

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462263

研究課題名(和文) 材料表面マイクロ形状による骨関連細胞の分化と機能の制御

研究課題名(英文) Regulation of bone-associated cells differentiation and function by micro configuration of material surface

研究代表者

名井 陽(Myoui, Akira)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10263261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プラズマエッチングを用いた金型による微細加工技術により、quartzに凸型構造を、polystyreneの培養表面にはpore/pillar凹凸構造を加工することに成功した。この培養皿上で骨芽細胞や破骨細胞などの骨代謝関連細胞の分化誘導培養を行った結果、微細加工を施した培養皿上では細胞増殖能が低下し、骨形成が促進していた。また、足場材料の材質の違いにより破骨細胞の形成能は低下した。骨形成、骨吸収の両面から検討を行った結果、細胞接着面の表面構造を適切な材質を用いて適切な形状に加工することにより、骨代謝関連細胞の機能を制御できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Microfabrication technique using plasma etching make it possible to pattern pillar shape on the quartz and cocave/convex micro configuration on the polystyrene materials. It was revealed that the ability of a cell to proliferate was down regulated and bone formation was promoted on the microfabricated culture materials in the study using bone metabolism-associated cells like osteoblast and osteoclast. The number of osteoclast formation was altered according to the difference of scaffold materials. So it was indicated the possibility of controlling the capability of bone metabolism associated cells by fabricating the adequate shape of cell attachment surface and using adequate materials.

研究分野：整形外科

キーワード：骨分化 バイオマテリアル 微細加工技術

1. 研究開始当初の背景

骨疾患や外傷による骨欠損には人工骨が開発され、臨床の場でも広く使用されてきたが、自家骨と比較して骨再生能は低く、これまで組織工学技術や生理活性物質を組み合わせた骨再生能を高める研究を進めてきた。骨疾患の最適な治療には、骨関連細胞の基礎的な分子メカニズムの解明に加え、マテリアル学の応用開発が欠かせない。バイオマテリアルの生体親和性を向上する目的で、材料表面の様々な表面構造の微細加工が試みられている。我々は、臨床で使用されている人工骨の骨組織修復過程の実験的検討の中で、マイクロレベルの人工骨表面構造が骨形成及び骨吸収の制御に関与している可能性を報告してきたがその詳しいメカニズムは解明されていない。また、これまで、細胞分化の促進や制御機構を調べるため、サイトカイン等様々な試薬の添加実験が行われてきたが、足場の材料、形状や構造が細胞の機能に与える影響についての報告は少なく、骨代謝関連の研究では骨芽細胞を用いた培養表面構造の影響に関する検討は行われているものの、破骨細胞の培養系を用いた検討の報告はない。

2. 研究の目的

バイオマテリアルを用いた医療機器と骨との接触面においては、材料表面の構造が周辺の細胞の活性に影響している可能性がある。足場材料表面の微細表面構造は、細胞の生存・機能維持に重要な足場材に適用することにより、細胞の増殖、分化など様々な機能を制御する可能性が示唆されている。そこで申請者らは、プラズマエッチング等の手法を用いて、培養表面に微細加工を施した培養皿を作成し、足場材料の材質や培養表面構造の違いによる細胞の増殖や分化能、調節因子の発現について、骨芽細胞や破骨細胞などの骨関連細胞を用いて、分子生物学、生化学的手法で検討を行った。

3. 研究の方法

プラズマエッチングによる微細加工技術を用いて、足場材料となる quartz に等間隔 ($\phi 1.5\mu\text{m}$, $h 2\mu\text{m}$) に凸型の pillar 加工した。この凸型 quartz (pillar/quartz) と未加工の quartz(quartz)、市販の polystyrene(polystyrene)培養皿を用いた検討を行うと共に、プラズマエッチングにより、polystyrene 材質で pore/pillar 凹凸構造を有する培養皿 (pore/polystyrene, pillar/polystyrene)を作成した。各培養皿を用いて、骨形成および骨吸収について多面的に解析を行った。骨芽細胞は、骨分化誘導培地 (Ascorbic acid, β -glycerophosphate, Dexamethasone) を添加して培養を行い、骨分化を誘導した。破骨細胞はマウス脾細胞や骨髄細胞を採取し、M-CSF や RANKL を添加して誘導を行った。

