

博士学位論文

三次元培養基材および力学刺激による
靱帯細胞の表現型制御に関する研究

平成 25 年 3 月

三重大学大学院 工学研究科 材料科学専攻

水谷 直紀

研究指導教員：堀内 孝 教授 ・ 宮本 啓一 准教授

目次

| | |
|---|----|
| 1 緒言 | 1 |
| 1-1 再生医学と組織工学 | 2 |
| 1-2 前十字靭帯組織 (ACL: anterior cruciate ligament) | 3 |
| 1-2-1 前十字靭帯 | 3 |
| 1-2-2 靭帯再建術の現状と課題 | 4 |
| 1-2-3 靭帯と骨の接合部の組成 | 5 |
| 1-3 細胞の機能 | 7 |
| 1-3-1 ACL 細胞 | 7 |
| 1-3-2 細胞接着原理 | 9 |
| 1-3-3 細胞接着分子 | 10 |
| 1-3-4 力学的刺激・機械受容体 | 14 |
| 1-4 細胞外マトリックス (ECM : extra cellular matrix) | 15 |
| 1-4-1 コラーゲン (Collagen) | 16 |
| 1-4-2 エラスチン (Elastin) | 17 |
| 1-5 本研究の目的 | 20 |
| 2 方法 | 21 |
| 2-1 前十字靭帯組織の基本性質の調査 | 22 |
| 2-1-1 走査型電子顕微鏡 (SEM) によるヒト前十字靭帯の観察 | 22 |
| 2-1-2 免疫蛍光染色によるヒト前十字靭帯組織の組成調査 | 22 |
| 2-1-3 前十字靭帯組織内細胞の遺伝子発現の定量 | 23 |
| 2-1-4 前十字靭帯の弾性率測定 | 23 |
| 2-2 水溶性エラスチンの抽出と分類 | 24 |
| 2-2-1 水溶性エラスチンの抽出 | 24 |
| 2-2-2 水溶性エラスチンの分類 (分画エラスチン) | 24 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2-3 | 靱帯細胞の採取と基本性質の調査 | 25 |
| 2-3-1 | 靱帯細胞の採取と継代培養 | 25 |
| 2-3-2 | 靱帯細胞の機能評価 | 25 |
| 2-4 | 培地中への ECM 添加が靱帯細胞に与える影響 | 27 |
| 2-5 | ECM ファイバー足場の作製 | 27 |
| 2-5-1 | エラスチンファイバー足場の作製 | 27 |
| 2-5-2 | コラーゲンファイバー足場の作製 | 27 |
| 2-5-3 | 作製した ECM ファイバー足場の弾性率測定 | 27 |
| 2-6 | ECM ファイバー足場上での靱帯細胞培養 | 28 |
| 2-6-1 | ECM ファイバー足場上細胞の観察 | 28 |
| 2-6-2 | アルカリフォスファターゼ (ALP: alkaline phosphatase) 活性の定量 | 28 |
| 2-6-3 | 遺伝子発現の定量 | 28 |
| 2-7 | 動的培養が靱帯細胞に与える影響 | 29 |
| 2-7-1 | アルカリフォスファターゼ (ALP: alkaline phosphatase) 活性の定量 | 30 |
| 2-7-2 | 遺伝子発現の定量 | 30 |
| 2-7-3 | 免疫蛍光染色によるタンパク質発現の確認 | 30 |
| 2-8 | 統計処理 | 30 |
| 3 | 結果 | 31 |
| 3-1 | 前十字靱帯組織の基本性質の調査 | 32 |
| 3-1-1 | 走査型電子顕微鏡(SEM)によるヒト前十字靱帯の観察 | 32 |
| 3-1-2 | 免疫蛍光染色によるヒト前十字靱帯組織の組成調査 | 34 |
| 3-1-3 | 前十字靱帯組織内細胞の遺伝子発現の定量 | 36 |
| 3-1-4 | 前十字靱帯の弾性率測定 | 38 |
| 3-2 | 靱帯細胞の採取と基本性質の調査 | 39 |
| 3-2-1 | 前十字靱帯細胞の増殖能、遺伝子発現の調査 | 39 |
| 3-2-2 | 前十字靱帯細胞と歯周靱帯細胞の比較 | 41 |
| 3-3 | 培地中への ECM 添加が靱帯細胞に与える影響 | 43 |

| | | |
|-------|--------------------------|-----|
| 3-4 | 作製した ECM ファイバー足場の評価 | 47 |
| 3-4-1 | SEM による ECM ファイバー足場の観察 | 47 |
| 3-4-2 | ECM ファイバー足場の弾性率 | 48 |
| 3-5 | ECM ファイバー足場上での靭帯細胞培養 | 49 |
| 3-5-1 | 免疫蛍光染色、SEM による靭帯細胞の観察 | 49 |
| 3-5-2 | 靭帯細胞に与える影響(遺伝子発現、ALP 活性) | 51 |
| 3-6 | 力学的刺激が靭帯細胞に与える影響 | 56 |
| 3-6-1 | 加圧培養が靭帯細胞に与える影響 | 56 |
| 3-6-2 | ねじれ型動的培養が靭帯細胞に与える影響 | 58 |
| 3-6-3 | 複合型動的培養が靭帯細胞に与える影響 | 60 |
| 4 | 考察 | 64 |
| 4-1 | 前十字靭帯について | 65 |
| 4-2 | ACL 細胞と PDLF について | 73 |
| 4-3 | 靭帯を構成する ECM が靭帯細胞に与える影響 | 75 |
| 4-4 | 力学的刺激が靭帯細胞に与える影響 | 86 |
| 4-4-1 | 加圧培養が靭帯細胞に与える影響 | 86 |
| 4-4-2 | ねじれ型動的培養が靭帯細胞に与える影響 | 89 |
| 4-4-3 | 複合型動的培養が靭帯細胞に与える影響 | 96 |
| 5 | 結論 | 99 |
| 6 | 参考文献 | 101 |
| | 謝辞 | 107 |

1 緒言

Introduction

1 緒言

1-1 再生医学と組織工学

生体は元来自己を復元する能力を持っているが、そのような再生能力が追い付けない程の大きな疾患の場合には、臓器移植を用いた治療が検討される。しかし、臓器移植にはドナー不足や免疫拒絶等の様々な問題が存在するため、実際に治療を受けられる患者は限られることになる。そこで、生体が持つ自らを再生する能力を用いて、一つの細胞から組織・臓器を再建する再生医学が注目されている。

この再生医学の一役を担う分野として、生きた細胞を用いることにより、今までにないような高性能な人工臓器や組織をつくり出すことを目的とする「組織工学」が挙げられる。

組織工学は大きく三つの要素に分けることができる。組織の機能を再生するための「細胞」、その細胞を培養し、組織を支持するための「足場材料」、細胞の分化や増殖を制御する「サイトカイン」の三つである(図 1-1)。これらの要素が密接に関連しあうことで組織工学が成立するとされる。

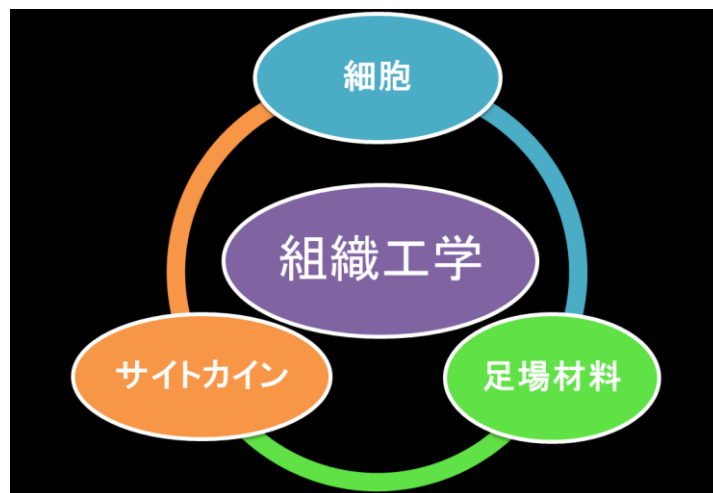


図 1-1 組織工学の三つの要素

また、再生医学・組織工学を実現するためには、細胞機能の制御、細胞および細胞外環境の理解が必要不可欠となる。細胞外環境として、細胞の周りには細胞外マトリックス (ECM: extra cellular matrix) と呼ばれる物質が数多く存在している。そのため、この細胞外マトリックスと細胞の関係や機能制御に関する理解が組織工学における重要な課題であると言える¹⁾²⁾。

1-2 前十字靭帯組織 (ACL: anterior cruciate ligament)

1-2-1 前十字靭帯

前十字靭帯 (ACL) は膝関節内のほぼ中央に位置する線維性の結合組織であり、大腿骨と脛骨を結んでいる (図 1-2)。ACL は、大腿骨に対して脛骨が前方へずれることを防いでおり、膝の安定性維持において重要な役割を果たしている³⁾⁴⁾。ACL は主に、collagen (I、III、V 型)、elastin などの細胞外マトリックスと、靭帯線維と平行に配向した紡錘型の線維芽細胞 (靭帯細胞) から構成されている⁵⁾。

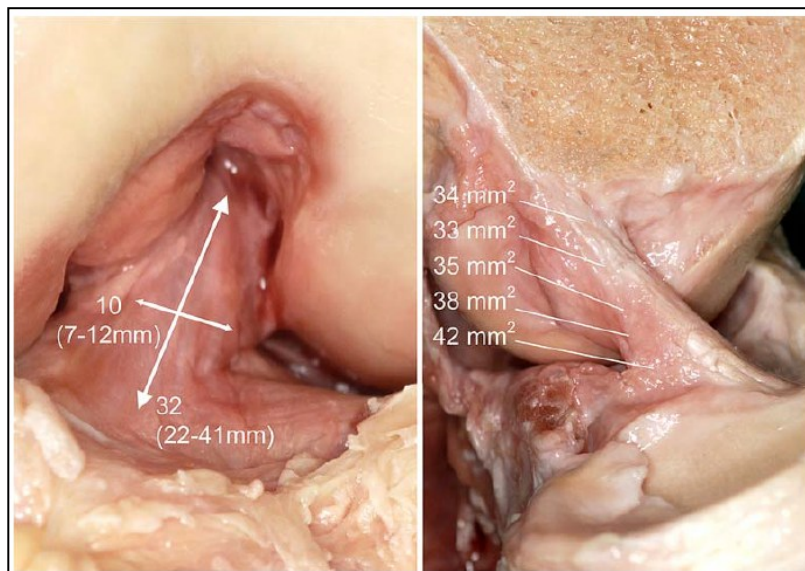


図 1-2 ヒト膝関節内 ACL⁶⁾

左図: 膝関節正面図、右図: 関節断面図

また、ACL は膝関節の曲げ伸ばしに応じて、ねじれ運動を生じることが知られている。例えば、膝を 90 度曲げた場合には大腿骨から脛骨にかけて約 90 度のねじれが生じる⁷⁾。さらに、膝関節は体重を支えることで、圧力が生じている。通常、ACL には 169 N の力がかかっているが、1,730 N 以上の負荷が加わることで断裂損傷を受けるとされる⁸⁾。ヒト ACL においては、長径約 32 mm のうち、約 6 % の伸張 (2 mm 程度) により損傷を受けることが報告されている⁹⁾。このことから、靭帯組織を組織工学的に再建するためには生体内での機能を再現するだけでなく、力学強度に優れた材料の開発が求められる。

1-2-2 靭帯再建術の現状と課題

近年、スポーツ人口の増加や高齢社会の影響を受けて、靭帯損傷の患者数は増加傾向にある。中でも ACL は最も損傷しやすい靭帯とされ、その受傷者数は 3,000 人に 1 人と報告されている²⁾。

ACL が損傷すると、膝半月板や関節軟骨の痛みに加え、変形性関節症を患うなど二次的損傷を引き起こす可能性が高い。そのため、早期の治療が求められる。しかし、ACL には栄養を送る血管が乏しく断裂すると生体内で自然治癒することはない。従って、損傷を受けた場合には代替物で置換する手術が必要となる^{6),10)}。

現在、国内外で最も広く実施されている治療法として、患者自身の健康な靭帯または腱の一部を移植する方法がある(自家移植法)。比較的良好な結果が得られるが、移植に使用した組織の筋力が低下する点や、自己の正常組織が犠牲になる点など、大きな欠点を抱えている。

自家移植法が抱える欠点を克服する治療法として、合成繊維から成る人工靭帯の使用が検討されてきた。現在までに、Gore-TexやDacronなど、様々な素材の人工靭帯が開発されたが、耐久性の問題や繊維の摩耗層により炎症が起こるなど、どれも実用化には至っていないのが現状である。

これらの問題を解決するための新しい試みとして、本研究では組織工学的な手法に着目した。生体由来の細胞と素材を使用した組織工学的な人工靭帯を作製することで、自己の正常組織を犠牲にすることなく、移植後の炎症発生も抑えることが期待できる。このような人工靭帯を開発するためには、多くの課題を克服する必要がある。例えば、細胞培養基材(細胞足場)の力学的強度の確保、足場上に生着した細胞が組織再生を促す条件の探索などである。その他にも、靭帯が骨同士を結合する組織であることから、移植後の組織再生を効率的に行うためには、人工靭帯の末端部分があらかじめ骨組織化されていることが望ましい点など、多くの課題が存在する。

1-2-3 靱帯と骨の接合部の組成

靱帯と骨の接合部は段階的に遷移しており、大きく分けて三つの領域に分類される。靱帯部分 (ligament region: L)、接合部分 (interface region)、骨部分 (bone region: B) の三つである。接合部分はさらに、鉱化していない部分 (non-mineralized interface: NI) と鉱化した部分 (mineralized interface: MI) の二つの領域に分けられるため、全部で四つの領域に分けることができる(図 1-3)。このように靱帯と骨の接合部分が段階的に遷移することで、これら二種類の組織間での応力集中が最小になり、応力転移が円滑となる¹¹⁾。

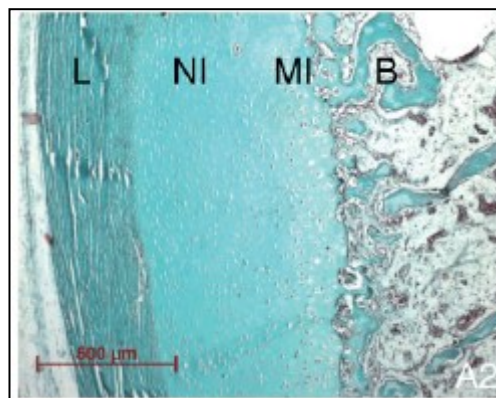


図 1-3 靱帯と骨の接合部 (染色写真)¹¹⁾

各領域の主な組成は以下の通りである¹¹⁾。

(1) 靱帯部分

Type I collagen、type III collagen が含まれており、線維芽細胞が collagen 線維の長軸方向に沿って引き伸ばされたような形で存在する。

(2) 鉱化していない部分

Type II collagen や、アグリカンなどのプロテオグリカンが含まれており、卵型の軟骨細胞が存在する。

(3) 鉱化した部分

Type X collagen が含まれており、肥大性軟骨細胞が存在する。靱帯において、type X collagen はこの部分にのみ見られる。

(4) 骨部分

Type I collagen が含まれており、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞が存在する。

靭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、骨部分から靭帯部分へ向かうにつれて小さくなる¹¹⁾。また、一般に細胞の縦横比は靭帯部分から骨部分に近づくにつれて小さくなり、靭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⁾¹¹⁾ (図 1-4, 1-5)。

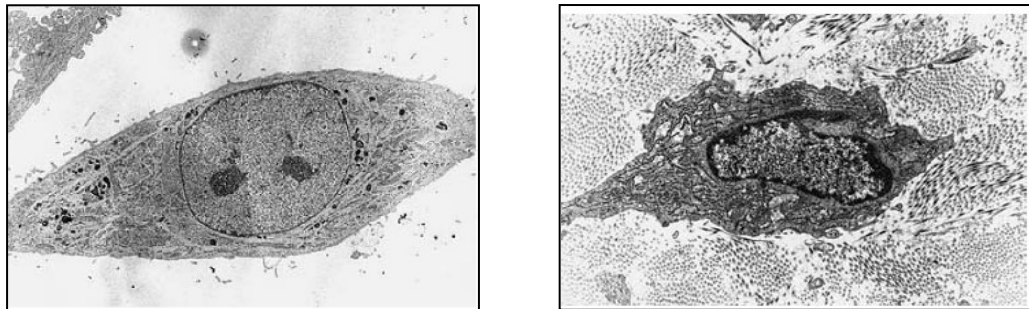


図 1-4 線維芽細胞(左)と軟骨細胞(右)⁶⁾

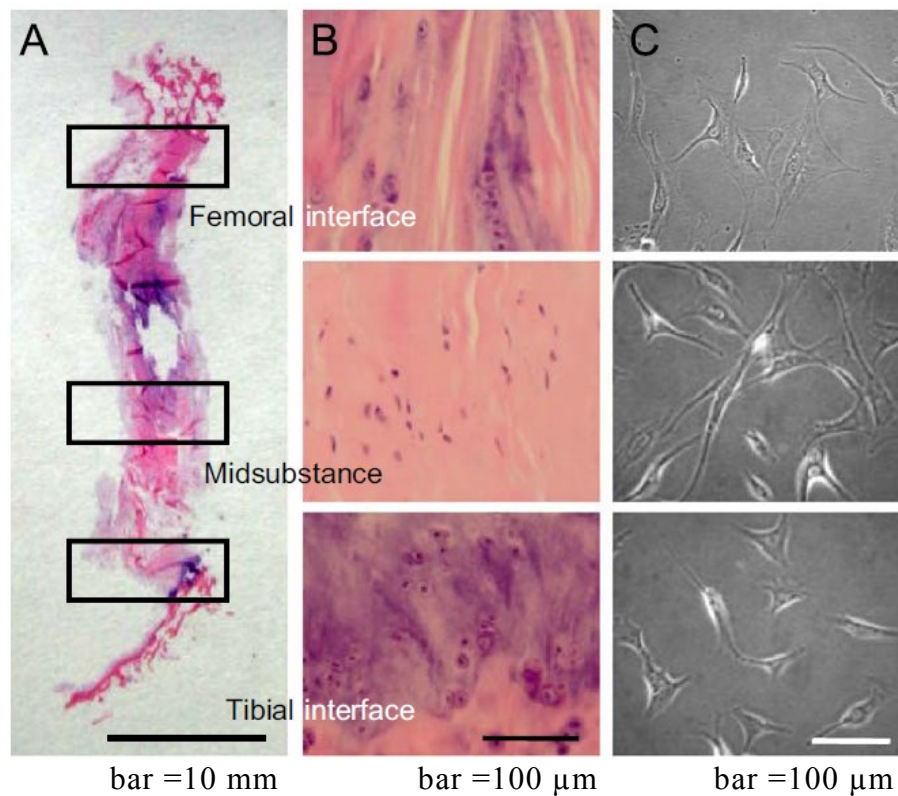


図 1-5 ACL-bone 接合部分における靭帯細胞の形態変化¹²⁾
 上段：大腿骨-ACL 接合部、中段：靭帯中央部、下段：ACL-脛骨接合部、A,B：ヘマトキシリン・エオジン染色、C：位相差顕微鏡写真

1-3 細胞の機能

1-3-1 ACL 細胞

靭帯組織中に存在する細胞は、一般的に紡錘型の線維芽細胞であり、靭帯組織中でこの細胞は組織の長軸方向に沿って引き伸ばされるような形で、平行に配向して存在している⁶⁾ (図 1-5 b 中段)。

ACL 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、フィブロネクチン、コンドロイチン硫酸などの細胞外マトリックスを産生する。

ACL 細胞をはじめ、靭帯細胞は間葉系幹細胞(MSC: mesenchymal stem cell)から分化した細胞であるとされているが、これまでの研究によると、靭帯細胞が発現する表面抗原、タンパク質、mRNA などは間葉系幹細胞とほぼ同一であり、これら2つの細胞を区別することは難しい¹³⁻¹⁵⁾。また、現時点で靭帯細胞にのみ特異的に発現するタンパク質や mRNA はほぼ見つかっていない。靭帯や腱などの密性結合組織に特異的に発現するとされるタンパク質に **tenomodulin** が挙げられるが¹⁶⁻¹⁸⁾、「靭帯細胞のみ」に発現するマーカーとしては不十分である。さらに、靭帯細胞は間葉系幹細胞と同様に、適切な分化誘導をかけることによって骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞など、他の間葉系の細胞に分化することが報告されている¹³⁾¹⁴⁾。従って、靭帯細胞は他の最終分化した間葉系の細胞に比べて、間葉系幹細胞にかなり近い位置づけになることが推測されるが、現段階では未知な部分が多い。

本研究では、靭帯細胞としてヒト前十字靭帯細胞(ACL 細胞)とヒト歯周靭帯細胞(PDLF: human periodontal ligament fibroblast)を使用した。歯周靭帯は歯のセメント質と歯槽骨を繋ぐ結合組織である。歯周靭帯を構成する主な細胞成分である PDLF は歯周組織のリモデリングにおいて、基質の産生や分解などの重要な働きを担う。PDLF の表面抗原も ACL 細胞と非常に似ていることが分かっており¹³⁻¹⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾(表 1-1)、両者の違いについては詳細な報告がほとんどされていない。将来の靭帯治療に使用する細胞源として、ACL 細胞が使用出来ない場合には、他の靭帯組織由来の細胞を使用することも想定される。そのため、由来する組織の異なる靭帯細胞の性質についても調査をすることが重要であると考えられる。

表 1-1 ACL 細胞、PDLF、MSC の表面抗原¹³⁻¹⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾

| surface antigen | ACL | PDLF | MSC |
|-----------------|-----|------|-----|
| CD29 | + | + | + |
| CD44 | + | + | + |
| CD73 | + | + | + |
| CD90 | + | + | + |
| CD105 | + | + | + |
| CD166 | + | + | + |
| CD34 | - | - | - |
| CD45 | - | - | - |

+: positive、-: negative

CD29: インテグリン $\beta 1$ 鎖、CD44: ヒアルロン酸レセプター、CD73: 5'-ectonucleotidase、CD90: Thy-1、CD105: Endoglin、CD166: ALCAM (Activated leukocyte cell adhesion molecule)、CD34: 造血幹細胞マーカー (sialomucin ファミリー)、CD45: LCA (Leukocyte common antigen)

1-3-2 細胞接着原理

多細胞生物では、個々の細胞は独立しているのではなく、集まって機能的な単位である組織を形成する。組織の例としては上皮組織 (epithelial tissue) や結合組織 (connective tissue)、筋組織 (muscular tissue) などが挙げられる。

組織中において、細胞は細胞間結合によって細胞同士が結合する場合や、ECM に取り囲まれた状態で存在している。細胞接着には細胞同士の細胞間接着 (Cell-Cell adhesion) と、細胞-ECM 間接着 (Cell-ECM adhesion) がある²¹⁾。

靱帯などの結合組織中に含まれる細胞は、主にECMと結合して存在している。この時、細胞は細胞接着分子 (インテグリンなど) を介してECMと接着することが知られている²²⁾ (図1-6)。

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、細胞とECMの組み合わせに応じて特異的なシグナル伝達を開始される²¹⁾。

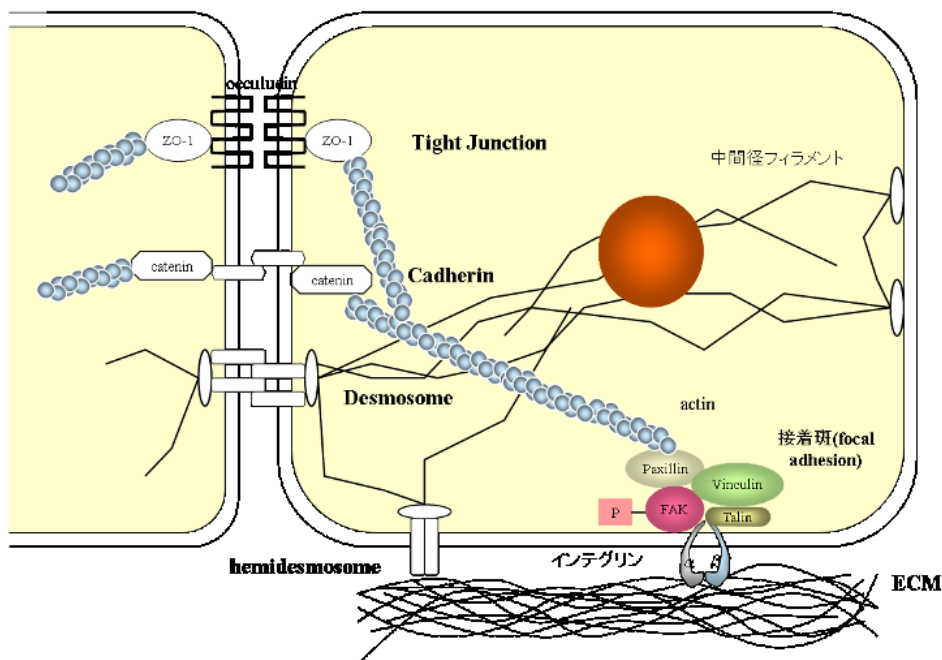


図 1-6 細胞間結合と細胞-ECM 間結合²²⁾

1-3-3 細胞接着分子

前述の通り、生体内の細胞の多くは、ECM あるいは隣接する細胞と接着して様々な組織を形成している。近年、これらの細胞接着には多くのタンパク質が接着分子 (adhesion molecule) として関与している事が明らかとなってきた²³⁾。これらのタンパク質は、細胞膜に存在する膜貫通型の糖タンパク質であり、細胞の外側ではECMや隣接する細胞の接着分子と結合し、細胞質側では様々なタンパク質因子を介して細胞骨格に連結している²¹⁾ (図 1-7)。

接着分子は構造的に数種類のグループに分類され、主なグループにはインテグリンファミリー、カドヘリンファミリー、セレクトリンファミリー、免疫グロブリンスーパーファミリーなどがある²³⁾²⁴⁾。以下に、接着分子の一例を挙げる。

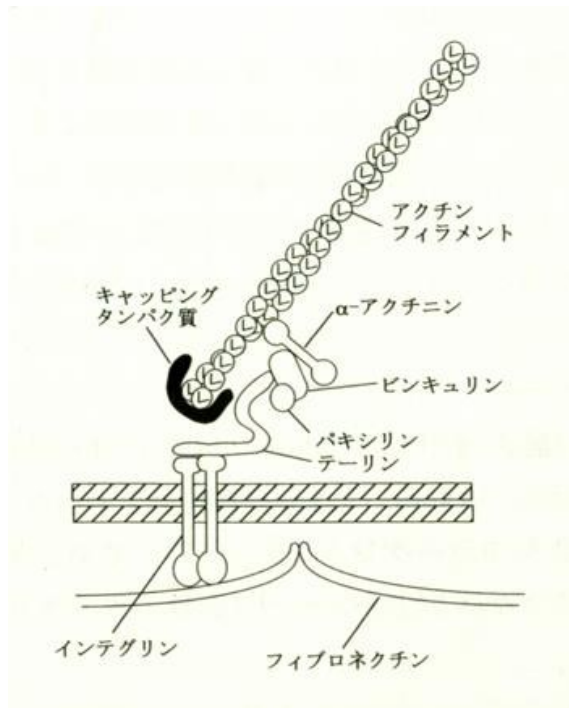


図 1-7 細胞接着分子の連結モデル²¹⁾

・ インテグリン(integrin)

インテグリンは細胞外マトリックスに対する主要な受容体であり、ほぼすべての細胞に発現するが、その種類は細胞種によって異なる。インテグリンはコラーゲンなどの様々な ECM との物理的な結合を媒介するだけでなく、ECM 自体が持つ特有の情報を解読するなど、細胞-ECM間接着において中心的な役割を果たす。その構造は 140 ~200 kDa の α 鎖と、90 ~110 kDa の β 鎖 (例外: β_4 の 180 ~200 kDa) が非共有結合したヘテロダイマーである。 α 鎖には 19 種類、 β 鎖には 8 種類の異なるタイプが見つかったため、組み合わせとして 152 種類のサブユニットが可能となるが、現段階では 24 種類しか同定されていない²⁵⁾²⁶⁾ (表 1-2)。

インテグリンは、細胞外部分でフィブロネクチンやコラーゲンなどの ECM と結合し、細胞質部分でタリン、ビンキュリン、 α -アクチニンを介して細胞骨格に連結することで、細胞形態の維持や細胞増殖などの情報を細胞内へと伝達している²³⁾ (図 1-8)。インテグリンからのシグナル伝達は、それ自身が単独で働くものではなく、複数の因子が複雑に働いているので、インテグリンを介するシグナル伝達経路は未解決の部分が多い。

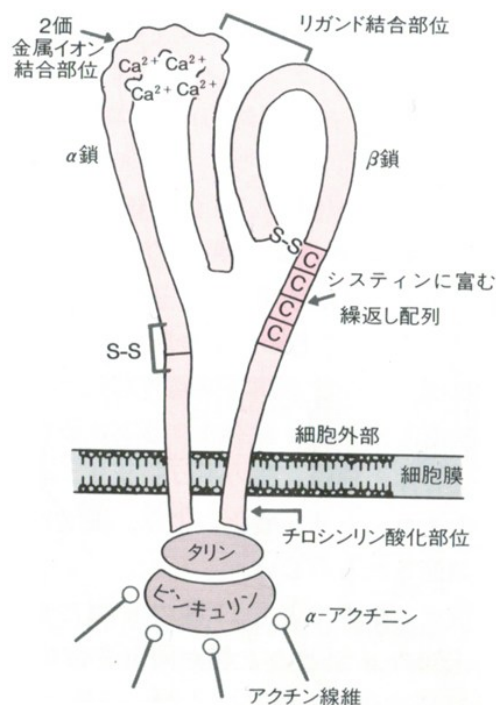


図 1-8 インテグリンの基本構造²³⁾

表 1-2 インテグリン一覧²⁵⁾

| インテグリン(別名) | 結合する接着分子 |
|-------------------------------------|------------------------|
| $\alpha 1\beta 1$ (VLA-1) | コラーゲン、ラミニン-1 |
| $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) | コラーゲン、ラミニン-1 |
| $\alpha 3\beta 1$ (VLA-3) | ラミニン-5 |
| $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) | VCAM-1、FN、TSP、MAdCAM-1 |
| $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) | FN |
| $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6) | ラミニン-1,2,3,5 |
| $\alpha 7\beta 1$ | ラミニン-1 |
| $\alpha 8\beta 1$ | FN、VN、テネイシン-C |
| $\alpha 9\beta 1$ | テネイシン-C |
| $\alpha V\beta 1$ | FN、VN |
| $\alpha L\beta 2$ (LFA-1) | ICAM-1 |
| $\alpha M\beta 2$ (Mac-1) | Fbg、ICAM-1 |
| $\alpha X\beta 2$ (p150/95) | Fbg |
| $\alpha D\beta 2$ | ICAM-1 |
| $\alpha II b\beta 3$ (GP II b/IIIa) | Fbg、FN、vWF、VN |
| $\alpha V\beta 3$ (VNR) | VN、Fbg、vWF、TSP、FN、OPN |
| $\alpha 6\beta 4$ | ラミニン-5 |
| $\alpha V\beta 5$ | VN |
| $\alpha V\beta 6$ | FN、テネイシン-C |
| $\alpha 4\beta 7$ (LPAM-1) | MAdCAM-1、VCAM-1 |
| $\alpha E\beta 7$ | E-カドヘリン |
| $\alpha V\beta 8$ | VN、ラミニン-1、コラーゲン |

FN:フィブロネクチン、VN:ビトロネクチン、TSP:トロンボスポンジン、OPN:オステオポンチン、Fbg:フィブリノーゲン、vWF:フォンビルブランド因子、VCAM-1:vascular cell adhesion molecule-1、ICAM-1:intercellular adhesion molecule-1、MAdCAM-1:mucosal adressin cell adhesion molecule-1

・ エラスチンレセプター (elastin receptor)

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靭帯細胞以外にも、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞、白血球、単球、リンパ球などが知られている。エラスチンレセプター複合体は、実際にエラスチンと結合する 67 kDa のエラスチン結合タンパク質 (EBP: elastin-binding protein)、61 kDa のノイラミニダーゼ-1 (Neu-1: neuraminidase-1)、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²⁷⁻²⁹⁾ (図 1-9)。Neu-1 と PPCA は膜貫通型である。また、EBP はエラスチン結合部位以外にレクチン結合部位を有しているため、ラクトースやコンドロイチン硫酸またはデルマトラン硫酸のようなグリコサミノグリカンなどのガラクトシドと結合することができる²⁷⁾。さらに、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ことから、エラスチン-ラミニンレセプターと呼ばれることがある。

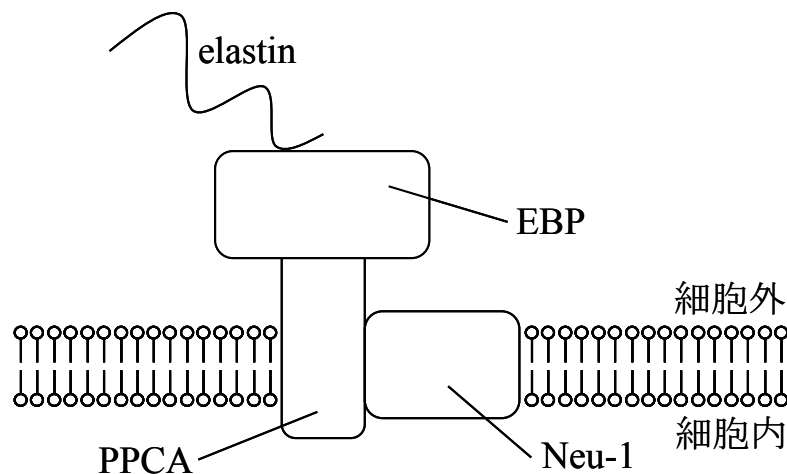


図 1-9 エラスチンレセプターの概略図²⁷⁾

1-3-4 力学的刺激・機械受容体

生体内で生じる力学的刺激には、「ずり応力」、「伸展」、「圧縮」など多くの種類がある。また、前十字靭帯には伸展刺激に加えて、膝の屈曲に応じて最大で90度にもなる「ねじれ刺激」が生じることが報告されている⁷⁾。このように、生体内では複数の力学的刺激が周期的・持続的・ランダムなど、複雑な形で細胞や組織に負荷されている³⁰⁾。従って、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「力学的刺激」が持つ影響を解明することが重要となる。しかし、力学的刺激に対する細胞応答に関する分子機構はほとんど解明されていないのが現状である。

・ 機械受容体 (SAチャネル)

近年、多くの細胞から力学的刺激に応答するイオンチャネルが見つかった。このイオンチャネルは細胞膜の伸展により活性化することから、SAチャネル (Stretch Activated Channel) と呼ばれており、機械受容体として注目されている³¹⁾。

一般にSAチャネルは、細胞膜の伸展度に応じて活性化する。しかし、細胞膜の伸展によって逆に不活性化するものや、細胞膜の凹み刺激にだけ応答を示すものも見つかっている³¹⁾。つまりSAチャネルには、単に細胞膜の伸展のみを感知するのではなく、細胞膜の変形を感知するものが存在すると考えられる。

細胞に伸展刺激を与えると細胞増殖が促進する報告がある。この時、SAチャネルを介して細胞内外でカルシウムイオンの移動が起こり、細胞内カルシウム濃度が上昇することが分かっている³⁰⁾。つまり、SAチャネルを介した細胞内カルシウム濃度の上昇をきっかけとして、シグナル伝達因子が活性化された結果、タンパク質合成や細胞増殖が制御される機構が推測される。

1-4 細胞外マトリックス(ECM:extra cellular matrix)

人間の体は約 60 兆個もの細胞から構成されているが、身体を構成しているのは細胞だけではない。多細胞生物においては、組織中の細胞と細胞の間、あるいは細胞集団と細胞集団の間隙を埋める物質が必要となる。このような物質を ECM と呼び、細胞の外側で細胞同士の接着、引張り、圧縮などの外圧に対抗するための強度を持っている。ECM は細胞が存在する場所には必ず存在しているため、全身のあらゆる臓器に存在しており、臓器の支持や、境界をつくる役割をしている。その他の働きとして、ECM が細胞の生存環境を形成することから、細胞の移動、接着、分化、増殖にも関与するとされており、近年では細胞機能制御因子としての ECM の働きが注目されている。

ECM の主要成分には、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン等の線維状タンパク質や糖タンパク質が挙げられるが、組織によって組成やその種類は極めて多様性に富むということが知られている³²⁾。

1-4-1 コラーゲン(Collagen)

コラーゲンはタンパク質の一種であり、骨、関節、腱などの組織に多く存在しており、主に組織の力学的な強度を担っている。また、コラーゲンは約十萬種ある生体内のタンパク質のうち約 30 % (重量比) を占めており、生体を構成するタンパク質の中で最も多い。

コラーゲンの役割としては、体全体や臓器等を形成し、これらを支持・結合し、境界を作るといったことが挙げられる。また、細胞の足場としても働く。この足場としてのコラーゲンの存在により細胞は分裂や増殖をすることが可能となる。

コラーゲンのペプチド鎖を構成するアミノ酸の配列は、GPHyp (G:グリシン-P:プロリン-Hyp:ヒドロキシプロリン) と、グリシンが 3 残基ごとに繰り返す一次構造である。また、分子量 10 万程度の、1 本のペプチド鎖はトロポコラーゲンと呼ばれ、30 種類以上存在するとされるコラーゲンのうち、多くの型のコラーゲンは、トロポコラーゲンが 3 本集まり、らせん構造を形成している(コラーゲン分子)。さらにこのコラーゲン分子同士が架橋構造を形成して結びつき、結合強度を高めている(図 1-10)。

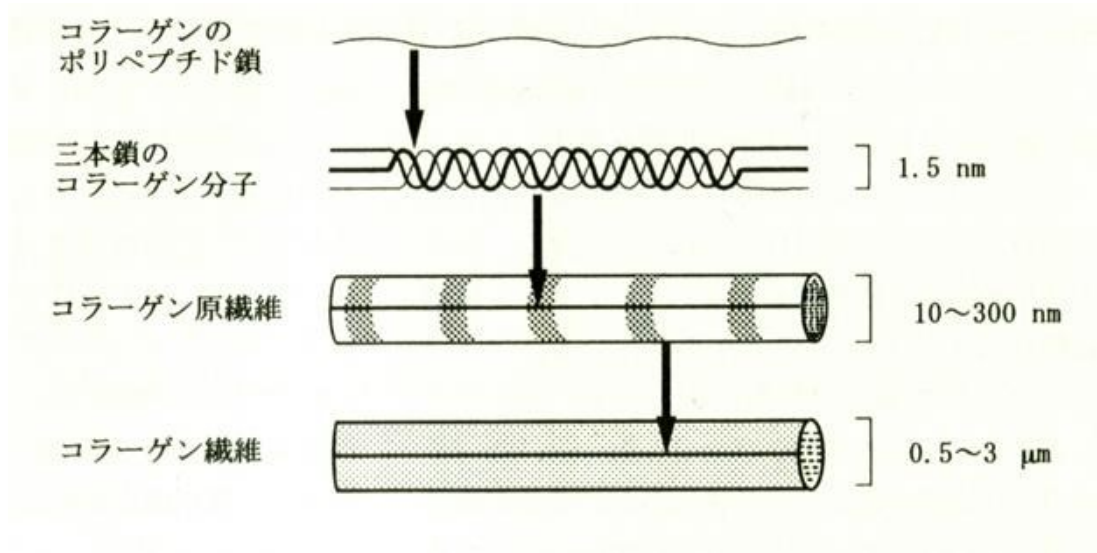


図 1-10 コラーゲンの構造²¹⁾

1-4-2 エラスチン(Elastin)

エラスチン(図 1-11)は分子量が約 67 kDa 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。コラーゲンが組織に強度や張力を与えるのに対し、エラスチンは組織に伸縮性や弾性を与える繊維状タンパク質で、生体を構成する ECM の中で、コラーゲンに次いで多い³²⁾。特に大動脈、靭帯、肺、皮膚などの伸縮性や弾性を伴う組織に多く見られ、その組織中の細胞(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²⁷⁾。細胞外へ産生されたトロポエラスチンは分子中に含まれるリシン側鎖に銅イオンとリシルオキシダーゼが働き、生体内架橋反応を経て不溶性のエラスチンとして形成される。架橋構造は、トロポエラスチン分子間の4つのリシン側鎖から導かれた4級ピリジニウム環を含むデスモシン、イソデスモシンと呼ばれる特徴的なもので(図 1-12)、この架橋の存在により、エラスチンは弾性に富んでいる。また、生体内のエラスチンが不溶性となるのもこの架橋構造を有するためである²⁷⁾³³⁾

また、エラスチン分子中には VGVAPG (Val:バリン-Gly:グリシン-Val:バリン-Ala:アラニン-Pro:プロリン-Gly:グリシン)という特徴的なアミノ酸配列があり、この配列を細胞が認識するため、細胞の接着領域となる²⁷⁾²⁸⁾(図 1-13)。

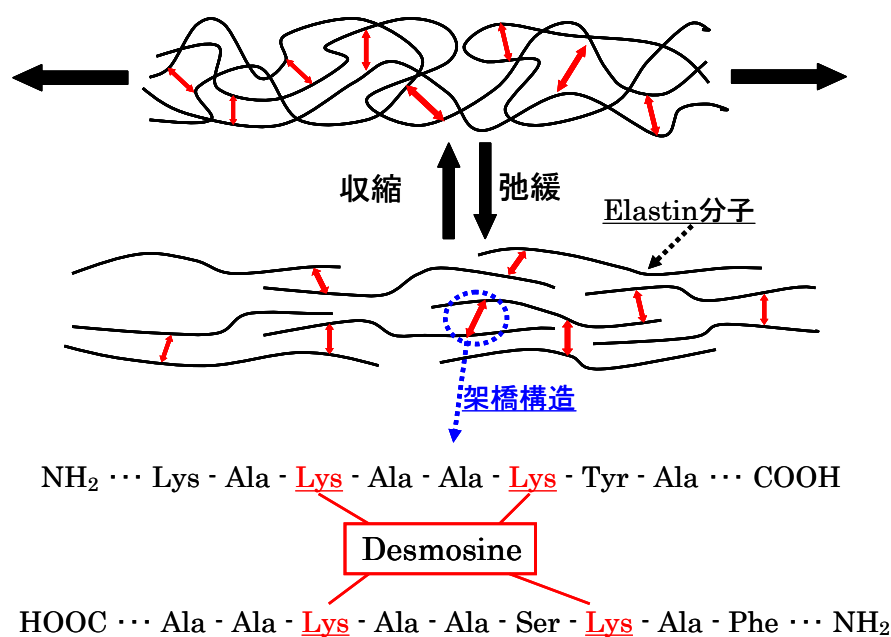


図 1-11 エラスチンの構造

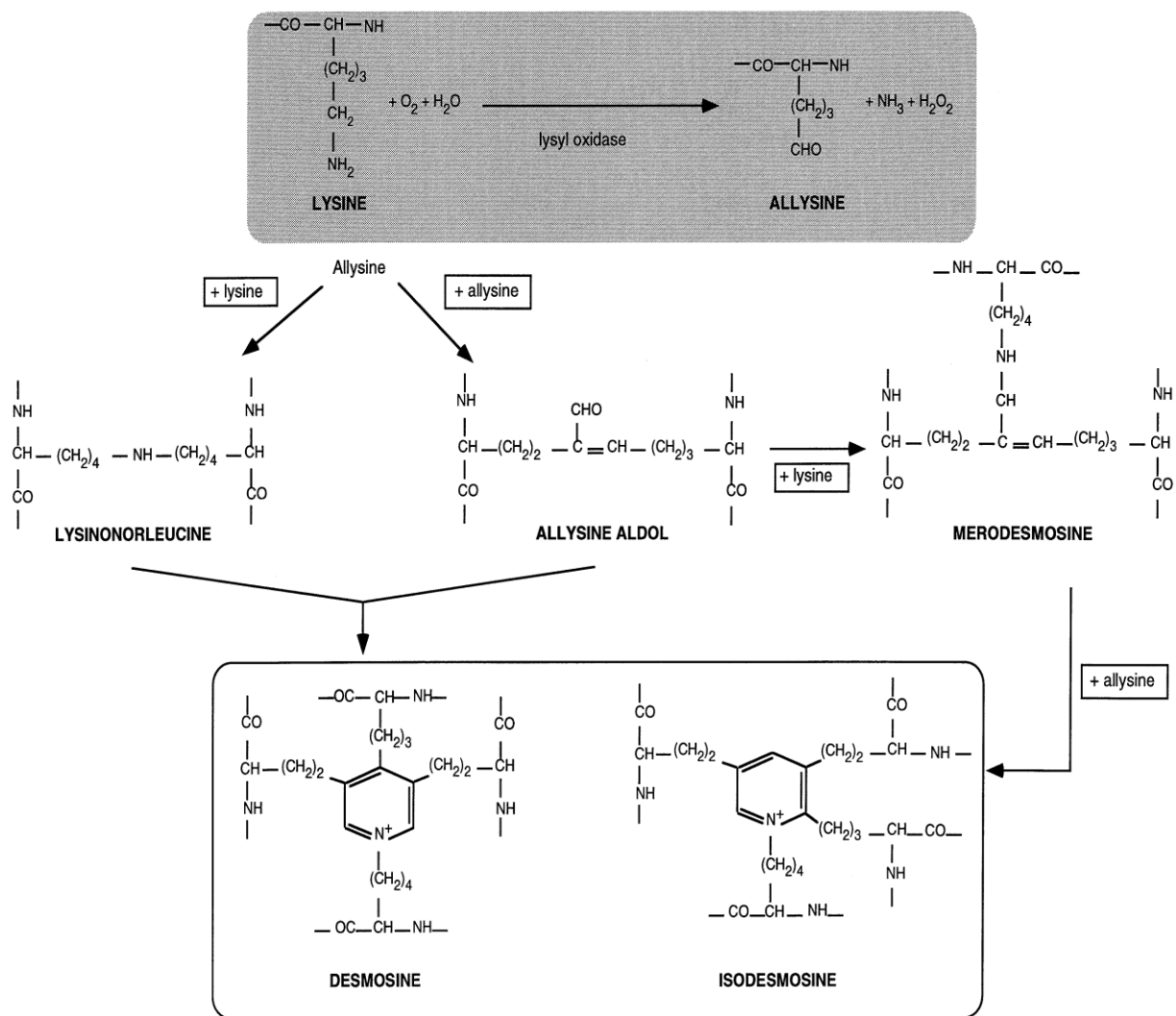


図 1-12 エラスチン架橋(デスモシン、イソデスモシン)の形成機構³³⁾

```

MAGLTAAAPR PGLVLLLLLSI LHPSRPGGVP GAIPGGVPGG 40
VFYPGAGLGA LGGGALGPGG KPLKVPGGGL AGAGLGAGLG 80
AFPAVTFPGA LVPGGVADAA AAYKAAKAGA GLGGVPGVGG 120
LGVSAGAVVP QPGAGVKPKG VPGVGLPGVY PGGVLPGARF 160
PGVGVLPGVPTGAGVKPKAP GVGGAFAAGIP GVGPFGGPQP 200
GVPLGYPIKA PKLPGGYGLP YTTGKLPYGY GPGGVAGAAG 240
KAGYPTGTGV GPQAAAAAAAA KAAAKFGAGA AGVLPGVGGA 280
GVPGVPGAIP GIGGIAGVGT PAAAAAAAAA AKAAKYGAAA 320
GLVPGGPGFG PGVVGVPAGAG VPGVGVPGAG IPVVPAGAGIP 360
GAAVPGVVSP EAAAKAAKA AKYGARPGVG VGGIPTYGVG 400
AGGFPGFGVG VGGIPGVAGV PSVGGVPGVG GVPGVGISPE 440
AQAAAAKAA KYGAAGAGVL GGLVPGPQAA VPGVPGTGGV 480
PGVGTAAAA AKAAKAAQF GLVPGVGVAP GVGVAPGVGV 520
APGVGLAPGV GVAPGVGVAP GVGVAPGIGP GGVAAAAKSA 560
AKVAAKAQLR AAAGLGAGIP GLGVGVGVPG LGVGAGVPGL 600
GVGAGVPGFG AGADEGVRRS LSPELREGDP SSSQHLPSTP 640
SSPRVPGALA AAKAAKYGAA VPGVLGGLGA LGGVGIPGGV 680
VGAGPAAAAA AAKAAKAAQ FGLVGAAGLG GLGVGGLGVP 720
GVGGLGGIPP AAAAKAAKYG AAGLGGVLGG AGQFPLGGVA 760
ARPGFGLSPI FPGGACLGKA CGRKRK 786

```

図 1-13 トロポエラスチンのアミノ酸配列²⁷⁾
(黒:疎水性ドメイン、赤:架橋ドメイン、黒二重線:細胞接着領域)

1-5 本研究の目的

本研究では、細胞と細胞足場 (ECM) の関係に着目した組織工学的な人工靭帯を作製することを目指し、そのための基礎的研究を行なった。

現在までの実験では、ECM をコーティングしたシャーレ上で靭帯細胞の培養を行なってきた。しかし、靭帯組織内のエラスチンやコラーゲンは線維として存在しており、シャーレを用いた平面培養とは形状が大きく異なる。そこで本研究では、靭帯組織を模倣した繊維状の ECM ファイバー足場を作製し、その上で細胞を培養することで、より生体内環境に近い条件で実験を行なった。

組織工学的な人工靭帯を作製するにあたり、以下の問題が挙げられる。

- (1) 靭帯を構成する ECM が靭帯細胞に与える影響が不明。
- (2) 靭帯に特徴的に見られる「ねじれ運動」が細胞に与える影響が不明。
- (3) 靭帯と骨との接合部分を再現するためには、足場基材末端の骨組織化が重要となるが、靭帯細胞の骨分化における ECM の影響が不明。
- (4) 力学的刺激 (遠心培養、加圧培養) により、骨形成に関連する遺伝子の発現が増加するという報告³⁴⁾があるものの、その詳細が不明。
- (5) 生体内では単独の力学的刺激が生じるのではなく、複数の刺激が同時に生じているが、そのような環境下での細胞応答が不明。
- (6) 由来する組織の違いによる靭帯細胞の応答性の違いが不明。

以上の問題点を踏まえて、本研究の目的を以下に示す。

- ① 靭帯を構成する ECM (エラスチン、コラーゲン) が靭帯細胞に与える影響を明らかにする。
- ② 力学的刺激 (「加圧刺激」、「ねじれ刺激」、「加圧+ねじれ刺激」) が靭帯細胞に与える影響を明らかにする。
- ③ 異なる組織由来の細胞 (ACL 細胞、PDLF) の、ECM に対する細胞応答の比較を行なう。

2 方法

Materials and Methods

2 方法

この章では、走査型電子顕微鏡と免疫蛍光染色法によるヒト前十字靭帯の観察、弾性率測定、水溶性エラスチンの抽出、ECM 添加実験、ECM ファイバー作製、動的培養実験（「加圧」、「ねじれ」、「加圧+ねじれ」）に関する方法を述べる。詳細な実験手順は 8 章付録に掲載した。

2-1 前十字靭帯組織の基本性質の調査

2-1-1 走査型電子顕微鏡 (SEM) によるヒト前十字靭帯の観察

三重大学医学部倫理委員会による承認のもと提供を受けたヒト ACL を使用した（変形性膝関節症もしくは関節リウマチ患者 11 名より摘出）。付着した他の組織を切除した ACL を、2.5 % グルタルアルデヒド/りん酸緩衝液 (PB: phosphate buffer, pH 7.4) で 2 h 固定した。PB にて洗浄後、エタノールで段階的脱水を行ない、99 % t-ブチルアルコール中で 30 分間置換した。その後、凍結乾燥を行なった。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ない、SEM (scanning electron microscope) で観察した。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-1 参照)

2-1-2 免疫蛍光染色によるヒト前十字靭帯組織の組成調査

ACL をプラスチック製の包埋皿 (Tissue Tek 社) に入れ O.C.T. Compound (Tissue Tek 社) で組織の包埋を行なった。包埋した組織を -80 °C で凍結した後、クライオスタット (MICROM 社) を用いて厚さ 7 μm の凍結切片を作製した。

作製した凍結切片を、PBS (phosphate buffered saline) で洗浄し、-20 °C acetone/ methanol (1:1) にて 10 分間固定した。固定液を除いて 10 分間風乾した。乾燥後、1 % BSA/ PBS で 20 分間ブロッキングし、一次抗体 (anti-type I collagen antibody、anti-type III collagen antibody、anti-tropoelastin antibody) を添加し 4 °C の飽和湿度条件下で一晩静置した。PBS にて十分に洗浄した後、二次抗体 (DyLight 649 標識) を添加し、室温で 90 分間静置した。その後、PBS にて十分に洗浄を行ない、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。(※操作法の詳細は付録 8-3 参照)

2-1-3 前十字靭帯組織内細胞の遺伝子発現の定量

ACL 組織内の細胞が発現する遺伝子発現量を定量した。

ACL に付着した余分な組織を切除した後、RNA iso plus (TaKaRa 社) を用いて組織中から total RNA を抽出した。抽出した RNA をサンプルとして、RT-PCR 法およびアガロース電気泳動法にて遺伝子発現を定量した。靭帯組織関連遺伝子として、靭帯の主要成分である type I collagen と type III collagen、結合組織(靭帯)マーカーである tenomodulin の三種類の遺伝子発現に加え、骨形成マーカーである alkaline phosphatase (ALP) の発現量を定量した。尚、各遺伝子の発現は GAPDH (内部標準) の発現量で規格化した。各遺伝子の PCR サイクル数を表 2-1 に示した。同様の操作を、骨組織および ACL と骨組織との接合部分の組織についても行った。(※操作法の詳細は付録 8-4 参照)

表 2-1 PCR primer の一覧

| Gene | sequence (5'-3') | annealing temperature (°C) | amplification cycle number |
|-------------------|--|----------------------------|----------------------------|
| GAPDH | sense GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT | 60 | 27 |
| | anti-sense CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC | | |
| ALP | sense TGG AGC TTC AGA AGC TCA ACA CCA | 60 | 32 |
| | anti-sense ATC TCG TTG TCT GAG TAC CAG TCC | | |
| type I collagen | sense TTT GTG GAC CTC CGG CTC | 60 | 28 |
| | anti-sense AAG CAG AGC ACT CGC CCT | | |
| type III collagen | sense AAC GGT CTC AGT GGA GAA CG | 60 | 28 |
| | anti-sense CCA CTC TTG AGT TCA GGA TGG | | |
| tenomodulin | sense CCC AGC AGA AAA GCC TAT TG | 58 | 34 |
| | anti-sense GCG TGA CGG GTC TTC TCT AC | | |

2-1-4 前十字靭帯の弾性率測定

ACL 組織片 (4.1 ± 0.4 mm) の両端を弾性率測定装置に固定し、37 °C の PBS 中で 1 秒間に 0.2 mm ずつ引っ張った。その計測値から応力と歪みを計算し、以下の式で弾性率を求めた。(※操作法の詳細は付録 8-5 参照)

$$\text{弾性率 (Pa)} = (F/A) / \{(I - I_0) / I_0\}$$

F: 張力 (N)、A: サンプル断面積 (mm²)、I₀: サンプル自然長 (mm)、I: 引張後のサンプルの長さ (mm)

2-2 水溶性エラスチンの抽出と分類

2-2-1 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提供を受けたブタ大動脈から、中膜層以外の部分を除去した。その後、細かくミンチにし、エタノールで脱水を行ない乾燥させた。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ない、水溶化処理をした。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なった。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。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-6-1、8-6-2 参照)

2-2-2 水溶性エラスチンの分類(分画エラスチン)

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。本実験ではエラスチン A-E の 5 種類に分画を行なった。

(※分画したエラスチンの分子量及び物性の詳細は付録 8-6-3 参照)

2-3 靱帯細胞の採取と基本性質の調査

2-3-1 靱帯細胞の採取と継代培養

ACL からの細胞単離を移植片培養法にて行なった。まず、提供を受けた ACL に付着した他の組織を取り除き、2-3 mm 程度の大きさに切り分けた。切り分けた ACL 切片を細胞培養シャーレ上に静置し、37 °C/ 5 % CO₂ インキュベータ(池本理化工業)内で 1 h インキュベートした。その後、組織が剥がれないよう慎重に 10 % FBS (fetal bovine serum) 含有 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を添加し、培養を開始した。数日後、組織から細胞が十分に遊出したことが確認出来たら (passage 0 と定義)、トリプシン処理にて細胞を剥離させ、ACL 細胞の継代培養を行なった。

由来する組織が異なる靱帯細胞として、本研究では歯周靱帯由来の細胞を用いた。Lonza 社から購入した正常ヒト歯周靱帯線維芽細胞 (Normal Human Periodontal Ligament Fibroblast: PDLF) を、製品プロトコルに従い、37 °C/ 5 % CO₂ インキュベータ内で培養した。3 日に 1 度培地交換を行ない、sub-confluent (70%~80%) まで細胞が増殖した時点でトリプシン処理にて PDLF を剥離させ、継代培養を行なった。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-7、8-8、8-9 参照)

2-3-2 靱帯細胞の機能評価

・分裂回数測定

ACL 細胞の増殖能を評価するために細胞の分裂回数を測定した。Passage 0 の ACL 細胞を、継代作業により φ35 シャーレに播種した (播種密度: 5,000 cells/ cm²)。5 日間の培養後、再び同じ播種密度で φ35 シャーレに継代作業を行なった。上記の作業を細胞増殖が観察されなくなるまで繰り返し実施した。継代作業毎に細胞分裂回数 (PD: population doubling) を算出し、その累積値を求めた。PD 値は以下の計算式にて算出した。

$$PD = \log_2 (N_c / N_0) \quad N_c: 5 \text{ 日目の細胞数} \quad N_0: \text{始めの細胞数}$$

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-9-2 参照)

・遺伝子発現の定量

Passage 1-10 の ACL 細胞を $\phi 35$ シャーレ上でコンフルエントに達するまで 10 % FBS/ DMEM にて培養した。その後、細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法およびアガロース電気泳動法にて遺伝子発現を定量した。靭帯組織関連遺伝子として、靭帯の主要成分である type I collagen と type III collagen、結合組織(靭帯)マーカーである tenomodulin の三種類の遺伝子発現を定量し、継代数ごとの発現量を比較した。尚、各遺伝子の発現は GAPDH(内部標準)の発現量で規格化した。PCR サイクル数は表 2-1 に従った。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-4 参照)

・ACL 細胞と PDLF の遺伝子発現量の比較

安定して細胞を得ることが可能な Passage 4-6 の ACL 細胞と PDLF を用いて、前述の方法で靭帯関連遺伝子発現をそれぞれ RT-PCR 法とアガロース電気泳動法により定量し、両者の結果を比較した。PCR サイクル数は表 2-1 に従った。(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-4 参照)

・ACL 細胞と PDLF の alkaline phosphatase (ALP) 活性の比較

骨形成マーカーである ALP 活性を定量した。

ALP 活性は、p-ニトロフェニルりん酸基質法によるアルカリフォスファターゼ活性測定キット(和光純薬工業株式会社)により定量した。簡単な実験方法を以下に示す。

Passage 4-6 の靭帯細胞をコンフルエントに達するまで培養した後、細胞溶解液(0.1% TritonX-100, 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.2)を用いて細胞を溶解した。その後 15,000 rpm、4 °C で 30 分間遠心分離し、上澄み液をタンパク溶液とした。

測定キットを使用して、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、分解産物として生成した p-ニトロフェノールを 405 nm の吸光度で測定することにより、検体中の ALP 活性値(units/ mg protein)を求めた。1 unit を pH 9.8、37 °C で、1 分間に 1 nmol の p-ニトロフェノールを生成する酵素活性として定義し、タンパク質量当たりの酵素活性値に換算して評価した。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-10 参照)

2-4 培地中への ECM 添加が靭帯細胞に与える影響

靭帯を構成する ECM として方法 2-2 で抽出・水溶化したエラスチン A と、同様にブタ血管から抽出した I 型アテロコラーゲンを使用した。

Passage 4-6 の ACL 細胞と PDLF を 5,000 cells/ cm² の密度で φ35 シャーレ上に播種した。細胞増殖培地として 10 % FBS/ DMEM を使用し、コンフルエントに達するまで培養を行なった。その後、ECM 添加培地 (1 % FBS/ DMEM with 1.0 mg/ ml ECM) に交換し、さらに 7 日間もしくは 14 日間の培養を行ない、RT-PCR 法にて靭帯関連遺伝子発現の定量を行なった。尚、血清による影響を低減させるため、FBS 濃度を 1 % とした。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-4、8-11 参照)

2-5 ECM ファイバー足場の作製

2-5-1 エラスチンファイバー足場の作製

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を用いてエラスチン A 足場を作製した。このとき電極を回転させることで、ファイバー足場に配向性を持たせた。(印加電圧 15 kV、注入速度 1.2 ml/hr、注入時間 3000 sec、空隙距離 20 cm、電極 Al、電極直径 12 cm、電極回転速度 0-5500 rpm、面積約 7 cm²)

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-12 参照)

2-5-2 コラーゲンファイバー足場の作製

I 型アテロコラーゲン 200 mg、glycidyl glycerol ether 50 mg を tri 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を用いて配向性を有したコラーゲン足場を作製した。(印加電圧 17 kV、注入速度 1.2 ml/hr、注入時間 2000 sec、空隙距離 20 cm、電極 Al、電極直径 35 cm、面積約 7 cm²)

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-12 参照)

2-5-3 作製した ECM ファイバー足場の弾性率測定

方法 2-1-4 と同様の方法で、ECM ファイバー足場の弾性率を測定した。

2-6 ECM ファイバー足場上での靭帯細胞培養

前準備として、作製した ECM ファイバー足場 (縦 2 cm × 横 2.5 cm × 厚さ 80 μm) に 5.0×10^4 個の靭帯細胞を播種し、10 % FBS/ DMEM で 7 日間培養した。(※操作法の詳細は付録 8-13 参照)

2-6-1 ECM ファイバー足場上細胞の観察

ECM ファイバー足場への靭帯細胞の接着を、免疫蛍光染色及び SEM により観察した。

免疫蛍光染色は以下の方法で行なった。7 日間の細胞培養後に培地を取り除き、PBS でファイバー足場を洗浄した。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ acetone/methanol (1:1) にて室温で 10 分間固定した後、固定液を除いて 10 分間風乾した。乾燥後、1 % BSA/ PBS で 90 分間ブロッキングし、一次抗体として anti-SM α -actin antibody を添加し $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 飽和湿度条件下で一晩静置した。PBS で十分に洗浄した後、二次抗体 (DyLight 649 標識) を添加し室温で 90 分間静置した。その後、PBS で十分に洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

SEM による観察は、7 日間の培養後にグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムによる固定、エタノール脱水、凍結乾燥、金イオンコーティングの操作を経て実施した。(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-1、8-3 参照)

2-6-2 アルカリフォスファターゼ (ALP: alkaline phosphatase) 活性の定量

ECM が靭帯細胞に与える影響の評価として、骨形成マーカーである ALP 活性を、方法 2-3-2 と同様に測定キットを用いて定量した。

ECM ファイバー足場上で靭帯細胞を 7 日間培養した後、細胞からタンパク溶液を作製した。作製したタンパク溶液を用いて、タンパク質量当たりの ALP 活性値 (units/ mg protein) を求めた。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-10 参照)

2-6-3 遺伝子発現の定量

ECM ファイバー足場上で培養した靭帯細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法およびアガロースゲル電気泳動法にて靭帯関連遺伝子 (type I collagen, type III collagen, tenomodulin) の発現を定量した。各遺伝子の発現量は GAPDH の発現量で規格化した。(※操作法の詳細は付録 8-4 参照)

2-7 動的培養が靭帯細胞に与える影響

本研究では靭帯細胞に「圧力刺激」、「ねじれ刺激」、「複合(ねじれ+圧力)刺激」を与えることで、力学的刺激と細胞の相互作用を調査した。前準備として、方法 2-5 で作製した ECM ファイバー足場 (2 cm × 2.5 cm × 80 μm) に 5.0×10^4 個の PDLF (passage 4-6) を播種し、10 % FBS/ DMEM で 7 日間培養した。

・加圧培養

体重を支える膝関節には圧力が生じており、膝の屈曲に応じて関節内靭帯も圧力を受けている。そこで、生体内靭帯に生じる「圧力」が靭帯細胞に与える影響を検証した。

本研究では液体クロマトグラフィー用の送液ポンプ及び圧力センサーを用いた実験装置で、水圧による加圧刺激を靭帯細胞に与えた。加圧条件は 0.8 MPa の加圧刺激を 12 時間与えた。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-14 参照)

・ねじれ型動的培養

靭帯には、関節の動きに応じて「ねじれ」運動が生じる。そこで、「ねじれ」という動きが靭帯細胞に与える影響を検証した。

ECM ファイバー足場上の靭帯細胞に対し、独自開発したねじれ型動的培養装置を用いて力学的刺激を与えた。ねじれ型動的培養の条件は、ねじれ角度: 50°、時間: 12 h、周期: 5 cpm (cycle per minute) で行なった。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-15 参照)

・複合型動的培養

生体内靭帯に加わる刺激は、加圧刺激やねじれ刺激が単独で生じるのではなく、これらの刺激が複雑に組み合わさって起こっている。そこで、本研究では加圧刺激とねじれ刺激を同時に与え、その影響を調査した。

ECM ファイバー足場上の靭帯細胞に対し、以下の条件で実施した。加圧: 0.8 MPa、ねじれ角度: 50°、周期: 5 cpm、時間: 12 h。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-16 参照)

2-7-1 アルカリフォスファターゼ (ALP: alkaline phosphatase) 活性の定量

力学的刺激が靭帯細胞に与える影響の評価として、骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の定量を行なった。

方法 2-3-2、2-6-2 と同様に、ALP 活性はラボアッセイ™ALP (p-ニトロフェニルりん酸基質法によるアルカリフォスファターゼ活性測定キット) を用いて、吸光度測定により定量した。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-10 参照)

2-7-2 遺伝子発現の定量

各種動的培養終了後に RT-PCR 法およびアガロースゲル電気泳動法を用いて靭帯組織関連遺伝子 (type I collagen、type III collagen、tenomodulin) の発現を定量し、静置培養時の結果と比較した。発現量は GAPDH の値で規格化した。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-4 参照)

2-7-3 免疫蛍光染色によるタンパク質発現の確認

複合型動的培養終了後、type III collagen と ALP のタンパク質発現を免疫蛍光染色により定性的に評価した。方法 2-6-1 と同様に抗原抗体反応を利用し、共焦点レーザー顕微鏡で ECM ファイバー足場上細胞が発現するタンパク質の発現を観察した。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-3 参照)

2-8 統計処理

結果は全て、平均値±標準偏差 (SD: standard deviation) で表記した。解析ソフト (StatView version 5.0) を使用し、Tukey-Kramer 法にて統計的有意差検定を行なった。p<0.05 で統計的な有意差ありとした。

3 結果

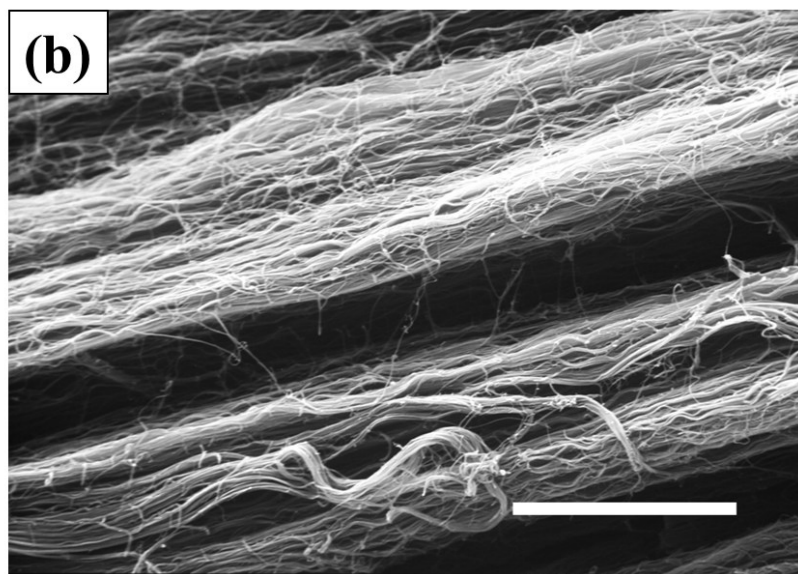
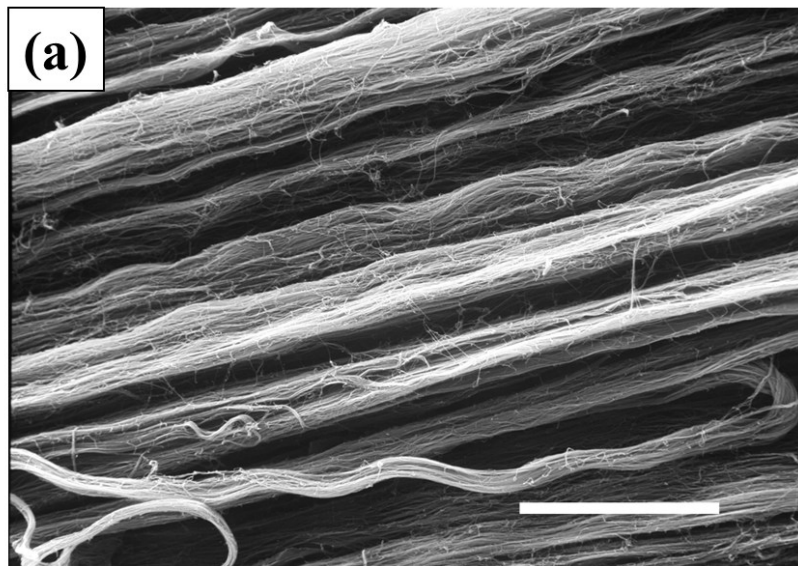
Results

3 結果

3-1 前十字靭帯組織の基本性質の調査

3-1-1 走査型電子顕微鏡(SEM)によるヒト前十字靭帯の観察

走査型電子顕微鏡(SEM)によりヒト前十字靭帯の観察を行なった(図3-1)。その結果、細い線維(直径: $0.12\pm 0.03\ \mu\text{m}$)が集まり、線維束(直径: $58.7\pm 24.2\ \mu\text{m}$)を形成する様子が観察された(図3-1 a,b,c)。



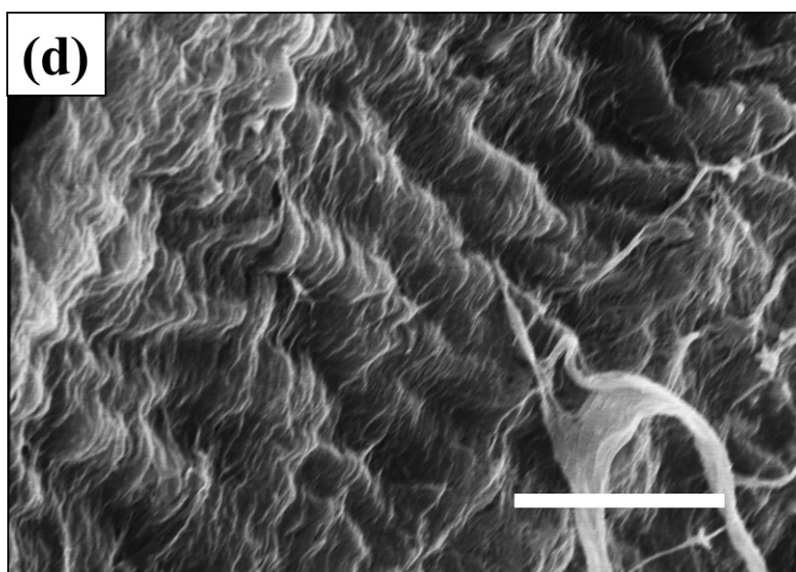
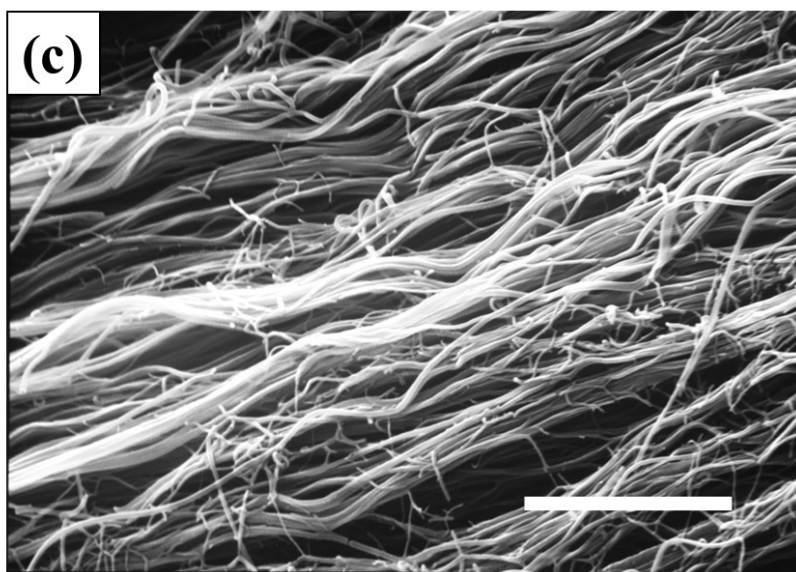


