213 滑膜由来幹細胞の3次元培養組織により生成した再生軟骨様組織の圧縮・潤滑特性

Compressive and lubricative properties of a 3-D cartilage-like tissue cultured from synovium-derived stem cells

准○片貝 大輔 (工学院大学大学院)
室井 悠里 (大阪歯科大学口腔外科)

正 藤江 裕道 (工学院大学)
中田 研 (大阪大学整形外科)

Daisuke KATAKAI, Graduate School of Engineering, Kogakuin University,
2665-1 Nakanomachi, Hachioji, Tokyo
Hiromichi FUJIE, Kogakuin University
Yuri MUROI, Osaka Dental University
Ken NAKATA, Osaka University Medical School

Key words: Tissue engineering, Mechanical stress, Mechanical properties, Collagen scaffold, Stem cell

1. 目的

関節軟骨が変形性関節症などにより損傷、変形すると、弾力性や潤滑性が低下する。関節軟骨の自己修復性は乏しいため、生化学的、生体工学的に刺激を与え、積極的に軟骨を修復させる必要がある。その刺激の方法として、*in vitro* で静水圧を与える方法¹⁾、Rotating bioreactor による方法²⁾、圧縮する方法³⁾ などがある。実際の生体関節には繰り返し圧縮荷重が加わるので、我々はこの圧縮刺激による軟骨再生に着目した。本研究では、ヒト滑膜由来幹細胞を collagen scaffold に埋入し作製した3次元培養組織に繰り返し圧縮刺激を与えた時の圧縮、潤滑特性を調べ評価を行った。

2. 実験方法

2-1 試料

ヒト滑膜由来幹細胞をコラーゲン溶液に懸濁し、遠心力を利用して細胞を collagen scaffold($\phi 9 \times 4$)内に埋入し、3次元培養組織を作製した(Fig.1)。5日間および10日間無負荷で培養した群と、10日間のうち後半5日間圧縮刺激(最大30 kPa, 周期0.5 Hz, 1 hr/day)を与えた3群とし、インキュベータ(温度37℃, CO₂濃度5%)内、DMEM中で培養した。また、細胞の有無による比較を行うために細胞を埋入せずに培養、圧縮刺激を与えた群も作製した。

Fig.1: Human synovium-derived stem cells were seeded into a collagen scaffold with centrifugal force to build a three-dimensional stem cells/collagen scaffold specimen.

2-2 圧縮試験

培養組織の静的圧縮特性を圧縮試験機を用いて評価した(Fig.2(a))⁴⁾。物質透過性の高い砥石製の台座の上に試験片を乗せ、37℃のDMEMに浸した。リニアアクチュエータ(LAH-46-3002-F, harmonic Drive Systems)によりプレロ

ード3 kPaを180s与え、除荷後、4, 100 μ m/sの圧縮速度で、約35 kPaまで圧縮する準静的圧縮試験を行った。

Fig.2: Schematic of (a) the compression test apparatus, and (b) the friction test apparatus.

2-3 摩擦試験

往復動摩擦試験機⁴⁾を用い、軟骨の潤滑特性を調べた(Fig.2(b))。荷重を1.22 Nとし、荷重負荷直後に摩擦を開始させ、ストローク25 mmを10往復繰返して(最大摩擦速度20 mm/s)、各往復ごとの摩擦係数を測定した。試験片の相手材はガラスで、測定のために表面を洗浄したガラスと交換した。また、試験片は37℃のDMEMに浸した。

2-4 組織学的観察

5日培養後の培養組織に対し、HE染色を行い組織学的検討を行った。

3. 結果

3-1 組織学的検討

5日間培養において、細胞が scaffold 内に均一に埋入されていることが確認できた。

Fig.3: Histological observation (HE staining) of the constructs cultured for 5 days.

3-2 準静的圧縮特性

圧縮試験の結果として、圧縮速度 $4 \mu\text{m/s}$ 、細胞なしの応力-ひずみ線図を Fig.4(a)に示す。培養を行わない scaffold は、ひずみの増加と共に傾きが低下する S 形状を示した。培養を行うことにより剛性は低下するが、培養期間や圧縮刺激の有無には影響されなかった。それに対し、細胞を含む群の場合、5 日間培養、10 日間培養と培養期間が増加するにつれ軟らかくなった(Fig.4(b))。10 日間培養では、細胞なし 10 日間培養より軟らかくなった。圧縮刺激を与えた 10 日間培養組織の応力-ひずみ線図はひずみを与えない群に比べ低ひずみ域でさらに軟らかくなった。培養組織の剛さを表すために、応力-ひずみ線図の傾きを接線係数として求めた結果、圧縮刺激を与えると 5、10% ひずみにおいて圧縮刺激無負荷群に比べ接線係数が有意に低下した(Fig.5(a))。

