

平成 26 年度 修士論文

軟骨組織再生のための硫酸化ジェラン固定化
カルボキシメチルジェランゲルの開発

三重大学大学院 工学研究科

分子素材工学専攻 生体材料化学研究室

古藏 史子

【目次】	
1 緒言	1
1-1 軟骨損傷	
1-1-1 軟骨	
1-1-2 軟骨の種類	
1-1-3 軟骨損傷	
1-1-4 軟骨損傷の現行の治療法とその問題点	
1-2 軟骨細胞	
1-2-1 軟骨細胞	
1-2-2 グリコサミノグリカン (GAG)	
1-2-3 軟骨細胞の脱分化	
1-2-4 軟骨細胞の現行の培養法とその問題点	
1-3 Drug Delivery System(DDS)	
1-3-1 DDS	
1-3-2 DDS の軟骨再生治療への応用	
1-4 ジェランガム	
1-4-1 ネイティブ型ジェランガム (NG)	
1-4-2 脱アシル型ジェランガム (DG)	
1-4-3 硫酸化ジェラン (GS)	
1-4-4 カルボキシメチルジェラン (CMG)	
1-5 本研究の目的	
1-5-1 目的	
1-5-2 GS 固定化 CMG ゲルを用いた軟骨再生	
1-5-3 GS 固定化 CMG ゲルの膨潤収縮による薬物トラップ方法	
2 方法	8
2-1 CMG ゲルの作成と物性	
2-1-1 CMG の調整	
2-1-2 CMG の置換率測定	
2-1-3 CMG ゲルの作成	
2-1-4 CMG ゲルの膨潤度測定	
2-1-5 DMEM と浸透圧調整 PBS (300mOsm) における CMG ゲルの膨潤度	
2-2 GS 固定化 CMG ゲルの作成と物性	
2-2-1 GS 固定化 CMG ゲルの作成	
2-2-2 GS 固定化 CMG ゲルの膨潤度測定	
2-2-3 細分化 GS 固定化 CMG ゲルの作成	
2-2-4 細分化 GS 固定化 CMG ゲルの膨潤収縮による薬物放出量の測定	

2-3 軟骨細胞の単層培養における表現型マーカー遺伝子の発現	
2-3-1 軟骨細胞の培養	
2-3-2 軟骨細胞の継代	
2-3-3 軟骨細胞の単層培養における表現型マーカー遺伝子の発現	
2-4 軟骨細胞の GS 固定化 CMG ゲル培養における軟骨細胞への影響	
2-4-1 細分化 GS 固定化 CMG ゲル内での細胞培養	
2-4-2 細分化 GS 固定化 CMG ゲル内で培養した軟骨細胞の生存率	
2-4-3 細分化 GS 固定化 CMG ゲル内で培養した軟骨細胞の Viability	
2-4-4 細分化 GS 固定化 CMG ゲル内で培養した軟骨細胞の遺伝子発現	
3 結果	20
3-1 CMG、GS 固定化 CMG ゲルの膨潤度	
3-2 細分化 GS 固定化 CMG ゲルの膨潤収縮による薬物放出量の測定	
3-3 単層培養における軟骨細胞の遺伝子発現	
3-4 細分化 CMG-GS ゲル内で培養した軟骨細胞の生存率	
3-5 細分化 CMG-GS ゲル内で培養した軟骨細胞の Viability	
3-6 細分化 CMG-GS ゲル内で培養した髄核細胞の遺伝子発現	
4 考察	30
4-1 CMG ゲルの膨潤度	
4-2 GS 固定化 CMG ゲルの膨潤収縮による薬物放出コントロール	
4-3 単層培養における軟骨細胞の遺伝子発現	
4-4 細分化 GS 固定化 CMG ゲル内の軟骨細胞への影響	
4-5 細分化 GS 固定化 CMG ゲルの軟骨再生について	
5 結論・展望	35
6 参考文献	36
7 謝辞	37
8 付録	38
8-1 NMR の設定方法 (マニュアル設定)	
8-2 PBS(300mOsm)の調整	
8-3 Pierce660nm 法	
8-4 軟骨細胞の培養培地の調製	
8-5 軟骨細胞の解凍	
8-6 培地交換	
8-7 細胞の継代	
8-8 Real Time PCR	

1 緒言

1-1 軟骨損傷

1-1-1 軟骨

軟骨とは、ヒアルロン酸やプロテオグリカンなどが網目状の組織をつくり、その隙間に豊富な水分を保持している弾性に富んだ組織である。関節内における骨の末端は軟骨に覆われており、関節の曲げ伸ばしをした際に固い骨同士が接触しない構造となっている。また、関節全体を滑膜が覆い、その内部は滑液と呼ばれる液体で満たされている。この滑液が上下の軟骨の間に入り、関節の滑らかな曲げ伸ばしを可能としている。通常、歩行時に人間の関節にかかる負荷はおよそ 3~5MPa と言われており⁽¹⁾、関節軟骨はこの大きな負荷を均等に分散させ、骨に直接かかる負荷を軽減させるクッションの役割を果たしている。

1-1-2 軟骨の種類

軟骨には大きく分けて3種類の軟骨が存在している。まず一つ目は硝子軟骨である。これらは関節軟骨や気管軟骨を構成する最も一般的な軟骨である。二つ目は線維軟骨で、椎間円板、関節半月などを構成している軟骨である。これらは固く、強い圧力に耐えることが出来る。三つ目は弾性軟骨である。この軟骨は耳介軟骨や喉頭蓋軟骨などが該当する。弾性線維を多く含み、硝子軟骨に比べ、弾性に富む軟骨である。

1-1-3 軟骨損傷

スポーツでの怪我や、長期間の関節の曲げ伸ばしなどにより軟骨を損傷した場合、軟骨は無血管領域であるので一般的には自然治癒が難しいと言われている。自然治癒したとしても本来硝子様である軟骨が線維様となって再生されてしまうため、力学的強度が著しく減退してしまうことが報告されている⁽²⁾。このことより、軟骨治療においては、自己の軟骨細胞を使用した再生医療への注目が高まっている。

1-1-4 現行の軟骨損傷における治療法と問題点

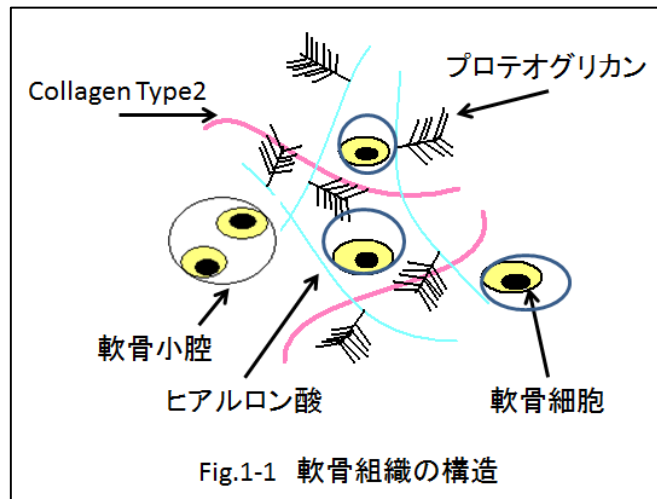
軟骨損傷時の治療としては、患者自身の軟骨細胞をシリンジなどで採取し、コーゲンゲル内で培養した後に損傷した患部に移植し、骨膜で蓋をする方法がとられている。以前の治療では、患者の体内で負荷のかからない部位の軟骨を採取し、その破片を移植されていた。この方法に比べて手術時に切開する範囲が狭く、低侵襲な治療法であるが、依然として細胞包埋ゲルを移植する際の手術は膝の切開は避けられず、高侵襲となるので患者の負担となる。そこで、より低侵襲である治療

法が求められている。

1-2 軟骨細胞

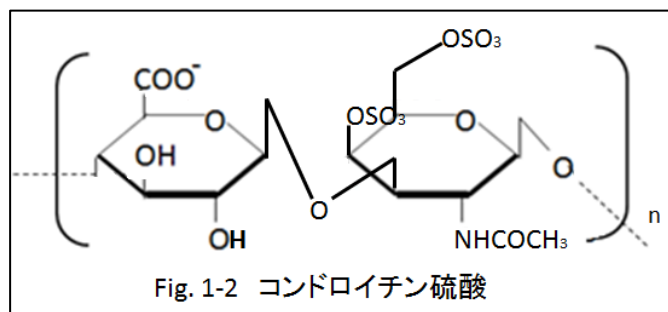
1-2-1 軟骨細胞

軟骨細胞とは軟骨内で唯一認められる細胞で、3次元網目構造をとるコラーゲン線維とプロテオグリカンなどの隙間(軟骨小腔)に数個単位で存在し、その軟骨小腔が組織に点在している構造を持っている。(Fig.1-1)軟骨組織の特徴として豊富な細胞外マトリックス(ECM)を含んでおり、水分を多く保持することで弾性に富んだ組織を形成している。



1-2-2 グリコサミノグリカン(GAG)

グリコサミノグリカン(GAG)は、枝分かれの無い糖鎖で結合組織を中心に多く存在している。硫酸基を持つ2糖の繰り返し構造をとり、常に負に帯電している。GAGの一つであるコンドロイチン硫酸の構造を Fig.1-2 に示した。



GAG は軟骨組織内ではコアタンパクに結合し、プロテオグリカンとして存在しており、組織内に多くの水分を保持する働きを担っている。(Fig.1-1)

1-2-3 軟骨細胞の脱分化について

軟骨細胞の特徴として培養中の脱分化があげられる。軟骨細胞は間葉系幹細胞(MSC)から軟骨細胞、更に肥満軟骨細胞へと分化する事が知られている。しかし、軟骨細胞は高度に分化した細胞である為、とても不安定である。通常の線維芽細胞などは平面上で培養する2次元培養法で細胞形態が維持されるが、軟骨細胞の場合はすぐに脱分化を起こして軟骨としての機能を失い、正常なECMを産出しなくなってしまう。軟骨細胞の遺伝子マーカーの一つであるSox9の発現も培養中に失われてしまう事が知られている⁽³⁾。これは軟骨細胞が培養中に産出したECMが培地交換などの際に失われてしまうことが原因だという報告がされている。そこで近年では軟骨細胞を培養する際は脱分化を防ぐためにゲルなどを使用し、3次元で培養を行うことが主流となっている。

1-2-4 現行の軟骨細胞の現行の培養法とその問題点

現行の軟骨細胞の3次元培養法としては、組織より単離した軟骨細胞をコラーゲンゲル溶液に混合し、ゲル内培養が一般的に行われている。しかし、ゲルを用いた3次元培養での問題はゲル内での物質交換がしにくい点にある。ゲルの構造が密であるほど培地が浸潤せず、ゲル内部の細胞に栄養を届けることが難しくなる。そのため、物質交換がしやすい材料と共に細胞の成長を促進させる薬物の担体としての機能をもった材料が有効と考えられている。

1-3 Drug Delivery System(DDS)

1-3-1 DDS

DDSとは薬物に特殊な加工をする事で患者に必要な量の薬を、必要な患部に届けるシステムの事を言う。例えば糖尿病患者などに対して考えられているDDSは、血中内の糖濃度を感知できるセンサーを薬物に取り付ける事である。糖尿病患者は定期的に血中の糖濃度を測定し、これを下げるためにインスリンを経口摂取、または注射により取り込む必要がある。しかし、薬物の効果は摂取直後が最も体内での薬物濃度が高く、その後徐々に下がっていく。そのため、一日3回食後に服用しなければ体内のインスリン濃度を維持できない。しかし、インスリンをカプセルなどで包み、そこに血中の糖濃度に応じてインスリンを放出するシステムを取り付ける事で、体内のインスリン濃度をコントロールできる。この様にDDSを導入する事で薬の服用回数、副作用、コストなどを大きく削減する事が可能である。

1-3-2 DDSの軟骨再生治療への応用

軟骨組織は無血管領域である為、細胞の栄養があまり豊富ではない。しかし現在軟骨再生に使用されているのはゲルの中に細胞を包埋し、完全に外界との接触を

断ってしまう材料である。そのため本来他の組織に比べ栄養が乏しい軟骨組織では、ゲルを使用する事で更に物質交換が難しい環境を作ってしまうと考えられる。そこで環境に応じて薬物放出可能な DDS 型ゲルを用いる事で細胞に栄養と成長刺激を長期間与え続け、3次元培養と栄養供給の両方の働きをさせることが期待される。

1-4 ジェランガム

1-4-1 ネイティブ型ジェランガム(NG)

今回材料として注目したのがジェランガムである。ジェランガムは *Spingomonas elodea* という微生物が菌体外に産出する多糖類であり、増粘安定剤として各種食品に幅広く利用されている⁽⁴⁾。またジェランガムは湿潤性に富んだ抗血栓性材料であり、先の実験から優れた生体適合性も証明されており、生体材料として様々な使用が可能であると考えられる。また、自然界に存在するジェランをネイティブ型ジェラン(NG)と呼ぶ。

NG は、1,3-β-D-グルコース、1,4-β-D-グルクロン酸、1,4-β-D-グルコース、1,4-α-Lラムノースの4糖の繰り返し単位からなり、平均分子量約 1 万の多糖類である。Fig1-3 中の赤の点線で示したのがアセチル基、青の点線で示したのがグリセリル基となり、この二つの置換基がゲルの形成に大きく関与している。また、形成したゲルは 100°Cまで熱不可逆的である。

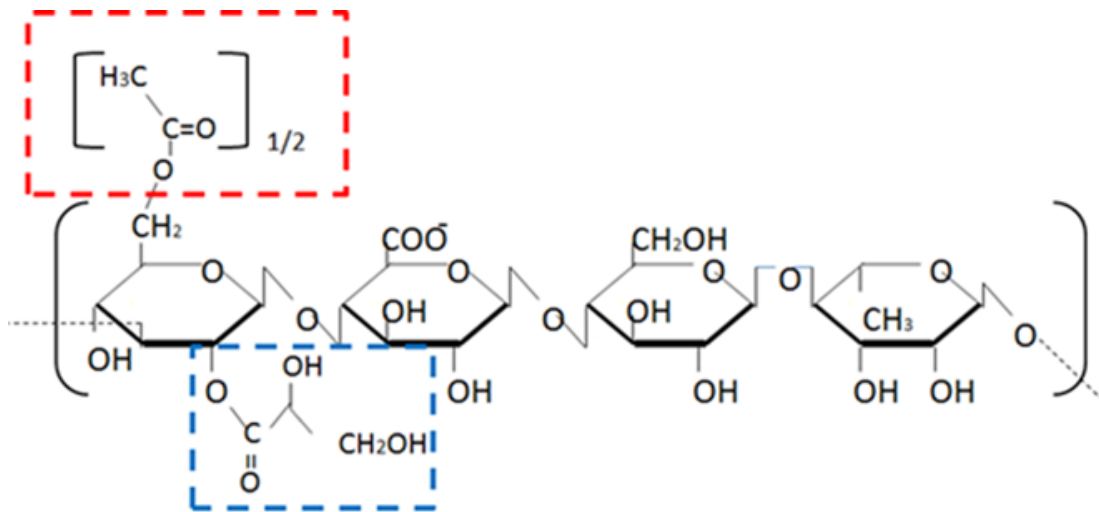


Fig.1-3 ネイティブ型ジェランガムの構造

NGを化学修飾する事で次の3種類のジェランガムを得ることが出来る。

1-4-2 脱アシル型ジェラン(DG)

脱アシル型ジェラン(DG)とはNGのアセチル基とグリセリル基を取り除いたものである。DGはカチオン類の存在下で強固で透明なゲルを形成する。方法としては90℃以上に加熱して溶解させ、その後ゲル化温度は濃度に依存し、30~60℃の比較的高温で熱可逆性のゲルを形成する。

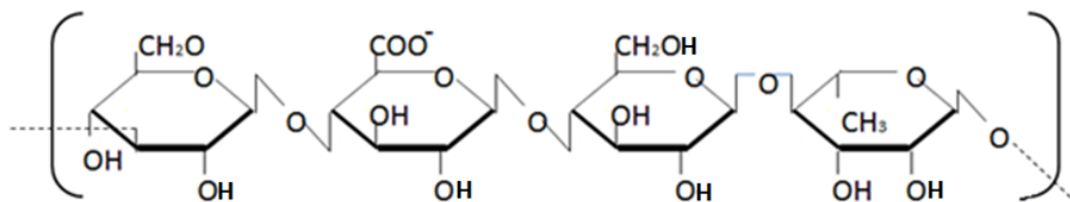


Fig.1-4 脱アシル型ジェランの構造

1-4-3 硫酸化ジェラン(GS)

硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)はネイティブ型ジェランをクロロスルホン酸と反応させ硫酸基を導入したものである。硫酸基を導入することにより生理活性タンパク質と結合能を持つようになり、以前の研究からフィブロネクチン(FN)、テネイシン-C(TN-C)や塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)と高い親和性を持つことが報告されている⁽¹⁾。これらのタンパク質は創傷治癒過程や軟骨修復過程における発現が確認されている。

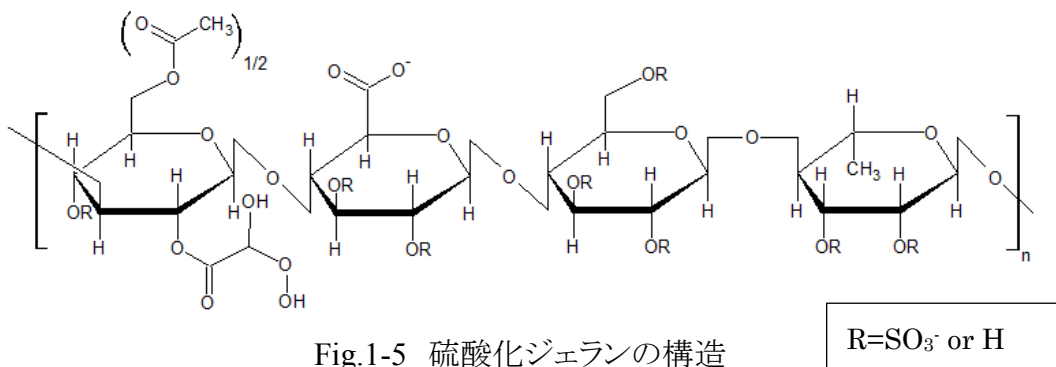


Fig.1-5 硫酸化ジェランの構造

またGSは硫酸基を持つ事で、軟骨組織を構成するコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカン(Fig.1-2-1)に類似した構造を有している。そのため生体適合性も高く、軟骨組織再生のための材料として適している。しかし、GS自身にゲル化能は無いため、ゲルの基質として別の材料が必要である。

1-4-4 カルボキシメチルジェラン(CMG)

CMGとは脱アシル型ジェランのヒドロキシ基をカルボキシ基に置換したものを言う。特徴として高い水溶性を持ち、化学架橋によりゲルを形成させることが出来、ゲル化は温度に依存しないため、生体温度でのゲル化が可能である。

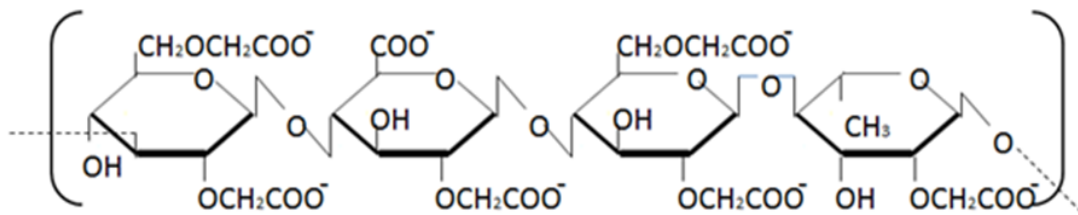


Fig.1-6 カルボキシメチルジェランの構造

1-5 本研究の目的

1-5-1 目的

本研究の目的は GS 固定化 CMG を使用して軟骨組織再生を可能とする、インジェクタブル且つ物質交換及び薬物調節放出能に優れた材料を開発する事である。そのため作成した材料の細胞に与える影響や材料の薬物放出性を調査した。以下にその概要を記す。

1-5-2 GS 固定化 CMG ゲルを用いた軟骨再生

サイトカインと親和性を持つ GS は無血管領域である軟骨再生に有用な材料である。しかし GS はゲル化能を持たない為、化学架橋可能な CMG ゲルに固定化させ、CMG をゲル化させる必要がある。そこで軟骨細胞に適したサイトカインを GS に結合させ、その GS を固定化した CMG ゲルを患部に移植する事で軟骨再生を目指す。また、そのゲルをシリンジの針を通る事が出来る形に加工する事で物質交換能を高くするとともにインジェクタブルな材料とする事が可能と考えた。

1-5-3 GS 固定化 CMG ゲルの膨潤収縮による薬物トラップ方法

本研究で調製した CMG ゲルは膨潤率の高い材料であるため、膨潤の前後でゲルの網目のサイズが大きく変化すると考えられる。そのため、ゲルの膨潤収縮を制御する事で網目の変化を利用して薬物をゲルに封入する方法を考案し、評価した。

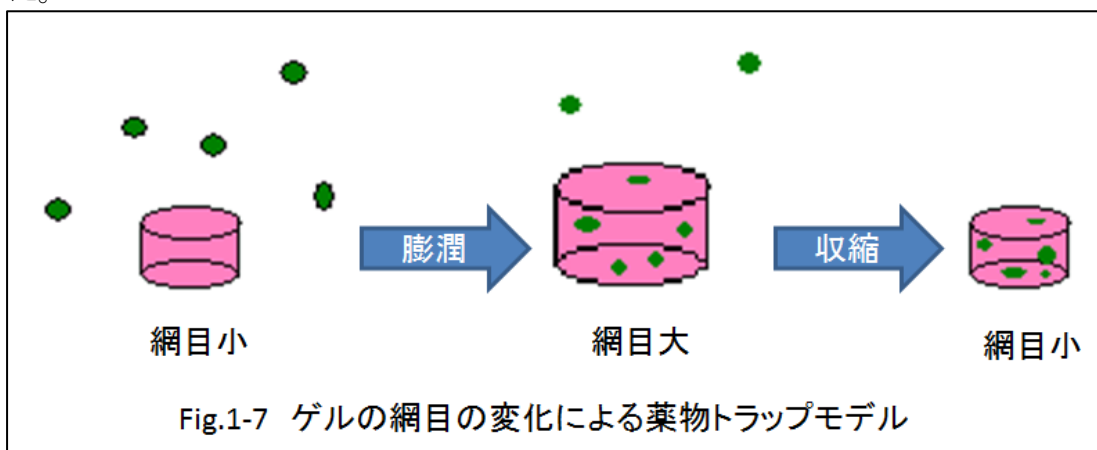
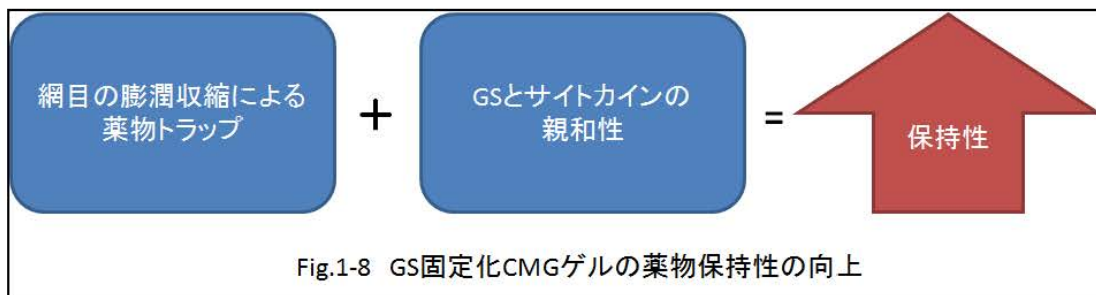


Fig.1-7 ゲルの網目の変化による薬物トラップモデル

また、CMGにGSを固定化する事で、更にサイトカインの保持性が増す効果が期待される。



2 方法

2-1 CMG ゲルの作成と物性

2-1-1 CMG の調製

本研究では高い水溶性を持ち、ゲルの素材として使用する CMG の調製を行った。

【試薬】

- 脱アシル型ジェラン:DG (和光純薬工業株式会社)
- 水酸化ナトリウム (和光純薬工業株式会社)
- モノクロロ酢酸ナトリウム (和光純薬工業株式会社)

【使用器具・機器】

- 電子天秤 (SHIMADZU)
- 凍結乾燥機 (LABCONCO)
- 薬さじ
- 薬包紙 (東京日本油紙)
- ビーカー
- 乳鉢
- エバポレーター (TOKYO RIKAKIKAI)
- 透析チューブ (三光純薬 分子量区画 14,000)
- 乳棒
- ナスフラスコ
- ガラスフィルター
- 耐圧ビン
- スターラー
- 攪拌子

【手順】

- ① DG5g を乳鉢で 10 分間すり潰した。
- ② 50wt%の水酸化ナトリウム水溶液を調製した。
- ③ 氷浴中で DG に水酸化ナトリウム水溶液を 50ml 加え、10分間攪拌した。
- ④ 室温で1時間静置し DG を十分に膨潤させた。
- ⑤ その後、氷浴に移し、モノクロロ酢酸ナトリウム 63g(DG の水酸基に対して 7 倍量)を少量ずつ加え、均一になるように攪拌した。
- ⑥ 均一になった後に室温で所定時間攪拌した。発熱した場合は氷浴で冷却し、再び室温で攪拌した。
- ⑦ 攪拌終了後に試料をビーカーに移し、脱イオン水に溶解した。
- ⑧ 完全に溶けたら透析チューブに注ぎ、脱イオン水で透析した。透析は pH 試験し透析外液が中性になるまで行った。
- ⑨ 透析終了後、エバポレーターで濃縮した後にガラスフィルターで濾過し、不純

物を取り除いた。

- ⑩ 濾過した溶液を耐圧ビンに移し、凍結乾燥した。
- ⑪ 乾燥終了後、スターラーと攪拌子でパウダー状になるまで攪拌した。

2-1-2 CMG の置換率測定

本項では作成した CMG の置換率を求めるために NMR 測定を行った。

【試薬】

- CMG (2-1-1 より調製)
- D₂O (和光純薬工業株式会社)

【使用器具・機器】

- JNM-500 型 核磁気共鳴装置 (JEOL 株式会社)
- NMR test tube (和光純薬工業株式会社)
- Win Alpha (Ver 1.0) FTNMR データシステム (ソフト) (JEOL 株式会社)
- ピペットマン
- ピペットマンチップ
- 電子天秤 (SHIMADZU)
- 薬包紙 (東京日本油紙)

【手順】

- ① CMG15mg を D₂O0.7ml に溶解し、サンプル管に高さ 4.2cm まで入れた。
- ② 下記の測定条件で測定を行った。

【¹H NMR 測定条件】

設定方法:¹H NMR 基本設定

実験モード: SINGL

照射モード: NON

SCANS : 100

溶媒: D₂O

2-1-3 CMG ゲルの作成

本項では架橋剤として L-Lysine methyl ester (Lys)、脱水縮合剤として 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) を使用して CMG のゲル化を行った。(Fig.2-1)

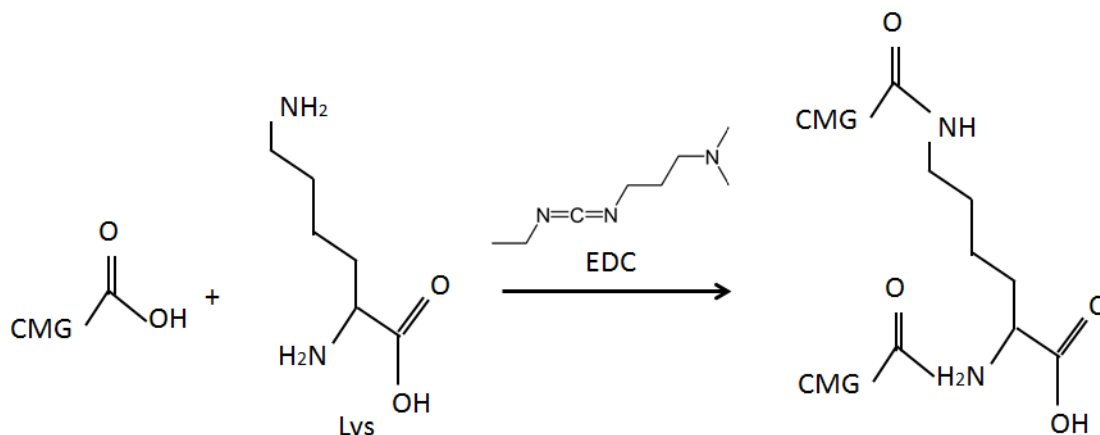


Fig.2-1 LysによるCMGの架橋

【試薬】

- CMG (2-1-1 により調製)
- L-Lysine methyl ester:Lys (ヒドラス化学株式会社)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride: EDC (ペプチド研究所)

【使用器具・機器】

- | | |
|-------------------|-----------------------|
| ● 薬さじ | ● ピペットマン |
| ● 薬包紙(東京日本油紙) | ● ピペットマンチップ |
| ● 電子天秤 (SHIMADZU) | ● ボルテックス |
| ● 遠沈管 | ● インキュベーター (アズワン株式会社) |
| ● スパチュラ | |

【手順】

- ① 遠沈管にCMG、Lys (CMGのカルボキシメチル基に対して0.5倍量)、EDC (CMGのカルボキシメチル基に対して4倍量)を量り取り、脱イオン水を加えボルテックスで攪拌した。(脱イオン水に対してCMGが10wt%となるように調製した。)
- ② 均一に溶解した後、37°Cのインキュベーター内で静置し、1hごとに溶液の流動性を確認した。ゲル化の判定はスパチュラをゲルの上に置き沈まない時点でゲル化とした。

2-1-4 CMGゲルの膨潤度測定

本項では調製したCMGゲルの物性評価として脱イオン水、PBS、DMEMでの膨潤度を測定した。

【試薬】

- CMG (2-1-1 により調製)
- Lys (ヒドラス化学株式会社)
- EDC (ペプチド研究所)
- Phosphate Buffered Saline:PBS
- Dulbecco's Modified Eagle Medium:DMEM

【使用器具・機器】

- 薬さじ
- 薬包紙 (東京日本油紙)
- 電子天秤 (SHIMADZU)
- 遠沈管
- ピペットマン
- 硝子チューブ
- メス
- ピペットマンチップ
- ボルテックス
- 35 φ シャーレ
- ノギス

【手順】

膨潤度測定

- ① EDC 濃度が CMG のカルボキシル基に対して×2,4,6 になるように調製した CMG ゲルを直径 3mm の硝子チューブ内に作成 (2-2 を参考)
- ② 作製したゲルを取り出し、メスで適当な長さ (3~5mm) に切る
- ③ 切ったゲルを 35 φ シャーレに移し、ゲルが十分に浸るまで脱イオン水、DMEM、のいずれかに浸す。
- ④ 経時的にゲルの直径と高さを測定し、膨潤率を算出する。

収縮度測定

- ① EDC 濃度が CMG のカルボキシル基に対して×4 になるように調製した CMG に脱イオン水に対して 1,3,5wt%GS を加えたゲルを直径 3mm の硝子チューブ内に作成 (2-2 を参考)
- ② 作製したゲルを取り出し、メスで適当な長さ (3~5mm) に切る
- ③ 切ったゲルを 35 φ シャーレに移し、ゲルが十分に浸るまで脱イオン水浸す。
- ④ 経時的にゲルの直径と高さを測定し、膨潤率を算出する。
- ⑤ 完全に膨潤した時点で外液を DMEM に交換しゲルを収縮させ、経時的にゲルの直径と高さを測定し、収縮率を算出する。

$$\text{膨潤率(収縮率)} = \frac{\pi h_1 r_1^2}{\pi h_0 r_0^2} \times 100(\%)$$

* h_0, h_1 : 膨潤前、膨潤後のゲルの高さ

* r_0, r_1 : 膨潤前、膨潤後のゲルの半径

2-1-5 DMEMと浸透圧調整済み PBS(300mOsm)における CMG ゲルの膨潤度

本項では浸透圧がゲルの膨潤度に与える影響を調査する為、DMEM と同様の浸透圧(300mOsm)になるように調製した PBS を用いて、CMG ゲルにおいて膨潤度の違いを調査した。

【試薬】

- CMG ゲル(2-1-3 より作成)
- DMEM
- PBS(300mOsm)(8-2 より調製)

【使用器具】

- 35 φ シャーレ
- ピペットマン
- オスモメーター

【手順】

- ① CMG ゲルを直径 3mm の硝子チューブ内に作成
- ② 作製したゲルを取り出し、メスで適当な長さに切る
- ③ 切ったゲルを 35 φ シャーレに移し、ゲルが十分に浸るまで PBS(300mOsm)、DMEM のいずれかを加える。
- ④ 経時的にゲルの直径と高さを測定し、膨潤率を算出する。

2-2 GS 固定化 CMG ゲルの作成と物性

2-2-1 GS 固定化 CMG ゲルの作成

本項では 2-1-1 で調製した CMG に GS を固定化させたゲルの作成を行った。Fig2-2 に Lys による CMG への GS 固定化の反応式を示した。

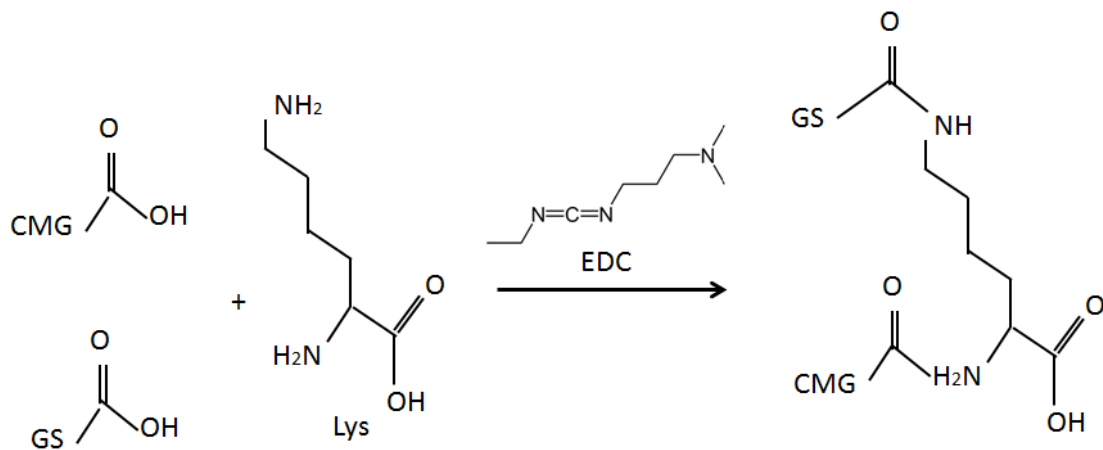


Fig.2-2 LysによるCMGへのGS固定化

このように GS のカルボキシ基と CMG のカルボキシメチル基を架橋する事で GS を CMG ゲルに固定する事が可能である。

【試薬】

- CMG (2-1-1 により調製)
- GS
- L-Lysine methyl ester (ヒドラス化学株式会社)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride: EDC (ペプチド研究所)

【使用器具・機器】

- 薬さじ
- 薬包紙 (東京日本油紙)
- 電子天秤 (SHIMADZU)
- 遠沈管
- ピペットマン
- ピペットマンチップ
- ボルテックス

【手順】

- ① CMG、Lys、EDC をそれぞれ計り取り、そこに GS を 1wt% になるように加える。
- ② 脱イオン水を加えてボルテックスで攪拌し、37°C でインキュベート。

2-2-2 GS 固定化 CMG ゲルの膨潤度測定

本項では調製した GS 固定化 CMG ゲルの物性評価として脱イオン水、PBS、DMEM

での膨潤度を測定した。

【試薬】

- GS 固定化 CMG (2-2-1 により調製)
- L-Lysine methyl ester (ヒドラス化学株式会社)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride: EDC (ペプチド研究所)
- PBS
- DMEM

【使用器具・機器】

- 薬さじ
- 薬包紙 (東京日本油紙)
- 電子天秤 (SHIMADZU)
- 遠沈管
- ピペットマン
- 硝子チューブ
- メス
- ピペットマンチップ
- ボルテックス
- 35 φ シャーレ
- ノギス

【手順】

- ⑤ GS が脱イオン水に対して 1,3,5wt%、EDC 濃度が CMG の架橋基に対して 4 倍になるように調製した CMG ゲルを直径 3mm の硝子チューブ内に作成 (2-2 を参考)
- ⑥ 作製したゲルを取り出し、メスで適当な長さに切る
- ⑦ 切ったゲルを 35 φ シャーレに移し、ゲルが十分に浸るまで脱イオン水、PBS、DMEM のいずれかを加える。
- ⑧ 経時的にゲルの直径と高さを測定し、膨潤率を算出する。
- ⑨ ゲルの収縮を見る場合はゲルが膨潤しきったところで DMEM 又は PBS を加える。
- ⑩ 経時的にゲルの直径と高さを測定し、収縮率を算出する。

