

平成 31 年 2 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25463047

研究課題名(和文) 三次元構造再生を目指した歯周組織再生用マイクロ・ナノパターン化シートの開発

研究課題名(英文) Development of micro/nano-patterned sheet for periodontal tissue regeneration aimed at 3d tissue construction

研究代表者

赤坂 司 (Akasaka, Tsukasa)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：00360917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織再生を将来目標として、ナノインプリント法を用いコラーゲンやアパタイトでのマイクロ・ナノパターン化を検討した。ゼラチンのパターン化では、熱や架橋剤の利用によりマイクロ・ナノレベルのパターン化が達成できた。アパタイトセメントや歯科用コンポジットレジンでも同様に材料種やモールドの選択によりパターン化が可能であった。パターン上での細胞挙動変化を検討した結果、細胞付着・増殖・配向性に大きく影響した。今後、歯根膜再生シートへの利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Preparation of micro/nano-patterned sheets was investigated by nanoimprinting with collagen or apatite materials for periodontal tissue regeneration. Micro/nano patterned gelation can be obtained by thermal crosslinking or crosslinking with genipin. The apatite or composite resin patterns were obtained by using appropriate materials and molds. As a result of cell assay, the patterns largely influenced cell adhesion, proliferation, and alignment.

研究分野：歯科理工学

キーワード：マイクロ・ナノパターン 再生 歯根膜線維芽細胞 ナノインプリント 骨芽細胞様細胞 ゼラチン アパタイト コンポジットレジン 歯周組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者の多くは歯周病を患い、歯肉が炎症し歯周組織が侵されるため、最終的には歯を失う。しかしながら、シャープ繊維(垂直コラーゲン線維)などを持った高度に制御された本来の3D構造を持つ歯周組織再生にまでは至っていないのが現状である。

(2) マイクロ・ナノ構造の作製技術が普及し、再生医療をはじめとするバイオ分野は、今後、集中的な競争分野となることが予想される。工業的材料によるパターンとの細胞応答性は一部報告があるが、現在のところ、コラーゲンやアパタイトによるパターン化シートは報告されていない。

2. 研究の目的

将来目標は、歯肉のずれ落ちを治療するための歯周組織再生を簡単に行える人工歯根膜シートを開発することである。歯の周囲には、歯肉のずれ落ちを防いでいるセメント質や歯根膜が存在するが、いずれも高度に制御された3D構造により機能発現を行っている。しかしながら、現在までに3D構造まで考慮に入れた再生医療材料の開発は行われていない。そこで本研究では、ナノインプリント法を用いコラーゲンやアパタイトでマイクロ・ナノ構造を持つ歯周組織再生用シートを作製し、各パターンとの細胞応答性を検討する。将来的には、本来の姿である歯周組織の3D構造をも再生することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 熱架橋ゼラチンの作製：マイクロからナノレベルのグループ・ピラー・ホール形状を持つG-PETモールドを作製した。モールド上に10%ゼラチン溶液(from porcine skin; Sigma-Aldrich)を適量添加し、24時間乾燥させた。モールドから剥がして得られたゼラチンシートを、200℃で2時間熱架橋することにより、熱架橋型ゼラチンシートを得た。

(2) ゲニピン架橋ゼラチンの作製：20%ゼラチン溶液を作製し、最終濃度1 mM~20 mMとなるようゲニピンを添加した。十分攪拌後、混合物の適量を培養用ディッシュに滴下した。次に、シリコンモールドを被せ、37℃で3日間反応させた。その後、乾燥し、ゲニピン架橋型ゼラチンを得た。また補助剤としてプロテオグリカンの添加効果も検討した。

(3) パターン化ゼラチン上での細胞挙動評価：骨芽細胞様細胞 Saos-2 を用い細胞培養挙動を評価した。DMEM培地に10%FBSを添加し、37℃、5%CO₂存在下で培養した。細胞毒性評価には、CellStrain (Dojindo) を使用した。蛍光免疫染色には、anti-vinculin Alexa-fluor488 と Acti-stain555 fluorescent phalloidin を用いた。細胞接着(1h)および細胞増殖(7d)評価のためには、

