

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20592336  
 研究課題名（和文） 先天性頭蓋・顎・顔面の骨、軟骨異常におけるコレステロール合成系の機能解析研究  
 研究課題名（英文） Functional analysis of cholesterol synthetic pathway in osteochondrodysplasia of congenital cranio-maxillo-facial anomalies  
 研究代表者：  
 角 健作（SUMI KEN-SAKU）  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：30403629

研究成果の概要（和文）：

**[目的]** 骨および軟骨細胞の増殖・分化におけるステロール類の機能について検討した。

**[方法と結果]** マウス軟骨前駆細胞の初期・後期分化期におけるコレステロールおよびその前駆物質（C27 sterol）の影響を、マウス軟骨前駆細胞株ATDC5を用いて検討した。各分化ステージにおける、種々の軟骨分化マーカーの発現および分化過程におけるC30からC27ステロールまでの代謝過程に関与する各合成酵素などの発現変動について検討した。

**[結果と考察]** コレステロールおよびその前駆物質が *in vitro* において軟骨細胞の増殖・分化に重要な機能を有していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

**Purpose:** In this study, we have studied the effect of C27 and C30 sterols on growth and differentiation of chondrogenic cell line, ATDC5 cells in serum-free cell culture.

**Material and Methods:** Mouse chondrogenic cell line ATDC5 cells have been used to study the effect of cholesterol and its precursor (C27 sterol and C30 sterol) on the growth and differentiation at early and late stage. The expression of the C14-demethylase, 3-ketoreductase, C4-demethylase, and several marker genes in the process of chondrogenic differentiation of the cells have been studied by RT-PCR analysis.

**Results and discussion:** By using ATDC5 cell line, which mimic *in vivo* chondrogenic differentiation process, we have studied effect of C27 and C30 sterols on the growth and differentiation of the cells. As a result, we have found that exogenously added C27 sterols has various effect on the growth and differentiation of the cell, suggesting that C27 sterol has an important role in the growth and differentiation of the ATDC5 cell line.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：軟骨分化、骨分化、コレステロール合成、ステロール代謝、ATDC5 細胞、MC3T3 細胞、細胞増殖因子、sonic hedgehog、

## 1. 研究開始当初の背景

マウス骨原性細胞株 MC3T3 と軟骨前駆細胞株 ATDC5 は骨芽細胞や軟骨細胞への分化を *in vitro* で効率よく再現する培養系として知られている。しかしいずれも 10%血清を添加した培養系であり、培養液中の脂質の影響を検討するためには可及的に血清を低濃度で用いることが必要となる。当科では種々の正常およびガン細胞株の無血清培養系を確立しており、この培養系に脂質を除去処理（チャーコール処理）した牛胎児血清を低濃度（0.5%）添加した培地を使用することで、ATDC5 細胞の軟骨分化を誘導できることを既に報告した。さらに、顎顔面に異常をきたす遺伝疾患（基底細胞母斑症候群、Crouson 症候群など）の責任遺伝子の解析や発生機序について解析し、報告してきた。Sonic hedgehog (SHH) およびその受容体である patched (PTCH) は、発生期の左右軸決定や neural crest の発生に重要な働きをしている。最近 SHH の変異は正中裂や単眼症を伴う全前脳胞症を引き起こすこと、PTCH の変異は基底細胞母斑 (Gorlin) 症候群 (NBCCS) を引き起こすことが明らかとなっている。我々は NBCCS 患者の末梢血および顎嚢胞由来 DNA を用いて、PTCH 遺伝子の exon 2 ~ exon 3 における変異を検討した結果、顎嚢胞を有する患者では exon 8 の 1162 番目の塩基アデニンのチミンへの変異を認め、同変異は 338 番目のアスパラギン酸のチロシンへの置換を示唆した。さらに、口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) における PTCH の変異を検討したところ、5 細胞株の OSCC のうち 4 細胞株に exon 12 の 1682 番目の塩基チミンのグアニンへの変異を認めた。同変異はコドン 561 のアミノ酸メチオニンのアルギニンへの置換を示唆している。さらに、正常上皮細胞および OSCC 細胞および唾液腺腺癌細胞 (SAC) における SHH-PTCH の機能を明らかにするため、遺伝子組み換え型 rmSHH-N を作成し、同タンパクの各細胞の増

殖に及ぼす影響について検討したところ、PTCH 変異を有する OSCC 細胞の増殖は SHH-N に影響を受けなかったが、PTCH 変異を持たない OSCC、SAC および正常上皮細胞の増殖は SHH-N により濃度依存的に促進された。したがって、PTCH 変異は、SHH 非依存的に PTCH 下流のシグナルを活性化することにより、口腔扁平上皮の癌化に深く関与していると考えられた。

下顎正中裂患者の末梢血より DNA を抽出し、PCR-SSCP にて sonic hedgehog 遺伝子の変異を解析した。その結果、エクソン 1 領域の 279 番目の塩基 C の T への変異が明らかとなった。この変異はコドン 43 番目のアラニンのバリンへの置換を示唆した。

## 2. 研究の目的

**【目的】** コレステロールおよびその前駆物質 (C27 sterol) が *in vitro* において種々の機能性細胞の増殖・分化にどのような影響をもたらしているか、またその組成比率の、シグナル伝達におよぼす影響についてはほとんど解明されていない。したがって、骨および軟骨細胞を使ってコレステロール合成経路の動態変化を研究することは極めて意義深い。そこで本研究では、骨および軟骨細胞の増殖・分化過程におけるステロール類 (コレステロール合成経路における中間代謝物: C27 Sterols) が及ぼす影響について検討し、先天性コレステロール合成異常による多発奇形症候群および SHH-PTCH 系シグナル異常による顎・顔面奇形の病因メカニズムの解明と骨・軟骨疾患の診断および治療法の開発を目的として以下の研究を行った。

## 3. 研究の方法

マウス軟骨前駆細胞の初期および後期分化期におけるコレステロールおよびその前物質 (C27sterol) の影響を、軟骨細胞への多段階分化が再現可能なマウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用いて検討した。また、ATDC5 細胞に

種々の濃度のC27 sterolを添加し増殖・分化維持が可能となるC27sterol濃度を検討し、培養9、15、21、35日目にALP活性の定量およびトルイジンブルー染色を行い、骨・軟骨分化の程度を比較検討した。同様に培養を行った試料から各ステージのtotal RNAの抽出を行い、種々の軟骨分化マーカーの発現の差異、さらに、分化過程におけるC30ステロールであるラノステロールからC27ステロールであるコレステロールまでの代謝過程に関与する、C14デメチラーゼ、3-ケトリダクターゼ、C4デメチラーゼなどの発現変動について検討した。さらに、軟骨および骨分化に及ぼすSonic hedgehog (SHH), EGF, FGF-1, -2, wnt, insulin, transferrin, などの細胞増殖因子の細胞増殖および細胞分化に及ぼす影響を、無血清培養系を用いて検討した。また、各種増殖因子受容体の発現についてもウエスタンブロット法および定量PCR法を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) ATDC5 細胞の増殖・分化におよぼす C27 および C30 sterol の影響

軟骨細胞への多段階分化が再現可能なATDC5細胞を用いて、これら細胞に種々の濃度のC27 sterolを添加し、培養9、15、21、35日目にALP活性の定量およびトルイジンブルー染色を行い、骨・軟骨分化の程度を比較検討した。

ラノステロール(C30)およびコレステロール(C27)は細胞分化に影響を及ぼさなかったが、デスモステロール(C27)および7-ヒドロコレステロール(C27)は増殖を抑制し分化を促進することが明らかとなった。

C27 sterolを添加して35日間培養した細胞をさらに[2-<sup>14</sup>C] acetate存在下で培養し、不ケン化脂質を抽出し、ステロール合成能を検討することでメタボローム解析を行なった結果、デスモステロールおよび7-ヒドロコレステロールはコレステロール合成を抑制した。

軟骨分化マーカーとしてII型コラーゲン

およびX型コラーゲンの発現を検討した結果、デスモステロールおよび7-ヒドロコレステロールはこれら分化マーカーの発現を促進した。

##### 2) 分化過程における各種コレステロール合成酵素遺伝子の発現変動の検討

各分化過程の細胞よりmRNAを抽出し、定量PCR法にて、ラノステロールからコレステロールまでの代謝過程に関与する、C14デメチラーゼ、3-ケトリダクターゼ、C4デメチラーゼなどの発現変動について検討した結果、細胞分化誘導過程でこれら酵素遺伝子の発現は著しく低下した。

以上の結果から、コレステロールおよびその前駆物質を外来性に添加することで、マウス軟骨前駆細胞の増殖・分化に差異がみられることが明らかとなり、コレステロールおよびその前駆物質(C27 sterol)が*in vitro*において軟骨細胞の増殖・分化に重要な機能を有していることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

1. 坂上泰士, 福井康人, 伊藤翼, 山崎佐知子, 岡崎文彦, 木村直大, 竹末奈七子, 鍋島巧, 石田康隆, 浜名智昭, 魚健作, 岡本康正, 神田拓, 新谷智章, 吉岡幸男, 谷亮治, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治: 当科における口腔顎顔面骨折の臨床統計的検討: 広島大学歯学会雑誌, 43巻、2号、2011 (印刷中) (査読有) .

