

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：34408  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25870927  
研究課題名(和文) ソフトセラミック・プロセッシング技術を応用した新規骨模倣性細胞伸縮デバイスの開発

研究課題名(英文) Fabrication of stretchable bone mimic membrane using soft ceramics processing technique

研究代表者  
坂井 加奈 (SAKAI, Kana)  
大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30632096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：「歯や骨に接着する細胞が応力を感じ取るメカニズム」の解析は、骨欠損・歯根吸収など歯科領域に生じる病態解明に道を開きうる。しかし、その特異的研究ツールは乏しく、研究遂行の大きな妨げとなっている。本研究は、高分子膜上に硬組織成分同様のナノリン酸カルシウム(Nano-CaP)を強固に固定したNano-CaP/高分子膜を新たに創製し、骨関連細胞・セメント芽細胞の新たな力学的刺激受容メカニズム解明を促す基盤ツールの創製を目的とした。その結果、伸展刺激を加えてもNano-CaPが脱離しないNano-CaP結合型高分子膜のプロトタイプの新規創製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Elucidating the mechanosensing mechanism of adherent cells on teeth and bone opens a way for diseases in dentistry. However, there is still room for discovering the specific tool to evaluate the mechanism, hindering the further advance of researches. In this project, we tried to fabricate a new cell culture device constructed of the nano-sized calcium phosphate (CaP) and stretchable polymeric membrane. As a result, we could fabricate the prototype of the stretchable membrane on which nano-sized CaP robustly attached.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リン酸カルシウム メカノバイオロジー 骨 歯 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

矯正治療に伴う人為的歯根吸収のメカニズムは未だ完全に解明されておらず、生来歯根の短い患者などは治療の選択肢が制限されている。もし、人為的歯根吸収を誘導する歯周組織の細胞応答機序を *In vitro* で「簡便かつ正確に」解明出来る画期的な基盤研究ツールが開発されれば、新規メカニズム解明や治療法の開発に繋がり、治療を享受出来る患者数の増大に大きく寄与できると考えられる。

歯根吸収は、セメント芽細胞の細胞死などに伴う歯根の露出を起源とし、破歯細胞が歯根近傍に出現する事によって進む事が広く提唱されている(参照: 歯の移動の臨床バイオメカニクス)。この破歯細胞の誘導には、破骨細胞同様 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)やオステオポンチン(OPN)等のタンパクが強く関与している事が示唆され、同タンパクを歯根膜内に放出する歯根膜細胞やセメント芽細胞、骨芽細胞、骨細胞の力学的刺激応答性が広く研究されてきた(Tyrovola et al., *J Oral Sci* 2008)。その中でも骨組織内に内包されている骨細胞は、破骨細胞誘導を骨芽細胞に比べ優位に促す報告が近年相次いでなされるものの、破歯細胞との関連性は未だ不明な点が多い。その大きな理由として、下記の2点が推測される。(1) 骨に加わる微視的な応力が巨視的レベルで骨に生じる歪みより優位に大きいという知見(Nicolella et al., *J Biomech*, 2006)が無視され、他の歯周組織細胞よりも伸展・圧縮刺激の影響が着目されてこなかった、(2) 既存の細胞伸縮ツールは、Fibronectin などの接着分子を高分子膜に簡易的に塗布するなど硬組織が模倣されておらず(Hsu et al., *Plos One*, 2010)、正確な解明が進まなかった。仮に、硬組織に隣接する細胞が力学的刺激を受ける機序を正確に再現しうる新たな細胞伸縮デバイスが開発されれば、骨細胞の機能解析はもとより、セメント芽細胞の解析などへの応用にも道を開き、歯科矯正治療の進歩に大きく貢献する事が予想される。

## 2. 研究の目的

本研究は、ソフトセラミックスプロセッシング技術を応用し、伸縮性に優れた高分子膜上に硬組織成分同様のナノリン酸カルシウム(Nano-CaP)を強固に固定した Nano-CaP/高分子膜を新たに創製し、骨関連細胞・セメント芽細胞の新たな力学的刺激受容メカニズム解明を促す基盤ツールの創生を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Nano-CaP の合成と物性評価

