

## CCN ファミリーの新規シグナルコンダクターとしての包括的 分子基盤の解明とその応用

Comprehensive study on molecular basis of action of CCN family proteins as novel signal conductors and its translational application

滝川 正春 (TAKIGAWA MASAHARU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授



### 研究の概要

CCN ファミリータンパク質が細胞外で交錯する種々のシグナルのオン・オフや強弱を制御することにより、その生物学的作用を発揮するシグナルコンダクターという新概念の分子であることを CCN2 を中心にファミリー全体を包括的に捉えて証明する。ついで、その成果を再生医療への応用へと展開し、また、CCN タンパク質発現異常による疾患の治療薬開発のための基礎を築く。

研究分野：CCN タンパク質・遺伝子ファミリー、硬組織分子細胞生物学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：CCN ファミリー、シグナルコンダクター、結合分子、遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

CCN ファミリーは、Cystein-rich 61 (Cyr61:CCN1), Connective tissue growth factor (CTGF:CCN2), Nephroblastoma Overexpressed (Nov:CCN3) の3つの頭文字をとって命名された現在6種からなる、特徴的な4つのモジュール構造を有するタンパク質ファミリーである。その“調和ある再生作用”や“組織をチューニングする作用”は各モジュールに成長因子、細胞外マトリックス並びにマトリックス分解酵素が結合することによるものと推察されていたが、その分子基盤の解明が待たれていた。

### 2. 研究の目的

CCN ファミリータンパク質が細胞外で交錯する種々のシグナルのオン・オフや強弱を制御することにより、その生物学的作用を発揮するシグナルコンダクターという新概念の分子であることを CCN2 を中心にファミリー全体を包括的に捉えて証明する。ついで、その成果を、再生医療へ向けての応用と、CCN タンパク質発現異常による疾患の治療薬開発のための基礎を築くべく展開する。

### 3. 研究の方法

CCN タンパク質結合分子を、タンパク質アレイ、Phage display system, Yeast two-hybrid system により、網羅的解析した後、表面プラズモン共鳴法によりカイネティクス解析した。CCN タンパク質とその関連分子の発現と機能を、遺伝子レベル、タンパク質レベル、細胞レベル、さらに個体レベルで調べた。

### 4. これまでの成果

1) CCN ファミリータンパク質のシグナルコンダクターとしての作用とその分子基盤

① CCN2による細胞外のシグナル伝達調節関連分子情報の総合解析とその検証

タンパク質アレイ、Phage display system, Yeast two-hybrid system による、網羅的解析と表面プラズモン共鳴法 (SPR) によって、RANK, FGFR2, FGFR3 および CCN3 と CCN2 の強い直接結合が確認され、解離定数が得られた。

② CCN2 の N-末 IGFBP と VWC モジュールがアグリカンの G3 ドメインに結合することを解明した。また、リコンビナント IGFBP-VWC ペプチドがリコンビナント TSP-CT ペプチドに比べ強力に培養軟骨細胞によるアグリカンの産生を促進することを見いだした。

③ BMP-2 が CCN2 と結合すること、BMP-2 と CCN2 を混合して軟骨細胞に作用させると、両者の増殖促進効果は抑制され、プロテオグリカン合成など分化促進効果は逆に相加的に増加すること、即ち、CCN2 がシグナルコンダクターとして働くことを見出した。

④ CCN2 が二次骨化中心の形成にも重要な役割を果たしていることを明らかにした。

⑤ CCN2 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、CCN2 が骨芽細胞分化と膜性骨化にも重要な働きをしていることを明らかにした。

⑥ CCN4/WISP1 のスプライシングバリエントが成長板軟骨細胞分化の最終分化段階で高発現していることを見だし、石灰化に関与していることを示唆した。

⑦ CCN2 が低酸素下で軟骨細胞において

Hif1a を介して VEGF の発現を制御していた。

⑧ 適度なメカニカルストレスが軟骨細胞において CCN2 の発現を誘導した。

⑨ CCN2 が破骨細胞前駆細胞の dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) の発現を促進し、自身が産生促進した DC-STAMP と相互作用することによって、破骨細胞分化を促進した。

⑩ II 型コラーゲンプロモーターを用いて軟骨組織特異的に CCN2 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成した。同マウスは内軟骨性骨化の亢進の結果、長管骨が伸長し、体長も伸長したが、調和ある伸長であった。

⑪ 上記、トランスジェニックマウスを老齢化するまで飼育して、その関節軟骨を観察すると、正常マウスでは老齢化により約半数に発症する変形性関節症の症状が全く見られなかった。

2) 全 CCN ファミリーメンバーの発現と作用について  
内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖・分化過程での全 CCN ファミリーメンバーの局在と作用を調べた結果、CCN2 と CCN3 が特に重要かつ相反する作用を有し、お互いを制御していることが判明した。また、骨組織および骨芽細胞培養系で全 CCN ファミリーの発現と作用について調べた結果、軟骨細胞同様に CCN2 と CCN3 が相反する作用を有していることが判明した。

3) 遺伝子発現制御機構に関する研究  
① CCN2 の遺伝子発現を制御する転写因子を遺伝子クローニングしたところ、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -3 であるという驚くべき事実を見いだした。  
② CCN2 の mRNA を不安定化させる 3' -UTR の cis-element に結合するタンパクを精製したところ、ヌクレオホスミンであった。

4) “調和ある再生” 医療への応用へ向けての基礎並びにトランスレーショナル研究  
① CCN2 が耳介軟骨の特徴を維持したまま同軟骨の“調和ある再生”に重要な働きをすることを明らかにした。  
② CCN2 をゼラチンハイドロゲルとともに実験的骨欠損動物モデルに投与すると骨の再生が認められた  
③ CCN2 はヒト骨髄間葉系幹細胞および歯髄間葉系未分化細胞のヒドロキシアパタイトへの接着を強力に促進し、そのことにより骨再生を促進することを見いだした。

5) CCN ファミリータンパクの異常発現 (ミスコンダクト) と線維症等病態との関連  
CCN2 の過剰発現が、心筋線維症、心不全、筋ジストロフィーの際に認められることを見出した。また、ニコチンが歯肉線維芽細胞と歯根膜細胞の CCN2 と I 型コラーゲンの発現を亢進することから、喫煙による歯肉線維症の発症における CCN2 の関与を示唆した。

## 5. 今後の計画

① CCN2 を核とした細胞外シグナル伝達ネットワークの *in silico* モデリング、② タンパク質アレイや Yeast two-hybrid システムによる CCN1, CCN3 結合因子のスクリーニング、③ CCN2 を核とした細胞外シグナル伝達ネットワークモデルの実験的検証、④ 変異マウスを用いた、軟骨細胞特異的 CCN2, CCN3 発現による形質変化、ならびに CCN2, CCN3 完全欠損表現型の回復度の解析、⑤ 間葉組織再生に最適化した CCN2-derived molecule の設計と効果の検証、⑥ CCN2 遺伝子の発現誘導・遮断因子の分子スクリーニング、等を行う。

## 6. これまでの発表論文等

- 1) Aoyama E., Hattori T., Hoshijima M., Araki D., Nishida T., Kubota S. and Takigawa M.: N-Terminal domains of CCN family 2/connective tissue growth factor bind to aggrecan. *Biochem. J.* 420, 413-420, 2009.
  - 2) Mukudai Y., Kubota S., Kawaki H., Kondo S., Eguchi T., Sumiyoshi K., Ohgawara T., Shimo T., Takigawa M.: Post-transcriptional regulation of chicken *ccn2* gene expression by nucleophosmin/B23 during chondrocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 28(19): 6134-6147, 2008.
  - 3) Kikuchi T., Kubota S., Asami K., Kawaki H., Nishida T., Kawata K., Mitani S., Tabata Y., Ozaki T., Takigawa M.: Promotion of bone regeneration by CCN2 incorporated into gelatin hydrogel. *Tissue Engineering Part A* 14(6), 1089-1098, 2008.
  - 4) Kawaki H., Kubota S., Suzuki A., Lazar N., Yamada T., Matsumura T., Ohgawara T., Maeda T., Perbal B., Lyons, K. M., Takigawa M.: Cooperative regulation of chondrocyte differentiation by CCN2 and CCN3 shown by a comprehensive analysis of the CCN family proteins in cartilage. *J. Bone Miner. Res.* 23(11): 1751-1764, 2008.
  - 5) Eguchi T., Kubota S., Kawata K., Mukudai Y., Uehara J., Ohgawara T., Ibaragi S., Sasaki A., Kuboki T., Takigawa M.: Novel transcription factor-like function of human MMP3 regulating *CTGF/CCN2* gene. *Mol. Cell. Biol.*, 28: 2391-2413, 2008. (第 14 回日本軟骨代謝学会賞受賞。また、筆頭著者は同内容で第 5 回国際 CCN 遺伝子ファミリーワークショップ Springer Scholarship 受賞)
- ホームページ等  
[http://www.dent.okayama-u.ac.jp/seika/index\\_sc\\_j.html](http://www.dent.okayama-u.ac.jp/seika/index_sc_j.html)