

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3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659909

研究課題名（和文） 骨再生開始の核として働く人工石灰化球の創製

研究課題名（英文） A study of a synthetic construct for bone development

研究代表者 鈴木 治 (OSAMU SUZUKI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60374948

研究成果の概要（和文）：

本研究では骨形成の開始場所を模倣して非コラーゲン性タンパク質に親和性がある新規リン酸カルシウム結晶の作製とそのタンパク質吸着特性の検討、また骨欠損充填のための埋入可能な形態の成型を天然高分子ゲル作製により検討した。F含有リン酸カルシウムはF導入法に依存して異なる物理化学的性質を示し、F共存下で得たF含有リン酸カルシウムは比較的高い溶解性を示すとともにアルブミンなどモデルタンパク質に対して高い親和性を示した。天然高分子ゲルによる水和ゲル形成を検討し骨欠損への埋入可能性が確認できた。

研究成果の概要（英文）：

Synthetic calcium phosphates, having a higher adsorption affinity with non-collagenous proteins, such as albumin, were prepared as a source material for an implantable construct. Fluoride-containing calcium phosphates, showing a relatively higher solubility and a higher protein adsorption affinity, were developed. Natural polymer, such as alginate, was used to study for the preparation of the implantable gel form.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：石灰化球，タンパク質，骨再生

1. 研究開始当初の背景

骨欠損を修復するために細胞と人工マテリアルを併用する組織工学的な手法が多く研究されており、骨再生が必要とされる歯科・口腔外科および整形外科の領域において、より生体親和性の高い付加価値のある組織工学手法の開発が望まれていた。本研究では骨形成の早期プロセスに着目してより高い生体親和性があり骨形成の核として働く可能性のある人工的な石灰球創製の可能性について検討した。背景となる研究実績として合成リン酸カルシウムをマウス皮質骨表面

に埋入すると血清由来タンパク質を集積して骨形成を開始するという結果があった (Suzuki O et al. Bone Miner 20:151-166, 1993)。すなわち、マウスの頭蓋冠上骨膜下に顆粒状のリン酸カルシウムを埋入すると骨形成が開始されるが、透過型電子顕微鏡観察によると、埋入リン酸カルシウム周囲には非コラーゲン性の基質タンパク質が集積した状態の無機・有機構造体が形成され (Suzuki O et al. Tohoku J Exp Med 164:37-50, 1991)、この構造体から骨形成が開始するという成果を得ていた。この構造体

は骨形成の開始に積極的に関わる構造的、生物学的な機能を有する可能性を考察した。そこで、生体の骨形成の開始場所を模倣して血清タンパク質や成長因子に親和性がある新規なリン酸カルシウム結晶の作製およびその結晶とタンパク質の複合体の調整、また、最終的には骨欠損への埋入を実現していくために形態付与を目的とした天然高分子を用いた水和ゲルの作製も検討した。

2. 研究の目的

細胞を活用する組織工学あるいはバイオマテリアルを用いる骨欠損の骨再生は、これらの足場を起点とした骨形成が基本となっている。本研究は骨再生開始の核として働く人工石灰化球の模倣構造体を作製できるかどうかを研究し、その特性や骨欠損への埋入可能性を検討するものである。骨の形成、再生で観察される骨芽細胞が作り出す硬組織はコラーゲン上にヒドロキシアパタイトが石灰化した組織が基本型となる。一方、骨には複数の非コラーゲン性タンパク質が含まれており一部はヒドロキシアパタイトに吸着している。そこで、タンパク質に親和性が高いと想定されるリン酸カルシウム結晶を新たに合成し、その物質のキャラクタリゼーション、また、血清由来タンパク質を用いたモデルタンパク質の吸着特定、さらには骨の欠損へ埋入可能な操作性を持った水和ゲルの成型体の作製を検討した。これらの研究に基づいて、最終的には人工石灰化球が設計・作製できるかどうか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リン酸カルシウム結晶の調整

先に確立し報告した湿式合成法 (Suzuki O et al. *Tohoku J Exp Med* 164:37-50, 1991) に基づきヒドロキシアパタイトの前駆体であるリン酸オクタカルシウム (OCP) を合成した。次にやはり先に報告した方法 (Suzuki O et al. *Cells Mater* 5:45-54, 1995) にて、OCP 粒子を分散させたトリスバッファーによる緩衝水溶液に F を任意の濃度で含有させて一定時間 37°C に保持して浸漬させ、F 含有リン酸カルシウム群を得た。また、別の方法として湿式合成法時に任意の濃度の F を共存させ温水中で結晶を育成して F 含有リン酸カルシウム群を得た (Shiwaku Y et al. *J Ceram Soc Japan* 118:402-405, 2010)。

