

平成 30 年度 修士論文

ジェラン材料を用いた
組織再生型人工椎間板の開発

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

水上 光太郎

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 線維輪(AF)の構造	
1-1-4 椎間板ヘルニア	
1-1-5 現在の治療法	
1-2 再生医療	5
1-2-1 椎間板治療における再生医療	
1-2-2 Platelet rich plasma(PRP)	
1-3 ジェランガム	6
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 組織再生型人工椎間板	8
1-4-1 NP モデル	
1-4-2 AF モデル	
1-5 本研究の目的	10
1-5-1 実験項目	
2. 実験方法	11
2-1 組織染色による椎間板構造の観察	11
2-1-1 NP 組織の HE 染色	
2-1-2 NP 組織のアルシアンブルー染色	
2-1-3 AF 組織の HE 染色	
2-1-4 AF 組織の EVG 染色	
2-2 ジェラン材料の作製	16
2-2-1 CMG の作製	
2-2-2 ¹ H-NMR による CMG の置換度測定	
2-2-3 NG のフリー化	

2-2-4	GS の作製	
2-2-5	酸素フラスコ燃焼法による GS の硫酸化度測定	
2-3	NP 細胞の培養	24
2-3-1	NP 細胞の単離	
2-3-2	細胞培養	
2-3-3	細胞の継代培養	
2-4	GS 添加培養による NP 細胞の影響調査	26
2-4-1	遺伝子発現測定	
2-4-2	GAG 産生量測定	
2-5	PRP 添加培養による NP 細胞の影響調査	28
2-5-1	遺伝子発現測定	
2-5-2	増殖速度測定	
2-5-3	GAG 産生量測定	
2-6	NP モデルの作製及び評価	30
2-6-1	CMG ゲルビーズの作製	
2-6-2	GS-CMG ゲルビーズの作製	
2-6-3	粒径分布測定	
2-6-4	GS 固定化量測定	
2-6-5	PRP 徐放測定	
2-6-6	NP 細胞の PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ培養	
2-7	AF モデルの作製及び評価	39
2-7-1	水溶性エラスチンの抽出と分画	
2-7-2	ECM ファイバーシートの作製	
2-7-3	AF モデルの作製	
2-7-4	構造観察	
2-7-5	力学強度測定	
2-7-6	NP 細胞のファイバー培養	
2-8	加圧培養	44
2-9	人工椎間板の培養及び評価	45

3. 結果	46
3-1 組織染色による椎間板構造の観察	46
3-1-1 NP 組織の HE 染色	
3-1-2 NP 組織のアルシアンブルー染色	
3-1-3 AF 組織の HE 染色	
3-1-4 AF 組織の EVG 染色	
3-2 ジェラン材料の作製	50
3-2-1 CMG の作製	
3-2-2 GS の作製	
3-3 GS 添加培養による NP 細胞の影響調査	52
3-3-1 遺伝子発現変化	
3-3-2 GAG 産生量	
3-4 PRP 添加培養による NP 細胞の影響調査	54
3-4-1 遺伝子発現変化	
3-4-2 増殖速度	
3-4-3 GAG 産生量	
3-5 NP モデルの作製及び評価	57
3-5-1 GS-CMG ゲルビーズの粒径分布	
3-4-2 GS-CMG ゲルビーズによる PRP 徐放	
3-4-3 PRP 徐放型ゲルビーズ内培養による NP 細胞の遺伝子発現変化	
3-6 AF モデルの作製及び評価	62
3-6-1 AF モデルの構造観察	
3-6-2 AF モデルの力学強度	
3-6-3 ファイバー培養による NP 細胞の遺伝子発現変化	
3-7 加圧培養による NP 細胞の遺伝子発現変化	65
3-8 人工椎間板の培養及び評価	66
3-8-1 人工椎間板の HE 染色	
3-8-2 人工椎間板のアルシアンブルー染色	

4. 考察	69
4-1 NP 細胞に対する GS の効果.....	69
4-2 NP 細胞に対する PRP の効果.....	73
4-3 NP モデルについて.....	76
4-3-1 NP モデルと NP 組織の比較評価	
4-3-2 ゲルビーズの薬物徐放	
4-3-3 NP 細胞のゲルビーズ内培養	
4-4 AF モデルについて.....	81
4-4-1 AF モデルと AF 組織の比較評価	
4-4-2 AF モデルの力学特性について	
4-4-3 NP 細胞のファイバー培養	
4-5 NP 細胞に対する加圧刺激の効果.....	84
4-6 組織再生型人工椎間板について.....	86
5. 結論	89
6. 参考文献	90
7. 謝辞	92

1. 諸言

1-1 椎間板

1-1-1 椎間板の構造

椎間板は脊椎を構成する椎体間に介在している円板状の軟骨組織である。外部には線維状軟骨の線維輪、内部はゲル状軟骨の髄核という組織の二重構造になっており、髄核内に水分を引き込むことにより適度の弾力性を維持している。この弾力性によって脊椎にかかる荷重や衝撃を吸収し、脊椎の安定性を維持する支持組織として重要な役割を果たしている。このように脊椎の重要な構成要素であるため、椎間板は姿勢の維持や体動時には常に外力にさらされている。また、二本足での立位や歩行、座位をとる人間では、椎間板にかかる負担は他の脊椎動物よりも大きい。一方、椎間板は人体内で最大の無血管組織である。血管が内部に存在しない組織であることは、組織内への栄養供給が乏しいため、人体の他の組織以上に外傷や老化による影響を受けやすく、損傷時の自己修復が極めて困難である。

椎間板の模式図を Fig.1-1 に示す。

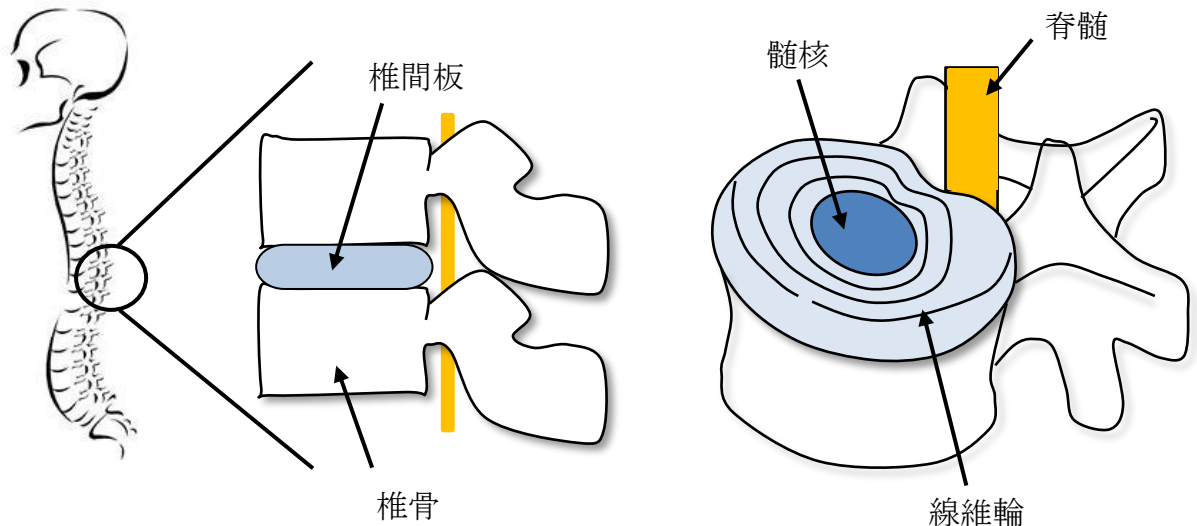


Fig.1-1 椎間板の模式図

1-1-2 髄核(NP)

NPは椎間板の中央部に存在するゲル状軟骨組織である。NPは水分を多量に含む組織で、椎間板に圧力がかかるとそのクッション性から圧力を分散することができる。しかし、加齢による水分減少や過度の負荷がかかるとクッション性を失ってしまう。NPの構造を Fig.1-2 に示す。

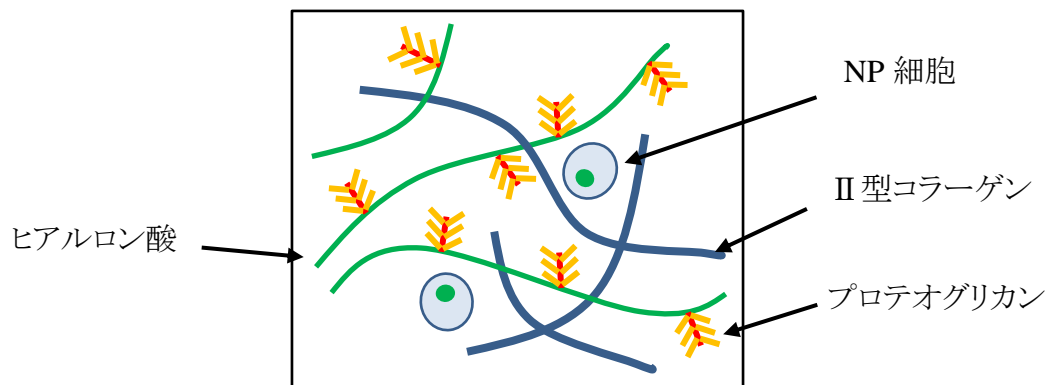
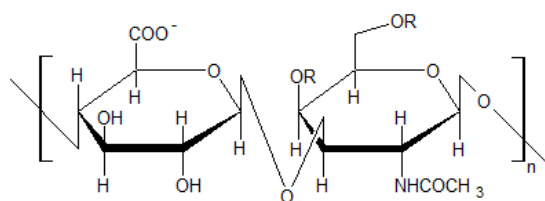


Fig.1-2 NP の構造

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) という硫酸化多糖が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。



R=SO₃⁻ or H

Fig.1-3 コンドロイチン硫酸⁽¹⁾

NP細胞のような軟骨細胞は単層培養で増殖させると脱分化を引き起こし、本来の軟骨としての機能を失うという特徴を有する⁽²⁾。よって脱分化したNP細胞を再分化させる、また脱分化を抑制するということが重要となる。

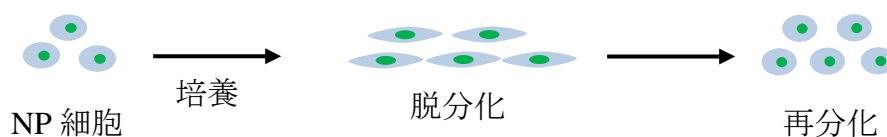


Fig.1-3 NP細胞の分化、脱分化

1-1-3 線維輪(AF)

AFはNP組織を取り囲むように存在する線維状軟骨であり、椎間板の力学支持を担う組織である。AFはNPによって加えられる内圧からのせん断応力および引張応力に抵抗することによってNPを保持する。AFの構造をFig.1-4に示す。

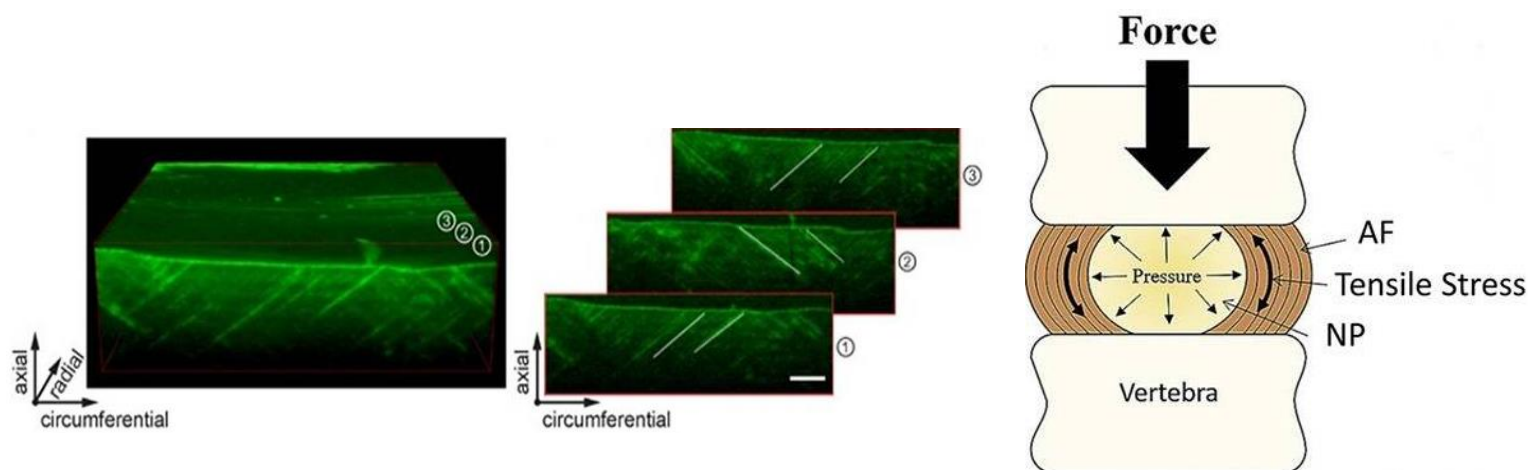


Fig.1-4 AFの構造⁽³⁾

AFは15~25の同心円状のラメラ層を有し、コラーゲン線維束で構成されている。各層のコラーゲン線維は椎間板の横断面に対して 30° の角度で配向しており、連続する層では配向方向が交互になるように重なっている。

AFの主な構成成分はAF細胞と細胞外基質としてI型コラーゲン、プロテオグリカンが挙げられるが、AFは外側領域から内側領域になるにつれてII型コラーゲンの割合が大きくなり、細胞も線維芽様の細胞から楕円状の細胞へと変化するという特徴がある。

また、コラーゲン線維のラメラ層の間にはエラスチン線維が存在している⁽⁴⁾。エラスチン線維はコラーゲン線維のラメラ間で結合し一緒に連動して動くことで、椎間板に曲げ伸ばしの力が加わった際に、椎間板が元の位置に戻るのを補助する役割を担っている。これによって椎間板の柔軟な動きを可能にしている。

1-1-4 椎間板ヘルニア

主な椎間板の疾患として椎間板ヘルニアが挙げられる。椎間板ヘルニアとは加齢による椎間板の変性や強い負荷によって髄核を保護している線維輪に亀裂が入り、髄核が突出することである。この突出した髄核が神経根を圧迫することによって腰痛、下肢の痛みや痺れ、また重度の場合は膀胱直腸障害といった症状を引き起こす。

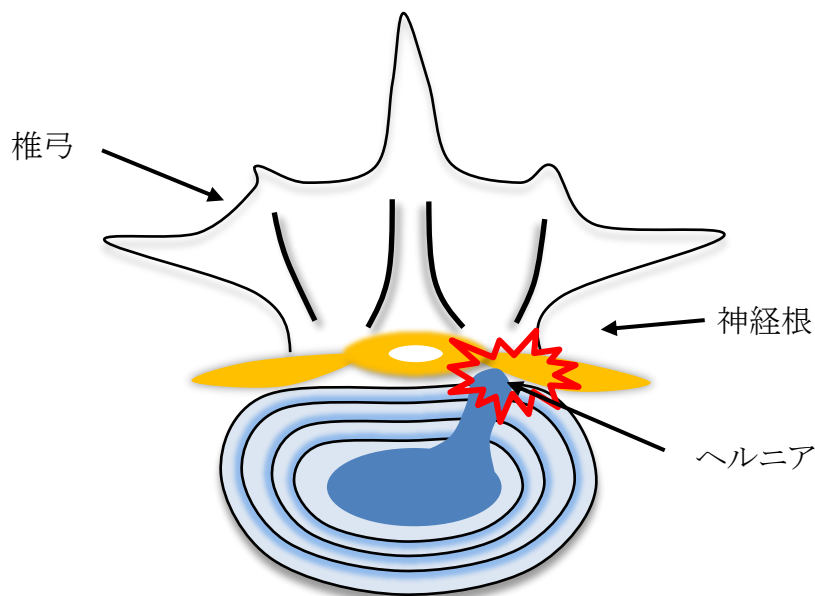


Fig.1-5 椎間板ヘルニア

1-1-5 椎間板ヘルニアの現行の治療法と問題点

椎間板ヘルニアの治療法は大きく2つに分けられる。症状が軽度の場合は保存療法が用いられる。椎間板への負荷を減らすためコルセットを着用する安静療法、腰痛を和らげる神経根ブロック注射、鎮痛消炎剤の服用、また慢性的な痛みに対して行われる腰部の牽引やマッサージなどの理学療法が挙げられる。保存療法は手術を行わないため身体への負担は少ないが、これらはヘルニアが自然吸収するまでの対処療法であり長期療養が求められる。

一方、保存療法を数か月行っても効果が出ない場合や下肢の運動麻痺や膀胱直腸障害が見られる場合は手術療法が用いられる。従来は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や椎骨を金属金具で固定する椎間固定術などが用いられてきたが、近年では1~2cm程度の切開創から内視鏡と専用器具を挿入してヘルニアを切除する内視鏡下手術といった低侵襲な手術法も増えてきている。しかし、これらの治療法は椎間板の損傷そのものを治療するものではないため再発を伴う危険性がある。

1-2 再生医療

再生医療とは病気や怪我によって損傷した組織を自己が有する再生能力を生かして治療する医療である。

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⁽⁵⁾、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医療材料の利用が有効であると考えた。

1-2-2 Platelet rich plasma (PRP)

多血小板血漿 (PRP) は患者自身の血液を採取し遠心分離することによって、血小板を濃縮した自己由来の血漿調製物である。血小板は血小板由来成長因子 (PDGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、トランスフォーミング成長因子 (TGF)- β 、上皮成長因子 (EGF)、インスリン様成長因子 (IGF)-1 など複数の成長因子を含んでいる⁽⁶⁾。PRP に含まれるこれらの成長因子は組織の修復、再生に関連しており、近年では椎間板治療においても多くの臨床現場で用いられている。

PRP を用いることの利点として、患者自身の血液から得られるため適合性が高いこと、採取が容易であり低コストで得られること、継続的に治療に用いることができる点が挙げられる。そこで、本研究においても椎間板再生を促す因子として PRP を採用した。

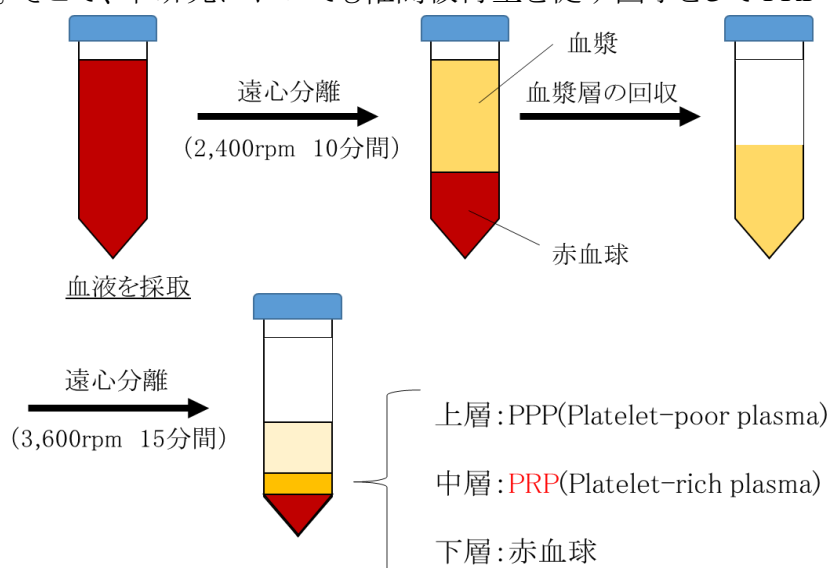


Fig.1-6 PRP の抽出方法

1-3 ジェランガム

本研究では材料として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⁽⁷⁾。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⁽⁸⁻¹⁰⁾。また、ジェランガムは化学修飾を行うことで、NP 組織の基質成分と類似構造をもつ材料や温度に依存しないゲル可能を持つ材料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.1-7 に示す。

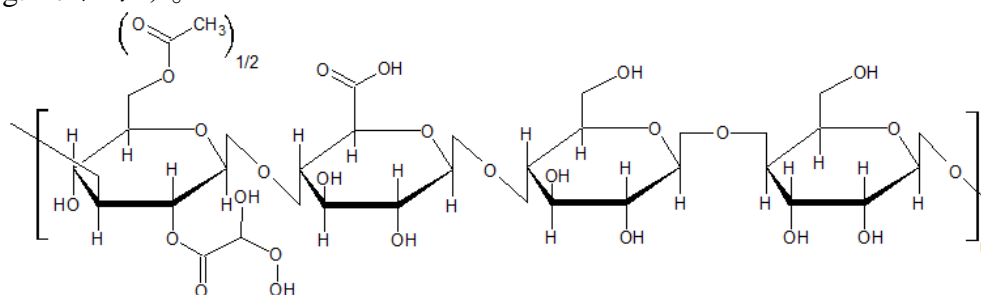


Fig.1-7 ネイティブ型ジェランの構造

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.1-8 に示す。

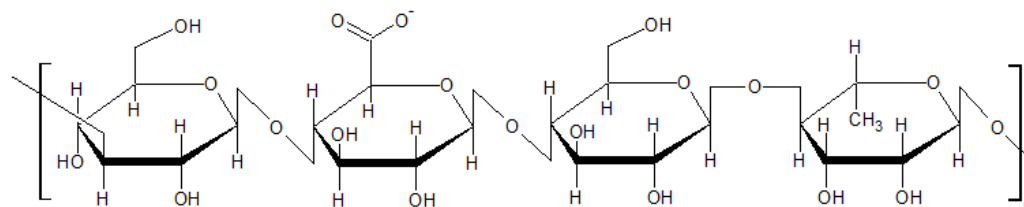


Fig.1-8 脱アシル型ジェランの構造

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ル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シン-CやbFGFと高い親和性を持つことが報告されている(8,9)。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(11)。GSの構造をFig.1-9に示す。

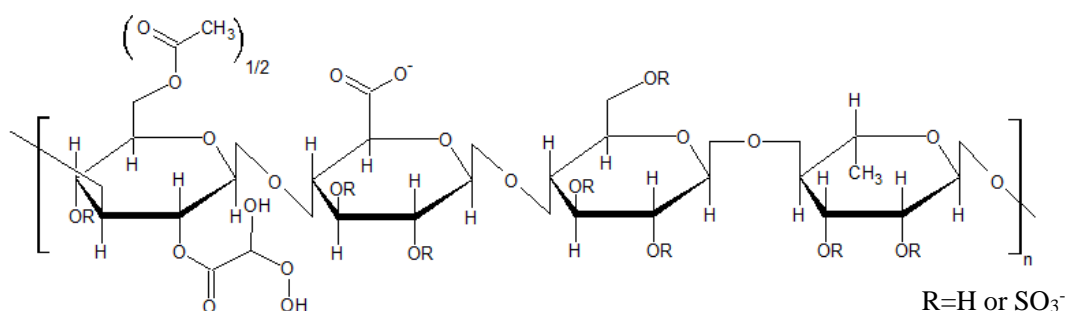


Fig.1-9 硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)の構造

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.1-10に示す。

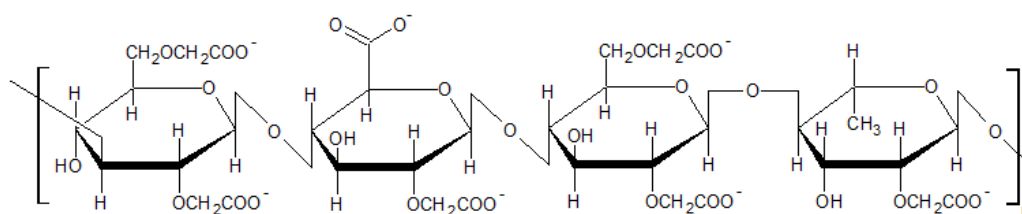


Fig.1-10 カルボキシメチルジェラン(CMG)の構造

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 組織再生型人工椎間板

本研究ではゼランを用いた材料を基に組織再生を促す人工椎間板を開発し、損傷した椎間板と置換する治療法を考案した。椎間板を構成するNPとAFはその特性が大きく異なるため、各モデルを作り分けた後に組み合わせることで人工椎間板の作製を試みた。

1-4-1 NP モデル

NPは水分を多量に含んだゲル状組織である。また、組織内でのNP細胞は数十個単位で分散しており、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た構造となっている(Fig.1-5)。

この構造を再現するために、本研究ではNPモデルとして球状のゲル(ゲルビーズ)を用いることが望ましいと考えた。ゲルビーズの間隙でNP細胞を培養し、適度な距離を保ちながら分散させることでNP組織内環境の模倣が可能であると考えられる。

更に組織再生を促す方法としてゲルビーズからの薬物徐放を考案した。ゲルビーズの膨潤・収縮機能を利用してゲルビーズ内部に軟骨誘導に有効な薬剤をトラップする。NP細胞をゲルビーズ内で培養する際に、このトラップした薬剤が徐放されることでNP細胞の再分化を誘導し、基質産生を促すことが可能であると考えられる。NPモデルとしてのゲルビーズの利用法をFig.1-11に示す。

