

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25220912

研究課題名(和文)骨配向化誘導のためのマテリアルポーンバイオロジー

研究課題名(英文) Induction of anisotropic bone tissues based on combination of materials science and bone biology

研究代表者

中野 貴由 (Nakano, Takayoshi)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：30243182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 172,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨機能の大部分を決める正常な骨配向化組織の回復は、最先端の骨再生手法を駆使しても困難であるため、骨配向化の基本原則からの解明が必須である。本研究では、材料工学および生物科学の異分野融合による新学理「マテリアルポーンバイオロジー」構築を基盤とし、骨配向化制御因子の探索、およびその機序に基づく骨配向化誘導のための新たな方法論の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：We successfully unveiled the biological scenario underlying the construction of anisotropic collagen/apatite in bone tissue by developing interdisciplinary research merging materials science and bone biology. Further, the construction of a novel methodology which enables the retrieval of anisotropic bone microstructure was achieved.

研究分野：生体材料学

キーワード：マテリアルポーンバイオロジー 学理構築 骨配向化誘導 材料工学 生物科学

1. 研究開始当初の背景

骨疾患は、患者の生活の質の低下、低余命化へとつながることから世界的な社会問題となっている。一方で、骨疾患の診断は、レントゲンやCTに基づく「アパタイトの存在量」を基準とした「骨密度診断」を基準としている。そのため、骨疾患治療薬や骨代替生体材料の研究・開発は、「骨密度」に対応するのみであった。研究代表者らは、これまでに骨質（骨密度以外の骨強度に関わる因子）を評価する最有力手法が、材料工学にあることを示した。とくに、骨組織中の多くを占めるアパタイト結晶のc軸配向性（骨配向性）は、『新たな骨質指標』として、従来指標の骨密度以上に重要である。

一方で、正常な骨配向化組織の回復は、最先端の骨再生手法を駆使しても困難である。骨配向性の回復には、異方性を強く意識した材料工学をベースとした異分野融合による新規骨代替材料の開発が不可欠である。そのためには、骨配向化機構を基本原理から解明することが必須であり、その知見に基づき骨配向化誘導材料の開発を行う必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、疾患や失われた骨の積極的な配向化組織誘導を目指し、(A) 骨配向化制御因子の探索、(B) 配向化制御因子を人為的に導入しつつ骨配向化誘導を可能とする新たな方法論（骨代替材料の創製や骨再建法を含む）、の2つの大きな柱に大別、さらには相補的に両輪からの研究展開を行う。骨密度から、骨配向性へと視点を変えた骨代替材料研究は、骨に関する常識を根底から覆す可能性を持ち、骨（ボーン）が取り持つ「材料工学」と「生物科学」の異分野融合から「マテリアルボーンバイオロジー」の学理構築を行う。

3. 研究の方法

骨配向化機構を担う因子を特定し、それを人為的に生体に導入しつつ骨配向化誘導を可能とする新たな方法論の提案のため、以下の具体的課題を解決する。

(A) 骨配向化制御因子を種々の生体内スケールにて探索

骨配向性の低下を示す骨（疾患骨や遺伝子組み換え動物骨などの異常骨）を材料学的スクリーニング解析により見出し、配向性と生物学的因子（発現や存在の有無や量）との関連性を明らかにする。さらに、外場因子の配向化への影響を明らかにする。

(B) 骨配向化誘導を可能とする新たな方法論（骨代替材料創製や骨再建法の提案）

配向化表面創製や配向化基材の開発に基づく配向化誘導材料の創製と、細胞増殖因子等の生体内機能分子の配向化への関与の解明。

4. 研究成果

当初の予定を遥かに上回り、骨配向化機構

の決定因子特定や骨配向化材料製品化の実現といった世界的な成果に到達した。

(A) 骨配向化制御因子の探索

(A1) がん転移による骨配向性低下の解明

当初計画を前倒しで研究が進捗したことから、平成28年度には研究加速予算として700万円の追加交付を頂き、骨がん転移の配向性をターゲットとした研究をスタートした。骨への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る。特に、造骨型がん転移骨は、骨量増加を示すにも関わらず骨力学機能が著しく低下し、その機序は骨医学分野において長年の謎であった。本研究では転移骨に対して材料学的アプローチを駆使することで、がん形成が転移骨の骨基質配向性を著しく低下させ（図1A:平成26年度に導入したワイドレンジ2次元複屈折評価システムにて取得、左は正常骨、右はがん転移部でのコラーゲン配向性）、力学機能の低下を招く（図1B）ことを見出した。骨配向性とヤング率の相関解析（図1C）より、がん転移骨の配向性劣化が骨力学機能破綻をもたらすことを見出した。本成果は、わずか2年足らずで骨医学（Bone 2017）、構造生物学（J Struct Biol 2016）の主要ジャーナルに掲載され、本研究成果のインパクトの高さを示している。一方で、がん転移に代表される疾患骨の健全化のためには、生体内での配向化機構に基づいた、人為的骨配向性制御による力学機能正常化が必要不可欠であることを意味する。

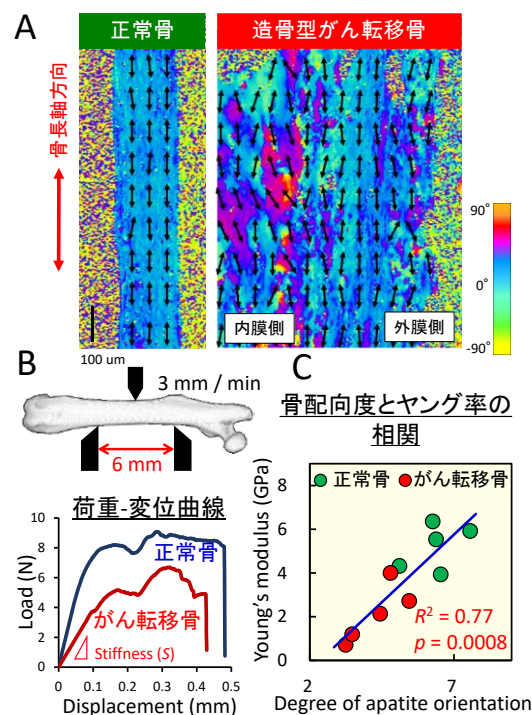


図1 (A) がん転移によるコラーゲン配向性の乱れ。(B) がん転移は著しい骨力学機能低下をもたらす。(C) ヤング率は骨配向性と相関する。

## (A2) *in vivo* 応力分布制御による新生骨への配向化付与

材料工学的な手技を駆使し、ラット前肢骨への *in vivo* 人為的強制負荷モデルの構築に成功した。人為的負荷により形成した骨は、主ひずみの方向に沿ったアパタイト結晶の優先配向構造を構築し、その配向度はひずみの大きさに依存して変化した。さらに、人為的負荷により生理的負荷を超えるひずみを与えた場合、一定の閾値までは配向度を上昇させる、つまり、通常の骨よりも強く配向化した骨組織を人為的に構築・再生することが明らかになった。骨量（断面積）、骨密度も増加するが、その上昇率は配向性の上昇に比べて低く、負荷ひずみ量依存性がほとんど認められない（図 2）。一方で、人為的除荷により応力負荷が低減した環境下では、骨量減少とともに配向性の有意な低下が生じた。

こうした知見は、荷重負荷量に合わせた緻密な機能調整は、骨密度ではなく配向性によって担われていることを意味する。さらには、こうした緻密な機能調整のためには、骨の負荷状態をその異方性まで含めて精密に検知可能なセンサーと、それを配向化組織の形成につなげる仕組みが必須である。その有力な候補として我々は、骨中オステオサイト細胞（OCY）を見出すことで、配向化説明への格段の新規発展へとつなげた。骨配向性はオステオサイトの形態・配列異方性と極めて良く対応する。こうした知見に基づき、オステオサイトに注目した細胞・遺伝子レベルでの配向化機構説明にいち早く着手した。

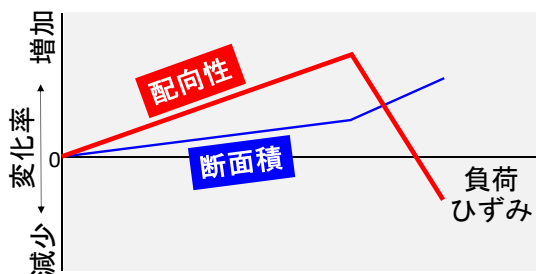


図 2 人為的負荷モデルにおける配向性と断面積の変化率。骨への負荷ひずみの大きさに依存して骨配向性が形成される。

## (A3) オステオサイトの力学応答に基づく骨配向化機構説明

オステオサイトの力学応答を起点とした骨配向化を細胞レベルから理解するためには、各細胞の機能を分子レベルで抽出可能な *in vitro* 培養系の構築が必須である。オステオサイトへの荷重負荷を制御しつつ、その力学応答に基づく骨芽細胞・破骨細胞との相互作用を理解可能な *in vitro* 応力負荷配向化共培養モデルを構築した。我々が樹立した *in vitro* 細胞配列化培養試験法の 2 細胞・3 細胞共培養系への拡張とオステオサイトへの定量的メカノストレス負荷の融合により、生

