

氏名	水川 朋美		
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6485号		
学位授与の日付	令和3年9月24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	RFX1-mediated CCN3 induction that may support chondrocyte survival under starved conditions. (飢餓状態での軟骨細胞の生存を支える、転写因子 RFX1 を介した軟骨細胞での CCN3 誘導システム)		
論文審査委員	長塚 仁 教授	池亀 美華 准教授	岡田 正弘 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

Cellular communication network factor (CCN) ファミリータンパク質は細胞外でさまざまな分子と結合し、その動態を制御することで組織発生・再生で重要な役割を果たしている。そのうち、CCN3 は軟骨細胞からも産生され、その増殖や成熟に関与している。過去にヒト軟骨細胞様 HCS-2/8 細胞において解糖系酵素の一つである glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase を阻害する monoiodoacetate (MIA) による解糖系の遮断及びグルコース飢餓状態により CCN3 が誘導されることが報告されている。このことから、本研究では、このシステムの機序および役割について、詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした。

【手順・方法】

1. 解糖系阻害による CCN3 遺伝子発現誘導現象の確認

ヒト軟骨細胞様 HCS-2/8 細胞に解糖系酵素の一つである glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase を阻害する monoiodoacetate (MIA) を作用させると CCN3 が誘導されることが過去の研究より明らかとなっていた。この現象が別の解糖系酵素である enolase を阻害するフッ化ナトリウム (NaF) でも再現されるかを、定量リアルタイム RT-PCR で検証した。続いてこれがヒト乳がん細胞株 MCF7 および MDA-MB-231 でも起こるかを同様に確認した。

2. 軟骨細胞において CCN3 を解糖系阻害下で誘導するエンハンサーの決定

解糖系阻害が *CCN3* プロモーターからの転写を強く活性化することはすでに知られていた。そこで *CCN3* プロモーター部分各種断片を蛍ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだプラスミドを HCS-2/8 細胞に導入し、レポータージーンアッセイによりこの *CCN3* 発現調節を媒介しているエンハンサー領域を *CCN3* 遺伝子座の中に突き止めた。

3. エンハンサーに結合する転写因子の同定

2 で同定された *CCN3* エンハンサー領域を *in silico* 解析し、エンハンサーに結合する転写因子候補をリストアップした。続いて ENCODE ポータルサイトで公開されている、MCF7 細胞における転写因子クロマチン免疫沈降 (ChIP)-PCR データを解析し、上記の転写因子候補から *CCN3* プロモーター

に結合しているものを絞り込んだ。

4. 上記転写因子の機能検証

3で実際にHCS-2/8細胞において見出された転写因子が、解糖系阻害によるCCN3誘導に関与しているかを検証した。まず当該転写因子の遺伝子発現が解糖系阻害により誘導されるかを1と同様の方法で検証した。続いて合成 siRNA によって候補転写因子の発現をノックダウンし、NaF による解糖系阻害によってCCN3の発現誘導が起こるかを検証した。

5. 解糖阻害下でCCN3が軟骨細胞のviabilityに与える影響の検討

HCS-2/8細胞を解糖阻害下におき、抗CCN3抗体を培地に添加して細胞のviabilityに与える影響をWST-8アッセイで評価した。

6. マウス骨端軟骨におけるCCN3の産生状況の確認

胎生16日のマウス脛骨軟骨原基におけるCCN3の分布を、免疫組織染色により確認した。

【結果】

HCS-2/8細胞、ヒト乳がん細胞株MCF7およびMDA-MB-231細胞においてMIA、NaFによる解糖阻害およびグルコース飢餓状態によってCCN3の発現が上昇することが確認され、解糖系によるCCN3制御は軟骨細胞だけでなく他種細胞でも機能していることが分かった。また、このCCN3の誘導はmRNAレベルだけでなくタンパク質レベルでも確認された。さらに、レポーター遺伝子アッセイで見出されたエンハンサー領域の塩基配列、MCF7細胞における同領域のヒストン修飾、転写因子結合状況を解析し、この制御を媒介する特定の転写因子としてregulatory factor binding to the X-box 1 (RFX1)を候補として得た。続くHCS-2/8細胞を用いた検討により、RFX1は解糖阻害によりその発現が誘導され、CCN3の発現誘導に必要であることが明らかになった。なお解糖阻害条件下で、抗CCN3抗体でCCN3を吸着してしまうと軟骨細胞のviabilityが低下することも示された。In vivoでは発生途中の脛骨軟骨原基で、関節液から遠く栄養供給に乏しい軟骨組織深部において強いCCN3の産生が認められた。

【考察・結論】

解糖系遮断およびグルコース飢餓状態によって増強されるCCN3の発現は、転写因子RFX1の直接作用により引き起こされることが明らかとなった。さらに、軟骨におけるCCN3の発現は、細胞を飢餓状態に順応させる役割を担っていることが示唆された。

論文審査結果の要旨

【緒言】

Cellular communication network factor (CCN) ファミリータンパク質は細胞外でさまざまな分子と結合し、その動態を制御することで組織発生・再生で重要な役割を果たしている。申請者は、それらのうち、軟骨細胞からも産生され、その増殖や成熟に関与している CCN3 に着目し、その解答系遮断およびグルコース飢餓状態における発現増強の機序および役割について、詳細な分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法および結果】

すでにヒト軟骨細胞様 HCS-2/8 細胞において解糖系酵素の一つである glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase を阻害する monoiodoacetate (MIA) による解糖系の遮断により CCN3 が誘導されることが報告されていることから、まず CCN3 と解糖系との関係を詳細に検討するために、別の解糖系酵素である enolase を阻害するフッ化ナトリウム (NaF) でも再現されるか、定量リアルタイム RT-PCR で検証した。続いてヒト乳がん細胞株 MCF7 および MDA-MB-231 でも、MIA、NaF による解糖阻害およびグルコース飢餓状態によって *CCN3* の発現が上昇することを確認し、解糖系による *CCN3* 制御は軟骨細胞だけでなく他細胞種でも機能していることを明らかにした。さらに、レポータージェンアッセイで見出された *CCN3* のエンハンサー領域の塩基配列、MCF7 細胞における同領域のヒストン修飾、転写因子結合状況を解析し、この制御を媒介する特定の転写因子として regulatory factor binding to the X-box 1 (RFX1) を候補として得た。続く HCS-2/8 細胞を用いた検討により、RFX1 は解糖阻害によりその発現が誘導され、合成 siRNA による RFX1 のサイレンシングによる RFX1 の機能検証により、*CCN3* の発現誘導に RFX1 が必要であることを明らかにした。

また、解糖阻害条件下で、抗 CCN3 抗体を培地に添加すると軟骨細胞の viability が低下することを WST-8 アッセイで示した。そして免疫組織染色により、発生途中の脛骨軟骨原基において、関節液から遠く栄養供給に乏しい軟骨組織深部に強い CCN3 の染色性が認められることも明らかにした。

【結論】

以上により申請者は、解答系遮断およびグルコース飢餓状態によって増強される CCN3 の発現は、転写因子 RFX1 の直接作用により引き起こされることを明らかにした。さらに、軟骨において CCN3 の発現は、細胞を飢餓状態に順応させる役割を担っていることを示唆した。

本研究によって得られた知見は、解糖不全に対する軟骨細胞の反応として、転写因子 RFX1 を介して CCN3 の発現を上昇させるメカニズムの一端を解明するものであった。また、本論文はすでに Journal of Cellular Physiology に掲載されており、国際的にも評価されている。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。