図 3-1 ヒト前十字靭帯（電子顕微鏡写真）
Scale bar : (a) 30 μm 、(b) 10 μm 、(c) 3 μm 、(d) 30 μm

3-1-2 免疫蛍光染色によるヒト前十字靭帯組織の組成調査

まず、組織自身が発する自己蛍光の有無を確認した。その結果、実験に使用した蛍光標識 (DyLight 649) の蛍光波長領域における自己蛍光は観察されなかった (図 3-2)。

各種抗体を使用して免疫蛍光染色を行なった結果、elastin、type I collagen、type III collagen が ACL の組織全体に広く分布することが明らかとなった (図 3-3)。

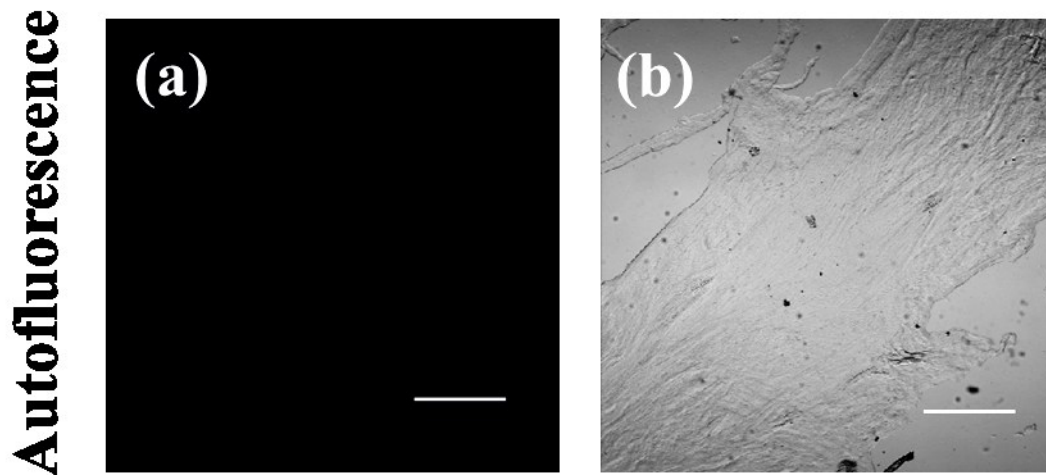


図 3-2 ACL 組織の自己蛍光の確認

(a) 自己蛍光確認写真 (b) ACL の微分干渉顕微鏡写真、scale bar: 250 μm

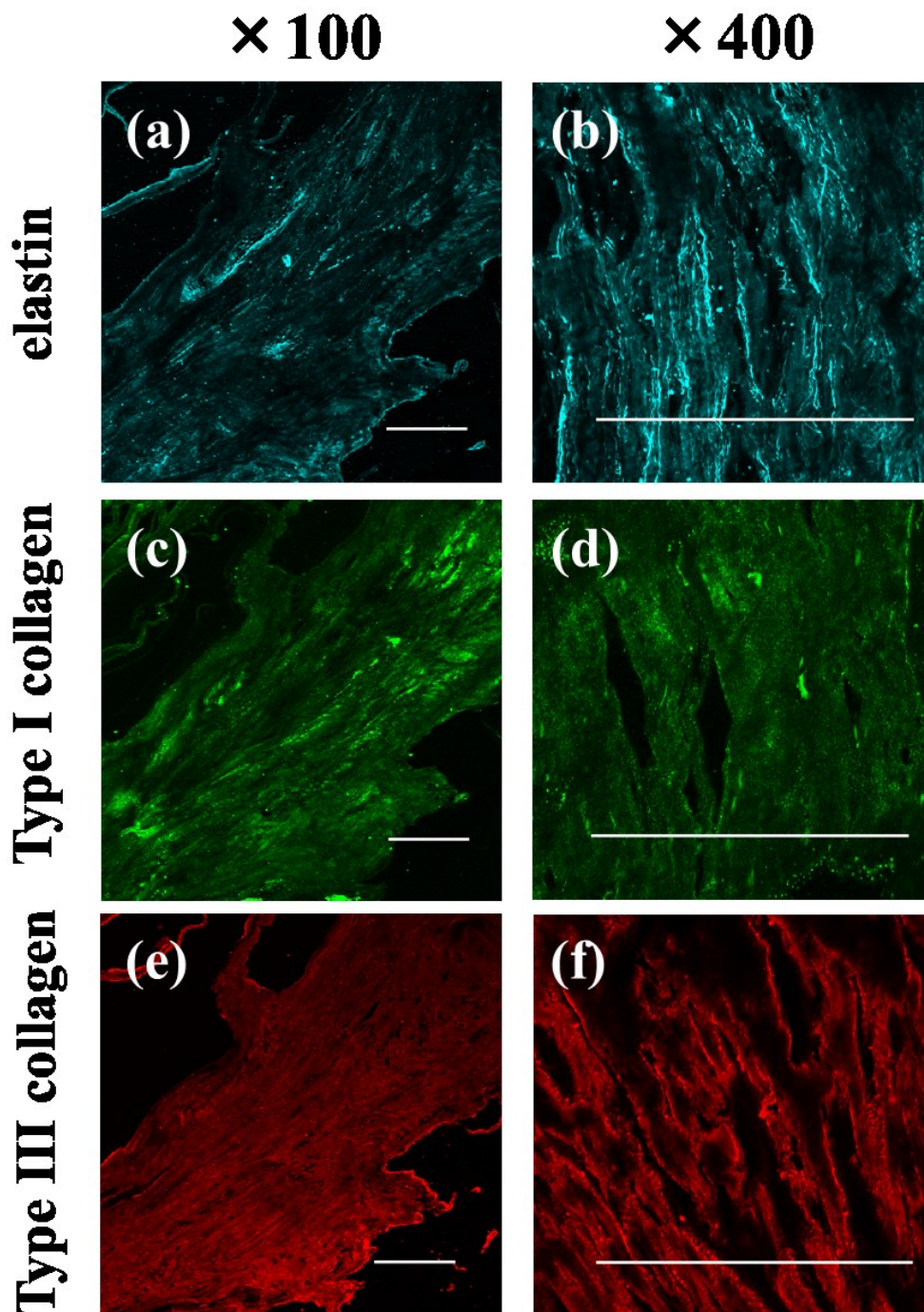
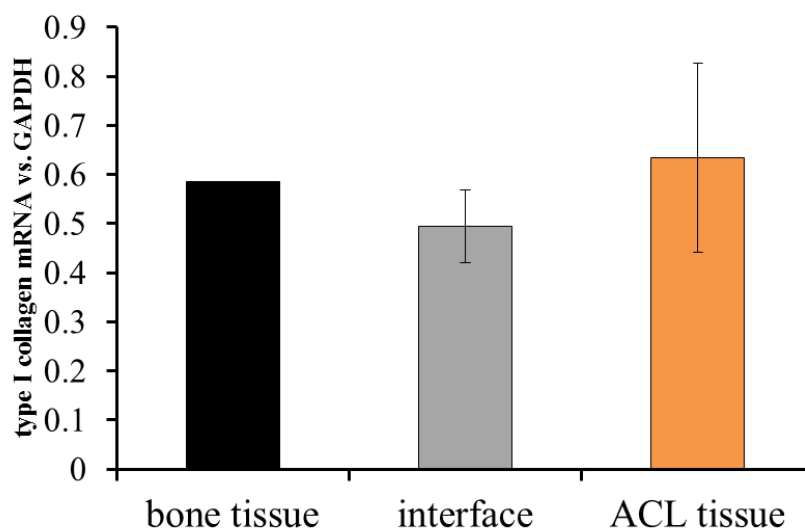


図 3-3 ACL 切片の免疫蛍光染色結果
 (a) (b) tropoelastin 染色結果 (c) (d) type I collagen 染色結果
 (e) (f) type III collagen 染色結果、Scale bar: 250 μ m

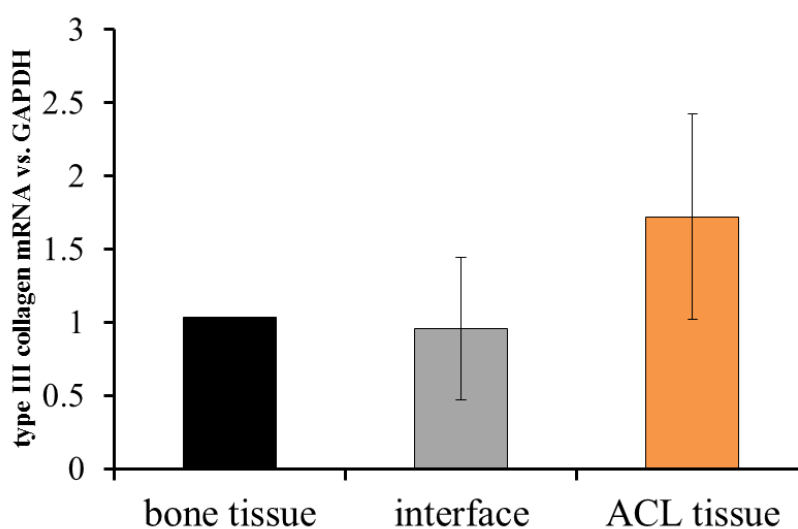
3-1-3 前十字靭帯組織内細胞の遺伝子発現の定量

ACL 組織、骨組織、接合部分の組織より RNA を抽出して、それぞれの遺伝子発現を定量した(図 3-4)。type III collagen と tenomodulin の発現量は骨組織よりも ACL 組織の方が高い傾向にあり、それぞれ 1.7 倍および 4.6 倍高かった(図 3-4 b,c)。また、骨組織における tenomodulin 発現量は三つの領域の中で最も低かった。一方、ALP の発現量は骨組織において最も高く、ACL 組織よりも 5.7 倍高い値を示した。接合部分(interface)の組織は ACL 組織と骨組織の中間の値を示す傾向がみられた。

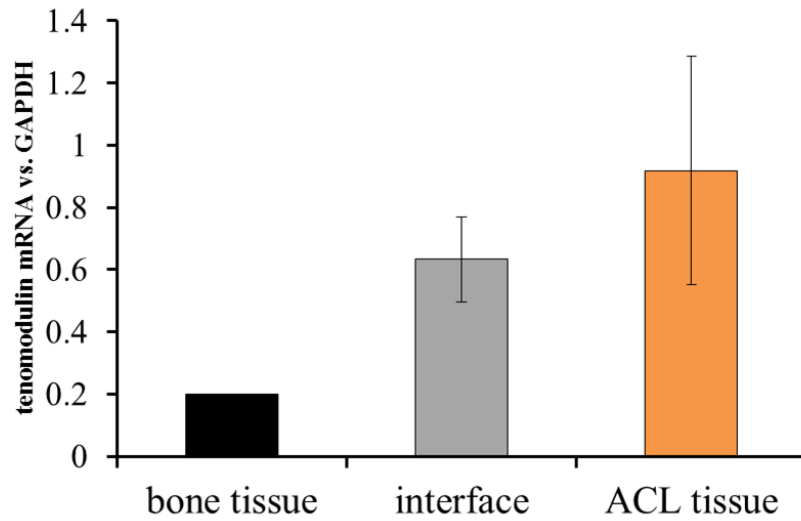
(a) type I collagen



(b) type III collagen



(c) tenomodulin



(d) alkaline phosphatase

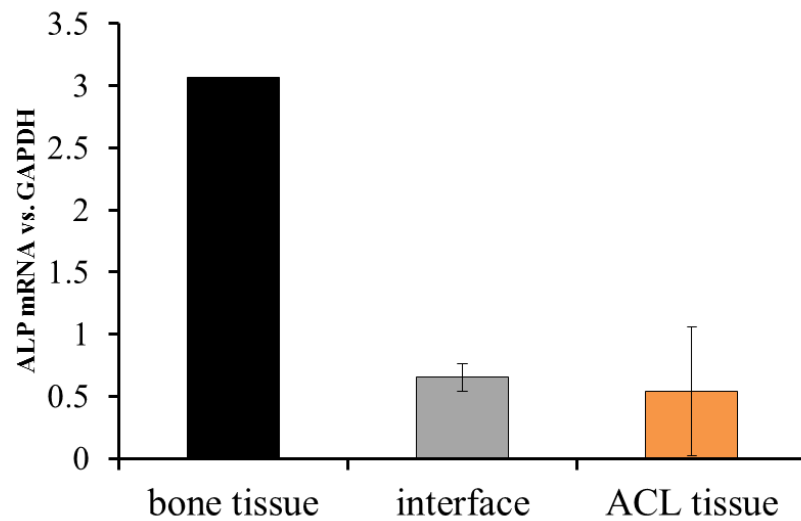


図 3-4 生体組織内の遺伝子発現の定量
Bone tissue: n=2、interface: n=3、ACL tissue: n=4

3-1-4 前十字靱帯の弾性率測定

引張試験を行なった結果、ACLの応力-歪み曲線は二段階に変化する(Jカーブ)ことが分かった(図 3-5)。そのため二つの領域(1)と(2)のそれぞれについて弾性率を算出した。その結果、領域(1)と(2)の弾性率はそれぞれ、0.28 MPaと3.2 MPaであった(図 3-6)。

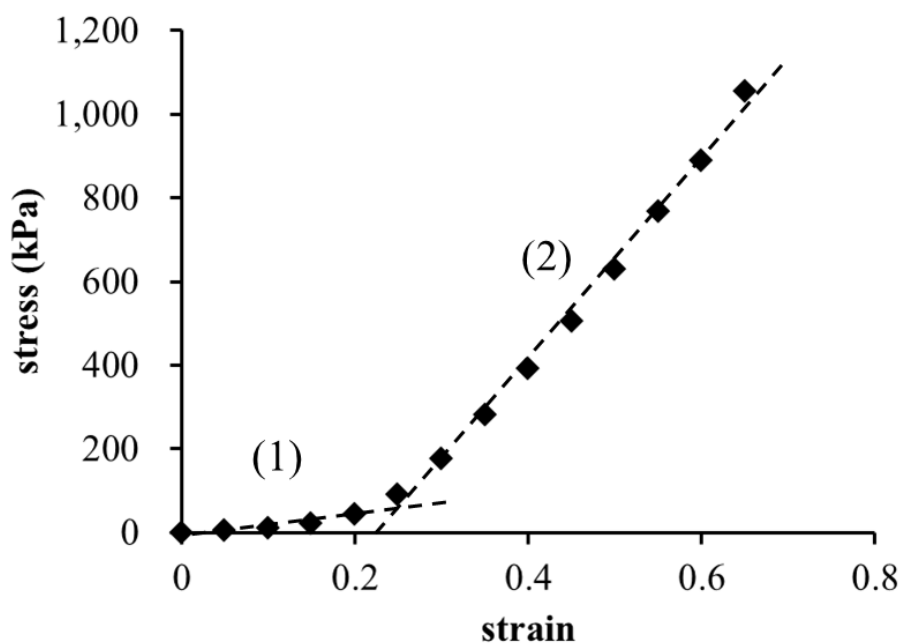


図 3-5 ACLの応力-歪み曲線

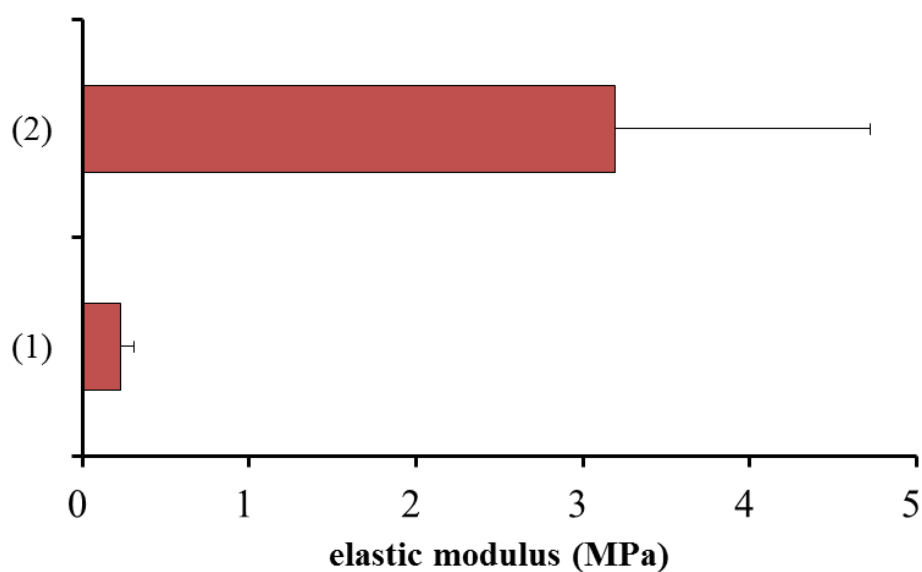


図 3-6 ACLの弾性率 (n=6)

3-2 靱帯細胞の採取と基本性質の調査

3-2-1 前十字靱帯細胞の増殖能、遺伝子発現の調査

ヒト ACL から移植片培養により得られた ACL 細胞は、紡錘状で線維芽様の形態を示した(図 3-7)。単離した ACL 細胞について、増殖能の評価として分裂回数を計測した結果、培養 130 日ほどで細胞増殖が観察されなくなり、その時点での累積分裂回数は約 23 回であった(図 3-8)。

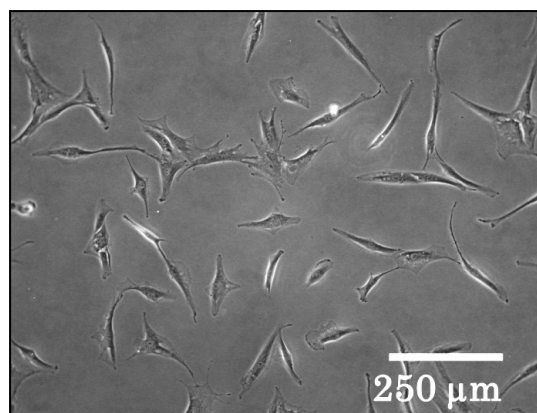


図 3-7 単離した ACL 細胞(位相差顕微鏡観察)

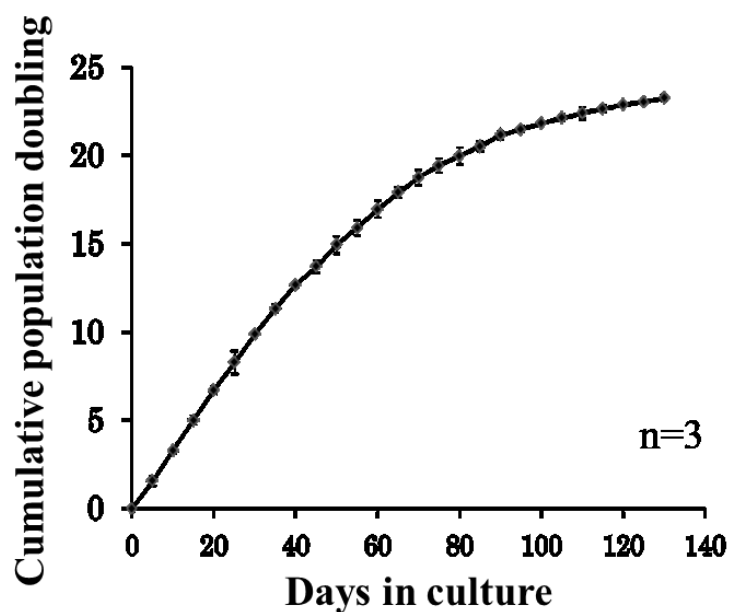
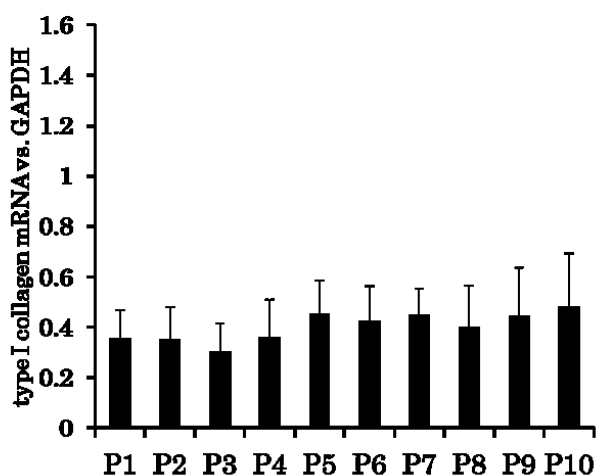


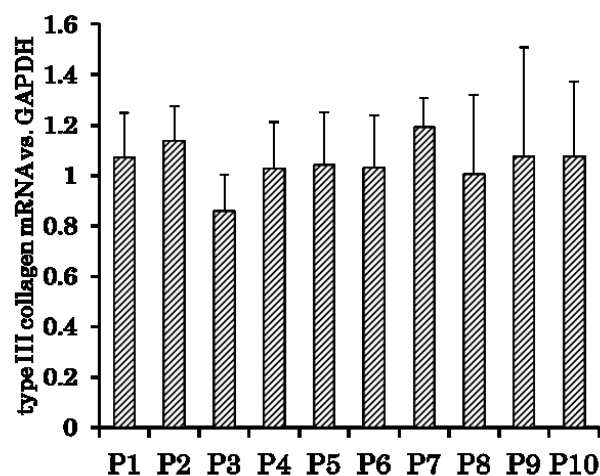
図 3-8 累積細胞分裂回数の測定結果

単離した ACL 細胞を継代培養して得られた passage 1-10 の細胞に対して、靭帯関連遺伝子 (type I and III collagen, tenomodulin) の発現を定量した。その結果、これらの遺伝子発現量は継代数によらずほぼ一定の値を示した (有意差なし、図 3-9)。また、type III collagen の発現量は継代数によらず、type I collagen よりも高い値を示した (有意差あり、 $p < 0.05$) (図 3-9 a, b)。

(a) type I collagen n=3



(b) type III collagen n=3



(c) tenomodulin n=3

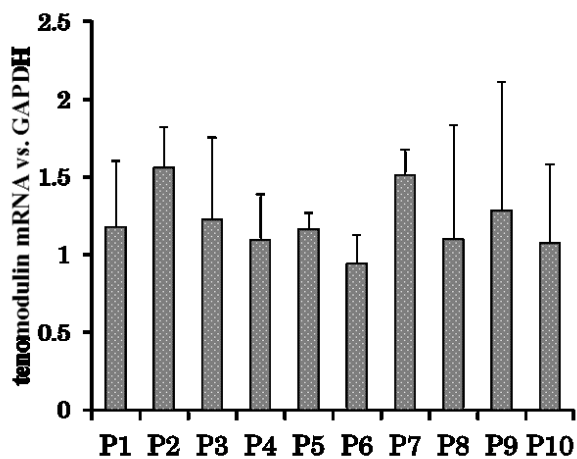


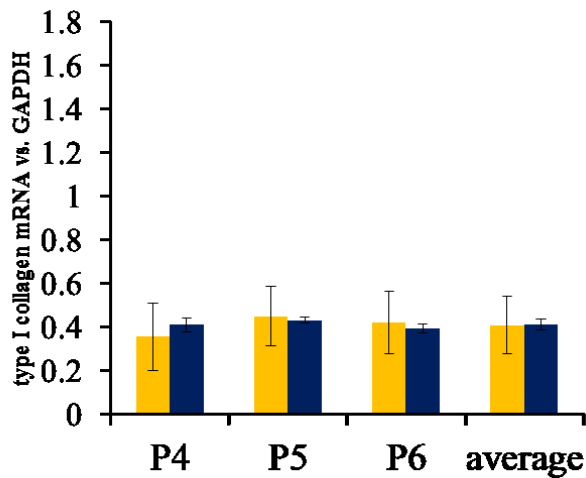
図 3-9 ACL 細胞の靭帯関連遺伝子発現の定量
(a) type I collagen (b) type III collagen (c) tenomodulin, n=3

3-2-2 前十字靭帯細胞と歯周靭帯細胞の比較

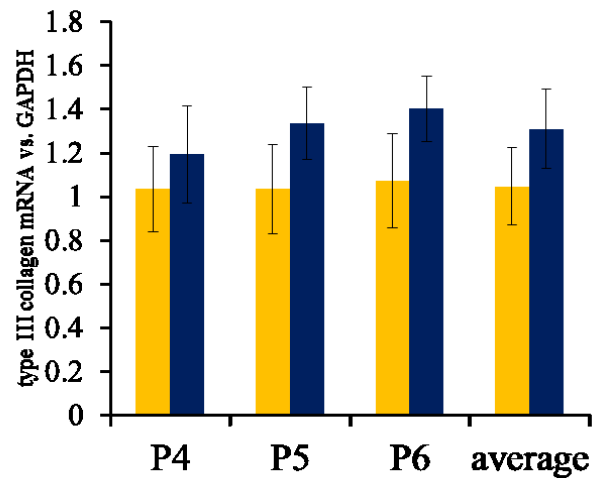
由来する組織が異なる靭帯細胞として、passage 4-6 の ACL 細胞と PDLF を準備して、それぞれの遺伝子発現量を定量した。

その結果、両者の靭帯関連遺伝子の発現量に有意な差は見られなかった(図 3-10)。

(a) type I collagen n=3



(b) type III collagen n=3



(c) tenomodulin n=3

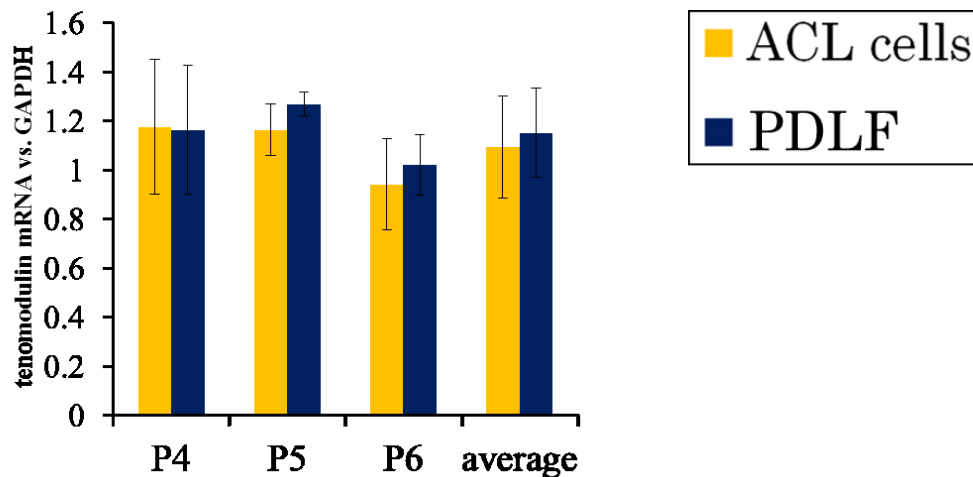


図 3-10 ACL 細胞と PDLF の遺伝子発現量の比較
(a) type I collagen (b) type III collagen (c) tenomodulin, n=3

同様に、passage 4-6 の ACL 細胞と PDLF の ALP 活性値を測定した結果、PDLF の ALP 活性値 (8.9 units/ mg protein) は ACL 細胞の活性値 (4.2 units/ mg protein) よりも 2.1 倍高い値を示した (図 3-11)。

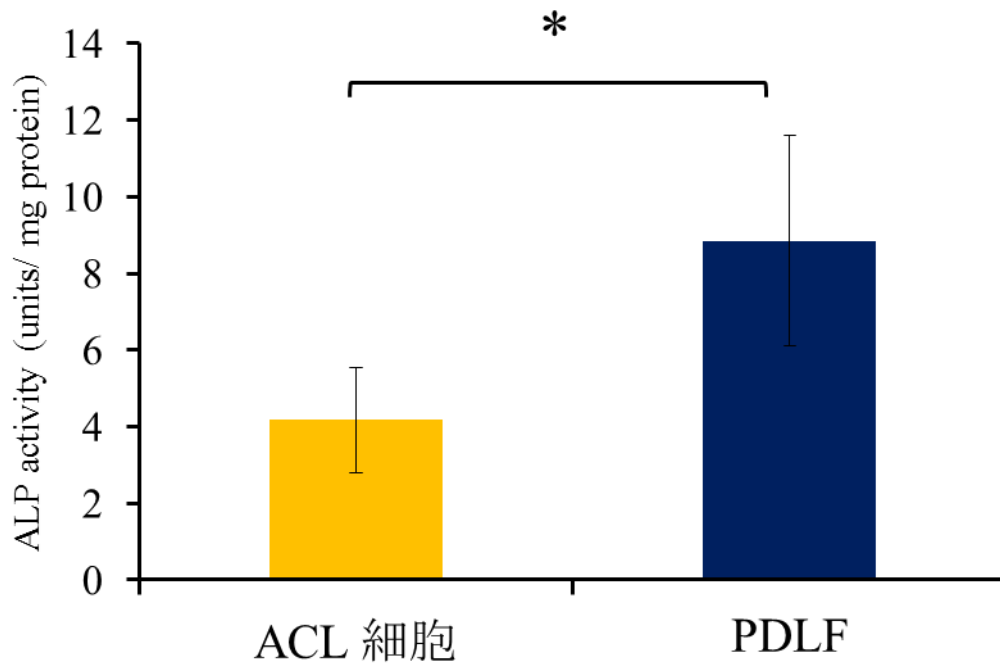


図 3-11 ACL 細胞と PDLF の ALP 活性の比較
ACL 細胞 : n=7、PDLF : n=4、* : p<0.05

3-3 培地中への ECM 添加が靭帯細胞に与える影響

靭帯を構成する ECM として、エラスチン A とコラーゲンを使用し、それぞれを培地中に添加することで靭帯細胞に与える影響を評価した (図 3-12、図 3-13)。

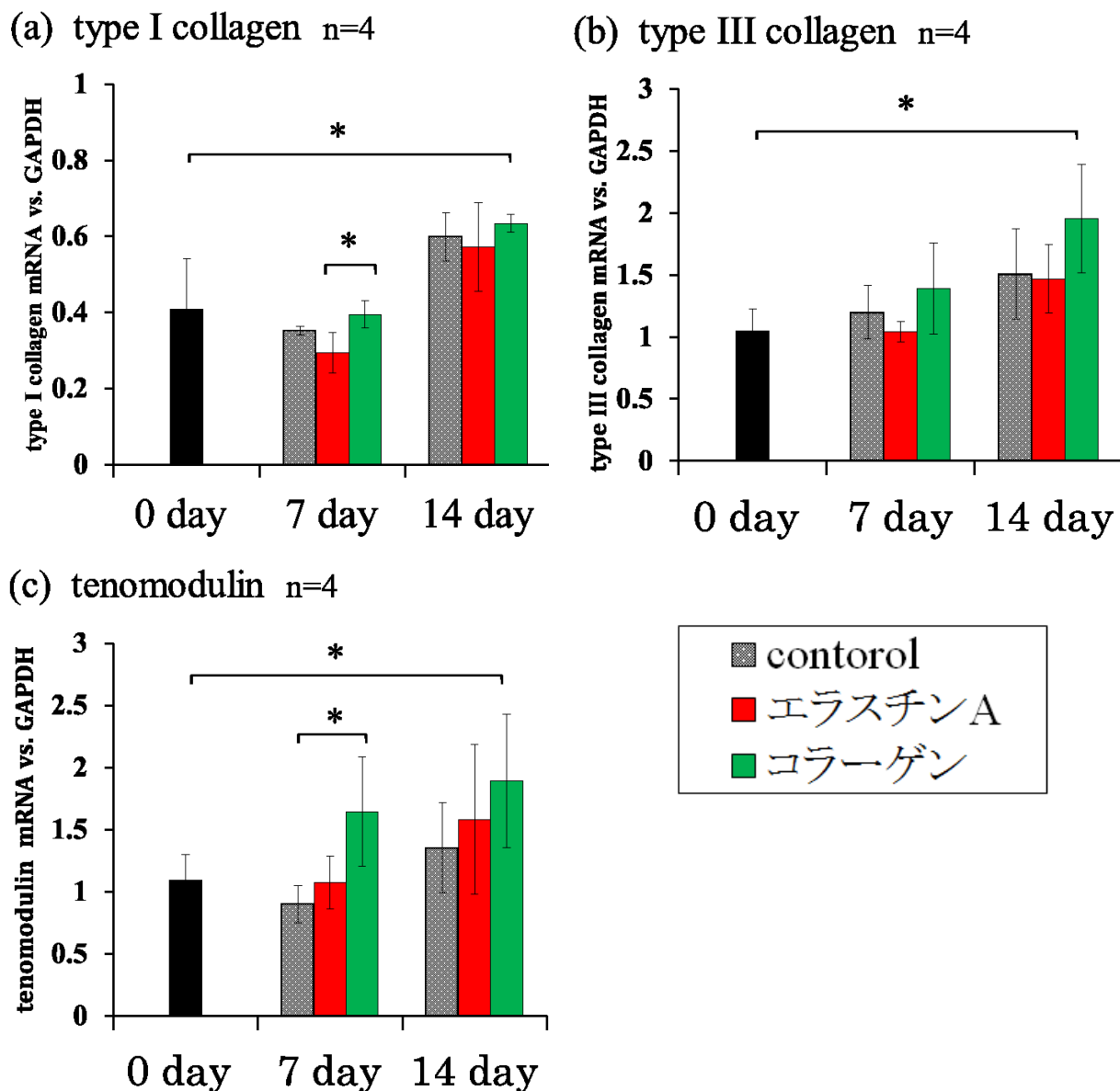
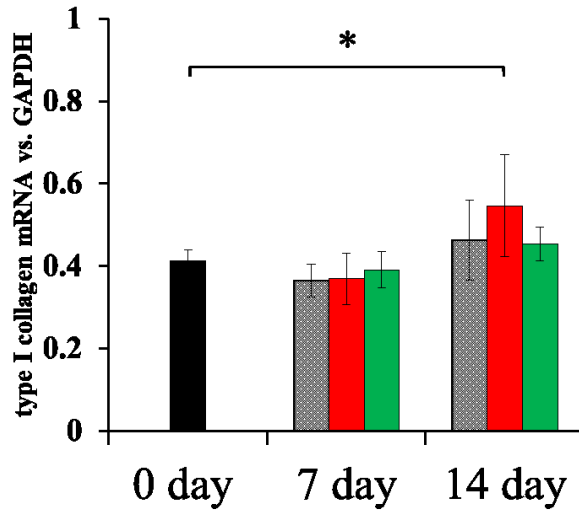


