

令和 3 年度 修士論文

編組構造を持つ組織工学的  
人工靱帯モデル軸の検討

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  
長瀬 周平

# 目次

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| 1 緒言 .....                           |  |
| 1-1 再生医療と組織工学                        |  |
| 1-2 靱帯(Ligament)                     |  |
| 1-2-1 靱帯の役割                          |  |
| 1-2-2 前十字靱帯                          |  |
| 1-2-3 靱帯再建方法と現状                      |  |
| 1-3 人工靱帯                             |  |
| 1-3-1 これまでの人工靱帯                      |  |
| 1-3-2 編組構造                           |  |
| 1-4 細胞外基質(ECM:Extra Cellular Matrix) |  |
| 1-4-1 コラーゲン                          |  |
| 1-5 本研究の目的                           |  |
| 2 方法 .....                           |  |
| 2-1 足場材料の作製                          |  |
| 2-1-1 水溶性コラーゲンの抽出                    |  |
| 2-1-2 コラーゲン単糸・束の作製                   |  |
| 2-1-3 編組コラーゲン軸の作製                    |  |
| 2-2 靱帯細胞の単離                          |  |
| 2-3 編組コラーゲン軸上での細胞培養                  |  |
| 2-4 力学試験                             |  |
| 2-4-1 コラーゲン糸の引張試験                    |  |
| 2-4-2 編組コラーゲン糸の繰り返し引張試験              |  |
| 2-4-3 組織工学的モデル軸の力学評価                 |  |
| 2-5 構造観察                             |  |
| 2-5-1 H&E 染色                         |  |
| 2-5-2 免疫蛍光染色                         |  |
| 2-5-3 走査型電子顕微鏡による構造評価                |  |
| 2-6 遺伝子発現調査                          |  |
| 2-7 統計分析                             |  |
| 3 結果 .....                           |  |
| 3-1 編組による力学特性の変化                     |  |

|            |                               |       |
|------------|-------------------------------|-------|
| 3-1-1      | コラーゲン単糸の力学特性                  |       |
| 3-1-2      | 3 本モデル軸における編組糸の力学特性           |       |
| 3-1-2      | ステッチによる力学特性への影響調査             |       |
| 3-1-3      | 編組コラーゲン糸の繰り返し引張試験             |       |
| <b>3-2</b> | <b>組織工学的的人工靱帯モデル軸の評価</b>      |       |
| 3-2-1      | 力学評価                          |       |
| 3-2-2      | 染色による構造観察および細胞接着確認            |       |
| 3-2-3      | 走査型電子顕微鏡による構造観察および細胞接着確認      |       |
| 3-2-3      | 遺伝子発現評価                       |       |
| <b>4</b>   | <b>考察</b>                     | ..... |
| <b>4-1</b> | <b>編組構造による力学特性の違いについて</b>     |       |
| 4-1-1      | 編組構造による弾性率への影響                |       |
| 4-1-2      | stitch の数の違いによる力学特性の変化について    |       |
| 4-1-3      | 編組糸に編組構造を持たせたことによる力学特性の変化について |       |
| 4-1-4      | 繰り返し引張負荷による力学特性の変化について        |       |
| 4-1-5      | コラーゲンモデル軸の力学特性について            |       |
| <b>4-2</b> | <b>コラーゲンモデル軸への細胞接着について</b>    |       |
| <b>4-3</b> | <b>編組による遺伝子発現変化について</b>       |       |
| <b>5</b>   | <b>結論</b>                     | ..... |
| <b>6</b>   | <b>参考文献</b>                   | ..... |
| <b>7</b>   | <b>謝辞</b>                     | ..... |

# 1 緒言

## 1-1 再生医療と組織工学

組織工学は、「組織機能の再生、維持、修復を目的とする生物学的代替品の開発に、工学と生物学を応用する学際的な研究分野」<sup>1)</sup>、また、「細胞とバイオマテリアルを組み合わせ、失われた組織の代替を目指す工学」<sup>2)</sup>と定義されている。

組織工学とは、組織の機能を再生するための「細胞」、その細胞を培養し組織を維持させるための「足場材料」、細胞の増殖・分化を制御する「サイトカイン」の 3 つの要素を組み合わせ、生体外で組織再生を行うための技術である(図 1-1)。

「細胞」は、細胞による再生能を引き出し移植した細胞そのものから臓器構築を促す。

「足場材料」は、組織再生をする空間を確保するとともに再生組織の形状を保ちながら損傷組織の再生を助ける働きがある。移植した細胞を欠損部位にとどまらせて望み通りの機能性組織の再生を誘導するために細胞の接着、増殖、細胞外基質産生を促進して細胞の分化の制御、生体適合性などいくつかの性質が必要である。

「サイトカイン」は、細胞から分泌されるタンパク質であり、細胞間相互作用に関与する生理活性物質の総称で標的細胞にシグナルを伝達し細胞の増殖、細胞死、機能発現など多様な細胞応答を引き起こすとされている。

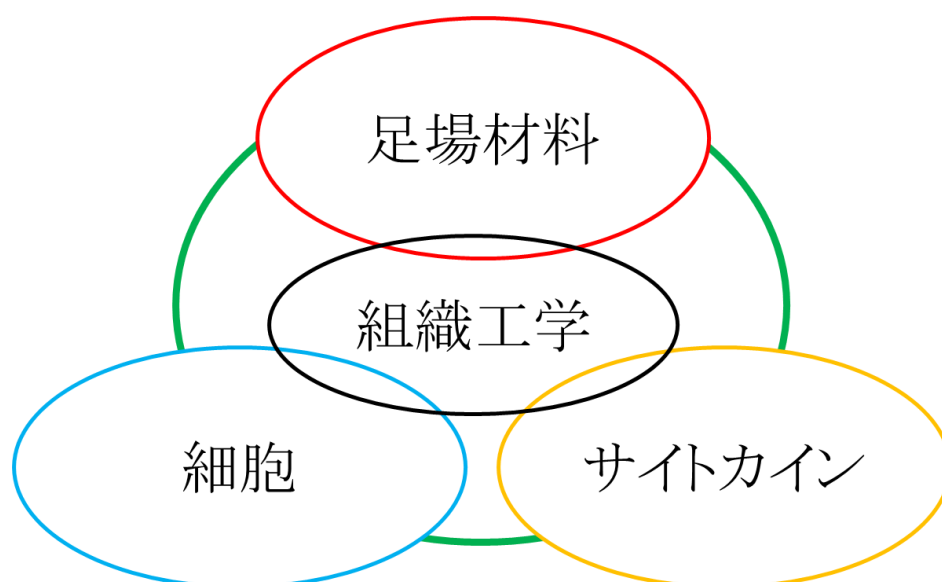


図 1-1 組織工学の 3 つの要素

## 1-2 靱帯(Ligament)

### 1-2-1 靱帯の役割

靱帯は、骨と骨をつないで離れないように関節を形成している、強靱な短い線維性の結合組織であり、関節の安定性を保つ働きだけではなく、必要な動作を制御する役割も持つ。また、靱帯は身体の至るところに存在している。

その中でも膝関節靱帯には、4 つの靱帯が存在する。関節外には内反方向に膝の左右のずれを防ぐ内側側副靱帯 (medial collateral ligament: MCL)、また、外反方向のずれを防ぐ外側側副靱帯 (lateral collateral ligament: LCL) が存在する。さらに、関節内には前十字靱帯 (anterior cruciate ligament: ACL) と後十字靱帯 (posterior cruciate ligament: PCL) があり、下腿と大腿骨の前後のずれを防ぎ膝の安定性を保っている(図 1-2)。

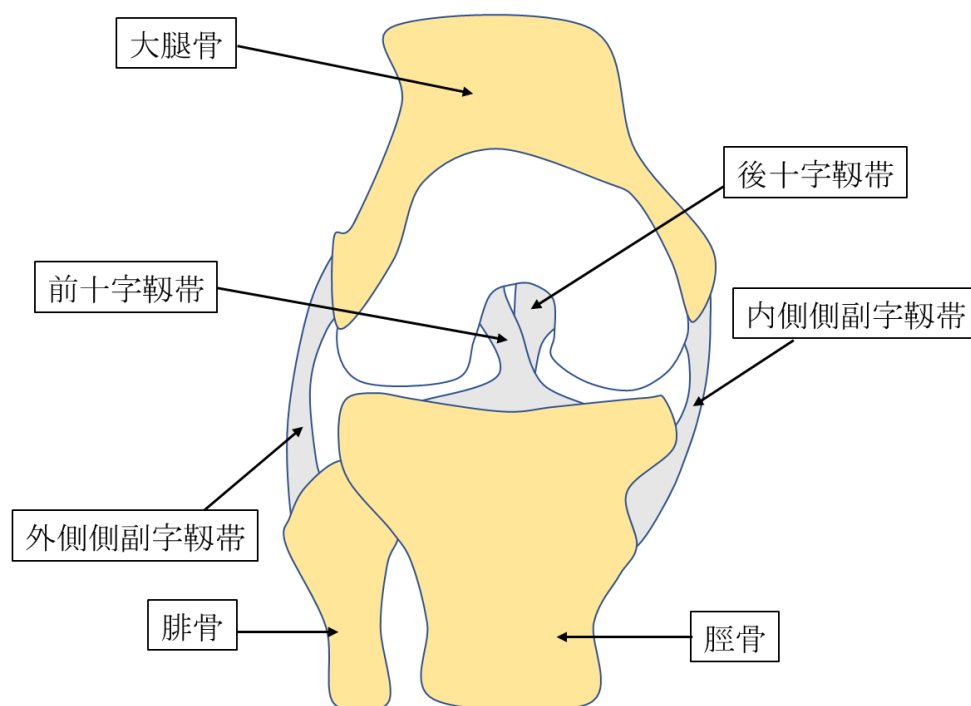


図 1-2 膝関節概略図

### 1-2-2 前十字靱帯 (ACL : anterior cruciate ligament)

膝関節の内側にあり、大腿骨と脛骨を結び、前外側線維束 (AM 束) と、後内側線維束 (PL 束) の 2 つに分けられ、脛骨のねじれを防いで、膝の安定性に重要な役割を果たしている<sup>3,4)</sup>。また、膝靱帯の中で最も弾性を有する組織である。

ACL は主にコラーゲン(I、III、V 型)やエラスチンなどの細胞外マトリックス(ECM)と、靱帯線維と平行に配向した紡錘型の線維芽様の靱帯細胞(靱帯細胞)から構成されている<sup>5)</sup>。その長さは約 30～40 mm、中央部の幅は 10 mm であり、靱帯の長軸方向に走行するコラーゲン線維の集合体である(図 1-3)。

ACL はそれ特有のクリンプ構造と呼ばれる波状構造を持ち、組織への局所的な負荷を緩和し、変形を容易にする働きを持つことが知られている。

また、ヒト ACL においては、長径約 30 mm のうち、約 6 %の伸張(2 mm 程度)により損傷を受け<sup>6)</sup>、730～1730N の荷重負荷がかかると破断し、その破断弾性率は 65～111 MPa であると報告されている<sup>7)</sup>。

前十字靱帯は、膝関節の内側にあるので血管が乏しく、自然治癒能力が低い。このことより、一度断裂してしまうと再生はほとんど見込めない。そのため、代替物を用いた研究が盛んに行われている。

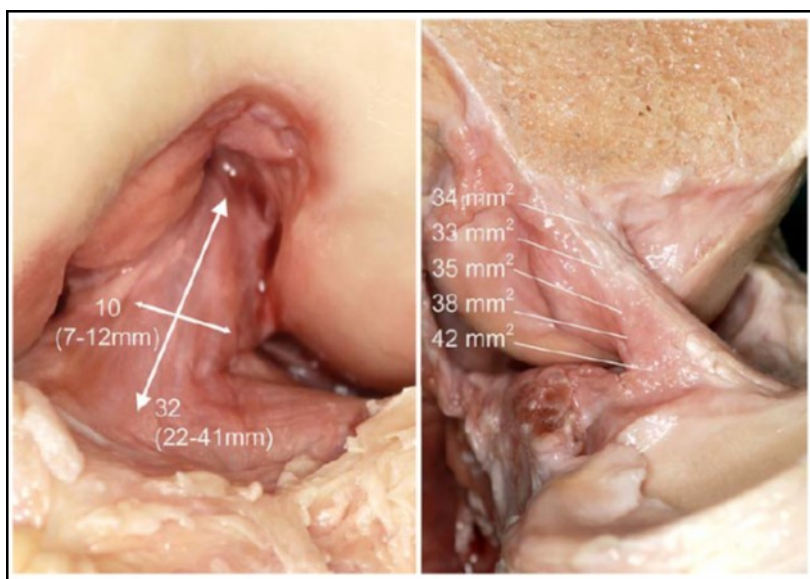


図 1-3 ヒト膝関節内 ACL<sup>8)</sup>

左図:膝関節正面図、右図:関節断面図

### 1-2-3 靱帯再建方法と現状

米国だけでも毎年約 30 万件以上の靱帯再建手術が行われており、靱帯再建は自家移植が主な方法となっている<sup>9)</sup>。しかしながら、自家移植にはドナー部位の罹患率の上昇や強度の低下が起こってしまう<sup>10)</sup>。

現在、最も一般的な治療方法として、骨付き膝蓋腱 (bone-patellar tendon-bone : 以下 BTB)、半腱様筋 (semitendinosus : 以下 ST)、薄筋 (gracilis : 以下 G) といった患者自身の組織を移植する自家移植が主流である。再建方法として BTB を使用した BTB 法と、ST および G を使用した ST/G 法がある。BTB 法は骨性部分を持っているため、骨孔内での治癒が早く、また骨-靱帯結合部を持っているので再建靱帯にかかる力が局所に集中することを避けることができる。ST/G 法は BTB 法と比較して脛骨の前方移動量や膝関節伸展筋力の手術成績は比較的良好であるという報告がある<sup>5-7)</sup>。

## 1-3 人工靱帯

### 1-3-1 これまでの人工靱帯

当初、非分解性の高分子ポリマーからなる人工靱帯が作られてきた。具体的には、ポリエステルの線維をメッシュ状にした Leeds-keio モデル<sup>11)</sup>やポリエチレンテレフタレート (PET) の線維を筒状にした LARS デバイス<sup>12)</sup>といったものがある。初期強度は十分に高かったものの、異物反応、慢性的滑膜炎や摩耗くずの発生などの欠点があった。それらを解決するために材料の改良やコーティング技術を組み合わせたり、組織工学を取り入れている<sup>13)</sup>。組織工学的人工靱帯において、細胞を効率よく働かせるために足場の形状は重要である。靱帯構造を模倣したモデル、多孔性を持たせることで細胞が接着、輸送がしやすくさせるモデル等の様々な形状のモデルが作られてきた。本研究室では、靱帯細胞を配向したコラーゲン、エラスチンファイバーに播種し、強度を担う生分解性ポリマーのポリジオキサノンの糸に巻き付けるというモデル (図 1-4) を開発している<sup>14)</sup>。

