

三次元細胞培養系を用いた機械的負荷モデルの構築

2014.3

東京農工大学大学院

連合農学研究科

応用生命科学専攻

原 真佐夫

目次

序論	1
第 1 章 関節由来の滑膜細胞における機械的負荷の影響	5
はじめに	5
第 1 節 アガロースゲル培養法の確立および繰り返し圧縮負荷の影響	6
はじめに	6
第 1 項 実験材料および方法	6
第 2 項 結果	10
第 3 項 考察	19
第 2 節 コラーゲンゲル培養法の確立および繰り返し圧縮負荷の影響	21
はじめに	21
第 1 項 実験材料および方法	21
第 2 項 結果	24
第 3 項 考察	36
第 2 章 真皮由来の線維芽細胞における機械的負荷の影響	38
はじめに	38
第 1 節 コラーゲンゲル培養法の確立および繰り返し圧縮負荷の影響	39
はじめに	39
第 1 項 実験材料および方法	39
第 2 項 結果	42
第 3 項 考察	51

第 2 節 コラーゲンスポンジ培養法と静的荷重負荷の影響	53
はじめに	53
第 1 項 実験材料および方法	53
第 2 項 結果	57
第 3 項 考察	64
第 3 章 総括	66
引用文献	69
謝辞	77

序論

生物学において培養とは、動植物の胚や組織または微生物を人工的に生育、発育、増殖させることを示す(Nema, 2013)。各構造を個体から分離して培養することで、組織や細胞の機能を観察できる。生体組織を培養器具中で培養することを実証したのは、1885年に Roux がニワトリ胚の神経板組織を数日間生かしたことに始まる(関口, 2007)。このとき Roux は、組織を人工的に生存させただけで成長を確認したわけではなかった。生体組織の成長の確認は、1907年に Harrison が、カエル神経組織をリンパ液で固め、神経線維の成長を観察したのが最初であり(Harrison, 1907)、1910年に Burrows と Carrel が、初めて哺乳類組織を凝固血漿上での培養に成功した(Carrel, 1910)。細胞培養は、1916年に Rous と Jones が、トリプシンで細胞懸濁液を作製し、培養したことから始まった(Rous, 1916)。単離した接着性細胞を培養皿に撒くと、細胞は二次元的に培養皿表面に接着することを報告している。細胞の単離には、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、そしてトリプシンなどのタンパク質分解酵素および糖質分解酵素で組織を分解する必要がある。トリプシンはカルシウムイオンやマグネシウムイオンに阻害されるため、キレート剤としてエチレンジアミン四酢酸(EDTA)も併用される。またキレート剤は、細胞間接着を弱めるためにも用いられる。これは、細胞間接着分子であるカドヘリンが、カルシウム依存性(Takeichi, 1988)であることに起因する。

細胞を合成高分子や天然高分子由来のゲルで包埋することで、三次元構造体を形成する事が可能である。天然高分子系の三次元培養担体として、アガロース、メチルセルロース、そしてコラーゲンなどが用いられる。線維芽細胞をコラーゲンゲル内で包埋培養すると、細胞の自己組織化によるゲル収縮が誘導され、皮膚真皮様モデルになる(Bell, 1979)。この真皮様モデルに、表皮細胞を播種した真皮モデルも提唱されている(Bell, 1981)。細胞は生体組織中で三次元的に分布しており、周囲の環境の影響を受ける。たとえば、コラーゲンゲル中で培養される細胞は、コラーゲンゲル上での培養に比べ増殖速度が遅い。これは、細胞のコラーゲン接着量の違いが原因であると考えられている(Nishiyama, 1989)。また、Kienerらは、ラミニンやコラーゲンを用いて滑膜細胞を三次元培養し、滑膜表層の構造に類似したモデルを作製している(Kiener, 2010)。しかし、滑膜細胞や真皮線維芽細胞は、生体内では常に機械的負荷にさらされているため、これらの細胞の機能解析には、機械的負荷の影響を考慮する必要がある。

生体内の組織は、常に機械的外力負荷が加わっており、圧縮負荷 (Compressive Load)、引っ張り負荷 (Tensile Load)、そしてせん断負荷 (Shearing load) が存在する (Silver, 2003)。これら外力に対応して、組織内部に圧縮応力 (Compressive Stress)、引っ張り応力 (Tensile Stress)、そしてせん断応力 (Shearing Stress) が生じる。組織への機械的負荷は、細胞外マトリックスを通じて細胞にも作用する。関節への機械的負荷は、関節組織中の生理メカニズムに寄与することが報告されている (Gabay, 2008)。また、皮膚への機械的負荷は、動脈血圧 (Kimura, 1995)、自律神経 (Holey, 2011)、そして創傷治癒 (Timmenga, 1991) に影響することが報告されている。

細胞には機械的負荷への応答機能が存在する。機械的負荷への応答に関与するタンパク質として、インテグリンがある。インテグリンは、細胞外の接着分子と結合する細胞膜貫通型受容体である。インテグリンは、 α 鎖と β 鎖の膜貫通型サブユニットからなるヘテロ二量体であり、細胞内ではシグナル伝達分子 focal adhesion kinase (FAK) や talin、 α -actinin のようなアクチン結合タンパク質を介し、細胞骨格であるアクチン繊維と結合している (Pavalko, 1991)。例えば、コラーゲンと結合するインテグリンは、コラーゲンの2本鎖中のモチーフである GFOGER 配列 (O: HyP) を介して結合している。細胞がインテグリンを介して細胞外マトリックスに結合することで FAK の自己リン酸化を起点として、細胞増殖、生存維持、そして細胞骨格の再編成を伝達する。これらの伝達経路は、増殖因子受容体のシグナル経路と基本的に一致する (関口, 2007)。実際、線維芽細胞をコラーゲン上で培養すると、プラスチック培養プレートよりも長期間培養可能である (Gey, 1974)。また、膜貫通型のヒアルロン酸結合タンパク質である CD44 (Clusters of differentiation-44) に関する研究が進んでいる。CD44 は、アンキリンファミリー (Lokeshwar, 1994) または ERM (Ezrin, Moesin, Radixin) ファミリーのようなアクチン結合タンパク質を介し、アクチン繊維と結合している。CD44 は、細胞外のヒアルロン酸と結合し、細胞の機能を制御していることが報告されている (Toole, 1997)。

生体組織は、常に機械的負荷を受けている。 *In vivo* に近い細胞培養モデル系を確立するためには、新たな細胞培養系を確立し、生体に近い機械的負荷を加えることが重要である。機械的負荷と細胞機能の関係を検証するため、単層培養系に機械的負荷を加える装置として伸展負荷装置 (FX-4000T[™]: Flexcell; ストレックス STB) (Banes, 1985) や流水圧負荷装置 (Krueger, 1971; Owan, 1997) が考案されている。これらの装置を用いて滑膜細胞に引っ張り負荷を加え

た結果、ヒアルロン酸産生量が増加することが報告されている (Mombberger, 2005)。また、真皮線維芽細胞に引っ張り負荷を加えることで細胞が伸び方向と直交して配向することが報告されている (Buck, 1980)。平板培養への負荷に対して、三次元構造体に機械的負荷を加える装置として圧縮負荷装置 (Cyclic Load Simulator: Technoview; FX-4000C™) が市販されている。本装置を用いて半月板組織に圧縮負荷を加えた結果、軟骨組織に存在するプロテオグリカンであるアグリカン、ビグリカン、デコリン、そして I 型コラーゲンの遺伝子発現量が減少し、マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MMP-1) の遺伝子発現量が増加した (Upton, 2003)。また、軟骨組織に Flexcell で圧縮負荷を加えた結果、プロスタグランジン E2 (PGE2) やシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) タンパク質が産出され (Gosset, 2008; Fermor, 2002)、活性酸素の発生が促進することが報告されている (Miki, 2010)。三次元培養細胞における機械的負荷は、組織分解系の因子の活動が活性化するものと考えられる。しかし、三次元培養系への機械的負荷に関する研究は緒についたばかりであり、未だ研究が十分とは言えない。これまでの研究から未達と思われることを以下に列挙する。

1. 二次元培養と三次元培養のように培養条件を変えた場合の細胞の産生物の違いが明確でない。
2. 三次元培養を行うに当たり、細胞を保持する担体の有効性が明確でない。
3. 三次元培養に機械的負荷を与えた研究において、遺伝子の発現量の変化を測定しているが、生成物の変化に着目した研究が行われていない。
4. 機械的負荷の条件を検討している研究報告がない。

これまでの研究を踏まえ、機械的負荷に対する実験系を確立する事を目的とし、生体において機械的負荷が常時影響する器官である関節および真皮由来細胞を用いた研究を計画した。そこで本研究では、生体組織様三次元培養簡易モデルを構築し、圧縮負荷を加えながら培養することで、細胞や細胞外マトリックス成分の変化について検討することとした。第 1 章では、関節由来の滑膜細胞を用いて三次元培養系を構築し、圧縮負荷の影響を検討し、第 2 章では、真皮由来の線維芽細胞を用いて三次元培養系を構築し、圧縮負荷の影響を検討した。関節滑膜細胞および真皮線維芽細胞は比較的多くのヒアルロン酸を産生することから、細胞応答の指標として細胞が産生するヒアルロン酸に着目し、また機械的負荷としては、定圧負荷 (静的負荷) および繰り返し圧縮負荷 (サイクル

負荷、動的負荷)を比較することで、細胞機能に及ぼす機械的負荷の影響を解析した。

第 1 章 関節由来の滑膜細胞における機械的負荷の影響

はじめに

関節は、軟骨、滑膜、そして関節液からなる。膝軟骨には、起立静止時で 0.7 MPa、歩行時で 5~10 MPa、そして運動時で 18 MPa 以上の圧力がかかる。この圧力が、機械的負荷として関節組織中の細胞に伝わり、関節内の生理メカニズムに寄与することがわかっている (Gabay, 2008)。関節液に含まれる主要成分の 1 つとして、ヒアルロン酸がある (岡部平八郎, 2001)。ヒアルロン酸は、関節液の潤滑、機械的な保護、そしてショック吸収などの流体力学的性質に不可欠と考えられている (Mombberger, 2005)。関節液中のヒアルロン酸は、主に滑膜 B 細胞が供給する (Itano, 2002)。変形性関節症患者の関節液は、健常患者の関節液と比べて粘度が低下することが知られている。関節液の粘度低下の原因として、関節液中のヒアルロン酸の濃度減少および低分子化が指摘されている (Takahashi, 2004)。健常者の関節液中ヒアルロン酸の平均分子量は約 7,000 k であるが (Fraser, 1997)、変形性関節症患者のものは約 1,500 k と報告されている (Takahashi, 2004)。低分子化したヒアルロン酸は多くのプロテオグリカンと結合させることができず、軟骨や関節液中のプロテオグリカンの分解が促進される (Rizkalla, 1992)。

ウサギ膝関節由来滑膜細胞である HIG-82 に引っ張り負荷を加えると、ヒアルロン酸産生量が増加するという報告がある (Mombberger, 2005)。しかし、滑膜細胞に運動負荷を加えた際、細胞が産生するヒアルロン酸の分子量変化を解析した実験例はない。細胞への圧縮負荷の検討には、三次元構造体に細胞を包埋する必要がある。アガロースは、ゲル化に伴い弾力性をもち強固なゲルを形成する。また、コラーゲンは三次元培養基質として多用されており、接着系の細胞を培養すると収縮し、生体を反映した三次元構造体を形成する。そこで、本章では、滑膜細胞の三次元培養系を構築し、二次元培養と比較し、ヒアルロン酸代謝への圧縮負荷の影響を検討した。第 1 節ではアガロースゲルによる、第 2 節ではコラーゲンゲルによる三次元構造体を作製して、三次元構造体の違いによる影響について解析した。

第 1 節 アガロースゲル培養法の確立および繰り返し圧縮負荷の影響

はじめに

アガロースは水溶性であり、低融点であることから、細胞のスフェロイドを形成するための培養基質として用いられている (Bougault, 2008)。このゲルは、材料特性が安定しておりサイズが調整しやすい。細胞への圧縮負荷の検討には、圧縮負荷装置の力学強度 (数十 kPa) にも耐性であり、三次元構造体に細胞を包埋する必要がある。そこで、アガロースで三次元培養系を構築し、二次元培養と比較し、ヒアルロン酸代謝への繰り返し圧縮負荷の影響を検討する。

第 1 項 実験材料および方法

1.1 実験材料

細胞は、滑膜細胞 (ウサギ膝関節由来滑膜細胞 HIG-82: 大日本住友製薬) を使用した。培地は、牛胎児血清 (FBS: lot No. 401739 made in CANADA, GIBCO)、1% penicillin streptomycin neomycin antibiotic mixture (PSN: GIBCO) を含有する F-12 培地 (Ham' s F-12 Nutrient Mixture: GIBCO) を使用した。

1.2 細胞培養法

細胞は、滑膜細胞 (ウサギ膝関節由来滑膜細胞 HIG-82) を使用した。6 well プレートに 1.0×10^6 cells/well になるように、4.0 ml の 10%FBS、1%PSN 含有 F-12 培地で培養した。プレートを phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄後、PSN1%含有無血清 F-12 培地 4.0 ml で 48 時間培養した。培養は、5% CO₂、37°C の条件で CO₂ インキュベーター (MC0-17AIC, 三洋電機) 内で行った。

1.3 アガロースゲル培養法

アガロースゲル培養は、Bougault の論文を参考にした (Bougault, 2009)。 1.5×10^6 cells/gel になるよう 10%FBS、1%PSN 含有 F-12 培地を用いて細胞液を作製し、37°C で保温した。アガロース (ピーエイチジャパン) を、2.5%濃度になるよう超純水で調製し、121°C に設定したオートクレーブで溶解した。PSN5%含有 5 倍濃度培地を、10 倍濃度 F-12 培地 (濃縮培養液 F-12: 新田ゼラチン) で調製した。5 倍濃度培地とアガロース溶液を、容量比 1: 4 で混合し、41°C で保温した。混合液を 12well プレートに 700 μ l/well 分注し、15 分間室温で分注し

ゲル化した。なお分注には、先端を切断した 1,000 μ l ピペットチップを用いた (Fig. 1-1)。その後、ゲルから直径 13 mm、高さ 3.0 mm の円形ゲル (1.0×10^6 cells/gel) を切り取った。ゲルの切り取りには、5.0 ml ピペットマンチップの底面部を用いた。ゲルを 12well プレートに移し、10%FBS、1%PSN 含有 F-12 培地 4.0 ml で 72 時間培養した。ゲルを PBS で 2 回洗浄後、1%PSN 含有無血清 F-12 培地 4.0 ml で 48 時間培養した。培養は、5% CO₂、37°C の条件で CO₂ インキュベーター (三洋電機) 内で行った。なお、細胞数の影響を検討するため、 3.3×10^5 、 5.0×10^5 、または 1.0×10^6 cells/gel を培養開始時に含むアガロースゲルを製作し、同様の実験に供した。

1.4 凍結切片の観察法

アガロースゲル (1.0×10^6 cells/gel) の凍結切片 (ゲル中心部を水平方向に 30 μ m 厚切断した) を作製し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色後、顕微鏡で観察した。ゲルを CRYO DISH (硝英製作所) に入れ、OCT コンパウンド (Optimal Cutting Temperature Compound: サクラファインテックジャパン) でゲルを完全に浸した。ゲルを液体窒素で凍結し、ミクロトーム (CM3050S, Leica) を用いてゲル中心部から 7.0 μ m の厚さの凍結切片を作製した。凍結切片を病理研究用マイルドホルム 10 N (和光純薬工業) で 5 分間固定した後、流水で 5 分間洗浄した。凍結切片を、マイヤーヘマトキシリン染色液 (Merck) で 5 分間染色し流水で 3 分間洗浄した。エオシン Y 染色液 (Merck) で 5 分間染色し流水で軽く染色液を落とした。その後、凍結切片を 70% エタノール、80% エタノール、90% エタノール、100% エタノール、そしてキシレンの順に軽く浸し脱水した。脱水後の凍結切片を、カナダバルサムとカバーガラスで密閉し、顕微鏡で観察した。

1.5 培養上清の精製および培養ゲルからのグリコサミノグリカンの精製法

各培養系で 48 時間培養後、培養上清とゲルを回収し、滑膜細胞が産生するグリコサミノグリカン (GAG) を精製した。アガロースゲル中の培地を回収するため、各ゲルをホモジナイザー (PT-1035GT, Kinematica) で粉砕し、20,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離し上澄みを回収した。Cell Strainer (Falcon) を用いて、回収液中のゲル残渣を除去した。回収液を、凍結乾燥機 (FDU-830: 東京理化工機) で凍結乾燥した。凍結乾燥物に 3.0 ml の超純水を加え、3.0 ml の 2 倍濃度 アクチナーゼ緩衝液 (100 mM Tris-HCL, 5.0 mM CaCl₂, pH7.8) を加えた。溶液を沸騰水浴で 10 分間熱変性し、10 mg のチモール (和光純薬工業) と、凍結乾燥物の 100 分の 1 量 (重量計算) のアクチナーゼ E (科研製薬) を加えた。50°C の恒温槽で 24 時間振とうしてタンパク質を分解した。3.0 ml の 30% トリクロロ酢酸

(TCA)を加え、4℃で1時間静置しタンパク質を沈殿した。9,000 rpm、0℃で15分間遠心分離し、上清を蒸留水で透析処理した。透析処理物を凍結乾燥し、50 μ lの超純水に懸濁したものをGAGサンプルとした。なお、アクチナーゼEはタンパク質沈殿時に取り除かれること、また仮にアクチナーゼが作用してもGAGの測定には影響が無いことから、失活処理は省略した。GAGサンプル中のヒアルロン酸の定量および分子量を解析した。

1.6 ヒアルロン酸の定量法

GAGサンプル中のヒアルロン酸を、セルロース・アセテート膜電気泳動で定量した。セルロース・アセテート膜電気泳動はHataらの方法に準じて行った(Hata, 1973)。2.0 μ lのGAGサンプルをセルロース・アセテート膜(MEMBRANE FILTER SELECA®-V: ADVANTEC)に添加した。泳動用緩衝液は、0.1 Mピリジン-0.47 Mギ酸緩衝液(pH3.0)を用いた。スタンダードとして、ヒアルロン酸(生化学工業)を0.5、0.25、0.0125、そして0.00625 mg/mlに調製したものをを用いた。膜幅1.0 cmあたり1.0 mAの定電流で1時間の電気泳動を行った。泳動後、セルロース・アセテート膜を染色液(0.5%アルシアンブルー、25%エタノール、10%酢酸)に数分間浸して染色し、10%酢酸溶液で脱色した。膜上のヒアルロン酸のスポットを、画像解析ソフト(Scion Image: Scion; ImageJ: NIH)でデンストメトリー分析し、ヒアルロン酸を定量した。

1.7 ヒアルロン酸の分子量の解析法

GAGサンプル中のヒアルロン酸の分子量を、アガロースゲル電気泳動で解析した。1.0%アガロースゲルを、アガロース(GIBCO)と0.1 Mピリジン-0.2 Mギ酸緩衝液(pH 3.5)で作製した。アガロースと超純水を混合し、150℃に設定したMAG-MIXER(Yamato)を用いて溶液を沸騰しない程度に加熱し、アガロースを溶解した。アガロース溶液30 mlをトレイ(縦100 mm、横115 mm、深さ10 mm)に流し込み、室温で30分間静置してアガロースゲルを作製した。GAGサンプルを、10 μ lの超純水に溶解し、1.0 μ lの6×Loading Buffer(タカラバイオ)と混合し、全量添加した。泳動用緩衝液は、0.1 Mピリジン-0.2 Mギ酸緩衝液(pH 3.5)を用いた。分子量マーカーは、1,500、1,000、700、500そして50 kのヒアルロン酸(210 kヒアルロン酸: 協和発酵バイオ; その他のヒアルロン酸: キューピー)を用いた。200 mA、50 Vの定電流で約5時間電気泳動を行った。なお、高温でゲルが溶解するのを防ぐため、4℃の冷蔵室内で電気泳動を行った。泳動後のゲルを、染色液(5.6 mg Stains-All、5.0 ml ジオキサン、90 ml 超純水、

0.1 ml 1.0 M 酢酸、5.0 ml 0.01 M アスコルビン酸)に浸した。染色後のゲルを、超純水で脱色し、ゲル上のバンドからヒアルロン酸の分子量分布を解析した。

1.8 機械的圧縮負荷方法

FX-4000C™(Flexcell)を用いて、アガロースゲル(1.0×10^6 cells/gel)へ圧縮負荷を加えた。この装置は、ソフトウェア(FX-4000 v5.0, Windows)、コントローラー(FlexLink®, 空気ポンプに接続)、ベースプレート(BioPress® baseplate)、そして6well圧縮負荷プレート(BioPress™ Plate: Flexcell, 直径13 mm)からなる(Fig. 1-2)。圧縮負荷プレートのwellの底には、シリコン圧盤がある。ベースプレートに4枚の圧縮負荷プレートを設置し、圧盤下部の空気量をコントロールして三次元構造体に圧力を加える。ベースプレート全体がCO₂インキュベーターに入るため、長時間の負荷実験が可能である。圧縮負荷プレートの蓋(Stationary plate)は中心が空洞の外蓋と、空洞に挿入される内蓋で構成されている(Fig. 1-3)。内蓋は回転ねじになっており、外蓋に容易に挿入できる。内蓋の下側に三次元構造体を設置するため、ねじの回転数によって圧力強度が変化する。すべてのゲルを同一の力で負荷を加えるため、内蓋を時計周りに3.0回転して固定した。アガロースゲルを先端平型ピンセットで掴み、圧縮負荷プレートの各wellに入れた。各wellに、2.0 mlの1%PSNを含む無血清F-12培地を滴下した。蓋をしたのち、内蓋を時計回りに1.0回転しゲルを固定した。圧縮負荷プレートの圧盤を指で押し、ゲルが均一の力で固定されているか目視で確認した。4つの圧縮負荷プレートをベースプレートに乗せ、CO₂インキュベーター(5% CO₂, 37°C)内に移動した(Fig. 1-4)。負荷波形は、繰り返し圧縮負荷(Shape: SIN 1/2, Freq: 1.0 Hz)とした。波形の最大強度は40 kPaとして、0、30、または180分間の圧縮負荷操作後、24または48時間培養した。負荷最大強度は、ソフトウェア上の負荷強度(単位 lbs)とゲルの圧面積を計算式($PMPa = (5.65 \times \text{Forcelbs}) / (D \text{ mm}^2)$)にあてはめて設定した。圧縮負荷後、6gel分の培養上清とゲルを回収し、培養上清からGAGを精製した。GAGサンプル中のヒアルロン酸の定量および分子量を解析した。

1.9 統計処理

MS-Excel用統計ソフトStatcel2を用いて、Tukey's-testで検定した。

第 2 項 結果

2.1 三次元培養中の細胞の解析

アガロースゲル中心部の凍結切片を作製し、顕微鏡で観察した(Fig. 1-5)。滑膜細胞はアガロース線維に包埋されており、均一に分布していた。

2.2 圧縮負荷前のヒアルロン酸の解析

ヒアルロン酸量の測定に必要な細胞数の目安をつけるために、アガロースゲルにおいて、48 時間培養後の上清中のヒアルロン酸量を定量した(Table 1-1)。培養開始時の細胞数を増やすに従って、培養上清中のヒアルロン酸量が増加した。このデータをもとに、 1.0×10^6 cells の細胞を用いて以下の実験を行った。培養開始時の細胞数を 1.0×10^6 cells として単層培養およびアガロースゲル培養系で 48 時間培養後の、各培養皿あるいはアガロースゲルあたりの上清中ヒアルロン酸量(平均値±標準偏差, n=4)を定量した結果を Table 1-2 に示した。アガロースゲル培養は、単層培養と比べヒアルロン酸量が有意に増加した($p < 0.01$, $p < 0.05$ Tukey's-test)。培養上清中のヒアルロン酸の分子量を解析した(Fig. 1-6)。単層培養時の分子量ピークは 50 k であった。アガロースゲル培養時の分子量ピークは 500 k だった。

2.3 圧縮負荷後のヒアルロン酸の解析

1.0×10^6 cells を培養開始時に含むアガロースゲル系で、圧縮負荷後の培養上清およびアガロースゲル中のヒアルロン酸量(平均値±標準偏差, n=3)を定量した(Table 1-3)。負荷時間が増加するに従い、ヒアルロン酸量は増加した。圧縮負荷後の培養時間を増やしても、ヒアルロン酸量は統計的な有意差はなかった。

2.4 ヒアルロン酸の分子量の解析

1.0×10^6 cells を培養開始時に含むアガロースゲル系で、0、30、または 180 分間の圧縮負荷操作後に 24 および 48 時間培養し、培養上清およびゲル中のヒアルロン酸の分子量を解析した。24 時間培養では、0、30、そして 180 分負荷時の分子量ピークは、210、500、そして 700 k であった(Fig. 1-7)。48 時間培養では、0 分、30 分、そして 180 分負荷時の分子量ピークは、50、500、そして 210 k であった(Fig. 1-8)。

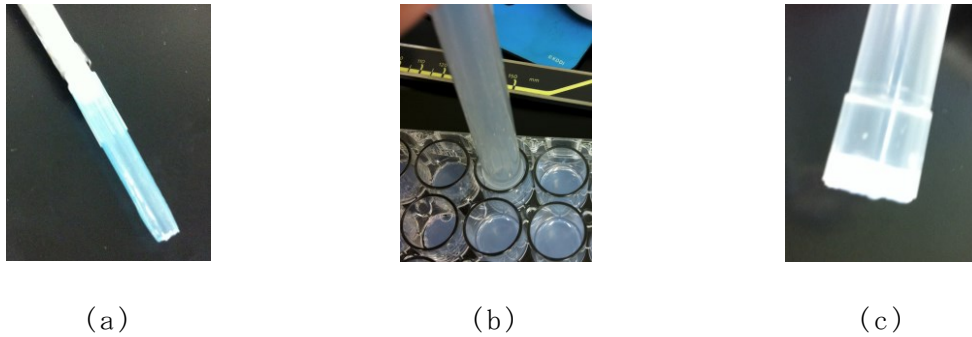


Fig. 1-1 アガロースゲルの作製

(a)アガロースゲルの well への分注には、先端を切断した 1,000 μ l ピペットチップを用いた。(b)アガロースゲルの切り取りには、5.0 ml ピペットマンチップの底面部を用いた。(c)切り取ったアガロースゲルは、ピペットマンチップに空気を押し込むと、容易に取り出すことが可能であった。

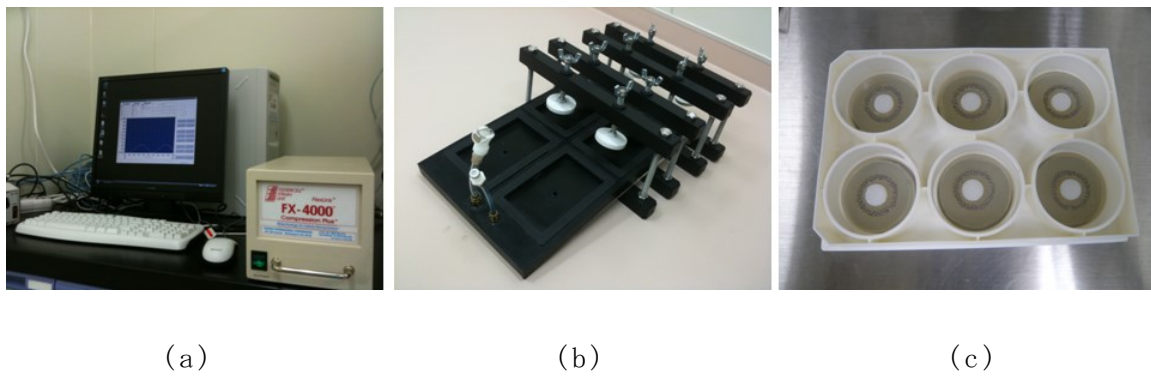


Fig. 1-2 圧縮負荷装置

(a)圧縮負荷制御ソフトウェア(FX-4000 v5.0)、コントローラー(FlexLink®) (b)ベースプレート(BioPress® baseplate)に 4 枚の圧縮負荷プレートを設置し、圧盤下部の空気量をコントロールして三次元構造体に圧力を加える。(c)圧縮負荷プレート(BioPress® compression plate, 6 well)の well の底にはシリコン圧盤があり、空気圧を利用して三次元構造体に圧縮負荷を加える。



(a)

(b)

(c)

Fig. 1-3 圧縮負荷プレートの蓋

(a)圧縮負荷プレートの蓋は、中心が空洞の外蓋と、空洞に挿入される内蓋で構成されている。
 (b)内蓋の外観(c)外蓋と内蓋の組み合わせ内蓋は回転ねじになっており、外蓋に容易に挿入
 できる。内蓋の下側に三次元構造体を設置するため、ねじの回転数によって負荷強度が変化
 する。



(a)

(b)

(c)

Fig. 1-4 圧縮負荷装置の使用方法

(a)アガロースゲルを先端平型ピンセットで掴み、圧縮負荷プレートの各 well に静置した。
 (b)内蓋の確認 圧縮負荷プレートの圧盤を指で押し、ゲルが均一の力で固定されているか目
 視で確認した。(c)ベースプレート全体が CO₂ インキュベーターに入るため、長時間の負荷実
 験が可能である。

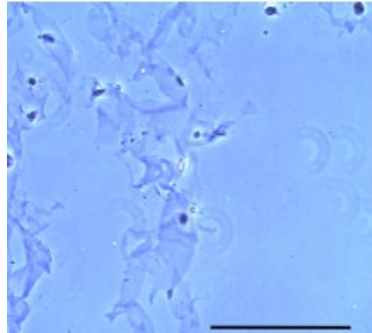


Fig. 1-5 三次元培養中の細胞

アガロースゲルの凍結切片(ゲル中心部を水平方向に $7.0 \mu\text{m}$ の厚さで切断した)を作製し、HE 染色後、顕微鏡で観察した。滑膜細胞はアガロース線維に包埋されており、均一に分布していた。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ を示す。

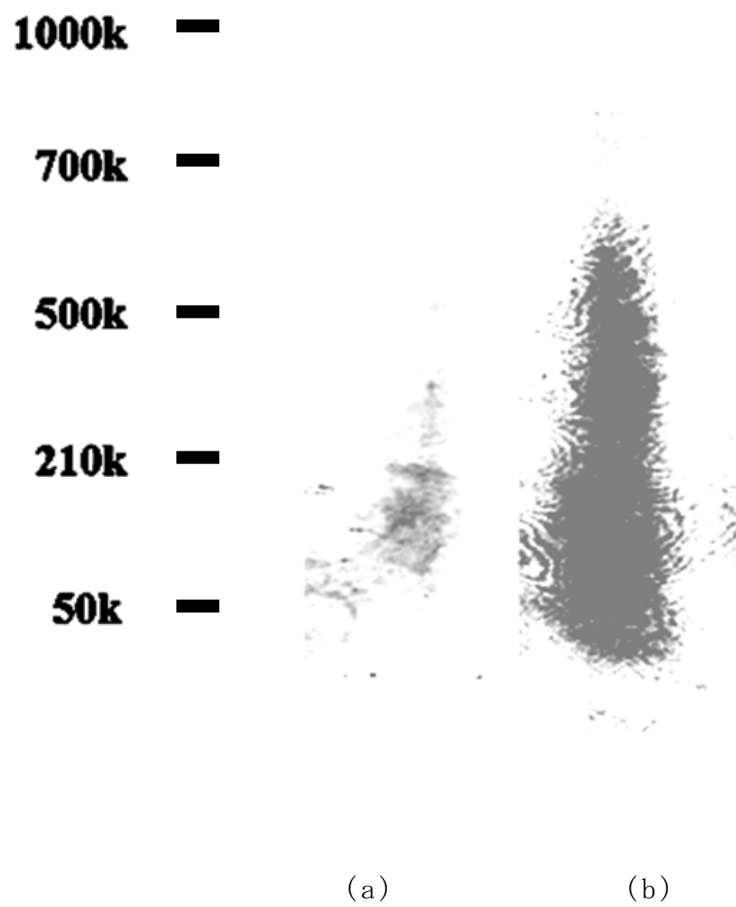


Fig. 1-6 培養上清中のヒアルロン酸の分子量

48時間培養後の培養上清中のヒアルロン酸の分子量を解析した。(a)単層培養時(b)アガロースゲル培養 単層培養時(a)の分子量ピークは50k、アガロースゲル培養(b)の分子量ピークは500kだった。

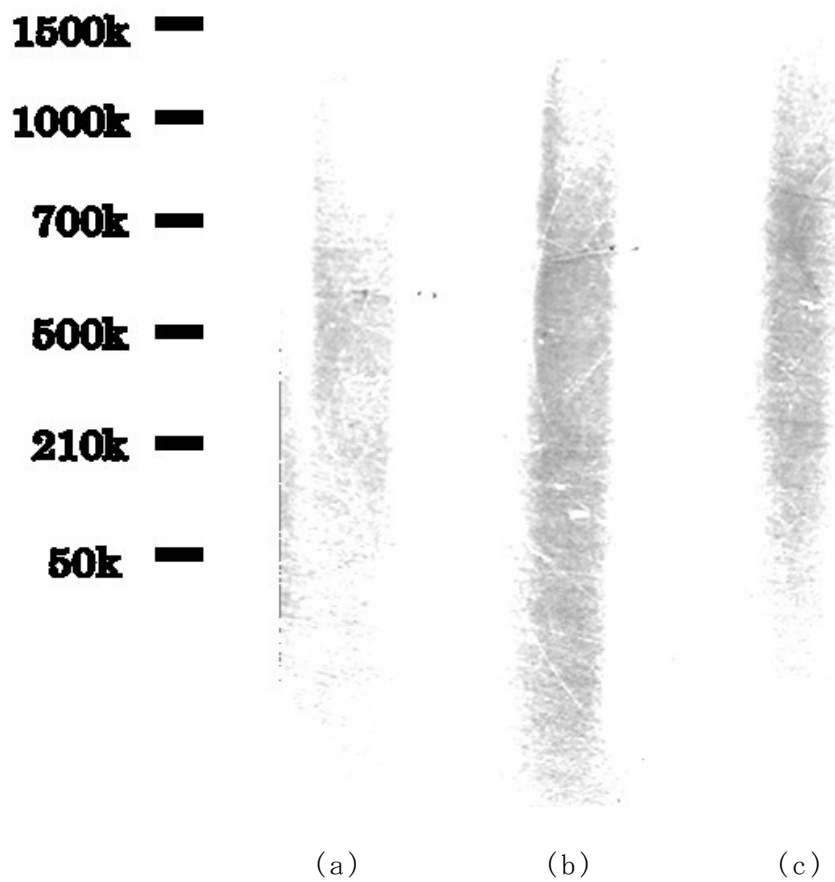


Fig. 1-7 培養上清およびアガロースゲル中のヒアルロン酸の分子量(24時間培養)

0、30、または180分の繰り返し圧縮負荷操作後に24時間培養し、培養上清およびアガロースゲル中のヒアルロン酸の分子量を解析した。(a)無負荷(0分)(b)30分負荷(c)180分負荷 無負荷(0分)(a)の分子量ピークは、210kだった。30分負荷(b)の分子量ピークは、500kだった。180分負荷(c)の分子量ピークは、700kだった。

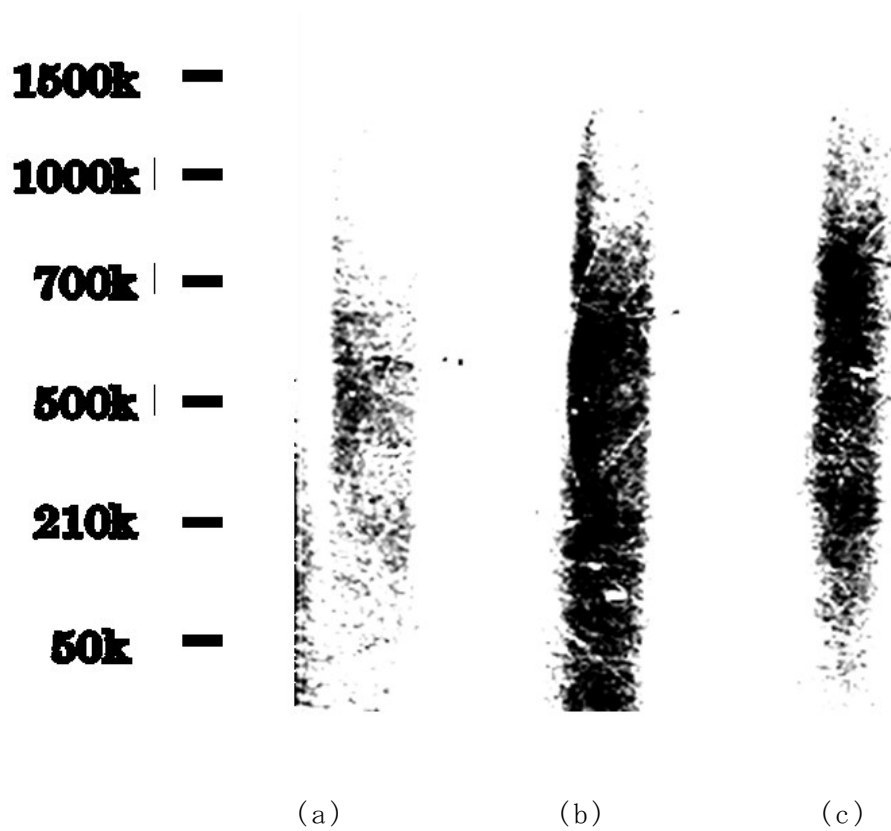


Fig. 1-8 培養上清およびアガロースゲル中のヒアルロン酸の分子量(48時間培養)

0、30、または180分の繰り返し圧縮負荷操作後に48時間培養し、培養上清およびアガロースゲル中のヒアルロン酸の分子量を解析した。(a)無負荷(0分)の分子量ピークは、50kだった。(b)30分負荷の分子量ピークは、500kだった。(c)180分負荷の分子量ピークは、210kだった。

Table 1-1 培養上清およびアガロースゲル中のヒアルロン酸量

培養開始時の細胞数	ヒアルロン酸量
3.3×10^5 cells/gel	2.7 μ g/gel
5.0×10^5 cells/gel	3.0 μ g/gel
1.0×10^6 cells/gel	3.2 μ g/gel

アガロースゲルにおいて、48時間培養後の培養上清中のヒアルロン酸量を定量した。培養開始時の細胞数を増やすに従って、培養上清中のヒアルロン酸量が増加した。

Table 1-2 三次元培養系におけるヒアルロン酸量

培養系	培養開始時の細胞数 (1.0×10^6 cells)あたりのヒアルロン酸量
単層培養	0.5 ± 0.5 μ g
アガロースゲル培養	4.5 ± 1.5 μ g

各培養系で48時間培養後、単層培養、アガロースゲル培養系の上清中のヒアルロン酸量(平均値 \pm 標準偏差, n=4)を定量した。アガロースゲル培養は、単層培養と比べヒアルロン酸量が有意に増加した($p < 0.05$ Tukey's-test)。

Table 1-3 アガロースゲル培養系での繰り返し圧縮負荷によるヒアルロン酸量への影響

	圧縮負荷後の培養時間	
	24 時間	48 時間
無負荷 (0 分)	1.9±0.5 $\mu\text{g/gel}$	2.0±0.7 $\mu\text{g/gel}$
30 分負荷	2.3±1.0 $\mu\text{g/gel}$	2.6±0.8 $\mu\text{g/gel}$
180 分負荷	3.9±0.8 $\mu\text{g/gel}$	3.1±1.0 $\mu\text{g/gel}$

1.0×10^6 cells を培養開始時に含むアガロースゲル系で、圧縮負荷後のヒアルロン酸量(平均値±標準偏差, n=3)を定量した。負荷時間が増加するに従い、ヒアルロン酸量は増加した。圧縮負荷後の培養時間を増やしても、ヒアルロン酸量は統計的な有意差はなかった。

第3項 考察

滑膜細胞のアガロースゲル中での培養において、滑膜細胞はアガロース線維に包埋されていた (Fig. 1-5)。培養上清に対する細胞数の影響を検討した結果、細胞の播種数に依存して上清中のヒアルロン酸量が増加していた (Table 1-1)。培養上清中のヒアルロン酸量は、滑膜細胞数に依存する可能性が示された。このため、各培養系で細胞播種数を 1.0×10^6 cells として、48 時間培養後の上清中のヒアルロン酸量を計算した。

培養上清中のヒアルロン酸産生量は、単層培養で $0.5 \pm 0.5 \mu\text{g}$ であったのに対し、アガロース培養で $4.5 \pm 1.5 \mu\text{g}$ であった (Table 1-2)。培養上清中のヒアルロン酸の分子量は、単層培養と比べ、アガロースゲル培養で高分子量側にシフトした。三次元培養によって滑膜細胞のヒアルロン酸代謝が変化することが確認できた。三次元培養を行った細胞は、単層培養と比べてタンパク質の代謝能力が変化する報告がある (Gruber, 2000)。椎間板由来細胞をアガロースゲルで培養した結果、単層培養と比べて細胞周囲および細胞間で細胞外マトリックスが増え、細胞の生存率が高まることを報告している。また、軟骨細胞をアガロースゲルで培養することで、細胞周囲に細胞外マトリックスが形成されており (Benya, 1982)、コラーゲンゲル中で培養すると、プロテオグリカン量が向上することが報告されている (Kimura, 1984)。これらの報告は、三次元ゲル培養により細胞のヒアルロン酸産生量が高まり、ヒアルロン酸が高分子化した本実験の結果を支持するものである。一方、滑膜細胞をコラーゲンゲル中で培養すると、コラーゲンゲルを足場として細胞増殖能が活性化する報告がある (Fox, 2006)。アガロースゲル培養により細胞数が増加した可能性もあるが、ヒアルロン酸の代謝変化も起きていると考えられる。なお、2.5 または 3.0% 濃度アガロース溶液でゲルを作製した結果、分注前にアガロースがゲル化してしまい、実験を行えなかった。2.0% 濃度アガロース溶液でゲルを作製した結果、問題なくゲルを作製できた。1.5% 濃度アガロース溶液でゲルを作製すると、ゲル化は不十分であり、圧縮負荷に耐えられるアガロースゲルとして、2.0% 濃度を選択した。

培養単位あたりのヒアルロン酸の定量結果より、圧縮負荷時間を増やすと培養上清中のヒアルロン酸量が増えることがわかった (Table 1-3)。圧縮負荷後の培養時間は 24 時間でも 48 時間でも上清中のヒアルロン酸量は同程度であり、培養あたりのヒアルロン酸産生量が一定に保たれている可能性を示唆するもの

であった。ヒアルロン酸の分子量解析の結果より、圧縮負荷時間を増やすと培養上清中のヒアルロン酸は高分子化することがわかった (Fig. 1-7; Fig. 1-8)。圧縮負荷後の培養時間は、24 時間でも 48 時間でもヒアルロン酸量に変化のないものであった。よって、以降の上清中ヒアルロン酸の検討には、圧縮負荷後の培養は 24 時間で良いと考えた。

関節の細胞に圧縮負荷を加えた研究例はいくつかある。滑膜由来培養組織に 1 時間の繰り返し圧縮負荷を行うことで、PGE2 産生が亢進し、MMP-1 および MMP-3 のタンパク質の発現量、MMP-2 の酵素活性が上昇することが報告されている (Akamine, 2012)。軟骨細胞をアガロースゲル中で培養して圧縮負荷を加えた結果、細胞の代謝が高まり (Bougault, 2009)、GAG とコラーゲンの合成量、そしてプロテアーゼ活性が変化した (Sharma, 2007)。これらの報告は、圧縮負荷によりヒアルロン酸が高分子化した本実験の結果を支持するものである。

本節では、関節の維持に必要な不可欠なヒアルロン酸に着目し、滑膜細胞を用いた新たな関節モデルを構築した。圧縮負荷により滑膜細胞の産生するヒアルロン酸が高分子化することを見出した。関節液中のヒアルロン酸の高分子化は、関節液の粘性の向上に繋がる。たとえば、低分子ヒアルロン酸 (平均分子量 200) は、マクロファージの MMPs の産生を促進し、軟骨変性を引き起こすことが報告されている (Horton, 1999)。高分子量のヒアルロン酸は、変形性膝関節症モデル動物では軟骨保護作用があり (Takahashi, 2001)、ヒアルロン酸の関節腔内注射により、変形性関節症患者の痛みを軽減する (Peyron, 1974)。平均分子量が比較的高いヒアルロン酸は、粘弾性に勝る (Garg, 2004)。滑膜細胞に対する機械的負荷は、より高分子のヒアルロン酸の産生を促進し、関節内の潤滑性に関与している可能性が明らかとなった。

第 2 節 コラーゲングル培養法の確立および繰り返し圧縮負荷の影響

はじめに

細胞への圧縮負荷の検討には、三次元構造体に細胞を包埋する必要がある。コラーゲンは、生体内の滑膜細胞を囲んでいることから、機械的負荷実験系の三次元構造体に適していると考えた。そこで、コラーゲンで三次元培養系を構築し、二次元培養と比較し、ヒアルロン酸代謝への圧縮負荷の影響について検討を行う。

第 1 項 実験材料および方法

1.1 実験材料

滑膜細胞は、ウサギ膝関節由来滑膜細胞 HIG-82(大日本住友製薬)を使用した。FBS、PSN、F-12 培地は、GIBCO 製を用いた。細胞培養用皿は、低接着表面処理済みの 6-well Lipidure®-Coat Multi-Dish A-6MD(日油)を使用した。10 倍濃度の F-12 培地は新田ゼラチン製のものを用いた。コラーゲン溶液は、0.5%ウシ真皮由来酸可溶性 I 型コラーゲン溶液 (IAC-50: 高研)のものを用いた。

1.2 細胞培養法

滑膜細胞を、 2.0×10^5 cells/plate になるように 10 cm プレートへ播種し、10% FBS、1% PSN を含む 10 ml の F-12 培地で 72 時間培養した。培養は、5% CO_2 、37°C の条件にて CO_2 インキュベーター (MC0-17AIC, 三洋電機)内で行った。単層培養は、10 ml の PSN を 1%含有した無血清 F-12 培地を用いて 48 時間培養した。

1.3 コラーゲングル培養法

1.0×10^6 cells/gel になるようにコラーゲングルを作製した。10 倍濃度の F-12 培地に 30% FBS および 3% PSN を混合することで 3 倍濃度の F-12 培地を作製し、F-12 培地 (10% FBS および 1% PSN 含有)に懸濁した滑膜細胞および 0.5%酸性コラーゲン溶液を混合し、滑膜細胞数が 1.0×10^6 cells/gel の 0.1%コラーゲン溶液になるように調製した。細胞を懸濁したコラーゲン溶液を 6 well プレートに 5.0 ml/well ずつ分注し、直ちに CO_2 インキュベーター (5% CO_2 、37°C)に静置することでコラーゲンをゲル化した。5% CO_2 濃度、37°C の培養条件にて CO_2 インキュベーター内で 72 時間培養することで、収縮コラーゲングルを調製した。

0、3、6、9、12、21、24、27、33、36、48、60、そして 72 時間培養後にゲルの直径を測定した。また、培養 48 時間後に 10%FBS および 1%PSN 含有 F-12 培地に培地交換した。また、作製した収縮コラーゲンゲル 48 時間培養した後、収縮コラーゲンゲルの凍結切片を作製し、HE 染色後、顕微鏡でゲル中の細胞の状態を観察した。

1.4 機械的圧縮負荷方法

圧縮負荷装置は、CO₂ インキュベーター内の FX-4000C™ (Flexcell) を用いた。10%FBS および 1%PSN 含有 F-12 培地を各 well に 2.0 ml 添加した。負荷波形は、繰り返し圧縮負荷 (Shape: SIN 1/2, Freq: 1.0 Hz)、または定圧負荷 (Shape: Static) とした。0、1.5、3.0、6.0、そして 12 時間の圧縮負荷操作後、圧縮培養開始から 48 時間の培養を行った。培養上清を回収し、GAG を精製した。GAG サンプル中のヒアルロン酸の定量および分子量を解析した。また、6 gel 分の培養上清を回収し、GAG を精製した。GAG の精製方法、ヒアルロン酸の定量、および分子量測定法は、第 1 章第 1 節と同様に行った。

細胞生存率を細胞数から測定した。収縮コラーゲンゲルを、5.0 mg/ml ディスパーゼ II (三光純薬) と 5.0 mg/ml Collagenase L (新田ゼラチン) を含む 1.0 ml PBS に入れ、インキュベート (37°C、20 分間) することでコラーゲンゲルを溶解した。溶解液を、1,800 rpm、25°C で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。沈殿物である細胞を PBS に懸濁し、0.4% Trypan blue stain (インビトロジェン) を用いて死細胞を染色した。生細胞と死細胞数を計測し、生細胞数を総細胞数で割ることで細胞生存率を測定した。

圧縮負荷直後に収縮コラーゲンゲルを回収し、1.0 ml のフェノール溶液 (TRIzol Reagent: Invitrogen) を加えた。溶解液を 10 分間ボルテックスで混合し、ゲルと細胞を溶解した。細胞溶解液から total RNA を抽出し、遺伝子発現量を解析した。使用した forward プライマーと reverse プライマーは、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 5' - GCACCGTCAAGGCTGAGAAC -3', and 5' - TGGTGAAGACGCCAGTGGA -3; hyaluronic acid synthetic enzyme-2 (HAS-2): 5' - AGTCATGTACACAGCCTTCAGAGCA -3', and 5' - CACCTCCAACCATGGGATCTTC -3'; HAS-3: 5' -AAGTGCCTCACAGAGACCCC -3', and 5' -AAGATCATCTCTGCATTGCC -3' とした。GAPDH の遺伝子発現量を内部標準として、相対遺伝子発現量を解析した。GAPDH は変動が少ない遺伝子であることを確認している。PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System (TP800: タカラバイオ) を用いて行った。

1.5 統計処理

MS-Excel 用統計ソフト Statcel2 を用いて、Student' s t -test で検定した。

第 2 項 結果

2.1 二次元培養と三次元培養の比較

コラーゲンゲル中心部の凍結切片を作製し、HE 染色した後、細胞を観察した (Fig. 1-9)。コラーゲンゲル中の細胞 (Fig. 1-9b, c) は、単層培養の細胞 (Fig. 1-9a) と比べて丸みを帯びていた。また、単層培養では細胞同士が密集していたのに対し、コラーゲンゲル中では細胞はコラーゲン線維に包まれており、均一に分散していた。

2.2 三次元培養

収縮コラーゲンゲルの直径を測定した (Fig. 1-10; Fig. 1-11)。0、3、6、9、12、21、24、27、33、36、48、60、そして 72 時間培養後にゲルの直径を測定した。1.0×10⁶ cells/gel のコラーゲンゲルは、培養開始から 6 時間後にゲル収縮し始めた。また、5.0×10⁵ cells/gel では、培養開始から 9 時間後、2.5×10⁵ cells/gel では培養開始から 12 時間後でゲル収縮が始まった。72 時間後のコラーゲンゲルの直径 (平均値±標準偏差, n=6) は 1.0×10⁶、5.0×10⁵、および 2.5×10⁵ cells/gel で 11.0±0.0、17.4±0.2、および 24.3±0.3 mm であった。

48 時間培養後の培養上清中のヒアルロン酸の分子量を測定した (Fig. 1-12)。コラーゲンゲル培養は、単層培養と比べて、培養上清中に比較的 low molecular weight (1,000 k 以下) のヒアルロン酸が多かった。

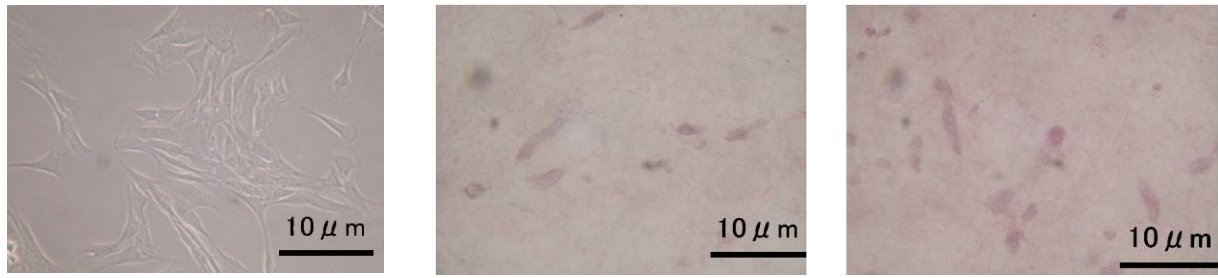
2.3 圧縮負荷

コラーゲンゲル培養における細胞生存率 (平均値±標準偏差, n=3) は、無負荷で 88.3±2.4% であったのに対し、定圧負荷を加えたゲルは 79.3±1.4% であった (Table 1-4)。定圧負荷を加えたゲルは、圧縮なしのゲルと比べ、有意に生存率が低下していた ($p < 0.05$, Student's *t*-test)。

培養上清中のヒアルロン酸量は、1.5、3.0、6.0 時間の繰り返し圧縮負荷で、無負荷 (0 時間負荷) と比べて、培養上清中のヒアルロン酸量が増加していた (Fig. 1-13)。1.5、3.0、6.0、12 時間の定圧負荷では、無負荷 (0 時間負荷) と比べて、培養上清中のヒアルロン酸量が増加していた (Fig. 1-14)。培養上清中のヒアルロン酸の分子量をアガロースゲル電気泳動で解析した結果を Fig. 1-15 および Fig. 1-16 に示した。無負荷 (0 時間) では、ヒアルロン酸の分子

量を 700 k 以下であったが、1.5、3.0、6.0、および 12 時間の繰り返し圧縮負荷では、50 k 以下のヒアルロン酸が減少した。特に、6.0、12 時間圧縮負荷で 700 k 以上のヒアルロン酸が増加した。一方、1.5、3.0、および 6.0 時間の定圧負荷は、無負荷(0 時間)と比べて、ヒアルロン酸の分子量分布に変化は見られなかった。

圧縮負荷操作後の細胞の遺伝子発現量を解析した (Fig. 1-17)。0、1.5、3.0、6.0、そして 12 時間の圧縮負荷操作後の遺伝子発現量 (平均値 ± 標準偏差, $n=2-5$) を測定した。HAS-2 mRNA の発現量は、1.5、3.0、6.0、および 12 時間の繰り返し圧縮負荷において、無負荷と比べて、有意な上昇が認められ、特に 6.0 時間の繰り返し圧縮負荷で上昇が顕著であった (繰り返し圧縮負荷: $p < 0.01$, 定圧負荷: $p < 0.05$ Student's *t*-test)。また、12 時間の定圧負荷において、HAS-2 遺伝子発現量の有意な減少が認められた ($p < 0.05$, Student's *t*-test)。HAS-3 mRNA の発現量は、1.5、6.0 および 12 時間の繰り返し圧縮負荷において、無負荷と比べて、有意な上昇が認められ、特に 1.5、12 時間の繰り返し圧縮負荷で上昇が顕著であった ($p < 0.01$, $p < 0.05$ Student's *t*-test)。



(a)

(b)

(c)

Fig. 1-9 コラーゲンゲル中の細胞の分布

(a)単層培養における滑膜細胞を顕微鏡で観察した。(b)コラーゲンゲル培養時、ゲル中心部の凍結切片を作製し、染色した。(c)コラーゲンゲルを圧縮負荷後、ゲル中心部の凍結切片を作製し、染色した。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ を示す。コラーゲンゲル中の細胞(b,c)は、単層培養の細胞(a)と比べて丸みを帯びていた。また、単層培養では細胞同士が密集していたのに対し、コラーゲンゲル中では細胞はコラーゲン線維に包まれており、均一に分散していた。

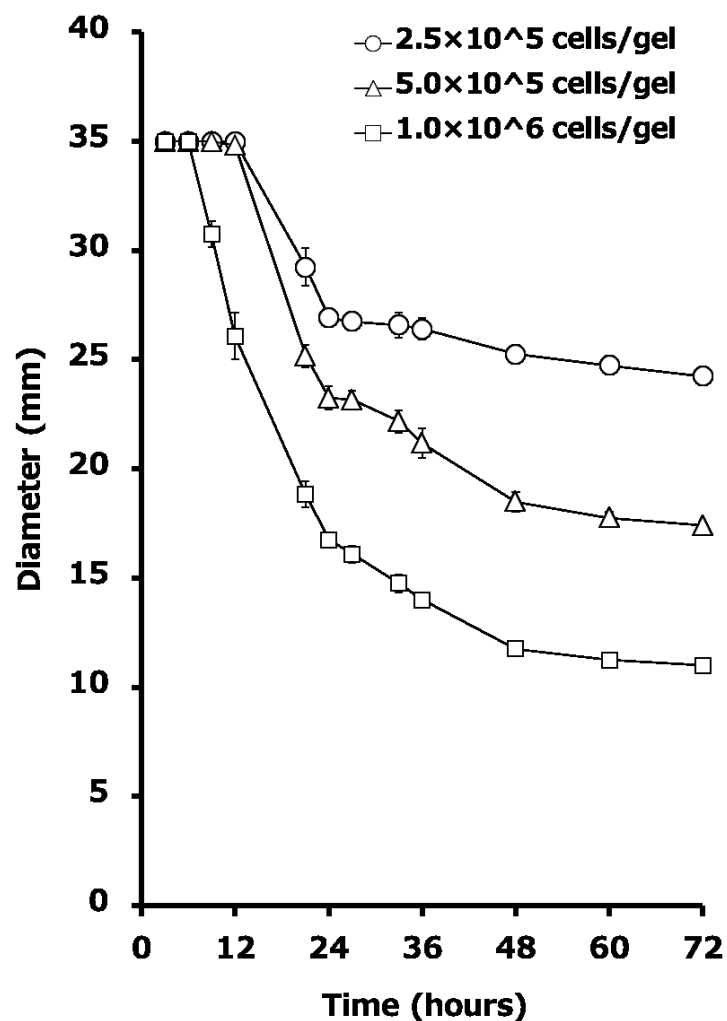


Fig. 1-10 収縮コラーゲンゲルの直径

滑膜細胞を 2.5×10^5 、 5.0×10^5 、および 1.0×10^6 cells/gel を培養開始時に含むコラーゲンゲルを調製し、低接着表面処理プレートで培養し、直径変化(平均値±標準偏差, n=6)を測定した。 1.0×10^6 cells/gel のコラーゲンゲルは、培養開始から 6 時間後にゲル収縮し始めた。また、 5.0×10^5 cells/gel では、培養開始から 9 時間後、 2.5×10^5 cells/gel では培養開始から 12 時間後でゲル収縮が始まった。72 時間後のコラーゲンゲルの直径(平均値±標準偏差, n=6)は 1.0×10^6 、 5.0×10^5 、および 2.5×10^5 cells/gel で 11.0 ± 0.0 、 17.4 ± 0.2 、および 24.3 ± 0.3 mm であった。

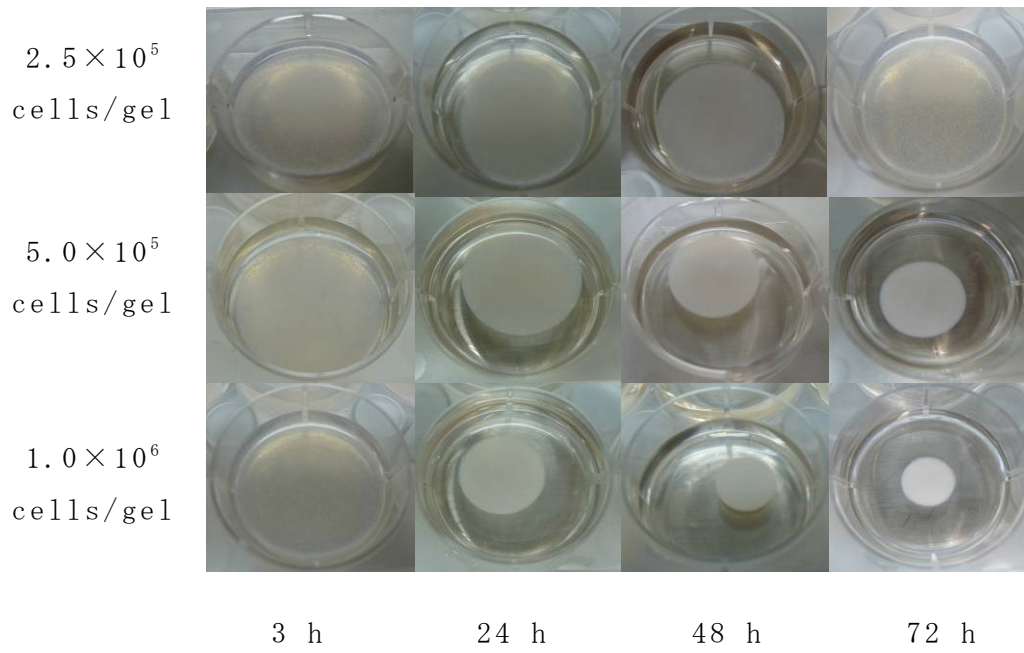


Fig. 1-11 収縮コラーゲンゲルの外観

滑膜細胞を 2.5×10^5 、 5.0×10^5 、および 1.0×10^6 cells/gel を培養開始時に含むコラーゲンゲルを調製し、低接着表面処理プレートで培養し、外観を観察した。

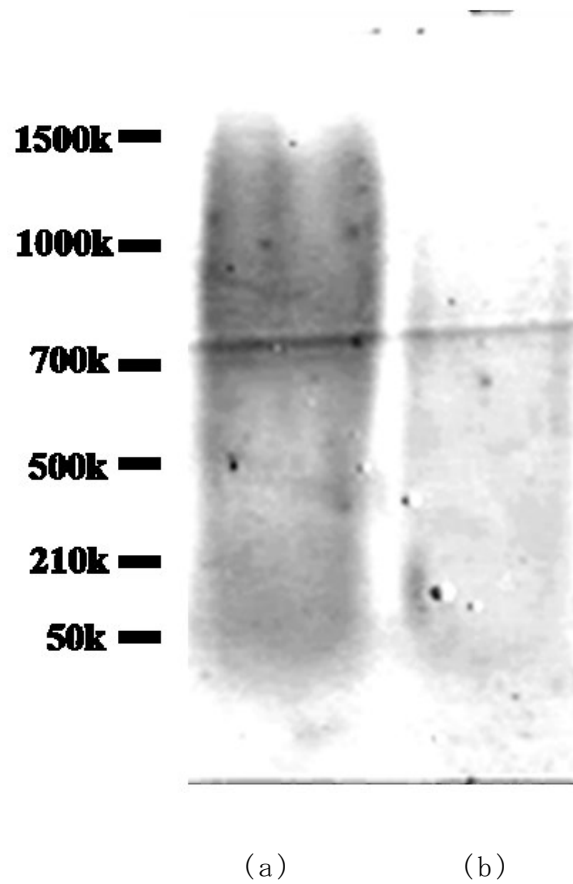


Fig. 1-12 上清中のヒアルロン酸の分子量

48時間培養後の培養上清中のヒアルロン酸の分子量を解析した。(a)単層培養(b)コラーゲンゲル培養 コラーゲンゲル培養(b)は、単層培養(a)と比べて、培養上清中に比較的 low 分子(1,000 k 以下)のヒアルロン酸が多かった。

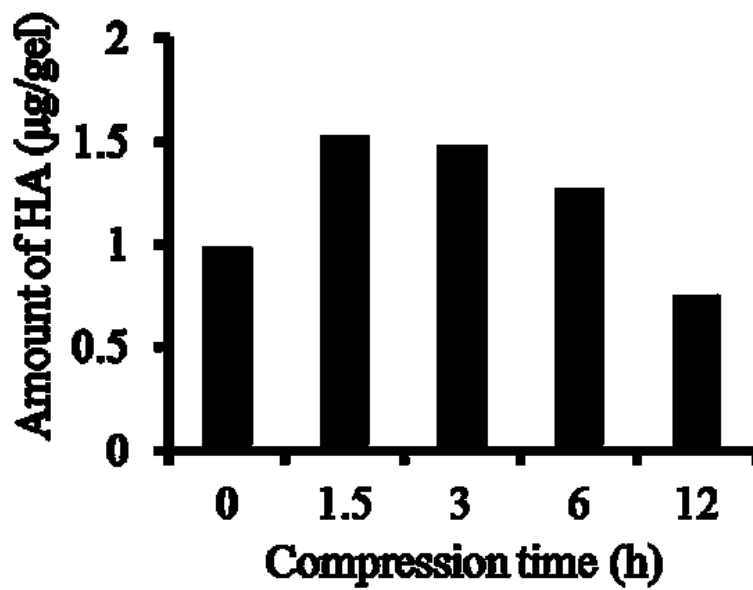


Fig. 1-13 繰り返し圧縮負荷後のコラーゲンゲル中のヒアルロン酸量

繰り返し圧縮負荷後、48時間培養したコラーゲンゲルの培養上清中のヒアルロン酸量を測定した。1gelあたりの培地中のヒアルロン酸量および泳動結果を示す。1.5、3.0、6.0時間の繰り返し圧縮負荷では、無負荷(0時間負荷)と比べて、培養上清中のヒアルロン酸量が増加していた。

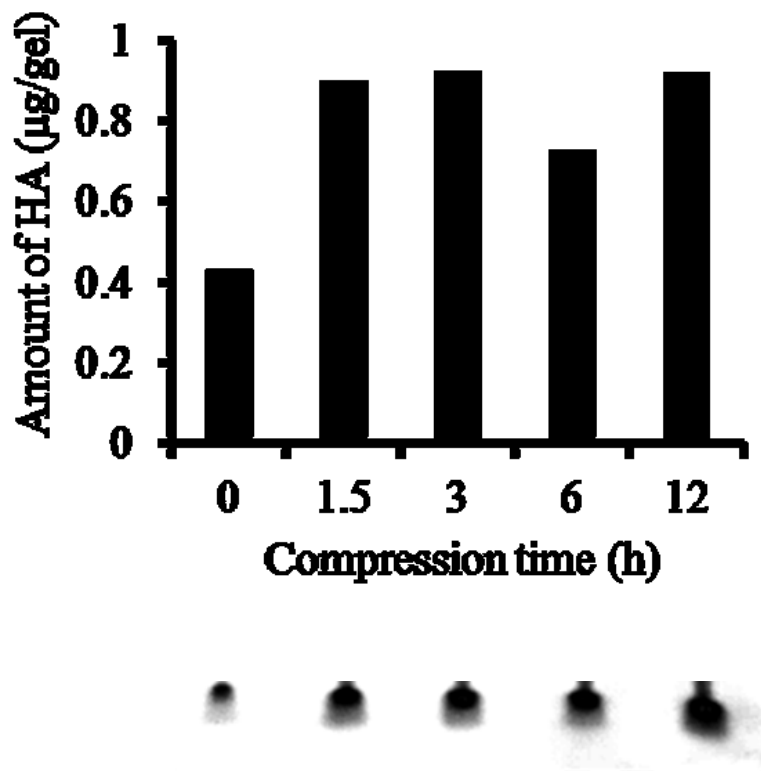


Fig. 1-14 定圧負荷後のコラーゲンゲル中のヒアルロン酸量

定圧負荷後、48時間培養したコラーゲンゲルの培養上清中のヒアルロン酸量を測定した。1gelあたりの培地中のヒアルロン酸量および泳動結果を示す。1.5、3.0、6.0、12時間の定圧負荷では、無負荷(0時間負荷)と比べて、培養上清中のヒアルロン酸量が増加していた。

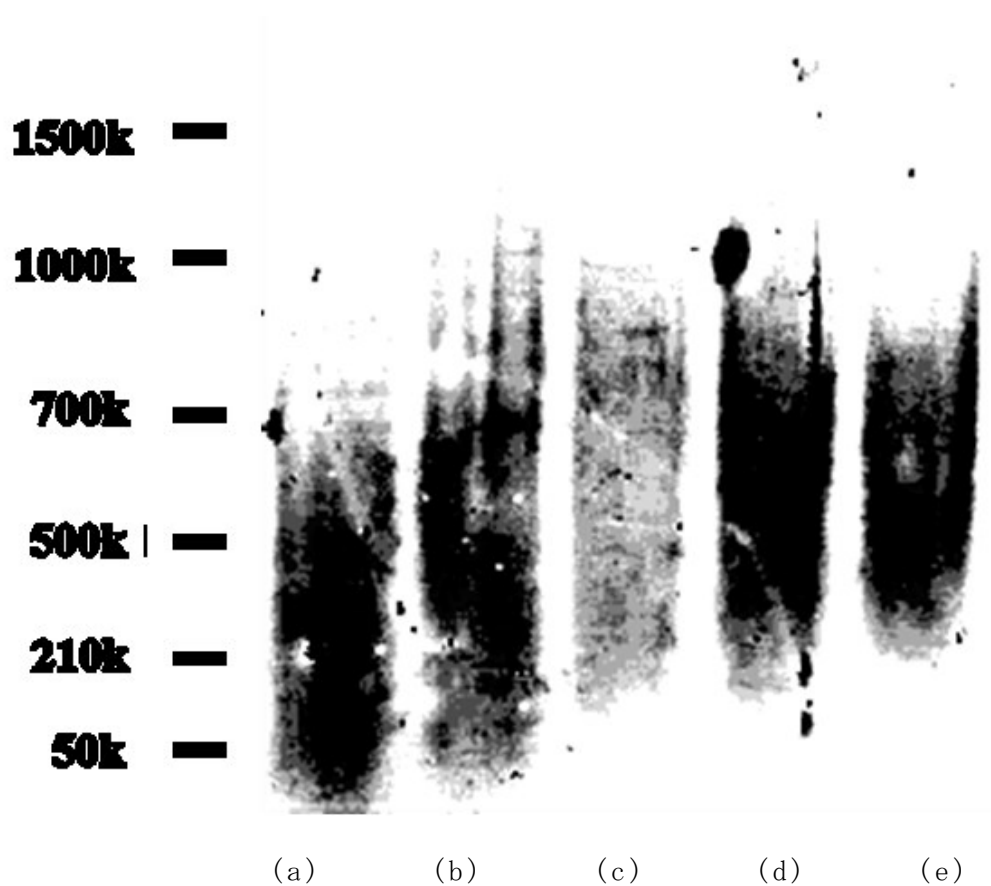


Fig. 1-15 繰り返し圧縮負荷操作後の培養上清中のヒアルロン酸の分子量

繰り返し圧縮負荷操作後の培養上清中ヒアルロン酸の分子量を解析した。圧縮培養開始から48時間培養を行った。(a) 0時間負荷 (b) 1.5時間負荷 (c) 3.0時間負荷 (d) 6.0時間負荷 (e) 12時間 無負荷(0時間)(a)では、ヒアルロン酸の分子量を700k以下であったが、1.5(b)、3.0(c)、6.0(d)、および12時間(e)の繰り返し圧縮負荷では、50k以下のヒアルロン酸が減少した。特に、6.0、12時間圧縮負荷で700k以上のヒアルロン酸が増加した。

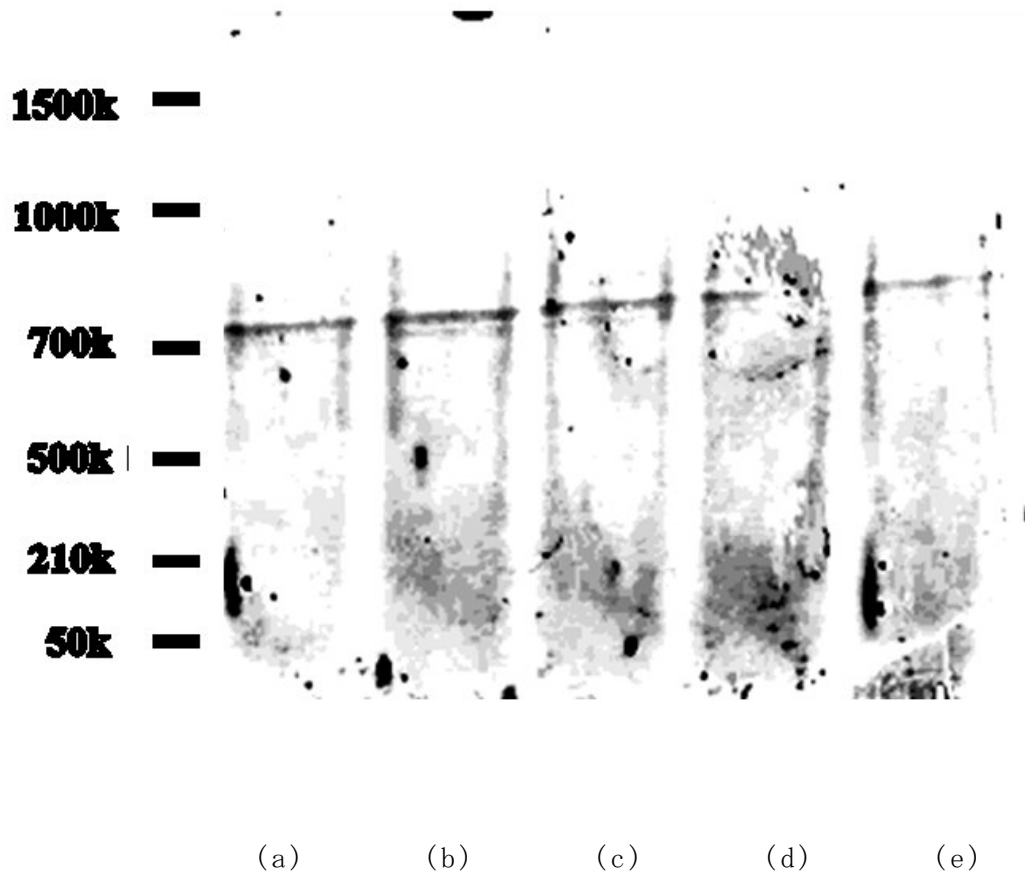


Fig. 1-16 定圧負荷操作後の培養上清中のヒアルロン酸の分子量

定圧負荷操作後の培養上清中ヒアルロン酸の分子量を解析した。圧縮培養開始から 48 時間培養を行った。(a) 0 時間負荷 (b) 1.5 時間負荷 (c) 3.0 時間負荷 (d) 6.0 時間負荷 (e) 12 時間負荷。1.5、3.0、および 6.0 時間の定圧負荷は、無負荷(0 時間)と比べて、ヒアルロン酸の分子量分布に変化は見られなかった。

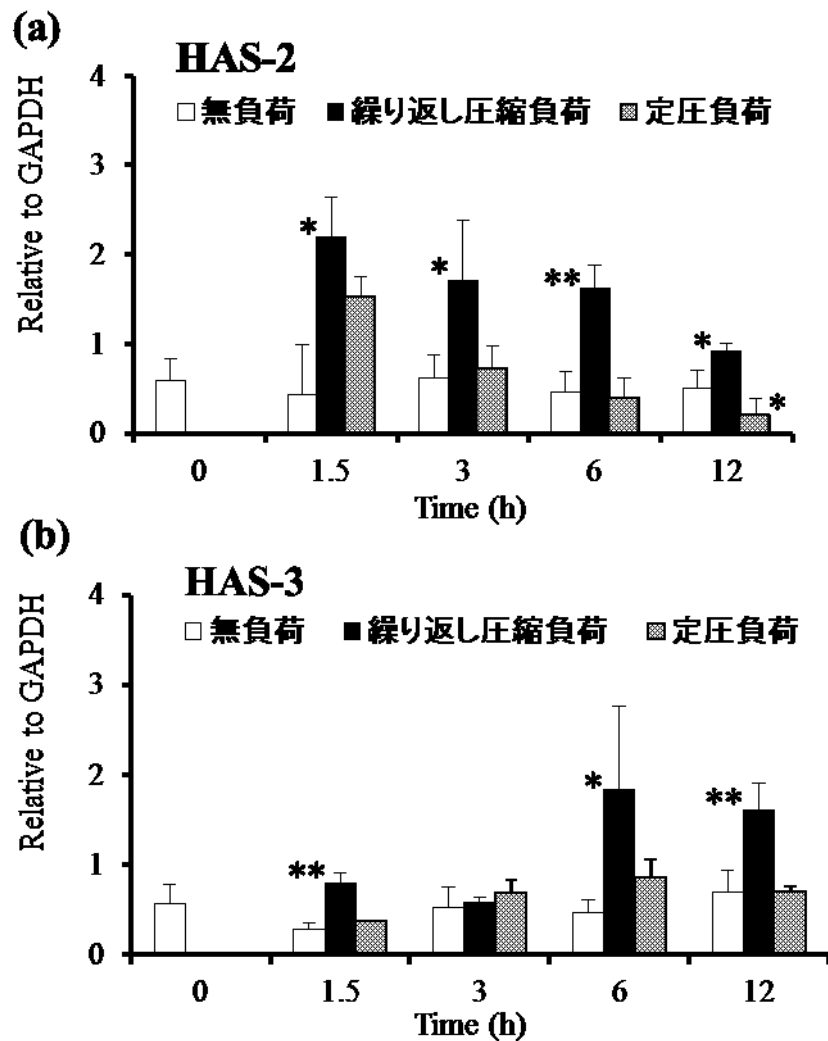


Fig. 1-17 圧縮負荷操作後の遺伝子発現量解析

0、1.5、3.0、6.0、そして 12 時間の圧縮負荷操作後の遺伝子発現量(平均値±標準偏差, n=2-5)を測定した。(a)HAS-2 mRNA の発現量は、1.5、3.0、6.0、および 12 時間の繰り返し圧縮負荷において、無負荷と比べて、有意な上昇が認められ、特に 6.0 時間の繰り返し圧縮負荷で上昇が顕著であった(*: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$ Student's *t*-test)。また、12 時間の定圧負荷において、HAS-2 遺伝子発現量の有意な減少が認められた(*: $p < 0.05$, Student's *t*-test)。(b)HAS-3 mRNA の発現量は、1.5、6.0 および 12 時間の繰り返し圧縮負荷において、無負荷と比べて、有意な上昇が認められ、特に 1.5、12 時間の繰り返し圧縮負荷で上昇が顕著であった($p < 0.01$, **: $p < 0.05$ Student's *t*-test)。

Table 1-4 細胞生存率

無負荷	88.3 ± 2.4%
定圧負荷	79.3 ± 1.4%

コラーゲンゲル培養における無負荷および定圧負荷における細胞生存率(平均値±標準偏差, n=3)を測定した。定圧負荷を加えたゲルは、圧縮なしのゲルと比べ、有意に生存率が低下していた($p < 0.05$, Student's *t*-test)

第 3 項 考察

コラーゲングル培養では、単層培養と比べて細胞は丸みを帯びていた (Fig. 1-9)。生体組織中でも滑膜細胞は丸みを帯びている (Iwanaga, 2000) ことから、コラーゲンをを用いた三次元培養系における細胞は単層培養と比べ、生体内により近い状態にあると考えられる。生細胞の測定の結果、コラーゲングル培養では約 10% が死細胞となった (Table 1-4)。この細胞死は、細胞包埋操作による影響と考えられる。ヒアルロン酸の産生量は、コラーゲングル培養では単層培養と比較して低分子ヒアルロン酸が多かった (Fig. 1-12)。細胞がインテグリンを介して細胞外マトリックスに結合することで、FAK の自己リン酸化を起点として、細胞増殖、生存維持、そして細胞骨格の再編成を伝達する (関口, 2007)。細胞が三次元的に培養されることで、接着できる細胞外マトリックス量が増え、代謝能力が高まるが、産生されるヒアルロン酸は減少し、分子量は低分子なものが多いという結果であった。これは、コラーゲングル中の培地を回収しなかったことが原因と考えられた。すなわち、高分子量ヒアルロン酸は、細胞から産生されても周囲のゲルに絡まり、コラーゲングル外には放出されにくかったと考えられる。収縮コラーゲングルの分解は難しかったため、今回は培養上清中のヒアルロン酸のみを解析した。滑膜細胞をコラーゲングルに包埋した結果、時間経過とともにゲルが収縮した (Fig. 1-10; Fig. 1-11)。細胞数を増やすと収縮がより顕著になったことから、滑膜細胞がコラーゲングルを収縮させると確認できた。

コラーゲングルに定圧負荷を加えると、約 20% が死細胞となった (Table 1-4)。イヌ軟骨組織における細胞生存率は、2.0 MPa 負荷で約 100%、4.0 MPa 負荷で約 80% という報告がある (Kuroki, 2005)。定圧負荷は、細胞死につながると考えられる。HAS-2 は平均分子量 300-2000 k の高分子ヒアルロン酸を合成し、HAS-3 は平均分子量 200-300 k の低分子ヒアルロン酸を合成する報告 (Spicer, 1998) がある。このため、圧縮負荷における HAS-2 および HAS-3 の遺伝子発現量の変化を解析した (Fig. 1-17)。HAS-2 および HAS-3 の遺伝子発現量は、無負荷と比べて、繰り返し圧縮負荷および定圧負荷において有意な上昇が認められた。繰り返し圧縮負荷は、定圧負荷と比べ、HAS-2 および HAS-3 の遺伝子発現量の上昇率が大きかった。6 時間までの繰り返し圧縮負荷および定圧負荷は、無負荷と比べ、培養上清中のヒアルロン酸量が多かった (Fig. 1-13; Fig. 1-14)。これは、圧縮負荷による HAS 遺伝子発現量の増加によるものと考

えられる。一方、ヒアルロン酸の分子量分布は、繰り返し圧縮負荷では高分子側にシフトし、定圧負荷では変化がみられなかった(Fig. 1-15; Fig. 1-16)。軟骨細胞への繰り返し圧縮負荷では産生する GAG 量が増加し、定圧負荷では GAG 量が減少した報告がある(Sharma, 2007)。Gabay の報告によれば、繰り返し圧縮負荷は抗炎症へと進み、定圧負荷は炎症発生を誘導すると考えられる(Gabay, 2008)。本実験の結果はこれらの報告と類似するため、繰り返し圧縮負荷のみが抗炎症に作用するかもしれない。

本節では、滑膜細胞の生体内における環境に着目し、コラーゲングル包埋による新たな関節モデルを構築した。滑膜細胞に対する繰り返し圧縮負荷は、定圧負荷と比べ、より高分子のヒアルロン酸の産生を促進し、関節内の潤滑性に関与している可能性が明らかとなった。