体内類似の異方性力学環境下での骨系細胞間相互作用の再現に成功した。オステオサイトの力学応答に伴い、骨芽細胞・破骨細胞挙動が制御されたことから、骨へのひずみ量に応じたシグナル伝達経路の存在が示唆される。一方で、骨形成初期には応力を起点としない細胞自律的機序に基づく骨配向化機構が存在すると予想される。

## (A4) 骨配向化制御たんぱくを世界で初めて発見

骨形成初期から異常配向性を呈する骨モデルに着目することこそが配向化制御因子解明の近道であるとの確信の下、我々は材料工学的解析と遺伝子・生物学的な手技を駆使し、破骨・骨芽細胞の分化や活性化を調整すると従来認識されてきたたんぱくが、実は骨配向化に深く関与することを発見した（詳細は論文投稿中）。さらには細胞内シグナル伝達経路の下流に着目することで、特定のビタミン授受経路を司る分子が、極めて重要な骨配向化制御因子のひとつであるという世界で初めての知見を得た。この驚くべき新規性の高い発見はブーンバイオロジーの一端を解き明かす高い学術的価値を有するのみならず、ヒト骨疾患の病態説明、治療薬創製への示唆を与える重要な知見となった。

## (B) 骨配向化誘導を可能とする新たな方法論（骨代替材料創製や骨再建法）の提案

前項までの知見から、骨配向性は機能性分子を介したシグナル伝達に基づく骨芽細胞配列化により達成されることが明らかとなった。その結果に基づき、骨芽細胞へと積極的に働きかけ、骨配向化を誘導可能な新規の骨代替材料創製に取り組んだ。

## (B1) レーザ干渉によるナノメートルスケールの配向溝（LIPSS）形成による骨芽細胞・骨基質配向化制御

Ti 合金や Co-Cr 合金は生体親和性に優れ、医療用デバイス等に広く適用される。しかしながら、これら金属材料による細胞の制御、ましてや生体組織の構造制御に関する研究は皆無である。本研究では、Ti-6Al-4V および Co-Cr-Mo などの合金表面に、フェムト秒レーザーの干渉によるナノメートルスケールの配向溝（LIPSS：金属基板レーザー誘起周期表面構造）を形成し（図 3A）、骨芽細胞配列化制御に成功した（図 3B）。数 100 nm オーダーの凹凸は溝方向へと細胞の接着斑を長く発達させ、接着分子インテグリンの集積化による活発な細胞-金属表面相互作用を促した。さらに、従来の常識を根底から覆し、骨芽細胞に直交するコラーゲン基質およびアパタイト結晶配向化構造の制御を初めて達成した（図 3C）。すなわち、金属表面をナノオーダーで制御することにより、従来の科学的常識を覆し、世界初の直交性骨基質配向化制御を達成した画期的成果である（図 3E）。本知見は、人工関節等の金属表面にナノ配向溝構造を与えることで新生骨組織の微細構

造をも健全化できることを示している。今回の新発見は、科学面トップ記事として新聞報道され、基礎・応用両観点からの意義は極めて高く、成果は生体材料分野のトップジャーナル *Biomaterials* 2015 (IF: 8.9) 等に掲載された。

