

半導体バイオセンサによる再生軟骨細胞基質産生挙動の*in situ*モニタリング

***In situ* monitoring of extracellular matrix produced by regenerative chondrocyte using semiconductor-based biosensor**

¹東京大学大学院工学系研究科、²(株)PROVIGATE、³ハーバード大学メディカルスクール

佐竹 皓宇¹、齋藤 暁子¹、加治佐 平²、水野 秀一³、坂田 利弥¹

School of Engineering, Univ. of Tokyo¹, PROVIGATE Inc.², Department of Orthopedic Surgery Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital³

[○]H.Satake¹, A.Saito¹, T.Kajisa², S.Mizuno³, T. Sakata¹

satake@biofet.t.u-tokyo.ac.jp

【はじめに】整形外科領域において関節症は最も患者数の多い疾患の一つである。現在は再生医療として自家培養軟骨移植法が開発され臨床応用されている。また培養軟骨細胞に静水圧を負荷することで細胞外基質の生合成が促進されることが水野らの研究により明らかとなり[1]、これを応用した治療法も臨床応用に近づいている。しかしながら基質産生のメカニズムは不明な点が多く、今後治療法の確実性を向上させるには基質産生挙動の理解のもと制御し、再生軟骨細胞の安全性、妥当性を評価する指標を得る必要がある。

前回までの報告で Ta₂O₅/Si₃N₄/SiO₂ をゲート絶縁膜とする n チャネルデプレッション型の電界効果トランジスタ(Field Effect Transistor; FET)のゲート絶縁膜上にウシ由来軟骨細胞及びヒト膝関節軟骨細胞を播種し、L-アスコルビン酸導入の有無による軟骨細胞応答の違いを計測したところ、アスコルビン酸を導入したウシ由来軟骨において著しいゲート表面電位の低下及び sGAG 産生量の増加を確認した。この際ゲート絶縁膜上の軟骨細胞の形態に差が見られたことから細胞及び細胞外基質の膜が絶縁膜として機能したことによるキャパシタンス変化を引き起こした可能性が示唆された。そこで本研究では FET のゲート絶縁膜上で培養されたウシ由来軟骨細胞について、電位およびキャパシタンスの両面から電気測定を行うことにより両者の相関について調査すると共に、軟骨細胞による基質産生挙動の電氣的評価の可能性について検討を行った。

【実験方法および結果】上記 FET のゲート絶縁膜上にウシ膝関節部より単離、培養した軟骨細胞を 7.3×10^5 cells/ml で継代し、DMEM(10%FBS+10U/ml penicillin+10ug/ml streptomycin)を用いて 37°C, CO₂ 5% インキュベータ内で一晩培養した。培地を交換した後白金参照電極を培地に差し込み、さらに培地の蒸発防止の目的でミネラルオイル(Mineral Oil Light: REPROLINE)500ul を加えた。その後 3 日ごとの培地交換の際、L-アスコルビン酸りん酸エステルマグネシウム塩を最終濃度 5ug/ml 含む培養液で培地交換したものと、培養液のみで培地交換したものの 2 種類に分け 2 週間培養を行い、ゲート表面電位変化をリアルタイム FET 測定装置を用いて計測した。また同様の培養系を用いて 3 日ごとにソース-ゲート電極間の Cp-V 特性をインピーダンスアナライザを用いて計測した。

さらに、細胞外基質の定量を行うため、4well ディッシュ上に電気計測と同様の条件となるようにウシ由来軟骨細胞を継代し 3 日ごと培地交換を行いながら 2 週間培養した。培養開始後 3 日ごとに sGAG 産生量を 1,9-dimethylmethylene blue を用いた比色定量法によって求めた。また 1 週間ごとにヒドロキシプロリンを定量することによってコラーゲン産生量を求めた[2]。本研究で得られる電気特性および基質定量の結果とその相関については当日議論したい。

【参考文献】 [1] S. Mizuno et al., Journal of Cellular Physiology 193:319–327 (2002).
[2] Darwin J.P et al., Analytical Biochemistry, 1, 228-239(1960).