

願能 智子論文内容の要旨

主 論 文

Early gene expression analyzed by cDNA microarray and real-time PCR in osteoblasts cultured with chitosan monomer

(cDNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR によって解析された、キトサンモノマー添加による培養骨芽細胞の初期遺伝子発現)

Tomoko Ganno, Shizuka Yamada, Naoko Ohara, Tsunenori Matsunaga, Kajiro Yanagiguchi, Takeshi Ikeda, Hidetaka Ishizaki, Yoshihiko Hayashi

Journal of Biomedical Materials Research 82A: 188-194, 2007

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻齶蝕学分野

(主任指導教員：林 善彦)

【緒 言】

キトサンは多様な生物活性を有する。硬組織形成誘導能についても知られているが、細胞調節機構について遺伝子レベルでの研究はほとんど行われていない。我々は低濃度キトサンモノマーを添加した培養骨芽細胞の遺伝子発現について、cDNA マイクロアレイ解析を行い、MAPKK3、インターフェロン- γ 等、細胞シグナル伝達系に関与するものを含む 10 個の遺伝子で 2.0 以上の発現の増強を確認した。本研究では、cDNA マイクロアレイで差が認められた遺伝子を含めたシグナル伝達系、特に MAPK 経路の遺伝子群についてリアルタイム PCR 法にて検討を加えたので報告する。

【実験方法】

本実験では、モノマータイプのキトサン(コーヨーグルコサミン:分子量;215.6Da、脱アセチル化度;100%)を用いた。これを 0.1%(v/v)酢酸溶液に溶解、5%(w/v)溶液を作成し、pH7.4 に調整後、0.2 μ m フィルターで濾過滅菌を行った。ヒト骨肉腫由来骨芽細胞(NOS-1)を 100mmdish に 1×10^6 cells 播種し、キトサン濃度が 0.005%となるように添加した α -MEM 培地で、5%CO₂、37°Cにて培養した。コントロール群は、pH7.4 に調整した 0.1% (v/v) 酢酸溶液を添加した α -MEM 培地で培養した。培養 3 日後細胞から Trizol[®]試薬で mRNA を抽出し、SUPERScript[™] First-Strand Synthesis

System for RT-PCR キット (Invitrogen) にて cDNA を合成した。その後、MAPK 経路の遺伝子群に対する PCR プライマーを設計し、SYBR Green I を使ったリアルタイム PCR を行った。結果は GAPDH と対比して定量解析した。

【結果と考察】

キトサン添加群では、cDNA マイクロアレイで MAPKK3 の発現がリアルタイム PCR でも 2.6 倍に上昇していた。また、その上流経路遺伝子である MLK3、Rac1、Shc1 の発現も亢進していた。キトサンモノマーは Shc1/Rac1/MLK3/MAPKK3 の経路によるシグナル伝達系を介し作用していると推測される (図 1)。また、増殖・分化を誘導する MAPK7、MAPKK1、MAPK1 などの遺伝子群についても発現の増強を認めた。すでに、キトサン添加による骨芽細胞の増殖やアルカリフォスファターゼ活性の上昇を確認しており、今回の結果と合わせてキトサンモノマーのシグナル伝達経路への関与の可能性が明らかとなった。

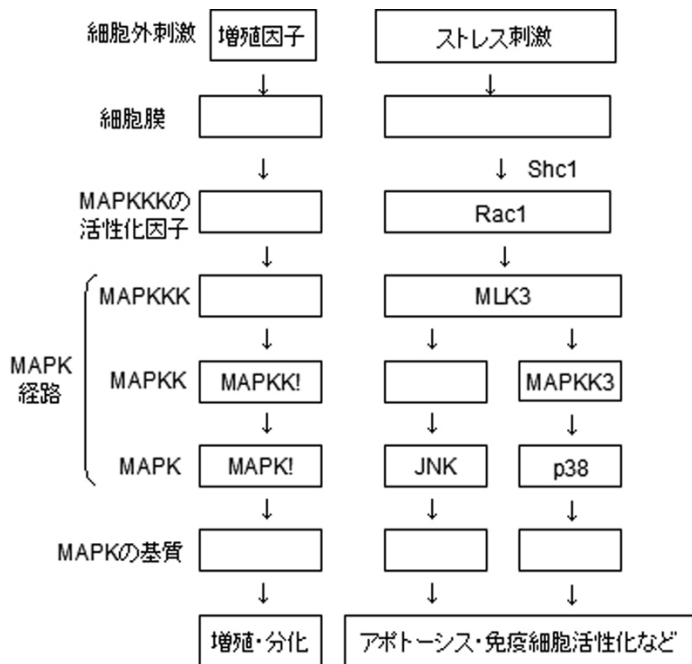


Fig. 1 MAPキナーゼ経路