

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18950

研究課題名(和文) 金属結晶原子ステップが操る細胞の秩序配列化

研究課題名(英文) Control of osteoblast arrangement by surface topography induced by plastic deformation

研究代表者

松垣 あいら (Matsugaki, Aira)

大阪大学・工学研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：10592529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：塑性変形による表面起伏を駆使した細胞制御に挑戦し、すべり線/双晶トレースに沿った細胞配列化制御を達成した。塑性変形による表面形状は、接着斑により認識され、細胞内へのシグナル伝達により細胞配列化を制御したと考えられる。本成果により、金属材料の塑性変形挙動の解明は、材料の変形機構理解のために必要不可欠であるのみならず、生体との相互作用理解に基づき、生体組織に固有の機能発現を誘導する生体材料開発に極めて有効であることが示された。加えて、本成果に基づき、骨力学機能発揮にとって最重要である骨配向化方向・配向度を自由自在に制御可能な金属材料表面の最適形状設計が可能になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、一見大きく異なる学問分野である結晶塑性学と細胞生物学の融合により、既存の学術体系を見直し、材料表面-生体細胞相互作用に基づく骨配向化制御の新たな原理を発見した。世界に先駆けて骨配向性制御の新たな方法論を確立し、部位や種類に応じて様々な配向方向・配向度を示す骨の配向性を自由自在にコントロール可能な材料創製につながる、極めて独創性が高く、基礎・実用研究両面において意義深い成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Control of osteoblast arrangement is essential for anisotropic bone tissue construction. In this study, a crystallography-driven methodology was proposed as a novel tool for controlling cellular arrangement. A specific surface topography derived from dislocation and deformation twinning was introduced into α -titanium crystals. Primary osteoblasts were aligned along the twinning traces and/or slip traces, and accumulation of the mature focal adhesions was observed in the same direction. These results indicated that the highly concentrated twinning traces with nanometer-scale relief structures induced the elongation and maturation of focal adhesions and the resulting cellular elongation and alignment. These findings provide important insights into the mechanisms underlying the interactions between cells and materials and the development of biomedical devices that can control bone tissue anisotropy.

研究分野：生体材料学

キーワード：骨芽細胞 細胞配列 塑性変形 すべり変形 双晶変形

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨のコラーゲン／アパタイト配向性は材料学的観点からの骨質指標であり、再生過程では骨配向性・骨強度の早期回復が求められる¹⁾。研究代表者らは、バイオマテリアルによる細胞・骨配向化制御を駆使した骨の健全化に取り組んでおり、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²⁾。材料の異方性表面形状、例えば一方向性溝構造は、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。骨芽細胞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³⁾。すなわち、基板の異方性を材料科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。

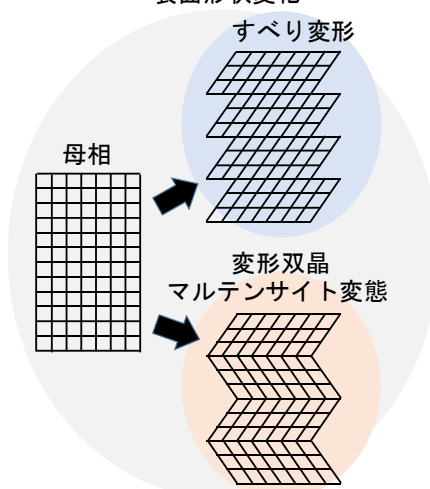
生体用金属材料表面は人工関節等の医療用デバイス埋入時に生体成分と直接接触し、組織再生にダイレクトに影響を及ぼすことから、金属表面の物理的・化学的性質はタンパク質や細胞・組織の挙動を左右する。金属表面の異方性形状は細胞との相互作用を介して骨配向性を決定する最重要因子であり、金属材料の構造・物性に基づく表面形状制御と細胞配列・骨配向化との相相互作用理解に基づく生体材料創製が強く求められている。

