

# ナノカーボンと骨再生

平田 恵理

## はじめに

カーボンナノチューブ (CNT) やカーボンナノホーン (CNH) などのナノカーボンは (図1), 生体適合性が高いことから, 再生医療のためのバイオマテリアルへの応用が研究されている。骨折, 変形性関節症, 骨粗鬆症, または骨癌により損傷した骨組織の再生は, 患者が正常な機能と健康を回復し, QOL (quality of life) を改善するための重要な課題である。特に, 高齢社会において, 部分的に歯を失った患者への義歯やインプラントといった補綴 (ほてつ) 治療の需要は高い。一方で重度の歯周病による抜歯や腫瘍の摘出には広範囲の歯槽骨欠損が伴う場合が多く, その後の補綴治療を困難にしている。そこで, 任意の場所で骨を形成できれば, 義歯の安定性やインプラントの埋入の自由度が増し, 咀嚼機能の回復が容易になり, 患者のQOLの改善につながると考えられる (図1)。ナノカーボンは, 特徴的な立体構造を持ち, 化学的修飾による高機能化が可能であることから, 骨再生のためのバイオマテリアルへの応用が期待される。そこで本稿では, ナノカーボンを用いた骨再生とそのメカニズムについての研究を紹介する。

## CNTを用いた細胞培養担体

組織工学においては立体的な組織や臓器の構築には, 3次元培養担体が不可欠と考えられており, 多様な担体の開発が進められている。しかしながらこれまで用いられてきた3次元培養担体では, 細胞が播種時に担体の気孔 (ポア) を通過してしまい, 担体内部に接着しにくいことが知られている。CNTは特有の立体構造によって細胞接着を向上させることが報告されている<sup>1,2)</sup>。筆

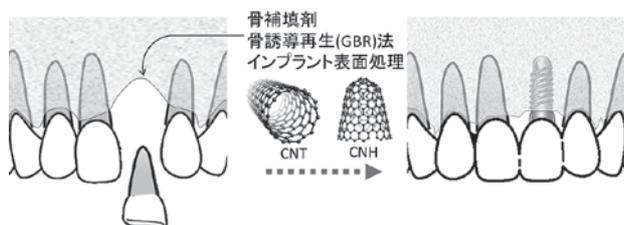


図1. 骨再生のための生体材料へのナノカーボンの応用

者らは, この特徴に着目し, 3次元細胞培養担体の一つであるコラーゲンスポンジの表面をCNTでコートすることで表面改質したCNTコートスポンジを開発した。表面に水溶性のCOOH基を化学修飾した多層CNT (MWCNT-COOH) を蒸留水に均一分散させ, コラーゲンスポンジ (気孔直径200–400 μm) を浸漬後, 余剰CNTを除去したものをCNTコートスポンジとした。図2に示すように, CNT特有の微細構造に細胞がトラップされ, 培養初期において担体深部にまで細胞が付着できること<sup>3–5)</sup>, さらに骨芽細胞の分化が促進されることを見いだした<sup>6)</sup>。これにより立体的な細胞構造 (骨組織) を構築する細胞培養担体としての応用が期待された。また, ポリ乳酸やチタンにCNTをコートすることにより表面の親水性が向上し, 骨芽細胞の接着が促進されることも明らかになった<sup>7,8)</sup>。

## CNTと骨の適合性

ナノカーボンを骨再生へと臨床応用するためには, 生体適合性, とくに骨組織との高い適合性が必要である。CNTは, 直径は数nm (単層) から数十nm (多層) で, 長さ数~数十mmと, きわめて細長い線維状であるが, 長さや処理方法により生体反応が異なるため, 適用量や方法の検討が必要である<sup>9)</sup>。CNTのみをバルク状に固めたCNT固化体をラット骨髄腔に埋入したところ, 強い炎症反応は認められず, CNTと骨細胞が接触している像が観察された<sup>10)</sup>。一般的に, 骨との適合性が低い材料は骨組織とは接触せず, 線維組織が介在することが多い。

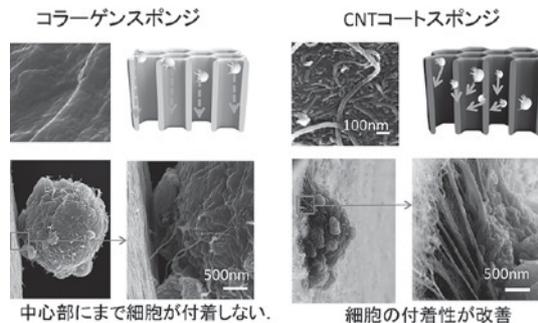


図2. コラーゲンスポンジ (左) とCNTコートスポンジ (右)。気孔内部壁面 (左上) と骨芽細胞培養後 (下段)

CNT固化体をラットの皮下に埋入した場合、7日後の炎症は軽微であった<sup>11)</sup>。

CNTコートスポンジをラット骨髄腔に埋入したところ、56日後において、CNTコートスポンジ周囲には骨組織が維持されていた。一方、対照のCNTコート未処理スポンジでは骨組織が消失していた。また、骨芽細胞培養1日後の各スポンジを皮下に埋入後28日において、未処理のスポンジでは骨形成がほとんど観察されなかったが、CNTコートスポンジにおいては、スポンジの気孔内のCNTコートに沿って明瞭な骨形成が認められた(図3)<sup>6)</sup>。これはCNTを表面にコートすることでコラーゲンスポンジのポア構造が保持されるため、内部に骨を形成したと考えられた。また長期埋入した2年後には炎症反応はほとんど収束し、細胞死などはみられなかった<sup>12)</sup>。これにより、CNTは生体親和性および骨との適合性が高いと考えられた。

### 化学修飾CNTによる骨再生

CNTの表面をタンパクなどで化学的に修飾することにより、生体適合性の向上と新たな機能の付与が可能となることが知られている<sup>13-15)</sup>。たとえば、COOH修飾CNT (CNT-COOH) 膜上では、親水性が高くなることにより骨芽細胞の接着が促進され、分化が亢進されることが報告されている<sup>16,17)</sup>。線維芽細胞増殖因子(FGF)は、骨芽細胞の増殖を促進し、初期の骨再生を促進することも報告されている。そこで、CNT-COOHにFGFを共有結合で接合させたCNT-FGFをコラーゲンスポンジに表面処理したCNT-FGFスポンジを作製した(図4)。CNT-FGFスポンジをラット頭蓋冠の骨膜下に埋入したところ、14日後、未処理のスポンジでは骨形成がほとんど観察されなかったが、CNT-FGFスポンジの気孔内部で

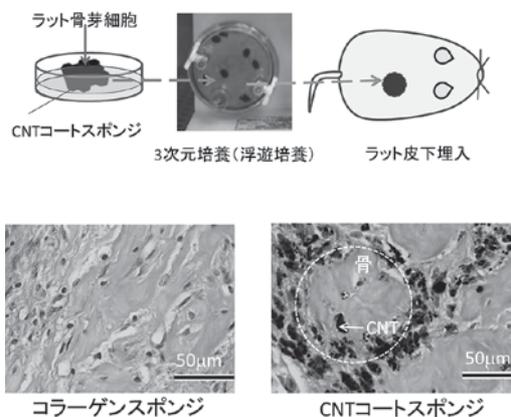


図3. CNTコートスポンジにて骨芽細胞を1日培養し、ラット皮下に埋入後28日の組織像。

は骨形成がみられた。これによりCNT表面のFGFが周囲の骨芽細胞に作用し、骨形成を促進することが明らかになった<sup>18)</sup>。

### CNHによる骨再生とそのメカニズム

CNHは、CNTと同様に炭素が円錐状の構造をとったものであり、直径100 nm程度の集合体として存在する(図1)。CNHは、CNTの合成時にはほぼ必須である金属触媒を用いることなく合成できるため、CNTをはじめとするナノカーボンと比較して生体適合性が高いことが知られている。骨誘導再生法(GBR法)は、骨欠損部を生体内吸収性あるいは非吸収性の膜(GBR膜)で覆うことで周囲の軟組織の侵入を防ぎ、骨再生を誘導する骨組織再生療法の一つであり、PTFE膜などが使用される。筆者らはCNHをPTFE膜に固着したCNH-PTFE膜を作製した。ラット頭蓋冠に円状の骨欠損を作製し、CNH-PTFE膜によって被覆した。その結果、CNHを固着したPTFE膜下にはCNHがないPTFE膜と比較して広い範囲で新生骨が観察された。また、新生骨周囲にCNHを貪食したマクロファージが多数観察された(図5)<sup>19)</sup>。

生体材料を生体内に埋入した際、最初に起こるのは免疫反応であり、骨再生に深く関与していることが報告されている<sup>20)</sup>。そこで筆者らはCNHによるマクロファージへの刺激が骨再生に関与していると考え、CNH存在下でヒトマクロファージ(hMDM)とヒト骨髄間質細胞(hMSC)の共培養を行い、骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化に与える影響について検討した。共培養開始から24時間後においてCNHは、hMSC内部にほとんど観察されなかったが、hMDMのライソゾーム内部に観察された。さらに、共培養後のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定したところ、CNHの存在下にて上昇することが明らかになった。ALP活性は骨芽細胞の分

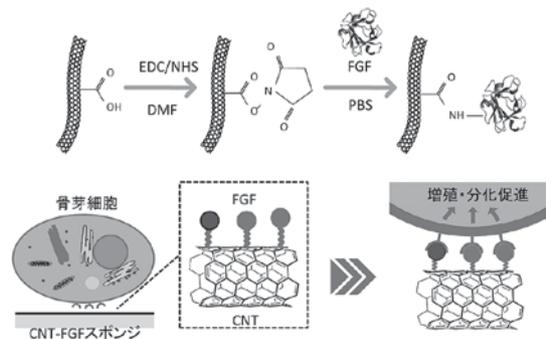


図4. FGF-CNT合成と骨芽細胞への作用。EDC × HCl (N-ethyl-N-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride) and NHS (N-hydroxysuccinimide)。

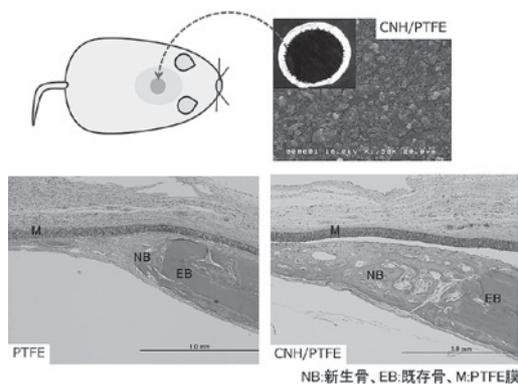


図5. CNH-PTFE膜をラット頭蓋冠骨欠損部に埋入後14日の組織像

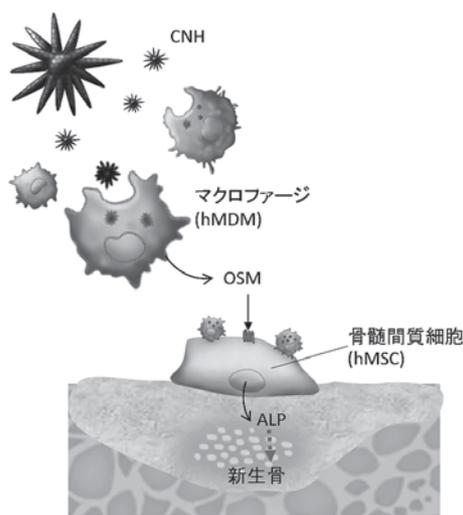


図6. マクロファージを介したCNHによる骨再生

化初期に発現するため、ALPの上昇が分化の指標となる。同時に、上清中のオンコスタチンM (OSM) の量も増加した。活性化されたマクロファージ由来のOSMは、骨芽細胞分化および石灰化を誘導することが報告されている。したがって、これらの結果は、マクロファージがCNHを取り込んだ後、OSM放出を介して間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進することを示唆している(図6)<sup>21)</sup>。ナノカーボンを用いた骨再生のメカニズムについては、前述したように、ナノカーボンが骨芽細胞の分化を促進するという報告はあるが、マクロファージ・骨髄間質細胞・ナノカーボンの関係性に注目した研究はない。これはナノカーボンを骨再生に応用するための重要な道標となるだろう。

## まとめ

ナノカーボンはさまざまな形状を有した炭素由来の物質であり、その形状や性質、機能は多岐にわたる。これらをさらに化学修飾などにより高機能化することにより、薬剤やタンパク質などを担持することができるのみならず、生体内分解性を制御することが可能である。たとえば、CNTやCNHは特徴的な構造やサイズによって、マクロファージを介した骨新生を促進する。これらの特徴を用いて、デンタルインプラントへの表面修飾、骨造成のためのGBR膜形成など、目的に応じた骨再生のための生体材料への応用が可能と考えられる。デンタルインプラントにおいては、迅速な骨再生が可能となり安全なインプラント治療を確立でき、また骨補填材およびGBR膜においては、迅速かつ多量の骨形成が可能となり治療後のQOLの向上を期待できる。さらにナノカーボンが骨形成を促進する分子生物学的メカニズムの解明により新たな骨再生材料の創発へつなげると考えられる。これにより、骨代謝機能の低下した高齢者や有病者に大きな福音をもたらすことが期待できる。

## 文 献

- 1) Aoki, N. *et al.*: *Dent. Mater. J.*, **26**, 178 (2007).
- 2) Warowicka, A. *et al.*: *Compos. Sci. Technol.*, **136**, 29 (2016).
- 3) Hirata, E. *et al.*: *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **90 B**, 629 (2009).
- 4) Hirata, E. *et al.*: *J. Electron Microsc.*, **59**, 447 (2010).
- 5) Hirata, E. *et al.*: *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **93**, 544 (2010).
- 6) Hirata, E. *et al.*: *Carbon.*, **49**, 3284 (2011).
- 7) Hirata, E. *et al.*: *Appl. Surf. Sci.*, **262**, 24 (2012).
- 8) Inoue, S. *et al.*: *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 621 (2012).
- 9) Alshehri, R. *et al.*: *J. Med. Chem.*, **59**, 8149 (2016).
- 10) Wang, W. *et al.*: *Mater. Sci. Eng. C*, **28**, 1082 (2008).
- 11) Sato, Y. *et al.*: *Carbon.*, **46**, 1927 (2008).
- 12) Sato, Y. *et al.*: *Sci. Rep.*, **3**, 2516 (2013).
- 13) Bianco, A. *et al.*: *Chem. Commun.*, **5**, 571 (2005)
- 14) Ménard-Moyon, C. *et al.*: *Chem. Biol.*, **17**, 107 (2010).
- 15) Battigelli, A. *et al.*: *J. Mater. Chem. B*, **2**, 6144 (2014).
- 16) Das, K. *et al.*: *Int. J. Nanomedicine*, **12**, 3235 (2017).
- 17) Mata, D. *et al.*: *Nanoscale*, **7**, 9238 (2015).
- 18) Hirata, E. *et al.*: *Nanotechnology*, **24**, 435101 (2013).
- 19) Kasai, T. *et al.*: *Nanotechnology*, **22**, 65102 (2011).
- 20) Franz, S. *et al.*: *Biomaterials*, **32**, 6692 (2011).
- 21) Hirata, E. *et al.*: *Nanoscale*, **8**, 14514 (2016)