

## 最新のトピックス

## 異分野融合を活かした特色あるバイオマテリアル研究を目指して

信州大学医学部生体適合システム学教室

馬 闖, 上田勝也, 泉谷 惇, 羽二生久夫

## I はじめに

我々のラボは修士課程の総合理工学研究科生命医学専攻も担当している事から、大学院生は保健学科の検査、PT、OTの卒業生のみならず、工学部の卒業生までが所属している。このラボ内異分野交流環境において、「バイオマテリアル」をキーワードに大学院生が各自のテーマを持った上で学び合い、協力し合って研究を行っている。このトピックではそれらの研究を紹介する。

## II カーボンナノマテリアルの生体応用

我々のラボではカーボン素材のカーボンナノホーン(CNH)が薬剤送達システム(DDS)のキャリアに有用と考え、研究を積み重ねてきた。CNHは長さ40~50 nm、直径2~5 nm程度の先端が閉じたチューブ形状をしており、通常、数千本が放射状に寄り集まって直径100 nm程度の球形集合体を形成している。この素材は表面の疎水性が非常に高く、表面修飾の容易性に優れている。

CNHの安全性評価においてカーボンナノチューブ(CNT)と共に、分散性に着目し、マクロファージによる細胞応答性を評価した<sup>1)</sup>。その結果、マテリアルの分散状態により細胞毒性や細胞取り込み、免疫応答が異なる事が明らかになった。特に高分散のCNH、CNTは同程度の分散状態において細胞取り込み様式に違いがある事が判明した。更にCNHは細胞内のリソソームに集積することが明らかになった。これらはナノマテリアルの形状の違いを細胞が認識していると考えられる。

また、カーボンマテリアルは骨への生体親和性に優れているため、我々はがんの骨転移に対する治療にCNHを応用できないかと考えた。骨転移環境下では、破骨細胞(OC)の働きが活性化され、骨吸収に伴う疼痛や骨脆弱性の増加、溶解された骨基質成分により

がん細胞が増殖し進展する。そこでOCをターゲットとして、CNHにビスホスホネートの1種であるイバンドロネート(IBM)をナノサイズリン酸カルシウム(CaP)を介して複合させたナノ複合体を作製した<sup>2)</sup>。そのナノ複合体を暴露した結果、IBM単体よりも非常に効率よくOCの増殖を抑制することが明らかになった。メカニズムとしては、細胞内に取り込まれたナノ複合体がOC内のリソソームに集積し、弱酸性環境になるにつれてCaPが溶解し、IBMが放出されOCの細胞死を誘発したと考えられる。

今後はがん骨転移モデルでの動物実験(*in vivo*)を行い、有効性の確認をしていく予定である。このようにカーボンナノマテリアルは、その形状特性や表面修飾により、がん骨転移などの骨疾患を始めとした様々な疾患に対して、DDSなどの新規治療法の開発に応用できる可能性がある。

## III ナノフェライトの骨分野への応用

現在、フェライト( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )は磁気センサー、顔料、MRI造影剤及び温熱療法で応用されており、生命医学分野において既に研究が進んでいる<sup>3)</sup>。一般的にナノフェライト粒子(NFPs)は耐食性・耐酸性等の化学的特性が安定である一方、粒径サイズによって磁気特性は変化し、粒径サイズが30 nm以下であれば超常磁性を示す。超常磁性とはNFPsに外部磁界を印加すると磁化方向が一旦磁界方向に揃い全体に磁化を持つが、外部磁界を取り除くと熱擾乱により磁化方向がランダムに回転し、全体の磁化がゼロとなる特性である。

我々はこの特性に着目し、細胞の3D構築に応用できるのではないかと考えた。その概念図を図1に示す。ゼロ磁化状態のNFPsは培養培地中で非凝集状態を示すが、これを細胞に取り込ませた後、外部磁界を印加すると細胞内のNFPsが磁化される。この状態で不均一な外部磁界を与える事によって磁化された

