

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17153

研究課題名(和文)析出型アパタイトによる内在性顎骨細胞の賦活化

研究課題名(英文)Activation of endogenous jaw bone cells by deposition-type apatite

研究代表者

田中 謙光(Tanaka, Kenko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00610049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、間葉系幹細胞(MSC)の足場となりうる新規骨補填材の開発を目的とする。in vitroにおけるアパタイトコートヒアルロン酸(ACH)とMSCの生体親和性を評価した結果、ACH上でMSCの細胞増殖、細胞伸展が確認された。次に、種々のイオンを炭酸アパタイト上に析出させた新規骨補填材の開発を目指して、2価金属イオンを炭酸アパタイトディスク上に析出させることを試み、ストロンチウム(Sr)コート炭酸アパタイトの作製に成功した。次にSrコートアパタイト上にMSCを播種した結果、Srコートアパタイト上に接着が確認された。接着したMSCは非コーティングアパタイト上に培養した細胞と同様の形態を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アパタイトコートヒアルロン酸(ACH)、およびストロンチウム(Sr)コート炭酸アパタイトが抗原性なく、内在性顎骨細胞としてのMSCを賦活化するための足場となることで骨化促進作用が計られ、さらに骨形成能を持つMSCと合わせることで、骨増生法の最大の欠点である治療期間の長期化を解決することができる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a new biomaterial that can be used as a scaffold for mesenchymal stem cells (MSCs). As a result of evaluating the biocompatibility of ACH and MSCs in vitro, cell proliferation and spreading of MSCs were confirmed on ACH. Next, with the aim of developing a new biomaterial in which various ions were deposited on carbonate apatite, we tried to deposit divalent metal ions on carbonate apatite disks. We have succeeded in producing strontium (Sr) coated carbonate apatite. Next, MSCs were seeded on the Sr-coated carbonate apatite. As a result, it was confirmed that the MSCs adhered on the Sr-coated carbonate apatite. It was revealed that the adhered MSCs showed the same morphology as the cells cultured on the uncoated carbonate apatite.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 アパタイト ヒアルロン酸 骨補填剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抜歯を行った患者に対し効果的なインプラント補綴治療を行うためには、骨が不足した部位の骨を保存、増生させるために自家骨や人工骨の移植が広く行われてきた。近年、自家骨移植に代わる方法として、種々の骨補填剤が応用されている。ヒアルロン酸は組織工学や再生医療のスキャフォールドとして注目されており、ヒアルロン酸の骨形成能についての研究も良好な成績が報告されている。そこで、我々は新たにバイオミメティック法を用いてヒアルロン酸表面にアパタイトをコートする方法を開発した。このようにしてできたアパタイトコートヒアルロン酸 (ACH)

は、析出されたアパタイトであるため抗原性がなく、また、骨と結合する生体活性と骨に近い機械的特性を併せ持った新素材として期待される。

我々の先行研究によって、ACH はアテロコラーゲンスポンジ (AS) と比較し、骨芽細胞様細胞の増殖および分化が促進される事が明らかとなった。また *in vivo* における骨形成も促進されることが明らかとなった。このことから、ACH は抜歯窩や歯槽骨に補填する骨補填材としての利用が期待される。

近年、幹細胞を用いた再生医療の研究が注目され、骨・軟骨・脂肪などの組織に分化する能力をもつ骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell:MSC) と人工骨等のスキャフォールドを組み合わせた再生医療の研究が注目されている。ハイドロキシアパタイト (HA) など生体由来材料を用いることで生体適合性を高める研究が行われている。HA は生体骨に類似した組成構造を有しており、生体内において無機質に類似した骨類似アパタイトを形成する。また、無機成分がヒト血漿成分と類似した組成をもつ擬似体液中で 作成されたアパタイトは抗原性を持たず拒絶反応を起こさずに生体骨と直接結合する生体活性機能を持っている。また、MSCs は、試験管内で、骨・軟骨を再生することはできるが、立体的な構造に再生することは困難である。そのために生体に移植できる骨・軟骨に仕上げるために生体材料と組み合わせることが必要となる。前述した HA にも単独で十分な治療効果のあるものであるが、HA に MSCs のもつ組織再生能力を付与し、さらに HA が MSCs の三次的に培養し、再生能力を賦活化することで、ことで治療期間を HA による治療よりも短縮するために、足場材料の開発が不可欠である。