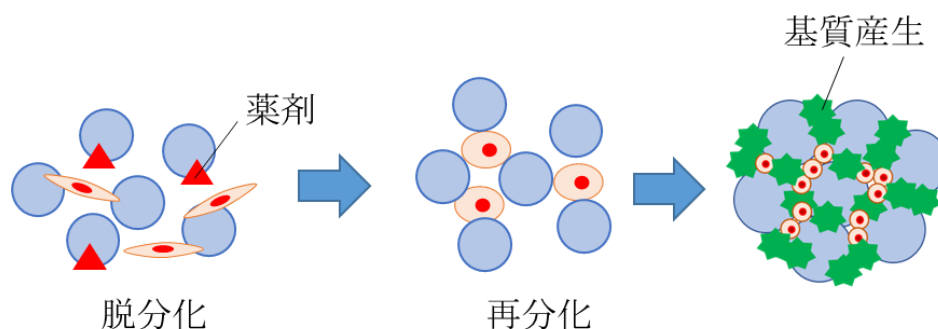


Fig.1-11 NPモデルとしてのゲルビーズの利用法

1-4-2 AF モデル

AF 組織を構成する基質は大部分がコラーゲン線維であり、そのコラーゲン線維間にエラスチン線維が存在してラメラ構造を有している。この 2 つの成分は AF 組織の力学特性を決定する上で、非常に大きな役割を果たしている。

コラーゲンは生体内のタンパク質の中で最も多く、総タンパク質量の 1/3 を占めている。このため、細胞外マトリックスの主成分である。皮膚、骨、腱、軟骨などの結合組織に多く存在している。コラーゲンの役割は、体全体、組織などを形成し、これらを支える働きを担っている。

エラスチンは、細胞外マトリックスの一つで分子量約 67kDa の不溶性の繊維状タンパク質である。コラーゲン線維を支える役割を持つ線維であり、コラーゲンが組織に強度や張力を与えるのに対し、エラスチンは組織に伸縮性や弾性を与える繊維状タンパク質で、靭帯、血管、皮膚、肺といった伸縮性や弾性が必要な組織に多く見られる。生体を構成する ECM の中で、コラーゲンに次いで多いため、生体内で重要な構成成分である。

そこで、AF モデルにはコラーゲンとエラスチンを材料として使用した。コラーゲン、エラスチンのタンパク溶液をファイバーシート状へと加工し、層状に重ねることで AF 組織構造の再現を行った。モデル作製のイメージ図を Fig.1-12 に示す。

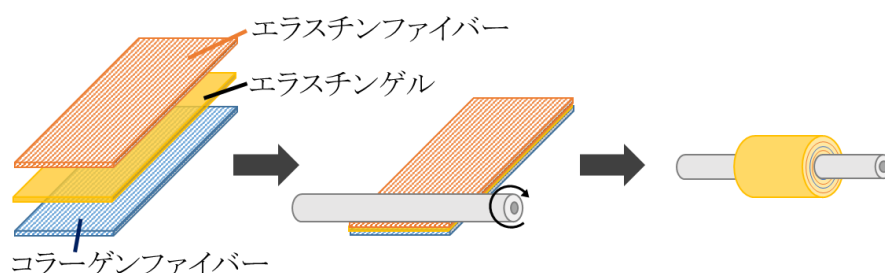


Fig.1-12 AF モデル作製のイメージ図

また本研究では、動物実験でウサギへのモデル移植を想定しているため、モデルの大きさはウサギ AF の大きさを目標値としている。目指すウサギ AF の大きさを Fig.1-13 に示す。

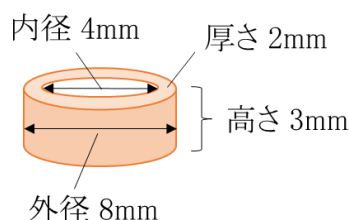


Fig.1-13 ウサギ AF の大きさ

1-5 目的

本研究の目的はジェラン材料を用いて損傷し、機能しなくなった椎間板に置き換わり、組織再生を誘導する人工椎間板を開発することである。

1-5-1 実験項目

実験は以下の項目で行った。

1. 椎間板の組織染色
 - ・NP 組織の HE 染色
 - ・NP 組織のアルシアンブルー染色
 - ・AF 組織の HE 染色
 - ・AF 組織の EVG 染色
2. ジェラン材料の作製
 - ・CMG の作製
 - ・GS の作製
3. NP 細胞の培養
4. NP 細胞の GS 添加培養
 - ・遺伝子発現測定
 - ・GAG 産生量測定
5. NP 細胞の PRP 添加培養
 - ・遺伝子発現測定
 - ・増殖速度測定
 - ・GAG 産生量測定
6. NP モデルの作製及び評価
 - ・GS-CMG ゲルビーズの作製
 - ・粒径分布測定
 - ・GS 固定化量測定
 - ・PRP 徐放測定
 - ・NP 細胞の PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ培養
7. AF モデルの作製及び評価
 - ・AF モデルの作製
 - ・構造観察
 - ・力学強度測定
 - ・NP 細胞のファイバー培養
8. NP 細胞の加圧培養
9. 人工椎間板の培養

2. 方法

2-1 組織染色による椎間板構造の観察

2-1-1 NP 組織の Hematoxylin-Eosin 染色 (HE 染色)

NP 組織の構造を調査するために HE 染色を行い、細胞と基質を染め分けた。ヘマトキシリンで細胞核を、エオジンで膠原繊維を染色する。切片は凍結切片で行った。

【試薬】

- ・マイヤーヘマトキシリン
- ・エタノール
- ・エオジン溶液
- ・マリノール
- ・固定液
- ・脱イオン水
- ・キシレン

【使用器具】

- ・パスツールピペット
- ・スライドガラス
- ・シャーレ
- ・カバーガラス
- ・ピンセット

【実験操作】

操作 I (脱コンパウンド)

1. 固定液で切片を 10 分間浸透した。
2. 脱イオン水で 2 分間洗浄した。

操作 II (染色)

3. マイヤーヘマトキシリンで 10 分間染色した。
4. 脱イオン水で 20 分間洗浄した。
5. 70%エタノールで洗浄した。
6. エオジン溶液で 5 分間染色した。
7. 70%、80%エタノールで素早く洗浄し、90%エタノールで 1 分間浸透、99%エタノールで素早く 2 回浸透した。
8. キシレンで 1 分間×3 回浸透して透徹を行った。
9. マリノールで封入を行った。

得られた染色写真内の細胞核数をカウントすることにより、NP 組織の細胞密度を算出した。

【実験操作】

1. 染色写真を 5 枚撮影した。
2. 写真内の細胞核の数をカウントし、5 枚の平均値を求めた。
3. スケールバーから写真の実寸値を導き出し、組織全体での細胞数求めた。
4. 染色前の NP 組織の重さから細胞密度を算出した。

2-1-2 NP 組織のアルシアンブルー染色

NP 組織構造の調査としてアルシアンブルー染色を行い、組織中の GAG の染色を行った。アルシアンブルー染色は硫酸化多糖を青色に染める染色法である。切片は凍結切片で行った。

【試薬】

- | | |
|--------------|--------|
| ・マイヤーヘマトキシリン | ・キシレン |
| ・アルシアンブルー溶液 | ・エタノール |
| ・固定液 | ・マリノール |
| ・3%酢酸溶液 | ・脱イオン水 |

【使用器具】

- | | |
|------------|----------|
| ・パスツールピペット | ・スライドガラス |
| ・シャーレ | ・カバーガラス |
| ・ピンセット | |

【実験操作】

操作 I (脱コンパウンド)

1. 固定液で切片を 10 分間浸透した。
2. 脱イオン水で 2 分間洗浄した。

操作 II (染色)

3. 3%酢酸溶液で 5 分間前処理を行った。
4. アルシアンブルー溶液で 1 時間染色した。
5. 3%酢酸溶液で 5 分間洗浄した。
6. 脱イオン水で 5 分間洗浄した。
7. マイヤーヘマトキシリン溶液で 10 分間染色した。
8. 脱イオン水で 20 分間洗浄した。
9. 70%、80%エタノールで素早く洗浄し、90%エタノールで 1 分間浸透、99%エタノールで素早く 2 回浸透した。
10. キシレンで 1 分間×3 回浸透して透徹を行った。
11. マリノールで封入を行った。

2-1-3 AF 組織の HE 染色

AF 組織の構造を調査するために HE 染色を行い、細胞と基質を染め分けた。切片はパラフィン切片で行った。

【試薬】

- ・マイヤーヘマトキシリン
- ・エタノール
- ・エオジン溶液
- ・マリノール
- ・3%酢酸溶液
- ・脱イオン水
- ・キシレン

【使用器具】

- ・パスツールピペット
- ・スライドガラス
- ・シャーレ
- ・カバーガラス
- ・ピンセット

【実験操作】

操作 I (脱パラフィン)

1. キシレンで切片を 5 分間×1 回、3 分間×2 回浸透した。
2. 99%エタノール×2 回、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノールで 3 分間浸透した。
3. 脱イオン水で 2 分間洗浄した。

操作 II (染色)

4. マイヤーヘマトキシリンで 10 分間染色した。
5. 脱イオン水で 20 分間洗浄した。
6. 70%エタノールで洗浄した。
7. エオジン溶液で 5 分間染色した。
8. 70%、80%エタノールで素早く洗浄し、90%エタノールで 1 分間浸透、99%エタノールで素早く 2 回浸透した。
9. キシレンで 1 分間×3 回浸透して透徹を行った。
10. マリノールで封入を行った。

2-1-4 AF 組織の Elastica van Gieson 染色 (EVG 染色)

AF 組織構造の調査として EVG 染色を行い、組織中の弾性線維と膠原線維の染め分けを行った。EVG 染色ではエラスチン線維を黒紫色、コラーゲン線維を赤色に染める染色法である。切片はパラフィン切片で行った。

【試薬】

- | | |
|-------------|--------|
| ・レゾルシンフクシン | ・エタノール |
| ・鉄ヘマトキシリン溶液 | ・マリノール |
| ・ワンギーソン溶液 | ・脱イオン水 |
| ・キシレン | |

【使用器具】

- | | |
|------------|----------|
| ・パスツールピペット | ・スライドガラス |
| ・シャーレ | ・カバーガラス |
| ・ピンセット | |

【実験操作】

操作 I (脱パラフィン)

1. キシレンで切片を 5 分間×1 回、3 分間×2 回浸透した。
2. 99%エタノール×2 回、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノールで 3 分間浸透した。
3. 脱イオン水で 2 分間洗浄した。

操作 II (染色)

4. 70%エタノールで浸透した後、レゾルシンフクシンで 90 分間染色した。
5. 99%エタノールで 3 分間×3 回浸透した。
6. 脱イオン水で 2 分間洗浄した。
7. 鉄ヘマトキシリン溶液で 5 分間染色した。
8. 脱イオン水で 20 分間洗浄した。
9. ワンギーソン溶液で 5 分間染色した。
10. 99%エタノールで 1 分間×3 回浸透した。
11. キシレンで 1 分間×3 回浸透して透徹を行った。
12. マリノールで封入を行った。

2-2 ジェラン材料の作製

2-2-1 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)
- ・モノクロロ酢酸ナトリウム
- ・水酸化ナトリウム

【使用器具】

- ・電子天秤
- ・スターラー
- ・凍結乾燥機
- ・攪拌子
- ・葉さじ
- ・耐圧瓶
- ・葉包紙
- ・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。

2-2-2 $^1\text{H-NMR}$ 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)
- ・ D_2O

【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

2-2-3 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
- ・アセトン
- ・塩酸

【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。

2-2-4 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
- ・N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)
- ・クロロスルホン酸
- ・水酸化ナトリウム
- ・アセトン

【使用器具】

- ・セパラブルフラスコ
- ・攪拌子
- ・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
- ・透析チューブ
- ・パラフィルム
- ・恒温槽
- ・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
- ・アスピレーター
- ・凍結乾燥機
- ・スパチュラ

【実験操作】

1. 蒸留済み DMF30mL 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。

2-2-5 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 | ・硫酸 |
| ・水酸化ナトリウム | ・過酸化水素水 |
| ・塩化バリウム | ・エタノール |

【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 |
| ・ワニ口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Ⅲ50mg 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%ジメチルスルホナヅ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。

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

2-3 NP 細胞の培養

2-3-1 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。Collagenase type II 溶液で組織を消化することで細胞をたんり

【試薬】

- Collagenase type II
- DMEM/F12
- エタノール

【使用器具】

- 50mL 遠沈管
- 10mL ピペット
- ピペットマン
- 40 μ m セルストレーナー
- 滅菌済みピンセット
- 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、70%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. 4.5 は組織 1 個ずつ行いピンセットとハサミはエタノールで殺菌しながら使用した。
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 を加えピペッティングした。
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。

2-3-2 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。

2-3-3 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。

2-4 GS 添加培養による NP 細胞の影響調査

2-4-1 遺伝子発現測定

NP 細胞に GS を添加した際の遺伝子発現変化を調査した。本実験では硫酸化度の異なる 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。

【細胞】P4 ヒト髄核細胞

【培地】硫酸化度 9%、18%および 37%の GS 添加培地 (100 μ g/ml)

【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 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。

Table 2-1 プライマー配列

Target		5'-3'
GAPDH	Forward	GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT
	Reverse	CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC
Collagen type1(Col1)	Forward	TTT GTG GAC CTC CGG CTC
	Reverse	AAG CAG AGC ACT CGC CCT
CD90	Forward	TGA GAT CCC AGA ACC ATG AAC C
	Reverse	TAT TCT CAT GGC GGC AGT CC
SOX9	Forward	AGT ACC CGC ACT TGC ACA AC
	Reverse	TTG TAA TCC GGG TGG TCC TTC

2-4-2 GAG 産生量測定

硫酸化率の異なる GS 添加培地を用いて培養した NP 細胞が培養上清中に産生する sGAG 量を測定するため、DMMB 法を用いた。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 GAG 産生量を測定することができる。

【試薬】

- ・コンドロイチン硫酸溶液
- ・1,9-ジメチルメチレンブルー溶液

【使用機器】

- ・500 μ l サンプリングチューブ
- ・分光光度計
- ・ピペットマン

【実験操作】

1. 濃度既知のコンドロイチン硫酸溶液を各サンプルで用いた培地で段階希釈することにより 25, 12.5, 6.25, … 0.781 μ g/ml のスタンダード溶液を 100 μ l ずつ作製した。また、ブランクとして各サンプルで用いた培地のみのものを 100 μ l 用意した。
2. 各スタンダード溶液に 1,9-ジメチルメチレンブルー溶液を 100 μ l ずつ加え、分光光度計により波長 525nm での吸光度を求めた。
3. 各スタンダードの吸光度から検量線を作成した。
4. 各サンプルの培養上清を②と同様に測定し吸光度を求めた。
5. 作成した検量線とサンプルの吸光度より、培養上清中に産生された sGAG 量を求めた。

2-5 PRP 添加培養による NP 細胞の影響調査

2-5-1 遺伝子発現測定

軟骨誘導剤としての PRP の効果を調査するために NP 細胞に PRP を添加した際の遺伝子発現変化を測定した。

【細胞】 P2 ブタ NP 細胞

【培地】 2.5% PRP 添加培地 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

【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 2-2 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 2-2 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、PRP 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、35 φシャーレ内の細胞数を推定した。

測定した細胞数から倍化時間を算出した。倍化時間は以下の式を用いて求めた。

$$\text{D.T. (doubling time)} = \frac{(t - t_0) \log 2}{\log N - \log N_0}$$

t_0 、 t : 細胞数を数えた時間、 N_0 : t_0 での細胞数、 N : t での細胞数

2-5-3 GAG 産生量測定

PRP 添加培地を用いて培養した NP 細胞が培養上清中に産生する sGAG 量を測定するため、DMMB 法を用いた。測定は GS 添加培養と同様に行った。

2-6 NP モデルの作製及び評価

2-6-1 CMG ゲルビーズの作製

CMG のゲル化を行った後、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。

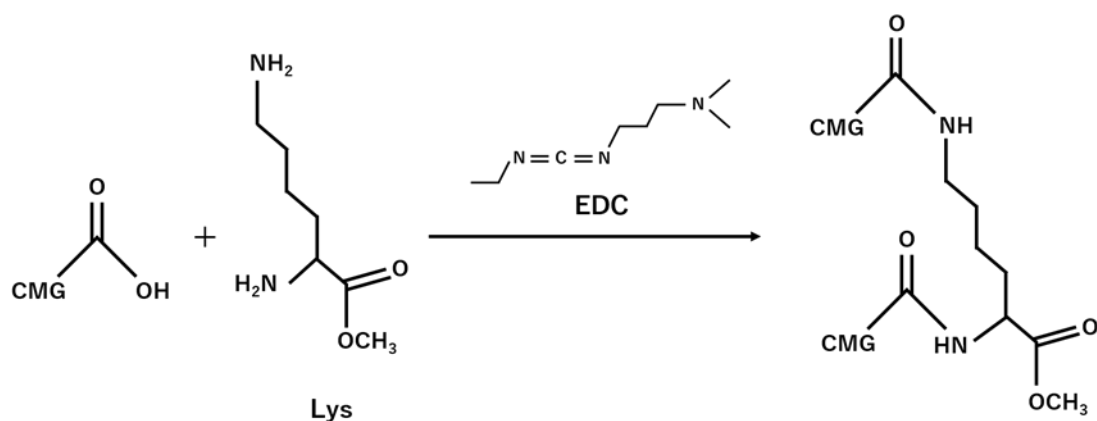


Fig. 2-1 Lys による CMG 架橋

【試薬】

- カルボキシメチルジェラン (CMG)
- L-Lysine methyl ester: Lys
- ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride: EDC
- 流動パラフィン
- ソルビタンモノオレエート
- エタノール

【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。

2-6-2 GS-CMG ゲルビーズの作製

2-6-2 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。この GS-CMG ゲルビーズを NP モデルとして後の実験で使用した。

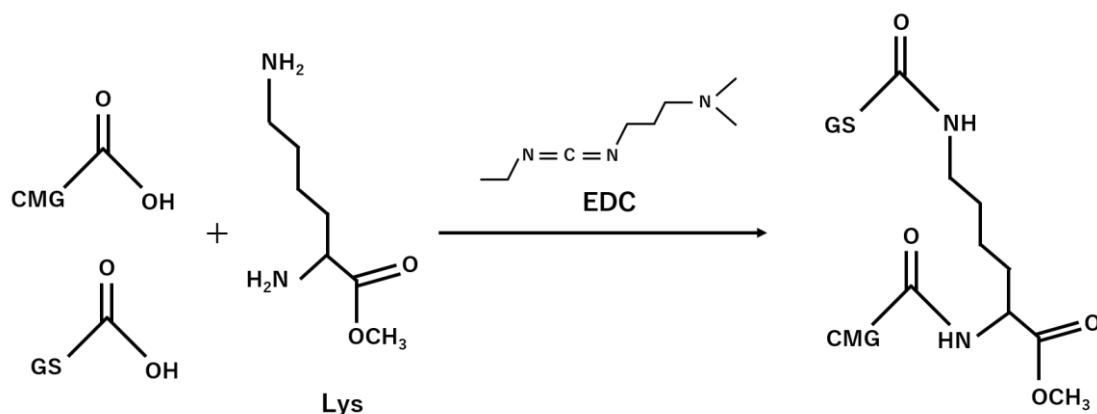


Fig.2-2 Lys による CMG と GS の架橋

【試薬】

- ・カルボキシメチルジェラン (CMG)
- ・硫酸化ネイティブ型ジェラン (GS)
- ・L-Lysine methyl ester
- ・1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride: EDC
- ・流動パラフィン
- ・ソルビタンモノオレエート
- ・エタノール

【使用器具】

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

2-6-4 GS 固定化量測定

GS-CMG ゲルビーズに固定化された GS 量を測定するために、トルイジンブルー染色法を用いた。トルイジンブルーは塩基性色素であり、硫酸化多糖に特異的に結合し呈色反応を示す。反応溶液の吸光度を波長 520nm と 630nm の 2 波長で測定することにより GS 固定化量を算出した。

【試薬】

- ・0.01%トルイジンブルー溶液
- ・6N 塩酸
- ・6N 水酸化ナトリウム溶液

【使用器具】

- ・10mL 試験管
- ・マイクロマン
- ・ピペットマン
- ・吸光度計

【実験操作】

検量線作成

1. 濃度 1000 , 500 , 250・・・1.95 $\mu\text{g/ml}$ の GS 溶液を調製した。
2. GS 溶液 2.4 ml に 0.01%トルイジンブルー溶液を 0.6 ml 加えた。
3. 波長 520 nm と 630 nm にて吸光度を測定した。

固定化量測定

4. 6N 塩酸 1.2mL に GS-CMG ゲルビーズ 100 μL を加え、110 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間ビーズを加熱分解した。
5. 分解溶液を 6N 水酸化ナトリウム溶液で中和した。
6. 中和溶液 2.4 mL に 0.01%トルイジンブルー溶液 0.6mL を加え、波長 520nm、630nm にて吸光度を測定した。
7. 得られた吸光度値と検量線を比較して、GS 固定化量を算出した。

2-6-5 PRP の徐放

GS-CMG ゲルビーズからの PRP 徐放挙動を調査した。外液に放出された PRP 濃度を Pierce protein assay 法によって測定を行った。

【試薬】

- CMG ゲルビーズ
- GS-CMG ゲルビーズ
- PRP
- DMEM/F-12
- アジ化ナトリウム

【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 50 μ L 測り取り、アシストチューブに加えた。
2. 5% PRP/DW 溶液を 100 μ L 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、5% PRP/DW 溶液を 100 μ L 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 100 μ L 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。

2-6-6 PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ培養

三次元培養によるNP細胞への影響を調査するためにPRPを含ませたGS-CMGゲルビーズ内でNP細胞を5日間培養した。培養後、Real time PCRによってNP細胞の遺伝子発現を測定した。

【試薬】

- ・GS-CMG ゲルビーズ
- ・PRP
- ・DMEM/F-12
- ・エタノール
- ・PBS

【使用器具】

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

【実験操作】

PRP 徐放型 CMG ゲルビーズの準備

➤ 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70%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。

➤ PRPの捕捉

1. 5%のPRP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. 5%のPRP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 $^{\circ}$ 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 5 日後に real-time PCR により遺伝子発現測定を行った。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。

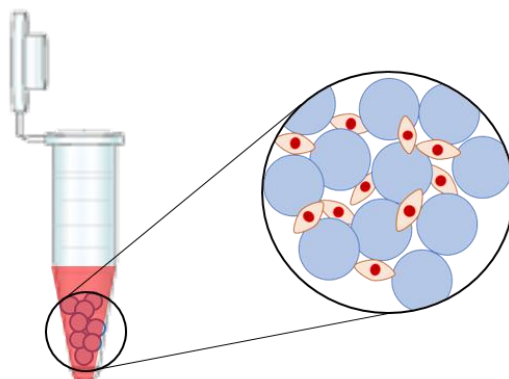


Fig.2-3 ゲルビーズ内培養の模式図

2-7 AF モデルの作製及び評価

2-7-1 水溶性エラスチンの抽出と分画

▶ 水溶性エラスチンの抽出

三重県松阪食肉流通センターから頂いたブタ大動脈から中膜層以外の部分を除去し、塩水(10%)に1日浸けた。コラーゲンを取り去り、再び塩水(10%)に1日浸け、洗浄し圧力鍋で1時間煮た。鍋から取り出し、細かくミンチにした後、水で洗浄後再び圧力鍋で1時間煮た。メッシュに移して水で1日流し洗いを行い、エタノールで脱水を行い乾燥させた。精製した不溶性エラスチンに対してシュウ酸による熱処理分解を行い、水溶化処理し、上澄み液を透析チューブに入れ、外液のpHが4.5以上になるまで透析を行った。チューブから取り出した液を遠心し、上澄み液を凍結乾燥させて水溶性エラスチンを得た。

▶ 水溶性エラスチンの分画

抽出した水溶性エラスチンを数平均分子量、凝集温度、ゲル弾性率によって各分画に分類した。本研究では各分画 ElastinA-E の5種類に分画を行った内、ElastinAのみ使用した。

2-7-2 ECM ファイバーシートの作製

▶ エラスチンファイバーシートの作製

分画エラスチン A 800 mg、glycidyl glycerol ether 80 mg を tri fluoro ethanol (TEF) 4 ml に溶解し、以下の条件でエレクトロスピンングを用いてエラスチン A 足場を作製した。このとき、電極を回転させることで、ファイバー足場に配向性を持たせたもの、配向性のないものの2種類を作製した。(印加電圧 15 kV、注入速度 1.2 ml/hr、注入時間 3000 sec、空隙距離 20 cm、電極 Al、電極直径 10 cm、電極回転速度 5500 rpm、面積: 配向 約 94cm²、無配向 約 49cm²)

▶ コラーゲンファイバーシートの作製

水溶性コラーゲン 200 mg、glycidyl glycerol ether 20 mg を TFE 2 ml に溶解し、以下の条件でエレクトロスピンングを用いて配向性を持たせたもの、配向性のないものの2種類のコラーゲン足場を作製した。(印加電圧 17 kV、注入速度 1.2 ml/hr、注入時間 2000 sec、空隙距離 20 cm、電極 Al、電極直径 10 cm、面積: 配向 約 49 cm²、無配向 約 49cm²)

2-7-3 AFモデルの作製

エラスチンファイバー、コラーゲンファイバー、エラスチンゲルを用いてAFモデルの作製を行った。ウサギ線維輪の大きさを基に、ファイバー、ゲル、ファイバーの順で層状にシリコンチューブに巻き付けることで構造の再現を行った。

【試薬】

- 配向エラスチンファイバー
- 配向コラーゲンファイバー
- エラスチンゲル

【使用器具】

- シリコンチューブ
- ハサミ
- ピンセット
- ピペットマン
- マイクロマン

【実験操作】

エラスチンゲルの作製

1. 1.5mL チューブ内でエラスチン、359.8mM Dode-DSP、500mM Na₂CO₃、DMEMをTable.2-3の割合で混合した後、遠心分離しエラスチンゲル溶液を作製した。

