

氏名	Ying Chen			
学位の種類	博士(工学)			
学位記番号	博甲第 8498 号			
学位授与年月日	平成 30年 3月 23日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	数理物質科学研究科			
学位論文題目	Preparation of Dexamethasone-loaded Biphasic Calcium Phosphate Nanoparticles/Collagen Porous Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering (骨組織再生のためのデキサメタゾンを含持した二相性リン酸カルシウムナノ粒子とコラーゲンの複合多孔質材料の作製)			
主査	筑波大学教授(連係大学院)	博士(工学)	陳 国平	
副査	筑波大学教授	工学博士	長崎 幸夫	
副査	筑波大学准教授(連係大学院)	博士(工学)	田口 哲志	
副査	筑波大学准教授(連係大学院)	博士(工学)	荏原 充宏	

論 文 の 要 旨

本論文は、デキサメタゾン(DEX)を含持した二相性リン酸カルシウムナノ粒子を調製し、本ナノ粒子とコラーゲンを複合化した多孔質材料による間葉系幹細胞の骨分化および骨組織再生の影響を解明するものである。

第1章では、研究背景として、骨欠損の治療方法、骨組織再生のための足場材料技術、利用可能な細胞と生理活性物質に関する研究の状況が先行文献に基づいてまとめられている。そして研究背景を踏まえ、本論文の研究全体を貫く目的が示されている。

第2章では、デキサメタゾン(DEX)を二相性リン酸カルシウムナノ粒子(BCP-NPs)に含持させる条件を検討し、作製したナノ粒子の存在下で骨髄由来の間葉系幹細胞を培養した結果について述べられている。DEXは幹細胞の骨分化促進因子として知られ、細胞の増殖や分化などの機能を制御する上で重要な役割を果たす。DEXを幹細胞の骨分化および骨組織の再生に応用するためには、DEXの徐放を制御できるキャリアが必要である。二相性リン酸カルシウムナノ粒子(BCP-NPs)は、優れた生体適合性と骨伝導性を持つことから、DEXを含持するキャリアとして用いた。まず、DEXを含持するために二つの方法を検討している。すなわち、予め作製したBCP-NPsをDEX溶液に浸漬し、DEXをBCP-NPsに吸着させる方法と、BCP-NPsの形成溶液にDEXを添加し、DEXをBCP-NPsに内包する方法である。前者の方法で得られたナノ粒子をDEX/BCP-NPsとし、後者の方法で作製したナノ粒子をDEX@BCP-NPsと表記する。次に、DEX/BCP-NPsとDEX@BCP-NPsへのDEX含持量と徐放速度を調べた。DEX@BCP-NPsはDEX/BCP-NPsより多くのDEXを含持でき、より持続的なDEXの徐放ができた。ヒト骨髄由来の間葉系

幹細胞 (MSCs) の培養に用いたところ、DEX@BCP-NPs は MSCs の増殖を促進し、アルカリホスファターゼ活性、カルシウム沈着および骨分化遺伝子の発現レベルは有意に上昇したことが分かった。したがって、DEX を二相性リン酸カルシウムナノ粒子に封じ込める方法で作製した DEX@BCP-NPs は DEX の徐放および幹細胞の骨分化に最も効果的であることが示された。本章で得られた結果は DEX を担持し、幹細胞の骨分化に有用なナノ粒子キャリアの設計と調製に関する重要な知見である。

第 3 章では、DEX を担持した二相性リン酸カルシウムナノ粒子とコラーゲンとの複合多孔質材料の作製、およびそれを用いた骨組織の再生について述べられている。生体組織工学による骨組織の再生は骨欠損を修復するための有効な方法としてよく研究されているが、大きな欠損に対する迅速かつ効果的な骨再生は依然として大きな課題である。そのために、骨伝導性と骨誘導性に優れた多機能性の足場材料が必要である。そこで、DEX を担持した二相性リン酸カルシウムナノ粒子とコラーゲンスポンジを複合化し、DEX の徐放能と制御した多孔質構造を有する複合多孔質材料を作製し、骨組織再生への影響を調べた結果をまとめている。第 2 章で作製した DEX@BCP-NPs とコラーゲン水溶液との混合溶液に、造孔材として用いられる氷微粒子を添加し、この混合物を凍結し、凍結乾燥し、架橋処理を行った後、DEX@BCP-NPs とコラーゲンの複合多孔質足場材料 (DEX@BCP-NPs/コラーゲン) を得た。電子顕微鏡観察より、DEX@BCP-NPs は複合足場材料の空孔壁のコラーゲンマトリックスに均一に分布していることが分かった。複合足場材料は氷微粒子の形状と大きさを反映した空孔を有し、空孔は互いにつながっていた。また、多孔質足場材料は高い力学強度と持続的な DEX の徐放特性を有した。複合足場材料を用いて MSCs を三次元培養し、幹細胞の増殖と骨分化は促進されることが分かった。さらに、MSCs を培養した複合足場材料をヌードマウスの背中皮下に埋植し、異所骨組織の再生を調べた。組織染色、免疫組織染色および骨分化遺伝子発現を調べた結果、複合足場材料は異所骨組織の再生を促進したことを示している。本章で得られた結果は骨組織再生のための複合多孔質足場材料の作製に関して重要な知見であると考えられる。

第 4 章では、骨組織と血管を同時に再生するために、マイクロ溝を導入した DEX@BCP-NPs/コラーゲンを作製し、その効果について述べられている。一般に天然の骨組織には豊富な血管網が張り巡らされている。したがって、大きな骨組織を再生するためには、血管を同時に再生することが不可欠である。まず、第 3 章で作製した DEX@BCP-NPs/コラーゲン複合多孔質足場材料に、幅が異なる数種類のマイクロ溝を導入した。電子顕微鏡観察より、複合多孔質足場材料の内部は連通した空孔と空孔表面に分布している DEX@BCP-NPs より構成され、上面にはマイクロ溝の構造が形成されていることが分かった。次に、MSCs を複合多孔質足場材料のバルク内部に播き、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) をマイクロ溝がある上面に播いて共培養を行った。MSCs は複合多孔質足場材料の内部空孔に接着して増殖し、HUVECs は上面のマイクロ溝に沿って集合することを明らかにした。最後に、細胞を培養した複合多孔質足場材料をヌードマウスの背中下の皮下に埋植し、骨組織と血管が同時に再生していることを見いだした。マイクロ溝を導入した複合多孔質足場材料は、マイクロ溝がない複合多孔質足場材料と比較して、多くの骨組織と血管が再生した。これは、複合多孔質足場材料から徐放するデキサメタゾン、分解する二相性リン酸カルシウムナノ粒子および連通した多孔質構造は骨組織の再生を促進したことによると考えられる。一方、マイクロ溝は HUVECs を集合させ、血管再生を誘導できた。幅 $290 \mu\text{m}$ で間隔 $352 \mu\text{m}$ のマイクロ溝を有する複合多孔質足場材料は骨組織と血管の同時再生に最も効果が高いという知見を得た。マイクロ溝を導

入した複合多孔質足場材料は血管再生を誘導し、骨組織の再生を促進することができ、大きな骨欠損の治療に有用であることが示唆された。本章で得られた知見は、大きな骨欠損を治療するための骨組織再生用足場材料の設計と作製に重要であると述べている。

第 5 章では、これまでに述べた内容の総括が示されている。幹細胞の骨分化および骨組織の再生を促進するために、デキサメタゾンを持続的に徐放できる二相性リン酸カルシウムナノ粒子およびコラーゲンとの複合足場材料、さらに血管の同時細胞を誘導するマイクロ溝を導入した複合多孔質足場材料を作製し、その効果を明らかにした。本論文の研究で得られた知見は、幹細胞の三次元培養および骨組織再生のための複合足場材料の設計と作製に有用であると結論されている。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

本論文は、骨分化促進因子のデキサメタゾンを持続的に徐放できる二相性リン酸カルシウムナノ粒子およびコラーゲンとの複合化多孔質足場材料を作製し、培養した幹細胞の骨分化および骨組織の再生に及ぼす影響を明らかにしたものである。著者は、まず、デキサメタゾンと二相性リン酸カルシウムナノ粒子に導入する方法および条件を検討し、デキサメタゾンとナノ粒子に封じ込めた二相性リン酸カルシウムナノ粒子は吸着法に比べて、より高い担持量と持続的な徐放を達成した。作製したナノ粒子は間葉系幹細胞の増殖と骨分化を促進することを明らかにした。また、デキサメタゾンと二相性リン酸カルシウムナノ粒子とコラーゲンを複合化する際、氷微粒子を利用することにより、デキサメタゾンを持続的に徐放でき、多孔質構造を制御した複合足場材料を作製することに成功した。複合多孔質材料における間葉系幹細胞の増殖と骨分化を確認し、マウスを用いた実験で背中皮下での異所骨組織の再生を促進する効果を明らかにした。さらに、前述の複合足場材料の上面にマイクロ溝を導入し、マイクロ溝を有する複合多孔質足場材料を作製し、三次元培養実験およびマウスの動物実験により、骨組織と血管の同時再生は促進されることを示した。骨組織の再生促進効果は徐放されるデキサメタゾン、分解する二相性リン酸カルシウムナノ粒子および連通した多孔質構造によるもので、血管再生の促進効果はマイクロ溝によると結論づけている。これら一連の研究結果は、複合多孔質足場材料への骨分化促進因子の導入や多孔質構造などを設計すれば、複合多孔質足場材料で三次元培養した細胞の機能を制御可能であることを示しており、大きな骨組織の再生のための足場材料の設計・作製において重要な学術的貢献をもたらすものである。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分な学術的価値をもつものと認める。

〔最終試験結果〕

平成 30 年 2 月 9 日、数理工学物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。