

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670892

研究課題名(和文) 生体適合性を有する3次元ナノ・マイクロパターン化足場材料による歯周組織再生

研究課題名(英文) Human periodontal ligament cell adhesions on biocompatible materials

研究代表者

田中 賢 (Tanaka, Masaru)

九州大学・先端物質化学研究所・教授

研究者番号：00322850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、再生医療の細胞源としてヒト歯根膜(PDL)細胞(PDL)が注目されている。本研究では、血小板粘着が軽微で優れた生体適合性を示すPoly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)およびPMEA類似体上でのPDL細胞の接着、増殖を調べた。PMEA類似体のPDL細胞は接着、伸展、増殖し、細胞外マトリックス(ECM)を産生することが明らかになった。従来の生体適合性高分子上では、接着と増殖を示さなかったことから、血液接触環境下にて異物反応を抑えた組織再生用足場として期待できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Human periodontal ligament (PDL) cells are a potential cell source for tissue engineering. We previously reported that poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) is highly biocompatible with human blood cells. In this study, we investigated the adhesion, morphology, and proliferation of PDL cells on PMEA and other types of polymers to design an appropriate scaffold for tissue engineering. PDL cells adhered and proliferated on all investigated polymer surfaces except for poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly[(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-co-(n-butyl methacrylate)]. The initial adhesion of the PDL cells on PMEA was comparable with that on polyethylene terephthalate (PET). In addition, the PDL cells on PMEA spread well and exhibited proliferation behavior similar to that observed on PET. In contrast, platelets hardly adhered to PMEA. PMEA is therefore expected to be an excellent scaffold for tissue engineering and for culturing tissue-derived cells in a blood-rich environment.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：生体適合性 血液適合性 歯根膜細胞 表面 海面 水和構造

1. 研究開始当初の背景

再生医療の分野では、ウシ血清のような動物由来成分は、狂牛病などに代表されるような未知のウイルスの感染の問題がある。この問題を克服し、安全性を確保する目的で、患者由来の自己血清を使用する場合があるが、患者の年齢や健康状態により、十分な血清の量を確保できない可能性がある。細胞を用いた臨床応用の際には、無血清培地もしくは低血清培地（低濃度の血清を含む培地）環境下においても、細胞が接着し、安全に細胞培養ができるような足場材料の開発が求められている。無血清培地環境下で細胞が接着可能な足場材料は、臨床応用が可能な足場材料として期待できる。中間水を有する PMEА は異物反応が軽微で、低毒性を示し、変異原性がない安全な高分子であるため、中心静脈カテーテルのコーティング材に使用されている。したがって、中間水を有する高分子は異物反応が軽微でかつ低毒性を示す材料である可能性が考えられ、中間水を有する高分子をコーティングした培養皿で培養された細胞は、市販の培養皿に比べ、炎症に関するサイトカインの分泌が少ないことが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、歯周組織再生において重要な課題であるヒト歯根膜細胞(PDL)の接着、増殖、分化、機能を制御できる新規バイオマテリアルの開発を行うために、中間水を有する高分子上の細胞接着挙動を調べた

3. 研究の方法

PMEA、PMEA 類似体および Poly[(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-*co*-(butyl methacrylate)] (30 : 70 mol%) (PMPC)などの各高分子をスピコーターにより Polyethylene terephthalate (PET) 上にコートし、水の静的接触角測定により被覆されていることを確認した。細胞接着は PET、TCPS、Fibronectin をコートした PET (FN)を陽性対照、PMPC を陰性対照とした。

無血清培養は 1% Penicillin-Streptomycin を含む α -MEM 培地（以後、無血清培地とする）で 1 時間プレコンディショニングを行った各基板上に、PDL 細胞を 1×10^4 cells/cm² で播種し、37 °C、5% CO₂、95% 空気雰囲気下で無血清培地を用いて 1 時間培養した。各条件で 1 時間培養した後、PBS で洗浄を行うことで非接着細胞を除去後、0.1% グルタルアルデヒド含有 PBS 溶液で固定した。その後 PBS 洗浄

