

細胞および骨基質の配向化機序に基づく 骨機能化誘導

松 垣 あいら¹⁾ 中 野 貴 由²⁾

1. はじめに

生体内では核酸やタンパク質、細胞が有機的に連携し相互作用し合うことで機能的な組織・臓器を構築し、個体レベルでの健全な生命活動を可能としている。疾患や損傷によりいったんその機能が破綻すると、組織の修復には、生体機能を回復させるための医療デバイスが大きな力を発揮する⁽¹⁾。人工材料である医療デバイスが生体本来の機能発現を導くためには、細胞やそれを取りまく環境に応じて生体組織・臓器が形づくられる仕組みを理解した上で、その機序を人為的にコントロールし、積極的に発動させる材料の創製が求められる。とりわけ、硬組織である骨は有機・無機成分および多数の細胞要素が、複雑に絡み合いながら作り上げられた生体組織であり、荷重支持といった力学的機能のみならず、生体内でのカルシウムやリン代謝を担う動的な臓器としても機能する⁽²⁾。筆者らは、こういった骨の高度な機能が、その配向化微細構造に基づいて発揮されることを見出し、骨機能化をもたらす生物学的機序の理解、およびその仕組みを誘起するための材料創製を目指し、次世代の生体材料研究に取り組んでいる。本稿では、骨機能化のための配向性形成について、現在明らかになりつつあるその細胞・分子機序、およびそれに基づく骨医療デバイスの創製に関する筆者らの最新の知見について紹介する。

2. 骨の配向化微細構造に基づく機能発現

骨に代表される生体硬組織は、生物が無機化合物を形成するバイオミネ랄化のプロセスに基づき、精緻な階層構造を有する有機/無機複合化材料として構成される。骨

再建プロセスでは、失われた骨の量的充填とともに、構造的な回復が鍵を握り、NIH(米国国立衛生研究所; National Institutes of Health)により骨密度以外の骨強度を支配する因子として提唱された「骨質」の概念を考慮する必要がある⁽³⁾。筆者らは、材料工学的立場から骨研究に取り組むことで、コラーゲン線維/アパタイト結晶からなる骨組織が示す特有の3次元配向化構造が、必要な方位に特異的な力学機能の発揮を可能とする重要な骨質因子のひとつであることを見出している(図1左)⁽⁴⁾⁻⁽⁶⁾。これは、コラーゲンおよびアパタイトが、ともに高度な力学的異方性を示す構造材料であることに由来する。コラーゲン線維は、3重らせん構造をもつコラーゲン分子が自己組織化したナノスケールの線維状構造体であり、線維方向に沿った強い力学特性を示す。正常骨では、こういった配向化コラーゲン線維上での結晶のエピタキシャル成長に基づき、アパタイト結晶c軸はコラーゲン線維に沿った優先配向性を示す。アパタイトは六方晶系の結晶構造に由来する力学的異方性を発現することから、骨はそのコラーゲン線維/アパタイト結晶配向性構造に基づいた力学特性を発揮する。

興味深いことに、骨はその種類や解剖学的部位に応じて異なる配向性を示す。図1右には、尺骨、頭蓋骨、下顎骨、腰椎骨の皮質骨部における代表的な3方向でのアパタイト結晶c軸配向度を示す⁽⁴⁾。尺骨や腰椎骨では重力方向に基づいた一軸的荷重負荷に応じて、骨長軸・頭尾軸に沿った優先配向性を示す。一方、下顎骨は咀嚼荷重に応じた配向性分布を示し、応力分布と骨配向性の密接な関係性を示唆している。しかしながら、こういった骨配向性の自発的な再構築は困難であり、その再生は骨密度に大幅に遅れて回復する⁽⁷⁾。そのため骨微細構造の再生を人為的に誘導する医療デバイス創製が必要不可欠であり、材料工学を基軸としつつ、細胞生

