

令和元年6月3日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21499

研究課題名（和文）伸縮可能な硬組織模倣シートを応用した歯周組織細胞間ネットワーク解析デバイスの開発

研究課題名（英文）Development of stretchable sheet mimicking hard tissue for elucidating cellular network in periodontal tissue

研究代表者

坂井 加奈（SAKAI, Kana）

大阪歯科大学・歯学部・講師（非常勤）

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）：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。本研究では、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）を強固に固定した高分子膜を基盤に、力学的刺激可能な歯周組織構造を模倣した2次元細胞培養デバイスの創製を試みた。同膜上での多様な細胞種の細胞接着・伸展挙動を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シリコンやポリジメチルシロキサン等の高分子膜は細胞接着性が乏しい。本助成期間では、ナノリン酸カルシウム（Nano-CaP）を強固に固定したNano-CaP/高分子膜の完成、同高分子膜に対する多様な細胞の接着挙動、伸展刺激後の細胞挙動解析に成功した。同結果は、歯周組織に存在する細胞集団の力学刺激受容ネットワークの解明を加速させる新たなデバイスの提供に繋がると予想される。さらに、至適矯正力や、病的歯根吸収のメカニズムの解明につながり、歯科矯正治療の進歩への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The detailed mechanisms of root resorption under orthodontic treatment is poorly elucidated, thereby hampering the choice of treatment methods from patients. If the novel cell culture tools capable of the facile and accurate measurements on cellular response are discovered, the indeterminate mechanism might be elucidated, leading to raise the quality life of patients. In the present study, we tried to fabricate the stretchable polydimethylsiloxane membrane attaching tightly the nano-sized calcium phosphates. The various cells could attach to the membrane more than that on PDMS alone; this stretchable membrane was applicable to confer the cyclic stretch stimuli for cells.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：細胞培養デバイス

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。

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ことが広く提唱されている。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ている。従って、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。しかしながら、応力受容時の、これらの細胞間の情報伝達ネットワークに目を向けると未だ解明の余地を多く残す。その大きな理由として、次の2点が推測される。(1) 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構造が模倣されておらず、硬組織に存在する細胞が直接的に応力を受けるメカニズムの正確な解明が進まなかった。(2)(1)が未開拓ゆえに、「硬組織のセメント質・骨」と「軟組織の歯根膜」からなる歯周組織類似の3層構造を持ちつつ力学刺激の付加が同時に行えるデバイスの開発が進んでこなかった。仮に、前述課題を克服し、簡易的に歯周組織が模倣されており、応力が付加された細胞群の解析が容易に可能な培養デバイスが開発されれば、歯周組織に存在する細胞集団の力学刺激受容ネットワークの解明を加速させる。これは、至適矯正力や、病的歯根吸収のメカニズムの解明などに繋がり、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、応募者等が独自開発を進める硬組織模倣シート(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)を応用し、力学的刺激可能な「セメント質・歯根膜・骨」構造を模倣した2次元細胞培養デバイスの創製を目的とする。

3. 研究の方法

3-1 Nano-CaP と高分子膜の合成と物性評価

硬組織模倣シートにコーティングする CaP の結晶粒子径と凝集具合は、CaP の剥離のし易さや、力学的刺激を与えた際に粒子間で起こる破壊に直結する。この課題には岡田らが開発したナノ粒子コーティング法(Okada, et al, *J Mater Sci*, 2007)を応用し対処した。CaP は合成後、結晶構造を X 線回折(XRD)およびフーリエ変換型赤外分光光度計(FTR)を用いて評価した。粒径分布は走査型電子顕微鏡(SEM)にて確認した。Nano-CaP をコートする高分子膜には、伸縮性に優れたポリジメチルシロキサン(PDMS)薄膜を作製して用いた(Koschwanetz et al, *Plos one*, 2009)。足場の硬さは、細胞の振る舞い(分化、増殖、成長等)を変化させることが知られている(Discher et al, *Science*, 2005)。この点を考慮し、PDMS 合成時にモノマーと、キャタリストの混合比(w/w)を変化させ、強度の異なる複数の膜を作製し、その物性および細胞挙動を評価した。PDMS の弾性率は原子間力顕微鏡(AFM)にて評価した。

3-2 硬組織模倣シート(Nano-CaP/高分子膜)の作製

一般的に、CaP を単純に PDMS にコーティングしても結合は弱い。従って、PDMS 膜表面にカルボキシル基を持つポリアクリル酸(PAA)の修飾を行った。PAA 修飾前の前処理には、コロナ放電処理を行い、膜表面を活性化した後、真空状態にて PAA のグラフト重合を行った。洗浄を繰り返し余剰の PAA を除去後、調製した PDMS 膜を Nano-CaP 分散液に浸漬し、3-1 で作製した Nano-CaP を付着させた。Nano-CaP の付着量は細胞接着性に影響を与える。しがたがって、CaP 分散液濃度や浸漬時間を調節した。得られた膜は、XRD、X 線光電子分光法、SEM にて物性評価を行った。

3-3 硬組織・軟組織模倣シート設置アダプタの改良

申請者等はすでに硬組織・軟組織模倣シートを設置するアダプタの試作に成功していたが、ハンドリング等に課題を残していた。より安定性の高い実験を行う目的で、既存のチャンバーに Nano-CaP シートを結合させた新たなチャンバーの作製を試みた。

