

## 論文要旨等報告書

氏	川木晴美
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3565 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科生体制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	軟骨細胞および骨芽細胞分化におけるCCNファミリータンパク質の機能解析

論文審査委員 教授 窪木 拓男 准教授 池亀 美華 教授 滝川 正春

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

CCN2は6つのメンバーからなるCCNファミリーの代表的メンバーであり、各メンバーは4つのモジュール (IGFBP, VWC, TSP1, CT)が連結した共通の構造をとっている。この構造上の類似性と、分布組織の共通性から、いくつかのメンバーが軟骨・骨組織において同一あるいは相反する機能を果たしていることが推察される。我々はこれまでに、CCN2の軟骨細胞、骨芽細胞における機能を解析し、その生理的重要性を報告してきた。その後 $ccn2$ 欠損マウスが作成され、当該マウスでは長管骨において軟骨から骨への置換が遅れることが*in vivo*で示された。そこで、本研究では、軟骨細胞および骨芽細胞における $ccn2$ 欠損の影響と、類似あるいは相反する機能を持つとされる他CCNメンバーの骨・軟骨組織発生における機能の解析を、野生型および $ccn2$ 欠損マウスを用いて詳細に行った。

#### 【材料および方法】

##### 1. 実験動物とその形態学的、組織学的解析

胎生 13.5 日から 18.5 日の  $ccn2$  欠損マウスおよび同腹の野生型マウスを用いた。パラフィン切片・凍結切片を作成し、HE、Safranin-O、Masson Goldner、von Kossa、TRAP、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色、さらに、増殖細胞核抗原(PCNA)とI型、II型、X型コラーゲン、CCNタンパク質、オステオカルシンの免疫染色を行った。また  $ccn2$ 、 $ccn3$  の発現部位の解析のために *in situ* hybridization 法により mRNA の検出を行った。そして骨の石灰化を検証するために骨格標本も作製し分析した。

##### 2. 細胞培養と mRNA およびタンパク質発現量の解析

マウス胎児の肋軟骨、頭蓋冠より軟骨細胞、骨芽細胞を分離培養した。コンフルエントに達した時点、あるいは播種後7日ごとに RNeasy Mini Kit を用いて全 RNA を調製し、逆転写後、リアルタイム PCR による mRNA 定量を実施した。またコンフルエントに達した軟骨細胞、骨芽細胞を用い、ウエスタンブロット法にて CCN メンバーのタンパク質量を解析した。培養細胞の一部については RNA 回収の時期に合わせて、ALP 染色、アリザリンレッド染色を行った。

##### 3. 軟骨細胞、骨芽細胞の増殖・分化・石灰化評価

まず軟骨細胞、骨芽細胞の増殖、分化、石灰化能を野生型と  $ccn2$  欠損マウスで比較した。増殖については MTT 法にて解析した。分化の指標は、軟骨細胞ではアグリカン II 型、X 型コラーゲンの mRNA 発現量と、プロテオグリカン合成能とし、骨芽細胞では、I 型コラーゲン、 $alp$ 、オステオカルシンの mRNA 発現量と ALP 活性を比較した。石灰化については軟骨細胞、骨芽細胞ともアリザリンレッド染色で評価した。さらにリコンビナント CCN タンパク質の増殖、分化、石灰化に対する効果を野生型軟骨細胞、骨芽細胞を用いて同様に検討した。

