215 再生軟骨モデルの組織構造形成に対する培養条件の影響(第2報)

Influence of Culture Conditions on Regenerated Tissue Structure in Chondrocytes-Agarose Construct (Part2)

○学 花木 昭宏 (九大) 正 澤江 義則 (九大) 正 坂井 伸朗 (九大)
正 石山 翔生 (TOTO) 学 鈴木 恵美子 (九大) 正 村上 輝夫 (九大)

Akihiro HANAKI, Kyushu University, Motoooka744, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395 Japan
Yoshinori SAWAE, Kyushu University, Nobuo SAKAI, Kyushu University, Sho ISHIYAMA, TOTO
Emiko SUZUKI, Kyushu University, Teruo MURAKAMI, Kyushu University

Key Words: Chondrocyte, Extra-cellular matrix, Mechanical property, Dynamic mechanical loading, Tissue

1. 緒 言

損傷した関節軟骨の治療法として注目される再生軟骨は、本来の軟骨組織が持つ潤滑や荷重支持などの力学的機能を、現時点では十分に再建できていない。軟骨組織の力学的機能は、軟骨細胞が産生する細胞外マトリックスが組織構造を形成することにより発現する⁽¹⁾。また細胞外マトリックス(プロテオグリカンおよびII型コラーゲン)の産生は、軟骨細胞に周期的な力学的負荷が与えられると促進される事が報告されている⁽²⁾。

そこで本研究では、2軸負荷培養装置⁽³⁾を用いてアガロースゲルを3次元スキャフォールドとした再生軟骨モデルに力学負荷を加え、細胞外マトリックスの産生および組織構造形成と、それに伴う力学特性の変化に対する培養条件の影響を検討した。

2. 実験方法

2-1 試験片作製

本研究では、牛中指骨遠位端の軟骨組織から酵素消化法⁽⁴⁾によって単離した軟骨細胞を4wt%のアガロースゲルに播種し、それを再生軟骨モデルとして用いた。再生軟骨モデルの形状は一辺5mmの立方体と、直径3mm×高さ2.5mmの円柱形の2種類とした。作製した再生軟骨モデルはDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にFetal Bovine Serum (FBS) を20vol%加えたものを培養液として、37°CのCO₂インキュベータ内で一日静置培養した。その後、立方体モデルは繰り返し力学的負荷を与えながら培養する負荷群と比較対象のコントロール群、そのまま静置培養をする静置群とに分けた。円柱形モデルは静置群のみとした。

2-2 圧縮培養実験

作製した2軸負荷培養装置のスライダ先端に塩化ビニール製の圧子を取り付け、再生軟骨モデルに繰り返し単軸圧縮を加えながら培養する実験を行った。実験は24ウェルのカルチャープレート(FALCON)内で培養中の再生軟骨モデルに対して行った。

立方体モデルの負荷群には、周期1Hzの15%単軸圧縮ひずみを1日6時間与えた。その日の負荷終了後は、圧子を軟骨モデルの上面に接触させたまま、ひずみ無しの状態($\epsilon=0$)とした。圧子が接触している影響を評価するために、コントロール群にもモデル上面

に別の圧子を接触させて培養した。円柱形モデルはカルチャープレート内で静置培養を続けた。培養液は2日に1度、全て交換した。

2-3 力学試験

培養した再生軟骨モデルは、培養1日目、8日目、15日目、22日目に、高精度ロードセルを備えた力学試験機(AUTOGRAPH, SHIMADZU)を用いて圧縮試験を行い、培養による弾性係数の変化を測定した。試験片を培養液で満たした35mmディッシュ(FALCON)中に、培養時と力学試験時の圧縮方向が一致するように静置し、20%/minの速度で10%のひずみを与えた。この時、直線近似が可能であったひずみ5%~10%の応力-ひずみ曲線の傾きより、弾性率を求めた。また試験片は著しい応力緩和を示すため、ひずみ負荷後変位を保持し、応力が平衡に達したとみなされた30分後の応力を計測し、この値より平衡弾性率を求めた。

2-4 蛍光抗体法と組織観察

力学試験を行った試験片について、蛍光抗体染色法によって軟骨細胞の代謝により細胞周囲に形成された細胞外マトリックスの3次元組織構造を観察した。

試験片より圧縮方向と垂直に厚さ0.5mm程度の薄片を複数枚切り出し、蛍光観察の標本とした。標本はプロテオグリカンの構成成分であるケラタン硫酸を観察する群と、II型コラーゲンを観察する群の2群に分け、それぞれ選択的に染色した。染色後の標本は、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM, BIORAD)上で60倍の油浸対物レンズを用いて観察し、細胞外マトリックスにより形成された組織構造の形態を評価した。

