

B218

移植用軟骨組織形成を目指した scaffold-free 細胞組織体形成法の開発

(九大工)○(学)朝倉杏奈, (学)城崎格, 入江裕, (正)水本博, (正)藤野茂, (正)梶原稔尚*

【緒言】

近年、変形性関節症や関節リウマチ等の関節疾患治療法として、生体由来細胞の組織化による軟骨様組織を利用した再生医療が期待されている。生体内の軟骨組織はわずかな軟骨細胞とその細胞より分泌された豊富な細胞外マトリックスから構成されており、軟骨様組織の形成には培養軟骨細胞による豊富な細胞外マトリックスの分泌が重要となる。

一方、こうした組織の作製において培養担体としてコラーゲン等の動物由来の生体材料を用いた場合、異種感染の可能性が懸念される。我々はこれらの問題を解決する手段として、細胞同士の凝集によって形成される組織体（オルガノイド）培養法に着目し、移植時に培養担体を使用しない安全性の高い scaffold-free 軟骨組織体の形成に取り組んでいる。本研究では軟骨細胞によるシート状オルガノイド（オルガノイドシート）の形成法の確立を目指して検討を行った。

【実験方法】

物質透過性の良い二枚の多孔平膜とスペーサーを貼り合わせ、内部でオルガノイド形成誘導が可能な培養構造を作製した（Fig. 1）。ウシ足関節から採取した軟骨細胞を以下に示す2つの方法を用いて培養装置内へ高密度に遠心充填し、オルガノイドシートの形成誘導を行った（Fig. 2）。

- ①分散状態の細胞（シングルセル）を直接装置内に充填
- ②シングルセルによりあらかじめスフェロイドを形成後、そのスフェロイドを装置内に充填

形成されたオルガノイドの評価として組織学的評価（コラーゲン、プロテオグリカン染色）、Real-time PCRによる遺伝子学的評価（アグリカン、Ⅱ型コラーゲン）を行った。

【結果及び考察】

シングルセル充填法で形成されたオルガノイドは培養経過とともに細胞が細胞外マトリックスに包埋された細胞密度の疎な形態を示し、生体軟骨組織に類似した構造を示した。また、スフェロイド充填法では培養経過とともに充填したスフェロイド同士の融合が観察された。どちらの方法においてもスペーサー厚みを変えることで形状制御されたオルガノイドシートの形成が可能であった。また組織染色の結果、軟骨特有のマトリックスであるコラーゲン、プロテオグリカンの分泌・蓄積が確認された。さらに遺伝子発現解析の結果、シングルセル充填法を用いた場合のⅡ型コラーゲンの遺伝子発現量は培養 14 日目まで単離直後に近い値を

示し、アグリカンにおいては減少を抑制出来た。これに対し、スフェロイド充填法を用いた場合のⅡ型コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現量は培養経過に伴い減少したが、Ⅰ型コラーゲンの発現量増加を抑制出来ることが示された。

【結言】

本培養法により形成されたシングルセル充填オルガノイドは2週間の培養の結果、組織の体積に変化はないが、内部の細胞密度が疎となり、生体軟骨類似の組織を形成可能であった。これに対し、スフェロイド充填オルガノイドにおいては充填させるスフェロイドの形成条件によっては径の肥大化が生じ、結果として同体積のオルガノイドシートをより少量の細胞から構築出来る可能性が示された。以上から、組織体積に変化がないシングルセル充填オルガノイドと比べ、自発的に細胞外マトリックスと細胞が増殖肥大化したスフェロイドを充填させたスフェロイド充填オルガノイドは、より生体軟骨に類似した組織を作製出来る可能性があり、利用細胞数の低減にも有効な手段である。そこで現在軟骨細胞がスフェロイドを形成する最適条件の検討を行うとともに、手法の違いによる形成されたオルガノイドシートの特性比較について検討を進めている。

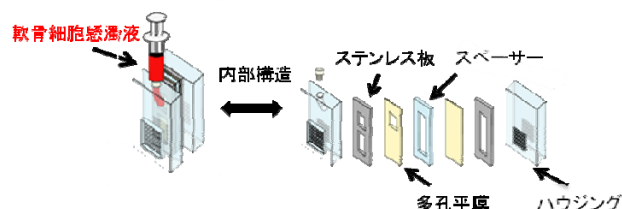


Fig.1 培養装置

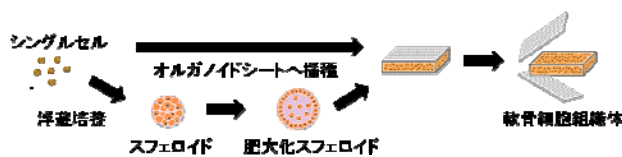


Fig.2 2つのオルガノイドシート形成法

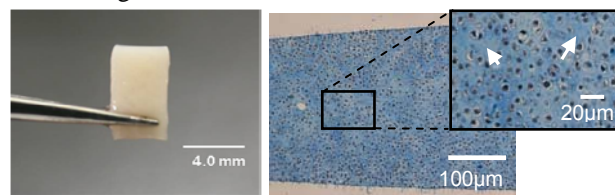


Fig.3 軟骨組織体（左：マッソントリクローム染色）

TEL:092-802-2746 FAX:092-802-2796

E-mail:kajiwara@chem-eng.kyushu-u.ac.jp