

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17076001
 研究課題名（和文） メカニカルストレスおよび局所環境制御による硬組織の形態再建機序モデルの創出
 研究課題名（英文） A study on mechanical stress and local environment for calcified tissue regeneration
 研究代表者 鈴木 治（OSAMU SUZUKI）
 東北大学・大学院歯学研究科・教授
 研究者番号：60374948

研究成果の概要（和文）：

本研究では顎口腔領域を含めた硬組織の形態再建機序をメカニカルストレスや生体成分等の局所環境の観点で研究した。非荷重下で高い骨再生能を示す生体内吸収性材料（リン酸オクタカルシウム（OCP）：骨アパタイトの前駆体合成物）でも荷重量依存的に材料自身の破骨細胞性吸収が亢進し骨再生に至らないこと、これは荷重による骨芽細胞の機能に関係すること、また、軟骨細胞分化も荷重量依存的に調節を受けることから、形態再建には適切な荷重が重要であることを定量的に解明した。

研究成果の概要（英文）：

The present study demonstrated that local environments, such as mechanical stress, control quantitatively osteoclastic cell-mediated biodegradability of apatite precursor (synthetic octacalcium phosphate, OCP), resulting in the loss of bone regenerative capability of this material through strain-dependent stimulation of the osteoblasts around the implanted OCP with collagen matrix. The mechanical stress could be a key factor controlling the morphology of the calcified tissue regeneration during bone and cartilage formation.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	39,400,000	0	39,400,000
2006 年度	21,500,000	0	21,500,000
2007 年度	11,800,000	0	11,800,000
2008 年度	11,700,000	0	11,700,000
2009 年度	11,500,000	0	11,500,000
総計	95,900,000	0	95,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学

キーワード：細胞・組織，硬組織，骨，軟骨，局所環境，メカニカルストレス，再生医学，マイクロ・ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

骨や軟骨など硬組織の再生研究は、骨髄由来幹細胞や各種バイオマテリアルを応用して数多くなされているが、細胞内分子レベルから組織レベルに至る階層間を形態形成の

視点で融合させる試みはなされていなかった。また硬組織の形態形成におけるメカニカルストレスを始めとした局所環境の影響は十分には明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、顎口腔領域を含めた硬組織の欠損再建において、機能のみならず組織の形態回復過程の評価モデル創出のため、硬組織形成系細胞内における情報伝達レベル（マイクロ）から組織レベル（マクロ）に至る階層間をリンクさせ、細胞レベルにおいては局所環境制御の効果を、また組織レベルにおいてはメカニカルストレスを介した間接刺激効果を検討し、生体計測・生体力学・生体材料による融合モデル実験系を確立し、細胞・組織・形態形成の関係を統合的に理解することを目的とした。

3. 研究方法

(1) 合成 OCP の骨再生における機能解明

骨アパタイトの前駆体と位置付けられるリン酸オクタカルシウム (OCP) の合成物は新生骨と置換する傾向があり高い骨伝導能を有する (Suzuki O et al., Tohoku J Exp Med 164: 37-50, 1991 他). OCP を本研究の硬組織再生の生体材料に応用するために、OCP の硬組織形成系細胞に対する活性を調べた。OCP および対照として市販の医療用 HA 焼結セラミックスの各粉末を、用量をパラメーターとして培養ディッシュ底面にコーティングし、マウス骨髄由来間質細胞株 ST-2 を用いて骨芽細胞の分化について、また骨芽細胞と骨髄細胞との共存培養にて破骨細胞形成能を検討した。

(2) In vivo メカニカルストレス負荷モデルの開発

ラット頭蓋冠上骨膜下に OCP (OCP/Collagen 複合体) を埋入し、骨膜および皮下で想定される張力をもとに埋入体に圧縮力 (メカニカルストレス) を負荷するモデルの開発を行った。また、埋入体と同時に O-ring (PTFE 製) を同部位へ埋入し、埋入体の変形を防ぐ措置を施しメカニカルストレス緩和モデルを作成した (図 1)。それぞれ 1mm 厚 (低負荷)、3mm 厚 (高負荷) の OCP 埋入体 (9mm φ, ディスク状) を用いて三次元的な組織形態形成の評価を行った。

