

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420036

研究課題名(和文)ハイブリッド界面制御と破骨細胞制御による新しい骨再生医療用生体吸収性材料の創製

研究課題名(英文)Creation of Novel Bioabsorbable Material for Bone Regeneration by Hybrid Interface-control and Control of Osteoclasts

研究代表者

田中 基嗣(TANAKA, MOTOTSUGU)

金沢工業大学・工学部・教授

研究者番号：30346085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ハイドロキシアパタイト粒子と生体吸収性樹脂の界面にハイブリッド界面制御を適用し、表面修飾割合を制御することを可能とすることによって、破壊特性と加水分解速度の両方を向上させるハイドロキシアパタイト/生体吸収性ポリマー複合材足場の創製を可能とした。ハイブリッド界面制御が適用可能で破骨細胞による溶解が可能な生体吸収性ポリマーとしてポリカプロラク톤を選択し、弾性率の制御により破骨細胞の代謝挙動を制御できることを示唆した。また、ハイドロキシアパタイトと炭酸アパタイトの併用により、骨芽細胞と破骨細胞を同時に制御し得る微視構造を設計できることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the hybrid-interface control was applied to the interface between hydroxyapatite and bioabsorbable polymer. By control of the interface-control ratio, it was made possible to create hydroxyapatite/bioabsorbable polymer composite scaffold, which can improve the fracture and hydrolysis properties. Then, polycaprolactone was chosen as a bioabsorbable polymer, where hybrid-interface control can be applied and which can be dissolved by osteoclasts. It was suggested that osteoclastic metabolic behavior can be controlled by the control of the substrate elastic modulus. In addition, it was suggested that the microstructure, where both osteoblasts and osteoclasts can be controlled, can be designed by combination of hydroxyapatite and carbonate apatite.

研究分野：材料力学・複合材料学・バイオマテリアル

キーワード：骨再生医療用生体吸収性材料 ハイドロキシアパタイト 生体吸収性ポリマー 界面制御 破骨細胞
細胞挙動制御

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞は、難病治療のための創薬やあらゆる組織の再生医療を可能にすると大きな期待が寄せられており、治療困難であった種々の難病に打ち克つ機会を与えるだけでなく、我が国が直面する超高齢化社会において喫緊の課題となっている健康寿命の引き上げにも大きく寄与すると期待される。このような観点から考えると、高齢者に多い骨疾患や骨欠損は、運動機能を著しく低下させ健康寿命を短縮させるため、主たる課題のひとつと言える。特に、骨腫瘍や自動車事故等による大規模な骨欠損は自己修復しないため、セラミックスやチタン合金等の人工骨を埋植する方法が主に採用されている。しかし、これらの人工骨は、再手術の必要性のため高齢者への負荷が高く、健常骨に比して剛性が高いため周囲の健常骨の吸収を招く等の問題がある。そのため、あらゆる部位の骨欠損への骨再生医療の実現が期待される。しかし、硬組織であり人体に加わる荷重のほとんどを支える骨組織を、iPS 細胞のみで迅速に再生することは困難であると考えられ、細胞による骨再生を可能とする生体吸収性足場を用いる必要性が生じる。このような生体吸収性足場用の材料には、生体親和性、骨欠損部周囲の骨組織と同等の剛性・破壊特性、細胞接着性、速やかな骨再生を促す骨誘導性・骨伝導性、骨再生速度に応じた生体吸収性、細胞・血管・体液の流入のための連結空洞などが要求される。これらを満たす材料の開発により、治療初期は骨の機能を代替し、自らが足場となって骨芽細胞による骨形成活動を促進し、自らは生体内で分解・吸収されて新生骨組織と置換される究極の生体吸収性人工骨が実現される。

