Bio-environment Designing for Cartilage-regeneration Using Stem Cells

○門林 義幸 (京大院) 正 山本 浩司 (京大院) 山本 英郎 (京大工)

中嶋 正明 (京大院) 脇谷 滋之 (信州大) 正 富田 直秀 (京大院)

Yoshiyuki KADOBAYASHI, Kyoto University, Yoshida-honmachi, Sakyo-ku, Kyoto Koji YAMAMOTO,

Kyoto University Hideo YAMAMOTO, Kyoto University Masaaki NAKAJIMA, Kyoto University

Shigeyuki WAKITANI, Shinshu University Naohide TOMITA, Kyoto University

Living tissue maintains its shape and function by adaptive self-remodeling in the environment. Our theme is the "in-vivo environment designing" which thought to be the key factor for successful tissue-engineering treatment. In previous reports, significance of the environment designing was showed using ES-cells transplanting into knee joint. In this report, change in viability of cells under low-temperature and/or high-pressure condition was evaluated. The high-pressure condition was set by hydrostatic-pressure apparatus using controlled piston mechanism. The results suggested the presence of some environment-derived communicative matter, but not yet have proved.

Key Words : Stem Cell, Cartilage Regeneration, Physical Stimulation, Bio-environment designing.

はじめに

再生医療が目指す目標の一つに、必要とされる組織の形態形成および機能発現がある。近年着目されている組織再生治療法の一つは、幹細胞の有する多能性および自己複製能を利用したものである。しかし、幹細胞が特定の細胞に分化し組織化するためには外・内部の環境との相互作用が重要であり、環境を含みこんだシステムを考慮する必要がある。

我々は細胞または組織周辺の物理環境を設定することによって、機能的な組織を得る「生体環境設計」を提唱し、基礎実験及び臨床応用を進めている。そこで、環境の設定条件の効率的設計を行うためには、生体の多様性と自律性を考慮した思考ツールが必要であり、一連の組織化過程を情報の流れとしたモデルを *in silico* で構築した⁽¹⁾。その中で、環境変化に関する情報のフィードバックが形態や機能発現の効率化に影響を与えている事が示唆された。本稿では、細胞間での環境変化に関する情報の受け渡しの有無を調べるべく、低温環境、静水圧環境が及ぼす影響をそれぞれ検証した。

1. 実験方法

1.1 実験装置 Fig. 1, 2に加圧装置の写真及び、その概略を示す。サーボモータ (AIP4150-AM オリエンタルモータ社製) によりピストンを駆動し、加圧速度はプログラムにより制御した。圧力計には耐環境型デジタル圧力センサ (AP-V80・AP-16S キーエンス社製) を用い、出力電圧値をマイクロコンピュータ (h83069f ルネサステクノロジー社製) により処理し、サーボモータを駆動する。加圧時の圧力の誤差は $\pm 0.2\text{MPa}$ である。また、清潔な状態で細胞に静水圧を加えるために、冷凍保存用クライオチューブ (NALGENENL クライオチューブ

Fig. 1 Photograph of experimental system

Fig. 2 Schematic drawing of experimental apparatus

2ml) に細胞を DMEM と共に入れ、空気が入らないように蓋をする⁽²⁾。クライオチューブの内と外で圧力が同じであることを調べるため感圧フィルム (プレスケール低圧用 富士フィルム社製) を用い検証したところ、誤差

は 10%以内であることがわかった。

1.2 試料 ラット脂肪由来の間質細胞 (AMSC) ⁽³⁾ 継代数 3~5 の細胞を用いた。細胞活性測定法としてニュートラルレッド染色を使用し吸光度を計測した。

1.3 低温環境実験 $\phi 100\text{mm}$ CultureDish にコンフルエント状態の細胞を低温環境 (7℃・遮光室・CO₂ 濃度無調整) に 36 時間さらし、その上澄みを新たに細胞を播種して 12 時間後のディッシュの培地と交換した。交換したディッシュを同様の操作で低温環境下に 36 時間置いた。コントロール群として低温環境下に無血清 DMEM の上澄みを入れたディッシュを 36 時間置き活性を測った。

1.4 加圧実験 クライオチューブへ細胞濃度 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/tube}$ の細胞浮遊液の状態ですら封入し加圧した。コントロール群として、同濃度の細胞混濁液を封入したチューブを被静水圧チューブと同じ姿勢で圧力容器外に静置した。実験は室温環境下 (25±2℃) で行った。

まず圧力環境が細胞に及ぼす影響を細胞活性の変化により計測した。まず AMSC をクライオチューブに入れ 24 時間 15MPa 静水圧を加え活性変化を検証した。

次に AMSC をクライオチューブに入れ 24 時間 15MPa 静水圧を加えた後、この上澄み 2.0ml と DMEM+10%FCS5ml を混合した培地を細胞播種後 24 時間のディッシュの上澄みと交換した。コントロール群として加圧容器の外に細胞を入れたクライオチューブを 24 時間置き、この上澄みを加圧上澄みと同様にディッシュに入れた後、24 時間インキュベータ内で培養して活性を測った。

2. 結果 及び 考 察

2.1 低温環境での細胞活性 36 時間 7℃低温環境下で静置した後の細胞活性を Fig. 3(a) に示す。この結果より、低温環境により細胞はダメージを受け、細胞活性が低下した事がわかる。

2.2 低温上澄み添加実験 上澄みを添加する実験によって得られた結果を Fig. 3(b) に示す。低温環境下で細胞が培養された上澄みを加えた方が細胞活性を向上させる結果となった。

2.3 加圧後の細胞活性 24 時間 15MPa 加圧後の細胞活性を Fig. 4(a) に示す。この結果より、圧力により細胞はダメージを受け、細胞活性が低下した事がわかる。

2.4 加圧上澄み添加実験 上澄みを添加する実験によって得られた結果を Fig. 4(b) に示す。加圧後の上澄みを加えた方が細胞活性が低下する結果となった。

なお、培地のみをそれぞれの環境に暴露しその上澄みを加えて間質細胞に加えた場合は変化は見られなかった。Fig. 3(a), Fig. 4(a) に示す結果より細胞は物理環境によってダメージを受け、活性が低下している事がわかる。その上澄みをかけ再度同一環境下で実験すると、低温刺激の

Fig. 3 Viability Of Cells Under Lo-Temperature Environment

Fig. 4 Viability Of Cells Under High-Pressure Environment

実験では細胞の活性が向上する結果が示され (Fig. 3(b)), 圧力刺激を与える実験では細胞の活性が低下する結果となった (Fig. 4(b)). これより、物理的刺激として温度や圧力を加えられた際に何らかの環境に依存した情報の伝達機能があるのではないかと推測することができる。

お わ り に

生体が物理環境の変化に効率的に適応するためには、物理環境の変化に応じた何らかの情報伝達が必要となる。本実験ではその伝達物質をさがすための基礎検討として、圧力及び温度変化に応じた間質細胞の活性変化と変化に曝された細胞培養上澄み液の間質細胞に及ぼす変化を調べた。高圧下に置かれた細胞上澄み液は細胞の圧力に対する耐性を低下させ、また、低温下におかれた細胞上澄み液は低温に対する耐性を上昇させた。現在のところそれぞれの物理環境に対する交差試験は実施していないため、それぞれの物理環境に応じた情報物質存在の可能性は検証されていない。

文 献

- (1) 山本浩司, 富田直秀, 他 "骨軟骨再生のための生体環境設計", 計測自動制御学会システム・情報部門学術講演会 2004 講演論文集, pp.197-202, 2004
- (2) P.Angele, J.U.Yoo, et al "Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro", J.Orthopaedic Res., Vol.21, pp.451-457, 2003
- (3) 水野博司 "幹細胞供給源としての脂肪組織の有用性", J Nippon Med Sch, 70(5), pp.428-431, 2003