

図1.9にビーグル犬左大腿骨小転子部付近の測定サンプルの様子を示す。本サンプルは骨頭部付近を縦に切断したものになる。丸で囲った部分でサンプルを作成し、測定した。なお、本サンプルは一昨年の研究で使われていた物と同一であり、都合により、試験片作成の最初の段階で染色が行われているため、このように色がついている。

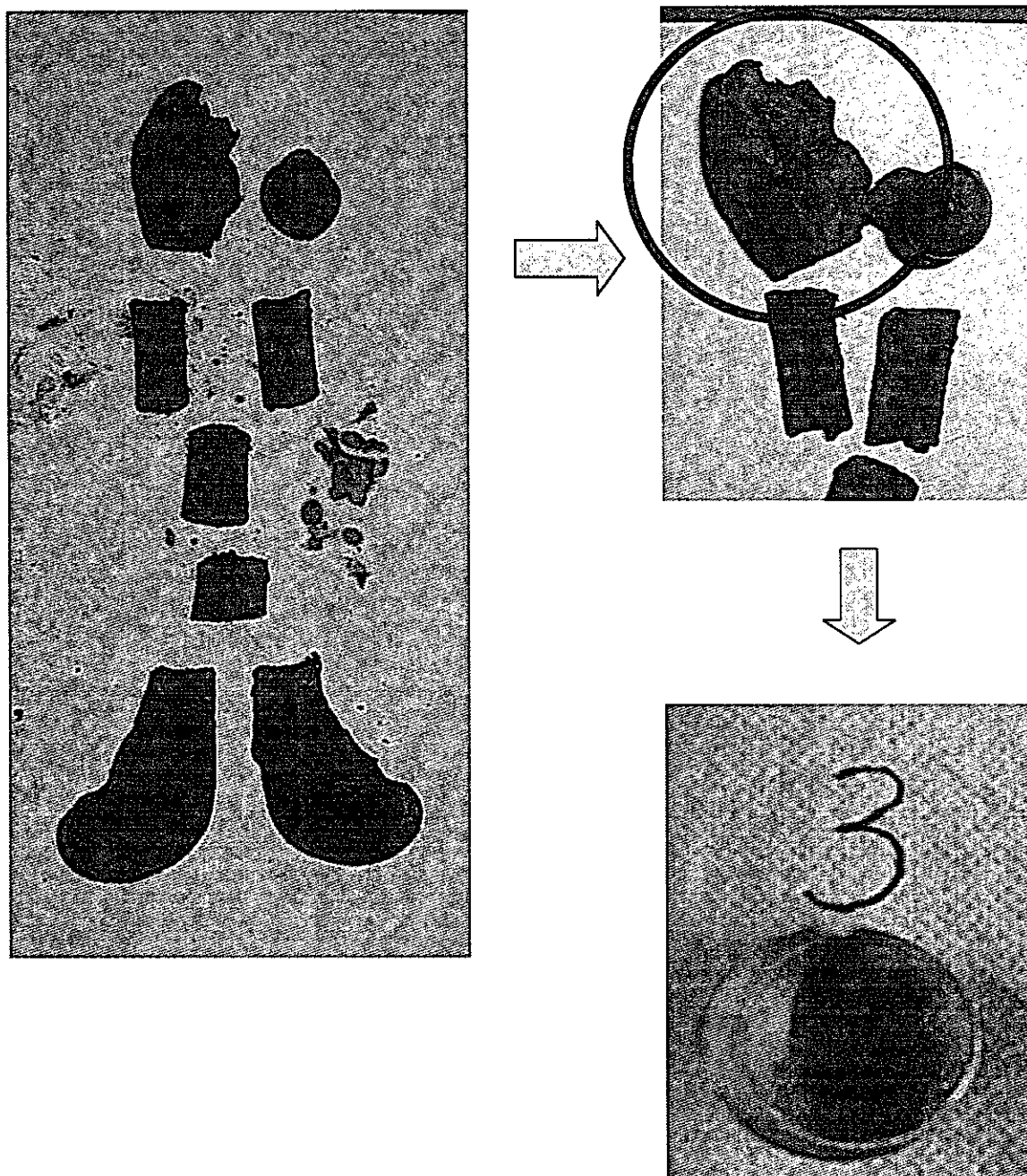
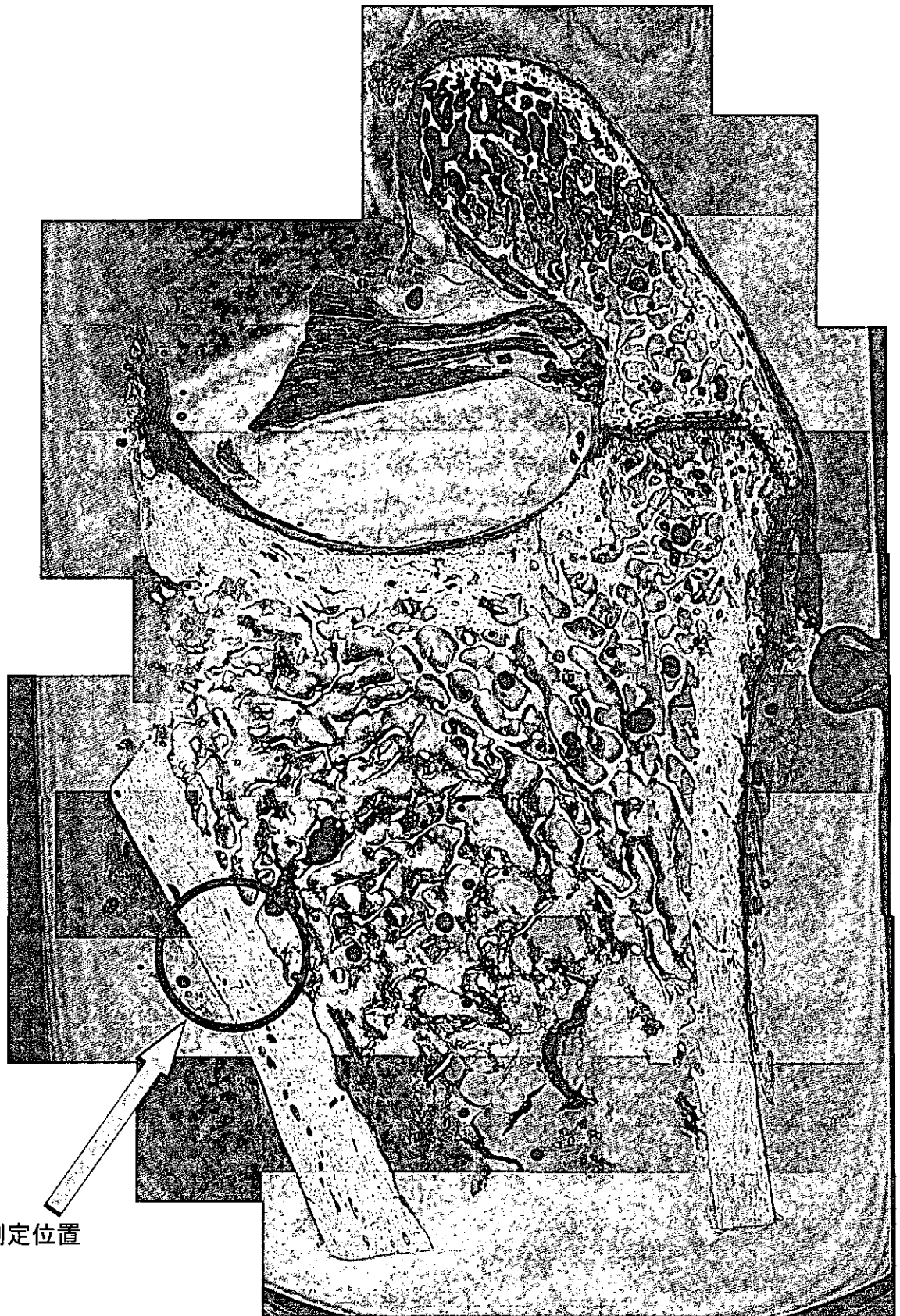


図1.9 ビーグル犬左大腿骨小転子部付近測定サンプル



測定位置

図 1.10 ビーグル犬大腿骨全体図

### 1-3-3 測定位置

#### ヒト左大腿骨骨幹部

ヒト左大腿骨骨幹部において、図 1.11 に SAM の C モード測定による試料表面画像を示す。生前の直立時、重力は上から下にかかっており、骨の上側を心臓に近いという意味から近位部、下側を遠位部と呼ぶ。水平、垂直にラインを 3 本ずつ引き、水平ラインを近位部から I, II, III、垂直ラインを外骨膜側から A, B, C とした。各交点を測定位置とし、図のように番号をつけた。

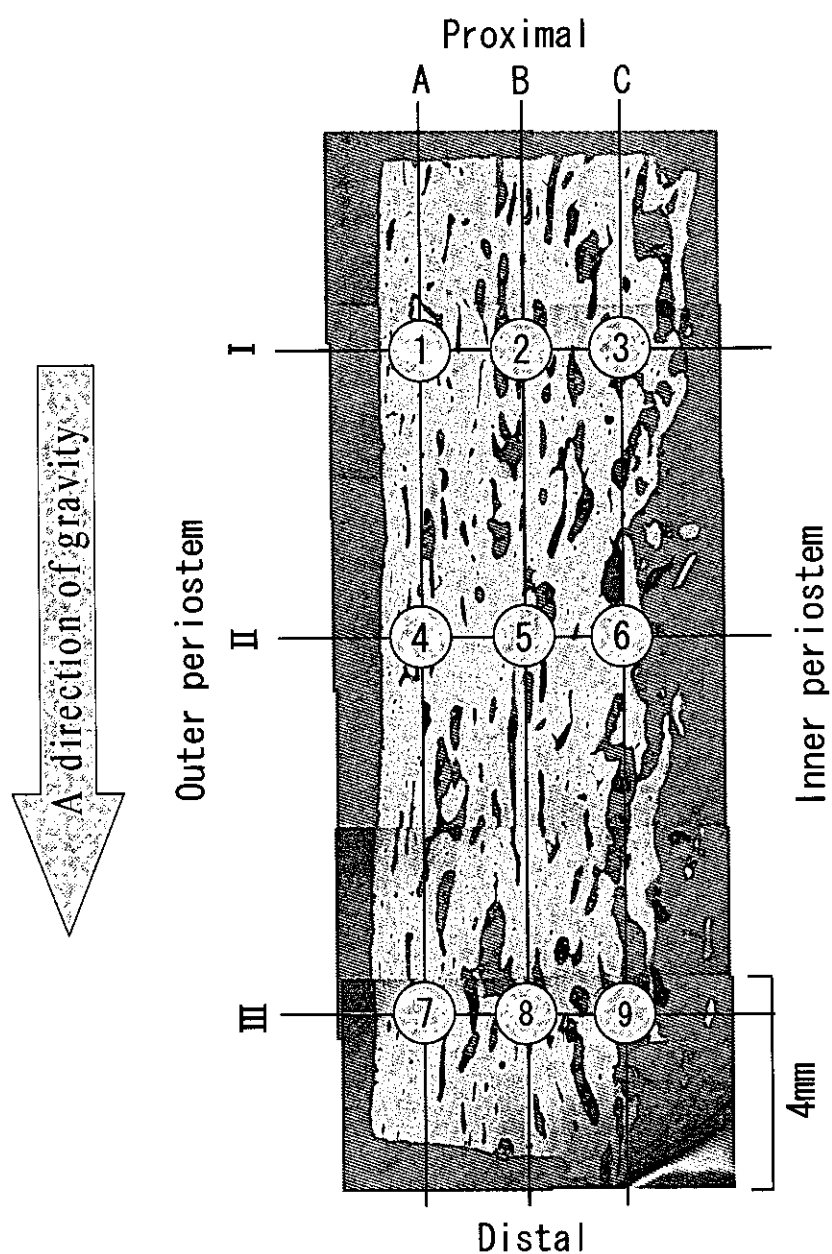


図 1.11 ヒト左大腿骨測定位置

### ビーグル犬左大腿骨小転子部付近

ビーグル犬左大腿骨小転子部付近において、SAMのCモード測定による試料表面画像を示す。図1.12にサンプル測定位置を示す。ヒト左大腿骨骨幹部と同様、生前の直立時、重力は上から下にかかっており、水平ラインを3本、垂直ラインを2本引き、水平ラインを近位部からI、II、III、垂直ラインを外骨膜側からA、Bとした。各交点を測定位置とし、図のように番号をつけた。

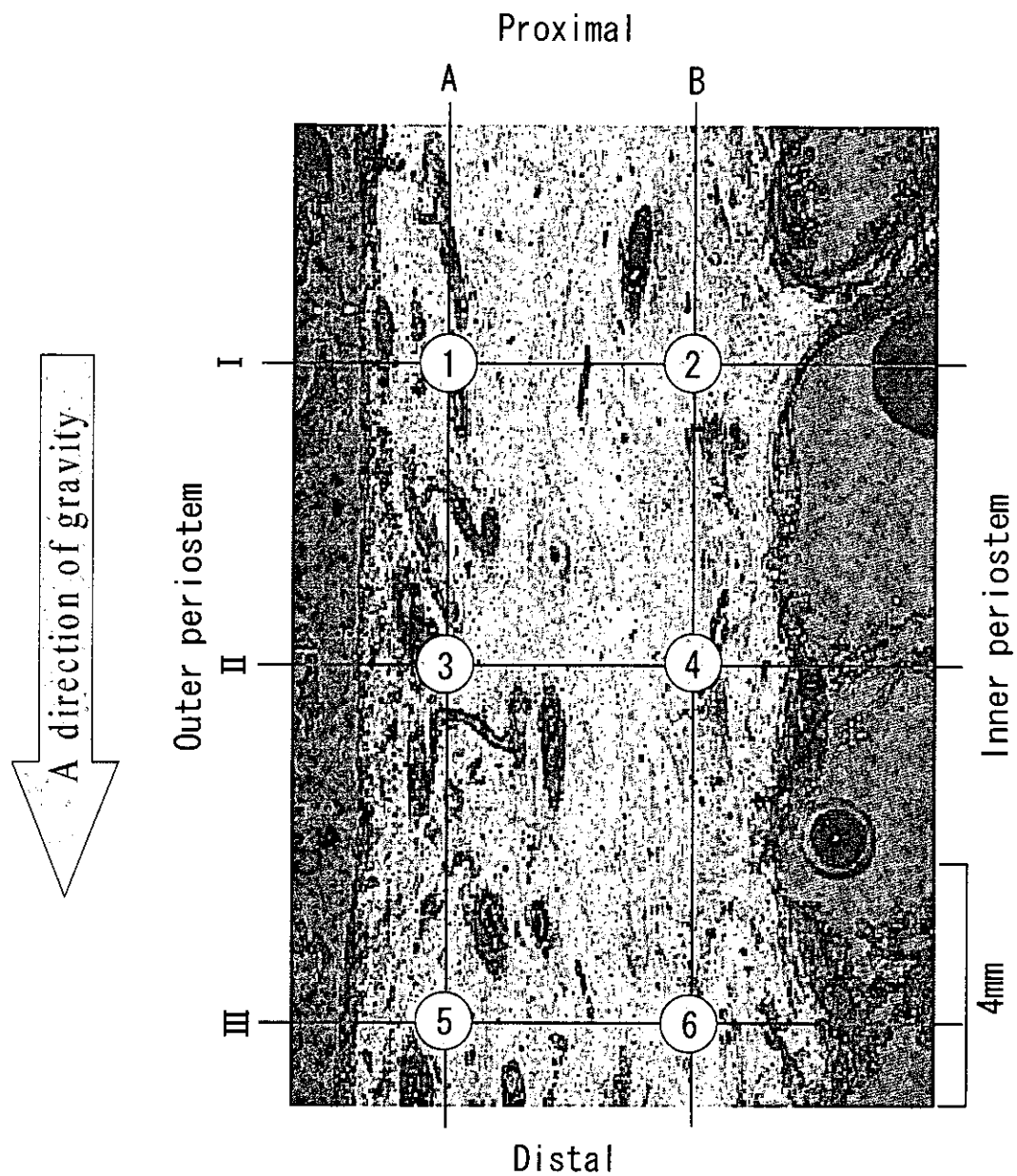


図1.12 ビーグル犬小転子部付近測定位置

## 1-4 実験結果および考察

### 1-4-1 ヒト左大腿骨骨幹部の異方性力学特性分布

各測定点における測定値をライン別にプロットする事により骨の外側から内側にかけての傾向、また遠位部から近位部にかけての傾向を見れるようにする。縦弾性係数を図1.13に水平ライン、図1.14に垂直ラインに分け、図示した。各測定点における異方性の主軸方向が重力に対して水平方向の測定値を●点で表し、実線で結び、重力方向である垂直方向の測定値は×点で表し、一点鎖線を用い結んである。また、同色は同一の測定点を意味する。同様にして密度を図1.15に水平ライン、図1.16に垂直ラインに分け、図示した。なお、紙面の都合上、水平ラインをH line、垂直方向をV lineとして表してある。

図1.13～図1.16より、ヒト左大腿骨骨幹部は水平ライン、垂直ラインともに力学特性の異方性は明瞭な傾向はほとんど見られないのがわかる。日常生活において、一般的に老人はあまり活動的ではなく、それにより骨には負荷がほとんどかからないため推測される。また、女性であり、年齢的に閉経していると考えられるので、骨粗鬆症などの医学的要因も考えられる。

### 1-4-2 ビーグル犬大腿骨小転子部付近の異方性力学特性分布

縦弾性係数を図1.17に水平ライン、図1.18に垂直ラインに分け、図示した。各測定点における異方性の主軸方向が重力に対して水平方向の測定値は●点で表し、実線で結び、重力方向である垂直方向の測定値は×点で表し、一点鎖線を用い結んである。また、同色は同一の測定点を意味する。同様にして密度を図1.19に水平ライン、図1.20に垂直ラインに分け、図示した。

図1.17、図1.18より、縦弾性係数における異方性の考察として、各測定点の垂直方向は水平方向と比較して常に大きい値を示した。言い換えると、若いビーグル犬の大腿骨は異方性が強く見られる、という事になる。また、図1.18より明らかなように、近位部に近づくほどに縦弾性係数は大きくなり、力学的負荷と密接に相関していることが推測できる。しかし、図1.20において、密度には垂直ラインの傾向がほとんど見られない。測定値が少ないので詳しく解明する事はできないが、密度が必ずしも縦弾性係数に影響を及ぼすとは言えない事がわかる。

ところで水平ラインについてだが、図1.17より明らかなように海面骨側に近づくにしたがって縦弾性係数が大きくなる傾向が存在する。また図1.19より、外骨膜側では値がまばらであった密度が、海面骨側に近づくにつれてまとまりを示す事がわかる。これらは骨梁の影響が強いのではないかと考えられるが、海面骨、海面骨付近は複雑な力学特性を示し、また様々な分野からのアプローチを必要とするので、現時点でこの特性を明らかにする事はできない。この部分は更なる検討が必要である。

### 1-4-3 骨組織力学特性の異方性に関する考察

図1.21にヒト左大腿骨骨幹部、図1.22にビーグル犬左大腿骨小転子部付近の各測定点において、異方性主軸が重力方向である垂直方向の縦弾性係数を水平方向の縦弾性係数で割った値を示す。この値が1であれば重力の影響によらず骨組織の力学的特性が等方的であることを意味し、1より大きければ重力方向に強化された異方性を有していることを意味している。老人の骨組織の縦弾性係数は、垂直、水平方向の大小が測定点ごとに入り乱れているため図1.21のように1を境に不規則な変化を示している。なお、測定点1、測定点8は水平方向の縦弾性係数が測定できなかったために値を載せていない。一方、若いビーグル犬の骨組織の縦弾性係数においては常に垂直方向が大きいため、その比がどの場所においても1以上であり、重力方向である垂直方向に縦弾性係数が常に大きい異方性を有していることがわかる。これらのことから、老人の骨組織よりも若い骨組織の方が力学特性に異方性が強く表れ、これは日常の運動負荷による骨組織のリモデリングと深い相関があることを推察させるものである。

図1.23にヒト左大腿骨骨幹部、図1.24にビーグル犬左大腿骨小転子部付近の各測定点における、異方性主軸の方向を示す。図中、赤い矢印が水平方向、青い矢印が垂直方向となっている。ヒト左大腿骨骨幹部では、主軸が直交していない測定点がいくつかあるのに対し、ビーグル犬左大腿骨小転子部付近は全ての測定点においてほぼ直交していると言える。これらのことより、若い骨は直交異方性の傾向が強く発現していることが明らかになった。

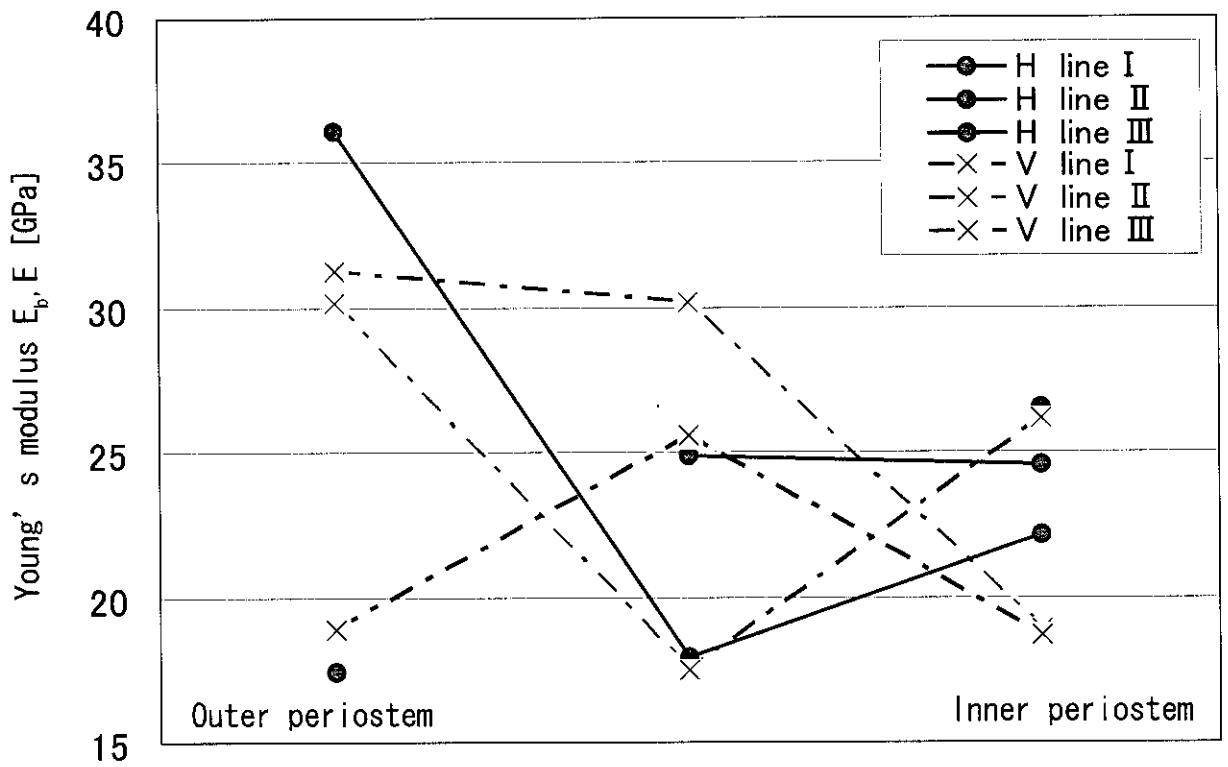


図 1.13 ヒト左大腿骨骨幹部 水平ライン縦弾性係数

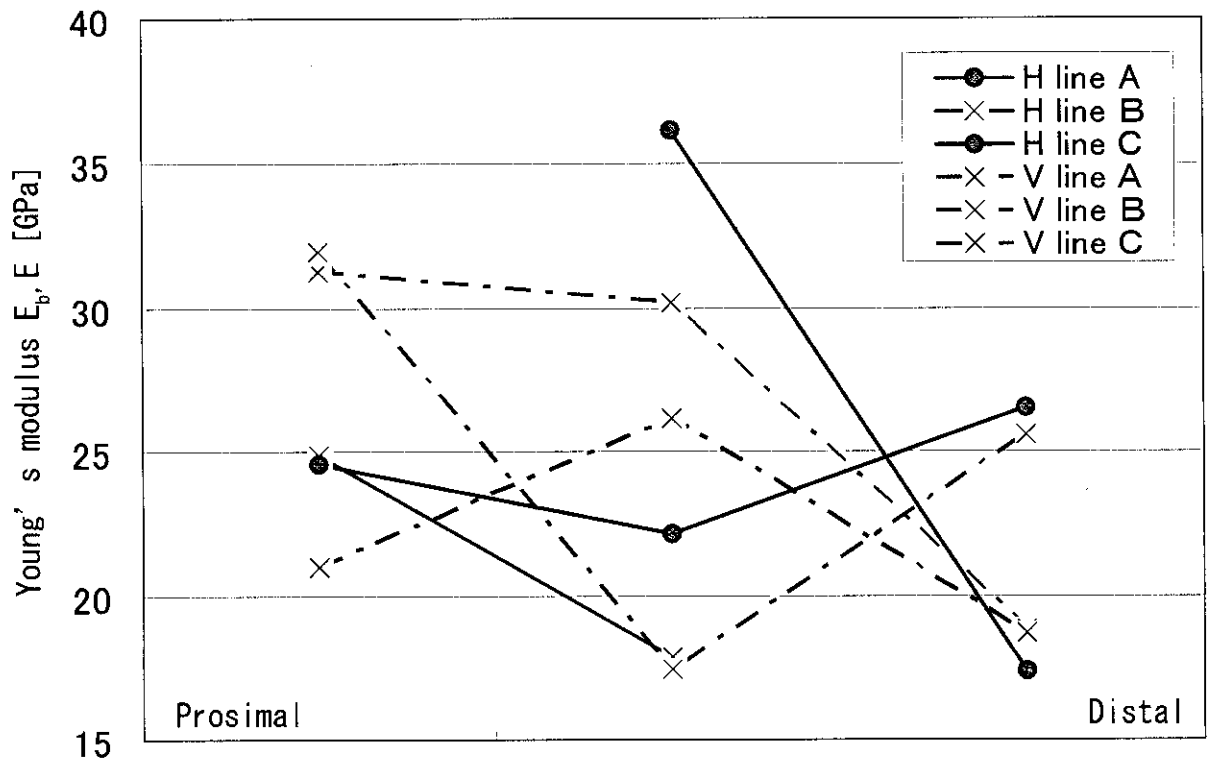


図 1.14 ヒト左大腿骨骨幹部 垂直ライン縦弾性係数

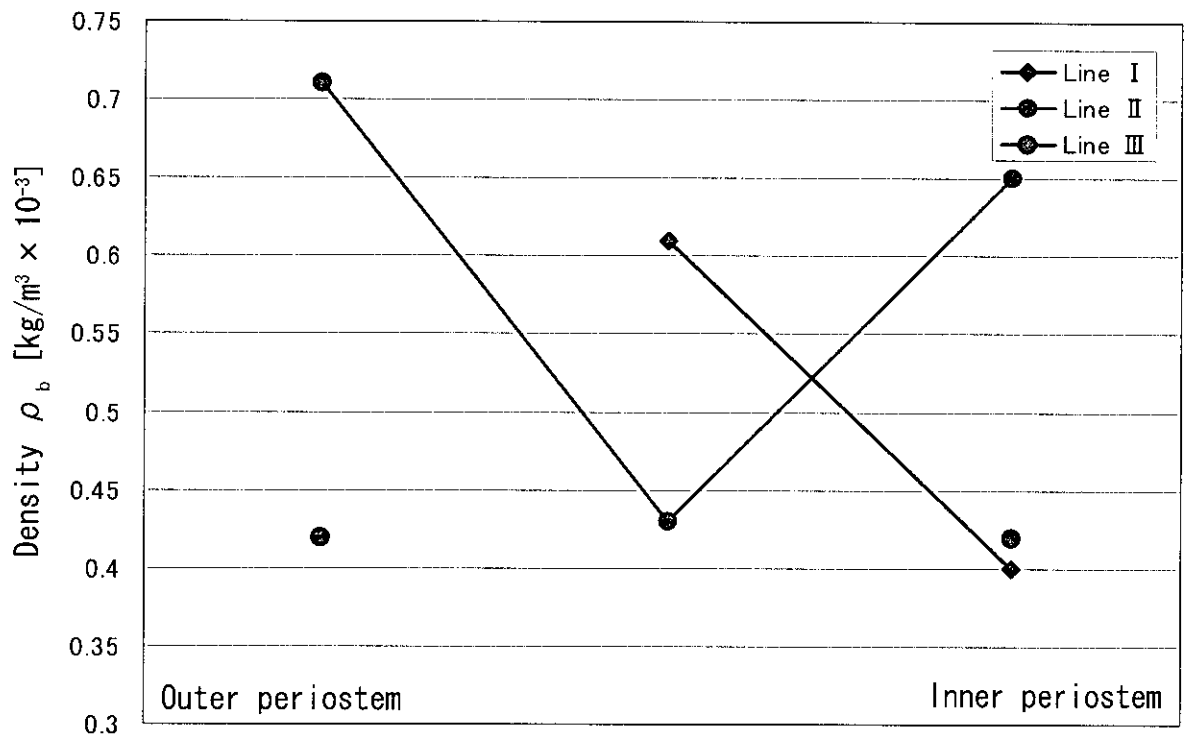


図 1.15 ヒト左大腿骨骨幹部 水平ライン密度

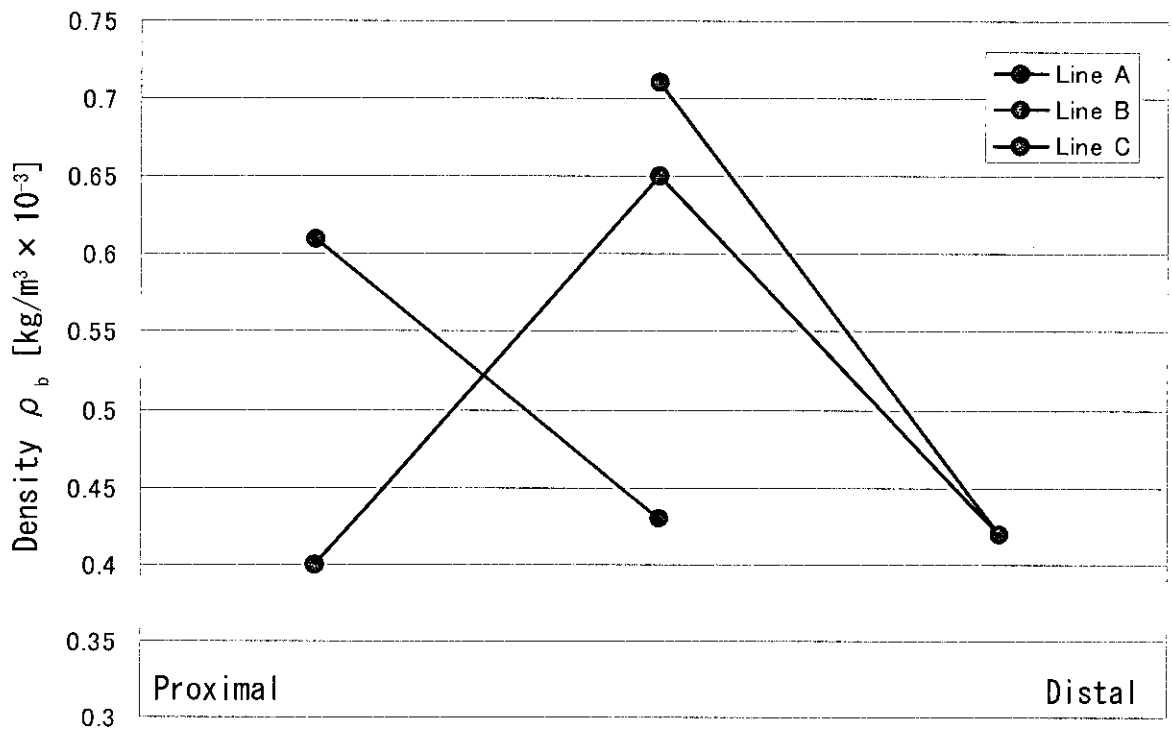


図 1.16 ヒト左大腿骨骨幹部 垂直ライン密度



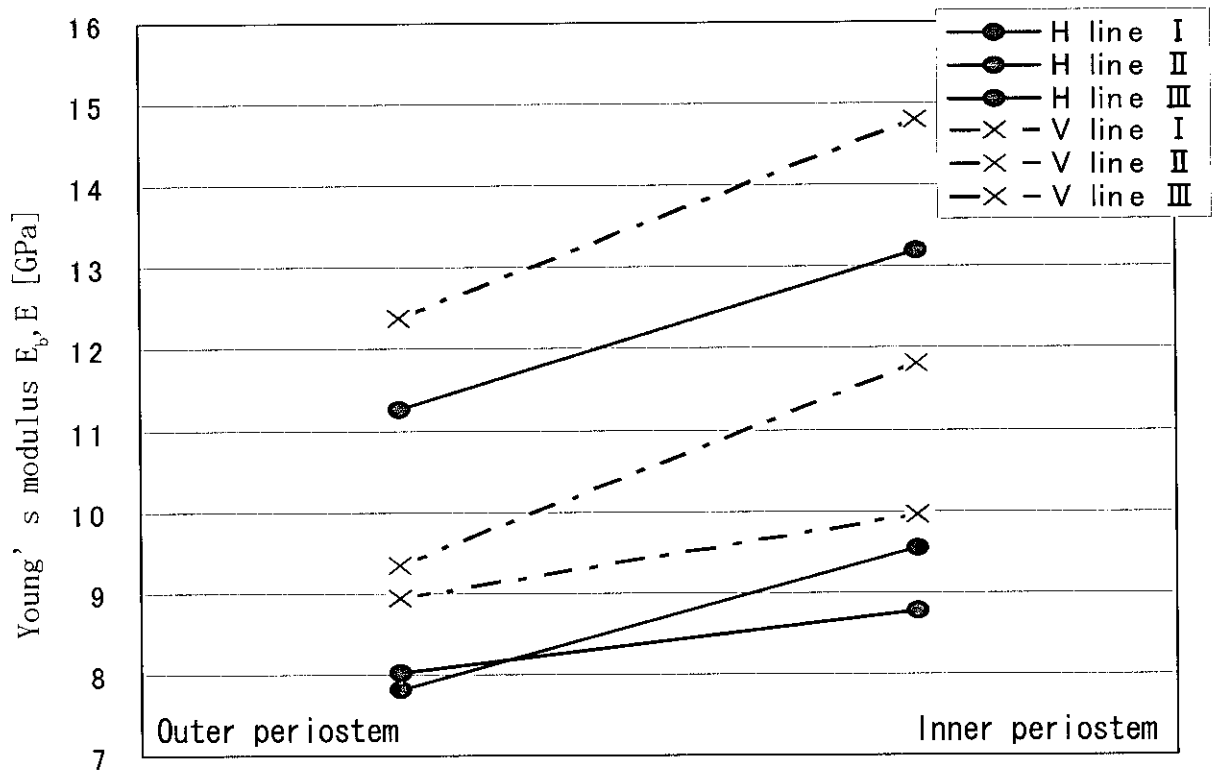


図 1.17 ビーグル犬大腿骨小転子部付近 水平ライン縦弾性係数

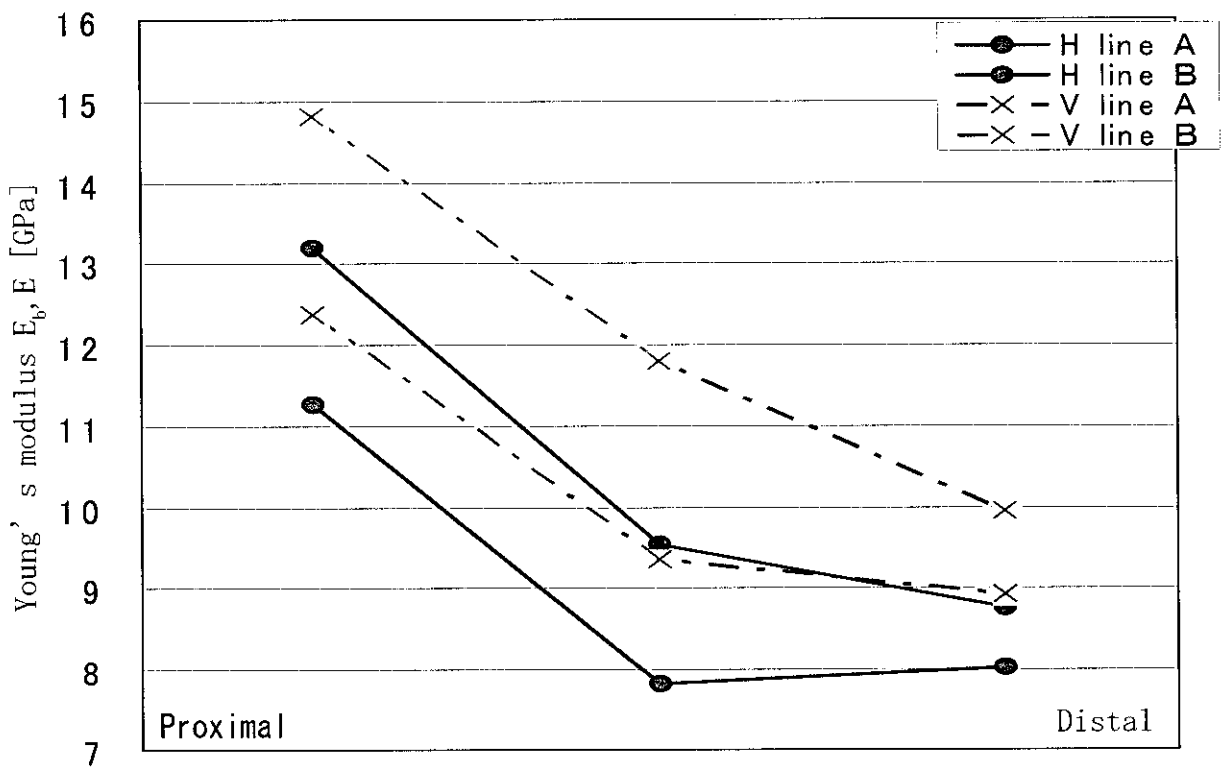


図 1.18 ビーグル犬大腿骨小転子部付近 垂直ライン縦弾性係数

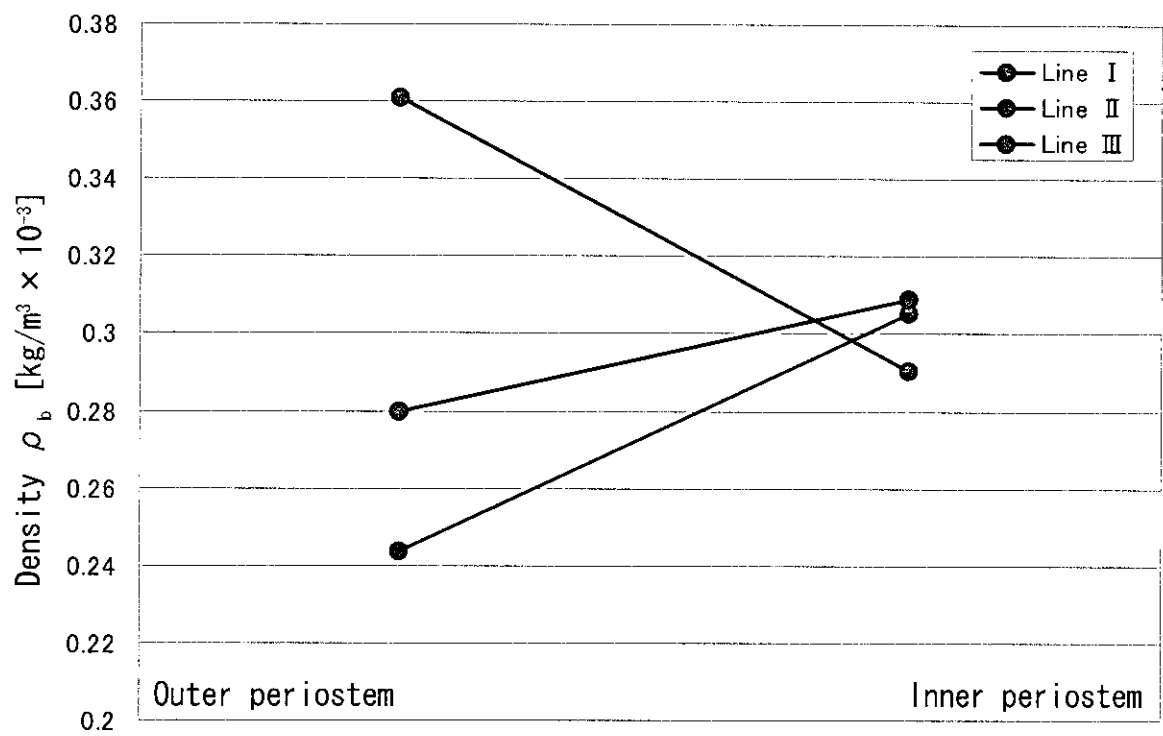


図 1.19 ビーグル犬大腿骨小転子部付近 水平ライン密度

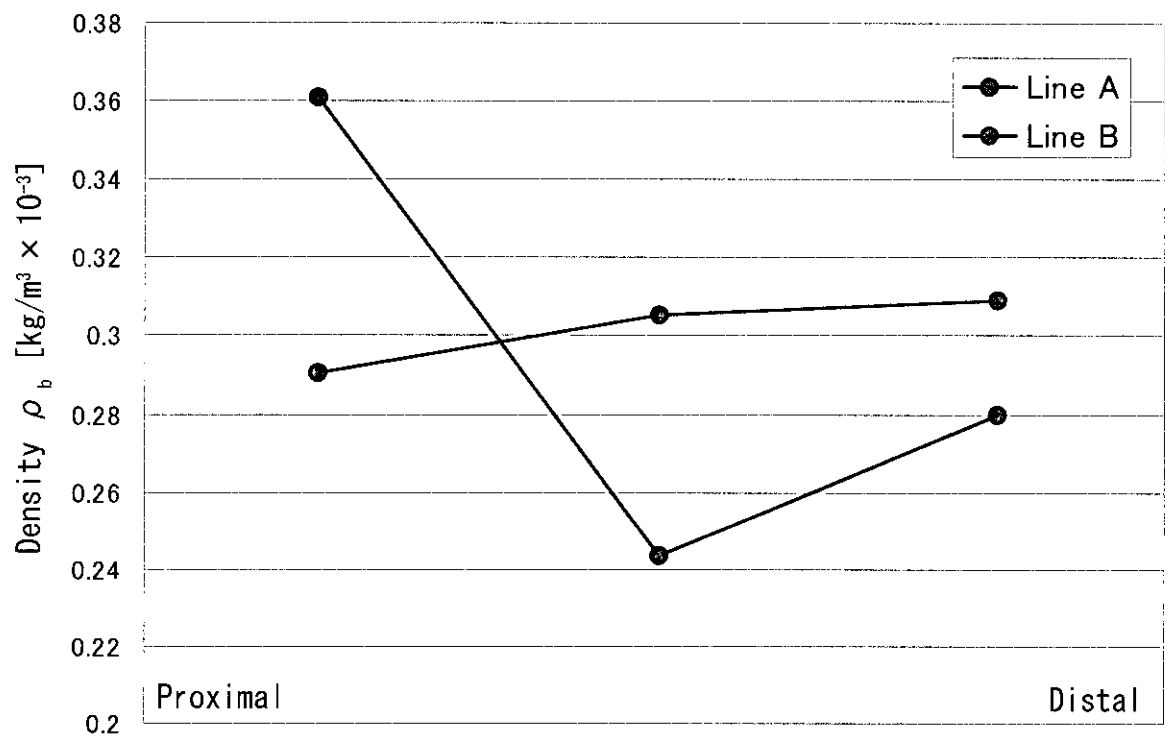


図 1.20 ビーグル犬大腿骨小転子部付近 垂直ライン密度

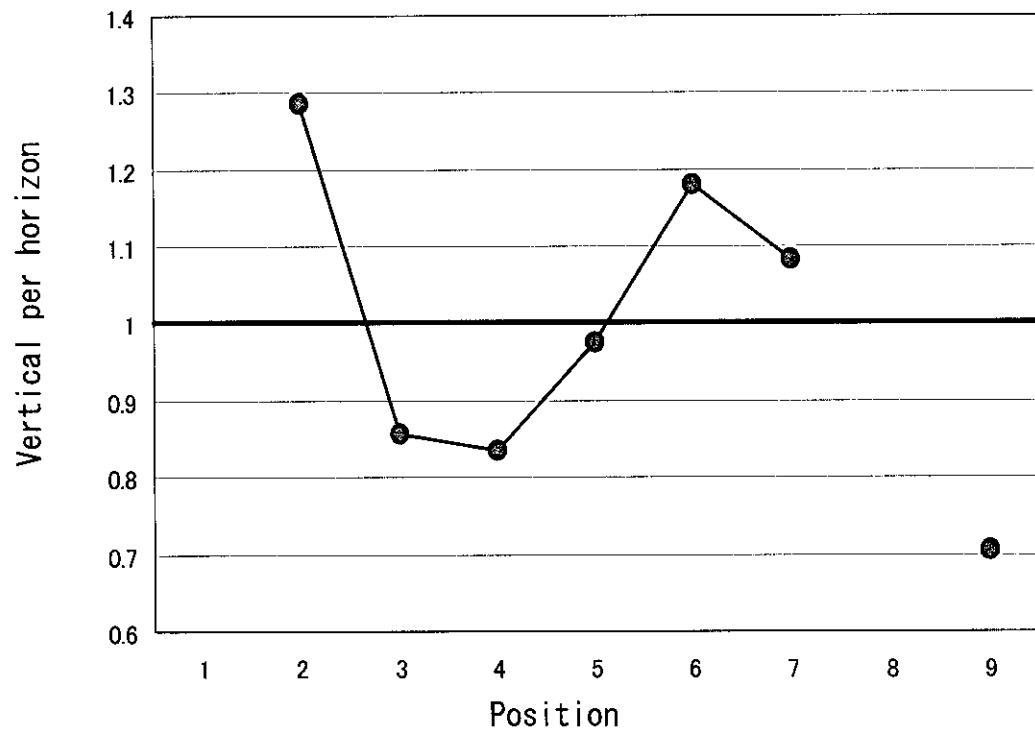


図 1.21 ヒト左大腿骨骨幹部の水平、垂直方向の比

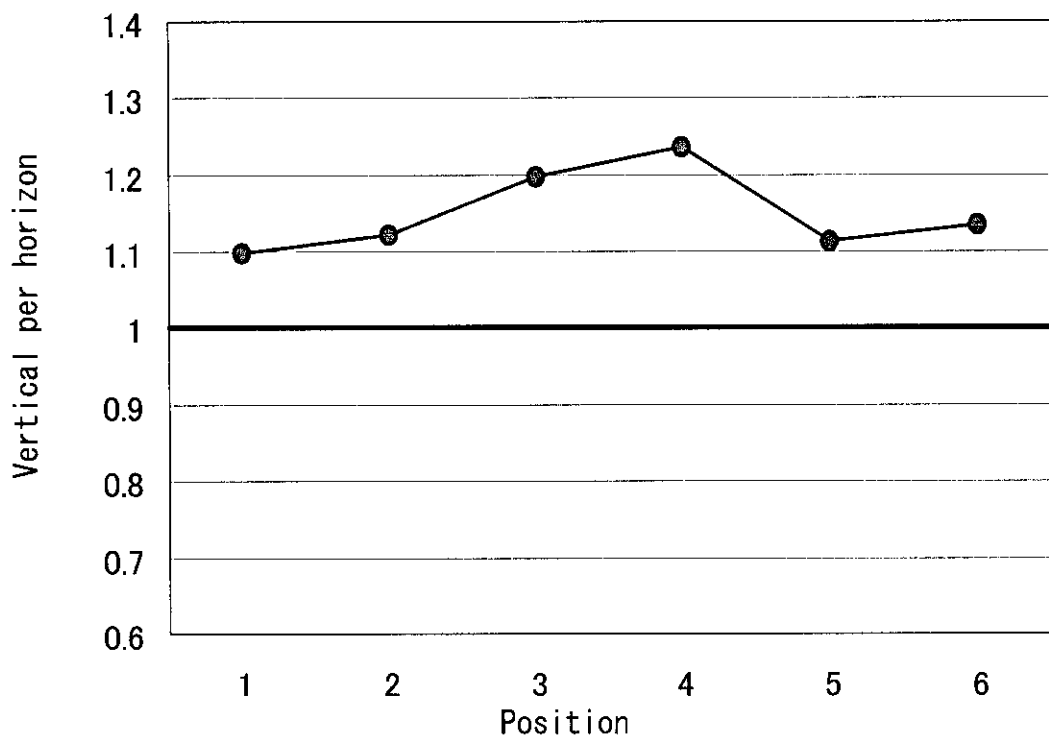


図 1.22 ビーグル犬左大腿骨小転子部付近の水平方向、垂直方向の比

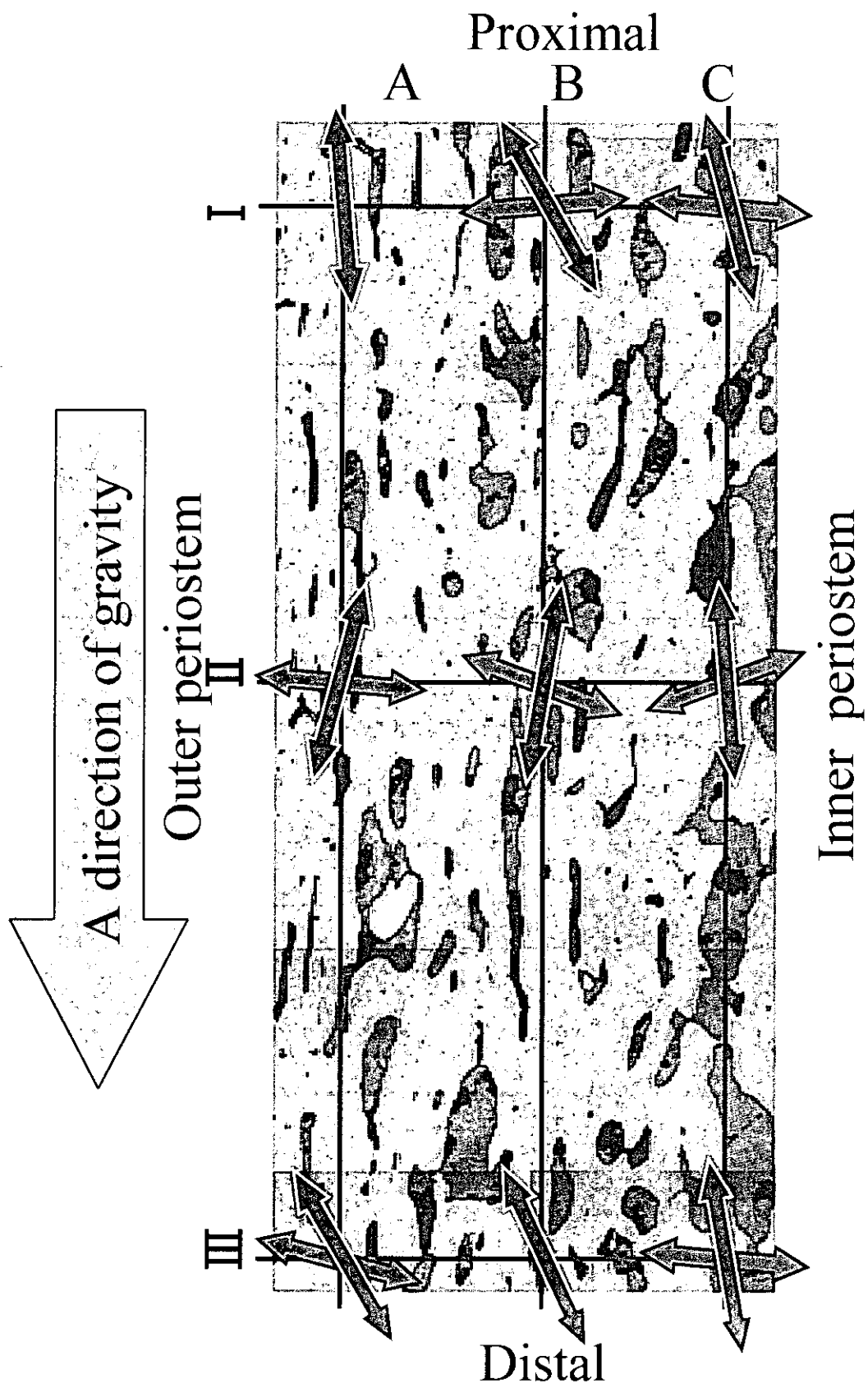


図 1.23 ヒト左大腿骨骨幹部 異方性の主軸の向き

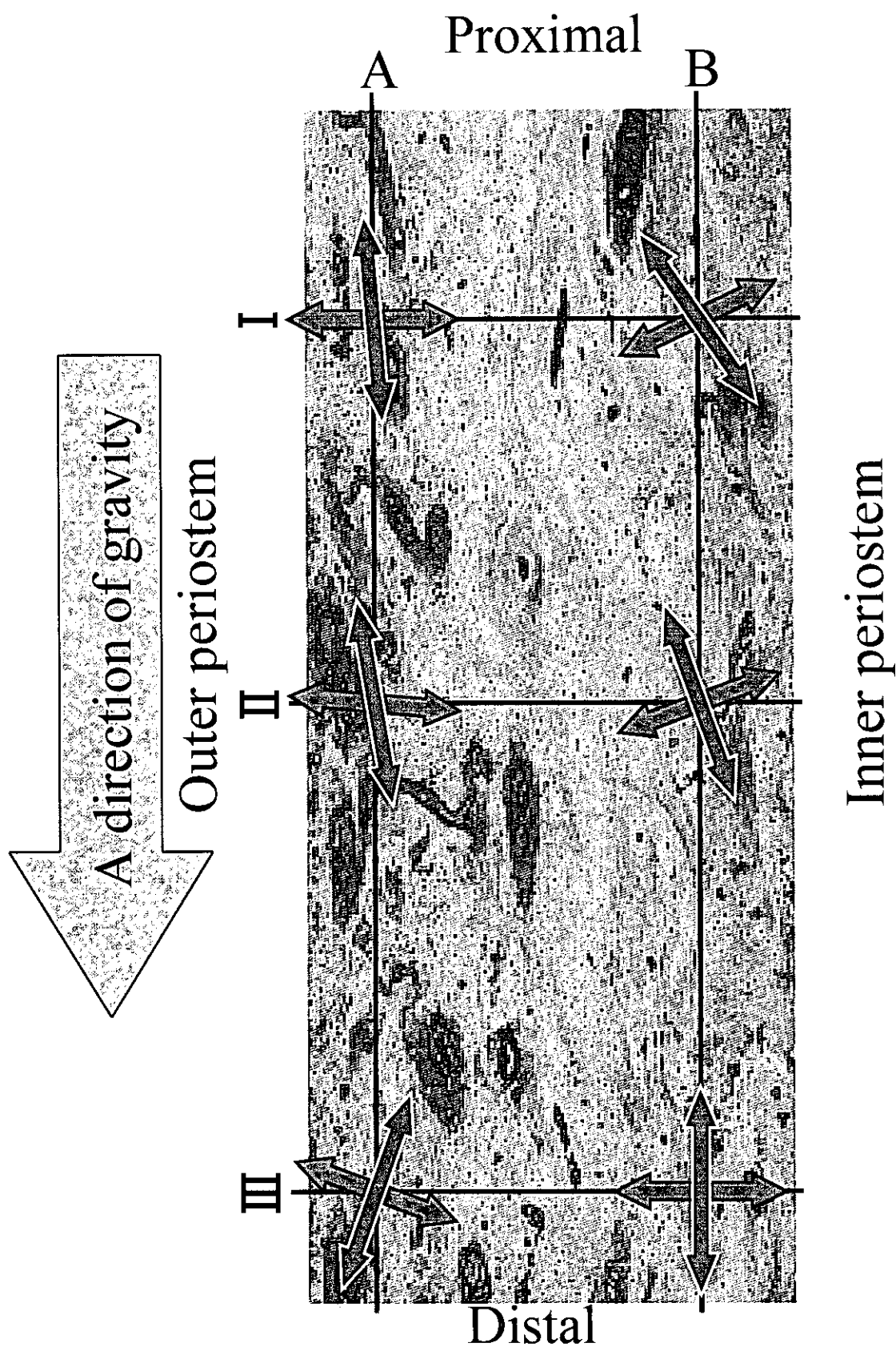


図 1.24 ビーグル犬左大腿骨小転子部付近 異方性の主軸の向き

培養骨系細胞のメカニカルストレス下での反応応答

分担研究者 阿部康次 信州大学繊維学部教授

研究要旨

多糖系高分子電解質錯体(PEC)を培養基材として、軟骨に分化する能力を有する未分化間葉系細胞(ATDC5)を培養し、増殖・分化挙動について検討を行うとともに、低出力超音波パルスが軟骨分化に及ぼす効果について検討を行った。PECのアニオン成分ポリマーであるアニオン性多糖類がグリコサミノグリカン構造およびその類似構造をとる時に、ATDC5細胞は凝集塊を形成すると共に軟骨基質を豊富に産生し、軟骨に特異的な遺伝子の発現も早期に発現することが示された。また、PEC上で凝集塊を形成し活性化されたATDC細胞は、低出力超音波パルスを照射することでより早期に分化が誘導されることが示された。

