

# 博士論文審査報告書

## 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 応用鉱物学研究

2013年 7月

近年、人工骨や経皮デバイスなどの生体材料表面（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して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、特に初期細胞接着形態と足場性状との関係に関する研究は未だ少ないのが現状である。例えば、独立行政法人産業技術総合研究所では、80例に及ぶ患者由来の間葉系幹細胞を人工関節などの生体材料上で培養することで、再生培養骨を作製し、骨再生医療の実用化への道筋を開いた。しかしながら、患者由来の細胞は、例え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能が大きく異なることから、再生培養骨が形成されず、患者への移植治療が出来ないケースがいくつか報告されている。すなわち、骨再生医療の実用化の促進には、細胞が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強く求められることになる。とくに、生体材料上における細胞の初期接着形態から、生体材料表面の性状と細胞挙動との相関性が求められれば、骨再生医療に用いる生体材料の最適化へ大きく貢献すると推察される。そこで本研究では、骨再生医療で汎用されている生体材料として、(1) 非吸収性 $\beta$ -TCP含有アパタイトディスク、(2) 異なる微細構造を有するアパタイトディスク、(3) 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン合金、の3種類を選択し、これら生体材料の最適な表面性状を検討することにより、異なる生体材料上における細胞の分化・増殖挙動の予測技術の開発を目的とした。

本論文は、大きく分けて四部で構成されている。第一部では、生体材料分野及び細胞生物学分野の二つ視点を用いて、骨再生医療に用いる生体材料の表面性状の現状を紹介している(第1章)。第二部では、骨再生医療に用いる生体材料としてチタン合金材料の高機能化について述べている(第2章)。第三部では、骨再生医療に用いる多種の材料上における細胞挙動について検討し、その細胞挙動の予測技術について述べている(第3、4、5章)。そして第四部では、各章の結果及び考察を総合的にまとめている(第6章)。

第1章では、本論文の研究背景と概要、とくに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った。しかし、金属系・セラミックス系などの不透明な生体材料は、透過光学系を用いる位相差顕微鏡では観察が不可能である。そこで、不透明な生体材料の細胞について、生細胞を蛍光物質によって染色し、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。また初期細胞接着形態を、細胞形態画像処理専用ソフト”image-pro”を用いて、生体材料上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迅速かつ自動的に数値化する方法を開発した。

第2章では、陽極酸化チタンピン上への線維芽細胞成長因子(FGF)-2/アパタイト複合層の形成について述べている。まず、室温で過飽和リン酸カルシウム溶液に陽極酸化チタンピンを浸漬することにより、チタン合金ピン上に均質なアパタイト層を形成させる。次に、FGF-2を含有する過飽和リン酸カルシウム溶液に、このアパタイト層をコーティングした陽極酸化チタンピンを容器内壁に触れないように浸漬し、25℃、24時間静置することで、 $0.41 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のFGF-2を含有するアパタイト複合層を構築することに成功した。ここで、FGF-2は物理吸着ではなく、アパタイトと共に担持することでチタン合金ピン上に固定できることを明らかにした。

第3章では、非吸収性 $\beta$ -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。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 $\beta$ -TCP粉体を異なる割合で混合し、所定温度で焼成することで、表面に様々な微細構造を有する非吸収性 $\beta$ -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、このディスク上において、ラット由来間葉系幹細胞の初期接着面積を可視化し評価する技術を確立して、培養2時間後の細胞の初期接着面積と3週間培養後の骨分化能の相関性について調べている。その結果、ディスク表面の $\beta$ -TCP粒子およびハイドロキシアパタイト粒子の集合組織性状が、間葉系幹細胞の初期接着面積及び骨分化能に影響を与えることを初めて見出した。これにより、非吸収性 $\beta$ -TCP含有アパタイト材料の最適な表面条件を求めている。

第4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と細胞分化能の相関について述べている。まず、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した。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、培養2時間後の細胞接着面積と3週間培養後の骨分化の相関を検討し、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との相関性を見出し、概して細胞接着面積が小さいほど骨分化活性が高いことを明らかにした。

第5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。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用いられるチタン合金の表面を様々な条件で加熱処理や酸処理を行い、種々の結晶相組成や微細構造を有したアパタイト層を修飾形成する手法が確立している。ここで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って構成組成や微細構造が制御される。本研究では、種々のアパタイト層で表面修飾したチタン合金を用いてラット由来間葉系幹細胞の初期接着時における細胞形態と細胞分化の相関性を初めて示した。

第6章では、論文の成果をまとめ、生体材料上での細胞分化の予測技術を含めて、これから向かうべき研究の方向性について述べている。

以上要するに、本論文は生体材料上での初期接着時における細胞形態を客観的に可視化解析する方法を確立し、当該細胞の分化能および増殖能を迅速に評価する技術を初めて提示したものであり、同時に生体材料の表面性状と細胞の初期接着形態との相関を明らかにしたことで、生体材料設計を最適化する要因を提示したものである。これらの成果は、素材物質科学、生体材料工学、細胞工学のみならず、再生医療の発展に大きく寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（工学）の学位を受けるに相応しいものであると認める。

2013年 7月

審査員

(主査) 早稲田大学理工学術院教授	工学博士 (早稲田大学)	山崎淳司
早稲田大学理工学術院教授	博士(理学) (大阪市立大学)	香村一夫
早稲田大学理工学術院教授	理学博士 (東京大学)	内田悦生
独立行政法人産業技術総合研究所主任研究員		
	博士(学術) (東京大学)	廣瀬志弘