

熊谷研究助成表彰報告書

(令和2年度 助成分)

令和4年6月13日

公益財団法人 熊谷科学技術振興財団 御中

代表研究者・所属機関名

有坂 慶紀・東京医科歯科大学

所属学部学科・所属部課室・役職

生体材料工学研究所・助教

氏名 有坂 慶紀

貴財団より助成を受けました件につき下記の通り（最終）報告致します。

1. 研究テーマ及び期間 研究テーマ 生体分子とエンジニアリングプラスチックの融合による骨再生用インプラント材料の開発 研究期間 2021年3月～2022年4月
2. 共同研究者名 氏名 所属機関・職名 本欄該当なし
3. 成果の概要 エンジニアリングプラスチックであるポリエーテルエーテルケトン (PEEK) は軽量かつ機械的強度に優れた材料であり、工業用途 (バルブやネジなど) では金属代替材料として期待されている。またPEEKは骨と類似した機械的強度を有していることから、近年では整形外科における人工関節・脊椎固定インプラント・骨折内固定材ならびに歯科におけるインプラント体や補綴物への応用が期待されている。しかし機械的強度に優れたPEEKは骨の固定には優れたものの、タンパク質や細胞との吸着性・接着性が低いために骨組織の再生には適さない。そこで研究代表者は、PEEK表面に骨基質の主成分であるI型コラーゲンを導入することに着想した。I型コラーゲンは骨芽細胞の接着と増殖に優れており、この線維形成はアパタイトの配向や骨の機械的強度に影響を与える。さらに、コラーゲンは血管内皮細胞の増殖を刺激するため、骨形成と血管新生の相乗的な効果によって骨修復を促進することが報告されている。そこでPEEK表面にコラーゲンを修飾することによって骨芽細胞と血管内皮細胞の両方の細胞適合性を獲得することができれば、骨の修復と再生を加速するインプラント材料の実現が期待できる。しかしながら、化学的に不活性であるPEEK表面にコラーゲンを導入するためには、表面の酸処理やシラン処理、化学処理などが必要である。このような煩雑で多段階の表面加工プロセスは、製造コストの高騰や残存試薬によるコンタミネーション・リスクの上昇などに繋がる可能性がある。 本研究では、メタクリロイル基を有するI型コラーゲン (COL-MA) を用いたPEEK表面の生体機能化法を考案した。紫外線を照射するとPEEKの分子骨格にあるベンゾフェノンユニットからラジカルが生成され、

PEEK表面で光重合が開始されることが報告されている。これまでに研究代表者はこの光開始重合を活用してPEEKプレートやスクリーンの表面に機能性マクロモノマーを固定化できることを実証している。今回、COL-MAをマクロモノマーとしてPEEKによる光開始重合を行い、COL-MAを固定したPEEK (COL-PEEK) を作製した。作製したCOL-PEEK表面におけるコラーゲンの固定化量についてBCAキットを用いて解析したところ、 $55 \pm 7 \mu\text{g cm}^{-2}$ であった。このCOL-PEEK表面をPBS中に3日間浸漬したが、その固定化量の大幅な減少は認められなかった。この結果は、PEEKを用いた光開始重合によってコラーゲンが安定に表面固定されたことを示唆している。

つぎにCOL-PEEKおよびPEEK表面にヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (HbmMSC) を播種して、細胞の接着および増殖を評価した。24時間後におけるCOL-PEEKおよびPEEK表面への初期細胞接着率はそれぞれ $69 \pm 4\%$ および $48 \pm 2\%$ であり、倍加時間はそれぞれ37.6時間および46.4時間であった。すなわち、コラーゲンをPEEK表面に固定化することによってPEEK表面の細胞適合性を改善することに成功した。さらにそれらの表面を用いてHbmMSCの骨分化を一週間誘導した後、その遺伝子発現をRT-PCRで解析した。骨前駆細胞マーカーであるRUNX2およびCOL1と骨細胞マーカーであるSPP1の遺伝子発現レベルに有意な差は認められなかったが、骨芽細胞マーカーであるALPおよびBGLAPの遺伝子発現は、PEEK表面よりもCOL-PEEK表面のHbmMSCにおいて有意に高かった。これは、COL-PEEK表面が培養1週間以内にHbmMSCの骨芽細胞分化を急速に促進したことを示唆している。さらに、ALPやBGLAPは石灰化にも関与しているため、さらに1週間の分化誘導を行った後アリザリンレッドS染色を行った。結果として、COL-PEEK表面上の細胞は、PEEK表面と比較して3.2倍以上の高い染色性を示した。これらの結果は、PEEKを使用したコラーゲンの光固定化技術がPEEKの骨芽細胞適合性を改善するのに効果的であることを示唆している。これらの成果を基にCOL-MAを位置選択的に塗布したところ、PEEK表面上にコラーゲンのパターンを作製することにも成功している。

最後に緑色蛍光タンパク質を発現した血管内皮細胞 (GFP-HUVEC) をCOL-PEEKおよびPEEK表面に播種したところ、培養24時間後の初期接着率に有意差は認められなかった。しかし、PEEK表面に接着したGFP-HUVECはほとんど増殖しなかったが、COL-PEEK表面に接着したGFP-HUVECは良好に増殖した。これは、コラーゲンの固定化によってGFP-HUVECの成長に適切な環境がPEEK上に構築できたことを示唆している。続いて、COL-PEEKとPEEK表面を用いてHbmMSCとGFP-HUVECの共培養を行った。位相差顕微鏡観察により、培養2週間後にCOL-PEEKおよびPEEK表面上を細胞が完全に覆ったことを確認した。これらを蛍光顕微鏡で観察するとGFP-HUVEC由来の緑色に発光した細胞が観察され、GFP-HUVECとHbmMSCが共生していることが認められた。興味深いことに、COL-PEEK表面ではGFP-HUVECがネットワーク構造を形成していたが、PEEK表面上のGFP-HUVECは一部分の断片化されたネットワーク構造を形成していたもののほとんどが単一細胞として接着していた。これらの結果は、COL-PEEK表面が共培養システムにおいて内皮細胞のネットワーク化を促進することを示唆している。

以上の成果を通じて、本研究ではメタクリロイル基を有するコラーゲンは、表面開始光重合を介してPEEK表面に固定化できることを明らかにした。これは、表面前処理や開始剤や凝縮剤の添加が不要なため、従来の方法よりも簡単なコラーゲン固定化法である。現在、3Dプリンター技術の進歩に伴い、メタクリロイル基を有するゼラチンやヒアルロン酸などが入手可能であり、これらのマクロモノマーを活用することによってPEEK表面の生体機能化の可能性をさらに拡大することが期待できる。さらに、コラーゲン固定は、体性幹細胞の骨芽細胞分化と石灰化を強力に促進する効果をPEEKに与えるのみでなく、血管内皮細胞の増殖や血管内皮ネットワークの形成を促進する。COL-PEEK表面は骨形成と血管新生の促進を可能とする新たなインプラント材料であり、成熟した骨組織の修復に寄与することが期待される。

4. 研究成果の発表状況 (予定を含む)

本研究はMacromolecular Bioscience誌(Impact factor : 4.9)に受理され、オンライン掲載された。

掲載論文:

Yoshinori Arisaka, Hiroki Masuda, Tetsuya Yoda, Nobuhiko Yui, Photo-tethering of collagen onto polyetheretherketone surfaces to enhance osteoblastic and endothelial performance, Macromolecular Bioscience in press (2022) DOI:10.1002/mabi.202200115