

# 主 論 文 要 旨

報告番号	甲 ㊦ 第 号	氏 名	千々岩 みゆき
<p>主 論 文 題 名</p> <p>CCN1 (Cyr61) is overexpressed in human osteoarthritic cartilage and inhibits ADAMTS-4 (aggrecanase 1) activity (CCN1(Cyr61)はヒト変形性関節症関節軟骨で過剰発現しADAMTS-4 (アグリカナゼ 1) 活性を阻害する)</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>ADAMTS-4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4) はアグリカナゼ 1とも呼ばれ、ヒト変形性関節症 (OA) 関節軟骨におけるアグリカン分解に重要な役割を果たしているが、ADAMTS-4のアグリカン分解活性調節因子に関する情報は限られている。本研究では、ヒト軟骨肉腫細胞株にhexahistidineとFLAGタグを付けたADAMTS-4遺伝子を強制発現する細胞株を樹立し、これら細胞株から培養液中に分泌されたADAMTS-4を精製し、本酵素に結合した分子をnLC-MS/MSにより探索した。その結果、CCN 遺伝子ファミリー分子の一つであるCCN1 (Cysteine-rich protein 61 = Cyr61) が候補結合分子として得られた。CCN1とADAMTS-4との結合を免疫沈降法と結合アッセイで証明し、ADAMTS-4の各ドメインを欠失したリコンビナントタンパク質を用いた実験により、ADAMTS-4のシステインリッチドメインがCCN1との結合に関与することを示した。次いで、CCN1との結合によりADAMTS-4のアグリカン分解活性が完全に阻害されることを明らかにした。ヒトOA関節軟骨組織におけるCCN1のmRNA発現は正常関節軟骨組織に比べて有意に約3倍高く、OA関節軟骨組織でのタンパク質発現がイムノブロット法で示された。免疫組織学的検討により、CCN1はOA関節軟骨細胞に陽性であり、その免疫染色性はOA関節軟骨の破壊指標であるMankin scoreおよび軟骨細胞クラスター形成の程度と正の相関を示した。また、CCN1とADAMTS-4はクラスター形成した軟骨細胞でしばしば共発現していた。培養OA関節軟骨細胞を6種類のサイトカインや増殖因子で刺激したところ、CCN1発現はTGFβ (transforming growth factor β) で亢進し、IL-1α (interleukin-1α) により抑制された。ADAMTS-4発現はIL-1αとTGFβ処理によって共に亢進したが、アグリカン分解活性はIL-1α刺激下でのみ検出された。TGFβで刺激した軟骨細胞ではアグリカン分解活性は認められなかったが、CCN1発現をsiRNAでノックダウンするとアグリカン分解活性が出現した。</p> <p>以上の研究から、ADAMTS-4活性阻害分子としてCCN1が新たに同定され、OA関節軟骨細胞でCCN1が高発現していることが明らかとなった。TGFβは軟骨細胞増殖と細胞外マトリックス産生促進を介して軟骨細胞クラスター形成に関わっているが、TGFβにより発現誘導されたADAMTS-4のアグリカン分解活性は同時に発現亢進したCCN1により阻害されることでクラスター形成を容易にしている可能性が示唆された。</p>			