* 大阪大学大学院工学研究科; 1)助教 2)教授(〒565-0871 吹田市山田丘2-1)
Bone Functionalization Based on the Cellular Mechanisms Controlling the Ordered Arrangement of Cells and Bone Matrix Microstructure; Aira Matsugaki and Takayoshi Nakano (Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita)
Keywords: biomedical device, collagen/apatite, surface topography, bone cells, cell signaling, intercellular communication, metallic implant
2020年7月9日受理[doi:10.2320/materia.59.594]

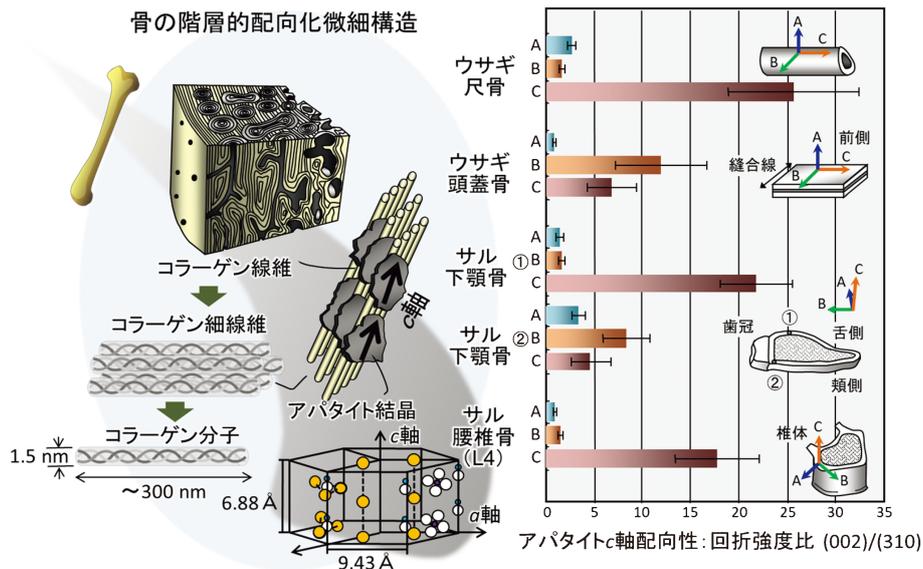


図1 (左)骨は主にコラーゲン線維/アパタイト結晶からなる配向化微細構造を有する。(右)骨のアパタイト配向性は、解剖学的部位や種類に応じて異なる配向化方向・配向度を示し、骨に負荷される応力分布と密接に関係する。(文献(4)より改変引用。) (オンラインカラー)

物学的観点との融合に基づいた生体組織制御の方法論と、それに基づく材料創製が求められる。とりわけ、材料を起点とした細胞接着の異方性制御に基づき、材料の特性を生物シグナルへと転換し、生体骨の機能化を誘導する新しい金属生体材料開発の指針が見出されてきた。

3. 医療デバイス材料表面への細胞接着制御に基づく骨配向化誘導

細胞接着は人工材料と生体との相互作用の起点となり、その後の組織再生を支配する最重要因子のひとつである⁽⁸⁾。再生骨組織の機能発現には、材料表面から骨の細胞へと働きかけ、その接着挙動の能動的制御が求められる。骨アパタイトの秩序だった結晶学的配向性を作り出すには、個々の細胞配列パターンの制御が必要不可欠である⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾。骨芽細胞はコラーゲン産生とその後の石灰化プロセスを担い、その配列化度は基板材料の異方性の度合と相関し、さらに、骨配向性の強さは、骨芽細胞配列化度と相関する⁽¹¹⁾。すなわち、基板の異方性を材料工学的手法に基づき制御することで、任意の骨配向性を得ることが可能となる。材料表面への異方性の導入は、金属単結晶の塑性変形⁽¹²⁾⁽¹³⁾や超高速レーザー加工技術⁽¹⁴⁾、応力場⁽¹⁵⁾の制御によって可能であり、細胞制御に基づく骨基質配向化方向や配向度の自在な制御を実現している。いずれの場合も、材料の異方性表面形状、たとえば一方向性溝構造が、骨芽細胞の優先配列化をもたらし、アパタイトが配向化した再生骨を短期間で形成可能であることが期待される。実際、異方性材料を足場とすることで、iPS細胞(人工多能性幹細胞: induced pluripotent stem cells)を用いて、幹細胞から直接配向化骨の創製をも可能である⁽¹⁶⁾。こうした材料による骨配向化誘導は、材料—生体界面において

細胞構成要素のサイズに応じてマルチスケールで統制されている。すなわちナノメートルスケールの分子(核酸やタンパク質)からマイクロメートルスケールの細胞内小器官(アクチン骨格や接着斑)を個別に考慮した細胞制御の方法論確立が必要である(図2)。たとえばリソグラフィーによるナノオーダーの表面微細加工は、細胞サイズよりもはるかに極微細な起伏であるものの、細胞表面の接着分子へとダイレクトに働きかけることで、細胞伸展方向を制御する。さらには、インテグリン(細胞接着を司る司令塔のタンパク質)の集合化を制御し、コラーゲン分子の特異的アミノ酸配列を認識することで、コラーゲン基質配向化を制御する。さらに細胞サイズへと表面形状を拡張すると、エレクトロスピニング法による直径10 μm 程度のファイバー形成や金属単結晶の塑性変形に基づく数十 μm 程度の表面起伏は、細胞膜構造や細胞骨格形成に対して3次的に作用し分子シグナルを発動することで細胞の一方向配列化、ひいては骨基質の配向化を達成可能である⁽¹⁷⁾。近年では、3次元形状の任意制御による医療デバイスのカスタム化に欠かせない技術となった金属積層造形法によるサブミリオーダーの表面起伏制御により、マクロには体液の流入を可能としデバイス表面への細胞成分の誘導を促し、さらには細胞体サイズに合致した表面形状に基づく細胞配列化を誘導可能であることが示された⁽¹⁸⁾。こういった配列化骨芽細胞による骨配向化は、表面形状やそのスケールに応じて遺伝子レベルから緻密な統制のもとに発現することが判明してきた。

4. 材料を起点とした細胞配列化制御が骨基質配向化をもたらす仕組み

材料工学的方法論に基づいた細胞の一方向配列化制御は、

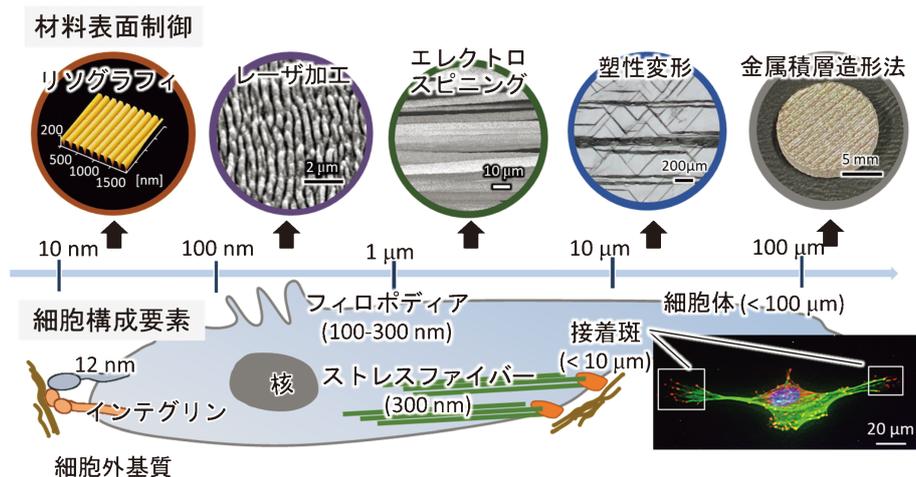


図2 ナノメートルスケールの分子(核酸やタンパク質)からマイクロメートルスケール(接着斑や細胞体)まで、細胞構成要素のスケールに応じた細胞配列化のための材料学的方法論。

