516 **BMP と旋回培養による scaffold-free 再生軟骨の組織構築効果**

Effects of BMP and rotational culture on scaffold-free tissue engineered cartilage

正 古川克子 (東京大工),

正 立石哲也 (東京大工), 正 牛田多加志 (東京大医)

Katsuko FURUKAWA, Tetsuya TATEISHI, Takashi USHIDA

University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

Key Words : Chemical stimulation, Chondrocytes, Rotational culture, Scaffold free, Tissue engineering

緒言

長期に亘って異物を生体内に残さない状態で細胞の治癒能力に頼る治療手段である再生医療研究が脚光を浴びるようになってから10年以上の月日が経った。軟骨組織は他の臓器に比べて構造が極めて単純であるため、皮膚に並んで早期にその実用化が期待され、欧米を中心に多くのベンチャー企業が立ち上がった。しかしながら、再生軟骨の場合、生分解性の担体に細胞を播種・培養して作製した再生軟骨は、細胞の分化状態の制御が難しく、さらに担体内部への細胞の均一播種、生体内分解性の材料の分解と細胞によるマトリクス産性のバランス制御、形態制御などにおいて問題があり、現在、臨床で満足に使用できるものはないといっても過言ではない。

一方、細胞の分化・発生の基礎研究では、細胞間接着が軟骨細胞の発生を促し、分化状態を正常なフェノタイプに制御可能であることがわかっている。生化学の分野で歴史のある試験管内に軟骨細胞の凝集塊を形成して培養するペレット培養法では細胞を脱分化型から分化型に変換できるが、一度に数ミリ程度の凝集塊を一つしか形成できず、さらに操作が煩雑である問題点があった。そこで、本研究では、脱分化型の軟骨細胞を任意の形状を有する鋳型(モールド)に播種した後、物理刺激と化学刺激を同時に加えることによって、正常軟骨様の形質を呈する再生軟骨の構築に成功したので報告する。

実験方法

ウシ膝関節から採取した軟骨細胞は *in vitro* で2継代を経た後、軟骨細胞サスペンションを内径10mmのクローニングリング内に高密度播種し、24時間静置した。その後、リングを外し、dexamethasone, ascorbic acid 2-phosphate, sodium pyruvate, proline, ITS-plus, BMP を添加した DMEM 培地中で70rpmの旋回条件で動的培養を行った。4週間の動的培養を行った後、力学試験、遺伝子発現解析、組織化学的解析を行った。

結果及び考察

モールドに細胞を播種した後に4週間程度旋回培養

を行ったところ、モールドの形状に依存した形態を有する再生軟骨が形成されることがわかった。

直径が1cmのモールドを使用した場合、旋回培養を行ったモデルではモールドと同様の形態である円柱状の再生軟骨が構築された(図1B,D)。モールドを用いて形態を付与して通常の静置培養を行ったところ、図1A, Cに示すように、培養期間中に容易のその形態が変形し、モールドによって付与した再生軟骨の形態を維持できないことがわかった。BMPを添加した静置培養系においては、頻繁に組織内部が膨らんだ形状を有する組織の形成が認められた。膨らんだ部分をメスで切開すると、内部から壊死を起こした組織が流出する現象が認められた。

図1 再生軟骨の外観. A: 静置培養による再生軟骨. B: 旋回培養による再生軟骨. C: BMPの存在下で静置培養した再生軟骨. D: BMPの存在下で旋回培養によって作製した再生軟骨.

