

課題番号 13

Roles of vasohibins - CCN2/CTGF interactions in angiogenesis and cartilage/bone-related tumors

[1] 組織

代表者：村瀬 友里香
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)
対応者：佐藤 靖史
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：滝川 正春
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科/
歯学部先端領域研究センター)
青山 絵理子
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科/
歯学部先端領域研究センター)
久保田 聡
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)
佐々木 朗
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

研究費：物件費 10 万円

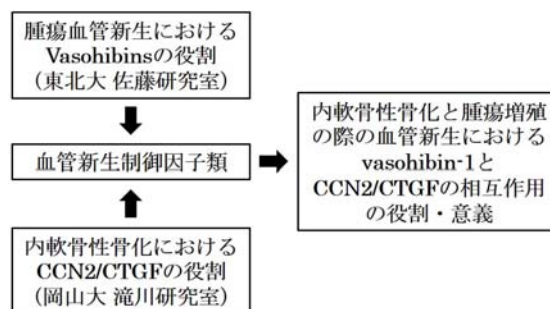
[2] 研究経過

血管新生は固形腫瘍の増殖や内軟骨性骨化などの種々の病的・生理的過程で重要な役割を果たしており、局所の血管新生因子とその阻害因子のバランスにより絶妙に調節されていると考えられている。佐藤教授は vasohibin-1 (VASH1) を発見し、血管内皮細胞(ECs)により産生される血管新生阻害因子であることを報告し、続いて VASH1 のホモログとして vasohibin-2 (VASH2) を発見した。マウスの血管新生モデルを用いた研究から、現在、VASH1 は血管新生の起こっている先端の ECs から産生され血管新生を終結させ、一方 VASH2 は血管内皮細胞以外の細胞から産生される血管新生因子であると考えられている。

内軟骨性骨化の過程では、軟骨細胞は増殖、分化し、成熟して肥大軟骨細胞になり、この肥大軟骨細胞層に、血管が侵入して無血管組織である軟骨が血管に富む骨に置換する。本申請の指導教員である、滝川は肥大軟骨細胞に高発現する hcs24 (hypertrophic chondrocyte specific gene 24)をクローニングし、この遺伝子が活発に増殖・遊走する ECs にも発現することを報告した。さらにその遺伝子産物 Hcs24(結合

組織成長因子:CTGF と同じで最近 CCN2 と名前が統一された)が、ECs、軟骨細胞、骨芽細胞の増殖、分化を促進し、in vivo で血管新生を促進することを報告した。また、CCN2 が腫瘍血管新生や浸潤にも関与することを明らかにした。さらに、CCN2 が破骨細胞形成を促進し、乳がんのような癌の骨吸収性骨転移にも関与することを明らかにした。CCN2 はその 4 つのドメインを介して、種々の成長因子や、細胞外マトリックス、細胞膜受容体と結合して、細胞外微小環境を飛び交うシグナル分子のシグナル伝達系を指揮する分子ではないかと考えられ、その多機能性は、細胞種や同種細胞でも分化段階の違いによる微小環境の違いによってもたらされるものと考えられる。さらに、悪性腫瘍はその指揮機能の乱れによってもたらされる可能性が示唆される。

そこで、本研究では、VASHs と CCN2 相互の遺伝子発現制御とその腫瘍増殖や内軟骨性骨化での意義、骨、軟骨およびそれらの腫瘍での VASHs と CCN2 の共発現と共局在、CCN2 と VASHs の血管新生における共同作用、CCN2 と VASHs の物理的相互作用の有無を調べ、骨・軟骨形成とそれらの腫瘍化における CCN2 と VASHs の相互作用の役割とその分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。



なお、本研究遂行のため頻回 (H28年2月10, 15日、3月24日、11月18, 21, 30, 12月2, 9, 27日、H29年1月6, 12, 19, 25, 30日、2月1, 6, 7, 10, 13, 14, 23日、3月14, 21, 22日、11月6, 30日、H30年1月27, 29日、2月6, 7, 9, 13日) にわたりメールでの研究打ち合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

一昨年度、血管新生のネガティブフィードバックを司る VASH1 mRNA が、マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用いた軟骨細胞分化誘導培養系において CCN2 mRNA と同様の経時的発現パターンで分化の進行に伴って上昇することを報告した。

