

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20360078

研究課題名（和文） 摺動刺激下の細胞代謝による軟骨最表面構造と潤滑機能の構築メカニズム解明

研究課題名（英文） Development of functional surface structure and lubrication ability in articular cartilage tissue under tribological stimulation

研究代表者

澤江 義則 (SAWAE YOSHINORI)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：10284530

研究成果の概要（和文）：

単離軟骨細胞をアガロースゲルに播種した再生軟骨組織モデルを用い、関節摺動に伴い組織に付加される繰り返し圧縮、せん断、摩擦といった力学的刺激が、組織内での物質輸送や細胞代謝に与える影響を実験的に評価した。その結果を基に、関節軟骨組織がその最表面層部に備えるきわめて洗練された生体潤滑機能が、摺動による力学的刺激に対する適応により構築されるプロセスを実験的に検証した。

研究成果の概要（英文）：

Process and mechanism in the functional adaptation of superficial zone tissue structure of articular cartilage to tribological stimulations was explored. A well established three dimensional culture system for isolated chondrocytes, chondrocyte-agarose construct, was employed as a regenerated cartilage model and mechanical stimulations, such as cyclic compression, shear and surface friction, were applied to the model to examine their effects on cell metabolisms and the subsequent development of functional tissue structure for joint lubrication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・設計工学・機械機能要素・トライボロジー

キーワード：トライボロジー，細胞・組織，関節軟骨，潤滑機能，移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

膝や股をはじめとする生体内の可動関節は、極めて洗練された潤滑機能を有することで常に滑らかに摺動し、私たちに様々な運動機能を与えている。この生体関節に備わる天賦の潤滑メカニズムについては、これまでも数多くの研究がなされてきたものの、未だその詳細について議論が続いている。

研究代表者は、可動関節の摺動面を覆う関節軟骨の表面に着目し、軟骨表面層部の組織構造と、その潤滑特性について研究を進めてきた。この中で、正常な軟骨表面はプロテオグリカンを主成分とするゲル様表層に覆われており、この表層部構造が優れた低摩擦維持機能を発揮していることを実験的に明らかにした。この一連の研究を通し、このような

関節軟骨組織の持つ機能的表層部構造が、摺動下の組織表面に生じる、力学的負荷に対する生体組織の適応現象により形成された可能性について着想を得た。

生体組織は、内部に存在する細胞とその代謝生成物である細胞外マトリックスにより形成されている。組織内の細胞は外部から組織に加わる力学的刺激に応じて細胞外マトリックスの産生と組織化を制御し、組織構造を力学的環境に適応させることが知られている。関節軟骨表層部の構造と機能の発現プロセスにも、このような生体組織のリモデリング則が、支配的な作用を及ぼしているのかもしれない。つまり、摩擦という界面現象による力学的負荷に対し、界面近傍に存在する細胞が代謝応答し、界面の組織構造を最適化することで負荷を緩和するという仮説である。

本研究は、上記の仮説に基づき、関節運動に適応した潤滑機能が軟骨表面に形成されるプロセスを解明することを目指すものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体関節を構成する要素のうち、関節面を覆う生体関節軟骨の表面に、優れた潤滑機能を発揮する機能的組織表層部構造が形成される構築メカニズムを明らかにすることである。これは生体関節潤滑機構の探求という、いまだ未解決のトライボロジー研究への新たなアプローチである。またここで得られる知見は、関節潤滑の破綻を一因とする変形性関節症等の発症メカニズムの解明と、その治療法の開発に大きく貢献することが期待される。さらに、再生医療への貢献も本研究の大きな目標であり、高度な機能性を有する再生軟骨組織を実現するための基礎研究と位置づけられる。

