アパタイトファイバースキャフォルドによる再生培養骨の構築およびその生体内反応

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2023-05-31
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 鈴木, 来
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/00023162

２０２２年度　理工学研究科

博士学位請求論文（要旨）

アパタイトファイバースキャフォルドによる再生培養骨の構築および

その生体内反応

応用化学専攻
鈴木　来

１　問題意識と目的

日本は超高齢社会となり内閣府が発表した令和 4 年版高齢社会白書では、 2025 年には 65 歳以上の高齢化率が 30%を超えると予測している。高齢者数の増加にともなって、運動器疾患患者の増加が懸念されている。さらに、この運動器疾患には骨に関するものが多く、現在のまま対策がない状態であると「生活の質 (Quality of Life: QOL) 」の低下が懸念され、健康長寿社会の実現が困難となる。高齢者の QOL を高めるとともに、医療費の増大を抑制するため、健康寿命延伸を実現することは喫緊の課題である。近年、事故や疾病により失われた組織を再生させる “ティッシュエンジニアリング” に関する研究が活発に行なわれている。ティッシュエンジニアリングは、「細胞」、「成長因子」、「足場材料 (スキャフォルド) 」の三つの要素から成り立っており、その三要素を適切に組み合わせることで組織再生が実現可能となる。

当該研究で着目する物質は、「水酸アパタイト ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$): HAp 」である。HAp はヒトの硬組織の主要な無機成分であるアパタイトに類似した構造をもつため、人工骨などとしても臨床応用されている。さらに、HAp は異なる 2 つの結晶面 (*a* 面・*c* 面) をもち、生体骨中のアパタイトは *a* 面が、歯のエナメル質では *c* 面が多く露出した異方性を有する。我々は「 HAp の異方性制御技術」を有しており、均一沈殿法を介した独自の合成経路で「 *a* 面を多く露出した繊維状 HAp 単結晶 (アパタイトファイバー: AF) 」の合成に成功している。これまでに生体骨のモデルとなりうる「 *a* 面を多く露出した HAp セラミックス (*a*-HAp) 」の作製に成功し、長管骨モデルセラミックスとして細胞との応答性について調査を行なってきた。我々は、この HAp に対する異方性制御技術を骨再生に応用展開している。 AF を用いて、繊維状の構造を保ちつつ、「任意の気孔構造に制御可能な足場材料 (アパタイトファイバースキャフォルド: AFS) 」を作製し、骨形成系に関わる細胞を培養し骨再生を試みてきた。AFS は三次元的な連通気孔を有し、良好な細胞増殖性を有する基材である。さらに、大型の AFS (直径 ~18 mm、高さ ~15 mm) を装填したラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) を用いて、ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (RBMC) を三次元培養することにより再生培養骨の構築にも成功している。

そこで本研究では、臨床応用可能な大型の再生培養骨を構築するための培養条件の最適化を目的として、AFS を装填した RFB による RBMC の培養期間の検討を行なった。続いて、構築した再生培養骨が生体内でも骨形成能を有するかを評価するために、同種のラット背部皮下へ埋入試験を行なった。さらに、HAp の *a* 面が骨芽細胞および破骨細胞に対してどのような影響を及ぼすかを解明するために、*a*-HAp を使用して骨形成と骨吸収に関わる細胞を培養し、その応答性を調査した。

２　構成及び各章の要約

本論文は、以下の 6 章より構成されている。

第 1 章: 緒言

第 2 章: アパタイトファイバースキャフォルドとラジアルフロー型バイオリアクターによる再生培養骨の構築と骨分化
第 3 章: アパタイトファイバースキャフォルドを装填したラジアルフロー型バイオリアクターにより構築した再生培養骨の生体内反応
第 4 章: *a* 面を多く露出した水酸アパタイトセラミックスに対する骨芽細胞の応答性
第 5 章: *a* 面を多く露出した水酸アパタイトセラミックス上での破骨細胞の培養とその生物学的評価
第 6 章: 総合考察および結言

次に、各章の要約を述べる。

第 1 章では、本研究の対象である HAp とその合成方法に加えて、幹細胞や骨の構造、ティッシュエンジニアリングなどについて概説し、本研究の目的について述べた。

第 2 章では、臨床応用可能な大型の再生培養骨を構築するための培養条件の最適化を目的として、AFS を装填した RFB による RBMC の培養期間の検討を行なった。RBMC は、4 週齢の雄ラット (Wistar 系) の大腿骨および脛骨から骨髄を採取した。培養後に 1.0×10^7 個の細胞を含む懸濁液を RFB に播種した。RFB を使用した培養は、通常培地と骨分化誘導培地を用いて行なった。ここで、通常培地での培養を 0 週、1 週および 2 週、骨分化誘導培地を用いた培養期間を 0 週、1 週および 2 週として、各培地での培養期間を組み合わせた、合計 8 種類の培養条件下で再生培養骨を構築し、骨分化進行レベルを調査した。定性的な評価として、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびアリザリンレッド S (ARS) 染色を実施し、定量的な評価として、 DNA 量、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性値、オステオカルシン (OC) 産生量の測定をした。DNA 量の定量結果から、培養期間が長いほど、総 DNA 量は増加する傾向にあった。さらに、骨分化誘導培地での培養期間が長いほど OC 産生量が多い傾向であった。OC 産生量が多い系では、ARS 染色の結果から、石灰化した部分が観察された。これらのことから、AFS および RFB を組み合わせて、異なる骨分化レベルを持つ再生培養骨が構築可能であることが示された。さらに、通常培地での培養を 1 週、骨分化誘導培地での培養を 1 週間行なった再生培養骨は、HE 染色の結果から細胞が AFS 全体で成育しており、比較的早期に ALP 活性値が高く、石灰化部位が観察されたことから、高い骨形成能を持つ可能性がある培養条件と決定した。

