

学 位 論 文 要 旨

三次元細胞培養系を用いた機械的負荷モデルの構築

Development of mechanical stress systems in three-dimensional cell cultures

応用生命科学専攻 生物機能化学大講座

原 真佐夫

生体内の組織は、常に機械的負荷が加わっている。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し、組織中の生理メカニズムに影響することが報告されている。この影響を解析するため、三次元培養細胞における機械的負荷が検討されてきた。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。そこで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皮膚由来細胞を用いた研究を計画した。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することとした。

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節では、滑膜細胞をアガロースゲルに包埋した関節モデルを構築した。本モデルへの圧縮負荷により、滑膜細胞の産生するヒアルロン酸量が増加し、更に高分子化することが明らかとなった。第2節では、滑膜細胞の生体内における環境に着目し、コラーゲンゲル包埋による新たな関節モデルを構築した。本モデルへの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することが示された。このヒアルロン酸の変化は、HAS-2、HAS-3 遺伝子の発現量変化が一因と考えられた。生体の関節は、定圧的な負荷ではなく、常に繰り返し圧縮負荷が加わっている。このことから、運動療法で関節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、滑膜細胞に対する繰り返し圧縮負荷が、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グルを用いることは、生体条件を反映しているため、圧縮負荷実験に適していると考えられる。しかし、本モデルは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、新たな真皮モデルの構築を計画した。第1節では、真皮線維芽細胞をコラーゲングルに包埋した真皮モデルを構築した。真皮線維芽細胞をコラーゲングル中で培養するとゲルが収縮し、真皮様の三次元線維構造体を形成する。真皮線維芽細胞を含有する収縮コラーゲングルへの圧縮負荷は、滑膜細胞と同様に、産生するヒアルロン酸が高分子化することが明らかとなった。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真皮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。コラーゲンスポンジへの静的荷重負荷では、ヒアルロン酸量に変化がみられず、マトリックスメタロプロテアーゼの産生が促進されることが明らかとなった。一方、静的荷重負荷ではマトリックスメタロプロテアーゼ関連遺伝子の発現量は変化しなかった。プロテアソーム阻害剤を用いても量的な変化はみられなかったことから、静的荷重負荷は遺伝子発現量とは関係なく、マトリックスメタロプロテアーゼの合成を促進する可能性が考えられた。真皮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。この結果は、美容および医療マッサージで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。その結果、細胞が産生するヒアルロン酸やマトリックスメタロプロテアーゼが変化し、組織に機械的負荷が加わる生理的意義を示唆した。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。