

軟骨前駆細胞におけるポリリン酸の作用

高田 匡基

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Effect of inorganic polyphosphate on chondrogenic precursor cell

MASAKI TAKADA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

ポリリン酸 (polyphosphate) は、リン酸が高エネルギーリン酸結合で直鎖状に重合したリン酸ポリマーで生体の多くの組織や細胞に存在する。ポリリン酸に関する研究は、細菌や酵母を用いた研究から、adenosine triphosphate (ATP) を利用して無機リン酸を基質としてポリリン酸を合成する polyphosphate kinase やポリリン酸を分解する polyphosphatase が同定されている。一方、哺乳動物細胞を用いた研究では、ポリリン酸存在下で線維芽細胞の増殖促進、骨芽細胞の細胞外基質の石灰化および破骨細胞の分化抑制作用などが明らかにされ、生体内の細胞増殖や骨形成過程におけるポリリン酸の生理的役割は明らかにされつつあるが、内軟骨性骨化におけるポリリン酸の作用やポリリン酸の代謝機構は未だ明らかにされていない。

本研究では、軟骨前駆細胞に対するポリリン酸の作用を明らかにすることを目的として、マウス軟骨前駆細胞株 (ATDC 5 細胞) を用いて、in vitro 内軟骨性骨化モデルによる軟骨細胞形質の獲得とポリリン酸代謝について検討した。

【実験方法】

1. 細胞および培養方法：培養細胞としてマウス軟骨前駆細胞株 (ATDC 5 細胞) を用い、分化誘導培地に、平均鎖長60のポリリン酸ナトリウムを 1 mM の終濃度で添加し培養した。

2. 遺伝子発現の評価：軟骨分化マーカーの発現は、Sox 9, Aggrecan, Type II collagen, Type X collagen, 骨形成関連遺伝子の発現は、Osteopontin, Osteocalcin, リン代謝関連遺伝子の発現は、Pit-1, ANK, ホスファターゼ関連遺伝子の発現は ALP, ENPP 1 について、各々の遺伝子特異的プライマーを用いた Real-timePCR 法で検討した。
3. 蛋白発現の評価：骨形成関連蛋白の発現は、Osteopontin, リン代謝関連蛋白の発現は、ALP, Pit-1, ANK, ENPP 1 について、各々の特異的抗体を用いた Western Blot 法で検討した。
4. 特殊染色：リン酸カルシウム生成の評価はアリザリンレッド S 染色を、軟骨基質の評価はアルシャンブルー染色を行った。
5. ポリリン産分解活性の測定： $[^{32}\text{P}]$ 標識長鎖ポリリン酸と細胞抽出液を反応させ、混合溶液を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィーで検討した。

【結果と考察】

- 1) ポリリン酸を添加して ATDC 5 細胞を培養すると、コントロールに比べ Sox 9 と Aggrecan の発現が低いレベルで増加すること、さらに軟骨細胞分化初期に発現する Type II collagen と肥大化軟骨形質を獲得した後期に発現する Type X collagen がともに抑制されることが

明らかとなった。また、骨関連マーカーの発現を検討したところ、ポリリン酸を添加して培養すると軟骨分化過程の初期から Osteopontin が高発現し、成熟、肥大化軟骨に分化する過程で Osteocalcin 遺伝子が誘導されていた。この現象は、ポリリン酸によって軟骨前駆細胞の軟骨細胞分化は抑制されるものの、骨芽細胞形質を早期に獲得し、基質の石灰化が亢進するものと考えられた。

2) ポリリン酸存在下では Pit-1 および ANK などのリントランスポーターの発現が亢進したことから、ポリリン酸は、軟骨前駆細胞のリントランスポーターの発現を上昇させ、石灰化が亢

進すると考えられた。

3) 薄層クロマトグラフィーの結果では、ポリリン酸を添加して培養すると正リン酸、二リン酸、三リン酸などの代謝産物の著明な増加がみられ、ALP や ENPP 1 などのエキソホスファターゼのほかに、エンドポリフォスフェート・ホスファターゼ活性を示すとともにリントランスポーターの発現が増加した。

これらの結果から、ポリリン酸が軟骨細胞前駆細胞から軟骨細胞への分化を抑制しながら骨芽細胞形質を獲得させ、内軟骨性骨化の一次骨化を促進する可能性が示唆された。