

S19005

3次元骨・軟骨組織の構築と赤外分光を用いた基質の解析

Construction of three-dimensional cartilage tissue and analysis for infrared spectroscopy

足立 哲也^{a,b}, 宮本 奈生^a, 山本 俊郎^a, 松田 修^b, Giuseppe Pezzotti^{b,c}, 金村 成智^a
Tetsuya Adachi^{a,b}, Nao Miyamoto^a, Toshiro Yamamoto^a, Osam Mazda^b, Giuseppe Pezzotti^{b,c},
Narisato Kanamura^a

^a 京都府立医科大学医学研究科歯科口腔科学, ^b 京都府立医科大学医学研究科免疫学,
^c 京都工芸繊維大学セラミック物理学研究室

^a Dental Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, ^b Immunology, Kyoto Prefectural University of Medicine, ^c Kyoto Institute of Technology, Ceramic Physics Laboratory

e-mail: t-adachi@koto.kpu-m.ac.jp

本研究は、新規足場材料”多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル”上で間葉系幹細胞を3次元培養することで軟骨組織を構築し、軟骨基質の質を分光学的解析で評価する。最終的には、ハイブリッドゲルにおける軟骨基質の成熟度（プロテオグリカンやコラーゲンの架橋の分布や局在）を赤外分光で明らかにし、良質の再生軟骨組織を軟骨疾患モデルに移植することで臨床応用への展開を目指す。

In this study, cartilage tissue is constructed by three-dimensional culture on a new scaffold "Nanogel-cross-linked porous (Nano CliP) gel", and the quality of cartilage matrix is evaluated by spectroscopic analysis. Finally, the maturity of cartilage matrix (distribution and localization of proteoglycan and collagen cross-links) in the hybrid gel is revealed by infrared spectroscopy, and high quality regenerated cartilage tissue is transplanted to a cartilage disease model for clinical application.

Keywords: 多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル・プロテオグリカン・コラーゲン

背景と研究目的

骨や軟骨の疾患に対して、iPS細胞・ES細胞・間葉系幹細胞と足場材料を組織工学的に組み合わせることで、生体外で構築したオルガノイドを患者に移植する再生療法の研究が加速している。細胞の分化は足場材料の種類（ポリマー・セラミックス・コラーゲン・金属等）や性状（硬さ・凹凸）によって制御されるため、適切な足場材料を使用することが重要である。骨はそのハイドロキシアパタイト（HAP）の配向によって「骨質」が決まるため、再生治療用の培養骨組織においてHAPの結晶構造や骨基質タンパク質成熟度を解析することが極めて重要である。良質な再生骨組織（剛性と弾性を兼ねそろえた）を移植することで、高品質の骨再生療法を提供することが可能になる。また軟骨組織においては、高い品質の再生軟骨（II型コラーゲンとプロテオグリカンを多く含む、しなやかな軟骨）を提供しなければならない。しかしながら、これまでの解析方法は骨や軟骨関連の遺伝子やタンパク質を調べる方法がほとんどで、骨・軟骨の基質の配向性や結晶構造、コラーゲンの成熟度を調べる方法はほとんどなかった。我々は、分子レベルで物質の種類や状態（結晶性・架橋）を解析することができる赤外分光法に注目した。赤外分光法は蛍光プローブや抗体を使わずに、骨基質や軟骨基質の質を測定することが可能である。本研究は、3次元培養で構築した骨・軟骨オルガノイ

ドの骨質(ハイドロキシアパタイト、I型コラーゲン)や軟骨基質(II型コラーゲン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン)の質を赤外分光で評価し、骨・軟骨再生を制御する足場材料の最適化を行う。

実験

各種培養基板上(ポリマー・セラミックス・コラーゲン・金属等)で骨芽細胞または軟骨細胞(マウス・ヒト由来)を播種し、骨誘導条件または軟骨誘導条件で3次元培養を行った。7日後、3次元培養組織の組織切片を作成し、石灰化基質(主にハイドロキシアパタイトとI型コラーゲン)や軟骨基質(II型コラーゲンとプロテオグリカン)の構造をBL-15赤外分光で解析し、軟骨基質の成熟度と足場により制御されるかを比較した。

- 1) ヒト間葉系幹細胞を基本培地(10%ウシ血清含有DMEM)に懸濁し(1×10^5 cells/ml)、多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル上に播種。
- 2) 24時間後、軟骨誘導培地に交換し、14日間培養。
- 3) 培養後、PBSとミリQ水で洗浄。パラフィン包埋後、薄切切片(厚さ約 $10 \mu\text{m}$)を作成した。
- 4) 薄切切片をフッ化バリウム基板にマウントし、BL-15赤外顕微分光で測定。赤外顕微鏡の測定モードは透過型で、アパーチャサイズは $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ であった。

結果、および、考察：

Fig. 1 に多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル上に沈着した軟骨基質の Synchrotron Radiation (SR)-FTIR 測定の結果を示す。Fig. 1(a)は、測定された IR スペクトルの一例で、多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル上の軟骨基質であるプロテオグリカン($985\text{-}1140 \text{ cm}^{-1}$)とコラーゲン($1590\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}$)が観察された。そこで、この2種類の吸収帯についてマッピングしたところ、プロテオグリカンとコラーゲンの局在はほぼ一致していた(Fig. 1(b))。また、免疫染色にて、アグリカン(プロテオグリカン)やII型コラーゲンの検出を試みたが、検出できなかった(データ未発表)。SR-FTIRでの軟骨基質の検出は、抗体を用いた免疫染色より早い段階で軟骨基質の検出が可能であることが示唆された。今後は、ラマン分光法による測定結果と比較するため、赤外顕微鏡測定においては空間分解能を高めた測定を行う予定である。

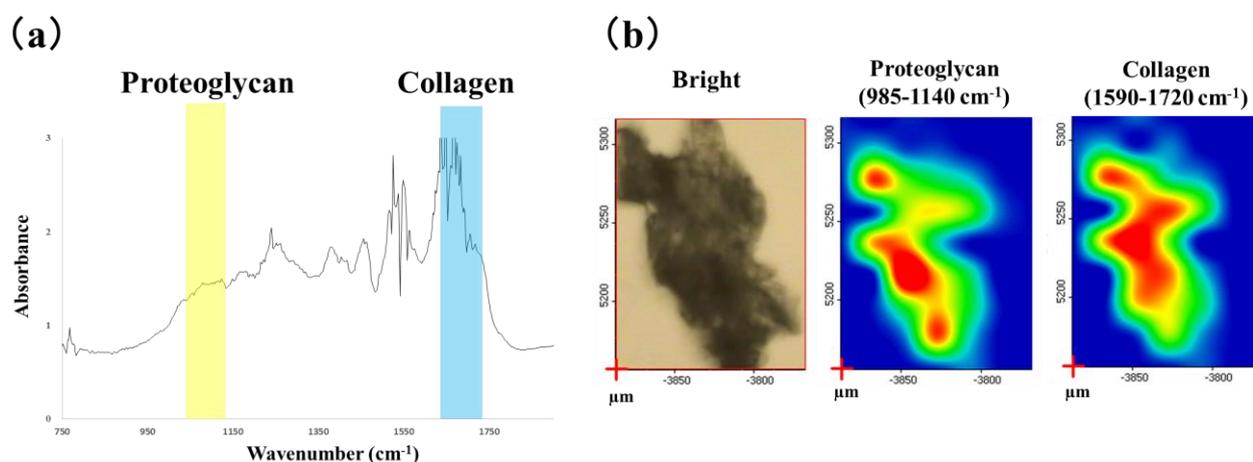


Fig. 1 (a) An SR-FTIR spectrum and (b) SR-FTIR images of chondrocytes.

参考文献

- [1] T. Adachi et al., Mater. Sci. Eng. C, **99** (2019) 1325-1340.
- [2] G. Pezzotti et al., Applied Materials Today, **9** (2017) 82-95.
- [3] G. Pezzotti et al., Scientific Reports, **6** (2016) 31717.

(キーワード： 分光学・プロテオグリカン・2型コラーゲン・軟骨)

研究成果公開方法／産業への応用・展開について

- ・本研究成果を発信することは、主にヘルスサイエンス関連の京都府内の中小企業との新たな連携を推進し、地元産業の発展につながる。