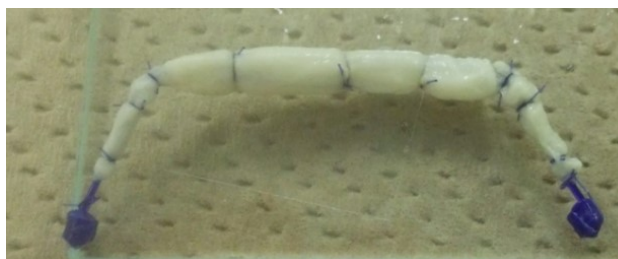


図 1-4 先行研究の人工靱帯モデル<sup>14)</sup>



### 1-2-5 編組構造

編組とは編むことでおもにワイヤーや銅線に使われ力学特性を向上することができる。繊維を編むということは服、電線、建築物、航空機などにさえ使われている。典型的な繊維は軸方向にそって共有結合で原子が並び、垂直方向には分子間力でつながっている。そのため軸方向への引張はとても強く、垂直方向への力に対しては変形しやすいという性質がある。その性質を制御するために編組構造は用いられ様々な分野で応用されてきた。ACL においてもそうで、編組構造を用いることで靱帯特有の応力-ひずみ曲線 J カーブを描くとされている<sup>15-18</sup>。生分解性の高分子ポリマーを用いた編組構造を持つ組織工学的な人工靱帯の開発例もある(図 1-5)。



図 1-5 高分子ポリマーに編組構造を持たせた足場<sup>19)</sup>

### 1-3 細胞外基質(ECM:Extra Cellular Matrix)

多細胞生物において細胞と細胞の間、または細胞集団の隙間を埋め、細胞同士の接着や外圧に対するための強度をもった物質の総称である。ECM は主に線維状タンパク質とプロテオグリカンで構成される。細胞にとって物理的な足場となるだけでなく組織形態、分化、ホメオスタシスに必要とされる重要な生化学的・生物力学的な合図を出す働きがあると言われている。

ECM の独自性は組織の発達段階で形成され、動的かつ相互的な生化学的・生物力学的な細胞同士のひいてはタンパク質などの微小環境との相互作用が影響している。ECM との細胞接着はインテグリンなどの ECM 受容体を介して行われる。



### 1-3-1 コラーゲン ( Collagen )

生体内のタンパク質の中で最も多く、全タンパク質の 30%を占めている。結合組織の主要な構成成分として全身に広く分布し、線維状の分子構造を形成している。コラーゲンを構成しているアミノ酸の組成は、約 1/3 がグリシン、約 1/4 がプロリンとヒドロキシプロリンで構成されており、アミノ酸配列は G-X-Y (G:グリシン、X には P:プロリン、Y には Hyp:ヒドロキシプロリンが多い)とグリシンが 3 塩基ごとに規則正しく配列するため、一本のコラーゲンペプチド鎖(  $\alpha$  鎖 )は左巻きの螺旋を形成している。さらに、これらのペプチド鎖 3 本が互いに集合し、コラーゲン分子は、右巻きの螺旋構造を有している。この構造がコラーゲンに特徴的な引張強度をもたらしている<sup>8)</sup>。

前十字靱帯においてはI型コラーゲンとIII型コラーゲンが豊富に含まれ構成成分の 50%を占めるとされている。

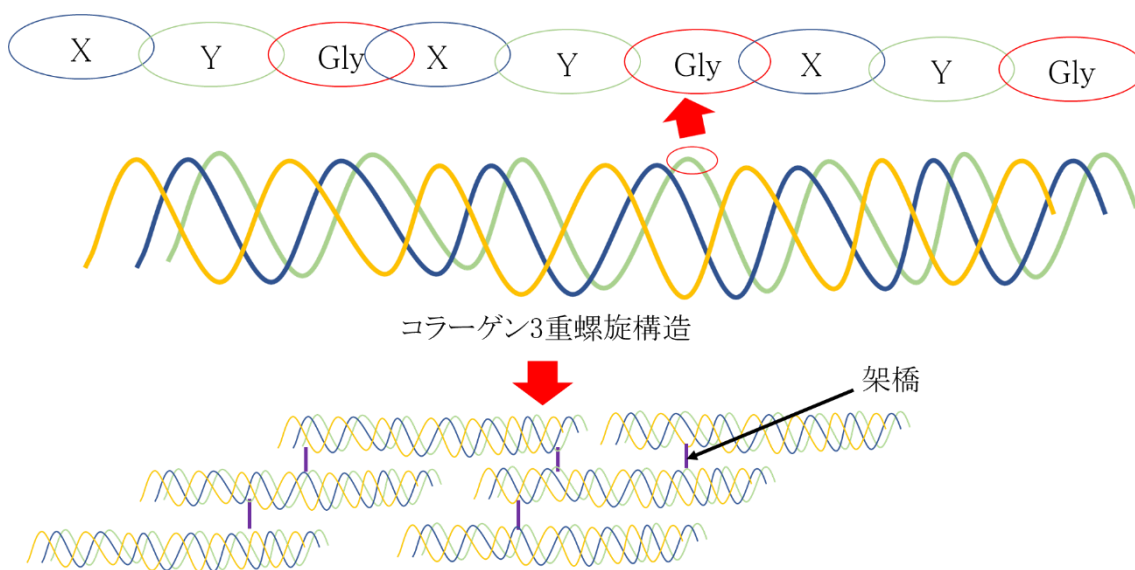


図 1-6 コラーゲン線維構造

## 1-5 本研究の目的

本研究の最終的な目的はヒト前十字靱帯の再生で、移植後に自家組織へと徐々に置換していく組織工学的的人工靱帯の開発である。

先行研究において、前十字靱帯の主な細胞外基質であるコラーゲン、エラスチンのファイバーシートに靱帯細胞を播種し、それを生分解性で生体適合性の高いポリジオキサノンに巻き付けるといったモデルを作製した。

このモデルは力学特性において、軸部分のポリジオキサノンが初期強度を担保する。ポリジオキサノンが加水分解されていき、そこにエラスチン、コラーゲンシート上の細胞による基質産生でポリジオキサノンが分解されたところにコラーゲンが産生されて、コラーゲン線維へと置き換わっていくというモデルである。

しかし、このモデルはポリジオキサノンの分解による強度への影響が大きく、分解されて空隙が生じるという問題があった。そこでコラーゲンでモデル軸を作るためにコラーゲン糸の開発が本研究室で行われてきた。しかし、研究室での前実験においてコラーゲン糸 10 本の引張試験の応力ひずみ曲線から最大応力から応力がゼロになるまでにひずみが大きくなっているため、糸 10 本が同時に切れていない、つまり糸 1 本 1 本に均等に力が加わっていないという問題点があげられた(図 1-7)。

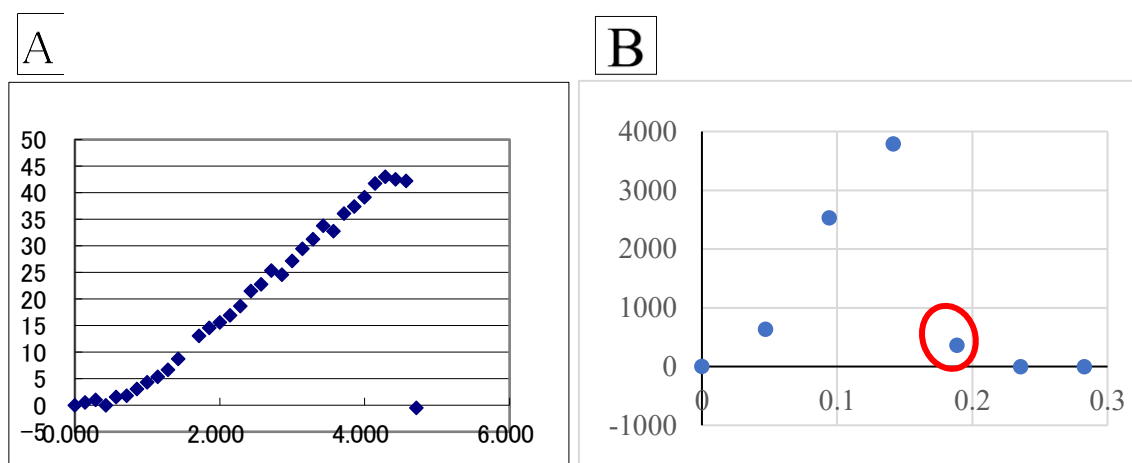


図 1-7 コラーゲン糸の応力ひずみ曲線

A; 1 本の応力ひずみ曲線、B、10 本の応力ひずみ曲線、

これらを解決するために、靱帯の主成分であるコラーゲンで軸を作製し、力学的特性を制御し、モデル内部に空間を持たせて細胞の接着、遊走がしやすいとされる編組構造を持たせた組織工学的的人工靱帯モデル軸の検討を行った。

## 2 方法

### 2-1 足場材料の作製

#### 2-1-1 水溶性コラーゲンの抽出

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外膜以外の部分を除去した。5% クエン酸溶液に  $1 \text{ mg / mL}$  となるようにペプシン（富士フイルム和光純薬）を添加した酵素溶液を作製し、外膜を入れて2週間溶解させた。酵素溶液にて溶解した部分をろ過し、エーテル（ジエチルエーテル；富士フイルム和光純薬）処理を行った。エーテル層を遠心分離で除去し、 $1.7\text{M}$   $\text{NaCl}$ （関東化学株式会社）を加え、生じた沈殿を透析チューブに入れ、外液の塩濃度が  $0$  になるまで透析を行った。チューブから取り出した液を凍結乾燥させて水溶性コラーゲンを得た。

#### 2-1-2 コラーゲン単糸・束の作製

抽出したコラーゲンを  $\text{HCl}$  ( $0.005 \text{ N}$ ；関東化学株式会社) に溶解させ、遠心分離によって気泡の除去を行った。コラーゲン溶液をシリンジ（TERUMO）で吸引し、シリンジポンプにてポリエチレンチューブを通して線維化緩衝液 20% PEG/Buffer ( $37^\circ\text{C}$ ； $\text{pH } 7.5$ ； $135 \text{ mM NaCl}$ ；関東化学株式会社,  $30 \text{ mM Tris}$ ；関東化学株式会社,  $30 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ ；富士フイルム和光純薬) 中に押し出した。その後、緩衝液  $37^\circ\text{C}$  で1時間十分に重合させた。99%エタノール（日本アルコール販売株式会社）で2時間脱水させた後、一晚荷重乾燥させた。EDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩；ペプチド研究所）にて室温で24時間架橋および24時間脱イオン水で洗浄した後、荷重乾燥させコラーゲン単糸を作製した。束においては、フレームにて糸を回収し、単糸と同様に処理することで得た（図2-1）。

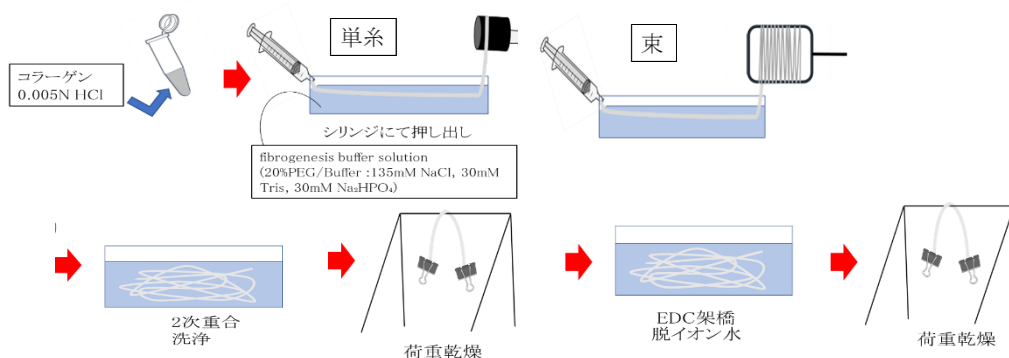


図 2-1 コラーゲン単糸作製の概略図

### 2-1-3 編組コラーゲン軸の作製

編組構造を持たせることでの力学特性への影響を調査するために束と編組を作製した。また、本数の違いの影響を見るために 3 本、9 本、90 本のサンプルを作製した。具体的には①3 本:3 本束、編組(三つ編み)、②9 本:9 本束(9 Bundles:9B)、三つ編み 3 束(3 Braid-Bundles:3BBs)、三つ編みを三つ編みにした(Braid-Braid:BB)、③90 本:90 本束、前架橋 90 本編組(EDC で 30 本束を架橋してから編組構造を持たせた架橋後三つ編み)、後架橋 90 本編組(30 本束編組させてから架橋したもの)を作製した。

3 本束については、編み目(Stitch)の数の違いで力学特性にどのような影響を及ぼすのかを調査するために 1cm あたり 5 つの編み目を作った 5stitch、1cm あたり 10 の編み目を作った 10stitch、30 の編み目を作った 30stitch という編組糸を作製した。

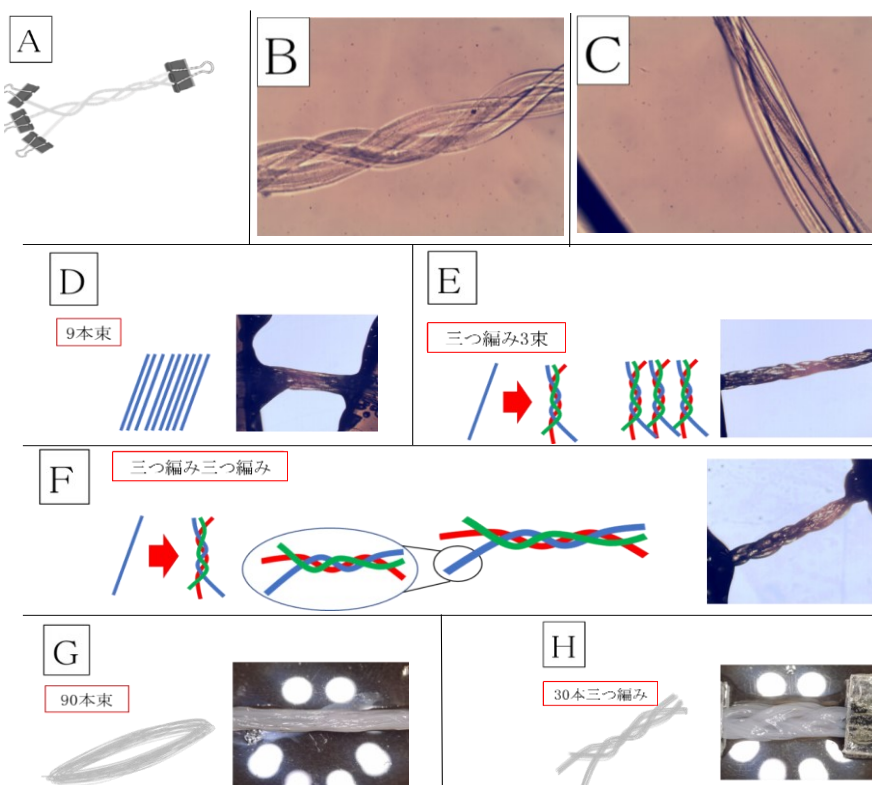


図 2-2 編組コラーゲン糸の顕微鏡画像

A: コラーゲン糸の編み方の図、B: 三つ編みコラーゲンの顕微鏡画像、C: 3 本束コラーゲンの顕微鏡画像、D-H: 概略図及び顕微鏡画像、D: 9 本束、E: 三つ編み 3 束、F: 三つ編み三つ編み、G: 90 本束、H: 30 本三つ編み

## 2-2 靱帯細胞の単離

三重大学医学部倫理委員会により承認を受け、三重大学医学部附属病院整形外科より提供を受けたヒト前十字靱帯(human anterior cruciate ligament:ACL)を使用した。ACLからの細胞単離を移植片培養法にて行った。PBSで軽く洗浄したのち2-3mm程度の大きさに切り分けた。切り分けたACL切片を細胞培養シャーレ上に置き、37°C/5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で1時間静置した。その後細胞が剥がれないよう、慎重に10%FBS/DMEMを添加し、培養を開始した。3日に1度培地交換を行い、組織から細胞が十分に遊出したことが確認できたらトリプシン処理により細胞を剥がして継代培養を行った(図2-4)。

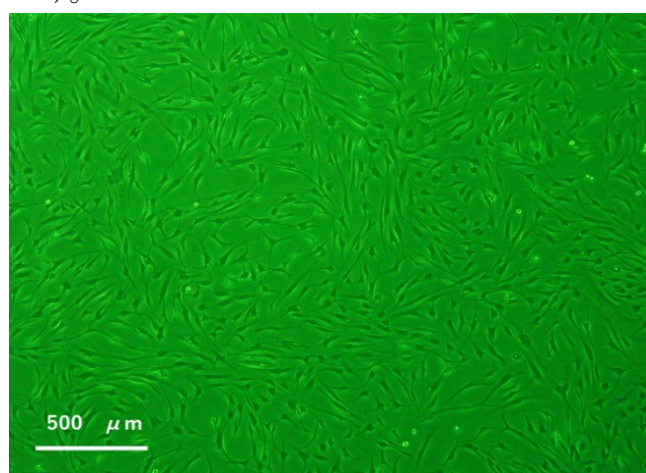


図2-4 ヒト前十字靱帯から単離した靱帯細胞の顕微鏡画像

## 2-3 編組コラーゲン軸上での細胞培養

モデル軸上で細胞培養したものを組織工学的モデル軸として評価した。90本のモデル軸をV字に掘られたシリコンの型に置き、10%FBS/DMEM培地に浸漬させ30分37°Cでインキュベートした。培地を取り除き、ACL細胞 $50 \times 10^4$  cellsを播種し、1時間37°Cでインキュベートした。翌日、培地交換を行い3日間培養した(図2-5)。

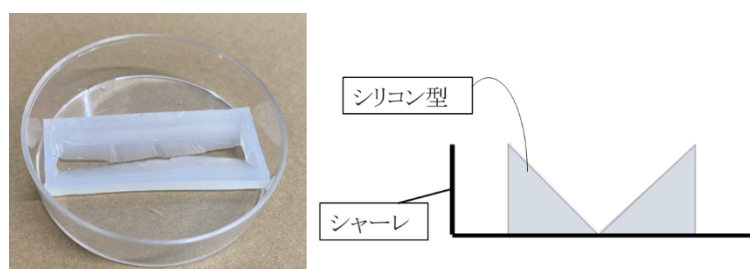


図2-5 培養型の概略



## 2-4 力学的試験

### 2-4-1 コラーゲン糸の引張試験

コラーゲン糸を 2cm に切り、0.5cm 四方のアクリル板にはさみ、接着剤で固定し 1 日静置させた。十分にアクリル板が接着したことを確認した後に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 時間膨潤させた。顕微鏡にてモデル軸の画像を撮影し、ImageJ にて直径を測定し断面積を計算した。それから、引張破断試験器にセットして自然長を測定し、完全に破断するまで引張試験を行った。引張速度は 500 $\mu\text{m}/\text{sec}$  の速さで完全に破断するまで行った。

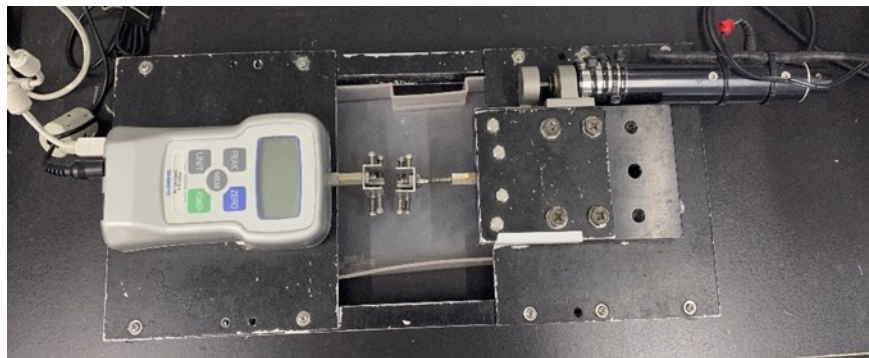


図 2-3 引張試験機

### 2-4-2 編組コラーゲン糸の繰り返し引張

9 本のコラーゲン糸から作られたサンプル (9Bs、3BBs、BB) は繰り返し負荷に対する影響を調査するために図 2-3 の引張試験機を用いて繰り返し引張を行い。その後、サンプルを破断させ、引張強度を測定した。条件は 100 $\mu\text{m}/\text{sec}$  の速さで 5 秒間引張り、5 秒間で戻る 10 秒のサイクルで 50 回引張させた。

### 2-4-3 組織工学的モデル軸の力学評価

モデル軸を4cm程度に切り、両端1cmをアクリル板ではさみ、接着剤で固定し 1 日静置させた。十分にアクリル板が接着したことを確認した後に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 時間膨潤させた。顕微鏡にてモデル軸の画像を撮影し、ImageJ にて直径を測定し断面積を計算した。それから、引張破断試験器にセットして自然長を測定し、完全に破断するまで引張試験を行った。破断強度が小さい場合は図 2-3 を使用し、引張速度は  $500\mu\text{m}/\text{sec}$  の速さで完全に破断するまで行った。破断強度が大きいもしくは自然長が長い場合は図 2-5 を用いて破断試験を行った。エクセルの 1 セルあたり約  $28\mu\text{m}$  の速さで完全に破断するまで行った。今回は 90 本からなるモデル軸で図 2-3 を使用し、それ以外のサンプルは図 2-5 の引張試験機を用いた。

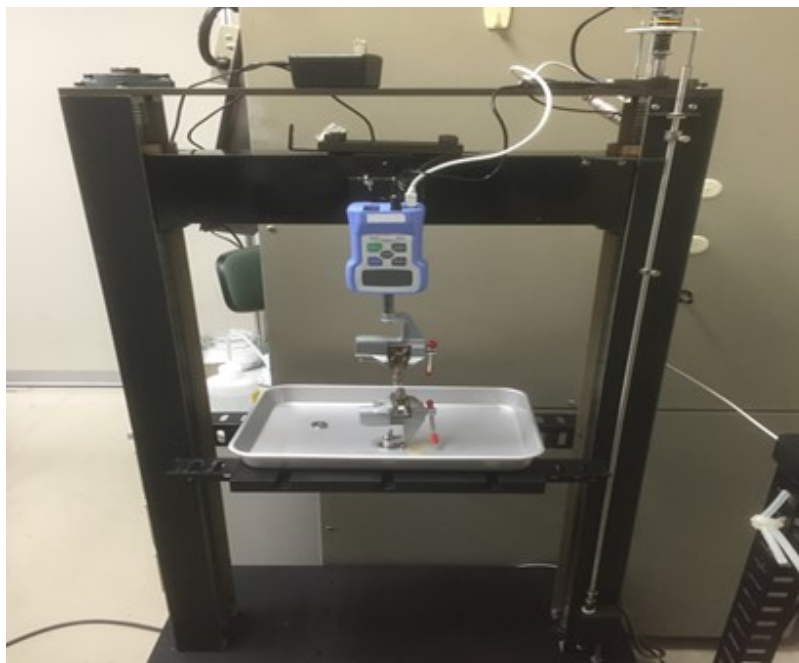


図 2-5 引張試験機



## 2-5 構造観察

### 2-5-1 H&E 染色

3日間培養したモデル軸を10%ホルマリン/PBSで固定し、70%エタノール、99%エタノールで脱水した。その後、キシレンに浸透、パラフィン置換し80°Cのオーブンで1時間静置し、包埋皿にサンプルをおきパラフィン包埋し、-20°Cで保存した。このサンプルをマイクロームにて7 $\mu$ mの切片を作製した。切片化したサンプルをキシレンに浸し脱パラフィンさせて、99%エタノール、95%エタノール、脱イオン水で洗浄した。ヘマトキシリンに浸して核染色し、脱イオン水で洗浄、エオシンで組織を染め顕微鏡にて観察した。

### 2-5-2 免疫蛍光染色

3日間培養したモデル軸を10%ホルマリン/PBSで固定し、脱イオン水で洗浄させた。トリプシン溶液に浸漬させて37°Cでインキュベーションすることで抗原賦活化処理を行った。PBSで洗浄し、ブロッキング液に浸した。その後、PBSで洗浄しDAPI溶液で核を蛍光染色した。スライドガラスにサンプルをのせ、封入液を被せて、カバーガラスを上から押しつけて封入した。その後、共焦点レーザー顕微鏡で観察しLinearunmixingにより細胞核とコラーゲン軸の蛍光を区別し観察した。

### 2-5-3 走査型電子顕微鏡による構造評価

3日間培養したモデル軸を10%ホルマリン/PBSで固定し、PBSで洗浄し、50%、70%、80%、90%、95%、99%エタノールで脱水させて、50%t-ブチルアルコール/エタノール溶液に浸漬し37°Cインキュベートし100%t-ブチルアルコール溶液に入れ替えて再びインキュベートした。7°Cの冷蔵庫で凍結し、凍結乾燥を行った。イオンスパッター装置で金コーティングした後に、走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察した。

## 2-6 遺伝子発現調査

3日間培養したモデル軸を乳鉢に入れ、液体窒素を加えて凍結した状態で乳棒を用いてホモジナイズした後に、Nucleospin Filter にて不純物を取り除き、Nucleospin RNA Column に RNA を吸着させ、洗浄した後に RNase-free H<sub>2</sub>O に溶出させ RNA を回収した。

靱帯関連遺伝子(type 3 collagen、Tenomodulin)、軟骨関連遺伝子(sox9)、骨関連遺伝子(type I collagen、Runx2)の発現量を Real-Time PCR にて解析した。

Table. 2-2 ターゲット遺伝子の用途

| Name              | 用途                    |
|-------------------|-----------------------|
| GAPDH             | ハウスキーピング。             |
| Type I collagen   | 骨分化マーカー。骨組織の主要タンパク質。  |
| type III collagen | 靱帯マーカー。靱帯組織の主要タンパク質。  |
| Tenomodulin       | 靱帯マーカー。靱帯、腱の成熟に関与。    |
| SOX-9             | 軟骨分化マーカー。軟骨細胞に多い転写因子。 |
| Runx2             | 骨分化マーカー。骨芽細胞に多い転写因子。  |

Table. 2-3 ターゲット遺伝子のプライマー配列

| Name                             | Primer sequence (5'-3')  |
|----------------------------------|--|
| GAPDH <sup>21)</sup>             | Forward: GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA<br>Reverse: GTCATTGATGGCAACAATATCCACT |
| type I collagen <sup>22)</sup>   | Forward: AAGGGACACAGAGGTTTCAG<br>Reverse: TAGCACCATCATTTCACGA        |
| type III collagen <sup>23)</sup> | Forward: TCAGGGTGTCAAGGGTGAA<br>Reverse: CAGGGTTTCCATCTCTTCCA        |
| Tenomodulin <sup>24)</sup>       | Forward: CCATGCTGGATGAGAGAGGTT<br>Reverse: TTGGTAGCAGTATGGATATGGGT   |
| SOX-9 <sup>25)</sup>             | Forward: CAG GTG CTC AAA GGC TAC<br>Reverse: CGC TCT CGT TCA GAA GTC |
| Runx2 <sup>26)</sup>             | Forward: TGAGCTGAGAGGACATATGGCC<br>Reverse: TAGACACCAAACCTCCACAGCCC  |

解析方法には  $\Delta\Delta C_T$  法を用いて、各領域の静置培養の値を 1 として相対発現量を算出した。

### $\Delta\Delta C_T$ 法

#### ① $\Delta C_T$ の算出

$$\Delta C_T = C_T \text{ 値 (ターゲット遺伝子)} - C_T \text{ 値 (GAPDH)}$$

#### ② $\Delta\Delta C_T$ の算出

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{各サンプル}) - \Delta C_T (\text{リファレンス (= 正常群)})$$

#### ③ 相対発現量の算出

$$[\text{遺伝子の相対発現量}] = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

## 2-7 統計分析

解析ソフト(StatView)を使用し、Tukey-Kramer 法により統計的有意差検定を行った。 $p < 0.05$  で統計的な有意差ありとした。有意差ありと判定した結果のグラフには、※: $p < 0.05$  と表記した。

### 3 結果

#### 3-1 編組による力学特性の変化

##### 3-1-1 コラーゲン単系の力学特性

コラーゲン単系の引張試験から力学特性を調査した。本研究で用いたコラーゲン単系の力学特性を以下に示す。

表 3-1 コラーゲン単系の力学特性

|                     |                  |
|---------------------|------------------|
| 直径( $\mu\text{m}$ ) | 125.1 $\pm$ 42.4 |
| 破断強度(mN)            | 87.8 $\pm$ 47.5  |
| 弾性率(MPa)            | 28.3 $\pm$ 10.4  |
| 伸長率(%)              | 24.7 $\pm$ 5.3   |

##### 3-1-2 3本モデル軸における編組系の力学特性

3本束と編組の引張試験による力学試験結果を以下に示す。

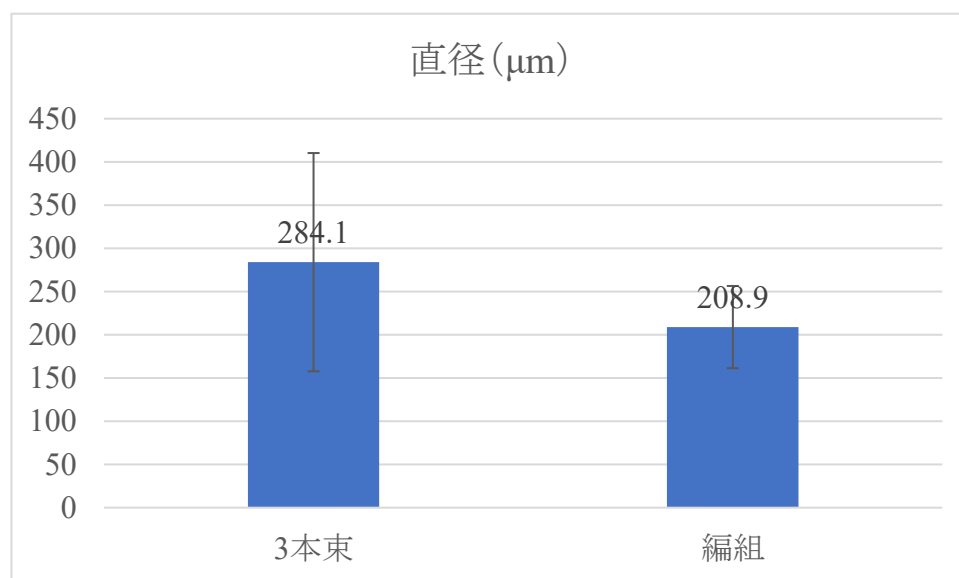


図 3-1 コラーゲン糸 3本の直径(n=12)

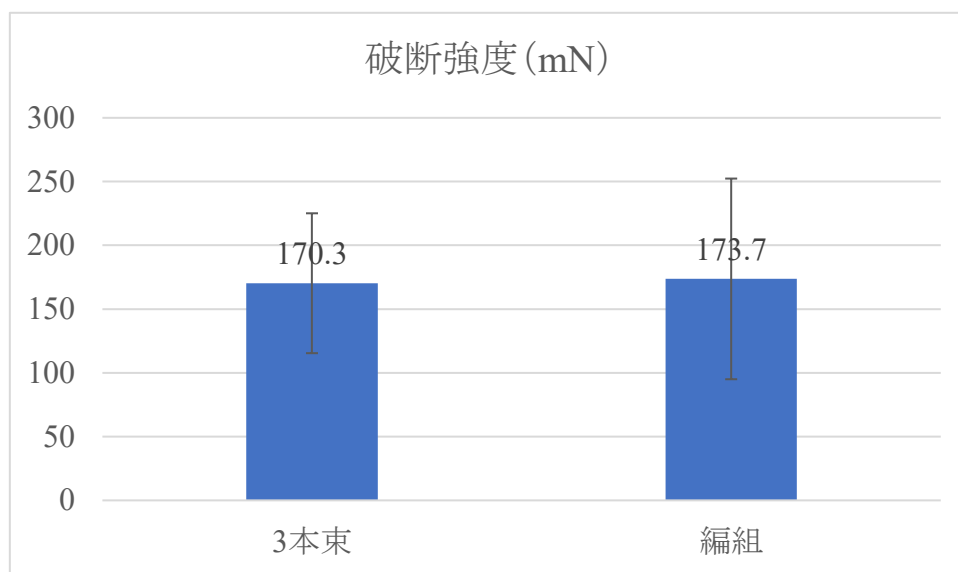


図 3-2 コラーゲン糸 3 本の破断強度 (n=12)

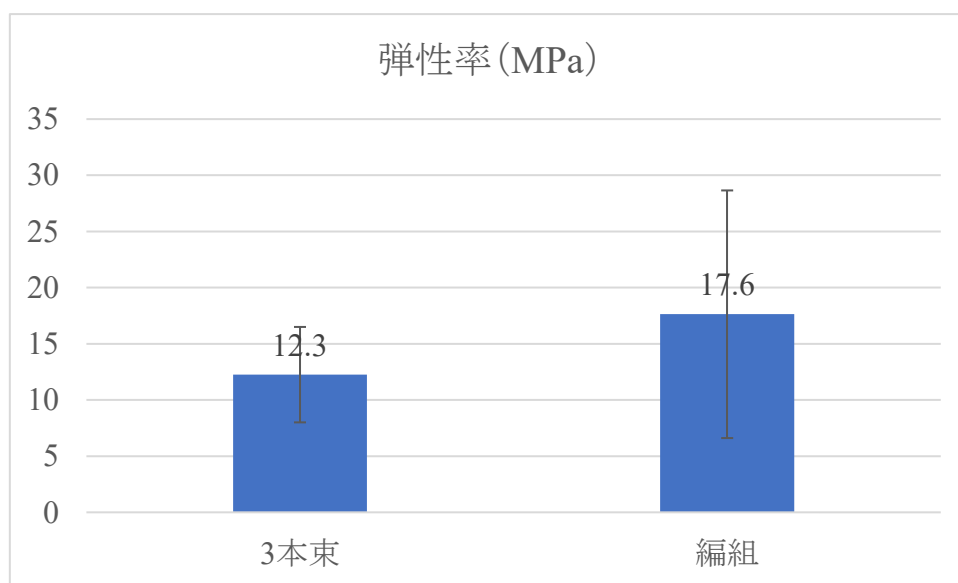


図 3-3 コラーゲン糸 3 本の弾性率 (n=12)

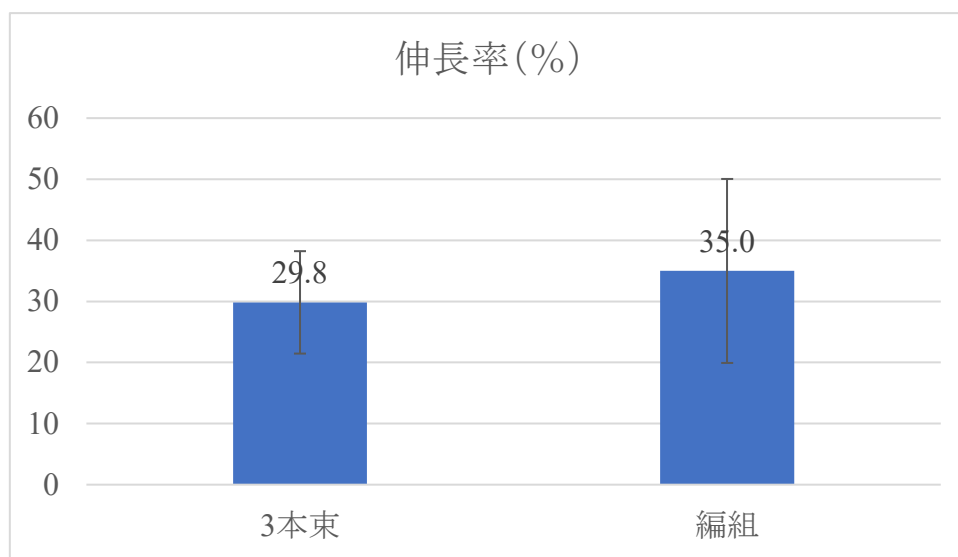


図 3-3 コラーゲン糸 3 本の伸長率 (n=12)

直径は 3 本束で  $284.1 \pm 126.2 \mu\text{m}$ 、編組で  $208.9 \pm 47.6 \mu\text{m}$  となった(図 3-1)。破断強度では 3 本束  $170.3 \pm 54.8 \text{ mN}$  で編組では  $173.67 \pm 78.68 \text{ mN}$  (図 3-2)、弾性率は 3 本束で  $12.25 \pm 4.25 \text{ MPa}$  で編組では  $17 \pm 11.02 \text{ MPa}$  であり(図 3-3)、伸長率は 3 本束で  $29.84 \pm 8.38 \%$ 、編組で  $34.98 \pm 15.06 \%$  を示した(図 3-4)。弾性率と伸長率において編組構造を持たせることで高くなった。

### 3-1-2 stitch による力学特性への影響調査

stitch 数の違う 5stitch、10stitch、30stitch の3つのサンプルで引張試験での力学特性の結果を以下に示す。

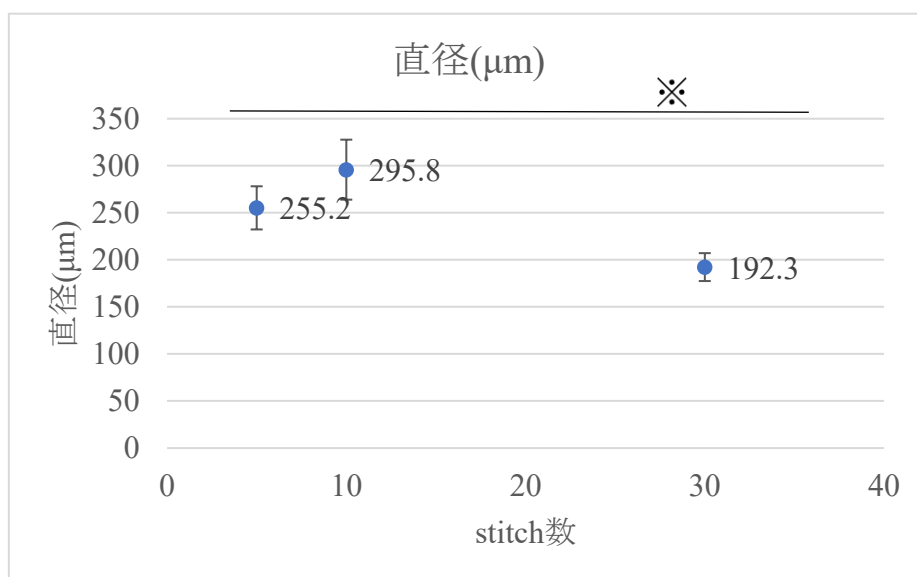


図 3-4 stitch 数が異なるモデル軸の直径 (n=3, ※: p<0.05)

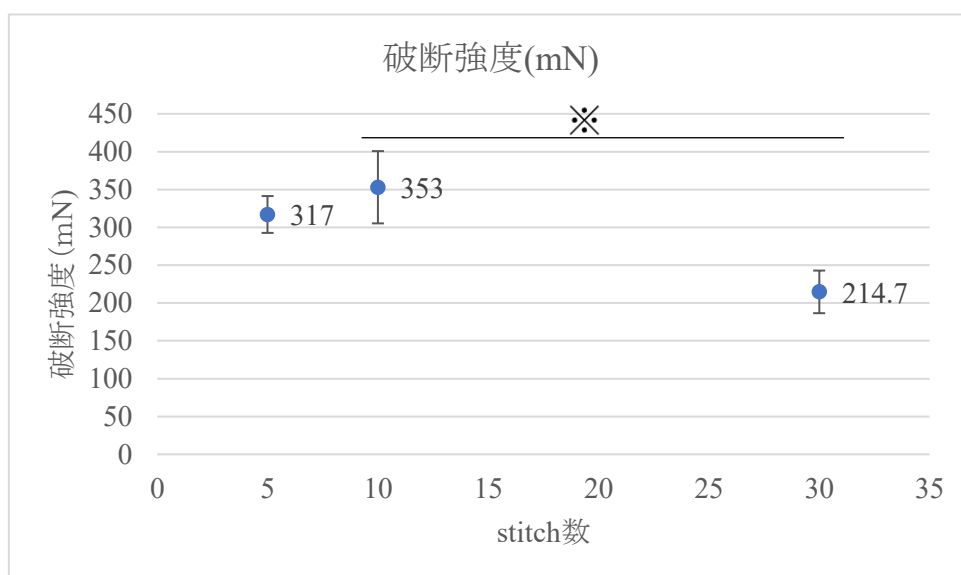


図 3-5 stitch 数が異なるモデル軸の破断強度 (n=3, ※: p<0.05)

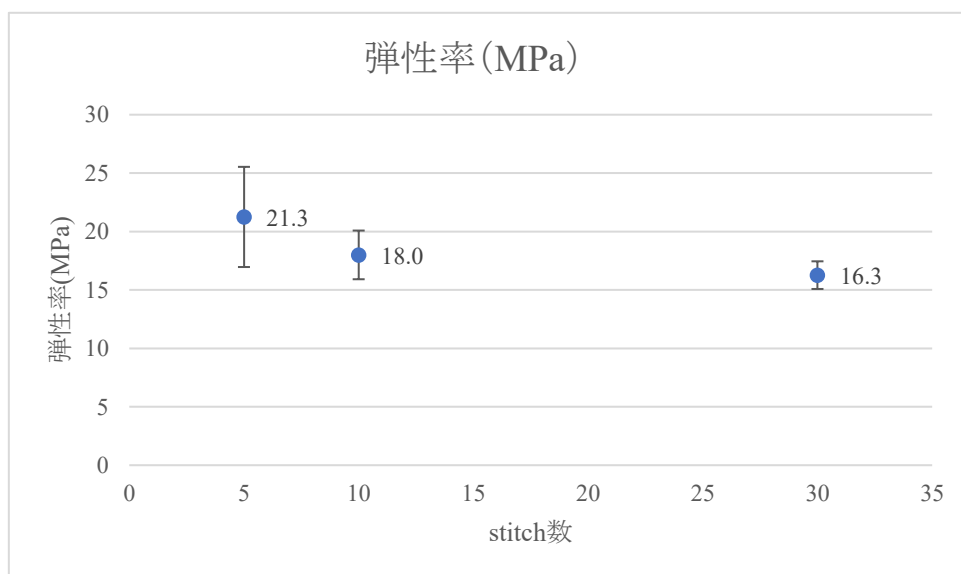


図 3-6 stitch 数が異なるモデル軸の弾性率 (n=3)



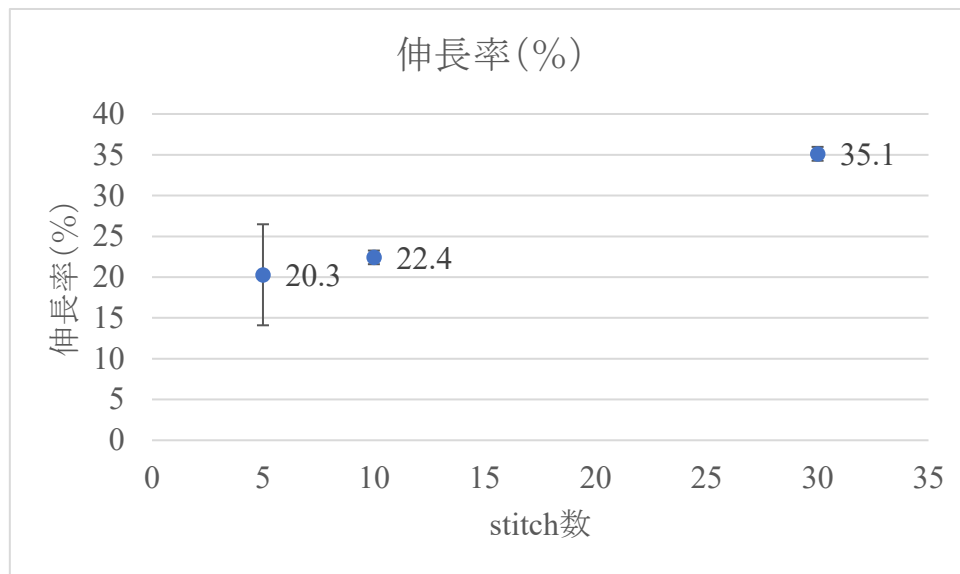


図 3-7 ステッチ数が異なるモデル軸の伸長率 (n=3)

5stitch、10stitch、30stitch のそれぞれの直径は  $255.23 \pm 22.93 \mu\text{m}$ 、 $295.84 \pm 31.87 \mu\text{m}$ 、 $192.45 \pm 18.15 \mu\text{m}$  で、5stitch が 30stitch よりも有意に高くなった。破断強度は  $319.5 \pm 29.5 \text{ mN}$ 、 $353.0 \pm 47.82 \text{ mN}$ 、 $214.5 \pm 34.5 \text{ mN}$  であり、5stitch が 30stitch よりも有意に高くなった。弾性率は  $21.25 \pm 5.25 \text{ MPa}$ 、 $18 \pm 2.08 \text{ MPa}$ 、 $16.25 \pm 1.45 \text{ MPa}$ 、そして伸長率は  $21.25 \pm 5.25\%$ 、 $22.43 \pm 0.84\%$ 、 $35.13 \pm 1.04\%$ を示した。弾性率では stitch の数が多くなるほど低くなり、伸長率では stitch の数が多くなるほど高くなった。

### 3-1-3 編組コラーゲン糸の繰り返し引張試験

9 本束 (9Bundles:9Bs)、三つ編み 3 本束 (3Braid-Bundles:3BBs)、三つ編み三つ編み (Braid-Braid:BB) の 3 つのモデル軸で 50 回繰り返し負荷をかけた後の力学的引張試験の結果を以下に示す。

