



Title	炎症制御・硬組織形成促進のためのリチウム・ストロンチウム放出ガラスの開発
Author(s)	堺, 裕彦
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101543
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 堀 裕 彦 ）

論文題名 炎症制御・硬組織形成促進のためのリチウム・ストロンチウム放出ガラスの開発

論文内容の要旨

【緒言】

損傷した骨は炎症期を経た後に再生過程へと移行し、治癒に至る。したがって、炎症期および骨形成期に、それぞれ抗炎症作用および骨形成促進作用を有するイオンを作用させることで、骨治癒を早めることが可能になるものと考えられる。本研究では、抗炎症作用を有するリチウム（Li）と間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を促進するストロンチウム（Sr）に着目し、バイオアクティブガラス（BG）を用いて、炎症期と骨形成期にLiイオンとSrイオンを段階的に供給する新たな材料デザインを考案した。すなわち、ガラスのネットワーク形成剤として機能するアルミニウム（Al）をBGに添加して、溶解性の異なる複数のLiイオン放出BG（Li-BG）およびSrイオン放出BG（Sr-BG）を試作し、各BGの物理化学的性質およびイオン放出挙動を評価した後、両BGを組み合わせた場合の生物学的作用を検討することにより、抗炎症作用と硬組織形成促進作用を段階的に発現可能な複合BGを開発することを目指した。

【材料と方法】

実験 1．試作BGの作製および構造と物理化学的性質の評価

リン酸二水素アンモニウム、酸化アルミニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸リチウム、炭酸ストロンチウムを異なる比率で混合し、熔融急冷法を用いてAl含有量の異なる4種のLi-BG（Li-Al0、Li-Al2、Li-Al4、Li-Al6）と4種のSr-BG（Sr-Al0、Sr-Al2、Sr-Al4、Sr-Al6）を作製した。得られたBG塊を細粒化し、走査型電子顕微鏡観察、粒度分布測定、エックス線回折（XRD）解析、エネルギー分散型蛍光X線（EDX）分析により、試作BGの構造および物理化学的性質を評価した。

実験 2．試作BGのイオン溶出性と組み合わせの検討

各試作BGを蒸留水に最長100日間浸漬し、経時的な溶解挙動を検討した。さらに、カルチャープレート用インサートを用いて各試作BGをMEMαに浸漬し、LiイオンまたはSrイオンの溶出濃度を高周波誘導結合プラズマ発光分光装置を用いて測定した。つづいて、Li-Al0と各Sr-BGを重量比1：1で混合して複合BG（Li/Sr-Al0、Li/Sr-Al2、Li/Sr-Al4、Li/Sr-Al6）を作製し、蒸留水中での溶解挙動の評価およびMEMα中へのLiイオンとSrイオンの溶出濃度測定を行った。

実験 3．複合BGのマクロファージに対する作用の評価

RAW264.7を各複合BG存在下で培養し、複合BGの細胞毒性およびマクロファージの増殖に及ぼす影響を検討した。次に、インサートを用いて複合BGとともに炎症型マクロファージ（M1マクロファージ）を培養し、炎症性遺伝子（*Nos2*、*IL-6*、*Cd80*）および抗炎症性遺伝子（*Arg1*、*Mrc1*）の発現量をリアルタイムPCR法を用いて評価した。また、複合BG存在下で培養した場合のM1マクロファージの食食能の変化を、オプソニン化ビーズを用いた食食活性試験にて評価した。さらに、複合BGとともにM1マクロファージを培養した場合の炎症関連タンパク質（GSK-3β、p-GSK-3β、STAT3、p-STAT3）の発現を、ウェスタンブロッティング法を用いて検討した。

実験 4．複合BGのヒト間葉系幹細胞に対する作用の評価

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hBMSCs）を複合BG存在下で培養し、生存率および増殖能を評価した。また、複合BGがhBMSCsの骨芽細胞分化に与える影響を、ALP活性測定、リアルタイムPCR法ならびにvon Kossa染色を用いて評価した。なお、リアルタイムPCR法では、骨形成マーカーである*Runx2*、*ALP*、*OPG*の発現量を評価した。さらに、複合BGの存在下で培養したhBMSCsについて、骨分化シグナル分子であるCalcineurinとNFATc1の発現をウェスタン

プロット法を用いて評価した。

【結果および考察】

実験 1. 作製したBGはいずれも不定形であり、Li-BGとSr-BGの間で形態に差は認められなかった。いずれの試作BGも近似した粒度分布を示し、その平均粒径は約10 μm であった。XRD解析の結果から、すべての試作BGが非晶質であることが確認された。さらに、EDX分析の結果から、軽元素であるため観察ができないLiを除いて、いずれの無機元素もBG内部で均一に分布していることが確認された。Sr-BGについては、各試料間でSrの含有量に差は認められなかった。各試料間で、組成比に応じたAl含有量の増大が認められた。

