

平成 29 年度 修士論文

椎間板組織再生のための
薬物徐放型硫酸化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

宮本 愛子

目次

1. 諸言	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 椎間板ヘルニア	
1-1-4 現在の治療法	
1-2 再生医療	4
1-2-1 椎間板治療における再生医療	
1-2-2 インジェクタブルゲルでの治療	
1-2-3 ゲルビーズ	
1-3 ジェランガム	5
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 薬物徐放	8
1-5 本研究の目的	9
1-5-1 実験項目	
2. 実験方法	10
2-1 材料の作製	10
2-1-1 CMGの作製	
2-1-2 ¹ 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の硫酸化度測定	
2-2 ゲルビーズの作製	18
2-2-1 CMGゲルの作製	
2-2-2 CMGゲルビーズの作製	
2-2-3 GS-CMGゲルビーズの作製	
2-2-4 粒径分布調査	

2-3	ゲルビーズの徐放実験	23
2-3-1	タンパクの徐放	
2-3-2	GS の徐放	
2-4	NP 細胞の培養	25
2-4-1	NP 細胞の単離	
2-4-2	細胞培養	
2-4-3	細胞の継代培養	
2-5	bFGF 添加培地による NP 細胞の培養	27
2-5-1	遺伝子発現調査	
2-5-2	増殖速度測定	
2-6	GS 添加培地による NP 細胞の培養	28
2-6-1	硫酸化度依存での遺伝子発現調査	
2-6-2	濃度依存での遺伝子発現調査	
2-7	bFGF および GS 添加培地による NP 細胞の培養	28
2-8	NP 細胞のゲルビーズ内培養	29
2-8-1	ゲルビーズ内培養の免疫蛍光染色	
2-8-2	bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズ内培養	
2-8-3	bFGF および GS 徐放型ゲルビーズ内培養	
3.	結果	35
3-1	材料の作製	35
3-1-1	CMG の作製	
3-1-2	GS の作製	
3-2	ゲルビーズの粒径分布調査	37
3-3	ゲルビーズの徐放実験	38
3-3-1	タンパクの徐放	
3-3-2	GS の徐放	
3-4	bFGF 添加培地による NP 細胞への影響	40
3-4-1	遺伝子発現調査	
3-4-2	増殖速度測定	
3-5	GS 添加培地による NP 細胞への影響	41
3-5-1	硫酸化度依存での遺伝子発現調査	
3-5-2	濃度依存での遺伝子発現調査	

3-6	bFGF および GS 添加培地による NP 細胞への影響	43
3-7	ゲルビーズ内培養による NP 細胞への影響	44
3-7-1	ゲルビーズ内培養の免疫蛍光染色結果	
3-7-2	bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズ内培養での遺伝子発現調査	
3-7-3	bFGF および GS 徐放型ゲルビーズ内培養での遺伝子発現調査	
4.	考察	47
4-1	GS 添加培養による NP 細胞の再分化	47
4-2	GS とコンドロイチン硫酸の類似性	48
4-3	ゲルビーズの薬物の捕捉と徐放	52
4-4	ゲルビーズ内培養	54
4-5	bFGF 徐放後の GS による再分化誘導メカニズム	55
4-6	椎間板再生治療材料としてのゲルビーズ	57
5.	結論	59
6.	参考文献	60
7.	謝辞	62

1. 諸言

1-1 椎間板

1-1-1 椎間板の構造

椎間板とは、脊柱を構成している椎骨一つ一つの間にある円形の線維軟骨のことである。ヒトの体内には 23 個の椎間板があり、日々の生活の中で脊柱にかかる衝撃を吸収、分散する役割を持つ。椎間板は中央にゲル状の髄核と呼ばれる組織を保持しており、層状の線維輪がその髄核を取り囲むような構造をとっている。また、椎間板は無血管組織であるため、損傷時に極めて修復、再生しにくい組織である。椎間板の模式図を Fig.1-1 に示す。

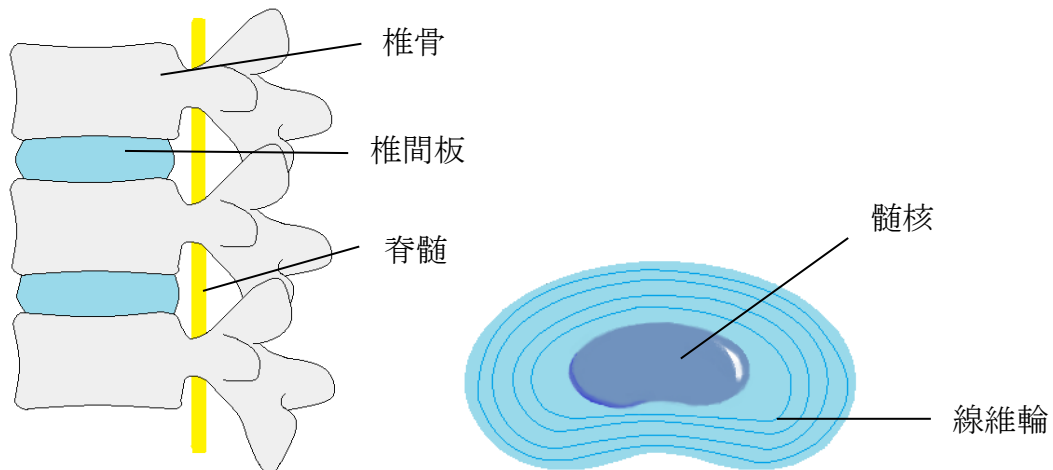


Fig.1-1 椎間板の模式図

1-1-2 髄核 (NP)

本研究では椎間板中央部に存在する髄核(Nucleus Pulposus, NP)に着目した。NP は多量の水分を含む組織で、成人で約 70%の水分を保持している。しかし、加齢により水分が徐々に減少し、ショックの吸収能を失い、クッションの働きが衰える。NP の模式図を Fig.1-2 に示す。

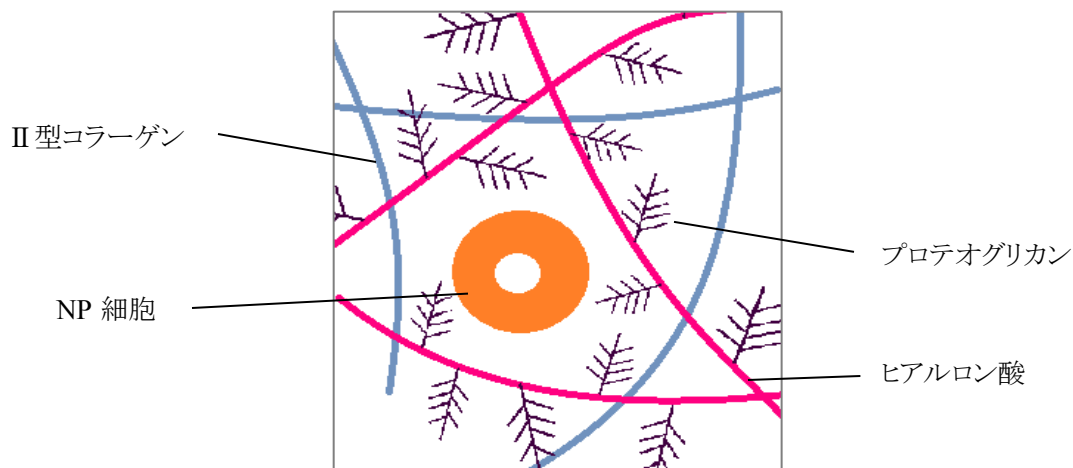


Fig.1-2 NP の模式図

NP は NP 細胞と細胞外基質から構成される組織である。主な細胞外基質には Fig.1-2 の通り、II 型コラーゲン、ヒアルロン酸、プロテオグリカンがあげられる。

特に、プロテオグリカンはコアタンパク質にグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG) と呼ばれる硫酸化多糖が多数共有結合している糖タンパクである。

GAG はアミノ糖 (ガラクトサミン、グルコサミン) とウロン酸 (グルクロン酸、イズロン酸) またはガラクトースの繰り返し構造からなっており、NP には主にコンドロイチン硫酸が存在している。コンドロイチン硫酸の構造を Fig.1-3 に示す。

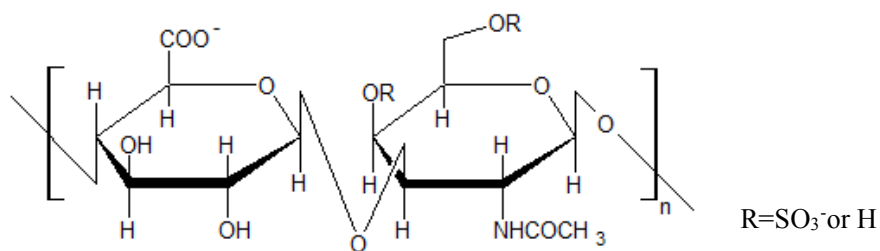


Fig.1-3 コンドロイチン硫酸⁽¹⁾

また、NP 細胞は *in vitro* での単層培養において、増殖していくにつれ脱分化が進むことが知られている⁽²⁾。

1-1-3 椎間板ヘルニア

椎間板には日々の生活の中で常時圧力がかかっている。その圧力に椎間板が耐え切れなくなったとき、NPが突出し周囲の神経を圧迫することで、下肢のしびれや痛みを引き起こし、重度の場合は排尿障害となる危険性がある。この病名を椎間板ヘルニアと呼ぶ。椎間板ヘルニアの模式図を Fig.1-4 に示す。

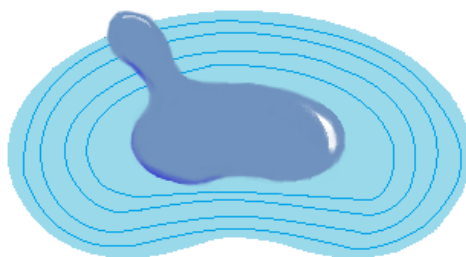


Fig.1-4 椎間板ヘルニアの模式図

1-1-4 現在の治療法

一般的には保存療法が用いられる。軽度の椎間板ヘルニアの場合、突出した椎間板は自然に引っ込む。立ったり座ったりの動作だけでも負担がかかり、椎間板を圧迫してしまうため、安静にし、コルセットを着用するなどして対処する方法が効果的である。また、鎮痛剤を服用し炎症を収める治療法もある。

しかし排尿障害などを引き起こし、生活が困難である場合は、手術を行うことが必要である。手術では主に患部を背中側から切開し、ヘルニア部分のみを切除するが、重度の場合椎間板そのものを摘出する場合がある。この時、不安定になった脊椎に対し、金属金具で椎骨同士を固定する術法が脊椎固定術である。この術法では、金属金具を一度体内に埋め込むと基本的には取り出すことはない。さらに、周りの正常椎間板を圧迫し、椎間板ヘルニアを再発させてしまう恐れもある。再発した場合、一度切開した部分は癒着がひどく、再び手術を行うことができない。そのため、低侵襲かつ効果的な治療法が求められている。

1-2 再生医療

再生医療とは怪我や病気で冒された組織や臓器を自己が有する再生能力を引き出して修復させる医療のことである。

1-2-1 椎間板治療における再生医療

椎間板は無血管組織であるため組織を修復するための栄養が乏しく、自己修復が難しい領域である。近年では、ひどく損傷した椎間板に代わる人工的な椎間板の研究も報告されているが⁽³⁾、本来の椎間板の構造とは大きく異なるため患者への負担が大きく、癒着を引き起こす可能性もある。そのため椎間板に直接働きかけ内部から組織の自己修復を促すような材料が有用であると考えた。

1-2-2 インジェクタブルゲルでの治療

椎間板をそのまま入れ替える方法では患者の身体を切開する必要があるため、非常に負担が大きくなる。そこで注射器を用いて椎間板の自己修復を促す材料を患部に直接インジェクトする方法を考案した。インジェクトする材料はNP組織を模したゲル状のものが適していると考えた。この材料と患者自身の細胞を組み合わせることで患部にインジェクトすることで、細胞からの基質産生を促し、内部から椎間板を治療することが可能になる。この治療法では注射器でゲルを注入するため、患者の身体を切開する必要もない上、麻酔の必要もないため治療時間を短縮することができる。また、癒着を引き起こす可能性もないため近接する椎間板が損傷した場合でも再度同じ治療を行うことができる。さらにゲル量を調節し注入するため患者の椎間板の損傷具合に適した治療を行うことができる。このようにインジェクタブルなゲルを用いた新しい治療法は従来の方法とは異なり、低侵襲で効果的であると言える。

1-2-3 ゲルビーズ

インジェクタブルゲルは流動性のあるものではなく、あらかじめ球状に固めてあるものが望ましいと考えた。NP 細胞は数個単位で存在しており、周囲をⅡ型コラーゲンやプロテオグリカンなどの基質によって取り囲まれている(Fig.1-5)。この構造を再現するためには、細胞が適度な距離を保ちながら分散している必要がある。そのため球状のゲル(ゲルビーズ)を用いて、細胞の入る隙間を確保しつつ患部にインジェクトする治療法が最適であると考えた。



Fig.1-5 組織中の NP 細胞⁽⁴⁾

1-3 ジェランガム

そこで本研究ではジェランガムという物質に注目した。ジェランガムは *sphingomonas elodea* という微生物が菌体外に産出する多糖類であり、増粘安定剤として食品に幅広く利用されている⁽⁵⁾。ジェランガムは優れた生体適合性も証明されており、生体材料としての利用が可能であると考えられる⁽⁶⁻⁸⁾。また、ジェランガムは化学修飾を行うことで様々な性質を持つ物質を作製することができる。

1-3-1 ネイティブ型ジェラン

ネイティブ型ジェラン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糖をひとつの単位として繰り返し構造をとる。また、1,3-β-D-グルコースの C-2 位にグリセリル基および C-6 位に 1/2 の割合でアセチル基がつく。ネイティブ型ジェランはグリセリル基が内側を向き、アセチル基が外側を向いてらせん構造を形成している。ネイティブ型ジェランの構造を Fig.1-6 に示す。

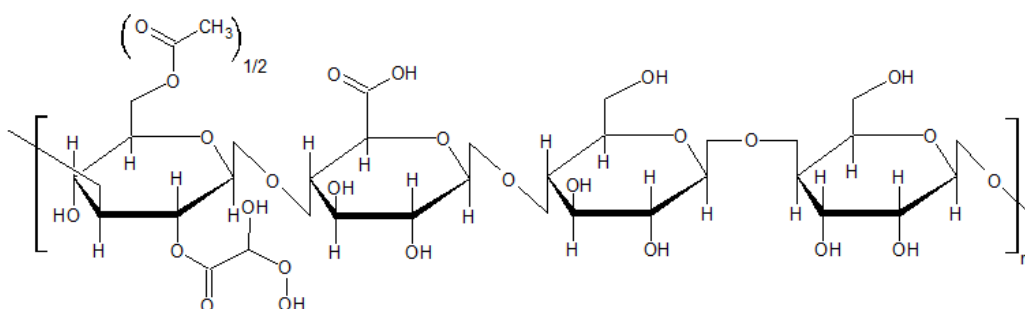


Fig.1-6 ネイティブ型ジェランの構造

1-3-2 脱アシル型ジェラン

ネイティブ型ジェランからアセチル基とグリセリル基を除いたジェランを脱アシル型ジェランという。脱アシル型はカチオン類の存在とジェラン鎖同士の水素結合により透明な強固で脆いゲルを形成する。脱アシル型ジェランの構造を Fig.1-7 に示す。

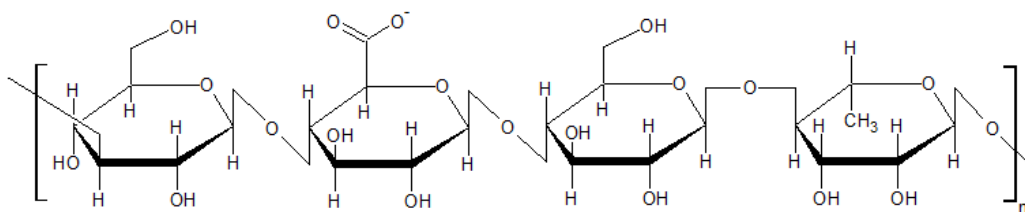


Fig.1-7 脱アシル型ジェランの構造

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イン-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)。GS の構造を Fig.1-8 に示す。

