

# 構造の異なるコラーゲンシート上で作製した組織再生材料 (TEC) の引張特性

## Tensile properties of stem cell-based tissue engineered constructs synthesized on various types of collagen sheets

○ 池谷 基志 (首都大), 大家 溪 (東海大), 鈴木 大輔 (札幌医大), 小倉 孝之 (ニッピ(株)),  
小山 洋一 (ニッピ(株)), 杉田 憲彦 (阪大), 中村 憲正 (阪大), 藤江 裕道 (首都大)

Motoshi Ikeya, Tokyo Metropolitan University

Kei Oya, Tokai University

Daisuke Suzuki, Sapporo Medical University

Takayuki Ogura, Nippi, Incorporated

Yoichi Koyama, Nippi, Incorporated

Norihiko Sugita, Osaka University

Norimasa Nakamura, Osaka University

Hikomichi Fujie, Tokyo Metropolitan University

**Abstract:** Improvement of mechanical properties of a mesenchymal stem cell (MSC) -based tissue engineered construct (TEC) is important for repairing cartilage, ligament, and tendon. For this purpose, the TEC was synthesized with a collagen sheet whose surface was rough or smooth (RCS or SCS). The MSC was cultured on each collagen sheet. The tensile strength of TEC/RCS was decreased after 28 days cultivation. On the other hand, the tensile strength of TEC/SCS was significantly increased. From the optical microscopic observation of the tissues, cell density of the TEC/SCS surface was obviously higher than that of TEC/RCS. These results indicate that the SCS is adequate for the improvement of the mechanical properties of TEC.

**Key Words:** Stem cell-based tissue engineered construct (TEC), Mesenchymal stem cell, Collagen sheet, Tensile property

### 1. 緒言

間葉系幹細胞 (MSCs) が細胞外基質 (ECM) を自己生成することで作製される TEC (stem cell-based tissue engineered construct)<sup>1)</sup> は、損傷した軟骨、腱、靭帯の修復材料として期待されている。しかし、医用応用には、TEC のコラーゲン密度が低く、強度が不足している。そこで本研究では、TEC とコラーゲンシート (CS) を複合させることで、TEC のコラーゲン密度を増大させることを考案した。CS はブタ真皮由来のコラーゲン線維からなるシートであり、線維組織の修復に効果があることが報告されている<sup>2)</sup>。また、コラーゲンは細胞の伸展、増殖や ECM 生成を促進させることが知られており、CS と TEC を複合させることで、軟骨や腱、靭帯修復において優れた効果が期待できる。また、細胞の伸展、増殖や ECM 生成はスキャフォールドの構造が影響することがわかっている。本研究では、線維径が太く粗い表面の Rough CS (RCS) と線維径が細く表面が滑らかな Smooth CS (SCS) を培養基板として用いて TEC/CS 複合体を作製し、その構造と引張特性について調べた。

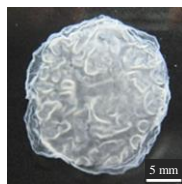


Fig.1 Appearance of TEC.

リン酸を培地に添加し 7, 14, 28 日間培養し、TEC/CS 複合体を作製した (TEC/RCS 群, TEC/SCS 群)。比較対照として 28 日間培地に浸漬した RCS, SCS を作製した (RCS 群, SCS 群)。

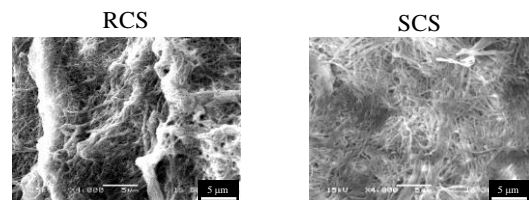


Fig.2 SEM images of RCS and SCS.

### 2-2 引張試験方法

引張試験には我々の研究室で独自に開発した引張試験機を用いた。プレロードを 4 mN 与え、その状態をひずみ 0 と定義し、引張速度 0.05 mm/s で組織が破断するまで引張荷重を与えた。試験は、37°C のリン酸緩衝塩 (PBS(-)) 溶液中で行った。TEC/CS の厚さと引張試験機のチャック部幅 6 mm から試験片の断面積を求めた。引張試験から得た荷重を断面積で除し、公称応力を求めた。

### 2-3 組織観察方法

組織観察用の試料作製では、28 日間培養した TEC/CS を Karnovsky 溶液で 24 時間浸透させ固定した。次に、70, 80, 90, 100% のエタノールに各 1 時間浸漬し、脱水を行った。その後、キシレンに 2 時間浸漬し、6 時間パラフィンに浸漬した。パラフィンブロックを作製後、マイクロトーム (REM-710, 大和工機工業) を用いて厚さ 4 μm に切り出した。ヘマトキシリンで核を、エオジンで細胞質類を染色し、

### 2. 実験方法

#### 2-1 TEC/CS 複合体作製方法

RCS または SCS (ニッピ(株)) を培養皿に設置して、ヒト膝関節滑膜より採取した MSCs を初期細胞密度  $4.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> で培地中に播種した。0.2 mM のアスコルビン酸 2

組織の断面を観察した。また、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察試料の作製のため、TEC/CS を Karnovsky 溶液で 24 時間前固定した後、1% 四酸化オスmium溶液により 2 時間後固定処理を行った。その後、50, 70, 80, 90, 95, 100% の順に各 20 分間エタノールで脱水し、臨界点乾燥した。Pt-Pd を 10 nm コーティングした後、走査型電子顕微鏡 (JSM-6380LA, JEOL) で組織表面及び断面を観察した。

