

## ビタミンAとDが成長軟骨細胞に及ぼす影響

日野 信次郎, 松井 徹, 矢野 秀雄  
(京都大学大学院農学研究科 動物栄養科学分野\*)

### **Synergistic effect of vitamin A and D on chondrocyte-like ATDC5 cells**

Shinjiro HINO, Tohru MATSUI, and Hideo YANO  
*Graduate School of Agriculture, Kyoto University*

Vitamin A and D are essential nutrients for normal skeletogenesis and bone growth in mammals. In growing calves, however, excess amounts of these vitamins synergistically cause growth inhibition of the hind limb. In this study, we investigated the adverse effect of these vitamins on a chondrocyte-like cell line, ATDC5.

All-trans retinoic acid (RA ; a vitamin A metabolite) or 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-D ; a bioactive form of vitamin D) inhibited cell proliferation and these vitamins synergistically inhibited cell proliferation. RA or 1,25-D also reduced proteoglycan accumulation to the cell layer in a dose dependent manner and these vitamins synergistically reduced proteoglycan accumulation. Although either 100nM of RA or 10nM of 1,25-D increased cellular alkaline phosphatase activity (an of cellular hypertrophy), co-treatment with these vitamins did not affect the activity.

These results suggest that alterations of cell proliferation and differentiation by the synergism of VA and VD are associated with growth inhibition of the limbs in growing calves.

ビタミンA (VA)とD (VD)は哺乳動物において骨格の正常な形成、成長に必須な栄養素である。様々な動物種においてVD欠乏は、くる病や骨軟化症を誘発し、またVA欠乏により軟骨内骨化が阻害されることが知られている。その一方で、子牛に多量のVAを投与すると、四肢長骨、中でも後肢の伸長が阻害されるハイエナ病とよばれる症状を呈し、VA単独よりもVDが同時に投与されたときにより伸長阻害が強調されることが報告されている<sup>1)</sup>。このことから、VAとVDの協調的な骨伸長阻害作用が推察される。

---

\* 所在地：京都市左京区北白川追分町 (〒616-8224)

長骨の長軸方向への成長は、骨端成長板に存在する成長軟骨細胞が増殖、基質分泌、肥大化することによって達成される。VA及びVDが成長軟骨細胞に及ぼす影響については、様々な動物種由来の初代培養系を用いた報告が数多くなされているが<sup>2)-4)</sup>、両ビタミンの協調的な作用については報告がなく、ハイエナ病発症と成長軟骨細胞の細胞機能変化との関係は明らかではない。そこで本研究では、成長軟骨細胞モデルであるマウス由来ATDC5株化細胞を用いて、VAとVDが細胞の増殖、基質分泌及び肥大化に及ぼす影響について検討した。

## 材料及び方法

### 1. 細胞培養

成長軟骨細胞モデルとして、マウス胚性腫瘍由来ATDC5細胞を供試した。培養は、DMEM/Ham's F12混合基本培地に5%FBS, 10 $\mu$ g/mlインスリン及び0.292mg/mlのL-グルタミン及び抗生物質を添加したものを用いて行った。細胞増殖測定用には96穴プレート、その他に関しては12穴プレートを使用した。培養期間及びビタミン添加期間をFig. 1に示した。

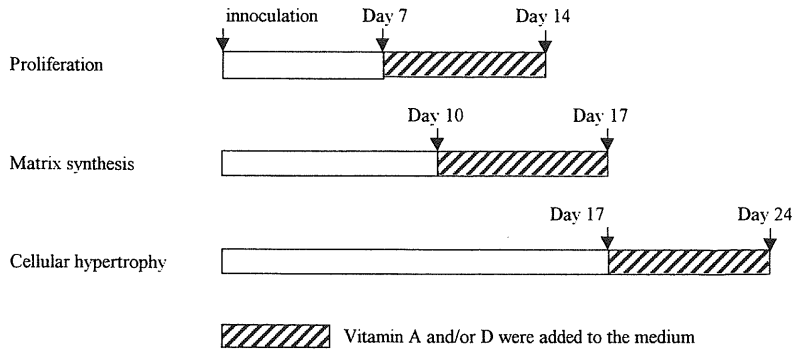


Fig. 1 Cell culture scheme

### 2. 使用試薬

本実験では、VAとして代謝産物である全トランスレチノイン酸 (RA) を、VDとしてその活性型である1,25-二水酸化ビタミンD<sub>3</sub> (1,25-D) を使用した。

### 3. 生化学分析

細胞増殖は、MTT変法であるWST-1法によって生細胞数を測定し<sup>5)</sup>、これを指標とした。

細胞層中軟骨基質沈着量は、軟骨組織における非コラーゲン細胞外基質の大部分を占めるグリコサミノグリカン鎖プロテオグリカン (PG) をアルシアンブルー色素染色し、この色素沈着量を指標とした。培養終了後の培養プレート中の細胞を95%メタノールで固定し、アルシアンブルー色素と2時間反応させた。純水で洗浄した後、6Mグアニジン塩酸塩を加えて色素を溶解させ、620nmにおける吸光度を測定した<sup>6)</sup>。

軟骨細胞の最終分化、すなわち細胞の肥大化は、肥大化期の細胞が活発に分泌するアルカリ性フォスファターゼ (ALP) の活性を指標とした。測定は、Kato et al.<sup>3)</sup> に準じて行い、Lowry<sup>7)</sup> 法により別途測

定した細胞層中タンパク質量を用い、単位タンパク質量当たりの比活性を算出した。

4. 統計処理

全ての分析においてDuncanの多重範囲検定により、有意差検定を行った。

結果及び考察

RAは、濃度依存的に細胞増殖を抑制し、1000nM区における細胞数はコントロール区の約67%であった。また、1,25-Dも同様に濃度依存的に細胞増殖を抑制し、1000nM区では細胞数はコントロール区の約79%であった (Fig. 2 a)。ウサギヤラット由来の初代培養系において両ビタミンは、血清存在下で培地中に生理濃度よりも高濃度で添加すると細胞増殖を抑制することが報告されている<sup>8),9)</sup>。今回得られた結果もそれらの報告と一致するものであった。

RA 0.1nM及び1,25-D 0.1nM共存区において、細胞数の変化は認められなかったが、RA 1000nM及び1,25-D 1000nM共存区では、それぞれ単独よりも強い増殖抑制作用が認められた (Fig. 2 b)。このこと

