

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12798

研究課題名（和文）サブミクロンの表面粗さを持つチタンが細胞機能を制御する機構の解明

研究課題名（英文）Effect of sub-micron roughened Ti surface for cellular function

研究代表者

右田 聖（Satoshi, Migita）

山形大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：00512302

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、金属のサブミクロン粗造化表面が細胞レベルでどのような影響を及ぼすかの解明を目指した。サブミクロン粗造化したチタン表面は、細胞のインテグリン $\alpha 5$ の発現を低下させ、およびYAPの核内局在を低下させることが明らかになった。その結果、細胞の増殖や骨分化が抑制されているのだと推測した。一方で、コバルトクロム合金をサブミクロン粗造化した場合、細胞は凹凸を利用して接着する傾向が見られた。このことから、チタンとそれ以外の金属では表面粗造化の効果も異なっている可能性が示された。これらの結果は、生体材料の粗造化が細胞の機能に及ぼす影響を理解し、新たな生体適合性向上戦略を検討するための重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、粗造化したチタンが細胞の増殖と分化を抑制するメカニズムの一部を明らかにし、一方で粗造化したCCM合金が細胞の接着を支える機能を提供することを明らかにした。これらの結果は、材料選択により粗造化の影響が変化することを示している。また、医療用インプラントや生体材料の表面設計において、細胞との相互作用をより詳細に考慮しなければならないことを示している。これらの知見は、インプラントが患者の体内で長期間にわたって安定した機能を発揮し、高い生体適合性を維持することを可能にするために重要である。本研究で得られた成果は、生体材料の理解を深め、より効果的な治療法の開発に資するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of sub-micron roughened surfaces on metallic biomaterials at the cellular level. We found that a sub-micron roughened titanium surface downregulated integrin $\alpha 5$ expression and reduced nuclear accumulation of YAP. These biological processes could potentially inhibit cell proliferation and differentiation. Conversely, sub-micron roughened Cobalt-Chromium-Molybdenum (CCM) alloy provided a scaffolding function for cell attachment. Therefore, the impact of surface roughness appears to differ between titanium and other metals.

研究分野：生物学

キーワード：バイオマテリアル 生体機能材料 生体適合材料 ナノバイオ材料 細胞・組織工学材料 細胞バイオメカニクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

金属の表面粗造化は古くから採用されている表面処理法であり、細胞レベルでは、特に細胞の機能亢進に対する効果が報告されている。この表面粗造化は、細胞の増殖、分化、遊走といった一連の生物学的反応を誘導する。一方で、細胞が接着面から受ける影響は、表面の粗さや形状、化学的性質など、粗造化の具体的な条件によって大きく異なる。

これまでの研究では、細胞の分子レベルでの反応メカニズムが明らかにされつつある。たとえば、たとえば、骨芽細胞は平滑面チタンで、MAP キナーゼ経路を介して骨分化へのシグナルを伝達する。また、マイクロサイズの粗造化チタン表面では、Wnt/ β -カテニン経路が活性化し、骨分化を亢進させる。

しかし、このような知見は特定の表面粗さの状態に限定されており、粗造化表面における細胞の反応についての統合的な理解には至っていない。特にナノサイズとマイクロサイズの間位置する $Ra = 100 \text{ nm} \sim 300 \text{ nm}$ のサブミクロン表面においては、研究が不十分であり、粗造化の効果や細胞が受ける影響はほとんど明らかになっていない。