分化誘導後の細胞は染色や、各細胞から抽出した RNA やタンパク質の発現解析により、培養表面構造の違いによる細胞制御に与える影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) quartz (quartz, pillar/quartz) 及び polystyrene 培養皿を用いた細胞培養実験

プラズマエッチング法で凸型に pillar 加工した pillar/quartz と未加工の quartz、市販の polystyrene 培養皿を用いて、下記検討を行った。

細胞増殖能および骨芽細胞様細胞株における骨分化の検討

各培養皿で ST2 細胞(マウス骨髄由来ストローマ細胞)を培養し、細胞増殖能について検討を行った。pillar/quartz で培養した ST2 細胞は、quartz、polystyrene 培養皿で培養した場合と比較して、細胞増殖能が低下していた(図1)。

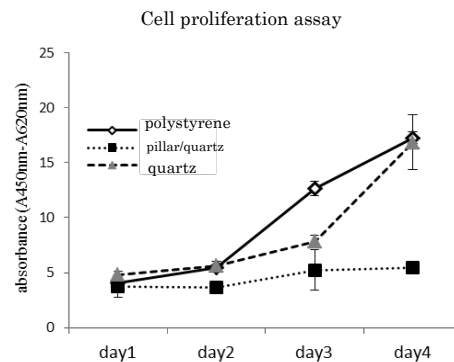


図1 ST2細胞の増殖能

次に、MC3T3細胞(マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株)を骨分化誘導培地を用いて骨分化を誘導し、骨芽細胞特異的分化マーカー (Alp, Collagen, Osteocalcin) の遺伝子発現量を qPCR で確認した。その結果、quartz や polystyrene で誘導された場合と比較して、pillar/quartz で誘導された骨芽細胞の Alp, Collagen の遺伝子発現量は上昇していた。さらに、骨芽細胞の比較的後期のマーカーである Osteocalcin の遺伝子発現量も pillar/quartz において有意に上昇していた。(図2)。

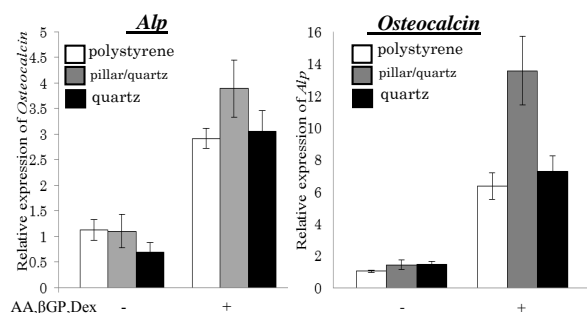


図2 qPCRによるAlp, Osteocalcinの発現

骨芽細胞における破骨細胞調節因子の誘導

生体骨組織においては、骨芽細胞を介して破骨細胞が誘導されることから、骨芽細胞における破骨細胞形成調節因子 (Rankl, Opg) の遺伝子発現を調べた。

ST2 細胞を vitaminD3 存在下で培養し、破骨細胞誘導因子である Rankl と阻受容体 Opg の遺伝子発現を qPCR で確認したところ、pillar/quartz で培養した場合、quartz や polystyrene で培養した場合と比較して Rankl の発現は低下し、Opg の発現が上昇していた。つまり、Rankl/Opg の発現が低くなる傾向がみられ、培養表面構造の違いにより、骨芽細胞による破骨細胞調節因子の誘導をコントロールできる可能性が示唆された。

破骨細胞の形成

活性化され、骨吸収状態におかれた破骨細胞が形成するとされるアクチンリングの形成について調べるため、各培養皿でマウス脾細胞および骨髄マクロファージから M-CSF/RANKL 存在下で培養破骨細胞の誘導を行った (図 3 TRAP 染色、図 4 Rhodamine phalloidin 染色、a) polystyrene b) quartz/pillar c) quartz)。その結果、polystyrene 上で培養した場合と比較して、quartz 上で培養すると破骨細胞の形成能が低下していた。一方で、polystyrene や quartz で培養した破骨細胞と比較して、pillar/quartz で誘導された破骨細胞は、大きさが小さいものの、全ての培養皿の破骨細胞にはアクチンリングが形成されることを確認した。また、各培養皿で培養した破骨細胞から RNA を回収し、qPCR で破骨細胞のマーカー遺伝子 (Trap, c-Fos, Nfatc1, Ctsk) の発現量を解析したところ、培養表面の構造の違いにおける各遺伝子発現に有意差は認められなかったが、Nfatc1 および CathepsinK の発現は、polystyrene 材質上で培養した場合と比較し、quartz 材質で高いという結果が得られた。このことから、足場材料の材質の違いが、細胞分化能に影響を与える可能性が示唆された。

図 3 TRAP 染色

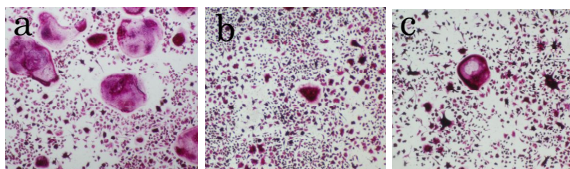
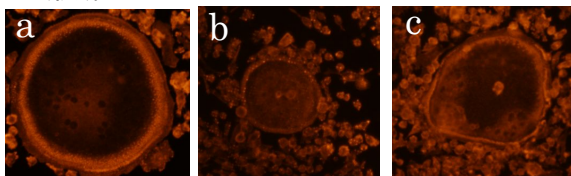


図 4 培養破骨細胞におけるアクチンリングの形成



(2) 微細加工技術を用いて作成した pore/pillar 凹凸構造を有する polystyrene 材質の培養皿での細胞培養実験

プラズマエッチング法を用いた微細加工技術を用い、polystyrene 素材の pore/pillar 凹凸構造を有する培養皿の作成を行った (pore/polystyrene, pillar/polystyrene)。当初、培養皿に直接プレスする事で作成を試みたが、間隙があるため熱と圧力が培養皿に伝わらず、想定したプレスが困難であった。このため、フィルムにプレスを行う事で熱と圧力が直接伝わり型通りのプレスが可能となった。これにより、作成したフィルムのサイズを替えることで様々な形状に対応が可能となった。

この培養皿上で、MC3T3 細胞を骨分化誘導培地を用いて培養を行い、qPCR で骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を調べたところ、normal (平面構造) と比較して pore/polystyrene 培養皿では、ALP の遺伝子発現が上昇していた (図 5)。

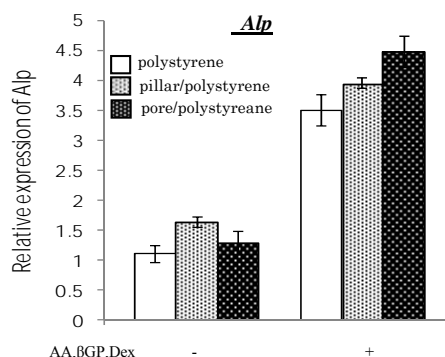


図 5 qPCR による Alp の発現

また、ST2 細胞に 10^{-8} M vitaminD3 を添加し、RNA を回収して Rankl と Opg の遺伝子発現を検討した結果、normal と比較して、pillar/polystyrene で Rankl の発現が、pore/polystyrene で Opg の発現が低下していた。凹凸構造パターンの違いにより、骨芽細胞における破骨細胞形成調節因子 (Rankl, Opg) の発現に差が認められたことから、足場材料の構造の違いが骨代謝関連細胞の分化に影響を与える可能性が示唆された。一方で、quartz を用いた検討 (1-) では、pillar 構造では Rankl の発現が低下し、Opg の発現が上昇していた。材質の違いにより、異なる結果が得られたことから、今後さらなる見当が必要と思われる。

本研究では、quartz と polystyrene の材質の違いにより、骨芽細胞や破骨細胞の分化に関わる遺伝子発現に相違が認められた。また、プラズマエッチング法を用いて、pillar 凸型だけでなく、pore 凹型の培養表面構造を加工することに成功し、

pillar/pore 構造の違いにより、骨芽細胞の分化における遺伝子発現に影響を与えることが明らかになった。

以上から、細胞接着面の表面構造の形状を適正に加工すれば、細胞の挙動や骨形成、骨吸収を制御できる可能性が示唆された。

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](計3件)

1. Yasui Y, Chijimatsu R, Hart DA, Koizumi K, Sugita N, Shimomura K, Myoui A, Yoshikawa H, Nakamura N. Preparation of Scaffold-Free Tissue-Engineered Constructs Derived from Human Synovial Mesenchymal Stem Cells Under Low Oxygen Tension Enhances Their Chondrogenic Differentiation Capacity. *Tissue Eng Part A*. 2016 Mar;22(5-6):490-500.(査読有) doi: 10.1089/ten.tea.2015.0458. Epub 2016 Mar 14.
2. Du D, Sugita N, Liu Z, Moriguchi Y, Nakata K, Myoui A, Yoshikawa H. Repairing Osteochondral Defects of Critical Size Using Multiple Costal Grafts: An Experimental Study. *Cartilage*. 2015 Oct;6(4):241-51. doi: 10.1177/1947603515591628.
3. 本田 博嗣, 名井 陽. 細胞・人工骨複合体移植による骨欠損補填治療. *関節外科* 34(5): 452-459, 2015.05

[学会発表](計11件)

1. Nishiyama K, Ito T, Sugimoto S, Gotoh K, Isobe M, Okamoto M, Myoui A, Yoshikawa H, and Hamaguchi S. Plasma-based Functionalization of Polystyrene Surfaces of Cell Culture Plates, the AVS 63rd International Symposium & Exhibition (Nov. 6-11, 2016, Nashville, TN, USA) PB+BI+PS-MoA11.
2. 名井 陽. 運動器疾患の治療におけるバイオマテリアルの位置づけと今後のニーズ. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016. 2016.11.21. 福岡市.
3. 名井 陽. 治療に活かすために知っておきたい人工骨の基礎知識と高機能化研究の現状. 第 42 回日本骨折治療学会. 骨折. 38Suppl: S79, 2016.07. 東京都.
4. 宮本 諭, 濱本 秀一, 吉田 清志, 岡本 美奈, 奥崎 大介, 後藤 直久, 浜口 智志, 吉川 秀樹, 名井 陽. 多能性幹細胞から分化誘導した骨芽細胞系細胞の特性. 第 15 回日本再生医療学会総会. 2016.3.17~19, O-07-6, 日本再生医療学会雑誌 “再生医療” Vol. 15. Suppl. P-207. 大阪市

5. 森口 悠, 李 大成, 増田 一仁, 浜口 智志, 吉川 秀樹, 名井 陽. ハイドロキシアパタイト人工骨に対する低温プラズマ処理. 第 35 回整形外科バイオマテリアル研究会. 2015.12. 東京都.
6. Myoui A, Fujimoto T, Tamai N, Ezoe S, Shimokawa T, Yoshikawa H. Clinical Research on Safety and Efficacy of Autologous MSC Integrated with Porous Ceramics for Bone Defect Repair after Benign Tumor Removal. 2015 4th TERMIS World Congress. September 8-11, 2015. Boston, MA
7. Miyamoto S, Myoui A, Okuzaki D, Goto N, Hamaguchi S, and Yoshikawa H. Optimization of Culture Conditions for Directing Osteogenesis Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells, in the Poster Abstract Book of the Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR 2015) (24-27 June, 2015. Stockholmsmässan Exhibition and Convention Center, Stockholm, Sweden) F-1307, p. 496.
8. 名井 陽. セラミックス人工骨の基礎と臨床. 第 34 回整形外科バイオマテリアル研究会. 2014.12. 大阪市.
9. Itsuki D, Sugimoto S, Miyamoto S, Myoui A, Yoshikawa H, and Hamaguchi S. Plasma Surface Modification of Cell Culture Plates, The 2nd International Symposium on Non-equilibrium Plasma and Complex-System Sciences (IS-NPCS) (Sept. 30 - Oct. 2, 2014, Ruhr Universität Bochum (RUB), Bochum, Germany).
10. Myoui A. Biological Effect of Plasma Processing on Ceramics Artificial Bone. The 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5). May 18 - 23, 2014. Nara, Japan.
11. Itsuki D, Ito T, Sugimoto S, Moriguchi Y, Miyamoto S, Myoui A, Yoshikawa H, Hamaguchi S. Modification of hydroxyapatite and polystyrene surface for cell culture by low-pressure plasmas, in Book of Abstracts of 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5). May 18 - 23, 2014. Nara, Japan.

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

名井 陽 (MYOUI,Akira)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10263261

(2)研究分担者

岡本 美奈 (OKAMOTO,Mina)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50457008

吉川秀樹 (YOSHIKAWA,Hideki)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60191558

(3)連携研究者

大阪大学・工学部・教授
浜口 智志 (HAMAGUCHI,Satoshi)
研究者番号：60301826