

令和3年度 修士論文

脂肪由来間葉系幹細胞の分化誘導を
用いた人工椎間板組織の作製に関する研究

三重大学工学研究科分子素材工学専攻

生体材料化学研究室

吉村 尚親

目次

1. 諸言・・・・・・・・・・・・・1

1-1 椎間板

1-1-1 椎間板の構造

1-1-2 髄核

1-1-3 線維輪

1-1-4 プロテオグリカン (proteoglycan:PG)

1-1-5 グリコサミノグリカン (Glycosaminoglycan:GAG)

1-1-6 椎間板変性

1-1-7 椎間板ヘルニアの治療法

1-2 再生用材料

1-2-1 椎間板疾患治療における再生用材料

1-2-2 脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose-derived stem cells ;ASC)

1-2-3 骨形成因子-13 (Bone morphogenetic protein -13 ;BMP-13)

1-2-4 結合組織増殖因子 (Connective tissue growth factor ;CTGF)

1-2-5 コラーゲン

1-2-6 硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)

1-3 以前の研究

1-3-1 GS とサイトカインの親和性

1-3-2 GS の細胞に対する影響

1-4 目的

2. 方法・・・・・・・・・・・・・11

2-1 ジェラン材料の作製

2-1-1 フリー化ネイティブ型ジェラン(FG)の作製

2-1-2 硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)の作製

2-1-3 硫酸化率測定

- 2-1-4 GS の分子量測定
- 2-1-5 GS-biotin-streptavidin-HRP 作製
- 2-1-6 GS-BMP-13 アフィニティー調査
- 2-1-7 GS-NG の作製
- 2-1-8 NG ゲルビーズの作製

2-2 細胞培養

2-3 二次元培養における ASC の NP 様細胞分化検討

- 2-3-1 ASC に対する GS,BMP-13 の影響調査
- 2-3-2 遺伝子発現解析

2-4 二次元培養における ASC の AF 様分化検討

2-5 三次元培養における ASC の NP 様分化検討

- 2-5-1 NP モデル作製
- 2-5-2 静水圧加圧培養
- 2-5-3 動的加圧培養

2-6 三次元培養における ASC の AF 様分化検討

- 2-6-1 コラーゲンの抽出
- 2-6-2 コラーゲン膜作製
- 2-6-3 コラーゲン糸の作製
- 2-6-4 配向コラーゲン膜の作製
- 2-6-5 三次元培養における ASC の AF 様分化検討

3.結果・・・・・・・・・・36

3-1 GS 作製および特性評価

3-2 二次元培養における ASC の NP 様細胞分化検討

3-3 二次元培養における ASC の AF 様細胞分化検討

3-4 三次元培養における ASC の NP 様細胞分化検討

- 3-4-1 NG ビーズおよび加圧の NP モデルにおける影響調査

3-4-2 GS 含有 NP モデルにおける影響調査

3-5 三次元培養における ASC の AF 様細胞分化検討

4.考察……………63

4-1 GS 特性評価

4-2 二次元培養における ASC の NP 様分化誘導

4-3 二次元培養における ASC の AF 様分化誘導

4-4 三次元培養における ASC の NP 様分化誘導

4-5 三次元培養における ASC の AF 様分化誘導

4-6 椎間板組織モデル培養としての展望

5.結論……………76

6.参考文献……………77

7.謝辞……………81

1. 緒言

1-1 椎間板

椎間板とは椎骨と椎骨の間に存在し、背骨にかかる圧力の吸収や椎骨間の可動を担う軟骨組織である。

1-1-1 椎間板の構造

椎間板は大きく分けて二つの構造から成っており、中央のゲル状の「髄核(Nucleus pulposus)」と髄核を取り囲む層状構造の「線維輪(Anulus fibrosus)」で構成されている(Fig.1-1-1)。髄核が椎骨にかかる荷重や衝撃を横方向に分散することによって吸収し、線維輪が荷重により広がろうとする髄核を保護することにより椎骨の衝撃吸収と柔軟性維持をする支持軟骨としての重要な役割を果たしている。椎間板は常に圧力がかかっており、Table 1-1-1 に示すように仰向けに寝ているとき 0.1MPa、立っているとき 0.5MPa、机に向かって作業をするとき 0.83MPa 程度であり、様々な強さの圧力がかかっている⁽¹⁾。他の脊椎動物と比較して、ヒトは二足歩行や座位をとるため椎間板の負荷が大きく、疾患が生じやすい組織である。しかし、椎間板は人体内で無血管組織である。従って、血管が内部に存在せず、栄養は椎骨に存在する血管からの浸透のみであるため、組織内への栄養供給が乏しく、人体の他の組織以上に損傷時の自己修復が極めて困難である。

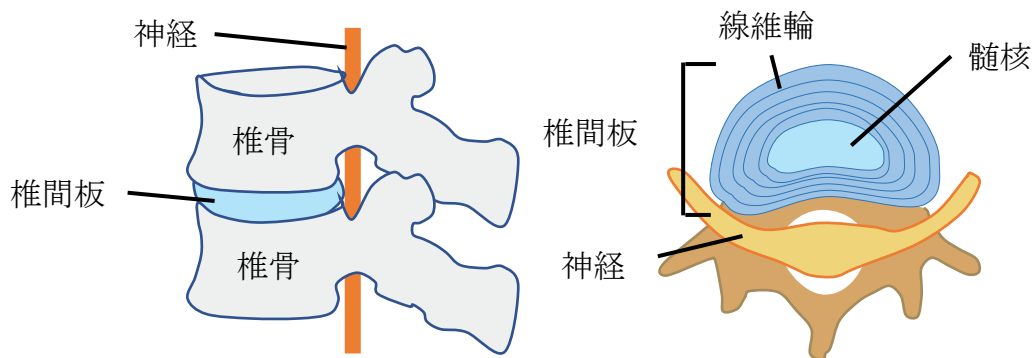


Fig.1-1-1 椎間板の模式図

Table 1-1-1 姿勢と椎間板にかかる負荷⁽¹⁾

仰向け:0.1 MPa	横たわる:0.12 MPa
椅子に座る:0.83 MPa	椅子から立つ:1.10 MPa
リラックスして立つ:0.50 MPa	姿勢を正して立つ 1.10 MPa
歩く: 0.53 - 0.65 MPa	ジョギング: 0.35 - 0.95 MPa

1-1-2 髄核(NP:Nucleus pulposus)

NP は非常に水分量の多いゲル状の軟骨組織であり、椎間板にかかる圧力の分散をしている。NP の主な構成成分は水分 70~90%であり、乾燥重量においてはプロテオグリカン (proteoglycan; PG) 50%、II 型コラーゲン 20%である⁽²⁾。

また、髄核には髄核細胞が存在しており、これは軟骨細胞に属する。髄核細胞は約 4×10^6 cells/mL の細胞密度で存在している⁽²⁾。また、髄核細胞は基質内で2~3個単位で非接触的に存在している (Fig.1-1-2)⁽³⁾。軟骨細胞の特徴として二次元培養により本来の軟骨としての機能を失う脱分化を引き起こすという報告がある⁽⁴⁾。生体内の髄核細胞が脱分化する事で、PG や II 型コラーゲンの発現量が低下し、椎間板機能が損失することで椎間板変性に繋がると考えられている。髄核細胞のマーカー遺伝子として T-box transcription (T-box ; Brachyry) や Cytokelatin8, 18, 19(KRT8, 18, 19)などが報告されている⁽⁵⁾。



Fig.1-1-2 組織中の NP 細胞⁽³⁾

1-1-3 線維輪(AF:Annulus fibrosus)

線維輪は 15~25 層の同心円状から成るラメラ層であり、隣接するラメラ層は反対方向に配向した繊維性軟骨組織である。椎間板にかかる負荷により広がろうとする髄核を保護する組織である。線維輪の主な構成成分は水分 60~70%、乾燥重量において PG 25%、I 型コラーゲン 50~60%である⁽⁶⁾。線維輪の内側から外側にかけて I 型コラーゲン/II 型コラーゲンの割合が高くなり、内側では I 型: II 型=68:32、外側では I 型: II 型=84:16 である⁽⁷⁾。

線維輪には線維輪細胞が存在しており、髄核細胞と同様に軟骨細胞であるため脱分化を引き起こすと考えられる。線維輪細胞は約 $3 \sim 9 \times 10^6$ cells/mL の細胞密度で存在している⁽²⁾。また、線維輪細胞のマーカー遺伝子として Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) や Tenomodulin (TNMD)、Mohawk homeobox (MKX)、Scleraxis (SCX)が報告されている⁽⁸⁾。

1-1-4 プロテオグリカン(proteoglycan: PG)

PGとはコアタンパク質に側鎖としてグリコサミノグリカン(Glycosaminoglycan; GAG)が共有結合している糖タンパクである。椎間板において、高浸透圧性による高い水分量の保持に寄与している。また、結合したGAGにより細胞へ影響を与える。

1-1-5 グリコサミノグリカン(Glycosaminoglycan: GAG)

GAGとはアミノ糖(ガラクトサミン、またはグルコサミン)とウロン酸(グルクロン酸、またはイズロン酸)またはガラクトースの二糖の繰り返し構造から成る酸性ムコ多糖である。多数の硫酸基とカルボキシ基を持つため、強く負に帯電して種々のタンパク質と静電的な力で親和性を持ち、相互作用により細胞の増殖や分化に働きかけると報告されている⁽⁹⁾。軟骨組織である椎間板ではコンドロイチン硫酸が多く含まれている。以下にコンドロイチン硫酸の構造を示す。

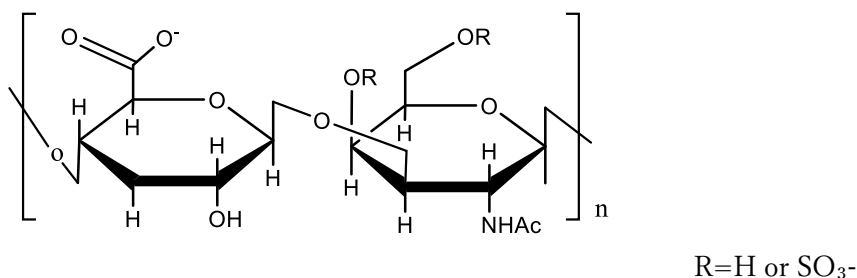


Fig.1-1-3 コンドロイチン硫酸の構造

1-1-6 椎間板変性

主な椎間板の疾患として椎間板変性がある。代表的なものとして椎間板ヘルニアが挙げられる。椎間板ヘルニア患者数は人口の約1%とされており、手術患者は人口10万人あたり年間46.3人である⁽¹⁰⁾。加齢、労働、喫煙、遺伝などが主な原因とされている。また、不規則な加圧刺激によりNP細胞やAFの機能損失を誘導し、椎間板変性に繋がると考えられている⁽¹¹⁾。椎間板の変性や強い負荷により線維輪に亀裂が入ることや軟骨終板の接着面が裂けることにより髄核が突出し、神経を圧迫することにより痛みが生じ、重度の場合は神経麻痺や膀胱直腸障害などの症状を引き起こす。

1-1-7 椎間板ヘルニアの治療法

椎間板ヘルニアの治療法は軽度の場合、保存療法が用いられる。保存療法は椎間板への負荷を減らすためにコルセットの着用、痛みを緩和するための神経ブロック注射、鎮痛消炎剤の服用、腰部のマッサージなどにより痛みを抑え、ヘルニアが自然吸収されるのを待つ対処療法である。これらは手術を行わないため体への負担は少ないが、長期の療養期間が求められる。

軽度～中度の場合には多くの手術法が存在する。椎間板に損傷がない場合にはヘルニアをレーザーにより除去する Percutaneous Laser Disc Decompression (PLDD) 法やオゾンによりヘルニアの自然吸収を促進する Percutaneous Ozone Disc Decompression (PODD) 法が用いられ、椎間板が損傷を受けている場合には髄核部にインプラント化するジェルを注入して機能保護をする Percutaneous Implant Disc Decompression (PIDD) 法や損傷部位に薬剤を注入し再生を促す Disc Seal Treatment (DST) 法などが用いられる。これらは体への負担が小さい手術とされ、より速い痛みの改善が期待できる療法である⁽¹²⁾。

神経麻痺や膀胱直腸障害などがみられるような重度の場合には椎間板そのものを摘出する手術療法が用いられる。これは背中を数十 cm 切開し、椎間板を摘出し、椎間板の部分には高分子材料や金属材料を用いることで椎間板補助をするものである⁽¹³⁾。



Fig.1-1-4 椎間板補助装置の図⁽¹³⁾

1-2 再生用材料

再生用材料とは損傷した組織の代替物としての人工材料に細胞を組み合わせることで、損傷した組織の機能および再生を助ける働きをもつ材料のことである。

1-2-1 椎間板疾患治療における再生用材料

椎間板は無血管組織であるため修復のための栄養が乏しく、自己修復が困難な組織である。椎間板に直接働きかけ内部から細胞の基質産生により組織の自己修復を促すような再生用材料の利用が有効であると考えた。本研究では基質産生により椎間板修復をする細胞や細胞による目的基質の産生を促すためのサイトカインを用い、サイトカインを長期的且つ効果的に作用させる事で椎間板変性治療における完治を目的とした椎間板モデルを用いた再生用材料の作製に焦点を当てた。

1-2-2 脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose-derive stem cells: ASC)

椎間板内の細胞である髄核細胞は増殖能が低く、*in vitro* の通常培養により再生材料や細胞移植やモデルに用いる細胞数まで増殖させることが困難であるとされている⁸⁾。また、疾患部治療のために正常である椎間板から細胞を獲得することは取り出された正常椎間板の変性を引き起こす可能性があるため、現実的ではない。これらの解決のために ASC に注目をした。

ASC とは幹細胞の一種である。幹細胞とは自己複製能と多分化能をもつ細胞であり、主に胚性幹細胞、体性幹細胞、iPS 細胞などが挙げられる。ASC の属する体性幹細胞は生体組織内に存在し、さらに詳細には造血幹細胞・神経幹細胞・間葉系幹細胞に分類され、ASC は間葉系幹細胞 (MSC) に属する。ASC は間葉系の細胞のみへの分化という制限を持っているが、脂肪吸引術によって比較的容易に単離できるという利点を持っている。

生体内に存在する様々な体細胞は分化が完遂し成熟すると、複数回の増殖を繰り返すことで DNA 中に存在するテロメア領域が短縮され、増殖不可能なヘイフリック限界に到達する。このように体細胞はいずれ寿命による細胞死を迎える。一方で幹細胞はヘイフリック限界による干渉を受けないため、寿命を迎えた細胞の代わりとなるべく増殖し、必要な細胞へと分化を行う。通常は線維芽細胞が構成する幹細胞ニッチと呼ばれる微小環境に存在することで未分化の維持を行っている。

MSC は国際細胞療法学会 (ISCT) により次のように定義されている⁽¹⁴⁾。

- ① プラスチックに接着性を持つ。
- ② 表面マーカー(-) : CD14、CD11b、CD19、CD79 α 、CD34、CD45、HLA-DR
- ③ 表面マーカー(+): CD73、CD90、CD105
- ④ 軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞へ分化できる。

1-2-3 骨形成因子-13 (Bone morphogenetic protein: BMP-13)

BMP-13 は約 16KDa のサブユニットのホモ二量体として存在しており、Transforming Growth Factor- β (TGF- β) と 20 - 30% の相同性を示す TGF- β スーパーファミリーの一つである⁽¹⁵⁾。BMP-13 は別名 GDF-6 (Growth differentiation factor-6) や CDMP-2 (Cartilage-Derived Morphogenetic Protein-2) と呼ばれる。BMP-13 を含む TGF- β ファミリーは増殖、分化、遊走を含む細胞プロセス、ならびに胚発生、血管形成、および創傷治癒を含む生理学的プロセスの遍在性かつ必須の調節因子である⁽¹⁶⁾。BMP-13 は骨格の発達や胚の成長と分化に関連するタンパク質である。BMP ファミリーと TGF β ファミリーの違いは、BMP は Smad 1/5/8 経路を介したシグナル伝達を促進するが、TGF- β ファミリーは Smad 2/3 経路を介したシグナル伝達を促進する⁽¹⁷⁾。

BMP-13 はヒト NP 細胞によって発現されている事が報告されている。また、BMP-13 を幹細胞へ適用する事で NP 様に分化する事が報告されている⁽¹⁸⁾。

1-2-4 結合組織増殖因子(Connective tissue growth factor: CTGF)

CTGF (Connective Tissue Growth Factor: 結合組織成長因子)は、4 つのモジュールで構成される 38 kDa のシステインに富むタンパク質である。CTGF は細胞表面および ECM タンパク質と同様にいくつかの成長因子と相互作用する能力が与えられ、ECM 合成および、細胞遊走、増殖、分化を含むいくつかのモジュレーターとして機能する⁽¹⁹⁾。また、発生および血管リモデリング、骨格形成の必須メディエーターとして機能するマトリックス細胞タンパク質として知られている⁽²⁰⁾。

また、別名 CCN2 とも呼ばれ、CCN ファミリーは、Cystein-rich 61 (Cyr61:CCN1), Connective tissue growth factor (CTGF:CCN2), Nephroblastoma Overexpressed (Nov:CCN3) の 3 つの頭文字をとって命名された現在 6 種からなる、特徴的な 4 つのモジュール構造を有するタンパク質ファミリーである。

MSC に及ぼす影響として CTGF を添加することにより、線維芽細胞に分化し、基質産生が向上されることが示されている⁽²¹⁾⁽²²⁾。

1-2-5 コラーゲン

コラーゲンは膠原線維の一部であり、1 分子当たり分子量が約 300kDa、長さは約 300nm、太さは約 1.5nm である。3 本のポリペプチド鎖が絡み合って三重らせんを形成している (Fig. 1-2-1)。組織中での役割として、剛性を担う。含まれる組織として、特に皮膚や骨、軟骨、腱、血管壁、歯などの硬い組織に多く存在している。脊椎動物では最も大量に存在するタンパク質である。

コラーゲンの構造として 3 本のポリペプチド鎖 (α 鎖) がらせん状構造をとる特徴的な構造(コラーゲンヘリックス)をしている。コラーゲン分子の両端部分はテロペプチドになっており、ヘリックス構造を持たない。テロペプチドは抗原性を示すためバイオマテリアルへ応用する際にはペプシン処理によりテロペプチドを除去し、抗原性の低いアテロコラーゲンとして利用されている。コラーゲンのアミノ酸組成は特徴的で、30%近くは Gly、15~30%は Pro またはヒドロキシプロリン(Hyp)残基である。アミノ酸配列は Gly-X-Y の繰り返し構造から成り、X の位置には Pro、Y の位置には Hyp が多いことが知られている⁽²³⁾。

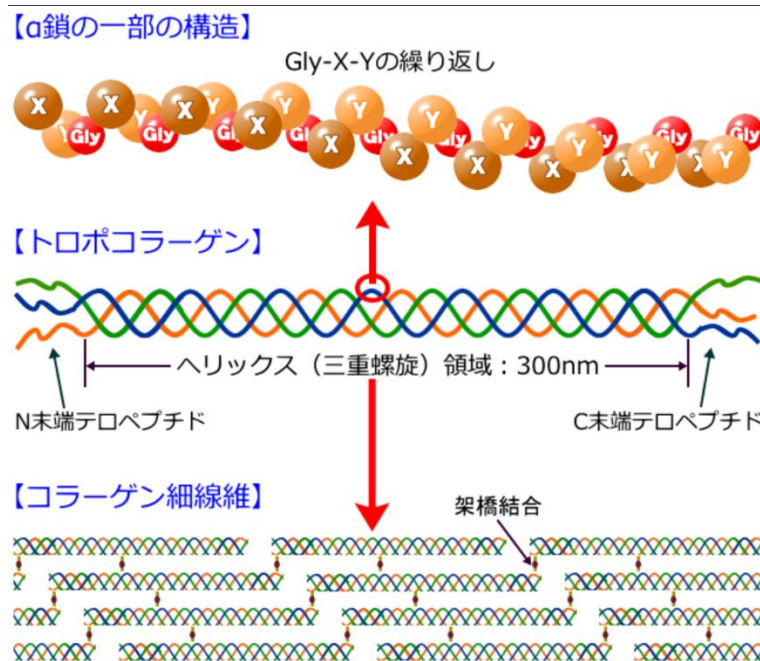


Fig. 1-2-1 コラーゲン分子およびコラーゲン線維

本研究では、不溶コラーゲンをクエン酸処理することで水溶化することができ、これを水溶性コラーゲンとした。さらに塩化ナトリウムの濃度により I, III型コラーゲンに分画を行った。

1-2-6 ジェランガム

ジェランガムは *sphingomonas elodea* という微生物が産生する多糖であり、アニオン性ポリマーである。熱可塑性ハイドロゲルを形成し、グミやゼリーなどのゲル化剤として利用されている⁽²⁴⁾。ネイティブ型ジェランと脱アシル型ジェランの二種類が存在する。ジェランガムは生体適合性が証明されており、生体材料として利用が可能であると考えられる⁽²⁵⁾。本研究では、ジェランガムに化学修飾を行うことで、椎間板内のグリコサミノグリカンと類似した構造と特性を持つ物質の作製を行った。

・ネイティブ型ジェランガム (NG)

ネイティブ型ジェランガム (Native gellan gum) 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ガム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。ネイティブ型はゆるく弾力のあるゲルを形成する。ゲル化の機構として、

90°C以上で加熱溶解することによって水和状態になり、ランダムコイルを形成する。さらに冷却することで二重螺旋を形成し二重螺旋に含まれるグリセリル基が相互作用により二重螺旋を安定化することによりゲル化する⁽²⁶⁾。ネイティブ型ジェランガムの構造を Fig.1-2-2 に示す。

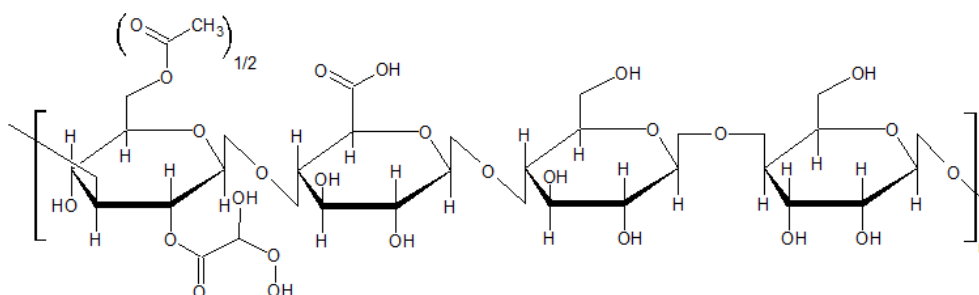


Fig.1-2-2 NG の構造

・硫酸化ネイティブ型ジェラン

硫酸化ネイティブ型ジェラン(Native type Gellan Sulfate; GS)はネイティブ型ジェランをクロロスルホン酸と反応させ硫酸基を導入した硫酸化多糖類である。硫酸化を行うことでコンドロイチン硫酸と類似した構造となる。常温では NG は不溶、または溶解に伴うゲル化を示す事に対し、GS は高い溶解性を示す。GS の構造を Fig.1-2-3 に示す。

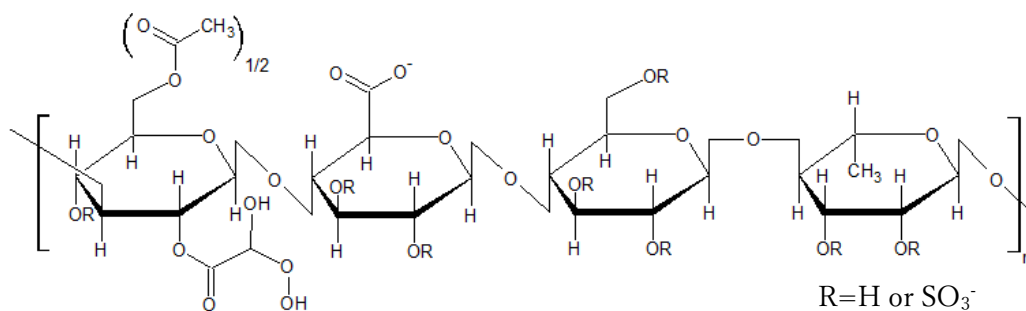


Fig.1-2-3 GS の構造

1-3 以前の研究

1-3-1 GS とサイトカインの親和性

以前の研究から GS とサイトカインのアフィニティーとして創傷治癒の初期に細胞接着や増殖に関与する細胞外基質で、プロテオグリカンであるヘパリンとの結合部位を持つテネイシン-C や組織修復の増殖因子でヘパリンとの親和性が高い塩基性-線維芽細胞成長因子 (b-FGF) と高い親和性を持つことが知られている⁽²⁷⁾ (Table 1-3-1)。

Table 1-3-1 テネイシン、b-FGF に対する GS の親和性⁽²⁷⁾

GS 硫酸化率	テネイシンとの結合定数 $K_A[M^{-1}]$	b-FGF との結合定数 $K_A[M^{-1}]$
28%	2.88 E+10	2.50 E+11
43%	7.94 E+10	
77%	2.92 E+10	

1-3-1 GS の細胞に対する影響

髄核細胞は軟骨細胞に属する細胞であり、髄核細胞のような軟骨細胞は二次元培養により脱分化を示す事が知られている。脱分化により、本来の機能である II 型コラーゲンやプロテオグリカンなどの軟骨基質および遺伝子の発現が減少し、I 型コラーゲンの発現が増加する。以前の研究において、二次元培養後の髄核細胞に対して硫酸化率 9.93%、18.74%、37.85% の GS を添加する事により、脱分化マーカーである I 型コラーゲンや CD90 の発現量の減少、軟骨マーカー遺伝子である SOX-9 の発現量の上昇が報告された。また、SOX-9 の遺伝子発現上昇は GS 硫酸化率が高いほど大きくなることから、硫酸化率が高いほど軟骨誘導に有効であるということが報告された (Fig.1-3-1)⁽²⁸⁾。

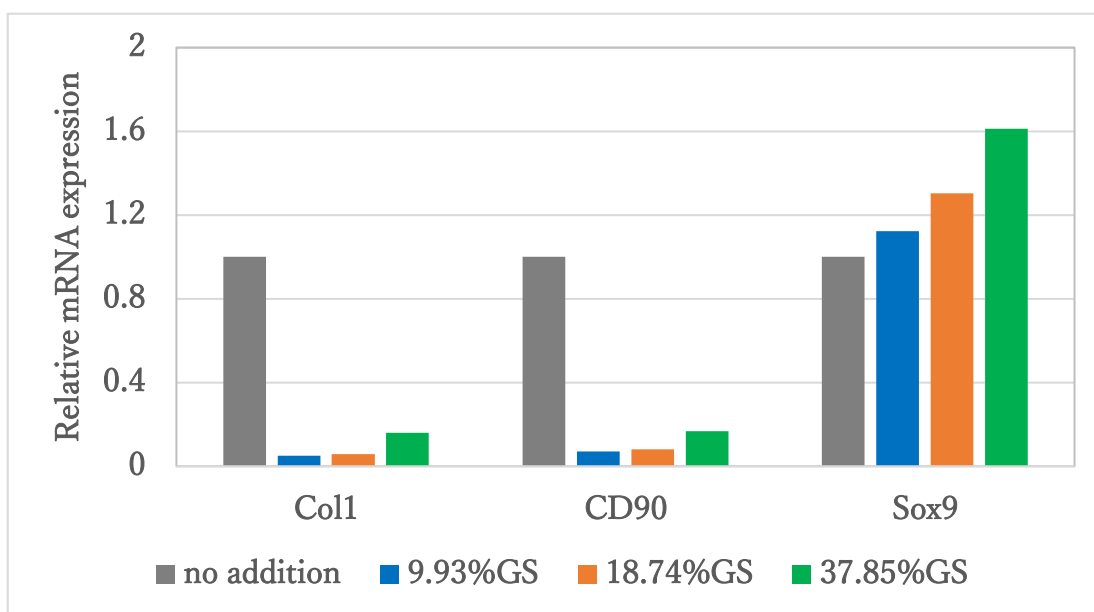


Fig.1-3-1 GS 添加 NP 細胞の遺伝子発現変化(硫酸化度依存)⁽²⁸⁾

9.93%、18.74%、37.85%の硫酸化率であるGSをNP細胞へ添加して7日間培養した後の遺伝子発現変化を示した。GSを加えない条件をno additionとした。

