

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12075

研究課題名(和文)細胞応答を操作する機能性ガラス材料の開発

研究課題名(英文)Development of bioactive glasses featuring ability of operating cell functions

研究代表者

小幡 亜希子 (Obata, Akiko)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40402656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目標は、無機イオンによる細胞への活性化効果を最大限に活かすべく、ガラスを活用した材料組成設計と申請者らの独自の技術による形状設計を組合せることで、新しい生体材料を開発することである。7種の無機イオンを用いて検討したところ、マクロファージはイオンに対しその種類および濃度に依存した特異な応答を示した。また、このことが共存する間葉系幹細胞による骨形成にまで影響を及ぼす可能性も見出した。一方で、任意のイオンを含有するゾルゲルガラスの繊維構造体の作製にも成功した。細胞に対するイオンの効果を積極的に活用することが可能な生体活性ガラス材料として期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨などの硬組織を再建する材料として、ケイ酸塩やリン酸塩などのガラス材料が有用と期待されている。これまでは、骨形成を担う細胞(骨芽細胞など)に対するこれら材料、および材料から溶出する無機イオンの影響について研究が進められてきた。しかし、細胞の機能発現に大きく影響を及ぼす免疫系細胞に対する影響はほとんど皆無であった。よって本研究課題で得た成果は、免疫系をも考慮した新規材料の設計指針を提供すると考える。また、ガラス材料の多くは柔軟性や成形性に乏しいため、優れた操作性を兼ね揃えた材料が求められていた。本研究課題で作製に成功した綿状の繊維構造体は新しいタイプの生体活性材料として有用と期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to develop novel glass materials by designing glass systems for operating cell functions using inorganic ions and glass structures using our original method based on electrospinning. Results of cell culture tests using macrophage and mesenchymal stem cells for 7 kinds of ion demonstrated that macrophages varied their reactions depending on the type and the amount of the ion provided to the cells, which influenced the bone-forming ability of mesenchymal stem cells. Sol-gel glasses with a fibrous structure were developed and observed to release ions under physiological environment. The glasses are expected to stimulate cell functions and enhance tissue regeneration with the ions released from them.

研究分野：材料工学

キーワード：生体材料 ガラス 無機イオン 細胞 免疫 骨形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨や葉などの硬組織を再建するための生体材料開発において、多くは骨再建に特化した細胞(骨芽細胞や骨細胞など)との関連について主に調査されてきた。しかし、実際に材料を体内に埋植した際、初期の炎症反応、骨芽細胞の増殖を伴う繊維性・軟骨性仮骨の形成、血管の侵入を経て骨様組織を形成し骨硬化、が起こる。つまり、骨芽細胞や破骨細胞が応答する以前に、免疫系細胞が応答する過程が必ず存在する。

骨と免疫系は、骨髄の微小環境およびサイトカインやシグナル伝達分子など多くの制御タンパク質を共有することが明らかとなり、両者の相互作用に着目した融合領域として「骨免疫学」が2000年より発展している。例えば、免疫系にて重要な役割を担うマクロファージが産生するサイトカインは、骨髄由来間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化するのを促すといったことが明らかとなっている。さらに、炎症性マクロファージは骨損傷に対する自然治癒を生体が開始するのに必須であり、骨損傷治癒の質は単球/マクロファージを伴う初期炎症プロセスに依存するとも言われている。

以上のことから、マクロファージを伴う炎症過程はその後の新生骨形成に寄与する間葉系幹細胞や骨芽細胞の活性にまで影響を及ぼす。しかし、生体材料由来因子が上述した相互作用に対しどのように関与するか、そして骨の形成機能などに対しどのような影響を及ぼすかは不明である。

2. 研究の目的

本研究課題では、セラミックス・ガラス材料由来の因子として溶出イオンに着目し、イオンと各細胞間の相互作用について検討した。さらに、各イオンの作用を受けたマクロファージを介した間葉系幹細胞への影響について検討した。実験系においては、各種イオン源となる試薬を細胞培養培地に添加し、それを用いて各種細胞を培養し評価した。これらの検討から得られた結果をもとに、ガラス組成を設計しゾルゲルガラス材料の合成を試みた。臨床での機能性を考慮し、研究代表者らの独自の技術にて綿(わた)状の繊維構造体に設計する。綿状にすることで柔軟性を実現し、優れた操作性を確保する。

