

氏名	Tarek Mohamad Mohamad Abd El Kader	
学位	博士	
専門分野の名称	歯学	
学位授与番号	博甲第4926号	
学位授与の日付	平成26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	The regenerative effects of CCN2 independent modules on chondrocytes <i>in vitro</i> and osteoarthritis models <i>in vivo</i> . (軟骨細胞と変形性関節症モデルに対するCCN2個別モジュールの軟骨再生効果)	
学位論文審査委員	松本 卓也 教授	長塚 仁 教授
	滝川 正春 教授	

学位論文内容の要旨

Introduction

Connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes both proliferation and differentiation of chondrocytes *in vitro*. In addition, the stimulating effect of CCN2 on chondrocytes differentiation depends on the type of chondrocytes; CCN2 stimulates proteoglycan synthesis and calcification of growth plate chondrocytes, while it stimulates proteoglycan synthesis but not undesired calcification of articular chondrocytes. Moreover, regeneration of articular cartilage and bone can be promoted by exogenously applied CCN2 suggesting its possible therapeutic use. However, large-scale preparation and long-time storage of biologically active CCN2 is difficult, probably because of the fragility of this cysteine-rich protein.

CCN2 is comprised of four modules. These modules are insulin-like growth factor binding protein-like (IGFBP), von Willebrand factor type C repeat (VWC), thrombospondin type 1 repeat (TSP1) and carboxyl terminal cystine knot (CT), each of which was suggested to have its own biological activity. Based on these findings, it is suspected that different combinations of these modules may exert unexpected biological effects through mutual molecular interaction. This study aims to assess the effects of these independent modules, either in single form or different combinations, in order to achieve a more therapeutically usable substitute for CCN2 with a higher regenerative capacity.

Methods

- 1) The independent modular proteins of human CCN2 were produced and purified through recombinant protein production system with *Brevibacillus choshinensis*. While the full length CCN2 was produced by a mammalian cell culture system, or was purchased.
 - 2) Effect of a single module, or a combination of independent modules was evaluated with human chondrocytic HCS-2/8 cells, where the chondrocytic phenotype was estimated by the gene expression of aggrecan and type II collagen via real time RT-PCR analysis.
 - 3) The evaluation of the effects of the CCN2 modules on proteoglycan synthesis was performed by using [³⁵S]-sulfate incorporation assay on human chondrosarcoma cell line HCS-2/8 after splitting them into different wells and treating each well with either PBS, rCCN2 or the combination of the four modules.
 - 4) Evaluation of the effects of the CCN2 modules on DNA synthesis was performed by using [³H]-thymidine incorporation assays on human chondrosarcoma cell line HCS-2/8 after splitting them into different wells and treating each well with either PBS, rCCN2 or the combination of the four modules.
 - 5) Surface plasmon resonance (SPR) methodology was used to evaluate the inter-modular interaction of CCN2 modules by applying full length CCN2 as a ligand and injecting each of the independent modules as an analyte separately to detect binding.
 - 6) Among the single modules of CCN2 and their combinations, the IGFBP and TSP1 single modules were selected based on the results obtained from our earlier experiment to determine the effectiveness of CCN2 modules *in vitro*. Retention in gelatin hydrogels was also evaluated
- Finally, evaluation of cartilage regeneration *in vivo* was performed with two rat modules prepared;
- A) Surgically induced osteoarthritis rat module.
 - B) Chemically induced osteoarthritis rat module.

The regeneration levels were histologically analyzed, followed by statistical analysis.

Results

- 1) Functional analysis of the independent modules *in vitro* revealed a biological activity comparable to, or even stronger than the full length CCN2 in a few modules. Interestingly, mixed application of all 4 modules almost reconstructed the bioactivity to the level of the full length.
- 2) Proteoglycan synthesis and DNA synthesis were increased after treatment with either CCN2 or the combination of the four modules put together.
- 3) Surface plasmon resonance analysis revealed significant interaction of 2 modules and full-length CCN2 indicating partial re-association of separate modules.
- 4) TSP1 showed higher retention ability than the other active single modules to the hydrogel

which lead us to forward it in the next *in vivo* experiment.

- 5) The result of cartilage regeneration experiments *in vivo* was also consistent with the findings obtained *in vitro* where the single module used (TSP1) and combination of the four modules yielded effects higher than or similar to full length CCN2 regenerative effects.

Conclusion

We are now sure that the 4 modules interact together and reconstruct the effect of full length CCN2. Although the means by which the modules interact together is still unclear yet, it is highly susceptible that through manipulating this inter-modular interaction we can increase the effect of full length CCN2. Not just that, but we are also optimistic about the use of one of CCN2 modules independently to achieve a higher regeneration ratio which give a chance for therapeutic use against osteoarthritis.

学位論文審査結果の要旨

CCN2はCCNファミリーに属するタンパク質であり、insulin-like growth factor-like protein-like (IGFBP)、von Willebrand factor type C repeat (VWC)、thrombospondin type 1 repeat (TSP1)、C-terminal cystine knot (CT) モジュールがこの順にアミノ末端から連結された構造をとっている。CCN2の機能は、多種多様な共同因子との分子間相互作用によって産み出されるためきわめて多彩であり、骨・軟骨組織などの間葉系組織の形成、成長に重要な役割を演ずることが知られている。さらにこのタンパク質は、損傷を受けた骨および軟骨の修復を促進し、調和のとれた組織再生を誘導するとの報告もあり、骨・軟骨再生分子として注目を集めてきた。

上述のようにCCN2は4つのモジュールから構成されているが、これらのモジュールがそれぞれ単独で細胞内シグナル伝達を惹起しうること、また様々なタンパク質と結合することがすでに知られている。加えて最近、CCN2分子同士が複合体を形成することが明らかになってきた。以上を統合的に解釈すれば、CCN2を構成するひとつひとつのモジュールが、それ自身で軟骨再生能力を発揮する可能性、および分断された各モジュールが再会合して、全長CCN2と同様、あるいはそれ以上の能力を発揮する可能性が考えられる。これら可能性を検証するため、本研究では細胞株を用いた各モジュールの機能評価、*in vitro*における各モジュール再会合の有無と程度の検討、さらに*in vivo*における関節軟骨再生効果の評価を行い、以下のような結果を得た。

- 1) IGFBP、VWC、TSP1、CT各モジュールを*Brevibacillus choshinensis*を用いた分泌生産系により準備・生成し高純度の各モジュールタンパク質を得た。
- 2) 1で得たタンパク質を単独、および様々な組み合わせでヒト軟骨細胞様HCS-2/8細胞株に添加培養し、軟骨の二大マーカーであるアグリカンとII型コラーゲンの遺伝子発現に与える影響を評価したところ、IGFBPおよびTSP1モジュール単独、及び全モジュールの同時適用で全長CCN2同等の効果が得られた。
- 3) 同細胞を用いた検討で、全モジュール同時適用でプロテオグリカン合成ならびに増殖が、全長CCN2同様に促進されることも確認された。
- 4) 表面プラズモン共鳴法により各モジュール再会合の可能性を検討したが、IGFBPとTSP1については直接どのモジュールにも結合するという所見は得られなかった。
- 5) 2で効果の確認されたものにつき、徐放性担体であるゼラチンハイドロゲルと複合体の形成がみられなかったIGFBPを除いて、この担体とともにラット変形性関節症モデルに適用し*in vivo*での軟骨再生効果を検討した。その結果、物理的に軟骨組織に欠損を導入したモデルではTSP1、全モジュール同時適用で再生促進効果を認め、化学的に軟骨損傷を与えたモデルではTSP1のみが有意に軟骨組織再生を促進した。興味深いことに、このTSP1の再生効果は全長CCN2のものより強力であり、新たな軟骨再生因子として有望と考えられる。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文に博士（歯学）の学位論文として価値があるものと認めた。