1-4 目的

変性椎間板疾患は腰痛を引き起こし、世界中で多くの患者が存在している疾患である。重度の場合の変性椎間板疾患はさらに深刻である。治療方法としては、背景で述べたような方法があるが、重度のヘルニア治療における完治療法がないという課題を解決する案として本研究では生体材料を用いて元の椎間板に近い組織工学的椎間板を作製しようと考えた。

本研究ではゼラン材料や細胞外基質を用いた椎間板組織の構造の特徴を模倣したモデルとGSとBMP-13やCTGFなどのサイトカインを複合する事による分化誘導を調査した。さらに、分化効果を増強するための刺激として、静水圧刺激と動的圧力刺激を加える事による影響を調査した。

2. 方法

2-1 ジェラン材料の作製

2-1-1 フリー化ネイティブ型ジェラン(FG)の作製

GS 作製時にネイティブ型ジェランを溶媒に溶解させる必要がある。ネイティブ型ジェランは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。そこでネイティブ型ジェランの溶解性向上のために、グルクロン酸のカルボキシル基から塩を取り除くフリー化を行った。

【試薬】

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

【使用器具】

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

【実験操作】

- ① セパラブルフラスコに脱イオン水 800 mL を入れた。
- ② ネイティブ型ジェラン 4.0 g を加えて 70°C で 20 時間攪拌した。
- ③ 溶液が pH 3 以下になるまで 1 N の塩酸を加えた。
- ④ 攪拌しながら室温まで冷却した。
- ⑤ 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 得られたフリー化ネイティブ型ジェランはミキサーにより粉末化した。

2-1-2 硫酸化ネイティブ型ジェラン(GS)の作製

フリー化を行ったネイティブ型ジェランを DMF に溶解し、硫酸化剤としてクロロスルホン酸を用いてネイティブ型ジェランの水酸基に硫酸基を導入することで GS の作製を行った。

【試薬】

- ・フリー化ネイティブ型ジェラン(FG)(2-1-1 より作製)
- ・N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)(和光純薬)
- ・クロロスルホン酸(和光純薬)
- ・水酸化ナトリウム(和光純薬)
- ・アセトン(和光純薬)

【使用器具】

- ・1000 mL セパラブルフラスコ
- ・スパチュラ
- ・ピペット
- ・薬包紙
- ・ピペッター
- ・ジムロート
- ・攪拌棒
- ・pH メーター
- ・パラフィルム
- ・2L マイヤーフラスコ
- ・攪拌機
- ・攪拌子
- ・恒温槽
- ・スターラー
- ・氷水
- ・ブフナーロート
- ・塩化カルシウム管
- ・ガラスフィルター
- ・二方コック
- ・アスピレーター
- ・窒素混入ゴム風船
- ・ビーカー
- ・スタンド
- ・透析チューブ
- ・クランプ
- ・耐圧ビン
- ・クランプホルダー
- ・凍結乾燥機

【実験操作】

- ① DMF を蒸留した。
- ② セパラブルフラスコに DMF 60 mL を入れ、窒素置換を行いながら氷水中で 20 分間攪拌した。
- ③ クロロスルホン酸 7.5 mL を加えて 20 分間攪拌した。
- ④ フリー化ネイティブ型ジェラン 2.0 g を加えた。
- ⑤ 氷水中で 20 時間攪拌した。
- ⑥ 80°C で 20 分間攪拌した。
- ⑦ 60°C で 2 時間攪拌した。
- ⑧ 氷水中で 20 分間攪拌した。
- ⑨ 攪拌しながら 2 M の水酸化ナトリウム水溶液で中和した。
- ⑩ 反応溶液をアセトンに滴下し、再沈殿させた。
- ⑪ 沈殿物を脱イオン水に溶解させ、透析した。
- ⑫ 遠心分離および 0.35 μ m フィルター濾過により、濾液と沈殿物を分離した。
- ⑬ 得られた濾液を凍結乾燥した。

2-1-3 硫酸化率測定

GS の硫酸化率測定を行うために、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から、硫黄の含有率を求め、そこから硫酸化率(水酸基から硫酸基に置換した割合)を算出した。

【試薬】

- ・硫酸化ネイティブジェラン(GS)(2-1-2 より作製)
- ・硫酸(和光純薬)
- ・ジメチルスルホナゾⅢ(和光純薬)
- ・エタノール(日本アルコール販売株式会社)
- ・塩化バリウム(和光純薬)
- ・過酸化水素水(和光純薬)
- ・水酸化ナトリウム(和光純薬)
- 工業株式会社)

【使用器具】

- ・ろ紙
- ・はさみ
- ・ピンセット
- ・シャーレ
- ・スパチュラ
- ・薬包紙
- ・FHO-A 型フラスコ
- ・ピペット
- ・ピペッター
- ・ガスバーナー
- ・O₂ ガスボンベ
- ・ワニロクリップ
- ・スライダック
- ・氷水
- ・50mL メスフラスコ
- ・ビーカー
- ・攪拌子
- ・スターラー
- ・pH メーター
- ・サンプルビン
- ・ビュレット

【試薬の調製】

50%エタノール溶液

脱イオン水 50mL とエタノール 50mL を混合した。

0.1%ジメチルスルホナゾIII溶液

脱イオン水 50mL にジメチルスルホナゾIII50mg を溶解した。

0.005M 塩化バリウム水溶液

脱イオン水 1000mL に塩化バリウム 1.0412g を溶解した。

0.02M 水酸化ナトリウム溶液

脱イオン水 100mL に水酸化ナトリウム 80mg を溶解した。

【力価(factor)の測定】

- ① メスフラスコに 1N の硫酸 1.0mL を入れ、50%のエタノールで正確に 50mL とした。
- ② ①で調製した 0.01N の硫酸 3.0mL に 5%のエタノール 17mL を加えて 20mL とした。これを 3 本用意した。
- ③ 指示薬である 0.1%のジメチルスルホナゾIII溶液を 2 滴加え、0.005M の塩化バリウム水溶液で滴定した。
- ④ ブランクとして 50%のエタノール 20mL も同様に滴定した。
- ⑤ 硫酸-エタノール溶液の平均滴定量からブランクの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 の塩化バリウム水溶液 1.0mL は硫黄 0.1603mg に相当する。
よって力価(factor)は得られた結果を式(1)に代入することにより求めた。

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

【実験操作】

- ① 直接手で触れないようにろ紙をはさみで切った。
- ② 硫酸化ネイティブジェラン 20mg をろ紙で包んだ。
- ③ FHO-A 型フラスコに脱イオン水 5.0mL、30%の過酸化水素水 4～5 滴を加えて内部を濡らした。
- ④ 白金バスケットをガスバーナーで焼いた。
- ⑤ ろ紙に包んだ硫酸化ネイティブジェラン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、フラスコ内部を 30 秒間酸素置換した。
- ⑦ 活栓と共栓を閉じてワニロクリップで止めた。
- ⑧ ワニロクリップをスライダックにつないだ。
- ⑨ 電圧をかけ、ろ紙に包んだ硫酸化ネイティブジェランを燃焼させた。
- ⑩ フラスコを氷水中に入れて 30 分間静置した。
- ⑪ 白金バスケット上部のメスピペットに脱イオン水 5.0mL、99%のエタノール 10mL を加え、活栓を開きフラスコ内を洗浄した。
- ⑫ フラスコ内を 50%のエタノールでさらに洗浄しながら溶液を 50mL メスフラスコに移し、50%のエタノールで正確に 50mL とした。
- ⑬ 溶液をビーカーに移し換え、攪拌しながら 0.02M の水酸化ナトリウム水溶液で pH6～7 に調節した。
- ⑭ 溶液を 5.0mL ずつ 10 本のサンプルビンに入れ、0.1%のジメチルスルホナゾIII 溶液を 2 滴加えた。
- ⑮ 0.005M の塩化バリウム水溶液で滴定した。溶液の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%のエタノールを 5.0mL ずつ 10 本のサンプルビンに入れ、同様に滴定した。
- ⑰ 滴定量からブランクの滴定量を差し引いた値を正味の滴定量とし、硫黄の含有率 S(%)を式(2)より求め、式(3)より硫酸化率を求めた。

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

求められた S%から以下の式を用いて単位構造当たりの分子量、置換可能な水酸基のうちの硫酸基に置換された割合(硫酸化率)を求めた。

NG の 2 単位構造の分子量 1505Da である。二単位構造中の全 OH の SO₃⁻へ置換可能箇所は 17 か所であり、すべて置換された場合の分子量増加 1360Da である。OH や SO₃⁻基中の H は Na に置換されているため 22×17 Da 増える。これらをもとに硫酸化率、単位構造当たりの分子量を以下の式から求めた。

硫酸化率を a とすると

$$S(\%) = \frac{\text{硫酸元素分子量}}{\text{生成 GS 分子量}} = \frac{17 \times \frac{a}{100} \times 32}{(1505 + 32 \times 17) + 1360 \times \frac{a}{100}}$$

この式を変形して

$$a(\%) = \frac{(1505 + 22 \times 17) \times S}{(32 - 0.8 \times S) \times 17}$$

という式から硫酸化率 a %を求めた

二単位構造当たりの分子量をもとに計算していることに注意して

$$\text{単位分子量(Da)} = \frac{1360 \times \frac{a}{100} + 1505 + 22 \times 17}{2}$$

から単位構造当たりの分子量を求めた。

2-1-4 GS の分子量測定

ゲル濾過クロマトグラフィーにより GS の分子量を測定した。

【試薬】

- ・GS(硫酸化率 42.25%、11.61%)
- ・プルラン(フナコシ)

【器具】

- ・TSKgel G4000SW_{XL}(東ソー)

【実験操作】

- ① プルランを脱イオン水に溶解させて 10 mg/mL に調製した。
- ② ループ 50μL とし、0.35 mL/min でプルランをカラムに流し、検量線を作成した。
- ③ GS を 10 mg/mL に調製し、②と同様の条件でカラムに流した。

2-1-5 GS-biotin-streptavidin-HRP 作製

GS と BMP-13 のアフィニティー調査のために GS に HRP を結合させることを目的とした。

【試薬】

- GS (硫酸化率 42.25%、11.61%)
- EZ-Link Amine-PEG11-Biotin (Thermo scientific)
- HRP conjugated streptavidin (PGI)
- MES (Wako)
- WSCD・HCl (EDC) (ペプチド研究所)

【実験操作】

- ① 2 mg/mL GS、50 mM EZ-Link Amine-PEG11-Biotin、100 mM EDC を MES buffer を溶媒として調製した。
 - ② 2 mg/mL GS を 1mL と 50 mM PEG11-biotin を 60 μ L、100mM EDC を 1.5 μ L を混合して、2 時間攪拌して反応させた。
 - ③ 3,000Da フィルターで透析し、未反応 PEG-biotin および EDC を除去した。
 - ④ ③の生成物に HRP conjugated streptavidin を加え、150kDa フィルターにかけ、150kDa 以上の生成物を回収した。
- これにより GS-biotin-streptavidin-HRP (GS-HRP) を得た。

2-1-6 GS-BMP-13 アフィニティー調査

様々なたんぱく質対してアフィニティーを持つ GS の結合定数を求めることを目的とした。

【試薬】

- GS-HRP (硫酸化率 42.25%、11.61%)
- BMP-13 (PEPRP TECH)
- NaCO₃ (Wako)
- HCl (関東化学)
- NaCl (関東化学)
- KH₂PO₄ (Wako)
- クエン酸一水和物 (Wako)
- OPD tablet (Wako)
- Anti GDF-6 , Human (Rabbit) (STJ)
- NaHCO₃ (Wako)
- Na₂HPO₄・12H₂O (関東化学)
- NaOH (関東化学)
- Tween20 (片山化学工業)
- NaH₂PO₄・2H₂O (Wako)
- H₂O₂ (三菱瓦斯化学)
- 95%硫酸 (Wako)

Coating buffer

Na₂CO₃ 1.59 g と NaHCO₃ 2.93 g を脱イオン水 11 に溶解し、2N HCl/NaOH で pH 9.6 に調製した。

PBST

NaCl 8 g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g と KH₂PO₄ 0.2 g を milli-Q 1 l に溶解し、Tween20 を 500 μl 加えた。

ブロッキング溶液

NaH₂PO₄·2H₂O 0.296 g と Na₂HPO₄·12H₂O 2.901 g を milli-Q 1 l に溶解し、pH7.4 に調製したリン酸 buffer 25 ml にスキムミルクを 0.773 g 加えた。

PBS

NaCl 8 g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g と KH₂PO₄ 0.2 g を milli-Q 1 l に溶解した。

OPD 発色試薬

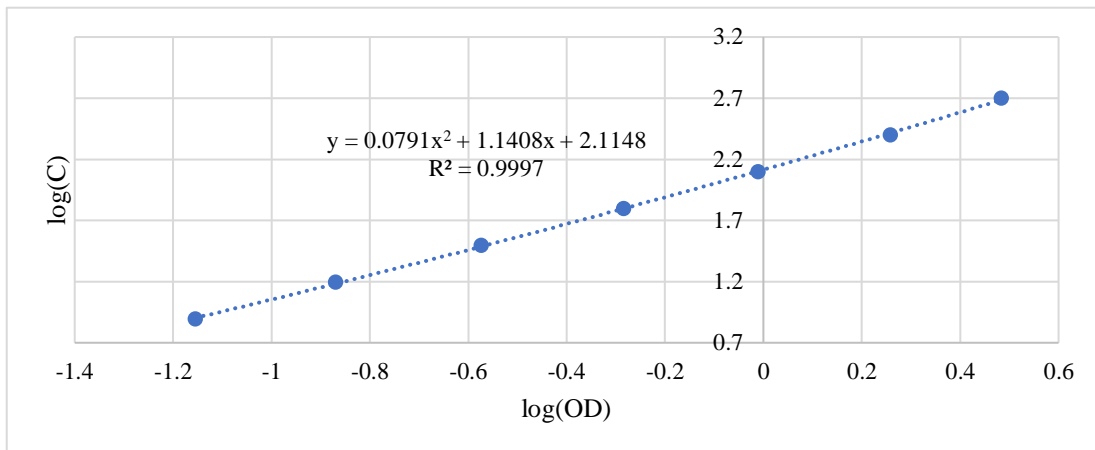
クエン酸一水和物 3.828 g と Na₂HPO₄·12H₂O 4.735 g を milli-Q 500 ml に溶解した発色緩衝液 27.3 ml に H₂O₂ 3.0 μl と OPD tablet 1 錠を加えた。

1 N 硫酸

milli-Q 97.2 ml に 95%硫酸を 2.8 ml 加えた。

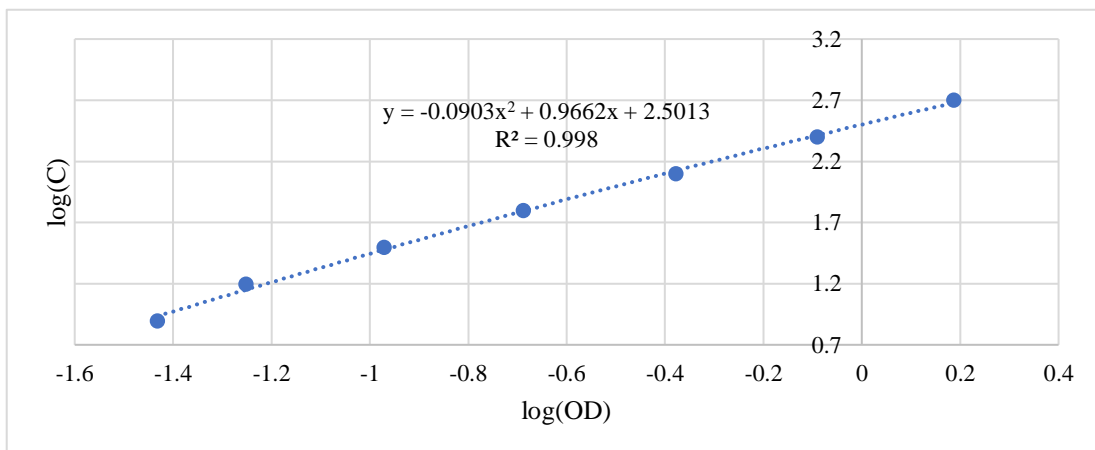
【実験操作】

- ① Anti GDF-6 , Human (Rabbit)を Coating buffer で 500 倍希釈し、96 穴プレート (SARSTEDT)に 100 μL 添加し、1 時間振とうした。
- ② PBST で洗浄した後、ブロッキング溶液を 200 μL 添加し、30 分浸透した。
- ③ PBST 洗浄後、BMP-13 100 ng/mL を 100 μL 添加し、1 時間振とうした。
- ④ PBST 洗浄後、GS-HRP を 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 0 μg/mL に調製し、100 μL 添加し、1 時間振とうした。
- ⑤ PBST 洗浄後、OPD 発色液を 100 μL 添加し、10 分間浸透した。
- ⑥ 1N 硫酸を 100 μL 加えて反応を停止させ、510 nm で吸光度を測定した。
- ⑦ 検量線より、GS-HRP の吸着濃度を換算した。
- ⑧ 事前に GS-HRP と OPD 発色液を 50 μL ずつ混合し、1N 硫酸 100 μL 加え、吸光度を測定して検量線を作成した。検量線の GS-HRP 濃度は GS-HRP と OPD 発色液を混合した後の GS-HRP 濃度である。



縦軸:GS-HRP 濃度 (ng/mL) の対数 横軸:510 nm の吸光度の対数

Fig.2-1 42.25%GS-HRP 検量線



縦軸:GS-HRP 濃度 (ng/mL) の対数 横軸:510 nm の吸光度の対数

Fig.2-2 11.61%GS-HRP 検量線

【データの処理方法】

- ① ELISA 結果から GS 添加濃度と吸着量のグラフを作成した。
- ② Fig.2-3 のように BMP-13 と GS 結合が飽和に達したときの GS 吸着濃度を読み取った。
- ③ BMP-13 と GS の結合が 1:n で行われと仮定すると、反応前(時間 $t=0$)および平衡時(時間 $t=t'$)の以下のような関係となる。

[BMP]_o: 反応前の BMP-13 濃度

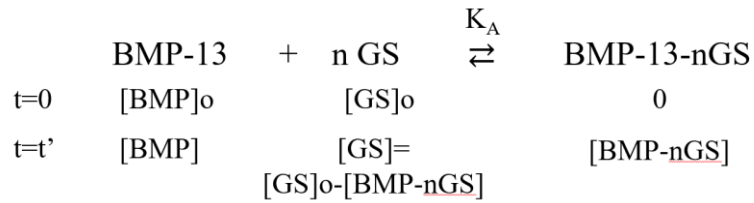
[BMP] : 平衡時の BMP-13 濃度

[GS]_o : 反応前の GS 濃度

[GS] : 平衡時の GS 濃度

[BMP-nGS]: 平衡時 BMP-13 と GS 複合体の濃度

K_A : 結合定数



このとき結合定数 K_A 、飽和度 b 、について以下の式が成り立つ。

$$K_A = \frac{[\text{BMP-nGS}]}{[\text{BMP}][\text{GS}]^n} \quad b = \frac{[\text{BMP-nGS}]}{[\text{BMP}]_o} = \frac{K_A [\text{GS}]^n}{1 + K_A [\text{GS}]^n}$$

B についての式について変形することで以下の式が求められる。

$$\text{Log}\left(\frac{b}{1-b}\right) = n \text{Log}([\text{GS}]) + \text{Log}(K_A)$$

$[\text{GS}]$ は $[\text{GS}]_o$ および $[\text{BMP-nGS}]$ の測定値より求めることが可能である。

$b=1$ のとき、 $[\text{BMP}]_o = [\text{BMP-nGS}]$ となる。従って②で求めた吸着濃度が $[\text{BMP}]_o$ となる。これにより b が 1 以下のときの b を求めることができる。

これらを用いて $\text{Log}\left(\frac{b}{1-b}\right)$ と $\text{Log}([\text{GS}])$ の計算値をプロットすることで、傾きおよび切片から結合数 n および K_A を求めた。

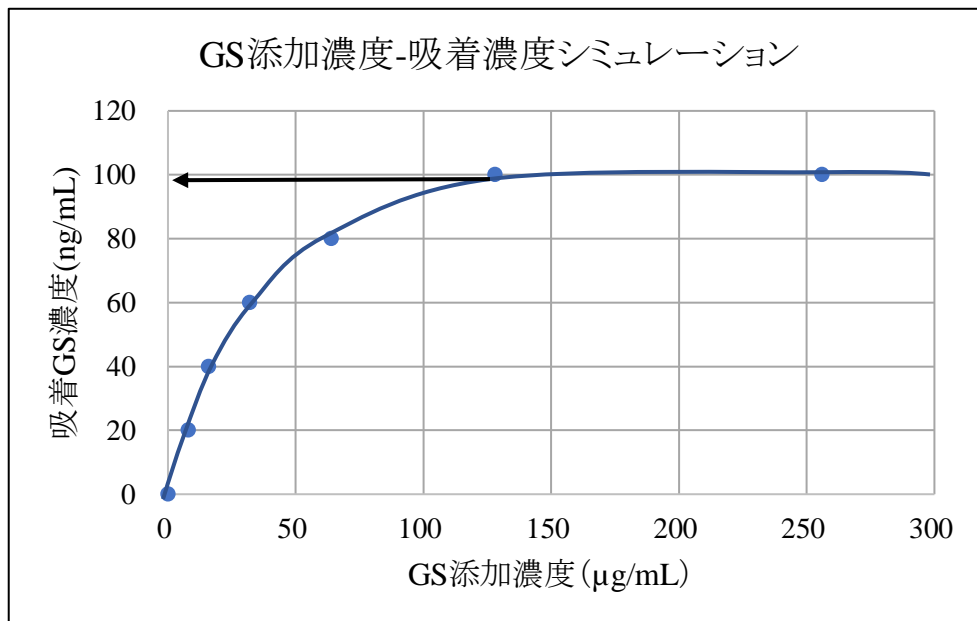


Fig.2-3 GS-BMP-13 アフィニティーELISA のシミュレーション

2-1-7 GS-NG の作製

髄核モデル内に GS を含有させた際に、モデル内からの流出を防ぐために分子量を大きくすることを考えた。そのために、GS と NG を架橋させた。

【試薬】

- ・NG (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社)
- ・GS (硫酸化率 42.25%)
- ・WSCD・HCl (EDC) (ペプチド研究所)
- ・L-lysine methyl ester dihydrochloride (Alfa Aesar)

【使用器具】

- ・恒温槽
- ・スターラー
- ・攪拌子
- ・透析チューブ
- ・ナスフラスコ

【実験操作】

- ① NG 0.1g, GS 0.08g, WSCD・HCl 1.189 g, L-lysine methyl ester dihydrochloride 0.181 g を脱イオン水 100mL に溶解し、ナスフラスコに入れた。
- ② 24 時間、80°C で攪拌した。
- ③ 得られた反応物を遠心分離によって溶液と沈殿物に分離した。
- ④ 溶液を透析し、未反応物の除去をし、凍結乾燥することで、GS-NG を得た。

2-1-8 NG ゲルビーズの作製

直径約 100 μ m 程度の球状ゲルビーズを目的とした。

【試薬】

- ・NG (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社)
- ・GS (硫酸化率 42.25%、11.81%)
- ・GS-NG (2-1-4 参照)
- ・CaCl₂ (和光純薬)

【使用器具】

- ・高圧噴霧器

【実験操作】

- ① Table 2-1 に示す条件に従って、脱イオン水に試薬を溶解させた。
- ② 溶液を 90°C に保ち、噴霧器から射出し、冷却された室内へ散布することで空気中でゲル化させた。
- ③ 200mM CaCl₂ 溶液を流すことで、ゲルビーズを回収した。

- ④ フィルター分離により、74 μm – 104 μm のゲルビーズを得た。

Table 2-1 脱イオン水に対する NG, GS 含有量

	NG	GS
NG ビーズ	1%	-
高 GS+NG ビーズ	1%	[42.25% GS] 0.08%
低 GS+NG ビーズ	1%	[11.82% GS] 0.08%
GS-NG + NG ビーズ	1%	[GS-NG] 0.08%

2-2 細胞培養

ヒト成体脂肪由来幹細胞 (hASC) はケーエーシーから購入した。

ASC は ASC を未分化維持できる培地である 5%FBS/ KBM により 37°C/ 5%CO₂ インキュベーター内で培養した。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を行った。

2-3 二次元培養における ASC の NP 様細胞分化検討

2-3-1 ASC に対する GS, BMP-13 の影響調査

軟骨分化および髄核様分化に効果的であるとされている GS と BMP-13 の併用による ASC の髄核様分化を促進する事を目的とした。

【細胞】

hASC (Passage 4~7)

【試薬】

- KBM ADSC-2 (コージーバイオ)
- DMEM (SIGMA)
- BMP-13 (PEPRP TECH)
- GS (硫酸化率 42.25%)

【実験操作】

- ① ASC を 12 well プレートへ 1×10^4 cells/ cm² で播種をし、接着および増殖のために未分化維持培地である 5%FBS/ KBM にて 3 日間培養を行った。
- ② Table 2-2 の条件培地に培地交換し、3 日間培養した。
- ③ 2-3-2 に示す方法によって遺伝子発現調査を行った

Table 2-2 二次元 NP 分化検討の培地条件

サンプル名	GS (100 µg/mL)	BMP-13(100 ng/mL)
Control	-	-
GS	+	-
BMP	-	+
GS, BMP	+	+

各条件における培地条件と添加物について示した。基本培地として 10%FBS/DMEM を用い、GS 添加量は 100 µg/mL、BMP-13 添加量は 100 ng/mL とした。

2-3-2 遺伝子発現解析

【試薬】

- NucleoSpin® RNA (TaKaRa)
- THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡)

【実験操作】

- ① 細胞培養終了後、培地を吸引し、PBS で洗浄をした。
- ② NucleoSpin® RNA を用いて、説明書に従い、細胞から mRNA を抽出した。
- ③ mRNA 抽出物、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix、Forward プライマー、Reverse プライマー、DEPC 水を混合し、反応液を調製した。
- ④ real-time PCR を行って遺伝子発現調査を行った。
- ⑤ ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用いた。NP 分化のネガティブマーカーとして Type I collagen、NP マーカーとして Type II collagen、SOX-9、Aggrecan、KRT18、KRT19 遺伝子発現を調査した。調査遺伝子を以下に示す。

Table 2-3 Real-Time PCR プライマー配列

遺伝子名	配列
ヒト GAPDH ⁽²⁹⁾	Forward 5'-GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA-3' Reverse 5'-GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T-3'
ヒト Type I collagen ⁽³⁰⁾	Forward 5'-AAG GGA CAC AGA GGT TTC AG-3' Reverse 5'-TAG CAC CAT CAT TTC CAC GA-3'
ヒト Type II collagen ⁽³¹⁾	Forward 5'-CAA CAC TGC CAA CGT CCA GAT-3' Reverse 5'-CTG CTT CGT CCA GAT AGG CAA T-3'
ヒト SOX-9 ⁽³²⁾	Forward 5'-CAG GTG CTC AAA GGC TAC-3' Reverse 5'-CGC TCT CGT TCA GAA GTC-3'
ヒト Aggrecan ⁽³³⁾	Forward 5'-GAGAAGTTCACCTTCCAG GAAG-3' Reverse 5'-CTGCACATGTCCATGCCA-3'
ヒト KRT18 ⁽³⁴⁾	Forward 5'-GCCTACAAGCCCAGATTGC-3' Reverse 5'-GGCGAGGTCCTGAGATTTGG-3'
ヒト KRT19 ⁽³⁵⁾	Forward 5'-ATATGAGGTCATGGCCGAGC-3' Reverse 5'-TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC-3'

2-4 二次元培養における ASC の AF 様分化検討

ASC を線維芽様細胞へ分化させる成長因子のである CTGF と NP 様へ分化を促すとされる BMP-13 を用いる事で ASC を AF 様へ分化させる事を目的とした。

【細胞】

hASC (Passage 4~7)

【試薬】

- KBM ADSC-2 (コージーバイオ)
- DMEM (SIGMA)
- BMP-13 (PEPRP TECH)
- CTGF (PROSPEC)

【実験操作】

① ASC を 12 well プレートへ 1×10^4 cells/ cm² で播種をし、接着および増殖のために未分化維持培地である 5%FBS/ KBM にて 3 日間培養を行った。

② Table 2-2 の条件培地に培地交換し、3 日間培養した。

③ 培養後に 2-3-2 に示した方法で遺伝子発現調査を行った。

AF 分化マーカーとして Type I collagen、Type II collagen、SOX-9、SFRP2、Aggrecan、TNMD 遺伝子発現を調査した。