そのため、国内では、東京大、京都大、九州大、首都大、神戸大、広島大、山形大、奈良先端科学技術大学院大、物質・材料研究機構など、国外では、サウスカロリーナ大(米国)、ドレスデン工科大(ドイツ)、テキサス大サンアントニオ校(米国)、パデュー大(米国)、ロンドン大インペリアルカレッジ(英国)といった諸機関において、生体吸収性人工骨用の材料開発がなされてきた。特に、骨の主成分であるコラーゲン、ポリ乳酸(PLA)・ポリカプロラクトン(PCL)などの生体吸収性ポリマーおよびそれらのブレンド、リン酸三カルシウム(TCP)などの生体吸収性セラミックスなどが詳細に研究されている。さらには、単体で上記の要求を満たす材料の開発は困難であるため、骨の主成分であるハイドロキシアパタイト(HAp)などの骨伝導性を持つ粒子との複合化が試みられている。これらの多くの研究者の精力的な研究にもかかわらず、大腿骨や背骨などの高負荷部位に使用可能な生体吸収性人工骨は実現されていない。主原因は、高負荷に耐えうる破壊特性と速やかな生体吸収性の両立が困難であることである。中でも、最も期待

の高い材料のひとつである PLA においては、高分子量化・結晶化によって高い破壊特性を実現可能である。しかし、残存低分子量体の完全な分解吸収に長い期間を必要とするため、分子量・結晶化度を上げずに高剛性・高強度を持つ HAp との複合化が試みられており、高い破壊特性を確保するため、HAp/PLA 界面接着性の向上が必要となっている。

2. 研究の目的

申請者らは、神戸大・京都大のグループと共同で、酸性高分子であるペクチン(シトラス由来)や塩基性高分子であるキトサン(カニの殻由来)などの生体親和性ポリマーを、HAp 表面に静電相互作用により吸着させ、極性相互作用や物理的な分子鎖の絡み合いにより PLA と接合することで、HAp/PLA 複合材料の破壊特性を改善可能であることを示してきた。最近では、光解離性保護基を用いた反応制御により、ペクチンとキトサンを直接化学反応させずに正負に帯電した HAp 表面全体に修飾(ハイブリッド界面制御)することで界面制御効率を劇的に向上させ、PLA 単体を上回る破壊特性を有する HAp/PLA 複合材料を創製可能であることを示した。静電相互作用と光解離性保護基による反応制御による「ハイブリッド界面制御」は、生体材料に適用可能であるだけでなく、類似の材料システムすべてに適用可能な手法である。また、申請者らは、骨細胞のメカノセンシングメカニズムの解明に取り組むなど、骨系細胞のバイオメカニクスに関して系統的な研究をこれまでにおこなってきた。特に、最近、骨吸収を担う破骨細胞に関して、その前駆体である造血幹細胞からの分化が基質の剛性に大きく影響を受けることを示した。よって、基質剛性の制御により破骨細胞の活性を制御可能であることが示唆される。破骨細胞は、ポリ乳酸を溶解することはできないが、キトサンなどの生体吸収性ポリマーを溶解可能である。これらの経験・知見により、適切な生体吸収性母材選択、HAp 表面へのハイブリッド界面制御、剛性の傾斜化による破骨細胞の活性制御とそれにとまなう生体吸収性足場の分解・吸収特性制御、を組み合わせた生体吸収性材料を創製する着想に至った。

本研究では、1)ハイブリッド界面制御が適用可能で破骨細胞による溶解が可能な生体吸収性ポリマーを探索する、2)選定した生体吸収性ポリマーとハイブリッド界面制御 HAp を複合化してその力学特性・加水分解特性の制御可能範囲を詳細に把握する、3)その結果に基づいて HAp/生体吸収性ポリマー複合材料の微視構造を破骨細胞の活性化・不活性化の最適な制御が可能にすべく設計する、4)設計した微視構造を有するハイブリッド界面制御 HAp/生体吸収性ポリマー複合材料を試作し本研究の手法の妥当性を検証する、ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ハイブリッド界面制御 HAp の作製