2. 研究の目的

現在、ACH 上に MSCs を培養した報告はされておらず、培養した場合どのような活性を示すのかは不明である。そこで、本研究では ACH 上に析出したアパタイトが MSCs を賦活化し、歯槽骨の骨造成に応用できるか調べるために、主に ACH と MSCs を使用し、骨補填材としての効果を検証することを目的とする。また、バイオミメックス法を進展させ、種々のイオンを炭酸アパタイト上に析出させた骨補填材を開発し、MSCs と組み合わせた新規の足場材料の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、Lonza 社より購入した腸骨骨髄由来 MSC を用いた。MSC の特性解析として、f y ローサイトメトリーによる特異的細胞表面抗原測定、*in vitro* での骨分化能評価をおこなった。骨分化能の評価法は、分化誘導 7 日目にアルカリフォスファターゼ活性定量、14 日目にアリザリンレッド染色による石灰化の評価をおこなった。

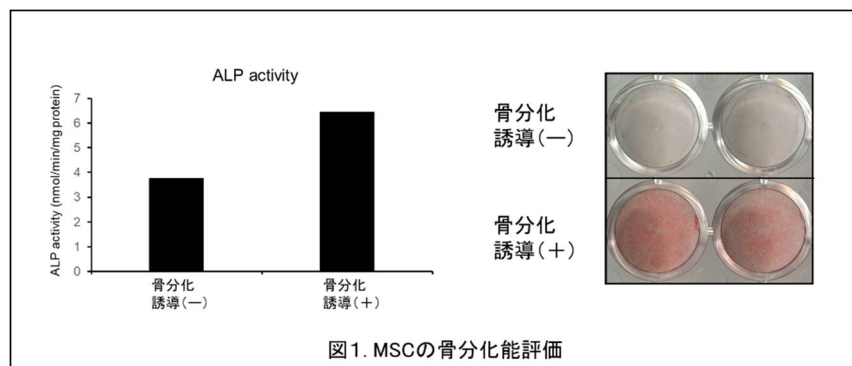
in vitro において、ACH 上に MSCs の生体親和性を調べるために、MSC を播種後、24、48 時間後にアクチンを Phalloidin にて染色し、DAPI にて核染色を行い ACH に対する細胞接着性の評価をおこなった。

バイオミメックス法を進展させ、亜鉛 (Zn)、マンガン (Mn)、ストロンチウム (Sr) イオンを炭酸アパタイトディスク上に析出させることを試みた。EDX スペクトルによりアパタイトディスク表面へのイオン導入を確認した。Sr イオンコーティングアパタイトディスクへの MSC の接着性および、増殖作用について評価をおこなった。

4. 研究成果

本研究で使用する MSC の特性の解析のため、フローサイトメトリーにより MSC 特異的細胞表面抗原発現を評価した。使用した腸骨由来 MSC は、CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166、HLA-ABC が陽性、CD11、CD34、CD45、HLA-DR が陰性であることが確認された。この結果は、以前より報告されている MSC の特異的細胞表面抗原発現パターンと一致していた。

次に使用した MSC の *in vitro* での骨分化能評価をおこなった。



骨分化誘導の評価は、分化誘導後、7日目にアルカリフォスファターゼ活性 (ALP activity) の測定をおこない、14日目にアリザリンレッド染色にておこなった。骨分化誘導により、ALP activityの上昇、石灰化の促進が認められた(図1)

次に、*in vitro*において、アパタイトコートヒアルロン酸 (ACH) 上にて MSCs の生体親和性を調べるために、MSC を播種後、24, 48 時間後にアクチンを Phalloidin にて染色し、DAPI にて核染色を行いACHに対する細胞接着性の評価をおこなった。MSC は特殊なコーティングを行うことなく ACH 上に接着し、伸展することが明らかとなった(図2)。

