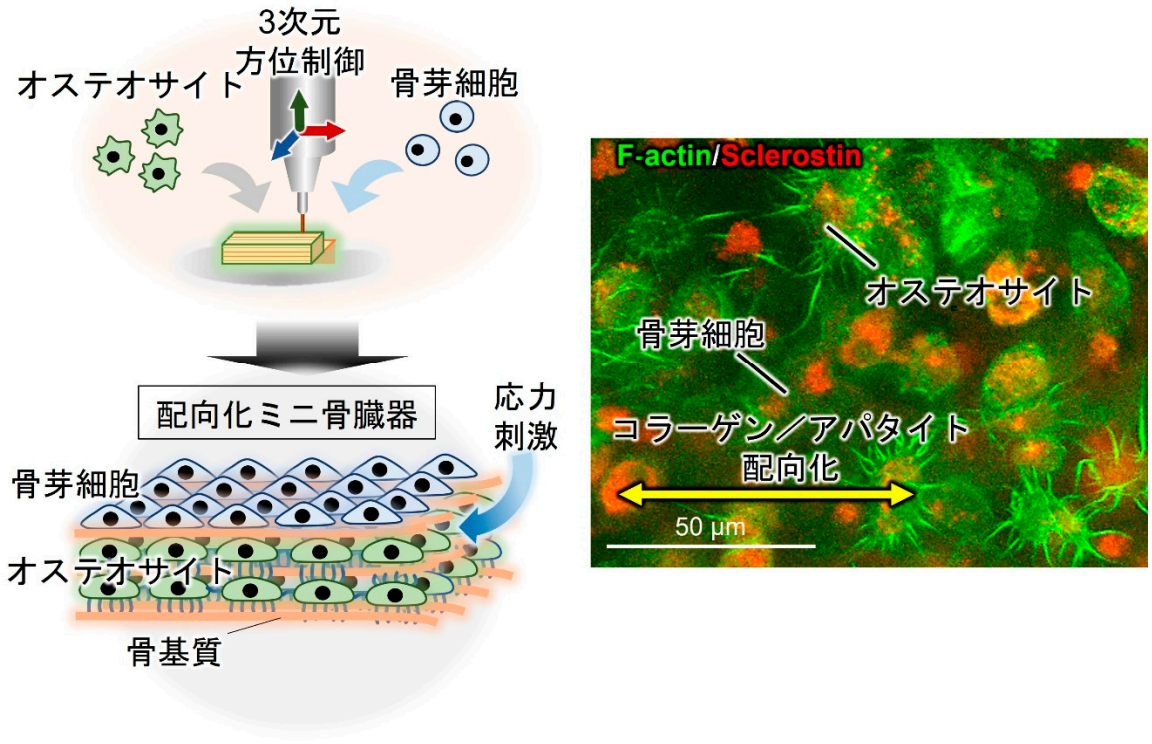
211　バイオプリンティングによる配向化骨誘導材料の創製	松垣　あいら

【目的】バイオプリンティングは細胞外マトリクスタンパク質や細胞そのものの吐出により単一細胞レベルで分子・細胞の配置制御が可能であり、生体内での構造を模擬した機能的な組織・臓器を創製することで、再生医療はじめ生命科学の飛躍的進歩につながると注目される画期的技術である。特に、緻密に制御された異方性微細構造に基づき健全な力学機能発現を可能とする骨組織の再生には、細胞制御に基づく配向化構造の回復が必要不可欠である。骨の配向化構造は、骨中の微小空隙である骨小腔に存在する骨系細胞の一種であるオステオサイトにより制御され、細胞突起構造を介した多細胞ネットワークを構築し、力学的環境の変化に対応した骨配向化構造を構築する。本研究では、バイオプリンティングを駆使した骨系細胞の配列制御に基づき、骨類似配向化構造体を構築するとともに、その制御機構に基づいた骨配向化の生体分子メカニズム解明を目的とする。

【方法】マウス由来初代オステオサイトとコラーゲン配向化の 3 次元プリンティングにより、骨類似の異方性組織を作製した。具体的には、マウス長管骨より逐次的酵素処理により初代オステオサイトを抽出、ノズル吐出の速度および方向性制御により 3 次元配向化コラーゲンとの共培養を行った。オステオサイトの異方性ネットワークは免疫染色法にて可視化、コラーゲン配向性解析には複屈折顕微鏡を用いた。遺伝子発現解析にはリアルタイム RT-PCR により定量解析を行った。流体刺激により、作製した骨類似配向化構造体の応力応答性を解析した。