また昨年度は、ヒト軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 を用いて VASH1 と CCN2 の関係性を loss or gain-of-function の手法を用いて追究した。CCN2 の発現を siRNA でノックダウンすると、VASH1 mRNA の発現が低下した。ところが、ヒト VASH1 発現 vector をトランスフェクトし VASH1 を過剰発現させても、CCN2 mRNA の発現に大きな変動は認められなかった。一方で興味深いことに、VASH1 を過剰発現させると、活性酸素分解酵素 superoxide dismutase 2 (SOD2) mRNA の発現が増加した。以上の結果より、軟骨細胞において VASH1 は、CCN2 の下流に位置し、SOD2 の上流に位置することが明らかになった。

本年度、野生型マウスの成長板において、VASH1 が CCN2 と同様に肥大軟骨細胞層に局在していることを報告し、一昨年度に報告した ATDC5 の軟骨分化誘導培養系の結果と合致することを確認した。また、HCS-2/8 を用いて、CCN2、VASH1、SOD2、3 者の関係性をさらに追究した。CCN2 の発現をノックダウンすると、SOD2 mRNA の発現が低下した。そしてまた、SOD2 の発現を siRNA でノックダウンすると、VASH1 mRNA の発現が低下した。

以上の結果は、軟骨細胞において VASH1 と SOD2 にはポジティブフィードバック調節の関係性があること、また CCN2 がその上流で VASH1-SOD2 の発現を調節することを示している。血管内皮細胞において VASH1 は、SOD2 を誘導し ROS のレベルを低下させることが知られている。内軟骨性骨化過程においては、軟骨細胞の分化が進行するとともに細胞内 ROS レベルが上昇し、その結果アポトーシスが誘導されるという報告がある。そのため、肥大軟骨細胞において SOD2 は、上流の CCN2 による VASH1 の発現亢進を介して誘導され、ROS のレベルの上昇を抑制し、軟骨細胞分化の最終段階である細胞死を分化終末期まで防いでいる可能性が推測される。また以前に我々は、軟骨細胞分化終末期には CCN2 mRNA 発現が低下することを明らかにしている。したがって、同時期には下流の VASH1-SOD2 mRNA 発現も低下し、その結果 ROS のレベルが上昇して、肥大軟骨細胞がアポトーシス等による細胞死へと導かれることが示唆される。

(3-2) 波及効果と発展性など

Vasohibins と軟骨代謝の関連については過去に全く報告がなく、また、CCN タンパク質による VASH 遺伝子発現制御に関する報告も過去に全く見られない。即ち、東北大の佐藤研究室と滝川研究室とが共同研究することにより、誰も予想もしなかった Vasohibins と CCN タンパク質の連関という新知見が得られた。この知見は Vasohibin 研究の研究領域を大きく広げることにつながるるとともに、CCN タンパク質研究者や軟骨代謝研究者にも Vasohibins に注目する機会を与え、軟骨代謝における CCN2-Vasohibin 連関の役割という新しい研究領域の開拓に結びつき、今後の発展が期待される。

[4] 成果資料

本研究は全くの新研究領域の研究のため、未だ研究途上にあり論文を発表するまでには至っていない。しかし、学会発表は下記を含め本年度 6 回行っている。なお、関連論文としては以下の著書、総説、原著論文がある。

<関連論文>

- (1) Kubota S and Takigawa M: CCN. Encyclopedia of Signaling Molecules (Choi S ed.), 2nd edition, Springer, pp. 814-827, 2018.
- (2) Takigawa M: An early history of CCN2/CTGF research: the lead to CCN2 via hcs24, ctgf, ecogenin and regenerin. J Cell Commun Signal. 12(1):253-264, 2017.
- (3) Hori A, Nishida T, Takashiba S, Kubota S, Takigawa M: Regulatory mechanism of CCN2 production by serotonin (5-HT) via 5-HT2A and 5-HT2B receptors in chondrocytes. PLoS One. 12(11):e0188014, 2017.

<学会発表>

- (1) 村瀬友里香、青山絵理子、久保田 聡、佐々木 朗、滝川正春: Vasohibin-1 (VASH1)による内軟骨性骨化の制御と CCN2 の関与. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会、博多、2017.7.27-29.
- (2) 村瀬友里香、青山絵理子、鈴木康弘、佐々木 朗、久保田 聡、佐藤靖史、滝川正春: 内軟骨性骨化における vasohibin-1 (VASH1)の発現とその意義. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017.12.6-9.
- (3) 村瀬友里香、青山絵理子、鈴木康弘、佐々木 朗、久保田 聡、佐藤靖史、滝川正春: CCN2-VASH1-SOD2 axis を介した内軟骨性骨化調節機構. 第 31 回日本軟骨代謝学会、名古屋、2018.3.2-3.