2-2-3 細分化 GS 固定化 CMG ゲルの作成

本項では GS 固定化 CMG ゲルをインジェクタブルな材料とするために細分化を行った。

【試薬】

- GS-CMG ゲル (2-2-1 より作成)
- 脱イオン水

【使用器具】

- ふるい(105 μ m)
- 50 μ m フィルター

【手順】

- ① 2-2-1 で作成した GS 固定化 CMG ゲルを脱イオン水に浸けて、限界まで膨潤させ、未反応物を洗浄。
- ② そのゲルを 105 μ m のメッシュでこして細分化する。
- ③ 細分化したものを 50 μ m のフィルターに通し、50~105 μ m のゲルを回収する。

2-2-4 GS 固定化 CMG ゲルの膨潤収縮による薬物放出量の測定

本項では膨潤外液を変える事によるゲルの膨潤収縮によりゲル内部に薬物モデルのトラップさせた材料を作成し、その放出試験を行った。

【試薬】

- 細分化 GS 固定化 CMG ゲル(2-2-3 より調製)
- 免疫グロブリン G:IgG
- ウシ血清アルブミン:BSA
- PBS(浸透圧 300mOsm)

【使用器具・機器】

- 遠沈管
- 薬さじ
- 薬包紙(東京日本油紙)
- 電子天秤(SHIMADZU)
- アシストチューブ
- ピペットマン
- ピペットマンチップ

【手順】

- ① 細分化ゲルを DMEM の浸透圧になるように調製した PBS で収縮させた。
- ② 細分化ゲルを遠心分離し、上澄みを廃棄した。
- ③ 残ったゲル溶液を 100 μ l ずつ 1.5ml チューブに移し、1mg/ml の各タンパク溶液を 200 μ l ずつ加えて 3h 静置。
- ④ その後チューブを遠心分離し、上澄みを廃棄。
- ⑤ その後 1mg/ml になるようにタンパク質を溶解させた PBS を 200 μ l 加えてゲルを 1h 収縮させる。
- ⑥ 1 時間後、チューブを遠心分離し、上澄みを廃棄して新しい PBS を 200 μ l 加えて

静置。

- ⑦ 各時間で上澄みを回収し、放出されたタンパク量を Pierce 660nm 法(8-3 参考)により測定した。-

2-3 軟骨細胞の単層培養における表現型マーカー遺伝子の発現

2-3-1 軟骨細胞の培養

(8-6 参考)

2-3-2 軟骨細胞の継代

(8-7 参考)

2-3-3 軟骨細胞の単層培養における表現型マーカー遺伝子の発現

本項では単層培養における脱分化による遺伝子発現の経時的変化を調査した。

【試薬】

付録 8-6 を参照

【調査遺伝子】

- Collagen type 1 (軟骨細胞脱分化マーカー)
- CD90 (軟骨細胞脱分化マーカー)
- Sox9(軟骨細胞マーカー)
- GAPDH (内部標準)

【手順】

- ① 軟骨細胞継代時に 24well に細胞を播種(1.0×10^5 cells/cm²)
- ② 細胞がコンフルエントになるまで培養し、2well を 1 サンプルとして RNA を抽出。
- ③ 各サンプルで RNA 濃度を一定に調製し、RTproduct を作製。
- ④ 作製した RTproduct を使用し、各遺伝子において Real time PCR を行った。(8-8 参照)

2-4 軟骨細胞の GS 固定化 CMG ゲル培養における軟骨細胞への影響

2-4-1 GS 固定化 CMG ゲル内での細胞培養

本項では 2-2-4 で作成した細分化 GS 固定化 CMG ゲルを用いて軟骨細胞への GS

の影響を調査した。

【試薬】

- 細分化 GS 固定化 CMG (2-2-4 より調製)
- DMEM
- FBS
- 99%エタノール

【使用器具・機器】

- 25cm² 培養用フラスコ
- 0.5ml アシストチューブ

【手順】

- ① 細分化 GS 固定化 CMG ゲルをアルコールに 3h 浸し、滅菌する。
- ② 滅菌後、遠心分離により(750rpm,10min)アルコールを除去する。
- ③ そのゲル溶液に大量の 10%FBS/DMEM を加えて洗浄を繰り返し、アルコールを完全に除去する。
- ④ 遠心分離により余計な DMEM を廃棄し、残ったゲル溶液を 0.5ml アシストチューブに 100 μ l ずつ分注する。
- ⑤ そこにトリプシン処理によって得た細胞を播種する。(1.0 \times 10⁶cells/tube)
- ⑥ 3 日に一回培地交換を行う。

2-4-2 GS 固定化 CMG ゲル内で培養した軟骨細胞の生存率

本項では、細分化 GS 固定化 CMG ゲル内で培養した軟骨細胞の生存率をトリパンブルー染色によって調査した。

【試薬】

- triton 溶液
- トリパンブルー溶液

【使用器具・機器】

- スライドガラス
- カバーガラス
- 顕微鏡

【手順】

- ① 細胞を培養しているゲルチューブを 2 本用意する。
- ② チューブを遠心し、DMEM を廃棄する。
- ③ そこに PBS 又は triton 溶液を加える。
- ④ 次に③で入れた液と同量のトリパンブルー溶液を加えてピペッティングする。
- ⑤ ピペッティング後すぐに液を 1~2 滴スライドガラスに落とし、上からカバーガラスを置く。
- ⑥ 作製したスライドガラスを位相差顕微鏡で観察する。

2-4-3 GS 固定化 CMG ゲル内で培養した軟骨細胞の Viability

本項ではゲル内で培養した軟骨細胞の Viability を MTT 試験により調査した。

【試薬】

- CMG 添加培地(2-5-2 より調製)
- 10%FBS/DMEM
- Cell Proliferation Kit I (MTT assay) (Roche Applied Science)
 - MTT 標識試薬(1 液)
 - MTT 可溶化試薬(2 液)
- PBS

【使用器具・機器】

- | | |
|-------------------|--------------------------------|
| ● ディスペンサー | ● 96 穴プレート |
| ● ガラスピペット | ● インキュベーター (IKEMOTO) |
| ● ピペットマン | ● 恒温槽 (YAMATO) |
| ● ピッペットマンチップ | ● 振盪機 (タイテック株式会社) |
| ● 血液ポンプ (NIKKISO) | ● プレートリーダー (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ) |
| ● パスツール | |

【手順】

- ① 細胞を培養しているチューブを 3 本用意する
- ② 培養チューブを遠心(750rpm 5min)し、培地を廃棄する。
- ③ PBS で 2 回洗浄後、10%FBS/DMEM200 μ l/tube と 1 液を 20 μ l/tube 加え、4h インキュベートを行った。
- ④ インキュベート後、2 液を 200 μ l/tube 加え、10 分間振盪した。
- ⑤ その後 12h インキュベートを行った。
- ⑥ インキュベート終了後、チューブを遠心し、上澄みを 210 μ l を 96 穴プレートに移し、

655nm をリファレンスとし、550nm で吸光度測定を行った。

2-4-4 GS 固定化 CMG ゲル内で培養した軟骨細胞の遺伝子発現

本項では GS 固定化 CMG ゲル内で培養した軟骨細胞における遺伝子発現の変化を調査した。

【試薬】

- 10%FBS/DMEM

【調査遺伝子】

- Sox9 (軟骨細胞ポジティブマーカー)
- Collagen type 1 (軟骨細胞脱分化マーカー)
- CD90 (軟骨細胞脱分化マーカー)
- GAPDH (内部標準)

【使用器具・機器】

付録 8-6 を参照

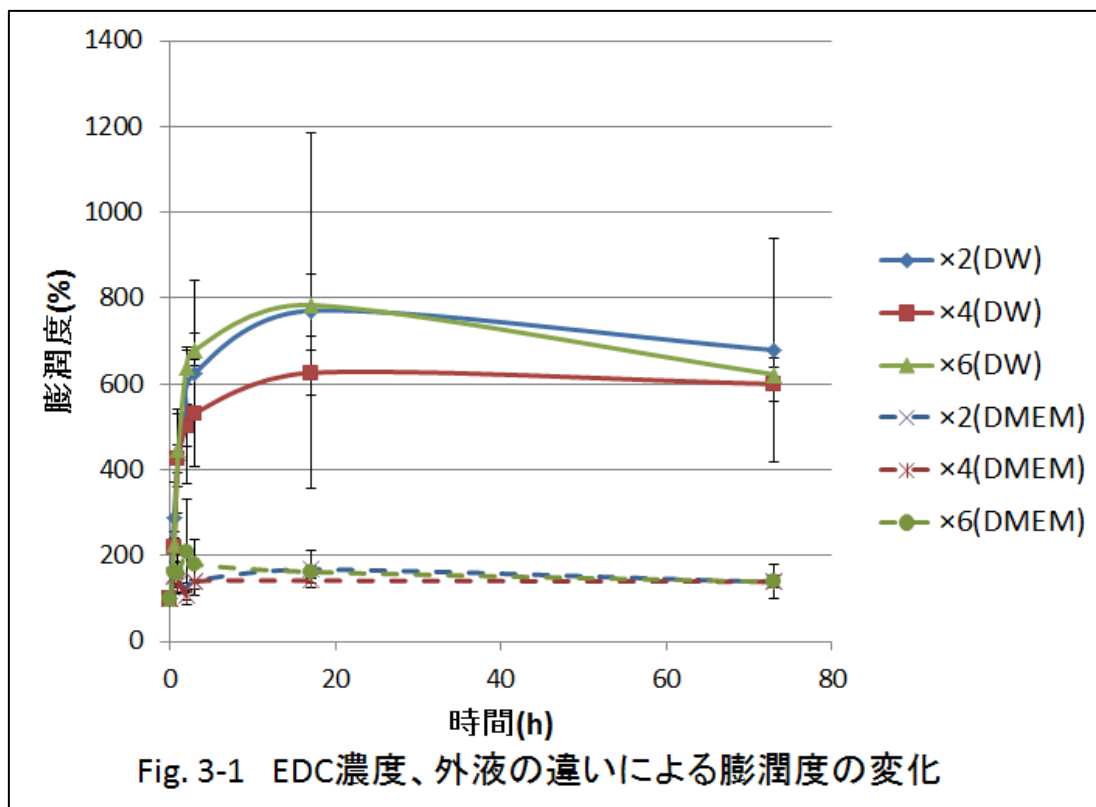
【手順】

- ① 軟骨細胞をゲル内で 1week 又は 2week 培養した。
- ② チューブ内にて RNA を抽出し、各サンプルで RNA 濃度を一定に調製し、RT product を作成した。(付録 8-6 を参照)
- ③ 作製した RT product を使用し、各遺伝子のプライマーにて Real time PCR を行った。(8-8 を参考)

3 結果

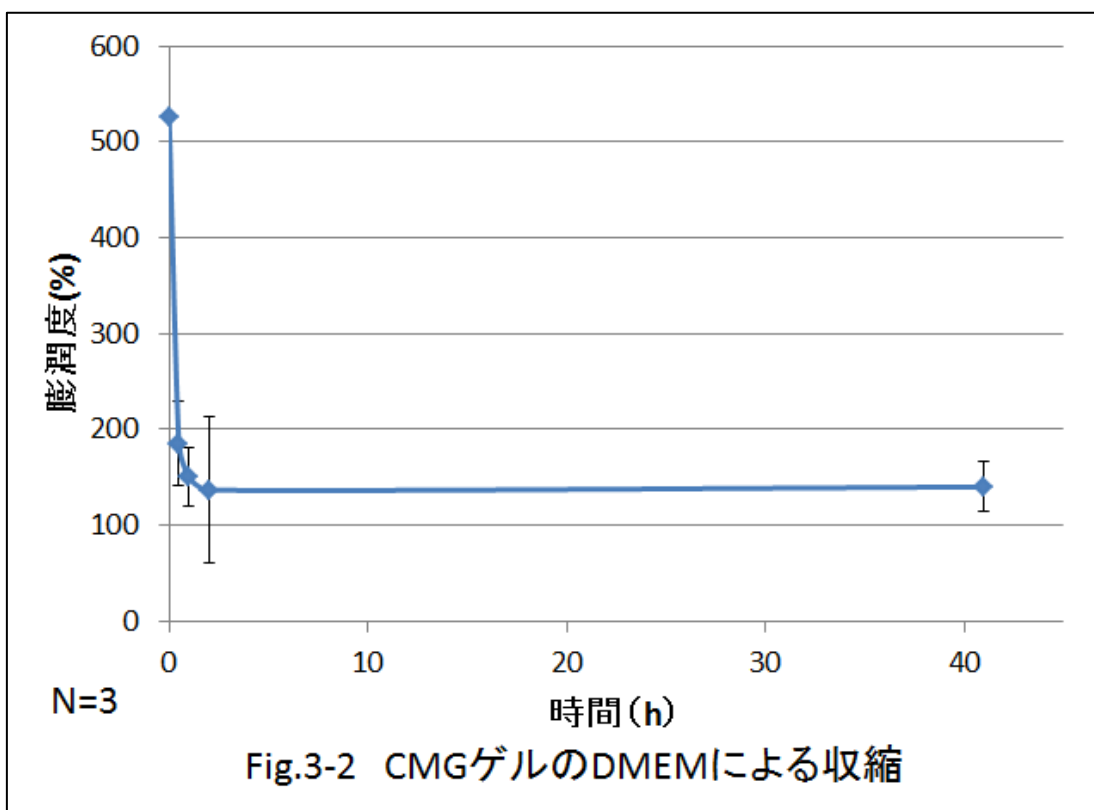
3-1 CMG、GS 固定化 CMG ゲルの膨潤率

作成した EDC 濃度、膨潤に用いた外液の違いによる CMG ゲルの膨潤率の変化を Fig.3-1-1 に示した。



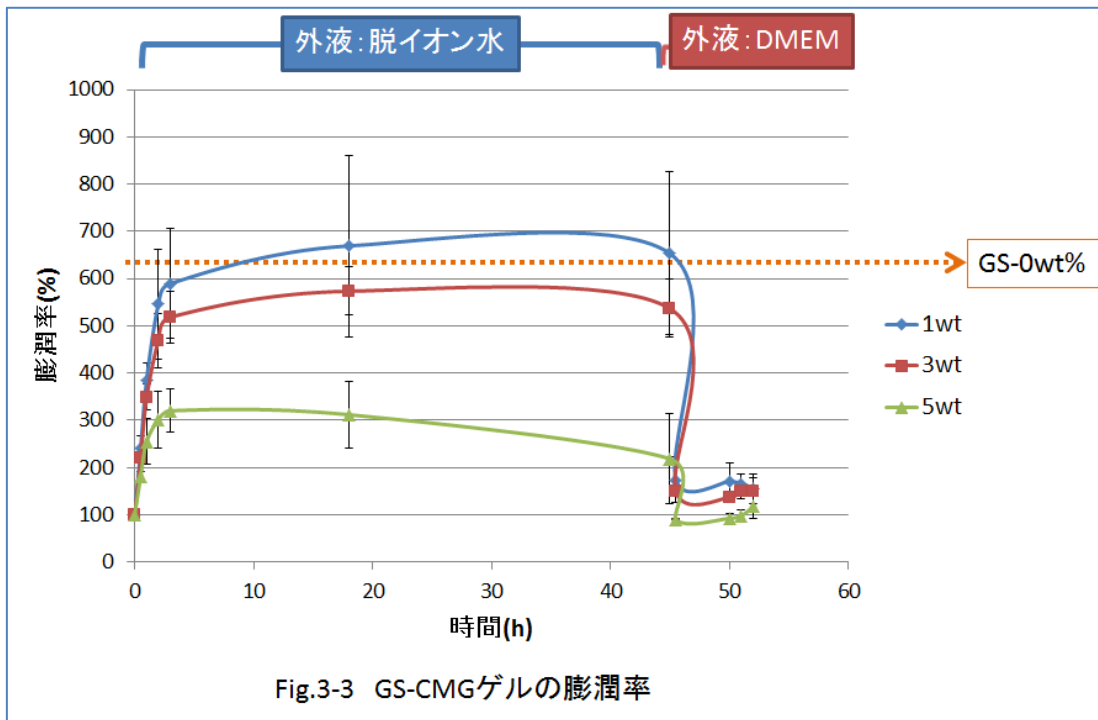
脱イオン水で膨潤させたサンプルは各 EDC 濃度で膨潤率に変化が見られた。EDC ×4 が最も低い値を示し最大 625%まで膨潤した。しかし EDC×2,6 は差が無く、どちらも 770~780%まで膨潤した。また、DMEM で膨潤させたサンプルについては殆ど膨潤せず最大で 200%まで膨潤し、各サンプルにおける膨潤率の違いは見られなかった。

次に Fig.3-2 に外液の変化による CMG ゲルの収縮の変化を示した。



CMG ゲルの外液の違いによる膨潤と収縮が可逆的であるかの調査をした。Fig.3-1において最も膨潤をせず、安定していたEDC×4のサンプルを用いて、膨潤外液を脱イオン水からDMEMへ変化させて収縮率を測定した。その結果、576±76%まで膨潤していたゲルは外液をDMEMに変化させることで136±17%まで収縮した。

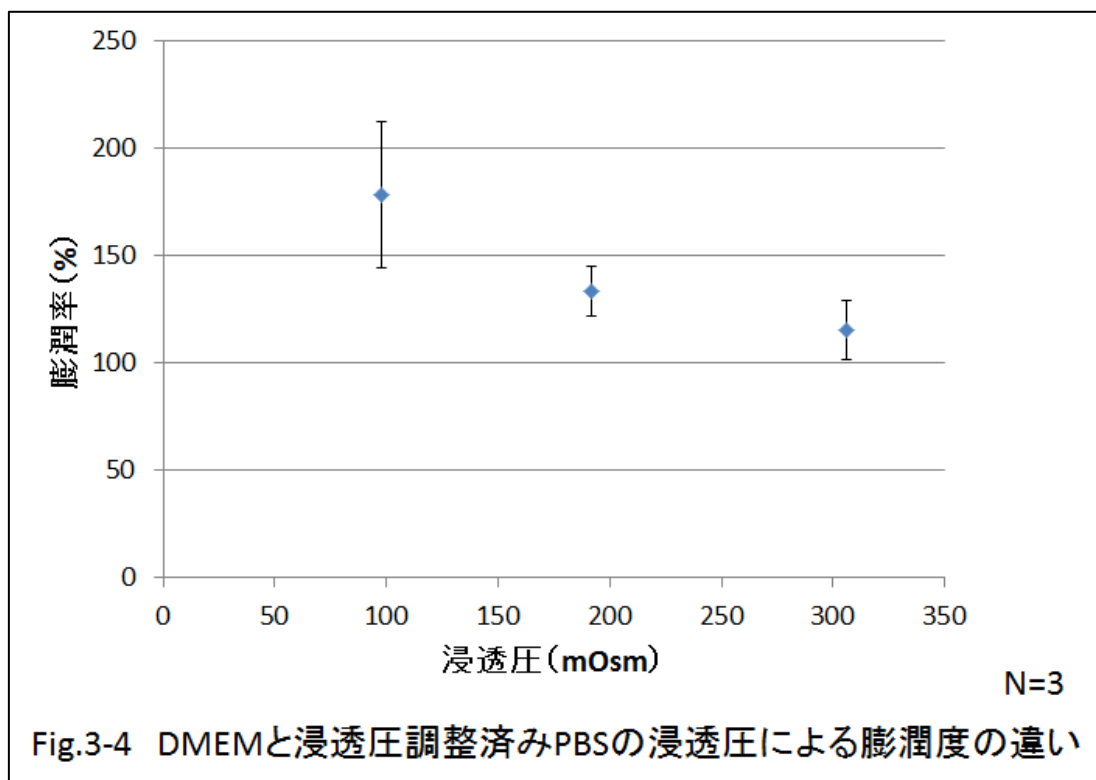
GS固定化CMGゲルの膨潤率と収縮率の変化を調査した。サンプルはEDC×4を使用し、GSの濃度の違いによる膨潤度の変化をFig.3-3に示した。



その結果、GSの仕込み濃度が1wt%のサンプルにおいては最大670%まで膨潤し、3wt%では約570%、5wt%においては320%まで膨潤し、最も低い値を示した。このグラフより、GSの濃度が高い程膨潤率が下がることがわかった。また、Fig3-1のEDC×4と比較しても1wt%,3wtのものと比較すると膨潤度に差は無かったため、以後の実験では1wt%のサンプルを使用する事とする。

次にDMEMと浸透圧調整済みPBSの浸透圧の違いにおけるCMGゲルの膨潤度

の違いの結果を Fig.3-4 に示した。



その結果、PBS の浸透圧が 98mOsm のものは約 179%、192mOsm では約 133%、306mOsm では約 115%まで膨潤した。Fig3-2 により、DMEM における膨潤率と 306mOsm の膨潤率が等しいため、今後の実験では DMEM (約 300mOsm) の代用として PBS を使用する。

3-2 GS 固定化 CMG ゲルの膨潤収縮による薬物放出量の測定

本項ではGS固定化CMGゲルの膨潤と収縮の際の網目のサイズによる薬物トラップの検討、放出量の測定を行った。また細分化GS固定化CMGゲルの顕微鏡写真をFig.3-5に示した。その結果をFig.3-6にBSAの放出量及び累積放出量、Fig.3-7にIgGの放出量及び累積放出量を示した。また、Fig.3-8にビタミンB12放出量とその累積放出量をそれぞれ示した。

*累積放出量の各グラフにおいて0minは洗浄時の放出量であるので5minからの放出量を積算した。

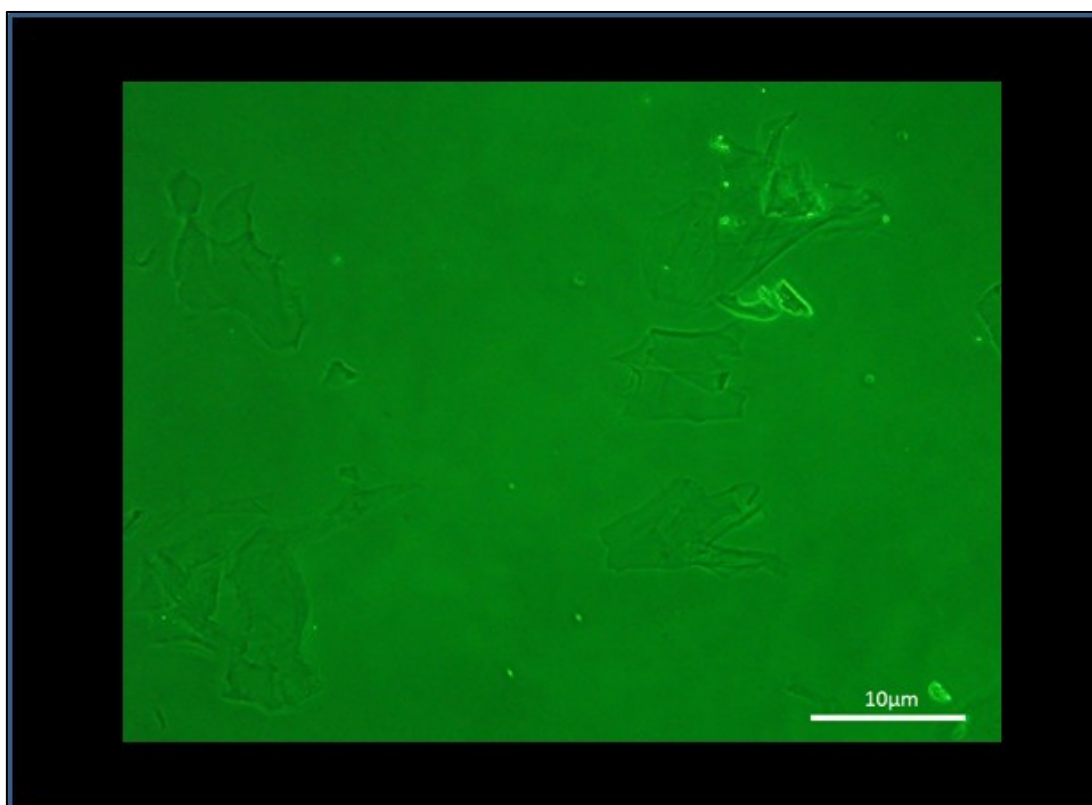
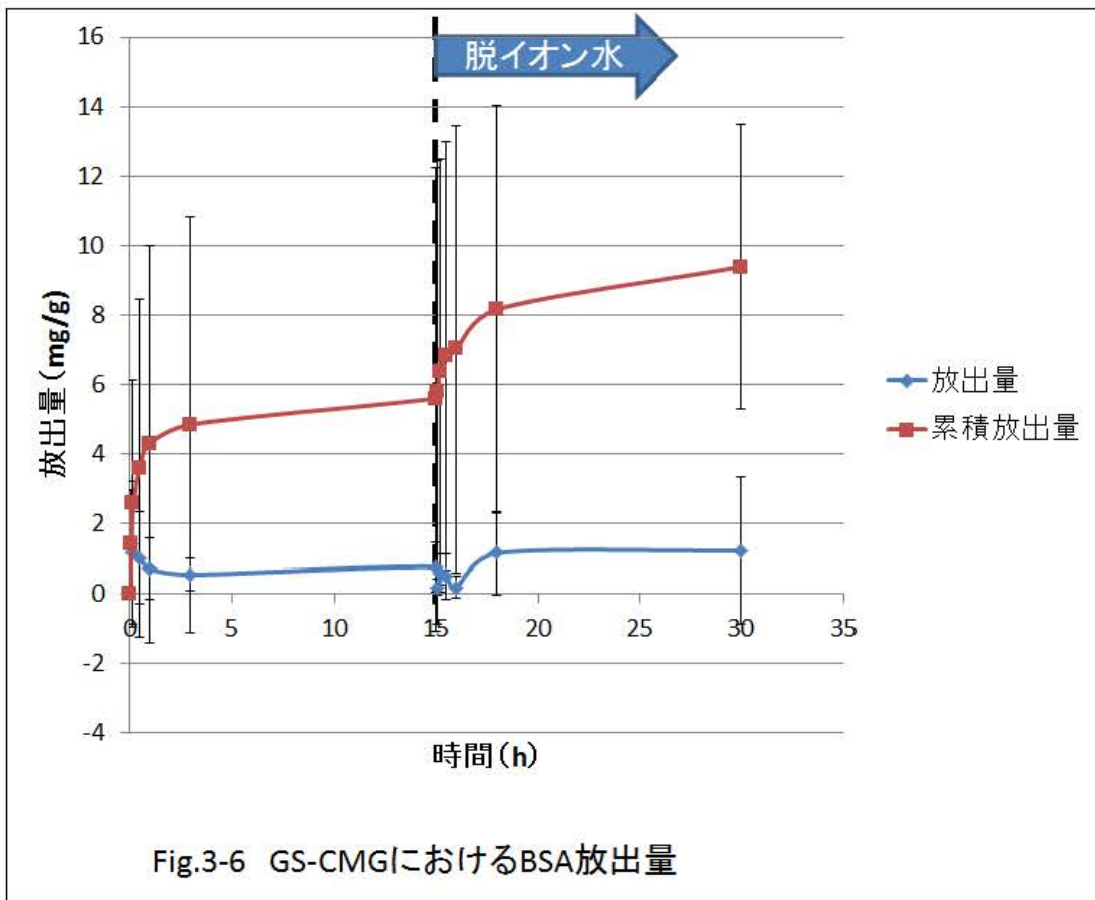
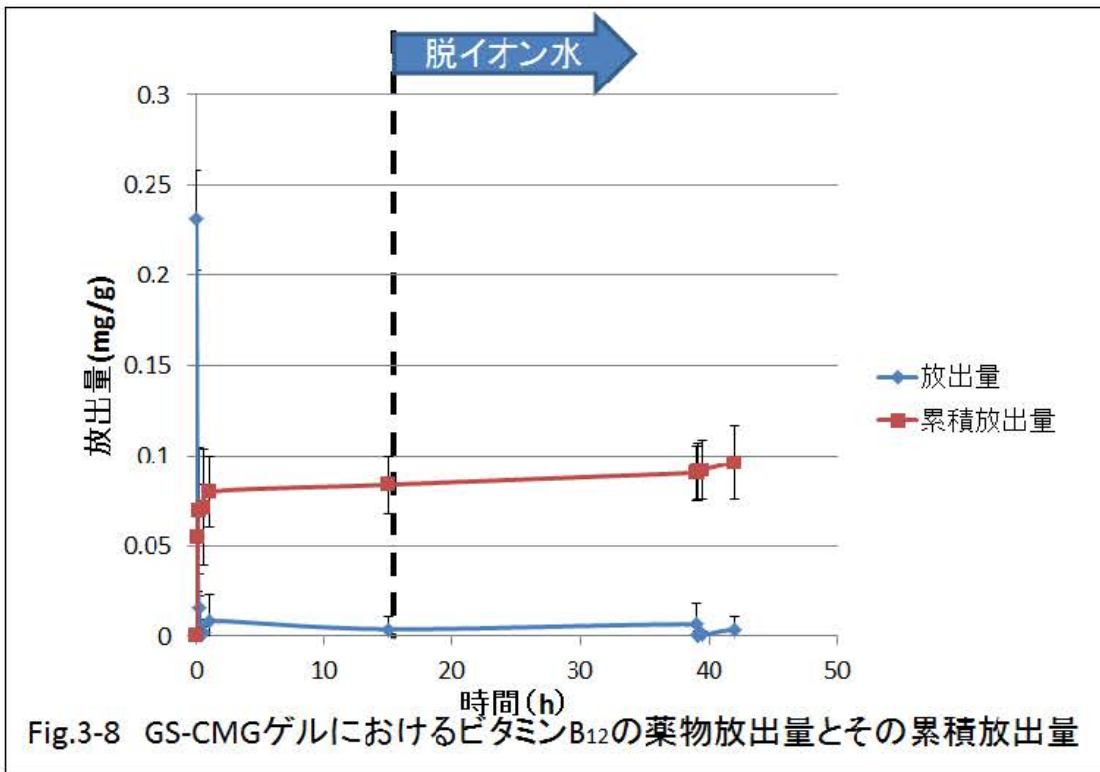
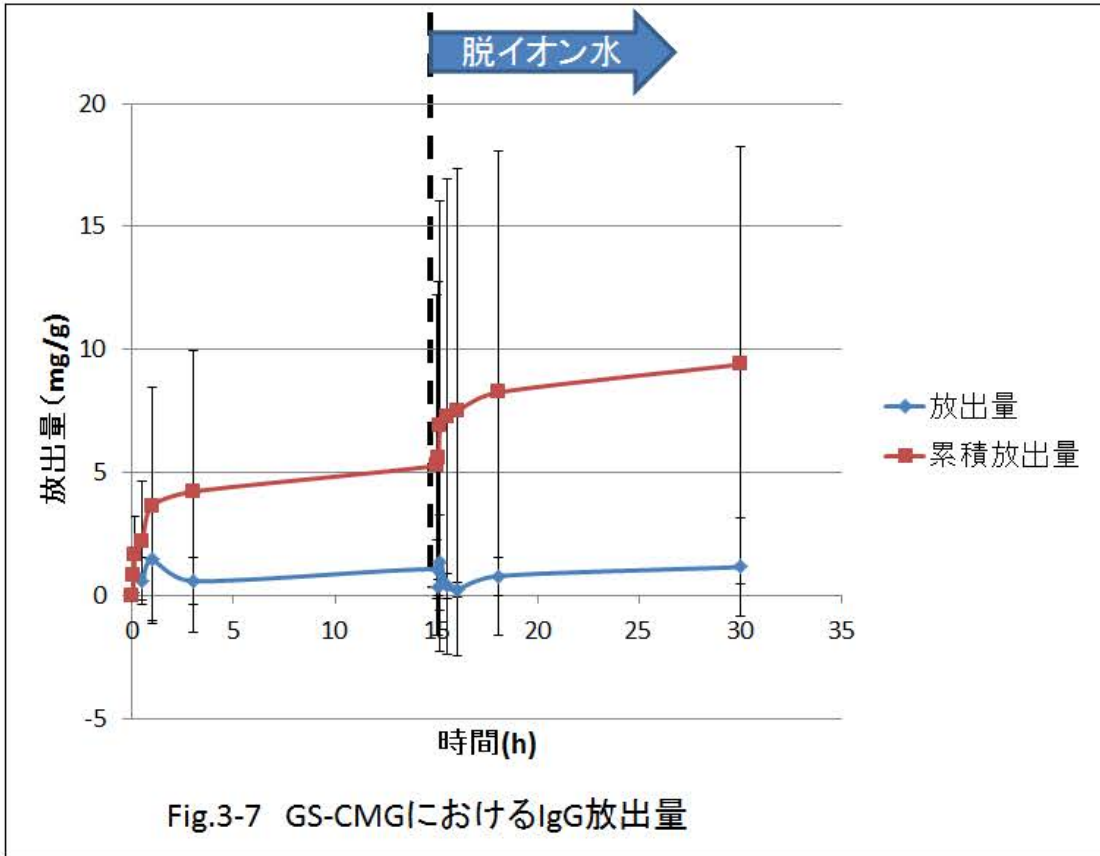


Fig.3-5 細分化GS固定化CMGゲル



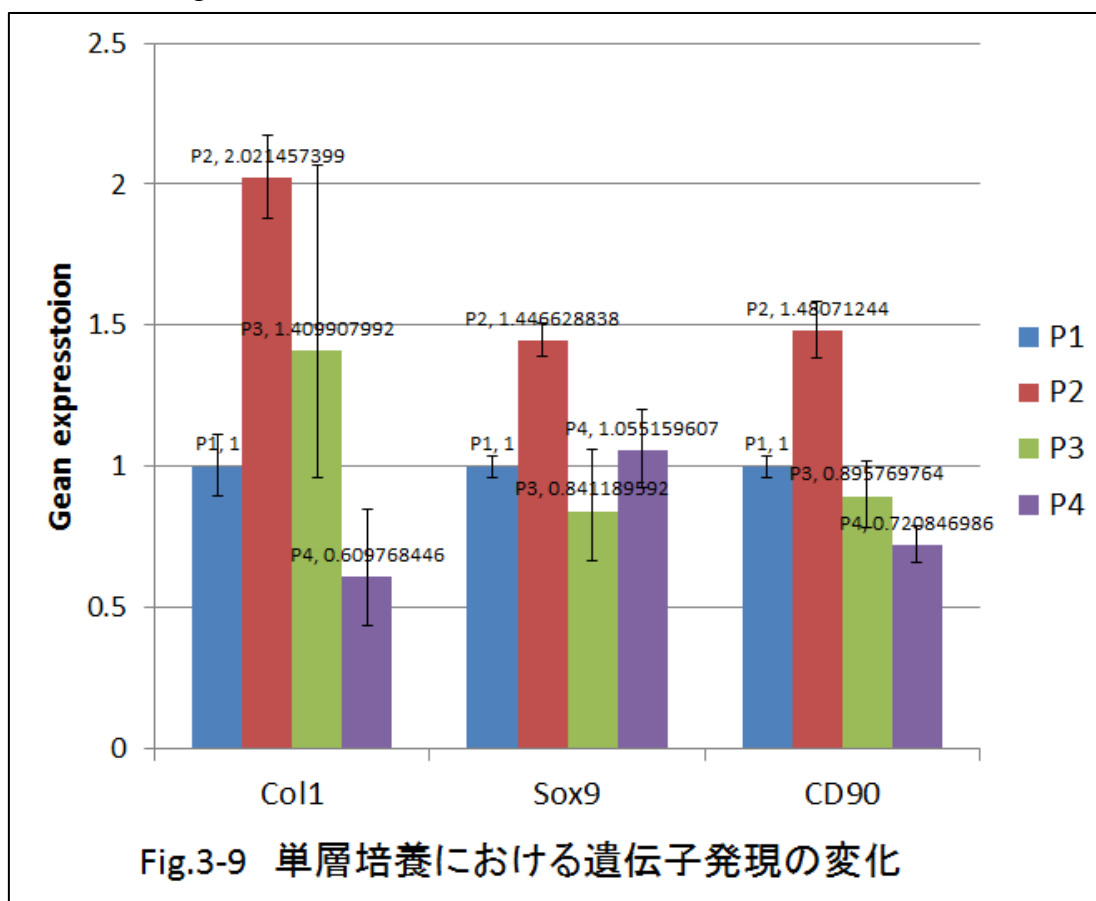


その結果、Fig.3-5, 3-6よりBSAは0hの時点で最も多く徐放され、IgGは最初の5minまでに大きく徐放された。その後15hで外液を脱イオン水に変えたところ、BSA,IgG共に放出が確認され、最終的に30hでそれぞれの累積放出量に差は無く、どちらも約9.4mg/g放出された。また脱イオン水で強制的に薬物を徐放させた15h~30hにおいてはBSAは約3.8mg/g、IgGにおいては約4.1mg/g放出が確認できた。

