

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500538

研究課題名(和文)破骨前駆細胞活性化機構解析による生体吸収制御可能な医療用セラミックの開発

研究課題名(英文)Development of absorption controllable bioceramic by analyzing activation mechanism of osteoclast precursor cells

研究代表者

張 曄 (ZHANG, Ye)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：70436179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、異なる性質をもつ2種のハイドロキシアパタイト、水熱ハイドロキシアパタイト(hydrothermally synthesized hydroxyapatite; HHA)および従来の焼結ハイドロキシアパタイト(stoichiometric hydroxyapatite; SHA)を利用した。これら2種のハイドロキシアパタイトを比較することで破骨細胞の骨吸収活性をより亢進させるメカニズムを明らかにし、吸収制御が可能な新しい医療用セラミック開発のための基礎技術を獲得することができた。

研究成果の概要(英文)：Two kinds of hydroxyapatites with different properties, hydrothermally synthesized hydroxyapatite (HHA) and stoichiometric hydroxyapatite (SHA) were used in this study. The basic technology for developing a new absorption controllable bioceramic could be obtained by revealing activation mechanism of osteoclast precursor cells comparing these two kinds of hydroxyapatites with different properties.

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 再生医工学材料

1. 研究開始当初の背景

骨組織は置換による修復機能を持つ。このため、埋入された吸収性の生体材料は、自然に置換され、除去手術がいらないという利点を持つ。临床上、人工セラミックスがよく使われるのは、ハイドロキシアパタイト (HA) と β -リン酸三カルシウム (β -TCP) である。TCP、オクタカルシウム (OCP) 等の研究は多く行われている。その理由は局所の原材料として置換により自身が HA となるためである。しかし、力学的性質が劣るため、初期段階では固定装置を取り除けない。このため固定が長期に及び、リハビリテーションによる回復に影響する。HA は天然骨の構成要素であるが、人工合成 HA は置換されにくい。

Goto らによると、生体内において焼結ハイドロキシアパタイト (SHA) の分解が観察された (2001 年)。しかし、その他多くの研究では、従来法である焼結法で合成された SHA は、置換吸収されにくいとされている。従来の SHA は、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で、六角結晶、 $a = 0.943 \text{ nm}$ 、 $c = 0.688 \text{ nm}$ 、space group、P63/m という性質をもつ。しかし、骨中の HA の Ca/P 比は 1.67 より小さく、カルシウム欠損 HA であるということが既に判明されている。そのため、近年カルシウム欠損 HA ($\text{Ca}_{10-n}(\text{HPO}_4)_n(\text{PO}_4)_{6-n}(\text{OH})_{2-n}$, $0 < n < 2$) の合成が注目されている。

水熱法は反応が遅いが、条件を制御でき、独特の材料を合成できる。HA の合成法の一つとして最近よく使われている。最近、申請者らは、この合成法で新しい生体吸収性 HA を開発した。この水熱ハイドロキシアパタイト (HHA) を利用し、動物モデルでこれが完全に置換吸収されることを初めて発表した (2008 年)。この HHA は以下の独特な利点を持つ。

- (1) 置換吸収反応を伴い、骨伝導 (osteconduction) 再生能力が強化され、頭蓋骨の直径 8mm の臨界性骨欠損 (critical bone defect) でも骨修復を導くことが可能である (金高ら、2010 年)。
- (2) HHA 顆粒は球状の構造と多孔性の特性を持ち、薬物の担体としての機能を保有し、サイトカインとタンパク分子を吸収して薬物をデリバリーすることができる。また、その徐放作用により骨誘導能を発揮し、これにより骨修復能がさらに強化される。以上の特長により、吸収性 HHA は、臨床上の将来性が期待される。

Okuda らは更に、動物実験モデル (72 週、ウサギ大腿骨) において、生体吸収性能が、表面の性状は長い c -axis 六角結晶で構成する球形である、材料表面の陽性電荷が大量に存在し、酸性タンパクが (pH 7.2) 吸着し易い、Ca/P 比が従来 (1.67) と異なる、という 3 点の性質と関係があることを示した。しかしながら、吸収性 HHA の具体的な生体吸収機構は未だに不明であり、その解明が急がれていた。

2. 研究の目的

申請者らの検討によると、生体の HA の修復過程においては、大量の破骨細胞が局所的に形成される。また、Gonda らの実験によると HHA は破骨細胞に認識される性質を持つ。生体外実験によると、マクロファージの RANKL 処理により、HHA または SHA ディスク上でこれの破骨細胞分化を誘導すると、HHA 上の破骨細胞の方が、SHA 上の破骨細胞より、骨吸収能が高い。しかしながら、その分子的メカニズムは全く不明であった。

そこで本研究では、様々な Ca/P 比やアスペクト比の HHA を作製し、いかなる HHA が破骨細胞に作用し、SHA よりも高い骨吸収能を示すのかを検討することを目的とする。

Yokozeki らの研究によると、材料の微細構造と性質はセラミックスの生体内反応に直接影響する。材料の微細構造は骨芽細胞の生物活性に影響する。本研究では、水熱法で Ca/P 比やアスペクト比が異なる性質を持つカルシウム欠損 HHA を作製し、SHA をコントロールとし、SHA と HHA のそれぞれの HA ディスク上に破骨前駆細胞をまき、組換え精製 RANKL 処理で破骨細胞の分化誘導を行い、両条件における骨吸収活性の差がいかなるメカニズムにおいて生ずるのか、主に分子生物学的手法により解析する。

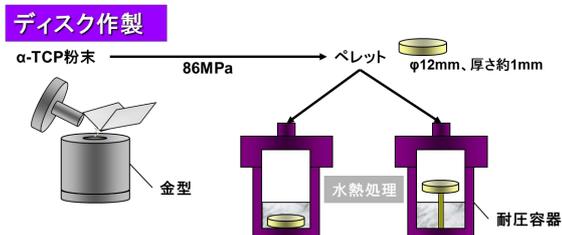
3. 研究の方法

(1) 材料の作製

Ca/P 比やアスペクト比が異なる吸収性 (カルシウム欠損) HHA および SHA を作製し、作製した HA ディスクの評価を行った。

ディスク作製

Ca/P 比やアスペクト比が異なる吸収性 HHA ディスクの作製を行った。吸収性を付与するために、 α -TCP 粉末を金型に入れ成形し、水熱処理により Ca 欠損の HA ディスクを作製した (下図)。この際、処理水の pH (4 ~ 11)、処理温度 (105 ~ 200 度) を変化させることで、Ca/P 比とアスペクト比が異なる HHA ディスクの作製が可能となる。なお、SHA は HA 粉末を焼結法にて作製した。



作製した HA ディスクの評価

作製した HA ディスクは、SEM-EDX で Ca/P 比を測定、X 線回折 (XRD) とフーリエ変換型赤外分光 (FT-IR) で表面構造とアスペクト比を測定し、さらに HHA (Ca/P 比が 1.53 と 1.58) および SHA ディスクを CO_2 インキュベータ内で培養液に浸漬した後、イオン溶出の評価を行った。

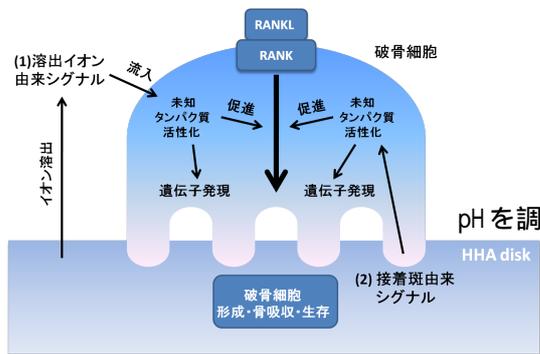
(2)破骨細胞への影響評価

細胞増殖・細胞分化・骨吸収能の評価

吸収性 HHA および SHA ディスクを利用し、各ディスク上培養による破骨細胞への影響を評価した。具体的には、細胞増殖・細胞分化・骨吸収能の評価、および破骨細胞分化に関連する遺伝子発現の解析を行うために、破骨細胞前駆細胞株(RAW 細胞)を HHA 材料または SHA 材料上に破骨前駆細胞をまき、破骨細胞分化を誘導し評価を行った。

