

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500399

研究課題名（和文） 腱・靭帯線維芽細胞に対する3次元培養環境下におけるメカニカルストレスの効果

研究課題名（英文） Effect of mechanical stress to ligament/tendon fibroblast under 3D culture environment

研究代表者

眞島 任史 (Majima Tokifumi)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：30241334

研究成果の概要（和文）：

運動器の中では、骨と骨格筋をリンクする腱、そして骨と骨をリンクする靭帯にとって、機械的刺激はその機能を維持するために重要な役割を担っているとされている。しかし、腱・靭帯由来の線維芽細胞に関するメカニカルストレスと細胞機能の関係についての報告は、いずれも2次元の培養環境で単一方向へメカニカルストレスを加え評価されたものであり、実際の生体内環境を模倣するには至っていない。生体内の腱・靭帯には3次元の組織に長軸方向のみならず、回転方向にもストレスが加わっている。我々は2次元のメカニカルストレスと3次元のメカニカルストレスでは、それぞれに対する細胞応答は異なるという仮説を立て、腱・靭帯の線維芽細胞におけるメカニカルストレスの効果をも3次元培養環境下で様々な複合的な機械刺激の下で分子生物学的な解明を行った。その結果、3次元で負荷を加えると **Collagen Type I, III, Fibromodulin** の mRNA の発現が有意に高く、DNA 量も2次元でのメカニカルストレス群に比べ有意に多かった。また細胞増殖能の検討でも両方向の負荷を同時に加えた群で最も高かった。

研究成果の概要（英文）：

Tissue engineering techniques using biodegradable three-dimensional (3D) scaffolds with cultured cells offer more potential alternatives for the treatment of severe ligament and tendon injuries. In tissue engineering, one of the crucial roles of 3D scaffolds is to provide a temporary template with the biomechanical characteristics of the native extracellular matrix (ECM) until the regenerated tissue matures. The purpose of the present study was to assess the effect of various cyclic mechanical stresses on cell proliferation and ECM production in a 3D scaffold made from chitosan and hyaluronan for ligament and tendon tissue engineering. Multidimensional cyclic mechanical strain to mimic the physiological condition in vivo has the potential to improve or accelerate tissue regeneration in ligament and tendon tissue engineering using 3D scaffolds in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス、腱・靭帯、線維芽細胞、リモデリング

1. 研究開始当初の背景

生体に存在する細胞はその一生を通じ何らかのメカニカルストレスや荷重にさらされている。これまで、機械的刺激と細胞の相互作用が生体内の様々な組織や器官の維持や機能に関わっていることが広く認められてきた。研究代表者は「生体軟組織のリモデリング」の研究で、腱・靭帯の形態や強度も、そこにかかる力学的負荷に応じて変化することを初めて定量的に評価し報告した（たとえば、Journal of Orthopaedic Research 誌および American Journal of Sports Medicine 誌 <“Excellence in research award paper: Deterioration of Mechanical Properties of the Autograft in Controlled Stress-shielded Augmentation Procedures-An Experimental Study with Rabbit Patellar Tendon-“22,821-829(1994)>などの報文として発表済み）。また、研究分担者との共同研究で、様々な機械的刺激が細胞代謝を調節する上で重要な役割を果たしており、動脈硬化や変形性関節症、骨粗鬆症などに大きく関与することが明らかになってきた(2006 研究業績)。さらに正常および損傷靭帯、再建靭帯の力学的強度およびこれらの組織に見られる細胞外基質（細胞外マトリックス）やサイトカイン分子の mRNA の発現に関する基礎データの蓄積を既に構築してきた実績がある。またこの変化にはオステオポンチンが深く関与していることも明らかにした(2007 研究業績)。運動器の中では、骨と骨格筋をリンクする腱、そして骨と骨をリンクする靭帯にとって、機械的刺激はその機能を維持するために重要な役割を担っているとされている。しかし、腱・靭帯由来の線維芽細胞に関するメカニカルストレスと細胞機能の関係についての報告は、いずれも2次元の培養環境で単一方向へメカニカルストレスを加え評価されたものであり、実際の生体内環境を模倣するには至っていない。生体内の腱・靭帯には3次元の組織に長軸方向のみならず、回転方向にもストレスが加わっている。そのため、より生体に近い3次元培養系を確立し、複合的なメカニカルストレスを加えた時の細胞応答の研究が望まれる。

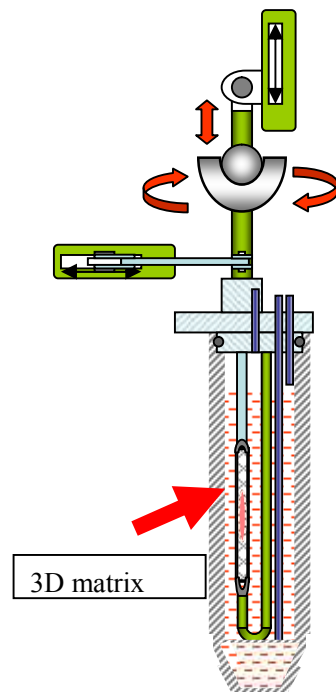
2. 研究の目的

我々は2次元のメカニカルストレスと3次元のメカニカルストレスでは、それぞれに対する細胞応答は異なるという仮説を立てた。本研究では腱・靭帯の線維芽細胞におけるメ

カニカルストレスの効果を3次元培養環境下で様々な複合的な機械刺激の下で分子生物学的な解明を通して行い、運動器疾患の治療に結びつけていくことを目的とした。

3. 研究の方法

腱・靭帯由来線維芽細胞におけるメカニカルストレスの研究は、そのほとんどが平面培養上、あるいは単一方向に力学的負荷をかけるといった手法が取られている。しかし、生体内では3次的に構築されたコラーゲンマトリックス中に細胞は存在し、様々な方向から力学的ストレスを受けている。そのため、未だ生体内環境を模倣する実験には達しておらず、腱・靭帯の損傷治癒過程とメカニカルストレスの関係を解明することは大きな課題となっていた。そこで我々は、長軸方向のみならず回転方向にもメカニカルストレスを3次元培養中の細胞に負荷できる装置（バイオリアクター、下図）を独自に開発することで、これらの欠点を補うことが可能になると考えた。