	エラスチン A(mg)	DMEM(μl)	Na ₂ CO ₃ (500mM) (μl)	Dode-DSP(359.8mM) (μl)
加速剤濃 度 70mM	48	44.03	10.08	17.89

Table.2-3 エラスチンゲル作製のための混合量

モデルの作製

1. ファイバーを所定のサイズにカットした。
2. エラスチンファイバー、エラスチンゲル溶液、コラーゲンファイバー(1unit)の順に重ね、引っ張りながらシリコンチューブに巻き付けた。
3. これを所定の unit 数分巻いた。
4. 37°Cインキュベーター内で20分静置し、反転して1日静置しゲル化させた。

モデルの作製条件

- ① 縦 2.5cm×横 0.6cm ファイバー、15unit
- ② 縦 2.5cm×横 0.6cm ファイバー、30unit
- ③ 縦 10cm×横 0.6cm ファイバー、7unit

2-7-4 AFモデルの構造観察

作製した AF モデルの構造を調査するために EVG 染色を行った。切片はパラフィン切片で行った。

【試薬】

- レゾルシンフクシン
- 鉄ヘマトキシリン溶液
- ワンギーソン溶液
- キシレン
- エタノール
- マリノール
- 脱イオン水

【使用器具】

- パスツールピペット
- シャーレ
- ピンセット
- スライドガラス
- カバーガラス

【実験操作】

操作Ⅰ (脱パラフィン)

1. キシレンで切片を 5 分間×1 回、3 分間×2 回浸透した。
2. 99%エタノール×2 回、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノールで 3 分間浸透した。
3. 脱イオン水で 2 分間洗浄した。

操作Ⅱ (染色)

4. 70%エタノールで浸透した後、レゾルシンフクシンで 30 分間染色した。
5. 99%エタノールで 3 分間×3 回浸透した。
6. 脱イオン水で 2 分間洗浄した。
7. ワンギーソン溶液で 10 分間染色した。
8. 99%エタノールで 1 分間×3 回浸透した。
9. キシレンで 1 分間×3 回浸透して透徹を行った。
10. マリノールで封入を行った。

2-7-5 AFモデルの圧縮試験

作製した線維輪モデルの評価として圧縮試験を行った。このデータを用いて応力-ひずみ曲線を作製し、弾性率を求めた。測定器具として Fig.2-4 に示す一軸圧縮試験機を用いた。計算式は以下のようにして求めた。応力を σ (Pa)、荷重を p (N)、断面積を A (mm^2)、ひずみを ε 、荷重を加えたときの材料の長さを l (cm)、弾性率を E (Pa)とする。

$$\text{応力} \quad \sigma = p / A$$

$$\text{ひずみ} \quad \varepsilon = l - l_0$$

$$\text{弾性率} \quad E = \Delta \sigma / \Delta \varepsilon$$

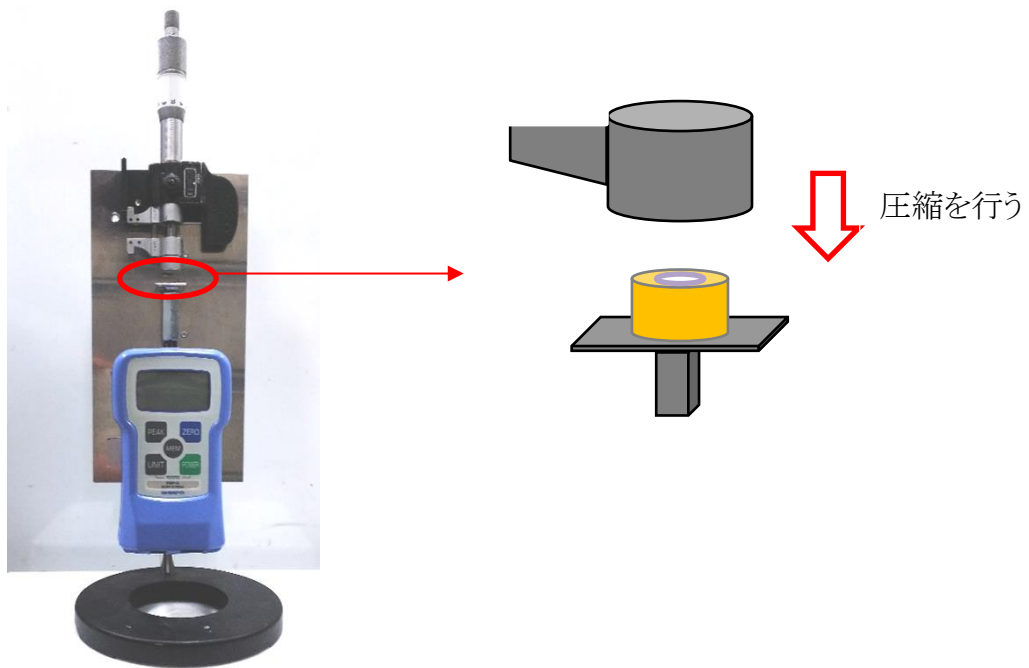


Fig.2-4 一軸圧縮試験の方法

2-7-6 NP 細胞のファイバー培養

AF モデル作製時にファイバーに NP 細胞を播種することを想定し、ファイバー培養を行った。ファイバー培養を行った際の NP 細胞の遺伝子発現を real-time PCR によって調査した。

【試薬】

- ・滅菌配向コラーゲンファイバー
- ・PRP
- ・DMEM/F-12

【使用器具】

- ・シリコンシート
- ・35 φ シャーレ
- ・ピンセット
- ・ピペットマン
- ・1.5mL アシストチューブ

【実験操作】

1. 滅菌したシリコンシートを 35 φ シャーレに貼り付けた。
2. シリコンシート上にコラーゲンファイバーを乗せ、ピンセットで圧着させた。
3. 細胞懸濁液を作製し、ファイバー上に少しずつ播種した。
4. 培地を加え、7 日間培養を行った。
5. 培地交換は 3 日毎に行った。

培養 7 日後に real-time PCR により遺伝子発現測定を行った。RT-product の作製時、ファイバーをアシストチューブに加え、チップの先端で破断することで RNA の抽出を行った。測定遺伝子は線維化マーカーとして Collagen type1, CD90 を使用し、軟骨関連マーカーとして Collagen type2, SOX9 を測定した。また、ハウスキーピング遺伝子には GAPDH を使用した。

2-8 加圧培養

本研究ではNP細胞に加圧刺激を加えることで、力学的刺激による細胞への影響を調査した。加圧培養には空気圧式の装置を用いた。培養装置の概略図はFig.2-5となっている。圧力釜に圧縮した空気を貯め、培養チャンバーへと解放することで培養物に空気圧を加えた。培養チャンバーに付いている圧力メーターが一定値に達すると、センサーが作動して圧力釜に戻る回路が開き圧力を解放する。これにより周期的な圧力刺激を加えることが可能となる(培養装置の操作方法は付録を参照)。

培養形式は単層培養とPRP徐放型GS-CMGゲルビーズ培養で加圧を行った。加圧培養条件は、圧力:0.4 MPa、加圧時間:4時間、周期:0.05 Hzで行った。培養終了後はreal-time PCRによる遺伝子発現測定を行った。

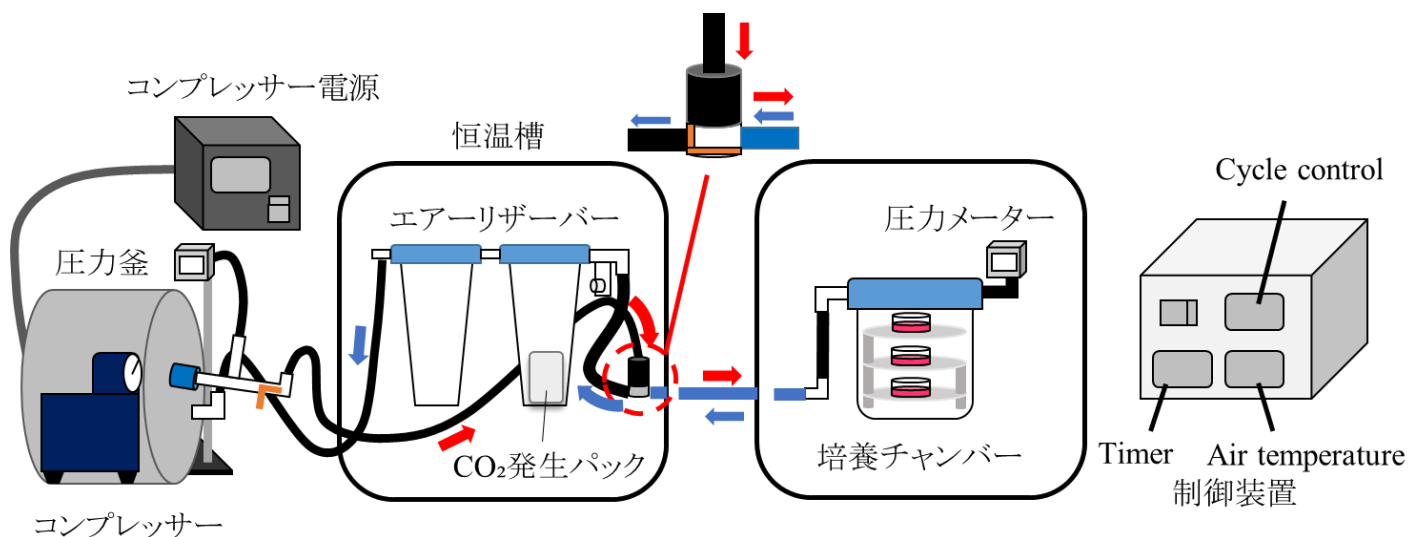


Fig.2-5 空気圧式加圧培養装置の概略図

→ :加圧回路
→ :減圧回路

2-9 組織再生型人工椎間板モデルの培養

作製した NP モデル、AF モデルを組み合わせて椎間板モデルを作製した。NP モデルには NP 細胞を播種して培養を行った。更にモデルの加圧培養を行うことによって組織再生を目指した。

【試薬】

- ・滅菌配向コラーゲンファイバー
- ・滅菌配向エラスチンファイバー
- ・滅菌無配向エラスチンファイバー
- ・滅菌エラスチン A
- ・滅菌 GS-CMG ゲルビーズ
- ・DMEM/F12
- ・PRP

【使用器具】

- ・24well プレート(2×3well に切断)
- ・シリコンシート
- ・シリコンチューブ
- ・ピンセット
- ・ピペットマン
- ・マイクロマン

【実験操作】

1. クリーンベンチ内で 2-7-3 同様に AF モデルの作製を行った。
2. プレートにシリコンシートを貼り、エラスチンファイバーを乗せ圧着させた。
3. エラスチンファイバーにエラスチンゲルを塗り、その上に AF モデルを乗せて接着させた。
4. AF モデルの中央空洞部分に NP モデル (PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ) を充填した。
5. 細胞懸濁液を NP 細胞が 16×10^4 cells になるよう作製し、NP モデルに播種した。
6. AF モデル上にエラスチンゲルを塗り、エラスチンファイバーを乗せて接着した。
7. 培地を 1mL 加えて培養を行った。

作製した培養モデルは 1 日 4 時間の加圧を 7 日間行った。培養終了後はモデルの凍結切片を作製し、組織染色を行った。

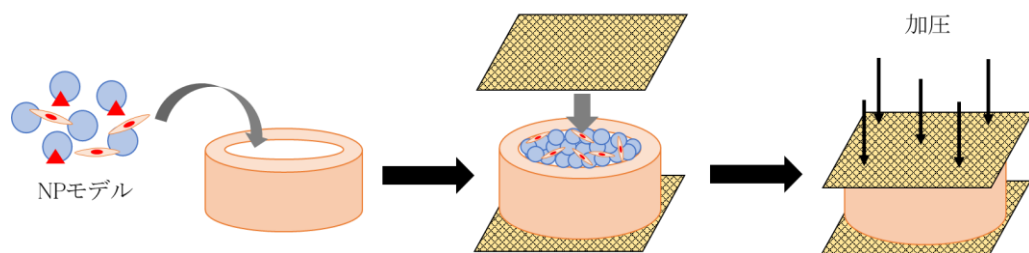


Fig.2-6 人工椎間板モデル培養の模式図

3. 結果

3-1 組織染色による椎間板構造の観察

3-1-1 NP 組織の HE 染色

NP 組織の凍結切片を作製し、HE 染色を行った。HE 染色では細胞核が青紫、コラーゲン線維が赤色に染色される。染色前の NP 組織写真を Fig.3-1 に、HE 染色結果を Fig.3-2 に示す。



Fig.3-1 NP 組織写真

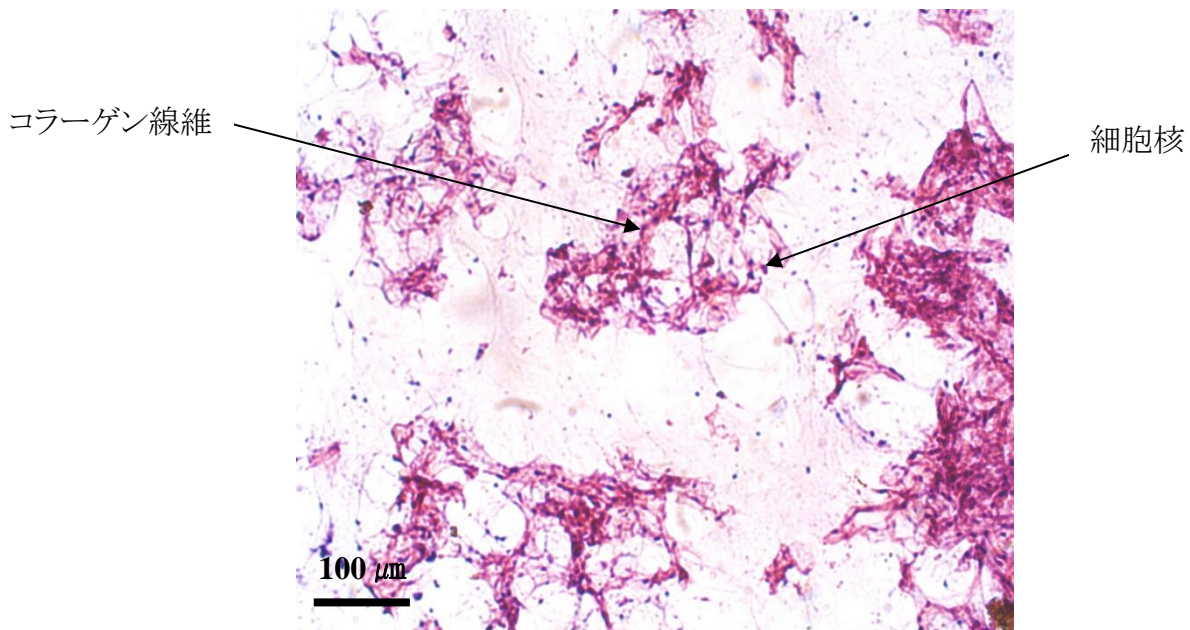


Fig.3-2 NP 組織の HE 染色写真(×200)

Fig.3-2 の染色結果より、NP 組織内では細胞核、コラーゲン線維の局在化が観察された。また、切片作製前に測定した NP 組織の重さと、染色写真中の細胞核数から NP 組織の細胞密度を算出した結果、細胞密度は $(70.3 \pm 21.1) \times 10^4$ cells/mlであった。

3-1-2 NP組織のアルシアンブルー染色

NP組織の凍結切片をアルシアンブルー染色し、位相差顕微鏡で観察した結果をFig.3-3に示す。アルシアンブルー染色では細胞核が青紫、硫酸化多糖が青色に染色される。

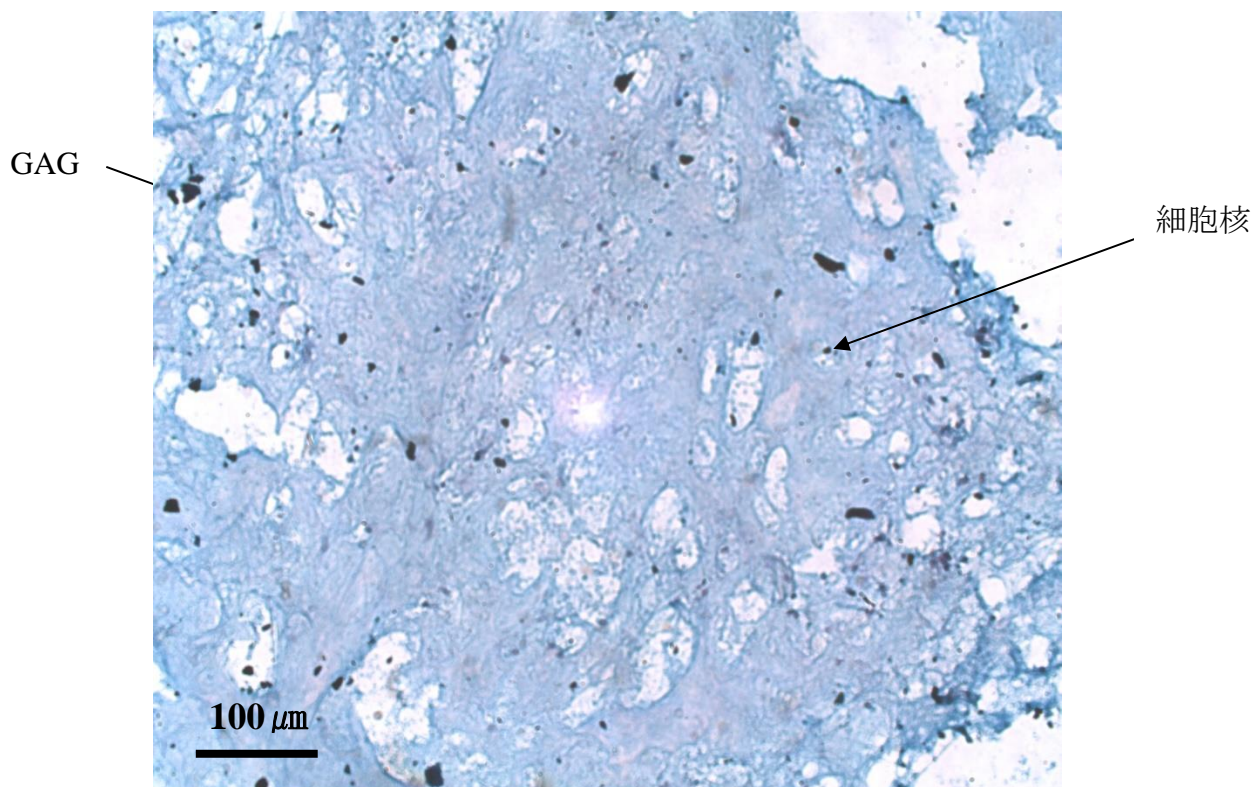


Fig.3-3 NP組織のアルシアンブルー染色写真(×200)

Fig.3-3の染色結果より、NP組織全体が青色に染色されたことから、GAGが組織全体にわたって分布していることが分かった。

3-1-3 AF 組織の HE 染色

AF 組織のパラフィン切片を HE 染色し、位相差顕微鏡で観察した結果を Fig.3-4 に示す。

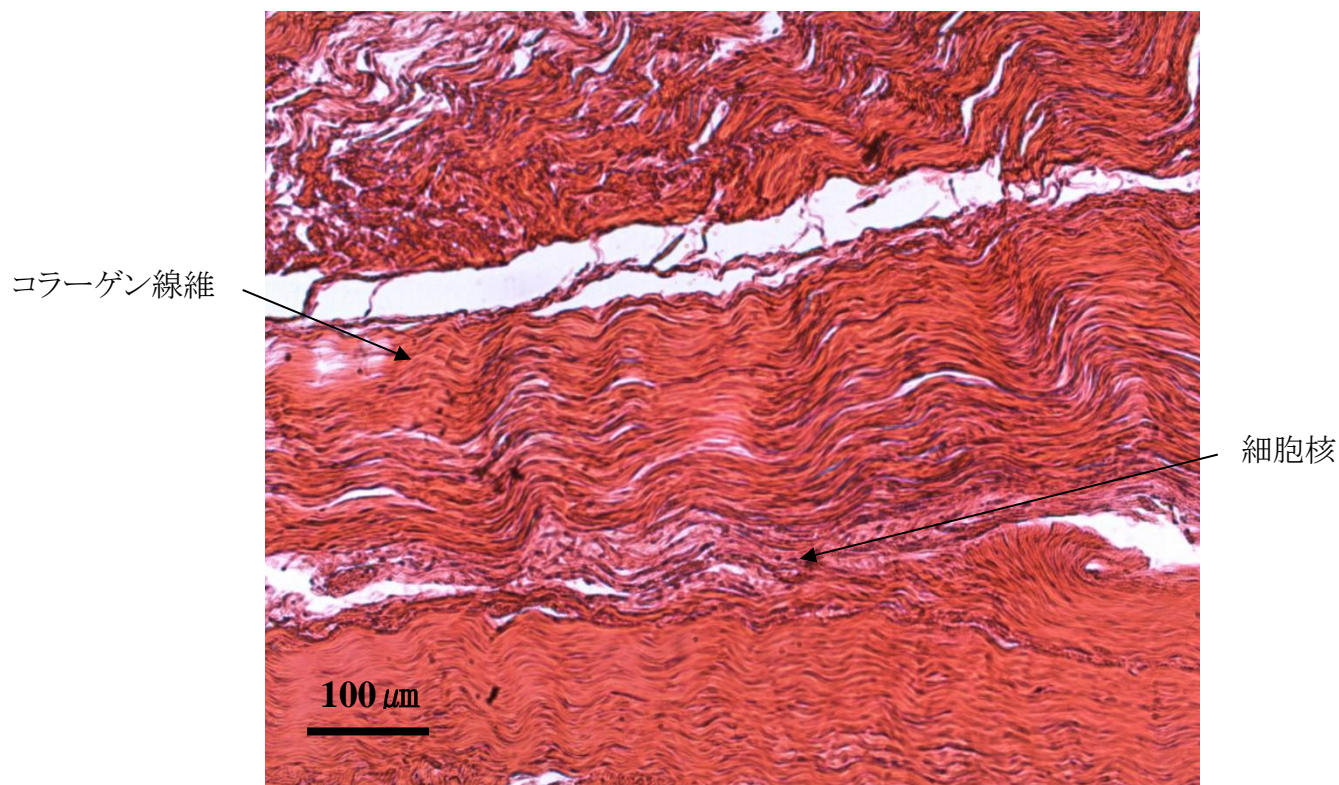


Fig.3-4 AF 組織の HE 染色写真(×200)

Fig.3-4 の染色結果より、コラーゲン線維の層状構造が確認され、細胞核はコラーゲン線維の配向に従い点在していることが分かった。

3-1-4 AF 組織の EVG 染色

AF 組織のパラフィン切片を EVG 染色し、位相差顕微鏡で観察した結果を Fig.3-5 に示す。EVG 染色ではエラスチン線維が黒紫、コラーゲン線維が赤色に染色される。

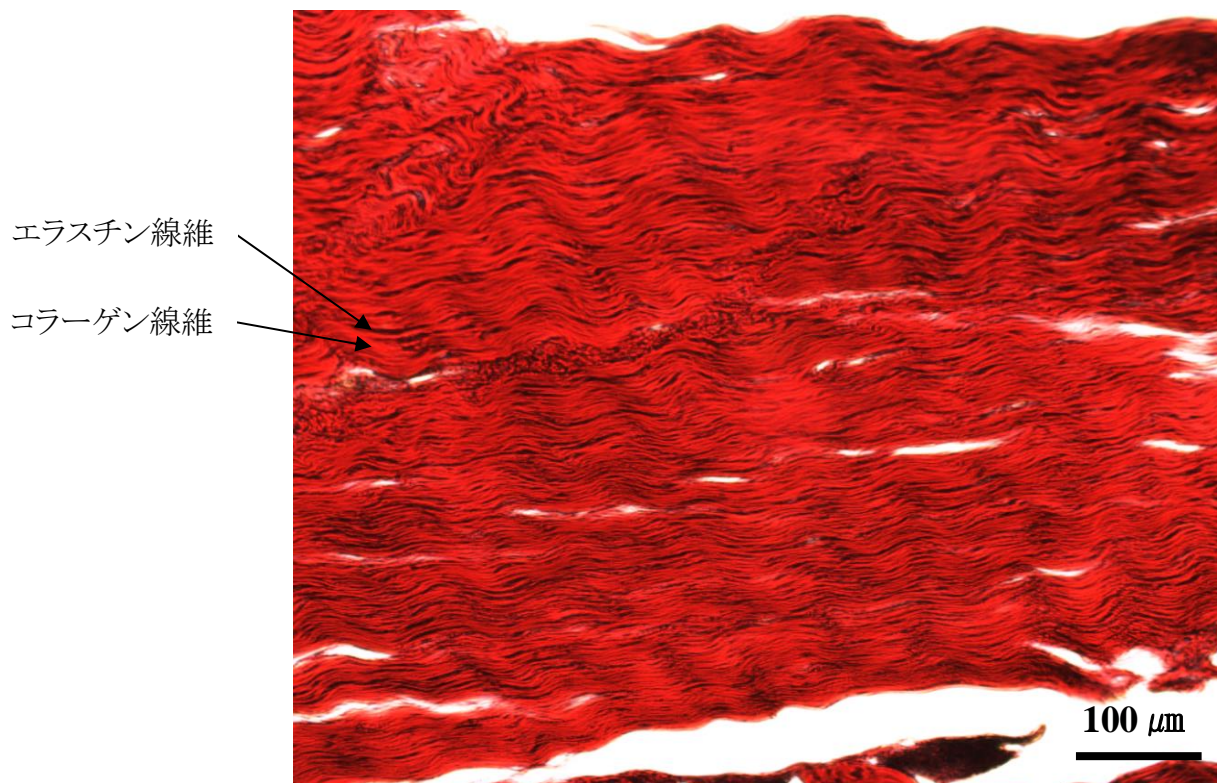


Fig.3-5 AF 組織の EVG 染色写真

Fig.3-5 の染色結果より、AF 組織ではコラーゲン線維とエラスチン線維の層状構造が観察された。

コラーゲン線維、エラスチン線維、コラーゲン線維の並びを 1 層として層の厚さを測定したところ、1 層あたり 4.54μm であった。

3-2 ジェラン材料

3-2-1 CMG の作製

作製した CMG の $^1\text{H-NMR}$ 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	0.24	22.0	9.93
2	1.00	0.33	29.6	18.7
3	1.00	0.77	77.3	30.7

Table3-1 GS の作製結果

硫酸化率の異なる GS を作製することができた。以降は上記の硫酸化率の GS を使用して実験を進めていく。

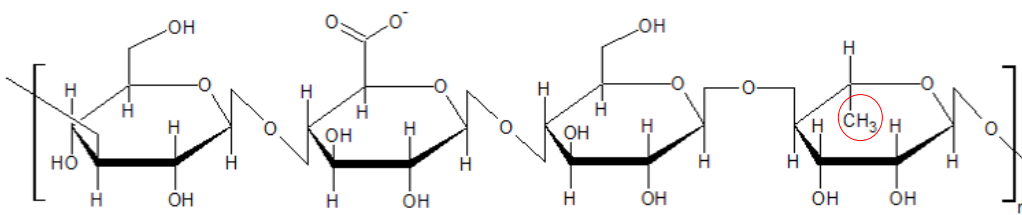
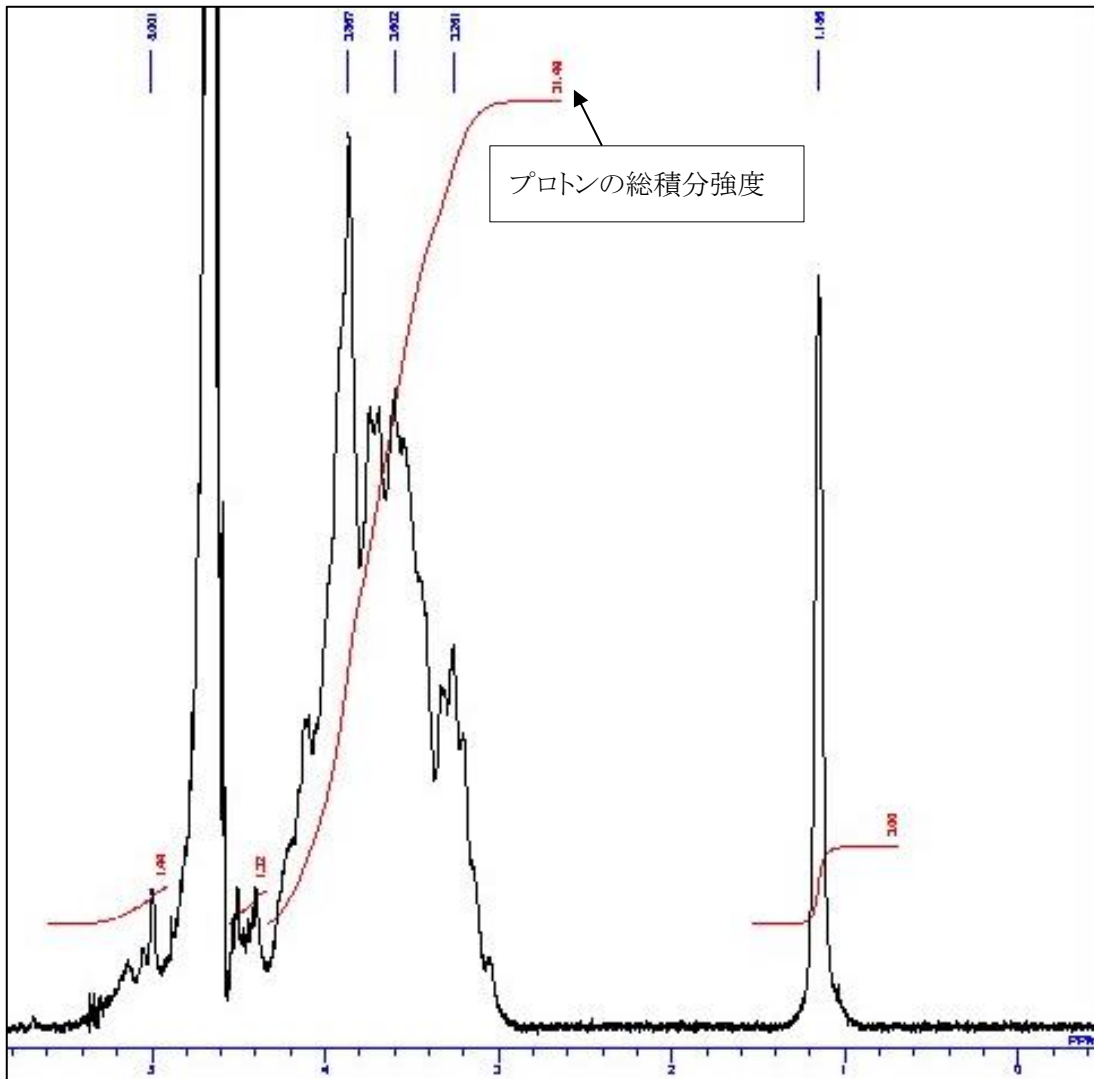


Fig.3-6 作製した CMG のスペクトルと脱アシルジェランの構造

3-3 GS 添加培養による NP 細胞の影響調査

3-3-1 遺伝子発現変化

GS 添加培地によって 7 日間培養した NP 細胞の遺伝子発現変化を real-time PCR によって調査した。その結果を Fig.3-7 に示す。(n=1)

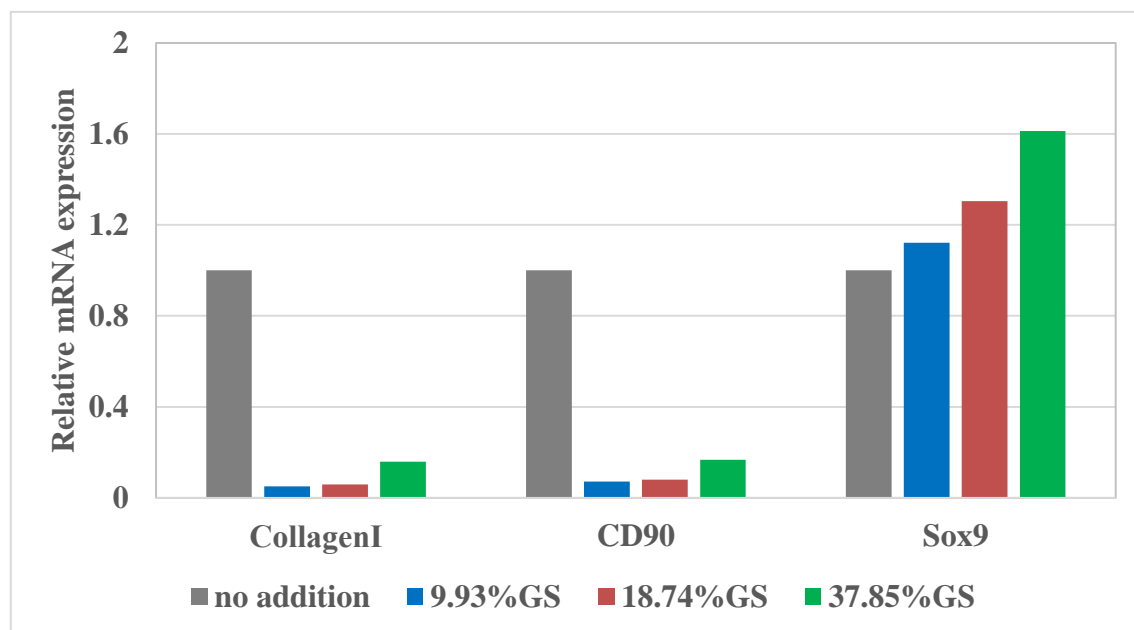


Fig.3-7 GS 添加 NP 細胞の遺伝子発現

通常培養と比較し、GS 添加培養で脱分化マーカーCollagen1、CD90の減少が見られた。また、分化マーカーの Sox9 が硫酸化率の上昇に伴って増加した。以上の結果より、GS が NP 細胞の脱分化を抑制し、再分化を促進させたことから、遺伝子レベルで軟骨誘導に有効であることが示唆された。また、その効果は硫酸化率の上昇に伴って高くなることが分かった。

3-3-2 GAG 産生量

次に作成した検量線を用いて通常培養、GS 添加培養における NP 細胞の培地中への sGAG 産生量を測定した。その結果を Fig.3-8 に示す。

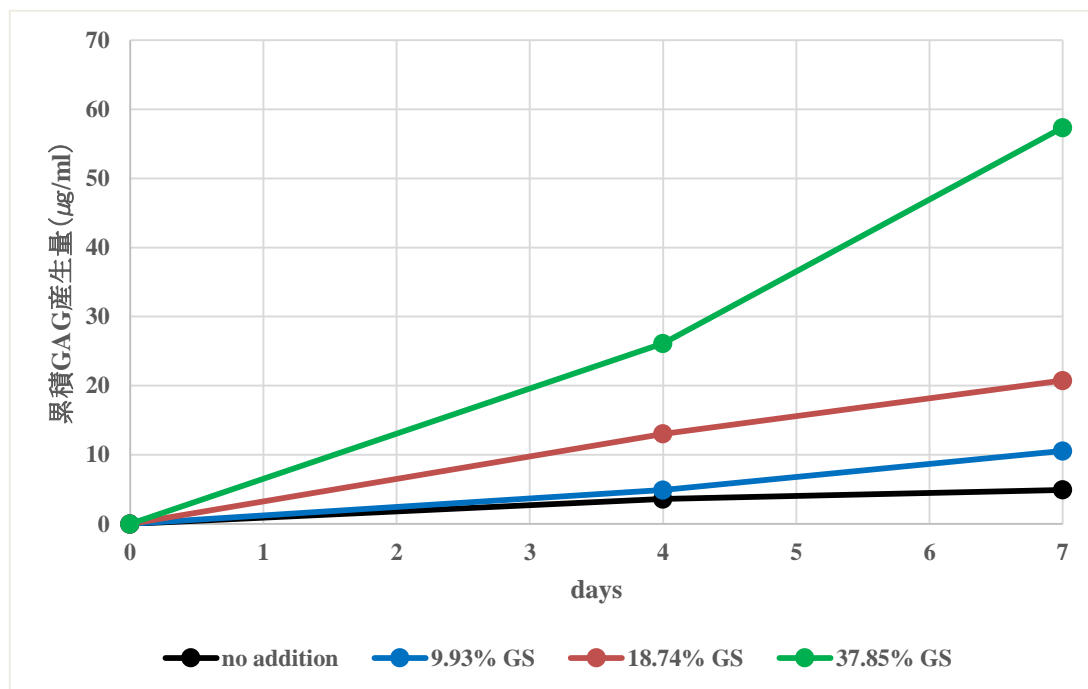


Fig.3-8 GS 添加 NP 細胞の sGAG 産生量

通常培養と比較して、GS 添加培養では NP 細胞の累積 GAG 産生量が増加した。また、硫酸化率が上昇するに伴って累積 GAG 産生量の増加が見られた。

以上の結果より、NP 細胞は GS により遺伝子レベルで軟骨誘導を行われた後、基質産生も促進されていることが確認された。また、遺伝子と同様に GAG 産生においても GS の硫酸化率の上昇に伴って有効であることが示された。

3-4 PRP 添加培養による NP 細胞の影響調査

3-4-1 遺伝子発現変化

PRP 添加培地によって培養した NP 細胞の遺伝子発現変化を real-time PCR によって調査した。その結果を Fig.3-9 に示す。(n=3, *p<0.05)

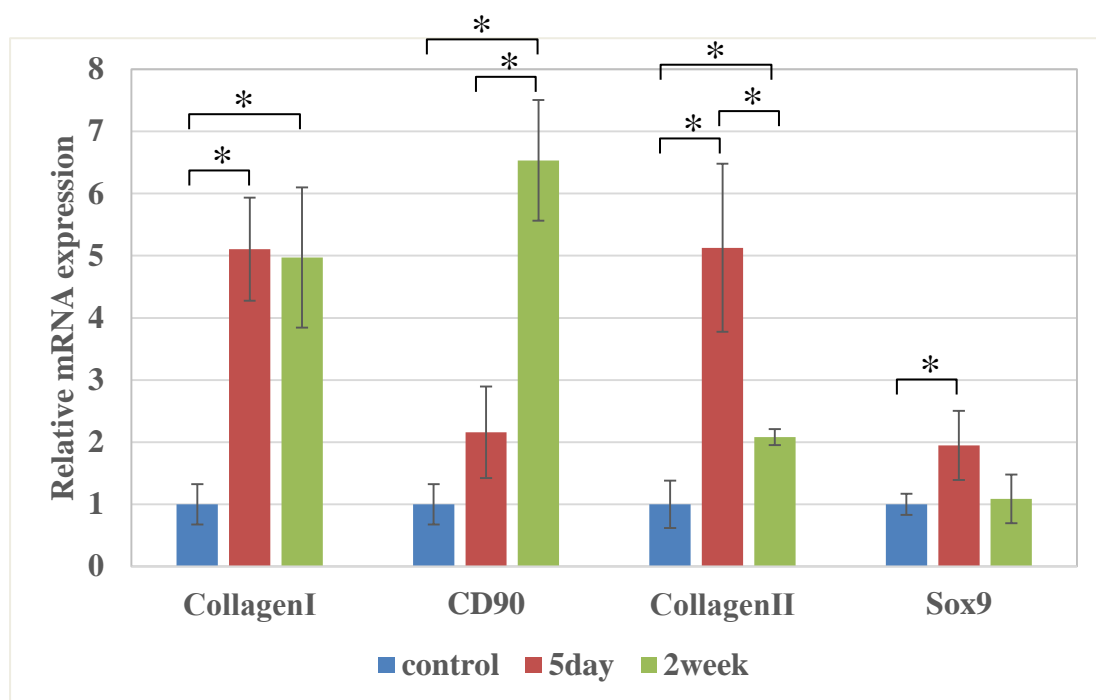


Fig.3-9 PRP 添加 NP 細胞の遺伝子発現変化

通常培養と比較し、PRP 添加培養では培養 5 日目に Collagen I、Collagen II、Sox9 の有意な発現上昇が見られた。培養 2 週間では CD90 の有意な発現上昇、Collagen II、Sox9 の発現抑制が見られた。

以上の結果より、培養 5 日では PRP が分化、脱分化の両方を促進し、培養 2 週間では脱分化が進行することが示された。

3-4-2 GAG 産生量

PRP 添加培地によって培養した NP 細胞の GAG 産生量を測定した。その結果を Fig.3-10 に示す。

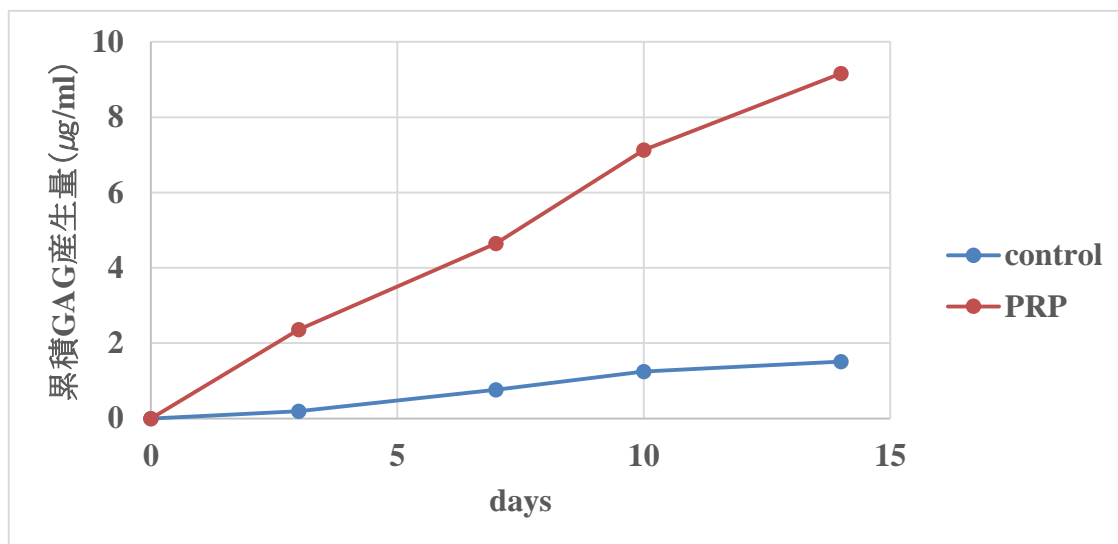


Fig.3-10 PRP 添加 NP 細胞の GAG 産生量

通常培養と比較して、PRP 添加培養では NP 細胞の累積 GAG 産生量が培養日数に伴って増加した。

3-4-3 増殖速度測定

PRPを添加した際のNP細胞の増殖速度を評価するために細胞数変化と倍化時間を求めた。結果をFig.3-11、3-12に示す。

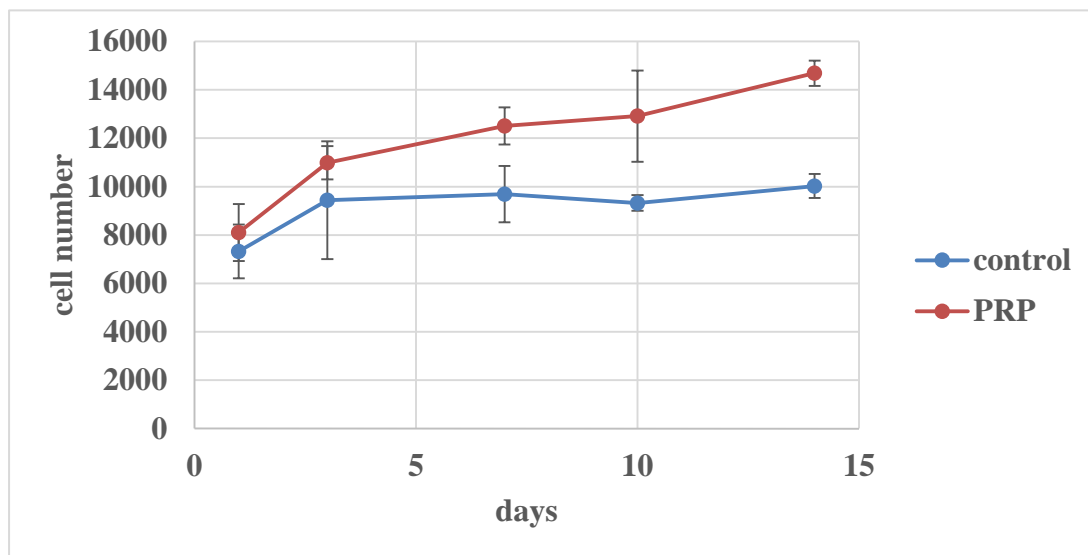


Fig.3-11 PRP 添加による NP 細胞数の変化

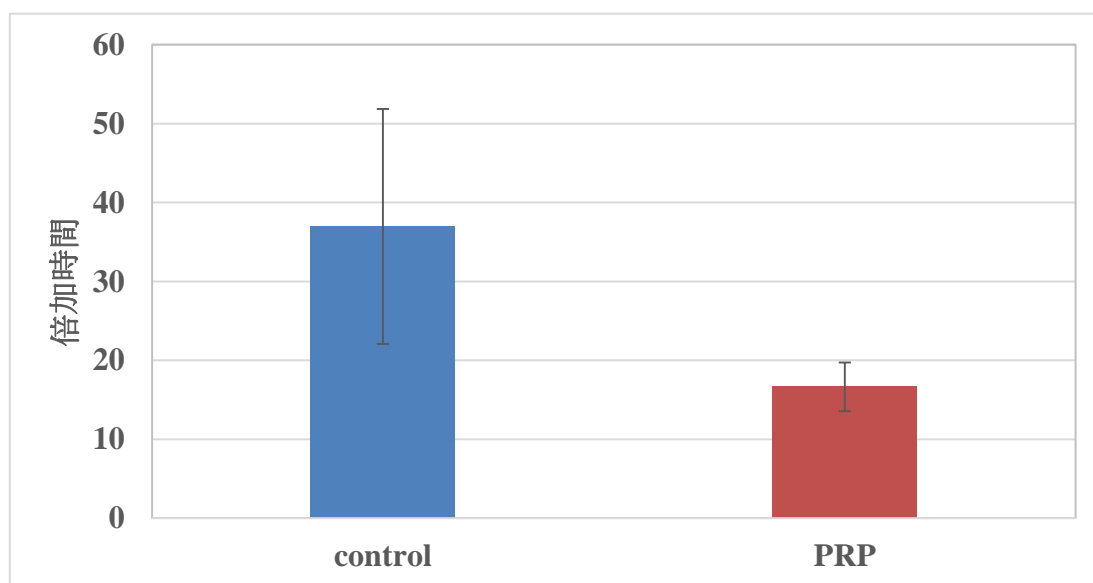


Fig.3-12 PRP 添加による NP 細胞の倍加時間

PRP 添加培養において、培養初期では control と比較して増殖速度に大きな違いは見られなかったが、培養が進むにつれて増殖速度の増加が見られた。倍加時間は control が約 37 日であるのに対し、PRP 添加では約 17 日であった。

以上の結果より PRP 添加培地で NP 細胞を培養することで、細胞増殖が促進されることが分かった。

3-5 NP モデルの作製と評価

3-5-1 GS-CMG ゲルビーズの粒径分布測定

2-6-2 より作製した GS-CMG ゲルビーズを位相差顕微鏡で撮影した写真を Fig.3-13 に示す。

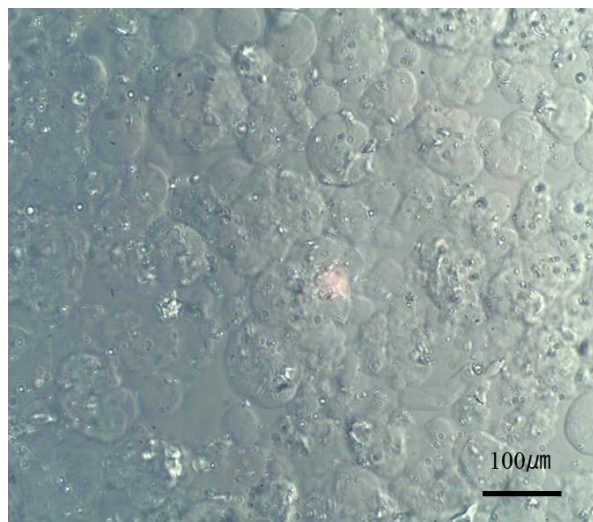


Fig.3-13 位相差顕微鏡で観察した GS-CMG ゲルビーズ(×200)

このように作製した GS-CMG ゲルビーズは真円度が高く、ゲルビーズ間に適度なスペースが存在した。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.3-14 に示す。

