

The behavior of ligament cells cultured on elastin and collagen scaffolds

三重大学大学院工学研究科生体材料化学研究室

水谷 直紀, 影山 聡志, 山田 将義, 長谷川 正裕, 宮本 啓一, 堀内 孝
Naoki MIZUTANI, Satoshi KAGEYAMA, Masayoshi YAMADA, Masahiro HASEGAWA,
Keiichi MIYAMOTO, Takashi HORIUCHI



1. 背景・目的

断裂損傷を受けた膝前十字靭帯 (anterior cruciate ligament: ACL) は自然治癒しないため, 組織工学的手法による人工靭帯の開発が求められている。その際に使用する細胞として, ACL由来のACL細胞が候補となるが, 組織損傷の程度によっては細胞の採取が出来ない可能性がある。そのため, 他の靭帯組織のうち比較的採取が容易な歯周靭帯 (periodontal ligament: PDL) 由来のPDL細胞 (periodontal ligament fibroblast: PDLF) に着目した。しかしながら, これまでにACL細胞とPDL細胞の機能を比較した研究は少なく, 両細胞の詳細な違いは分かっていない。そこで本研究では新たな靭帯組織再生法の試みとして, ACL細胞とPDL細胞の靭帯関連遺伝子の発現を比較した。さらに, 靭帯を構成する細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) であるエラスチンおよびコラーゲンの高配向性ファイバーを足場基材として, ECMが靭帯細胞の表現型に及ぼす影響を検証した。

2. 方法

ACL細胞とPDL細胞について靭帯関連遺伝子 (I型コラーゲン, III型コラーゲン, tenomodulin (TeM)) のmRNA発現およびアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase: ALP) 活性を定量した。また, 豚大動脈より

本受賞レポートの対象論文はJ Artif Organ誌に掲載されています。Mizutani N, Kageyama S, Yamada M, et al. J Artif Organs 17: 50-9, 2014

■ 著者連絡先

三重大学大学院工学研究科生体材料化学研究室
(〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577)
E-mail. 410D001@m.mie-u.ac.jp

抽出・水溶化したアイソタイプ型エラスチンA~E¹⁾のうちエラスチンAと, I型アテロコラーゲンをを用いて, エレクトロスピンニング法により高弾性および高配向性を有するECMファイバーを作製した。作製したECMファイバーを足場としてACL細胞とPDL細胞を培養し, 表現型を確認するために靭帯関連遺伝子のmRNA発現およびALP活性を定量した。

3. 結果・考察

継代数4~6のACL細胞とPDL細胞の靭帯関連遺伝子のmRNA発現を定量した結果, 両者の遺伝子発現量に有意な差は見られず, 互いに近い性質をもつことが確認された (図1a~c)。一方で, PDL細胞はACL細胞よりも約2倍高いALP活性を示した (図1d)。PDL細胞は皮膚や歯肉に存在する他の線維芽細胞と比較し, コラーゲン産生能やALP活性が高く, 石灰化組織形成能を有するなど骨芽細胞と近い性質をもつことが知られている。このようなPDL細胞の特徴は, 靭帯再生時に靭帯と骨との結合部を再建するために有用であると考えられる。

ECMファイバー足場上で培養したACL細胞のTeM mRNA発現を定量した結果, エラスチンA足場上の細胞はコラーゲン足場上のものよりTeM mRNAの発現量が約70%低かった。一方, ALP活性についてはエラスチンA足場上の細胞はコラーゲン足場上のものよりも約1.8倍高い活性を示した (図2c, d)。PDL細胞についても同様の傾向が観察された (図2g, h)。

TeMは靭帯や腱などの密性結合組織に特異的に発現するとされ, 靭帯細胞マーカーとして知られている。ALPは骨形成の指標であり, 骨芽細胞マーカーとされている。また, ACL細胞とPDL細胞はともに骨芽細胞への分化能を有しており, 分化の過程でALPを発現することが知られてい

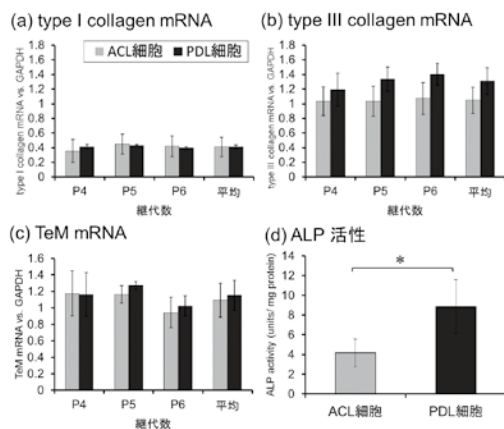


図1 ACL細胞とPDL細胞の靱帯関連遺伝子発現 (a~c) およびALP活性 (d)

