

緒 言

我々は損傷した軟骨、腱、靭帯を修復することを目的に、幹細胞を含む自己生成組織であるTEC (stem cell-based tissue engineered construct)¹⁾に関する研究を行っている。TECは、細胞と細胞自身が産生する細胞外基質(タイプI, IIIコラーゲン, フィブロネクチン, ヴィトロネクチン)からなる組織であり、動物由来のコラーゲンや人工化合物からなるスキャフォールドを必要としないため、生体内に埋入した際に拒否反応等を起こしにくいといった特徴を有している。TECはすでに軟骨修復において優れた効果があることがわかっている¹⁾が、TECによる修復軟骨の力学特性は正常と比較して劣っており、特にコラーゲン密度が高い軟骨表層の修復が課題となっている⁶⁾。一方、腱、靭帯修復のための研究もこれまで行われてきたが、TECのコラーゲン密度が低く、強度が不足しているために実用化には至っていない^{9)~11)}。そこで、TECとコラーゲンシート(CS)を複合させることで、TECのコラーゲン密度を増大させることを考案した。CSはブタ真皮由来のコラーゲン線維からなるシートであり、線維組織の修復に効果があることが報告されている¹²⁾。また、コラーゲンは細胞の伸展、増殖や細胞外基質生成を促進させることが知られており^{3),4)}、CSとTECを複合させることで、軟骨最表層や腱、靭帯修復において優れた効果が期待できる。本研究では、CSを培養基板として用いてTEC/CS複合体を作製し、TEC/CS複合体の組織観察および引張試験を行い、その構造と引張特性について調べた。

実験方法

1. CSの作製

ブタ真皮由来ペプシン可溶性コラーゲン(3 mg/mL)に対して、等量の二倍濃縮PBS(-)溶液を加え攪拌した後、37°Cで24時間インキュベートすることで、再構成線維を得た。得られた線維を、ホモジナイザーにて破碎し、遠心分離機にて回収した。沈殿物にエタノールを加

え、ミキサーを用いて細かく分散後、この分散体を孔径1 μmのフィルターで濾取し、シート状の線維堆積物を得る。エタノールを自然乾燥させることでCSを作製した。このCSは生体組織と同様の20~30%程度のコラーゲン密度、多孔性、架橋剤を用いていないといった特徴を有している¹²⁾。

2. TEC/CS複合体の作製

CSを組織培養皿上に設置しコラーゲンゲルを用いて固定した。その後、ヒト膝関節滑膜より採取した幹細胞を含む滑膜由来細胞を、5回の継代培養の後、初期細胞密度 4.0×10^5 cells/cm²で培養培地(DMEM, 10%ウシ胎児血清, ペニシリン(100 U/mL)/ストレプトマイシン(100 μg/mL))中に播種した。細胞外基質生成を促進させるためアスコルビン酸2リン酸を0.2mM添加した^{2),9)}。7, 14, 28日間培養を行いTEC/CS複合体を作製した。組織培養皿上を用いて同様の条件で滑膜由来細胞を28日間培養し、培養皿底面に生成した基質と細胞を剥離して1時間自己収縮させることでTECを生成した(TEC 28d群)。また、培地に28日間浸漬したCS(CS 28d群)と培地に浸漬していないCS(CS 0d群)を比較対照として用いた。

3. 組織観察

TEC/CS 7d, 28d群をKarnovsky溶液⁷⁾で前固定した後、1%四酸化オスミウム溶液により後固定処理を行った。その後、50, 70, 80, 90, 95, 100%の順にエタノールで脱水し、臨界点乾燥した。Pt-Pdを10 nmコーティングした後、走査型電子顕微鏡(JSM-6380LA, JEOL)で観察した。また、Karnovsky溶液により固

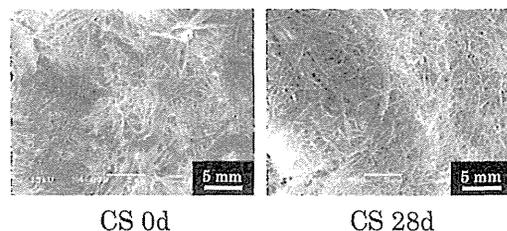


図1. Microscopic observation of collagen sheet soaked in culture medium for 0 and 28 days.