コーティングに用いた CaP の結晶粒子径と凝集具合は、剥離のし易さや、力学的刺激受容時の粒子間で起こる破壊頻度に直結すると予想される。従って、本コーティングには、分散状態の微小 CaP スラリーを合成し、単層コーティングを行う事が必須となる。同手法にむけ、ナノ粒子コーティング法を応用した。Nano-CaP は合成後、X 線回折(XRD)を用いて結晶学的評価を行い、粒径分布は走査型電子顕微鏡(SEM)で確認した。

### (2) 力学的強度の異なる高分子膜の作製および物性評価

Nano-CaP をコートする高分子膜には、伸縮性に優れたシリコン膜とポリジメチルシロキサン(PDMS)薄膜を用いた。PDMS 膜は、定法に従い合成し、シリコン膜は購入し用いた。細胞は足場の硬さを認識し、自らの振る舞い(分化等)を決定する事が明らかになっている。この点を考慮し、PDMS は、合成時に、キャタリストと、モノマーの混合比(w/w)を 1:10 から前後させ、強度の異なる複数の膜を作製し、細胞評価に用いる事とした。PDMS の弾性率は原子間力顕微鏡(AFM)にて評価した。

### (3) Nano-CaP/高分子膜の作製

CaP は未修飾の PDMS と結合性に乏しい事から膜表面にカルボキシル基を持つ高分子の修飾を行う。高分子修飾前の前処理には、コロナ放電処理を用い、膜表面が活性化後、真空状態にて高分子のグラフト重合を行う。洗浄を繰り返した後、CaP 分散液に調製した膜を浸漬し、(1)で作製した Nano-CaP を単層付着させる。Nano-CaP の付着量は CaP 分散液濃度を調節する事で変化させた。得られた膜は、XRD、X 線電子分光法、SEM にて物性評価を行った。

### (4) Nano-CaP の剥離試験と物性評価

(3)で得られた Nano-CaP/高分子膜は最終的に当大学中央歯学研究所に設置済の細胞伸縮装置(ストレックス社製の自動伸展装置 STB-140)に装着し、細胞の力学応答評価に用いることとした。細胞培養に先んじて、周期的な力学的刺激を付与し、Nano-CaP の膜に対する結合安定性を評価した。細胞実験で加える予定のひずみ・周期、1-10%、1-2 Hz で刺激後、SEM 画像と NIH Image J を用いた画像解析により CaP の脱離具合を評価した。

### (5) 細胞生着評価

(4)で Nano-CaP が安定して結合している事が確認された膜を用い、同様な力学的刺激を加えた際の細胞挙動を免疫染色または光

学顕微鏡を用いて評価し細胞培養実験に使用可能な最適膜を確定した。細胞としては、ラット骨芽細胞様細胞株 (UMR106) とラット骨髄由来前破骨細胞を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) Nano-CaP の合成と物性評価

コーティングに用いられる CaP は、分散 Nano-CaP 粒子合成法に基づいて合成した。その結果、分散性に優れつつ、100 nm 前後の粒径で高度に結晶性を持った Nano-CaP が得られた。

### (2) Nano-CaP/シリコン膜の作製

シリコン膜を用いた Nano-CaP 結合型シリコン膜の合成を行った。伸縮性に優れ、かつ、Nano-CaP がシリコン膜表面に吸着している Nano-CaP 結合型シリコン膜の試作に成功した (図 1)

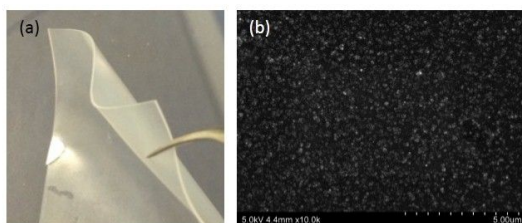


図 1 : Nano-CaP 結合型シリコン膜。(a)マクロ所見、(b) SEM 像

これらの Nano-CaP 結合型シリコン膜においては、Nano-CaP がシリコン膜の表面 30% 程度を被覆していた。

### (3) Nano-CaP の脱離試験と物性評価

Nano-CaP 結合型シリコン膜に対して、空气中、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中において、10% ひずみ、1 Hz の条件下で最長 3 日間伸展刺激を加えた。伸展刺激の前後で SEM 画像を取得し、Nano-CaP の脱離度合いを評価した。その結果、空気中および、PBS 中においても、Nano-CaP は脱落せずにシリコン膜に強固に付着していることが確認出来た。これらの結果は、ソフトセラミックス法を応用して Nano-CaP を吸着させたシリコン膜は、伸展刺激に耐える細胞培養デバイスとなりうる可能性を示唆する。しかしながら、用いたシリコン膜では、ナノフィラーを含有していたことから、光透過性に課題を残し (図 2) 光学顕微鏡を用いた細胞形状の観察が困難であった。従って、(2) の条件を参考に、光透過性に優れた PDMS 膜を用いた Nano-CaP 結合型 PDMS 膜の作製に取り組んだ。

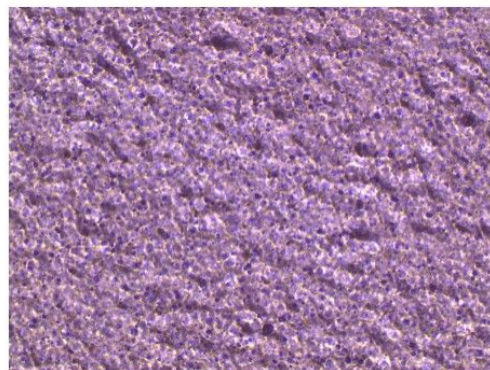


図 2 : Nano-CaP 結合型シリコン膜の光学顕微鏡像。細胞の識別が困難。

### (4) 力学的強度の異なる PDMS 膜の作製および物性評価

キャタリスト/モノマー比 (w/w) の異なる複数の PDMS を試作した。キャタリスト/モノマー比、0.00125 から 1.25 まで変化させ様々なシートの作製を試みた。その結果、キャタリスト/モノマー比が 0.00625 以下のサンプルでは、硬化せずにハンドリングに課題を残すことが明らかとなった。また、AFM による強度測定の結果、キャタリスト/モノマー比が増加するに従い、強度が高くなることを確認した。

### (5) Nano-CaP 結合型 PDMS 膜の作製

(4) で作製した PDMS 膜に対して、コロナ放電や、グラフト重合および、CaP 吸着の条件を多様に变化させ、Nano-CaP 型 PDMS 膜のプロトタイプを作製条件を探索した。その結果、Nano-CaP が吸着している、Nano-CaP 結合型 PDMS 膜の試作に成功した (図 3)。

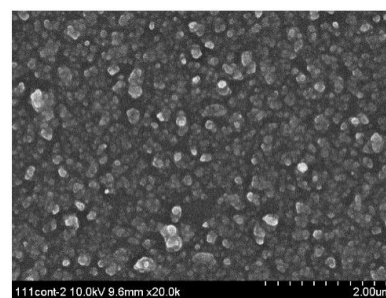
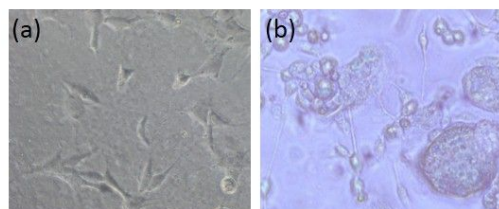


図 3 : Nano-CaP 型 PDMS 膜の SEM 像

### (6) 細胞生着評価

(5) で作製した、Nano-CaP 結合型 PDMS 膜を用いて、UMR106 および破骨細胞の培養を試みた。その結果、仮に Nano-CaP が PDMS 膜上

に吸着している場合でも、前処理のコロナ放電、グラフト条件、CaP 吸着処理の条件によっては、細胞が接着しない膜が多く存在する事が明らかとなった。一方、上記の条件を最適化する事により、UMR106、破骨細胞が安定して生着する条件が存在することを合わせて見つけ出した（図4）。



**図4**：Nano - CaP 結合型 PDMS 上での細胞培養像。(a) UMR106、(b) ラット骨髄由来前破骨細胞を分化させた破骨細胞

更に同条件では、伸展刺激をかけた後においても細胞は脱離せず、伸展刺激に応じた細胞形態を取ることを明らかにした。

以上をまとめると、最適条件下で調整された Nano-CaP/PDMS 膜は、細胞を接着させると共に、伸展刺激を細胞に伝えうる新たな培養デバイスとして有用である可能性が示唆された。本研究は、大阪歯科大学中央歯学研究所・本田義知講師、近畿大学生物理工学部・古菌勉教授の協力を得て進めた研究である。現在、本期間に得た知見を基に、更なる細胞生物学的知見の取得にむけ準備を進めている。

## 5 . 主な発表論文等

なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者  
坂井 加奈 (SAKAI Kana)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：30632096