生体環境適用に向けた 3D プリンティングによる骨細胞制御

3D Printing of Osteocytes for Application in Biological Environment

松垣 あいら・松坂 匡晃・田中健嗣・三浦涼靖・大原秀真 丹羽陽―朗・小笹良輔・Gokcekava Ozkan・中野貴由

丹羽陽一朗・小笹良輔・Gokcekaya Ozkan・中野貴由 Aira MATSUGAKI, Tadaaki MATSUZAKA, Kenji TANAKA, Ryosei MIURA, Shuma OHARA, Yoichiro NIWA, Ryosuke OZASA, Ozkan GOKCEKAYA and Takayoshi NAKANO

生体環境適用に向けた 3D プリンティングによる骨細胞制御

3D Printing of Osteocytes for Application in Biological Environment

松 垣 あいら*・松 坂 匡 晃*・田 中 健 嗣*・三 浦 涼 靖*・大 原 秀 真*

丹 羽 陽一朗*・小 笹 良 輔*・Gokcekaya Ozkan*・中 野 貴 由*

Aira MATSUGAKI, Tadaaki MATSUZAKA, Kenji TANAKA, Ryosei MIURA, Shuma OHARA, Yoichiro NIWA, Ryosuke OZASA, Ozkan GOKCEKAYA and Takayoshi NAKANO

(Received 27 January 2023, Accepted 31 January 2023)

The biological environment maintains vital functions by responding to the surrounding changes inside and outside the body in association with various kinds of substances including nucleic acids and proteins. In addition, dynamic environmental changes, such as pH fluctuations and changes in oxygen concentration due to cellular activities, are regulated by molecular mediators, leading to hierarchical tissue and organ function. In recent years, bio-3D (three-dimensional) printing technology for assembling organs from cells has evolved dramatically. In particular, bone tissue regulates its function by constructing a highly oriented micro-organization of the bone matrix through the action of multicellular systems. The creation of mini bone organs that enable the expression of highly regulated bone function is regulated by unteractions with cells based on the responses of osteocytes (stress-sensitive cells in the bone matrix) to *in vivo* environmental stimuli. The aim of this study is to control cellular functions in the biological environment by controlling the osteocyte arrangement using the bioprinting technique. Drawing living cells at the single-cell level and constructing cell-cell interactions are expected to lead to the elucidation of mechanisms for highly regulated bone functions and also functional artificial organ development.

Key Words: Biological Environment, Bioprinting, Bone Tissue, Protein Patterning, Osteocyte, Intercellular Connection

1. 緒言

生体環境は核酸やタンパク質など多種類の物質が相互作 用しつつ、生体内外の環境変化に応答することで生命機能 を保持している。さらには細胞活動による pH 変動や酸素 濃度の変化など、動的環境変化が分子を媒介して制御され、 多階層的に組織・臓器の機能を導く^{1),2)}。こうした複雑系の 生命システムを考えると、疾患や損傷により失われた生体 機能を復元することは容易ではない。近年、細胞から臓器 を組み上げるバイオ 3D (three-dimensional) プリンティング の技術は格段に進化を遂げている3)。足場材料不要の人工 血管や肝臓構造体の再生医療への応用展開が現実味を帯び るなかで、単に形状を模倣した 3D のみではなく、時間依 存的な機能発現、さらには外的刺激に応答してその機能を 自在に変化可能な 4D 組織制御が強く求められている。特 に、多細胞系のはたらきにより非常に巧妙な配向化組織を 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 ことで、骨の高次機能発現をも可能とするミニ骨臓器の創 製が期待される。しかしながら、その実現は容易ではない。 なぜならば、骨機能は応力や環境ストレスなど生体外刺激 を起点として、骨細胞(骨基質中に存在する応力感受細胞) の応答に基づき、異種細胞との相互作用により制御される 複雑系臓器のためである⁴⁾。特に、健全な力学機能発現の ためには、骨基質が原子レベルから緻密に制御された異方 性微細構造の回復と、それを実現するための細胞制御が必 要不可欠である⁵⁻¹⁰⁾。

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骨細胞により制御され、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¹¹⁾。本研究では、 バイオプリンティングを駆使した骨細胞の配置制御によ り、生体環境で機能する細胞の自在制御を目的とする。骨 複雑系を制御する骨細胞を単一細胞レベルで描画、細胞間 での相互作用を構築することで、3D プリンティングでしか アプローチできない骨機能の高次制御システム解明にもつ ながることが期待される。

2. 実験方法

ピエゾ駆動によるドロップオンデマンド方式のインク ジェットプリンタは、微粒子分散液や、タンパク質等の生 体分子を含む高粘性溶液をも吐出可能な次世代バイオプリ

^{*} 大阪大学大学院工学研究科 マテリアル生産科学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1) Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University (2-1 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0872, Japan)

ンタである (Fig. 1A)。複数のピエゾ制御パラメータ (駆動 波形・1秒当たりの吐出回数・駆動電圧)のコントロール により、吐出量、液滴サイズの制御を行った(WaveBuilder、 クラスターテクノロジー)(Table 1)。細胞膜類似構 造(ホスホリルコリン基)を有し材料表面の超親水化を 制御する MPC (日油株式会社製、2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) によるコーティングを施し、50℃にて1 時間乾燥し細胞非接着基板を作製した。その後、直径15 μmのノズルを用い、駆動電圧 8.6 V にてタンパク質のパ ターニング制御を行った。ハイスピードカメラによる撮像 から、均一な単一液滴の吐出を確認し(Fig. 1B)、パター ン化基板を作製した。骨細胞制御のために、中心間隔200 μm×100 μmの周期的微小ドットパターニングを作製した。 C57BL6Jマウス(17週齡)の大腿骨、脛骨、上腕骨より、 コラーゲン分解酵素 (Collagenase)、エチレンジアミン四酢 酸 (EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid) による逐次的酵 素処理法により、初代骨細胞を抽出した。パターン化基板 上にて、37℃、5% CO2下にて骨細胞の培養を行い、免疫 染色により細胞形態・突起伸展を解析した。

実験結果と考察

骨基質中に埋入し生存する骨細胞は、一般的には抽出し 生体外で培養することは困難である。本研究では、コラゲ ナーゼ/EDTA処理による骨基質溶解を反復することで、 骨基質内部から骨細胞を生きた状態で単離し培養を行っ た^{12),13)}。これにより、骨片より遊走し、細胞突起を豊富に 有する骨細胞を得た(Fig. 2)。MPC(2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)塗布による超親水化表面により均一な 細胞非接着表面を作製した。細胞非接着面への細胞外マト リクスタンパク質のパターニングによる選択的細胞接着制



Fig.1 (A) Schematic illustration of piezoelectric injectors. Printing of proteins can be controlled by regulating the ejection parameters involving voltage waveform and impulse. (B) High-speed camera observation of droplet deposition. Arrows indicate the single droplet deposited from the nozzle.

 Table 1
 Parameters for controlling Fibronectin dot-patterning droplet deposition.

Frequency [Hz]	Voltage [V]	Speed [mm/s]	Number
1000	10	20	50

御に取り組んだ¹⁴⁾。高分子糖タンパク質である Fibronectin は骨をはじめ結合組織の基質に多量に存在し細胞の増 殖・分化や遊走を制御する。細胞スケールの微小領域での Fibronectin 吐出制御は、電流・電圧制御したインクジェッ ト方式により緻密に制御を行った。細胞サイズに類する微 小ドットパターニングが設計通り導入され(Fig. 3A)、液 滴吐出条件に応じてパターニングサイズ・間隔の制御が可 能であった。骨細胞はパターン化基板に応答して選択的な 接着様式を示し、バイオプリンタを用いた骨細胞の配置制 御を達成した(Fig. 3B)。これは、骨細胞表面のインテグ リンが Fibronectin パターニングを感受し、選択的に接着す ることで特異的な細胞突起伸展をもたらしたためと考えら れる¹⁵⁾。さらに培養期間の延長により、骨細胞の成熟化は 細胞間接着分子 Connexin 43 の発現を促し、正常な骨機能 に必要な細胞間ネットワークを構築した(Fig. 4)。骨細胞 は基板パターニングに従って一方向へと伸展し選択的に接 着、細胞体に直交方向へと細胞突起を伸展し、異方性微細 構造を有する生体骨に極めて類似した細胞形態をも誘導可 能であった。

骨細胞の異方性ネットワークは骨の配向化微細構造と密 接に関わり、応力に基づく骨機能化に必要不可欠な要素で ある¹⁶⁾。とりわけ、応力刺激に応じた骨細胞からの可溶性 シグナルは骨芽細胞へと伝達され、骨形成における結晶学



Fig. 2 Primary osteocytes isolation from mmature bones. Arrows indicate the migrating cells from bone fragments. Scale bar: 50 μm.



Fig. 3 (A) Micro-dot patterning of Fibronectin. (B) F-actin images of osteocytes on the micro-dot patterning. Osteocytes selectively adhere to the Fibronectin patterning. Scale bar: 100µm.



Fig. 4 Combined patterning of line and dot depopsition. Osteocytes dendrites elongation and Cx-43-positive intercellular connection (arrowheads). Scale bar: 50 μm.



Fig. 5 Schematic illustration of 3D printing of biological components in biological environment.

的異方性を制御する¹⁷⁾。こういった骨配向化機序は、配向 性と同時に骨強度劣化をもたらす再生骨、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¹⁸⁻²⁰⁾。

生体は応力をはじめ外的環境変化(酸素濃度、温度や気 圧等)への暴露により動的に機能適応する。バイオプリン タ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・組織工学の飛躍的進歩 につながると注目される画期的技術である(Fig. 5)。3Dプ リンタによる細胞制御は、物理・化学的刺激に応答した 4D 細胞機能を誘導するための足場として極めて有効であり、 単一細胞レベルでの細胞操作やタンパク質の配置制御をも 可能にする。さらには金属 3D プリンタとの融合により力 学的にも生体適合性の高い材料創製が実現可能である^{21),} ²²⁾。加えて、骨以外の臓器も特定方位への配向性や微細構 造に基づく機能発現機構を有することから、将来的には生 体機能化のためのすべての基質材料に適用可能な普遍的原 理を導くことが期待される。

4. 結論

生体環境は、タンパク質や核酸、脂質など多種類の分子 が相互作用しながら複雑な微小環境を形成している。さら に生体外環境への細胞応答は動的・可逆的なシグナル伝達 を介して生体機能を制御している。こういった複雑な生体 環境で臓器として機能する生体代替材料には、個々の細胞 機能を人為的に制御しさらには組織・臓器として機能する デバイス開発が求められる。生体環境での3Dプリンティ ングの活用は、分子・細胞の同時制御、さらには外場によ る細胞応答を活用した生体模擬デバイス創製へとつなが り、創薬や医療デバイス開発への展開が大いに期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は、日本学術振興会科学研 究費補助金 JP21H05196、JP20H003080、JP18H05254、JST CREST JPMJCR22L5、JPMJCR2194の支援により実施され た。ここに謝意を示します。

参 考 文 献

- S. Fathollahipour, PS. Patil, ND. Leipzig: "Oxygen Regulation in Development: Lessons from Embryogenesis towards Tissue Engineering", Cells Tissues Organs., 205 (2018), 350-371.
- RA. Timothy: "Extracellular pH Regulates Bone Cell Function", The Journal of Nutrition, 138 (2008), 415S-418S.
- A. Swarnima, S. Shreya, BV. Krishna, P. Aniruddha, B. Ananya, B. Subhadip, "Current Developments in 3D Bioprinting for Tissue and Organ Regeneration-A Review", Frontiers in Mechanical Engineering, 6 (2020), 1-10.
- 4) LF. Bonewald: "The amazing osteocyte", Journal of Bone and Mineral Research, 26 (2011), 229-238.
- 5) T. Nakano, K. Kaibara, Y. Tabata, N. Nagata, S. Enomoto, E. Marukawa et al.: "Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by microbeam x-ray diffractometer system", Bone, 31 (2002), 479-487.
- 6) T. Nakano, K. Kaibara, T. Ishimoto, Y. Tabata, Y. Umakoshi: "Biological apatite (BAp) crystallographic orientation and texture as a new index for assessing the microstructure and function of bone regenerated by tissue engineering", Bone, 51 (2012), 741-747.
- T. Ishimoto, T. Nakano, Y. Umakoshi, M. Yamamoto, Y. Tabata: "Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using recombinant bone morphogenetic protein-2", Journal of Bone and Mineral Research, 28 (2013), 1170-1179.
- A. Matsugaki, G, Aramoto, T. Nakano: "The alignment of MC3T3-E1 osteoblasts on steps of slip traces introduced by dislocation motion", Biomaterials, 33 (2012), 7327-7335.
- A. Matsugaki, N. Fujiwara, T. Nakano: "Continuous cyclic stretch induces osteoblast alignment and formation of anisotropic collagen fiber matrix", Acta Biomaterialia, 9 (2013), 7227-7235.
- 10) A. Matsugaki, Y. Isobe, T. Saku, T. Nakano: "Quantitative regulation of bone-mimetic, oriented collagen/apatite matrix structure depends on the degree of osteoblast alignment on oriented collagen substrates", Journal of Biomedical Materials Research: Part A, 103 (2015), 489-499.
- 11) J. Wang, T. Ishimoto, T. Nakano: "Unloading-induced degradation of the anisotropic arrangement of collagen/apatite in rat femurs",

Calcified Tissue International, 100 (2017), 87-97.

- 12) A. Matsugaki, D. Yamazaki, T. Nakano: "Selective patterning of netrin-1 as a novel guiding cue for anisotropic dendrogenesis in osteocytes", Materials Science and Engineering: C, 108, (2020), 110391.
- 13) AR. Stern, MM. Stern, ME. Van Dyke, K. Jähn, M. Prideaux, L.F. Bonewald: "Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice", Biotechniques, 52 (2012) 361-373.
- T. Goda, K. Ishihara, Y. Miyahara: "Critical update on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer science", Journal of Applied Polymer Science, 132 (2015), 41766.
- 15) N. Batra, S. Burra, AJ. Siller-Jackson, S. Gu, X. Xia, GF. Weber, D. DeSimone, LF. Bonewald, EM. Lafer, E. Sprague, MA. Schwartz, JX. Jiang: "Mechanical stress-activated integrin $\alpha 5\beta$ 1 induces opening of connexin 43 hemichannels", Proceedings of National Academy of Science U S A., 28 (2012), 3359-64.
- 16) T. Ishimoto, K. Kawahara, A. Matsugaki, H. Kamioka, T. Nakano: "Quantitative Evaluation of Osteocyte Morphology and Bone Anisotropic Extracellular Matrix in Rat Femur,", Calcified Tissue International, 109 (2021), 434-444
- 17) T. Matsuzaka, A. Matsugaki, T. Nakano: "Control of osteoblast arrangement by osteocyte mechanoresponse through prostaglandin E2 signaling under oscillatory fluid flow stimuli", Biomaterials, 279, (2021), 121203; 1-10.
- 18) R. Ozasa, A. Matsugak, T. Ishimot, S.. Kamura, H. Yoshida, M.

Magi, Y. Matsumoto, K. Sakuraba, K. Fujimura, H. Miyahara, T. Nakano: "Bone fragility via degradation of bone quality featured by collagen/apatite micro-arrangement in human rheumatic arthritis", Bone, 155, (2022), 116261.

- 19) A. Sekita, A. Matsugaki, T. Nakano: "Disruption of collagen/ apatite alignment impairs bone mechanical function in osteoblastic metastasis induced by prostate cancer", Bone, 97 (2017), 83-93.
- 20) R. Ozasa, T. Ishimoto, S. Miyabe, J. Hashimoto, M. Hirao, H.Yoshikawa, T. Nakano: "Osteoporosis changes collagen/apatite orientation and Young's modulus in vertebral cortical bone of rat", Calcified Tissue International, 10 (2018), 449-460.
- 21) A. Matsugaki, T. Matsuzaka, A. Murakami, P. Wang, T. Nakano: "Three-dimensional printing of anisotropic bone mimetic structure with controlled fluid flow stimuli for osteocytes, Flow orientation determines the elongation of dendrites", International Journal of Bioprinting, 6 (2020), 293.
- 22) O. Gokcekaya, T. Ishimoto, Y. Nishikawa, YS. Kim, A. Matsugaki, R. Ozasa, M. Weinmann, C. Schnitter, M. Stenzel, HS. Kim, Y. Miyabayashi, T. Nakano: "Novel single crystalline-like nonequiatomic TiZrHfNbTaMo bio-high entropy alloy (BioHEA) developed by laser powder bed fusion", Materials Research Letters, 11 (2023), 274-280.

代表者メールアドレス

松垣あいら matsugaki@mat.eng.osaka-u.ac.jp