定処理を行った後, 70, 80, 90, 100%のエタノールで順に脱水し, キシレンで置換後にパラフィンに浸漬し, パラフィンブロックを作製した. ミクロトーム (REM-710, 大和工機工業) を用いて厚さ $4\ \mu\text{m}$ に切り出し, ヘマトキシリンで核を, エオジンで細胞質類を染色し (HE染色), 組織の断面を観察した.

4. 引張試験

試験片をスライドガラスに広げてPBS (-) 溶液を $10\ \mu\text{L}$ 添加し, カバーガラスで挟みデジタルマイクロスコープ (VHX-100, KEYENCE) を用いて, スライドガラスとカバーガラス間距離を5カ所測定し, 測定した値の平均を厚さとした.

試験片の引張特性解析のため, 齊藤らが作製した引張試験機¹⁰⁾ を用いた (図2). 各群をリニアアクチュエータ (LAH-46-3002-F-PA, ハーモニックドライブシステムズ) 側と荷重検出側に接続したチャック部に挟み込み, 幅が6mmになるよう両側を切り揃えた. リニアアクチュエータを用いて, プレロードを2mN与えた後に, 引張速度 $0.05\ \text{mm/s}$ で試験片が破断するまで荷重を与えた. 引張荷重は2枚のひずみゲージ (KFG-02-120-C1-23, KYOWA) を貼った板バネ状の荷重センサで計測した. ひずみは, 試験片の固定両端から6mm以上離れた2点において, 微小磁石 (重量 $0.002\ \text{g}$, 寸法 $1 \times 1 \times 1\ \text{mm}$) と発泡スチロールビーズ ($\Phi 2\ \text{mm}$) を用いて作製したマーカを試験片の上下から挟み, この2点間距離の変化をCCDカメラ (CV-070, KEYENCE) と画像センサ (CV-750,

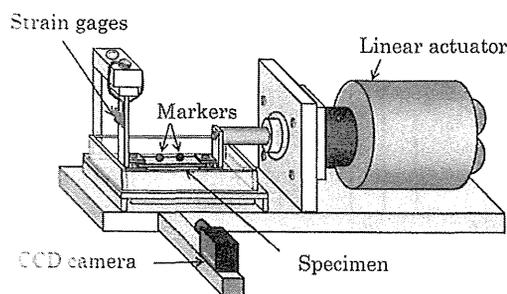


図2. Schematic image of the tensile test system for TEC/CS.

KEYENCE) で追跡して非接触で求めた. シリコンラバーヒータ (一般用SR, スリーハイ) と温度コントローラ (ON-DO2, ワンダーキット) を用いて, 37°C に保たれたPBS (-) 溶液中で試験を行った. 厚さと引張試験機のチャック幅6mmから断面積を求め, 荷重と断面積より公称応力を求めた. また応力-ひずみ線の線形部分における接線係数を求めた.

結果

1. 組織観察結果

組織断面のSEM像とHE染色像の観察結果から, TEC/CS 7d群では, 組織表面に多くの細胞が観察されたのに対し, TEC/CS 28d群は組織表面から約 $100\ \mu\text{m}$ の深さまでコラーゲンの分解が進み, より多くの細胞がコラーゲンシート内に侵入していた (図3).

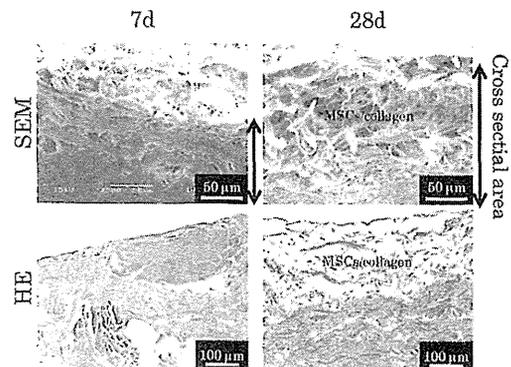


図3. Optical microscopic (HE stain) and scanning electron microscopic observation of the cross-sectional area of the TEC/CS.

2. 厚さ測定結果

厚さ測定の結果, CS 0d群は $331.0 \pm 29.0\ \mu\text{m}$, CS 28d群は $931.3 \pm 122.8\ \mu\text{m}$, TEC 28d群は $288.3 \pm 75.6\ \mu\text{m}$, TEC/CS 7d群は $1319.6 \pm 137.9\ \mu\text{m}$, TEC/CS 14d群は $891.6 \pm 65.7\ \mu\text{m}$, TEC/CS 28d群は $854.5 \pm 87.2\ \mu\text{m}$ となった. CS 0d群と比較してTEC/CS群, CS28d群の厚さは有意に増大した. TECをCSと複合させて一週間培養したTEC/CS 7d群はCS 28d群と比較して厚さが有意に増大したが, 二週間および四週間培養したTEC/CS 14d, 28d群では厚さ

が有意に減少した。

3. 引張試験結果

CS 0d群の破断強度は274.9±80.1 kPa, 接線係数は1093.9±617.6 kPaであったが, 浸漬28日後のCS 28d群の破断強度は13.6±5.0 kPa, 接線係数は52.1±15.0 kPaとなり有意に低下した。また, CSを用いないで培養したscSAT 28d群の破断強度は66.2±27.9 kPa, 接線係数は515.9±194.2 kPaだった。これらに対し, TECとCSを複合させて7日間培養したTEC/CS 7d群の破断強度は5.3±1.9 kPa, 接線係数は38.4±26.5 kPaだった。14日間培養したTEC/CS 14d群の破断強度は13.9±3.8 kPa, 接線係数は73.5±40.2 kPaとなりTEC/CS 7d群と比較して有意に高い値を示し, CS 28d群と同程度の値だった。28日間培養したTEC/CS 28d群の破断強度は15.5±3.9 kPa, 接線係数は93.9±52.7 kPaであり, CS 28d群に比べ高い傾向を示し, TEC/CS 7d群と比較して有意に高い値を示した。しかし, TEC 28d群の破断強度, 接線係数に比べると有意に低かった。

考 察

TEC/CS複合体を一週間培養したTEC/CS 7d群の破断強度, 接線係数はCS 28d群と比較して減少したが, さらに一週間培養したTEC/CS 14d群の破断強度, 接線係数は, TEC/CS 7d群と比較して有意に増加した。四週間培養を継続したTEC/CS 28d群では, さらに破断強度, 接線係数が増加した。組織観察結果から考察すると, 培養過程でMSCsがCS内部に侵入し, CSのコラーゲンを分解して新たな基質を生成したためと考えられる。この際に, 低分子化したコラーゲンペプチドやアスコルビン酸2リン酸などの効果によりMSCsが強固なコラーゲンを生成した可能性も考えられる^{8),9)}。本研究結果からTEC/CS複合体は豊富なコラーゲンを含有するとともに, 培養を継続することで組織の引張特性向上が可能であることが示された。TECを用いた軟骨修復では, 表層のコラーゲン密度が少ないため透水率が高い値となり,

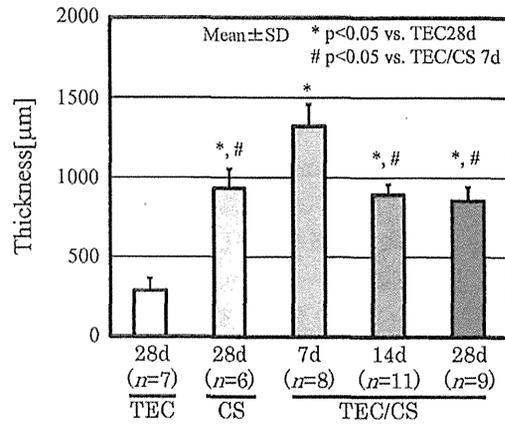


図4. Thickness of the TEC 28d, CS 28d, TEC/CS 7d, 14d, 28d groups.

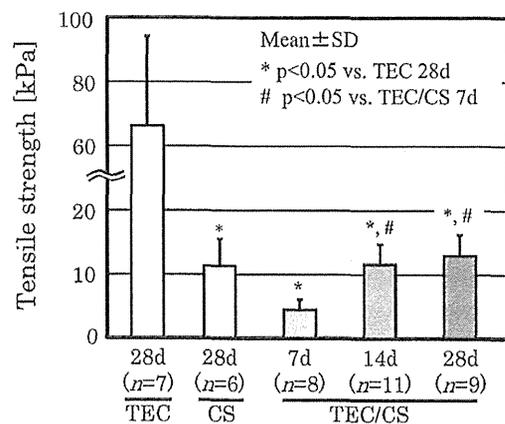


図5. Tensile strength of the TEC 28d, CS 28d, TEC/CS 7d, 14d, 28d groups.

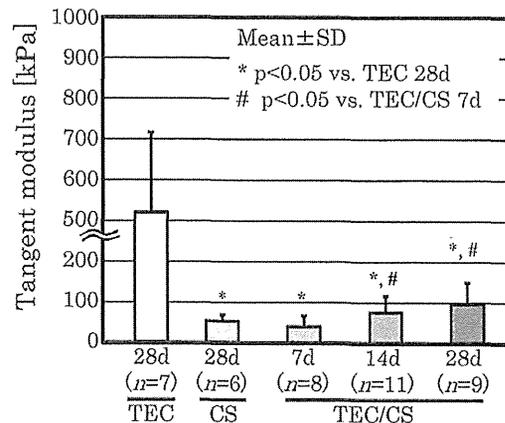


図6. Tangent modulus of the TEC 28d, CS 28d, TEC/CS 7d, 14d, 28d groups.

圧縮特性や摩擦特性が正常軟骨レベルまで回復しないという問題が指摘されている⁵⁾。本研究で開発したTECとCSの複合体により、この問題を解決できる可能性がある。

一方、CSを用いずに生成したTEC 28d群と比較して、TEC/CS 28d群の破断強度、接線係数は有意に低い値を示し、組織の強度がより重要になる腱、靭帯の修復に応用は困難であると考えられる。TEC/CS複合体の強度が低下した原因に、培地に浸漬したことによるCSの強度低下が考えられる。四週間培養したTEC/CS 28d群の組織観察ではCS上層部にのみMSCsが存在していた。CS内に均等にMSCsを浸潤させ、CSのコラーゲンの分解と細胞外基質の生成を促すことで組織の高強度化が可能であると考えられる。

結 言

CSを培養基板としてTECを作製することで、TEC/CS複合体を作製し、組織観察と引張試験を行った。その結果、7日間培養したTEC/CS複合体は28日間培地に浸漬したCSと比較して強度が低下したが、TEC/CS複合体を28日間培養することでより多くの細胞がCS内部に侵入し、強度が向上することがわかった。

<謝 辞>

この研究は、科研費基盤研究B (25282134)、首都大学東京全学傾斜研究費 (医工連携)、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (工学院大総研FMS) の助成を受けた。

文 献

- 1) Ando W, Tateishi K, et al.: Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials*: 28, 5462-5470, 2007.
- 2) Ando W, Nakamura N, et al.: In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells, biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Engineering*: 14, 2041-2049, 2008.
- 3) Eileen G., Kay C. Dee, et al.: Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*: 24, 3805-3813, 2003.
- 4) Huang D., Ehrlich HP., et al.: Mechanisms and dynamics of mechanical strengthening in ligament-equivalent fibroblast-populated collagen matrices. *Ann Biomed Eng*: 21, 289-305, 1993.
- 5) 今出久一郎, 藤江裕道, 他: 膝関節軟骨表層の透水率が摩擦特性に及ぼす影響. *臨床バイオメカニクス*: 34, 441-445, 2013.
- 6) 井村真知子, 藤江裕道, 他: 滑膜由来間質細胞から生成した組織再生材料 (TEC) の軟骨修復への応用. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*: 29, 135-140, 2008.
- 7) Karnovsky M. J.: A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol*: 27, 137A-138A, 1965.
- 8) Matsuda N., Takehana K., et al.: Effects of ingestion of collagen Fibrils and glycosaminoglycans in the Dermis. *J Nutr Sci Vitaminol*, 52, 211-215, 2006.
- 9) 永井清人, 藤江裕道, 他: 滑膜由来間質細胞から生成したスキャフォールドフリー三次元人工組織の力学特性. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*: 27, 89-93, 2006.
- 10) 齊藤佳, 藤江裕道, 他: 滑膜由来幹細胞自己生成組織の引張荷重下による強度向上. *臨床バイオメカニクス学会誌*: 30, 1-4, 2009.
- 11) 須玉裕貴, 藤江裕道, 他: マイクロパターン加工培養皿による幹細胞自己生成組織 (scSAT) の異方性付与. *臨床バイオメカニクス*: 31, 7-12, 2010.
- 12) 鈴木大輔, 藤宮峯子, 他: コラーゲンシートとコラーゲンペプチドを用いた膝蓋靭帯の再生. *日本臨床バイオメカニクス学会抄録集*: 39, 161, 2012.

ナノ周期構造上で作製した
幹細胞自己生成組織 (scSAT) の引張特性

首都大学東京大学院システムデザイン研究科

谷 優樹・藤江 裕道

東海大学工学部機械工学科

大家 溪

大阪大学整形外科

杉田 憲彦・中村 憲正

臨床バイオメカニクス, Vol. 35, 2014.

ナノ周期構造上で作製した幹細胞自己生成組織 (scSAT) の引張特性

谷 優樹^{*1} 大家 溪^{*2} 杉田 憲彦^{*3} 中村 憲正^{*3} 藤江 裕道^{*1}

Tensile property of stem cell-based self-assembled tissues
cultured on a nanoperiodic structured surface.

Yuki TANI, BS., Kei OYA, PhD., Norihiko SUGITA, MD., PhD.,
Norimasa NAKAMURA, MD., PhD., Hiromichi FUJIE, PhD.

Abstract

Stem cell-based self-assembled tissue (scSAT) biosynthesized from synovium-derived mesenchymal stem cells has great potential for the repair and regeneration of biological soft tissues. However, the mechanical properties of scSAT were insufficient for clinical applications. Moreover, the structural and mechanical properties of scSAT are isotropic, while those of ligaments and tendons are anisotropic. A candidate solution to the problem is to promote the generation of the extracellular matrix in scSAT using a special culture on a nano-structured surface. As described above, previous studies indicated that a material having a certain roughness promotes cell adhesiveness and that a material having a nanoperiodic structure enhances the anisotropic property of cells. Therefore, a nanoperiodic structure was processed on a titanium surface using a femtosecond laser system, and the mechanical strength of scSAT cultured on the processed surface was determined in the present study. The tensile strength was significantly higher in scSAT cultured on Nano-Ti than in that on Ti. Microscopic observation indicated that scSAT cultured on Nano-Ti had a nanoperiodic, anisotropic structure. In summary, the tensile strength of scSAT cultured on Ti having a nanoperiodic-structured surface was higher than that cultured on normal Ti.

Key words : Stem cell-based self-assembled tissue (scSAT), Tissue engineering, Tensile property, Anisotropic property.

※ 1 首都大学東京大学院システムデザイン研究科 〒191-0065 東京都日野市旭ヶ丘6-6

※ 2 東海大学工学部機械工学科 〒259-1292 神奈川県平塚市北金目4-1-1

※ 3 大阪大学整形外科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2

Corresponding Author : Hiromichi FUJIE, PhD. Faculty of System Design, Tokyo Metropolitan University.
6-6 Asahigaoka, Hino, Tokyo, 192-0065, Japan.
Tel & Fax : 042-585-8628 E-mail address : fujie@sd.tmu.ac.jp

緒 言

ヒト膝滑膜から採取した間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells : MSCs) に細胞外基質を自己生成させて作製される組織 (Stem cell-based self-assembled tissue : scSAT)¹⁾ が腱や靭帯の新たな再生医療材料として期待されている。しかし、現状の scSAT は腱や靭帯の修復のためには力学強度が不足している。この解決策として、MSCs による細胞外基質の生成を促進させて組織の強度を向上させることと、組織に腱や靭帯のような構造異方性を付与し、一方方向への強度を高めることの二つの方法が考えられる。この二つを同時に実現するためには、周期的な溝構造をもつ基板表面上で scSAT を作製することが有効である。これまでに、フェムト秒レーザーによりチタン表面に形成したナノ周期構造上で MSCs を培養することにより、細胞の接着特性が向上し、細胞配向を制御できることがわかっている⁶⁾。そこで本研究では、フェムト秒レーザーによりナノ周期構造を付与したチタン表面上で scSAT を作製し、組織の高強度化を図った。

実験方法

1. ナノ周期構造の形成

研磨紙320, 600, 800, 1000番の順で湿式研磨を施した直径19mm, 厚さ1.0mmのJIS2種の工業用純チタンを試料とした。基本波長780nmのフェムト秒レーザー装置 (IFRIT, サイバー

レーザー) を用いて、パルス時間幅190fs, レーザフルエンス $0.5\text{J}/\text{cm}^2$, 走査速度1200mm/minの条件で作製した (Nano-Ti)。試料表面を走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-6380LA, 日本電子) により観察し、画像解析ソフト (ImageJ, version 1.46, National Institutes of Health) を用いて、得られたSEM像からナノ周期構造のピッチを測定した。さらに、原子間力顕微鏡 (AFM), (VN-8000, キーエンス) を用いて表面形状を計測し、溝の深さと表面粗さ (R_a , R_v , R_z) を測定した。なお、溝のピッチは隣り合う山の頂点間の距離と定義した。

