

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791389  
 研究課題名 (和文) 天然資源由来の有機機能性素材による骨芽細胞の増殖・分化に関する遺伝子学的解析  
 研究課題名 (英文) Gene analysis on the osteoblast proliferation and differentiation by culturing with biomaterial derived from natural resources.  
 研究代表者  
 山田 志津香 (YAMADA SHIZUKA)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：00363458

研究成果の概要 (和文) : アルカリフォスファターゼ活性が最も上昇した濃度(0.1%)のフィッシュコラーゲン(FC)添加培地でヒト骨芽細胞を培養した。細胞数計測による細胞増殖、リアルタイム PCR とウェスタンブロット分析による石灰化関連遺伝子ならびに蛋白発現を検討した。また、長期培養における FC の影響を検討する為、von Kossa 染色を行った。その結果、FC 群は対照群と比べて細胞増殖や石灰化関連遺伝子ならびに蛋白の発現が増強しており、長期培養においても石灰化物の増加が確認された。

研究成果の概要 (英文) : A human osteoblast was cultured with  $\alpha$ -MEM containing fish collagen (FC) that was total concentration of 0.1%(w/v). Osteoblast proliferation by cell count and the expression of mineralization-related genes and proteins with real-time PCR and western blot analyses were investigated. Furthermore, von Kossa staining was performed to study the effect of FC on the osteoblast at the prolonged culture. The results revealed that cell proliferation and mineralization-related genes and proteins increased in the FC group compared with control group. After the incubation of prolonged period, mineralized nodule of FC group augmented than that of control group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
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・保存治療系歯学

キーワード：フィッシュコラーゲン、骨芽細胞、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット分析、von Kossa 法

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会に伴い、生活習慣病の激増

とならび、寝たきりの主な原因となる骨折の予防は、QOL、ADL を高める上で重要視されている。歯科領域においても、歯根嚢胞摘

出術後や抜歯後の治癒は若年者と比較して、高齢者では明らかに治癒の遅いケースが多い。天然有機素材の一つであるフィッシュコラーゲンは、魚類の鱗や皮膚、骨、軟骨から抽出、精製され、キチン質も数%含有する。コラーゲンは、ヒトにおいて体内のタンパク質のうち約30%を占めるといわれており、現在、化粧品、飲料水を含む生活用品、加工食品、健康食品など広い範囲に利用されている。特に皮膚科領域においては、コラーゲンの合成促進効果や皮膚角質層の代謝回転促進効果について多くの調査がなされており、その優位性が実証されている。しかし、これらの研究にはいずれも動物性コラーゲンが使用されている。1990年代にイギリスで猛威をふるい、その後アメリカや我が国でも発生した牛海綿状脳症(BSE)により、供給源が動物性のもは敬遠される傾向にある。それに対して、フィッシュコラーゲンはBSEの心配がなく、加工技術も向上しており低分子化が可能なことから、近年、その利用が注目されている。骨に対するフィッシュコラーゲンの影響に関する研究においては、フィッシュコラーゲンシート上で培養された骨芽細胞の増殖が促進され、生体親和性を有することが報告されている。更に、フィッシュコラーゲンは、化学薬品と異なり、魚類を原料とした素材であるため、高齢者への身体的負担も少なく、また高い産出量で資源枯渇の可能性が低く、かつ比較的容易に抽出できることから、安価で安定した供給が可能であるため、骨再生促進薬として最適であるといえる。また、食品産業では廃棄される魚類の鱗、皮膚、骨、軟骨が供給源であるため、天然資源の有効利用という点からも、その利用の意義は大きいと考える。

## 2. 研究の目的

現在、研究代表者が所属する教室で培養しているヒト株化骨芽細胞を用いて、培地にフィッシュコラーゲン溶液を添加し、免疫細胞化学的および形態学的に、フィッシュコラーゲンの骨芽細胞に対する親和性・分化促進を確認することによって、*in vitro*におけるフィッシュコラーゲンの生体材料としての組織工学的有用性を科学的に証明する。

## 3. 研究の方法

### (1) フィッシュコラーゲン溶液の調整

今回の実験には、焼津水産化学工業社製のフィッシュコラーゲン(FC)粉末を用いた。この粉末の分子量は500~10,000 Daであり、主として3,000 Daのものからなっている。これを、 $\alpha$ -MEMに溶解し、5%(w/v)のFC溶

液を作製した。溶解後、孔サイズ0.2  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌を行った。

### (2) 骨芽細胞培養

本実験には、研究代表者の所属する教室に現有するヒト骨肉腫由来骨芽細胞(NOS-1細胞)を用いた。

NOS-1細胞を60mm培養皿に $2 \times 10^5$  cells播種し、10%FBS添加 $\alpha$ -MEMで37°C、5% CO<sub>2</sub>下にて培養を行った。培地は3日おきに交換した。

### (3) アルカリフォスファターゼ活性分析

FCの至適濃度を決定するために、総濃度が0.0005、0.005、0.05、0.1、0.5% (w/v)となるようにFC溶液を培地に添加した後、上述と同条件で培養を行った。FCを添加しない培地で培養したものをコントロール群とした。培養3日目にNOS-1細胞を回収し、*p*-ニトロフェニルリン酸を基質としてアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を、micro-Lowry法を用いて総蛋白質濃度を測定した。

測定結果は、one-way ANOVAとFisherのPLSDテストを用いて統計学的分析を行った。

### (4) 細胞増殖試験

前述のALP活性の最も高かった至適濃度でNOS-1細胞を上述と同条件で培養後、1、3、5、7日目に血球計算盤を用いて細胞数を計測した。測定結果は、student's *t*-testを用いて統計学的分析を行った。

### (5) リアルタイムPCR分析とウェスタンブロット分析

至適濃度のFCを添加した培地で上述と同条件で培養を行い、3日目と7日目にリアルタイムPCR装置で石灰化関連遺伝子であるオステオカルシン(OC)、オステオポンチン(OP)、BMP-2、インテグリン $\beta$ 3(ITG)のmRNA発現を、ウェスタンブロット法で上記の4種類の蛋白の発現を調査した。ウェスタンブロット分析では、各蛋白質のバンドが、Scion Image softwareを用いて画像解析された。そして、コントロール群に対するFC群における各蛋白質の発現比がバンドの濃度から定量化された。

### (6) von Kossa 染色

NOS-1細胞を35mm培養皿に $2 \times 10^5$  cells播種して $\alpha$ -MEM培地にて培養後、コンフルエントになった1週間後に、5mM  $\beta$ -グリセリン酸ナトリウムとFCを添加した培地で7、14、21日間培養した。その後、通法に従って、von Kossa染色を行い、石灰化物の沈着状況を調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1)ALP 活性試験

培養 3 日目の ALP 活性は、コントロール、0.0005%、0.005%、0.05%、0.1%、0.5% FC 群でそれぞれ、 $2.148 \pm 0.062$ 、 $2.183 \pm 0.082$ 、 $2.262 \pm 0.051$ 、 $2.155 \pm 0.008$ 、 $3.379 \pm 0.037$ 、 $2.294 \pm 0.039$  (平均 $\pm$ 標準誤差)  $\mu\text{mol pNPP/mg protein/min}$  (n=3)であった。0.1%FC 群の ALP 活性が他群と比較して統計学的に有意に高かった( $P < 0.05$ )。よって、0.1%を FC の至適濃度と決定した。

##### (2)細胞増殖試験

図 1 に培養 1、3、5、7 日目の細胞数の計測結果を示す。(■: FC 群、▲: コントロール群)

コントロール群の細胞数は、培養 1、3、5、7 日目でそれぞれ、 $(1.77 \pm 0.04) \times 10^5$ 、 $(4.02 \pm 0.05) \times 10^5$ 、 $(6.54 \pm 0.05) \times 10^5$ 、 $(1.06 \pm 0.01) \times 10^6$  cellsであった。一方、FC群の細胞数は、培養 1、3、5、7 日目でそれぞれ、 $(2.02 \pm 0.05) \times 10^5$ 、 $(5.09 \pm 0.09) \times 10^5$ 、 $(7.40 \pm 0.10) \times 10^5$ 、 $(1.14 \pm 0.01) \times 10^6$  cells (n=3)であった(平均 $\pm$ 標準誤差)。

培養期間中、FC 群はコントロール群と比較して統計学的に有意に細胞数が増加していた。

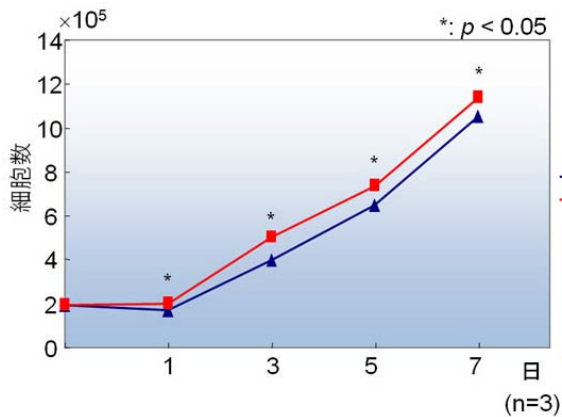


図 1 細胞増殖試験結果

##### (3)リアルタイム PCR 分析

4 種類の石灰化関連遺伝子における FC 群のコントロール群との発現比を表 1 に示す。培養 3 日目には OC、OP、BMP-2、ITG ともにコントロール群よりも高い発現を認めた。7 日目には OC と BMP-2 の発現が低下したが、OP と ITG の発現は依然として高かった。

