

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20560070

研究課題名（和文） ひずみ誘導型液体流動による骨形成反応促進効果の実験的検証

研究課題名（英文） Experimental validation of osteogenic effect of strain-induced fluid flow

研究代表者

田中 茂雄（TANAKA SHIGEO）

金沢大学・環日本海域環境研究センター・准教授

研究者番号：20262602

研究成果の概要（和文）：骨基質内で生じるひずみ誘導型液体流動（SIFF）は骨細胞を刺激し骨形成反応を促すと考えられている。しかし、SIFFによる骨形成反応促進機構は十分に理解されていない。そこで本研究では、骨芽細胞と多孔質担体から成る培養再生骨を用いて、SIFFの骨形成反応促進効果を調べた。その結果、SIFFの骨形成反応促進効果は担体の多孔性、素材、細胞密度および刺激周波数の影響を受けることが分かった。本成果は、骨生体力学のより一層の理解と骨の再生医療発展へ貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：It is believed that strain-induced fluid flow (SIFF) stimulates osteogenic response of bone cells, resulting in adaptive bone formation. However, the mechanism of the osteogenic ability of SIFF is not fully understood. In this research, the ability of SIFF was investigated using regenerative bones made of osteoblasts and porous scaffolds. The results showed that SIFF promotes the osteogenesis of regenerated bones. This ability of SIFF was influenced by the porosity and material of scaffold, and the frequency of mechanical stimulation. These findings contribute to further understanding of the bone mechano-biology and the progress of bone tissue engineering.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生体工学

科研費の分科・細目：機械工学 ・ 機械材料・材料力学

キーワード：骨形成，力学刺激，骨芽細胞，再生骨，再生医療，ティッシュエンジニアリング

1. 研究開始当初の背景

従来、骨形成反応を引き起こす力学的刺激は、力学的負荷により生じる骨基質の“ひずみ”であると考えられ、ひずみと骨形成反応の研究が数多く行われてきた。一方、Piekarskiら（Piekarskiら，Nature，1977）

によって、繰返し負荷により生じる骨基質のひずみが基質内に液体流動を発生させ、それにより骨の細胞が刺激されるという考えが提唱された。その後、骨の細胞も血管内皮細胞と同様に液体流動に対し反応することや（Reichら，J Cell Physiol，1990）、また、理論的に骨細胞を刺激するのに十分な大き

さのずり応力がひずみ誘導型液体流動により発生すること (Cowin ら, Am J Med Sci, 1998) などが報告され、現在、Piekarski らの説が広く支持されている。しかしながら、ひずみ誘導型液体流動という力学的刺激形態により実際に骨形成反応が促進されることを確認した例は国内外ともない。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでピエゾアクチュエータとコラーゲン・スポンジを利用することにより、培養下においてひずみ誘導型液体流動を作り出すことに成功している (図1)。そして、この刺激よりスポンジ内に三次元培養した骨芽細胞の骨形成反応が促進されることを mRNA レベルおよびタンパクレベルで明らかにしている (Tanaka ら, CTI, 2005)。本研究では、この成果を発展させ、最終的な骨形成反応である石灰化に至るまでのひずみ誘導型液体流動の刺激効果について確認することを目標とした。

3年の研究期間における具体的な目的は、【目的1】ひずみ誘導型液体流動の刺激効果において、ひずみと液体流動それぞれの寄与率を明らかにすること、【目的2】ひずみ誘導型液体流動の刺激効果を高める培養条件を明らかにすること、および【目的3】ひずみ誘導型液体流動の刺激効果を高める刺激周波数を明らかにすることであった。

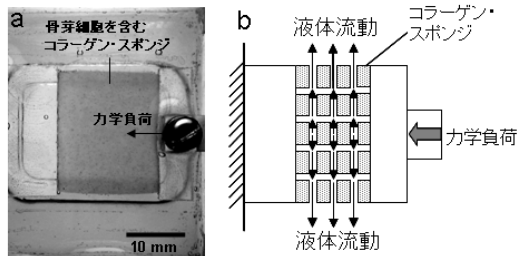


図1 コラーゲン・スポンジ担体に三次元培養された骨芽細胞へ力学刺激負荷。担体への力学負荷により担体内にひずみ誘導型液体流動が生じる (Tanaka ら, CTI, 2005)。

