

氏名	桑原 実穂
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6378号
学位授与の日付	令和3年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	CCN3 (NOV) Drives Degradative Changes in Aging Articular Cartilage (CCN3 は関節軟骨の加齢性変性を促進する)
論文審査委員	沢 禎彦 教授 窪木 拓男 教授 池亀 美華 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

加齢は、不可逆的な細胞増殖停止を特徴とする細胞老化の主要な危険因子であり、様々な器官の機能低下を誘発する。運動器に注目すると、関節軟骨の変性を特徴とする変形性関節症 (OA) は、関節の損傷、肥満、遺伝的素因など多くの危険因子によって発症することが知られているが、年齢と発症率と有病率に強い正の相関があることから、加齢が OA 発症に及ぼす影響が明らかになっている。

加齢が時間経過に伴って進行的に起こる現象を指すのに対し、細胞老化は種々のストレス刺激に応答した不可逆的細胞増殖停止状態と定義されるが、老化細胞の代謝自体は活発であり、特有の表現型を示すようになる。一般的な細胞老化の機序として、酸化ストレスやがん遺伝子の活性化等の刺激により DNA の損傷が生じると、p53 や p21、p16 等の細胞周期停止因子の発現が上昇し細胞増殖が停止する。その後成長因子などは発現が減少するのに対し、MMP などの分解系は亢進するとともに老化細胞随伴分泌現象：SASP (senescence associated secretory phenotype) として IL-6 や IL-8、TNF- α などの炎症性因子が放出され、最終的に老化細胞自身がクリアランスされるようになる。この細胞老化は軟骨組織でも生じることが明らかになっており、OA 罹患組織に老化細胞の蓄積がみられることや、老化細胞の除去により OA の改善がみられることが報告されている。

CCN3 (cellular communication network factor 3) は腎芽腫や軟骨組織に発現している多機能の分泌タンパク質である。以前の研究では、CCN3 の軟骨細胞外マトリックス遺伝子の発現調節作用や、成長板軟骨細胞の増殖と成熟の抑制作用が報告されている。またいくつかの腫瘍細胞株において CCN3 の抗増殖活性が示されている。そこで本研究では CCN3 と軟骨細胞老化との関連について検証した。

【方法および結果】

加齢と CCN3 発現との相関を調べるため、出生後2日~9か月齢のマウス関節軟骨組織から初代培養軟骨細胞を単離し、抽出した RNA を調べたところ、老化マーカーである細胞周期停止因子 p21, p53, p16 とともに Ccn3 発現レベルに年齢との正の相関を認めた。また、1か月齢から7か月齢のマウス膝関

節軟骨組織においてCCN3の免疫染色を行ったところ、7か月齢の関節軟骨表層において強い染色像を認めた。

次に、ラット軟骨肉腫細胞（RCS）細胞にH₂O₂を添加し、酸化ストレスによる細胞老化を誘導したところ、H₂O₂用量依存的に*Ccn3*、*p53*、*p21*発現量の上昇を認めた。またウェスタンブロットにてタンパクレベルでもH₂O₂用量依存的なCCN3産生上昇を確認した。さらにsenescence associated (SA)-β galの活性化を観察した。同様に、ヒト関節軟骨から得られた初代培養軟骨細胞においてもH₂O₂用量依存的なCCN3、*p53*、*p21*発現の上昇を確認した。

次に、CCN3の老化への関与を検証するため、RCS細胞に発現ベクターを用いてCCN3を強制発現させ*p53*結合領域を連結した*p21*プロモーターコンストラクトのレポーター活性を調べたところ、CCN3発現量増加に伴った*p21*プロモーター活性の上昇が観察された。またRCS細胞培地へのリコンビナントCCN3の添加によっても*p21*および*p53*発現の上昇がみられた。

さらにCCN3の生体における機能を解析するため、*Col2a1*プロモーター下流に*Ccn3*を接続したコンストラクトを用い、軟骨組織特異的CCN3過剰発現マウス（tg）を作製した。このマウスから得られた膝関節のサフラニンOによる軟骨組織の組織学的解析では、2か月齢でtgの関節軟骨表層の粗造化と菲薄化を認め、7か月齢ではより進行した変性所見を確認した。また、tgの軟骨組織から直接RNAを抽出したところ、*Col2a1*や*Acan*の発現低下に加えてSASP性炎症性因子である*Il-6*や*Il-8*、*Tnf-α*の発現が上昇していた。