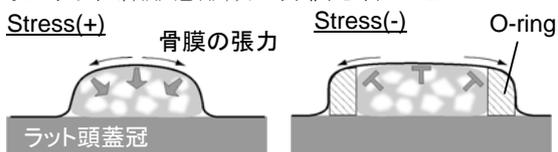


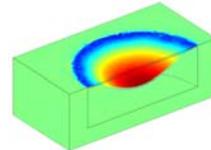
図 1 In vivo メカニカルストレス負荷及び緩和モデル。

(3) In vitro メカニカルストレス負荷モデルの開発

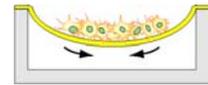
培養細胞に、ひずみ量および方向を定量的に制御して負荷できる培養装置を開発した (図 2)。培養装置は PDMS 製チップに 200

~600μm 厚の PDMS 膜を貼付、親水化後、細胞を播種して、膜下の陽圧・陰圧により膜表面に播種した細胞群に引張りずみ・圧縮ひずみを負荷できるように設計した。事前に有限要素解析を行い、膜表面は勾配量をもつひずみ場を有することを確認した。硬組織形成細胞である軟骨細胞および骨芽細胞について圧縮・引張りのひずみの方向および量とこれら細胞の増殖・分化との関連性を遺伝子レベルで調べた。

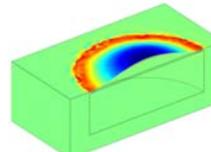
Compressive Strain



FEM によるひずみ分布



Tensile Strain



FEM によるひずみ分布

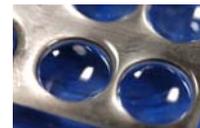
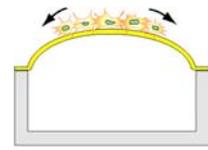


図 2 In vitro メカニカルストレス負荷装置。

(4) 局所環境計測を目的とした pH インジケータの開発

骨形成における局所環境評価として含水性のゲルに pH 指示薬を固定化し、局所 pH が計測可能なゲルシートを作成した。培地還流用の PDMS 性培養チップ内にゲルシートを設置し、OCP による骨形成の環境をモニタリングするために、OCP 顆粒近傍の pH 変化を検出するデバイスおよび解析ソフトを開発した (図 3)。

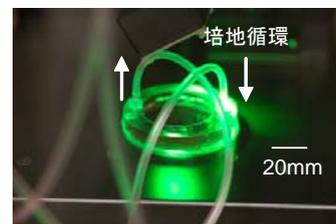


図 3 局所 pH 計測を行う培養チップ概観。

4. 研究成果

(1) 合成 OCP が示す細胞賦活化能

図 4 は、OCP 上に ST-2 細胞を播種したときの骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の RT-PCR による

mRNA 発現である。OCP は用量依存的に ST-2 細胞の骨芽細胞への分化を促進することが確認された。一方、OCP の生理的環境下における安定相である HA では OCP よりも用量依存性は顕著でなかった。OCP は用量依存的に骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を促進することが明らかとなった (Anada T et al., Tissue Eng Part A 2008)。

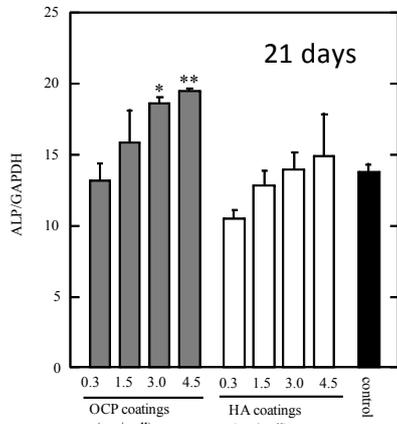


図4 ST-2 細胞の骨芽細胞への分化に及ぼす OCP および HA の用量依存性 (Anada T, Suzuki O et al., Tissue Eng Part A 2008 より改変引用)。

一方、同様の培養方法にて骨芽細胞と骨髄由来細胞との共存培養にて、破骨細胞の形成能を検討したところ、OCP は破骨細胞誘導因子であり骨芽細胞に発現する RANKL の発現を促進させ、また、実際に破骨細胞に特異的な TRAP 及び cathepsin-k を発現する多核の細胞形成を誘導した (Takami M et al., Tissue Eng Part A 2009)。以上の検討から OCP が骨芽細胞および破骨細胞の双方に作用する細胞賦活化因子と成り得ることが *in vitro* において初めて解明された。

(2) *In vivo* メカニカルストレス負荷モデルにおける骨再生の検討

図5は脱灰標本による頭蓋冠のヘマトキシリン・エオジン染色像であり、メカニカルストレス負荷及び緩和による検討結果である。OCP/Collagen 試料 3mm 厚の複合体においては OCP の破骨細胞誘導能が著しく促進され骨再生には至らず、複合体が吸収されてしまった。他方、1mm 厚の複合体では骨芽細胞の分化促進に転じて骨の再生を促進した (Suzuki Y et al., J Dent Res 2009)。一方、メカニカルストレス緩和モデルでは 3mm 厚の複合体においても顕著な骨形成が認められた。これらの頭蓋冠の組織から mRNA を回収し、遺伝子の発現を RT-PCR で調べたところ、O-ring を使わない骨形成が生じない系において、破骨細胞形成に特異的な骨芽細胞の RANKL 発現亢進が検出されたことから (Matsui A et al., Tissue Eng Part A 2009)、OCP

を用いた骨の三次元な再生においては適度なメカニカルストレス負荷が鍵となることが明らかになった。

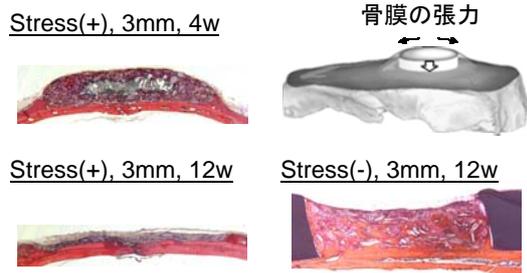


図5 メカニカルストレスが調節する OCP/Collagen 埋入体による骨再生の組織像。

(3) *In vitro* における硬組織形成細胞に及ぼす定量的メカニカルストレスの影響

未分化軟骨細胞株 ATDC5 を用いて、開発した定量的ひずみ負荷培養装置にて、圧縮方向のひずみ量を調節して RT-PCR による軟骨細胞への分化を検討した。分化を示す II 型 Collagen の発現にひずみ量依存性が認められた (Masuda T et al., J Biotechnol 2008)。過去の研究にて伸展ひずみは軟骨細胞の分化抑制に寄与することから、軟骨細胞の分化はひずみの量および方向によって調節を受けることが明らかとなった。

マウス骨髄由来間質細胞株 ST-2 を用いた同様の実験では圧縮ひずみ負荷を行った結果、骨芽細胞の分化マーカー ALP、オステオポンチン (OPN) 等の発現減少が確認された。また、ラット頭蓋冠でのメカニカルストレス負荷モデル実験を再現するため、OCP/Collagen 複合体に ST-2 細胞を播種し、1軸加圧式のひずみを負荷して培養した後、mRNA を分析したところ、RANKL の発現促進が観察された。このことから骨芽細胞に対して圧縮ひずみは分化の抑制と破骨細胞の誘導に寄与することが示唆された。

