

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01278

研究課題名(和文) 機能性骨補填材設計に有用なリアルタイムイメージング技術を用いた評価法の開発

研究課題名(英文) Real-time imaging for innovative design of bone substitute materials.

研究代表者

永井 亜希子(NAGAI, Akiko)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：40360599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では機能性骨補填材の開発のため、生体-インプラント材料間で生じる相互作用を経時的に評価することを目的とした。ハイドロキシアパタイトナノ粒子を、有機分子による自己集合を利用して形状制御した。この粒子をガラス基板上に成膜した。得られた透光性ナノシート上で細胞培養を行い、接着やエンドサイトーシスなどの細胞挙動を経時的に観察した。

生体のリアルタイムイメージングは、cranial window法を用いて行った。骨形成は骨組織側から優位に始まり、材料側の変化は乏しかった。この結果は、人工骨補填材と自家骨との骨修復時の差の一要因を示している、新しい機能性骨補填材開発の手掛かりとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to evaluate interactions between the living body and implant materials by real-time imaging to develop functional bone substitutes. Hydroxyapatite nanoparticles were prepared using self-organization of organic molecule. Nano-thin film was formed on glass, and stem cells or osteoblasts were cultured on it. Cell behaviors such as cell attachments or endocytosis could be observed in real-time.

Real-time imaging for interactions between bone tissues and implants (hydroxyapatite porous bodies) were observed using the cranial window method. Bone formation started around the damaged bone with lacking in material-side by confocal microscopy observations. The result linked the difference between a bone prosthetic material and an autologous bone in the repair of bone and suggested the idea of development for innovative materials.

研究分野：生体材料

キーワード：機能性骨補填材 アパタイトナノ薄膜 リアルタイムイメージング

1. 研究開始当初の背景

粉碎骨折部位等の骨欠損部補填や骨腫瘍部切除後の補填、脊椎手術や人工関節手術で生じた骨欠損部への充填のために、自家骨の移植や人工骨補填材の埋入が行われている。自家骨は自身の健全な部位から採取するため患者への負担が大きく、採取量にも限界があるが、骨再生に優れていることから人工骨よりも自家骨が多く使用されているのが現状である。そのため、自家骨の使用を減らすような、骨再生に優れた人工骨補填材の開発が求められている。

人工骨補填材に求められる機能として挙げられるのは、1)骨結合性、2)リモデリング性(生体との置換)、3)細胞親和性、4)可溶性、5)強度、などであり、なかでも重要な因子は骨結合性とリモデリング性である。骨結合のメカニズムには、骨類似アパタイト層の形成(化学的石灰化)と骨芽細胞の細胞外基質の産生(生物学的石灰化)が適度なバランスで関与していると考えられている。また、骨リモデリングは、補填材の化学的溶解と破骨細胞による吸収(生物学的溶解)と前述の石灰化の繰り返しにより、材料が生体骨と置き換わることである。従来それらの評価法としては、擬似体液浸漬試験や、骨系細胞培養試験、動物埋入試験などがあり、いずれも定点的観察評価が行われてきたため同一個体による継続的な観察は少ない。そのため、埋入した材料が生体と相互作用しながら変化していく過程に関する情報が得られていない。人工骨の機能向上には、骨修復過程において生体骨と同じ時間軸に沿って変化する性質が必要であると考えられるため、材料上に培養した骨系細胞や、材料を埋入した生体組織をリアルタイムにライブ観察する骨再生イメージングによる評価システムを確立し、可視化する必要がある。しかし骨やハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp)のような骨補填材は光透過性が低いこともあり、その過程を直視下に観察することは難しい側面があった。

2. 研究の目的

これまで行ってきた骨補填材埋入実験の定点的観察の結果とリアルタイム観察を比較し、骨補填材の骨再生への寄与についての新しい知見を得ることを目的とする。具体的には下記の4点を目的に研究を遂行した。

- (1)ガラス基板上への透光アパタイトナノ薄膜コーティングとその物性評価を行う。
- (2)作製したアパタイトナノ薄膜と培養細胞の相互作用を、経時的観察により評価を行う。
- (3)実際に試料を生体骨に埋入し、材料表面と生体との界面で起こるアパタイト-骨組織間の相互作用を、経時的にその場観察する。
- (4)従来から行われてきた摘出標本のマイクロCT撮影や免疫組織染色を用いた定点的・非連続的観察の評価と、新しい評価法としての骨再生イメージング解析法について比較検討

を行う。

それらの結果を基に、骨補填材の代表であるアパタイトと骨の経時的变化に関する理解を深め、新しい骨補填材の設計に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 試料作製と物性評価

細胞の基板材料には、透光性アパタイトナノ薄膜を作製した。マイクロエマルジョン法を用い、テンプレートをおレイン酸としHApを合成した。生成物を洗浄後、ディップ法にてガラスにコートした後、350・1時間で焼成した。各種物性評価を行った。生体内埋入材料としては、アパタイト多孔体をパラフィンビーズ法により作製した。

(2) アパタイトナノ薄膜上での細胞培養と経時的観察

作製したアパタイトナノ薄膜基板上で、胚性幹細胞(ES細胞)を培養し、4,6,12,24時間後に走査型電子顕微鏡にて観察を行った。また、骨芽細胞様細胞を培養し、共焦点レーザー顕微鏡にて、リアルタイムイメージングを行った。

(3) in vivo におけるアパタイト-骨組織間のリアルタイムイメージング評価。

in vivo 観察は長期埋込型cranial window法を用いて実現した。これはラット頭頂部に取り付けた透明窓を介して埋入材料(アパタイト多孔体)とその周囲組織を蛍光実体顕微鏡にて観察する方法である。当初、ナノ薄膜を用い観察を行う考えだったが、形成される空間がかなり広く骨補填剤を用いる状況と異なるため、多孔体を埋入して観察を行った。前日にカルセリンを(カルシウム塩の染色)、観察直前に尾静脈より血管壁用蛍光色素を注入し、タイムラプス撮影にて記録した。

4. 研究成果

(1) ナノアパタイト薄膜の作製と物性評価。

マイクロエマルジョン法にて作製したHAp試料の物性評価を行った。X線回折スペクトルは、典型的なHAp(JCPDS card: 09-0432)に帰属する回折パターンを示した。次にこの試料を用いてガラス基板上に成膜した。ナノ薄膜は透光性を示した。図1に、走査型レーザー顕微鏡で得た観察像を示す。

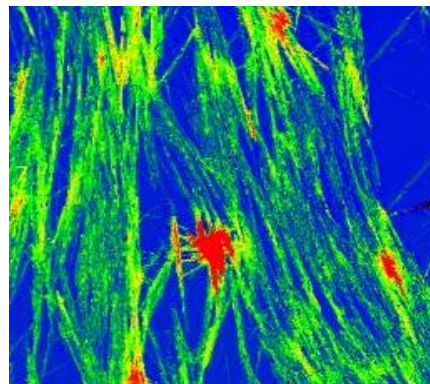


図1 ナノアパタイト薄膜の走査型レーザー顕微鏡像。

膜は、異方性配向を示す $0.30 \pm 0.16 \mu\text{m}$ のファイバー状の結晶で構成されていて、ほぼ単層に成膜することができると考えた。また、減衰全反射法(ATR)による FT-IR スペクトルでは、 $1088, 960, 566\text{cm}^{-1}$ 付近に PO_4 に帰属する吸収ピークが、さらに $3571, 631\text{cm}^{-1}$ 付近に OH^- に帰属する吸収ピークが確認されたことから HAp の典型的な IR スペクトルと結論付けた。

(2) アパタイトナノ薄膜上での ES 細胞培養と経時的観察。

骨修復を支持する骨補填材は、細胞とのコンポジットの開発も有用な手段となりうる。細胞には幹細胞を用い、材料上で増殖後、骨分化させて体内に埋入させるといった戦略が考えられている。以前我々は、不透光性のアパタイトペレット上で ES 細胞培養を行い、コロニー形成を認め、ALP 染色や発現遺伝子の検討から、未分化状態が維持されていたことを報告している(文献)。

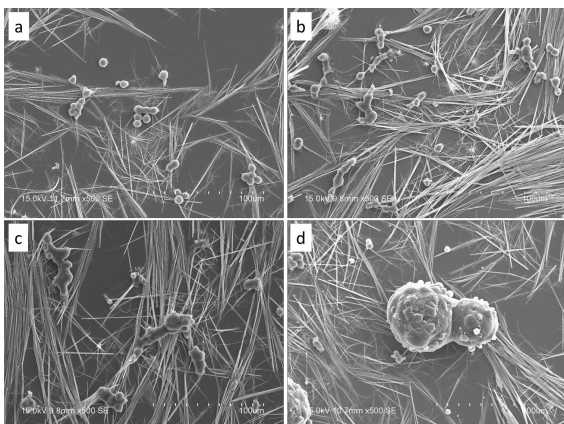


図2 アパタイトナノ薄膜上で培養したES細胞の SEM 像。播種後、(a)4 , (b)6 , (c)12 , (d)24 時間

今回作製した透光性アパタイトナノ薄膜基板を用いることで、単一 ES 細胞が足場を利用し集合、徐々にコロニー化していく様子を、光学顕微鏡でチェックタイミングを逃すことなく、経時的に観察することができた(図2)。

(3) アパタイトナノ薄膜上における骨芽細胞様細胞培養とリアルタイムイメージング。

骨芽細胞様細胞の接着・増殖の様子を共焦点レーザー顕微鏡と付随する培養装置を用いてリアルタイム観察を行った。細胞は播種までに、PKH26 にて蛍光染色を施し、その挙動を追跡することができた。この色素は数日(2-3 サイクル)消褪することなく観察できる。また、蛍光染色したナノ粒子を用いて、エンドサイト シス現象を捉えることができた。図3は、Hoechst® 33342 にて核染色を追加し観察したものである。今後の課題としては、この細胞を用いて骨分化を観察するには、培養時間が長すぎるのがネックであり

細胞種を選択等の工夫が必要となる。

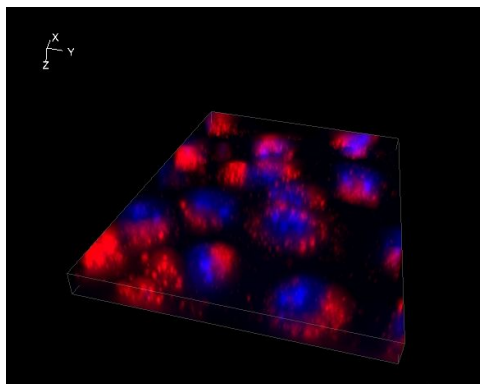


図3 共焦点レーザー顕微鏡像。赤：デキストラン-ローダミン、青：核

(4) in vivo におけるアパタイト - 骨組織間のリアルタイムイメージング評価。

生体のリアルタイム評価を、共焦点実体顕微鏡により行った。頭蓋骨に作成した欠損部位に、多孔質の人工骨補填材(HAp)を埋入した。この空間を透明ガラスにて封入、外環境から遮断した閉空間を構築した。そのガラスを窓として、この部位での組織変化を経時的に3D観察した。まず顕著に認められた現象は細胞群の集積であり、炎症細胞と推測されたが、視野の透明性は保たれていた。その後補填材に向かって伸びる血管形成と(図4)作成した骨孔の辺縁部で起こる骨破壊が認められた。新生骨形成は、その後開始された。この骨形成は骨組織側から優位に始まり、材料側の変化は乏しかった。

