

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 13日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656090

 研究課題名（和文） 多孔質多層構造生体材料の開発と軟骨・骨多層組織再生
に関する基礎的研究

 研究課題名（英文） Development of porous multi-layer biomaterial and basic study
on regeneration of cartilage-bone multi-layer tissue

研究代表者

東藤 貢 (TODO MITSUGU)

九州大学・応用力学研究所・准教授

研究者番号：80274538

研究成果の概要（和文）：

本研究では、大規模な関節部の損傷に対する再生医療への応用を目指して、軟骨・骨多層系生体組織と同等の力学特性を示す多層構造足場材料の開発、および再生培養骨作製のための基礎技術の確立を主目的とした。足場材料として、生分解性高分子のPCLとPLLAおよびバイオセラミックスHAを原料とし、軟骨-骨の多層構造を力学的に模擬した多層構造の生体吸収性多孔質材料の開発に成功した。生体軟骨・骨多層組織と比較した結果、類似の圧縮特性を示すことが明らかになった。また、有機・無機複合系足場材料と間葉系幹細胞を組み合わせて一定期間培養することで、再生培養骨の作製に関する有益な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

The primary aim of this study was to develop multi-layer scaffolds having biomechanical compatibility with natural cartilage-bone layered tissue in order to apply to regenerative medicine for large scale injuries of joints. Fundamental fabrication process for regenerated artificial bone tissue was also tried to be established. Novel bioabsorbable multi-layer porous materials imitating the mechanical properties of cartilage-bone layered tissue was successfully developed by using biodegradable polymers such as PCL and PLLA with bioceramic HA. It was found that the compressive properties of the layered scaffolds are very similar to those of natural layered tissues. Regenerated artificial bone tissues have also developed by culturing mesenchymal stem cells with organic/inorganic composite scaffold for a certain period.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械材料・材料力学

キーワード：生体材料、再生医療、整形外科

1. 研究開始当初の背景

小規模な軟骨損傷の再生医療については、コラーゲンゲル中で軟骨細胞を培養して作製する再生軟骨による治療が実際に行われている。しかし、人工軟骨の力学的特性が生

体軟骨に劣ることが問題となっている。一方、膝や股関節の摺動部に変形性関節症、悪性腫瘍、壊死等が生じ病態が悪化すると、軟骨とその下部に存在する骨（軟骨下骨）までもが損傷するために広範囲な組織の再生が必要

となる。しかし、このような場合の再生医療は未だ確立されておらず、人工関節を置換する手術が広く行われているのが現状である。軟骨と骨からなる多層構造組織（図1参照）の再生治療を実現するためには、組織再生技術として、足場材として使用する多孔質多層構造足場材料の開発と目的とする組織再生技術の確立が必要不可欠であるが、軟骨・骨からなる多層構造組織の再生技術については、まだ基礎的研究がわずかに行われているにすぎない。一方、本申請者は、生体吸収性高分子系複合材料の多孔質化技術の開発（図2参照）、骨芽細胞・間葉系幹細胞による再生骨の創製、生体活性セラミックスによる骨再生研究、軟骨の粘弾性を考慮した股関節の応力解析等を整形外科医との共同研究で進めており、これまでに得られた技術と知見を統合することで、多層構造再生組織の創製研究への応用が可能であることを見出し、本申請課題を着想するに至った

2. 研究の目的

本研究は、多孔質多層構造足場材料の創製と、開発した新材料内で骨髄由来間葉系幹細胞を播種・分化・増殖させることによる軟骨・骨多層再生組織の創製を最終目的としている。2年間の研究期間内での目標は、各層の力学的特性（特に弾性率）が異なる生体吸収性多孔質多層構造足場材料の作製と足場材料内で間葉系幹細胞を軟骨細胞と骨芽細胞へ分化させ、最終的には異なる層で軟骨様組織と骨様組織をそれぞれ形成させた多層再生組織を創製することである。