また、19歳から91歳までの人工関節置換術を受けた患者14名から採取したヒト関節軟骨組織由来初代軟骨細胞で、*p21*や*p53*とともにCCN3発現レベルに年齢との強い正の相関関係がみられた。また、ヒト関節軟骨組織切片のCCN3免疫染色で74歳や81歳の患者組織において軟骨細胞に強い染色像が見られ、ヒト組織においてもマウス同様の加齢におけるCCN3発現誘導が認められた。

【考察】

CCN3は軟骨細胞の新たな老化マーカーとなることが示唆された。また、CCN3の過剰発現で細胞周期停止因子が誘導されることにより軟骨組織の老化促進が示唆された。加齢に伴う細胞老化は、炎症の惹起から組織障害に関与するが、一方で細胞老化は腫瘍形成に対する安全システムとしても捉えられている。CCN3は複数の腫瘍細胞株で抗増殖活性を持つほか、軟骨細胞においてグルコース欠乏状況でのCCN3発現上昇が報告されている。これらのことから、CCN3の発現誘導は、加齢に伴う酸化ストレスや栄養不足などの種々の刺激に対する防御反応であるとも考えられる。

論文審査結果の要旨

【目的】

加齢は、関節軟骨の変性を主体とする変形性関節症 (OA) の主要なリスク因子であり、加齢に伴う軟骨細胞の老化が基質産生低下および変性をもたらす一因であることが報告されている。CCN3 は、腎芽腫、軟骨などに見られる多機能の細胞外タンパク質であるが、軟骨細胞の増殖や基質産生を抑制する作用、軟骨細胞を含む各種腫瘍細胞に対する抗増殖効果が報告されている。本研究では軟骨細胞の老化における CCN3 の機能について検証した。

【方法および結果】

出生後 2 日~9 か月齢のマウス関節軟骨細胞から得た RNA の解析により、老化マーカーである細胞周期停止因子 *p21*, *p53*, *p16* とともに *Ccn3* 発現レベルに年齢との正の相関を認めた。また、1 か月齢から 7 か月齢のマウス膝関節軟骨組織において CCN3 の免疫染色を行ったところ、7 か月齢の関節軟骨表層で強い染色像を認めた。次に、ラット軟骨肉腫 (RCS) 細胞およびヒト初代培養に H₂O₂ を添加し、酸化ストレスによる人工的老化を誘導したところ、H₂O₂ 用量依存的に *Ccn3*, *p53*, *p21* 遺伝子発現量の上昇を認めた。次に、RCS 細胞に発現ベクターを用いて CCN3 を強制発現させ *p53* 結合領域を連結した *p21* プロモーターコンストラクトのレポーター活性を調べたところ、CCN3 発現量増加に伴った *p21* プロモーター活性の上昇が観察された。また RCS 細胞培地へのリコンビナント CCN3 の添加によっても *p21* および *p53* 発現の上昇がみられた。

軟骨組織特異的 CCN3 過剰発現マウス (tg) から得られた膝関節のサフラニン O による軟骨組織の組織学的解析では、2 か月齢で tg の関節軟骨表層の粗造化と菲薄化を認め、7 か月齢ではより進行した変性所見を確認した。また、tg の軟骨組織から RNA を抽出したところ、*Col2a1* や *Acan* の発現低下に加えて Senescence-associated secretory phenotype (SASP) 性炎症性因子である *Il-6* や *Il-8*, *Tnf- α* の発現が上昇していた。

さらに 19 歳から 91 歳までの人工関節置換術を受けた患者 14 名から採取したヒト関節軟骨組織由来初代軟骨細胞で、*p21* や *p53* とともに *CCN3* 発現レベルに年齢との強い正の相関関係がみられた。また、ヒト関節軟骨組織切片の CCN3 免疫染色で 74 歳や 81 歳の患者組織において軟骨細胞に強い染色像が見られ、ヒト組織においてもマウス同様の加齢における CCN3 発現誘導が認められた。

【結論】

以上より、CCN3 は軟骨細胞の新しい老化マーカーであるだけでなく、CCN3 の発現増強によって軟骨老化が促進されることが示唆された。

本研究によって得られた知見は、OA または加齢による関節軟骨変性のメカニズムの一端を解明するものであった。また、本論文はすでに International Journal of Molecular Sciences に掲載されており、国際的にも評価されている。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。