

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04097

研究課題名(和文) 軟骨細胞/アルギン酸ファイバーによる3次元編み構造培養軟骨の創製技術の開発

研究課題名(英文) Fabrication of three-dimensional woven structural cultured cartilage with chondrocyte-enclosing alginate fiber

研究代表者

森田 有亮 (Morita, Yusuke)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：80368141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨再生において、広範囲の軟骨損傷に対応できるような力学特性に優れた培養軟骨の作製は重要な課題である。本研究では、軟骨細胞/アルギン酸ファイバーによる編み構造体を創製する技術を開発した。開発した編み構造体には、編み構造を通じた栄養供給の維持が期待される。紡糸過程において軟骨細胞の活性は低下せず、培養に伴い軟骨細胞はアルギン酸ファイバー内で増殖した。編み構造体全体においてコラーゲンとプロテオグリカンの産生がアルギン酸ファイバーに沿って確認された。開発した編み構造体創製技術によって、優れた力学特性を獲得するため長期培養において軟骨細胞活性を維持する編み構造体の構築が可能となることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スキャホールドを用いずに培養軟骨の3次元組織化が試みられているが、いまだ実用的な欠損サイズへの対応は困難である。本研究では、任意の形状で形成可能な軟骨細胞/アルギン酸ファイバー3次元編み構造体の創製技術を開発した。ファイバー間を通じた栄養供給の維持による編み構造体の長期培養を可能とすることで培養軟骨全層において細胞活性の低下を抑制し均一な細胞外基質の産生を実現した。また、力学特性に優れた広範囲欠損に対応可能な培養軟骨が作製できることで、軟骨疾患の再生医療分野における新たな発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In cartilage regeneration, it is required to prepare cultured cartilage that has superior mechanical properties and enable to apply for wide defect. In this study, we developed the knitting technique to fabricate the three-dimensional mesh fabric knitted by the chondrocyte-enclosing alginate fiber. It was expected that culture medium supply was maintained through mesh structure. Chondrocytes proliferated in the alginate fibers during cultivation. Synthesis of proteoglycan and collagen were confirmed along the alginate fibers in the mesh fabric. These results showed that the developed knitting technique enabled to form mesh fabric which can maintain chondrocyte activity during long-term cultivation to obtain superior mechanical properties.

研究分野：機械材料・材料力学

キーワード：軟骨再生 アルギン酸 細胞ファイバー 編み構造 培養軟骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軟骨再生の臨床的な試みでは、患者の早期治癒のために広範囲にわたる再生軟骨の十分な力学特性の獲得と周辺組織との力学特性の一致は極めて重要な課題である。そのため、生体外においてスキャホールドを用いず力学特性に優れた培養軟骨の作製が試みられている。軟骨再生分野では、培養軟骨の力学特性獲得のため細胞外基質 (ECM) 産生の促進に着目した研究が進められてきた。しかし、生体外で作製した培養軟骨の力学特性は生体軟骨に著しく劣り、実用的な大きいサイズでの培養軟骨の作製は困難である。

生体軟骨ではコラーゲン線維が階層的な網目構造を形成し、荷重支持性と衝撃吸収性に富んだ軟骨特有の力学挙動を実現している。一方、軟骨細胞に産生されたプロコラーゲンやプロテオグリカン低分子が重合することで ECM 構造が形成されるが、生体外において生体軟骨に類似した網目構造が自発的に形成されることは期待できない。培養軟骨の力学機能向上には、生体軟骨に類似した ECM 構造の早期形成が不可欠と考える。また、力学特性向上には十分な培養期間が必要であるが、生体外培養においては細胞周辺に産生された ECM により培養液の供給が阻害され、培養日数に伴い細胞死が引き起こされる。

よって、広範囲欠損に対応でき力学機能に優れた軟骨組織を再生するためには、培養軟骨の形状・構造を制御することで、再生過程において生体軟骨に類似した組織構造に誘導し、力学特性獲得まで長期間にわたり培養軟骨内での細胞活性を維持することが重要となる。

2. 研究の目的

ファイバー状にした軟骨細胞/アルギン酸複合体を 3 次的に編み構造として集積させることで、広範囲の軟骨損傷に対応できるような力学特性に優れた培養軟骨を作製する技術の開発を目的とする。その際、患者の欠損サイズや形状に応じた培養軟骨の形状構築の自由度、長期培養における軟骨細胞活性の維持および ECM の産生促進が重要となる。本研究では、軟骨細胞の活性化と生体軟骨に類似した再生軟骨組織の 3 次元構造化の視点から、培養軟骨の力学機能の向上を試みる。

3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞/アルギン酸 3 次元編み構造体作製装置の開発

軟骨細胞/アルギン酸ファイバーを集積させ 3 次元編み構造体を作製するために、図 1 に示す 3 次元紡糸装置を作製した。紡糸装置は、紡糸溶液を押し出すシリンジポンプ、CaCl₂ 溶液槽、ファイバーを集積させる剣山型ホルダー、吐出ノズルおよびノズルを移動させる 3 軸アクチュエーターで構成された。ノズル先端を CaCl₂ 溶液中で紡糸溶液を押し出しながら移動させることで、軟骨細胞/アルギン酸ファイバーの形成とホルダーへの集積を可能とする機構とした。ノズルの移動パターンはプログラミングにより制御し、移動パターンにより任意の編み構造とすることが可能である。アルギン酸溶液に単離したブタ関節軟骨細胞を混合することで、アルギン酸濃度 1.0 w/v%、細胞密度 4.0×10⁶ cells/ml の紡糸溶液を調製した。先端内径 60 μm のノズルより 1.2 w/v% CaCl₂ 水溶液中に紡糸溶液を押し出し、3 次元編み構造体を作製した。位相差顕微鏡を用いて作製した編み構造体の形態を観察した。紡糸が細胞に与えるダメージを評価するため、ファイバー内の生細胞を Calcein AM、死細胞を Ethidium homodimer で染色し、蛍光観察により細胞の生存率を評価した。

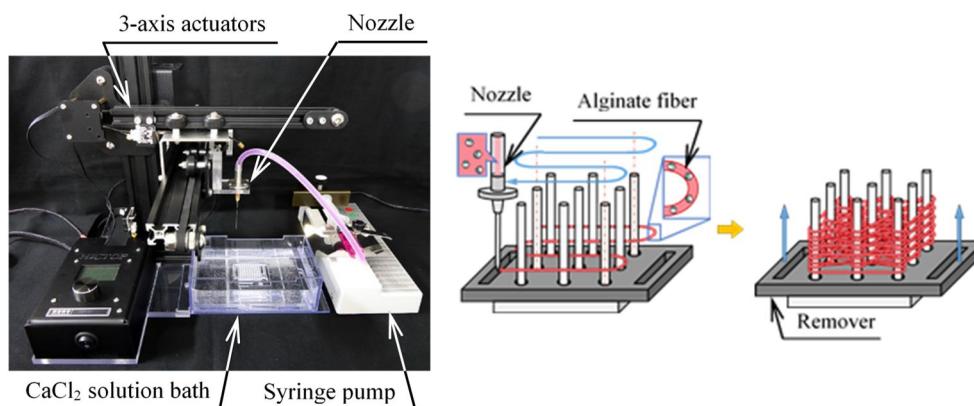


図 1 軟骨細胞/アルギン酸 3 次元編み構造体の紡糸装置

(2) 培養による軟骨細胞/アルギン酸 3 次元編み構造体の活性評価

(1)と同様の条件により作製した 3 次元編み構造体を、10%牛血清、抗生物質および L-アスコルビン酸を含む DMEM を用いて 7 日および 14 日間培養した。比較対照として同体積、同細胞

密度の紡糸溶液をシート状に固めた軟骨細胞/アルギン酸シートを準備した。培養後に編み構造体とシートを位相差顕微鏡で観察し、アルギン酸ファイバー内の軟骨細胞の形態を観察した。多光子励起顕微鏡 (MPM) を用いた第二高調波発生 (SHG) 光の検出によるコラーゲンの 3 次元観察およびサフラニン O 染色によるプロテオグリカン (PG) の産生評価を行った。また、編み構造体内に産生された ECM 産生量を DMMB 法により測定し、編み構造体内の軟骨細胞数の指標として DNA 量を測定した。

(3) ヘパリン添加による軟骨細胞活性向上の試み

アルギン酸ファイバー内での軟骨細胞の活性促進を目指しヘパリン添加の効果の評価した。

(1)と同様に調整した紡糸溶液に、1, 3 および 5 w/v% となるようにヘパリンを添加した。作製した軟骨細胞/アルギン酸 3 次元編み構造体を培養し、(2)と同様の評価方法によりヘパリン添加が細胞活性と ECM 産生量に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 軟骨細胞/アルギン酸 3 次元編み構造体作製装置の開発

作製した編み構造体はノズルの移動パターンを反映した編み構造を維持していた(図 2)。また図 2 (b)より直径約 100 μm のアルギン酸ファイバー内に軟骨細胞が一様に分布していることを確認した。編み構造体内の細胞生存率は 83.1%、シート内の細胞生存率は 84.7%であった。これら細胞生存率は細胞培養における継代時と同じであり、細胞培養に十分な生存率であった。これらより、開発した創製技術により、プログラムしたノズルの移動パターンを有した軟骨細胞/アルギン酸 3 次元編み構造体が作製可能であることを確認した