3. 研究の方法

(1) 多層多孔質材料の作製と評価

①PCL-PLLA/HA 多孔質材料

原料としては、代表的生分解性樹脂であり医療用材料としても使用されるポリ L 乳 (PLLA) とポリカプロラクトン (PCL), リン酸カルシウム系バイオセラミックスであるハイドロキシアパタイト (HA) を用いた。多孔体の作製方法には、固液相分離法と凍結乾燥法を応用した。作製方法の概略は以下の通りである。PCL および PLLA の溶液をそれぞれジオキサンを溶媒として作製した後、PLLA 溶液には HA 粒子を分散させた。PCL 溶液と PLLA/HA 溶液をそれぞれ容器に入れて凍結させた後、両者を重ね合せて（上部が PCL, 下部が PLLA/HA）、上面から最大 1kPa 程度の負荷を加えて、凍結乾燥を行い、多層構造の多孔質体を作製した。

作製した多層構造体の微視構造を電界放射形走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) で観察した。また、圧縮試験を行い、マクロな応力-ひずみ関係を測定した。さらに、圧縮弾性率を評価した。

②強化構造型 PCL-PLLA/HA 多孔質材料

上述の多層多孔体では、PCL 多硬質層は軟骨層を模擬し、PLLA/HA 層は軟骨下骨（界面骨層）を模擬していたが、PLLA/HA 層の圧縮特性が実際の生体骨の特性よりも劣るために、PLLA/HA 層に PLLA 強化構造を導入した多層構造体を作製した。具体的には、円筒状 PLLA を作製し、その中央空洞部に PLLA/HA 多孔体を導入した新規構造を開発した。基本的な多孔体作製方法は前述の方法と同様である。

得られた多層構造体の微視構造を FE-SEM で観察した。また、圧縮力学特性を測定した。実際の生体多層組織の力学特性との比較を行うために、新鮮な豚の膝関節と股関節から多層組織を抽出し、同様の圧縮試験を行って、今回開発した材料の力学特性との比較を行った。

(2) 有機・無機複合多孔体と間葉系幹細胞による再生培養骨の作製と評価

①複合系足場材料の作製

HA と類似のリン酸カルシウム系バイオセラミックスである第三リン酸カルシウム β -TCP の多孔体をテンプレート法を用いて作製した。具体的には、ポリウレタン製スポンジに β -TCP 粒子を混合した PVA に含浸させて、焼結することで多孔体を作製した。次いで、 β -TCP 多孔体をコラーゲン溶液に浸した後凍結し、凍結乾燥を行うことで、 β -TCP 多孔体の空孔にコラーゲン多孔質構造が挿入された、2相構造型多孔体を作製した。

②再生培養骨の作製

上述の2相系多孔体を足場材料として、ラット間葉系幹細胞を最長 28 日間培養し、再生培養骨の作製を試みた。培地には骨分化誘導剤を混合させ、骨芽細胞への分化を促進させた。一定期間毎に、圧縮力学特性、細胞数、ALP 活性、骨分化マーカーを測定すると共に、FE-SEM で細胞外基質 (ECM) 形成挙動を観察した。これらの結果より、幹細胞の増殖・分化・ECM 形成に及ぼす足場材料の影響について考察した。

4. 研究成果

(1) 多層多孔質材料

①PCL-PLLA/HA 多孔質材料

PCL 多孔体と PLLA/HA 多孔体が層状に重なった多層材料の微視構造を図1に示す。PCL 層と PLLA/HA 層の間には、PCL と PLLA/HA がブレンドされた中間層が存在することがわかる。このような中間層の存在は、PCL 層と PLLA/HA 層が分離せずに界面結合を形成していることを示している強固にしている。

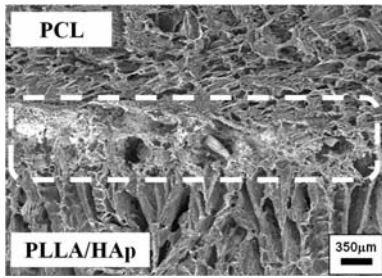


図1 PCL-PLLA/HA 多層多孔質材料

図2に圧縮変形下での初期弾性率 E1 と第2弾性率 E2 の測定結果を示す。ここで横軸はHAの含有率を示している。E1は主により延性的なPCL層の弾性変形に対応しており、E2は主にPLLA/HA層の変形に対応している。したがって、E1へのHA含有率の影響は小さいが、E2はHA含有率の増加とともに増加する傾向を示す。また、図3に初期弾性率を線形弾性理論と3次元有限要素解析により予測した結果を示す。実験結果と予測結果は良い一致を示しており、初期弾性率は、理想化した複層モデルで予測可能であることがわかる。

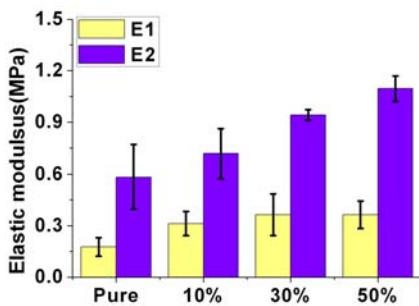


図2 初期弾性率と第2弾性率

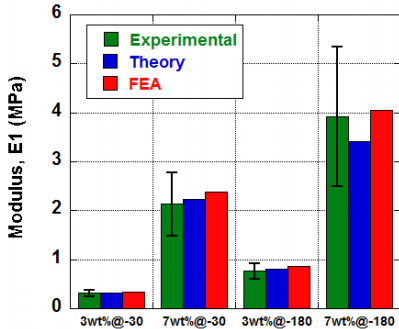


図3 初期弾性率の実験結果と理論との比較

②強化構造型 PCL-PLLA/HA 多孔質材料

強化構造型多層多孔質材料のFE-SEM画像を図4に示す。上層は軟骨に対応するPCL層であり、下層は軟骨下骨に対応するPLLA強化PLLA/HA層である。また、PCL-PLLA/HA多孔体と同様に、中間部に上層と下層のブレンドにより形成されたPCL/PLLA/HA層が存在する。

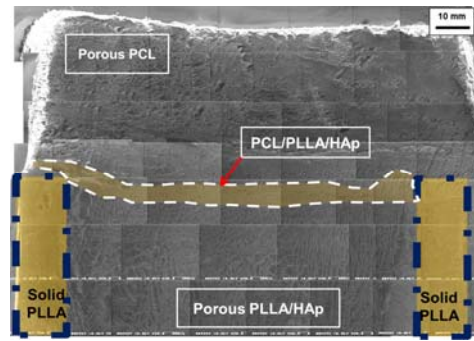


図4 強化型多層多孔質材料

図5に強化型多層多孔質材料の圧縮下での応力-ひずみ曲線を示す。初期の低弾性部はPCL層の変形に対応しており、PCLが圧縮変形することで気孔が消失し緻密化すると弾性率が上昇する。その後の急峻な応力の増加は、強化PLLA/HA層の変形に対応している。このような2段階型の応力-ひずみ挙動は、生体の軟骨・骨組織の変形挙動と対応している。また、表1に初期弾性率 E1 と第2弾性率 E2 および実測した豚関節組織の E1 と E2、文献から得たヒトの軟骨 (E1) と海綿骨 (E2) の弾性率を示す。本研究で開発した強化型多層多孔質材料の E1 と E2 が、生体組織とほぼ同等の値を示すことがわかる。

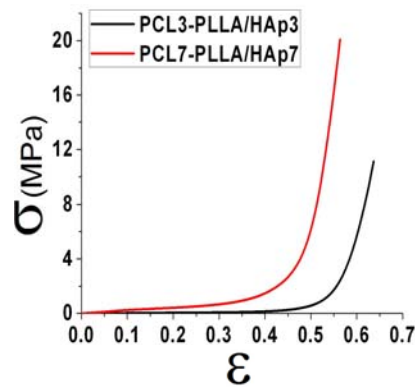


図5 圧縮応力-ひずみ曲線

(2) 再生培養骨

骨再生用に開発したコラーゲンとβ-TCPの2相多孔質材料の微視構造を図6に示す。β-TCPの多孔質骨格構造の内部に、コラーゲンの多孔質構造が形成されている。

図7に圧縮力学特性(弾性率、強度)に及表1 初期弾性率と第2弾性率の比較

	E1 (MPa)	E2 (MPa)
Porcine knee joint	1.24	144
Porcine hip joint	0.46	97.2
Human joint	0.4 - 0.8*	247 - 360**
PC-PLHA_A_01	0.22	294
PC-PLHA_A_02	2.89	300
PC-PLHA_B_01	0.25	211
PC-PLHA_B_02	2.35	229

ぼす細胞培養の影響を示す。弾性率は、最初の2週間は細胞培養と共に低下する傾向にあるが、その後、21日から28日にかけて回復する傾向を示す。最初の低下はβ-TCP 骨格構造の劣化（β-TCP は培地中で分解する性質をもつ）に起因すると考えられるが、14日目以降で幹細胞が骨芽細胞に分化し、活発なECM形成を行うことで構造が強化され弾性率が回復したことが予測される。一方、強度は最初の1週間は減少する傾向にあるが、その後28日目まで増加を続ける。これらの結果は、細胞の増殖とECM形成は、弾性率よりも強度に対して、より大きな影響を及ぼすことを示唆している。

細胞数と骨分化マーカーのひとつであるオステオネクチン（骨芽細胞により分泌されるたんぱく質の一種。骨形成に関連している）の変化を図8に示す。細胞数は、培養期間の増加と共に順調に増加しており、特に21日以降は、β-TCP 単体では細胞の増殖は停止するが、β-TCP/コラーゲン複合型では28日目まで増殖が継続する。また、オステオネクチンも最初の7日目を除き、終始β-TCP/コラーゲン複合型の方が高い発現率を示していた。

以上、これらの結果を統括すると、本研究において開発したβ-TCP/コラーゲン2相多孔質構造材料が、骨再生用足場材料としての有力な候補材となることが示唆された。

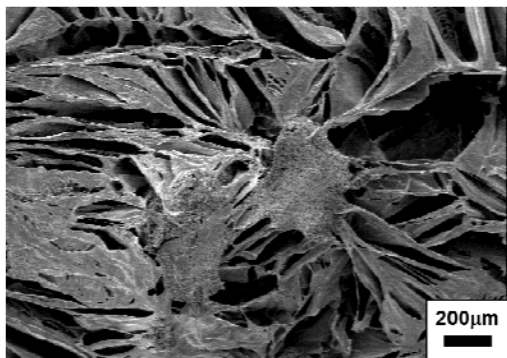
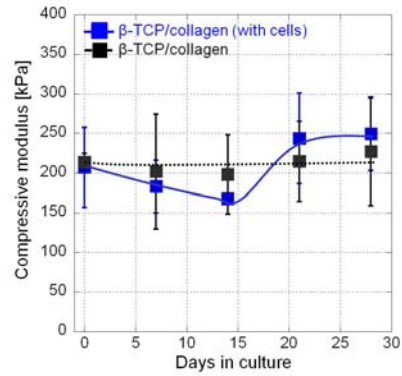
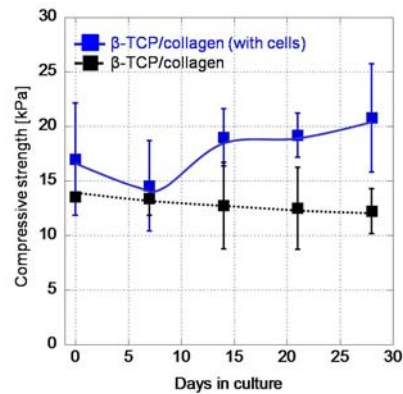


図6 β-TCP/コラーゲン2相多孔質材料

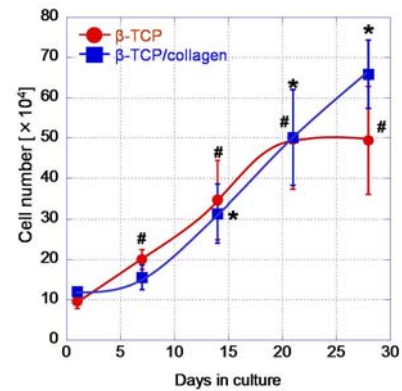


(a) 圧縮弾性率

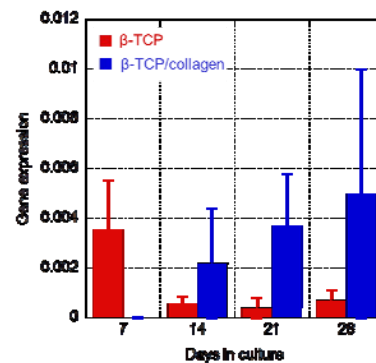


(b) 圧縮強度

図7 圧縮特性に及ぼす細胞培養の影響



(a) 細胞数



(b) オステオネクチン

図8 細胞数とオステオネクチンの変化

最後に足場材料と幹細胞をハイブリッド化して作製した軟骨・骨を模擬した2層再生組織の一例を図9に示す。軟骨層はコラーゲンゲルと幹細胞，骨層は前述の2層多孔体と幹細胞から形成されており，それぞれの層を別個に培養した後，積層させてさらに培養して作製した。今後は，この2層再生組織を基に，さらに研究を進めていく予定である。