実験 2. Li-BGおよびSr-BGのいずれにおいても、Al含有割合が増加するにつれて溶解性が低下した。Li-BGからのLiイオン溶出濃度は、MEMα浸漬7日目まではAl含有割合が低いガラス程大きかったが、浸漬30日後にはいずれのLi-BGからもLiイオンの溶出がほとんど認められなくなった。Sr-BGについては、Al含有割合が増加するにつれてSrイオンの最大溶出濃度を示すまでの期間が延長し、いずれのSr-BGでも長期的なSrイオン溶出が認められた。これらの結果から、Alの含有割合を調整することで、試作BGの溶解性およびイオン溶出性を緻密に制御できることが示された。試作した4種のLi-BGのなかで、Li-Al0のみが抗炎症に有効な範囲のLiイオン溶出濃度を示したことから、Li-Al0と各Sr-BGを混合して複合BGを作製したところ、いずれの複合BGも浸漬1日目から7日目まで抗炎症に有効なLiイオン溶出濃度を示した。一方、Srイオンについては、複合BGのAl含有割合が増加するにつれてイオン溶出性が低下したが、いずれのSr-BGにおいても浸漬100日目でも骨形成促進に有効な濃度範囲のイオン溶出が確認された。骨治癒は数か月間にわたって進行するが、Li/Sr-Al2は、骨形成促進に有効な期間を通して、複合BGのなかで最も高いSrイオン溶出濃度を維持した。これらのことから、Li/Sr-Al2が最も理想的なLiイオンとSrイオンの段階放出能を有するものと考えられた。

実験 3. RAW264.7を用いた細胞毒性試験の結果、すべての複合BGにおいて、コントロールと比較して生存率に差は認められず、試作BGはマクロファージに対して毒性を示さないことが確認された。細胞増殖試験の結果から、各複合BGと培養したM1マクロファージの増殖能は、BG非添加のM1マクロファージと比較して向上することが分かった。さらに、すべての複合BGにおいて、M1マクロファージの貪食活性が有意に抑制され、*Nos2*、*IL-6*、*Cd80*の発現量が低下した一方、*Arg1*、*Mrc1*の発現量は、BG非添加のM1マクロファージと比較して有意に増加した。また、複合BGの存在下では、BG非添加の場合と比較して、M1マクロファージにおけるp-GSK-3 β の発現が有意に増大する一方で、p-STAT3の発現量が有意に減少した。GSK-3 β は炎症関連遺伝子の発現を促進するSTAT3のリン酸化を制御することから、複合BGから溶出したLiイオンがGSK-3 β のリン酸化を通じてM1マクロファージの活性を抑制している可能性が示された。

実験 4. 細胞毒性試験および増殖試験において、いずれの複合BGでもコントロールとの間に有意な差は認められず、複合BGがhBMSCsに対して良好な親和性を有することが分かった。また、Li/Sr-Al0およびLi/Sr-Al2では、ALP活性および*Runx2*、*ALP*の発現量がコントロールと比較して有意に増加し、Li/Sr-Al2では*OPG*の発現量が有意に増加した。さらに、複合BG存在下でhBMSCsを培養後にvon kossa染色を施した結果、すべての複合BGにおいて、コントロールと比較して石灰化基質の沈着量が有意に増加し、とくにLi/Sr-Al0およびLi/Sr-Al2では他の複合BGよりも多くの沈着が認められた。また、複合BGと培養したhBMSCsにおいてCalcineurinとNFATc1の発現量が有意に増加し、とくにLi/Sr-Al0およびLi/Sr-Al2で増加が顕著であった。これらの結果から、複合BGから溶出したSrイオンが細胞膜上のカルシウム感受容体にアゴニストとして作用し、hBMSCsの骨芽細胞分化を促進するものと考えられ、その効果がLi/Sr-Al2において明瞭であることが分かった。

【結論】

リン酸塩系BGのAl含有割合を調整することで、LiイオンやSrイオンの緻密な放出制御が可能になることが明らかとなった。そして、この技術の応用により溶解挙動を制御したLi-BGとSr-BGを組み合わせることによって、LiイオンとSrイオンを段階的に放出する複合BGの開発に成功した。本研究で開発した複合BGは、抗炎症作用と硬組織形成促進作用を示すことにより、迅速かつ効果的な骨再生の実現に有益な材料であると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (堺 裕 彦)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	今里 聡
	副 査	教 授	豊澤 悟
	副 査	准教授	和田 誠大
	副 査	講 師	山下 元三
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、リチウムおよびストロンチウムイオンの放出能を制御した新規のバイオアクティブガラスを作製し、両ガラスを組み合わせることで、抗炎症作用と骨形成促進作用を段階的に発現する骨再生用材料の開発を試みたものである。</p> <p>その結果、リン酸塩系ガラスをベースにアルミニウム含有割合を調整することで、それぞれのイオンの放出挙動を緻密に制御できることが分かった。そして、リチウムイオンを速やかに放出するガラスとストロンチウムイオンを長期的に放出するガラスを組み合わせ、マクロファージまたは骨髄間葉系幹細胞を用いて評価したところ、試作複合ガラスが抗炎症作用と硬組織形成促進作用を示すことが明らかとなった。</p> <p>以上の研究成果は、迅速かつ効果的な骨再生を可能にする新規バイオアクティブガラスの開発に成功したことを示すものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>			