

弾性組織からエラスチンおよび微細線維の抽出法の開発

敦賀 英知 [北海道医療大学歯学部口腔解剖学第1講座/助手]

背景・目的

弾性組織は、血管や肺などに存在し、組織に弾性を与える役割を担っている。その弾性組織は、エラスチンと微細線維により構成され、エラスチンが微細線維に沈着することにより成熟する。しかし、エラスチンと微細線維は可溶化させることが困難であったため、定性および定量分析の報告が少なかった。我々は、ヒト歯肉由来の線維芽細胞を用いた培養系の研究において、エラスチンの沈着を伴う弾性系線維の存在を微細構造学的に確認し報告している。本研究では、生化学的にエラスチンと微細線維(フィブリン)の抽出方法を開発確立することを目的とする。

内容・方法

I 細胞培養

ヒト歯肉線維芽細胞(HGF-15)および歯根膜線維芽細胞(HPLF-15)を10%仔ウシ血清を含むMEM培地で6週間培養した。

II 弾性系線維構成成分(微細線維とエラスチン)の発現

フィブリンとトロポエラスチンの遺伝子発現をRT-PCR法および培地中への分泌をWestern blot法で検出し、NIH imageにより定量化した。

III 培養細胞層から弾性系線維構成成分(微細線維とエラスチン)の抽出

(1) フィブリンの抽出

細胞外基質画分を5M Guanidine, 50mM Tris-HCl (pH 7.4)で抽出した。

(2) トロポエラスチンの抽出

細胞外基質画分を0.5M Ammonium sulfate (pH 7.0)で抽出し、Ammonium sulfate で塩析(40%)後、0.5M Ammonium sulfate (pH 5.5)で可溶化し、透析後、1.5倍量の1-propanol、更に2.5倍量の1-butanolを加えた後、乾燥させ、0.02N formic acidで可溶化し凍結乾燥した。

結果・成果

1. フィブリンおよびエラスチンの発現

RT-PCR法により、培養開始1週目からフィブリン-1、フィブリン-2およびトロポエラスチンの遺伝子の発現が認められた。HGF-15はフィブリン-1、フィブリン-2およびトロポエラスチンの発現が認められたが、HPLF-15はフィブリン-1、フィブリン-2のみの発現が認められ、トロポエラスチンの遺伝子発現は認められなかった。また、1週目以降6週目まで、

HPLF-15におけるトロポエラスチンの遺伝子の発現は認められなかった。

Western blot法により、培地中のトロポエラスチンは、HGF-15とHPLF-15ともに1週目以降検出されたが、3週目以降は、HGF-15はHPLF-15に比べて発現量を大きく増大させた。フィブリンの発現量は、HGF-15、HPLF-15ともに経時的に増加傾向を示し、4週目においては、HGF-15はHPLF-15に対してフィブリン-1が約14倍、フィブリン-2が約10倍の値(NIH Imageによる)を示した。

2. 培養細胞層から微細線維とエラスチンの抽出と検出

(1) 微細線維(フィブリン)

細胞層におけるフィブリンは、ともに4週目からWestern blotによる明瞭なバンド(350kD)として検出できた。HGF-15細胞層におけるフィブリン-1の検出は、培養4週目から認められ、NIH Imageによる比較では培養6週目にかけて、HGF-15細胞層に沈着するフィブリン-1の量は増加していることが示された。HPLF-15細胞層におけるフィブリン-1の検出は、HGF-15と同様の傾向を示し、4週目で検出され6週目にかけて増加傾向を示した。また、HGF-15細胞層におけるフィブリン-2の検出は、培養4週目で認められ6週目にかけて増加傾向を示した。HPLF-15細胞層におけるフィブリン-2は、4週目にはほとんど検出されず、6週目においてもその検出量はHGF-15の10分の1以下であった。

(2) トロポエラスチン

HGF-15細胞層におけるトロポエラスチン(68kD)は、2週目においてわずかに認められた。4週目では、トロポエラスチンの前駆体であるプロトロポエラスチン(77kD)が、また2週目と同様にトロポエラスチンが検出された。6週目では、プロトロポエラスチンおよびトロポエラスチンが明瞭なバンドとして認められた。

HPLF-15細胞層におけるトロポエラスチンは検出されなかった。このことは、RT-PCR法においてHPLF-15におけるトロポエラスチン遺伝子の発現が認められなかったことと一致する。

今後の展望

細胞層から抽出することが困難とされてきたエラスチンおよび微細線維(フィブリン)を含む画分の抽出法を確立することができたため、弾性系線維の生化学的分析を可能にした。エラスチンの沈着および架橋形成は、微細線維を形成したフィブリンを介して進行することが知られており、今回用いた培養系が、エラスチンが主にどの種類の微細線維に沈着するかを検索する有用な系であると考え、現在、エラスチンと微細線維の相関関係を分析中である。また、各種分解酵素の阻害剤を併用することにより、弾性系線維の分解を含む改造機構をも検索できるものと考えられる。