

博士論文概要

論文題目

骨再生医療に用いる生体材料の
表面性状の最適化に関する研究

The surface property optimizations of
biomaterials used in bone tissue
engineering

申請者

程	侃
Kan	CHENG

地球・環境資源理工学専攻 応用鉱物研究

2012年12月

近年，人工骨や経皮デバイスの作製にあたり，生体材料表面(細胞の足場，scaffold)の性状が細胞の接着，増殖，分化などの基本的な細胞挙動に大きく連動的に影響を与えることがわかってきた。しかしながら，生体材料上における細胞の接着挙動，特に初期細胞接着形態と足場性状との関係は十分に解明されているとは言い難いのが現状である。現在，独立行政法人産業技術総合研究所(以下は産総研と記す)のヒューマンライフテクノロジー研究部門では、現状の再生医療の経済的技術的問題を発展的に解決する方法として「生体内に埋入すると材料自身が細胞分化や組織再生を促がす」第3世代生体材料の開発を主テーマの1つとして研究が行なわれている。例えば，産総研では80例に及ぶ患者由来の間葉系幹細胞を用いて人工関節などの生体材料上での培養を行って再生培養骨を作製することに成功し，骨再生医療の序幕を開いたことが知られている。しかしながら，患者由来の細胞は同一組織由来であっても，人工関節などの生体材料上での細胞分化が大きく異なることが確認される中，再生培養骨が形成できず，患者への移植治療が出来ないケースも報告されている。この状況から，骨再生医療の実用化の促進には，移植時に期待される骨形成能を有しているか否かを，培養早期の細胞形態によって評価・判定する技術の確立が求められる。とくに，生体材料上における細胞の初期接着形態に着目して、生体材料表面の性状と細胞挙動の相関が明らかになれば、骨再生医療に用いる生体材料の細胞活性安定化と最適化へ大きく貢献することが期待される。そこで本研究では，骨再生医療で汎用に用いられるセラミックス系・金属系生体材料として，(1) 非吸収性 β -TCP含有アパタイト，(2) 異なる微細構造を有するアパタイト，(3) 種々のアパタイト相で表面修飾したチタン合金，の3種類のディスクを作製し，これら生体材料の最適な表面性状を比較検討し、異なる生体材料上における細胞挙動の予測技術の開発を目的とした。

本論文は，5章より構成されている。

第1章では，本論文の研究背景と概要，とくに研究に用いた実験方法について述べている。

具体的に生体材料とその表面での細胞挙動との相関を把握するためには，当該生体材料上における細胞の初期接着形態を把握し，さらにその初期細胞接着形態と細胞分化能の相関性を解明することが必要である。とくに，生体材料上における細胞の初期接着形態を調べるためには，初期細胞接着形態の可視化技術と評価技術が求められる。生体材料上での初期細胞接着形態の可視化技術として，これまでの細胞生物学では，透明な材料上に培養した細胞を位相差顕微鏡で観察する方

法が一般的であるが，本論文では金属系・セラミックス系などの不透明な生体材料を使用するため，透過型の光学系を用いる位相差顕微鏡では観察は不可能である。そこで，まず不透明な生体材料上に接着した細胞を可視化することを試みた。その一例として，生細胞を蛍光物質によって染色する技術により，生体材料に接着した細胞を可視化する観察技術を確立した。また，生体材料上での初期細胞接着形態の評価技術として汎用の可視化技術を応用し、生体材料上に接着した細胞の初期形態を画像化すれば，画像処理ソフトを用いた解析は可能となると考えた。そこで本研究では，“image-pro”という細胞形態画像処理専用の市販ソフトを利用して，生体材料に接着した初期細胞について形態(面積)などのパラメータを自動的に数値化する方法を用いた。

本研究で開発した評価技術の利点としては，①操作が簡単，②100個以上の細胞が連続的に観察できることで，評価結果の一般化ができる，などがある。一方，本評価技術の弱点として，①細胞の投影面積を観察するため，生体材料の表面状態に測定値が左右される，②面積画像の綺麗さは細胞厚みに左右される，などがある。さらに本評価技術を応用して，生体材料の表面性状と表面上における様々な細胞挙動との相関性を求めれば，初期細胞接着面積による細胞分化の予測技術への応用が期待できると考えられる。そこで，実際に数種の金属系・セラミックス系生体材料を作製し，それらの表面に加熱処理や酸処理等の物理的，化学的処理を施すことによって表面性状を調整し，その上で細胞を培養して初期細胞形態と細胞分化能の変化と相関性を系統的に調べる方法の構築について述べている。

第2章では，「非吸収性 β -TCP含有アパタイトディスク上における細胞初期接着挙動及び細胞分化能の相関」について述べている。

本章ではまず，セラミックス系生体材料として水酸アパタイト粉体に β -TCP粉体を異なる割合で混合し，所定温度で焼成して，様々な微細構造を有する非吸収性 β -TCP含有アパタイトディスクを作製する手法を確立した。そして，とくに一般に医用材料として用いられている混合調製比の非吸収性 β -TCP含有アパタイトディスク上においてラット由来間葉系幹細胞を培養した際の初期接着面積の可視化技術・評価技術を確立し，細胞の初期接着面積及び分化能の相関性について調べた。その結果，ディスク表面の β -TCP粒子およびハイドロキシアパタイト粒子の結晶粒径および集合組織性状が，表面で培養したラット細胞の初期接着面積及び分化能に有意に影響を与えることを見出した。これにより，非吸収性 β -TCP含有アパタイト質材料の最適な表面調製条件を求めることができた。

