

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893247

研究課題名(和文) ナノハイドロキシアパタイト・人工合成コラーゲンをを用いた骨補填材の開発

研究課題名(英文) Development of bone substitute material using artificial collagen/nano-size apatite complexes

研究代表者

畠山 航(HATAKEYAMA, WATARU)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：20733728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000 円

研究成果の概要(和文)：合成コラーゲンにナノサイズアパタイト(n-HAP)を加えた複合体を調製，背部皮下における軟組織反応と頭蓋骨欠損部における硬組織反応および骨芽細胞接着の程度と骨系分化誘導能について検討を加えた．複合体は生体親和性に優れ，軟組織では早期から深部まで体液成分の侵入が活発で，コラーゲンの代謝活動が認められた．一方，硬組織欠損部では，ある程度の骨伝導能が確認された．3週培養分析の結果，骨芽細胞のアルカリフォスファターゼの発現を強く誘導することが明らかになった．骨シアロプロテインの発現は不定状であった．従って，合成コラーゲンは初期中期の骨系分化を誘導し，n-HAPの配合が骨伝導能を促進すると判断された．

研究成果の概要(英文)：(1) We produced artificial collagen/nano-size apatite complexes, and evaluated histological reactions in mouse back soft tissues and bony tissue reactions at rat cranial bone defects to produce biological safe osteo-conductive bio-materials. In soft tissues, phagocytes entered deep inside complexes due to hydrophilicity. At bony defects, middle degree osteo-conductions was observed. (2) We cultured osteoblastic SaOS-2 cells, extracted genes (mRNAs) and evaluated gene expression by RT-PCR, using primers of osteoblastic differentiations. On collagen/nano-size patite, one gene (Alkaline phosphatase) expressions was more accelerated than on collagen only control, suggesting that nano-size apatite was useful to form new bone.

研究分野：歯科インプラント学

キーワード：生体材料 ナノアパタイト 合成コラーゲン コラーゲン複合体 硬組織再生 医療デバイス

## 1. 研究開始当初の背景

現在医療用に用いられているコラーゲンは動物由来のものがその大半を占め、その臨床成績は非常に高いことが知られている。しかしながら宗教上の理由等、様々な理由から動物由来の生体材料を受け入れがたい患者も少なくない。更にはウイルスやプリオン、未知の感染症等のリスクが全くないとは言いがたい。こういった観点から危険性のない非動物由来生体材料の開発が期待されており、人工合成コラーゲンの利用が、見込まれた。

## 2. 研究の目的

トリペプチド（プロリン・ヒドロキシプロリン・グリシン）を重合することによってコラーゲン様ポリペプチド（合成コラーゲン）を自家調製し、ナノ・アパタイトを配合して、骨伝導能を有する骨補填材を新規に調整する事を目指した。動物実験から、有用性を評価した。

## 3. 研究の方法

(1) 合成コラーゲンにナノ・ヒドロキシアパタイト顆粒（以下 nHAP）を分散させた複合スポンジ体を調製し、ラット頭蓋骨欠損部における硬組織反応について検討を加え、非動物由来の安全な硬組織伝導デバイスの開発を目指した。プロリン、ヒドロキシプロリンとグリシンからなるトリペプチドを出発材料とし、カルボジイミドによる化学架橋と HOBt（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール）による縮合を行い合成コラーゲンとした。nHAP (0.9g) を中和した合成コラーゲン (30ml 原液) (aCol) に混練し、 $-80^{\circ}\text{C}$  3 時間の予備凍結後、12 時間凍結乾燥し、 $\phi 6\text{mm} \times \text{厚さ } 1\text{mm}$  の円盤状試料に打ち抜いた (nHAP / aCol) (図 1)。対照としてコラーゲンのみの試料 (aCol) も作製した。動物実験倫理委員会の承認を得た後、雄性 Wistar ラット 10 週齢 12 匹の頭蓋骨に対して直径 6mm のトレフィンバーを用いて骨欠損部を形成した。頭蓋骨欠損部には 2 種類の試料を各 3 匹ずつ埋入し縫合した (図 2)。術後、4 週および 8 週経過後、ラットを安楽死させ、マイクロ CT によるエックス線学的評価を行った。

(2) 試料を 10cm 培養皿に入れ、骨芽細胞様細胞 SaOS-2 を (200 $\mu\text{l}$  中  $1 \times 10^6$  個) 播種し、5%CO<sub>2</sub>/95%空気、37 $^{\circ}\text{C}$  環境下で培養した。播種前と播種 1, 3 週間後、骨芽細胞様細胞から Total RNA を採取した (n=3)。遺伝子発現解析には定量 PCR 装置 (TP800, Takara) を用い、定量は  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法によった。骨系分化誘導マーカー遺伝子として分化の順に ALP, COL1, SPP1 (OSP 相当), BSP, BGLAP (OSC 相当) を用いた。また、骨芽細胞様細胞の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