【結果】コラーゲン基板の分子配向性を制御することで、オステオサイトの細胞体・細胞突起伸展の異方性を制御し、外場刺激（流体流動刺激）に応答して機能する配向化骨類似材料を得た。構造体内部ではオステオサイトが細胞突起を形成し異方性ネットワークを構築し、バイオプリンティングを用いたオステオサイトの 3 次元異方性制御に成功した（図）。さらには流体刺激に応じた細胞突起方位改変の分子機序が明らかになった。本成果は、配向性（同時に骨強度）劣化をもたらす異常状態の骨（骨折時の再生骨、骨粗鬆症・関節リウマチなどの疾患骨、寝たきり等による免荷骨）の配向性向上や維持を可能とする新規骨治療法の創出、医療デバイス開発へとつながることが期待される。

バイオプリンティングによる 3 次元配向化骨の創製



211. バイオプリンティングによる配向化骨誘導材料の創製

松垣　あいら

大阪大学 大学院工学研究科 マテリアル生産科学専攻 生体材料学領域

Key words : バイオプリンティング，オステオサイト，コラーゲン／アパタイト配向化構造，流体刺激

緒　言

骨の「コラーゲン／アパタイトの 3 次元配向性」は構造材料として、従来の骨密度指標以上に骨の力学機能を支配する骨質因子である。これは、コラーゲンおよびアパタイトが、ともに高度な力学異方性を示す構造・機能性材料であることに由来する。コラーゲンは 3 重らせん構造の分子が線維化した高次構造に、アパタイトは六方晶系の結晶構造に由来する力学異方性を発現することから、骨はその配向化微細構造に基づいた力学機能を発揮する［1］。一方で、現存の骨疾患治療・骨研究は骨密度・骨量のみに対応しており、骨本来の機能発現を可能とするためには骨配向性を考慮した本質的な研究が最重要課題である。したがって、最重要骨質因子としての「骨配向性」が生体内でいかに形成されるのか、その生物学的機序の解明、およびその知見に基づく骨代替材料の創製が求められる。

骨の結晶学的異方性は、解剖学的部位に応じて大きく異なり、尺骨や腰椎骨では荷重方向に基づいた一軸的応力負荷に応じて、骨長軸・頭尾軸に沿った優先配向性を示す。一方、下顎骨は咀嚼荷重に応じた 3 次元配向分布を示し、*in vivo* 応力分布と骨配向性の密接な関係性を示唆している。しかしながら、こういった骨配向性の自発的な再構築は困難であり、その再生は骨密度に大幅に遅れて回復する。失われた骨配向性の修復を人為的に誘導する医療デバイス創製が必要不可欠であり、異方化機能発現のための生体材料開発が強く求められる。

とりわけ、多細胞系のはたらきにより巧妙に配向化組織をつくりあげることでその機能調整を果たす骨においては、多種類の細胞を相互に連携させつつ立体構造をくみ上げる「3 次元配向化」が鍵を握る。骨の高次機能は応力や環境ストレスなど外的刺激を起点として、オステオサイト（骨基質中に存在する応力感受細胞）の応答に基づき、他細胞との相互作用により制御される複雑系臓器である。本研究では、バイオプリンティング技術を駆使した単一細胞およびタンパク質の配置制御による配向化骨組織を創製すると同時に、外的刺激負荷を制御することで、骨芽細胞・オステオサイトを含む骨系細胞および骨基質タンパク質を組み合わせた細胞積層化による配向化骨誘導材料の創製を目指す。

方　法

1. バイオプリンティングによる配向化培養

豚皮アテロコラーゲンを原料とし、10×PBS（Phosphate Buffer Saline）中への吐出制御により 3 次元配向化コラーゲン基板を作製した。基板配向性解析には、複屈折顕微鏡システム（WPA-micro ver. 2.4、Photonic Lattice Inc.）を用い、遅軸方向を矢印とカラーマップにて示した。新生マウス頭蓋冠より初代骨芽細胞を、成熟マウス長管骨より初代オステオサイトを、それぞれ逐次酵素処理により抽出した。骨芽細胞は石灰化誘導下で長期培養を行った。得られた細胞は 3 次元配向化コラーゲン基板との積層化培養を行った。

