

O2-1

靱帯細胞の三次元培養基材形状および力学刺激による表現型の制御

The technique to control the phenotype of the ligament cells
by three dimensional cell scaffolds and mechanical stress

○ 水谷直紀 (三重大) 前田裕子 (三重大) 白土絵里 (林兼産業 (株))

長谷川正裕 (三重大) 竹林貴史 (三重大) 宮本啓一 (三重大) 堀内孝 (三重大)

Naoki MIZUTANI, Mie University, Yuko MAEDA, Mie University, Eri SIRATSUTI, Hayashikane Sangyo Co.,Ltd.
Masahiro HASEGAWA, Mie University, Takafumi TAKEBAYASHI, Mie University,
Keiichi MIYAMOTO, Mie University, Takashi HORIUCHI, Mie University**Abstract:** To develop the treatment method for ligament reconstruction, we cultured the human anterior cruciate ligament cells and the human periodontal ligament cells, and examined their characteristics. In addition, the development of the cell scaffolds and the searching of the factor to control the phenotype of the ligament cells were performed.

In this study, the three-dimensional biocompatible scaffold was made from elastin and collagen, which are the extracellular matrix (ECM) components that make up a ligament, originating from a living body. Ligament cells were seeded on the ECM scaffold, and then mechanical stress was applied to the cells. As a result, the differentiation-inducing effect by ECM and mechanical stress was suggested. Furthermore, the results from this study suggested that the supplemental ECM to the culture medium, the culture period on the scaffolds and the condition of mechanical stress would control a phenotype.

Key Words: elastin, ligament, mechanical stress

1. 諸言

靱帯 (前十字靱帯) はスポーツ時の過度なストレス等により損傷を受けやすく、断裂した場合には自然治癒されにくい。そのため、組織工学的な靱帯治療の発展への期待が高まっている。そこで、本研究では靱帯再生治療法の開発のための基礎的研究として、歯周靱帯細胞と前十字靱帯細胞の培養を行い、それぞれの表現型を制御するための因子の探索、および材料開発を行った。

一般に靱帯は、骨同士を結合する線維性結合組織であり、その主成分はエラスチンやコラーゲンといった細胞外基質である。また、靱帯は関節内で圧力などの力学刺激を受けながら、ねじれ運動などの複雑な動きを伴う関節の安定性を維持するため、高い強度と運動性が求められる。これらを踏まえ、靱帯細胞表現型を制御する因子として「細胞外基質 (ECM: extracellular matrix)」、 「細胞足場材料」、 「力学的刺激」に着目した。

細胞外基質にはエラスチンとコラーゲンを使用し、これらが靱帯細胞に与える影響を検証した。また、エラスチンとコラーゲンから三次元足場材料を作製し、細胞の三次元培養を行った。さらに、足場材料上の細胞に力学的刺激を与えることで、靱帯細胞表現型の制御を試みた。

2. 方法

2-1 培地への細胞外基質 (ECM) 添加試験

ECM には、本研究室にて豚大動脈より抽出・水溶化したアイソタイプ型エラスチン A~E⁽¹⁾ のうちエラスチン A と E、さらに I 型アテロコラーゲンを使用した。これらを靱帯細胞培養培地へ添加し、靱帯細胞への影響を検証した。表現型確認として、RT-PCR 法による mRNA 発現および骨形成マーカー発現の定量を行った。

2-2 靱帯細胞培養足場基材の作製

アイソタイプ型エラスチンのうちエラスチン A と、I 型アテロコラーゲンを使用した。これらを用いて、エレクトロスピンニング法にて高弾性および高配向性を有する ECM マイクロファイバー基材 (繊維径数マイクロメートル) をそれぞれ作製した (Fig.1 a, b)。またファイバー基材を二次形成することで直径 5 mm、厚さ 3 mm 程度のペレット状培養基材を作製した (Fig.1 c, d)。

2-3 足場基材上での靱帯細胞培養および力学刺激の適用

作製した足場基材上で靱帯細胞の培養を行い、その後靱帯細胞に加圧刺激 (0.8 MPa) を適用した。その際、足場基材上での培養期間 (3, 7, 10, 14, 21 days) および力学刺激の適用期間 (3, 6, 12, 24 h) を変化させることで、それぞれが靱帯細胞に与える影響を検証した。