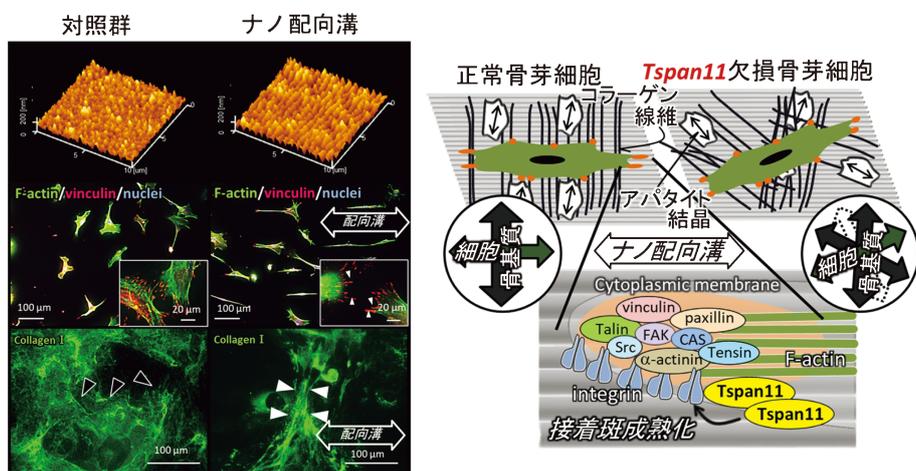


図3 (左)チタン合金表面へのナノ配向溝導入(上段; SPM 像)による骨芽細胞(中段)・骨基質配向化誘導(下段)。(右) Tspan11による接着斑成熟化を介した骨配向化機構。正常な骨芽細胞は、ナノ配向溝に対して配列化する一方で、細胞方向に垂直に骨基質を形成する。Tspan11欠損状態においては、溝方向への接着斑成熟化が妨げられ、直交性の骨基質形成に破綻をもたらす。(文献(19)より改変引用。)

インテグリンを介した細胞と基質との接着機構や細胞内小胞輸送プロセス(細胞内にてコラーゲン分子を合成し、小胞形成により細胞外へと分泌、線維形成する過程)に基づき、緻密にその配向性が形成される可能性が示唆された。一方、ナノメートルスケールの一方向溝形状は、細胞接着の特異性を生み出し、従来の科学的常識を覆して細胞方向に垂直に骨基質を形成する。筆者らはこういった特異垂直化現象を見出すとともに、平行/垂直配向化が遺伝子のはたらきによりコントロールされることを発見し、骨配向化の分子機序理解は飛躍的な進展をみせている。

超短パルスレーザーによる高速溝加工 LIPSS(レーザー誘起周期表面構造)を用いることで、Ti-6Al-4V 合金表面にナノメートルスケールの配向溝形状(幅およそ500 nm、高さ250 nm)を付与すると、骨芽細胞は配向溝に沿って配列化する。驚くべきことに、ナノ配向溝上で配列化した骨芽細胞は、細

胞配列に直交する方向へコラーゲン/アパタイト配向化基質を形成することが見出された⁽¹⁴⁾。マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析の結果、こういった特異垂直配向化には、Tspan11(Tetraspanin11)遺伝子が制御する接着斑成熟化のナノ構造依存性が関与することを発見した⁽¹⁹⁾(図3)。こうした知見は、人工関節等の医療デバイス表面への微細構造付与により、インプラント周囲に形成する新生骨組織の微細構造を自在に制御できる可能性を示している。さらには、これまでまったく未知であった配向化機序の解明は、最終的には骨疾患治療の新たな方法論や、材料から積極的に細胞シグナルを誘導、骨配向化の発現を自発的に促すような材料創出につながる可能性を秘めている。

