

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700485

研究課題名（和文） 硬組織再生医用材料の表面科学と骨芽細胞・破骨細胞分化機能制御機構の解明

研究課題名（英文） Study on the mechanism of the differentiation control of osteoblast and osteoclast based on the surface characteristics of biomaterials for hard tissues

研究代表者

中村 美穂（NAKAMURA MIHO）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：40401385

研究成果の概要（和文）：本研究では、リン酸カルシウム系医用材料上における骨芽細胞・破骨細胞挙動を明らかにし、材料の表面科学特性が両細胞に与える影響について検討することを目的とした。材料表面科学特性評価より、分極処理によって表面に正電荷または負電荷を誘起した表面では、結晶性、粗さ、元素組成に変化が見られなかったが、ぬれ性が向上したことが確認された。骨芽細胞挙動評価では、骨芽細胞の接着・遊走等の細胞初期挙動では分極表面で促進効果が見られ、ぬれ性向上と関与していると考えられた。破骨細胞挙動評価では、破骨細胞評価法が確立され、材料種によって吸収効率が異なり、表面科学特性のみならず溶解性等の材料性質も関与していることが確認された。これらの得られた知見より細胞挙動を制御する新たなマテリアルデザインの可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to study the surface characteristics of polarized hydroxyapatite (HA) and the effects of electrical stimulation by polarization on osteoblast behavior *in vitro* in order to investigate the mechanism of the osteoconductive enhancement. Based on the material analysis, the surface characteristics revealed that electrical polarization had no effect on surface roughness, crystallinity, and constituent elements. According to contact angle measurement, electrically polarized HA, which provides two kinds of surfaces, negatively charged HA (N-HA) and positively charged HA (P-HA), was even more hydrophilic than that of normal HA. Morphological observations and quantitative analyses revealed that the typical adhered cells had a round shape on the HA but had a spindle or fan-like spreading configuration on the N-HA and the P-HA. The cell areas positively stained for actin, which indicates the degree of cell spreading, were distinctly larger on the N-HA and P-HA than that on the HA. In conclusion, electrical polarization improved the wettability of the HA surface and affected osteoblastic adhesion, especially spreading.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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・生体材料学

キーワード：バイオマテリアル、骨芽細胞、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

Schwartz らによって提唱された骨伝導モデル (Z. Schwartz, et al. J Cell Biochem 1994, 56; 340-347) では、「材料への血液由来タンパク質吸着に続いて骨芽細胞の誘引、接着、増殖、分化がおり幼弱な骨ができる。そして最終的には破骨細胞と骨芽細胞のリモデリングによって硬く密な骨が再生される」と考えられている。

申請者が所属する研究グループでは、分極材料が骨伝導能を強化すると報告してきた。Schwartz モデルに則り、骨伝導で主体的な役割を果たすタンパク質や細胞への分極材料の効果を検討することによって、骨伝導能強化機構についての知見が得られるのではないかと考えられる。また、材料表面科学特性が細胞接着・分化に影響するという報告 (C. Boura, et al. Biomaterials 2005, 26; 4568-4575) を参考にし、分極材料の表面科学特性と骨芽・破骨細胞挙動への効果について重点的に検討する。

2. 研究の目的

本研究では、ハイドロキシアパタイト (HA)、βリン酸三カルシウム (βTCP)、炭酸アパタイト (CA) を検討試料として用いた。その理由は、HA と βTCP は臨床応用されている医用材料であるため、CA は脊椎動物の硬組織と最も近似した化学組成であることから有用な材料として注目されているためである。

上記材料を分極処理し、分極材料の表面科学特性と骨芽・破骨細胞挙動への効果について検討することを目的とした。骨芽細胞評価では、マウス由来初代骨芽細胞を用いて接着・遊走・分化に与える影響について検討する。破骨細胞評価では、ヒト末梢血由来初代破骨細胞を用いて接着・分化・吸収について検討するとともに、破骨細胞評価法の確立も目指す。

3. 研究の方法

(1) 材料の作製と表面科学解析：湿式法によって HA、βTCP、CA を合成し、分極処理後、各表面のキャラクタリゼーション (X線回折、赤外分光分析)、表面科学解析 (表面粗さ測定、結晶粒径測定、接触角測定、表面エネルギー測定) を行う。

(2) 骨芽細胞評価：マウス骨髄由来間葉系幹細胞を単離し、分化誘導因子を添加することによって前骨芽細胞に分化させ、試料上へ播種する。一定期間後に接着能、遊走能、増殖能、骨芽細胞への分化能を比較検討する。

(3) 破骨細胞評価：ヒト末梢血より単核球を単離し、試料上へ播種し、分化誘導因子添加培地中で培養する。陽性対照群としてウシ骨薄切切片を用いる。一定期間培養後、接着能、

分化能、吸収能を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 材料の作製と表面科学解析：材料表面科学特性評価より、分極処理によって表面に正電荷または負電荷を誘起した表面では、結晶性、粗さ、元素組成に変化が見られなかったが、ぬれ性が向上したことが確認された。ぬれ性の向上には分極条件依存性が認められ、より多くの電荷を蓄積した試料はぬれ性がより増加していた。また、溶媒依存性も確認され、表面エネルギーの高い溶媒ではぬれ性の向上が顕著に見られ、低い溶媒ではぬれ性に対する効果が認められなかった。

(2) 骨芽細胞評価：骨芽細胞挙動評価では、骨芽細胞の接着・遊走等の細胞初期挙動では分極表面で促進効果が見られ、ぬれ性向上と関連していると考えられた。一方、骨芽細胞への分化に関して、PCR による分化マーカー発現と石灰化物質産生能によって比較検討した結果、分極表面のうち正電荷が誘起した面上で促進傾向が認められた。このことから、細胞挙動の初期にはぬれ性等の材料表面特性が効果を及ぼし、長期的な細胞挙動には電界等の別の因子が関連していると考えられた。

(3) 破骨細胞評価：破骨細胞挙動評価では、定量的な破骨細胞評価法が確立された。また、HA、βTCP、CA の材料種によって破骨細胞接着形態が変化することが確認された。これは各面上における PCR による分化マーカー発現の比較から分化効率の相違が原因であると考えられる。また、吸収効率が異なることが認められ。これは各面上におけるアクチンリング形成に見られる基板と細胞のシーリング能の相違が原因であると確認された。このことから、破骨細胞分化とシーリング能が優れた CA が最も破骨細胞吸収性を有することが確認され、表面科学特性のみならず溶解性等の材料性質も関連していると考えられる。

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 13 件)

Wada N, Nakamura M, Wang W, Hiyama T, Nagai A, Yamashita K. Controlled Deposition of Calcite Crystals on Yttria Stabilized Zirconia Ceramic electrets. Cryst Growth Des 2011; 11 (1): 166-174. (査読有)

Kobayashi M, Saito H, Mase T, Sasaki T, Wang W, Nakamura M, Tanaka Y, Nagai A, Yamashita K. Polarization of Hybridized Calcium Phosphoaluminosilicates with 45S5

type Bioglass. Biomed Mater 2010; 5: 025001 (5pp). (査読有)

- ③ Tanaka Y, Iwasaki T, Nakamura M, Nagai A, Katayama K, Yamashita K. Polarization and microstructure effects of ceramic hydroxyapatite electrets. J Appl Phys 2010; 107: 014107. (査読有)

- ④ Tanaka Y, Yoshida M, Nakamura M, Nagai A, Hashimoto K, Toda Y, Yamashita K. Biocompatibility and water durability of alumina-zirconia ceramics blended with microsized HA particles. J Ceram Soc Japan 2010; 118 (6): 498-501. (査読有)

