

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360076

研究課題名(和文) 摺動負荷培養モデルによる生体潤滑機能の構築・維持・破綻メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on functional development, homeostasis and degradation of lubrication mechanism in living tissue using regenerated cartilage model cultured under traction loading

研究代表者

澤江 義則 (Sawae, Yoshinori)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10284530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨組織から取り出した軟骨細胞をアガロースゲル内に分散し3次元培養した再生軟骨モデルの表面に、プラスチックローラーを用いて摺動(摩擦)負荷を加え、再生組織表面への潤滑機能の構築と、組織の健全性に及ぼす影響を評価した。その結果、組織表面に加わる適度な摺動負荷は、組織形成を促進するだけでなく、組織内に生体軟骨に見られるような構造的異方性の形成を促すことが示された。また組織表面の潤滑性は確認できなかったものの、潤滑の破綻により5%程度のせん断ひずみが組織に生じると、細胞の一部が死んでしまい組織がダメージを受ける可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The agarose construct containing freshly isolated primary chondrocytes was prepared as a regenerated cartilage tissue model and cultured under the traction loading applied to the model surface. Then, the effects of the traction loading on the functional development and degradation of lubricious cartilage tissues were examined. Results indicated that the traction loading on the tissue surface could stimulate the biosynthesis of extracellular matrix and bring anisotropic nature in the regenerated cartilage tissue. However, the enhancement in the lubricating ability of cultured tissue surface could not be confirmed experimentally. However, degenerative effects of the excessive shear deformation that would be caused by the disruption of lubrication mechanism could be confirmed, since the cell viability in the agarose construct dropped drastically when the shear strain exceeded 5%.

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 移植・再生医療 摩擦 メカノトランスダクション

## 1. 研究開始当初の背景

膝や股、肘、肩といった手足の可動関節の関節面は、関節軟骨組織により覆われている。この関節軟骨をガラスに対して摺動させると、たとえ外部から潤滑成分を供給しなくても、初期摩擦係数は0.01を下回る非常に低い値となる。この関節軟骨の持つ低摩擦性は、その表面近傍の組織構造に由来する潤滑機能によると考えられる。正常な軟骨表面は滑らかなゲル様表層に覆われており、その上面にはさらに脂質・蛋白混合膜が存在している。この表層部の階層的組織構造により、せん断抵抗の低い滑り面が形成され、固体間接触時の摩擦が抑制されていると考えられる。同様の組織構造と潤滑機能は、呼吸の際に摺動する胸壁と肺の表面を覆う胸膜にも見ることができる。

では、このような機能的表層構造は、組織の発達の過程においてどのようにして形成されるのか？ Rheeらは、高い潤滑性を有する糖タンパク複合体 PRG4 に着目し、マウスが成長するとともに、その関節表面に PRG4 を豊富に含む表層が形成されていく様子を明らかにした。これは、潤滑性を有する表層構造が個体の発生時から存在するのではなく、成長の過程において関節部が摺動することにより、組織表面に徐々に構築されることを示している。つまり、組織表面の潤滑機能は、組織への摺動負荷に対し内部の細胞が応答し、組織構造を適応させた結果と考えることができる。

組織表面への摺動負荷は、軟骨組織全体の微細構造と力学特性にも影響を及ぼすことが示されている。Sawaeらは、再生軟骨モデルの表面に滑り運動を加えながら培養し、表面への摺動負荷が内部の軟骨細胞による細胞外マトリックスの産生とコラーゲン線維による三次元網目構造の形成を促進し、組織の力学特性を向上させることを実験的に示した。

一方、関節軟骨表面に加わる摺動負荷は、表面損傷とそれに続く関節疾病の原因となることも示唆されている。組織表面に損傷が生じ潤滑機能が破綻すると、それをきっかけに軟骨組織全体の退行性変化が進行し、重度の変形性関節症等を発症することが示唆されている。

