

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 26 日現在

機関番号：11301
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2021～2023
課題番号：21K21031
研究課題名（和文）包括的遺伝子情報に基づいた新規生分解性Mgデバイスの形状および表面処理技術の開発

研究課題名（英文）Development of new biodegradable Mg device shape and surface treatment technology based on RNA sequencing

研究代表者
柳沢 佑太（Yanagisawa, Yuta）
東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40899738
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ラット大腿骨にチタン（Ti）またはマグネシウム（Mg）金属を埋入し、術後3日、7日後で大腿骨を採取しRNA-Seq解析を行った。約29000種の遺伝子群から、有意に変動した遺伝子約1900種を検出した。GO解析により発現遺伝子の機能を調査したところ、コラーゲン代謝に関する遺伝子群を同定した。さらにパスウェイ解析で上流の遺伝子を追跡したところ、Mg埋入群ではインディアンヘッジホッグ（IHH）遺伝子を中心としてHAPLIN1、Col2aが活性化していた。さらにMgとの直接的な関連を追跡したところ、Integrin 10 1を介してCol2aの上昇が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

材料学分野では、新規吸収性骨接合デバイスとしてマグネシウム（Mg）合金の利用が着目されている。またMgは骨形成初期においてカルシウム（Ca）とイオン交換を行うことで骨代謝に関与しているとされているが、生体内での生分解や骨代謝機序は解明されていないことが多い。今回、Mg埋入群で高発現を示したIHH遺伝子は軟骨形成で中心的な役割を担うことが知られているが、型コラーゲンやMgとの関連は報告が少ないため、これらパスウェイを包括的に把握することによりMg関連骨代謝機構の一部を観察できたことは本研究の成果であり、今後同分野の研究に知見を与えることができると考える。

研究成果の概要（英文）：Titanium (Ti) or magnesium (Mg) metal was implanted in rat femurs and femurs were extracted 3 and 7 days after surgery for RNA-Seq analysis. From approximately 29 000 genes, 1900 significantly variable genes were detected. Functional investigation of expressed genes by gene ontology (GO) analysis showed gene expression related to collagen metabolism. Further pathway analysis traced upstream genes and found that the HAPLIN1 and Col2a pathways were activated with expression of the Indian hedgehog (IHH) gene in the Mg-implanted group. Further investigation of the direct relationship between Mg and these pathways showed an Integrin 10 1-mediated Col2a up take.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 マグネシウム RNAシーケンス インプラント 骨造成

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで骨折や再建手術で使用される生体吸収性デバイスは、ポリ-L-乳酸 (PLLA) に代表される高分子系材料による製品がほとんどであった。PLLA は生体吸収性が高く、撤去のための再手術が不要という利点があるが、強度不足や吸収に伴う炎症反応などが課題である。一方マグネシウム (Mg) による生体吸収性デバイスは、骨に類似した機械的強度を持ち、生体内で加水分解されるため吸収過程で炎症反応を伴わないことが、既存の高分子系吸収性デバイスに対して利点である。さらに 2015 年、Mg 製デバイスを骨固定に利用した場合、デバイス周囲に骨形成を誘導したことが報告され、Mg の骨形成能が注目された (Acta Biomater 18:262, 2015)。Mg は骨に多く含まれる生体必元素であり、骨代謝では骨形成初期に作用すること示唆されているが、その具体的な作用機序は不明である。我々も Mg 製デバイスの開発を進めてきたが、適用部位の環境によって骨形成反応は大きく異なり、Mg 製デバイスに再現性の高い骨形成能の付与するためには骨形成における Mg の役割を解明することが重要である。

2. 研究の目的

我々は先行研究において (1) Mg 製デバイスは生分解過程で表面にリン酸カルシウム被膜を形成し、周囲骨組織との親和性を向上させること、(2) リン酸カルシウム被膜の形成に先行して、一時的に炭酸マグネシウム被膜が形成されることを発見し、Mg 製デバイスと骨組織中のカルシウム (Ca) の間でイオン交換が活発に行われていることが示唆された (図 1)。Mg 製デバイスは生体埋入直後から Mg イオンを放出することから、骨形成初期に何らかの影響を与えていると考えられるが、具体的な作用機序は不明である。また生体内のイオン交換を観察することは非常に困難であることから、Mg 存在下での生体局所の遺伝子発現変動を追跡することで Mg の骨形成機構を解明することとした。本研究ではラット大腿骨に Mg を埋入し、次世代 RNA シーケンス (NGS) により骨形成初期の発現遺伝子を網羅的に調査することで、Mg の作用部位および対象となる骨代謝経路の解明を目指す。

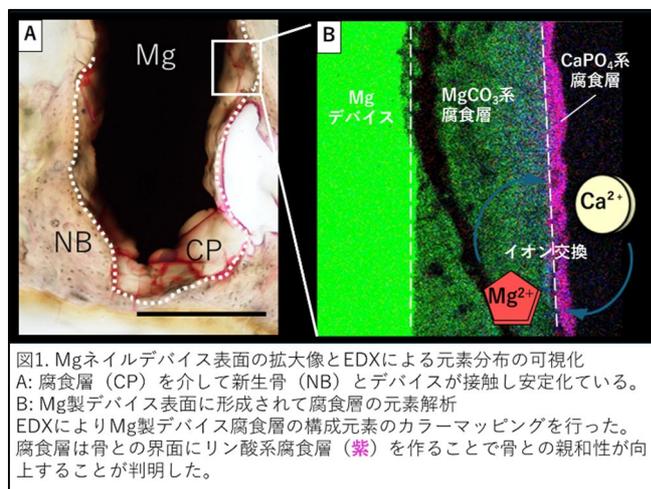


図1. Mg ネイルデバイス表面の拡大像とEDXによる元素分布の可視化
A: 腐食層 (CP) を介して新生骨 (NB) とデバイスが接触し安定化している。
B: Mg 製デバイス表面に形成されて腐食層の元素解析
EDXによりMg製デバイス腐食層の構成元素のカラーマッピングを行った。
腐食層は骨との界面にリン酸系腐食層 (紫) を作ることで骨との親和性が向上することが判明した。

3. 研究の方法

直径 1 mm、長さ 3 mm の円柱形の純 Mg 製インプラントを準備しラット大腿骨に埋入した。埋植後、3 日、7 日後にインプラント前後 2mm の長さでラット大腿骨を採取し、液体窒素で即時冷凍保存した (図 2)。(1) 大腿骨サンプルの NGS 解析: 採取した大腿骨の NGS により約 25000 種の遺伝子を解析した。対象群としてチタン埋入群 (Ti)、偽手術群 (Sham)、非手術群 (Control) にも同様の遺伝子解析を行い、それぞれの遺伝子変動を比較した。(2) 遺伝子機能解析 (GO 解析): 高発現した遺伝子群の傾向から、どのような機能が活性化しているか推定した。(3) Pathway 解析: 得られた遺伝子情報から、Mg 埋入群でどのようなシグナル伝達経路が活性化したかを推定した。



4. 研究成果

(1) Mg 埋入後 7 日目のラット大腿骨では、既知の骨代謝遺伝子が有意に上昇していた。骨芽

細胞の代表的な分化マーカーである RUNX2 やアルカリフォスファターゼ (ALPL) や 型コラーゲン (Col1a1) など多数の骨代謝関連遺伝子が高発現を示した (図3)。これらの結果から Mg 埋入群では骨代謝が加速しており、術後7日程度で骨芽細胞の分化を誘導している可能性が示唆された。

(2) 術後7日目の Mg 埋入群と Ti 埋入群で発現変動解析 (GO 解析) を行い、Mg 埋入群で高発現を示した遺伝子群の機能解析を行った (図4)。Mg 埋入群では細胞外マトリクス代謝やコラーゲン形成に関連した遺伝子が高発現しており、また骨芽細胞および破骨細胞はいずれも活性化していることが示唆された。金属イオンチャネルにかかわる遺伝子は抑制的に発現しており、生体局所の Mg イオンが急激に上昇したことに伴い、細胞内への取り込みが抑制されていると考えられた。

(3) Mg 埋入群で最も高発現したシグナル伝達経路を調査したところ、インディアンヘッジホッグ (IHH) 経路が最も活性化されており、型コラーゲン形成が活発に行われていることが判明した。また Mg がインテグリン 10 1 を介して型コラーゲンの接着性向上に関与していることが示唆された (図5)。これらの結果から Mg 埋入群では軟骨内骨化の骨代謝回転が加速している可能性が考えられた。

さらに最も高発現を示した IHH 経路を中心に、関連性の強いパスウェイの推定と活性化の有無を調査したところ、上流に位置する Wnt 経路の活性化を認めただけ、IHH 経路の下流では各種の骨代謝関連遺伝子の発現傾向を確認し、機能解析では骨基質の石灰化が亢進していることが判明した (図6)。

