

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560114

研究課題名(和文) 骨軟骨再生のための圧電粒子添加ナノファイバースキャホールドの開発

研究課題名(英文) Development of PLLA Nanofiber Scaffold Doped with BaTiO<sub>3</sub> by Electrospinning for Bone/Cartilage Tissue Engineering

研究代表者

森田 有亮 (Morita, Yusuke)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：80368141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨形成を促進するためのBaTiO<sub>3</sub>(BTO)ナノ粒子を添加したPLLAナノファイバースキャホールドをエレクトロスピンニングにより作製した。PLLA濃度10 w/v%およびBTEAC濃度3 w/v%の条件において、BTO粒子が均一に分散したPLLA/BTOナノファイバースキャホールドを作製した。BTO添加量が増加するに伴いナノファイバーの表面電位は低下した。また、BTO粒子を添加したスキャホールド上で培養した骨芽細胞様細胞のALP活性値は、BTO粒子を添加しないスキャホールドの場合と比較して高い値を示し、BTO粒子の添加による骨形成の促進が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, PLLA nanofiber scaffold doped with BaTiO<sub>3</sub> (BTO) particle was developed to accelerate bone formation. We developed PLLA/BTO nanofiber scaffold with uniformly dispersed BTO nanoparticles at PLLA concentration of 10 w/v% and BTEAC concentration of 3 w/v%. According to TEM observation, BTO nanoparticles were dispersed uniformly in the PLLA/BTO nanofiber, and the density of BTO nanoparticle in the PLLA/BTO nanofiber increased with increasing amount of BTO. The surface potential of PLLA/BTO nanofiber was lower than that of PLLA nanofiber due to BTO nanoparticles. There were no differences in DNA amount among all nanofiber scaffold. ALP activity on PLLA/BTO nanofiber scaffold was higher than that on PLLA nanofiber scaffold. It was suggested that PLLA/BTO nanofiber scaffold enhanced osteogenic differentiation.

研究分野：生体医工学

キーワード：骨軟骨再生 スキャホールド ナノファイバー チタン酸バリウム粒子 エレクトロスピンニング

## 1. 研究開始当初の背景

近年、軟骨再生に関しては *in vivo*, *in vitro* において数多くの研究が行われている。臨床的な試みも軟骨疾患および損傷に対して活発に行われているが、患者の早期社会復帰を考えると軟骨疾患の再生をさらに短期間に行うという現実的な要求がある。しかしながら、*in vitro* で再生された軟骨組織の力学特性は生体組織に遠く及ばないのが現状である。より効率的に3次元構造の再生軟骨組織を作製するために、骨軟骨再生用スキャホールドに対する開発要求は非常に高い。

骨軟骨再生促進のためのスキャホールド開発における主要課題のひとつは、軟骨細胞の活性向上と再生軟骨の早期成熟である。軟骨組織の大部分はコラーゲン線維とグリコサミノグリカンより構成される細胞外基質であり、細胞は周囲に形成される細胞外基質に接着することで、物理的な足場を確保し、細胞活性や細胞増殖に必要な情報を確保する。さらに軟骨組織の大部分は水分であり、軟骨組織の変形に伴い生じる水分流動による流動電位や細胞外基質の陰性固定電荷といった電気的刺激が軟骨細胞の活性に影響している。圧電特性を有するポリ乳酸(PLA)を用いたスキャホールドの試作と *in vitro* 実験による細胞活性評価は数多く見受けられるが、繊維状スキャホールド自体が刺激能を有し自発的に細胞活性を促すものは無い。

