

平成 22 年度 修士論文

靱帯細胞の骨分化誘導に対する
加圧刺激の影響

三重大学大学院 工学研究科 博士前期課程

分子素材工学専攻

前田 裕子

目次

1 緒言	1
1-1 再生医学と組織工	1
1-2 靭帯組織	2
1-2-1 前十字靭帯の基本構造	
1-2-2 靭帯組織の再建方法	
1-2-3 靭帯と骨の接合部の組成	
1-2-4 細胞外マトリックス (ECM: Extra Cellular Matrix)	
1-3 細胞の機能	9
1-3-1 靭帯細胞	
1-3-2 細胞接着	
1-3-3 機械的刺激に対する応答	
1-4 骨形成のリモデリング	13
1-5 本研究の目的	15
2 方法	16
2-1 水溶性エラスチンの抽出と分類	16
2-1-1 水溶性エラスチンの抽出	
2-1-2 水溶性エラスチンの分類	
2-2 コーティングシャーレ上において加圧刺激が靭帯細胞に与える影響	16
2-2-1 細胞の採取と継代培養	
2-2-2 ECM コーティングシャーレの作製	
2-2-3 遠心型加圧培養装置	
2-2-4 靭帯細胞の遠心培養	
2-2-5 アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の定量	
2-2-6 色素結合法を用いた産生マトリックス測定	
2-2-7 フローサイトメトリー解析による靭帯細胞の分化割合	
2-3 ECM ペレット内において加圧刺激が靭帯細胞に与える影響	19
2-3-1 ECM ペレットの作製	
2-3-2 水圧による加圧培養装置	
2-3-3 ECM ペレット内における加圧培養	
2-3-4 ECM ペレットへの細胞接着確認 (免疫蛍光染色、走査型電子顕微鏡)	
2-3-5 アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の定量	

2-3-6	フローサイトメトリー解析による靱帯細胞の分化割合	
2-4	ラクトース添加によるエラスチン結合タンパクの阻害	21
3	結果	22
3-1	コーティングシャーレ上における遠心培養	22
3-1-1	加圧刺激が靱帯細胞の ALP 酵素活性に与える影響	
3-1-2	加圧刺激による靱帯細胞の分化割合	
3-1-3	加圧刺激が靱帯細胞のマトリックス産生に与える影響	
3-2	作製した ECM ペレットの評価	29
3-2-1	走査型電子顕微鏡による ECM ペレットの観察	
3-3	ECM ペレット内への細胞接着確認	30
3-4	ECM ペレット内における水圧による加圧培養	33
3-4-1	加圧刺激が靱帯細胞の ALP 酵素活性に与える影響	
3-4-2	加圧刺激による靱帯細胞の分化割合	
3-5	ラクトース添加によるエラスチン結合タンパク阻害	38
4	考察	40
4-1	ECM シャーレ上における遠心培養が靱帯細胞に与える影響	40
4-2	ECM ペレット内における加圧培養が靱帯細胞に与える影響	43
5	結論	50
6	参考文献	51
7	謝辞	54
8	付録	55

1 緒言

1-1 再生医学と組織工学

人間は創傷治癒のように、もともと自己を復元する能力を持っているが、その再生能力が追いつかないほどの大きな組織損傷の場合、臓器移植などの方法が検討される。しかし、現在はこのような移植療法はドナー不足をはじめ、拒絶反応や感染症など様々な問題が存在しているため、治療を受けることのできる患者は少ない。

そこで、その様な問題を解決するために、生体から生きた細胞を取り出し、生体外で増殖・分化・活性化させたものを再び生体に戻すという再生医療が注目されている。

細胞を用いた再生医療の一役を担うものとして、細胞を生着させてその機能を発現させる足場と一緒に移植する方法があり、これを組織工学という。

生体外で組織再生を行うためには主に三つの要素が必須となる(図 1-1)。組織機能を再生させる主体である“細胞”、細胞を 3 次元的に培養し生体組織を支持する“足場”、そして細胞の分化・増殖を制御する“サイトカイン”である。

3 要素が密接に関係し合うことで組織工学が成立すると考えられている¹⁻³⁾。

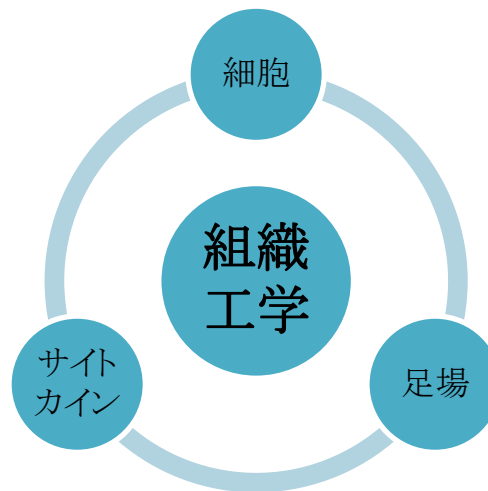


図 1-1 組織工学の 3 要素

1-2 靭帯組織

1-2-1 前十字靭帯の基本構造

前十字靭帯 (anterior cruciate ligament : ACL) は膝関節内にある大腿骨と脛骨を結ぶ結合組織である。ACL は大腿骨に対して脛骨が前方に逸脱するのを防ぐことや、脛骨が旋回するのを防ぎ、膝の安定性の維持に関して重要な役割をしている^{4,5)}。主要な構成成分として複合型 (普通は I 型) の繊維形成型コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカンなどの細胞外マトリクスと、繊維と平行に配向した紡錘状の繊維芽細胞がある。また、ACL は、前内側線維束 (AM: anteromedial bundle) と後外側線維束 (PL: posterolateral bundle) の二つの線維束に分けられる^{6,7)} (図 1-2)。

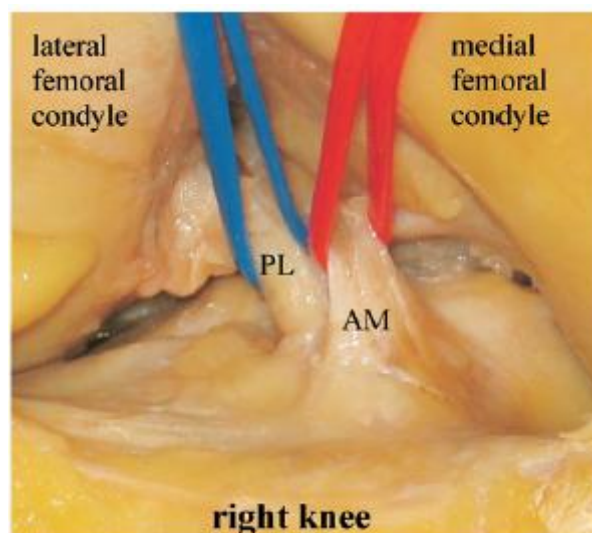


図 1-2 前内側線維束 (AM) と後外側線維束 (PL)⁷⁾

1-2-2 靱帯の再建方法^{5,8,9)}

靱帯は血管に乏しい部位であり、損傷・断裂してしまうと自然治癒しない。放置しておくると二次的に半月板や軟骨損傷の合併症を引き起こし、最終的には変形性膝関節症の発症に至る。そのため、失った靱帯の代わりになるものが必要となる。

現在、靱帯の再建術には大きく分けて二つある。一つ目は生物学的素材を移植する方法で、二つ目は人工素材を移植する方法である。

生物学的素材としては腱組織が使用されることが多い。腱組織は骨と筋肉を結ぶ結合組織で、その構造や組成は靱帯と類似している。この方法では、患者自身の腱を採取して移植する自家移植法(auto graft)と他人の腱を移植する同種移植法(allograft)があるが、圧倒的に自家移植法で再建される事が多い。現在の日本ではドナー不足であり、安定した供給が困難であるためである。一般的に採取される腱は骨付き膝蓋腱や半腱様筋腱、薄筋腱が多い。

一方、人工素材では、ポリエチレンテレフタレート(Leeds-keio ligament)、ポリプロピレン(Kennedy Ligament Augmentation Device)、ポリテトラフルオロエチレン(Gore-Tex)などの非分解性合成繊維材料を用いて人工靱帯が開発されてきた。しかしながら、現在様々な問題が存在することから、これらの素材を用いた人工靱帯は単独で使われていない。

以下に三種類の移植法の利点と欠点をまとめた(表 1-1)。

表 1-1 各移植法の利点と欠点

	利点	欠点
自家移植法	<ul style="list-style-type: none">・最終的に自家組織に置換され、再建部で生着する・拒絶反応が無い・感染症のリスクが低い	<ul style="list-style-type: none">・自己の正常な組織の一部を犠牲にするため、採取部の筋力が落ちる・疼痛の残存・移植後の強度の低下・採取できる量に制限がある
同種移植法	<ul style="list-style-type: none">・最終的に自家組織に置換され、再建部で生着する・正常な自家組織を犠牲にしない	<ul style="list-style-type: none">・安定した供給が困難・合併症、感染症の危険
人工靱帯移植法	<ul style="list-style-type: none">・正常な自家組織を犠牲にしない・初期強度が高い	<ul style="list-style-type: none">・長期間の強度が不十分・摩耗粉による炎症・骨への強固な固定が困難・生体との親和不良性・再断裂の可能性が高い

近年では、組織工学的に再建させる足場材料の開発が進められており、優れた生体適合性、初期力学強度だけでなく、足場への細胞接着、細胞増殖、マトリックス産生などを促進させるような足場材料が望まれている。そのような材料として、ポリウレタン尿素、ポリデスアミノチロシルチロシンエチル (DTE) カーボネート、ポリジオキサン、ポリ乳酸 (PLA)、ポリグリコール酸 (PGA)、およびポリ乳酸とポリグリコール酸の共重合体 (PLGA) などの、新しい靱帯組織が形成されると共に分解・吸収されるような生体分解性合成繊維材料が開発されているが、力学的強度、細胞接着性、材料の分解速度などまだまだ未解決な問題が多い。

1-2-3 靭帯と骨の接合部の組成

靭帯は骨と骨を結ぶ結合組織であり、それらの接合部は靭帯部分 (Ligament region : L)、硬化していない部分 (non-mineralized interface : NI)、硬化した部分 (mineralized interface : MI)、骨部分 (Bone region : B) の段階構造になっている (図 1-3)^{10,11)}。

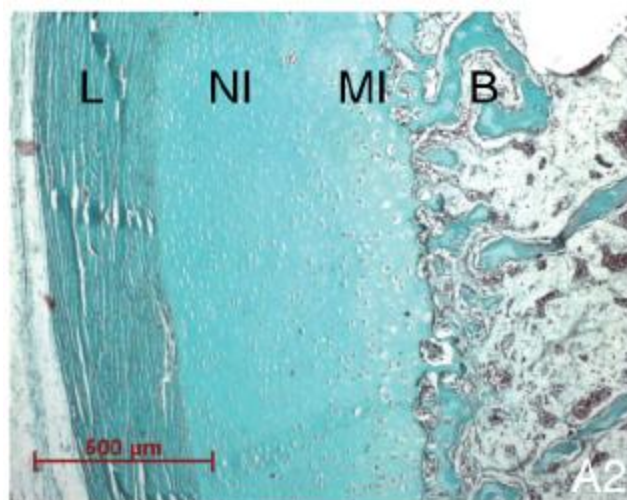


図 1-3 靭帯と骨の接合部¹⁰⁾

各部分の組成は以下の通りである (表 1-2)。

表 1-2 靭帯と骨の接合部の組成

	主な細胞外マトリックス	存在する細胞
靭帯部分(L)	I、III型コラーゲン	コラーゲン線維の長軸方向に引き伸ばされた形をした線維芽細胞
硬化していない部分(NI)	・II型コラーゲン ・アグリカン	卵型の軟骨細胞
硬化した部分(MI)	X型コラーゲン	肥大性軟骨細胞
骨部分(B)	I型コラーゲン	・骨芽細胞 ・骨細胞 ・破骨細胞

靱帯と骨の接合部分において、細胞密度は一定であるが、細胞が含まれている部分の面積は骨部分付近で最も大きく、骨部分から靱帯部分へ向かうにつれて小さくなる¹⁰⁾(図 1-4)。また、一般に細胞の縦横比は靱帯部分から骨部分に近づくにつれて小さくなり、靱帯部分での引き伸ばされたような線維芽細胞から、骨部分での丸い軟骨細胞、肥大性軟骨細胞へと変化していく^{6),10)}(図 1-5)。

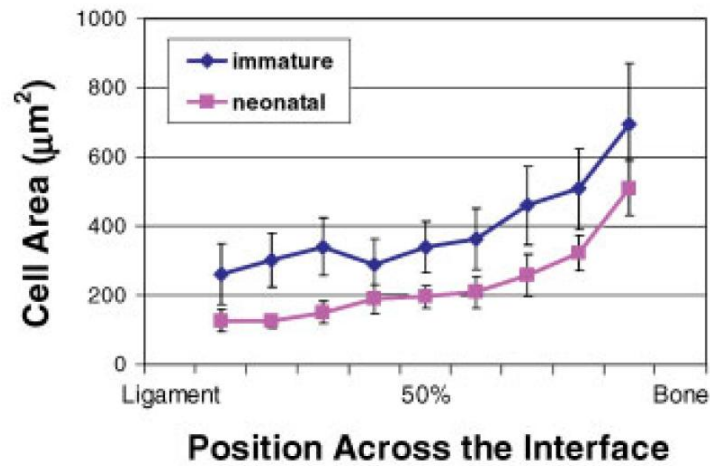


図 1-4 細胞面積の変化¹⁰⁾

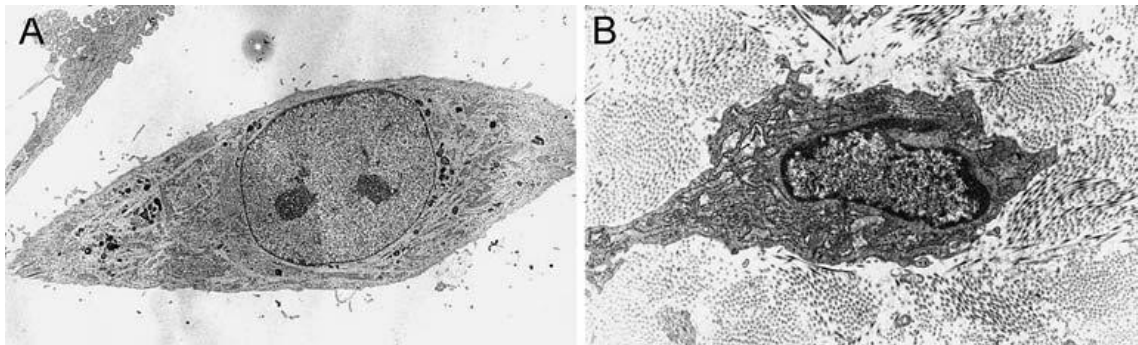


図 1-5 (A) ACL 中央部の線維芽細胞と(B) ACL 末端部の線維芽細胞⁶⁾

1-2-4 細胞外マトリックス (ECM : Extra Cellular Matrix)

細胞外マトリックス (ECM : Extra Cellular Matrix) とは、多細胞生物において細胞の周囲や細胞と細胞の間隙に存在する繊維状またはシート状の構造物であり、細胞の増殖、分化、形質発現を制御する^{12,13)}。

上皮や筋肉は組織の大部分が細胞で占められているが、骨などの結合組織は細胞よりも ECM の割合が多く、その物理的性質を決めている¹⁴⁾。

ECM の主成分はプロテオグリカンと繊維状タンパク質である。プロテオグリカンは、多糖類である各種のグリコサミノグリカンが各種のタンパク質と共有結合したものであり、繊維状タンパク質はコラーゲンやエラスチン、フィブロネクチン、ラミニンである²⁾。

・エラスチン (Elastin)^{2,10,15,16)}

エラスチンは分子量が約 67kDa の細胞外マトリックスの一つであり、組織から酸、アルカリ、アルコール等で処理した後に残る、不溶性タンパク質として定義される。ECM の繊維成分としてエラスチンは、コラーゲンの次に多い。エラスチンは、組織の伸縮性や弾性に関与するため、コラーゲンが膠原繊維と呼ばれているのに対して、弾性繊維と呼ばれる。そのため、大動脈、肺、靭帯、皮膚などの伸縮性・弾性を伴う組織に多く含まれる。これらの組織中に存在する細胞 (主に線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞) によって前駆体であるトロポエラスチンとして産生される。エラスチンは、この前駆体であるトロポエラスチンが架橋されてできた不溶性の巨大分子である。架橋部分はリシン由来のデスマシン、イソデスマシンからなる。

エラスチンは、一次構造に疎水性側鎖を含むアミノ酸が約 92 % を占めており、エラスチン凝集体の収縮・弛緩により、立体構造が容易に復元する。エラスチンの特異的なアミノ酸配列として VGVAPG (Val バリンー Gly グリシンー Val バリンー Ala アラニンー Pro プロリンー Gly グリシン) 構造を有していることが知られている。また、生体内において架橋構造を形成することで、その弾性・不溶性・熱安定性を有している (図 1-6)。

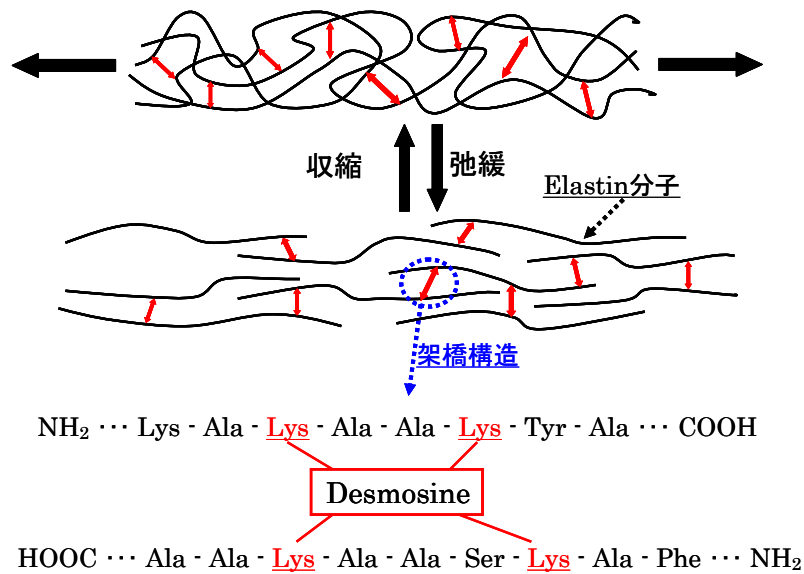


図 1-6 エラスチンの構造¹⁵⁾

•コラーゲン(Collagen)

コラーゲンは生体に最も多量に存在するタンパク質である。力学的強度に優れている構造体のため、真皮、骨、軟骨、腱、靭帯などに多く含まれる⁹⁾。

コラーゲン分子の基本構造は、3本の α 鎖と呼ばれるポリペプチド鎖から成る三重らせん構造である。 α 鎖とは Gly-X-Y (X、Y は任意のアミノ酸残基であるがプロリン残基とヒドロキシプロリン残基であることが多い) という3つのアミノ酸残基の繰り返しであるコラーゲン領域を持ち、三つおきに必ずグリシンがあるという特殊なアミノ酸配列を持っている^{13,14)}。コラーゲン分子は、集合して細線維、繊維、繊維束という高次構造を形成する⁹⁾。

1-3 細胞の機能

1-3-1 靱帯細胞

靱帯組織中に存在する細胞は一般的に、紡錘型の線維芽様細胞であり、靱帯組織の長軸方向に対して平行になるように配向している⁶⁾(図 1-7)。靱帯細胞は機能的にも線維芽細胞と似ており、コラーゲン(主に I、III、V型)やエラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの細胞外マトリックスを産生する。

靱帯細胞は、さまざまな細胞に分化することができる間葉系幹細胞から分化した細胞であるとされるが、これまでの研究では、発現する表面抗原、タンパク、mRNAなどが間葉系幹細胞と同一であり、2つを区別することができない。また、現時点で靱帯細胞のみに特異的に発現するタンパクや mRNA はほぼ見つかっていないため、靱帯細胞を識別するための特別なマーカーに関する情報は無い。さらに、靱帯細胞は間葉系幹細胞と同様に、分化誘導することで骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞など、他の細胞に分化することが報告されている。したがって、靱帯細胞は他の最終分化した細胞に比べ、間葉系幹細胞にかなり近い位置づけになると推測されるが、現段階では未知な部分が多い^{11,17,18)}。

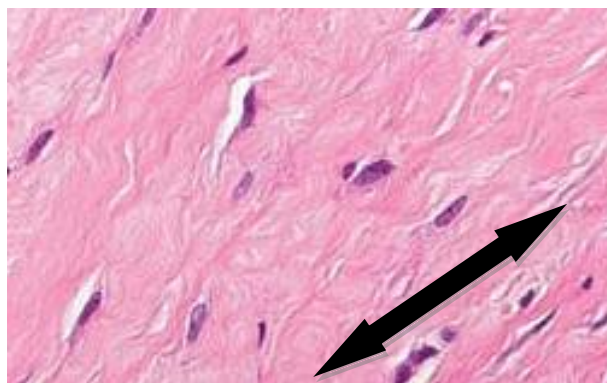


図 1-7 組織中の細胞分布⁶⁾
ヘマトキシリン/エオシン染色
紫:細胞 ピンク:細胞外基質
矢印:靱帯の長軸方向

1-3-2 細胞接着

多細胞生物の構成要素として各種細胞と細胞外マトリックス(ECM)があり、それらをまとめている機構の一つが特異的な細胞接着機構である。この細胞接着機構には大きく分類して細胞と細胞との間である細胞間接着(cell-cell adhesion)と、細胞とECM(cell-substratum adhesion)の接着との間の接着の二種類がある¹³⁾。これらの細胞接着に関わるタンパク質は接着分子と呼ばれ、それらは細胞膜上の接着タンパク質(接着受容体)とその結合相手となる接着タンパク質(広くはリガンドと呼ぶ)の二種類に分けることができる¹⁴⁾。この接着分子が接着部位に集まり、細胞膜裏打ちタンパク質と細胞骨格が細胞接着構造を細胞内から支えている¹⁹⁾。また、接着分子は接着対象の認識・選別、接着相手との機械的結合および情報の享受などを行っている¹¹⁾。

細胞間結合には①密着結合(tight junction)②接着結合(adherens junction)③デスモソーム結合(desmosome junction)④ギャップ結合(gap junction)の四種類が存在している^{11,20)}。一方、細胞-ECM間ではヘミデスモソームやインテグリンといった接着構造を介して接着する^{11,21)}(図1-8)。

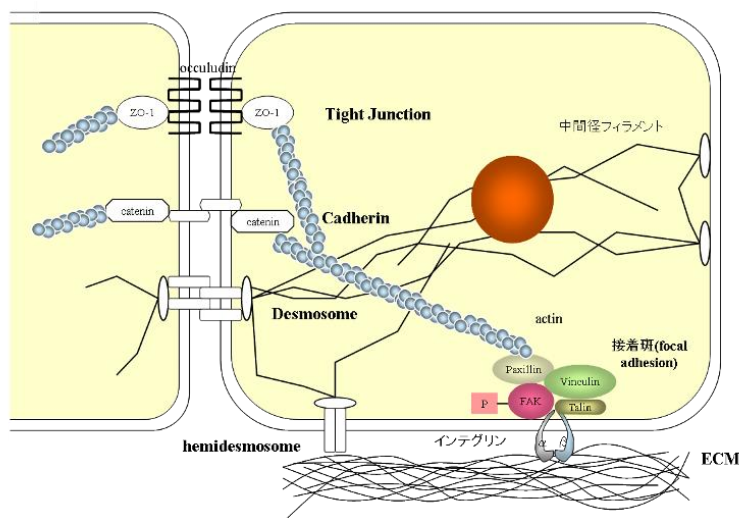


図1-8 細胞間接着と細胞-ECM間接着²¹⁾

・インテグリン (integrin)

細胞-ECM 間接着機構の代表的な機構は、インテグリンと呼ばれる接着受容体の関与する接着である。インテグリンは様々な種類の α 鎖と β 鎖の組み合わせでできたヘテロ二量体構造をしている¹²⁾。インテグリンはフィブロネクチンやコラーゲンなどの様々な細胞外マトリックスと結合し、細胞-ECM 間の接着や情報伝達に関与している。細胞が ECM と結合すると、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^{11,20)}。インテグリンが果たす役割には、細胞の遊走など、細胞の接着-脱着機構に関係するものが挙げられる¹¹⁾。

ECM に結合するインテグリンは大きく分けて、ラミニン結合型 ($\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 、 $\alpha 7\beta 1$)、Arg-Gly-Asp (RGD) 結合型 ($\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha_v\beta 3$ 、および α_v 鎖を含む他のインテグリン)、コラーゲン結合型 ($\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 10\beta 1$ 、 $\alpha 11\beta 1$)、その他 ($\alpha 4\beta 1$ 、 $\alpha 9\beta 1$) の四種類がある¹³⁾。

・エラスチンレセプター

靭帯細胞はエラスチンレセプターと呼ばれる複合体を発現することが知られており、靭帯細胞とエラスチンの結合は、エラスチン中の VGVAPG というアミノ酸配列の細胞接着領域が、このレセプターに結合することにより行われると考えられている。エラスチンレセプターを発現する細胞は他にも、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞、多形核白血球、単球、リンパ球などが知られている¹¹⁾。

