

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009～2011

課題番号：21700487

研究課題名（和文）間葉系幹細胞の増殖を促進させる三次元不織布型スキャホールド材料の創製

研究課題名（英文）Development of 3D-fibrous scaffolds with ability of stimulating mesenchymal stem cells.

研究代表者

小幡 亜希子(AKIKO OBATA)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：40402656

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、組織工学用のスキャホールドとしての応用を見据えた、立体構造を有する不織布状材料の作製方法を確立し、材料の諸物性・細胞親和性を評価した。細胞の活性を促す機能を付与すべく、生体親和性ポリマーをベースとした材料中に、ケイ酸イオンを溶出する機能をもつセラミックス粒子を分散させた。得られた材料は、柔軟性および弾性を示し、操作性に優れるものであった。また細胞培養試験の結果、細胞が材料内部で旺盛に増殖することがわかった。

研究成果の概要（英文）：Novel fibrous materials with three dimensional structure were developed for use in the tissue engineering field. Ceramic particles releasing silicate ions, which have been reported to stimulate cell functions, were combined with biodegradable polymer to prepare fibrous materials enhancing cell proliferation and mineralization. The prepared fibrous materials showed flexibility and elasticity. Results of cell culture tests for the materials showed osteoblast-like cells proliferated inside of the fibrous structure of the materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
22 年度	800,000	240,000	1,040,000
23 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：生体材料、組織工学、ハイブリッド材料、細胞培養

1. 研究開始当初の背景

近年注目を浴びる研究分野の一つに再生医療があげられる。そのうち既に実用化される再生医療研究もあり、また応用分野は医療

にとどまらず、例えば美容分野にも応用されており、培養した皮膚繊維芽細胞を皮下に注入ししわやたるみを取り除くという例もある。このように再生医療の研究は急速に発展しつづけており、今後も数多くの領域におい

て実用化されるのは必至である。

しかし、組織の再建には多量の細胞が必要とされる。そのため、再生医療の現場では、操作性はもちろんのこと高い増殖促進効果を有するスキャホールド材料の開発が望まれている。申請者は、細胞の増殖を促すファクターとして、ケイ酸イオンの効果に着目し様々な材料開発に取り組んできた。これまでの研究により、骨形成性細胞や未分化細胞のひとつである間葉系幹細胞の生物機能を促進する効果を確認している。よって、ケイ酸イオンを徐放する機能を付与したスキャホールドであれば、組織工学において有用と期待される。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、再生医療分野での応用を見据えた、細胞を積極的に増殖させるスキャホールド材料の開発である。

ケイ酸イオンが示す細胞の生物機能促進効果に着目し、材料へのケイ酸イオン徐放能の付与を試みる。同時にケイ酸イオンによる細胞への効果について、イオン種を変えて詳細に検討する。また、スキャホールド材料に求められる機能である「多量の細胞の担持能」および「操作性」を考慮し、立体構造を有する不織布型スキャホールドを作製する。

作製においては、すでに申請者が検討してきた、エレクトロスピンニング(ES)法を用いることとし、立体構造の作製を実現するためのシステムの確立を目指す。また、材料においては、生分解性ポリマーの一つであるポリ乳酸を用い、ケイ酸イオン徐放能を有するセラミックスと複合化することで、目的とするイオン徐放型材料の実現を目指す。

以上の内容を達成すべく、より具体的な目的を下記のように設定した。

(1)種々のケイ酸イオンに対する細胞応答変化の観察

材料から溶出するケイ酸イオンは、その材料組成によって、シロキサン構造のサイズや結合する官能基などに違いがある。また、ケイ酸イオンと同時に材料から溶出する他のイオンにおいても、同様な違いが発生することが考えられる。これらの違いによって、細胞の応答性に変化があることが予想される。

本テーマにおいては、申請者がこれまでに取り組んできた「シロキサン含有炭酸カルシウム(SiV)」材料を用いて細胞培養を行い、増殖や分化に着目して観察する。SiVにおいては、シロキサン源として二種類のシランカップリング剤を使用し、比較することとする。