(2) リン酸カルシウム結晶のキャラクタリゼーション

結晶の同定を X 線回折法、フーリエ変換赤外分光法にて行った。また Ca および P の含有量を ICP による化学分析にて、また F の含有量をフッ素電極による化学分析にて決定

した。結晶の形態を走査型電子顕微鏡にて観察した。さらに培地中での溶解性の評価を一定時間浸漬後に培地上清の過飽和度を計算して溶解度として見積もった。過飽和度は先に報告した方法にて (Suzuki O et al. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 77:201-212, 2006), リン酸カルシウムの溶解度積とイオン活動度との比から計算した。結晶浸漬後の上清の Ca やリン酸など主要なイオンの濃度を定量し、また培地の pH を用いて決定した。

(3) タンパク質の吸着親和性の研究

F 含有リン酸カルシウム結晶の表面積を表表面積の数値に基づいて一定となるようにして HEPES 緩衝液中 pH7.4 下で牛血清アルブミンの吸着を測定した。タンパクアッセイ法にて上清の濃度を決定し、その値から結晶に吸着したと想定される量を定量して、その値を結晶の単位表面積当たり換算して吸着量として決定した。

(4) 天然高分子ゲル作製

アルギン酸水溶液から、架橋剤となるイオン存在下の溶媒中で埋入体を想定して適切なサイズとできるかゲル化させて成型体を作製した。

以上の検討から、結晶とタンパク質を含有させたゲル埋入体の基本型を設計・作製するための基盤データを収集した。

4. 研究成果

(1) リン酸カルシウム結晶の性質

F 溶液に浸漬して得た F 含有リン酸カルシウム、F 共存下で得た F 含有リン酸カルシウムともに、初期 F 濃度に依存して結晶に含有される F 濃度は高くなった。また双方とも投入する F の濃度に依存して HA 様結晶への結晶化が促進された。結晶形態も F 濃度に依存して変化した。前者では結晶の無定形化が進んだのに対して、後者では板状から F 含有 HA 様の特徴であるロッド状へ変化しており、異なる結晶化プロセスが生じていることがわかった。また、結晶浸漬後の培地の過飽和度から見積もった溶解度はそれぞれの結晶でオリジナル OCP 結晶のそれとは異なっていた。しかしながら、F 共存下で得た F 含有リン酸カルシウム群の溶解度は F 含有量が高くなってもなお、オリジナル OCP 結晶のそれに比較的近い状態 (高い溶解度) を維持していた。F 含有リン酸カルシウムは F 含有 HA を形成する傾向があり HA に比較して溶解度が低下することが知られている (Moreno EC et al. *Nature* 247:64-65, 1974)。これに対して本研究で、F 共存下で得た F 含有リン酸カルシウムは比較的高い溶解度を維持していたこ

とから、これらのF含有リン酸カルシウム群は、結晶の周囲環境に対してより反応性の高いリン酸カルシウムとなっている可能性のある物質であることがわかった。

(2) F含有リン酸カルシウムのタンパク質吸着量

F溶液に浸漬して得たF含有リン酸カルシウム、F共存下で得たF含有リン酸カルシウムについて、オリジナルOCP結晶との比較で牛血清アルブミンの吸着量を調べたところ、F共存下で得たF含有リン酸カルシウムの吸着量がF溶液に浸漬して得たF含有リン酸カルシウムの吸着量より優っていた。但し、これらの吸着量はオリジナルOCPの吸着量よりも小さかった。この検討から、F共存下で得たF含有リン酸カルシウムの牛血清アルブミンに対する反応性が高いことが裏付けられた。

(3) 天然高分子水和ゲルの成型

結晶を含有させることが可能な天然高分子水和ゲルの成型について検討した。先にリン酸カルシウムとアルギン酸のスポンジとの複合体を作製し、培養によって骨芽細胞様細胞がスポンジ内へ比較的良好に侵入できること、同スポンジはマウス頭蓋冠欠損埋入によって良好な骨再生能を示すことを確認している (Fuji T et al. *Tissue Eng Part A* 15:3525-3535, 2009)。本研究ではスポンジではなく水和ゲルの状態での結晶含有を考え、水和ゲル成型体を架橋剤となるイオンを含有させた水溶液中にアルギン酸を投入してゲル化させることで成型体の作製を検討した。結晶の含有に適切なアルギン酸濃度と投入方法を検討した。小動物の骨欠損に埋入可能なサイズの成型体を得られることが確認できた。結晶含有性については今後の計画の課題とする。