2. 試験片

ヒト膝関節滑膜より採取した幹細胞を含む滑膜由来細胞を、6回の継代培養の後、初期細胞密度 $4.0 \times 10^5 \text{cells}/\text{cm}^2$ で培地DMEM (FBS10%, 100U/ml Penicillin + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin) に播種した。細胞外基質生成を促進させるため、アスコルビン酸2リン酸を0.2mM添加し^{2), 5)}, 14, 28日間培養を行った。培養後に培養皿底面に生成した基質と細胞を剥離して1時間自己収縮 (静置培養) させることで、組織の厚さを増大させて scSAT を作製した (図1)。この時、培養面が平滑なポリスチレン製組織培養皿で作製した試験片をPS群、研磨のみを行ったTi上で作製した試験片をTi群、Nano-Ti上で作製した試験片をNano-Ti群とした。なお、本研究におけるヒト膝滑膜の採取および細胞培養は、大阪大学医学部および工学院大学の倫理審査委員会より承認を得ており、被験者の同意を得た上

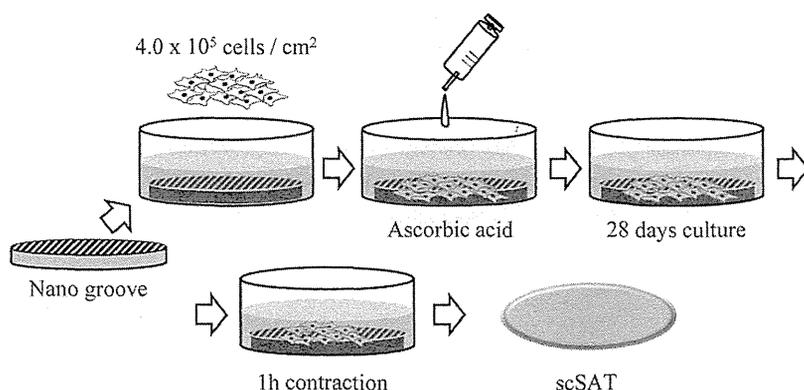


図1. Production procedure of scSAT.

で滑膜の提供を受けている。さらに、本研究はヘルシンキ宣言に則って遂行していることを付記する。

3. 組織観察

14日後の各試験片に対して4%パラホルムアルデヒド溶液により固定処理を行い、その後シリウスレッド溶液で組織のコラーゲン線維を赤色に染色し、組織の表面をデジタルマイクロスコープ (VHX-100, KEYENCE) を用いて観察した⁷⁾。培養14日後におけるPS群とNano-Ti群の組織観察を行った。

4. 厚さ測定

28日後の各試験片に対して、試験片をスライドガラスに広げてPBS(-)溶液を10 μ l添加し、その上にカバーガラスで挟んだ。そして、デジタルマイクロスコープ (VHX-100, KEYENCE) を用いて、スライドガラスとカバーガラス間距離を任意の5カ所測定した。測定した値の平均を厚さとし、厚さと引張試験機のチャック幅6 mmから断面積を求め、荷重と断面積より公称応力を求めた⁵⁾。

5. 引張試験

試験片の引張特性解析のため、齊藤らが作製した引張試験機⁵⁾を用いた (図2)。試験片は培養皿の溝方向と引張荷重を与える方向が同じになるように、リニアアクチュエータ (LAH-46-3002-F-PA, ハーモニックドライブシステムズ) 側と荷重検出側に接続したチャック部に挟み込み、幅が6 mmになるよう両側を切り揃えた。リニアアクチュエータを用いて、プレロードを2 mN与えた後に、引張速度0.05mm/sで試験片が破断するまで荷重を与えた。引張荷重

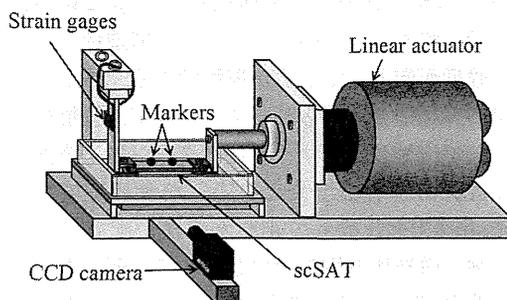


図2. Schematic image of tensile test system.