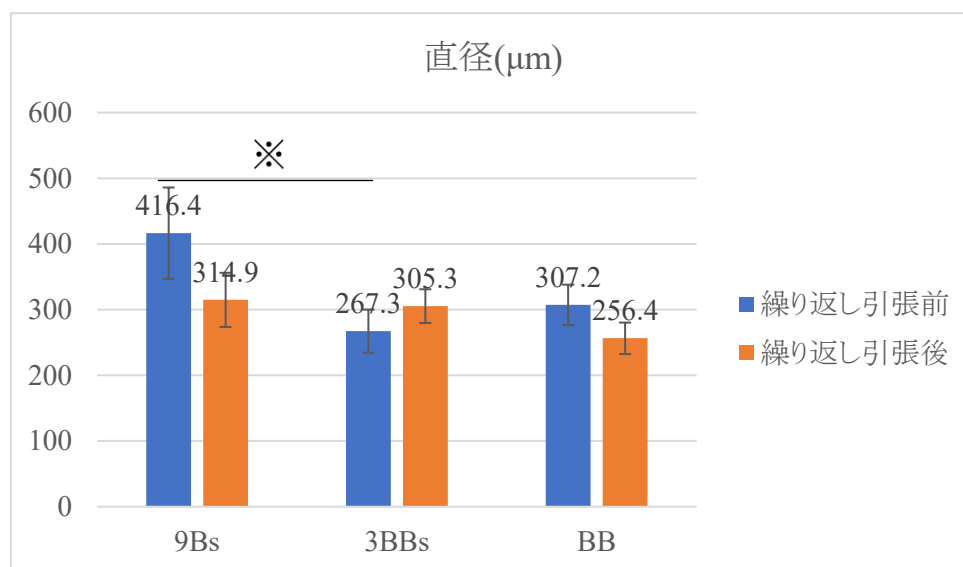


図 3-8 繰り返し引張前後のモデル軸の直径 (n=4-6, ※:  $p < 0.05$ )

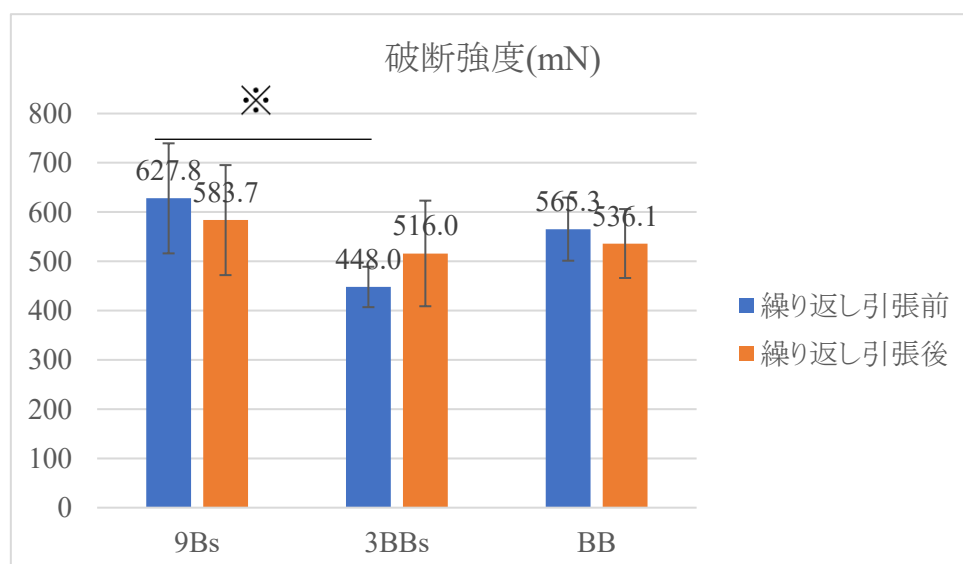


図 3-9 繰り返し引張前後のモデル軸の破断強度 (n=4-6, ※:  $p < 0.05$ )

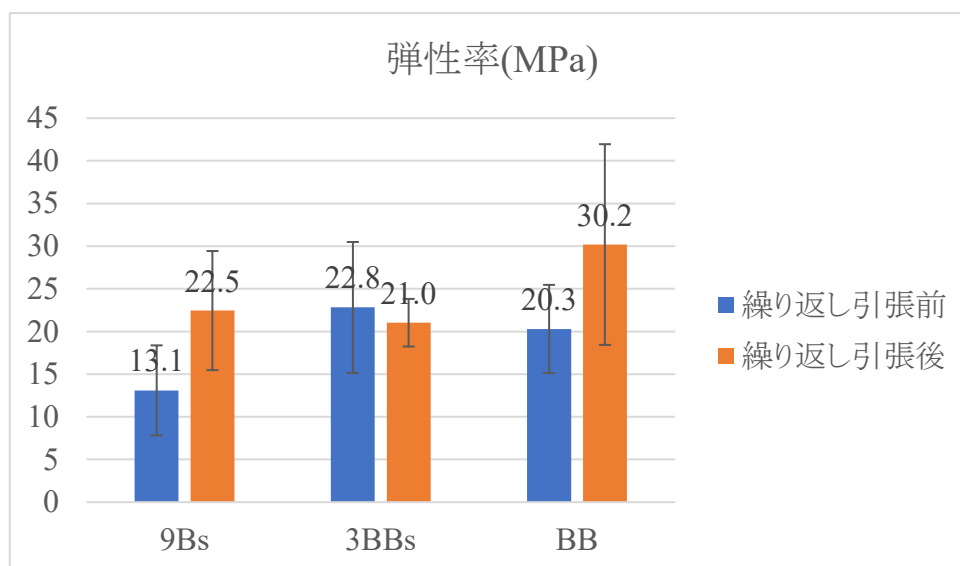


図 3-10 繰り返し引張前後のモデル軸の弾性率 (n=4-6)

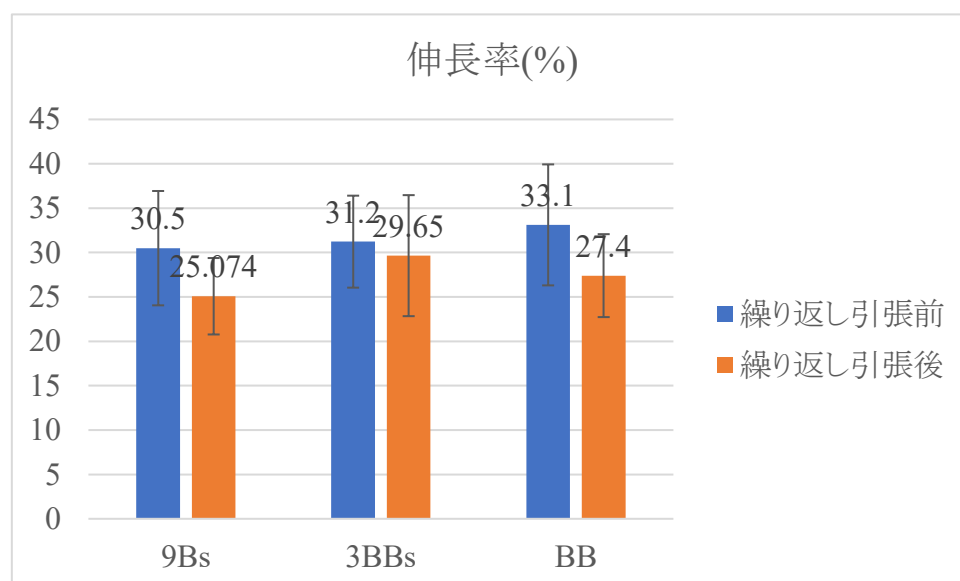


図 3-11 繰り返し引張前後のモデル軸の伸長率 (n=4-6)

繰り返し引張前において 9Bs、3BBs、BB のそれぞれの直径は  $416.44 \pm 69.52 \mu\text{m}$ 、 $267.27 \pm 32.9 \mu\text{m}$ 、 $307.22 \pm 30.82 \mu\text{m}$  となり 9Bs は 3BBs よりも有意に大きかった。破断強度は  $627.83 \pm 11.70 \text{mN}$ 、 $448.00 \pm 41.03 \text{mN}$ 、 $565.33 \pm 64.11 \text{mN}$  で 9Bs が 3BBs より有意に高い値を示した。弾性率は  $13.1 \pm 5.27 \text{MPa}$ 、 $22.82 \pm 7.67 \text{MPa}$ 、 $20.3 \pm 5.16 \text{MPa}$ 、そして伸長率は  $30.49 \pm 6.44\%$ 、 $31.23 \pm 5.18\%$ 、 $33.12 \pm 6.82\%$  であった。

繰り返し引張後においての 9Bs、3BBs、BB のそれぞれの直径は  $314.89 \pm 41.23 \mu\text{m}$ 、 $305.33 \pm 25.74 \mu\text{m}$ 、 $307.22 \pm 30.82 \mu\text{m}$ 、破断強度は  $583.67 \pm 111.68 \text{mN}$ 、 $516.00 \pm 107.20 \text{mN}$ 、 $536.14 \pm 69.95 \text{mN}$ 、弾性率は  $22.45 \pm 6.97 \text{MPa}$ 、 $21.03 \pm 2.79 \text{MPa}$ 、 $30.19 \pm 11.76 \text{MPa}$ 、そして伸長率は  $25.07 \pm 4.31 \%$ 、 $29.65 \pm 6.81 \%$ 、 $27.40 \pm 4.67 \%$ を示した。

### 3-2 組織工学的人工靱帯モデル軸の評価

#### 3-2-1 力学評価

90 本束と、前架橋編組と後架橋編組の力学試験結果を以下に示す。

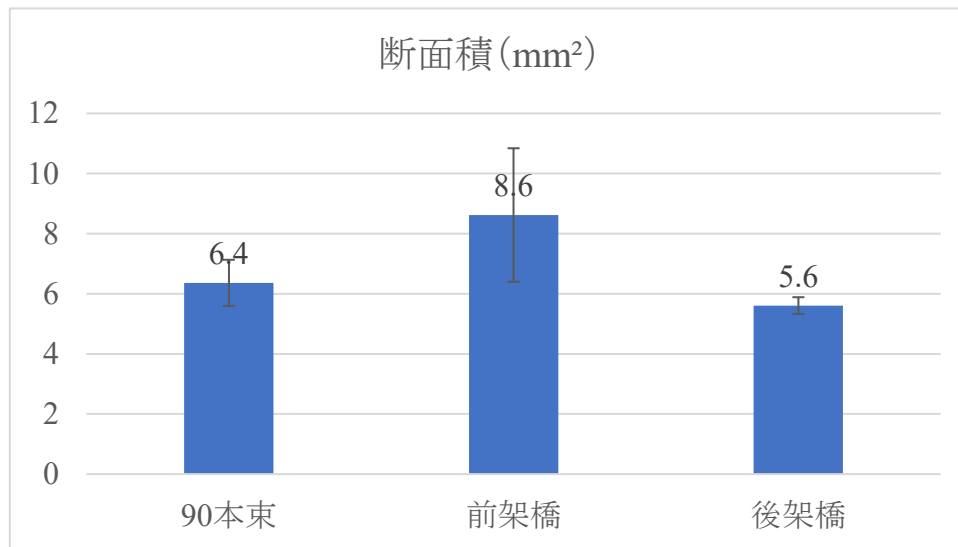


図 3-12 コラーゲンモデル軸の弾性率 (n=4)

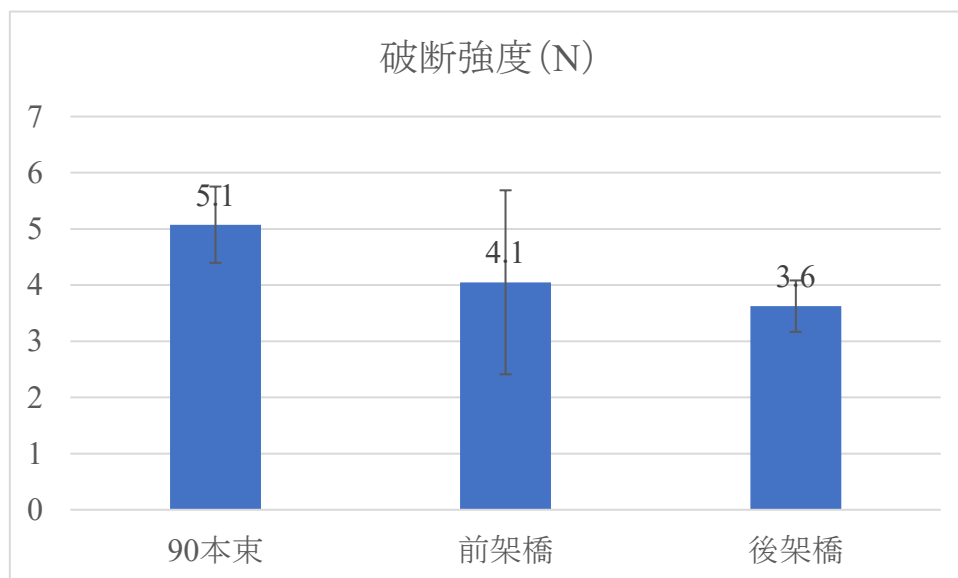


図 3-13 コラーゲンモデル軸の破断強度 (n=4)

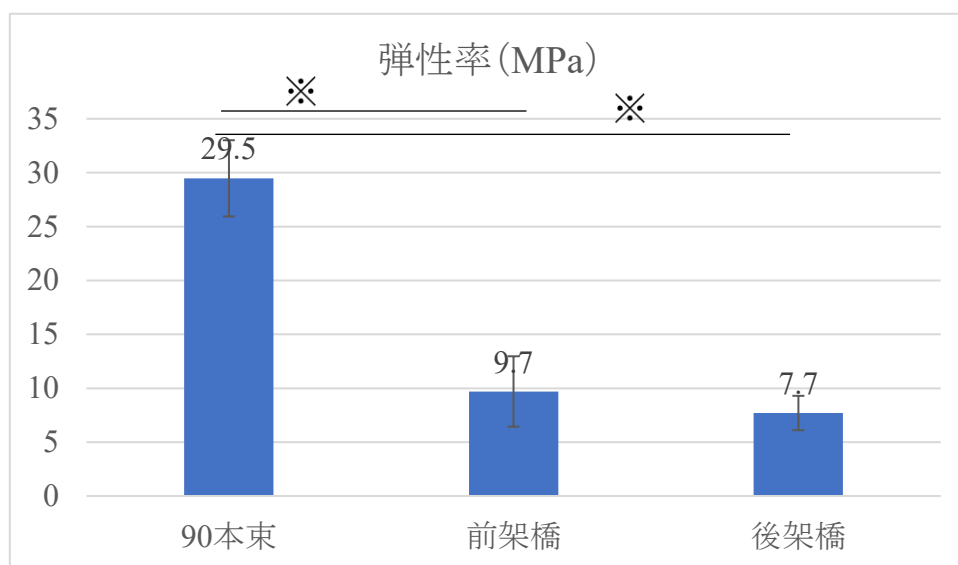


図 3-14 コラーゲンモデル軸の弾性率 (n=4, ※ : p<0.05)

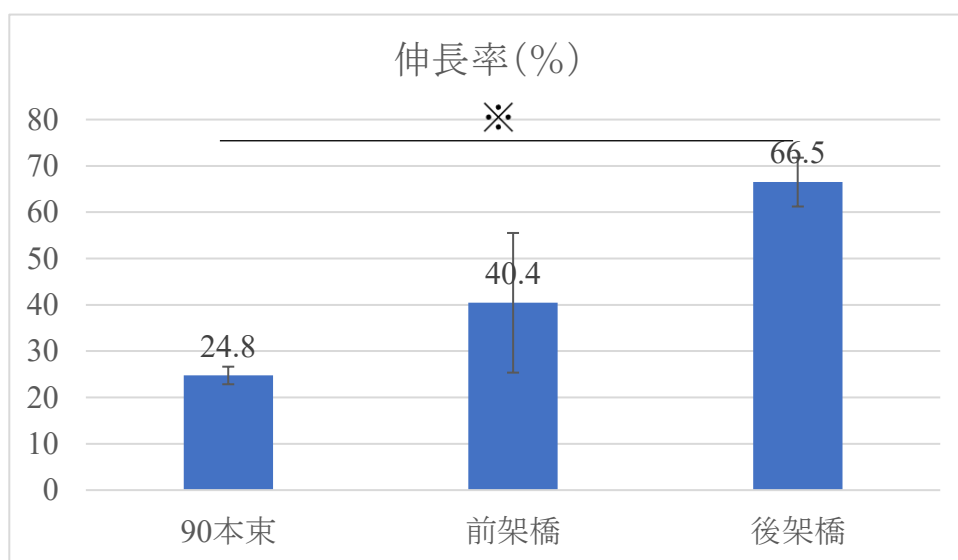


図 3-15 コラーゲンモデル軸の弾性率 (n=4, ※ : p<0.05)

90 本束、前架橋、後架橋それぞれの断面積は、 $6.36 \pm 0.77 \text{ mm}^2$ 、 $8.62 \pm 2.22 \text{ mm}^2$ 、 $5.65 \pm 0.28 \text{ mm}^2$ で、破断強度は  $5.08 \pm 0.68 \text{ N}$ 、 $4.05 \pm 1.64 \text{ N}$ 、 $3.63 \pm 0.46 \text{ N}$ 、弾性率は  $29.48 \pm 3.53 \text{ MPa}$ 、 $9.70 \pm 3.27 \text{ MPa}$ 、 $7.7 \pm 1.59 \text{ MPa}$ 、伸長率は  $24.76 \pm 1.90 \%$ 、 $40.44 \pm 15.07 \%$ 、 $66.51 \pm 5.27 \%$ となった。

編組構造を持つ前架橋と後架橋で弾性率が低くなった。伸長率は後架橋が最も高くなった。

### 3-2-2 染色による構造観察および細胞接着確認

構造観察及び細胞接着確認のために H&E 染色、免疫蛍光染色を束コラーゲン軸と編組コラーゲン軸で行った。免疫蛍光染色では細胞核とコラーゲン糸の自家蛍光を分けるために Linearunmixing を行った結果を以下に示す。

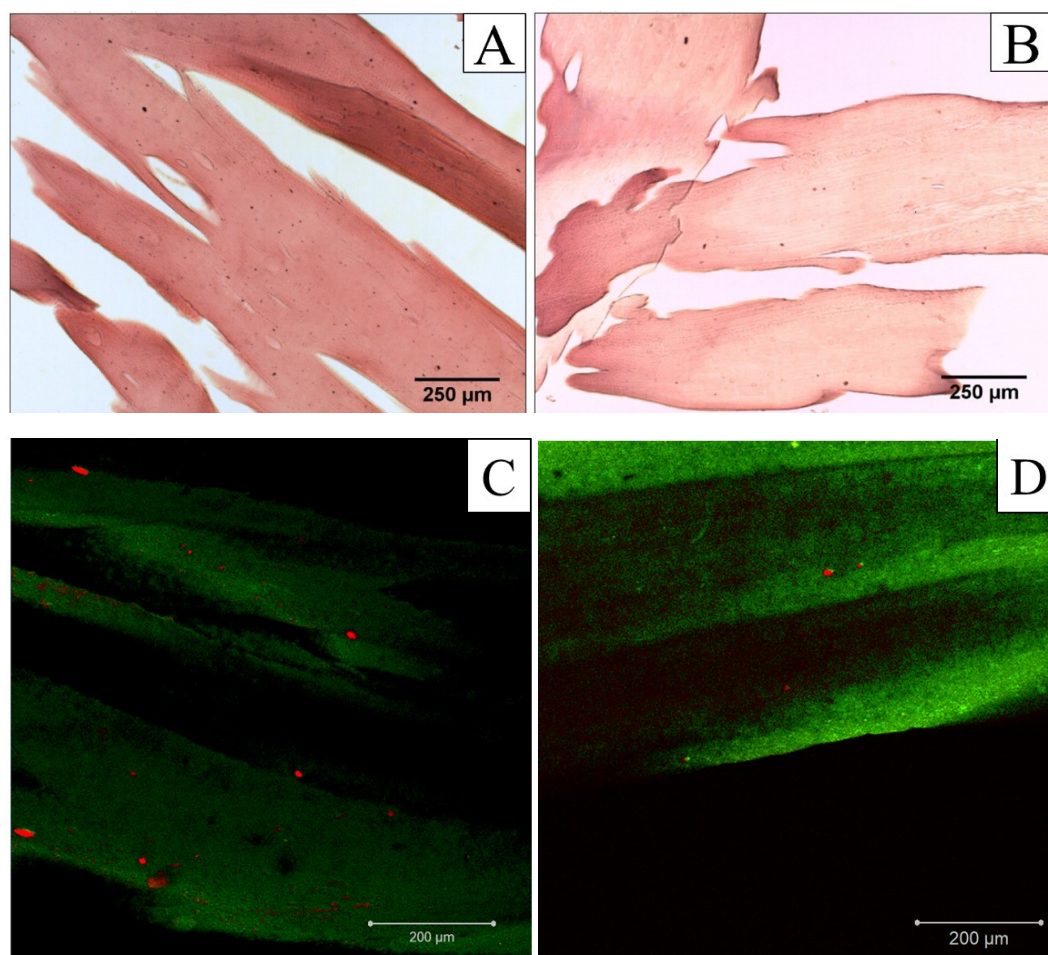


図 3-15 コラーゲンモデル軸の画像

束コラーゲン軸 (A、C) と編組コラーゲン軸 (B、D) の染色画像

A、B: H&E 染色、黒紫色が細胞核で赤色が組織を示す。C、D: 免疫蛍光染色画像、赤色が細胞核で緑色がコラーゲン糸の自家蛍光を示す。

H&E 染色においては切片作製の際に編組構造を残した状態で切片を作製することが困難であったが比較的構造が残っている染色画像を用いた。

H&E 染色画像から編組軸モデルでは糸の重なりのある部分が観察できた。糸内部細胞はほとんど確認できなかった。SEM においては、どちらの軸においても表面に細胞核らしき丸い粒を確認した。さらに、免疫蛍光染色においても細胞核を確認した。



### 3-2-2 走査型電子顕微鏡による構造観察および細胞接着確認

SEM によって表面構造の観察画像を以下に示した。

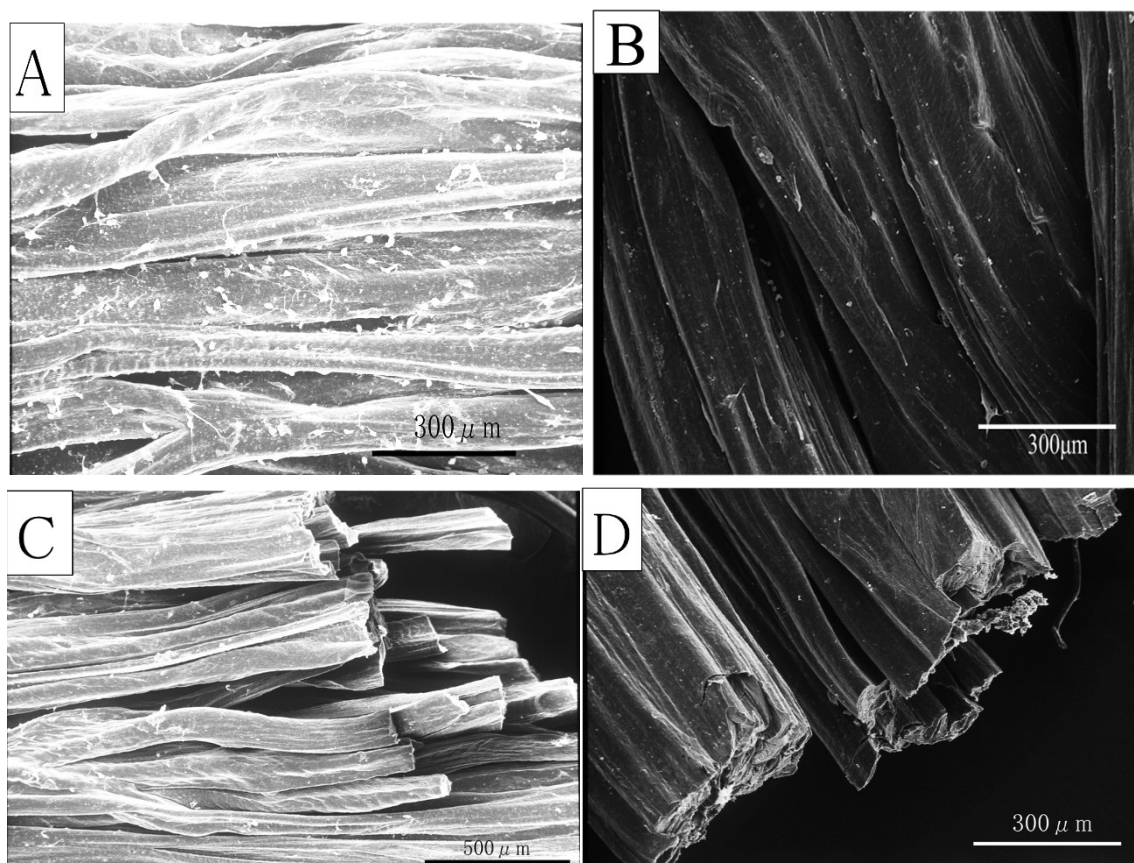


図 3-16 コラーゲン軸モデルの SEM 画像

A.: 束コラーゲン軸の表面画像、B: 編組コラーゲン軸の表面画像、C: 束コラーゲン軸の断面図、D: 編組コラーゲン軸の断面図。

A、B の画像から核と思われる粒を軸表面で確認した。C、D の画像から 90 本束の場合はコラーゲン単糸の観察が出来たが、編組ではコラーゲン単糸一本一本の区別が困難であった。

### 3-2-4 遺伝子発現評価

束と編組で遺伝子発現確認を行った結果を以下に示す。確認した遺伝子はコントロールとして GAPDH、靱帯関連遺伝子である Type 3 collagen(Col3)、Tenomodulin(tnmd)、骨関連遺伝子である Type 1 collagen(Col1)、Runx2 と軟骨関連遺伝子である Sox9 を用いた。

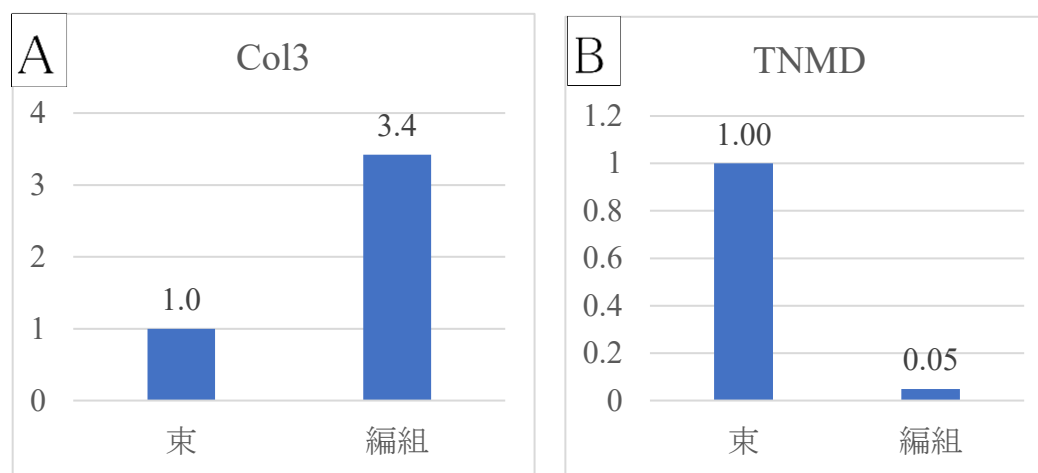


図 3-17 コラーゲンモデル軸の靱帯関連遺伝子の遺伝子発現(n=1)

A: type 3 collagen、 B: Tenomodulin

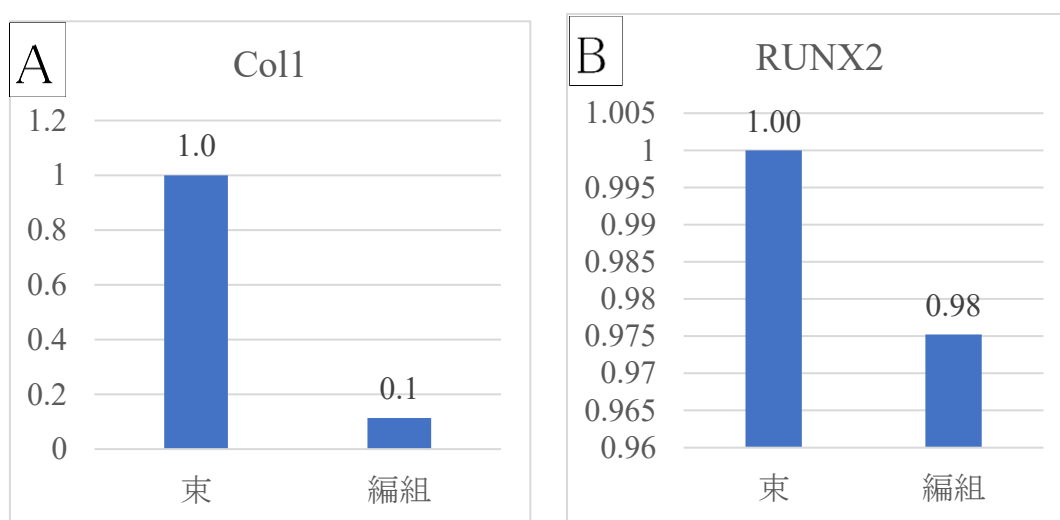


図 3-18 コラーゲンモデル軸の骨関連遺伝子の遺伝子発現(n=1)

A: type 1 collagen、 B: Runx2

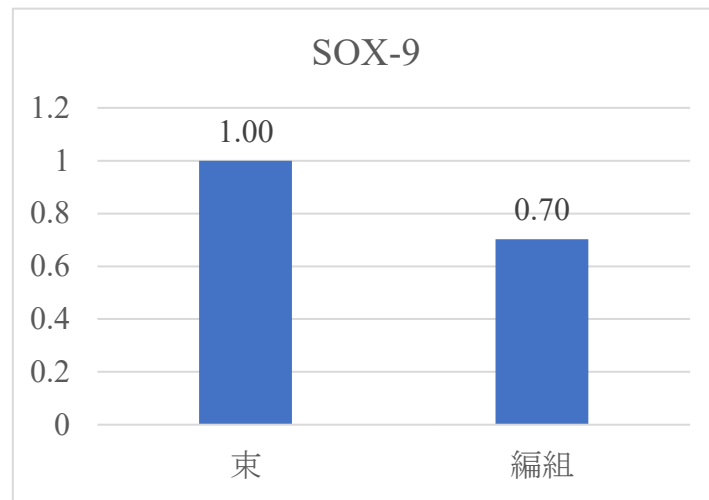


図 3-19 コラーゲンモデル軸の軟骨関連遺伝子の遺伝子発現(n=1)

編組の遺伝子発現は束と比べて Type 1 collagen では 0.11 倍、靱帯関連遺伝子である Type 3 collagen では 3.42 倍、Tenomodulin では 0.05 倍、骨関連遺伝子である Sox9 では 0.70 倍で Runx2 では 0.98 を示した。

