

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19560781

研究課題名（和文） 生体環境を模倣する培養工学的な軟骨組織再生

研究課題名（英文） Regeneration of tissue engineered cartilage in vitro under culture conditions mimicking intact tissue circumstances

研究代表者

山本 進二郎（YAMAMOTO SHINJIRO）

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：40262307

研究成果の概要：

継代培養操作は多数の細胞を得るには有効であり、移植用の組織再生に利用できる。しかし軟骨細胞は、継代培養操作を行うと脱分化して組織再生が難しくなる。軟骨細胞の分化マーカーであるⅡ型コラーゲンを再発現させる培養技術の開発が重要である。本研究では、培養条件として体内環境を模倣する低酸素分圧や細胞が凝集する条件が軟骨細胞の再分化やコラーゲン合成に有効であることを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学

キーワード：軟骨細胞、生物・生体工学、再生医療、細胞凝集、Ⅱ型コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

膝軟骨組織に障害を抱える患者数は日本の人口の1%を超える。障害の主な原因は、膝関節軟骨の磨耗や消耗、体重増加による軟骨への負担や長寿による軟骨の老化などである。高齢化が進む日本では患者数はさらに増加すると予測されている。軟骨組織には血管がないために、一旦多量に損傷すると体内での回復が難しく、その際には主に人工関節が利用されるが、拒絶反応や半永久的な利用が困難などの問題がある。人工関節に代替する方法として期待されている技術が、自らの細胞を体外で培養・組織再生して利用する自

家移植である。しかし、体外培養した軟骨細胞は、継代培養に伴って脱分化し、組織特異的なタンパク、例えばⅡ型コラーゲンやアグリカンコアタンパクなどの発現が無くなることや組織形成に重要なグリコサミノグリカンが低分子化することなどが問題視されている。継代培養した軟骨細胞を再分化させる培養操作技術の開発が求められている。

組織再生において組織が置かれた生体環境を模倣する培養条件は、細胞の正常な代謝を引き出す上で重要なことが指摘されている。既往の研究では、コラーゲンや生分解性ポリマーを用いて軟骨細胞を包括或いは培

養基材として利用して増殖や代謝特性が調べられ、包括固定することが軟骨の再分化に有効なことが報告されている。また軟骨組織が体内で圧力負荷や低酸素分圧などの培養雰囲気下に存在していることから、これらの軟骨細胞への影響が調べられ、効果があることが報告されている。しかしいずれも初代細胞や継代数が小さい細胞を使う場合がほとんどである。多数の継代培養操作をした軟骨細胞を、生体環境に近い低い培養条件で培養して、再分化に有効な培養操作条件を検討した研究例はあまり見当たらない。適切な組織を再生させるには継代培養操作とそれに伴って脱分化する細胞を再分化させる条件の検討が不可欠である。これまでの研究では、モデル動物の初代細胞を使って組織特異的なタンパクの mRNA 発現に関する検討が多い。ヒトに関する研究も行われているが、初代細胞か数継代した細胞がほとんどである。自家移植を想定した場合、多量の軟骨細胞が必要であるため、初代細胞では不十分である。細胞数を増やすには継代培養が有効であるが、脱分化するので、再分化させることが重要である。再分化させる培養技術としてゲル培養が有効であるが、ゲルに軟骨細胞を包括固定するため、十分な細胞数が期待できない。したがって、多くの細胞数を確保して、再分化条件を見出すことが重要と考えられる。本研究で提案するのは、軟骨細胞を継代培養して必要な細胞数を確保し、継代培養に伴って脱分化した軟骨組織を再分化させる条件を見出すことである。この方法であれば、十分な細胞数の準備ができ、再分化に成功すれば、軟骨組織の再生が可能になる。申請者らは、軟骨組織は体内において低い酸素分圧下で球状に存在していることに着目して、生体に近い条件、すなわち体内環境を模倣した培養条件下で軟骨細胞を培養し、低酸素分圧の条件が、再分化に関わる分化マーカーの II 型コラーゲン合成を向上する知見を得ている。

2. 研究の目的

軟骨細胞が体内で存在する環境を模倣することが再分化に密接に関係すると想定して、脱分化した軟骨細胞の再分化条件を見出すことを目的としている。体内を模倣する条件としては、主に、低酸素分圧と細胞凝集の条件を検討する。低酸素分圧に関する研究報告は多いが、継代培養した軟骨細胞の再分化条件や II 型コラーゲン量の検討はあまり行われていない。また、モデル動物の研究例は多いが、本研究ではヒトの細胞を利用して検討する。現在のところ、継代培養した軟骨細胞を低酸素分圧下で培養することによって、II 型コラーゲンの生成量が増加する知見を得ている。細胞凝集に関しては、回転培養によって軟骨細胞の凝集体形成が可能なこと

が報告されているが、継代培養した細胞を使った例は見当たらない。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

①. 細胞

細胞は正常ヒト胎児軟骨細胞 (Human chondrocytes; HC、TOYOBO 社製、femoral cartilage、18 week fetal) を使用した。本培養には、初代から 7 継代した細胞を用いた

②. 培地及び添加物

培地は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を基本培地として、所定量の MEM Non-Essential Amino Acid supplement と Sodium Pyruvate、L-Glutamine、Proline、Penicillin-Streptomycin、10% 血清を含むものを用いた。増殖因子 Transforming growth factor- β 1 (TGF- β) は Roche 社製を用いた。

③. 培養容器への細胞接着阻害剤のコート

細胞を凝集させるためには、ディッシュの底への細胞接着を阻害する必要がある。そのために細胞接着阻害剤 poly-(2-hydroxyethyl methacrylate ; pHEMA) をディッシュの細胞接着面にコートした。所定量の pHEMA を含むエタノール溶液を、培養面積 8.8 cm^2 ディッシュに 1 mL ずつ入れ、 45°C の恒温機でエタノールを乾燥させて pHEMA をコートした。

(2) 実験

本研究では、継代培養して脱分化したヒト軟骨細胞を再分化するために、*in vitro* で軟骨組織を効果的に再生させることを目指し、以下の実験を行った。

①. コラーゲン合成に及ぼす酸素分圧の影響

これまでの研究を通じて、細胞外マトリクスの II 型コラーゲン合成には低い酸素分圧が有効なことを観察しているが、最適な酸素分圧を見出すに至っていなかった。幅広く酸素分圧に関する影響を実験的に調べ、II 型コラーゲン合成量を測定して最適な酸素分圧を検討した。この実験では単層培養で行った。細胞また分化マーカーである II 型コラーゲンの mRNA 発現を分子生物学的に測定して、再分化についても検討を行った。生細胞率や増殖速度などを測定して、代謝産物生産を向上する操作条件も調べ、組織再生に有効な培養操作条件を検討した。

②. 細胞凝集体の形成条件の検討

軟骨細胞は、体内では細胞外マトリクスで覆われ、見かけ上、密な状態と見なすことができ、したがって細胞凝集体は、生体を模倣する培養法として有効と考えられる。これまでの予備実験から、継代培養した軟骨細胞を回転培養することによって細胞凝集体を形成できることを確認している。そこで、細胞凝集体を形成させるために、その因子である回転速度の影響を検討し、細胞凝集の形成時

期や細胞凝集の大きさ、細胞凝集体の分布などを経時的に測定して、凝集体の形成し易い培養操作条件を検討した。さらに細胞凝集体を免疫染色し、II型コラーゲンなどの細胞外マトリクス成分の分布状態を免疫組織学的に観察した。

③. 細胞形態の観察

培養容器の細胞接着面を化学処理して細胞接着を阻害することによって細胞の形態制御の可能性が示唆されている。pHEMA コーとしたディッシュで細胞培養を行い、球状の細胞形態を制御できるかどうか検討した。

④. 細胞増殖に及ぼす増殖因子やアスコルビン酸などの添加効果

自家移植を目標とした場合、軟骨組織をできるだけ早くかつ大量に準備することが重要である。細胞増殖速度を大きくすることが実用上有効であり、それには増殖因子を利用することが効果的である。細胞増殖に有効と報告されている増殖因子 TGF- β の影響を実験的に調べ、細胞増殖する条件を検討した。

コラーゲン合成にはアスコルビン酸が効果的である。継代培養した軟骨細胞のII型コラーゲン(全コラーゲンも含む)合成に及ぼすアスコルビン酸濃度の影響、ならびに最適なアスコルビン酸濃度を検討した。この実験では、単層培養でコラーゲン合成が最適である酸素分圧を用いた。

(3) 分析

①. 細胞計数

単層状の control も凝集体の何れの培養においても、トリプシン処理によりディッシュ或いは凝集体から細胞を剥離した後、遠心操作によって細胞を回収した。血球計算盤で細胞計数を行った。

②. 顕微鏡観察と凝集体解析

単層状の control 培養では、ディッシュをそのまま顕微鏡観察を行った。

凝集体培養では、一旦 96 穴プレートに入れた後、顕微鏡で写真撮影を行った。凝集体情報を電子ファイルに保存した後、コンピュータを利用した画像解析により凝集体の大きさを計測した。

凝集体の密度は、凝集体に含まれる細胞数を、細胞凝集体の平均直径から得られる体積で割って求めた。

③. RNA の抽出と濃度

市販の RNA 抽出キットのマニュアルに従って、control や細胞凝集体から RNA を抽出した。抽出した RNA の濃度は分光光度計により求めた。

④. RT-PCR と遺伝子発現の解析

市販の One Step RNA PCR Kit (Takara 社製)を用いて、抽出した RNA から目的の mRNA を RT-PCR によって増幅した。PCR 産物は、II型コラーゲンが 472 bp、GAPDH が 392 bp であった。

PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動で分析し、目的の mRNA の解析を行った。

目的遺伝子の発現量は画像解析ソフト (Image J) を用いて行った。II型コラーゲンの面積を、ハウスキーピング遺伝子の GAPDH のそれで割ってII型コラーゲンの発現量比を求めた。

⑤. コラーゲン合成量の分析

全コラーゲンとII型コラーゲンの合成量は、それぞれ市販の全コラーゲン分析キットと ELISA 分析キットを用いて分析した。

4. 研究成果

①. コラーゲン合成に及ぼす酸素分圧の影響

Fig. 1 には、II型コラーゲン合成に及ぼす酸素分圧の影響を示す。通常酸素分圧である 20%では、30 日間の培養期間を通じてII型コラーゲンの合成はほとんど観察されなかったが、5.0%以下の酸素分圧では10日以降II型コラーゲンが合成し、時間経過とともに増加する傾向が観察された。10日以降では細胞がほぼコンフルエントになっていたことから、コンフルエントのような細胞密度が高い状態がII型コラーゲン合成、すなわち軟骨細胞の再分化に有効なことが示された。また 2.5%の酸素分圧が最もII型コラーゲンを合成することが見出された。体内の軟骨組織は 1~7.5%の酸素分圧に存在していることから、2.5%の酸素分圧がII型コラーゲンの合成に最適と考えられる。

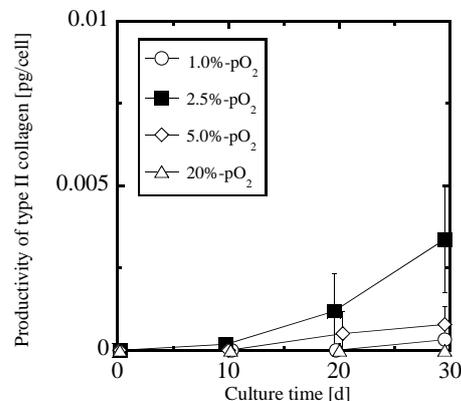


Fig. 1 Productivity of type II collagen for subcultured cells under various oxygen tensions. The data points are average values estimated from three independent experiments. Error bars represent standard deviation of three independent experimental data.