研究代表者等はチタンの粗造化と細胞機能の関係に着目し、以下の2つの主要な報告を行ってきた。サブミクロンサイズの表面粗さは、細胞の伸展を阻害すること(Migita, *J Biomater Funct Mater*, 2016)、骨芽細胞では骨分化が抑制されること(Migita, *AIMS Bioeng*, 2017)。これらの発見は、粗造化表面で細胞が活性化するという一般的な報告に反して、特定の条件下では細胞機能が抑制される可能性を示唆している。このような背景から、サブミクロンサイズの粗造化表面における細胞内の分子メカニズムに関する研究をスタートさせるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、サブミクロン粗造化表面が骨芽細胞の骨分化をどのように抑制するのかを解明することを目指した。具体的には、粗造化表面における細胞接着のメカニズムとその後の細胞内シグナル伝達の変化を追うことにより、この現象の背景にある生物学的プロセスに迫る。この研究によって、マイクロ～サブミクロンサイズの表面粗造化が生体材料としてどのような効果をもたらすかを解明し、金属材料の生体適合性を向上させるための新しい戦略を提供することが可能になる。

3. 研究の方法

(1) サブミクロン表面の状態を認識し、細胞内に伝える機構の検討

湿式研磨により、チタンの表面粗さを数 nm～数百 nm になるように調節し、MC3T3-E1 細胞をその上に 5000 cells/cm^2 の密度で播種した。24 時間の培養後、細胞表面に存在するインテグリンの発現を解析した。抗インテグリン抗体でラベルと Alexa488 標識抗体による免疫染色をおこなった後、蛍光顕微鏡を用いて観察し、どのようなタイプのインテグリンの発現が主要であるかを検討した。

(2) サブミクロン表面から影響を受ける細胞内シグナルの検討

チタン上のサブミクロン粗造化表面は細胞の伸展を阻害する。このことから、サブミクロン粗造化表面は細胞形態を制御する機能を持っていることが示唆される。細胞骨格の形成と細胞形態との関連を考慮し、Yes-associated protein (YAP) の局在を研究した。サブミクロン粗造化表面で細胞を 24 時間培養し、YAP の免疫染色と蛍光顕微鏡を用いた観察を行い、YAP の細胞内局在を調査した。また、Wnt/カテニン経路への影響を確認するため、GSK3 の不活性化を検証した。

(3) サブミクロンの表面粗さが与える影響は金属の種類に影響するのか

表面粗さが細胞に与える影響を明らかにするために、チタン以外の金属についても検討した。生体材料として広く使用されているコバルトクロム合金を選び、その表面粗さを数 nm～数百 nm になるように調節する技術を確立した。その後、MC3T3-E1 細胞が受ける影響を検討した。

4. 研究成果

(1) サブミクロン表面の状態を認識し、細胞内に伝える機構の検討

まず、粗造化表面での細胞接着についての分析を行った。その結果、サブミクロン粗造化表面ではインテグリン 5 の発現が低下し、そのクラスタリングが観察できなくなった。これは、サブミクロン粗造化表面では細胞と材料表面との相互作用が弱まる可能性を示している(図 1)。一方、サブミクロン粗造化表面では、発現量が少ないもののインテグリン 2 の発現が観察された。サブミクロン粗造化表面では、主要な接着分子としてインテグリン 2 が機能していると推定される。

(2) サブミクロン表面から影響を受ける細胞内シグナルの検討

次に粗さの変化による Wnt/ β -カテニン経路の影響を明らかにするために、GSK-3 のリン酸化

状態について調査した。免疫染色によって GSK-3 のリン酸化を検出したところ、表面粗さ 0.1 ~ 0.3 μm の表面に付着する細胞は鏡面研磨表面に付着する細胞よりも GSK-3 のリン酸化が顕著に低くなった。このことから、GSK-3 の活性が低下し、Wnt/ カテニン経路の動態はあまり影響を受けていないと推測される。

一方で、表面粗さによる細胞形態の変化とアクチンファイバーの形成の違いから、Hippo-YAP/TAZ シグナルを介した細胞機能制御が行われている可能性が示唆された。表面粗さ 100-150 nm の研磨チタン表面では、細胞の伸展が抑制され、YAP の核内局在も低下した。これにより、細胞は伸展面積に基づいて表面環境を感知し、Hippo 経路を介して細胞機能を制御していると考えられる。