次にビタミンB12については0minでの洗浄時の放出以外に大きな放出は見られず、累積放出量も0.9mg/gとほとんど放出されなかった。

3-3 単層培養における軟骨細胞の遺伝子発現

軟骨細胞が脱分化する上での遺伝子発現の変化をReal time PCRにより調査した。その結果をFig.3-3に示す。



その結果、軟骨脱分化マーカーであるCollagen type1,CD90はP1に比べP2において大きな発現が見られたが、その後は継代数を重ねる毎に減少傾向を示した。軟骨マーカーであるSox9においてはP2において高い発現がみられたものの、その後は継代数に依存する傾向は無く、全体的に大きな差は見られなかった。

3-4 GS固定化CMGゲル培養における軟骨細胞の生存率

ゲル内培養をした軟骨細胞の生存率の変化をトリパンプルー染色により調査した。その結果を Fig.3-10 に位相差顕微鏡による画像と、Fig.3-11 に軟骨細胞の生存率を示した。

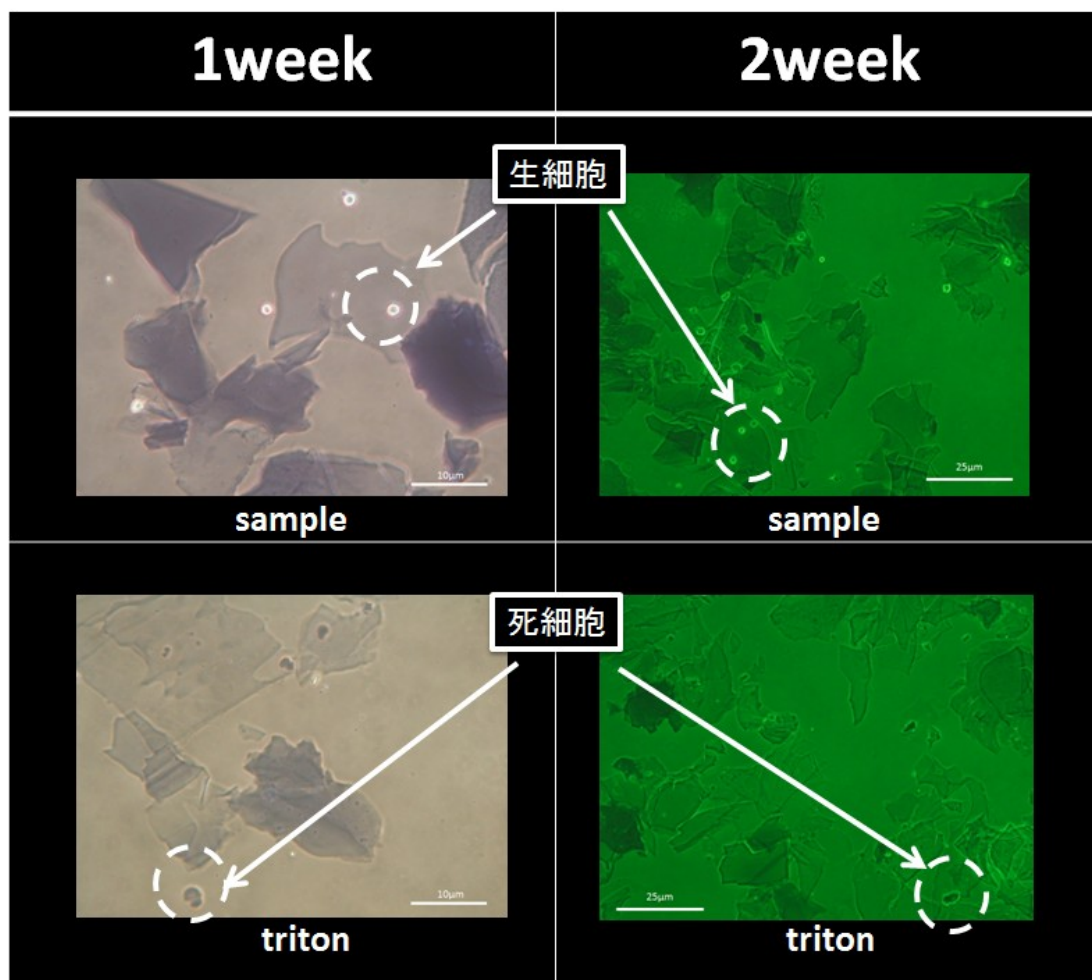


Fig.3-10 GS-CMGゲル内培養における軟骨細胞のトリパンプルー染色

Fig.3-10 ではポジティブコントロールとして Triton を使用した。Triton は細胞膜を壊す作用がある界面活性剤であるので細胞がネクロシスを起こし、トリパンプルーで染色される為、黒っぽく示される。対して Sample の方は細胞が活着しているため細胞内に色素が入り込まず、染色されない為白っぽく光って見える。

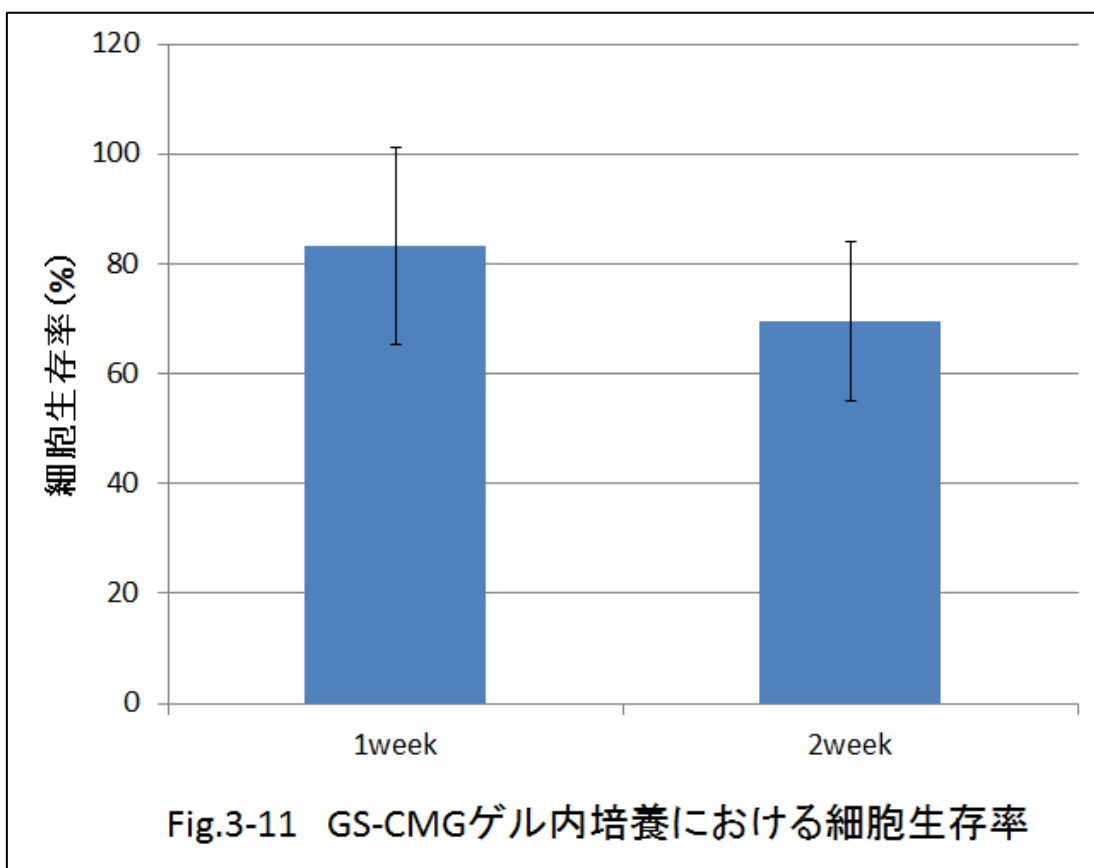
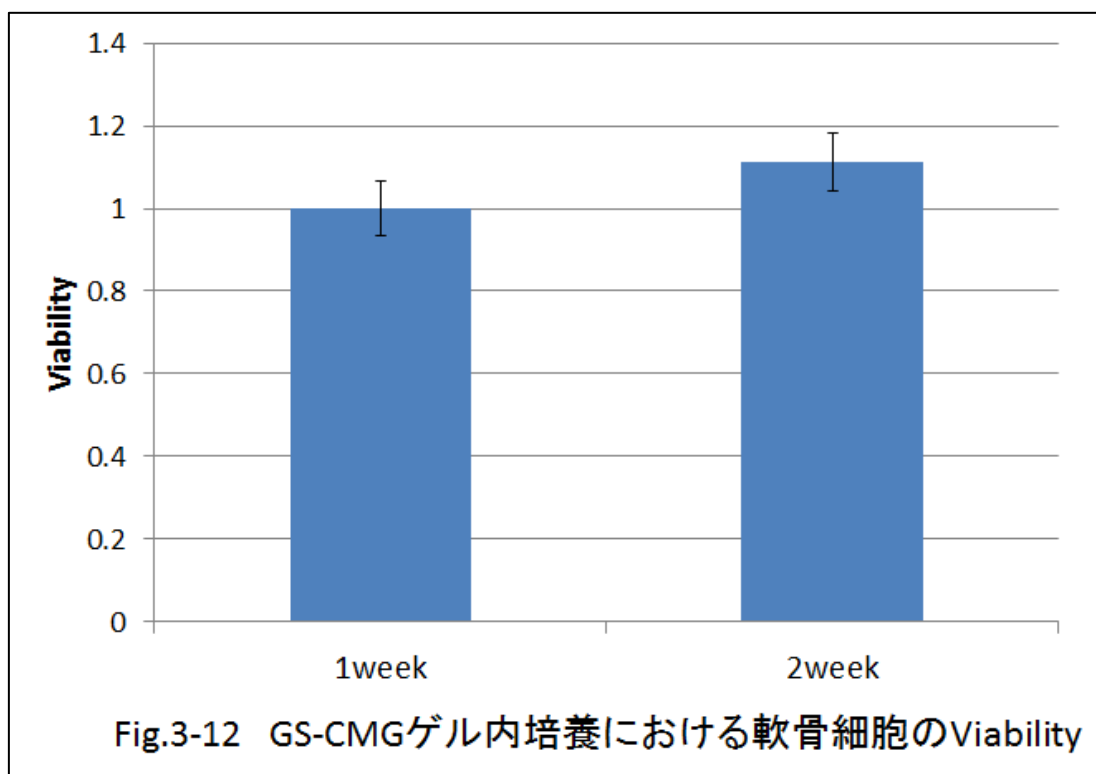


Fig.3-11 より、1week での細胞生存率は $83.3 \pm 18\%$ 、2week では $69.4 \pm 14\%$ となり、培養期間での変化が見られなかった。

3-5 GS 固定化 CMG ゲル内培養における軟骨細胞の Viability

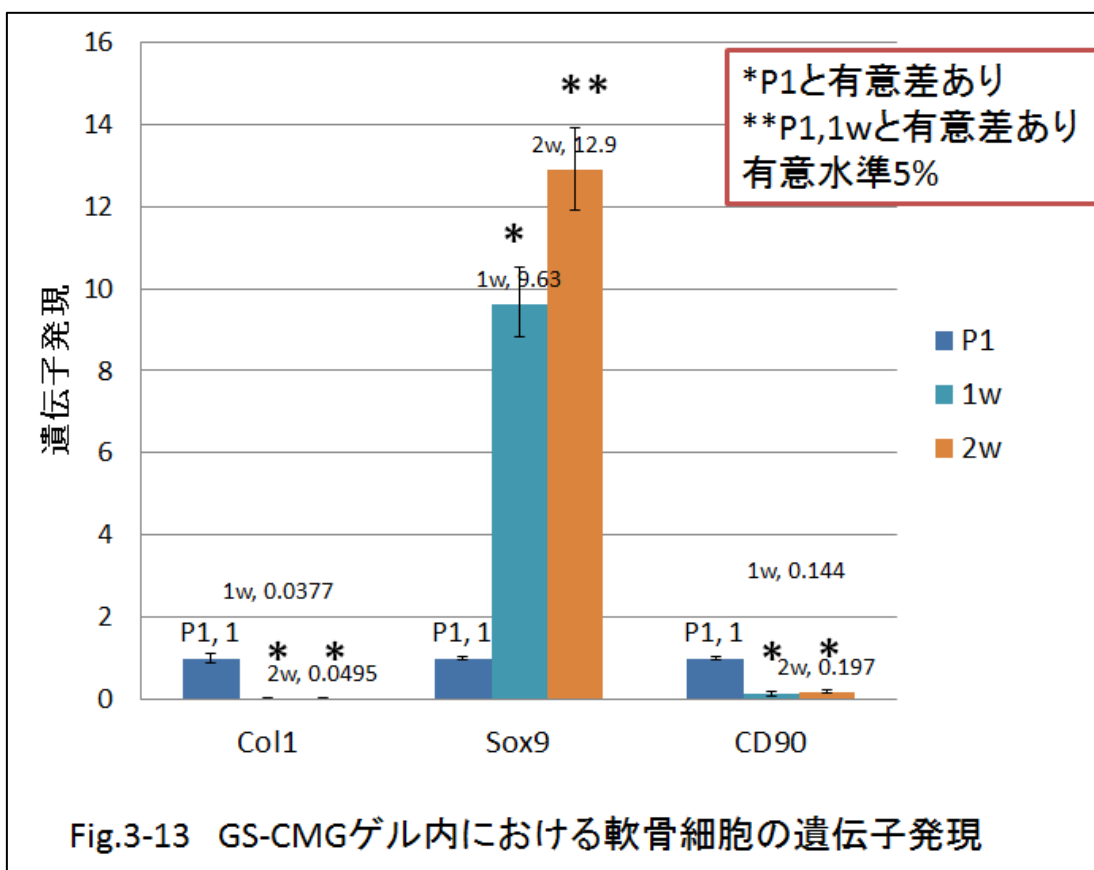
本項ではゲル内培養をした軟骨細胞の Viability の調査として MTT 試験を行った。その結果を Fig.3-12 に示す。



その結果、軟骨細胞の viability は 1week に比べ 2week においては 1.1 倍に増加したが、有意差は見られなかった。

3-6 GS 固定化 CMG ゲル内培養における軟骨細胞の遺伝子発現

GS 固定化 CMG ゲルが軟骨細胞へ与える影響をみる為、遺伝子発現の変化を real time-PCR にて調査した。その結果を Fig.3-13 に示した。



軟骨細胞脱分化マーカーである Collagen type1、CD90 については P1 に比べ 2week での発現がそれぞれ 0.05 倍、0.20 倍となっており、どちらの遺伝子も大きく発現が減少している。また、どちらも 1week、2week において大きな差は見られない。これらの二つの遺伝子に対して、軟骨マーカーである Sox9 については P1 に比べて 1week では約 10 倍、2week に関しては約 13 倍まで発現が増加している。

4 考察

4-1 CMGゲルの膨潤度

Fig.3-1 より脱水縮合剤である EDC の濃度によって膨潤度が変化している。EDC×2 と EDC×4 を比較すると×4 倍のものの方が膨潤率が低くなっている。この理由としては EDC の濃度が高い事でゲルの架橋度がより高くなり、膨潤が抑えられたのだと考えられる。また×4 と×6 を比較すると×4 の方が膨潤度が低くなっている。これは EDC が過剰含まれているためであると考えられる。Fig4-1 はゲルを作成した際の仕込み濃度をそれぞれ%で示したものである。このグラフより、EDC×2 では出来たゲルの 18.81%を EDC が占め、7.55%を CMG が占めている。対して EDC×6 のサンプルでは EDC が 41.06%占めており、CMG は 5.49%となっている。この事より、ゲルの架橋度を上げる目的で EDC を過剰に加える事は、CMG の見かけの濃度を下げる事となり、逆に膨潤度を上げることとなる。まとめると、EDC が過剰であるほど CMG の架橋度が上がる事で膨潤率は EDC×2>EDC×4>EDC×6 となるが、実際は EDC の濃度が上がるほど CMG の見かけの濃度が下がる事により膨潤度は EDC×6>EDC×4 となると考えられる。したがって、架橋度、膨潤度共にもっとも安定するサンプルは EDC×4 の条件である。

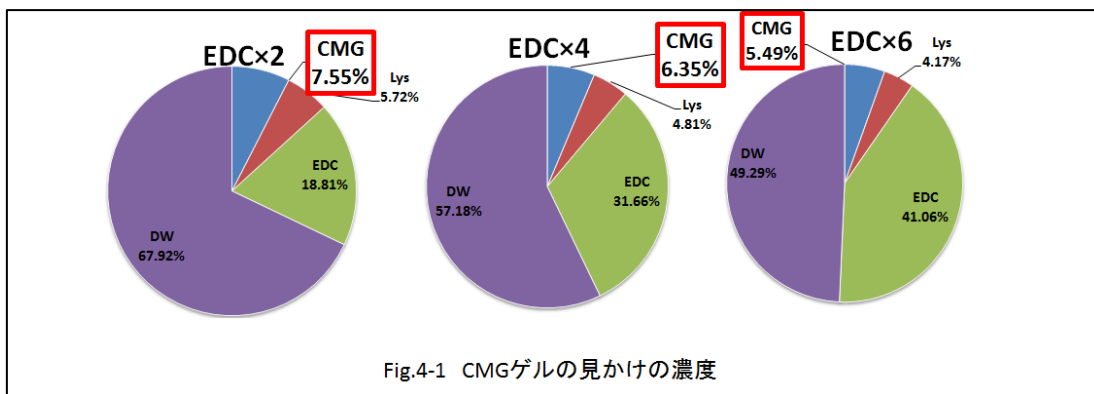


Fig. 3-4 より浸透圧を DMEM と同等に調製した PBS を使用して膨潤度を比較した結果、膨潤率に大きな差は見られなかった。このため、ゲルの膨潤収縮を左右する因子は浸透圧の違いによるものだと考えられる。

また、ゲルの網目を賽の目であると仮定すると、ゲルの体積が 5 倍になる事で網目の 1 辺が約 1.7 倍になる。この差を利用する事でゲルの中に薬物をトラップする事で DDS ゲルとして有用となると考えられる。

また、GS-CMG ゲルの膨潤度については Fig3-3 より、GS の濃度が高いゲル程膨潤度が低い事がわかった。これはカルボキシ基を持つ GS が多く含まれることで

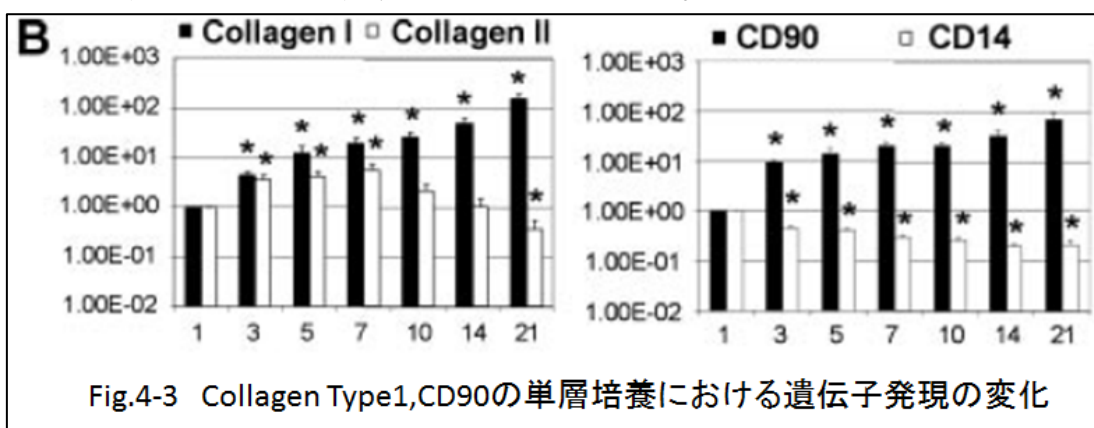
GS-CMG 間でも架橋が起き、膨潤度が低下していると考えられる。これにより、GS の仕込み濃度における膨潤度のコントロールも可能であると考えられる。

4-2 GS-CMG ゲルの膨潤収縮による薬物放出コントロール

Fig3-6, 3-7を見るとBSAは最初の0分(洗浄)の時点で放出が確認できるがIgGは外液を脱イオン水に変えるまで放出が見られない。この事より、BSAもIgGもゲルの膨潤時には網目から侵入可能であるがより分子量が小さいBSAの方が完全にトラップできず、一部が洗浄により放出されたのだと考えられる。それに対してIgGは分子量が160kDaとBSAに対して大きいいため、ゲルが収縮した際に完全にトラップされたと考えられる。この結果より分子量66kDa~160kDaの薬物はトラップ可能だという事が解った。

4-3 単層培養における軟骨細胞の遺伝子発現

Fig.3-9より、全ての遺伝子においてP1に比べてP2で遺伝子発現が大きく増加している。これは解凍したばかりであるP1の細胞が不安定だったためであると考えられる。Fig4-3に軟骨細胞の一つである髄核細胞単層培養におけるCollagen Type1, CD90の遺伝子発現の変化をしめした。^(2より改変)これより髄核(軟骨)細胞は単層培養において脱分化し、日数を重ねる毎にCollagen Type1,CD90は大きく増加して行くことがわかる。また、髄核細胞においてSox9の発現も培養日数により発現が下がっており、Fig4-4⁽³⁾より、プライマリーと比較して10倍以下になっているこのがわかる。⁽⁴⁾これらの事より、本実験で使用した軟骨細胞はP2以降もどの遺伝子においても傾向が見られないため、P2の時点で脱分化していると考えられる。



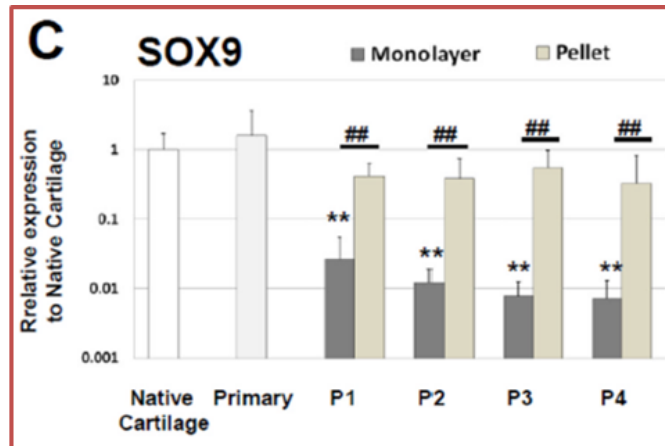
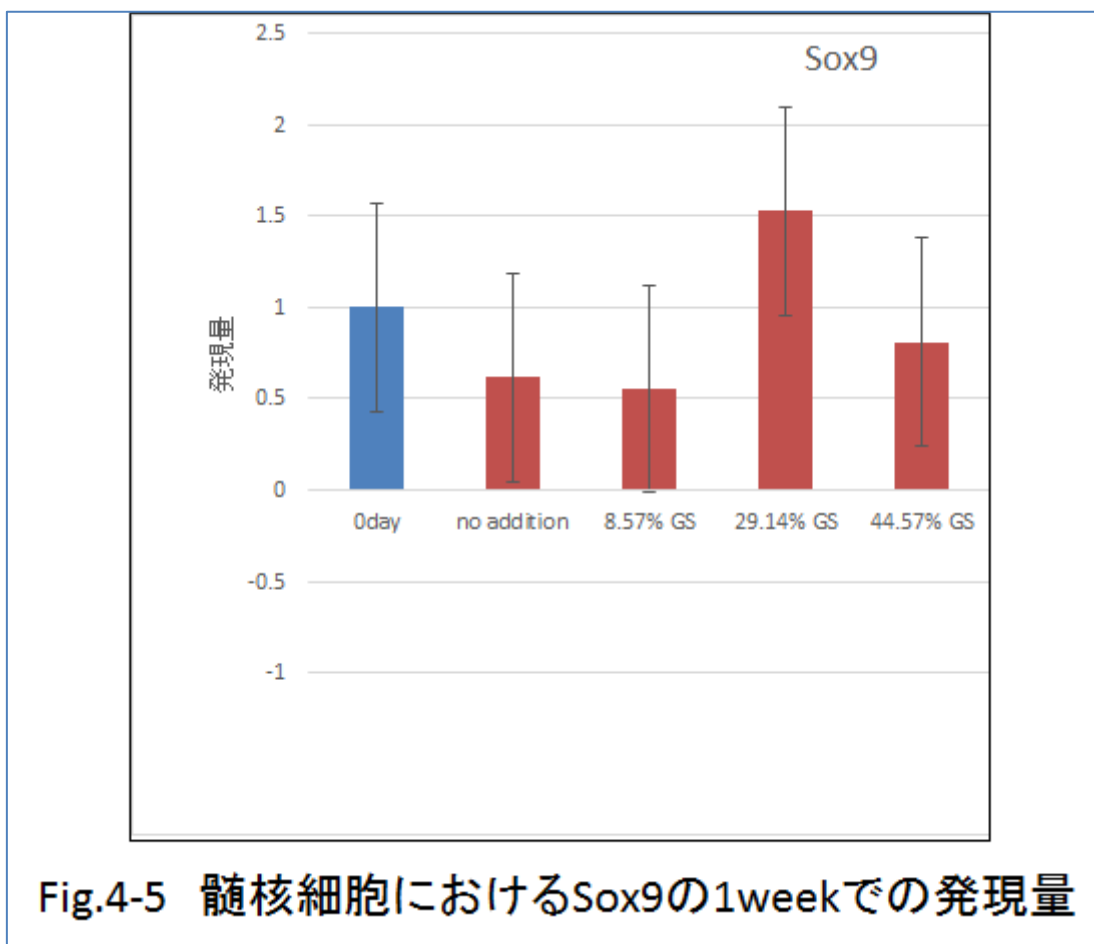


Fig4-4 SOX9の単層培養における遺伝子発現の変化

4-4 細分化 GS-CMG ゲル内培養の軟骨細胞への影響

Fig3-11、3-12 において細胞の生存率、Viability 共に大きな差は見られなかった。この事より、材料には細胞毒性が無いことが証明された。また、軟骨細胞は元々組織内では豊富な ECM に囲まれ、軟骨小腔と言われる隙間に単独で存在していることが知られている。そのため本来の軟骨細胞は増殖する必要が無いと考えられる。そのため、脱分化した軟骨細胞が再分化する事でその増殖能は低下する可能性がある。そのため GS-CMG ゲル内で培養した際に培養期間の違いにより細胞の Viability が変化しなかったと考えられる。

また、Fig.3-13 においては軟骨脱分化マーカーである Collagen Type2、CD90 が 10 倍以下に減少したのに対し、軟骨マーカーである Sox9 は 2week 下において約 13 倍にもなっている。Sox9 に関して過去の研究より、硫酸化率 29.1%の GS を軟骨細胞の一つである髄核細胞に添加したところ発現が 1.5 倍になっていることが報告されている。(Fig4-5)⁽⁴⁾より改変



この事より、本実験で Sox9 が増加したのは、GS による影響とゲルによる 3 次元培養両方に影響されていると考えられる。この事より GS-CMG ゲルでの培養は軟骨細胞の再分化に効果的であることがわかる。また、サイトカインと親和性がある GS に軟骨誘導因子を結合させ、薬物放出能を持つ材料とする事で更なる軟骨誘導が可能となる。

4-5 細分化 GS-CMG ゲルの軟骨再生について

本実験では GS-CMG ゲルが軟骨細分化に有用であるという事、ゲルの膨潤収縮を利用して薬物トラップが可能であることが示された。しかし、軟骨形成に有効であると言われている BMP や TGF- β などの分子量は 14kDa~17kDa と今回使用した BSA よりも小さい分子となっている。そのため GS-CMG ゲルではトラップ出来ない可能性がある。しかし、単体で軟骨細胞へ影響がある GS (約 85000) で修飾する事でサイトカインを 2 量体や 3 量体にする事で分子量を大きくし、ゲル内にトラップすることが可能である。また、今回は調査していないが軟骨誘導に効果があると言われているテネインは分子量が 1200kDa であるため、ゲル内にトラップ出来る可能性が考えられる。

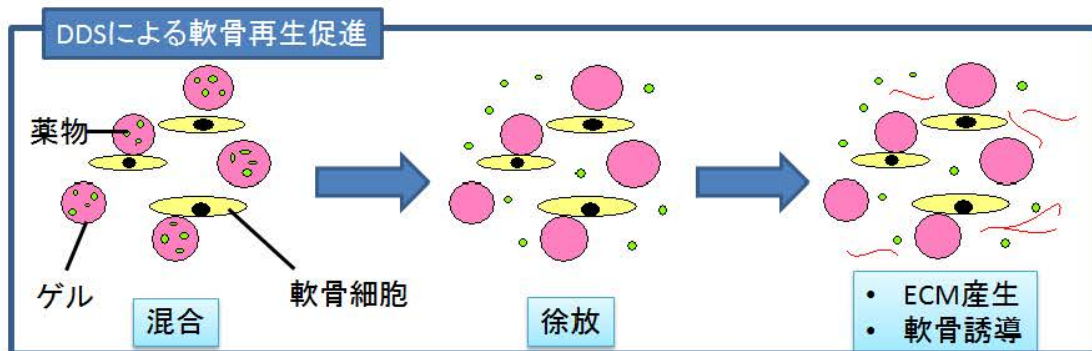


Fig.4-6 DDSによる軟骨再生モデル

5 結論・展望

5-1 結論

- GS 固定化 CMG ゲルの作成に成功した。
- GS 固定化 CMG ゲルの膨潤収縮により、66~160kDa の薬物がトラップ可能であるとわかった。
- GS 固定化 CMG ゲルは単体で軟骨細胞に対して軟骨誘導する事がわかった。

5-2 展望

- GS 固定化 CMG ゲルの保持可能な薬物の分子量の明確化
- 薬物トラップ型 GS 固定化 CMG ゲルが細胞に与える影響の調査

6 参考文献

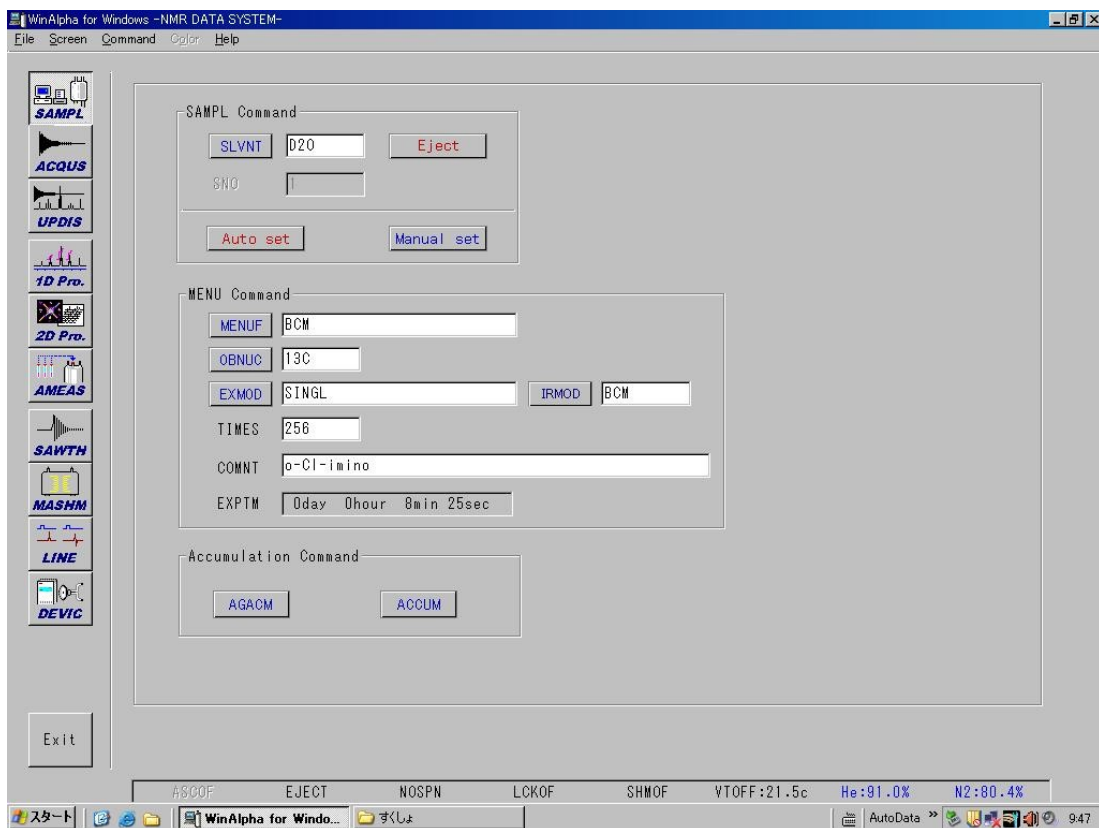
1. 野口 寛之：硫酸化ネイティブジェラン含有三次元足場培養に関する基礎研究 平成 23 年度 修士論文 2012
2. *Bin HE, et al*: Normal and Degenerated Rabbit Nucleus Cells in in vitro Cultures: A biological Comparison. Huazhong University of Science and Technology and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013
3. YOhei Ono Chondrogenic capacity and alterations in hyaluronan synthesis of cultured human osteoarthritic chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 June 14; 435(4): 733–739.
4. Munetaka Iwata: Variations on Gene and Protein Expression in canine Chondrocytic Nucleus Pulposus Cells following Long-Term Three-Dimensional Culture. *PLOS ONE* May 2013 Volume 8 Issue 5 e63120
5. 奥村 和也：髄核細胞に対する硫酸化ネイティブ型ジェランの影響 平成 25 年度 卒業論文 2013

7 謝辞

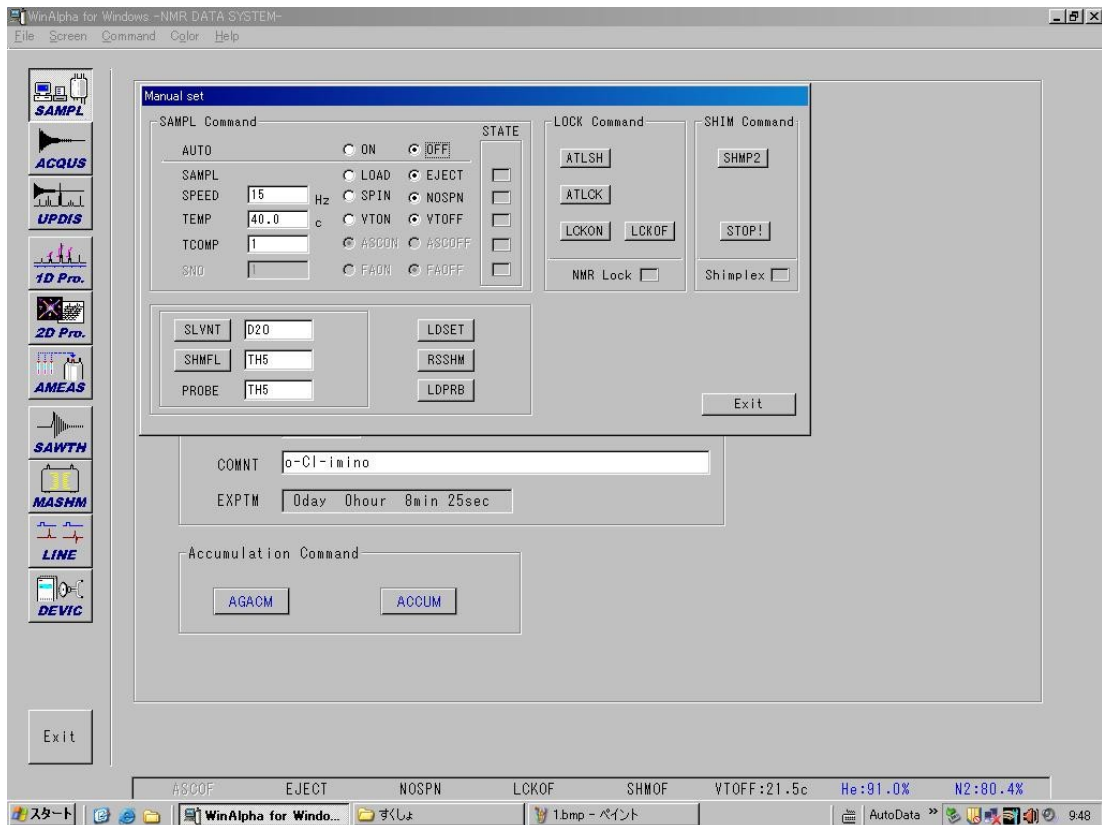
本研究において、丁寧なご指導、ご配慮をしていただいた堀内孝教授、宮本啓一准教授並びに諸先輩方には深く感謝しております。また、私たちの研究室生活を支えてくださった村上さんにも深く感謝申し上げます。堀内先生には直属ではないに関わらず、様々な場面でお声をかけていただき、心置きなく研究に向かうことができました。また、宮本先生には実験についてお話しする上で私が理解が追いつかない時でも丁寧に何度もご指導していただきまして、無事に研究を進めることができました。今後もご指導、ご鞭撻のほどをよろしくお願いします。また、直属の後輩である奥村君、松浦君には実験が行き詰った時の相談や、実験の補助をしていただき大変助かりました。また諸先輩や、同期の仲間たちのおかげで快適でとても楽しい研究室生活を送ることができ、深く感謝しております。私にはまだまだ至らぬ点が多くあるとは思いますが、これからも向上に努めていきたいと思っておりますので今後もよろしくお願いします。本当にありがとうございました。

8 付録

8-1 NMR の設定方法(マニュアル設定)



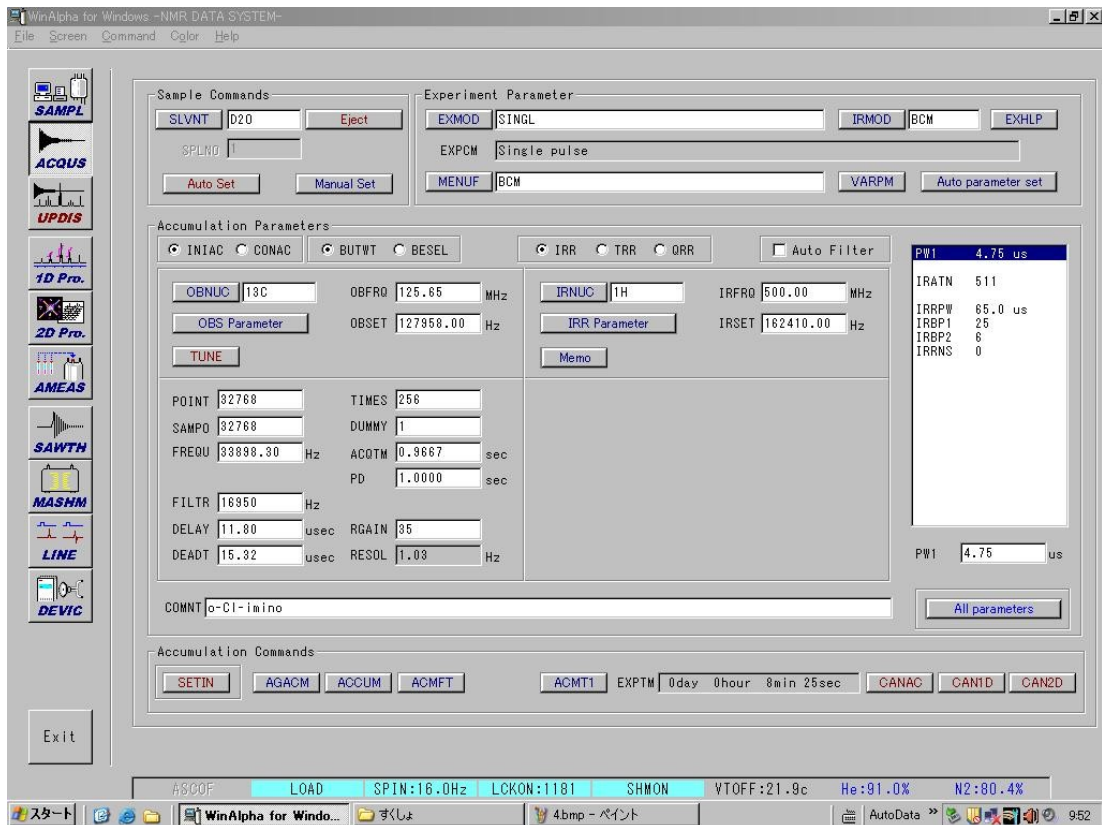
- ① サンプルを所定の位置にセットした後、[SLVNT]をクリックし、[D₂O]を選択する。
- ② [Manual set]をクリックする。



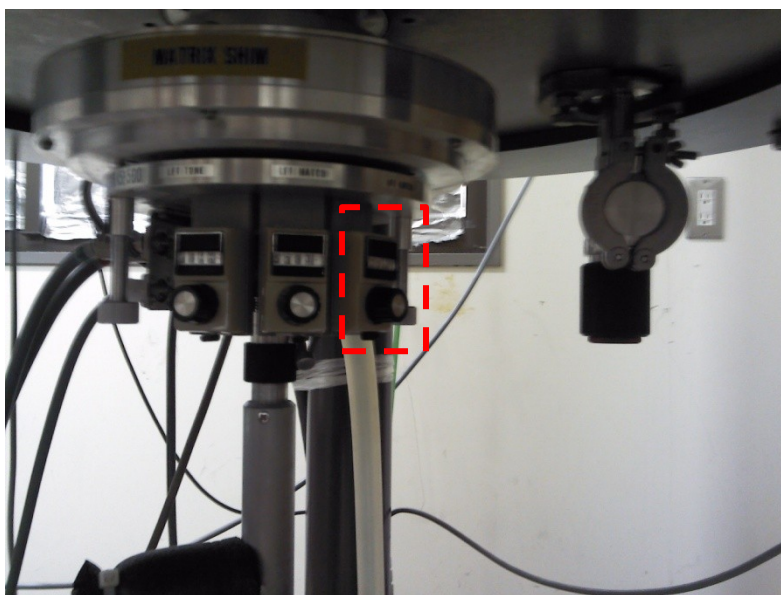
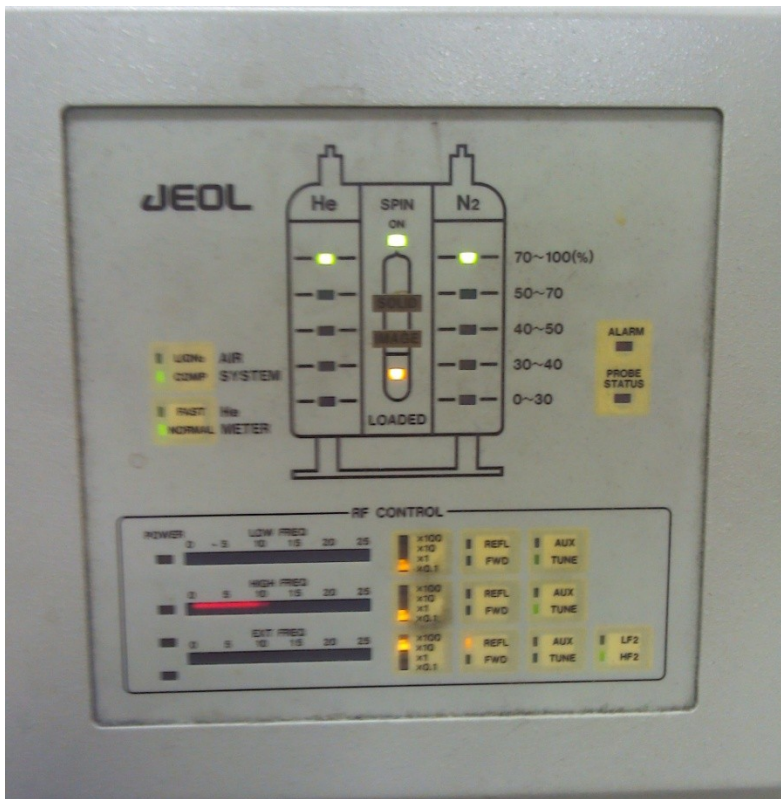
- ① Manual set のウィンドウの中の[LOAD]でサンプルを挿入する。
- ② [SPIN]をクリックする。
- ③ LOCK Command の[ATLCK]をクリックする。
- ④ SHIM Command の[SHMP2]をクリックし、出てきた Shimp2 のウィンドウの[Exit]をクリックする。
- ⑤ Manual set のウィンドウの右下の[Exit]をクリックする。



- ① 動作確認のため[LINET]をクリックする。
- ② 画面下にある[LIPHS]をクリックし、正常に波形が出るかを確認する。
- ③ 確認後、[STOP!]をクリックする。

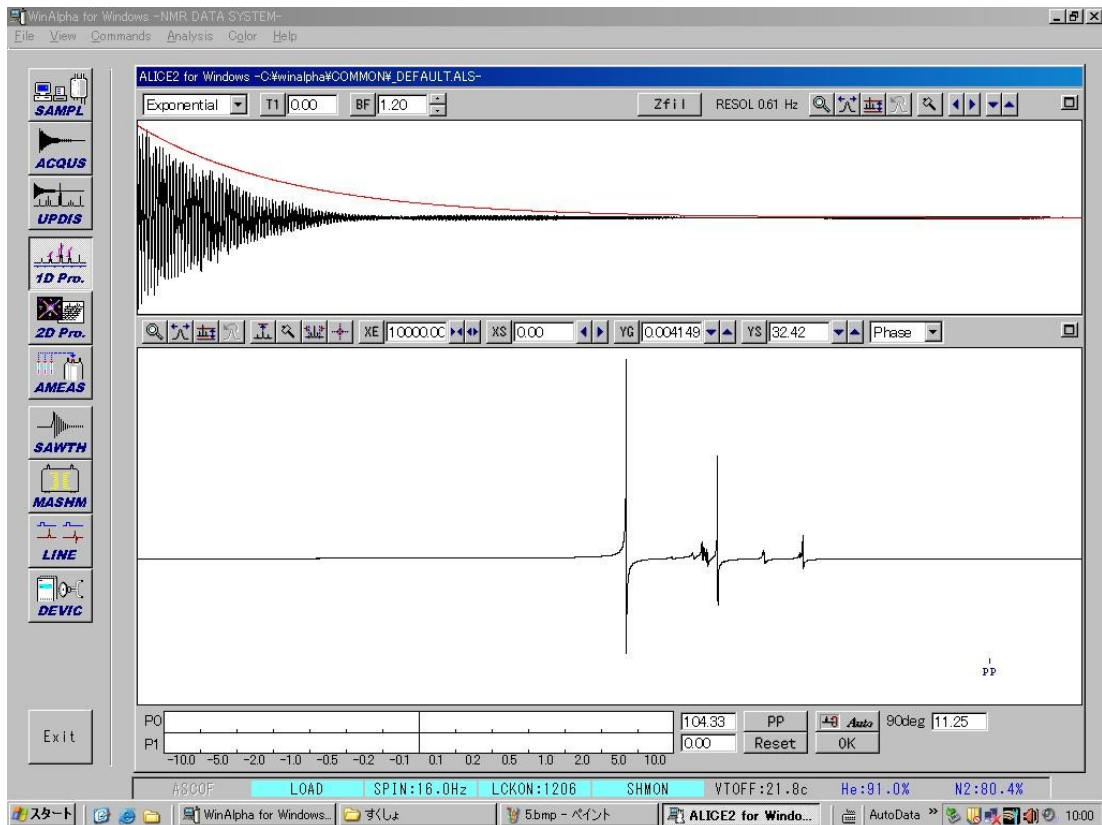


- ① 次に ^1H NMR の設定をする。左のタブで[ACQUS]を選択する。
- ② そこで以下のように設定する
 - (ア) [EXMOD]→Single
 - (イ) [MENUF]→NON
 - (ウ) [TIME]→100
 - (エ) [DUMMY]→1
- ③ 上記の設定が終了後、画面中央右側にある[TUNE]をクリックし、チューニングを行う。
- ④ チューニングが完了したら、[COMNT]にサンプル名、測定日を記入する。
- ⑤ 画面下側にある[AGACM]をクリックし、測定を開始する。

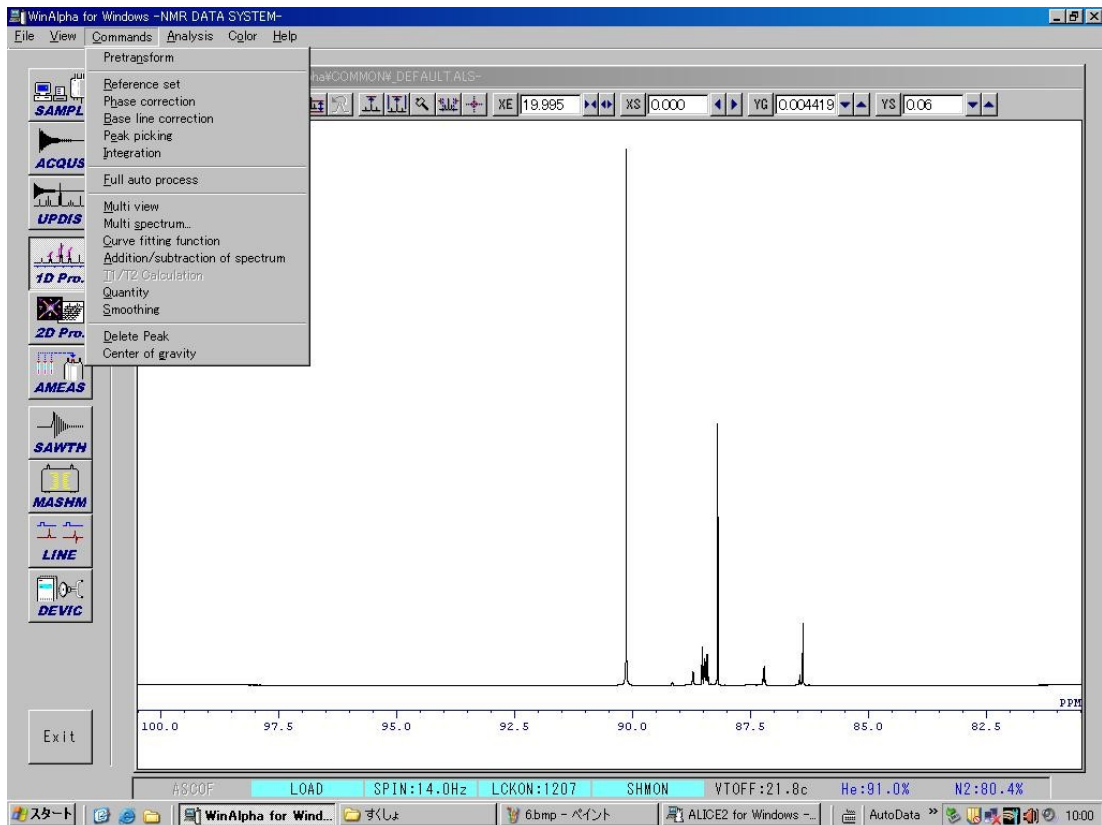


〈チューニング方法〉

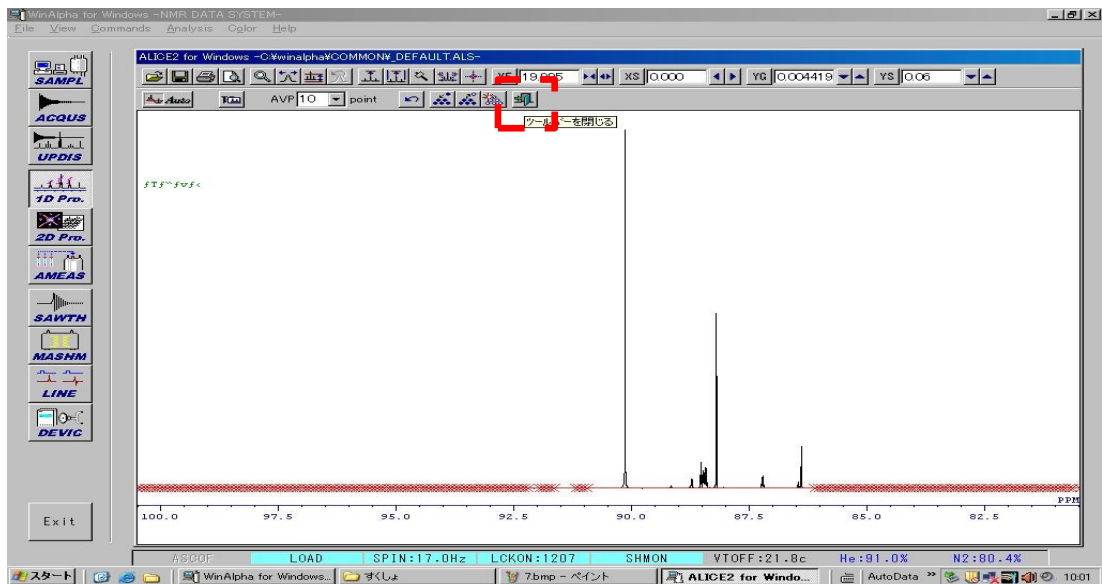
- ① 真ん中のレーンの HIGH FREQ に赤色のバーが表示されている状態で倍率を x10 に設定する。
- ② 赤のバーが 0~10 の間で安定するように下の写真のつまみを回して調節する。



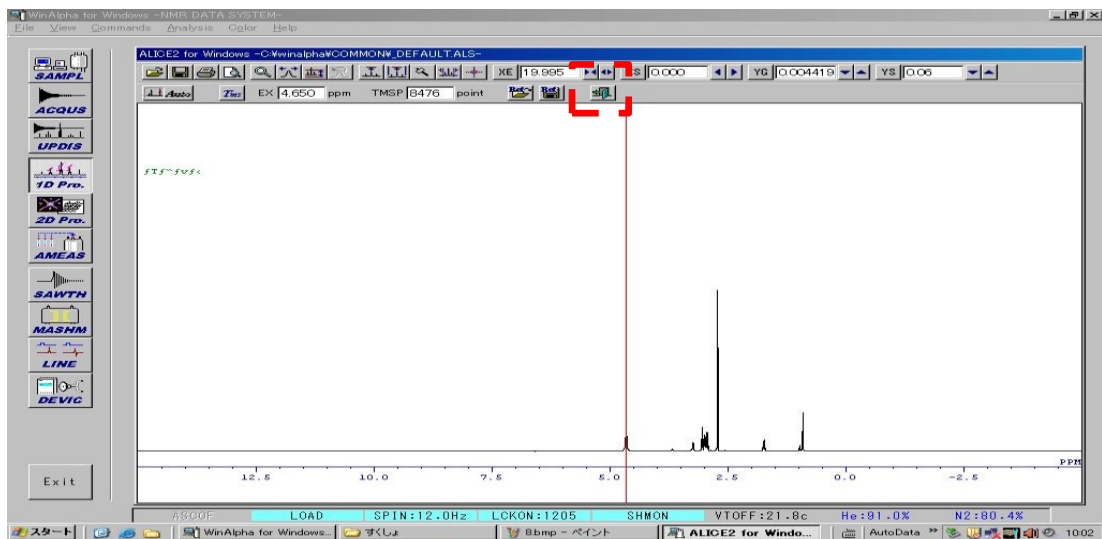
- ① 測定結果を解析するために、左側のタブで 1D Pro を選択する。
- ② [YG]の上矢印をでピークを見やすい大きさまで拡大する。
- ③ 画面下の[P.P]をクリックしてから[AUTO]を押し、P.P の位置を設定する。
- ④ ピークが平坦になるように[P0]、[P1]で調節する。
- ⑤ [OK]をクリックする。