HHA 上破骨細胞分化に関連する遺伝子解析

HHA 材料上培養による mRNA レベルの変化を網羅的に解析した。この際 SHA 材料上培養時の mRNA レベルの変化を比較対象におく。特に RANK リガンド下流シグナル経路に関連する因子に注目した。



特徴タンパク質分子の解析

SHA 上の RAW 細胞培養を比較対照としながら、HHA 材料上培養に特徴的なタンパク質分子を電気泳動法により網羅的に抽出し、質量分析によりそのタンパク質分子の解析を行った。

(3) 破骨細胞活性の亢進を促すシグナル伝達経路の解析

HHA により活性化され破骨細胞活性の亢進を促すシグナル伝達経路を解析した。遺伝子発現量の網羅的解析と、活性化されたタンパク質の網羅的発現解析により同定された結果をもとに、HHA 上での破骨細胞の培養により活性化され、破骨細胞内 RANKL シグナルを促進し、骨吸収を促進すると考えられるシグナル伝達経路を抽出する。加えて、シグナル伝達経路と溶出イオンや細胞接着との関係を検討した。

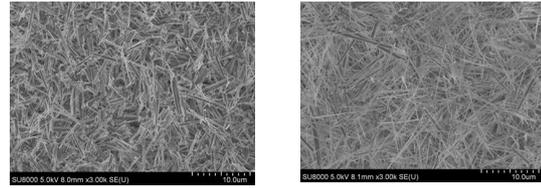
4. 研究成果

(1) 材料の作製

Ca/P 比やアスペクト比が異なる 2 種の吸収性(カルシウム欠損)HHA および SHA を作製し、作製した HA ディスクの評価を行った。

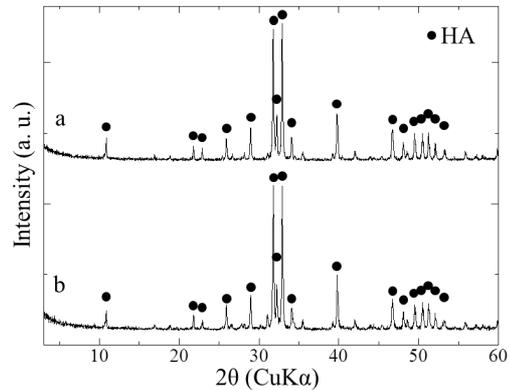
	Porosity (%)	Rod width (μm)	Rod length (μm)	Aspect ratio	Ca / P	Surface area (m ² / g)
SRHA	74	0.59 ± 0.23	5.5 ± 2.0	11 ± 6.4	1.58	2.600
LRHA	74	0.29 ± 0.09	11.3 ± 2.2	42 ± 11	1.53	3.565

短い針状結晶を持つ吸収性 HHA を SRHA (short rod-shaped HA) とし、長い針状結晶を持つ吸収性 HHA を LRHA (long rod-shaped HA) とした。また、FT-IR 解析の結果、どちらも HA 単体であることを確認した。



SRHA(a)

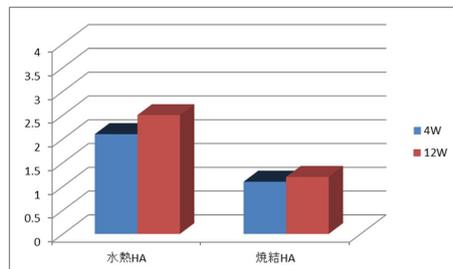
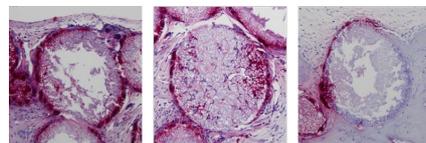
LRHA(b)



(2)破骨細胞への影響評価

吸収性 HHA および SHA ディスクを利用し、各ディスク上培養による破骨細胞への影響を評価した。評価に先立ち、HA 顆粒埋入による破骨細胞の誘導について、水熱 HA(HHA) と焼結 HA (SHA) との比較を行った。

このように、細胞増殖・細胞分化・骨吸収能の評価、および破骨細胞分化に関連する遺伝子発現の解析を行ったところ、生体吸収性を持つ HHA で破骨細胞活性の上昇が確認された。さらに、SHA 上の RAW 細胞培養を比較対照としながら、HHA 材料上培養に特徴的なタンパク質分子を電気泳動法により網羅的に抽出し、質量分析によりそのタンパク質分子の解析を行った。



(3) 破骨細胞活性の亢進を促すシグナル伝達経路の解析

HHA により活性化され破骨細胞活性の亢進を促すシグナル伝達経路を解析した。これまでの実験結果をもとに、HHA 上での破骨細胞の培養により活性化され、破骨細胞内 RANKL シグナルを促進し、骨吸収を促進すると考えられるシグナル伝達経路を抽出した。加えて、シグナル伝達経路と溶出イオンや細胞接着との関係について検討した。

これにより、破骨前駆細胞活性化機構解析による生体吸収制御可能な医療用セラミックの開発における重要な知見を得ることができた。

本研究では、異なる性質をもつ2種のハイドロキシアパタイトとして、水熱ハイドロキシアパタイト(HHA)および従来の焼結ハイドロキシアパタイト(SHA)を利用した。これら2種のハイドロキシアパタイトを比較することで破骨細胞の骨吸収活性をより亢進させるメカニズムを明らかにし、吸収制御が可能な新しい医療用セラミック開発のための基礎技術を獲得することができた。

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1件)

Zhang Y, Kanetaka H, Sano Y, Kano M, Kudo T, Sato T, Shimizu Y,

Pressure controlled clamp using shape memory alloy for minimal vessel invasion in blood flow occlusion.

Ann Thorac Cardiovasc Surg 19: 35-42, 2013

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.09.030

(査読有)

[学会発表](計3件)

佐野有哉, 金高弘恭, 清水良央, 工藤忠明,
上高原理暢, 井奥洪二, 佐々木啓一

吸収性ハイドロキシアパタイトの三次元
ブロック構築へ向けた医工学的検討

第22回日本歯科医学会総会, 2012.11.09-11,
大阪

清水良央, 佐野有哉, 石橋卓大, 工藤忠明,
金高弘恭, 井奥洪二, 市川博之, 熊本裕行
焼結および水熱処理を施したハイドロキ
シアパタイトの生体内分解特性に関する
形態計測学的研究

第33回日本バイオマテリアル学会,
2011.11.21-22, 京都

金高弘恭, 佐野有哉, 井奥洪二, 張 曄,
工藤忠明, 清水良央, 佐々木啓一

水熱合成法によるハイドロキシアパタイト
顆粒の骨伝導能および生体吸収性評価
粉体粉末冶金協会平成 23 年度秋季大会,
2011.10.26-28, 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

張 曄 (ZHANG, Ye)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常
勤講師

研究者番号：70436179

(2)研究分担者

井奥 洪二 (IOKU, Koji)

慶應義塾大学・経済学部・教授

研究者番号：60212726

工藤 忠明 (KUDO, Tada-aki)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50431606

清水 良央 (SHIMIZU, Yoshinaka)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30302152

金高 弘恭 (KANETAKA, Hiroyasu)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：50292222