は2枚のひずみゲージ (KFG-02-120-C1-23, KYOWA) を貼った板バネ状の荷重センサで計測した。また、試験環境を生体に模擬するため、シリコンラバーヒータ (一般用SR, スリーハイ) と温度コントローラ (ON-DO2, ワンダーキット) を用いて、37°Cに保たれたPBS(-)溶液中で試験を行った。28日間培養したPS群、Ti群、およびNano-Ti群の溝方向に対する引張試験を行った。

6. 統計解析手法

nを測定回数として、全てのデータは平均 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) で表した。2群の場合は2標本t検定で評価した。有意水準はそれぞれ $p < 0.05$ とした。

結 果

1. ナノ周期構造の形成

図3にTiとNano-TiのSEM像を示す。Nano-Tiでは、フェムト秒レーザー処理により、ナノ周期構造が形成されていることが確認された。AFMにより表面形状を測定した結果、Nano-Tiのピッチは(540 \pm 54nm) (平均 \pm 標準偏差)、深さは(55.0 \pm 23nm)、粗さは、 R_a が27.0 \pm 4.0 nm, R_y が164 \pm 13nm, R_z が102 \pm 23nmであった。Tiの R_a , R_y , R_z はそれぞれ6.20 \pm 1.1nm, 49.0 \pm 10nm, 19.0 \pm 4.0nmであり、全てのパ

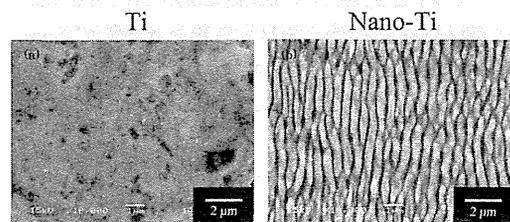


図3. Scanning electron microscope images of Ti (a) and Nano-Ti (b).

ラメータにおいてNano-Tiの粗さは4倍以上に増大した。

2. 組織観察結果

デジタルマイクロスコープによる組織観察結果をそれぞれ図4に示す。Nano-Ti群はPS群と比較して濃い染色部分が多く観察された。

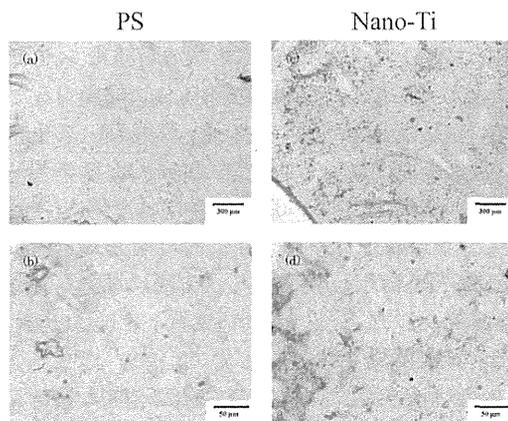


図4. Digital microscopic images of the PS (a) (b) and Nano-Ti (c) (d).

3. 厚さ測定結果

PS群の厚さは $212 \pm 2.0 \mu\text{m}$, Ti群は $173 \pm 34 \mu\text{m}$, Nano-Ti群は $206 \pm 51 \mu\text{m}$ となり, PS群およびNano-Ti群ともにTi群と比較して高い傾向を示したが, 両者の間に統計的な有意差はなかった. またPS群とNano-Ti群との間においても統計的な有意差はなかった.

4. 引張試験結果

引張試験より取得した引張強度を図5に示す. Ti群は $0.006 \pm 0.006 \text{MPa}$, Nano-Ti群は $0.045 \pm 0.011 \text{MPa}$, PS群は $0.060 \pm 0.034 \text{MPa}$ となった. Ti群と比較してPS群は有意 ($p = 0.009$) に高い値を示した. また, Ti群と比較してNano-

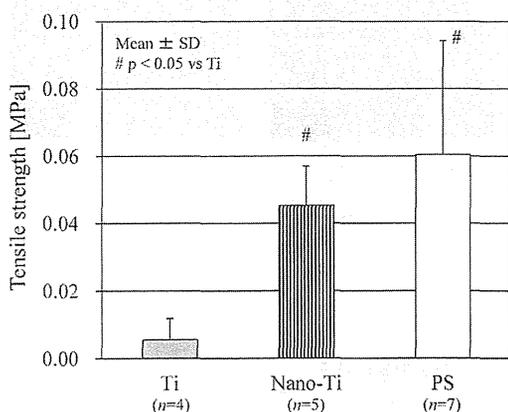


図5. Tensile strength of scSATS produced on Ti, Nano-Ti and PS.

Ti群は引張強度が約7倍に増大し, 両群に統計的な有意差 ($p = 0.03$) が見られた. 一方, Nano-Ti群とPS群の引張強度に有意差はなかった.