具体的には、単離軟骨細胞をアガロースゲルに播種した軟骨細胞-アガロース複合体を再生軟骨組織モデルとし、その表面に関節運動を模擬した摺動負荷を与えながら培養する。そして摺動に伴い組織に負荷される力学パラメータと、組織内部の軟骨細胞による細胞外マトリックス成分の産生と構造化との相関を実験的に検討する。ここでは、組織内に生じる圧縮ひずみとせん断ひずみを力学パラメータとし、それによる組織内物質輸送と細胞外マトリックス成分の産生および組織化を評価し、軟骨表層部の構造形成と潤滑機能発現にはたす役割を考察する。

3. 研究の方法

牛中指骨遠位端の軟骨組織から酵素処理によって単離した軟骨細胞を、アガロース (Sigma Type VII agarose) 1wt%ゲルに初期細胞濃度 10^7 cells/ml にて播種し、直径4mm、

厚さ2.5mmの再生軟骨組織モデルを作製した。作成した再生軟骨組織モデルの外観を図1に示す。このモデル試験片に対し、図2に示す二軸負荷培養装置、および図3に示す摺動負荷培養装置を用い、関節運動を模擬した力学的負荷を与えながら、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ のインキュベータ内にて3週間にわたる培養実験を行った。

培養後のモデル試験片内に形成された再生組織の力学特性に対し、培養中に加えた力学的負荷が与えた影響を評価するため、培養1, 8, 15, 22日目に試験片の圧縮試験を行った。圧縮試験では、円柱形試験片を0.5mm/minの速度にて軸方向に10%圧縮し、得られた応力-ひずみ曲線のひずみ5-10%の領域から最小二乗法により求めた回帰直線の傾きより、接線弾性率を求めた。また、試験片から切り出した厚さ1mmの切片について、その内部のII型コラーゲン線維およびプロテオグリカンの一部を抗体染色法により蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて形成された再生組織の形態観察を行った。



図1 再生軟骨組織モデル外観

研究期間中に実施した各種実験では、主に以下の4項目について評価を行った。

(1) 培養に用いる培地に添加するビタミンC量について、培養後の組織モデルの力学特性への影響を評価した。ビタミンCは、軟骨組織の主要な細胞外マトリックス成分であるコラーゲン線維の合成時に、還元剤として必要不可欠な役割を果たす。そのため、再生組織の力学的強度を向上させるには、十分な量のビタミンCを培養細胞に与えることが必要となる。しかし一方で、ビタミンCは酸化ストレスによる細胞毒性も有している。そのため、力学的に健全な再生組織を形成するためには、培地中のビタミンC濃度を最適化することが必要である。ここでは実験結果を基に、再生軟骨組織モデルの力学的負荷培養実験に用いる、培地組成の最適化を図った。

(2) 二軸負荷培養装置を用い、繰り返し圧縮ひずみと往復せん断ひずみの組み合わせによる力学的負荷を与えながら再生組織モデルを培養し、各ひずみ成分の振幅および二軸ひずみの組み合わせが、再生組織の形成とその力学特性に与える影響を評価した。

この二軸負荷培養装置では、直交して配置

した二つのリニアアクチュエータにより塩化ビニル製の圧子を駆動することで、培養中の再生軟骨組織モデルに様々な形態の力学的負荷を加えることが可能である。ここでは、圧子を上下動することにより円柱形の試験片軸方向に 10~15%の圧縮ひずみを与えると同時に、圧子を試験片表面に対し接線方向に往復運動させることで、試験片/圧子間の摩擦により 5%のせん断ひずみを試験片に与えた。力学的負荷は 1日に6時間与え、負荷終了後は、圧子が試験片上面に接触した状態を保持し、ひずみを与えない状態で培養を継続した。

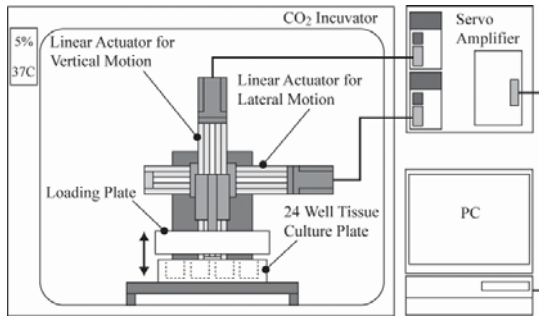


図2 二軸負荷培養装置の概略図

(3) 摺動負荷培養装置を用い、再生軟骨組織モデル表面に摺動負荷を与えながら3週間培養した。開発した摺動負荷培養装置は、3つの独立したサーボモータから構成されており、3つのモータはそれぞれ、ローラと試験片間の相対距離、ローラの回転運動、および試験片の並進運動を制御している。この実験では、まずシリコンゴムで表面が覆われたローラをモデル表面に接触させ、その後ローラとモデルをそれぞれ往復運動させることにより、接触した表面間に往復転がり滑り運動を生じさせた。これにより、モデル表面には両振りの摩擦負荷を与えることができる。3週間の培養期間中、モデル表面に対し摩擦負荷は1日12時間、毎日加えた。

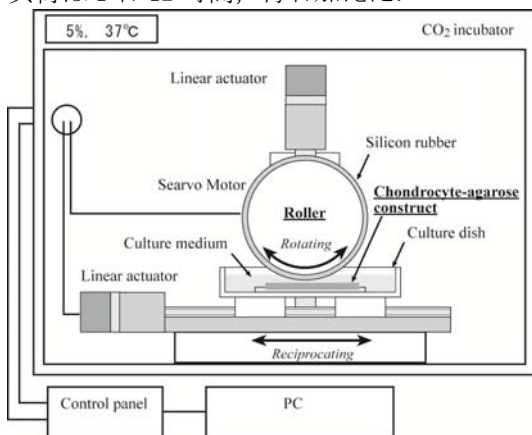


図3 摺動負荷培養装置の概略

培養後の試験片は、まず光学顕微鏡にて表

面形態を観察し、その後コラーゲン線維およびプロテオグリカンの一部を蛍光染色し、モデル表層部に形成された再生組織の構造を評価した。評価には、水浸対物レンズを備えた正立型共焦点レーザー顕微鏡を用い、モデル表面から深さ方向への、コラーゲン線維およびプロテオグリカンの3次元分布を求めた。これにより、摺動刺激下においてモデル表層部に形成された組織の形態的特徴を明らかにすると共に、それを生体関節軟骨組織の持つ構造的特徴と比較した。

(4) 再生軟骨組織モデルに加えらるる繰り返し変形が、モデル内部における物質輸送に与える影響を明らかにするため、モデル内物質輸送の可視化実験を行った。この実験では、試験片内および周囲液体との界面における物質輸送現象を可視化するため、Fluoresceinで蛍光標識された分子量3kDaのデキストランを用いた。試験片および周囲を満たしたリン酸緩衝生理食塩水内の蛍光デキストラン分布を、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により得られた蛍光画像から求め、その経時変化から、試験片からのデキストランの流出および試験片への流入を評価した。

モデルに対する圧縮ひずみの負荷と除荷には、図3に示す顕微鏡設置型マイクロ力学試験機を用いた。負荷実験では、蛍光デキストランで染色した試験片を、無添加PBSに浸漬すると同時に20%の圧縮変形を与え、蛍光デキストラン分布の経時変化を測定した。その結果から、圧縮変形に伴う内部流体の移流が、試験片からのデキストラン流出量に与える効果を評価した。除荷実験では、20%の圧縮変形を与えた無処理試験片をデキストラン添加PBSに浸漬し、浸漬60秒後に圧縮を除荷し、試験片内へのデキストラン流入量に対する圧縮除荷の影響を評価した。