した後、クリスタルバイオレット染色を行った。光学顕微鏡を用いて、細胞核を計測した。

また、各基板上に吸着した Fibrinogen (Fng) および FN の細胞接着部位の定量を、構造特異的抗体を用いた ELISA 法により評価を行った。

4. 研究成果

PMEA および PMEА 類似体上の PDL 細胞は PET 上の細胞と同様の接着、増殖挙動を示した(図 1)。一方、PMPC 上の細胞は PET 上の細胞に比べ、接着、増殖が低かった。また、PMEA および PMEА 類似体表面上では、PDL 細胞が伸展し、細胞外マトリックスを形成していることが明らかになった。PMEA および PMEА 類似体表面上には血小板、白血球、赤血球などの血液細胞が接着、活性化しにくいことが確認されていることから、PDL 細胞は選択的に接着・伸展することがわかった。

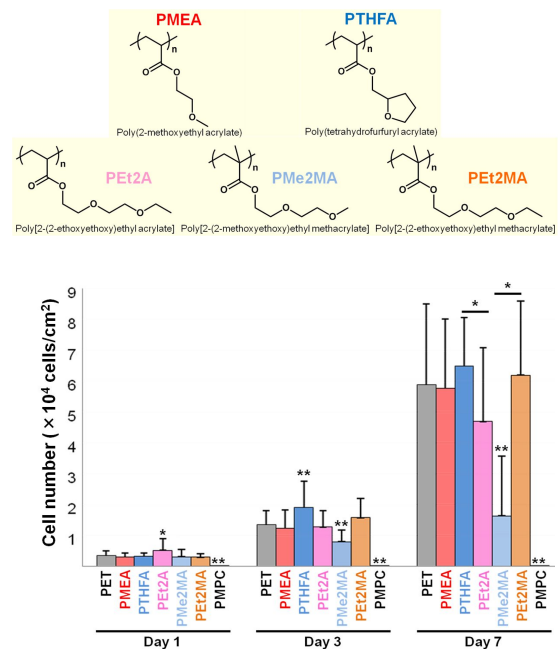


図 1 PMEА および PMEА 類似体の化学構造と PDL 細胞の接着と増殖の時間変化

PMEA および PMEА 類似体表面上で血小板粘着はほとんどせず、PDL 細胞が選択的に接着する要因として、水和した各高分子材料表面が形成する水の構造が各細胞接着数に影響していると考察している。血小板粘着が軽微な PMEА、PMEA 類似体および PMPC は中間水と定義できる特殊な水が存在することを確認している。数 wt% の中間水量を有する高分子材料表面上では血小板粘着が抑制された。一方、PDL 細胞の接着を抑制するためには、15 wt% 以上の中間水量を有する高分子材料が

必要であることが示唆された。中間水が存在する高分子表面上では血小板粘着に関するタンパク質であるフィブリノーゲンの変性が軽微であるため、血小板粘着が少ないと考察している。また、PDL細胞が接着、増殖しなかったPMPCはPMEAの6倍以上の中間水量を有しており、細胞接着に関するフィブロネクチンの吸着、変性が抑制されたため、PDL細胞は接着できなかったと考察している。以上のことから、血小板粘着が軽微で、PDL細胞が接着、増殖可能なPMEAおよびPMEA類似体は血液接触環境下における歯周組織再生用の足場材料として期待できる。

PMEA上で見られた細胞の接着選択性のメカニズムを解明するために、各基板の中間水量と各吸着タンパク質の細胞接着部位の露出量をプロットしたところ、Fngの細胞接着部位の露出量に関しては、少量の中間水量が存在することで、細胞接着部位の露出量は抑制された。一方、FNの細胞接着部位の露出量に関しては中間水量が増加するにつれて吸着したFNの細胞接着部位の露出量が減少することがわかった。吸着タンパク質と中間水量に関して、中間水量が増加するほど吸着タンパク質が抑制され、吸着したタンパク質の細胞接着部位の露出量が減少する傾向がみられた。