## 4 考察

### 4-1 編組構造による力学特性の違いについて

#### 4-1-1 編組構造による弾性率への影響

今回の3本束と三つ編みの弾性率では三つ編みで高い値を示し、一般的な編組の力学特性とは異なっていた。一般に言われている編組の特性を確認するために材料の違う糸で引張試験を行った。図4-1は3本のPDS糸の弾性率の結果である。3本束で $704.00 \pm 45.72 \text{MPa}$ 、三つ編みで $514.29 \pm 131.76 \text{MPa}$ となった。3本束と三つ編みで比較したとき三つ編みの方が3本束よりも弾性率が低くなったため、本研究での編組の仕方は一般的な編組の力学特性を示し、編組の作り方は成功していた。

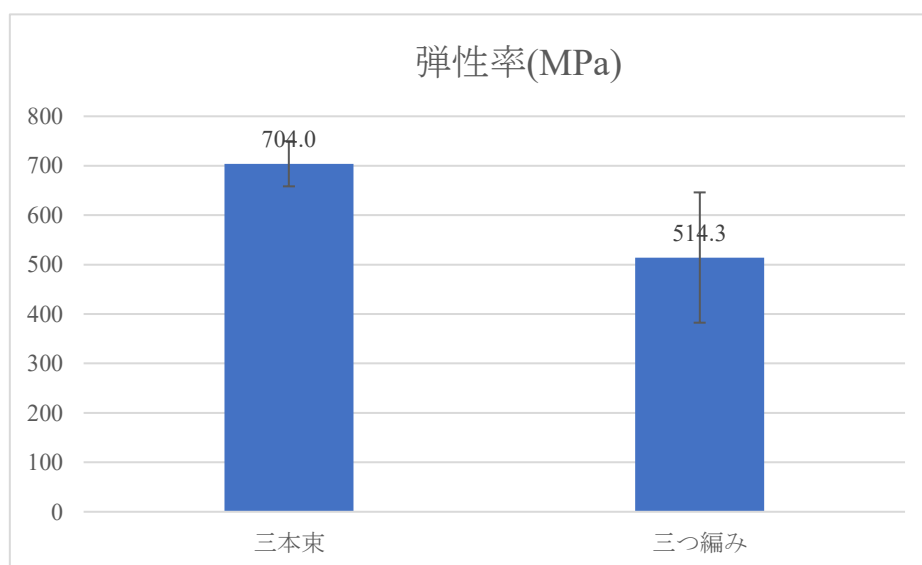


図4-1 3本のPDS糸の弾性率

伸長率を確認すると三つ編みで高い値を示しており、編組した効果で糸の遊びが力の加わり方を緩やかにし、高くなったと考えられるため編組が機能していないということではない。一方で、直径を見ると3本束で高い値をとっている。弾性率は糸の断面積が大きくなるほど低くなる。したがって、直径の大きい3本束は弾性率が抑えられたために三つ編みの弾性率が3本束よりも上回った。本来であれば全く同じ直径の糸を3本束ねたものと三つ編みにしたものでは糸同士が最も密な状態でいると同じ直径になる。しかし、直径は両端付近と中央付近で測っており、今回の測定においてはサン

プルをアクリル板にはさみ、接着剤で固定し、アクリル板ごと引張させることで測定している。直径を測定するために顕微鏡で観察するときはアクリル板で固定した後に行う。そのため3本束では糸がアクリル板に沿うように並んでしまい直径を多く見積もってしまったためと考えられる。

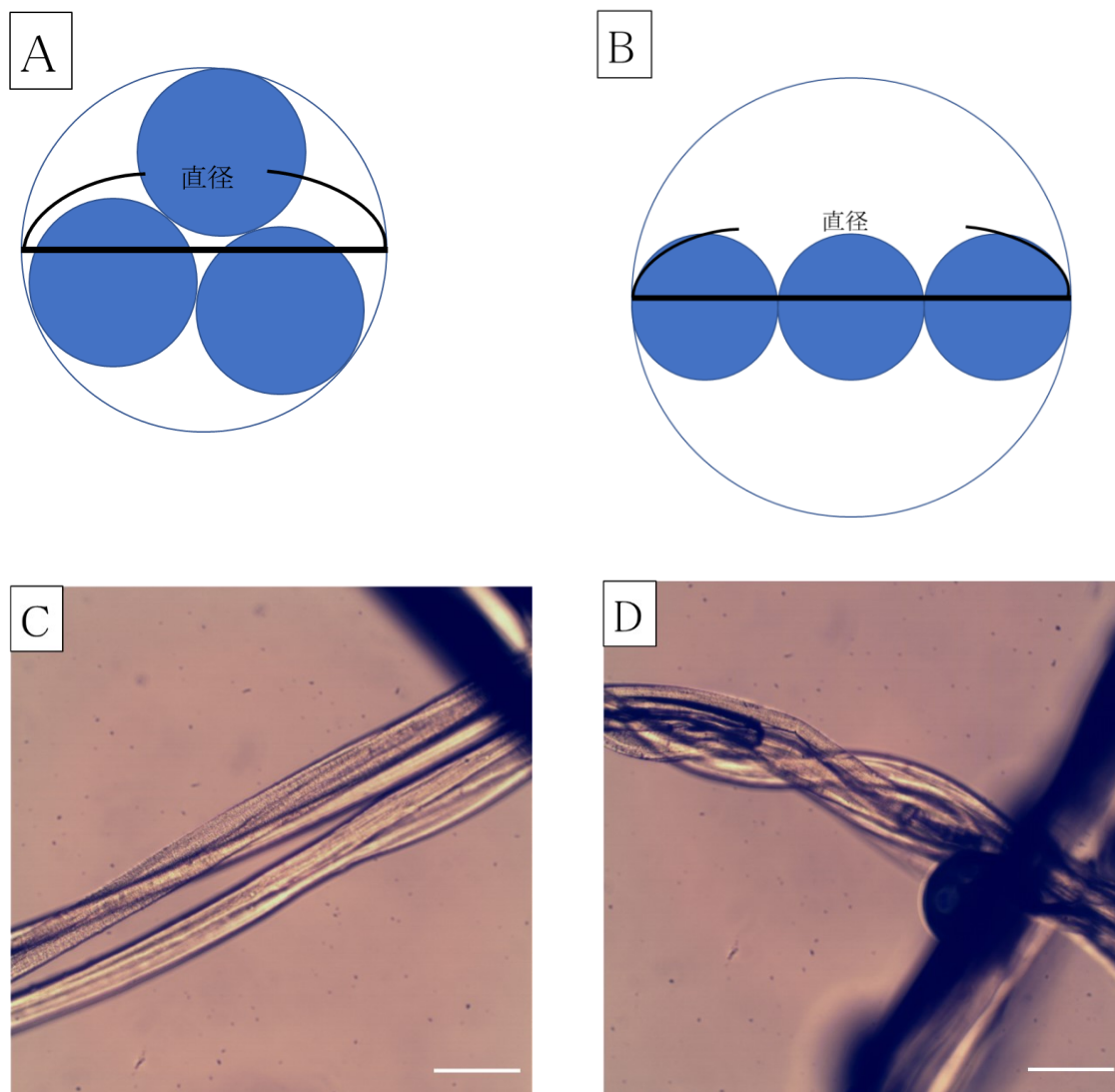


図 4-2 3 本束内の位置関係と見積もられる直径

A:最密構造での見積もられる直径、B:平面に並んだ糸から見積もられる直径、C:3 本束の顕微鏡画像、D:三つ編みの顕微鏡画像 スケールバー:250 $\mu$ m

#### 4-1-2 stitch の数の違いによる力学特性の変化について

Stitch 数が違う編組糸の引張試験を行うことで力学特性の制御が出来るかを試みた。弾性率において最も編み目の数が少ない 5stitch で弾性率が最高となり、編み目の多い 30stitch で最低となった。伸長率では 30stitch で最も高い値となり、5stitch で低くなった。このように stitch が増えるほど弾性率が抑制され、伸長率が上昇した。そのため stitch の数を変えることで力学特性を制御出来ることが示唆された。

さらに伸長率のグラフに近似直線を描くと  $R^2$  が高く伸長率と stitch 数は比例関係にあり近似曲線の傾きから stitch 数を1つ増やすと伸長率を 0.6% 上昇させられることが予測できる。

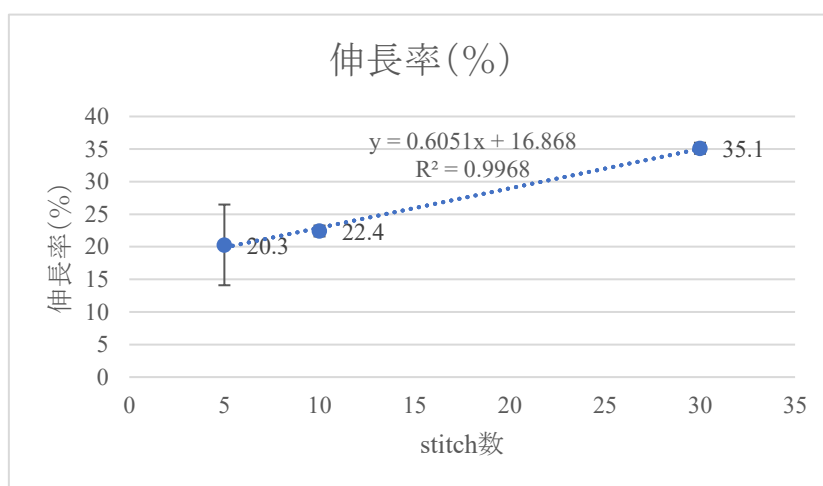


図 4-3 ステッチ数が異なるモデル軸の伸長率と近似曲線

Amitrawal によると、編組角度は編組構造の引張特性の制御に重要な役割を果たす。編組角の増加により、編組縫合糸の応力-ひずみ曲線の勾配が減少した。編組角が大きいと高い伸びと低い弾性率を示す<sup>27)</sup>。つまり stitch 数が多ければ多いほど応力-ひずみ曲線の勾配は減少し、弾性率は低くなるとされているため、今回用いているコラーゲン糸も同様に編組角と編組直径を変えることで意図的に力学特性を変化させられる。



前十字靱帯の応力ひずみ曲線は3領域にわかれていて、まずクリンプと呼ばれる靱帯特有の周期的な波形構造(図4-3)が伸ばされる小さな応力で大きなひずみが出る<sup>28)</sup>領域、次にクリンプが伸びきるとコラーゲン線維束に直接力がかかる領域、最後に線維が破断し応力がさがっていく領域があるとされている<sup>12)</sup>。したがって、靱帯モデルの力学特性を意図的に変化させる必要がある。Stitch 数を変えることで力学特性を変化させられるため、編組構造が人工靱帯モデルの軸として有効であることが示唆された。

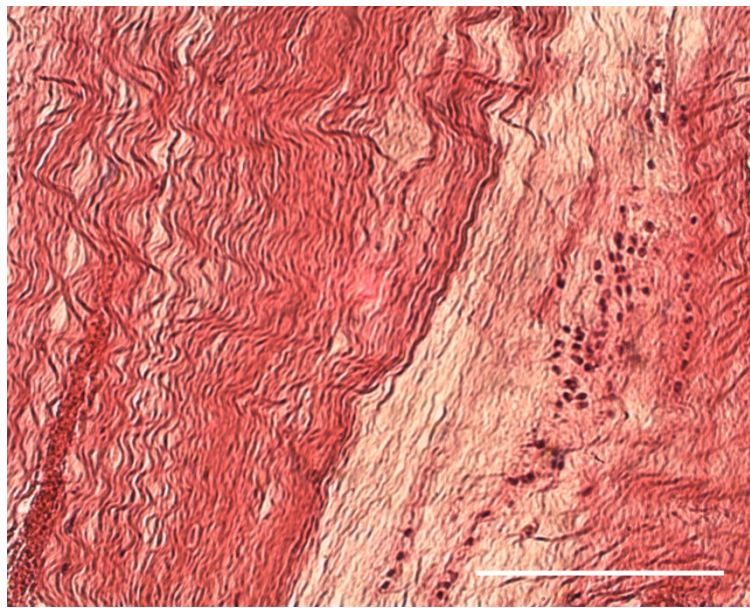


図4-3 ヒト前十字靱帯の H&E 染色画像  
スケールバー:250 $\mu$ m



#### 4-1-3 編組糸に編組構造を持たせたことによる力学特性の変化について

BB と 3BBs の 2 つのサンプルを作り引張試験を行うことで編組を重ねることによる力学特性の変化を調べた。今回の繰り返し引張前のサンプル同士での弾性率と伸長率の差がほとんどなかったことから、2 つのことが考えられる。1 つめは、編組を 1 カ所でも取り入れれば力学特性に十分に影響を及ぼせる。2 つめは、編組を重ねるほど弾性率に対する効果が増すが、何らかの影響で編組の効果が薄れる、もしくは失ってしまったということである。編み糸は図 4-2 の D の画像からわかるように凹凸が出来る。凹凸のある 3 本の糸を編んでいるため糸同士で引っ掛かってしまい、編組の効果が薄れてしまったと考えた。また、図 4-3 でもわかるように編組することで出来る凹凸が小さくなっていることから同じことが言える。繰り返し引張後の破断試験の結果から弾性率で 3BBs より BB で高い値を示した。このことから stitch が不均一で力の加わり方が均一でなくなり弾性率が繰り返し引張前では 3BBs と BB で同程度となり、繰り返し引張後では stitch が均一に近づくことで BB が 3BBs よりも高くなったと思われる。ただし、繰り返し引張前後どちらにおいても弾性率以外のパラメータにおいて 9Bs と 3BBs の比較と 9 本束と三つ編み三つ編みの比較での増減の傾向が同じであるため、編組を一部に取り入れれば効果が得られるので編組を重ねることによる影響に対する効果を調べるためにさらなる調査が必要である。

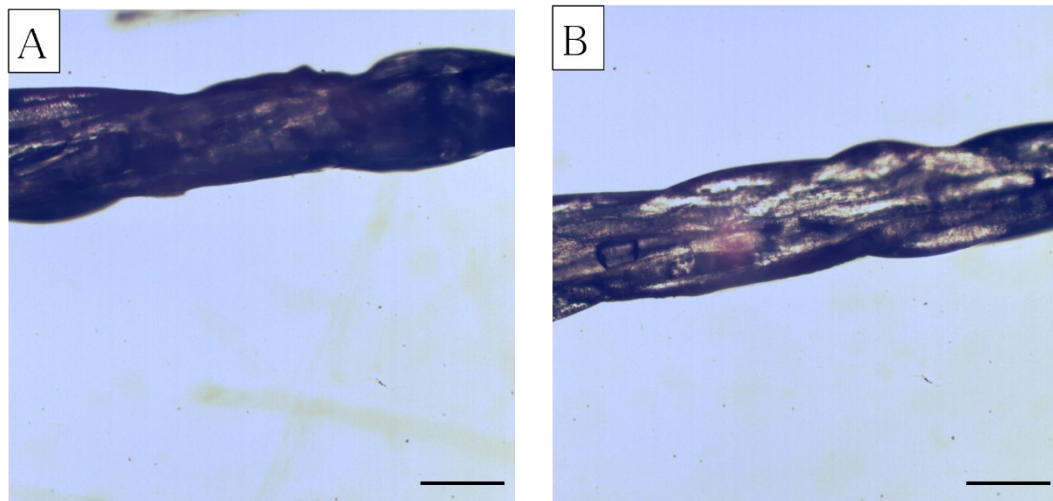


図 4-4 編組糸の顕微鏡画像

A:三つ編み三つ編みの顕微鏡写真、B:三つ編み 3 本束の顕微鏡写真、スケールバー:250 $\mu$ m

#### 4-1-4 繰り返し引張負荷による力学特性の変化について

繰り返し引張負荷を与え続けると、負荷に耐えられなくなったコラーゲン線維が損傷し弾性率が低下する<sup>29)</sup>。今回の引張負荷では弾性率が有意に下がったサンプルがなかったためどれも繰り返し負荷に耐えうることが示唆された。その中でも表 4-1 から 3BBs が直径、破断強度、伸長率において最も繰り返し前後での差が小さいことから繰り返し負荷に最も耐える可能性を示唆した。今回は負荷がかかっていない 0 回目と 50 回での比較を行っているため、詳細に調査するためにある程度繰り返し負荷をかけたあとのサンプルと数百回、数千回と繰り返し負荷をかけた後のサンプルで試験を行っていく必要がある。

表4-1 繰り返し引張前後での各パラメータの差

| $\Delta$            | 9Bs    | 3BBs  | BB    |
|---------------------|--------|-------|-------|
| 直径( $\mu\text{m}$ ) | 101.56 | 38.07 | 50.84 |
| 破断強度(mN)            | 44.17  | 68.00 | 29.19 |
| 弾性率(MPa)            | 9.35   | 1.80  | 9.89  |
| 伸長率(%)              | 5.42   | 1.58  | 5.72  |

#### 4-1-5 コラーゲンモデル軸の力学特性について

図 3-14 から 90 本束と編組させたサンプルどちらも弾性率が有意にさがっていることからスケールアップをしても編組による効果を受けることを示した。しかしながら、今回の 3 本束と三つ編み、9Bs と 3BBs と BB との比較、さらには PDS を用いた比較、全てにおいて弾性率を下げていたが有意ではなかった。有意な差がなかったのは別の要因があると考えられる。90 本のモデル軸での構造観察において、図 3-16 の SEM の画像から束の中の線維の構造に少し違いが見られた。束と比べて編組ではコラーゲン単糸一本一本のはっきりとした区別が難しい。この違いは 90 本モデルの作り方で差が現れたと考えられる。まず、束モデル軸は束にしてから架橋し編組モデル軸は架橋してから編組している。架橋のタイミングが違うため 30 本束が糸同士で架橋し合ったと考えられるまた、図 4-5A のフレームにコラーゲン糸を巻き付けた後に、フレームを伸ばすことで糸に荷重をかけながら乾燥させる。これは糸それぞれが均一に伸ばされるため巻き取り回数が違っても糸への荷重は同じである。その後 EDC 架橋をさせ、再び荷重乾燥を行う。これは図 4-5B のように両端をクリップではさみつるしながら乾燥させることで荷重乾燥を行っている。クリップの重さに荷重が依存しているため同じ方法でも 90 本束にかかる力と 30 本束にかかる力は同じであるが糸 1 本に対してかかる負荷は 3 倍になっている。そのため、30 本束がより伸ばされて、糸同士が融合したような構造になっていたと考えられる。

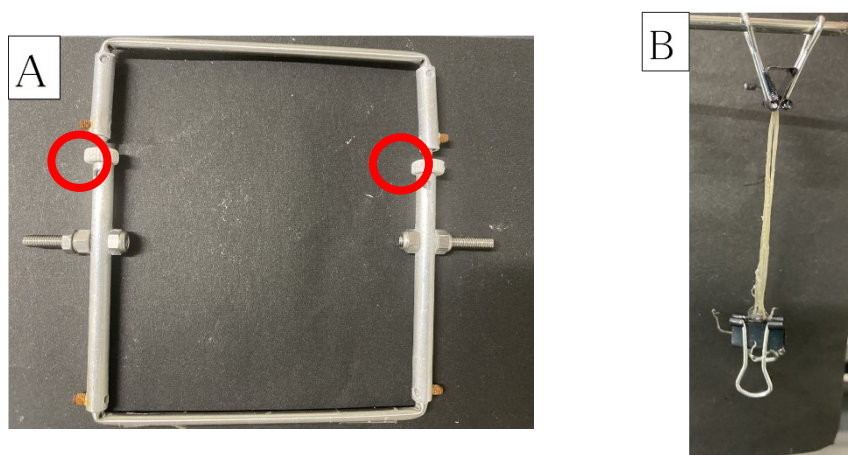


図 4-5 コラーゲン束荷重乾燥に用いる方法

A:巻き取り後の乾燥方法、赤丸:延長部位、B:EDC 架橋後の乾燥方法

## 4-2 コラーゲンモデル軸への細胞接着について

SEMと免疫蛍光染色を用いて軸への細胞接着確認を行った。3次元足場において多孔性であることは細胞接着、遊走においては有効であるとされている<sup>30)</sup>。編組はモデル軸内部に空間を生み出すことが出来るため多孔質であると言える。そのため、今回においても編組モデル軸が束モデル軸よりも細胞を多く確認できると考えた。しかしながら、H&E染色、SEM画像、免疫蛍光染色結果のいずれにおいても束モデル軸と同等もしくは、少ない様子が観察された。一般的に3次元足場へ細胞を接着させることは難しいとされ、スポンジやゲル、細胞シートと組合わせて細胞を播種している<sup>31)</sup>。本研究においては専用のV字シリコン型を用いて細胞のディッシュへの付着を防ぐ方法で行ったがさらなる改善が必要であると思われる。そのため、播種方法の改善が必要である。細胞の接着させる機会を増やすために1度播種してモデルを裏返してもう一度播種する、細胞包埋ゲルを塗布する等の例が考えられる。

また、観察方法の改善も必要である。モデル軸を切片にして染色することが出来なかったために、今回はSEMで細胞接着確認を行った。モデル軸を切片にするときに組織が抜け落ちてしまっていた。したがって、固定から包埋までの過程でパラフィンが十分に浸透していないことが考えられるため各手順での最適な時間を検討していく。SEMと免疫蛍光染色においては内部に焦点を当てた観察が難しいため編組では観察できなかった細胞が存在していると考えられるため、内部での細胞接着確認や基質産生を観察するためにもパラフィン切片の検討、改良を行っていく必要がある。

### 4-3 編組による遺伝子発現変化について

束モデル軸と編組モデル軸での遺伝子発現調査で靱帯関連遺伝子である Type 3Collagen が上昇し Tenomoduin が減少した。骨関連遺伝子である Type 1 collagen、Runx2 軟骨関連遺伝子である sox9 が抑制された。このことから編組することで靱帯化を促進することが示唆された。外部からの刺激がないこの二つのサンプルでの遺伝子発現の変化を考えると、細胞が接着する足場と関連しているのではないかと考えた。SEM の画像より、90 本束と 30 本三つ編みでは(局所的な密度)コラーゲン線維同士の間隔が違っている。束モデル軸では 1 本 1 本の糸が独立していて細胞も個々に接着している。一方、編組モデル軸では 30 本束内のコラーゲン単糸が局所的に密集している様子であったので、細胞認識部位が近くに集まっている可能性がある。細胞-ECM 間の接着機構はインテグリンと呼ばれる接着受容体が関与している接着である<sup>32)</sup>。細胞が ECM と結合することでインテグリンが活性化し、細胞の下部には接着斑(focal adhesion)と呼ばれる構造ができる。接着斑が形成されると、プロテインキナーゼである FAK (focal adhesion kinase) が自己リン酸化により活性化され、シグナル伝達を開始される。最ボイがそのため、細胞が接着する際に、細胞認識部位が密集していればその分刺激を受けたと考えられる。細胞と 1 本のコラーゲン糸だけを認識して接着した束モデル軸と 30 本の糸を面として認識した編組モデル軸でインテグリン結合箇所数が変わったために遺伝子発現に変化が見られた。

今後の展望としては、編組コラーゲン軸に細胞包埋コラーゲンを塗布し、靱帯部にはコラーゲン配向ファイバーを巻き、骨挿入部には骨分化誘導するとされているエラスチンランダムファイバーを巻いたモデルを作製し、ねじれ刺激、繰り返し負荷に対する影響を調査していく必要がある。

## 5 結論

本研究では、以下のような結論を得た。

1. 編組構造を持たせることでコラーゲンモデル軸の力学特性を制御出来ることが示唆された。
2. 繰り返し引張に対して、編組構造を持たせたコラーゲンモデル軸が耐えられる可能性を示した
3. コラーゲンモデル軸上への細胞接着が確認でき、遺伝子発現に影響を及ぼした。

以上のことから、コラーゲン系に編組構造を持たせることで、任意に力学特性を制御出来るモデル軸の作製に成功し、このモデル軸は組織工学的人工靱帯の材料として有効であると考えられる。



## 6 参考文献

- 1) Langer, R. , Vacanti, J.P. : science, 260, 920-926 (1993)
- 2) Ikeda, Y. : Connect. Tissue, 31, 213-219 (1999)
- 3) Douthon V. B. et al: Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006 ; 77A: 204-13
- 4) Zigang G. et al: Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2006 ; 77A: 639-652
- 5) Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 2007; 26: 7530-6.
- 6) Amis AA, Dawkins GPC. Functional anatomy of the anterior cruciate ligament: Fibre bundle actions related to ligament replacements and injuries. *J Bone Jt. Surg. Br.* 1991; 73: 260-267.
- 7) Noyes, et al.: *J. Bone joint surg.* , 58-A : 1077-1078 (1976)
- 8) Duthon VB, Barea C, Abrassart S, Fasel JH, Fritschy D, Menetrey JI. Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006 ; 14 : 204-13.
- 9) Chang CB, Choi JY, Koh IJ, Lee KJ, Lee KH, Kim TK (2011) Comparisons of femoral tunnel position and length in anterior cruciate ligament reconstruction: modified transtibial versus anteromedial portal techniques. *Arthroscopy* 27(10):1389–1394
- 10) Buss DD, Warren RF, Wickiewicz TL, Galinat BJ, Panariello R. Arthroscopically assisted reconstruction of the anterior cruciate ligament with use of autogenous patellar-ligament grafts. Results after twenty-four to forty-two months. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:1346–1355
- 11) Fujikawa and Seedhom, K.F. Fujikawa, B.B. Seedhom: Arthroscopy after anterior cruciate reconstruction with the Leeds-Keio ligament *J. Bone Joint Surg.*, 71 (1989), pp. 566-570
- 12) T.M. Tiefenboeck, E. Thurmaier, M.M. Tiefenboeck, R.C. Ostermann, J. Joestl, M. Winnisch, M. Schurza, S. Hajdua, M. Hofbauer: Clinical and functional outcome after anterior cruciate ligament reconstruction using the LARS™ system at a minimum follow-up of 10 years *The Knee* (2015) Accepted, In Press
- 13) M.F. Guidoin, Y. Marois, J. Bejui, N. Poddevin, M.W. King, R. Guidoin Analysis of retrieved polymer fiber based replacements for the ACL *Biomaterials*, 21 (2000), pp. 2461-2474
- 14) 山本星都. 靱帯-骨段階構造再生を目指した組織工学的な人工靱帯開発のための動的刺激の効果 2021 修士論文
- 15) panel Joseph W. Freeman and Mia D. Woods and Cat T. Laurencin. Tissue engineering of the

- anterior cruciate ligament using a braid-twist scaffold design, *Journal of Biomechanics*;2007;40:2029-36
- 16) D. Amiel, E. Billings, W.H. Akeson Ligament structure, chemistry and physiology;1990:77-99
  - 17) 井水治博. はじめて学ぶ繊維. 日刊工業新聞社.2011
  - 18) 桜田一郎. 繊維の化学. 三井出版株式会社. 1979
  - 19)Helen H. Lu et al : Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials* Volume 26 (2005):4805-4816
  - 20) 長谷美里. 靱帯組織再生のためのコラーゲン単糸作製と特性制御.2019:卒業論文
  - 21)Consuelo et al: Elastin Development-Associated Extracellular Matrix Constituents of Subepithelial Connective Tissue in Human Pterygium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* October 2014, Vol.55, 6309-6318.
  - 22) Lavanya et al: Nanoparticulate delivery of agents for induced elastogenesis in three-dimensional collagenous matrices.*Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*;Volume10, Issue12
  - 23) Yuwan Li et al: Differentiation of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells into Human Anterior Cruciate Ligament Fibroblast Cells by In Vitro Coculture. *Bio med research international*,2017; Volume 2017;15 pages
  - 24) Kaisa Vuornos et al: Human Adipose Stem Cells Differentiated on Braided Polylactide Scaffolds Is a Potential Approach for Tendon Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*. 2016 Mar;22(5-6):513-23.
  - 25) Ming Bai et al: miR-182-5p overexpression inhibits chondrogenesis by down-regulating PTHLH. *cell biology international*; 2019 Mar;43(3):222-232.
  - 26)Jin Kyu Lee et al: Anterior cruciate ligament remnant cells have different potentials for cell differentiation based on their location. *Sci Rep* ;10, 3097 (2020).
  - 27)AmitRawal, ApurvSibal, Harshvardhan Saraswat, Vijay Kumar :Geometrically controlled tensile response of braided sutures, *Materials Science and Engineering: C* Volume 48, 2015, 453-4561
  - 28) Marco Franchi,Milena et al: Crimp morphology in relaxed and stretched rat Achilles tendon. *Journal of Anatomy* Volume210(2006):1-7
  - 29)Thornton, GM, Schwab, TD, Oxland, TR. Fatigue is more damaging than creep in ligament revealed by modulus reduction and residual strength. *Ann Biomed Eng*. 2007;35(10):1713-1721.



- 30) Vaquette C, Kahn C, Frochot C, Nouvel C, Six JL, De Isla N, Luo LH, Cooper-White J, Rahouadj R, Wang X. Aligned poly(l-lactic-co-e-caprolactone) electrospun microfibers and knitted structure: A novel composite scaffold for ligament tissue engineering. J Biomed Mater Res A 2010;94:1270–1282
- 31) Cedryck Vaquette et al: Combining electrospinning and cell sheet technology for the development of a multiscale tissue engineered ligament construct (TELC). Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials Volume 106, Issue 1(2017)399-409
- 32) 水谷 直紀：細胞外基質と動的培養による人工靱帯再生技術の開発 ,平成 21 年度修士論文, 2010

## 7 謝辞

本研究及び、卒業論文作成にあたり、ご指導、ご鞭撻のほどいただきました三重大学工学部 宮本 啓一 教授、晝河 政希 助教授に深く御礼申し上げます。宮本先生には実験を進めていくにあたり、多くの助言を頂き、また、実験に必要な装置を作製して頂くなど様々な面で助けていただきました。晝河先生には基本的な実験から、研究まで多くの助言を頂き、さらには、研究に行き詰まったときに最後まで助力していただき本当に有難うございました。

また、修士論文発表にあたり副査を担当していただきました 湊元 幹太 教授に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、研究室の皆様のご指導、アドバイス等誠に有難うございました。特に、同じ靱帯に関するテーマを持つ M2 の長谷美里さん、M1 の森田透地くんには実験のサポートやご指導、研究内容に関しての事細かで貴重なご意見を頂いただけではなく、研究者としての心構えや、あり方や発表の仕方・見せ方なども教えて頂きました。心から感謝いたします。

研究室の事務の仕事をされている村上節子さんには研究室生活で様々な形でご支援をしていただきました。有難うございました。

毎日ともに過ごした M2、M1、4 年生の皆さまには、とても有意義な研究生活を送ることができました。感謝しています。有難うございました。

最後に、大学院までの 6 年間、多くの援助をしてくださった両親に深く感謝いたします。本当に有難うございました。

令和 3 年 2 月  
長瀬 周平