

アディポネクチン遺伝子導入による硬組織誘導

安田 善之 [北海道医療大学歯学部う蝕制御治療分野／講師]

背景・目的

高齢社会を迎え人々の医学に対する要求が「長生き」から「QOLの向上」へと変化した近年、種々の臓器や組織の再生をめざす再生医療が注目されている。特に骨、歯など硬組織の再生は人のQOLに関連する重要な課題である。このような背景のもと、生体親和性を示し短期間で強力に硬組織を誘導するような革新的な組織誘導材料および技術を開発することが本研究の目的である。われわれは、脂肪細胞に特異的に発現しているホルモンとして知られるアディポネクチンの細胞分化促進作用を詳細に解析し、さらにエレクトロポレーション法によりヒトアディポネクチン遺伝子導入を行うことで、硬組織再生のための臨床応用を最終目標とする。

内容・方法

実験には、ラット歯髄細胞およびマウス象牙芽細胞様細胞株(MDPG-23)を使用した。細胞増殖はCell Counting Kit-8(同仁化学)を、またALP活性はアルカリフォスファターゼ(ALP)キット(和光純薬)を用いて測定した。さらに、PCR法によりアディポネクチン、アディポネクチン受容体であるAR1およびAR2各遺伝子発現を検討した。ARのタンパク発現は特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。アリザリンレッド染色後に石灰化結節を観察した。ヒトアディポネクチン全長遺伝子は、ヒト脂肪細胞cDNAライブラリーよりPCR法により増幅し、動物細胞発現用ベクターにサブクローニングを行った。8週齢のラット頭蓋および足の標的領域を除毛し、ヒトアディポネクチン遺伝子DNAを注射し、電気パルス为数回1秒間隔で与えた。当該組織におけるアディポネクチンの発現を免疫組織染色にて確認した。

結果・成果

ラット歯髄細胞とMDPC-23におけるAR1、AR2およびアディポネクチンの遺伝子発現をRT-PCRにて調べた結果、いずれの発現も認められた。さらに、AR1のタンパク質発現に抗AR1特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により解析したところ、ポジティブコントロールであるマウス心臓抽出液サンプルと同様に約40 kDaの分子量を持つバンドが検出された。

AR1の存在が確認できたため、そのリガンドであるアディポネクチンの細胞に与える影響について検討を行った。10 μ g/ml アディポネクチン添加群では24時間後の細胞数は未処理のcontrol群に比べて有意に増加した。

しかし、より低濃度(0.1, 1 μ g/ml)のアディポネクチン処理群ではcontrol群との間に有意な差は認められなかった。

アディポネクチンは10 μ g/mlの濃度では、4日後においてMDPC-23のALP活性をcontrol群に比べて有意に亢進し、さらに処理2および4日後のオステオカルシンの発現を増強した。ところが、より低濃度(0.1, 1 μ g/ml)のアディポネクチン処理群ではALP活性においてcontrol群と違いは認められなかった。

MDPC-23による石灰化結節の形成をアリザリンレッド染色後に光学顕微鏡下にて観察したところ、明らかな石灰化結節の増大がみられた。さらに、石灰化物量をマルチプレートリーダーにて定量した。10 μ g/ml アディポネクチン添加群では8日後の石灰化量はcontrol群に比べて有意に増加したが、1 μ g/ml アディポネクチン添加群ではcontrol群との間に有意差はなかった。

アディポネクチンの歯髄細胞におけるDentin sialphosphoprotein(DSPP)発現への影響を検討したところ、10 μ g/ml 添加4日後ではDSPPの発現はコントロールと同様に認められなかったが、8日後ではDSPPの発現はコントロールに比べて著しく増加した。

ヒトアディポネクチン全長遺伝子は、ヒト脂肪細胞cDNAライブラリーよりPCR法により増幅し、動物細胞発現用ベクターにサブクローニングを行った。DNAシーケンスにより変異や欠損は認められなかった。8週齢のラット頭蓋および足の標的領域の除毛し、ヒトアディポネクチン遺伝子DNA(100 μ g)を注射した後、電気パルスを与え、当該組織におけるアディポネクチンの発現を免疫組織染色にて確認した。しかし、当該組織におけるアディポネクチンの過剰発現は認められなかった。

今後の展望

今回の結果から、アディポネクチンは歯髄細胞および象牙芽細胞前駆細胞の分化・石灰化を促進することがはじめて明らかとなった。また、アディポネクチンは、歯髄細胞のDSPP発現を誘導することでその石灰化能を亢進する作用を持つことが明らかとなり、積極的な硬組織形成を誘導する材料として硬組織再生医療に応用できる可能性が示唆された。しかし、ラットへのエレクトロポレーション法によるアディポネクチンの産生誘導は検出できなかったため、今後他の産生効率のよりよいベクターへの組み替え、電気パルス刺激条件の再検討などが必要と思われる。