一方でデバイス周囲への骨形成が達成されると、骨の健全化には最大主応力ベクトルをホスト骨へ連続的に伝達することが不可欠となる。材料表面への配向溝構造の設計によ

り、溝内への配向化骨誘導を可能とするインプラントとして、電子ビーム積層造形法により骨配向化誘導を期待できる人工股関節(2018年薬事承認)⁽²⁰⁾、および切削での表面加工により骨配向化の誘導が期待できる歯科インプラント(2017年薬事承認・上市化)⁽²¹⁾を提案しており、いずれの場合も、骨中のオステオサイトによる応力感受を起点とした細胞間相互作用に基づき配向化骨形成を誘導することが期待される。骨に負荷された応力は、骨内部に張り巡らされた、体液の流路である骨細管ネットワーク内の流体流動をオステオサイト突起表面で感受、骨芽細胞や破骨細胞へと生化学シグナルを伝達することで骨の微細組織形成を調整している⁽²²⁾⁽²³⁾。こうした骨健全化のための細胞間相互作用は、正常な細胞機能が連携して骨異方性構築をもたらす生物システムを意味しており、一方で細胞の異常化は重篤な骨劣化をもたらし、その多くが骨の異方性微細構造破綻に起因することが近年明らかになりつつある⁽²⁴⁾。

5. 細胞間相互作用制御に基づく配向化誘導

がんは正常細胞の遺伝子変異により異常化した細胞集団をもたらす疾患であり、その多様性と他臓器への転移能の高さを最大の特徴とする。骨はその主要な転移標的臓器であり、造骨性がん転移骨では骨形成過剰による高骨密度を示すにもかかわらず非常に脆く、易骨折性の難治病態を示す。こういったがん転移は現在の骨医学において最も大きな課題の一つであり、転移骨における骨機能破綻の機序は依然として不明であり、課題解決の糸口さえ得られていない。一方で既存のがん医療は骨密度のみに対応しており、がん転移による骨機能異常の本質理解には至っていない。こうした中、筆者らは、結晶学的アプローチを駆使することで、ベクトル量としての結晶配向性の低下が、がん転移による骨折リスク上昇の重要因子であることを発見した⁽²⁵⁾⁻⁽²⁷⁾。造骨性転移を示す前立腺がん転移マウスモデルにおいて、骨長軸に沿ったコラーゲン線維走行/アパタイト結晶c軸配向性の顕著な乱れとともに、それに起因した力学機能の低下が見出された(図4)。すなわち、がん転移による骨の脆弱化が、従来の治療指標である骨密度ではなく、骨配向性の低下によりもたらされることを意味している。このとき、正常骨では骨表面に一層に配列した骨芽細胞の規則的な作用により秩序だった骨形成が行われた一方、造骨型転移骨では、骨内膜・外膜の両側で分化亢進し積層化した骨芽細胞による無方向性の骨形成が生じており、骨芽細胞配列化不全が転移骨の配向性低下をもたらした可能性が示された⁽²⁵⁾。

がん細胞はいかにして骨芽細胞配列破綻をもたらしたのか? 筆者らは、*in vitro* 異方性がん転移モデルを構築し、そのダイナミクス解明にアプローチしている。筆者らの確立した異方性共培養システムをがん転移モデルへと拡張し、がん細胞存在下での骨芽細胞配列化への影響に系統的に取り組むことで、がん骨転移の新たな機序を見出している。がん細胞は可溶性タンパク質の産生を介して間接的に骨芽細胞へと働

