

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09634

研究課題名（和文）有機-無機プロセスを用いた骨内インプラント材の先進的表面的設計開発

研究課題名（英文）Development of new material surface design for bone scaffolds

研究代表者

永井 亜希子（NAGAI, Akiko）

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：40360599

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、インプラント材料の高機能化に役立つ新しいバイオナノ界面モデルの提案を目的とした。まずW/Oエマルジョン法を用いてハイドロキシアパタイトを合成した。添加脂肪酸を変え、線維状と板状のナノ粒子を作製した。これらナノ粒子の単層膜をガラス基板上に成膜したのち、焼成した。どちらの膜もa面配向であったが、親水性やタンパク吸着能が異なった。軟骨前駆細胞の培養実験で、板状粒子面で特に、より短い期間で接着し増殖能が高かった。伸展性を抑制できたことで、添加物なしで軟骨様細胞に分化した。これらの結果は、配向性を持つアパタイトナノフィルムが、軟骨形成細胞に有用な足場を与えることができることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工インプラント材料は、現在臨床応用されているものをさらに改良するため、組成という1次構造に加え、細胞の足場となる表面配向性など高次構造が注目されている。バイオセラミックスは生体親和性が高いが形状制御が難しいため、有機分子の自己集合構造を反応場として利用することで低温・低圧の環境調和型合成法により、新しいアパタイトナノフィルムを創製した。関節軟骨は骨の関節面を覆っているためこの部位の人工骨材料は、軟骨細胞とも界面を構築する。軟骨細胞の培養実験により、本研究で作製したアパタイト膜は、軟骨前駆細胞の増殖や分化を促進する新しい材料表面となりうることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed new material surface designs which mediate favorable interactions with cells in the living body.

Hydroxyapatite nanoparticles synthesized via a hydrothermal method displayed uniform needle-like and plate-like morphology. Apatite films were formed through self-organization of the nanoparticles and had 2D structures regularly arrayed with the particles. Both films prominently comprised a-plane orientation surfaces but differed in the degree of hydrophilicity because of the patterns of particle self-assembly. The oriented apatite film formed using plate-like particles provided chondrogenic cells with a desired scaffold to increase cell proliferation and differentiation.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生材料 配向性ナノセラミックスシート 有機 無機プロセス ハイドロキシアパタイト 細胞培養

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) インプラント材の表面は、治療後最初に生体と接するところであり、対象の組織細胞が、再生の足場として接着してその機能を発揮する場である。通常、生体内で細胞は、コラーゲンなどの細胞外基質という足場に接着・伸展することで、足場の物理化学的性状を感知して細胞内シグナルに変換、そして増殖・分化など自身の挙動に反映していく。よって、骨内インプラント材の生物学的パフォーマンスに、表面トポグラフィーやケミストリーが大きく影響することが分かってきていて、様々な表面の改質が研究、報告され、臨床応用されている。

(2) インプラント材の中でもバイオセラミックスは生体親和性に優れ、すなわちセラミックス表面の親水・疎水性や表面電荷におけるヘテロジェニックな構成が細胞親和性につながっていると考えられている。さらに、表面トポグラフィーの改善としてこれまで行われている表面処理法は、等方性のトポグラフィーを示すことが多かった。それゆえ、生体骨の主な細胞外基質であるコラーゲンと骨アパタイトが示すような異方性配向を模倣したナノ/マイクロオーダーの形状制御に期待が高まっていた。

### 2. 研究の目的

(1) 有機分子をテンプレートとしてセラミックス合成を行い、形態を制御したナノセラミックス粒子やナノセラミックスプレートを作成する。次いで、それらナノセラミックスを、有機分子が作る自己集合構造を反応場として利用して、基板上に周期性を持ったシート状に配列させたのち、基板と接合させる。

(2) 作成したセラミックスナノシート上で、培養細胞(株細胞)の培養と分化誘導因子などの添加実験を行う。異方性配向したナノシートの表面物性が、細胞の増殖や分化等のキャラクターの変化に与える影響について精査し、その細胞にとっての適材適所な表面を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 有機 無機プロセスによるナノセラミックスの作製と評価

ナノセラミックスの合成には、有機分子が作る自己集合構造を反応場として利用する有機-無機プロセスを用いた。有機分子には脂肪酸を用い、W/O エマルジョン法を用いてハイドロキシアパタイトを合成した。添加する脂肪酸の種類を変化させることでその成長方向を規定し、濃度を変化させることによりナノオーダーの長距離秩序状態を変化させ、生成物の形状制御を行った。次いで、X線回折(XRD)、赤外分光光度計(FT-IR)、透過電子顕微鏡(TEM)を用いて、ナノ粒子の物性を評価した。

#### (2) 成膜プロセスによる培養用セラミックスシートの作製と評価

上記で作製したナノセラミックスを用いて、数種の成膜プロセスを用いた培養用セラミックスシートを作製した。ハイドロキシアパタイト粒子と有機分子との架橋形成を促進させ両親媒性分子とし、気-水界面にて単層膜を形成させた。この膜を細胞培養用ガラス基板の片面にディップコーティングにて移しとり成膜した。その後、焼成にて接合を行った。次に膜の表面物性を、走査電子顕微鏡(SEM)、表面粗さをレーザー顕微鏡にて、性状を接触角測定、X線光電子分光(XPS)を用いて評価した。

### (3) シート上での細胞培養と細胞挙動の評価

上記で作製したセラミックスシート上において、軟骨前駆細胞(ATDC5細胞)を培養した。細胞培養用ガラスをコントロールとし、それぞれの膜の細胞の接着、伸展の様子を蛍光顕微鏡や細胞剥離アッセイにて増殖効率を、MTTアッセイを用いて評価した。軟骨性分化の程度をアルシアンブルー、骨性分化の程度をアルカリホスファターゼ、アリザリン染色にて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) ナノセラミックスの作製と評価

XRD、FT-IR解析より、調製されたナノアパタイトは、わずかに炭酸イオンを含有するハイドロキシアパタイトと同定された。TEM解析にて、ナノアパタイト粒子は、均一な線維状(長径 $608 \pm 164$  nm・幅 $21 \pm 7.4$  nm、**図1左**)、および板状(長径 $1.13 \pm 0.38$   $\mu$ m・幅 $0.44 \pm 0.12$   $\mu$ m、**図1右**)のナノ構造を有していることが確認できた。

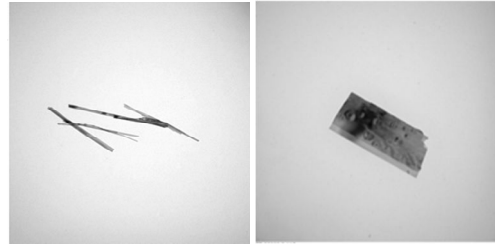


図1. TEM像

### (2) 培養用セラミックスシートの作製と評価

細胞培養用ガラス基板にそれぞれのナノアパタイト粒子を用いて成膜した。焼成後、アパタイトナノシートの表面物性を評価した。SEMにて、アパタイト膜は、ナノ粒子が自己組織化によって規則的に配列された2D構造を有していた。ハイドロキシアパタイト結晶は結晶面が二つあり、結晶成長を制御することでその形態や配向性を制御する研究が報告されている。作成した膜は、XRD解析でどちらもa面配向だった。水滴による静的接触角を測定すると、2つのフィルムはコントロール( $44^\circ \pm 1.8^\circ$ 、**図2上**)に比較してどちらも親水性が高く、針状粒子面が $31^\circ \pm 1.4^\circ$ 、**図2中**、板状粒子面が $25^\circ \pm 0.8^\circ$ 、**図2下**、だった。XPS解析にて表面の化学状態分析を行うと、01sスペクトルが特に板状粒子面で高エネルギー側にシフトすることが分かった。次にそれぞれの面の一定時間におけるタンパク吸着量を測定すると、どちらの面もコントロールに比較して増加することが明らかとなった。

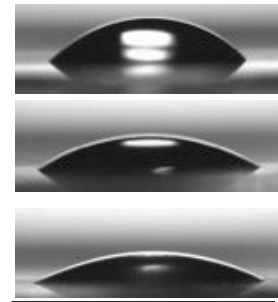


図2. 接触角測定

### (3) 材料表面 細胞相互作用の調査

それぞれの面で、軟骨前駆細胞様のキャラクターを持つATDC5細胞の培養を行った。通常の細胞培養操作を、膜が基板から剥離することなく行うことができた。板状粒子面上で培養されたATDC5細胞は、他の面より短い期間で足場に接着することができたが、伸展面積が小さかった。細胞の接着力についてトリプシンを使用した細胞剥離試験で評価したが、板状粒子面では他の表面よりも弱かった。これらの結果から、濡れ性の高い表面は、細胞の初期接着には有利であるが、接着力は弱いことが示唆された。

### (4) 細胞挙動への影響

MTTアッセイにて、ATDC5細胞の増殖を評価した。本研究で作製したアパタイトフィルム上ではどちらも増殖は促進されていたが、特に板状粒子面で促進された。次に分化能について調査した。ATDC5細胞は生体内と同様インスリンシグナルに反応して軟骨分化し、さらに軟骨性骨化過程が再現できことが報告されている。よって、培養液に添加物を加えることで、容易に軟骨基質