培養後、グルタル固定・ギムザ染色を行い、光学顕微鏡下で細胞数をカウントした。

(4) パターン化アパタイトの作製：-TCP(太平化学工業)と0.6Mリン酸を所定比で混合し、パターン化シリコンモールドでプレスした。その後、26℃で3日間硬化させ、パターン化アパタイトを得た。次に、アパタイト系歯科材料として Tooth desensitizer (Teethmate® Desensitizer) および Apatite cavity lining cement (New Apatite Liner Type II) を選び、メーカー指定の手順に従い、成分を混合した。その後、混合物をシリコンモールドでプレスし、26℃で3日間硬化させ、パターン化アパタイトを得た。

(5) パターン化コンポジットレジンの作製：フロアブルコンポジットレジンをCOPフィルムモールド上に滴下し、ガラス表面に対し圧接した。その後、可視光照射器で20秒間硬化させることにより、容易にパターン化コンポジットレジンを得ることができた。次に、歯肉線維芽細胞(HGF)を用い、上記と同様な方法にて培養を行い、細胞接着・配向性を評価した。

(6) パターン化プラスチックと歯根膜線維芽細胞の反応および破骨細胞への分化：レーザー描画では、レジストに対するレーザー強度、速度、パターン形状の種類等の検討を行った。さらに作製したパターンを、ポリスチレンに転写し、その上でヒト歯根膜線維芽細胞の集合状態の制御を検討した。また破骨細胞への誘導では、RAW264.7マクロファージを用い、パターン上にてRANKL存在下、-MEM培地中にて分化誘導を検討した。

4. 研究成果

(1) 熱架橋ゼラチンシートの作製：パターン化コラーゲンシートの作製は、室温ナノインプリントにより成形し、熱架橋を施すことにより、マイクロ・ナノパターンを容易に作製できることが分かった。豚皮膚由来のゼラチンを原料として、パターンモールドを用いて室温ナノインプリントすると、直径および高さが500 nm~2 μmレベルまでのパターン形状を再現できた。架橋処理条件を詳細に検討した結果、200℃・2hの熱架橋したゼラチンが培養期間中にて形状を保持できた。熱架橋の利点として架橋剤の毒性の懸念が二個とが挙げられ、強度およびパターン再現性を合わせ持つ作製法の発見により、以降の細胞培養の検討が可能となった。

(2) ゲニピン架橋ゼラチンの作製：天然物由来の架橋剤ゲニピンを用い、架橋剤濃度を高く反応時間を延長することにより、ゼラチン強度の向上が達成できた(図1)。ゲニピン濃度20 mM・37℃・3日間の架橋にて、培養14日の培養でも形状が保持できた。グルー

ブ・ホール・ピラーの 100 nm ~ 50 μm サイズまで作製したところ、いずれも十分なパターン形状を再現でき、強度は改良の余地があるが細胞接着・増殖試験に使用可能であった。一方でプロテオグリカンの添加は膨潤の防止に有効であったが、詳細な検討が今後必要である。さらに、架橋剤の濃度 (1 mM ~ 20 mM) によりパターン化コラーゲンの生分解性のコントロールが可能であることがも分かった。以上の安定なパターン化ゼラチンの作製の達成は、歯および歯周組織と類似組成の「歯の表面に貼るためにシート」に近づいたと思われる。

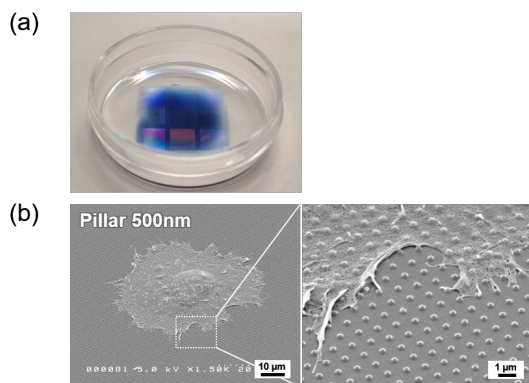
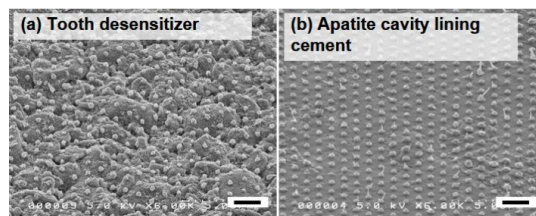


図1 (a) ゲニピン架橋型ゼラチンディッシュ、(b) パターン化ゼラチン (直径 500 nm ピラー) 上で培養した Saos-2 細胞の SEM 像 (培養 7 日)

(3) パターン化ゼラチン上での細胞挙動評価：ゲニピン添加型ゼラチンの細胞毒性を Live/dead viability assay にて骨芽細胞様細胞 Saos-2 を用いて検討したところ、通常の細胞培養ディッシュと同等の高い細胞親和性を示した。このことよりゼラチンパターンに対するゲニピン架橋は、低毒性な架橋法であることが分かった。さらにゼラチンパターンへの細胞接着部位の観察を免疫染色により行ったところ、パターン形状に依存しパターン上面やその縁に接着斑を介して接着していることが示された。このことはパターン種により接着度合が大きく影響を受けていることを示している。Saos-2 細胞を用いた細胞接着試験 (1h) の結果、パターン化により平面よりも細胞付着数が上昇することが分かった。しかしながら形状やサイズによる違いは観察されなかった。細胞増殖試験 (7d) の結果では、多くの場合でパターン化により細胞数が増加し、形状やサイズにより大きな違いが観察された。大まかにはピラーやグループで接着数が高く、各グループ内では 1 μm 直径が高い傾向を示した。特に高さ 2 μm のピラーで高い接着数が観察された。一方、100 nm 直径のピラー上では接着数は減少した。以上より、ゼラチンをパターン化することにより、細胞接着や細胞増殖がコントロールできることが示された。

(4) アパタイトシートの作製：-TCP と酸の混合比および硬化時間、モールドの材質を詳



細に検討した結果、適度な粉液比で 3 日間シリコンモールドを用いて硬化させると、パターン化アパタイトが得られた。パターンの溶解性検討の結果、初期に酸を放出するものの十分な洗浄により細胞培養に使用可能であることが分かった。次に各種歯科材料のアパタイトセメントを用いてパターン化を検討した結果、シリコンモールドと Tooth desensitizer や Apatite cavity lining cement の組み合わせで 500 nm 直径のピラーまで作製できることが判明した。

図2 アパタイト系歯科材料によるパターン化アパタイトの SEM 像 (a) Tooth desensitizer (Teethmate® Desensitizer)、(b) Apatite cavity lining cement (New Apatite Liner Type II)

(5) パターン化コンポジットレジン作製：歯の表面への応用を考え、コンポジットレジンによるパターン化を検討した。その結果、フロアブルコンポジットレジンにて、容易に 500nm レベルのパターン化が達成できた。特にフロアブルコンポジットレジンでは曲面を持つ歯の表面のパターニングに向いており、1分以内でパターン化できる簡便な操作性であった。パターン上での細胞接着の結果では、パターンのサイズや形状により細胞接着数が変化し、パターン化による付着数の向上が観察された。特にホール形状の直径 500 nm パターンで高い値を示した。一方、初期細胞剥離試験では、より大きな 2 μm サイズのパターンで剥離抵抗性を示した。これらは生体内でのパターン設計の際に有用となる。またグループ上にて線維芽細胞を培養したところ、細胞の配向と細胞が産出する細胞外マトリックスの配向が観察された。これはパターン設計により細胞配向や細胞外マトリックスの配向をコントロールできることを示している。

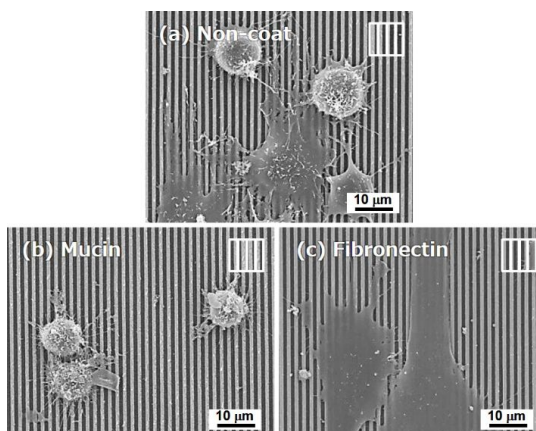


図3 パターン化コンポジットレジジン上で培養した歯肉線維芽細胞のSEM像 (a)未処理、(b)ムチン処理、(c)フィブロネクチン処理

表面吸着による影響を検討した結果、未処理では細胞配向が観察されないのに対し、フィブロネクチン処理では高い配向性が認められた。一方、ムチン処理した表面では細胞自体が伸展しにくかった。さらに、パターンによる分化誘導への影響に関しては、アルカリフォスファターゼ活性を染色法にて検討しているが、パターン間で大きな違いは見られなかった。今後、材料による影響等、詳細に検討する必要がある。

(6) パターン化プラスチック(レーザー描画での歯根膜線維芽細胞と破骨細胞分化): レーザー描画によるパターン化条件の検討では、描画線の幅やピッチを変化させ、細胞の速度応答を観察した結果、細胞の十分な速度応答を得るためには、3 μ m程度の線幅でより狭いピッチの方が有利であることが判明した。さらに現在機構は不明であるが、パターンの形状を変化させることにより、特定形状パターンにて培養細胞の局所的な濃度をコントロールできることが分かった。今後、細胞濃度が上昇する機構を詳細検討する予定である。次に、分化する細胞としてRAW264.7細胞を用い、マイクロ・ナノパターン上でのRANKL刺激による破骨細胞への分化誘導を検討した。その結果、分化誘導の度合いは、パターンの材質、種類、サイズに大きく依存することが分かった。プラスチック材料としてG-PETを用い、平面と500nmホール形状にて分化誘導を行うと、500nmホール上で破骨細胞への誘導が促進する傾向があった(但し有意差なし)。このことはマイクロ・ナノパターンの設計により破骨細胞の機能をコントロールできる可能性を示唆しており、また人工歯根膜に対する重要なファクターの発見の可能性を示している。

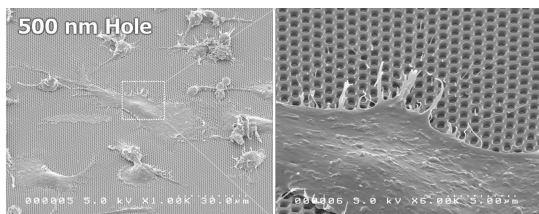


図4 500 nm ホール上のRAW264.7から誘導した破骨細胞の走査型電子顕微鏡像

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9件)

J. Honma, T. Akasaka, M. Tamai, Y. Yoshimura, T. Taira, H. Miyaji, S.

Yamagata, Y. Sato, Y. Yoshida, Fusion of RAW 264.7 macrophage cells on micro-scale fine pillar patterns, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 査読有, 13(4), 1123-1131 (2018). <http://www.chalcogen.ro/index.php/journals/digest-journal-of-nanomaterials-and-biostructures>

Reika Makita, Tsukasa Akasaka, Seiichi Tamagawa, Yasuhiro Yoshida, Saori Miyata, Hirofumi Miyaji, and Tsutomu Sugaya, Preparation of micro/nano-patterned gelatins crosslinked with genipin, Beilstein Journal of Nanotechnology, 査読有, 9, 1735-1754 (2018). DOI: 10.3762/bjnano.9.165

R. Takata, T. Akasaka, M. Tamai, Y. Yoshimura, T. Taira, H. Miyaji, Y. Tagawa, S. Yamagata, J. Iida, Y. Yoshida, Effect of a nano-scale fine hole pattern on the differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 査読有, 13(2), 451-458 (2018). <http://www.chalcogen.ro/index.php/journals/digest-journal-of-nanomaterials-and-biostructures>

Naoyuki Kaga, Tsukasa Akasaka, Rumi Horiuchi, Yasuhiro Yoshida, Atsuro Yokoyama, Cell adhesion and alignment of human osteoblasts and human gingival fibroblasts on micro/nano-grooved gelatin sheet, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 査読有, 12(2), 431-440 (2017). <http://www.chalcogen.ro/index.php/journals/digest-journal-of-nanomaterials-and-biostructures>

Naoyuki Kaga, Rumi Horiuchi, Atsuro Yokoyama, Tsukasa Akasaka, Yasuhiro Yoshida, Effect of Micro/Nano-Patterned Surfaces on Cell Adhesion of Ca9-22 cells, e-Journal of Surface Science and Nanotechnology, 査読有, 15, 1-6 (2017). DOI: 10.1380/ejsnt.2017.1

Akasaka, T., Miyaji, H., Imamura, T., Kaga, N., Yokoyama, A., Yoshida, Y., Submicro-patterning of curable dental materials by molding methods: A screening trial, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 査読有, 12, 281-292 (2017).

<http://www.chalcogen.ro/index.php/journals/digest-journal-of-nanomaterials-and-biostructures>

Akasaka T, Miyaji H, Kaga N, Yokoyama A, Abe A, Yoshida Y, Adhesion of Osteoblast-like cells (Saos-2) on micro-/submicro-patterned apatite scaffold's fabricated with apatite cement paste., Nano Biomedicine, 査読有, 8, 112-122 (2016). DOI: 10.11344/nano.8.112

Kaga N, Akasaka T, Horiuchi R, Yoshida Y, Yokoyama A, Adhesion of Human Osteoblast-like Cells (Saos-2 cells) on Micro / nanopatterned Structures Sputter-Coated with Titanium, Nano Biomedicine, 査読有, 8, 74-82 (2016). DOI: 10.11344/nano.8.74

Akasaka T, Imamura T, Miyaji H, Kaga N, Yokoyama A, Yoshida Y, Effect of Protein Adsorption on Alignment of Human Gingival Fibroblasts on Grooved Composite Resin, e-Journal of Surface Science and Nanotechnology, 査読有, 14, 225-230 (2016). DOI: 10.1380/ejsnt.2016.225

[学会発表](計20件)

赤坂 司, キャピラリーフォースによるマイクロピラー自己組織化による培養担体の調製, 第71回日本歯科理工学会学術講演会, 2018年

赤坂 司, ゲニピン架橋によるマイクロ・ナノパターン化ゼラチンの作製, 第70回日本歯科理工学会学術講演会, 2017年

赤坂 司, 硬化可能な歯科材料によるマイクロ・ナノパターンニング, 第69回日本歯科理工学会学術講演会, 2017年

赤坂 司, マイクロパターンによる歯根膜線維芽細胞の細胞集合, 日本バイオマテリアル学会 北海道ブロック第2回研究会, 2017年

赤坂 司, 硬化可能な歯科材料によるマイクロ・ナノパターンニング, 日本歯科理工学会 第67回 春期学術講演会, 2017.

赤坂 司, マイクロパターンによる歯根膜線維芽細胞の細胞集合, 日本歯科理工学会 第69回 春期, 学術講演, 2016.

Tsukasa Akasaka, The effect of protein adsorption on cell alignment of human gingival fibroblast on the grooved

composite resins, AsiaNano 2016 (国際学会), 2016.

Akasaka T, Cell aggregation of periodontal ligament fibroblasts controlled by micro-patterns, 国際歯科材料会議 2016 第68回 秋期学術講演会 (国際学会), 2016.

赤坂 司, マイクロ・ナノパターン化材料に対する細胞接着挙動, 第66回日本歯科理工学会学術講演会, 2015.

赤坂 司, 歯の上でナノテク? マイクロ・ナノパターンの歯科治療応用へ向けて, 第1回北海道ナノバイオ研究会シンポジウム, 2015.

赤坂 司, 歯表面での3D微細構造構築によるバイオミメティック次世代歯科治療へ向けて, 第31回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」, 2015.

赤坂 司, マイクロパターンにおける歯根膜線維芽細胞の細胞配向および移動, 第67回日本歯科理工学会学術講演会, 2015.

赤坂 司, マイクロパターンによる歯根膜線維芽細胞の細胞集合, 第68回日本歯科理工学会学術講演会, 2015

赤坂 司, 歯の表面で微細構造をつくる: 歯科治療応用を目指した微細構造への細胞接着の応用, 日本機械学会北海道支部バイオメカニクス懇話会(招待講演), 2015.

赤坂 司, マイクロ・ナノパターン化バイオマテリアルの作製, 平成25年度歯科理工学会北海道・東北支部 夏季セミナー, 2015.

赤坂 司, マイクロ・ナノパターン化コンポジットレジンへの細胞接着, 第63回日本歯科理工学会, 2014.

赤坂 司, マイクロ・ナノパターン化コンポジットレジンへの細胞接着に対する細胞種の影響, 第64回日本歯科理工学会, 2014.

赤坂 司, 再生医療に繋がるバイオ系マイクロ・ナノパターンの作製と細胞応答, 文部科学省ナノテクプラットフォームH26地域セミナー(招待講演), 2014.

Tsukasa Akasaka, Cell adhesion of osteoblast-like cells on micro/nano-patterned apatite scaffolds, Seventh international conference on

science and technology of advanced ceramics, 2013.

赤坂 司, マイクロ・ナノパターン化したアパタイト担体への細胞接着, 第62回日本歯科理工学会, 2013.

〔その他〕

ホームページ等

研究内容 (赤坂 司)

<https://www.den.hokudai.ac.jp/seitaizairyou/akasaka/>

北海道大学 研究者総覧

<https://researchers.general.hokudai.ac.jp/profile/ja.pGAj0CcQow4x8PHcQnHJzQ==.html>

Researchmap

<https://researchmap.jp/read0103543/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤坂 司 (AKASAKA TSUKASA)

北海道大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号: 00360917