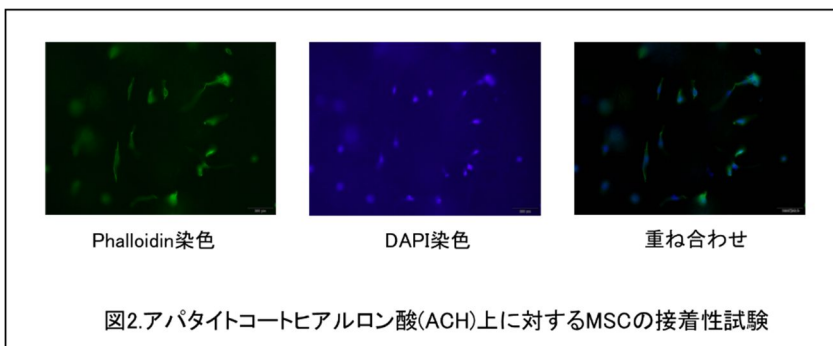


図2.アパタイトコートヒアルロン酸(ACH)上に対するMSCの接着性試験

我々はバイオミメティクス法を進展させ、種々のイオンを炭酸アパタイト上に析出させた新規骨補填材の開発を目指している。バイオミメティクス法とは、ヒトの血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を持った擬似体液 (SBF) 中で材料表面にアパタイトを析出させる手法である(図3)。我々の先行研究により、すでに炭酸アパタイト上にマグネシウムを析出させることに成功しており、さらに他のイオンを析出させることで最適な新規骨補填材の開発を行っている。今回、我々は亜鉛 (Zn)、マンガン (Mn)、ストロンチウム (Sr) イオンを炭酸アパタイトディスク上に析出させることを試みた。評価をおこなった2価金属イオンの中で、今回 Sr コートアパタイトの作製に成功した。EDX スペクトルに解析によりアパタイトディスク表面への Sr 導入が確認された(図4)。

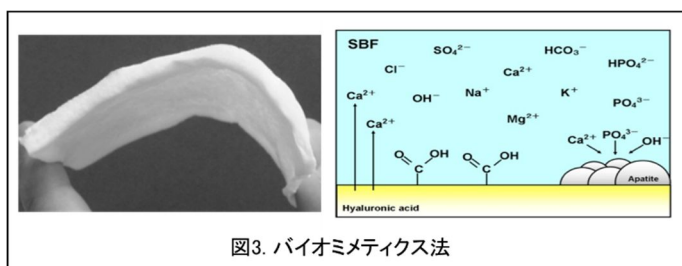


図3. バイオミメティクス法

次に Sr コート炭酸アパタイト上にヒト腸骨骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs) を播種し、細胞接着性の評価をおこなった。hMSCs は非コーティング炭酸アパタイト上に接着し(図5)今回作成した Sr コートアパタイトディスク上にも接着することが確認された。