HAp 粒子 (宇宙マテリアルズ製, 平均粒径: $0.2[\mu\text{m}]$ 程度, アスペクト比: $10\sim 20$) を使用した. また, HAp 表面の修飾材として, ペクチンとキトサンを用いた. ペクチンを蒸留水に入れた後, HAp 粒子を加え, 攪拌機を用いて $500[\text{rpm}] \cdot 30[]$ で $24[\text{h}]$ 攪拌してペクチン修飾 HAp 粒子を得た. 沈殿物を取り出し, 常温・大気圧下で $48[\text{h}]$ 乾燥させた. ペクチン修飾 HAp をジクロロメタン中に入れ攪拌した後に, ペクチンに含まれているカルボキシル基の保護基となる *o*-nitrobenzyl alcohol を投入し, マグネチックスターラーを用いて $300[\text{rpm}]$ で $30[\text{min}]$ 攪拌した. 得られた保護基導入ペクチン修飾 HAp とキトサンを酢酸中に入れることで, 保護基導入ハイブリッド界面制御 HAp 粒子を得た. 最後に, 保護基導入ハイブリッド界面制御 HAp をジクロロメタン中に投入し, $365[\text{nm}]$ の紫外線を $30[\text{min}]$ 当てて保護基を外すことにより, ハイブリッド界面制御 HAp を得た. 保護基を導入したのは, ペクチンを保護基で覆うことで異なる電荷を持つキトサンとペクチンが引き合うのを防ぐためである. そのため, HAp 表面に修飾後には脱保護できるように, 紫外線照射により脱保護可能な光解離性保護基を用いた.

(2) HAp 表面修飾割合評価・制御方法の確立

修飾割合を確認するために, FT-IR (堀場製作所製, FT-700) を用いた. 修飾高分子の量を変化させた時 ($0.1[\text{wt}\%] \sim 20[\text{wt}\%]$ の範囲) の対応する吸収ピークの高さを評価し, 最大のピーク高さになった時に修飾可能最大値とした. 着目する波数は, ペクチンの時は $1650[\text{cm}^{-1}]$ 付近のカルボキシル基, キトサンの時は $1550[\text{cm}^{-1}]$ 付近のアミノ基とした. これらに着目したのは, HAp の分子に結合する分子がカルボキシル基とアミノ基だからである. 測定条件は, 測定範囲 $1800\sim 1200[\text{cm}^{-1}]$, スキャン回数 30 回, 走査速度 $5.0[\text{m/s}]$, 分解能 4, スペクトル: ABS, H-G 関数とした.

(3) HAp 表面修飾割合が HAp/PLA 複合材料の引張破壊特性に及ぼす影響の解明

PLA (東レ製, エコディア 330 - RC30) を用いた. ハイブリッド界面制御 HAp をジクロロメタンに混合し, PLA を加え, PLA が完全に溶解するまで, マグネチックスターラーを用いて $500[\text{rpm}]$ で攪拌した. その後, 自転公転式攪拌機を用いて, $3[\text{min}]$ 攪拌した. 得られた溶液をエタノールに注ぎ, 再沈殿させた. 沈殿物を, $0.04[\text{MPa}]$ に引圧したデシケーター内にて $24[\text{h}]$ 乾燥させた. 乾燥後に, 恒温槽を用いて温度を $40[]$ に維持し, $5[\text{h}]$ 乾燥させた. 乾燥させた沈殿物をフットポンプ式小型ホットプレスで $180[] \cdot 0[\text{MPa}]$ で $2[\text{min}]$ かけて融解してから, $8[\text{MPa}]$ で $1[\text{min}]$ プレスした. プレスして得たフィルムを細かく裁断し, スペーサーで挟み, ホットプレス

で $180[] \cdot 0[\text{MPa}]$ で $15[\text{min}]$ かけて融解した. 試料が融解したら, $180[] \cdot 8.0[\text{MPa}]$ で $3[\text{min}]$ プレスし, 保冷剤で急冷することでフィルムを得た.

破壊特性を評価するために油圧サーボ式試験機 (島津製作所 (株) 製, 容量 $5[\text{kN}]$) で引張試験をおこなった. 試験条件は, 最大ストローク $25[\text{mm}]$, 最大荷重 $500[\text{N}]$, 試験速度 $0.0167[\text{mm/sec}]$ ($1.0[\text{mm/min}]$) とした. 試験時に試験片がすべるのを防ぐためにタブとして $10[\text{mm}]$ 四方, 厚さ $0.8[\text{mm}]$ のガラス繊維強化プラスチックを接着した. 接着には, エポキシ系接着剤を用いた.