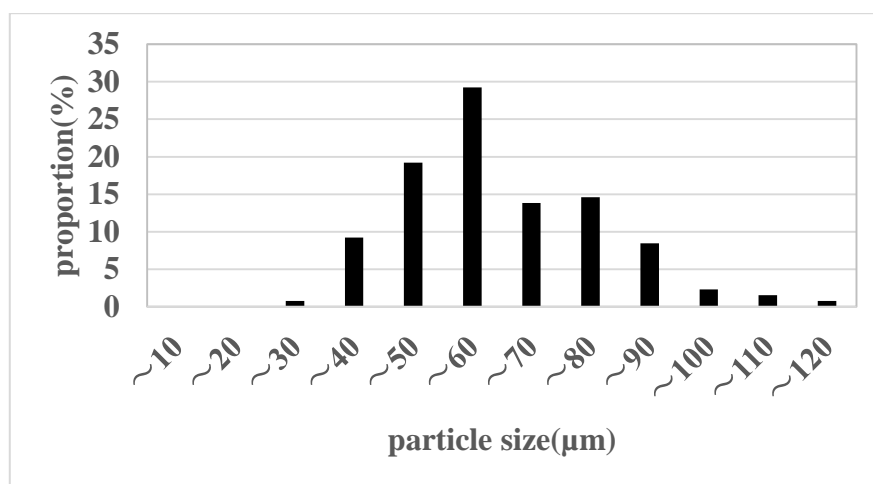


Fig.3-14 ゲルビーズの粒径分布

粒径 40~100 μm のゲルビーズが全体の 87.7% を占めた。平均粒径は 60.16 μm であった。

3-5-2 GS-CMG ゲルビーズの GS 固定化量測定

GS-CMG ゲルビーズを作製する際に用いた硫酸化率 30.7% の GS で波長 520、630nm における吸光度を測定し検量線を作成した。

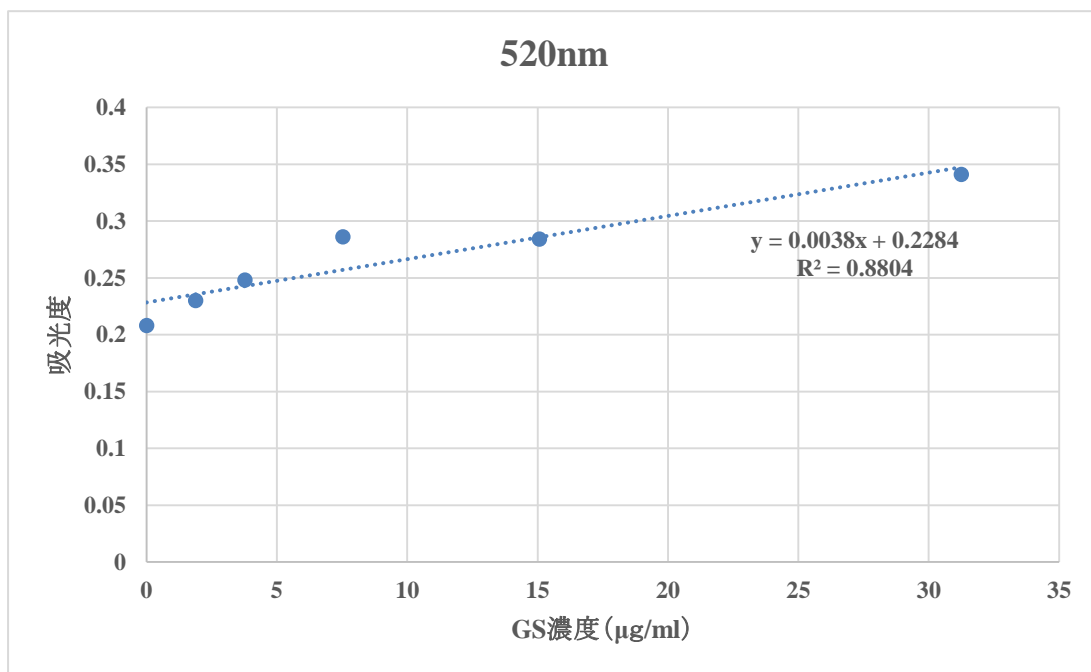


Fig.3-15 波長 520nm における検量線

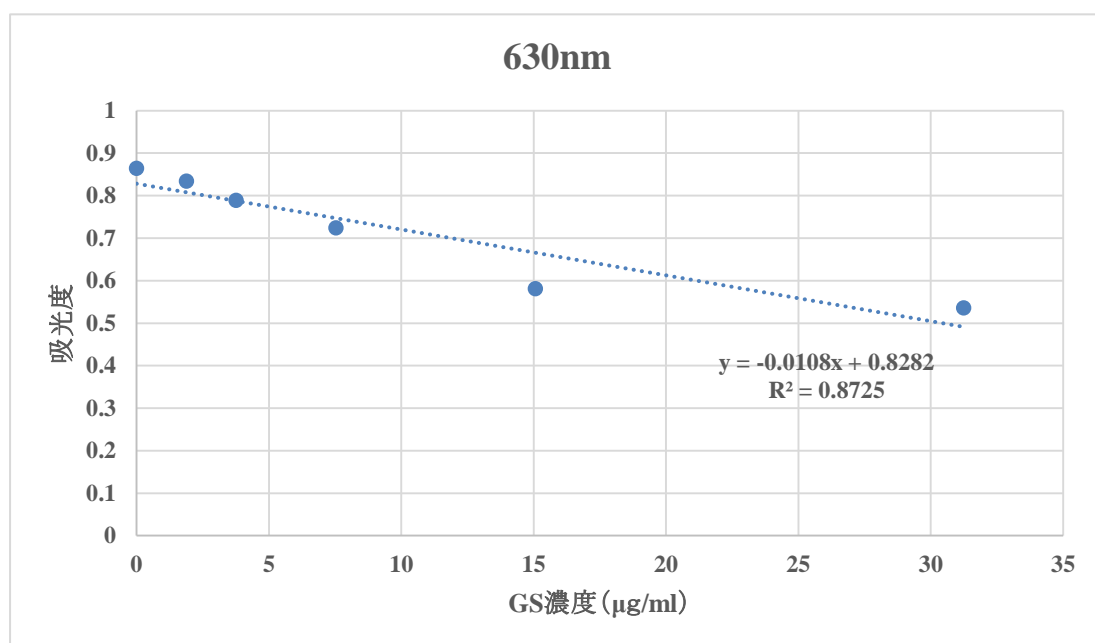


Fig.3-16 波長 630nm における検量線

1 波長では直線性が得られなかったため、2 波長の比から検量線を作成した。

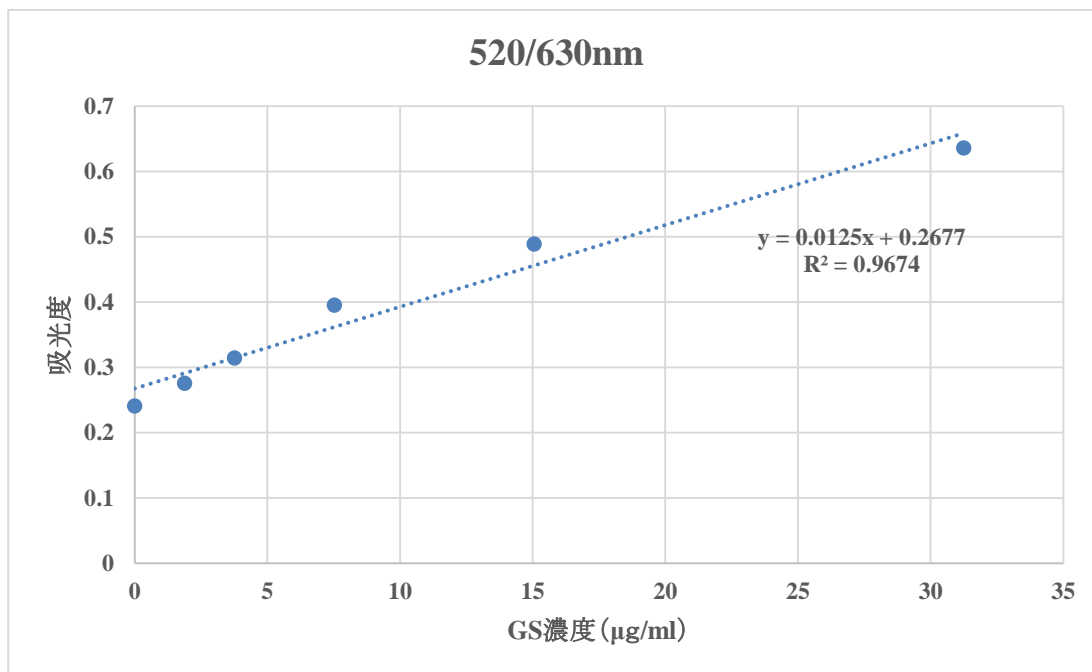


Fig.3-17 波長 520/630 比における検量線

以上の検量線より GS-CMG ゲルビーズにおける GS 固定化量を測定した。

➤ 分解ビーズでの測定値

520nm	630nm	520/630nm
0.231	0.484	0.477

作成した検量線より、GS-CMG ゲルビーズの GS 濃度は 502.32 μg/ml となった。ゲルビーズの重さは 1ml で 1g であったので、GS 濃度とゲルビーズの重さから、作成したゲルビーズに固定化された GS 量は仕込み量 100mg に対して 14.5mg であった。

3-5-3 GS-CMG ゲルビーズの PRP 徐放

GS-CMG ゲルビーズによる PRP の徐放の結果を Fig.3-18 に示す。

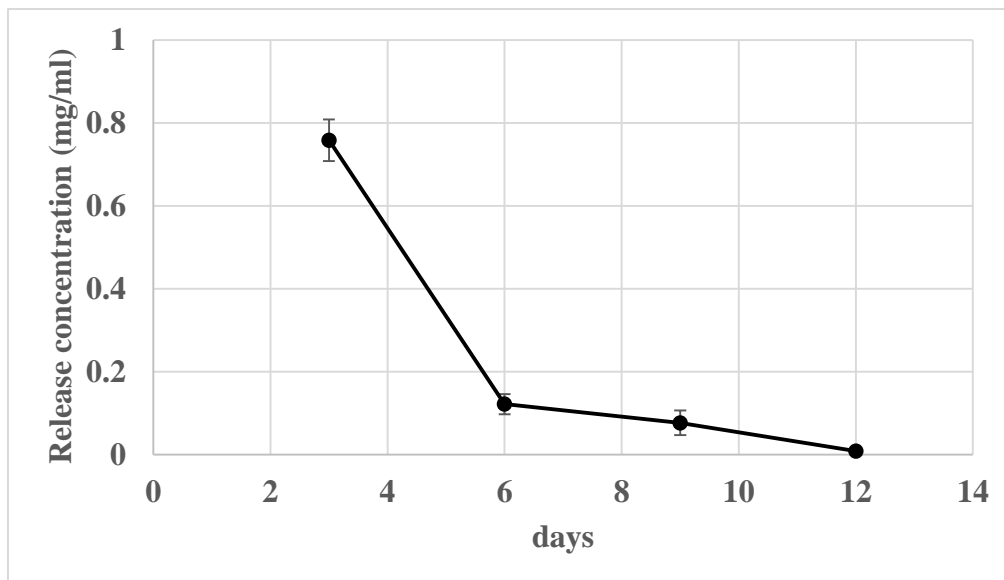


Fig.3-18 GS-CMG ゲルビーズからの PRP 徐放

GS-CMG ビーズからの PRP の徐放量は日数が経過するにつれて減少していき、12 日目で検出できなくなったため観察を終了した。

3-5-4 PRP 徐放型ゲルビーズ内培養による NP 細胞の遺伝子発現変化

PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ内で 5 日間培養した NP 細胞の遺伝子発現を real-time PCR によって調査した。結果を Fig.3-19 に示す。(n=3, *p<0.05)

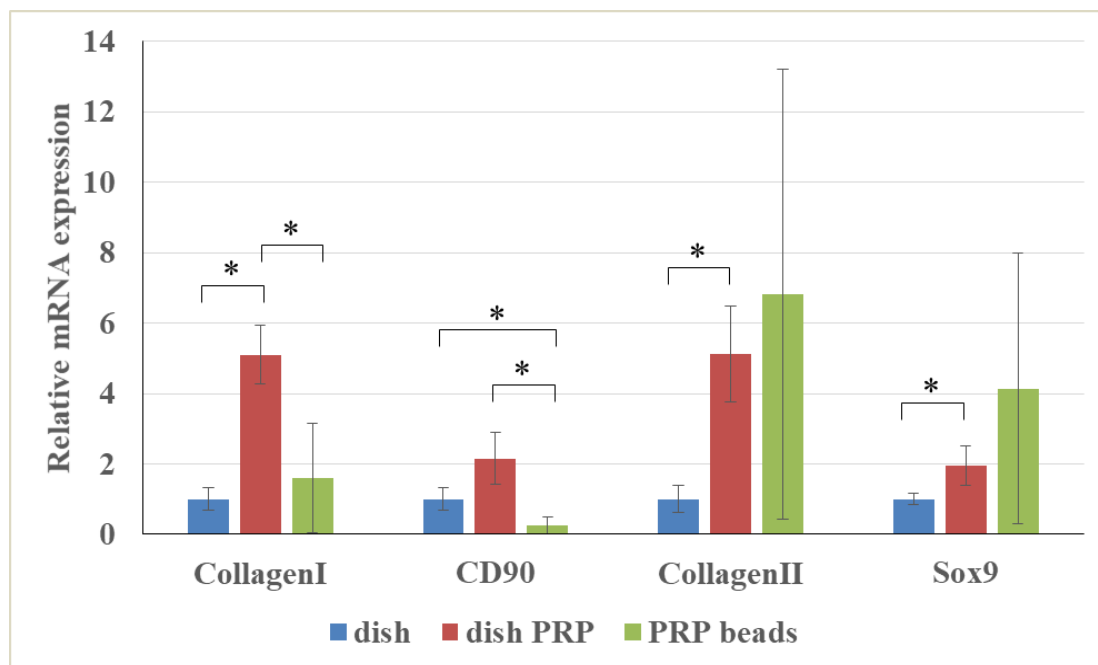


Fig.3-19 PRP 徐放型ゲルビーズ内培養による NP 細胞の遺伝子発現変化

PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ内で NP 細胞を培養することによって、PRP 添加培養によって発現が上昇していた脱分化マーカーの CollagenI、CD90 の発現は有意に減少し、分化マーカーの CollagenII、Sox9 は更なる増加傾向が見られた。

この結果より、PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズで三次元培養を行うことにより、NP 細胞の軟骨誘導が促進されることが示された。

3-6 AF モデルの作製と評価

3-6-1 AF モデルの構造観察

作製したモデルとEVG 染色による染色結果を Fig.3-20、21 に示す。

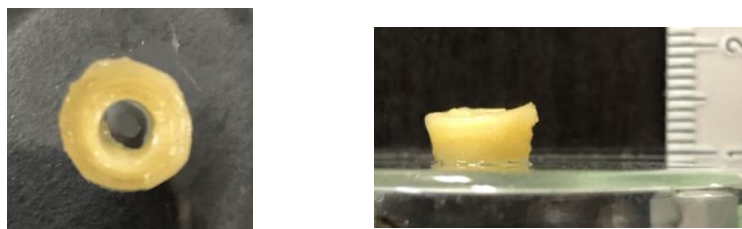


Fig.3-20 AF モデル写真

作製した AF モデルは内径 4mm、厚さ 2mm、外径 8mm、高さ 4mm であった。

AF モデルの EVG 染色

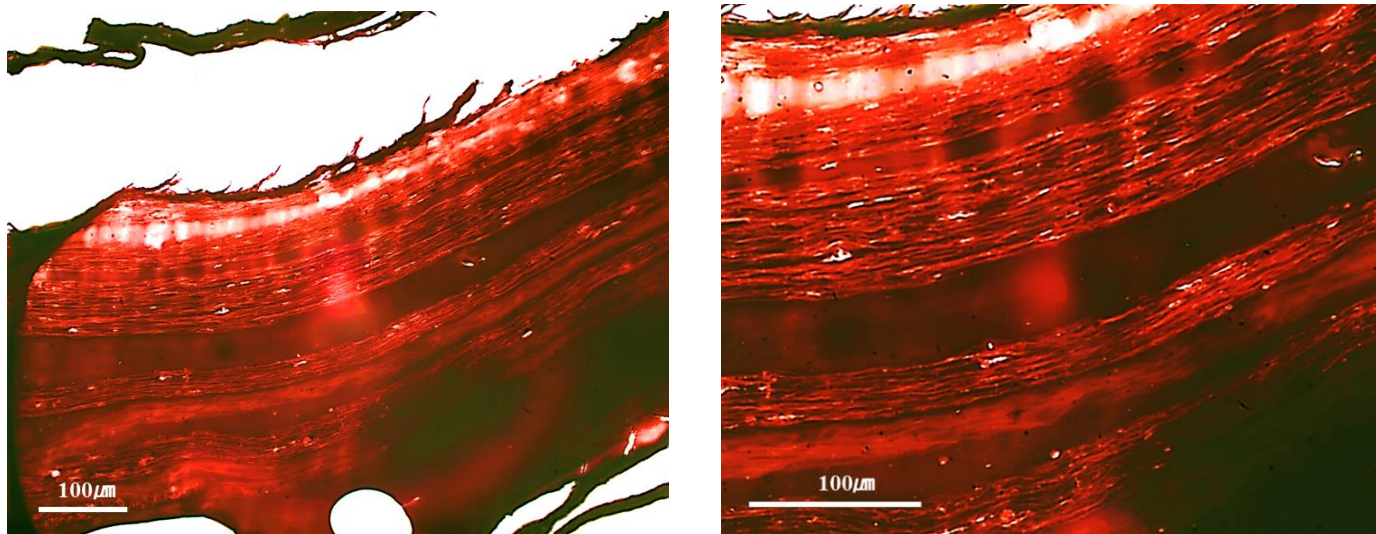


Fig.3-21 AF モデルの EVG 染色(倍率:左×100、右×200)

Fig.3-21 の染色結果より、エラスチンファイバーとコラーゲンファイバーの層状構造が観察できた。

コラーゲンファイバー、エラスチンファイバー、コラーゲンファイバーの並びを1層として層の厚さを測定したところ、1層あたり5µm であった。

3-6-2 AFモデルの力学強度測定

作製した AF モデルの力学特性を調査するために圧縮試験を行った。圧縮試験により求めた AF モデルの弾性率と応力を Fig.3-22、23 示す。

条件①：縦 2.5cm×横 0.6cm ファイバー、15unit

条件②：縦 2.5cm×横 0.6cm ファイバー、30unit

条件③：縦 10cm×横 0.6cm ファイバー、7unit

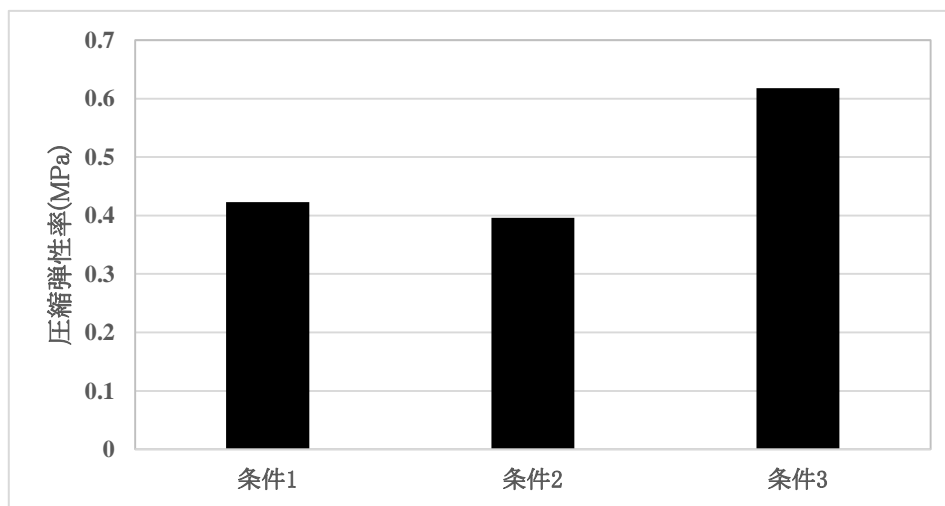


Fig.3-22 AFモデルの圧縮弾性率

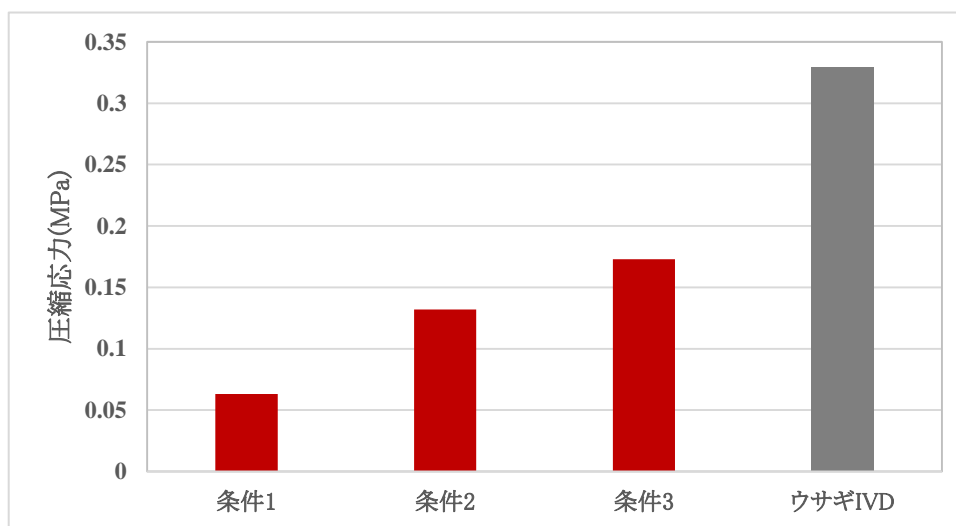


Fig.3-23 AFモデルの圧縮応力

弾性率は条件①と②の unit 数の違いによる変化は見られず、条件③のファイバーを長くすることでわずかに増加した。

モデルが耐えることができる応力に関しては unit 数を増やすことで増加し、ファイバーを長くし、連続的に巻き付けることで最も高くなった。

3-6-3 ファイバー培養による NP 細胞の遺伝子発現変化

コラーゲンファイバー上で 7 日間培養した NP 細胞の遺伝子発現を real-time PCR によって調査した。結果を Fig.3-24 に示す。(n=3, *p<0.05, fiber+PRP の CollagenII、Sox9 は n=2)

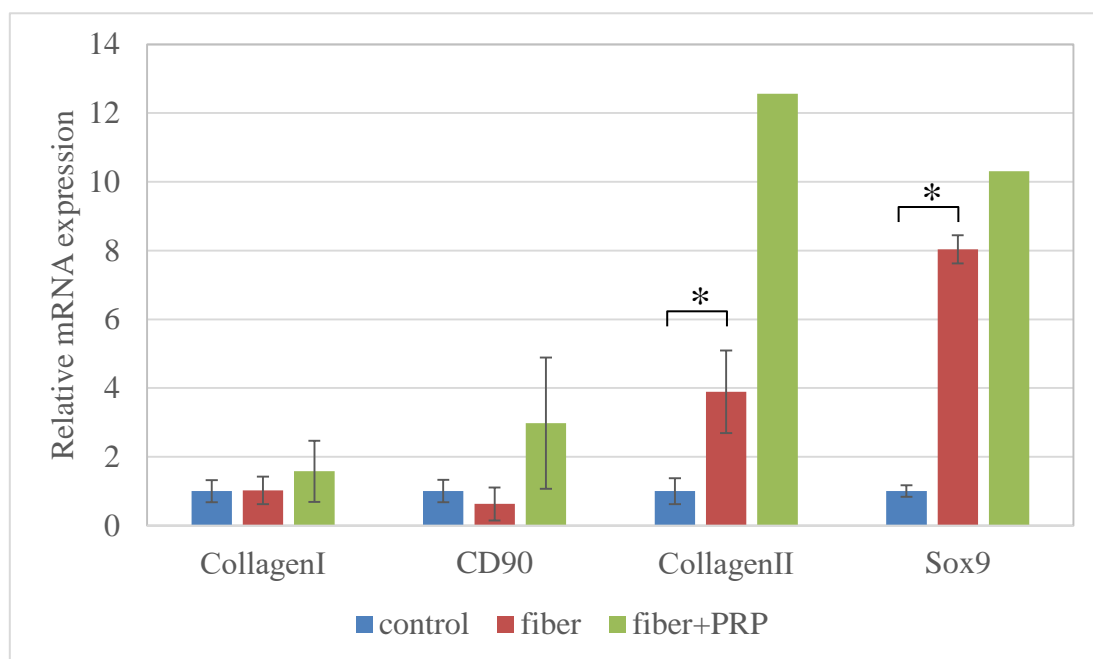


Fig.3-24 ファイバー培養による NP 細胞の遺伝子発現変化

コラーゲンファイバー上で NP 細胞を培養すると、軟骨関連マーカーの Collagen II、Sox9 は有意に上昇したが、線維化マーカーの Collagen I、CD90 に変化は見られなかった。ファイバー上で PRP 添加培養を行った群では Collagen II、Sox9 の発現上昇と CD90 の上昇傾向が見られた。

よって、コラーゲンファイバー上かつ PRP の存在下で NP 細胞は線維化傾向が見られた。

3-7 加圧培養による NP 細胞の遺伝子発現変化

2-8 の加圧培養装置を用いて NP 細胞を培養した際の遺伝子発現を real-time PCR によって調査した。培養形式は単層培養と PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ培養で加圧を行った。結果を Fig.3-25 に示す。(n=3, *p<0.05)

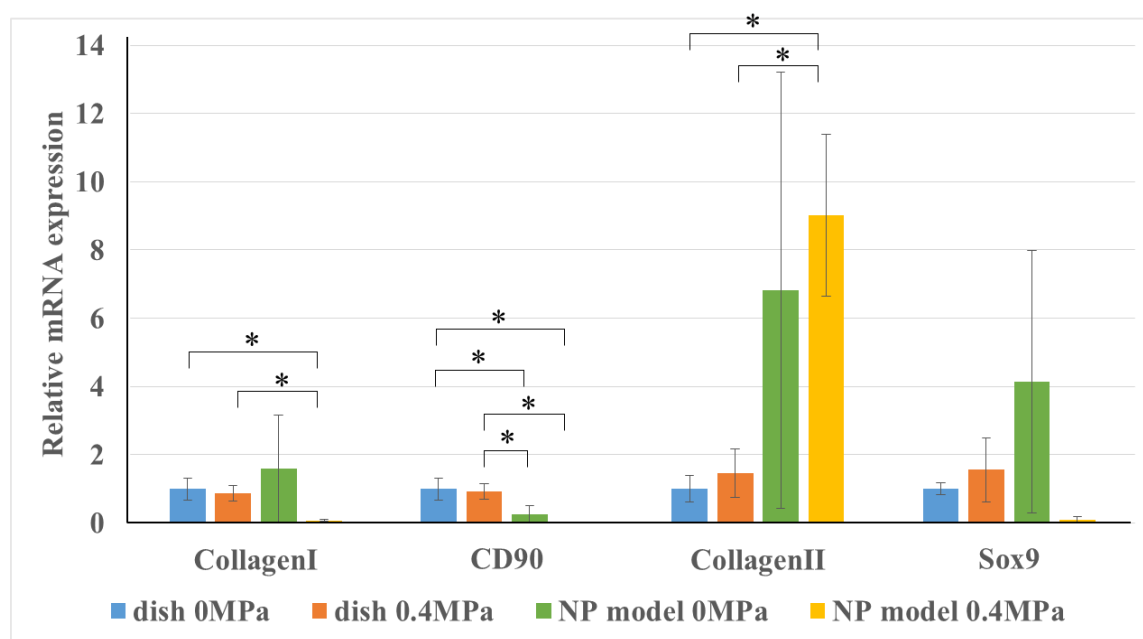


Fig.3-25 加圧培養による遺伝子発現変化

control の dish 無刺激の培養と dish 0.4 MPa の加圧培養とで、脱分化マーカーの Collagen I、CD90 には変化は見られず、分化マーカーの Collagen II、Sox9 は若干の増加が見られたが、大きな変化は見られなかった。PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ内培養に加圧刺激を加えたものでは dish の無刺激と比較して Collagen I、CD90 が有意に減少し、Collagen II が 9.0 倍と有意に増加した。

これらの結果より、三次元培養での加圧刺激が NP 細胞に対して最も有効であることが示唆された。

3-8 人工椎間板の培養及び評価

作製した人工椎間板内で NP 細胞を培養した後、組織染色により人工椎間板の観察を行った。人工椎間板の写真を Fig.3-26 に示す。

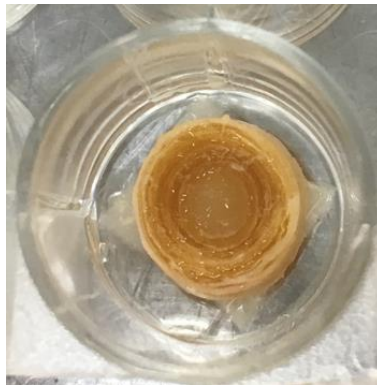


Fig.3-26 作製した人工椎間板

3-8-1 人工椎間板の HE 染色

7 日間の加圧培養が終了した後、人工椎間板の凍結切片を作製し、HE 染色を行った。染色結果を Fig.3-27,28 に示す。

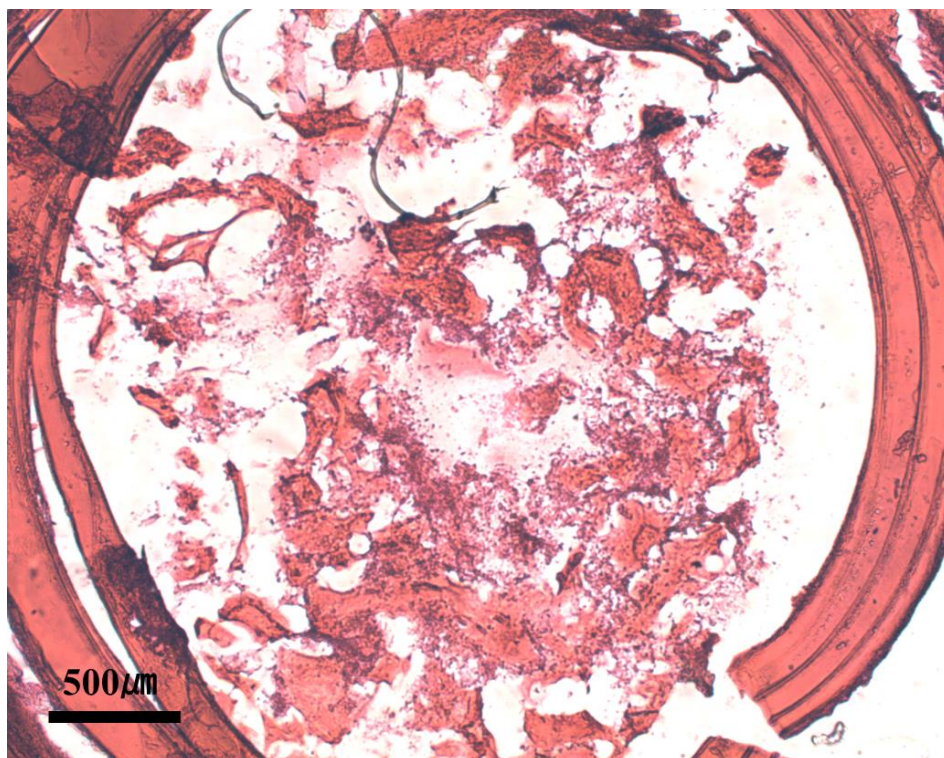


Fig.3-27 人工椎間板の HE 染色(×40)

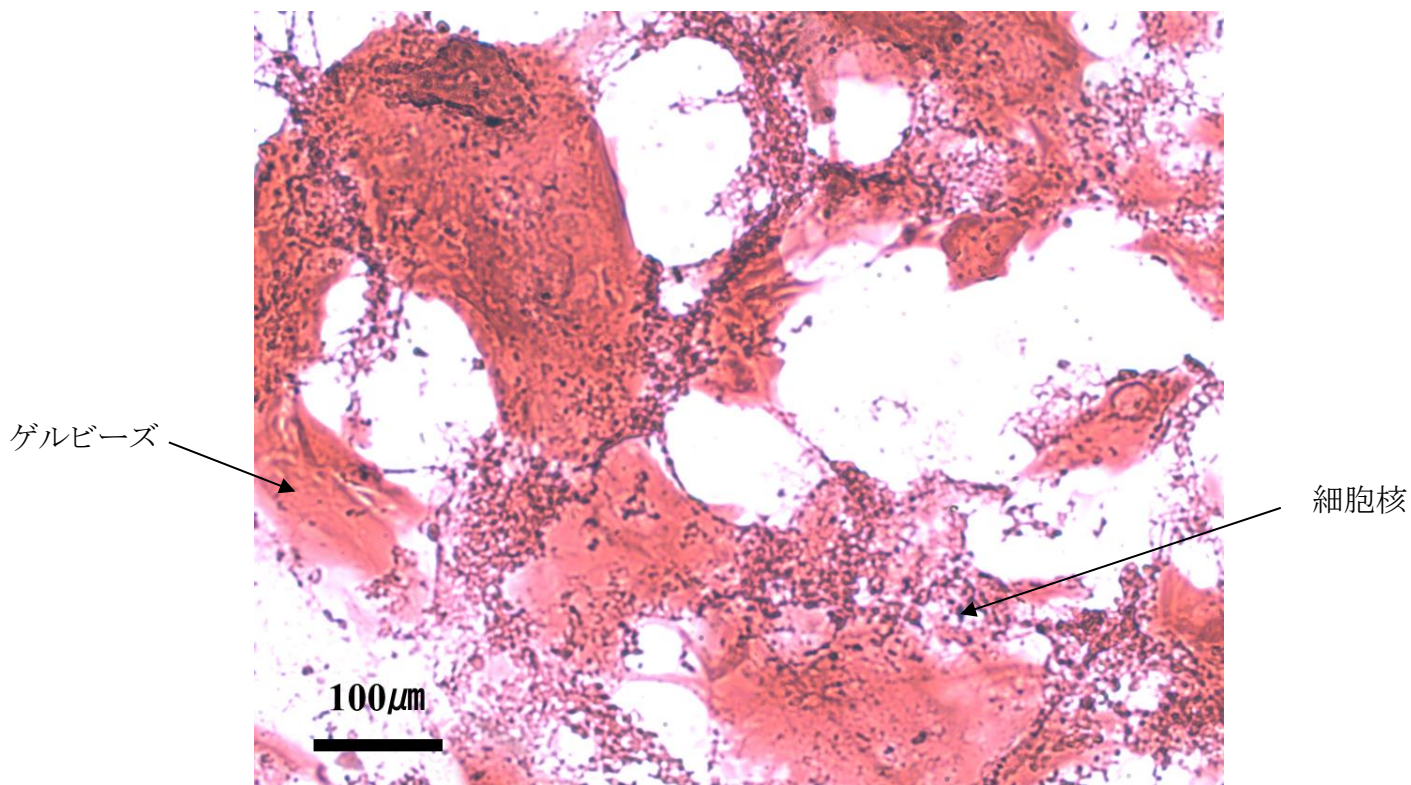


Fig.3-28 人工椎間板の HE 染色(×200)

Fig.3-27 の染色結果から、加圧培養後も人工椎間板は内部の NP を AF が取り囲む椎間板組織構造を再現していた。

次に NP モデル部分を 200 倍に拡大して観察した Fig.3-28 では NP 組織と同様に細胞の点在が確認された。

3-8-2 人工椎間板のアルシアンブルー染色

3-8-1 と同様に凍結切片を作製し、アルシアンブルー染色を行った。アルシアンブルー染色は培養 0 日と培養 7 日後のサンプルを染色し、染色度合を比較した。染色結果を Fig.3-29 に示す。(×200)

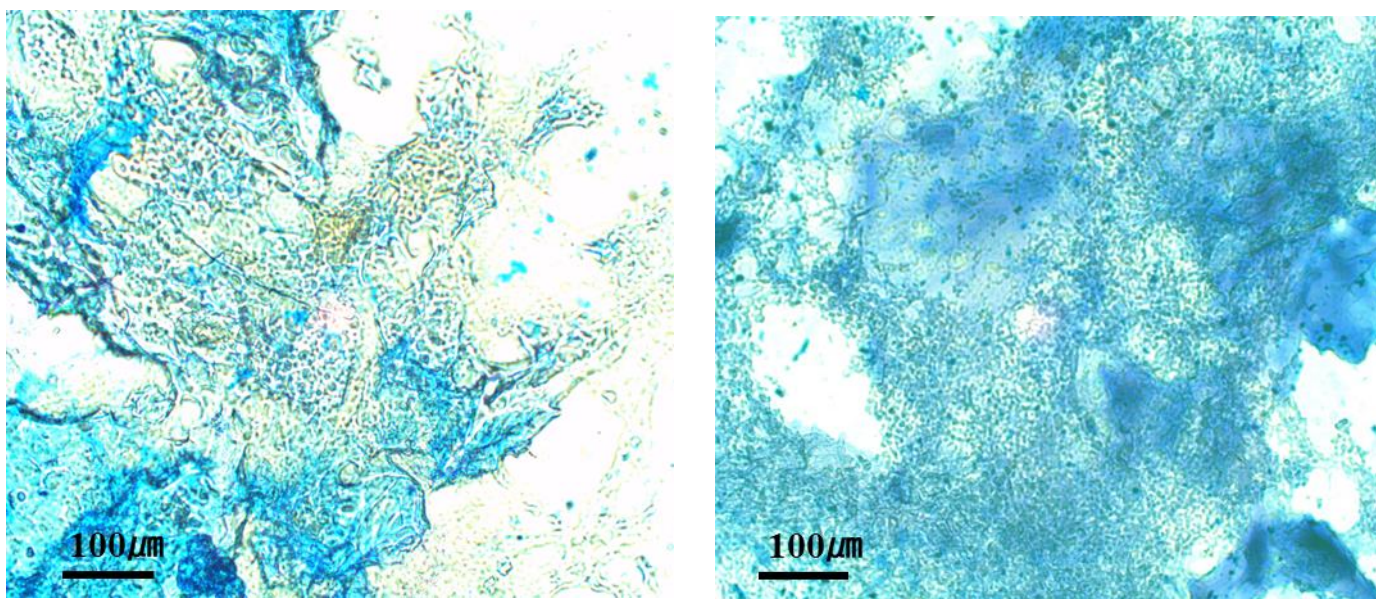


Fig.3-29 人工椎間板のアルシアンブルー染色(左:培養 0 日目、右:培養 7 日目)

Fig.3-29 の染色結果から、培養 0 日目の染色と比較して加圧培養 7 日後の染色では染色強度の増強が確認された。

よって、人工椎間板を加圧培養することで NP 細胞の基質産生が見られ、モデル内で組織再生が促されていることが示唆された。

4. 考察

4-1 NP 細胞に対する GS の効果

NP 細胞のような軟骨細胞は *in vitro* で単層培養を行い増殖させると、脱分化を引き起こして本来の軟骨としての機能を失うという特徴を有する。そこで脱分化した NP 細胞を再分化させる、また脱分化を抑制するということが NP 組織再生を行う上で重要となる。本研究では NP 細胞の再分化を誘導させる因子として GS に着目し、NP 細胞に対する応答を調査した。GS 存在下で NP 細胞の単層培養を行った結果、Fig.3-7 の遺伝子発現変化では脱分化マーカーの CollagenI、CD90 の発現が減少し、分化マーカーの Sox9 の発現が上昇した。また、Fig.3-8 の GAG 産生量測定の結果では通常培養と比較して、GS 添加培養において NP 細胞の GAG 合成を促した。以上の結果より、GS が NP 細胞の再分化を促したと考えられる。

再分化を促進した要因としては GS とヘパリン結合性成長因子との相互作用が考えられる。ヘパリン結合性成長因子とはすべての細胞の細胞膜上に存在するヘパラン硫酸(HS)や、HS に由来した分解産物のヘパリンと結合能を有するタンパク質のことである。GAG の一種である HS、ヘパリンは強い陰性電荷を帯びているため、ヘパリン結合性成長因子のカチオンと相互作用を引き起こし、活性に影響を与えている⁽¹²⁾。

以上の反応をもとに NP 細胞の分化、脱分化について考察を行う。現在、ヘパリン結合性成長因子として同定されているものは数多く存在するが、その中で NP 細胞の脱分化に影響を与えた因子としては bFGF を考えている。bFGF は線維芽細胞増殖因子として発見されたが、血管内皮細胞や平滑筋細胞、軟骨細胞といった様々な細胞に対して増殖活性や分化誘導を示す多機能性細胞間シグナル因子である。我々の過去の研究において、bFGF が NP 細胞の脱分化を促進させるという報告がある⁽¹³⁾。bFGF を添加した培地で NP 細胞を培養し遺伝子発現を測定したところ、脱分化マーカーの Collagen1 と CD90 の発現の増加が見られている(Fig.4-1)。また、GS が bFGF と高い親和性を持つという報告もされている⁽¹⁴⁾。

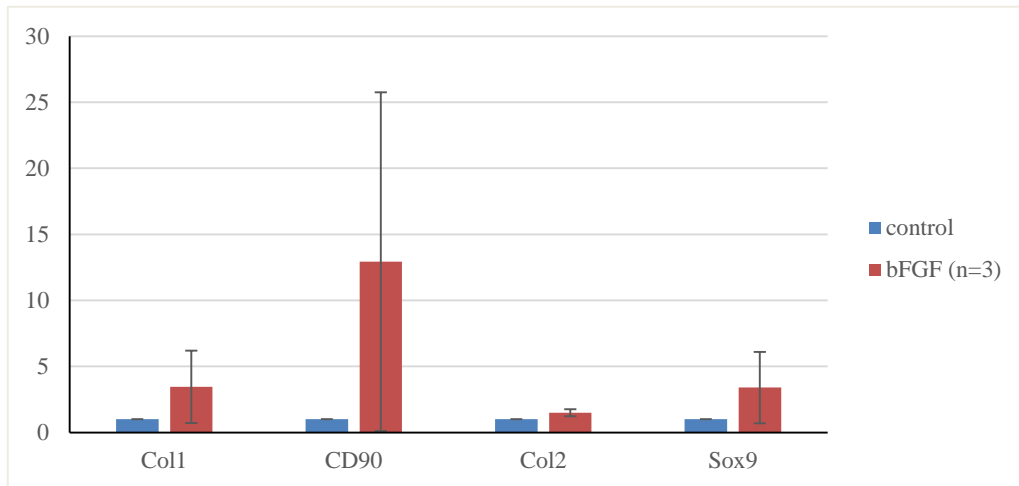


Fig.4-1 bFGF 添加 NP 細胞の遺伝子発現変化

bFGF は細胞膜上のヘパラン硫酸プロテオグリカン(heparan sulfate proteoglycan: HSPG)の HS とレセプター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ことが知られている⁽¹⁵⁾。GS はこの bFGF の三量体形成を妨げることで、bFGF のシグナル伝達を阻害していると考えられる。そのメカニズムを Fig.4-2 に示す。

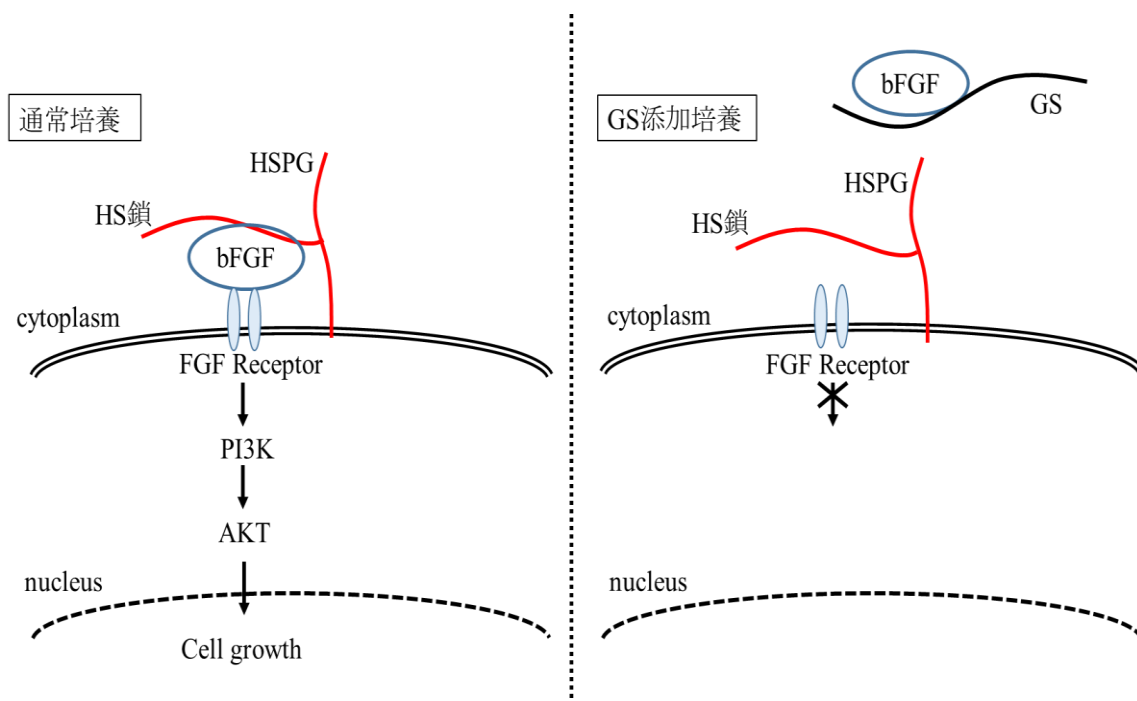


Fig.4-2 GS の bFGF による脱分化の抑制メカニズム

次にGSとヘパリン結合性成長因子によるNP細胞の分化について考察を行う。軟骨細胞に由来する成長因子としてTransforming growth factor(TGF)- β スーパーファミリーを挙げる。TGF- β スーパーファミリーは多様な細胞型において増殖、分化、生存といった細胞活動を調節する多くのサイトカインを含んでいる。中でもTGF- β 1、骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein :BMP)-2、BMP-7は軟骨誘導を促進することが報告されている^(16,17)。これらの成長因子もbFGFと同様にヘパリン結合性であるためHSPGのHS鎖と結合することができるが、受容体活性によるシグナル伝達には必須でないと考えられている⁽¹⁸⁾。Ruppert Rらの報告によると、ヘパリン結合を無効にしたBMP-2の変異体が潜在型サイトカインよりも活性が高いことを示した⁽¹⁹⁾。しかし、同研究者らによると、潜在型BMP-2の活性は、外因性ヘパリンの添加によって増加するという結果が得られており、細胞外マトリックスとしてのヘパリン結合はサイトカイン活性を刺激することが示された。よって、TGF- β スーパーファミリーは細胞膜上のHS鎖、レセプターと単一で複合体を形成するよりも、マトリックス内に貯蓄され高密度化した状態においてよりレセプターとの活性が増強され、シグナル伝達が促進するのではないかと考える。そこで、GSは細胞外マトリックスと同様にTGF- β スーパーファミリーを結合させることで高密度化させ、シグナル伝達に影響を与えたと考える。そのメカニズムをFig.4-3に示す。

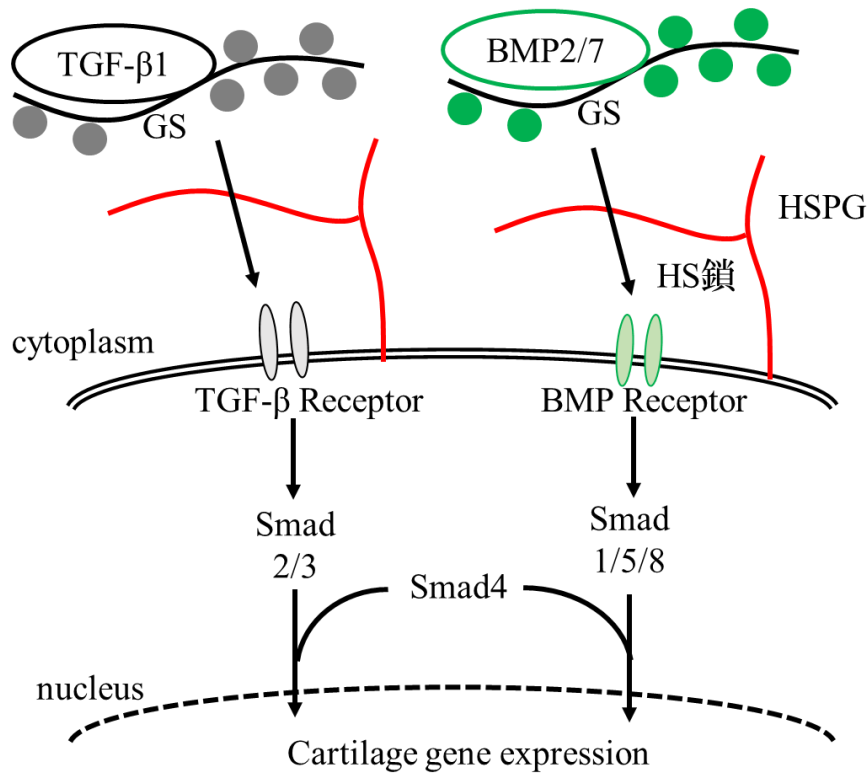


Fig.4-3 GSとTGF- β スーパーファミリーによる分化のメカニズム

このように **GS** によるサイトカイン活性の増加によってシグナル伝達が促進され、**Smad** の経路を介した軟骨関連遺伝子、本実験では **Sox9** の発現上昇が見られたと考える。

また、**GS** は硫酸化率が上昇するに伴ってヘパリン結合性成長因子との親和性が高くなると報告されている⁽¹⁴⁾。本研究の **GS** 添加培養では遺伝子発現測定、**GAG** 産生量測定ともに硫酸化率が高くなるにつれて、より再分化を誘導するという結果が示された。これらの結果は硫酸化率の上昇に伴って **GS** とヘパリン結合性成長因子の親和性が高まることで、より **bFGF** とレセプターとの複合化を妨げることによる脱分化の抑制、**TGF- β** スーパーファミリーの高密度化による分化の効果を高めているためであると考え。そこで以上の結果、考察を踏まえると、より高硫酸化率の **GS** を用いることが **NP** 組織再生に有効であることが考えられる。

4-2 NP 細胞に対する PRP の効果

本研究では NP モデルから徐放させる薬物として PRP を用いた。PRP 存在下で NP 細胞の単層培養を行った結果、Fig.3-9 の遺伝子発現変化より、培養 5 日目では脱分化マーカーである CollagenI は有意な発現上昇が見られ、CD90 は上昇傾向が見られた。分化マーカーである CollagenII、Sox9 は共に有意な発現上昇が見られた。この結果より、PRP は NP 細胞に分化、脱分化の両方の効果をもたらすことが示唆された。これは PRP に複数の成長因子が含まれている影響が考えられる。PRP に含まれる成長因子の中で NP 細胞の表現型に影響を与えているものとして PDGF、IGF-I、bFGF、TGF- β の 4 つの因子を考えている。

まず、PRP による NP 細胞の分化作用に関しては TGF- β 1、IGF-1 の影響を考えている。TGF- β 1 は TGF- β レセプターと結合することで Smad2/3 を介した経路を通り、軟骨関連遺伝子が上昇することが報告されている⁽¹⁹⁾。更に NP 細胞に対して TGF- β 1 単体を用いるより、PRP を用いた方が Smad のリン酸化が増強されるという報告がされている⁽²⁰⁾。これは TGF- β 1 の効果に対して PRP に含まれる別の成長因子の相乗効果が考えられている。細胞種は異なるが脂肪由来幹細胞において、IGF-1 を TGF- β 1 と共に曝露することで CollagenII、Sox9 の遺伝子発現を増強するという報告がされている⁽²¹⁾。IGF-1 がレセプターと結合し、ERK1/2 経路を活性化した後、Smad2/3 経路へとクロストークすることで発現が増強すると考える。これらの報告を基に PRP 中に含まれた成長因子による分化の機序を Fig.4-4 に示す。

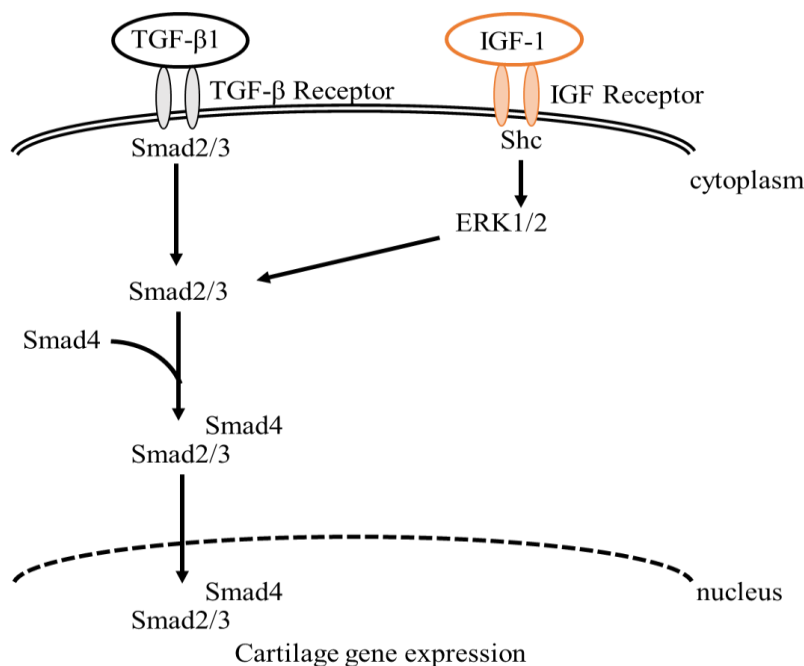


Fig.4-4 TGF- β 1、IGF-1 による軟骨関連遺伝子発現のメカニズム

次に PRP による NP 細胞の脱分化作用について考察する。脱分化作用に関しては PRP 中の PDGF、bFGF、IGF-1 の影響を考えている。Haris. P らは *in vitro* における NP 細胞が PDGF、bFGF、IGF-1 に対して強い増殖反応を示すことを報告した。この反応に対して MEK/ERK および PI3K/Akt のシグナル経路を遮断したところ、増殖が大幅に抑制されることが示された⁽²²⁾。これより、NP 細胞に対する PDGF、bFGF、IGF-1 の刺激は MEK/ERK および PI3K/Akt のシグナル経路を介して DNA 合成を促進することが考えられる。NP 細胞において増殖が促進されている状態は脱分化状態であると言えるため、PRP 中の PDGF、bFGF、IGF-1 は NP 細胞の脱分化を引き起こす因子であると考えられる。Fig.4-5 に PDGF、bFGF、IGF-1 による脱分化のメカニズムを示す。

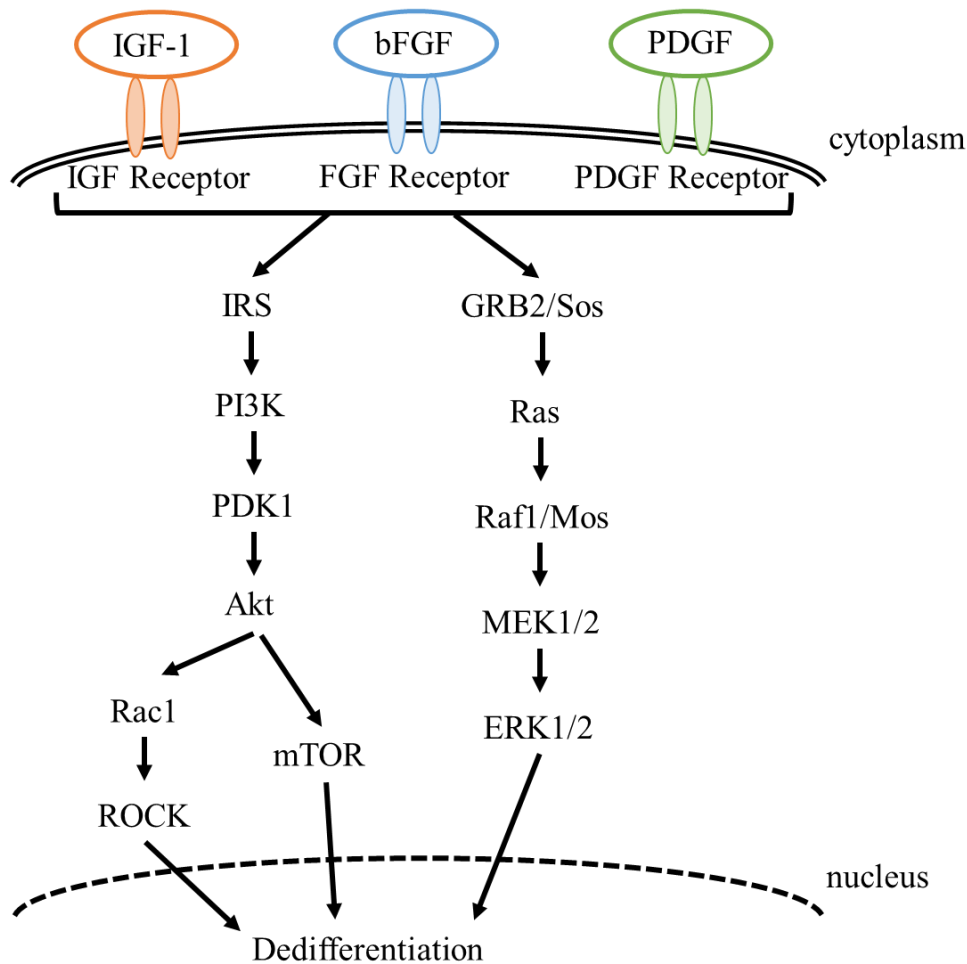


Fig.4-5 PDGF、bFGF、IGF-1 による脱分化のメカニズム

以上の考察より PRP には複数の成長因子が含まれることで NP 細胞に脱分化と分化の両方の効果をもたらすと言える。

ここまでは培養 5 日目における PRP に対する NP 細胞の応答について考察してきた。一方、培養 2 週間では異なる結果が得られた。培養 2 週間での NP 細胞の遺伝子発現変化は脱分化マーカーである CD90 が大幅に発現上昇し、分化マーカーである CollagenII、Sox9 の発現抑制が見られた。また、細胞増殖速度測定においても培養 2 週間目では通常培養と比較して PRP 添加群で増殖が促進されていた。よって、培養 2 週間では脱分化が大きく進行していることが分かった。Chen. WH らの報告では、PRP 刺激によるヒト NP 細胞の増殖は培養 3 日目で誘導が開始され、9 日目でピークに達した⁽²⁰⁾。そこで、本研究においても同様に培養初期以降は脱分化作用の効果の方が強くなり、脱分化が進行したと考える。よって、NP 組織再生を行う上では PRP による長期間の培養は有効ではないことが考えられる。

4-3 NP モデルについて

4-3-1 NP モデルと NP 組織の比較評価

本研究では 2-6-2 で作製した GS-CMG ゲルビーズを NP モデルとした。NP モデルはゲルビーズの隙間で NP 細胞を培養することで、本来の生体内環境を模倣し、NP 組織再生を促すことを目的としている。そのためにはゲルビーズの粒径を調整し、ゲルビーズ同士が適度な間隔を保った状態で分散している必要がある。

そこで、NP モデルを作製するにあたり、実際の NP 組織の構造を観察することによって NP モデルに必要な要素を特定した。Fig.3-2 の HE 染色の結果より、NP 組織内で NP 細胞は一様に分散して存在するのではなく、局在化していることが分かった。また膠原繊維も局在化しており、膠原繊維と同様の位置に細胞核が分布していた。

まずは、この染色結果をもとにして NP 組織の細胞密度を算出した。組織の重さと染色写真の細胞核の数から細胞密度は $(70.3 \pm 21.1) \times 10^4$ cells/ml であると推定した。そこで、NP モデル内で NP 細胞を培養する際はこの細胞密度を参考にし、モデルへの細胞播種を行った。

次に NP 細胞の分布について着目した。本研究の NP 組織染色で用いた切片は凍結切片であり、組織の脱水過程が存在しないため、組織の収縮などは見られないと考える。よって、今回撮影された染色写真での膠原線維、細胞核の分布は本来の NP 組織内の分布を正確に再現していると考えられる。染色結果では膠原線維、細胞核は共に局在化しており、膠原線維が分布する位置に大半の細胞核も分布していた。また、染色が見られなかった部分も多く存在していた。そこで、染色写真内の細胞の分布面積を膠原線維の分布面積と同様であるとして算出し、写真全体の面積における割合を求めた。これを細胞分布割合とする。その結果、NP 組織内の NP 細胞の細胞分布割合は $27.7 \pm 4.67\%$ であった。

一方、NP モデルにおいてはゲルビーズの隙間が細胞の分布できるスペースである。Fig.3-14 の結果より、ゲルビーズの粒径は 40~100 μm のものが全体の 87.7% を占め、平均粒径は 60.16 μm であった。そこで、ゲルビーズが規則正しく立体的に配置された状態を面心立方格子のモデルとして表し、ゲルビーズの細胞分布割合を算出した。Fig.4-6 にゲルビーズの面心立方格子モデルを示す。

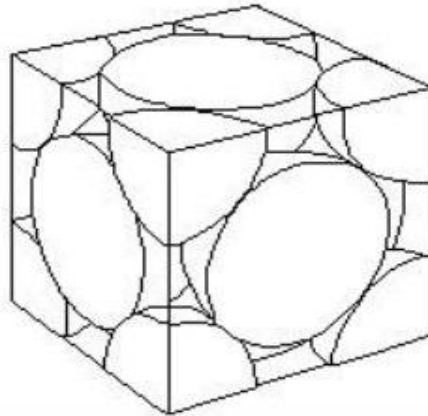


Fig.4-6 ゲルビーズの面心立方格子モデル

まず格子の体積を求める。ここではゲルビーズの直径を平均粒径の $60\mu\text{m}$ とする。
格子の各辺の長さは $60\sqrt{2}$ となるため、

$$\text{格子の体積} = (60\sqrt{2})^3 = 6.11 \times 10^5 \mu\text{m}^3 = 6.11 \times 10^{-4} \text{mm}^3$$

$$\text{ゲルビーズの体積} = \frac{4}{3} \pi \times 30^3 \times 4 = 4.52 \times 10^5 \mu\text{m}^3 = 4.52 \times 10^{-4} \text{mm}^3$$

ここで、隙間の体積 = (格子の体積) - (ビーズの体積) であるため、

$$\text{隙間の体積} = 6.11 \times 10^{-4} - 4.52 \times 10^{-4} = 1.59 \times 10^{-4} \text{mm}^3$$

次に格子の体積当たりの隙間の体積の割合を算出する。これをゲルビーズにおける細胞分布割合とする。

$$\text{細胞分布割合} = \frac{\text{隙間の体積}}{\text{格子の体積}} \times 100 = \frac{1.59 \times 10^{-4}}{6.11 \times 10^{-4}} \times 100 = 26.02\%$$

よって、ゲルビーズの面心立方格子モデルにおける細胞分布割合は 26.02% であり、NP 組織内における細胞分布割合の $27.7 \pm 4.67\%$ と近い値となった。

以上より、本研究で作製した NP モデルは本来の NP 組織の細胞密度、細胞空間を正確に模倣していると考えられる。

4-3-2 ゲルビーズの PRP 徐放

本研究では NP モデルの機能としてゲルビーズからの薬物徐放を行った。薬物徐放はゲルビーズの膨潤、収縮機能を利用して内部に薬物をトラップし、徐放させる方法を用いた。ゲルビーズの膨潤、収縮はゲルビーズ内と外液との浸透圧の差を利用して行った。

まず、薬物を含んだ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薬物と共にゲルビーズの網目を通して内部へ流れ込む。しかし、この状態ではゲルビーズは膨潤し、網目が開いたままの状態であるため容易に薬物が流れ出てしまう。

そこで次は薬物を含んだ培地にゲルビーズを浸すことによって収縮させた。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炭酸ナトリウム、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ゲルビーズの網目が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内に薬物をトラップすることができたと考えられる。そのイメージ図を Fig.4-7 に示す。

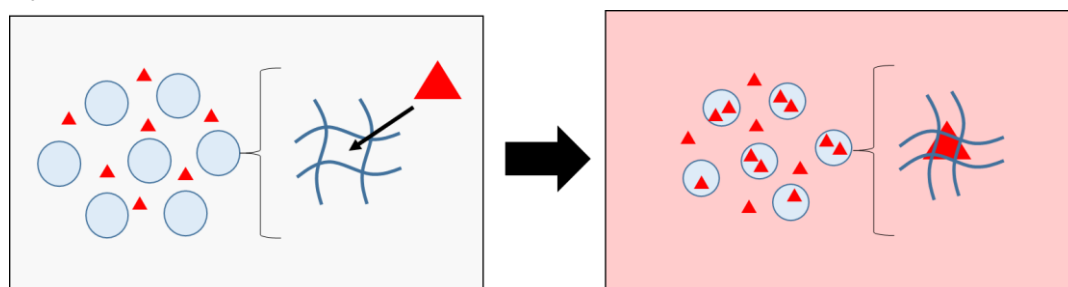


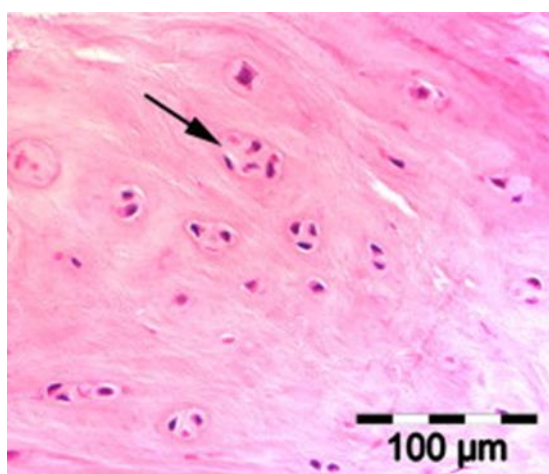
Fig.4-7 ゲルビーズの薬物トラップ

本研究では徐放させる薬物として PRP を用いた。Fig.3-18 の結果より、GS-CMG ゲルビーズからの PRP の徐放は初期で大半が徐放され、12 日目では測定できなくなった。よって、PRP の徐放は長期間継続することが難しいことが分かった。しかし、Fig.3-9 でも示されたように NP 細胞への長期間の PRP の曝露は脱分化を促進する可能性があると考えられる。そこで NP モデルにおいては、PRP の徐放は人工椎間板移植の初期に NP 細胞の基質産生を促す役割で用いることが望ましいと考える。一方、AF モデルでは PRP の長期曝露による NP 細胞の脱分化は AF 基質の産生につながるため、長期間の徐放の継続は有効であると言える。今後は各モデルで異なる基質産生誘導を行うために、NP モデルと AF モデル間での徐放挙動の制御が必要であると考えられる。

4-3-3 NP 細胞のゲルビーズ内培養

PRP の徐放機能を持った GS-CMG ゲルビーズ内で NP 細胞の培養を行った結果について考察する。Fig.3-19 の遺伝子発現変化より、PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ内で培養した NP 細胞は通常培養と比較して、CollagenI、CollagenII、Sox9 の発現が上昇し、CD90 の発現が減少した。また、PRP 添加培養と比較すると、発現が上昇していた脱分化マーカーの CollagenI、CD90 は有意に減少し、分化マーカーの CollagenII、Sox9 は更なる増加傾向が見られた。以上の結果をまとめると、PRP の影響によって脱分化マーカー、分化マーカーともに発現が上昇している状態からゲルビーズ内で培養を行うことによって、脱分化マーカーの抑制と分化マーカーの発現上昇が確認された。この結果より、ゲルビーズ内での三次元培養は NP 細胞の再分化誘導により適していることが考えられる。

ゲルビーズ内培養による NP 細胞の再分化誘導についてはゲルビーズが NP 細胞のマトリックスの代わりとして物理的効果をもたらした影響が考えられる。NP のような軟骨は本来、細胞成分に乏しい組織であり、細胞外マトリックスが 9 割を占めている。その中で NP 細胞は少数単位でクラスターを形成し、機能している⁽²³⁾ (Fig.4-8)。これは NP 細胞が細胞外マトリックスに依存していると言える。しかし、*in vitro* で NP 細胞を培養すると生体内の環境とは全く異なり、細胞を取り囲むものが存在しないため形態変化を起こし脱分化すると考えられる。そこでゲルビーズの隙間で NP 細胞を培養する本研究の培養形式は NP 組織内の細胞クラスターを再現することによって再分化に影響を与えたと考える。



F-g.4-8 組織内の NP 細胞

そこでNP細胞のクラスター形成がどのように再分化誘導に影響を与えているかについて考察する。NP組織内のNP細胞のクラスター形成は細胞-細胞間接着によって保たれている。N-CadherinはNP細胞の細胞間接着を担う細胞膜上の糖タンパクである。Priscillaらの報告では、このN-CadherinがNP細胞のマトリックス産生、細胞表現型の維持に寄与していること示した⁽²⁴⁾。NP細胞のクラスター形成を妨げるためのN-Cadherin阻害実験ではNP細胞の表現型の損失が見られている⁽²⁴⁾。これらの結果にはN-Cadherinを媒介した β -cateninのシグナル経路が関連していると考ええる。N-Cadherinは細胞間接着によって活性化されることで裏打ちタンパクの β -cateninが外れ、APC、Axinと複合体を形成することで核内へと移行し、軟骨関連遺伝子を発現させる。しかし、通常は β -cateninはGSK-3 β というキナーゼのリン酸化によって分解されるため、核内まで移行することができない。ゲルビーズ内培養によるクラスター形成はこのN-Cadherin結合の増加をもたらすことによって、 β -cateninの発現量を増加させ、GSK-3 β によって分解される前に核内への移行が進むことで軟骨関連遺伝子の発現上昇をもたらし、再分化誘導を引き起こしたと考える。そのメカニズムをFig.4-9に示す。

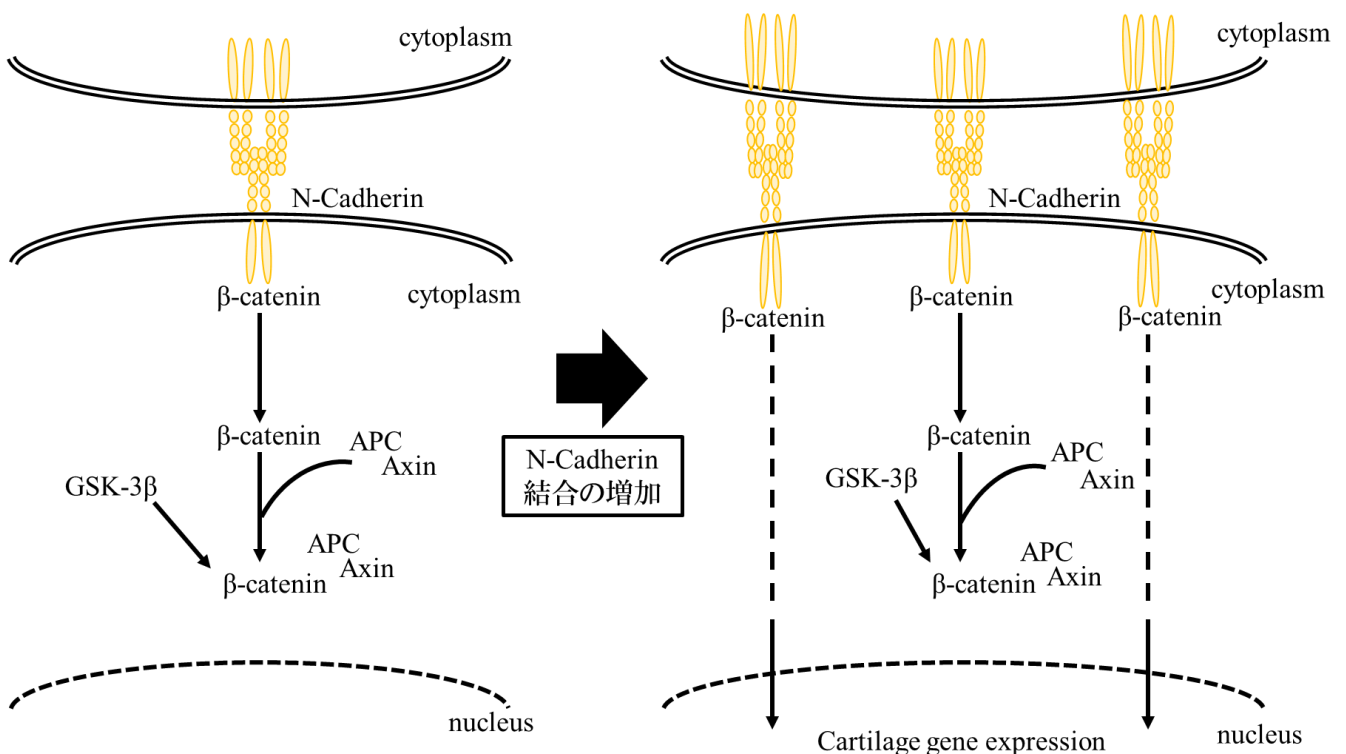


Fig.4-9 N-Cadherin 媒介性 β -カテニン経路の活性化

4-4 AF モデルについて

4-4-1 AF モデルと AF 組織の比較評価

AF 組織は椎間板の力学支持を担う組織であるため、本研究では AF 組織の力学特性に重要な基質に着目した。コラーゲンは AF 組織の乾燥重量の 50~60% を占める主要基質である。コラーゲン線維が束をなして層状に配置されることによって、AF 組織構造を形作っている。エラスチンはコラーゲン線維を支える役割を持ち、AF 組織に弾性や伸縮性を与えることによって、椎間板の柔軟な動きを可能にしている。

そこで、本研究ではコラーゲン、エラスチンを材料として用い、AF モデルの作製を試みた。作製したモデルは臨床で用いる前段階として、ウサギへの移植実験を想定しているため、サイズはウサギの AF の大きさを参考とした。

まず、AF モデルを作製するにあたり、AF 組織構造の観察のために EVG 染色を行った。Fig.3-4 の染色結果より、AF 組織ではコラーゲン線維、エラスチン線維の層構造が確認された。そこで、コラーゲン線維、エラスチン線維、コラーゲン線維の並びを 1 層として層の厚さを測定したところ、1 層あたり $4.54\mu\text{m}$ であった。

これをもとに作製した AF モデルを同様に EVG 染色し、モデル構造の観察を行った。Fig.3-21 の染色結果より、コラーゲンファイバーとエラスチンファイバーの層構造が確認できた。また、AF 組織と同様に層の厚みを測定したところ、1 層あたり $5\mu\text{m}$ であった。よって、本研究で作製した AF モデルは本来の AF 組織の層構造を模倣していることが示唆された。

本研究では垂直方向の力学強度を担保するためにファイバーの配向方向が円周方向となるように AF モデルを作製した。AF 組織の構造の特徴として、コラーゲン線維は椎間板の横断面に対して 30° の角度で配向しており、連続する層では配向方向が交互になるように重なっている(Fig.4-10)。これは椎間板にかかる負荷が垂直方向だけでなく、姿勢や動きに応じてあらゆる方向からかかり、その負荷に抵抗するためであると考えられる。よって今後、動物への移植を考えた場合、ファイバーの配向性を考慮したモデル作製を行う必要があると考える。

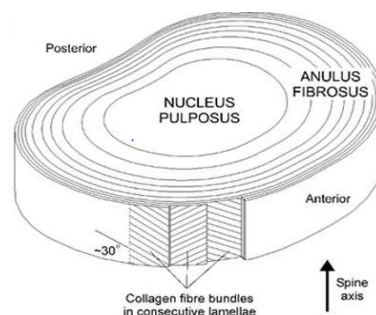


Fig.4-10 AF 組織の配向性⁽²⁵⁾

4-4-2 AF モデルの力学特性について

作製した AF モデルを動物移植、行く末は臨床で使用するためには力学特性が重要な項目となる。そこで本研究では AF モデルの力学特性を決定するために一軸方向の圧縮試験を行った。

まず、モデル作製の条件として 3 つの条件を設定した。条件①はファイバーの長さを縦 2.5cm×横 0.6cm として 15unit 巻きつけたもの、条件②は条件①の unit 数を 2 倍の 30unit としたもの、条件③は unit 数を減らし、ファイバーの縦の長さを 10cm としたものである。Fig.3-19 の弾性率の結果より、条件①と条件②の unit 数の違いによる弾性率は見られず、条件③のファイバーを長くして連続的に巻きつけることで若干の増加が見られた。また、Fig.3-20 の結果より、モデルが耐えることができる応力は unit 数を増やすことで増加し、ファイバーを長くし、連続的に巻き付けることで最も高くなった。

よって、今回設定した条件の中で最もモデル作製に適しているのは条件③であると言える。ファイバーを連続的に巻き取ることで力学特性が向上した理由としてはモデルを作製する際に各 unit 間にはファイバーの途切れ目が存在しており、そこでムラが生じている可能性が考えられる。そこで unit 数が多いとその分だけムラの箇所も増え、モデルの力学特性に影響を与えたと考えられる。

モデルの力学強度を上昇させるための手段として、細胞による基質産生が有効であると考えられる。ファイバー上に細胞を播種した状態でモデルの作製を行い、モデル内で細胞を培養する。これによりモデル内で細胞によるリモデリングが行われ、力学強度の上昇につながると考えられる。また、AF 組織には細胞外基質としてプロテオグリカンが存在しており、組織内の恒常性の維持や細胞の表現型に影響を与えている。そこでプロテオグリカンの代替物として GS を用いることで細胞によるリモデリングを促進できるのではないかと考える。GS はファイバーとファイバーを接着させるエラスチンゲルと混合させることでモデル内に取り込むことができると考える。更にこれは AF 組織構造の再現にもつながり、AF モデルの強度面だけでなく構造面においても有効な手段であると考えられる。

本研究で作製した AF モデルと実際のウサギの AF 組織を比較すると、現段階では十分な力学特性が得られているとは言えない。しかし、ファイバーの unit 数やモデル作製時のファイバーの長さなど、少しの作製条件の変化で圧縮応力の値は目標のウサギ AF 組織の値に近づいた。そこで今後、より最適な条件の設定や細胞によるリモデリングによってウサギの AF 組織と同等の力学特性を得ることは十分可能であると考えられる。

