

組織再生機能に優れた複合足場材料の開発研究

研究代表者 山崎 淳司
(創造理工学部 環境資源工学科 教授)

1. 研究課題

再生医療において特に硬組織（骨組織）再生を安全かつ高効率に行うための基礎技術の一つとして、アパタイト型リン酸カルシウム結晶基材に、細胞活性化因子、DNAなどの有機シグナル物質を複合化した足場材料基材を調製し、細胞増殖・分化挙動と効率の制御因子を明らかにすることを 目指す。

2. 主な研究成果

2.1 アパタイト型リン酸カルシウムを用いた免疫アジュバントの最適化

1981 年以降、日本人の死因のトップは「がん」であることが統計的に公示されている。このがんの代表的治療法としては、外科療法、化学療法、放射線療法、もしくはこれらの併用療法があるが、いずれも副作用などの患者への大きな負荷の問題が挙げられている。そのなかで近年、第 4 の療法として「免疫療法」が研究されている。これはマクロファージなどの免疫を担当する細胞に作用する免疫賦活剤（アジュバント）を用いて免疫力を全体的に高める治療法であるが、副作用が非常に少ない反面、他の治療法と比較すると現在は効果が薄いことから、効果のあるアジュバントの創製が求められている。

アパタイト型リン酸カルシウムのうちヒドロキシアパタイトは、優れた生体親和性とイオン交換特性を有する。これに、マクロファージが効率よく食食できるサイズ（ $1\mu\text{m}$ 以下）で、免疫細胞を活性化する性質を持つケイ素を置換した Si 置換型ヒドロキシアパタイトを合成し、その物性を評価した。

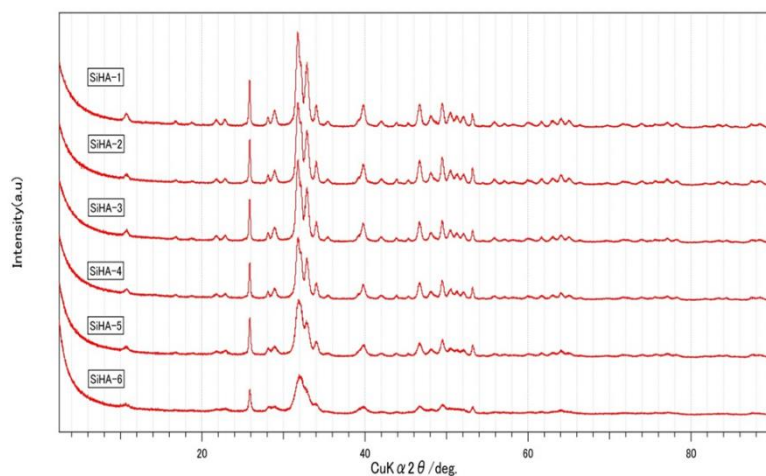


図 1 Si 置換型ヒドロキシアパタイトの XRD 図

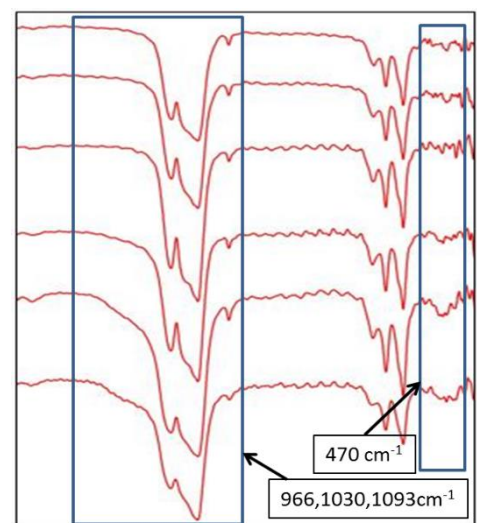


図 2 Si 置換型ヒドロキシアパタイトの IR 図

塩化カルシウム、アンモニア、CTAB(C₁₉H₄₂BrN)より調製したCa溶液と、クエン酸ナトリウム、リン酸水素アンモニウム、ケイ酸ナトリウムより調製したSi含有P溶液を混合し、180℃、24時間水熱処理したのち、CTAB除去、固液分離・洗浄・乾燥することで、Si/P原子比=0~1.5 PO₄³⁻がSiO₄⁴⁻と一部置換した、結晶子サイズが4.7~17 nmのSi置換型ハイドロキシアパタイトを合成した。得られた試料は、Si置換率の増加に伴い結晶子サイズが小さくなる傾向が認められた。

2.2 Si置換型ハイドロキシアパタイトのナノ粒子の有効性と安全性評価

Si置換型ハイドロキシアパタイトのナノ粒子の有効性を評価するために、THP-1マクロファージ様細胞に試料を貪食させ、産生するサイトカイン(GM-CSF)量をELISA(BD KIT-human)キットを用いて測定した。また、併せて安全性を評価するために、試料を貪食させたTHP-1細胞の生存率を測定した。評価には、THP-1(ヒト由来のマクロファージ系統の細胞)の培養中にPMAを作用させて分化誘導して貪食能を誘発してマクロファージ様細胞としたものを用いた。

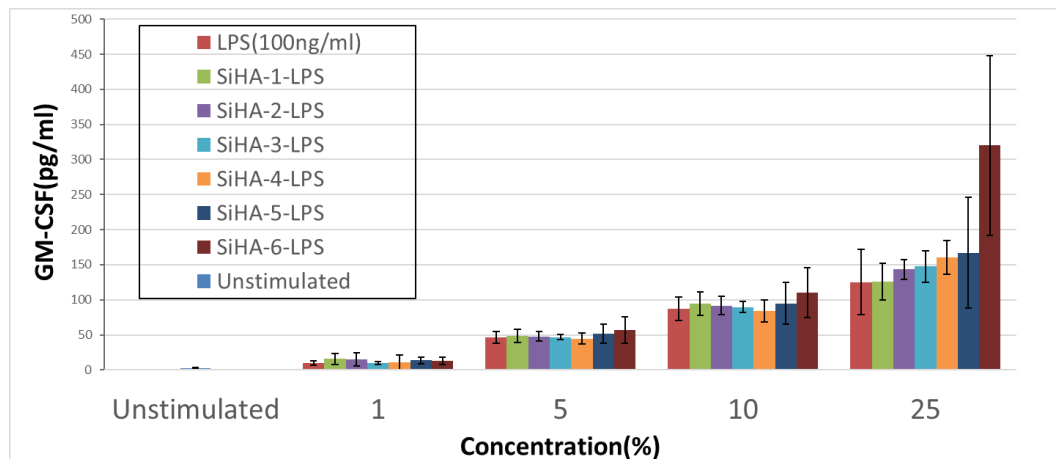


図3 Si置換型ハイドロキシアパタイトによるTHP-1細胞からのサイトカイン産生量

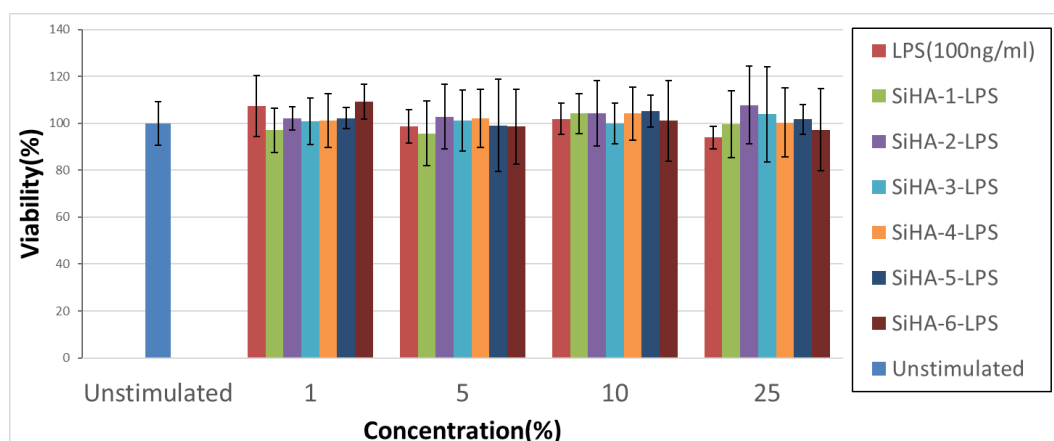


図3 Si置換型ハイドロキシアパタイトによるTHP-1細胞への細胞毒性評価

ハイドロキシアパタイトへのケイ素置換量が増加するにつれてGM-CSF産生量が有意に増加したことから、マクロファージを活性化し、アジュバント粒子の比表面積が増加すること

で、免疫刺激剤である LPS の吸着量が増加することがわかった。また、Si 置換型ハイドロキシアパタイトのナノ粒子を加えた THP-1 細胞の生存率は 100 ± 20 %程度であることから、今回合成した試料 (SiHA-1~6) に基本的に毒性は無く、安全性が高いことが示された。

以上から、本方法で合成された Si 置換型ハイドロキシアパタイトが、アジュバントとして有望であり、抗原のデリバリー機能に優れることがわかった。

3. 共同研究者

一ノ瀬 昇 (理工学研究所 顧問研究員)

程 侃 (創造理工学部 環境資源工学科 助手)

矢崎 侑振 (理工学研究所 招聘研究員)

安井 万奈 (創造理工学部 環境資源工学科 客員次席研究員)

4. 研究業績

4.1 学術論文

Y. Yazaki, A. Oyane, H. Tsurushima, H. Araki, Y. Sogo, A. Ito and A. Yamazaki, Improved gene transfer efficiency of a DNA-lipid-apatite composite layer by controlling the layer molecular composition, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 465-471 (2014)

Y. Sugiura, K. Onuma, M. Nagao, K. Momma, Y. Kimura and A. Yamazaki, Dissolution behavior of vaterite spherulites in solution containing phosphate ions”, *Journal of the Ceram. Soc. Jpn*, 122, 1428, 679-684 (2014)

Y. Yazaki, A. Oyane, H. Tsurushima, H. Araki, Y. Sogo, A. Ito and A. Yamazaki, Coprecipitation of DNA-lipid complexes with apatite and comparison with superficial adsorption for gene transfer applications, *J. Biomater. Appl.*, 28, 6, 937-945 (2014)

4.2 総説・著書

4.3 招待講演

4.4 受賞・表彰

4.5 学会および社会的活動

日本熱測定学会 編集委員

日本粘土学会 常務委員、評議員

5. 研究活動の課題と展望

引き続き足場となるアパタイト系リン酸カルシウム、窒化物、酸化物などのアジュバント材料を検討・評価し、組織再生のためのシグナルを担持した成形材料を作製する。これら足場材料に細胞培養と動物実験 によって、担持シグナル物質および薬剤種、ドーズ方法、製造条件などのパラメータを最適化することで、目的の細胞増殖・分化または組織再生を選択的かつ高効率に行うことができ、感染率を有効に低減させた実用的な足場材料の作製技術の構築を目指す。