

令和元年6月12日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21291

研究課題名(和文) ナノコーティング技術により生体親和性および骨形成能を向上した人工靭帯の開発

研究課題名(英文) Apatite nano coating improves biocompatibility and osteogenic ability of artificial ligament

研究代表者

稲垣 有佐 (Inagaki, Yusuke)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60707529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：前十字靭帯再建術の一法として、自家腱とポリエチレンテレフタレート(PET)繊維人工靭帯を接続し、移植腱として用いる再建術がひろく行われている。人工靭帯の生体親和性を高めることが可能であれば、移植腱と周囲骨孔との早期固着、さらには臨床成績の向上が期待できる。本研究では骨細胞外基質構成成分であるハイドロキシアパタイトのカルシウムをストロンチウムに置換、リン酸イオンをケイ酸イオンに置換しケイ酸ストロンチウムアパタイト(SrSiP)としPET繊維人工靭帯上にナノ粒子コーティング、ラット骨髄間葉系細胞の骨分化能への影響等を検討した。SrSiPが骨髄間葉系細胞の骨形成能を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膝前十字靭帯損傷は最も頻度の高いスポーツ外傷のひとつであり、靭帯再建術においては移植材料と骨孔との早期固着を要し、整形外科分野において重要な課題である。本研究のSrSiPナノコーティング法により、人工靭帯のような耐熱性の低く、表面形状が複雑な材料の表面性状の改変が可能となり、人工靭帯周囲の骨誘導促進が期待できる。さらに本研究は前十字靭帯再建術のみならず、人工靭帯以外の医療材料への応用が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Anterior cruciate ligament reconstruction (ACLR) using autologous tendon and polyethylene terephthalate (PET) artificial ligaments are widely performed. In previous reports, hydroxyapatite (HAP) was coated on the surface of the artificial ligament to improve biocompatibility and osteogenic ability. As for the component of HAP, calcium can be substituted with strontium, and phosphate ion with silicate ions (SrSiP). In this study, the osteogenic abilities of rat bone marrow stromal cells (BMSCs) cultured on the surfaces of SrSiP nano coated PET film and artificial ligament were evaluated. BMSCs cultured on the SrSiP nano coated PET film and artificial ligament showed the high osteogenic abilities. These findings indicate that PET artificial ligaments coated with SrSiP may be one of the future options to improve the clinical results of ACLR.

研究分野：整形外科

キーワード：ナノコーティング ストロンチウム ケイ素 人工靭帯 骨形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膝前十字靭帯損傷は最も頻度の高いスポーツ外傷のひとつであり、一旦損傷した前十字靭帯の自然治癒は望めないため、膝屈筋腱や膝蓋腱などの自家腱を用いた再建術が行われている。前十字靭帯再建術の手法として、膝屈筋腱とポリエチレンテレフタレート(PET)繊維人工靭帯を直列接続し、移植腱として用いる再建術がひろく行われている。靭帯再建術においては移植材料と骨孔との早期固着が必要であり、整形外科・スポーツ医学分野において重要な課題である。一方、人工靭帯そのものには骨伝導能、骨形成能はなく、人工関節のようにハイドロキシアパタイトなど材料表面の修飾によって生体親和性および骨分化誘導能を高めることが可能であれば、移植腱と周囲骨孔との早期固着が期待できる。しかし、これまで PET のような耐熱性の低い材料へのコーティングは困難であった。さらに人工靭帯など複雑な形状をした材料へは表面への薄く均一なコーティングが求められる。

骨細胞外基質の主要構成成分であるハイドロキシアパタイトは、カルシウムとリン酸で構成され、カルシウムをストロンチウムに置換、リン酸イオンをケイ酸イオンに置換しケイ酸ストロンチウムアパタイト(SrSiP)とすることが可能である。これまでストロンチウムやケイ素は骨形成促進および骨吸収抑制作用を持つことが報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的はアパタイト構成成分をストロンチウム、ケイ酸イオンに置換し、PET 繊維人工靭帯上にナノ粒子コーティングすることにより、人工靭帯周囲の骨形成能が向上できるか、検討することである。

3. 研究の方法

(1). SrSiP の合成およびナノ粒子コーティング

アパタイト原料をジルコニアビーズと混合し、アセトニトリルを加え、さらに分散剤としてポリ乳酸(PDLLA)を添加して溶解し、湿式分散装置を用いて湿式分散処理にてナノ粒子化を行った。作製したアパタイト分散液に PET フィルムを浸漬ののち、乾燥後、12mm 径の円形に裁断し、以後の実験に使用した。同様にして幅 10mm の人工靭帯にもコーティングを施行し、長さ 10mm として 10mm 角に裁断して以後の実験に使用した。走査型電子顕微鏡による表面観察および元素分析を行った。

(2). SrSiP コーティング PET フィルム上でのラット骨髄間葉系細胞骨分化誘導

7 週齢の F344 ラット(オス)の両大腿骨から骨髄を採取し、フラスコを使用して初期培養を行い、約 2 週間培養皿に付着・増殖した細胞を骨髄間葉系細胞として、トリプシン EDTA で処理し採取した。本実験では、15%ウシ胎児血清と抗生剤含有 Minimal essential medium (MEM) を標準培養液とし、5%CO₂の培養器を使用して 37℃ で細胞培養を行った。24 wells プレート上に静置したナノコーティング PET フィルム上に 1.0×10⁴/cm²の密度で骨髄間葉系細胞を播種した。培養液は、上記標準培養液に、デキサメサゾン 10nM、アスコルビン酸 0.28mM、グリセロリン酸 10mM よりなる骨形成培地にて行った。14 日目培養上清より ELISA 法にてオステオカルシン(OC)濃度を測定した。さらにアリザリンレッド染色にて染色性を評価した。

(3). SrSiP コーティング PET 人工靭帯上でのラット骨髄間葉系細胞骨分化誘導

次に 24 wells プレート上に静置したナノコーティング人工靭帯上に 1.0×10⁵/cm²の密度で骨髄間葉系細胞を播種した。人工靭帯は繊維状であるため、人工靭帯に付着せず、プレート底面に付着するため、フィルム実験系より細胞数は高密度とした。プレート底面に付着した細胞の影響を除くために、翌日には新しいプレートに人工靭帯を移して、以後の実験を継続した。培養は上記骨形成培地にて行った。8, 10, 12, 14 日目培養上清より ELISA 法にて OC 濃度および市販のメチルキシレノールブルー吸光度法キットを用いて、カルシウム濃度を測定した。これは骨組織形成にともなってカルシウムが消費されることに着目し、骨形成能を評価するものである。また 14 日間培養終了後の細胞より、mRNA を抽出し、qPCR により glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)で標準化し OC、アルカリフォスファターゼ(ALP)、Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP2), and Runt-related transcription factor 2 (Runx2)発現量を評価した。

(4). SrSiP コーティング PET 人工靭帯の家兎脛骨移植実験

細胞培養での実験系にて SrSiP コーティング PET 人工靭帯の骨分化誘導効果を確認したのち、ニュージーランド白色家兎脛骨近位に 3.2mm 径の骨孔を作成し、移植実験を行った(奈良県立医科大学動物実験施設審査承認済)。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色により組織学的検討および引張試験により力学的検討を行った。

4. 研究成果

(1). SrSiP コーティングアパタイトの合成およびナノ粒子コーティング

走査型電子顕微鏡による SrSiP コーティングのフィルムおよび人工靭帯表面の観察では表面が SrSiP により均一にコーティングされており、元素分析にてストロンチウム、ケイ素の存

