



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Fabrication and characterization of osteoconductive scaffold of recombinant peptide based on human collagen type I and β -tri calcium phosphate nanoparticles. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	降旗, 友和
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13486号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74057
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomokazu_Furihata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 降籙友和
学位論文題名

Fabrication and characterization of osteoconductive scaffold of recombinant peptide based on human collagen type I and β -tri calcium phosphate nanoparticles.

（ヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチドと β -リン酸三カルシウムナノ粒子からなる骨形成スキャフォールドの作製および特性評価）

骨補填材には、骨ミネラルの供給、未分化の幹細胞や血管が増殖し分化するための栄養や成長因子の保持などが求められる。骨補填材に用いられるバイオマテリアルとして、コラーゲンやヒアルロン酸などの天然高分子やハイドロキシアパタイト、 β 三リン酸カルシウム（ β -TCP）などのセラミックスがあげられる。天然高分子は細胞親和性や吸収性に優れるが骨分化誘導能が低く、ウシやブタなどの動物由来材料は感染の懸念もある。一方、セラミックスは機械的強度や骨分化誘導能に優れるが、生体吸収性が低いとされている。近年、コラーゲンなどの天然高分子にナノ構造のセラミックスを付着させると、優れた生物学的活性を示し、組織再生を促進することが報告されている。また、遺伝子工学技術により開発されたヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチド（RCP）は、ヒト I 型コラーゲンを基に設計されたポリペプチドであり、高い細胞接着性や生体吸収性、加工性を示すことが報告されている。そこで本研究では、新しい骨補填材の開発を目的として、顆粒状に加工した RCP にナノ粒子化した β -TCP を付着させた骨補填材（RCP-TCP）を作製し、*in vitro* で特性評価を行うとともに、ラット頭蓋骨に作製した骨欠損に移植して骨新生効果を検討した。

まず、湿式粉碎して得た平均粒径 700 nm の β -TCP ナノ粒子分散液（太平化学産業株式会社）を PBS（富士フィルム和光純薬株式会社）で希釈し、0.01, 0.1, 1, 10 wt% の β -TCP ナノ粒子分散液を作製した。各濃度の β -TCP ナノ粒子分散液 500 μ L を凍結乾燥した顆粒状の RCP（富士フィルム株式会社）100 mg に滴下して、それぞれ RCP-0.01, 0.1, 1, 10TCP とした。また、PBS を滴下したものを RCP とした。特性評価として、SEM-EDX 分析、MC3T3-E1 細胞培養による WST-8 activity 試験、LDH activity 試験、LIVE/DEAD 染色、F-Actin 染色および骨形成マーカーである Runx2, ALP, BSP の mRNA 発現をリアルタイム PCR で定量解析を行った。また、ラット頭蓋骨に外形 4.5mm のトレフィンバーを用いて骨欠損を作製し、RCP-0.01, 0.1, 1 を埋植、2, 4 週後の骨形成量をマイクロ CT 画像で計測するとともに、組織学的観察と骨形成量の測定を行った。また、何も移植しないものを対照とした。

SEM-EDX 分析の結果、RCP-TCP 表面には Ca, P が同定され、 β -TCP ナノ粒子の付着が認められた。また β -TCP ナノ粒子分散液の濃度の向上に伴って Ca, P の強度も向上した。WST-8 activity 試験の結果、RCP, RCP-0.01TCP, RCP-0.1TCP, RCP-1TCP では、いずれも 3 日目から 7 日目において細胞増殖が確認され、7 日の細胞増殖は RCP-1TCP が RCP, RCP-0.01TCP, RCP-0.1TCP に比べて有意に高い値であった。また、LDH activity 試験の結果、3 日目および 7 日目の細胞毒性は、RCP-0.01TCP, RCP-0.1TCP, RCP-1TCP が RCP に比較して低い値であった。LIVE/DEAD 染色では、いずれの試料でも生細胞が多く死細胞はほとんど観察されなかった。また、F-Actin 染色ではいずれも細胞付着は良好であった。MC3T3-E1 細胞を各試料上で 14 日間培養後、リアルタイム PCR 定量解析による Runx2, ALP, BSP の mRNA 発現は、

RCP および RCP-1TCP では対照 (plate) と比較し有意に高い値であった。

ラット頭蓋骨骨欠損部に埋植後のマイクロ CT 画像では、2 週後、RCP-1TCP は対照および RCP に比較して有意に低い透過像面積であった。4 週後、RCP および RCP-1TCP は骨欠損中央部にも不透過像がみられ、RCP-1TCP は対照に比較して有意に低い透過像面積を示した。組織学的観察の結果、2 週後において、対照では欠損の大部分は結合組織で満たされていたが、RCP 及び RCP-1TCP は移植材料の残存と、その周囲に新生骨様組織が一部で観察された。また材料周囲には血管様の管腔構造や多核巨細胞様細胞も認められた。4 週後、対照では 2 週後と同様に欠損の大部分は結合組織で満たされていたが、RCP および RCP-1TCP では新生骨様組織が増加しており、とくに RCP-1TCP では骨欠損の大部分を新生骨様組織が満たしている標本もあった。血管様構造や多核巨細胞様細胞は 2 週後と同様に観察された。骨形成量の計測では、RCP-1TCP は 2, 4 週において対照および RCP と比較して有意に高い値であり、RCP も 4 週後は対照と比較して有意に高い値を示した。

SEM-EDX 分析の結果から、 β -TCP ナノ粒子は分散液の濃度依存的に RCP への付着量が増加したと考えられた。RCP への β -TCP ナノ粒子の付着は、WST-8 activity 試験の結果から細胞増殖を促進し、LDH activity 試験の結果から細胞適合性を向上させることが示唆された。またリアルタイム PCR 定量解析を行った結果より、RCP-1TCP は Runx2, ALP および BSP の骨形成マーカーの発現を促進することが明らかとなった。Runx2 は、間葉系幹細胞の未成熟骨芽細胞への分化を刺激する骨形成マーカーであり、ALP および BSP は骨の石灰化に関与する成熟骨芽細胞を検出する骨形成マーカーであることから、RCP-1TCP は骨芽細胞分化を促進することが示された。また RCP でも対照と比較するとこれらの骨形成マーカーの発現が増加したことから、RCP にも骨芽細胞分化の促進効果が認められた。これは、RCP に多く含まれるアミノ酸 Arg-Gly-Asp 配列はインテグリン結合を介して細胞接着活性を促進すると報告されており、このことが RCP による骨分化マーカーの発現に関与したのではないかと考えられた。

これらの結果から、ラット頭蓋骨骨欠損における 2 週後のマイクロ CT 画像、および組織標本による骨新生評価で、RCP-1TCP は対照および RCP と比較して骨形成を有意に促進したのは、 β -TCP ナノ粒子による細胞増殖や骨芽細胞の分化が促進された可能性が考えられ、RCP-1TCP は新たな骨補填材になる可能性が示唆された。