

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659670

研究課題名(和文) 骨組織再生のためのナノカーボンファイバーシートを用いた機能性足場材の開発

研究課題名(英文) Development of a biofunctional scaffold using nanocarbon fiber sheets for bone regeneration

研究代表者

齋藤 直人 (SAITO, Naoto)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：80283258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： エレクトロスピニング法で作製したナノサイズのカーボンファイバーを立体構築したナノカーボンファイバーシート(NCFS)を開発し、その骨組織親和性、骨形成能を評価し骨組織再生療法のscaffoldとしての可能性を検討した。

NCFSは骨形成蛋白質(rhBMP-2)を複合させることによりマウス頭蓋骨に形成した骨欠損部に良好な骨再生を誘導した。また、骨芽細胞の増殖試験では、NCFS上にて骨芽細胞は強い増殖性を示し、石灰化培地によるNCFS上での培養では骨芽細胞の分化を示すALPの活性が上昇していることが確認された。これらの結果から、NCFSは骨再生のscaffoldとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： We recently developed nanocarbon fiber sheets (NCFs) made from electrospun nanosized carbon fiber. Here, we investigated the possibility of using NCFs as a scaffold for bone regeneration by evaluating bone tissue compatibility and osteogenesis.

NCFs scaffolding enabled good bone regeneration of skull defects in mice through interactions with the bone morphogenic protein rhBMP-2. In proliferation trials, osteoblasts showed good compatibility with NCFs, and ALP activity in culture assays with calcification medium indicated elevated differentiation of osteoblasts. Based on these findings, NCFs may have potential bioapplications as a scaffold for bone regeneration.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨組織再生 カーボンファイバー scaffold 生体安全性

### 1. 研究開始当初の背景

近年 iPS 細胞の樹立などにより再生医療研究が大きく進展したが、その実用化には組織構築のための scaffold が必須である。これまでに scaffold として様々な生体材料が研究されてきたが、scaffold そのものが生体内で組織再生を促進する機能性 scaffold の開発には至っていない。この機能性 scaffold が実用化されれば、細胞やサイトカインのもつ再生能と相乗効果を発揮して、有効性の高い新しい再生医療技術を創生することができる。我々はこれまでに、エレクトロスピニング法で作製したナノサイズのカーボンファイバーの立体構築に初めて成功し、骨組織再生の scaffold として応用が可能なことを確認した。この新知見を基に、骨組織再生を促進する生体メカニズムを探究し、骨組織の再生能を飛躍的に高める機能性 scaffold の開発を試みる。我々は長年骨再生の scaffold に関する研究を行っており [Nat Biotechnol(IF 31.085) 2001, Chem Soc Rev (IF 26.583) 2009, 2011 等]、優れたナノカーボン技術を有している信州大学工学部[Endo M. Nature (IF 36.104) 2005 等]と協力して、本研究を医学・工学双方から推進する。

### 2. 研究の目的

骨組織再生の足場材 (scaffold) に応用するために、エレクトロスピニング法を用いてナノサイズのカーボンファイバーを立体構築することに成功した(図 1、図 2)。この新しいナノカーボンファイバーシート (Nano carbon fiber sheet, NCFS) と生体の反応を組織、細胞、細胞内レベルまで解明することにより、骨再生能を飛躍的に高める機能性 scaffold の開発を試みる。

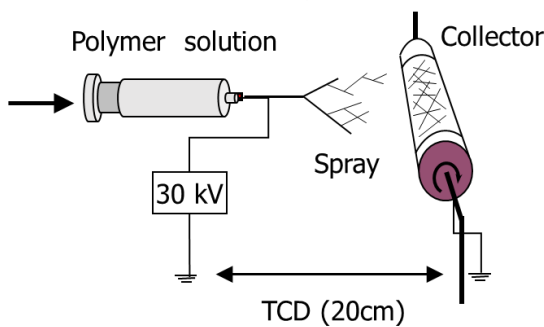


図1. NCFSの作製

比表面積の大きな、生体親和性の高いナノカーボンファイバーの立体構造体は、高い細胞接着性と多孔性を示し、細胞や血管の侵入、細胞やサイトカインの保持などの点で scaffold として有利である。さらにナノカーボンが周囲のカルシウム濃度を高めるとともに、ハイドロキシアパタイトが析出する核になると考えられる。このナノカーボンファイバーが骨形成を促進するメカニズムをさらに詳細に探求し、骨形成促進機能を向上することにより、細胞やサイトカインの骨再

生能を飛躍的に高める機能性 scaffold を達成する。今後ナノカーボンファイバーは、骨以外の組織再生や scaffold 以外の生体材料である人工関節、癌治療の DDS、イメージング等への応用研究が国際的に進展すると予想される。従来のカーボンファイバーはすでに脊椎固定材料や腱の補強材料として臨床応用されているが、ナノサイズに特異な生体反応を示す可能性があり、本研究では生体安全性も詳細に検討する。

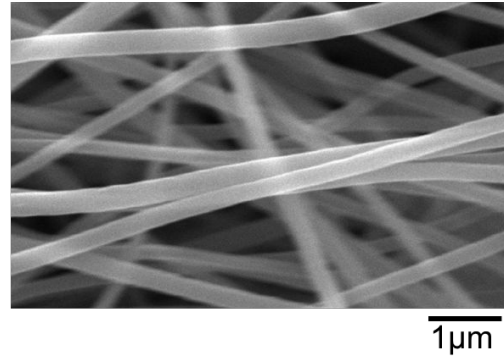


図2. NCFSの走査型電子顕微鏡像

本研究は、ナノカーボンファイバーシートを生体に応用して、骨組織再生を促進する機能性 scaffold を開発する世界初の挑戦である。現在停滞している骨の再生医療技術を飛躍的に向上させるだけでなく、他の組織再生にも応用が可能で、再生医療全体の推進に大きく貢献する。また、ナノカーボンファイバーの骨形成促進能を探究することにより、これまで不明であった骨形成初期の石灰化機序が解明される可能性がある。さらに、今後発展が期待されるナノカーボンファイバーの生体応用のための、生体安全性を評価する意義は大きいと考える。

### 3. 研究の方法

(1) 6 週齢 ddY マウスにネンブータル注射液 (ペントバルビタールナトリウム、大日本製薬) を 30mg/kg 腹腔内注射した。手術中に体動の多いマウスはイソフルランを吸入させた。1%リドカインを頭頂部皮下に注射し、局所麻酔とした。皮膚をメスで切開し、頭蓋骨を露出させ、骨膜を丁寧に剥離し、骨を露出させ、頭蓋骨にトレフィンバーを用いて直径 5mm の Critical size の骨欠損を作成した。骨欠損部に各サンプルを充填し、皮膚を縫合した。

サンプルは、ナノカーボンファイバーシートを充填したものを NCFS 群としたのに対し、何も充填しないものを negative control 群とし、positive control としてコラーゲンスポンジ (Collacote) を充填したものをコラーゲン群とした。

マウスは 12 週後にジエチルエーテルの過量吸入にて安楽死させ、動物用マイクロ CT ((RmCT, Rigaku 社) (図 3) にて頭蓋骨を撮影し、骨形成を評価した。



図3. RmCT

(2) NCFS 上とカバーガラス上で、マウス骨芽細胞系 cell line である MC3T3-E1 細胞を培養し、細胞増殖能と骨分化能を評価するため、Alamar Blue assay と ALP(alkaline phosphatase) assay を行った。

《Alamar Blue assay》96well plate 上に直径 5mm のカバーガラスと、同じ大きさに切った NCFS を乗せ、MC3T3-E1 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/sample となるように播種し、3 日目に Alamar Blue assay を行った。カバーガラスと NCFS を別のプレートに移し、100uL の  $\alpha$ -MEM 培地と 10uL の Alamar Blue reagent を各 well にそれぞれ注入し、1 時間後に蛍光強度を測定した。サンプル自体が蛍光強度に影響することを避けるため、それぞれ、細胞を播種しないサンプルを同数作成し Reagent blank とし、蛍光強度は Reagent blank との比で評価した。

《ALP assay》96well plate 上に直径 5mm のカバーガラスと、同じ大きさに切った NCFS を乗せ、MC3T3-E1 細胞を  $4.0 \times 10^3$  cells/sample となるように 8well ずつ播種した。2 日後、それぞれの群の 4well は  $\alpha$ -MEM、4well は石灰化培地 ( $\alpha$ MEM+100 $\mu$ g/ml Ascorbic Acid + 5mM  $\beta$ -Glycerophosphate) に培地を交換し、その 8 日後、それぞれに対し蛋白濃度を測定するためにピシンコニン酸を用いた BCA assay と、ALP 活性を測るため ALP assay を行った。細胞溶解とタンパク質の可溶化のため、96well plate の 1well あたり 100uL の PBS(-) で 2 回 wash し、各 well に 100 $\mu$ L ずつの RIPA buffer を注入して氷上に 15 分静置した。その後、上清を細胞溶解液として ALP 活性・蛋白濃度の定量を行った。BCA assay にはプロテインアッセイ BCA キット(Wako)を、ALP assay にはラボアッセイ ALP(Wako)を用いた。

#### 4. 研究成果

(1)動物用マイクロ CT によるマウス頭蓋骨の観察では、negative control 群では骨欠損は修復されず、欠損部は開存したままであった。コラーゲンスポンジを使用した positive

control 群および、NCFS 群では、マウス頭蓋骨欠損部に新生骨が形成され、骨欠損部が修復されていることが観察できた(図 4)。positive control 群と NCFS 群の間に、骨修復に関して明らかな差異を認めなかった。NCFS 群では、骨欠損作成部に骨融解像などの有害反応は認められず、NCFS は骨組織親和性についても優れていると考えられた。

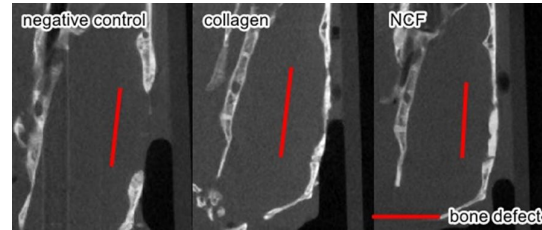


図4. 骨欠損作成後12週のマウス頭蓋骨CT像

(2)マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞による細胞親和性試験

《Alamar Blue assay》NCFS 上で培養した MC3T3-E1 細胞は、control のカバーガラス上で培養した同細胞と比較し、有意に高い蛍光強度を示し、良好な細胞増殖性が確認できた(図 5)。

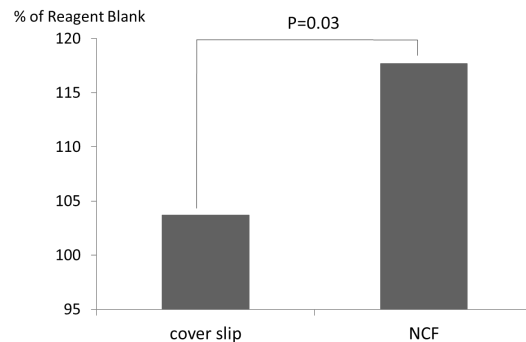


図5. 培養MC3T3-E1細胞の細胞増殖性(Alamar Blue assay)

《ALP assay》カバーガラス群および NCFS 群で、石灰化培地を使用した群は  $\alpha$ MEM で培養した群と比較して ALP 活性が上昇していたが、両群間に有意差は認めなかった(図 6)。この結果から、NCFS 上でも MC3T3-E1 細胞の石灰化誘導が問題なく起こることが確認でき、NCFS は骨再生療法における骨形成のための scaffold として有用であることが示唆された。

(3)NCF の安全性評価

NCF を生体材料に応用するための安全性試験として、同じナノカーボンであるカーボンナノチューブを用いて、培養細胞の反応試験、関節内埋め込み試験などを実施し、その結果を NCF にも適応可能であるかを検討した。広範囲にわたり適応が可能であるが、今後の実用化のためには、NCF を用いた安全性評価試験を追加して実施することとした。

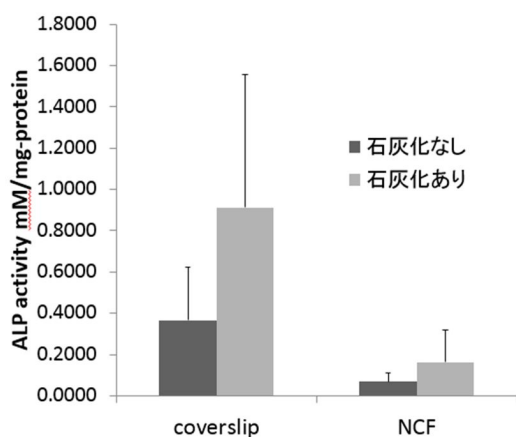


図6. 培養MC3T3-E1細胞のALP活性

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Saito N, Haniu H, Usui Y, Aoki K, Hara K, Takanashi S, Shimizu M, Narita N, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Kato H, Nishimura N, Taruta S, Endo M. Safe clinical use of carbon nanotubes as innovative biomaterials. Chem Rev 114(11):6040-6079, 2014. 査読有  
DOI: 10.1021/cr400341h.