(4) 局所環境指標としての pH のモニタリング

予備的検討から、pH 指示薬を固定化したゲルシートは優れた空間分解能 (2 μ m) と長時間 (連続 12 時間) の計測が可能であることがわかった。pH ゲルシートを用いた OCP 顆粒表面近傍の pH 計測を行った結果、石灰化に相当する OCP-HA 転換過程において pH の低下を検出および定量することができた (図6)。OCP-HA の転換過程においては PO₄³⁻の放出が報告されており、本検討により PO₄³⁻放出の様子を間接的ではあるが初めて観察することが可能となった (Masuda T et al., MHS2009, Nagoya)。

なお、本研究の成果は、研究分担者の他、以下の研究者らとの共同によるものである。

共同研究者：東北大学大学院工学研究科・新井史人（現名古屋大学大学院工学研究科）、名古屋大学大学院工学研究科・福田敏男、東北大学大学院歯学研究科・益田泰輔（現名古屋大学大学院工学研究科）。

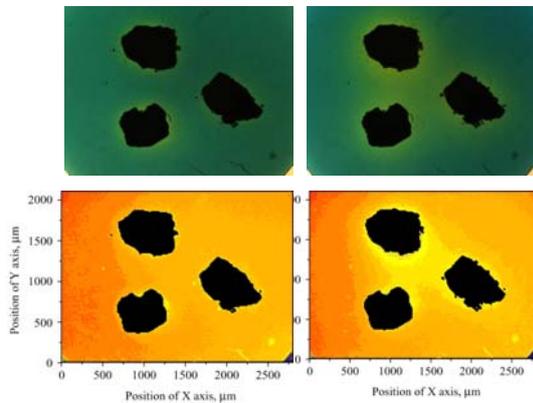


図6 OCP 顆粒表面近傍の局所 pH の変化。

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 46 件）

- 1) Anada T, Masuda T, Suzuki O, et al., Three-dimensional cell culture device utilizing thin membrane deformation by decompression. *Sens Actuators B Chem* 147(1): 376-379, 2010, 査読有.
- 2) Murakami Y, Honda Y, Suzuki O, et al., Comparative study on bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate with various granule sizes. *Acta Biomater* 6(4):1542-1548, 2010, 査読有.
- 3) Masuda T, Kamakura S, Suzuki O, et al., Quality of regenerated bone enhanced by implantation of octacalcium phosphate-collagen composite. *Tissue Eng Part C Methods* 2010 in press, 査読有.
- 4) Matsui A, Kamakura S, Suzuki O, et al., Mechanical stress-related calvaria bone augmentation by onlayed octacalcium phosphate-collagen implant. *Tissue Eng Part A* 16(1): 138-151, 2010, 査読有.
- 5) Takahashi I, Masuda T, Suzuki O, et al., Molecular mechanisms of mechanical stress response during chondrogenesis. *J Biomech Sci Eng* 4(3): 307-316, 2009, 査読有.
- 6) Suzuki Y, Kamakura S, Sasaki K, Suzuki O, et al., Appositional bone formation by OCP-collagen composite. *J Dent Res* 88(12): 1107-1112, 2009, 査読有.
- 7) Takami M, Suzuki O, Kamijo R, et al., Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through RANKL expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A* 15(12), 3991-4000, 2009, 査読有.
- 8) Fuji T, Kamakura S, Sasaki K, Suzuki O, et al., Appositional bone formation by OCP-collagen composite. *Tissue Eng Part A* 15(11), 3525-3535, 2009, 査読有.
- 9) Kikawa T, Imaizumi H, Suzuki O, et al., Intramembranous bone tissue response to biodegradable octacalcium phosphate implant. *Acta Biomater* 5(5), 1756-1766, 2009, 査読有.
- 10) Honda Y, Kamakura S, Suzuki O, et al., The effect of microstructure of octacalcium phosphate on the bone regenerative property. *Tissue Eng Part A* 15(8) 1965-1973, 2009, 査読有.
- 11) Kawai T, Kamakura S, Suzuki O, et al., Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. *Tissue Eng Part A* 15(1), 23-32, 2009, 査読有.
- 12) Miyatake N, Nishimoto KN, Suzuki O, et al., Effect of partial hydrolysis of octacalcium phosphate on its osteoconductive characteristics. *Biomaterials* 30 (6): 1005-1014, 2009, 査読有.
- 13) Miyazaki T, Miyauchi S, Suzuki O, et al., Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 217(3): 768-777, 2008, 査読有.
- 14) Suzuki O, Imaizumi H, Kamakura S, et al., Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization. *Curr. Med. Chem* 15(3): 305-313, 2008, 査読有.
- 15) Anada T, Kamijo R, Kamakura S, Shimauchi H, Suzuki O, et al., Dose-dependent osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 14(6): 965-978, 2008, 査読有.
- 16) Masuda T, Takahashi I, Suzuki O, et al., Development of a cell culture system loading cyclic mechanical strain to chondrogenic cells. *J Biotechnol* 133(2): 231-238, 2008, 査読有.
- 17) Kamakura S, Sasaki K, Suzuki O, et al., Dehydrothermal treatment of collagen influences on bone regeneration by octacalcium phosphate (OCP) collagen composites. *J Tissue Eng Regen Med* 1(6): 450-456, 2007, 査読有.
- 18) Hatakeyama J, Takahashi I, Suzuki O, et al., Proliferation and adhesion of periodontal ligament cells on synthetic biomaterials, *Oral Dis*, 13(5): 500-506, 2007, 査読有.