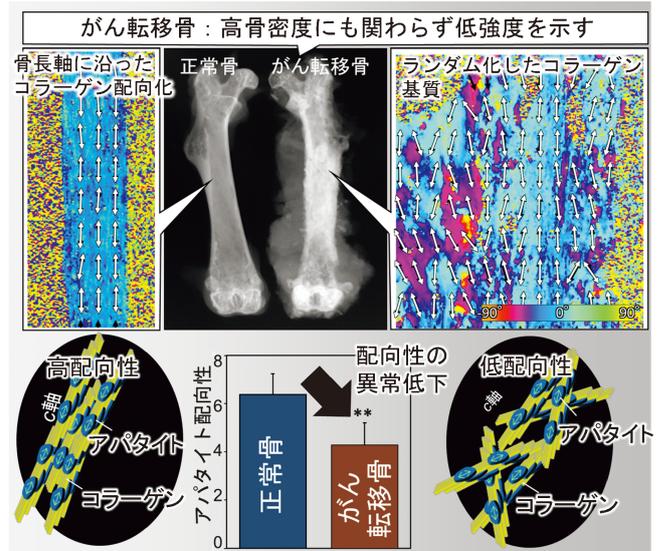


図4 がん転移による骨の脆弱化は、従来の治療指標である骨密度ではなく、コラーゲン基質(上段)/アパタイト結晶(下段)配向性の低下によりもたらされる。(文献(25)より改変引用。)

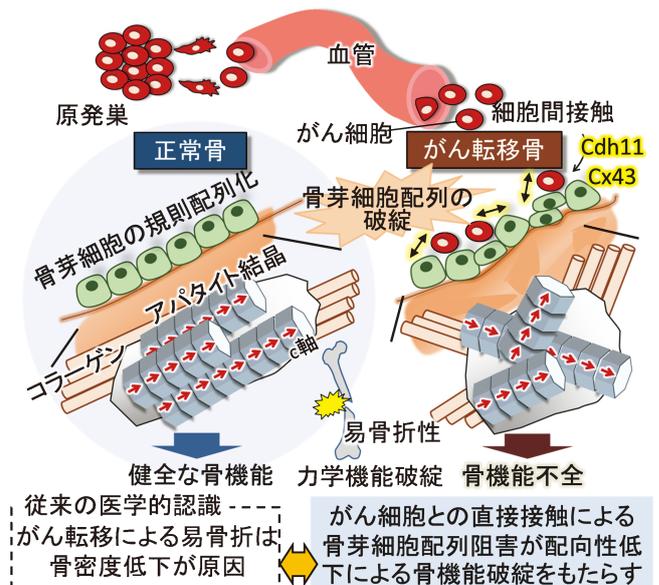


図5 がん細胞との細胞間結合が骨芽細胞配列低下を招き、ひいてはがん転移による骨配向化破綻による機能不全を招く。(文献(29)より改変引用。)

きかけることで、骨形成や骨溶解に関わる細胞増殖・分化を調整した。一方でがん細胞との直接接触が骨芽細胞配列化低下を招き⁽²⁸⁾、その主要因は細胞間のギャップジャンクションを介した分子レベルの相互作用による細胞骨格制御に基づく⁽²⁹⁾(図5)。こうした発見は、材料工学的観点からのがん研究の必要性を顕在化し、がん転移骨における骨配向化異常のメカニズムの解明に基づき、骨配向性を基軸にしたがん転移の抑制、創薬や骨がん転移に対応したカスタム金属人工関節材料の開発にダイレクトにつながることを期待される。

6. 骨配向化アダプティブマテリアルが切り拓く次世代骨医療

本稿では、分子や細胞レベルで骨配向性が形づくられる生物学的仕組みの理解に基づいた骨医療デバイス開発の現状について、筆者らの最新の知見を交えて紹介した。次世代の骨医療デバイスには、人工材料でありながら、生体内の仕組みに取り込まれ、骨機能化発現の生物学的機序を誘導する特性が求められる。さらに近年では、生きた細胞やタンパク質を適材適所に3次元配置することで生体組織や臓器模倣構造体を作製するバイオプリンティング技術の研究も進められ、金属医療デバイスと複合的に用いることで、再生医療分野への効果的な応用が期待されている。バイオプリンティング技術は細胞・タンパク質の配置制御により、応力応答可能な配向化ミニ骨臓器の創製を可能とする⁽³⁰⁾とともに、応力を起点として骨配向化を司る生物シグナルの同定にもつながる⁽³¹⁾。こういった金属材料や細胞のプリンティング技術を駆使した細胞制御は骨機能化誘導のための医療デバイス創出につながるのみならず、生体内で異方性が形成される仕組み解明にもつながることが期待され、創薬や医療デバイス開発に向けたその応用的展開が見込まれる。骨配向化のための生物学的機序は他臓器との関連を含めて多岐にわたるものの、近年筆者らにより見出された複数の配向化制御因子は、その徐放システムの確立や細胞・遺伝子医療との組み合わせにより、骨配向化アダプティブマテリアルの実現に向けた幅広い展開が期待される(図6)。



図6 骨配向化は材料を起点とした異方性細胞接着機構および細胞間での情報伝達により、複数の配向化因子の関与のもとで達成される。配向化に基づく骨の機能化誘導のためには、こういった生物学的仕組みの理解に基づいた骨医療デバイス開発が求められる。(オンラインカラー)

7. おわりに

骨代替材料は、いまや単に骨を置換する役割を担うのではなく、材料を起点として生物が持つ特性を引き出し、生体機能化を誘導する、生体組織の再建に必要な不可欠な機能性材料として次世代骨医療を切り拓く大きな役割と期待を担う。合金・形状設計～人工材料/生体表界面制御～細胞・分子応答まで、材料科学と生物学の連続的な融合により構築される「バイオマテリアル科学」を基盤として、バイオアダプティブマテリアルの創出が先端医療革新実現の鍵を握ることは間違いない⁽³²⁾。一例として、超多成分系元素からなるBioHEA(生体用ハイエントロピー合金)の開発は、材料科学に基づく合金設計と細胞-材料界面反応の人為的制御の融合により、元素選択的に細胞接着の分子シグナルを発動することで、細胞制御をも可能とする⁽³³⁾⁻⁽³⁵⁾。生体機能を生み出す細胞・分子や遺伝子のはたらきを人為的に促すような、バイオアダプティブマテリアルの創製は、溶解性や力学的特性、結晶学的組織といった金属材料ならではの長を活かしつつ、融合的アプローチから次世代医療への展開が大いに期待される。

本稿で紹介した研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(S)「骨異方性誘導のための「異方性の材料科学」の構築」(研究代表者:中野貴由)(平成30(2018)年度～令和4(2022)年度)の支援により実施された。ここに謝意を示します。

文 献

- (1) 山岡哲二, 大矢裕一, 中野貴由, 石原一彦: バイオマテリアルサイエンス 第2版-基礎から臨床まで, 東京化学同人, (2018).
- (2) E. F. Morgan, G. L. Barnes, T. A. Einhorn: Osteoporosis (Forth Edition), (2013), 3-20.
- (3) NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, JAMA, **285**(2001), 785-795.
- (4) T. Nakano, K. Kaibara, Y. Tabata, N. Nagata, S. Enomoto, E. Marukawa and Y. Umakoshi: Bone, **31**(2002), 479-487.
- (5) 中野貴由, 石本卓也, 松垣あいら, 小笹良輔: BIO Clinica, **35**(2020), 651-657.
- (6) T. Nakano, K. Kaibara, T. Ishimoto, Y. Tabata and Y. Umakoshi: Bone, **51**(2012), 741-747.
- (7) T. Ishimoto, T. Nakano, Y. Umakoshi, M. Yamamoto and Y. Tabata: J. Bone Miner. Res., **28**(2013), 1170-1179.
- (8) 石原一彦, 埴 隆夫, 前田瑞夫(監修): バイオマテリアルの基礎, 日本バイオマテリアル学会, (2010).
- (9) 当代光陽, 石本卓也, 松垣あいら, 中野貴由: まてりあ, **56**(2017), 584-588.
- (10) 松垣あいら, 中野貴由: まてりあ, **55**(2016), 579.
- (11) A. Matsugaki, Y. Isobe, T. Saku and T. Nakano: J. Biomed. Mater. Res. A, **103**(2015), 489-499.
- (12) A. Matsugaki, G. Aramoto and T. Nakano: Biomaterials, **33**(2012), 7327-7335.
- (13) A. Matsugaki and T. Nakano: Crystals, **6**(2016), 73.
- (14) A. Matsugaki, G. Aramoto, T. Ninomiya, H. Sawada, S. Hata

- and T. Nakano: Biomaterials, **37**(2015), 134–143.
- (15) A. Matsugaki, N. Fujiwara and T. Nakano: Acta Biomater., **9** (2013), 7227–7235.
 - (16) R. Ozasa, A. Matsugaki, Y. Isobe, T. Saku, H-S Yun and T. Nakano: J. Biomed. Mater. Res. A, **106**(2018), 360–369.
 - (17) S. Lee, A. Matsugaki, T. Kasuga and T. Nakano: J. Biomed. Mater. Res. A, **107**(2019), 1031–1041.
 - (18) 松垣あいら, 中野貴由: スマートプロセス学会誌, **9**(2020), 164–168.
 - (19) Y. Nakanishi, A. Matsugaki, K. Kawahara, T. Ninomiya, H. Sawada and T. Nakano: Biomaterials, **209**(2019), 103–110.
 - (20) GS-Taper ステム(医療機器製造販売承認番号: 22900BZX00364000), http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/md/PDF/510462/510462_22900BZX00364000_A_01_01.pdf
 - (21) FINESIA BL フィクスチャー ファイナフィックス(医療機器承認番号: 22800BZX00034000), http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/md/PDF/230934/230934_22800BZX00037000_A_02_03.pdf
 - (22) 中野貴由: バイオマテリアル—生体材料—, **35**(2017), 10–13.
 - (23) 松垣あいら, 中野貴由: 現代化学, **580**(2019), 56–59.
 - (24) R. Ozasa, T. Ishimoto, S. Miyabe, J. Hashimoto, M. Hirao, H. Yoshikawa and T. Nakano: Calc. Tissue Int., **104**(2018), 449–460.
 - (25) A. Sekita, A. Matsugaki and T. Nakano: Bone, **97**(2017), 83–93.
 - (26) A. Sekita, A. Matsugaki and T. Nakano: Mater. Trans., **58**(2017), 266–270.
 - (27) A. Sekita, A. Matsugaki, T. Ishimoto and T. Nakano: J. Struct. Biol., **197**(2016), 260–270.
 - (28) Y. Kimura, A. Matsugaki, A. Sekita and T. Nakano: Sci. Rep., **7**(2017), 44824.
 - (29) A. Matsugaki, T. Harada, Y. Kimura, A. Sekita and T. Nakano: Int. J. Mol. Sci., **19**(2018), 3474.
 - (30) A. Matsugaki, T. Matsuzaka, A. Murakami, P. Wang and T. Nakano: Int. J. Bioprint., **6**(2020), 293.
 - (31) A. Matsugaki, D. Yamazaki and T. Nakano: Mater. Sci. Eng. C, **108**(2020), 110391.
 - (32) 日本学術会議 第24期学術の大型研究計画に関するマスタープラン(マスタープラン2020), 計画番号134, バイオマテリアル国際先導研究拠点の構築
 - (33) M. Todai, T. Nagase, T. Hori, A. Matsugaki, A. Sekita and T. Nakano: Scr. Mater., **129**(2017), 65–68.
 - (34) T. Hori, T. Nagase, M. Todai, A. Matsugaki and T. Nakano: Scr. Mater., **172**(2019), 83–87.
 - (35) T. Nagase, Y. Iijima, A. Matsugaki, K. Ameyama and T. Nakano: Mater. Sci. Eng. C, **107**(2020), 110322.

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★

松垣あいら
 2013年9月 大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了
 2013年10月- 大阪大学大学院工学研究科 特任助教
 2020年7月- 現職
 専門分野: 生体材料学・細胞生物学
 ◎細胞・遺伝子の観点から骨配向化機序解明を目指し, 生物学的仕組みに根差した骨機能化誘導のための生体材料開発に精力的に取り組んでいる。

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★



松垣あいら



中野貴由