在が確認された。

(2). SrSiP コーティング PET フィルム上でのラット骨髄間葉系細胞骨分化誘導

SrSiP コーティング PET フィルム上でラット骨髄間葉系細胞を骨分化誘導培地で培養し、14 日目培養上清より ELISA 法にて OC 濃度を測定したところ、コーティングなし群と比較して、有意差をもってコーティング群が高値であった。さらにアリザリンレッド染色による染色性評価でも、コーティング群が強い染色性を示した。

(3). SrSiP コーティング PET 人工靭帯上でのラット骨髄間葉系細胞骨分化誘導

SrSiP コーティング PET 人工靭帯上でのラット骨髄間葉系細胞を骨分化誘導培地で培養し、8, 10, 12, 14 日目培養上清より ELISA 法での OC 濃度では 14 日目培養上清で、コーティングなし群と比較して、有意差をもってコーティング群が高値であった。また 12 日目培養上清でもコーティング群が高い傾向であった。8, 10, 12, 14 日目培養上清よりメチルキシレノールブルー吸光度法でのカルシウム濃度では、8, 10, 12, 14 日目すべての培養上清において、コーティングなし群と比較して、有意差をもってコーティング群が低値であった。14 日間培養終了後の細胞の qPCR では、OC, ALP, BMP2, Runx2 いずれにおいても、コーティングなし群と比較して、有意差をもってコーティング群が高い発現量を示した。

(4). SrSiP コーティング PET 人工靭帯の家兎脛骨移植実験

SrSiP コーティング PET 人工靭帯のニュージーランド白色家兎脛骨近位への移植試験では、HE 染色による組織学的検討においてコーティング人工靭帯周囲に骨形成を認めた。一方、コーティングなし人工靭帯群では骨形成を認めなかった。引張試験による力学的検討で、破断強度はコーティング群(48.0 ± 25.4N)、コーティングなし群(52.2 ± 29.3N)であり、二群間に有意差は認めなかった。本引張試験では破断強度のばらつきが大きく、結論を得るには不十分な結果であった。

以上より、本研究では、SrSiP アパタイトを合成したのちナノ粒子化して既存の PET 人工靭帯にコーティングし、ラットの骨髄間葉系細胞を用いて骨分化能への影響を検討したところ、SrSiP が骨髄間葉系細胞の骨形成能を促進する可能性が示唆された。一方、SrSiP コーティング PET 人工靭帯のニュージーランド白色家兎脛骨近位への移植試験では、コーティング人工靭帯周囲に骨形成を認めたが、引張試験にてコーティング群の優位性を示すにはいたらなかった。

しかしながら、本ナノコーティング技術を人工靭帯など人工材料表面の改質へ応用することで、骨形成能の高い新たな生体材料の開発につながると考えられ、さらなる研究をすすめていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

1 報 英文誌投稿中

〔学会発表〕(計 4 件)

稲垣 有佐 ほか

ナノコーティング技術により骨形成能を促進した人工靭帯への基礎研究

第 128 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会、2017 年

江川 琢也 ほか

ナノコーティングにより骨形成能を促進した人工靭帯開発のための基礎研究

第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年

江川 琢也 ほか

骨形成促進のための整形外科バイオマテリアル ケイ酸ストロンチウムアパタイトコーティング人工靭帯による骨形成能促進の可能性

第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、2018 年

Takuya Egawa et. al.

Strontium Silicate Apatite Nano Coating Improve Osteogenesis around Artificial Ligament Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting, 2018

〔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：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

奈良県立医科大学

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：赤羽 学

ローマ字氏名：Akahane Manabu

研究協力者氏名：古川 彰

ローマ字氏名：Furukawa Akira

研究協力者氏名：江川 琢也

ローマ字氏名：Egawa Takuya

研究協力者氏名：小川 宗宏

ローマ字氏名：Ogawa Munehiro

研究協力者氏名：川手 健次

ローマ字氏名：Kawate Kenji

研究協力者氏名：田中 康仁

ローマ字氏名：Tanaka Yasuhito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。