

1K10-2 軟骨細胞三次元培養におけるグリコサミノグリカン関連糖の添加効果

鍵田 恵里奈¹, ○藤原 政司¹, 脇谷 滋之², 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能, ²大阪市大院・医・整形外科)

【目的】軟骨組織の再生治療を目指した骨髄間葉系幹細胞から分化した軟骨細胞の三次元培養において、II型コラーゲンやアグリカンなどの細胞外マトリックスの蓄積量を改善する必要がある。そこで、I型コラーゲンをを用いたブタ初代軟骨細胞の三次元培養において、グルクロン酸(GlcA)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、コンドロイチン硫酸C(CSC)などのグリコサミノグリカン(GAG)関連糖が細胞外マトリックスの生産に与える効果について検討した。【方法】ブタ大腿骨関節から分離した初代軟骨細胞(1×10^7 cells/mlゲル)を含むI型アテロコラーゲンを96マルチウェル (0.32 cm^2) 中でゲル化させた後、GlcA、GalNAc、CSCを添加したMEM培地を重層し、37℃、5% CO_2 雰囲気下で三次元培養を開始した。24時間後、ゲルを24マルチウェル (1.8 cm^2) に移し、培地1.8 mlを加えて、さらに3週間培養した。培地は1週間毎に全量交換し、培養終了後、細胞密度 (トリパンブルー法)、アグリカン蓄積量 (DMMB 法)、II型コラーゲン蓄積量 (ELISA 法)、II型コラーゲンとアグリカンの mRNA 発現量 (定量的 RT-PCR) を測定した。

【結果】GAG 関連糖の添加はアグリカンの蓄積にはほとんど影響を及ぼさなかったが、II型コラーゲン蓄積量は顕著に増大し、GlcA (50、500 mg/l) および GalNAc (5、50 mg/l) で約6倍となった。さらにII型コラーゲンの mRNA発現はGlcA、GalNAc、CSCの添加により明らかに促進されていた。

Effect of glycosaminoglycan-related sugars on three-dimensional culture of chondrocytes

Erina KAGITA¹, ○Masashi FUJIWARA¹, Shigeyuki WAKITANI², Mutsumi TAKAGI¹
(¹Div. Biotechnol., Grad.Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Orth. Surg., Osaka-City Univ.)

Key words chondrocyte, glycosaminoglycan, collagen, mRNA

1K10-3 間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化誘導における播種細胞密度の影響

梅津 洋介¹, 藤原 政司¹, 脇谷 滋之², ○高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能, ²大阪市大院・医・整形外科)

【目的】骨髄間葉系幹細胞 (MSC) から軟骨細胞への分化培養における分化の短時間化を目指して、播種細胞密度の影響を検討することを目的とした。【方法】骨髄液から得られたヒトMSCを6穴マルチプレートに種々の細胞密度で播種し、37℃、5% CO_2 雰囲気下24時間インキュベートして接着させた後、10%FCSを含むDMEM-LG培地に分化誘導因子としてIGF-1、TGF- β 3、デキサメタゾンなどを添加した分化用培地へ交換し、分化誘導培養を行った。培養後、細胞密度 (トリパンブルー法) 及び軟骨細胞特有に産生される細胞外マトリクスであるアグリカンの遺伝子発現量 (定量的 RT-PCR法) を測定した。

【結果と考察】5種類の播種密度で7日間分化培養した結果、播種密度が高いほどアグリカン遺伝子の発現が早期に増大する傾向が認められた。次に、高密度 (0.3×10^4 cells/ cm^2) 及び低密度 (0.05×10^4 cells/ cm^2) で播種し7日間分化誘導培養して得られた培養上清を用い、播種密度 0.3×10^4 cells/ cm^2 で分化誘導培養を3日間行った結果、高密度培養由来の培養上清を用いた場合にアグリカン遺伝子の発現率が早期に増大した。また、より長期間 (14日間) の分化誘導培養においても、播種密度が高い (0.3×10^4 cells/ cm^2) 培養の方が低い (0.05×10^4 cells/ cm^2) 培養に比べてアグリカン遺伝子の発現が高いレベルで推移することが確認された。

Influence of inoculum cell concentration on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes

Yousuke UMETSU¹, Masashi FUJIWARA¹, Shigeyuki WAKITANI², ○Mutsumi TAKAGI¹
(¹Div.Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Orth. Surg., Osaka-City Univ.)

Key words differentiation, mesenchymal stem cell, chondrocyte, cell concentration

1K10-4 The Molecular Mechanism of Anticancer Activity of the Broth from Mycelia of *Antrodia Camphorata*

○Yu-Ming LIU¹, Yu-Kuo LIU²

(¹Cancer Center, Taipei VGH, No. 201, Sec.2, Shih-Pai Road, Taipei, Taiwan, ²Department of Chemical and Material Engineering, Chang Gung University, Kwei-Shan, Tao-Yuan, Taiwan)

Antrodia camphorata is a Taiwan-unique fungus which grows on the walls inside the core of decayed *Cinnamomum kanehirae*. This herb has attracted great attention due to its fame for anti-tumor activity against cancer. In this study, we characterized this *A. camphorata* mycelia fermentation broth (ACMB) and investigate the molecular mechanism accounting for its anticancer effect in vitro. Several molecular pathways essential for cancer proliferation, anti-apoptosis and metastasis were investigated in this study. We explored the effect of ACMB on cell viability using MTT assay in cancer cell lines, including nasopharyngeal, hepatoma, prostate, and endothelial cell line including SVEC and HUVEC. The cell viability was decreased by ACMB in a dose-dependent manner. We also tested the inhibitory effects of ACMB on HIF-1 α and NF- κ B signaling pathways, which are critical for tumor progression and resistance to treatment. In the luciferase assay, the luciferase activity was controlled by binding of either NF- κ B or HIF-1 α to their response elements, enhanced by addition of 100 nM of Taxol or 50 μM of CoCl_2 , respectively. There signaling pathways were inhibited by increasing concentration of ACMB. Additionally, we also demonstrated the significant anti-angiogenesis activity of ACMB in endothelial tube forming assay. These results support the therapeutic effect of ACMB as an anticancer agent. The manufacturing strategy could provide active anticancer ingredient of ACMB in a cost-effective way. The potent inhibitory effects of ACMB on cell viability, angiogenesis and signaling pathways controlled by NF- κ B and HIF-1 α justify further study of combining ACMB with conventional treatment such as radiotherapy and chemotherapy.

The Molecular Mechanism of Anticancer Activity of the Broth from Mycelia of *Antrodia Camphorata*

○Yu-Ming LIU¹, Yu-Kuo LIU²

(¹Cancer Center, Taipei VGH, No. 201, Sec.2, Shih-Pai Road, Taipei, Taiwan, ²Department of Chemical and Material Engineering, Chang Gung University, Kwei-Shan, Tao-Yuan, Taiwan)

Key words *Antrodia camphorata*, anticancer, antiangiogenesis, NF- κ B