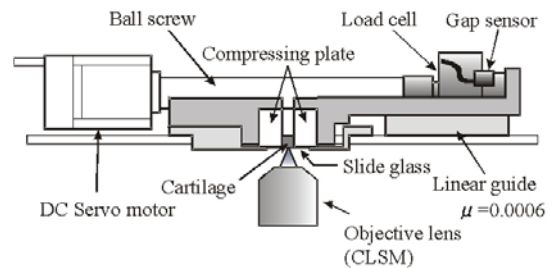


図3 顕微鏡設置型マイクロ力学試験機

4. 研究成果

(1) 培地へのビタミンC添加量の影響

本研究では、基本培地としてダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle's medium: DMEM) に、ウシ胎仔血清 20 v/v%, L-グルタミン 2 mM, ペニシリン 100 unit/mL, ストレプトマイシン 100 μ g/mL, アンフォテリシン B 0.25 μ g/mL, ヘパス 20

mM を添加し、濾過滅菌を施したものを使用した。これに、ビタミンCの1種であるアスコルビン酸 (Ascorbic acid: AsA) を添加し、その添加量の相違による、再生軟骨組織モデル内での組織形成と、培養後の組織の機械的特性への影響を評価した。

図4は、各培養日での接線弾性率を、それぞれの試験片群の培養1日目の接線弾性率により正規化した値を、培養日数に対してプロットしたものである。この図より、再生軟骨組織モデルの接線弾性率と培養日数の関係が、指数関数により近似できることがわかる。そこで、試験片群ごとに指数関数近似を行い、その指数の値と培地に添加したAsA濃度との関係を図5に示した。AsA濃度3.2 pmol/10⁹cells以下では、指数の値がAsA濃度の上昇と共に線形に増加しており、弾性率の上昇速度が、AsA添加量の増加とともに増加していることがわかる。しかし、AsA濃度6.4 pmol/10⁹cellsの場合は、この線形関係から大きく外れ、指数値の上昇が抑制されている。蛍光観察による細胞の生死判定を行ったところ、AsA濃度6.4 pmol/10⁹cellsの試験片群では、特に培地と接する試験片表面部分で細胞の生存率が低下していた。このことから、AsAの過剰投与により細胞毒性が顕在化し、培養軟骨細胞による組織形成と、それによるモデルの弾性率上昇が抑制されることが確認された。

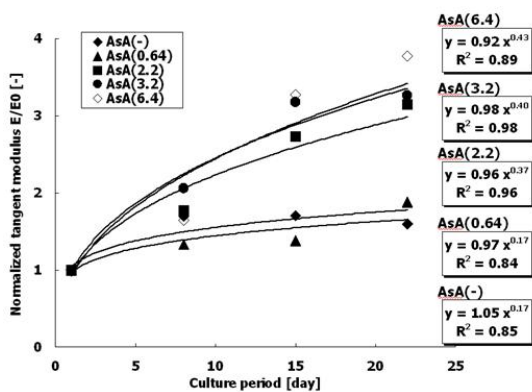


図4 培養日数による接線弾性率の変化とその指数関数近似

前述の実験結果により、高濃度添加でのAsAの細胞毒性とそれによる再生組織形成障害が明らかに成ったことから、次に細胞毒性を抑制した安定型リン酸化アスコルビン酸 (Ascorbic acid 2-phosphate: A2P) を用いて同様の実験を行った。またここでは、二軸負荷培養装置を用いた、振幅15%、周期1Hzでの繰り返し圧縮負荷培養の結果も併せて示す。

培養22日目における、試験片群の接線弾性率の比較を図7に示す。静置培養の場合、A2Pは添加濃度6.4 pmol/10⁹cellsまで目立

った細胞毒性を示さなかった。しかし、培養22日に至っても接線弾性率の顕著な上昇が認められず、蛍光観察の結果からも、コラーゲン線維、プロテオグリカンとも、産生量が限られていることが確認された。この原因の一つとして、A2Pが比較的電荷の大きいリン酸基を側鎖に持ち、分子量も大きいことから、モデル内での物質輸送が制限された可能性が考えられた。一方、試験片に繰り返し圧縮負荷を加えながら培養した場合、培養後の接線弾性率が顕著に上昇した。これは、圧縮変形に伴う内部流体の移流効果により、モデル内でのA2Pの輸送が促進され、培養細胞への供給が改善したことが一因と考えられる。

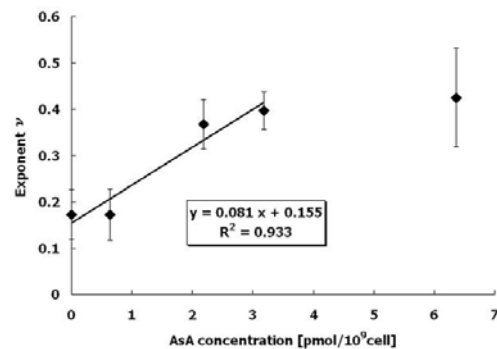


図5 接線弾性率の上昇曲線の指数とAsA濃度の関係

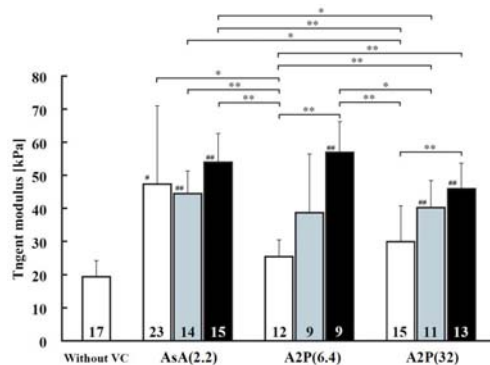


図6 A2P添加群の接線弾性率の比較

(2) 圧縮・せん断ひずみ負荷の影響

作製した再生軟骨組織モデル試験片はすべて、37°C、5%CO₂のインキュベータ内にて24時間静置培養した後、負荷群と対照群の二群に分割し、負荷群の試験片には二軸負荷培養装置を用い、表1に示す、圧縮とせん断を組み合わせた5通りの力学的負荷を与えながら培養した。対照群は、試験片上面に圧子を接触させた状態で、変形負荷を与えずに静置培養した。

圧縮試験により得られた再生軟骨モデルの接線弾性率の比較を図7に示す。対照群では、培養日数の増加に伴う有意な弾性率の上昇が認められなかった。圧縮ひずみのみを加えた負荷群の場合、15%圧縮ひずみを与えた

群では培養に伴う有意な弾性率の上昇が認められたものの、圧縮ひずみを 10%に減少させた群では弾性率の上昇が認められなかった。

表 1 機械的刺激の形態

Mechanical stimulus	test 1	test 2	test 3	test 4	test 5
Name	test 1	test 2	test 3	test 4	test 5
Compression	15%	15%	10%	10%	10%
Shear	-	5% pulsating	-	5% pulsating	5% reversed
Frequency	1Hz	1Hz	1Hz	1Hz	1Hz
Velocity	0.75mm/s	1.00mm/s	0.50mm/s	0.75mm/s	1.00mm/s
Loading period	6h/day	6h/day	6h/day	6h/day	6h/day

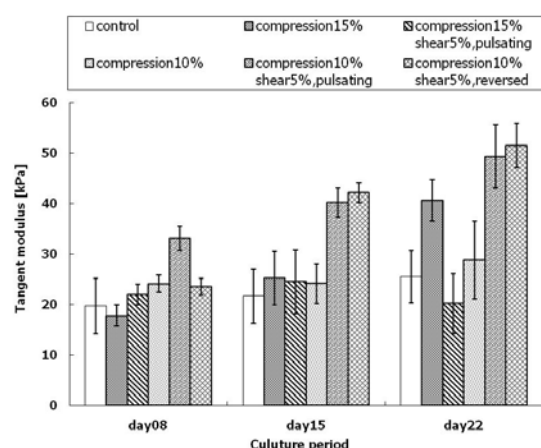


図 7 機械的刺激の形態による培養後の接線弾性率への影響

一方、10%の圧縮ひずみと同時に 5%のせん断ひずみを加えることで、弾性率は有意に上昇した。特に両振りのせん断ひずみを加えた群の弾性率上昇がもっとも顕著であり、培養 8 日目と比較し、培養 22 日目では弾性率がおよそ 119%増加した。これらせん断ひずみの負荷により弾性率の上昇が認められた二群では、組織観察においても対照群と比較しコラーゲン線維量の増加とより広範囲にわたるコラーゲン線維網の形成が認められた。

