

ハイドロキシアパタイトと胚性幹細胞のコンポジット骨補填材の開発

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

○永井 亜希子、野崎 浩佑、江部 典子、山下 仁大

Development of new bone substitute using hydroxyapatite and embryonic stem cells
by ○Akiko NAGAI, Kosuke NOZAKI, Noriko EBE and Kimihiro YAMASHITA

1. 研究目的

骨腫瘍や外傷など治療では、形態および機能の回復を目的として、骨欠損部に自家骨移植や種々の生体材料が応用されている。自家骨移植では、採取量および手術侵襲などの問題点があり、その適用に制限を受けざるを得ない。一方リン酸カルシウム系セラミックスを主とする人工骨補填剤は、材料の採取に制限を受けることなく臨床応用が可能である。人工骨材としては、ハイドロキシアパタイトや TCP、リン酸カルシウムセメントが用いられている。また、材料の機能や強度を向上させるために、有機材料やコラーゲンなどのタンパク質、細胞とのコンポジットが研究されている。

胚性幹細胞（ES 細胞）は、受精卵から得られる細胞で、体外で培養することができる。自己複製能と多分化能を持ち、長年、幹細胞研究をリードしてきた。倫理的観点や、拒絶反応からヒトに応用することが難しいとされてきたが、iPS 細胞の研究が進めばこれらの問題点を解決されそうである。

本課題では、新しい骨補填材の開発にむけた検討として、ハイドロキシアパタイトと ES 細胞のコンポジットの開発を試みたので報告する。長年研究されているマウス ES 細胞を用い、アパタイト上で培養・増殖させた後、骨分化させ、解析を行った。

2. 研究成果

2. 1 ES 細胞のアパタイト上における培養

通常、ES 細胞はフィーダー細胞上で培養するため、生体内に用いるためには、このフィーダー細胞と培養液中の血清が問題となる。

本課題では、フィーダーフリーで培養可能な ES 細胞を理研バイオリソースセンター小倉先生より供与していただき、フィーダーの代わりに、アパタイトを 0.1%ゼラチンにて前処理を行った。また、無血清培地に LIF と GSK3 阻害剤を添加した。LIF は、Stat3 pathway、Akt 経路において、自己複製能を維持し、GSK3 阻害剤は、Wnt pathway において 多能性維持に関与すると考えられている。LIF および GSK3 inhibitor の影響を見るために、ガラスとアパタイト上に培養した ES 細胞にそれぞれを添加した。両者を添加した

場合、どちらの基盤上でもこれは未分化 ES 細胞の特徴である、アルカリホスファターゼ陽性の丸くて緊密なコロニーが得られた。どちらかのみでの添加では、コロニーの形はいびつとなり、未分化状態が維持されていないと考えられた (Fig. 1)。

次にアパタイト上で培養した ES 細胞が、自己複製能と多分化能を維持しているかを調べた。6 継代行った

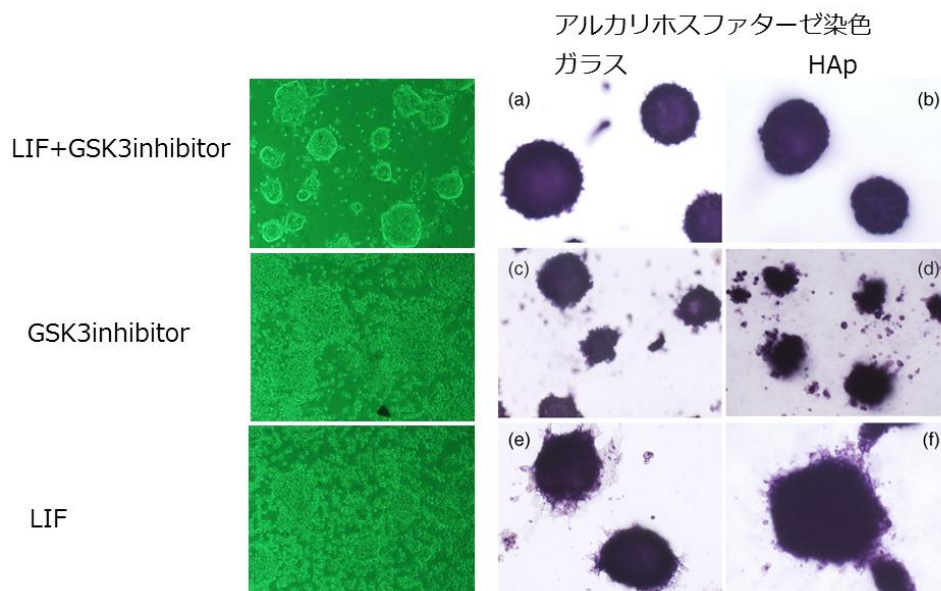


Fig. 1. ガラス、HAp 上で培養した ES 細胞への添加剤の効果

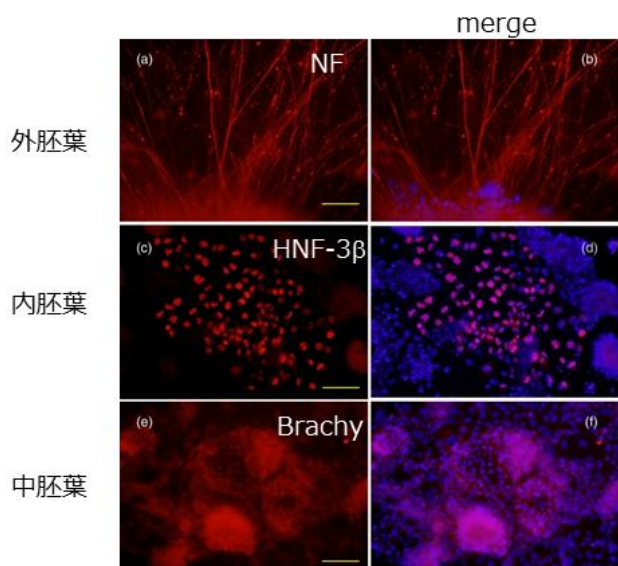


Fig. 2. 分化誘導後の三胚葉それぞれのマーカー発現(核 ; DAPI 染色)

後も、未分化マーカーである Oct4 と、Nanog が発現していることを免疫染色にて確認できた。また、胚葉体を作製した後、3 胚葉に分化させることができ（外胚葉 = Nestin、内胚葉 = HNF-3 β 、中胚葉 = Brachyury）、多分化能を維持していることが示された (Fig. 2)。

2. 2 ES 細胞のアパタイト上における分化

ES 細胞をアパタイト上で増殖させた後、誘導因子を用いて骨分化させた。骨分化させるには、胚葉体を作製してから分化させる方法と、ES コロニーを直接分化させる方法がある。胚葉体は、多くの細胞を分化させるのに魅力的な方法であるが、一度細胞を基板からはがす必要があるため、今回は直接法を選択した。分化させた細胞は qRT-PCR 法にて、骨のマーカーである Cbfa1 や Osteopontin を発現していることが確認された。また、細胞周囲の細胞外基質においては、アリザリンレッド S 染色や、EDX 法にて

リン酸カルシウムの存在が示された。これらの結果より、未分化—骨分化状態を制御することができるハイドロキシアパタイトと ES 細胞のコンポジットを作製することが示された。

3. 参考文献

- (1) Wada N, Horiuchi N, Nakamura M, Nozaki K, Hiyama T, Nagai A, Yamashita K Controlled Calcite Nucleation on Polarization Calcite Single Crystal Substrates in the Presence of Polyacryl Acid, J. Cryst. Growth. in press
- (2) Matsui N, Nozaki K, Ishihara K, Yamashita K, Nagai A. Concentration-dependent effects of fibronectin adsorbed on hydroxyapatite surfaces on osteoblast adhesion. Mater Sci Engineer C, 48, 378-383, 2015.
- (3) Nozaki K, Wang W, Horiuchi N, Nakamura M, Takakuda K, Yamashita K, Nagai A. Enhanced osteoconductivity of titanium implant by polarization-induced surface charges. J Biomed Mater Res A. 2014;102(9):3077-86.
- (4) Nagai A, Suzuki Y, Tsutsumi Y, Nozaki K, Wada N, Katayama K, Hanawa T, Yamashita K. Anodic oxidation of a Co-Ni-Cr-Mo alloy and its inhibitory effect on platelet activation. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014;102(4):659-66.
- (5) Nakamura M, Kobayashi A, Nozaki K, Horiuchi N, Nagai A, Yamashita K. Improvement of osteoblast adhesion through polarization of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on metal. J Med Biol Eng, 2014, 34 (1), 44-48.
- (6) Shinonaga T, Tsukamoto M, Nagai A, Yamashita K, Hanawa T, Matsushita N, Xie G, Abe N, Cell Spreading on Titanium Dioxide Film Formed and Modified with Aerosol Beam and Femtosecond Laser, Appl. Surf. Sci., 288 (1), 649-653 (2014).
- (7) Horiuchi N, Tsuchiya Y, Nozaki K, Nakamura M, Nagai A, Hashimoto K, Yamashita K, Thermally Stimulated Depolarization Current Measurements in Cubic and Tetragonal Yttria-Stabilized Zirconia, Solid State Ionics, 262, 500-503 (2014).
- (8) Wada N, Horiuchi N, Nakamura M, Nozaki K, Hiyama T, Nagai A, Yamashita K, Cooperative Effects of Polarization and Polyaspartic Acid on Formation of Calcium Carbonate Films with a Multiple Phase Structure on Oriented Calcite Substrates, J. Cryst. Growth, 402, 179-186 (2014).
- (9) Horiuchi N, Nakaguki S, Wada N, Nozaki K, Nakamura M, Nagai A, Katayama K, Yamashita K, Polarization Induced Surface Charge in Hydroxyapatite Ceramics, J. Appl. Phys., 116, 014902 (2014).
- (10) Nagai A, Hattori T, Hirose M, Ogura A, Nozaki K, Aizawa M, Yamashita K. Mouse embryonic stem cells cultured under serum- and feeder-free conditions maintain their self-renewal capacity on hydroxyapatite. Mater Sci Engineer C, 34, 214-220, 2014.