培養 30 日後のII型コラーゲン合成と全コラーゲン合成を検討した結果を Fig. 2 に示す。II型コラーゲンと全コラーゲンの何れも 2.5%が顕著に高いことが観察され、軟骨組織の形成にはこの低酸素分圧が有効なことが示された。なお分化マーカーであるII型コラーゲンの mRNA 発現も観察した。

②. 細胞凝集体の形成条件の検討

Fig. 3 に各回転数における生細胞数の経時変化を示す。90 rpm 以上の回転数では、7 日

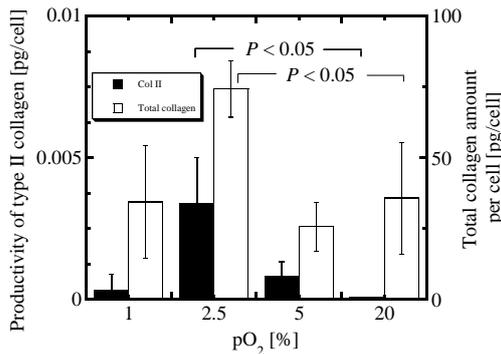


Fig. 2 Effect of oxygen tension on productivity of type II collagen and total collagen production for subcultured cells after 30 d culture. The data points are average values estimated from three independent experiments. Error bars represent standard deviation of three independent experimental data.

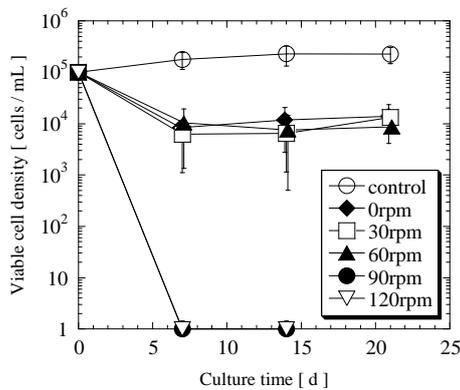


Fig.3 Effect of rotational speed on viable cell densities.

までに細胞が死滅した。controlの細胞では、生細胞数がほぼ一定であった。これは、confluentに近い細胞数で播種したためである。細胞凝集体を形成した0~60 rpmの回転数では、培養開始から生細胞数が減少したが、細胞凝集体形成 (Fig. 4) 後、一定な細胞数を維持していた。これは、細胞凝集体が安定であったためと考えられる。その中でも、0 rpmが最も多い生細胞数を維持していた。細胞凝集は小さかったが、多くの細胞凝集体を得ることができたために、多くの生細胞数を維持することができたと考えられる。このことから、静置培養を含む0~60rpmの回転数

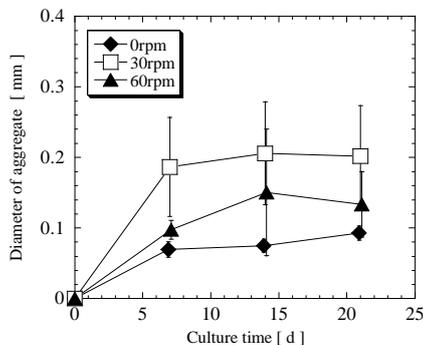


Fig.4 Effect of rotational speed on formation of cell aggregate and its diameter

が細胞数維持に有効であることがわかった。培養開始後、90 rpm以上の回転数では、7日目までに細胞が死滅し、細胞凝集体が形成されなかった。一方、0~60 rpmの回転数で細胞凝集体の形成が観察された。

細胞凝集体は、0~60rpmにおいて培養開始後、速やかに形成されることが観察された。凝集体の平均直径の経時変化を Fig. 4 に示す。30 rpmの回転数で最も大きな細胞凝集体が得られた。数日以内に数個の約200~300 μm の細胞凝集体が形成され、7日以内にその細胞凝集体が接着し、1つになることが観察された。100 μm 以下の細胞凝集体は、接着せず数個残っていた。60 rpmの回転数では、7日目までに約100~200 μm の大きさの細胞凝集体が数十個形成され、7日目以降に細胞凝集体が接着し、1つの細胞凝集体を形成した。回転培養は、細胞凝集体が接着しやすい環境と考えられる。静置培養である0 rpmの回転数では、最も小さく、約70 μm の均一な細胞凝集体を形成していた。これは、ディッシュ表面への軟骨細胞の付着がpHEMAコートにより妨げられ、自己組織化しやすい細胞であったため、細胞凝集体が形成したと考えられる。また回転操作をしていなかったため、大部分の細胞凝集体同士が接着せず、均一な細胞凝集体が形成されたと考えられる。

