

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390343

研究課題名(和文) 各種セラミックスを用いた骨代謝解析系による破骨細胞・骨芽細胞相互作用の解明

研究課題名(英文) Studies for interaction between osteoblasts and osteoclasts with experimental systems using ceramics

研究代表者

池田 通 (IKEDA, Tohru)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00211029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した生体内吸収性人工骨材料、柱状粒子ベータリン酸三カルシウムを骨粗鬆症モデルである卵巣摘出ラットの骨欠損部位に移植すると、生理的骨梁構造及び生理的骨量を保って修復されることを発見した。また、インターフェロン関連分子が優れた修復能に関与すると考えられた。一方、独自に開発した人工骨材料、柱状粒子ハイドロキシアパタイト(HA)にはビタミンD結合蛋白(DBP)への強い親和性があることを発見した。さらに、DBPが活性化されマクロファージ活性化因子になると強い破骨細胞形成促進作用を発揮することも発見し、この分子が柱状粒子HAに骨代謝活性化作用を起こさせて骨修復を促進すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We implanted granules of beta-tricalcium phosphate composed of rod-shaped particles in bone defects of ovariectomized rats. In the region, bone defects were regenerated with much amount of bone with physiological trabecular structures. Molecules involved in interferon signaling pathways were thought to induce the normal bone healing. We also found that hydroxyapatite composed of rod-shaped particles had strong interaction with vitamin D binding protein. Macrophage activating factor, an active form of vitamin D binding protein, possessed potent stimulatory effect for osteoclastogenesis and this molecule was thought to induce potent osteoconductivity of hydroxyapatite composed of rod-shaped particles.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：骨代替材料 骨代謝 破骨細胞 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は水熱処理を応用して柱状粒子のセラミックを作製する技術確立し、柱状粒子ハイドロキシアパタイト (HA) 及び柱状粒子ベータリン酸三カルシウム (β -TCP) を作製し、骨代替材料としての性能を確認するために実験を行ってきた。すでに医療に应用されている非柱状粒子 β -TCP が動物実験で過剰気味の吸収を示し、十分量の修復骨を形成できないのに対し、柱状粒子 β -TCP は骨に近い代謝を示し、修復部位に多くの骨を形成した。一方、これもすでに医療に应用されている非柱状粒子 HA が生体内非吸収性であるのに対し、柱状粒子 HA は生体内吸収性を示した。この材料は、世界で初めて開発された生体内吸収性 HA となった。柱状粒子 HA は生体内での吸収が遅いが、周囲に長期間多数の破骨細胞が認められた。また、骨欠損部位に多量の修復骨を誘導したが、骨代謝活性化作用がその原因であると考えられた (Biomaterials 28:2612-2621, 2007, Biomaterials 29:2719-2728, 2008, Biomaterials 30:4390-4400, 2009, J. Cer. Soc. Jpn. 119:101-104, 2011)。

2. 研究の目的

一般に吸収が進めば形成も盛んになり、形成が進めば吸収が盛んになるという吸収と形成の「カップリング作用」が知られている。破骨細胞形成因子 RANKL の発生源が骨芽細胞であることが解明されその一端が明らかにされたが、骨吸収が盛んになると骨形成が刺激されるメカニズムについてはまだわかっていない。これを解明するためには、薬物刺激によらないで種々の活性の破骨細胞を形成する実験系が有効である。柱状粒子 β -TCP、非柱状粒子 β -TCP、柱状粒子 HA、非柱状粒子 HA を用いると、それぞれのセラミックに接する破骨細胞を薬物刺激なしで異なる活性の破骨細胞に誘導することが可

能であると着想し、これらのセラミックを利用して骨吸収と骨形成のカップリング作用に關与する機構を明らかにすることを目的に研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) セラミック試料の作製

蒸留水に分散したゼラチンに α -TCP 粉末を加えスラリーを作製し、攪拌中の 80 °C の植物油中にピーカーから滴下した後、冷却した。冷却後洗浄、乾燥した顆粒を 1200 °C、30 分熱処理し、500-600 μ m の顆粒 (α -TCP 顆粒) を回収した。

i) HA 球状顆粒の作製

α -TCP 顆粒 (0.2 g) を 160 °C、20 時間水熱処理した。得られた顆粒を洗浄、乾燥後、pH11 のアンモニア水に浸漬し、105 °C、3 時間再度水熱処理した。試料を洗浄して柱状粒子 HA 試料とした。非柱状粒子 HA は、HA 粉末を原料として同様の方法で球状顆粒を作製し、900 °C 3 時間加熱して作製した。

ii) β -TCP 球状顆粒の作製

α -TCP 顆粒 (0.2 g) を 160 °C で 20 時間水熱処理した。得られた顆粒を乾燥後、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 水溶液に浸漬し、室温乾燥した。得られた顆粒を 900 °C にて 3 時間熱処理し、柱状粒子 β -TCP 試料とした。非柱状粒子 β -TCP は、 α -TCP 顆粒を 1200 °C 30 分加熱後、900 °C 6 時間加熱することで作製した。

(2) 不働動物実験

生後 8 週齢の雌 Wistar 系ラット右側大腿骨遠位端に直径 2 mm 深さ 3 mm の骨孔を形成し、同部に 30 mg の直径 0.5 mm の柱状粒子 β -TCP または柱状粒子 HA 顆粒を移植した。移植 2 週後、6 週後、10 週後及び 22 週後に右側の坐骨神経を 2 mm 切除し、不働状態にした。坐骨神経切除手術の 2 週後に動物を安楽死処置し、右側大腿骨と頸骨を摘出した。

(3) 卵巣摘出動物実験

生後 8 週齢の雌 Wistar 系ラットの両側卵巣を摘出した。卵巣摘出の 2 週後に右側大腿骨遠位端に直径 2 mm 深さ 3 mm の骨孔を形成し、同部に 30 mg の直径 0.5 mm の柱状粒子 β -TCP または非柱状粒子 β -TCP 顆粒を移植した。対照として卵巣摘出を行わない疑似手術を行った実験群を作製した。移植 4 週後、8 週後、12 週後に大腿骨と頸骨を摘出した。

摘出大腿骨は固定後樹脂包埋し、非脱灰切片を作製した。切片はギムザ染色、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 及びアルカリホスファターゼ (ALP) 活性染色を施した。各実験群に 6 匹の動物を確保し、形態計測は KEYENCE BZ-9000 顕微鏡を用いて行った。

(4) マイクロアレイ解析

柱状粒子 β -TCP 及び非柱状粒子 β -TCP ディスク上に RANKL を 400 ng/ml 濃度で添加した状態でマウス骨髄由来マクロファージを 7 日間培養した。その後細胞から RNA を抽出し、遺伝子発現マイクロアレイ解析で遺伝子発現レベルの違いを検討した。

(5) 蛋白吸着実験

直径 0.5 mm のセラミック顆粒をチューブに入れ、バッチ法にて正常ヒト血清を 24 時間作用させ、吸着蛋白を 0.5 M リン酸緩衝液で溶出した。溶出した血清蛋白は 0.05 M リン酸緩衝液で透析後、iTRAQ システム (Filgen) を用いて定量的質量分析を行うとともに、骨髄マクロファージに対する走化性及び破骨細胞形成への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 柱状粒子 HA は、顕著な骨形成低下を起こす不動化モデル動物の骨欠損部位の骨代謝を活性化し、修復を促進することを明らかにした。

セラミック顆粒を移植しない群では骨孔

を空けてから 4 週目ではほとんど骨修復が起らないが、8 週、12 週、24 週後では、過去 2 週間不動化状態であったにも関わらず少量の海綿骨が形成された。セラミック顆粒を移植した群では、多量の残留セラミック顆粒周囲に骨組織が見られた。セラミック顆粒を移植しない群では骨孔を空けてから 4 週後に ALP 活性が認められたが、24 週後ではほとんど活性が認められなかった。セラミック顆粒を移植した群では、移植 4 週後から 24 週後まで高い ALP 活性が検出された。TRAP 活性についても同様であった。柱状粒子 HA を移植した群では 24 週後でも特に多数の TRAP 陽性破骨細胞が認められた。

(2) 柱状粒子 β -TCP は、卵巣摘出動物に正常の構造の骨を誘導して骨欠損を修復することができる材料であることを発見した。

骨欠損部位には、骨孔形成 12 週後までほとんど修復骨が認められなかった。セラミック顆粒を移植した群では、残留したセラミックと共に修復骨の形成が認められた。非柱状粒子 β -TCP 顆粒移植群では修復骨が誘導されても骨梁構造が寸断されて機能的な骨梁構造が維持できなかったが、柱状粒子 β -TCP 顆粒移植群では非卵巣摘出疑似手術群と変わらない正常の骨修復が起きていた。残留セラミック量は柱状粒子 β -TCP と非柱状粒子 β -TCP の間に差がなかった。骨梁構造を評価するパラメータである、骨梁数 (Tb.N)、骨梁厚 (Tb.Th)、骨梁分離 (Tb.Sp) のいずれも非柱状粒子 β -TCP 顆粒移植群では骨粗鬆症で見られる高度の骨破壊傾向を示したが、柱状粒子 β -TCP 顆粒移植群では正常の骨梁構造を保っていることを示していた。

柱状粒子 β -TCP 移植部位の破骨細胞数は非柱状粒子 β -TCP 移植部位の破骨細胞数と変わらないことから、同部の破骨細胞活性が卵巣摘出状態であるにもかかわらず正常に維持されていると判断された。そこで、柱状

粒子 β -TCP 及び非柱状粒子 β -TCP ディスク上に培養した破骨細胞が発現する遺伝子をマイクロアレイ法で検討した。パスウェイ解析の結果、両者で違いのあった遺伝子群には、インターフェロン β で発現が上昇することが知られている ISG15 関連分子が多く含まれていた。インターフェロン β は破骨細胞活性を低下させることが広く知られているが、本研究成果は、そのメカニズムの根幹を ISG15 が担っていることを強く示唆していた。

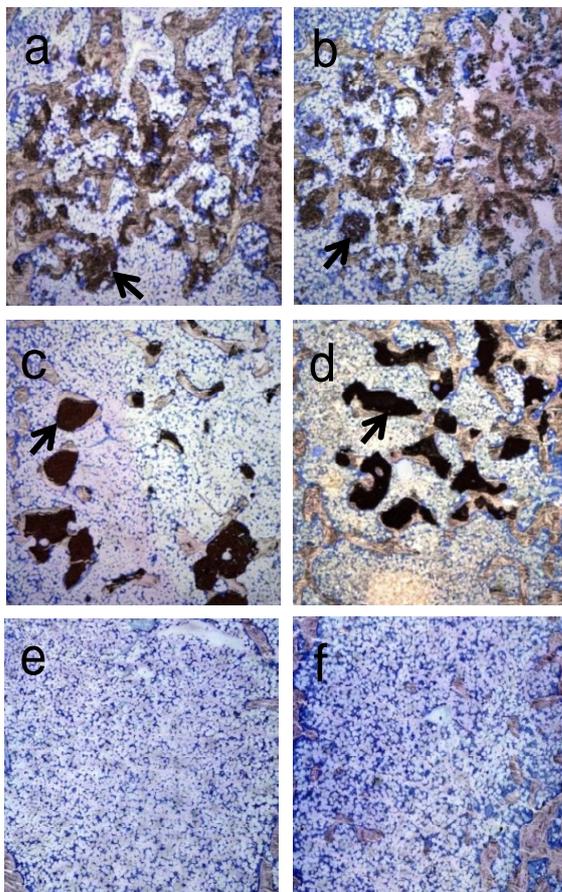


図1. 卵巣摘出ラット移植12週後

a, c, e: 卵巣摘出 b, d, f: 疑似手術
a, b: 柱状粒子 β -TCP c, d: 非柱状粒子
 β -TCP e, f: 移植物なし
: 残留セラミック顆粒

(3) 柱状粒子 HA には強いビタミン D 結合蛋白親和性があり、これが強い破骨細胞維持能及び修復骨誘導能の原因となっている可能性を示した。

柱状粒子 HA が強い修復骨誘導能及び破骨細胞維持能を発揮するメカニズムには柱状

粒子 HA に吸着する血中蛋白が関与していると考え、血清蛋白吸着能を解析した。チューブ内でセラミック顆粒に正常ヒト血清を 24 時間作用させ、吸着蛋白に対し iTRAQ 法による定量的質量分析を行った結果、柱状粒子 HA と非柱状粒子 HA の間で最も大きな吸着量の差があったのが、ビタミン D 結合蛋白 (DBP) であった。そこで、ヒト血清由来 DBP をチューブ内で 24 時間セラミック顆粒に作用させ、溶出液に含まれる DBP を ELISA 法で確認した。柱状粒子 HA は非柱状粒子 HA に比べ数倍量の DBP を吸着することがわかった。また、大腿骨遠位端の骨孔にセラミック顆粒を移植し、2 日後に取り出してそのセラミック顆粒に吸着している DBP を同様に解析すると、吸着している総蛋白量には差がないにも関わらず、柱状粒子 HA 顆粒には非柱状粒子 HA 顆粒に比べて有意に多量の DBP が吸着していた。

DBP には 2 本の糖鎖があるが、それぞれの糖鎖を β -ガラクトシダーゼ及びニューラミニダーゼで切断すると活性型であるマクロファージ活性化因子 (MAF) となり、破骨細胞を活性化させることが疑われていた (Schneider et al., Bone 16:657-662, 1995; Swamy et al., J Cell Biochem 81:535-546, 2001)。柱状粒子 HA は長期間破骨細胞を維持する能力があるが、その原因が多量に吸着した DBP によると考えた場合、DBP にはマクロファージ系細胞を呼び寄せる走化作用があるか、もしくは破骨細胞形成を促進する作用があるかどうか、または双方であることが考えられた。そこで、直径 5 μ m の穴が空いた膜を隔ててマウス骨髄由来マクロファージを培養し、膜の外側に DBP または MAF を加え、直径 5 μ m の穴の外に遊走するマクロファージ数を評価した。その結果、DBP 及び MAF はともにマクロファージに対して走化作用をほとんど示さないことがわかった。次に DBP または MAF を破骨細胞

培養系に添加して破骨細胞形成への影響を調べた。DBPの活性型であるMAFは、0.1 µg/ml以上の濃度で強い破骨細胞形成促進作用を示した。これらの結果から、多量に吸着したDBPが周囲の炎症性細胞等が有するβ-ガラクトシダーゼやニューラミニダーゼにより糖鎖を切断されてMAFとなり、柱状粒子HAが長期間にわたり強い破骨細胞維持作用を示すものと考えられた。

これら一連の研究から、柱状粒子β-TCP上の破骨細胞はインターフェロンβシグナリング関連分子の活性化によって卵巣摘出動物に正常構造の修復骨を形成することができ、柱状粒子HAは血清中のDBPを多量に吸着し、それが活性型のMAFになることで周囲に多数の破骨細胞を維持するが、生体内吸収性がそれほど高くない柱状粒子HA周囲においては顕著な吸収作用を示すことができず、カップリングによる骨芽細胞刺激作用は示すため、その結果移植部位に多量の修復骨を誘導することが考えられた。セラミック工学は我が国が世界に誇る先進技術の一つであるが、我々の開発した柱状粒子β-TCPは骨粗鬆症患者に対して極めて有効な人工骨材料であると思われた。さらに、これらのセラミックの生体反応のメカニズムを解析したところ、破骨細胞 骨芽細胞相互作用による新たな骨代謝調節メカニズムがあることを示す結果を得た。

5. 主な発表論文等

雑誌論文 (計3件)

1. Tatsukawa, E., Gonda, Y., Kamitakahara, M., Matsuura, M., Ushijima, M., Shibata, Y., Yonezawa, I., Fujiwara, M., Ioku, K., Ikeda, T. Promotion of normal healing of bone defects under estrogen deficiency by implantation of beta-tricalcium phosphate composed of rod-shaped particles., J.

Orthopaed. Res. 32:189-196, 2014. (査読有)

2. Ikeda, T., Kasai, M., Tatsukawa, E., Kamitakahara, M., Shibata, Y., Yokoi, T., Nemoto, T. K., Ioku, K. A bone substitute with high affinity for vitamin D binding protein-relationship to niche of osteoclasts. J. Cell Mol. Med. 18:170-180, 2014. (査読有)

DOI: 10.1111/jcmm.12180

3. Ikeda, T., Gonda, Y., Tatsukawa, E., Kasai, M., Shibata, Y., Kamitakahara, M., Okuda, T., Yonezawa, I., Kurosawa, H., Ioku, K. Stimulation of osteogenesis in bone defects implanted with biodegradable hydroxyapatite composed of rod-shaped particles under mechanical unloading. Acta Histochem. Cytochem. 45 (5):283-292, 2012. (査読有)

DOI: 10.1267/ahc.12012

学会発表 (計9件)

1. 池田 通, 立川絵里, 上高原理暢, 柴田恭明, 横井太史, 井奥洪二. 柱状粒子ハイドロキシアパタイトの血清蛋白親和性. 第35回日本バイオマテリアル学会大会, 2013年11月25, 26日, 東京. { 予稿集 演題番号 1D-07, p138, 2013 }
2. 池田 通, 立川絵里, 権田芳範, 上高原理暢, 奥田貴俊, 柴田恭明, 米澤郁穂, 黒澤 尚, 金子和夫, 井奥洪二. セラミックの微小構造と生体反応. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012年11月26-27日, 仙台. (招待講演) { 予稿集 演題番号 S9-3, p112, 2012 }
3. Ioku, K., Kamitakahara, M., Ikeda, T. Integration between apatite ceramics and bones. The 12th Asian Bio Ceramics Symposium, November 18-21, 2012, Tainan, Taiwan. (招待講演) { 抄録集 演

- 題番号, KN16, p.29, 2012 }
4. Ioku K, Kamitakahara M, Ikeda T. Functional biomaterials for bone regeneration. IUMRS Int. Conf. Electronic Materials 2012 (IUMRS-ICEM 2012), 26 September, 2012, Yokohama, Japan. {抄録集 演題番号 A-5-026-004, 2012 }
 5. Ioku K, Kamitakahara M, Ikeda T. Ceramic Functional Biomaterials for Regenerative Medicine. Int. Conf. Traditional and Advanced Ceramics 2012 (ICTA2012), 22-25 August, 2012, Bangkok, Thailand. (招待講演) {抄録集 演題番号 INA-10, p. 27, 2012 }
 6. 池田 通, 立川絵里, 柴田恭明, 上高原理暢, 井奥洪二. 柱状粒子ハイドロキシアパタイトに吸着する血清蛋白と破骨細胞維持能. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会, 2012 年 7 月 19-21 日, 東京. {抄録集 演題番号 P1-10, p241, 2012 }
 7. 池田 通, 立川絵里, 権田芳範, 柴田恭明, 米澤郁穂, 上高原理暢, 井奥洪二: 卵巣摘出ラットで生理的骨再生を促す柱状粒子 -リン酸三カルシウム. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、7 月 28-30 日 {抄録集 演題番号 P1-07, p224, 2011 }
 8. Fujii R, Kamitakahara M, Watanabe N, Ikeda T, Ioku K. Preparation and characterization of granules composed of rod-shaped β -tricalcium phosphate particles, 15th International Metallurgy & Materials Congress, 11-13 November 2010, Istanbul, Turkey, { BM-06, p91 }
 9. Ioku K, Kamitakahara M, Ikeda T. Calcium-deficient Hydroxyapatite for Metabolism of Subsequently Formed Bone Tissue, 5th Forum on New Materials, Int. Conf. Modern Materials & Technologies (CIMTEC 2010), 13-18 June 2010,

Montecatini Terme, Tuscany, Italy, Invited.
{ FL-4:IL02, p.127 }

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

池田 通 (IKEDA, Tohru)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 0 0 2 1 1 0 2 9

(2) 研究分担者

井奥 洪二 (IOKU, Koji)
慶応義塾大学・経済学部・教授
研究者番号 : 6 0 2 1 2 7 2 6

上高原 理暢 (KAMITAKAHARA, Masanobu)
東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
研究者番号 : 8 0 3 6 2 8 5 4

(3) 連携研究者

藤田 修一 (FUJITA Shuichi)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 : 0 0 1 8 1 3 5 5

柴田 恭明 (SHIBATA Yasuaki)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 8 0 2 5 3 6 7 3

石川 雄一 (ISHIKAWA Yuichi)
がん研究会・癌研究所病理部・部長
研究者番号 : 8 0 2 2 2 9 7 5

(4) 研究協力者

立川 絵里 (TATSUKAWA Eri)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・技術職員
研究者番号 : 6 0 5 3 4 5 3 4