

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592287

研究課題名（和文）リン酸カルシウム置換型機能性ベクトルマテリアルに対する細胞応答の検討

研究課題名（英文）Fabrications of zinc-releasing biocermet combining zinc calcium phosphate to calcium phosphate cement

研究代表者

堀内 信也 (HORIUCHI SHINYA)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：70263861

研究成果の概要（和文）：リン酸亜鉛より誘導したリン酸亜鉛カルシウムをリン酸カルシウムセメントへと配合し新規の亜鉛徐放性セメントを得た。また、このセメント上で培養した骨芽細胞の遺伝子発現と機能的解析を行ったところ、細胞増殖や骨基質産生に関連する遺伝子マーカーの発現が上昇し、細胞増殖能、ALP 活性ともに向上した。以上の結果から、リン酸亜鉛カルシウムを添加したアパタイトセメントは、骨芽細胞様細胞に対して、その分化増殖能を高め、骨基質産生能を向上する可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, zinc-releasing bioceramics have been the focus of much attention owing to their bone-forming ability. Thus, some types of zinc-containing calcium phosphate (*e.g.*, zinc-doped tricalcium phosphate and zinc-substituted hydroxyapatite) are examined and their osteoblastic cell responses determined. In this investigation, we studied the effects of zinc calcium phosphate (ZCP) derived from zinc phosphate incorporated into calcium phosphate cement (CPC) in terms of its setting reaction and MC3T3-E1 osteoblast-like cell responses. The proliferation of the cells and alkaline phosphatase (ALP) activity were enhanced when 10 wt% ZCP was added to CPC. Taken together, ZCP added CPC at an appropriate fraction has a potent promotive effect on bone substitute biomaterials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児歯科学

キーワード：亜鉛、ハイドロキシアパタイト、骨形成、セメント

1. 研究開始当初の背景

口唇裂口蓋裂などの先天性疾患や、外傷、歯周病によって生じた骨欠損部位に対する骨補填療法の有用性は高く、歯槽骨の連続性が得られるばかりか、骨充填部への歯の

移動や、人工歯根の埋入が可能となる。現在、歯槽骨欠損に対する骨補填材として最も有効とされるのは自家腸骨であるが、採取する際に外科的な侵襲が不可避で、ドナーへの影響が大きい。また、形成性や機械

的強度に乏しく、採取できる骨量には限界がある。こうした欠点を補い、無限に得ることができる人工骨補填材料が求められているが、現存する骨補填材には機械的な強度や操作性、骨誘導能において満足できるものは開発されていない。

従来の我々の検討では、リン酸亜鉛より誘導したリン酸亜鉛カルシウムと、アパタイトセメントと組み合わせることで、ハイドロキシアパタイトを形成しつつ硬化する亜鉛徐放性セメントを作成し、材料上で骨基質の形成を司る骨芽細胞様細胞を培養することに成功した。しかし、セメント上で培養した細胞の機能的な解析などの生物学的な応答性が検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リン酸亜鉛より誘導したリン酸亜鉛カルシウムを配合した、亜鉛徐放性リン酸カルシウムセメントが骨芽細胞様細胞に与える生物学的な影響を検討することである。

3. 研究の方法

(1) リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメントの作成

等モルの TTCP (第 4 リン酸カルシウム) と DCPD (第 2 リン酸カルシウム・2 水和物) にリン酸亜鉛より誘導したリン酸亜鉛カルシウムを重量比 0~50% の範囲で配合し、高速ミルにて粉末を混和しセメント粉末を作成した。練和液は 2.5% リン酸二ナトリウムで、粉液比は 2.5 とした。練和したセメント泥は 10mm 径の型枠に流し込み、一時間後にオートクレーブにて滅菌した。

(2) リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメントの骨形成作用の検討

①細胞増殖能に対する影響の検討

(1) で得られたセメント硬化体上で骨芽細胞様細胞を培養し、細胞増殖試験 (WST-8) と、走査型電子顕微鏡観察を行う。

細胞増殖に与える影響について検討する。

②骨代謝マーカーの測定

培養細胞より産生される骨代謝マーカー (アルカリホスファターゼの活性) の測定を行い、骨形成能について検討する。

③遺伝子発現の解析

培養細胞より産生される遺伝子発現を観察し、培養細胞の分化・増殖、骨形成能について検討する。

4. 研究成果

①細胞増殖能に対する影響の検討

リン酸亜鉛カルシウム濃度が 30wt% を超えると骨芽細胞様細胞は死滅した。しかし、10wt% のセメントはリン酸亜鉛カルシウムを含有しないアパタイトセメントと比較して細胞増殖能が高かった。しかし、いずれの場合も、培養用のプラスチックプレートにおける細胞増殖能が最も高かった。(図 1)

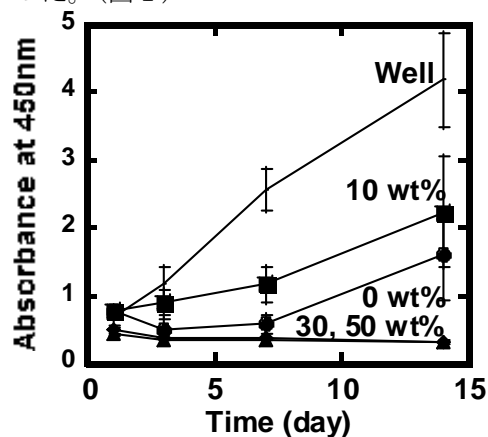


図 1 細胞増殖試験

②骨代謝マーカーの測定

10wt% のセメントはリン酸亜鉛カルシウムを含有しないアパタイトセメントと比較してアルカリホスファターゼ活性が高かった。リン酸亜鉛カルシウム濃度が 30wt% を超えるとアルカリホスファターゼ活性は認められなかった。これは、骨芽細胞様細胞の増殖試験より得られた細胞増殖がみられなかった結果と考えられる。しかし、いずれの場合も、培養プレートにおけるアルカリホスファターゼ活

性が最も高かった。(図2)

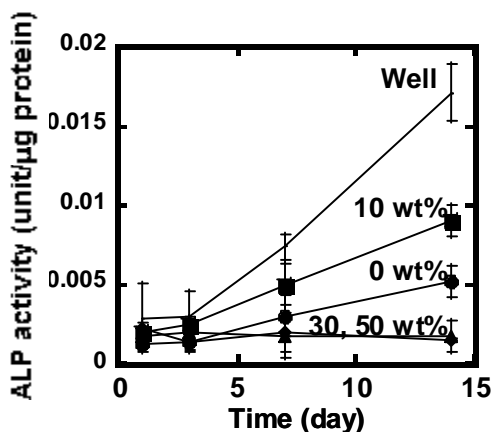


図2 アルカリフォスファターゼ活性

③遺伝子発現の解析

骨芽細胞より産生される遺伝子として、初期の増殖に関連するコラーゲンタイプ I (Col-type I)、分化中間から終期に産生される遺伝子としてアルカリフォスファターゼ (ALP)、分化終期から骨基質期に発現する遺伝子としてオステオカルシン (OCN) について遺伝子発現を定量的 RT-PCR にて観察を行った。

Col-type I は培養プレート上では、培養 3 日をピークにその発現は低下した。また、アパタイトセメント上では、培養初日から 3 日にかけて発現が低下しその後 6 日にかけて上昇した。一方 10wt% のリン酸亜鉛カルシウムを配合したアパタイトセメント上では、時間依存的にその発現が上昇した。

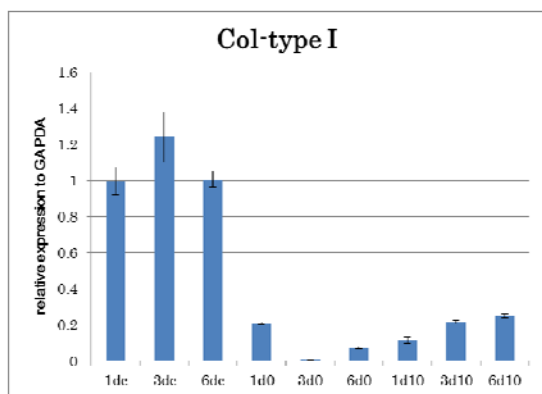


図3 コラーゲンタイプ 1 の遺伝子発現

ALP は培養プレート上では、培養期間を通じてその発現は上昇した。一方、アパタイトセメント上では、培養期間中その発現に有意な上昇をみなかった。しかし 10wt%

のリン酸亜鉛カルシウムを配合したアパタイトセメント上では、時間依存的にその発現が上昇した。

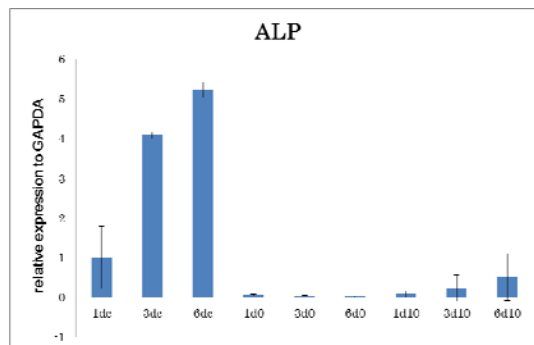


図4 アルカリフォスファターゼ発現

OCN は培養プレート上では、培養期間を通じてその発現は上昇した。一方、アパタイトセメント上では、培養期間中その発現に有意な上昇をみなかった。しかし 10wt% のリン酸亜鉛カルシウムを配合したアパタイトセメント上では、時間依存的にその発現が上昇した。

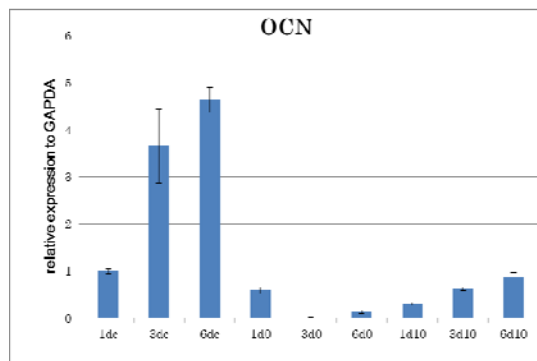


図5 オステオカルシンの遺伝子発現

以上の結果から、リン酸亜鉛カルシウムを添加したアパタイトセメントは、骨芽細胞様細胞に対して、その分化増殖能を高め、骨基質産生能を向上する可能性があることが示唆された。今後は、in vitro では骨吸収を司る破骨細胞のセメントへのレスポンスと、in vivo における動物実験により、リン酸亜鉛カルシウムを配合した亜鉛徐放性リン酸カルシウムセメントの効果を検証していく必要がある。

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 3件)

1. 天知良太, 堀内信也, 川合暢彦, 木内奈央, 藤原慎視, 黒田晋吾, 田中栄二、3次元デジタルモデルを用いた片側性口唇裂口蓋裂患者の咬合評価に関する検討, 査読有り, 日本口蓋裂学会雑誌, 37, 2012, 203-209
2. Horiuchi S, Kuroda S, Hiasa M, Suge T, Saku S, Hamada K, Matsuo T, Asaoka K, Tanaka E. Reinforcement of bond strength of self-etching orthodontic adhesive. 査読有り, Angle Orthod. 82(1), 2012, 30-35.

〔学会発表〕(計 4件)

1. 金南希, 天知良太, 堀内信也, 川合暢彦, 藤原慎視, 木内奈央, 黒田晋吾, 田中栄二、三次元デジタルモデルを用いた片顎性口唇口蓋裂患者の咬合評価に関する検討(第二報)、第36回日本口蓋裂学会、2012.5.27-29、京都市、京都国際会議場
2. S. Horiuchi, K. Asaoka, S. Fujihara, A. Yasue, E. Tanaka, Development of zinc-releasing apatite cement modified by zinc calcium phosphate, International associations of dental research, 2011.3.18, San Diego (USA), San Diego convention center
3. 堀内信也、日浅雅博、木内奈央、泰江章博、浜田賢一、浅岡憲三、田中栄二、リン酸亜鉛カルシウムを添加した亜鉛徐放性アパタイトセメントの開発、第69回日本矯正歯科学会大会、2010.9-27-29、横浜市、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 信也 (HORIUCHI SHINYA)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：70263861

(2) 研究分担者

田中 栄二 (Tanaka Eiji)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：40273693
泰江 章博 (YASUE AKIHIRO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：80380046
木内 奈央 (KINOUCHI NAO)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：30457329
日浅 雅博 (MASAHIRO HIASA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：90511337