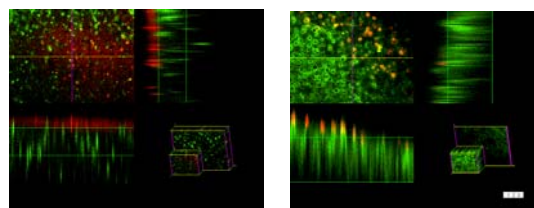
これに対し、15%の圧縮ひずみに対し 5%のせん断ひずみを同時に加えた群では、弾性率の上昇が抑制された。これらの結果は、摩擦により組織に生じるせん断ひずみが、適度な圧縮ひずみと組み合わせられた場合、軟骨細胞によるコラーゲン線維網の形成が促進され、形成される組織の機械的強度の向上に寄与することを示すものと考えられる。

(3) 表面への摺動負荷の影響

実験では、滑り率 0 (純転がり)、振幅 1mm、周期 1Hz の往復転がり運動により、モデル表面に摺動刺激を与えながら培養した。培養後の再生軟骨組織モデル表面を光学顕微鏡により観察すると、摺動刺激を加えていない対

照群の表面と比較し、負荷群試験片の摺動面は滑らかになっている。その反面、負荷群試験片の摺動面外では、大きな凹凸の多い粗い表面が形成されていた。

図 8 に、CLSM を用いて取得した各試験片表層部の 3 次元蛍光像を示す。画像の左上部分に表面から深さ方向への投影像が示されており、コラーゲン線維およびプロテオグリカンの面内分布を見ることができる。また、その右および下の像は、両成分の深さ方向分布を示している。これより、摺動刺激を与えた再生軟骨モデルでは、対照群と比較しプロテオグリカンが多く産生されており、そのプロテオグリカンが最表面に蓄積されていることがわかる。このようなプロテオグリカンの最表面への蓄積は、摺動面だけでなく摺動面外にも同様に見られた。一方、コラーゲン産生状態には負荷群と対照群の間で大きな違いが見られず、負荷群試験片内では、摺動面でのコラーゲン線維の分布が摺動面外と比較し、やや少なくなっていた。摺動面では細胞の生存率が若干低下しており、このためコラーゲン産生量が低下したと思われる。以上の結果から、摺動負荷培養により、生体軟骨組織類似の、構造的異方性を持った再生組織が形成される可能性が示唆された。



(a) 負荷群

(b) 対照群

図 8 摺動負荷培養後のモデル表層部組織構造の CLSM 像

(4) モデル内物質輸送への繰り返し圧縮負荷の影響

蛍光デキストランを含む再生軟骨組織モデルを PBS に浸漬すると同時に圧縮負荷を与え、その後 30 秒間隔で圧縮変形の除荷と負荷を繰り返した際の、モデルから PBS へのデキストラン流出量の経時変化を、モデル内および PBS 内の蛍光輝度分布の経時変化から求めた。これを単純浸漬時の結果と比較し、物質輸送に対する繰り返し圧縮変形負荷の影響を評価した(図 9)。この図より明らかとなり、機械的変形を繰り返すことにより、デキストラン流出量は著しく増加した。またデキストラン流出量は負荷時よりも、むしろ除荷時に著しく増加していることがわかる。これは、除荷により周囲の PBS が試験片内に流入するため、見かけ上のデキストラン流出量が増加した結果と考えられる。この様に、再生軟骨モデルへの周期的圧縮負荷は、圧縮時にモデルからの物質の排出を促すとともに、除荷時