3-4 Nano-CaP 結合 PDMS シート上での細胞培養

歯周組織モデルを構築するためには、歯周組織に存在しうる多種類の細胞が接着できることが求められる。これらの予備的検討として細胞接着性を評価した。骨関連細胞としては、ラット骨芽細胞株 (UMR106) およびラット破骨細胞を用いた。間葉系幹細胞としてヒト脂肪由来間葉系幹細胞(hADSC)を、歯根膜細胞への予備的検討としてマウス線維芽細胞 (L929 細胞) を用いた。

3-5 細胞への伸展刺激

細胞伸展デバイスとして応用するためには、伸展刺激付加後も Nano-CaP が脱落せずに、なおかつ高い細胞接着性を具備する必要性を持つ。同シートを結合したチャンバーをストレックス社製 STB-140 装置に設置し、周期的な力学的刺激を付与し、細胞の接着動向、形状変化を評価した。培養条件は、周期、1-10%、0-1 Hz (Nagayama, et al, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012) を基準に刺激後、各細胞を蛍光染色にて確認した。

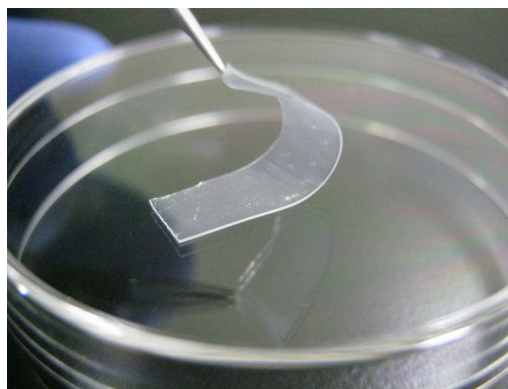
4. 研究成果

4-1 Nano-CaP と高分子膜の合成と物性評価

上記の合成法に従い、分散性の高い焼結 Nano-CaP 粒子を合成した。得られた CaP を XRD にて評価したところ、ヒドロキシアパタイトに帰属するピークが確認された。また、SEM 画像を観察したところ、各粒子は約 100-200 nm の大きさであった。PDMS のモノマーとカタリストの混合比を変化させた多種類の PDMS シートを作製したところ、混合比を変えても PDMS は 110 度付近の接触角を示し、プラズマ処理後には 10 度以下の接触角を示すなどぬれ性に大きな違いは認められなかった。一方、両材料の弾性率には大きな違いが認められた。

4-2 硬組織模倣シート (Nano-CaP/高分子膜) の作製

4-1 で得た PDMS を用いて、Nano-CaP 結合 PDMS 膜の合成を行った。コロナ放電時間、グラフト重合時間、水洗時間等を変化させた様々な条件下で Nano-CaP/PDMS 膜の合成に成功した。一定の最適条件下において作製した膜では細胞の接着が得られたが、多くの条件下で作製された膜上では細胞の接着が認められなかった。これらの結果から、PAA 結合に向けた前処理の条件がその後の細胞接着挙動を大きく影響することがわかった。得られた Nano-CaP 結合 PDMS 膜は図右の様に自由な変形が可能である。



4-3 硬組織・軟組織模倣シート設置アダプタの改良

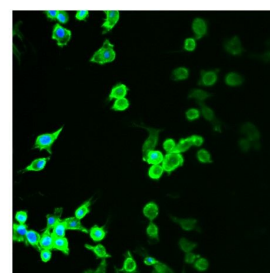
シリコンチャンバーに Nano-CaP 結合 PDMS 膜を化学的に結合させた新たな培養チャンバーの作製を試みた。その結果、安定して細胞培養がおこなえる環境が構築された。

4-4 Nano-CaP 結合 PDMS 膜上での細胞培養

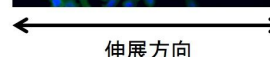
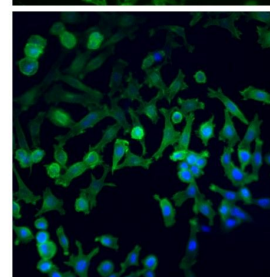
条件が最適化された Nano-CaP 結合 PDMS 膜上に 3-4 に記載した各種細胞を播種したところ、PDMS 単独、プラズマ照射がなされた PDMS に比べ優れた細胞接着数の増加が認められた。また同高分子膜上において、伸展刺激を加えたところ、細胞の伸展および、接着面積の増大が確認された。(図右)

以上の様に、Nano-CaP 結合 PDMS 膜上での種々の細胞の培養および、これらの細胞への伸展刺激の付与に成功した。本研究は、大阪歯科大学中央歯学研究所本田義知准教授、近畿大学生物理工学部古菌勉教授との共同研究である。本期間で得られた知見を基に、細胞間ネットワークの解明に向け準備を進めているところである。

伸展刺激なし



伸展刺激あり



5 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：本田 義知

ローマ字氏名：(HONDA, Yoshitomo)

(2)研究協力者

研究協力者氏名：古菌 勉

ローマ字氏名：(FURUZONO, Tsutomu)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。