- 19) Kamakura S, Sasaki K, Suzuki O, et al., The primacy of octacalcium phosphate (OCP) collagen composites in bone regeneration. *J Biomed. Mater Res A* 83(3): 725-733, 2007, 査読有.
- 20) Honda Y, Kamakura S, Suzuki O, et al., Formation of bone-like apatite enhanced by hydrolysis of octacalcium phosphate crystals deposited in collagen matrix. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 80(2): 281-289, 2007, 査読有.
- 21) Kamakura S, Honda Y, Suzuki O, et al., Octacalcium phosphate (OCP) combined with collagen orthotopically enhances bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 79(2): 210-217, 2007, 査読有.
- 22) Uchida T, Arai F, Suzuki O, Fukuda T, et al., Differentiation and monitoring of cell using a biochip for regenerative medicine: Differentiation of bone marrow stromal cells and myoblasts. *JSME Int J C* 49(3) 852-858, 2007, 査読有.
- 23) Honda Y, Kamakura S, Nakamura M, Suzuki O, et al., Elevated extracellular calcium stimulates secretion of bone morphogenetic protein 2 by a macrophage cell line. *Biochem Bioph Res Co* 345(3): 1155-1160, 2006, 査読有.
- 24) Takahashi I, Onodera K, Mitani H, et al., Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *J Mol Histol* 37(8-9): 333-342, 2006, 査読有.
- 25) Akiba N, Suzuki O, Sasaki K, et al., Characterization of dentin formed in transplanted rat molars by electron probe microanalysis. *Calcified Tissue Int* 78(3): 143-151, 2006, 査読有.
- 26) Imaizumi H, Kikawa T, Suzuki O, et al., Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. *Calcified Tissue Int* 78(1): 45-54, 2006, 査読有.
- 27) Suzuki O, Kamakura S, Katagiri T, et al., Surface chemistry and biological responses to synthetic octacalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 77(1): 201-212, 2006, 査読有.
- 28) Suzuki O, Kamakura S, Nakamura M, Kamijo R, et al., Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* 27(13): 2671-2681, 2006, 査読有.
- 29) Onodera K, Takahashi I, Mitani H, et al., Stepwise mechanical stretching inhibits chondrogenesis through cell-matrix adhesion mediated by integrins in embryonic rat limb bud mesenchymal cells. *Eur J Cell Biol* 84(1): 45-58, 2005, 査読有.
- 30) Takahashi I, Onodera K, Mitani H, et al., Age-related changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats. *J Mol Histol* 36(5): 355-366, 2005 査読有.