以上述べてきたように、生体組織表面に加わる摺動負荷は、潤滑機能を含む生体組織の力学的機能の構築と維持、さらに破綻プロセスにおいて、重要な支配因子の一つとなっていると考えられる。その詳細なメカニズムを解明し得られる知見は、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として今後の再生医療の展開に貢献するとともに、変形性関節症の発症メカニズムの解明とその予防法の確立を通じ、今後さらに重要性を増す高齢者医療にも貢献することが期待される。

## 2. 研究の目的

この研究では、軟骨組織表面の持つ潤滑機能が、組織表面に加わる摺動負荷に対し内部の細胞が応答し、組織構造を適応させることにより発現するとの仮説に立ち、そのメカニズムを明らかにすることを第一の目的とする。次に、摺動負荷が過大となり潤滑機能が破綻すると、組織表面に大きな接線力が生じるため、組織は大きくせん断変形することが予想される。このせん断変形が組織に退行性変化をもたらす可能性を検証することを第二の目的とする。

ここでは、軟骨組織から単離した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、発達過程における生体組織のモデルとして用いる。この生体組織モデル表面にプラスチックローラを用いて摺動負荷を加えながら培養し、モデル内部の細胞による組織形成に及ぼす影響を評価するとともに、形成された組織の持つ構造的特徴との関係について検討する。その結果をもとに、摺動負荷による潤滑機能を有する組織表面構造構築の可能性について考察する。

次に、培養中の生体組織モデルに定量的なせん断ひずみを加え、内部の細胞に与える影響を評価する。これにより、組織のせん断変形に起因する内部細胞の損傷とそれに続く細胞死の可能性、および組織中の細胞が耐えうる機械的せん断ひずみの限界値を明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

## (1) 生体組織モデル

本研究では、食用として処理された牛の新鮮な蹄部分を手し、中指骨遠位端から関節軟骨組織を採取した。これを2種の酵素 (protease および collagenase) により消化することで初代軟骨細胞を単離し、これをアガロースゲル (Sigma Type VII) に播種したものを生体組織モデルとした。

## (2) 摺動負荷培養実験

本実験では、直径18mm、厚さ2.5mmの円盤状生体組織モデルを専用培養皿中に作成し使用した。生体組織モデルおよび専用培養皿の外観を図1に示す。培養皿は3つの部品から成り、組織モデルと接する底面をポリエチレン多孔質フィルムとすることにより、培養液からモデルへの物質供給を確保し、細胞生存率の低下を防いだ。初期細胞濃度は  $10^7$  cells/mL、アガロース濃度は1wt%とした。この生体組織モデルの上面にプラスチックローラにより摺動負荷を加えながら、CO<sub>2</sub> インキュベータ内にて2週間または3週間培養し、軟骨細胞による組織形成に対する摺動負荷の影響を評価した。

実験に用いた摺動負荷培養装置の概略図を図2に示す。本装置では、培養皿を設置する試料ステージの上部にポリプロピレン製ローラを配し、3つの独立したサーボモータにより両者の相対位置、ローラの回転および

試料ステージの往復動を協調制御する。これによりモデル/ローラ間に設定した滑り率での転がり滑り運動を与え、生体組織モデル表面に摺動負荷を加える。なお、ポリプロピレン製ローラは生体組織モデルに比べ硬く、そのままではモデル表面の摩耗が著しいことから、ローラ表面に軟質なシリコンゴムからなる表面層を設けた。実験に先立ち、ローラおよび培養皿はオートクレーブにより滅菌した。摺動負荷部のその他の部品・フレームについては、エタノール滅菌を行った後CO<sub>2</sub>インキュベータ内に設置した。滅菌が困難なサーボコントローラ、電源、制御用PC等はインキュベータ外に設置し、ケーブルにて負荷部と接続した。

