

## 論文内容の要旨

Effects of apatite particle size in two apatite/collagen composites on the osteogenic differentiation profile of osteoblastic cells.

—2種類のアパタイト/コラーゲン複合体中のアパタイト粒子径が骨芽細胞様細胞の骨系分化挙動に及ぼす影響—

(International Journal of Molecular Medicine 第32巻、6号1255頁～1261頁、平成25年12月)

はたけやま わたる  
畠山 航

### I. 研究目的

顎骨の形態や骨量によってインプラント治療の成否が左右されるため、新規生体材料の開発に関する様々な試みがなされている。しかしながら、生物由来骨補填材料に比較して、必ずしも親和性の高い人工骨補填材料は開発されていない。我々は、ナノサイズとマクロサイズのアパタイト粒子をコラーゲンに練和し、複合体を自家調製した。次に、骨芽細胞様細胞 (SaOS-2) を2種類の複合体上に播種して長期間培養し、骨系分化マーカーのプライマーと定量 PCR を用いて骨系分化の程度を調べた。さらに、複合体上の骨芽細胞様細胞の経時的形態変化を走査型電子顕微鏡 (SEM) で調べた。本研究の目的は、異なる粒径のアパタイト粒子を含有するアパタイトコラーゲン複合体上での骨芽細胞様細胞の骨系分化の程度を調べ、細胞形態変化との関係性を評価することである。

本研究は、今後の臨床における新規骨補填材の開発の一助とすることを目標としている。

### II. 研究方法

1. 本研究では、ナノサイズのアパタイト粒子 (粒径 40nm) (n-HAP) とマクロサイズのアパタイト粒子 (粒径 0.5~1mm) (m-HAP) とを使用した。複合体調製のため、アパタイト粒子を中和した医療用コラーゲンに混練し、凍結乾燥後、Φ6mm×1mm の円盤状試料に打ち抜いた。対照としてコラーゲンのみの試料 (Col) を作製した。試料にはエチレンオキシドガス滅菌を施した。
2. 3試料 (Col, n-HAP/Col と m-HAP/Col) の上に、SaOS-2 を播種し、5%CO<sub>2</sub>/95%空気、37°C環境下で培養した。播種 (Control) と播種 1, 2, 3, 4 週間後、Total RNA を抽出 (n=3) し、定量的 RT-PCR 法によって骨系分化マーカーの遺伝子発現解析を行った。定量には  $\Delta \Delta Ct$  法を用い、初期骨系分化マーカーであるアルカリフォスファターゼとタイプ I コラーゲン、及び中後期：後期骨系分化マーカーであるボーンシアロプロテインとオステオカルシンの遺伝子発現の解析を行った。遺伝子発現の規格化には  $\beta$  アクチンの遺伝子発現量を用いた。
3. 3試料 (Col, n-HAP/Col と m-HAP/Col) の上に、SaOS-2 を播種し、培養 1, 4 週後、試料ごと細胞をグルタルアルデヒド固定、オスミウム固定、アルコール系列による脱水、ブチルアルコール透徹後、凍結乾燥を行って、試料上の細胞の形態を SEM で観察した。

### III. 研究成績

1. 定量的 RT-PCR 実験から、SaOS-2 は3種類の材料 (Col, n-HAP/Col と m-HAP/Col) 上で培養することで、2次元の培養皿上よりも、2種類の骨系分化マーカーの発現が経時的に上昇することが確認された。その発現増加率は、ナノサイズのアパタイト配合複合体 (n-HAP/Col) が最大で、マクロサイズ

のアパタイト配合複合体 (m-HAP/Col) が続き、コラーゲン単体 (Col) が最小であった。調べた骨系分化マーカーのうち、ボーンシアロプロテイン遺伝子が最も感度が良好で、骨系分化の傾向の違いを明瞭に表わした。

2. SEM観察から、SaOS-2の接着／展伸性はColが最大で、n-HAP/Colが続き、m-HAP/Colが最小であった。n-HAP/Col中のn-HAPは凝集傾向があり、培養1週では、SaOS-2が優れた接着／展伸性を示す反面、培養4週ではSaOS-2がn-HAP粒子を個別に貪食する形態変化が認められた。m-HAP/Col中のm-HAPは細胞接着性が弱く、SaOS-2が経時的に剥がれる傾向が認められた。