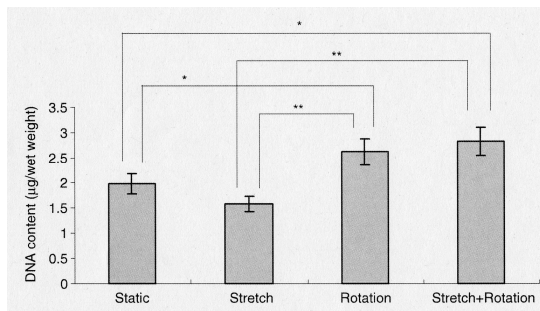
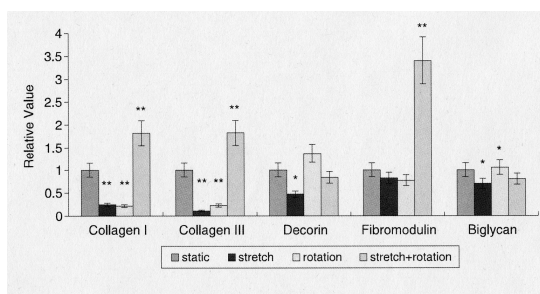


この装置を用いて、様々な力学的ストレスが引き起こす組織へのリモデリングあるいは退行変性などなどの現症を評価しその理由を分子生物学的手法を用いて解析する。具体

的には器官培養中の組織変化を HE 染色、組織免疫学的染色を行い組織の評価を行う。また、分子生物学手法を用いて組織中の Type I, III collagen の構成変化、その他プロテオグリカン含有量の変化、各種 MMP の発現量などを定量評価し検討する。

4. 研究成果

3次元ストレッチ装置を作成し器官培養系を確立した。具体的にはキトサン・ヒアルロン酸ハイブリッド繊維に腱由来の線維芽培養を播種し、2週間静地培養したものをコントロールとし、細胞を播種後1週間静地培養の後、1週間メカニカルストレスを加え培養したものと比較検討した。メカニカルストレスは3次元基材を長軸方向に5%のstrainを付与した群、90° rotationを付与した群、両方向の負荷を同時に付与した群とした。それぞれ0.5Hzで16時間連続荷重負荷を加え、その後8時間静止させた。このサイクルを1週間継続した。各群における細胞外基質産生能をReal-Time RT-PCR法を用いてCollagen Type I, III, Decorin, Fibromodulin, Biglycanについて検討した結果、コントロールと比較し、両方向同時負荷群ではCollagen Type I, III, FibromodulinのmRNAの発現が有意に高かった(p<0.001)。長軸方向負荷群、回転方向負荷群ではCollagen Type I, IIIの発現が有意に低かった(p<0.05)。さらにDNAの定量を行った結果、両方向の負荷を同時に付与した群でDNA量が2次元でのメカニカルストレス群に比べ有意に多かった。また細胞増殖能の検討でも両方向の負荷を同時に付与した群で最も高かった。



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5件)

① Majima T, Inoue M, et. al.: Effect of Japanese herbal medicine, Boiogito, on osteoarthritic knee with joint effusion. Sports Med, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy & Technology, 4:3. 2012. doi: [10.1186/1758-2555-4-3](https://doi.org/10.1186/1758-2555-4-3) (査読有)

② Irie T, Majima T, et. al.: A biomechanical and histological evaluation of a tissue engineered ligament using chitosan and hyaluronan hybrid polymer fibers: A rabbit medial collateral ligament reconstruction model. J Biomed Mat Res A. Mar2.Doi:10100, 2011 (査読有)

③ Majima T, Nishiike O, et. al.: Patella eversion deteriorates early knee functional recovery after TKA -Comparison between MIS TKA and conventional TKA- Arthritis, doi: 10.1155/2011/854651 (査読有)

④ 眞島 任史: キトサン・ヒアルロン酸ハイブリッド繊維を用いた組織工学的的手法による靭帯再生. 整形外科 62: 1088, 2011 (査読なし)

⑤ Sawaguchi N, Majima T, et. Al: Effect of cyclic 3D strain on cell proliferation and collagen synthesis of fibroblast seeded chitosan-hyaluronan hybrid polymer fiber. J Orthop Sci. 15: 569-577, 2010 (査読有)

[学会発表] (計2件)

① Majima T: Chitosan-based Hyaluronan Hybrid Polymer Fiber Scaffold for Ligament/Tendon Tissue Engineering. The 5th International Cell Therapy Conference. (Invited lecture) November 1st, 2011 Seoul National University Hospital, Seoul

② 眞島 任史: キトサン・ヒアルロン酸ハイブリッド繊維を用いた組織工学的的手法による靭帯再生. 日本整形外科基礎学会2010年10月15日京都国際会議場

[図書] (計1件)

① Majima T: Chapter 12, Osteotomies about the knee. The knee A comprehensive Review, 335-352. World Scientific, New Jersey, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞島 任史 (Majima Tokifumi)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：30241334

(2) 研究分担者

沢口 直弘 (Sawaguchi Naohiro)

北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：804355982

笠原 靖彦 (Kasahara Yasuhiko)

北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：00581927

(3) 連携研究者

()

研究者番号：