金属製培養基材の表面改質と 流体せん断力による複合刺激が 軟骨細胞の増殖性および細胞形態に与える影響

中井創一朗^{1,*} 宮田昌悟² 小茂鳥潤²

¹慶應義塾大学大学院理工学研究科総合デザイン工学専攻

²慶應義塾大学理工学部機械工学科

J. Japan Inst. Met. Mater. Vol. 79, No. 6 (2015), pp. 324–329

© 2015 The Japan Institute of Metals and Materials

Effect of Complex Stimuli of Shear Stress and Surface Modification on Proliferation and Phenotype of Chondrocyte

Soichiro Nakai^{1,*}, Shogo Miyata² and Jun Komotori²

¹*School of Integrated Design Engineering, Graduate School of Science and Technology, Keio University, Yokohama 223–8522*

²*Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University, Yokohama 223–8522*

Articular cartilage has a poor ability to regenerate and repair itself. To restore cartilage defects, a method has been developed by culturing autologous chondrocytes to create a three dimensional tissue and then implanting the cultured tissue. However, articular chondrocytes easily leads to de-differentiation state and loses their ability to synthesize the functional cartilaginous matrixes during *in vitro* culture. Therefore, it is important to maintain their differentiated phenotype during the expansion culture of chondrocytes. The objective of this study is to develop a novel culturing methodology combined surface modification and mechanical stimuli on articular cartilage. To develop a surface-modified substrate, a SUS316L stainless plate was treated by Fine Particle Peening (FPP) technique using alumina particles. The chondrocytes were cultured on the modified stainless plate and stimulated by fluid-induced shear stress using a custom-made flow culture system. As a result, proliferation rate was increased and phenotypic-change of chondrocytes was also observed by culturing the chondrocytes on physically modified surface combined with fluid-induced shear stress. In addition, the synergetic effect on proliferation rate was observed by applying the surface modification and flow shear stress simultaneously. [doi:10.2320/jinstmet.J2015009]

(Received January 27, 2015; Accepted March 30, 2015; Published June 1, 2015)

Keywords: chondrocyte, cell differentiation, cell proliferation, shear stress, fine particle peening

1. 緒 言

近年、急速な高齢化社会への移行に伴い QOL (Quality of Life) を高めることがこれまで以上に重要となっている。特に高齢者に多くみられる臓器不全や関節疾患の治療法として、細胞を用いて臓器や器官を再構築してその機能を代替する再生医療に注目が集まっている。関節疾患は関節軟骨組織の破壊に由来し、再生医療の早期の適用が求められている疾患である。

関節軟骨は軟骨細胞とこれを取り囲む細胞外マトリクスから構成される組織であり、関節において骨相互間に生じる摩擦および衝撃を緩和する役割を果たしている。しかしながら、関節軟骨は血管網を持たないために修復・再生能に乏しく広範囲に及ぶ損傷に対しては完全な自己修復が困難であるという問題を抱えている。このため、一度大きな損傷を受けると治癒せず、最終的には変形性関節症に移行するケースが

多い。このような関節疾患の既存の治療法としては人工関節への置換が一定の効果を挙げているが、耐用年数や炎症反応による痛みなどの問題がある。

このような状況を鑑みて、患者から摘出した健常な軟骨細胞を生体外で培養し、再び関節軟骨の損傷部に移植・置換する再生医療による軟骨再生が提案され、すでに臨床応用が進められている¹⁾。このアプローチは自家軟骨細胞を用いることで拒絶反応を回避できる長所がある一方で、大規模の軟骨疾患に対しては極めて多量の細胞が必要となる。現時点では、そのための生体外での増殖培養の過程において継代(細胞の植え継ぎ)を繰り返すことによる軟骨細胞としての機能の変質(脱分化)が避け得ない問題となっている。脱分化が起こると関節軟骨に特有かつ必須である構成成分のコラーゲン Type II, IX, XI やプロテオグリカンなどの細胞外マトリクスを産生するという軟骨細胞本来の機能が失われ、増殖能を強く示す線維芽細胞様に変質する²⁾。また、脱分化した軟骨細胞は分化形態の軟骨細胞と比較して、接着形態が円形から紡錘形になるなどの特徴を有している。このような軟骨細胞の脱分化を抑制することを目的として、生理活性物質の

* 慶應義塾大学大学院生 (Graduate Student, Keio University)

添加によって脱分化した細胞を再分化させる手法が試みられている³⁾。この手法は効果的なアプローチではあるが、一般に生理活性物質は非常に高価である上に臨床適用への認可取得の煩雑さもあって、関節軟骨の再生医療を臨床展開する上で大きな障壁となっている。