Table 2-3 に含まれないプライマー配列は Table 2-5 に示した。

Table 2-4 二次元 AF 分化検討の培地条件

サンプル名	BMP-13 (100 ng/mL)	CTGF (100 ng/mL)
Control	-	-
CTGF	-	+
BMP,BMP	+	+

各条件における培地条件と添加物について示した。基本培地として 10%FBS/DMEM を用い、BMP-13 添加量は 100 ng/mL、CTGF 添加量は 100 ng/mL とした。

Table 2-5 Real-Time PCR プライマー配列-2

遺伝子名	配列
ヒト SFRP2 ⁽³⁶⁾	Forward 5'-GGA GAC CAA GAG CAA GAC CAT-3' Reverse 5'-GCA CTG CAA GCT GTC TTT GA-3'
ヒト TNMD ⁽³⁷⁾	Forward 5'-CCATGCTGGATGAGAGAGGTT-3' Reverse 5'-TTGGTAGCAGTATGGATATGGGT-3'

2-5 三次元培養における ASC の NP 様分化検討

NP 構造における細胞局在性、GAG 模倣としての GS および分化刺激因子としての BMP-13 添加、加圧培養を組み合わせる事による ASC の NP 様分化を目的とした。

2-5-1 NP モデル作製

NG ビーズを用いた NP の細胞局在構造の模倣と GS 含有を用いた NP モデルの作製を目的とした。

【細胞】

hASC (Passage 4~7)

【試薬】

- | | |
|--------------|----------------------------|
| •DMEM(SIGMA) | •BMP-13(PEPRP TECH) |
| •NaOH(関東化学) | •NaHCO ₃ (Wako) |
| •HEPES(Wako) | •HCl(関東化学) |

[ゲル化用培地]

DMEM 10 mL、NaOH 20 mg、NaHCO₃ 300 mg、HEPES 489 mg を混合し、0.22 μ m フィルターを用いて濾過滅菌した。

[3%コラーゲン溶液]

1mM HCl 溶液 10 mL に I+III 型コラーゲン 0.3 g を溶解させ、30 分間 UV 照射して滅菌した。

- ① 2-1-5 で作製した NG ビーズをそれぞれ EtOH で洗浄して、遠心分離、上澄み除去により NG ビーズの滅菌をした。
- ② EtOH 除去のために PBS で 3 回、①と同様の方法で洗浄した。
- ③ PBS 内の NG ビーズ 500 μ L に 2 μ g/mL BMP-13 を 50 μ L 加え、4°C で 1 日間静置することで BMP-13 を NG ビーズ内に拡散させた。
- ④ hASC 140 万 cells をゲル化用培地 87.5 μ L で懸濁し、③を 350 μ L と 3%コラーゲン溶液 350 μ L を加えた。
- ⑤ ピペッティングにより優しく混合し、直径 4 mm の円柱型チューブに、高さ 5mm となるように溶液を加えた。
- ⑥ 800g、3 分間遠心分離した。
- ⑦ 37°C で 1 時間インキュベートして、ゲル化させた。

- ⑧ ゲルを取り出して、10%FBS/DMEM に浸して培養した。
- ⑨ NG ビーズを含まない比較群として、④において NG ビーズを含まない PBS と 3%コラーゲン溶液、ゲル化用培地を混合した。また③工程で BMP-13 を含まない群を作製した。詳細は Table 2-6、2-7 に示した。
- ⑩ 培養したサンプルは加圧を行った次の日に 2-3-2 に示した方法で遺伝子発現調査を行った。

NP 分化のネガティブマーカーとして Type I collagen、NP マーカーとして Type II collagen、SOX-9、Aggrecan、KRT18、KRT19 遺伝子発現を調査した。

2-5-2 静水压加圧培養

本研究では ASC に静水压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。静水压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.2-4 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。これにより培養液を通して細胞に周期的な圧力刺激を加えることが可能となる。

静水压加圧培養条件は Fig.2-5 の通りであり、加圧時間:4 時間/日で行った。この加圧を静水压加圧とした。

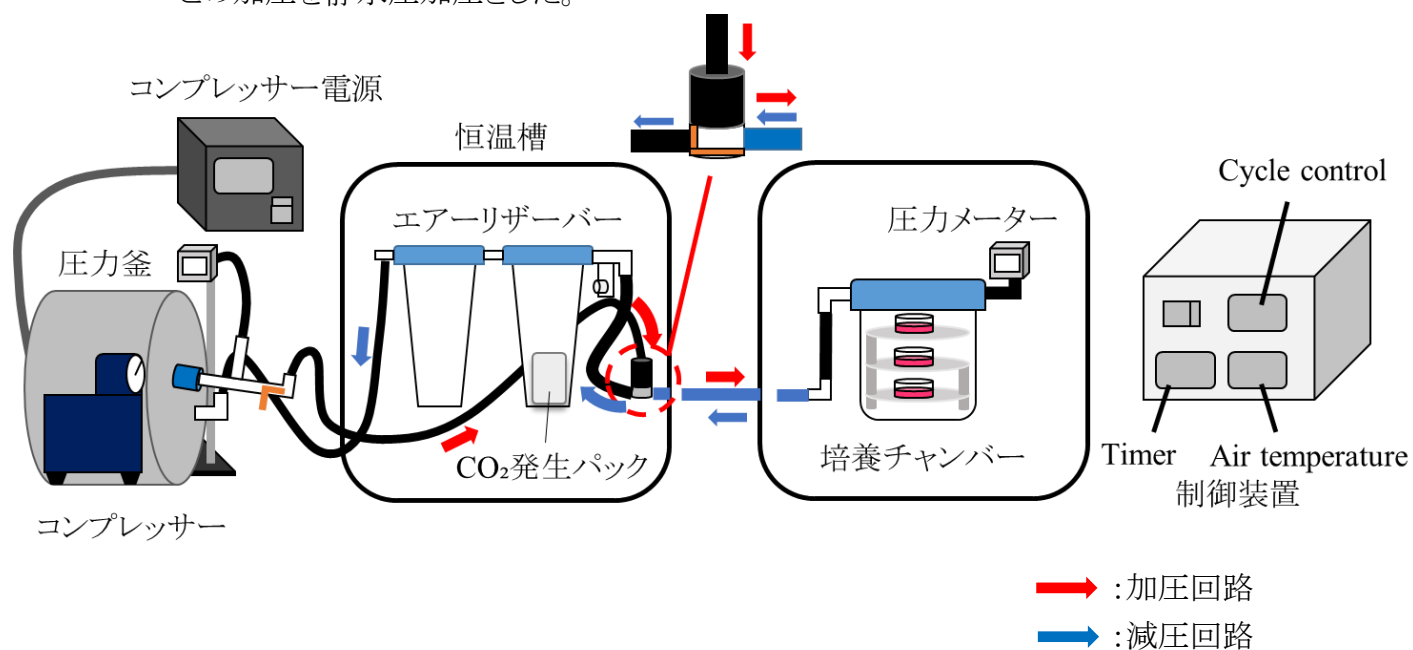


Fig.2-4 空気圧式加圧培養装置の概略図

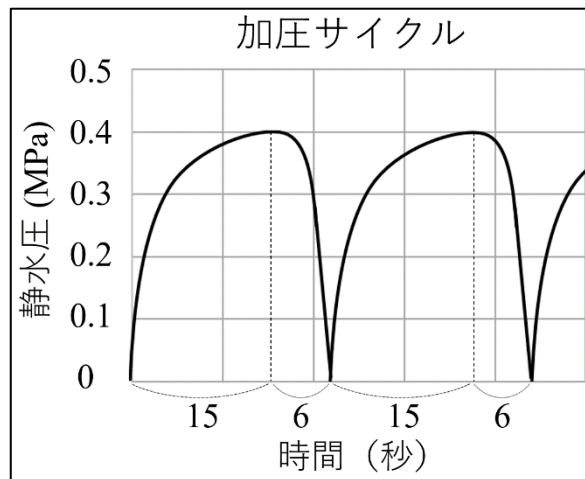


Fig.2-5 加圧周期

2-5-3 動的加圧培養

本研究では、静水圧刺激に加え、ゲルのひずみを伴う動的加圧刺激による細胞への影響調査を目的とした。

- ① Fig.2-6 のような直径 5 mm、深さ 5 mm の以上の穴が 4 つと中央に貫通孔が空いた培養器を用意した。
- ② エポキシ樹脂(ブレニー技研)を用いて Fig.2-7 のような型を取った。
- ③ 中央の貫通孔にはばねを設置し、外側の 4 つの穴に 2-4-1 で作製した NP モデルを入れた。
- ④ エポキシ樹脂の型を上から置き、1 秒周期で圧縮した。圧縮量はばねサイズで調整し、0.5 mm となるようにした (Fig.2-8)。この加圧を動的加圧とした。

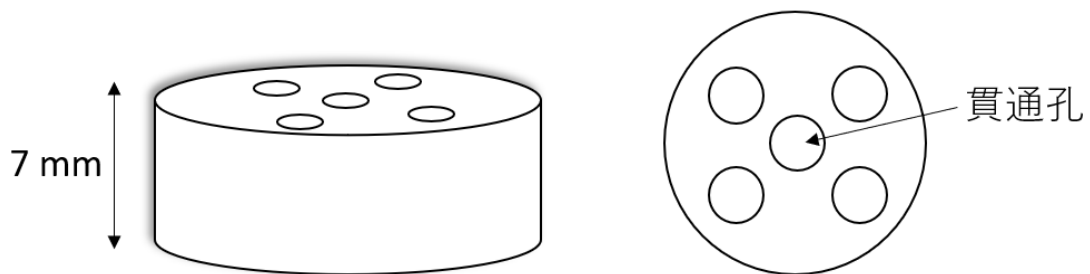


Fig.2-6 動的加圧培養器

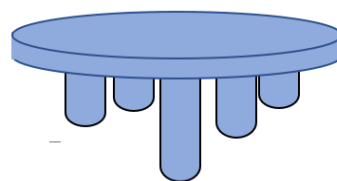


Fig.2-7 動的加圧培養器の型

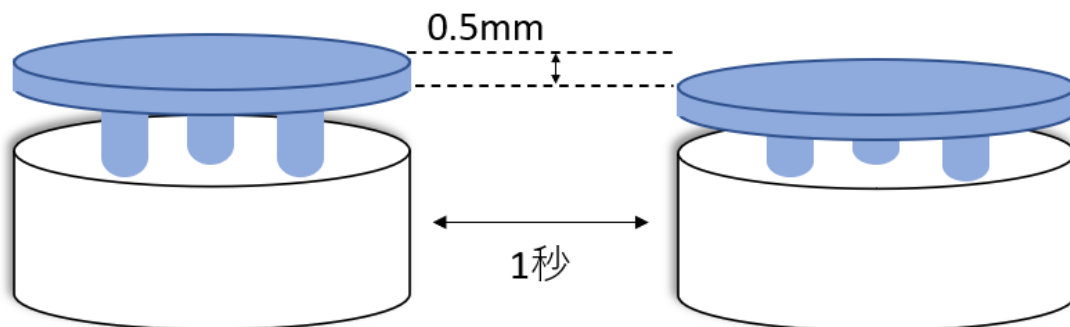


Fig. 2-8 動的加圧培養

培養条件は以下の通りであった。

ゲルビーズによる細胞局在モデルの効果、静水圧および動的加圧の影響を調査するために、Table 2-6 サンプルを培養した。

Table 2-6 NP モデル培養条件

サンプル名	NG ビーズ種	静水圧	動的加圧	BMP-13 含有
NG、無加圧	NG	-	-	-
NG なし、静	なし	+	-	-
NG、静	NG	+	-	-
NG、静+動	NG	+	+	-

ゲルビーズによる細胞局在モデルの効果、静水圧および動的加圧の影響を調査するために、Table 2-6 サンプルを培養した。

Table 2-7 GS、BMP-13 含有 NP モデル培養条件

サンプル名	NG ビーズ種	静水圧	動的加圧	BMP-13 含有
NG	NG	+	+	-
BMP	NG	+	+	+
低 GS	低 GS+NG	+	+	+
高 GS	高 GS+NG	+	+	+
高 GS-NG	GS-NG + NG	+	+	+

2-6 三次元培養における ASC の AF 様分化検討

AF 構造における配向性、分化刺激因子としての BMP-13+CTGF の添加、加圧培養を組み合わせる事で ASC の AF 様分化を目的とした。

2-6-1 コラーゲンの抽出

ペプシン処理によるブタ大動脈の外膜部分よりコラーゲンを分解し、塩化ナトリウムを用いてクラス分けを行った。

【試薬】

- ・ブタ大動脈
- ・99.5% ジエチルエーテル (Wako)
- ・NaCl (関東化学)
- ・酢酸 (Wako)
- ・1:10,000 ペプシン (Wako)

【実験操作】

- ① ブタ大動脈血管組織を水道水で洗浄し、血塊や脂質、余分な組織をハサミで切り取り、さらに水道水で洗浄した。
- ② 10%食塩水に付け、1 日静置した。
- ③ 5%食塩水に入れ洗浄後、脱イオン水で 10 回程度洗浄した。
- ④ 処理したブタ大動脈の外膜部分を梅酒瓶に移し、0.5 M 酢酸溶液 3000 ml を入れた。
- ⑤ 外膜、酢酸溶液の入った梅酒瓶にペプシンを 1 mg/ml になるように溶解させ、2 週間かき混ぜながら反応させた。
- ⑥ ペプシン処理にて溶解した溶液をろ過した。不溶部分は梅酒瓶に戻し再度、実験操作⑤・⑥を繰り返した。
- ⑦ ろ液の 1/10 量のジエチルエーテルを加え滅菌した。
- ⑧ 4.4 M になるように NaCl を添加し、3000 rpm・5 分で遠心分離を行った。
- ⑨ 沈殿からエーテル臭がなくなるまで冷やした 4.4 M NaCl 水溶液で洗浄し、3000 rpm・5 分で遠心分離を繰り返した。
- ⑩ エーテル臭がなくなった沈殿に冷やした脱イオン水を加え溶解させ、透析用セルロースチューブ (積水メディカル) で透析を行った。
- ⑪ 塩分計 (SANSYO SWC-501SA) で値が 0 になるまで透析を行った。

2-6-2 コラーゲン膜作製

人工椎間板を作製するにあたり高強度の再生用材料として線維輪に多く含まれているコラーゲンに着目した。抽出したコラーゲンをもちいて、コラーゲンをゲルを作製し乾燥させて膜状に加工した。

- ・ I + III型コラーゲン
- ・ HCl(関東化学)
- ・ EDC(ペプチド研究所)
- ・ 99.5% ジエチルエーテル(Wako)
- ・ DMEM(SIGMA)
- ・ 99%エタノール
(日本アルコール販売)

【実験操作】

- ① 1mM HCl 溶液とI+III型コラーゲンを混合して 1.5%コラーゲン酸性溶液を調整した。
- ② コラーゲン 酸性溶液と DMEM を 1:1 の割合で混合させた。
- ③ シリコンシート枠の中に②溶液を入れて 2 時間 37°C でインキュベートした。
- ④ インキュベート後、ドラフト内で完全に乾燥させた。
- ⑤ PBS で 30分以上静置し、洗浄した。その工程を 2 回繰り返した。最後に PBS 溶液を入れたまま 3 時間以上乾燥しないように静置した。
- ⑥ PBS 溶液を捨て枠から膜を外し、PBS で軽く流してもう一度乾燥を行うためにドラフトの中に入れた。
- ⑦ コラーゲン膜をエタノール内に 3 時間以上振とうさせた。エタノールから出してすぐのコラーゲン膜を乾燥させ、コラーゲン膜を得た。

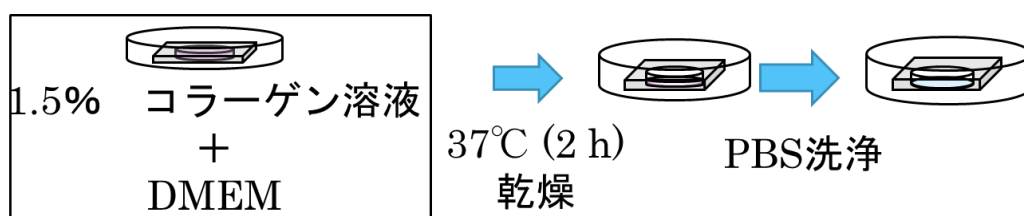


Fig. 2-9 コラーゲン膜の作製模式図

2-6-3 コラーゲン糸の作製

酸性溶液に水溶性コラーゲンを溶かし、糸状に加工することでコラーゲン糸を作製した。

【試薬】

- | | |
|---------------------------|---|
| ・ I +III型コラーゲン | ポリエチレングリコール(PEG) (Wako) |
| ・HCl(Wako) | ・エタノール(日本アルコール販売) |
| ・WSCD・HCl (EDC) (ペプチド研究所) | |
| ・アセトン(Wako) | ・Buffer 溶液(NaCl、Tris、Na ₂ HPO ₄) |

【作製方法】

- ① 0.005M HCl 溶液にI+III型 コラーゲンを溶けるだけ溶かしてI+III型 コラーゲン酸性溶液を調整した。
- ② シリンジにI+III型 コラーゲン酸性溶液を吸引した。
- ③ 25% PEG/Buffer 溶液にI+III型 コラーゲン酸性溶液を 0.06 ml/分で押し出した (Fig. 2-10)。
- ④ コラーゲン糸を 37°Cで Buffer に 1 時間再重合を行った。
- ⑤ コラーゲン糸を室温で 80% acetone / PBS に 2 時間高分子除去を行った。
- ⑥ コラーゲン糸を 99%エタノールで 4 時間以上浸透した。
- ⑦ コラーゲン糸をエタノールから取り出し延伸しながら 1 日乾燥を行った。
- ⑧ 乾燥終了後、1% WECD・HCL で 1 日浸透を行った。
- ⑨ 1 日脱イオン水で洗浄を行った。
- ⑩ 延伸しながら乾燥を行った。

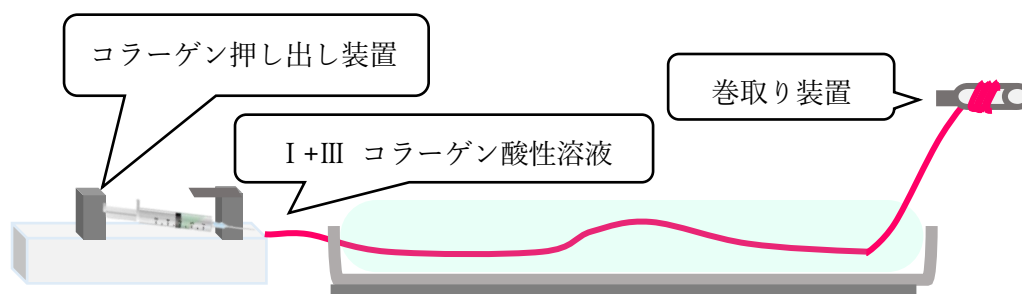


Fig. 2-10 コラーゲン糸作製過程

2-6-4 配向コラーゲン膜の作製

コラーゲン糸とコラーゲン膜を組み合わせることにより配向したコラーゲン膜を作製した。

【試薬】

- ・ I + III 型コラーゲン
- ・ DMEM (SIGMA)
- ・ HCl (Wako)
- ・ エタノール
- ・ WSCD・HCl (EDC) (ペプチド研究所)
- ・ Buffer 溶液 (NaCl, Tris, Na₂HPO₄)
- ・ アセトン (Wako)

【実験操作】

- ① 1 M HCl 溶液とI+III型 コラーゲンを混合して 1.5%I+III型 コラーゲン酸性溶液を調整した。
- ② 1.5%コラーゲン酸性溶液と DMEM を 1:1 の割合で混合させた。
- ③ シリコンシートの上にフィルムとシリコンシートの枠を乗せて 2 溶液を入れて 2 hr インキュベーター内でゲル化させた。
- ④ コラーゲン糸を作製するために 2-4-3 の実験操作①～⑥の作業を行った。
- ⑤ 2 hr ago, インキュベーター内からコラーゲンゲルを取り出し、その上にエタノールに浸透したコラーゲン糸をのせた。
- ⑥ ドラフトの中で乾燥が終わるのを待った。
- ⑦ コラーゲン膜を作製するために 2-4-1 の実験操作⑤～⑩の作業を行った。

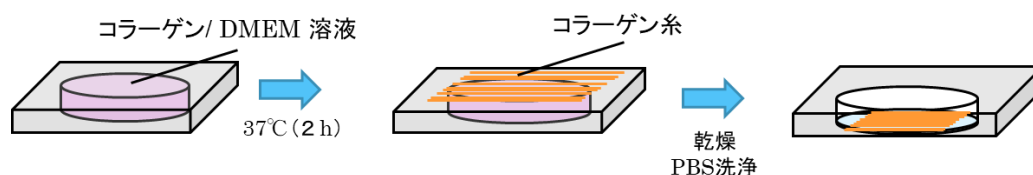


Fig. 2-11 配向コラーゲン膜の作製模式図

2-6-5 三次元培養における ASC の AF 様分化検討

【細胞】

hASC (P4~7)

DMEM (SIGMA)

BMP-13 (PEPRP TECH)

CTGF (PROSPEC)

【実験操作】

- ① 作製したコラーゲン膜を EtOH に浸して、滅菌し、乾燥させた。
- ② コラーゲン膜 $1 \times 1 \text{cm}^2$ に hASC を 50 万 cells 播種した。
- ③ BMP-13 100 ng/mL および CTGF 100 ng/mL を含む 10%FBS/DMEM 培地で培養を行った。
- ④ 2-4-2 と同様の静水圧加圧装置を用いて、播種した次の日から二日間、加圧培養を行った。加圧時間、周期は 2-4-2 に示した通りであった。
- ⑤ 加圧培養を行った次の日に mRNA 回収を行い、遺伝子発現調査を行った。
AF 分化マーカーとして Type I collagen、Type II collagen、SOX-9、SFRP2、Aggrecan、TNMD 遺伝子発現を調査した。

2-7 統計処理

統計的な有意性は解析ソフト StatView®-J 5.0(SAS 社)を使用した。解析には Tukey-Kramer 法を用いた。p 値 < 0.05 を有意とした。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 GS 作製および特性評価

作製した GS の硫酸化率、単位構造当たりの分子量を求めた。

Table 3-1-1 GS の硫酸化率と単位構造当たりの分子量

	単位構造 (Da)
42.25%GS	1226.8
11.61%GS	1018.5

ゲル濾過クロマトグラフィーから GS 分子量を測定した。プルランにより作成した検量線を Fig.3-1-1 に示した。

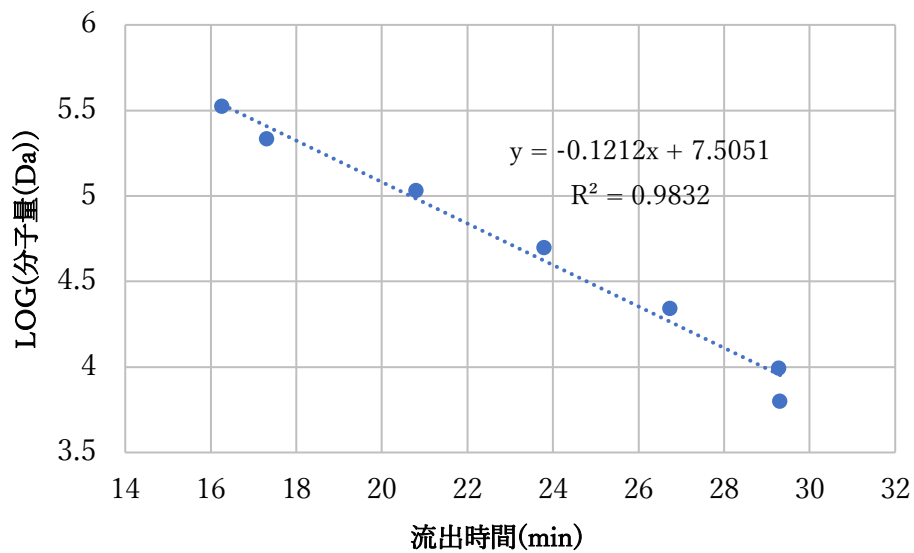


Fig.3-1-1 ゲル濾過クロマトグラフィー検量線

硫酸化率 42.25%および 11.61%の GS の流出ピークの結果を Fig.3-1-2、Fig.3-1-3 に示した。

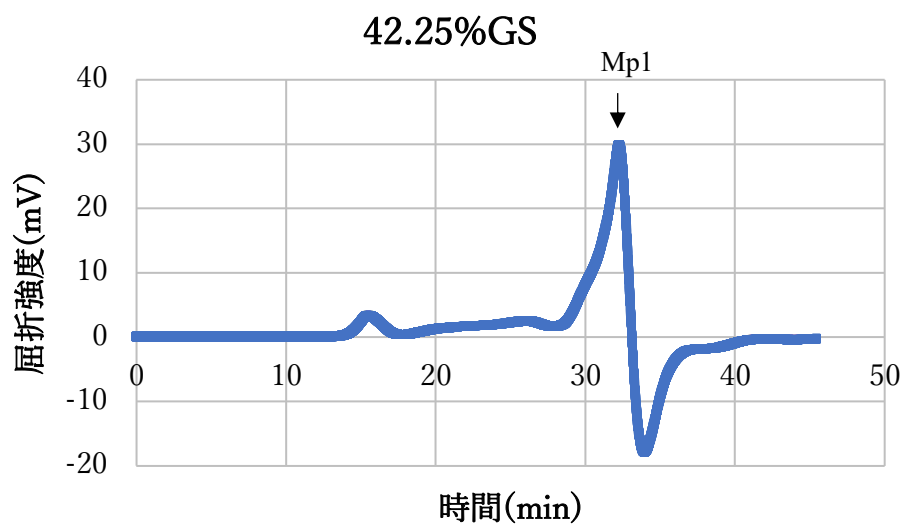


Fig.3-1-2 42.25%GS のクロマトグラフィー結果

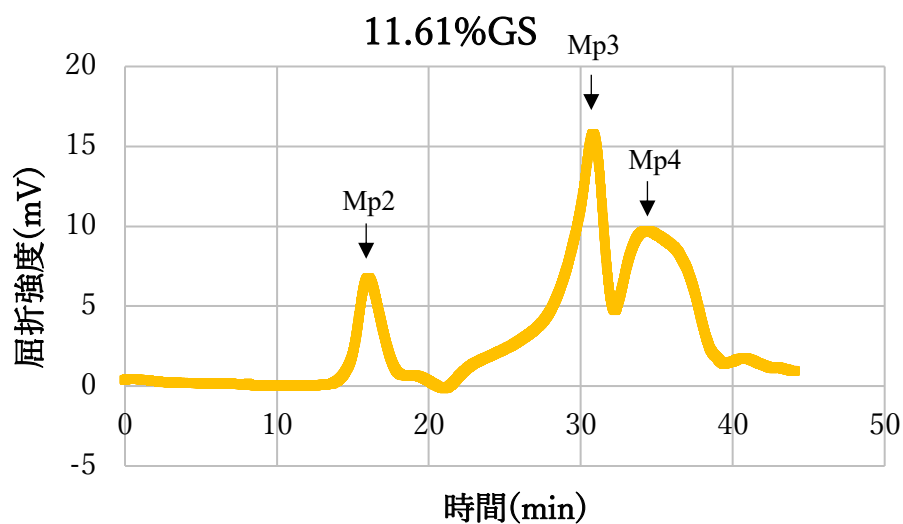


Fig.3-1-3 11.61%GS のクロマトグラフィー結果

Fig.3-1-2、Fig.3-1-3 の Mp1 – Mp4 の分子量を算出した。また、11.61%GS について、Fig.3-1-3 のピーク面積から換算して、全体の分子量の平均を算出した。これらを Table 3-1-2 にまとめた。

Table 3-1-2 分子量算出の結果

	Mp1	Mp2	Mp3	Mp4	11.61%GS 平均分子量
分子量(Da)	3.915E+3	3.629E+5	5.860E+3	1.833E+3	4.817E+4

GS-BMP13 アフィニティー調査結果について GS 添加量と BMP-13 に吸着した GS 量について以下に示した。42.25%GS については Fig.3-1-4、11.61%GS については Fig.3-1-5 に示した。