エラスチンレセプターは非インテグリン型のレセプターであり、3つのタンパク質のサブユニットから構成される複合体として存在する。細胞膜上に存在して実際にエラスチンと結合する 67kDa のエラスチン結合タンパク質 (EBP : elastin-binding protein)、細胞膜内に存在する 61 kDa のノイラミニダーゼ-1 (Neu-1 : neuraminidase-1) と 55 kDa の保護タンパク質/カテプシン A (PPCA : protective protein/cathepsin A) の3つのサブユニットから構成される^{22,23)} (図 1-9)。

EBP 上のエラスチン結合部位にはラミニンも結合することができる。また、エラスチン結合部位とは別にレクチン結合部位が存在し、ガラクトース、ラクトースまたは、N-アセチルガラクトサミンを含有するグリコサミノグリカン (コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸) と結合して相互作用を起こす。その結果 EBP はエラスチンとの親和性を失い、エラスチンレセプターから離される²²⁾。

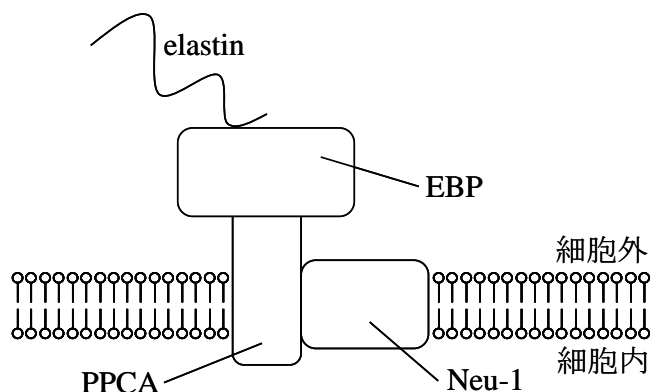


図 1-9 エラスチンレセプターの概略図¹⁶⁾

また、エラスチンレセプター中の EBP が認識する細胞接着領域 VGVAPG というアミノ酸配列の他にも細胞接着領域が存在している。その候補としては、トロポエラスチンの末端部に見られる「GRKRK」というアミノ酸配列が挙げられる^{11,16)}。この配列をヒト線維芽細胞が $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを介して認識し、細胞接着をするという報告がある^{11,24)}。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンはビトロネクチン受容体であり、ビトロネクチン、フィブリノーゲン、オステオポンチン、コラーゲン、ラミニンなどに結合するという報告がある²⁵⁾。

1-3-3 機械的刺激に対する応答

機械的な刺激には多くの種類があり、その代表的なものは「ずり応力」、「伸展」、「静水圧」である¹¹⁾。運動器系では、関節軟骨には「静水圧」、骨には「曲げ応力」や「圧縮応力」、靭帯には「伸展刺激」や「ねじれ刺激」が生じている^{11,26)}。生物を構成する細胞は、地球の重力、身体動作などの機械的な刺激を絶えず受けている²⁶⁾。そのため、組織工学的に組織を再建するためには、細胞・足場材料・サイトカインに加えて物理的因子としての「機械的刺激」による影響を解明することが重要となる。しかしながら、機械的刺激に対する細胞応答に至る分子過程はほとんど解明されていないのが現状である^{11,27)}。

1-4 骨のリモデリング

骨は結合組織が石灰化したものであり、豊富な細胞外マトリックスと数種の細胞から成る。その役割としては、支持、運動、保護、貯蔵や造血の場の提供である²⁸⁾。

骨において細胞間を埋める石灰化組織を骨組織 (bone matrix) と呼び、無機質、有機質、水から成る²⁹⁾(図 1-10)。

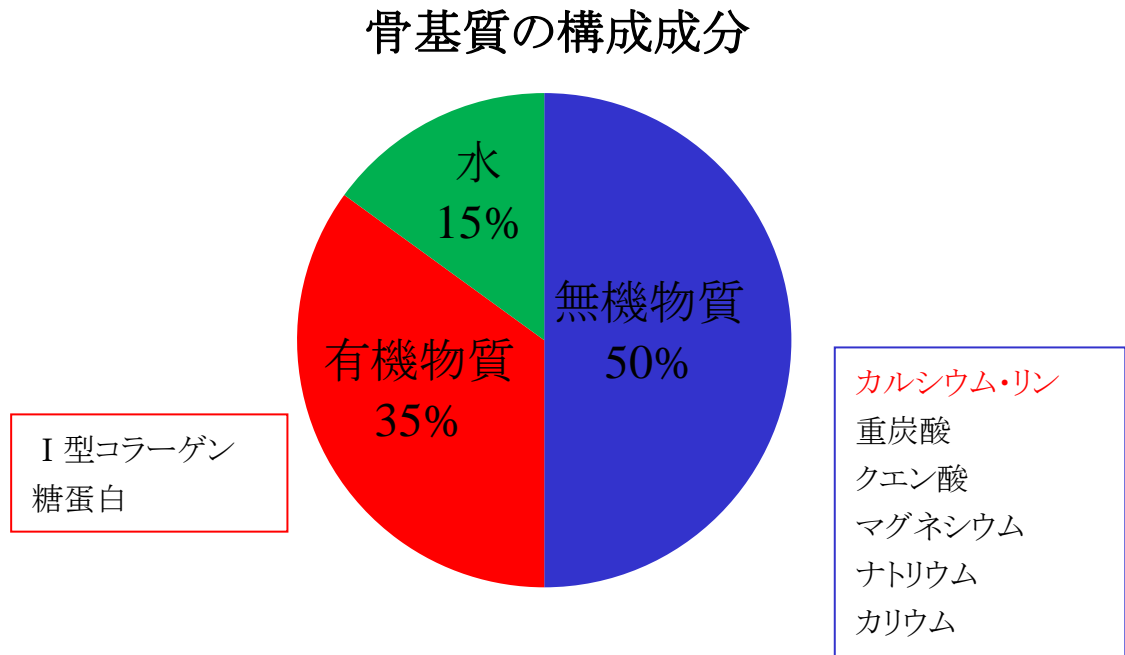


図 1-10 骨基質の構成成分

また、骨組織には、骨形成細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞の四種類が存在する³¹⁾。

骨形成細胞……骨芽細胞に分化する間葉組織に由来した未分化幹細胞。

骨芽細胞……骨形成細胞から分化した細胞で、骨表面にシート状に配列して骨基質を合成・分泌する。骨芽細胞は自身を分泌した骨基質で取り囲み、骨細胞となる。

骨細胞……一部の骨芽細胞は自ら分泌した骨基質に取り囲まれ、骨細胞へと分化する。骨細胞は骨組織を維持し、骨に加わる外力に応答して骨形成を行っている。

破骨細胞……造血幹細胞から分化した前駆細胞(単核)が多数融合して多核巨細胞となったもの。破骨細胞は遊走能を有し、活性化すると骨表面に接着して骨基質を分解・吸収する。

骨は出生以前から形作られるが、成人になってからも骨組織は絶え間なく骨吸収と骨形成によってリモデリングされている。骨組織のリモデリングの意義としてはおもに二つの理由が考えられ、一つ目はカルシウムの動態機構を維持するため、二つ目は物理的な刺激に対する対応のためである²⁸⁻³¹⁾。

骨のリモデリング過程はおもに、休止期・活性化期・骨吸収期・逆転期・骨形成期の5段階に分けられ、これらが繰り返される^{28,29)}(図1-11)。

休止期……骨吸収も骨形成も起こらず、休止状態の骨芽細胞が骨表面を覆っている。

活性化期……骨芽細胞の発現するRANKL(receptor activator of NF κB ligand)が前駆破骨細胞のRANK(receptor activator of NF κB)に結合して増殖・融合させ、破骨細胞への分化を促す。

骨吸収期……活性化された破骨細胞は骨表面に接着し、骨吸収を行う。その結果、ハウシップ窩というくぼみができる。

逆転期……基質中の抑制因子(TGF-β:transforming growth factor β、BMP:bone morphogenetic protein)により、破骨細胞の機能は抑制される。骨吸収された部位に骨芽細胞が移動してきて骨基質成分を分泌し、骨形成が骨吸収を上回る。

骨形成期……骨芽細胞により新しい類骨が形成される。一部の細胞は類骨の中に埋め込まれて骨細胞になる。

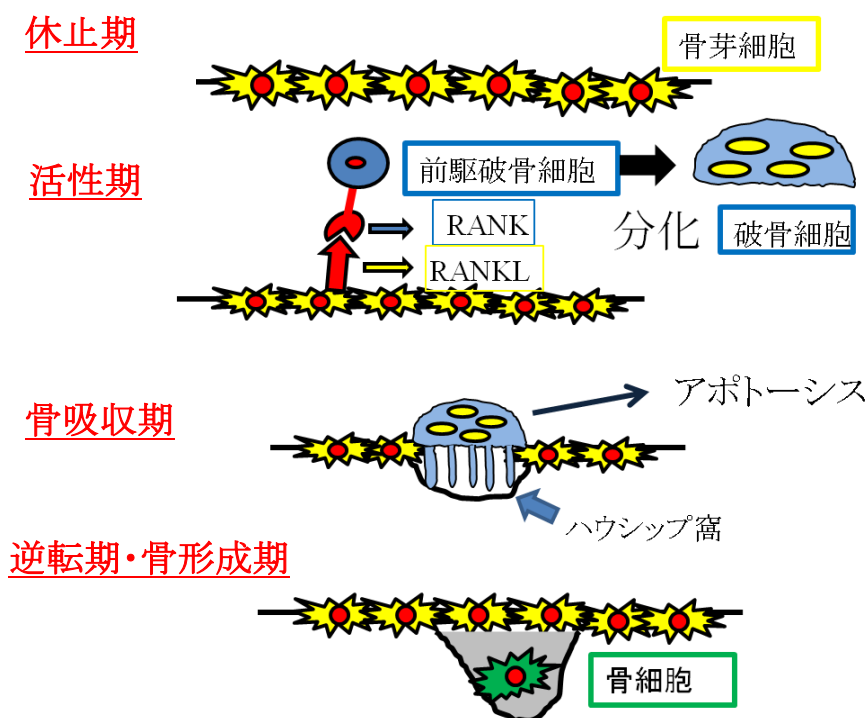


図1-11 骨のリモデリング

1-5 本研究の目的

人工靭帯を用いた靭帯再建手術には様々な問題点が存在する。そのうちのひとつとして、人工靭帯と骨の結合部分を再現することができないことが挙げられる。現在、人工靭帯と骨の接続は金属のボルトで行われている。その繋ぎ目から摩耗層が発生し、炎症を起こしてしまうことがしばしばある。そこで、金属を使わないで靭帯と骨を接合する必要がある。

本研究室では生体組織再生を目的とした人工組織を開発するために、細胞と足場(細胞外マトリックス)の関係に着目し、これらに動的刺激を用いることによって機能的な人工組織を作製することを目指している。

靭帯と骨の接合部には靭帯細胞や骨芽細胞などが存在する¹⁰⁾。そこで、靭帯組織に含まれる主な細胞外マトリックスであるエラスチンとコラーゲンに注目した。また、機能的な人工組織を作製するにあたり、二次元培養ではなく、生体組織に近付けた三次元培養を行う必要があると考えられる。そのため、エラスチンとコラーゲンを材料とした三次元の細胞培養システムにおける靭帯細胞の影響を観察する必要がある。

靭帯細胞は加圧刺激(遠心力、静水圧)を与えると、骨芽様の細胞になり、骨基質を分泌したり^{32,33)}、骨のリモデリングに重要なサイトカインなどを産生したりする³⁴⁻³⁷⁾という報告がいくつかある。靭帯細胞を骨芽細胞様の細胞に分化誘導し、人工靭帯と骨の接合部に使用できれば、より正常な結合部を再現できるのではないかと考えた。骨組織においても、常に「圧縮力」がかかっている、その力を骨組織に存在する細胞が感知して骨のリモデリングが行われる。これらのことを考慮して動的刺激として「圧力」に注目した。

以上より、本研究の目的は、エラスチンとコラーゲンで作製した三次元培養システムが靭帯細胞の骨分化誘導に対する影響と、それらの基質内における加圧刺激の影響を検討することにした。

2 方法

この章では、水溶性エラスチンの抽出、分類、コーティングシャーレ及びペレットの作製、加圧刺激が靭帯細胞に与える影響における実験方法を述べる。詳細な実験方法は 8 章付録に示した。

2-1 水溶性エラスチンの抽出と分類

2-1-1 水溶性エラスチンの抽出

三重県松阪食肉流通センターから頂いたブタ大動脈から中膜層以外の部分を除去し、細かくミンチにした後、エタノールで脱水を行い乾燥させた。精製した不溶性エラスチンに対してシュウ酸による熱処理分解を行い、水溶化処理し上澄み液を透析チューブに入れ、外液の pH が 5~6 程度になるまで透析を行った。チューブから取り出した液を遠心し、上澄み液を凍結乾燥させることで水溶性エラスチンを得た。

2-1-2 水溶性エラスチンの分類

抽出した水溶性エラスチンを数平均分子量、凝集温度、ゲル弾性率によって各分画に分類した。本実験では各分画 Elastin A-E の 5 種類に分画を行った。

2-2 コーティングシャーレ上において加圧刺激が細胞に与える影響

2-2-1 細胞の採取と継代培養

Lonza 社から購入した正常ヒト歯周靭帯線維芽細胞 (Normal Human Periodontal Ligament Fibroblast: HPdLF、CC-7049/Lonza) を、37°C/5%CO₂ インキュベーター (池本理化工業) 内で培養した。培地には SCBM (添加因子セット (hFGF-B、インスリン、GA-1000) を添加した) を用いて、3 日に 1 度培地交換を行った。sub-confluent (70%~80%) ほどに細胞が増殖した時点でトリプシン処理を行って HPdLF を剥離させ、細胞懸濁液を調整し継代培養を行った。

2-2-2 ECM コーティングシャーレの作製

φ35 浮遊細胞用シャーレに対してコロナ放電処理を行った後、シャーレにコーティング溶液(本実験ではフィルター滅菌した 0.1 mg/ml または 1.0 mg/ml の Elastin A、滅菌水、を使用)を 1.5 ml (滅菌水は 3ml) 添加し、4℃で 5 時間静置した。コーティング溶液を回収し、これをコーティングシャーレとして以下の実験を行った。

2-2-3 遠心型加圧培養装置

本実験では、以下のような装置を用いて加圧(933r.p.m)を行った(図 2-1)。

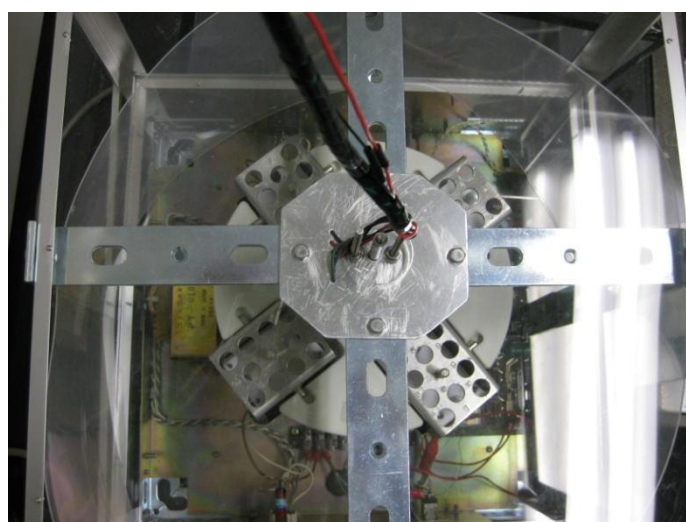


図 2-1 遠心型細胞培養装置

2-2-4 靱帯細胞の遠心培養

コーティングシャーレに靱帯細胞をコンフルエントになるまでインキュベーター内で静置培養を行った。コンフルエントになったら培地交換を行い、遠心培養するものと静置培養するものに分け、12 時間遠心培養を行った。

培地はコンフルエントになるまでは 5% FBS/ SCBM を使用し、加圧培養中は 0.1% FBS/ SCBM 使用した。

2-2-5 アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の定量

本実験では、骨形成の代表的なマーカーである ALP を骨分化の指標のうちの1つとして用いた。加圧培養・静置培養後にタンパク抽出を行い、ラボアッセイ™ALP (p-ニトロフェニルりん酸基質法による ALP 活性測定キット)を用いてアルカリフォスファターゼ活性を測定した。

方法として、まず、加圧培養終了後、コーティングシャーレ上の靭帯細胞を細胞溶解液を用いて溶解した。その後 15,000 r.p.m、4℃で30分間遠心分離を行い回収した上澄み液をタンパク溶液とした。

次に、ラボアッセイ™ALPを用いて、p-ニトロフェニルりん酸を含む炭酸塩緩衝液 (pH 9.8) 中で細胞から抽出したタンパク溶液を検体として作用させることで、分解産物として生成した p-ニトロフェノールを 405 nm の吸光度(黄色)で測定することにより検体中の ALP 活性値を求めた。

2-2-6 色素結合法を用いた産生コラーゲン測定 (Collagen Assay)

本実験では、骨形成の代表的なマーカーであるコラーゲンを骨分化の指標のうちの1つとして用いた。加圧培養・静置培養後の培地中のコラーゲン量を色素結合法によって測定した。コラーゲンと特異的に結合する色素には Direct Red 80 (別名: Sirius Red)を用いた。

方法として、染色液(Direct Red 80/ピクリン酸,1:1)1 ml に対して培地を 100 µl 加え、ローテーターで室温で30分間攪拌した。12,000 r.p.m で10分間遠心分離を行い上澄み液を除去した後、0.5M 水酸化ナトリウムを1 ml 加えて沈殿物を溶解した。96 穴プレートに 200 µl ずつ移してからマイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した(波長:550 nm)。

2-2-7 フローサイトメトリー解析による靭帯細胞の分化割合

本実験では、骨形成の代表的なマーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)と、破骨細胞活性化因子である receptor activator of NF κ B ligand(RANKL)を骨形成マーカーとして用いた。

方法として、まず、加圧培養終了後、コーティングシャーレ上の靭帯細胞にトリプシン処理を行って細胞を剥がし、1000 rpm で遠心分離して細胞を回収した。次に細胞を 2% FBS/ PBS で二回洗浄した。ALP、RANKL の抗体を加え、4℃で30分間インキュベートし、2% FBS/ PBS で二回洗浄した。その後、BD FACSCanto™ II フローサイトメーターで靭帯細胞の分化割合を測定した。

2-3 ECM ペレット内において加圧刺激が細胞に与える影響

2-3-1 ECM ペレットの作製

分画エラスチン A、I 型コラーゲンをエレクトロスピンニング法により繊維状にして、その後、凍結乾燥を行い、ペレットを作製した(図 2-2、2-3、2-4)。



図 2-2 エラスチンペレット



図 2-3 コラーゲンペレット

直径:5mm
厚さ:3mm



図 2-4 培養容器

2-3-2 水圧による加圧培養装置

本実験では、以下のような装置を使用して加圧(0.8MPa)を行った(図 2-5)。



図 2-5 水圧による加圧培養装置

2-3-3 ECM ペレット内における加圧培養

ECM ペレットに靭帯細胞を播種するために、まず、ペレットを SCBM と FBS に浸して前準備を行った。ECM ペレットを培養容器に入れ、そこに靭帯細胞を播種した。静置培養期間を変化させた実験では、靭帯細胞を 3, 7, 10, 14, 21 日間培養してから水圧による加圧培養を 12 時間行った。加圧培養時間を変化させた実験では、靭帯細胞を 14 日間培養してから加圧培養を 3, 6, 12, 24 時間行った。

培地は静置培養時は 5% FBS/ SCBM で培養し、加圧培養中は 0.1% FBS/ SCBM で培養した。

2-3-4 ECM ペレットへの細胞接着の確認(免疫蛍光染色、走査型電子顕微鏡)

ECM ペレットへの細胞接着を確認するために、免疫蛍光染色と走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行った。

免疫蛍光染色は以下のように行った。ECM ペレットに 1.0×10^6 個の靭帯細胞を播種し、5% FBS/ SCBM で 7 日間培養した。7 日後に培地を取り除き、PBS でペレットごと細胞を洗浄し、 -20°C acetone/methanol (1:1)にて室温で 5 分間固定した後、固定液を除いて 10 分間風乾した。核染色のヨウ化プロピジウム(PI)を終濃度(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)になるように添加して 90 分暗所室温で静置した。その後、十分に洗浄を行い、共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, Olympus)を用いて観察した。

SEM による観察は以下のように行った。ECM ペレットに 1.0×10^5 個の靭帯細胞を播種し、5% FBS/ SCBM で 7 日間培養した。7 日後に培地を除き、りん酸緩衝液(PB)でファイバーごと細胞を洗浄した。洗浄後、前固定として 2.5% グルタルアルデヒド/PB で 2 時間固定した。固定後、PB にて 4 回のつけおき洗浄を 4°C で 15 分毎に行った。洗浄後に後固定として 1% 四酸化オスミウム/PB により室温で 1.5 時間固定した。その後、PB による洗浄、エタノールによる段階的脱水、 t -ブチルアルコールによる置換を行い、凍結乾燥機を用いて試料を乾燥した。乾燥させた試料は、真空イオン蒸着装置を用いて金イオンコーティングを行い、SEM で観察した。

2-3-5 アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の定量

本実験では、骨形成の代表的なマーカーである ALP 活性を骨分化の指標のうちの 1 つとして用いた。加圧培養・静置培養後にタンパク抽出を行い、ラボアッセイTMALP(p-ニトロフェニルりん酸基質法による ALP 活性測定キット)を用いて ALP 活性を測定した。

実験操作は、2-2-5 に示した通りに行った。

2-3-6 フローサイトメトリー解析による靱帯細胞の分化割合

本実験では、骨形成の代表的なマーカーである ALP と、破骨細胞活性化因子である RANKL を骨形成マーカーとして用いた。

実験操作は、2-2-7 に示した通りに行った。

2-4 ラクトース添加によるエラスチン結合タンパクの阻害

靱帯細胞にはエラスチンレセプターという複合体が存在する。この中にある実際にエラスチンと結合する部位であるエラスチン結合タンパク質 (EBP: elastin-binding protein) はガラクトース、ラクトースまたは、N-アセチルガラクトサミンを含有するグリコサミノグリカン(コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸)と結合することにより、エラスチンとの親和性を失う²²⁾。また、靱帯細胞とエラスチンの結合部位は他にもあると考えられているが、その詳細はまだ不明である。

そこで、本実験では、靱帯細胞とエラスチンの結合にエラスチンレセプターが関与しているのかどうか調べるために、結合阻害剤としてラクトースを靱帯細胞の培養培地に添加して実験を行った。

方法としては、靱帯細胞を培養するときに、通常の 5% FBS/SCBM にラクトースを 1mg/ml になるように添加し、同様に培養した。評価法としては、ALP 活性の定量を行った。実験操作は 2-2-5 に示した通りに行った。

3 結果

3-1 ECM コーティングシャーレ上における遠心培養

3-3-1 加圧刺激(遠心力)が靭帯細胞に与える影響

ECM シャーレ (ElastinA 0.1mg/ml、ElastinA 1.0mg/ml、Non-coat) 上に靭帯細胞を播種してサブコンフルエントになるまで(7日間)静置培養を行い、12時間遠心培養を行った。その後、ALP活性を測定し、それぞれを比較した(図3-1)。ALP活性の測定にはラボアッセイ™ALPキットを使用した。

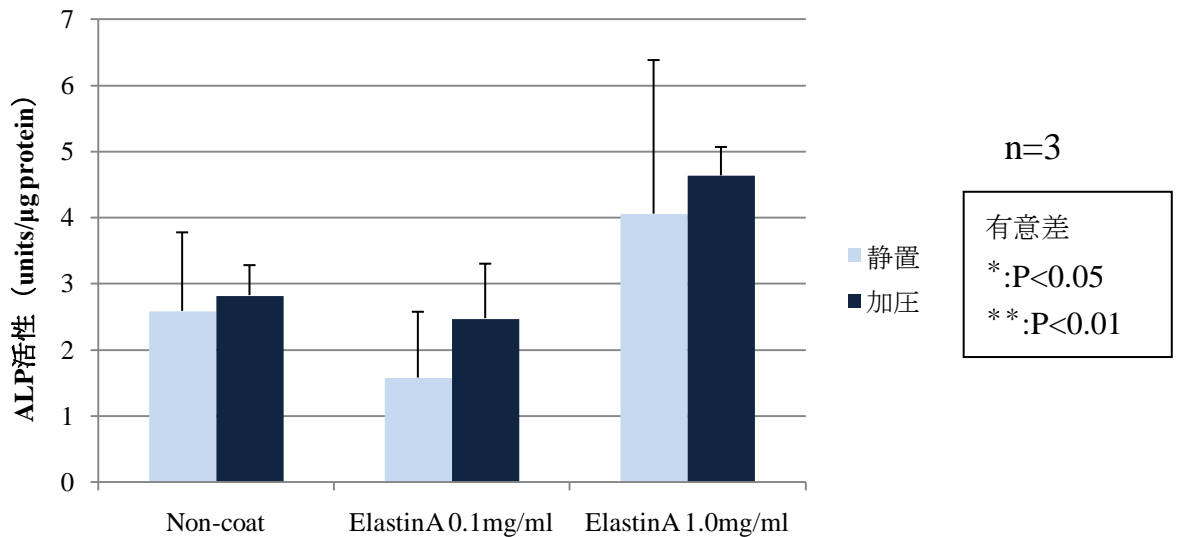


図3-1 ECM シャーレ上における遠心培養後のALP活性

ElastinA 1.0mg/ml をコーティングしたシャーレ上で静置・遠心培養で行うことにより、ALP活性が上昇する傾向にあった。

Non-coat と ElastinA 0.1mg/ml のシャーレではほとんど同様の結果になった。

3-3-2 加圧刺激による靱帯細胞の分化割合

本実験では、骨形成の代表的なマーカーである ALP と、破骨細胞活性化因子である RANKL (receptor activator of NF κ B ligand) を骨分化マーカーとして用いてフローサイトメリー分析を行った。ECM シャーレ (ElastinA 0.1mg/ml、ElastinA 1.0mg/ml、Non-coat) 上に靱帯細胞を播種してサブコンフルエントになるまで(7日間) 静置培養を行い、12 時間遠心培養を行った後にフローサイトメリーを行った(図 3-2~3-4)。

図 3-2~3-4 では図を 4 つの領域に分けた。Q1 (ピンク) は RANKL のみを発現している細胞、Q2 (青) は RANKL と ALP を両方発現している細胞、Q3 (黒) は RANKL と ALP を両方発現していない細胞、Q4 (緑) は ALP のみを発現している細胞である。

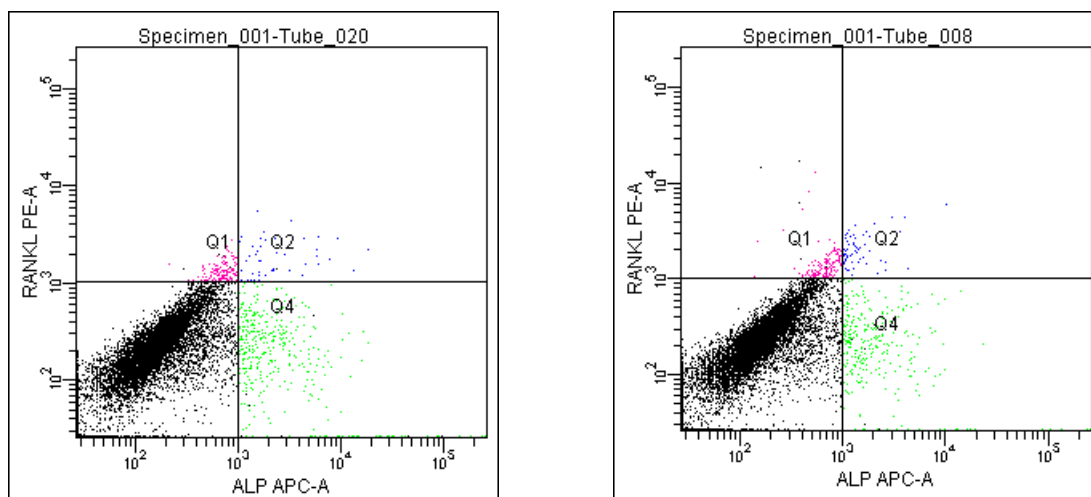


図 3-2 Non-coat シャーレ上での静置培養(左)・加圧培養(右)後の各マーカーの発現

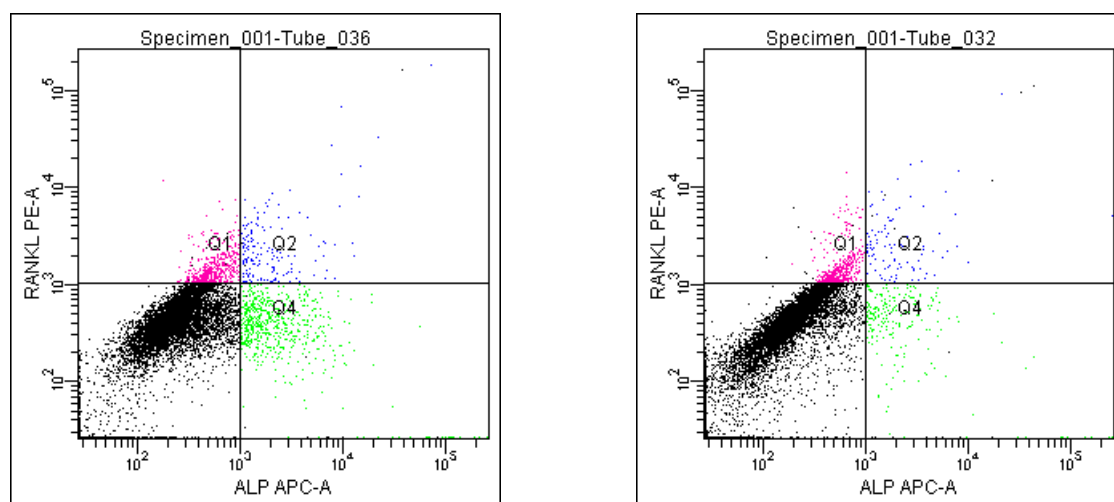


図 3-3 ElastinA 0.1mg/ml シャーレ上での静置培養(左)・加圧培養(右)後の各マーカーの発現

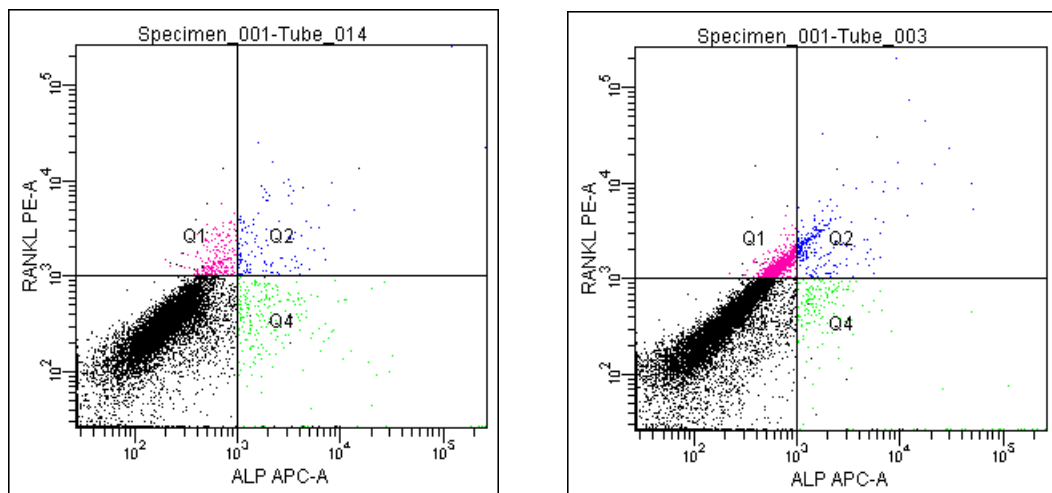


図 3-4 ElastinA 1.0mg/ml シヤーレ上での静置培養(左)・加圧培養(右)後の各マーカーの発現

Non-coat シヤーレ上では、静置と加圧の間に変化は見られなかった(図 3-2)。ElastinA 0.1mg/ml シヤーレ上では、静置は Non-coat と同じような細胞集団が得られたが、加圧することにより、細胞集団は Q1 の領域に引き上げられる様な形へと変化した(図 3-3)。ElastinA 1.0mg/ml シヤーレ上でも同じような現象が起こり、それはさらに顕著となった(図 3-4)。また、ElastinA をコーティングしたシヤーレを加圧培養すると、ALP 発現よりも RANKL 発現への影響の方が大きくなった。

図 3-2～図 3-3 をもとにして、各マーカーの発現の割合をグラフにした(図 3-4～図 3-7)。割合の算出方法は、ALP を発現した細胞の割合 = Q2 + Q4、RANKL を発現した細胞の割合 = Q1 + Q2、両方発現した細胞の割合 = Q2 とした。

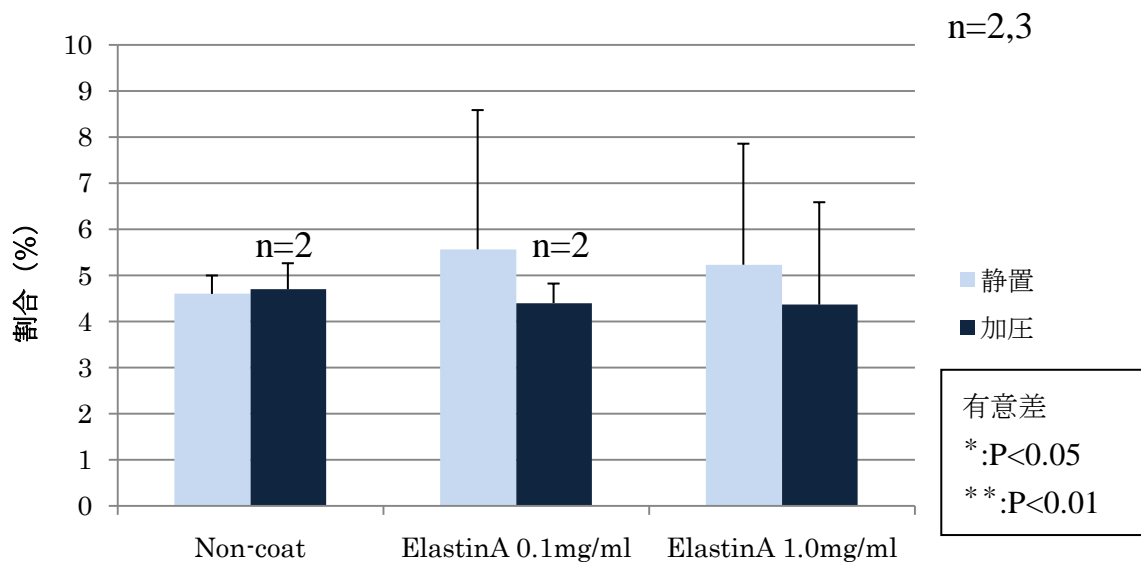


図 3-5 ECM シャーレ上における加圧培養後の ALP 発現細胞の割合

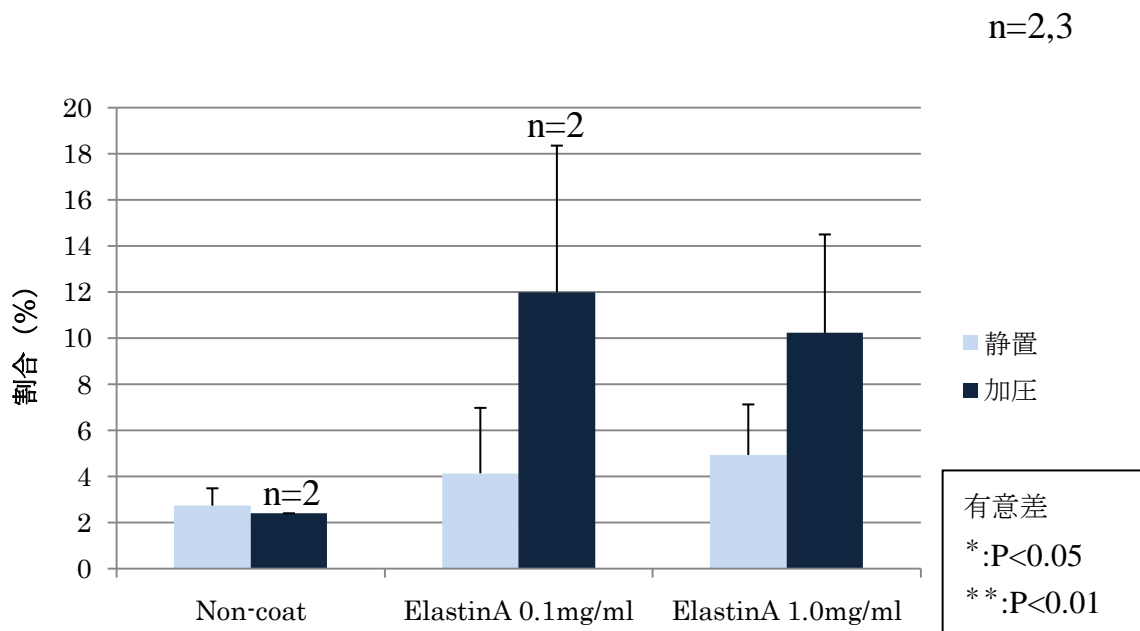


図 3-6 ECM シャーレ上における加圧培養後の RANKL 発現細胞の割合

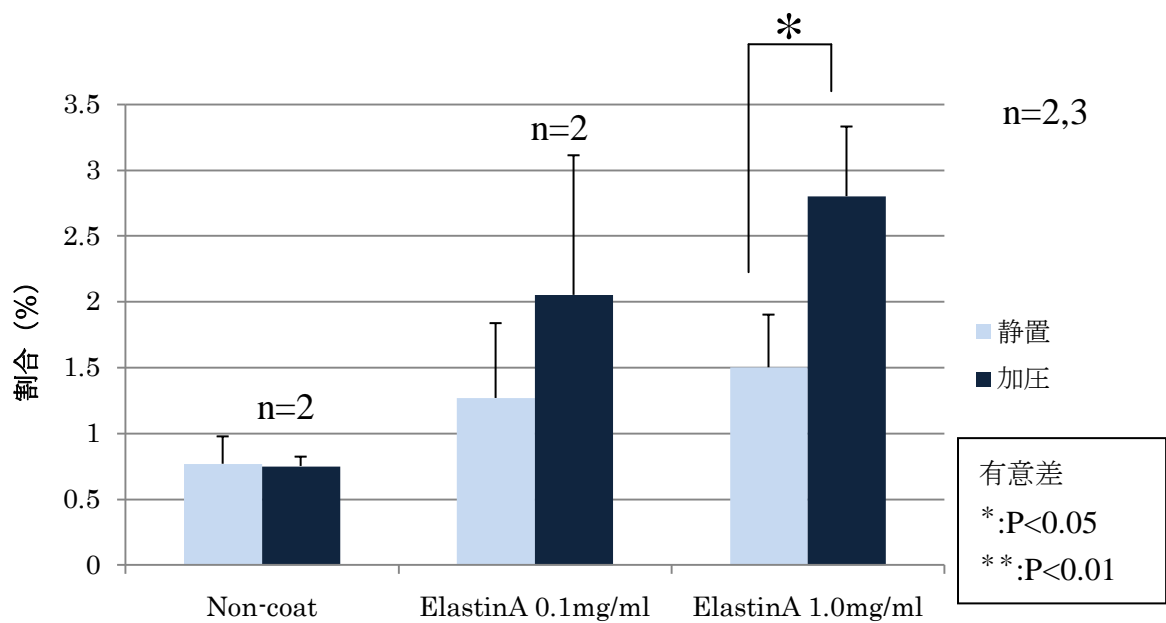


図 3-7 ECM シヤーレ上における加圧培養後の ALP と RANKL を発現する細胞の割合

全ての条件において、ALP 発現細胞の割合はほとんど同じであった(図 3-5)。RANKL 発現細胞は、エラスチンコーティングシヤーレ上で培養し、加圧培養することで発現細胞の割合が増えた。一方、Non-coat シヤーレ上で培養した細胞を加圧培養しても、RANKL 発現細胞の割合は増えなかった(図 3-6)。ALP と RANKL を共に発現する細胞はエラスチンコーティングシヤーレ上で多く見られ、さらに、加圧することで発現細胞が増加した。Non-coat シヤーレ上では、両方発現している細胞はほとんど存在しなかった(図 3-7)。

3-3-3 色素結合法を用いた産生マトリックス測定

細胞が産生したマトリックスと特異的に結合する色素を用いることで、培地中に存在するコラーゲン量を測定した。

まず、絶対量が 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μg のサンプルを測定し、検量線を作製した(図 3-8)。本実験では図 3-5 を利用して、コラーゲンの量を算出した。

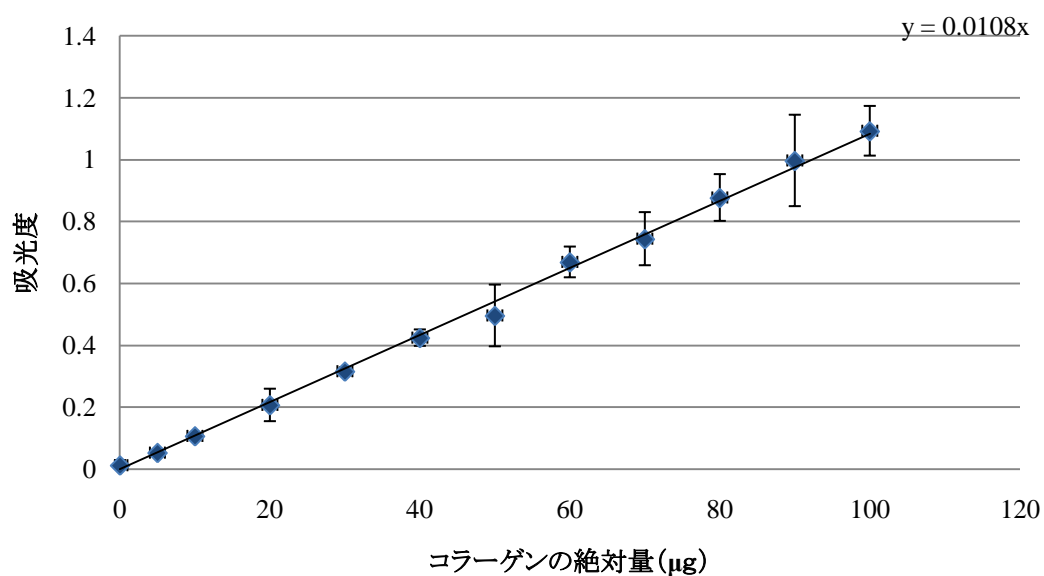


図 3-8 Collagen Assay の検量線

ECM シヤーレ (ElastinA 0.1mg/ml、ElastinA 1.0mg/ml、Non-coat) 上に靱帯細胞を播種してサブコンフルエントになるまで(7日間)静置培養を行い、12時間遠心培養を行った。その後、培地を回収して、産生マトリックスの測定を Collagen Assay 法により行った(図 3-9)。

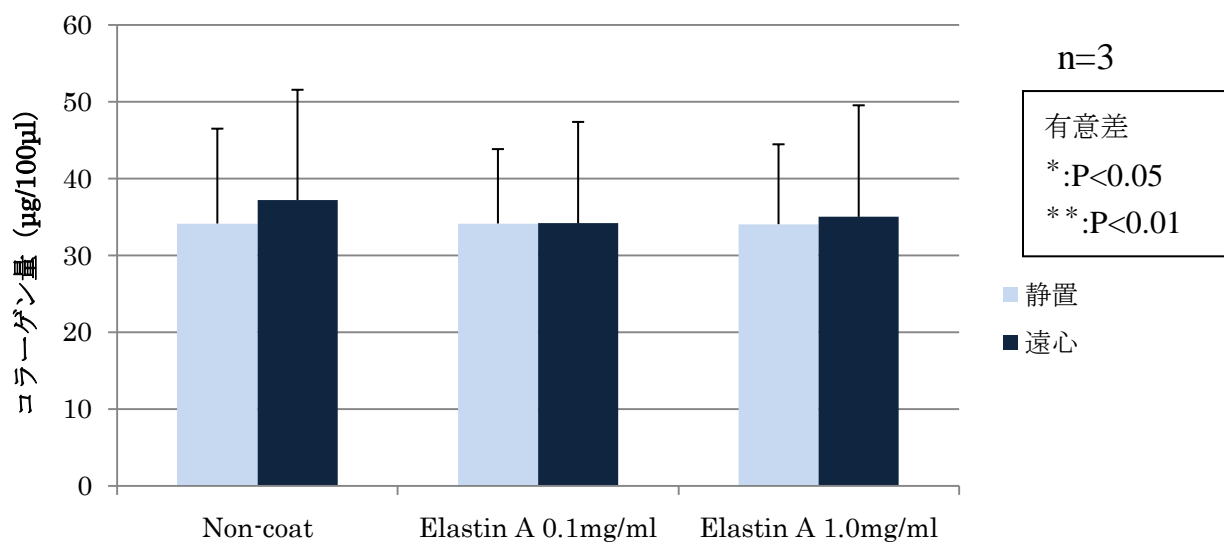


図 3-9 培地中の I 型コラーゲン量

培地中への I 型コラーゲンの産生量は、どの条件でもほとんど同じであった。

3-2 作製した ECM ペレットの評価

走査型電子顕微鏡 (SEM) により、作製した ECM ペレットの観察を行った (図 3-10、3-11; Scale Bar = 45 μm)。繊維径の平均は、エラスチンが $2.2 \pm 0.55 \mu\text{m}$ 、コラーゲンが $0.76 \pm 0.36 \mu\text{m}$ であった。

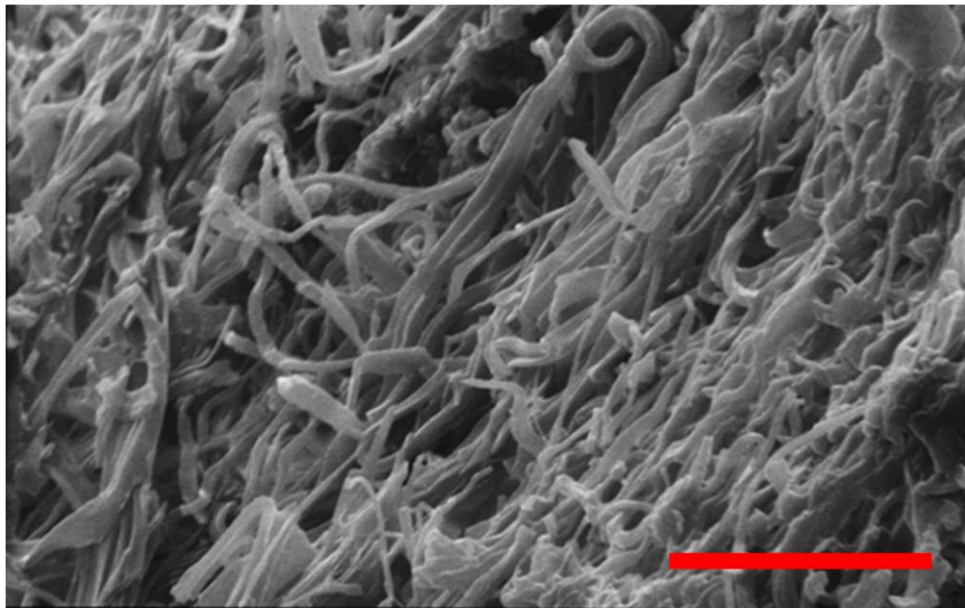


図 3-10 エラスチンペレット断面 (撮影倍率 400 倍)

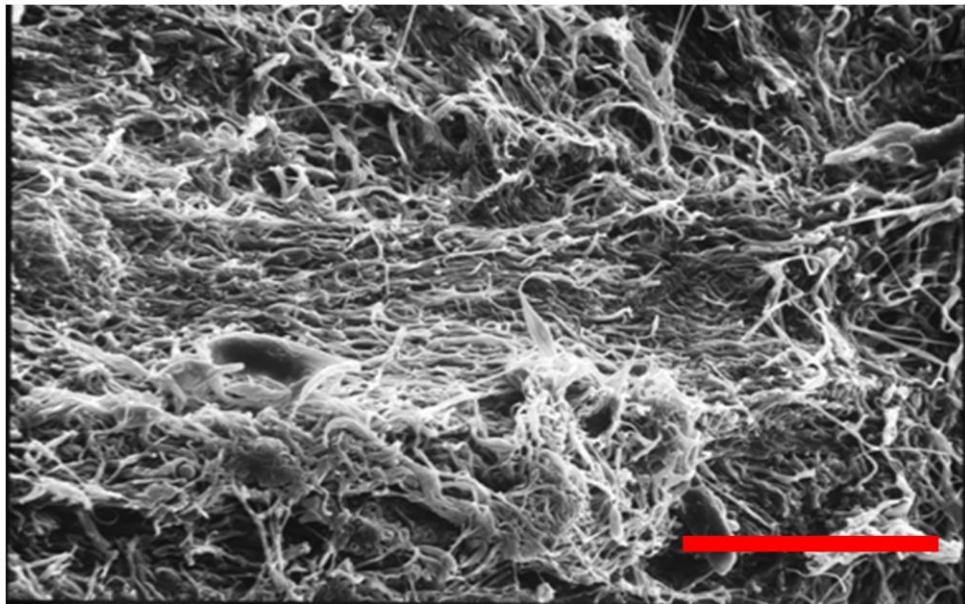


図 3-11 コラーゲンペレット断面 (撮影倍率 400 倍)

3-3 ECM ペレットへの細胞接着確認

作製した ECM ペレットへの細胞接着を確認するために免疫化学染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した(図 3-12,3-13)。緑色の部分はエラスチンの自家蛍光で、赤色は細胞核である。図 3-12 は ECM ペレットを底面約 1.2mm、高さ約 0.13mm を切り取って立体的に写真撮影をしたものであり、図 3-13 は図 3-12 を側面から撮影したものである。共焦点顕微鏡で観察した画像をもとに、ペレットの内部の細胞分布を調べた(図 3-14)。