細胞凝集体を免疫染色し、細胞外マトリクス成分のII型コラーゲンの分布状態を免疫組織学的に観察したところ、中心部が染色されたことから、凝集体の中心部の細胞から再分化することが示唆された。

各回転数におけるII型コラーゲンの遺伝子発現を検討した結果、controlの細胞では、II型コラーゲン遺伝子は発現していなかったが、細胞凝集体を形成していた0~60 rpmの回転数では、II型コラーゲン遺伝子が発現していた。このことから、細胞凝集体がII型コラーゲン遺伝子の発現に有効であることがわかった。ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現も調べ、14日後におけるGAPDHに対するII型コラーゲンの発現量比を計算し、その結果を Fig. 5 に示す。30, 60 rpmの回転数に比べて、0 rpmの静置培養では、II

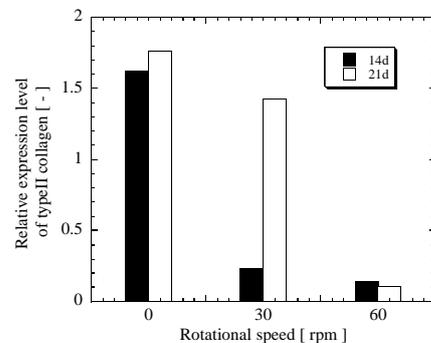


Fig. 5 Effect of rotational speed on mRNA expression of type II collagen.

型コラーゲンが速やかに発現することが観察された。また 21 日後では、0-30rpm での II 型コラーゲン遺伝子の発現比は何れも高くなった。このことから、0-30 rpm の回転数が II 型コラーゲン遺伝子の再発現に有効であることがわかった。

また 2.5%の低酸素分圧下で培養を開始した場合も、細胞凝集の形成が観察された。さらにこの細胞凝集体は細胞数維持や II 型コラーゲン発現に良好に作用するという知見も得られた。

③. 細胞形態の制御培養

培養容器の細胞接着面を化学処理して細胞接着を阻害することによって、浮遊状態の球状細胞が得られ、細胞の形態を球状に制御できる。しかしほとんどの培養で凝集体形成したため個々の細胞が得られず、今後検討すべき課題として残された。細胞接着或いは細胞骨格を阻害するなどの薬剤を使うことにより個々の細胞制御の可能と考えられる。

④. 細胞増殖に及ぼす増殖因子やアスコルビン酸などの添加効果

細胞増殖速度を大きくするために、細胞増殖に及ぼす増殖因子 TGF- β の影響を検討した。さらに全コラーゲンを含む II 型コラーゲン合成に及ぼすアスコルビン酸濃度の影響を検討した。

0-100 ng/L の TGF- β 濃度を凝集体培養に添加して細胞増殖を検討したが、細胞増殖の向上は観察されなかった。なおこの実験は 30rpm の回転数のみの結果であり、回転培養に伴う剪断応力や凝集体での過密な細胞密度などが原因で、増殖に対して効果がほとんど見られなかったと考えられ、静置を含む他の回転数での回転培養を試みる必要がある。

しかし TGF- β はコラーゲン合成に対して効果的に作用することが観察された。単層培養で有効な 2.5%の酸素分圧下で培養を行った。Fig. 6 には、培養 20 日後の、細胞あたりの全コラーゲン合成量を示す。1ng/L の TGF- β が最も全コラーゲン合成に有効なことが観察された。Fig. 7 には、II 型コラーゲン合成に及ぼす TGF- β 濃度の影響を示す。全コラーゲンと同様に 1ng/L が最も II 型コラーゲン合成する結果が得られた。細胞凝集によって細胞間の相互作用が高まる組織様となった