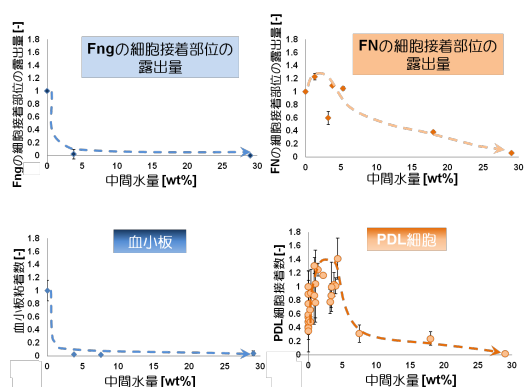


図2 吸着タンパク質の細胞接着部位の露出量、細胞接着と中間水量の関係

血小板粘着と中間水量に関して、少量の中間水量が存在することで血小板粘着が抑制され、Fngの細胞接着部位の露出量と中間水量の関係と似た傾向を示した。PDL細胞の接着数と中間水量の関係は、少量の中間水量を有する基板ではPDL細胞の接着数が多いが、中間水量の増加に伴い、PDL細胞の接着が抑制

される傾向がみられ、FNの細胞接着部位の露出量と中間水量の関係と傾向が似ていた。以上のように、タンパク質の種類によって構造変化のしやすさが異なるので、PMEAやPMEA類似体上では、血小板粘着は抑制されるが、PDL細胞が接着できたと考えられる。以上の結果から、中間水量は、吸着タンパク質の細胞接着部位の露出量を変化させ、最終的に細胞接着数に影響を与えていると考えられる。以上のように、タンパク質の種類によって構造変化のしやすさが異なるので、PMEAやPMEA類似体上では、血小板粘着は抑制されるが、PDL細胞が接着できたと考えられる。含水した高分子上に形成される中間水の量が吸着タンパク質の細胞接着部位の露出量と細胞接着に影響を与えると考えられる。

また、無血清培養の条件では、PMPCを除き、中間水を有する高分子上でPDL細胞が接着できることが明らかになった。細胞はタンパク質非存在下においても高分子基板に接着できることがわかった。無血清培地条件下でEDTA添加によるインテグリン依存性の細胞接着を阻害したところ、FN以外の全ての基板上でPDL細胞の接着は阻害されなかった。無血清培地条件下では、PDL細胞はインテグリンを介さず、PDL細胞表面の糖鎖や糖タンパク質などと高分子鎖が非共有結合（疎水性相互作用、水素結合など）することにより、非特異的に接着していると予想される。

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 4件)

1. K. Sato, S. Kobayashi, M. Kusakari, S. Watahiki, M. Oikawa, T. Hoshihara, M. Tanaka, The relationship between water structure and blood compatibility in poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) analogues, *Macromol. Biosci.*, 15, 1296-1303 (2015). 査読有り
2. F. Khan, M. Tanaka, S.R. Ahmad, Polymeric Biomaterials, their Processing and Fabrication: A Strategy for Tissue Engineering and Medical devices, *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 8224-8249 (2015). 査読有り
3. M. Tanaka, K. Sato, E. Kitakami, S. Kobayashi, T. Hoshihara, K. Fukushima, Design of biocompatible and biodegradable polymers based on the intermediate water concept, *Polymer Journal*, 47, 114-121 (2015). 査読有り

4. E. Kitakami, M. Aoki, C. Sato, H. Ishihata, M. Tanaka, Adhesion and proliferation of human periodontal ligament cells on poly(2-methoxyethyl acrylate), *BioMed Research International*, 2014, 102648 (2014). 査読有り