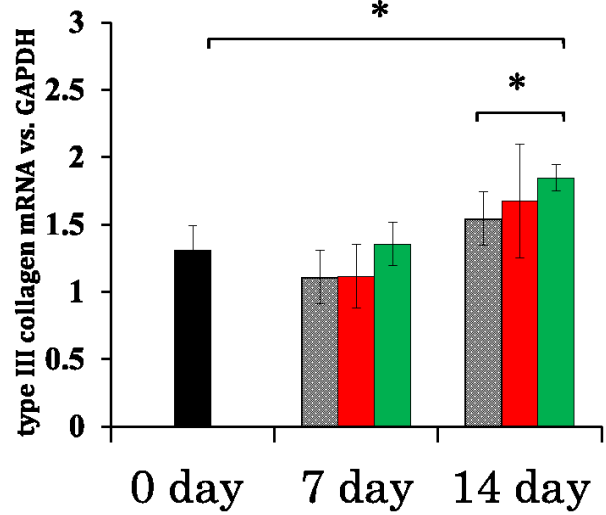
図 3-12 ECM 添加が ACL 細胞に与える影響

(a) type I collagen (b) type III collagen (c) tenomodulin, n=4, *: p<0.05

(a) type I collagen n=4



(b) type III collagen n=4



(c) tenomodulin n=4

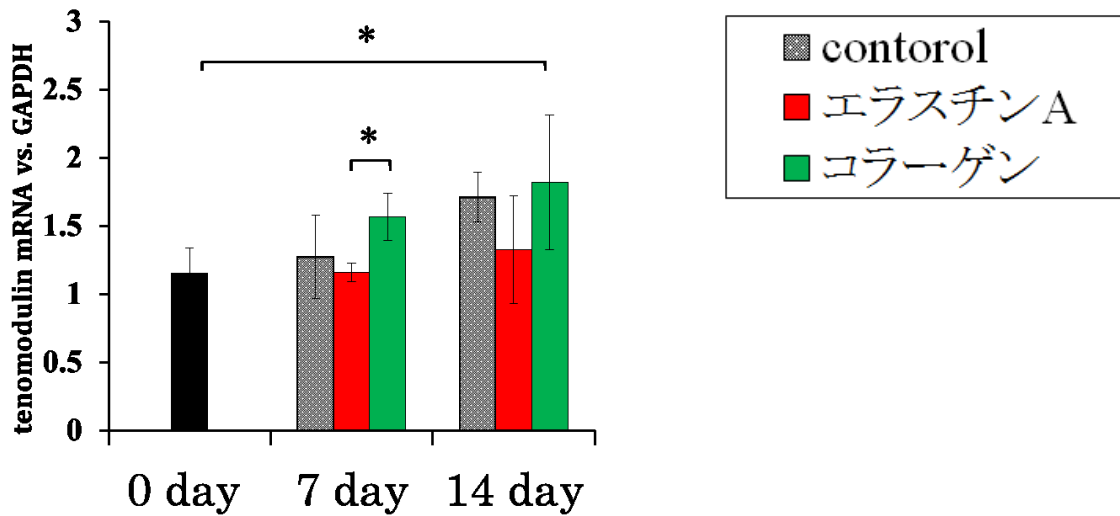


図 3-13 ECM 添加が PDLF に与える影響

(a) type I collagen (b) type III collagen (c) tenomodulin、n=4、*: p<0.05

図 3-12 より、ACL 細胞にコラーゲンを添加することで、靭帯関連遺伝子の発現量が有意に上昇した(0 日目 vs. 14 日目、 $p < 0.05$)。0 日目の結果と比較し、コラーゲン添加 14 日目の各遺伝子発現量は type I collagen: 1.5 倍、type III collagen: 1.9 倍、tenomodulin: 1.7 倍上昇する結果となった。一方、エラスチン A 添加による ACL 細胞の遺伝子発現への影響は観察されなかった(control との有意差なし)。

PDLF に対する ECM 添加実験においても同様の傾向が観察された(図 3-13)。コラーゲン添加 14 日目の遺伝子発現量は、type III collagen: 1.4 倍、tenomodulin: 1.6 倍上昇した(vs. 0 日目)。一方、type I collagen 発現はエラスチン A 添加 14 日目に 1.3 倍上昇する結果となった(vs. 0 日目)。

ECM 添加の影響を ACL 細胞と PDLF で比較した(図 3-14)。その結果、コラーゲン添加 14 日目における type I collagen 発現量に違いが見られたものの、各遺伝子の発現量は二種類の細胞ではほぼ同等であった。

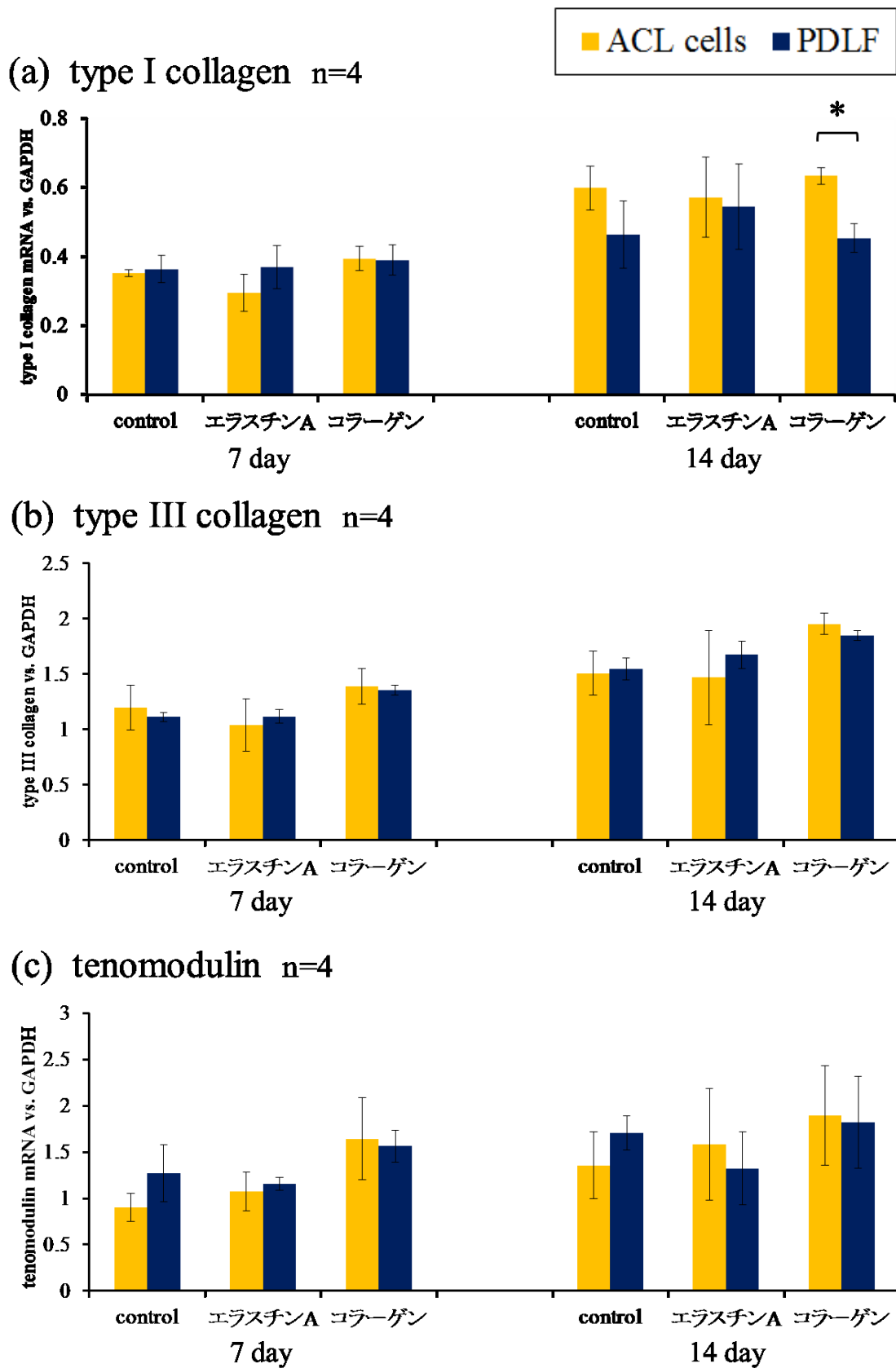


図 3-14 ACL と PDLF の比較 (ECM 添加実験)

(a) type I collagen (b) type III collagen (c) tenomodulin、n=4、*: p<0.05

3-4 作製した ECM ファイバー足場の評価

3-4-1 SEM による ECM ファイバー足場の観察

エレクトロスピンニングを行う際にターゲットとなる電極を回転させることで、配向性を持った ECM ファイバー足場を作製した。図 3-15 に作製したエラスチン A 足場及びコラーゲン足場の電子顕微鏡写真を示した。今回作製したエラスチン A およびコラーゲン足場の繊維径はそれぞれ、 $1.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$ と $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった(乾燥状態)。

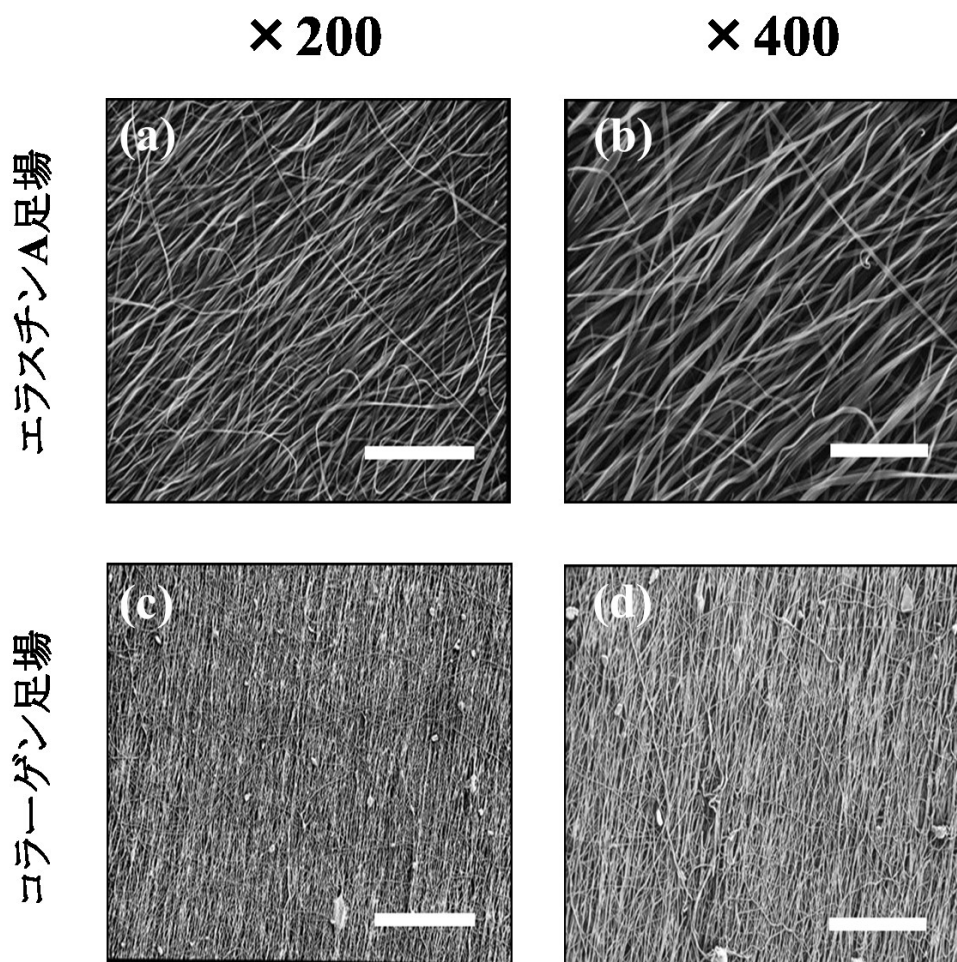


図 3-15 作製した ECM ファイバー足場の SEM 写真
(a) (b) エラスチン A 足場 (c) (d) コラーゲン足場
Scale bar: (a) (c) $90 \mu\text{m}$ 、(b) (d) $45 \mu\text{m}$

3-4-2 ECM ファイバー足場の弾性率

作製した ECM ファイバー足場の弾性率を求め、ECM の違いによる比較を行なった。その結果、コラーゲン足場の弾性率 (1.2 MPa) がエラスチン A 足場の弾性率 (0.3 MPa) よりも高い値を示した (図 3-16)。

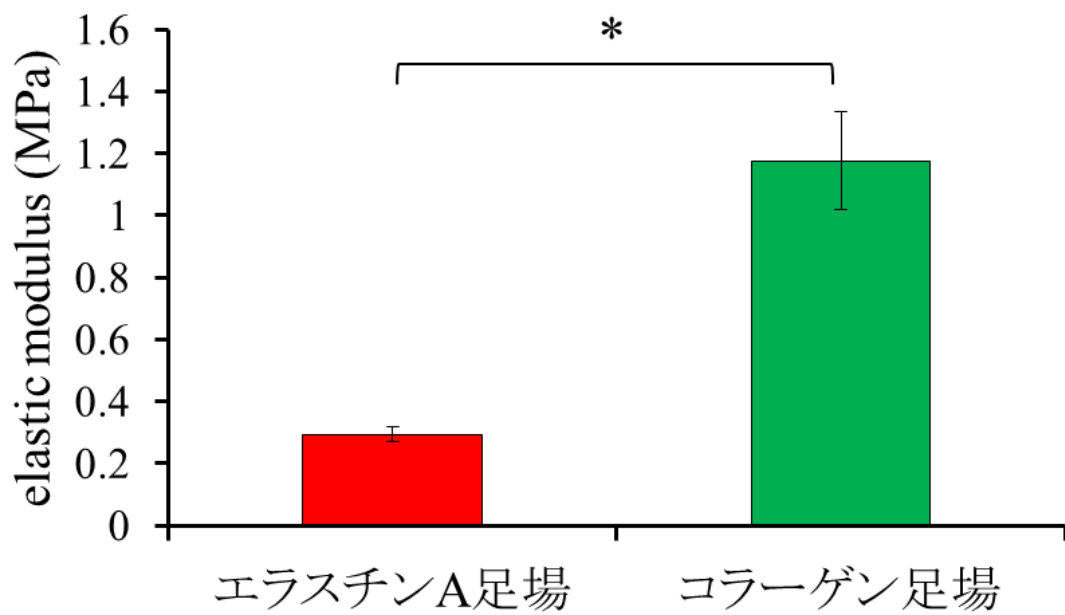


図 3-16 ECM ファイバー足場の弾性率測定結果
n=4、*:p<0.05

3-5 ECM ファイバー足場上での靱帯細胞培養

3-5-1 免疫蛍光染色、SEM による靱帯細胞の観察

ECM ファイバー足場上で7日間培養した靱帯細胞の免疫蛍光染色結果を図 3-17 に示した。

免疫蛍光染色の結果、各 ECM ファイバー足場への細胞接着を確認した。また、靱帯細胞が足場繊維の配向方向(図 3-17a 矢印方向)へ向きを揃えて接着する様子が観察された。

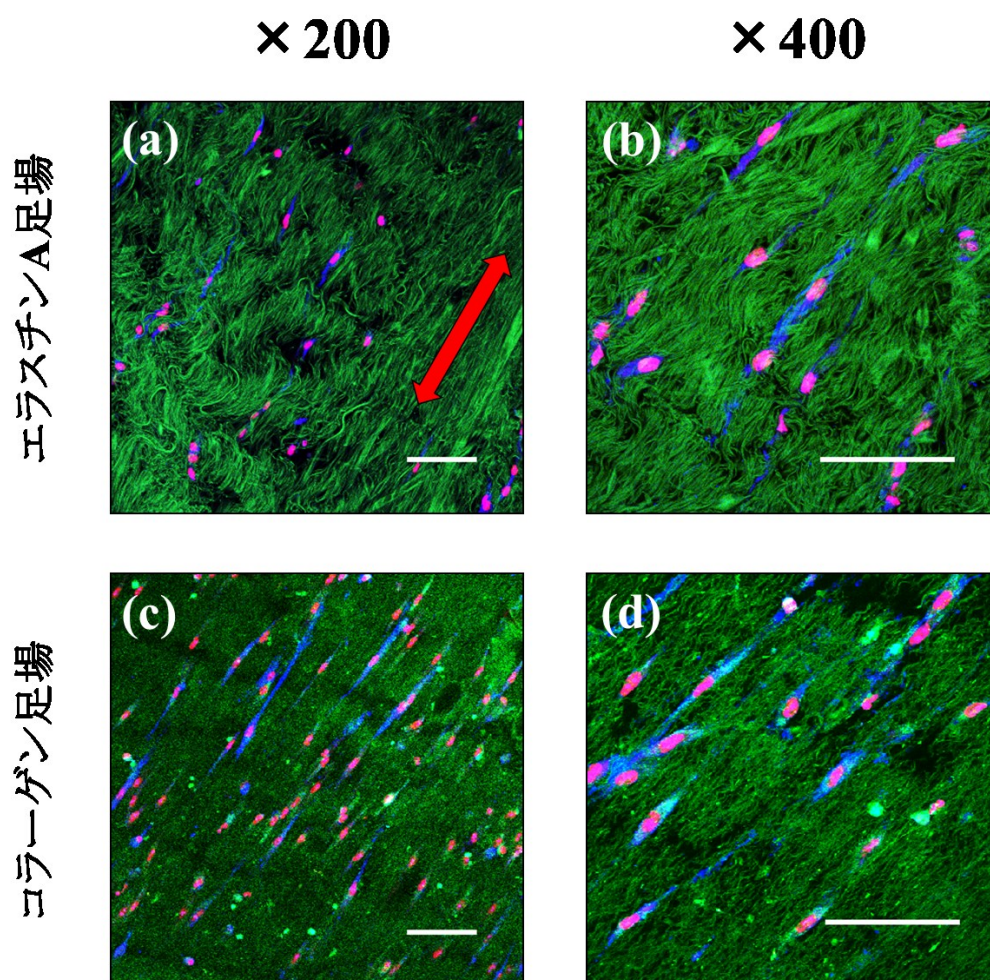


図 3-17 ECM ファイバー足場上の PDLF(免疫蛍光染色)
(a) (b) エラスチン A 足場上 PDLF、(c) (d) コラーゲン足場上 PDLF
赤色:細胞核、青色: α -smooth muscle actin、緑色:ECM ファイバー足場の自己蛍光、
図中矢印:繊維の配向方向、Scale bar:100 μ m

同様に ECM ファイバー足場上で培養した靭帯細胞を走査型電子顕微鏡により観察した(図 3-18)。その結果、免疫蛍光染色の結果(図 3-17)と同様に、各 ECM ファイバー足場への細胞接着を確認した。また、繊維の配向方向への靭帯細胞の配向も同様に観察された。

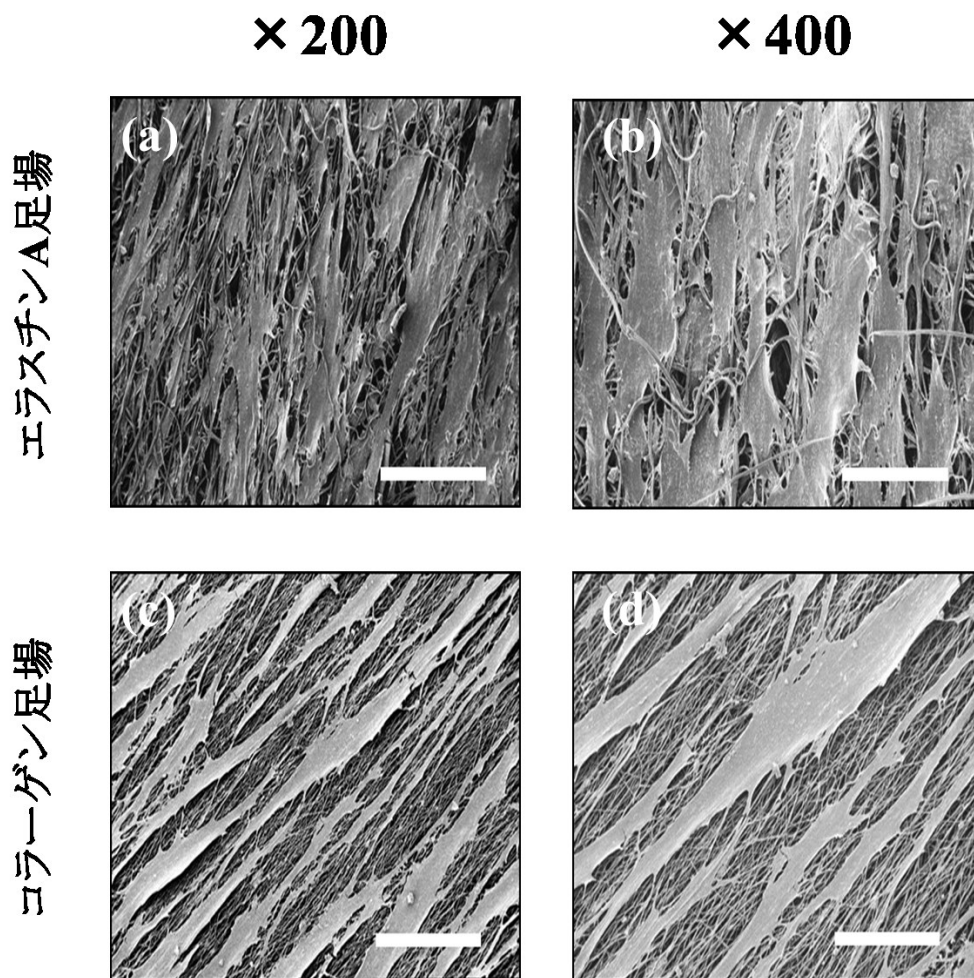


図 3-18 ECM ファイバー足場上の PDLF (SEM 写真)

(a) (b) エラスチン A 足場、(c) (d) コラーゲン足場

Scale bar: (a) (c) 90 μm 、(b) (d) 45 μm

3-5-2 靱帯細胞に与える影響(遺伝子発現、ALP 活性)

・遺伝子発現の定量

ECMファイバー足場上で7日間培養した靱帯細胞の表現型の確認として、遺伝子発現の定量を行なった(図 3-19、3-20)。

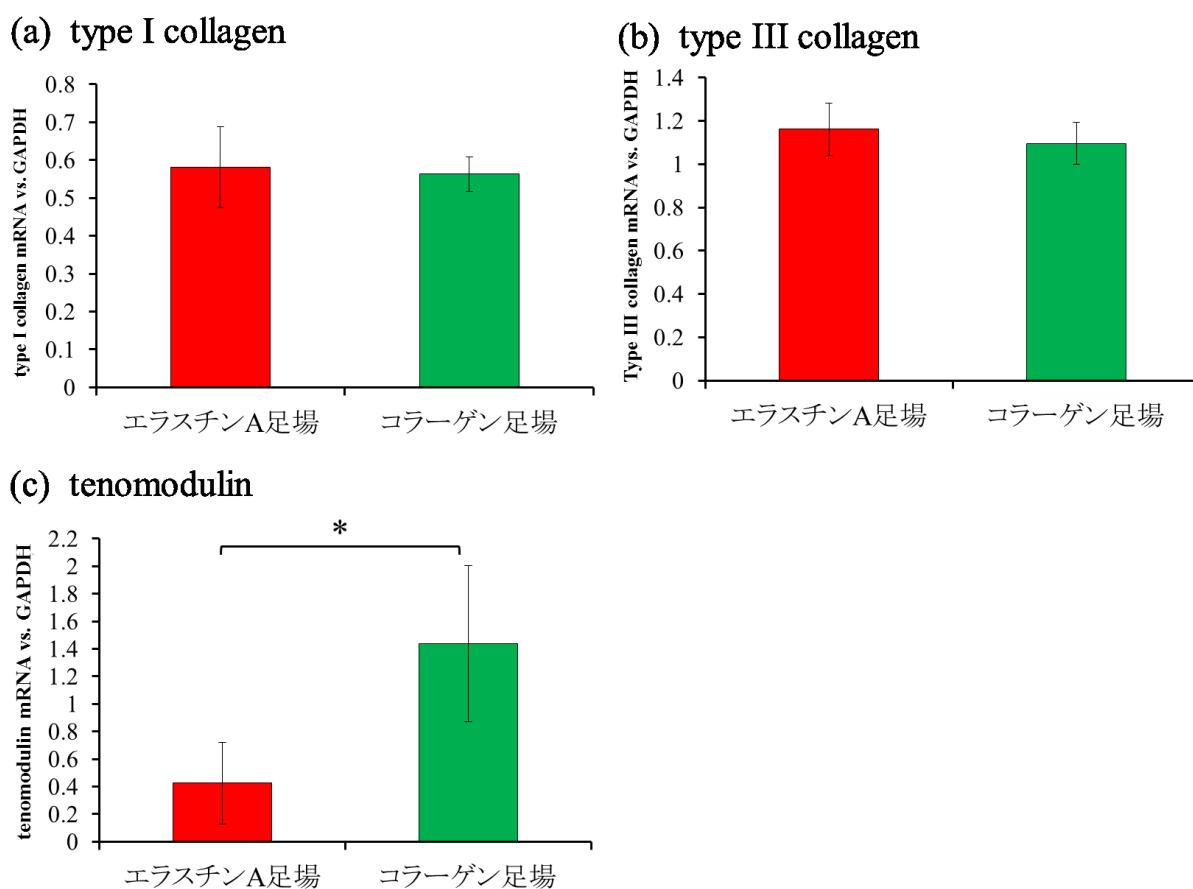
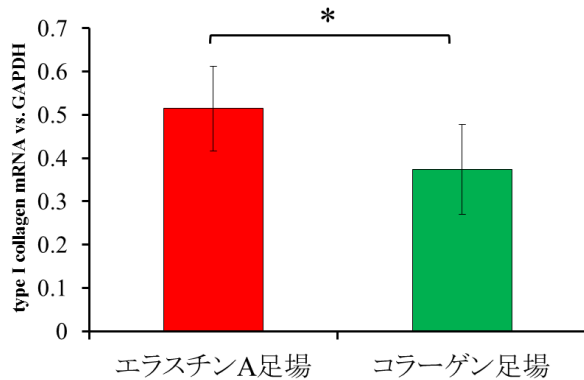
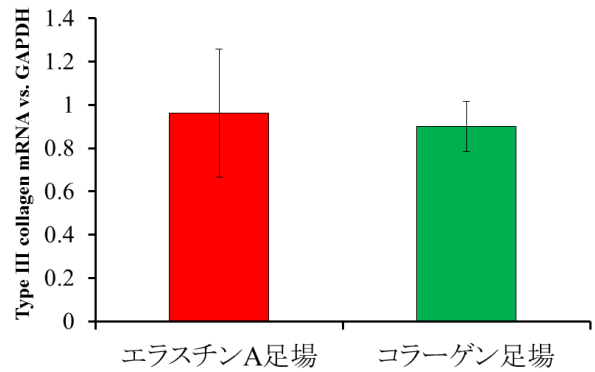


図 3-19 ECM ファイバー足場上 ACL 細胞の遺伝子発現
(a) type I collagen (b) type III collagen (c) tenomodulin
エラスチン A 足場 : n=5、コラーゲン足場 : n=8、* : p<0.05

(a) type I collagen



(b) type III collagen



(c) tenomodulin

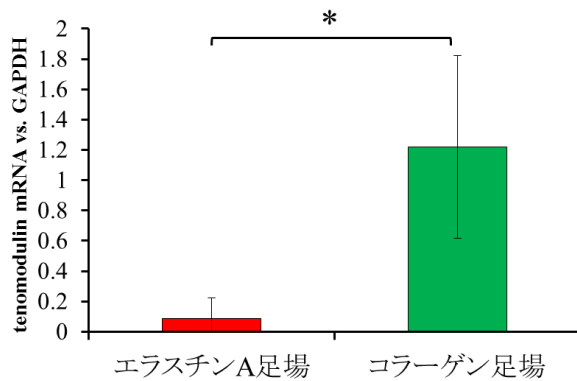


図 3-20 ECM ファイバー足場上 PDLF の遺伝子発現

(a) type I collagen、エラスチン A 足場 : n=11、コラーゲン足場 : n=9

(b) type III collagen、エラスチン A 足場 : n=11、コラーゲン足場 : n=9

(c) tenomodulin、エラスチン A 足場 : n=9、コラーゲン足場 : n=7、* : p<0.05

図 3-19 より、ACL 細胞をエラスチン A 足場上で培養した場合、結合組織 (靭帯) マーカーである tenomodulin の発現量が、コラーゲン足場上の細胞よりも有意に低い値を示す結果となった ($p<0.05$)。同様の結果が、PDLF についても観察された (図 3-20)。

エラスチン A 足場上での tenomodulin 発現を、ACL 細胞と PDLF とで比較した結果、PDLF の方が 79 %低かった (図 3-21)。

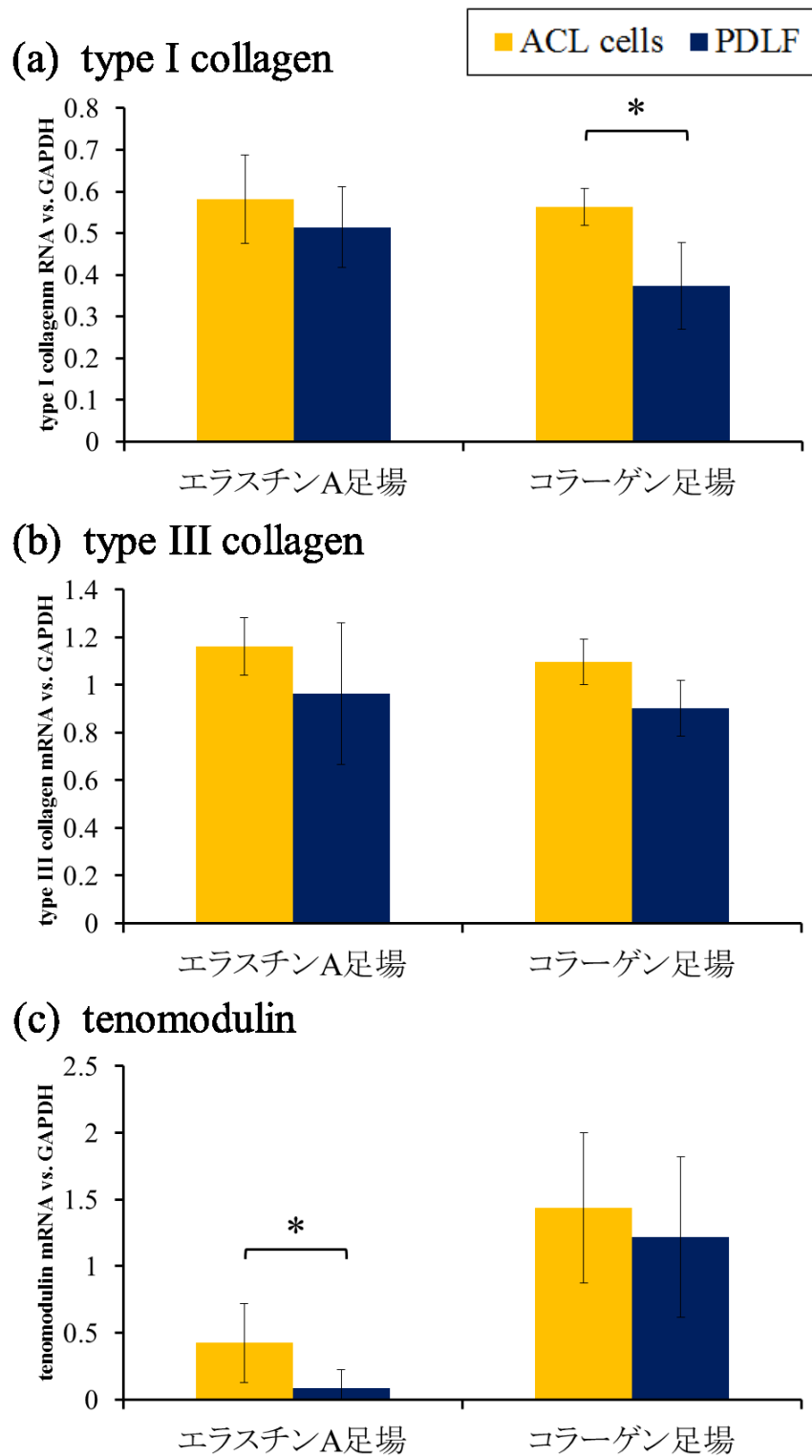
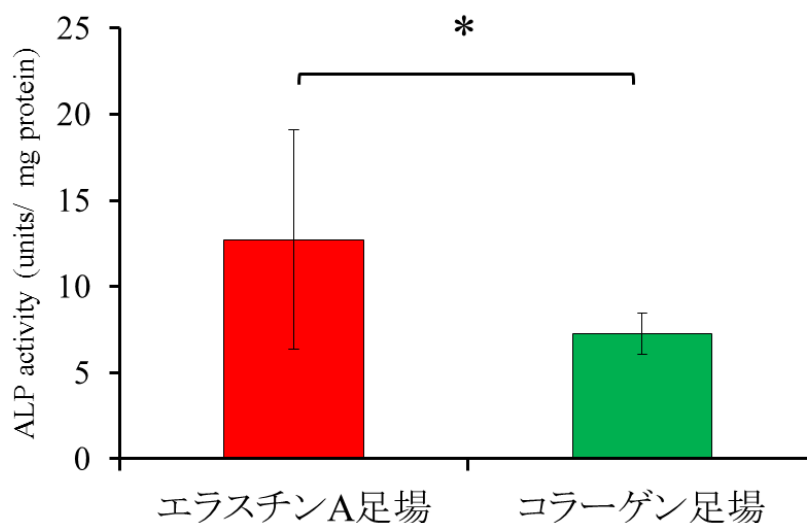


図 3-21 ECM ファイバー足場上の ACL 細胞と PDLF の遺伝子発現の比較
*: p<0.05

•ALP (alkaline phosphatase) 活性

ECMファイバー足場上で7日間培養した靱帯細胞の表現型の確認として、骨形成マーカーであるALPの活性を測定した(図 3-22)。

(a) ACL細胞



(b) PDLF

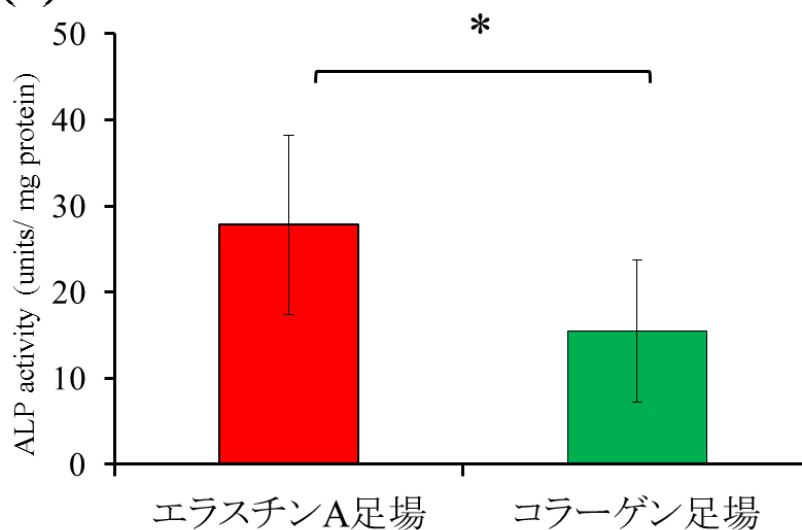


図 3-22 ECM ファイバー足場上の靱帯細胞の ALP 活性
(a) ACL 細胞、エラスチン A 足場:n=6、コラーゲン足場:n=7
(b) PDLF、エラスチン A 足場:n=9、コラーゲン足場:n=8
*:p<0.05

ACL 細胞を ECM ファイバー足場上で培養した結果、足場の ECM に応じて ALP 活性に違いが見られた(図 3-22 a)。エラスチン A 足場上で培養した ACL 細胞の ALP 活性値(12.7 units/ mg protein)は、コラーゲン足場上の細胞(7.3 units/ mg protein)よりも 1.8 倍高かった($p<0.05$)。

PDLF についても、ACL 細胞と同様の結果が得られた(図 3-22 b)。エラスチン A 足場上で培養した PDLF の ALP 活性値(27.8 units/ mg protein)は、コラーゲン足場上の細胞(15.5 units/ mg protein)よりも 1.8 倍高かった($p<0.05$)。

ECM ファイバー足場上で培養した ACL 細胞と PDLF の ALP 活性を比較した結果、足場の ECM によらず PDLF の ALP 活性が ACL 細胞のものよりも高い値を示した(図 3-23)。PDLF の ALP 活性値は、エラスチン A 足場上とコラーゲン足場上でそれぞれ 2.2 倍、2.1 倍だけ ACL 細胞よりも高かった($P<0.05$)。