[学会発表] (計 18 件)

- 1) Masuda T, Suzuki O et al., Development of a pH indicator immobilized gel-sheet for micro- environment analysis. 20th IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2009), (2009. 11. 8) Nagoya.
- 2) Matsui A, Masuda T, Suzuki O et al., Effect of mechanical strain on differentiation of osteoblastic cells. 19th IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2008), (2008. 11. 8) Nagoya.
- 3) Masuda T, Arai F, Fukuda T, Suzuki O et al., Fabrication of PDMS scaffold with controlled configuration. 18th IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2007), (2007. 11. 11) Nagoya.
- 4) Takahashi I, Masuda T, Arai F, Fukuda T, Suzuki O et al., Mechanobiological signal transduction in differentiating chondrocyte and new configuration for mechanical stress culture, the 2nd Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular System, (2007. 1. 16) Bangkok.
- 5) Kamakura S, Suzuki O et al., Bone regeneration with a transitory scaffold modifying local environment. 17th IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2006), (2006. 11. 5) Nagoya.
- 6) Masuda T, Suzuki O et al., A new configuration device for mechanical stress culture. 17th IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2006), (2006. 11. 5) Nagoya.
- 7) Suzuki O, Takahashi I et al., Effect of mechanical stress and scaffold material on osteogenesis and chondrogenesis. 16th IEEE International Symposium on

Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2005), (2005. 11. 7) Nagoya.

〔図書〕(計 8 件)

- 1) Takahashi I, Masuda T, Suzuki O et al. Springer, Tokyo, Molecular mechanisms of the response to mechanical stimulation during chondrocyte differentiation, In: Sasano T, Suzuki O, editors. Interface Oral Health Science 2009, 2009, pp. 53-59.
- 2) 鈴木治, 益田泰輔, 高橋一郎. 学会誌刊行センター内, 「生体医工学」編集部. 「局所環境が硬組織形成細胞の分化に及ぼす影響について」, 生体医工学 46(4), 2008, pp.414-418.
- 3) Masuda T, Takahashi I, Suzuki O et al. Springer, Tokyo, Development of mechanical strain cell culture system for mechanobiological analysis, In: Watanabe M, Okuno O, editors. Interface Oral Health Science 2007, 2007, pp.167-172.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 6 件)

名称: スフェロイド培養方法及びスフェロイド培養容器スフェロイドディッシュ
発明者: 穴田貴久, 鈴木治, 新井史人, 益田泰輔, 福田敏男, 森元慎二
権利者: 東北大学ほか
種類: 特願
番号: 2008-284109
出願年月日: 平成 20 年 9 月 2 日
国内外の別: 国内

名称: 骨形成用キットおよび骨形成治具
発明者: 鈴木治, 越後成志, 鎌倉慎治, 穴田貴久, 本田義知, 松井有恒, 森元慎二
権利者: 東北大学ほか
種類: 特願
番号: 2010-35834
出願年月日: 平成 20 年 8 月 6 日
国内外の別: 国内

名称: 人工骨材
発明者: 鈴木治, 井樋栄二, 穴田貴久, 宮武尚央, 森元慎二
権利者: 東北大学ほか
種類: 特願
番号: 2008-284109
出願年月日: 平成 17 年 11 月 21 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-kiso.dent.tohoku.ac.jp/cfe/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 60374948

(2)研究分担者

佐々木 啓一 (SASAKI KEIICHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 30178644

鎌倉 慎治 (KAMAKURA SHINJI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授
研究者番号: 80224640

高橋 一郎 (TAKAHASHI ICHIRO)

九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号: 70241643

中村 雅典 (NAKAMURA MASANORI)

昭和大学・歯学部・教授
研究者番号: 50180394

上條 竜太郎 (KAMIJO RYUTARO)

昭和大学・歯学部・教授
研究者番号: 70233939