

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700528

研究課題名(和文) 骨 人工材料もしくは骨 骨間インターフェース改善に関する新技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of new technologies related to environmental improvement of bone interface between the inorganic material or bone tissue

研究代表者

松田 純平 (Matsuda, Junpei)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・研究員

研究者番号：00535271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では海綿骨欠損による間隙を効率的に補填し接触領域を確保すること、さらに早期osteointegrationを獲得することを可能にするためのバブル様スキャフォールドの開発を行い、再生組織培養における新たな選択肢を提示することを目的とした。この組織と機械的刺激伝導性は一般的な三次元培養組織に比べて高いことが示された。骨梁様組織の形態的特徴は気泡径に依存し、形成される骨梁の複雑性はバブルサイズに依存することが明らかとなった。機械的刺激に対する応答は、0.5%の剪断刺激に対して骨梁構造は維持され、骨梁様組織および構成細胞が伸展しひずみを伝達している特徴を有した。

研究成果の概要(英文)：In order to improve the bone inductivity of bone and implant, we developed free-shaped bubble like scaffold. In this study, it was possible to evaluate the performance and establishment of a new scaffold technology to create and present new options in the regenerated tissue culture. As a result of evaluating the relationship between the mechanical stimulation conductive, new scaffold showed mechanical response higher than general. Morphological features of trabecular bone-like tissue was dependent on the bubble diameter. For response to mechanical stress of a new scaffold, trabecular structure was maintained for shear stimulus of 0.5%. In addition, it was confirmed that the trabecular bone-like tissue is transmitting mechanical stress.

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：バイオエンジニアリング 骨 インプラント 医用生体工学 再生医療 オステオインテグレーション

1. 研究開始当初の背景

骨は身体の運動や支持機能を担うことから、疾患や骨折を引き起こすと、生活の質(QOL: Quality of Life)は著しく低下する。特に高齢者は、骨粗鬆症をはじめとする重度な骨疾患を抱えることが多く、一度の骨折が障害寝たきりを誘起するケースは少なくない。このような状況を改善するための早期離症につながる技術として、最小侵襲手術(MIS: Minimally Invasive Surgery)や生体組織の温存技術、再生医療技術の発展が求められている。

近年では幹細胞を用いた歯周組織や軟骨組織の修繕技術が臨床で成果を上げており、培養組織を用いた補填技術を基とした治療が手技として確立されつつある。一方、骨組織の欠損や人工関節置換における骨形成誘導(Osteointegration)に関する技術は、人工的に形成されたポーラス状の無機質もしくは金属材料を適用する方法が適用されて一定の成果を上げているものの、複雑な骨組織の空間形状に沿った接触領域を確保することはできない。人工関節の初期段階での固定性は、関節脱臼、二次的骨折、ルースニングの原因となり、最悪の場合、再置換を強いられるケースもある。このように、骨-人骨物もしくは骨-骨間のインターフェースは、術後の臨床成績において極めて重要な要因である。

2. 研究の目的

近年、高い Osseointegration を獲得する技術への関心が高まっており、人工関節などのインプラント材として骨親和性の高いチタン合金を用いたものや、骨組織との接触面に対して微細構造(Grossner SB et al., 1992, Sascha E et al., 2007 など)を施して骨形成を促したものが積極的に研究・開発され、骨との接触面で効果的に作用している。しかしながら、欠損した骨組織を補填する際、骨組織との空間を最適化して接触領域の改善を図るものではなく、生体親和性を向上させるためには、骨組織と人工材料との接触を確保するための再生医療的アプローチによる手技の開発を目指した。

本研究では、バブル様スキャフォールドの気泡強度改善および気泡径コントロール技術を確立し、機械的刺激や組織培養方法について実験的な検討から期待される用途の選択肢を提示する。

3. 研究の方法

複雑な空間を補填するための方法として、本研究では基材として臨床で使用されているコラーゲンを用い、マイクロオーダーの気泡を機械的剪断によって形成させて培養する方法および技術を検討した。コラーゲンは TypeI コラーゲンマトリクス(新田ゼラチン)を用いてスキャフォールドの特徴について検討し、臨床における本技術の利用を円滑に進めるため臨床で用いられているアテロコ

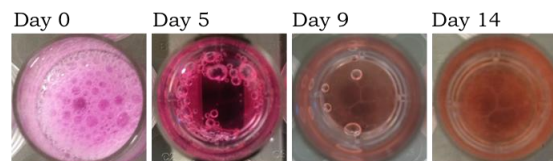


図1 気泡形成から骨梁様組織担体形成までの基本的な過程

ラーゲルを用いた場合の組織形成骨性についても検討を行った。生成したスキャフォールドに骨芽細胞樹立株 MC3T3-E1 細胞を播種し、形成される組織担体の担体形成までの代表的な過程を図1に示す。基本的なバブル様スキャフォールドの生成メカニズムは、基材への気体流入による気泡の生成および、その後の基材表面層部での気泡破碎行程の2行程が均質かつ微細な気泡生成のポイントである(図2)

気泡形成はコラーゲンのゲル化までに氷上でアイシングしながら行い、37℃で20分間静置することで作成した。

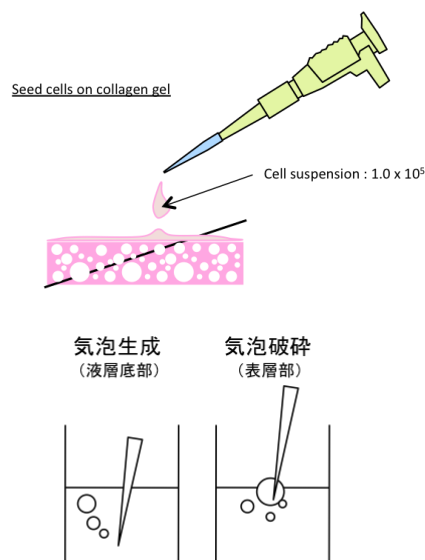


図2 気泡形成の基本メカニズム

バブル様スキャフォールドの気泡コントロールに関しては、生成された気泡の安定化および微細化を図るため、スクロース、カルボキシメチルセルロース、キトサンを其々添加し、組織担体の形成に与える影響を含めて検討した。さらに、骨補填材として用いられるβ-TCPもしくはハイドロキシアパタイトとの併用培養についても実験的検討を行った。骨芽細胞の播種密度を50cells/mm²添加量を0%、10%、20%に設定し、骨芽細胞の形態および死細胞について評価した結果、培地への添加では0%に対し、10%では細胞突起の収縮および球状の形態を示し、20%では生存細胞数が有意に減少した。一方、基質に添加した場合、添加量に応じて細胞のサイズおよび細胞間ネットワークの連結性が亢進された。基質への添加によって、気泡形成能や微細化に有効であった。微細化に関しては、気泡破碎行程によるコントロールが可能であった。

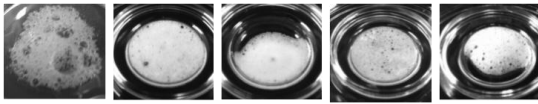


図3 バブル様スキャフォールドの微細化コントロール

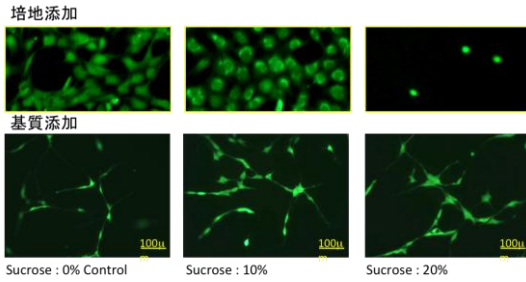


図4 多糖類添加方法と細胞形態

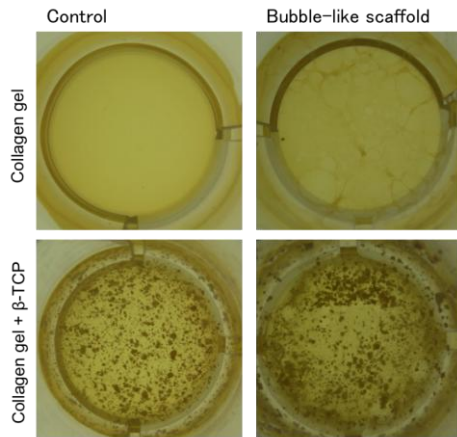


図5 骨補填材(β-TCP)の添加(1wk培養)

次に、*in vitro* 三次元細胞培養を行い、バブル様不定形スキャフォールドの特性および使用条件について検討した。スキャフォールドに播種した骨芽細胞(樹立株: MC3T3-E1)の生存、分布について評価を行った。上述の方法で作成したスキャフォールドを培養用ディッシュ上に成形し、予め準備しておいたMC3T3-E1細胞を 1×10^6 cells の密度で播種した。CO₂ インキュベーター(5%CO₂, 37°C)内で2時間静置して、コラーゲンを固化させた後、培地(10%FBSを含むα-MEM)を添加して2週間培養を行った。なお、培養液には、骨形成因子(β-glycerophosphate (2µL), ascorbic acid (50µg/mL), dexamethasone (10⁻⁸M))を添加した。培養した組織担体の特性を確認するため、形態、生存、増骨指標であるアルカリフォス

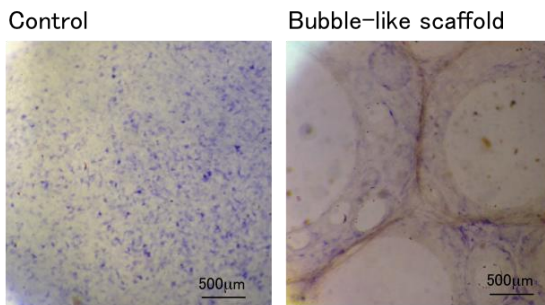


図6 バブル様スキャフォールド上で培養された骨芽細胞のALP染色像

ファターゼ活性(ALP)について評価を行った。細胞の生存率や細胞の形態には差異は無かった。スキャフォールド上で培養された細胞の分布について、密度を含めて差異はなかった。ALPの発現に関しては、特徴的な担体の骨梁様形状に沿ってALPの発現は顕著であり、骨梁様の表層部に遊走した骨芽細胞のALP発現も認められた。



図7 顕微鏡設置型リアルタイム観察機械的剪断負荷装置

骨組織は、モデリング・リモデリング機構を有し、応力分布や荷重方向に対して高効率構造を形成する。本スキャフォールドにより形成された組織担体の海綿骨様構造においても、ひずみの伝達による細胞の影響について確認を行った。本研究では骨梁様の特徴的形態を有する担体のひずみに対する応答を局部的に観察するため、顕微鏡下で機械的剪断を負荷することのできる装置を開発した(図7)。本装置はアクチュエータによって定量的に負荷することが可能であり、試料設置部はCO₂ インキュベータ内に静置可能である。監察部は2枚のガラス板で構成されており、ガラス板の間に担体を設置する仕様である。2週間培養した後、顕微鏡下で刺激しカルシウム応答を観察した。骨梁様の組織は剪断の程度に応じて連続的に変形し、細胞を含めた刺激伝達が行われていることが確認された(図8)。機械的特性の違いから担体の変形は、骨組織

に見られる応力伝達というよりは伸展による追従によって刺激が伝播していると思われる。

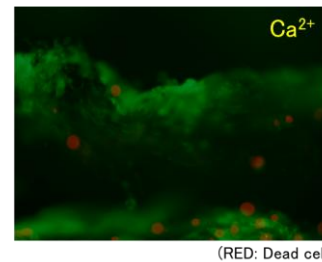


図8 機械的剪断刺激時のカルシウム応答

再生医療分野において、大きな組織を形成する手法としてスフェロイドなどの細胞凝塊培養法やハイドロキシアパタイトなどの整形されたポーラス状の構造体に細胞を培養して組織を作成する方法、組織構造と同様の細胞分布や配置をマイクロピペット等で作成する三次元プリンティング技術などが検討されている。しかしながら、大きな組織は栄養などの不足により内部壊死が引き起こされる問題がある。本研究で開発されたスキャフォールドは海面骨様の空間を有するた

め内部まで栄養や酸素を供給できた。担体作成方法および培養条件は上記方法と同様である。細胞播種から24時間後、培養容器壁面から機械的に担体を切断し、培地内に浮遊させて培養を行った。14日後、内部壊死と思われる細胞死は確認されなかった。内部の空隙はスポンジ状であり基質を通じて連続的であるため液層の交換が可能であった。従来の高密度培養とは異なる特性を有する新たな担体作成技術として組織再生の選択肢を示した結果である。



図9 バブルサイズおよび形成量によってコントロールされる組織担体(14日培養)

担体の生体への埋植方法を確立するため、wister rat 大腿骨遠位外側に対してハンドドリルを用いてφ1mmの穴を開け、シリンダ状に整形した担体を埋植した。シリンダ状の担体の成形方法は、必要な担体形状が加工された金属製の型を加工し、細胞毒性の低いシリコンエラストマー(ダウ・コーニング社)を用いてシリンダ状の整形チャンバーを作成した。所見では感染や過剰な炎症反応、形態的異常は認められず、海綿骨の形態的異常も認められなかった。実験対象が小さいため、スキヤフォールドの埋植が困難であり本担体の効果を比較確認するためにはある程度大きな埋植空間を確保する必要がある。組織学的評価を含めて大型の動物について検討しているところであるが、本担体を持つリスク評価に対する方法としては本方法によっても確認できると思われた。

4. 研究成果

本研究では、新しい担体作成技術の確立および特性評価を行い、再生組織培養における新たな選択肢を提示することができた。スキヤフォールドを生成においては、滅菌されたエアを物理的に剪断する簡易的な装置の開発を含めた作成方法を検討し、担体作成における条件を確認した。さらに、骨芽細胞樹立株MC3T3-E1細胞と共に2週間培養し、海綿骨様組織を作成した。この組織と機械的刺激伝導性との関係について評価したところ、タイプIコラーゲン基質による一般的な3次元培養組織に比べて高い力学応答性を示した。バブル径と骨梁様スキヤフォールドの形態的特徴との関係についてはin vitroで形成された骨梁様組織の形態的特徴はバブル径に依存し、形成される骨梁の複雑性や緻密性、骨梁方向はバブルサイズに依存することを確認した。骨梁様組織のメカニカルストレスに対する応答について検討を行うため、作成

したスキヤフォールドに対して顕微鏡下で剪断刺激を負荷することができるシステムを新たに開発し、スキヤフォールドの剪断による形態的变化および組織を構成する骨芽細胞の応答をリアルタイムに評価し、0.5%程度の剪断刺激に対して骨梁構造は維持され、さらに、骨梁様組織および構成細胞がメカニカルストレスを伝達していることを確認した。また、バブルを構成する成分としては、多糖類を濃度別に添加したところ、添加しない群に比べ、気泡生成効率、強度、バブル径の微細化において改善された。さらに、以下に本スキヤフォールドの有益な点を上げる。

- その場で採取した骨組織や骨髄を、その場でバブル様スキヤフォールドとして使用することができる。
- これまでの骨補填材は、購入してそれを適当なブロックサイズやペースト材料として使用してきた。しかしながら、自家の生体由来活性因子を豊富に含む自家材料をその場で高鮮度のまま使用できる点で有利である。
- 従来の補填材(無機+形態制限有)と比較し、自家有機材料を含む本システムは、補填の無い自然修復と補填材料に頼るイレギュラーな修復との中間的治療手段として、高い生体活性を維持しながら、補填すべき空隙を十分フォローすることのできるシステムを提供することができる。

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2件)

1. 松田純平, 遠藤直人, 全身振動刺激(Whole-Body Vibration)がマウスの不動性骨組織に与える影響, Osteoporosis Japan, Vol. 21(2), 344-351, 2013, 査読有
2. 松田純平, 骨構造からみた廃用性骨粗鬆症に対する全身振動刺激の影響, Bio Clinica, 28(10), 972-975, 2013, 査読有

[学会発表](計3件)

1. 松田純平, 遠藤直人, 関節安定性不全膝に対する副甲状腺ホルモン投与が股関節の骨形態に及ぼす影響, 第39回日本股関節学会学術集会, 2012年12月(新潟)
2. 松田純平, 遠藤直人, 全身振動刺激(Whole-Body Vibration)がマウスの不動性骨組織に与える影響, 第14回日本骨粗鬆症学会, 2012年9月(新潟)
3. 松田純平, 原利昭, 遠藤直人, 変形性関節症による軟骨下骨および軟骨下骨フレートの形態的影響, 第23回運動器リハビリテーション学会, 2011年7月(新潟)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

※ 出願準備中

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〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 純平 (MATUDA JUNPEI)

新潟大学

医歯（薬）学総合研究科・研究員

研究者番号：00535271

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：