これらの結果は、人工骨補填材と自家骨とを用いたときの骨修復の差が誘導される一要因と考えられ、新しい機能性骨補填材開発への知見となりうる。

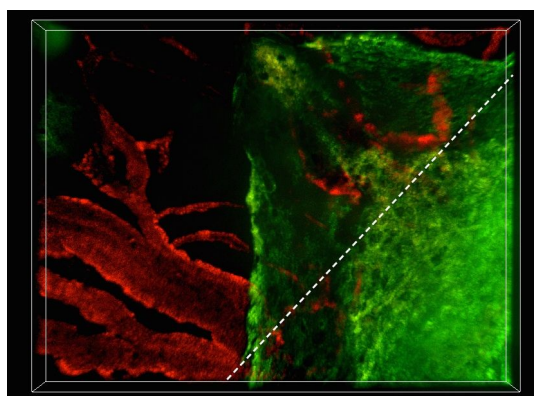


図4 蛍光実体顕微鏡像。緑：アパタイト多孔体、赤：血管壁

<引用文献>

Nagai A, Hattori T, Hirose M, Ogura A, Nozaki K, Aizawa M, Yamashita K, Mouse embryonic stem cells cultured under serum- and feeder-free conditions maintain their self-renewal capacity on hydroxyapatite, Mater. Sci. Eng. C, 34, 214-220 (2014)

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Iwata N, Nozaki K, Horiuchi N, Yamashita K, Tsutsumi Y, Miura H, Nagai A, Effects of controlled micro-/nanosurfaces on osteoblast proliferation, J. Biomed. Mater. Res. A, 査読有、105, 2017, 2589-96 (doi.org/10.1002/jbm.a.36118)

Igeta K, Kuwamura Y, Horiuchi N, Nozaki K, Shiraishi D, Aizawa M, Hashimoto K, Yamashita K, Nagai A, Morphological and functional changes in RAW264 macrophage-like cells in response to a hydrated layer of carbonate-substituted hydroxyapatite, J. Biomed. Mater. Res. A, 105, 査読有、2017, 1063-1070 (doi.org/10.1002/jbm.a.35997)

Chen P, Nagai A, Tsutsumi Y, Ashida M, Doi H, Hanawa T, Differences in the calcification of preosteoblast cultured on sputter-deposited titanium, zirconium, and gold, J. Biomed. Mater. Res. A, 査読有、104, 2016, 639-651 (doi.org/10.1002/jbm.a.35598)

〔学会発表〕(計 12 件)

Komuro H, Sasano T, Yamashita K, Nagai A, Influence of surface modification for hydroxyapatite nanoparticles by biomolecules on transfection efficiency. International Symposium on Integrated Functionalities (ISIF), 2017

堀内 尚紘, 野崎 浩佑, 中村 美穂, 永井 亜希子, 山下 仁大. 二価のカルボン酸を用いた板状水酸アパタイトの水熱合成. 日本セラミックス協会第 30 回秋季シンポジウム, 2017

Nagai A, Carbonate substitution in hydroxyapatite influences on macrophage differentiation, The 33rd International Korea-Japan Seminar on Ceramics, 2016.

野副 菜摘, 堀内 尚紘, 野崎 浩佑, 橋本 和明, 山下 仁大, 永井 亜希子. 細胞足場材料のためのハイドロキシアパタイト薄膜作成. 第 20 回生体関連セラミックス討論会, 2016

Nozaki K, Fujita K, Ebe N, Miura H, Yamashita K, Nagai A. Bioresorbable and osteoconductive properties of porous carbonated apatite implanted in cortical and cancellous bone tissues. The 6th International

Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMD1-6), 2015

〔図書〕(計 1 件)

Nagai A, Horiuchi N, Nakamura M, Wada N, Yamashita K, Wiley 社, Handbook of Solid State Chemistry, Functional surfaces for biomaterials, 227-248, 2017

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 亜希子 (NAGAI, Akiko)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授
研究者番号: 40360599

(2) 研究分担者

野崎 浩佑 (NOZAKI, Kosuke)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
研究者番号: 00507767

研究分担者

堀内 尚紘 (HORIUCHI, Naohiro)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
研究者番号: 90598195

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

増田 宏 (MASUDA, Hiroshi)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 10321861