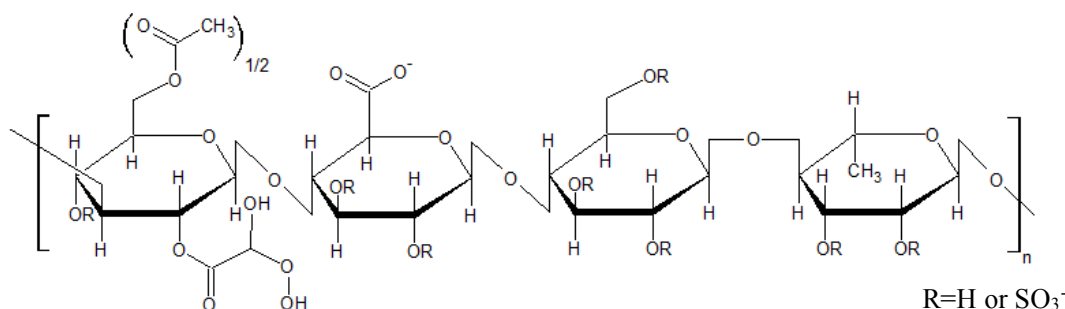


Fig.1-8 硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)の構造

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。CMG の構造を Fig.1-9 に示す。

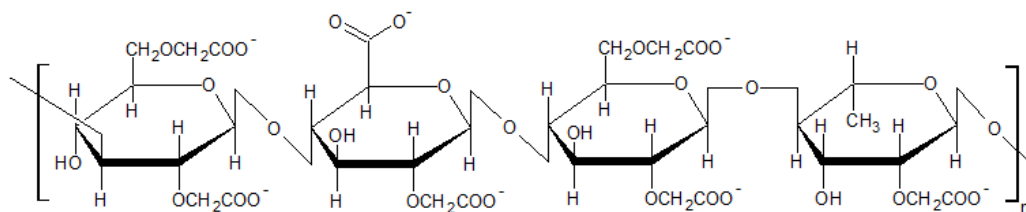


Fig.1-9 カルボキシメチルジェラン(CMG)の構造

本研究では、温度に依存せずゲル化することのできる CMG を用いて CMG ゲルビーズを作製した。さらに NP 組織に多量に存在する GAG に類似した構造を持つ GS を組み合わせて GS-CMG ゲルビーズを作製した。

1-4 薬物徐放

今回考案したゲルビーズでの治療法では大量の NP 細胞が必要となるが、NP 細胞は増殖速度が遅く細胞数の確保に時間がかかる。そのため NP 細胞を一度脱分化させ、増殖させてから再分化させる方法を考案した。それがゲルによる薬物徐放である。その方法を Fig.1-10 に示す。まず、ゲルビーズから脱分化を促進させる薬物を徐放させ、細胞を増殖させる。次にゲルビーズから再分化を促進させる薬物を徐放させ、細胞を再分化させる。そうすることで再分化させた細胞から II 型コラーゲンや GAG などの基質が産生され、徐々に本来の NP 組織の構造に近づいていくと考えられる。

脱分化を促進させる薬物には bFGF を用いた。bFGF は NP 細胞の増殖を促進し、基質産生を減少させるという報告がある⁽¹⁰⁾。そのため NP 細胞を脱分化させ増殖させる薬物として適していると考えた。

再分化を促進させる薬物には GS を用いた。過去に GS 添加培地を NP 細胞に添加すると基質産生の増加および分化マーカーの増加が促されることが示されている⁽¹¹⁻¹³⁾。また、GS はゲルビーズ作製時にあらかじめ仕込むことができるため、長期間徐放し続けることが可能であると考えられる。

このように生体内で時間経過と共に bFGF や GS などの薬物を放出し NP 細胞の分化・脱分化を制御することのできるゲルビーズの作製が本研究の目的である。

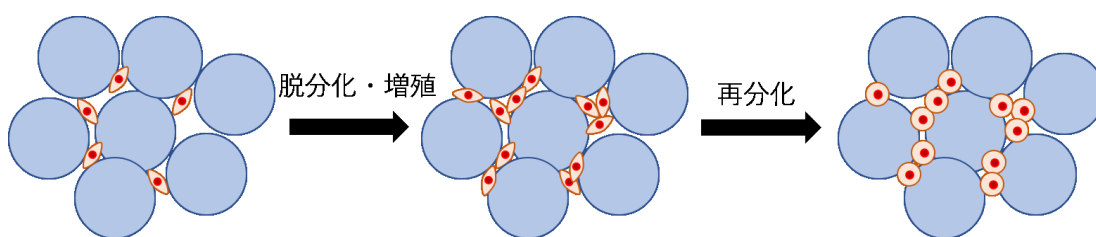


Fig.1-10 ゲルビーズによる NP 細胞の制御

1-5 目的

本研究の目的は患者の身体的負担を最小限にとどめる椎間板再生材料を開発するため、ジェランを用いて薬物徐放が可能なゲルビーズを作製し、評価することである。

1-5-1 実験項目

実験は以下の項目で行った。

1. 材料の作製
 - ・CMG の作製
 - ・GS の作製
2. ゲルビーズの作製
 - ・CMG ゲルビーズの作製
 - ・GS-CMG ゲルビーズの作製
 - ・粒径分布調査
3. ゲルビーズの徐放実験
 - ・タンパクの徐放
 - ・GS の徐放
4. NP 細胞の培養
5. bFGF 添加培地による NP 細胞の培養
 - ・遺伝子発現調査
 - ・増殖速度測定
6. PRP 添加培地による NP 細胞の培養
7. GS 添加培地による NP 細胞の培養
 - ・硫酸化度依存での遺伝子発現調査
 - ・濃度依存での遺伝子発現調査
8. bFGF および GS 添加培地による NP 細胞の培養
9. NP 細胞のゲルビーズ内培養
 - ・ゲルビーズ内培養の免疫蛍光染色
 - ・bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズ内培養
 - ・bFGF および GS 徐放型ゲルビーズ内培養

2.方法

2-1 材料の調製

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 | ・スターラー |
| ・凍結乾燥機 | ・攪拌子 |
| ・薬さじ | ・耐圧瓶 |
| ・薬包紙 | ・乳鉢 |
| ・ビーカー | ・乳棒 |
| ・透析チューブ | |

【実験操作】

1. DG 5g を乳鉢で 10 分間すり潰した。
2. 50wt% に調整した水酸化ナトリウム溶液を氷浴中で 50mL 加え、10 分間攪拌した。
3. 室温で 1 時間放置し DG を十分に膨潤させた。
4. 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。
5. 均一になった後に室温で 2 時間攪拌した。発熱した場合を氷浴で冷却し、再び室温で攪拌した。
6. 攪拌終了後に資料をビーカーに移し、脱イオン水に溶解した。
7. 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。
8. 透析終了後、溶液を耐圧瓶に移し、凍結乾燥させた。
9. 乾燥終了後、ミキサーで粉末化し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 の置換度を測定した。

【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
- ・Win Alpha (Ver. 1.0) FTNMR データシステム
- ・NMR test tube
- ・電子天秤
- ・ピペットマン

【実験操作】

1. CMG 10mg を D_2O 0.7mL に溶解し、NMR test tube 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。

【測定条件】

設定方法： $^1\text{H-NMR}$ 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

NGは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。そこで溶媒への溶解度を向上させるために、NGのグルクロン酸のカルボキシ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 | (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 | ・攪拌子 |
| ・恒温槽 | ・スターラー |
| ・スタンド | ・クランプ |
| ・クランプホルダー | ・塩化カルシウム管 |
| ・氷水 | ・ピペット |
| ・ピペッター | ・500mL ビーカー |
| ・薬包紙 | ・二方コック |
| ・pH メーター | ・2L マイヤーフラスコ |
| ・ガラスフィルター | ・ジムロート |
| ・アスピレーター | ・凍結乾燥機 |
| ・パラフィルム | ・スパチュラ |
| ・ゴム管 | ・500mL メスフラスコ |

【実験操作】

1. セパラブルフラスコに 800mL の脱イオン水を加えた。
2. NG を 8.0g 測りとり、脱イオン水に溶解させ、70℃で 20 時間攪拌した。
3. 20 時間攪拌終了後、溶液が pH3.0 以下になるまで 1N の塩酸を加えた。
4. 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. 沈殿物をろ過し、凍結乾燥した。
7. 得られたフリー化 NG(FNG)をミキサーで粉末化した。

2-1-4 GSの作製

NGの遊離の水酸基に対して硫酸化を行うことでFNGに硫酸基を導入し、硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)を作成した。

【試薬】

- | | |
|----------------------|--------------|
| ・フリー化ネイティブ型ジェラン | (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) |
| ・水酸化ナトリウム | (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】

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

【実験操作】

1. 蒸留済み DMF 30mL をセパラブルフラスコに加え、窒素置換を行いながら氷水中で 20 分撹拌した。
2. クロロスルホン酸 3.75mL をピペットで DMF 中に滴下し、20 分撹拌した。
3. ネイティブ型ジェランフリー化体を 1.0g 加えた。
4. 恒温槽で約 0°C に保ち、20 時間撹拌した。
5. 撹拌終了後、80°C まで温度を上げ、20 分間撹拌した。
6. 60°C に設定し、2 時間撹拌した。
7. 氷水に変え、20 分間撹拌した。
8. 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。
9. 溶液をアセトン中に滴下し、再沈殿させた。
10. ガラスフィルターでろ過し、得られた沈殿物を脱イオン水で再溶解させた。
11. 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入れ、3~4 日間透析した。
12. 透析終了後、凍結乾燥させた。
13. 得られた GS をミキサーで粉末化した。

2-1-5 酸素フラスコ燃焼法による GS の硫酸化度測定

GS の硫酸化度測定を行うために、酸素フラスコ燃焼法を用いた。酸素フラスコ燃焼法とは吸収液で湿らせた燃焼フラスコ内で試料を燃焼させることで、生成ガスを発生させ、それを液中に吸収させることでその検液の成分を分析する方法である。本実験では滴定による分析を行った。

【試薬】

- | | |
|----------------|--------------|
| ・ジメチルスルホナゾ III | (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) |
| ・塩化バリウム | (和光純薬工業株式会社) |
| ・硫酸 | (和光純薬工業株式会社) |
| ・過酸化水素水 | (和光純薬工業株式会社) |
| ・エタノール | (和光純薬工業株式会社) |

【使用器具】

- | | |
|---------------|-----------------------|
| ・FHO-A 型フラスコ | ・pH メーター |
| ・100mL ビーカー | ・スターラー |
| ・パスツールピペット | ・パラフィルム |
| ・濾紙 | ・スライダック |
| ・ガラスピペット | ・50mL メスフラスコ |
| ・ガスバーナー | ・スパチュラ |
| ・ビュレット | ・サンプル瓶 |
| ・氷水 | ・攪拌子 |
| ・ワニロクリップ付きコード | ・O ₂ ガスボンベ |

【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 50mg を脱イオン水 50mL で溶解した。
- ・0.02M 水酸化ナトリウム溶液
水酸化ナトリウム 80mg を脱イオン水 100mL 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
塩化バリウム 1.0412g を脱イオン水 1000mL で溶解した。

【力価 (factor) の測定】

1. 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 とした。
2. 1 で調製した 0.01N 硫酸 3.0mL に 5%エタノール 17mL を加え 20mL とし、サンプル瓶に入れた。これを 3 本用意した。
3. 3 で調製した溶液に指示薬である 0.1%ジメチルスルホナゾ III 溶液を 2 滴加え、0.005M 塩化バリウム水溶液で滴定した。
4. ブランクとして 50%エタノール 20mL も同様にして滴定を行った。
5. 硫酸-エタノール溶液の平均滴定量からブランク平均滴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。

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

【実験操作】

1. 直接手で触れないように濾紙をはさみでカットした。
2. カットした濾紙の上に sample を 20mg 量りとり、丁寧に折りたたんだ。
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. 濾紙に包んだ 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 30 秒酸素置換した。
7. 置換後ただ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こんだ。
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、30 分間静置した。
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 10mL 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%ジメチルスルホナゾ III 溶液を 2 滴ずつ加えた。
15. ビュレットを用い、0.005M 塩化バリウム水溶液で滴定した。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、同様に滴定を行った。
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(%)を式(2)より求めた。

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

2-2 ゲルビーズの作製

2-2-1 CMG ゲルの作製

CMG を足場材料として使用するためにゲル化を行った。

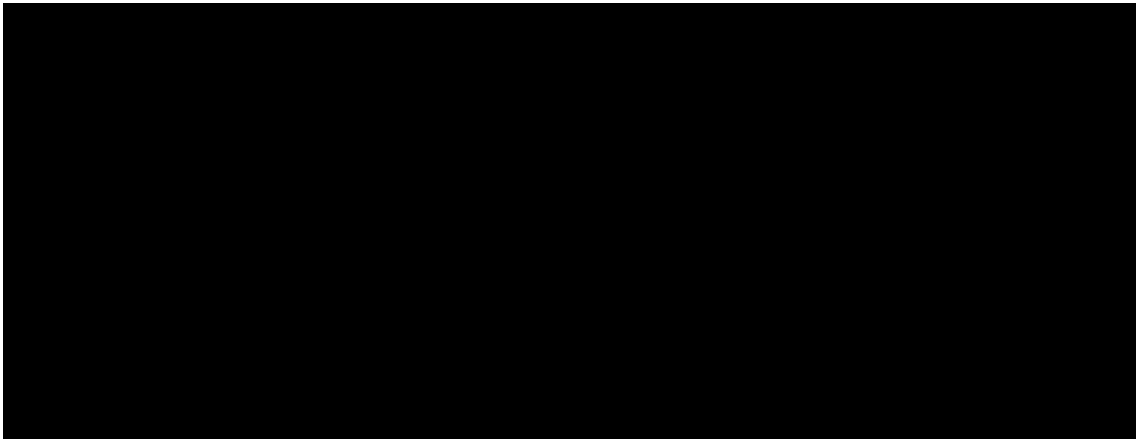


Fig. 2-1 Lys による CMG 架橋

【試薬】

- ・カルボキシメチルジェラン (CMG) (2-1-1 より作製)
- ・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)

【使用器具】

- ・スパチュラ
- ・ピペットマン
- ・電子天秤 (SHIMADZU)
- ・5mL サンプリングチューブ
- ・薬包紙
- ・チップ
- ・ボルテックス
- ・インキュベーター

【実験操作】

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 CMG ゲルビーズの作製

乳化法を応用して CMG を球状のゲル(=ゲルビーズ)に加工した。乳化法とは本来混じりあわない水相と油相を混合・保持させ、微細な乳化粒子を生成する方法である。本実験では水相に CMG ゲル溶液を用いてゲルビーズを作製した。

【試薬】

- ・カルボキシメチルジェラン (CMG) (2-1-1 より作製)
- ・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)
- ・流動パラフィン (関東化学株式会社)
- ・ソルビタンモノオレエート (和光純薬工業株式会社)
- ・エタノール (日本アルコール販売株式会社)

【使用器具】

- ・50mL 遠沈管
- ・100mL ナスフラスコ
- ・恒温槽
- ・攪拌子
- ・スパチュラ
- ・パスツールピペット
- ・50mL ビーカー
- ・電子天秤

【実験操作】

1. 50mL 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. ナスフラスコに流動パラフィン 20mL およびソルビタンモノオレエート 200 μ L を加え、37 $^{\circ}$ Cに保った恒温槽内で攪拌した。
4. CMGゲル溶液をパスツールピペットで3のナスフラスコに少しずつ滴下し、24h 攪拌した。
5. 攪拌終了後、ナスフラスコ内の溶液をビーカーに移し入れスパチュラで油相を丁寧に取り除いた。
6. 水相を 50mL 遠沈管に入れ、1000rpm 5min 遠心分離を行った。
7. 上澄を取り除き、エタノールを加えて再度 1000rpm 5min 遠心分離を行い洗浄した。

2-2-3 GS-CMGゲルビーズの作製

2-2-2で作成したCMGゲルビーズに対しGSを固定したGS-CMGゲルの作成を行った。Fig. 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。

