

氏名	吉岡 裕也
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5307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	CCN4/WISP-1 positively regulates chondrogenesis by controlling TGF- $\beta$ 3 function (CCN4/WISP-1はTGF- $\beta$ 3の機能を調節することで軟骨細胞分化を正に制御する)
論文審査委員	久保田 聡 教授      志茂 剛 准教授      窪木 拓男 教授

### 学位論文内容の要旨

超高齢社会に突入した我が国では、現在、医療費の高騰や要支援・要介護者の増加に伴った介護保険の財源圧迫が非常に大きな社会問題となっている。国民が要支援となる原因の第1位は関節疾患であるが、その関節疾患の大部分を占める変形性関節症の病態は関節軟骨の退行性変化であることが知られているものの、その発症原因は未だ解明されておらず、臨床的・医療経済学的に重要な課題とされている。このような中、様々な組織発生や分化への関与が報告されているCCNファミリーの1つであるCCN4は、変形性関節症の関節軟骨においても高発現することが報告されており、軟骨組織を構成する唯一の細胞である軟骨細胞に何らかの影響を与えている可能性が示唆されるが、その詳細は未だ明らかではない。そこで本研究ではCCN4と軟骨細胞分化の関与、およびそのメカニズムを解明にすることにした。

はじめに、*in vitro*において軟骨細胞分化過程におけるCCN4遺伝子の発現パターン解析を行った。すなわち、軟骨細胞分化誘導培地を用いてヒト骨髄由来間葉系間質細胞(hBMSC)をマイクロマス培養法にて培養した。培養開始1, 3, 7, 14, 21日後のCCN4遺伝子と他のCCNファミリー遺伝子のmRNA発現量を定量性RT-PCR法にて評価した。その結果、CCN4遺伝子は他のCCNファミリー遺伝子と比較して、早期の培養開始7日後に有意な発現上昇を示した(9.9倍,  $p < 0.001$ . vs 1日後)。次に、*in vitro*においてCCN4がhBMSCsの軟骨細胞分化に与える影響を検討するため、アデノウイルスベクターを用いCCN4遺伝子を強制発現、またはsiRNAを用いCCN4遺伝子を発現抑制したhBMSCsを軟骨細胞分化誘導培地を用いたマイクロマス培養法にて28日間培養した。そして、培養開始1日後のSOX-9のタンパク質発現量をウェスタンブロッティング法、培養開始28日後のAggrecan (Acan) 遺伝子、Type II collagen alpha 1 (Col2a1) 遺伝子のmRNA発現量を定量性RT-PCR法にて評価した。また、切片を作製し、サフラニンO染色、COLIIの免疫組織化学法を行い、組織学的に評価した。その結果、培養開始1日後にはCCN4強制発現群において、SOX-9のタンパク質発現量は対照群と比較して増加し、一方、CCN4発現抑制群においては減少した。培養開始28日後にはCCN4強制発現群においてAcan遺伝子(2.3倍,  $p < 0.01$ )、Col2a1遺伝子(3.2倍,  $p < 0.001$ )のmRNA発現量は対照群と比較して有意に増加した。また、組織学的検討の結果、COLII陽性の軟骨基質形成の増大が確認された。一方、CCN4発現抑制群においてAcan遺伝子(0.34倍,  $p < 0.001$ )、Col2a1遺伝子(0.40倍,  $p < 0.01$ )のmRNA発現量は対照群と比較して有意に抑制され、COLII陽性の軟骨基質形成が抑制された。

次に、CCN4 が軟骨細胞分化の主なシグナル経路の一つである TGF- $\beta$ -SMAD シグナル経路に与える影響を検討した。すなわち、同様にして CCN4 遺伝子を強制発現、または発現抑制した hBMSCs に TGF- $\beta$ 3 刺激を加え、10 分後に SMAD2/3 のリン酸化に与える影響をウエスタンブロッティング法にて評価した。その結果、CCN4 強制発現群において SMAD2/3 のリン酸化は促進され、一方、CCN4 発現抑制群において SMAD2/3 のリン酸化は阻害された。さらに、そのメカニズムを明らかにするため、同様にして CCN4 を強制発現または発現抑制した hBMSCs と外因性 TGF- $\beta$ 3 の結合性を免疫学的手法を用い評価した。その結果、CCN4 強制発現群において hBMSCs 表面に存在する CCN4 (1.29 倍,  $p < 0.01$ )、ならびに TGF- $\beta$ 3 の量 (1.21 倍,  $p < 0.01$ ) は対照群と比較して有意に増加した。一方、CCN4 発現抑制群においては hBMSCs 表面に存在する CCN4 (0.67 倍,  $p < 0.001$ )、ならびに TGF- $\beta$ 3 の量 (0.77 倍,  $p < 0.01$ ) は対照群と比較して有意に減少した。つまり、hBMSCs 表面に存在する CCN4 の量が、TGF- $\beta$ 3 の細胞表面への結合性を制御している可能性が示唆された。さらに、CCN4 と TGF- $\beta$ 3 が直接結合することを免疫沈降法を用いて確認した。