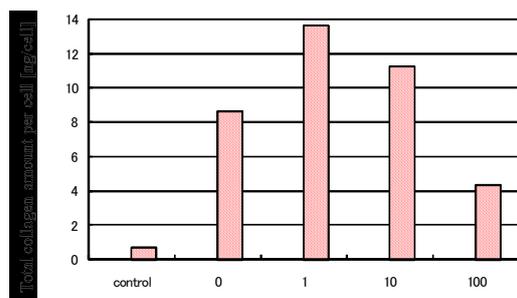


Fig.6 Effect of TGF- β concentration on total collagen amount per cell after 20 d culture under 2.5% oxygen tension.

ために、細胞外マトリクスのこのようなコラーゲン合成が促進されたと考えられる。また II 型コラーゲン合成量が増加していることから、凝集体培養において TGF- β は再分化に有効なことも示唆された。

TGF- β とともにアスコルビン酸の添加もコラーゲン合成に有効であることが見られ、さらに TGF- β とアスコルビン酸を同時に添加する培養においてさらなるコラーゲン合成の促進が観察された。

本研究の条件では、TGF- β やアスコルビン酸はコラーゲン合成を促進することが示されたが、細胞増殖には効果が認められなかった。静置ならびに様々な回転数の回転培養などを行って TGF- β やアスコルビン酸の濃度の影響を検討して、コラーゲン合成を促進する適切な培養条件操作を見出すことが今後の課題として残された。

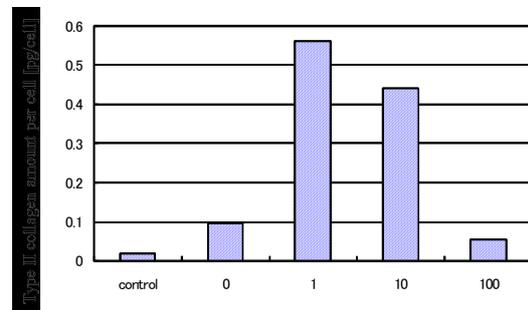


Fig.7 Effect of TGF- β concentration on type II collagen amount per cell after 20 d culture under 2.5% oxygen tension.

⑤. 軟骨組織を再生させるための最適条件の検討とバイオリクター開発

低い酸素分圧や凝集状態など生体環境と類似する細胞条件が、脱分化した軟骨細胞の再分化に有効であることが示された。しかし細胞凝集形成に伴って細胞数の減少が観察されたことから、今後は細胞数の維持や向上を目指す培養操作条件を検討する必要がある。そのために TGF- β を利用する実験を行ったが、適切な TGF- β 濃度ではなかったために細胞増殖の向上が観察されなかった。細胞増殖を向上させる条件を見出すことが今後の検討すべき課題として残された。

静置培養で細胞凝集させて、細胞増殖を維持する培養操作条件が、脱分化した軟骨組織を再分化させ、さらに軟骨組織の再生に有効と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

① 園井理恵、津留田和秀、林修平、山本進二郎、古崎新太郎、塩谷捨明、D-03、継代培養した軟骨細胞の回転操作による細胞凝集

と機能発現、2008

② 津留田和秀、林修平、山本進二郎、古崎新太郎、継代培養した軟骨細胞の低酸素分圧下での凝集化操作と組織再生の検討、P-106、第7回日本再生医療学会総会、2008

③ 津留田和秀、小佐井芳徳、山田通大、林修平、山本進二郎、古崎新太郎、継代培養した軟骨細胞の組織再生における凝集体形成の影響、P-343、第6回日本再生医療学会総会、2007

[その他]

<http://www.life.soyo-u.ac.jp/cell/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 進二郎 (YAMAMOTO SHINJIRO)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：40262307

(2) 研究分担者

古崎 新太郎 (FURUSAKI SHINTARO)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：40011209

(平成19年度)

林 修平 (HAYASHI SHUHEI)

崇城大学・生物生命学部・助教

研究者番号：30389522

(3) 連携研究者

なし