また、走査型電子顕微鏡(SEM)を使用して、ECM ペレット内の靭帯細胞の観察を行った(図 3-15,16)。

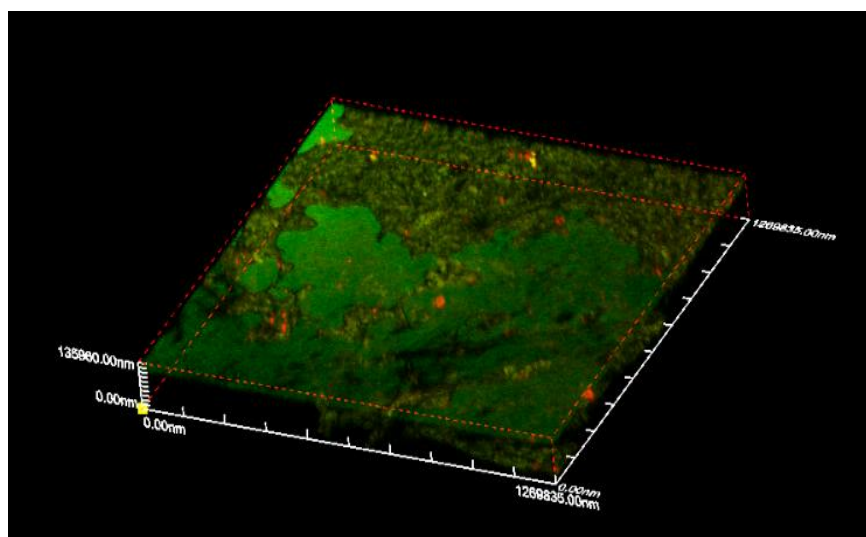


図 3-12 ECM ペレット内の靭帯細胞の様子

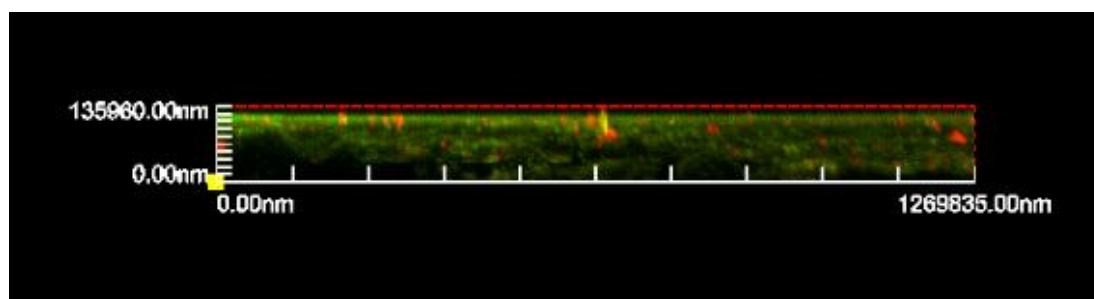


図 3-13 ECM ペレット内の靭帯細胞の様子(側面)

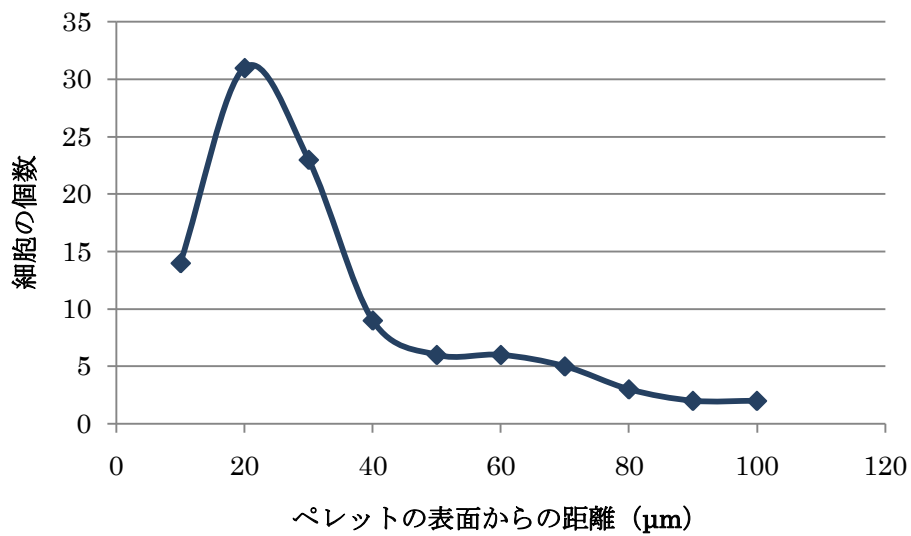


図 3-14 ECM ペレット内の靭帯細胞の分布

図 3-12～図 3-14 より靭帯細胞が作成した ECM ペレット内に細胞が存在することがわかった。また、ペレットの表面から 40μm までに細胞が多く存在し、その後 100μm まではまんべんなく存在していた。

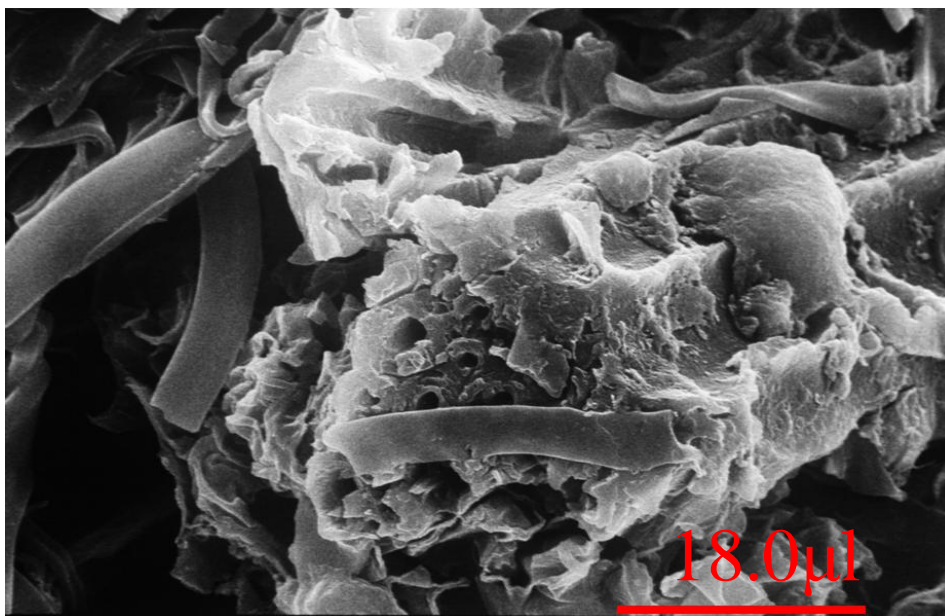


図 3-15 ECM ペレット内の靭帯細胞 (撮影倍率:1000 倍)

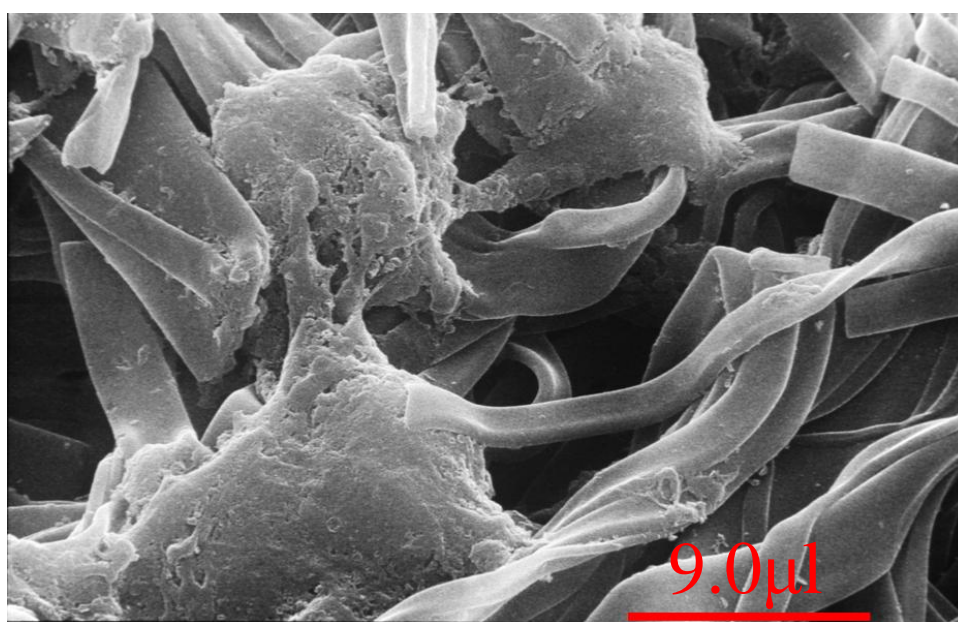


図 3-16 ECM ペレット内の靭帯細胞 (撮影倍率:2000 倍)

図 3-15～3-16 より、作製した ECM ペレットに靭帯細胞が接着していることがわかった。

3-4 ECM ペレット内における水圧による加圧培養

ECM ペレット内に細胞が接着していることが確認できたので、ペレット内培養による靭帯細胞の ALP 活性と分化の割合を測定した。

3-3-1 加圧刺激が靭帯細胞の ALP 活性に与える影響

実験は三種類行った。一つ目は、エラスチンペレット内における培養期間(静置期間)を 3、7、10、14、21 日間と変化させ、その後 12 時間の加圧培養を行った(図 3-17)。二つ目は、加圧時間を 3、6、12、24 時間と変化させた(図 3-18)。三つ目は静置期間 14 日間、加圧時間 12 時間の条件でエラスチンペレットとコラーゲンペレット内培養における両者の ALP 活性を比較した(図 3-19)。ALP 活性の測定にはラボアッセイ™ALP キットを使用した。

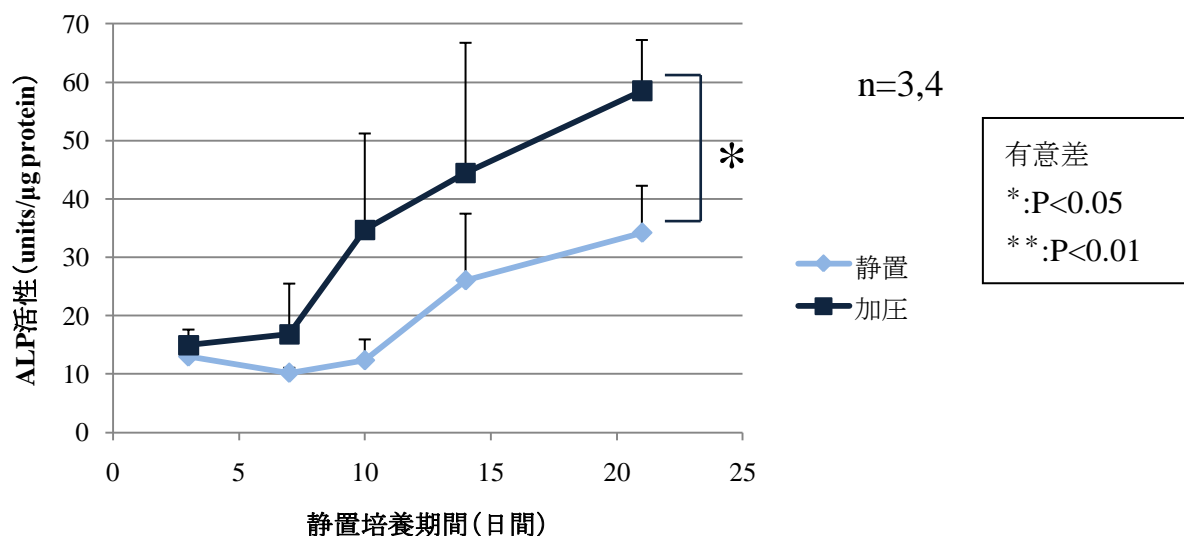


図 3-17 エラスチンペレット内培養における ALP 活性(静置培養期間の変化)

加圧前の静置培養期間が長いほど ALP 活性が高くなった。また、静置培養期間が 7 日間から、加圧培養をした時の ALP 活性が大きく上昇した。その後は緩やかに 21 日まで上昇した。一方、静置培養は 10 日目まではほとんど ALP 活性は変化せず、その後 14 日目にかけて急に増加し、21 日まで緩やかに上昇していった。

次に、加圧時間を変化させて、同様に ALP 活性を測定した。加圧までの静置培養期間は静置・加圧とも ALP 活性の上昇が安定しはじめた 14 日間で行った。

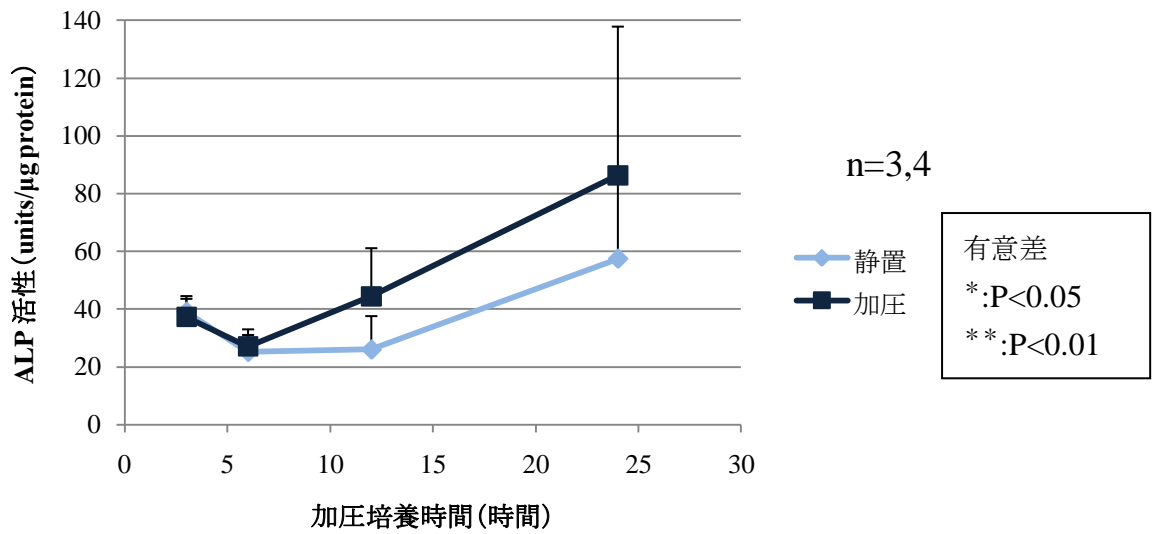


図 3-18 エラスチンペレット内培養における ALP 活性(加圧培養期間の変化)

加圧時間が 12 時間までは、あまり変化が見られなかったが、24 時間加圧すると、ALP 活性が大きく上昇した。

エラスチンペレットとコラーゲンペレットの二種類を用いて加圧培養を行った。加圧前の静置期間は 14 日間で、加圧時間は 12 時間の条件で行った。

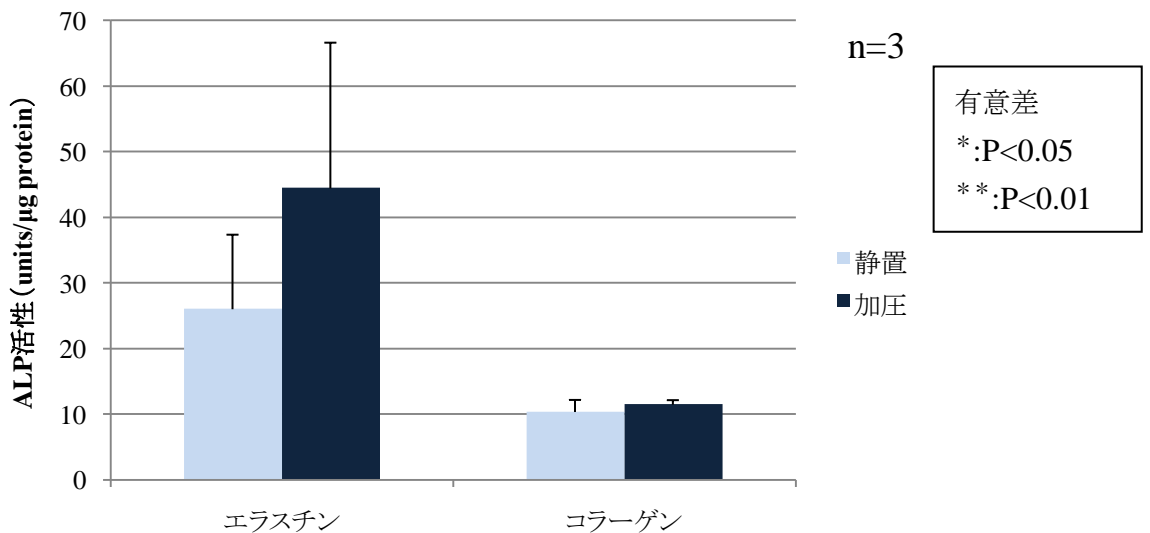


図 3-16 エラスチンペレットとコラーゲンペレットの比較

エラスチンペレットの方がコラーゲンペレットよりも静置・加圧培養の両方において ALP 活性が高くなった。

3-4-2 加圧刺激による靭帯細胞の分化割合

本実験では、骨形成の代表的なマーカーである ALP と、破骨細胞活性化因子である RANKL を骨分化マーカーとして用いてフローサイトメトリー分析を行った。エラスチンペレット内で加圧前に 14、21 日間培養し、12 時間加圧培養を行った後にフローサイトメトリーを行った(図 3-17、3-18)。

図 3-17~3-18 では図を 4 つの領域に分けた。Q1(ピンク)は RANKL のみを発現している細胞、Q2(青)は RANKL と ALP を両方発現している細胞、Q3(黒)は RANKL と ALP を両方発現していない細胞、Q4(緑)は ALP のみを発現している細胞である。

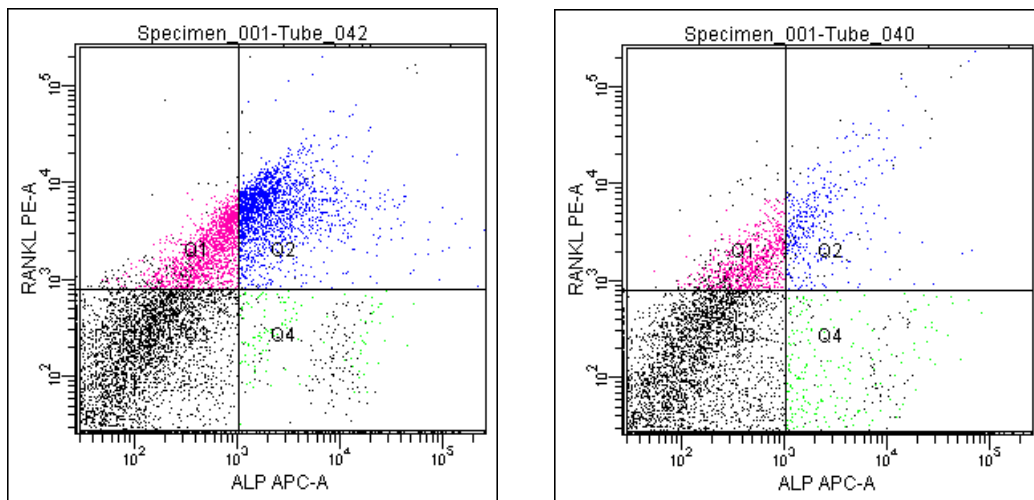


図 3-17 静置培養(左)・加圧培養(右)後の ALP・RANKL 発現細胞
(ペレット内で静置培養期間 14 日間、加圧時間 12 時間)

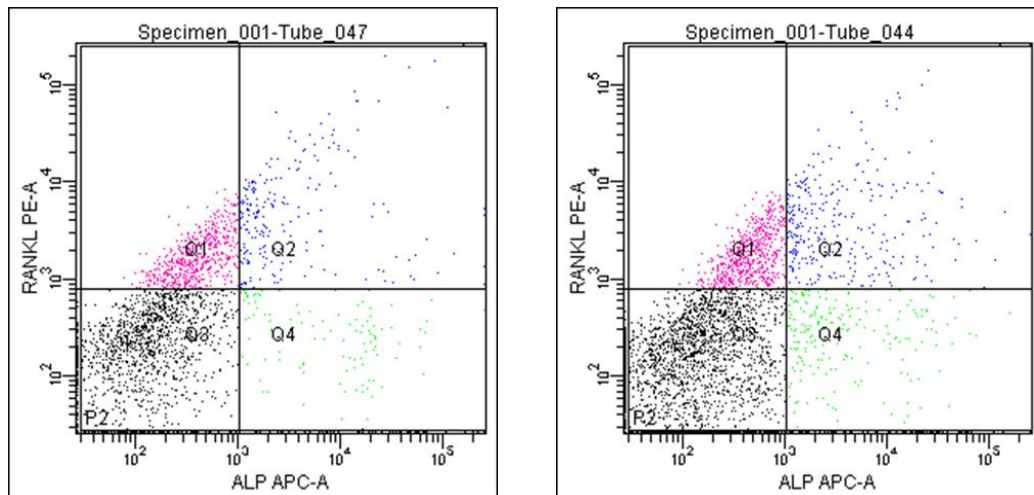


図 3-18 静置培養(左)・加圧培養(右)後の ALP・RANKL 発現細胞
(ペレット内で静置培養期間 21 日間、加圧時間 12 時間)

図 3-17、3-18 をもとにして、各マーカーの発現の割合をグラフにした(図 3-19～図 3-21)。割合の算出方法は、ALP を発現した細胞の割合 = Q2 + Q4、RANKL を発現した細胞の割合 = Q1 + Q2、両方発現した細胞の割合 = Q2 とした。

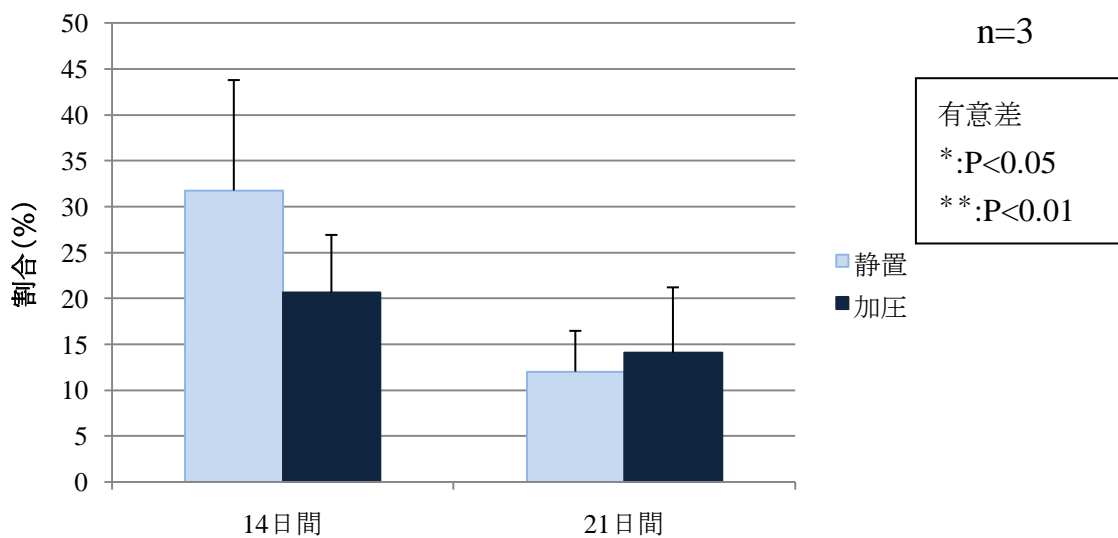


図 3-19 ALP 発現細胞の割合

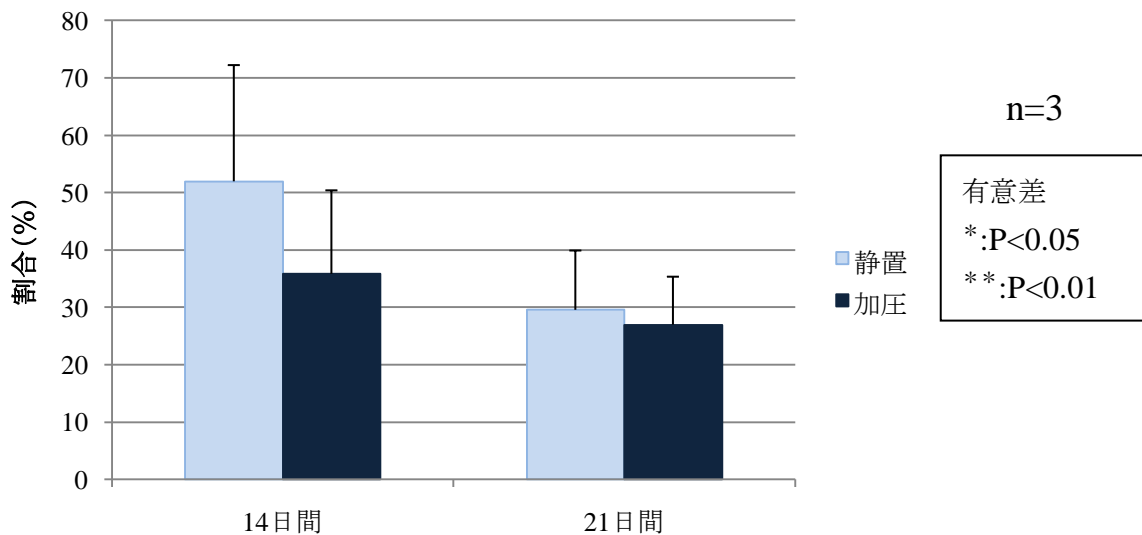


図 3-20 RANKL 発現細胞の割合

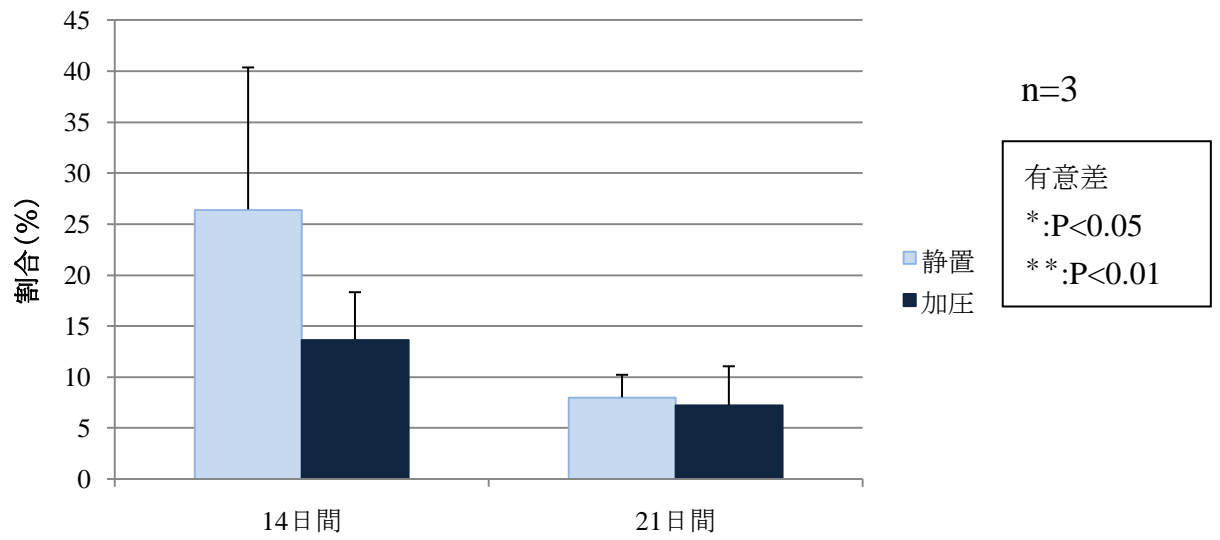


図 3-21 ALP と RANKL を共に発現する細胞の割合

ALP、RNKL 発現ともに 14 日間、21 日間、静置、加圧の条件において有意な差はみられなかった。

3-5 ラクトース添加によるエラスチン結合タンパク質の阻害

靭帯細胞が持っているエラスチンレセプターがエラスチンとの結合に関わっているのかを検討するために、通常培地である 5% FBS/SCBM にラクトースを 1mg/ml になるように添加して、ALP 活性を比較した。ALP 活性の測定にはラボアッセイ™ALP キットを使用した。

3-5-1 ECM コーティングシャーレ上における遠心培養実験

ECM シャーレ (ElastinA 1.0mg/ml、Non-coat) 上に靭帯細胞を播種してサブコンフルエントになるまで (7 日間) 静置培養を行い、12 時間遠心培養を行った。その後、ALP 活性を測定し、それぞれを比較した (図 3-22)。ALP 活性の測定にはラボアッセイ™ALP キットを使用した。

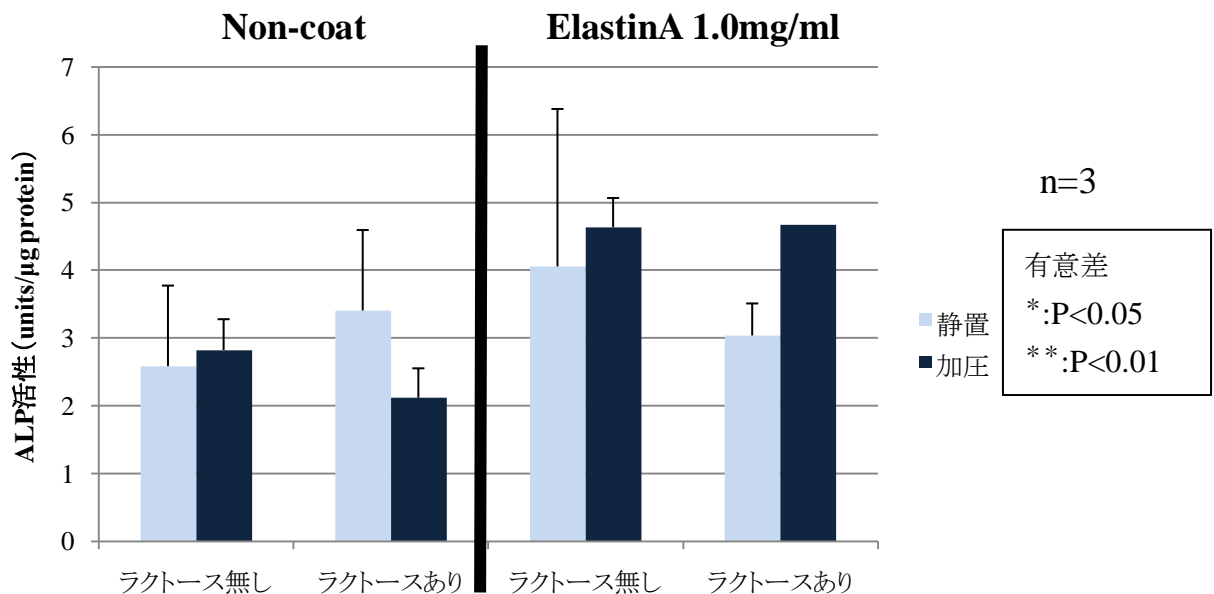


図 3-22 ラクトース添加時の Non-coat シャーレ上における遠心培養後の ALP 活性

Non-coat、ECM シャーレ上において、静置、遠心培養ともに、ラクトース添加による EBP 阻害の効果は見られなかった。

3-5-2 ECM ペレット内における水圧による加圧培養

エラスチンペレット内に靭帯細胞を播種して 14 日間静置培養を行い、12 時間加圧培養を行った。その後、ALP 活性を測定し、それぞれを比較した(図 3-23)。ALP 活性の測定にはラボアッセイ™ALP キットを使用した。

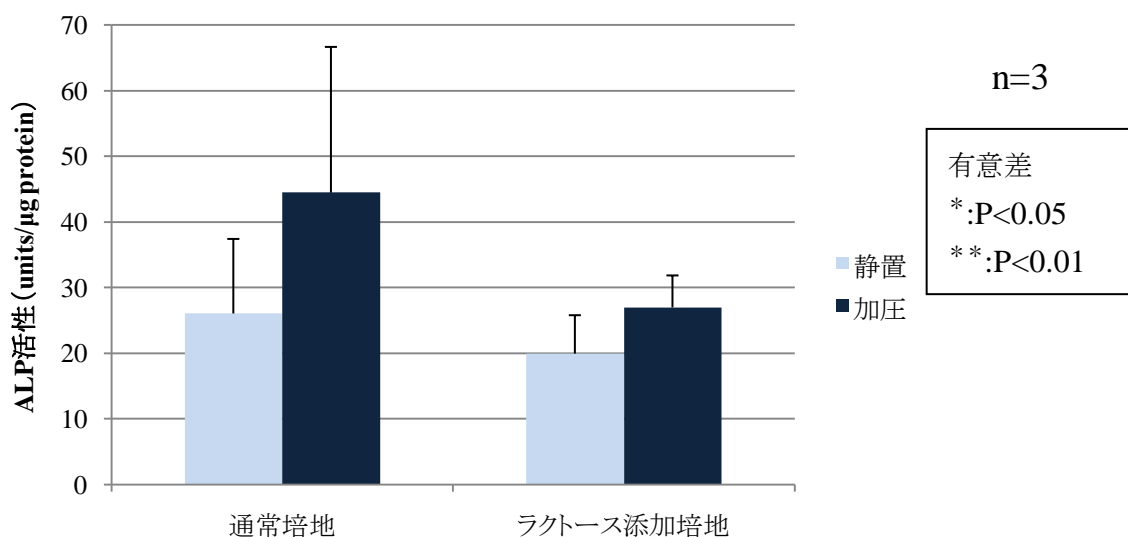


図 3-23 ラクトース添加時のエラスチンペレット内における加圧培養後の ALP 活性

ペレット内培養においては、静置で変化は無かったが、加圧培養をすることによって、ALP 活性がラクトース添加によって若干の減少が見られた。

4 考察

4-1 ECM シヤーレ上における遠心培養が靭帯細胞に与える影響

本研究では、0.1mg/mlと1.0mg/mlの二種類の濃度のElastinAを用いてECMシヤーレを作製した。これらのシヤーレ Non-coat のシヤーレ上に靭帯細胞をコンフルエントなるまで(7日間)静置培養し、その後12時間の遠心培養を行った。遠心後、骨分化の指標としてアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定を行った。ALPは、本実験で靭帯細胞として用いたヒト歯周靭帯線維芽細胞(HPdLF)が骨芽細胞様に分化する時に初期の段階で高い発現が確認されるため、骨分化の指標として用いた³²⁾。

ほかの骨分化の指標としてI型コラーゲンを用いた。骨芽細胞が骨を形成する時に、大量に分泌するのがI型コラーゲンであり、骨芽細胞は自身の分泌した基質に埋もれて骨細胞となり、骨を形成する。そのため、骨分化の程度を測るために靭帯細胞の産生したI型コラーゲンを測定した。

また、HPdLFに機械的な刺激を加えると、破骨細胞活性化因子であるRANKL(receptor activator of NFκB ligand)が発現し、骨吸収を助けて骨のリモデリングを促進するという報告がある³⁴⁻³⁷⁾。生体内では、骨のリモデリングは骨が破骨細胞によって吸収した後に、骨芽細胞が骨形成を行う。骨形成と骨吸収の詳細なメカニズムはいまだ不明だが、骨のリモデリングを再現するためには、RANKLの発現も必要であると考え、靭帯細胞の骨分化の指標として用いた。

以上より、本実験はALP活性とI型コラーゲン産生、RANKLの発現により靭帯細胞の骨分化の程度を判断する。

まずは、ALP活性定量の結果の考察を行う。コーティングしたエラスチンの濃度に注目すると、図3-1のALP活性の結果はコーティングしたエラスチンの濃度が高いほど活性が高くなった。Non-coatとElastinA 0.1mg/mlの間でALP活性がほぼ同じであったのは、この二種のシヤーレの表面特性がほぼ同じであったことが考えられる。以下に、ECMシヤーレの表面を評価する時に行った接触角測定の結果を示す(図4-1)。

接触角

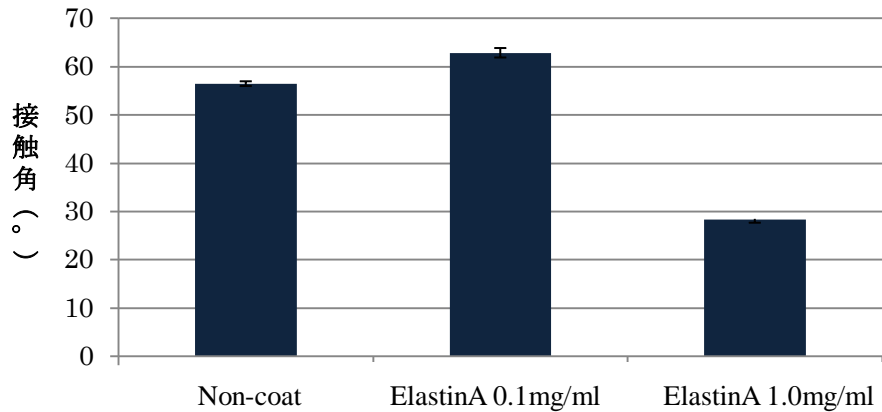


図 4-1 接触角測定の結果

接触角測定の結果、Non-coat のシャーレとElastin 0.1mg/ml のシャーレの接触角はほぼ同じになり、二枚のシャーレの表面特性に違いが無いことがわかる。ElastinA 1.0mg/ml についても、他の二種のシャーレに比べて著しく活性が高いわけではない。エラスチンには細胞と結合する特異的な領域が存在する。本実験で使用した二種類のエラスチン溶液は濃度が低いため、この特異的な領域があまり含まれておらず、エラスチンの効果を十分に得ることができなかったと考えられる。

静置培養よりも加圧培養の方が活性が高くなったことについて考察する。静置に比べると加圧を行うと活性が高くなる傾向が得られた。この結果は、多くの論文で示された結果と同じになった^{32,33}。しかし、静置と加圧培養に顕著な差は無い。本研究で用いた遠心培養機の回転数は 933r.p.m. であり、回転数や回転半径からシャーレにかかる力は $21.3 \text{ g pressure/cm}^2 \text{ of cells}$ であり圧力換算すると 0.2MPa であった。ヒト歯周靭帯細胞を機械的的刺激によって骨分化誘導を行う時には、歯列矯正運動の時にかかる力に近い $33.5 \text{ g pressure/cm}^2 \text{ of cells}$ (約 0.3MPa) が使われることが多い³¹。このことを考慮すると、骨分化誘導を行うにはかける圧力が足らなかったのではないかと考えられる。

以上の二点は、図 3-2~3-7 についてもあてはまることである。しかし、図 3-7 の RANKL を持つ細胞の割合では、ElastinA をコーティングして加圧培養を行ったものが発現が高くなった。これについては、エラスチン・機械的刺激・RANKL の三つ

の影響を同時に観察している論文は無く、それぞれの関係性は不明である。しかしながら、機械的刺激と RANKL 発現には以下の様な関係がある(図 4-2)。

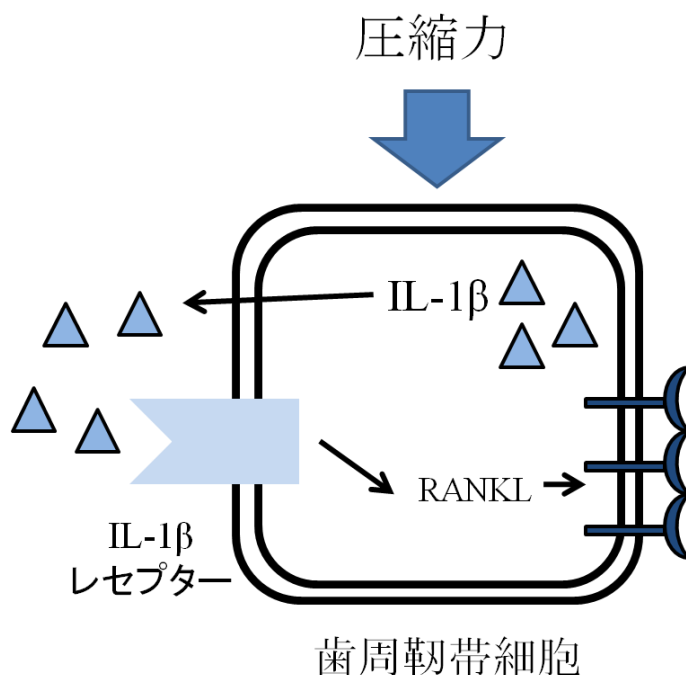


図 4-2 圧縮力と RANKL の関係³⁶⁾

圧縮力を歯周靱帯細胞に加えると、IL-1 β が発現し、オートクリン作用により分泌された IL-1 β が IL-1 β レセプターを通り、RANKL の発現に関与する。また直接は関係ないが、IL-1 β は生体内でエラスチンの合成に関与するという報告もある³⁸⁾。エラスチンと IL-1 β との間にはまだ別の相互作用があるかもしれない。本実験では調査していないが、IL-1 β に注目すれば、エラスチン・機械的刺激・RANKL の関係性が見えてくる可能性がある。

次に、加圧培養が靱帯細胞の I 型コラーゲンの産生に与える影響について考察する。三種類のコーティング条件で静置・加圧培養を行ったが、加圧培養の方が若干活性が高い傾向がでたが、差はほとんど出なかった。骨芽細胞の分化は I 型コラーゲンや ALP が先行して発現するという報告がある^{28,32)}。そのため、差があまり無かったのは、靱帯細胞が十分に I 型コラーゲンを産生できる状態ではなかったと考えられる。原因として考えられる事は、先に考察した力の大きさと、細胞の培養状態が関係しているのではないかと考えられる。生体内で細胞は ECM に包まれた状態で存在し、本実験のように組織に固有の ECM をコーティングしたシャーレ上に存

在しているわけではない。最近、ECM が硬いシャーレ上に固定化されている状態で培養していたことで、生体中に無かった細胞の性質が誘起されたり、逆に生体中で発揮していた能力の低下が生じるということが明らかにされつつある²⁶⁾。そのため、靭帯細胞を分化の方向に向かわせるためには、二次元培養ではなく、三次元培養を行う必要がある。

4-2 ECM ペレット内における加圧培養が靭帯細胞に与える影響

本実験では、エラスチンとコラーゲンで作製した ECM ペレットの中で靭帯細胞を様々な期間を培養し、その後水圧による加圧培養を行った。実験は、①加圧前の静置期間を変化させたもの②加圧時間を変化させたもの③エラスチンペレットとコラーゲンペレットの比較の三種類を行った。骨分化の指標としては ECM シャーレの時と同様に ALP 活性と RANKL の発現を観察した。

まずは①加圧前の静置培養期間を変化させた実験について考察する。エラスチンペレットにおいて静置培養期間を 3, 7, 10, 14, 21 日間と変化させた。ALP 活性の結果は図 3-17 に示した通りである。3, 7 日間の静置培養では、加圧を行っても行わなくても ALP 活性に差はほとんど出なかった。その後時間が経過するにつれて加圧培養と静置培養の差が開き、また、加圧を行わなくても ALP 活性が上昇した。この現象の理由の一つとして、ElastinA は細胞の接着率が悪い事が考えられる。以前の研究で、ElastinA は細胞の接着率が悪く、増殖しにくいという報告がある¹⁷⁾。ペレットはすべて ElastinA で作製しているため、3, 7 日間では細胞が十分に接着・増殖できていなく、エラスチン・加圧の影響を受けにくかったと考えられる。その後は、ペレット内で細胞が十分に接着・増殖して、エラスチンと加圧の効果が十分に出る結果となった。

②加圧時間を変化させた実験について考察する。エラスチンペレットにおいて静置期間 14 日間で加圧時間を 3, 6, 12, 24 時間と変化させた。ALP 活性の結果は図 3-18 に示した通りである。時間に依存して ALP 活性が高くなった、これは、エラスチンの効果よりも、加圧の効果が強いと考えられる。

加圧時間については色々な報告がある。靭帯細胞を最大 12 時間で様々な時間遠心培養すると ALP や I 型コラーゲンなどの骨形成マーカーの mRNA が遠心 12 時間で最大になるという報告³²⁾、30 分間遠心して 24 時間インキュベートすると ALP 活性が上昇するという報告³³⁾、そして 60 分間遠心した後、インキュベートして 4 時間後に I 型コラーゲンの mRNA が最大になり、その後は減少していくという報告³⁹⁾

などである。これらの実験で用いられた力の大きさはそれぞれ異なる。骨形成マーカーの発現には、加圧時間と大きさの関係が大切であり、力の大きさを変えて実験していく必要がある。本実験では、24 時間 0.8MPa の大きさで加圧することが一番良い条件となった。

ここで、エラスチンと加圧の関係性について考察する。エラスチンは靭帯細胞の骨分化に関与するという報告¹¹⁾があるが、その詳細は不明のままである。機械的な刺激を細胞内に伝える機械受容体には、インテグリン^{40,41)}、stretch activated channel(SA チャンネル)²⁷⁾、などが代表的である。インテグリンについては、歯周靭帯細胞に圧縮力を加えるとインテグリンを介してオステオポンチン⁴²⁾の発現が上昇したり、遠心力を加えると I 型コラーゲン³⁹⁾の発現が上昇するのではないかという報告がある。また、骨芽細胞では遠心力を加えるとインテグリンが機械受容体として働き、フィブロネクチンやオステオポンチン、I 型コラーゲンの mRNA 発現を増加させるという報告もある⁴⁰⁾。これらの報告から、エラスチンと加圧にはインテグリンが関与しているのではないかと考えられる。

エラスチンレセプターについては未知な事が多い。しかし、エラスチンレセプターを通して、動脈の平滑筋細胞の増殖を促進するという報告⁴³⁾もあり、靭帯細胞にも何らかの影響を与えているのではないかと考えられる(図 4-3)。

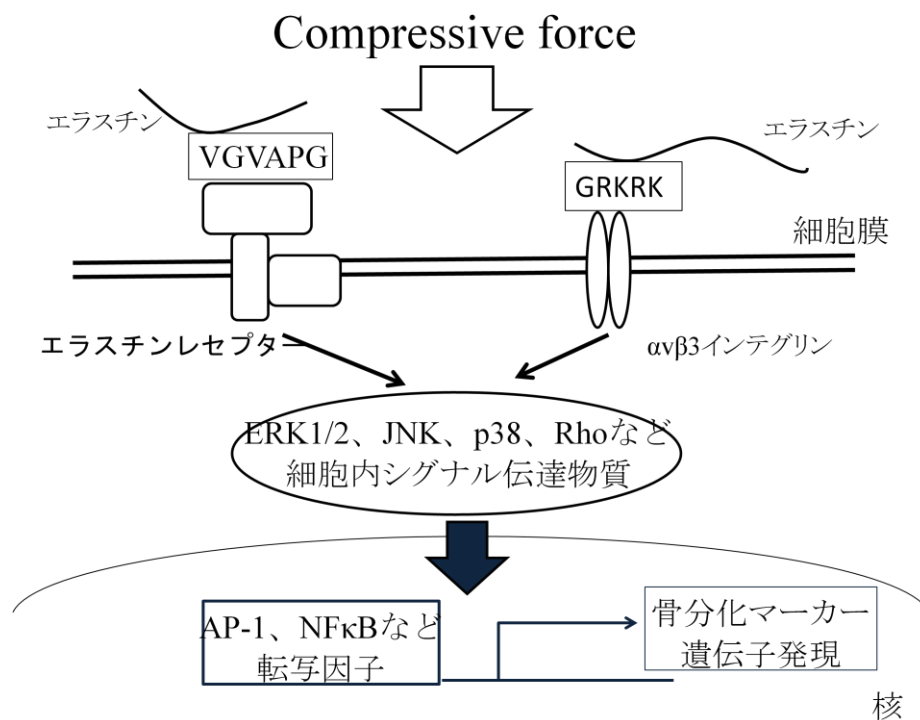


図 4-3 エラスチンと加圧刺激⁴¹⁾

③エラスチンペレットとコラーゲンペレットの比較について考察する。静置培養期間は14日間で加圧時間は12時間で行った。ALP活性の結果は図3-19に示した通りである。エラスチンペレット内で培養した時と比較して、コラーゲンペレット内で培養した時は明らかにALP活性が静置・加圧ともに減少した。コラーゲンペレット内で培養したものは、静置培養と加圧培養の間にも変化はなかった。コラーゲンペレットは加圧の影響を受けにくいと考えられる。コラーゲンには「RGD」というアミノ酸配列が存在し、その部位に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが接着し、細胞内に情報を伝達する¹³⁾。また、インテグリンには「RGD」配列に結合する他に、コラーゲン結合型インテグリンが存在する¹³⁾。この種類のインテグリンのうち、本実験で用いたヒト歯周靭帯細胞は $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_{11}\beta_1$ を発現する⁴³⁾。一方エラスチンは「VGVAPG」配列にEBPが結合、または「GRKRK」に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが結合して細胞内に情報が伝達される^{11,16,24)}。そのため、加圧を感じ取ったインテグリンの種類の違いか、あるいは、結合するアミノ酸配列の違いによって伝わる情報が違ったため、エラスチンでは骨分化が促進されて、コラーゲンではされなかったと考えられる(図4-4)。

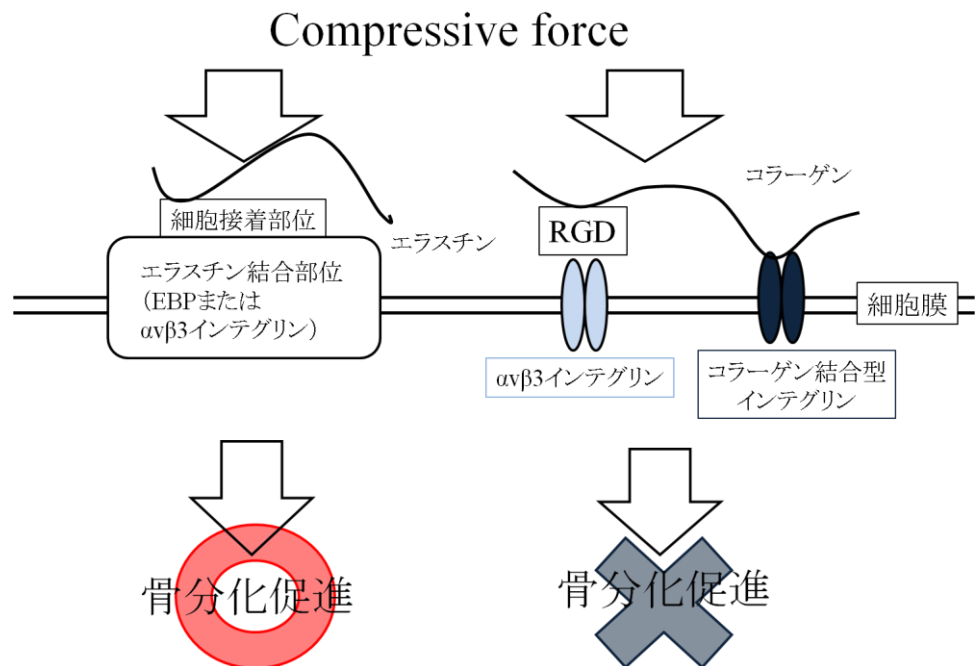


図 4-4 エラスチンとコラーゲンの違い

次に、靭帯細胞とエラスチンの結合について考察する。靭帯細胞にはエラスチンと結合するためのエラスチンレセプターという複合体を持つことが知られている。このエラスチンレセプターのうちのエラスチン結合タンパク質 (EBP: elastin-binding protein) が実際にエラスチンと結合すると考えられている^{22,23)}。しかし、この EBP はラクトースやガラクトースなどと結合し、エラスチンとの親和性を失ってしまう。

そこで、靭帯細胞を培養する際の培地にラクトースを添加し、EBP を阻害することによって、靭帯細胞のエラスチンとの関係にどのような影響があるかということ調べた。

図 3-22 の ECM シャーレ上でラクトース入りの培地で靭帯細胞を静置培養・遠心培養後の ALP 活性に変化は見られなかった。これは、考察 4-1 で示したように、エラスチンの濃度が薄いため、もともとエラスチンの影響が無かったため EBP を阻害してもほとんど影響が無かったものだと考えられる。

図 3-23 の ECM ペレット内でラクトース入りの培地で靭帯細胞を静置培養・加圧培養後の ALP 活性は、ラクトースを添加して培養したものを加圧すると、活性が少し下がるという結果になった。しかし、誤差を考慮すると、ほとんど減少していないと考えられる。

これらの結果から、エラスチンと靭帯細胞の結合部位が EBP だけでは無い事が考えられる(図 4-5)。別の候補としてはトロポエラスチンの末端部にある「GRKRK」配列であり、ビトロネクチン受容体である $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを介して認識し、細胞接着する。今後、「GRKRK」配列と $\alpha_v\beta_3$ インテグリンにも注目していく必要がある。

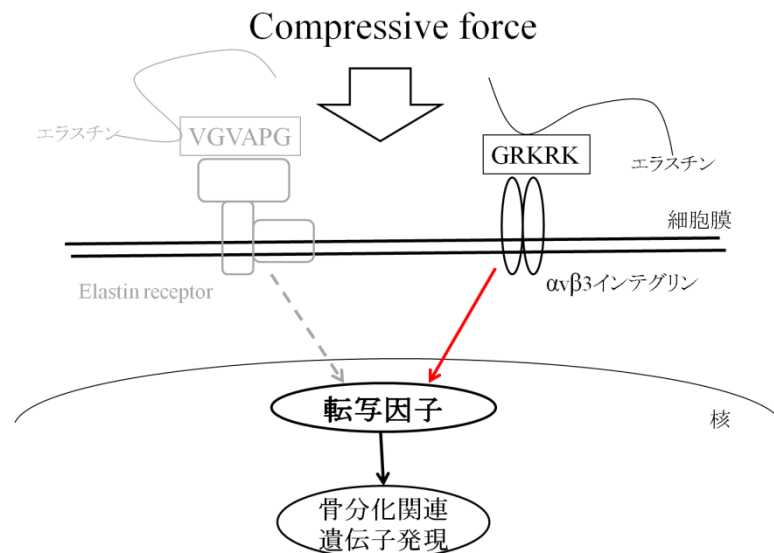


図 4-5 EBP とインテグリンの違い

フローサイトメトリー解析を用いた靱帯細胞の分化割合測定の考察を行う。

本実験は、加圧刺激とエラスチンによってどのくらいの細胞が骨芽様の細胞になっているかを算出するために行った。図 3-17～図 3-19 で示した細胞の分布図では静置培養に比べて加圧培養の方が各マーカーの発現分布が広がっていたが、図 3-19～図 3-21 では、加圧したものよりも、静置培養したものの方が ALP、RANKL の発現が高くなってしまった。しかし、ALP 活性の結果と図 3-17～図 3-19 の細胞分布の結果を合わせて考えると、ペレット内での静置培養では ALP の発現細胞を発現する細胞を増やすが、加圧培養は ALP 発現細胞を活性化させる役割があると考えられる。ALP は細胞の細胞膜に存在している。その ALP 分子は細胞膜への結合様式が特徴的で、GPI アンカーを持ち、脂質二重層の外側のホスファチジルイノシトール(PI)に共有結合している(図 4-6)^{28,45)}。骨形成が進むと、骨芽細胞は細胞外に ALP 活性を示す基質小胞を放出する⁴⁵⁾(図 4-7)。培養系の骨芽細胞の石灰化においてもこの小胞が出現する⁴⁵⁾。この基質小胞内で石灰化が進行すると考えられている。ALP の石灰化への関与については不明な点が多い。可能性としては、ALP はカルシウムとリン酸塩の沈着を強く阻害するピロリン酸を分解する役割があるため、石灰化にとって重要であるという考えである⁴⁷⁾。また、ALP は PI 特異的ホスホリパーゼ C の活性によって膜結合部が切断されて可溶化し、血中に流れていき^{28,30)}、骨形成期には血中の ALP 濃度は高くなる。マウス由来の骨芽細胞を培養すると、培地中に ALP が放出され、その放出量の増加は石灰化過程と一致していたという報告もある^{46,47)}。このことから、エラスチンは ALP 活性を上昇させ、さらに加圧を行うと ALP は細胞膜から離れてしまい、その結果静置培養よりも発現細胞が少なくなってしまうのかもしれない。

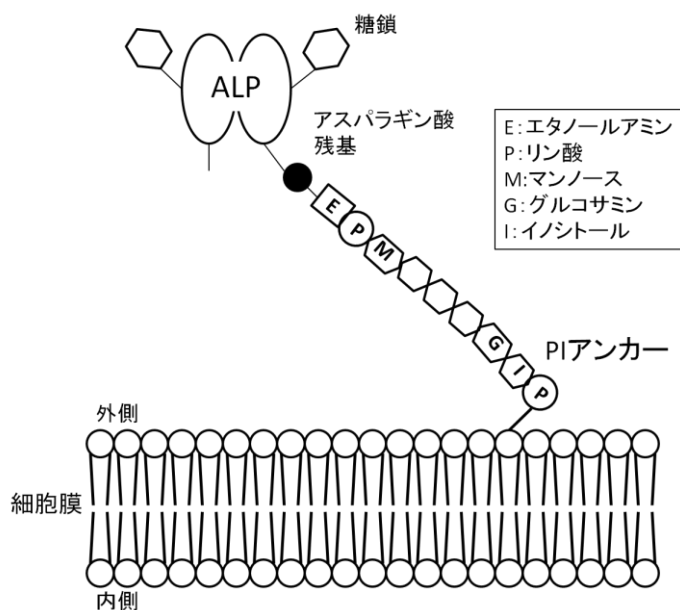


図 4-6 ALP の細胞膜への結合様式⁴⁵⁾

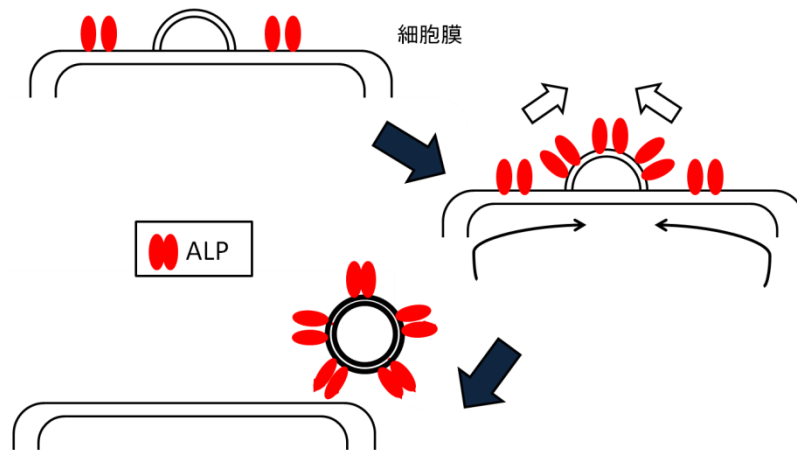


図 4-7 ALP の基質小胞への集積仮説²⁸⁾

RANKL についても、図 3-6 に示した ECM シャーレ上と比較すると、図 3-20 で示したペレット内培養の方が約 3 倍に発現量が増えた。エラスチンに RANKL 発現を促進させる何らかの効果があることは示唆されたが、加圧の影響が見られなかった。考察 4-1 でも述べたが、靭帯細胞に圧縮力などの機械的な刺激を加えると、RANKL の発現が増加する。これは、機械的な刺激によって炎症時に炎症組織から誘導される酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2 (cyclooxygenase-2: COX2) の発現を経てプロスタグランジン E₂ (prostaglandin E₂: PGE₂) を発現する³⁵⁾。PGE₂ は生理活性物質であるプロスタグランジンの一種であり、PGE 受容体を介して発熱や破骨細胞による骨吸収に関与している物質である。この PGE₂ は RANKL の発現を誘導することによって骨吸収を促進している³⁵⁾。また、PGE₂ 産生には機械的刺激によって産生した IL-1 β が関係しているという報告もある³⁶⁾。これらをまとめると以下の様な図になる(図 4-8)。

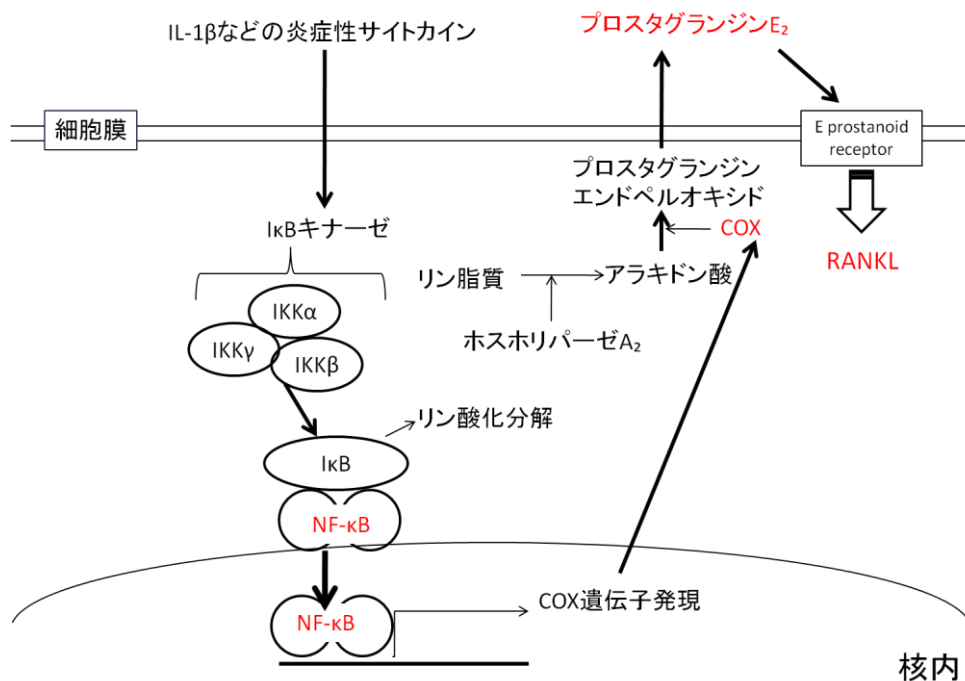


図 4-8 RANKL 発現の流れ^{35,36,48)}

上記の報告で使われた圧縮力や時間に共通することは『弱い力を長期的』にかけることである。適用されている力は 1.5g/cm^2 から 2.0g/cm^2 で、RANKL の発現が促進された時間は 24 時間であった^{34,35)}。また、 2.0g/cm^2 の力を 1 日 8 時間かけそれを 4 日間続けると RANKL の発現を促進したという報告もある³⁵⁾。これより、本実験で RANKL の発現が静置とペレット内培養で有意な差が見られなかったのは、力の大きさが強すぎたことと、加圧の時間が 12 時間と短かったことが考えられる。加圧の時間が大きすぎたことについては、靭帯細胞の骨芽細胞様細胞への分化促進には比較的大きな力が必要となり、破骨細胞形成の促進には弱い力が必要であること関係があるかもしれない。今回、ペレット内培養においては骨芽細胞様細胞への分化が優先され、ECM シャーレ上では破骨細胞の形成促進の効果があるような実験結果であった。力の大きさ、時間、適用の仕方を変えていくことによって、骨形成と骨吸収のバランスの再現が可能であることが示唆された。

5 結論

本研究において、

- ①ECM ペレット内における三次元培養システムの確立ができた。
- ②ECM ペレット内で培養した靭帯細胞に対する加圧培養法により、水圧を用いた加圧刺激による靭帯細胞の骨芽細胞分化促進が示唆された。
- ③骨のリモデリングを考慮にいれ、骨形成と骨吸収の両面から、靭帯細胞の可能性を検討できた。

以上のことから、生体内で起こっている骨のリモデリングを三次元的に ECM ペレットで再現することが可能となった。これにより、より生体に近い状態の組織工学的な人工靭帯材料の開発が可能になることが示唆された。

6 参考文献

- 1) 阿形 清和、ほか:再生医療生物学／岩波書店(2009)
- 2) 赤池 敏宏:生体機能材料学／コロナ社(2005)
- 3) 古山 義紘:エラスチン基質と伸展刺激による血管平滑筋細胞の分化誘導 . 平成 19 年度 修士論文 , 2008
- 4) 日本エム・イー学会編:生体細胞・組織のリモデリングのバイオメカニクス／コロナ社(2003)
- 5) 富士川恭輔編:図解 膝の臨床／メジカルビュー社(2002)
- 6) Duthon V.B.,*et al* :Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006;14:204-13
- 7) Rainer S,*et al*:Tibial Insertions of the Anteromedial and Posterolateral Bundles of the Anterior Cruciate Ligament.: Morphometry, Arthroscopic Landmarks, and Orientation Model for Bone Tunnel Placement. *Arthroscopy* 2008;24:154-61
- 8) 日野原 重信、ほか:看護のための最新医学講座Ⅱ 運動器疾患／中山書店(2005)
- 9) 堀内 孝、ほか:医用材料工学／コロナ社(2006)
- 10) Ning E.W, *et al*:Age-Dependent Changes in Matrix Composition and Organization at the Ligament to Bone Insertion. *J Orthop Res* 2006;24:1745-1755
- 11) 水谷 直紀:細胞外基質と動的培養による人工靭帯再生技術の開発 , 平成 21 年度修士論文 , 2010
- 12) 林 典夫:シンプル生化学／南江堂(2007)
- 13) 関口 清俊編:再生医療のための細胞生物学／コロナ社(2005)
- 14) 尾張部 克志編:細胞生物学／オーム社(2008)
- 15) 新 真樹:血管系細胞の細胞外基質認識性に関する研究 . 平成 17 年度 修士論文 , 2006
- 16) Daamen W. F.,*et al*: Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* 2007;28:4378-98
- 17) 河戸 仁志:エラスチンを用いた靭帯組織再生誘導に関する基礎的研究. 平成 19 年度 修士論文 , 2008
- 18) Nagatomo K , *et al*:Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*:2006;303-310
- 19) 林 正男:細胞接着分子の世界／羊土社(1995)
- 20) 多賀谷 光男:分子細胞生物学／朝倉書店(2002)
- 21) 中村 桂子、ほか:THE CELL 細胞の分子生物学／Newton Press(1995)
- 22) Salvatore P , *et al*:The 67-kDa Enzymatically Inactive Alternatively Spliced

- Variant of β -Galactosidase Is Identical to the Elastin/Laminin-binding Protein.
The Journal of Biological Chemistry:1998;6319-6326
- 23) Duca L., *et al*: The elastin receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its Neu-1 subunit. *J Biol Chem* 2007;17:12484-91
- 24) Daniel V.B., *et al*: Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRK motif and integrin $\alpha_v\beta_3$. *J Biol Chem* 2009;284:28616-28623
- 25) 宮坂 昌之監修：接着分子ハンドブック／秀潤社（1994）
- 26) 赤池 敏宏編：再生医療のためのバイオエンジニアリング／コロナ社（2007）
- 27) 三品昌美、ほか：実験医学増刊 イオンチャネルレセプターと細胞情報
 1994;12 No.11:151-158
- 28) 野田 政樹：骨のバイオロジー／羊土社（1998）
- 29) 坂井 建雄、ほか：人体の正常構造と機能／日本医事新報社（2008）
- 30) L.P Gartner, *et al*: 組織学／西村書店（2003）
- 31) G.J.Totora：トートラ 人体の構造と機能 第2版／丸善株式会社（2007）
- 32) Zhao Y.H, *et al*: Expression of Osterix in mechanical stress-induced osteogenic differentiation of periodontal ligament cells in vitro. *European Journal of Oral Sciences*.2008; 116: 199-206
- 33) Wei F, *et al*: The effect of centrifugal force on the mRNA and protein levels of ATF4 in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Oral Biology* 2008: 53; 35-43
- 34) S.Wongkhantee, *et al*: Mechanical Stress Induces Osteopontin via ATP/P2Y1 in Periodontal Cells. *J Dent Res* 2008: 87; 564-568
- 35) H. Kanzaki, *et al*: Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Stress Induce Osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand Up-Regulation via Prostaglandin E₂ Synthesis. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002: 17; 210-220
- 36) K. Nakano, *et al*: Intermittent Force Induces High RANKL Expression in Human Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res* 2007: 86; 623-628
- 37) T. Yamamoto *et al*: Mechanical stress induces expression of cytokines in human periodontal ligament cells. *Oral Diseases* 2006: 12; 171-175
- 38) 岡元 孝二：エラスチンの新たな展開を求めて：構造、機能、素材としての特性
 ／和光純薬時報 Vol.74（2006）
- 39) Kook, S.H. *et al* : Mechanical Force Induces Type 1 Collagen Expression in Human Periodontal Ligament Fibroblasts Through Activation of ERK/JNK and AP-1. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009: 106; 1060-1067
- 40) Li,J.*et al* : The role of extracellular matrix, integrins, and cytoskeleton in

- mechanotransduction of centrifugal loading. *Mol Cell Biochem* 2008; 309; 41-48
- 41) Wang, J. H. *et al* : An introductory review of cell mechanobiology. *Biomech Model Mechanobiol* 2006; 5; 1-16
- 42) Hong, S. Y. *et al* : Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2010; 335; 263-272
- 43) Mochizuki, S. *et al* : Signaling Pathways Transduced through the Elastin Receptor Facilitate Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 44854-63
- 44) M.M.Barczyk. *et al* : A Role for $\alpha 11\beta 1$ Integrin in the Human Periodontal Ligament. *J Dent Res* 2009; 89; 621-626
- 45) 須田 立雄 : 骨形成と骨吸収及びそれらの調節因子 1 / 廣川書店 (1995)
- 46) Yoshikawa M. *et al* : Quantitative analysis of alkaline phosphatase activity and Mineralization of a clonal osteoblast-like cell MC3T3. *J Hard Tissue Biol* 1999 : 8; 37-42
- 47) Sugawara Y *et al* : Necessity of Enzymatic Activity of Alkaline Phosphatase for Mineralization of Osteoblastic Cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 2002; 88; 262-269
- 48) Luckprom P *et al* : Adenosine triphosphate stimulates RANKL expression through P2Y₁ receptor-cyclo-oxygenase-dependent pathway in human periodontal ligament cell. *Journal of periodontal research* 2010; 45; 404-411

7 謝辞

本研究及び修士論文作製にあたり、ご指導、ご鞭撻のほどいただきました 三重大学工学部 堀内 孝 教授、宮本 啓一 准教授に対し深く御礼申し上げます。特に宮本先生には実験に関して多くの助言を頂くなど、様々な面で助けて頂きました。本当にありがとうございました。

また、修士論文を発表するにあたり、副査を担当して頂いた分子生物研究室的富田 昌弘先生には深く感謝しております。

本研究を進めるにあたり、「エラスチン」をテーマとする水谷 直紀さん、石田 尚志君、石原 千明さん、羽多野 由季子さん、熊澤 雄基君、佐々木 剛君、神谷歩君、境 淳志君、中村 雅広君、本当にありがとうございました。特に、同じ「靱帯再生」に関するテーマを持つ水谷 直紀さんには実験で悩んでいる時などに的確なアドバイスを頂きました。本当に感謝しております。

毎日ともに過ごした、M2 の伊藤 寛之君、篠原 紀子さん、永田 裕子さん、山崎 慎也君、M1、四年生のみなさん、研究室生活において様々な形でサポートして頂いた村上節子さん、遺伝子実験施設でお世話になった近田 登美子さん、登川 美奈さん、高速遠心分離機を貸して下さった分子生物研究室的の皆様方に深く御礼申し上げます。

平成 23 年 3 月
前田 裕子

8 付録

8-1 培地、試薬の調整

[試薬・器具・機器]

- Stromal Cell Basal Medium (SCBMTM) (Lonza/CC-3205)
- ストローマ細胞添加因子セット (Lonza/CC-3205)
(hFGF-B、インシュリン、GA-1000)
- Fetal bovine serum (FBS) (EQUITCH-BIO)
- Trypsin-EDTA solution (10x) (T-4174/SIGMA)
- 各種アシストチューブ (アシスト)
- 各種シリンジ (テルモ)
- 孔径 0.22 μm フィルター (Millex-GV) (SLGV025LS/MILLIPORE)
- Stericup フィルターユニット (SCGVU05RE/MILLIPORE)
- 恒温槽 (BT-15/Yamato)

[培地の調整]

- ①凍結保存してある hFGF-B、インシュリン、GA-1000 の各バイアルを恒温槽で解凍した。
- ②バイアルの周囲をアルコールで拭いた。
- ③ピペットを用いて、各バイアル中の全量を培地に入れ、培地で共洗いした。
- ④培地を 4°C (冷蔵庫) で保存した。

[各溶液の調製]

FBS (牛胎児血清) の不活性化、分注、保存

[操作]

- ①37°C の温水で解凍した後、数回振り、55~56°C の温水で、時折振り混ぜながら 30 分間加温した (不活性化)。
- ②Stericup フィルターユニットでフィルター滅菌を行い、30 ml アシストチューブに 25 ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌状態で行った。
- ③分注後の溶液は冷凍庫 (-20°C) で保存した。

Trypsin-EDTA solution (10x)

[操作]

- 37°Cの温水で解凍した後、5 ml アシストチューブに4 ml ずつ分注し、冷凍庫(−20°C)で保存した。

滅菌水の作成

[操作]

- ① 脱イオン水を密閉できるガラスビン(赤蓋の1L メディウムビン)に入れる。
- ② 蓋をきっちり締めた後、滅菌テープで封印し 121°C/40 分にて高圧蒸気滅菌を行う。

8-2 細胞培養

[試薬・器具・機器]

- Stromal Cell Basal Medium (SCBM™) (Lonza/CC-3205)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (D-8537/SIGMA)
- Fetal bovine serum (FBS) (EQUITCH-BIO)
- トリプシン (T-4174/SIGMA)
- セルバンカー (日本全薬工業)
- バンバンカー (日本ジェネティクス)
- 75 cm² 培養フラスコ (MS-21250/住友ベークライト)
- φ35 シャーレ (住友ベークライト)
- 各種遠沈管 (住友ベークライト, Nunc)
- エルマ血球計算盤 (Erma)
- CO₂ インキュベータ (池本理化工業)
- 遠心機 (2010/KUBOTA)
- ボルテックス (S-100/TAITEC)
- 恒温槽 (BT-15/Yamato)

[継代培養 —正常ヒト歯周靭帯線維芽細胞(HPdLF)—]

I 細胞の洗浄

- ① 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌する。
- ② 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引する。

- ③ PBS 溶液 5 ml/25 cm² フラスコ又は 10 ml/75 cm² フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄する。
- ④ 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、洗浄液を吸引する。

II 培養細胞の剥離方法

- ① 冷凍保存してあるトリプシン 1.0 ml に PBS 溶液 9.0 ml を加え、10 倍希釈する。(以下トリプシン溶液)
- ② トリプシン溶液 5 ml/25 cm² フラスコ又は 6 ml/75 cm² フラスコを加え、1 分間放置する。
- ③ 顕微鏡で細胞がはがれたことを確認後、FBS を 1 ml/25 cm² フラスコ又は 2 ml/75 cm² フラスコを加える。
- ④ 細胞をピペッティング又はフラスコをたたくことで培養フラスコから剥離させる。
- ⑤ 滅菌済み 10 ml のピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15 ml 遠沈管に入れる。
- ⑥ 100 G (800 rpm) 5 分間遠心分離する。
- ⑦ 培養フラスコに 10% FBS/SCBM 培地を入れ、37°C の 5% CO₂ インキュベーター内にてプレインキュベートしておく。
- ⑧ ⑥ で遠心分離した上澄みをピペットで吸引する。
- ⑨ SCBM 培地を 1 ml 又は 3 ml を遠沈管に沈殿している細胞に加え、細胞懸濁液を作成し、10 回程度ピペッティングを行う。
- ⑩ 細胞懸濁液を取り、⑦ で用意しておいた培養フラスコに播種し、37°C の 5% CO₂ インキュベーター内にて培養する。

※ 細胞懸濁液濃度は血球計算版にカバーガラスをのせ、その隙間に培養フラスコに播種する直前の細胞懸濁液を約 7 μ l 注入して、顕微鏡で細胞数を測定し算出した。1 mm² の面積の細胞を数えて、液の厚みを 0.1 mm としたときの細胞懸濁液濃度は細胞測定数 $\times 10^4$ cells/ml とした。HPdLF の推奨播種密度は 3500 cells/cm² である。

[培地交換]

[操作]

- ① あらかじめ交換する培養培地を 37°C の温水で温めたものを使用した。
- ② 滅菌済みパスツールで細胞培養培地を吸引した。

- ③ 細胞培養に使用する各容器に対してそれぞれ適量の培養培地を加えた。

[細胞の凍結]

正常ヒト歯周靭帯細胞 (HPdLF) の凍結はセルバンカーの凍結液を用いた。

(参考: 内皮細胞-セルバンカー、マンバンカー 線維芽細胞-セルバンカー)

[操作]

- ① 継代培養の手順に従い、II 培養細胞の剥離方法の⑥まで行った。
- ② 上澄み液を除去し、凍結液 1 ml を加えてピペッティングすることで凍結用細胞懸濁液を作成した。
- ③ 2 ml アシストチューブに細胞懸濁液を加え、 -80°C の冷凍庫内で凍結した。

※冷凍庫の温度変化は細胞へ大きく影響を与えるため、発泡スチロールの入れ物などに入れ、凍結後の温度変化を防いだ。

[細胞の解凍]

[操作]

- ① 75 cm^2 フラスコに SCBM を 15 ml 入れ、 37°C 、5% CO_2 インキュベート内でプレインキュベートした。
- ② -80°C で凍結してあった歯周靭帯線維芽細胞の 2ml アシストチューブを、 37°C の温水で解凍した。僅かに氷が残る程度に加温を抑えた。
- ③ 解凍した細胞懸濁液を、あらかじめ用意しておいた 15 ml 遠沈管中の 6 ml の SCBM に加えた。
- ④ ボルテックス後、800 rpm で 5 分間遠心分離を行った。
- ⑤ 上澄み液をとり、1 ml の SCBM を加えてピペッティング後、 75 cm^2 フラスコに播種した。

8-3 エラスチンの調整

8-3-1 不溶性エラスチンの抽出

[使用装置・器具・試薬]

- ・ 豚大動脈 (三重県松坂食肉流通センター)
- ・ 塩化ナトリウム (WAKO)
- ・ 99.5%エタノール (WAKO)
- ・ アルミ圧力鍋
- ・ ミキサー
- ・ メッシュ
- ・ 500 mlビーカー

[操作]

- ① 血管を水道水で洗浄した。
- ② 血管表面に付着している組織や血塊をはさみで切り取り、水道水で洗浄した。
- ③ 塩水(10%)に漬けて、冷蔵庫の中で一日保存した。
- ④ 透明になったコラーゲンをはさみで切り取った。
- ⑤ 塩水(10%)に漬けて、冷蔵庫の中で一日保存した。
- ⑥ 新しい塩水(10%)と交換し、さらに冷蔵庫の中で一日保存した。
- ⑦ 水道水で洗浄後、圧力鍋に入れ一時間煮た。
- ⑧ 圧力鍋から取り出して水道水でよく洗浄した後、ミキサーにかけた。
- ⑨ 圧力鍋に移して、灰汁を取り除いた後、さらに一時間煮た。
- ⑩ メッシュに移して、水道水でよく洗浄した後、一日流し洗いをを行った。
- ⑪ よく水をきってから洗濯機に移し入れ、蒸留水で10分間洗浄した。(×4回)
- ⑫ 洗浄後、よく水をきってからビーカーに移し、50%エタノールを加え30分間放置した。
- ⑬ 50%エタノールを取り除いて、70%エタノールを加え90分間放置した。
- ⑭ 70%エタノールを取り除いて、90%エタノールを加え一日放置した。
- ⑮ 乾燥機に入れ乾燥させた(2時間)。

8-3-2 水溶性エラスチンの調整

[使用装置・器具・試薬]

- ・ 不溶性エラスチン (ECM Lab)
- ・ シュウ酸 (wako)
- ・ 50ml 遠沈管 (IWAKI)
- ・ 50ml 遠沈管 (nunc)
- ・ 吸引瓶 (VIDREX)
- ・ ガラスフィルター (ADVANTEC)
- ・ 凍結乾燥瓶 (APPROX)
- ・ 透析用セルロースチューブ (三光純薬株式会社)
- ・ オイルバス OSB-200 (EYELA)
- ・ 遠心分離機 CT-6D (HITACHI)
- ・ 凍結乾燥機 FZ-4.5 (LABCONCO)
- ・ pH メーター D-50 (HORIBA)

[操作]

I. 前処理

- ① 不溶性エラスチンを 10 g ずつ取ってガラス製遠沈管に入れた。
- ② 0.25 M のシュウ酸を 45 ml ずつ加え、冷蔵庫に一晩保存した。

II. シュウ酸処理

- ① 前処理したものを 100 °C の油槽で、一時間加熱した。
- ② 氷水で十分に冷やしてから、遠心分離 (3000 rpm、6 min) した。
- ③ 上澄み液を除去分子量 10000~14000 のセロハン透析チューブに入れた。
- ④ 上澄み液回収後、新たに同濃度のシュウ酸 20 ml を加え再度 100 °C で一時間加熱した。
- ⑤ エラスチンが全て溶けるまで①~④の操作を繰り返した。上澄み液を入れた透析チューブを、水道水で 2~3 日流し洗いしてから、脱イオン水で透析し、外液の pH が 5~6 程度になるまで透析を行った。

III. 水溶性エラスチンの取り出し

- ① チューブから上澄み液を取り出して、遠心分離 (3000 rpm、6 min) した。
- ② 上澄み液をガラスフィルターで吸引ろ過し、ろ液を 2~3 日凍結乾燥することで水溶性エラスチンを得た。

8-3-3 エラスチンの分画

上述で得られた水溶性エラスチンを凝集温度、ゲル弾性率によって各分画に分類した。また、分画したエラスチンの数平均分子量を求めた。本実験では Elastin A-E までの各分画の名称を使用した。

表 8-1 エラスチンの各分画における性質

	数平均分子量(kDa)	凝集温度(°C)	ゲル弾性率(Pa)
Elastin A	25.2	20 - 22.5	- 50000
Elastin B	21.4	22.5 - 25	25000 - 50000
Elastin C	18.7	25 - 30	5000 - 25000
Elastin D	10.3	30 - 35	5000 - 測定不能
Elastin E	10.1	35 -	ゲル化不可

8-3-4 エラスチン水溶液の調整

[試薬・器具・機器]

- ・ Elastin PES-(A) (Lot.011-FEI20-A/ECM Lab)
- ・ 滅菌水
- ・ 各種シリンジ (テルモ)
- ・ 孔径 0.22 μm フィルター (Millex-GV) (SLGV025LS/MILLIPORE)

[方法]

- ① 分画水溶性エラスチンを 50 mg 秤量し、50 ml の滅菌水に溶解させた。
- ② エラスチン水溶液をシリンジで吸引し、0.22 μm フィルター滅菌を行い、1.0mg/ml のエラスチン溶液とした。
- ③ ②で作成した 1mg/ml の各エラスチン水溶液を 5ml 取り、10 倍希釈をして、0.1mg/ml のエラスチン水溶液とした。
- ④ これらのエラスチン溶液は冷蔵庫に保存し、コーティング溶液として用いた。

8-4 ECM コーティングシャーレの作成と評価

8-4-1 ECM コーティングシャーレの作製

生体細胞は、接着するための足場を必要とする接着細胞と、接着なしに浮遊したまま培養可能な浮遊細胞に分類される。接着細胞は細胞外マトリックス(ECM)に接着することではじめて接着・分化・増殖といった機能を果たすため、接着細胞のECM 上での詳しい解析を行う必要がある。そこで、細胞接着もタンパクの吸着もできない浮遊細胞培養用のシャーレ表面をコロナ放電処理した後に、ECM をコーティングすることでECM のみの表面を持つシャーレを作製した。

【コロナ放電処理の原理】

シリコン、ポリプロピレン、ポリエチレン等は、その表面層に極性基を持たない為に、接着性、コーティング性、親水性が悪い等の問題があり、その表面を改質する必要がある。コロナ放電表面処理装置は、高周波高電圧を利用し、大気中にコロナ放電を発生させ、それによって生成される官能基と共に、その電子を物質表面に照射することにより物質の表面改質を行うもので、高周波高電圧の気中で、電解内にて起きる、原子、分子、電子、イオン間での衝突により、電子エネルギーの励起、光子の放出が起こる。このコロナ放電のエネルギーを物質の表面で作用させたとき、その表面がエネルギーを受け、表面エネルギーが高くなり活性化された状態(ラジカル生成)になる。そこに空気中の酸素や水分などが反応し、極性をもったさまざまな官能基が表面の濡れ性が向上する。

<浮遊培養用シャーレ>



図 8-1 コロナ放電処理前後のシャーレ表面の様子

[使用機器・器具]

- ・浮遊培養用 φ35 シャーレ (MS-80240/住友ベークライト)
- ・各種シリンジ (テルモ)
- ・Corona Fit (CFG-500/信光電気計装株式会社)
- ・0.22 μm フィルター (SVGSB1010/ステリベックス)
- ・50 ml 遠沈管 (MS-56500/SUMILON)

[使用試薬]

- ・Elastin PES-(A) (ECM Lab)
- ・滅菌水

[準備]

エラスチン溶液の調整

- ① 分画水溶性エラスチンを 50 mg 秤量し、50 ml の滅菌水に溶解させた。
- ② エラスチン水溶液をシリンジで吸引し、0.22 μm フィルター滅菌を行い、1.0mg/ml のエラスチン溶液とした。
- ③ ②で作成した 1mg/ml の各エラスチン水溶液を 5ml 取り、10 倍希釈をして、0.1mg/ml のエラスチン水溶液とした。
- ④ これらのエラスチン溶液は冷蔵庫に保存し、コーティング溶液として用いた。

[操作]

- ① 浮遊培養用 φ35 シャーレの表面を 1 分間コロナ放電した。
- ② 作成しておいたエラスチン水溶液、コラーゲン水溶液をそれぞれ 1.5 ml/φ35 シャーレに添加し、4°C で 5 時間静置した。
- ③ コーティング溶液を吸引後、細胞培養液を 2 ml 添加し、37 °C/5%CO₂ 条件で 15 分間以上プレインキュベートした。
- ④ 細胞懸濁液を播種し、37 °C/5%CO₂ 条件で培養した。

8-4-2 ECM コーティングシャーレ表面の接触角測定

【接触角の原理】

接触角とは、固相表面に液滴をたらしたときの接触部分がつくる角度(□)と定義でき、「固相表面のぬれ」を表す指標としてはとても直感的でわかりやすく、あらゆる産業分野において、表面評価手法として採用されている。接触角が大きい場合は濡れ性が悪く疎水性表面になり、逆に接触角が小さければ濡れ性が良く親水性表面といえる。

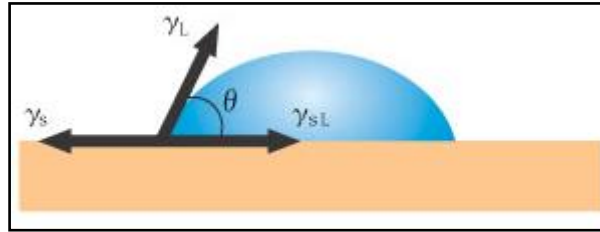


図 8-2 固体表面の接触角

濡れ性は図で示されるように、固体と気体の表面張力 (γ_s)、気体と液体の表面張力 (γ_L)、固体と液体の界面張力 (γ_{sL}) の 3 つの張力がつり合ったときの接触角 (θ) で表すことができる。3 つの力を水平方向のベクトルのバランスとして考えると、以下の Young の式が成り立つ。

$$\gamma_s = \gamma_L \cdot \cos\theta + \gamma_{sL} \dots \text{Young の式}$$

また、もともとこの系が持っている界面自由エネルギーを γ_{sL} とし、引き離してできる各々の新しい表面の自由エネルギーをそれぞれ、 γ_L 、 γ_s とすると、このエネルギー収支から固体と液体を引き離すのに必要なエネルギー W_a (接着の仕事) は次の Dupre の式で表すことができる。

$$W_a = \gamma_s + \gamma_L - \gamma_{sL} \dots \text{Dupre の式}$$

つまり、この W_a の値が大きいものほど、強く接着していることになる。ここで、Young の式と Dupre の式を組み合わせると Dupre-Young の式となる。

$$W_a = \gamma_L (1 + \cos\theta) \dots \text{Dupre-Young の式}$$

固体の表面あるいは界面自由エネルギーは、直接測定する手段がないが、液体の表面自由エネルギーと接触角が分かれば、Dupre-Young の式を用いて界面における相互作用エネルギーを決定できる。

[使用機器・器具・試薬]

- ・接触角測定器
- ・φ35 シャーレ (ECM コーティングシャーレ等)
- ・20 μl ピペット
- ・脱イオン水

[操作]

- ① ECMコーティングシャーレのコーティング溶液を捨て、脱イオン水で3回すすぎ、20時間乾燥させた。
- ② シャーレを接触角測定器に載せ、20 μ l ピペットを用いて5 μ l の脱イオン水をシャーレ表面に静かに載せるように置いた。
- ③ 液滴の接触角を測定した。
- ④ シャーレ1個に対し、②、③の操作を無作為に8回繰り返した。

8-5 細胞からのタンパク質抽出と定量

8-5-1 ECM シャーレ培養細胞からのタンパク抽出

[使用器具・試薬]

- ϕ 35 シャーレ (ECMコーティングシャーレ等)
- 高速冷却遠心機 (HIMAC CR15B, BIO-RAD)
- FBS, HEPES, NaOH, protease inhibitor, phosphatase inhibitor

[操作]

- ① confluent の ϕ 35 シャーレの培地を吸い取り、氷上で冷やした PBS 2ml で十分に洗浄する。***氷上で行う**
 - ② 細胞溶解液 (0.1% TritonX-100 を含む 20mM HEPES-NaOH, pH7.2) をシャーレに 300 μ l 加える。
 - ③ protease inhibitor, phosphatase inhibitor をそれぞれ 1 μ l 加える。
 - ④ 25~37 $^{\circ}$ C で 5 分間、軽く振とうし、細胞膜を溶解させる。
 - ⑤ セルスクレーパーで細胞を剥離した後、強くピペッティングを行い、1.5 tube に移す。
 - ⑥ 冷却遠心機で 15,000 r.p.m.、30 分間遠心する。
 - ⑦ 上澄み液をアシストチューブに移す。
 - ⑧ タンパクの定量を BCA 法にて行う。
- * 抽出したタンパク質は冷凍保存 (-80 $^{\circ}$ C)**

8-5-2 タンパク質の定量(BCA 法)

[原理]

蛋白はアルカリ溶液中で2価の銅イオンに作用し、1価の銅を生成させる。この1価の銅イオンが2分子の BCA (Bicinchoninic Acid) 分子と錯体を形成し紫紅色を発する。その際の吸光度を測定することでタンパク質濃度を求める。

[使用器具・試薬]

- Spectrophotometer (SmaetSpec™Plus , BIO-RAD)
- ビシニコニン酸、酒石酸ナトリウム、 Na_2CO_3 、 NaOH 、 NaHCO_3 、硫酸銅(II)5水和物

[操作]

- ① A 溶液、B 溶液をそれぞれ作製する

• A 溶液(数か月保存可)

ビシニコニン酸	1g
酒石酸ナトリウム	0.16g
Na_2CO_3	2g
NaOH	0.4g
NaHCO_3	0.95g
DW	適量

100ml にメスアップ後 NaOH を加え、
pH 11.25 にする。

• B 溶液(室温保存)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4g
DW	100ml

- ② スタンダード(1mg/mL BSA)を作製し、下表のように加える

1mg/ml BSA (μl)	DW (μl)	試験管1本当たりの BSA 量(μg)
0	10	0
2	8	2
4	6	4
6	4	6
8	2	8
10	0	10

- ③ A 溶液と B 溶液を 50 : 1 で混合する。
- ④ サンプルとスタンダードをそれぞれ 10 μ ずつアシストチューブにとり(各サンプル 2 本ずつ)、③で作製した溶液を 100 μ l 加える。
- ⑤ ボルテックスで攪拌する。
- ⑥ 37°C、30 分で静置する。
- ⑦ OD₅₆₂ を測定する。
- ⑧ タンパク質濃度を横軸、吸光度を縦軸にとり、検量線を作り、総タンパク質濃度を測定する。

* Spectrophotometer (SmartSpecTMPlus , BIO-RAD) 操作方法

- (1) 電源を入れる
- (2) λ を押す
- (3) enter を押す(波長の読み取り 1)
- (4) 波長を 562 nm に設定する
- (5) enter を押す(バックグラウンド読み取りを引きますか No)
- (6) select → enter を押す(繰り返して読むサンプルはありますか YES)
- (7) enter を押す(試料の反復番号 3)
- (8) セルに Blank (A 溶液+B 溶液)をいれ、Read Blank を押す
- (9) →を押す
- (10) 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄し、脱イオン水を取り除く
- (11) セルに試料を入れ、Read Sample を3回押す
- (12) 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄し、脱イオン水を取り除く
- (13) (10)~(13) を繰り返す

8-6 アルカリフォスファターゼ活性の定量

[測定原理]

p-ニトロフェニルりん酸を含む炭酸塩緩衝液(pH 9.8)中で検体を作用させると、検体中のアルカリフォスファターゼにより p-ニトロフェニルりん酸は p-ニトロフェノールとりん酸に分解され、生成された p-ニトロフェノールはアルカリ性側で黄色を呈します。この 405 nm の吸光度を測定することにより検体中のアルカリフォスファターゼ活性値を求める。

[試薬(キットの中身)]

- ・基質錠(溶解時 p-ニトロフェニルりん酸二ナトリウム)
- ・基質溶解液(2.0mmol/L 塩化マグネシウム含有 0.1mol/L 炭酸塩緩衝液 pH9.8)
- ・反応停止液(0.2mol/L 水酸化ナトリウム溶液)
- ・標準液(0.5mmol/L p-ニトロフェノール溶液)

[使用器具(キット以外に必要なもの)]

- ・96 ウェルの透明マイクロプレート
- ・アシストチューブ
- ・ピペット
- ・マイクロプレートリーダー(405nm 吸光フィルター)

[試薬の調整法]

- ①基質緩衝液:基質錠 1 錠を基質溶解液 5mL で溶解する。
調整後は 2~10℃遮光で 2 週間使用可。
- ②反応停止液:そのまま使用。
- ③標準液希釈系:標準液を蒸留水で順次倍々希釈し、0.5、0.25、0.125、0.0625 mmol/L の 2 倍希釈系列を調整する。

〔標準操作法〕

	テスト	ブランク	スタンダード
基質緩衝液	100 μ L	100 μ L	100 μ L
試料	(検体) 20 μ L	(蒸留水) 20 μ L	(標準液希釈系) 20 μ L
プレートミキサーで1分間攪拌後、37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベート			
反応停止液	80 μ L	80 μ L	80 μ L
プレートミキサーで1分間攪拌後、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する。			

8-7 色素結合法を用いたコラーゲン産生量の測定

〔原理〕

培養細胞によって培地中に産生されたコラーゲン量を定量化するために、それらと特異的に結合する色素と反応させ、反応した色素-マトリックス複合体のみを回収し、その吸光度を測定することで検量線から産生量を求める。

コラーゲンと特異的に結合する色素には Direct Red 80 (別名: Sirius Red) を用いる。構造式を図に示す。

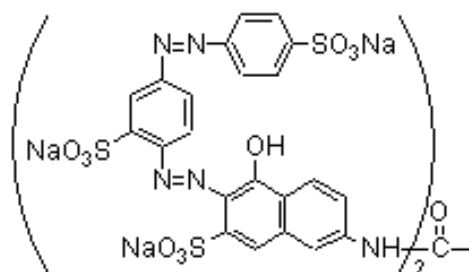


図 8-3 Direct Red 80 の構造式

Direct Red 80 は分子量 1373.07 のアゾベンゼン環にスルホン酸基を持つアニオン性の色素で、コラーゲンの組織染色などでよく用いられる。この色素は細長い構造をしており、コラーゲンの三重らせん構造の長軸に平行となるようにコラーゲンの塩基性アミノ酸側鎖に結合することが知られている。そのため、コラーゲンのみと特異的に結合し、他のタンパクとは結合しないが、変性コラーゲンなどの三重らせん構造が破壊されたコラーゲンでは結合が失われる²⁶⁾。

8-7-1 Collagen Assay

[使用装置・器具・試薬]

- ・1.5 ml アシストチューブ (SARSTEDT)
- ・50 ml 遠沈管 (日本ジェネティクス)
- ・96 穴プレート (住友ベークライト)
- ・ローテーター (井内盛栄堂)
- ・遠心分離機 (HITACHI)
- ・マイクロプレートリーダー (日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ)
- ・サンプル (培地を測定する場合、FBS 含有量は 5 % 以内のものとする)
- ・Collagen Type I (Lot.001-1/ECM Lab)
- ・酢酸 (Cat.No.012-00245/Wako)
- ・Direct Red 80 (Cat.No.501-68041/Wako)
- ・ピクリン酸 (Cat.No.239801-10G/SIGMA)
- ・水酸化ナトリウム (Cat.No.197-02125/Wako)

[操作]

- ① Direct Red 80 水溶液 (1 mg/ml) とピクリン酸の飽和水を 1:1 で混合し、染色液を作製した。
 - ② 1.5 ml アシストチューブにサンプルあるいは 0.5M 酢酸に溶解した I 型コラーゲン (スタンダード: 5-100 μ g) を最大 100 μ l 入れ、染色液を 1 ml 加えた。
 - ③ アシストチューブを数回上下させて混合し、ローテーターを用いて 30 分間攪拌した。
 - ④ 12000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。
 - ⑤ 上澄み液を除去し、1 ml の 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え、ボルテックスした。
- (※上澄み液はピペットや細く丸めたキムワイプなどを用いて完全に取り除くこと。このとき、アシストチューブの側面や底に付着している沈殿物に絶対に触れてはならない。また、側面などに黄色く付着しているピクリン酸も完全に取り除く。)

⑥96 穴プレートに 200 μ l ずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した(波長:550 nm)。

⑦測定値を水の値で補正し、検量線から得られた近似曲線式(以下に示す)に代入し、コラーゲン量を測定した。

$$\text{吸光度の値(550 nm)} = 0.0131x + 0.0232 \quad x = \text{コラーゲン量}$$

8-8 フローサイトメトリー解析

[原理]

フローサイトメトリー(flow cytometry)とは、細胞を整流(シース液と呼ばれる)中に流し込み、整然と列を成して流れている状態にしたところにレーザーを当てることで細胞から発生する前方散乱光、側方散乱光、蛍光を測定する。この光の強さを電気信号に置き換えて定量化し、細胞一つ一つの情報をサンプリングすると共に、その情報をもとに細胞を生きのまま回収することができる。前方散乱光はレーザー光軸に対して前方で検出され、細胞の表面積に比例し、側方散乱光はレーザー光軸に対して 90 度の角度で検出され、細胞の顆粒や構造の状態に比例する。また、細胞に標識した蛍光色素はレーザー光を吸収し分子振動や熱を放出することで吸収した光より長い波長を持つ蛍光を発する。

フローサイトメトリーによる表面抗原解析では、特定の分子を特異的に認識して結合する物質に適当な蛍光物質を結合させたプローブで細胞を染色する。ここにレーザーを照射して細胞が発する蛍光を検出し、測定したい分子の量を蛍光強度に置き換えて測定する。しかし、細胞には細胞自体が持っている自家蛍光がある。これは非特異的蛍光と呼ばれ、抗体が本来認識する抗原以外の場所で細胞に捕獲、あるいは接着するため、測定時は必ずコントロールが必要となる。

細胞表面上にはその細胞特異的な抗原が存在しており、これらを測定することで細胞を同定することが可能となる。

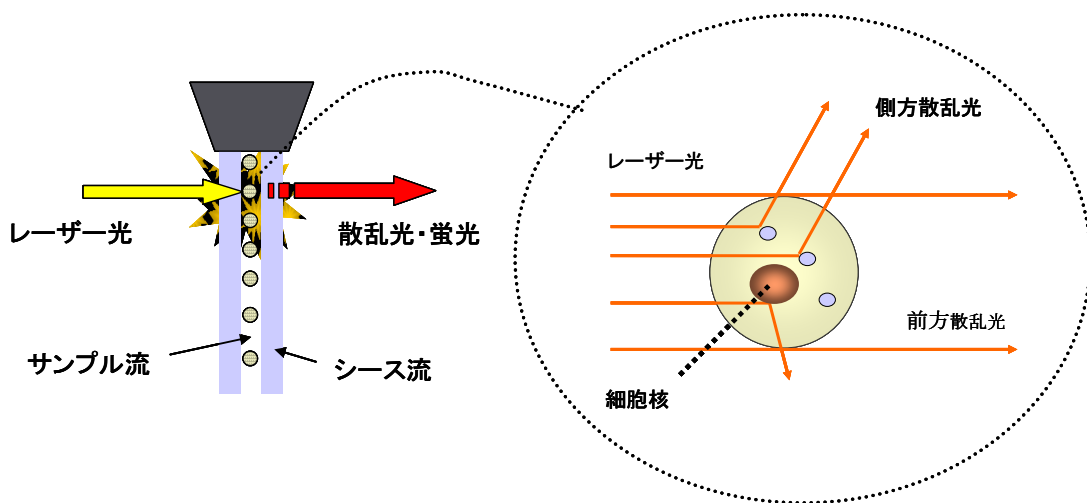


図 8-4 フローサイトメリーの原理¹⁾

[使用装置・器具]

- 15ml 遠沈管 (373687/NUNC)
- セル・ストレーナー (352235/FALCON)
- セルスクレーパー (MS - 93170/SUMILON)
- BD FACSCanto™ フローサイトメーター (日本ベクトンデッキンソン)

[使用試薬]

- trypsin - EDTA (T4174/SIGMA、100 ml)
- FBS[fetal bovine serum] (181024/Roche、50 ml)
- PBS[Phosphate Buffered Saline] (D - 8537/SIGMA、500 ml)
- Monoclonal Anti-human/mouse/rat Alkaline Phosphatase-Allophycocyanin (R&D Systems)
-

[操作]

- ①φ35 シャーレに細胞を sub-confluent まで培養した。
- ②培養液を吸引後、φ35 シャーレ内の細胞を PBS 溶液で洗浄した。
- ③洗浄液を吸引後、10%trypsin/PBS 溶液を 2 ml/well ずつ加え、ピペッティングを行った。
- ④顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認後、FBS を 400 μl/well ずつ加えた。

- ※細胞の剥離が十分でない場合はセルスクレーパーを用いた。
- ⑤細胞懸濁液を 15 ml 遠沈管にいれて、1000 rpm で5分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。
 - ⑥2% FBS/PBS 溶液を 2 ml ずつ加えて、1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。(洗浄)
 - ⑦2% FBS/PBS 溶液を 1 ml ずつ加えて、抗体を各 10 μ l 加えて 4°C で 45 分間インキュベートした。(遮光保存)
 - ⑧1000 rpm で5分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。
 - ⑨2%FBS/PBS 溶液を 2 ml ずつ加えて懸濁し、1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。これを二回繰り返した。
 - ⑩測定直前に 2%FBS/PBS 溶液を 1ml ずつ加えて懸濁し、FACS で測定した。

8-8 エレクトロスピンニング法を用いた ECM ペレット作製

【エレクトロスピンニング法の原理】

シリンジに高分子溶液を入れて、高電圧を印加しポンプを押し出すと高分子溶液が電極に飛び、電極上に非常に細い繊維ができる。このとき電圧、溶液濃度、空隙距離を変えることで繊維の形状や太さを変えることができる。

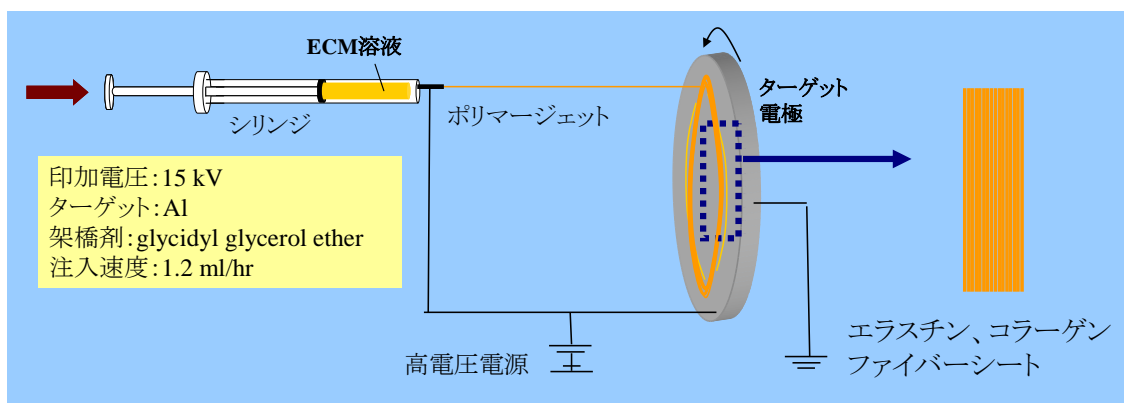


図 8-5 エレクトロスピンニング法

〔使用機器・器具〕

- エレクトロスピンニング装置
- 各種シリンジ(テルモ)
- 各種注射針 (テルモ)



図 8-6 エレクトロスピンニング装置

〔使用試薬〕

- Elastin PES-(A) (ECM Lab)
- glycidyl glycerol ether (Polysciences Inc.)
- trifluoroethanol
- I 型コラーゲン (ECM Lab)

〔操作〕

- ①分画エラスチン A 800 mg、glycidyl glycerol ether 80 mg を tri fluoro ethanol (TFE) 4 ml に溶解し、以下の条件でエレクトロスピンニングにより、エラスチンファイバーを作製した。(印加電圧 15 kV、注入速度 1.2 ml/hr、注入時間 3000 sec、空隙距離 20 cm、電極 A1、電極直径 12 cm、電極回転速度 0-5500 rpm)
- ② I 型コラーゲン 200 mg、glycidyl glycerol ether 50 mg を tetra fluoro ethanol (TFE) 6 ml に溶解し、以下の条件でエレクトロスピンニングにより、コラーゲンファイバーを作製した。(印加電圧 17 kV、注入速度 1.2 ml/hr、注入時間 2000 sec、空隙距離 20 cm、電極 A1、電極直径 35 cm)
- ③作製した ECM ファイバーを 120°C で 20 分架橋した。
- ④ECM ファイバーを凍結乾燥した。

8-9 走査型電子顕微鏡 (SEM)

8-9-1 試料の作成

[使用試薬]

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Wako, Lot No. LDH2678, Cat No. 192-02815)
- Na_2HPO_4 (Wako, Lot No. KCG5195, Cat No. 197-02865)
- glutaraldehyde (東京化成工業, Lot No. FGL01, Cat No. G0068)
- ホルムアルデヒド液(Wako, Lot No. LEM4049, Cat No. 064-00406)
- 酸化オスミウム(VIII)(2% 水溶液)(ナカライテスク, Lot No. V8N8335, Cat No. 25746-06)
- ギ酸(Wako, Lot No. EWE1179, Cat No. 066-00466)
- ethanol(Wako, Lot No. AGH2000, Cat No. 052-00467)
- t-butylalcohol(ナカライテスク, Lot No. M8F2732, Cat No. 06104-25)

I 試料の前処理

乾燥試料(ペレットなど)の場合は I、II は飛ばしてよい。

[操作]

- ① 試料を 4%ホルムアルデヒド/0.1 Mリン酸緩衝液 pH7.4 で 24 時間固定した。
- ② 試料を適当な大きさに切断した。
- ③ 脱イオン水で洗浄後、試料を 45 °C、90 %ギ酸溶液で 4 日間処理した。
- ④ 脱イオン水中で 12 時間洗浄した。
- ⑤ 50 %、70 %、90 %、99 %エタノール/脱イオン水で 10 分ずつ段階的に脱水した。
- ⑥ 50 % t-ブチルアルコール/エタノールで 15 分置換した。
- ⑦ 37 °C、100 % t-ブチルアルコールで 30 分置換した。
- ⑧ t-ブチルアルコールで置換した試料をサンプル瓶にいれ、試料が完全に浸る程度に t-ブチルアルコールを入れて凍結乾燥した。

※ 四酸化オスミウムは危険なので作業はドラフト内で行い、廃液は正規の処理をすること。

II 試料の乾燥

[使用機器]

VFD-21S(Vacuum devise inc.) (図 8-1)

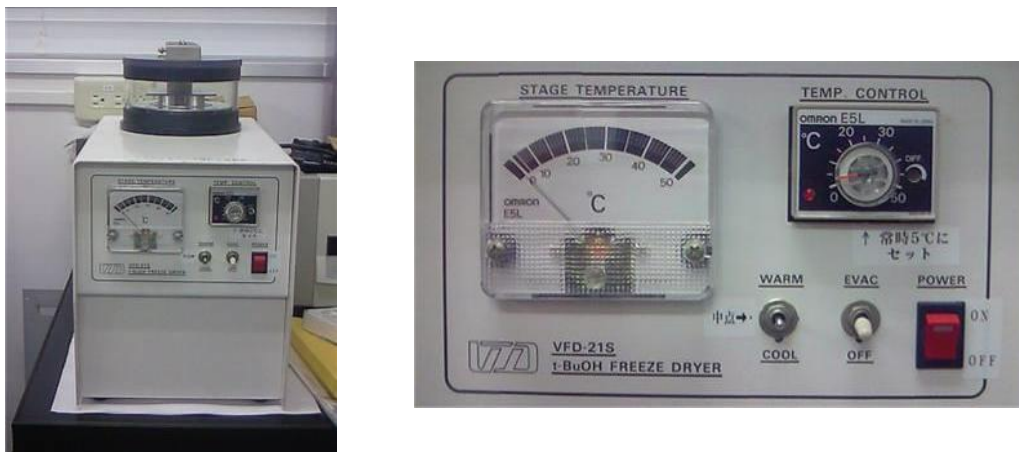


図 8-7 t-ブチルアルコール用凍結乾燥機 (VFD-21S)

- (1) 後部のトラップコップを水で満たした。
- (2) POWER をオンにし、左のスイッチを COOL に合わせ、内部の温度が 4°C になるまで待った。
- (3) 4°C になったら予め t-ブチルアルコールに浸して凍らせておいたサンプルを、サンプル瓶ごと台座にセットし、押さえ蓋を置き、30 分待った。
- (4) EVAC をオンにし、乾燥を開始し、周囲の氷がなくなるまで待った。内部までしっかり乾燥させる為、完全に氷が無くなってからさらに 30 分放置した。
- (5) 30 分経過後、温度スイッチを WARM に合わせ、温度が 30°C になるまで待った。
- (6) スイッチを中点に戻した後、EVAC をオフにして吸引を停止した。
- (7) 乾燥が終了したサンプルはデシケーター内で保存し、吸湿しないようにした。

III イオンスパッターによる試料の金コーティング

[使用機器]

・日立イオンスパッターE1010 (図 8-2)



図 8-8 イオンスパッター装置

- (1) SEM用の試料台に両面テープでサンプルを固定した。この時、撮影したい面が上を向くようにし、なるべく平らになるように張り付けた。
- (2) 試料台の裏側(ねじ穴のある側)にシャーペンなどで番号を記入し、サンプルの区別が付くようにした。
- (3) 金スパッタリング用の台座にサンプルを試料台ごとセットした。台座に空きができる場合にはテープで塞いだ。
- (4) イオンスパッターの MAIN VALVE を開き、台座をセットし、POWER をオンにして、圧力が 10 Pa まで下がるのを待った。
- (5) 10 Pa になり、Ready のランプが点灯してから 1~2 分待ち、スパッタリング時間を 120 sec に set を押した。
- (6) DISCHARGE をオンにして金イオンを飛ばし、終了したら POWER をオフにし、試料台を取りだした。

8-9-2 SEM 撮影法

〔使用装置〕

- ・パソコン
- ・日立走査型電子顕微鏡 S4000 (図 8-9)



図 8-9 走査型電子顕微鏡

- (1) 撮影前に装置内部の試料台が $x=12.5$ 、 $y=12.5$ 、傾き=0 の位置にある事を確認した。
- (2) displaypower とカメラの電源を入れた。同時に、パソコンの電源を入れ、EOS utility を起動させた。
- (3) サンプルを高さ調整台に乗せ、固定台と固定した。
- (4) EVAC を押し内部を真空状態にした(基本的に真空状態になっている)。
- (5) 左上部のレバーが CLOSE になっていることを確認してから、AIR を押した。
- (6) 前室部分を開き、固定台を棒にセットした。

- (7) 棒を固定して、前室部分を閉じ、EVAC を押して真空にした。
- (8) 緑のランプが点灯し、high の位置にある事を確認してから 20 秒ほど待ち、その後レバーを OPEN にして、試料を内部試料台に乗せた。
- (9) 棒を抜き、前室部分に固定したらレバーを CLOSE にし、右下にある SPECIMENE STAGE と AIR LOCK VALVE のつまみをそれぞれ LOCK と OPEN にした。
- (10) キーボード左上端にある HV の ON を押した(図 8-10)。



図 8-10 キーボード上 HV ON

- (11) Vacc、Vext、EMISSION の値がそれぞれ安定したら ABC を押し、画面のコントラストを合わせた(図 8-5)。



図 8-11 上図: Vacc、Vext、EMISSION、下図:コントラスト及び撮影倍率調整

- (12)本体のつまみを回し、画像を動かし、サンプルを探した。
 (13)MAGNIFICATION のつまみ(図 8-5)を回し、撮影倍率を決定した。
 (14)STIGMA: AUTO→FOCUS: AUTO の順で押していき、画像のピントを調整した(図 8-12)。

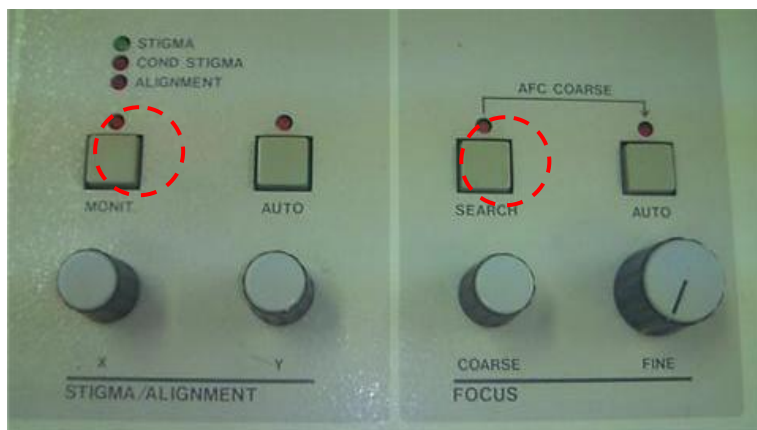


図 8-12 ピントの調整

- (15)SCAN SPEED を 1 にし(次図矢印を 1 回押す)、RUN/STOP:A を押して画像を静止画にした(図 8-13)。

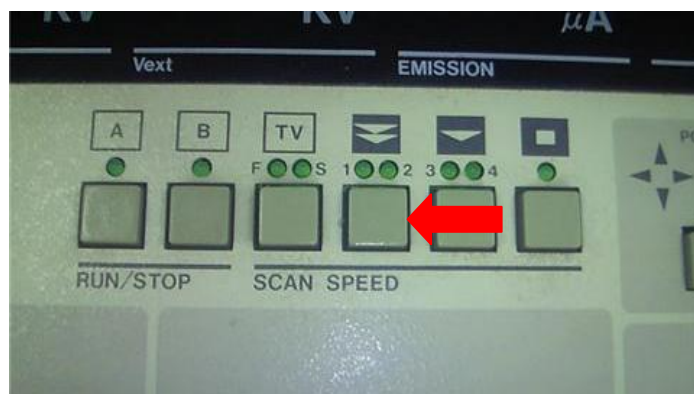


図 8-13 SCAN SPEED の調節

- (16)カメラのシャッターを開き、キーボード右上端の PHOTO:DIRECT を押した(図 8-14)。



図 8-14 SEM 画像取得開始ボタン

- (17)「ピー」と音が鳴ったら、シャッターを閉じた。(この時、パソコン画面の SEM 画像フォルダに撮影した画像が表示される)
- (18)SCAN SPEED:TV を一回押し、RUN/STOP:A を押した後に(11)～(17)の工程を繰り返して撮影した。
- (19)サンプルの撮影を終了する時は HV の OFF を押した後、SPECIMENE STAGE と AIR LOCK VALVE のつまみをそれぞれ FREE と CLOSE にした(図 8-15)。

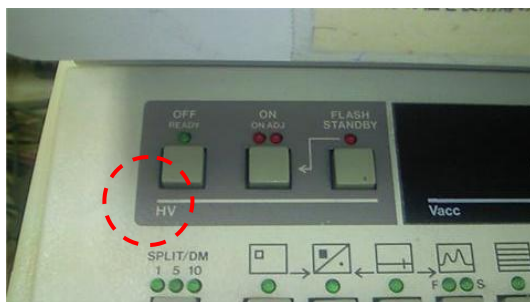


図 8-15 SEM 撮影の終了

- (20)レバーを OPEN にし、固定台を内部試料台から取り出した後、レバーを CLOSE に戻し、AIR を押してサンプルを取り出した。
- (21)サンプルを交換して再度撮影するときは(5)から同様の作業を行った。
- (22)全工程終了時に SEM 画像フォルダ中の画像を全てメディアに保存した。

8-10 ECM ペレット内における細胞培養

[細胞培養方法]

- ① 作製した ECM ペレットを厚さ 3mm に切り分けた。
- ② ECM ペレットをアルミホイルで包み、121℃で 30 分間の乾熱滅菌を行った。
- ③ 滅菌後の ECM ペレットを 5ml アシストチューブに入れ、SCBM を加えて数時間インキュベータ(37℃、5% CO₂)内でプレインキュベートした。
- ④ SCBM を取り除き、FBS を加えて数十分インキュベータ(37℃、5% CO₂)内でプレインキュベートした。
- ⑤ ④の ECM ペレットをペレット培養器にピンセットを使って入れた。
- ⑥ 継代培養の操作により HPdLF の細胞懸濁液を作製した。
- ⑦ 準備した ECM ペレット内に、細胞数が 1.0×10^5 個程度になるように播種した。

細胞播種後、インキュベータ(37℃、5% CO₂)内で 3 日から 21 日間の培養を行った。

8-11 免疫化学染色

〔測定原理〕

免疫化学染色は、特定のタンパク質を検出する方法で、各々の細胞の特異的なタンパク質を標識し、それを確認することにより細胞の同定を行う。

特定タンパクに一次抗体を認識させ、さらにその一次抗体を抗原として認識する蛍光物質を標識した二次抗体を用いる。二次抗体には特定の動物種の免疫グロブリンを認識する抗体を利用する。同じ動物種の由来の一次抗体であれば二次抗体が認識可能である。

それぞれの蛍光物質に対応する波長の励起光当て、蛍光を検出する。

(図 8-16)

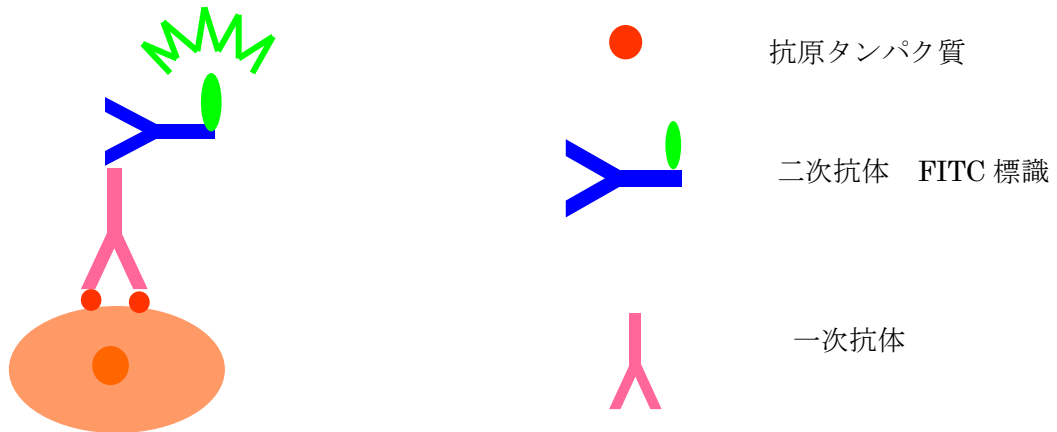


図 8-16 抗原抗体反応を用いた免疫化学染色

・FITC (fluorescein isothiocyanate)

緑色系の蛍光色素で、この色素は安定で、抗体活性を阻害せず、抗体への標識が容易で安定、蛍光効率が低い、最大吸収波長と最大発光波長がかなり離れているなどの標識用蛍光色素の要件をかなり満たしている。

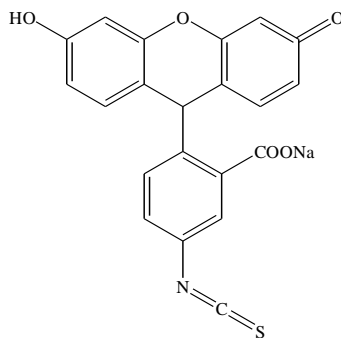


図 8-17 FITC

[使用装置・器具・試薬]

- 共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV1000 倒立顕微鏡 IX81)
- propidium iodide(PI)(P4170-25MG/SIGMA)
- acetone (WAKO)
- methanol (WAKO)
- Stromal Cell Basal Medium (SCBMTM) (Lonza/CC-3205)

[操作]

ECM ペレットへの靱帯細胞接着確認 (Smooth Muscle Actin、細胞核の染色)

I. ペレット上への細胞播種 (培地: 5 % FBS/SCBM)

- ① 付録 8-10 で示した方法で細胞を播種し 7 日間培養した。

II. 溶液の調整

- ① ウシ血清アルブミンを PBS に溶解させ 1 % BSA/PBS を作製した。
- ② acetone と methanol をそれぞれ 1:1 で混合し、acetone/methanol (1:1) 固定液を作製し、 -20°C で保管した。

III. 細胞固定

- ① シャーレから培地を取り除き、細胞を PBS で洗浄した。
- ② -20°C の acetone/methanol (1:1) にて室温で 5 分間細胞を固定した後、固定液を除き 10 分間風乾した。

IV. PI

- ① PI 溶液 (10mg/ml を 200 希釈) を 1ml (希釈: 1% BSA、0.02% tritonX-100/PBS) 加え、90 分間、暗所室温で放置した。
- ② PI を取り除き 1 % BSA/PBS で 3 回洗浄した後、1 % BSA/PBS 中で overnight させた。
- ③ 共焦点レーザー顕微鏡で観察し撮影した。

8-12 ECM ペレット内培養細胞からのタンパク抽出

8-12-1 ECM ペレット内培養細胞からのタンパク抽出

[使用器具・試薬]

- ・高速冷却遠心機 (HIMAC CR15B , BIO-RAD)
- ・FBS , HEPES , NaOH , protease inhibitor , phosphatase inhibitor

[操作]

- ① 培養器の培地を吸い取り、ECM ペレットを滅菌済みピンセットで取り出して、氷上で冷やした PBS で十分に洗浄する。***氷上で行う**
- ② ECM ペレットを 1.5 ml アシストチューブに入れる。
- ③ 細胞溶解液 (0.1% TritonX-100 を含む 20mM HEPES-NaOH , pH7.2) を 1.5 ml アシストチューブに 300 μ l 加える。
- ④ protease inhibitor , phosphatase inhibitor をそれぞれ 1 μ l 加える。
- ⑤ 25~37 $^{\circ}$ C で 5 分間、軽く振とうし、細胞膜を溶解させる。
- ⑥ 滅菌済みのチップで ECM ペレットを崩し、細胞膜を溶解させる。
- ⑦ 冷却遠心機で 15,000 r.p.m 、30 分間遠心する。
- ⑧ 上澄み液をアシストチューブに移す。
- ⑨ タンパクの定量を BCA 法にて行う。

***抽出したタンパク質は冷凍保存(-80 $^{\circ}$ C)**

8-12-2 タンパク質の定量(BCA 法)

付録 8-5-2 で示した手順と同様に BCA 法を行った。

8-13 アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の定量 (ECM ペレット)

付録 8-12-1 に示した通りにタンパクを抽出した後、付録 8-6 で示した手順で ALP 活性の定量を行った。

8-14 フローサイトメトリー解析 (ECM ペレット)

[使用装置・器具]

- ・1.5ml アシストチューブ (SARSTEDT)
- ・セル・ストレーナー (352235/FALCON)
- ・セルスクレーパー (MS - 93170/SUMILON)
- ・BD FACSCanto™ フローサイトメーター (日本ベクトンデッキンソン)

[使用試薬]

- ・Elastase(Porcine)(E134/コスモバイオ)
- ・trypsin - EDTA (T4174/SIGMA、100 ml)
- ・FBS[fetal bovine serum] (181024/Roche、50 ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline] (D - 8537/SIGMA、500 ml)
- ・Monoclonal Anti-human/mouse/rat Alkaline Phosphatase-Allophycocyanin (R&D Systems)

[操作]

- ①Elastase 40U/ml に PBS を加えて、40U/ml になるように調整した。
- ②①で調整した 40U/ml Elastase 溶液を 1.5ml アシストチューブに 1ml 加えた。
- ③②に細胞を培養したエラスチンペレットを滅菌済みピンセットでちぎって入れた。
- ④37°Cで 1 時間、ローテーターで攪拌しながら、エラスチンペレットを分解させた。
- ⑤1 時間後、1000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。
- ⑥2%FBS/PBS 溶液を 1ml ずつ加えて、1000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした(洗浄)。これを二回行った。
- ⑦2% FBS/PBS 溶液を 25 μ l ずつ加えて、抗体を各 10 μ l 加えて 4°Cで 45 分間インキュベートした。(遮光保存)
- ⑧1000 rpm で5分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。
- ⑨2%FBS/PBS 溶液を 1ml ずつ加えて懸濁し、1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした(洗浄)。これを二回繰り返した。
- ⑩測定直前に 2%FBS/PBS 溶液を 1ml ずつ加えて懸濁し、FACS で測定した。

8-15 ラクトース添加培地の調整法

[試薬・器具・機器]

- Stromal Cell Basal Medium (SCBMTM) (Lonza/CC-3205)
- ストローマ細胞添加因子セット (Lonza/CC-3205)
(hFGF-B、インシュリン、GA-1000)
- Fetal bovine serum (FBS) (EQUITCH-BIO)
- Lactose (Wako)
- 各種アシストチューブ (アシスト)
- 各種シリンジ (テルモ)
- 孔径 0.22 μm フィルター (Millex-GV) (SLGV025LS/MILLIPORE)
- Stericup フィルターユニット (SCGVU05RE/MILLIPORE)
- 恒温槽 (BT-15/Yamato)

[培地の調整]

- ①凍結保存してある hFGF-B、インシュリン、GA-1000 の各バイアルを恒温槽で解凍した。
- ②バイアルの周囲をアルコールで拭いた。
- ③ピペットを用いて、各バイアル中の全量を培地に入れ、培地で共洗いした。
- ④調整した培地に FBS の割合が 5% になるように FBS を加えた。
- ⑤④で調整した 5% FBS/SCBM にラクトースを 1mg/ml になるように加えた。
- ⑥⑤で調整したラクトース添加培地を孔径 22 μm を用いてフィルター滅菌を行った。

* 動的培養時は 0.1% FBS/SCBM になるようにした。

** ラクトース添加培地は、エラスチン結合タンパク質阻害実験に用いた。