2. 流体流動刺激制御

3 次元配向化コラーゲン基板内オステオサイトを 24 時間静置環境下で培養を行った後、骨臓器培養特殊フローチャンバーによりペリスタポンプを用いて流動培養を行った。オステオサイトの細胞突起への流体せん断応力を見積もるため、Hagen-Poiseuille の式を用いて流体せん断応力を算出した。コラーゲン配向方向に平行・垂直の流動刺激を負荷し、細胞形態、突起伸展の変化を定量解析した。

3. 細胞形態・遺伝子発現解析

オステオサイトの細胞形態・突起形成は Sclerostin 免疫染色、phalloidin 染色を用いて共焦点レーザー顕微鏡（FV1000D-IX81、OLYMPUS）により観察した。Total RNA 抽出後、リアルタイム RT-PCR（StepOne、Applied Biosystems）により接着斑関連遺伝子の発現変化の定量解析を行った。

結果および考察

コラーゲン基板の 3 次元配向化により、骨芽細胞の一方向性配列化を制御した。さらに石灰化誘導により骨基質産生を促すことで、細胞伸展方向に配向化したコラーゲン／アパタイト複合体を得た（図 1a、b）。骨基質配向性は、骨芽細胞伸展方向へと優先配向化するとともに、細胞配列度に相関して変化する［2］。これは、コラーゲン分子配列との相互作用に基づく骨芽細胞の配列化、ひいてはインテグリンを介した基質配向化決定機構に起因する［3］。さらに、3 次元配向化骨基質内部では、配列化骨芽細胞から分化したオステオサイトの規則配列化、突起伸展の異方性をも誘導可能であった（図 1c）。

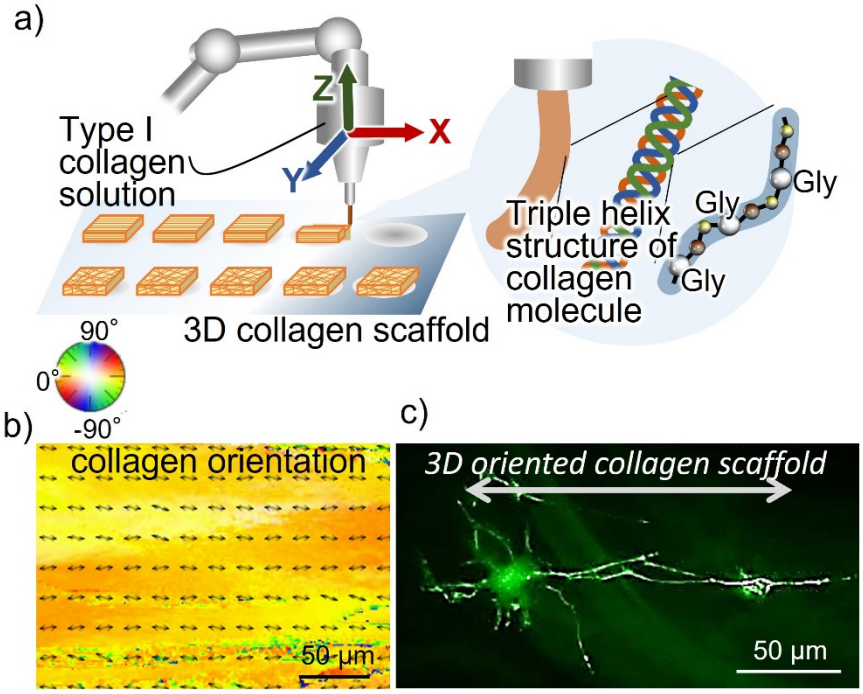


図 1. バイオプリンティングによる 3 次元コラーゲン配向化と細胞制御

a) コラーゲン吐出制御による 3 次元配向化。

b) 作製したコラーゲン基板の複屈折顕微鏡像（矢印；遅軸方位）。

c) 基板コラーゲン配向方向に伸展、突起形成したオステオサイト。

さらには得られた 3 次元配向化構造体に流体刺激を付与（図 2a）すると、接着斑代謝に関わる遺伝子発現の変化、ならびに細胞突起伸展方位の変化が観察された（図 2b）。3 次元配向化骨構造体が流体刺激を感受し、コラーゲン基板との相互作用を介した接着斑のリモデリングにより細胞形態を変化させていることが理解される。実際、骨細管中の流体流動、インテグリンによる骨芽細胞接着および両細胞間での生体分子のやり取りを模擬し静的・動的荷重を負荷すると、オステオサイトは応力場に応じた興味深い規則化応答を示す。オステオサイトへの一定流速の流体刺激負荷は骨芽細胞配列に影響を与えない一方で、流速変化を有する振動流刺激は、骨芽細胞の高配列化を導いた。これは、オステオサイトが衝撃運動などの強度に対応する骨細管中の流体加速度を感受することで、骨芽細胞への指令伝達により骨配向

化を促すことを意味している。加えて、次世代シーケンシング解析により、振動流刺激が骨の異方性を決定する分子を同定している［4］。こういった骨配向化機序は、配向性（同時に骨強度）劣化をもたらす異常状態の骨（骨折時の再生骨、骨粗鬆症・関節リウマチなどの疾患骨、寝たきり等による免荷骨）の配向性向上や維持を可能とする新規骨治療法の創出、医療デバイス開発へとつながることが期待される。

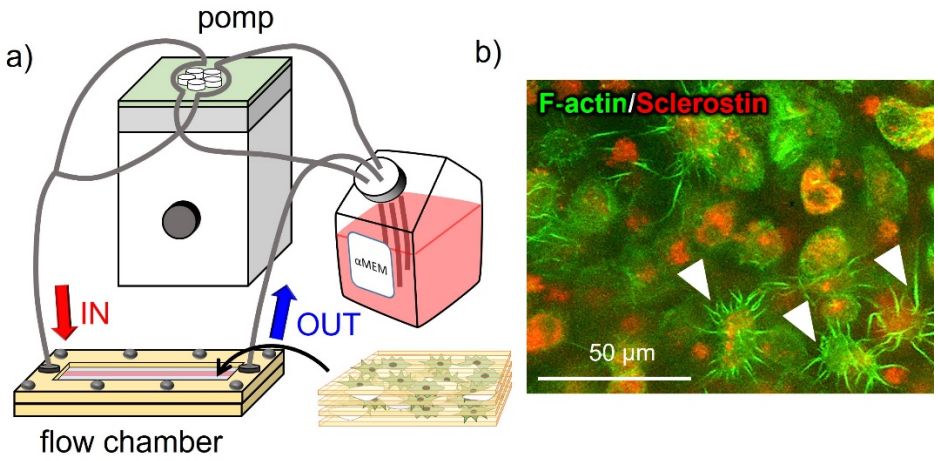


図 2.　3 次元配向化骨構造体への流体刺激負荷とオステオサイト応答性

a)　ペリスタポンプを用いた流動刺激制御。

b)　流体刺激に応答したオステオサイトの細胞突起形成（矢頭：オステオサイト細胞突起）。

謝　辞

本研究は、大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻の中野貴由教授研究室にて実施されました。ここに謝意を表します。

文　献

1)　Ishimoto T, Nakano T, Umakoshi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using recombinant bone morphogenetic protein-2. J Bone Miner Res. 2013 May;28(5):1170-9. doi: 10.1002/jbmr.1825. PMID: 23184575.

2)　Matsugaki A, Isobe Y, Saku T, Nakano T. Quantitative regulation of bone-mimetic, oriented collagen/apatite matrix structure depends on the degree of osteoblast alignment on oriented collagen substrates. J Biomed Mater Res A. 2015 Feb;103(2):489-99. doi: 10.1002/jbm.a.35189. Epub 2014 Apr 25. PMID: 24733774.

3)　Nakanishi Y, Matsugaki A, Kawahara K, Ninomiya T, Sawada H, Nakano T. Unique arrangement of bone matrix orthogonal to osteoblast alignment controlled by Tspan11-mediated focal adhesion assembly. Biomaterials. 2019 Jul;209:103-110. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.04.016. Epub 2019 Apr 16. PMID: 31030082.

4)　Matsuzaka T, Matsugaki A, Nakano T. Control of osteoblast arrangement by osteocyte mechanoresponse through prostaglandin E2 signaling under oscillatory fluid flow stimuli. Biomaterials. 2021 Dec;279:121203. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121203. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34717197.