

平成 27 年度 修士論文

椎間板修復材料としての硫酸化ネイティブ型ジェラン固定化
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

414M317 奥村 和也

目次

1	緒言	1
1-1	椎間板	1
1-1-1	椎間板 (IVD) の構造	
1-1-2	髄核 (NP) の構造	
1-1-3	グリコサミノグリカン	
1-1-4	椎間板ヘルニア	
1-1-5	現行の治療法および問題点	
1-2	再生医療	6
1-2-1	椎間板ヘルニア治療としての再生医療	
1-2-2	椎間板修復材料としてのインジェクタブルゲル	
1-3	ジェラン	7
1-3-1	ネイティブ型ジェラン (NG)	
1-3-2	脱アシル型ジェラン (DG)	
1-3-3	硫酸化ネイティブ型ジェラン (GS)	
1-3-4	カルボキシメチルジェラン (CMG)	
1-4	目的	9
1-4-1	目的	
1-4-2	実験項目	
2	実験方法	10
2-1	インジェクタブルゲル材料の作製	10
2-1-1	CMG の作製	
2-1-2	$^1\text{H-NMR}$ による CMG の置換度測定	
2-1-3	NG のフリー化	
2-1-4	GS の作製	
2-1-5	酸素フラスコ燃焼法による GS の硫酸化率測定	
2-2	インジェクタブルゲルの作製	19
2-2-1	CMG ゲルの作製	
2-2-2	GS-CMG ゲルの作製	
2-2-3	ゲルビーズの作製	

2-3	髄核細胞の単層培養における GS の影響	22
2-3-1	細胞培養	
2-3-2	細胞の継代培養	
2-3-3	髄核細胞の倍化日数	
2-3-4	髄核細胞の単層培養における形態変化	
2-3-5	髄核細胞の単層培養における遺伝子発現	
2-3-6	髄核細胞の単層培養における sGAG 産生	
2-4	GS-CMG ゲルビーズ内培養における NP への影響	28
2-4-1	ゲルビーズ内培養のための培養チャンバーの作製	
2-4-2	GS-CMG ゲルビーズ内での細胞培養	
2-4-3	GS-CMG ゲルビーズ内で培養した細胞の生存率	
2-4-4	GS-CMG ゲルビーズ内で培養した細胞の遺伝子発現	
2-4-5	GS-CMG ゲルビーズ内で培養した細胞の sGAG 産生	
3	実験結果	30
3-1	CMG の作製	30
3-2	GS の作製	32
3-3	髄核細胞の増殖	32
3-4	髄核細胞の単層培養における形態変化	34
3-5	髄核細胞の単層培養における遺伝子発現	35
3-6	髄核細胞の単層培養における sGAG 産生	37
3-7	GS-CMG ゲルビーズ内で培養した髄核細胞の遺伝子発現	38
3-8	GS-CMG ゲルビーズ内で培養した髄核細胞の sGAG 産生	40
4	考察	41
4-1	髄核細胞の増殖	41
4-2	単層培養における GS の髄核細胞に対する作用	43
4-2-1	bFGF による応答	
4-2-2	BMP-7 および noggin による応答	
4-2-3	Wnt による応答	
4-3	GS-CMG ゲルビーズ内培養	52
4-3-1	三次元足場の髄核細胞に対する作用	
4-3-2	ゲルビーズ内での GS の作用	
4-4	椎間板修復材料	56

5	結論	57
6	参考文献	58
7	謝辞	60

1. 緒言

1-1 椎間板

現在、椎間板の疾病が原因となる腰痛や下肢の痺れなどの症状に苦しむ人々が多数存在している。その一方で椎間板の疾病は現行の治療法では完全に修復させることは困難とされている。

1-1-1 椎間板(IVD)の構造

椎間板は腰椎の椎骨の間に存在する支持組織で、椎骨にかかる衝撃を軽減する役割を果たしている。また、関節軟骨を形成することで椎骨の細やかな動きを可能にし、靭帯とともに脊椎を保持する役割をもっている。

椎間板の模式図を Figure 1-1 に示す。

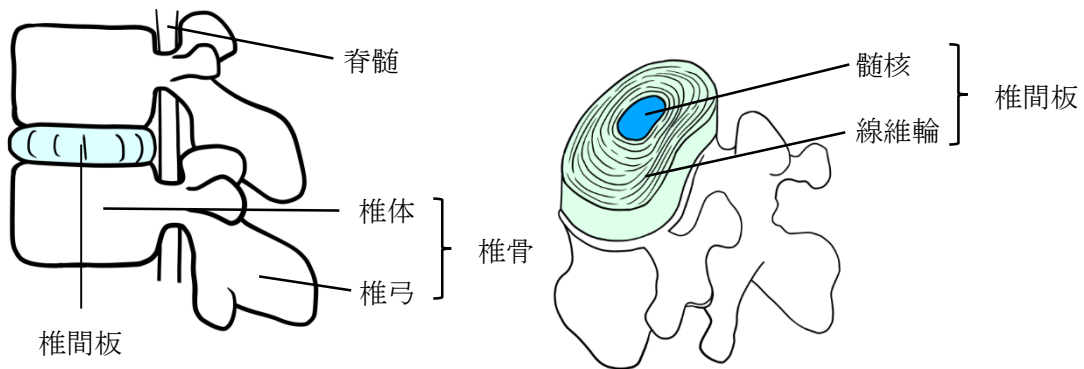


Figure 1-1 椎間板の模式図

椎間板は中央部分に水分を豊富に含む髄核 (nucleus pulposus; NP) が存在し、その周りを繊維軟骨が同心円上に層状に重なった線維輪 (annulus fibrosus; AF) が取り囲んだ構造を持つ。椎間板は無血管組織であり、損傷した時にきわめて修復、再生しにくい組織として知られている。

1-1-2 髄核(NP)の構造

椎間板を構成する組織のうち、本研究では髄核に着目した。

髄核は髄核細胞とその細胞外基質(extracellular matrix; ECM)から構成される水分を豊富に含んだゲル状の組織である。

髄核組織の模式図を Figure 1-2 に示す。

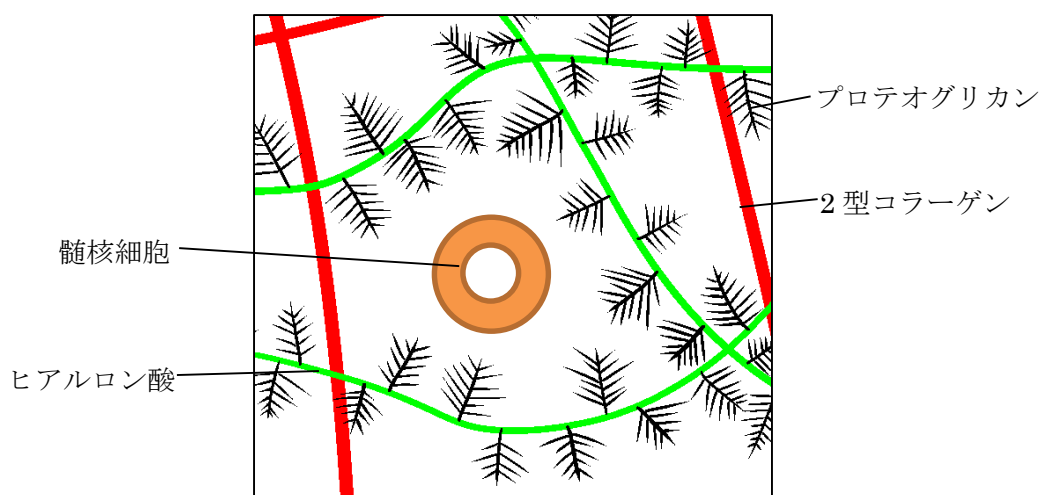


Figure 1-2 髄核の ECM

【髄核細胞】

髄核細胞は髄核を形成する ECM を産生する役割をもっている。*In vitro* では通常のプレート上で培養すると脱分化し、髄核細胞の表現型を示さなくなることが知られており、髄核細胞は単層培養を行うことで基質である Type II collagen および aggrecan の mRNA 発現量が減少することが報告されている^[1]。

Table 1-1 単層培養による髄核細胞の脱分化^[1]

Cells	Type II collagen		Aggrecan	
	Normal NP cells	Degenerated NP cells	Normal NP cells	Degenerated NP cells
Passage 1	20.53±2.58	12.50±1.53 ^a	31.34±2.87	19.49±2.57 ^a
Passage 2	20.37±2.67	11.75±1.56 ^a	30.24±2.50	18.35±2.37 ^a
Passage 3	18.16±2.39	10.43±1.34 ^a	27.56±2.39	17.59±2.25 ^a
Passage 4	12.10±1.76 ^b	8.79±1.08 ^{ab}	21.43±1.85 ^b	14.69±1.89 ^{ab}
Passage 5	10.32±1.54 ^b	5.24±0.84 ^{ab}	18.36±1.67 ^b	12.32±1.56 ^{ab}
Passage 6	4.33±0.85 ^b	2.54±0.69 ^{ab}	11.26±1.05 ^b	6.54±1.08 ^{ab}
Passage 7	3.32±0.68 ^b	1.53±0.53 ^{ab}	8.58±0.88 ^b	5.24±0.87 ^{ab}

^aP<0.01 vs. normal NP cells, ^bP<0.05 vs. NP cells at passage 1

Figure 1-3 に示すように、髄核細胞は単層培養により髄核細胞の基質産生に必要な転写因子である Sox9 の発現量が減少すると報告されている。Primary と比較して Passage 1 以降は全て有意に減少しており、P3 以降は 1/100 未満の発現量に減少している。髄核細胞は単層培養を行うと早い段階で脱分化が進むと考えられる。

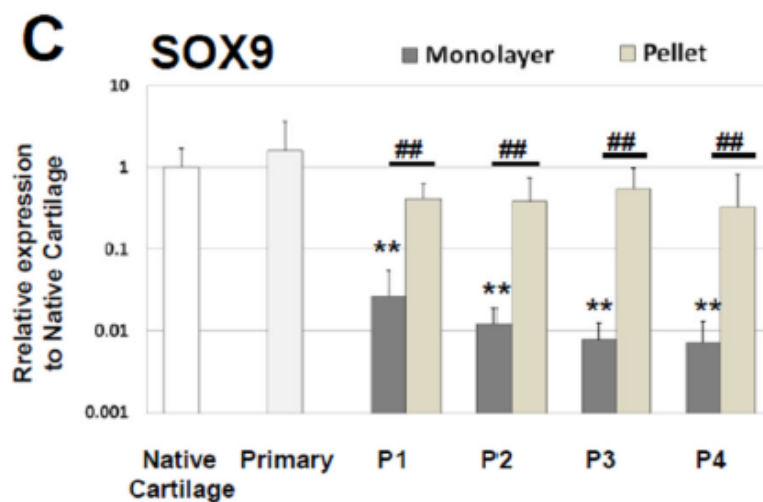


Figure 1-3 単層培養による SOX9 発現量の変化^[2]

脱分化状態の髄核細胞が分化状態へと変化することを再分化と呼ぶ。

1-1-3 グリコサミノグリカン

Figure 1-2 のプロテオグリカンとはコアタンパク質にグリコサミノグリカンと呼ばれる硫酸化多糖が共有結合している糖タンパクで、髄核組織の ECM 中に多く存在する。髄核組織中のプロテオグリカンの大半は **aggrecan** であり、へパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) である **perlecan** も存在している。Aggrecan に結合するグリコサミノグリカンの多くはコンドロイチン硫酸である。

グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan; GAG) はアミノ糖とウロン酸の繰り返し構造からなる硫酸化多糖であり、大部分がプロテオグリカンの糖鎖として存在する。主に結合組織の細胞により産生されるが、存在部位により異なる構造のものが存在することが知られている。

グリコサミノグリカンは骨格構造や硫酸基の部位により様々な名称に分類され、髄核組織ではコンドロイチン硫酸が多く産生されることが知られている。Figure 1-4a～1-4c にグリコサミノグリカンの一例を記す。

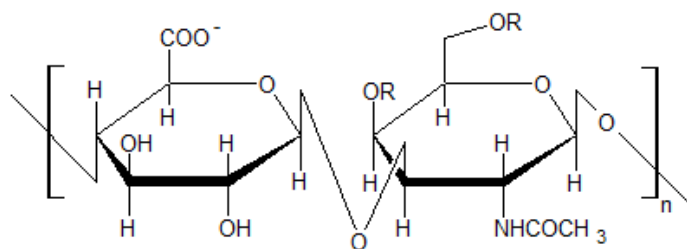


Figure 1-4a コンドロイチン硫酸^[3]

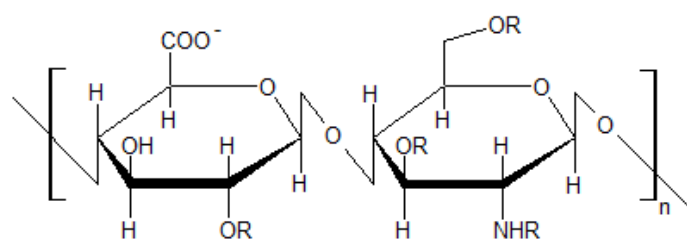
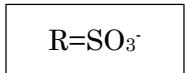


Figure 1-4b へパラン硫酸^[3]

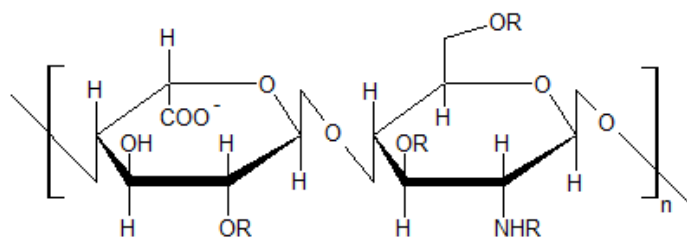
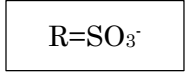
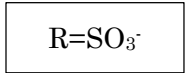


Figure 1-4c へパリン^[3]



グリコサミノグリカンは、硫酸化部位と生理活性タンパク質との相互作用による吸着能を有し、細胞の接着、増殖、分化など様々な現象に関わっていると考えられている。グリコサミノグリカンの硫酸化率および硫酸化部位の違いなどによる構造の違いは、様々な生理活性タンパク質に対する特異的な結合に関与すると考えられている。また、髄核組織内においては保水性の維持も担っている。

1-1-4 椎間板ヘルニア

椎間板の主な疾病に椎間板ヘルニアが挙げられる。線維輪に亀裂が入り、内部の髄核が後方に突出したものを椎間板ヘルニアと呼ぶ。加齢による変性や強い外力を原因とし、突出した髄核が神経根を圧迫することにより腰痛や下肢の痺れ、膀胱障害などの症状を引き起こす。

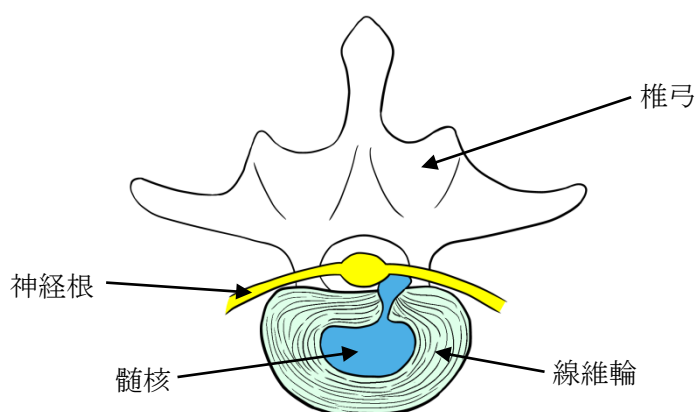


Figure 1-5 椎間板ヘルニア

1-1-5 現行の治療法および問題点

現行の椎間板ヘルニア治療は、保存療法と手術療法の2つが存在する。

保存療法は軽度の場合に行われ、神経に局所麻酔を浸透させ痛みを緩和する神経ブロック、鎮痛剤の服用、コルセットの着用、マッサージなどの理学療法などが挙げられる。

手術療法は保存療法で効果が得られない場合や緊急を要する場合に行われる。患部を背中側から切開しヘルニアを切除する後方椎間板切除術、金属などで椎間を固定する椎間固定術などが挙げられる。近年では背中を切開せずにヘルニアを切除する顕微鏡下椎間板ヘルニア摘出術や内視鏡下椎間板ヘルニア摘出術などより低侵襲な治療法も行われているが、主な罹病者である高齢者には依然として手術による身体的負担は大きい。

また、いずれの治療法も椎間板の損傷そのものを治癒することはできないため再発のおそれが伴うという問題点が存在する。

1-2 再生医療

現行の治療法における問題点から、低侵襲でヘルニアの根本的原因である椎間板の損傷を修復する治療法の確立が必要である。そこで有効なのが、欠損した組織を自己の有する再生能力により機能を回復させる再生医療である。本研究では椎間板を構成する髄核組織に着目し、髄核の再生を目的とする。

1-2-1 椎間板ヘルニア治療としての再生医療

椎間板ヘルニアの再生医療のアプローチとしては、患部の組織から単離した細胞のうち正常なものを *in vitro* で培養・増殖させ、患部へインジェクトすることで組織の修復を促す方法が有効であると考えられる。しかし、前述のとおり髄核細胞は単層培養により脱分化することが知られており、通常に培養を行うだけでは再生医療に用いることはできない。

1-2-2 椎間板修復材料としてのインジェクタブルゲル

本研究で目標とする治療法は、*in vitro* で増殖させた髄核細胞を足場材料に混和させて患部にインジェクトし、髄核細胞の再分化および基質産生を促進させて損傷した髄核組織を再生させる方法で、従来の手術療法と比較して低侵襲な治療法である。このような再生医療に用いるための材料として必要な条件は以下の通りである。

1. 増殖と同時に脱分化を起こした髄核細胞を再分化誘導できる。
2. シリンジを用いてインジェクトが可能な流動性を持つ。
3. 生体に対して毒性を持たない。

このような条件を満たす材料開発のアプローチとしては、様々な生理活性タンパク質との結合能を持つグリコサミノグリカンと同等の機能を有する材料を用いて髄核細胞の培養を行うことで髄核組織修復材料の開発が可能になることが期待される。また、髄核細胞は三次元足場での培養により脱分化が抑えられるという報告^[4]があることから、三次元の足場材料が望ましい。