研究代表者らの知る限り、初期炎症反応から骨形成までの一連の流れにおけるセラミックス・ガラス材料由来因子による影響について検討した例はほとんど無く、そしてこの一連の流れを見据えて設計された材料開発の例は皆無である。このことから、本研究課題で得られる知見は今後の生体材料開発および機能を検討する上で有用と期待する。

3. 研究の方法

下記(1)～(4)について実施した。なお、(1)～(3)については実験方法の模式図を図1に示す。

(1) マクロファージの各種イオンに対する応答性調査

はじめに、マウス由来マクロファージ単体に対する各種イオン(Zn, Cu, Co, Ca, Si, Mg, Sr)の影響について、濃度依存性を考慮しつつ検討した。過去の報告例や研究代表者らがこれまでに得た知見をもとに、骨芽細胞・間葉系幹細胞に対してポジティブな作用を示すイオン濃度域である10～500 ppm範囲と設定した。各イオンを含有する培地を作製し、これを用いてマクロファージの培養を行なった。細胞の生存率や増殖性は、DNA量測定またはAlamar blue色素を用いた代謝活性値の測定から検討した。

(2) マクロファージを介した間葉系幹細胞の機能発現に対する各種イオンの影響調査

各種イオンの刺激を受けることでマクロファージがサイトカイン等を産生するが、これが間葉系幹細胞の機能発現にどのように影響を及ぼすか検討した。上記(1)と同様に、所定濃度の各種イオンを含有する培地でマクロファージを培養し、ここで得た培養上清を用いてマウス由来間葉系幹細胞を培養した。これにより「マクロファージから間葉系幹細胞への作用」の過程に対する各種イオンの影響を調査できる。間葉系幹細胞の増殖性や骨芽細胞への分化傾向を計測した。

(3) マクロファージと間葉系幹細胞の共培養系における各種イオンの影響調査

各種イオンを含有した培地を用いて、両細胞を同じ培養空間にて培養する「共培養」を実施し、この時の間葉系幹細胞の機能発現に対する各種イオンの影響を調査した。これにより「マクロファージと間葉系幹細胞の相互作用」の過程に対する各種イオンの影響を調査できる。上記(1)と(2)と同様に、所定濃度の各種イオンを含有する培地を用い共培養を行なった。各細胞の増殖性や間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化傾向を計測した。

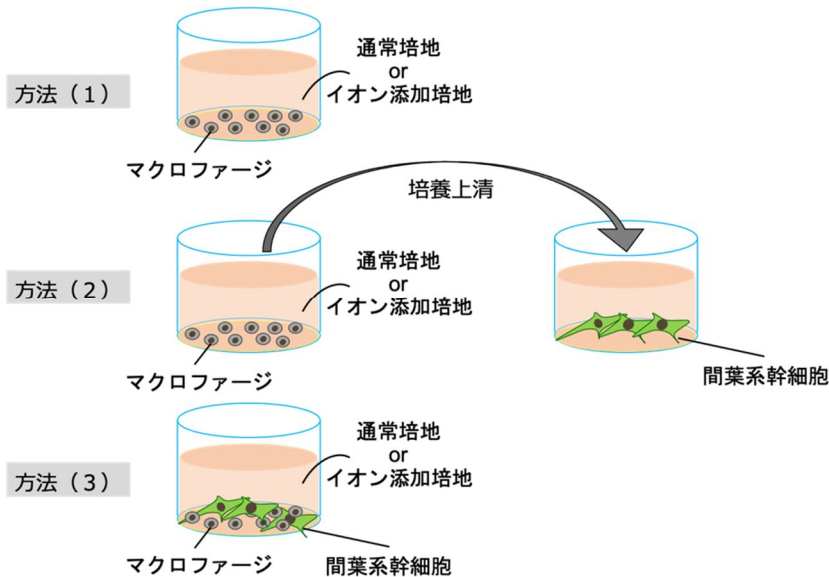


図 1 . 本研究課題で実施した各実験方法の概略図 .