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 小林慎吾、福田考作、戸来奎介、片岡真依子、大澤康平、田中 賢, Synthesis and blood compatibility of sequence-specific polymers via regioselective ROMP., 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), ハワイ (アメリカ合衆国), 2015/12/15-20.
2. 田中 賢, 中間水コンセプトによる生体親和性ソフトマテリアルの設計と合成, 第 25 回日本 MRS 年次大会, 波止場会館 (神奈川県横浜市), 2015/12/8-10.
3. 小林慎吾、福田考作、戸来奎介、片岡真依子、園田敏貴、村上大樹、田中 賢, バイオマテリアルの機能制御を志向した ROMP 法による等間隔分岐高分子の合成., 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ (京都府京都市) 2015/11/9-10.
4. 田中 賢, 細胞とマテリアルの融合: 健康長寿社会に貢献するバイオ化学工学をめざして, 日本化学会秋季事業 第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015, タワーホール船堀 (東京都江戸川区), 2015/10/13-15.
5. 小林慎吾, 田中 賢, バイオマテリアルの機能制御を志向した ROMP 法による等間隔分岐高分子の合成, 第 5 回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会, 九州大学 (福岡県福岡市), 2015/9/18.
6. 片岡真依子、小林慎吾、佐藤力哉、田中 賢, 抗血栓性ポリマーの開発を志向した側鎖間の炭素数を制御したポリマーの合成と抗血栓性評価, 第 5 回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会, 九州大学 (福岡県福岡市), 2015/9/18.
7. 小林慎吾、福田考作、戸来奎介、片岡真依子、大澤康平、田中 賢, バイオマテリアルの機能制御を志向した ROMP 法による等間隔分岐高分子の合成, 第 64 回高分子討論会, 東北大学仙台キャンパス (宮城県仙台市), 2015/9/15-17.
8. 小林慎吾、泉井美幸、岩田幸久、村上大樹、田中 賢, Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価, 第 64 回高分子討論会, 東北大学仙台キャンパス (宮城県仙台市), 2015/9/15-17.
9. 小林慎吾, 田中 賢, 開環メタセシス重合法による高分子バイオマテリアルの精密合成, 九州大学先端物質化学研究所・九州シンクロトロン光研究センター合同シンポジウム, サンメッセ鳥栖 (佐賀県鳥栖市), 2015/8/30.
10. 田中 賢, 生体親和性高分子の設計と医療デバイスへの応用, 第 45 回繊維学会夏季セミナー, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市), 2015/7/31.
11. 田中 賢, 佐藤 一博, 北上恵理香, 小林慎吾, 干場隆志, 福島和樹, Design of biocompatible polymers based on the intermediate water concept, International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 物質・材料研究機構並木地区 (茨城県つくば市), 2015/7/29-30.
12. 泉井美幸, 小林慎吾, 田中 賢, Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成および抗血栓性評価, 第 44 回医用高分子シンポジウム, 産総研臨海副都心センター (東京都江東区) 2015/7/27-28.
13. 泉井美幸, 小林慎吾, 田中 賢, Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価, 第 64 回高分子学会年次大会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2015/5/27-29.
14. 大澤康平, 小林慎吾, 田中 賢, Regio 選択的な開環メタセシス重合による側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成とその血液適合性評価, 第 64 回高分子学会年次大会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2015/5/27-29.
15. 田中 賢, 佐藤一博, 北上恵理香, 小林慎吾, 干場隆志, 福島和樹, Design of biocompatible and biodegradable polymers based on intermediate water concept, Symposium on Advanced Polymer Science, 九州大学 (福岡県福岡市), 2015/5/25.
16. Erika Kitakami, Kazuhiro Sato, Chikako Sato, Masaru Tanaka, Selective cell adhesion of human periodontal ligament cells on biocompatible polymeric substrates, Fourth

International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (Hybrid Materials 2015), Sitges (スペイン), 2015/3/9-13

17. 北上恵理香, 堀内友貴, Herlinde De Keersmaecker, 水野秀昭, 堀田純一, 田中賢, 超解像蛍光顕微鏡による血液適合性高分子表面上の細胞の接着斑解析, 第36回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 2014/11/17-18
18. 北上恵理香, 佐藤一博, 福田孝作, 佐藤千香子, 小林慎吾, 田中賢, 異なる中間水量を有する血液適合性高分子表面におけるヒト歯根膜細胞の接着制御, 第36回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 2014/11/17-18
19. 北上恵理香, 佐藤一博, 佐藤千香子, 小林慎吾, 田中賢, 生体適合性高分子表面上におけるヒト歯根膜細胞の選択的な接着, 第63回高分子学会年次大会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2014/5/28-30
20. Erika Kitakami, Kazuhiro Sato, Chikako Sato, Masaru Tanaka, Selective cell adhesion of human periodontal ligament cells on biocompatible polymeric substrates, E-MRS 2014 Fall Meeting, Warsaw University of Technology (ポーランド), 2014/9/15-18

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: 医療用部材

発明者: 田中賢

権利者: 山形大学

種類: 特願

番号: 165052

出願年月日: 2015年8月24日

国内外の別: 国内

名称: 細胞培養器具およびその製造方法

発明者: 田中賢

権利者: 山形大学

種類: 特願

番号: 154078

取得年月日: 2015年8月4日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.soft-material.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中賢 (TANAKA, Masaru)

九州大学・先導物質化学研究所・教授

研究者番号: 00322850

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: