

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670658

研究課題名(和文)多層カーボンナノチューブブロックを用いたin vitroでの骨形成再現実験

研究課題名(英文)In vitro bone generation trial using multi-walled carbon nanotube blocks

研究代表者

田中 学 (TANAKA, Manabu)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30723069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：当初計画した多層カーボンナノチューブブロックを用いたin vitroでの骨再生は叶わなかったが、多層カーボンナノチューブを骨再生に適した形状に形成し(CNTp)、骨形成能を評価した。CNTpは良好な細胞増殖能、骨伝導能に加えて、薬剤を保持・徐放する能力に優れ、単に骨欠損を充填するだけでなく、細胞を培養して移植する足場材としてや、薬剤を添加して徐放させるための担体、組織工学を用いた再生医療の材料に応用することができる素材であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Multi-walled carbon nanotubes were formed in a shape suitable for bone regeneration (CNTp), and evaluated the possibility of applications in bone regeneration medicine. We couldn't produce bones in vitro but CNTp showed good cell proliferation, bone conduction, and excellent capacity to hold and release of the drug sustainably. It was suggested that CNTp can be applied to regenerative medicine using tissue engineering not only as a filler of the bone defect, but also as a scaffold material transplanted by culturing cells and as a carrier for controlled release of drugs.

研究分野：整形外科

キーワード：カーボンナノチューブ 再生医療 整形外科

1. 研究開始当初の背景

骨折や骨腫瘍切除後の大規模な骨欠損に対する骨移植による骨再生治療において、人工再生骨の研究が盛んに行われている。人工再生骨の作製では、細胞を播種し増殖させるために連通多孔質構造をもつスキャフォールドが重要であり、様々な原料からスキャフォールドが開発されている。従来、スキャフォールドの研究は *in vivo* での実験が主流で、*in vitro* で臨床上有用な骨形成を確認した報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非常に優れた骨形成促進作用を持った MWCNT を圧縮凝固させた新素材である『MWCNT block』を足場材料(スキャフォールド)として世界初の *in vitro* での骨形成を目指すことである。これまでの骨のスキャフォールドは *in vivo* では骨形成が確認されているが、*in vitro* では石灰化までしか出来ていなかった。すでに *in vivo* での block 内での骨形成は確認しており、*in vitro* での骨形成が成功すれば、骨再生治療のための研究に非常に大きな貢献が出来るはずである。

3. 研究の方法

・新素材『MWCNT block』による骨形成能試験

本研究は研究分担者である佐藤が世界で初めて作製に成功した新素材『MWCNT block』と骨形成たんぱく質である recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) を組み合わせた実験系における骨形成能を調査し、CNT block における良質の骨再生足場材としての可能性を検討するものである。

我々は、2種類のブロック体を用い、骨再生能を検討した。まず、気孔がなく、強度を最大限まで高めた固体である『MWCNT block』の骨形成能を評価するため、細胞接着試験、rhBMP-2 を添加した際のマウス背筋内における異所性骨化再現実験を行った。次に、MWCNT を多孔質のブロックに成型した多孔質 MWCNT block (CNTp) を作成し、骨形成能の評価を行った。表面観察の後、表面におけるハイドロキシアパタイト(HA)析出実験、蛋白吸着試験、蛋白徐放試験、細胞を接着させての細胞形態観察、細胞増殖試験、マウス頭蓋骨欠損部へ移植した際の骨伝導能評価および rhBMP-2 を添加した際の同所性骨化の評価を行い、*in vitro* における骨再生への応用について検討した。

4. 研究成果

MWCNT block 上で、V79 細胞・RAW267.4 細胞の接着性はカバーガラスより高く、MC3T3-E1 細胞の接着性と増殖性はカバーガラスと同等であった(図1)。

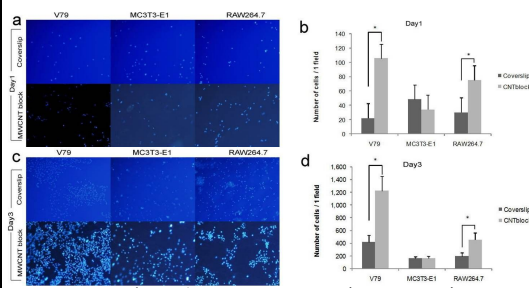


図1 カバーガラス上およびMWCNTブロック上での、V79細胞、MC3T3-E1細胞、RAW267.4細胞を用いた細胞増殖試験。

また、MWCNT block に rhBMP-2 を添加しマウス背筋に埋植すると、ブロックに密着して骨形成が認められ、その骨量は骨再生の足場材として臨床に用いられているコラーゲンシートの scaffold を用いた場合と同等であった(図2.3)。

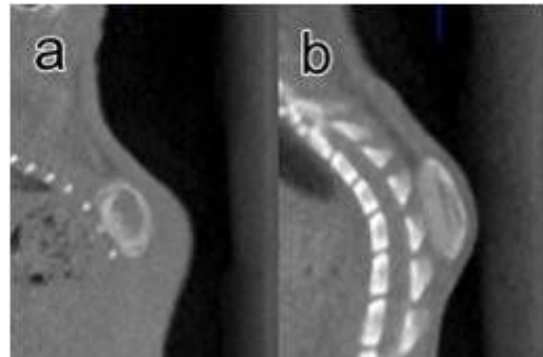


図2 マウス背筋内に移植し、3週後のCT像。(a) rhBMP-2含有PET繊維補強コラーゲンシート群で形成された異所性骨(矢頭)。(b) rhBMP-2含有MWCNTブロック群で形成された異所性骨。共に明瞭な骨形成を認めた。

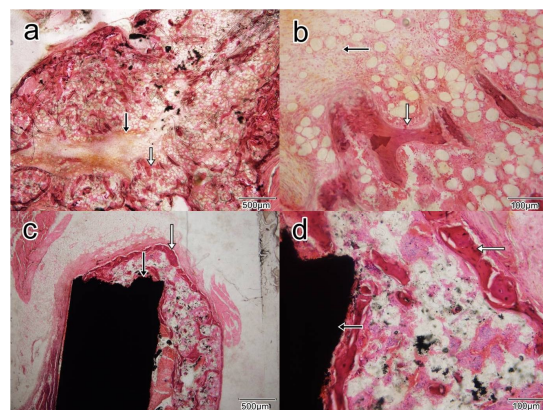


図3 マウス背筋内に埋め込み後3週の組織像(HE染色)。(a,b) rhBMP-2含有PET繊維補強コラーゲンシートの周囲に形成された異所性骨。(c,d) rhBMP-2含有MWCNTブロックの周囲に形成された異所性骨。

このMWCNTブロックは一定の強度を有するため、スペーサーとして骨欠損部を充填し、かつ骨再生を誘導するBMPのscaffoldとして機能することが明らかになった。

また、MWCNT を骨再生に適した多孔質形状に形成し(CNTp)、骨再生分野における応用の可能性を検討した。CNTp は interpore connection を持った多孔体で、表面はMWCNT の繊維に覆われていた(図4)。

