

新たな組織再生因子リジェネリンとしてのCTGFの役割解明と 再生医歯工学的応用

The role of CTGF as a novel tissue-regenerating factor, regenerin,
And its application for medical and dental tissue engineering

滝川 正春 (Masaharu TAKIGAWA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授



研究の概要

結合組織成長因子/肥大軟骨特異的遺伝子産物 24(CTGF/Hcs24)が新たな組織再生因子リジェネリンとして機能していることを明らかにするとともにその再生医歯工学的応用法を複数例示した。その過程で、多彩な作用発現の分子基盤を解明すべく、ドメイン構造と機能との連関、遺伝子発現制御機構および細胞内外情報伝達機構について詳細な検討を加えた。

研究分野：医歯薬学(硬組織分子細胞生物学、CCN タンパク質・遺伝子ファミリー)
科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：CTGF/CCN2/Hcs24, 再生、硬組織、遺伝子発現、結合分子、情報伝達

1. 研究開始当初の背景・動機

ヒト軟骨細胞様細胞株 Hcs-2/8 よりクローニングした結合組織成長因子/肥大軟骨細胞特異的遺伝子産物 24(CTGF/Hcs24)は、CCN 遺伝子ファミリーに属するタンパク質で、現在 CCN2 とよばれている。我々はこの因子が内軟骨性骨形成を促進する因子であることを明らかにしてきたが、その発現が胎生期には軟骨以外でも見られ、また、創傷治癒時にも認められることから、新たな組織再生因子である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、CTGF/CCN2/Hcs24(以下 CTGF と略す)が、組織を本来持っている形質を保持したまま、即ち、あるがままの姿で再生させる組織再生因子”regenerin”であることを明らかにするとともに本因子の再生医歯工学的応用の基礎を確立する。また、この目的のために特有の4つのドメイン構造と機能との連関、遺伝子発現制御機構作用の分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

CTGF の発現と機能を、遺伝子レベル、タンパク質レベル、細胞レベル、個体レベルで調べた。遺伝子レベルの解析には、サーマルサイクラーを、細胞レベルの解析およびリコンビナントタンパクの調製には炭酸ガスインキュベーターを、また、細胞および固体レベルの解析には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。組織再生に及ぼす機械的刺激における CTGF の役割は培養細胞進展装置を用いて調べた。

4. 研究の主な成果

(1)β CTGF の組織再生・修復因子リジェネリンとしての機能解明と工学との連携

マウスの胎仔の発育過程、二次骨化中心の形成過程、骨延長術後の骨再生過程、抜歯後の抜歯創治癒過程、ラット実験の変形性関節症およびヒト変形性関節症軟骨、メカニカルストレスをかけた軟骨細胞等での CTGF の発現パターンから CTGF は、内軟骨性骨化促進因子という生理的な役割に加え、種々の組織、特に骨格系組織の修復・再生の際に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、リコンビナント CTGF を徐放剤ゼラチンハイドロゲルとコラーゲン担体とともに、ラット実験の変形性関節症や関節軟骨全層欠損モデルに対し局所投与したところ、“望まれない石灰化”は惹起することなく関節軟骨の再生が見られた。さらに、弾性軟骨である耳介軟骨に対しても、CTGF は増殖促進作用と耳介軟骨細胞の形質発現を促進した。また、骨欠損モデルに投与すると骨再生の促進効果を認めた。即ち、CTGF が骨、軟骨系組織の各組織を本来あるべき特徴を維持しつつ再生させる仮想因子としての“リジェネリン”作用を有していることが明らかした。ついで、CTGF が骨髄間葉系幹細胞の接着、増殖、遊走を促進すること、多孔性ハイドロキシアパタイトとともに CTGF をウサギ下顎骨骨欠損中に移植すると骨再生が見られることを示し、骨欠損の再生医療に CTGF を応用できる可能性を示した。また、創傷後の組織修復・再生の初発現象である血液凝固に注目し、血小板に

CTGF が大量に含まれていること、血液凝固とともに血小板から放出されることを明らかにした。なお、CTGF ノックアウトマウスおよびその培養細胞を用いて、CTGF が膜性骨化に重要である知見を得た。また、新たな血管新生阻害剤を用いて CTGF が VEGF の下流で血管新生促進因子として働いていることを示し、その生理的意義と血管新生への応用の可能性に加え、血管新生の治療の標的としての可能性を示した。

