

氏名	星島 光博
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4716号
学位授与の日付	平成25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(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	Roles of heterotypic CCN2/CTGF-CCN3/NOV and homotypic CCN2-CCN2 interactions in expression of the differentiated phenotype of chondrocytes (CCN2/CTGF-CCN3/NOV および CCN2-CCN2 のダイマー形成が軟骨細胞の基質合成に及ぼす役割)
学位論文審査委員	長塚 仁 教授                      山本 敏男 教授 滝川 正春 教授

#### 学位論文内容の要旨

In healthy tissue CCN family member 2 / connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) is highly expressed in cartilage and modulates chondrocyte differentiation and proliferation. Since ectopical overexpression of CCN2 is observed in several pathological states such as fibrosis or cancer, regulation of protein level and activity of CCN2 are required for normal development and maintenance of the physiological conditions in the living organisms. To understand the regulating mechanism of CCN2 activity, I identified CCN2-interactive proteins and investigated the effects of interaction on CCN2 activity in chondrocytes.

To identify CCN2-intractive proteins, I carried out GAL4-based yeast two-hybrid screening using a cDNA library derived from a chondrocytic cell line, HCS-2/8. CCN2/CTGF and CCN3/NOV polypeptides were picked up as CCN2-binding proteins, and CCN2-CCN2 and CCN2-CCN3 binding domains were identified. CCN family members have 4 characteristic domains: insulin-like growth factor binding protein-like (IGFBP), von Willebrand factor type C (VWC), thrombospondin type 1 repeats (TSP-1) and C-terminal cystine knot (CT). Among the four domains of CCN2, IGFBP, VWC and CT domains interact directly with full length CCN2, while only VWC and CT domains, but not IGFBP, of CCN2 bound to CCN3. Furthermore direct binding between CCN2 and CCN3 was confirmed by coimmunoprecipitation *in vitro* and *in vivo* and surface plasmon resonance, and the calculated dissociation constant ( $K_d$ ) was  $1.17 \times 10^{-9}$  M between CCN2 and CCN2 and  $1.95 \times 10^{-9}$  M between CCN2 and CCN3, respectively. Ectopically overexpressed GFP-CCN2 and Halo-CCN3 in COS7 co-localized as determined by direct

fluorescence analysis. In addition indirect immunostaining of endogenous CCN2 and CCN3 with specific antibodies showed subcellular co-localization of these proteins. I also present evidence that CCN2-CCN3 interactions modulated CCN2 activity such as enhancement of *aggrecan* and *col2a1* expression. Curiously, CCN2 enhanced, whereas CCN3 inhibited, the expression of *aggrecan* and *col2a1* mRNA in HCS-2/8 cells; and the combined treatment with CCN2 and CCN3 abolished the inhibitory effect by CCN3. These effects were neutralized with an antibody against the VWC domain of CCN2 (11H3). This antibody diminished the binding between CCN2 and CCN2, but enhanced that between CCN3 and CCN2. These results suggest that CCN2 could form homotypic and heterotypic dimers with CCN2 and CCN3, respectively. Strengthening the binding between CCN2 and CCN3 with the 11H3 antibody had an enhancing effect on aggrecan expression in chondrocytes, suggesting that CCN2 had an antagonizing effect by binding to CCN3.

## 学位論文審査結果の要旨

CCNファミリータンパク質2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF)は軟骨に強い発現を示し、軟骨細胞の増殖・分化や線維芽細胞ならびに血管内皮細胞の接着・遊走など多彩な生理機能を発揮する。しかし、一方で異所性の過剰な発現が種々の線維症や癌細胞で観察され、生体の恒常性維持において、CCN2の発現量およびその活性は、厳密にコントロールされていると思われる。そこで申請者らはCCN2の機能を調節する機構を解析する目的で、CCN2と結合する分子を探索し、これらの分子間の相互作用が細胞に与える影響を調べた。

軟骨細胞様細胞株HCS-2/8より作製したcDNAライブラリーから、CCN2と結合する因子を yeast two-hybrid screening を用いて同定したところ、CCNファミリーに属するCCN3/NOV およびCCN2が単離された。これらのタンパク質とCCN2との相互作用部位を調べたところ、CCN2はIGFBP、VWCおよびCTドメインを介してCCN2と結合するが、CCN3との結合にはVWCとCTドメインのみを介することを確認した。また、これら両因子をCOS7細胞内で異所性に発現させ、局在および細胞内での結合を調べたところ、共発現したCCN2とCCN3は共局在していることが蛍光タグを用いた観察により、また細胞内での結合がタグ抗体を用いたプルダウン法により示された。CCN2とCCN3の組換えタンパク質を作製し、*in vitro*での結合を免疫沈降法によって確認し、さらに表面プラズモン共鳴解析の結果から、CCN2同士およびCCN2とCCN3が共に $K_d \approx 1 \times 10^{-9}$  Mの強い結合を示すことが明らかとなった。

そこでこの両者の結合の生理的意義を調べるために、軟骨細胞にCCN2およびCCN3を添加し、アグリカンmRNAの発現に及ぼす影響をreal time-PCRにより調べたところ、アグリカンのmRNAレベルは、CCN2添加により上昇し、CCN3で低下した。CCN3によるアグリカンmRNAの発現抑制は、CCN2の添加により濃度依存的に回復した。さらに、CCN2-CCN2の結合を阻害するが、CCN2-CCN3の結合を増強する抗CCN2抗体を添加することにより、CCN2添加で見られたアグリカンmRNA上昇が消失し、一方でCCN2とCCN3共存下でのアグリカンmRNAレベルは同抗体の添加でさらに上昇した。したがって、CCN2とCCN3はタンパク質レベルで相互作用し、軟骨細胞の基質産生を促進していることが示唆された。

本論文は、CCN2とCCN3がタンパク質レベルで相互作用し合うことで、各々の活性を相互に調節していることを示したものであり、これらの知見は、骨や軟骨の正常な発生機構を明らかにするだけでなく、CCN2やCCN3が原因因子となっている骨・軟骨形成に異常を示す原因不明の疾病の究明や、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。