(1) プレス加工した nHAP/aCol 複合体は、ラット骨欠損部において欠損部から浮き上がりやすかったものの、マイクロ CT 像上での不透過度を経時的に増加させた (図 3)。複合体材料により骨欠損部骨縁から連続した不透過像が観察でき、骨が形成されていると考えられる。成長因子 (EGF や BMP2) を使用しなくても、顕著な早期骨伝導能が達成されたことは画期的と考えられた。また合成コラーゲンは動物性コラーゲンと異なり未発見のプリオンやウイルス等の感染による異害性がないと考えられるため、安全であり生体材料として有用であると示唆された。

(2) 骨芽細胞 SaOS-2 は Col 単体に比べ nHAP/aCol 上で骨系分化が促進されることが確認された。特に 2 種類の骨系分化マーカー (Osteocalcin, RUNX2)、発現増強に効果があり、n-HAP が骨伝導能の向上に有益と示唆された (表 1)。



図1 ニュートンプレス機および形成材料



図2 埋入手術

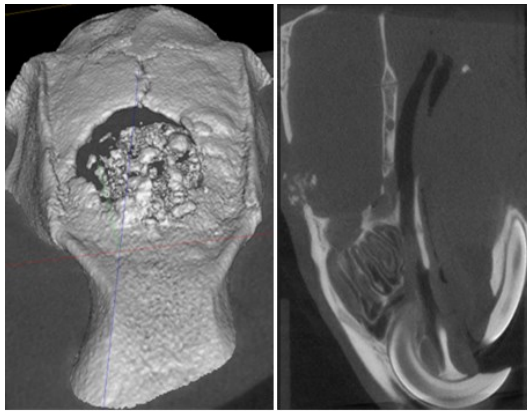


図3 ラット頭蓋骨欠損部8週経過  
μCT像

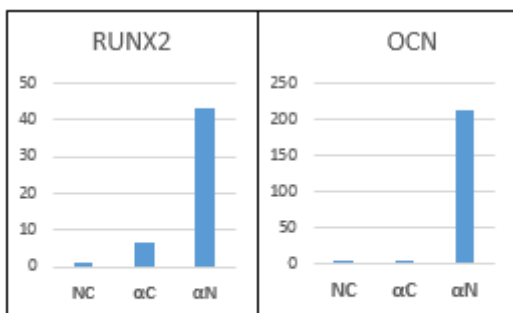


表1. RUNX2およびOCNの  
遺伝子発現

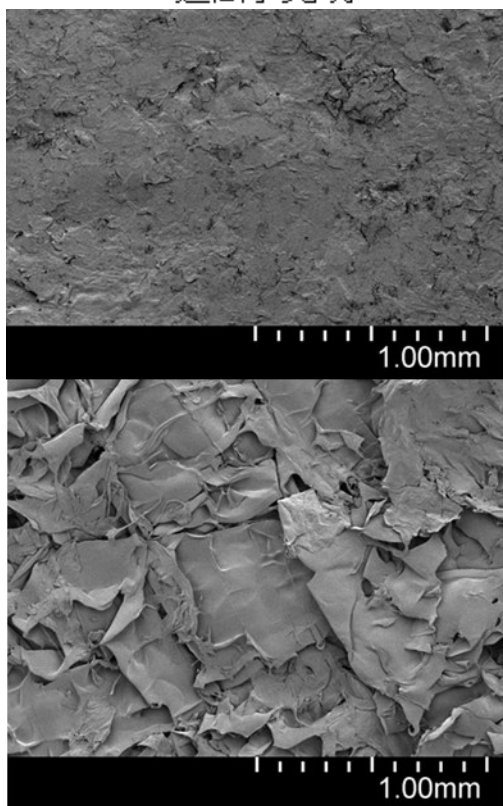


図4 a)Col/nHAP複合体  
b) Colのみ SEM像

ol  
隙  
APを  
図後  
確い  
かる  
で  
の  
レン  
を着  
、を  
も可  
化方  
新唆

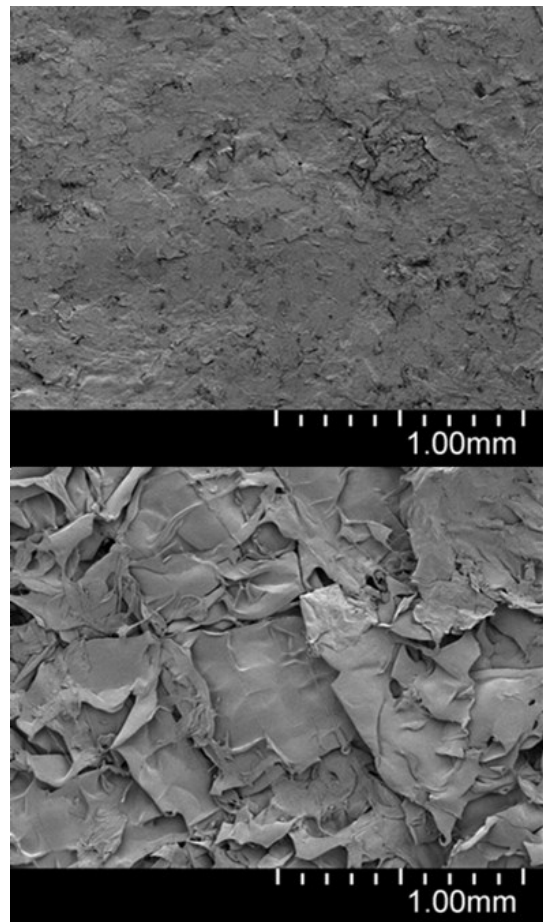


図4 a)Col/nHAP複合体  
b) Colのみ SEM像

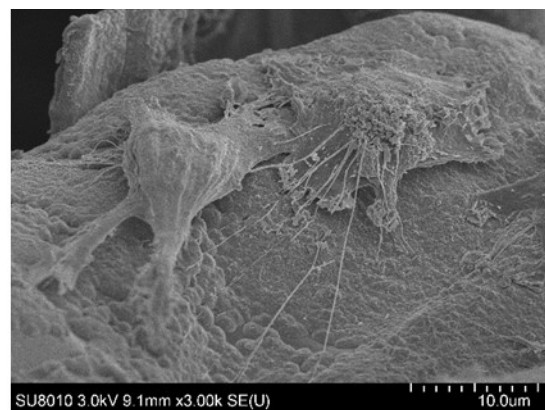


図5 Col複合材料上細胞培養  
SEM像



## 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 Hatakeyama W, Taira M, Ikeda K, Takafuji K, Kihara H, Kondo H, Hattori M. In vivo evaluation of noble porous apatite disks implanted in rat critical-size calvarial defects by Micro-CT and histological observations. J Oral Tissue Eng. 12(1): 13-19, 2014. 査読有  
[https://www.istage.jst.go.jp/article/jard/e/12/1/12\\_13/article](https://www.istage.jst.go.jp/article/jard/e/12/1/12_13/article)
- ② Taira M, Hatekeyama W, Yokota J, Chosa N, Ishisaki A, Takafuji K, Kihara H, Kondo H, Hattori M. Tracking GFP-labeled transplanted mouse MSC in nude mice using in vivo fluorescence imaging. Nano Biomed. 6(2):73-77, 2014. 査読有  
[https://www.istage.jst.go.jp/article/nano/6/2/6\\_73/pdf](https://www.istage.jst.go.jp/article/nano/6/2/6_73/pdf)

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 畠山 航, 平 雅之, 鬼原英道, 近藤尚知. ナノアパタイト/コラーゲン複合体に対する生体反応の評価: 骨芽細胞応答、軟組織反応および硬組織反応.  
日本歯科理工学会 北海道東北地方会夏期セミナー. 盛岡市, 2013 年 9 月 1 日
- ② 畠山航, 平 雅之, 鬼原英道, 高藤恭子, 近藤尚知.  
アパタイト/コラーゲン複合体中のアパタイト粒子の違いが骨芽細胞様細胞の骨系分化挙動に及ぼす影響評価.  
第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会. 福岡市, 2013 年 9 月 15 日
- ③ 畠山 航, 平 雅之, 鬼原 英道, 近藤 尚知.  
多孔質アパタイト粒子コラーゲン複合体によるラット頭蓋骨クリティカルサイズ骨欠損部における骨再生の試み.  
第 62 回日本歯科理工学会学術講演会. 新潟市, 2013 年 10 月 20 日
- ④ 畠山 航, 平 雅之, 池田功司, 鬼原英道, 近藤 尚知.  
ラット頭蓋骨骨欠損部におけるハイドロキシアパタイト多孔体ディスクを用いた骨再生の試み.  
第 44 回日本口腔インプラント学会. 東京都, 2014 年 9 月 13 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畠山 航 (HATAKEYAMA Wataru)  
岩手医科大学・歯学部・助教  
研究者番号 : 20733728

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :