

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20472

研究課題名(和文)再生医療への応用を目指した間葉系幹細胞支持基板の開発

研究課題名(英文)Development of scaffolds to support mesenchymal stem cells for tissue engineering

研究代表者

中村 美穂 (NAKAMURA, Miho)

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：40401385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、再生医療における組織再生効率を向上する再生医療用足場材料の開発を行うことを目指した。再生医療用足場として作製した有機(ポリ乳酸)－無機(水酸アパタイト、炭酸アパタイト、ベータリン酸三カルシウム)コンポジットは、無機材料の添加量に依存して破骨細胞を誘導すること、間葉系幹細胞が破骨細胞誘導をサポートすることが見出された。また、間葉系幹細胞の存在は生体内で炎症反応を抑制することから、間葉系幹細胞の分子分泌能を強化し、組織再生能を向上する再生医療用足場として今後の研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop the scaffolds for regenerative medicine to support the functions of mesenchymal stem cell. The osteoclast differentiation from monocytes were induced on the organic (PLA) and inorganic (hydroxyapatite, carbonate apatite and tricalcium phosphate) composites with more inorganic materials and enhanced by co-culture with mesenchymal stem cells. The mesenchymal stem cells inhibited the inflammation in vivo. These results suggest that the composites would be useful and helpful in tissue regeneration as a scaffold.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体材料 間葉系幹細胞 破骨細胞 有機無機コンポジット

1. 研究開始当初の背景

2006年に間葉系幹細胞 (MSC) は周囲環境の力学的性質に依存して分化を決定することが報告された (Engler A, et al. Cell 126, 677, 2006)。また、これまでの研究成果の中で、我々は「セラミックス系骨補填材の表面特性が骨芽細胞接着に効果的に作用すること」を報告した (Nakamura M, et al. ACS Appl Mater Interfaces 1, 2181, 2009)。これらの報告は、細胞接着基板の材料学的性質が細胞挙動 (接着や分化) に大きく影響していることを示している。今後、細胞挙動と骨補填材の相互作用を解明すれば、細胞挙動効率化を実現できることが期待される。

細胞は、隣接細胞または周囲の細胞外マトリックスと細胞-細胞間または細胞-細胞外基質間接着構造により相互作用を行う。このことから、再生医療における組織再生効率を向上させるために、細胞-細胞間、細胞-基質間コミュニケーションに着目した。

2. 研究の目的

本研究では、再生医療における組織再生効率向上を目指して、間葉系幹細胞 (MSC) の新たな機能として注目されている分子分泌能を強化することを通して、組織再生能を向上する足場材料の開発を行うことを目的とした。研究期間内に、MSC の細胞-基質間および細胞-細胞間コミュニケーションに及ぼす骨補填材の効果を *in vitro*, *in vivo* で検討し、MSC の分子分泌能効果を強化できる足場の最適化を行う。本研究成果を硬組織再生医療に応用できれば、移植部位で MSC を長期間保持し、MSC がサイトカインを分泌することで、内在性の幹細胞を局所へ動員し、組織再生能を向上することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 有機無機コンポジット試料の作製およびキャラクタリゼーション

有機材料としてはポリ乳酸 (PLA) を利用した。無機材料としては、骨補填材として臨床応用されているハイドロキシアパタイト (HA)、β-リン酸三カルシウム (βTCP) に加え、破骨細胞吸収性を有する炭酸含有アパタイト (CA) を利用した。

(2) 細胞培養試験

各種試料上で破骨細胞前駆細胞試験を行った。ヒト骨髄および末梢血より Monocyte を単離した。破骨細胞分化誘導因子 (M-CSF、RANKL) を添加した培地中で培養し、破骨細胞分化を比較検討した。また、Conditioned medium を用いて、ELISA 法によるサイトカイン分泌能を比較検討した。

ヒト MSC と破骨細胞前駆細胞の共培養試験を行った。ヒト MSC、骨芽細胞、骨細胞をそれぞれ培養し、ヒト末梢血由来 Monocyte を加えて共培養を行った。破骨細胞

分化能を比較検討した。

(3) 生体内埋入実験

ヌードマウス埋入試験を実施し、組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 有機無機コンポジット試料の作製およびキャラクタリゼーション

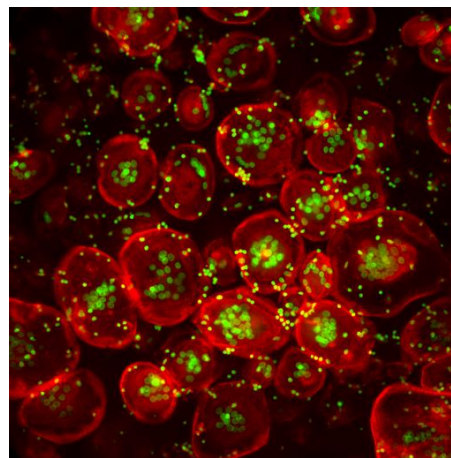
各種コンポジット試料について、材料学的キャラクタリゼーションを行ったところ、組成変化は見られないが、無機物添加量増加に伴い表面粗さ値が増加すること、表面濡れ性は変化しないことが確認された。

(2) 細胞培養試験

ヒト骨髄由来 Monocyte、ヒト末梢血由来 Monocyte を用いて破骨細胞培養実験を行うと、無機物を含むコンポジット試料上で破骨細胞分化が見られた。CA、βTCP を含むコンポジット試料上で破骨細胞分化の亢進が見られた。しかし、サイトカイン分泌能に違いは見られなかった。

ヒト MSC、骨芽細胞、骨細胞をそれぞれ培養し、ヒト末梢血由来 Monocyte を加えて

(a)



(b)

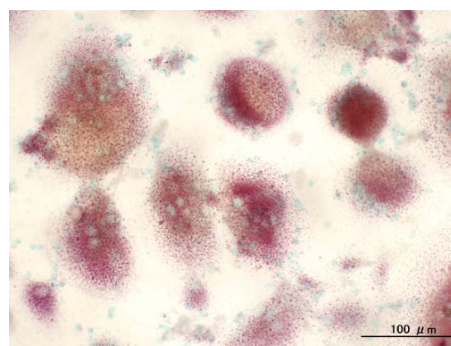


Fig. MSC と Monocyte の共培養による破骨細胞分化。(a)アクチン・核染色像、(b)TRAP 染色像。

共培養を行った結果、MSC が破骨細胞分化を誘導することが見出された。

(3) 生体内埋入実験

組織学的解析の結果、MSC 担持コンポジット群では炎症性細胞の減少が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

原著論文

- ① Kylmäoja E, Nakamura M, Kokkonen-Puuoerä H, Veli-Pekka R, Lehenkari, P, Tuukkanen J. Gap junctional communication is involved in differentiation of osteoclasts from bone marrow and peripheral blood monocytes. *Helion* 2018: 4(5) e00621. 10.1016/j.heliyon.2018.e00621. 査読有
- ② Horiuchi N, Iwasaki Y, Nozaki K, Nakamura M, Hashimoto K, Nagai A, Yamashita K. A critical phenomenon of phase transition in hydroxyapatite investigated by thermally stimulated depolarization currents. *J Am Ceram Soc* 2017: 100 (2), 501-505. 査読有
- ③ Wada N, Horiuchi N, Nishio M, Nakamura M, Nozaki K, Nagai A, Hashimoto K, Yamashita K. Crystallization of Calcium Phosphate in Agar Hydrogels in the Presence of Polyacrylic Acid under Double Diffusion Conditions. *Cryst. Growth Des* 2017: 17 (2), 604-611. 査読有
- ④ Nakamura M, Hori N, Ando H, Namba S, Toyama T, Nishimiya N, Yamashita K. Surface Free Energy Predominates in Cell Adhesion to Hydroxyapatite through Wettability. *Mater Sci Eng C* 2016: 62, 283-292 doi:10.1016/j.msec.2016.01.037 . 査読有
- ⑤ Horiuchi N, Wada N, Nozaki K, Nakamura M, Nagai A, Yamashita K. Dielectric relaxation in monoclinic hydroxyapatite: Observation of hydroxide ion dipoles, *J Appl Phys* 2016: 119, 084903. 査読有
- ⑥ Nakamura M, Hiratai R, Hentunen T, Salonen J, Yamashita K. Hydroxyapatite with High Carbonate Substitutions Promotes Osteoclast Resorption through Osteocyte-like Cells. *ACS Biomater Sci Eng* 2016: 2 (2), 259-267. 10.1021/acsbiomaterials.5b00509. 査読有
- ⑦ Wada N, Horiuchi N, Mukougawa K, Nozaki K, Nakamura M, Nagai A, Okura T, Yamashita K. Electrostatic induction power generator using hydroxyapatite ceramic electrets. *Mater Res Bull* 2016: 74, 50-56. 査読有
- ⑧ Horiuchi N, Endo J, Wada N, Nozaki K, Nakamura M, Nagai A, Katayama K, Yamashita K. Dielectric properties of fluorine substituted hydroxyapatite: the effect of the substitution on configuration of hydroxide ion chains. *J Mater Chem B* 2015: 3 (33), 6790-6797. DOI: 10.1039/C5TB00944H. 査読有
- ⑨ Wada N, Horiuchi N, Nakamura M, Nozaki K, Hiyama T, Nagai A, Yamashita K. Controlled calcite nucleation on polarized calcite single crystal substrates in the presence of polyacrylic acid. *J Cryst Growth* 2015: 415, 7-14. doi:10.1016/j.jcrysgro.2014.12.027. 査読有
- ⑩ Nozaki K, Shinonaga T, Ebe N, Horiuchi N, Nakamura M, Tsutsumi Y, Hanawa T, Tsukamoto M, Yamashita K, Nagai A. Hierarchical periodic micro/nano-structures on nitinol and their influence on oriented endothelialization and anti-thrombosis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015: 12 (57), 1-6 doi: 10.1016/j.msec.2015.07.028. 査読有
- ⑪ Horiuchi N, Tsuchiya Y, Wada N, Nozaki K, Nakamura M, Nagai A, Okura T, Yamashita K. Polarization-assisted surface engineering for low temperature degradation-proof in yttria-stabilized zirconia ceramics. *J Asian Ceram Soc* 2015: 3(2), 156-159. 査読有 doi:10.1016/j.jascer.2015.02.002
- ⑫ Nozaki K, Koizumi H, Horiuchi N, Nakamura M, Okura T, Yamashita K, Nagai A. Suppression effects of dental glass-ceramics with polarization-induced highly

dense surface charges against bacterial adhesion. Dent Mater J 2015: 34(5), 671-678. 10.4012/dmj.2014-342. 査読有

- ⑬ Nakamura M, Hori N, Namba S, Toyama T, Nishimiya N, Yamashita K. Wettability and surface free energy of polarised ceramic biomaterials. Biomed. Mater 2015: 10, 011001. doi: 10.1088/1748-6041/10/1/011001. 査読有

プロシーディング

- ⑭ Nakamura M, Hentunen T, Varaniemi J, Salonen J, Hori N, Yamashita K. Characterization of Human Osteoclast on Different Bioceramics, K Key Eng. Mater 2015: 631, 363-366 10.4028/www.scientific.net/KEM.631.363. 査読無

総説

- ⑮ Tuukkanen J, Nakamura M. Hydroxyapatite as a nanomaterial for tissue engineering and drug therapy. Curr Pharm Design, 2017: 23(26), 3786-3793. 査読有
- ⑯ Kylmäoja E, Nakamura M, Tuukkanen J. Osteoclasts and Remodeling Based Bone Formation. Curr Stem Cell Res Ther 2016: 11, 626-633. 査読有

[学会発表] (計 43件)

国際学会発表 (招待講演)

- ① Nakamura M, Yamashita K. Surface electric fields of bioceramic electrets promote cell adhesion. 42nd International Conference and Exposition on Advanced Ceramics and Composites, Daytona beach, USA, 24,01,2018
- ② Nakamura M. A new concept for hydroxyapatite in bone remodeling-the nano structure and response to mechanical strain. 18.1.2018, 34th Annual Meeting for southern biomedical engineering conference. Charlotte, North Carolina, holiday inn charlotte airport.
- ③ M. Nakamura, K. Yamashita. Hydroxyapatite with high carbonate substitutions promotes osteoclast differentiation through osteocyte-like cells. Finnish Bone Society Meeting 2017. 2017.06.08. Viking line, Turku,

Finland

- ④ M. Nakamura, K. Yamashita, J. Tuukkanen, P. Lehenkari. Banked bone intended for clinical use as an electrical energy reservoir. Finnish Bone bank meeting 2017, University of Turku, Turku, Finland.
- ⑤ M. Nakamura, K. Yamashita. Understanding of cell-biomaterial interactions in terms of surface and materials science. International Symposium on Biomedical and Environmental Materials. 02.11.2017. Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan.
- ⑥ Nakamura M. Osteocyte-mediated osteoclastogenesis stimulated by carbonate apatite. 28th Annual Meeting of the International Society for Ceramics in medicine (Bioceramics28), Charlotte, U.S.A., 10.2016

国際学会発表 (一般発表)

- ⑦ M. Nakamura, R.Hiratai, T. Hentunen, J. Salonen, K. Yamashita. Hydroxyapatite with high carbonate substitutions promotes osteoclast formation *in vitro* and *in vivo*. European Society for Biomaterials 2017, Athens, Greece.
- ⑧ Nakamura M. Design of inorganic biomaterials with use of bone mineral measurements. 2nd Bone and Biomaterials workshop, Inari, Finland, 2016.9.10.
- ⑨ Nakamura M, Hiratai R, Soya T, Hashimoto K, Yamashita K. Composite biomaterial of polarized hydroxyapatite and silk fibroin for wound dressing. 13th International Conference on Ceramic Processing Science. 2016.05.09.
- ⑩ Nakamura M, Hentunen T, Salonen J, Hori N, Yamashita K. Osteocyte Function in Regulating Osteoclast Differentiation on Ceramic Biomaterials. 27th European Conference on Biomaterials. Krakow, Poland, August-September 2015.

国内学会発表 (依頼)

- ① 中村美穂. バイオマテリアル表面科学に着目した基礎研究. 無機リン産学連携講座 2017、07.11.2017. 東京
- ② 中村美穂、堀内 尚紘、山下仁大. アパタイトミネラルに蓄積された電気的エネルギーによる細胞機能制御. 学際・国際高度人材育成ライフイノベーション

ンマテリアル創製共同研究プロジェクト公開討論会、30.3.2018、大阪

- ③ 中村美穂、骨再生医療材料の表面科学と細胞制御、日本再生医療学会、21.3.2018、横浜

国内学会発表

- ④ 中村美穂、米山祥平、吉田直哉、大倉利典、山下仁大、分極ゼオライトの電気特性評価、日本セラミックス協会 2018 年年会 2018.03.17 東北大学
- ⑤ 中村美穂、堀内尚紘、和田徳雄、遠山岳史、西宮伸幸、野崎浩佑、永井亜希子、山下仁大、分極リン酸カルシウムの物理化学的解明-表面自由エネルギーと表面張力-、日本セラミックス協会 2016 年年会 2016.03.15 東京
- ⑥ 中村美穂、平体留美、田熊孝子、Teuvo Hentunen、Jukka Salonen、Juha Tuukkanen、山下仁大、破骨細胞吸収特性に対するアパタイトの炭酸含有量の影響、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016. 2016.11.22 福岡
- ⑦ 中村美穂、堀奈央子、難波咲、安藤大志、堀内尚紘、遠山岳史、西宮伸幸、山下仁大、分極ハイドロキシアパタイト表面特性における焼結雰囲気中の水分の意義、日本セラミックス協会第 28 回秋季シンポジウム 2015.09.18 富山大学 (五福キャンパス)
- ⑧ 中村美穂、堀奈央子、Hentunen T、Salonen J、Tuukkanen J、山下仁大、骨細胞制御による生体吸収性セラミックスの破骨細胞吸収特性、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 2015.11.09 京都
- ⑨ 中村美穂、堀内尚紘、山下仁大、生体骨無機成分を模倣した炭酸アパタイトの破骨細胞吸収特性、粉体粉末冶金協会成 27 年度秋季大会(第 11 6 回講演大会) 2015.11.11 京都大学百周年時計台記念館
- ⑩ 中村美穂、山下仁大、バイオセラミックエレクトレットの物理的、化学的、生物学的性質、2015 年度セラミックス総合研究会、2015.11.12、鹿児島

[図書] (計 5 件)

成書(分担)

- ① 中村美穂、山下仁大、“無機エレクトレットによるバイオミネラリゼーションの制御”、月刊地球、2017、31 (1), p. 49-56.
- ② 中村美穂、山下仁大、“ポーリングによるバイオセラミックスの高機能化”、FC report 2017、35 (2), p.

52-57.

- ③ 中村美穂、山下仁大、“バイオセラミックスの高機能化”、PHOSPHORUS LETTER、2017、88, p. 402-409.
- ④ Horiuchi N、Nakamura M、Wada N、Yamashita K、Nagai A、Functional surfaces for biomaterials (Chapter 10, pp.227-248)、Handbook of Solid State Chemistry (edited by R. Dronskowski, S. Kikkawa, A. Stein), Wiley 2017.
- ⑤ 中村美穂、山下仁大、“無機材料表面の分極処理による骨再生技術 (第 3 編第 8 章第 5 節)”、表面・界面技術ハンドブック、エヌ・ティー・エス; 2016 p. 647-53.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/bcr/bcr/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 美穂 (NAKAMURA, Miho)
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：40401485

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

山下 仁大 (YAMASHITA, Kimihiro)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
教授
研究者番号：70174670

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

(4)研究協力者

Petri Lehenkari (LEHENKARI, Petri)
University of Oulu・Professor

Juha Tuukkanen (TUUKKANEN, Juha)
University of Oulu・Professor