近年、軟骨細胞の再分化を促す生理活性物質に代替する手法として、物理的刺激をその誘導因子として用いる研究が進められている。Smith らは軟骨細胞に対して流体由来のせん断応力を印加したところ、細胞外マトリックスの産生量が増加することを報告している⁴⁾。同様に Malaviya らは、軟骨細胞に対して流体由来のせん断応力を印加すると増殖性が向上すること、さらに接着形態が変化することを報告している⁵⁾。Mauck らはカム式の圧縮変形刺激装置を用いて、円柱形状の仔ウシ軟骨細胞-アガロース複合体に周期的な圧縮刺激を印加した結果、再生組織の平衡弾性率の増加および細胞外マトリックス産生量が増加することを報告している⁶⁾。我々の研究グループにおいても、基板に微粒子を投射して微小な凹凸形状を形成する微粒子ピーニング(FPP)処理を施した Ti-6Al-4 合金の表面で L929 線維芽細胞を培養することで、その増殖性および接着性が向上することを明らかにしている⁷⁾。また、アルミナ粒子、シリカ粒子を用いた FPP 処理を施した SUS316L ステンレス鋼基材上で軟骨細胞を培養し、アルミナ粒子による FPP 処理面が軟骨細胞の接着および増殖性を向上させることを報告している⁸⁾。しかしながら、これらの物理的刺激の複数種を同時に印加することによる複合効果を検討した例はなく、さらに、脱分化した軟骨細胞の再分化に与える効果に関する研究は行われていない。

そこで本研究では、特に細胞が接着する足場を改質する表面改質と流体由来のせん断力を同時に印加可能な培養装置を開発し、軟骨細胞の増殖性と再分化の一つの指標である細胞形態に与える影響を調査したので報告する。

2. 試料および実験方法

2.1 軟骨細胞の単離および培養

関節軟骨組織片は生後 4~6 週の仔ウシ肩関節部から無菌環境下でメスを用いて摘出した。摘出された組織片はリン酸緩衝溶液(PBS)で 2 回洗浄した後に培養液に浸漬し、CO₂ インキュベータ内で温度 37°C、CO₂ 濃度 5%、湿度 95% の環境下に 24 時間静置した。培養液には DMEM/F12 + 10% FBS + Antimycotic-Antibiotic を用いた。軟骨組織片は静置後に 1 mm³ 角以下に細かく刻み、コラゲナーゼ溶液に浸漬して温度 37°C で 20 時間緩やかに攪拌することで酵素的に細胞周囲の基質を溶解した。この溶解液を 75 μm 口径のナイロンメッシュフィルターを通して残存物を取り除き、軟骨細胞を単離した。単離された軟骨細胞を遠心分離器により 1500 rpm で 7 分間遠心分離して PBS で 2 回洗浄した後、培養液で懸濁して細胞培養フラスコに播種した。本研究では 3 回継代作業を行った脱分化形態の軟骨細胞を実験試料とした。

2.2 表面改質基材を用いた流れ刺激型培養装置

細胞培養を行う基材には、金属系生体材料として利用されている SUS316L ステンレス鋼を用いた。微粒子ピーニングによる表面改質処理は Nagai ら、Kurashina らの先行研究に基づいて実施した^{7,8)}。ピーニング処理の前処理として厚さ 1 mm のステンレス鋼板を 26 mm × 76 mm の形状に機械加工した後に、耐水研磨紙(# 240~1200)を用いて培養面を研磨した。次に、粒径が 30~50 μm のアルミナ粒子を用いてピーニング処理を行った^{8,9)}。なお、Kurashina らは SUS316L ステンレス鋼基材の FPP 処理においてはアルミナ粒子を用いた基材が軟骨細胞の接着および増殖性を向上させることを報告⁸⁾しており、本研究においても同条件の FPP 処理を用いることで先行研究と同様の表面性状を得られることを確認している。また、比較のために未処理の基材も準備した。

流体せん断力を印加するための循環型培養装置は、細胞培養を行うステンレス鋼基板で作製された培養チャンバ、培養液用リザーバ、ペリスタルティックポンプからなる閉鎖循環系とした(Fig. 1)。培養チャンバは、ポリカーボネート板(厚さ 3 mm)と細胞が接着するための FPP 処理が施された SUS316L ステンレス鋼基板(厚さ 1 mm)で、流路形状を形成したシリコンゴムシート(厚さ 1 mm)を挟み込むことで構築した(Fig. 2)。さらに、培養チャンバはアルミニウム板で作製した治具で上下から固定することで、シリコンゴムシー

Fig. 1 Schematic of flow culture system.

Fig. 2 Cell culture chamber made by sandwiching a silicone rubber gasket with a polycarbonate and a stainless plate treated by FPP.

トをポリカボネート板およびステンレス鋼板と圧着させ、循環による培養液の漏出を防止した。ペリスタルティックポンプを除いたすべての培養装置は炭酸ガスインキュベータ内に設置して温度 37°C、CO₂ 濃度 5% の環境下に置いた。

シリコンゴムシートに形成した流路形状はディフューザ内において流れが剥離しない条件を考慮して、流路の導入部から拡張部分を設計し、チャンバ内の中流部、すなわち細胞培養部において層流となるような形状とした (Fig. 3)¹⁰⁾。なお、流路内部すなわち細胞培養面に印加されるせん断応力分布は汎用 FEM 解析ソフトウェア (COMSOL Multiphysics Ver4.0, 計測エンジニアリング) を用いて分析し、中流部において均一にせん断応力が印加されることを確認した (Fig. 4)。本研究では、先行研究⁵⁾を参考に中流部におけるせん断応力が 1.2×10^{-2} Pa となるように流量を 1.3 mL/min に設定した。

2.3 流体由来せん断力印加実験

流体由来せん断力印加実験に際して、細胞培養における足場の影響、流体せん断力の与える影響を個々に検討するため、静置培養群 (S)、流れ印加培養群 (F)、FPP 処理基材上での静置培養群 (S_p)、FPP 処理基材上での流れ印加培養群 (F_p) の 4 種類の試料群を設定した。すべての試料群の培養チャンバに細胞密度 1.5×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を 100 μ L 注入し、CO₂ インキュベータ内で 24 h 静置培養して基材に細胞を接着させた。この細胞の接着処理が終了した時点を培養 0 日目と設定した。その後、S、S_p 試料群では静置させた状態で、F、F_p 試料群では流れを印加した状態で 2 日間の培養を行った。

なお、静置培養の S、S_p 試料群は 1 日に一度培養液を交

Fig. 3 Geometry of flow channel in silicone rubber gasket. (unit: mm)

換し、流れ印加培養の F、F_p 試料群は培養開始時に培養液用リザーバに 60 mL の培養液を加えたのち培養液の交換は行わなかった。この培養条件とすることで培養期間において全試料群の細胞に加えられる培養液の量が等しくなるように調整した。

2.4 細胞増殖性の評価

細胞播種操作を実施した 12 時間後および培養 2 日目において生細胞を緑色に蛍光染色する Calcein-AM solution による染色を実施した。各試料群のチャンバ内中流部を蛍光顕微鏡で 1 試料あたり 4 箇所撮像し、各画像内の接着細胞数をカウントすることで単位面積当たりの細胞数 N (cells/ μ m²) を算出した。増殖性の評価は、細胞播種 12 時間後における細胞数 N_{12h} (cells/ μ m²) を初期細胞数として培養 2 日目の同様に算出された細胞数 N_{d2} (cells/ μ m²) を

$$\text{Cell proliferation rate} = N_{d2}/N_{12h} \quad (1)$$

のように除して標準化することで実施した。なお、増殖性については、比較試料として市販の細胞培養フラスコを用いた静置条件下での培養試料群も用意し、その増殖率を各試料群と比較した。

2.5 細胞形態の評価

軟骨細胞は分化、脱分化の形態で細胞形態が真円形から紡錘形へと変化することが知られており、Takagi らは形態解析によって軟骨細胞の分化、脱分化を非侵襲および非破壊的に評価できることを報告している¹¹⁾。分化・脱分化形態の評価には本来、遺伝子分化マーカーなどによる詳細な評価が必須ではあるが、本研究ではその前段階の基礎的な評価として細胞の形状を楕円近似して数値化する手法を採用した。具体的には Shape Index という指標を用いることで軟骨細胞の形態変化を定量的に評価した。Shape Index は細胞の面積 A と外周 L を用いて次の式で定義される。

$$\text{Shape Index} = 4A/L^2 \quad (2)$$

この値は 0 から 1 の間の値をとり、直線形で 0 を、真円で 1 の値をとる。この値を軟骨細胞の分化、脱分化状態の細胞形態と対応させると、脱分化した軟骨細胞は紡錘形の形態をとることから Shape Index は 0 に近い値を示す。一方、分化状態の軟骨細胞は真円状の形態をとることから 1 に近くな

Fig. 4 Numerical analysis of shear rate in the cell culture chamber. (a) Simulation model of the chamber and (b) the result of analysis (contour plot of shear rate).

Fig. 5 Schematic of cell morphology analysis. (a) Raw fluorescent image and (b) binary image from the raw image. Scale bar: 100 μm .

る。これより、Shape Index の値の分布を調べることで総細胞数における分化状態の軟骨細胞の割合を推測することが可能となる。Shape Index の算出において細胞の面積と外周長の測定には汎用画像解析ソフトウェア Image J を用いた。具体的には細胞播種 12 時間後、培養 2 日目において撮像した蛍光顕微鏡画像 (Fig. 5 (a)) より細胞形状をトレースして、二値化した (Fig. 5 (b))。二値化画像内の細胞形状を楕円近似することで Shape index の値を算出した。各試料群で測定した細胞の Shape Index 値の分布をヒストグラムで評価することで培養環境が軟骨細胞の細胞形態に与える影響を評価した。なお、ヒストグラムの各区間値は総細胞数で除して標準化することで、試料群間の比較を行った。

3. 結果および考察

Fig. 6 に細胞播種 12 時間後における細胞接着形態の代表例として S_P 試料群の蛍光顕微鏡像を示す。軟骨細胞は 3 継代を経た脱分化形態にあるため紡錘形で培養基材に接着している。なお、軟骨細胞を播種した時点から 12 時間後においては、いずれの試料群においても紡錘形を呈し、細胞の接着数にも有意差は見られなかった。また、Fig. 7 に各試料群における培養 2 日目における顕微鏡像を示す。培養 2 日目では、静置培養を行った S, S_P 試料群においては、細胞数は細胞播種 12 時間後と比較して増加しており、細胞の形状は同様に紡錘形を維持している (Fig. 7 (a), (b))。一方で、流れによるせん断刺激を印加した F, F_P 試料群では細胞が分化状態にある時と同様に円形の形状で基材に形態を変化させて接着していた (Fig. 7 (c), (d))。

Fig. 8 に培養 2 日目における細胞播種 12 時間後に対する各試料群の細胞増殖率を示す。S 試料群と S_P 試料群を比較すると表面改質を行った S_P 試料群の細胞増殖率の方が大きくなっており、表面改質によって細胞増殖性が向上したことが示された。また、S 試料群と F 試料群を比較すると、F 試料群の細胞増殖率の方が大きくなっており、せん断刺激を印加されたことによって細胞増殖性が向上したことが示された。さらに、表面改質を施した S_P 試料群と施していない S 試料群の差および流体せん断刺激を与えた F 試料群と与えていない S 試料群の差の合計と比較して、S 試料群と表面改質と流体せん断刺激を同時に複合的に印加した F_P 試料群と

Fig. 6 Fluorescent image of chondrocytes cultured on FPP-treated stainless plate (S_P group) after 12 h from cell seeding. Scale bar: 50 μm .

Fig. 7 Fluorescent image of chondrocytes on (a) polished stainless (S group), (b) FPP-treated stainless (S_P group), (c) polished stainless with fluid-induced shear stress (F group), and (d) FPP-treated stainless with fluid-induced shear stress (F_P group). Scale bar: 100 μm .

の差の方が大きくなることが明らかとなった。これより細胞増殖性という観点においては、培養基材への表面改質と流体せん断力を複合的に加えることでそれぞれの刺激を単独で印加する効果よりも高い相乗効果が得られると考えられる。

本研究で用いた FPP 処理は、培養基材表面に微小な凹凸を形成することで表面改質が施される^{7,8)}。一方で、細胞は培養基材に接着する際には、接着斑と呼ばれる細胞膜上の微小領域を支持点として、物理的刺激のレセプターとしても機能する細胞骨格を形成する。本研究では Fig. 9 に示すように FPP 処理によって軟骨細胞の接着性が向上し細胞骨格の生成が促進することで、細胞骨格を介した流体せん断刺激への応答性が高まり、細胞増殖における相乗効果を生じたと考えられる。

Fig. 10 に細胞播種 12 時間後、培養 2 日目における各試料群の Shape Index のヒストグラムを示す。静置培養を行

Fig. 8 Cell proliferation rate of chondrocytes in each specimen group and cell culture flask (mean ± SD, $n=4$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

った S, Sp 試料群では分布形状が播種 12 時間後と近似形を示しており、細胞形態の培養時間の経過による変化はなかった (Fig. 10(a)). 一方で、流れ刺激を印加した F, Fp 試料群では 2 日目における分布のピークが細胞播種 12 時間経過後の分布曲線のピークよりも右方に移動し、Shape Index の値が 1 に近づいている。すなわち、円形の細胞の割合が多くなっている (Fig. 10(b)). これより流れ刺激を印加した細胞は、再分化と関連する細胞形態の変化が生じていると推測された。また、この形態変化は表面改質の有無にかかわらず生じたことから、流れ刺激による細胞形態の変化は表面改質ではなくせん断刺激に由来すると考えられる。

本研究では、金属基材に表面改質を施すことで細胞接着性を向上し、流体せん断刺激を印加しながら培養することで軟骨細胞の形態を円形に維持し、かつ細胞増殖性を向上することを実現した。これは、脱分化した軟骨細胞を再分化させながら増殖培養できる可能性を示唆するものである。一方で、今回の評価は培養 2 日間での短期的な評価にとどまったことから、培養手法として検討するためには長期間の培養実験を行う必要がある。さらに、軟骨細胞の再分化の詳細な検証には形態学的な評価に加えて、コラーゲン Type II やプロテオグリカンに代表される硝子軟骨の分化マーカーを対象とした遺伝子分析や免疫染色などが必須である。今後は培養日数を長期化した上で、分化マーカーに着目した評価を実施する計画である。

4. 結 言

本研究では、アルミナを投射粒子に用いた FPP 処理によ

Fig. 9 Schematic of adhesion and mechano-sensing of chondrocytes cultured on surface-modified stainless.

Fig. 10 Distribution of shape index of chondrocytes cultured in (a) S and Sp groups, (b) F and Fp groups.

り SUS316L ステンレス鋼表面に微細凹凸形状を構築し、この培養基板上で流れ刺激培養を行うことで、軟骨細胞の増殖性、接着形態に与える影響を検討した。その結果、物理的な表面改質と流体せん断応力による刺激を複合印加することで、細胞の増殖性が向上すること、かつ、脱分化した細胞が再分化する可能性が示唆された。さらに、細胞増殖性においては、表面改質および流体せん断応力の 2 種の物理的刺激を複合することで、単独刺激では実現し得なかった相乗効果を得ることができた。

文 献

- 1) K. Takazawa, N. Adachi, M. Deie, G. Kamei, Y. Uchio, J. Iwasa, N. Kumahashi, T. Tadenuma, S. Kuwata, K. Yasuda, H. Tohyama, A. Minami, T. Muneta, S. Takahashi and M. Ochi: J. Orthop. Sci. **17**(2012) 413-424.
- 2) U. R. Goessler, P. Bugert, K. Bieback, H. Sadick, A. Baisch, K. Hormann and F. Riedel: Otolaryngol. Head Neck Surg. **134** (2006) 510-515.
- 3) D. K. Lee, K. B. Choi, I. S. Oh, S. U. Song, S. Hwang, C. L. Lim, J. P. Hyun, H. Y. Lee, G. F. Chi, Y. Yi, V. Yip, J. Kim, E. B. Lee, M. J. Noh and K. H. Lee: Tissue Eng. **11** (2005) 310-318.
- 4) R. L. Smith, B. S. Donlon, M. K. Gupta, M. Mohtai, P. Das, D. R. Carter, J. Cooke, G. Gibbons, N. Hutchinson and D. J. Schurman: J. Orthop. Res. **13** (1995) 824-831.
- 5) P. Malaviya and R. M. Nerem: Tissue Eng. **8** (2002) 581-590.
- 6) R. L. Mauck, M. A. Soltz, C. C. Wang, D. D. Wong, P. H. Chao, W. B. Valhmu, C. T. Hung and G. A. Ateshian: J. Biomech. Eng. **122** (2000) 252-260.
- 7) A. Nagai, S. Miyata, M. Saito, J. Komotori, S. Obi, Y. Namba and T. Koyama: Trans. Jpn. Soc. Mech. Eng. A **77** (2011) 544-551 (in Japanese).
- 8) Y. Kurashina, T. Hamano, S. Miyata, J. Komotori and T. Koyama: J. Japan Inst. Met. Mater. **78** (2014) 170-176.
- 9) Y. Kameyama, J. Komotori and K. Yamada: J. Japan Society for Abrasive Technology **49** (2005) 86-89.
- 10) P. W. Runstadler Jr. and F. X. Dolan: *Diffuser Data Book*, (Creare Inc. Tech., Hanover, NH, 1975) Note 186.
- 11) M. Takagi, T. Kitabayashi, S. Koizumi, H. Hirose, S. Kondo, M. Fujiwara, K. Ueno, H. Misawa, Y. Hosokawa, H. Masuhara and S. Wakitani: Biotech. Letter. **30** (2008) 1189-1195.