Nakamura M, Nagai A, Okura Toshinori, Sekijima Y, Hentunen T, Yamashita K. Enhanced osteoblastic adhesion through improved wettability on polarized hydroxyapatite. J Ceram Soc Japan 2010; 118 (6): 474-478. (査読有)

Nakamura M, Nagai S, Tanaka Y, Sekijima Y, Yamashita K. Polarized Hydroxyapatite Promotes Spread and Motility of Osteoblastic Cells. J Biomed Mater Res A 2010; 92A: 783-790. (査読有)

Nakamura S, Kobayashi T, Nakamura M, Itoh S, Yamashita K. Electrostatic surface charge acceleration of bone ingrowth of porous hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ceramics. J Biomed Mater Res A 2010; 92A(1):267-75. (査読有)

Nakamura M, Nagai A, Hentunen T, Salonen J, Sekijima Y, Okura T, Hashimoto K, Toda Y, Monma H, Yamashita K. Surface Electric Fields Increase Osteoblast Adhesion through Improved Wettability on Hydroxyapatite Electret. ACS Appl Mater Interfaces, 1 (10), 2181-2189, 2009. (査読有)

Okabayashi R, Nakamura M, Okabayashi T, Tanaka Y, Nagai A, Yamashita K. Efficacy of polarized hydroxyapatite and silk fibroin composite dressing on epidermal recovery from full-thickness porcine skin wounds. J Biomed Mater Res Applied Biomaterials B 2009; 90: 641-646. (査読有)

Nakamura S, Kobayashi T, Nakamura M, Yamashita K. Enhanced in vivo responses of osteoblasts in electrostatically activated zones by hydroxyapatite electrets. J Mater Sci:

Mater Med. 2009; 20: 99-103. (査読有)

Iwasaki T, Tanaka Y, Nakamura M, Nagai S, Hashimoto K, Toda Y, Katayama K, Yamashita K. Rate of bonelike apatite formation accelerated on polarized porous hydroxyapatite. J Am Ceram Soc 2008; 116: 23-27. (査読有)

Wada N, Nakamura M, Tanaka Y, Kanamura K, Yamashita K. Formation of Calcite Thin Films by Cooperation of Polyacrylic Acid and Self-generating Electric Field due to Aligned Dipoles of Polarized Substrates. J Colloid Interface Sci 2009; 330: 374-379. (査読有)

Tanaka Y, Nakamura M, Nagai A, Toyama T, Yamashita K. Ion conduction mechanism in Ca deficient hydroxyapatite whisker. Mater Sci Eng B-Solid 2009; 92[7]: 1586-1591. (査読有)

[学会発表](計 19件)

Nakamura M, Hentunen T, Salonen J, Sekijima Y, Nagai A, Yamashita K. Characteristics of Human Osteoclasts Cultured on different Bioceramics. 23rd European Conference on Biomaterials, Tampere, Finland, Sep, 2010.

Nakamura M, Soya T, Hashimoto K, Nagai A, Yamashita K. Polarized Hydroxyapatite in Silk Fibroin Film Increases in vitro Organization of Endothelial Cells into Capillary-like Networks. 3rd International Congress on ceramics, Osaka, Japan, Nov 2010.

Nakamura M, Nagai A, Okura T, Monma H, Sekijima Y, Hentunen T, Yamashita K. Polarization increases osteoblastic adhesion through improved wettability on hydroxyapatite. 9th Asian Bioceramics Symposium, Nagoya, Japan, December 2009.

Nakamura M, Soya T, Okabayashi R, Nagai A, Hashimoto K, Toda Y, Morita I, Yamashita K. Evaluation of Endothelial Cell Behaviors on Silk Fibroin Films Including Polarized Hydroxyapatite. 22nd International Symposium on Ceramics in Medicine, Bioceramics 22, Daegu, Korea, August 2009.

Okabayashi R, Nakamura M, Tanaka Y, Nagai A, Yamashita K. Efficacy of polarized hydroxyapatite and silk fibroin composite gel on skin wounds in vivo. 22nd International Symposium on Ceramics in Medicine, Bioceramics 22, Daegu, Korea, August 2009.