(4) イオン徐放能を有するゾルゲルガラス綿状繊維構造体の作製

ゾルゲル法とエレクトロスピンング法を組み合わせることで、ゾルゲルガラスの綿状繊維構造体を作製した。研究代表者らが既に作製に成功している $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ 組成のガラスをベースとして、新たに Zn や Cu を導入したガラスの綿状繊維構造体の作製について検討した。ゾルゲル法により合成した各種ガラスのベースとなるゾルをポリビニルピチラル溶液と混合し、これをスピニング用の溶液として用いた。スピニング時の諸条件 (特に溶液粘度、湿度、印加電圧) を最適化することで、立体的な綿状の繊維構造体を得た。最後に熱処理することでガラス単体からなる繊維構造体を得た。得られたサンプルを走査型電子顕微鏡 (SEM) で形態観察し、トリス緩衝溶液 (pH 7.4) を用いた浸漬実験からイオン溶出能を調査した。

4. 研究成果

(1) マクロファージに対する各種イオンの影響

DNA 量の測定結果について、コントロールサンプルとなる通常培地の結果と比較したところ、7 種のイオンのうち 3 種では同程度の値を、2 種では有意に低い値を、残りの 2 種では有意に高い値を示すことがそれぞれわかった。つまり、イオンの種類によってマクロファージの応答性は変化し、促進及び抑制の作用を示すことがわかった。この時、上記のような傾向は濃度依存性を持つことも見出した。以上のことから、免疫細胞の一つであるマクロファージは、生体用セラミックス材料から溶出するイオンに対し、その種類及び濃度に依存した特異な応答を示すことがわかった。

(2) マクロファージを介した間葉系幹細胞の骨分化に対する各種イオンの影響

骨分化に関する複数の評価結果において、イオン種に依存した違いが観察された。一例として、分化の指標となるタンパク質の一つであるオステオカルシンの発現量を比較した結果を以下に示す。コントロールサンプルを用いてマクロファージを培養し、その培養上清を用いて間葉系幹細胞を培養した条件では、培養上清を使用しない条件よりもオステオカルシンの発現量は減少していた。一方で、7 種のイオンを添加した培養培地を用いた系において、そのうち 2 種ではイオン濃度に依存せず同様に減少を示し、3 種では増減の変化が現れず、残りの 2 種では増大する結果が得られた。以上のことから、免疫系細胞の一つであるマクロファージが各種イオンによる刺激を受け、サイトカイン等の産物の内容が変化したことが推測される。そしてこの変化によって、間葉系幹細胞の骨形成性細胞への分化の過程に変化が生じたことがわかった。

(3) 共培養環境における骨分化に対する各種イオンの影響

各種イオンの存在下においてマクロファージと間葉系幹細胞を共培養し、石灰化の指標としてカルシウム沈着量を測定したところ、7 種のうち 3 種にてコントロールサンプルよりも有意に高い値を示した。そこでこれら 3 種についてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いた各種遺伝子の発現挙動を調査した。骨分化に関連する遺伝子を調査したところ、どのサンプルにおいても関連遺伝子の発現が確認されたが、3 種のうち 1 種において特に旺盛な発現が観察された。さらに炎症性・抗炎症性サイトカインに関連する遺伝子の発現を調査したところ、旺盛な骨分化関連遺伝子の発現が観察された 1 種において炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現が抑制され、他 2 種では旺盛に発現することがわかった。以上のことから、間葉系幹細胞の骨分化挙動には炎症性サイトカインが関与していることが示唆された。そしてこのサイトカインの発現に対し、イオンが

作用していることを見出した。

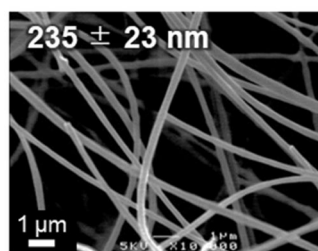
(4) ガラス繊維の作製

70SiO₂-30CaO (mol%)組成のガラスをベースとして、Caの一部をZnまたはCuと置換させたガラスを作製した。例えば5 mol%のZnで置換した場合のガラス組成は70SiO₂-25CaO-5ZnO (mol%)であり、この時のサンプルコードは5Znと表記する。どの組成においても綿状の立体的な繊維構造をもち、柔軟性を示すことが観察された(図2a)。SEM観察より(図2b-d)、熱処理後のサンプルは220~250 nm直径からなる均一性の高い繊維で構成されていることがわかった。各組成のガラスサンプルをトリス緩衝溶液に浸漬し37℃でインキュベートしたところ、Si、Ca、そしてZnまたはCuが溶出することが確認された。よって、各イオンの供給源としても本ガラスは機能することがわかった。

