エラスチンを用いた靱帯組織再生誘導に関する研究

Study on regeneration of ligament tissue using elastin

○河戸 仁志, 古山 義紘, 稲熊 章誠, 宮本 啓一, 堀内 孝

三重大学大学院 工学研究科 分子素材工学専攻 生体材料化学研究室

Hitoshi Kawato, Yoshihiro Koyama, Akinobu Inakuma, Keiichi Miyamoto, Takashi Horiuchi

Dept. of Chemistry for Materials, Fac. of Eng., Mie University

【はじめに】

膝関節内靱帯はスポーツなどにより損傷を受けやすい靱帯であるが、血管が乏しく自然治癒能力が低いため、一度断裂などの損傷を受けると他のもので置換しなければならない。現在最も頻繁におこなわれている治療法は腱の一部を採取し移植するという方法であるが、腱を採取した部分の動きが弱くなるといった問題が生じる。そこで、生体外で組織工学的に再生することができる材料が開発できればより理想的な治療法となると考えられる。

膝関節内靱帯はコラーゲン、エラスチンなどの細胞外基質と線維芽様の細胞から構成されていることが知られており、その中でもコラーゲンは組織の力学的強度、エラスチンは組織の柔軟性を担っていると考えられる。したがって、柔軟性を有する靱帯組織の再生にはエラスチンが必要不可欠であると考えられる。また、コラーゲン、エラスチンなどの細胞外基質が靱帯細胞に与える影響などはほとんど明らかにされていないのが現状である。そこで、本研究では靱帯組織再生に関する基礎研究として、特にエラスチンに着目し、細胞外基質が靱帯細胞に与える影響を検証した。

【方法】

1) エラスチン表面への靱帯細胞の応答性の評価

本研究では豚血管から抽出および水溶化した 5 種類の分画エラスチン (A~E) を使用した。φ35 浮遊培養用シャーレにコロナ放電を施すことで表面処理を行い、エラスチン水溶液 (1 mg/ml) でコーティング (4℃, 5h) することにより、エラスチンコーティングシャーレを作製した。そこにヒト歯周靱帯線維芽細胞 (HPdLF) を播種し、位相差顕微鏡下で 5 分ごとに撮影を行いながら 10 時間培養した。培養終了後、画像を用いて動画を作製し、以下の式を用いて接着率・伸展率を評価した。

接着率 (%) = 接着細胞数 / 全細胞数 × 100

伸展率 (%) = 伸展細胞数 / 接着細胞数 × 100

2) 表面抗原発現の評価

1)と同様の方法で作製したエラスチンまたはコラーゲンコーティングシャーレに HPdLF を播種し、インキュベーター (37℃, 5%CO₂) 内で sub-confluent になるまで培養した。その後、CD29、CD44 抗体を用いてフローサイトメトリーにより表面抗原の発現量を評価した。

【結果・考察】

本研究室で抽出し、分画したエラスチンによって細胞接着性、伸展性が異なることがわかった (Fig. 1)。Elastin C~E では、接着率、伸展率共に 90%以上というかなり高い値を示したのに対し、Elastin A、B ではそれらと比較して接着率、伸展率ともにかなり低い値となった。

Fig.1 Adhesion and spreading ratio of periodontal ligament cells on elastin coating dish

フローサイトメトリーによる表面抗原発現の解析結果から、CD29、CD44 とともにコラーゲン上で培養した靱帯細胞はピークが左にシフトし表面抗原の発現量が低下した (Fig. 2)。しかし、エラスチン上で培養した靱帯細胞では表面抗原の発現量は何もコーティングしていないものと同様もしくはそれ以上の発現量を有していることがわかった。したがって、生体内の靱帯においてエラスチンは組織に柔軟性を与えるだけでなく、靱帯細胞の機能維持にも関与している可能性があると考えられる。

Fig.2 Expression of CD29 and CD44

【結論】

以上の結果から、本研究室で抽出し分画したエラスチンへの細胞応答は、全て同じではなく、異なることがわかった。また、エラスチンは靱帯細胞の機能維持に関与している可能性があることが示唆された。