第 3 章では、「異なる微細構造を有するアパタイトディスク上における細胞初期接着挙動及び細胞分化能の相関」について述べている。

本章では、セラミックス系生体材料としてハイドロキシアパタイト粉体を原料として用い、異なる焼結温度により、様々な結晶粒径分布と表面微細構造を有するアパタイトディスクを系統的に作製する手法を確立した。そして、それら表面性状の異なるハイドロキシアパタイトディスク上にラット由来の間葉系幹細胞を播種し、3週間培養後の早期の細胞接着面積と骨形成分化の相関を確認した。ディスク表面のハイドロキシアパタイト粒子サイズと細胞接着面積の間で高い相関性が認められた。とくに 1150℃焼成で作製したディスクでは、表面は結晶粒子径が平均 1～2 μm の緻密集合組織となったが、細胞接着面積が有意に小さくなり、対応してオステオカルシン生成量が多くなったことから、本実験系では骨分化活性が最も高くなることがわかった。

第 4 章では、「種々のアパタイト層で表面修飾したチタン合金上における細胞初期接着挙動及び細胞分化能の相関」について述べている。

本章では、一般に人工骨や人工歯根として用いられる金属／セラミックスの複合生体材料として、チタン合金基材の表面に様々な条件で加熱処理や酸処理を施し、さらにその上に種々の結晶相組成や微細構造を有したアパタイト層を効率的に修飾形成する手法を確立した。形成されたアパタイト修飾層は基本的にはチタン合金表面の酸化状態による性状の変化によって、アパタイト層の Ca/P 比などの組成や微細構造が有意に変化し制御されることがわかった。作製した種々のアパタイト層で表面修飾したチタン合金製基板や経皮デバイス用のピンの上でラット由来の間葉系幹細胞を培養したところ、上記実験と同様に初期接着時における細胞形態と細胞分化の相関性を確認できた。

第 5 章 「結論」

本章では、本論文の成果をまとめ、さらに生体材料上での細胞分化の予測技術などへの応用展開の可能性について述べている。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 程 侃 印

(2012年11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
筆頭論文 (査読有)	○ Correlation between cell attachment areas after 2 hours of culture and osteogenic differentiation activity of rat mesenchymal stem cells on hydroxyapatite substrates with various surface <u>Kan Cheng</u> , Motohiro Hirose, Xiupeng Wang, Yu Sogo, Atsushi Yamazaki, Atsuo Ito <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> 2012.
筆頭論文 (査読有)	○ Development of an early estimation method for predicting later osteogenic differentiation activity of rat mesenchymal stem cells cultured on biomaterials <u>Kan Cheng</u> , Motohiro Hirose, Xiupeng Wang, Yu Sogo, Atsushi Yamazaki, Atsuo Ito <i>Science and Technology of Advanced Materials</i> 2012.
共著論文 (査読有)	Effect of coprecipitation temperature on the properties and activity of fibroblast growth factor-2 apatite composite layer Xia Li, Xiupeng Wang, Ito Atsuo, Sogo Yu, <u>Kan Cheng</u> , Oyane Ayako <i>Materials Science and Engineering C</i> 2009, vol.29, 216-221
学会発表	室温 2 回法による陽極酸化チタンピン上への繊維芽細胞成長因子(FGF)-2/アパタイト複合層の形成 程侃、山崎淳司、大矢根綾子、十河友、王秀鵬、伊藤敦夫 2008年3月 日本セラミックス協会 2008年年会
学会発表	FGF-2-アパタイト複合層の Ti ピン上への形成 程侃、山崎淳司、大矢根綾子、十河友、王秀鵬、伊藤敦夫 2008年11月 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008
学会発表	種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上における細胞挙動の評価 程侃、廣瀬志弘、六崎裕高、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫 2010年11月 第32回 日本バイオマテリアル学会大会
学会発表	種々の表面性状を有するアパタイト層複合体を用いた間葉系幹細胞培養 程侃、廣瀬志弘、六崎裕高、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫 2011年3月 第10回 日本再生医療学会総会

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
学会発表	<p>Correlation between osteoblastic differentiation activity and cell morphology of rat mesenchymal stem cells <u>Kan Cheng</u>, Motohiro Hirose, Hirotaka Mutsuzaki, Xiupeng Wang, Yu Sogo, Atsushi Yamazaki, Atsuo Ito 2011年3月 国際幹細胞学会</p>
学会発表	<p>微細表面性状を有するチタン/アパタイト層複合体を用いた間葉系幹細胞の骨分化評価 <u>程侃</u>、廣瀬志弘、六崎裕高、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫 2011年11月 第33回日本バイオマテリアル学会大会</p>
学会発表	<p>骨の再生医療に用いる生体材料の最適な表面性状の解明その① <u>程侃</u>、廣瀬志弘、六崎裕高、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫 2012年1月つくば医工連携フォーラム2012 「医工連携研究から社会還元・産業化へ」</p>
学会発表	<p>骨の再生医療に用いる生体材料の最適な表面性状の解明その② <u>程侃</u>、廣瀬志弘、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫 2012年11月 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）