

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2013

課題番号：25893236

研究課題名(和文)分極ハイドロキシアパタイトが破骨・骨芽細胞へ及ぼす影響の分子細胞レベルでの解明

研究課題名(英文)Clarification of the mechanism for acceleration of new bone formation by an electrically polarized hydroxyapatite from the molecular biological point of view

研究代表者

大庭 聖子(Ohba, Seiko)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：60710118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円、(間接経費) 330,000円

研究成果の概要(和文)：分極HA表面での骨芽細胞の挙動を分子細胞生物学的に解明することで、分極HAの骨への影響、分極HAの骨形成に関わる遺伝子の同定をマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子解析を行った。検体間の発現差を見て、発現の高い遺伝子を絞っていくことが今後の課題である。マイクロアレイによって網羅的に発現の高い遺伝子を絞り、それらを標的としてリアルタイムPCRやウェスタンブロットを行い、分極HAにおいて骨形成に関わる遺伝子を同定していきたい。

研究成果の概要(英文)：By clarifying the osteoblastic cell behavior on polarized HA from the molecular biological point of view, we analyzed the effect on the bone of polarized HA and identification of gene concerning bone formation of polarized were done by microarray. As a result of microarray, there was a difference between same sample, we analyzed the differences between samples in n=1 in Excel and compiled the data. Our future challenges are to use software for microarray, pick up and remove the genes that show big difference between n=2 in the same sample, and analyze the expression level between samples again to narrow down the high expression genes. We'd like to narrow down high expression genes by microarray comprehensively, analyze them by realtime PCR and westernblot, and clarify the genes relate to bone formation on the surface of electrically-polarized HA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：分極 ハイドロキシアパタイト 骨芽細胞 破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えたわが国では、8020 運動(80 歳で 20 歯以上保ち、生涯に渡って健全な咀嚼能力を維持しようという運動)が推進されている一方、50 歳以上では平均して 2 年に 1 本強の歯を喪失しており、80 歳以上の一人平均現在歯数は 4.6 本となっている。このため、インプラント(人工歯根)による欠損補綴治療の需要がますます高まっているが、顎骨に人工歯根を埋める治療を行うためには元々の顎骨の量がある程度必要であり、顎骨吸収の著しい患者は今まで十分な治療を受けることができなかった。また、先天異常の一つである口唇口蓋裂の顎裂部への治療は小児期における腸骨から顎骨への骨移植が主流であり、このような広範囲に渡る手術は小児にとって非常に負担が大きい。また、整形外科で、椎間板症などで異常な動きによって生じる痛みを軽減するために行われる脊椎固定では脊椎の側方へ骨移植が行われる。この際、椎弓切除術の時に取り除いた棘突起や椎弓の自家骨(自分の骨)が再利用されるが、骨が不足する時には切開部下方から届く骨盤から採取したり、人工骨を使用しなくてはならない。こうしたインプラントや顎裂部の大きな骨欠損や脊椎固定に対して、一般的には自家骨移植(自分の体の中の別の部分から採取した骨を移植すること)を中心に治療が進められているが、そもそもの自家骨の採取量に限界があること、採取手術自体の負担が大きいこと、また、せっかく移植した骨が吸収されてしまうこと等の数々の問題があり、現在、様々な骨補填材が開発され、自家骨とともに用いられている。リン酸カルシウム化合物は生体親和性、イオン交換性、吸着性、触媒機能性などを有する多機能性バイオセラミックスであり、その中でも特に HA は骨の無機成分と同様の構造であるため、優れた生体親和性と骨伝導性を持ち、骨代替材料として最も広く臨床応用されているが、HA だけでは不十分で、自家骨と混和して使用する必要があることが欠点である。そのため、自家骨を混和せず、HA のみで十分な骨再生を促し、巨大欠損部の補填を可能とすることが、臨床的に強く望まれている。

セラミックスを帯電した正負極板の間に置くと、分子内の陽イオンは電場の向きに、陰イオンは逆向きに移動し、セラミックス表面には電荷が現れ、この状態で外部電界を取り去ると、イオン分極ではそのままの状態が保存され、分極された固体表面にはエネルギーが蓄積される。

この分極処理により HA に蓄積された大きな表面電荷は、細胞や微生物を活性化させる効果があることを申請者らは発見した(Chem Mater 1996)。さらにこれまでの研究により、骨芽細胞が負に帯電した面(N 面)で活性化され、蓄積された表面電荷は骨原性細胞を活

性化し、初期の骨形成を促進させることを明らかにした(Biomaterials2006)。

また、分極により HA 表面の濡れ性が増し、各種のイオンやタンパクを吸着し、骨原性細胞の接着性に影響を与えることも明らかにした(J Ceram Soc of Jpn 2010)。このように、電気分極を行うことで、帯電した HA 粒子は各種のイオンやタンパクを吸着することができるため、移植した HA 自身が生体内で分泌されたサイトカインや細胞接着因子を吸着できると考えられる。HA の電気分極により、HA はこれまでのような単なる担体ではなく、周囲の細胞が移植部位へ侵入するための足場となり、栄養因子を供給すると同時に残存する自己細胞を活性化する組織再生促進型マトリックスとして機能することが期待できる。

申請者らはこれまで、HA 微粒子の電気分極処理とその評価法の確立、HA 微粒子の分極処理が骨再生促進効果を持つことを明らかにしてきた(Actabiomaterialia 2012)が、分極による HA 表面の破骨細胞・骨芽細胞の接着性に与える影響や骨形成促進効果の分子細胞レベルでの機構は未だ明らかとされていない。

## 2. 研究の目的

これまで申請者らは、ハイドロキシアパタイト(hydroxyapatite: HA)に電界を加え、表面電荷を生じさせた上で(分極)骨欠損部に補填することで、HA をそのまま移植する従来の方法と比べて、極めて効率よく骨再生が可能であることを明らかにしてきた(Chem Mater1996, Biomaterials2006, Actabiomaterialia 2012 など)。これらの結果から、HA がこれまで想定されていた単なる担体として作用するだけでなく、周囲の細胞が移植部位へ侵入するための足場や、自己細胞を活性化する組織再生促進型マトリックスとして機能する可能性が明らかとなった。本研究においては、これら分極による再生促進の分子機構を個体レベルで解明することで、硬組織再生のみならず、神経、血管などのあらゆる組織再生の分野における臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 分極 HA ペレットの作製

ハイドロキシアパタイト粉体よりペレットを作製し、水蒸気下にて 400、2000 V にて焼結、電気分極処理を行った。電気分極処理を行った HA は XRD (X 線回折) 測定、IR (赤外分光法) 測定により、アパタイト結晶であることの確認を行い、さらに TSDC (熱刺激脱分極電流) 測定により分極の確認を行った。

### (2) 分極 HA の骨への影響、分極 HA の骨形

成に関わる遺伝子の同定

分極 HA 表面での骨芽細胞の挙動を分子細胞生物学的に解明する。

骨芽細胞：生後 5 日のマウスの頭蓋骨から未分化骨芽細胞を播種（未分極 HA、分極 HA の N 面、分極 HA の P 面、Glass（プレート上へそのまま播く）の 4 群。各 n=2）

2 日おきに Medium change とアスコルビン酸添加を行い、7 日と 14 日でサンプルを採取し、RNA を抽出、Nano Drop にて RNA 濃度測定を行い(図 D)、マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子解析を行った。

4 . 研究成果

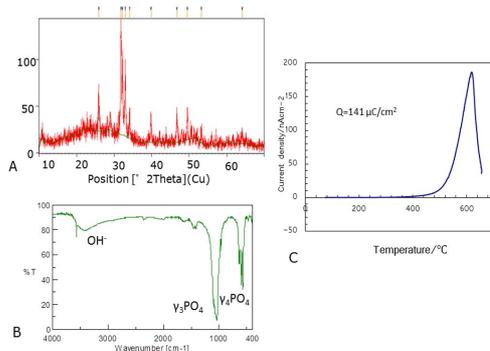
合成した HA 微粒子の XRD パターンは類似したピークを示し、HA 既定値と一致した(図 A)。

FTIR も同様の結果だった (図 B)。

分極した HA 微粒子の TSDC スペクトルより計算した蓄積電荷量の平均値は  $141 \pm 32.3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  (average $\pm$ SD)だった (図 C)。

以上より、分極処理を行った HA は XRD (図 A)、IR (図 B) の結果より、アパタイト構造が保たれ、TSDC 測定 (図 C) の結果よりきちんと分極が行われ、蓄積電荷も有することが示された。

分化のより進んだ Day14 のサンプルにてマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子解析を行った。Excel による解析ではデータの数値の高い遺伝子を選択した (図 E)。



Sample No.	material	Day	n	RNA (ng/μl)	vol (μl)	total vol (ng)
1	HA	7	1	47	25	1175
2	HA	7	2	35	25	875
3	HA-N	7	1	41	25	1025
4	HA-N	7	2	26	25	650
5	HA-P	7	1	57	25	1425
6	HA-P	7	2	32	25	800
7	Glass	7	1	30	25	750
8	Glass	7	2	49	25	1225
9	HA	14	1	25	25	625
10	HA	14	2	27	25	675
11	HA-N	14	1	50	25	1250
12	HA-N	14	2	63	25	1575
13	HA-P	14	1	73	25	1825
14	HA-P	14	2	56	25	1400
15	Glass	14	1	40	25	1000
16	Glass	14	2	32	25	800

(図 D)RNA 濃度

	発現の高い遺伝子
Glass	lincRNA:chr5, Parm1, lincRNA:chr2, Rgs4, Gzmc, Abr, Sox11 . . .
未分極 (HA)	5830443J22Rik, lincRNA:chr10, Niacr1, Olf482, Zfp438, Atp6v0d2, lincRNA:chr5 . . .
分極 N 面 (HA-N)	lincRNA:chr 1, Ifitm5, Col11a2, Galt, B4galnt2, Tubgcp6, Slc13a5 . . .
分極 P 面 (HA-P)	Arg1, Pbp2, Cxcr6, Ank, Cx3cr1, Grem1, Cdhr3 . . .

(図 E)マイクロアレイの Excel による解析

分極バイオセラミックスの複合材料の研究は、安価で永続的効果を持つ再生医療に有用な医用材料の開発につながると考えられる。マイクロアレイの結果、n=2 の同一検体内で n 間に差が見られたため、Excel 上で n=1 で検体間の違いを解析し直したものを結果にまとめた。マイクロアレイのデータは非常に膨大なため、専用の解析ソフトを用いた解析を行うこと、それにより、同一検体内で n 間での差が大きい遺伝子をピックアップし、それらを除去して再度、検体間の発現差を見て、発現の高い遺伝子を絞っていくことが今後の課題である。マイクロアレイによって網羅的に発現の高い遺伝子を絞り、それらを標的としてリアルタイム PCR やウェスタンブロットを行い、分極 HA において骨形成に関わる遺伝子を同定していきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大庭 聖子 (OHBA, Seiko)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号：60710118