(4) 埋入可能なリン酸カルシウム結晶と高分子水和ゲル成型体との複合体について

骨再生においては埋入する材料に、生体親和性、骨形成活性、そして操作性が求められる。本研究では埋入可能な骨形成の開始点の構造体の基本型を作製するための基盤となるデータを作製できた。すなわち、ミネラル成分となるF含有リン酸カルシウム結晶、そして、アルギン酸の水和ゲルについて検討した。特にF含有リン酸カルシウム結晶について詳細な検討を行い、非コラーゲン性タンパク質のモデルとして牛血清アルブミンの吸着能が、結晶性状に依存して顕著に異なることがわかった。この性状はF含有量に依存して変化した。また、上述したように、F共存下で得たF含有リン酸カルシウムにおいては、予想に反して溶解度の低下が生ぜず、オリジ

ナルOCP結晶に比較的近い溶解性を示す結晶が作製可能となった。本研究ではゲル成型体に含有する結晶としてどちらの合成方法で作製したF含有リン酸カルシウムが適するかを判断するまでの検討はできなかった。先にプロテオーム解析から血清由来タンパク質のリン酸カルシウム結晶に特異的吸着を示すタンパク質群を同定した (Kaneko H et al. *Anal Biochem* 418: 276-285, 2011)。この研究では骨組織の代謝に関連するタンパク質も吸着タンパク質として含まれていることから、これら吸着タンパク質はリン酸カルシウム結晶の骨伝導能に関連するタンパク質であることが示唆された。一方、リン酸カルシウム結晶、天然高分子 (コラーゲン) のスポンジにラット骨髄由来の未分化間葉系細胞の播種効果も先に検討しており、未分化間葉系細胞の分化促進にリン酸カルシウム結晶の導入が効果的であることを、*in vivo* のラット頭蓋冠骨欠損への埋入によって確認している (Kawai T et al. *Eur Cell Mater* 22:124-136, 2011)。本研究と先のこれらの研究から得られたデータに基づき、今後、未分化間葉系細胞の播種性の検討、リン酸カルシウム結晶、タンパク質 (成長因子として働くタンパク質)、水和ゲルの組み合わせの検討を進めていく予定である。

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 2 件)

(1) Shiwaku Y, Anada T, Yamazaki H, Honda Y, Morimoto S, Sasaki K, Suzuki O. Structural, morphological and surface characteristics of two types of octacalcium phosphate-derived fluoride-containing apatitic calcium phosphates. *Acta Biomater* 8: 4417-4425, 2012. doi: 10.1016/j.actbio.2012.07.041 (査読あり)。

(2) Kaneko H, Kamiie J, Kawakami H, Anada T, Honda Y, Shiraiishi N, Kamakura S, Terasaki T, Shimauchi H, Suzuki O. Proteome analysis of rat serum proteins adsorbed onto synthetic octacalcium phosphate crystals. *Anal Biochem* 418: 276-285, 2011. doi: 10.1016/j.ab.2011.07.022 (査読あり)。

[学会発表] (計 4 件)

① 鈴木堅太郎, 穴田貴久, 今泉秀樹, 宮武尚央, 井樋栄二, 鈴木治. 注入可能なリン酸オクタカルシウム/ヒアルロン酸複合体材料の皮質骨造成効果. 第 34 回東北骨代謝・骨

粗鬆症研究会. 2013年02月02日～2013年02月02日. 仙台.

② 森元慎二, 穴田貴久, 本田義知, 鈴木治. リン酸オクタカルシウム (OCP) の in vitro 生体適合性評価. 平成24年度秋期第60回日本歯科理工学会学術講演会. 2012年10月13日～2012年10月14日. 九州大学 (福岡).

③ 川井忠, 穴田貴久, 益田泰輔, 本田義知, 坂井裕大, 加藤幸夫, 鎌倉慎治, 越後成志, 鈴木治. MSC の分化条件の検討と OCP/Col と組み合わせた担体の骨再生能の検討. 第33回東北骨代謝研究会. 2012年2月4日. 仙台.

④ 鈴木 治. 骨ナノミネラル形成環境が調節する骨芽細胞分化. 新世紀世界の成長焦点に築くナノ医工学拠点: 第61回グローバルCOE「ナノ医工学シリーズセミナー」(招待講演). 2011年7月28日. 東北大学 (仙台).

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 治 (OSAMU SUZUKI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 60374948

(2) 研究分担者

島内 英俊 (SHIMAUCHI HIDETOSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 70187425

鎌倉 慎治 (SHINJI KAMAKURA)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号: 80224640

穴田 貴久 (TAKAHISA ANADA)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 30398466

(3) 連携研究者

()

研究者番号: