

微小重力バイオリアクターで大型の3次元軟骨組織を構築

ナノテクノロジー研究部門 ナノバイオ・メディカルテクノロジーグループ

植村 壽公

新しい軟骨再生技術

変形性関節症などの関節疾患(図1)の治療法として、軟骨再生技術の確立が急がれています。しかし、生体外での細胞培養の際に生じる障害によって培養組織が壊死してしまうため、広範囲の軟骨欠損に応用できる大型の軟骨組織の再生技術はまだありません。そこで私たちは、従来の軟骨再生技術における問題点を解決し、大型の3次元軟骨組織の再生に応用するため、細胞障害の少ない微小重力環境を模倣したバイオリアクターを利用して新しい軟骨再生技術を開発しました。

地球重力の影響を回避するバイオリアクター

軟骨疾患の治療法のひとつとして期待されているのが、患者自身の骨髄に由来する間葉系幹細胞を用いて欠損した軟骨組織を再生する技術です。間葉系幹細胞は高い増殖能力と骨、軟骨、脂肪、靭帯

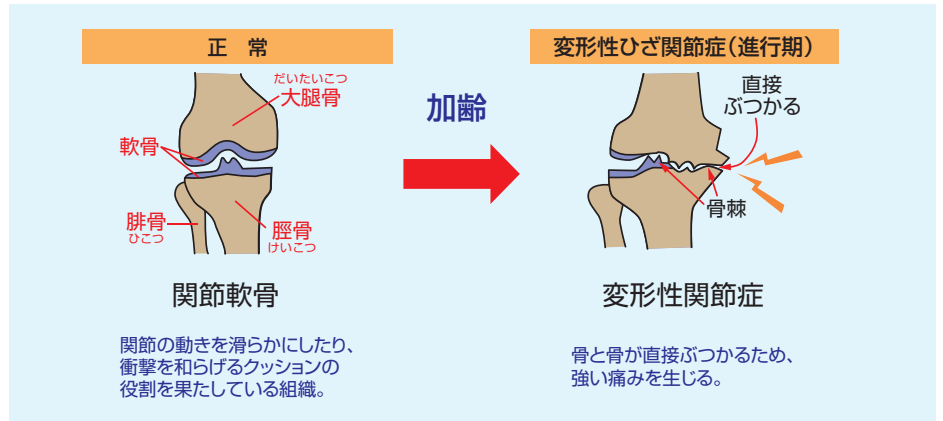


図1 関節軟骨と変形性関節症

などへの分化能を持っており、適切な分化誘導因子の存在下で3次元培養を行なうと軟骨組織へ分化します(図2)。しかし、生体外で培養を行なうと、地球の重力の影響を受けて細胞はシャーレの底に沈んでしまうため、培養組織は2次元のシート状にしかありません。また、軟骨細胞は2次的に培養すると、繊維芽細

胞様の細胞に脱分化してしまいます。そのため、人工の生体材料を使った3次元培養法や、攪拌培養などが行なわれていますが、細胞が高密度に凝縮すると培養液の組織内部への浸透が阻害されたり、攪拌によるストレスで細胞傷害を受けたりして培養組織が壊死してしまいます。このような問題点を解決する方法の