表 1 リアルタイム PCR 分析結果

Gene name	Ratio (3 days)	Ratio (7 days)
Osteocalcin	3.7	1.0
Osteopontin	1.3	2.1
BMP-2	3.4	1.0
Integrin $\beta$ 3	2.2	1.9

##### (4)ウェスタンブロット分析

4 種類の石灰化関連蛋白における FC 群のコントロール群との発現比を表 2 に示す。培養 3 日目には、上述の 4 種類の蛋白は FC 群においてコントロール群より高い発現を認めた。7 日目には OC、OP、BMP-2 の発現は低下したが、ITG は 3 日目と変わらない発現がみられた。これは mRNA の発現とほぼ同様の傾向がみられた。培養 3 日目に発現の高かった OC および BMP-2 の発現が 7 日目に低下した理由として、過剰に分泌された蛋白質がオートクリン的にネガティブフィードバック機構を活性化させた可能性が考えられる。

表 2 ウェスタンブロット分析結果

Protein name	Ratio <sup>a</sup> (3 days)	Ratio <sup>a</sup> (7 days)
Osteocalcin	3.3	1.3
Osteopontin	1.8	1.1
BMP-2	2.7	0.7
Integrin $\beta$ 3	1.5	1.5

##### (5) von Kossa 染色

培養 7、14、21 日目の von Kossa 染色結果を図 2 に示す。白抜き矢印は石灰化粒もしくは石灰化塊を示す。左列がコントロール群、右列が FC 群であり、(A)が培養 7 日目、(B)が 14 日目、(C)が 21 日目の結果である。培養 7 日目では、コントロール群の石灰化粒が点在していたのと比較して、FC 群では、やや大きい石灰化物が認められた。

14 日目では、コントロール群、FC 群ともに 7 日目より石灰化物の沈着は増大していた。コントロール群では、小さな石灰化物が散在していたのと対照的に、FC 群ではやや大きな石灰化塊が認められた。

21 日目では、コントロール群、FC 群ともに経時的に石灰化塊が増大していた。しかし、コントロール群と比較して、FC 群の方が大きな石灰化塊が点在していた。

以上の結果から、魚の鱗、皮ならびに骨から精製されたコラーゲンはウシやラット由来のコラーゲンと同様に、ヒト骨芽細胞の増殖や分化を促進する効果を有する天然機能性素材であることが示唆された。

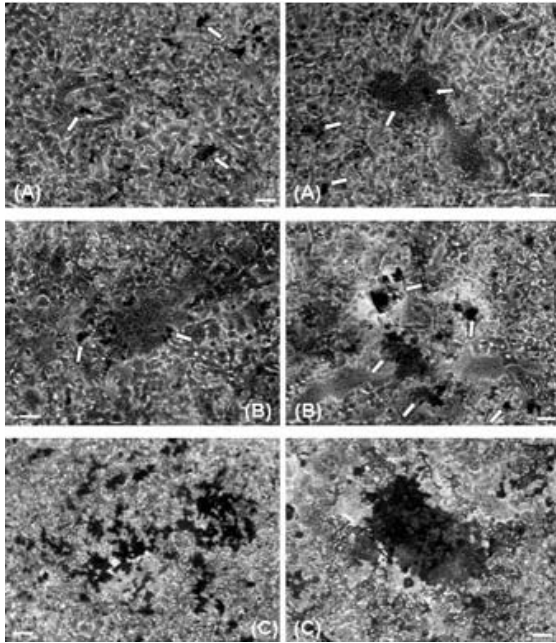


図2 NOS-1細胞の von Kossa 染色結果

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

#### 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0件)

[学会発表] (計2件)

- ① 山田 志津香, 池田 毅, 柳口 嘉治郎, 林 善彦. フィッシュコラーゲンペプチドのヒト骨芽細胞増殖・分化に及ぼす影響、第128回日本歯科保存学会春季学術大会、2008年6月6日、朱鷺メッセ(新潟)
- ② 山田 志津香, 池田 毅, 林 善彦. フィッシュコラーゲンペプチドによるヒト骨芽細胞における石灰化の促進作用、第131回日本歯科保存学会秋季学術大会、2009年10月30日、仙台国際センター(宮城)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山田 志津香 (YAMADA SHIZUKA)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：00363458

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：