### 3. 実験結果

7 日間培養した TEC/RCS の強度は RCS よりも有意に低下し、培養日数の増加とともに強度が低下する傾向を示した。一方で、TEC/SCS の強度は培養 7 日目で SCS と比較して低下したが、その後培養を継続することで、強度が 7 日目と比較して有意に増加した。28 日間培養した TEC/SCS の強度は SCS と有意な差はないが、高い値だった。

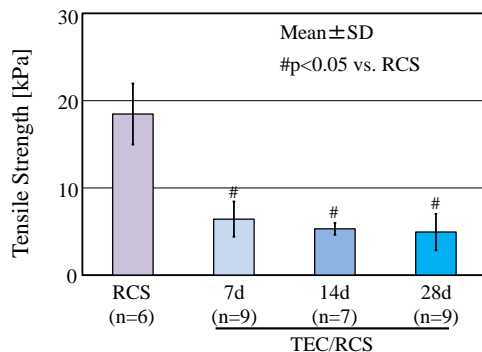


Fig.3 Tensile strength of RCS and TEC/RCS after 7, 14, 28 day cultivation.

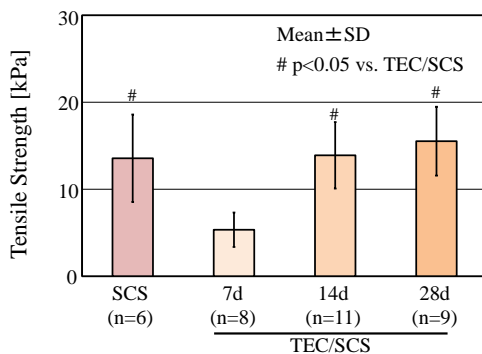


Fig.4 Tensile strength of the SCS and TEC/SCS after 7, 14, 28 day cultivation.

TEC/RCS の HE 染色による組織断面観察では、表層で MSCs と線維が分散している様子が観察された。SEM 断面の観察でも MSCs やコラーゲンが分解されている様子は観察されなかった。しかし、TEC/SCS では MSCs がコラーゲンを分解し、CS 内部に浸潤している様子が HE 染色像と SEM 像両方で観察された。また、SEM による組織表面の観察では、TEC/RCS では MSCs の密度が低く、線維が分散しているのに対して、TEC/SCS では、MSCs と MSCs が生成した基質により、SCS 表面が覆われている様子が観察された。

### 4. 考察

TEC/SCS の破断強度は、培養を継続することで増加した。組織表面には、高密度に MSCs が存在し、培養過程で SCS のコラーゲン線維を分解し、SCS 内に浸潤していた。一方で、TEC/RCS の強度は、培養日数の増加とともに低下した。組織表面の MSCs の密度は TEC/SCS と比較して低く、線維

が分散している様子が観察された。これは、RCS は線維径が太く、間隙率が高いことから、MSCs が RCS 内に浸潤し、分散したためと考えられる。このため、RCS 上には強度の低い TEC が生成され、TEC/RCS の強度が低下したと考えられる。これに対して、SCS は線維径が細く、間隙率が低い構造のため、MSCs が SCS 内に浸潤せずに高密度で存在し、SCS 上で高強度な TEC が生成されたと考えられる。さらに、高密度に存在する MSCs により、コラーゲン線維が分解され、低分子化したコラーゲンペプチドやアスコルビン酸 2 リン酸などの効果により MSCs が強固なコラーゲンを生成して、TEC/SCS の強度が向上した可能性も考えられる<sup>2)</sup>

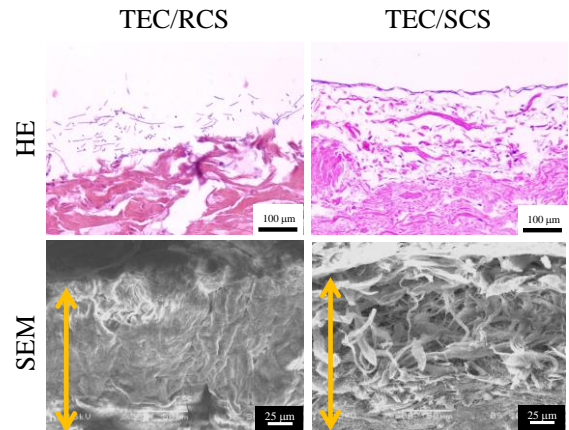


Fig.5 Optical microscopic images (HE stain) and SEM images of the cross-sectional area of TEC/RCS and TEC/SCS after 28 day cultivation.

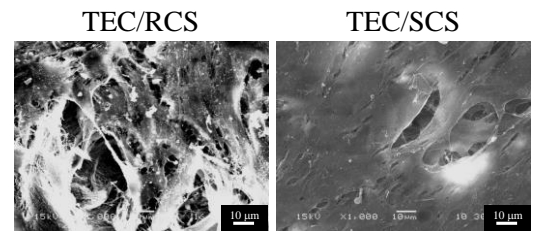


Fig.6 SEM images of the surfaces of TEC/RCS and TEC/SCS after 28 day cultivation.

### 5. 結言

TEC/RCS では、TEC が生成されず培養日数とともに強度が低下したのに対し、TEC/SCS では CS 表層でコラーゲンの分解と TEC の生成が行われ、培養日数とともに強度が増加した。以上より、TEC は平滑な表面をもつ CS との複合化によって、組織の引張特性を向上できることがわかった。

### 謝辞

この研究は、科研費基盤 B, 首都大学東京全学傾斜研究, および文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (工学院大総研 BERC, FMS) の助成を受けた。

### 参考文献

- W. Ando, K. Tateishi, Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, Vol.28, pp.5462-5470, 2007.
- 鈴木大輔, 藤宮峯子, コラーゲンシートとコラーゲンペプチドを用いた膝蓋靭帯の再生, *日本臨床バイオメカニクス学会抄録集*, Vol.39, pp.161, 2012.