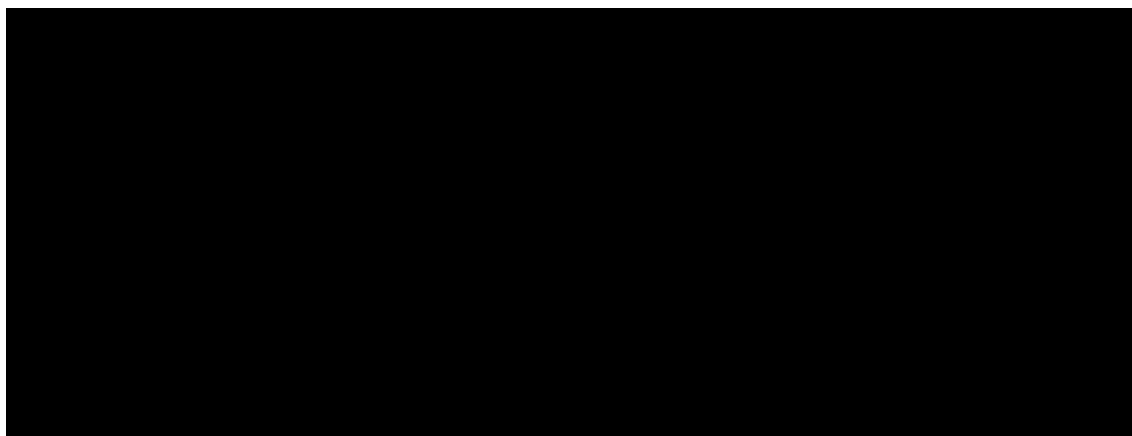


Fig.2-2 LysによるCMGとGSの架橋

【試薬】

- ・カルボキシメチルジェラン(CMG) (2-1-1により作製)
- ・硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS) (2-1-2により作製)
- ・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)
- ・流動パラフィン (関東化学株式会社)
- ・ソルビタンモノオレエート (和光純薬工業株式会社)
- ・エタノール (日本アルコール販売株式会社)

【使用器具】

- ・50mL 遠沈管
- ・100mL ナスフラスコ
- ・恒温槽
- ・攪拌子
- ・スパチュラ
- ・パスツールピペット
- ・50mL ビーカー
- ・電子天秤

【実験操作】

1. 50mL 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. ナスフラスコに流動パラフィン 20mL およびソルビタンモノオレエート 200 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C に保った恒温槽内で攪拌した。
4. CMG ゲル溶液をパスツールピペットで 3 のナスフラスコに少しずつ滴下し、24h 攪拌した。
5. 攪拌終了後、ナスフラスコ内の溶液をビーカーに移し入れスパチュラで油相を丁寧に取り除いた。
6. 水相を 50mL 遠沈管に入れ、1000rpm 5min 遠心分離を行った。
7. 上澄を取り除き、エタノールを加えて再度 1000rpm 5min 遠心分離を行い洗浄した。

2-2-4 粒径分布調査

2-2-2 および 2-2-3 で作製したゲルビーズの粒径分布を調査するため、粒径を測定した。粒径の算出には画像解析ソフト ImageJ を使用した。

【使用器具】

- ・位相差顕微鏡 (OLYMPUS) ・35Φ シャーレ
- ・スパチュラ

【実験操作】

1. スパチュラを用いてゲルビーズを少量取り、シャーレに乗せ、脱イオン水を適量加えた。
2. 位相差顕微鏡でゲルビーズの写真を撮影した。
3. 2 の画像を ImageJ で開いて、[straight line selections] でスケールバーを測り、[Analyze] → [Set scale] で縮尺の補正を行った。
4. [Analyze] → [Set measurements] → [Feret's Diameter] にチェックを入れた。
5. [Analyze] → [Tools] → [ROI manager] を開いた。
6. [Polygon selections] または [Freehand selections] でゲルビーズの外径を囲んだ。
7. ROI manager 内の [Add] を押し、6,7 を全てのゲルビーズに対して行った。
8. ROI manager 内の [Measure] を押し、測定値をコピーした。
9. エクセルで COUNTIF 関数を使用し、粒径分布を求めた。

2-3 ゲルビーズの徐放実験

2-3-1 タンパクの徐放

2-2-2 で作製した CMG ゲルビーズのタンパク徐放能を調査した。本実験では薬物モデルとしてアルブミンを使用した。外液に放出されたアルブミンの測定は分光光度計を用いて、波長 280nm の吸光度を求めることにより行った。

【試薬】

- ・CMG ゲルビーズ (2-2-2 より作製)
- ・ウシ血清アルブミン
- ・DMEM/F-12 (Gibco)
- ・アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社)

【使用器具】

- ・1.5mL アシストチューブ
- ・50mL 遠沈管
- ・CHIBITAN- II
- ・マイクロマン
- ・ピペットマン
- ・電子天秤
- ・分光光度計
- ・インキュベーター

【実験操作】

1. ゲルビーズをマイクロマンで 200 μ L 測り取り、アシストチューブに加えた。
2. 100 μ g/mL アルブミン溶液を 1mL 加え、ゲルビーズを膨潤させた。
3. CHIBITAN で軽く遠心し、上澄を取り除いた後、100 μ g/mL アルブミン/DMEM 溶液を 1mL 加え、ゲルビーズを収縮させた。
4. CHIBITAN で軽く遠心し、上澄を取り除いた後、ゲルビーズを別のアシストチューブに移し、0.05%のアジ化ナトリウムを含む DMEM を 1mL 加えた。
5. 37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターに入れ、3 日毎に DMEM を交換した。
6. 取り除いた DMEM 内のアルブミン量は分光光度計を用いて波長 280nm の吸光度を測定することによって求めた。

2-3-2 GSの徐放

2-2-3 で作製した GS-CMG ゲルビーズの GS 徐放能を調査した。外液に放出された GS の測定は DMMB 法を用いて測定した。DMMB 法とは 1,9-ジメチルメチレンブルー呈色反応を利用した硫酸化多糖の測定方法のことであり、波長 525nm の吸光度を測定することで GS を定量することができる。

【試薬】

- ・CMG ゲルビーズ (2-2-2 より作製)
- ・ウシ血清アルブミン
- ・DMEM/F-12 (Gibco)
- ・アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社)
- ・Proteoglycan Detection Kit (ASB)

【使用器具】

- ・1.5mL アシストチューブ
- ・CHIBITAN- II
- ・ピペットマン
- ・分光光度計
- ・50mL 遠沈管
- ・マイクロマン
- ・電子天秤
- ・インキュベーター

【実験操作】

1. ゲルビーズをマイクロマンで 200 μ L 測り取り、アシストチューブに加えた。
2. 100 μ g/mL GS 溶液を 1mL 加え、ゲルビーズを膨潤させた。
3. CHIBITAN で軽く遠心し、上澄を取り除いた後、100 μ g/mL GS/DMEM 溶液を 1mL 加え、ゲルビーズを収縮させた。
4. CHIBITAN で軽く遠心し、上澄を取り除いた後、ゲルビーズを別のアシストチューブに移し、0.05%のアジ化ナトリウムを含む DMEM を 1mL 加えた。
5. 37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターに入れ、3 日毎に DMEM を交換した。
6. 取り除いた DMEM 内の GS 量は DMMB 法を用いて波長 525nm の吸光度を測定することによって求めた。

2-4 NP 細胞の培養

2-4-1 NP 細胞の単離

本実験には三重県四日市畜産公社から提供して頂いたブタ髄核組織から単離した細胞を使用した。

【試薬】

- Collagenase type II (Gibco)
- エタノール (日本アルコール販売株式会社)
- DMEM/F12 (Gibco)

【使用器具】

- 50mL 遠沈管
- ピペットマン
- 滅菌済みピンセット
- 10mL ピペット
- 40 μ m セルストレーナー
- 滅菌済みハサミ

【実験操作】

1. DMEM/F12 30mL に Collagenase type II 0.06g を混合し、0.20wt% Collagenase type II 溶液を調整した。
2. 調整した Collagenase type II 溶液をシリンジに取り、フィルター滅菌した。
3. エタノールに滅菌水を加え希釈し、80%エタノールを作製した。
4. ピンセットを用いて組織をエタノールに浸し表面を殺菌した後、PBS へ浸した。
5. ハサミを用いて髄核組織を細分化し再度エタノールに浸した後、Collagenase type II 溶液に入れた。
6. ピンセットとハサミはエタノールで殺菌しながら 4.5 を組織 1 個ずつ行った。
7. Collagenase type II 溶液を 37°C の恒温槽で一晩インキュベートした。
8. 25cm² フラスコに 10%FBS/DMEM 4mL を加え、プレインキュベートした。
9. 一晩インキュベートした Collagenase type II 溶液を 40 μ m セルストレーナーを用いて濾過した。
10. 1000rpm/5min 遠心分離を行い上澄を回収した後、PBS 10mL を加えピペティングした。
11. 1000rpm/5min 遠心分離を行い、上澄を回収した後、10%FBS/DMEM 1mL を加え細胞懸濁液を作製した。
12. プレインキュベートした 25cm² フラスコに播種した。
13. 播種後 5 日間は培地交換せず細胞が接着するのを待ち、その後は通常通り培養した。

2-4-2 細胞培養

NP細胞は37°C/5%CO₂インキュベーター内で培養した。培地はDMEM/F-12 1:1にペニシリンストレプトマイシンおよびL(+)-アスコルビン酸を添加し使用した。3日に1度培地交換を行い、サブコンフルエント(70-80%)の状態に増殖した時点で継代作業を行った。

2-4-3 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。
3. 継代先の培養フラスコに10%FBS/DMEM/F-12(1:1)を5mL/25cm²フラスコ入れ、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。

【実験操作】

1. 滅菌済み10mLピペットを加熱滅菌し、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、10%Trypsin/PBSを5mL/25cm²フラスコ入れ、37°C/5%CO₂インキュベーター内で5分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10%FBS/DMEM/F-12(1:1)を1mL加えピペッティングを行い、細胞懸濁液を作成した。
9. 血球計算盤にカバーガラスを載せ、隙間に細胞懸濁液10μLを注入し、顕微鏡で細胞数を測定し算出した。液の厚みを0.1mmとしたときの細胞懸濁液濃度を(測定細胞数)×10⁴cells/mLとした。
10. プレインキュベートしておいた培養フラスコに10,000cells/cm²で播種し、37°C/5%CO₂インキュベーター内で培養した。

2-5 bFGF 添加培地による NP 細胞の培養

2-5-1 遺伝子発現調査

NP 細胞に bFGF を添加した際の遺伝子発現の変化を調査した。

【培地】10ng/mL bFGF 添加培地

【期間】1 週間

培養後、real-time PCR により遺伝子発現を調査した。脱分化マーカーとして Collagen type1, CD90 を使用し、分化マーカーとして Collagen type2, SOX9 を使用した。また、ハウスキーピング遺伝子には GAPDH を使用した。本実験で使用したターゲット遺伝子のプライマー配列を Table 2-1 に示す。以降全ての遺伝子発現調査において同様のプライマーを使用した。

Table 2-1 プライマー配列

Target		5'-3'
GAPDH	Forward	ATC CTG GGC TAC ACT GAG GAC
	Reverse	AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG
Collagen type1(Col1)	Forward	CCT CAA GAT GTG CCA CTC CGA C
	Reverse	CTC GCC TGT CTC CAT GTT GCA
CD90	Forward	CCG CTC TCG AAC CAA CTT CT
	Reverse	AGC CAC GAG GTG TTC TGG AT
Collagen type2(Col2)	Forward	CTG AGG GCA ACA GCA GGT TCA
	Reverse	CAA TGA TGG GGA GGC GAG AGG
SOX9	Forward	GAC CGA CGA GCA GGA GAA GG
	Reverse	TTC TCT GTG TCC GAG CCG GA

2-5-2 増殖速度測定

培地交換毎に細胞数をカウントすることにより、bFGF 添加培地で培養した細胞の増殖速度を測定した。また、コントロールとして通常培地で培養した細胞も同様にカウントした。培養は 2 週間行った。

【実験操作】

1. 培地交換毎に細胞の写真をそれぞれ 4 枚撮影した。
2. 写真内の細胞数をカウントし、4 枚の平均値を計算した。
3. スケールバーから写真の実寸を導き出し、25cm² フラスコ内の細胞数を推定した。

2-6 GS 添加培地による NP 細胞の培養

2-6-1 硫酸化度依存での遺伝子発現調査

NP 細胞に GS を添加した際の遺伝子発現の変化を解析した。本実験では 2 種類の硫酸化度の異なる GS を添加し、GS の硫酸化度の違いが NP 細胞に与える影響を real-time PCR により調査した。

【培地】硫酸化度 7%および 30%の GS 添加培地

【期間】1 週間

2-6-2 濃度依存での遺伝子発現調査

本実験では 4 種類の濃度の異なる GS 添加培地を使用し、GS の濃度の違いが NP 細胞に与える影響を real-time PCR により調査した。

【培地】10, 50, 200, 500 μ g/mL の GS 添加培地

【期間】1 週間

2-7 bFGF および GS 添加培地による NP 細胞の培養

NP 細胞に bFGF と GS を同時に添加した際の遺伝子発現を real-time PCR により調査した。

【培地】100 μ g/mL GS および 10ng/mL bFGF 添加培地

【期間】1 週間

2-8 NP 細胞のゲルビーズ内培養

2-8-1 ゲルビーズ内培養の免疫蛍光染色

ゲルビーズに NP 細胞を播種した後、ゲルビーズ内の様子を免疫蛍光染色により観察した。

◆ 試料の作製

【試薬】

- ・CMG ゲルビーズ (2-2-2 より作製)
- ・DMEM/F-12 (Gibco)

【使用器具】

- ・1.5mL アシストチューブ
- ・マイクロマン
- ・ピペットマン
- ・15mL 遠沈管

【実験操作】

1. 直径 1cm の 1.5mL アシストチューブにゲルビーズをマイクロマンで 200 μ L 測り
とった。
2. 細胞懸濁液を細胞数が 16×10^4 cells になるように加え軽くピペッティングした。
3. しばらく静置した後、上澄を取り除いた。

チューブ内の模式図を Fig.2-3 に示す。

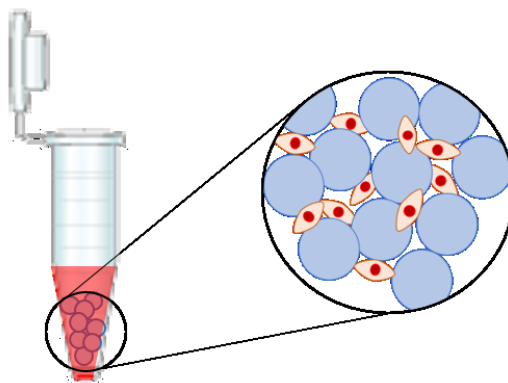


Fig.2-3 チューブ内の模式図

◆ 固定液の作成

【試薬】

- ・パラホルムアルデヒド
- ・PBS
- ・20% tritonX100

【使用器具】

- ・100mL 三角フラスコ
- ・攪拌子
- ・電子レンジ
- ・ピペットマン
- ・100mL メスシリンダー
- ・スターラー
- ・保冷剤
- ・スパチュラ

【実験操作】

1. 100mL 三角フラスコにパラホルムアルデヒド 1.0g と PBS 50mL を加えた。
2. 攪拌子を入れ、パラホルムアルデヒドが溶解するまで電子レンジで少しずつ加熱した。
3. スターラーで攪拌後、保冷剤で冷却した。
4. 20%tritonX100 を溶液に対して 100 倍希釈になるよう加えた。

◆ 染色

【試薬】

- ・10%正常ヤギ血清 (Life Technologies)
- ・Alexa Fluor 488 (Invitrogen)
- ・DAPI (DOJINDO)
- ・PBS
- ・固定液

【使用器具】

- ・45mL 遠沈管
- ・カバーガラス
- ・ピンセット
- ・35 φ シャーレ
- ・ピペットマン
- ・15mL 遠沈管
- ・CHIBITAN- II
- ・500μL アシストチューブ
- ・マイクロマン
- ・チップ