そこで、本研究では、

1. 生体適合性を有する
2. グリコサミノグリカン様の基本骨格を有する
3. ゲル化能を有する

以上3点の条件を満たす多糖類として、ネイティブ型ジェランに硫酸基を導入した硫酸化ネイティブ型ジェラン、および脱アシル型ジェランにカルボキシメチル基を導入したカルボキシメチルジェランを選択した。

1-3 ジェラン

ジェラン(Gellan)は *Shingomonas elodea* という微生物が菌体外に産出する多糖類で、増粘安定剤として各種食材に幅広く使用されている^[5]。また、以前の研究から優れた生体適合性を有する抗血栓性材料であることが報告されている^[6-8]。

1-3-1 ネイティブ型ジェラン(NG)

ネイティブ型ジェラン(Native type Gellan; NG)は直鎖状のヘテロ多糖類であり、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糖の繰り返し構造からなり、1,3-β-D-グルコースのC-2位にグリセリル基、C-6位が1/2の割合でアセチル基により修飾された構造を持つ。

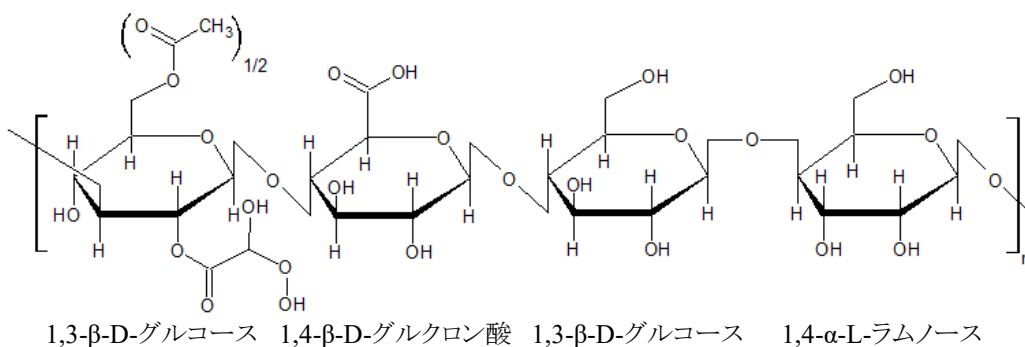


Figure 1-5 ネイティブ型ジェランの構造

1-3-2 脱アシル型ジェラン(DG)

脱アシル型ジェラン(De-acyl type Gellan; DG)はネイティブ型ジェランのアセチル基とグリセリル基を取り除いたものである。カチオン類の存在下で透明のゲルを形成する。

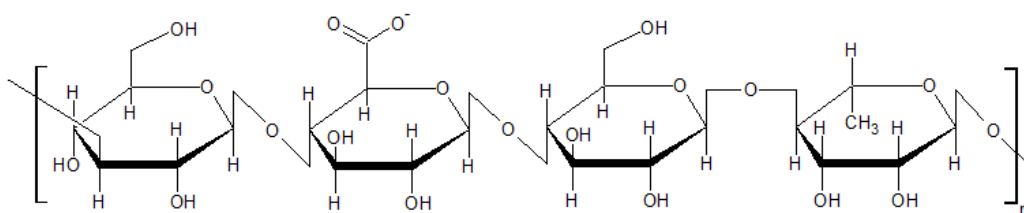


Figure 1-6 脱アシル型ジェランの構造

1-3-3 硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)

硫酸化ネイティブ型ジェラン(Native type Gellan Sulfate; 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硫酸化多糖類である。硫酸化を行うことで生理活性タンパク質と結合能を持つようになり、以前の研究からテネascin-C(Tenascin-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^[6,7]。これら2つ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^[9]。

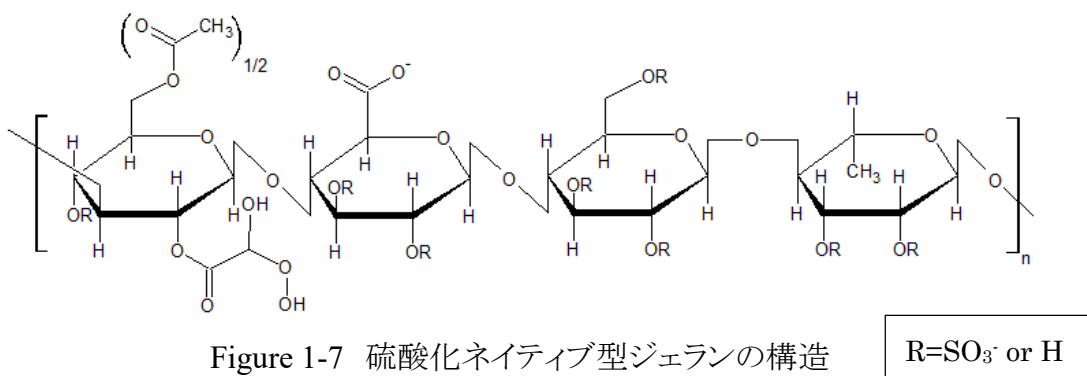


Figure 1-7 硫酸化ネイティブ型ジェランの構造

R=SO₃⁻ or H

1-3-4 カルボキシメチルジェラン(CMG)

カルボキシメチルジェラン(Carboxymethyl Gellan; CMG)は脱アシル型ジェランの水酸基をカルボキシメチル基に置換したものである。濃アルカリ中で脱アシル型ジェランとモノクロ酢酸を反応させることで得られる。特徴として高い水溶性を持ち、温度に依存せず化学架橋によりゲル化させることが可能である。

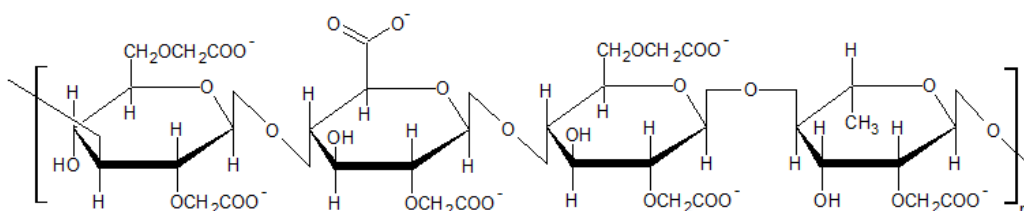


Figure 1-8 カルボキシメチルジェランの構造

硫酸化ネイティブ型ジェランは水溶性が高く、ゲル化能を持たないため、足場材料としての利用はできない。本研究では足場材料としてカルボキシメチルジェランを用いた硫酸化ネイティブ型ジェラン固定化カルボキシメチルジェランゲルを作製し実験を行った。

1-4 目的

1-4-1 目的

本研究の目的は、硫酸化ネイティブ型ジェラン固定化カルボキシメチルジェランゲル(GS-CMGゲル)を用いて椎間板組織再生を可能とするインジェクタブルな材料を開発することである。

1-4-2 実験項目

実験は以下の項目で行った。

1. インジェクタブルゲル材料の作製
 - カルボキシメチルジェラン(CMG)の作製
 - 硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)の作製
 - GS-CMGゲルの作製

2. 単層(2D)培養におけるGS添加による髄核細胞の応答評価
 - 遺伝子発現の測定
 - sGAG産生量の測定

3. GS-CMGゲル内(3D)培養における髄核細胞の応答評価
 - 培養容器の作製
 - 遺伝子発現の測定
 - sGAG産生量の測定

2. 実験方法

2-1 インジェクタブルゲル材料の作製

2-1-1 CMG の作製

本研究において足場材料として使用する CMG の作製を行った。

【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】

- 電子天秤 (SHIMADZU)
- 凍結乾燥機 (LABCONCO)
- 葉さじ
- 葉包紙
- 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
- 耐圧瓶
- 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整した。
- 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 2 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、不溶物を取り除いた。

- ⑩ 透析した溶液を耐圧瓶に移し、凍結乾燥させた。
- 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 $^1\text{H-NMR}$ による CMG の置換度測定

$^1\text{H-NMR}$ により作製した CMG の置換率を測定した。

【試薬】

- カルボキシメチルジェラン(CMG) (2-1-1 より作製)
- D_2O (和光純薬工業株式会社)

【使用器具】

- 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 (JEOL 株式会社)
- ピペットマン
- 電子天秤 (SHIMADZU)

【手順】

- ① CMG15mg を D_2O 0.7mL 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。

【 $^1\text{HNMR}$ 測定条件】

設定方法: $^1\text{HNMR}$ 基本設定

実験モード: SINGL

照射モード: NON

SCANS: 100

溶媒: D_2O

2-1-3 NGのフリー化

多糖類を利用するためにはそれを溶媒に溶解させる必要がある。ネイティブ型ジェランは構成するグルクロン酸のカルボキシル基がカリウム等の金属と塩を形成しているため溶媒への溶解性が低下している。そこで本項では、ネイティブ型ジェランの溶媒への溶解性の向上を目的としてグルクロン酸のカルボキシル基から塩を取り除くフリー化を行った。

【試薬】

- ネイティブ型ジェラン(NG) (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社)
- 塩酸 (和光純薬工業株式会社)
- アセトン (和光純薬工業株式会社)

【使用器具】

- 1000mL セパラブルフラスコ
- 攪拌機
- 攪拌棒
- スタンド
- クランプ
- クランプホルダー
- 氷水
- 薬包紙
- pHメーター
- ブフナーロート
- アスピレーター
- 凍結乾燥機
- スパチュラ
- 恒温槽
- スターラー
- スターラーチップ
- 塩化カルシウム管
- ピペッター
- ピペット
- ビーカー
- 二方コック
- 2L マイヤーフラスコ
- ジムロート管
- 脱イオン水
- パラフィルム

【実験方法】

- ① 1,000mL セパラブルフラスコに 800mL の脱イオン水を入れた。
- ② ネイティブ型ジェラン 8.0g を脱イオン水に溶解させ 70°C で 20 時間攪拌した。
- ③ 攪拌終了後、溶液が pH3.0 以下になるまで 1N の塩酸を加えた。
- ④ pH3.0 以下になったら攪拌しながら室温まで冷却した。
- ⑤ 冷却後、反応溶液をアセトンに滴下し再沈殿させた。
- ⑥ 再沈殿後、沈殿物を濾過し、得られた沈殿物を凍結乾燥により精製した。
- ⑦ 得られたフリー化ネイティブ型ジェラン (FNG) はミキサーおよび乳鉢で粉末化した。

2-1-4 GSの作製

ネイティブ型ジェランの遊離の水酸基に対して硫酸化を行うことでネイティブ型ジェランに硫酸基を導入した硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)の調製を行った。硫酸化反応はN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を溶媒、クロロスルホン酸を硫酸化剤に用いた。

【試薬】

- フリー化ネイティブ型ジェラン(FNG) (2-1-3より作製)
- N,N-ジメチルホルムアミド(DMF) (和光純薬工業株式会社)
- クロロスルホン酸 (和光純薬工業株式会社)
- 塩化カルシウム (和光純薬工業株式会社)
- アセトン (和光純薬工業株式会社)

【使用器具】

- 300mL セパラブルフラスコ
- 攪拌機
- 攪拌棒
- 窒素混入ゴム風船
- スタンド
- クランプホルダー
- 氷水
- ピペッター
- 薬包紙
- pHメーター
- ガラスフィルター
- アスピレーター
- ロート
- 凍結乾燥機
- スパチュラ
- 恒温槽
- 攪拌子
- スターラー
- ジムロート
- クランプ
- 塩化カルシウム管
- ピペット
- ビーカー
- 二方コック
- 2L マイヤーフラスコ
- エバポレーター
- 脱イオン水
- 透析チューブ
- パラフィルム

【実験方法】

- ① セパラブルフラスコに蒸留した DMF を加え、セパラブルフラスコの口の片方に窒素を含有させたゴム風船を、もう片方には頭部に塩化カルシウム管をつけたジムロートをつけ窒素置換をし、恒温槽(0°C)で 20 分撹拌した。
- ② 撹拌終了後、クロロスルホン酸を GS の水酸基に対して 5 倍量加えて 20 分撹拌した。
- ③ 撹拌終了後、FNG を加えて 20 時間撹拌した。
- ④ 所定の反応開始温度(Figure 2-1 の t1(°C))まで温度を上げ、20 分撹拌した。
- ⑤ 所定の反応温度(Figure 2-1 の t2(°C))に温度を設定し、2 時間撹拌した。
- ⑥ 0°Cで 20 分撹拌したのち 2M 水酸化ナトリウム水溶液を撹拌させながら滴下し中和した。
- ⑦ pH 試験紙で反応溶液の中和を確認後、スターラーで撹拌しながらアセトン(500mL~1,000mL)中に滴下し、再沈殿させた。
- ⑧ ガラスフィルターで沈殿物をろ過し、得られた沈殿物を脱イオン水で再溶解させた。
- ⑨ あらかじめ脱イオン水で洗浄しておいた透析チューブに再溶解液を移し、脱イオン水で 3~4 日間透析を行った。
- ⑩ 透析終了後、透析液を再度ガラスフィルターに通し、濾過を行った。濾過後、濾液に対し凍結乾燥を行い GS を精製した。濾液が大量の場合はエバポレーターを用いて 200~300mL ほどに濃縮した後凍結乾燥を行った。

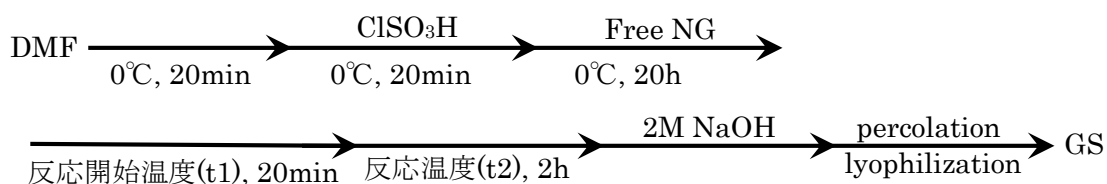


Figure 2-1 硫酸化ネイティブ型ジェランの調製方法

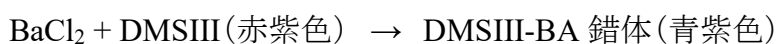
Table 2-1 GS の作製条件

Entry	Free NG(g)	クロロスルホン酸(mL)	反応温度 t1, t2(°C)
1	1.00	3.75	70, 50
2	1.00	3.75	80, 60

2-1-5 酸素フラスコ燃焼法による GS の硫酸化率測定

酸素フラスコ燃焼法は、吸収液で湿らせた燃焼フラスコ内で試料を燃焼させ、生成ガスを液中に吸収させ、その検液の成分を分析する方法である。分析方法は様々であるが、本実験では滴定による分析を行った。

【酸素フラスコ燃焼法の原理】



【試薬】

- ジメチルスルホナヅ-III (和光純薬工業株式会社)
- 無水塩化バリウム (和光純薬工業株式会社)
- 硫酸(精密分析用) (和光純薬工業株式会社)
- 30%過酸化水素水 (和光純薬工業株式会社)
- エタノール(99%, 50%) (和光純薬工業株式会社)
- 水酸化ナトリウム(特級) (和光純薬工業株式会社)

【使用器具】

- FHO-A 型フラスコ (浜田理科)
- 100mL ビーカー
- パスツールピペット
- 試料秤量用ろ紙
- ガラスピペット
- ガスバーナー
- ビュレット
- ワニ口クリップ付きコード
- 氷水
- pH メーター
- スターラー
- パラフィルム
- スライドダック
- 50mL メスフラスコ
- スパチュラ
- サンプル瓶
- O₂ ガスボンベ
- 攪拌

【関連試薬の調製】

- 0.1% ジメチルスルホナゾ-III 溶液
ジメチルスルホナゾ-III(50.0mg)を脱イオン水(50.0mL)で溶解した。
- 0.02M 水酸化ナトリウム水溶液
水酸化ナトリウム(80.0mg)を脱イオン水 (100.0mL)に溶解した。
- 50%エタノール溶液
99%エタノールと脱イオン水を 1:1 の割合で混合した。

【0.005M 塩化バリウム水溶液の調製と力価(factor)の測定】

- ① 塩化バリウム(無水) 1.0412g を取り、1,000mL メスフラスコに入れ脱イオン水で正確に 1,000mL にした。
- ② 精密分析用 1N 硫酸 1.0mL を 100mL メスフラスコに入れ、50%エタノールで正確に 100mL にした。
- ③ ②で調製した 0.01N 硫酸 3.0mL に 5%エタノール 17.0mL を加え 20mL とし、サンプル瓶に入れた。これを 3 本用意した。
- ④ ③で調製した溶液に指示薬の 0.1% dimethyl sulfonazo - III を 2 滴加え、0.005M 塩化バリウム水溶液で滴定した。
- ⑤ ブランクとして 50%エタノール 20.0mL も同様にして滴定を行った。
- ⑥ 硫酸-エタノール溶液の平均値滴定量からブランク平均的定量を差し引いた値を正味の滴定量とし、力価 (factor) を算出した。

0.005M 塩化バリウム水溶液 1.0mL は硫黄 0.1603g に相当することから、Factor は得られた結果を式(1)に代入することにより求めた。

$$S(\%) = \frac{\text{滴定量(mL)} \times \text{factor} \times 0.1603}{\text{sample 量(mg)}} \times 100 \quad (1)$$

