

論文要旨等報告書

氏	柳田 剛志
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3362 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯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)
学位論文題名	成長板軟骨細胞と軟骨肉腫由来の軟骨細胞株におけるCCN4/WISP1 mRNAおよびそのスプライシングバリエーションの発現

論文審査委員 教授 滝川 正春 教授 北山 滋雄 助教授 池亀 美華

学位論文内容の要旨

【目的】

Wnt-signaling inducible secreted protein 1 (WISP1)/CCN family 4 (CCN4) 遺伝子は 1998 年にマウスメラノーマ細胞において Elm1 という名で同定され、その後ヒト腫瘍細胞において Wnt-signaling pathway 下流の β -カテニンにより誘導される遺伝子群のひとつ、WISP1 と同じものであることが分かった。現在では遺伝子の構造が似ていることから CCN ファミリーというタンパク質群のひとつに分類されている。CCN ファミリータンパク質の構造はシステインに富む IGFBP, VWC, TSP, CT という 4 つのモジュールで構成されているという特徴を持ち、各モジュールは様々な分子と相互作用を持つという性質を有している。CCN ファミリータンパク質の発揮する多彩な機能は、この特徴的な構造と性質によると考えられている。

今回研究対象とした CCN4/WISP1 には、癌転移を抑えるという報告や、VWC モジュールを欠落するスプライシングバリエーションである WISP1v が悪性の胃癌で過剰に発現するという報告に代表されるように、悪性腫瘍との関わりに関する報告は多く存在する一方、正常な組織での生理的機能はまだほとんど研究されていない。また CCN ファミリーメンバーの遺伝子の中でスプライシングバリエーションが存在するのは CCN4/WISP1 と CCN6/WISP3 だけであり、その意義にも興味を持たれる。

本研究では CCN4/WISP1 および WISP1v の軟骨細胞における発現とその生理的意義について検討した。

【材料及び方法】

1、細胞培養：ヒト軟骨肉腫由来細胞株(HCS-2/8)、MDA231、HeLa、A371、HEK293、骨肉腫由来細胞株(SaOS2)は 10%FBS 添加 D-MEM にて培養した。また HUVEC の培養には EBM-2 complete medium を使用した。ウサギ肋軟骨由来初代軟骨細胞(RGC cell)は 10%FBS 添加 α -MEM で培養した。

2、遺伝子導入：HCS-2/8 細胞を 6well プレートに 50 万/well で播種し、24 時間後に FuGENE6 を用いて遺伝子導入を行った。細胞への導入後 48 時間後にサンプルを回収しウェスタンブロットティング法、RT-PCR 法に用いた。

- 3、RT-PCR 法：RNeasy kit を用いて回収した Total RNA を Oligo d(T)プライマーで逆転写し cDNA とした。cDNA の PCR 反応は通法どおり行った。
- 4、cDNA クローニングと CCN4/WISP1 発現ベクターの作成：CCN4/WISP1 の cDNA を pGEM T-easy ベクターに挿入した。CCN4/WISP1 および WISP1v 発現ベクターは Mammalian Amino-Terminal FLAG ベクターに cDNA を挿入し作成した。WISP1vx 発現ベクターは WISP1v 発現ベクターからエクソンに相当する部位を抜き取って作成した。
- 5、DNA シークエンス：今回新たに検出した PCR 産物はすべてクローニングの後 ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて配列の解析を行った。
- 6、定量的 PCR：LightCycler™ system を用いて行った。酵素反応には SYBR Green PCR Master Mix を用いた。混液比は製品マニュアルに沿って行った。
- 7、ウェスタンブロッティング法：細胞を 2.5% β -メルカプトエタノールを含む SDS サンプルバッファーで溶解し、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。PVDF メンブレンに転写後 1 次抗体として抗 FLAG M2 モノクロナル抗体と rabbit 抗ヒト WISP1 IgG をそれぞれ使用した。2 次抗体には HRP 標識した抗マウス IgG、抗ウサギ IgG を用い、ECL™ Western Blotting Detection Reagents で発光させた。