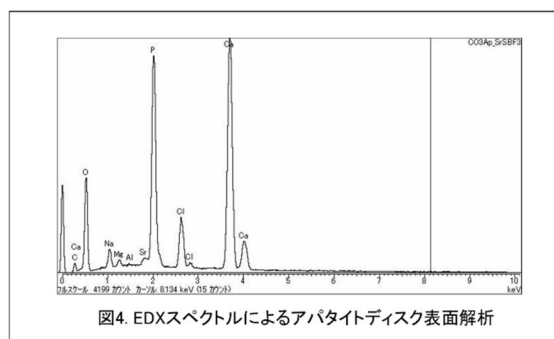


図4. EDXスペクトルによるアパタイトディスク表面解析

Sr コートアパタイトディスクに接着した hMSC は非コーティングアパタイトディスク上に培養した細胞と同様の形態を示すことが明らかとなった。

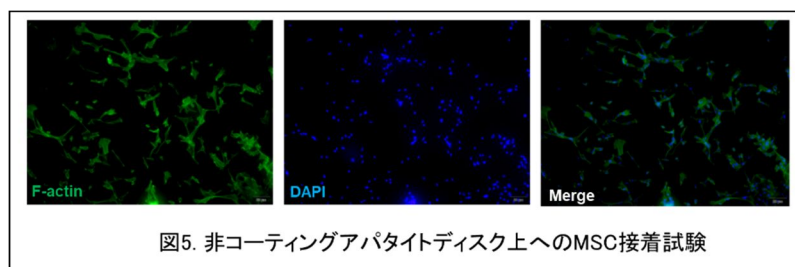


図5. 非コーティングアパタイトディスク上へのMSC接着試験

次に、接着した hMSC が Sr コートアパタイトディスク上で増殖するか評価をおこなった。細胞播種1日後、4日後に細胞を染色し接着細胞数を測定した結果、培養4日目に Sr コートアパタイトディスク上の細胞数の減少が確認された(図6)。このような結果となった原因として、Sr の溶出が過剰になり細胞毒性を示した可能性が示唆される。現在はコーティング条件を改良し、より細胞接着性の高いアパタイトディスク作成を試みている。

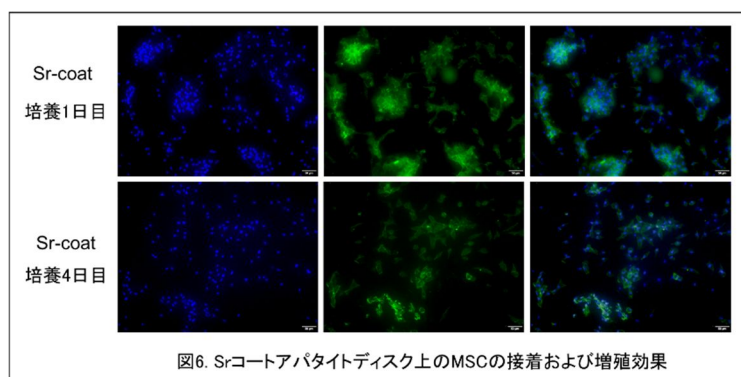


図6. Srコートアパタイトディスク上のMSCの接着および増殖効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Jurado CA, Tsujimoto A, Tanaka K, Watanabe H, Fischer NG, Barkmeier WW, Takamizawa T, Latta MA, Miyazaki M.	4. 巻 50
2. 論文標題 3D Printed Coping for Intraoral Evaluation: A Clinical Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Quintessence International	6. 最初と最後の頁 534-538.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3290/j.qi.a42655.	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 Kenko Tanaka, Irena Sailer, Ryosuke Iwama, Kensuke Yamauchi, Shinnosuke Nogami, Nobuhiro Yoda, Tetsu Takahashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Relationship between cortical bone thickness and implant stability at the time of surgery and secondary stability after osseointegration measured using resonance frequency analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal & Implant Science	6. 最初と最後の頁 360-372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5051/jpis.2018.48.6.360	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
1. 著者名 Ueno D, Kobayashi M, Tanaka K, Watanabe T, Nakamura T, Ueda K, Nagano T.	4. 巻 106
2. 論文標題 Measurement Accuracy of Alveolar Soft Tissue Contour Using a Laboratory Laser Scanner	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 202-207.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s10266-017-0315-4.	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 Miyamoto I, Takahashi T, Tanaka T, Hirayama B, Tanaka K, Yamazaki T, Morimoto Y, Yoshioka I.	4. 巻 34
2. 論文標題 Dense Cancellous Bone as Evidenced by a High HU Value Is Predictive of Late Implant Failure: A Preliminary Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 199-207.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s11282-017-0299-3.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 駒走尚大, 田中謙光, 末廣史雄, 益崎与泰, 松山孝司, 西村正宏
2. 発表標題 当院口腔インプラント専門外来における過去5年間のインプラント治療の臨床的検討
3. 学会等名 第36回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末廣史雄, 益崎与泰, 田中謙光, 駒走尚大, 西村正宏
2. 発表標題 顎堤増生を目的とした顎骨骨髓由来間質細胞の採取成績
3. 学会等名 第36回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会
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
研究協力者	西村 正宏 (NISHIMURA Masahiro)		
研究協力者	後藤 哲哉 (GOTO Testuya)		
研究協力者	宮崎 敏樹 (MIYAZAKI Toshiki)		