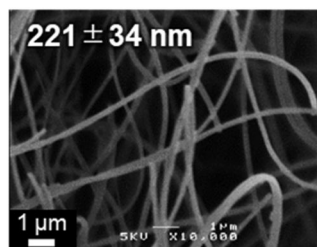
一方で課題も見出された。Ca、Zn、およびCuは浸漬後数時間内に多量の溶出を示し(初期バースト)その後の溶出量はほぼ一定であった。この初期バーストによって材料周辺のpHが急上昇し、細胞や組織に悪影響を及ぼすことが予想されることから、今後本課題の解決は必要と考えている。



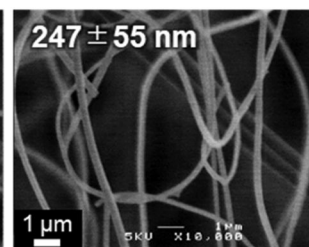
(a) 外観写真



(b) 70S30C



(c) 5Zn



(d) 5Cu

図2. 本研究課題にて作製したガラスサンプルの外観写真(a)とSEM画像(b-d).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Obata Akiko, Mori Kazuma, Inukai Keiichi, Kato Katsuya, Poologasundarampillai Gowsihan, Kasuga Toshihiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Three-Dimensional Cotton-Wool-Like Polyhydroxybutyrate/Siloxane-Doped Vaterite Composite Fibrous Scaffolds: Effect of Imogolite-Coating on Physicochemical and Cell Adhesion Properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmats.2020.00033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Obata Akiko, Ogasawara Toru, Kasuga Toshihiro	4. 巻 107
2. 論文標題 Combinatorial effects of inorganic ions on adhesion and proliferation of osteoblast like cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1042 ~ 1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36623	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Norris Elizabeth, Ramos-Rivera Carolina, Poologasundarampillai Gowsihan, Clark Joshua P, Ju Qun, Obata Akiko, Hanna John V, Kasuga Toshihiro, Mitchell Christopher A, Jell Gavin, Jones Julian R	4. 巻 15
2. 論文標題 Electrospinning 3D bioactive glasses for wound healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 015014 ~ 015014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1748-605X/ab591d	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Akiko Obata, Toru Ogasawara, Toshihiro Kasuga
2. 発表標題 Combinatorial effects of inorganic ions on adhesion and proliferation of osteoblast-like cells
3. 学会等名 The 13th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Ishihara, Elizabeth Norris, Julian R Jones, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga
2. 発表標題 Bioactive sol-gel glasses with controlled ion-release for skin wound healing
3. 学会等名 The 36th International Japan-Korea Seminar on Ceramics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Joel Turner, Azadeh Rezaei, Julian Jones, Alexandra Porter, Akiko Obata, Gavin Jell
2. 発表標題 Cellular uptake of silicate species in bone cells
3. 学会等名 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials together with the 26th Annual Conference of the German Society for Biomaterials (DGBM) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Joel Turner, Azadeh Rezaei, Akiko Obata, Alexandra Porter, Julian Jones, Gavin Jell
2. 発表標題 Understanding cellular uptake of silicate species in bone cells
3. 学会等名 TCES-UKSB2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古屋陸、小幡亜希子、春日敏宏
2. 発表標題 リン酸およびケイ酸イオンによる骨芽細胞様細胞の石灰化への影響
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2019年度秋季大会（第124回講演大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田将宏、小幡亜希子、春日敏宏
2. 発表標題 無機イオンの組み合わせが破骨前駆細胞の分化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本セラミックス協会2020年年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河合星、小幡亜希子、春日敏宏
2. 発表標題 ケイ酸塩ガラス及びリン酸塩ガラスが骨芽細胞様細胞の石灰化に与える影響
3. 学会等名 日本セラミックス協会2020年年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田将宏、小幡亜希子、春日敏宏
2. 発表標題 無機イオンの組み合わせが破骨前駆細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾関祐輝、井口真樹人、小幡亜希子、春日敏宏
2. 発表標題 無機イオンによる免疫細胞機能への影響
3. 学会等名 第22回生体関連セラミックス討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小幡亜希子、尾関祐輝、井口真樹人、春日敏宏
2. 発表標題 免疫細胞への溶出イオンによる影響
3. 学会等名 日本セラミックス協会2019年年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Obata, Yamato Goto, Gavin Jell, Toshihiro Kasuga
2. 発表標題 Osteoblast-like cell responses to silicate ions with different ion structures
3. 学会等名 Bioceramics30 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Birmingham	University College London	Imperial College London	