

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03139

研究課題名（和文）カーボネイトアパタイトの高い骨伝導能・骨再生能を細胞の分子メカニズムから解明する

研究課題名（英文）Elucidation of the cellular and molecular mechanisms of superior osteoconductivity and bone regeneration abilities of carbonate apatite

研究代表者

宮本 洋二（MIYAMOTO, Youji）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授

研究者番号：20200214

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的はハイドロキシアパタイト（HAp）より優れた骨伝導能、骨再生能を有するカーボネイトアパタイト（CAp）の分子メカニズムの検索である。HAp作成時の焼結温度を変化させることで、表面粗さや表面形状が同じで、材質だけが異なるHApとCApディスクの開発に成功した。このディスク上でラット骨髄間葉系幹細胞（MC3T3-E1）を24時間培養した結果、CApディスク上で有意な細胞増殖を認めた。培養した細胞を回収し、遺伝子とmicro RNAの発現変化をマイクロアレイにて解析することで、CApによる骨芽細胞への分化促進が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔外科の臨床では、悪性腫瘍等の治療のため顎骨切除を行った結果、広範囲の顎骨欠損を生じることがあり、この顎骨欠損の再建方法が大きな課題となっている。この問題を解決するために人工的に合成された骨補填材、特にハイドロキシアパタイト（HAp）がよく用いられてきた。しかし、HApは生体内で吸収されず、長期に残存し感染源となる可能性がある。そこで近年、生体内吸収性、骨置換性を有するカーボネイトアパタイト（CAp）の臨床応用が始まった。このCApはHApより骨新生、骨伝導に優れることが明らかになったが、その理由まで解明できていないため、分子メカニズムから解析を行った。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism of carbonate apatite (CAp), which has superior osteoconduction and bone regeneration abilities to hydroxyapatite (HAp). By changing the sintering temperature during HAp disk production, HAp and CAp disks were developed that have exactly the same surface roughness and shape, but differ only in material. Rat bone marrow mesenchymal stem cells (MC3T3-E1) were cultured on these disks for 24 hours, and significant cell proliferation was observed on the CAp disk compared HAp disk. By collecting cultured cells and analyzing changes in gene and micro RNA expression using a microarray, it was suggested that CAp promotes differentiation into osteoblasts.

研究分野：口腔外科

キーワード：カーボネイトアパタイト ハイドロキシアパタイト 骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

口腔外科の臨床では悪性腫瘍等の治療のため顎骨切除を行った結果、広範囲の顎骨欠損を生じることがあり、この顎骨欠損の再建方法が大きな課題となっている。従来から骨再建のゴールドスタンダードは自家骨による再建とされており、腸骨などの自家骨を顎骨欠損部へ移植する再建方法が行われてきたが、自家骨採取のために患者へさらなる身体的侵襲を加えることが避けられないのが現状である。この問題を解決するために人工的に合成された骨補填材を用いた骨再建の研究が盛んに行われてきた。

これまで、ハイドロキシアパタイト (HAp) が骨再生医療におけるスキャフォールド (足場) や骨補填材としてよく用いられてきた。しかしながら、この HAp は体内でほとんど吸収されずに長期に残留するため、時に感染源となることがある。一方、骨自体もアパタイトからできているが、骨代謝に同調して吸収と添加を受ける。この違いは、骨のアパタイトが純粋な HAp ではなく、炭酸基を含んだ炭酸アパタイト (CAp) であることと、その結晶性が低いことに起因している。研究代表者らは、水酸化カルシウムを出発物質として、溶解析出反応による炭酸化・リン酸化を行うことによって、CAp を人工的に調製することに成功した(特願 2003-179257、医療用骨補填材およびその製造方法、Characterization of microporous carbonate-substituted hydroxyapatite bodies prepared in different phosphate solutions, *J Mater Sci*, 42(18), 7843-7849, 2007)。

この CAp は従来の HAp とは違って破骨細胞による吸収を受け、骨と置換することを明らかにしてきた。さらに薬事承認を得て、2018年2月よりサイトランス グラニュールとして顆粒状の形態で市販され、実臨床応用が始まっている (図1)。



図1：市販されている炭酸アパタイト顆粒 (サイトランス®グラニュール)

CAp が HAp よりも培養骨髄細胞の骨系細胞への分化を促進すること、さらにウサギやイヌの動物実験でも CAp が HAp よりも骨新生、骨伝導に優れることを明らかにしてきた。しかし、これまでの一連の研究の中で、CAp の優れた骨伝導能、骨再生能の理由は解明できていない。そこで今回、表面荒さや表面性状が同じ CAp と HAp を作製し、この上で骨芽細胞様細胞を培養し、その分子メカニズムの解析に挑戦した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は HAp より優れた骨伝導能、骨再生能を有する CAp の分子メカニズムの検索である。これまで HAp やチタンなどの生体材料の上で骨芽細胞を培養し、骨の分化マーカーの発現を比較した研究は多数ある。しかし、殆どは表面形状を揃えていないため、その差が何に起因するかを解明できていない。そこで、表面粗さや表面形状が同じで、材質だけが異なる HAp と CAp 試料を開発する。この上で骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を培養、遺伝子および miRNA の発現変化をマイクロアレイにて解析し、CAp の優れた骨伝導、骨新生の分子メカニズムを検索する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 表面荒さおよび表面形状が同じで、材質だけが異なるディスク状試料の作製

CAp ディスクを作製し、その表面性状と一致する HAp ディスクを作製する方法を探索した。炭酸カルシウム粉末を油圧プレス機で一軸加圧成型し、350 で焼結することで炭酸カルシウムディスクを作製した。作製したディスクをリン酸水素ナトリウム水溶液に浸漬し、エックス線回折装置、フーリエ変換赤外分光光度計を用いて炭酸アパタイトへの組成変換を確認した。次に HAp を同様に一軸加圧成型し、焼結する温度を 600~1100 と変化させることで、表面性状を変化させ、CAp と表面粗さが同じディスクの作製を試みた。表面性状は SHIMADZU 社の Micromeritics Gemini 2375 を用いて比表面積を比較した。

#### (2) 2種類のディスク試料上で細胞培養、細胞増殖能の評価

続いて表面性状が同じディスクを用いて培養実験を行った。直径 15mm、厚み 1mm の CAp、HAp ディスク上で骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を 24 時間培養した後、細胞増殖能を評価した。

#### (3) ディスク試料上で培養した MC3T3-E1 細胞の遺伝子および miRNA 発現の網羅的検索

表面性状が同じ 2 種類のディスク上で骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を 24 時間培養した後、Trizol(Invitrogen)により total RNA を回収した。材質の違いによる MC3T3-E1 細胞の遺伝子および miRNA の発現変化をマイクロアレイ解析した。遺伝子発現変化の網羅的解析は total RNA を逆転写して cDNA を作製後、Agilent 社製 mouse cDNA マイクロアレイキットを用い、miRNA の発現変化の解析は Agilent 社製 mouse miRNA マイクロアレイキットを用いて解析した。

### 4. 研究成果

まず CAp ディスクを作製し、その表面性状と一致する HAp ディスクを作製する方法を探索した。炭酸カルシウム粉末を油圧プレス機で一軸加圧成型し、350 で焼結することで炭酸カルシウムディスクを作製した。作製したディスクをリン酸水素ナトリウム水溶液に浸漬することで、溶解析出反応を利用して炭酸アパタイトに組成変換させた。次に HAp を同様に一軸加圧成型し、焼結する温度を変化させることで、表面性状を変化させた。HAp ディスクを 800 で焼結することで CAp と表面粗さが同じディスクの作製に成功した (図 2)。

作製に成功した CAp ディスク、HAp ディスク上で細胞培養、細胞増殖能の評価を行った。ラット骨髄間葉系幹細胞(MC3T3-E1)をディスク上で 24 時間培養した結果、CAp ディスク上で有意な細胞増殖を認めた (図 3)。

