

氏名	明石 翔
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5939号
学位授与の日付	平成31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	Metabolic regulation of the CCN family genes by glycolysis in chondrocytes (軟骨細胞における CCN ファミリー遺伝子の糖代謝を介した制御)
論文審査委員	沢 禎彦 教授      鳥井 康弘 教授      十川 千春 准教授

### 学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

The CCN family consists of 6 genes in the mammalian genome and produces multifunctional proteins involved in a variety of biological processes. Recent reports indicate the profound roles of CCN2 in energy metabolism in chondrocytes, and *Ccn2* deficiency is known to alter the expression of 2 other family members including *Ccn3*. However, almost nothing is known concerning the regulation of the CCN family genes by energy metabolism. In order to gain insight into this critical issue, we initially and comprehensively evaluated the effect of inhibition of glycolysis on the expression of all of the CCN family genes in chondrocytic cells. Upon the inhibition of a glycolytic enzyme, repression of *CCN2* expression was observed, whereas *CCN3* expression was conversely induced. Similar repression of *CCN2* was conferred by the inhibition of aerobic ATP production, which, however, did not induce *CCN3* expression. In contrast, glucose starvation significantly enhanced the expression of *CCN3* in those cells. The results of a reporter gene assay using a molecular construct containing a *CCN3* proximal promoter revealed a dose-dependent induction of the *CCN3* promoter activity by the glycolytic inhibitor in chondrocytic cells. These results unveiled a critical role of glycolytic activity in

the regulation of *CCN2* and *CCN3*, which activity mediated the mutual regulation of these 2 major CCN family members in chondrocytes.

## 論文審査結果の要旨

CCN ファミリー遺伝子は哺乳類では6つのメンバーからなり、内軟骨性骨形成や関節軟骨再生を含む多様な生物的作用に関与する。そのメンバーの1つである *CCN2* は、軟骨細胞の解糖系の維持に必要であることが報告されている。しかしながら、*CCN* ファミリー遺伝子発現の解糖系による制御については未だに不明の点が多い。本研究では、軟骨細胞における *CCN* ファミリー遺伝子発現と解糖系との関係を明らかにすることを目的として解析を進めた。

軟骨細胞における *CCN* ファミリー遺伝子発現への解糖系の関与を明らかにするために、ヒト軟骨細胞様 *HCS-2/8* 細胞を解糖系阻害薬であるモノヨード酢酸で処理し、定量リアルタイム RT-PCR を用いて *CCN* ファミリー全メンバーの遺伝子発現を評価した。その結果、*CCN2* 発現は低下し、*CCN3* と *CCN5* の発現は上昇した。*Ccn2* ノックアウトマウスの成長板軟骨では *Ccn3* 発現が上昇することが明らかにされていることから、以降は *CCN2* と *CCN3* に着目した。解糖系阻害では細胞内 ATP 量も減少するため、解糖系と ATP 量のどちらがこれらの遺伝子発現に関与しているかを明らかにするために、*HCS-2/8* 細胞を ATP シンターゼ阻害薬であるオリゴマイシンで処理したところ、モノヨード酢酸処理時と同様に *CCN2* 発現の低下が確認されたが、*CCN3* 発現は変動しなかった。また、グルコース未添加培地で *HCS-2/8* 細胞を培養したところ、*CCN3* 発現は上昇したため、*CCN3* 発現は細胞内 ATP 量ではなく解糖系による調節を受けていることが示唆された。そこで、ヒト *CCN3* 遺伝子転写開始点から約1.3キロ塩基対上流までの DNA 断片をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを作製し、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を有するコントロールレポーターベクターとともに *HCS-2/8* 細胞に導入後、モノヨード酢酸で処理し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、レポーター遺伝子発現の上昇が確認され、解糖系阻害による *CCN3* 発現の上昇が転写レベルで生じていることが判明した。

以上のことから、*HCS-2/8* 細胞において *CCN3* 発現は解糖系による抑制を受けており、それが転写レベルで生じていること、および *CCN2* 発現は ATP 依存性であることが明らかとなり、*Ccn2* ノックアウトマウスの成長板軟骨で *Ccn3* が上昇するという過去の報告にも矛盾なく、生体における軟骨細胞においても同様の機構が機能している可能性が示唆された。

本論文は、軟骨細胞において解糖系によって *CCN* ファミリーメンバーのうち *CCN2* と *CCN3* がそれぞれ亢進と抑制という逆の制御を受けているという新しい知見を示したものである。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。