

論文内容の要旨

Effects of Addition of Nano-hydroxyapatite to Highly-pressed Collagen on Osteogenic Differentiation in Osteoblastic SaOS-2 Cells

ナノハイドロキシアパタイトの高度圧縮コラーゲンへの添加が
骨芽細胞様細胞 SaOS-2 細胞の骨系分化に及ぼす影響

(Nano Biomedicine Vol.8、 No.2 第8巻、第2号 1頁～10頁、平成28年12月)

いけだ こうじ
池田 功司

I. 研究目的

インプラント治療による機能回復は、無歯顎患者を含む多くの患者の QOL の回復と維持を可能とするが、骨量が少ない場合インプラント治療が容易には適用出来ない。その為、骨量をいかに回復するかが現在の課題である。本研究の目的は、プレス加工したナノ・アパタイト/コラーゲン複合体を自家調製し、同材料上に骨芽細胞様細胞 SaOS-2 細胞を播種し、複数の骨系分化マーカーを RT-PCR にて解析し骨伝導能を調べ、複合体の新規骨補填材としての有用性を評価することである。

II. 研究方法

①複合体調製：ナノサイズのアパタイトには(40 nm 径) (nHAP) を用いた。nHAP 粒子(1.5g)を中和した I 型コラーゲン (42ml) (COL) に混練し、 -80°C 3 時間の予備凍結後に、12 時間凍結乾燥した。プレスにはニュートンプレス装置を用いプレート状にし、同材料を打ち抜くことによって直径 6mm×厚さ 1mm の試料 (Press-nHAP/COL) を制作した。また Control として COL のみの試料 (Press-COL) も作成した。全試料にはエチレンオキサイドガス滅菌を施した。また、両試料の表面性状をあらかじめ走査型電子顕微鏡 (SEM) を使用し観察した。

②骨芽細胞様細胞培養系における評価：調製した複合体材料上で骨芽細胞様細胞 (SaOS-2) を 37°C 、 CO_2 : 5%インキュベーター中で 1、2、3、4 週間培養し、RT-PCR を用い複数の骨系分化マーカー発現の状態を計時的に評価した。使用した骨系分化マーカーとして Alkaline phosphatase (ALP)、Type 1 collagen (COL1)、Bone Sialo protein (BSP)、osteocalcin precursor (BGLAP) を用いた。ALP と COL1 は初期骨分化マーカー、BSP は中後期骨分化マーカーそして BGLAP は後期骨分化マーカーであった。内部標準用遺伝子には β -Actin を用いた。また、1 週、4 週培養後の SaOS-2 の形態変化を SEM で観察した。

III. 研究成績

SEM にて観察した Press-COL の表面性状は、プレス加工によりコラーゲン繊維が帯状に重なり合い、多くの間隙が見られた。一方、Press-nHAP/COL では、コラーゲン線維の間隙を埋めるように nHAP が埋入し、Press-COL より比較的滑沢な表面性状が観察された。また、高倍率では表面に単体や凝集した nHAP が見られた。

Press-nHAP/COL 上では、ALPL、COL1 の遺伝子発現は 2 週から 3 週でピークとなり、初期骨系分化が終了したと考えられた。BSP の遺伝子発現は、1 週から 3 週にかけて有意に増加し、3 週から 4 週にかけて低下し、中後期骨系分化も終了したと考えられた。BGLAP (OCN 前駆体) の遺伝子発現では 1 週から 4 週にかけて持続的に、また顕著に増加し、後期骨系分化の進展が示唆された。一方、P-COL 上では、1 週から 4 週にかけて、ALP、COL1、BSP と BGLAP の遺伝子発現は定常的か微増的であり、骨系分化のステージは初期から中後期内に留まり、

後期ステージには達していなかったと考えられた。

SEMを用いた観察では、Press-nHAP/COL上でSaOS-2細胞は1週の顆粒状から4週の高度進展形に変化し、骨系分化が最終ステージに達したと判断された。一方、Press-COL上では、SaOS-2細胞は線維芽細胞の形態を1週から4週まで維持し、骨系分化は後期にまで進展していないと判断された。

IV. 考察及び結論

骨芽細胞様細胞 SaOS-2 細胞は Press-COL 上と比較し、Press-nHAP/COL 上で有意に骨系分化が促進された。SaOS-2 細胞が試料上の nHAP 粒子を貪食溶解し放出 Ca イオン等が細胞内での細胞情報伝達機能 (MAPK 系等) に影響を与えた為であると考えられた。

上記より、Press-nHAP/COL は、ある種の疑似骨様の作用があり、それにより骨リモデリング、骨新生を誘導しうると考えられた。以上の結果から、Press-nHAP/COL は新規骨補填材料として、極めて有用と期待出来る。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 杉山 芳樹 (口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)
副査 教授 近藤 尚知 (補綴・インプラント学講座 補綴・インプラント学分野)
副査 准教授 平 雅之 (医療工学講座)

インプラント治療による機能回復は、無歯顎患者等にとって QOL の向上に繋がるが、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治療が容易には適用出来ない場合が少なくない。本研究の目的は、プレス加工したナノ・アパタイト/コラーゲン複合体を自家調製し、同材料上に骨芽細胞様細胞 SaOS-2 細胞を播種し、その骨系分化マーカーを RT-PCR にて解析し骨伝導能を調べ、新規骨補填材としての有用性を評価することである。

実験ではナノサイズハイドロキシアパタイト粒子を用い、複合体調整のため、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、ニュートンプレス機により 3t、2 分間の一軸両方向性加圧を加え、Φ6×1mm の円盤状試料に打ち抜いた (Press-nHAP/COL)。同試料にはエチレンオキサイドガス滅菌を施した。対照としてコラーゲンのみの試料も作製した (Press-COL)。また透過型電子顕微鏡 (SEM) にて表面性状の比較も行なった。作製した各試料上に骨芽細胞様細胞 SaOS-2 を播種し、5%CO₂/95%空気、37°C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 (ALPL、COL1、BSP、BGLAP) の遺伝子発現解析を行った。定量には $\Delta \Delta ct$ 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 Press-nHAP/COL 試料上で培養することで Press-COL 試料上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 BGLAP 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 Press-nHAP/COL 試料上で SaOS-2 は 1 週の顆粒状から 4 週の高度進展形に変化した。一方、Press-COL 試料上では線維芽細胞の形態を維持し、骨系分化は進展しないと判断された。

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、かつ今後の臨床現場における骨再生療法発展への貢献が期待できる。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

論文審査に加えて、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、下記のように、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。

記

杉山 教授より

問：自家調製した Press-nHAP/COL 材料の機械的性質について、特に臨床応用との関連で述べよ。

答：金属やセラミックの様に数値では表せないが、しなやかで、手指で少し曲げられる程度である。しかし、直接、咬合圧に耐えられる強度はないと考えられる。臨床応用に関しては、骨誘導能を持つ膜（メンブレン）や、塊状にした骨補填材が考えられる。

問：アパタイトにナノ粒子を使用した理由について述べよ。

答：ナノ粒子は、細胞（マクロファージなど）に貪食され細胞内での代謝に関わる為、骨の形成に関与する事が期待された。一方、現在市販されている大きなマクロサイズのアパタイトは直接細胞の貪食が生じず、骨伝導能の効果で臨床応用されている。ナノ粒子の応用が、本研究のノイエスの1つである。

問：貪食されたナノアパタイト粒子が骨芽細胞の骨系分化を促進する理由について述べよ。

答：細胞内に貪食されたナノアパタイトはファゴゾーム等で分解されカルシウムイオンやリン酸イオンを放出する。特にカルシウムイオンは細胞内シグナル伝達系（MAPK 等）を活性化し、骨系分化を促進すると考えられる。同時に、細胞の増殖能については抑制すると考えられる。

問：形成された骨と、nHAP/COL 材料との関係を述べよ。

答：これは別の動物実験結果から回答する。残存材料の中心部や近傍に実際に骨が出来ており、in vitro の SaOS-2 骨芽細胞の骨系分化が nHAP/COL によって促進される事と一致していた。

問：Scaffold としての考えを述べよ。

答：Scaffold としてはコラーゲンに依存し、スペースメイキングとしての役割もあると考えている。nHAP の添加により、骨伝導能が付加されると考えられる。なお、類似研究を行なった研究者の報告では、プレス加工を行なわないスポンジ状の場合、吸収が早く長期の骨伝導能が維持できない為、ニュートンプレスが必要であった。

問：出来る骨は皮質骨と考えていいのか述べよ。

答：これは別の動物実験結果から回答する。Villanueva 染色による組織観察から、出来た骨は皮質骨と考えられる。

近藤 教授より

問：自家調製した Press-nHAP/COL 材料上での細胞の増殖傾向はどうか述べよ。

答：プレス加工している為、材料表面は滑沢であり、細胞が接着しにくい。また、内部に入り込むことが出来ない。材料の表面凝集エネルギーも大きく、細胞接着は比較的困難であると考えられる。これら

の結果、1週までに増殖した細胞数は4週までは停滞するか、減少傾向にあった。SEM 像観察の結果も同様であった。ただし、Press-nHAP/COL 上では SaOS-2 細胞の増殖は抑制傾向ではあったが骨系分化は促進されていた。

問：骨系分化の促進を、SaOS-2 骨芽細胞の分化マーカーの増減で判断する事の妥当性について述べよ。また、他の種類の骨芽細胞でも同様の実験結果が得られるのかについて述べよ。

答：骨系分化を初期 (ALP、COL 1)、中期 (BSP)、後期 (BGLAP) に分け、分化のピークまでは遺伝子発現が増加し、ピークを超えると減少するのは SaOS-2 で通常起こる現象であり、過去の文献や所属講座の過去の研究でも報告されている。しかし、この傾向は他の骨芽細胞、例えば MC3T3-E1 骨芽細胞や KUSA (骨髄細胞) などで同様とは言い切れず、実験条件や実験材料に依存すると考えられる。

問：今後の展望について述べよ。

答：Press-nHAP/COL を用いてインプラント治療の臨床成績の向上を目指す。例えば、臨床部位としてはサイナスリフト、メンブレン、ブロック骨移植等である。もちろん動物実験、薬事申請・承認・治験を経てからの事である。付言すると、BMP 等の生理活性物質を用いないアプローチは実現性がより高いと考えられる。

平 准教授より

問：今回の in vitro の SaOS-2 骨芽細胞の培養実験は、in vivo の動物実験の結果と対比しうるものかについて述べよ。

答：動物実験については、ラットの頭蓋部骨欠損部に同サイズの Press-nHAP/COL ディスクを埋入し8週までの骨形成を μ CT および組織学的評価で調べている。動物実験においても Press-nHAP/COL は優れた骨形成能を有している事が確認出来た。すなわち、in vitro と in vivo の2実験の結果が一致していた。in vitro 実験では、nHAP によって骨芽細胞の骨系分化が促進された事が確認された。in vivo の実験では、さらに Press-nHAP/COL 上に多核巨細胞 (破骨細胞) が誘導・成熟し、材料の貪食、骨の新生が活発に生じる事が確認された。

参考論文

1. In Vivo Evaluation of Noble Porous Apatite Disks Implanted in Rat Critical-size Calvarial Defects by Micro-CT and Histological Observation. (Kouji Ikeda 他6名と共著) *Journal of Oral Tissue Engineering* 平成26年12月 第12巻1号 13頁~19頁