

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861616

研究課題名(和文)機能性ペプチドを固定化したカーボンナノ物質の歯槽骨再生への応用

研究課題名(英文)Carbon nanomaterial immobilized peptide for alveolar bone tissue engineering

研究代表者

平田 恵理(Hirata, Eri)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10722019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：1. カーボンナノホーン(CNHs)の骨形成メカニズムの解明：hMDMとhMSCの共培養において、CNHsの存在下にてALP活性が有意に高いことが明らかになった。CNHsはマクロファージを介して骨髄間質細胞の分化を促進すると考えられた。2. カーボンナノホーン修飾チタンの開発：300V、処理時間180秒の泳道電着にてCNHsが均一に固着したチタンを得ることができた。骨髄腔に埋入28日後では炎症は収束し、一部のCNHsは骨組織と接触しており、骨との適合性が示された。3. 骨形成ペプチド修飾CNHsの開発：CNH-DWIVAはペプチド単独と比較し、骨芽細胞のオステオポンチンの発現が有意に上昇した。

研究成果の概要(英文)：1. The effect of carbon nanohorns on human monocyte and mesenchymal stem cells: CNHs thus accelerating the differentiation of mesenchymal stem cells into the osteoblasts via OSM. This study demonstrates one of the possible mechanisms for bone formation with CNHs and CNHs could be applied for bone regeneration. 2. CNH coated anodized titanium by electrodeposition: CNHs were fixed uniformly by electrophoretic deposition at a voltage 300V, processing time of 180 seconds. 7days after implantation showed new bone tissue contacted with CNHs directly. 3. Development of the CNHs functionalized bone morphogenic protein receptor binded peptide (DWIVA): Osteopontin of the cells cultured with CNH-bone DWIVA was significantly higher than that of CNH-control peptide and DWIVA itself. DWIVA binded CNHs could increase osteoblast differentiation more than DWIVA itself.

研究分野：補綴歯科理工学

キーワード：カーボンナノ物質 ナノテクノロジー 骨再生

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ(CNTs),カーボンナノホーン(CNHs),グラフェン(GI)等のカーボンナノ物質(CNMs)は炭素のみからなる新素材であり,物理的特性および化学的安定性から医学歯学領域を含むバイオ領域において基礎研究が開始されている.申請者はこれまでに,CNTsを用いて3次元細胞培養担体の表面をコーティングすることにより担体深部にまで早期に細胞を付着させ骨芽細胞の分化を促進することや,骨との良好な適合性を示すことを報告してきた.さらにポリ乳酸やチタンにCNTsをコートすることにより骨芽細胞の接着が促進されることを報告した.これにより,CNMsの骨再生医療用生体材料への応用の可能性が示された.

また,*in vivo*においてCNHsを固着したGBR膜が骨再生を促進し,新生骨周囲にCNHsを貪食したマクロファージが多数観察されることを報告した.これにより,CNHsによるマクロファージへの刺激が骨再生に関与していることが示唆された.

さらにCNMsは,タンパク等を化学的に修飾することにより,生体適合性が向上するとともに新たな機能を付与することが可能である.我々はFGFを化学的に修飾したCNTs(FGF-CNTs)をコートしたコラーゲンスポンジが新生骨の形成を促進することを報告した.これにより,CNTsを化学的に修飾することで,効果的な骨再生への応用が可能となることが示された.

一方でFGF等のタンパクは,高価であり,化学反応の際に変性しやすい上,免疫原性となる可能性も報告されている.そこで本研究では,骨誘導性タンパクに由来した低分子ペプチド(機能性ペプチド)に着目した.低分子ペプチドは安価であり,化学修飾の際もコントロールが容易である.また,免疫反応を惹起しないことが報告されている.この機能性ペプチドをCNMsに結合し固定化することによって,安定性の向上を図る.これは以下の図で示すように,CNMsと接触した細胞表面のレセプターに直接作用し,タンパクと同様に骨芽細胞の増殖や分化の促進および骨再生への効果を発揮すると考えた.

2. 研究の目的

- (1) CNHsによる骨形成メカニズムの解明
CNHs存在下でマクロファージと骨髄間質細胞の共培養を行い,骨髄細胞への分化に与える影響について検討する.
- (2) 骨誘導性低分子ペプチドを用いた高機能化CNHsの開発
骨誘導性低分子ペプチド(機能性ペプチド)は, bone morphogenic proteins や collagen type2(BMP), また, osteopontin 等の small integrin-binding ligand を由来とした配列が明らかになっている.これらをポリマー等に化学結合することによって骨芽細胞の増殖や分化を促進するとい

った効果も報告されている.本研究では右図で示すように,各種CNHsを機能性ペプチドにより化学的に修飾する.高機能化CNHsの骨芽細胞に与える影響を評価する.

- (3) CNMsおよび高機能化CNMsの免疫反応および長期的な安全性の評価

CNMsおよび高機能化CNMsの安全性を評価するために,マクロファージを用いた即時的な免疫反応を調査すると共に,3年間の長期にわたり経時的な生体反応を観察することにより安全性を評価する.また,CNMsの構造の変化を観察し,生体反応との関連を明らかにする.

