

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：11501  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22592252  
 研究課題名（和文） 耳介軟骨細胞を利用した再生軟骨による顎関節再建に向けた戦略的研究  
 研究課題名（英文） The development of temporomandibular joint reconstruction using auricular cartilage cells.

### 研究代表者

飯野 光喜 (Iino Mitsuyoshi)  
 山形大学・医学部・教授  
 研究者番号：50212717

### 研究成果の概要（和文）：

ラットの耳介軟骨細胞およびATDC5細胞には脂質性二次メッセンジャー代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）アイソザイムのうちDGK $\zeta$ が高い発現を認めた。ATDC5細胞の分化過程におけるDGK $\zeta$ の mRNA およびタンパク発現は分化の進行に従って減少した。また、ラット耳介軟骨細胞の脱分化過程におけるDGK $\zeta$ の発現は増加することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In diacylglycerol kinase (DGK) isozymes, DGK $\zeta$  is substantially expressed in rat auricular cartilage cells and ATDC5 cells. DGK $\zeta$  expression in rat auricular cartilage cells and ATDC5 cells were temporarily examined using Western blot and RT-PCR. Results indicated that DGK $\zeta$  expression of mRNA level and protein level decreased with differentiation of ATDC5 cells. They increased with dedifferentiation of rat auricular cartilage cells.

### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：口腔顎顔面再建外科学

## 1. 研究開始当初の背景

近年顎骨再生医療（再建治療）は長足の進歩を遂げ、以前は困難とされていた下顎においてかなり大きな骨欠損でも本来の形態に近似した骨を再建することが可能となっている。しかし、関節軟骨を再生する手法が確立されていないため、顎関節を含む下顎頭欠損例の再建治療は極めて困難である。つまり、顎関節の再建方法を確立すれば、骨の再建と組み合わせることによって下顎骨全体を再建することも夢ではなくなる。関節軟骨の再生医療は整形外科分野を中心に実際の臨床応用が行われているが、その適応範囲は関節軟骨の小欠損に限られており、現時点では広範囲の軟骨欠損を再生可能なレベルには達していない。また、現在行われている顎関節疾患の治療法にもいくつかの問題点が指摘される。これらの問題を解決するためには顎関節の機能を再現できる顎関節の再生医療の実現が必要である。ところで我々は脂質性二次メッセンジャー代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）が細胞内の様々な現象に関与することに着目した。我々はすでにいくつかの組織において細胞の増殖と分化に DGK が関与していることを確認している。軟骨細胞における DGK の機能を理解し、その発現を制御することにより、より効率的で安全な関節軟骨の再生医療が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、耳介軟骨細胞が軟骨としての性質を保ちながら効率よく細胞を増殖しうる細胞培養法と、脱分化により部分的に失われた軟骨形態を回復する再分化誘導法の開発を試みる。加えて、科学的根拠に裏付けられた軟骨再生医療の実現のためには、軟骨生物学の基礎的理解も必要である。細胞内におけるイノシトールリン脂質代謝回転においてジアシ

ルグリセロールを制御し、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化調節を担う DGK の機能解析を行い、軟骨再生医療への有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ラット耳介軟骨細胞および ATDC5 細胞における DGK アイソザイムの発現解析

ラットマウスの耳介軟骨細胞は組織を細切後、コラゲナーゼタイプ 2 (Worthington) にて処理し、細胞を分取した。細胞懸濁液はナイロンメッシュ (BD Biosciences) で濾過し、37°C、CO<sub>2</sub> 5% に設定したインキュベータで 10% fetal bovine serum (JRSscientific, Inc.)、penicillin (100 units/ml) - streptomycin (100 μg/ml; Wako) を含有する DMEM/Ham' s F12 medium (Wako) により培養を行った。ATDC5 細胞も同様の条件で培養を行った。コンフルエントに達した段階で RNA を抽出し、RT-PCR 法で DGK アイソザイムの mRNA 発現を確認した。

(2) ATDC5 細胞の分化過程における DGK $\zeta$  の発現解析

ATDC5 細胞を Insulin-transferrin-Selenium (ITS; GIBCO) を添加した分化誘導培地を用いて 28 日間培養を行った。分化誘導開始後 1 日、7 日、14 日、21 日および 28 日目に RNA を抽出し、RT-PCR 法で DGK $\zeta$  mRNA の経時的な変化を解析した。また、同様の方法で培養を行った ATDC5 細胞からタンパク抽出を行い、Western blot 法で DGK $\zeta$  タンパクの発現変化を解析した。分化の指標として、Type I collagen, Type II collagen, aggrecan の mRNA の発現解析およびアルシアンブルー染色を行った。

(3) ラット 耳介軟骨細胞の脱分化過程における DGK $\zeta$  の発現解析

(1) と同様にして得たラット耳介軟骨細胞の単層培養を行い、コンフルエントに達するまで培養し、その後 1:4 の比で継代を繰り返す。

して脱分化の過程を観察した。継代ごとにタンパクを抽出し、Western blot 法で DGK $\zeta$  タンパクの発現変化を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) ラット耳介軟骨細胞および ATDC5 細胞における DGK アイソザイムの発現解析

