

研究助成報告書(中間・終了)

No.1

整理番号	H-J-102	報告者氏名	小幡 亜希子
------	---------	-------	--------

研究課題名

無機イオンによる細胞の活性化効果を活用した新規組織工学用セラミックス材料の開発

<代表研究者> 機関名：名古屋工業大学 職名：准教授 氏名：小幡亜希子

<共同研究者>	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：

<研究内容・成果等の要約>

ガラスおよびセラミックス系材料を、人工組織を構築するための足場材料（スキヤホールド）として有用と期待されている。実際に用いる際、材料は体内にて溶解し、最終的には再生組織と置き換わることが望まれる。つまり組織の再生過程において、材料を構成する無機イオンが周囲に放出される。これまでに、数種の無機イオンが骨形成性細胞の生物機能を促進すると報告されているが、多くの報告は一種のイオンの効果に着目するに留まる。ガラス系材料からは複数のイオンを同時に放出するのに対し、イオンの組合せによる細胞への影響についてはほぼ皆無である。

本研究課題では、複数の無機イオンを用いた細胞培養試験結果より、骨形成性細胞の生物機能に対するイオンの影響を検討し、将来的に、骨形成を促進させるのに有効な生体材料の化学組成設計へ導くことを目指した。Ca、Mg、Siイオンによる骨芽細胞様細胞の種々の生物機能に対する影響の検討することとし、各イオンの濃度・イオンの組合せ・各種生物機能（接着、増殖、分化、石灰化）の比較を行った。濃度調整した各イオン含有培地を作製し、その培地を用いてマウス由来骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を培養した。イオン源として、CaはCaCl₂·2H₂O、MgはMgSO₄·7H₂O、そしてSiはaminopropyltriethoxysilane(APTES)を加水分解・脱水縮合処理して得たゲルを用いた。

骨芽細胞様細胞の石灰化過程における4段階に対し、Si、Ca、Mgの3種のイオンの濃度、組合せによる影響を検討した結果、各段階に対して促進効果を示す濃度条件は異なることがわかった。傾向として、接着、増殖、分化といった初期から中期にかける段階においては、Mgが促進に対して効果的であることがわかった。一方、石灰化という後期の段階においては、抑制する傾向が見られた。本研究結果より、骨形成を促進させるのに有効な生体材料の化学組成設計として、目的とする作用に則した組成設計、およびイオンの供給時期を設計することが重要であることを見出した。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

口頭発表

1. 無機イオンの組合せ効果が骨芽細胞の接着に及ぼす影響
小笠原徹、小幡亜希子、春日敏宏
日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会、名古屋、2015/12/12.
2. Combined effects of silicate, calcium and magnesium ions on osteoblast-like cell functions
Akiko Obata, Toru Ogasawara, Shinya Yamada, Toshihiro Kasuga
The 40th International Conference on Advanced Ceramics and Composites (ICACC), Daytona Beach, Florida, USA, 2016.01.24-29.
3. 骨芽細胞様細胞に対する Si, Ca, Mg イオンの影響
小幡亜希子、小笠原徹、春日敏宏
日本金属学会 2016 年(第 157 回) 春期講演大会、東京(東京理科大学葛飾キャンパス)、2016.3.23-25.

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

目的

再生医療分野において日本は世界のトップレベルといえるが、一方で当分野に特化した材料研究においては発展が強く期待されているのが現状である。再生医療を支える重要な技術に組織工学があり、用いられる材料として人工組織を構築するための足場材料（スキャホールド）がある。スキャホールドに求められる機能として、細胞との親和性はもちろんのこと、連通気孔を有した多孔質構造や組織に適した機械物性などがあげられる。

本研究課題の最終目標は、このスキャホールド材料に「細胞の生物機能を操作する機能」をさらに付与することで高機能化することである。まずは骨組織の再生に焦点を絞り、ガラス系材料について検討を行った。ガラスおよびセラミックス系材料は、骨代替材料として有用であることがこれまでに報告されている。これら材料をスキャホールドとして応用する場合、材料は体内にて溶解し、最終的には再生組織と置き換わることが望まれる。つまり組織の再生過程において、材料を構成する無機イオンが周囲に放出される。

これまでに、数種の無機イオンが骨形成性細胞の生物機能を促進すると報告されているが、多くの報告は一種のイオンの効果に着目するに留まる。ガラス系材料からは複数のイオンを同時に放出するのに対し、イオンの組合せによる細胞への影響についてはほぼ皆無である。よって、イオンの組合せによる生物機能への影響について評価し、細胞を活性化させるのに最適な材料組成を提案することを最終目標とした。今回は材料から溶出する無機イオンに着目し、材料上の細胞の増殖・分化・石灰化などの生物機能を効果的に促進するのに有効なイオンの種類、量、そして複数のイオンの組合せ効果について細胞培養試験により検討した。

リン酸カルシウムやケイ酸カルシウム系材料が骨代替材料として有効であることが広く知られており、すでに臨床応用されているガラス・セラミックス系材料の多くはこれらに当たる。しかし、これら材料の組成が組織工学を用いて人工組織を構築するにあたり、最適かどうか不明である。同時に、とくにこの点に着目した研究は少ないのが現状である。そこで今回は、生体活性ガラスの組成に多く含まれる Ca、Si、そして Mg の 3 種の元素に着目し検討を行った。

以上のことから、複数の無機イオンを用いた細胞培養試験結果より、骨形成性細胞の生物機能に対するイオンの影響を検討し、将来的に、骨形成を促進させるのに有効な生体材料の化学組成設計へ導くことを目指した。Ca、Mg、Si イオンによる骨芽細胞様細胞の種々の生物機能に対する影響の検討することとし、各イオンの濃度・イオンの組合せ・各種生物機能（接着、増殖、分化、石灰化）の比較を行った。

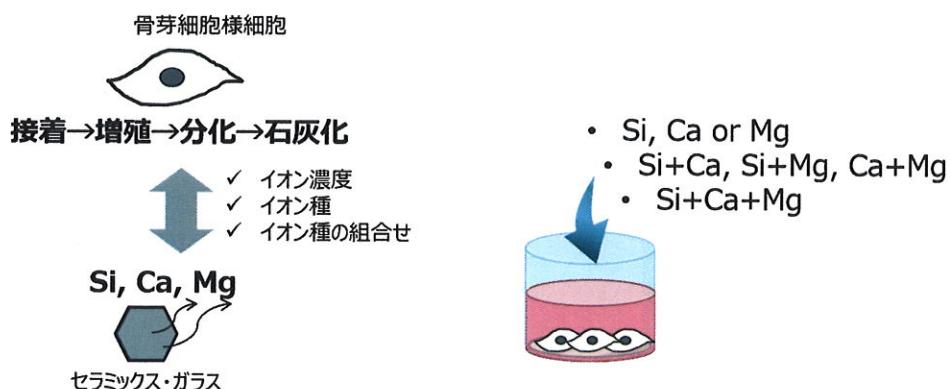


図 1. 本研究課題の概要

経過・結果・考察

濃度調整した各イオン含有培地を作製し、その培地を用いてマウス由来骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を培養した。イオン源として、CaはCaCl₂・2H₂O、MgはMgSO₄・7H₂O、そしてSiはaminopropyltriethoxysilane(APTES)を加水分解・脱水縮合処理して得たゲルを用いた。Si源としてAPTESゲルを用いた理由は、我々の研究グループでこれまでに、APTESを用いて有機無機コンポジット・ハイブリッド材料を開発しており、その材料から溶出するSiイオンが細胞の生物機能に対して影響を及ぼすことを既に見出していることによる。

骨芽細胞様細胞が石灰化する過程を、接着・増殖・分化・石灰化という4段階に設定し、各段階に対する各イオンおよび組合せが、どのように影響を及ぼすかを検討することとした。基礎実験として、通常培地を用いて同細胞を培養し、各段階のタイムポイントを見出した。その結果をもとに作製したイオン含有培地を用いるタイミングを、接着評価においては0～3 hr、増殖評価においては3 hr～5 days、分化評価には7～25 days、石灰化評価には7～42 daysと設定した。各段階に対するイオンの影響を観察すべく、設定したタイミングにのみイオン含有培地を用いて培養を行い、他の期間では通常培地を用いて培養した。

各単体イオンの細胞に及ぼす影響を報告する論文によると、各イオンの濃度は、Siは10～100 ppm、Caは80～400 ppm、そしてMgは25～750 ppmと幅広い濃度域で調査されている。しかし、高濃度域では細胞死を引き起こすことも報告されており、それらをふまえ、本研究においてSiは10～70 ppm、Caは80～400 ppm、そしてMgは25～500 ppmと設定した。これら濃度範囲内において4～5段階に濃度をふり、実験条件とした。作製したイオン含有培地の各イオン濃度はICP-AESを用いて確認した。

MC3T3-E1細胞の接着能におよぼす各イオン、濃度、組合せの影響を検討した。その結果、まず各イオン単体を含有する培地を処理した場合、2条件下で促進される結果がみられたが、全体的にはほぼ変化が無いことが分かった。一方で、組み合わせた場合、Siが50 ppm、Caが240 ppm、Mgが250 ppm(50Si-240Ca-250Mgと表記)が最も高い接着細胞数を示すことを見出した。また、Mgが組み合わさることで接着細胞数が増殖する傾向がみられ、よってMgの接着に対して促進効果があり、この効果は他のイオンが組み合わさって発現されることが判明した。

細胞の接着は点状の接着斑でおこり、この接着斑の多くはインテグリンと呼ばれるタンパク質から構成される。インテグリンは細胞外において、細胞外マトリックス(ECM)中のフィブロネクチンやコラーゲンなどと結合し、一方で細胞内においては、細胞骨格やシグナル伝達分子に結合することで、細胞内外を結合する働きをもつ。このインテグリンには、2価のカチオンが作用することが報告されており、さらにMgについては、インテグリンを活性化させて細胞接着を向上させることや、そこにCaが存在することで接着細胞数が減少するといった報告がある。本研究においても同様な傾向が観察されたことから、同様な挙動が細胞内外で起きたと考察している。

本細胞の増殖能におよぼす各影響について検討した。各イオン単体を含有する培地を処理した場合、Caでは濃度が上昇するにつれ細胞数も上昇する傾向がみられた。一方、SiとMgにおいては、今回設定した濃度範囲において低濃度または中濃度域において、もっとも高い細胞数を示す結果であった。両イオンにおいて共通して、高濃度域においては抑制の作用が観察された。つまり、両イオンについては過剰なイオン量が供給された場合は細胞の増殖を阻害するが、最適な濃度域においては促進するという事がわかった。このような結果は、多くの既報と符合していた。イオンを組み合わせた場合、10Si-400Ca-500Mgにおいて最も高い細胞数が観測された。特に着目する点として、Mgが500 ppmについて、単体で供給された場合は抑制作用が観察されたのに対し、他のイオンと組み合わせた場合はその作用が変化し、むしろ促進する結果となった。

今回の増殖能評価試験において、イオンを複数組み合わせることで拮抗作用を示す条件もあったが、上記した 10Si-400Ca-500Mg をはじめとする多くの組合せ条件下においては、促進効果を示したイオン単体の結果と比較して、より高い細胞数が観測された。つまり、本細胞の増殖に対してイオンを組み合わせて供給することは有用であることを見出した。

本細胞のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性値を計測することで、骨芽細胞への分化能を評価した。ALP は骨形成性細胞の分化能を評価する上で広く利用される表現形質の一つであり、比較的初期の分化時期に発現するといわれている。分化能評価結果においては、単体および組合せの全条件下を比較した時、250Mg が最も高い ALP 活性値を示すことが分かった。また、組合せ条件下においては、Ca 濃度の増加に伴い活性値が減少する傾向がみられた。

細胞の石灰化能を評価すべく、所定期間培養した後の細胞を洗浄・酸で溶解し、溶解液中の Ca 濃度を測定することで、Ca 沈着量を計測した。最長 42 日間まで計測したところ、どの条件下においても程度に差はあるにせよ、培養期間に伴って増大する傾向が観察された。単体のイオンを供給した条件下においては、Ca が最も高い石灰化能を示すことが分かった。さらに Si も促進する傾向が見られた。一方 Mg においては、どの濃度域においても抑制作用が観察された。イオンを組み合わせて供給した結果をふまえても、400Ca が最も高い Ca 沈着量を示した。また、Mg 濃度の増加に伴い Ca 沈着量が減少した。つまり、複数のイオンを組み合わせた際も、単体のイオンを胸腔した時と同様に Mg は Ca 沈着を抑制することが分かった。

細胞の分化が Mg で促進された原因として、Mg による Runx2 への影響が考えられる。Mg および Si が Runx2 の活性化によって分化を促進すると報告されている。一方で、石灰化に対して Mg が抑制作用を示したのも、この Runx2 への作用が関与しているのではないかと現在考えている。なぜなら Runx2 が活性化することにより、分化後期を抑制することが報告されている。つまり、Mg によって Runx2 が活性化され分化が促進されたが、この活性化が比較的長期間にわたり継続されたことで、石灰化に対しては抑制に作用したのではないかと我々は予想している。しかし、これらの考察については、さらなる実験が必要と考えている。

以上のように、骨芽細胞様細胞の石灰化過程における 4 段階に対し、Si, Ca, Mg の 3 種のイオンの濃度、組合せによる影響を検討した結果、各段階に対して促進効果を示す濃度条件は異なることがわかった。傾向としては、接着、増殖、分化といった初期から中期にかける段階においては、Mg が促進に対して効果的であることがわかった。一方、石灰化という後期の段階においては、抑制する傾向が見られた。本研究結果より、骨形成を促進させるのに有効な生体材料の化学組成設計として、目的とする作用に則した組成設計、およびイオンの供給時期を設計することが重要であることを見出した。