

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463060

研究課題名(和文) 焼結温度調節により細胞の活動を高める機能性炭酸アパタイト骨補填材の創製

研究課題名(英文) Enhancement of the cell activities on the carbonate apatite bone substitute by the conditioning of the sintering temperature

研究代表者

田辺 俊一郎 (Tanabe, Toshiichiro)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：60227197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は焼成温度の異なる炭酸含有アパタイト(CA)の骨補填材としての有用性を検討し、骨補填材として最適な焼成温度を解明するためにラット骨髄由来間質細胞(rBMSCs)およびラット頭蓋冠由来骨芽細胞(rOBs)を用いたin vitroの評価とラット骨欠損モデルおよびヌードマウス皮下への移植実験によるin vivoの評価によりCAが骨補填材として優れた細胞親和性と組織親和性を有する材料であるとの結果を得た。また、低温焼成は細胞増殖促進に有利であり高温焼成は骨芽細胞への分化を促進することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that sintered carbonate-containing apatites (CA) were useful as bone substitute materials, since they closely resemble bone apatite. In this study, the utility of CA as a scaffold on bone regeneration was examined in vitro and in vivo in combination with rat bone marrow derived stem cells (rBMSCs) or rat calvarial osteoblasts (rOBs). We prepared porous CA and evaluated radiographically using micro CT before implantation. CA powder and ribose mixed at an equal weight ratio resulted in approx. 70 % porosity and good mechanical property. Next, in order to investigate effects of CA scaffold, the porous CAs, HAs or beta-TCPs were cultured with rBMSCs or rOBs. CA showed good cyto-compatibility as compared with HA or beta-TCP. In addition, results of animal study indicated that the bone-like tissues were remarkably formed inside the CA scaffolds.

研究分野：歯科インプラント学

キーワード：炭酸含有アパタイト 焼成温度 骨再生 生体親和性 バイオマテリアル バイオアクティブ 骨芽細胞 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

歯科領域では歯の喪失に対する咬合回復治療としてインプラントを用いた補綴治療の需要が増加しており、今日では補綴治療の一選択肢として確立している。しかし、インプラント治療を適用する場合、骨量不足を補うための骨移植術が必要となるケースがある。従来より骨移植には自家骨が使用されることが多いが、自家骨移植は移植片を採取する部位の手術が必要であり患者への侵襲と負担は決して小さいものではない。このような背景から代替材料として様々な人工材料が研究され、注目を集めている。しかし、こうした材料には生体内で吸収されず長期間残存することや異物反応等の無視できない問題がある。そこで申請者らは自家骨移植に取って代わる生体吸収性の骨補填材料として、骨アパタイトに物理化学的性状が酷似する炭酸含有アパタイト(CA)を合成し、焼結を施した新たな骨補填材料を開発した(Doi et al. JDR 1993)。そして焼結 CA が焼結水酸化アパタイト(HA)や、骨補填材料として有望視されているβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)と同等の骨誘導能を有することに加え、破骨細胞によって吸収されうる生体親和性を有することを示してきた(Doi et al. Biomaterials 2001 他)。

2. 研究の目的

我々はラット骨髄由来間質細胞 (rBMSC) を用いた実験から、CA の焼成温度によって細胞の応答性が異なることを見出した。そこで、本研究では異なる焼成温度 (400°C ~ 700°C) の CA を用意し、骨再生に関わる細胞を骨髄あるいは頭蓋骨から採取して CA 上で培養し、その応答性を解析して骨補填材として最適な焼結温度条件を明らかにすること、実験動物に骨欠損を作製して移植を行いその効果を確認した後、結果をフィードバックして移植に適した焼結温度で多孔体 CA を作製し、さらに動物実験にて効果を検討することとした。これにより CA の生体親和性ならびに吸収性を一層高め、移植した焼結 CA への生体内の細胞の生着・増殖・分化を促す機能を備えた骨補填材を創製することを目的とする。

3. 研究の方法

CA の温度特性を解明し最適な条件を見出して、細胞の活動を高める機能を備えた多孔体 CA を作り出すために以下の解析を行った。

1. 焼成温度による細胞応答性の検討

骨組織形成にかかわる初代細胞として、骨髄より採取直後の混合培養系、骨髄由来間葉系間質細胞、骨芽細胞を使用し、底面に 400°C ~ 700°C で焼成した CA あるいは比較対象とする HA、β-TCP をコートした培養容器 (コート量は 4mg/cm² から 8 段階に段階希釈) とさらに何もコートしないコントロール培養

容器上で培養し、細胞接着、細胞増殖、分化誘導能について検討した。また、細胞接着について、播種後一定時間後に接着した細胞数の算出とアクチン線維の蛍光染色による細胞の形態解析を行った。さらに、分化誘導能を検討するために、骨芽細胞の分化の指標として ALP 活性の測定と ALP 活性染色、リアルタイム PCR 法による骨芽細胞マーカー遺伝子の mRNA 発現解析、石灰化の指標としてアリザリンレッド染色、破骨細胞の分化の指標としてカテプシン K 蛍光基質染色を行い、骨補填材上で培養した細胞の分化の度合いを比較検討した。また、細胞の接着や増殖分化に作用するメカニズムを解析するために MAPK 経路の解析も行った。

2. 多孔体 CA の作製と物性検討

多孔体の作製には焼成前に予備加圧 (200MPa) の必要があるため作製後の焼成 CA が圧力を負荷せずに焼成した CA と同様の細胞親和性を示すかどうかを確認する必要がある。そこで、多孔体 CA を粉砕して顆粒を作製し培養容器にコーティングして細胞を培養し上記同様に細胞の活性を検討した。比較対象として既に臨床に应用されている多孔体 HA (ネオボーン) と、多孔体β-TCP (オスフェリオン) を用いた。

3. 動物モデルを用いた焼成 CA の骨再生効果の検証

ラットの大腿骨に欠損を作製して欠損部に焼成温度の異なる CA をそれぞれ填入する群と比較対象として HA (ネオボーン)、β-TCP (オスフェリオン) を填入する群、そして未処理のコントロール群を作製し欠損部の再生過程でどのような細胞が機能しているか、パラフィン包埋切片を作製して組織化学的・免疫化学的解析を行った。これとは別に、CA、HA およびβ-TCP をそれぞれ 20 mg ずつヌードマウス背側皮下に移植し、術後 3 週間および 6 週間で取り出してパラフィン包埋切片あるいは樹脂包埋切片を作製して、組織化学的・免疫組織化学的に異所性骨誘導能の検討を行った。

4. 焼成温度の異なる多孔体 CA 混合材の検証

細胞増殖には低温 (400°C) で焼成した CA が最も効果が高く、骨芽細胞の分化では高温 (700°C) で焼成した CA の効果が高かったことから 1 種類の焼成温度からなる CA を用いる群に加え、400°C と 700°C で焼成した CA を等量 (重量比) 混合した CA を移植する群を加えて 3 の動物実験を行った。

4. 研究成果

1a. 各種実験材料上での細胞増殖評価

CA のラット骨髄由来間質細胞 (rBMSC) に対する細胞生物学的効果を評価するため、

まず、それぞれの材料存在下での細胞増殖について検討した。播種後 72 時間経過した各材料上の rBMSC 数を算出した結果、CA ではコントロールおよび HA、 β -TCP よりも有意に細胞増殖が促進されていた。また、400°C 焼成 CA が最も細胞増殖を促進し、低温で焼成した CA ほど細胞増殖促進能を示した。一方、HA および β -TCP 上ではコントロールと比較して有意に細胞増殖が抑制されていた。同様に、ラット頭蓋冠由来骨芽細胞 (rOB) を用いて増殖を評価したところ、rBMSC と同様の結果が得られた。

1b. 各種実験材料への細胞の接着評価

各種材料への rBMSC、rOB の接着について、播種後 6 時間で検討した。その結果、3 種の CA 上に接着した細胞数はコントロールと同等の値を示した。その一方で HA および β -TCP 上の細胞数はコントロールと比較して有意に減少していた。また、播種 6 時間後の各種実験材料上での細胞の形態および接着について検討するため、ビンキュリンの蛍光免疫染色および蛍光標識ファロイジンを用いたアクチン線維の染色を行った。その結果、HA および β -TCP では萎縮した細胞が多数みられるのに対し、CA 上では萎縮した細胞が減少する一方で、コントロールと同様に、伸展した細胞が多数みられ、伸展したアクチン線維の先端にビンキュリンの分布が顕著

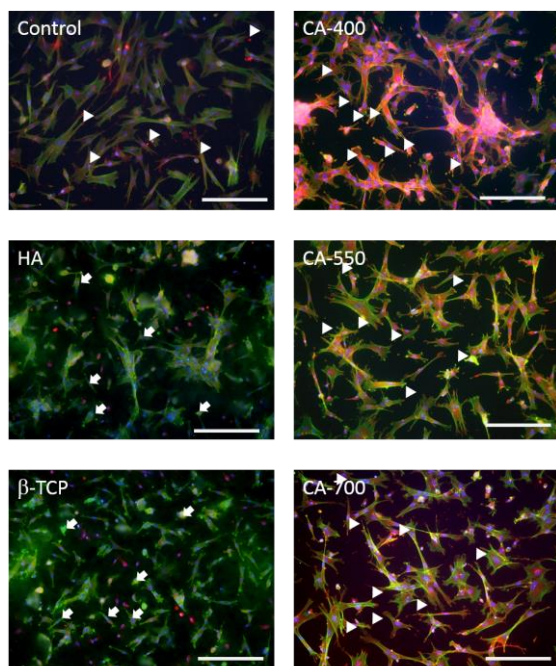


図1 各種骨補填材上で培養したrBMSCのビンキュリン蛍光免疫染色像
HA、 β -TCP上では萎縮した細胞が多数みられる(白矢印)が、CA群では400°C、550°C、700°Cと焼成温度によらず伸展したアクチン線維の先端にビンキュリンが局在している(白矢頭)。
ビンキュリンを赤(Alexa 594)、アクチン線維を緑(Alexa 488)、核を青(Hoechst 33258)で示す。

であった (図 1)。

1c. 各種実験材料上での rBMSC、rOB の骨芽細胞分化評価

各種材料上で培養した rBMSC、rOB の骨

芽細胞への分化について評価した。分化の指標として、骨芽細胞のマーカであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性や骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現変化について検討した。その結果、ALP 活性の染色性が HA と CA で顕著であることが観察された。特に 700°C 焼成 CA 上で培養した細胞の ALP 染色性が最も顕著であり、3 種の CA を比較すると 400°C、550°C、700°C の順に焼成温度に依存して ALP 染色性が増強していた (図 2)。分化マーカーの mRNA 発現は CA 群と HA 群で顕著な増加がみられた。さらに石灰化の指標としてアリザリンレッド染色を行ったところ、アリザリンレッド染色においても CA 上の細胞は、コントロール、HA、 β -TCP と比較して濃染性を示した。石灰化では、特に焼成温度の低い CA ほど顕著な石灰化を示した (図 2)。さらに、各種実験材料上で同様に培養した細胞の溶解液を用いて、ALP 活性を測定し、細胞数で除した値を比較した。その結果、 β -TCP を除くすべての材料がコントロールに比べ有意に高い ALP 活性を示した。特に、HA および 700°C で焼成した CA 上で培養した細胞試料が高い ALP 活性を示した。

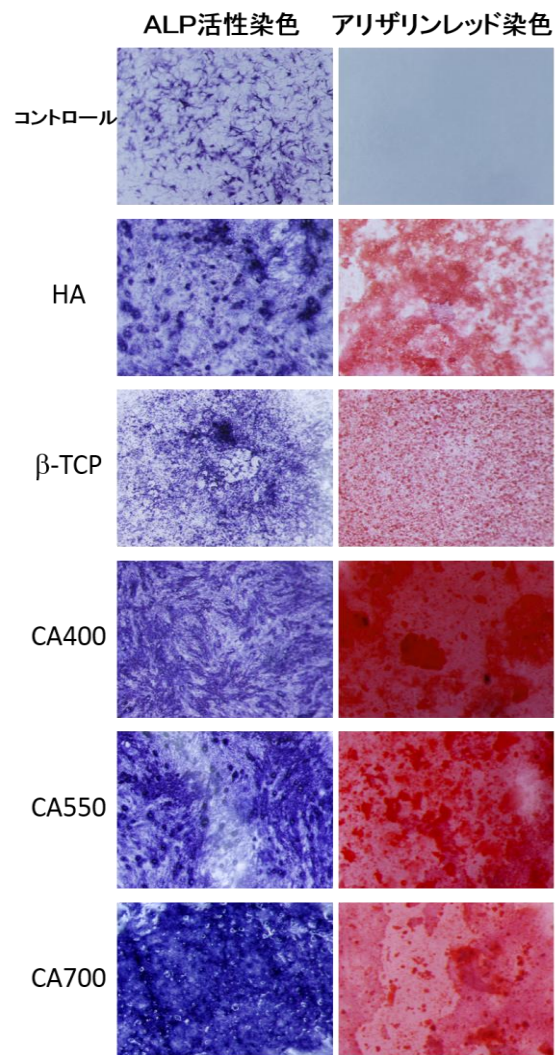


図2 各種骨補填材上で培養後のrBMSCのALPおよびアリザリンレッド染色

1d. 各種実験材料上での破骨細胞様細胞分化評価

各種実験材料上で骨髄懸濁液を活性型ビタミン D₃ 存在下で 7 日間培養し、カテプシン K 蛍光基質染色を行って破骨細胞様細胞の分化について検討した。その結果、コントロール、HA、 β -TCP ではカテプシン K 活性陽性細胞がわずかに認められるのに対し、CA 上では焼成温度によらず、多数のカテプシン K 活性陽性細胞が認められた (図 3)。

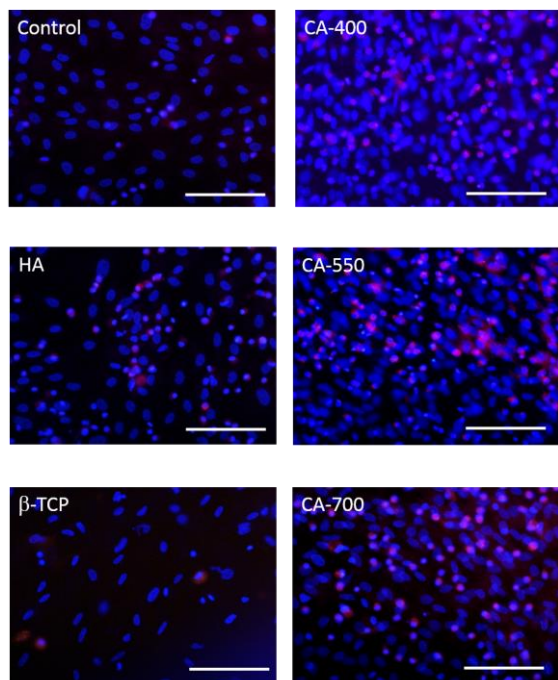


図3 カテプシンK蛍光基質染色像
CA群では焼成温度によらずカテプシンK活性陽性細胞 (赤) が多数認められる。

1e. 各種実験材料上での MAPK pathway の関与の検討

各種骨補填材上で培養した rBMSC、rOB における 3 種の MAPK (ERK1/2, p38MAPK, JNK) のリン酸化についてウェスタンブロット法を用いて検討した。その結果、400°C で焼成した CA で、ERK1/2 のリン酸化が顕著であり、700°C で焼成した CA および HA で p38MAPK のリン酸化がコントロールおよび β -TCP に比べ顕著に誘導されていた。また、阻害剤を用いた実験から細胞増殖には ERK1/2 経路が、骨芽細胞分化においては p38 MAPK 経路の関与が示唆された。

2. 多孔体 CA の細胞親和性評価

多孔体存在下での細胞増殖について検討したところ、播種 72 時間後、それぞれの多孔体とともに培養した細胞の増殖は、CA 多孔体とともに培養した細胞で顕著であった。また、骨芽細胞への分化では、HA および CA 多孔体とともに培養した細胞の ALP 活性の上昇と ALP 染色性が顕著であり、骨芽細胞の分化マーカーである ALP、オステオカルシンの mRNA 発現が有意に上昇していた。

3a. ラット大腿骨骨欠損モデルを用いた検討

ラット大腿骨骨欠損モデルでは、CA および HA 填入群で、術後 7 日目には顆粒を足場に母床骨から細胞が進入し、顆粒周囲に骨様の組織が形成されていた。術後 3 週間後ではいずれの骨補填材でも顆粒の周囲に新生骨が形成されていたが、とくに 700°C で焼成した CA 填入群で特に顕著であった。

3b. ヌードマウス皮下モデルを用いた検討

ヌードマウス皮下組織では、埋植 6 週間後 CA の顆粒周囲に硬組織様組織の形成が観察され、TRAP 陽性細胞も観察された。

4. 焼結温度の異なる多孔体 CA 混合材の検証

異なる焼成温度の CA を用いて 3 と同様に動物実験を行ったところ、新生骨の形成が 700°C 焼成 CA のみを用いた群と比較して遅れており、生体への移植では細胞培養系では評価できない要因の関与が示唆された。

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 1 件)

1. Nagaya R, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Onoe I, Tanabe T, Nagahara K, Kondoh N. Mechanisms of the immunosuppressive effects of mouse adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on mouse alloreactively stimulated spleen cells. *Exp Ther Med*. 7:17-22. 2014.

[学会発表] (計 8 件)

1. 市川恭大, 川木晴美, 尾上一平, 田辺俊一郎, 永原國央. ERK1/2 経路を介した炭酸含有アパタイトの骨髄由来間質細胞の接着・増殖促進効果の検討. 第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会. 2013 年 9 月 13 日~15 日. 福岡.

2. 尾上一平, 川木晴美, 高橋 潤, 田辺俊一郎, 永原國央. 炭酸含有アパタイトの骨芽細胞増殖分化調節メカニズムの解析. 2013 年 9 月 13 日~15 日. 福岡.

3. 近藤雄三, 川木晴美, 尾上一平, 田辺俊一郎, 永原國央. ラット骨髄由来細胞の増殖・分化における炭酸含有アパタイトの焼結温度依存的影響. 2013 年 9 月 13 日~15 日. 福岡.

4. 近藤雄三, 川木晴美, 高橋 潤, 田辺俊一郎, 永原國央. 骨芽細胞の増殖分化における MAPK 経路を介した炭酸含有アパ

イトの機能解析. 第 44 回日本口腔インプラント学会. 2014 年 9 月 12 日～14 日. 東京

5. 高橋 潤, 川木晴美, 土井 豊, 田辺俊一郎, 永原國央. 炭酸含有アパタイト多孔質体の骨様硬組織誘導能評価. 第 44 回日本口腔インプラント学会. 2014 年 9 月 12 日～14 日. 東京

6. 近藤雄三, 川木晴美, 高橋 潤, 田辺俊一郎, 近藤信夫, 永原國央. 炭酸含有アパタイトを足場材料とした骨芽細胞分化の特性解析. 第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 2015 年 5 月 13 日～15 日. 福岡.

7. 高橋 潤, 川木晴美, 近藤雄三, 神谷真子 高山英次 土井 豊, 田辺俊一郎, 永原國央, 近藤信夫. 炭酸含有アパタイト骨補填材を用いた骨再生評価. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 2015 年. 9 月 11 日～13 日. 新潟.

8. 田辺俊一郎. 朝日大学での口腔インプラント学教育. 第 45 回日本口腔インプラント学会. 2015 年 9 月 21 日～23 日. 岡山.

〔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

朝日大学歯学部インプラント学分野ホームページ

<http://scw.asahi-u.ac.jp/~implant/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺俊一郎 (Tanabe, Toshiichiro)

朝日大学・歯学部・准教授
研究者番号：60227197

(2) 研究分担者

土井 豊 (Doi, Yutaka)
朝日大学・歯学部・名誉教授
研究者番号：40116067

(3) 研究分担者

近藤 信夫 (Kondoh, Nobuo)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：40202072

(4) 研究分担者

川木 晴美 (Kawaki, Harumi)
朝日大学・歯学部・講師
研究者番号：70513670

(5) 連携研究者

()

研究者番号：