考 察

組織観察の結果, Nano-Ti群はPS群と比較してコラーゲン線維が濃く染まっていたことから, コラーゲンの産生が促進されていると考えられた. Dongwooらは, 粗さ0.645から13.4nmまでの凹凸構造を付与したチタン表面上で骨髄由来MSCsを培養した. 結果, 細胞から産生されるコラーゲン基質の産生量は最も粗い13.4nmの時に高い値を示したことを報告している³⁾. このことから, 細胞から産生されるコラーゲン基質量はチタン表面の粗さに依存し, 粗い表面であるほど産生されると結論付けた. 本研究では, フェムト秒レーザーにより加工したチタン表面は未処理のチタンと比較して粗い表面となった. よって, scSATから産生される細胞外基質量は, 培養過程におけるナノ周期構造の影響を受け, 粗い表面であるほどコラーゲン産生量が増大していることが考えられる.

引張試験において, Ti群がPS群に劣る結果が得られた. Tiは, 生体親和性に優れた材料であるが, PSに比べて何らかの悪影響をscSAT生成に及ぼしている可能性がある. チタン表面に構成するナノ周期構造をPDMS (ジメチルポリシロキサン) に転写し, それを培養皿として用いることによりこの問題を解決する必要がある. しかし, Nano-Ti群は材質的には同じTi群と比較して引張強度が有意に高い値を示しており, このことからナノ構造付与により強度が向上したことが理解できる. 須玉らは半導体製造で用いられるマイクロ加工技術を導入して作製されたマイクロパターン加工培養皿でscSATを作製したところ, 培養皿で培養したscSATと比較して細胞と組織が配向してより強い構造異方性を示すと同時に, 配向方向の引張強度が有意に増大することを示した^{4),9)}. 本研究の結果より, マイクロレベルだけでなく,

ナノレベルの溝構造上でも力学特性に優れた scSAT が生成できることがわかった。ただし、マイクロレベルとナノレベルの溝構造では幹細胞の接触様式や、接触による細胞の反応、動態が異なると予想される。この点について今後検討していかなければならない。

結 言

フェムト秒レーザーによりチタン表面に形成したナノ周期構造上で培養を行うことにより、幹細胞自己生成組織 (scSAT) を生成した。その結果、未処理のチタン上で作製した scSAT と比較して、引張強度が増大し、高強度の組織が作製できることが明らかになった。

<謝 辞>

本研究を行うにあたり、科学研究費助成事業 (基盤研究 B, 25282134)、首都大学東京全学傾斜研究費 (医工連携)、および私立大学戦略的研究拠点形成支援事業 (FMS, 工学院大学) の支援を受けた。謝意を表す。

文 献

- 1) Ando W., Tateishi K., et al. : Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials* : 28, 5462-5470, 2007.
- 2) Ando W., Nakamura N., et al. : In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells, biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Engineering* : 14, 2041-2049, 2008.
- 3) Dongwoo K., Jin-Woo P., et al. : Role of subnano-, nano- and submicron-surface features on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials* : 33, 5997-6007, 2012.
- 4) 熊谷賢一, 藤江裕道 他 : 滑膜由来スキャフォールドフリー三次元人工組織の細胞外基質生成能におよぼす力学刺激の影響, 日本臨床バイオメカニクス学会誌 : 28, 47-51, 2007.
- 5) 永井清人, 藤江裕道 他 : 滑膜由来間質細胞から生成したスキャフォールドフリー三次元人工組織の力学特性, 日本臨床バイオメカニクス学会誌 : 27, 89-93, 2006.
- 6) Oya K., Aoki S., et al. : Morphological Observations of Mesenchymal Stem Cell Adhesion to a Nanoperiodic-Structured Titanium Surface Patterned Using Femtosecond Laser Processing : *Jpn. J. Appl. Phys.* 51, 125203, 2012.
- 7) Sabine F., Xin J., et al. : Dynamic processes involved in the pre-vascularization of silk fibroin constructs for bone regeneration using out-growth endothelial cells. *Biomaterials* : 30 1329-1338, 2009.
- 8) 齊藤佳, 藤江裕道 他 : 滑膜由来幹細胞自己生成組織の引張荷重下による強度向上, 臨床バイオメカニクス : 30, 1-4, 2009.
- 9) 須玉裕貴, 藤江裕道 他 : マイクロパターン加工培養皿による幹細胞自己生成組織 (scSAT) の異方性付与, 臨床バイオメカニクス : 31, 7-12, 2010.

