

細胞外基質を用いた三次元培養基材による靭帯細胞の表現型制御

The technique to control the phenotype of the ligament cells by three dimensional cell scaffolds

○ 水谷直紀 (三重大) 影山聡志 (三重大) 長谷川正裕 (三重大) 竹林貴史 (三重大)

宮本啓一 (三重大) 堀内孝 (三重大)

Naoki MIZUTANI, Mie University, Satoshi KAGEYAMA, Mie University, Masahiro HASEGAWA, Mie University, Takafumi TAKEBAYASHI, Mie University, Keiichi MIYAMOTO, Mie University, Takashi HORIUCHI, Mie University

Abstract: To develop the treatment method for ligament reconstruction, we cultured the human anterior cruciate ligament cells and the human periodontal ligament cells, and examined their characteristics. In addition, the development of the cell scaffolds and the searching of the factor to control the phenotype of the ligament cells were performed.

In this study, we prepared the three-dimensional extracellular matrix (ECM) scaffolds. The ECM scaffolds were made from elastin and collagen, which were the ECM components that make up a ligament. And then, we cultured the ligament cells on these scaffolds. To confirm the phenotype of the ligament cells on the ECM scaffold, we measured the osteogenic marker and the ligament cell marker. As a result, when the ligament cells were cultured on the elastin scaffold, the osteogenic marker was upregulated and the ligament cell marker was downregulated. On the other hand, the ligament cell marker of the cells on the collagen scaffold was maintained. Thus, it is expected that the ECM scaffold prepared in this study would be useful to promote the phenotypical alteration of the ligament cells.

Key Words: elastin, anterior cruciate ligament, periodontal ligament

1. 諸言

前十字靭帯 (ACL: anterior cruciate ligament) はスポーツ時の過度なストレス等により損傷を受けやすいものの、自然治癒力の乏しい組織である。そのため近年、組織工学的な靭帯治療法の発展が期待されている。そこで、本研究では靭帯再生治療法の開発のための基礎的研究として、靭帯細胞の表現型を制御するための技術、および足場材料の開発を目指した。

一般に靭帯は、エラスチンやコラーゲンなどの細胞外基質 (ECM: extracellular matrix) から構成される線維性結合組織である。以前の我々の研究では、エラスチンとコラーゲンから三次元の細胞外基質足場 (ECM 足場) を作製し、歯周靭帯細胞 (PDLF: periodontal ligament fibroblast) との応答評価を行った。その結果、エラスチン足場上で培養した細胞の骨芽細胞マーカーの発現量が上昇し、逆に靭帯細胞マーカーの発現量は減少した。一方で、コラーゲン足場上での靭帯細胞マーカーの発現量には変化が見られなかった。つまり、ECM 足場を細胞との相互作用により、靭帯細胞の表現型を制御できる可能性が示唆された。本研究では、前十字靭帯再建への応用を目指し、歯周靭帯細胞の応答と、前十字靭帯由来の細胞の応答を比較することを目的とした。

実験には、ヒト ACL より単離した細胞 (ACL 細胞) を用いた、予備実験として ACL 細胞の増殖能や遺伝子発現の定量を継代数毎に行い、実験に使用する細胞の条件を検討した。その後、作製した ECM 足場上で ACL 細胞を培養し、細胞表現型の確認として、骨芽細胞マーカー及び靭帯細胞マーカーの測定を行い、歯周靭帯細胞の結果と比較した。

2. 方法

2-1 ECM 足場の作製

ECM には、本研究室でブタ血管より抽出・水溶化を行ったアイソタイプ型エラスチン A~E⁽¹⁾のうちエラスチン A と、I 型アテロコラーゲンを使用した。これらを用いて、エレクトロスピンング法にて高弾性および高配向性を有する ECM 繊維足場 (繊維径 0.5 ~ 2.0 μ m) をそれぞれ作製した。

2-2 ヒト ACL からの細胞単離、基本性質の調査

移植片培養法により、ヒト ACL から細胞を単離した。単離した ACL 細胞について、継代数毎に分裂回数および靭帯関連遺伝子 (type I and III collagen, tenomodulin) の発現量を定量し、実験に使用する細胞条件を決定した。また、市販の PDLF についても同様に継代数毎の調査を行い、両者の結果を比較した。本実験は、三重大学医学部倫理委員会承認のもと行った。

2-3 ECM 足場上での靭帯細胞培養

作製した ECM 足場上で、ACL 細胞および PDLF を培養した。7 日間の静置培養の後、骨形成マーカー (ALP: alkaline phosphatase) の活性と靭帯関連遺伝子の発現量を定量し、両者の結果を比較した。

3. 結果・考察

3-1 ヒト ACL からの細胞単離、基本性質の調査

ヒト ACL から単離した細胞の形態は、紡錘状で線維芽様であった。継代数 1~10 の ACL 細胞について遺伝子発現量を定量した結果、type I collagen, type III collagen, tenomodulin のいずれについても、継代数による発現量の違いは見られなかった。また、継代数による増殖速度の変化についても観察されなかった。これらの結果から、本研究で単離した ACL 細胞は、継代培養による形質変化が起こりにくい細胞であることが推測される。

継代数 4-6 の PDLF と ACL 細胞の遺伝子発現量を比較した結果、type I collagen (Fig.1), type III collagen, tenomodulin のいずれも、細胞種による発現量の違いは見られなかった(有意差なし)。ACL 細胞と PDLF は互いに性質の近い細胞であるということが示唆される結果となった。

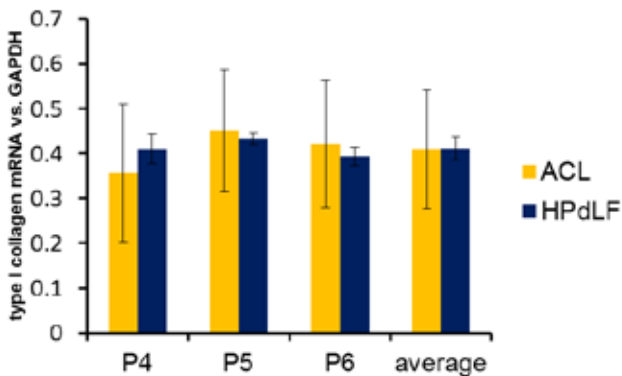


Fig.1 Comparison of type I collagen expression of ACL cells and PDLFs

3-1 ECM 足場上での靭帯細胞培養

作製したエラスチン A 足場, コラーゲン足場上で培養した靭帯細胞の ALP 活性および靭帯関連遺伝子の発現を定量した。その結果, エラスチン A 足場上の細胞は靭帯細胞マーカーである tenomodulin (TeM) の発現量が, コラーゲン足場上の細胞よりも有意に低かった (Fig.2)。一方, 骨芽細胞マーカーである ALP の活性値は, エラスチン A 足場上の細胞のほうがコラーゲン足場上のものよりも有意に高い結果となった (Fig.3)。つまり, エラスチン A 足場上の靭帯細胞が骨芽細胞へと分化誘導された可能性が示唆された。このような結果は ACL 細胞と PDLF のどちらについても観察され, ECM に対する細胞応答に両者の類似性を確認した。ただし, エラスチン A 足場上における ALP 活性と TeM の発現量を二種類の細胞間で比較した場合, PDLF のほうが ALP 活性値がより高く, TeM 発現がより低い結果となった。つまり, 二種類の細胞を比較した場合, PDLF のほうが ECM の影響を受けやすく, 骨分化誘導が起こりやすい可能性が示唆される結果となった。

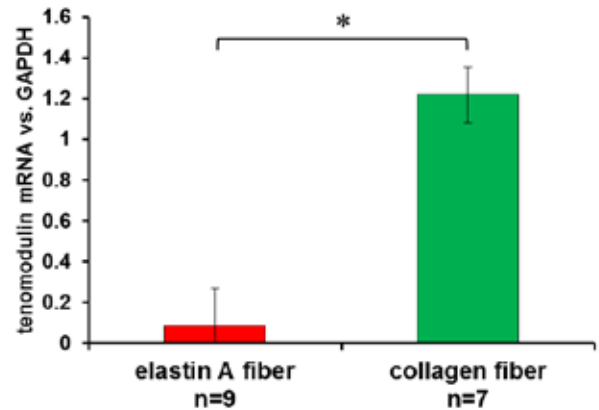


Fig.2 TeM expression of PDLFs on the ECM fiber scaffold
*: p<0.05

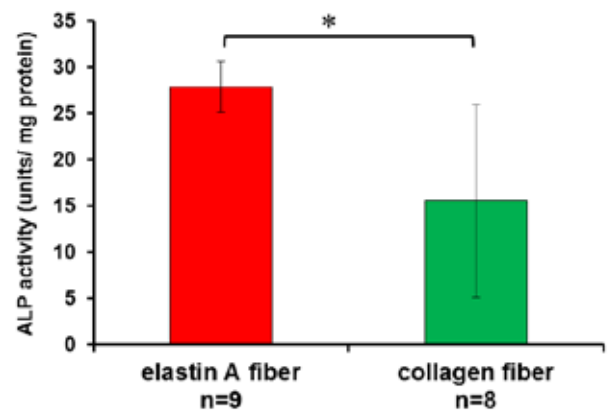


Fig.3 ALP activity of PDLFs on the ECM fiber scaffold
*: p<0.05

4. 結論

靭帯細胞と細胞外基質との相互作用として, エラスチン A 足場による靭帯細胞の骨分化誘導効果が示唆され, ECM 足場による細胞表現型の制御が期待できる結果となった。また, このような相互作用は ACL 細胞と PDLF で観察され, 組織の由来に関係しないことが分かり, 組織工学的な靭帯治療への応用が期待できる可能性が示唆された。

5. 参考文献

- (1) Miyamoto K, Atarashi M, Kadozono H, et al : Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker. Int J Biol Macromol, vol.45, pp.33-41, 2009