Haniu H, Saito N, Matsuda N, Tsukahara T, Usui Y, Maruyama K, Takanashi S, Aoki K, Kobayashi S, Nomura H, Tanaka M, Okamoto M, Kato H. Biological responses according to the shape and size of carbon nanotubes in BEAS-2B and MESO-1 cells. Int J Nanomed 9:1979-1989, 2014. 査読有  
DOI: 10.2147/IJN.S58661.

Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Maruyama K, Usui Y, Aoki K, Takanashi S, Kobayashi S, Nomura H, Okamoto M, Shimizu M, Kato H. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. Toxicol in Vitro 27 (6):1679-1685, 2013. 査読有  
DOI: 10.1016/j.tiv.2013.04.012.

[学会発表](計 6件)

Nomura H, Haniu H, Takanashi S, Kobayashi S, Okamoto M, Aoki K, Maruyama K, Usui Y, Kato H, Saito N. Comparison of intraarticular reactions to Multi Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) by injection at once with three divided times. 22th Annual

Meeting of the European Orthopaedic Research Society, Nantes, France, July 2-4, 2014.

Takanashi S, Haniu H, Usui Y, Aoki K, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Tanaka M, Kato H, Saito N. Carcinogenicity evaluation of carbon nanotubes in rasH2 mice. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Nagoya, Japan, October 28-31, 2013.

Haniu H, Saito N, Matsuda N, Maruyama K, Tsukahara T, Usui Y, Takanashi S, Aoki K, Kobayashi S, Nomura H, Okamoto M, Shimizu M, Kato H. Endocytosis of MWCNT in BEAS-2B cells are affected by the culture medium type. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Nagoya, Japan, October 28-31, 2013.

Nomura H, Haniu H, Takanashi S, Kobayashi S, Okamoto M, Aoki K, Maruyama K, Usui Y, Kato H, Saito N. Intraarticular reaction and secretion of inflammatory chemokines to Multi wall carbon nanotubes. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Nagoya, Japan, October 28-31, 2013.

Nomura H, Haniu H, Takanashi S, Kobayashi S, Okamoto M, Aoki K, Maruyama K, Usui Y, Kato H, Saito N. Intraarticular reaction and secretion of inflammatory chemokines to Multi wall carbon nanotubes. 8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies, Venice, Italy, October 13-16, 2013.

Haniu H, Saito N, Matsuda N, Usui Y, Aoki K, Takanashi S, Kobayashi S, Nomura H, Okamoto M, Kato H. The biological response to carbon nanotubes in the BEAS-2B cell line is affected by medium conditions. the 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, USA, March 10-14, 2013.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 直人 (SAITO, Naoto)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：80283258

(2)研究分担者

加藤 博之 (KATO, Hiroyuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号： 40204490

KIM YOONG AHM ( KIM, Yoong Ahm )  
信州大学・工学部・准教授  
研究者番号： 70362100  
(平成 25 年度 8 月まで)

(3)連携研究者

薄井 雄企 ( USUI , Yuki )  
信州大学・医学部附属病院・特任研究員  
研究者番号： 00467169

羽二生 久夫 ( HANIU , Hisao )  
信州大学・学術研究院医学系・講師  
研究者番号： 30252050

清水 政幸 ( SHIMIZU , Masayuki )  
信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用)  
研究者番号： 40467171

高梨 誠司 ( TAKANASHI , Seiji )  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号： 70596783

岡本 正則 ( OKAMOTO , Masanori )  
信州大学・医学部附属病院・助教(診療)  
研究者番号： 50596781

小林 伸輔 ( KOBAYASHI , Shinsuke )  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号： 40624705

田中 学 ( TANAKA , Manabu )  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号： 30723069