2. Mimura, S., Kimura, N., Okamoto, T., et al., Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol.* Feb 3., 2011 (印刷中) (査読有) .

3. Zhumadilov, K., Okamoto, T., Hoshi, M., et al., The Influence of The Lop Nor Nuclear Weapons Test Base to The Population of The Republic of Kazakhstan, *Radiation Measurements.* 46: 425-429, 2011 (査読有) .

4. Kobayashi, M., Huang, Y., Jin, C., Luo, Y., Okamoto, T., Wang, F., McKeehan, W.L., FGFR1 abrogates inhibitory effect of androgen receptor concurrent with induction of androgen-receptor variants in androgen receptor-negative prostate tumor epithelial cells. *Prostate*, doi: 10.1002/pros.21386., Mar 28, 2011 (印刷中) (査読有) .

5. Matsumoto, S., Okamoto, T., Kikuchi, A. et al., Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. *The EMBO Journal*, 29, 1192-1204, 2010 (査読有) .

6. Furue, KM., Tateyama, D., Okamoto, T., Sato, JD., et al., Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* Jul; 46(7): 573-576, 2010 (査読有) .

7. Sato, GH., Sato, JD., Okamoto, T., McKeehan, WL., Barnes, DW. Tissue culture: the unlimited potential. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, Jul; 46(7): 573-576, 2010 (査読有) .

8. 岡崎文彦, 虎谷茂昭, 小林雅史, 角健作, 岡本康正, 神田拓, 吉岡幸男, 谷亮治, 岡本哲治: 発音・嚥下障害を生じた巨大な口底部類皮嚢胞の一例: 広島大学歯学雑誌41巻、2号、154-159、2009 (査読有) .

9. Matsumoto, S., Okamoto, T., Kikuchi, A.,  $\beta$ -Catenin-independent Wnt signaling regulates cell migration, polarity, and morphogenesis, *Tissue Culture Research Communications*, Vol. 28: 117-128, 2009 (査読有) .

10. Zhumadilov K, Okamoto, T., Hoshi, M., et al., ESR dosimetry study on population of settlements nearby Ust-Kamenogorsk city, Kazakhstan., *Radiat Environ Biophys*, Nov: 48 (4): 419-425, 2009 (査読有) .

11. Zhumadilova, A., Hoshi, M., Okamoto, T., et al., High prevalence of cleft lip and palate deformities among the residents of the Semipalatinsk nuclear test site area in Kazakhstan. *Indian Journal of Radiation Research (IJRR)* Volume: 5, No.: 1-2, 2008 (査読有) .

12. Furue, MK., Na J., Jackson JP, Okamoto, T., et al., Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Sep9;105 (36) 13409-14, 2008 (査読有) .

13. Hayashi, Y., Furue, MK., Myoishi, Y., Okamoto, T., Review article: Chemically defined serum-free culture for mouse embryonic stem cells, *Tissue Culture Research Communications*, Vol. 27, No.3, 2008 (査読有) .

14. Abe, S., Kabashima, K., Sakabe, J., Shimauchi, T., Zhang, Y., Okamoto, T., Tokura, Y., Coincident two mutations and one single nucleotide polymorphism of the PTCH1 gene in a family with naeboid basal cell carcinoma syndrome. *Acta Derm Venereol*, 88(6) 635-636, 2008 (査読有) .

[学会発表] (計2件)

1. Okamoto, T. Neuroectodermal Differentiation from embryonic stem cells in *Xenopus*, *Mouse*, and *Human* in serum-free defined culture, The 32nd Annual Scientific

Meeting of Association for Dental Sciences of the Republic of China (ADS-ROC), Nov. 28, 2009, Kaohsiung, Taiwan.

2. 岡本哲治, 口腔癌に対する細胞治療: 基礎研究から臨床研究へ、台湾歯科医学会総会招待講演、2008年11月30日、台北市

[図書] (計1件)

白砂兼光、古郷幹彦、他、医歯薬出版、口腔外科学、第3版、2010年3月10日発行 総ページ数 838.

6. 研究組織

(1) 研究代表者: 角 健作 (SUMI KEN-SAKU)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 30403629

(2) 研究分担者

福井 康人 (FUKUI YASUTO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 90363085

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00169153

(3) 連携研究者

( )