実験では、まずローラと生体組織モデル上面を、初期押し込み深さ 0.2 mm となるように接触させ、試料ステージをストローク 1.6 mm で往復動させながら、ローラの純転がり運動による摺動負荷をモデル上面に対し1日12時間加えた。培養液には、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に、20vol%ウシ胎仔血清、L-グルタミン、ペニシリン、アンフォテリシンB、ストレプトマイシン、HEPES、L-アスコルビン酸 2-リン酸 (A2P) を添加したものをを用い、24時間毎に全量を交換した。また摺動負荷を加える生体組織モデルに加え、同一形状の生体組織モデルを用意し、これを同じCO<sub>2</sub>インキュベータ内で静置培養し比較対照試料 (コントロール) とした。



図1 摺動負荷培養実験用培養皿と内部に作成された生体組織モデル

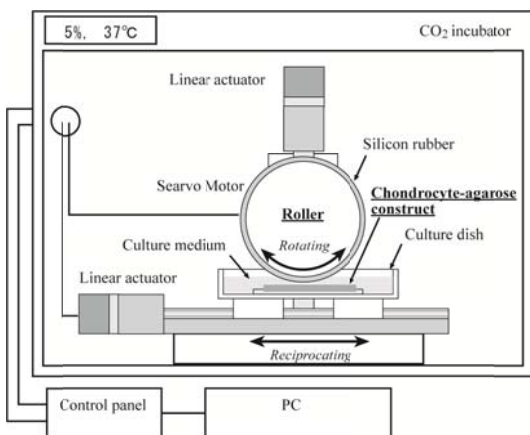


図2 摺動負荷培養装置の概略図

培養終了後、各生体組織モデルから直径 5 mm の円筒状評価試料を生研トレパンにより採取し、コラーゲン含有量、グリコサミノグリカン (GAG) 含有量および粘弾性特性を評価するとともに、ゲル内に形成された軟骨組織の形態的特徴を観察した。

関節軟骨組織は主にコラーゲン線維とプロテオグリカンという2種の細胞外マトリックス (ECM) 成分からなり、GAGはプロテオグリカンの主要な構成成分である。ここでは、モデル内に蓄積されたGAGおよびコラーゲン量を比色定量法により測定し、培養細胞による組織形成量の定量的指標とした。GAGについては、回収した培養液中に含まれる量についても定量した。

生体組織モデルの粘弾性特性は、回転式のレオメータにより計測した。測定は必ず速度 0.01~100 1/s の範囲で行い、直線性の良い 1~10 1/s における貯蔵弾性率および損失弾性率の平均値を評価に用いた。

形成された組織形態の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を使用した。培養後の生体組織モデルから厚さ 1 mm 程度の切片を作成し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) による洗浄と牛血清アルブミン (BSA) によるブロッキング処理後、抗体染色法を用いてモデル内部のII型コラーゲン、およびGAGの一種であるケラタン硫酸を、それぞれ緑および赤の蛍光色素により標識した。その後、切片の断面を CLSM により観察し、得られた蛍光画像から形成された組織の形態的特徴を評価した。

### (3) 繰り返しせん断ひずみ負荷実験

この実験では、外径 20 mm、内径 3 mm、高さ 2 mm の円筒形生体組織モデルに対し、回転式レオメータを利用して任意のせん断ひずみを繰り返し負荷しながら培養した。レオメータの回転軸下の平行平板間に円筒形モデルを挟み、平板間に任意の回転角を与えることにより、生体組織モデル内部にせん断ひずみが生じる。そのひずみ量は、内周から外周に向け半径方向に線形に増加する。そのため、モデル内部に分布する細胞の生存状態を、半径方向に比較することで、培養中の軟骨細胞が耐える機械的せん断ひずみ量の限界値について検討した。用いた生体組織モデルの初期細胞濃度は 10<sup>6</sup> cells/mL、アガロース濃度は 2 wt%とした。

実験に用いたレオメータのせん断ひずみ負荷部の詳細を図3に示す。生体組織モデルを培養皿中に固定し、その上方に位置する回転円盤に同形状の無細胞 2%アガロースゲルを固定した。生体組織モデル、無細胞ゲルともに、作成時に多孔質ポリプロピレン円盤と複合化し、このポリプロピレン円盤を把持することで、装置への確実な固定を行った。試験片の設置後、負荷部を簡易容器で覆い、内部を CO<sub>2</sub> 5%混合空気で満たすと同時に、ペルチェヒータにより 37°Cに調整した。さらに、試験機全体をクリーンブースで覆い、8日間

の培養実験を行った。

8 日間の培養期間中、任意のタイミングでせん断ひずみを 1 日 6 時間、2 日間にわたりモデルに負荷した。まず軸方向に 10% の圧縮ひずみを負荷し、軸方向力が 1 N 以下となるまで緩和させた。その後、モデル外周での最大せん断ひずみが 25% となるよう回転円盤を往復回旋させ、モデルに繰り返しせん断ひずみを与えた。この間、モデルと無細胞ゲル間で滑りが生じていないことを、レオメータから得られるトルク値により確認した。培養液には、先に述べた摺動負荷培養実験と同じものを用い、2 日ごとに全量を交換した。

また本実験では、せん断ひずみを加えるせん断負荷試料のほかに、無細胞ゲルと接触させ、せん断負荷を与えない対照試料、および培養液中で静置培養する静置培養試料を用意し、せん断負荷試料と同期間、同環境下で培養を行った。

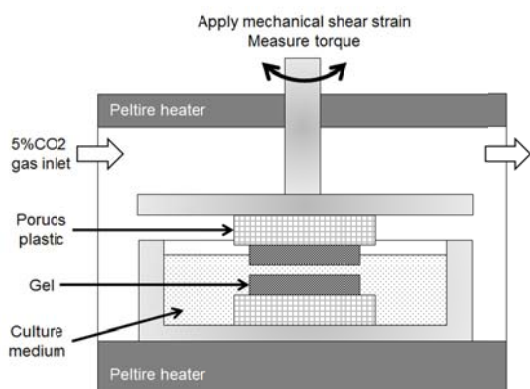


図 3 回転式レオメータを利用した生体組織モデルに対する定量的せん断ひずみ負荷機構の概略図

培養終了後、生体組織モデル内の細胞について、蛍光染色法による生死判定を行い、負荷したせん断ひずみと細胞死の関係の評価した。多孔体上の組織モデルの切片を半径方向に切り出し、リン酸緩衝液で洗浄後、カルセイン AM とエチジウムホモダイマを含むリン酸緩衝液に 15 分間浸漬し、生細胞と死細胞を、それぞれ緑と赤の蛍光で標識した。その後、断面を CLSM により観察し、得られた蛍光画像中の生細胞数と死細胞数から細胞の生存率を計算し、その半径方向分布を求めた。この結果を対照試料、静置培養試料と比較することにより、組織に加わったせん断ひずみが細胞の生存率に及ぼした影響を評価した。

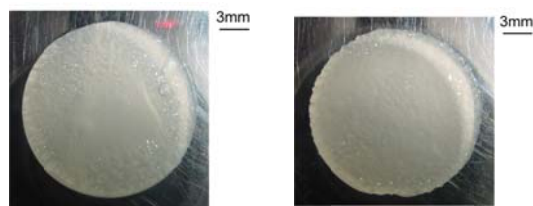
#### 4. 研究成果

##### (1) 摺動負荷の組織形成への影響

3 週間の摺動負荷培養後の生体組織モデルおよび比較対照試料の外観を図 4 に示す。摺動負荷培養後の生体組織モデル表面には、摩耗および塑性変形により形成された、目視で確認可能な摺動痕が残っていた。そこで、組

織形成量の定量等に用いる評価試料は、摩耗痕内の摺動部、およびその外側の摺動部外からそれぞれ採取し、結果を比較することとした。

2 週間および 3 週間培養後の生体組織モデル内に蓄えられた GAG およびコラーゲン線維の定量結果を図 5 および図 6 に示す。GAG 量およびコラーゲン量ともに、摺動負荷試料と対照試料の間で統計的に有意差は得られなかったものの、特に摺動負荷試料の摺動部外において、対照試料と比較し GAG 量およびコラーゲン線維量が多くなる傾向が認められた。3 週間培養後のデータが得られている GAG 量については、2 週間培養後と比較し 3 週間培養後の方が対照試料との差が大きくなる傾向が認められた。