【実験操作】

1. 1.5mL アシストチューブ内の試料に固定液を入れ、CHIBITAN- II で軽く遠心をかけて上澄を取り除いた。
2. 再び固定液を加え、15 分間静置した。
3. PBS で 5 分間 3 回洗浄した。
4. PBS に対して 10%正常ヤギ血清を 100 倍希釈して加えた。
5. 5 の溶液を試料に加えて 15 分間静置した。
6. PBS で 5 分間 3 回洗浄した。
7. Alexa Fluor 488 で蛍光ラベル化したアルブミン溶液を 1mL 加えた。
8. PBS で 5 分間 3 回洗浄した。
9. PBS に対して DAPI を 1000 倍希釈して加えた。
10. 9 の溶液を試料に加え、軽く遠心をかけて上澄を取り除いた。この操作を 2 回行った。
11. 試料をマイクロマンで少量測り取り、35 φ シャーレに滴下し、その上にカバーガラスを乗せた。
12. 共焦点顕微鏡で観察した。

2-8-2 bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズ内培養

bFGF を徐放するゲルビーズ内で NP 細胞の培養を1週間行った。bFGF 徐放型ゲルビーズには 2-2-2 で作製した CMG ゲルビーズを用いた。

【試薬】

- CMG ゲルビーズ (2-2-2 より作製)
- bFGF
- DMEM/F-12 (Gibco)
- エタノール (日本アルコール販売株式会社)
- PBS

【使用器具】

- 15mL 遠沈管
- マイクロマン
- ピペットマン
- 1.5mL アシストチューブ
- ローテーター

【実験操作】

*bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズの作製

➤ ゲルビーズの滅菌

1. ゲルビーズを 15mL 遠沈管に測りとり、そこへ 80%エタノールを適量加え、ローテーターで攪拌した。
2. 1000rpm 5min で遠心分離した後、クリーンベンチ内で開封し、上澄を取り除いた。
3. PBS を適量加え、1000rpm 5min で遠心分離し、上澄を取り除いた。
4. DMEM を適量加え 1000rpm 5min で遠心分離し、上澄を取り除いた後、UV 照射を一晩行った。

➤ bFGF の捕捉

1. 10ng/mL の bFGF を含む PBS を滅菌したゲルビーズに加え膨潤させた後、1000rpm 5min で遠心分離し、上澄を取り除いた。
2. 10ng/mL の bFGF を含む DMEM を加え収縮させた後、1000rpm 5min で遠心分離し、上澄を取り除いた。

➤ ゲルビーズ内培養

1. 1.5mL アシストチューブにゲルビーズをマイクロマンで 200 μ L 測りとった。
2. 細胞懸濁液を細胞数が 16×10^4 cells になるように加え、軽くピペッティングした。
3. しばらく静置した後、上澄を取り除き培地を 200 μ L 加えた。
4. アシストチューブの口を開けたままパラフィルムを張り、穴を 4 つ程度開けて 37°C, CO₂ 条件下で培養した。
5. 培地交換は 3 日毎に行った。

培養 1 週間後に real-time PCR により遺伝子発現解析を行った。RT-product の作製時、RNA isoPLUS を培養アシストチューブに直接加え、チップの先端で混合することで RNA の抽出を行った。

2-8-3 bFGF および GS 徐放型ゲルビーズ内培養

bFGF を徐放するゲルビーズと GS を徐放するゲルビーズを混合し、NP 細胞の培養を 1 週間および 3 週間行った。GS 徐放型ゲルビーズには 2-2-3 で作製した GS-CMG ゲルビーズを用いた。培養方法は 2-9-1 と同様。

【試薬】

- bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズ (2-9-1 より作製)
- GS-CMG ゲルビーズ (2-2-3 より作製)
- GS (2-1-4 より作製)
- DMEM/F-12 (Gibco)
- エタノール (日本アルコール販売株式会社)
- PBS

【使用器具】

- 15mL 遠沈管
- マイクロマン
- ピペットマン
- 1.5mL アシストチューブ
- ローテーター

【実験操作】

*GS 徐放型 GS-CMG ゲルビーズの作製

➤ GS の捕捉

1. ゲルビーズを 15mL 遠沈管に測りとり、100 μ g/mL の GS を含む PBS をゲルビーズに加え膨潤させた後、1000rpm 5min で遠心分離し、上澄を取り除いた。
2. 100 μ g/mL の GS を含む DMEM を加え収縮させた後、1000rpm 5min で遠心分離し、上澄を取り除いた。

➤ ゲルビーズの滅菌

1. 80%エタノールを適量加え、ローテーターで攪拌した。
2. 1000rpm 5min で遠心分離した後、クリーンベンチ内で開封し、上澄を取り除いた。
3. PBS を適量加え、1000rpm 5min で遠心分離し、上澄を取り除いた。
4. DMEM を適量加え 1000rpm 5min で遠心分離し、上澄を取り除いた後、UV 照射を一晩行った。

▶ ゲルビーズ内培養

1. 1.5mL アシストチューブに bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズと GS 徐放型 GS-CMG ゲルビーズをそれぞれマイクロマンで 100 μ L 入れ、混合した。
2. 細胞懸濁液を細胞数が 16×10^4 cells になるように加え、軽くピペッティングした。
3. しばらく静置した後、上澄を取り除き培地を 200 μ L 加えた。
4. アシストチューブの口を開けたままパラフィルムを張り、穴を 4 つ程度開けて 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 条件下で培養した。
5. 培地交換は 3 日毎に行った。

培養 1 週間および 3 週間後に real-time PCR により遺伝子発現解析を行った。RT-product の作製時、RNA isoPLUS を培養アシストチューブに直接加え、チップの先端で混合することで RNA の抽出を行った。

3.結果

3-1 材料の作製

3-1-1 CMG の作製

作製した CMG の ¹H-NMR スペクトルを Fig.3-1 に示す。

ラムノース 5 位に存在するメチル基のピーク(1.2ppm)の積分強度を 3 としてプロトンの総積分強度を求めた。ラムノース部分のメチル基を除いた CMG のプロトンの総積分強度は 4.2~3.0ppm で示され、その値は 31.49 であった。

出発物質である脱アシルジェランのラムノース部分のメチル基を除いたプロトン数は 20 であるので、4.2ppm~3.0ppm の積分強度は 20 である。作製した CMG の積分強度がこの値を上回ったことから、プロトンの積分強度の増加が認められた。よってカルボキシメチル基が導入されたことが確認できた。

脱アシルジェランにカルボキシメチル基が導入されることで-OH が-OCH₂COO⁻に置換され、1 箇所につきプロトン 2 個分増加する。また、脱アシルジェラン 1 ユニット当たり-OH は 10 箇所である。これらから CMG の置換率は下式より算出できる。

$$\text{置換率(\%)} = \frac{[(\text{CMG の積分強度} - 20) / 2]}{10} \times 100$$

以上より作製した CMG の置換率は 57.5%であった。

3-1-2 GS の作製

ネイティブ型ジェランフリー化体の遊離の水酸基に対して硫酸化を行い GS を作製した。その結果を Table 3-1 に示す。

Entry	FNG(g)	収量(g)	収率(%)	硫酸化率(%)
1	1.00	0.41	40.9	7.02
2	1.00	0.77	77.3	30.7

硫酸化率 7.02%と硫酸化率の低い GS と 30.7%と硫酸化率の高い GS を作製することができた。以降この 2 種類の GS を使用して実験を進めていく。

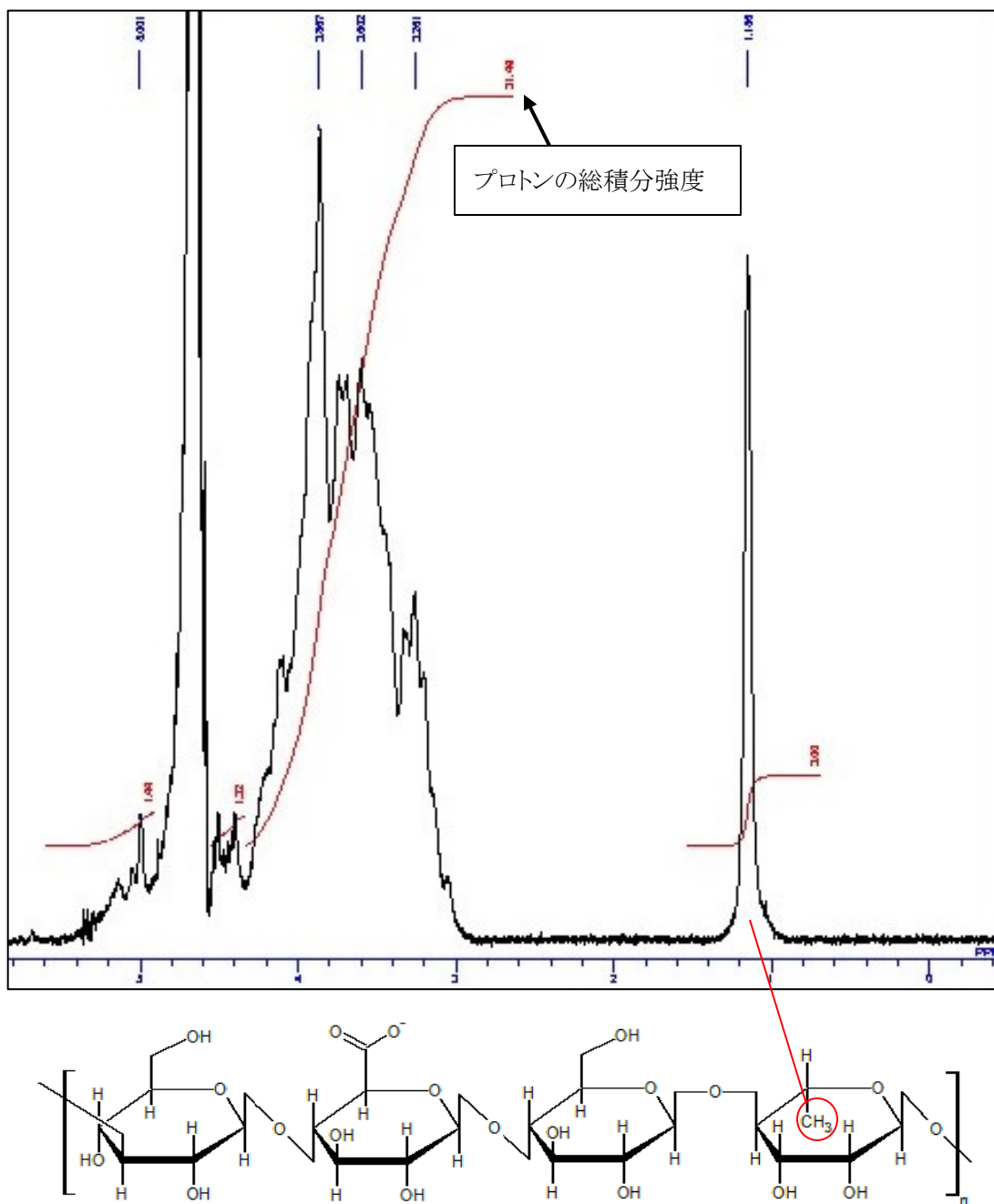


Fig.3-1 作製した CMG のスペクトルと脱アシルジェランの構造

3-2 ゲルビーズの粒径分布調査

2-2 より作製したゲルビーズを位相差顕微鏡で撮影した写真を Fig.3-2 に示す。

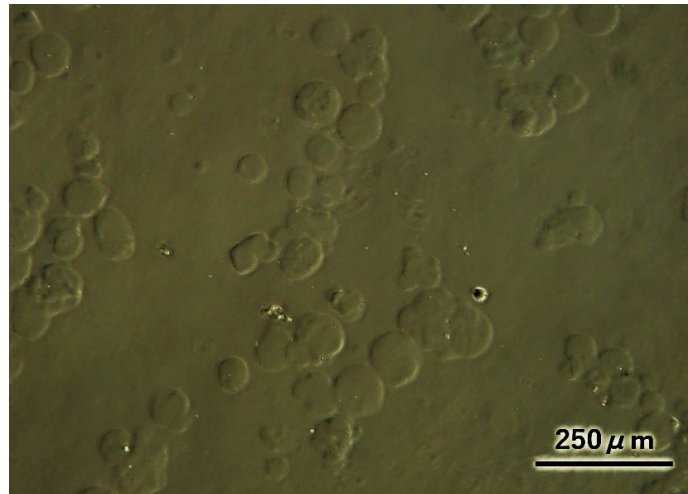


Fig.3-2 位相差顕微鏡で撮影したゲルビーズ(×100)

このように、乳化法により真円度の高いゲルビーズを作製することができた。また、撮影した写真からゲルビーズの粒径分布を調査した結果を Fig.3-3 に示す。

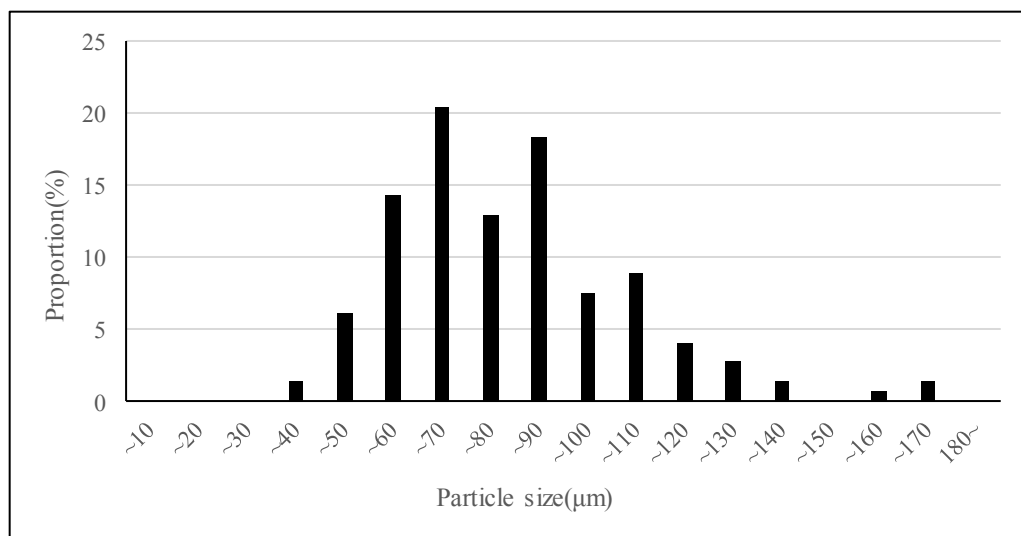


Fig.3-3 ゲルビーズの粒径分布

粒径 40~100 μm のゲルビーズが全体のおよそ 80%を占めた。平均粒径は 79.26 μm であった。

3-3 ゲルビーズの徐放実験

3-3-1 タンパクの徐放

CMG ゲルビーズによるタンパク(アルブミン)の徐放の結果を Fig.3-4 に示す。徐放開始から 15 日目まで外液内のアルブミン量の測定を続けた。

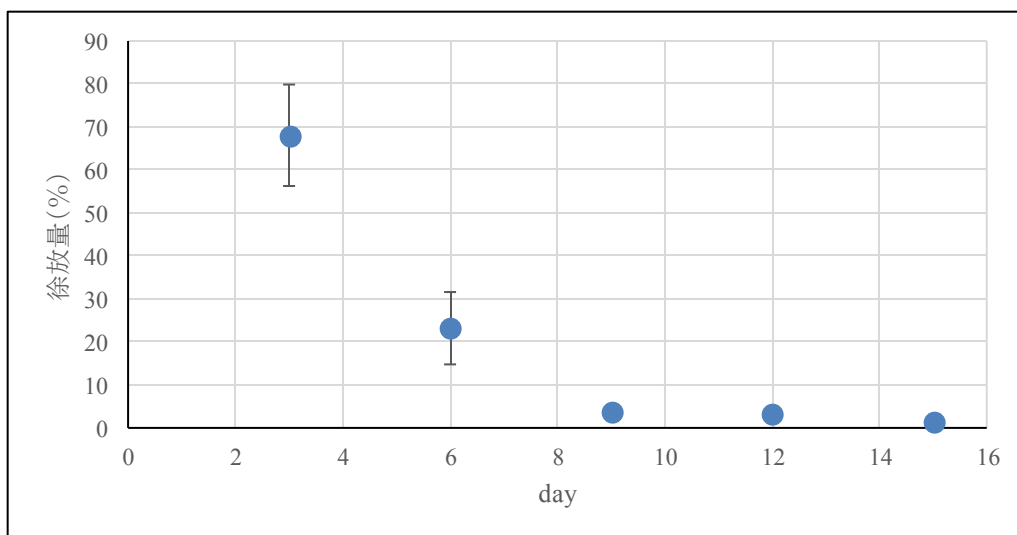


Fig.3-4 アルブミンの徐放量の推移(n=3)

アルブミンを捕捉させた時の外液から 0 日目でのゲルビーズ内に捕捉されているアルブミン量は 44.6 μ g であると分かった。

3 日目の時点でゲルビーズに含まれているアルブミンの 68%が外液に放出された。その後、日数が経過するにつれて徐放量は減少していき、15 日目で外液からアルブミンが検出できなくなったため観察を終了した。

3-3-2 GS の徐放

GS-CMG ゲルビーズによる GS の徐放の結果を Fig.3-5 に示す。

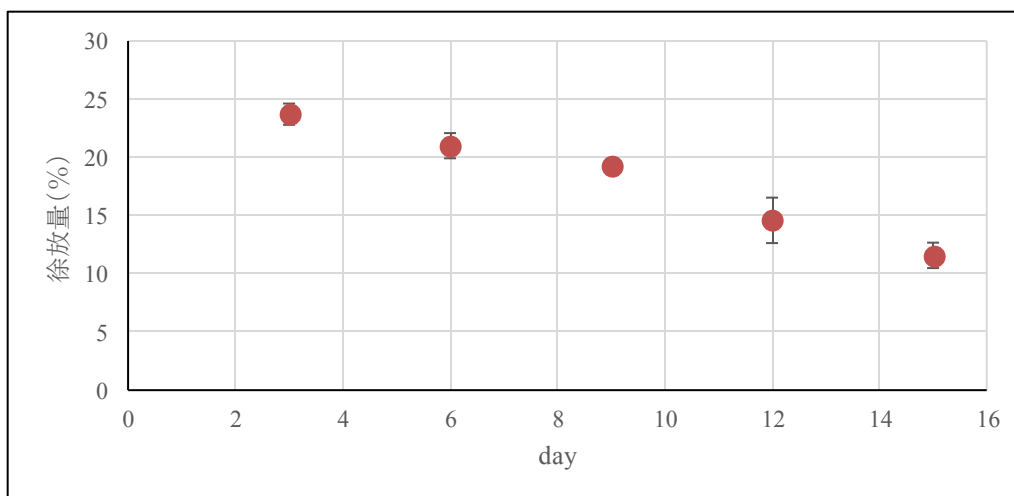


Fig.3-5 GS の徐放量の推移(n=3)

GS を捕捉させた時の外液から 0 日目でのゲルビーズ内に捕捉されている GS 量は $54.3\mu\text{g}$ であると分かった。3 日目の時点でゲルビーズに含まれている GS の 23.7% が外液に放出された。その後、日数が経過するにつれて徐放量は減少していった。

また、Fig.3-4 と Fig.3-5 をまとめたグラフを Fig.3-6 に示す。

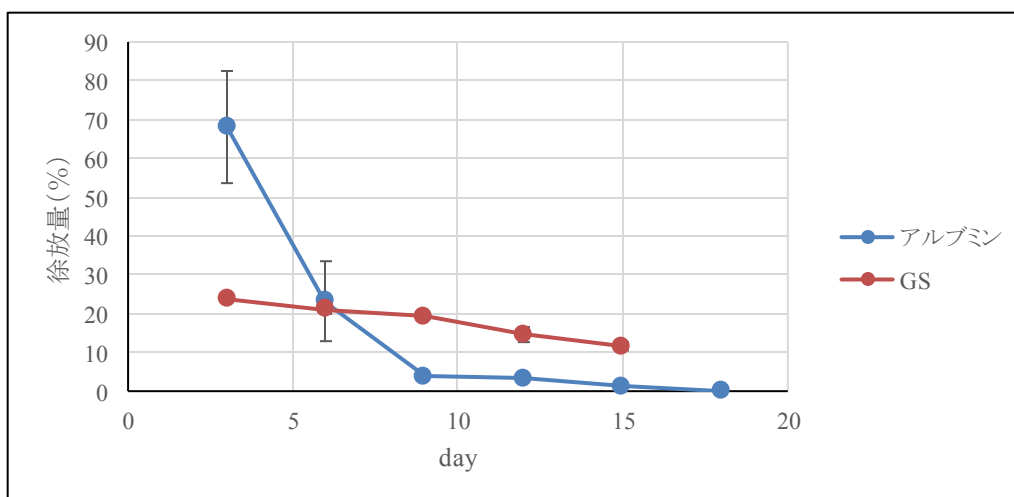


Fig.3-6 アルブミンと GS の徐放量の比較

アルブミンは初期に大量に徐放され、2 週間程度でほとんどが徐放されたが、GS はゆるやかに徐放され、2 週間後でも低濃度で徐放していた。

3-4 bFGF 添加培地による NP 細胞への影響

3-4-1 遺伝子発現調査

bFGF を添加し NP 細胞の遺伝子発現変化を調査した。結果を Fig.3-7 に示す。

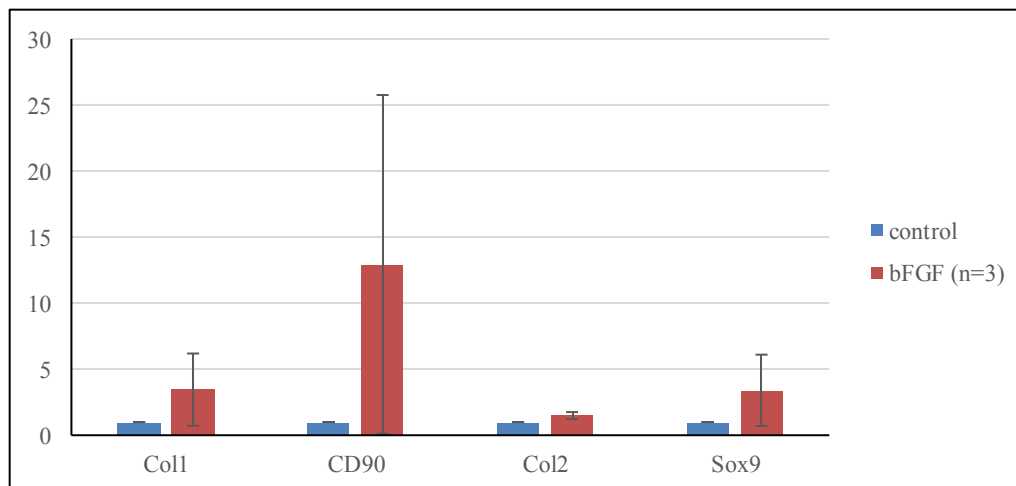


Fig.3-7 bFGF 添加 NP 細胞の遺伝子発現変化

脱分化マーカーである Collagen type1 および CD90 の発現が増加した。

3-4-2 増殖速度測定

bFGF を添加した際の NP 細胞の増殖速度を測定した。結果を Fig.3-8 に示す。

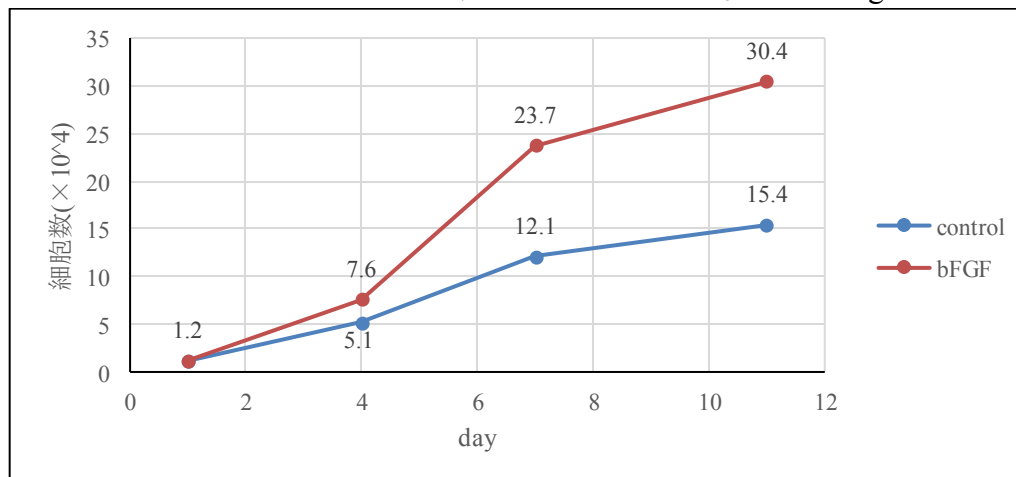


Fig.3-8 bFGF 添加 NP 細胞の増殖速度変化

コントロールと比較して培養日数当たりの細胞数が増加した。細胞は脱分化することで増殖が促進されることが分かっている。そのためこれらの結果から、今回単離した NP 細胞においても bFGF を用いて脱分化を促進できると確認できた。

3-5 GS 添加培地による NP 細胞への影響

3-5-1 硫酸化度依存での遺伝子発現調査

異なる硫酸化度の GS を添加した際の NP 細胞の遺伝子発現変化を調査した。結果を Fig.3-9 に示す。(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$)

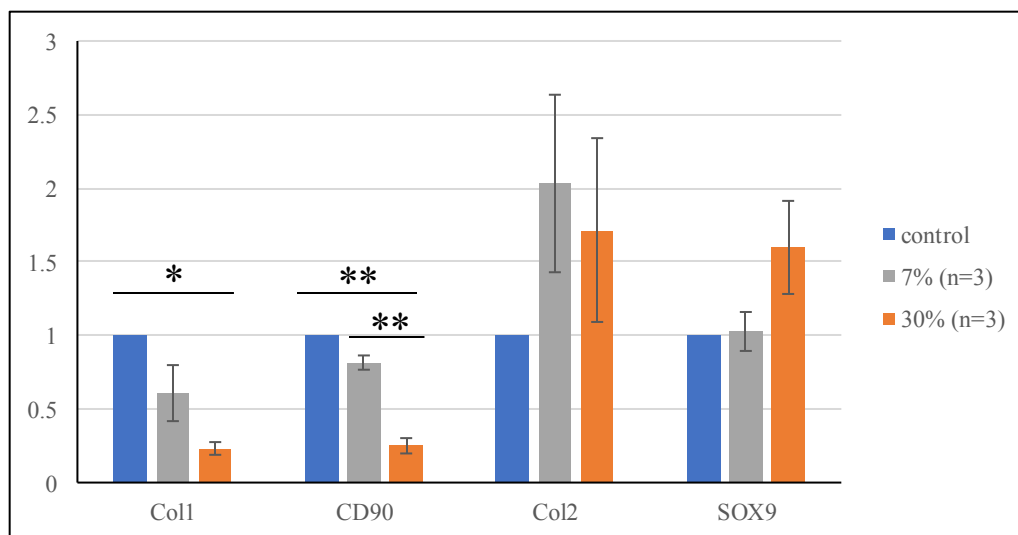


Fig.3-9 GS 添加 NP 細胞の遺伝子発現変化(硫酸化度依存)

どちらの GS もコントロールと比較して脱分化マーカーである Collagen type1 および CD90 の発現が減少し、分化マーカーである Collagen type2 および SOX9 の発現が増加した。

硫酸化度 30%の GS を添加した NP 細胞では Collagen type1 および CD90 がコントロールと比較して有意に減少し、特に CD90 の発現は 7%GS と比較しても有意に減少した。

この結果から以降の実験ではより分化作用を持つ 30.7%の GS を用いて行った。

3-5-2 濃度依存での遺伝子発現調査

異なる濃度のGSを添加した際のNP細胞の遺伝子発現変化を調査した。結果をFig.3-10に示す。(*:p<0.05, **:p<0.01)

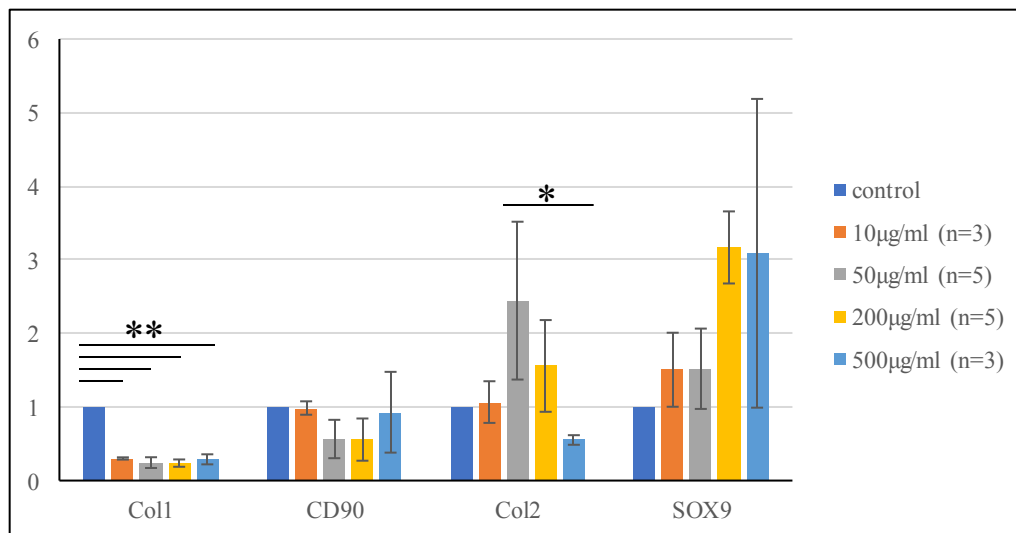


Fig.3-10 GS 添加 NP 細胞の遺伝子発現変化(濃度依存)

いずれの濃度においてもコントロールと比較して脱分化マーカーである **Collagen type1** および **CD90** が減少した。特に **Collagen type1** に関しては全ての濃度で有意に減少した。また、分化マーカーである **Collagen type2** および **SOX9** については増加傾向を示した。

特に **SOX9** に関しては濃度が高くなるにつれて発現も増加しており、より高濃度のGS添加培地がNP細胞の分化に有効であることが示唆された。

3-6 bFGF および GS 添加培地による NP 細胞への影響

bFGF および GS を同時に添加した際の NP 細胞の遺伝子発現の変化を調査した。結果を Fig.3-11 に示す。(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$)

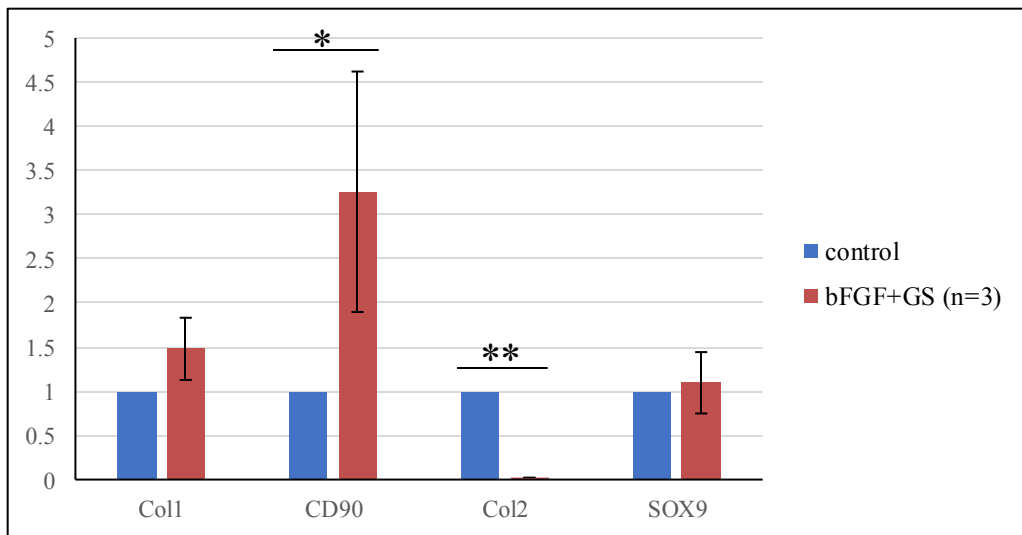


Fig.3-11 bFGF および GS 添加 NP 細胞の遺伝子発現変化

コントロールと比較して、脱分化マーカーである **Collagen type 1** および **CD90** の発現が増加し、特に **CD90** に関しては有意に増加した。また、分化マーカーである **Collagen type 2** の発現が有意に減少した。

