

令和元年5月30日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03890

研究課題名(和文) 灰化ウシ海綿骨を担体とする高力学適合性再生骨の開発

研究課題名(英文) Development of highly mechano-compatible regenerated bone with calcined bovine cancellous bone as a scaffold

研究代表者

田中 茂雄 (Tanaka, Shigeo)

金沢大学・フロンティア工学系・教授

研究者番号：20262602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、灰化ウシ海綿骨を使った再生骨用担体に対し生体骨並みの力学的特性を持たせることを目標とし、以下の成果を得た。灰化ウシ海綿骨をナノ粒子化し、それとアルギン酸を混合した複合材を作製した。同複合材は、生体緻密骨並みの力学的剛性を有しており、さらにアルギン酸をシアノール架橋することで疑似体液中での力学的安定性を確保することができた。加えて、ランダムパルス電磁場刺激とRGDSペプチド表面修飾を併用することにより担体内での骨芽細胞による基質産生と石灰化が促進されることがマイクロCT計測により確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、灰化処理した動物骨とアルギン酸といういずれも安価な生体由来の材料を使い、高い力学的適合性を有する再生骨用担体が作製可能であることをはじめて示した。また、担体内での骨組織再生がRGDSペプチド修飾と電磁場刺激の相乗効果により促進され得ることを明らかにしている。本研究結果から、急増する高齢者の骨粗鬆症において、安価で再手術不要な骨置換治療が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to give the mechano-compatibility to the scaffold for regenerated bone made of calcined bovine cancellous bone. The following results were obtained. Calcined bovine cancellous bone was nanoparticulated and mixed with alginate. The composite has mechanical properties close to those of a living compact bone. Furthermore, silanol crosslinking of the alginate made the composite mechanically-stable in simulated body fluid. In addition, Micro-CT imaging technique confirmed that the combination of random pulse electromagnetic field stimulation and surface modification with RGDS peptide promotes bone matrix production and calcification by osteoblasts in the scaffold.

研究分野：生体医工学

キーワード：再生骨 ティッシュエンジニアリング 灰化骨 アルギン酸 力学的適合性 RGDSペプチド 電磁場刺激

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者の半数以上が罹患する骨粗鬆症では、骨密度低下により容易に骨折が生じる。現在、骨折治療に用いられている人工骨は金属製やセラミック製であるが、硬質で高剛性な力学的特性により生体骨との界面で摩擦や応力遮蔽による骨吸収が生じ、長期使用に耐えられない。そこで我々は、患者自身の細胞により作られる再生骨に着目した。再生骨の構成要素は生体骨とほぼ同じであるため、患者の骨組織と同質ものを作製できる可能性がある。これにより力学的特性の違いにより生じる上記問題を解決できると考えた。

(2) 再生骨用担体には、生体適合性、力学的適合性、生体吸収性、多孔質構造、骨伝導性(骨との結合性)、骨誘導性、低コストが求められるが、これら全ての条件を満たす担体素材は開発されていない。そこで本研究では、上記条件のほとんどを満たす可能性を有する灰化動物骨を担体素材として利用するに着目した。しかしながら、一方で、灰化处理により弾性率や圧縮強度などの力学的特性が大きく減少することが分かっており、力学的適合性の改善が最大の課題である。

2. 研究の目的

次の三つのアプローチにより灰化ウシ海綿骨担体自身、または、それを用いた再生骨の力学的強度の向上させることを目的とした。(1) 電磁場刺激により再生骨内の骨芽細胞の石灰化作用が促進させ、再生骨の力学特性を向上させる。(2) アルギン酸を用いた繊維強化により灰化ウシ海綿骨担体の力学的特性が向上させる。(3) 灰化骨担体表面に接着認識ペプチドを修飾し、骨芽細胞の接着と新生骨基質産生を促進させる。さらに、上記の異なる二つの方法の併用効果についても調査を行った。

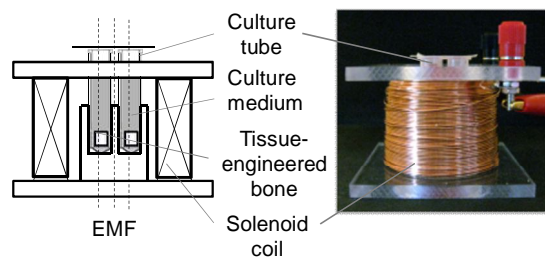


図1 電磁界 (EMF) 刺激装置。4つの培養再生骨を同時に刺激することができる。

3. 研究の方法

(1) 灰化ウシ海綿骨担体を用いた再生骨への電磁場刺激: ウシ大腿骨の遠位端から採取した海綿骨より作製した灰化海綿骨担体を用いて作製した再生骨に対し電磁場刺激を与え、刺激に対する再生骨内の骨芽細胞の石灰化反応を確認した。細胞は、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を使用し、骨形成促進因子が含まれた培地で培養した。骨芽細胞を型コラーゲンゲル溶液に分散させ、灰化ウシ海綿骨担体に浸透させることで再生骨を構築した。電磁場刺激には、ソレノイドコイル型刺激装置(図1)を用いて、1日20分間の刺激を21日間再生骨に与えた。パルス列波形として、500Hzの繰り返し周波数を有する周期的パルス列(PrPT)と幾何確率分布に従って50~500Hzまでの繰り返し周波数でパルスが出現するランダムパルス列(RdPT)の2種類を用いた(図2)。マイクロCT撮影および三次元骨形態計測ソフトを使い再生骨への電磁場刺激の効果を調べた(図3)。

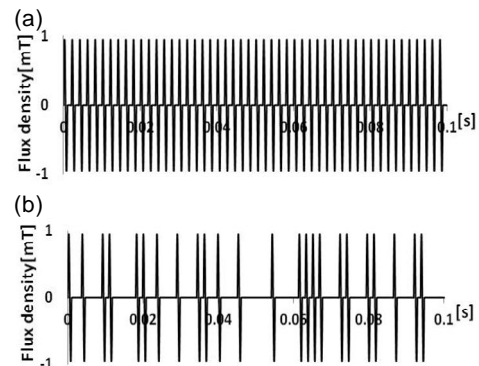


図2 電磁界 (EMF) 波形。(a) 周期的 EMF パルス列 (PrPT)。(b) ランダム EMF パルス列 (RdPT)。

(2) 接着認識ペプチド (RGDS) の灰化ウシ海綿骨担体表面への修飾: 骨芽細胞を担体表面に誘導させ、表面での骨基質産生を促すために灰化ウシ海綿骨担体表面に骨芽細胞の接着タンパク認識配列 (RGDS) 配列ペプチドをコーティングした。RGDS ペプチド粉末を、生理食塩水 (PBS) に 1mg/ml の濃度となるように溶解し、担体をこの溶液に 30 分間浸漬させることで担体表面への RGDS ペプチドの修飾を行った。その後、余分な溶液を担体から除去し、24 時間の自然乾燥を行った後、培養実験に供した。マイクロCT撮影および三次元骨形態計測ソフトを使い再生骨への RGDS ペプチド修飾の効果を調べた(図3)。

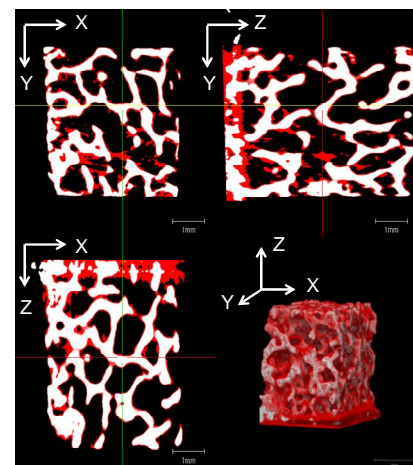


図3 灰化ウシ海綿骨担体を使った再生骨のマイクロCT分析

(3) 骨パウダー/アルギン酸複合体の作製：灰化処理したウシ海綿骨パウダーをアルギン酸と混合することで繊維強化複合体を形成した。さらに、同パウダーをナノ粒子化するとともに、アルギン酸を架橋することで力学特性の向上と疑似体液中での安定性の確保をした。灰化したウシ海綿骨をボールミルで粉碎し、さらに湿式プラズマ処理によりナノ粒子化した。一方、アルギン酸は、3-アミノプロピルトリメトキシシランおよび架橋促進剤とともに混合することでシラノール基架橋を施した。これを上記骨パウダーと混合し、円柱状に成形することで複合体を得た (B/A-Si)。加えて、B/A-Si に対してアルギン酸を5倍、10倍、25倍、または50倍にした複合体 (各 B/A5-Si, B/A10-Si, B/A25-Si, B/A50-Si, 図4) を作製し、準静的圧縮試験により力学的特性を比較することで最適なアルギン酸含有量の調査を行った。

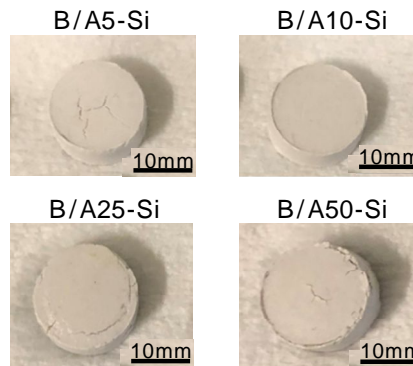


図4 骨パウダー/シアノ ア ル架橋アルギン酸複合体

4. 研究成果

(1) 電磁場刺激およびRGDSペプチド表面修飾の効果：ランダムパルス電磁場刺激 (RdPT) とRGDSペプチド表面修飾の相乗効果により新生骨質が産生され、且つ石灰化 (nBMD) が促進されることが培養実験により確認された。PrPT+RGDSでは、新生骨質のミネラル量および体積はControlよりも小さく、密度では高い値を示したものの有意な差ではなかった。一方、RdPT+RGDSでも新生骨質のミネラル量および体積においてControlとの有意差は見られないものの、密度において全実験群に対し有意に高い値を示した (図5)。

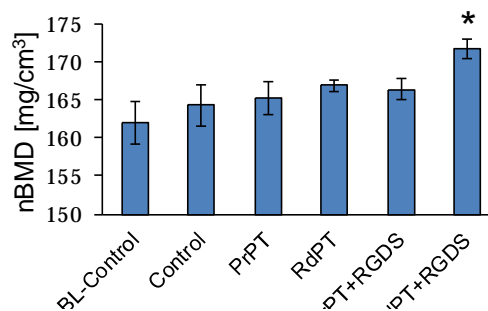


図5 再生骨内部新生骨質の密度。*p < 0.05 vs BL-Control, Control, PrPT, RdPT and PrPT+RGDS

(2) 骨パウダー/アルギン酸複合体の力学的特性評価：骨パウダー/シラノール基修飾アルギン酸複合体は、生体緻密骨並みの力学特性を有していたものの、生体への移植を想定した疑似体液浸漬実験を行ったところ、膨潤化し力学特性が著しく低下する問題が生じていた。シアノ ア ル架橋を施すことにより、疑似体液中における力学特性低下が防げることが分かった (図6)。また、力学特性の程度も生体海綿骨と同等であった。

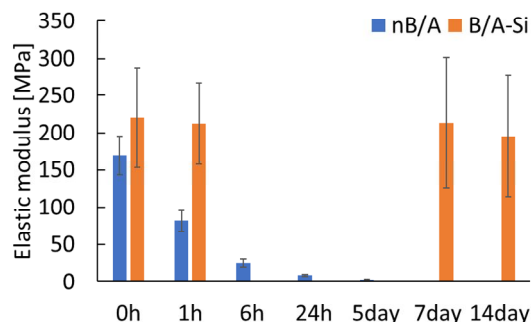


図6 骨パウダー/アルギン酸複合体の疑似体液中での力学的特性の変化。nB/A (シアノ ア ル架橋なし), B/A-Si: シアノ ア ル架橋あり)

一方、灰化骨パウダー/シラノール基架橋アルギン酸のアルギン酸量の力学的特性へ与える影響を調べた結果、アルギン酸の量を従来比で10倍することで、最大応力を約8.2倍、弾性率を約2.3倍にすることができた (図7)。以上の結果より、本複合材は、これまでにない高い力学適合性を備えた再生骨担体材料として期待できる。今後、緻密骨と同等の力学特性を実現するための改良を加えるとともに、同複合体の多孔質化、電磁場刺激付与、RGDS表面修飾を導入し、再生骨としての高性能化を図る予定である。

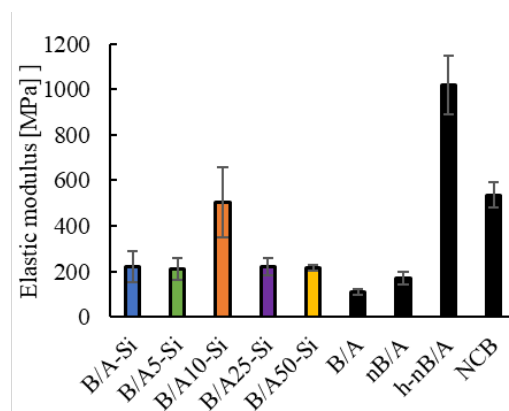


図7 骨パウダー/アルギン酸複合体の力学的特性の比較。

< 引用文献 >

Hosoya, K., et al., A novel covalently crosslinked gel of alginate and silane with the ability to form bone-like apatite, J. Biomed. Mater. Res. A, Vol. 71, No. 4, 2004, pp. 596-601

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Ishak S. Limbong, Tomoki Yamamura, Shigeo M. Tanaka, Electromyostimulation influences the mechanical properties and microarchitectures of bones beyond the stimulation site, Journal of Biomechanical Science and Engineering, accepted 査読有

Shigeo M. Tanaka, Yuma Yorozuya, and Daisuke Takatsu, Random electromyostimulation promotes osteogenesis and the mechanical properties of rat bones, Annals of Biomedical Engineering, Vol. 45, No.12, 2017, pp.2837-2846 査読有
DOI: 10.1007/s10439-017-1927-0

[学会発表](計27件)

小浪文太, 田中茂雄, 灰化骨パウダー/アルギン酸複合体を用いた新規人工骨材料の開発, 日本機械学会北陸信越支部第56期総会・講演会, 富山大学, 2019年3月2日

西山佑樹, 水上 真, 小浪文太, 田中茂雄, 骨パウダー/アルギン酸複合体を用いた再生骨用多孔質担体の開発, 日本機械学会北陸信越支部第48回学生員卒業研究発表講演会, 富山大学, 2019年3月1日

渡辺 寛之, 田中 茂雄, 平野義明, マイクロCTを用いた再生骨内新生骨基質の解析, 日本機械学会北陸信越支部第55期総会・講演会, 福井工業大学, 2018年3月3日

小浪文太, 水上 真, 田中茂雄, 灰化骨パウダー/アルギン酸複合体を用いた新規人工骨材料の開発, 日本機械学会北陸信越支部第47回学生員卒業研究発表講演会, 福井工業大学, 2018年3月2日

泉 雅樹, 田中茂雄, 破骨細胞を用いた灰化ウシ骨の生体吸収性の評価, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 京都大学, 2017年12月14-15日

Makoto Mizukami, Hiroyuki Watanabe, Shigeo M. Tanaka, The effects of electromagnetic field stimulation on cell distribution and calcification in tissue-engineered bone, Japan-Thailand Research Exchange Conference 2017, Bangkok, Thailand, August 21, 2017

Ishak S. Limbong, Tomoaki Yamamura, Shigeo M. Tanaka, The effectiveness of electro-myostimulation at rat quadriceps in increasing the mechanical properties of the lumbar vertebrae, The XXVI Congress of the International Society of Biomechanics (ISB2017), Brisbane, Australia, July 23-27, 2017

廣岡直樹, 田中茂雄, 再生骨用担体材料としての灰化ウシ骨の骨伝導性に関する研究, 日本機械学会北陸信越支部第54期総会・講演会, 金沢大学, 2017年3月9日

渡辺寛之, 田中茂雄, マイクロCTを用いた再生骨内新生骨基質の解析, 日本機械学会北陸信越支部第54期総会・講演会, 金沢大学, 2017年3月9日

泉 雅樹, 田中茂雄, 破骨細胞培養系を用いた灰化骨の生体吸収性の評価, 日本機械学会北陸信越支部第54期総会・講演会, 金沢大学, 2017年3月9日

Ishak S. Limbong, Tomoaki Yamamura, Shigeo Tanaka, Osteogenic Effect of Single-Position Electromyostimulation in a Whole-Body Scale, 日本機械学会北陸信越支部第54期総会・講演会, 金沢大学, 2017年3月9日

一瀬俊明, 田中茂雄, ナノ灰化骨パウダー/アルギン酸複合体による骨再生材料の開発, 日本機械学会北陸信越支部第54期総会・講演会, 金沢大学, 2017年3月9日

水上 真, 渡辺寛之, 田中茂雄, 再生骨内における細胞分布と石灰化へ及ぼす電磁場刺激の影響, 日本機械学会北陸信越支部第46回学生員卒業研究発表講演会, 金沢大学, 2017年3月8日)

山村知輝, Ishak S. Limbong, 田中茂雄, 骨組織の力学特性へ及ぼす電氣的刺激の影響, 日本機械学会北陸信越支部第46回学生員卒業研究発表講演会, 金沢大学, 2017年3月8日

田中茂雄, 一瀬俊明, 高靱性を備えたナノ灰化骨パウダー/アルギン酸複合体による骨再生材料の開発, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋市, 2017年1月19-20日

田中茂雄, 高津大輔, Limbong Ishak, ランダムパルス波形を有する電氣的筋刺激の骨形成促進効果, 第43回日本臨床バイオメカニクス学会, 札幌市, 2016年10月8-9日

Shigeo Tanaka, Naoki Hirooka, Study on the biosolubility of calcined bovine bone scaffold for bone tissue engineering, 2016 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (SB3C2016), National Harbor, Maryland, USA, June 29 - July 2, 2016

田中茂雄, 高津大輔, ランダムパルス波形を有する電氣的筋刺激の骨形成促進効果, 第36回日本骨形態計測学会, 新潟市, 2016年6月23-25日

田中茂雄, 廣岡直樹, 泉 雅樹, 灰化ウシ骨の再生骨用担体としての利用のその特性評価, 第55回日本生体医工学会大会, 富山市, 2016年4月26-28日

田中茂雄, 廣岡直樹, 灰化ウシ海面骨を担体として用いた再生骨の作製と電磁場刺激による力学特性の向上, 第15回日本再生医療学会総会, 大阪市, 2016年3月17-19日

②1 泉 雅樹, 田中茂雄, 灰化骨担体の生体吸収性に関する研究, 日本機械学会北陸信越支部学

生会第 45 回学生員卒業研究発表講演会，長野市，PS2-41，2016 年 3 月 4 日

②② 渡辺寛之，田中茂雄，灰化海綿骨担体を用いた再生骨の石灰化促進に関する研究，日本機械学会北陸信越支部学生会第 45 回学生員卒業研究発表講演会，長野市，2016 年 3 月 4 日

②③ 廣岡直樹，田中茂雄，灰化ウシ骨担体材料の生体吸収性に及ぼす灰化温度の影響，第 28 回バイオエンジニアリング講演会，東京都，2016 年 1 月 9-10 日

②④ 廣岡直樹，田中茂雄，灰化ウシ骨の生体吸収性に及ぼす灰化処理条件の影響，第 26 回バイオフロンティア講演会，福岡市，2015 年 10 月 2-3 日

②⑤ Shigeo Tanaka, Yuki Yamashita, Effects of electromagnetic field stimulation on the mechanical properties of tissue-engineered bone, The Sixth International Conference on Science and Engineering, 2015, Yangon Technological University, Yangon, Myanmar, December 12-13, 2015

②⑥ Shigeo M. Tanaka, Yuki Yamashita, Effect of electromagnetic field stimulation on the mechanical properties of tissue-engineered bone constructed with a calcined bovine trabecular bone scaffold, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, Hokkaido University, Sapporo, Japan, September 16-19, 2015

②⑦ Shigeo M. Tanaka, Yuki Yamashita, Electromagnetic field stimulation enhances mechanical properties of tissue-engineered bone constructed with calcined bovine trabecular bone scaffold, 2015 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (SB3C2015), Snowbird, Utah, USA, June 17-20, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=3439>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松原 秀憲

ローマ字氏名：(MATSUBARA, hidenori)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 10507057

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平野 義明

ローマ字氏名：(HIRANO, yoshiaki)

所属研究機関名：関西大学
部局名：化学生命工学部
職名：教授
研究者番号(8桁): 80247874

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。