

複合型動的培養による靭帯再生誘導に関する研究

Research on the artificial ligament tissue regeneration by multi dynamic culture.

○ 水谷直紀(三重大) 前田裕子(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. Yuko MAEDA, Mie University. Takafumi TAKEBAYASHI, Mie University.

Keiichi MIYAMOTO, Mie University. Takashi HORIUCHI, Mie University.

1. 緒言

靭帯(前十字靭帯)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く、断裂した場合には自然治癒されにくいいため、組織工学的な靭帯治療の発展への期待が高まっている。

靭帯は関節内で圧力を受けながら、様々な運動が複雑に絡み合う関節を安定化させる働きをする。そのため、靭帯には高い強度と可動性が必要となる。また、靭帯の骨結合部は骨組織と一体化していることから、移植した人工靭帯についても骨結合部では骨分化誘導されることが望ましい。しかしながら、このような靭帯から骨組織への階層組織構造を再現した研究はこれまでに少なく、細胞外基質を用いたものでも力学強度や再生組織構造が不完全であるのが現状である。そこで本研究では、新たな靭帯組織再生法の試みとして、靭帯を構成する細胞外基質であるエラスチンやコラーゲンから高配向性ファイバーを足場基材として作製した。さらに、「加圧」刺激と「ねじれ」運動型刺激を複合化した動的培養を行うことで、生体内と類似した環境条件を再現し、靭帯細胞の表現型維持や骨芽細胞様細胞への分化に及ぼす影響を検証することを目的とした。

2. 方法

1) 靭帯細胞培養足場基材の作製

本研究では、豚大動脈より抽出・水溶化し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、エレクトロスピング法にて高弾性および高配向性を有するマイクロファイバー(繊維径数マイクロメートル)をそれぞれ作製し、数千本束ねることで、靭帯構造を模倣した培養基材に加工した。

2) 培養基材上での細胞培養

作製した各培養基材に靭帯細胞(歯周靭帯線維芽細胞; HPdLF)を播種し7日間培養した。その後、免疫蛍光染色と走査型電子顕微鏡(SEM)による形態観察および表現型確認として骨形成マーカー(アルカリフォスファターゼ; ALP)の活性を測定した。

3) 動的培養による力学的刺激の適用

培養基材上でHPdLFを7日間培養した後、「加圧」刺激培養および「ねじれ」運動型刺激培養を行った。12時間の動的培養を行った後、コラーゲン、骨形成マーカーの遺伝子発現およびその活性を測定し、静置培養時と比較、評価した。

3. 結果・考察

本研究で作製した培養基材は高い配向性を有しており、強度も生体組織に近い1~2 MPaの弾性を示した。さらに、培養基材上靭帯細胞の形態観察より、足場の繊維方向に沿って細胞が伸展・配向することを確認し、生体内の靭帯細胞と同様の傾向を示す事が分かった。つまり、作製した培養基材が構造、強度、培養環境の面から生体内環境を再現する可能性が示唆された。

また、表現型の確認として骨分化誘導性マーカーを測定した結果、コラーゲン基材と比較してエラスチンA基材上HPdLFで高いALP活性を示すことが分かった。このようなALP活性の上昇は「加圧」刺激を与えた際にも観察され、逆に「ねじれ」運動刺激を与えることで減少する結果となった。つまり、「加圧」刺激およびエラスチンA基材に骨組織誘導性、「ねじれ」運動刺激に靭帯細胞の分化能維持効果など、特有の細胞相互作用が存在することが示唆される結果となった。(Fig. 1)

さらに、これらの刺激を複合化した刺激を与えることで靭帯組織再生基材としての有用性が期待できる結果が得られた。

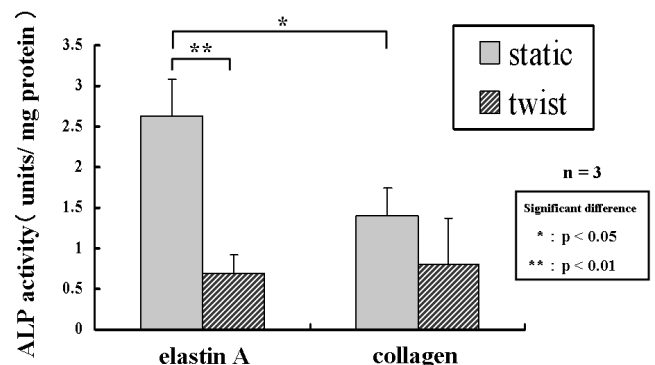


Fig. 1 ALP activity influenced by twist type dynamic stimulation and ECM fiber

4. 結論

本研究で作製したアイソタイプ型エラスチン足場基材と複合型動的培養技術により、靭帯・骨の階層構造を再現する人工靭帯再生基材の開発が期待できる結果となった。

[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