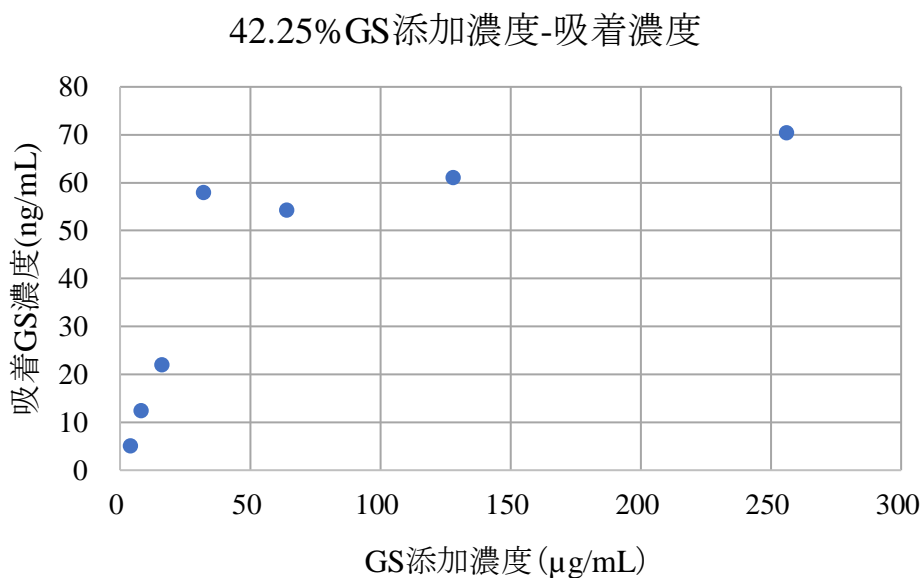


Fig.3-1-4 42.25%GS の BMP-13 アフィニティー-ELISA 結果

11.61%GS添加濃度-吸着濃度

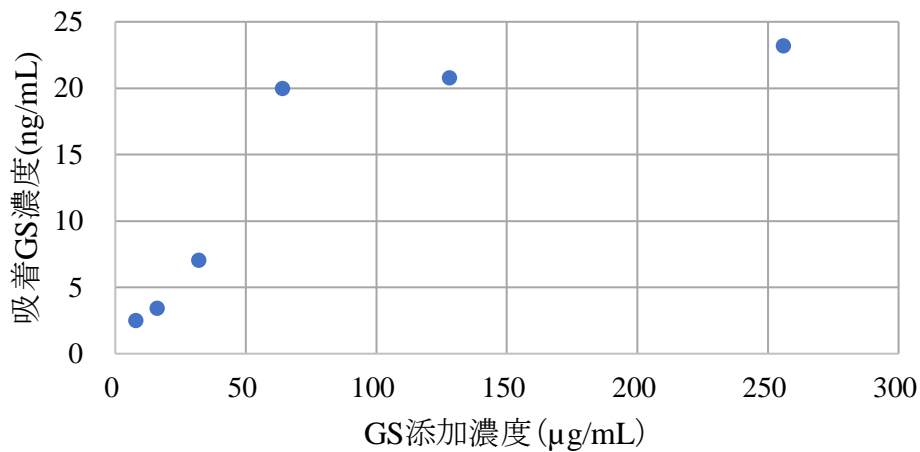


Fig.3-1-5 11.61%GS の BMP-13 アフィニティー-ELISA 結果

Fig.3-1-4、Fig.3-1-5より42.25%GS、11.61%GSどちらにおいても、256 μg/mL のGS添加によって飽和度が1に達したとした。各GSの分子量の測定値から結合定数を換算した。11.61%GSについては平均分子量を用いた。このときGS添加量と吸着濃度のグラフより、飽和度が80%未満のときの $\text{Log}(\frac{b}{1-b})$ と $\text{Log}([\text{GS}])$ プロットをすることで、結合数 n および K_A を求めた。

$\text{Log}(\frac{b}{1-b})$ と $\text{Log}([\text{GS}])$ プロットを以下に示す (Fig.3-1-6、Fig.3-1-7)。

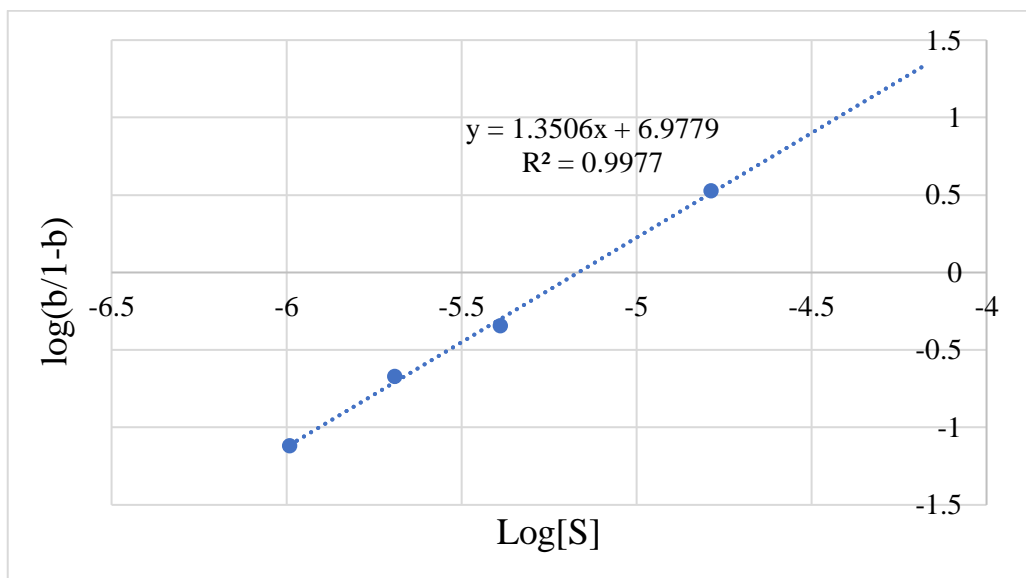


Fig.3-1-6 42.25%GS の $\text{Log}(\frac{b}{1-b})$ - $\text{Log}([\text{GS}])$ グラフ

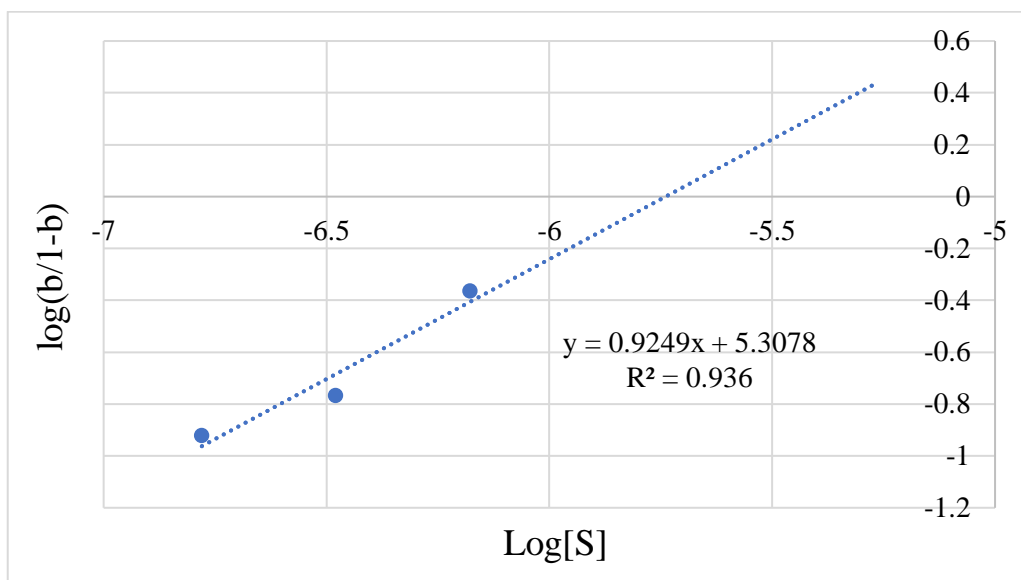


Fig.3-1-7 11.61%GS の $\text{Log}(\frac{b}{1-b})$ - $\text{Log}([GS])$ グラフ

Fig.3-1-6、Fig.3-1-7 から結合数 n および結合定数 K_A を求めた結果を Table3-1-3 に示す。

Table 3-1-3 各 GS における結合数と結合定数

	結合数 n	結合定数 $K_A [M^{-1}]$
42.25%GS	1.3506	9.504E+6
11.61%GS	0.9249	2.031E+5

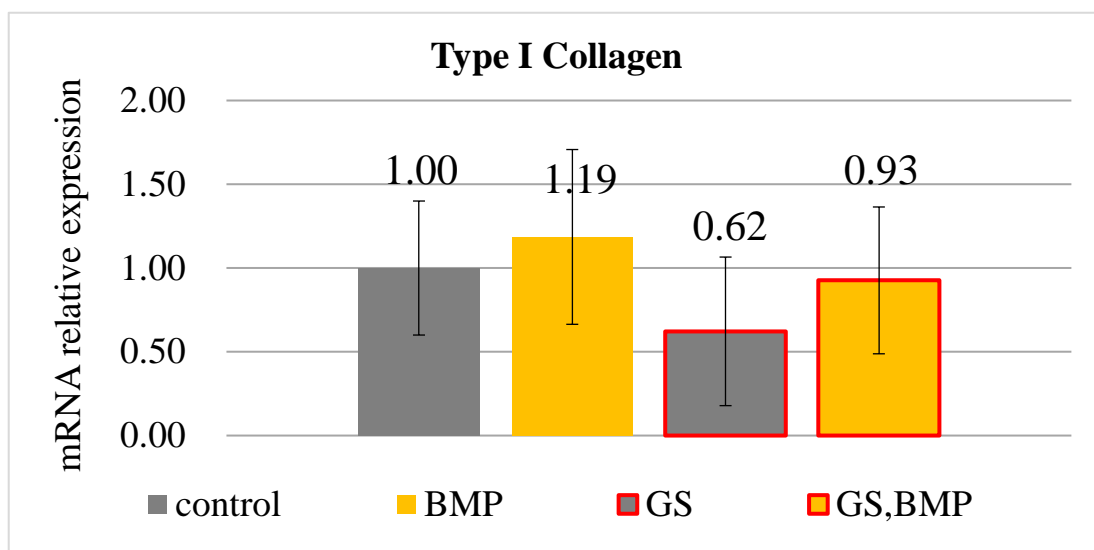
結合数、結合定数ともに 42.25%GS が 11.61%GS より高い値となった。結合数の差は 0.4257 であり、結合定数は 46.8 倍の差が見られた。従って、より高い硫酸化率の GS が BMP-13 に対して、アフィニティーを示した。

3-2 二次元培養における ASC の NP 様細胞分化検討

二次元培養における ASC の NP 様分化を評価するため、Table 3-2-1 に示した条件の培養を行い、遺伝子発現解析により評価した。全てのサンプル測定数は 3 であり、データ数 3 未満は測定限界を下回ったデータである。

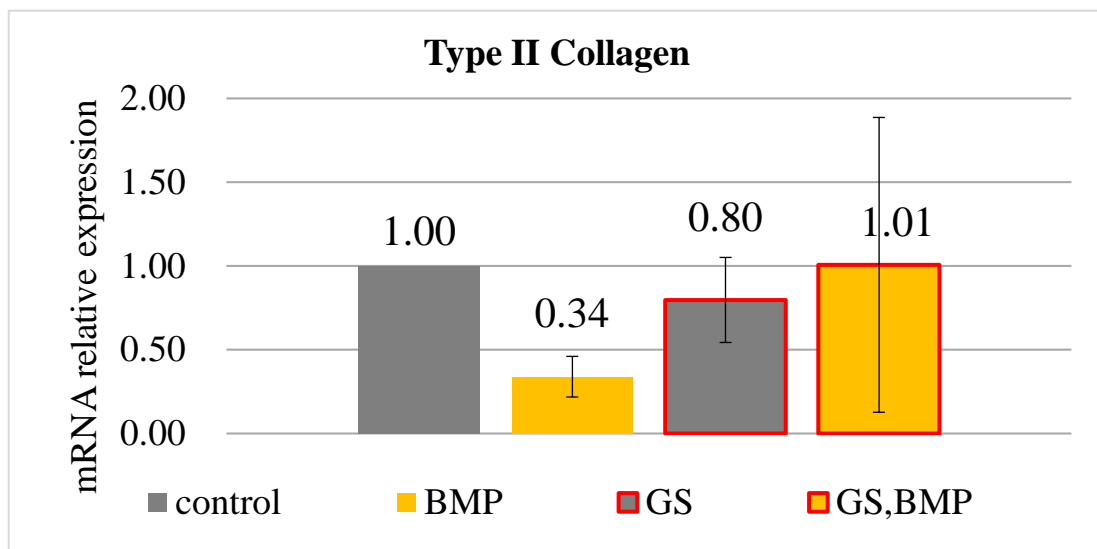
Table 3-2-1 二次元-NP 分化検討条件

サンプル名	BMP-13 (100 ng/mL)	42.25% GS (100 µg/L)
control	-	-
BMP	+	-
GS	-	+
GS,BMP	+	+



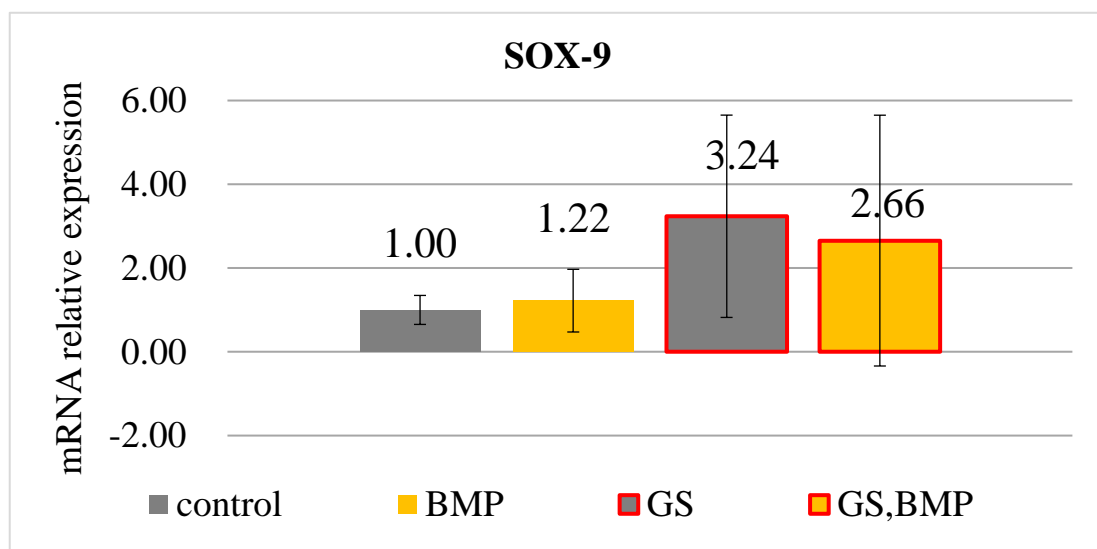
(n 数 control=3、BMP=3、GS=3、GS、BMP=3)

Fig.3-2-1 二次元-NP 分化による ASC の I 型コラーゲン遺伝子発現変化
「BMP」条件では I 型コラーゲン発現に変化はほとんどない傾向が見られた。
「GS」条件では I 型コラーゲン発現が 0.62 倍までの減少傾向が見られたが、
「BMP,GS」条件では I 型コラーゲン発現の変化はほとんどない傾向が見られた。



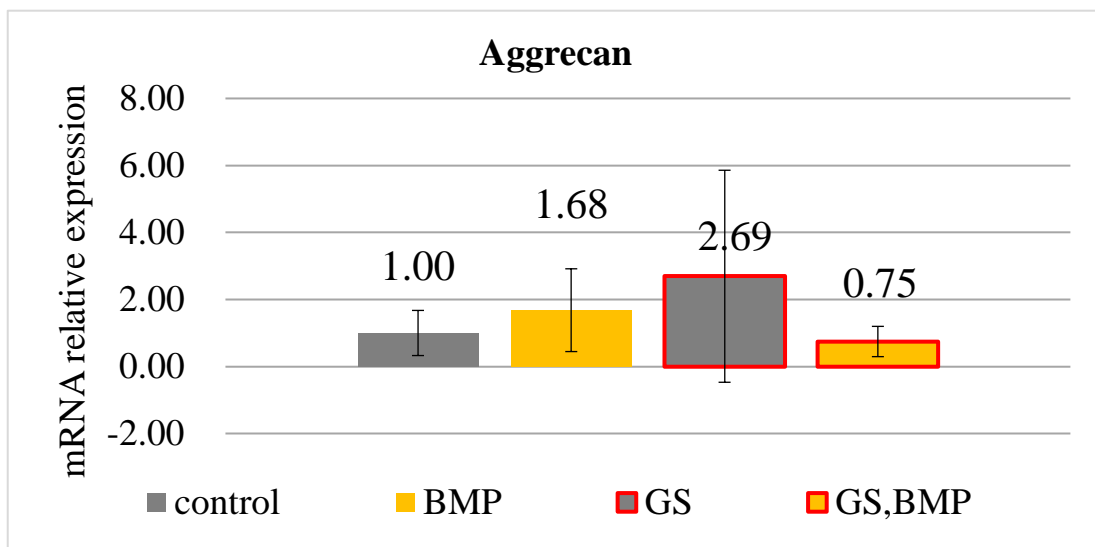
(n 数 control=1、BMP=2、GS=2、GS, BMP=3)

Fig.3-2-2 二次元-NP 分化による ASC の II 型コラーゲン遺伝子発現変化
「BMP」条件では II 型コラーゲン発現は 0.34 倍まで減少した。しかし、GS を添加した条件である「GS」、「GS,BMP」条件では II 型コラーゲン発現にほとんど変化がない傾向が見られた。



(n 数 control=3、BMP=3、GS=2、GS, BMP=3)

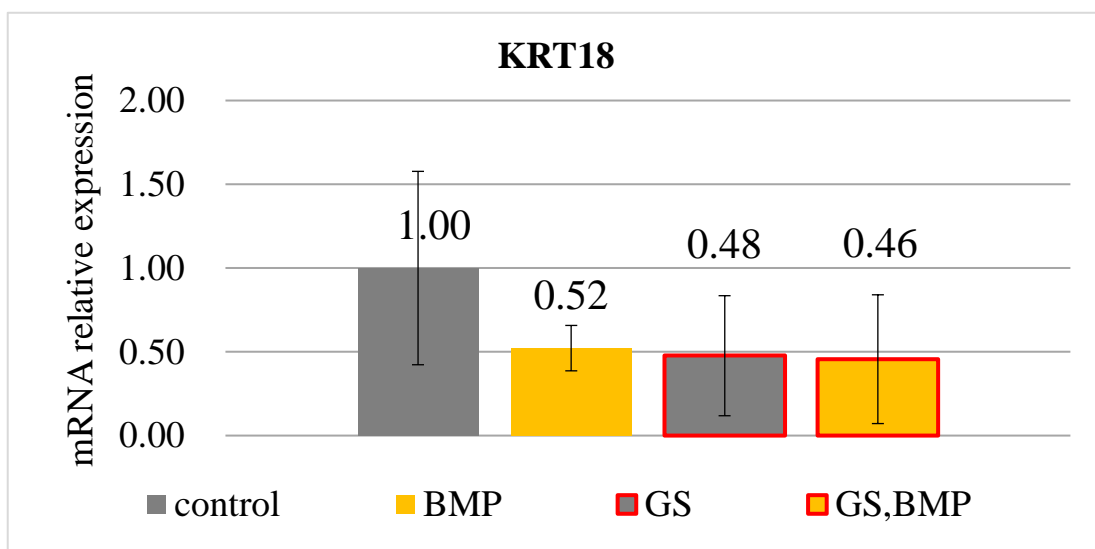
Fig.3-2-3 二次元-NP 分化による ASC の SOX-9 遺伝子発現変化
「BMP」条件では SOX-9 発現の変化はほとんど見られなかった。しかし、GS を添加した条件である、「GS」条件では「control」の 3.24 倍、「GS,BMP」条件では「BMP」条件の 2.18 倍まで SOX-9 発現の増加傾向が見られた。従って、GS 添加による軟骨分化の促進の可能性が見られた。



(n 数 control=2、BMP=2、GS=3、GS, BMP=3)

Fig.3-2-4 二次元-NP 分化による ASC のアグリカン遺伝子発現変化

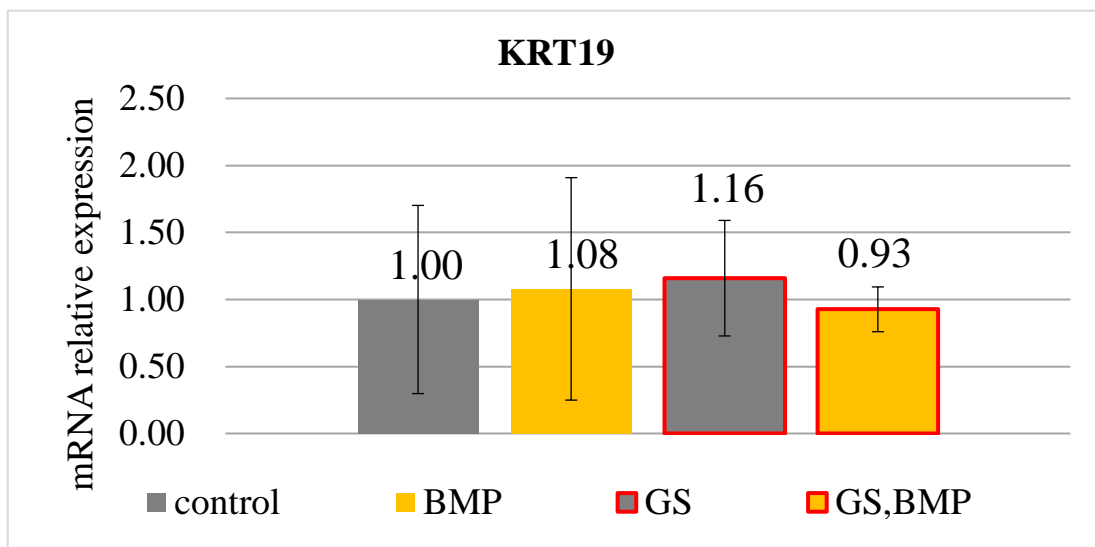
「BMP」条件では 1.68 倍までアグリカン発現の増加傾向が見られ、「GS」条件では 2.69 倍まで増加傾向が見られた。しかし、「GS,BMP」では増加傾向が見られなかったことから、2 次元条件では軟骨分化に対する BMP-13 と GS の相乗効果は見られなかった。



(n 数 control=3、BMP=3、GS=3、GS, BMP=3)

Fig.3-2-5 二次元-NP 分化による ASC の KRT18 遺伝子発現変化

BMP-13 または GS を加えたすべての条件において KRT18 発現は減少傾向を示した。従って、BMP-13 と GS による NP 様分化傾向が見られなかった。



(n 数 control=3、BMP=3、GS=3、GS, BMP=3)

Fig.3-2-6 二次元-NP 分化による ASC の KRT19 遺伝子発現変化

BMP-13 または GS を加えたすべての条件において KRT19 発現の変化はない傾向が見られた。従って、BMP-13 と GS による NP 様分化傾向が見られなかった。

Table 3-2-2 二次元-NP 分化による ASC の遺伝子発現変化結果のまとめ

	control	BMP	GS	GS,BMP
I 型コラーゲン	-	-	○	-
II 型コラーゲン	-	×	-	-
SOX-9	-	○	○	○
Aggrecan	-	○	○	×
KRT18	-	×	×	×
KRT19	-	-	-	-

Control を比較対象として、線維化マーカーである I 型コラーゲンは減少を○、上昇を×とし、その他遺伝子については上昇を○、減少を×とし、増減傾向が見られなかった遺伝子発現変化は-としてまとめた。○は NP 分化傾向を示した遺伝子発現変化であり、×は NP 分化に反する遺伝子発現変化である。

Table 3-2-2 より、「BMP」条件では軟骨関連遺伝子である II 型コラーゲンの発現は減少傾向にあり、SOX-9 やアグリカンは上昇傾向にあった。しかし、KRT18 や KRT19 に上昇傾向が見られなかったため、NP 様分化傾向は見られなかった。

「GS」条件では線維化マーカーである I 型コラーゲン発現は減少傾向にあり、

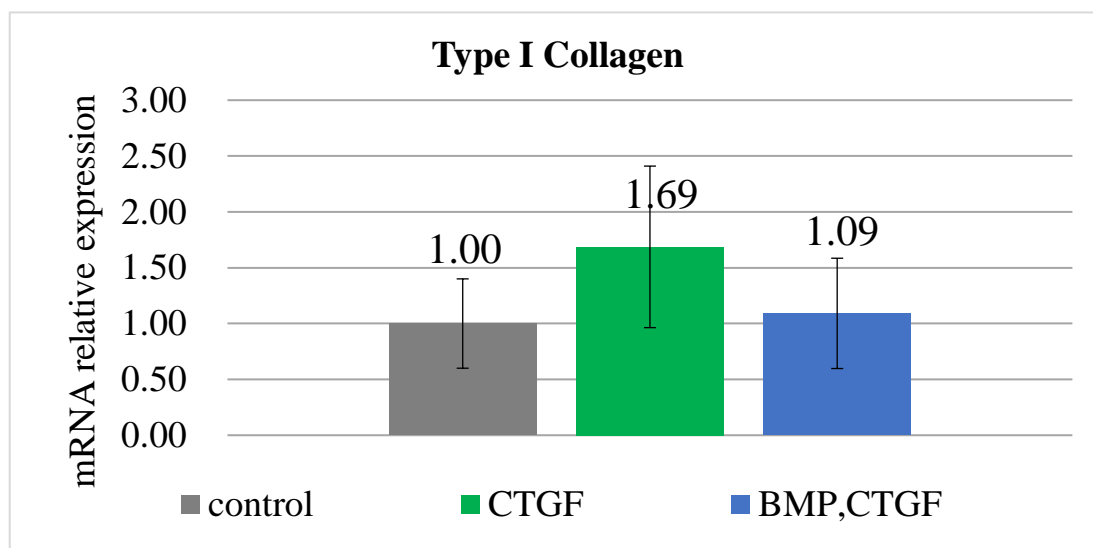
SOX-9 やアグリカンの増加傾向が見られた。しかし、KRT18 や KRT19 発現に増加傾向は見られなかった。従って、GS による軟骨分化傾向は見られたが、NP 様分化傾向は見られなかった。

3-3 二次元培養における ASC の AF 様細胞分化検討

二次元培養における ASC の AF 様分化を評価するため、Table 3-3-1 に示した条件の培養を行い、遺伝子発現解析により評価した。全てのサンプル測定数は 3 であり、データ数 3 未満は測定限界を下回ったデータである。