を生成する軟骨細胞に分化させることができ、軟骨分化の研究に多く用いられてきた。本研究では、作製した配向性アパタイトフィルムが供する足場による細胞への影響を調査することが目的だったため、ATDC5細胞の培養液に添加物を加えることなく分化させることができるか観察した。アルシアンブルー染色を用いて軟骨分化を定量したところ、板状粒子面で分化が促進される（**図3**右）ことが分かった。

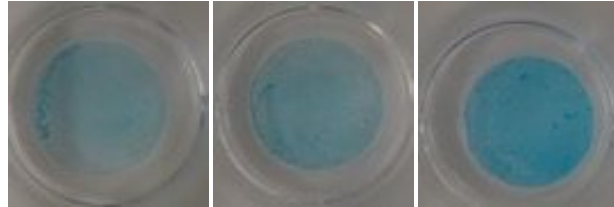


図3．アルシアンブルー染色（分化アッセイ）

以上の結果から、有機 - 無機プロセスを用いたハイドロキシアパタイト合成法を用いることで、生成物の成長方向を規定し、ナノオーダーの長距離秩序状態を変化させて、針状および板状ナノ粒子を作製できた。これらナノ粒子を用いて細胞培養用ガラス基板に成膜し、この膜が配向性を持ち、親水性であることが分かった。板状粒子を用いて形成された配向アパタイト膜では、軟骨前駆細胞は初期接着が増加したが、細胞伸展は抑制された。そして細胞増殖と軟骨分化を増加させることが分かった。なお、細胞伸展の増加により細胞分化が促進される内皮細胞等には、線維状粒子面が適合する可能性が考えられる。このように人工インプラント材料の表面デザインの改良は、材料と隣接組織の細胞との相互作用を良好にして人工物の体内への定着・機能化を促進するため、今後の新しいインプラント開発に重要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komuro H, Wint WY, Horiuchi N, Nozaki K, Sasano T, Miyashin M, Yamashita K, Nagai A.	4. 巻 108
2. 論文標題 An oriented hydroxyapatite film with arrayed plate-like particles enhance chondrogenic differentiation of ATDC5 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res A	6. 最初と最後の頁 537-544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.36834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimabukuro M, Tsutsumi Y, Nozaki K, Chen P, Yamada R, Ashida M, Doi H, Nagai A, Hanawa T	4. 巻 9
2. 論文標題 Chemical and Biological Roles of Zinc in a Porous Titanium Dioxide Layer Formed by Micro-Arc Oxidation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Coatings	6. 最初と最後の頁 705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/coatings9110705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Komuro H, Sasano T, Horiuchi N, Yamashita K, Nagai A	4. 巻 107A
2. 論文標題 The effect of glucose modification of hydroxyapatite nanoparticles on gene delivery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res A	6. 最初と最後の頁 61-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.36523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wada N, Horiuchi N, Nakamura M, Nozaki K, Nagai A, Yamashita K	4. 巻 3
2. 論文標題 Controlled crystallization of calcium carbonate via cooperation of poly-aspartic acid and poly-lysine under double-diffusion conditions in agar hydrogels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 16681-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.8b02445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiuchi N, Shibata K, Saito H, Iwabuchi Y, Wada N, Nozaki K, Hashimoto K, Tanaka Y, Nagai A, Yamashita K	4. 巻 18
2. 論文標題 Size control synthesis of hydroxyapatite plates and their application in the preparation of highly oriented films	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cryst Growth Des	6. 最初と最後の頁 5038-5044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.cgd.8b00480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 永井 亜希子
2. 発表標題 骨組織構造から学ぶ人工骨補填材
3. 学会等名 歯学会地方学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井 亜希子
2. 発表標題 細胞機能応答を制御するハイドロキシアパタイト表面修飾の研究
3. 学会等名 無機リン化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Komuro, Tetsuo Sasano, Kimihiro Yamashita and Akiko Nagai
2. 発表標題 Insight into cellular uptake mechanism and gene delivery of hydroxyapatite nanoparticles in cardiomyocytes
3. 学会等名 30th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小室博明, 笹野哲郎, 山下仁大, 永井亜希子
2. 発表標題 ナノアパタイトが心筋細胞へのトランスフェクションに与える細胞内取り込みの解明
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nagai A, Tsutsumi Y, Nozaki K	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer社	5. 総ページ数 620
3. 書名 Novel Structured Metallic and Inorganic Materials, Surface Modification with Micro-arc Oxidation	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野崎 浩佑 (NOZAKI Kosuke) (00507767)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教  (12602)	
研究分担者	堀内 尚紘 (HORIUCHI Naohiro) (90598195)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教  (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------