

マウス ES 細胞の軟骨細胞分化に生化学的因子と力学的因子がおよぼす影響

Effect of Biochemical and Mechanical Factors on the Chondrocyte Differentiation of the Mouse Embryonic Stem Cell

1K06A217

指導教員 主査 福林 徹先生

富士 晴華

副査 赤間 高雄先生

【緒言】

超高齢社会を迎えた日本において、関節軟骨の老化や磨耗によって骨が変形していく進行性の変性疾患である変形性関節症の患者は数千万人おり、中高年の日常生活の質を下げる大きな社会問題となっている。また、成長期のスポーツ選手によくみられる離断性骨軟骨炎など、スポーツ選手にとって軟骨疾患は競技生命を左右しかねない傷害の1つである。軟骨組織は血管を欠くため自己再生能力が非常に低く、また現在行われている治療法はどれも欠点がある。このため、どの軟骨疾患にも対応できる普遍的な治療法として、組織工学技術を用いた再生軟骨移植治療が期待されている。そこで本研究では再生軟骨組織を作る条件最適化に向けての基礎研究として、生化学的誘導因子と力学的誘導因子が ES 細胞の軟骨細胞分化におよぼす影響を検討することを目的とした。

【方法】

マウス由来胚性幹細胞株として樹立された細胞株 CCE を用い、 1×10^6 cell ずつ旋回培養をして凝集塊を作成した後、生化学的因子として FBS 濃度の異なる培養液 (1%, 5%, 10%, 15%, 20%) で培養する実験 () と、力学的因子として異なる大きさの静水圧 (20 MPa, 5 MPa, unload) を 1 時間負荷した後に FBS 濃度の異なる培養液 (5%, 15%) で培養する実験 () を行った。そして旋回培養 10 日後に細胞を回収して RNA を抽出し、RT-PCR により軟骨特異的転写因子 Sox9 および

軟骨特異的コラーゲンの Col2a1 遺伝子発現を解析した。

【結果】

() Sox9 の mRNA 発現量は 5 条件のいずれについても大きな違いはみられなかった。一方、Col2a1 の mRNA 発現量は FBS 1% が最も高く、濃度が薄いほど発現量が多い傾向がみられた。しかし、1% FBS 濃度の培養液で培養した細胞から抽出できた RNA 量は他の 4 条件に比べて半分以下であった。

() Sox9 の mRNA 発現量は 6 条件のいずれについても大きな違いはみられなかった。一方、Col2a1 の mRNA 発現量は静水圧の大きさに関わらず、15% FBS 濃度より 5% FBS 濃度の培養液で培養した方がより軟骨細胞様に分化する傾向が認められた。また、5% FBS 濃度で培養する場合、20 MPa より 5 MPa の方がより軟骨細胞様に分化する傾向が認められた。

【考察】

低 FBS 濃度の培養液での培養により軟骨細胞様に分化する傾向にあることが示されたが、1% FBS 濃度ではおそらく栄養不足により死滅する細胞が非常に多いため、細胞が大量に死滅しない 5% FBS 濃度の培養液が、ES 細胞を軟骨細胞へ分化させるための適切な条件であると考えられる。一方、静水圧負荷実験で静水圧の大きさが軟骨分化にあまり影響を及ぼさなかった理由として、本研究では静的な静水圧負荷しか行わ

なかったことが挙げられる。現在までに体性幹細胞などに対して行われている実験では、動的な静水圧が静的な静水圧負荷よりも軟骨細胞へ分化しやすいという結果も報告されていることから、ES 細胞に対しても動的な静水圧を負荷することで軟骨細胞へ分化を誘導できる可能性もある。

【結論】

本実験で検討した FBS 濃度と静水圧負荷条件では、ES 細胞を顕著に軟骨細胞に分化させることはできなかったが、生化学的誘導因子(低 FBS 濃度での培養)と力学的誘導因子(生体内で日常的に受け続けている程度の 5 MPa)を組み合わせることで、どちらかの誘導因子だけで誘導するよりも分化を早めることができる可能性が示唆された。