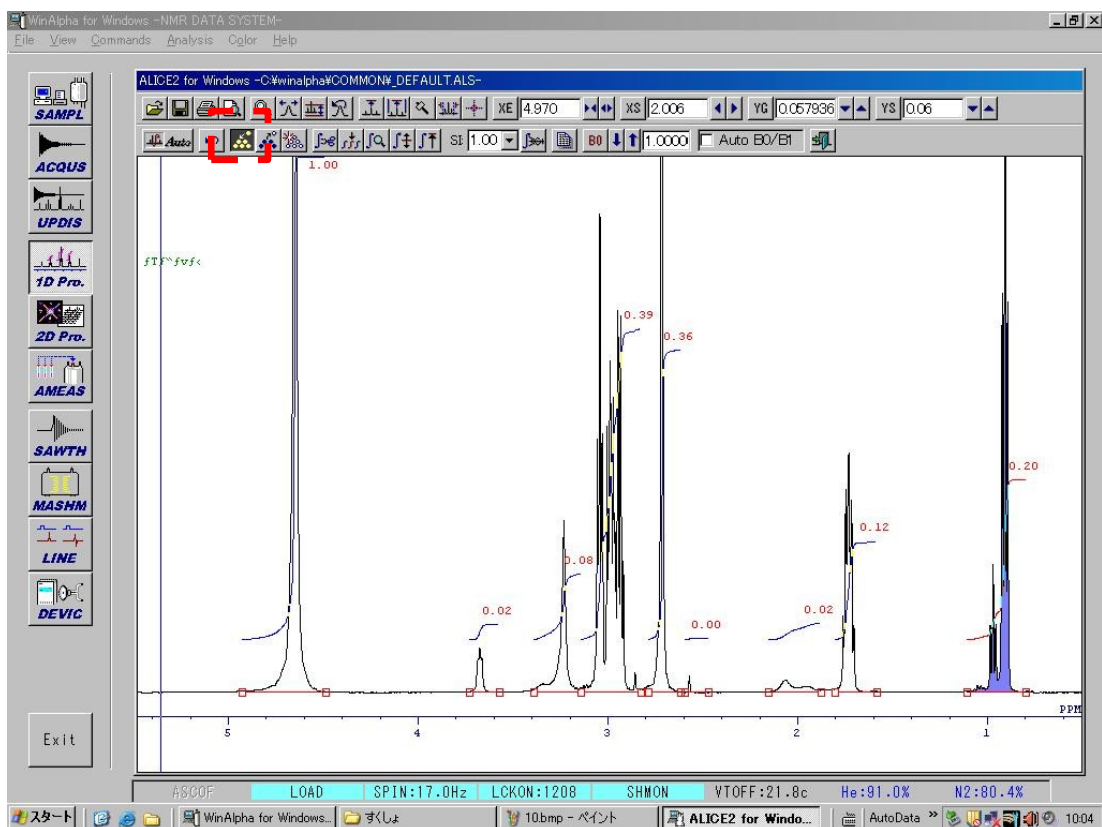
① 画面上部の[Commands]→[Base line correction]を選択する。



② 現れたツールバーの[AUTO]を押し、ベースライン上に赤の×が表示されることを確認した後、赤の点線で示したボタンをクリックする。



- ③ 同様に[Commands]→[Reference set] を選択しツールバーの[AUTO]をクリックすると画面の中心に赤の線が表示される。
- ④ その後、同様に赤の点線で示したボタンをクリックする。



- ① [Commands]→[Integration]を選択し、[YG]で見やすい大きさまで拡大する。
- ② 赤の点線で示した[積分曲線の追加]を選択し、目的の区間を積分する。

8-2 PBS(300mOsm)の調整

【試薬】

- リン酸 2 水素カリウム
- 塩化カリウム
- リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物
- 塩化ナトリウム

【手順】

- ① 以下の表に従って各試薬を量りとり、1L 用のメスフラスコに入れた。
- ② 脱イオン水で 1L までメスアップし、試薬を溶解させて通常の 10 倍の PBS を調製。
- ③ 調整した PBS を脱イオン水を加え、浸透圧が 300mOsm になるまで希釈した。

	×10PBS 用
● リン酸 2 水素カリウム	2g
● 塩化カリウム	2g
● リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物	29g
● 塩化ナトリウム	80g

8-3 Pierce660nm 法

【試薬】

- Pierce 660nm Protein Assay Reagent

【使用器具】

- SmartStep Plus スペクトロフォトメーター

【手順】

- ① 0.5μl チューブにタンパク溶液を 5μl 入れた。
- ② そこに 75μl の Pierce 660nm Protein Assay Reagent を加え、5min 静置。
- ③ 静置後、チューブから 75μl 溶液を取り出し、660nm にて吸光度測定。

8-4 軟骨細胞の培養培地の調製

【試薬】

- High-glucose DMEM (Sigma)
- ペニシリンストレプトマイシン (Sigma)
- L-グルタミン (Sigma)
- ITS + premix (Becton Dickison)
- L(+)-アスコルビン酸 (Wako)

【使用器具・機器】

- 恒温槽(YAMATO)
- シリンジ
- 0.22 μ m 滅菌フィルター

【手順】

- ① 凍結保存してあるペニシリンストレプトマイシン(PS) 5ml を恒温槽にて解凍した。
 - ② L-グルタミン 5ml に PS を添加し、フィルター滅菌を行い、DMEM 500ml に添加した。
 - ③ ITS + premix 5ml をフィルター滅菌し、DMEM に添加した。
 - ④ アスコルビン酸を 18.75mg 秤量し、少量の DMEM に溶解後、フィルター滅菌を行い DMEM に添加した。
 - ⑤ 調製した DMEM を冷蔵庫で保存
- ※本実験ではすべてここで調製した DMEM を使用した。

8-3 軟骨細胞の解凍

【試薬】

- DMEM
- FBS

【使用器具・機器】

- ピペットマン
- ピペットマンチップ
- ガラスピペット
- 遠心機(KUBOTA)
- インキュベーター
- 恒温槽(YAMATO)

【手順】

- ① 細胞培養用フラスコに 10%FBS/DMEM を 5ml 加えて、37°C/5%CO₂ インキュベーター内でプレインキュベートした。
 - ② -80°C で凍結保存しておいたクライオチューブのキャップを無菌下で 1/4 程度開けて、内部の減圧をし、再度閉めた。
- ※開栓前にチューブ表面をエタノール滅菌した。

- ③ チューブの底から 3/4 を限度を 37°C 恒温槽中に浸し、緩やかに揺らしながら解凍した。
※氷片がわずかに残った状態で取り出し、過度の加温は避けた。
- ④ チューブ表面をエタノール滅菌後、無菌下で細胞懸濁液を 15ml 遠沈管に入れ、さらに培地を 10ml 加えた。
- ⑤ 750rpm、で 5 分間遠心分離後、上澄み液を廃棄した。
- ⑥ 培地 1ml を加えて十分なピペッティング後、プレインキュベートしておいた細胞培養用フラスコに細胞懸濁液を加えた。

8-4 培地交換

【試薬】

- DMEM
- FBS

【使用器具】

- ピペットマン
- ピペットマンチップ
- ガラスピペット
- 恒温槽(YAMATO)

【手順】

- ① FBS 400 μ l に DMEM 3.6ml を加え、10%FBS/DMEM を調製した。
- ② 調製した 10%FBS/DMEM を 37°C に設定した恒温槽に浸けて、十分に温める。
- ③ インキュベーターより取り出した 25cm² フラスコ内の培地を吸引し、廃棄した。
- ④ ② で温めておいた 10%FBS/DMEM 4ml を直接細胞培養面に当てないように加えた。
- ⑤

8-5 細胞の継代

【試薬】

- DMEM
- TRYPSIN-EDTA SOLUTION
- FBS
- PBS

【使用器具】

- 恒温槽 (YAMATO)
- ガラスピペット
- ピペットマン
- ピペットマンチップ
- インキュベーター (IKEMOTO)
- 25cm² フラスコ

【手順】

- ① 目的の培養フラスコに培地を入れ、37℃、5%CO₂ インキュベーター内にプレインキュベートした。
- ② 細胞の洗浄
 - (ア) 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌した。
 - (イ) 滅菌済み 10ml ピペットで培養フラスコ内の培養液を吸引し廃棄した。
 - (ウ) PBS 溶液 4ml/25cm² フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄した。
 - (エ) 滅菌済みパストツールで培養フラスコ内の洗浄液(PBS)を吸引し廃棄した。
- ③ 培養細胞の剥離
 - (ア) 融解した Trypsin-EDTA solution 400μl に PBS 3.6ml を加え、トリプシン溶液を調製した。
 - (イ) トリプシン溶液 4ml を 25cm² フラスコに加え、約 10 分間 37℃、5%CO₂ 条件下でインキュベートし、細胞を剥離させた。
 - (ウ) 顕微鏡で細胞の剥離を確認後、FBS 1ml を 25cm² フラスコに加えた。
 - (エ) 滅菌済み 10ml ピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml 遠沈管に入れた。
 - (オ) 750rpm で 5 分間遠心分離した。
 - (カ) 遠心分離した上澄み液を 10ml ピペットで吸引し、廃棄した。
 - (キ) 細胞に培養培地を 1ml 加えて細胞懸濁液を作成した。
 - (ク) 数回ピペッティングを行った後、細胞懸濁液を取り、あらかじめ用意しておいた培養フラスコに定量播種し、37℃、5%CO₂ 条件下でインキュベート培養した。

8-6 Real Time PCR

1. AGPC 法 (total RNA の抽出)

【使用機器・器具・試薬】

- ・ 日立微量高速遠心機 (日立/CR15B 型)

- DNA mini(HETO LAB EQUIPMENT/ID 872146)
- MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- Vortex
- ウォーターバス
- 1.5ml チューブ(アシスト/72.690S)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- タイマー
- Crash ice 用発泡スチロール
- PARAFILM®(Pechiney Plastic Packaging, Inc./PM-996)
- 注射針(TERUMO®/NN-2432R)
- RNA-iso plus (takara bio, Inc./ 9108)
- chloroform-isoamylalcohol 24:1(SIGMA/C-0549)
- isopropanol(SIGMA/I-9516)
- PBS(SIGMA/D-8537)
- 75%EtOH/DEPC 処理水溶液(無水 EtOH を DEPC 処理水で希釈)
 - 無水 EtOH(Wako/321-00025)
- DEPC 処理水
 - Diethylpyrocarbonate(CALBIOCHEM®/298711)
- Crash ice

【AGPC 法(前半)】

- ① 胞に刺激を与え、Φ35 シャーレから培地を吸引し、PBS を 1ml/well 入れて細胞を洗浄した。洗浄後 PBS を吸引し、素早く RNA-iso plus を 1ml/well 入れた。
- ② 2 連にしたピペットチップの先端で well 内の細胞を剥がすように掻いた後、10 回程度ピペッティングを行い、その懸濁液を 1.5ml チューブに移し入れた。
- ③ チューブに入った各サンプルに chloroform-isoamylalcohol 24:1 を 200 μ l ずつ加え、しっかりと蓋を閉めた後 15 回程度上下に振り混ぜた。
- ④ 温(R.T)にて 15 分間静置。
- ⑤ 12000G/4°C/15 分にて遠心分離を行った。
- ⑥ 3 層に分離するので、最上層の溶液(透明な水層、ここに RNA が含まれる)を液面近傍よりそれぞれ 350 μ l ずつ採取し、別に用意した 1.5ml チューブに移し入れた。
- ⑦ 移し入れた各サンプルに isopropanol を 500 μ l ずつ加え、Vortex にて攪拌した。

【AGPC 法(後半)】

※ 全て氷上操作

- ① ①(サンプルを解凍し、)12000G/4℃/10 分にて遠心分離を行った。
- ② チューブを傾け、ある程度の上澄みを慎重に取り除いた。
- ③ 各サンプルに 75%EtOH/DEPC 処理水溶液を 500 μ l ずつ加え Vortex にて攪拌した後、10000G/4℃/5 分にて遠心分離を行った。
- ④ チューブを傾け、より慎重に上澄みをぎりぎりまで取り除いた。
- ⑤ チューブの口に 2.5cm 四方程度の PARAFILM® を張り、注射針にて 10 個程度の穴を開けた。
- ⑥ DNA mini にサンプルをセットし、減圧乾燥を行った。
- ⑦ 各サンプルに DEPC 処理水を 20 μ l ずつ加え、Vortex による攪拌と MINI CENTRIFUGE による軽い遠心を 2 回繰り返した。
- ⑧ ウォーターバスにて 55℃/5 分加温後、冷蔵庫または氷上にて 10 分程度冷却した。
- ⑨ 得られたサンプルは RNA の定量後、RT-PCR 法に使用した。

2.RNA の定量プロトコール

【使用機器・器具・試薬】

- Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer(BIO RAD/170-2501)
- Cuvette(BIO RAD/170-2505)
- MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- Vortex
- 0.5ml チューブ(アシスト/72.699S)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- キムワイプ® S-200(株式会社クレシア/62011)
- 廃液入れ
- 洗瓶(脱イオン水)
- 0.1N HCl aq
- DEPC 処理水

<RNA の定量>

- ① AGPC 法により得られた各サンプル 10 μ l より 1 μ l ずつ採取し、サンプル数分用意した 0.5ml チューブの底部にそれぞれ入れた。
- ② DEPC 処理水を 59 μ l ずつ①のチューブに加え、Vortex にて攪拌後 MINI CENTRIFUGE にて軽く遠心を行った。
- ③ 前日より HCl aq(0.1N)に浸け置いた Cuvette を、脱イオン水にてよく濯ぎ水気を切った。

- ④ マイクロピペッターを用いて Cuvette に DEPC 処理水を 60 μ l 入れ、Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer にセットし、零点補正(Read Blank)を行った。
- ⑤ マイクロピペッターを用いて DEPC 処理水を抜き取り、1 つ目の測定サンプルを 60 μ l 入れ Smart Spec™ 3000 にセットし、3 回吸光度の測定(Read Sample)を行った。
- ⑥ 測定し終えたサンプルを、マイクロピペットを用いて抜き取り元のチューブに戻した(測定のやり直しができるようにするため)。
- ⑦ Cuvette を脱イオン水にてよく濯ぎ水気を切った。
- ⑧ ⑤⑥～⑦をサンプル数分繰り返した。
- ⑨ 得られたデータを出力し、データの処理を行う。

【データの処理】

得られたデータより、次の 2 つの計算を行う。

i)各サンプルの濃度

ii)最適濃度に合わせるために必要なサンプルと DEPC 処理水の量

それぞれに必要な計算式を以下に示す。

- ・サンプル濃度(μ g/ μ l)=(OD260)×(換算係数)×(希釈倍率)
- ・必要サンプル量(μ l)=RNA の最適濃度(μ g)/希釈対象のサンプル濃度(μ g/ μ l)
- ・必要 DEPC 処理水量(μ l)=8 μ l-必要サンプル量(μ l)

※換算係数は RNA 測定の場合 0.04(μ g/ μ l)。

※本実験における希釈倍率は 60 倍。

※本実験における RNA の最適濃度は RT product 10 μ l あたり 500ng 以下(500ng を推奨)。

3.Real-Time PCR プロトコール

【使用機器・器具・試薬】

- ・PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM(ASTEC/PC-708)
- ・MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- ・Vortex
- ・Reaction Tube with Cap(Micro Amp/N801-0540)
- ・チューブ立て
- ・マイクロピペッター各種
- ・チップ各種
- ・Crash ice 用発泡スチロール
- ・5xPrimeScript T Master Mix(TaKaRa/RR036A) →-20℃保存
- ・Rnase free ddH₂O(TaKaRa/RR036A)→-20℃保存

•Crash ice

【RT product 作成】

※氷上操作

- ① 得られたサンプルを Reaction Tube with Cap 内で希釈し 8 μ l とした。
(ア) 希釈溶液には Rnase free ddH₂O を用いた。
- ② 希釈した各サンプルに 5xPrimeScript RT Master Mix(Perfect Real Time)を 2 μ l ずつ加え、vortex/遠心を行った。

5xPrimeScript RT Master Mix(Perfect Real Time)	2 μ l
Total RNA	8 μ l
Rnase free	
合計	10 μ l

- ③ サーマルサイクラーにサンプルをセットし以下のプログラムを実行した。(

37°C	15 分
85°C	5 秒
4°C	∞

- ④ 成した RT product は-80°Cで保存した。

【real-time PCR の定量方法】

【使用機器・器具・試薬】

- Step One Plus Real Time PCR system(Applied Biosystems)
- プレート遠心機
- MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- Vortex
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- Crash ice 用発泡スチロール
- Crash ice
- 滅菌水
- SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa/RR420S)→4°C遮光保存
- ROX Reference Dye(TaKaRa/RR420S) →4°C遮光保存
- PCR Forward Primer(Life technologies)
- PCR Reverse Primer(Life technologies)
- EASY Dilution dH₂O((TaKaRa/RR036S)) →-20°C保存

- MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate(Applied Biosystems/ 4346907)
- MicroAmp Optical Adhesive Film(Applied Biosystems/ 4360954)
- ヘラ

【反応プレートの準備】

- ① cDNA を最適濃度に希釈し 7 μ l 得た(滅菌チューブ)。
 - ※氷上操作(②以下は氷上操作しない)
 - ※希釈溶液には EASY Dilution dH₂O を用いる。
 - ※サンプルの場合、最適濃度は 0.02 μ g/ μ l 以下。
 - ※スタンダードの場合、最適濃度は 0.02 μ g/ μ l。(スタンダードの作成方法は【スタンダードの作成】参照)
 - ※全サンプル間で cDNA 濃度を合わせること。
- ② 下記の表に従い、Ready reaction MIX の容量を遺伝子毎に計算した

	1well 当たりの反応液量
SYBR Premix Ex Taq	10 μ l
PCR Forward Primer(※10 μ M)	0.4 μ l
PCR Reverse Primer(※10 μ M)	0.4 μ l
ROX Reference Dye	0.4 μ l
滅菌水	6.8 μ l
合計	18 μ l

- ③ 遺伝子毎に Ready reaction MIX を作成する。ここでは滅菌水と Primer を滅菌チューブに加えた。
- ④ 暗室で③で作成した Ready reaction MIX に ROX Reference Dye と SYBR Ex Taq を加えた。
- ⑤ ①の各 cDNA に Ready reaction MIX を 63 μ l ずつ加えた。
- ⑥ ⑤で作成した反応液を MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate に 1well 当たり 20 μ l ずつ加えた。
- ⑦ プレートに MicroAmp Optical Adhesive Film を張った。
- ⑧ 遮光した状態で生命科学支援センターへプレートを持っていき、PCR・解析を行った。