

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18680039
 研究課題名 (和文) 外的刺激を応用した細胞機能制御およびバイオミメティック硬組織材料の作成
 研究課題名 (英文) Biomimetic fabrication of biomaterials using cell manipulation
 研究代表者 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

研究成果の概要：

本研究では生体内における硬組織発生を模倣したアプローチにより、無機単体、無機/有機複合体からなる新規機能性スキャフォールドの作製、また、スキャフォールド内における細胞の増殖、分化、三次元パターンニングさらには組織化といった細胞操作をあらかじめ *in vitro* にて行うことで無機/有機/細胞からなる生体組織様組織 (プレティッシュ) の構築を試みた。その結果、塩基性タンパク質に対して親和性の高いアパタイト材料や含有アパタイト量が傾斜的に変化するゲル材料の作製に成功した。さらに、ゲル内細胞に対する外的刺激を応用することで、ゲル内細胞の配置、配向制御を達成し、これら細胞含有ゲルを利用した石灰化誘導により、細胞/有機/無機からなる三次元複合材料の作製を達成した。本研究で作製した材料は新しい硬組織再生、再建用材料として有望である。また、本研究で示したような生体擬似的アプローチによる材料の作製は新しい機能性材料創製において有効なシステムとなりうる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2007 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	21,400,000	6,420,000	27,820,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：(1) バイオミメティック (2) 有機・無機複合材料 (3) ハイドロキシアパタイト

1. 研究開始当初の背景

生体硬組織は動的な組織でありその大きさ、形態だけでなく、微細的には石灰化物の構成成分や結晶サイズなど物性においても時間的に変化し続けていることが知られている。この組織は細胞によって産生された細胞外基質をテンプレートに、リン酸カルシ

ウムの核形成、結晶成長が進むことで生成される究極の有機/無機ハイブリッド物質であるが、この石灰化機構について未だ不明な点が多い。石灰化物生成の場となる細胞外基質は I 型コラーゲンを主としたコラーゲン性タンパク質に非コラーゲン性タンパク質 (e.g. BSP、オステオカルシン、オ

ステオポンチンなど)が結合したもので、有機無機相互作用に関する研究からこれらタンパク質中の酸性アミノ酸を多く含む領域において無機結晶の核形成が起こること、これら基質タンパク質の走行が無機結晶の成長方向を決定することなどが報告されている。しかし、有機基質沈着の3次元的配置や有機基質組成の決定には基質産生細胞が大きく関与することから、従来の有機/無機界面での研究だけでは石灰化機構の解明は困難であり、より生体に近い環境での検討が望まれている。一方、これまでも研究が進められている組織工学的手法を利用した骨再生では、コラーゲン、アパタイト、ポリ乳酸およびその共重合体などの生体親和性材料が細胞の担体として利用されており成果を上げているが、この手法の次のステップとして治療期間の短縮が挙げられる。現在担体として利用されている材料は実際の硬組織とは異なる組成をもっているため、完全な骨組織への置換には比較的長期間を要する。この改善策として、より生体と類似した組成を有する有機/無機/細胞複合材料の *in vitro* での生成およびその利用は硬組織再生期間短縮方法として有望である。

2. 研究の目的

本研究では生体内における硬組織発生を模倣したアプローチにより、無機/有機複合体の新規機能性スキャフォールドの作製、また、スキャフォールド内における細胞の増殖、分化、三次元パターンニング、さらには組織化といった細胞操作をあらかじめ *in vitro* にて行うことで無機/有機/細胞からなる生体組織様組織 (プレティッシュ) の構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) 酸性有機質によるアパタイトの化学修飾とそのタンパク質キャリアとしての有効性に関する検討

骨生成能を高めるうえで、細胞増殖因子などのタンパク質の利用は有効であるが、そのためにはキャリア材料において、それらタンパク質の保持量や放出量の制御が重要となる。ところで、骨生成に有効な増殖因子である BMP や bFGF は塩基性アミノ酸を多く含む塩基性タンパク質であることが知られている。そこで、我々は実験室でのアパタイト合成段階における酸性有機質の存在により、マイナスに荷電したアパタイトを合成できるという仮説をたてた。

使用したアパタイトの合成系は2種類である。1つは α -TCPの加水分解によるもの、もう1つはカルシウム溶液、リン酸溶液の混和

によるアパタイトの湿式合成である。それぞれの合成系に関して、2つのカルボキシル基を有するメルカプトコハク酸および酸性アミノ酸であるアスパラギン酸を添加し合成を行った。

(2) 生体擬似的石灰化を利用した無機/有機複合材料の作製

生体における石灰化は骨芽細胞が産生する基質をベースに無機結晶の析出、成長により進行する。このシステムを実験室にて再現することで、一般的な材料の複合化(混合)では達成できないヘテロな組成を有する新規材料の創製につながることを期待できる。そこで、フィブリンをベースに、ゲル内へのカルシウム、リン酸溶液供給により、新しい無機/有機複合体の作製を行った。

(3) 外的刺激およびゲルを利用した三次元細胞操作と細胞、無機、有機複合体の作製

生体における石灰化は骨芽細胞が産生する基質をベースに無機結晶の析出、成長により進行する。ここで、細胞の存在パターンを三次元的に制御することで、石灰化の成長や存在部位などを制御できるかもしれない。これは新しいヘテロ材料(同一材料内で異なる性質を有する材料)の創製につながる。そこで、本研究ではハイドロゲルの微細構造制御、ゲル内における細胞配置、配向制御、さらにはその石灰化誘導を行った。

4. 研究成果

(1) 酸性アミノ酸存在下で合成したアパタイトは FTIR の結果から合成物中に酸性アミノ酸を含有しており、イオン強度の異なる溶液に入れても外れなかった。このアパタイトは塩基性タンパク質に対して高い親和性を示した。また、このアパタイトをプラスイオンでブロックした場合、塩基性タンパク質の親和性が抑制された。このことから、本アパタイトは塩基性タンパク質に対して選択的吸着性を有していることが示された。また、メルカプトコハク酸存在下で合成したアパタイトは多くが単純な吸着を示し、一部のみ、結晶中に挟み込まれていることが分かった。このアパタイトも同様に塩基性タンパク質に対して高い親和性を示す一方、イオン強度を上げることで、すぐにメルカプトコハク酸の脱着が進み、それに伴うタンパク質の脱着も認められた。また、これらアパタイトからのタンパク質放出はアパタイトの溶解によりコントロールできることが示された。以上の結果から、酸性有機質の利用によるアパタイトの修飾とそのドラッグキャリアとしての有効性が示唆された。

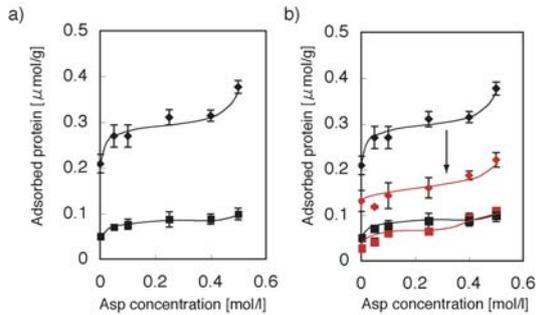


図1 アスパラギン酸修飾アパタイト上での塩基性タンパク質吸着特性の変化。(右赤ラインはプラスイオンでのブロック後)

(2) フィブリンゲルを介在した状態で Ca および P 溶液をそれぞれ、一軸反対側より供給し、ゲル内石灰化を行った。この結果カルシウム溶液に接したゲル側から石灰化沈着が生じ、時間経過とともに石灰化部位がゲル全体に広がることを確認した。この際、石灰化時における pH および F 濃度条件を変えてみた。その結果、低 pH 環境では DCPD、続いて OCP が作製されること、pH 中性以上で HAp が作製されることが明らかとなった。また、F イオンの添加により低 pH でも HAp を生成しやすくなることが明らかとなった。



図2 ゲル内石灰化誘導と無機/有機複合体の作製

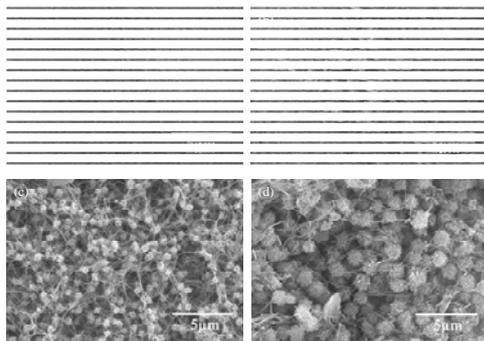


図3 ゲル内石灰化物

(3) 骨膜中の骨芽細胞や緻密骨のハバース管周囲の骨細胞など骨組織には三次元的に高度に制御された細胞のパターニングや配置が確認できる。このような細胞、産生有機質、および沈着無機質の三次元パターニングの再現を試みた。三次元ゲル培養基材としてフィブリンゲルを使用し、このゲルを一軸方向に伸展したところ、線維束の配向が可能とな

った。また、この伸展ゲル中において細胞、有機質の三次元配向も達成でき、これら配向に沿って、沈着無機質が局所的に存在することを確認した。さらに、この微小 X 線回折の結果、この沈着無機質はヒドロキシアパタイトであり、その結晶配向が伸展方向と一致することが明らかとなった。

また、配向基質、細胞複合体を免疫不全マウスに埋入することで、これら基質の局在と配向が骨生成におよぼす影響について検討した。その結果、これら基質の局在化は、生体内での新規石灰化における核形成の場となり、もともとの局在部位から等方的に石灰化沈着が進むことが明らかとなった。以上のことから、伸展を加えることで基質沈着の局所化、配向させた機能性材料は骨再生の新しいアプローチとして有効であることが示された。