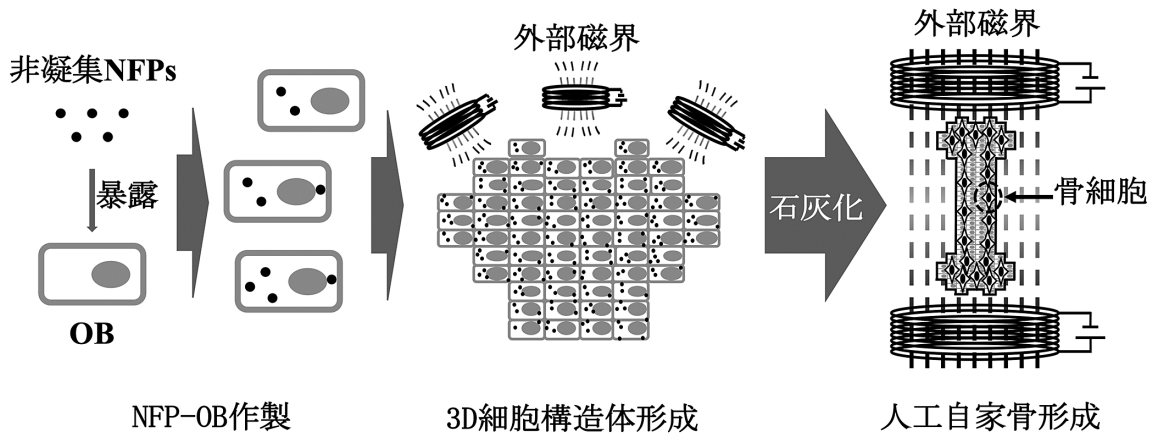


図1 人工自家骨作製の概念図

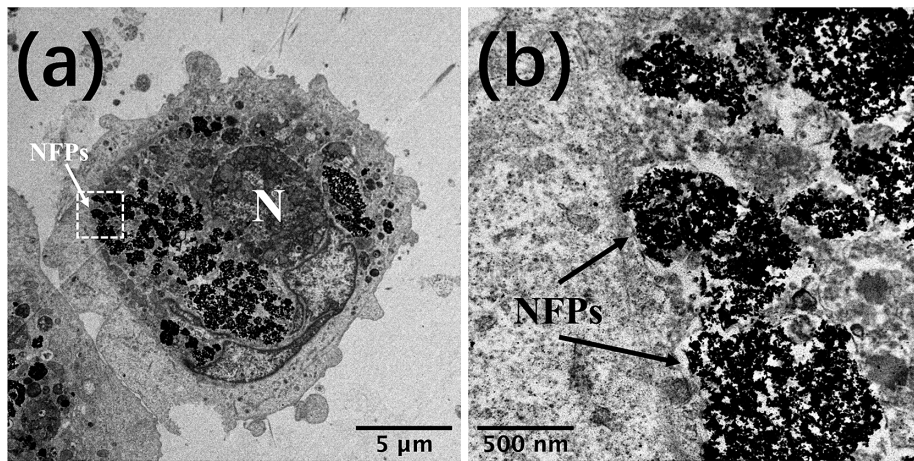


図2 NFPs取り込みのTEM像

(a) NFPsを取り込んだOBの観察結果, (b) 取り込まれたNFPsの拡大図

NFPsは取り込んだ細胞の位置を直接細胞に触れることなく誘導できるので、自由自在に3D細胞構造体を形成できるはずである。そして、この3D構築した骨芽細胞（OB）に石灰化刺激を与える事によって培養細胞（*in vitro*）によるテーラーメイドの人工自家骨の作製が可能になると考えた。

これまでの実験で図2に示すように自作した約20 nmの粒径サイズのNFPsは期待通りにCNHなどと同様にOBに大量に取り込まれるにもかかわらず、細胞毒性はほとんど示さない事が明らかとなっている。さらに、石灰化機能性評価と磁界による細胞の移動も確認できており、NFPsを取り込ませたOBによる3D造形のための基盤データの収集が完了している。

今後は第二段階として、導出したNFPsの最適暴露条件を用い、外部磁界印加によるNFP-OBの3D造形を確認した上で、その状態での石灰化の可否や機械的特性の検討を行っていく予定である。そして、最

終的には*in vivo*での骨再生への有効性を検討し、骨欠損を修復するためのテーラーメイドな人工自家骨の開発を目指す。

#### IV *in vitro* 骨形成評価法の標準化

骨組織を対象とするバイオマテリアルや新規治療薬の開発とその実用化に向けて、実際の生体内の骨形成の機能にどのような影響があるかを、動物を使って評価することは最重要項目の一つである。その一方で、*in vivo*実験の規制は厳格化されており、必要最小限に留めることが求められている。したがって、研究開発の初期段階で実施される*in vitro*実験で*in vivo*実験を代替できることが好ましい。

ところが、骨芽系細胞を使用したマテリアルなどの骨形成機能評価において、*in vivo*実験の結果と一致しない事例や再現性が得られない事例が報告される<sup>4)</sup>。我々は、この根本原因の一つと考えられる既存の*in*

*in vitro* 骨形成評価に潜む問題点を骨形成研究全般に長く用いられている MC3T3-E1細胞を使って報告した<sup>5)</sup>。この実験では、異なる多数の論文報告がある細胞培地条件、すなわち培地の種類、鮮度、添加物の差異だけで評価の基準となる細胞増殖、OBの分化状態、アルカリホスファターゼ活性及び骨石灰化能が大きく異なることが明らかとなった。このことは、同じマテリアルや薬剤成分を評価してもその条件の違いから評価が異なってしまう危険性があることを示唆している。そのため、生体内の骨形成状態を適切に反映した *in vitro* 条件を明らかにし、骨形成機能評価法の標準化を目指したい。

現在、骨形成の重要な指標と考えられる骨石灰化に

着目し、その特異マーカーを見つけ出すことを通じて、*in vitro* 骨形成機能標準評価法の開発に結び付けようと試みている。本研究から導き出される新規知見は、OB及び骨形成に関連する基礎研究全般に対して大いに役立つと確信している。

## V おわりに

ここに紹介した以外にも生体由来物質を用いたアミロイドタンパク質をターゲットとした治療薬の開発等が大学院生主導で進められている。若い異分野出身の大学院生こそが生み出す新たな研究を今後もアシストしていきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Kuroda C, Ueda K, Haniu H, et al: Different aggregation and shape characteristics of carbon materials affect biological responses in RAW264 cells. *Int J Nanomedicine* 13: 6079-6088, 2018
- 2) Nakamura M, Ueda K, Yamamoto Y, et al: Ibandronate-Loaded Carbon Nanohorns Fabricated Using Calcium Phosphates as Mediators and Their Effects on Macrophages and Osteoclasts. *ACS Appl Mater Interfaces* 13: 3701-3712, 2021
- 3) El-Dek SI, Ali MA, El-Zanaty SM, Ahmed SE: Comparative investigations on ferrite nanocomposites for magnetic hyperthermia applications. *J Magn Magn Mater* 458: 147-155, 2018
- 4) Kohli N, Ho S, Brown SJ, et al: Bone remodelling *in vitro*: Where are we headed? -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials *in vitro*. *Bone* 110: 38-46, 2018
- 5) Izumiya M, Haniu M, Ueda K, et al: Evaluation of MC3T3-E1 Cell Osteogenesis in Different Cell Culture Media. *Int J Mol Sci* 22: 7752, 2021