(4) HAp 粒子に対する表面修飾割合が HAp/PCL 複合材料の引張変形・破壊特性および加水分解挙動に及ぼす影響の解明

PCL (Perstorp 社, CapaTM6800, 分子量: 8 万程度) を用いた. まず, PVF フィルム (厚さ: $0.4[\text{mm}]$) ではさんだ PCL を融解するために, フットポンプ式小型ホットプレスを用いて圧力は加えないで温度 $100[]$ で $2[\text{min}]$ 維持した. $100[]$ に温度を維持し, 圧力 $8[\text{MPa}]$, $1[\text{min}]$ の条件でプレスし, 保冷剤で挟み急冷することで, PCL をシート状にした. 切り取った PCL シートをジクロロメタンに加え, マグネチックスターラーを用いて室温で $2[\text{h}] \cdot 500[\text{rpm}]$ でかく拌した. このとき, ジクロロメタンの揮発を防ぐために, 厚さ $0.13[\text{mm}]$ のパラフィン製のシートをピーカーに被せた. ポリプロピレン製のディスプレイカップ内に, PCL/ジクロロメタン溶液を入れ, 自転公転方式ミキサーを用いて, $3[\text{min}]$ かく拌した. このとき, パラフィン製のシートはディスプレイカップには被さなかった. ピーカー内にエタノールを入れ, PCL/ジクロロメタン溶液をゆっくり注いだ. ガラス棒でエタノール中の再沈殿物を軽く混ぜると, 沈殿物は粘性の高いゲル状になる. スポイトで全てのエタノールを吸い出し, 残った再沈殿物を厚さ $0.5[\text{mm}]$ の PTFE 製のシートで作った容器に流し込んだ. 真空デシケーターを用いて, $0.04[\text{MPa}]$, $24[\text{h}]$ の条件で再沈殿物を乾燥させた後, 送風定温乾燥器を用いて, $40[] \cdot 24[\text{h}]$ の条件で再沈殿物を乾燥させた. その後, PCL の融解・冷却工程を再度おこなって得た PCL フィルムを約 $10[\text{mm}]$ 四方にはさみで細かく裁断し PVF フィルムと $0.5[\text{mm}]$ 厚のステンレスプレートで挟んだ. このとき, $50[\text{mm}]$ 四方にくりぬいた厚さ $0.5[\text{mm}]$ のスペーサー内に裁断した PCL フィルムを配置した. まず, 圧力は加えず, 温度 $100[]$ で, $10[\text{min}]$ 維持し, 圧力 $20[\text{MPa}] \cdot 5[\text{min}]$ の条件で約 $90[\text{s}]$ かけてプレスした後, 保冷材を用いて急冷することで, 厚さ $0.5[\text{mm}]$ の PCL が得られた.

次に, PCL を HAp と再沈殿法により複合化させた. まず, HAp をジクロロメタンに混合・攪拌・超音波分散した後, PCL を加えマグネチックスターラーで攪拌した. このとき,

ジクロロメタンの揮発を防ぐために、パラフィルムをピーカーに被せた。ポリプロピレン製のディスポーザブルカップ内に HAp/PCL/ジクロロメタン溶液を入れ、自転公転方式ミキサーを用いて、自転回転数：160～800[rpm]・公転回転数：160～1800[rpm]・3[min]の条件でかく拌した。このとき、パラフィルムはディスポーザブルカップには被さなかった。ピーカー内にエタノールを入れ、HAp/PCL/ジクロロメタン溶液を注ぎ、ガラス棒でエタノール中の再沈殿物を軽く混ぜると、沈殿物は粘性の高いゲル状になる。エタノール全てをスポイトで吸い出し、残った再沈殿物を、厚さ 0.5[mm]の PTFE 製シートで作った容器に流し込んだ。真空デシケータを用いて引圧し 0.04[MPa]に維持したデシケータ内で、再沈殿物を室温で 24[h]乾燥させた後、送風定温乾燥機を用いて、40[]・24[h]の条件で乾燥させた。得られた再沈殿物を PVF フィルムにはさみ、融解するために圧力は加えないで、温度 100[]で 2[min]維持した。100[]に温度を維持し、圧力 8[MPa]、1[min]の条件でプレスし、保冷剤で挟み急冷した後、融解・冷却工程を再度おこなった。

次に、試験片を pH 7.4 の擬似的な生体内環境にしたリン酸緩衝溶液のガラス瓶に浸した。その瓶を、恒温水槽を使用し 37[]に保持した水の中に入れて加水分解を行った。この条件で、1, 2, 4 [week]浸漬させた。破壊特性を評価するため、引張試験をおこなった。引張試験には、短冊状試験片(長さ 50[mm]、幅 5[mm]、厚さ 0.5[mm])を用いた。なお、PCL は破断伸びが大きく、短冊状試験片ではゲージ部で破断させることが難しかった。そこで、見かけの破断ひずみを比較するために、短冊状試験片の真ん中にφ3[mm]の穴をあけた。引張試験には、卓上型試験機(島津製作所製、AGS-X、容量 500[N])および平面つかみ具(島津製作所製、SCG-1kNA)を用いた。試験速度は 10 [mm/min]とした。

(5) 弾性率の異なる基質上での破骨細胞挙動

用いたマウス由来の造血幹細胞(理化学研究所)は、浮遊細胞であり短時間で増殖する。α-MEM+10%FBS を使用し、310[K]-5%CO₂環境において培養した。次に、造血幹細胞から破骨細胞へ分化させた。M-CSF および RANKL として、デキサメタゾンおよびカルシトリオールをそれぞれ用いた。これらの試薬を培養した造血幹細胞に加え、弾性率の異なる基質上で破骨細胞に分化させた。

生体吸収性材料には、コラーゲンゲル、キトサンおよび PCL を用いた。コラーゲンゲルの作製は、生体内のコラーゲン線維化と架橋の同時反応を模倣することにより行った。実験環境上でコラーゲンの線維化を行い、それと同時に架橋剤(水溶性カルボジイミド)を共存させることで、生体内と類似した線維化と架橋の同時反応を起こす。このとき、コラーゲン濃度と架橋剤濃度を変化させること

で、弾性率の異なるコラーゲンゲルを作製した。なお、Soft:2.48[kPa]、Medium:17.5[kPa]、Hard:100[kPa]の弾性率を有することを確認した。次に、1[%]酢酸にキトサン粉末(ACROS)を加え、マグネチックスターラーを用いて 500[rpm]で 24[h]攪拌した後、一晚乾燥させて未架橋キトサンシート(弾性率:0.177[GPa])を作製した。また、未架橋キトサンシートを、脱イオン水にトリポリリン酸ナトリウムを溶解させた溶液に 1800[s]浸漬し一晚乾燥させることで、架橋キトサンシート(弾性率:0.217[GPa])を作製した。最後に、ペレット状の PCL を、フットポンプ式ホットプレスにてシート状に成形した。成形方法は前述のものと同じであるが、冷却速度を変えた。急冷した PCL シートは 0.295[GPa]、徐冷した PCL シートは 0.406[GPa]、炉冷した PCL シートは 0.657[GPa]の弾性率を有していた。

カテプシン K は、破骨細胞から分泌される酵素に含まれる物質で、骨吸収時に活性化し、骨のコラーゲンマトリックスの分解に参与している。弾性率の異なる基質上で破骨細胞を 168[h]培養し、分泌の前後で培養液 pH を測定した。次に、活性化によってカテプシン-K がプロトンポンプから排出されている破骨細胞の割合を調べるため、赤色蛍光試薬(MagicRed™(クリスタルバイオレット))を使用した。共焦点レーザー顕微鏡を使用し、波長:610 [nm]で蛍光観察した。この際、直前に洗浄することで、新たに分泌されたカテプシン K のみを観察した。

4. 研究成果

(1) HAp 表面修飾割合の評価方法の検討結果

ペクチンの量を 20[wt%]から減らすと 11[wt%]までのカルボキシル基のピークはほぼ同じ高さになった。これは、HAp 表面に修飾できる割合を超えているためであると考えられる。また、カルボキシル基以外のピークの高さがペクチンを 20[wt%]にした時に高くなった。これは、HAp と結合できなくなった分子が増えたためであると考えられる。次に、10[wt%]にするとピークの高さが 11[wt%]よりも低くなった。さらに、ペクチンの量を減らして 8[wt%]にすると、10[wt%]よりもピークが高くなった。これは、ペクチンで覆えていない HAp の表面が多くなり、HAp 特有のピークが現れたためであると考えられる。したがって、ペクチンの修飾可能最大値は 11[wt%]であると示唆される。

次に、キトサンの量を 5[wt%]から減らすと、0.5[wt%]までのアミノ基のピークはほぼ同じ高さになった。この範囲では、HAp 表面に修飾できる割合を超えているためであると考えられる。次に、0.3[wt%]にすると、ピークが低くなった。ペクチンの修飾量と大きく異なる結果になったのは、ペクチンとキトサンの分子量が違うためであると考えられる。したがって、キトサンの修飾可能最大値は 0.5[wt%]であると示唆される。

以上より、ペクチン 11[wt%]、キトサン 0.5[wt%]を用いて作製したハイブリッド界面制御 HAp を表面が 100[%]修飾できているとした。修飾割合は、修飾割合 100[%]の時の修飾高分子量を基準にして、修飾割合に応じて修飾高分子の量を同じ割合で減らした。

(2) HAp 表面修飾割合が HAp/PLA 複合材料の引張破壊特性に及ぼす影響

修飾割合を変えたハイブリッド界面制御 HAp/PLA と、比較対象として PLA 単体と最大修飾割合のペクチン修飾 HAp/PLA とキトサン修飾 HAp/PLA を作製して、引張試験をおこなった。修飾割合を 100[%]にした時と 50[%]にした時のハイブリッド界面制御 HAp/PLA の引張強度は、PLA 単体、ペクチン修飾 HAp/PLA、キトサン修飾 HAp/PLA よりも引張強度が低かった。しかし、修飾割合 73[%]の時は、PLA 単体以上の引張強度になった。これらの結果になったのは、修飾割合 100[%]と仮定したハイブリッド界面制御 HAp/PLA の作製時に使用した光解離性保護基の量が足りず、ペクチン全体を保護基で覆えなかったためであると考えられた。ペクチンを保護基で覆えないと、ペクチンとキトサンが引き合うため、全てのキトサンを HAp 表面に修飾できなかつたと考えられる。そのため、表面を 100[%]覆えていたと仮定していた HAp/PLA にも界面制御できていない箇所ができ、引張強度を向上させることができなかつたと考えられる。73[%]の修飾割合のハイブリッド界面制御 HAp/PLA は、保護基の量が足りていたことで引張強度が向上したと考えられる。そのため、修飾割合 100[%]のハイブリッド界面制御 HAp/PLA も保護基の量の調整によっては引張強度の向上が期待できると考えられる。そこで、光解離性保護基の最適量 (11[wt%]) を探索・適用したところ、修飾表面率の増加とともに破壊特性が向上する結果が得られた。

(3) HAp 表面修飾割合が HAp/PCL 複合材料の引張変形・破壊特性および加水分解挙動に及ぼす影響

PCL 単体は、加水分解をおこなっても破断伸びが大きかった。これに対し、未制御 HAp/PCL 複合材料は、加水分解によってすぐに破断伸びが顕著に減少した。これは、未制御界面での加水分解の加速が原因であると考えられる。ペクチン修飾 HAp/PCL 複合材料およびキトサン修飾 HAp/PCL 複合材料では、加水分解期間が長くなると破断伸びが減少し、特にキトサン修飾 HAp/PCL 複合材料でその傾向が顕著であった。これは、キトサンそのものが生分解性を有することに起因すると考えられる。ハイブリッド界面制御 HAp/PCL 複合材料 (界面制御割合 50[%]、100[%]) では、加水分解前の破壊特性が改善されただけでなく、加水分解による破断伸びの減少は顕著ではなかった。このことから、

PCL と接着しているハイブリッド界面制御 HAp が微小なクラック等の損傷進展を妨げていることが示唆される。また、未制御界面が無い場合、界面での加水分解の加速現象が生じなかつたと考えられる。以上より、破骨細胞の代謝挙動により融解させることが可能な高分子であるポリカプロラク톤を母材に用いた場合でも、ハイドロキシアパタイト粒子表面へのハイブリッド界面制御が界面特性の改善・制御に有効であることが示された。また、界面制御効率を最大化した場合に加水分解にともなう破壊特性の低下がもっとも抑制されたことから、高い破壊特性とすみやかな分解・吸収特性を両立できる最適界面制御効率の存在が示唆される。

(4) 弾性率の異なる基質上での破骨細胞挙動

カテプシン K (化学式 $C_{35}H_{51}N_7O_8$) は、1 価の酸性であり、その活性範囲 pH は 4~8 である。本実験で得られた結果もこの範囲に該当したため、カテプシン K を分泌していると考えられる。そこで、カテプシン K のみを分泌したと仮定して測定結果より得られた pH から H^+ モル濃度を算出し、同様に評価した分化前の H^+ モル濃度を差し引いた後に破骨細胞数で割ることで、破骨細胞 1 個あたりの産生 H^+ モル濃度を算出した。破骨細胞の代謝挙動は基質の材料種別によって影響を受けることが示唆されていることと、破骨細胞の分泌物がカテプシン K のみであると仮定した場合の評価結果であることから、定量的な比較は難しいものの、破骨細胞の分泌物産生挙動は足場の基質弾性率の影響を受けることが明らかとなった。特に、10 [kPa]前後の弾性率を越えると破骨細胞への分化数が増加しはじめ、100 [kPa]程度の弾性率を越えると不活性化破骨細胞が活性化され始めることが示唆された。破骨細胞には、骨の表面に接着し強い酸を出す R 型と骨は溶かさず表面を移動するだけの N 型が存在し、いずれにも変化することが可能であることが知られていることから、この結果は以下のように解釈することができる。まず、基質弾性率が高くなると、造血幹細胞から破骨細胞への分化が活性化されることがわかっている。コラーゲンのように低い弾性率を有する基質上では、R 型の破骨細胞への分化が優先的に生じると推察される。しかし、基質弾性率の上昇にともなう N 型の破骨細胞への分化も生じるようになり、分化したものの活性化していない (代謝活動をおこなわない) 破骨細胞数が増え、見かけ上、破骨細胞 1 個あたりの産生 H^+ モル濃度が低下すると推察される。また、基質弾性率がさらに高くなると、今度は N 型の破骨細胞が活性化されて R 型となるため、キトサンや PCL 上で培養した場合の破骨細胞 1 個あたりの産生 H^+ モル濃度は、基質弾性率の上昇にともなう増加したと推察される。一般的に、接着細胞は基質底面に移動すると、焦点接着斑を細胞膜上に発現し、

これを介して基質に接着する。細胞骨格のひとつであるアクチンフィラメントは、細胞が基質に接着する際にその端を焦点接着斑に付着させ、細胞に付与された力学刺激の伝達経路としての働きを担っていると考えられる。アクチンフィラメントのいくつかは細胞核につながっていることから、細胞核と焦点接着斑を結ぶアクチンフィラメントが力学的刺激を伝達し、細胞核が刺激され分化・活性が促進されるのではないかと考えられる。

次に、弾性率を変化させた PCL 基質上で破骨細胞を培養し、カテプシン K 蛍光染色を実施した結果、約 0.3~0.7 [GPa]の範囲内では、基質弾性率の増加にともなって破骨細胞の活性化率が增加することを定量的に評価することができた。また、PCL 基質と HAp/PCL 基質を比較すると、HAp/PCL 基質上においても PCL 基質上と同様に破骨細胞はカテプシン K を分泌したが、分化した破骨細胞数が少なくなった。これは、ハイドロキシアパタイトから放出されるリン酸イオンもしくは微小な基質表面凹凸が原因であると考えられる。以上より、これより、PCL 基質または HAp/PCL 基質を足場材料として用い、治療初期には足場吸収挙動を促進し治療進展とともに徐々に抑制するためには、表面が高結晶化度（高弾性率）で内部が低結晶化度（低弾性率）となるような傾斜構造を創製することが期待される。一方、骨芽細胞による骨形成のための代謝活動が同時に行われるためには、骨伝導能の高い HAp を分散させることが考えられる。一方、現段階では原因は不明であるが、HAp を分散させると破骨細胞への分化挙動が抑制された。今後はその原因を究明するとともに、破骨細胞による吸収を開始させる側の面には HAp とは異なる粒子を用いて弾性率を制御することも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