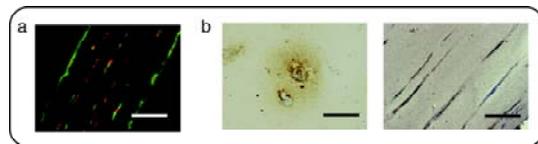


図4 配向細胞と石灰化基質の配向沈着

以上、示したとおり、本研究では生体擬似的環境に着目し、新しい合成のアプローチで、無機修飾材料、無機/有機複合体の作製を行った。さらには、外的刺激を応用した（これも生体擬似的である）アプローチで、三次元的な細胞操作を達成、さらにはこれを利用した細胞/有機/無機複合材料を作製した。これまでの材料合成において、研究者は「均一である」とか「界面が明瞭」といった整然とした物質状態を好んで用いてきた。しかし、人工的には作製できない優れた機能を有する材料を生物は多く持っており、その物質状態を考えた場合、ヘテロや不均一、揺らぎ、グラディエントといった量的に表しづらいものが多い。すなわち、より機能的な材料の創製において生物的合成手法は必須であることを意味する。そういった観点から、今回の研究は非常に大きな意味合いを有し、かつ、大きな成果を上げられたと考える。現在も遂行している前駆生体組織（プレティッシュ）の研究は、将来的には多くの医療に応用できうるシステムとして発展する可能性も高い。今後は、より *in vivo* に近い研究、特に、宿主組織との生着および、機能発現の適正化について検討を進める予定である。宿主との生着などにおいても、先に述べた、ヘテロかつ不均一な新規材料の概念は新しいアプローチとして有効に働くものと期待している。

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 13 件)

- 1) Ishihara S, Matsumoto T, Onoki T, Sohmura T, Nakahira A. New concept bioceramics composed of octacalcium phosphate (OCP) and dicarboxylic acid intercalated OCP via hydrothermal hot-pressing. Mater Sci Eng C in press
- 2) Yoh R, Matsumoto T, Sasaki J, Sohmura T. Biomimetic fabrication of fibrin/apatite composite material. J Biomed Mater Res A 87(2008) 222-228.
- 3) Egusa H, Watamoto T, Matsumoto T, Abe K, Kobayashi M, Akashi Y, Yatani H. Clinical evaluation of the efficacy of removing microorganisms to disinfect patient-derived dental impressions. Int J Prosthodont. 21 (2008) 531-538
- 4) Egusa H, Watamoto T, Abe K, Kobayashi M, Kaneda Y, Ashida S, Matsumoto T, Yatani H. An analysis of the persistent presence of opportunistic pathogens on patient-derived dental impressions and gypsum casts. Int J Prostho 21 (2008) 62-68
- 5) Matsumoto T, Sasaki J, Alsberg E, Egusa H, Yatani H, Sohmura T. Three-dimensional cell and tissue patterning in a strained fibrin gel system. PLoS ONE 2(2007) e1211
- 6) Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, Schmelzle T, Brugge J, Polverini P, Mooney DJ. Engineering tumors with 3D scaffolds. Nat Methods 4(2007) 855-860
- 7) Matsumoto T, Yung YC, Fischbach C, Kong HJ, Nakaoka R, Mooney DJ. Mechanical strain regulates endothelial cell patterning in vitro. Tissue Eng 13 (2007) 207-217
- 8) Matsumoto T, Okazaki M, Nakahira A, Sasaki J, Egusa H, Sohmura T. Modification of apatite materials for bone tissue engineering and drug delivery system. Curr Med Chem 14(2007) 2726-2733. (Review)
- 9) Hamada Y, Egusa H, Kaneda Y, Hirata I, Kawaguchi N, Hirao T, Matsumoto T,

Yao M, Daito K, Yatani H, Okazaki M, Matsuura N. Synthetic osteopontin-derived peptide SVVYGLR induce neovascularization in artificial one marrow scaffold materials Dent Mater J 26(2007): 487-492

10) 11) Matsumoto T, Tamine K, Kagawa R, Hamada Y, Okazaki M, Takahashi J. Different behavior of implanted hydroxyapatite depending on its size and crystallinity. J Ceram Soc Jap 114(2006) 760-762

[学会発表] (計 42 件)

- 1) Kashiwagi M, Matsumoto T, Sasaki J, Sohmura T. Modification of mechanical properties of fibrin gel. IADR 2008 年 7 月 Toronto, Canada
- 2) Sasaki J, Matsumoto T, Egusa H, Sohmura T, Yatani H. Function change of osteoblasts subjected to different mechanical stimulation. IADR 2008 年 7 月 Toronto, Canada

[図書] (計 2 件)

- 1) Matsumoto T, Mooney DJ. Cell Instructive Polymers. "Tissue Engineering" Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology series. Edited by Kaplan D. Springer, Berlin. 102 (2006) 113-137
- 2) 莊村泰治, 寺岡文雄, 松本卓也. 新たな修復用材料の造形とその表面修飾. 生命歯科医学のカッティングエッジ 米田俊之編 (2008) 188-198

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.osaka-u.ac.jp/~techno/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者