次に、作製した再生軟骨の形態維持性について検討した。旋回培養によって作製した再生軟骨は、BMPの有無に関わらず、ピンセットで把持した際に、下敷きのような感触を保持する優れた力学的な性質を有することがわかった。一方で、物理刺激を負荷しない系においては、BMPを加えていない系の組織が極端に脆弱であり、ピンセットで把持した際には組織が容易に変形することがわかった。BMPを加えた系においても同様の結果が得られた。

軟骨の分化マーカーの一つであるプロテオグリカンの発現量を、DMMB 法とトルイジンブルーによる染色で調べた。

プロテオグリカンの産生量を定量的に評価した結果を図2に示す。静置培養の系では、プロテオグリカンの産生量が著しく低いことがわかった。BMP を加えても静置培養の系においては、その明確な効果が確認できなかった。物理刺激を加えた系においては、静置培養の系に比べて、有意にプロテオグリカンの産生の促進が認められた。BMP の存在下で旋回培養を行った系においては、旋回培養のみの系よりもさらに、プロテオグリカンの産生の促進効果が認められ、生体軟骨と同程度の発現が確認された。

トルイジンブルーによる組織の染色結果を図3に示す。DMMB による定量的な解析結果と同様の傾向が得られた。すなわち、静置培養の系において、プロテオグリカンの産生量は物理刺激を加えた系に比べて少ない傾向が切片像からも確認された。BMP の効果は静置培養系では悪い方向で働いている可能性が示され、一方で、物理刺激を加えた系においては、BMP のプラスの効果があることがわかった。

再生軟骨の圧縮試験による機械的な特性を評価したところ、プロテオグリカンの産生結果と同様の傾向を示すことがわかった。すなわち、ピーク応力値と平衡弾性率の測定から、物理刺激と BMP の相乗的な力学特性の向上効果が認められた。

Monolayerなどの培養細胞の系やpellet培養などの実験系では、BMP が軟骨構築の方向に働くことが複数の研究者によって方向されている。これらの系は物理刺激は存在せず、静的な実験系である。我々の scaffold-free の再生軟骨のモデルにおいては、静的な条件下で BMP の positive な効果が認められなかったことから、scaffold-free の再生軟骨モデルにおける BMP の分化に及ぼす効果の詳細なメカニズムの解明が今後必要であると考えられた。

おわりに

従来の再生医療の技術で軟骨組織を再生する場合、担体（材料）、細胞、成長因子が再生医療の3要素と呼ばれている。再生したい臓器の形を生体内分解性の材料によってあらかじめ形成し、細胞を播種して、各種成長因子の存在下で細胞と担体を培養することによって、任意の形態を維持しながら細胞と細胞外マトリクスから構成される組織を再構築する。軟骨の場合、生体内分解性材料を用いることなく、細胞と成長因子で組織を構築できる可能性が本研究より示唆された。物理刺激の存在する本モデルは細胞の分化制御の観点から優れた特性を持っていると考えられ、今後の臨床研究への発展が期待される。

図2 プロテオグリカンの定量結果. S: 静置培養による再生軟骨. D: 旋回培養による再生軟骨. SB: BMP の存在下で静置培養した再生軟骨. DB: BMP の存在下で旋回培養によって作製した再生軟骨. CH: ウシ生体軟骨

図3 再生軟骨のトルイジンブルーによる染色. A: 静置培養による再生軟骨. B: 旋回培養による再生軟骨. C: BMP の存在下で静置培養した再生軟骨. D: BMP の存在下で旋回培養によって作製した再生軟骨.

参考文献

1. KS Furukawa, K Imura, T Tateishi, T Ushida. J Biotech 133(1): 134-145 (2008).
2. T Nagai, KS Furukawa, M Sato, T Ushida, J Mochida. Tissue Eng 14(7): 1183-1193 (2008)
3. T Nagai, M Sato, KS Furukawa, T Ushida, J Mochida. Tissue Eng 14(7): 1225-1235(2008).
4. M Satp, M Ishihara, KS Furukawa, N Kaneshiro, T Nagai, G Mitani, T Kutsuna, N Ohta, M Kokubo, T Kikuchi, H Sakai, T Ushida, M Kikuchi, J Mochida. Med Biol Eng Comput. 2008 Aug;46(8):735-743. 2008.