



Title	Multiscale analysis of changes in matrix structure by culturing osteoblasts [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	花崎, 洋平
Citation	北海道大学. 博士(生命科学) 甲第11113号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/53811
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Yohei_Hanazaki_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文題名
Multiscale analysis of changes in matrix structure by culturing osteoblasts
(骨芽細胞培養によるマトリックス構造変化のマルチスケール解析)

【背景・目的】

組織工学において、ネイティブな組織の複雑な構造を模倣することは最も重要な要因の一つである。なぜなら、組織の構造は細胞-細胞外マトリックス (ECM) 間の相互作用を通じて細胞分化など種々の細胞の振る舞いに影響を与えるからである。組織の構造において、異方的な構造と固さの勾配といった傾斜特性は特に重要であるが、それらの特性を完全に模倣した骨格は開発されていない。本研究室では、「異方性コラーゲンゲル骨格 (ACGS)」を開発した¹⁾。ACGSはネットワーク状の濃厚相と、円柱状の希薄相を持っており、異方的な構造と傾斜特性を示すため、細胞-ECM間の相互作用を調査するために適していると考えられる。

本研究の目的は、細胞によるマトリックスリモデリングの機序を調査することである。細胞-ECM間の相互作用を解析するためのモデルシステムとして、ACGS上で骨を作る細胞である骨芽細胞の培養を行った。解析には共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察と小角 X 線散乱 (SAXS) 解析を用い、マトリックスの変化をマクロなスケールからミクロなスケールまで行った。また、適切な骨芽細胞によるマトリックスリモデリングを促すために、力学刺激 (MS) を印加した。

【実験手法】

ACGSはアテロコラーゲン溶液 (IPC-50, pH 3, 5 mg/ml) から作成した。35mm ディッシュに配置したチャンバー内にコラーゲン溶液を注ぎ、透析膜を被せた後に、上方からリン酸緩衝液 (PBS) を注いでゲル化させた。これにより直径 10mm、厚さ 3mm の ACGS を作成した。また、同様の方法で PBS を培地に変えることにより通常のコラーゲンゲルと同様の等方性コラーゲンゲル骨格 (ICGS) を ACGS に対するコントロールとして作成した。

骨芽細胞は MC3T3-E1 細胞を用いた。培地は α MEM に 10% FBS, 1% 抗生物質を添加した培地を使用した。ACGS と ICGS 上に 3×10^4 個の骨芽細胞を播種した。2 日培養した後に上記の培地に $50 \mu\text{g/ml}$ の L-アスコルビン酸と 2mM のグリセロリン酸を追加した分化培地に交換し、この日から 7、14、21 日間培養を行った。また、MS は周波数 3Hz、歪 0.3% の周期的な圧縮を 1 日当たり 1 時間、分化培地に交換した日から 7 日間印加した。

【実験結果】

1) CLSM 観察

培養 14 日目では、ゲル上部 (ゲル表面から $30 \mu\text{m}$) では ACGS、ICGS とも均一な細胞の分布が見られた。しかし、ゲル内部 (ゲル表面から $30\text{-}60 \mu\text{m}$) では ICGS では細胞が均一に存在したものの、ACGS では希薄相のみに細胞が存在していた。図 1 に拡大した CLSM 像を示す。希薄相の浅い部分では細胞が希薄相内の

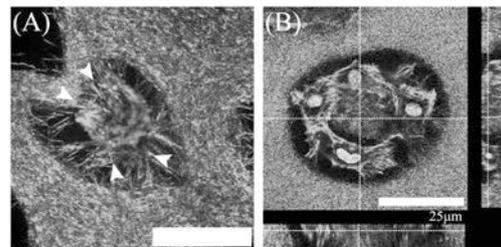


Figure 1. CLSM image of ACGS-cells specimens. 希薄相の浅い部分では細胞が希薄相内のコラーゲン繊維を引っ張っている様子が観察され (Fig.1A、矢印)、より深い場所では円形に複数の骨芽細胞が存在していることが観察された (Fig.1B)。

2) SAXS 解析

Cross-section Guinier解析により、直径の異なる2種類の棒状分子が存在することが示唆された。2種類の棒状分子の内、大きい方の半径を $R_{c,l}$ 、小さい方の半径を $R_{c,s}$ とし、それらをFig.2に示す。 $R_{c,s}$ はどの試料でも同じ値(～50nm)であり、これは先行研究のコラーゲン繊維直径と一致する。 $R_{c,l}$ はACGSでは培養7日目に最も大きな値をとり、培養期間とともに減少した。一方、ICGSでは培養期間とともに $R_{c,l}$ は増加した。これらはコラーゲン繊維束によるものだと考えられる。

【考察】

CLSMの結果より、足場の3次元的構造によって細胞の分布が変化することが示された。特に希薄相の直径が重要だと考えられる。SAXSの結果より、細胞足場の構造が骨芽細胞によるマトリックスリモデリングに影響を与え、コラーゲン繊維束のパッキングが変化

Figure 2. Radius of lod-like scattering body.

したと考えられる。以上より、足場の構造を変化させることによって細胞の分布や振る舞いを直接変化させることができる可能性が示された。また、MS印加による違いはどちらの測定においても観察されなかったため、MSのコラーゲン繊維や細胞の分布に対する影響はほとんどなかったと考えられる。

【結論】

本研究ではACGS骨格中での細胞培養によって、マクロな形態から分子の再配置までのレベルにわたって細胞-ECM間相互作用により骨格構造がどのようにリモデリングされるかを調査した。ACGSの構造によって不均一な細胞分布が観察された。特に細胞の形態や振る舞いを希薄相の直径によって制御できる可能性が示された。また、ACGSの構造はコラーゲンのパッキングに影響を与えることも示唆された。ACGSの構造はpHなどによって容易に制御できるため、ACGSは細胞-ECM間の相互作用を幅広く制御できることが期待される。それ故に、ACGSは種々の組織工学構築物を開発可能なポテンシャルを有すると考えられる。

【参考文献】

1) Furusawa, K.; Sato, S.; Masumoto, J.; Hanazaki, Y.; Maki, Y.; Dobashi, T.; Yamamoto, T.; Fukui, A.; Sasaki, N. *Biomacromolecules* **2012**, 13, 29–39; corrections, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 1232–1232.

