

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560199

研究課題名(和文)メカニカル医工学技術を駆使した3次元軟骨組織作製法の開発

研究課題名(英文)Development of the preparing method of three dimensional cartilage tissue by taking advantage of mechanical medical engineering technology

研究代表者

成瀬 恵治(Naruse, Keiji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40252233

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):我々の体は、歩行時の膝にかかる荷重など、常に機械的な刺激を受けている。これらの刺激は細胞機能の活性化に役立っていると考えられている。本研究では、機械刺激と細胞機能の関係を明らかにし、機械刺激の作用を利用するため、実験的に軟骨(肉腫)細胞を自己集合性ペプチドゲルと呼ばれるゲルの中で培養した後、引っ張り刺激を繰り返し与えた。その結果、細胞からのコラーゲンとその他のタンパク質の産生量が低くなることを確認した。

研究成果の概要(英文):Our bodies are always exposed to mechanical stress, for example, knees are subjected to a load while walking. Such stimulation is deemed to play an important role on activation of cell functions. In this study, to clarify the relationship between the mechanical stimulation and the cell functions and to utilize the mechanism of such mechanical stimulations, we investigated cell response when the cells (chondrosarcoma cells) were cyclically stretched after culturing in a self-assembling peptide hydrogel. As a result, the decreased secretion of collagen and another protein was observed.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：メカノバイオロジー 機械刺激 バイオマテリアル 3次元培養 自己集合性ペプチドゲル

1. 研究開始当初の背景

再生医療では、細胞を3次元的な組織へと導くための足場=スキャフォールドが必要である。近年、機械刺激によって細胞の増殖や分化を促進できることが明らかとなり、その応用としてスキャフォールドを伸展・圧縮し、内部細胞に機械刺激を加える研究がなされるようになった。代表的なスキャフォールドであるコラーゲンは高い生体適合性と力学的強度を併せ持ち、上記の用途に適している。しかし、動物由来で多くの増殖因子を含むため、それらの因子が機械刺激の影響を解析困難にし、また将来的なヒト臨床応用においても未知の感染症への懸念がある。

そこで、我々はコラーゲンに代わる非動物由来のスキャフォールドとして、完全化学合成の自己集合性ペプチドゲルを開発した(特許第4620804号)。これまでに、同ゲルを用いた筋芽細胞や線維芽細胞、軟骨細胞などの3次元培養に成功しており、さらに独自開発の伸展チャンバー(特願2011-099776)を用いてゲルを伸展すると、内部の細胞にも伸展刺激を加えることができることを報告している。また予備検討において、ヒト軟骨肉腫細胞をゲル内で培養すると、II型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨特有のECM成分が産生されることが分かっている。

2. 研究の目的

再生医療では細胞を増殖・分化させる手段として成長因子やサイトカインが用いられていたが、生理的に生体内で発生している機械刺激負荷を活用するという発想はなかった。本研究では、我々が新規開発した自己集合性ペプチドゲルを用いた機械刺激下での3次元細胞培養により、効率的に軟骨組織再生を促し、動物由来成分の排除と成長因子などの添加物量の削減によって、将来的に再生医療を用いた膝軟骨治療の安全性を高め、治療コストの大幅カットを実現することを目的とする。

3. 研究の方法

<伸展培養実験系の確立>

我々はこれまでに機械刺激下での3次元培養を行うためのスキャフォールド(自己集合性ペプチド)および専用の伸展チャンバーを作製しており、まず、伸展チャンバーで細胞培養を行い、伸展実験が行えるかどうかを確認した。

[細胞培養操作]

種々の培養パターンを検討した結果、以下の方法で培養を行うことで、伸展培養を行うことが可能な状態にできることが確認された。

- 1) 3次元培養用のチャンバーを予めオートクレーブにて滅菌した。

- 2) 3次元培養用のチャンバーを浸水処理後、UVランプ下に静置した。
- 3) 細胞をトリプシン処理でプレートよりはがし、細胞ペレットを作成した。その後、任意量のFCSフリーの液体培地(DMEM)で懸濁した。
- 4) 細胞数をカウントした。
- 5) 細胞数が 1×10^7 の7乗個になるよう調製し、細胞懸濁液を遠心(1200rpm, 3)した。
- 6) 250ulのFCSフリーの培地を加えてよく混合した。
- 7) 750ulの0.4%自己集合性ペプチドゲルを1.5mlのエッペンチューブに移した。
- 8) 6の細胞懸濁液を7のエッペンチューブに移した。注意:泡を作らないようにやさしくかつしっかり混ぜた。
- 9) 8の細胞/ゲル混合物を70ulずつ、3次元培養用のチャンバーのゲルホルダー部分に挟むように入れた。
- 10) チャンバーを一度手でストレッチしゲルと細胞をしっかりと培養用のチャンバー内に入れた。
- 11) チャンバー内に2%FCS入りの液体培地を充填した。
- 12) 約6時間後FCSフリーの培地と交換した。
- 13) その後約15時間インキュベーター内に静置し、細胞/ゲル混合物を安定させた。
- 14) 翌日ストレッチ開始した。

<細胞への機械刺激>

細胞の伸展パターンについては、1Hz程度の比較的速い伸展ではゲルが崩壊してしまうことが確認された。その後、安定して確実な伸展を行うためのパターンとして、ゆっくりとした周期的伸展刺激{伸展速度=0.33%、伸展率5 or 10%、伸展保持時間=5min、収縮速度=0.33%/sec、収縮後の無伸展待機時間(次の伸展までの待機時間)=5min}が適当であることを見つけ出し、上記2パターン(伸展率違い5 or 10%)について細胞応答を確認した。

<機械刺激についての評価>

上記伸展刺激を加えた軟骨肉腫細胞(OUMS-27)のゲル内でのII型コラーゲンの産生をELISA法で確認し、同じくII型コラーゲン、さらにアグリカンのmRNAの産生をRT-PCRを用いて評価した。

ELISAおよびRT-PCRの実験操作は細胞/ゲル混合物を細胞塊と同じとして取扱い、一般的なプロトコールに従って行った。ただし、細胞培養後にELISAまたはRT-PCR用に簡単な洗浄工程を含むサンプル調製を行っており、それらの方法については検討の結果、以下のような方法を用いた。

[ELISA用サンプル調製]

- 1) チャンバーより培地を全て吸い出した。

- 2) スパーテルを用いて、細胞/ゲル混合物を可能な限り回収した。
- 3) プロテアーゼインヒビター入りの PBS(-) 1ml の中に 2 で回収したサンプルを入れた。
- 4) ピペッターを用いて緩やかに混合した。
- 5) 8500rpm 5min 4 で遠心した。
- 6) 上清を捨てた。
- 7) プロテアーゼインヒビター入りの PBS(-) 1ml を加え、緩やかに混合した。
- 8) 8500rpm 5min 4 で遠心をかけた。
- 9) プロテアーゼインヒビター入り RIPA 120 μ l を加えた。
- 10) 超音波処理。5 秒超音波処理後、10 秒休息を 5 回繰り返した。
- 11) 16000rpm 60min 4 で遠心をかけた。
- 12) 上清を回収しサンプルとした。

[RT-PCR 用サンプル調製]

- 1) チャンバーより培地を全て吸い出した。
- 2) スパーテルを用いて、細胞/ゲル混合物を可能な限り回収した。
- 3) FCS フリーの液体培地 (DMEM) 1mL に 2 で回収したサンプルを入れた。
- 4) 8500rpm 5min 4 で遠心した。
- 5) 上清を捨て、TRIzol (Life technologies) 1mL を加えホモジナイズし、サンプルとした。

4. 研究成果

<細胞培養結果>

OUMS-27 のダブリングタイムが 40 時間以上と比較的長く、また、長期培養を行った際には液体培地に添加した血清成分がゲルにトラップされて、ELISA での S/N 比を低下させる。そこで、従来ゲル内で細胞を増殖させた後に伸展を行う手法は取らず、初めから高濃度(従来比約 3 倍の 1×10^7 乗個/mL)で、細胞を播種し、24 時間後に伸展実験を行う系を確立した(3. 研究の方法 [細胞培養操作]を参照)。実際に細胞培養操作を行った細胞/ゲル混合物について、その後伸展を行わずに培養を続け、カルセイン DAPI 染色による生死判別を行った結果を図 1 に示す。

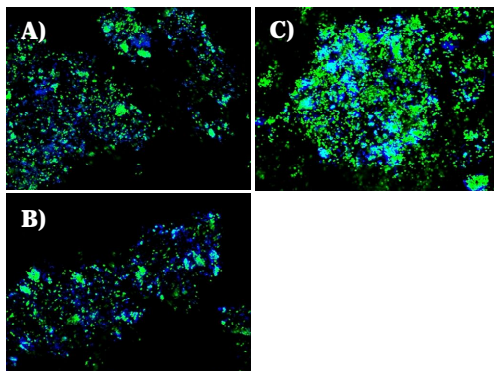


図 1 ペプチドゲル内細胞の生死判別
A) 培養 1 日後、B) 培養 3 日後、C) 培養 8 日後。

染色の結果、青 (DAPI) で染まる死細胞 (核) も見られるものの、緑 (カルセイン) で染まる生細胞もおよそ 50% 以上の割合で確認された。

<機械刺激に対する細胞の応答>

[II 型コラーゲンの産生 (ELISA)]

