

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

研究テーマ

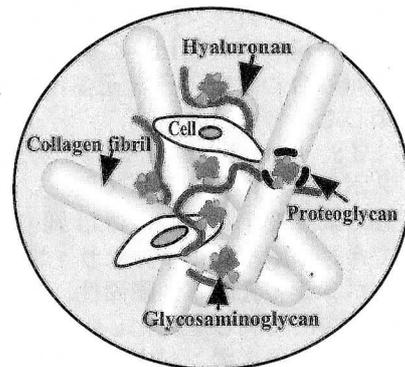
15-2-5：天然多糖類の高機能化と医用材料への応用

ABSTRACT

Cells in vivo are surrounded by extracellular matrix (ECM) composed of collagen, glycosaminoglycan (GAG), etc. It is well known that GAG regulates the growth, differentiation, morphology, and functional expression of cells. We have already reported that polysaccharide type polyelectrolyte complex could control osteoblast functions. In this study, we investigated the cell functions of osteoblasts and cartilage cells cultured on polysaccharides immobilized surfaces and in three-dimensional cell culture matrix (polysaccharide and protein hybrid sponges). These cells functions were regulated by polysaccharides scaffolds.

研究目的

近年、自己の細胞の増殖、分化を制御し、正常組織や臓器を再生させる、「再生医療」が注目されている。しかしながら、細胞だけでは再生医療の実現は難しく、再生誘導のために細胞の増殖、分化に適した足場(scaffold)を構築することが必須である。この足場の開発のために、生体組織工学(ティッシュエンジニアリング)の技術が発展してきた。生体内において細胞組織は細胞外マトリックス(ECM)というタンパク質や多糖類の複合体に囲まれて存在している。ECMは巨大なハイドロゲルであり、細胞の増殖、分化、機能発現などを制御している。また、細胞膜表面や体液中には多くの多糖類が存在し、分子認識や反応の制御などに重要な役割を果たしている。本研究では、このECMの構造を模倣することにより、生体外で細胞機能を維持、発現させる材料を開発することを目的とし、ECMの重要な成分の一つである多糖類に注目し、細胞培養担体としての可能性を検討した。



5年間の研究内容と成果

1) 骨芽細胞であるMC3T3-E1は一般の細胞培養用ディッシュ(TCD)上では伸展し増殖する。多糖類をアジド基を利用した光反応により固定化したディッシュ上でMC3T3-E1を培養すると、培養日数の経過とともに硫酸化ヒアルロン酸(SHya)上ではTCDとほぼ同様に伸展、増殖したが、ヒアルロン酸(Hya)、カルボキシメチルキチン(CMCHN)上の細胞は徐々に集まり凝集塊を形成し増殖が抑制される傾向が示された。

骨芽細胞の代表的な機能であるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性は、TCD、およびSHya上で培養されたMC3T3-E1においては培養日数の経過とともに緩やかに増加した。これに比べ、細胞増殖を抑制されていたHya、CMCHNは他の多糖類固定化ディッシュに比べてALP活性が早期に高くなる傾向が観察された。また、石灰化部位を染色するAlizarin red S染色により、Hya固定化ディッシュにおいて著しいカルシウムの沈着が確認された(Fig. 1)。さらにRT-PCR法の結果、凝集塊を形成したHya、CMCHN上ではI型コラーゲン、オステオポンチン及びオステオカルシンのmRNAに強い発現が認められた。

これらのことより、カルボキシル基を有する多糖類固定化基材は骨芽細胞の分化を著しく促進させ、

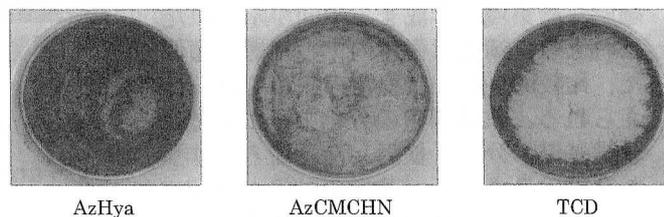


Fig.1 Alizarin red S staining of MC3T3-E1 cultured on polysaccharide immobilized dishes for 14 days.

骨再生を促進させる材料であることが示された。

2) 軟骨細胞に分化する能力を有する ATDC5 細胞は、TCD 上では接着、伸展して増殖し、コンフルエントになると分化機能が亢進されて軟骨基質の産生が促進される。ATDC5 を多糖類固定化基材上で培養すると、培養日数の経過とともにアルギン酸 (Alg)、カルボキシメチルセルロース (CMC_{el})、SHya 上の細胞はコントロールである TCD と同様にシート状に伸展、増殖したのに対し、CMCHN、Hya 上では、細胞凝集塊を形成した (Fig. 2)。また、凝集塊を形成する CMCHN、Hya 上では他の dish に比べ増殖が抑制された。軟骨基質を染色するアルシアンブルー染色を行ったところ、細胞が伸展している dish 上では全体的に薄く染色されたのに対し、CMCHN、Hya 上では凝集塊の中心が濃く染色され、軟骨基質が盛んに生産されていることが示された。また、RT-PCR 法の結果より CMCHN、Hya 上では、軟骨分化のマーカである II 型コラーゲンとアグリカンの mRNA の早期発現が観察され、遺伝子レベルでの軟骨基質の早期産生が確認された。このように ATDC5 細胞に凝集塊を形成させる多糖類固定化基材は、早期に軟骨細胞への分化を誘導させることのできる優れた基材であることが示された。

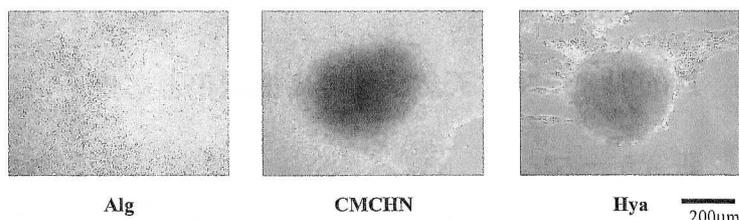


Fig.2 Morphology of ATDC5 cells cultured on polysaccharide immobilized dishes for 14days.

3) *in vitro* において機能性に優れた培養基材を *in vivo* で用いるためには 3 次元的な構造を持った足場材料 (scaffold) に加工する必要がある。そこで、Hya、キトサン (CS)、シルクフィブロイン (SF) を組み合わせた、三次元多孔性複合型バイオマテリアルを作製し、軟骨再生基材としての有用性を評価した。

CS、Hya、SF を組み合わせた溶液を凍結乾燥した後、水溶性カルボジイミドで架橋することによりスポンジを作製した。スポンジの細孔は組成により変化したが、概ね 70-150 μm 程度であり細胞培養に十分なサイズであった。スポンジの孔隙率、膨潤性、吸水率は細孔サイズに関連して変化した。Fig. 3 に、CS と SF 混合スポンジ中で、培養した ATDC5 細胞の SEM 写真を示した。ATDC5 細胞は、混合スポンジ中で培養時間の経過とともに増殖した。スポンジの組成にかかわらず、培養期間が三週間に達しても、細胞培養用ディッシュ (二次元培養) の様に伸展せず、ラウンド形状で接着、増殖していた。特に、多糖類を含有するスポンジ中においては、細胞が凝集塊を形成する傾向が示された。これより、細胞は生体内での状態に類似した、比較的良好な状態で存在していると考えられる。軟骨細胞の分化マーカーである軟骨基質の分泌を検討したところ、作製した全てのスポンジで基質の分泌が確認された。混合スポンジにおいては、CS 含量また、Hya 含量の多いスポンジほど、軟骨基質の分泌量が多くなり、分化を促進するすぐれた基材であることが示された。

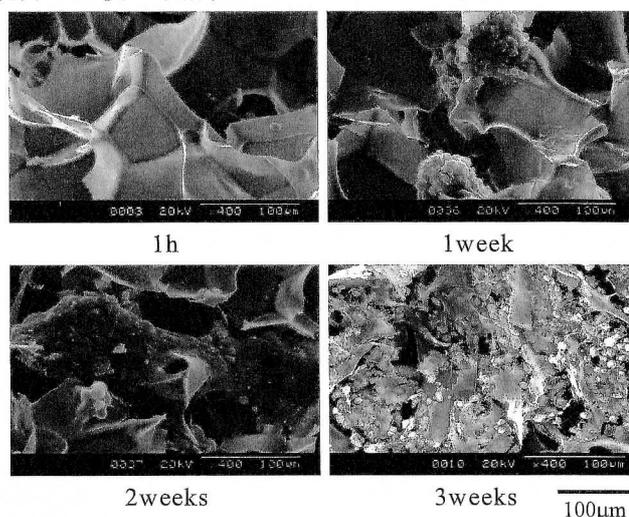


Fig.3 SEM images of ATDC5 cells cultured in CS and SF hybrid sponges.

このように、天然多糖類およびその化学修飾体は、構造を変化させることにより、骨芽細胞や軟骨細胞の機能を制御できることが明らかとなった。また、複数の多糖類、タンパク質などと複合化させることにより、3 次元的な scaffold を形成させることが可能であり、再生医療分野への応用性が期待できる。