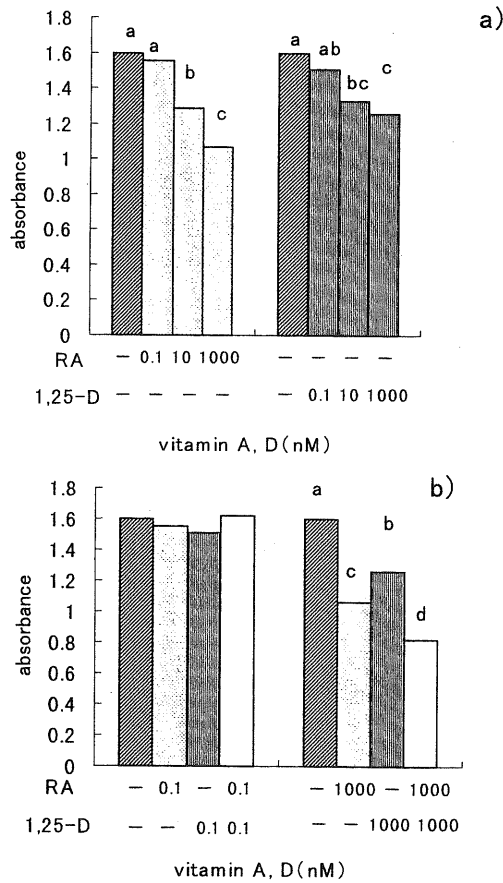


Fig. 2 Effect of vitamin A and D on cell proliferation

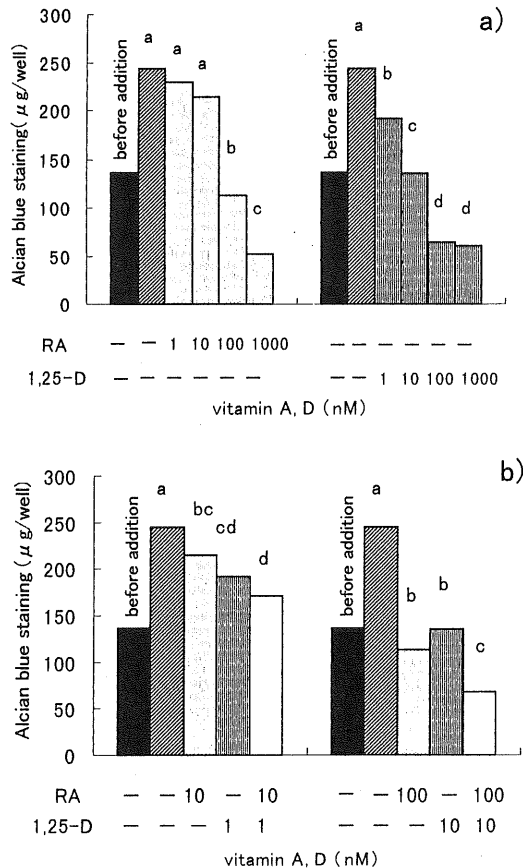
Values with different letters are significantly different from each other. :

p < 0.05

から、VAとVD同時投与によるハイエナ病発症に成長軟骨細胞の増殖抑制が寄与している可能性が考えられた。しかし、本実験で用いた細胞増殖測定期間には、前軟骨細胞と分化した増殖軟骨細胞が混在しているため、RAや1,25-Dの作用がどちらの細胞種に対するものかを特定することはできなかった。

100nMよりも高濃度のRA、1nMよりも高濃度の1,25-Dは、単独で濃度依存的に細胞層へのPG蓄積を抑制した (Fig. 3 a)。この結果は、過去のATDC5細胞を用いた報告と一致した<sup>6),10)</sup>。また、PG蓄積量はビタミン添加前よりも低値を示したことから、PG合成が抑制されただけでなく、蓄積していたPGの分解が促進されることが示唆された。

100nM RA及び10nM1,25-D共存区では、それぞれ単独よりも強いPG蓄積抑制が認められた (Fig. 3 b)。ハイエナ病を発症したウシの骨端成長板においてPGの一種であるアグリカンの蓄積が低下することが報告されていることから<sup>11)</sup>、VA及びVDによるハイエナ病誘発作用にPGの蓄積抑制及び異化促進が関与していると考えられた。



**Fig. 3** Effect of vitamin A and D on proteoglycan synthesis

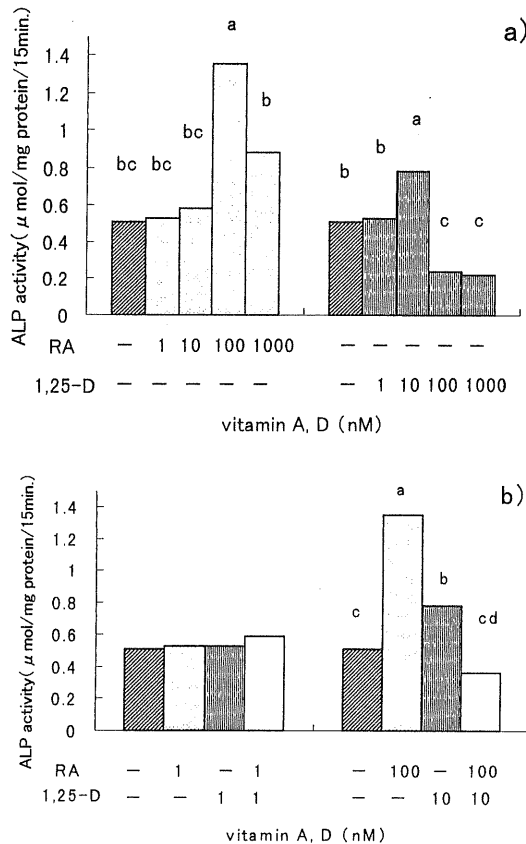
Values with different letters are significantly different from each other. :

p < 0.05

100nM RA区では、ALP活性は高値を示したが、1000nM区ではコントロール区との差は認められなかった。10nM1,25-D区では、ALP活性は高値を示したが、100nMよりも高濃度区では反対に低値を示した (Fig. 4 a)。

100nM RA及び10nM1,25-D共存区では、ALP産生促進作用は消失し、コントロール区との間に差は認められなかった (Fig. 4 b)。そのため、両ビタミンの成長軟骨細胞の肥大化に対する作用をハイエナ病発症機構と関連づけることはできなかった。ニワトリやラットの初代培養系においてRAや1,25-Dに対する成長軟骨細胞の応答性は、細胞の成熟に伴って変化することが報告されている<sup>4), 12)</sup>。本試験で、RAと1,25-Dは細胞増殖及びPG分泌に際しては協調作用を示し、ALP産生に際しては互いに拮抗作用を示したことから、ATDC5細胞において増殖及びPG分泌期の細胞と肥大化期の細胞とでは、RAや1,25-Dに対する応答性が異なっている可能性が示唆された。

本実験の結果から、牛ハイエナ病発症には、VA及びVDによる成長軟骨細胞の増殖及び基質沈着抑制



**Fig. 4** Effect of vitamin A and D on cellular alkaline phosphatase activity

Values with different letters are significantly different from each other :

p < 0.05

が関与している可能性が示唆された。しかしながら、今回の結果はマウス由来の細胞を用いて得られたものである。VAやVDの作用は、細胞ドナーの種や年齢によって異なる可能性があることから、若齢牛由来の成長軟骨細胞を用いたさらなる検討が必要であると考えられた。

### 参 考 文 献

- 1) 内藤 善久, 高木 久 (1995) 栄養生理研究会報 39 (2) : 117
- 2) Enomoto, M., H. Pan, F. Suzuki and M. Takigawa (1990) J. Biochem. 107 : 743
- 3) Kato, Y., A. Shimazu, M. Iwamoto, K. Nakashima, T. Koike, F. Suzuki, Y. Nishi and K. Sato (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 6522
- 4) Iwamoto, M., E.B. Golden, S.H. Adams, S. Noji and M. Pacifici (1993) Exp. Cell Res. 205 : 213
- 5) Ishiyama, M., M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizoguti and P. He (1993) Chem. Pharm. Bull. 41 (6) : 1118
- 6) Akiyama, H., Y. Hiraki, C. Shigeno, H. Kohno, C. Shukunami, T. Tsuboyama, R. Kasai, F. Suzuki, J. Konishi and T. Nakamura (1996) J. Bone Min. Res. 11 (1) : 22
- 7) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) J. Biol. Chem. 193 : 265
- 8) Hagiwara, H., A. Inoue, S. Nakajo, K. Nakaya, S. Kojima and S. Hirose (1996) Biochem. Biophys. Res. Com. 222 : 220
- 9) Boyan, D.D., G.H. Posner, G.H. Greising, M.C. White, V.L. Sylvia, D.D. Dean and Z. Schwartz (1997) J. Cell. Biochem. 66 : 457
- 10) Shibata, M., E. Fujino, Y. Sato, S. Numazawa, T. Yoshida and Y. Kuroiwa (1996) Biochem. Biophys. Res. Com. 225 : 593
- 11) Woodard, J.C., G.A. Donovan and L.W. Fisher (1997) Bone 21 (2) : 171
- 12) Swain, L.D., Z. Schwartz, K. Caulfield, B.P. Brooks and B.D. Boyan (1993) Bone 14 (4) : 609