4-4-3 NP 細胞のファイバー培養

コラーゲンファイバー上で NP 細胞を培養した結果について考察する。Fig.3-24 の遺伝子発現変化より、コラーゲンファイバー上で培養した NP 細胞は通常培養と比較して、軟骨基質マーカーの CollagenII、Sox9 の発現が有意に上昇した。よって、コラーゲンファイバー上で NP 細胞は軟骨分化誘導が促進されることが分かった。

コラーゲンファイバーと NP 細胞の応答性についてはインテグリンの影響を考える。インテグリンは細胞表面の原形質膜にあるタンパク質で、細胞と ECM の接着に関与している。細胞が ECM に結合するとインテグリンが活性化し、下流へとシグナル伝達が進むことで細胞接着や増殖、分化等に影響を与えていると知られている⁽²⁶⁾。

Qiaoqiao Wan らによると、軟骨細胞では基質としてのコラーゲンをインテグリンが認識すると、接着によるインテグリンの活性化が起こり、FAK(Focal Adhesion Kinase)によるシグナル伝達が進められると報告している⁽²⁷⁾。FAK はインテグリンに結合する膜タンパクであり、インテグリンにより活性化されると Sos、Ras、ERK のシグナルを経由して軟骨関連遺伝子を発現させる。よって、コラーゲンファイバー上での NP 細胞においても同様の作用が起こり、軟骨関連遺伝子の発現が見られたと考える(Fig.4-11)。

本研究では AF モデル作製時にファイバー上に NP 細胞を播種して作製することを想定して、ファイバーによる NP 細胞の AF 基質産生の誘導を目指した。ファイバーのみの培養では軟骨関連遺伝子のみ上昇が見られたが、ファイバー上で PRP を添加すると軟骨関連遺伝子の上昇と共に線維化マーカーの上昇傾向も見られた。これは軟骨基質と線維基質が共存している状態を作り出すため、線維軟骨である AF の組織再生に有効な手段であると考えられる。

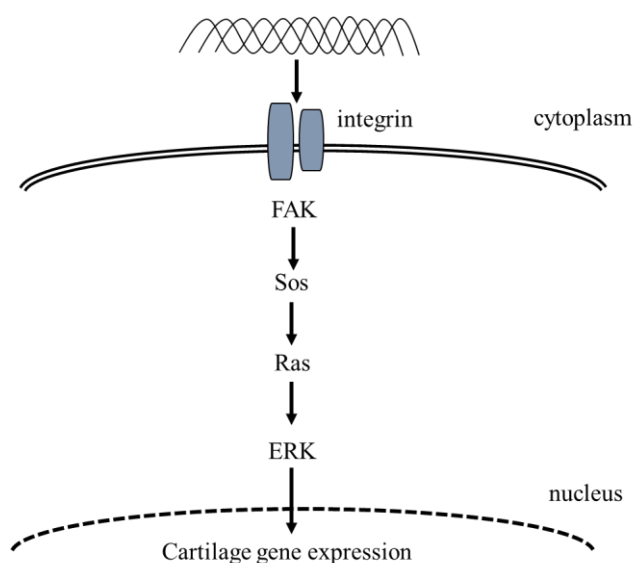


Fig.4-11 コラーゲンファイバーによる軟骨分化誘導のメカニズム

4-5 NP 細胞に対する加圧刺激の効果

本研究では生体内で NP 細胞が受ける加圧刺激を *in vitro* で与えることで NP 細胞がどのような応答を示すかを調査した。日常生活でヒトの椎間板が受ける圧力負荷は姿勢によって異なるが一般的に 0.03~0.5MPa、周期は~1Hz とされている。また、ブタ NP 細胞での最適な圧力条件を調査した報告によると、圧力:0.4 MPa、加圧時間は 4 時間が最適であるとされた⁽²⁸⁾。そこで本研究での加圧培養は圧力:0.4 MPa、周期:0.05 Hz、加圧時間:4 時間の条件で行った。

Fig.3-25 の遺伝子発現変化の結果では control の dish 無刺激の培養と dish 0.4 MPa の加圧培養とでは分化マーカー、脱分化マーカー共に大きな変化は見られなかった。一方、PRP 徐放型 GS-CMG ゲルビーズ内培養に加圧刺激を加えたものでは dish の無刺激と比較して CollagenI、CD90 が有意に減少し、CollagenII が 9.0 倍と有意に増加した。これらの結果より、三次元培養での加圧刺激が NP 細胞に対して最も有効であることが示唆された。

そこで、三次元培養と加圧刺激の関連性について考察する。4-3-3 でも述べたようにゲルビーズ内で NP 細胞を培養すると、細胞クラスター形成により N-Cadherin が発現し、細胞-細胞間接着がなされる。活性化された N-Cadherin は裏打ちタンパクの β -catenin の結合が外れ、核内へと移行することで軟骨遺伝子を発現させる。Li Pらの報告によると、N-Cadherin は圧力刺激を受け取ることで、 β -catenin が PI-3K と結合し、Akt の経路を活性化する⁽²⁹⁾。活性化された Akt は β -catenin の分解を行う GSK-3 β をリン酸化することによってその働きを阻害する⁽³⁰⁾。よって、 β -catenin が GSK-3 β による分解を受けずに安定化した状態で核内へと移行することができ、軟骨関連遺伝子を発現させる。そのメカニズムを Fig.4-11 に示す。

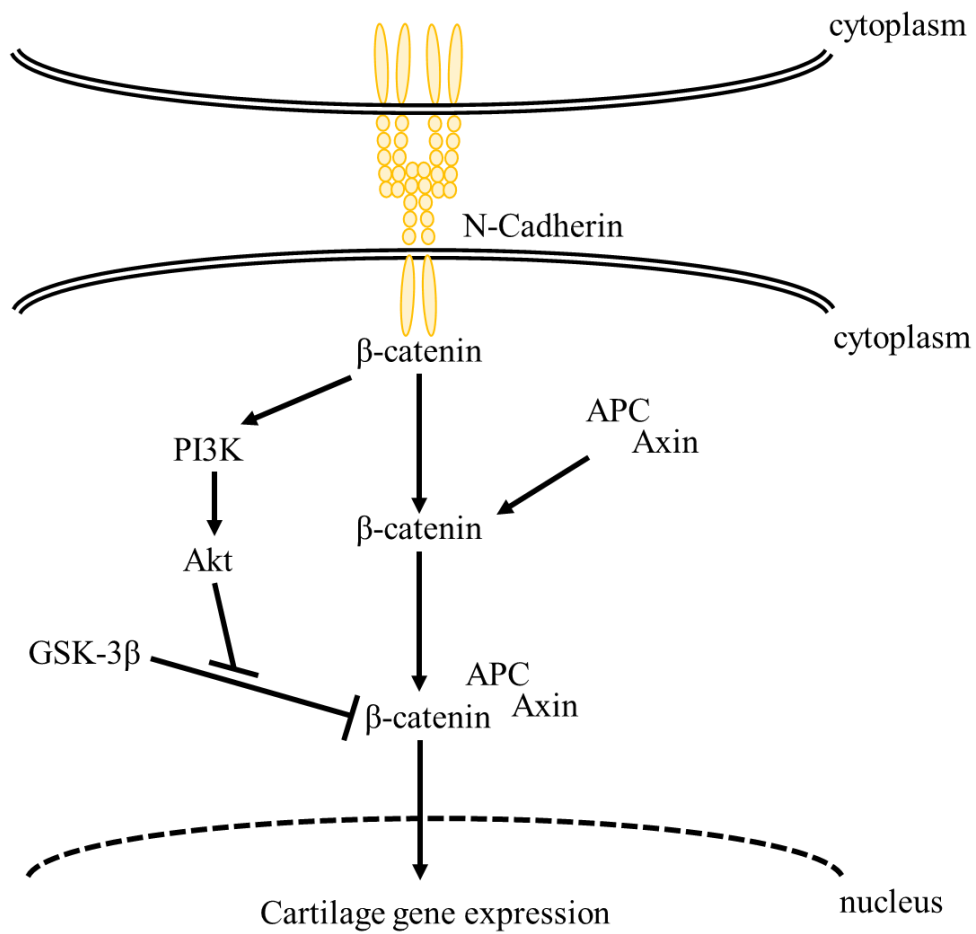


Fig.4-11 N-Cadherin 媒介性 β -カテニン経路の活性化

以上の考察より、加圧刺激に応答する N-Cadherin 媒介のシグナル伝達が NP 細胞の分化誘導に影響を与えていると考えられる。

4-6 組織再生型人工椎間板について

本研究では作製した NP モデルと AF モデルを組み合わせて人工椎間板とし、加圧培養を行うことで組織再生を目指した。培養後の人工椎間板を組織染色した Fig.3-29 の結果では培養 0 日目と培養 7 日目で硫酸化多糖の染色の増強が見られた。作製した NP モデルの GS-CMG ゲルビーズは GS が硫酸化多糖として含まれているため、培養 0 日でも染色が確認されるものと考えられる。そこで、培養 0 日から 7 日にかけて増強された硫酸化多糖が NP 細胞によって産生された GAG であると考えられる。このことから、人工椎間板を加圧培養することによって組織再生が促されることが示された。

Fig.3-2,3 で示した本来の組織と比較して観察してみても、HE 染色ではゲルビーズ、NP 細胞の点在化が確認され、これは NP 組織のコラーゲン線維と NP 細胞の点在化を模倣していると言える(Fig.4-12)。また、アルシアンブルー染色では加圧培養により産生された GAG によって NP モデル全体に染色が見られ、NP 組織の GAG 染色と同じように観察されたことから(Fig.4-13)、より本来の組織環境に近いモデルであることが示された。

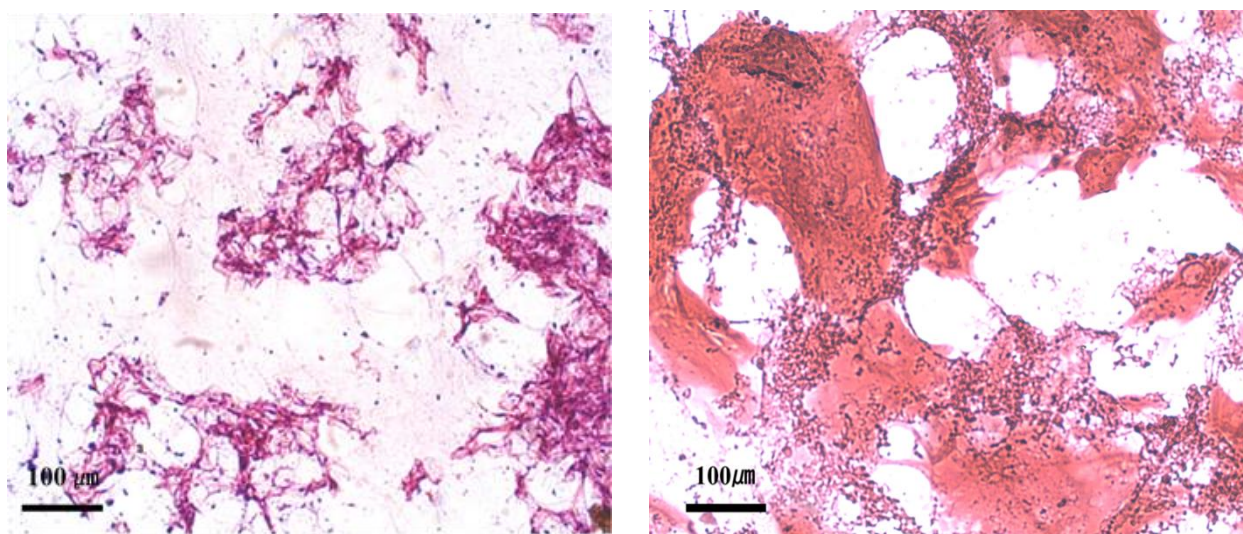


Fig.4-12 NP 組織、モデルの HE 染色 (左:NP 組織、右:NP モデル)

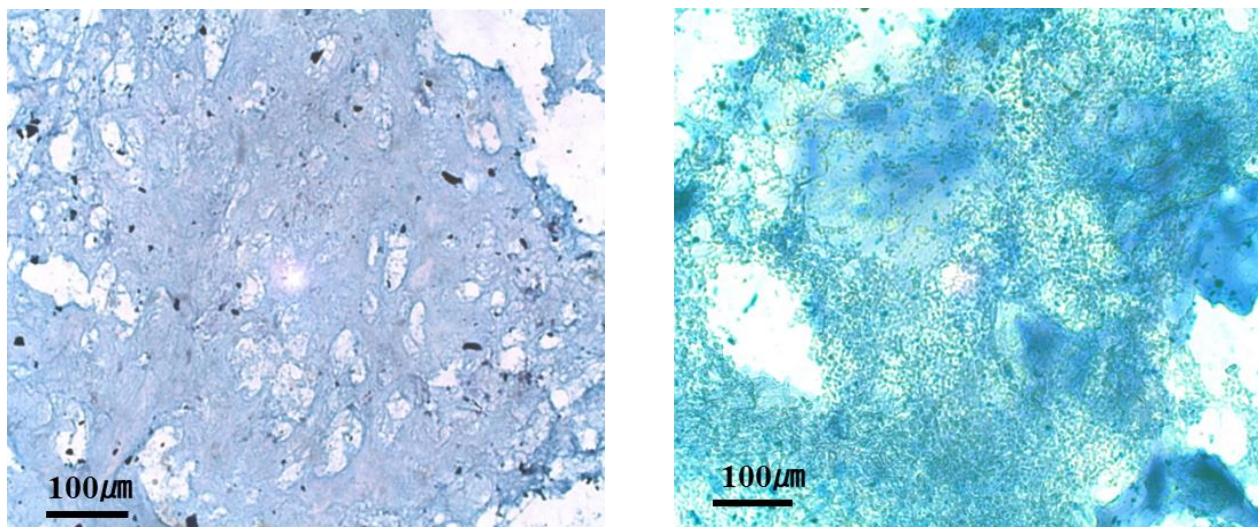


Fig.4-12 NP 組織、モデルのアルシアンブルー染色(左:NP 組織、右:NP モデル)

本研究では組織再生を促す人工椎間板の開発に成功した。そこで、この人工椎間板を臨床で適用した際の組織再生治療の流れを Fig.4-13 に示す。

損傷し、修復が困難となった椎間板を切除し、人工椎間板の移植を行う。移植した初期の段階では人工椎間板の内部で PRP の徐放が行われる。本研究の徐放実験より、体液にさらされた NP モデルからの徐放は数日間しか続かないと考えられる。徐放された PRP は移植後、数日間で NP 細胞の基質産生を誘導し、脱分化の影響をもたらす前に NP と椎骨の間に存在する軟骨終板を介した組織液交換によって組織外部へと拡散されることが考えられる。

薬物徐放が終了すると、その後は加圧刺激によって基質産生を誘導する。本研究では 1 日 4 時間の加圧刺激を 7 日間行い、モデル内での GAG 基質産生が見られた。人工椎間板を移植した患者においては術後のリハビリテーションなどで人工椎間板に適度な加圧刺激を加えることで、本研究と同様に基質産生が促されると考える。

移植後、このように基質産生が誘導された後はモデルが産生された基質によって置き換えられる必要がある。そのためにはモデルの分解が重要となる。内部の NP モデルはジェランゲルであるため、現在特定の酵素によって分解されるという報告はないが、架橋剤である Lys と CMG、GS の架橋点にペプチダーゼが働くことや、Lys のエステル部位、EDC で脱水縮合を行った部位で加水分解が生じる可能性がある。また、加圧による劣化などでも分解が進むと考えられる。一方、AF モデルは力学支持の役割を担うため、十分な基質産生が行われた後に分解される必要があ

る。AF モデルを構成するコラーゲンやエラスチンはコラゲナーゼやエラスターゼとして同定されている酵素によって分解されることが知られているため、今後これらの酵素を用いた分解挙動の制御が必要となるだろう。このような点を踏まえて分解挙動を制御できると人工椎間板を完全に本来の組織へと置き換えることが可能であると予測される。

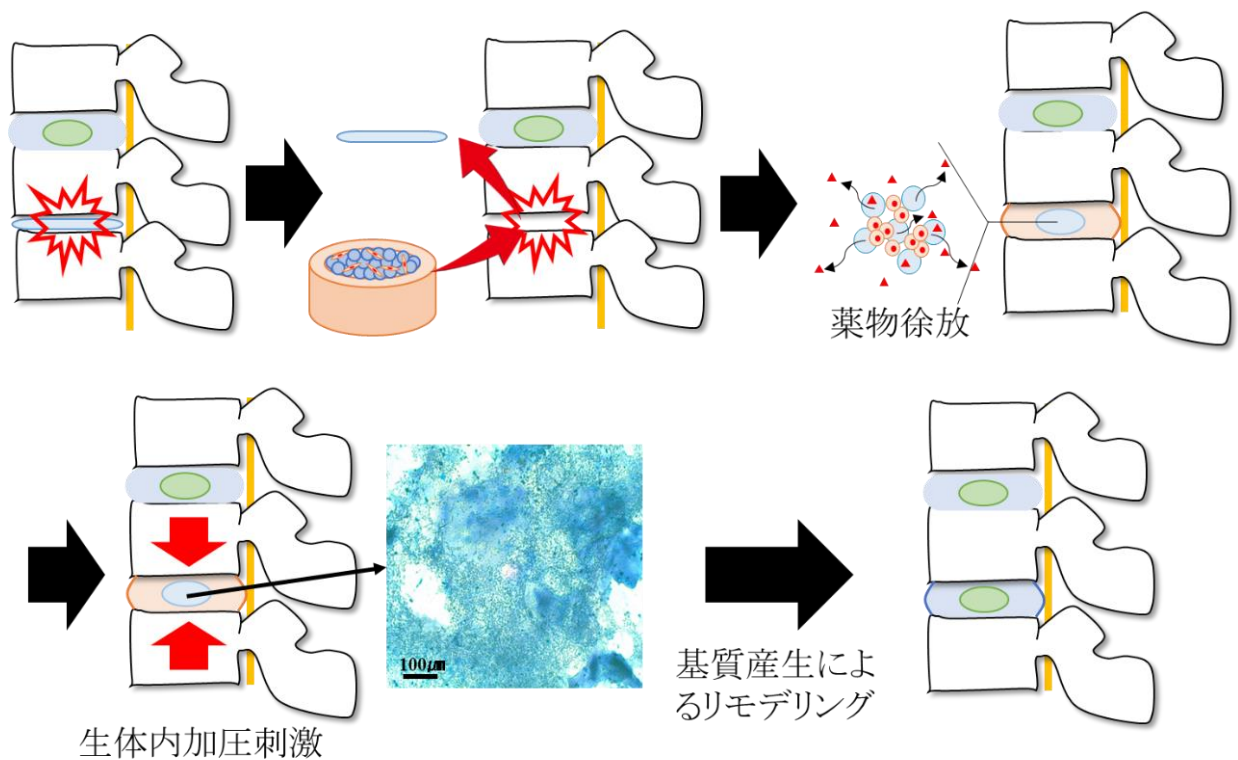


Fig.4-13 人工椎間板の臨床応用

5. 結論

- 椎間板組織構造を模倣した NP モデル、AF モデルの作製に成功した。
- 椎間板モデル内培養で、NP 細胞はモデル機能、加圧刺激により軟骨分化誘導を示した。

以上より、組織再生型人工椎間板の開発に成功した。

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. Genglei Chu, *et al*: Strategies for Annulus Fibrosus Regeneration: From Biological Therapies to Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018 Jul 10
4. P. Prithvi Raj MD, *et al*: Intervertebral Disc: Anatomy-Physiology-Pathophysiology-Treatment. *PAIN Practice*. 18 January 2008
5. A Carl, *et al*: New developments in nucleus pulposus replacement technology. *The Spine Journal* 4, 2004 Nov-Dec;4(6 Suppl):325S-329S.
6. Pouria Samadi. *et al*: The Use of Platelet-Rich Plasma in Aesthetic and Regenerative Medicine: A Comprehensive Review. *Aesthetic Plastic Surgery*. 14 December 2018
7. 「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
8. 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
9. 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
10. 「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
11. Nakoshi Y, *et al*: Distribution and role of tenascin-C in human osteoarthritic cartilage. *Journal of Orthopaedic Science*. 2010 Sep;15(5):666-73.
12. Xu D *et al*. Demystifying heparan sulfate-protein interactions. *Annu Rev Biochem*. 2014;83:129-57.
13. 宮本愛子, 平成 29 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
14. 小山直紀, 平成 25 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, 軟骨組織再生のためのマイクロジェランビーズの開発
15. Haugsten EM, *et al*: Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Molecular Cancer Research*. 2010 Nov; 8(11): 1439-52.
16. Zhang J *et al*. TGF- β 1 suppresses CCL3/4 expression through the ERK signaling pathway and inhibits intervertebral disc degeneration and inflammation-related pain in a rat model. *Exp Mol Med*. 2017 Sep 22;49(9):e379

17. Deng ZH et al. Heterodimeric BMP-2/7 for Nucleus Pulposus Regeneration—In Vitro and Ex Vivo Studies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018 Sep;26(9):1153-1161.
18. Chris C. Rider et al. Heparin, Heparan Sulphate and the TGF- β Cytokine Superfamily. *Molecules*. 2017 May; 22(5): 713.
19. Ruppert R et al. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur. J. Biochem*. 1996;237:295–302.
20. Wei-Hong Chen et al. Tissue-engineered intervertebral disc and chondrogenesis using human nucleus pulposus regulated through TGF- β 1 in platelet-rich plasma. *Cellular Physiology*. September 2006 209 744-754
21. Quan Zhou et al. IGF-1 induces adipose derived mesenchymal cell chondrogenic differentiation in vitro and enhances chondrogenesis in vivo. *In vitro cell.dev.biol*. 2016 52:356-364
22. Harris Pratsinis et al. Organotypic Cultures of Intervertebral Disc Cells: Responses to Growth Factors and Signaling Pathways Involved. *BioMed Research International*. 2015 10 pages.
23. M.Endres. et al: Augmentation and repair tissue formation of the nucleus pulposus after partial nucleotomy in a rabbit model. *Tissue and Cell*. Volume 46, Issue 6, December 2014, Pages 505-513
24. Priscilla Y. Hwang et al. N-Cadherin-Mediated Signaling Regulates Cell Phenotype for Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc. *Cell Mol Bioeng*. 2015 Mar 1; 8(1): 51–62.
25. Genglei Chu. et al Strategies for Annulus Fibrosus Regeneration: From Biological Therapies to Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018; 6: 90.
26. 宮坂昌之. Adhesion Molecule 接着分子. メカジカルビュー社, 1991
27. Qiaoqiao Wan et al. Subcellular domain-dependent molecular hierarchy of SFK and FAK in mechanotransduction and cytokine signaling. *Sci Rep*. 2017; 7: 9033.
28. Li P, et al. Dynamic Compression Effects on Immature Nucleus Pulposus: a Study Using a Novel Intelligent and Mechanically Active Bioreactor. *International journal of medical sciences*. 2016; 13(3): 225-234.
29. Li P, et al. N-Cadherin-Mediated Activation of PI3K/Akt-GSK-3 β Signaling Attenuates Nucleus Pulposus Cell Apoptosis Under High-Magnitude Compression. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44:229–239.
30. Kaytor MD et al. The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12: 275-278.

7. 謝辞

本研究及び、修士論文作成にあたり、ご指導、ご鞭撻のほどいただきました三重大学大学院工学研究科 宮本 啓一 教授、晝河 政希 助教授、堀内 孝 名誉教授に対し深く御礼申し上げます。

宮本啓一教授には本研究を進めるにあたり、多くのご指導、ご助言を頂き、感謝申し上げます。グループとして困難に直面することもありましたが、先生の手厚い支えによって無事研究を進めることができました。また、日々多忙の中で実験に使用する組織を手配して下さったこと、自作の実験装置を作製して頂いたこと、心より感謝しております。大学入学以前から希望していた生体材料化学研究室に配属でき、先生のもとで研究できたこの3年間はとても充実しておりました。あらためて感謝申し上げます。

晝河政希助教授には大学院1年次までは先輩として実験や実験室の使い方などのご指導や研究室生活全般でお世話になりました。本年度からは助教授として実験や修士論文発表資料の作成で的確なご助言を頂き、感謝申し上げます。

また、修士論文発表にあたり、副査を担当して頂きました分子生物工学研究室の湊元 幹太教授に深く感謝申し上げます。

事務員の村上節子さんには研究室生活の様々な場面でサポートして頂きました。おかげさまで快適な研究室生活を送ることができました。3年間有難うございました。

同じジェラングループの後輩である岸本悠哉君、今村優香さん、村尾栄治君には実験を進める中で多くのサポートをして頂きました。この修士論文を作成できたのも皆さんのご協力のおかげだと思っています。心より感謝申し上げます。

3年間、研究室生活を共にした同期の出口智恵さん、土井大和君、中村文哉君、丹羽紘介君、三田百恵さん、本当に有難うございました。皆さんと切磋琢磨し合った研究室生活は非常に充実した日々でした。これからは社会人として新たな環境での日々が始まりますが、研究室での思い出を忘れずに過ごしていこうと思います。また、M1、B4の皆さん、実験や日々の生活、その他様々な場面でサポートして頂きました。有難うございます。これからも研究に励み、楽しい研究室生活を送ってください。

最後に6年間、精神的、経済的に支えて頂いた両親に感謝の意を示し、私の謝辞とさせていただきます。

水上光太郎