#### IV. 考察及び結論

1. ナノサイズのアパタイト (n-HAP) は表面積が非常に大きく、蛋白等の吸着性に優れ、表面からカルシウムイオンのリン酸イオンを微量放出するため、n-HAP/Col 複合体への骨芽細胞様細胞の接着性と骨系分化誘導能を高めたと考えられた。また、骨芽細胞様細胞が n-HAP を貪食すると細胞内でカルシウムイオンとリン酸イオンが放出されるため、MAPK などのシグナル機構を活性化し、骨系分化の促進に繋がると考えられた。
2. マクロサイズのアパタイト (m-HAP) は表面積が小さく、疎水性が大きいために、骨芽細胞様細胞の接着性と骨系分化能力が、n-HAP に及ばなかったと考えられた。しかし、m-HAP は破骨細胞の誘導や成熟に適する生体材料であるため、異なる臨床上の長所を有すると考えられた。
3. 以上の考察から、ナノサイズのアパタイト (n-HAP) を配合する複合体 (n-HAP/Col) が新規骨補填材に応用可能であると示唆された。今後、動物実験や臨床知見を通じて、将来的な臨床への応用が期待できると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 八重柏 隆 (歯科保存学講座歯周療法学分野)

副査 教授 近藤 尚知 (補綴・インプラント学講座)

副査 准教授 平 雅之 (医療工学講座)

現在、口腔インプラント治療は欠損補綴の一選択肢として捉えられるようになってきており、その治療術式の進歩や適応症の拡大には目覚ましいものがある。しかしながら重度の歯周病患者、顎顔面口腔外傷、悪性腫瘍切除後の患者においてはインプラントの埋入やその後の補綴処置が困難になる場合が少なくない。こういった場合にはインプラント埋入あるいは補綴に適した顎堤形態を得るために骨移植術が行われる。骨移植においては自家骨移植がゴールドスタンダードとされているが採取骨量の問題や、患者に与える侵襲の問題から種々の骨補填材利用も頻繁に行われている。世界的にみると動物由来の異種骨あるいは同種他家骨が主流となっているが、これらの骨補填材には未知の感染源となる可能性や量的安定供給の問題、さらには日本国内においては薬事法承認等の問題が存在する。そのため化学合成された人工骨の需要も高まっているといえる。人工骨の中でも既存のハイドロキシアパタイト骨補填材は動物由来のものと比較して、必ずしも生体適合性、新生骨形成能が高いとは言い難く、未だ改良の余地があると考えられる。本研究ではハイドロキシアパタイトの中でも粒子径の小さいナノサイズのアパタイトとコラーゲンを複合体化し、新規骨補填材としての可能性を検討することを目的に以下の実験を行った。現在までのところ、ナノサイズ・ハイドロキシアパタイトをコラーゲンと複合体化

した状態での三次元細胞培養の報告はなく新規性のある実験と考えられる。

本実験ではナノサイズアパタイト粒子とマクロサイズアパタイト粒子とを用い、複合体調製のため、アパタイト粒子を中和した医療用コラーゲンに混練し、凍結乾燥後、Φ6×1mmの円盤状試料に打ち抜いた。対照としてコラーゲンのみの試料も作製した。試料にはエチレンオキサイドガス滅菌を施した。作製した3試料上に骨芽細胞様細胞 SaOS-2 を播種し、5%CO<sub>2</sub>/95%空気、37℃環境下で培養を行った。播種前と播種1, 2, 3, 4週間後、Total RNAを抽出し、定量的RT-PCR法によって骨系分化マーカーの遺伝子発現解析を行った。定量にはΔΔct法を用いた。また培養1, 4週後に試料ごと細胞に固定、脱水処理を施し、SEMによる細胞形態の観察も併せて行った。

定量的RT-PCR実験からSaOS-2はナノサイズ・アパタイト/コラーゲン複合体上で培養することで他の試料よりも優位に骨系分化マーカーの発現が上昇することが明らかになり、中でもボーンシアロプロテインの発現量の差が最も顕著であった。さらにはSEM像観察からナノサイズアパタイト/コラーゲン複合体上でSaOS-2は優れた接着・伸展性を示し、ナノサイズハイドロキシアパタイト粒子を貪食する形態変化が認められた。

上記より、ナノハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体が新規骨補填材として有用である可能性が示唆され、かつ骨量不足でありながら低侵襲なインプラント治療を希望する患者のQOL向上におおいに貢献できるものと考えられる。よって本研究の内容は、学位論文に値すると評価した。

### 試験・試問結果の要旨

本研究の目的、方法、結果などについて本人から説明を受け、質問を行った。また、今後の研究の展開ならびに関連する基本的事項についても試問を行い、適切かつ十分な回答が得られたことから、学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと認めた。

### 参考論文

- |  |   |          |
|--|---|----------|
| 1. Quantitative analyses of osteogenic-differentiation-related gene expressions in human osteoblast-like cells(SaOS-2) cultured on hydroxyapatite and titanium (MASAYUKI TAIRA 他4名と共著) | Journal of Oral Tissue Engineering<br>第10巻、第1号<br>34頁～41頁 | 平成24年9月  |
| 2. Subcutaneous tissue reactions against nano-apatite collagen composites (WATARU HATAKEYAMA 他5名と共著)   | Nano Biomedicine<br>第4巻、第2号<br>118頁～124頁                  | 平成24年12月 |