この結果から、脱分化を促進させる **bFGF** と分化を促進させる **GS** を同時に添加すると、**bFGF** の作用により脱分化傾向を示すということが分かった。

3-7 ゲルビーズ内培養による NP 細胞への影響

3-7-1 ゲルビーズ内培養の免疫蛍光染色結果

ゲルビーズ内培養を行った際のゲルビーズ内での細胞の様子を共焦点顕微鏡により撮影した結果を Fig.3-12 に示す。(green:ゲルビーズ, blue:細胞核, scale bar: 100 μ m)

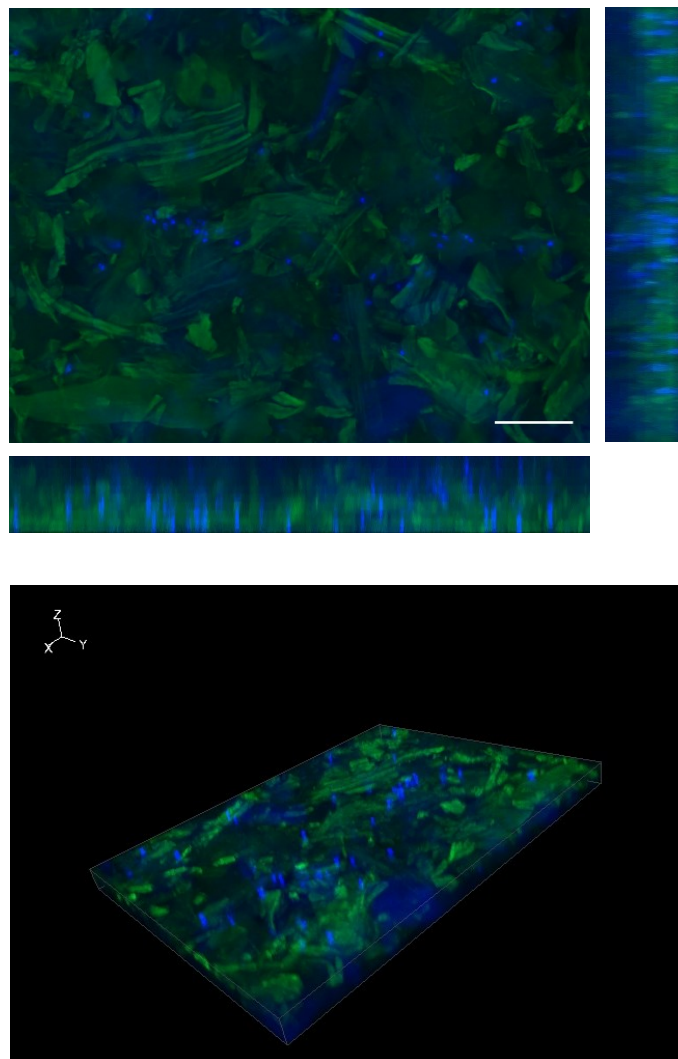


Fig.3-12 ゲルビーズ内培養の免疫蛍光染色画像

染色の過程でゲルビーズの形状が崩れ球状では無くなったが、ゲルとゲルの間に細胞が存在し、偏らずに分散していることが分かった。

3-7-2 bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズ内培養での遺伝子発現調査

bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズ内で 1 週間培養した NP 細胞の遺伝子発現変化を調査した。結果を Fig.3-13 に示す。さらに、CD90, Col2 および SOX9 については対数目盛で示したグラフを Fig.3-14 に示す。(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$)

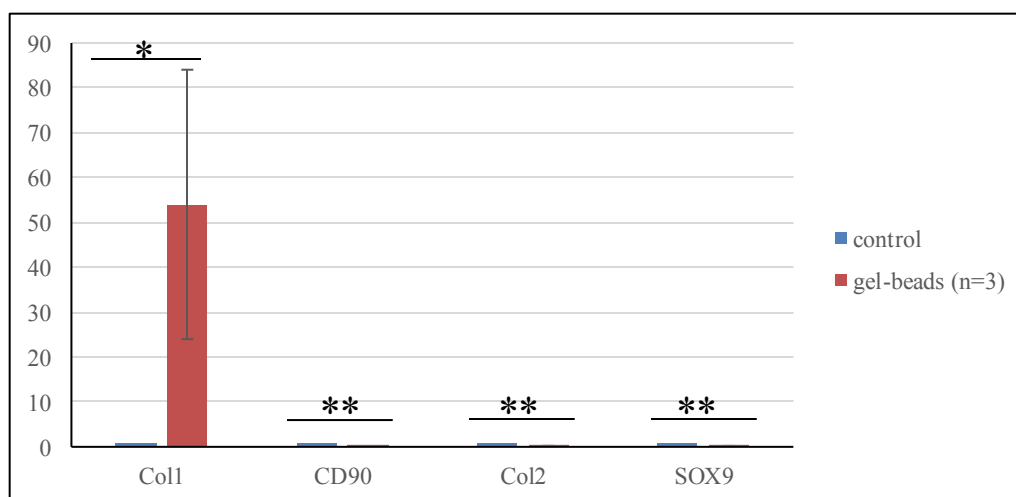


Fig.3-13 bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズ内培養の遺伝子発現変化

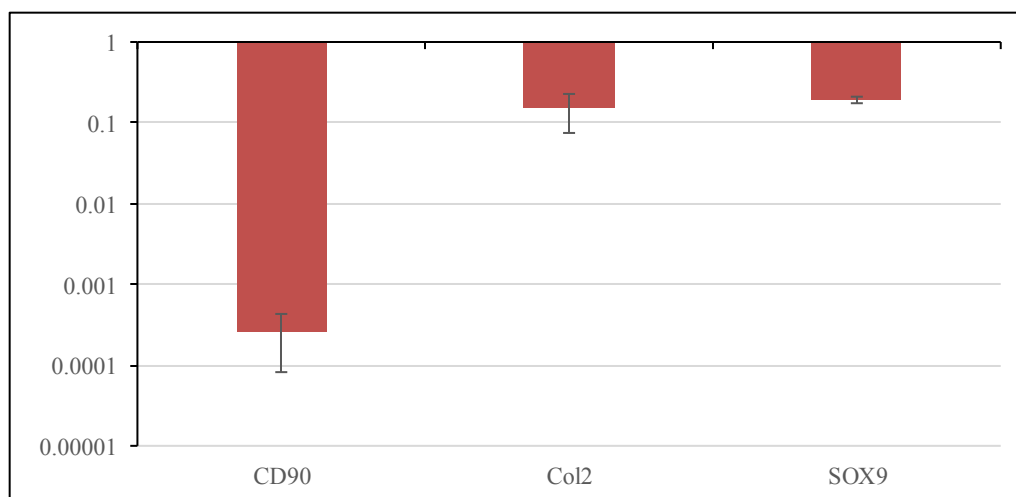


Fig.3-14 対数目盛で示した CD90, Col2, SOX9

コントロールと比較して、脱分化マーカーである Collagen type1 の発現が有意に増加した。また、分化マーカーである Collagen type2 および SOX9 の発現は有意に減少した。

この結果から、bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズ内で 1 週間培養した NP 細胞は脱分化傾向を示すことが分かった。

3-7-3 bFGF および GS 徐放型ゲルビーズ内培養での遺伝子発現調査

bFGF および GS 徐放型ゲルビーズ内で 1 週間および 3 週間培養した NP 細胞の遺伝子発現変化を調査した。1 週間培養の結果を Fig.3-15、3 週間培養の結果を Fig.3-16 に示す。(** :p<0.01)

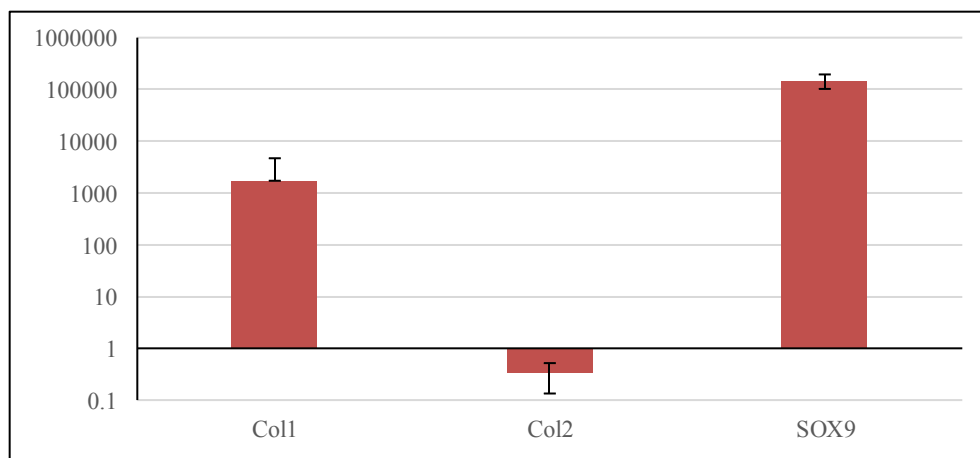


Fig.3-15 ゲルビーズ内培養 1 週間の遺伝子発現変化

コントロールを 1 とした時の遺伝子発現量の変化をグラフで示した。脱分化マーカである Collagen type1 の発現が増加した。さらに、分化マーカである転写因子の SOX9 の発現が大幅に増加し、Collagen type2 の発現が減少した。

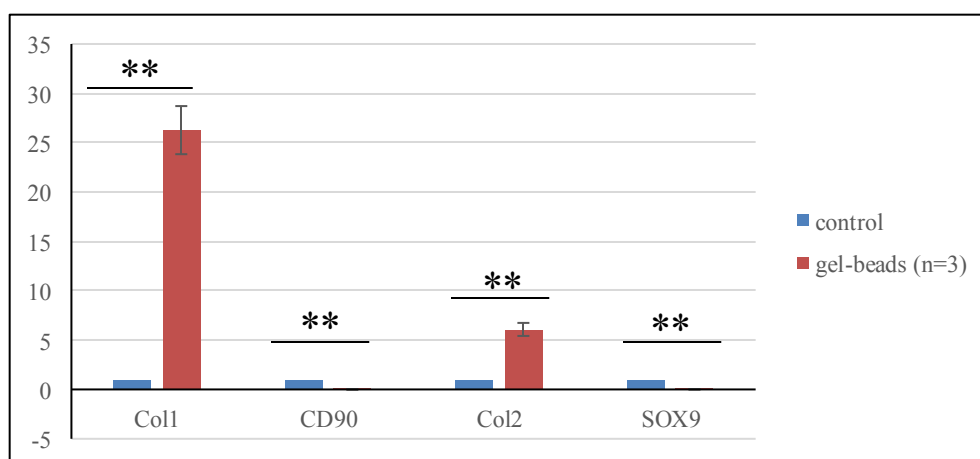


Fig.3-16 ゲルビーズ内培養 3 週間の遺伝子発現変化

コントロールと比較して脱分化マーカである Collagen type1 の発現が増加し、CD90 が減少した。また、分化マーカである Collagen type2 の発現が増加し、SOX9 は減少した。

4. 考察

4-1 GS 添加培養による NP 細胞の再分化

NP 細胞は *in vitro* で単層培養を行うと、増殖していくにつれ脱分化することが知られている⁽²⁾。本研究で行った遺伝子発現解析から、脱分化した NP 細胞を GS 添加培地中で培養すると、通常培地で培養した NP 細胞と比較して、分化マーカーである Collagen type2 および SOX9 が増加し、脱分化マーカーである Collagen type1 および CD90 が減少するという結果が得られた(Fig.3-9, Fig.3-10)。このことから、GS が NP 細胞の再分化を促したと考えられる。

NP は本来、II 型コラーゲンやヒアルロン酸、sGAG などの細胞外マトリックスで構成された 3 次元構造の隙間(小腔)に数個単位の NP 細胞が存在し、機能している。生体内での NP 細胞は数個単位で存在しているため、細胞増殖を行う必要がない。そのため、ほとんど細胞増殖が起きることはない。しかし *in vitro* での単層培養では小腔内とは異なりスペースが沢山あるため、細胞分裂が盛んに行われ形態変化を及ぼし、脱分化してしまう。

そこで、形態変化を起こした NP 細胞に sGAG に似た構造を持つ GS を添加すると、GS が NP 細胞の周囲に蓄積し、NP 細胞が細胞外マトリックスに取り囲まれたような構造になると考えられる。そのような状況下にある NP 細胞が徐々に再分化し、元の形態に戻ることで、本来の NP 細胞の機能を取り戻し、遺伝子発現解析における分化マーカーの増加が確認できたと考えられる。(Fig.4-1)。

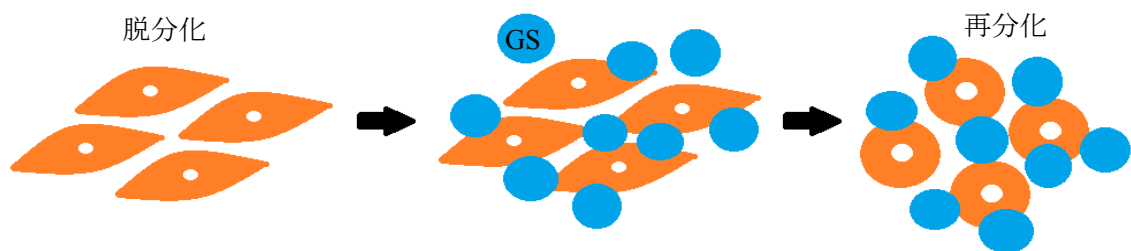


Fig.4-1 NP 細胞の再分化

4-2 GS とコンドロイチン硫酸の類似性

過去に脱分化を引き起こした軟骨細胞に sGAG の一種であるコンドロイチン硫酸を加えることにより、主な基質であるアグリカンやコラーゲンの分解酵素の発現量が減少すると報告されている⁽¹⁴⁾。このことから、コンドロイチン硫酸は軟骨破壊を促進させる分解酵素の産生を抑えることで、基質の産生を促進させていると考えられる。

コンドロイチン硫酸は Fig.4-2 に示されるように D-グルクロン酸と N-アセチル-D-ガラクトサミンの 2 糖単位の構造を持っており、硫酸基は N-アセチル-D-ガラクトサミン内の赤丸で示した R2 個のうちどちらか一方に付加している。4 位に硫酸基が付加したものがコンドロイチン 4 硫酸、6 位に硫酸基が付加したものがコンドロイチン 6 硫酸と呼ばれるがどちらのコンドロイチン硫酸も軟骨に多く含まれる。

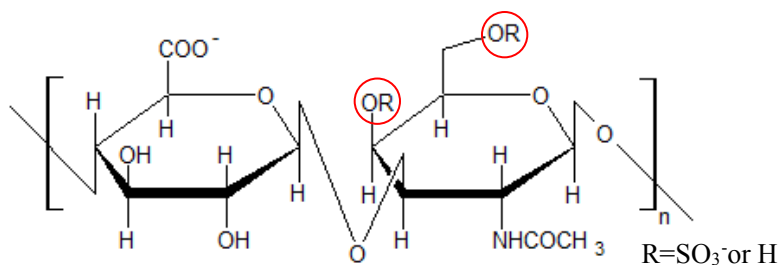


Fig.4-2 コンドロイチン硫酸の構造

対して GS は Fig.4-3 のような構造を持っており、赤丸で示した部位が硫酸化可能部位であるが、より立体傷害の少ない(a)の部位が最も硫酸化しやすいと考えられる。したがって、コンドロイチン 6 硫酸と同じ部位に硫酸基がある可能性が非常に高い。さらに、コンドロイチン硫酸と同様に D-グルクロン酸が含まれており、このことから GS とコンドロイチン硫酸は類似点の多い物質だということが分かる。

