

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16687

研究課題名(和文) 膨張黒鉛を足場材に用いた新規骨再生技術の開発

研究課題名(英文) Expanded Graphite as a Scaffold for Bone Regeneration

研究代表者

傍島 淳(Sobajima, Atsushi)

信州大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00770760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膨張黒鉛の骨形成能の評価が目的である。動物実験ではコラーゲンとBMP-2に膨張黒鉛を加えたものをマウスの背部皮下に埋め込み、異所骨形成を評価したが、実験ごとにデータのばらつきが大きく、最終判断としては骨形成促進効果はないと判断した。細胞を使った安全性と骨形成能についての検討は膨張黒鉛の分散状態の計測から行った上で、MC3T3-E1前骨芽細胞を使つての細胞毒性、骨芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現を評価した。結果として細胞毒性はほとんど見られないものの、骨芽細胞の分化促進効果は見られなかった。総合的にナノサイズでないカーボン材料である膨張黒鉛自体には骨形成促進の効果は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は膨張黒鉛の新しいバイオマテリアルとしての可能性を評価することである。膨張黒鉛の骨形成能への影響に対する研究は我々がこれまでカーボン材料を生体材料として用いる研究を行ってきたからこそ行える研究であり、膨張黒鉛のin vivo、in vitroの実験を通じてカーボンナノマテリアル(CNM)で見られた骨形成に対する優位性が連通多孔質構造によって高まる可能性を検討した。今回の膨張黒鉛の結果は我々がこれまでに同じく炭素素材であるカーボンナノチューブやカーボンファイバーによる骨形成促進効果と異なることが明らかになり、カーボンナノマテリアルの骨形成促進効果のメカニズム解明の一助となる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to evaluate the osteogenic ability of expanded graphite. In animal experiments, collagen and BMP-2 plus expanded graphite were implanted subcutaneously into the back of mice to evaluate ectopic bone formation. Although results varied widely between experiments, the final conclusion was no bone formation promoting effects. The dispersed state of expanded graphite was measured before evaluating the safety and osteogenic ability of expanded graphite using cells, after which cytotoxicity and expression of osteoblast differentiation marker genes were assessed using MC3T3-E1 preosteoblasts. Although virtually no cytotoxicity was observed, no osteoblast differentiation promoting effects were detected as well. In summary, expanded graphite, which is a non-nanosized carbon material, appears unable to promote bone formation.

研究分野：整形外科学

キーワード：膨張黒鉛 スキャフォールド カーボン素材 生体材料 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は骨折などの骨欠損時に対する骨補填剤として様々な素材を研究している。我々のこれまでの研究でカーボンナノチューブ(CNT)をはじめ、カーボン素材は骨親和性が非常に高いということを確認している。今回我々は新たなインプラント材料として膨張黒鉛に着目した。熱により黒鉛粒子が膨張し、互いが絡まりあう連通多孔質構造で、大容量の空隙を有する膨張黒鉛は骨補填剤には有利な物質と考える。しかしながら現時点で本素材を使用した骨形成の研究は行われていない。本申請の目的は、補填剤に適した構造を持つ膨張黒鉛の足場材料(スキャフォールド)としての可能性を、in vivo ならびに in vitro で明らかにすることである。その特徴的な構造から CNT を超える骨形成促進効果も有していれば、新たな生体材料として医療応用できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は膨張黒鉛の新しいバイオマテリアルとしての可能性を評価するというものである。膨張黒鉛の骨形成能への影響に対する研究は我々がこれまでカーボン材料を生体材料として用いる研究を行ってきたからこそ行える世界で初めての研究であり、膨張黒鉛の骨親和性のみならず、in vivo、in vitro の実験を通じてカーボンナノマテリアルで見られた骨形成に対する優位性が連通多孔質構造によってさらに高まる可能性がある。

今回研究対象である膨張黒鉛と同様に、我々はこれまでに同じく炭素線維であるカーボンナノファイバーによる骨形成試験を行ったがファイバー周囲に骨形成を認めている。膨張黒鉛も同様に骨形成能を有することが予想され、さらに良質の骨形成足場材としての効果を評価する。

3. 研究の方法

3 - 1. 動物実験

3 - 1 - 1. サンプルの調製

骨親和性を評価する実験として、マウスの背筋内にコラーゲン(Cellmatrix)と rhBMP-2(Cosmo Bio)を 5 µg 添加した膨張黒鉛(Toyo Tanso: 図1)を埋植して異所性骨化ができるか否かの評価を行った。これに対して control としてコラーゲンに rhBMP-2 を 5 µg 添加した群を用意した。いずれも凍結乾燥させて使用した。異所性骨化を評価するために、6週 ddY マウス(SLC)の背部皮下に上記の群を埋植した。埋植の方法は、イソフルラン(Abbot)3.0%、2.0mL/分の吸入麻酔にて鎮静化したマウスの脊椎より右側背部を剪刀で約 5 mm 皮膚切開し、皮下に筋膜を確認した。筋膜をまた剪刀で切開しそこに膨張黒鉛を埋植した。皮膚を縫合して手術は終了とした。埋植手術後 10 日、21 日で異所性骨化について検討した。それぞれの時期に、microCT により視覚化し解析ソフトによって骨の定量化を行った。さらに膨張黒鉛埋植背筋とその周囲組織を 21 日目に摘出し、組織標本作製、形態観察してさらに詳細に検討した。動物実験は信州大学動物実験等実施規定に則って実施した(承認番号:290037)。

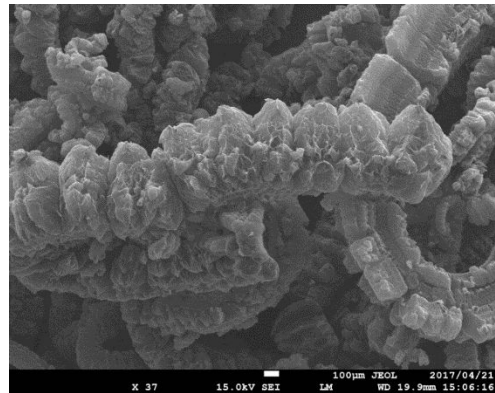


図 1. 膨張黒鉛

3 - 2. 細胞実験

3 - 2 - 1. サンプルの調製

我々は培養細胞に膨張黒鉛を暴露できるように分散の検討を行った。3 mg/mL になるように膨張黒鉛に分散剤として 2% ウシ胎児血清(FBS) in D-PBS (2% FBS in DPBS)を 3 mL 加え、RP-1 回転式超音波処理装置(Thinky)で 10、30、60、180 min の超音波処理を 140 w で行った。各時間で 0.1 mL を採取し、サンプルの粉体サイズを Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) を使って 10 倍希釈して測定した。

また、分散剤の影響を検討するため 2% FBS in DPBS とは別に ethanol で 60 min 分散した膨張黒鉛も用意した。

3 - 2 - 2. 細胞増殖性試験

用いた細胞は MC3T3-E1 マウス前骨芽(MC)細胞を理化学研究所から購入し、培地は 10% FBS in MEM を用いた。膨張黒鉛の暴露実験では MC 細胞を 6×10^4 /mL に調製し、96 ウェルプレートに 0.1 mL ずつ分注し、24 時間 CO₂ インキュベーターで培養後、膨張黒鉛サンプルの暴露を行った。24 時間と 48 時間後、培地をアスピレートし、10% AlamarBlue 試薬(Bio-rad)を 0.1 mL 加えて 1 時間インキュベートした。蛍光プレートリーダー(Eppendorf)を使い、535/590 nm で蛍光強度を測定し、細胞増殖試験を行った。

3 - 2 - 3. 細胞接着性試験

分散した膨張黒鉛サンプルを 96 ウェルプレートにあらかじめ量を変えて添加し、一晩、37 で乾燥させた。これに上記と同様に MC 細胞を播種して、2448 時間での細胞増殖を評価した。

3 - 2 - 4. 骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現

6×10^4 /mL に調製した MC 細胞を 12 ウェルプレートに 1 mL ずつ分注し、24 時間 CO₂ インキュベーターで培養後、膨張黒鉛サンプルの暴露を行った。3 日毎に培地交換をし、1 週間後に RNA

