

組織工学的人工腱開発のための筋—腱および 腱—骨段階構造モデルの作製

晝 河 政 希*

Fabrication of Muscle-tendon and Tendon-bone Junction Models for Tissue-engineered Tendon Development

Masaki HIRUKAWA*

Tendon is a connective tissue which joints muscle and bone, and the most common treatment for achilles tendon tears is suture surgery. However, because of the risk of re-tearing due to strength loss and other factors, treatment with alternative materials is necessary. In this study, we fabricated muscle-tendon and tendon-bone junction models using collagen, elastin and cells. In muscle tendon junction (MTJ) model, myoblast and tenocyte co-cultured on collagen/elastin hybrid fiber increased mRNA expression of collagen type XXII (MTJ marker). In tendon-bone junction model, tenocyte cultured on random elastin fiber with bone differentiation medium increased Runx2 (bone differentiation marker) mRNA expression over time. These results suggest that it is possible to mimicking muscle-tendon and tendon-bone junctions *in vitro*.

1. 緒言

スポーツ等の運動や加齢の影響により、筋肉と骨をつなぐ腱への負荷が大きくなると、組織の損傷につながり、時には断裂を引き起こすことがある。腱組織は他の組織に比べて血管が豊富ではなく、断裂時の修復は見込めないため、治療には断裂端を結び合わせる手術が行われる。この治療では再断裂のリスクもあるが、そもそも断裂端を結び合わせる事が難しい場合には治療が望めない。また、代替組織を移植する手術療法では患者自身の他の健康な腱を採取して使用するが、この方法では本来健康な組織を傷つけてしまうため、これらの理由から人工腱の開発が求められている。他にも、腱の損傷は骨との接合部で損傷することもあり、この場合には腱—骨段階構造を有する（あるいは移植後に再現できる）ような人工腱が必要とされる。我々はこれまで腱と類似の特徴を持つ靱帯について、靱帯基質と細胞、生分解性材料を用いた組織工学的人工靱帯を開発、提案してきた⁽¹⁾。そこで本研究では、本来の腱組織を構成しているコラーゲンやエラスチンといったタンパク質に着目し、それらを足場材料として腱細胞や筋芽細胞といった細胞と組み合わせ、培養過程において細胞に刺激を与えることで、筋—腱と腱—骨それぞれの組織接合部を生体外環境で再現できるかを試みた。

2. 筋—腱モデルの作製と評価

細胞足場として、ブタ血管組織より抽出した水溶化コラーゲン、エラスチンを用いたウェットスピニング法による線維配向性足場材料（コラーゲン/エラスチン混合線維材料）を作製した。細胞はウサギ下肢よりヒラメ筋およびアキレス腱を採取し、ヒラメ筋を酵素処理することで筋芽細胞を単離し、アキレス腱から移植片培養法により腱細胞を単離した。作製したコラーゲン/エラスチン混合線維材料を配向方向に対し垂直に中央で区切り、混在しないよう一方に筋芽細胞を、他方に腱細胞を播種し、接着後に区切りをなくすことで疑似的に材料上で筋—腱構造を再現した（図1）。1, 3, 7日培養し、筋—腱構造において特異的に発現されることが知られているV型コラーゲン（ $\alpha 3$ ）とXXII型コラーゲン（ $\alpha 2$ ）の遺伝子発現を観察したところ、XXII型コラーゲン（ $\alpha 2$ ）において経時的に有意な増加が見られた（図2）。

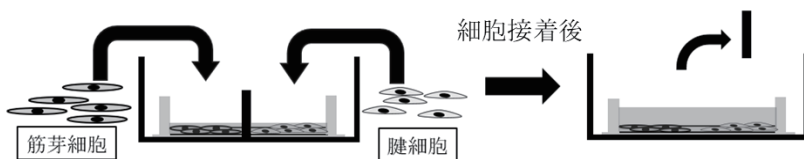


図1 コラーゲン/エラスチン混合線維材料上における筋—腱構造の再現モデル。

3. 腱-骨モデルの作製と評価

細胞足場として、水溶化エラスチンを用いたエレクトロスピニング法による足場材料（無配向エラスチン材料）を作製し、使用した。細胞はウサギアキレス腱より腱細胞を単離した。

