

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006 ～ 2009

課題番号：18390515

研究課題名（和文） 炭酸アパタイト複合体スカフォールドへのアフィニティー化学修飾と機能制御

研究課題名（英文） Affinity chemical modification and functional control onto carbonate-apatite composite scaffolds

研究代表者 岡崎 正之 (OKAZAKI MASAYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30107073

研究成果の概要（和文）：

口腔機能の完全回復を目指し、炭酸アパタイト・コラーゲン複合体への骨形成因子の化学修飾の有効性と作用機序について検討した。その結果、BMP2 を付与すると骨芽細胞様細胞の増殖が促進されるとともに骨再生期間の大幅な短縮が得られること、血管新生因子として合成したSVVYGLRを導入すると、1週間で血管新生が観察されることが確認できた。本研究で創製した高機能性炭酸アパタイト複合体スカフォールドは、再生能力の衰えた患者や部位にも有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To develop a new biodegradable scaffold biomaterial, bone-like carbonate apatites (CO₃Ap) were synthesized and CO₃Ap-collagen scaffolds were created. When these sponge-frame complexes with rh-BMP2 were implanted beneath the periosteum cranii of rats, sufficient new bone was created at the surface of the periosteum cranii after 4 wks' implantation. Furthermore, when the CO₃Ap-collagen sponge containing SVVYGLR peptide was implanted as a graft into a tissue defect created in rat tibia, the migration of numerous vascular endothelial cells as well as prominent angiogenesis inside the graft could be detected after 1 week. Thus, the modification of higher function such as cytokine and angiogenesis factors is effective for low regeneration region as tissue engineering biomaterials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,100,000	0	7,100,000
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	13,600,000	1,950,000	15,550,000

研究分野：生体材料学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：①炭酸アパタイト、②スカフォールド、③骨再生、④化学修飾、⑤機能制御

1. 研究開始当初の背景

国内外における、この方面の硬組織代替材料に関する研究は盛んでアパタイトを初めとするリン酸カルシウムと各種有機化合物との複合体の報告も多く見受けられるが、現状では、非代謝性焼結アパタイトやあくまでも工業用新素材の応用と言った感があり、生体の機能が十分理解されないまま利用されていることが少なくない。アメニティ材料、クオリティーライフを目指すと言うことであれば、炭酸アパタイトのようなバイオミメティック材料が望まれる。幸いにも、我々はこれまで炭酸アパタイト・コラーゲン複合体の研究を続けてきた。ただ、高機能性を付与するまでには至っていないのが現状である。一方、最近組織再生の研究や胚性幹(ES)細胞研究も始まっている。ただ、これらの研究のみでは現在のところ大きな欠損部位を補填し、一定の形態に再建・再生することは困難であるため、本研究のような生体材料を足場として、迅速に硬組織そのものを再建・再生する方が、より機能の再現という点では現実的且つ重要であろう。

2. 研究の目的

高齢化社会を迎え、抜歯を余儀なくされた人々や、骨粗鬆症・骨欠損に悩む人々にとって硬組織の再建・再生は重要な課題である。骨は歯と異なり比較的高い再生能力を有しているが、再生能力の衰えた高齢者や大きな欠損部位を自らの自己再生能力で回復させることは困難であり、特に人工歯根や義歯を満足に装着するには、健康で丈夫な歯槽骨の確保は欠かせず、人工材料の手助けが必要となる。しかしながら、従来の生体材料では生体の形態や機能とほど遠い工学的材料の応用に過ぎなかった。これでは、残念ながら満足はいく生体機能の回復は望めない。そのため、生体の完全機能回復を目的とした生体硬組織と類似した成分と機能から構成されているバイオミメティックな生体材料が求められている。

本研究では、歯槽骨の速やかな再建・再生促進を目指し、従来、腰が弱く収縮し易かったスポンジ材料の欠点を克服するため、炭酸アパタイトを含有した適度な機械的強度を有する歯槽骨再生スカフォールド開発に取り組んだ。特に、(1)炭酸アパタイト・コラーゲン複合体への組織再生因子の付与と(2)複合体に代謝性且つ適度な機械的強度と弾力性を有するスカフォールドの開発との2点に焦点を当てた。この過程で、各機能性骨形成因子の化学修飾の有効性と作用機序を明

らかにするとともに、義歯やインプラントが安全で安心して装着できる口腔機能の完全回復を目指した。

生体材料に関するこれまでの研究では、「生体親和性」の概念が余り明瞭でなかった。材料と生体との親和性を真に論ずる場合には、界面の分子レベルでの理解が不可欠である。本研究では、アフィニティー化学修飾を導入し、「生体親和性の概念」を分子レベルより明らかにするとともに、真に生体に安全で安心な新規高機能性硬組織スカフォールド生体材料の改質を目指した機能制御を行った。

3. 研究の方法

(1) バイオミメティック炭酸アパタイトの合成 (岡崎、野村、平田)

結晶性や化学組成が異なる各種炭酸アパタイトおよび骨様炭酸アパタイトを合成し、生体内代謝性についても検討した。また、X線回折、FT-IR、化学分析により同定を行った。

(2) 炭酸アパタイト・コラーゲン複合体スポンジの作成 (岡崎、赤川、平田)

各種含水量のことなるアパタイト・コラーゲン複合体を遠心法により作成し、凍結乾燥することにより気孔率のことなるスカフォールドを創製した。

(3) 細胞増殖並びに細胞接着実験 (松本、平田、小原)

ハイブリッドアパタイト・有機マトリックス複合体スポンジを作成し、細胞培養による細胞接着試験を行い、接着assay試験を行った。

(4) 複合体試料および細胞培養実験試料の表面化学分析 (平田、松本、岡崎)

既存のSEM, TEM等による表面観察、ESCA, プラズモン分析装置による表面状態解析を行った。

(5) 複合体試料への有機マトリックスの修飾 (平田、岡崎)

スポンジ試料の収縮抑制並びにBMP等サイトカイン修飾を助けるための複合体表面へのヒアルロン酸や環状4糖等の修飾を検討した。

(6) 血管新生因子の合成 (松浦、小原)

VEGF, SVVYGLR等の血管新生因子を精製あるいはそのシーケンスをコンビナトリアルケミストリーの手法によりペプチド

- 合成し、適用濃度等の最適化を図った。
- (7) サイトカイン、血管新生因子と複合体相互作用の解析 (平田、松浦)
炭酸アパタイト・コラーゲン複合体へのサイトカインや血管新生因子の導入に際しては、材料と因子や生体との界面におけるナノレベルでの相互作用の解析が重要となる。本研究では、独自に平田が試作した表面プラズモン解析装置を用いて、界面アフィニティーを解明した。
- (8) 複合体スポンジ強化フレームの作成 (岡崎、赤川)
フレームに関する基礎的研究は継続的に行っているため、スポンジの収縮を防ぐフレームとの強固な接着法について検討した。
- (9) 複合体へのサイトカインの導入 (小原、松本、岡崎)
炭酸アパタイト・コラーゲン複合体へのサイトカイン修飾法の最適化を図り、3次元的配置、徐放化についても検討した。
- (10) 動物実験 (赤川、小原、野村)
ラット、家兎の骨欠損部位にアパタイト・コラーゲン複合体を埋入し、生体接着性や生体親和性、自家骨髄細胞含浸法について検討した。
- (11) 化学分析と組織学的検討 (平田、野村)
各種サイトカインを導入した複合体による動物実験結果につき、組織切片の化学分析と組織学的・生化学的分析、遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 化学分析およびX線回折
各合成試料は、炭酸供給量の増加に伴い炭酸含有量は増加し、P含有量が低下した。各試料のX線回折パターンはアパタイトックパターンを示し、炭酸濃度が高くなるほど結晶性は低下した。また、拡大した $32.0^\circ \sim 32.3^\circ$ および $32.6^\circ \sim 33.0^\circ$ 付近に認められた(300)回折線ピークは、炭酸濃度の増加に伴い高角度側にシフトした。
- (2) FT-IRによる測定
1400 ~ 1500 カイザーでの吸収ピークは炭酸の存在を示しており、炭酸の濃度が増加するにつれて吸光度も増加した。
- (3) SEMおよびHR-TEMでの形態観察
HApの形態は明瞭な針状結晶を示していた。0.005Mの形態は板状結晶になっており、板状が重なり合っていた。0.06Mの形態は板状が小さくなった。0.3Mの形態はブロッコリー状になっており、細かく小さな針状の固まりのようであった。HR-TEM観察では、HApの場合

明瞭な六角形の結晶断面構造が観察されたが、炭酸含有量の増加に伴い結晶の六角形形態は維持されなくなった。

(4) 細胞培養実験

試作炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドは、細胞の遊走には適当なサイズの貫通孔を有した。マウス MC3T3-E1 骨芽細胞様細胞を用い細胞培養実験を行なったところ、フレーム強化したハイブリッド試料では、スポンジの収縮は抑制され、細胞の内部への侵入も良好であった。

(5) 動物実験

炭酸含有量の異なる各種スカフォールドを家兎大腿骨に埋入したところ、2週目において炭酸含有量の高い試料では材料の吸収と骨形成が始まった。また、骨面積率を比較したところ、生体骨と類似した結晶性と炭酸含有量を有するスカフォールドが最も高い骨再生能を示した(図1)。一方、骨増殖因子としての rhBMP2 とともにラット頭蓋骨骨膜下に埋入した際には、生体親和性は良好で、旺盛な新生骨の形成が認められ、必要十分量の骨が形成される期間が8週間から4週間に短縮された(図2)。SVVYGLRを修飾したスカフォールドでは、埋入1週目で早くも血管新生が認められた(図3)。

本研究で試作した炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドは、骨の結晶性や炭酸含有量に類似した試料で最も高い骨形成能を示し、骨増殖因子 rhBMP2 の添加や血管新生因子 SVVYGLRを化学修飾することによりさらに骨再生を促進する可能性が示唆された。この新規創製のスカフォールド材料は、硬組織再生用生体材料として有望である(図4)。

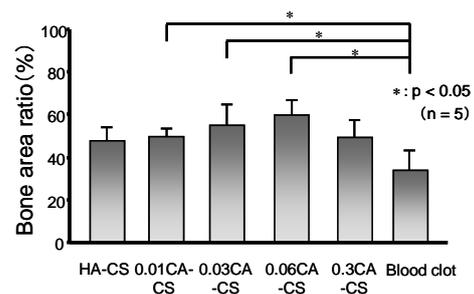


図1. 炭酸アパタイト含有量の異なるスカフォールドの骨面積率(家兎大腿骨埋入3週目)

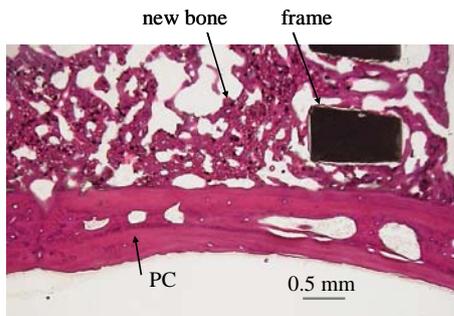
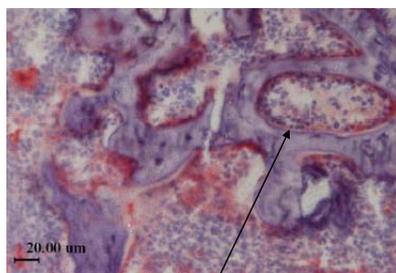


図 2. rhBMP2 添加炭酸アパタイト複合体スカフォールドの骨形成能 (ラット頭蓋骨骨膜下埋入 4 週目)



Angiogenesis
(factor VIII)

図 3. SVVYGLR 修飾炭酸アパタイト複合体スカフォールドの血管新生 (ラット埋入 1 週目)

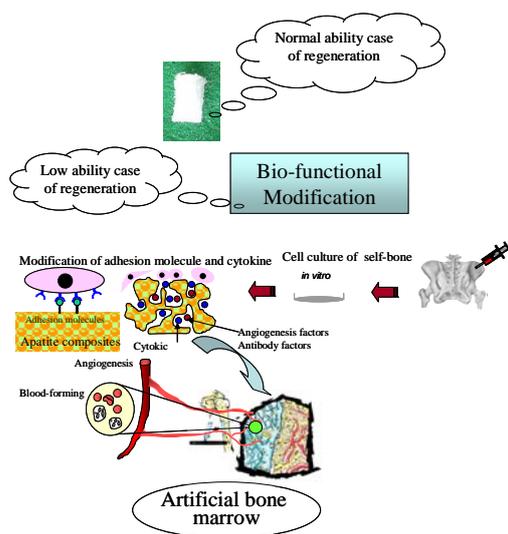


図 4. 高機能性炭酸アパタイト複合体スカフォールドの概念図

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 5 件)

- ① Matsuura A., Kubo T., Doi K., Hayashi K., Morita K., Yokota R., Hayashi H., Hirata I., Okazaki M., Akagawa Y.: Bone formation ability of carbonate apatite-collagen scaffolds with different carbonate contents. Dent Mater J, 28: 234-242, 2009. (査読有り)
- ② Van Landuyt K.L., Yoshida, Y., Hirata I., Snauwaert J., De Munck J., Okazaki M., Suzuki K., Lambrechts P., and Van Meerbeek B.: Influence of the chemical structure of functional monomers on their adhesive performance. J Dent Res 87:757-761, 2008. (査読有り)
- ③ Hirata I., Nomura Y., Ito M., Shimazu A. and Okazaki M.: Acceleration of bone formation with BMP2 in frame-reinforced carbonate apatite-collagen sponge scaffolds. J Artif Organs 10: 212-217, 2007. (査読有り)
- ④ Fuse Y., Hirata I., Kurihara H. and Okazaki M.: Cell adhesion and proliferation patterns on mixed self-assembled monolayers carrying various ratios of hydroxyl and methyl groups. Dent Mater J 26: 814-819, 2007. (査読有り)
- ⑤ Hamada Y., Egusa H., Kaneda Y., Hirata I., Kawaguchi N., Hirao T., Matsumoto T., Yao M., Daito K., Suzuki M., Yatani H., Daito M., Okazaki M. and Matsuura N.: Synthetic osteopontin-derived peptide SVVYGLR can induce neovascularization in artificial bone marrow scaffold biomaterials. Dent Mater J 26: 487-492, 2007. (査読有り)

[学会発表] (計 19 件)

- ① シンポジウム7「ティッシュエンジニアリング」炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨再生能に関するコンセプト. 岡崎正之, 平成22年3月18日, 第9回日本再生医療学会総会、広島 (広島国際会議場)
- ② 異なるSAM表面上へのハイドロキシアパタイトのアフィニティー析出. 岡崎正之、平田伊佐雄, 平成 21 年 11 月 16 日, 日本バイオマテリアル学会、京都 (京都テルサ)
- ③ 各種炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨再生能. 岡崎正之、平田伊佐雄, 平成21年11月13日, 第47回日本人工臓器学会、新潟 (朱鷺メッセ)
- ④ Biological interface reaction of CO₃Ap-collagen composites. M. Okazaki, October 28, 2009, Composite at Lake Louise 2009, Lake Louise, Canada (招待講演)
- ⑤ 新規バイオメテック骨移植材の骨形成能, 松浦歩、久保隆靖、土井一矢、平田伊

佐雄、岡崎正之、赤川安正、平成21年10月2日、第54回日本歯科理工学会、鹿児島（かごしま県民交流センター）

⑥ Interface Affinity between Apatites and Biological Tissues. Okazaki M., January 16, 2009, The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science, Sendai (Tohoku University)

⑦ シンポジウム8 バイオマテリアルとしての新規材料：アパタイトに秘められた可能性を探る。岡崎正之、平成20年11月17日、日本バイオマテリアルシンポジウム2008、東京（東京大学）

⑧ Bone Formation Ability of CO₃Ap-collagen Sponge Scaffolds with Cytokine. Okazaki M., Hirata I., September 12, 2008, ISACB2008, Manila, Philippines (Edsa Shangri-La)

⑨ Promoted Bone Formation in Frame-Reinforced CO₃Ap-Collagen Composites with BMP2, Okazaki M., Hirata I., May 31, 2008, WBC, Amsterdam, Netherland (RAI Convention Center)

⑩ シンポジウム13 「アパタイトを基盤とした歯科領域の再生医療」。アパタイト無くして歯や骨は語れない。岡崎正之、平成19年11月26日、第29回日本バイオマテリアル学会、大阪（千里ライフサイエンスセンター）

⑪ 平成19年度学会賞受賞講演「アパタイト合成法の確立と生体材料への応用」。岡崎正之、平成19年11月26日、第29回日本バイオマテリアル学会、大阪（千里ライフサイエンスセンター）

⑫ Bone formation ability of newly developed CO₃Ap-collagen sponges. Matsuura A., Kubo T., Doi K., Hayashi K., Morita K., Hirata I., Okazaki M., Akagawa Y. November 24, 2007, International Dental Materials Congress 2007, Bangkok, Thailand

⑬ Bone formation with reinforced CO₃Ap-collagen scaffolds. Tieliewuhan Y., Hirata I., Okazaki M., November 24, 2007, International Dental Materials Congress 2007, Bangkok, Thailand

⑭ Development of highly functional hard tissue scaffold biomaterials. M. Okazaki, October 30, 2007, Composite at Lake Louise 2007, Lake Louise, Canada（招待講演）

⑮ 骨芽細胞様細胞の炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジ上での細胞活性。赤松麻衣、長尾雅美、増西稔、横田理絵、林英貴、平田伊佐雄、岡崎正之、平成19年5月12日、第49回日本歯科理工学会、札幌（札幌コンベンションセンター）

⑯ Roles of Trace Elements in Hydroxyapatite Crystals as Biomaterials. M. Okazaki, I. Hirata,

November 8, 2006, Asian Bioceramics Symposium 2006, Bangkok, Thailand

⑰ フレーム強化炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨形成能。岡崎正之、平成18年11月1日、第44回日本人工臓器学会、横浜（パシフィコ横浜 会議センター）

⑱ Biocompatibility of Mg-containing CO₃Ap-collagen Composite as a Hard Tissue Biomaterial. M. Okazaki, October 25, 2006, The 11th IMGS2006, Kashikojima, Japan (Invited lecture)

⑲ 硬組織バイオマテリアルの現状と将来展望。岡崎正之、平成18年9月16日、化学工学会第38回秋季大会シンポジウム<バイオメディカルマテリアルの最前線>「展望講演」、福岡（福岡大学）

〔図書〕（計 2 件）

① 岡崎正之、山下仁大 編著：バイオマテリアルシリーズ 3. セラミックバイオマテリアル。コロナ社、東京、2009、210ページ。

② 岡崎正之：2. セラミックス：ますます重要になる細胞周辺環境（細胞ニッチ）の最新科学技術（田端泰彦 編）。メディカルドゥ、東京、pp.60-64, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 正之 (OKAZAKI MASAYUKI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30107073

(2) 研究分担者

平田 伊佐雄 (HIRATA ISAO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40346507

(3) 連携研究者

赤川 安正 (AKAGAWA YASUMASA)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00127599

野村 雄二 (NOMURA YUJI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80218370

小原 政信 (OBARA MASANOBU)
広島大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：60132479

松浦 成昭 (MATSUURA NARIAKI)
大阪大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70190402

松本 卓也 (MATSUMOTO TAKUYA)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：40324793