(2) CTGF は 4 つの特徴的なドメイン構造を有しており、各ドメインに特異的なモノクローナル抗体やその ELISA 法を確立し、また、各ドメインのリコンビナントタンパクを調製して、軟骨細胞のプロテオグリカン合成促進作用は TSP1 ドメインと CT ドメインが活性が強く、血管内皮細胞の接着には VWC と TSP1 が強力な作用を有することが明らかにした。また、上記の骨髄間葉系幹細胞に対する作用は CT ドメインだけでも見られた。

(3) CTGF の遺伝子発現を制御することにより組織再生を制御することを目的に、その制御機構を調べたところ、プロモーター領域に軟骨特異的エンハンサー TENDIC を特定した。また、この TENDIC にマトリックスメタロプロテアーゼ 3 (MMP3) が結合して CTGF の遺伝子発現が亢進するという意外な事実が判明した。このことは、CTGF が MMP3 により分解されたマトリックスを修復すること、すなわち、細胞外マトリックスのリモデリングに大きな役割を果たしていることを示している。

一方、mRNA の 3' -非翻訳領域の mRNA 不安定化配列を特定し、この *cis*-element に結合する 40-kDa のタンパク質の存在を明らかにした。成長軟骨細胞におけるこのタンパクの結合は、CTGF の発現レベルと逆相関しており、肥大軟骨細胞における CTGF の高発現の一翼を担っていることが明らかとなった。また、腫瘍や軟骨等の低酸素組織で CTGF 発現レベルが高いのは、mRNA 3' -非翻訳領域にある別の *cis*-element を介する mRNA の安定性の増大によること、また、この element に 35kDa のタンパク質が結合することを見出した。

(4) CTGF の作用機構の分子基盤として、細胞外でパルカン、アグリカン、フィブロネクチンと結合すること、細胞膜状で LRP-1、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ や $\alpha v \beta 3$ と結合することを見いだした。細胞内情報伝達経路として軟骨細胞増殖促進作用は ERK を、プロテオグリカン促進作用は p38MAPK を介することは報告済みだが、新たに PKC が両者の上流に、JNK が PKC とは別経路で増殖と分化を促進すること、さらに、PI3K が PKB を介して終末分化に関与することが見いだした。骨髄間葉系幹細胞の接着にインテグリン-p38 MAPK シグナル経路が重要であることも明らかとなった。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

CTGF の生理作用、特に組織再生因子リジェネリンとしての役割を解明し、工学との連携により再生医療への応用の可能性を示し、さらに、その分子基盤として、機能-構造連関、遺伝子発現制御機構、細胞内外情報伝達機構まで、この分子・遺伝子を対象に遺伝子レベル、タンパク質レベル、細胞レベルさらに個体レベルまで徹底的に解析している研究者は他に例を見ない。これらの成果は国際的に高く評価され、図書 CCN Proteins の編著、第 4 回国際 CCN 遺伝子ファミリーワークショップ (2006, 瀬戸内市) の主催に繋がった。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) Kubota, S. and **Takigawa, M.**: Role of CCN2/CTGF/Hcs24 in bone growth. Int. Rev. Cytol., 257, 1-41, 2007. (invited review)
- 2) Kondo, S., Tanaka, N., Kubota, S., Mukudai, Y., Yosimichi, G., Sugahara T., and **Takigawa, M.**: Novel angiogenic inhibitor DN-9693 that inhibits post-transcriptional induction of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by vascular endothelial growth factor (VEGF) in human endothelial cells. Mol. Cancer Ther. 5, 129-137, 2006.
- 3) Kondo, S., Kubota, S., Mukudai, Y., Moritani, N., Nishida, T., Matsushita, H., Matsumoto, S., Sugahara, T. and **Takigawa, M.**: Hypoxic regulation of stability of connective tissue growth factor/CCN2 mRNA by 3'-untranslated region interacting with a cellular protein in human chondrosarcoma cells. Oncogene, 25(7): 1099-1110, 2006.
- 4) Mukudai, Y., Kubota, S., Eguchi, T., Kondo, S., Nakao, K. and **Takigawa, M.**: Regulation of chicken *ccn2* gene by interaction between RNA *cis*-element and trans-factor during differentiation of chondrocytes. J. Biol. Chem., 280, 3166-3177, 2005.
- 5) Perbal, B. and **Takigawa, M.** (Editors, 編著): CCN Proteins: A New Family of Cell Growth and Differentiation Regulators. Imperial College Press (London), 2005, pp.1-311.
- 6) Nishida, T., Kubota, S., Kojima, S., Kuboki, T., Nakao, K., Kushibiki, T., Tabata, Y. and **Takigawa, M.** Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor). J. Bone Miner. Res., 19, 1308-1319, 2004.

ホームページ等

http://www.dent.okayama-u.ac.jp/seika/index_sc_j.html