3. 結果・考察

本研究で作製したファイバー基材は高い配向性を有しており、強度も生体組織に近い 1~2 MPa の弾性を示した。ペレット状培養基材を走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM) にて観察した結果、エラスチンペレットおよびコラーゲンペレットの平均繊維径はそれぞれ $2.2 \pm 0.55 \mu\text{m}$ と $0.76 \pm 0.36 \mu\text{m}$ であった (Fig.1)。さらに、培養基材に播種した靱帯細胞を共焦点顕微鏡にて観察した結果、培養基材表面から 100 μm 程度まで細胞の存在を確認した。特に表面から 40 μm 程度に多くの細胞が分布することが分かった。

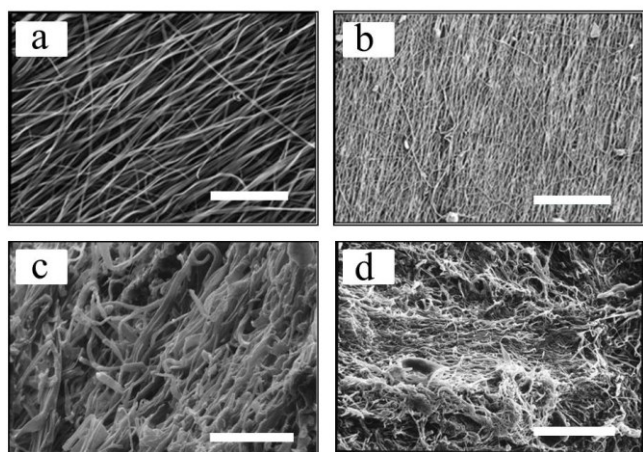


Fig. 1 SEM images of ECM scaffold
 (a) elastin fiber scaffold. (b) collagen fiber scaffold. (c) elastin pellet scaffold. (d) collagen pellet scaffold. Scale ber = 45 μ m

ECM が靭帯細胞に与える影響を、ECM 添加試験および ECM 基材上での細胞培養により検証した。その結果、ECM による分化誘導効果が期待できる結果となった。特に、エラスチン基材上で培養した靭帯細胞の骨形成マーカー (Alkaline Phosphatase: ALP) の発現量は、コラーゲン基材上のものよりも高い結果となった。つまり、エラスチンによる骨分化誘導効果が示唆された。エラスチンによる骨分化誘導効果は、培養基材上での培養期間が長いほど高い効果が得られる結果となった (Fig.2)。加えて、エラスチン基材上で培養した細胞に加圧刺激を与えることで、骨分化誘導効果がさらに促進することが明らかとなった (Fig.2)。また、加圧刺激の影響はその適用時間が長いほど効果的であることが明らかとなった。これらの結果からエラスチン基材上での培養期間と加圧刺激期間の組み合わせにより、効率的に靭帯細胞の表現型制御、特に骨分化誘導制御が可能となることが期待できる。

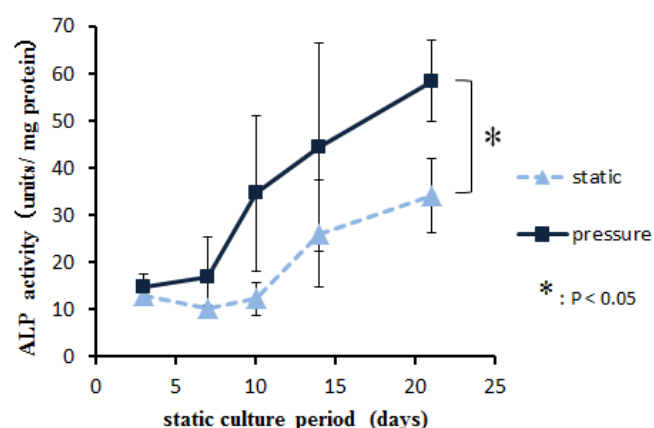


Fig. 2 Alkaline Phosphatase activity vs. static culture period of ligament cells in elastin pellet
 Closed triangle and closed square shows static culture and pressurized culture, respectively. n=4

4. 結論

本研究の結果より、靭帯細胞と細胞外基質との相互作用が示唆された。特に、アイソタイプ型エラスチンによる靭帯細胞の骨分化誘導効果が期待できる結果となり、本研究で作製した足場基材の有用性が期待できる。

また、この分化誘導効果は加圧刺激型の動的培養技術と組み合わせることで、より効率的な制御が可能であることが示唆され、将来の靭帯治療への応用が期待できる結果となった。

5. 引用文献

- (1) Miyamoto K, Atarashi M, Kadozono H, et al : Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker. Int J Biol Macromol, vol.45, pp.33-41, 2009