第 2 章 真皮由来の線維芽細胞における機械的負荷の影響

はじめに

皮膚は表面から順番に表皮、真皮、そして皮下組織の 3 層に分かれている。表皮は、角質層、顆粒層、有棘層、そして基底層からなる。表皮を下から支える真皮は、水分を多く含む結合組織の層である。真皮は、線維芽細胞、マクロファージ、肥満細胞、そして形質細胞といった細胞成分が、コラーゲン、エラスチン、そしてプロテオグリカンといった細胞外マトリックス成分で埋められている。表皮と真皮を分けているのが表皮基底膜であり、表皮側および真皮側からの双方向の選択的な刺激が常に行われている。皮膚組織へのマッサージをはじめとした機械的負荷は、動脈血圧 (Kimura, 1995)、自律神経系 (Holey, 2011)、そして創傷治癒 (Timmenga, 1991) などに影響することが報告されている。これらの報告は、美容および医療マッサージにより皮膚組織へ機械的負荷を加えることの生理的意義を示唆しており、血流改善や皮下脂肪抑制への効果だけでなく、真皮における皮膚状態の改善にも効果を示す可能性が示唆されている。

真皮線維芽細胞では、ヒアルロン酸合成酵素として HAS-2 が主に働いている (Sugiyama, 1998)。真皮におけるヒアルロン酸はプロテオグリカンと結合し、エラスチン線維やコラーゲン線維の隙間を埋めるように組織全体に広がっている。ヒアルロン酸は、真皮の保水機能を担っていると考えられているが、線維芽細胞に圧縮負荷を加えた際のヒアルロン酸代謝に与える影響を解析した研究は行われていない。そこで、本研究では、機械的負荷に対する真皮線維芽細胞が産生するヒアルロン酸量および分子量に着目し、以下のように研究を行った。

細胞への圧縮負荷の検討には、三次元構造体に細胞を包埋する必要があるため、三次元構造体として、収縮コラーゲングルおよびコラーゲンスキャッフールドによる三次元構造体を用いた。この 2 つの系を用いて、繰り返し圧縮負荷が真皮線維芽細胞のヒアルロン酸産生に及ぼす影響を検討した。

第 1 節 コラーゲングル培養法の確立および繰り返し圧縮負荷の影響

はじめに

細胞への圧縮負荷の検討には、三次元構造体に細胞を包埋する必要がある。コラーゲンは、生体内の線維芽細胞を囲んでいることから、機械的負荷実験系の三次元構造体に適していると考えた。そこで、コラーゲンで三次元培養系を構築し、ヒアルロン酸代謝への圧縮負荷の影響について検討を行う。

第 1 項 実験材料および方法

1.1 実験材料

細胞は、正常ヒト皮膚組織由来線維芽細胞 (NB1RGB cells: 理研) を使用した。コラーゲン溶液は、0.5%ウシ真皮由来酸可溶性 I 型コラーゲン溶液 (IAC-50: 高研) を用いた。培養には、DMEM 液体培地 (6046D: SIGMA) を用いた。ウシ胎児血清 (FBS: Sigma-Aldrich, Lot no. 772900)、3 倍濃度培地 (D5523-10L 粉末培地: SIGMA, 1.5 g/50 ml)、PSN、安定型ビタミン C (AA2G: L-アスコルビン酸 2-グルコシド, 252.9 mg/ml)、炭酸水素ナトリウム溶液 (2.2 g/50 ml)、細胞培養用プレートとして、未処理 12well プレート (Nunc)、細胞培養表面処理 12well プレート (Nunclon™ Δ Surface plate: Nunc)、低接着表面処理 12well プレート (12-well Lipidure®-Coat Multi-Dish A-12MD: 日油)、または低接着表面処理 6well プレート (6-well Lipidure®-Coat Multi-Dish A-6MD: 日油) を用いた。収縮コラーゲングルの染色に bovine serum albumin (BSA A2934-25G: Sigma-Aldrich)、phalloidin (Alexa Fluor 488: Molecular Probes)、4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI: Invitrogen) を用いた。

1.2 細胞培養液調製法

Nishiyama らの手法を参考に、線維芽細胞 $2.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/gel を懸濁した中性コラーゲン溶液を作製し、コラーゲングル培養に用いた (Nishiyama, 1988; Amano, 2001)。以下に、6gel 分の中性コラーゲン溶液の作製方法を示す。線維芽細胞含有中性コラーゲン溶液の調製方法は、pH 調製液、細胞溶液、そして酸性コラーゲン溶液を混合し作製した。pH 調製液は、3.5 ml FBS、4.4 ml 3 倍濃度培地そして、1.5 ml 炭酸水素ナトリウム溶液の混合溶液

とした。細胞溶液は、細胞を含む 無血清 1% PSN 含有 13 ml DMEM 培地と 3.0 mg の安定型ビタミン C の混合液とした。酸性コラーゲン溶液は、11.6 ml ウシ真皮由来酸可溶性 I 型コラーゲン溶液を用いた。pH 調製液と酸性コラーゲン溶液を混合した後、細胞溶液を混合し、コラーゲン終濃度 0.1% の線維芽細胞含有コラーゲン溶液を調製した。なお、線維芽細胞含有コラーゲン溶液は、冷やしながら 6 gel 分ずつ作製した。これは、一度に大量に作製すると、混合過程でゲル化しやすいためである。2.0 ml の線維芽細胞含有コラーゲン溶液を、未処理 12well プレート、細胞培養表面処理 12well プレート、および低接着表面処理 12well プレートの各 well に分注した。未処理プレートは、浮遊細胞や血球系細胞の培養に一般に用いるプレートである。細胞培養表面処理プレートは、コロナ放電処理を施すことでプレート表面に水酸基及びカルボキシル基が付加したプレートである。細胞の接着および増殖が良好なため、一般に接着性細胞の培養に用いられる。低接着表面処理プレートは、2-Methacryloyloxyethyl-Phosphoryl-Choline (MPC) がコートしてあるプレートである。このプレートは、細胞接着を抑制するため、細胞スフェロイドや胚葉体の作製に用いられる。各プレートを 48 時間培養し、収縮コラーゲンを調製した。インキュベーター時に、画像撮影装置 (ChemiDoc™: Bio-Rad) でコラーゲンを上部から撮影し、解析ソフトウェア (Quantity One®, Bio-Rad) でコラーゲンを面積を自動測定した。培養は、5% CO₂、37°C の条件で CO₂ インキュベーター (Heracell®150i: Thermo Scientific) 内で行った。

1.3 コラーゲンゲル培養法

2.5×10⁵ ~ 1.0×10⁶ cells/gel の線維芽細胞含有コラーゲン溶液を、低接着表面処理 6well プレートの各 well に分注した。プレートを 72 時間培養し、収縮コラーゲンを調製した。なお、0、3、6、9、12、21、24、27、33、36、48、60、そして 72 時間培養後にゲルの直径を測定した。培養は、5% CO₂、37°C の条件で CO₂ インキュベーター内で行った。

1.4 蛍光染色法

収縮コラーゲンゲル (1.0×10⁶ cells/gel の中性コラーゲン溶液を低接着表面処理プレートで 48 時間培養したもの) を、Vernon らの手法を参考に、細胞のアクチン繊維と細胞核を染色し観察した (Vernon, 2002)。培養後、コラーゲンを PBS で洗浄し、1% ホルムアルデヒドで固定した。コラーゲンを PBS に 15 分間 2 回浸した。-20°C のアセトンに 20 分間浸し、透過処理を行った。1% BSA-PBS 溶液で 30 分間ブロッキング処理を行った。2.0 units/ml の phalloidin

で 1 時間染色し、PBS で 30 分間洗浄した。7.2 μ M の DAPI で 15 分間染色し、PBS で 15 分間 2 回洗浄した。蛍光顕微鏡 (Biozero: キーエンス) で、染色後のコラーゲンを上部から観察した。全ての染色工程は、室温で行った。

1.5 圧縮負荷方法

収縮コラーゲンゲル (1.0×10^6 cells/gel の線維芽細胞含有コラーゲン溶液を低接着表面処理プレートで 72 時間培養したもの) に、FX-4000C[™] (Flexcell) で繰り返し圧縮負荷 (Shape: SIN 1/2, Freq: 1.0 Hz; 40 kPa, 6 時間) を加えた。圧縮負荷は、5% CO₂、37°C の条件で CO₂ インキュベーター (三洋電機) 内で行った。42 時間の培養後、4 gel 分の培養上清を回収し GAG を精製した。GAG サンプル中のヒアルロン酸の定量および分子量を解析した。GAG の精製方法は、第 1 章第 1 節と同様に行った。GAG の精製方法、ヒアルロン酸の定量、および分子量測定法は、第 1 章第 1 節と同様に行った。

1.6 マイクロアレイ

Agilent Expression Array (SurePrintG3 Human GE 8x60K, タカラバイオ) を用いて、圧縮負荷前後の遺伝子発現量 (約 40,000 遺伝子) の変化を解析した。圧縮負荷なしをコントロールとして、圧縮負荷ありにおける発現量が "増加した遺伝子" を分類した。"増加した遺伝子" は、遺伝子発現変化量が Log2Ratio で 1 以上の遺伝子とした。

1.7 統計処理

MS-Excel 用統計ソフト Statcel2 を用いて、Tukey's-test で検定した。

第 2 項 結果

2.1 培養プレートの検討

収縮コラーゲンを作製するに当たり最適なプレートを選択するために、通常の未処理プレート、表面処理プレート、そして低接着表面処理プレートについて検討を行った。各 12well プレートにおける、コラーゲンの面積を示した (Fig. 2-1)。コラーゲンは、包埋から 6 時間後にコラーゲンが収縮し始めた。0、6、24、そして 48 時間培養後のコラーゲンの面積 (平均値 ± 標準偏差, n=4) を図示した。低接着表面処理プレートで作製したコラーゲンは、未処理プレートと細胞培養表面処理プレートで作製したコラーゲンと比べ、面積が小さかった。なお、低接着表面処理プレート以外でのコラーゲンは正円状ではないことから、結果は面積で示した。48 時間培養の低接着表面処理プレートのコラーゲンでは円柱状であり、上部からみても正円に近かった (Fig. 2-2a)。未処理プレートと細胞培養表面処理プレートで作製したコラーゲンは歪んでおり、内側に円状の線が認められた。コラーゲン上部の高さは、低接着表面処理プレートでは均一であり、細胞培養表面処理プレートではカルデラ状であった (Fig. 2-2b)。

2.2 コラーゲンの培養条件の検討

圧縮負荷に用いるプレート (BioPress™ Plate) の各 well の直径は 13 mm であることから、これよりも小さい収縮コラーゲンを調製する必要がある。コラーゲンの直径における培養時間および細胞濃度について検討した。12、24、36、48、60、そして 72 時間培養後のコラーゲンの直径 (平均値 ± 標準偏差, n=6) を示した。培養開始時にコラーゲン内に播種していた細胞数に依存して、収縮コラーゲンの直径は減少していた。なお、低接着表面処理プレートのコラーゲンは正円状であること (Fig. 2-4) から、結果は直径で示した。

2.3 蛍光染色による細胞の観察

1.0×10^6 cells/gel の線維芽細胞を含有するコラーゲンを蛍光染色した蛍光顕微鏡画像を Fig. 2-5 に示した。アクチン繊維は、コラーゲン中に均一に分散していることが確認できた (Fig. 2-5a)。また細胞の核染色により、線維芽細胞がコラーゲン中に均一に分散していることが確認できた (Fig. 2-5b)。

2.4 培養上清の検討

圧縮負荷操作後に42時間培養し、培養上清中のヒアルロン酸を解析した。セルロース・アセテート膜電気泳動の結果、上清中のヒアルロン酸量は、圧縮負荷時で0.11 $\mu\text{g/gel}$ 、無負荷時で0.07 $\mu\text{g/gel}$ であった(Table 2-1)。であった。アガロースゲル電気泳動の結果、繰り返し圧縮負荷時の上清中のヒアルロン酸の分子量は、無負荷と比べ高分子化していた(Fig. 2-6)。

2.5 マイクロアレイ

負荷なしと比べ、繰り返し圧縮負荷で変動した遺伝子を解析した。細胞外マトリックスの産生に関与する遺伝子を抽出した。圧縮負荷により増加した遺伝子は、HAS-1、HAS-2、NFKBIZ、CREB5、IL-1A、IL-1B、IL-6、MMP-3、MMP-10、MMP-12、であった。

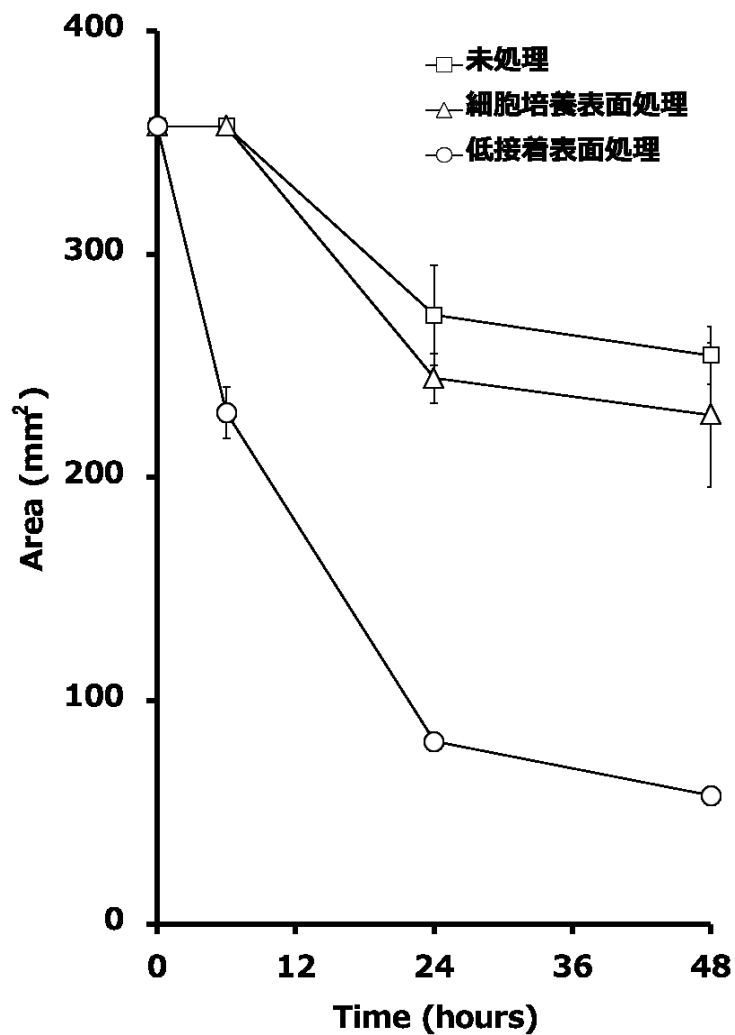


Fig. 2-1 各培養プレートにおける収縮コラーゲンゲルの面積

1.0×10⁶ cells/gel の 0.1%コラーゲンゲル 2.0 ml を、未処理 12well プレート、細胞培養表面処理 12well プレート、または低接着表面処理 12well プレートに分注し、コラーゲンゲルの面積(平均値±標準偏差, n=4)を図示した。低接着表面処理プレートで作製したコラーゲンゲルは、未処理プレートと細胞培養表面処理プレートで作製したコラーゲンゲルと比べ、面積が小さいものであった。なお、低接着表面処理プレート以外でのコラーゲンゲルは正円状ではないことから、結果は面積で示した。

(a)



Non-treated plate

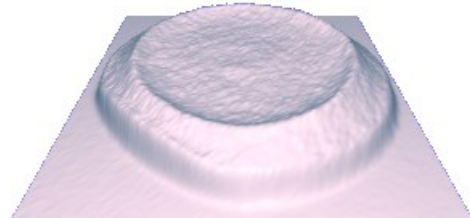


Tissue culture plate

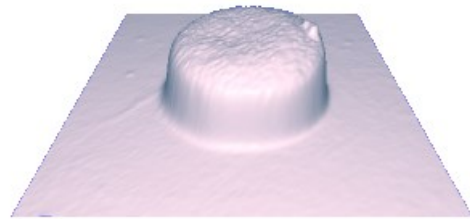


Low adherence plate

(b)



Non-treated plate



Low adherence plate

Fig. 2-2 各培養プレートにおける収縮コラーゲンゲルの外観

(a)48 時間培養の低接着表面処理プレートのコラーゲンゲルでは円柱状であり、上部からみても正円に近かった。未処理プレートと細胞培養表面処理プレートで作製したコラーゲンゲルは歪んでおり、内側に円状の線が認められた。スケールバーは 1.0 mm を示す。(b)コラーゲンゲル上部の高さは、細胞培養表面処理プレートではカルデラ状であり、低接着表面処理プレートでは均一であった。

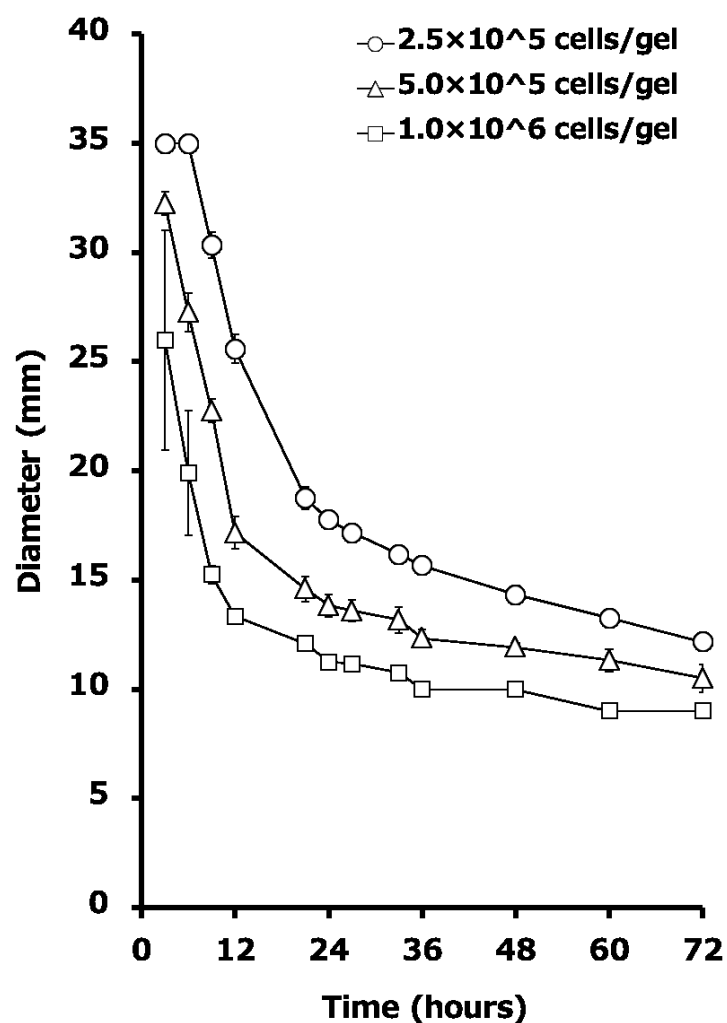


Fig. 2-3 収縮コラーゲングルの直径

線維芽細胞を $2.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/gel 含む 0.1% コラーゲングルを、低接着表面処理プレートに分注し、72 時間培養した。コラーゲングルの直径 (平均値 \pm 標準偏差, $n=6$) は Fig. 2-1 と同様に測定した。培養開始時にコラーゲングル内に播種していた細胞数に依存して、収縮コラーゲングルの直径は減少していた。なお、低接着表面処理プレートのコラーゲングルは正円状であることから、結果は直径で示した。

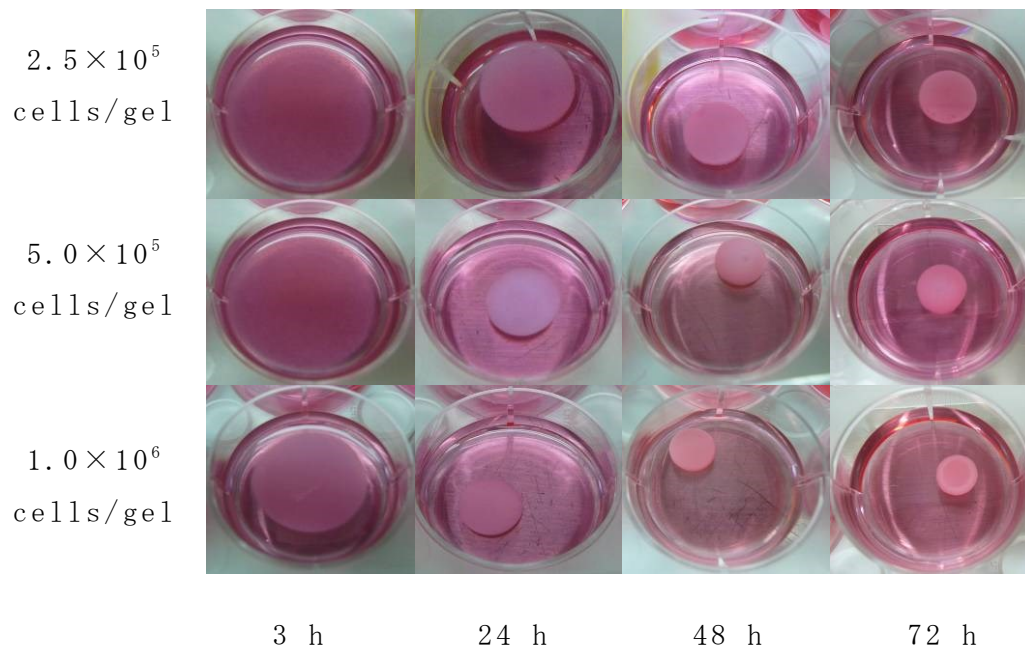
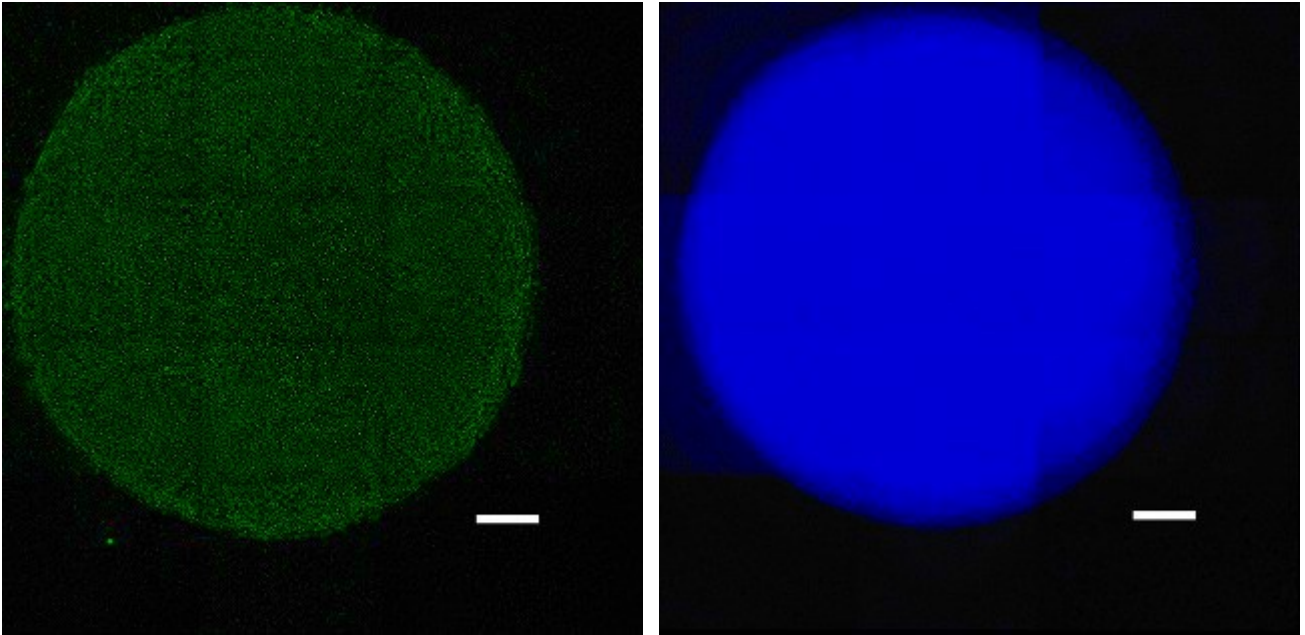


Fig. 2-4 低接着表面処理における収縮コラーゲンゲルの外観

線維芽細胞を 2.5×10^5 、 5.0×10^5 、および 1.0×10^6 cells/gel を含むコラーゲンゲルを調製し、低接着表面処理プレートで培養し、外観を観察した。



(a)

(b)

Fig. 2-5 収縮コラーゲンゲル中の細胞の分布

線維芽細胞を 1.0×10^6 cells/gel 含む 0.1% コラーゲンゲルを低接着表面処理プレートで 48 時間培養し、細胞のアクチン繊維と細胞核を観察した。(a)細胞骨格染色画像 (b)細胞核染色画像 スケールバーは 1.0 mm を示す。細胞骨格(a)および細胞核(b)の観察の結果、細胞のアクチン繊維と核はコラーゲンゲル中に均一に分散していることが確認できた。

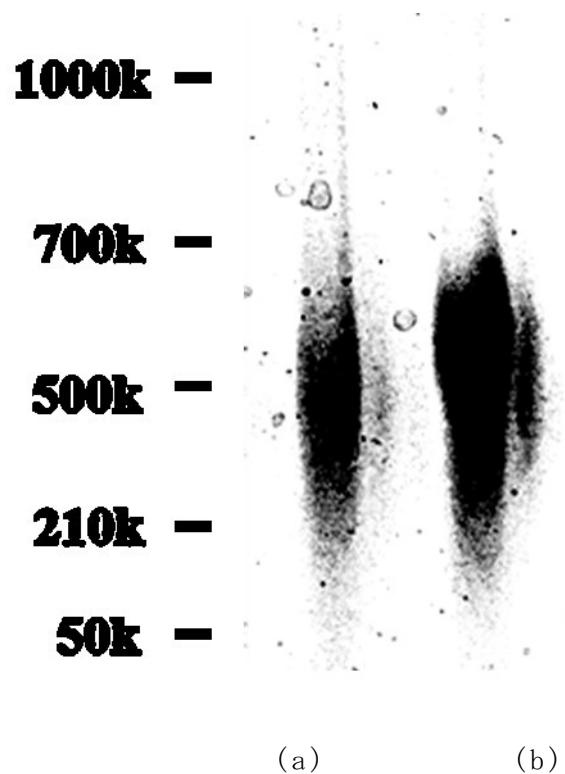


Fig. 2-6 繰り返し圧縮負荷操作後の培養上清中のヒアルロン酸の分子量

収縮コラーゲンゲル(線維芽細胞を 1.0×10^6 cells/gel 含む 0.1%コラーゲン溶液を低接着表面処理プレートで 72 時間培養したもの)へ、CO₂ インキュベーター内の圧縮負荷装置 FX-4000C™ (Flexercell®)で繰り返し圧縮負荷(Shape: SIN 1/2, Freq: 1.0 Hz; 40 kPa, 6 時間)を加えた。負荷操作後、42 時間培養し培養上清から GAG を精製した。なお、24 gel 分の培養上清を回収し GAG を精製した。(a)無負荷(0 分)(b)繰り返し圧縮負荷 アガロースゲル電気泳動の結果、繰り返し圧縮負荷時(b)の上清中のヒアルロン酸の分子量は、無負荷(a)と比べ、より高分子化していた。

Table 2-1 培養上清中のヒアルロン酸量

無負荷	0.07±0.06 μ g/ml
圧縮負荷	0.11±0.05 μ g/ml

繰り返し圧縮負荷操作後に42時間培養し、培養上清中のヒアルロン酸量を解析した。セルロース・アセテート膜電気泳動の結果、圧縮負荷時の上清中のヒアルロン酸量は、無負荷時と比べて増加していた。

第 3 項 考察

低接着表面処理プレートで作製した収縮コラーゲングルは円柱状であり、上部からみても正円であった(Fig. 2-2b)。低接着表面処理プレートの各 well には、ホスホコリン基がコートしてある。このホスホコリン基コーティングがコラーゲンの過度の接着を防ぎ、コラーゲングルの収縮を妨げなかったと考えられる。このプレートの Lipidure® コーティングは、細胞毒性やタンパク質変性能力がないことが報告されている(DeFife, 1995; Ishihara, 1998)。プレートの well 表面は、細胞膜表面を模しており、細胞も接着しない(Wataya, 2008; Yasuda, 2009)。未処理プレートと細胞培養表面処理プレートにおいて、収縮コラーゲンのゲルの高さが部位により違った(Fig. 2-2b)のは、コラーゲングル収縮初期にコラーゲングル周辺部だけが well から離れ、その後コラーゲングル全体が well から離れたためと考えられる。

細胞をコラーゲングル中で三次元培養すると、細胞中のアクチン骨格の収縮によりコラーゲングルは収縮し固くなる。このコラーゲングルの収縮能は、有効成分のスクリーニングにも用いられている(Bell, 1979)。コラーゲングルの収縮には、包埋された線維芽細胞の走化性が関与している。成長因子などを遊走因子として、線維芽細胞は引き寄せられる(Poslethwaite, 1976)。この際、線維芽細胞が細胞外マトリックスに接着、収縮を繰り返すことで(Willingham, 1981)、ゲルが収縮すると考えられている。円柱の収縮コラーゲングルを作るために、いくつかの手法が考案されてきた。たとえば、ミネラルオイル(Vernon, 2002)、BSA コーティング(Nishiyama, 1988)、ローテーター(Ogura, 2008)、またはシリコン膜(Arai, 2011)を用いる手法が提案されている。このような人為的な手法ではなく、低接着表面処理プレートを用いることでコラーゲングルの形状を制御可能であった。

コラーゲングルの形状は制御可能であることから、圧縮負荷プレートの well に収縮コラーゲングルを設置可能であった。細胞濃度を 2.5×10^5 cells/gel から 1.0×10^6 cells/gel に増やすと、コラーゲングルの直径はより収縮した(Fig. 2-3)。これは Nishiyama らが、 1.0×10^4 から 2.0×10^5 cells/gel のコラーゲングルを培養し、コラーゲングルがより収縮した結果と同様のものであった(Nishiyama, 1988)。圧縮負荷実験には、 1.0×10^6 cells/gel の細胞数で培養 72 時間の収縮コラーゲングルを用いることにした。この条件で作製した収縮コ

ラーゲルゲルの直径は平均 9.0 mm であり、圧縮負荷プレートの well (直径 13 mm) におさまる。

コラーゲルゲルに圧縮負荷を加えたことで、上清中のヒアルロン酸の産生量が増加し (Table 2-1)、分子量が増大した (Fig. 2-6)。マイクロアレイの結果から、圧縮負荷直後には、ヒアルロン酸合成酵素である HAS-1 と HAS-2、核の I κ B タンパク質の 1 つをコードする NFKBIZ (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor)、cAMP 応答配列結合タンパク質ファミリーをコードする CREB5 (cAMP responsive element binding protein 5)、生理活性物質の一種である IL-1A (Interleukin-1-alpha)、IL-1B (Interleukin-1-beta)、IL-6 (Interleukin-6)、そしてマトリックスメタロプロテアーゼである MMP-3、MMP-10、MMP-12 の遺伝子発現量が増加した。これらはすべて、ヒアルロン酸合成に関与する遺伝子である (Saavalainen, 2005; Stylianou, 1998)。コラーゲルゲル中の線維芽細胞は、圧縮負荷により遺伝子発現量に変化がおき、ヒアルロン酸産生に影響することを認めた。圧縮負荷が細胞周辺のインテグリンなどの接着因子に刺激を与え、遺伝子発現に影響を及ぼした可能性が考えられる。ラット皮膚への圧縮負荷で、皮膚中のヒアルロン酸量が増加することが報告されている (Kot, 2008)。この報告は、圧縮負荷により線維芽細胞のヒアルロン酸産生量が高まった本実験の結果を支持するものである。

本節の実験システムを用いることで、三次元培養モデルを容易に作製でき、細胞への繰り返し圧縮負荷の影響を検討できることが明らかとなった。

第 2 節 コラーゲンスポンジ培養法と静的荷重負荷の影響

はじめに

細胞への圧縮負荷の検討には、細胞を三次元構造体に包埋する必要がある。細胞包埋収縮コラーゲンゲルよりも、更に簡易な実験系を検討した。既存のコラーゲンスキャッフオルドと市販のバイアルガラスを用いた静的荷重負荷実験系を構築し、ヒアルロン酸代謝への影響を解析する。

第 1 項 実験材料および方法

1.1 実験材料

細胞は、正常ヒト皮膚組織由来線維芽細胞 (NB1RGB cells: 理研) を使用した。FBS (Sigma-Aldrich, Lot no. 106K0366)、1%PSN 含有 DMEM (Sigma-Aldrich)、コラーゲンスキャッフオルドとして、ウシ真皮由来 I 型アテロコラーゲン製スポンジ (CSM-50: 高研) を用いた。96 well プレートは (353072: Falcon) を、6well プレートは (Multidish 6-well Nunclondelta SI: thermo Fisher Scientific) を用いた。

ウエスタンブロッキングの一次抗体には、MMP-1 抗体 (抗マウス, 第一ファインケミカル) 溶液 (500 倍希釈) と GAPDH 抗体 (抗ウサギ, EnoGene) 溶液 (1,000 倍希釈) を用いた。二次抗体には、Jackson ImmunoResearch Laboratories 製の抗マウス抗体 IgG (西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG (F(ab')₂ フラグメント製品; MMP-1 抗体用) および抗ウサギ IgG (西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (F(ab')₂ フラグメント製品; GAPDH 抗体用) を用いた。発光基質には、ECL Western blotting detection substrate (GE Healthcare) を用いた。

1.2 コラーゲンスポンジ培養法

10%FBS, 1%PSN 含有 DMEM に、線維芽細胞を 1.0×10^7 cells/ml になるように調製した。コラーゲンスポンジ (Fig. 2-7) を 96 well プレートに設置し、スポンジ上に線維芽細胞懸濁液を 50 μ l 播種した。播種した細胞量は、 5.0×10^5 cells/sponge である。播種後、10 分間インキュベートし、0 または 500 g で 5 分間遠心分離した。各 well へ 100 μ l の 10%FBS, 1%PSN 含有 DMEM を加え、72 時間培養した。培養は、5%CO₂、37°C の条件で CO₂ インキュベーター (Heracell®150i: Thermo Scientific) 内で行った。

1.3 蛍光染色法

72時間の培養後、コラーゲンスポンジを1.0%ホルムアルデヒドで固定した。コラーゲンスポンジをPBSで2回洗浄し、アセトンで透過処理後、1.0%アルブミンPBS溶液でブロッキングした。コラーゲンスポンジの中心部を垂直方向に50 μ m厚切断し、凍結切片を作製した。凍結切片を2.9 μ MのDAPIで10分間染色し、蛍光顕微鏡(Biozero: キーエンス)で観察した。全ての染色工程は、室温で行った。

1.4 静的荷重負荷方法

コラーゲンスポンジを6wellプレートに設置し、上部に50 mlバイアルガラス(9-852-09: AS ONE)を乗せて静的荷重負荷を加えた(Fig. 2-9a, b)。接触圧は、バイアル内の水量で調節し、0 kPa(負荷なし)、20 kPa(バイアルに0 mlの水を含む)、または40 kPa(バイアルに32.6 mlの水を含む)とした。40 kPaの接触圧(0.41 kgf/cm²)は、65.2gの荷重がコラーゲンスポンジの断面積15.9 mm²へかかるものとして決定した。バイアルガラスがずれないように、上部を別の6wellプレートで固定した。5%CO₂、37°Cの条件でCO₂インキュベーター内にプレートを静置し、静的荷重負荷を1時間加えた。静的荷重負荷操作後、コラーゲンスポンジを0~24時間培養した。このとき、0、1.0 μ Mのプロテアソーム阻害剤(MG132)を培地に加えて培養した。

1.5 DNAの測定法

静的荷重負荷操作後、DNA抽出キット(Nucleo Spin Tissue: タカラバイオ)を用いて細胞中のDNAを抽出した。抽出したDNAの量を、260 nmの吸光度から測定した。

1.6 ヒアルロン酸の定量

静的荷重負荷操作後、ヒアルロン酸ELISAキット(280566: 生化学工業)を用いて、培養上清中のヒアルロン酸量を測定した。

1.7 ウェスタンブロッティング法

静的荷重負荷操作後の培養上清中のMMP-1を、ウェスタンブロッティングで解析した。コラーゲンスポンジと培養上清をホモジナイザー(Biomasher[®]: ニッピバイオマトリックス研究所)で均質化し、泳動サンプル用緩衝液(Z sample buffer: アトー)と混合した。5-20% SDS-PAGEゲル(e-PAGEL[®] E-T/R/D520L: アトー)に試料を注入し、電気泳動を行った。なお添加量は、タンパク質量測定キット(Pierce[®] BCA Protein Assay: Thermo)を用いて、タンパク質量を合わせた。

分子量の目安として、スタンダード (Precision Plus Protein™ Standards: BIO-RAD) を用いた。泳動後、SDS-PAGE ゲル上のバンドを PVDF 膜 (Clear Blot membrane-P: アトー) に転写した。転写後の SDS-PAGE ゲルにバンドが残らないことを、CBB 染色試薬 (EzStain Aqua, アトー) で確認した。ノンスペックバンドを抑制するため、膜をブロッキング溶液 (N101: 日油) に 1 時間浸した。1 次抗体は、MMP-1 抗体と GAPDH 抗体を用いた。2 次抗体として、MMP-1 抗体には抗マウス抗体 IgG、GAPDH 抗体には抗ウサギ IgG を用いた。バンドの発光には、発光基質を用いた。膜上のバンドを、画像撮影装置 (ChemiDoc™ XRS+: Bio-Rad) で検出した。

1.8 ゼラチンザイモグラフィ法

コラーゲンスポンジ内外の培養上清中の MMP-2 と MMP-9 を、ゼラチンザイモグラフィキット (AK-45: プライマリーセル) で解析した。なお、ゼラチンゲルの染色には、キット付属品ではなく、クマシブリリアントブルー (CBB) 染色試薬を用いた。試料添加量は、タンパク質量を合わせた。

1.9 遺伝子発現量解析法

0~24 時間培養後、コラーゲンスポンジ中の細胞から total RNA を抽出した。コラーゲンスポンジを 1.0 ml のフェノール溶液に 40 分浸すことで、細胞溶解液を調製した。0.2 ml のクロロホルム (和光純薬工業) を加え、よく攪拌した後、13,000 rpm、4℃ で 15 分間遠心分離した。遠心分離後の溶解液は、上層が RNA、中層がタンパク質、下層が DNA を多く含む層に分離した。上層を別の 1.5 ml チューブに回収し、そこへ 0.5 ml のイソプロピルアルコール (和光純薬工業) を加え攪拌し、常温で 10 分間静置した。その後、13,000 rpm、4℃ で 10 分間遠心分離し、デカンテーションで上清を除去し、風乾した。風乾物を、39.5 μ l の 0.1% Diethyl Dicarbonate (和光純薬工業) を含む DEPC 溶液に懸濁した。溶液中に残った DNA を除去するため、DNA-free (DNase treatment removal reagent: Ambion) を使用した。39.5 μ l RNA 懸濁液と 5.0 μ l 10×DNase buffer、そして 0.5 μ l DNase を混合し、37℃ で 30 分間酵素分解した。5.0 μ l DNase Inactivation Reagent を加えて反応を停止し、15,000 rpm、4℃ で 1 分間遠心分離した。上清を 0.6 ml チューブに回収し、これを total RNA 溶液とした。total RNA 溶液中の RNA 濃度を、吸光度をもとに測定した。DEPC 水で 100 倍希釈した total RNA 溶液の 260 nm の吸光度を、Gene Spec I (Naka Instruments) で測定した。専用のソフトウェア (Gene Spec I) を用いて、total RNA 濃度を計算した。cDNA 合成を、Prime Script RT-PCR kit (タカラバイオ) を用いて行った。

total RNA 溶液を RNase Free dH₂O で希釈し、14 μ l の溶液中に 2.0 μ g の RNA を含む濃度とした。この溶液に、1.0 μ l の 20 μ M Random 6 mers、4.0 μ l の 5 \times Prime Script Buffer、そして 1.0 μ l の Prime Script RT Enzyme Mix を加えた。サーマルサイクラーで逆転写反応を行い、二倍に希釈して鋳型 cDNA を作製した。遺伝子発現量解析は、PCR と SYBR Green を用いたインターカーレーター法 (Higuchi, 1993) を用いて行った。反応チューブ (0.2 ml Hi-8-Tube: タカラバイオ) に 12.5 μ l の SYBR Premix Ex Taq (Taq DNA Polimerase、dNTP mixture、Mg²⁺、そして SYBR Green I を含む試薬: タカラバイオ)、9.5 μ l の滅菌水、センスおよびアンチセンスの 0.5 μ l の 100 pmol/ μ l 特異的プライマー、そして 2.0 μ l の cDNA を入れ、混合液を調製した。

使用した forward プライマーと reverse プライマーは、GAPDH: 5' - GCACCGTCAAGGCTGAGAAC -3', and 5' - TGGTGAAGACGCCAGTGGA -3; interleukin-6 (IL-6): 5' - AATTCGGTACATCCTCGACGG -3', and 5' - TTGGAAGGT TCAGGTTGTTTTCT -3'; MMP-1: 5' - ATTCTACTGATATCGGGGCTTTGA -3', and 5' - ATGTCCTTGGGGTATCCGTGTAG -3'; MMP-2: 5' - TACAGGATCATTGGCTACACACC -3', and 5' - GGTCACATCGCTCCAGACT -3'; tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1): 5' - AGAGTGTCTGCGGATACTTCC -3', and 5' - CCAACAGTGTAGGTCTTGGTG -3' とした。GAPDH 遺伝子発現量を内部標準とした。GAPDH は変動が少ない遺伝子であることを確認している。PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System (StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems: Applied Biosystems) を用いて行った。

1.10 統計処理

MS-Excel 用統計ソフト Statcel2 を用いて、Dunnett's multiple-comparison で検定した。

第 2 項 結果

2.1 コラーゲンスポンジ培養

細胞をコラーゲンスポンジ(Fig. 2-7)へ播種したのみでは、細胞はスポンジ上部のみに分布していた。細胞播種後に遠心処理を行った結果、細胞はコラーゲンスポンジ中心部まで分布した(Fig. 2-8)。なお、遠心処理を行っても、プレート well 上に細胞は存在しなかった。

2.2 静的荷重負荷の影響

本研究では、市販のバイアルガラスをスポンジ上部に静置することで静的荷重負荷を加えた(Fig. 2-9a, b)。20 kPa を比較的弱い負荷、40 kPa を比較的強い負荷として設定した。静的荷重負荷操作後、細胞核を DAPI で染色し、コラーゲンスポンジ中央部の切片を作製した結果、静的荷重負荷操作後も線維芽細胞はコラーゲンスポンジに接着していることを確認した(Fig. 2-9c)。

2.3 DNA 量測定

静的荷重負荷により細胞数が増えているか確認するため、負荷前後での DNA 量を測定した。コラーゲンスポンジ中の DNA 量(平均値±標準偏差, n=3)は、0、20、そして 40 kPa 負荷で、 28.8 ± 2.0 、 27.8 ± 1.9 、そして $26.0 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ であった。群間に統計的有意差はなかったが、静的荷重負荷強度が高いほど、DNA 量が少ない傾向があった。

2.4 線維芽細胞のヒアルロン酸産生におよぼす静的荷重負荷の影響

静的荷重負荷操作後に 24 時間培養し、培養上清中のヒアルロン酸量を解析した(Table 2-2)。上清中のヒアルロン酸量は、圧縮負荷によって変化しなかった。

2.5 線維芽細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)産生におよぼす静的荷重負荷の影響

24 時間培養後、培地とコラーゲンスポンジを混合した試料中の MMP-1 をウェスタンブロッティングで解析した(Fig. 2-10a)。40 kPa 静的荷重負荷群におけるグリコシル化 Pro-MMP-1 (57 k)と Pro-MMP-1 (52 k)発現量は、負荷なし群と比べて多かった。なお、GAPDH(37 k)発現量は変化していなかった。プロテアソーム阻害剤($1.0 \mu\text{M}$ MG132)を添加して培養した結果、培地中の MMP-1 の産生量は変化しなかった(Fig. 2-10b)。

24 時間培養後、培地とコラーゲンスポンジを混合した試料中の MMP-2 と MMP-9 をゼラチンザイモグラフィーで解析した(Fig. 2-10c)。40 kPa における Pro-MMP-2 (72 k) 発現量は、負荷なしと比べて多かった。20 kPa における MMP-2 (62 k) 発現量は、負荷なしと比べて多かった。Pro-MMP-9 (92 k) と MMP-9 (83 k) のバンドは検出されなかった。

MMP-1、MMP-2、MMP-9、IL-6、そして TIMP-1 の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR で解析した(Fig. 2-11)。静的荷重負荷直後(t=0)は、20 kPa の静的荷重負荷は、無負荷と比べて IL-6 の遺伝子発現量が有意に増加した。

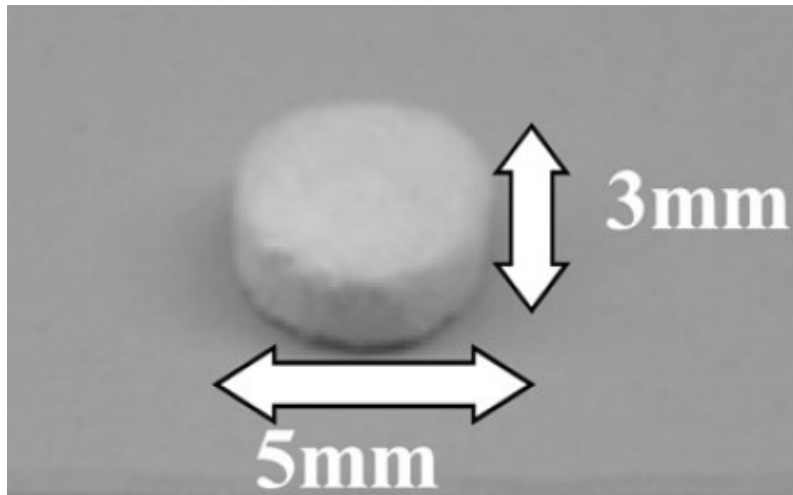
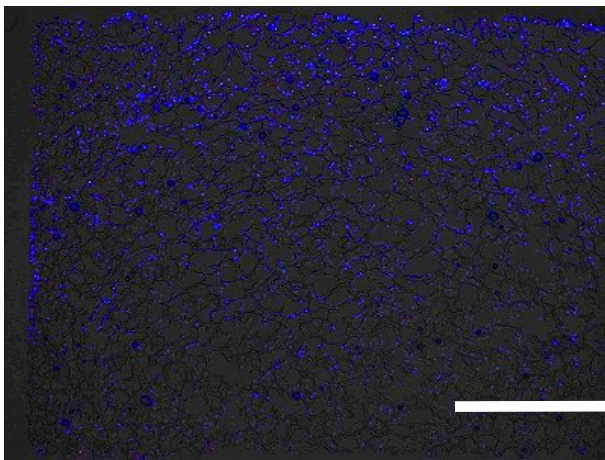
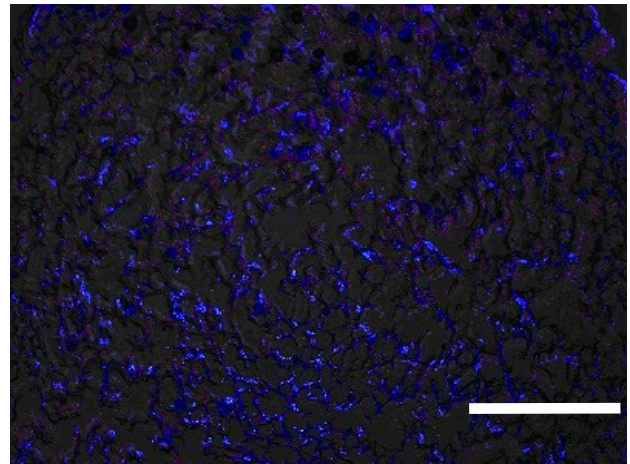


Fig. 2-7 コラーゲンスポンジ

コラーゲンスポンジ外観 (Akamine, 2012 より引用)



(a)



(b)

Fig. 2-8 コラーゲンスポンジ中の細胞の分布

細胞をコラーゲンスポンジに播種し、72時間培養後、コラーゲンスポンジの凍結切片を作製した。凍結切片中の細胞核の分布を DAPI で確認した。(a)細胞を播種し、遠心処理を行わなかったコラーゲンスポンジ (b)細胞播種後、遠心処理(500g, 5 分間)したコラーゲンスポンジスケールバーは 1.0 mm を示す。

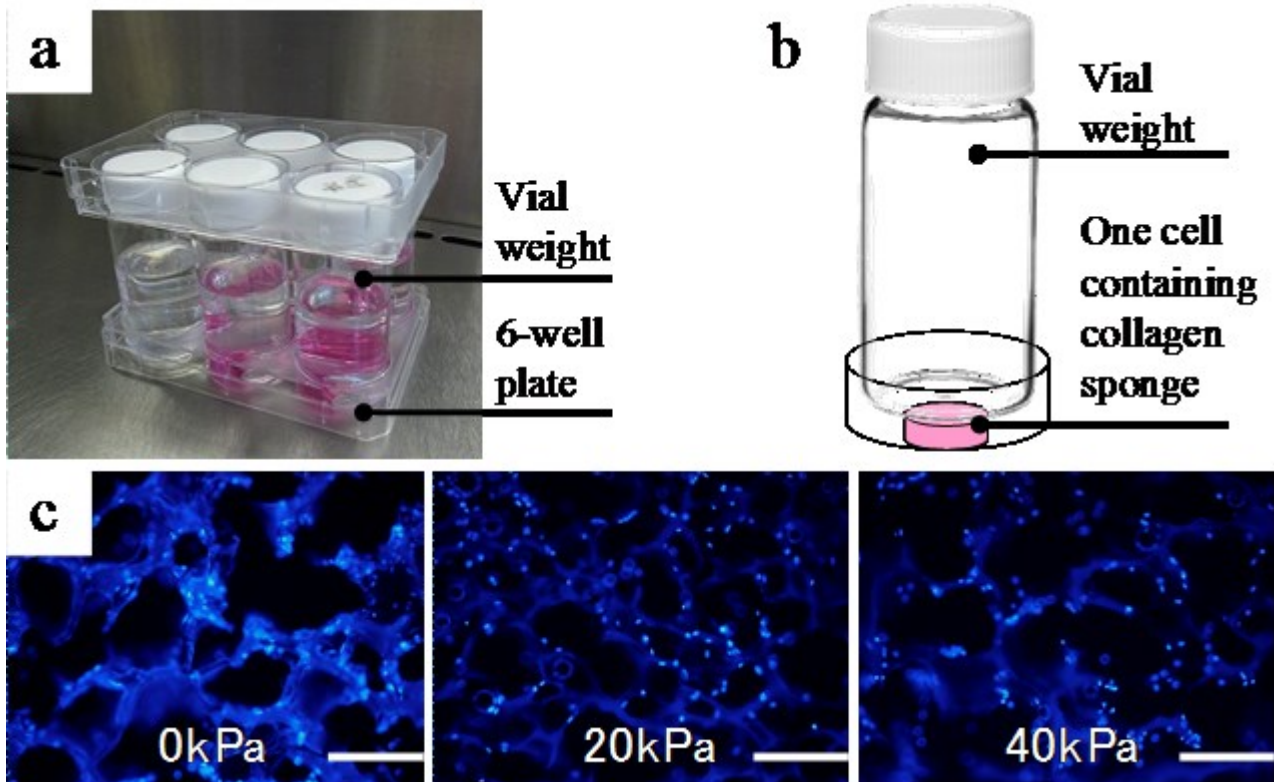


Fig. 2-9 簡易静的荷重負荷装置

(a)細胞を包埋したコラーゲンスポンジを 6well プレートに設置し、バイアルガラスで静的荷重負荷を加えた。静的荷重負荷は CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37°C) 内で加えた。(b) バイアルガラスの重さで、コラーゲンスポンジへ静的荷重負荷を加えた。負荷強度は、バイアル内の水量で調節し、負荷なし (0 kPa)、20 kPa (0 ml の水をバイアルに入れた)、または 40 kPa (32 ml の水をバイアルに入れた) として、1 時間の静的荷重負荷を加えた。バイアルガラスの上部は別の 6well プレートで固定した。(c) 静的荷重負荷操作後、コラーゲンスポンジ中の細胞の核部を DAPI で染色し、コラーゲンスポンジ中心部の切片を観察した。静的荷重負荷操作後も線維芽細胞はコラーゲンスポンジに接着していることを確認した。スケールバーは 200 μm を示す。

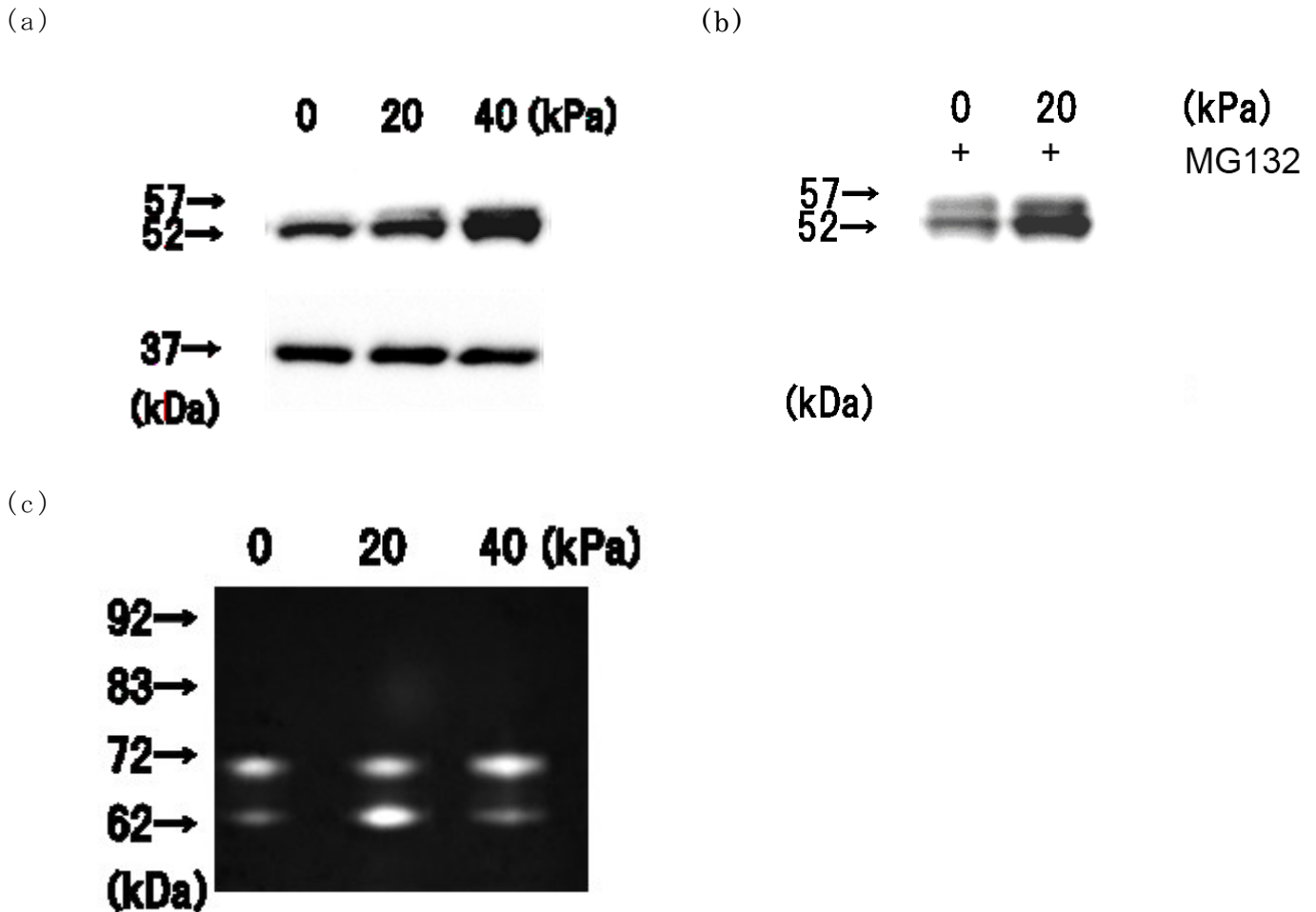


Fig. 2-10 静的荷重負荷操作後の培地の解析

細胞をコラーゲンスポンジに包埋し、ガラスバイアルで 0、20、そして 40 kPa の静的荷重負荷を 1 時間加えた。静的荷重負荷操作後に 24 時間培養し、培地とコラーゲンスポンジを混合した試料中の MMP-1、MMP-2、そして MMP-9 のタンパク質をウェスタンブロッティングとゼラチンザイモグラフィーで解析した。試料添加量は、タンパク質量を合わせて決定した。(a)ウェスタンブロッティング解析結果。静的荷重負荷 40 kPa におけるグリコシル化 Pro-MMP-1 (57 k)と Pro-MMP-1 (52 k)発現量は、負荷なし群と比べて多かった。なお、GAPDH(37 k)発現量は変化していなかった。(b)プロテアソーム阻害剤(1.0 μ M MG132)を添加して培養した結果、培地中の MMP-1 の産生量は変化しなかった。(c)ゼラチンザイモグラフィー解析結果。静的荷重負荷 40 kPa における Pro-MMP-2 (72 k)発現量は、負荷なしと比べて多かった。20 kPa における MMP-2 (62 k)発現量は、負荷なしと比べて多かった。Pro-MMP-9 (92 k)と MMP-9 (83 k)のバンドは検出されなかった。

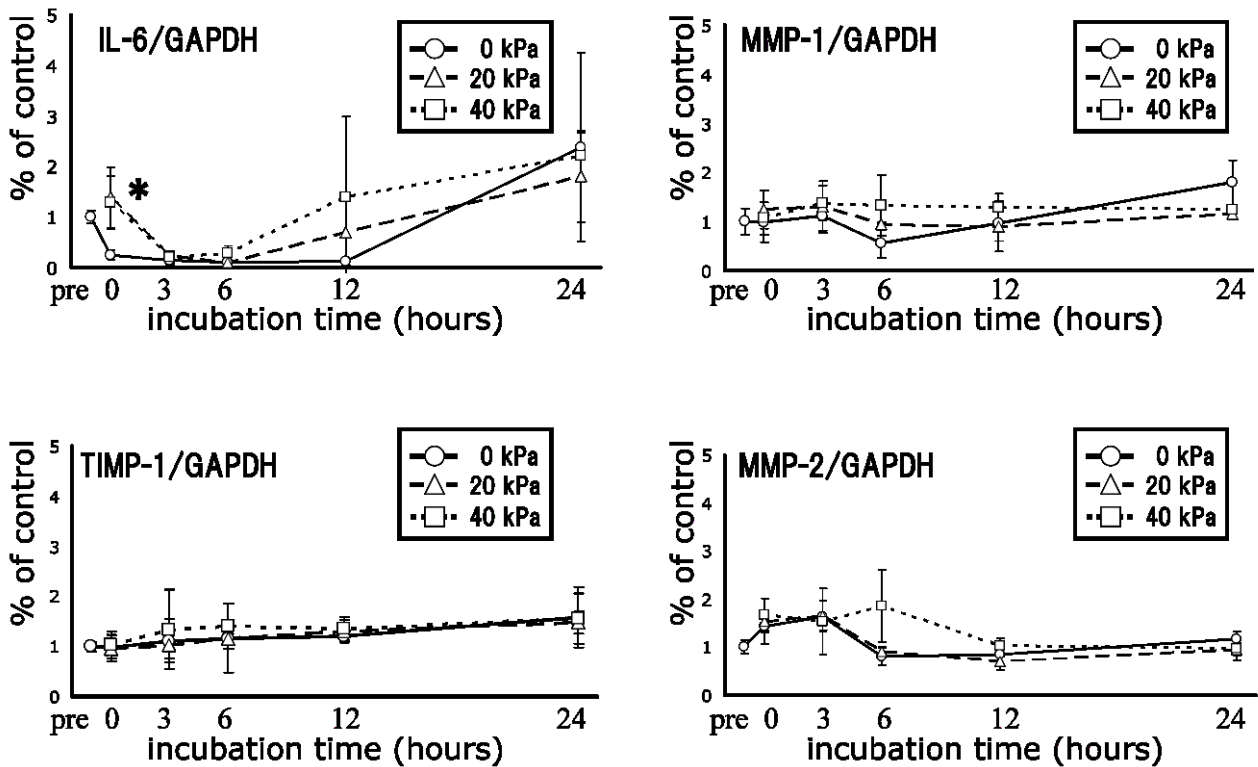


Fig. 2-11 遺伝子発現量の経時的変化

コラーゲンスポンジに細胞を包埋し、ガラスバイアルで 0、20、そして 40 kPa の静的荷重負荷を 1 時間加えた。静的荷重負荷操作後に 0~24 時間培養後、コラーゲンスポンジ中の細胞から total RNA を抽出した。total RNA から Real-time RT-PCR で遺伝子発現量を解析した。解析対象は、静的荷重負荷前 (pre)、静的荷重負荷直後 (t=0)、3、6、12 そして 24 時間培養として、荷重前を 1 とした相対遺伝子発現量(平均値±標準偏差, n=3)で示した。20 kPa の静的荷重負荷で、静的荷重負荷直後 (t=0)と比べて、IL-6 の遺伝子発現量が増加した (Dunnett's multiple-comparison tests, $P < 0.05$)。

Table 2-2 培養上清中のヒアルロン酸量

無負荷	1.6 ± 1.2 μ g/ml
静的荷重負荷	1.7 ± 0.1 μ g/ml

静的荷重負荷操作後に 24 時間培養し、培養上清中のヒアルロン酸量を解析した。上清中のヒアルロン酸量は、圧縮負荷によって変化しなかった。

第3項 考察

近年、細胞用の伸展負荷装置が開発され、細胞に対する機械的負荷の影響が検討されてきた(Russell, 2004; Shelton, 2003)。真皮線維芽細胞は伸展負荷に応答するが、これは細胞膜上の機械的負荷の受容体によるものである(Kessler, 2001)。しかし、これらの伸展負荷装置は、単層培養した細胞に適用するため、細胞を三次元的に囲む細胞外マトリックスの影響は考慮できなかった。三次元培養は、単層培養と比べて細胞応答性が異なる(Pedersen, 2005)。このため、三次元培養環境に圧縮負荷を加えるシステムが望まれていた。既存の三次元培養系での圧縮負荷実験システムは、三次元構造体に対し、空気圧(FX-4000C: Flexcell)や荷重ピストン(Cyclic Load Stimulator: Technoview)を利用し、定圧負荷または繰り返し圧縮負荷操作が可能である。たとえば、顎関節滑膜由来細胞へ荷重ピストンで定圧負荷を加えた結果、炎症性サイトカインと MMP-3 の産生が促進した(Akamine, 2012)。本節では、より簡易な機械的負荷実験系として、市販のコラーゲンスキャッフオルド、バイアルガラス、そして標準的な研究機器だけで静的荷重負荷実験系を構築した。

本研究では、市販のバイアルガラスをスポンジ上部に静置することで静的荷重負荷を加えた(Fig. 2-9a)。20 kPa を比較的弱い負荷、40 kPa を比較的強い負荷として設定した。40 kPa の静的荷重負荷では、今回用いたコラーゲンスポンジは崩壊しない(Akamine, 2012)。コラーゲンスポンジ(CSM-50; 直径 4.4 mm、高さ 3.0 mm、ポアサイズ 100-200 μ m)は、滅菌済み製品であるため、線維芽細胞の培養足場として利用できた。コラーゲンスポンジは不溶化コラーゲン線維の集合であり、細胞はコラーゲン線維上に接着する。このため、厳密には三次元培養とはいえない。コラーゲンゲル培養のような包埋系を構築するためには、コラーゲンスポンジに細胞を播種し、その後スポンジ中にコラーゲンゲルを注入する方法が考えられる。今回用いたバイアルガラスの直径は 34.90 mm であり、6well プレートの well 直径は 34.96 mm である。このため、バイアルガラスは 6well プレートの well に収まった(Fig. 2-9b)。ホウケイ酸ガラス製のバイアルガラスは、容易に滅菌でき再利用も可能である。またバイアルガラス内の水量の調整で、静的荷重負荷強度を変更できた。

コラーゲンスポンジに静的荷重負荷を加えた結果、無負荷と比べ細胞数が微減したのにも関わらず、培地中の MMP-1 と MMP-2 量が増加した(Fig. 2-10a,c)。プロテアソーム阻害剤(1.0 μ M MG132)を用いても、MMP-1 量は変化しなかった

(Fig. 2-10b)。また、静的荷重負荷直後で、無負荷と比べて IL-6 の遺伝子発現量が増加した (Fig. 2-11)。このことから静的荷重負荷は、遺伝子発現量とは関係なく、MMPs 合成を促進している可能性が考えられる。なお、培養上清中のヒアルロン酸産生量は変化がみられなかった (Table 2-2)。

静的荷重負荷は、コラーゲンスポンジ中の線維芽細胞に影響し、MMPs 産生に影響した。この影響は、IL-6 を介した経路で細胞外マトリックスの分解を促進する可能性が考えられる。本節のシステムを用いることで、簡便かつ安価に細胞への静的荷重負荷の影響を検討できることが示された。

第 3 章 総括

本論文では、機械的負荷に対する実験系を確立する事を目的とし、生体における機械的負荷が常時影響する器官である関節および真皮由来細胞を用いた研究を実施した。本研究では、生体組織様三次元培養モデルを簡易に作製し、圧縮負荷を加えながら培養することで、細胞や細胞外マトリックス成分の変化について検討した。

第 1 章では、関節の維持に必要な不可欠なヒアルロン酸に着目し、滑膜細胞を用いた新たな関節モデルを構築することを計画した。

第 1 章第 1 節では、滑膜細胞を 1.0×10^6 cells 含む 2.5%アガロースゲルを調製し、48 時間培養後の上清を解析した。培養上清中のヒアルロン酸の分子量は、単層培養と比べ、アガロースゲル培養で高分子量側にシフトした。アガロースゲル培養により細胞数が増加した可能性もあるが、ヒアルロン酸の代謝変化も起きていると考えられる。アガロースゲルに 0、30、または 180 分の 40 kPa の繰り返し圧縮負荷を行った結果より、圧縮負荷時間を増やすと培養上清中のヒアルロン酸量が増えることがわかった。圧縮負荷後の培養時間は 24 時間でも 48 時間でも上清中のヒアルロン酸量は同程度であり、培養あたりのヒアルロン酸産生量が一定に保たれている可能性を示唆するものであった。ヒアルロン酸の分子量解析の結果より、圧縮負荷時間を増やすと培養上清中のヒアルロン酸は高分子化することがわかった。

第 1 章第 2 節では、滑膜細胞を 1.0×10^6 cells 含む 0.1%コラーゲンゲルを調製し、72 時間培養することでゲル収縮を誘導した。この収縮コラーゲンゲルに 40 kPa の繰り返し圧縮負荷を行った結果より、6 時間までの繰り返し圧縮負荷および定圧負荷は、無負荷と比べ、培養上清中のヒアルロン酸産生量が増加した。これは、圧縮負荷による HAS 遺伝子発現量の増加によるものと考えられる。一方、ヒアルロン酸の分子量分布は、繰り返し圧縮負荷では高分子側にシフトし、定圧負荷では変化がみられなかった。滑膜細胞に対する繰り返し圧縮負荷が、定圧負荷と比べ、より高分子のヒアルロン酸の産生を促進し、関節内の潤滑性に関与している可能性が明らかとなった。

三次元構造体として、滑膜細胞を含有した収縮コラーゲンをを用いることは、生体条件を反映していることから圧縮負荷実験に適していると考えられる。しかし、実際に膝にかかっている 100 kPa 以上の圧力に耐えることができないため、より生体に類似したモデル系とするには、収縮コラーゲンとアガロースなどの構造体で滑膜細胞を包埋する系の開発が必要であることが示された。

第 2 章では、皮膚の保湿性と弾力性維持に必要な不可欠なヒアルロン酸に着目し、真皮線維芽細胞を用いた新たな真皮モデルの構築を計画した。

第 2 章第 1 節では、真皮線維芽細胞を 1.0×10^6 cells 含む 0.1% コラーゲンを調製し、低接着表面処理プレートで 72 時間培養した。作製した収縮コラーゲンは円柱状であり、上部からみても正円に近かった。コラーゲンの形状を制御可能であることから、圧縮負荷プレートの well に収縮コラーゲンを設置することが可能であった。コラーゲンに 40 kPa の繰り返し圧縮負荷を 6 時間加えたことで、上清中のヒアルロン酸の産生量が増加し、分子量が増大した。マイクロアレイの結果から、ヒアルロン酸合成に関与する遺伝子群の発現量が増加した。コラーゲン中の線維芽細胞は、圧縮負荷により遺伝子発現量に変化がおき、ヒアルロン酸産生に影響することを認めた。線維芽細胞をコラーゲンに包埋した真皮モデルを構築でき、ゲルへの圧縮負荷により、産生するヒアルロン酸が滑膜細胞の場合と同様に高分子化することが明らかとなった。

第 2 章第 2 節では、より簡易な実験系の確立を目的に、コラーゲンスポンジに線維芽細胞を包埋し、三次元構築させた真皮モデルを構築した。市販のコラーゲンスポンジに真皮線維芽細胞を 5.0×10^5 cells を浸透させた細胞培養モデルを作製し、72 時間培養した。市販のバイアルガラスをスポンジ上部に静置することで静的荷重負荷を加えた。コラーゲンスポンジに 40 kPa の静的荷重負荷を 1 時間加えた結果、培地中の MMP-1 と MMP-2 量が増加し、プロテアソーム阻害剤を用いても、MMP-1 量は変化しなかった。しかし、培養上清中のヒアルロン酸産生量は変化がみられなかった。このことから静的荷重負荷は、遺伝子発現量とは関係なく、MMPs 合成を促進しているが、ヒアルロン酸の産生量には影響を与えないものと考えられる。本実験方法は、簡便かつ安価に細胞への静的荷重負荷の影響を検討できることが示された。

線維芽細胞に対する繰り返し圧縮負荷は、より高分子のヒアルロン酸の産生を促進し、皮膚組織内の保湿性と弾力性維持に関与している可能性がある。ま

た、線維芽細胞に対する静的荷重負荷は、細胞外マトリックスの分解に関与する可能性がある。この結果は、美容および医療マッサージにより、皮膚組織へ機械的負荷を加えることの生理的意義を示唆しており、血流改善や皮下脂肪抑制への効果だけでなく、真皮における皮膚状態の改善にも効果を示す可能性が示唆された。

本研究では、生体組織様三次元培養モデルを簡易に作製し、圧縮負荷を加えながら培養することで、細胞や細胞外マトリックス成分の変化について検討した。今後、本研究で構築した三次元培養モデルと動物由来の組織の挙動を比較し、生体組織との相関を検討することで、より生体に類似した圧縮負荷モデルを確立することが出来、動物実験代替法や薬剤探索などのスクリーニング法としての発展が期待できる。

引用文献

Akamine Y, Kakudo K, Kondo M, et al. Prolonged matrix metalloproteinase-3 high expression after cyclic compressive load on human synovial cells in three-dimensional cultured tissue. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(7): 874-81.

Amano S, Akutsu N, Matsunaga Y, et al. Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res.* 2001;271(2): 249-62.

Arai KY, Ono M, Kudo C, et al. IL-1beta stimulates activin betaA mRNA expression in human skin fibroblasts through the MAPK pathways, the nuclear factor-kappaB pathway, and prostaglandin E2. *Endocrinology.* 2011;152(10):3779-90.

Banes AJ, Gilbert J, Taylor D, Monbureau O. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro. *J Cell Sci.* 1985;75: 35-42.

Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science.* 1981;211(4486): 1052-4.

Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(3): 1274-8.

Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 1982;30(1): 215-24.

Bougault C, Paumier A, Aubert-foucher E, Mallein-gerin F. Investigating conversion of mechanical force into biochemical signaling in three-dimensional chondrocyte cultures. *Nat Protoc.* 2009;4(6):928-38.

Bougault C, Paumier A, Aubert-foucher E, Mallein-gerin F. Molecular analysis of chondrocytes cultured in agarose in response to dynamic compression. *BMC Biotechnol.* 2008;8:71.

Buck RC. Reorientation response of cells to repeated stretch and recoil of the substratum. *Exp Cell Res.* 1980;127(2): 470-4.

Capozzi I, Tonon R, D'andrea P. Ca²⁺-sensitive phosphoinositide hydrolysis is activated in synovial cells but not in articular chondrocytes. *Biochem J.* 1999;344 Pt 2: 545-53.

Carrel A, Burrows M. Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. *JAMA.* 1910;55(16): 1379-1381.

Defife KM, Yun JK, Azeez A, et al. Adhesion and cytokine production by monocytes on poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-alkyl methacrylate)-coated polymers. *J Biomed Mater Res.* 1995;29(4): 431-9.

ema R. An animal cell culture: Advance technology for modern research. *ABB.* 2012;03(03):219-226.

Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Fink C, Guilak F. Induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress through a nitric oxide-regulated pathway. *Osteoarthr Cartil.* 2002;10(10): 792-8.

Fox DB, Cook JL, Kuroki K, Cockrell M. Effects of dynamic compressive load on collagen-based scaffolds seeded with fibroblast-like synoviocytes. *Tissue Eng.* 2006;12(6):1527-37.

Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997;242(1): 27-33.

Gabay O, Hall DJ, Berenbaum F, Henrotin Y, Sanchez C. Osteoarthritis and obesity: experimental models. *Joint Bone Spine.* 2008;75(6): 675-9.

Garg HG, Hales CA. *Chemistry and Biology of Hyaluronan.* Elsevier Science; 2004.

Gey GO, Svtelis M, Foard M, Bang FB. Long-term growth of chicken fibroblasts on a collagen substrate. *Exp Cell Res.* 1974;84(1): 63-71.

Gosset M, Berenbaum F, Levy A, et al. Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(4): R135.

Gruber HE, Hanley EN. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation. *BMC Musculoskelet Disord.* 2000;1: 1.

Harrison, R. G., Greenman, M. J., Mall, F. P. and Jackson, C. M. (1907), Observations of the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.*, 1: 116-128.

Hata R, Nagai Y. A micro colorimetric determination of acidic glycosaminoglycans by two dimensional electrophoresis on a cellulose acetate strip. *Anal Biochem.* 1973;52(2): 652-6.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY).* 1993;11(9): 1026-30.

Holey LA, Dixon J, Selfe J. An exploratory thermographic investigation of the effects of connective tissue massage on autonomic function. *J Manipulative Physiol Ther.* 2011;34(7): 457-62.

Horton MR, Shapiro S, Bao C, Lowenstein CJ, Noble PW. Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *J Immunol.* 1999;162(7):4171-6.

Ishihara K, Nomura H, Mihara T, Kurita K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption?. *J Biomed Mater Res.* 1998;39(2): 323-30.

Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life.* 2002;54(4): 195-9.

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol.* 2000;63(1): 17-31.

Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, et al. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. *J Biol Chem.* 2001;276(39): 36575-85.

Kiener HP, Watts GF, Cui Y, et al. Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture. *Arthritis Rheum.* 2010;62(3): 742-52.

Kimura A, Ohsawa H, Sato A, Sato Y. Somatocardiovascular reflexes in anesthetized rats with the central nervous system intact or acutely spinalized at the cervical level. *Neurosci Res.* 1995;22(3): 297-305.

Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop Relat Res.* 1984;(186):231-9.

Kot JG, Zhukova TV, Ponomarenko AN, El'-Ta' Alu AB. *Annales UMCS, Pharmacia.* 2008;21(1):243-246.

Krueger JW, Young DF, Cholvin NR. An in vitro study of flow response by cells. *J Biomech.* 1971;4(1): 31-6.

Kuroki K, Cook JL, Stoker AM, Turnquist SE, Kreeger JM, Tomlinson JL. Characterizing osteochondrosis in the dog: potential roles for matrix metalloproteinases and mechanical load in pathogenesis and disease progression. *Osteoarthr Cartil.* 2005;13(3): 225-34.

Lokeshwar VB, Fregien N, Bourguignon LY. Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J Cell Biol.* 1994;126(4): 1099-109.

Miki Y, Teramura T, Tomiyama T, et al. Hyaluronan reversed proteoglycan synthesis inhibited by mechanical stress: possible involvement of antioxidant effect. *Inflamm Res.* 2010;59(6): 471-7.

Momberger TS, Levick JR, Mason RM. Hyaluronan secretion by synoviocytes is mechanosensitive. *Matrix Biol.* 2005;24(8): 510-9.

Momberger TS, Levick JR, Mason RM. Mechanosensitive synoviocytes: a Ca²⁺-PKC α -MAP kinase pathway contributes to stretch-induced hyaluronan synthesis in vitro. *Matrix Biol.* 2006;25(5):306-16.

Nishiyama T, Tominaga N, Nakajima K, Hayashi T. Quantitative evaluation of the factors affecting the process of fibroblast-mediated collagen gel contraction by separating the process into three phases. *Coll Relat Res.* 1988;8(3): 259-73.

Nishiyama T, Tsunenaga M, Nakayama Y, Adachi E, Hayashi T. Growth rate of human fibroblasts is repressed by the culture within reconstituted collagen matrix but not by the culture on the matrix. *Matrix.* 1989;9(3): 193-9.

Ogura Y, Matsunaga Y, Nishiyama T, Amano S. Plasmin induces degradation and dysfunction of laminin 332 (laminin 5) and impaired assembly of basement membrane at the dermal-epidermal junction. *Br J Dermatol.* 2008;159(1):49-60.

Owan I, Burr DB, Turner CH, et al. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol.* 1997;273(3 Pt 1): C810-5.

Pavalko FM, Otey CA, Simon KO, Burrridge K. Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem Soc Trans.* 1991;19(4): 1065-9.

Pedersen JA, Swartz MA. Mechanobiology in the third dimension. *Ann Biomed Eng.* 2005;33(11): 1469-90.

Peyron JG, Balazs EA. Preliminary clinical assessment of Na-hyaluronate injection into human arthritic joints. *Pathol Biol.* 1974;22(8):731-6.

Postlethwaite AE, Snyderman R, Kang AH. The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor. *J Exp Med.* 1976;144(5):1188-203.

Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular

heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J Clin Invest.* 1992;90(6):2268-77.

Rous P, Jones FS. A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *J Exp Med.* 1916;23(4): 549-55.

Russell D, Andrews PD, James J, Lane EB. Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 22): 5233-43.

Saavalainen K, Pasonen-seppnen S, Dunlop TW, Tammi R, Tammi MI, Carlberg C. The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary retinoic acid and epidermal growth factor responding gene. *J Biol Chem.* 2005;280(15): 14636-44.

Sharma G, Saxena RK, Mishra P. Differential effects of cyclic and static pressure on biochemical and morphological properties of chondrocytes from articular cartilage. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2007;22(2): 248-55.

Shelton JC, Bader DL, Lee DA. Mechanical conditioning influences the metabolic response of cell-seeded constructs. *Cells Tissues Organs (Print).* 2003;175(3): 140-50.

Silver FH, Siperko LM, Seehra GP. Mechanobiology of force transduction in dermal tissue. *Skin Res Technol.* 2003;9(1):3-23.

Spicer AP, McDonald JA. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem.* 1998;273(4):1923-32.

Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30(10): 1075-9.

Sugiyama Y, Shimada A, Sayo T, Sakai S, Inoue S. Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF-beta upregulates their expression in cultured human skin cells. *J Invest Dermatol.* 1998;110(2):116-21.

Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, Hirasawa Y, Lotz M, Amiel D. Hyaluronan suppressed nitric oxide production in the meniscus and synovium of rabbit osteoarthritis model. *J Orthop Res.* 2001;19(3):500-3.

Takahashi T, Tominaga K, Takano H, et al. A decrease in the molecular weight of hyaluronic acid in synovial fluid from patients with temporomandibular disorders. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(4): 224-9.

Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development.* 1988;102(4): 639-55.

Timmenga EJ, Andreassen TT, Houthoff HJ, Klopper PJ. The effect of mechanical stress on healing skin wounds: an experimental study in rabbits using tissue expansion. *Br J Plast Surg.* 1991;44(7): 514-9.

Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med.* 1997;242(1):35-40.

Upton ML, Chen J, Guilak F, Setton LA. Differential effects of static and dynamic compression on meniscal cell gene expression. *J Orthop Res.* 2003;21(6): 963-9.

Vernon RB, Gooden MD. An improved method for the collagen gel contraction assay. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2002;38(2): 97-101.

Wataya T, Ando S, Muguruma K, et al. Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(33): 11796-801.

Willingham MC, Yamada SS, Davies PJ, Rutherford AV, Gallo MG, Pastan I. Intracellular localization of actin in cultured fibroblasts by electron microscopic immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 1981;29(1):17-37.

Yasuda E, Seki Y, Higuchi T, Nakashima F, Noda T, Kurosawa H. Development of cystic embryoid bodies with visceral yolk-sac-like structures from mouse embryonic stem cells using low-adherence 96-well plate. *J Biosci Bioeng.* 2009;107(4): 442-6.

岡部平八郎, 功刀俊夫, 三島優. 高機能潤滑剤の開発と応用. 2001.

関口清俊．再生医療のための細胞生物学．2007．

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を頂いた東京農工大学農学部 硬蛋白質利用研究施設 皮革研究部門 野村義宏教授に心より感謝申し上げます。野村教授には、筆者の東京農工大農学部在学中より、生体材料学に関してご指導をいただきました。再び、生体材料学の道に導いていただいたことに心より感謝申し上げます。

本学位論文作成にあたり、適切なお助言、ご鞭撻を頂きました東京農工大学 西山敏夫教授、ならびに宇都宮大学 東徳洋教授に深く感謝致します。

また、論文審査では、東京農工大学 三浦豊教授、ならびに茨城大学 長南茂准教授にご教授頂きました。心より感謝申し上げます。

また、数々の面で御協力してくださった硬蛋白質利用研究施設の皆様と卒業生に心から感謝いたします。特に、津田祐一氏、上原一貴氏、並木郷氏、松尾俊輝氏、中島正博氏、横野智砂子氏には大変お世話になりました。

また、仕事と学位取得の両立を支援していただきました日油株式会社の皆様に心から感謝申し上げます。特に、小橋仁氏、押部義宏氏、榎本裕之氏、姜義哲氏、橋爪論氏、田中信治氏、土田衛氏、大久保剛氏、木下修平氏、吉崎舟洋氏、藤井敬洋氏、今村龍太郎氏、沼尻いく子氏、野地美由紀氏には大変お世話になりました。

最後になりましたが、博士課程に進学する機会をくださり、見守り続けてくれた両親と妻に感謝の意を申し上げます。