田中基嗣, 安田涼平, 津田裕介, 金原勲, 光解離性保護基による反応制御による骨再生医療用 HAp/PLA 複合材料における新しい界面制御法の提案, 材料システム, 査読有, 34 巻, 2016, 45-49

〔学会発表〕(計 12 件)

田中基嗣, 飛石好輝, 松波純希, 金原勲, 弾性率の異なる PCL および HAp/PCL 基質上で培養した破骨細胞のカテプシン K 分泌挙動の評価, 日本材料学会第 65 期学術講演会, 2016 年 5 月 29 日, 富山大学五福キャンパス

田中基嗣, 杉田祐輔, 高橋知之, 金原勲, 骨再生医療用 HAp/PCL 複合材料の力学特性に及ぼすハイブリッド界面制御の影響, 第 55 回生体医工学学会大会, 2016 年 4 月 26 日, 富山国際会議場

田中基嗣, 飛石好輝, 松波純希, 金原勲, カテプシン K 蛍光染色による剛性の異なる PCL および HAp/PCL 基質上で培養した破骨

細胞の代謝挙動の評価, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年 1 月 10 日, 東京工業大学大岡山キャンパス

田中基嗣, 飛石好輝, 舩田侑也, 金原勲, 異なる弾性率を有する PCL 基質上で培養した破骨細胞の活性化挙動の観察, 日本機械学会 M&M2015 材料力学カンファレンス, 2015 年 11 月 21 日, 慶應義塾大学矢上キャンパス

飛石好輝, 舩田侑也, 田中基嗣, 金原勲, カテプシン K 蛍光染色による破骨細胞活性化率に及ぼす基質弾性率の影響の観察, 日本機械学会第 26 回バイオフロンティア講演会, 2015 年 10 月 3 日, 九州大学伊都キャンパス

Tanaka, M., Takahashi, T., Kimpara, I., Trial to Optimize Fracture Properties and Biodegradability in HAp/PLA Composites as Bio-absorbable Bone Substitute Using Hybrid Interface Control, The 20th International Conference on Composite Materials, 2015 年 7 月 21 日, Copenhagen Congress Center, Copenhagen, Denmark

高橋知之, 斎藤友貴, 田中基嗣, 金原勲, ハイブリッド界面制御 HAp/PLA 複合材料における界面制御割合の評価方法の検討, 計測自動制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2014, 2014 年 9 月 19 日, 金沢大学宝町・鶴間キャンパス

高橋知之, 斎藤友貴, 田中基嗣, 金原勲, ハイブリッド界面制御 HAp/PLA 複合材料の破壊特性に及ぼす界面制御割合の影響, 日本複合材料学会第 39 回複合材料シンポジウム, 2014 年 9 月 18 日, 秋田大学手形キャンパス

田中基嗣, 光井康人, 飛石好輝, 金原勲, 破骨細胞の代謝挙動に及ぼす生体吸収性材料基質の弾性率の影響の観察, 日本材料学会第 63 期学術講演会, 2014 年 5 月 18 日, 福岡大学

高橋知之, 斎藤友貴, 田中基嗣, 金原勲, ハイブリッド界面制御 HAp/PLA における粒子表面修飾割合制御の試み, 日本機械学会北陸信越支部第 51 期総会・講演会, 2014 年 3 月 8 日, 富山県立大学

光井康人, 田中基嗣, 金原勲, 異なる剛性を有する生体吸収性材料上で培養した破骨細胞の代謝挙動の観察, 日本機械学会第 24 回バイオフロンティア講演会, 2013 年 11 月 1 日, 同志社大学室町キャンパス

Tanaka, M., Takahashi, T., Y., Yasuda, R., Kimpara, I., Possibility to optimize durability and biodegradability in HAp/PLA composites for bone regeneration by interface control, The 18th Composites Durability Workshop, 2013 年 10 月 1 日, 東北大学片平キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 基嗣 (TANAKA, Mototsugu)

金沢工業大学・工学部・教授

研究者番号: 30346085