ラット耳介軟骨細胞および ATDC5 細胞には DGK アイソザイムのうち、DGK $\zeta$  の発現が最も高く、その他  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\theta$  の発現が認められた。

(2) ATDC5 細胞の分化過程における DGK $\zeta$  の発現解析

ATDC5 細胞をインスリン添加培地で 28 日間培養し、DGK $\zeta$  を RT-PCR で検討した結果、DGK $\zeta$  の mRNA 発現は経時的に減少することが明らかとなった。さらに Western Blot で検討した結果 DGK $\zeta$  タンパクは分化刺激後 7 日目に最も高い発現を認め、その後減少することが明らかとなった。

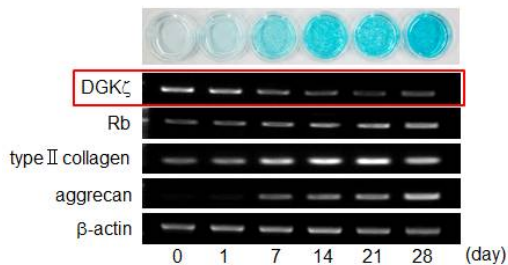


図 1 ATDC5 の軟骨分化過程における DGK $\zeta$  mRNA の発現

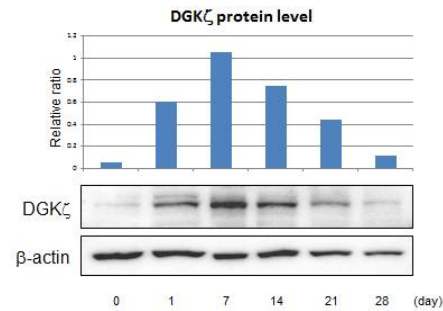


図 2 ATDC5 の軟骨分化過程における DGK $\zeta$  タンパクの発現

(3) ラット 耳介軟骨細胞の脱分化過程における DGK $\zeta$  の発現解析

ラット耳介軟骨細胞を継代ごとにタンパクを抽出し、Western blot 法で解析した結果、DGK $\zeta$  タンパクは次第に増加した。この時 Type I collagen の mRNA 発現は増加し、Type II collagen、aggrecan の mRNA 発現は減少したことからラット耳介軟骨細胞が脱分化する過程において DGK $\zeta$  タンパクは増加することが明らかとなった。

以上の結果より、DGK $\zeta$  が耳介軟骨細胞の分化を制御している可能性が示唆された。

#### 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 3 件)

① Tanaka T, Okada M, Hozumi Y, Tachibana K, Kitanaka C, Hamamoto Y, Martelli AM, Topham MK, Iino M, Goto K. Cytoplasmic localization of DGK $\zeta$  exerts a protective effect against p53-mediated cytotoxicity. J Cell Sci. Apr 19, 2013 (in press) 査読有り

② Tanaka T, Iino M, Goto K. Knockdown of Sec6 improves cell-cell adhesion by

increasing  $\alpha$ -E-catenin in oral cancer cells. FEBS Lett. 23;586(6):924-33, 2012  
査読有り

③飯野光喜 顎裂に対する自家腸骨海綿骨細片移植術—これまでの臨床研究の紹介—  
東北大学歯学雑誌 30(1):11-20, 2011 査読無し

[学会発表] (計3件)

①土谷理恵子、飯野光喜、後藤薫 間葉系細胞分化調節における DGK $\zeta$  と Retinoblastoma 蛋白の役割 日本解剖学会第58回東北・北海道連合支部学術集会 2012年9月22-23日 山形 山形大学医学部

②土谷理恵子、飯野光喜、後藤薫、DGK $\zeta$  と Retinoblastoma 蛋白の軟骨細胞分化調節における役割 第117回解剖学会総会・全国学術集会 2012年3月26-28日 甲府 山梨大学甲府キャンパス

③土谷理恵子、後藤薫、飯野光喜、DGK $\zeta$  の軟骨細胞分化調節における役割 第33回東北骨代謝研究会 2012年2月4日 仙台 江陽グランドホテル

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯野 光喜 (Iino Mitsuyoshi)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号：50212717

### (2) 研究分担者

森 良之 (Mori Yoshiyuki)  
東京大学・医学部付属病院・准教授  
研究者番号：70251296

濱本 宜興 (Hamamoto Yoshioki)  
山形大学・医学部・准教授  
研究者番号：40231526  
(H22→H23：研究協力者)

### (3) 連携研究者

高戸 毅 (Takato Tsuyoshi)  
東京大学・医学部付属病院・教授  
研究者番号：90171454

小笠原 徹 (Ogasawara Toru)  
東京大学・医学部付属病院・講師  
研究者番号：20359623