に外部からモデル内への物質導入を促進し、結果としてモデル内の物質輸送量を著しく増加させることが実験的に示された。

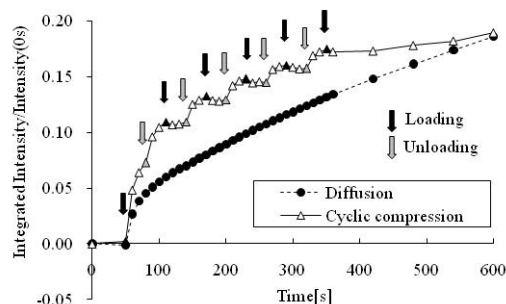


図 9 蛍光輝度分布から求めたデキストラン流出量の比較

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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① S. Omata, Y. Sawae, T. Murakami, Influence of Ascorbic acid (AsA) Concentration in Culture Medium on Mechanical Property of Regenerated Cartilage, Journal of Environment Engineering, 査読有, Vol.6, 2011, 416-425
- ② ② N. Hosoda, N. Sakai, Y. Sawae, T. Murakami, Finite Element Analyses of Articular Cartilage Models Considering Depth-Dependent Elastic Modulus and Collagen Fiber Network, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol.5, 2010, 437-448
- ③ 小俣誠二, 澤江義則, 村上輝夫, 培地中のアスコルビン酸濃度が再生軟骨組織の力学特性に与える影響, 日本機械学会論文集 (A 編), 査読有, 75 巻, 2009, 1668-1673
- ④ 澤江義則, 関節機能再建を目指した再生軟骨のトライボロジー, トライボロジスト, 査読有, 53 巻, 2008, 799-804

[学会発表] (計 26 件)

- ① 澤江 義則, 再生軟骨組織内の物質輸送 (招待講演), 平成 22 年度日本伝熱学会九州支部講演会, 2011.3.4, 福岡
- ② Y. Sawae, S. Omata, H. Murakami, T. Murakami, Effect of friction loading on cartilaginous tissue formation in cultured chondrocyte-agarose construct, 37th Leeds-Lyon Symposium on Tribology, 2010.9.8, Leeds, UK
- ③ Y. Sawae, S. Omata, H. Murakami, T. Murakami, Friction Loading Stimulation of Chondrocyte Biosynthesis of

Extracellular Matrix in Chondrocyte-Agarose Construct, 6th World Congress of Biomechanics, 2010.8.3, Singapore

- ④ S. Omata, T. Shimizu, Y. Sawae, T. Murakami, Effect of Vitamin C on Mechanical Property of the Regenerated-cartilage Tissue, 6th World Congress of Biomechanics, 2010.8.2, Singapore
- ⑤ S. Omata, Y. Sawae and T. Murakami, Influence of Ascorbic acid (AsA) concentration in culture medium on mechanical property of regenerated cartilage, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2009.9.9, Munich, Germany.
- ⑥ Y. Sawae, N. Nakashima, S. Yarimitsu, C. Morillo, T. Murakami, Effect of lipid and protein on friction and wear of joint prosthesis (Keynote), COST533 2nd Workshop on Biotribology, 2009.5.25, Guimaraes, Portugal.
- ⑦ Y. Sawae, Role of protein and lipid in biotribology of joint prosthesis (Invited), 2nd International Symposium on TriboCorrosion, 2009.03.18, Wiener Neustadt, Austria.
- ⑧ 野林 真, 渡部将平, 野田博敬, 澤江義則, 渡部正夫, 再生軟骨担体ゲル内での物質輸送現象, 日本機械学会第 21 回バイオエンジニアリング講演会, 2009.1.23, 札幌

[その他]

特別講演

Y. Sawae, Biotribology in Natural and Artificial Joints, National Formosa University, 2010.11.3, Hwai, Taiwan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤江 義則 (SAWAE YOSHINORI)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：10284530

(2) 研究分担者

渡部 正夫 (WATANABE MASAO)
北海道大学
研究者番号：30274484
坂井 伸朗 (SAKAI NOBUO)
九州工業大学
研究者番号：60346814