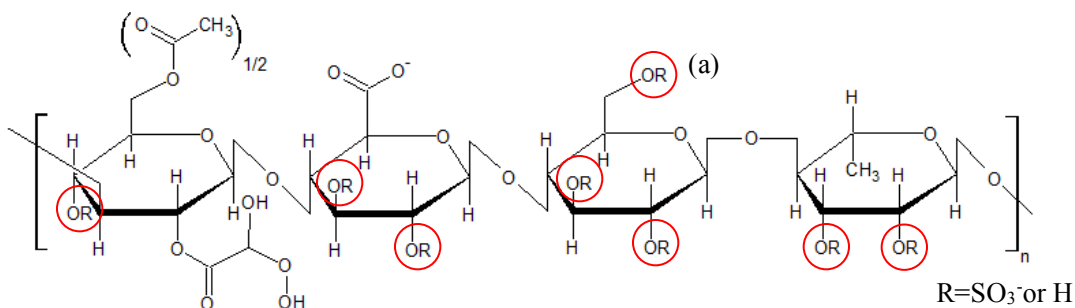


Fig.4-3 硫酸化ネイティブ型ジェラン (GS) の構造

本研究では硫酸化率 30.7%の GS を用いて実験を行った。硫酸化率 30.7%の GS とは、Fig.4-2 の赤丸で示した R8 個に対し 2 個の硫酸基と 6 個の水素が付加している状態であると考えられる。また、コンドロイチン硫酸の 2 糖単位の構造が 2 回繰り返されると、4 糖のうち硫酸基が 2 個付加していることが分かる。このことから、コンドロイチン硫酸と硫酸化率 30.7%の GS は硫酸基の個数も同じであると推測できる。そのため、硫酸化率 7%の GS と比較して硫酸化率 30.7%の GS はコンドロイチン硫酸と非常に似た構造を持っており、NP 細胞培養の際は、NP に対するコンドロイチン硫酸の役割と同様の役割を GS が担っていると考えられる。

コンドロイチン硫酸による分解酵素発現の抑制について説明する。

ADAMTS4 (aggrecanase-1) はアグリカンを含むヒアルロン酸結合プロテオグリカンの全てを切断する酵素である。この酵素は炎症性サイトカインである Interleukin-1 α (IL-1 α) が細胞表面の受容体に結合し、シグナルが伝達されることで産生されることが分かっている⁽¹⁵⁾。また、このシグナルは細胞表面に存在する CD44 にヒアルロン酸が結合することで阻害される事が分かっている⁽¹⁶⁾。さらに CD44 のヒアルロン酸結合部位にコンドロイチン硫酸も結合できると報告されている⁽¹⁷⁾。

これらの報告を元にコンドロイチン硫酸による ADAMTS4 の産生の阻害についてまとめた結果を Fig.4-4 に示す。

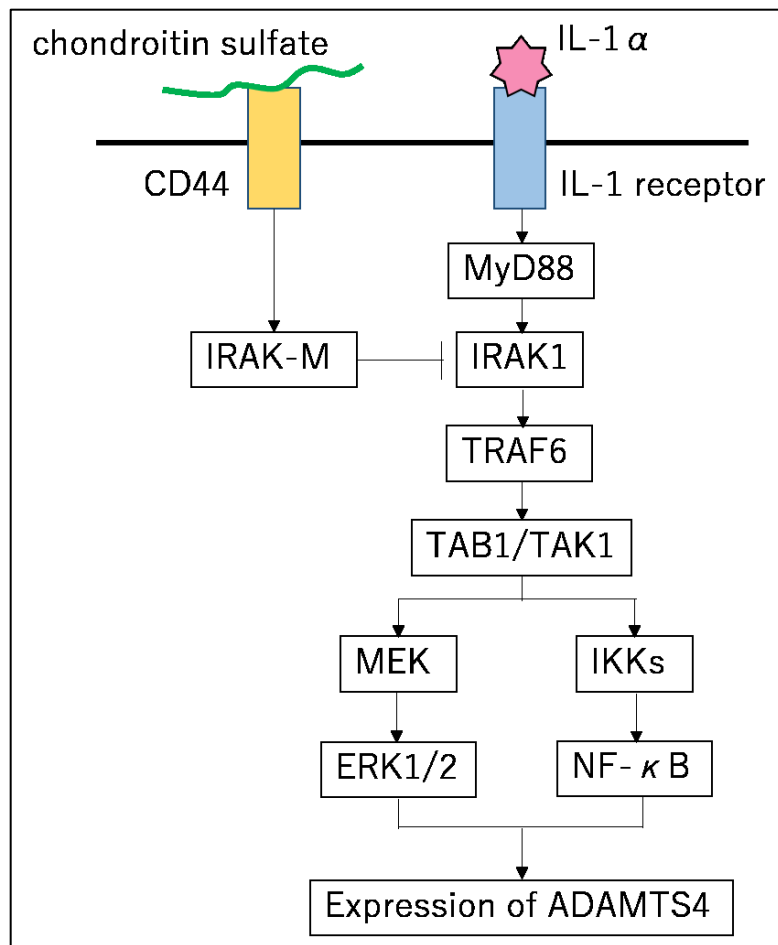


Fig-4-4 コンドロイチン硫酸による分解酵素の抑制

IL-1 α が細胞表面の受容体に結合することで IRAK1 が活性化され、ERK や NF- κ B などの経路を辿ることにより ADAMTS4 が発現される。そこへコンドロイチン硫酸が CD44 に結合し、活性化された IRAK-M が IRAK1 のシグナル伝達を阻害することで ADAMTS4 の発現が抑制されると考えられる。このように ADAMTS4 産生シグナルを阻害することで基質の分解が抑制され、結果的に基質産生の増加へと繋がると考えられる。

また、GS はコンドロイチン硫酸と類似点の多い構造を持っているため、同様の役割を担う可能性が高いと考えられる。

ADAMT4 は C 末端ドメインに Thrombospondin type-1(TSP-1)モチーフを有しており、そこにコンドロイチン硫酸などの硫酸化グリコサミノグリカンが結合するということが分かっている⁽¹⁸⁾。また、ADAMT4 がアグリカン分解する際、TSP-1 モチーフとアグリカンコアタンパク質上のグリコサミノグリカン側鎖との間で生じた相互作用によりアグリカンの分解が促進されるが、先にコンドロイチン硫酸が TSP-1 モチーフと結合することで、アグリカンの分解が阻害されると考えられている⁽¹⁹⁾。さらに、コンドロイチン硫酸と比較して高硫酸化度のグリコサミノグリカンが軟骨のアグリカン分解を阻害したという報告があることから⁽²⁰⁾、TSP-1 モチーフとグリコサミノグリカンの結合においてグリコサミノグリカン上の硫酸基の関与が示唆される。

したがって、本研究で使用した GS は前述の通りコンドロイチン硫酸と同程度の硫酸化度であるが、より硫酸化率の高い GS を添加することにより基質産生が増大する可能性もある。

CD44 との結合による ADAMT4 産生の阻害や TSP-1 モチーフとの結合によるアグリカン分解の抑制などの理由から、コンドロイチン硫酸は NP 細胞の基質産生を促進させると示唆され、構造上の類似点が多い GS に関しても同様の効果があると考えられる。その上で、より高硫酸化度の多糖になり得る GS はコンドロイチン硫酸と比較して NP 細胞の再分化をコントロールする薬剤として優れていると言える。

4-3 ゲルビーズの薬物の捕捉と徐放

本研究ではゲルビーズを脱イオン水で膨潤、培地で収縮させて薬物を内部に捕捉させた。この方法はゲルビーズ内部とゲルビーズ外部の溶液の浸透圧の差を利用して行った。その模式図を Fig.4-5 に示す。

まず、薬物を含む脱イオン水にゲルビーズを浸すと、ゲルビーズ内部の未反応物の濃度が高いことから脱イオン水が内部へ流れ込む(a)。その際に、薬物も同時にゲルビーズ内に流れ込む。しかし、この状態ではゲルビーズは膨潤した状態であるため容易に薬物が流れ出てしまう。

そこで次に薬物を含む培地に浸してゲルビーズを収縮させた(b)。これは、ゲル内部に脱イオン水が侵入することでゲルビーズ内部の濃度が薄まり、培地中に含まれるグルコースや重曹、アミノ酸の濃度の方が内部よりも高くなったことにより、内部の水分が奪われ収縮したと考えられる。また、培地中にも薬物は含まれているため、ある程度の収縮で留めることができ、ゲルビーズ内部に薬物を保持したまま収縮することが可能となる。以上の原理でゲルビーズに薬物を捕捉することができたと考えられる。

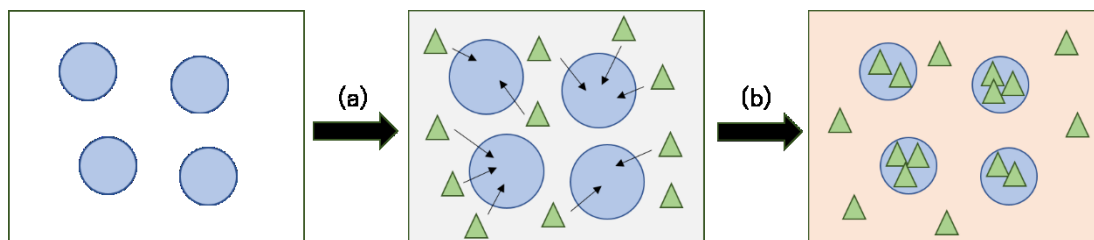


Fig.4-5 ゲルビーズの薬物捕捉

ゲルビーズは薬物を上記の方法で捕捉した後、徐放する。Fig.3-6 で示される通りアルブミンは3日目で初期に捕捉量のおよそ70%を放出し約2週間で徐放が終了した。対してGSはゆるやかに放出されていき、2週間目の時点でも徐放が継続していた。この徐放挙動の違いについて、薬物の大きさに要因があると考えられる。それぞれの分子量はアルブミンが66,000、GSが50万以上となっている。ゲルビーズが薬物を捕捉する際、ゲルは大きく膨潤することで網目のような構造になっていると考えられる。したがって徐放される際もその網目を通り外液に放出されていると思われる。この場合、分子量が小さく網目を容易に通れる薬物ほど早く徐放されるのではないかと推測できる。そのため、より分子量の小さいアルブミンがGSよりも早く徐放されたと考えられる。

また、NP細胞の脱分化を促進する薬物として用いるbFGFの分子量は17,000でアルブミンと近いいため徐放挙動が同じと仮定して実験を進めた。

次に体内にインジェクトした際のゲルビーズの徐放挙動について説明する。

本実験ではゲルビーズ 200 μ l に対し DMEM 1ml を加え 3 日毎に交換し、そこに放出された薬物量を測定して徐放挙動を観察した。そのため、測定濃度 = 3 日間で徐放された薬物の濃度ということになる。

ゲルビーズを体内にインジェクトすると、ゲルビーズは組織液にさらされることになる。組織液は髄核と椎骨の間に存在する硝子軟骨から供給される。この組織液は椎間板と硝子軟骨を自由に出入りすることができ、椎間板にとっての重要な栄養供給源である。この組織液が髄核周辺に存在する唯一の液体である。椎間板は組織液をスポンジのように吸ったり出したりして厚さを変化させており、その変化は 6mm から 20mm である⁽²¹⁾。

椎間板を横(a)30mm×奥行き(b)15mm の立方体と仮定すると、厚さ(c)が 6mm から 20mm に変化した場合、体積は 2.7cm³ から 9cm³ へ変化する (Fig.4-6)。したがって椎間板内を出入りする組織液量は 6.3ml であると考えられる。ここで椎間板における髄核の割合が 3 分の 1 と考えると、髄核を出入りする液量は 2.1ml である。



Fig.4-6 椎間板の体積変化

本実験ではゲルビーズ 200 μ l に対し DMEM を 1ml 加えた。しかし髄核を出入りする液量は 2.1ml であるため、体内で同様の徐放挙動を示すとなると外液の濃度が半分ほどに減少してしまい、細胞に十分に薬物を与えることができない。

この時、インジェクトするゲルビーズ量を 2 倍にすることで問題を解決することができる。また、患部の損傷具合に応じてゲルビーズ量を変化させる場合、ゲルビーズに捕捉させる薬物量を調節することによって徐放濃度をコントロールすることができる。

このようにゲルビーズを用いた椎間板再生治療は患部に合わせて適切な処置をすることができるため、あらかじめ形・大きさが決まっている椎間板置換術と比較しても有用であると言える。

4-4 ゲルビーズ内培養

本研究で考案したゲルビーズでの治療法は体内で一度 NP 細胞を脱分化・増殖させてから再分化させるという方法である。まず、bFGF 徐放型 CMG ゲルビーズのみで培養した NP 細胞は脱分化マーカーである **Collagen type1** の発現が増加した (Fig.3-13, Fig.3-14)。このことからゲルビーズ内であっても単層培養と同様に bFGF によって脱分化が促進されることが分かった。

次に薬物徐放実験においてアルブミンを bFGF と仮定した場合、最初の 1 週間で GS と比較して脱分化促進薬物である bFGF が多量に放出される (Fig.4-7, 赤)。そのため 1 週間の bFGF および GS 徐放型ゲルビーズ内培養では NP 細胞の脱分化が促進され脱分化マーカーである **Collagen type1** の発現が増加したと考えられる (Fig.3-15)。しかし同時に分化マーカーである **SOX9** の発現も増加した。そのため 1 週間の時点では NP 細胞は脱分化型から分化型に移行している途中であると考えられる。

ゲルビーズの薬物徐放は 1 週間を境に bFGF がほとんど放出されなくなり、GS の徐放量が上回る (Fig.4-7, 緑)。そのため 3 週間の bFGF および GS 徐放型ゲルビーズ内培養では 1 週間培養と比較して脱分化マーカーである **Collagen type1** の増加が抑制されたと考えられる (Fig.3-16)。また、Fig.3-15 で転写因子である **SOX9** が発現したことにより、基質産生が活性化され **Collagen type2** の発現が増加したと考えられる。

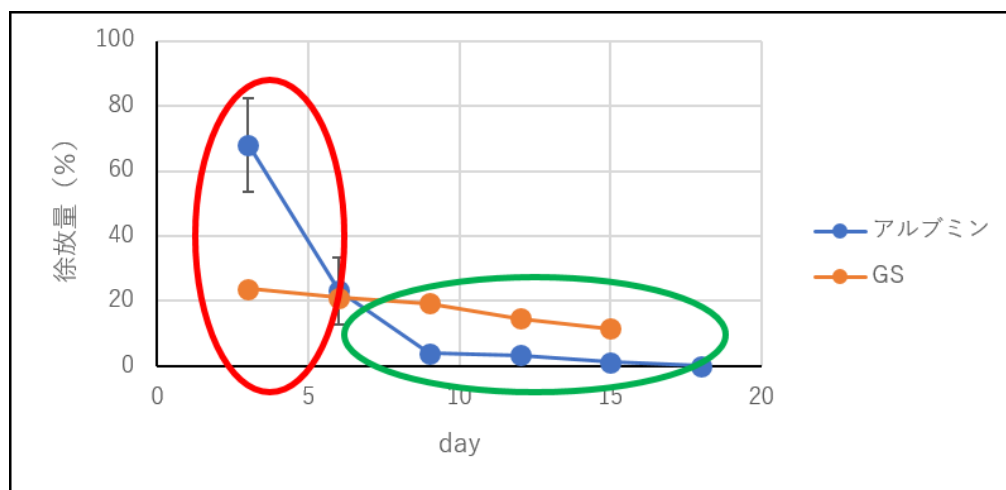


Fig.4-7 ゲルビーズの薬物放出挙動

しかし、脱分化傾向を示した Fig.3-13 の結果において脱分化マーカーである CD90 の発現が増加せず、Fig.3-15 に至っては測定可能限界を下回ったため測定ができなかった。CD90 は線維芽細胞や間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) のマーカーとして知られており、近年 NP 細胞の脱分化マーカーである事が示された(22)。以来 NP 細胞の脱分化マーカーとして使用されているが、ゲルビーズ内培養のような 3 次元培養で CD90 の発現を調査した報告は見つけれなかった。したがって CD90 は 3 次元培養のような細胞接着が生じない培養法においてはマーカーになり得ないのではないかと考えた。