次に、*in vivo*において CCN4 が軟骨組織に与える役割を明らかにするため、6週齢の Ccn4 遺伝子欠損マウス (KOマウス)、野生型マウス (WTマウス) の大腿骨頭関節軟骨から RNA を回収し、Sox-9 遺伝子、Acan 遺伝子、Col2a1 遺伝子の mRNA 発現量を定量性 RT-PCR 法にて評価した。その結果、KOマウスの関節軟骨では WTマウスのそれと比較して、Sox-9 遺伝子 (0.34 倍,  $p < 0.01$ )、Acan 遺伝子 (0.29 倍,  $p < 0.01$ )、Col2a1 遺伝子 (0.63 倍,  $p < 0.05$ ) の発現量は有意に低下していた。最後に、関節軟骨欠損の治癒における CCN4 の関与を明らかにするため、6週齢の KOマウスおよび WTマウスの大腿骨顆部関節軟骨中央に直径約 400  $\mu$ m の関節軟骨全層欠損を作製した。4週後に組織を回収し脱灰組織切片を作製後、トルイジンブルー染色、COLII の免疫組織化学法を行い、組織学的に評価した。加えて、評価者に対してサンプルがどちらの実験群に属するかをブラインドにして、ICRS 変法スコアシステムに従い関節軟骨欠損部位の治癒状態をスコア化し、合計点の平均を算出して比較した。組織学的検討の結果、WTマウスの関節軟骨欠損部位に COLII 陽性の関節軟骨組織様組織が一部再生している像が確認されたが、KOマウスでは確認されなかった。また治癒状態をスコア化した結果、KOマウスにおいて関節軟骨欠損部位の治癒が有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。

以上の結果より、*in vitro*において CCN4 が hBMSC 表面への TGF- $\beta$ 3 の結合性を調節し、その下流シグナルを調節することで TGF- $\beta$ 3 誘導性軟骨細胞分化を正に制御している可能性が示唆された。また、Ccn4 遺伝子欠損マウスの関節軟骨において軟骨細胞分化マーカーの遺伝子発現量が低下しており、人工的に作製した関節軟骨全層欠損の治癒が抑制された。これら *in vivo* の結果は、CCN4 が軟骨細胞分化を正に制御しているという *in vitro* の結果と一致しており、*in vivo* においても CCN4 が軟骨細胞分化において重要な機能を有していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

CCNファミリー遺伝子は様々な組織発生や分化への関与が報告されており、その中でもCCN2やCCN3は骨芽細胞・軟骨細胞分化において重要な役割を担っていることが知られている。一方、骨芽細胞分化を正に制御することが知られているCCN4は変形性関節症の関節軟骨においても高発現することが報告されており、軟骨組織を構成する唯一の細胞である軟骨細胞にも何らかの影響を与えている可能性が示唆されるが、未だ詳細は明らかではない。本研究では、軟骨細胞に注目し、CCN4が軟骨細胞分化に与える影響、およびそのメカニズムを明らかにすることを目的に、*in vitro*, *in vivo*において、CCN4が軟骨細胞分化を制御するか否か検討を行っている。

初めに、*in vitro*において、ヒト骨髄由来間葉系間質細胞 (hBMSC) を用いて、軟骨細胞分化過程におけるCCN4遺伝子の発現パターンを解析している。その結果、CCN4遺伝子は他のCCNファミリー遺伝子と比較して、早期 (誘導7日後) に発現の上昇を示した。

次に、アデノウイルスベクターを用いCCN4を強制発現させたhBMSCsをマイクロマス培養法にて培養し軟骨細胞分化に与える影響を検討している。その結果、CCN4を強制発現したhBMSCsではTGF- $\beta$ 3刺激により誘導されたSMAD2/3のリン酸化が増強され、軟骨細胞分化は促進された。一方、siRNAにてCCN4の発現を抑制すると、TGF- $\beta$ 3誘導性SMAD2/3のリン酸化および軟骨細胞分化は抑制された。

また、その作用メカニズムを明らかにするため、CCN4を強制発現または発現抑制したhBMSCsとTGF- $\beta$ 3の結合性を免疫生化学的手法により検討している。その結果、hBMSCs表面のCCN4が、TGF- $\beta$ 3の細胞表面への結合性を制御していることが明らかとなった。さらに、CCN4とTGF- $\beta$ 3が結合することを免疫沈降法によっても確認している。

最後に、関節軟骨の再生におけるCCN4の関与を明らかにするため、6週齢の*Ccn4*遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスの関節軟骨中央に直径約400  $\mu$ mの欠損を作製し、4週後に治癒状態を組織学的に評価している。その結果、野生型マウスの関節軟骨欠損部位に軟骨組織が一部再生している像が観察されたが、*Ccn4*遺伝子欠損マウスでは認められなかった。

以上の結果は、CCN4はTGF- $\beta$ 3のhBMSCsへの結合性を制御することで、軟骨細胞分化を正に制御していることを明らかにしている。このようにCCN4が軟骨細胞分化に関与していることから、*Ccn4*遺伝子欠損マウスにおいて関節軟骨欠損の治癒が阻害された可能性を示唆している。

本研究は、CCN4が軟骨細胞分化を正に制御することを報告した初めての研究であり、変形性関節症とCCN4の関係の解明、治療への応用にも繋がるものとして評価できる。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。