また、圧縮速度を $100 \mu\text{m/s}$ にすると圧縮刺激を与えた群の低ひずみ域での軟らかさが消失し、接線係数に有意な差はなくなった(Fig.5(b))。

Fig.4: Typical stress strain relationship of non cell-seeded constructs at a rate of $4 \mu\text{m/s}$ (a), and cell-seeded constructs at a rate of $4 \mu\text{m/s}$ (b).

Fig.5: Tangent modulus of cell-seeded constructs at a rate of $4 \mu\text{m/s}$ (a), and cell-seeded constructs at a rate of $100 \mu\text{m/s}$ (b).

3-3 潤滑特性

摩擦試験の結果として、滑り出し 1 回目での摩擦係数を Fig.6 に示す。細胞なしに比べ細胞ありの培養組織は摩擦係数が有意に低かった。しかし、培養期間の増加や圧縮刺激の負荷に対して摩擦係数の低下は見られなかった。

Fig.6: Coefficient of friction of cell-seeded and non cell-seeded constructs at the beginning of the friction test.

4. 考察

4-1 圧縮特性

細胞なしの培養組織は DMEM に浸すだけで軟らかくなった(Fig.4(a))。同様の結果として、Michelle らは、Alginate gel を NaCl に浸しその力学特性を調べた結果、15 時間後に大幅に軟らかくなったが、7 日間浸しても 15 時間後と同等の軟らかさであったと報告している⁹⁾。つまり、培養組織を溶液に浸すとコラーゲンネットワークの架橋結合が壊され、その力学特性が変化し、ある程度まで軟らかくなると考えられる。

細胞ありの培養組織は培養日数の増加と共に軟らかくなった(Fig.4(b))。10 日間培養では、細胞なしに比べ軟らかくなったことから細胞がコラーゲンネットワークの架橋結合の分解を促進したことが考えられる。圧縮刺激を与えた 10 日間培養は低ひずみ域でさらに軟らかくなり、その接線係数は有意に低下した(Fig.5(a))。同様の結果として、Seidel らは scaffold に軟骨細胞を埋入し、圧縮刺激を与えた結果、培養期間と共に compressive modulus が減少したことを示している⁹⁾。これらのことから、圧縮刺激は細胞に何らかの作用を及ぼし、コラーゲンネットワークの架橋結合を分解する働きがあることが考えられる。

圧縮速度を $100 \mu\text{m/s}$ に高めて接線係数を求めると、力学刺激を与えた培養組織の低ひずみ域での軟らかさは消失した。推測の域を出ないが、圧縮刺激が細胞に作用し、ある程度の保水力を有するプロテオグリカンなどの物質が生成されていた可能性がある。

4-2 潤滑特性

細胞なし培養組織の摩擦係数は高く、細胞あり培養組織の摩擦係数は有意に小さくなったことより、培養組織表面にある細胞は潤滑性を高める物質を産出したと考えられる。

5. 結言

ヒト滑膜由来幹細胞を collagen scaffold に埋入し作製した 3 次元培養組織の圧縮特性と潤滑特性を求めた結果、以下のことが明らかとなった。

1. 静的圧縮において、培養組織は培養期間の増加と共に軟らかくなる。
2. 静的圧縮において、圧縮刺激を与えた培養組織は低ひずみ域でさらに軟らかくなる。
3. 準静的圧縮において、培養組織は培養期間の増加と共に軟らかくなる。
4. 培養組織の摩擦係数は、細胞を埋入すると小さくなる。

謝辞

文科省科学研究費(基盤 C, 15591603), 同ハイテクリサーチセンター整備事業費(SMBC, 2002-2006), および工学院大学総合研究所プロジェクト研究費の補助を受けた。

文献

- 1) Ikenoue et al.: Journal of Orthopaedic Research(2003), 110-116.
- 2) Freed et al.: Medical Sciences(1997), 13885-13890.
- 3) Mauck et al.: Annals of Biomedical Engineering(2002), 1046-1056.
- 4) 片貝, 他: 日本機械学会関東支部総会講演会講演論文集(2004), 601, 602.
- 5) Michelle A. LeRoux et al.: Journal of Biomedical Materials Research(1999), 46-53.
- 6) Seidel et al.: Biorheology(2004), 445-458.