

吉澤 祐 論文内容の要旨

主論文

Early gene and protein expression associated with osteoblast differentiation in response to fish collagen peptides powder

(フィッシュコラーゲンを骨芽細胞に加えた際の、骨芽細胞の分化に対する
影響を遺伝子、タンパク発現において検討を行った)

山田 志津香、吉澤 祐、川久保 敦、池田 毅、柳口 嘉治郎、林 善彦

The first two authors contributed equally to this work.

Dental Materials Journal 2013; 32(2): 233-240

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：林 善彦教授)

緒 言

コラーゲンは現在、組織工学や再生医療において広く利用されている生体材料である。口蹄疫や牛海綿状脳症などの人畜共通感染症の問題から、近年では魚類の骨、皮、鱗から抽出したコラーゲンが健康食品、食品および、化粧品の添加剤として利用されている。我々の研究室では、このフィッシュコラーゲンを再生医療の際の細胞の足場材としての応用を考えている。しかし、フィッシュコラーゲンが細胞機能へ影響を与えるといった EBM はほとんど存在していない。そこで、本研究では、フィッシュコラーゲンペプチド（以下、FCP と表記）のヒト骨肉腫由来骨芽細胞（以下、NOS-1 と表記）に対する影響を、細胞の ALP 活性、細胞増殖、骨分化関連遺伝子発現、タンパク発現に対して検討を加えた。

材料及び方法

本実験に用いた FCP は焼津水産化学工業（静岡）から供与された。FCP のアミノ酸自体が NOS-1 細胞に与える影響を検討するため、比較としてカゼインペプチド（以下 CP）を対象アミノ酸とした。FCP の添加する際の至適濃度は、NOS-1 細胞に作用させた際に ALP 活性が最も高く示した濃度である 0.1%とした。FCP の NOS-1 細胞への影響に関して、細胞増殖能、さらに遺伝子発現、タンパク発現に関しては、それぞれリアルタイム PCR、ウェスタンブロット法を

用いて解析を行った。また、FCPの石灰化に与える影響については、FCPを0.1%の濃度で加えた石灰化用 α -MEM培地(β -グリセロリン酸を添加)で細胞を7、14、21日間培養ののち、Von Kossa染色にて評価を行った。

結果

ALP活性は、0.1%FCPを加えた実験群において、コントロール群、CPを加えた群と比較して高い活性を示した。細胞増殖においても、1、3、5、7日目においてFCP添加群は有意に高い増殖効果を示した。また、リアルタイムPCRの結果では、細胞接着、分化に関わるマーカー(osteopontin、osteocalcin、integrin β 3、BMP-2)の発現上昇を3日後、7日後の時点で認めた。ウェスタンブロット解析においても、遺伝子発現と同様の結果が認められた。また、Von Kossa染色の結果では、コントロール群に比べて、FCP群では観察期間すべてにわたり対象群と比べて、染色陽性結節の占める割合が大きかった。

考察

今回の実験からFCP添加群は、コントロール群との比較において、NOS-1細胞のALP活性および細胞増殖の促進、分化マーカー発現の上昇が認められ、骨芽細胞の初期培養時に効果があることが示された。また、FCPを加えた群の長期培養時においても、骨芽細胞の石灰化促進作用のあることが明らかとなった。以上のことから、FCPは骨芽細胞の培養初期段階において、骨芽細胞の機能を亢進させることが可能である。今回の研究から、FCPは今後の臨床応用に際して骨欠損部位に用いた場合、骨の再生にも期待できる可能性がある。