抽出キット(FastGene™ RNA Basic Kit, 日本ジェネティクス)を用いて付属のプロトコールに従って、トータル RNA を抽出した。その後、抽出した RNA を用いて ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用いて cDNA を合成した。リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)を用いて骨芽細胞分化マーカー遺伝子 5 種類についてリアルタイム PCR 装置(Realplex 2, Eppendorf)を使用して測定した。プライマーは全てタカラバイオから購入した。分化マーカー遺伝子として Runx2 (MA144435)、Alpl(MA127137)Col1a2(MA150504)、Sp7(MA147894)、Bglap(CR000261)、そしてノーマライザー遺伝子として gapdh (HA067812) を用い、Ct 法により定量比較を行った。

4. 研究成果

4 - 1 . 動物実験

4 - 1 - 1 . サンプルの形状

膨張黒鉛を水銀圧入法により細孔直径約0.0036 ~ 200 μm の細孔分布を求めた。細孔径は Washburn の式を用いて算出した(表 1)。

表- 1. 水銀圧入法の測定結果

試料名	累積細孔容積 (mL/g)	累積細孔比表面積 (m ² /g)	平均細孔直径 (μm)	かさ密度 (g/mL)	見掛け密度 (真密度) (g/mL)	気孔率 (%)
膨張黒鉛	33.1	941	0.14	0.031	1.00*1	104*1

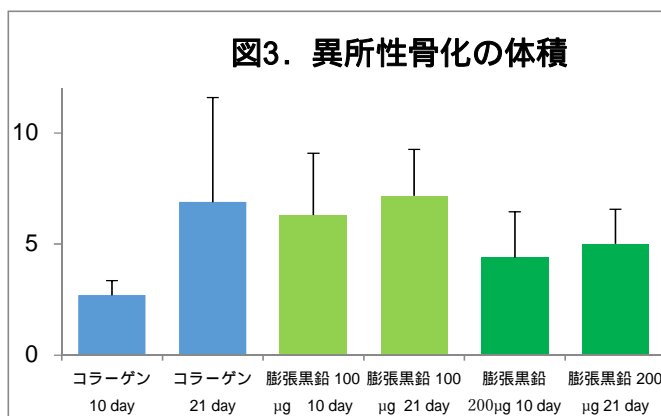
※1: 計算上、理論に適合しないため、参考値として記載した。

4 - 1 - 2 . microCTでの定量化

膨張黒鉛を100 μgとrhBMP-2 5 μgを添加したコラーゲン 50 μLの群と、膨張黒鉛を200 μgとrhBMP-2 5 μgを添加したコラーゲン 50 μLの群と、コラーゲン 50 μL単独の群をそれぞれ凍結乾燥装置(EYELA)で凍結乾燥させた(図 2)。マウスに埋植し、microCTで撮像し定量化した結果を示す(図 3)。



図2. コラーゲンに混入後、凍結乾燥させた膨張黒鉛(左)と凍結乾燥させたコラーゲン。



結果として 10 日、21 日の時点での microCT でコラーゲン単独群と膨張黒鉛群とで有意差はなかった。10 日の結果だけ見ると骨の体積は膨張黒鉛のほうが増加が早い様子であった。21 日においてはコラーゲン群が膨張黒鉛 200 μg の群を抜いていた。早期の骨再生に膨張黒鉛群が足場材として有利であるかと考えた。microCT でもコラーゲンは 21 日に内部構造がしっかりしてきているが膨張黒鉛群は 10 日で異所骨ができてから 21 日まででは大きな変化がなかった(図 4)。

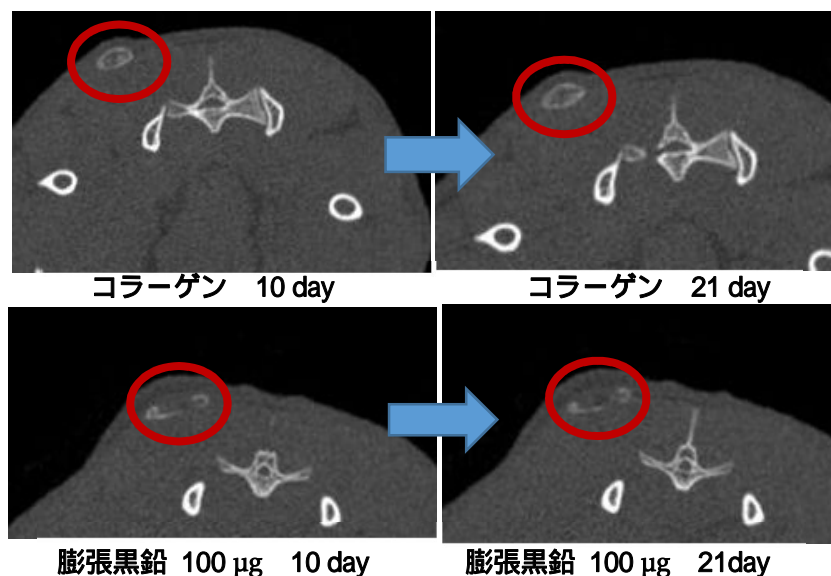


図 4 . 異所性骨の microCT 像

4 - 1 - 3 . 組織学的所見

マウスにサンプル埋植後 21 日で microCT 撮像後に、全マウスを犠牲にして、背筋内異所性骨化部分を摘出し、ホルマリン(Wako)固定した。組織学的所見を光学顕微鏡で確認して骨化の状態を評価した。コラーゲン群は良好な骨梁構造が確認できたが、膨張黒鉛群では炎症性癒痕の形成が多く見られた結果となった(図 5)。

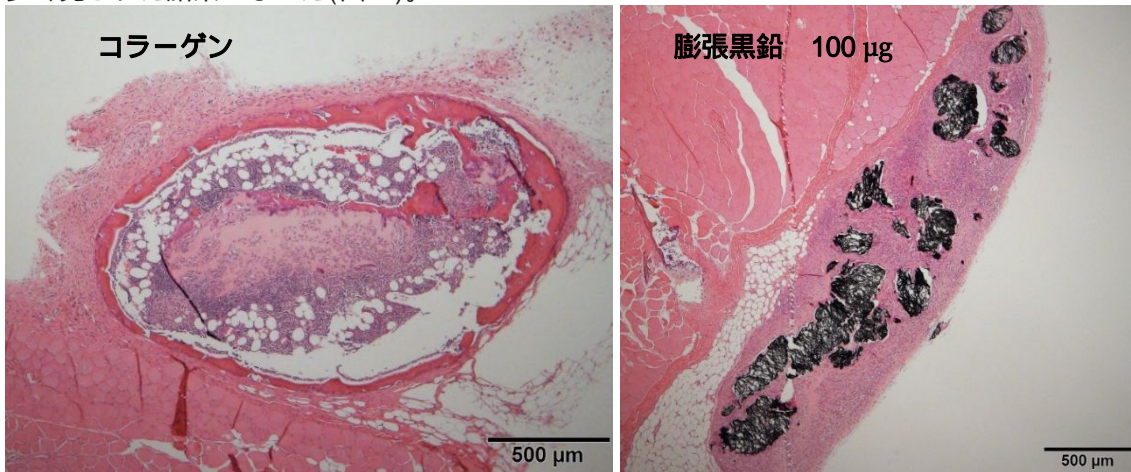


図 5 . 異所性骨の光学顕微鏡下組織像

4 - 2 . 細胞実験

4 - 2 - 1 . サンプルの形状

超音波処理による分散膨張黒鉛の粒子径の結果を表 2 に示す。この測定は細胞暴露のために分散処理をする膨張黒鉛が、超音波処理によってその形状に影響があるかを確認するためのものであったが、膨張黒鉛の分散は必ずしも均一な分散にはなっていない結果である一方、時間と共に粒子径が小さくなる傾向があることが示された。

表 2 . 超音波処理時間による膨張黒鉛の粒子サイズ

Sonication time	10 min	30 min	60 min	180 min
d. nm	11,930	9,138	6,999	5,720

4 - 2 - 2 . 細胞増殖性試験

まず、超音波処理時間の異なる膨張黒鉛の 10 µg/mL 濃度での細胞増殖への影響を比較した(図 6 A)。超音波処理によって粒子径に違いが見られた膨張黒鉛だったが、細胞増殖性への影響は見られなかった。次に 2 種類の分散剤で分散した膨張黒鉛を MC 細胞に暴露した時の細胞増殖性を評価した。図 6 B に 48 時間での結果を示した。2% FBS で分散した膨張黒鉛は濃度を 30 µg/mL まで高くしても、細胞毒性を示さなかったのに対し、エタノールで分散させた膨張黒鉛では細胞増殖が 30 µg/mL で 40%にまで抑制され、濃度依存性を示す結果であった。この違いについてはナノマテリアルで言われているプロテインコロナが関与している可能性がある。FBS で分散させた膨張黒鉛は培地と同じタンパク質成分であることから、暴露後にその成分が変わることは考えにくい。エタノール分散した膨張黒鉛では培地内でどのような化合物が吸着するのかわかっていない。もともと膨張黒鉛自体が油性成分の除去に用いられる性質もあることから、FBS とは異なる状態となり、この成分による細胞増殖への影響が出た可能性がある。

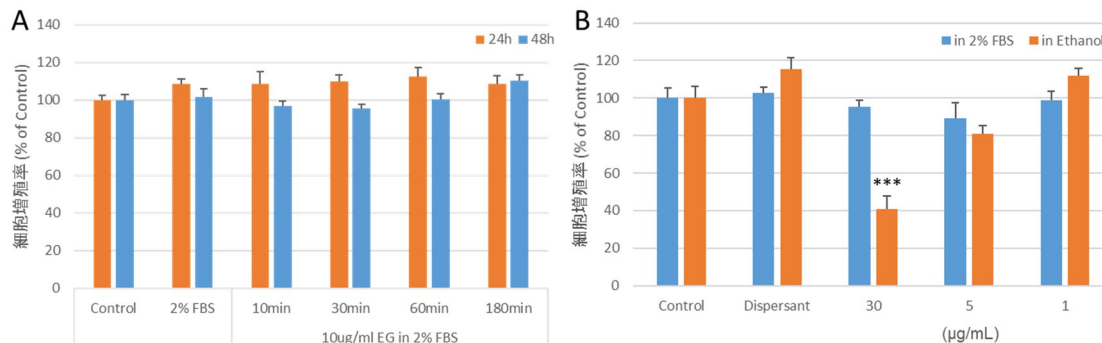


図 6 . MC 細胞での細胞増殖性試験。

A: 超音波処理時間の異なる膨張黒鉛の細胞増殖への影響。n=4。

B: 分散剤の異なる膨張黒鉛の細胞増殖への影響。n=4, vs Control, *** p<0.001。

4 - 2 - 3 . 細胞接着性試験

インプラント器材を評価する場合、その器材をプレートに設置した上で、その器材に細胞が接着した後、増殖するかを評価する。それと同様の評価をするために、分散させた膨張黒鉛をプレートにあらかじめ敷き詰めた状態での細胞の接着性を評価した(図7)。細胞播種後の24時間での細胞接着を評価したが、FBSで分散させた膨張黒鉛ではFBS自体に有意に細胞増殖の抑制効果が見られた。しかし、その分散剤に膨張黒鉛が加わってもその接着性には変化が見られなかった。一方、エタノールで分散させた膨張黒鉛では濃度に依存した細胞接着の抑制が見られた。この実験で用いられた膨張黒鉛の1ウェルとしての量は最も多い所で30 µgであり、細胞増殖性試験の最も濃い30 µg/mLを0.1 mLで暴露した量の3 µgの10倍量である。増殖性試験の24時間での値は59%であったことから、プレートに膨張黒鉛を固化させた時の接着性の抑制と暴露した時の増殖の抑制メカニズムは異なっていると考えられる。エタノールで分散・固化した膨張黒鉛は本来、その周りに何も無いのに対し、FBS分散・固化した膨張黒鉛はその周りに多くのタンパク質が吸着していると考えられ、この違いが接着性の違いを生じさせたと考えられる。

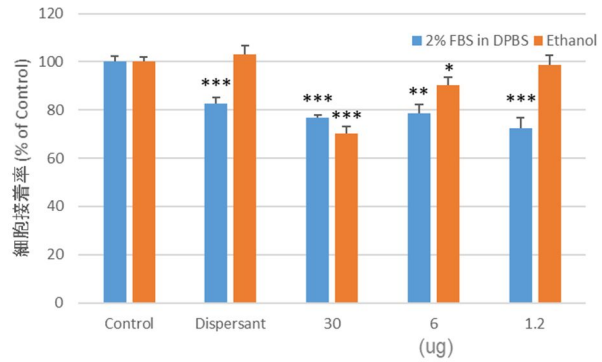


図7 . MC 細胞での細胞接着試験。
分散剤の異なる膨張黒鉛での細胞接着の評価。
n=6, vs Control, * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.001。

4 - 2 - 4 . 骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現

MC 細胞に対して抑制効果が出ない FBS で分散した粒子サイズの異なる膨張黒鉛での骨芽細胞の分化マーカー遺伝子発現に対する影響を評価した。図8に示すように Runx2 や Sp7 のような転写因子のマーカー遺伝子に変化は見られないものの、骨芽細胞の機能に関する遺伝子 Alpl、Bglap、Col1a2 は低下していた。そして、その傾向は分散時間が短い、つまり粒子が大きい膨張黒鉛ですべて有意に低下し、粒子サイズが小さいものでは Alpl、Bglap だけが有意な低下を示した。転写因子に変化が見られなかったのは RNA の抽出が暴露の1週間後であったからかもしれない。その一方で Alpl や Bglap などの発現抑制は膨張黒鉛の粒子サイズが大きい方が強いことから、膨張黒鉛の表面に接着する形での炭素材料は必ずしも骨芽細胞の細胞分化にポジティブに作用しないのかもしれない。実際、我々がこれまで報告してきたカーボンナノチューブ(CNT)の骨芽細胞分化誘導促進効果は骨芽細胞に CNT が取り込まれていた。カーボンマテリアルの骨芽細胞に対する作用はより詳細に検討する必要がある。

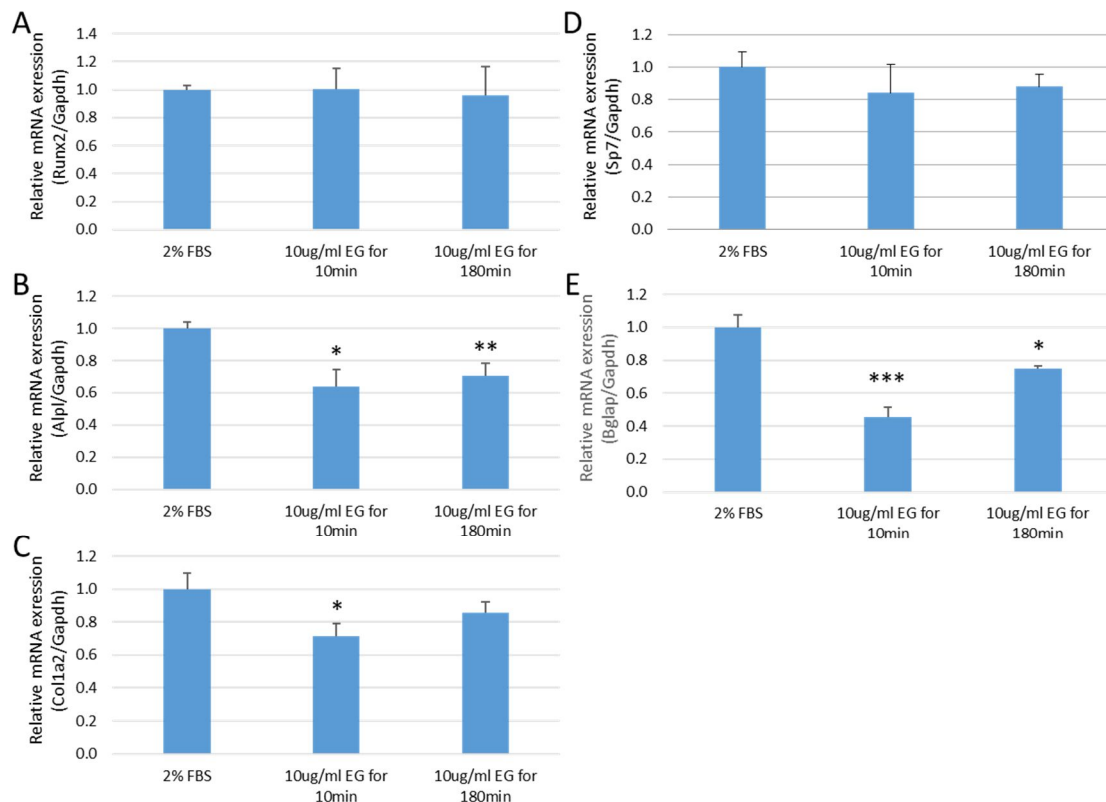


図8 . MC 細胞での骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現。
A:Runx2, B: Alpl, C: Col1a2, D: Sp7, E: Bglap, n=3, vs 2% FBS, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----