【酸素フラスコ燃焼法の実験方法】

- ① 試料秤量用濾紙の作製。直接手で触れないようにろ紙をはさみでカットした。
- ② カットした濾紙の上に sample を 20.0mg 量り取り、丁寧に折り畳んだ。
- ③ FHO-A 型フラスコに脱イオン水 5mL、30%過酸化水素水 4～5 滴を入れ、内部を濡らした。
- ④ 白金バスケットをバーナーで焼いた。
- ⑤ ろ紙に包んだ sample を白金バスケットに入れた。
- ⑥ 白金バスケットを FHO-A 型フラスコにセットし、内部を 30sec 酸素置換した。
- ⑦ 置換後直ちに活栓と共栓を閉じ外部遮断し、専用クリップで止めた。
- ⑧ ワニロクリップ付きコードをスライダックにつなぎ、ワニロクリップの両方をフラスコの銅線に挟み込んだ。
- ⑨ 電圧をかけ sample と濾紙を燃焼させた。
- ⑩ 燃焼後フラスコを氷水中に入れ 30min 静置した。
- ⑪ 静置後、白金バスケット上部のメスピペットに脱イオン水 5.0mL と 99%エタノール 10.0mL を入れ、活栓を開きフラスコ内を洗浄した。
- ⑫ フラスコ内を 50%エタノールで洗浄しながら溶液を 50mL メスフラスコに移し、50%エタノールで正確に 50mL とした。
- ⑬ 溶液を 100mL ビーカーに移し換え、攪拌しながら 0.02M 水酸化ナトリウム水溶液を滴下し、pH6～7 に調節した。
- ⑭ 検液を 5.0mL ずつサンプル瓶 10 本に入れ、0.1% Dimethyl Sulfonazo-III Solution を 2 滴ずつ入れた。
- ⑮ ビュレットを用い、0.005M 塩化バリウム(無水)水溶液で滴定した。溶液色が赤紫から青緑に変色する点を終点とした。
- ⑯ ブランクとして 50%エタノールを 5.0mL ずつサンプル瓶 10 本に取り、同様の滴定を行った。
- ⑰ 検液の滴定量からブランクの滴定量を引いた値を正味滴定量とし、硫黄の含有率 S(%)を(2)式より求めた。

$$S(\%) = \frac{\text{正味滴定量(mL)} \times \text{滴定液濃度(mmol/mL)} \times S \text{ 原子量} \times \text{factor} \times 100}{\text{sample 量(mg)}} \times 100 \quad (2)$$

2-2 インジェクタブルゲルの作製

2-2-1 CMG ゲルの作製

作製した CMG を足場材料として使用するためにゲル化を行った。

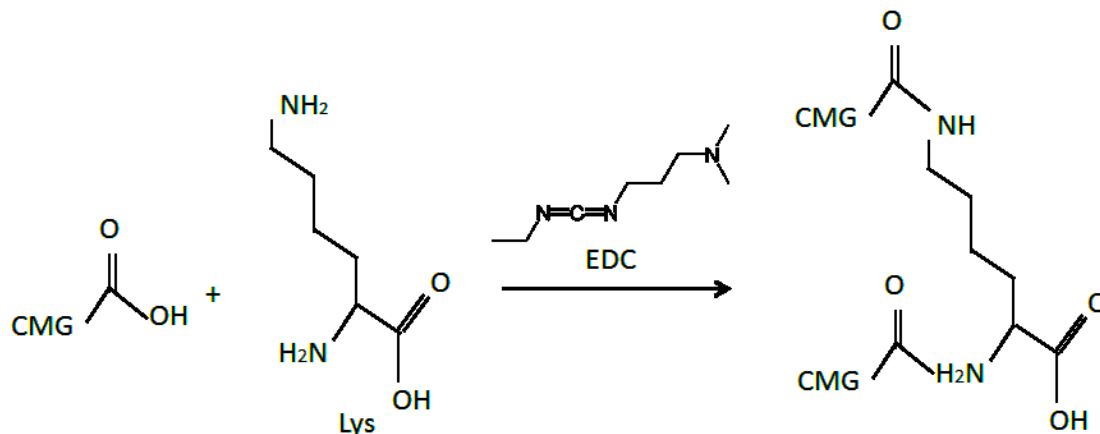


Figure 2-1 Lys による CMG 架橋

【試薬】

- カルボキシメチルジェラン (CMG) (2-1-1 により調製)
- L-Lysine methyl ester: Lys (ヒドラス化学株式会社)
- ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride: EDC (ペプチド研究所)

【使用機器】

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

【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) を量り取った。
- ② 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% になるように調製した。)
- ③ 均一に溶解した後、37°C で overnight インキュベートした。

2-2-2 GS-CMG ゲルの作製

2-1-1 で作成した CMG に対し GS を固定化した硫酸化ネイティブ型ジェラン固定化カルボキシメチルジェランゲル(GS-CMG ゲル)の作成を行った。

Figure 2-2 に示すように、GS のカルボキシル基と CMG のカルボキシル基を架橋させることによって GS の固定化を行った。

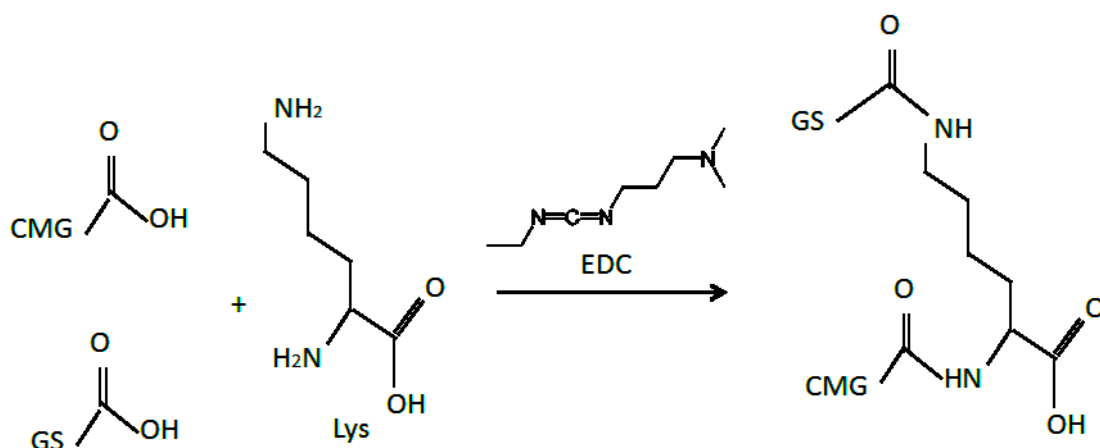


Figure 2-2 Lys による CMG と GS の架橋

【試薬】

- カルボキシメチルジェラン(CMG) (2-1-1 により調製)
- 硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS) (2-1-4 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)

【使用器具・機器】

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

【手順】

- ① 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) をそれぞれ計り取り、そこに GS を 1wt% になるように加えた。
- ② 脱イオン水を加えてボルテックスで攪拌し、37℃で overnight インキュベートした。

2-2-3 ゲルビーズの作製

2-2-1 および 2-2-2 で作製した CMG ゲル、GS-CMG ゲルをインジェクタブルな材料にするために細分化しゲルビーズを作製した。

【試薬】

- CMG ゲルまたは GS-CMG ゲル(2-2-1 および 2-2-2 より作成)、
- 脱イオン水
- 99%エタノール

【使用器具】

- 5mL サンプリングチューブ
- 注射針(20G, 25G)
- 透析膜
- 15mL 遠沈管
- シリンジ

【準備】

- ① 作製したゲルを 5mL サンプリングチューブに移し、脱イオン水を加えた。
- ② 20G の注射針で粉碎し、別のサンプリングチューブに移した。
- ③ 25G の注射針で更に粉碎して遠沈管に移した。
- ④ 1,000rpm/5min で遠心分離を行い、上澄みを除去した。
- ⑤ 遠沈管に 99%エタノールを加えローテーターで 3h 攪拌を行った。
- ⑥ 1,000rpm/5min で遠心分離を行い、上澄みを除去した。
- ⑦ 滅菌水を加え膨潤させた。
- ⑧ 無菌状態で 40 μ m セルストレーナーに通し、40 μ m 未満のゲルビーズを取り除いた。
- ⑨ セルストレーナー上に残ったゲルビーズを遠沈管に移し、滅菌水を加えた。
- ⑩ 1,000rpm/5min で遠心分離を行い、上澄みを取り除いた。
- ⑪ この操作を 3 回行った。
- ⑫ 浮遊培養用シャーレにゲルを移し、UV 照射を行いながら overnight 静置し、滅菌を行った。

2-3 髄核細胞の単層培養における GS の影響

2-3-1 細胞培養

髄核細胞 (NP) は三重大学医学部附属病院 外科系診療科 整形外科より提供を受けたヒト髄核細胞を使用し、提供を受けた段階を passage 1 とした。

NP は 37°C/5%CO₂ インキュベータ (池本理化工業) 内で培養した。培地はペニシリンストレプトマイシン (Sigma) および L(+)-アスコルビン酸 (Wako) を添加した。

DMEM/F-12 1:1 (Gibco) を用い、3 日に一度培地交換を行った。

Sub-confluent (70-80%) の状態に増殖した時点でトリプシン処理により継代培養を行った。

2-3-2 細胞の継代培養

【準備】

- ① 10%FBS / DMEM/F-12(1:1)、滅菌済み PBS を適量用意した。
- ② 冷凍保存してある Trypsin を解凍し、10%Trypsin/PBS を適量用意した(以下、トリプシン溶液)。
- ③ 継代先の培養フラスコに 10%FBS / DMEM/F-12 1:1 を 5mL/25cm² フラスコを入れ、37°C/5%CO₂ インキュベータ内でプレインキュベートした。

【細胞の洗浄、剥離】

- ① 滅菌済み 10mL ピペットを加熱滅菌後に培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引、廃棄した。
- ② PBS を 5mL/25cm² フラスコ入れ、フラスコ内を洗浄した。
- ③ 洗浄液を吸引、廃棄し、トリプシン溶液を 5mL/25cm² フラスコ入れ、37°C /5%CO₂ インキュベータ内で 5 分程度インキュベートした。
- ④ 培養フラスコを揺らす又は叩くことで、フラスコから細胞を剥離させた。
- ⑤ 顕微鏡で細胞が剥離したことを確認後、FBS を 1mL/25cm² フラスコ) を加えた。
- ⑥ 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。
- ⑦ 遠心機で 750rpm/5min 遠心分離した。
- ⑧ 上澄みをピペットで吸引、廃棄し、遠沈管に沈殿している細胞に DMEM/F-12(1:1) を 1mL 又は 3mL 加えピペッティングを行い、細胞懸濁液を作成した。

【細胞の播種】

- ① 細胞懸濁液濃度を決定した。
血球計算盤にカバーガラスを載せ隙間に細胞懸濁液 $7\mu\text{L}$ を注入し、顕微鏡で細胞数を測定し算出した。 1mm^2 の面積の細胞数を数え、液の厚みを 0.1mm としたときの細胞懸濁液濃度を $(\text{測定細胞数}) \times 10^4 \text{cells/mL}$ とした。
- ② プレインキュベートしておいた培養フラスコに $10,000 \text{cells/cm}^2$ で播種し、 37°C / $5\% \text{CO}_2$ インキュベータ内で培養した。

2-3-3 髄核細胞の倍化日数

継代培養を行った際に細胞数をカウントすることにより、髄核細胞の累積分裂回数および倍化日数を求めた。

累積分裂回数の算出は下式を用いた。

$$[\text{累積分裂回数}] = \log_2([\text{増殖後の細胞数}]/[\text{P1 の細胞数}])$$

倍化日数の算出方法は以下に記す。

まず、細胞の増殖について下式が成り立つ。

$$[\text{増殖前の細胞数}] \times 2^{([\text{培養日数}]/[\text{倍加日数}])} = [\text{増殖後の細胞数}]$$

2 を底とする対数を取る。

$$[\text{培養日数}]/[\text{倍加日数}] = \log_2([\text{増殖後の細胞数}]/[\text{増殖前の細胞数}])$$

これにより、下式を得た。

$$[\text{倍化日数}] = \frac{[\text{培養日数}]}{\log_2([\text{増殖後の細胞数}]/[\text{増殖前の細胞数}])}$$

2-3-4 髄核細胞の単層培養における形態変化

NP に GS を添加して単層培養した時の形態の変化を調査した。GS の添加は硫酸化率 25.44% の GS を濃度 100 μ g/mL で培地に溶解させた GS 添加培地を作製し、その培地を用いて培養を行った。

培養を行った細胞は写真を撮影し、その写真を元に細胞面積と真円度を求めた。細胞面積と真円度の算出には ImageJ を用いて行った。

【細胞面積】

- ① 細胞写真を撮影した。
- ② 写真中から任意の細胞の輪郭を複数 cells トレースした。
- ③ ②で作成した画像を ImageJ で開き、[Image]→[Adjust]→[Threshold]により 2 値化を行った。
- ④ [Analyze]→[Analyze Particles]により細胞のピクセル数を求めた。
- ⑤ スケールバーを読み込み、1 ピクセルあたりの大きさを求めた。
- ⑥ ④⑤で求めた値より細胞面積を算出した。

【真円度】

- ① 細胞写真を撮影した。
- ② 写真中から任意の細胞の輪郭を複数 cells トレースした。
- ③ ②で作成した画像を ImageJ で開き、[Image]→[Adjust]→[Threshold]により 2 値化を行った。
- ④ [Analyze]→[Analyze Particles]により出力された結果の Circ. が真円度である。

真円度は正円のときに 1、正円から外れるほど 0 に近づく値で、下式により求めることができる。

$$[\text{真円度}] = \frac{4\pi \times [\text{面積}]}{[\text{周長}]^2}$$

2-3-5 髄核細胞の単層培養における遺伝子発現

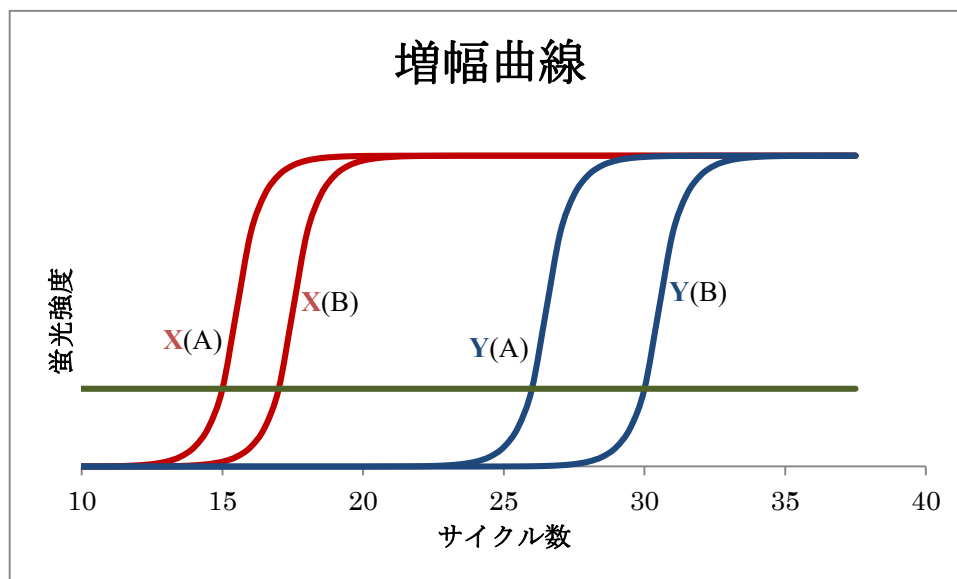
NP を単層培養した時の遺伝子発現の変化を調査した。同時に複数の硫酸化率の GS を添加して培養を行うことにより、GS が髄核細胞に与える影響を調査した。

GS 添加は 2-3-4 と同条件で、培養容器は 24 well プレートを用いた。添加培地により培養を行った細胞は real-time PCR によりマーカー遺伝子 (Colla1, Sox9, CD90) の発現を測定した。Sox9 を分化マーカーとして利用し、Colla1 および CD90 を脱分化マーカーとして利用した。内在性コントロールは GAPDH を用いた。PCR により得られたデータは $\Delta\Delta Ct$ 法を用いてノーマライズを行った。

Table 2-1 本実験で使用したヌクレオチドプライマー配列

Target gene		5'→3'
GAPDH	Force	GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT
	Reverse	CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC
Colla1	Force	TTT GTG GAC CTC CGG CTC
	Reverse	AAG CAG AGC ACT CGC CCT
SOX9	Force	AGT ACC CGC ACT TGC ACA AC
	Reverse	TTG TAA TCC GGG TGG TCC TTC
CD90	Force	TGA GAT CCC AGA ACC ATG AAC C
	Reverse	TAT TCT CAT GGC GGC AGT CC

【 $\Delta\Delta Ct$ 法】



X(A)	サンプル A の内在性コントロール遺伝子 X
Y(A)	サンプル A のターゲット遺伝子 Y
X(B)	サンプル B の内在性コントロール遺伝子 X
Y(B)	サンプル B のターゲット遺伝子 Y

Figure 2-3 PCR の増幅曲線

Table 2-2 X 遺伝子と Y 遺伝子に基づく $\Delta\Delta Ct$ 値

	X 遺伝子の Ct 値	Y 遺伝子の Ct 値	ΔCt 値	$\Delta\Delta Ct$ 値
サンプル A	15	26	11	-2
サンプル B	17	30	13	

- ① 増幅曲線と、横軸との平行線との交点のサイクル数を Ct 値とした。
- ② 各サンプルのターゲット遺伝子と内在性コントロール遺伝子の Ct 値の差を ΔCt 値とした。

$$\Delta Ct = [\text{ターゲット遺伝子の Ct 値}] - [\text{内在性コントロール遺伝子の Ct 値}]$$

- ③ ターゲットのサンプル(今回の例ではサンプル B とする)と基準となるサンプル(今回の例ではサンプル A とする)の ΔCt 値の差を $\Delta\Delta Ct$ 値とした。

$$\Delta\Delta Ct = [\text{サンプル A の } \Delta Ct \text{ 値}] - [\text{サンプル B の } \Delta Ct \text{ 値}]$$

- ④ “1 サイクルの差が 2 倍量の発現量となる”理論を用いて、下式により発現量を求めた。

$$\text{gene expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2-3-6 髄核細胞の単層培養における sGAG 産生

DMMB 法により、単層培養を行なった NP の産生した sGAG の量を測定した。

【試薬】

- Proteoglycan Detection kit (ASB)

【使用機器】

- 500 μ L サンプリングチューブ
- 分光光度計

【手順】

- ① 段階希釈により 25, 12.5, 6.25, …… , 0.625 μ g/mL のスタンダード溶液を 100 μ L ずつ作製した。
- ② サンプルとして培養細胞の上清を 100 μ L 分注した。
- ③ 1.9-ジメチルメチレンブルーを全ての溶液にそれぞれ 100 μ L ずつ加えた。
- ④ 分光光度計により波長 525nm の吸光度を測定した。
- ⑤ スタンダードを作成し、全細胞の sGAG 産生量を求めた。
- ⑥ ⑤で求めた sGAG 産生量を細胞数で割り、1 細胞あたりの sGAG 産生量を求めた。

2-4 GS-CMG ゲルビーズ内培養における NP への影響

2-4-1 ゲルビーズ内培養のための培養チャンバーの作製

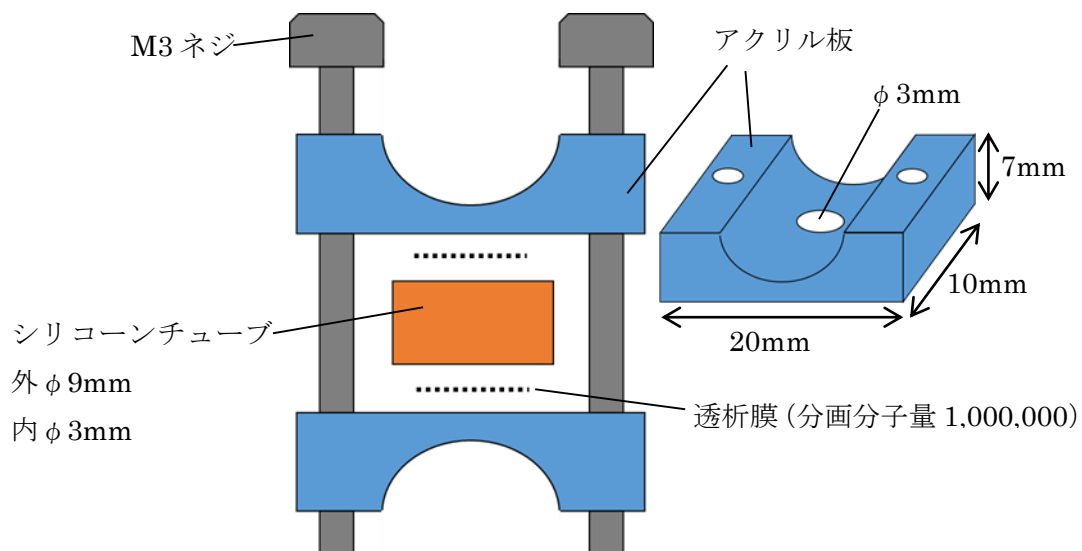


Figure 2-4 培養チャンバー

【手順】

- ① Figure 2-4 に示す形にアクリル板を加工した。
- ② 各部品を滅菌した。
- ③ アクリル板の間に透析膜、シリコンチューブを挟み、ネジで固定した。(Figure 2-4)

2-4-2 GS-CMG ゲルビーズ内での細胞培養

作製した GS-CMG ゲルビーズ内で髄核細胞の培養を行った。

【使用器具】

- 5mL サンプルングチューブ
- シリンジ
- バッド
- 注射針(25G)
- 培養チャンバー(2-4-1 より作製)
- 6well プレート
- 透析膜
- ドライバー

【手順】

- ① 滅菌したゲルビーズ(2-2-3 より)を 5mL サンプルングチューブに移し、プレインキュベートした。
- ② 6well プレートに培地 7mL を入れ、プレインキュベートした。
- ③ 細胞懸濁液を作製した。(2-3-2 より)
- ④ バッド上で培養チャンバーを組み立てた。
- ⑤ 所定量の細胞懸濁液をゲルビーズに加え、ゆっくりとピペッティングを行った。
- ⑥ シリンジで⑤の細胞懸濁液とゲルビーズの混合物を吸引した。
- ⑦ ⑥のシリンジと空のシリンジを装置の穴に差し込んだ。
- ⑧ 空のシリンジで装置内を真空にしながるゲルを注入した。
- ⑨ ②で用意した 6well プレートに装置を入れ、培養を行った。

2-4-3 GS-CMG ゲルビーズ内で培養した細胞の遺伝子発現

ゲルビーズ内で培養した細胞の遺伝子発現量の測定のために real-time PCR を行った。使用したヌクレオチドプライマーは Table 2-1 で示したものである。

2-4-4 GS-CMG ゲルビーズ内で培養した細胞の sGAG 産生

硫酸化グリコサミノグリカン(sGAG)の産生量を測定することで、髄核基質の主要構成成分である Aggrecan の産生量を調査した。測定には DMMB 法を用いた(2-3-4 による)。

3. 実験結果

3-1 CMG の作製

作製した CMG の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Figure 3-1 に示した。1.2ppm 付近のラムノースのメチル基のプロトンのピーク(a)の積分強度を 3 としてその他のプロトンの積分強度を求めた。5.0ppm 付近のピーク(b)は α アノマー(1,4- α -L-ラムノース)、4.4ppm 付近のピーク(c)は β アノマー(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)の 1 位の炭素に結合しているプロトンのピークである。4.2~3.0ppm のピークが 1 位に存在するプロトンとラムノースのメチル基のプロトンを除いた CMG のプロトンのピークである。

脱アシルジェラン(DG)は 1 位に存在するプロトンとラムノースのメチル基のプロトンを除いた総プロトンの数が 20 なので、4.2~3.0ppm の積分強度を 20.00 とすると、作製した CMG のプロトンの同じ範囲での積分強度が 24.64 であり、プロトンの積分強度の増加が見られた。これにより、DG にカルボキシメチル基が導入されたことが確認された。

以上の結果を用いて、置換度を求めた。

-OH が -OCH₂OO に置換されるので、置換された部分はプロトン 2 個分増加することから、置換度は下記の式を用いて求めることができる。

$$\text{置換度} = [\text{CMG のプロトンの積分強度} - \text{DG のプロトンの積分強度}] / 2$$

この式より、作製した CMG の置換度は、

$$\frac{24.64 - 20}{2} = 2.32$$

であった。

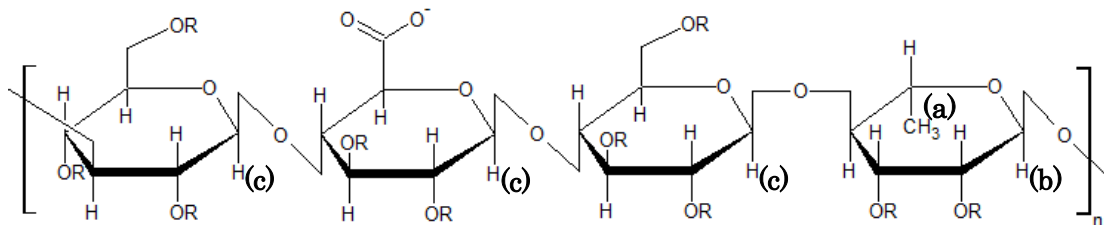
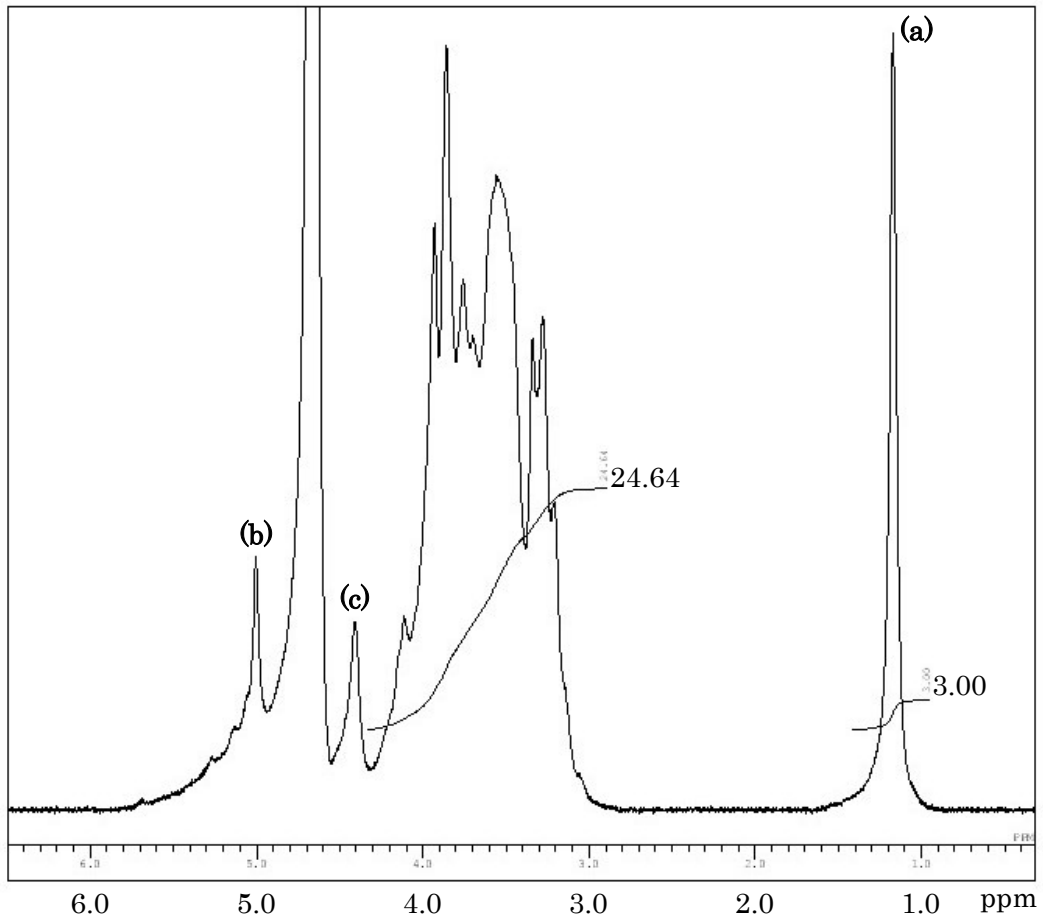


Figure 3-1 カルボキシメチルジェランの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

3-2 GSの作製

DMFを溶媒、クロロスルホン酸を酸化剤としてフリー化ネイティブ型ジェランの遊離の水酸基に対して硫酸化を行った結果をTable 3-1で示す。

Entry	Free NG(g)	クロロスルホン酸(mL)	反応温度 t1, t2(°C)	収量(g)	硫酸化率(%)	収率 (%)
1	1.00	3.75	70, 50	0.48	8.57	44.98
2	1.00	3.75	80, 60	0.76	25.44	71.35

Table 3-1 作製した硫酸化ネイティブ型ジェラン

反応開始温度および反応温度を低くして作製を行ったEntry 1は硫酸化率8.57%と硫酸化率の低いGSを得ることができた。

反応開始温度と反応温度を上げて作製を行ったEntry 2においては硫酸化率25.44%と、Entry 1と比較して硫酸化率の高いGSを得ることができた。

3-3 髄核細胞の増殖

NPの累積分裂回数および倍化日数を算出した結果を示す。

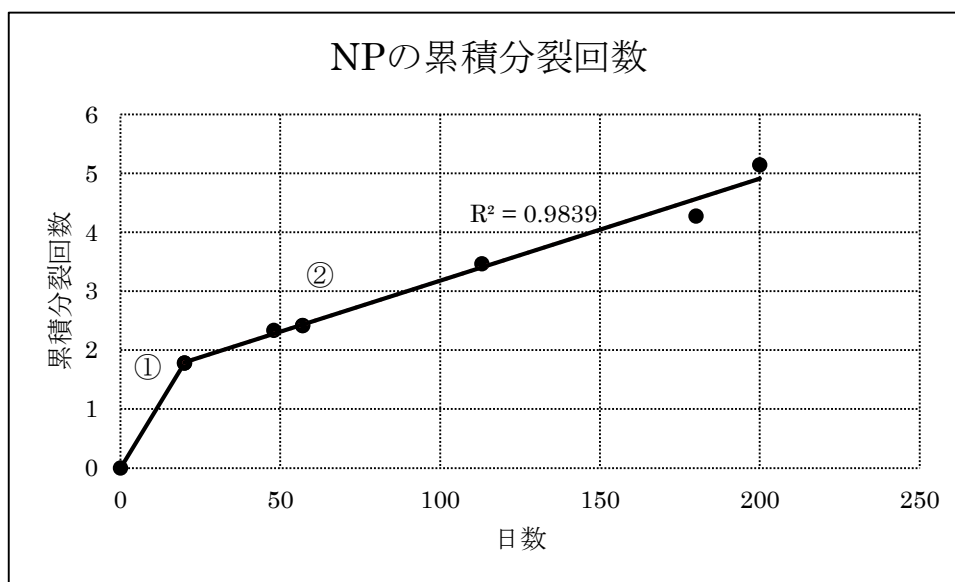


Figure 3-2 髄核細胞の累積分裂回数

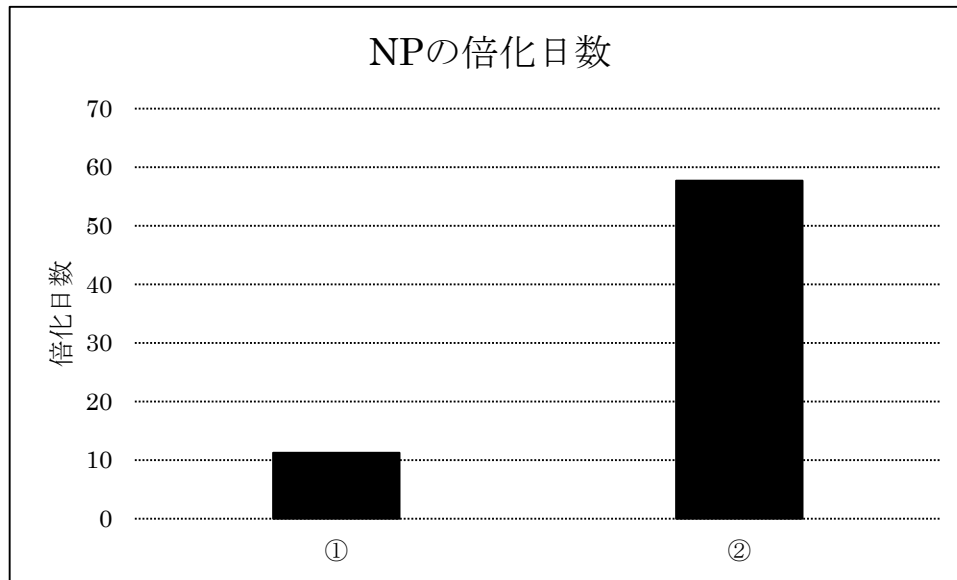


Figure 3-3 髓核細胞の倍化日数

培養初期段階①においては倍化日数 11 日だが、その後②の段階になると倍化日数 58 日と増殖速度が大きく低下した。

3-4 髄核細胞の単層培養における形態変化

GS を添加して 7days 培養を行った後の細胞写真を Figure 3-4 に示す。Control は GS を添加せずに培養を行ったものである。

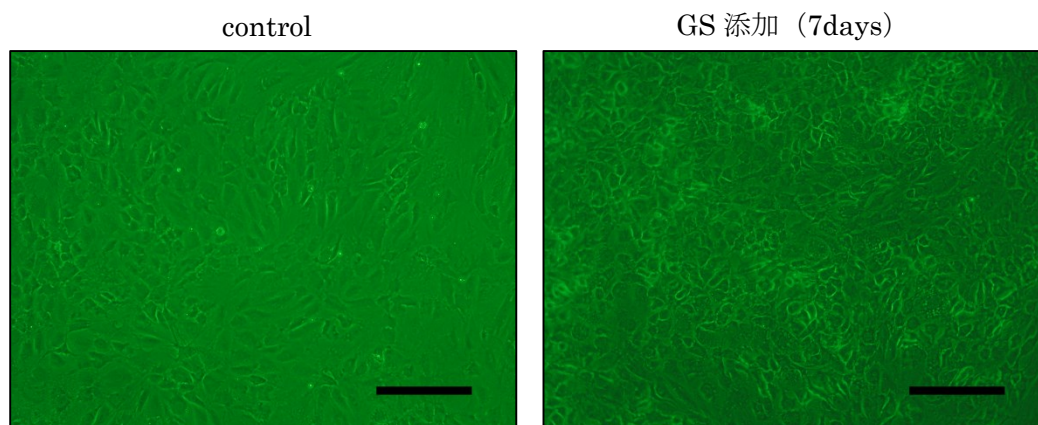


Figure 3-4 GS 添加による髄核細胞の形態変化 (scale bar = 250 μ m)

Figure 3-4 の写真から細胞面積を算出したグラフを Figure 3-5、真円度を算出したグラフを Figure 3-6 に示す。細胞面積および真円度は GS 添加サンプルでは Figure 3-4 中の任意の 47cells、control では 31cells より算出した。