#### 4. 統計解析

各データの統計学的有意性は、各条件における試料から得られた数値全体を標本として、Student-t 検定を用いて検討した。

#### 【結果および考察】

##### 1. CCN ファミリータンパク質の軟骨細胞における発現と機能

形態学的解析の結果、*ccn2* 欠損マウスでは成長板軟骨細胞の分化が野生型に比べ遅れており、さらに増殖能、基質合成能も低下し、石灰化も遅れていた。また *ccn2* 欠損によって *ccn3* の過剰発現がみられた。次にリコンビナント CCN タンパク質の野生型軟骨細胞に対する生理的作用を検討した結果、CCN1,2,6 が増殖を促進し、中でも CCN2 が最も強い促進効果を示した。これとは逆に CCN3 は増殖を抑制した。CCN4,5 は増殖に対し効果を示さなかった。そして CCN3 を除く CCN メンバーが成熟を促進し、CCN1,2,5 は石灰化も促進した。ここにおいても CCN2 が最も強い促進効果を示した。CCN3 は成熟、石灰化に対しても強い抑制効果を示し、また、CCN4 も石灰化を抑制した。CCN6 は石灰化には効果を示さなかった。

##### 2. CCN ファミリータンパク質の骨芽細胞における発現と機能

*ccn2* 欠損マウスの膜性骨化部位の詳細な解析の結果、内軟骨性骨化だけでなく、膜性骨化でも増殖、分化、石灰化に遅れが見られ、また成熟した破骨細胞もほとんど見られなかった。そして *ccn2* 欠損によって *ccn3* と *ccn4* の発現が分化後期でも強く維持されていた。次いで全 CCN ファミリーメンバーの野生型骨芽細胞の増殖、分化、石灰化に対する効果を検討した。その結果、CCN1,2,4 が増殖を促進し、中でも CCN2 の効果が最も顕著であった。CCN3 は強力な抑制効果を示し、CCN5,6 は増殖に対し効果を示さなかった。そして CCN1,2,4,5 が ALP 活性の上昇を促進するのに対し、CCN3 は顕著に抑制した。石灰化については、CCN2,5 が石灰化を強力に促進し、CCN1 は石灰化には効果を示さなかった。CCN6 は成熟、石灰化の両方に対し効果を示さなかった。一方 CCN3 は石灰化に対しても強力な抑制効果を示し、CCN4 も石灰化には抑制的に働いた。

#### 【結 論】

本研究から得られた知見は以下の3点にまとめることができる。

1. CCN2 は軟骨・骨芽細胞の正常な増殖、分化・成熟、石灰化に必須の因子である。
2. CCN ファミリータンパク質は軟骨・骨芽細胞の分化段階に応じて発現が制御されており、促進または抑制的效果を発揮して軟骨・骨組織の発生に貢献している。
3. CCN3 は両組織で CCN2 と相反する機能を有しており、*ccn2* と *ccn3* の間にはなんらかの制御機構が存在することが強く示唆される。さらに骨芽細胞においては *ccn2* は *ccn4* の発現制御にも関わっていることが推察される。

## 論文審査結果の要旨

本研究はCCN2欠損マウスを用いて、CCN2の軟骨・骨組織における生理的作用を*in vivo*で解析し、さらに、CCN2と相同性の高いCCNファミリーメンバータンパク質の軟骨・骨組織での役割と同ファミリーメンバーによる代償作用の有無を探ったものである。

その結果、CCN2欠損により、軟骨細胞および骨芽細胞の増殖能および基質合成能が低下し、その結果石灰化が遅延したことから、CCN2が軟骨細胞および骨芽細胞の正常な成熟・分化に必須の因子であることが明らかとなった。

さらに、CCN3が軟骨・骨組織においてCCN2と相反する機能を有しており、軟骨組織では過剰発現が、骨組織では分化後期まで発現時期の延長が見られたことから、CCN2はCCN3の遺伝子発現制御に関与している可能性があり、また骨芽細胞においてはCCN4の過剰発現も認められ、CCN2はCCN4の遺伝子発現制御にも関与していることが明らかとなった。

CCNファミリータンパク質は軟骨・骨芽細胞の分化段階に応じて発現が制御されており、促進または抑制的效果を発揮して軟骨・骨組織の発生に貢献している。

これらの知見は軟骨・骨組織の発生段階における分子機構を知るうえで非常に有用な研究であり、よって、本研究は博士（歯学）の学位論文に値するものと認めた。