3. 研究の方法

【目的1】実験では、SD ラット (メス、8週齢) の初代培養骨芽細胞を播種した I 型コラーゲン・スポンジ担体 (Zimmer Dental Inc., L 16 x W 20 x t 2 mm, 孔径約 100 μm) に対しひずみ誘導型液体流動を与えた群 (OP 刺激群) およびその無負荷コントロール群 (OP コントロール)、そして、I 型コラーゲンをスポンジに浸透させることで液体流動を遮断しひずみのみを与えた群 (FP 刺激群) およびその無負荷コントロール群 (FP コントロ

ール) の計 4 群を設け、30 日間の長期培養を行った。なお、担体への力学刺激は 1 日 3 分間とし、培養担体の石灰化度は近赤外光 LED を利用した非破壊的石灰化度評価システム (図2) を用いてモニタリングした (Tanaka ら, J. Biomech. Sci. & Eng., 2008)。

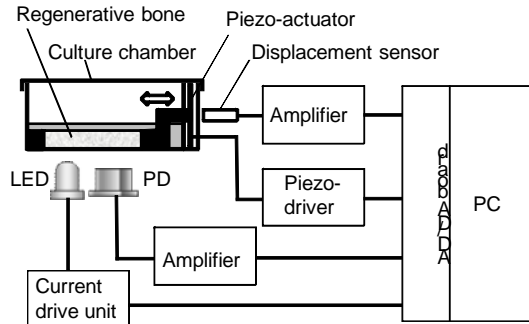


図2 三次元培養骨芽細胞に対する力学刺激負荷と非破壊的石灰化度モニタリングを可能とする実験システム (田中, 日本臨床バイオメカニクス, 2010)。

【目的2】ひずみ誘導型液体流動の刺激効果を高める培養条件を明らかにするために、播種細胞密度と担体素材に着目し実験を行った。実験では、ラット骨芽細胞を低播種密度 (1600 cells/mm³) または高播種密度 (6900 cells/mm³) で I 型コラーゲン・スポンジまたはメラミン・スポンジに播種し、ひずみ誘導型液体流動を 0.8 Hz の周波数で 1 日 3 分間与え、石灰化度の変化をおよそ 3 週間観察した。実験群は、表1の通り計 8 群である。なお、培養担体への力学刺激方法および石灰化度モニタリング方法は、上記【目的1】と同様である。

表1 目的2における実験群

Scaffold material	Physical treatment	Cell seeding density	
		1600 cell/mm ³	6900 cell/mm ³
Collagen	Control	CC1600 (n=3)	CC9600 (n=2)
	Stimulated	CS1600 (n=3)	CS9600 (n=2)
Melamine	Control	MC1600 (n=3)	MC9600 (n=2)
	Stimulated	MS1600 (n=3)	MS9600 (n=2)

【目的3】ひずみ誘導型液体流動の刺激効果を高める条刺激周波数の調査を行った。実験では、ラット骨芽細胞を播種した I 型コラーゲン・スポンジに対しひずみ誘導型液体流動を 0.2 Hz, 2 Hz, または 20 Hz の周波数で与え、各周波数における刺激効果の違いを刺激直後に生じる細胞内 Ca²⁺ 応答を観察することで調べた。なお、動的負荷を受ける三次元培養細胞の細胞内 Ca²⁺ 応答は顕微鏡での観察が不可能であるため、本研究室において独自に開発した光学装置を使用した (図3)。

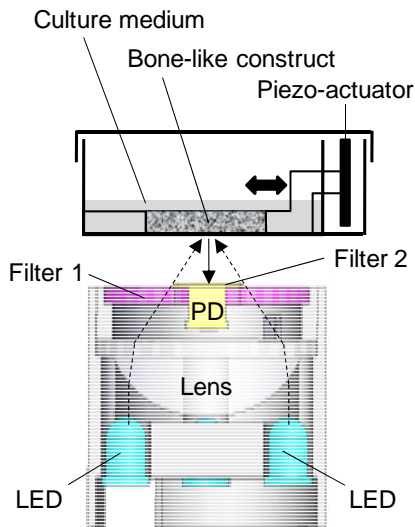


図3 力学刺激負荷時に生じる三次元培養骨芽細胞の細胞内 Ca^{2+} 応答を観察するための光学装置。カルシウムインジケータは Fluo3-AM (励起波長: 488nm, 蛍光波長: 518nm) を使用。

4. 研究成果

【目的1】最終的な石灰化度での比較において、FP 刺激群は OP 刺激群の約 1.3 倍の値を示した (図4、5)。なお、いずれの無負荷コントロール群においも顕著な石灰化度の上昇は見られないことから、力学刺激の石灰化促進効果は明らかであった。以上の結果は、ひずみ誘導型液体流動の石灰化促進効果において液体流動の貢献度は高くないことを示している。しかしながら、ゲルによる液体流動の遮断がサブマイクロレベルにおいても実現されているかどうかは不明であり、このような流動が石灰化を促進している可能性も考えられる。今後、同モデルにおける液体流動の実態を確かめる必要があると言える。

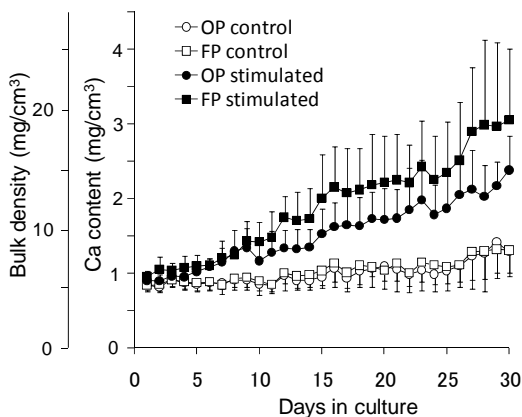


図4 ラット骨芽細胞が三次元培養されたコラーゲン・スポンジ担体の石灰化度変化。

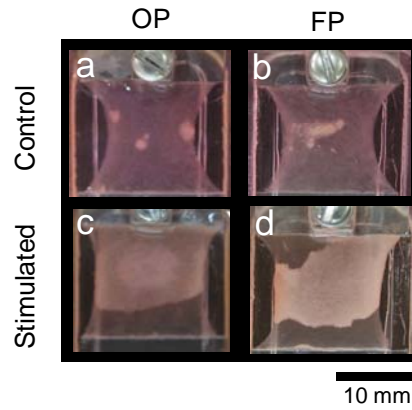


図5 ラット骨芽細胞が三次元培養されたコラーゲン・スポンジ担体の接写撮影像。

【目的2】低播種密度では明確な刺激効果は見られず、一方、高播種密度では刺激効果が確認された。特に、メラミン・スポンジよりもコラーゲン・スポンジを用いた場合でより高い刺激効果が認められた (図6、7)。本結果は、ひずみ誘導型液体流動の刺激効果は播種細胞密度と担体素材に大きく依存すること示しており、特に、ひずみ誘導型液体流動による培養再生骨の効果的な石灰化促進には高い播種細胞密度と適切な担体素材選定が重要であることが分かった。

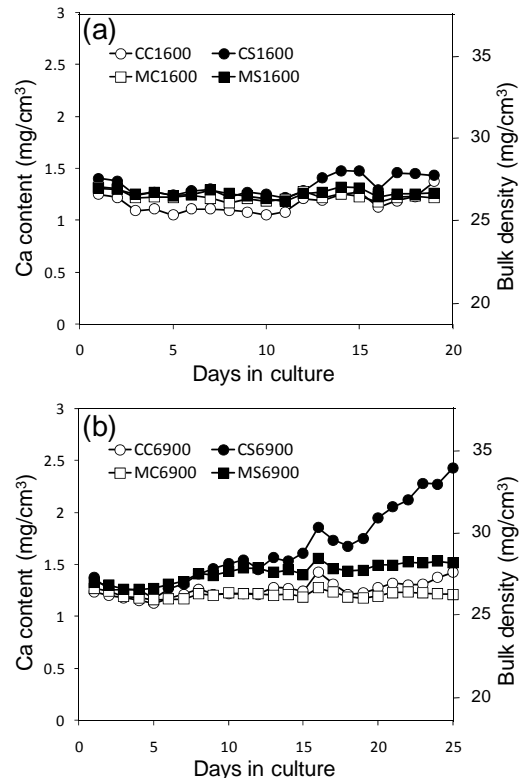


図6 ラット骨芽細胞が三次元培養されたコラーゲン・スポンジ担体またはメラミン・スポンジ担体の石灰化度の変化。(a) 播種細胞密度 1600 cells/mm^3 , (b) 播種細胞密度 6900 cells/mm^3

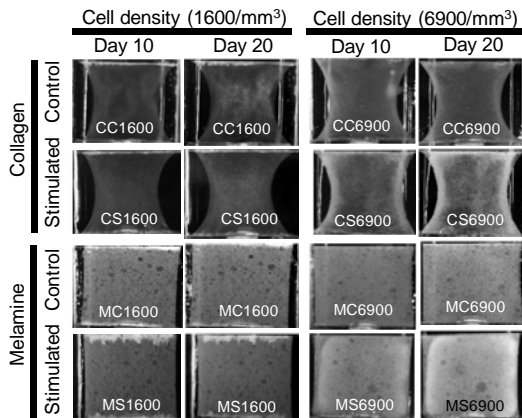


図7 ラット骨芽細胞が三次元培養されたコラーゲン・スポンジ担体またはメラミン・スポンジ担体の接写撮影像。

【目的3】20 Hzの刺激は0.2 Hzと比べて約4倍、また、2 Hzと比べて約2倍、細胞内Ca²⁺応答時間が長いことが明らかとなった(図8a)。以上の結果は、刺激周波数が高いほどひずみ誘導型液体流動の刺激効果が高まることを示している。しかしながら、今回の実験では20 Hz以上の刺激周波数での反応を調べていないため、今後、より高い刺激周波数での調査を行う必要がある。また、細胞内Ca²⁺応答レベルで得られた結果が、石灰化レベルでも同様の傾向を示すかどうかについて確認する必要がある。

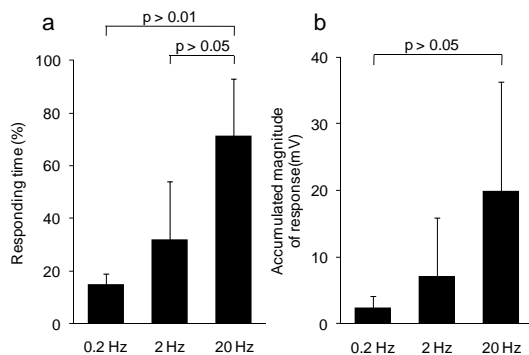


図8 刺激後の細胞内Ca²⁺応答の比較。(a) 反応時間、(b) 反応時間における積算強度

以上の成果は、骨の力学的適応機構解明のための示唆的知見として興味深いものである。また同時に本成果は、培養再生骨の石灰化を効率的に促進する刺激条件の選定における有益な情報であり、骨再生医療分野の貢献が期待される。今後は、骨の細胞の力学刺激感受性の支配機構を明らかにするとともに、石灰化をより高い効率で促進する力学刺激パターンを明らかしていきたい。これにより生体骨と同等の石灰化度を有する培養再生骨の実現を目指したい。

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〕(計7件)

- ① 橘 孝平, 田中茂雄, 力学的刺激による再生培養骨の石灰化促進—播種細胞密度と担体素材の影響—, 臨床バイオメカニクス, 掲載確定
- ② Tanaka, SM., Mechanical loading promotes calcification of tissue-engineered bone in vitro, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol. 5, No. 5, pp. 635-645, 2010, 査読有
- ③ 田中茂雄, コラーゲン担体を用いた培養再生骨への力学刺激と石灰化促進, 臨床バイオメカニクス, Vol.31, pp. 27-32, 2010, 査読有
- ④ Tanaka, SM., Sun, HB., Walking-induced bone strain stimulates cultured osteoblasts accompanied by the low-magnitude, high frequency components, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol. 4, No. 3, pp. 434-442, 2009, 査読有
- ⑤ 杉浦直樹, 武田 純, 田中茂雄, 細胞内Ca²⁺動態観察用小型光システムの開発, 臨床バイオメカニクス, Vol. 30, pp. 41-46, 2009, 査読有
- ⑥ 垣尾雅文, 杉浦直樹, 山越憲一, 田中茂雄, 光を用いた再生骨の石灰化モニタリング, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, Vol. 29, pp.187-192, 2008, 査読有
- ⑦ Tanaka, SM., Kakio, M., Yamakoshi, K., Non-destructive optical monitoring for calcification of tissue-engineered bone *in vitro*, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol. 3, No. 3, pp. 332-342, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計19件)

- ① Tanaka, S., Tachibana, K., Frequency dependence of intracellular Ca²⁺ response of osteoblasts under dynamic loading, 6th World Congress of Biomechanics, 2010. 8. 1-6, Singapore Suntec Convention Center (Singapore)
- ② 田中茂雄, 培養再生骨の力学刺激応答観察を目的とした新規光計測装置の開発, 第37回日本臨床バイオメカニクス学会, 2010年11月1-2日, 国立京都国際会館(京都府)
- ③ 橘 孝平, 田中茂雄, 力学的刺激による培養再生骨の石灰化促進 - 播種細胞密度と担体素材の影響 -, 2010年11月1-2

- 日, 国立京都国際会館 (京都府)
- ④ 橋 孝平, 田中茂雄, 力学的刺激により促進される培養再生骨の石灰化 - 播種細胞密度と担体素材の影響 -, 第 21 回バイオフロンティア講演会, 2010 年 11 月 12 - 13 日, IT ビジネスプラザ武蔵 (石川県)
- ⑤ 田中茂雄, 杉浦直樹, 三次元培養骨芽細胞の力学刺激への細胞内 Ca^{2+} 応答, 日本機械学会北陸信越支部第 47 期総会・講演会, 2010 年 3 月 10 日, 新潟大学 (新潟県)
- ⑥ 橋 孝平, 杉浦直樹, 田中茂雄, 力学的刺激による培養再生骨の石灰化促進, 日本機械学会北信越学生会第 39 回学生員卒業研究発表講演会, 2010 年 3 月 9 日, 新潟大学 (新潟県)
- ⑦ 杉浦直樹, 田中茂雄, 動的負荷を受ける三次元培養骨芽細胞群の細胞内 Ca^{2+} 動態観察, 第 22 回バイオエンジニアリング講演会, 2010 年 1 月 9-10 日, 岡山理科大学 (岡山県)
- ⑧ 杉浦直樹, 田中茂雄, 基質変形を伴う動的負荷を受ける三次元培養骨芽細胞の細胞内 Ca^{2+} 応答観察, 平成 21 年度日本生体医工学学会北陸支部大会, 2009 年 12 月 12 日, 金沢大学サテライト・プラザ (石川県)
- ⑨ Tanaka, SM., Sugiura, N., Observation of intracellular Ca^{2+} dynamics in three-dimensionally cultured osteoblasts under dynamic loading, 4th International Symposium on Advanced Fluid/Solid Science and Technology in Experimental Mechanics, 2009.11. 28-30, Toki Messe, Niigata (Japan)
- ⑩ 田中茂雄, コラーゲン担体を用いた培養再生骨への力学刺激と石灰化促進, 第 36 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2009 年 10 月 16-17 日, ひめぎんホール (愛媛県)
- ⑪ 田中茂雄, 垣尾雅文, ひずみ誘導型液体流動刺激による培養再生骨の石灰化促進, 第 48 回日本生体医工学大会, 2009 年 4 月 23 - 25 日, タワーホール船堀 (東京都)
- ⑫ Tanaka, SM., Kakio, M., *In vitro* osteogenesis promoted by strain-induced fluid flow, Commemorative international conference on the occasion of the 4th cycle celebration of KMUTT, Sustainable development to save the earth technologies and strategies vision 2050 (SDSE 2008), 2009.4. 7-9, Millennium Hilton Bangkok hotel, Bangkok, (Thailand)
- ⑬ 田中茂雄, 垣尾雅文, 力学的刺激により促進される培養再生骨の石灰化, 日本機械学会北陸信越支部第 46 期総会・講演会, 2009 年 3 月 7 日, 富山大学 (富山県)
- ⑭ 垣尾雅文, 田中茂雄, ひずみ誘導型液体流動刺激による培養再生骨の石灰化促進, 第 21 回バイオエンジニアリング講演会, 2009 年 1 月 23-24 日, 札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑮ 垣尾雅文, 山越憲一, 田中茂雄, ひずみ誘導型液体流動による再生骨の石灰化促進, 平成 20 年度日本生体医工学学会北陸支部大会, 2008 年 12 月 13 日, 金沢大学 (石川県)
- ⑯ 杉浦直樹, 垣尾雅文, 武田 純, 田中茂雄, 細胞内 Ca^{2+} 動態観察用小型光システムの開発, 第 35 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2008 年 11 月 14-15 日, 大阪国際交流センター (大阪府)
- ⑰ 田中茂雄, 再生組織用カルシウムイオンモニタリング装置, BioJapan2008 World Business Forum, 2008 年 10 月 15-17 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑱ Tanaka, SM., Kakio, M., Yamakoshi, K., Strain-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix promotes osteoblastic calcification in vitro, The American Society for Bone and Mineral Research 30th Annual Meeting, September 12008.9. 2-16, Palais des congrès de Montréal, (Canada)
- ⑲ 杉浦直樹, 垣尾雅文, 田中茂雄, 山越憲一, 再生骨における刺激効果を評価する小型光センシングシステム, 第 47 回日本生体医工学大会, 2008 年 5 月 8 - 10 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 茂雄 (TANAKA SHIGEO)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・准教授

研究者番号 : 20262602

(2) 連携研究者

山越 憲一 (YAMAKOSHI KENICHI)

金沢大学・自然科学研究科・教授

研究者番号 : 40014310