る。本研究で、エラスチンA足場上の細胞はTeM発現が低く、ALP活性が高かったことから、靱帯細胞が骨芽細胞様の細胞へと分化した可能性が示唆された。そしてコラーゲン足場上の細胞はTeM発現が維持されたことから、靱帯細胞として表現型を維持しているものと考えられる。

エラスチンA足場による骨芽細胞分化誘導効果、コラーゲン足場による靱帯細胞の表現型維持効果はACL細胞とPDL細胞のどちらにおいても確認された。靱帯は骨同士を結合する組織であるため、靱帯再生時には靱帯部分に加えて靱帯と骨との結合部を再現する必要があるが、今回作製したECMファイバー足場は、靱帯組織がもつ複雑な階層構造を再現するための再生足場基材として有用であることが期待される

4. 本研究の独創性

本研究では異なる組織由来の靱帯細胞についてその機能を比較し、組織工学的な靱帯再建時に使用する細胞の検討を行った。また本研究では、靱帯再建足場として報告例の少ないエラスチンに着目しており、エラスチンAが靱帯細胞の表現型に与える影響を検証した点が独創的である。本研究のECMファイバー足場の働きによって、細胞のタンパク質産生、分化誘導を適切に促進することで、組織再生を促すことが期待できると考えている。

5. まとめ

ACL細胞とPDL細胞は互いに近い機能を有していることが明らかとなり、組織工学的手法によるACL再生時の細

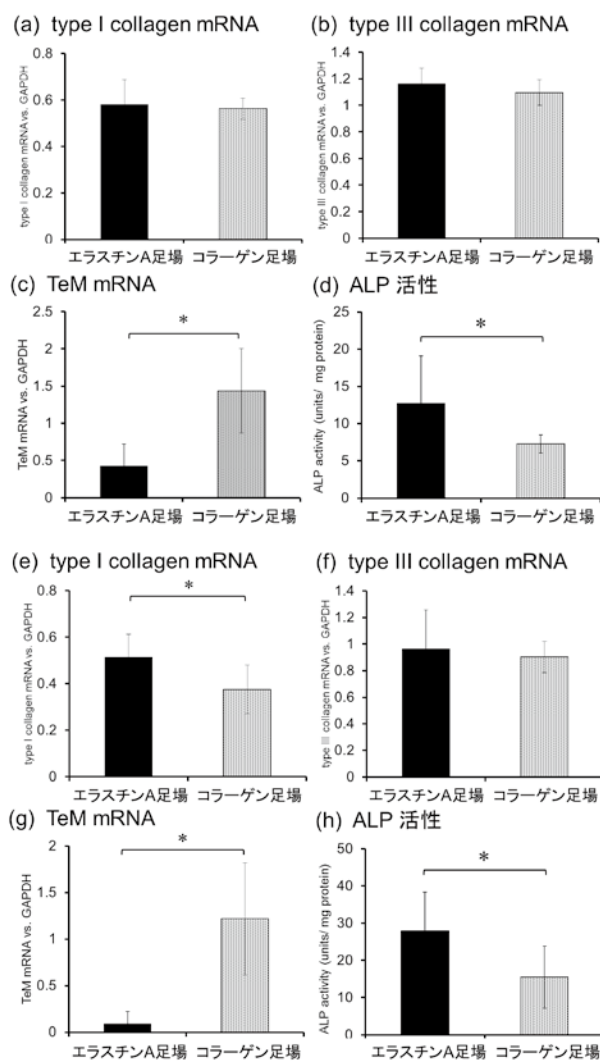


図2 ECMファイバー足場上のACL細胞 (a~d) とPDL細胞 (e~h) の細胞応答

胞として、ACL細胞だけでなく、PDL細胞についてもその有用性が期待される結果となった。また、ECMの効果として、エラスチンAによる骨分化誘導の調節機能、コラーゲンによる靱帯細胞の表現型維持機能が明らかとなった。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

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* **45**: 33-41, 2009