3. 研究の方法

- (1) CNHsのマクロファージと骨髄間質細胞への影響評価

ヒト全血からヒト末梢血単核細胞を採取し,得られた細胞をM-CSF添加培地にて7日間培養しヒトマクロファージ(hMDM)へと分化させた.hMDMを96well plateに播種し(150,000cells/well),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.次に,ヒト骨髄間質細胞(hMSC; Lonza, 5,000cells/well)とhMDM(50,000cells/well)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-CNHs)分散培地に置換した.24時間後,蛍光顕微鏡により,Alexa-CNHs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.尚,本研究は北海道大学大学院歯学研究科臨床・疫学研究倫理審査委員会の承認を得て行った(2014第6号).

- (2) CNHsのインプラントへの応用

カルボキシル基を付与したCNHsを無水エタノールに分散し,CNH分散液を作成した.チタン板(直径10mm,厚さ1mm)に陽極酸化処理を施し,CNH分散液中にて30mA/cm²の定電流下で,電圧,処理時間を変えて泳動電着を行った.各条件での電着後のSEM像からCNHsの付着面積を測定し比較した.またFIB-SEMを用いて断面構造を観察した.Tiワイヤー(直径1mm,長さ5mm)を同様に表面処理し,10週齢Wistar系雄性ラットの左側大腿骨骨髄腔内に埋入し,28日後に組織学的観察を行った.尚,本研究は北海道大学動物実験委員会の承認を受けて行った(承認番号:14-0090).

- (3) 骨誘導性低分子ペプチドを用いた高機

能化 CNHs の開発

BMP2 由来の骨誘導ペプチドとして、文献 1 の報告により、DWIVA を作製した。DWIVA を CNHs にクリック反応により結合し、CNH-DWIVA を作製した。コントロールとして DFMLG-CNH を作製した。CNH-DWIVA を培地中に添加し、骨芽細胞を培養した。7 日後に RNA を回収し、リアルタイム PCR を用いて、オステオポンチンの発現を比較した。

4. 研究成果

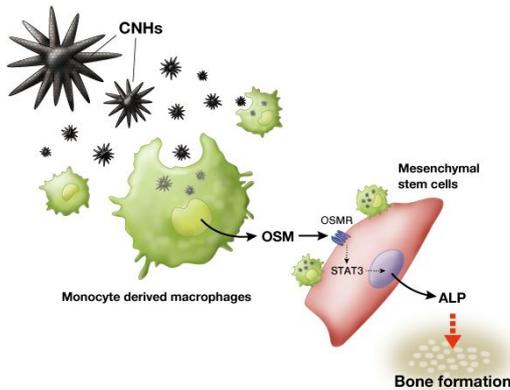
(1) CNHs のマクロファージと骨髄間質細胞への影響評価

フローサイトメトリーの結果、CNHs はマクロファージのアポトーシスおよびネクローシスに影響を与えなかった。また、マクロファージの活性を示す CD86 は CNTs 添加によって変化しなかったことから、CNHs はマクロファージのアポトーシスおよび活性に影響を与えないことが示された。

24 時間後において蛍光顕微鏡と TEM による観察の結果、CNHs は、hMSC 内部にほとんど観察されなかったが、hMDM のライソゾーム内部に観察された。共培養においても、CNHs は hMDM 内部に観察されたが、hMSC 内部では観察されなかった。

hMDM と hMSC の共培養において、CNHs の存在下にて ALP 活性が有意に高いことが明らかになった。

以上の結果より、下図に示すように、CNHs はマクロファージを介して骨髄間質細胞の分化を促進すると考えられた。



(2) CNHs のインプラントへの応用

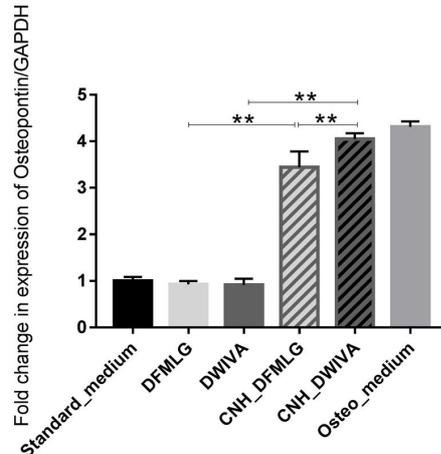
CNHs の付着面積は、電圧に比例して増加する傾向がみられた。300V、処理時間 180 秒において CNHs の付着面積が最も高く、均一に固着することが確認され、FIB-SEM 観察により、CNHs は陽極酸化 Ti 上に 0.2-0.3 μm の厚みで積層していることが確認された。

各骨髄腔埋入 7 日後の組織像では、ANTi、CNH-ANTi とともに軽微な炎症が認められ、CNHs 周囲にマクロファージが観察された。また埋入後 28 日後では炎症は

収束し、一部の CNHs は骨組織と接触しており、骨との適合性が示された。

(3) 骨形成ペプチド修飾 CNHs の開発

下図に示すように、CNH-DWIVA はペプチド単独と比較し、骨芽細胞のオステオポンチンの発現が有意に上昇した。



これらの特性を用いて、グロースファクター等を担持した CNHs をインプラント体表面に修飾することにより、オッセオインテグレーションの早期獲得など新たな機能を付与することが期待できる。

<引用文献>

1. J.-Y. Lee et al. / Biomaterials 30 (2009) 3532-3541

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)

Julie Russier, Veronica Leon, Marco Orecchioni, Eri Hirata, Patrizia Viridis, Claudio Fozza, Francesco Sgarrella, Gianaurelio Cuniberti, Maurizio Prato, Ester Vázquez, Alberto Bianco, Lucia G. Delogu, Few-Layer Graphene Kills Selectively Tumor Cells from Myelomonocytic Leukemia Patients, ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION 査読有, 56 巻, 2017, 3014-3019
DOI 10.1002/anie.201700078

Eri Hirata, Eijiro Miyako, Nobutaka Hanagata, Natsumi Ushijima, Norihito Sakaguchi, Julie Russier, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Alberto Bianco, Atsuro Yokoyama, Carbon nanohorns allow acceleration of osteoblast differentiation via macrophage activation, Nanoscale 査読有 8 巻, 2016, 14514-14522
DOI 10.1039/C6NR02756C

〔学会発表〕(計 11 件)

平田恵理, 湯田坂雅子, 前田由佳利, 小松原浩実, 田中丈土, 片浦弘道, 横山敦郎, 局所埋入したカーボンナノチューブの体内動態、フラレン・ナノチューブ・グラフェン学会第 6 回ナノカーボンバイオシンポジウム、2017-02-28、伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)

平田恵理, 都英次郎, Alberto Bianco, 湯田坂雅子, 横山敦郎. カーボンナノホーンを用いた骨形成、フラレン・ナノチューブ・グラフェン学会第 5 回ナノカーボンバイオシンポジウム、2016-09-06、かでの 27 (北海道・札幌市)

Eri Hirata, Eijiro Miyako, Masako Yudasaka, Alberto Bianco, Atsuro Yokoyama. The effect of carbon nanohorns on human monocyte and mesenchymal stem cells. 17th International Conference on the Science and Application of Nanotubes, 2016-08-13, Vienna (Austria)

高田紗理, 平田恵理, 小松原浩実, 山本悟, 横山敦郎. カーボンナノホーンコーティング陽極酸化チタンの開発. 日本補綴歯科学会第 125 回学術大会 2016-07-09、石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)

Sari Takada, Eri Hirata, Atsuro Yokoyama. The Electrodeposition of Anodized Titanium with Carbon Nanohorns. The 11th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, 2016-06-03, Bangkok(Thailand)

平田恵理, 都英次郎, Alberto Bianco, 湯田坂雅子, 横山敦郎, カーボンナノホーンはマクロファージとの共培養下において骨髄間質細胞の ALP 活性を促進する、第 3 回ナノカーボンバイオシンポジウム、2015-09-06、北九州国際会議場(福岡県・北九州市)

Eri Hirata, Eijiro Miyako, Masako Yudasaka, Alberto Bianco, Atsuro Yokoyama. Carbon nanohorns boost alkaline phosphatase activity in co-culture of macrophages and mesenchymal stem cells 116th International Conference on the Science and Application of Nanotube, 2015-07-28、名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

平田恵理, 伊藤達郎, 高田紗理, 横山敦郎. マクロファージとの共培養下における骨髄間質細胞に対するカーボンナノホーンの影響 日本補綴歯科第 124 回学術大会、2015-05-31、大宮ソニックシティ (埼玉県・大宮市)

Eri Hirata, Eijiro Miyako, Masako Yudasaka, Alberto Bianco, Atsuro Yokoyama, The effect of carbon nanohorns on macrophages and mesenchymal stem cells International Association for Dental Research General session, 2015-03-12, Boston (USA)

平田恵理, 伊藤達郎, 山本悟, 横山敦郎. カーボンナノホーンがマクロファージと骨芽細胞に与える影響、第 44 回インプラント学会学術大会、2014-09-14、東京国際フォーラム (東京都、千代田区)

平田恵理, 横山敦郎. カーボンナノホーンがマクロファージと骨芽細胞に与える影響、フラレン・ナノチューブ・グラフェン学会第 1 回ナノカーボンバイオシンポジウム、2014-09-02、名古屋大学東山キャンパス IB 電子情報館 IB014 講義室 (愛知県名古屋市)

〔その他〕

アウトリーチ活動

女子中高生を対象とした講演会「理系の実際 私が研究をしている理由」

日時:平成 29 年 3 月 7 日(火)9:50~10:40

会場:札幌日本大学中学校

開催規模 3 年生 約 80 名

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 恵理 (HIRATA, Eri)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号:10722019