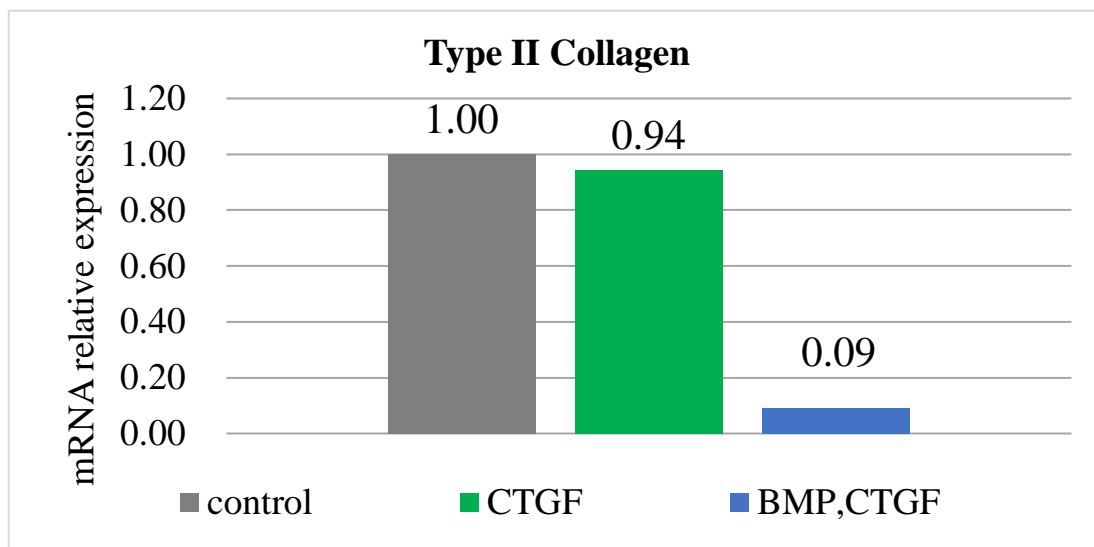
Table 3-3-1 二次元-AF 分化検討条件

サンプル名	BMP-13 (100 ng/mL)	CTGF (100 ng/mL)
control	-	-
CTGF	-	+
BMP,BMP	+	+



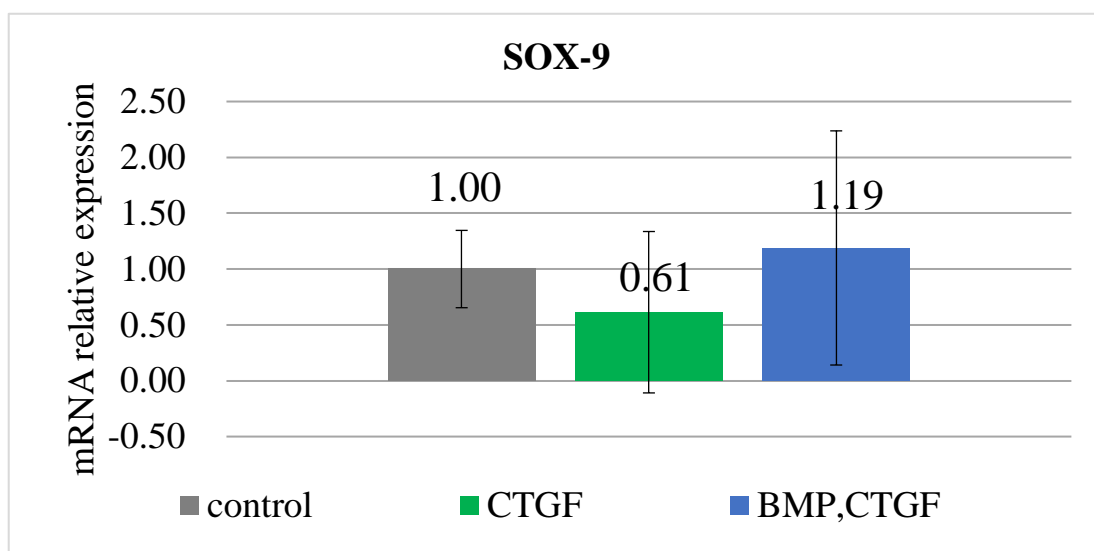
(n 数 control=3、CTGF=3、BMP,CTGF=3)

Fig.3-3-1 二次元-AF 分化による ASC の I 型コラーゲン遺伝子発現変化
「CTGF」条件では「control」に比べ、I 型コラーゲン発現が 1.69 倍までの上昇傾向が見られたが、BMP-13 を加えたことで、0.64 倍まで減少傾向が見られた。



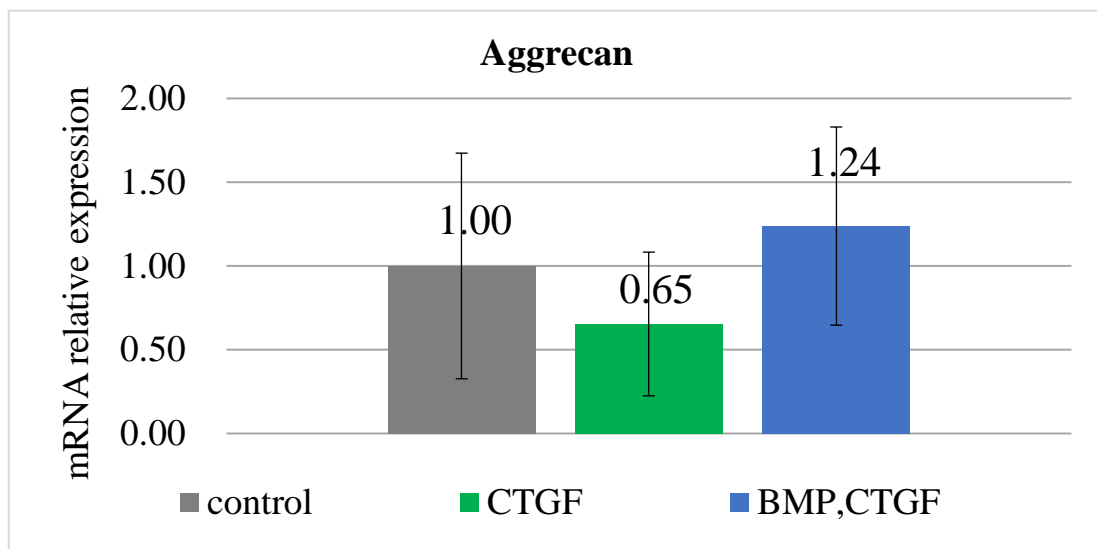
(n 数 control=1、CTGF=1、BMP,CTGF=1)

Fig.3-3-2 二次元-AF 分化による ASC の II 型コラーゲン遺伝子発現変化
「CTGF」条件では II 型コラーゲン発現の変化がない傾向が見られたが、
「BMP,CTGF」添加条件において「control」と比べ 0.09 倍までの減少傾向が見られ
た。



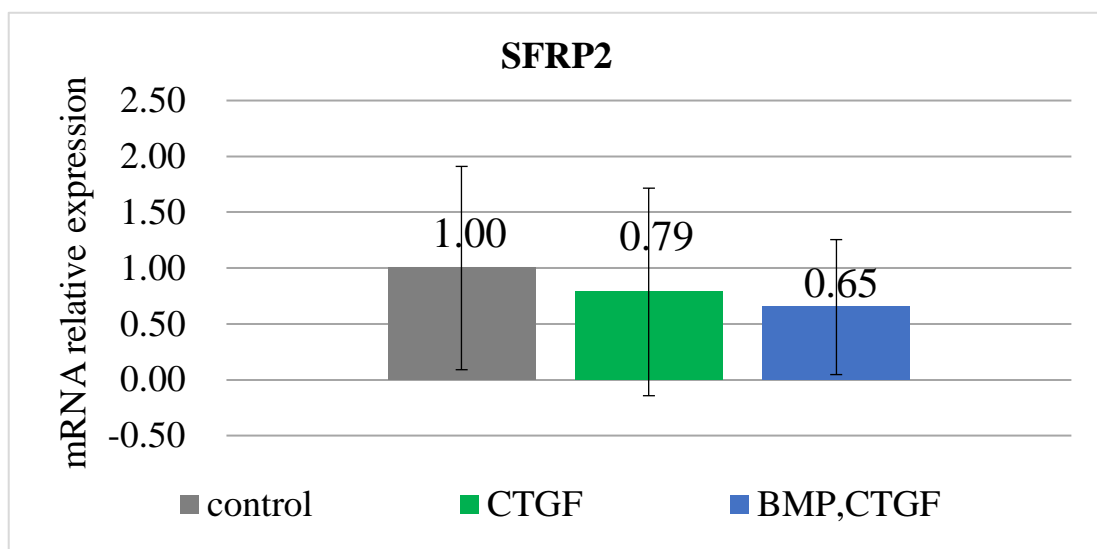
(n 数 control=3、CTGF=3、BMP,CTGF=3)

Fig.3-3-3 二次元-AF 分化による ASC の SOX-9 遺伝子発現変化
「CTGF」添加条件において、SOX-9 発現が 0.61 倍まで減少傾向を示した。しか
し、BMP-13 の添加により、1.95 倍までの増加傾向が見られた。



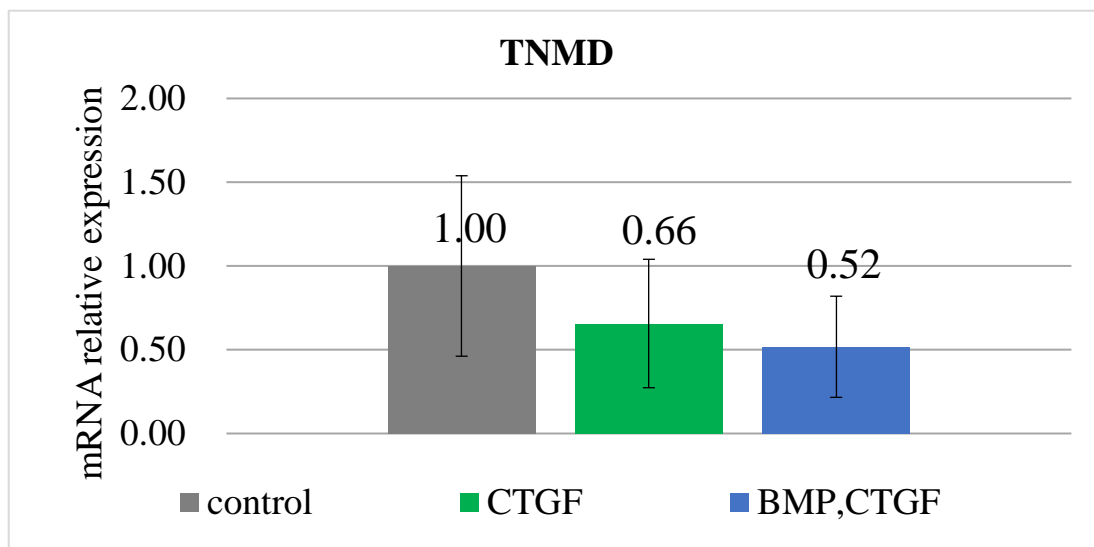
(n 数 control=2、CTGF=2、BMP,CTGF=3)

Fig.3-3-4 二次元-AF 分化による ASC のアグリカン遺伝子発現変化
「CTGF」条件においてアグリカン発現が 0.65 倍まで減少傾向を示した。しかし、「BMP,CTGF」条件において「CTGF」条件と比較して、1.91 倍までの増加傾向が見られた。



(n 数 control=3、CTGF=3、BMP,CTGF=3)

Fig.3-3-5 二次元-AF 分化による ASC の SFRP2 遺伝子発現変化
CTGF と BMP-13 の添加による SFR2 発現の増加傾向は見られなかった。



(n 数 control=3、CTGF=3、BMP,CTGF=3)

Fig.3-3-6 二次元-AF 分化による ASC の TNMD 遺伝子発現変化
BMP-13 と CTGF の添加による、テノモジュリンの増加傾向は見られなかった。

Table 3-3-2 二次元-AF 分化による ASC の遺伝子発現変化結果のまとめ

	control	CTGF	BMP,CTGF
I 型コラーゲン	-	○	-
II 型コラーゲン	-	-	×
SOX-9	-	×	-
SFRP2	-	×	-
Aggrecan	-	×	×
TNMD	-	×	×

すべての遺伝子について control を比較対照として上昇を○、減少を×とし、増減傾向が見られなかった遺伝子発現変化は-としてまとめた。○は AF 分化傾向を示した遺伝子発現変化であり、×は AF 分化に反する遺伝子発現変化である。

Table 3-3-2 より、CTGF 添加による I 型コラーゲンの増加傾向と SOX-9 やアグリカンの減少傾向から CTGF による線維芽様分化の傾向が見られた。しかし、BMP-13 と CTGF の添加では II 型コラーゲンの減少傾向や AF マーカーとなる SFRP2、テノモジュリンの増加傾向が見られなかったことから、短期、二次元培養における AF 様分化傾向は見られなかった。

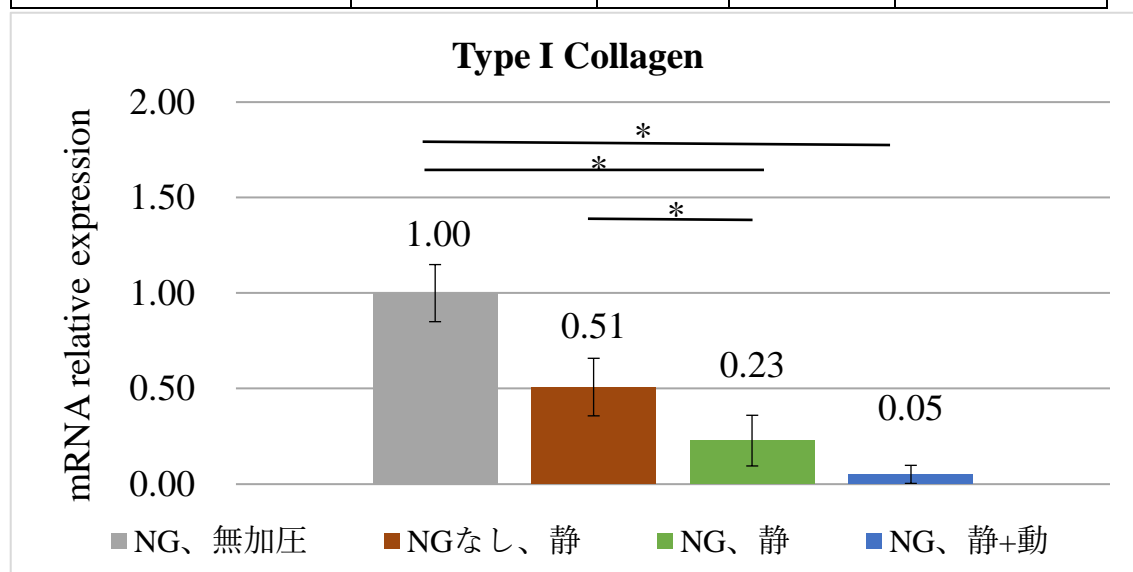
3-4 三次元培養における ASC の NP 様細胞分化検討

3-4-1 NG ビーズおよび加圧の NP モデルにおける影響調査

ゲルビーズによる細胞局在モデルの効果、静水圧および動的加圧の影響を調査するために、Table 3-4-1 に示した条件を遺伝子発現解析により比較した。全てのサンプル測定数は 4 であり、データ数 4 未満は測定限界を下回ったデータである。

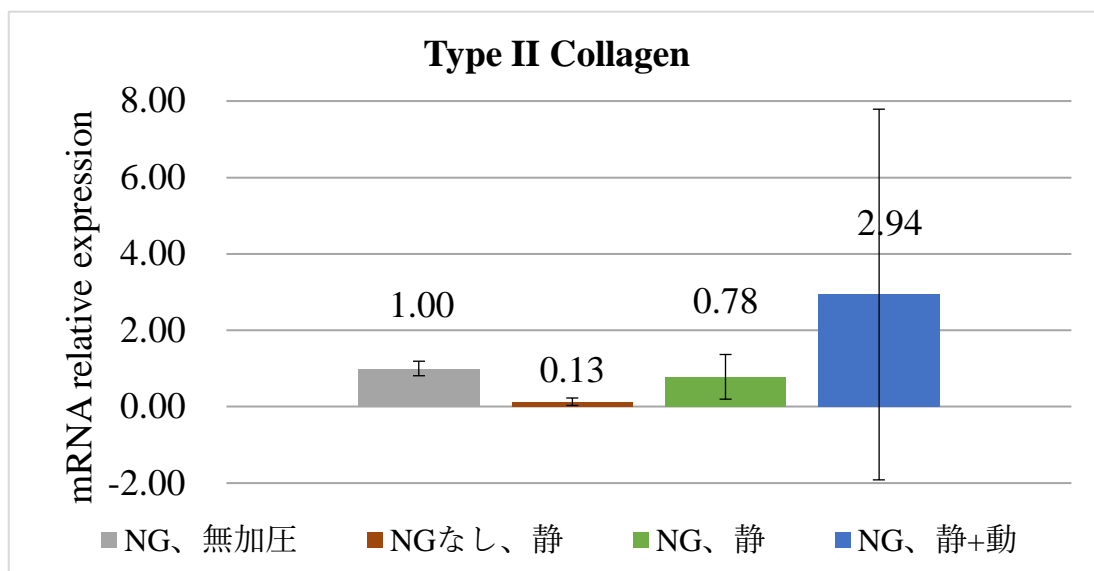
Table 3-4-1 NG ビーズ、静水圧、動的加圧による影響調査

条件名	NG ビーズ種	静水圧	動的加圧	BMP-13 含有
NG、無加圧	NG	-	-	-
NG なし、静	なし	+	-	-
NG、静	NG	+	-	-
NG、静+動	NG	+	+	-



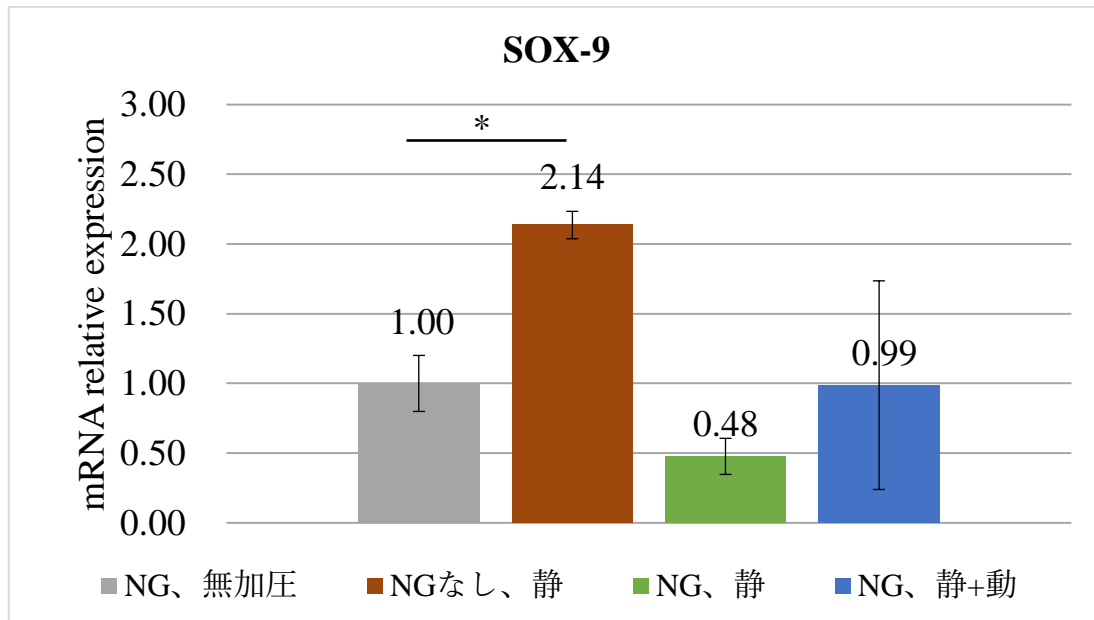
(n 数 全て n=4)

Fig.3-4-1 NG ビーズ、加圧刺激による ASC の I 型コラーゲン遺伝子発現変化
「NG、無加圧」と「NG、静」の比較から、静水圧によって I 型コラーゲン発現が 0.23 倍まで減少した。さらに、動的加圧を加える事で、0.30 倍の減少傾向が見られた。また、「NG なし、静」に比べ「NG、静」において 0.45 倍まで減少した。



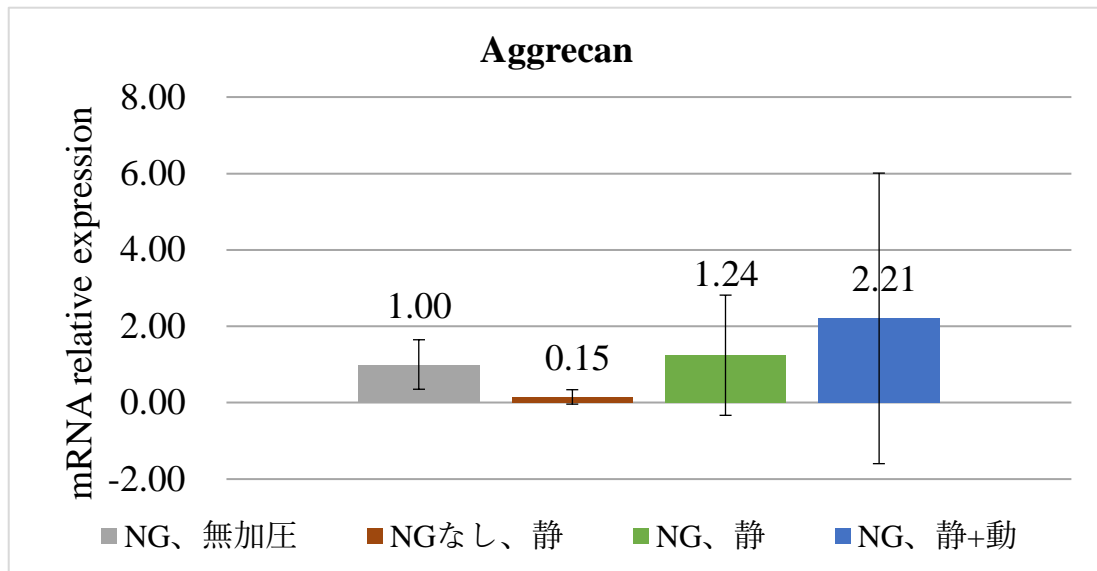
(n 数 全て n=4)

Fig.3-4-2 NGビーズ、加圧刺激による ASC の II 型コラーゲン遺伝子発現変化
 「NGなし、静」では「NG、無加圧」に比べて II 型コラーゲン発現が 0.10 倍までの減少傾向を示したが、「NG、静+動」では 2.94 倍までの増加傾向を示した。また、「NGなし、静」と「NG、静」を比較した際、「NG、静」が 6.0 倍の II 型コラーゲン発現の増加傾向が見られた。



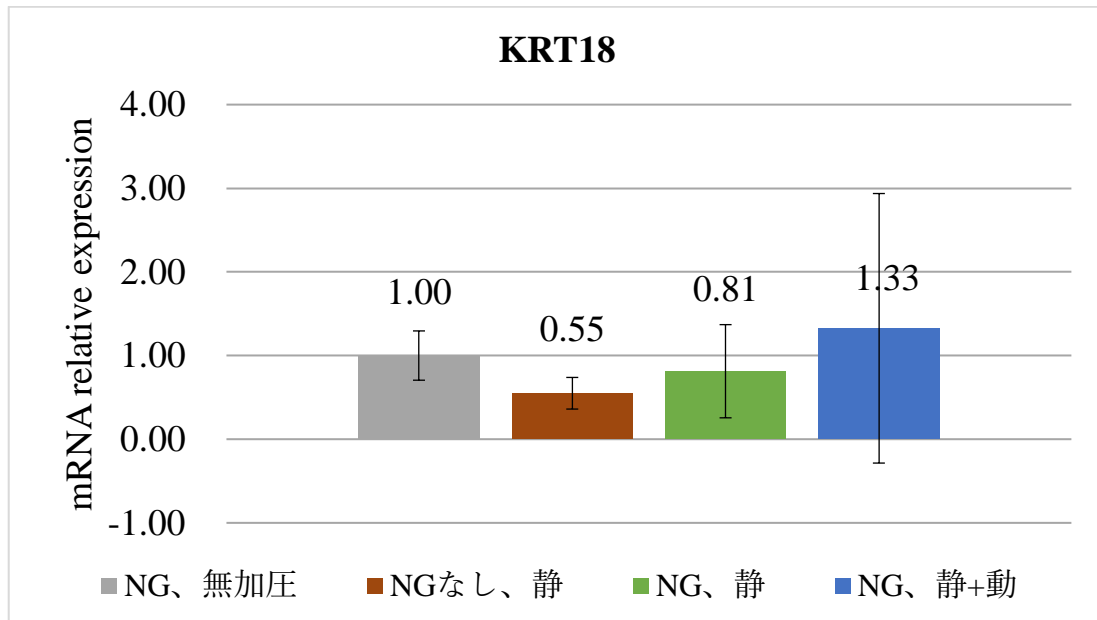
(n 数 全て n=4)

Fig.3-4-3 NGビーズ、加圧刺激による ASC の SOX-9 遺伝子発現変化
 SOX-9 発現について「NG、無加圧」と比較して、「NGなし、静」では 2.14 倍まで増加したが、「NG、静」では 0.48 倍までの減少傾向が見られた。「NG、静+動」では SOX-9 発現に変化がない傾向が見られた。



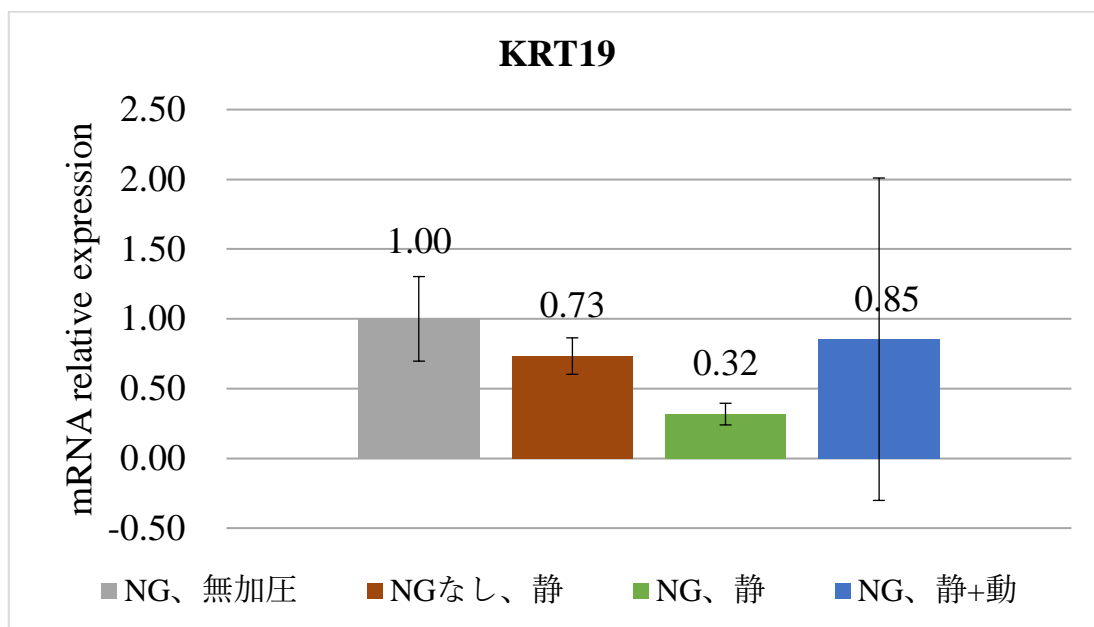
(n 数 NG、無加圧=4、NGなし、静=3、NG、静=3、NG、静+動=4)

Fig.3-4-4 NGビーズ、加圧刺激によるASCのAggrecan遺伝子発現変化
 アグリカン発現について、「NGなし、静」では0.15倍までの減少傾向が見られたが、「NG、静」では増減は小さく、「NG、静+動」では2.21倍までの増加傾向が見られた。



(n 数 全て n=4)

Fig.3-4-5 NGビーズ、加圧刺激によるASCのKRT18遺伝子発現変化
 「NG、無加圧」と比べて、「NGなし、静」や「NG、静」ではKRT18発現の減少傾向が見られたが、「NG、静+動」では1.33倍までの増加傾向が見られた。



(n 数 全て n=4)

Fig.3-4-6 NG ビーズ、加圧刺激による ASC の KRT19 遺伝子発現変化
KRT18 同様に NG、無加圧と比べて、「NG、静」では KRT19 発現の減少傾向が見られたが、「NG なし、静」や「NG、静+動」では変化がない傾向が見られた。

Table 3-4-2 三次元-NP 分化による ASC の遺伝子発現変化結果のまとめ

	NG、無加圧	NG なし、静	NG、静	NG、静+動
I 型コラーゲン	-	○	○	○
II 型コラーゲン	-	×	-	○
SOX-9	-	○	×	-
Aggrecan	-	×	-	○
KRT18	-	×	-	○
KRT19	-	-	×	-

「NG、無加圧」を比較対象として、線維化マーカーである I 型コラーゲンは減少を○、上昇を×とし、その他遺伝子については上昇を○、減少を×とし、増減傾向が見られなかった遺伝子発現変化は-としてまとめた。○は NP 分化傾向を示した遺伝子発現変化であり、×は NP 分化に反する遺伝子発現変化である。

これらの結果をまとめると、「NG 無加圧」と「NG、静」の比較から、静水圧によって、I 型コラーゲン発現の減少傾向は見られた。しかし、NP 分化に関係する遺伝子発現に大きな変化傾向は見られなかった。従って、NG ビーズと静水圧による十分な NP 分化は見られなかった。

「NGなし、静」と「NG、静」の比較から NG ビーズによって I 型コラーゲンの減少傾向や II 型コラーゲン、アグリカンの増加傾向が見られた。しかし、NP マーカーである KRT18 や 19 は「NGなし、静」と同様の傾向を示した。従って、NG ビーズによる軟骨化分化の促進傾向は見られたが、NP 様分化傾向は見られなかった。

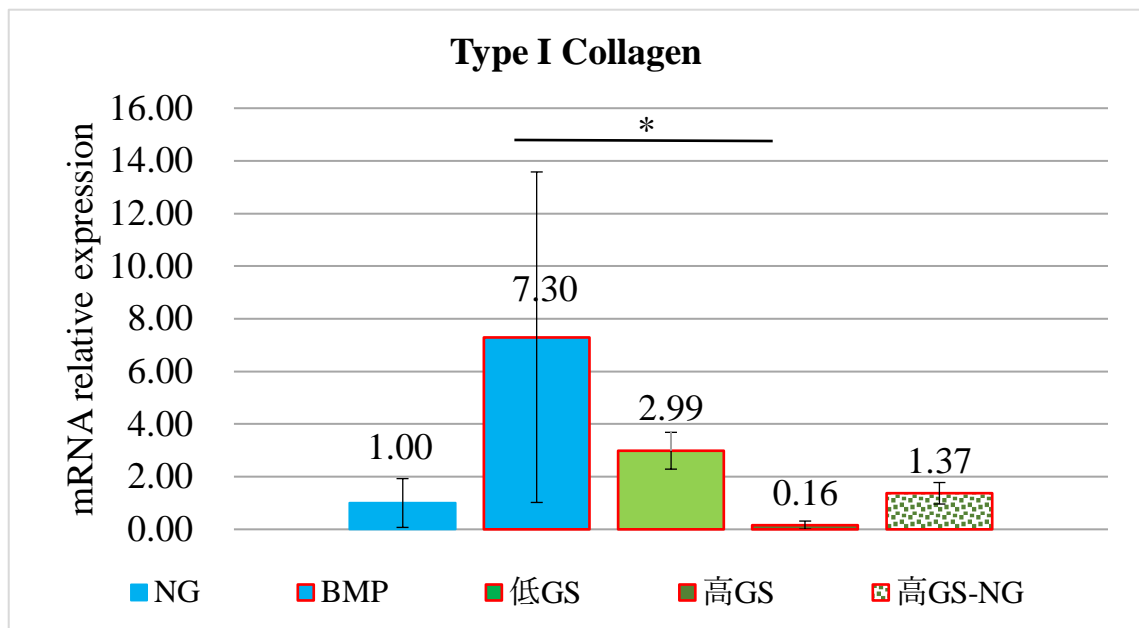
「NG、無加圧」と「NG、静+動」の比較から、「NG、静+動」では I 型コラーゲン発現の減少傾向がみられ、さらに軟骨化マーカーである II 型コラーゲンやアグリカンの増加傾向、NP マーカーである KRT18 の増加傾向が見られた。従って、NP 様への分化傾向が見られた。

3-4-2 GS 含有 NP モデルにおける影響調査

GS と BMP-13 含有 NG および静+動加圧を加えた NP モデルによる影響調査のために、Table 3-4-3 に示した条件を遺伝子発現解析により比較した。全てのサンプル測定数は 4 であり、データ数 4 未満は測定限界を下回ったデータである。

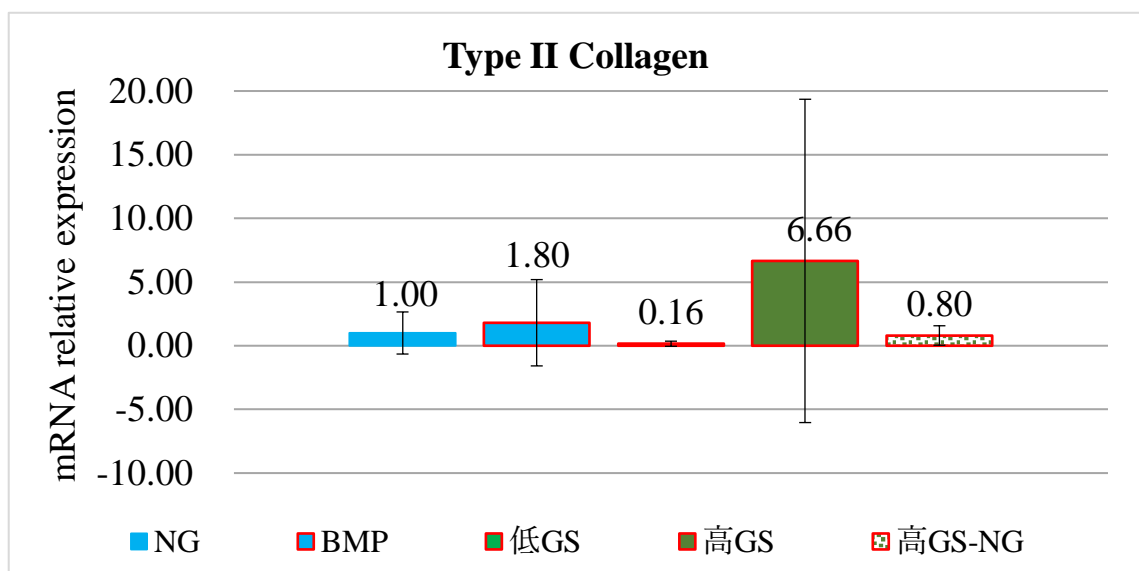
Table 3-4-3 GS、BMP-13 添加 NP モデルによる影響調査

サンプル名	NG ビーズ種	静水圧	動的加圧	BMP-13 含有
NG	NG	+	+	-
BMP	NG	+	+	+
低 GS	低 GS+NG	+	+	+
高 GS	高 GS+NG	+	+	+
高 GS-NG	GS-NG + NG	+	+	+



(n 数 すべて n=4)

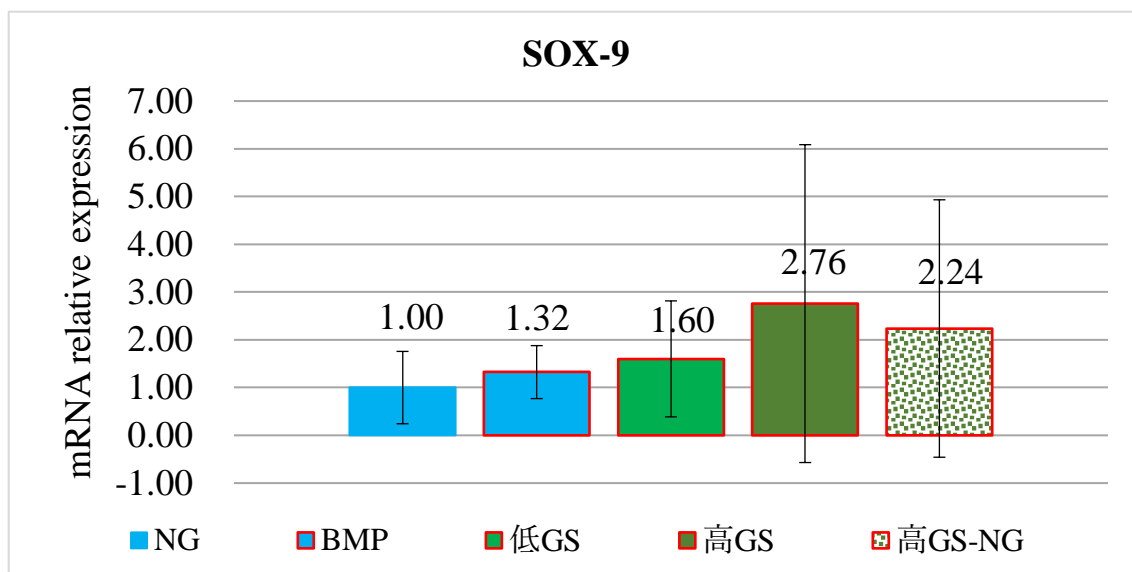
Fig.3-4-7 BMP、GS 含有 NP モデルによる ASC の I 型コラーゲン遺伝子発現変化「NG 静+動」と比較して、「BMP」では 7.30 倍、「低 GS」では 2.99 倍までの増加傾向が見られたが、「高 GS」では 0.16 倍までの減少傾向を示した。また「BMP」と「高 GS」の比較では「高 GS」が有意な減少を示した。



(n 数 NG=4、BMP=4、低 GS=4 高 GS=4、高 GS-NG=3)

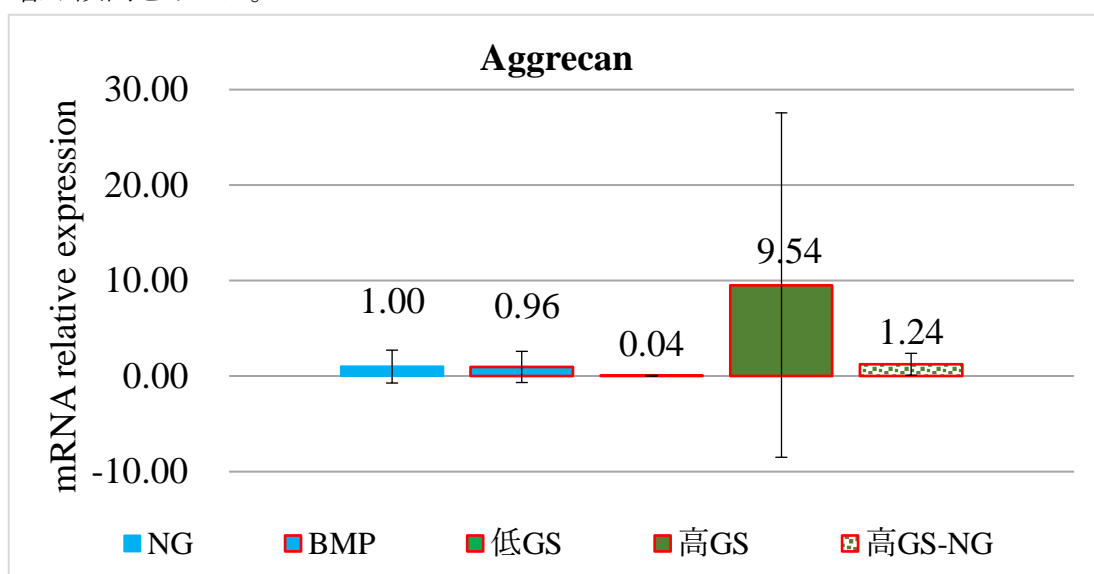
Fig.3-4-8 BMP、GS 含有 NP モデルによる ASC の II 型コラーゲン遺伝子発現変化「NG」と比較して、「BMP」では II 型コラーゲン発現が 1.80 倍の増加傾向を示した。また、「低 GS」では 0.16 倍まで減少傾向を示したが、「高 GS」では 6.66 倍まで

の増加傾向を示した。



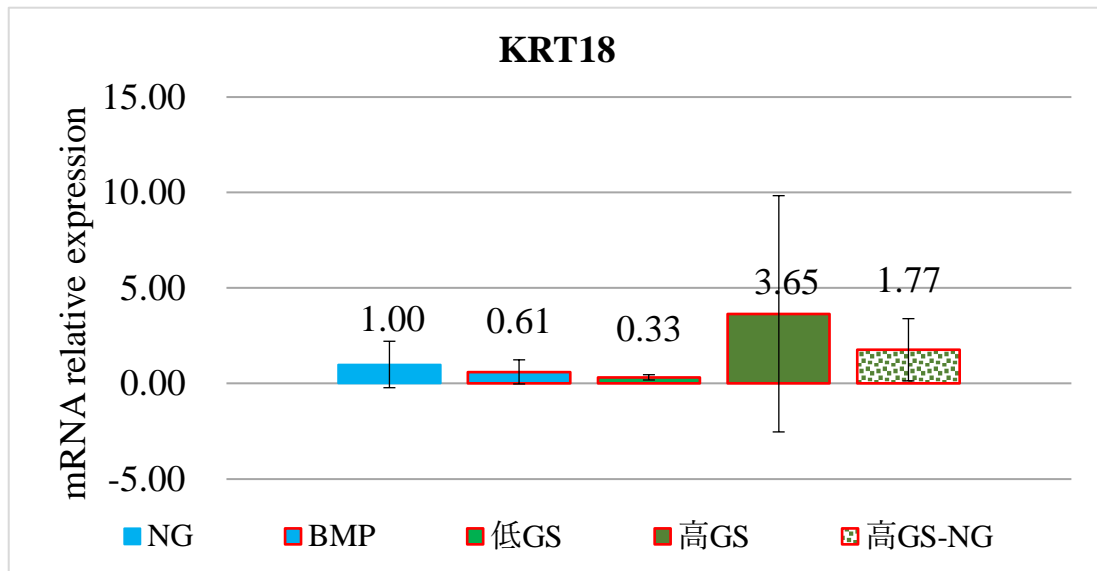
(n 数 すべて n=4)

Fig.3-4-9 BMP、GS 含有 NP モデルによる ASC の SOX-9 遺伝子発現変化
「NG」と比較して「BMP」において SOX-9 発現の 1.32 倍まで増加傾向を示し、さら
に「低 GS」では 1.60 倍、「高 GS」では 2.76 倍、「高 GS-NG」では 2.24 倍までの
増加傾向を示した。



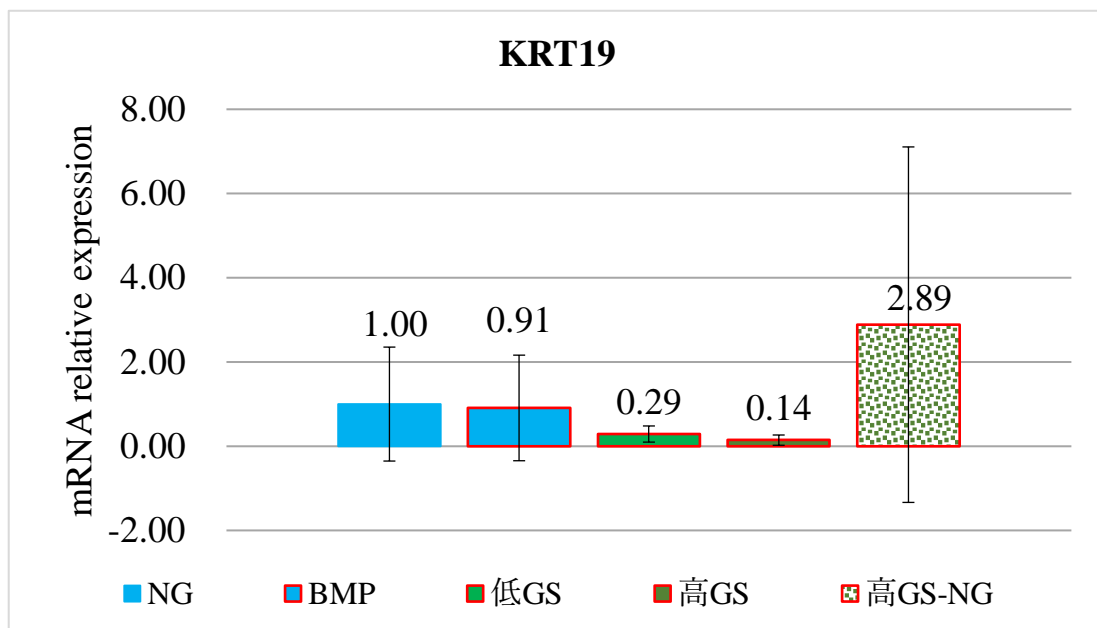
(n 数 NG=4、BMP=4、低GS=3 高GS=4、高GS-NG=3)

Fig.3-4-10 BMP、GS 含有 NP モデルによる ASC の Aggreacan 遺伝子発現変化
アグリカン発現について「NG」と比較して、「BMP」ではほとんど変化がなく、「低
GS」では 0.04 倍までの減少傾向を示したが、「高 GS」では 9.54 倍までの増加傾向
を示した。また、「高 GS-NG」では 1.24 倍までの増加傾向を示した。



(n 数 全て n=4)

Fig.3-4-11 BMP、GS 含有 NP モデルによる ASC の KRT18 遺伝子発現変化
 KRT18 発現について「NG、静+動」と比較して、「NG、BMP、静+動」では 0.61 倍、「低 GS、BMP、静+動」では 0.33 倍まで減少傾向を示したが、「高 GS、BMP、静+動」では 3.65 倍、「高 GS-NG、BMP、静+動」では 1.77 倍までの増加傾向を示した。



(n 数 全て n=4)

Fig.3-4-12 BMP、GS 含有 NP モデルによる ASC の KRT19 遺伝子発現変化

KRT19 発現について「NG、静+動」と比較して、「NG、BMP、静+動」ではほとんど変化はない傾向であり、「低 GS、BMP、静+動」では 0.29 倍までの減少傾向が見られた。また、「高 GS、BMP、静+動」では KRT18 が増加傾向であったが、KRT19 では 0.14 倍までの増加傾向を示した。しかし、同様に高 GS を含む「高 GS-NG、BMP、静+動」では 2.89 倍までの増加傾向を示した。

Table 3-4-4 BMP、GS 含有 NP モデルによる ASC の遺伝子発現変化結果のまとめ

	NG	BMP	低 GS	高 GS	高 GS-NG
I 型コラーゲン	-	×	×	○	-
II 型コラーゲン	-	○	×	○	-
SOX-9	-	○	○	○	○
Aggrecan	-	-	×	○	-
KRT18	-	×	×	○	○
KRT19	-	-	×	×	○

「NG」を比較対象として、線維化マーカーである I 型コラーゲンは減少を○、上昇を×とし、その他遺伝子については上昇を○、減少を×とし、増減傾向が見られなかった遺伝子発現変化は-としてまとめた。○は NP 分化傾向を示した遺伝子発現変化であり、×は NP 分化に反する遺伝子発現変化である。

「低 GS」では NP マーカーの減少傾向を示したが、「高 GS」では KRT19 以外の NP マーカーの増加傾向を示した。従って、NP 分化には高硫酸化率の GS が必要である可能性が見られた。

「高 GS-NG」では、NP 分化に不利な遺伝子発現の増減はなく、SOX-9 や KRT18、19 の上昇傾向を示したことから、NP 分化に有効である可能性が見られた。

3-5 三次元培養における ASC の AF 様細胞分化検討

AF モデルにおける ASC の分化を評価するため、Table 3-4-1 に示した条件の培養を行い、遺伝子発現解析により評価した。全てのサンプル測定数は 3 であり、データ数 3 未満は測定限界を下回ったデータである。

Table 3-5-1 AF モデル培養条件

サンプル名	コラーゲン膜の種類	加圧	BMP-13 (100 ng/mL) CTGF (100 ng/mL)
無配向	無配向	-	-
無配向、B,C	無配向	-	+
無配向、加圧	無配向	+	-
無配向、B,C、加圧	無配向	+	+
配向	配向	-	-
配向、B,C	配向	-	+
配向、加圧	配向	+	-
配向、B,C、加圧	配向	+	+

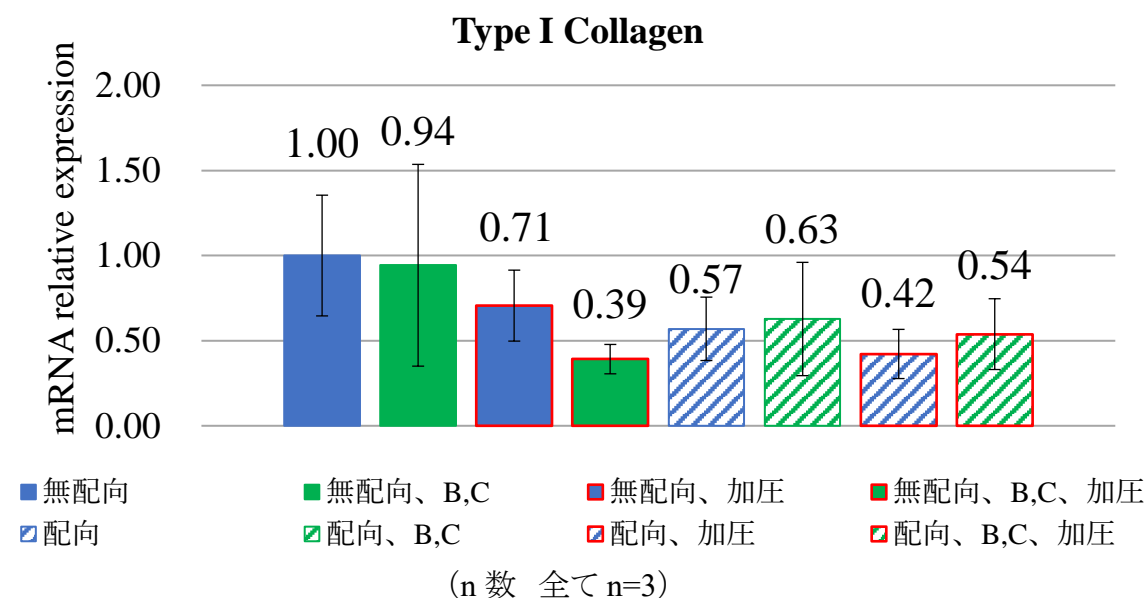


Fig.3-5-1 AF モデルによる ASC の I 型コラーゲン遺伝子発現変化
 一律して、加圧条件を加えることで I 型コラーゲン発現の減少傾向が見られた。「配向、B,C、加圧」において、「無配向」と比較すると 0.54 倍までの減少傾向がみられたが、「無配向、B,C、加圧」と比較すると 1.38 倍、「配向、加圧」と比較すると 1.29 倍までの増加傾向が見られた。従って、BMP-13 と CTGF の添加や配向膜によって加圧による I 型コラーゲン発現の減少を抑制する可能性が見られた。

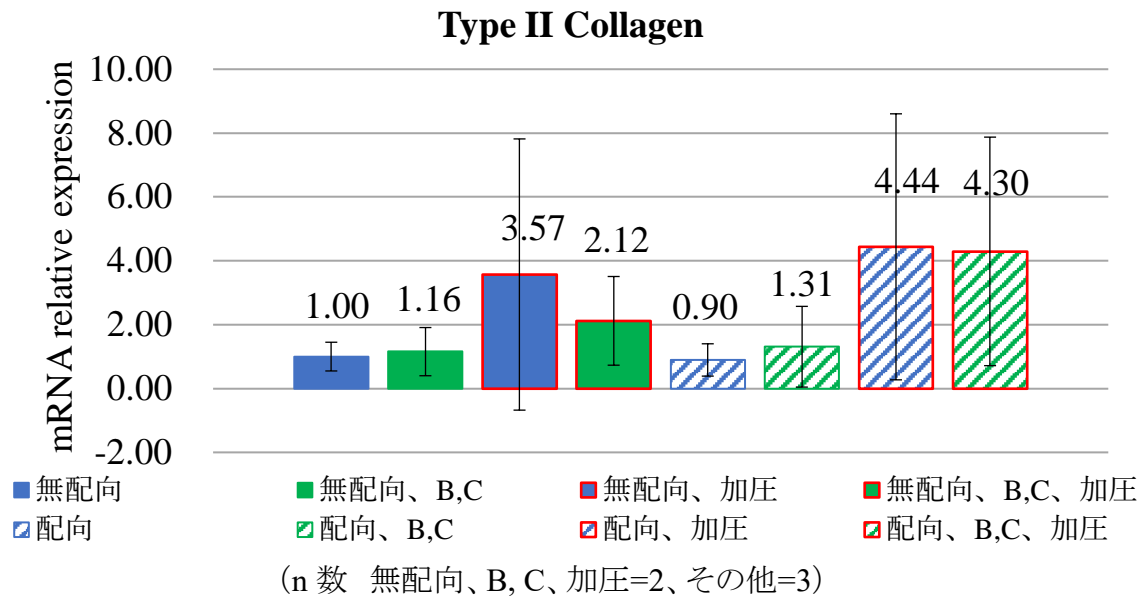


Fig.3-5-2 AF モデルによる ASC の II 型コラーゲン遺伝子発現変化

一律して、加圧条件を加える事で II 型コラーゲン発現が増加傾向にあり、特に「配向、加圧」と「配向」の比較では 4.93 倍、「配向、B,C、加圧」と「配向、B,C」の比較では 3.28 倍の増加傾向を示した。

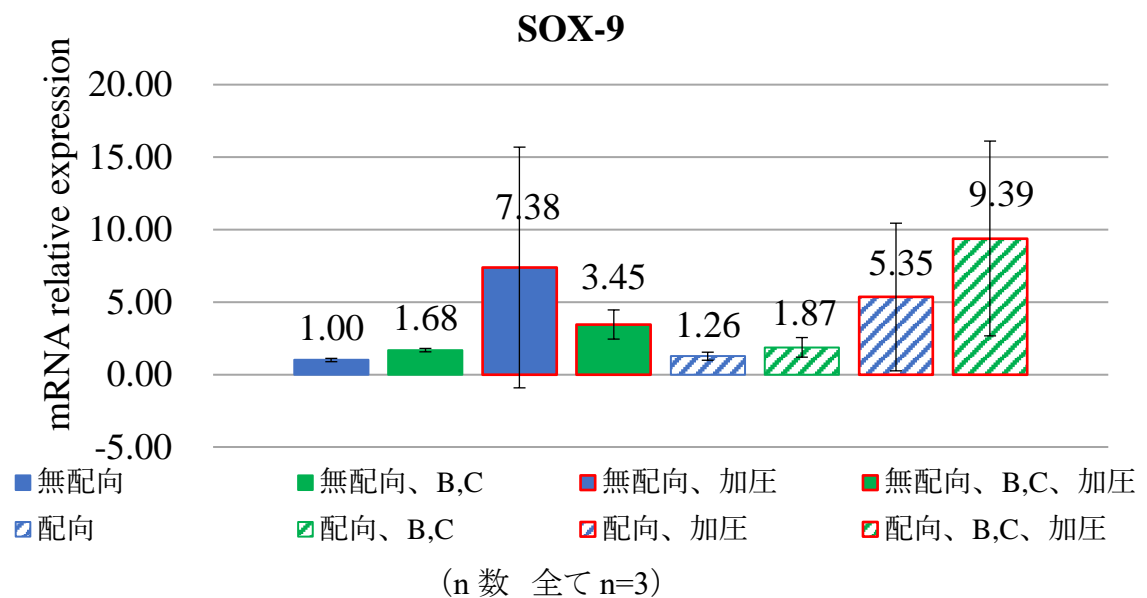


Fig.3-5-3 AF モデルによる ASC の SOX-9 遺伝子発現変化

SOX-9 発現は II 型コラーゲン発現の増減と類似した増減傾向を示しており、加圧によって増加傾向を示した。また、「配向、B,C、加圧」では「無配向」と比較して最も高い 9.39 倍の増加傾向を示した。

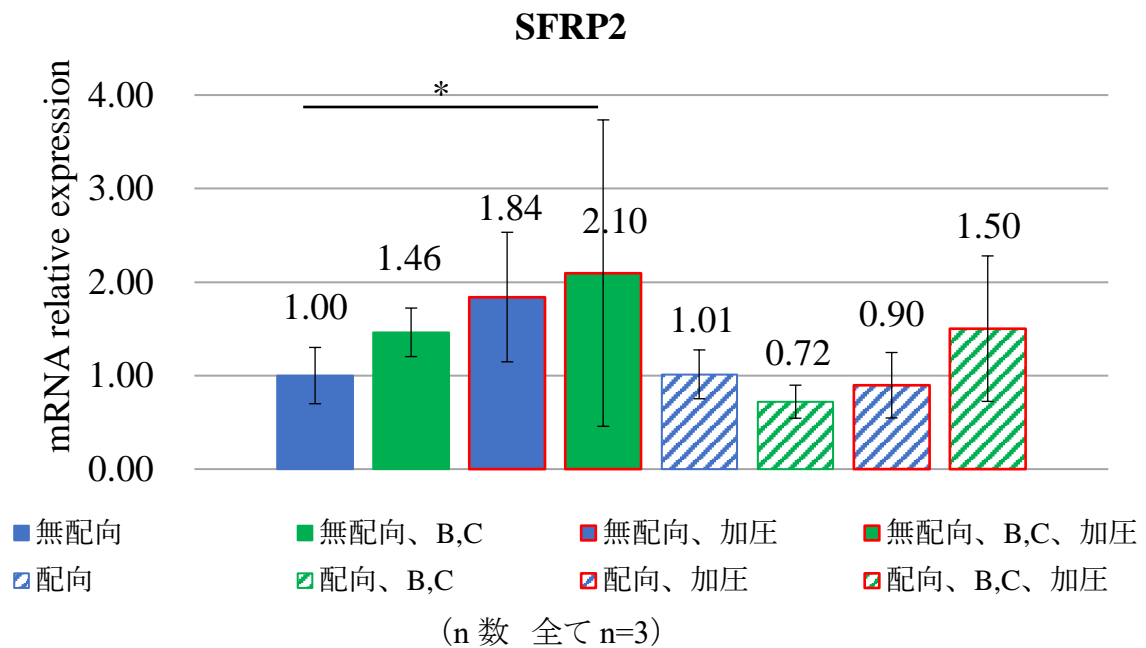


Fig.3-5-4 AF モデルによる ASC の SFRP2 遺伝子発現変化

「無配向」条件、「配向」条件ともに BMP-13、CTGF を添加し、加圧刺激を加えた条件において最も高い SFRP2 発現の増加傾向を示し、「無配向、B,C、加圧」と「無配向」の比較では 2.10 倍増加し、「配向、B,C、加圧」と「配向」の比較では 1.49 倍の増加傾向を示した。