(a) 摺動負荷試料 (b) 対照試料  
図 4 3 週間培養後の生体組織モデル外観

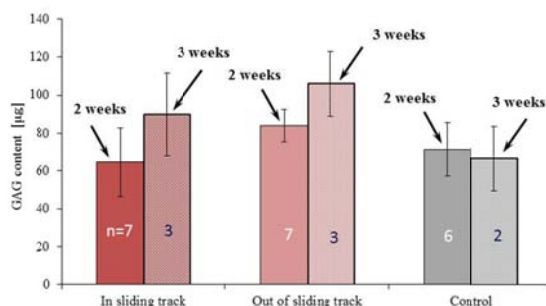


図 5 培養後の生体組織モデル内に蓄積されていた GAG 量の比較

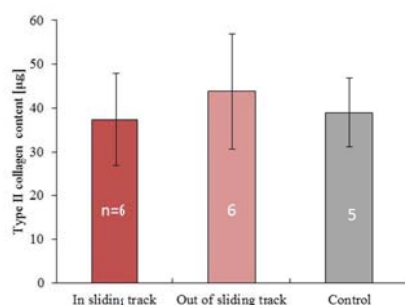


図 6 培養後の生体組織モデル内に蓄積されていたコラーゲン線維量の比較

3 週間培養後の生体組織モデル断面の蛍光画像を図 7 に示す。対照試料の断面において、緑の蛍光色素で染色されたコラーゲン線維は細胞周囲に蓄積され、断面内にはほぼ一様に分布している。これに対し、摺動負荷試料の摺動部では、緑に染色されたコラーゲン線維

が他の部分と比較し摺動面近傍に高密度に分布していることがわかる。これは図8に示した高倍率画像により明確に確認することが可能であり、摺動面近傍ではコラーゲン線維が細胞間を密に充てんしているのに対し、試料断面中央部では、コラーゲン線維は主に細胞周囲に蓄積され、細胞間を充てんするにはいたっていない。また、摺動負荷試料では、試料表面全域に赤い蛍光で染色されたケラタン硫酸が堆積し最表層を形成していることが確認された。

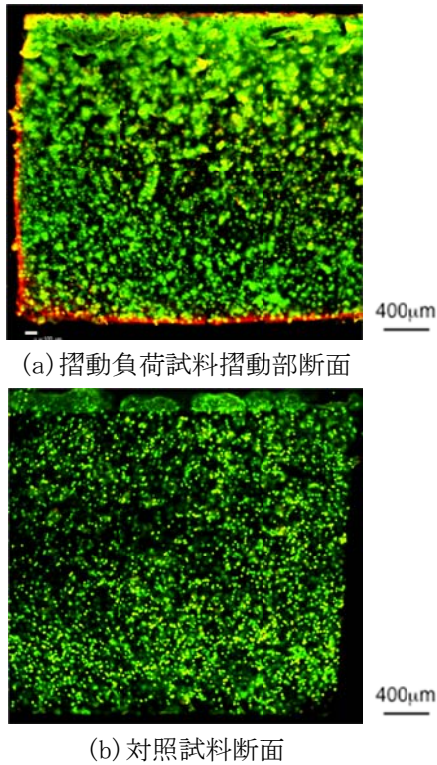


図7 3週間の培養によりモデル内に形成された軟骨組織の構造  
緑：コラーゲン組織，赤：ケラタン硫酸

図9に粘弾性特性の測定結果の一例として、貯蔵弾性率の比較を示す。摺動負荷試料の摺動部において貯蔵弾性率が高くなる傾向が見られたものの、摺動部外および対照試料との間に有意差は見られなかった。