2-5 プロテオグリカンの定量

力学試験後の試験片は-30度で冷凍保存し、後日、再生軟骨モデル中に含まれるプロテオグリカンの定量を行った⁽⁵⁾。

凍結した試験片を2.8mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)と9mMの塩酸システインを加えたリン酸緩衝液(PBS)1mlに入れ、完全に溶解するまで70°Cのヒーター内で加熱した。試験片が溶解した懸濁液は37°Cのインキュベータ内で除熱した後、3IUのパパイン(Papain from Carica papaya 76220, Fluka)を含むPBS溶液5 μ lと1IU/mlのアガラゼ(β -Agarase, Wako)10 μ lを加え、インキュベータ内で

一晚37℃に保温した。翌日60℃まで再加熱した後、ジメチルエチレンブルー溶液で染色し、マイクロプレート測定装置(BIORAD)を用いた吸光度測定によりプロテオグリカン量を定量した。

3. 実験結果および考察

図1に力学試験によって得られた立方体モデルの弾性率を示す。横軸は培養日数を表している。培養8日目ではコントロール群と負荷群に明確な差は無いが、培養15日目では負荷群の弾性率が有意に増加している。培養22日目に減少した負荷群の弾性率には、長期間の培養中にカビや雑菌が混入・増殖するコンタミネーションが発生した影響を含んでいると考えられる。また、図2に定量試験で測定された立方体モデルのプロテオグリカンの含有量を示す。縦軸は試験片の湿潤重量に対するプロテオグリカンの重量比率を表している。図2において負荷群のプロテオグリカン含有量は培養日数に応じて増えている。一方コントロール群は培養15日目に減少を、22日目に大幅な増加を示している。

図1と図2を比較すると、培養8日目から15日目にかけて負荷群のプロテオグリカン量と弾性率の増加が同時に起こるなど、プロテオグリカン量と弾性率が似た変化の傾向を示しているため、両者の間に何らかの相関があると考えられる。しかし、2つの値の増減が完全には一致していないので、弾性率がプロテオグリカンの量で一義的に決定される訳ではないと分かる。

他方、再生軟骨モデルの形状による細胞外マトリックスの組織構造形成に対する影響を見るために、静置群の立方体モデル(a)と円柱形モデル(b)の培養8日目におけるⅡ型コラーゲンの染色画像を図3に示す。(b)においては再生軟骨モデル中の細胞間にⅡ型コラーゲンのネットワークが形成されているのが確認できるが、(a)では見られない。これは円柱形モデルの表面積と体積の比が立方体モデルの1.5倍あり、拡散による物質の十分な供給に有利な条件となっているため、良好な代謝によって細胞外マトリックスがより多く産生されたためと考えられる。同時に静置群の立方体モデルと円柱形モデルの弾性率を測定・比較すると、8日目では円柱形モデルの弾性率が立方体モデルよりも上昇しており、立方体モデルでも組織構造が確認できる15日目には両者の差は無くなっている。このことからⅡ型コラーゲンの組織構造が形成されると、弾性率が上昇すると考えられる。

今後は円柱形モデルのプロテオグリカン量を測定して、細胞外マトリックスの産生量の増加を定量的に確認する必要がある。また円柱形モデルを用いて圧縮培養試験を行い、立方体モデルでは明確には確認できなかった細胞外マトリックスの組織構造形成に対する圧縮負荷の影響を調べていく予定である。

4. 結 言

本研究では、力学的負荷下で培養した再生軟骨モデルについて、プロテオグリカン含有量および細胞外マトリックスの組織構造形成と弾性率の相関関係を評価し、それに対する培養条件の影響を検討した。その結果、再生軟骨モデルの弾性率の変化は、モデル中のプロテオグリカン含有量の増加が一因になると考えられる。一方でモデル形状を変更した実験を行い、細胞への物質供給が良好なモデル形状のほうが、Ⅱ型コラーゲンを中心とした細胞外マトリックスの組織構造形成が促進され、弾性率の上昇に寄与する事を確認した。

Fig.1 Tangent Modulus of Cube Model (n=4, *p<0.01)

Fig.2 Proteoglycan Content in Cube Model

Fig.3 Confocal Image of Collagen typeII elaborated around Chondrocyte cultured for 8days

今後は円柱形モデルでも圧縮培養試験を行い、弾性率やプロテオグリカン量を測定し、組織構造形成に対する圧縮負荷の影響をさらに調査していく予定である。

参考文献

- (1) 花木, 石山, 澤江, 村上, 平成16年度日本エム・イー学会九州支部学術講演会論文集, (2005), 11
- (2) Lee D.A. and Bader D.L., *Biorheology*, 37(2000), 149-161
- (3) 花木, 澤江, 坂井, 石山, 村上, 2005年度年次大会講演論文集 Vol.5, (2005), 211-212
- (4) Knight M.M., Lee D.A. and Bader D.L., *Biochimica et Biophysica Acta* 1405,(1998),67-77
- (5) Lee D.A. and Bader D.L., *The Journal of Orthopaedic Research* Vol.15, no.2, (1997), 181-188