ELISA 法で検出した II 型コラーゲンの産生への機械刺激の影響を図 2 に示す。

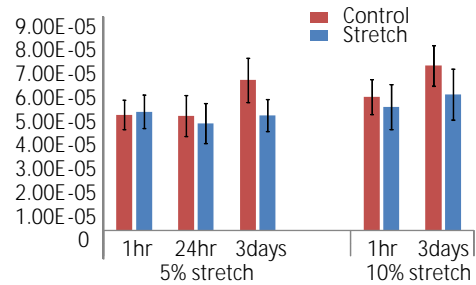


図 2 細胞/ゲル混合物内の全タンパク質量を 1 とした場合の II 型コラーゲンの割合 (n=9)。3 日間の伸展培養を行った群では、伸展率 5、10%の両方において II 型コラーゲンの産生がコントロールよりも低かった。

<機械刺激に対する細胞の応答>

[II 型コラーゲン mRNA (RT-PCR)]

RT-PCR 法で検出した II 型コラーゲンの mRNA 産生への機械刺激の影響を図 3 に示す。

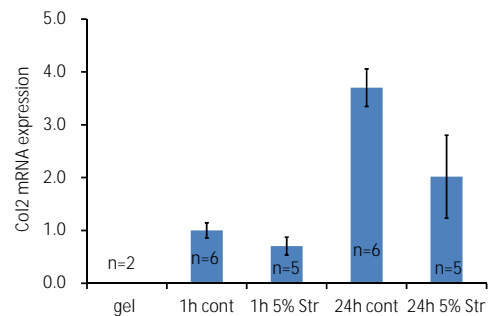


図 3 細胞/ゲル混合物内の II 型コラーゲン mRNA の割合 {無伸展培養 1 時間後のコントロール (1h cont) の値を 1 とする}。伸展培養 24 時間後において、II 型コラーゲンの mRNA 産生が無伸展培養コントロールに対して抑制されていることが確認された。

[アグリカン mRNA (RT-PCR)]

RT-PCR 法で検出したアグリカンの mRNA 産生への機械刺激の影響を図 4 に示す。

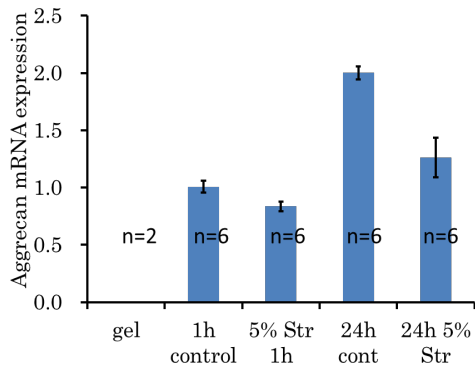


図4 細胞/ゲル混合物内のアグリカン mRNA の割合〔無伸展培養 1 時間後のコントロール (1h cont) の値を 1 とする〕。伸展培養 24 時間後において、アグリカンの mRNA 産生が無伸展培養コントロールに対して抑制されていることが確認された。

機械刺激に対する細胞の応答について、当初の実験計画では、5 ~ 15 % の伸展率での比較やより速い (~ 1Hz) 伸展での細胞応答への比較、さらに ~ 28 日間の長期培養での比較を予定した。今回の研究では ELISA や RT-PCR での実験条件を踏まえ、伸展速度や時間に制約があることが確認され、実験計画通りに試験を実施できない場面もあったが、RT-PCR の導入などにより、比較的短時間 (~ 1 日) の伸展培養において比較実験が可能であることが見出された。

ELISA では伸展 3 日後の II 型コラーゲン量を比較し、RT-PCR では伸展 1 日後の II 型コラーゲンならびにアグリカン mRNA 発現比較を行った。その結果、いずれの場合も伸展を行うとそれぞれのタンパク質の発現量がコントロールに対して抑制されることが確認された。

従来、コラーゲン内で培養した軟骨細胞に周期的な圧縮刺激を加えると II 型コラーゲンとアグリカンの遺伝子発現抑制が起こることを確認していたが、今回、ゆっくりとした伸展刺激で類似のデータが得られた。

また、予備検討レベルではあるが、ペプチドゲル内で静的に培養した OUMS-27 からの II 型コラーゲン、およびアグリカンの遺伝子発現量は通常のシャーレ上での 2 次元培養系と比較して高い傾向にあるという興味深い知見が得られた。これらの点について、今後はスキャフォールドとしてのコラーゲンゲルとペプチドゲルの力学的強度の比較や伸展前の培養期間に起きるゲルの変形などを考慮した詳細検討が必要であると考えられる。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成瀬恵治 (NARUSE, Keiji)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40252233