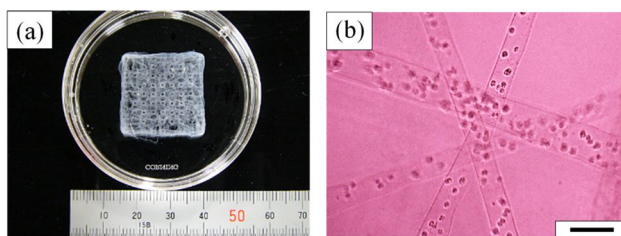


図 2 作製した軟骨細胞/アルギン酸 3 次元編み構造体

(2) 培養による軟骨細胞/アルギン酸 3 次元編み構造体の活性評価

位相差顕微鏡観察より、培養に伴い編み構造体のアルギン酸ファイバー内で軟骨細胞が増殖していることを確認した。軟骨細胞/アルギン酸シートにおいても、培養に伴い軟骨細胞が増殖し、培養 14 日目にはシート表面近傍に増殖する様子が確認された。サフラニン O 染色による PG の観察 (図 3) より、細胞周辺に産生された PG がアルギン酸ファイバーに沿って分布し、また PG 産生量は培養に伴い増加していた。シートにおいても細胞周辺に PG が産生され、位相差顕微鏡観察と同様にシート表面近傍に集中して PG が産生されていた。SHG 光の検出によるコラーゲン分布観察 (図 4) においても、編み構造体では細胞周辺に産生されたコラーゲンが培養に伴いアルギン酸ファイバーに沿って増加していた。一方で、シートではコラーゲンの分布がシート表面に集中し、表面から 300 μm より深部の領域ではコラーゲンの産生が確認されなかった。編み構造体およびシートの GAG 量および DNA 量は、いずれも培養に伴い増加する傾向が得られ、編み構造体の GAG 量および DNA 量はシートよりも高くなった。これらより、シートでは深部への栄養供給の阻害による細胞活性低下にともない ECM 産生量が減少するが、開発した編み構造体ではファイバー間を通じた培養液供給により内部においても軟骨細胞の活性と ECM の産生が維持されることが示された。

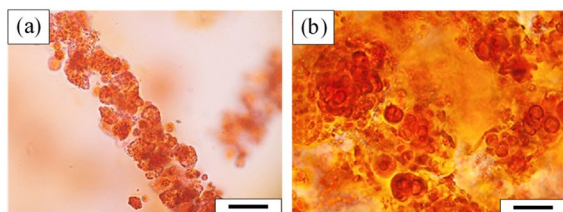


図 3 サフラニン O 染色結果
(a) 編み構造体 (b)シート

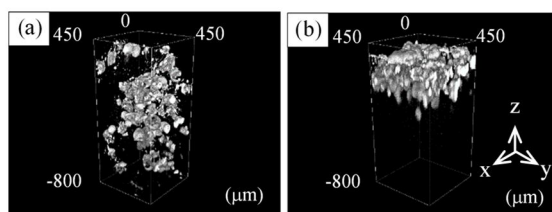


図 4 MPM によるコラーゲン観察
(a) 編み構造体 (b)シート

(3) ヘパリン添加による軟骨細胞活性向上の試み

1, 3 および 5 w/v% のヘパリン添加において、いずれの添加濃度でも細胞生存率は 80% 以上であった。培養 7 日後の SHG 観察およびサフラニン O 染色観察より、編み構造体内において細胞周辺にコラーゲンおよび PG が産生されている様子が観察された。培養 14 日後では、産生されたコラーゲンと PG は、細胞周辺からファイバーに沿って広く分布し、またヘパリン添加濃度の

上昇に伴い多く産生されていた。しかし、培養 7 日後の編み構造体ではヘパリン添加による ECM 産生量に差は見られなかった。培養 7 および 14 日後の GAG/DNA 測定において、いずれのヘパリン添加濃度においても培養に伴い ECM 産生量は増加し、またヘパリン添加濃度の増加に伴い GAG/DNA が増加する傾向が見られた。しかし、ヘパリンを添加した場合の GAG/DNA は添加しない場合と比較して ECM 産生量が低くなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenta Yoshitomi, Koji Yamamoto, Eiji Nakamachi, Yusuke Morita
2. 発表標題 Development of three-dimensional mesh fabric constructed with chondrocyte-enclosing alginate fiber
3. 学会等名 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterial (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------