

氏名	村瀬 友里香
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5305号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Role of CCN2 in Amino Acid Metabolism of Chondrocytes (CCN2の軟骨細胞アミノ酸代謝における役割)
論文審査委員	長塚 仁 教授 山本 敏男 教授 久保田 聡 教授

学位論文内容の要旨

CCN2/connective tissue growth factor (CTGF) is a multifunctional molecule that promotes harmonized development and regeneration of cartilage through its matricellular interaction with a variety of extracellular biomolecules. Thus, deficiency in CCN2 supply profoundly affects a variety of cellular activities including basic metabolism. A previous study showed that the expression of a number of ribosomal protein genes was markedly enhanced in *Ccn2*-null chondrocytes. Therefore, in this study, we analyzed the impact of CCN2 on amino acid and protein metabolism in chondrocytes. Comparative metabolome analysis of the amino acids in *Ccn2*-null and wild type mouse chondrocytes revealed stable decreases in the cellular levels of all of the essential amino acids. Unexpectedly, uptake of such amino acids was rather enhanced in *Ccn2*-null chondrocytes, and the addition of exogenous CCN2 to human chondrocytic cells resulted in decreased amino acid uptake. However, as expected, amino acid consumption by protein synthesis was also accelerated in *Ccn2*-null chondrocytes. Furthermore, we newly found that expression of 2 genes encoding 2 glycolytic enzymes, as well as the previously reported *Eno1* gene, was repressed in those cells. Considering the impaired glycolysis and retained mitochondrial membrane potential in *Ccn2*-null chondrocytes, these findings suggest that *Ccn2* deficiency induces amino acid shortage in chondrocytes by accelerated amino acid consumption through protein synthesis and acquisition of aerobic energy. Interestingly, CCN2 was found to capture such free amino acids *in vitro*. Under physiological conditions, CCN2 may be regulating the levels of free amino acids in the extracellular matrix of cartilage.

論文審査結果の要旨

CCN2はCCNファミリーに属する分泌タンパク質で、様々な生体分子との相互作用を通じて内軟骨性骨形成の促進のみならず、軟骨の再生をも加速する。従って逆にCCN2が欠損した軟骨組織では、細胞外基質産生の低下が見られ、その結果骨格異常を来す。これに関連して、CCN2欠損軟骨細胞において多くのリボソームタンパク質遺伝子の発現が増加していることが知られている。そこで本研究では、CCN2の軟骨細胞におけるアミノ酸およびタンパク質代謝における役割を解明することを目的として解析を進めた。

まず、CCN2欠損マウスと同腹野性型マウスの胎児肋軟骨から軟骨細胞を分離、培養し、総代謝産物を抽出後、アミノ酸の絶対定量（メタボローム解析）を行った。その結果、CCN2欠損により細胞内の必須アミノ酸量が安定して低下することが明らかとなった。他方、同マウスの軟骨細胞を用いたロイシンの取り込み実験では、CCN2欠損により取り込み量は増加した。またその結果と合致して、ヒト軟骨細胞様細胞株に外部からCCN2を加えると、ロイシンの取り込み量は減少した。さらに、CCN2欠損軟骨細胞において細胞タンパク質量、およびタンパク質合成によるロイシンの消費も亢進していた。引き続き解糖系について調べた結果、CCN2欠損により解糖系酵素遺伝子 *Eno1* の発現が減少することは知られていたが、今回さらに2つの解糖系酵素遺伝子 *Pgk1*、*Pgam1* の発現が減少することが明らかにされた。加えて、電子伝達系へ高エネルギー電子を運ぶ補酵素の量は影響を受けないことも明らかとなった。

以上の結果は、軟骨細胞においてCCN2の欠損は、タンパク質合成、およびエネルギー獲得のための異化によるアミノ酸の消費の亢進を通して、細胞内アミノ酸プールの減少をもたらすことを示したものである。また、CCN2がアミノ酸と結合することが *in vitro* 実験において明らかにされたことから、CCN2は軟骨組織の細胞外基質でアミノ酸貯蔵庫として、細胞へのアミノ酸供給を調節する役割を担う可能性も示している。

本論文は、CCN2が軟骨細胞においてアミノ酸代謝を調節しているという新しい知見を示したものであり、これらの知見は骨や軟骨の生理的な代謝機構の新局面を明らかにするだけでなく、代謝機構の破綻が原因となりうる骨・軟骨疾病の病態解明や、治療法開発の糸口になると考えられる。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。