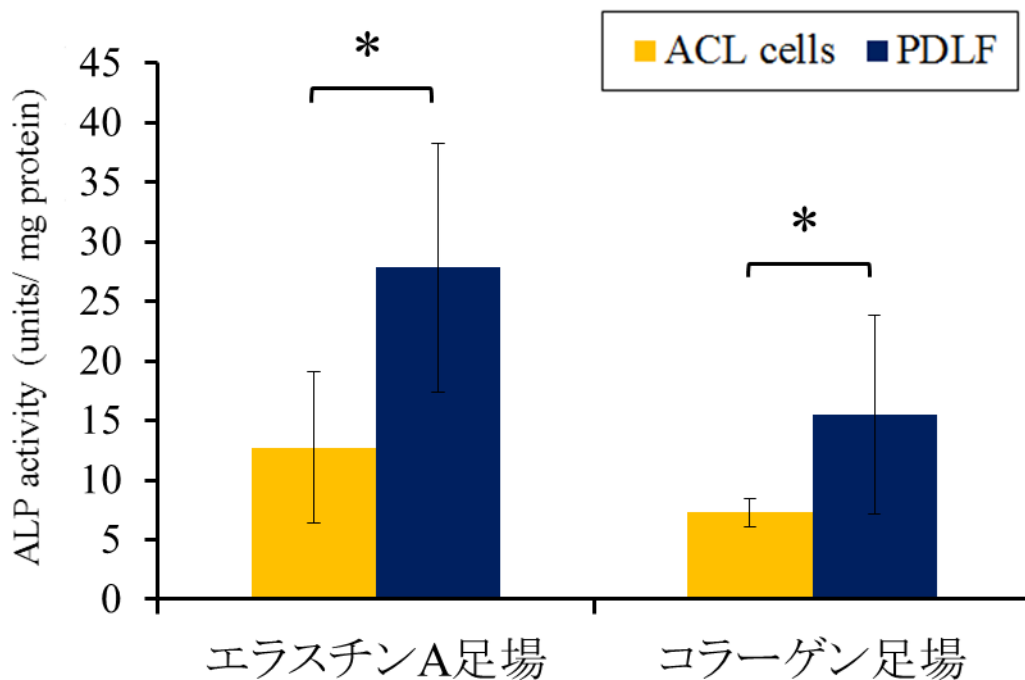


図 3-23 ECM ファイバー足場上の ACL 細胞と PDLF の ALP 活性の比較
*: $p<0.05$

3-6 力学的刺激が靭帯細胞に与える影響

3-6-1 加圧培養が靭帯細胞に与える影響

ECMファイバー足場上で7日間培養したPDLFに、12hの加圧刺激を与えた。加圧刺激を与えた細胞の表現型評価として、ALP活性と遺伝子発現の定量をそれぞれ行なった。

・ ALP活性の定量

加圧刺激を与えたPDLFのALP活性を定量した(図3-24)。加圧刺激を与えたPDLFのALP活性は、足場のECMに関係なく上昇する傾向が見られた。ALP活性の上昇はエラスチンA足場上の細胞で顕著に見られ、静置培養よりも1.8倍上昇する結果となった($p < 0.05$)。一方、コラーゲン足場上の細胞のALP活性は、静置培養時よりも1.6倍上昇した。

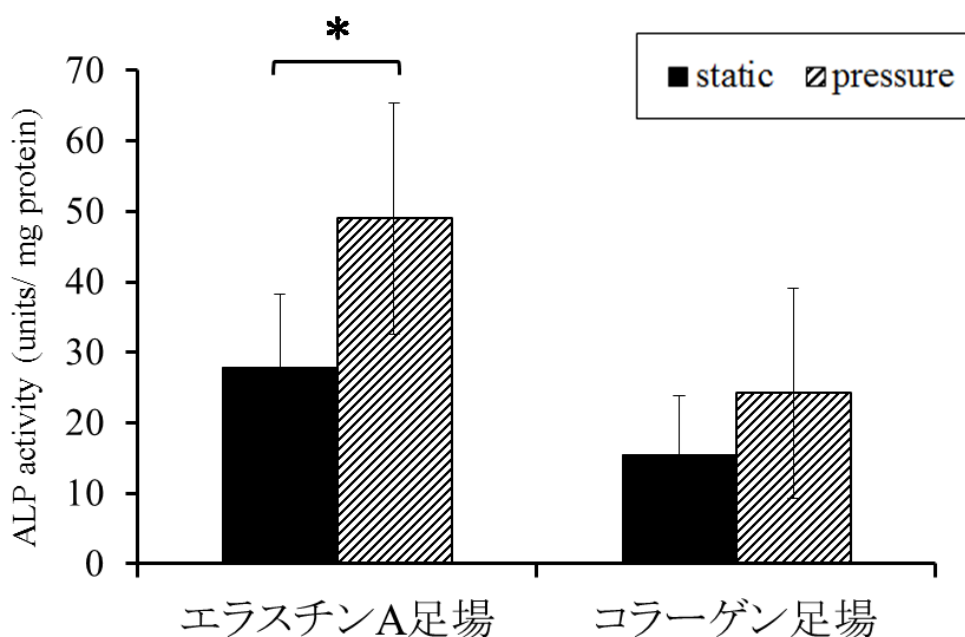


図 3-24 加圧刺激を与えたPDLFのALP活性
エラスチンA足場:n=6、コラーゲン足場:n=6、*: $p < 0.05$

・ 遺伝子発現の定量

遺伝子発現量を定量した結果、足場の ECM によらずに、加圧刺激により ALP 発現量が上昇した (vs. 静置培養、図 3-25 a)。type I collagen、type III collagen、tenomodulin の発現量は、静置培養時と有意な差は見られなかった。しかしながら、tenomodulin 発現は加圧刺激により減少する傾向が観察され、エラスチン A 足場上の PDLF ではほとんど発現が観察されなかった (図 3-25 b,c,d)。

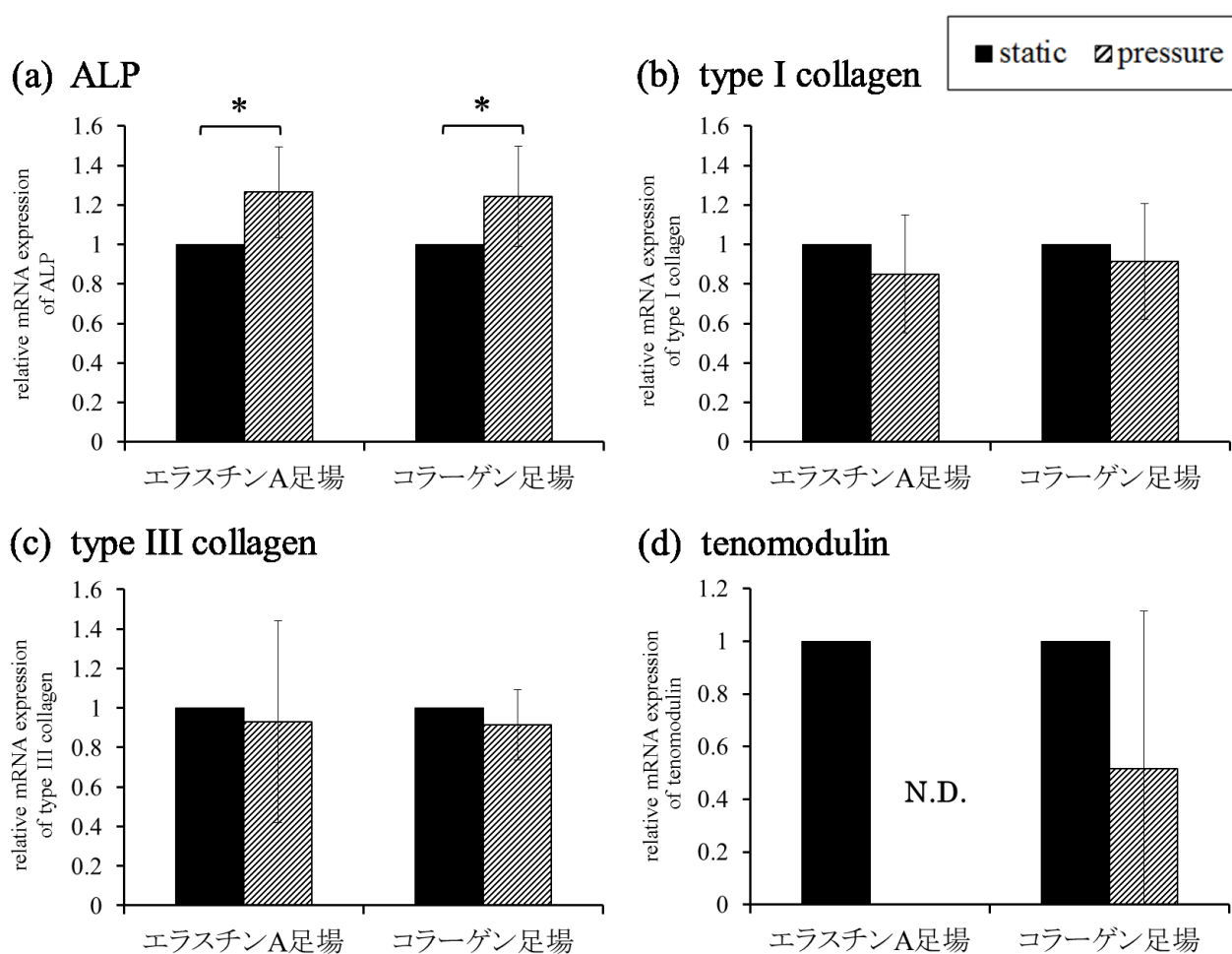


図 3-25 加圧刺激を与えた PDLF の遺伝子発現 (vs. 静置培養)

(a) ALP (b) type I collagen (c) type III collagen (d) tenomodulin、

(a) (b) (c) エラスチン A 足場 : n=5、コラーゲン足場 : n=4

(d) エラスチン A 足場 : n=3、コラーゲン足場 : n=4、* : p<0.05

N.D. : not detected

3-6-2 ねじれ型動的培養が靭帯細胞に与える影響

ECM ファイバー足場上で7日間培養したPDLFに、12hのねじれ刺激を与えた。ねじれ刺激を与えた細胞の表現型評価として、ALP活性と遺伝子発現の定量をそれぞれ行なった。

・ ALP活性の定量

ねじれ刺激後にALP活性を定量した(図3-26)。その結果、ねじれ刺激後のALP活性が静置培養時よりも減少する結果が得られた。静置培養時のALP活性と比較し、ねじれ刺激を与えた場合、エラスチンA足場上の細胞では約75%減少し、コラーゲン足場上の細胞では約50%減少した。

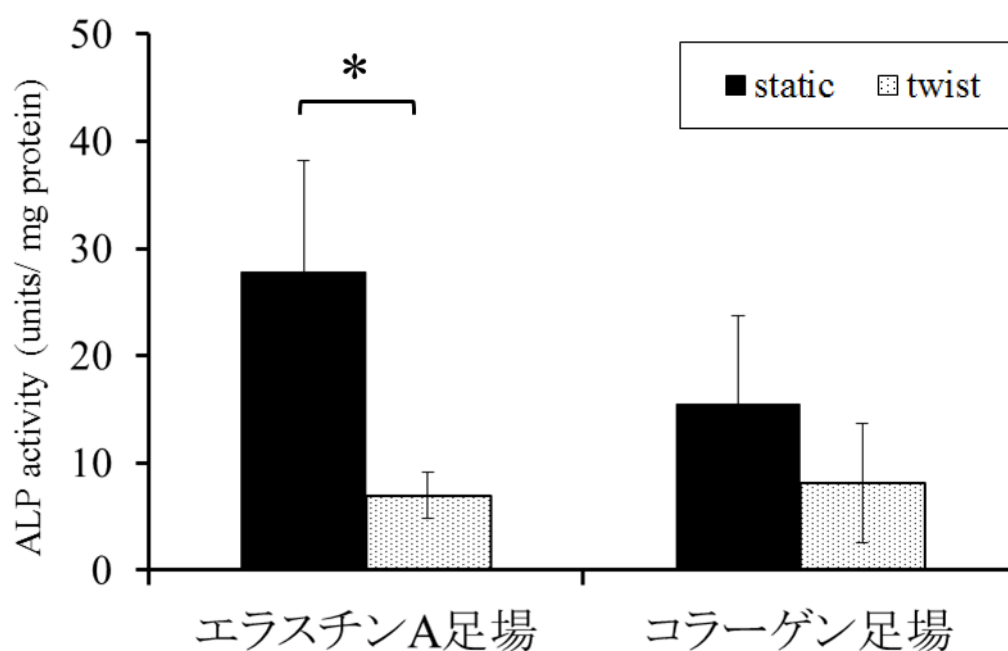


図 3-26 ねじれ刺激を与えたPDLFのALP活性
エラスチンA足場:n=3、コラーゲン足場:n=3、*:p<0.05

・ 遺伝子発現の定量

ねじれ刺激により ALP 発現が減少した(図 3-27 a)。静置培養と比較し、エラスチン A 足場上の細胞では約 20 %減少し、コラーゲン足場上の細胞では約 22 %減少した。また、type I collagen 発現の減少も観察され、静置培養時と比較し、それぞれ約 16 %減少した(図 3-27 b)。一方、type III collagen はねじれ刺激を与えることで、静置培養時よりも発現量が増加した(図 3-27 c)。それぞれ 1.1 倍増加した。Tenomodulin 発現は、ねじれ刺激後も発現量に変化は見られなかった(図 3-27 d)。

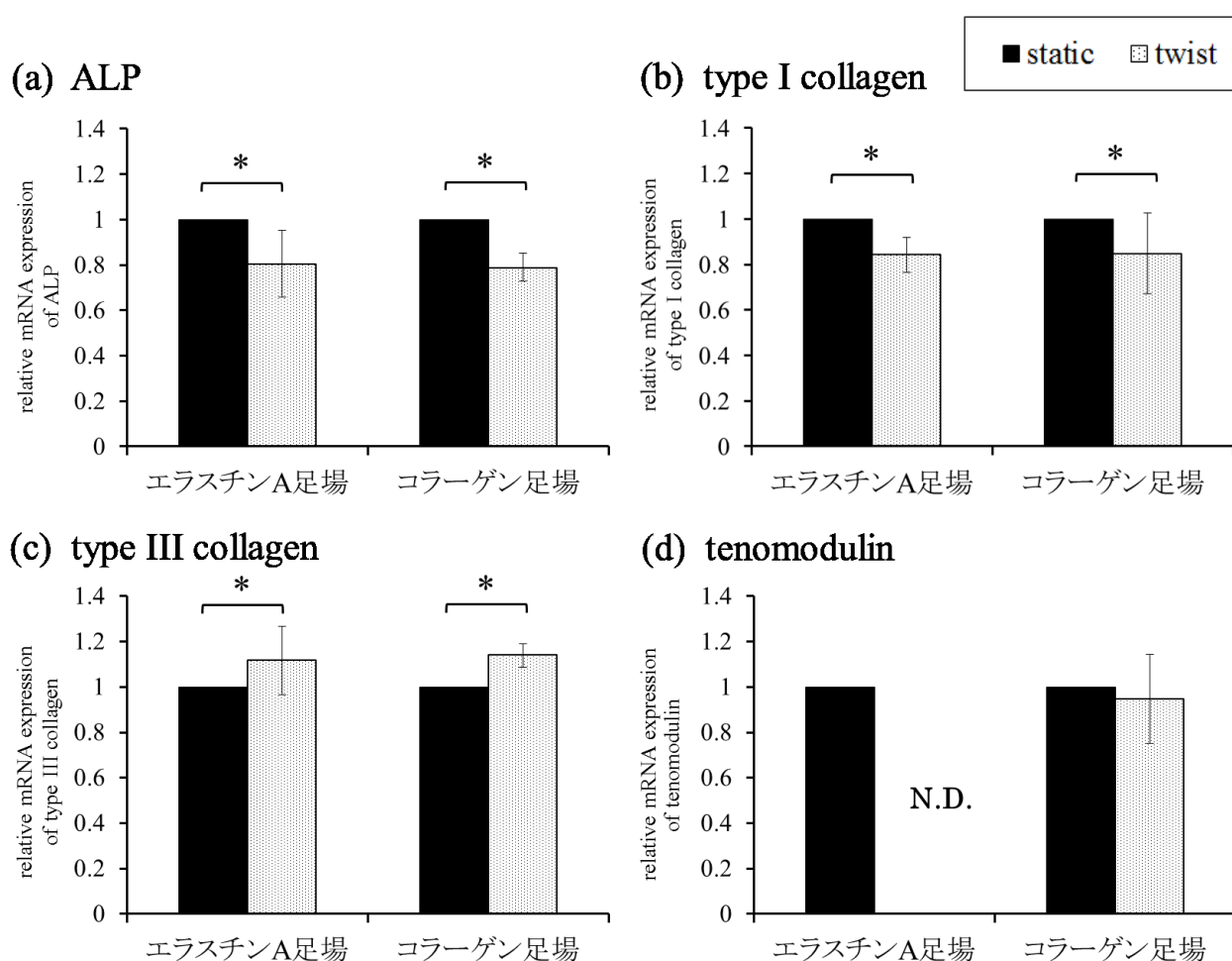


図 3-27 ねじれ刺激を与えた PDLF の遺伝子発現 (vs.静置培養)
 (a)ALP (b)type I collagen (c)type III collagen (d)tenomodulin
 エラスチン A 足場:n=3、コラーゲン足場:n=3、*:p<0.05
 N.D.:not detected

3-6-3 複合型動的培養が靭帯細胞に与える影響

ECM ファイバー足場上で7日間培養した PDLF に、12 h の複合(ねじれ+加圧)刺激を与えた。複合刺激を与えた細胞の表現型評価として、遺伝子発現の定量と、免疫蛍光染色によるタンパク質発現の確認を行なった。

・ 遺伝子発現に与える影響

複合刺激を与えた PDLF の遺伝子発現を定量した結果、ALP、type I collagen、type III collagen、tenomodulin のいずれの発現量も静置培養時との有意な差は確認されなかった(図 3-28)。

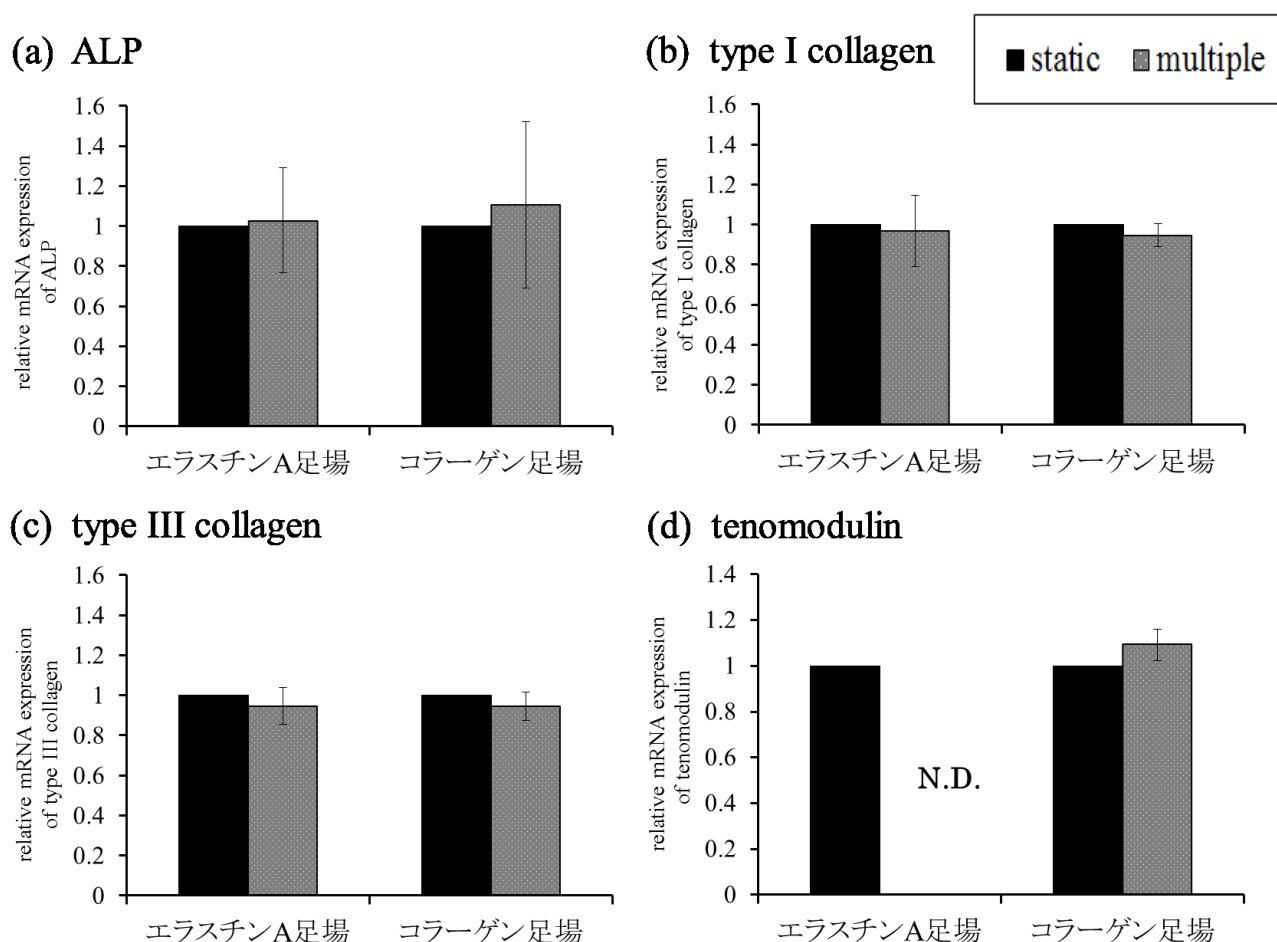


図 3-28 ねじれ刺激を与えた PDLF の遺伝子発現 (vs.静置培養)

(a) ALP (b) type I collagen (c) type III collagen (d) tenomodulin

(a) (b) (c) エラスチン A 足場 : n=6、コラーゲン足場 : n=3

(d) エラスチン A 足場 : n=4、コラーゲン足場 : n=3、

*: p<0.05、N.D.: not detected

・ 免疫蛍光染色によるタンパク発現の確認

複合型動的培養後に免疫蛍光染色により、ALPと type III collagen のタンパク質発現を確認した(図 3-29)。

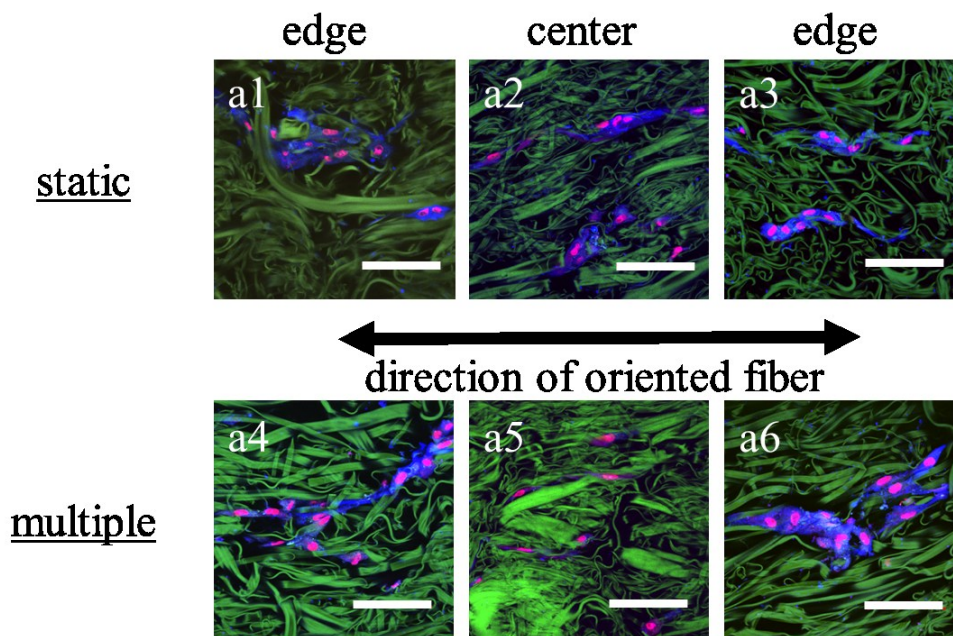
エラスチン A 足場上 PDLF の ALP を染色した(図 3-29 a)。静置培養(a1-3)において ALP 発現が確認された。複合培養(a4-6)についても ALP 発現が観察された。しかしながら、足場の中央部分と末端部分において発現レベルに違いが見られ、末端部分の ALP 発現(a4,6)は中央部分(a5)よりも高かった。末端部分の ALP 発現レベル(a4,6)は静置培養時(a1-3)と同等であった。

エラスチン A 足場上 PDLF の type III collagen を染色した(図 3-29 b)。静置培養(b1-3)及び、複合培養(b4-6)で type III collagen 発現が観察された。複合培養は末端部分(b4,6)と中央部分(b5)で発現レベルが異なった。末端部分の発現量は中央部分よりも低かった。

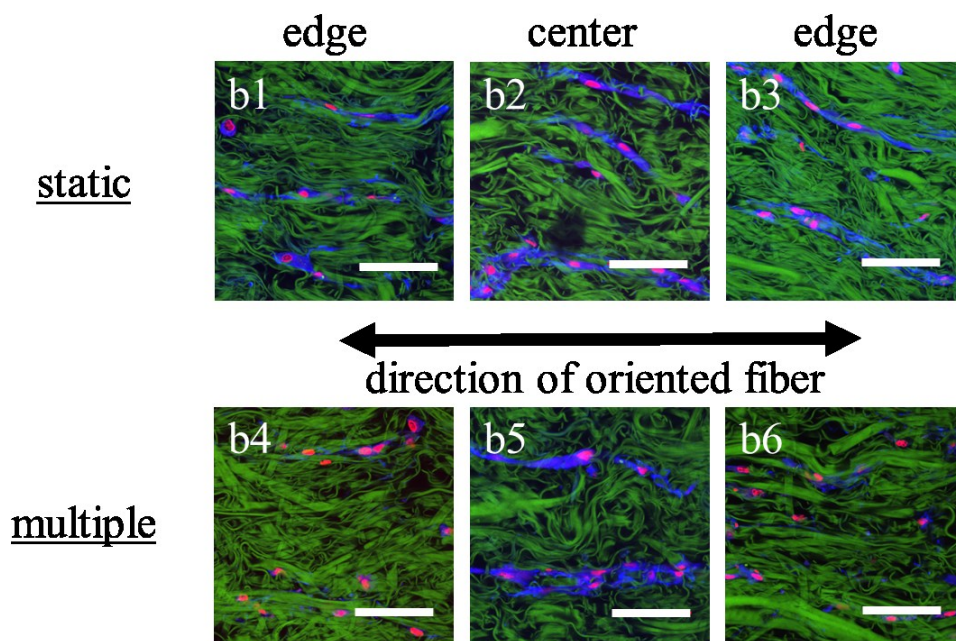
コラーゲン足場上 PDLF の ALP を染色した(図 3-29 c)。静置培養(c1-3)では強い ALP 発現は観察されなかった。一方、複合培養では強い ALP 発現を確認した。特に末端部分(c4,6)において全体に強い発現が見られた。

コラーゲン足場上 PDLF の type III collagen を染色した(図 3-29 d)。静置培養(d1-3)ではほとんど type III collagen 発現が見られず、一部で弱い発現を示すのみであった。複合培養の末端部分(d4,6)でも強い発現は見られなかった。しかし、複合培養の中央部分(d5)では type III collagen 発現が観察された。

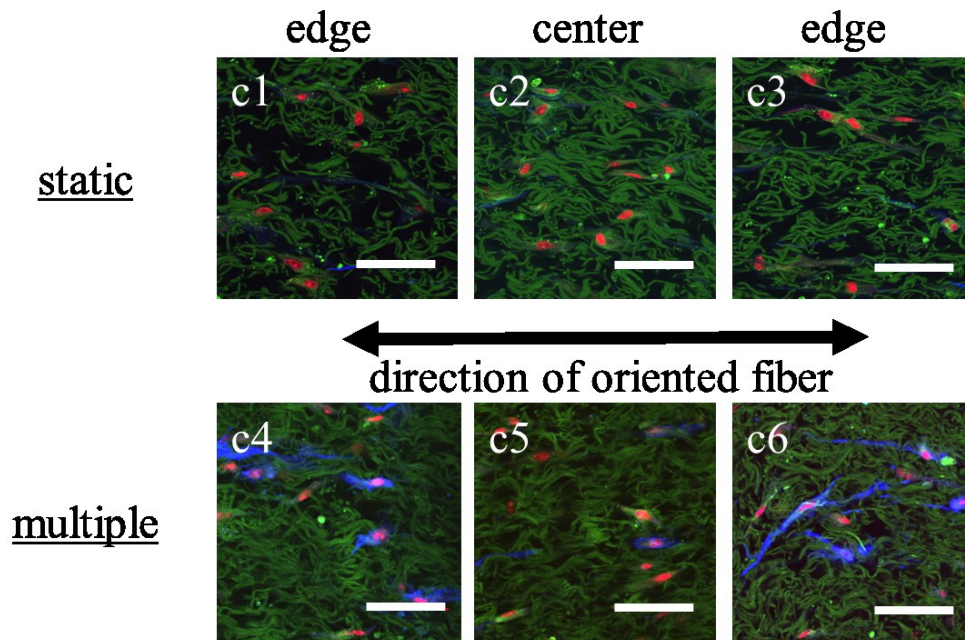
(a) エラスチンA足場/ ALP



(b) エラスチンA足場/ type III collagen



(c) コラーゲン足場/ ALP



(d) コラーゲン足場/ type III collagen

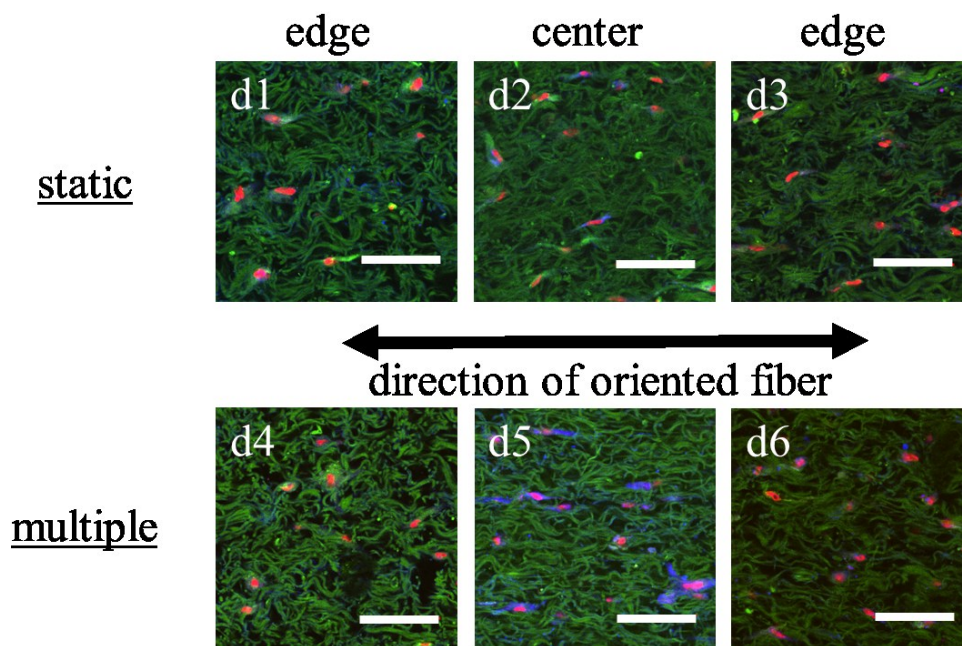


図 3-29 複合培養後の免疫蛍光染色 (PDLF)

(a) エラスチン A 足場上の ALP (b) エラスチン A 足場上の type III collagen
 (c) コラーゲン足場上の ALP (d) コラーゲン足場上の type III collagen
 緑色: ECM 足場自己蛍光、赤色: 細胞核、青色: (a) (c) ALP; (b) (d) type
 III collagen、scale bar: 100 μ m

4 考察

Discussion

4 考察

4-1 前十字靭帯について

・SEM 観察結果

ACLをSEMで観察した結果、細い線維(線維径: $0.12 \pm 0.03 \mu\text{m}$)が組織の長軸方向に配向しながら緻密で太い線維束(線維径: $58.7 \pm 24.2 \mu\text{m}$)を形成していることが分かった(図 3-1)。ただし、図 3-1 dのように、ACLを構成する線維の走行は必ずしも平行なものではなく、波状に走行している部分も観察された。

一般に、靭帯や腱の線維を構成するコラーゲンは特徴的な階層構造をとることが知られている。階層構造はトロポコラーゲン(1.5 nm)から始まり、マイクロフィブリル(microfibril)、サブフィブリル(subfibril: $\sim 10 \text{ nm}$)、フィブリル(fibril: $20 \sim 150 \text{ nm}$)、線維(fiber: $1 \sim 50 \mu\text{m}$)、線維束(fascicle: $\sim 200 \mu\text{m}$)へと階層的に大きな構造になり、最終的に靭帯や腱となる³⁵⁻³⁷⁾(図 4-1)。今回観察された線維径はこれらの文献値ともよく一致しており、コラーゲンフィブリル(図 3-1c)とそれが束になったコラーゲン線維(図 3-1a,b)を確認することが出来たものと考えられる。



図4-1 靭帯・腱の階層構造³⁵⁾

また、靭帯や腱を構成するコラーゲン線維束やコラーゲン線維はクリンプパターン(crimp pattern)と呼ばれる縮れた波形構造をとる(図 4-2)。この特徴的な構造は組織を伸張することで観察されなくなり、元に戻すことで再び現れる⁸⁾³⁶⁻⁴⁰⁾。クリンプ構造によって、靭帯は小さな負荷で容易に変形することが可能となる。また、この構造が損傷のバッファーとなり、衝撃荷重を緩衝するなど、靭帯や腱において重要な働きをすることが分かっている⁴⁾。本研究においても靭帯線維の波形構造が観察されており、靭帯に特徴的にみられるクリンプパターンを確認する事が出来たものと考えられる(図 3-1d)。

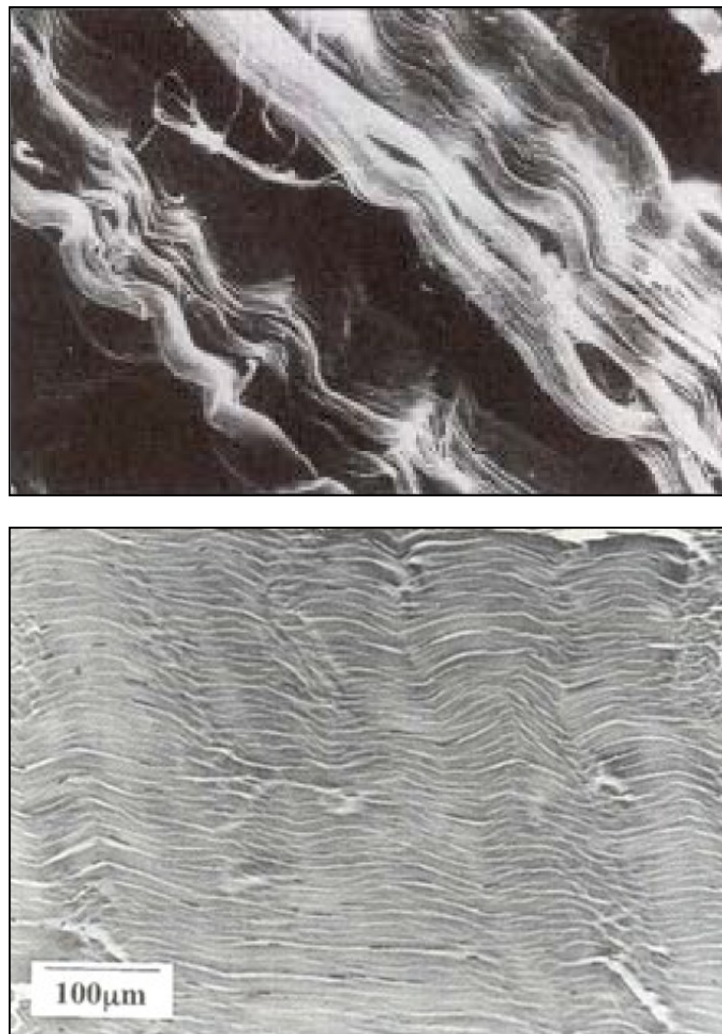


図 4-2 コラーゲンのクリンプパターン³⁾³⁷⁾

・免疫蛍光染色結果

ACL は一般的に type I, III and V collagen、elastin から構成されることが知られている⁵⁾。そこで本研究では、ACL から作製した組織切片を使用して、免疫蛍光染色法により ACL の組成を調査した(図 3-2、3-3)。

ACL の免疫蛍光染色を行うにあたり、組織中に含まれるエラスチンやコラーゲンに由来する自己蛍光(自家蛍光: Autofluorescence)の有無を確認した(図 3-2)。

一般的に使用される蛍光標識に FITC (fluorescein-isothiocyanate、励起波長: 490 nm; 蛍光波長: 520 nm)がある。FITC を発光させるレーザー光を、固定処理のみを行なった ACL 切片に照射した。すると、FITC 標識をしていない ACL からの蛍光発光が観察された(図 4-3)。そこで、別の蛍光標識として DyLight 649 (励起波長: 646 nm; 蛍光波長: 674 nm)を発光させるレーザー光を、同様に固定処理のみを行なった ACL 切片に照射した。その結果、図 3-2 のように ACL 由来の自己蛍光は観察されなかった。従って、抗原抗体反応を利用し、蛍光標識として DyLight 649 を使用することで、標的とする抗原(タンパク質)のみが検出される条件で実験を行なったと言える。

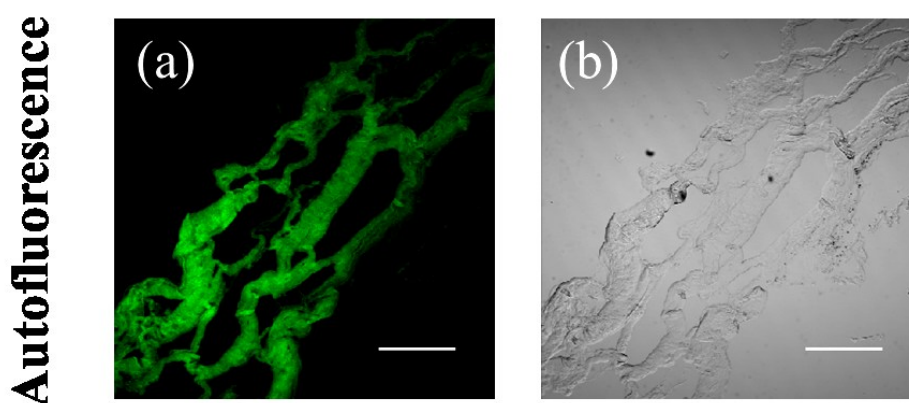


図 4-3 ACL の自己蛍光

(a) ACL の自己蛍光 (b) 微分干渉顕微鏡写真、scale bar: 250 μ m

抗原抗体反応を利用し elastin、type I and III collagen の染色を行なった。その結果、線維状の elastin が ACL の全体に亘って存在する様子が観察された(図 3-3 a,b)。一方、type I collagen と type III collagen は組織全体に染色されたものの、線維状には観察されなかった(図 3-3 c,d,e,f)。これは靭帯が結合組織の中でも「密性結合組織」であることに関係すると考えられる。一般に密性結合組織の主成分は collagen (膠原線維) であり、その線維は極めて緻密に並ぶことが知られている。構造の緻密さのために、collagen は線維状には観察されず、逆に、比較的少ない割合で collagen 線維の間に存在する elastin (弾性線維) が、線維状に観察されたと推測される。

・遺伝子発現の定量結果

培養細胞を用いた実験系は、生体内での実験と比べて単純な実験系で生体内での反応を解析できる利点があるため、本研究でも培養細胞を用いた実験を行なった。しかしながら、培養細胞は必ずしも生体内での反応を反映しきれない場合もある。例えば、生体内の細胞が常に隣接する他の細胞や細胞外マトリックスと接して存在しているのに対し、培養細胞はプラスチックシャーレ上に細胞同士がバラバラの状態に播種されたり(図 4-4)、継代作業により細胞が傷害を受けたりするため、本来持っている細胞の機能が変化してしまう可能性がある。そこで、本研究では培養細胞から得られる情報に加えて、靭帯組織内の細胞が持つ情報を得ることを考えた。そのための実験として、ACL 組織から RNA を抽出し、RT-PCR 法による解析を行なった

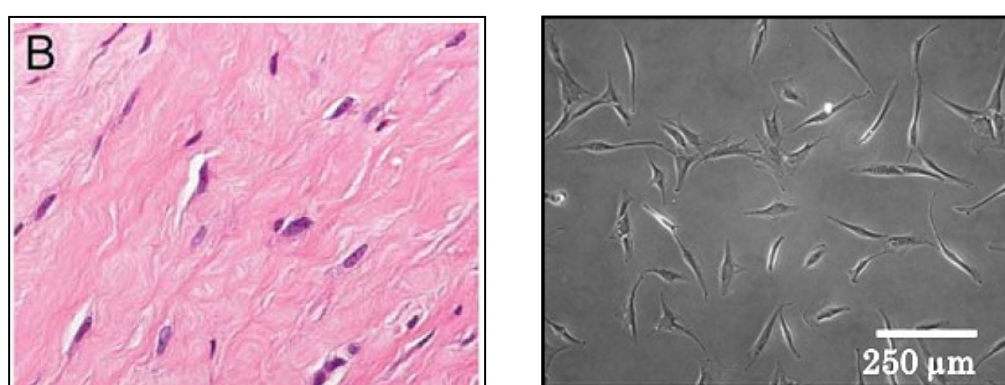


図 4-4 生体内外の ACL 細胞の比較

左図: ACL 組織の HE 染色⁶⁾、紫色:細胞;ピンク色:細胞外マトリックス
右図:培養 ACL 細胞

ACL 組織を用いて RT-PCR を行なった結果、ACL 組織、接合部分、骨組織で強発現する遺伝子に違いが見られた。特に、type III collagen と tenomodulin は ACL 組織で最も発現量が高かった。これらの結果は type III collagen が靭帯を構成する主要な成分であることや、tenomodulin が結合組織(靭帯)マーカーであるという報告からも妥当であると考えられる。また、type I collagen と type III collagen の発現量の比を算出した結果、ACL 組織内では type III collagen 発現の割合が高かった(図 4-5)。従って、Type III collagen が ACL を特徴づけるタンパク質の一つとなることが推測される。

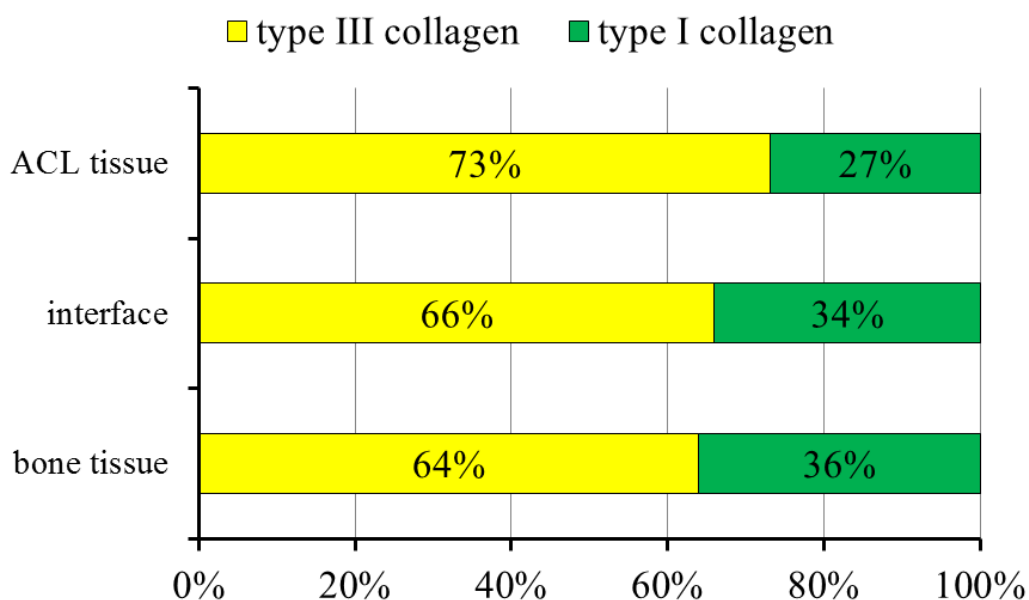


図 4-5 type I and III collagen の発現量比較 (ACL 組織、骨組織)

今回、骨組織においても type III collagen と tenomodulin の発現が少量ではあるが確認された。しかし一般には、骨組織を構成する有機成分の 90 % は type I collagen であり、残りの 10 % のタンパク質成分はオステオカルシンやオステオネクチンなどとされている⁴¹⁾。つまり、type III collagen は発現しないはずである。それにもかかわらず、これらの発現が確認された理由として、骨組織に ACL (接合部分) の一部が除去しきれずに混入した可能性が考えられる。ただし、実験に使用した骨組織からは、可能な限り ACL を切除しているため、回収した total RNA の大部分は骨組織由来であると考えられる (尚、この時切除した ACL を接合部分と定義した)。従って、ACL 組織、接合部分、骨組織の違いを比較することは十分に可能であると考えられる。

靭帯関連遺伝子の他に、骨形成マーカーである ALP の発現を領域ごとに定量した。その結果、骨組織で最も発現量が高いことが確認されたため、ALP を骨芽細胞マーカーとして使用することが妥当であると言える。

ACL 内には線維芽細胞の他に、前駆細胞や間葉系幹細胞 (MSC) など複数種類の細胞が含まれる可能性が指摘されている¹³⁻¹⁵⁾。そのため、今回得られた結果は ACL 内に存在する全細胞が発現する遺伝子の合算値となる。しかしながら、本研究の結果は intact の ACL 内で細胞が発現する遺伝子として、重要な結果であると考えられる。

・ACL 組織の弾性率測定結果

ACL 組織の引張試験によって得られた応力-歪み曲線は J カーブを示した(図 3-5)。つまり、二種類の成分(膠原線維と弾性線維)の複合組織であることが分かる。引っ張り始めにおいて、組織中の膠原線維(コラーゲン線維)が緩んだ状態(クリンプ構造; 図 3-1 d)では、弾性線維(エラスチン線維)が小さな力で伸長する(図 4-6 領域 1、図 4-7 (1))。そして、ある程度引っ張りを加えて、膠原線維が伸びきった状態からは、剛性を持ち伸長しにくいコラーゲンの性質が現れ、初めと同じだけ歪むのにも大きな応力が必要となる(図 4-6 領域 2、図 4-7 (2))。その結果として、応力-歪み曲線に傾きが異なる二つの領域が現れ、J カーブ曲線を示したものと考えられる。つまり、領域(1)の弾性率 0.28 MPa はエラスチン線維による影響が大きく、領域(2)の弾性率 3.2 MPa はコラーゲン線維による影響が大きいと推測される。

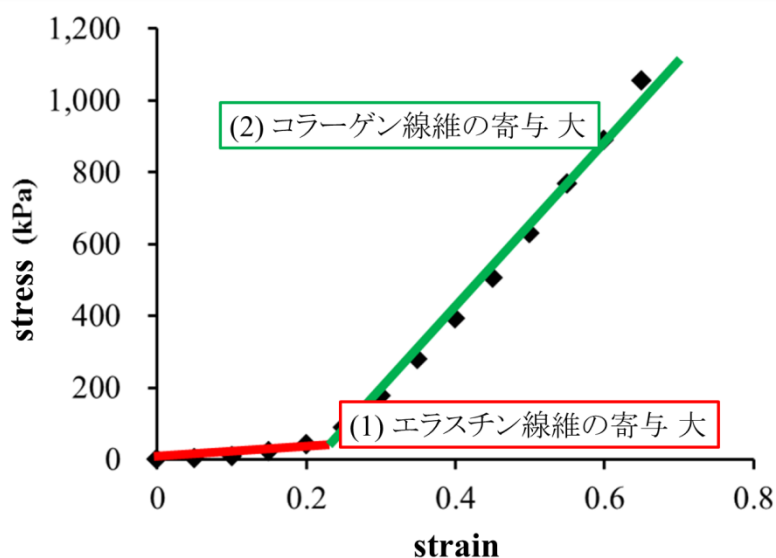


図 4-6 応力-歪み曲線の二段階変化

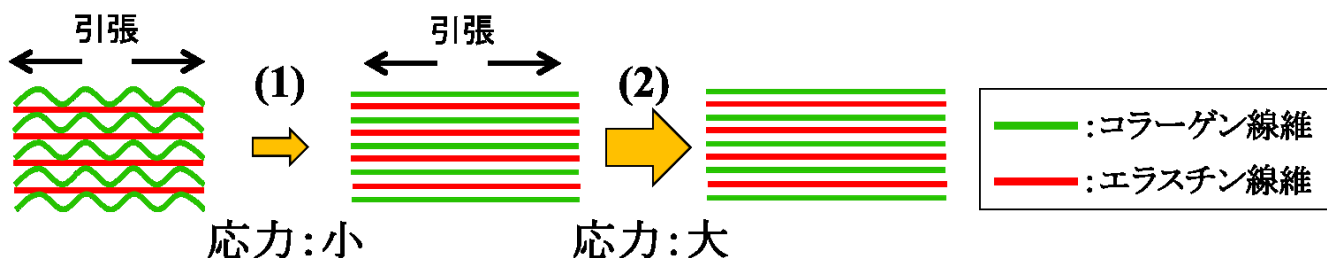


図 4-7 ACL 組織の力学特性(概念図)

図 4-8 に ACL との比較として、ウシ腱の弾性率を測定した結果を示した(ウシ腱は食肉流通センターより提供を受けた)。腱は骨と筋肉を繋ぐ結合組織であり、ACL と同様に主にコラーゲンから構成される。腱と ACL の大きな違いには弾性線維(エラスチン)の含有量が挙げられ、腱では乾燥重量で 2%程度⁴²⁾なのに対して、ACL では 26%程度(研究室データ)含まれている。従って、弾性線維をほとんど含まない腱の応力-歪み曲線はほぼ一直線となった(図 4-8 a)。また、膠原線維で主に構成されるため、ACL よりも高い弾性率(40.4 MPa)を示した(図 4-8 b)。

以上の結果を踏まえると、ACL が示す力学的特性はコラーゲンのみでは達成することが出来ず、エラスチンが持つ弾性が不可欠であると考えられる。そのため、靭帯組織再生のための人工足場には、コラーゲンとエラスチンをうまく組み合わせることが極めて重要となる。

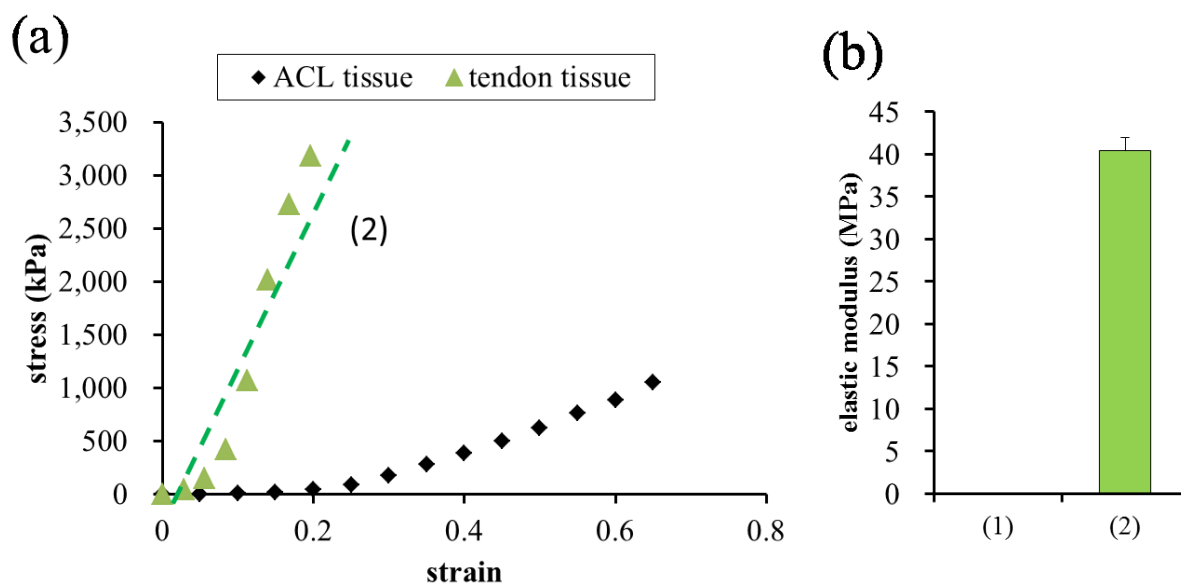


図 4-8 (a) 腱組織 (tendon tissue) の応力-歪み曲線と (b) 弾性率

4-2 ACL 細胞と PDLF について

・単離した ACL 細胞について

前述した通り、ACL には線維芽細胞に加え、MSC など他の細胞が含まれている可能性がある。そのため、今回単離した細胞は一種類だけではない可能性がある。

組織からの細胞単離方法には、本研究で実施した移植片培養法の他に、消化酵素を用いた細胞分散法がある。Tanaka ら⁴³⁾は歯周靭帯組織を用いて、移植片培養法からは主に線維芽細胞の集団が単離され、酵素分散法からは主に MSC が単離されることを報告した。つまり、単離方法によって得られる細胞集団が異なる可能性を示唆している。しかしながら、どちらの単離方法においても、ACL 組織から線維芽細胞と MSC がそれぞれ得られるとする報告も数多く存在する¹²⁻¹⁵⁾⁴⁴⁾。そのため、単純に単離方法のみで細胞群を分けることは難しいと考えられる。加えて、靭帯組織内の線維芽細胞と MSC は形態や表面抗原などの性質が非常に似ており、両者を明確に区別するための方法(特異的なマーカータンパク質や遺伝子)は現在までに確立されていない。Lee ら⁴⁴⁾は細胞電気泳動法により、これら二種類の細胞を区別することが可能であると報告したが、一般的な方法とはなっていない。従って、現時点でこれら二種類の細胞を分離・区別することは極めて困難である。以上のような理由から本研究では、移植片培養法で ACL から得られた細胞を「ACL 細胞」と呼ぶことにして、実験に使用した。

ACL から移植片培養法により単離した細胞の形態は、Cheng ら¹³⁾や Steinert ら¹⁴⁾の報告と同様に、紡錘状で線維芽様であった(図 3-7)。また、得られた細胞が増殖しなくなるまでの分裂回数の合算値である「累積細胞分裂回数」を測定した結果(約 23 回)は、Cheng ら¹³⁾の結果(約 20 回)と近い値を示した(図 3-8)。さらに、passage 1-10 の ACL 細胞について遺伝子発現を定量した結果、結合組織(靭帯)マーカーを含む三種類の遺伝子(type I and III collagen, tenomodulin)のいずれについても、継代数による変化は見られなかった(図 3-9)。つまり、継代作業による形質変化が起こりにくい細胞であることが示唆される。

以上の結果から、今回 ACL 組織から単離した ACL 細胞は増殖能が高く、比較的安定した継代培養が可能であることが分かった。

・ACL 細胞と PDLF の遺伝子発現量の比較

歯周靭帯組織には ACL と同様に線維芽細胞や幹細胞をはじめ、複数種類の細胞が含まれることが知られている⁴³⁾⁴⁵⁻⁴⁷⁾。また、歯周靭帯組織から単離した細胞は、ACL 細胞や MSC と同様に多分化能を有している³⁴⁾⁴³⁾⁴⁷⁾。さらに細胞形態や表面抗原についても、これらの細胞と非常に近いことが分かっている¹³⁻¹⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾。そこで本研究では、由来する組織が異なる靭帯細胞として、ヒト歯周靭帯由来の PDLF (市販品、Lonza 社) を使用して、ACL 細胞との比較を行ない、両者の違いを調査した。

Passage 4-6 の PDLF と ACL 細胞の遺伝子 (type I and III collagen、tenomodulin) 発現量を比較した (図 3-10)。その結果、PDLF の type III collagen 発現量が ACL 細胞よりも高い傾向を示したものの (有意差なし、 $p>0.05$)、両者の遺伝子発現量には大きな違いは見られず、互いに近い性質を持っていることが分かった。

一方で、ALP 活性については PDLF のほうが ACL 細胞よりも高い値を示す結果となった (図 3-11)。PDLF は皮膚や歯肉に存在する他の線維芽細胞と比較して、タンパク合成能、コラーゲン産生能、ALP 活性が高いという報告がある。さらに PDLF は石灰化組織形成能を有するなど、骨芽細胞とよく似た性質を持つことが知られている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。そのため、PDLF の ALP 活性が ACL 細胞の活性よりも高い値を示したのだと考えられる。

4-3 靱帯を構成する ECM が靱帯細胞に与える影響

ACL の免疫蛍光染色結果(図 3-3)から、ACL を構成する ECM として、elastin と type I collagen の存在が確認された。つまり、生体内の靱帯細胞は常にこれらの ECM に囲まれた状態で存在しており、細胞増殖や分化が制御されていると考えられる。細胞と ECM の働きを利用した、組織工学的な人工靱帯を作製するためには、両者の相互作用を理解することが不可欠である。そこで本研究では、生体組織より抽出した水溶性エラスチンと I 型アテロコラーゲンを使用して、靱帯を構成する ECM と靱帯細胞との応答性評価を行った。

本研究室ではブタ血管からエラスチンの抽出を行ない、水溶性エラスチン A～E の 5 種類のエラスチンを分画している。分画したエラスチンの分子量を図 4-9 に示した。分画エラスチンの分子量は、エラスチン A (25.2 kDa) からエラスチン E (10.1 kDa) に向かって小さくなることが分かっている。

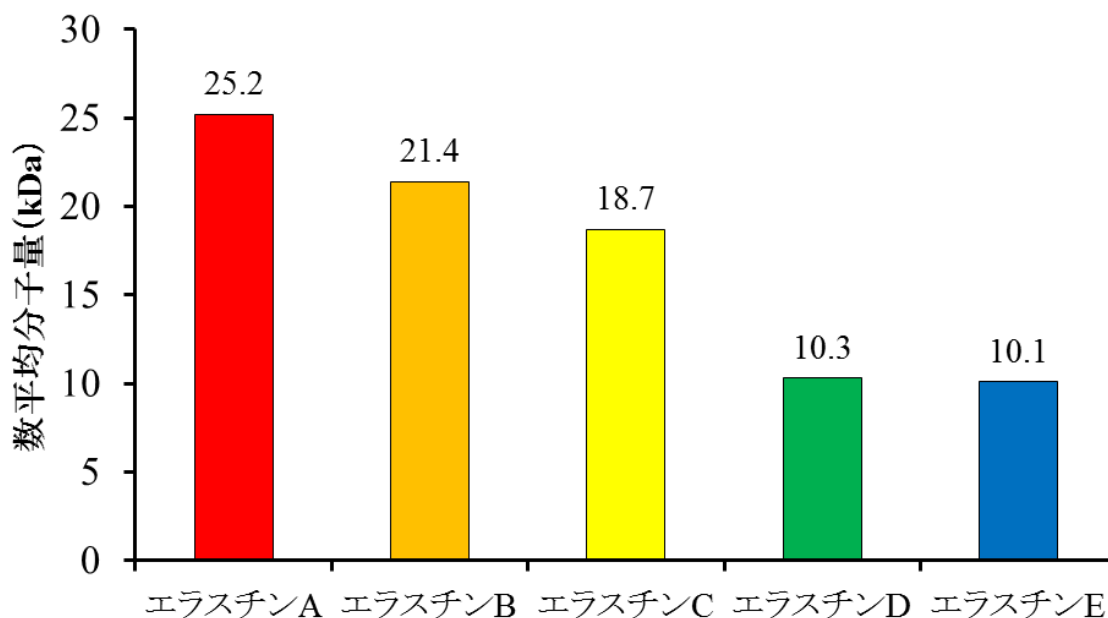


図 4-9 分画エラスチンの数平均分子量(研究室内データ)

また、分画エラスチン A-E は分子量の違いに加え、分子内架橋(デスモシン)の含有量にも違いがあり、エラスチン A から E に向かってデスモシン含有量が低くなっている(図 4-10)。

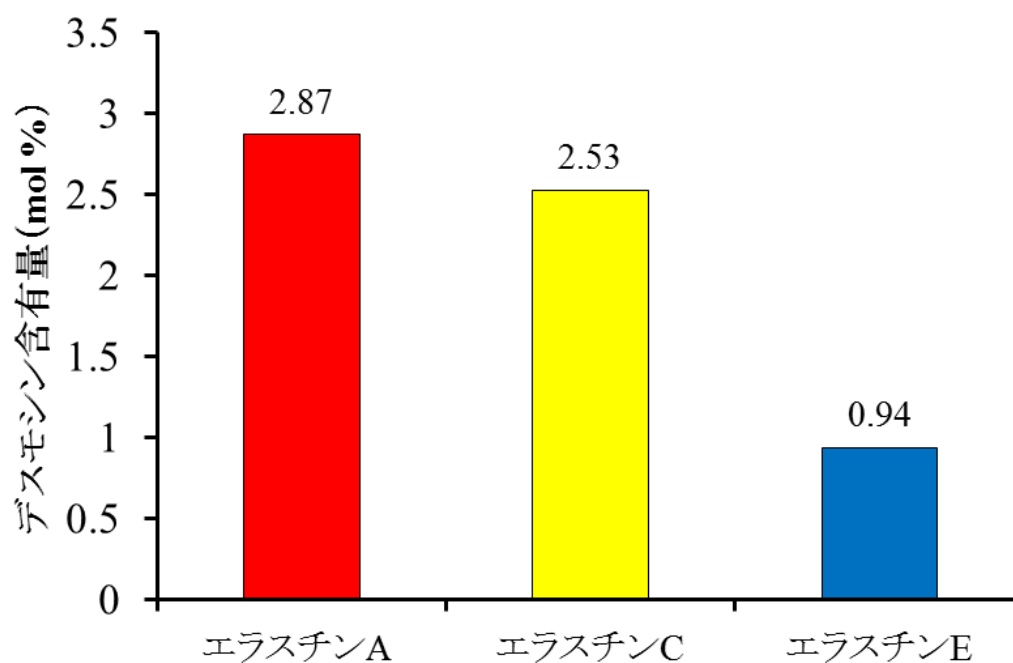


図 4-10 分画エラスチンのデスモシン含有量(研究室内データ)

本研究では分画エラスチン A-E のうち、エラスチン A を使用した。これは分画エラスチンのうち、エラスチン A が比較的容易に材料化(ゲル化、繊維化)することが可能であり、尚且つ材料化した際の強度が最も高いためである。再生医療用材料としての、ECM 細胞足場を作製するために、エラスチン A と靱帯細胞との相互作用の解明を試みた。

・培地中への ECM 添加実験

靭帯を構成する ECM が ACL 細胞に与える影響を、培地中への ECM 添加実験により検証した(図 3-12)。その結果、添加する ECM の違いによる遺伝子発現量に大きな差は見られなかったが、培地中へコラーゲンを添加することで靭帯組織関連遺伝子 (type I and III collagen、tenomodulin) の発現量が上昇する傾向が観察された。特に type III collagen 発現と結合組織マーカーである tenomodulin 発現の増加が顕著に現れた(図 3-12 b,c)。どちらも ACL 組織内で強く発現する遺伝子であることから(図 3-4 b,c)、コラーゲンは靭帯細胞の表現型を維持し、細胞の働きを促進させる可能性が示唆される。

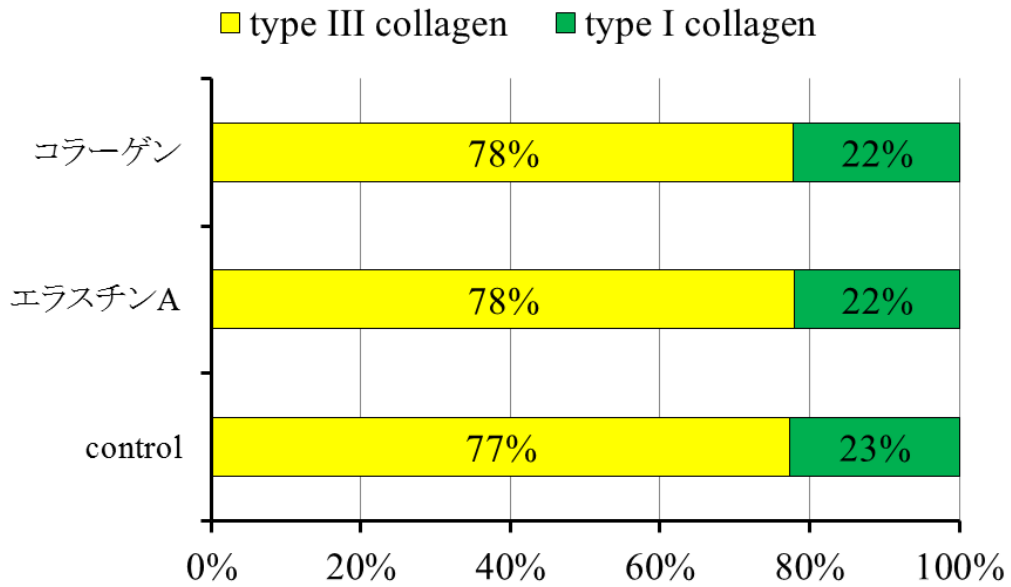
PDLF についても、培地中へのコラーゲン添加によって type III collagen や tenomodulin の発現量が上昇したことから、コラーゲンが靭帯細胞の働きを促進し、基質産生を促す可能性が示唆される結果となった(図 3-13)。

ECM 添加の結果を ACL 細胞と PDLF で比較したが、両者に大きな違いは見られず、ECM に対する細胞応答も近いと考えられる(図 3-14)。

Type III collagen は type I collagen と同様に線維性タンパク質である。様々な組織において type I collagen と共存するが、その比率は様々であり、弾性を示す結合組織に多く存在することが分かっている。そこで、図 3-12、図 3-13 の結果をまとめて、type I collagen と type III collagen の発現量の比を算出し、添加する ECM による違いを比較した(図 4-11、図 4-12)。その結果、control やエラスチン A 添加時と比較して、コラーゲン添加時には type III collagen 発現の割合が 3~5 %程度高かった。

一般に靭帯などの結合組織の治癒は、線維芽細胞が細胞外マトリックス (collagen など) の合成と分解を繰り返すことで進行する。Woo ら⁵¹⁾と Amiel ら⁵²⁾は靭帯組織の治癒過程において、治癒の初期段階に産生される collagen の大部分は type III collagen であること、また、腱を用いた靭帯再建時における靭帯化 (ligamentization) の過程においても type III collagen の発現量が増加することを報告している。本研究の結果では、コラーゲン添加時に type I collagen よりも type III collagen の発現割合が増加した。つまり、コラーゲンが靭帯組織の治癒やリモデリングを促進する働きを持つ可能性が示唆される結果となった。

(a) 7 days/ ACL cells



(b) 14 days/ ACL cells

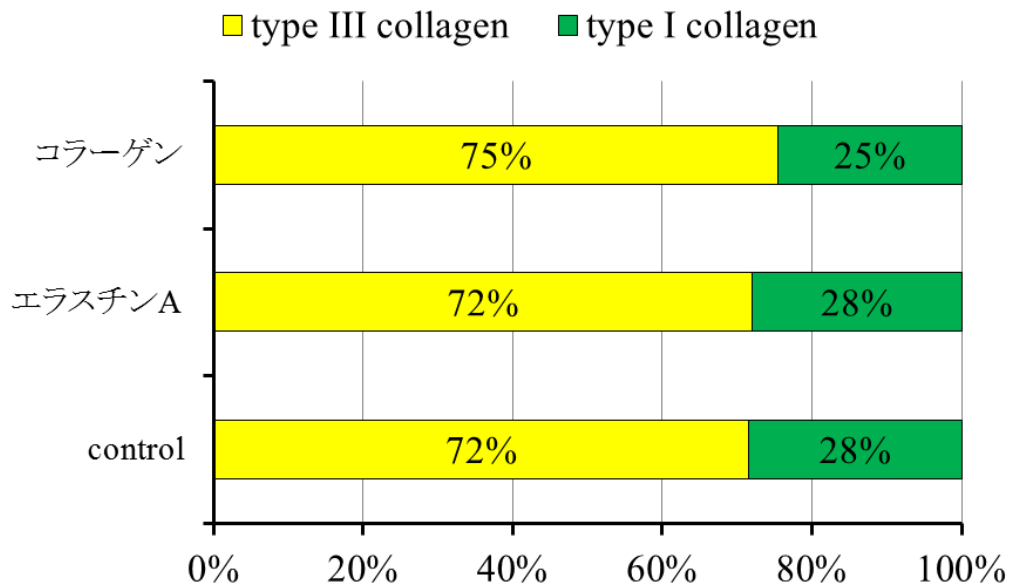
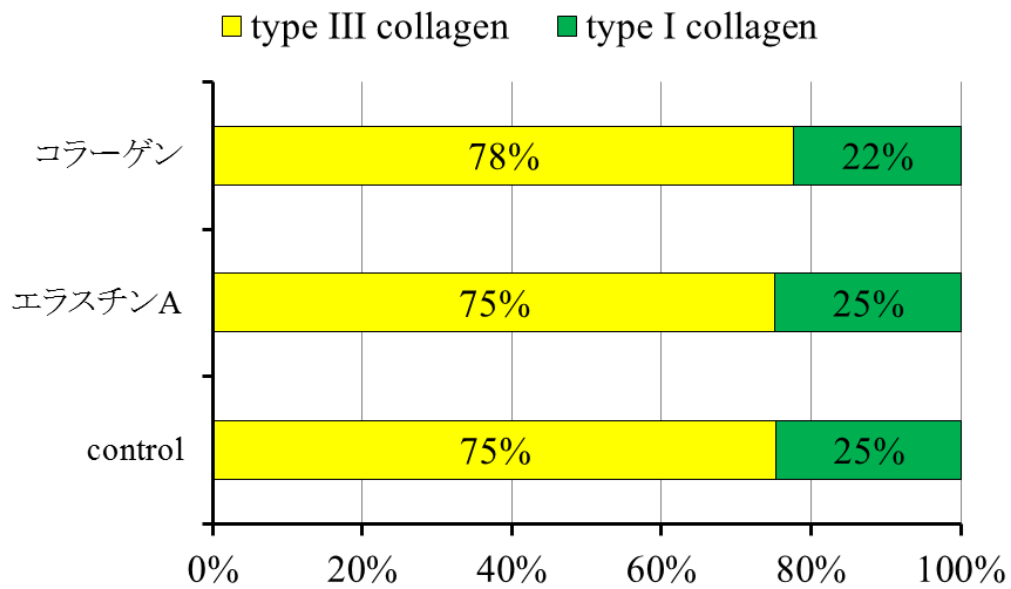


図 4-11 type I and III collagen の発現量比較 (ACL 細胞)

(a) 7 days/ PDLF



(b) 14 days/ PDLF

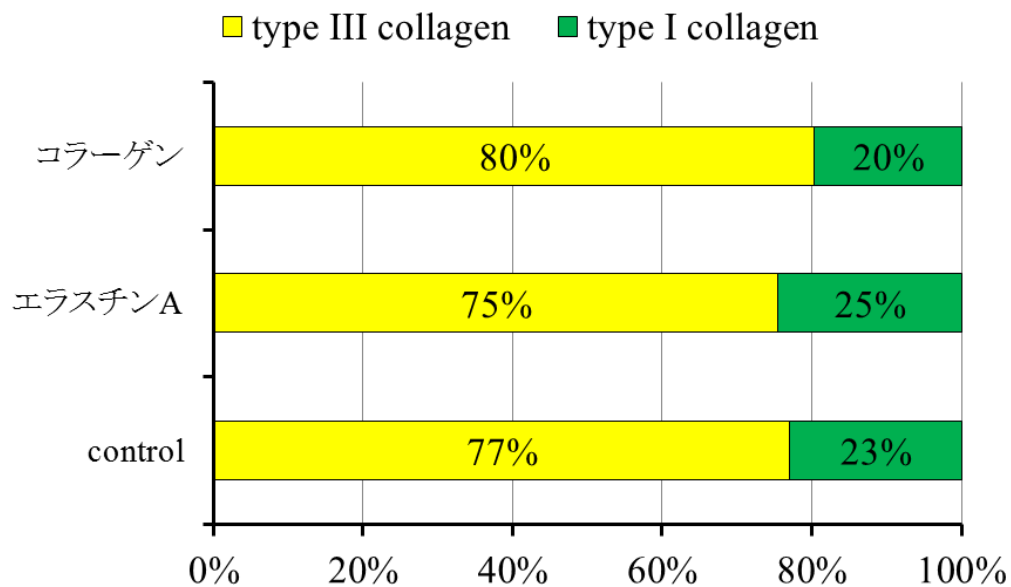


図 4-12 type I and III collagen の発現量比較 (PDLF)

・ECM ファイバー足場および、足場上の靭帯細胞

図 3-17、図 3-18 から、ECM ファイバー足場上の靭帯細胞は、足場の配向方向に沿って伸展した状態で培養されることが確認された。一方、生体内の靭帯細胞も紡錘型の線維芽様細胞であり、靭帯組織線維の長軸方向に配向して存在する事が知られている⁶⁾。つまり、本研究で作製した ECM ファイバー足場は、従来の細胞培養シャーレでの平面培養と比べ、生体内の環境に近いことが言え、細胞足場としての有用性が期待できる。

ECM ファイバー足場と生体内靭帯の線維径を比較すると、ACL では 0.12 μm 程度の線維 (乾燥状態) が太い束を作っていたのに対して、作製した足場の繊維径 (乾燥状態) は、エラスチン A 足場が平均で 1.7 μm 、コラーゲン足場が 0.5 μm であった。従って、作製した足場の繊維径は ACL を構成する線維とほぼ同等であることが分かった。ただし、足場の繊維径に応じて、靭帯細胞の応答が変化する可能性も考えられる。実際に、マイクロスケールの繊維足場の繊維径が、線維芽細胞の配向性等に影響を及ぼすという報告がある⁵³⁾。そのため、今後は繊維径の違いによる細胞応答の違いについても検証していく必要がある。今回の実験では、ファイバー径 0.5~2.0 μm の範囲での細胞応答を評価した結果である。

靭帯は関節が無理な方向に曲がるのを防ぐストッパーとして働くことで、関節の安定性を維持する。そのため、靭帯組織再生のための人工足場には、生体内靭帯と同等の力学的強度が求められる。今回作製した ECM ファイバー足場の弾性率 (コラーゲン足場: 1.2 MPa; エラスチン A 足場: 0.3 MPa) は ACL の弾性率 (コラーゲン成分: 3.2 MPa; エラスチン成分: 0.28 MPa) と近い値を示したものの、やや低かった (図 4-13)。生体組織と同様にエラスチン繊維とコラーゲン繊維を複合化させることや、他の ECM 繊維を複合化することにより、ECM 足場の強度はさらに上昇する可能性がある。移植手術直後から十分な力学的支持を得るためにも、足場の強度をさらに上昇させることは重要である。

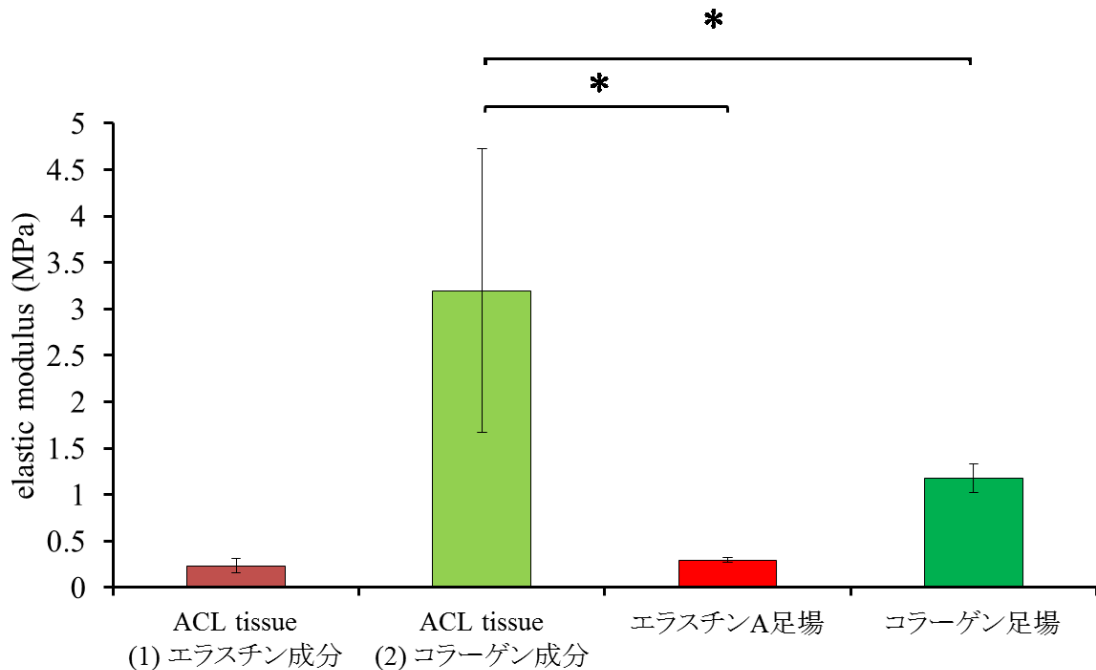


図 4-13 ACL と ECM ファイバー足場の弾性率比較 *: $p < 0.05$

・ECM ファイバー足場上靭帯細胞の遺伝子発現

ACL 細胞と PDLF の *tenomodulin* 発現量に関して、エラスチン A 足場とコラーゲン足場で大きな違いが観察された。(図 3-19 c、図 3-20 c)。

Tenomodulin は腱や靭帯などの密性結合組織に特異的に発現する血管新生抑制因子であり、発生過程において腱細胞や靭帯細胞の分化マーカーとなることが報告されている。また、転写因子である *scleraxis* も同様に、腱や靭帯細胞の分化マーカーであることが報告されている。しかしながら、腱の形成過程において *scleraxis* の発現は腱細胞だけでなく、その前駆細胞にも現れることが分かっている。さらに、*in vitro* においては、腱細胞だけでなく軟骨細胞や骨芽細胞などの細胞にも発現する。一方、*tenomodulin* は腱の形成過程において、分化した腱細胞にのみ発現し、*in vitro* においても分化した腱細胞や靭帯細胞においてのみ、その発現が確認されている⁵⁴⁻⁵⁸。従って、*tenomodulin* は *in vivo* と *in vitro* のどちらにおいても高い組織・細胞特異性があることが言え、腱細胞や靭帯細胞への分化の指標となると考えられる。

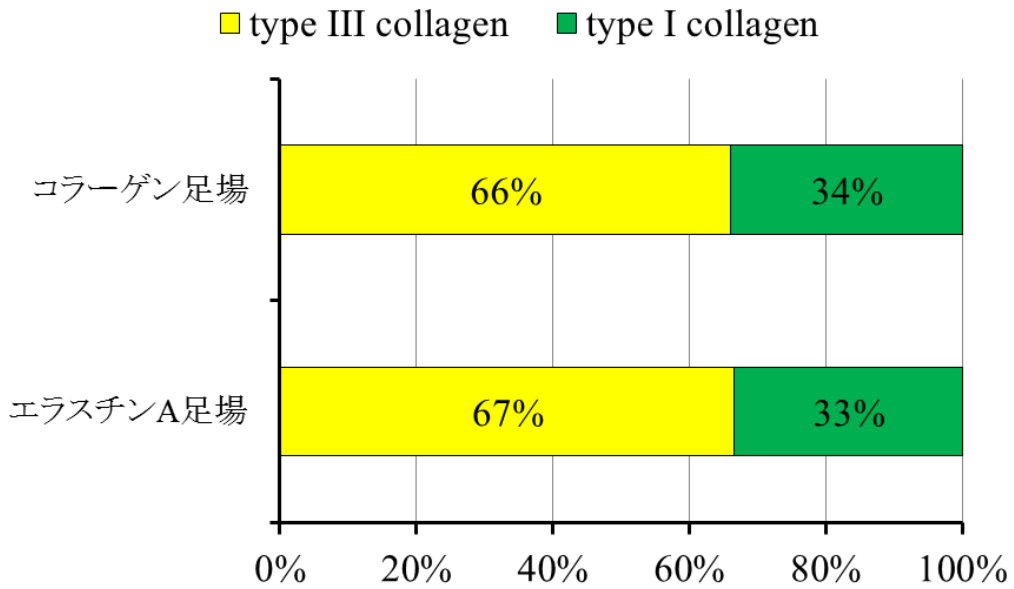
図 3-19 c、図 3-20 c より、エラスチン A 足場上で培養した靭帯細胞の *tenomodulin* 発現は極めて低いものであった。つまり、エラスチン A 足場上の靭帯細胞の表現型が変化し、別の細胞へと分化している可能性が考えられる。また、エラスチン A 足場上での *tenomodulin* 発現量を ACL 細胞と PDLF で比較すると、PDLF のほうが有意に低かった(図 3-21 c)。これらの結果から、ACL 細胞と比べて PDLF は ECM 足場の影響を受けやすく、比較的容易にその表現型を変化させる性質を持つことが推測される。

細胞の種類によって ECM への応答性に違いがみられた理由としては、各細胞が持っているエラスチンレセプターの数が違うことが考えられる。どちらの細胞もエラスチン A に対して同様の細胞応答を示したため、エラスチンの認識機構(レセプター)は同じであることが推測される。エラスチンに対する受容体として一般的なものはエラスチン結合タンパク質(EBP)である²⁷⁻²⁹⁾。しかし、EBP が靭帯細胞の表面にどのように、どれだけの割合で分布しているのかは不明である。本研究で得た応答性の違いからは、ACL 細胞と比べて、PDLF にはエラスチンを認識するレセプターが多く含まれる可能性が推測される。

エラスチン A 足場とコラーゲン足場で細胞応答に差が見られた理由は、両者の認識機構の違いによるものと考えられる。コラーゲンの認識は、インテグリンがコラーゲンの RGD 配列に結合することで起こることが知られている²⁵⁾。一方、エラスチンの認識は前述した EBP がエラスチンの VGVAPG 配列に結合することで起こる。さらに、エラスチンを認識するレセプターは EBP 以外にも存在する可能性が高い($\alpha\text{v}\beta\text{3}$ インテグリンによるトロポエラスチンの GRKRRK 配列の認識など⁵⁹⁾)。いずれにしても、各 ECM を認識するレセプターやアミノ酸配列の違いによって、細胞内に伝わるシグナル伝達経路に違いが生じ、結果として細胞応答に違いが現れたのだと推測される。しかしながら、それらを裏付ける結果が得られておらず、メカニズムに関しては未だ不明な点が残るのが現状である。

考察 4-3 と同様に、*type I collagen* と *type III collagen* の発現量の比を算出し、足場の ECM ごとに比較した(図 4-14)。その結果、ACL 細胞では ECM 足場の種類による違いは見られなかったが、PDLF ではコラーゲン足場上で *type III collagen* 発現量の割合が高かった。コラーゲン足場上の靭帯細胞は *tenomodulin* の発現を維持しており、さらに *type III collagen* 発現の割合が高くなる結果となった。つまり、コラーゲン足場には靭帯細胞の表現型を維持し、その機能を促進する働きをもつことが示唆される。これらの結果はコラーゲン添加実験の結果とも一致した。

(a) ACL cells



(b) PDLF

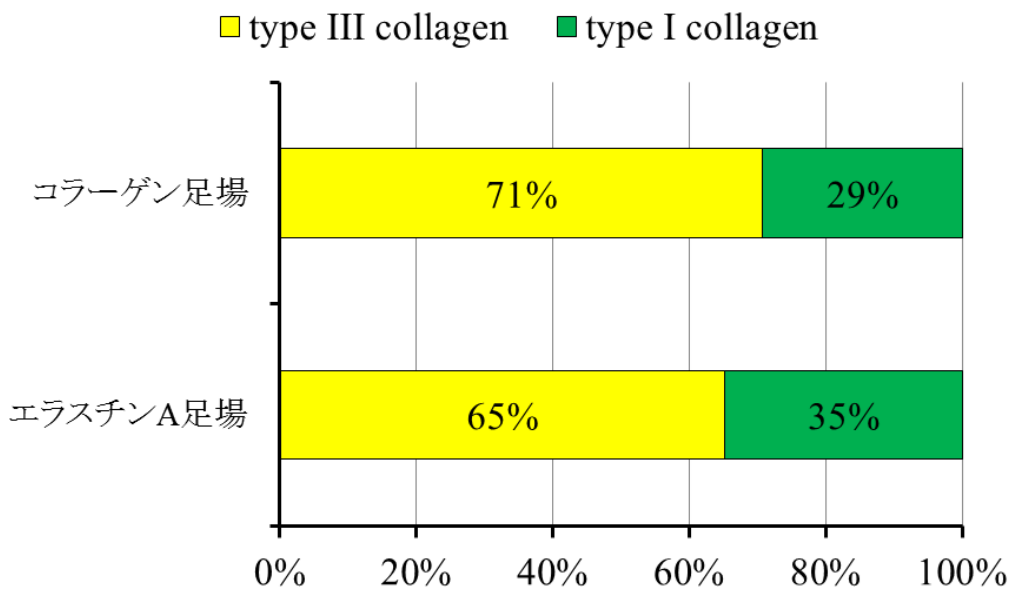


図 4-14 type I and III collagen の発現量比較 (ECM ファイバー足場)

・ECM ファイバー足場上靱帯細胞の ALP 活性

本研究では ECM ファイバー足場上で培養した靱帯細胞の表現型の評価として、ALP 活性の測定を行なった。

ALP (alkaline phosphatase) は骨芽細胞分化マーカーとして知られる膜結合型タンパク質である⁶⁰⁾。主に細胞膜の脂質二重層の外層に存在するホスファチジルイノシトールに共有結合し、二量体を形成している(図 4-15)⁶¹⁾⁶²⁾。ALP の役割は、リン酸エステルを加水分解して、石灰化部へリン酸を供給することである。ALP と石灰化の機構は未だ明らかにされていないものの、基質小胞を介して起こる説が有力である。石灰化の初期において骨芽細胞が細胞外マトリックス中に基質小胞を形成し、その中に結晶様構造物が出現し、次第に成長して小胞膜が断裂し、膜外へ突出する。石灰化が進むと石灰化球が形成され、周囲の I 型コラーゲン細線維に到達して線維に沿って石灰化領域が拡大していくと考えられている。また、ALP がヒドロキシアパタイトの結晶形成を阻害するピロリン酸を分解することも主要な役割の一つである⁶³⁾。ピロリン酸はヌクレオシド三リン酸の分解により生じ、ヒドロキシアパタイトの結晶成長を阻害する結晶毒であり、それを分解し、石灰化を促進することから ALP が骨形成・骨分化の指標となるとされている。ACL 細胞や PDLF が骨芽細胞へと分化し、その過程で ALP 発現量が増加するという報告¹³⁻¹⁵⁾³⁴⁾を受けて、本研究では靱帯細胞の表現型の評価として ALP 活性を測定した。

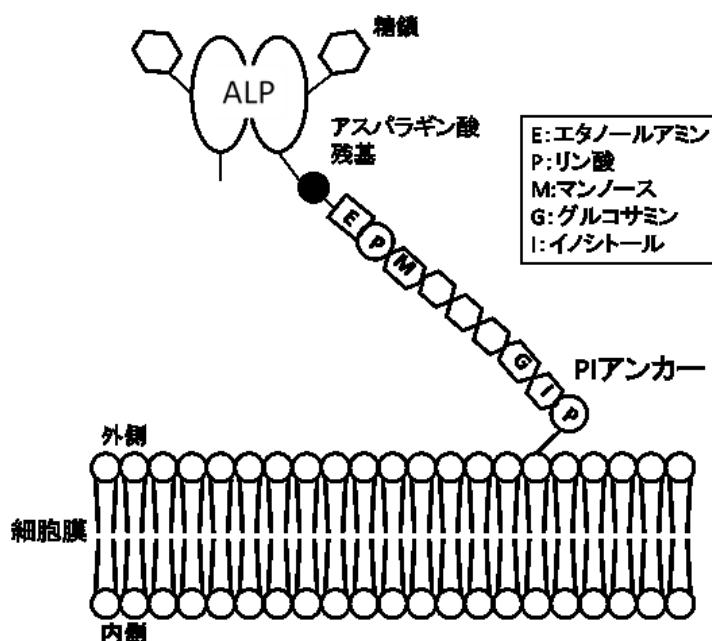


図 4-15 ALP と細胞膜の結合様式⁶²⁾

エラスチン A 足場上での靭帯細胞の ALP 活性は、細胞の種類によらず、コラーゲン足場上よりも高かった(図 3-22)。その一方で、エラスチン A 足場上では *tenomodulin* の発現量が極めて低かった(図 3-21 c)。これらの結果をまとめると、エラスチン A 足場上では、靭帯細胞マーカー (*tenomodulin*) が減少し、逆に骨芽細胞マーカー (ALP 活性) が増加したことになる。つまり、エラスチン A 足場上の靭帯細胞は、骨芽細胞に近い性質に変化した可能性が考えられる。そして、コラーゲンと比べてエラスチン A には靭帯細胞を骨芽細胞へと分化誘導する働きがあることが推測されるが、そのメカニズムについては未解明な部分が多い(図 4-16)。

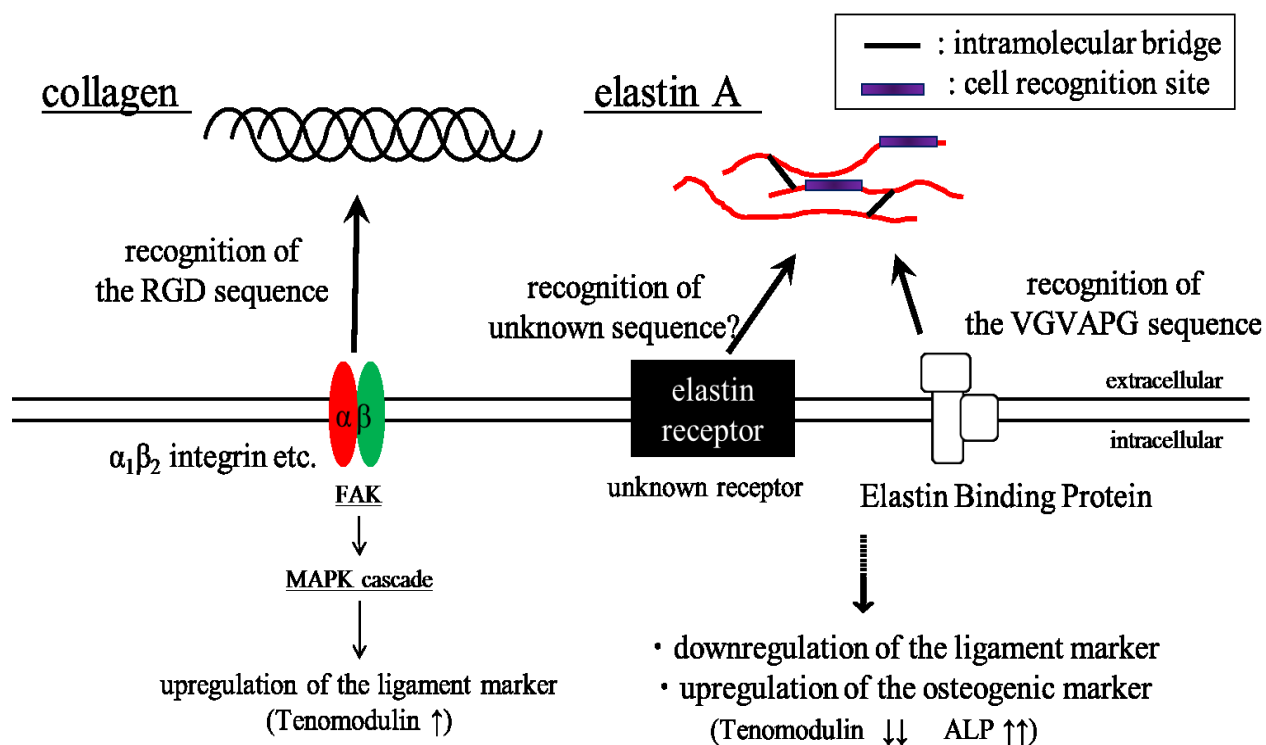


図 4-16 エラスチン A とコラーゲンの認識機構の違い

4-4 力学的刺激が靭帯細胞に与える影響

これまでの結果から、ACL 細胞と PDLF の性質は互いに似ており、また ECM に対する細胞応答も近いことが明らかとなった。ただし、PDLF は ACL 細胞と比べて分化マーカーの発現パターンが特徴的であり、表現型が変化しやすいことが示唆された。そこで本研究では、表現型の変化が起こりやすいと考えられる PDLF を用いて、力学的刺激が細胞に与える影響を検証した。

4-4-1 加圧培養が靭帯細胞に与える影響

・ALP 活性の定量

加圧培養後の ALP 活性は、ECM 足場の種類によらず上昇した(図 3-24)。つまり、加圧刺激には靭帯細胞の骨芽細胞への分化を促す働きがあると考えられる。Zhao ら³⁴⁾は PDLF を用いて、遠心力による加圧培養を行なった結果、ALP をはじめ骨芽細胞に特異的なタンパク質や遺伝子の発現が増加することを報告しており、加圧刺激による PDLF の骨芽細胞への分化誘導を示唆している。このような報告と本研究の結果は、骨芽細胞マーカーである ALP 発現が加圧培養後に上昇するという点で一致している。しかし、加圧刺激による骨芽細胞分化の詳細なメカニズムについては不明な点が多いのが現状である(図 4-17)。

・遺伝子発現の定量

図 3-25 a より、ALP は mRNA レベルにおいても上昇することが確認された。一方、靭帯細胞マーカーである *tenomodulin* の発現は、加圧培養後に減少する傾向が示された(図 3-25 d)。加圧培養後に ALP 活性・ALP mRNA が増加したことに加えて、*tenomodulin* が減少したことからも、圧力刺激によって靭帯細胞の表現型が変化したことが示唆される結果となった。

加圧培養後に *type I collagen* と *type III collagen* の発現量を比較したが、静置培養時と大きな変化は見られなかった(図 4-18)。

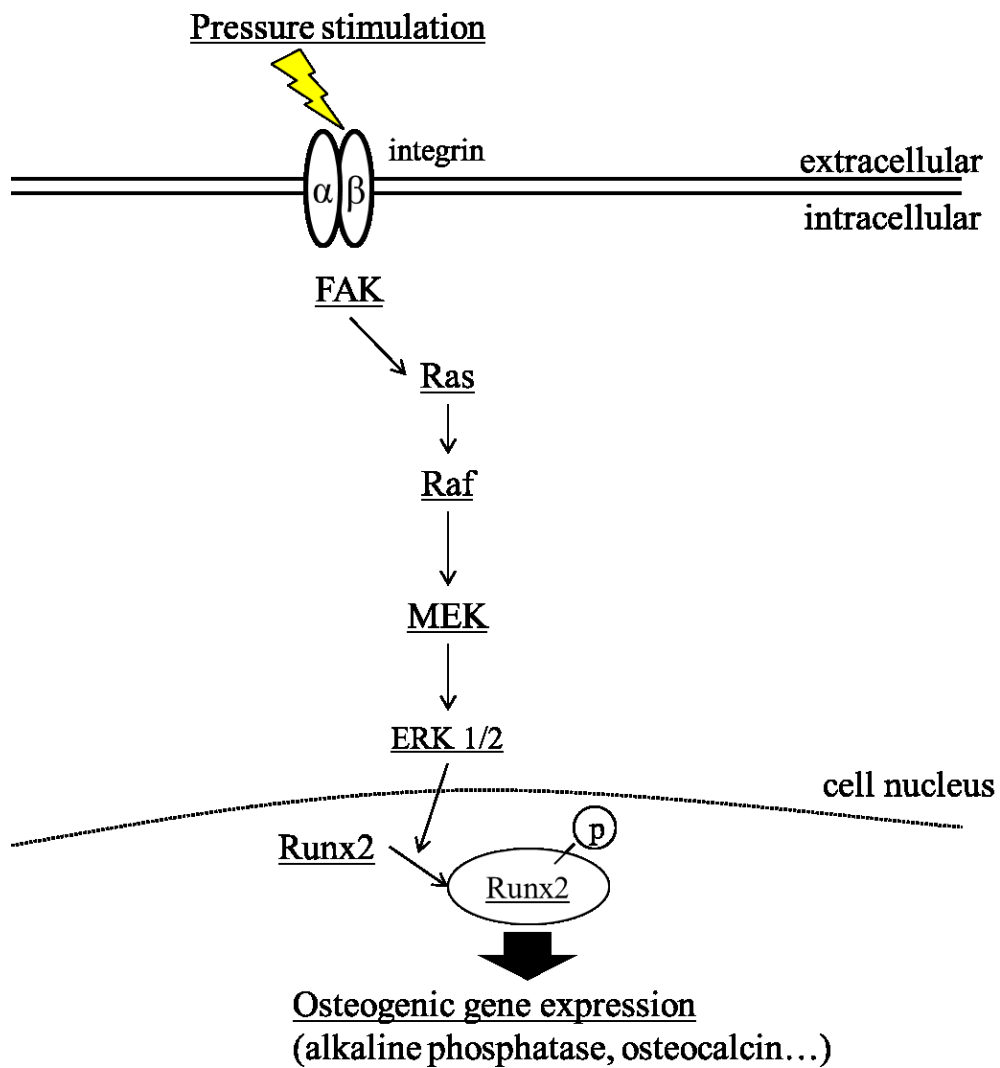
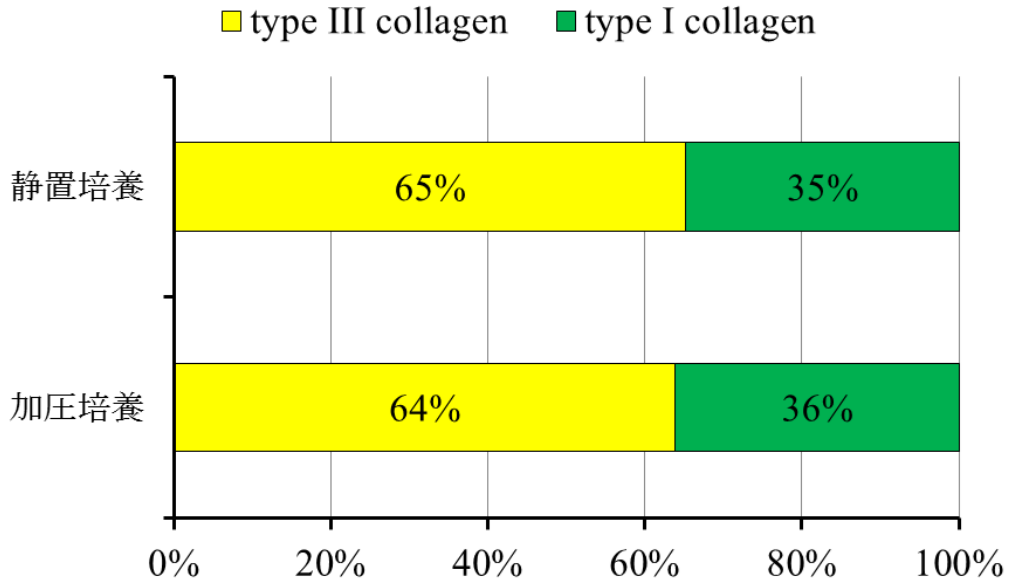


図 4-17 推測される骨芽細胞分化のメカニズムの一例 ³⁴⁾⁶⁴⁾

(a) エラスチンA足場



(b) コラーゲン足場

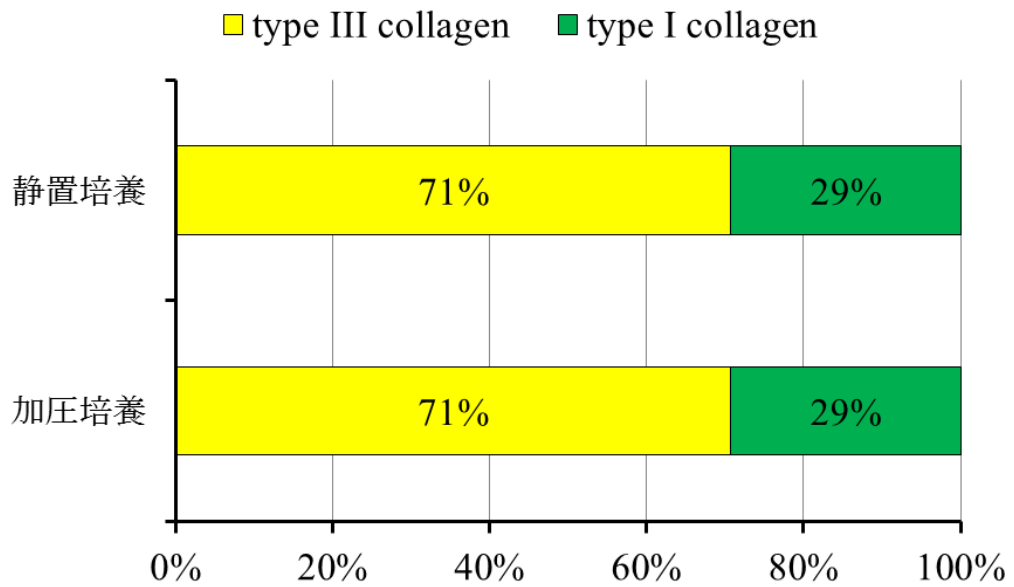


図 4-18 type I and III collagen の発現量比較 (加圧培養)

4-4-2 ねじれ型動的培養が靭帯細胞に与える影響

・ALP 活性の定量

ねじれ型動的培養によって、靭帯細胞の ALP 活性が減少した(図 3-26)。つまり、加圧刺激とは異なり、ねじれ刺激には靭帯細胞として表現型を維持する働きがあることが考えられる。

現在までに、PDLF に周期的な伸展刺激を与えることで ALP 活性および ALP mRNA の発現量が減少することが、Yamaguchi らをはじめ多くの研究者によって明らかにされてきた⁶⁵⁻⁶⁸⁾。力学的刺激に応答した ALP 発現量減少の詳細なメカニズムは不明であるが、プロスタグランジンやインターロイキン-1 β が関与している可能性が考えられている。プロスタグランジンおよびインターロイキン-1 β は炎症反応に関連するサイトカインであり、骨吸収を促進することや、線維芽細胞や骨芽細胞の ALP 活性を抑制することが知られている⁶⁶⁾⁶⁹⁾。また、Yamaguchi らや Yoshida らは、PDLF に周期的な伸展刺激を与えることで、これらのサイトカイン産生が増加することを報告している^{65-67)70,71)}。つまり、力学的刺激に応答して PDLF がプロスタグランジンなどのサイトカインを産生し、オートクリンもしくはパラクリンのように周辺の細胞の受容体に作用した結果、ALP 発現が減少するものと考えられる(図 4-19)。本研究において、ねじれ刺激により ALP 発現が減少する結果が得られたことから、上述のメカニズムが関与する可能性が考えられる。

靭帯細胞にねじれ刺激を与えることで、ALP 発現の減少や collagen 発現の増加など特有の細胞応答が観察された。以下の考察では、細胞が力学的刺激を認識するメカニズムについて記述する。また、ねじれ刺激と伸展刺激の違いについても考察する。

・力学的刺激の認識

以下に細胞が力学的な刺激を認識するメカニズムについて考察する。

細胞に伸展刺激を与えると、細胞膜が物理的に引っ張られる。この時、細胞膜に存在する特定のイオンチャネル(stretch-activated チャネル)が活性化し、細胞内にカルシウムイオンが流入することが分かっている。そして、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇することをきっかけとして、細胞内にシグナルが伝達されると考えられている³⁰⁾³¹⁾。つまり、力学的刺激を認識するレセプター(機械受容体)が、物理的な刺激(伸展刺激、ねじれ刺激、加圧刺激)を生化学的な刺激に変換し、細胞内のシグナル伝達分子が活性化することで様々な細胞応答(ALP 発現、コラーゲン産生など)が現れるのだと考えられる。

別の可能性として、細胞骨格タンパク質や接着斑が関与することも考えられる。一般的な接着細胞は ECM との接着部位に接着斑が形成される。接着斑は ECM への接着分子であるインテグリン、膜裏打ちタンパク質(vinculin、talin、FAK など)や接着斑に連結するストレスファイバーから構成される。ストレスファイバーは主に actin から成り、細胞全体にわたって存在しながら細胞骨格を形成している²¹⁾⁷²⁾(図 4-20)。ECM 足場にインテグリンを介して接着した細胞が伸展刺激やねじれ刺激を受けると、インテグリンの裏打ちタンパク群である接着斑タンパク質の一部や細胞骨格タンパク質(アクチンストレスファイバー)など細胞膜に結合するタンパク質の立体構造が変化し、それまで隠れていたリン酸化部位や他の因子との結合部位が露出(もしくは隠れる)ことでタンパク質の活性が変化し、シグナル伝達を開始される可能性が指摘されている⁷³⁾。実際に、骨格タンパク質や接着斑タンパク質が力学刺激を感知し、細胞応答を導くシグナルを生み出すセンサー(メカトランスデューサー)として働く可能性が示されている⁷²⁾。

力学的刺激に対する細胞応答のメカニズムは未だ不明な点が多いものの、前述のようにイオンチャネルや接着斑タンパク質などが制御している可能性が推測される。

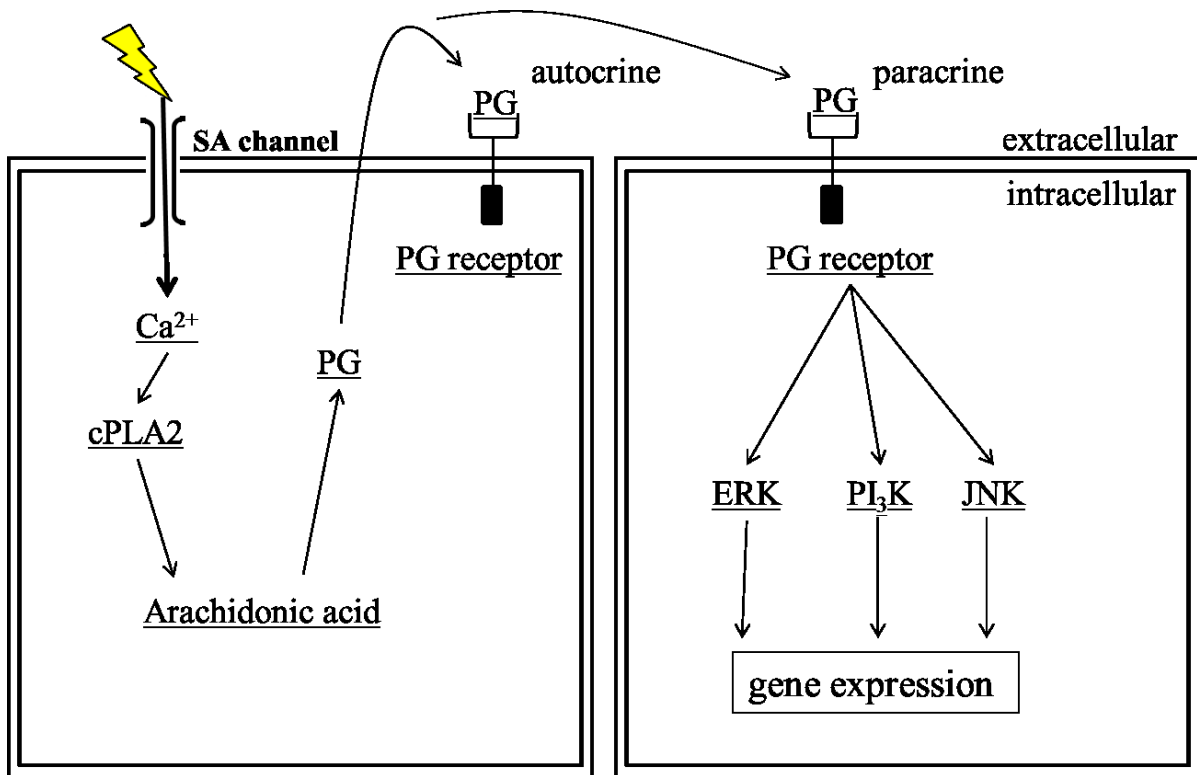


図 4-19 機械刺激によるプロスタグランジン (PG) の産生⁷³⁾
 cPLA2: phospholipaseA2、PG: Prostaglandin、

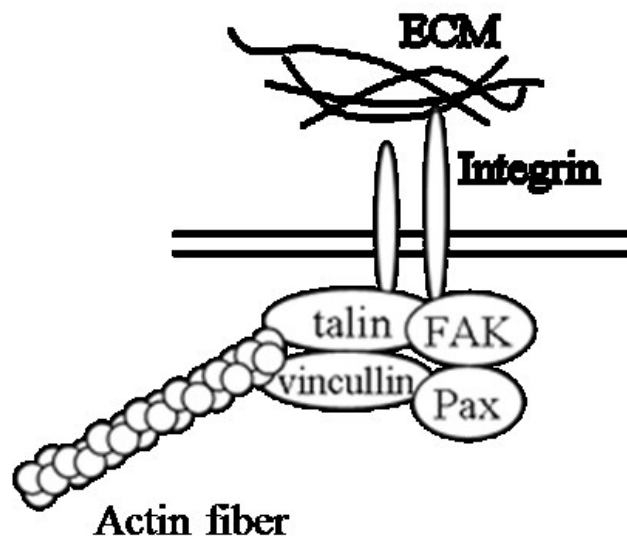


図 4-20 接着斑の分子の模式図²¹⁾⁷²⁾

・ねじれ刺激と伸展刺激の違い

まず、本研究においてねじれ刺激に着目した背景を述べる。

生体内において ACL には、膝関節の動きに応じて最大で 90 度のねじれ運動が生じ、同時に伸張している⁷⁾。つまり、ACL は「ねじれ」と「伸び」の大きく二つの運動をしている。しかしながら、ACL は約 6 % (2 mm) の伸張により損傷を受けるとされているため⁹⁾、生理的条件下において ACL に生じる伸張は 6 % 未満ということになる。このことを考慮に入れると、靭帯細胞に伝わる力学刺激は伸展(伸張)による刺激ではなく、ねじれによる刺激が主になると推測される。そこで、本研究ではねじれ刺激に注目をした。

本研究では ECM ファイバー足場 (2 cm × 2.5 cm × 80 μm) の上で靭帯細胞を培養し、足場の両端をねじれ型動的培養装置 (図 4-21) に固定した。その後、足場の両端を互いに反対の方向に 25 度ずつ回転させることで、全体で 50 度のねじれ運動を生じさせた。この条件では、細胞のひとつひとつがねじられることはなく、むしろ足場の伸張に伴う細胞の伸展が生じるものと考えられる。そのため、前述の考察では伸展刺激とねじれ刺激では同様のメカニズムで細胞応答が起こると推測した。

伸展刺激とねじれ刺激との大きな違いは、足場の場所に応じて生じる力の大きさが異なるかどうかであると考えられる。例えば、一軸方向の伸展運動を考えると、生じる引張歪み (tensile strain) は伸展方向に一様に生じるものと考えられる (図 4-22a)。一方、ねじれ運動では足場の場所 (中央部分と両末端部分) に応じて、生じる歪みの大きさに差が生じると考えられる。我々の見積もりでは、引張歪みは足場の回転 (ねじれ) 軸から外側に向かって徐々に大きくなっていく (図 4-22b)。さらに、運動に伴う培地の流れによるせん断応力 (fluid shear stress) にも両者で違いが生じると考えている。ねじれ運動時には回転軸とは垂直方向の中心ラインから、外側 (足場の固定末端) 方向に向かって徐々にせん断応力が大きくなっていくと想定される (図 4-22c)。従って、足場の場所に応じて細胞には異なる大きさの歪みが生じることになり、これがねじれ運動の大きな特徴になると考えられる。

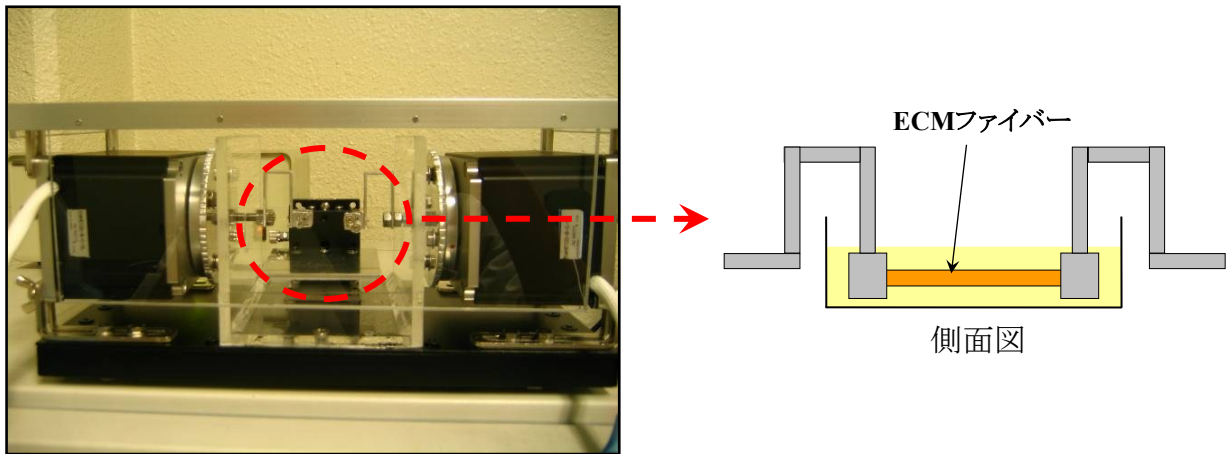


図 4-21 ねじれ型動的培養装置 (左) と概略図 (右)

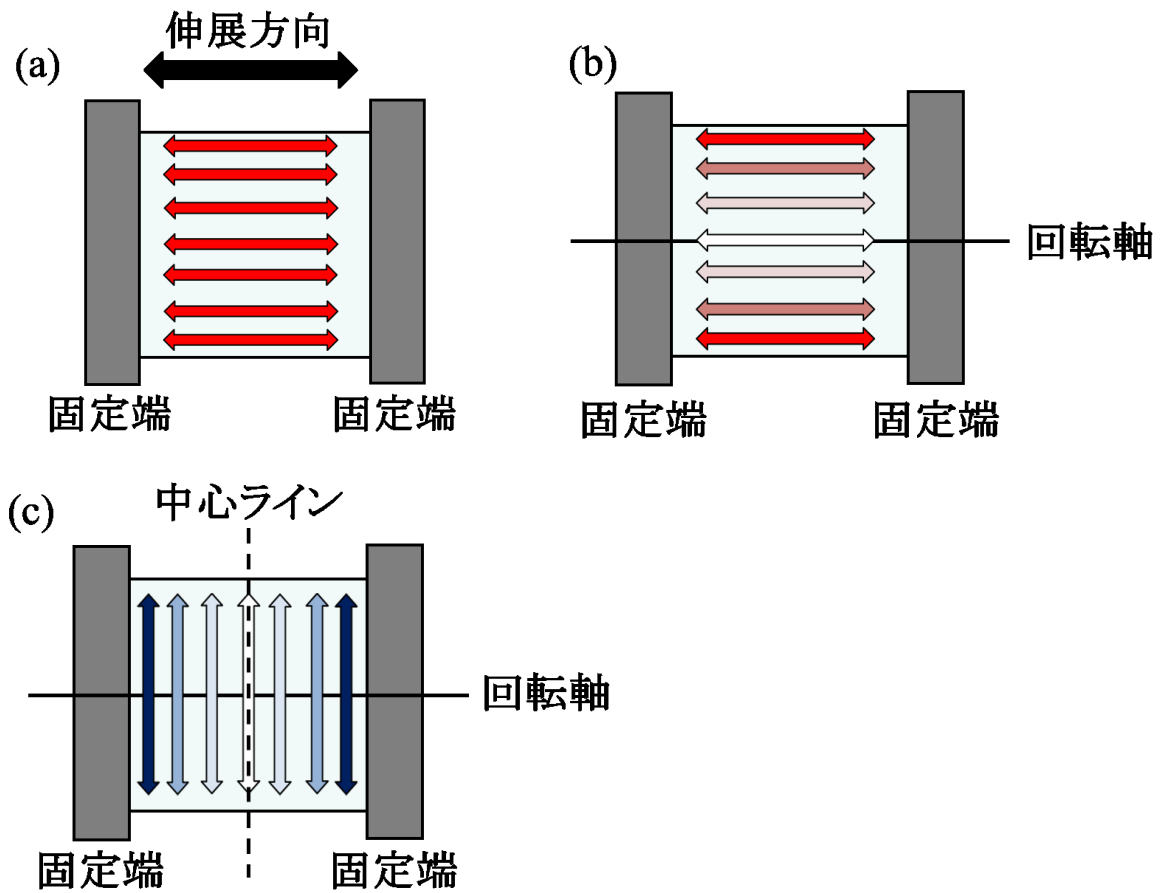


図 4-22 ねじれ運動と伸展運動時に生じる歪みの概念図

(a) 伸展刺激時の引張歪み (b) ねじれ刺激時の引張歪み (c) ねじれ刺激時のせん断応力

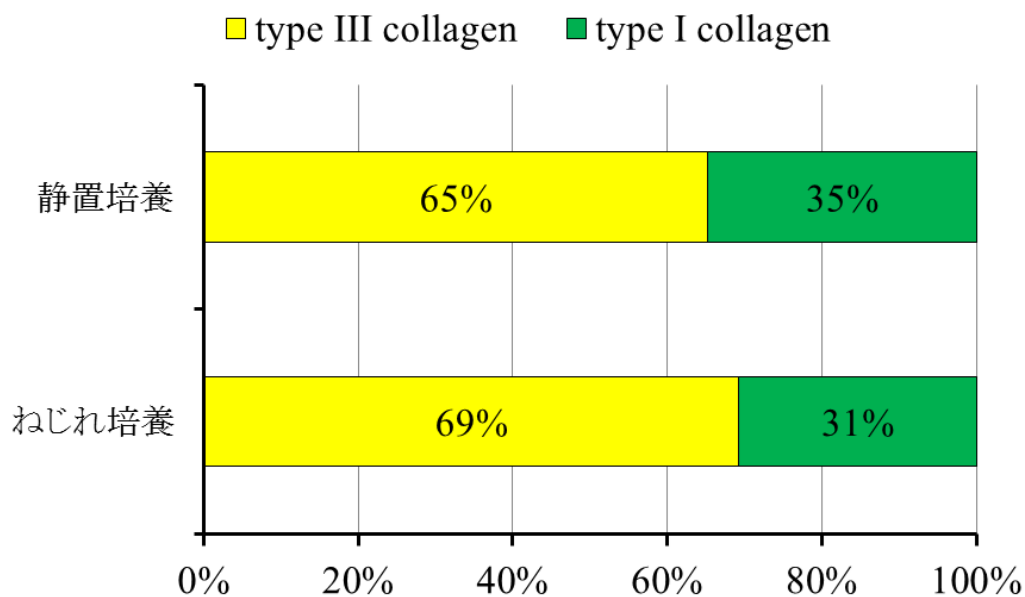
(矢印の色が濃いほど大きな歪みが生じることを示す)

・遺伝子発現の定量

ねじれ刺激による ALP 発現の減少が mRNA レベルでも確認され、靭帯細胞の表現型が維持されることが示唆された(図 3-27 a)。一方で、靭帯の主要成分の一つである type III collagen の発現量は、ねじれ刺激によって増加する結果となった(図 3-27 c)。Kim ら⁷⁴⁾は、ヒト ACL から単離した ACL 細胞に一軸方向の周期的な伸展刺激を与えることで、type I collagen および type III collagen の mRNA 発現量が増加することを報告した。本研究のねじれ刺激においても同様に、type III collagen の発現量が増加する結果が得られたが、type I collagen の発現量は逆に減少する結果となった。つまり、良く似た細胞応答メカニズムを想定していたねじれ刺激と伸展刺激には、それぞれ異なる ECM 産生メカニズムが存在する可能性が示唆される結果となった。このような異なる細胞応答性が観察された原因の一つに、前述した歪みのかかり方の違いが関与している可能性が考えられる。

ねじれ型動的培養後の type I collagen と type III collagen の発現量の比を算出した(図 4-23)。その結果、ECM 足場の種類によらず、ねじれ刺激を与えることで type III collagen 発現の割合が静置培養時よりも 4~9 %程度高くなることが分かった。Kim ら⁷⁴⁾は、ACL 細胞に周期的な伸展刺激を与えた際に type I collagen よりも type III collagen mRNA 発現の割合が高くなることを示しており、type III collagen が組織修復の初期段階に多く産生される基質であることから、伸展刺激が靭帯の治癒やリモデリングにおいて正の調節因子と成り得る可能性を指摘している。本研究のねじれ刺激の結果も遺伝子レベルではあるが、type III collagen の発現割合が増加した。ALP 発現は(図 3-26、図 3-27 a)、遺伝子発現と同様にタンパク質発現も減少したことから、type III collagen についても遺伝子と同様にタンパク質レベルでも発現割合が増加することが期待できる。つまり、Kim らの報告と同様に、ねじれ刺激が靭帯のリモデリングにおいて有効である可能性が示唆される。しかし、靭帯マーカーである tenomodulin の発現量は、ねじれ培養後にも変化しなかった(図 3-27 d)。特に、エラスチン A 足場上の細胞では tenomodulin の発現量は極めて低いままであった。ねじれ刺激が靭帯細胞の表現型変化にどのような影響を及ぼすかについては更なる実験が必要となる。今回は、ねじれ型動的培養を単一の条件でのみ行っているため、今後はねじれ角度や動的培養時間を変化させることで、靭帯細胞に与える影響をより詳細に検討することが求められる。

(a) エラスチンA足場



(b) コラーゲン足場

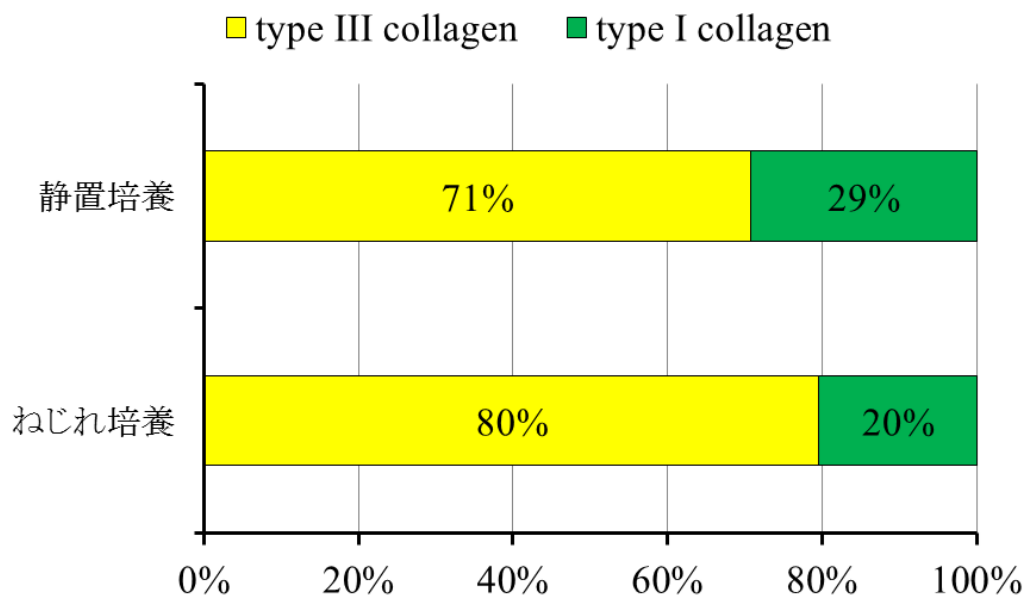


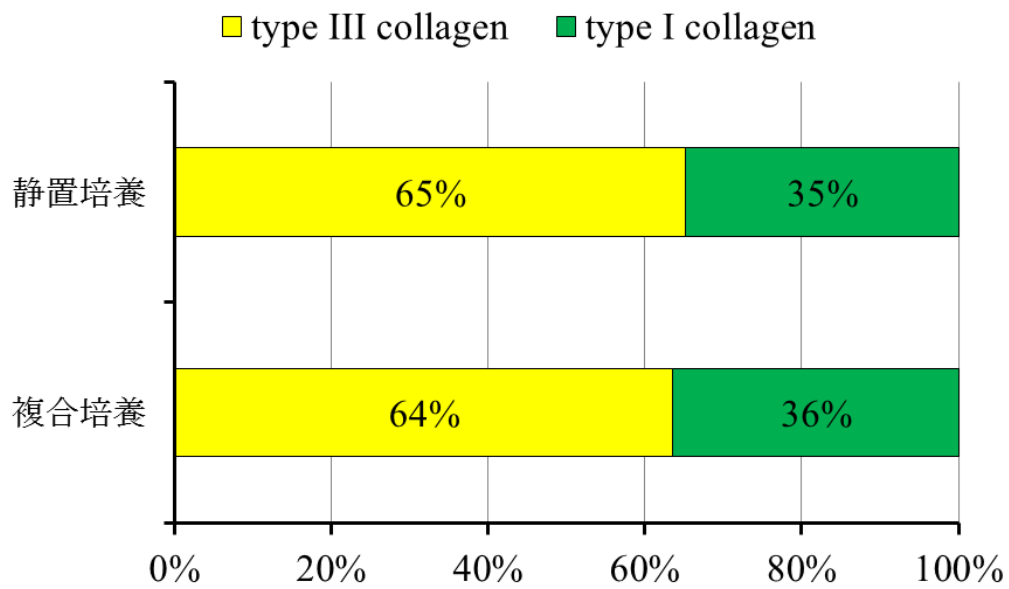
図 4-23 type I and III collagen の発現量比較(ねじれ型動的培養)

4-4-3 複合型動的培養が靭帯細胞に与える影響

本研究では ACL が生体内で受ける力学的刺激として圧力刺激とねじれ刺激に注目し、靭帯細胞に与える影響を評価した。その結果、圧力刺激による骨分化誘導効果やねじれ刺激による靭帯基質の産生促進効果などが明らかとなった。しかし、生体内ではこれらの力学的な刺激が単独で生じるのではなく、同時にかつ複雑に生じると考えられる。そこで、圧力刺激とねじれ刺激を同時に作用させることで、靭帯細胞がどのような応答を示すのかを調査した。

圧力刺激とねじれ刺激を同時に作用させる複合型動的培養を行なった後、靭帯細胞の遺伝子発現の定量を行なった。その結果、力学的刺激を単独で作用させた場合とは異なり、ALP、type I collagen、type III collagen、tenomodulin の発現量がそれぞれ静置培養時の発現量と同等であった(図 3-28)。また、type I collagen と type III collagen の発現量の比に関しても、静置培養時とは変化がなかった(図 4-24)。これらの結果から、圧力刺激とねじれ刺激による影響が同時に現れたために、その効果が互いに打ち消されてしまい、正味の発現量に変化が無いように見えたのではないかと考えた。そこで、複合型動的培養を行なった後に ECM ファイバー足場上の靭帯細胞が発現する ALP と type III collagen のタンパク質発現を免疫蛍光染色により確認した(図 3-29)。その結果、各タンパク質の発現量は ECM ファイバー足場の場所によって異なっており、ALP は ECM ファイバー足場の固定末端付近で強く発現しており、足場の中央部分では発現が弱いことが分かった。ALP とは逆に、type III collagen の発現は足場の中央部分で強く、足場の固定末端では弱かった。免疫蛍光染色の結果から、複合培養後に発現するタンパク質の量を ECM ファイバー足場の全体で考えると、足場の末端部分と中央部分ではそれぞれタンパク質発現が増減しているため、正味の発現量に変化が見られなくなったのだと考えられる(例:ALP が末端部分で増加し、中央部分で減少することで正味の発現量に変化しなくなる)。遺伝子発現の定量は足場上の全細胞から同時に行なっていることを考慮すると、このことが、複合培養後の遺伝子発現量が静置培養時の発現量と同等であった原因であると推測される。

(a) エラスチンA足場



(b) コラーゲン足場

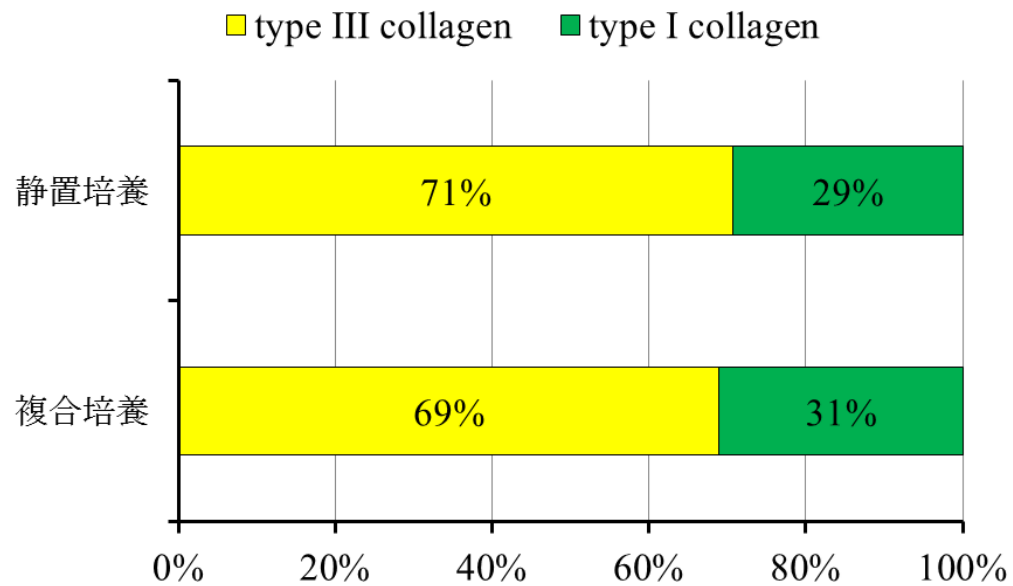


図 4-24 type I and III collagen の発現量比較(複合型動的培養)

免疫蛍光染色の結果(図 3-29)から、ECM ファイバー足場の場所に応じて発現するタンパク質が異なることが分かった。骨芽細胞マーカーである ALP が足場末端部分で強発現し(図 3-29 a4, a6, c4, c6)、靭帯成分である type III collagen が足場中央部分で強発現した(図 3-29 b5, d5)。これらの結果は、複合型動的培養によって靭帯細胞の表現型変化を局所的に誘導できる可能性を示唆している。靭帯は骨と骨を結合する組織であるため、組織工学的な人工靭帯を作製する際には「骨(末端)-靭帯(中央)-骨(末端)」という段階的な階層構造を再現する必要がある。今回得られた結果では、足場の末端と中央部分ではそれぞれ ALP と type III collagen の発現量が増加しており、靭帯特有の段階的な階層構造が再現される可能性が期待される。今後、複合型動的培養により生じる細胞応答メカニズムの解明を含め、最適な実験条件の検討を行うなど詳細な研究を行うことが重要である。

5 結論

Conclusion

5 結論

本研究では靭帯組織がエラスチン及びコラーゲン等の ECM から構成される線維性の結合組織であり、生体内において常に力学的刺激にさらされる環境にあることに着目し、それらの因子が靭帯細胞に与える影響を検証した。また、由来する組織の異なる二種類の靭帯細胞 (ACL 細胞と PDLF) の性質を比較し、以下のような結論を得た。

1. ACL 細胞と PDLF について

ヒト ACL より単離した ACL 細胞と、歯周靭帯由来の PDLF の遺伝子 (type I collagen, type III collagen, tenomodulin) 発現パターンは類似していた。また、ECM に対する細胞応答に関しても同様の応答を示した。以上の結果から、両者は互いに近い性質を持つことが分かった。ただし、PDLF は ACL 細胞よりも ALP 発現が高かった点や、エラスチン A 足場上での tenomodulin 発現量が低かった点から、PDLF の表現型は比較的变化しやすい可能性が示唆された。

2. ECM ファイバー足場に対する靭帯細胞の応答について

エラスチン A 足場上では靭帯細胞の表現型が変化し、骨芽細胞に近い性質を示した (tenomodulin 発現の減少、ALP の増加)。一方、コラーゲン足場上では tenomodulin が発現しており、靭帯細胞としての表現型を維持することが分かった。

3. 力学的刺激に対する靭帯細胞の応答について

力学的刺激により、靭帯細胞の表現型が変化することが示唆された。特に、加圧刺激は ALP 発現を増加させるなど、骨芽細胞への分化を促進させた。一方、ねじれ刺激は ALP 発現を減少させ、type III collagen 発現の割合を増加させるなど、靭帯細胞としての働きを促進させた。また、これらの刺激を同時に与えた際には、足場の部位特異的に靭帯細胞の表現型が変化することが示唆された。

6 参考文献

- 1) Nagai M. Design of Biomaterials for Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *SEN'I GAKKAISHI* 2005; 61: 139-141.
- 2) Petrigliano FA, McAllister DR, Wu B M. Tissue engineering for anterior cruciate ligament reconstruction: a review of current strategies. *Arthroscopy* 2006; 22: 441-51.
- 3) 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.
- 4) 富士川恭輔. 図説 膝の臨床. メジカルビュー, 2002.
- 5) Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 2007; 26: 7530-6.
- 6) Duthon VB, Barea C, Abrassart S, Fasel JH, Fritschy D, Menetrey JI. Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006; 14: 204-13.
- 7) Arnold MP, Blankevoort L, ten Ham A, Verdonschot N, van Kampen A. Twist and its effect on ACL graft forces. *J Orthop Res* 2004; 22: 963-9.
- 8) Bessette GC, Hunter RE. The anterior cruciate ligament. *Orthopedics* 1990; 13: 551-562.
- 9) Amis AA., Dawkins GPC. Functional anatomy of the anterior cruciate ligament: Fibre bundle actions related to ligament replacements and injuries. *J. Bone Jt. Surg. Br.* 1991; 73: 260-267.
- 10) Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 2005; 26: 7530-6.
- 11) Wang IE, Mitroo S, Chen FH, Lu HH, Doty SB. Age-dependent changes in matrix composition and organization at the ligament-to-bone insertion. *J Orthop Res* 2006; 24: 1745-1755.
- 12) Tetsunaga T, Furumatsu T, Abe N, Nishida K, Naruse K, Ozaki T. Mechanical stretch stimulates integrin $\alpha\beta3$ -mediated collagen expression in human anterior cruciate ligament cells. *J Biomech* 2009; 42: 2097-2103.
- 13) Cheng MT, Yang HW, Chen TH, Lee OK. Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments. *Cell Prolif* 2009; 42: 448-60.

- 14) Steinert AF, Kunz M, Prager P, Barthel T, Jakob F, Noth U, Murray MM, Evans CH, Porter RM. Mesenchymal stem cell characteristics of human anterior cruciate ligament outgrowth cells. *Tissue Eng Part A* 2010; 17: 1357-88.
- 15) Zhang J, Pan T, Im HJ, Fu FH, Wang JH. Differential properties of human ACL and MCL stem cells may be responsible for their differential healing capacity. *BMC Med* 2011; 9: 68.
- 16) Shukunami C, Oshima Y, Hiraki Y. Molecular cloning of tenomodulin, a novel chondromodulin-I related gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 1323-7.
- 17) Brandau O, Meindl A, Fassler R, Aszodi A. A novel gene, tendin, is strongly expressed in tendons and ligaments and shows high homology with chondromodulin-I. *Dev Dyn* 2001; 221: 72-80.
- 18) Oshima Y, Shukunami C, Honda J, Nishida K, Tashiro F, Miyazaki J, Hiraki Y, Tano Y. Expression and localization of tenomodulin, a transmembrane type chondromodulin-I-related angiogenesis inhibitor, in mouse eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1814-23.
- 19) Wu LP, Wei X, Ling JQ, Liu L. The surface antigen expression of periodontal ligament cells and dental pulp cells in vitro. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2009; 27: 20-3.
- 20) Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y. Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 380-388.
- 21) 多賀谷光男. 分子細胞生物学. 朝倉書店, 2002.
- 22) 中村桂子、ほか. THE CELL 細胞の分子生物学. Newton Press, 1995.
- 23) 宮坂昌之. Adhesion Molecule 接着分子. メジカルビュー社, 1991.
- 24) 宮坂昌之. 接着分子ハンドブック. 秀潤社, 1994.
- 25) 林正男、ほか: 新 細胞接着分子の世界. 羊土社, 2001.
- 26) Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 311-39.
- 27) Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JC, van Kuppevelt TH. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28: 4378-98.
- 28) Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49:235-44.
- 29) Duca L, Duca L, Blanchevoye C, Cantarelli B, Ghoneim C, Dedieu S, Delacoux F, Hornebeck W, Hinek A, Martiny L, Debelle L. The elastin

- receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its Neu-1 subunit. *J Biol Chem* 2007; 17: 12484-91.
- 30) 成瀬恵治: ソフトリソグラフィーを駆使したメカトランスダクションの研究. 蛋白質 核酸 酵素 2006; 51 No.6: 705-714.
- 31) 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.
- 32) 木南凌、ほか: 細胞の世界. 西村書店, 2005.
- 33) Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* 1998; 258: 1-18.
- 34) Zhao YH, Zhao Y, Wang C, Li S, Song H, Wei F, Pan K, Zhu K, Yang P, Tu Q, Chen J. Expression of Osterix in mechanical stress-induced osteogenic differentiation of periodontal ligament cells in vitro. *Eur J Oral Sci* 2008;116: 199-206.
- 35) 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.
- 36) Elliott, D. H. The Growth of Tendon after Denervation or Excision of Its Muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1965; 162: 203-209.
- 37) J'ozsa LG, Kannus P. *Human tendons: anatomy, physiology and pathology*. Champaign, Illinois: Human Kinetics, 1997: 1-574.
- 38) Diamant J, Keller A, Baer E, Litt M, Arridge RG. Collagen; ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1972; 180: 293-315.
- 39) Rigby BJ. Effect of Cyclic Extension on the Physical Properties of Tendon Collagen and Its Possible Relation to Biological Ageing of Collagen. *Nature* 1964; 202: 1072-4.
- 40) Thornton GM, Shrive NG, Frank CB. Ligament creep recruits fibres at low stresses and can lead to modulus-reducing fibre damage at higher creep stresses: a study in rabbit medial collateral ligament model. *J Orthop Res* 2002; 20: 967-74.
- 41) 内山安男、相磯貞和 監訳. 靱帯組織学 原書第2版. 南江堂. 2000.
- 42) Hess GP, Cappiello WL, Poole RM, Hunter SC. Prevention and treatment of overuse tendon injuries. *Sports Med* 1989; 8: 371-84.
- 43) Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y. Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 380-388.

- 44) Lee IC, Wang JH, Lee YT, Young TH. Development of a useful technique to discriminate anterior cruciate ligament cells and mesenchymal stem cells--the application of cell electrophoresis. *J Biomed Mater Res A* 2007; 82: 230-7.
- 45) Bordin S, Page RC, Narayanan AS. Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: isolation and characterization of one phenotype. *Science* 1984; 223: 171-3.
- 46) McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res* 1991; 26: 144-54.
- 47) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-55.
- 48) Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988; 67: 66-70.
- 49) Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 1996; 245: 327-41.
- 50) Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1995; 57: 52-9.
- 51) Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 367: 321-23.
- 52) Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH. The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J Orthop Res* 1986; 4: 162-72.
- 53) Hwang CM, Park Y, Park JY, Lee K, Sun K, Khademhosseini A, Lee SH. Controlled cellular orientation on PLGA microfibers with defined diameters. *Biomed Microdevices* 2009; 11: 739- 46.
- 54) Kimura N, Shukunami C, Hakuno D, Yoshioka M, Miura S, Docheva D, Kimura T, Okada Y, Matsumura G, Shin'oka T, Yozu R, Kobayashi J, Ishibashi-Ueda H, Hiraki Y, Fukuda K. Local tenomodulin absence,

- angiogenesis, and matrix metalloproteinase activation are associated with the rupture of the chordae tendineae cordis. *Circulation* 2008; 118: 1737- 47.
- 55) Shukunami C, Takimoto A, Miura S, Nishizaki Y, Hiraki Y. Chondromodulin-I and tenomodulin are differentially expressed in the avascular mesenchyme during mouse and chick development. *Cell Tissue Res* 2008; 332: 111-22.
- 56) Shukunami C, Hiraki Y. Chondromodulin-I and tenomodulin: the negative control of angiogenesis in connective tissue. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 2101-12.
- 57) Burgess R, Cserjesi P, Ligon KL, Olson EN. Paraxis: a basic helix-loop-helix protein expressed in paraxial mesoderm and developing somites. *Dev Biol* 1995; 165: 296-306.
- 58) Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 2003; 113: 235-48.
- 59) Bax DV, Rodgers UR, Bilek MM, Weiss AS. Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRRK motif and integrin alphaVbeta3. *J Biol Chem* 2009; 284: 28616-23.
- 60) Wlodarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 1986; 39: 382-385.
- 61) 野田政樹. 骨のバイオロジー. 羊土社. 1998.
- 62) 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.
- 63) 松本歯科大学大学院硬組織研究グループ. Hard Tissue 硬組織研究ハンドブック. 松本歯科大学出版会. 2005.
- 64) Meyers VE, Zayzafoon M, Gonda SR, Gathings WE, McDonald JM. Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004; 93: 697-707.
- 65) Yamaguchi M, Shimizu N, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E2 production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 1994; 39: 877-84.
- 66) Yamaguchi M, Shimizu N. Identification of factors mediating the decrease of alkaline phosphatase activity caused by tension-force in periodontal ligament cells. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 1229-35.
- 67) Ozaki S, Kaneko S, Podyma-Inoue KA, Yanagishita M, Soma K.

- Modulation of extracellular matrix synthesis and alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells by mechanical stress. *J Periodontal Res* 2005; 40: 110-7.
- 68) Chiba M, Mitani H. Cytoskeletal changes and the system of regulation of alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells induced by mechanical stress. *Cell Biochem Funct* 2004; 22: 249-56.
- 69) Takeshita A, Niu ZG, Hanazawa S, Takara I, Higuchi H, Katayama I, Kitano S. Effect of interleukin-1 beta on gene expressions and functions of fibroblastic cells derived from human periodontal ligament. *J Periodontal Res* 1992; 27: 250-5.
- 70) Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Ozawa Y, Saito K, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 beta production by human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 1994; 29: 328-33.
- 71) Yoshida M, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Takemura M, Wada Y, Sato T, Ito A, Fujii S. Prostaglandin F(2alpha), cytokines and cyclic mechanical stretch augment matrix metalloproteinase-1 secretion from cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 681-7.
- 72) 曾我部正博 ほか. 細胞工学. Vol.31. 秀潤社. 2012.
- 73) 宮坂恒太、木田泰之、小椋利. メカニカルストレスと転写制御. 生化学 2009; 81: 494-501.
- 74) Kim SG, Akaike T, Sasagawa T, Atomi Y, Kurosawa H. Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct Funct* 2002; 27: 139-44.

謝辞

本研究及び博士論文の作成にあたり、ご指導ご鞭撻のほどを頂きました三重大学工学研究科 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。堀内教授には学術論文を投稿する際に、多くの貴重な助言を頂くなど、私のために御尽力いただきました。堀内教授のご支援もあり無事に学術論文の投稿を行うことが出来ました。本当に有難うございました。

そして、宮本准教授には学部4年生から博士後期課程までの6年間にわたり実験のご指導を頂きました。実験に関する助言だけではなく、実験装置の作製をして頂くなど、様々な面で助けて頂きました。さらには、実験を離れての私の個人的な相談に対しても、親身になって聞いてくださるなど、研究室生活全体のサポートをして頂きました。本当に感謝しております。有難うございました。

博士論文作成の際に、力学刺激の解析に関して貴重なご意見を頂いた、お茶の水女子大学の太田裕治 教授、靱帯組織の提供にご協力頂いた三重大学医学系研究科整形外科学の長谷川正裕 先生、組織切片作製時にご協力頂いた三重大学医学系研究科腫瘍病理学講座の金山和樹 先生、共同研究者の立場から支援を賜りました白土絵理 博士をはじめ、林兼産業株式会社に深く感謝致します。

また、博士論文を発表するにあたり、副査を担当して頂いた有機素材化学研究室の川口正美 教授と分子生物工学研究室の富田昌弘 教授に深く感謝致します。

本研究と同じく「エラスチン」に関与する研究をテーマとする神谷歩さん、境淳志さん、中村雅広さん、影山聡志さん、長谷川まりなさん、傍嶋達也さん、堀江俊貴さん、山田将義さんには様々な面でお世話になりました。本当に有難うございました。特に、これまでに同じ「靱帯再生」に関する研究を行ってきた河戸仁志さん、前田裕子さん、影山聡志さん、山田将義さんには実験のサポートや、研究内容に関する多くの貴重な意見を頂きました。深く感謝致します。影山さん、山田さんが来年度からも活躍し、今後さらに靱帯再生の研究が発展していくことを期待しております。

また、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、そして毎日を共に過ごし、大いなる刺激と笑いを提供して下さった M2、M1、B4 の皆様方に深く御礼申し上げます。

私が生体材料化学研究室で過ごした 6 年間は本当に貴重な時間だったと感じております。特に博士後期課程として過ごした 3 年間は非常に密度の濃いものとなりました。力及ばずで、ドクターの学生としては頼りない部分があったかと思いますが、堀内教授と宮本准教授のお力添えを頂くことで、今日まで来ることが出来ました。両先生には改めて感謝をさせていただきます。本当に有難うございました。研究室で学んだ多くのことを活かし、今後も精進して参ります。長い間、本当にお世話になりました。

最後になりましたが、博士後期課程に進学する機会を与えてくださり、あらゆる面で私をサポートし、見守り続けてくれた両親に深く感謝致します。これから少しずつではありますが、恩返しをさせて頂きたいと思っております。

本研究の成果が少しでも皆様方のご期待に沿うものであることを願いつつ、ここに重ねて厚く謝意を表し、謝辞と致します。

水谷 直紀