第 3 章では、構築した再生培養骨が生体内でも骨形成能を発揮するかを評価するために、同種のラット背部皮下への埋入試験を行なった。まず、予備的検討として、小型の AFS (直径 6-8 mm、 高さ 3-4 mm) に RBMC を播種し、ラット背部皮下へ埋入して組織学的評価にて骨形成能を評価した。薄切切片に対する ALP 染色および ARS 染色の結果から、細胞を播種した AFS の方が細胞を播種していない AFS よりも高い骨形成を示すことを明らかにした。続いて、最適化した培養条件下で RFB を用いて構築した再生培養骨 (RFB-bone) を、7 週齢の雄ラット (Wistar 系) の背部皮下へ埋入した。対照群として、細胞培養を行なっていない AFS (Control) を使用した。取り出した試料の薄切切片を作製し、組織学的評価を行なった。いずれのサンプルにおいても ALP 活性が確認された。さらに、ALP 活性値の定量評価を行なった結果、Control に比べ RFB-bone では ALP 活性が有意に高かった。ARS 染色においては、今回の実験では組織の介入が多く、石灰化物の判断が難しかったため、骨分化後期の分化マーカーである OC の免疫染色を行なった。その結果、RFB-bone のみ OC の発現が確認できた。以上の結果から、最適な条件下で構築した再生培養骨は、生体内においても優れた骨形成能を発揮することが分かった。

第 4 章では、第 3 章で明らかにした再生培養骨の優れた骨形成能の成因を精査するため、骨芽細胞を用いた *in vitro* 系での実験を計画し、HAp の *a* 面が骨形成に関与する細胞に対してどのような影響を与えたかの解明を目指した。我々はこれまでに開発した AF およびアパタイトゲルから作製することに成功している *a*-HAp を使用して、アパタイトセラミックスの異方性構造と骨芽細胞の応答性を調査した。ここで、対照群は HAp-100 粉体 (太平化学産業製) から作製した HAp セラミックス (*i*-HAp) とした。使用したセラミックスに対して電子線後方散乱回折 (EBSD) 像を撮影し、*a*-HAp が *a* 面を多く露出していることを確認した。これらのセラミックスに対する細胞初期付着率は *i*-HAp に比べて *a*-HAp の方が低いことが分かった。一方、

細胞増殖性試験では、各試験片間での増殖性の差は少なかった。細胞分化について検討した ALP 染色では、骨分化誘導環境下で 1 および 2 週間の培養後のいずれの細胞においても *a*-HAp は他の基材よりも濃く染色された領域が散見された。*a*-HAp 上で培養した細胞の発現タンパク質の評価を二次元電気泳動法で調査したところ、*i*-HAp 上で培養した細胞のものとは異なっていた。これらの結果は *a*-HAp の異方性構造が骨芽細胞の骨分化初期段階における分化を促進させたことを示唆している。以上の結果より、HAp の *a* 面は細胞の接着性を若干低下させるものの、特に骨芽細胞の初期段階における分化を促進することが分かった。

第 5 章では、第 3 章で明らかにした再生培養骨の優れた骨形成能の成因を骨吸収の視点から明らかにするため、*a*-HAp を用いてアパタイトセラミックスの異方性構造と骨吸収を担う破骨細胞との応答性を調べた。具体的には、HAp の *a* 面が破骨細胞の骨吸収能にどのように影響するかを調査した。マウス骨髄間質細胞 (mBMSC) は、9-11 週齢の C57BL / 6NCr Slc から骨髄液を採取し、予備培養を行ない破骨細胞へ分化誘導した。その後、*a*-HAp および *i*-HAp 上に、1.0×10^5 個の前破骨細胞を播種した。回収したセラミックス試料片は、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観察し、セラミックス上に形成された吸収窩の深さなどの表面状態を解析した。その結果、破骨細胞培養後の試料片の表面粗さは増加していた。さらに、*a*-HAp 上に破骨細胞が形成した吸収窩は *i*-HAp のものより深かった。破骨細胞の分化マーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行なった。また、TRAP 陽性細胞の細胞面積を ImageJ により算出し、統計ソフト R にて解析した。各セラミックス上の TRAP 陽性細胞を対象とした画像解析の結果から、*i*-HAp 上で培養した細胞のサイズは、*a*-HAp 上で培養した細胞のサイズに比べて有意に大きいことが分かった。各セラミックスが破骨細胞の活性に与えた要因を調査するため、JIS T 0330-3 で定義される溶解液を用いて、*a*-HAp および *i*-HAp の Ca^{2+}イオンおよび PO_4^{3-}イオンの溶出挙動を 2 週間にわたり調査した。酸性環境下および中性環境下ともに、*a*-HAp の方が *i*-HAp と比べて多くの Ca^{2+}イオンを溶出していた。PO_4^{3-}イオンでも同様な傾向であった。したがって、培養環境中の各イオン濃度の違いが、セラミックス上の破骨細胞の細胞面積に影響を与えた一因であると示唆される。上記の結果より、アパタイトセラミックスの異方性構造は破骨細胞の活性に影響を与えたことが明らかになった。

第 6 章では、第 2 章から第 5 章で得られた知見をまとめて研究全体を総括した。本研究の成果は、AFS はティッシュエンジニアリングの足場材料として有用な生体材料であることを示している。HAp の *a* 面を多く露出させることは骨芽細胞の分化を促進し、破骨細胞の活性に影響を与えたことから、HAp の異方性は骨組織の形成に関与する細胞に強く影響を与えることが示された。これらの知見は HAp の異方性制御技術を用いた新規バイオマテリアルの創製に寄与できると思われる。