(3) サブミクロンの表面粗さが与える影響は金属の種類に影響するのか

サブミクロンの表面粗さが与える影響は金属の種類によってどのように変化するのかを調査するため、チタンとコバルトクロム合金での比較実験を行った。その結果、コバルトクロム合金の表面粗さは細胞の初期接着数には影響を与えないが、接着した細胞の形態形成に影響を与えることが明らかになった。特に表面粗さ 0.3 μm の表面では、細胞が研磨痕に沿って伸展するコンタクトガイダンスが顕著に見られた。一方で、鏡面研磨した試料では、細胞は細長く伸展するものの、特定の方向性を示す傾向は見られなかった。これらのことから、チタン表面とコバルトクロム表面では細胞に対する親和性に大きな違いがあることが示された。また、チタンではそもそも細胞が接着しやすいため、表面粗さがネガティブな影響を及ぼすが、コバルトクロムでは細胞が粗面を足場として接着するため、表面粗さが細胞接着に対してポジティブな影響を及ぼす可能性が示された。このチタンとそれ以外との金属の比較は、チタンが生体材料としてなぜ優れているかを明らかにする上で、重要な知見であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 Migita Satoshi, Wakabayashi Keita | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Analysis of disordered abrasive scratches on titanium surfaces and their impact on nuclear translocation of yes-associated protein | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 21705 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-26203-0 | 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 Migita Satoshi, Wakabayashi Keita, Yamazaki Tomohiko | 4. 巻 119 |
| 2. 論文標題 Binding stability of peptides to Co-Cr-Mo alloy affects proliferation and differentiation of osteoblast | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering | 6. 最初と最後の頁 1157 ~ 1163 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.28041 | 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 右田 聖 | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 仮骨の形成を抑制する機能を持つジルコニウム合金 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 アグリバイオ | 6. 最初と最後の頁 96-99 |
| 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 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 - |

| | |
|------------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 右田 聖 | 4. 巻 54 |
| 2. 論文標題 サブミクロンの表面粗さを持つチタンが細胞機能を制御する機構 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 細胞 | 6. 最初と最後の頁 47-49 |
| 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 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 - |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1. 著者名 Migita Satoshi, Sakashita Kosuke, Saito Yuta, Suyalatu, Yamazaki Tomohiko | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Co-Cr-Mo alloy binding peptide as molecular glue for constructing biomedical surfaces | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials | 6. 最初と最後の頁 1-6 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2280800020924739 | 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 該当する |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 Satoshi Migita, Kosuke Sakashita, Suyalatu | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Osteoblast compatibility of 3D printed Co-Cr-Mo alloys with different building direction | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biosurface and Biotribology | 6. 最初と最後の頁 67-70 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1049/bsbt.2018.0043 | 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 Migita Satoshi, Yamaguchi Tomoya | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Initial Adhesion Behavior of Osteoblast on Titanium with Sub-Micron Scale Roughness | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Recent Progress in Materials | 6. 最初と最後の頁 9 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/rpm.2001003 | 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 - |

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

| |
|------------------------------------------|
| 1. 発表者名 右田 聖 |
| 2. 発表標題 CCM 表面を機能化するための CCM 結合ペプチドの創出 |
| 3. 学会等名 第78回日本歯科理工学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 右田 聖 |
| 2. 発表標題 材料結合ペプチドによるコバルトクロム合金の生体機能化 |
| 3. 学会等名 第15回ナノ・バイオメディカル学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 若林慶太、右田聖 |
| 2. 発表標題 材料結合ペプチドを用いたCCM合金の表面修飾 |
| 3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名 右田聖 |
| 2. 発表標題 金属材料における細胞機能の制御 |
| 3. 学会等名 東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 ペプチド、CCM合金 - ペプチド複合体、ペプチド - リガンド結合体、CCM合金 - ペプチド - リガンド複合体、及び、体内埋込型医療器具 | 発明者 山崎 智彦、右田 聖 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2021-082482 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

| | | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|