ここまで述べてきたGAGおよびコラーゲン線維量の定量結果と試料断面の蛍光観察結果を総合すると、培養中に生体組織モデル表面に加えられた摺動負荷によりモデル内に生じた圧縮およびせん断ひずみは、表面近傍での軟骨細胞によるECM産生を促進したと判断される。その結果、モデル内にコラーゲン密度の高い表層部と、さらにその表面を覆うプロテオグリカンを豊富に含む最表層が形成され、静置培養では得られない異方性に富んだ組織構造が形成された。このような構造的異方性と不均一性は生体軟骨組織の構造に見られる特徴とも共通するものであり、生体軟骨組織の持つ優れた潤滑機能が発現するための大きな要素でもある。そのため、

ここで得られた知見は、生体軟骨における潤滑機能発現に必要な組織構造の形成に、組織表面に加わる摺動負荷が関与している可能性を示唆するものと考えられる。

ただ、摺動負荷による組織形成促進効果が表面近傍に限られていたことに加え、今回の実験では生体組織モデル表面のうち、限られた領域にのみ摺動負荷が加えられたため、比色定量により得られた組織形成量やレオメータによる粘弾性測定結果において、対照試料との間に有意差が得られなかったものと考えられる。

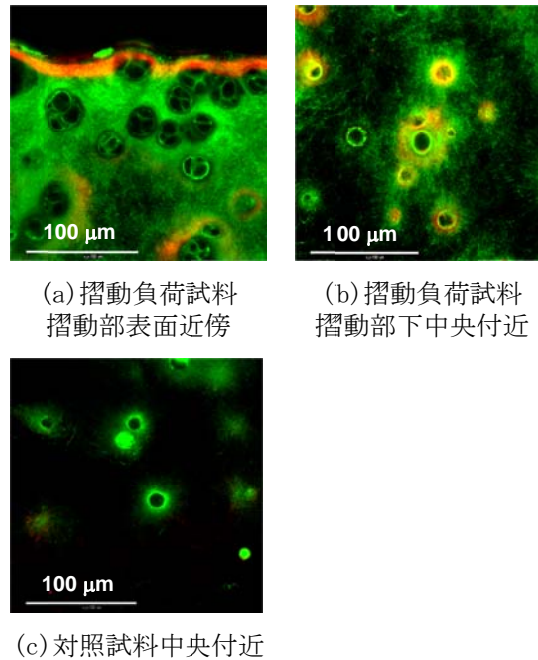


図8 3週間の培養によりモデル内に形成された軟骨組織構造の拡大像  
緑：コラーゲン組織，赤：ケラタン硫酸

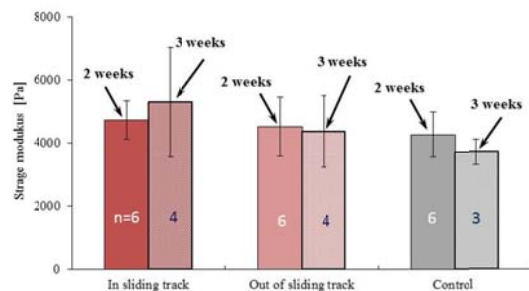


図9 培養後に得られた生体組織モデル貯蔵弾性率の比較

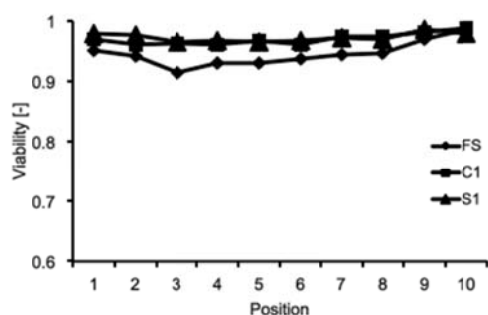
## (2)せん断ひずみによる細胞死

表1に示すように、8日間の培養期間中、せん断負荷を加える時期を変えて3通りの実験を行った。8日間の培養終了時における、細胞生存率の分布の比較を図10に示す。培養前期(1日目,2日目)および中期(3日目,4日目)にせん断負荷を加えた実験1および実験2では、せん断ひずみ負荷試料(S1,S2),

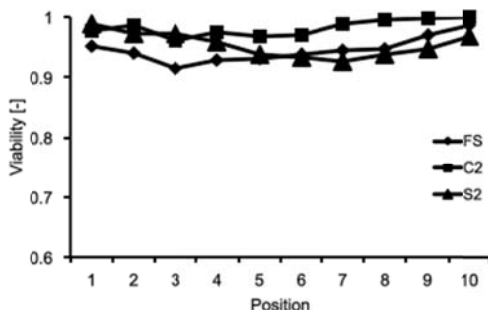
対照試料 (C1, C2), 静置培養試料 (FS) とも, 半径方向全領域に対して死細胞がほとんど確認されず, 高い生存率が得られた. 一方, 後期 (5 日目, 6 日目) にせん断負荷を加えた実験 3 では, せん断ひずみ負荷群において内周からモデル中央にかけて, 細胞生存率が 80% 程度まで徐々に低下し, 中央から外周にかけては 80% 程度の低い生存率となった.

表 1 培養期間中のせん断ひずみ負荷時期

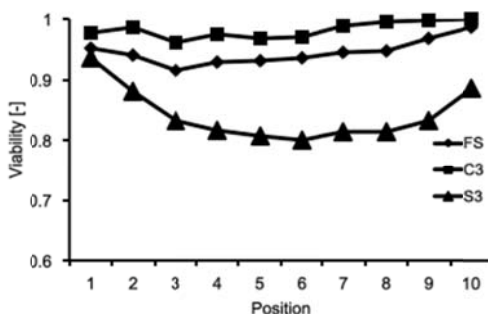
Culture period [day]	1	2	3	4	5	6	7	8
Group 1 (S1, C1)	Shear, Control				Free swelling (FS)			
Group 2 (S2, C2)		FS	Shear, Control				FS	
Group 3 (S3, C3)			FS		Shear, Control			FS



(a) 実験 1



(b) 実験 2



(c) 実験 3

図 10 培養後の生体組織モデル内における細胞生存率の分布

実験 3 で認められた細胞生存率の低下は, せん断ひずみ負荷試料にのみ認められ, 対

照試料, 静置培養試料には認められなかったことから, この細胞生存率の低下はモデルに加えられたせん断ひずみによるものと考えられる. 実験ではモデル外周においてせん断ひずみ量が 25% となるように設定したため, モデル内周では 3.8%, モデル中央では 14.4% のせん断ひずみ加わったことになる. 図 10(c) に示すように, モデル内周における細胞生存率は対照試料, 静置培養試料と同程度であるが, そこから線形に減少している. この結果は, 5% 程度のせん断ひずみでも細胞死を誘導する可能性を示唆するとともに, 5% から 15% 程度のせん断ひずみでは, 細胞死を誘導する確率がせん断ひずみ量に依存することを示している.

せん断負荷を培養前期および中期に加えた実験 1 および実験 2 では, 上記のような細胞生存率の低下が認められなかった. これは, せん断ひずみによる機械的ダメージにより細胞死に至った細胞が, その後の培養期間中に酵素等による異化作用によりモデル外に排除された結果と考えられる. しかし, 先に述べたせん断ひずみ量と細胞死の確率の関係を含め, そのメカニズムに関するより詳細な検討が必要である.

## 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)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① S. Yarimitsu, K. Nakashima, Y. Sawae, T. Murakami, Influence of phospholipid and protein constituents on tribological properties of artificial hydrogel cartilage material, J. Biomech. Sci. Eng., 査読有り, 8, 2013, 257-267
- ② 澤江義則, バイオトライボロジーへの導入, トライボロジスト, 査読有り, 57, 2012, 270-272

[学会発表] (計 27 件)

## 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

中嶋 和弘 (NAKASHIMA Kazuhiro)  
九州大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号: 70315109

### (3) 連携研究者

渡辺 正夫 (WATANABE Masao)  
北海道大学  
研究者番号: 30274484