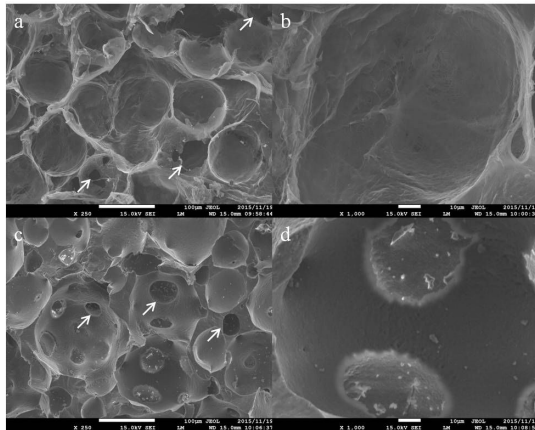


図4 (a,b) CNTp および (c,d) HAp(多孔質HA スキャフォールド) の SEM 画像. 矢印: interpore connection

CNTp を r-SBF 中に静置したところ、表面にナノサイズのHA 結晶の凝集体が析出した(図5)。

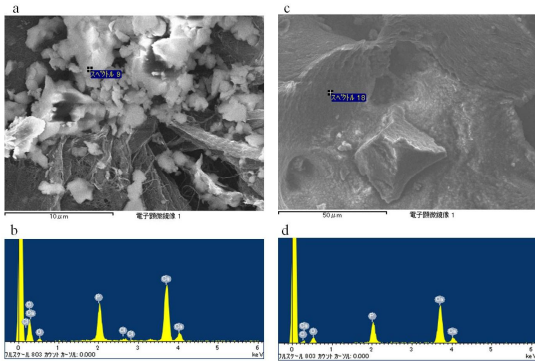


図5 (a) CNTp 上に析出した結晶の SEM 画像。(c) 処理していない HAp の SEM 画像。(b) CNTp 上の結晶と (d) 未処理 HAp の表面の EDS による Ca, P, O の確認。

In vitro における薬剤徐放性試験として行った蛋白吸着試験および蛋白放出試験では、CNTp は有意に蛋白溶液中の蛋白濃度を減少させ、他のスキャフォールドに比べてゆっくりと蛋白を放出した(図6,7)。

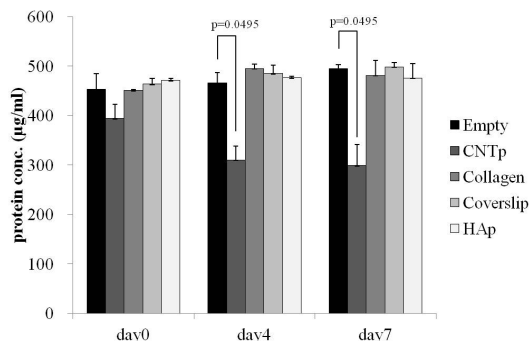


図6 蛋白吸着試験

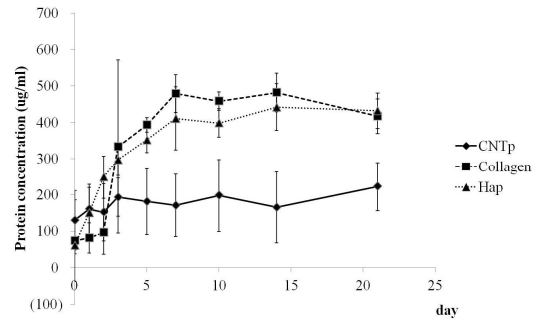


図7 蛋白放出試験

走査型電子顕微鏡および蛍光顕微鏡による形態観察において、CNTp 上に播種された前骨芽細胞は、アクチンフィラメント・filopodia をよく発達させ、気孔を満たしていた(図8)。

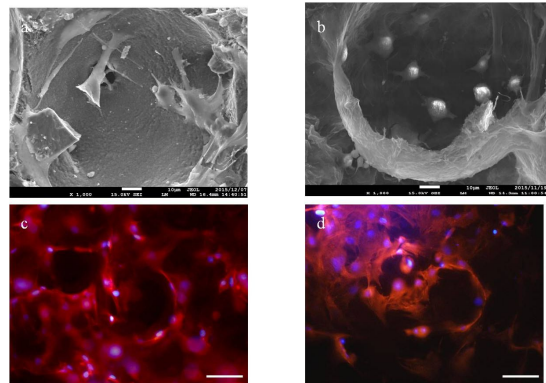


図8 接着した細胞の形態観察 (a,c)HAp、(b,d)CNTp に接着した細胞

細胞増殖試験において、CNTp は対照群のカバーガラスよりも有意に高い細胞増殖能を認めた(図9)。

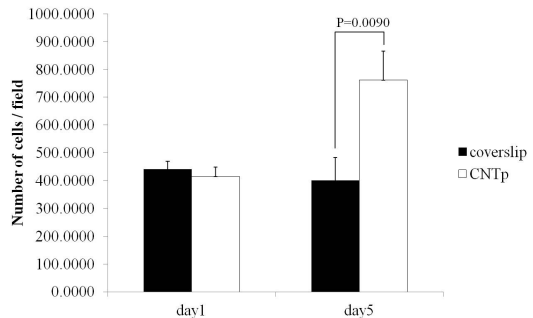


図9 細胞増殖試験

マウス頭蓋骨を用いた骨欠損修復モデルでは、対照群のコラーゲンよりも良好な骨電導能を認めた(図10)。

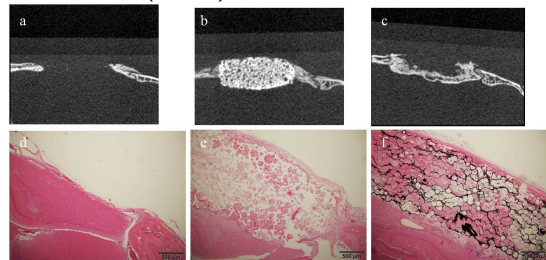


図10 (a,d)無移植, (b,e) HAp, (c,f) CNTp 移植群の骨形成(上:µCT, 下:組織標本)

In vivo における薬剤徐放性として、試験 rhBMP-2 を添加し、マウス頭蓋骨骨欠損に移植したところ、3 週間で他のスキャフォールドよりも多くの骨形成を認めた(図 11)。
図 11 (a,d)無移植, (b,e) HAp, (c,f) CNTp 移植群の骨形成(上:µCT, 下:組織標本)

In vitro の結果と併せ、CNTp は良好な細胞増殖能、骨伝導能に加えて、薬剤を保持・徐放する能力に優れ、単に骨欠損を充填するだけでなく、細胞を培養して移植するスキャフォールドとしてや、薬剤を添加して徐放させるための担体としての能力を有することが示唆された。

結果的に、in vitro の骨再生には至らなかったが、本研究により、CNTp はスキャフォールド単体としてだけでなく、細胞治療や薬剤の担体として、組織工学を用いた再生医療の材料に応用することができる素材であることが示された。

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)

[学会発表](計 4 件)

第 117 回信州整形外科懇談会 松本 2016.2.20 田中学 齋藤直人 Mei Zhang 佐藤義倫 他 9 名 多孔質に成型した多層カーボンナノチューブブロック体の骨形成への影響

第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 富山 2015.10.22-23 田中学 齋藤直人 Mei Zhang 佐藤義倫 他 9 名 Porous Multi-Walled Carbon Nanotube block (p-MWCNT block) の骨形成への影響

12th Bone Biology Forum Chiba, Japan 3, August 2015 Tanaka M, Saito N, Zhang M. Sato Y. et al. A capacity of porous multi-walled carbon nanotube blocks as scaffold of bone regeneration

Sixth Symposium on Carbon Nanomaterials Biology, Medicine & Toxicology Nagoya, Japan 28, June 2015 Tanaka M, Saito N, Zhang M. Sato Y. et al. The effect of carbon nanotube blocks on bone regeneration

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 学 (TANAKA, Manabu)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 30723069

(2)研究分担者

佐藤 義倫 (SATO, Yoshinori)

東北大学・環境科学研究科・准教授
研究者番号: 30374995

羽二生 久夫 (HANIU, Hisao)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号: 30252050

(3)連携研究者

齋藤 直人 (SAITO, Naoto)
信州大学・学術研究院保健学系・教授
研究者番号: 80283258

青木 薫 (AOKI, Kaoru)
信州大学・医学部・准教授(特定雇用)
研究者番号: 30467170