2. 研究の目的

金属結晶の塑性変形により生じる材料表面形状変化に着目し、原子レベルでの材料表面形状により細胞秩序配列を制御可能か？さらにその仕組みを追究することで、これまでの学術体系を覆し、材料工学的アプローチによる細胞操作に新たな方法論を導入する。

金属材料はその組成や応力状態に依存して塑性変形挙動が複雑に変化し、多彩な表面形状を生み出す(図1)。こういった表面起伏は、たとえば最先端の微細加工技術を駆使しても実現不可能な特徴的な形状であり、さらにはその形状は合金組成や応力状態、結晶構造により複雑に変化する。塑性変形・相変態による表面形状変化は、計算に基づく理論的予測が可能であり、標的とする生体組織や臓器の構造に応じた合金・変形モードの選択をも可能とすることが期待される。本研究では、金属結晶の塑性変形により導入される表面構造制御を駆使し、健全な骨配向化誘導のための細胞制御を目指した。

金属結晶の塑性変形・相変態による表面形状変化



3. 研究の方法

純チタン単結晶および多結晶試料へのすべり変形・変形双晶の導入により、塑性変形に基づく表面起伏を形成した。双晶導入面における細胞応答を解析することで、原子レベルでの表面起伏による細胞配列化応答およびその分子機序解明を目指し、以下の具体的項目について研究を実施した。

図1 金属結晶は塑性変形や相変態により特徴的な表面形状を生み出す。

(1) 浮遊帯溶融(FZ)法による生体用純Ti(hcp)単結晶の育成(図2)。背面ラウエ法による結晶方位決定。シュミット因子計算に基づく圧縮軸の決定。圧縮試験による変形誘起に基づき、すべり変形・双晶変形を導入。表面起伏(角度)・幅・高さの計算予測と実測。

(2) 表面形状に対する骨芽細胞応答の定量的解析。免疫染色に基づく細胞形態・配列解析。塑性変形モードや応力状態に応じた細胞配列化、骨基質配向化について細胞・タンパク質レベルでの可視化。

4. 研究成果

チタン単結晶の塑性変形により導入されるすべり変形や双晶変形に着目し、すべり線や双晶面ナノトレース構造により骨芽細胞配列化・骨基質配向化が導かれることを発見した。純チタンは柱面すべり系の活性化により、圧縮変形後に特徴

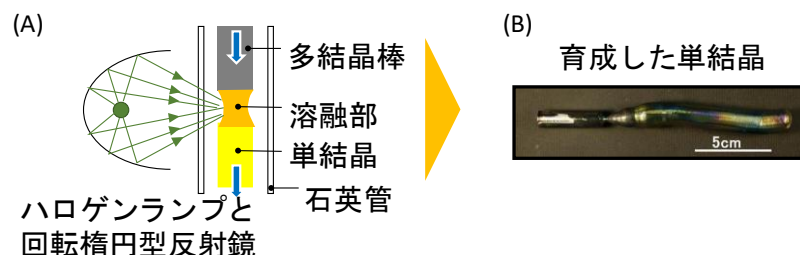


図2 (A) 浮遊帯溶融(FZ)法による単結晶育成の模式図 (B) 育成した純チタン単結晶外観

的な鋭角の段差を形成する。1%~10%までの圧縮ひずみ導入により、幅約10 μm~20 μm、高さ約200 nm~500 nmに表面形状を制御可能であった。表面の段差形状により細胞配列化を制御可能

であり⁴⁾、アクチン線維のすべり線方向への伸展、すべり線間への接着斑の局在による骨芽細胞配列化により、転位運動に基づく表面段差を利用した分子レベルでの細胞配列化制御を実現した。一方で、骨芽細胞は双晶トレースによる起伏を障壁として優先配列化し(図3A)、双晶トレースに沿った接着斑やフィロポディアの伸展が見出された(図3B, C)。塑性変形による表面形状は、細胞膜上の受容体であり、インテグリンや関連タンパクからなる分子集合体である**接着斑により認識され、細胞内へのアウトサイド・インシグナル伝達によりストレスファイバーの脱重合反応を誘導、細胞形態・配列化を制御したと考えられる(図4)**。その結果として、細胞接着を起点とした機能的な骨組織形成を誘導することが期待される^{5,6)}。金属単結晶は結晶方位に依存して異なる物性を示すことから、単結晶インプラントは骨異方性発現に極めて有効であるのみならず、多結晶を用いることであらゆる方位への細胞接着挙動制御をも達成可能である⁷⁾。すなわち、本成果に基づき、多結晶体を構成する個々の結晶子の変形挙動に由来する起伏に応じて細胞伸展・配列化をも制御可能であることを示唆している。

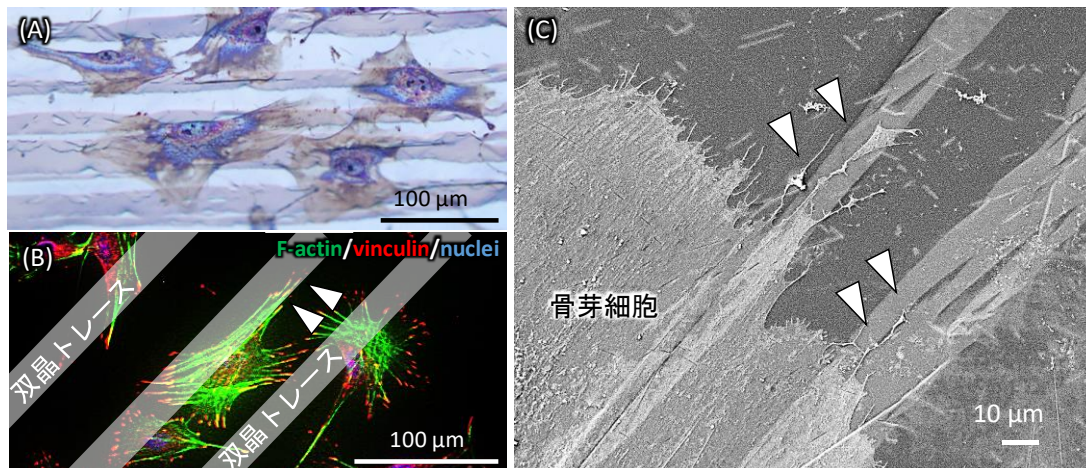


図3 (A) 骨芽細胞は双晶トレースによる起伏を障壁として優先配列化し、(B) 双晶トレースに沿った接着斑(矢頭で示す)や(C)フィロポディアの伸展(矢頭で示す)が見出された。

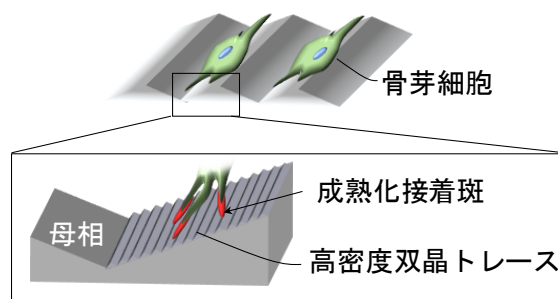


図4 塑性変形により形成される表面起伏は、細胞膜上の受容体である接着斑により認識され、細胞内への情報伝達によりストレスファイバーの再構築を誘導、細胞伸展・配列化を制御する。

本成果により、金属材料の塑性変形挙動の解明は、材料の変形・変態機構理解のために必要不可欠であるのみならず、生体との相互作用理解に基づき、生体組織・細胞種に固有の機能発現を誘導する生体材料開発に極めて有効であることが示された。加えて、本成果に基づき、骨力学機能発揮にとって最重要である骨配向化方向・配向度を自由自在に制御可能な生体用金属材料表面の最適形状設計が可能になると期待される。