次に組成のみが異なる CAp ディスク、HAp ディスク上で MC3T3-E1 を培養、遺伝子と micro RNA の発現変化をマイクロアレイにて解析することで、骨伝導能、骨再生能がどのような分子メカニズムに起因しているかを探索した。その結果、CAp は HAp と比較して、4 種類の miRNA の発現量を増加させた。特に、miR-26b-3p については、エストロゲンレセプターを介して骨芽細胞の分化を促進することが報告されていることから、CAp による骨芽細胞への分化促

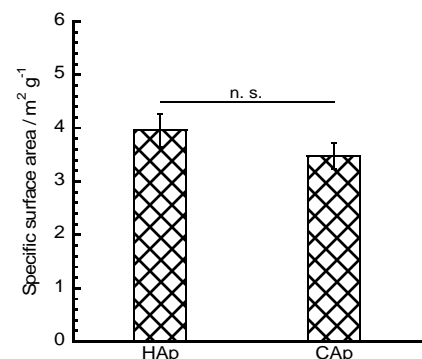


図 2) 作製した HAp ディスクと CAp ディスクの比表面積を測定

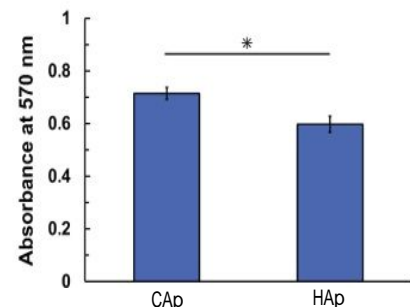


図 3) 細胞を播種したカーボネイトアパタイトとハイドロキシアパタイトを MTT Assay にて評価

進作用があることが示唆された（表1）。

以上より、分子メカニズムの検索により、炭酸アパタイトの圧倒的な骨伝導性の機序には、数種類の miRNA が関与して細胞増殖と細胞分化を促進することが明らかになった。今後、これらの miRNA の機能解析を行う予定である。

カーボネイトアパタイト vs ハイドロキシアパタイト	
8倍以上UpのmiRNA	PubMed
miR-7078-5p	none
miR-7050-3p	none
miR-26b-3p	<ul style="list-style-type: none"><li>• MiR-26b-3p <a href="#">regulates osteoblast differentiation via targeting estrogen receptor <math>\alpha</math></a></li><li>• miR-26b-3p regulates human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell proliferation by targeting estrogen receptor</li></ul>
miR-7085-3p	none

表1) マイクロアレイの結果、カーボネイトアパタイトは骨芽細胞の分化を促進させる miR-26b-3p の発現量が増加することが分かった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukuda Naoyuki, Kudoh Keiko, Akita Kazuya, Takamaru Natsumi, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 20
2. 論文標題 Comparison of bioresorbable bone substitutes, carbonate apatite and tricalcium phosphate, for alveolar bone augmentation with simultaneous implant placement	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 221 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1170	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 Kudoh Keiko, Fukuda Naoyuki, Akita Kazuya, Kudoh Takaharu, Takamaru Natsumi, Kurio Naito, Hayashi Koichiro, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 34
2. 論文標題 Reconstruction of rabbit mandibular bone defects using carbonate apatite honeycomb blocks with an interconnected porous structure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Materials Science: Materials in Medicine	6. 最初と最後の頁 2-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10856-022-06710-2	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 Fujioka Kobayashi Masako, Miyamoto Youji, Ishikawa Kunio, Satomi Takafumi, Schaller Benoit	4. 巻 110
2. 論文標題 Osteoclast behaviors on the surface of deproteinized bovine bone mineral and carbonate apatite substitutes in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1524-1532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.37392	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 宮本洋二, 福田直志, 工藤景子	4. 巻 35
2. 論文標題 口腔領域における骨補填材としての炭酸アパタイトの現状と今後の展開	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本口腔インプラント学会誌	6. 最初と最後の頁 268-275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 宮本洋二, 福田直志, 秋田和也, 工藤景子, 栗尾奈愛	4. 巻 20
2. 論文標題 骨補填材としての炭酸アパタイトの現状と今後の展開	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本顎顔面インプラント学会誌	6. 最初と最後の頁 88-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Ogino Yoichiro, Ayukawa Yasunori, Tachikawa Noriko, Shimogishi Masahiro, Miyamoto Youji, Kudoh Keiko, Fukuda Naoyuki, Ishikawa Kunio, Koyano Kiyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Staged Sinus Floor Elevation Using Novel Low-Crystalline Carbonate Apatite Granules: Prospective Results after 3-Year Functional Loading	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5760 ~ 5760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14195760	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 Fukuda Naoyuki, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 48
2. 論文標題 Alveolar ridge preservation in beagle dogs using carbonate apatite bone substitute	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ceramics International	6. 最初と最後の頁 1796 ~ 1804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceramint.2021.09.260	査読の有無 無
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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋田 和也, 福田 直志, 高丸 菜都美, 工藤 景子, 工藤 隆治, 栗尾 奈愛, 宮本 洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイト製骨補填材の炭酸基量を変えることによる吸収性と骨新生のコントロール
3. 学会等名 第68回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田 直志, 秋田 和也, 高丸 菜都美, 工藤 景子, 宮本 洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイトハニカムブロックによる新規骨再建・骨造成法の開発
3. 学会等名 第53回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋田 和也, 福田 直志, 高丸 菜都美, 工藤 景子, 宮本 洋二
2. 発表標題 炭酸含有量が多孔質炭酸アパタイト顆粒の骨置換性に及ぼす影響
3. 学会等名 第26回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田 直志, 秋田 和也, 高丸 菜都美, 工藤 景子, 宮本 洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイトハニカムブロックによる新規骨造成法の開発
3. 学会等名 第52回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本 洋二
2. 発表標題 新しく開発された生体材料による骨再生研究の最前線
3. 学会等名 第21回再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋田和也, 福田直志, 棕本修平, 鎌田久美子, 高丸菜都美, 工藤景子, 栗尾奈愛, 宮本洋二
2. 発表標題 マイクロファイバーを用いた多孔質炭酸アパタイトの開発とウサギ頭蓋骨における組織学的評価
3. 学会等名 第75回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田直志, 高丸菜都美, 秋田和也, 棕本修平, 工藤景子, 宮本洋二
2. 発表標題 嚢胞摘出後の骨欠損を炭酸アパタイト製骨補填材で即時再建した1例
3. 学会等名 第66回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤景子, 福田直志, 秋田和也, 工藤隆治, 棕本修平, 高丸菜都美, 栗尾奈愛, 鎌田久美子, 宮本洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイト顆粒と魚うろこコラーゲンの複合化による新規骨補填材の開発
3. 学会等名 第66回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田直志, 秋田和也, 高丸菜都美, 工藤景子, 宮本洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイトハニカムブロックを用いたベニアグラフトの実験的検討
3. 学会等名 第25回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 福田直志, 秋田和也, 棕本修平, 高丸菜都美, 工藤景子, 宮本洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイト製骨補填材による広範囲骨欠損の即時再建
3. 学会等名 第51回 公益財団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋田和也, 福田直志, 棕本修平, 高丸菜都美, 工藤景子, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二
2. 発表標題 炭酸含有量の異なる多孔質炭酸アパタイト顆粒の開発
3. 学会等名 第51回 公益財団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	福田 直志  (FUKUDA Naoyuki)  (10804156)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教   (16101)	
研究分担者	工藤 景子  (KUDOH Keiko)  (70380029)	徳島大学・病院・講師   (16101)	
研究分担者	秋田 和也  (AKITA Kazuya)  (70876028)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教   (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	栗尾 奈愛  (KURIO Naito)  (80622141)	徳島大学・病院・講師    (16101)	

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