

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592824

研究課題名(和文) 生体模倣環境培養によるストレス負荷細胞の親和性動態と骨形成能

研究課題名(英文) Bone formation of stressed cells under bio-mimetic condition

研究代表者

飯田 俊二 (Iida, Shunji)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：30281827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：初期実験として、水酸化アパタイトセラミクスに対する細胞接着への超音波処理の影響について解析を行った。超音波処理を行うことによりセラミクス(HAP)にはクレーター状のマイクロ細孔と微小亀裂が観察され、細胞接着能が上がったことが、細胞数で明らかとなった。生体模倣環境下で骨芽細胞を培養した結果、細胞はコラーゲンゲル上では細胞突起を伸ばして3次元的に進展し、またハイドロキシアパタイトによるメカニカルストレスに対しては、骨形成能を示すオステオカルシンの発現が増加した。

研究成果の概要(英文)：As a preliminary experiment, we investigated the effect of ultrasonic treatment for hydroxyapatite ceramics to the cell adhesion. Due to ultrasonic treatment at the surface of hydroxyapatite ceramics, a plenty of micro pores and micro cracks were observed and the increasing cell numbers raised the ability of cell adhesion to the ceramics. Osteoblastic cell culturing under the biomimetic condition caused cells extended the process three dimensionally on collagen gel. And Cells increased osteocalcin expression against mechanical stress by hydroxyapatite block.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨形成

1. 研究開始当初の背景

骨代謝、中でも骨形成における骨芽細胞の役割は、重要であり、近年その作用機序は徐々に明らかになりつつある。今まで、申請者らはある強さの加圧によるメカニカルストレスでは、骨芽細胞の骨形成活性を優位にさせることを明らかにしてきた(Mechanical stress suppresses the expression of CYP 24 mRNA in UMR-106 bone cells Iida S., Hatta M., Hasegawa T., and Yokoyama A. 北海道歯誌 Vol.28. No.1 36-40, 2007)。ただまだその詳細なメカニズムには不明なものも多い。

骨芽細胞は、各種サイトカインやホルモンにより、分化もしくはマクロファージからの破骨細胞への刺激・誘導をつかさどる役割を持っている。この骨代謝調節の中心となる細胞である骨芽細胞の分化機構解明は、骨粗鬆症などの病態研究において重要な意味をなす。骨芽細胞分化には、次第に細胞内のタンパク質発現パターンが変化していくのが特徴で、骨分化のマーカーにも利用されている。細胞にストレスを加え、そのマーカーの発現を検出することで分化の度合いを知ることが可能になる。この分化のキーとなる転写因子(Runx2, OSX)やキナーゼ(ERK, p38, JNKなどのMAPキナーゼ)を用いた生化学的解析と細胞骨格の観察などが必要であると考えた。

骨芽細胞による骨形成メカニカルストレスの強度に左右されることは想定されるが、実際にはその詳細なメカニズムは明らかでない部分が多い。細胞が、生きた状態で原子間力顕微鏡にて観察という、いままであまり報告がない手法でのアプローチを行えば、細胞骨格レベルでの骨芽細胞がメカニカルストレスに対応する状況が判明する。骨芽細胞の働きが解明されることは、骨粗鬆症治療にも十分貢献できる点でも意義が高いと考えられる。

2. 研究の目的

申請者らは、まず骨芽細胞と、骨の主成分であるハイドロキシアパタイトの親和性を確認するため、水酸化アパタイトセラミックスに対する細胞接着への超音波処理の影響を調べた。

さらにより骨の組成に近い材料として作成した、鮭由来アパタイト(HAp)とコラーゲン(Col)の複合体(HA-C)粉末を添加したマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞MC3T3-E1(E1)の培養では、細胞周囲を取り囲むHAp粒子がSEMにて観察された。したがって細胞活性の定量的な解析を目的として、HA-C粉末の生成温度・組成比・添加濃度と骨芽細胞様細胞活性の関係を検討した。

以上のように、骨芽細胞の水酸化アパタイトセラミックスへの親和性が確認された後、生体模倣環境を作り、その場での骨芽細胞様細胞の骨形成能などを、組織学的、生化学的

に分析を行った。

3. 研究の方法

研究の方法(1)

市販研究用HApセラミックス(HOYA製CELLYARD、直径13mm、厚さ2mm、pellet:気孔率0%)を用いた。HAp緻密体をHNO₃水溶液に完全溶解後、同種試料を浸漬し、120W、38kHz、10~20minで超音波溶解、洗浄、乾燥により部分溶解HAp(PD-Hap pellet)を作成した。それらをディッシュ(コスモバイオ社製)に入れ、メディウムにMG-63細胞(骨芽細胞様細胞)を播種、3日間静置培養した。細胞数を計測後、細胞を固定、走査型電子顕微鏡(SEM)により細胞の接着界面を観察した。

研究の方法(2)

HA-C粉末の調整 鮭の骨を材料として溶解析出法により調整した。合成温度は283Kあるいは293Kとし、ハイドロキシアパタイトとコラーゲンの配合比率(HAp/Col)は2.0あるいは3.5とした。合成したHA-C粉末は紫外線下にて24時間滅菌して使用した。

細胞培養 細胞はE1細胞を用いた。培養液はMEM培地を使用し、96wellカルチャープレートに1.67mg/ml、3.33mg/mlあるいは6.67mg/mlとなるようにHA-C粉末を懸濁させた培地を添加してE1細胞を500cells/well播種し、72時間培養した。

細胞増殖能の判定 Cell counting Kit-8(同仁化学研究所)を用いて、測定した。

研究の方法(3)

通常細胞培養; マウス頭蓋冠由来のMC3T3-E1(E1)細胞を使用し、24穴プラスチックディッシュ(Corning社製Falcon Tissue Culture Plate 24well)に播種し、コンフルエントになった後、37℃、5%CO₂下にて2日間培養を行った。

生体模倣条件; タイプコラーゲンをゲル状にしたもの(新田ゼラチン社製Cellmatrix Type1-A)を3mmほどの厚みになるように調整し、硬化後、E1細胞を播種する。コンフルエントになる前に使用したHApブロックを細胞上に乗せ、メカニカルストレスとして1日放置した。

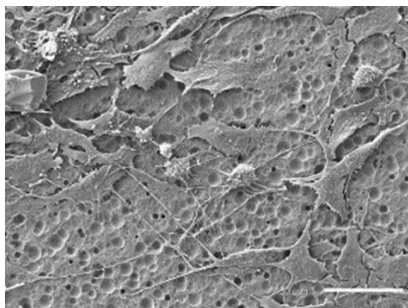
生化学的分析; 所定の日数を培養後、各ウェル内のメディウムを吸引し、そして各ウェルにTrizol(Life Technologies社製)200µlを滴下し、十分に細胞質が溶解された後、エッペンドルフに回収し、-80℃で保存。その後、クロロホルムで溶解後、4℃、毎分15000回転で15分遠心を行い、上部の水層のみを新しい1.5mlチューブに移し替える。そこにイソプロパノールを加え、軽く反転し、4℃、毎分15000回転で15分遠心。沈殿したペレットに触らないように、溶液を吸引。70%エタノールを加え、4℃、毎分15000回転で5

分遠心を行い、溶液を吸引後、乾燥を行い、白色ペレットになるようにする。RNase(-)H₂O でサスペンドし、NanoDrop-1000(エル・エム・エス社製)にてRNA量の測定を行った。tRNA量を各サンプルで調整後、PCR master mix(タカラバイオ株)によりc-DNA作成後、real time PCR(Applied Biosystems 7300 real time PCR system)にてGAPDH,Osteocalcin,RANKLをプライマーとし、PCR測定を行った。

多色蛍光タイムラプス顕微鏡観察用培養;細胞培養後の細胞を多色蛍光タイムラプス顕微鏡にて観察するため、特殊加工したカバーガラス(9×9mm)をひき、その上に細胞を播種する、もしくはコラーゲンゲルを一層流し、その上で細胞を播種する。毎日メディアウム交換し、コンフルエントになる前に、HApブロックにてメカニカルストレスを与えた。1日経過後、カバーガラスごと細胞をIwaki Glass base dish 径35mmに装着後、細胞像の撮影を行った。

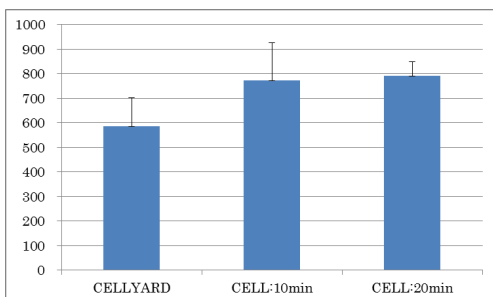
4. 研究成果

(1) 図1はアパタイトに過飽和な水溶液を用いた超音波溶解処理により初期のディスク形状は維持され、キャビテーションに由来するクレーター状のミクロ細孔と微小亀裂が観察された。



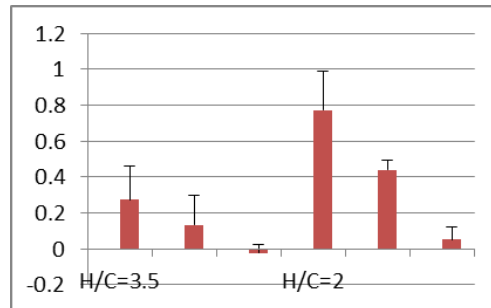
(図1 超音波溶解処理したブロック上の培養3日後のMG-63細胞) 細胞形状は多層膜状に接着することが分かった。

図2には、細胞数を示す。超音波処理を10分、20分行ったどちらもコントロールに比べて細胞数の増加が確認できた。



(図2 コントロールおよび超音波処理を行ったブロック上の細胞数。超音波溶解処理を行うと、細胞数が増加する)

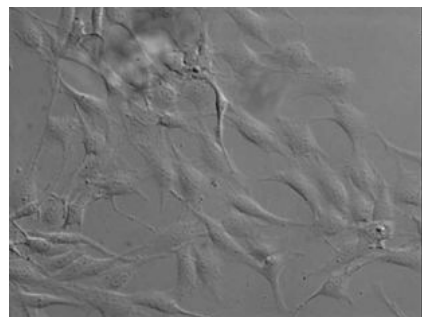
(2) 283Kで合成したHA-C粉末では、組成比に関係なく、HA-C添加濃度依存的に、細胞増殖能が徐々に低下していく傾向が認められた。細胞数の減少と細胞増殖の抑制が示唆された。また、HAp/Col=3.5と比較し、HAp/Col=2の方が細胞増殖能が高かった。(図3)



(図3 283K HA-C添加による細胞増殖能の変化グラフはコントロールを1とした値。H/C3.5, H/C2とも左から1.67, 3.33, 6.67mg/ml)

(3) 多色蛍光タイムラプス顕微鏡での観察の結果、通常のE1細胞上にHApブロックを乗せたものでは、細胞だけの像よりも少し細胞が伸びて四方に足を伸ばした状態であった。

またコラーゲンゲル上のE1細胞上にHApブロックを乗せたものでは、細胞だけの像よりもコラーゲンゲルなしの細胞同様に足を伸ばした足の長さが長い状態であった(図4)



(図4 2次元および3次元に足を伸ばしたE1細胞)

またreal time PCRの結果、ゲルなしの状態では、ストレスを与えたほうがオステオカルシンの値が高くなった(図5)

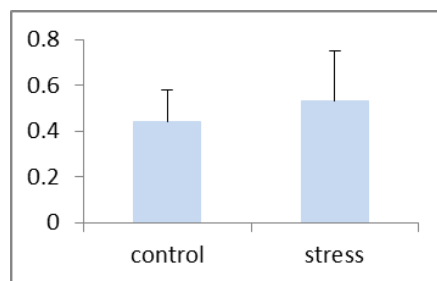


図5

またRANKLについては、図6に示す通り、

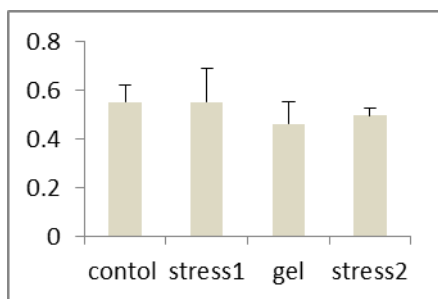


図6

ゲル状でもそれぞれストレスを与えたものでも変化はなく、骨吸収シグナルは同等に発生していることを示す。

以上より、水酸化アパタイトセラミックスに超音波溶解処理を行うことは、骨芽細胞様細胞を接着させるのに、効果のある手法であり、セラミックス表面にミクロ細孔と微小亀裂が観察され、細胞接着能が上がったことから、細胞数の増加が認められた。またハイドロキシアパタイトとコラーゲン複合体では、その組成により、細胞接着能が異なることがわかった。

さらに生体模倣環境下で骨芽細胞を培養した結果、細胞はコラーゲンゲル上ではその形態を変化させ、細胞突起を3次的に伸ばすことによりゲル内に進展し、またハイドロキシアパタイトによるメカニカルストレスに対しては、オステオカルシンの発現が増加したことから、骨形成能をプラスにさせる働きが出たことがわかった。

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2件)

Akazawa T, Murata M, Iida S, 他7名 (10番目): Surface design and water vapor-adsorption characteristics of biomimetic. Key Engineering 529, 430-435, 2013. 査読有

T Akazawa, M Murata, S Iida, 他10名 (12番目) Surface structure and biocompatibility of demineralized dentin matrix granules soaked in a stimulated body fluid Applied Surface Science No.262, 51-55, 2012, 査読有

[学会発表](計6件)

Akazawa T, Murata M, Minamida M, Iida S, et al.: Materials design and cell activity of apatite/collagen composites on Ti substrates by the electrospinnings, アジアバイオセラミックスシンポジウム, 2013/12/4, 京都大学(京都市)

赤澤敏之、村田勝、南田康人、飯田俊二ら: エレクトロスピニング法による細胞培養用アパタイト/チタン複合基材の

作製、日本セラミックス協会第26回秋季シンポジウム、2013/9/4、信州大学(長野市)

柏崎晴彦、原田尚樹、赤澤敏之、飯田俊二ら: 超音波部分溶解・析出処理による一方向性多孔体人工骨の骨誘導促進効果、第25回北海道骨粗鬆症研究会、2013/2/9、北海道大学(札幌市)

Akazawa T, Murata M, Nomura T, Shingyo K, Sakai K, Iida S et al.: Surface design and water vapor-adsorption characteristics of biomimetic. Bioceramics 24, 2012/10/21, 九州大学(福岡市)

赤澤敏之、執行達弘、野村隆文、山岸暢、稲野浩行、飯田俊二ら: 海洋資源由来吸収生体模倣複合材料の創薬と応用、日本セラミックス協会2012年度基礎科学部会セミナー・北海道地区セミナー、2012/7/27、北海道大学(札幌市)

飯田俊二、横山敦郎、原田尚樹、柏崎晴彦、赤澤敏之ら: 水酸アパタイトセラミックスの細胞接着特性に及ぼす超音波溶解処理の影響、日本セラミックス協会第24回秋季シンポジウム、2011/9/8、北海道大学(札幌市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯田 俊二 (IIDA SHUNJI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号: 30281827

(2)研究分担者

赤澤 敏之 (AKAZAWA TOSHIYUKI)

北海道立総合研究機構・産業技術研究本部・研究主幹

研究者番号: 80469692

横山 敦郎 (YOKOYAMA ATSURO)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 20210627

(3)連携研究者

なし