また、一般的に NP 細胞を含む軟骨細胞は 3 次元培養下で分化傾向を示すことが分かっている。そのため bFGF 添加培地で単層培養を行った NP 細胞の遺伝子発現調査の結果 (Fig.3-7) では CD90 の発現は増加しているが、単層培養から 3 次元培養に変化した事で発現が抑えられたとも考えられる。

4-4 bFGF 徐放後の GS による再分化誘導メカニズム

Fig.3-13 の結果よりゲルビーズ内培養において bFGF の徐放終了後、GS が徐放されることにより NP 細胞が再分化する事が分かった。bFGF がレセプターである線維芽細胞増殖因子受容体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) と細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan: HSPG) のヘパラン硫酸鎖 (heparin sulfate: HS) と三量体を形成することにより脱分化のシグナルが伝達すると考えられている(23)。

GS は以前の研究で bFGF と親和性を持つことが報告されているため、GS が bFGF と HS の結合を阻害し、GS と bFGF が結合することで bFGF のシグナル伝達を抑制していると考えられる。そのメカニズムを Fig.4-8 に示す。

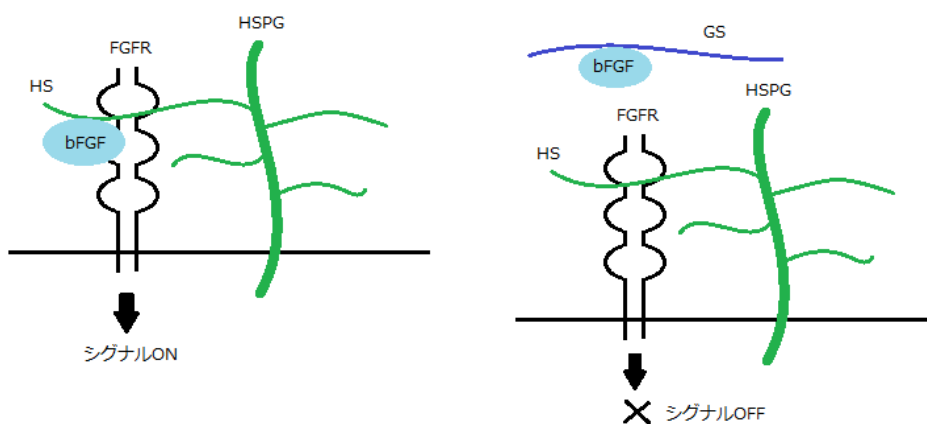


Fig.4-8 bFGF 添加後の GS による再分化誘導メカニズム

また、実際にブタ NP 細胞に bFGF を添加すると、線維芽様の形態を取ったが、その後 GS を添加すると、本来の NP 細胞に近い形態に戻るといった報告がある⁽²⁴⁾。このことから bFGF を添加した培養において GS は再分化を誘導していることが分かる。

しかし、bFGF と GS を同時に添加し培養した NP 細胞の遺伝子発現の結果 (Fig.3-11) は脱分化マーカーが増加しており、この考察と矛盾を生じているように見える。

本研究では濃度 10ng/ml の bFGF 添加培地を使用し細胞の脱分化および増殖を刺激した。しかし、実際はさらに低濃度であっても同様の反応を示す可能性が高い。Fig.4-9 で示すグラフは bFGF を濃度別でウシ NP 細胞に添加した際の DNA 合成の変化を表している。このグラフから bFGF は 0.1ng/ml という低濃度でも細胞増殖を促進していることが分かる。

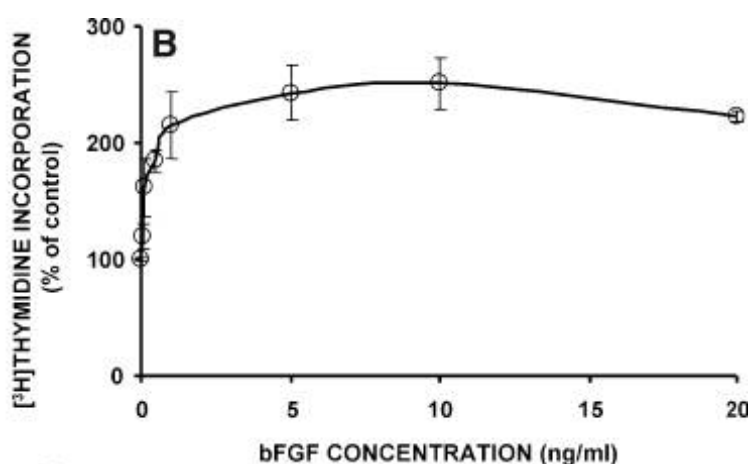


Fig.4-9 bFGF 濃度別の DNA 合成促進⁽²⁵⁾

このことから、本研究で使用した 10ng/ml の bFGF 添加培地は NP 細胞の脱分化および増殖を促進することに対しては過剰量であったと推測される。そのため bFGF と結合しシグナル伝達を阻害する GS を同時に添加した場合であっても再分化を促進せず脱分化傾向を示したと考えられる。

ゲルビーズ内培養においては bFGF が先に徐放されたため、3 週間後の遺伝子発現調査の時点では、残りの bFGF が全て GS と結合して機能しなくなり再分化傾向を示したと考えられる。

今回の研究で bFGF を過剰量加えることで、GS によるシグナル伝達の阻害を抑えることができると示唆された。そのため bFGF と GS の濃度比を変えることで、脱分化の程度や再分化し始めるまでの期間を調節することが可能であると分かった。

4-6 椎間板再生治療材料としてのゲルビーズ

本研究によって薬物徐放能を示すゲルビーズを作製することができた。そしてそのゲルビーズ内で細胞を培養することにより分化・脱分化をコントロールできることが示唆された。このことからゲルビーズを用いた新しい椎間板再生治療の可能性を見出した。治療の流れを Fig.4-10 に示す。

実際に治療を行う場合、細胞の増殖を待つ必要がないため細胞単離後すぐにゲルビーズとともに患部にインジェクトすることが可能である。また、作製したゲルビーズの粒径は平均 79 μm であり、内径 500 μm の注射針を用いることでゲルビーズと細胞を容易に押し出すことができると考えられる。さらに注射針の内径が小さいことから周辺組織の損傷も最小限に留めることができる。

ここで問題となるのが細胞の単離である。本実験では NP 細胞を用いて様々な環境下での遺伝子発現の変化を調査したが、実際の治療を考えた場合、患者自身の NP 細胞を単離することは負担が大きく難しい。そこで間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) の利用を考えた。現在 MSC を用いた椎間板再生のための研究が盛んに行われており⁽²⁶⁾、MSC が NP 細胞に分化するという報告もある⁽²⁷⁾。MSC は脂肪組織から採取することができるため、負担も少なくすることができる。

ゲルビーズを体内にインジェクトすると細胞は徐々に分化し、コラーゲンやプロテオグリカンなどの基質を産生する。産生されたそれらの基質によって別個に存在していたゲルビーズがひとまとまりになり、本来の髄核のような弾性を持つ物質へと変化していく。そしていずれは全てが基質に置き換わると考えている。

ゲルビーズの原料であるジェランが特定の酵素により分解されるという報告は現時点ではないが、架橋剤である Lys と CMG、GS の架橋点にペプチダーゼが働き、分解される可能性がある。Lys のエステル部位や EDC で脱水縮合を行った部位で加水分解が生じる可能性もある。これらの分解作用および椎間板に常時かかる圧によりゲルビーズが劣化し、組織液とともに血中に流れ出て体外に排出されると考えられる。

ただし、ゲルビーズの分解は先ほども述べた通り特定の酵素によるものではないため、かなりの時間を要すると考えられる。実際に本研究で作製したゲルをコラゲナーゼ溶液に浸し5ヶ月間観察したところ弾力が少し失われ分解される傾向にあったが、完全に分解されることはなかった。したがって、ゲルビーズは基質が十分に産生されるまでは椎間板中に保持され、髄核の働きを担うことができる。最終的に治療後半年～数年ほどでゲルビーズが分解され、完全な髄核組織に置き換わると推測される。

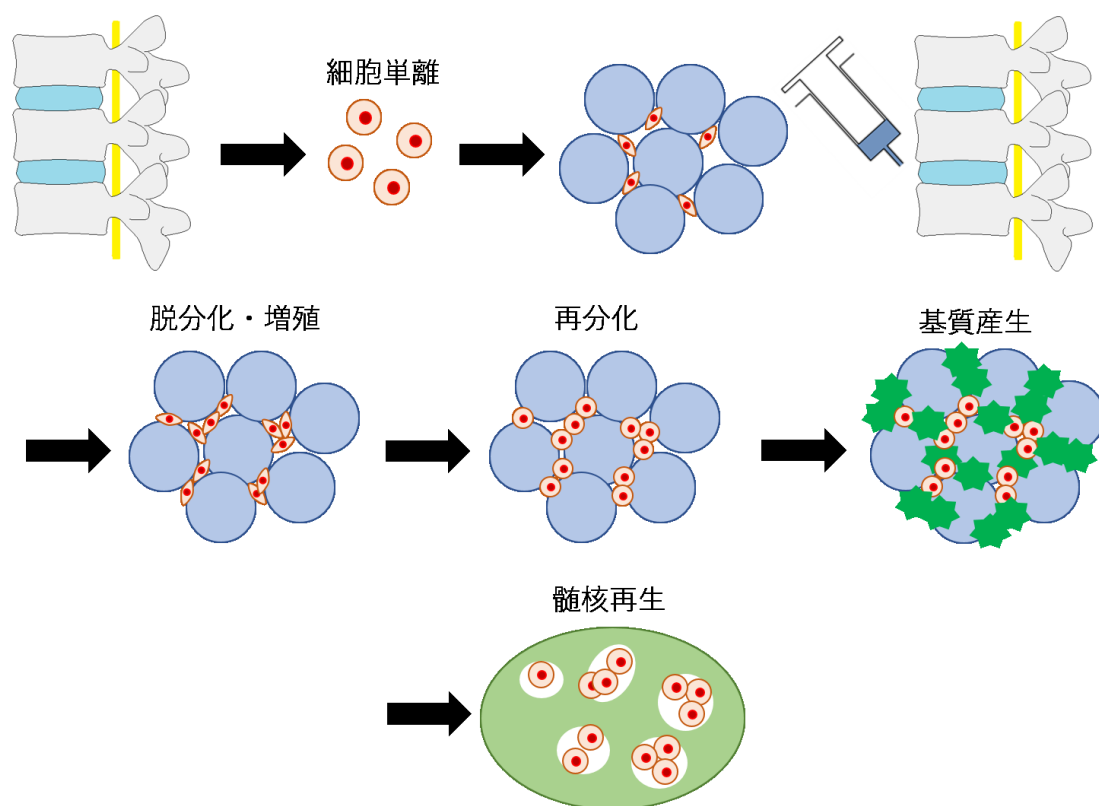


Fig.4-10 ゲルビーズによる椎間板再生治療

5.結論

- ・薬物徐放能を持つゲルビーズの作製に成功した。
- ・髄核細胞を bFGF が脱分化させ、GS が再分化させることを示した。

以上より、ゲルビーズを用いた新しい椎間板治療法の可能性を見出した。

6.参考文献

1. D. Voet, *et al*: 「ヴォート基礎生化学」第3版, 東京化学同人(2010)
2. Bin HE, *et al*: Normal and Degenerated Rabbit Nucleus Cells in in vitro Cultures: A biological Comparison. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2013 Apr;33(2):228-33.
3. A Carl, *et al*: New developments in nucleus pulposus replacement technology. *The Spine Journal* 4, 2004 Nov-Dec;4(6 Suppl):325S-329S.
4. Satoh K, *et al*: Presence and Distribution of Antigen-Antibody Complexes in the Herniated Nucleus Pulposus. *Spine*. 1999 Oct 1;24(19):1980-4.
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. *Journal of Orthopaedic Science*. 2010 Sep;15(5):666-73.
10. Li X, *et al*: Action of fibroblast growth factor-2 on the intervertebral disc. *Arthritis Research & Therapy*. 2008;10(2): R48.
11. 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, 髓核細胞に対する硫酸化ネイティブ型ジェランの影響
12. 宮本愛子, 平成27年度 三重大学工学部分子素材工学科卒業論文, 椎間板再生材料の開発
13. 水上光太郎, 平成28年度 三重大学工学部分子素材工学科卒業論文, 椎間板由来細胞に対する硫酸化ネイティブ型ジェランの効果
14. Imada K, *et al*: Anti-arthritic action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2010;33(3):410-4.
15. Le Maitre CL, *et al*: The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Research & Therapy*. 2005;7(4): R732-45.

16. Yatabe T, *et al*: Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009 Jun;68(6):1051-8.
17. Ruffell B, *et al*: Chondroitin sulfate addition to CD44H negatively regulates hyaluronan binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005 Aug 26;334(2):306-12.
18. Guo N, *et al*: Heparin-binding peptides from the type I repeats of thrombospondin: Structural requirements for heparin binding and promotion of melanoma cell adhesion and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*. 1992 Sep 25;267(27):19349-55.
19. Kuno K, *et al*: ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998 May 29;273(22):13912-7.
20. Munteanu SE, *et al*: Highly sulfated glycosaminoglycans inhibit aggrecanase degradation of aggrecan by bovine articular cartilage explant cultures. *Matrix Biology*. 2002 Aug; 21(5):429-40.
21. アラン・スタッダード, ほかに: 「オステオパシー臨床マニュアル」 科学新聞社 (1994)
22. Tang X, *et al*: Changes in the Molecular Phenotype of Nucleus Pulposus Cells with Intervertebral Disc Aging. *PLoS One*. 2012;7(12): e52020.
23. Haugsten EM, *et al*: Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Molecular Cancer Research*. 2010 Nov; 8(11): 1439-52.
24. 奥村和也, 平成 27 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, 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
25. Pratsinis H, *et al*: PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways. *European Spine Journal*. 2007 Nov;16(11):1858-66.
26. Clarke LE, *et al*: Harnessing the Potential of Mesenchymal Stem Cells for IVD Regeneration. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2015;10(4):296-306.
27. Korecki CL, *et al*: Notochordal cell conditioned medium stimulates mesenchymal stem cell differentiation toward a young nucleus pulposus phenotype. *Stem Cell Research & Therapy*. 2010 Jun 16;1(2):18.

7.謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導していただ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ました。希望していた生体材料化学研究室に配属され、大学院に進学し、3年間とても有意義な時間を過ごすことができました。

堀内教授には材料と細胞どちらに対してもいつも鋭い指摘をして頂き、深く勉強するきっかけを与えてくださいました。心から感謝しております。そしてご退官おめでとうございます。これからの益々のご活躍をお祈り申し上げます。

宮本准教授には実験に行き詰まり、どう進めて行けば良いのか分からなくなった時も丁寧に指導して頂きました。本論文を作成する上でも自分一人では到底思いつかないような考え方など沢山の助言をくださいました。また、忙しい中で私達のために実験に使用する組織を手配してくださったこと、大変感謝しております。3年間研究が出来たのも先生のおかげです。本当にありがとうございました。

副査を務めて頂いた湊元幹太先生に感謝申し上げます。至らぬ点が多々見受けられると思いますが、ご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い致します。

事務員の村上節子様には日々の研究室生活の中で様々な手続きをして下さり大変お世話になりました。これからも本研究室の学生を暖かく見守って頂けると幸いです。

ジェラングループの後輩である水上光太郎君、岸本悠哉君には細胞培養や材料の作製、時には実験の相談にも乗って頂き何度も助けられました。大学院進学後、悩みながらも楽しく過ごすことができたのは二人のおかげです。ありがとうございました。そしてこれからもよろしくお願いします。

3年間共に過ごしてきた同期のM2の皆さん、博士の晝河政希さんには実験や日々の生活の中で大変お世話になりました。M1、B4の皆さん、これからも実験に真面目に取り組み、楽しむ時は楽しむ研究室を守ってってください。

最後に、6年間の大学生活を経済的・精神的に支えてくださった家族に深く感謝致します。

皆様の益々のご健勝とご発展を願い、私からの謝辞とさせていただきます。

宮本愛子