Nakamura M, Hentunen T, Salonen J, Nagai A, Sekijima Y, Yamashita K. Osteoblast Adhesion and Differentiation Cultured on Polarized Hydroxyapatite. 20th European Conference on Biomaterials, Lausanne, Switzerland, September 2009.

Nakamura M, Soga M, Nagai A, Sekijima Y, Hashimoto K, Toda Y, Yamashita K. Adhesion Morphology and Motility of Osteoblastic Cells Cultured on Polarized Hydroxyapatite. 2nd Asian Biomaterials Congress, Syngapore, June 2009.

中村美穂, 永井亜希子, 山下仁大. 分極水酸アパタイトの骨芽細胞挙動制御. 第20回無機リン化学討論会, 仙台, 2010年10月.

中村美穂, 征矢朋子, 岡林留美, 橋本和明, 関島安隆, 永井亜希子, 森田育男, 山下仁大. 分極水酸アパタイトを含有するフィブリン複合材料に体する細胞応答性. 日本バイオマテリアル学会, 広島, 2010年10月.

岡林留美, 中村美穂, 永井亜希子, 山下仁大. 分極水酸アパタイトを含有するフィブリン複合ゲルを用いた豚全層皮膚欠損モデルに対する治癒効果の検討. 日本バイオマテリアル学会, 広島, 2010年10月.

堀内尚紘, 中村美穂, 岩崎健, 永井亜希子, 武田博明, 鶴見敬章, 片山恵一, 山下仁大. ハイドロキシアパタイトの分極及び誘電特性. 第14回生体関連セラミックス討論会, 京都, 2010年12月.

渡会孝典, 中村美穂, 橋本和明, 永井亜希子, 山下仁大. 骨系細胞の挙動に及ぼす炭酸アパタイトセラミックスの分極能. 第14回生体関連セラミックス討論会, 京都, 2010年12月.

安藤大志, 中村美穂, 永井亜希子, 遠山岳史, 山下仁大. 分極水酸アパタイトの表面場が及ぼす骨細胞の接着及び結合への効果. 第14回生体関連セラミックス討論会, 京都, 2010年12月.

中村美穂, 大倉利典, 門間英毅, 田中優実, 永井亜希子, 山下仁大. 分極水酸アパタイト局所場による表面機能制御. 無機マテリアル学会第118回学術講演会, 千葉, 2009年6月.

中村美穂, 永井亜希子, 関島安隆, 大倉利典, 門間英毅, 山下仁大. 分極ハイドロキシアパタイトの表面特性と骨芽細胞接着挙動. 日本セラミックス協会第22回秋季シンポジウム, 愛媛, 2009年9月.

中村美穂, 永井亜希子, 田中優実, 山下仁

大. 分極アパタイトによる骨芽細胞挙動制御. 2009年度秋季(第54回)日本歯科理工学会学術講演会, 鹿児島, 2009年10月.

中村美穂, 永井亜希子, 関島安隆, 山下仁大. 分極水酸アパタイトによる間葉系幹細胞由来骨芽細胞挙動制御. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2009, 京都, 2009年11月.

中村美穂, 永井亜希子, 田中優実, 山下仁大. 骨芽細胞機能を制御する分極ハイドロキシアパタイトの表面局所場. 第8回日本再生医療学会総会, 東京, 2009年3月.

中村美穂, 永井亜希子, 関島安隆, 田中優実, 山下仁大. 分極ハイドロキシアパタイトのぬれ性と骨芽細胞様細胞挙動. 日本セラミックス協会2009年年会, 千葉, 2009年3月.

〔図書〕(計 1件)

中村美穂, 第3章セラミックバイオマテリアルの科学, “セラミックバイオマテリアル”, 岡崎正之, 山下仁大編, p. 44-82, コロナ社, 2009.

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ:
<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/material/index2.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

()

研究者番号：

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：