

A13

ヒト骨芽細胞の細胞増殖に関連したⅢ型コラーゲン遺伝子の発現

○高見澤純治^{1,2}, 前畑洋次郎¹, 小澤重幸^{1,3}, 岡田鈴人^{1,2}, 加藤靖正¹, 久保田英朗^{3,4}, 佐藤貞雄^{2,4}, 畑 隆一郎^{1,4}

(神奈川歯科大学口腔生化学講座¹, 成長発達歯科学講座², 顎顔面外科学講座³, 顎機能先端研⁴)

【目的】ヒト骨芽細胞の培養系にコラーゲン合成阻害剤を共存させるとアスコルビン酸による細胞増殖および分化促進作用が阻害される事から (Takamizawa et al, Cell Biol. Int. in press), 増殖分化に関与するコラーゲン分子種を検索した。【対象ならび方法】ヒト骨芽細胞様細胞 MG-63 を用い、アスコルビン酸としては活性持続型ビタミン C (Asc2-P) を用いた。Asc2-P による細胞増殖促進作用が認められない添加 24 時間後と促進作用が認められる 4 日後に誘導される遺伝子を解析するために cDNA マイクロアレイ (TaKaRa ヒトキャンサーチップ) を用いた。また、変化した遺伝子の発現量を経時的にノーザンプロット法にて定量評価した。さらにコラーゲン分子種の合成量の変化は放射線ラベルした後、SDS-PAGE にて分離測定した。また、培養液中の血清とは別の増殖因子として EGF (上皮増殖因子) を作用させ細胞増殖促進を誘導させた上で遺伝子の発現変化をノーザンプロット法にて解析した。【結果】①cDNA マイクロアレイの解析結果から Asc2-P の細胞増殖促進作用時に 2 倍以上に発現が促進された遺伝子は COL3A1 のみであった。②Asc2-P 非添加でも細胞の増殖と共に COL3A1 の発現量が上昇するが、Asc2-P を添加すると COL3A1 の発現量およびⅢ型コラーゲンの合成量が 2 倍以上に促進された。③EGF による細胞増殖促進時にも COL3A1 の発現が有意に促進していた。

【結論】ヒト骨芽細胞の増殖に対しⅢ型コラーゲンの発現が密接な関係があることが明らかになった。骨折の治癒過程の初期や、頭蓋骨骨縫合部に拡大矯正力を加えた際にⅢ型コラーゲンの発現が促進される事から、骨質にわずかに存在しているⅢ型コラーゲンは骨形成時および再生時の骨芽細胞の増殖に必須である事が示された。

Type III collagen gene expression in the proliferation phase of cultured human osteoblasts

Shinji Takamizawa^{1,2}, Yojiro Maehata¹, Shigeyuki Ozawa^{1,3}, Suzuhito Okada^{1,2}, Yasumasa Kato¹, Eiro Kubota^{3,4}, Sadao Sato^{2,4}, and Ryu-Ichiro Hata^{1,4}

(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, ²Department of Craniofacial Growth and Development Dentistry, ³Department of Oral & Maxillofacial Surgery, ⁴Research Center of Advanced Technology for Craniomandibular Function, Kanagawa Dental College, Yokosuka, Japan)

A14

Ⅰ型コラーゲングルの物性と繭糸の形状を改善した新しい培養担体の開発と強度のある結合組織の再構築

○竹澤俊明¹, 尾崎克之¹, 高林千幸², 二谷綾^{1,3}, 下岡正志^{1,3}

(独立行政法人農業生物資源研究所 動物細胞機能研究チーム¹, 生活資源開発研究チーム², 旭テクノグラス (株)³)

【目的】組織工学の技術が発展し様々な細胞の足場 (scaffold) が開発されてきたが、加重や加圧に十分に耐えられる靱帯や腱などの結合組織を再構築する決定的な方法は開発されていない。Ⅰ型コラーゲングルは線維芽細胞の良好な足場になることが、一方、繭糸は古くより手術用縫合糸として使用され優れた強度と安全性を有していることが知られている。しかし、十分に強度のある結合組織を再構築するためには、Ⅰ型コラーゲングルには強度の向上が、また繭糸には組織の鑄型となるような形状加工が必要と考えられた。そこで、これらを改善した新しい培養担体を開発し、さらに線維芽細胞を三次元培養することで強度のある結合組織の再構築を検討した。

【対象ならびに方法】Ⅰ型コラーゲングルの物性改変は、卵白のガラス化技術 (乾燥により自由水と結合水を除去して透明性のある固い物質へ変換する) を応用した後に再水和した。また、繭糸の平面形状への加工は、水分を付与した後に加熱プレスすることで繭糸構成蛋白質のセリシンを再膠着させて平面絹を作製した。平面絹を包埋したⅠ型コラーゲングルにガラス化技術を応用して新しい培養担体を開発した。この培養担体の両面にヒト真皮由来線維芽細胞を三次元培養することで結合組織を再構築して、その経時的な組織形態と強度特性を解析した。【結果】Ⅰ型コラーゲングルは、ガラス化技術を応用して再水和することで透明性と強度を向上したゲル薄膜へ物性を改変できた。平面絹の引っ張り力と押しに耐える強度は綿製ガーゼの約 5 倍であった。線維芽細胞は 2-3 週間の培養で、平面絹含有コラーゲングル薄膜担体の周囲に厚み 0.5 mm 以上の結合組織様の再構築体を形成した。再構築した結合組織は、平面絹の強度を維持していた。【結論】Ⅰ型コラーゲングルの物性と繭糸の形状を改善した新しい培養担体を開発して、強度のある結合組織を再構築する技術を開発した。

Development of a novel scaffold improving both the physical property of type-I collagen gel and the shape of silk filaments and reconstruction of a hard connective tissue on it

Toshiaki Takezawa,¹ Katsuyuki Ozaki,¹ Chiyuki Takabayashi,² Aya Nitani,^{1,3} and Tadashi Shimo-Oka^{1,3}

(¹Laboratory of Animal Cell Biology, ²Laboratory of New Silk Materials, National Institute of Agrobiological Sciences, ³Asahi Techno Glass Co)