骨軟骨再生促進のためのスキャホールド開発における主要課題のもうひとつは、移植された再生軟骨組織と生体骨との早期結合である。生体内から供給される骨髄細胞から骨芽細胞への分化促進と骨再生促進機能をスキャホールドに付与する必要がある。一般に、生体骨は圧電特性を有しており、骨の変形に伴う圧電効果により骨芽細胞・破骨細胞活性の調整や骨のリモデリングが行なわれていることが知られている。これらより、圧電特性を有する PLA や分極処理したハイドロキシアパタイト(HA)を用いたスキャホールドの試作と *in vitro* 実験による細胞再構成運動の実験観察は数多く見受けられる。分極処理による HA や HA・BaTiO<sub>3</sub> 複合材の電荷刺激により骨形成が促進されるとの報告もあるが、これらの材料は硬組織代替材であるため軟骨組織と比べて材料剛性が高く、本研究が目指す軟骨と骨の同時再生用スキャホールドには適していない。また、繊維性スキャホールドに HA を添加する研究も行われているが、HA 粒子の添加は骨基質と同成分を含有させることで骨芽細胞との接着性向上の効果を狙ったものであり、表面電荷の効果による能動的な骨細胞増殖および生体骨との接着促進を狙ったものではない。開発する電荷誘導型ナノファイバースキャホールドのために用いる圧電定数の高い圧電材料として PZT が挙げられるが、PZT は鉛を含み生体材料としては適さない。本研究では、無鉛圧電材料 BiTiO<sub>3</sub> 粒子を生体吸収性ポリマ

ーに添加することで、エレクトロスピニング技術により開発したナノファイバースキャホールドに自発分極による電荷を付与する。さらに、そのスキャホールドの構造は骨軟骨構造を模擬した階層構造とする。電界場の軟骨細胞と骨芽細胞の活性促進への効果を定量的に評価することを目的とするが、本研究のようにスキャホールドに自発的な刺激能を付与することによる細胞活性の加速化の試みは例が無いと考える。本研究では、骨や軟骨が力学的環境下において圧電特性を有する点に着目し、患部における骨軟骨再生機能を模倣するためには、この電気力学特性を再現することが必要であり、圧電材料粒子と生体吸収性ポリマーのハイブリッド化による3次元スキャホールドを用いることで生体模倣の骨軟骨組織再生システムが完成すると考える。

## 2. 研究の目的

本研究は、再生軟骨移植術において軟骨再生促進に加え骨界面での生体骨との接着を促進するための電荷刺激誘発型新規ナノファイバースキャホールドの開発を目指す。圧電材料チタン酸バリウム粒子を含有させた生体吸収性ポリマーをエレクトロスピニングにより繊維化することで生体組織構造を模擬したナノファイバースキャホールドを創製し、圧電材料粒子の自発誘電効果によって骨誘導を促進する電荷刺激誘発型骨再生用ナノファイバースキャホールドの創製技術開発を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) PLLA/BTO ナノファイバースキャホールドの創製条件探索

ナノファイバーの材料として PLLA、溶媒として使用する 1,3-dioxolane および溶液の導電性を向上させる benzyl triethylammonium chloride (BTEAC) を攪拌・脱泡装置を用いて攪拌した。その後、界面活性剤として 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) を加え、攪拌した PLLA 溶液を脱泡した。紡糸条件探索を行うため、PLLA 濃度を 8, 10 および 12 w/v%, BTEAC 濃度を 0, 1, 3 および 5 w/v% とした。エレクトロスピニングユニットを用いて、アルミホイルを巻いた銅板上に調製した PLLA 溶液を紡糸することで、シート状の PLLA ナノファイバースキャホールドを作製した。ノズルは針先を平らに研磨した 21 G 注射針を用いた。紡糸条件として、溶液の吐出量を 32, 96 および 159  $\mu\text{l}/\text{min}$ 、印加電圧を 7.7-23.3 kV および紡糸時間を 10 分とした。実験環境は  $24\pm 1^\circ\text{C}$  とした。作製した各ナノファイバースキャホールドの形態は Scanning Electron Microscope (SEM) を用いた観察により評価した。本研究ではファイバー径の目標値を 300 nm と設定し、紡糸条件の探索を行った。選定した溶液条件をもとに PLLA 溶液に BTO ナノ粒子を加えた

PLLA/BTO 溶液を作製した。PLLA/BTO 重量比率は 16/1 および 6/1 とした。選定した紡糸条件下において、シート状の PLLA および PLLA/BTO ナノファイバースキャホールドを作製した。

#### (2) PLLA/BTO ナノファイバースキャホールドの評価

BTO を添加したナノファイバーの表面形態とファイバー径を SEM 観察より評価した。また、PLLA/BTO ナノファイバー内部の BTO ナノ粒子の分布を確認するため、Transmission Electron Microscope (TEM) を用いて観察を行った。PLLA および PLLA/BTO ナノファイバーの表面電位は、走査型プローブ顕微鏡により測定した。試料台上に PLLA ナノファイバーと PLLA/BTO ナノファイバーを設置し、PLLA ナノファイバーを基準とした各 PLLA/BTO ナノファイバーの表面電位を測定した。

作製した PLLA および PLLA/BTO ナノファイバースキャホールドを 12 well culture plate のサイズに切り抜いた。各ナノファイバースキャホールドを  $O_2$  プラズマにより親水性化処理した後、培養液として準備した 10% 牛血清および抗生物質を含む Minimum Essential Medium, Alpha 中に 12 時間静置した。培養液を除去した後、各ナノファイバースキャホールド上に  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を、インキュベータ内で 18 日間培養した。培養液は 2 日毎に交換した。培養 12 および 24 時間後、各ナノファイバースキャホールド上における初期細胞接着性を評価するため、多光子励起顕微鏡を用いて vinculin, actin および核の蛍光観察を行った。また、培養 9, 12, 15 および 18 日後、各ナノファイバースキャホールド上における細胞増殖の指標として DNA 量および骨芽細胞への分化の指標としてアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定した。

#### 4. 研究成果

BTEAC 濃度 3 および 5 w/w%, 吐出量 96 および 159  $\mu$ l/min においては、いずれの濃度においても PLLA 溶液は紡糸されなかった。PLLA 濃度の低下, BTEAC 濃度の上昇および吐出量の減少に伴い、それぞれファイバー径が細くなる傾向が確認された。PLLA 濃度 10 w/v%, BTEAC 濃度 3 w/v%, 吐出量 32  $\mu$ l/min の条件においてファイバー径は  $425 \pm 71$  nm となり、目標値である 300 nm に最も近いナノファイバーを作製することが出来た。よって、紡糸条件を PLLA 濃度 10 w/v%, BTEAC 濃度 3 w/w%, 吐出量 32  $\mu$ l/min とし、BTO 粒子を添加した PLLA 溶液の紡糸を行った。

図 1 に作製した PLLA/BTO(16/1) ナノファイバーの SEM 観察写真を示す。PLLA, PLLA/BTO(16/1) および PLLA/BTO(6/1) ナノファイバーのファイバー径はそれぞれ

$425 \pm 71$  nm,  $442 \pm 52$  nm および  $433 \pm 79$  nm であった。

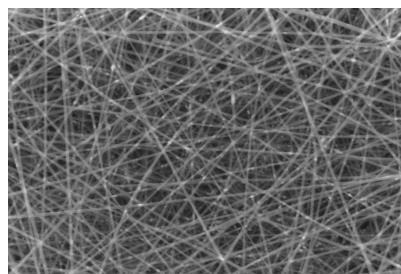


Fig.1 SEM image of PLLA/BTO(16/1) nanofiber scaffold ( $\times 2000$ ).

図 2 に作製した PLLA/BTO(16/1) ナノファイバーの TEM 観察写真を示す。TEM 観察に見られるように、いずれのファイバー中にも BTO 粒子が均一に分散している様子が観察され、PLLA/BTO(6/1) ナノファイバー中に含有されている BTO 粒子密度が PLLA/BTO(16/1) ナノファイバーと比べて高い様子が観察された。

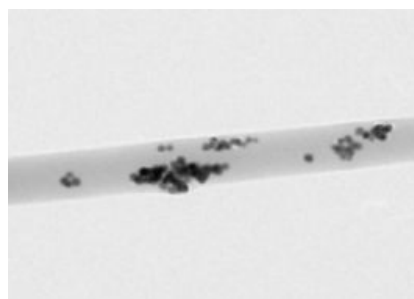


Fig.2 TEM image of PLLA/BTO(16/1) nanofiber scaffold ( $\times 5000$ ).

PLLA/BTO(16/1) ナノファイバーの表面電位観察結果を図 3 に示す。PLLA ナノファイバーに対して PLLA/BTO(16/1) および PLLA/BTO(6/1) ナノファイバーの表面電位はそれぞれ 38 mV および 45 mV 低くなった。よって、BTO 粒子の添加量に伴いナノファイバー表面に生じる電位が変化することが示された。

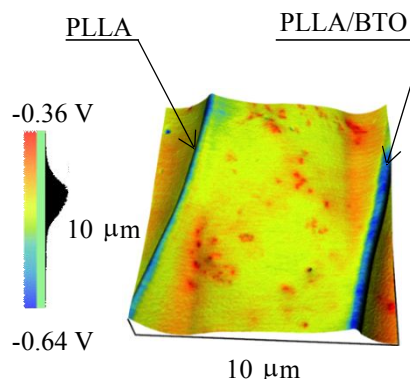
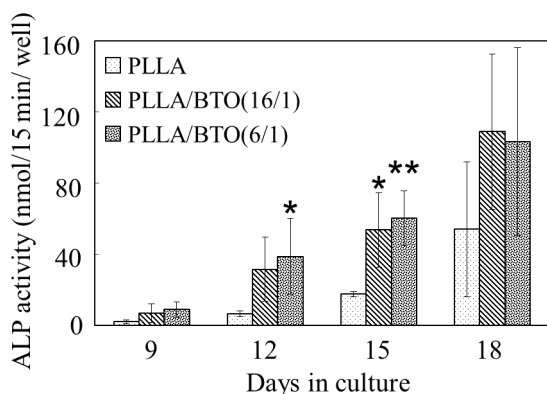


Fig.3 The surface potential images of PLLA and PLLA/BTO(16/1) nanofibers.

作製した各ナノファイバースキャホールド上で培養したMC3T3-E1の蛍光染色観察より、培養時間に伴い各スキャホールドに接着している細胞は増加していたが、いずれの培養時間においても各スキャホールド上の細胞数や細胞形態に違いは見られず、添加したBTO粒子は細胞の初期接着に影響を及ぼさないことが分かった。

各ナノファイバースキャホールド上で培養したMC3T3-E1のDNA量を測定した結果、培養日数に伴いいずれのナノファイバースキャホールド上においてもDNA量が増加したが、それぞれの培養日数において各ナノファイバースキャホールド上でのDNA量に有意な差は見られなかった。図4に各ナノファイバースキャホールド上で培養したMC3T3-E1のALP活性値を示す。培養日数に伴い、いずれのナノファイバースキャホールド上においてもALP量が増加した。いずれの培養日数においてもPLL/BTO(16/1)およびPLL/BTO(6/1)ナノファイバースキャホールド上でのALP活性は、PLLナノファイバースキャホールド上でのALP活性よりも高く、12日目以降で有意な差が見られた。しかし、PLL/BTO(16/1)とPLL/BTO(6/1)ナノファイバースキャホールドとの間には有意差は見られなかった。蛍光染色観察およびDNA量測定結果より初期の細胞接着性および細胞増殖性に差が見られなかったことから、自発分極を有するBTO粒子の添加によりPLLナノファイバーの表面に誘起された電位は、ALP活性を促進したと考えられる。

以上より、PLL濃度10 w/v%、BTEAC濃度3 w/w%および溶液の吐出量32 μl/minの紡糸条件において、BTO粒子が均一に分散したPLL/BTOナノファイバースキャホールドを開発した。BTO粒子の添加により、PLL/BTOナノファイバースキャホールドの表面に電位を生じさせ、骨芽細胞への分化を促進させることが示唆された。



**Fig.4** ALP activity of MC3T3-E1 cells cultured on each nanofiber scaffold (\*  $p < 0.05$  with respect to 12 or 15 days on PLLA, \*\*  $p < 0.01$  with respect to 15 days on PLLA).

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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

1. 山野彩花, 森田有亮, 仲町英治, エレクトロスピニングによる骨再生のためのBaTiO<sub>3</sub>添加PLLナノファイバースキャホールドの創製, 日本機械学会第27回バイオエンジニアリング講演会論文集, 2015年1月10日, 新潟市

2. Yamano, A., Morita Y. and Nakamachi, E., Development of PLLA/BTO Nanofiber Sheet for Bone Tissue Engineering, 26th Annual Conference European Society for Biomaterials, 2014年9月1日, Liverpool

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 有亮 (MORITA YUSUKE)  
同志社大学・生命医科学部・教授  
研究者番号: 80368141

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: