

ビタミンKが成長軟骨細胞の増殖に及ぼす影響

日野 信次朗, 松井 徹, 矢野 秀雄
(京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻*)

Effect of vitamin Ks on the growth of chondrocyte-like ATDC5 cells

Shinjiro HINO, Tohru MATSUI and Hideo YANO

Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Effects of Vitamin Ks (VKs) on proliferation of chondrocyte-like ATDC5 cells were studied. The proliferation of cells was evaluated by bromo-deoxyuridine incorporation. Vitamin K₂ (menatetrenone) significantly stimulated cell proliferation at 10⁻⁹M. Although VK₃ also stimulated cell proliferation, the dose required for the stimulatory effect of VK₃ was 100-fold higher than that of VK₂. These stimulations were eliminated by the addition of warfarin which is a well known antagonist of VK acting as an inhibitor of γ -carboxylase. Since the higher concentration of VK₃ was required for stimulating cell proliferation compared to VK₂ and VK₃ does not affect carboxylase activity, VK₃ might be converted into VK₂ during culture and stimulated cell proliferation. Vitamin K₂ and VK₃ suppressed cell growth at the concentration of 10⁻⁵M. This suppressive effect was not antagonized by warfarin. It was likely that the suppressive effects of VKs were unrelated to the carboxylation of vitamin K-dependent protein(s). The high level of VK₃ but not VK₂ induced cell death. Therefore, VK₂ suppressed cell growth through a different mechanism from VK₃.

ビタミンKは多種の細胞の増殖や分化に影響を及ぼすことが報告されている。ビタミンKはペプチド中のグルタミン酸残基を γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) に変換する γ -カルボキシラーゼの補酵素として作用することにより、ビタミンK依存性タンパク質の活性化を行う。一方、ビタミンKはビタミンK依存性タンパク質のGla化促進を介さない作用も有していることが示唆されている。骨芽細胞にはビタミンK₂であるメナテトレノンに対する核内受容体が存在することが示唆されている¹⁾。また、メナテトレノンはGla化に直接関与するキノン骨格と側鎖(ゲラニルゲラニオール鎖)からなるが、骨芽細胞分

* 所在地：京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

化促進作用を有するのはその側鎖であり、キノン骨格はその作用に直接的には関与しないことも報告されている²⁾。さらに、in vitroでGla化活性を有しないビタミンK₃およびその誘導体はヘパトーマ細胞の増殖を抑制することも示唆されている³⁾。軟骨にはビタミンK依存性タンパク質であるマトリックスマググタンパク質⁴⁾やgrowth-arrest-specific-gene 6の産物(GAS6)⁵⁾が存在している。一方、軟骨細胞の増殖や分化に及ぼすビタミンKの作用に関しては報告されていない。そこで本試験では成長軟骨細胞の増殖に及ぼすビタミンKの作用ならびにビタミンKの作用とそのGla化促進活性の関連を検討した。

材料および方法

成長軟骨細胞モデルとしてマウス胚性腫瘍由来のATDC5細胞を用いた。培養は96穴プレートを用い、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)とHam'F12(1:1)混合培地に10 μ g/mlのインスリン、292 μ g/mlのL-グルタミン、100U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン及び5%牛胎児血清(FBS)を含む培地にて24時間培養を行い、その後FBSを培地から除き、0.1%牛血清アルブミンを加えた基本培地に、ビタミンK₂(メナテトレノン)またはビタミンK₃を10⁻¹¹から10⁻⁵M添加し72時間培養した。培養は37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で行い、培地交換は2日に1度行った。

次に、10⁻⁹Mおよび10⁻⁵MのビタミンK₂添加、または10⁻⁷Mおよび10⁻⁵MのビタミンK₃添加とともに γ -カルボキシラーゼ阻害剤であるワーファリンを1 μ g/ml培地に加え、72時間培養を行った。

細胞増殖は、5-ブプロモ-2'デオキシウリジン(BrdU)取り込み試験により得たDNA合成活性を指標とした。測定はBrdUラベリング&ディテクションキット(Boeringer Maneim)を用い、実験操作は、同キットのプロトコールに従った。

結果および考察

予備試験として、5%FBSを含む培地を用いて増殖試験を行ったが、ATDC5細胞は血清含有培地では非常に増殖能力が高く、ビタミンKの増殖促進能を正確に測定するには適さないと考えられた。また、ビタミンKが他の血清成分と相互作用を起こす可能性も考えられ、ビタミンKの成長軟骨細胞に対する直接的な作用を検討する上でも無血清培地を用いた試験を行う必要があると考えられた。そこで、次に無血清培地に様々な濃度のビタミンK₂及びビタミンK₃を添加し、BrdU取り込みに及ぼす影響を検討した。この無血清培地中でもATDC5細胞の培養皿からの剥離や、細胞の形態的变化は一部を除き認められなかった。10⁻⁹Mから10⁻⁶MのビタミンK₂添加72時間においてBrdU取込みが有意に促進され、一方、10⁻⁵Mでは取り込みは強く抑制された(Fig. 1)。ビタミンK₃は、10⁻⁷M及び10⁻⁶M添加によりBrdU取込みを有意に促進したが、10⁻⁵M添加により取り込みを著しく抑制した。

これらの結果から、ビタミンK₂およびビタミンK₃は細胞増殖調節作用を有することが明らかとなった。一般的にビタミンKは γ -カルボキシラーゼの補酵素として、数種のペプチドのグルタミン酸残基をGlaに変化させることにより、ペプチドを活性化させる機能を有する。しかし、in vitroではビタミンK₃はビタミンK依存性タンパク質のGla化促進作用を有さないことが報告されている^{6,7)}。そこで、次にビタミンKアンタゴニストであり γ -カルボキシラーゼ阻害剤であるワーファリンをビタミンKと共に添加して

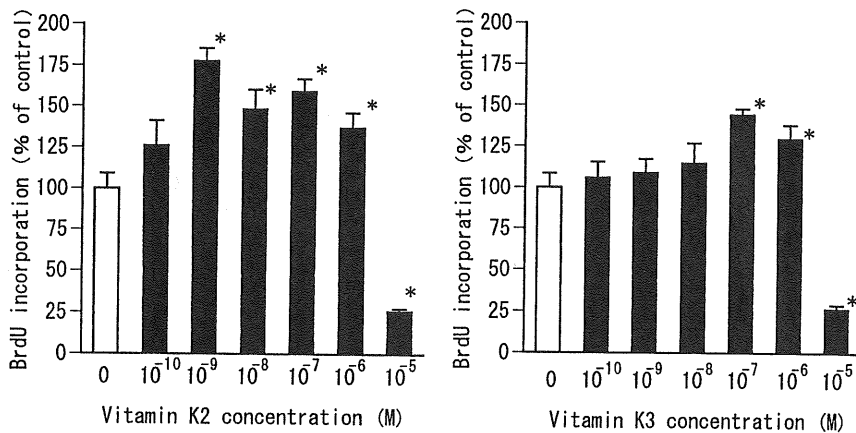


Figure 1 Effect of vitamin K₂ and vitamin K₃ on chondrocyte proliferation.

Proliferation was determined using bromo-deoxyuridine incorporation by ATDC5 cells.

Data were expressed as mean ± SD for 6 replicated cultures.

*; Significantly different from the control (P<0.05).

ビタミンKの細胞増殖調節作用におけるGla化の関与の可能性を検討した。

10^{-9} MのビタミンK₂により生じたBrdU取り込み促進はワーファリン添加により完全に消失した (Fig. 2)。また、同様に 10^{-7} MのビタミンK₃添加により生じたBrdU取り込み促進作用もワーファリン添加により完全に打ち消された。これらの結果から、ビタミンKの細胞増殖促進作用はGla化促進を介して生じていることが示された。軟骨にはビタミンK依存性のタンパク質であるGAS6が存在していることが報告されている。このタンパク質の機能は明らかではないが、軟骨細胞の増殖を促進することが示唆されている⁵⁾。また、無血清培地中で培養された軟骨細胞においてGAS6は強く発現される⁵⁾。そこで無血清条件で培養を行った本試験におけるビタミンKによる軟骨細胞増殖促進はGAS6の活性化を介したものである可能性がある。

ニワトリにビタミンKを経口投与した試験ではビタミンK₃はビタミンK₂ (メナテトレノン) の約30%のGla化活性を有することが知られている⁸⁾。一方、肝臓ミクロソーム系または粗製カルボキシラーゼを用いた試験では、ビタミンK₃はほとんどGla化活性を有しないことが報告されている^{6,7)}。一方、本試験ではビタミンK₃による軟骨細胞増殖促進作用もワーファリンにより打ち消されたことから、ビタミンK₃もカルボキシラーゼによるGla化を介して細胞増殖を促進していることが推察された。ビタミンK₂は 10^{-9} Mで細胞増殖促進作用を示したが、ビタミンK₃では 10^{-7} Mで同様の作用を示した。このようにビタミンK₂の細胞増殖促進作用はビタミンK₃の100倍程度であった。ビタミンKの体内代謝に関しては不明な点も多いが、ビタミンK₃が動物体内でメナテトレノンに変化しうることを示唆した報告もなされている⁹⁾。

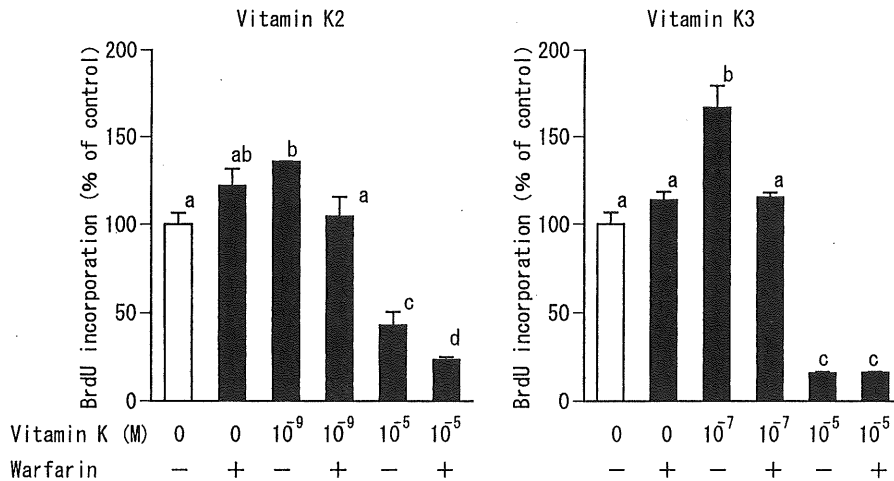


Figure 2 Effect of warfarin on the stimulation of chondrocyte proliferation by vitamin Ks. Proliferation was determined using bromo-deoxyuridine incorporation by ATDC5 cells. Data were expressed as mean \pm SD for 4 replicated cultures. Means having no common letter significantly differ ($P < 0.05$).

軟骨細胞におけるビタミンK₃からビタミンK₂への代謝に関する報告はないが、ビタミンK₃からビタミンK₂への代謝が軟骨細胞においても生じており、ビタミンK₃は体内でビタミンK₂に変化した後に細胞増殖促進作用を有するようになることが推察される。

10⁻⁵MのビタミンK₂ならびにビタミンK₃はBrdUの取り込みを著しく抑制した (Fig. 1)。また、この取り込み抑制はワーファリン添加により消失しなかった (Fig. 2)。この結果から、高濃度のビタミンKは軟骨細胞増殖を抑制すること、この抑制作用にはGla化は関与していないことが示唆された。このように10⁻⁵MのビタミンK₂およびビタミンK₃添加時の細胞増殖抑制作用はほぼ同程度であったが、ビタミンK₃添加時には細胞の剥離が認められたのに対し、ビタミンK₂添加では細胞の形状に目立った変化は認められなかった。また、細胞の生存性をトリパンブルー染色により検討したが、高濃度のビタミンK₂では細胞は高い生存性を示したが、ビタミンK₃では細胞毒性が認められた。そこで、ビタミンK₂およびビタミンK₃は異なる機作で細胞増殖を抑制している可能性がある。ヘパトーマ細胞において6 × 10⁻⁵ MのビタミンK₃はアポトーシスを引き起こすが、ビタミンK₂は15 × 10⁻⁵Mにおいてもアポトーシスを生じないことが報告されている¹⁰⁾。そこで、本試験におけるビタミンK₃による細胞増殖抑制にはアポトーシスが関与している可能性がある。一方、ビタミンK₂による軟骨細胞増殖抑制作用の機作は明らかではない。また、本試験では高濃度のビタミンK₂とともにワーファリンを添加すると、ビタミンK₂単独処理と比較しより強い細胞増殖抑制が認められた。これらの点をさらに検討する必要があると考えられた。

文 献

- 1) Hoshi, K., K. Nomura, Y. Sano and Y. Koshihara (1999) *Biochem.Pharmacol.* 58 : 1631
- 2) Hara, K., Y. Akiyama, T. Nakamura, S. Murota and I. Morita (1995) *Bone* 16 : 179
- 3) Juan, C.-C., and F.Y.-H. Wu (1993) *Biochem.Bioph.Res.Co.* 190 : 907
- 4) Hale, J.E., J.D. Fraser and P.A. Price (1988) *J.Biol.Chem.* 263 : 5820
- 5) Loeser, R.F., B.C. Varnum, C.S. Carlson, M.B. Goldring, E.T. Liu, S. Sadiev, T.E. Kute and R. Wallin (1997) *Arthritis.Rheum.* 40 : 1455.
- 6) Freidman, P.A. (1976) *Biochem.Bioph.Res.Co.* 70 : 647
- 7) Olson, R.E. (1978) *Fed.Proc.* 37 : 2610
- 8) Matshiner, J.T., and E.A. Doisy (1966) *J.Nutr.* 90 : 97
- 9) Billeter, M., W. Bollinger and S.C. Martius (1964) *Biochem. Z.* 340 : 290
- 10) Nishikawa, Y., B.I. Carr, M. Wang, S. Kar, F. Finn, P.Dowd, Z.B. Zheng, J. Kerns and S. Naganathan (1995) *J.Biol.Chem.* 47 : 28304