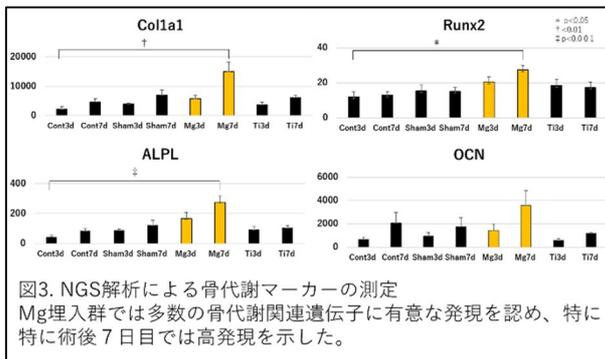


図3. NGS解析による骨代謝マーカーの測定
Mg埋入群では多数の骨代謝関連遺伝子に有意な発現を認め、特に術後7日目では高発現を示した。

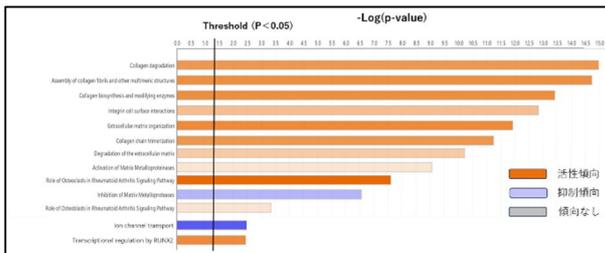


図4. 術後7日目のMg埋入群とTi埋入群での機能解析 (GO解析)
術後7日目のMg埋入群はTi埋入群と比較して細胞外マトリクスの代謝、リモデリングの機能に関連する遺伝子が多く発現していた。金属イオンチャネルは抑制的に発現しており、生体局所の急激なMg濃度上昇に伴うフィードバックによるものと考えられる。

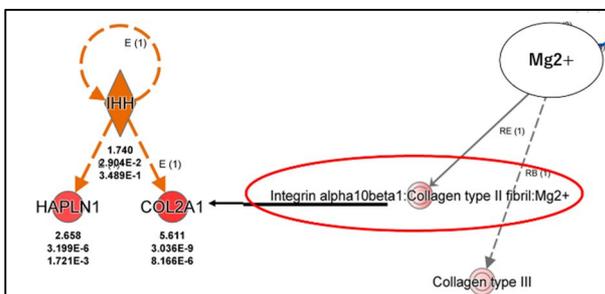


図5. パスウェイ解析で推定されたインディアンヘッジホッグ (IHH) 経路における Mg の作用部位
Mgはインテグリン $\alpha 10\beta 1$ を活性化させることにより、II型コラーゲンの接着性を向上させることが知られている。

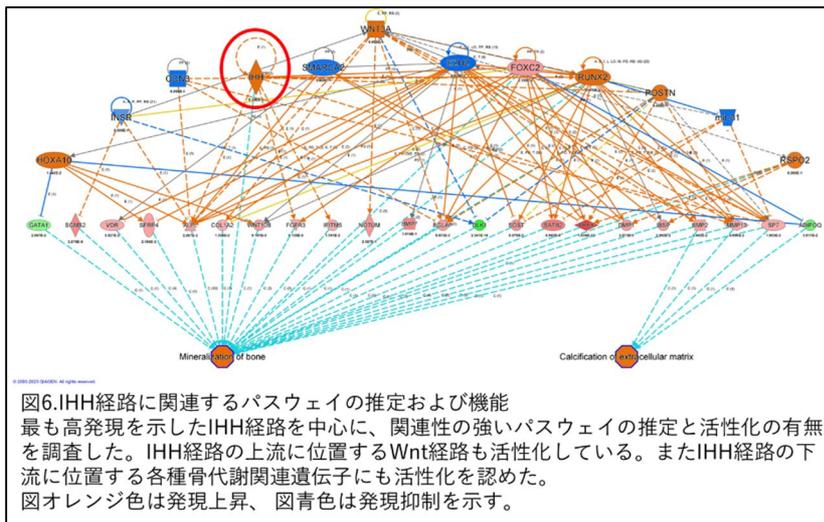


図6. IHH経路に関連するパスウェイの推定および機能
最も高発現を示したIHH経路を中心に、関連性の強いパスウェイの推定と活性化の有無を調査した。IHH経路の上流に位置するWnt経路も活性化している。またIHH経路の下流に位置する各種骨代謝関連遺伝子にも活性化を認めた。
図オレンジ色は発現上昇、図青色は発現抑制を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yanagisawa Yuta, Shimizu Yoshinaka, Mukai Toshiji, Sano Yuya, Odashima Kenji, Ikeo Naoko, Saito Haruka, Yamauchi Kensuke, Takahashi Tetsu, Kumamoto Hiroyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Biodegradation behaviors of magnesium(Mg)-based alloy nails in autologous bone grafts: In vivo study in rabbit skulls	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2.2808E+14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/22808000221095230	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 Yuta Yanagisawa	4. 巻 in press
2. 論文標題 Biodegradation behaviors of magnesium(Mg)-based alloy nails in autologous bone grafts: In vivo study in rabbit skulls	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials	6. 最初と最後の頁 in press
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuta Yanagisawa
2. 発表標題 Biodegradation behaviors of magnesium(Mg)-based alloy nails in autologous bone grafts: In vivo study in rabbit skulls
3. 学会等名 第66回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Yanagisawa
2. 発表標題 次世代RNAシーケンスによるマグネシウム関連骨代謝遺伝子の包括的発現変動解析
3. 学会等名 第68回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------