<参考文献>

- 1) Ishimoto T, Nakano T, et al., J Bone Miner Res 28, 1170-1179 (2013).
- 2) Matsugaki A, Nakano T, et al., Acta Biomater 9, 7227-7235 (2013).
- 3) Matsugaki A, Nakano T, et al., J Biomed Mater Res A 103, 489-499 (2015).
- 4) Matsugaki A, Nakano T, et al., Biomaterials 33, 7327-7335 (2012).
- 5) Matsugaki A, Nakano T, et al., Biomaterials 37, 134-143 (2015).
- 6) Nakanishi Y, Nakano T, et al., Biomaterials 209, 103-110 (2019).
- 7) Matsugaki A, Nakano T, et al., Crystals 6, 73 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yohei Nakanishi, Aira Matsugaki, Kosuke Kawahara, Takafumi Ninomiya, Hiroshi Sawada, Takayoshi Nakano | 4. 巻 209 |
| 2. 論文標題 Unique arrangement of bone matrix orthogonal to osteoblast alignment controlled by Tspan11-mediated focal adhesion assembly | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biomaterials | 6. 最初と最後の頁 103-110 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2019.04.016 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 松垣あいら、中野貴由 | 4. 巻 70 |
| 2. 論文標題 生体骨における自己組織化現象と代替材料への応用 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 化学工業 | 6. 最初と最後の頁 44-49 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 松垣あいら、中野貴由 | 4. 巻 580 |
| 2. 論文標題 応力による骨のリモデリングー骨配向性と骨再生を促す表面形態 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 現代化学 | 6. 最初と最後の頁 56-59 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 松垣あいら | 4. 巻 66 |
| 2. 論文標題 骨配向化誘導のためのチタン表面形状制御による新規生体材料創製 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 チタン | 6. 最初と最後の頁 24 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 松垣あいら、中野貴由 | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 医用材料による細胞制御に基づく骨配向化誘導 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 高分子論文集 | 6. 最初と最後の頁 164-173 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1295/koron.2017-0077 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹花諒、松垣あいら、川原公介、二宮孝文、沢田博司、中野貴由 |
| 2. 発表標題 材料表面微細周期構造形成による骨芽細胞および骨基質配向化 |
| 3. 学会等名 日本金属学会2020年春期講演大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 若林誠、松垣あいら、孫世海、木村恒太、中野貴由 |
| 2. 発表標題 材料表面形状による間葉系幹細胞制御 |
| 3. 学会等名 日本金属学会2020年春期講演大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹花諒、松垣あいら、川原公介、二宮孝文、沢田博司、中野貴由 |
| 2. 発表標題 微細周期構造に依存した骨芽細胞および骨基質配向化挙動 |
| 3. 学会等名 日本金属学会2019年秋期講演大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 松垣あいら、中野貴由 |
| 2. 発表標題 バイオマテリアルによる細胞・骨配向化制御 |
| 3. 学会等名 第37回骨代謝学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松垣 あいら、中野 貴由 |
| 2. 発表標題 バイオマテリアル科学に基づく細胞・骨基質配向化イメージング |
| 3. 学会等名 日本金属学会2018年秋期講演大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 中西 陽平、松垣 あいら、中野 貴由： |
| 2. 発表標題 ナノ周期表面構造による骨芽細胞および骨基質配向化機構 |
| 3. 学会等名 第38回骨形態計測学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Y. Nakanishi, A. Matsugaki, T. Nakano |
| 2. 発表標題 Formation of bone matrix perpendicular to osteoblast alignment in response to nanogrooves |
| 3. 学会等名 Biomaterials International 2018（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

中野研究室HP
<http://www.mat.eng.osaka-u.ac.jp/msp6/nakano/>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 中野 貴由 (Nakano Takayoshi) (30243182) | 大阪大学・工学研究科・教授 (14401) | |