

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293389

研究課題名(和文) ナノ物質を用いたハイブリッド型口腔領域用生体材料の創製と安全性の検討

研究課題名(英文) Development and evaluation on safety of Hybrid nano biomaterial for reconstruction for oral and maxillofacial region

研究代表者

横山 敦郎 (YOKOYAMA, ATSURO)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20210627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノ物質が骨形成に与える影響の解明を目的としたカーボンナノホーン(CNHs)が骨髄間質細胞に与える影響の検討、デンタルインプラント開発を目的としたカーボンナノチューブ(CNTs)とCNHsのチタン表面修飾ならびに開発した材料についての細胞培養と動物実験、さらにCNHsの生体材料としての安全性解明のためのCNHsを局所埋入後の体内移行について検討を行った。その結果、CNHsはOncostatin Mを介して骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を促進すること、CNTsおよびCNHsの表面修飾により骨形成が促進されること、CNHsは局所埋入した場合は他臓器には蓄積されないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Effects of CNHs on bone formation, surface modification of CNTs and CNHs on titanium and their characteristics on bone formation, and the distribution of CNHs to internal organs used for biomaterial locally were evaluated in this study. CNHs accelerated differentiation of bone marrow cells to osteoblasts by Oncostatin M. The surface modification with CNHs and CNTs increased osteogenesis on titanium. CNHs have not been distributed in other organs on the local delivery.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：カーボンナノホーン カーボンナノチューブ チタン マクロファージ 骨髄間質細胞 骨形成 安全性 泳動電着

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノ物質(CNMs)は、炭素原子のみから構成される新素材であり、基礎研究とともに様々な材料・製品へ応用が進められている。医学領域への応用についても研究が進められているが、生体材料への応用に関する研究は、漸く端緒についたばかりである。我々は、2003年より、CNMsの生体材料への応用、特に再生医療用生体材料の開発を目的に基礎研究を行い、細胞毒性が低く、生体内への埋入試験により起炎性が低いこと、骨芽細胞が強固にCNTsに結合するといったCNMsの生物学的特性を明らかにし、この生物学的特性を活かして骨芽細胞培養用3次元スキャホールドの開発やCNTsコート培養用ディッシュの製品化、GBR膜への応用、さらにCNMsの高機能化について成果を報告してきた。これらの基礎的研究結果から、CNMsの骨形成にはマクロファージの関与が示唆され、これを解明することにより新たな生体材料開発につながるのではないかと考えた。さらに口腔領域における生体材料として応用を考え、CNMsを複合したハイブリッド型デンタルインプラントを開発し、有用性の評価を行うとともに、CNMsの安全性確認のため、生体内における移行と分布等の安全性を解明するという考えに至った。

2. 研究の目的

上記のような状況を鑑み、以下を目的として本研究を行った。

(1) CNMsが骨形成に与える影響の解明を目的として、カーボンナノホーン(CNHs)を貪食したマクロファージが骨髄間質細胞に与える影響について検討する。

(2) デンタルインプラント開発を目的としてCNTsとCNHsをチタン表面へコーティングするとともに開発した材料の生体適合性を検討する。

(3) CNHsの生体材料としての安全性を解明するためにCNHsを局所埋入し、その体内移行、分散および排出について検討する。

3. 研究の方法

(1) CNMsが骨形成に与える影響

ヒトマクロファージ(hMDM)を96well plateに播種し、4時間後にCNHsを5.0 μ g/mLの濃度で培地に分散させたCNHs分散培地に置換した。24時間培養後、細胞死についてフローサイトメトリーを用いて評価した。hMDMをCNHsと培養したものとhMDM単独で培養したものについて遺伝子発現の差異をマイクロアレイで解析した。次に、ヒト骨髄間質細胞(hMSC)とhMDMの共培養を行った。細胞播種4時間後にCNHs分散培地またはAlexa Fluor 488にてラベル化したCNHs(Alexa-CNMs)分散培地に置換した。24時間後、蛍光顕微鏡により、Alexa-CNMsの動態の観察を行った。また、透過型電子顕微鏡(TEM)によりCNHsと細胞小器官の観察を行った。さらに、7日間お

よび14日間培養を行い、hMSCの分化の指標となるALP活性を測定した。

(2) CNTsおよびCNHsのチタン表面へのコーティングおよび生体適合性の検討

CNTsについて

チタンを陽極酸化処理し、シランカップリングを行った後に、多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)分散液に浸漬することによりMWCNTsをチタンに固着した。ラット大腿骨内に埋入し、チタン-CNT-骨組織の界面を観察するため、集束イオンビームにて観察部位を加工し、EDSによる元素分析を行った。

CNHsについて

チタンを陽極酸化処理し、CNHs-COOHを無水エタノールに分散し、種々の条件下で泳動電着を行い、CNHsのコーティングの状態をSEMにて観察した。骨芽細胞様細胞Saos2の培養特性を検索するとともに、ラット大腿骨内に埋入し、組織学的検索を行った。

(3) 局所埋入したCNHsの生体内移行、分散、排出

ラット頭頂骨に骨欠損部を形成し、CNHsを固着した膜で被覆し、経時的に頭頂骨および各臓器(脳、肝臓、腎臓、肺、脾臓、大腿骨)を摘出し、CNHsに含有させた酸化ガドリニウムを誘導結合プラズマ分析法(ICP-発光分光法)にて計量することにより各臓器への移行したCNHs量を検討した。

4. 研究成果

(1) CNMsが骨形成に与える影響

CNHの細胞への取り込みについて

CNHsはhMDMに取り込まれるが、hMSCにはほとんど取り込まれず、共培養でも同様に、ほとんどのCNHsはhMDMの内部で観察された。CNHsを貪食したhMDMは、コントロールと比較して形態は変化しなかった。hMDMにとりこまれたCNHsはライソゾームに存在した。ライソゾーム中のCNHsの結晶構造の変化はみられなかった。(図1)

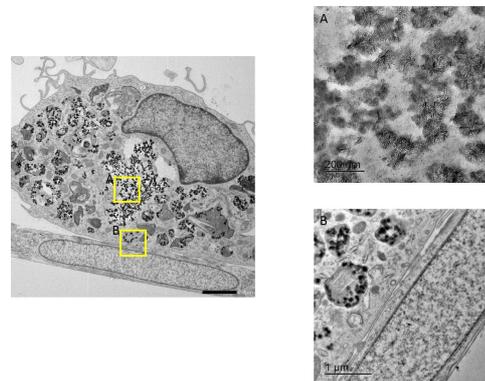


図1 hMDMとhMSC共培養7日後のTEM像(左図上方の細胞がhMDM 下方の細胞がhMSC、右図は左図AおよびBの拡大図)

細胞死について

CNHs50mg/mLの濃度下でもhMDMのアポトーシスやネクローシスを引き起こさなかった。マイクロアレイの結果から、hMDM単独培養で

あるコントロール(CTRL)と比較して CNHs 存在下ではほとんどの遺伝子の発現は変化しないことが明らかとなったが、CTRL に比べて CNHs で発現が増加(1 以上)している遺伝子は 16 個であった。

CTRL に比べて CNHs で発現が減少(-1 以下)している遺伝子は 14 個であった。発現が増加した遺伝子の gene ontology 解析では、CCL3, CCL4, CXCL12 が挙げられた。CCL3, CCL4, CXCL12 はリアルタイム PCR の結果においても有意差がみられた。

ALP 活性について

7 日後の共培養の結果、CNHs を添加しない CTRL においても hMSC 単独培養と比較して共培養では ALP が上昇した。さらに CNHs の存在下では、共培養後の ALP は CTRL と比較して有意に高かった(図 2)。

14 日後には、CTRL においては hMSC 単独と比較して変化しなかったが、CNHs 存在下では ALP が上昇した。以上より、hMDM と hMSC がコンタクトしている状態で CNHs を添加すると ALP が上昇することが明らかになった。

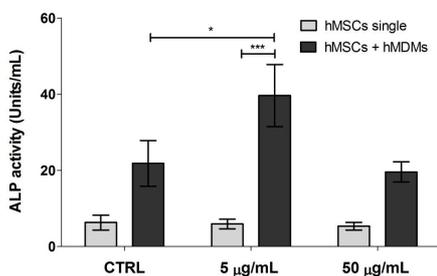


図 2 : CNH 添加 7 日後の ALP 活性

Oncostatin M (OSM) について hMSC と hMDM を共培養した培地中の OSM は、CNHs 存在下で上昇した。OSM の抗体を添加したところ、CNH の存在下では OSM の濃度が高くなるほど ALP が減少した。

以上の結果から、CNHs をとりこんだ hMDM と接した hMSC は OSM を介して骨芽細胞への分化が促進されることが明らかとなった。

(2) CNTs および CNHs のチタン表面へのコーティングおよび生態適合性の検討

CNTs について

シランカップリング処理した後に CNT 分散液に浸漬することにより陽極チタン表面に CNT を均一にコーティングすることが可能であった。CNTs コーティングチタンをラット大腿骨に埋入すると陽極酸化チタンと比較して骨形成が促進されることが明らかとなった。EDS による観察では、骨内埋入後 4 週間においてもチタンと骨組織の間に炭素が認められたことから CNTs はチタン表面に存在していることが示された。(図 3)

CNHs について

各種条件下で泳動電着を行った結果、300V で 180 秒の条件が CNHs を陽極酸化チタン表面に最も均一に付着することが明らかとなった。(図 4)

CNHs を表面処理したチタン上で骨芽細胞様細胞 Saos2 を培養したところ、細胞は伸展し、CNHs に接していた(図 5)。CNHs を処理していないチタンと比較し、DNA 量は有意に多かったが、ALP 活性には差が認められなかった(図 5)これらのことから、CNHs 表面処理は、骨芽細胞の増殖を促進するが、分化については影響を与えないことが示唆された。

ラット大腿骨に埋入した結果、1 週間後から活発な骨形成が試料表面上で観察された。

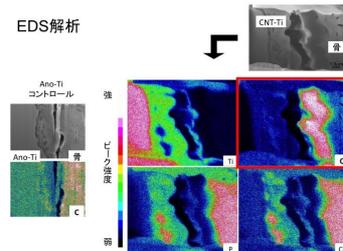


図 3 EDS 解析 C(炭素)が Ca と Ti(チタン)の間に観察される。

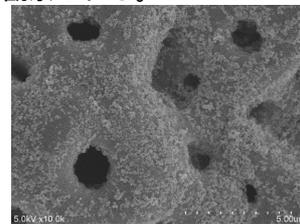


図 4 300V、180 秒の条件で泳動電着した CNHs 表面修飾チタンの SEM 像 多孔質の陽極酸化チタン表面に CNHs が均一に観察される。



図 5 CNHs コートチタン上で培養した Saos2 仮足が CNHs に接しているのが観察される。

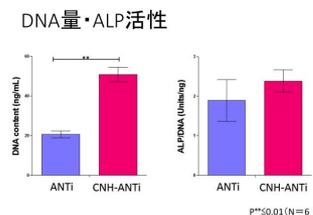


図 6 培養 1 週後の Saos2 の DNA 量と ALP 活性 CNHs を修飾した方が少ないものに比較し、DNA 量は有意に多いが、ALP 活性には差が認められない。

以上の結果から、陽極酸化チタンを CNTs、CNHs で表面修飾することにより、骨形成が促進されることが明らかとなった。

(3) 局所埋入した CNHs の生体内移行、分散、排出

ラット頭頂骨に形成した骨欠損部を被覆する GBR 膜に固着した CNHs は 6 ヶ月後においては、肺、肝臓、脾臓等の他の臓器には移行しておらず、埋入した 75.5%が、頭頂骨ならびに GBR 膜に残存していた。この結果から、CNHs を局所的に応用した場合、長期的に他臓器に留まることはないことが示された。

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)

Sato Y, Yokoyama A, Nodasaka Y, Kohgo T, Motomiya K, Matsumoto H, Nakazawa E, Numata T, Zhang M, Yudasaka M, Hara H, Araki R, Tsukamoto O, Saito H, Kamino T, Watari F, Tohji K. Long-term biopersistece of tangled oxidized carbon nanotubes inside and outside macrophages in rat. Scientific Reports 3:1-9, 2013 査読あり

Hirata E, Menard-Moyon C, Venturelli E, Takita H, Bianco A, Yokoyama A. Carbon nanotubes functionazed with fibroblast growth factor accelerate proliferation of bone marrow derived stromal cells and bone formation. Nanotechnology. 24:435101-08, 2013 査読あり

〔学会発表〕(計 15 件)

Hirata E, Miyako E, Yudasaka M, Bianco A, Yokoyama A. Carbon nanohorn boost alkaline phosphatase activity in co-cultures of macrophages and mesenchymal stem cells. 16th International Conference of the Science and application of Nanotubes 平成 27 年 6 月 28 日名古屋大学(愛知県・名古屋市)

横山敦郎 カーボンナノマテリアルの生体材料への応用を目指して. 第 46 回フラーレン, ナノチューブ, グラフェン学会ナノカーボンバイオサテライトシンポジウム. 平成 27 年 2 月 21 日東京大学(東京・文京区)

Yamauchi A, Matsumura S, Shiba K, Yudasaka M, Yokoyama A. The effects of CNHs absorbed simvastatin on bone regeneration. 13th International Conference of the Science and application of Nanotubes. 平成 25 年 6 月 25 日ヘルシンキ(フィンランド)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

赤坂 司 (AKASAKA, Tsukasa)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：00360917
佐藤 義倫 (SATO, Yoshinori)
東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
研究者番号：30374995
山本 悟 (YAMAMOTO, Satoru)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：10344524
滝田 裕子 (TAKITA, Hiroko)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30125330

(3)連携研究者

湯田坂 雅子 (YUDASAKA, Masako)
産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・チーム長
研究者番号：70159226
坂口紀史 (SAKAGUCHI, Norihito)
北海道大学・附属エネルギー・マテリアル融合領域研究センター・准教授
研究者番号：70344489
芝 清隆 (SHIBA, Kiyotaka)
癌研究所・タンパク創製研究部・部長 研究者番号：40196415