(2)立体型不織布状材料の作製と物性評価

ES法とは、ポリマー溶液に高電圧を印加し帯電させることで、アースをとったコレクターに向かって飛ばし、同時に繊維化させるという手法である。ES法による不織布膜の作製技術はすでに確立しているが、立体構造を有する不織布材料の作製はほぼ報告例が無かった。

本テーマにおいては、このES法システムを独自に改良することで、立体型不織布状材料の作製の確立を目指した。また、得られた材料については、操作性を考慮し、柔軟性の評価を行うこととした。

(3)立体型不織布状材料の生体親和性の向上

得られた材料について、さらなる高機能化をはかり、細胞接着性に優れると報告のあるハイドロキシアパタイトのコーティングを目指す。コーティング方法については、低温処理可能であり、かつコーティング処理中における材料からのケイ酸イオンの溶出を最小限に抑えることを目的として、交互浸漬法を用いることとする。

(4)立体型不織布状材料上での細胞挙動評価

得られた材料について、応用を見据えた細胞培養試験による生体親和性評価、および細胞の担持機能について検討する。特に、細胞の増殖挙動や、経時的な進入挙動について着目する。

3. 研究の方法

(1)種々のケイ酸イオンに対する細胞応答変化の観察

SiVは炭酸ガス化学法をベースに作製した。メタノール中に水酸化カルシウムとシランカップリング剤であるアミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)またはテトラエトキシシラン(TEOS)を加え、炭酸ガスをバブリングし、熟成、乾燥を経てサンプルを得た。APTESを用いた場合、シロキサン構造内にアミノ基が導入されるため、分解性が優れる。また、溶出するケイ酸イオン種はアミノ基を含有したタイプであり、TEOS由来のシロキサンではケイ酸のみとなる。

これら二種類のSiVおよび比較用の炭酸カルシウム(V)を細胞培養用培地に浸漬し、1日間インキュベートした後、SiVを取り除くことで、「ケイ酸イオン含有培地」を作製した。この培地を用いて、骨芽細胞への分化能を有するMC3T3-E1細胞を培養し評価を行った。一方で、SiVをポリ乳酸と複合化して作製した膜材料上においても、同細胞を培養し評価を行った。

(2)立体型不織布状材料の作製と物性評価

ES法にて立体構造を作製するには、ファイ

パー同士の絡み合いを減少させ、かつ電荷によって引きつけられる力を減少させることが有効と考えた。APTES-SiV/ポリ乳酸複合体を用いてスピニングする際、風を当てることで迅速に溶媒を揮発させ、同時に絡み合いを抑制し、その結果、立体型不織布状材料の作製に成功した。

得られたサンプルにおいて、SiVの添加量を変化させた時の柔軟性変化を観察した。JIS規格に従って圧縮試験を行い、圧縮率と回復率を算出した。

(3) 立体型不織布状材料の生体親和性の向上

交互浸漬法では、120mM CaCl₂水溶液（Ca溶液）と、200mM Na₂HPO₄水溶液（P溶液）を用いた。立体型不織布状材料 10mg を、Ca溶液 20ml に5分間浸漬し、蒸留水で洗浄後、P溶液 20ml に0.5、1、2時間浸漬し、蒸留水およびエタノールで洗浄後、乾燥させた。

(4) 立体型不織布状材料上での細胞挙動評価

立体型不織布状材料上へMC3T3-E1細胞を播種し、2週間培養することで、材料内部における細胞の接着および増殖挙動について観察した。接着挙動については、細胞中のアクチンを蛍光染色することで観察した。また、増殖挙動については、Cell Counting Kit-8 試薬を用いて比色法により評価した。

4. 研究成果

(1) 種々のケイ酸イオンに対する細胞応答変化の観察

作製した二種類のケイ酸イオン含有培地を用いて培養したときの、生細胞数の変化を図1に示す。培養1日目においてAPTES-SiVでは有意に大きな値を示したが、その後は、

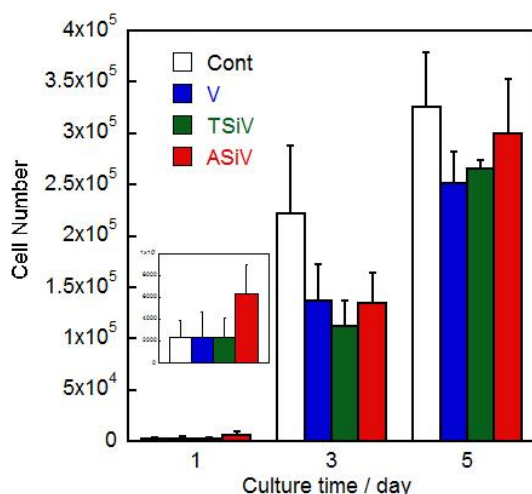


図1.各培地中で培養したときの生細胞数変化

Controlより低い値を示した。一方で、各SiVとポリ乳酸を複合化して作製した膜材料上における、生細胞数変化を図2に示す。APTES-SiV/ポリ乳酸複合膜上において、有意に大きな値を示した。

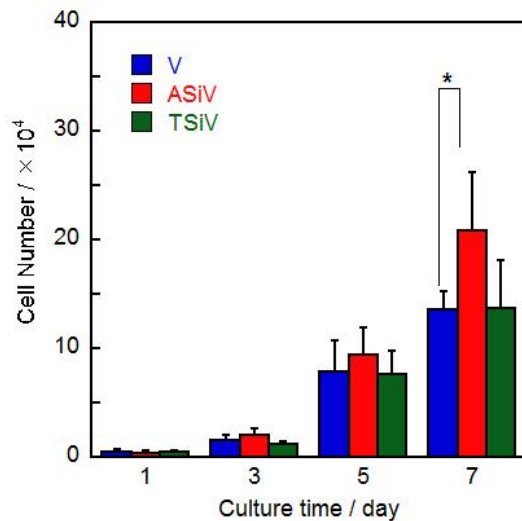


図2.各複合膜上で培養したときの生細胞数変化

以上のことから、APTES-SiVにおいてはポリ乳酸と複合化することで、細胞の増殖に対する促進効果を示すことがわかった。また、ケイ酸イオン種の違いにより、細胞の応答性に変化があることがわかった。特に、アミノ基を含有したタイプのケイ酸イオンが効果的であることを見出した。ケイ酸イオンによる促進効果を、より効果的に発揮できる材料設計に繋がる知見と考える。

分化の進行過程において増大するアルカリフォスファターゼ(ALP)値を評価することで、細胞の分化能を観察できる。APTES-SiV由来のケイ酸イオン含有培地中、およびAPTES-SiV/ポリ乳酸複合膜上で培養した細胞のALP活性値変化を観察したところ、含有培地中では分化の促進効果は見られなかったが、複合膜上では有意に促進されることがわかった。よって、APTES-SiVをポリ乳酸と複合化することで、分化能に対しても促進効果が発現されることがわかった。

(2) 立体型不織布状材料の作製と物性評価

作製したサンプルの写真を図3に示す。約10 μm径のファイバー構造からなる、綿のような材料が得られた。送風システムを加えることで、通常の不織布とは全く異なる三次元構造を有するファイバー骨格を設計することに成功した。

また、圧縮試験の結果、SiV添加量が増え

ることでは圧縮後の回復率が減少した。添加量が<30wt%のとき、ポリ乳酸単体と同等の値を示すことがわかった。よって、操作性も十分良好と考える。

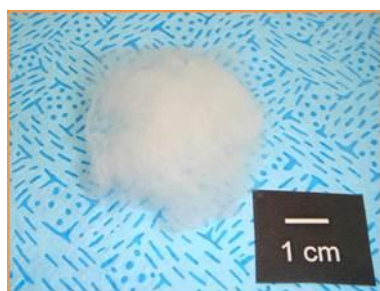


図3.作製した立体型不織布状材料

(3) 立体型不織布状材料の生体親和性の向上

立体型不織布状材料の場合、交互浸漬法において、P 溶液への浸漬時間がアパタイト生成に影響をおよぼすことをすでに見出している。そのため、P 溶液の浸漬時間のみ条件振りを行い、比較検討した。

図4に浸漬前と、P 溶液に2時間浸漬したときのファイバー表面の写真を示す。浸漬後は微細な析出物が、ファイバー表面全体に接着しているのがわかる。1時間浸漬したサンプルにおいても、同様な析出物が観察されたが、その量はごくわずかであった。また、0.5時間浸漬したサンプルにおいては、全く観察されなかった。この析出物については、XRDパターンより hidroキシアパタイトであることが示唆された。また、このとき APTES-SiV は残存しており、コーティング後もケイ酸イオンやカルシウムイオンを供給できることが確認された。

以上のことから、交互浸漬法によって立体型不織布状材料のファイバー表面を、アパタイトでコーティングすることに成功した。コーティング層が薄いため、ファイバー間隙が狭小化することなく、三次元構造を維持したファイバー骨格の形成に成功した。

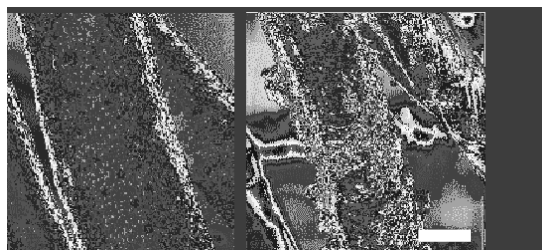


図4.交互浸漬処理前(左)と後(右)のファイバー表面。Bar; 10 μ m

(4) 立体型不織布状材料上での細胞挙動評価

蛍光顕微鏡による材料中の細胞観察を行ったところ、約2mm厚のサンプルにおいても、全体的に細胞が接着していることがわかった。また、細胞はファイバーの表面に沿うように接着し、さらに増殖している様子もみられた。よって、当材料中において、細胞はファイバー一本ずつを足場として、材料内部にまで進入すると考えられた。一方で、播種直後も材料内部にて細胞が観察されたことから、接着前の浮遊した細胞がファイバー間隙を通過し、内部のファイバー表面に接着することもわかった。

比色法による生細胞数カウントを行ったところ、2週間にかけて、増大する傾向がみられた。最終的な生細胞数は、一般的な膜状の不織布材料よりも有意に大きく、よって、立体構造とすることで、より多くの細胞を担持することが可能であることがわかった。

以上のことから、本研究にて開発した立体型不織布状材料は、細胞を活性化させる機能をもつケイ酸イオンを徐放し、かつ多くの細胞を内部に担持することが可能であることから、組織工学用のスキャホールドとして期待できると考える。

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19件)

1. Preparation of electrospun poly(lactic acid)-based hybrids containing siloxane-doped vaterite particles for bone regeneration
Kie Fujikura, Akiko Obata, Sen Lin, Julian R Jones, Robert V Law, Toshihiro Kasuga
Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition. 査読有り. *In press*.
2. Fabrication of silicate and calcium ion releasable biomaterials with siloxane-containing vaterite
Jin Nakamura, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Julian R Jones
Key Eng. Mater., 査読有り. 493-494, 561-565 (2012)
3. Electrospun Microfiber Meshes of Silicon-doped Vaterite/Poly(lactic acid) Hybrid for Guided Bone Regeneration
Akiko Obata, Toshiki Hotta, Takashi Wakita, Yoshio Ota and Toshihiro Kasuga
Acta Biomaterialia, 査読有り. **6**, 1248-1257 (2010).
4. Preparation of Silicon-Containing Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid Membranes
Akiko Obata, Takashi Wakita, Yoshio Ota and

- Toshihiro Kasuga
Mater. Sci. Forum, 査読有り . 638-642, 670-674 (2010).
5. Electrospun Fibrous Membranes Based on Poly(lactic acid) for Guided Bone Regeneration
Akiko Obata, Takashi Wakita, Yoshio Ota and Toshihiro Kasuga
Proc. 22th Inter. Symp. Ceramics in Medicine, edited by S. Kim, 査読有り . 2009, pp. 579-582.
 6. Enhanced *in vitro* Cell Activity on Silicon-Doped Vaterite / Poly(lactic acid) Composites
Akiko Obata, Shingo Tokuda and Toshihiro Kasuga
Acta Biomaterialia, 査読有り . 5, 57-62 (2009).
 7. Stimulation of Human Mesenchymal Stem Cells and Osteoblasts Activities *in vitro* on Silicon-Releasable Scaffolds
Akiko Obata and Toshihiro Kasuga
Journal of Biomedical Materials Research, 査読有り . 91A, 11-17 (2009).
- [学会発表] (計 29 件)
1. 溶出ケイ酸イオンによる骨芽細胞への影響
小幡亜希子、中村仁、前田浩孝、春日敏宏、Julian R Jones
日本金属学会 2012 年春期大会、横浜、2012.3.28-30.
 2. Effects of silicate and calcium ions on osteoblast functions
Akiko Obata, Jin Nakamura, Hirotaka Maeda, Julian R Jones, Toshihiro Kasuga
2nd German-Japanese Seminar on Advanced Ceramic Materials, Erlangen, Germany, 2011.11.24-25.
 3. Preparation of fibrous scaffolds containing calcium and silicon species
Akiko Obata, Hiroki Ozasa, Julian R Jones, Toshihiro Kasuga
Bioceramics23, 23rd Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine (ISCM), Istanbul, Turkey, 2011.11.6-9.
 4. 硬組織再建用バイオマテリアルの開発
小幡亜希子
名工大—自然科学研究機構合同講演会第 3 回講演会、名古屋、2011.10.3.
 5. 生分解性ポリマー・炭酸カルシウムの複合化による骨再建用材料の創製
小幡亜希子、春日敏宏
第 60 回高分子討論会、岡山、2011.9.28-30.
 6. 骨芽細胞様細胞に対する溶出シリコンの影響
小幡亜希子、春日敏宏
日本セラミックス協会第 24 回秋季シンポジウム、札幌、2011.9.7-9.
 7. カルシウム・シリコン徐放機能を付与した生分解性無機・有機複合体の作製
小幡亜希子、春日敏宏、Julian R Jones
第 3 2 回日本バイオマテリアル学会大会、広島 (グランドプリンスホテル広島) 2010.11.29-30.
 8. Calcium Carbonate/Polymer Composites Releasing Silicon and Calcium Species for Biomaterials
Akiko Obata, Shinya Yamada, Julian R Jones, Toshihiro Kasuga
The 27th International Korea-Japan Seminar on Ceramics, Incheon, Korea, 2010.11.24-26
 9. Preparation of Scaffold Materials Releasing Silicon and Calcium Ions for Bone Reconstruction
Akiko Obata, Shinya Yamada, Toshihiro Kasuga, Julian R Jones
3rd International Congress on Ceramics (ICC3), Osaka, Japan, 2010.11.14-18
 10. Preparation of Poly(lactic acid)-based Fibrous Membranes Releasing Silicon Species by Electrospinning
Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Julian R. Jones
ESB 2010 (23rd European Conference on Biomaterials), Tampere, Finland, 2010.9.11-15
 11. Poly(lactic acid)-based Fibrous Membranes Releasing Silicon Species
Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Julian R Jones
TERMIS-EU 2010, Galway, Ireland, 2010.6.13-17
- [図書] (計 2 件)
1. Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Nova Science Publishers Lactic Acid: Production, Properties and Health Effects; Siloxane-Containing Vaterite / Poly (lactic acid) Fibremats with Improved Ductility, *in press*.
- [産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)
- 名称 : 骨欠損部充填材料およびその製造方法
発明者 : 春日敏宏、小笹弘貴、小幡亜希子
権利者 : 名古屋工業大学
種類 : 特願
番号 : 2010-80139
出願年月日 : 2010.3.31
国内外の別 : 国内

名称：骨再生誘導膜およびその製造方法
発明者：春日敏宏、小幡亜希子、藤倉喜恵
権利者：名古屋工業大学
種類：特願
番号：2009-208922
出願年月日：2009.9.10
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小幡 亜希子 (OBATA AKIKO)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：40402656

(2)研究協力者

中村 仁 (NAKAMURA JIN)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士後
期課程二年
研究者番号：なし