A. 研究目的

生体内における組織細胞は、細胞外マトリックス(ECM)と呼ばれる生体高分子の集合体に囲まれて存在している。ECMの主成分としてはタンパク質や多糖類があげられ、これらと細胞との相互作用により、細胞の生存性、機能発現などが制御されている。我々は、ECMの主成分である多糖類に注目し、アニオン性多糖類とカチオン性多糖類を混合することにより形成される多糖類系高分子電解質錯体(PEC)(図1)を培養基材とし各種細胞の培養を行い、優れたマトリックス素材であることを明らかにしてきた。本研究では、軟骨に分化する能力を有する未分化間葉系細胞であるATDC5を多糖類系PEC上で培養し、PECの分化機能促進効果を検討すると共に、骨形成を促進することが指摘されている低出力超音波パルスが、分化機能に与える効果について検討することを目的とした。

B. 研究方法

細胞培養用ディッシュ(TCD)中で、カチオン性多糖類[キトサン:CS]とアニオン性多糖類{硫酸化キチン[SCHN; D.S.=1.55 (D.S.とは単糖(1

unit)あたりの官能基導入率を示す)、リン酸化キチン[PCHN; D.S.=1.68]、カルボキシメチル化キチン[CMCHN; D.S.=1.0]、ヒアルロン酸[Hya]、カルボキシメチル化セルロース[CM-C; D.S.=0.9]、ペクチン[Pec]、アルギン酸[Alg; D.S.=1.0]}の水溶液を0.001 $\mu$ Mの濃度で等量混合し、沈降法によりPECコーティングディッシュを作製した(硫酸化キチンを有するPECをSPEC、以下順にPPEC, CMPEC, HyaPEC, CM-CPEC, PecPEC, AlgPECとする)。作製したPECコーティングディッシュ上に、ATDC5をインスリン添加DMEM-F12培地を用いて播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で所定日数培養後、細胞形態の観察を行った。また、分化の評価として、Alcian blueによる軟骨基質の染色、およびRT-PCR法により軟骨に特異的な基質であるtype II collagenとAggrecanのmRNAの発現を検討した(図2、3)。

また、PECをコーティングした培養フラスコに、ATDC5を、 $1.3 \times 10^5$  cell s/wellの密度で播種し、24時間培養した後を1回目として、実験期間を通して毎日低出力超音波パルス(周波数=1.0 MHz、バースト幅=200  $\mu$  sec、ピーク圧=330 kPa)を10分間照射した。所定日数培養後、細胞の形態、機能発現について検討を行った(図4)。

## C. 研究結果および考察

### 1) ATDC5 の培養

図5に、培養3時間後のATDC5の接着率を示した。コントロールであるキトサン (CS)、TCD上の細胞接着率は、100%近い高い値であったのに対し、CM-CPEC、HyaPEC上では80%程度の低い細胞接着率を示した。その他のPECに対しては、全て、94~99%と良好な細胞接着率であった。CM-CPECにおいて若干接着率が劣った理由として、基材の表面物性が考えられるが、PEC自体の表面の親・疎水性、表面電位等には有意な差は確認されていない。唯一の相違点として表面の起伏状態の若干の相違が挙げられ、この物理的構造の相違や表面の含水性が原因となっている可能性が考えられるが、現時点で詳細は不明である。

図6に、PEC上で10日間培養したATDC5の形態写真を示した。培養期間を通してコントロールであるCS、TCD上の細胞は、紡錘状で伸展形態を示した。一方、カルボキシル基系PECであるHyaPEC、CMPEC、CM-CPEC、PecPEC上の細胞は、培養5日目で凝集塊を形成し、培養日数が進むにつれて、凝集塊が大きくなるのが観察された。特に、HyaPEC上の細胞が最も顕著に凝集塊を形成し、ディッシュ全体に凝集塊が形成されていた。ディッシュの全面積に対する凝集塊の形成数は、PecPEC<CM-CPEC<CMPEC<HyaPECの順に多くなった。その他のAlgPEC、SPEC、PPEC上の細胞は、コントロールとほぼ同様な伸展形態を示し、培養5日目にはコンフルエントに達し、それ以後は細胞が多層状に増殖していた。凝集塊を形成させる要因として、まず基材表面の物性が考えられるが、基材表面の水接触角、表面の起伏状態には有意な差は観察されなかったことより、凝集塊形成の要因になる可能性は小さいと考えられる。また、生物学的な要因として、細胞表面に存在するレセプターが考えられる。最も凝集塊形成数が多かつ

たHyaPECの成分ポリアニオンであるヒアルロン酸は、軟骨基質に豊富に存在し、細胞の挙動に直接影響する機能を含め、多岐にわたった生理作用を有することが知られている。また、SV3T3細胞などのげっ歯類の細胞株を用いた凝集形成に関する研究において、ヒアルロン酸が細胞同士の架橋を仲介することが明らかとされている<sup>1)</sup>。このような細胞間の凝集は、細胞表面に局在するCD44と呼ばれるヒアルロン酸結合たんぱく質(レセプター)により引き起こされると考えられている。CD44はニワトリ胚芽軟骨細胞、成ウシまたはヒト関節に存在し、図7に示すように細胞表面上でヒアルロン酸との結合を介して、隣接した細胞を架橋(凝集)することが明らかになっている<sup>1)</sup>。また、同様にCMPEC、CM-CPEC、PecPECが凝集する原因として、これら多糖類は、グリコサミノグリカン構造を有し、また官能基にカルボキシル基を含むことから、多くの点でヒアルロン酸と構造的に類似点が多い。特に、凝集塊が多く形成されたCMPECは、分子内にカルボキシル基とN-アセチル基を併せて有し、ヒアルロン酸と類似する構造を有するため、CD44により凝集が引き起こされたのではないかと考えられる。また、カルボキシル基を持たないSPEC、PPECあるいは、カルボキシル基を有していてもグルコース環を基本骨格とするAlgPEC上の細胞は、TCD上の細胞と同様に伸展することから、凝集塊を形成するためには、カルボン酸とグルコサミン骨格が共に必要であることが想定される。

図8に、各PEC上におけるATDC5の増殖挙動を示した。AlgPEC、SPEC、PPEC、CS上におけるATDC5は、CSやTCD上の場合とほぼ同様の程度で単調に増殖した。一方、細胞凝集塊が形成されるPEC(HyaPEC、CMPEC、CM-CPEC、PecPEC)上の細胞の増殖は若干遅い傾向がみられた。特に、細胞凝集塊形成が顕著に観察されるHyaPEC、CMPEC、CM-CPECにおいては、強い増殖抑制がかかっている。この増殖抑制は、凝集塊中の細胞増殖が遅いためだと考えられる。

一般に、細胞密度が上がり、細胞間接触が起きるようになると、接触障害が起り、細胞増殖が抑制されることが知られている。今回の細胞凝集塊中でも、上記のような現象が起こっていると考えられる。このような HyaPEC や CMPEC による細胞の凝集塊形成及び増殖抑制は、マウス骨芽細胞 (MC-3T3E1) やヒト歯根膜線維芽細胞 (HPLF) のような硬組織細胞においても報告されている<sup>3), 4)</sup>。このように、PEC は主にポリアニオンの官能基および糖骨格構造によって、細胞接着、形態、増殖などに影響を及ぼしていることが示された。

図 9 に、PEC 上で 10 日間培養した ATDC5 の走査型電子顕微鏡写真を示した。培養 5 日目では、SPEC、PPEC、CS 上の細胞は、TCD と同様に扁平形態を示し、シート状に増殖していた。一方で、HyaPEC、CMPEC 上の細胞は凝集塊を形成しており、一つ一つの細胞の形状も球状であった。培養 10 日目になると、これらの PEC 上で凝集塊を形成している細胞の表面を覆うように、図中の矢印で示した部分に軟骨基質様の物質が観察された。これに比べ、伸展形態を示した細胞周辺では、軟骨基質様の物質は明確に観察されなかった。

## 2) ATDC5 の分化挙動

図 10 に、各 PEC 上で 10 日間培養した ATDC5 の Alcian blue 染色写真を示した。この染色法では、軟骨基質である酸性ムコ多糖類が青色に染色され、軟骨基質の沈着が観察できる。伸展形態を示した SPEC、PPEC、CS 上の細胞は TCD とほぼ同様に全体が薄く染色されていた。これに対し、HyaPEC、CMPEC、CM-CPEC、PecPEC 上の凝集塊は、中心付近が伸展形態の細胞よりも濃い色で染色されており、凝集塊に含まれる細胞が盛んに軟骨基質である酸性ムコ多糖類を産生していることが示唆された。図 3 に示されるように、培養 10 日目は一般的に分化相への移行が起こり始めた時期であり、軟骨基質の産生はそれほど多くないと考えられる。これに対

し、凝集塊内部の細胞は増殖が抑制されており、CS や TCD に比べ早い時期に分化相への移行が起こっているものと推測される。

また、一般的に ATDC5 は、凝集塊を形成することで軟骨への分化が進行することが知られている。したがって、本実験においても、HyaPEC、CMPEC、CM-CPEC、PecPEC 上の細胞は凝集塊を形成することにより、軟骨細胞への分化が進行したと考えられる。

図 11 に、各 PEC 上で 7、10 日間培養した ATDC5 における II 型コラーゲン、Aggrecan の mRNA 発現を示した。対照となる GAPD は全ての系において、ほぼ同様の発現が確認されている。ATDC5 は、分化にあたって図 3 に示すように、培養 7 日目以降 II 型コラーゲンの mRNA が発現し、培養 10 日目以降 Aggrecan の mRNA が発現すると報告されている<sup>2)</sup>。凝集塊を形成する HyaPEC、CMPEC、CM-CPEC、PecPEC 上の細胞は、培養 7 日目においてのみ II 型コラーゲンの mRNA 発現が観察された。さらに、培養 10 日目において、凝集塊を形成するグループの細胞のみから Aggrecan の mRNA 発現が観察された。この実験結果は軟骨基質沈着の結果と良い相関性を示しており、細胞が凝集塊を形成する HyaPEC、CMPEC、CM-CPEC、PecPEC は、早期に軟骨細胞への分化を誘導させるような基材であることが遺伝子レベルでも示された。

図 12 に、HyaPEC をコーティングしたカバーガラスおよび未コートのカバーガラス上で 7 日間培養した ATDC5 における、カドヘリンの蛍光免疫染色の結果を示した。カドヘリンは、細胞表層に存在する細胞-細胞間の接着タンパク質であり、特に N-カドヘリンは軟骨形成に関与していることが知られている<sup>2)</sup>。培養 7 日目において、緑色の蛍光を発色している N-カドヘリンは、コントロールと比べ HyaPEC 上で形成された凝集塊内部の細胞間で特に多くの発現が観察された。したがって、HyaPEC 上の凝集塊内部の細胞は、N-カドヘリンを強く発現し、細胞-細胞間の情報伝達が盛んに起こること



により軟骨形成が促進されている可能性が示唆された。この結果は、前述した細胞の増殖、軟骨基質の発現、遺伝子レベルでの分化マーカーの確認などの結果と良い相関性を示している。

### 3) 低出力超音波パルス照射効果

低出力超音波パルスを照射して培養した ATDC5 の形態を図 13 に、軟骨基質を Alcian blue 法により染色した結果を図 14 に示した。培養期間を通して、凝集塊形成の有無、大きさ、発生数などに有意差はみられなかった。また、Alcian blue の染色性についても低出力超音波パルスの照射による染色促進効果は確認されなかった。

図 15 に、低出力超音波パルスを照射して 5 日間および 7 日間培養した ATDC5 の II 型コラーゲン、aggrecan の mRNA 発現結果を示した。伸展形態を示す SPEC、TCD 上の細胞における II 型コラーゲン、aggrecan の mRNA 発現には、培養期間を通して、低出力超音波パルスの影響は認められなかった。一方、HyaPEC 上の細胞は、低出力超音波パルス未照射においても、他の基材より分化が促進されていた。さらに、低出力超音波パルスを照射することにより、未照射群の細胞よりも分化マーカーの mRNA の発現が、より強く観察された。従って、HyaPEC 上の細胞は、凝集塊を形成することにより、軟骨細胞の初期分化が促進され、低出力超音波パルスは、このような活性化状態の軟骨細胞に対して分化促進効果を有すると考えられる。

## D. まとめ

凝集塊を形成させる HyaPEC、CMPEC、CM-CPEC、PecPEC 上で培養された ATDC5 細胞は、軟骨基質を豊富に産生し、軟骨に特異的な遺伝子の発現も早期に観察された。細胞凝集には、細胞表面のレセプターなど生物的要因が考えられるが、詳細については未だ明らかでない。しかしながら、ヒアルロン酸等のグリコサミノグリカン構造や糖鎖に含まれるカルボキシル基や N-

アセチル基などの官能基が軟骨細胞の凝集や分化促進に何らかの影響を与えていることが示唆された。

また、PEC 上で凝集塊を形成し活性化した ATDC 細胞は、低出力超音波パルスを照射することによりさらに早期に分化することが示された。

## E. 参考文献

1) Underhill CB et al. ; Physical characteristics of hyaluronate binding to the surface of simian virus 40-transformed 3T3 cells. J Biol Chem 255 : 4544-4549,1980

2) A.Cevic Tufan et al. ; AP-1 Transcription factor complex is a target of signals from both WNT-7a and N-Cadherin-Dependent cell-cell adhesion complex during the regulation of limb mesenchymal chondrogenesis. Experimental Cell Research 273, 197-203,2002

3) T. Hamano, D. Chiba, K. Nakatsuka, M. Nagahata, A. Teramoto, Y. Kondo, A. Hachimori and K. Abe, Evaluation of a Polyelectrolyte Complex (PEC) Composed of Chitin Derivatives and Chitosan, which Promotes the Rat Calvarial Osteoblast Differentiation, Polymers for Advanced Technologies,13, 46-53(2002)

4) Takaichi Hamano, Akira Teramoto, Eisaku Iizuka and Koji Abe : Effects of polyelectrolyte complex (PEC) on Human Periodontal Ligament Fibroblast (HPLF) function I : Three dimensional structure of HPLF cultured on PEC ; Journal of Biomedical Materials Research, 41, 257-269(1998)

## F. 研究発表

### 口頭発表

1. 平田智子, 長幡 操, 寺本彰, 阿部康次, 中土幸男, 超音波照射条件下の骨芽細胞の培養と機能発現、第 5 2 回高分子学会年次大会 予稿集、52, 1150, 2003
2. 寺本彰, 長幡操, 阿部康次, 立岩裕, 中土

幸男、小林道明、多糖類系高分子電解質錯体培養と低出力超音波パルスの影響、第30回臨床バイオメカニクス学会要旨集、63、2003

3. 清水絵美、川崎崇典、寺本彰、阿部康次、高分子電解質錯体による軟骨細胞(ATDC5)の機能制御、第25回日本バイオマテリアル学会予稿集、273、2003



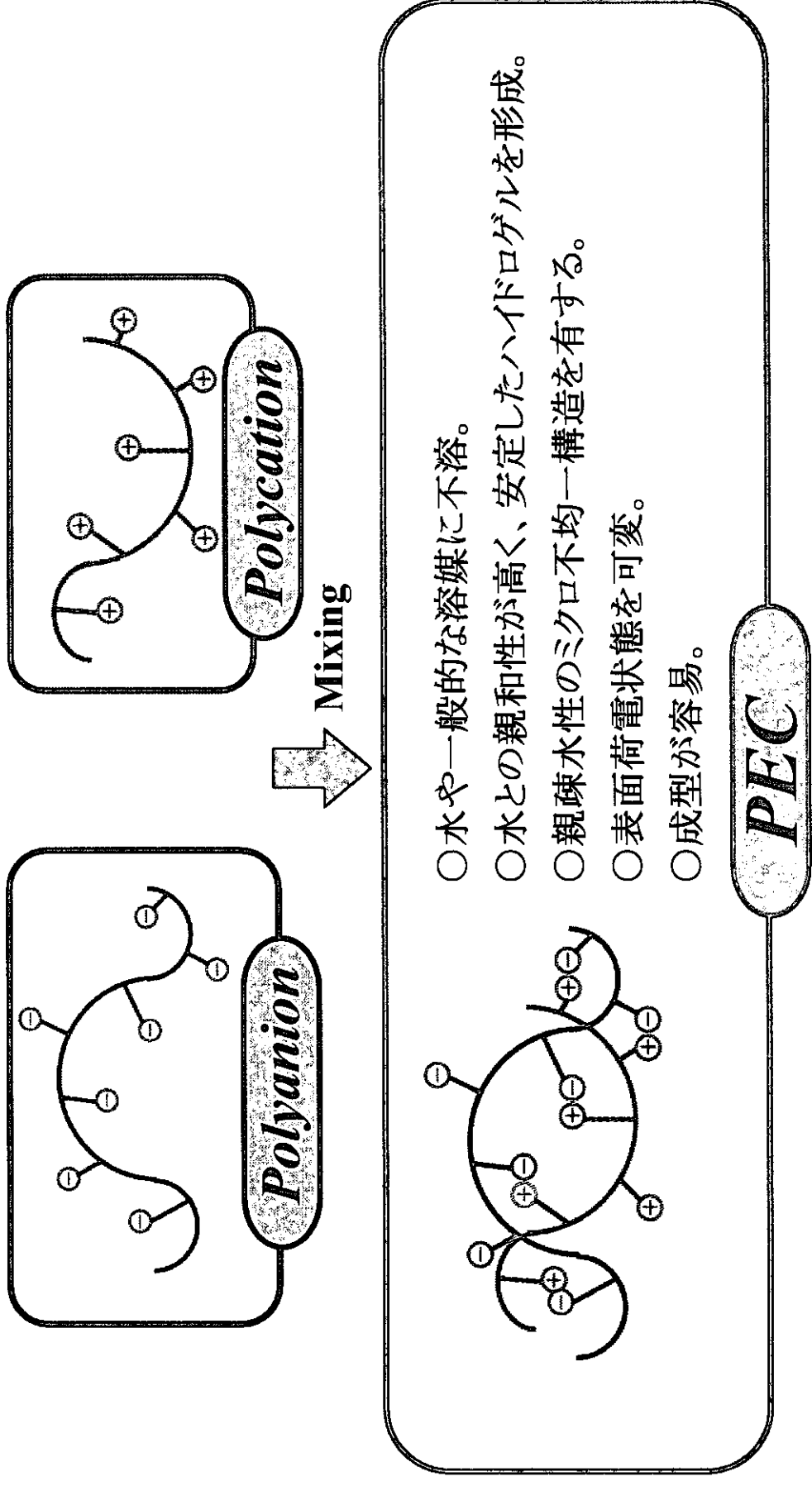


図1 高分子電解質錯体 (PEC)