作製した無配向エラスチン材料に腱細胞を播種し、播種後1日、1週間、2週間、3週間、4週間の時点において、骨分化の指標とされるRunx2の遺伝子発現解析を行った。この結果、無配向エラスチン材料において培養4週間までRunx2の経時的な発現増加は見られなかった。細胞の骨分化を促すため、一般的に骨分化で良く用いられるアスコルビン酸、 β グリセロリン酸二ナトリウム、デキサメタゾンを含む培地を用いて同じ期間の培養を行ったところ、経時的なRunx2の遺伝子発現増加が見られた（図3）。また、材料の効果を検証するため、材料を用いない誘導培地のみで培養したものと比較すると、細胞播種後1日時点からRunx2の遺伝子発現増加が見られたことから、無配向エラスチン材料も細胞の骨分化へ影響していることが示唆された。

腱と類似した組織である靱帯から単離した細胞（靱帯細胞）を用いた際には、エラスチン材料での培養により経時的にRunx2が発現されることを確認しているが、細胞の違いによるものかは明らかでない為、さらなる検討が必要となる。

4. 展望

本研究において、腱の細胞外基質であるコラーゲンとエラスチンを用いた材料上で筋-腱および腱-骨構造に関する細胞の遺伝子発現の増加が見られたため、生体外においてこれらの構造をある程度再現できることが期待できる。組織工学的的人工腱開発のためには効率的でより早期の組織化誘導が可能となる培養条件を模索する必要があると考えられるため、サイトカインを使用した細胞の分化誘導と接合部マーカーの発現に関する調査も進めており⁽²⁾、今後はより生体内環境を模した培養系を検討していく。

謝辞

本研究は、公益財団法人豊田理化学研究所より豊田理研スカラー研究助成を受けて実施しました。研究遂行にあたり三重大学大学院工学研究科応用化学専攻の宮本啓一先生に材料作製をはじめ数々のご協力を賜りました。関係各位に深く感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) M. Hirukawa, *et al.*, *Artificial organs*, **42** (2018) 736-745.
- 2) 青木星河, 中西亨允, 長谷川正裕, 須藤啓広, 晝河政希, 宮本啓一, 第38回ライフサポート学会大会講演要旨集, (2023) 64.

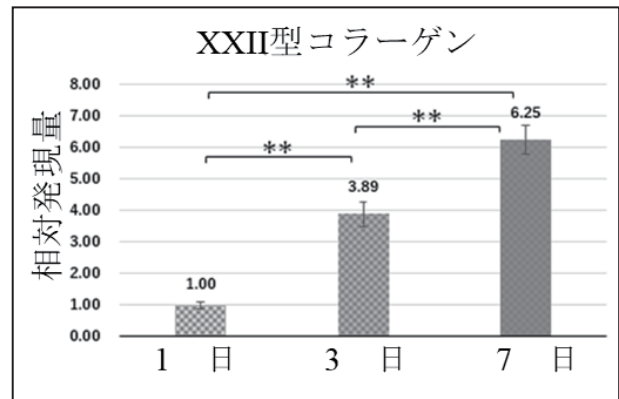


図2 コラーゲン/エラスチン混合線維材料上でのXXII型コラーゲンの遺伝子発現変化。
** $p < 0.01$

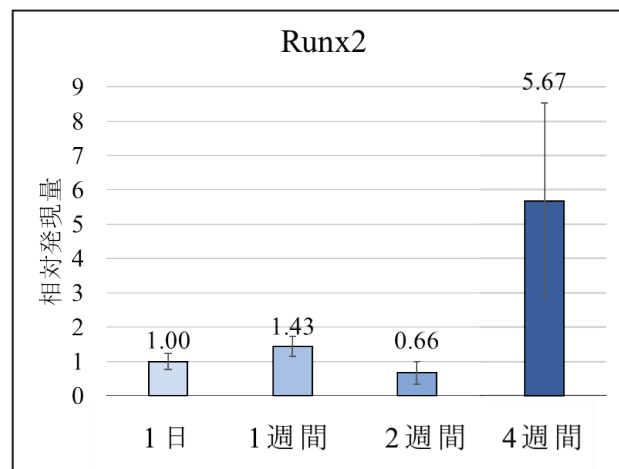


図3 無配向エラスチン材料+骨分化誘導培地での培養による経時的なRunx2遺伝子発現変化。

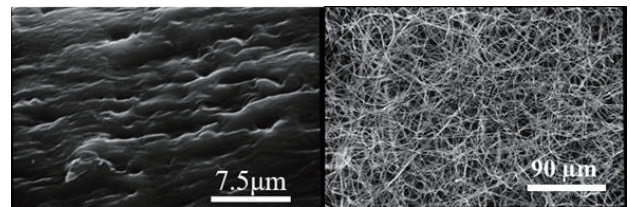


図4 本研究で用いた材料の構造（左）コラーゲン/エラスチン混合線維材料（右）無配向エラスチン材料。