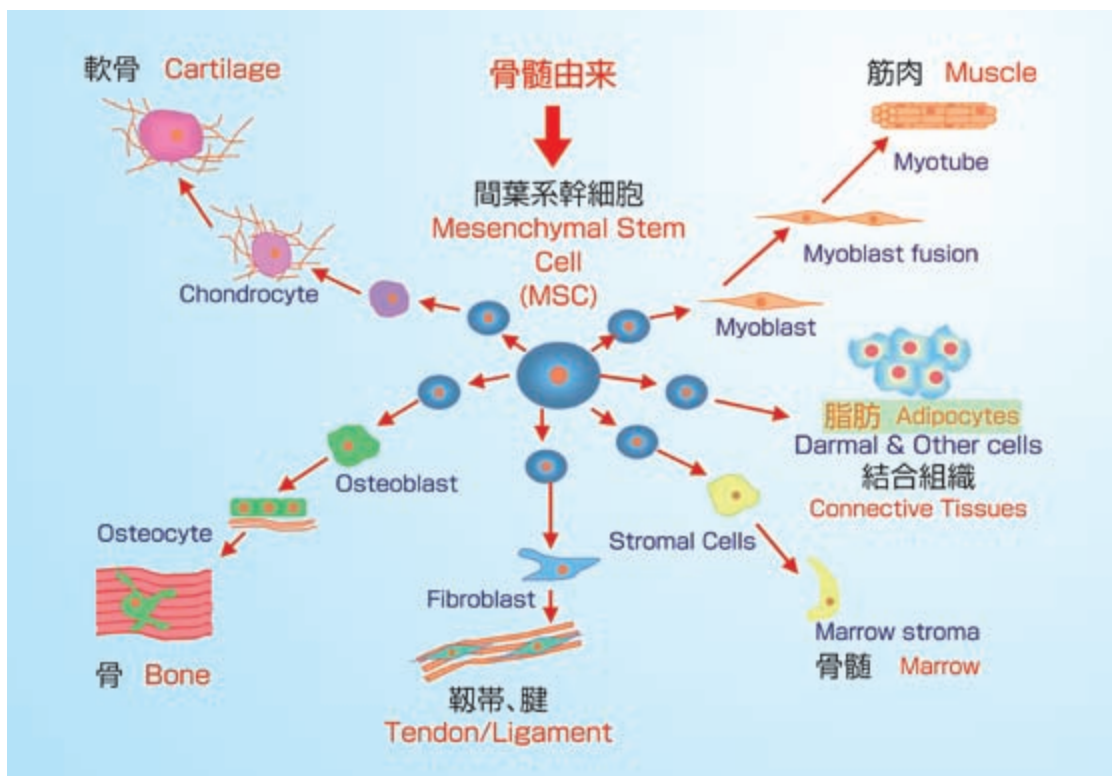


図2 間葉系幹細胞の種々の組織への分化過程

ひとつとして、無重力に近い環境、すなわち微小重力環境での3次元培養法が考えられます。この微小重力での細胞培養を実現するために開発されたのが、回転するバイオリアクター、RWV (Rotating Wall Vessel) です(図3)。RWVは、ガス交換膜を裏側に備えた円形のベッセル(容器)が回転することで、細胞に及ぼす重力の方向を絶えず変化させ、結果として時間平均すると、地上重力の100分の1という微小重力環境を模倣することができます。ベッセルが回転するので、細胞はベッセルの底に沈むことなく、培養液中にふわふわと浮いた状態で徐々に3次元の集合体を形成することになります。

大型で均質な3次元軟骨組織の形成に成功

私たちは、まずRWVバイオリアクターを用いて、ウサギの骨髄細胞から軟骨組織の構築を試みました。JWラビット(10日齢)の長骨から骨髄細胞を採取し、通常条件下で3週間培養して増殖させた後、軟骨誘導因子TGF- β などを添加した培養液中でRWVバイオリアクターによる回転培養を行いました。その結果、4週間で長径1.5cm、短径0.8cmの大型で均質な、しかも生体内の軟骨の半分から4分の1程度の強度をもつ3次元軟骨組織を形成させることに成功しました(図4)。遠心で固まりをつくっただけのペレット培養では、強度が弱く、内部が壊死した組織しか得ることができませんでした。組織切片を作製し、軟骨基質を染めるサフラニンOによる染色、軟骨に特異的なアグリカン(軟骨組織に存在する代表的な大型のケラタン硫酸/コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)やコラーゲンIIのmRNA発現が見られることから、それが軟骨組織であることを確認しています。さらに、ウサギの膝関節全層欠損モデル

にRWVバイオリアクターで構築した軟骨様組織を移植し、その後の経過を観察しました。肉眼での所見や組織切片のサフラニンO染色、アグリカンやコラーゲンIIの発現量から見て、良好な軟骨形成と宿主(宿主)の軟骨や骨との良好な結合が確認されました。このようにウサギを用いた移植モデルでは、たいへん良い結果が得られています。

今後の方針

私たちはさまざまな形の軟骨疾患に対応するため、細胞が付着する種々の足場材料(スキャホールド)の検討を行っています。また、十分なインフォームドコンセントを行ったうえで、患者より採取した骨髄細胞からRWVバイオリアクターを用いて軟骨組織の再構築を行っており、個々の患者に応じた培養方法を検討しています。

現在、自家軟骨組織から軟骨細胞を採取、培養し、移植する方法が試みられていますが、自家軟骨を用いる限り、採取

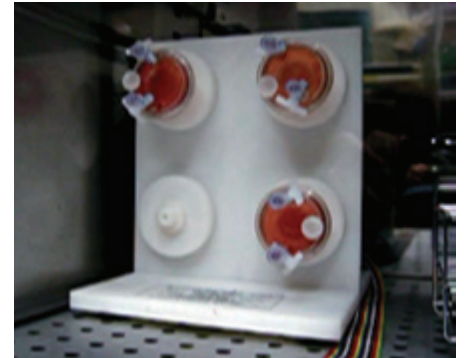


図3 RWV(Rotating Wall Vessel)バイオリアクター

できる細胞数には限界があります。また、健全な軟骨に損傷を与えることも避けられません。一方、骨髄細胞は間葉系幹細胞を含んでいるので、これを培養して増殖させ、多数の軟骨細胞を得られることが大きな長所です。大型の軟骨欠損の修復を目指して、私たちは、独立行政法人物質材料研究機構・生体材料研究センター、筑波大学整形外科、鈴鹿医療科学大学と共同研究体制を組み、臨床応用を目指した多角的な研究を進めています。

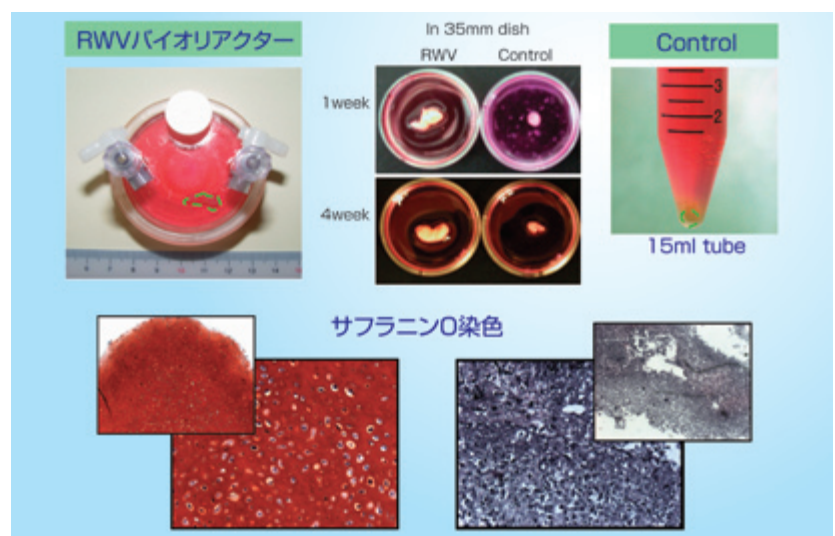


図4 上左:ウサギ骨髄細胞をRWVバイオリアクターで培養しているところ。軟骨組織が形成されている(緑の波線内)。

上右:コントロールとしての試験管内培養

上中:35mm皿中での写真観察(無染色)

下左:軟骨組織がサフラニンOによって赤く染まっている

下右:試験管内培養のものは染まらない