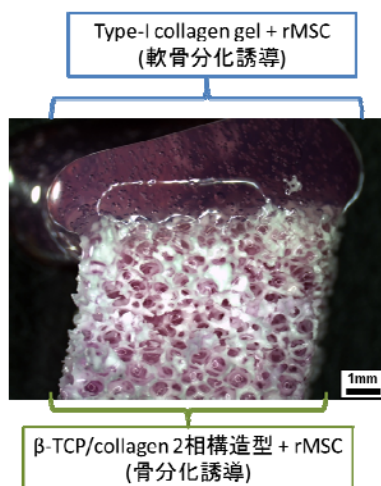


図9 軟骨・骨2層再生組織

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6件)

- ① Sunghyen Hwang and Mitsugu Todo, Biomechanical effect of implantation of chitosan/MWNTs reinforced scaffold into damaged femur, Journal of Novel Carbon Resource Science, 7, 2013, 1-6, 査読有.
- ② Sunghyen Hwang and Mitsugu Todo, Compressive deformation behavior of bioabsorbable porous layered composite materials for articular tissue engineering, Journal of Solid Mechanics and Materials Engineering, 7(2), 2013, 1-10. 査読有.
- ③ Phanny Yos and Mitsugu Todo, Development and characterization of poly(ϵ -caprolactone) reinforced porous hydroxyapatite for bone tissue engineering, Key Engineering Materials, 529-530, 2013, 447-452, 査読有.
- ④ Sunghyen Hwang and Mitsugu Todo, Characterization of compressive deformation behavior of multi-layer porous composite materials for articular tissue engineering, Journal of Mechanical Science and Technology, 26(7), 2012, 1999-2004, 査読有.
- ⑤ 荒平高章, 東藤 貢, コラーゲン/ β -TCP 複合系scaffoldの圧縮力学特性に及ぼす間葉系幹細胞培養の影響, 臨床バイオメカニクス, 33, 2012, 237-244, 査読有.
- ⑥ 荒平高章, 東藤 貢, 多孔質バイオセラ

ミックス人工骨の圧縮力学特性に及ぼすコラーゲンコーティングの影響, 粉体および粉末冶金, 59(7), 2012, 421-424, 査読有.

[学会発表] (計8件)

- ① 東藤貢, 荒平高章, 名井陽, 有機・無機2相多孔質構造体と間葉系幹細胞を用いた骨再生に関する基礎的研究, 第12回日本再生医療学会総会, 2013年3月21日, 横浜市.
- ② 東藤貢, 荒平高章, 名井陽, 構造が異なる2種類の複合系足場材を用いた骨髄由来間葉系幹細胞の培養と増殖・分化・ECM形成能の比較, 第12回日本再生医療学会総会, 2013年3月21日, 横浜市.
- ③ 荒平高章, 東藤貢, 骨組織工学のための有機・無機2相多孔質材料の創製と評価, 第25回バイオエンジニアリング講演会, 2013年1月10日, つくば市.
- ④ 荒平高章, 東藤貢, 名井陽, β -TCP/collagen scaffoldの圧縮特性に及ぼす間葉系幹細胞培養の影響, 第39回日本臨床バイオメカニクス学会, 2012年11月10日, 千葉市.
- ⑤ Sunghyen Hwang and Mitsugu Todo, Characterization of compressive deformation behavior of multi-layer porous composite materials for articular tissue engineering, International Conference on Materials and Reliability 2011, 2011年11月22日, Busan, Korea.
- ⑥ Sunghyen Hwang and Mitsugu Todo, Development of polymer/composite multi-layer porous material for osteochondral tissue engineering, The 8th Korea-Japan Joint Symposium on Composite Materials, 2011年11月17日, Changwon, Korea.
- ⑦ Hwang Sunghyen, 東藤貢, 関節組織再生のための積層構造 scaffold の圧縮変形挙動, 日本機械学会材料力学講演会 (M&M2011), 2011年7月17日, 北九州市.
- ⑧ Hwang Sunghyen, 東藤貢, 軟骨・骨インターフェイス組織再生のための多層 scaffold の圧縮変形挙動, 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会, 2011年1月7日, 大阪市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東藤 貢 (TODO MITSUGU)

九州大学・応用力学研究所・准教授

研究者番号: 80274538

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し