

「分子複合系の構築と機能」

平成 11 年度採択研究代表者

田中 順三

(物質・材料研究機構 主幹研究員)

## 「無機ナノ結晶・高分子系の自己組織化と生体組織誘導材料の創出」

### 1. 研究実施の概要

細胞の時系列にしたがった特異に組織化された有機・無機複合系細胞外マトリックスを化学的相互作用によるナノ領域からの自己組織化過程として捉えて研究を行なっている。特に、「自己組織化による複合系構造の構築」を、「有機無機の界面形成→表面修飾と配位結合によるイオン/共有結合の競合・協調」および「結晶核形成時における結晶方位の規定→共有結合の方向性とイオン配列の制御」のように材料科学的に捉え、さらに人為的な化学結合を導入して高分子/無機ナノ結晶系からなる新規ナノコンポジットの創出を目指している。有機官能基－無機イオン相互作用についてカルシウムイオンを中心に理解し、生体組織誘導型人工骨・歯・靭帯再建用材料の開発・生体における特性評価を行なう。これまでに有機単分子膜を用いたリン酸カルシウム・炭酸カルシウムの形成過程、多孔質水酸アパタイトによる骨形成、水酸アパタイト/コラーゲン複合体の合成と生物学的特性、配向性キトサンを用いたチューブによる神経再生等の研究により生体組織誘導材料の開発を行っている。今後、硬組織周辺を自己治癒能力により再生させる材料及び技術の開発・実用化を目指す。

### 2. 研究実施内容

天然の結晶性キチン/キトサン膜と、LB 法で作製した重合化単分子膜上に水酸アパタイトや炭酸カルシウムを形成する実験を中心に研究を進めた。生体高分子上に生体鉱物が形成される。界面で生じる無機物の結晶方位・界面構造・結晶形態の制御に関しての詳細を高分解能電子顕微鏡等により明らかにした。天然のキチン及びその脱アセチル化によって形成されたキトサン上には水酸アパタイトは結局形成されず、界面の観察等はできなかった。一方 p-PDA 膜上には従来の LB 膜と同様に疑似体液から水酸アパタイト微結晶の凝集体の析出が確認された。また p-PDA 膜上に炭酸カルシウムを形成させる実験では、純粋な炭酸カルシウム溶液からは過去の報告のように、方解石 (calcite) が $\{102\}$ 面を界面として p-PDA 膜上に方位成長するこ

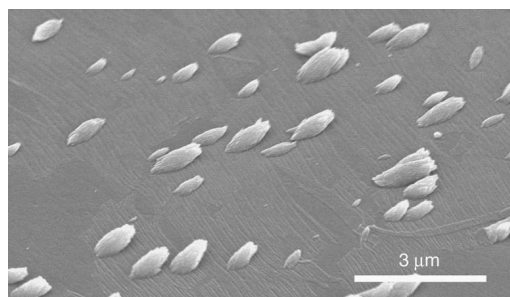


図 1 LB 膜上に形成した炭酸カルシウム微結晶

とが確認できた。(図1)これに引き続き溶液に $Mg^{2+}$ イオン及びポリアスパラギン酸を加えた析出実験では、c 軸方向に配向した紡錘形の方解石の凝集体が、p-PDA 膜の重合化方向に対して一定の角度で形成されるのが観察された。

変形性関節症に代表される関節系の疾患の治療方法として、組織工学的な手法によって作製した再生軟骨の移植手術が有効であると考えられているが、軟骨細胞としての形質を *in vitro* で維持することが困難であることが硝子軟骨の再生の大きな障害となっている。今までに、脱分化した軟骨細胞または未分化な間葉系幹細胞を pellet 培養と呼ばれる方法で培養することによって、分化型の軟骨細胞を誘導できることが報告されている。しかしながら、この方法では pellet を大量に作製することが難しい(1凝集塊/1試験管)ために、pellet を用いて人工軟骨や人工関節を作製する試みは成功していない。流れによる応力(遠心力、求心力)に着目し、正常軟骨細胞の3次元凝集塊の大量・迅速形成を試みた。ウシ正常膝関節から軟骨細胞を 0.2%コラゲナーゼ/F12 培地(含 10%ウシ胎児血清)で一晩抽出した後に組織培養用ディッシュに播種した。組織培養用ディッシュに軟骨細胞が付着伸展した後に、細胞の数を増やすための継代培養を行った。十分な数に達した軟骨細胞を  $1.5 \times 10^7$  cells/dish の濃度で非接着性の 6-wells-プレートに播種し、プレートを大腸菌培養用シェイカの上に乗せ、80rpm の速度で旋回培養を行った。さらに、分化型の軟骨細胞に多く発現していることが知られているタイプ II コラーゲン、アグレカン、そして脱分化型の軟骨細胞に特異的に発現するタイプ I コラーゲン遺伝子の発現量を RT-PCR 法を用いて解析した。継代培養によって脱分化したウシ膝軟骨細胞を旋回流れの存在下で浮遊培養したところ、24 時間以内にウシ軟骨細胞から構成される3次元凝集塊(aggregates、スフェロイド)が一度に大量に形成されることをはじめて見いだした。形成された軟骨細胞の3次元凝集塊の直径は、培養時間の経過に伴って増加することがわかった。脱分化した軟骨細胞を旋回培養することによって得られた3次元凝集塊は、通常の2次元培養によるシート状の軟骨細胞に比べてタイプ I コラーゲンの産生が著しく抑制されることがわかった。また、タイプ II コラーゲンの産生量の亢進は認められたものの、アグレカンの産生量に有意な変化は認められなかった。次に、Pellet 培養で軟骨細胞の分化を促進することが知られている TGF- $\beta$  の存在下で軟骨細胞の旋回培養を行ったところ、TGF- $\beta$  を添加しない系と同様に、3次元凝集塊は通常の2次元培養によるシート状の軟骨細胞に比べてタイプ I コラーゲンの産生が著しく抑制されていることがわかった。さらに、TGF- $\beta$  のない条件下と比べて、タイプ II コラーゲンとアグレカンの産生に有意な向上効果が認められた。

生体腱に対する磷酸カルシウムコーティング法を用いて、臨床応用可能な膝関節靭帯再建システムを開発する。交互浸漬法を用いて靭帯の表面から内部に、骨と親和性が高いリン酸カルシウム(骨の主成分であるハイドロキシアパタイト)を修飾した。交互浸漬法とは、移植する靭帯を“カルシウム系水溶液”と“リン酸系水溶液”に交互に浸漬して、靭帯の表面から内部にリン酸カルシウムを反応析出させる方法である短時間で処理できるため、術中の処理が可能である。用いる 3 つの処理溶液は、pH と浸透圧を体液付近に制御しており、細胞組織に与えるダメージが小さい。靭帯再建の手術は、患者に負担をかけないために短時間で行う必要がある。今回開発した技術は、医療現場(手術室)で使用するため、迅速かつ無菌的に処理できる自動処理装置が必要である。“カ

ルシウム系水溶液”と“リン酸系水溶液”が自動的に反応容器に流れ込むように流入・排出量を制御する装置を開発した。

### 3. 研究実施体制

研究代表者：独立行政法人 物質・材料研究機構 生体材料研究センター 田中 順三

#### (1) 界面モデル研究グループ

- ① 田中 順三 物質・材料研究機構 生体材料研究センター センター長
- ② 研究項目 自己組織化現象の解明を担当

#### (2) 自己組織化材料研究グループ

- ① 田中 順三 物質・材料研究機構 生体材料研究センター センター長
- ② 研究項目 無機・有機複合体の創出を担当

#### (3) 新規結合系研究グループ

- ① 田中 順三 物質・材料研究機構 生体材料研究センター センター長
- ② 研究項目 新規結合を導入した複合体の創出を担当

#### (4) 組織工学・医学応用研究グループ

- ① 立石 哲也 東京大学大学院工学系研究科 教授
- ② 研究項目 複合体の組織工学・医学応用を担当

### 4. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

- 植村寿公, 小島弘子, 根本淳子, Honma. Reiko, Ogura. Mariko, Yin-kun Liu: Journal of Biological Chemistry (JBC). rDrak1, a novel kinase related to apoptosis, is strongly expressed in active osteoclasts and induces apoptosis.
- 植村寿公, 根本淳子, 小島弘子, Jian Dong, Ohgushi. Hajime, Yin-kun Liu, Yabe. Tomoko, Yoshikawa. Takafumi, 牛田多加志・立石哲也: Materials Science and Engineering C. Osteopontin involvement in bone remodeling and its effects on in vivo osteogenic potential of bone marrow-derived osteoblasts/porous hydroxyapatite constructs.
- 植村寿公, Dong Jian, 小島弘子, 立石哲也, 菊池正紀, 田中順三: Materials Science and Engineering C. Application of low pressure system to sustain in vivo bone formation in osteoblast/porous hydroxyapatite composite.
- 山口勇, 鈴木真澄, 伊藤聡一郎, 坂根正孝, Osaka Akiyoshi, 田中順三: Journal of Biomedical Materials Research. Mechanical Properties of Crystalline Tendon Chitosan.
- 小暮敏博, 田中順三: Journal of the Society Inorganic Materials, Japan. 生体材料に見るナノの世界, Nanospace World in Biomaterials.
- 古川克子, 牛田多加志, 立石哲也, Yasuyuki Sakai, Motoyuki Suzuki, 田中順三: Cell Transplantation. Formation of Human fibroblasts-aggregates (Spheroids) by rotational culture.

- 古川克子, 牛田多加志, 立石哲也, 田中順三, 玉木保: 日本臨床バイオメカニクス学会誌. 円錐-平盤型剪断応力負荷装置による血管内皮細胞の接着強度の定量的な解析.
  - Dominic Walsh, 古菌勉, 田中順三: Biomaterials. Preparation of porous composite implant materials by in situ polymerization of porous apatite containing  $\epsilon$ -caprolactone or methyl methacrylate.
  - Dominic Walsh, 田中順三: Journal of Materials Science. Preparation of a bone-like apatite foam cement.
  - S.Saotome, 伊藤聰一郎, M.Takahashi, 四宮謙一, 植村寿公, 立石哲也, 菊池正紀, 田中順三: Key Engineering Materials Vols. In Vitro Evaluation of Highly Absorptive Ceramics Materials Needs Consideration of Calcium and Magnesium Ions Adsorbed to the Materials.
  - 古川克子, 牛田多加志, 立石哲也, Yasuaki Sakai, Kaiko Kunii, 田中順三: Materials Science and Engineering. Effects of hormone and growth factor on formation of fibroblast-aggregates for tissue-engineered skin.
  - 古川(酒井)克子, 牛田多加志, 立石哲也, 玉木保, Takayuki Nagase, Hideki Nakamigawa, Takuya Noguchi, 田中順三: Materials Science and Engineering. Quantitative analysis of cell detachment by shear stress.
  - 小暮敏博, 田中順三: Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan. 生体材料に見るナノの世界.
- (2) 特許出願件数(H13年度):6件