【結果】

- 1、RT-PCR の結果、SaOS2、HCS-2/8 の 2 種の細胞において CCN4/WISP1、WISP1v の発現が認められた。また、HCS-2/8 細胞では WISP1v よりさらに小さい PCR 産物が認められた。この PCR 産物はこれまでに報告されていない CCN4/WISP1 のスプライシングバリエーション mRNA に由来するものであった。HUVEC、A371 は CCN4/WISP1 mRNA の発現のみを認め、それ以外の細胞株では PCR 産物は検出されなかった。
- 2、RGC 細胞でも WISP1v が発現していることが分かった。また HCS-2/8 細胞で発現が見られた WISP1vx は RGC 細胞では検出できなかった。
- 3、RGC 細胞を石灰化するまで長期培養し、CCN4/WISP1 および WISP1v の発現を検討した結果、CCN4/WISP1 mRNA は常に発現していたが WISP1v mRNA は石灰化に伴い上昇した。
- 4、WISP1v および WISP1vx を強制発現させた細胞はともに 2 型コラーゲンとアグリカン mRNA に変動はみられなかったが、WISP1v 強制発現細胞でアルカリフォスファターゼ mRNA が上昇した。一方 WISP1vx では対照と比較して大きな差はなかった。

【結論及び考察】

以上の結果から WISP1v が正常な軟骨細胞の分化、特に石灰化に関与することが強く示唆された。一方 CCN4/WISP1 には分化依存的な変動は見られず、軟骨細胞におけるより基本的な生理的機能との関わりが考えられる。新たに発見した WISP1vx については腫瘍関連形質との関わりが考えられるが、その詳細は今後の研究課題として残されている。

論文審査の結果の要旨

Wnt-signaling inducible secreted protein 1 (WISP1)/CCN4 遺伝子は腫瘍細胞において Wnt-signaling pathway 下流の β -カテニンにより誘導される遺伝子群のひとつ、WISP1 として同定された。しかしその後、遺伝子の構造が似ていることから CCN ファミリーという遺伝子群のひとつに分類されるようになった。CCN ファミリーの遺伝子の構造はシステインに富む IGFBP, VWC, TSP, CT という 4 つのモジュールで構成されているところが非常に特徴的であり、各モジュールはすべてさまざまな分子と相互作用を持つという性質を有している。CCN ファミリーたんぱく質の発揮する多彩な機能は、この特徴的構造と各モジュールの性質に起因すると考えられている。今回研究対象とした CCN4/WISP1 には VWC モジュールが欠損するスプライシングバリエント (WISP1v) が存在することが知られているが、WISP1、WISP1v とともに正常な組織での生理的機能はまだほとんど研究されていない。

この論文では CCN4/WISP1 とともにそのスプライシングバリエントである WISP1v の生理的機能にも焦点を当て一連の解析を行い以下の結論を得た。

- 1、ヒト骨肉種由来細胞株(SaOS2)、ヒト軟骨肉腫由来細胞株(HCS-2/8)の 2 種において CCN4/WISP1、WISP1v の発現が認められた。また、HCS-2/8 細胞では WISP1v よりさらに小さい PCR 産物が認められた(WISP1vx)。この PCR 産物はこれまでに報告されていない CCN4/WISP1 のスプライシングバリエント mRNA に由来するものであった。
- 2、ウサギ肋軟骨由来初代軟骨細胞 (RGC) 細胞でも WISP1v が発現していた。これまで WISP1v が正常細胞で発現していることを確認した報告はなかったが、今回 WISP1v が正常細胞で生理的役割を持つ可能性が初めて示された。また HCS-2/8 細胞で発現が見られた WISP1vx は RGC 細胞では検出できなかった。
- 3、RGC 細胞で CCN4/WISP1 が常に発現しているのに対し、WISP1v は石灰化に伴い上昇した。
- 4、WISP1v、WISP1vx 強制発現 HCS-2/8 細胞ともに 2 型コラーゲンとアグリカン mRNA に変動はみられなかったが、WISP1v 強制発現 HCS-2/8 細胞でアルカリフォスファターゼ mRNA が上昇していた。一方 WISP1vx では対照と比較して大きな差は見られなかった。

以上の結果より WISP1v が正常な軟骨細胞の分化、特に石灰化に関与することが強く示唆された。一方 CCN4/WISP1 には分化依存的な変動は見られず、細胞におけるより基本的な生理的機能を持つことが、そして今回新たに発見された WISP1vx については腫瘍関連形質との関わりが考えられる。

従って本研究は今後、軟骨組織発生機序の解明や軟骨組織再生に役立つ可能性があり、本申請論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。