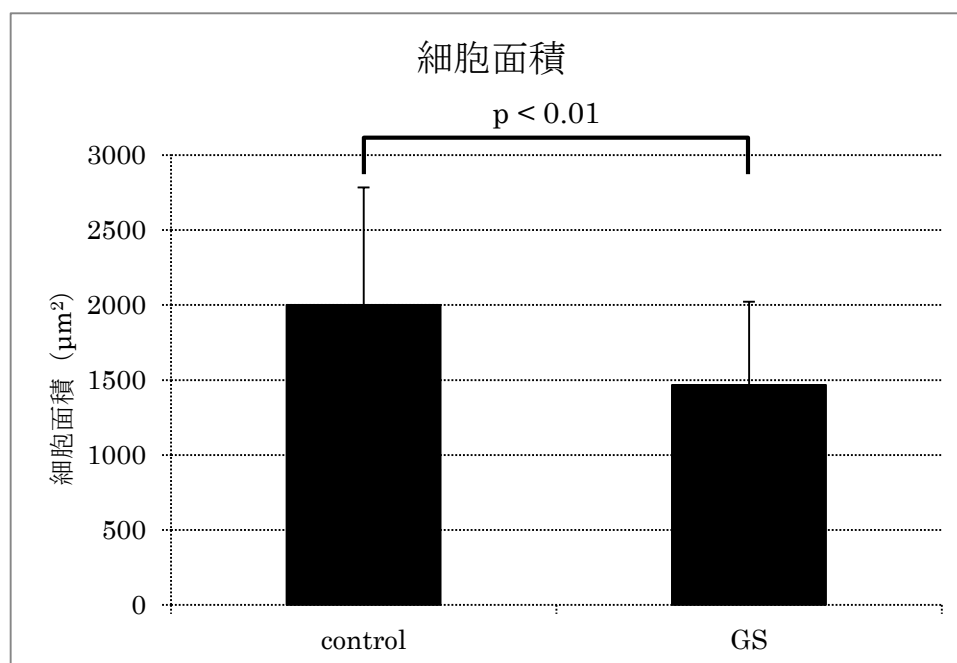


Figure 3-5 GS 添加による髄核細胞の細胞面積

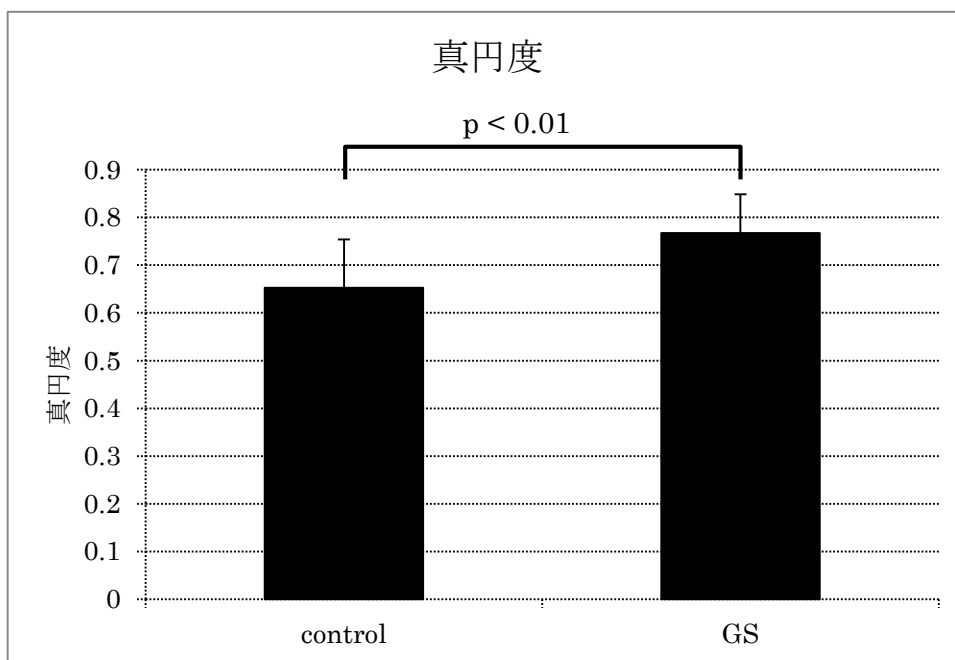


Figure 3-6 GS 添加による髄核細胞の真円度

GS の添加により細胞面積が有意に減少し、真円度が有意に増加した。

3-5 髄核細胞の単層培養における遺伝子発現

髄核細胞を平面足場で所定期間培養を行い、real-time PCR によりマーカー遺伝子の発現量を測定した結果を示す。

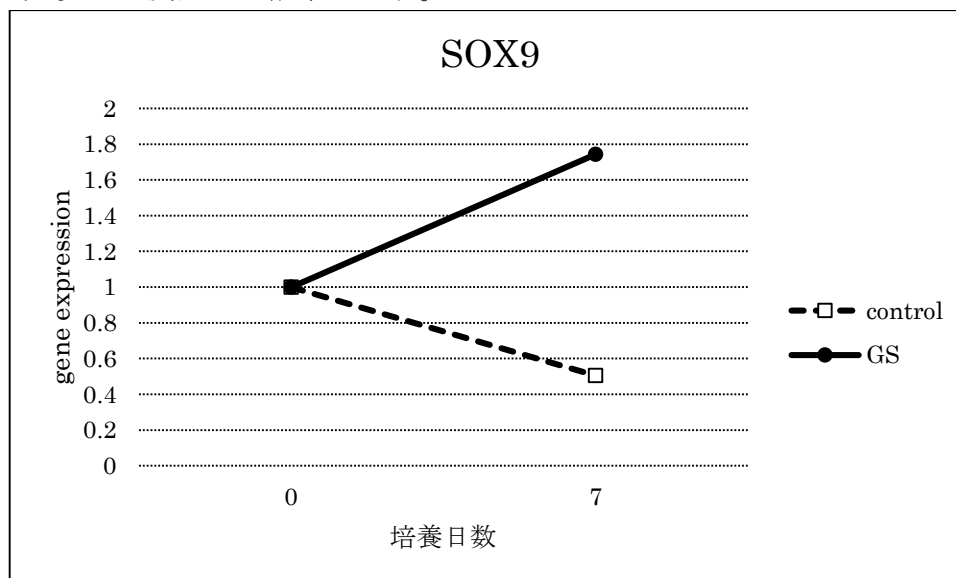


Figure 3-7 Sox9 の遺伝子発現

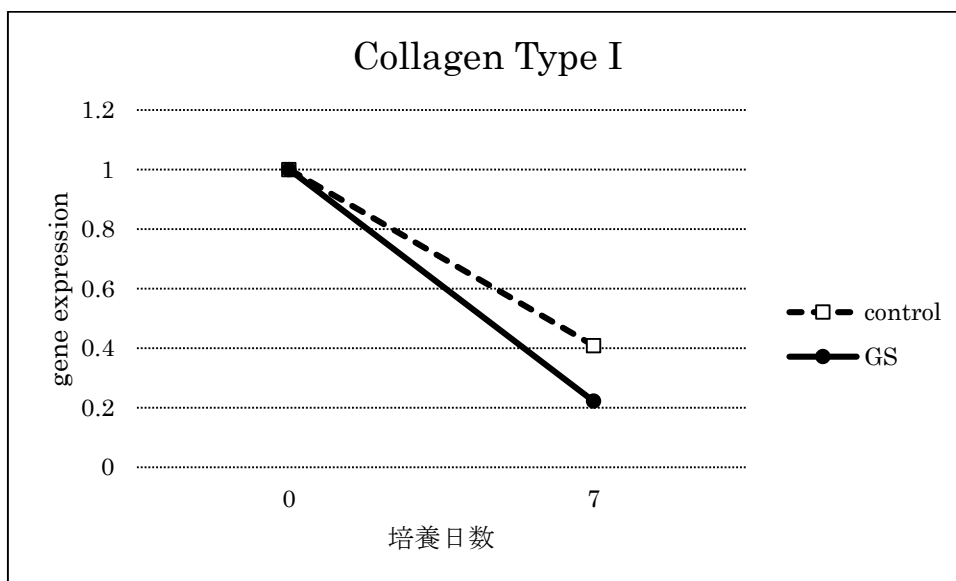


Figure 3-8 Coll の遺伝子発現

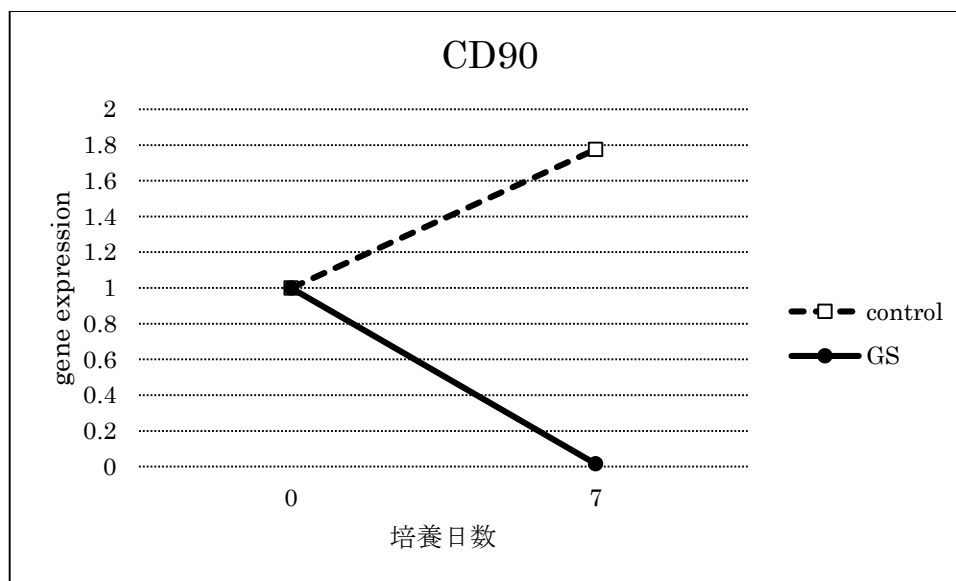


Figure 3-9 CD90 の遺伝子発現

単層培養を行うことで Sox9 の発現量の減少が見られたが、GS の添加により発現量減少が抑えられた (Figure 3-7)。脱分化マーカーの Collagen Type I (Figure 3-8)、CD90 (Figure 3-9) は GS を添加することにより発現量の減少が見られた。

3-6 髄核細胞の単層培養における sGAG 産生

1cell あたりの sGAG の産生量を Figure 3-10 に示す。

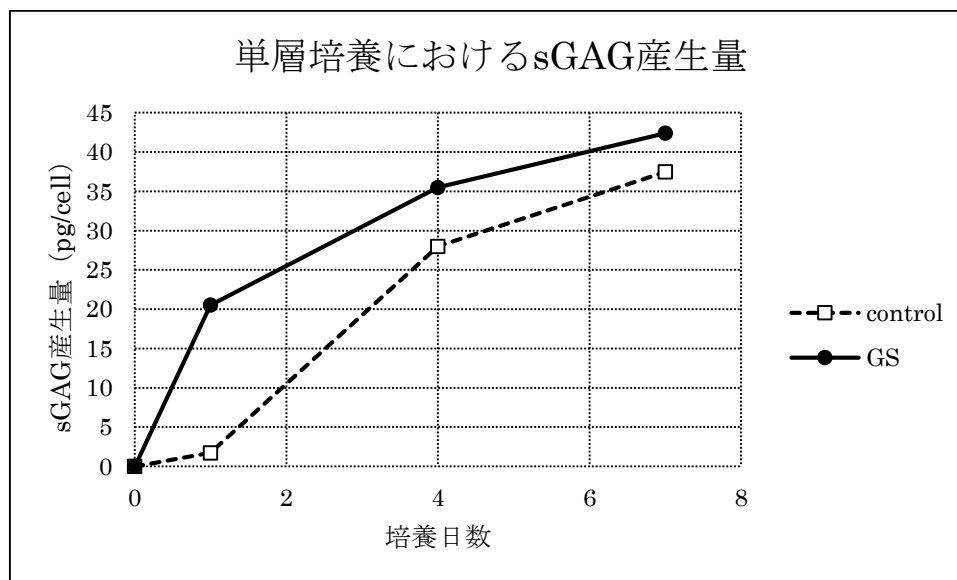


Figure 3-10 単層培養における sGAG の産生量

GS を添加したサンプル(GS)では、添加していないサンプル(control)と比較して1cell あたりの sGAG 産生量が増加した。

3-7 GS-CMG ゲルビーズ内で培養した髄核細胞の遺伝子発現

ゲルビーズ内で所定期間培養した髄核細胞のマーカー遺伝子発現量を測定するために real-time PCR を行った結果を示す。

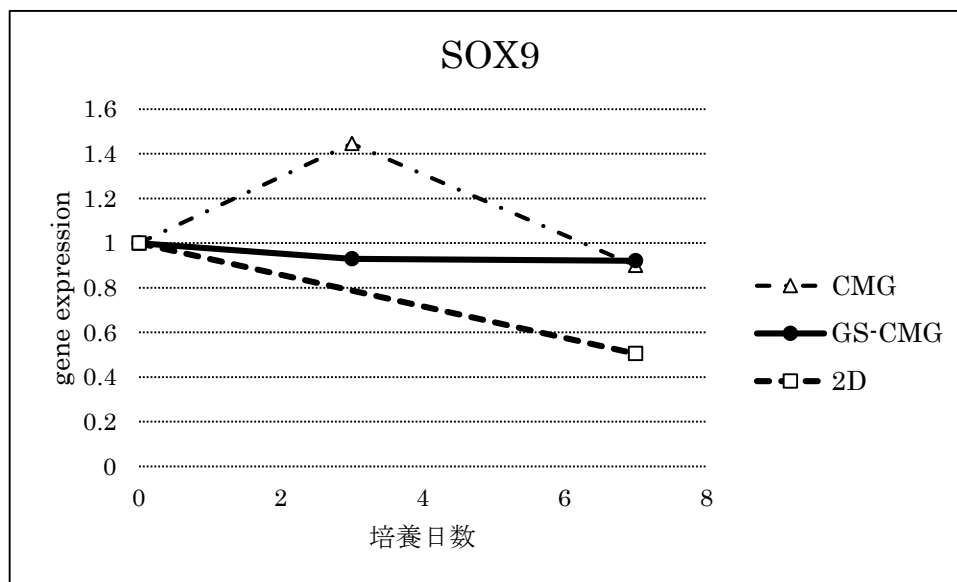


Figure 3-11 ゲルビーズ内培養による Sox9 の遺伝子発現

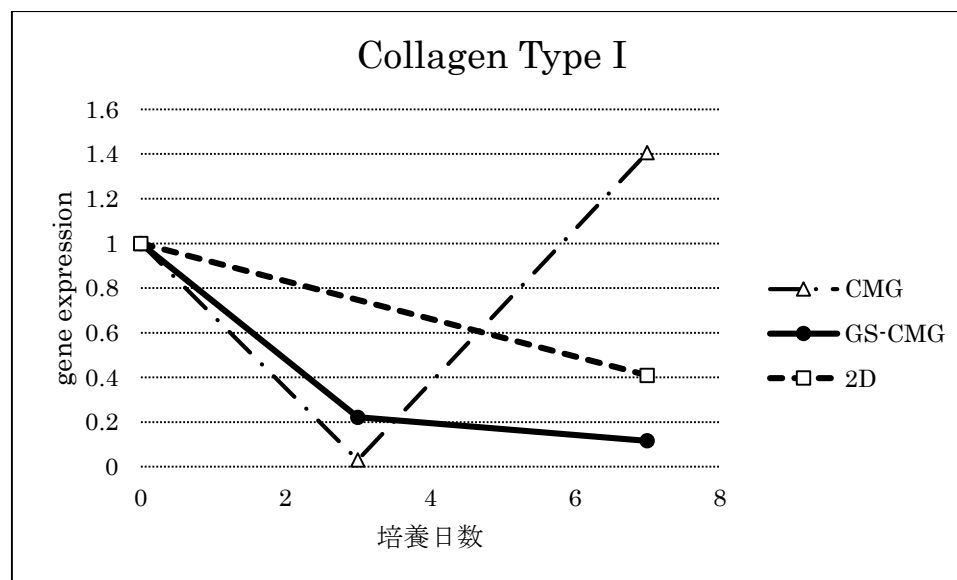


Figure 3-12 ゲルビーズ内培養による Coll の遺伝子発現

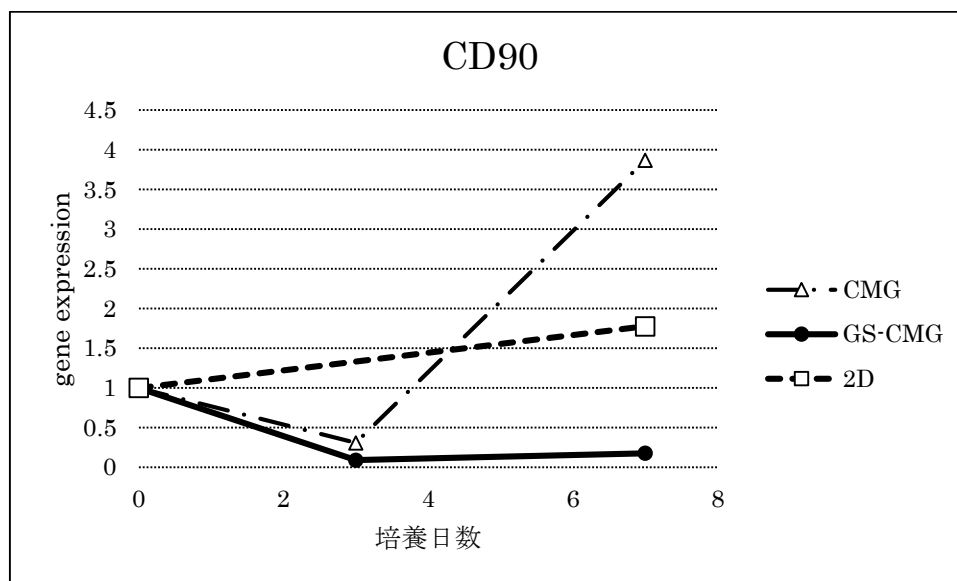


Figure 3-13 ゲルビーズ内培養による CD90 の遺伝子発現

分化マーカーの Sox9 の遺伝子発現は単層培養を行うことで減少が見られたが、CMG および GS-CMG ゲルビーズ内での 3D 培養では発現量の減少が見られず培養 0 日の発現量を維持した (Figure 3-11)。

脱分化マーカーの Collagen Type I の遺伝子発現は培養 7 日目において CMG ゲルビーズでは 1.4 倍の増加が見られたが、GS-CMG ゲルビーズでは培養 0 日の 0.04 倍と大幅な減少が見られた (Figure 3-12)。

同じく脱分化マーカーの CD90 についても培養 7 日目において GS-CMG ゲルビーズで 0.02 倍と減少が見られた。CMG ゲルビーズ培養では 7 日目に 3.9 倍の発現量の増加が見られた (Figure 3-13)。

3-8 GS-CMG ゲルビーズ内で培養した髄核細胞の sGAG 産生

ゲルビーズ内で培養を行った細胞 1cell あたりの sGAG 産生量を Figure 3-13 に示す。

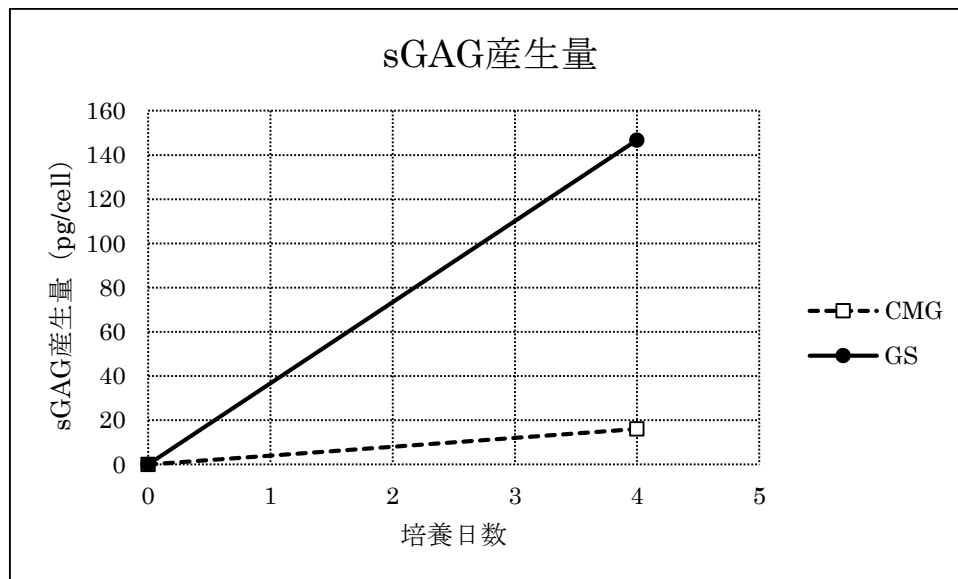


Figure 3-14 ゲル内培養における sGAG 産生量

CMG ゲルビーズ内培養と比較して GS-CMG ゲルビーズの方が 1cell あたりの sGAG 産生量が増加した。

4. 考察

4-1 髓核細胞の増殖

本研究で使用した髓核細胞は培養初期段階において、倍化日数 11 日で、その後倍化日数 58 日と増殖速度が低下した (Figure 3-3)。髓核細胞は組織から単離して単層培養 (2D 培養) を行うと速い速度で増殖し、しばらく経つと増殖速度が落ちることが分かる。これは組織中では三次元の環境にある細胞を平面で培養を行うことによって引き起こされた脱分化による形質の変化に由来するものと考えられる。

以下にブタ髓核細胞の累積分裂回数 (Figure 4-1) および倍化日数 (Figure 4-2) のグラフを示す。ブタ髓核細胞においては、ブタの髓核組織から髓核細胞を単離した日を 0 日として、Passage 0 からのデータを示す。

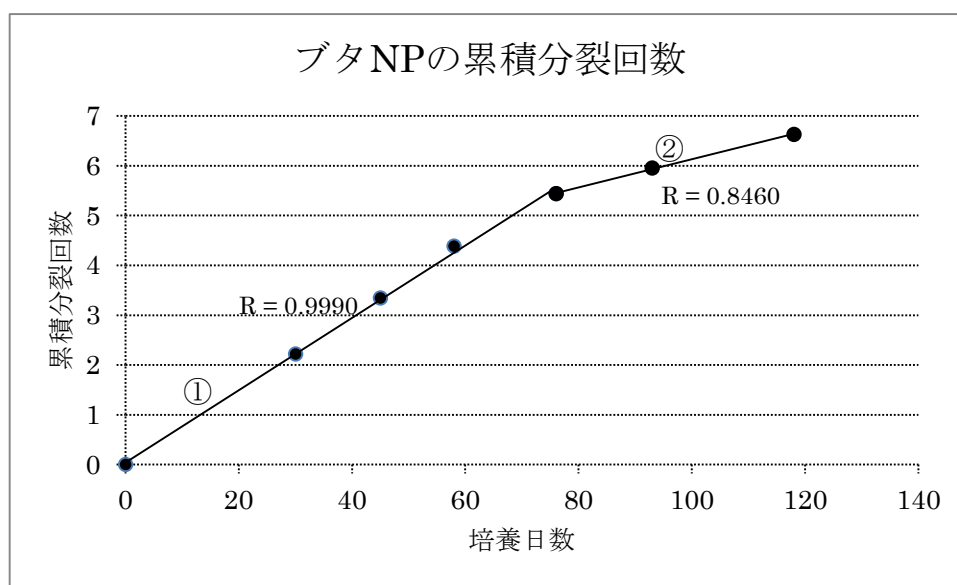


Figure 4-1 ブタ髓核細胞の累積分裂回数

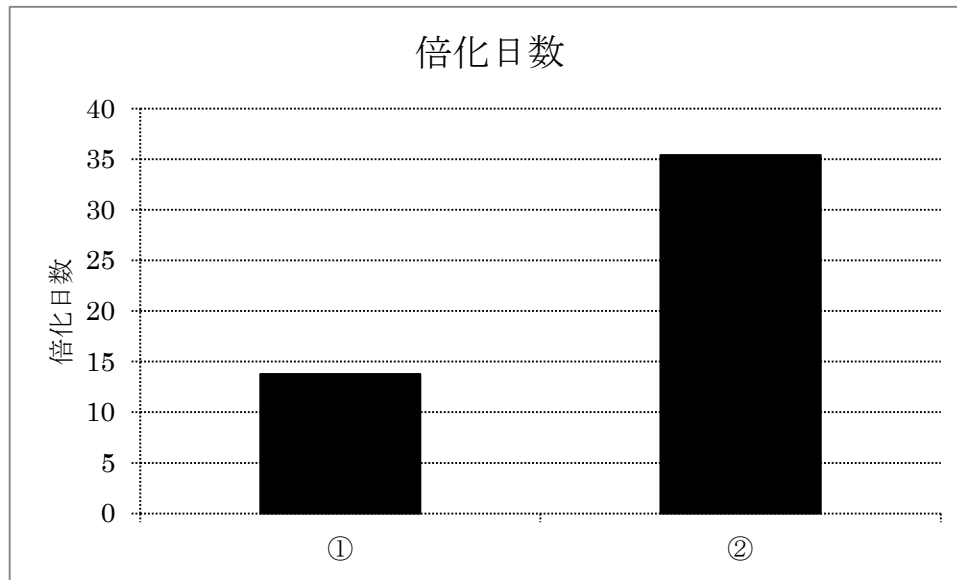


Figure 4-2 ブタ髄核細胞の倍化日数

ブタの髄核細胞においても培養期間が長くなると増殖が遅くなるというヒト髄核細胞と同様の結果が得られた。今回提供を受けたヒト髄核細胞は既に数回の継代を経たものであるため、増殖速度の低下がブタ髄核細胞より早い時期に見られる。すなわち、細胞の提供を受けた時点で既に単層培養による影響を受けていたと考えられる。

以上より髄核細胞は培養初期段階では倍化日数 10 日程度だが培養を進めるに伴って増殖速度が遅くなることが分かった。臨床で患者の細胞を増殖させることを考慮すると、正常な髄核細胞が少量しか採取できない患者に対しては増殖に時間が掛かりすぎることから、増殖因子の添加など培養期間の短縮を考える必要がある。

4-2 単層培養におけるGSの髄核細胞に対する作用

GSの添加により分化マーカーであるSOX9 (Figure 3-4)の発現の減少が抑制され、また、脱分化マーカーであるCollagen type I (Figure 3-5)およびCD90 (Figure 3-6)の発現増加が抑制された。このことより、GSは脱分化した髄核細胞の再分化を促進させる効果があることが示唆される。

加えて、以下に軟骨細胞にIL-1 β を添加して炎症を誘導することによって脱分化を引き起こしたモデルを示す^[10]。

脱分化を引き起こした軟骨細胞にコンドロイチン硫酸(CS)を加えることにより、アグリカン分解酵素であるADAMTS-4およびADAMTS-5、コラーゲン分解酵素であるMMP-13の発現量が減少すると報告されている (Figure 4-3)。また、CS添加によりIL-1 β 添加によるaggrecanの産生減少を抑制する効果も報告されている (Figure 4.4)。CSは軟骨破壊を促進させる分解酵素の産生を抑えると共に分化状態を維持することで基質の産生を促進させていると考えることができる。

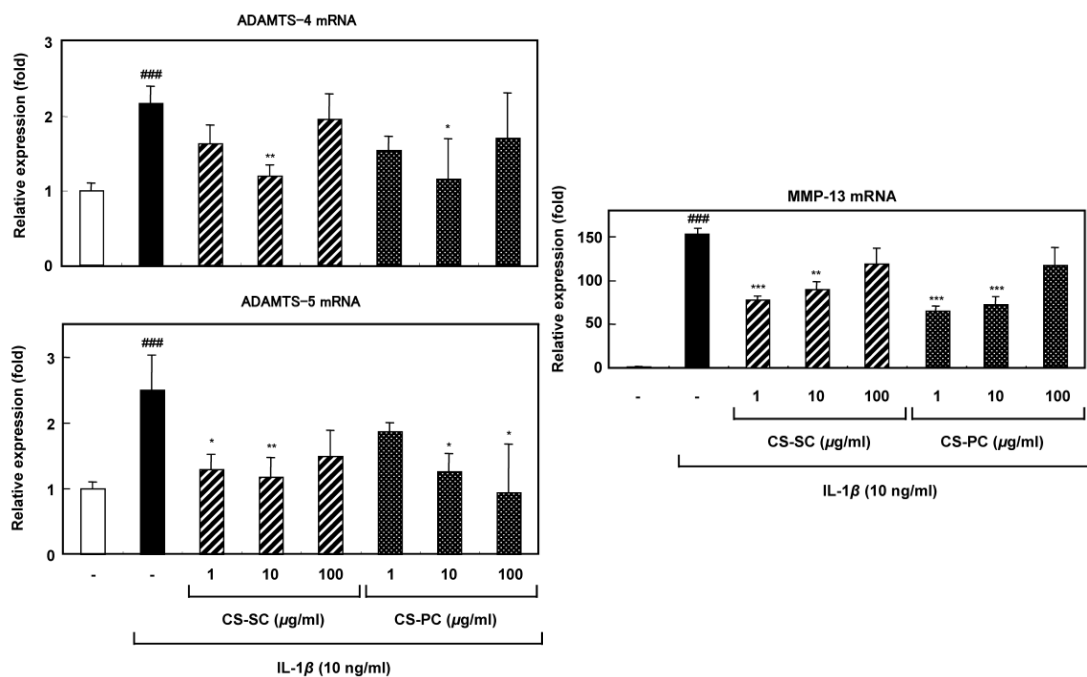


Figure 4-3 コンドロイチン硫酸添加による抗炎症作用^[10]

CS-SC: サメ由来のコンドロイチン硫酸, CS-PC: ブタ由来のコンドロイチン硫酸

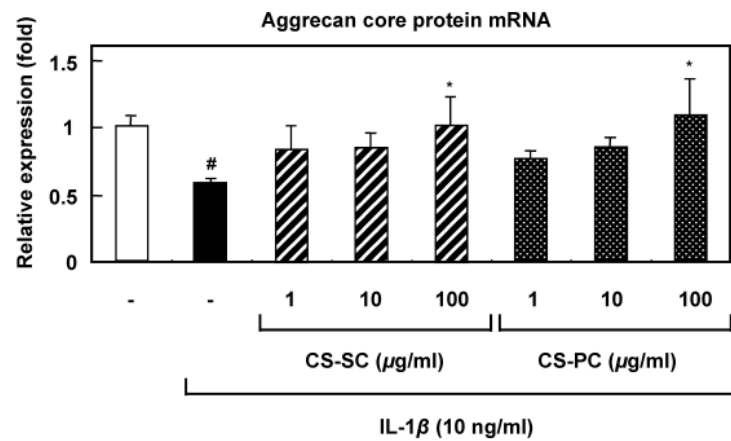


Figure 4-4 コンドロイチン硫酸添加による aggrecan 産生の変化^[10]

GS は再分化を促進させる効果を有すると共に、CS と同様にこうしたアグリカン分解酵素やコラーゲン分解酵素の産生を抑え、脱分化を抑制する効果も有することが考えられる。

4-2-1 bFGF による応答

髄核細胞の脱分化を促進する物質として塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF) が報告されている。bFGF は MAPK 経路の活性化によりコラーゲン分解酵素である MMP-13 の産生をアップレギュレーションさせ、髄核の基質の分解を促進させる。また、BMP シグナル経路の活性化を阻害し髄核基質の産生をダウンレギュレーションさせると報告されている (Figure 4-5)^[11]。

bFGF はヘパリン結合性のタンパク質であることが知られており、また過去の研究より硫酸化ネイティブ型ジェランとの親和性も報告されている (Table 4-1)^[12]。

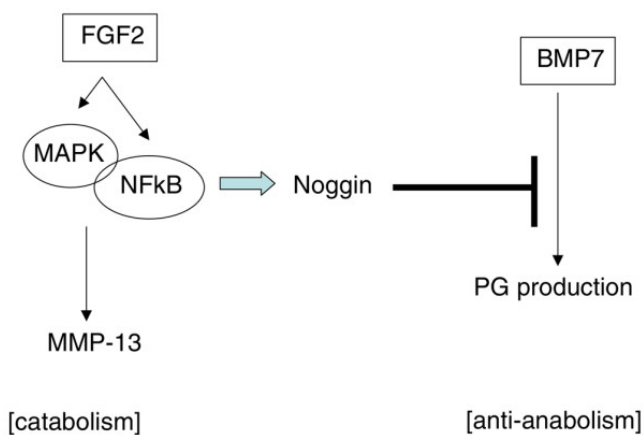


Figure 4-5 bFGF が IVD に与える影響^[11]

Table 4-1 GS と bFGF の結合定数^[12]

Entry	硫酸化率 (%)	結合定数 (M)
1	6.6	5.99E+08
2	14.8	7.51E+08
3	20.2	3.30E+08
4	28.7	9.35E+08
5	33.6	1.28E+09

bFGF はレセプターである FGFR、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) のヘパラン硫酸 (HS) 鎖と bFGF-HS-FGFR 三量体を形成することによりシグナルが伝達されると考えられている (Figure 4-6)^[13]。GS は bFGF と HS 鎖の結合と競合することで bFGF-HS-FGFR 三量体の形成を阻害し、bFGF のシグナル伝達を阻害していると考えられる (Figure 4-7)。変形性関節症の軟骨細胞において膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンである syndecan-4 の発現が報告されており^[14]、脱分化した軟骨細胞では bFGF のシグナルが入りやすくなっていると考えられる。

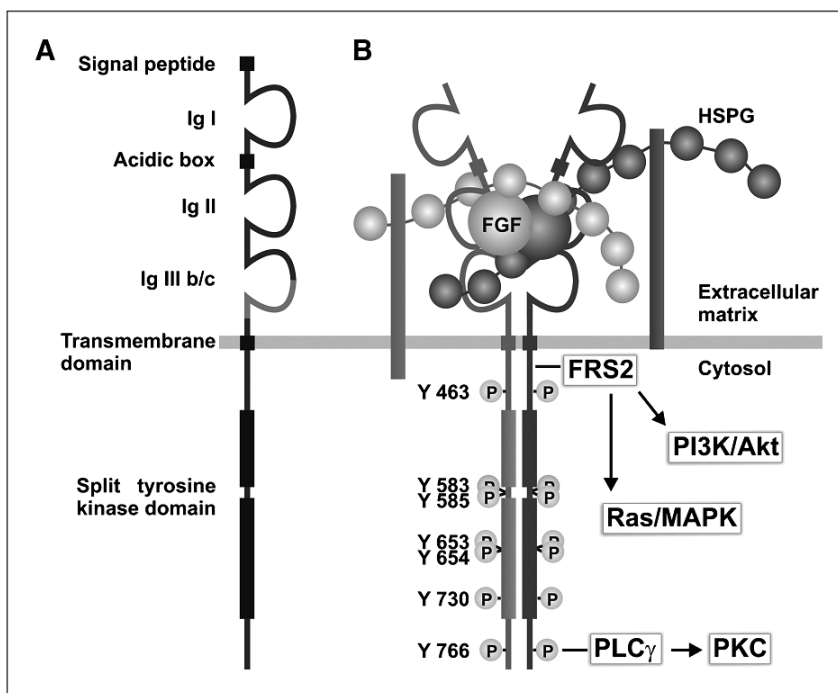


Figure 4-6 bFGF-HS-FGFR 三量体形成^[13]

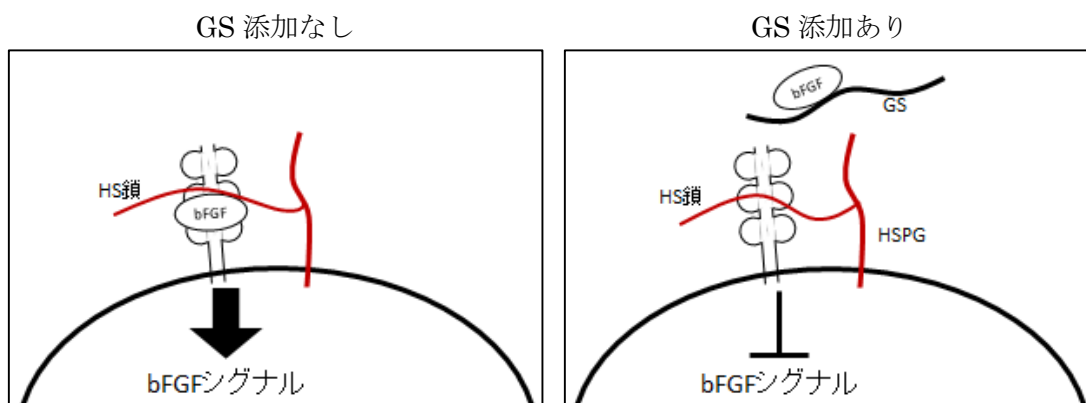


Figure 4-7 GS による bFGF 阻害

実際に Passage 2 のブタ髄核細胞に bFGF を 2ng/mL で添加を行ったところ、線維芽様の形態を取ったが、100 μ g/mL で硫酸化率 29.14% の GS を添加したところ本来の髄核細胞に近い円形の形態を取ることが示された (Figure 4-8)。この画像を元に真円度を算出したところ、GS の添加により有意に上昇した (Figure 4-9)。真円度の算出は、bFGF は画像中の任意の 31cells、bFGF+GS は 44cells より算出した。