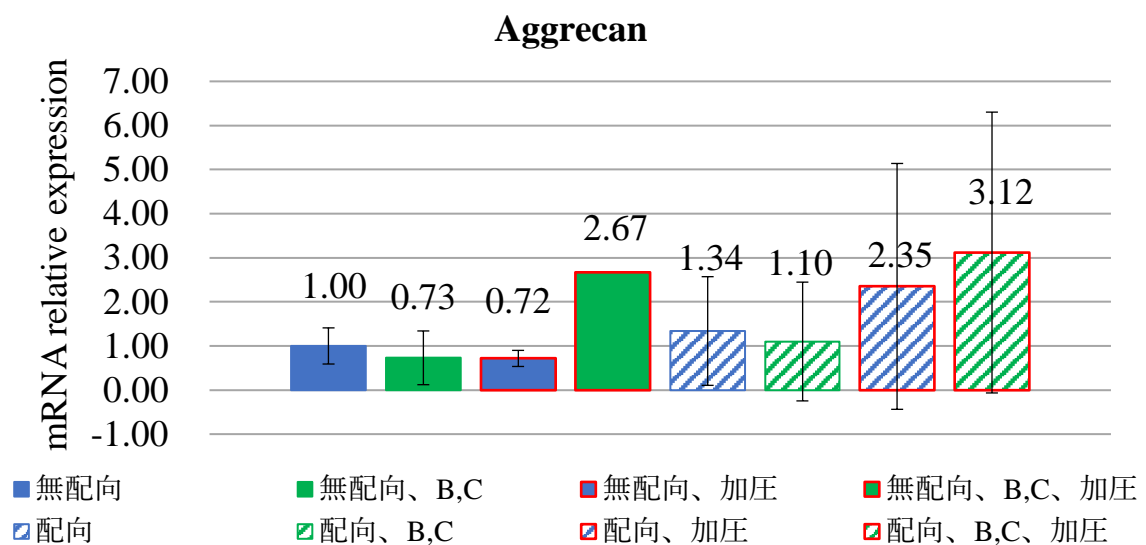


Fig.3-5-5 AF モデルによる ASC の Aggrecan 遺伝子発現変化

BMP-13、CTGF 添加をし、加圧刺激を行った条件にてアグリカン発現の増加傾向が見られ、「無配向」条件と比較して、「無配向、B,C、加圧」では 2.67 倍、「配向、B,C、加圧」では 3.12 倍の増加傾向を示した。

TNMD

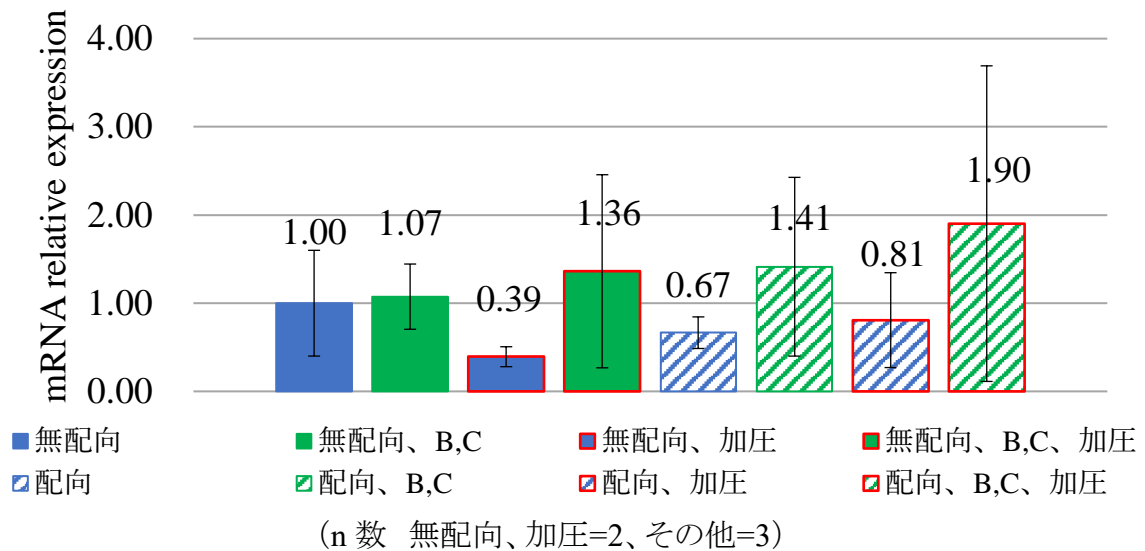


Fig.3-5-6 AF モデルによる ASC の TNMD 遺伝子発現変化

BMP-13、CTGF の添加によりテノモジュリン発現の増加傾向が見られた。「無配向」と比較して、「無配向、B,C、加圧」では 1.36 倍、「配向、B,C」では 1.41 倍の増加傾向が見られた。さらに、「配向、B,C、加圧」では「無配向、B,C、加圧」と比較して 1.40 倍、「配向、B,C」と比較して 1.35 倍の増加傾向が見られ、配向、BMP-13 および CTGF 添加、加圧刺激の相乗的な効果によるテノモジュリン発現の増加傾向が見られた。

Table 3-5-2 AF モデルによる ASC の遺伝子発現変化結果のまとめ

サンプル名	Col1	Col2	SOX-9	SFRP2	AGR	TNMD
無配向	-	-	-	-	-	-
無配向、B,C	-	-	-	-	-	-
無配向、加圧	×	○	○	○	-	×
無配向、B,C、加圧	×	○	○	○	○	○
配向	×	-	-	-	-	×
配向、B,C	×	-	-	-	-	○
配向、加圧	×	○	○	-	○	×
配向、B,C、加圧	×	○	○	○	○	○

すべての遺伝子について control を比較対照として上昇を○、減少を×とし、増減傾向が見られなかった遺伝子発現変化は-としてまとめた。○は AF 分化傾向を示した遺伝子発現変化であり、×は AF 分化に反する遺伝子発現変化である。

Col1: I 型コラーゲン、Col2: II 型コラーゲン、AGR: アグリカン、TNMD: テノモジュリン

Table3-5-2 より、配向、BMP-13 および CTGF の添加、加圧刺激による I 型コラーゲン発現の増加傾向は見られなかったが、加圧刺激による I 型コラーゲン発現の減少傾向を BMP-13 と CTGF の添加や配向足場条件によって抑制する可能性が見られた。

「無配向、B,C、加圧」および「配向、B,C、加圧」において I 型コラーゲン以外の全ての AF マーカー遺伝子について、増加傾向を示した。「配向、B,C、加圧」と「無配向、B,C、加圧」を比較した際、SFRP2 では 0.71 倍までの減少傾向が見られたが、I 型コラーゲンは 1.38 倍、II 型コラーゲンは 2.03 倍、SOX-9 は 2.72 倍、アグリカンは 1.17 倍、テノモジュリンは 1.40 倍の増加傾向を示したことから、「配向、B,C、加圧」による ASC の AF 様分化が最も有効であった事が示された。

4. 考察

4-1 GS 特性評価

42.25%GS と 11.61%GS の BMP-13 へのアフィニティーは大きな差が見られ、42.25%GS にて高いアフィニティーを示した。以前の研究よりジェランの硫酸化は D-グルコース C-6 の水酸基、L-ラムノース C-2 水酸基が優先的に硫酸化されることが報告されている⁽⁹⁾⁽³⁸⁾。また、32.0% GS の構造解析より、D-グルコースの C-4 の水酸基、D-グルコース C-6 の水酸基、L-ラムノース C-2 水酸基が硫酸基に置換されていることが報告されている⁽⁹⁾。このことから、11.61%GS と 42.25%GS は共に D-グルコース C-6、L-ラムノース C-2 の硫酸基を有しているが、D-グルコースの C-4 硫酸基は 42.25%GS のみ多く存在すると考えられる。42.25%GS が BMP-13 に対して 11.61%GS より強いアフィニティーを示したことから、D-グルコースの C-4 硫酸化が BMP-13 結合に重要である可能性が考えられた。

また、D-グルコースの C-4 の水酸基、D-グルコース C-6 の水酸基、L-ラムノース C-2 水酸基がすべて硫酸化されたと仮定した際の GS 硫酸化率は 35.3%である。従って、42.25%GS はさらに異なる位置の硫酸基をもつと考えられ、その硫酸基が BMP-13 結合に重要である可能性も考えられる。今後の研究において、硫酸化率分画および構造解析をした GS によるアフィニティー調査によって、GS 結合部位に関するさらなる調査が必要であると考えられた。

4-2 二次元培養における ASC の NP 様分化誘導

Louise E Clarke らによって、BMP-13 の添加によって ASC が NP 様に分化することが示されている⁽¹⁸⁾。また、二次元培養によって I 型コラーゲン発現が増加し、II 型コラーゲンや SOX-9 の発現が減少した NP 細胞に対して GS を添加することで、軟骨様分化を誘導することが示されている⁽²⁸⁾。従って、本研究では二次元培養における BMP-13 と GS 添加による ASC の NP 様分化を目的とした培養を行った。

BMP-13 の添加ではアグリカン発現の増加傾向が見られたが、II 型コラーゲン、SOX-9、KRT18、KRT19 の増加傾向が見られなかった (Fig.3-2-2, -3, -4, -5, -6)。従って、ASC が NP 様に分化していないことが示唆された。ASC および NP 細胞において二次元培養において、脱分化を状態となり、増殖傾向が高くなっていると考えられる。従って、BMP-13 による ASC の NP 様分化が起きると同時に、二次元培養によって NP 様分化をしている ASC の脱分化が起きている可能性が考えられる (Fig.4-2-1)。これにより、本研究における 3 日間という培養期間では十分な NP 様分化が起きなかったと考えられた。

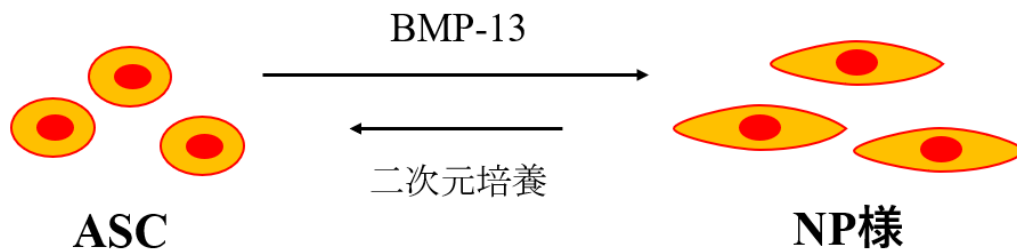


Fig.4-2-1 BMP-13 添加-二次元培養における ASC の分化傾向

二次元培養における GS の添加では I 型コラーゲン発現の減少傾向がみられ、SOX-9、アグリカン発現の上昇傾向が見られた (Fig.3-2-1, -3, -4)。従って、ASC の軟骨様分化が促進されたことが示唆された。

Fig.3-4-7 においても、「高 GS」によって I 型コラーゲン発現の減少が見られたことから、GS が I 型コラーゲン発現の減少に関連していると考えられた。しかし、「低 GS」および「高 GS-NG」では I 型コラーゲンの減少傾向が見られなかった。「高 GS」と「低 GS」の違いは GS の硫酸化率であり、「高 GS」と「GS-NG」の違いは分子量が違うことによる GS の NG ビーズから流出する割合であると考えられる。従って、様々なたんぱく質に対してアフィニティーをもつ可能性がある高硫酸化率の GS が NG ビーズから流出することで、I 型コラーゲン発現を減少させたと考えられる。このことから、GS は培地内のタンパク質に結合して I 型コラーゲン発現を阻害してはならず、ASC の I 型コラーゲン発現に関連するレセプターに直接結合することで I 型コラーゲン発現を阻害している可能性が示唆された。また、低 GS ではレセプターに対するアフィニティーが小さいために阻害効果が現れなかったと考えられた (Fig.4-2-2)。Nicola Alessio らによって、MSC に対してケラタン硫酸やコンドロイチン硫酸の添加することで I 型コラーゲン発現の増加が示されていることから、I 型コラーゲンの減少は高硫酸化による特異的影響であると考えられた⁽³⁹⁾。

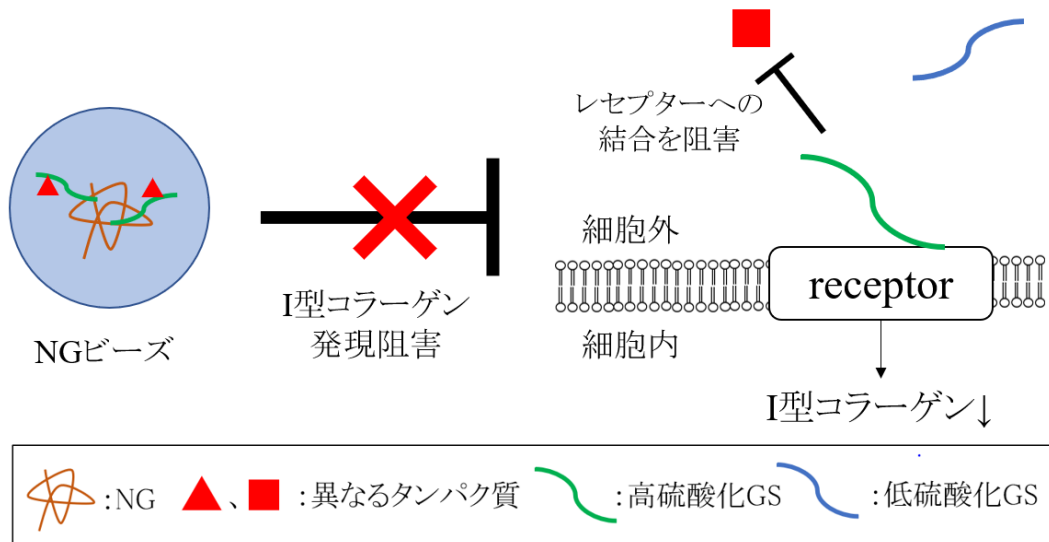


Fig. 4-2-2 GS による I 型コラーゲン発現の抑制

Table 2-3-2 より、アグリカン発現について「BMP」や「GS」条件では増加傾向であったが、「GS,BMP」条件では減少傾向を示した。また、「GS,BMP」はその他の遺伝子発現についても「GS」よりも NP 分化傾向を示した遺伝子はなかった。従って、BMP-13 と GS の併用では相乗的効果による NP 様分化が示されなかった。これは GS と BMP-13 のアフィニティーにより、培地内に遊離した GS と BMP-13 が結合し、BMP-13 がレセプターへ結合することを阻害してしまった可能性が考えられた (Fig.4-2-3)。

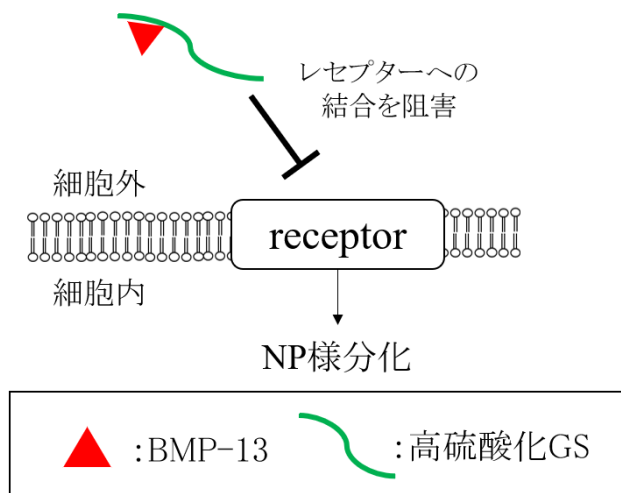


Fig.4-2-3 GS による BMP-13 の阻害

4-3 二次元培養における ASC の AF 様分化誘導

CTGF の添加により ASC の I 型コラーゲン発現の増加および繊維芽様分化が報告されていることから、本研究では ASC を NP 様に分化させると報告されている BMP-13 と併用することで、線維軟骨に属する線維輪細胞へ分化させることを目的とした^{(18) (21)(22)}。二次元培養における CTGF の添加では I 型コラーゲンの発現の増加傾向が見られ、繊維芽様に分化傾向が示唆された。しかし、BMP-13 と CTGF の添加では増加傾向の見られた遺伝子はなく、AF 様への分化は見られなかった (Table3-3-2)。

CTGF は ASC において FAK や ERK1/2 を介して、I 型コラーゲンやテノモジュリン、アグリカン発現の増加が報告されている⁽⁴⁰⁾。BMP-13 は BMPRA1 (BMP receptor A1)、BMPRII、BMPRII、ACVR2A (Activin Receptor 2A)、ACVR2B いずれかに結合して Smad1/5/8 や ERK1/2 を介した BMP シグナルにより、軟骨および NP 分化を誘導することが報告されている⁽¹⁷⁾。これらを用いたことで線維軟骨様へ分化することを想定したが、AF 分化傾向はみられなかった。CTGF は BMP を含む TGF- β ファミリーと結合することで、シグナル伝達を促進または阻害することが報告されている。CTGF は BMP と結合することで BMP の BMPRA1 への結合を阻害する⁽⁴¹⁾。従って、BMP-13 による軟骨分化が抑制され、且つ細胞へ結合する CTGF が減少したために、「BMP,CTGF」条件では「CTGF」条件と比較して II 型コラーゲンや I 型コラーゲン、テノモジュリン発現の減少傾向を示したと考えられた (Fig.3-3-1, -2, -6)。しかし、SOX-9 やアグリカンは「CTGF」条件より「BMP,CTGF」の発現が高い傾向を示した。これは、CTGF と BMP-13 によって、共通に促進される ERK1/2 経路を介したために、増加傾向を示したと考えられた (Fig.3-3-3, -4)。これらのシグナル経路を以下に示した (Fig.4-3-1)。

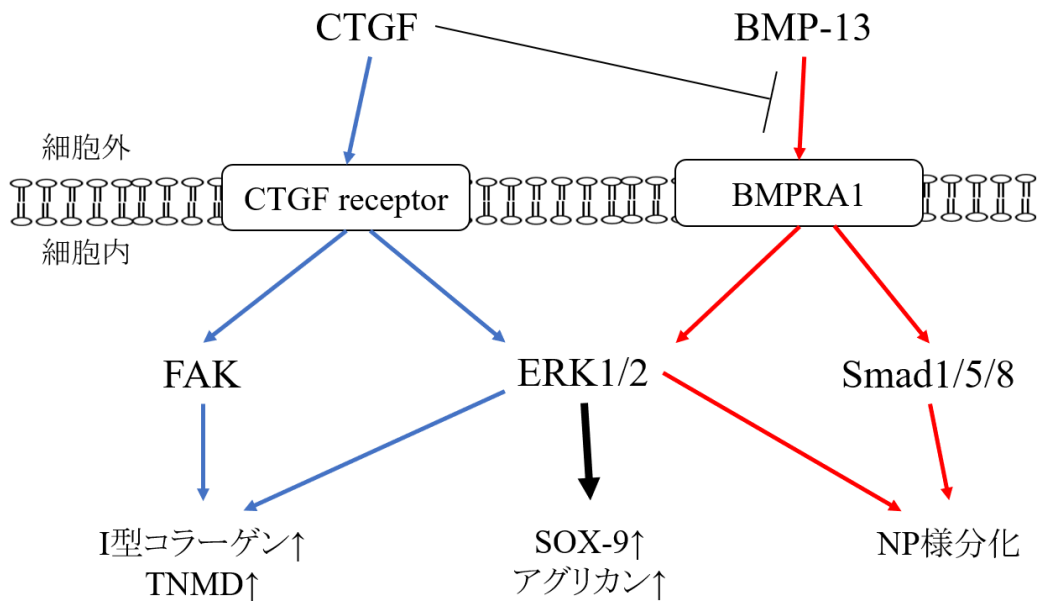


Fig.4-3-1 CTGF と BMP-13 シグナル経路

4-4 三次元培養における ASC の NP 様分化誘導

Table 3-4-2 における、「NG なし、静」と「NG、静」の比較より、II 型コラーゲン発現やアグリカン発現に減少傾向のない「NG、静」が NP 分化に有効であることが示唆された。Satoshi Sobajima らにより NP 細胞と MSC の接触的共培養によって MSC の NP 様分化が促進されることが示されている⁽⁴²⁾。従って、本研究においては一部の ASC が BMP-13 や加圧刺激によって NP 様分化した際、接触する ASC の NP 様分化を促進する可能性が考えられた。本研究では「NG、静」において NP マーカーの増加傾向が見られなかったが、長期培養においては NG ビーズを含む事で細胞と NG ビーズが密となり、細胞同士の接触が生じる事で NP 分化が促進される可能性があると考えられる (Fig.4-4-1)。

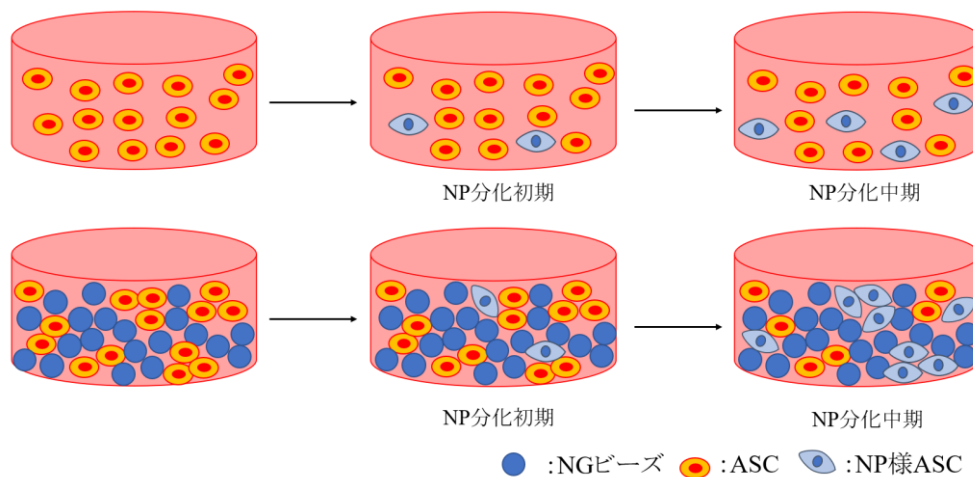


Fig.4-4-1 NG ビーズによる NP 様分化促進

Table 3-4-2 より、静水圧加圧により有意な I 型コラーゲン減少が見られ、さらに動的加圧を加える事で、II 型コラーゲン、アグリカン発現の上昇傾向がみられた。従って、静水圧と動的加圧によって軟骨分化が促進される傾向が示唆された。加圧培養によって ASC の軟骨様分化が報告されているが、静水圧と動的加圧の併用に関する研究は少ない⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾。本研究では、静水圧と動的加圧の併用によって ASC の軟骨分化が促進されることが示唆された。

これらの加圧刺激は細胞に対して異なった刺激を加えると考えられるが、どちらの加圧刺激に対しても TRPV4 というシグナルが軟骨分化を促進すると考えられている。しかし、動的加圧刺激をした際には直接的な加圧刺激だけでなく、細胞の形状および骨格に変化があると考えられる。Andrew J. Steward らは、動的圧縮下においてインテグリンを介した細胞外基質への結合が MSC の軟骨形成に重要であることを報告した⁽⁴⁵⁾。従って、細胞全体を水圧によって加圧する刺激、コラーゲンゲルの伸縮によって生じる細胞の形状変化、NG ビーズによる圧力や圧迫されることによる形状変化など様々な刺激が影響し、それらは TRPV4 およびインテグリンを介したシグナル伝達により相乗的な軟骨分化効果を示すことが示唆された (Fig.4-4-2)。

静水圧加圧のみの場合においても微小な細胞形状の変化が起きることや、動的加圧における細胞に対する加圧刺激が生じる事から、一方のみによる TRPV4 およびインテグリンを介した軟骨分化は誘導されるが、静水圧は TRPV4 を効果的に効果的に刺激し、動的加圧はインテグリンを介した軟骨分化を促進すると考えられることから、静水圧と動的加圧の併用が相乗効果を示すと考えられた (Fig.4-4-3)。

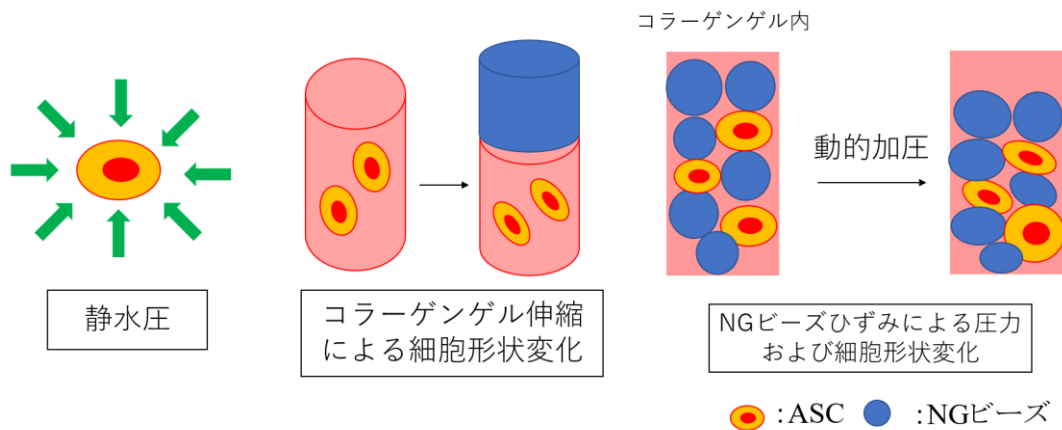


Fig.4-4-2 NP モデルにおいて ASC にかかる加圧刺激

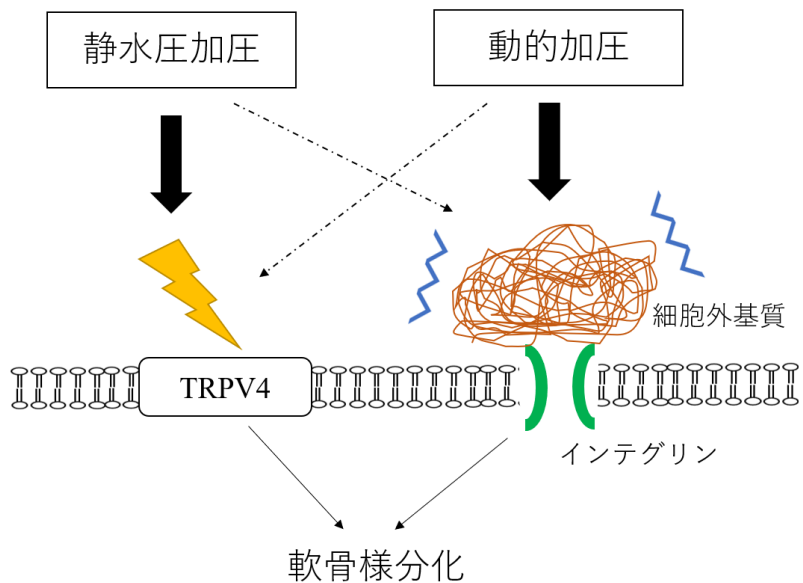


Fig.4-4-3 静水圧と動的加圧の違いおよび相乗効果

NP モデルでは NG ビーズに GS を含有させ、BMP-13 を NG ビーズおよびコラーゲンゲル内に加えて培養を行った。Table 3-4-4 より、「高 GS」における I 型コラーゲン発現の減少、II 型コラーゲン、SOX-9、アグリカン、KRT18 の増加傾向が見られた。従って、BMP-13 による ASC の軟骨および NP 様分化が促進された傾向が示唆された。

Fig.4-1-3 では高硫酸化 GS による BMP-13 シグナルの阻害について考察した。しかし、NP モデルにおいては高 GS による ASC の NP 様分化傾向が見られた。理由の一つ目は GS が NG ビーズ表面に維持されている可能性がある事である。GS は硫酸基による負電荷を持っており、また、NG についてもカルボキシ基による負電

荷をいくらか持っている。PBS や培地内の Na^+ などの正電荷金属イオンが存在する事により、GS と NG はイオン結合をしていると考えられる。これにより、NG 表面に GS が存在し、BMP-13 と GS のアフィニティーにより BMP-13 も NG 表面に維持されている。NG ビーズは ASC と接触している事から、BMP-13 を ASC 表面に維持することができ、ASC の NP 分化が促進されたと考えられる (Fig.4-4-4)。

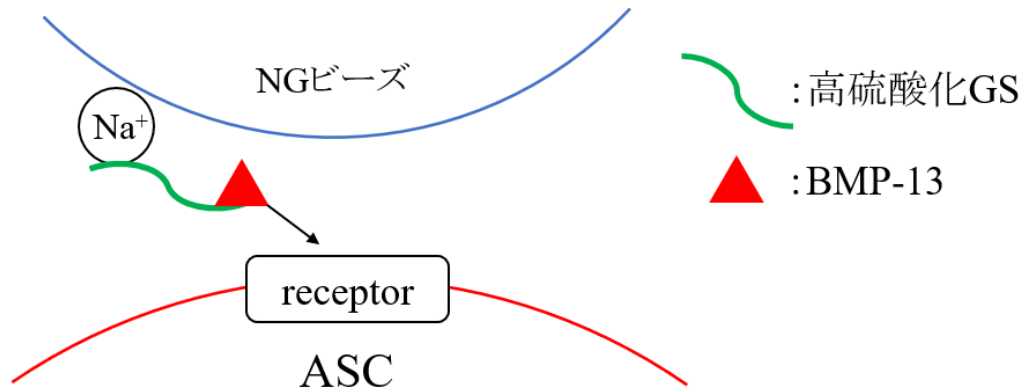


Fig.4-4-4 NG ビーズ表面 GS による BMP-13 シグナルの促進

高硫酸化 GS による ASC の NP 様分化促進の二つ目の理由は、NG 内に BMP-13 が保持され、動的加圧によって徐放をされている可能性である。上記で述べた電荷より、NG 内にも GS および BMP-13 が保持されていると考えられる。そして、それは動的加圧によって NG ビーズがひずむことにより、徐放され、ASC に作用すると考えられる。また、徐放されたが ASC のレセプターに結合しなかった BMP-13 は他の NG ビーズに捉えられ、保持されることが考えられるため、効率的に BMP-13 の効果を ASC に対して与える事が出来ると考えられた (Fig.4-4-5)。

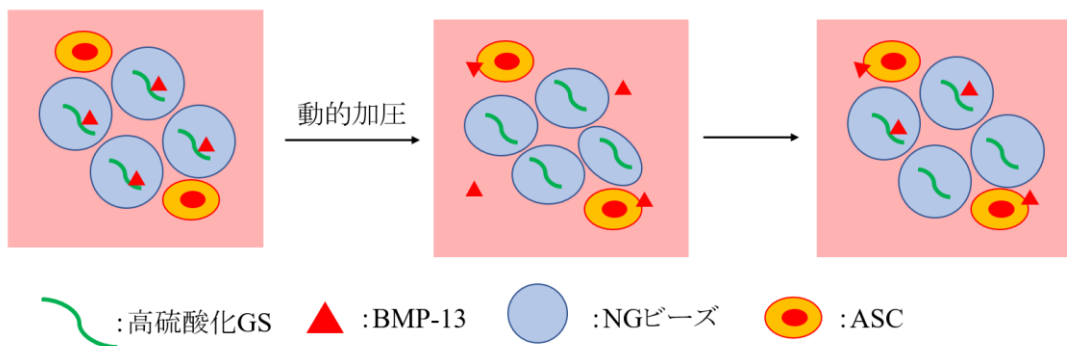


Fig.4-4-5 効率的な BMP-13 の徐放

Table 3-4-4 より、「高 GS-NG」では「高 GS」より小さいが NP 様分化傾向を示した。また、「高 GS」では KRT19 発現が減少したが、「高 GS-NG」では増加傾向が見られ、NP 分化に不利な遺伝子発現変化を示さなかった。従って、Fig.4-1-2 に示した通り、GS が ASC 表面のレセプター結合する事による I 型コラーゲンの減少は見られなかったが、同時に KRT19 の減少傾向も見られなかったと考えられる。従って、「高 GS」では早期 NP 様分化を促すが KRT19 のように NP 分化と反する遺伝子発現変化を与えるが、「高 GS-NG」では「高 GS」より遅いが長期に渡って的確な NP 様分化を与える可能性がある。従って、「高 GS」と「高 GS-NG」を複合することにより、短期的には「高 GS」による NP 様分化が促され、長期的に「高 GS」では十分ではなかった NP 様分化傾向が継続されると考えられる (Fig.4-4-6)。

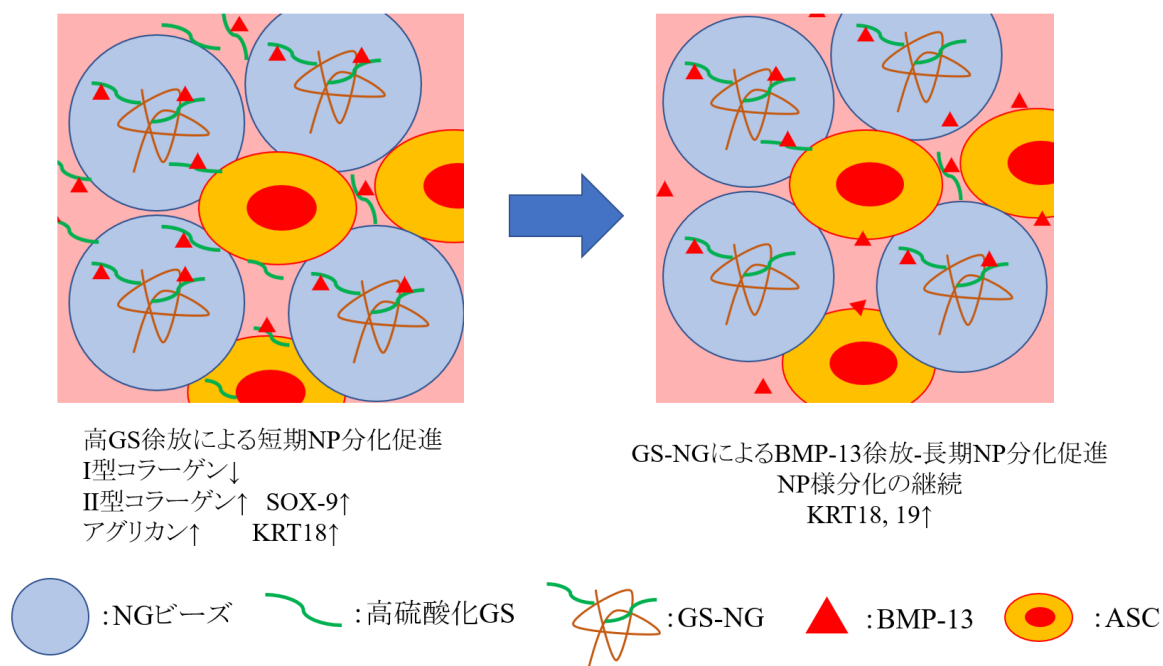


Fig.4-4-6 「高 GS」「高 GS-NG」複合 NP モデルによる効率的 NP 様分化

BMP-13 は上記で示した通り、Smad1/5/8 や ERK1/2 を介した ASC の NP 様分化が報告されている⁽¹⁷⁾。これに対し、加圧培養では TRPV4 シグナルが促進される。これにより、p38 MAPK や ERK1/2 を介した ASC の軟骨様分化が報告されている⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁶⁾。また、別の軟骨化誘導を促すサイトカインの代表例として TGF- β 3 (Transforming growth factor- β 3) が存在する。TGF- β によるシグナル経路は Smad2/3 を介した軟骨化誘導である。本研究では骨化誘導を示さず、TGF- β 3 より ASC の NP 分化誘導を示す事が報告されている BMP-13 を用いたが、BMP-13、TGF- β 3、加圧による NP 様分化誘導のシグナル経路は異なっているため、これらを併用することによる相乗的効果が見られる可能性がある。Table 3-4-4 より、

「BMP」条件ではⅡ型コラーゲンや SOX-9 の増加傾向が見られたが、Ⅰ型コラーゲンの増加傾向も見られた。従って、BMP-13 による ASC の NP 分化には 2 週間以上の中長期にわたる培養が必要であると考えられ、分化期間を短くするためには BMP-13、TGF- β 3、加圧の併用が一つの策として挙げられる。BMP-13、TGF- β 3、加圧による NP 様分化に関連するシグナル経路を以下に示した (Fig.4-4-7)。

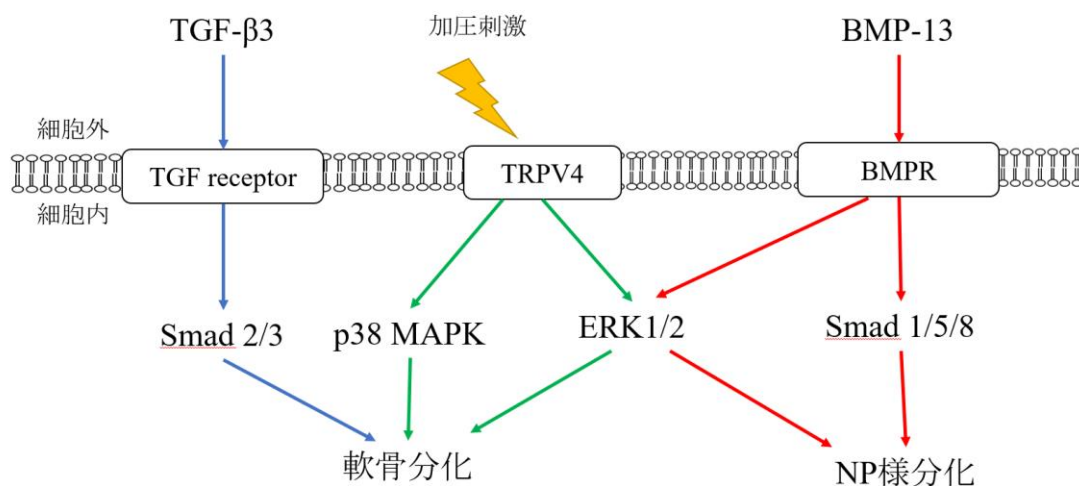


Fig.4-4-7 BMP-13、TGF- β 3、加圧刺激による NP 様分化シグナル経路

4-5 三次元培養における ASC の AF 様分化誘導

Table 3-5-2 より、BMP-13 と CTGF の添加と加圧効果により I 型コラーゲン以外の AF マーカー遺伝子の増加傾向が見られた。Fig.4-2-1 および Fig.4-3-5 より BMP-13、CTGF、加圧刺激には共通して ERK1/2 を介した経路が存在する。従って、二次元培養においては競合していた CTGF と BMP-13 は細胞外では二次元同様競合状態となるが、細胞内のシグナルにおいて、加圧刺激シグナルと共に ERK1/2 の活性化を伴うことで、相乗効果を示したと考えられる。

さらに「配向」では「無配向」に比べ、AF マーカー発現が高い傾向が見られた。従って、配向性によって線維芽様および TNMD の上昇傾向より靭帯様細胞に分化傾向を示したと考えられた。しかし、加圧刺激による I 型コラーゲンの発現抑制を上回る I 型コラーゲン発現促進効果が見られなかった。原因の一つとして配向のサイズを考えた。本研究で用いたコラーゲン配向膜はコラーゲン膜にコラーゲン糸を融合させた膜であった。コラーゲン糸は直径 $100\mu\text{m}$ 程度であり、コラーゲン膜の幅 4.5cm に対してコラーゲン糸を約 100 本手動で並べて配向膜を作製した。従って、糸が均一な間隔で並んでいるとした場合、糸と糸の間は $350\mu\text{m}$ である。細胞の大きさは大きくて $100\mu\text{m}$ 程度であることから細胞が糸と糸の間に入り、配向性を認識しにくい細胞が存在したと考えられた (Fig.4-5-1)。

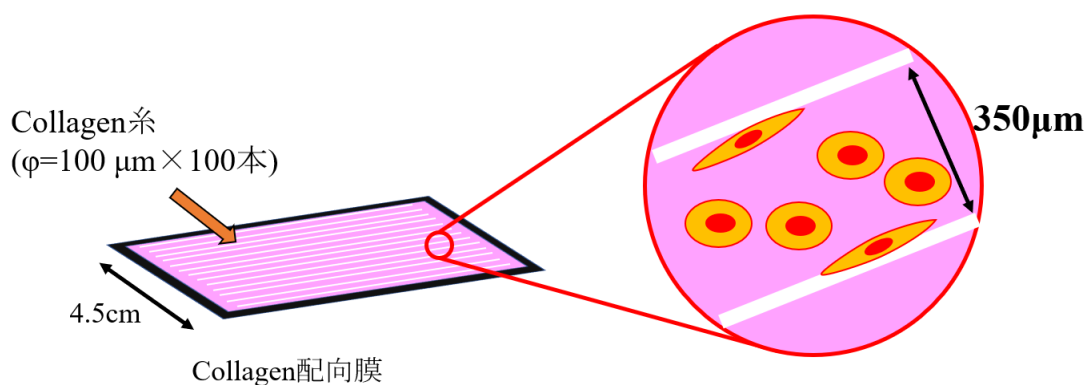


Fig.4-5-1 ASC によるコラーゲン配向膜の配向認識

「配向」において I 型コラーゲン発現が増加しなかった二つ目の原因としてひずみ刺激を考えた。Mostafa Elsaadany らにより、配向性 AF モデルにひずみ刺激を加えることによる ASC の AF 様分化が報告されている⁽⁴⁷⁾。生体における椎間板においても腰を曲げる際などに、Fig.4-5-2 に示したようなひずみ加わると考えられる。従って、本研究における AF モデルによる ASC の AF をさらに促進するためにはひずみ刺激を加える必要があると考えられる。

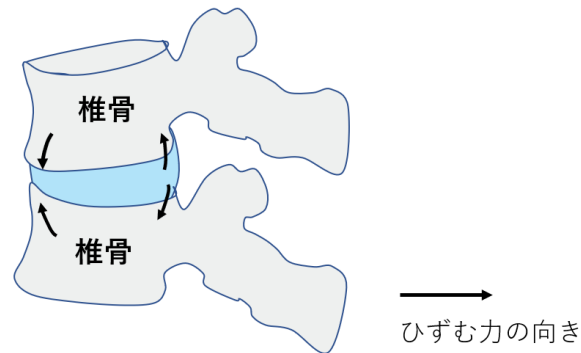


Fig. 4-5-2 椎間板のひずみ

4-6 椎間板組織モデル培養としての展望

本研究における椎間板組織モデルは髄核と線維輪を別々にした培養によって検討した。本研究結果から、三次元培養において ASC に対する BMP-13、GS による NP 分化促進と配向性、BMP-13、CTGF 刺激による AF 分化促進が見られた。さらに、加圧培養による軟骨様分化が確認された。最終モデルとしては NP モデルとコラーゲン膜を同心円状に重ね合わせて作製した AF モデルを組み合わせた椎間板モデルとなる。加圧によって NP 分化促進、AF 分化促進が確認され、さらに静水圧と動的加圧の異なった細胞への影響が示唆された。このことから、椎間板モデルに対して静水圧と動的加圧を加えることで、NP、AF の各部位における分化が促進されることが考えられる。

また、AF は外側 AF と内側 AF で I 型コラーゲンや II 型コラーゲン、GAG 組成が異なる異なり、外側程線維性が高く、強度が強いことがわかっている。これを基に理想的椎間板モデルを考えた場合、NP モデルでは軟骨形成分化を示す NP 分化をし、外側 AF では I 型コラーゲン発現の高い線維性分化をし、内側 AF では NP と外側 AF の中間となる分化をすることが必要であると考えられる。

NP モデルと AF モデルの組み合わせは NP モデルへの CTGF 流入、AF モデルへの GS 流入が想定される。これを制御することで外側 AF、内側 AF、NP 各部位への ASC の分化が促進される必要があり、それはコラーゲン膜の物質透過性と GS のアフィニティーによってコントロールできると考えられる。以前の研究より様々な強度と透過性を示すコラーゲン膜が作製された⁽⁴⁸⁾。これを用いて、BMP-13 保持をするための GS 架橋コラーゲン膜を内側 AF とし、強度が高い配向コラーゲン膜を外側 AF とする。CTGF の浸潤制御のために EDC 架橋されたコラーゲン膜を用いることで CTGF と BMP-13 が共に存在する領域を制御できると考えられる。これによって作製される人工椎間板理想モデルを Fig.3-6-1 に示した。

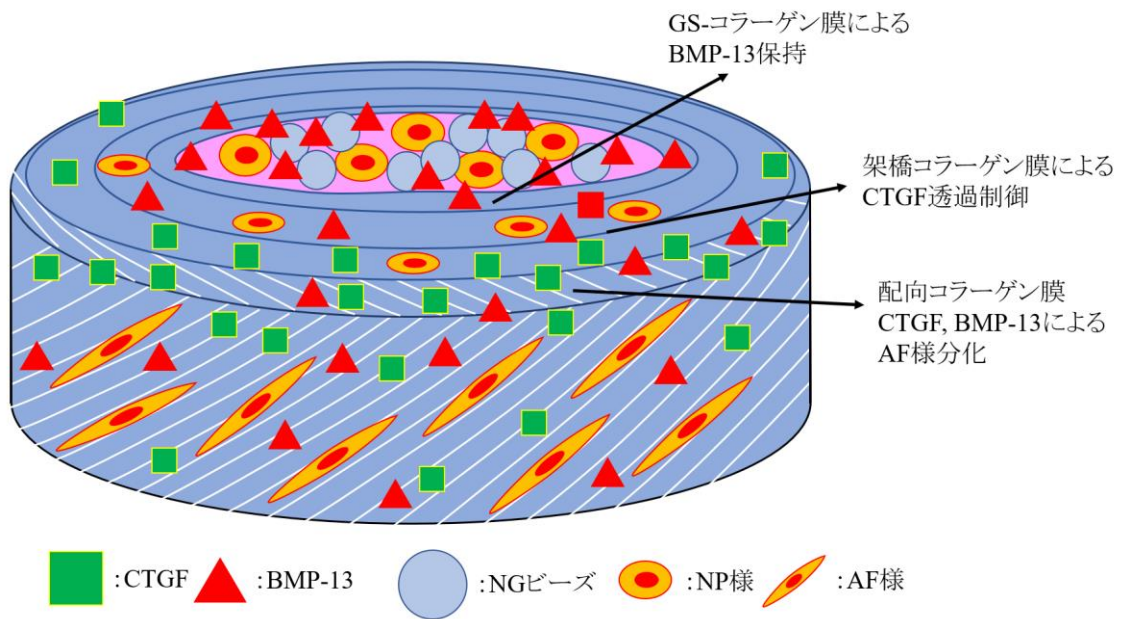


Fig.3-6-1 椎間板モデルにおける分化培養

5.結論

1. より高い硫酸化率の GS が BMP-13 に対してアフィニティーを示した。
2. 二次元培養における GS と BMP-13 による ASC の相乗的 NP 様分化は見られなかったが、三次元培養においては高硫酸化率の GS 添加によって NP 様分化傾向が促進された。
3. 静水圧と動的加圧による相乗的な ASC の軟骨様および NP 様分化傾向が促進された。
4. 配向性コラーゲン膜上における BMP-13、CTGF 添加刺激、加圧刺激によって ASC の AF 様分化傾向が促進された。

6.参考文献

1. Sato, Katsuhiko, *et al*: In vivo intradiscal pressure measurement in healthy individuals and in patients with ongoing back problems. *SPINE Volume 24*, Number 23, pp 2468–2474
2. Girish Pattappa, *et al*: Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function. *J. Anat.* (2012) 221, pp480–496
3. Satoh K, *et al*: Presence and Distribution of Antigen-Antibody Complexes in the Herniated Nucleus Pulposus. *SPINE Volume 24*, Number 19, pp 1980–1984
4. 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.
5. Ricardo Rodrigues-Pinto, *et al*: An understanding of intervertebral disc development, maturation and cell phenotype provides clues to direct cell-based tissue regeneration therapies for disc degeneration. *European Spine Journal volume 23*, pages1803–1814 (2014)
6. 宮本 啓行/受動喫煙によるラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果/2016 年日本大学大学院医学研究科博士課程修士論文
7. DAVID R. EYRE, *et al*: Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus. *Biochem. J.* (1976) 157, 267-270
8. Olivia M Torre, *et al*: Annulus fibrosus cell phenotypes in homeostasis and injury: implications for regenerative strategies. *Ann N Y Acad Sci.* 2019 April ; 1442(1): 61–78
9. 園田 雄久/組織再生を誘導する硫酸化ネイティブ型ジェランの調製/平成 21 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
10. <https://www.tokushima.med.or.jp/kenmin/doctorcolumn/hc/491-495>
11. Runze Zhao, *et al*: Disordered Mechanical Stress and Tissue Engineering Therapies in Intervertebral Disc Degeneration. *Polymers (Basel)*. 2019 Jul 5;11(7):1151. doi: 10.3390/polym11071151.
12. <https://il-clinic.com/pldd>
13. <https://mdf.or.jp/plif/>
14. 室田 誠逸:現代化学 増刊 41 再生医学・再生医療/東京化学同人(2002)
15. Lisa A Williams, *et al*: Unveiling the Bmp13 Enigma: Redundant Morphogen or Crucial Regulator? *Int J Biol Sci.* 2008; 4(5): 318–329
16. <https://jp.sinobiological.com/research/signal-transduction/tgf-beta>

17. Tom Hodgkinson, et al: High BMP2 expression leads to enhanced SMAD1/5/8 signalling and GDF6 responsiveness in human adipose-derived stem cells: implications for stem cell therapies for intervertebral disc degeneration. *Journal of Tissue Engineering Volume 11*: 1–12
18. Louise E Clarke, Growth differentiation factor 6 and transforming growth factor-beta differentially mediate mesenchymal stem cell differentiation, composition, and micromechanical properties of nucleus pulposus constructs. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16(2): R67
19. Naim Kittana : Role of Secretory Processes in Cardiac Fibroblasts in Heart Failure Development and Progression. *Researchgate*, 2014
20. Bernard Perbal: CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* (2004) 363:62–64
21. Man-Jung Hung, *et al*: Fascia tissue engineering with human adipose-derived stem cells in a murine model: Implications for pelvic floor reconstruction. *Journal of the Formosan Medical Association* (2014) 113, 704e715
22. Zhixiang Tong, *et al* : Controlling the Fibroblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Via the Combination of Fibrous Scaffolds and Connective Tissue Growth Factor. *Tissue Eng Part A*. 2011 Nov; 17(21-22): 2773–2785.
23. 田宮 信雄 訳 et al: ヴォート基礎生化学第3版/東京化学同人
24. 「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
25. 長尾 達郎/組織修復をコントロールする生体材料の開発/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
26. DSP 五協フード&ケミカル:多糖類.com
27. 清水 康治/組織修復材料としてのジェラン/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
28. 水上 光太郎/ジェラン材料を用いた組織再生型人工椎間板の開発/平成 30 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
29. Consuelo P´erez-Rico, et al: Elastin Development-Associated Extracellular Matrix Constituents of Subepithelial Connective Tissue in Human Pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014;55:6309– 6318.
30. Lavanya Venkataraman,*et al*: Nanoparticulate delivery of agents for induced elastogenesis in three-dimensional collagenous matrices. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE*, 2016; 10: 1041–1056.

31. HAIBING PENG *et al*: ESE-1 Is a Potent Repressor of Type II Collagen Gene (COL2A1) Transcription In Human Chondrocytes. *J Cell Physiol*, 2008 May ; 215(2): 562–573.
32. Ming bai *et al*: miR-182-5p overexpression inhibits chondrogenesis by down-regulating PTHLH. *Cell Biology International*, 2018, Volume 43, Issue 3
33. Emmanouella Tsirimonaki, *et al*: PKC ϵ Signalling Activates ERK1/2, and Regulates Aggrecan, ADAMTS5, and miR377 Gene Expression in Human Nucleus Pulposus Cells. *PLoS One*. 2013; 8(11): e82045.
34. Ben M Minogue, *et al*: Transcriptional profiling of bovine intervertebral disc cells: implications for identification of normal and degenerate human intervertebral disc cell phenotypes. *Minogue et al. Arthritis Research & Therapy* 2010, 12:R22
35. P C Xu, *et al*: [Exploration of the mechanism of human platelet-rich plasma in regulating and controlling human epidermal stem cells for promoting wound re-epithelialization at transcriptome level] *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2020 Oct 20;36(10):915-922.
36. Xianling Zeng *et al*: Secreted Frizzled Related Protein 2 Modulates Epithelial–Mesenchymal Transition and Stemness via Wnt/ β -Catenin Signaling in Choriocarcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018;50:1815-1831.
37. 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.
38. 新井 要子/硫酸化ジェランの調製/平成 8 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
39. Nicola Alessio, *et al* Timely Supplementation of Hydrogels Containing Sulfated or Unsulfated Chondroitin and Hyaluronic Acid Affects Mesenchymal Stromal Cells Commitment Toward Chondrogenic Differentiation. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 641529.
40. Xiaoning Li, *et al*: CTGF Induces Tenogenic Differentiation and Proliferation of Adipose-Derived Stromal Cells. *J Orthop Res*. 2019 Mar; 37(3): 574–582.
41. KM Schmidt-Ott: Unraveling the role of connective tissue growth factor in diabetic nephropathy. *Kidney International Volume 73*, Issue 4, 2 February 2008, Pages 375-376
42. Satoshi Sobajima, *et al*: Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *The Spine Journal Volume 8*, Issue 6, November–December 2008, Pages 888-896

43. Cristina Correia, *et al*: Dynamic Culturing of Cartilage Tissue: The Significance of Hydrostatic Pressure. *Tissue Eng Part A*. 2012 Oct; 18(19-20): 1979–1991
44. Yibo Gan, *et al*: Low Magnitude of Compression Enhances Biosynthesis of Mesenchymal Stem Cells towards Nucleus Pulposus Cells via the TRPV4-Dependent Pathway. *Stem Cells Int*. 2018; 2018: 7061898.
45. Andrew J Steward, *et al*: Exploring the roles of integrin binding and cytoskeletal reorganization during mesenchymal stem cell mechanotransduction in soft and stiff hydrogels subjected to dynamic compression. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials Volume 38*, October 2014, Pages 174-182
46. Ismail M. Hdud, *et al*: Effect of osmotic stress on the expression of TRPV4 and BKCa channels and possible interaction with ERK1/2 and p38 in cultured equine chondrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 306:C1050-C1057, 2014
47. Mostafa Elsaadany. *et al*: Equiaxial Strain Modulates Adipose-derived Stem Cell Differentiation within 3D Biphasic Scaffolds towards Annulus Fibrosus. *Sci Rep*. 2017; 7: 12868
48. 村尾 栄治/椎間板再生治療のための組織工学的人工椎間板足場材料の開発 /平成 8 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

7.謝辞

本研究におきまして、ご指導を頂きました宮本 啓一教授、晝河 政希助教授には大変にお世話になり感謝の礼を申し上げます。

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。実験に使用する組織を手配して下さったこと、実験結果について様々な観点から思考の幅を広げて下さったこと、心より感謝申し上げます。今後ともご指導、ご鞭撻のほどよろしくも願います。晝川 政希助教授には報告会、雑誌会、実験方法についてご助言を頂き、感謝申し上げます。加えて事務員の村上 節子さんには研究室生活全般におきましてお世話になりました。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機械材料工学専攻の稲葉 忠司 教授に深く感謝致します。

ジェラングループの木全 優介さん、隅川 彰斗さんにはたくさんの場面で助けて頂きありがとうございました。他の先輩、後輩方にも、いろいろな場面でお世話になり、三年間の研究室生活がより充実したものになりました。M2の皆様とは互いに協力し合い、共に楽しみ、研究室生活を充実したものにできた感じております。特に、長谷 美里さん、倉田 園加さん、豊田 真由さん、長瀬 周平さんには互いに支え合って実験を進めることができ、成長することが出来ました。心から感謝申し上げます。

最後に 24 年間精神的、経済的に支えて頂いた両親に深く感謝申し上げます。これからも感謝の念を忘れずに日々精進していこうと思います。

吉村 尚親