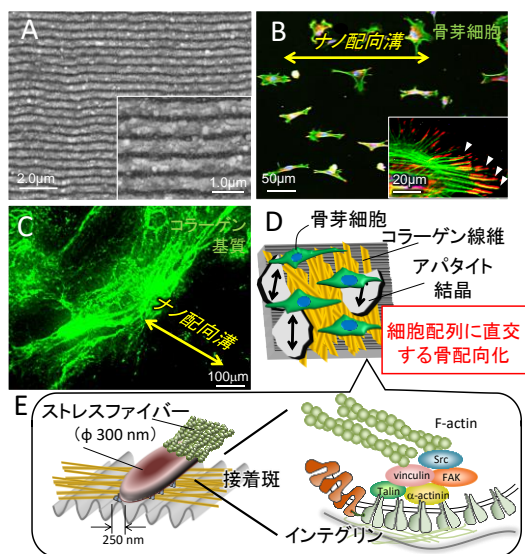


図3 (A) 医療用金属材料へのナノ配向溝形成により、(B, E) 骨芽細胞配列化制御に成功した。接着斑の巨大化(矢頭)による金属表面—細胞間相互作用に基づき、(C) 細胞配列に直交するコラーゲン/アパタイト基質形成が明らかとなった。(D) 細胞配列に直交して骨基質が形成されることを見出した世界初の研究であり、骨配向化の新規メカニズムとして教科書を塗り替える新発見である。

### (B2) 世界初の配向化骨誘導デンタルインプラントの開発

上記の材料工学に基づく細胞・骨基質配向化誘導は、材料表面の溝構造が骨配向化誘導に極めて有効であることを示した。骨の健全化には骨配向性をターゲットとしたインプラントデバイスの開発・臨床化が必要不可欠である。前項までの知見を融合し、溝構造に沿った細胞伸展、オステオサイトへの連続的な荷重伝達を制御することで、骨配向性のコンセプトを搭載した世界初のデンタルインプラントの製品化を実現した(歯科インプラント「FINESIA」(2017年7月上市、京セラ株との共同開発))。こうした配向溝構造は、初期での骨芽細胞伸展のみならず、溝内部に骨が形成された後の、骨を通じた応力伝達を促進することから、長期的な配向性・骨健全性維持をも可能とすることが期待され(図4)、既に多数の臨床適用例を有する。歯科インプラントにおいては歯冠部から負荷する咀嚼荷重を、下部の大腿骨、下顎骨へと連続的に伝達し、インプラント周囲の骨の健全化を促す。こうした成果は本研究課題における工学・歯学・再生医学(材料工学と生物科学)の有機的連携による研究協力体制の下で初

めて達成しうる画期的成果であり、まさに「マテリアルボーンバイオロジー」に基づく極めてオリジナリティの高い骨代替材料研究の成果である。

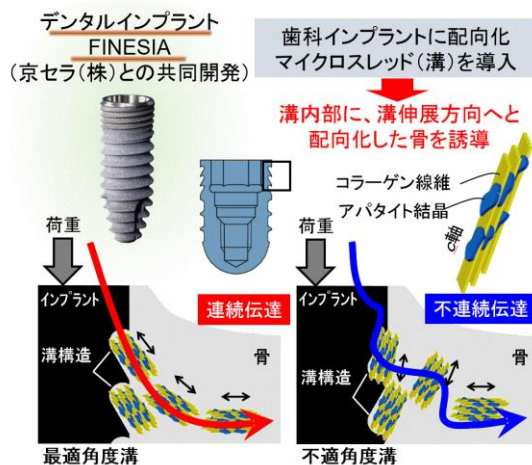


図4 歯科インプラントに対し配向化マイクロスレッド(溝)を導入することで、溝内部に、溝伸展方向へと配向化した骨を誘導することが可能である。

本研究では、材料工学的手段を最大限活用し、骨関連分野における材料工学の重要性を示す新たな研究領域「マテリアルボーンバイオロジー」の学理構築を達成した。「配向化因子探索」「配向化誘導法樹立」の両輪からの研究展開を行うことで、生体骨内での配向化機構に基づく配向化薬剤ターゲットを示したのみならず、配向化誘導インプラントの製品化をも達成した。すなわち本研究は学術的価値のみならず、「骨配向性医療」実現を可能とする極めて画期的成果に到達した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (以下を含む計 180 件)

- [1] T. Ishimoto, K. Yamada, H. Takahashi, M. Takahata, M. Ito, T. Hanawa, T. Nakano: Trabecular health of vertebrae based on anisotropy in trabecular architecture and collagen/apatite micro-arrangement after implantation of intervertebral fusion cages in the sheep spine, *Bone* 108 (2018) 25-33. 査読有、DOI: 10.1016/j.bone.2017.12.012.
- [2] A. Sekita, A. Matsugaki, T. Nakano: Disruption of collagen/apatite alignment impairs bone mechanical function in osteoblastic metastasis induced by prostate cancer, *Bone*, 97 (2017) 83-93. 査読有、DOI: 10.1016/j.bone.2017.01.004.
- [3] Y. Kimura, A. Matsugaki, A. Sekita, T. Nakano: Alteration of osteoblast

arrangement via direct attack by cancer cells: New insights into bone metastasis, *Scientific Reports*, 7 (2017) 44824. 査読有、DOI: 10.1038/srep44824.

- [4] K. Hagihara, T. Nakano, M. Todai: Unusual dynamic precipitation softening induced by dislocation glide in biomedical beta-titanium alloys, *Scientific Reports*, 7 (2017) 8056. 査読有、DOI: 10.1038/s41598-017-08211-7.
- [5] A. Sekita, A. Matsugaki, T. Ishimoto, T. Nakano: Synchronous disruption of anisotropic arrangement of the osteocyte network and collagen/apatite in melanoma bone metastasis, *Journal of Structural Biology*, 197 (2016) 260-270. 査読有、DOI: 10.1016/j.jsb.2016.12.003.
- [6] G. A. Sathi, K. Kenmizaki, S. Yamaguchi, H. Nagatsuka, Y. Yoshida, A. Matsugaki, T. Ishimoto, S. Imazato, T. Nakano, T. Matsumoto: Early initiation of endochondral ossification of mouse femur cultured in hydrogel with different mechanical stiffness, *Tissue Engineering: Part C*, 21 (2015) 567-575. 査読有、DOI: 10.1089/ten.TEC.2014.0475.
- [7] A. Matsugaki, G. Aramoto, T. Ninomiya, H. Sawada, S. Hata and T. Nakano: Abnormal arrangement of a collagen/apatite extracellular matrix orthogonal to osteoblast alignment is constructed by a nanoscale periodic surface structure, *Biomaterials*, 37 (2015) 134-143. 査読有、DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.025.
- [8] A. Matsugaki, Y. Isobe, T. Saku and T. Nakano: Quantitative regulation of bone-mimetic, oriented collagen/apatite matrix structure depends on the degree of osteoblast alignment on oriented collagen substrates, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 103 (2015) 489-499. 査読有、DOI: 10.1002/jbm.a.35189.
- [9] M. Todai, K. Hagihara, T. Ishimoto, K. Yamamoto, T. Nakano: Development of single crystalline bone plate with low Young's modulus using beta-type Ti-15Mo-5Zr-3Al alloy, *Tetsu-to Hagane*, 101 (2015) 501-505. 査読有、DOI:10.2355/tetsutohagane.TETSU-2015-044.
- [10] 中野貴由, 石本卓也, 松垣あいら: 骨石灰化、アパタイト配向性、目で見るB

one Biology, *骨粗鬆症治療*, 14 (2015) 97-100. 査読有.

[学会発表] (以下を含む計 418 件)

- [1] T. Nakano: Analysis and control of bone tissue anisotropy, 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, 2017.9.4-8, Magaron Athens International Conference Center 【招待講演】
- [2] 中野 貴由: 癌骨転移部における骨質変化, 第 35 回日本骨代謝学会学術集会・第 20 回癌と骨病変研究会 (ミニシンポジウム「癌と骨病変」), 2017.7.28-29, ホテル日航福岡 【招待講演】
- [3] 中野貴由: 骨配向性と骨疾患, 第 59 回日本老年医学学術集会, 2017.6.13, 名古屋国際会議場 【招待講演】
- [4] 石本卓也: 硬組織機能を支配するアパタイト配向性とその制御, 日本バイオマテリアル学会東北地域講演会, 2016.9.26, 東北大学金属材料研究所 【招待講演】
- [5] T. Nakano, A. Matsugaki, T. Ishimoto: Control of preferential alignment of osteoblasts and extracellular matrix composed of oriented apatite and collagen for bone replacement, IUMRS-ICAM 2015, 2015.10.26, Jeju International Convention Center, Korea 【招待講演】
- [6] T. Nakano: Analysis and control of degree of preferential apatite orientation in bones, TriboBR-2014, 2014.11.3-5, Foz do Iguacu, Brazil 【招待講演】
- [7] 中野貴由: バイオマテリアルを用いた再生骨におけるアパタイト配向性を指標とする新解析法, 第 13 回日本再生医療学会, 2014.3.5, 国立京都国際会館 【招待講演】
- [8] T. Nakano: Control of oriented extracellular matrix similar to anisotropic bone microstructure, THERMEC' 2013, 2013.12.2, Las Vegas, NV, USA 【基調講演】

[図書] (以下を含む計 21 件)

- [1] 松本卓也, 武田宏明, 鳥居康弘, 中野貴由 (分担執筆): エヌティエス株式会社, 基材の力学特性と組織形態形成, 「三次元ティッシュエンジニアリングー細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化までー」, 2015, pp. 87-93.
- [2] 石本卓也, 中野貴由 (分担執筆): 日本金属学会, 骨力学機能を支配する生体アパタイト結晶学的配向性-再生骨における骨配向性は骨密度に遅れて再生し, 骨力学特性を支配するー バイオマテリアル研究の最前線, 2014, pp. 209-210.
- [3] T. Nakano (分担執筆): Springer, Part

I Biological Tissues and Organ, Chapter I: Bone Tissue and Biomaterials Design Based on the Anisotropic Microstructure Advances in Metallic Biomaterials: Tissues, Materials and Biological Reactions (edited by M. Niinomi, T. Narushima, M. Nakai), Volume 3, 2015, pp 3-30.

- [4] 松垣あいら, 中野貴由 (分担執筆): 羊土社, 人工材料による骨疾患治療 骨代謝 つくり, 壊し, 変えるーそのメカニズムと最新治療 (田中栄編集), 2014, pp. 203-211.
- [5] 中野貴由, 石本卓也, 當代光陽, 芹沢愛, 松垣あいら (分担執筆): 日本医学館, 未来型人工関節を目指して, 2013, 415 ページ.

[産業財産権]

○出願状況 (以下を含む計 7 件)

名称: 金属間化合物を含有する構造物の製造方法  
発明者: 中野貴由, 蘇亜拉図, 石本卓也, 萩原幸司  
権利者: 国立大学法人大阪大学  
種類: 特許権  
番号: 特開 2017-109357  
出願年月日: 2016 年 12 月 15 日  
国内外の別: 国内

名称:  $\beta$  型チタン合金を含有する構造物の製造方法  
発明者: 中野貴由, 蘇亜拉図, 石本卓也, 村瀬剛, 坂井孝司, 吉川秀樹  
権利者: 国立大学法人大阪大学  
種類: 特許権  
番号: 特開 2017-171985  
出願年月日: 2016 年 3 月 23 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: コラーゲン/アパタイト配向性材料, 及びコラーゲン/アパタイト配向性材料の製造方法  
発明者: 中野貴由, 松垣あいら, 石本卓也, 佐久太郎, 磯部仁博  
権利者: 株式会社アトリー  
種類: 特許権  
番号: US9441031B2  
取得年月日: 2016 年 9 月 13 日  
国内外の別: 国外 (米国)

[その他]

ホームページ

<http://www.mat.eng.osaka-u.ac.jp/msp6/nakano/>

以上を含む、原著論文: 100 報、解説論文:

75 報、国際会議論文: 5 報、著書: 21 冊、特許: 8 件、学会発表: 418 件 (内 基調・特別講演: 30 件、招待講演: 80 件)、新聞報道: 15 件、受賞: 65 件の関連業績。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 貴由 (Takayoshi NAKANO) ・大阪大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 30243182

(2) 研究分担者

松本 卓也 (Takuya MATSUMOTO) ・岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 40324793

山本 雅哉 (Masaya YAMAMOTO) ・東北大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 10332735

石本 卓也 (Takuya ISHIMOTO) ・大阪大学・工学研究科・准教授  
研究者番号: 50508835

當代 光陽 (Mitsuharu TODAI) ・新居浜工業高等専門学校・環境材料工学科・准教授  
研究者番号: 10610800

松垣 あいら (Aira MATSUGAKI) ・大阪大学・工学研究科・助教  
研究者番号: 10592529

藤本 隆士 (Takashi FUJIMOTO) ・弓削商船高等専門学校・電子機械工学科・教授  
研究者番号: 30332076

福田 英次 (Hidetsugu FUKUDA) ・弓削商船高等専門学校・電子機械工学科・助教  
研究者番号: 30536553

萩原 幸司 (Koji HAGIHARA) ・大阪大学・工学研究科・准教授  
研究者番号: 10346182