これにより、bFGF を添加した細胞においても GS は再分化を誘導していることが示唆される。

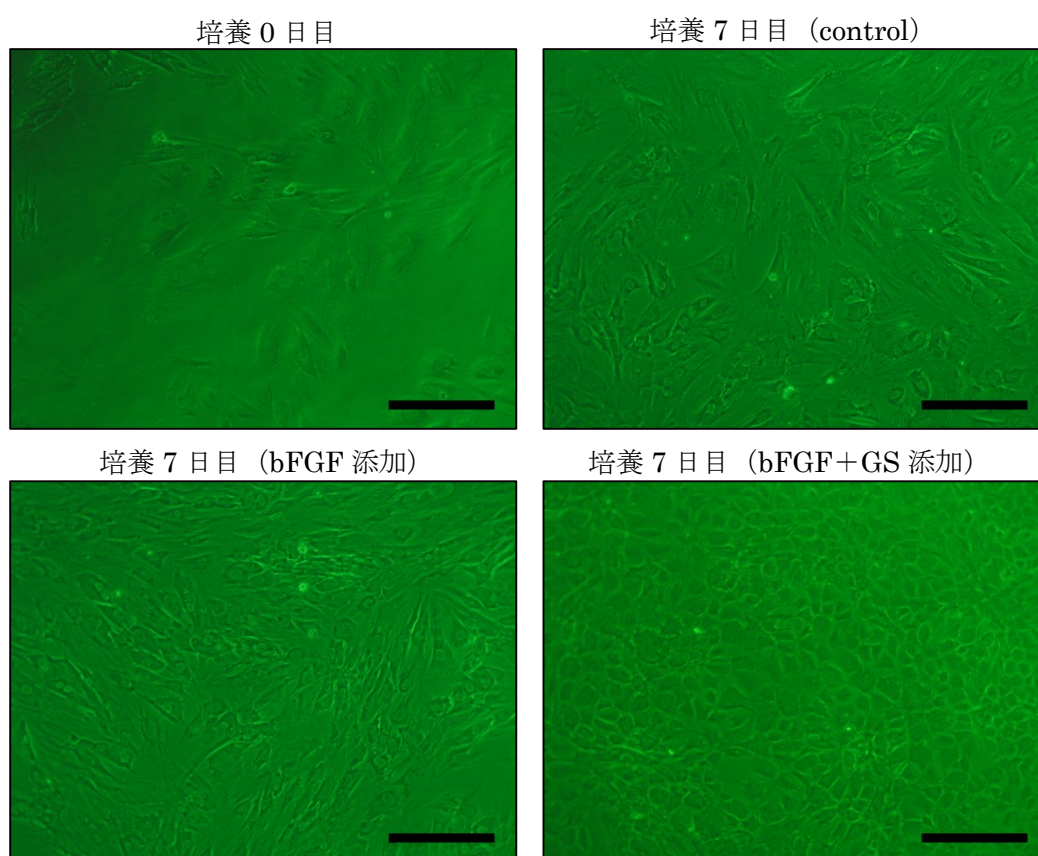


Figure 4-8 ブタ髄核細胞への bFGF 添加 (Scale bar 250 μ m)

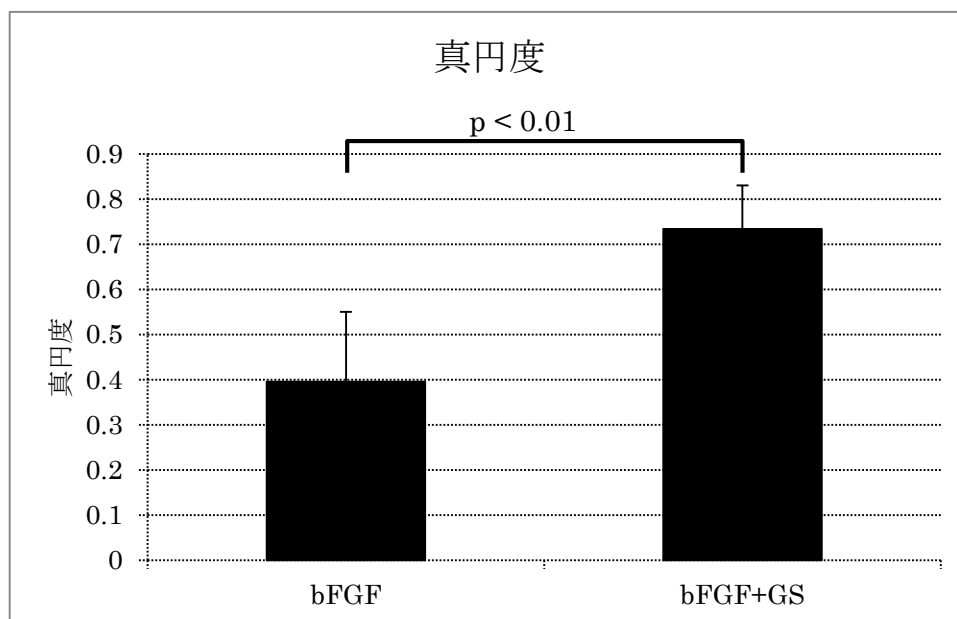


Figure 4-9 bFGF および GS 添加による真円度

また、Passage 2 のブタ髄核細胞に bFGF を添加して培養を行い、倍化日数を求めた。添加していないサンプル(control)の倍化日数 17.6 日に対し、bFGF を添加したサンプルでは 6.0 日と短く、増殖能が高いことが分かった (Figure 4-10)。bFGF の添加により脱分化が進行すると考えられるが、同時に増殖能を高める効果も期待できるので、臨床で患者の細胞を増殖させる際に添加することで、培養期間の短縮が期待できる。

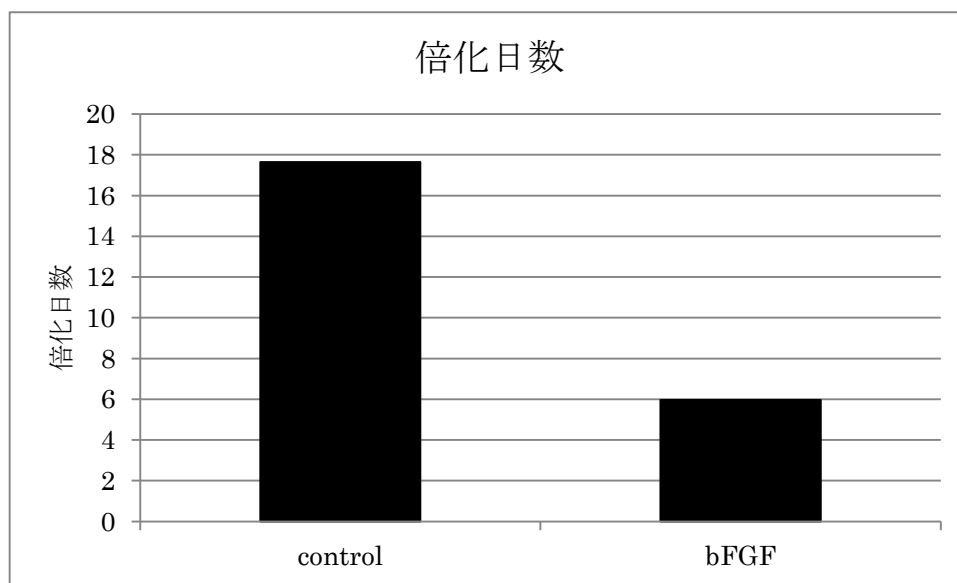


Figure 4-10 bFGF 添加による倍化速度

4-2-2 BMP-7 および noggin による応答

軟骨の誘導因子として報告されている骨形成因子 7 (bone morphogenetic protein 7; BMP-7) のアンタゴニストである noggin とヘパリンとの親和性が報告されている^[15]。Noggin の構造は Figure 4-12 の白色部分でグリーン部分は BMP-7 を表している。Noggin は Figure 4-12 の上部の四角で囲まれた部分にヘパリンとの結合部位を持つ^[16]。

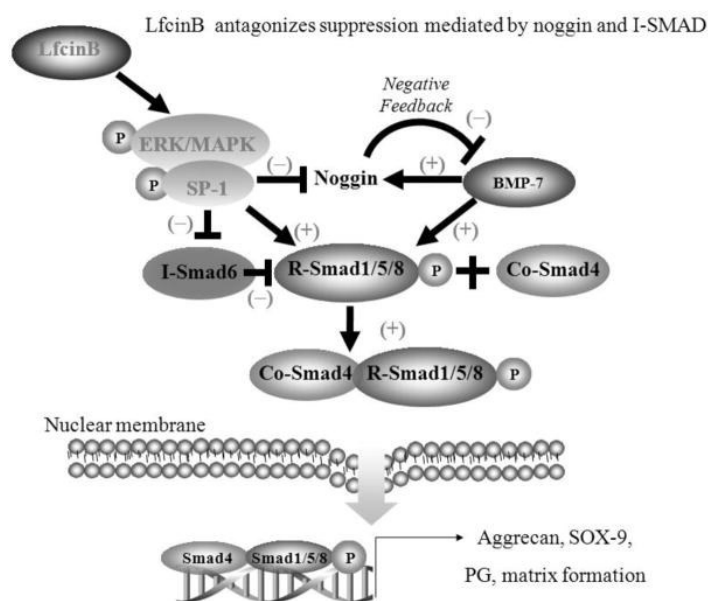


Figure 4-11 BMP-7 による髄核基質産生^[15]

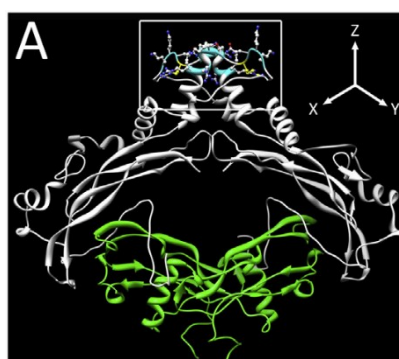


Figure 4-12 noggin の構造^[16]

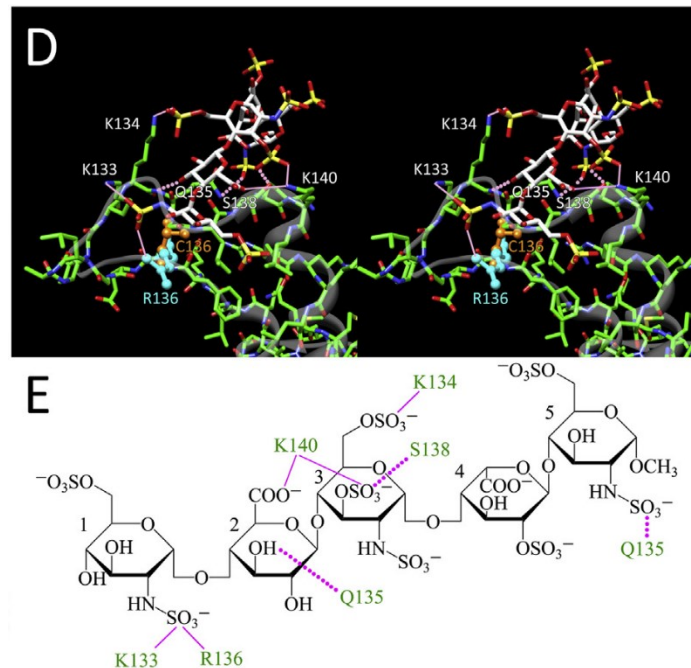


Figure 4-13 noggin とヘパリンの結合^[16]

Noggin は細胞表面のプロテオグリカンに補足されており、BMP のシグナルが入るのを抑制している。細胞から細胞外のプロテオグリカンの硫酸基を分解する細胞外スルファターゼ (Sulf) により硫酸基とともに切り離されることにより BMP のシグナルが細胞内に入るようになる^[17]。

4-2-3 Wnt による応答

Wnt-3a や Wnt-7a といった Wnt ファミリーのシグナル分子により制御される Wnt シグナル経路により基質産生が誘導されるといった報告がなされている^[18,19]。

Wnt-3a および Wnt-7a は硫酸化多糖との親和性を持ち、細胞外スルファターゼ (Sulf) によって細胞外のプロテオグリカンの硫酸基を分解し、プロテオグリカン糖鎖の硫酸化率を調節することで Wnt シグナル経路の制御をしていると報告されている。Wnt はヘパラン硫酸 (HS) 鎖、Wnt のレセプターである Frizzled と Wnt-HS-Frizzled 三量体を形成してシグナルが ON になると考えられているが、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) のコンドロイチン硫酸鎖 (CS) に結合することで HS との結合を阻害し、Wnt のシグナルが入るのを抑制している。Sulf が作用すると CS の硫酸基の分解が起こることにより、CS 鎖に捕捉されていた Wnt が遊離し Wnt-HS-Frizzled 三量体を形成して Wnt のシグナルが ON になると考えられている^[20]。

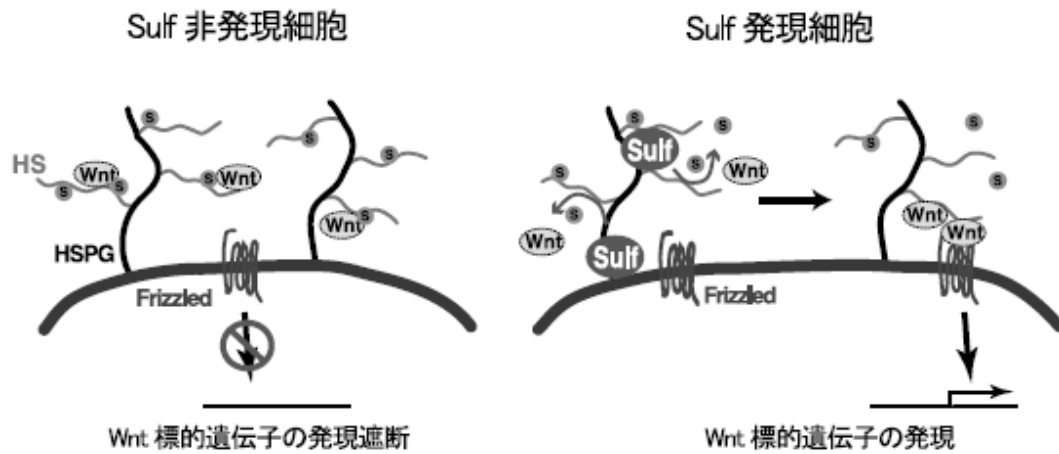


Figure 4-14 Sulf による Wnt シグナルの制御^[20]

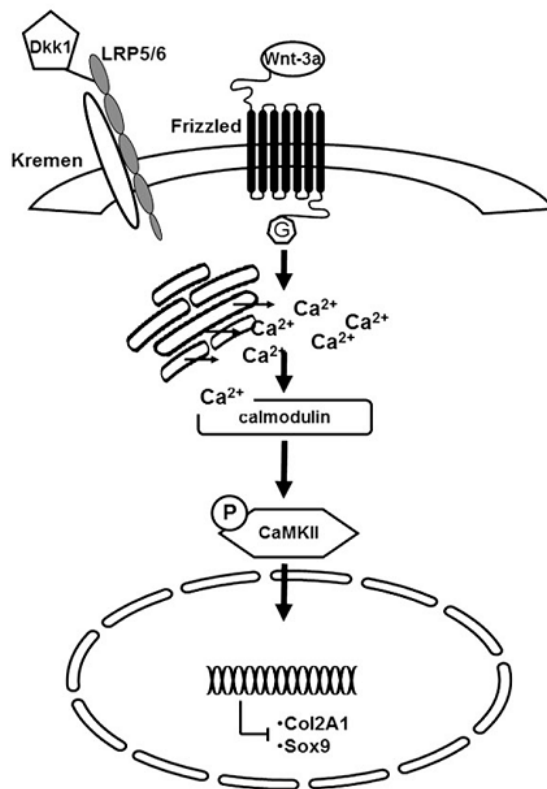


Figure 4-15 Wnt による Col2、Sox9 の発現抑制^[21]

4-3 GS-CMG ゲルビーズ内培養

4-3-1 三次元足場の髄核細胞に対する作用

髄核細胞をゲルビーズ内で培養を行うことにより分化マーカーである SOX9 (Figure 3-11) の遺伝子発現量の維持、ECM である aggrecan (Figure 3-14) の産生量の増加が見られた。これはゲルビーズ内培養により脱分化が抑制されていることを意味する。

軟骨細胞に対して siRNA により各種 integrin の発現をノックダウンし単層培養を行ったところ、Figure 4-16 に示すように integrin α v (ITGAV) および integrin β 5 (ITGB5) をノックダウンしたサンプルにおいて Collagen type II および Aggrecan の遺伝子発現が増加したと報告されている^[22]。また、Figure 4-16 に示すように、integrin α v (ITGAV) および integrin β 5 (ITGB5) のノックダウンにより線維芽細胞様への形態変化が抑制されると報告されている。

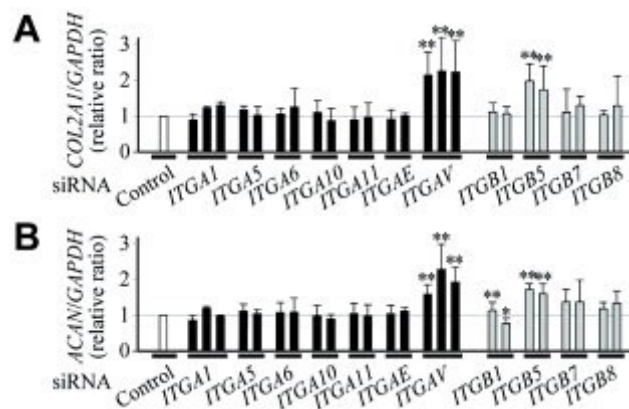


Figure 4-16 integrin のノックダウンによる軟骨基質の遺伝子発現^[22]

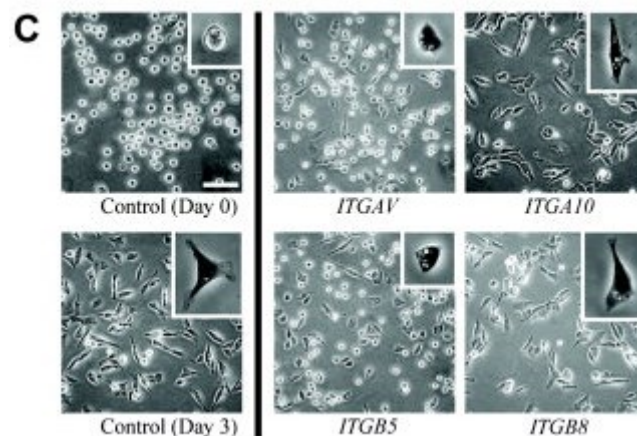


Figure 4-17 integrin のノックダウンによる形態変化^[22]

髓核細胞においても単層培養における脱分化に integrin αv および integrin $\beta 5$ の関与が考えられる。Integrin $\alpha\beta 5$ は Type IIB procollagen の N 末端ペプチドと結合するが、正常な軟骨細胞では integrin $\alpha\beta 5$ が発現せず自らの産生した Type II collagen の影響を受けないと報告されている^[23]。

本研究で作製した GS-CMG ゲルおよび CMG は細胞接着性を持たないため、単層培養により発現した integrin $\alpha\beta 5$ に由来するシグナル伝達が抑制され、再分化へと誘導されたと考えられる。

単層培養においても Figure 3-5 に示したように GS を添加した髓核細胞において、細胞面積が減少し、Figure 3-6 に示したように GS 添加により線維芽細胞様の形態を取らずに髓核本来の円形の形態を取った。また、Figure 4-9 に示したように、GS は bFGF を添加して増殖能が上がった細胞に対しても円形の形態に変化させる機能があることが示唆される。

このことから、GS は髓核細胞の伸展を阻害し、髓核細胞本来の形態である円形の形態を保たせる効果があることが分かる。Figure 4-17 で示した integrin αv および integrin $\beta 5$ を阻害して単層培養を行った細胞様の形態を取っており、単層培養においても GS には integrin を阻害する機能があることが示唆される。

4-3-2 ゲルビーズ内での GS の作用

Figure 3-11 に示すように、ゲルビーズ内培養によって分化マーカーである Sox9 の発現量は維持されたが、GS を固定化していない CMG ゲルでは脱分化マーカーである Collagen type I (Figure 3-12) および CD90 (Figure 3-13) の発現量が増加したのに対し、GS-CMG ゲルでは分化マーカーの発現量維持と脱分化マーカーの発現量減少が同時に起こり、再分化へ向かっていることが示唆される。

これはゲルビーズによる三次元培養においても GS の再分化へと誘導する作用が維持されていることを意味する。

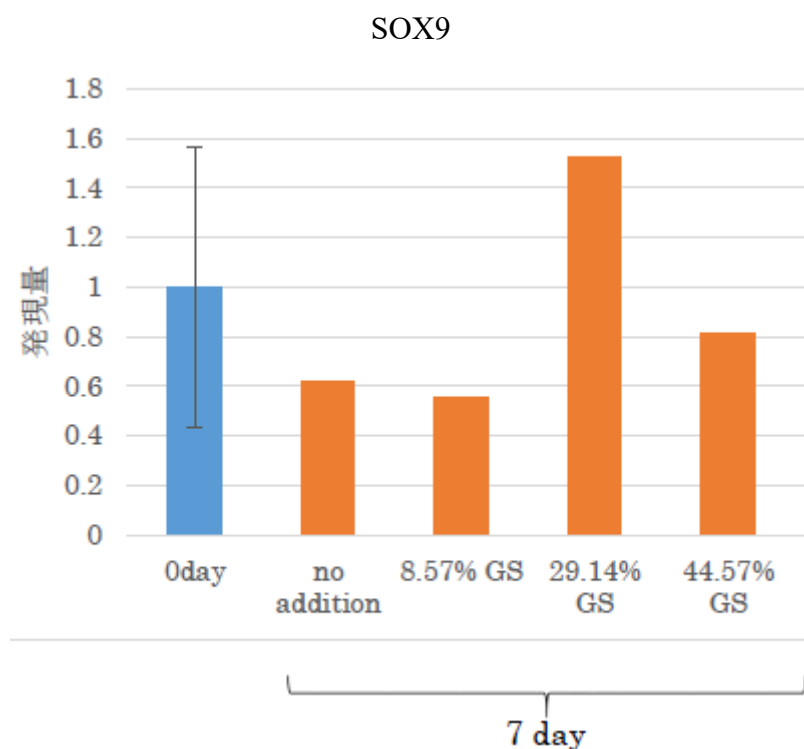


Figure 4-20 GS 添加による Sox9 の遺伝子発現^[24]

Figure 4-20 で示すように、単層培養を行っている髓核細胞に GS を添加したところ、29.14%の GS を添加したサンプルにおいて Sox9 の発現量が増加したことから、硫酸化率 30%前後の GS が最も再分化を促進させる作用が強いと考えられる。

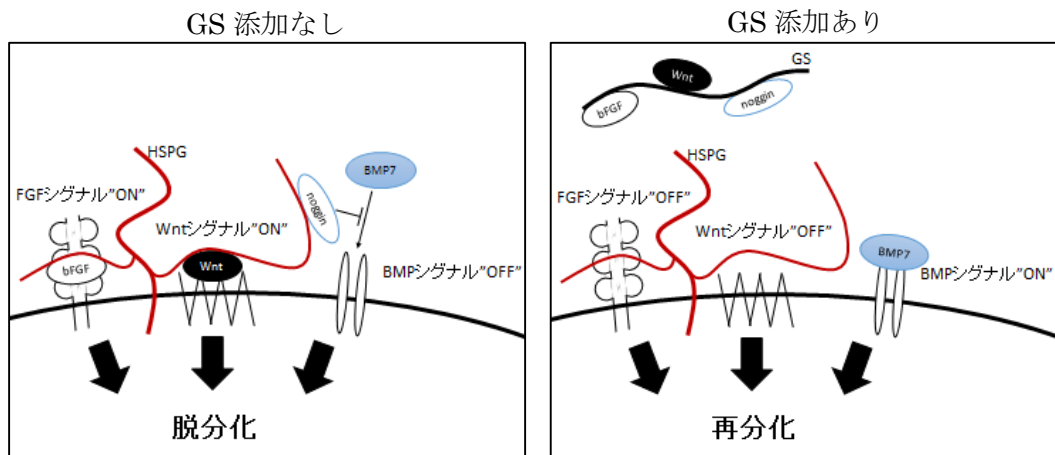


Figure 4-21 GS の髄核細胞への作用

GS は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) と複合体を形成することでシグナルが伝達され脱分化が進行する bFGF や Wnt と競合することで、脱分化が進行するシグナルの伝達を阻害していると考えられる。また、noggin と細胞表面のプロテオグリカンとの結合と競合することで noggin の細胞表面への凝集を阻害し、分化を誘導する BMP-7 のシグナルが伝達されたと考えられる (Figure 4-21)。

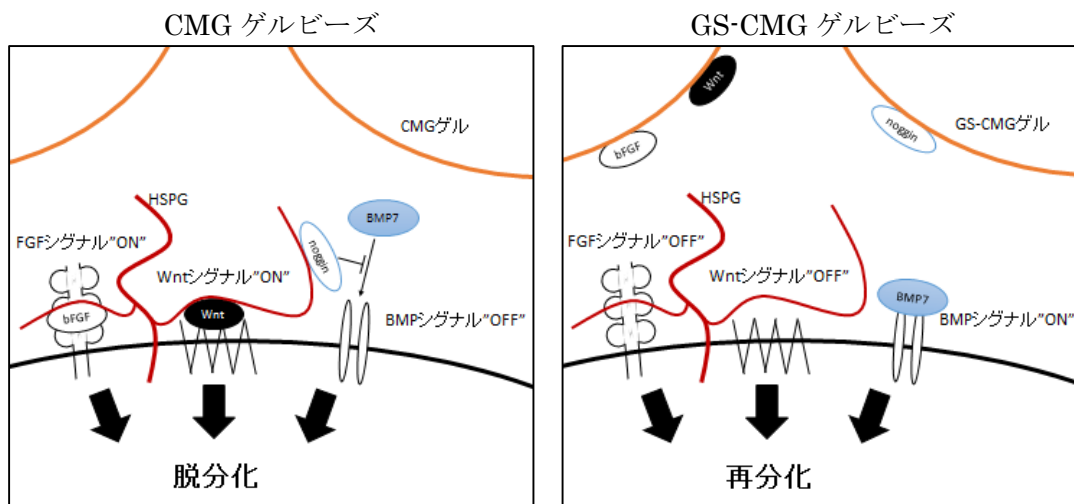


Figure 4-22 GS-CMG ゲルビーズの髄核細胞への作用

GS-CMG ゲルビーズは硫酸化多糖と親和性を持つ分子を吸着させる作用があると考えられる。その中で髄核細胞の分化・脱分化に関与していると考えられる bFGF や Wnt, noggin などが細胞周囲のゲルビーズに吸着することでそれらの細胞周囲の濃度が変化し、細胞を分化誘導したと考えられる (Figure 4-22)。

4-4 椎間板修復材料

本研究で作製したGS-CMGゲルビーズはシリンジにより容易にインジェクトできる材料であり、これを用いることで現在行われている手術療法のような広範囲の切開は不要となり低侵襲な治療を行うことができると期待される。また、患者自身の細胞を用いた治療となるので拒絶反応が起こりにくく、より安全な治療が可能になると考えられる。

GS-CMGゲルビーズに脱分化した髄核細胞を混和し、椎間板組織を模した培養チャンバーにインジェクトして培養を行うことで再分化が確認されたことから、生体へのインジェクトにより治療を行うことが可能である材料であることが期待できる。

実際に治療を行うにあたり問題となるのが、髄核細胞の増殖能の低さによる治療期間の長期化である。この問題の改善策として培地へのbFGFの添加が考えられる。bFGF添加により増殖能の上昇が見られ、またbFGFを添加した髄核細胞においてもGSの効果が見られたことから、患部から採取した髄核細胞にbFGFを添加して早急に増殖させ、GS-CMGゲルビーズに混和してインジェクトを行うことで短期間の治療が可能になることが期待できる。

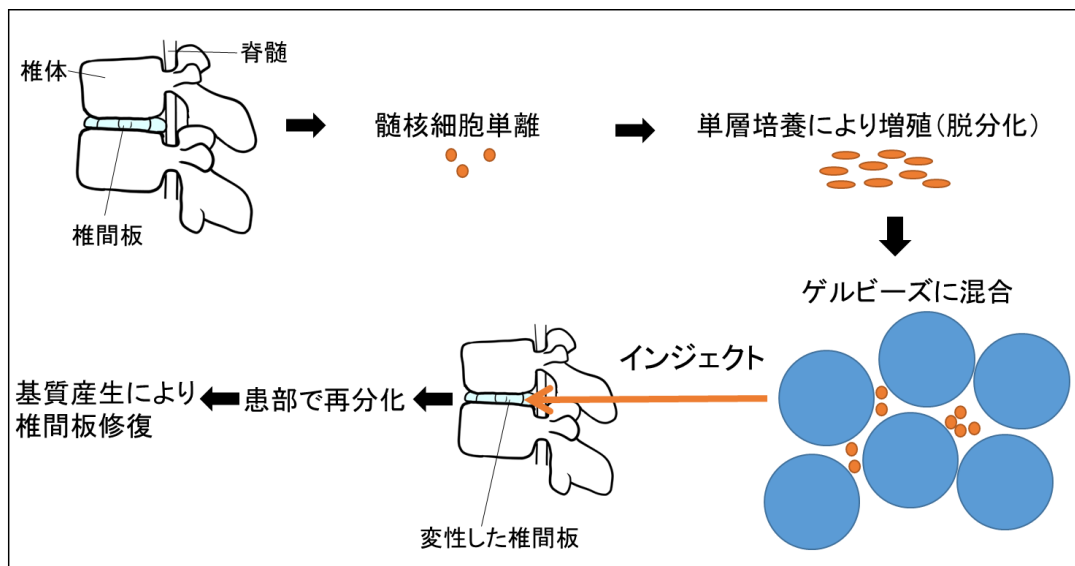


Figure 4-23 本研究で目指す治療法

5. 結論

以下、本研究において得られた結論を記載する。

- 硫酸化ネイティブ型ジェランは脱分化した髄核細胞を再分化誘導する作用があることが判明した。
- 髄核細胞の再分化に適した材料として硫酸化ネイティブ型ジェラン固定化カルボキシメチルジェランゲルビーズの開発に成功した。

6. 参考文献

1. Bin HE, *et al*: Normal and Degenerated Rabbit Nucleus Cells in in vitro Cultures: A biological Comparison. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2013 Apr;33(2):228-33
2. Ono Y, *et al*: Chondrogenic capacity and alterations in hyaluronan synthesis of cultured human osteoarthritic chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jun 14;435(4):733-9
3. D. Voet, *et al*: ヴォート基礎生化学 第3版, 東京化学同人(2010)
4. Yuan M, *et al*: Three-dimensional culture of rabbit nucleus pulposus cells in collagen microspheres. *Spine J.* 2011 Oct;11(10):947-60
5. 「FFI Reports ジェランガムの基礎と食品への応用」三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
6. 長尾達郎, 平成 18 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文, 組織修復をコントロールする生体材料の開発
7. 清水康治, 平成 20 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文, 組織修復材料としてのジェラン
8. 「組織修復・再生を促進する機能性生体材料の開発」平成 20 年 6 月 三重大学 當麻直樹／独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構平成19年度産業技術研究助成事業研究成果報告書
9. Nakoshi Y, *et al*: Distribution and role of tenascin-C in human osteoarthritic cartilage. *J Orthop Sci.* 2010; 666-73
10. Imada K, *et al*: Anti-arthritic action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(3):410-4
11. Li X, *et al*: Action of fibroblast growth factor-2 on the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):R48
12. 山本光則, 平成 23 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文, 組織修復を目的とした薬物徐放調製型硫酸化ジェランゲルの開発
13. Haugsten EM, *et al*: Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Mol Cancer Res.* 2010 Nov;8(11):1439-52
14. Echtermeyer F, *et al*: Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1072-6
15. Ellman MB, *et al*: Lactoferricin enhances BMP7-stimulated anabolic pathways in intervertebral disc cells. *Gene.* 2013 Jul 25;524(2):282-91

16. Masuda S, *et al*: A mutation in the heparin-binding site of noggin as a novel mechanism of proximal symphalangism and conductive hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 9;447(3):496-502
17. Otsuki S, *et al*: Extracellular sulfatases support cartilage homeostasis by regulating BMP and FGF signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 1;107(22):10202-7
18. Buchtova M, *et al*: Fibroblast growth factor and canonical WNT/ β -catenin signaling cooperate in suppression of chondrocyte differentiation in experimental models of FGFR signaling in cartilage. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1852(5):839-50
19. Hwang SG, *et al*: Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J Biol Chem*. 2004 Jun 18;279(25):26597-604
20. 内村健治, 細胞外スルファターゼ Sulf によるヘパラン硫酸糖鎖機能の調節, 生化学 第 83 卷 第 3 号, pp.216-223, 2011
21. Nalesso G, *et al*: WNT-3A modulates articular chondrocyte phenotype by activating both canonical and noncanonical pathways. *J Cell Biol*. 2011 May 2;193(3):551-64
22. Fukui N, *et al*: $\alpha\beta 5$ integrin promotes dedifferentiation of monolayer-cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):1938-49
23. Wang Z, *et al*: Type IIB procollagen NH(2)-propeptide induces death of tumor cells via interaction with integrins $\alpha(V)\beta(3)$ and $\alpha(V)\beta(5)$. *J Biol Chem*. 2010 Jul 2;285(27):20806-17
24. 奥村和也, 平成 25 年度 三重大学工学部分子素材工学科卒業論文, 髄核細胞に対する硫酸化ネイティブ型ジェランの影響

6. 謝辞

本研究を行うに辺りご指導を頂きました堀内孝教授、宮本啓一准教授には大変お世話になり、深く感謝の礼を申し上げます。

堀内教授には研究生活においてご助言をいただき大変勉強になりました。研究成果の報告や雑誌会の際には厳しくも鋭いご指摘を数多く頂き、深く勉強するきっかけを与えていただきました。

宮本准教授には本研究を遂行し、本論文を執筆するにあたり適切なお助言を数多く賜り、終始丁寧にご指導を頂きました。研究目標へのアプローチのかけかた、実験結果の解釈など様々な面から学ばせて頂き、大変感謝しております。

副査を努めて頂き、本論文をご精読頂いた湊元幹太先生に感謝申し上げます。至らぬ点も多々見受けられるかと思いますが、ご指導ご鞭撻のほど宜しく願い申し上げます。

三重大学医学部附属病院 外科系診療科 整形外科の明田浩司先生には本研究で使用したヒト髄核細胞をご提供いただきました。深く感謝申し上げます。

生命科学支援センター遺伝子実験施設の小林裕子様を始めとするスタッフの皆様には **real-time PCR** を行うにあたり大変お世話になりました。

事務員の村上節子様には日々の研究生活において大変お世話になり深く感謝いたします。

直属の後輩である宮本さんには研究を進めるにあたり、数多くの助けをいただきました。宮本さんの助けなしでは研究を進めることは出来なかったと思います。至らぬ点ばかりの先輩でしたが1年間ついてきてくれてありがとうございました。

M1、B4の後輩の皆様には研究生活において大変お世話になりました。これから研究、就活と忙しい日々を過ごすことになると思いますが、お体に気をつけて頑張ってください。

M2の同期の皆様には3年間大変お世話になりました。皆と過ごした研究室生活はとても楽しく、また大変有意義に過ごすことができました。皆様の今後のご活躍を願っております。

最後に、精神的そして経済的に支えて頂いた両親に感謝の意を示し、謝辞とさせていただきます。

奥村 和也