

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06285・19K21374

研究課題名(和文) 生体材料の三次元的表面構造の違いが間葉幹細胞の分化に与えるメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cell response on three-dimensional surface structure

研究代表者

加我 公行 (Kaga, Naoyuki)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：50824083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ・ナノ構造が細胞に与える影響の検索を行った。ナノインプリント法を用いることで、パターン化チタンシート及びPLGAシートを作製することに成功した。異なるマイクロ・ナノパターンの表面上で骨芽細胞、上皮細胞が異なる細胞応答を示した。今後、このパターンが細胞種の違いに与える影響を利用することで、再生医療へのさらなる可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノインプリント法を利用することで、異なるマイクロ・ナノパターンを付与した生体材料の作製法を可能とした。これにより安価で用意に生体材料への表面性状を可能とした。作製されたマイクロ・ナノパターンを付与した生体材料で培養した細胞は、パターンの形状で異なる細胞応答を示した。本研究成果は、種々の目的に適応し多様な分野に応用可能な生体材料の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was investigated the effect of micro/nano pattern for cells. Our nanoimprint method can make possible in producing patterned titanium sheet and PLGA sheet. Osteoblasts and epithelial cells showed different cellular responses on the surface of different micro/nano patterns. In the future, further potential for regenerative medicine is expected by utilizing the effect of this pattern on cell type differences.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：マイクロ・ナノパターン ナノインプリント 骨芽細胞 上皮細胞 再生医療 チタン PLGA

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

異なるナノパターンがなぜ細胞の定着/分化/機能に影響を与えるのかは未知であり、その分子生物学的メカニズムの解明はこれからの課題である。生体材料の構造学的表面性状が細胞の定着/分化/機能に与える影響を明らかにすることは、新しい生体工学材料を使った予知性の高い組織/臓器再生術にとって極めて重要と考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、異なるナノパターンの表面性状をもつ生体材料が細胞の定着/分化/機能を調節するメカニズムを解明することにある。生体材料のナノパターン表面性状が細胞機能を調節するメカニズムの一端が明らかとなれば、予知性の高い組織再生術を可能にする生体工学材料のデザインが可能になると考えられる。なによりも、細胞足場の表面性状が接着を介して細胞の分化に与える影響を解明することは、細胞生物学のさらなる理解に大きく貢献する。

3. 研究の方法

(1) パターン化チタンシートの作製

熱ナノインプリントを用いて、グループ、ピラー形状を持つポリカーボネートのレプリカモールドを作製した。モールド表面にチタンのスパッタコーティングを行い、パターン化チタンシートの作製を行った。

(2) パターンシートの表面観察

得られたパターン化チタンシートを走査型電子顕微鏡 (SEM) およびレーザー顕微鏡 (Keyence) に表面観察を行った。

(3) パターン化チタンシート上での細胞挙動

骨芽細胞様細胞 Saos-2 とヒト歯肉上皮系細胞 Ca9-22 を用いて細胞挙動を評価した。10% FBS 含有 DMEM 培地にて、37℃, 5%CO₂ 存在下にて培養した。1 時間, 24 時間, 5 日後の細胞接着数を評価した。細胞数の計測は、培養後にグルタルアル固定・ギムザ染色を行い光学顕微鏡下で細胞数を計測した。Saos-2 24 時間培養後に免疫染色を行い、ビンキュリンの観察を行った。

(4) パターン化 PLGA シートの作製

グリコール酸/L-乳酸共重合体 (PLGA, BMG, Kyoto, Japan) グラニューを熱プレス機にてシート上に成形し、熱ナノインプリント法を用いて、パターン化 PLGA シートの作製を行った。

4. 研究成果

(1) パターン化チタンシートの作製

ナノインプリント法にて、500nm のグループおよびピラー形状を付与した Ti シートを作製することができた。表面解析から、グループを付与した Ti シートでは、表面粗さ $0.18 \pm 0.0052 \mu\text{m}$ 、ピラーを付与した Ti シートでは、表面粗さ $0.16 \pm 0.0066 \mu\text{m}$ であった。

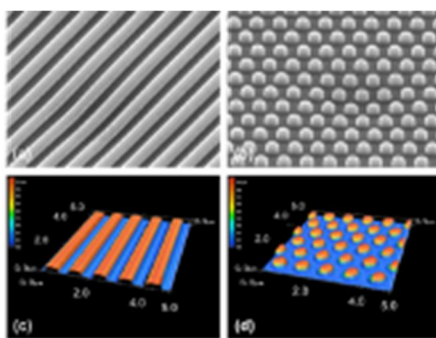


Fig.1. パターン化チタンシートの SEM とレーザー顕微鏡による表面解析.

SEM micrograph of the surface patterns with (a) 500 nm grooves, (b) 500 nm pillars. Laser microscope images and analysis of patterned Ti-seets, (c) 500 nm grooved Ti-seet: height 500nm, width 500nm. (d) 500 nm pillared Ti-seet: height 500nm, width 500nm.

(2) 細胞接着および増殖

Saos-2 では、グループおよびピラー上で細胞接着数は滑沢面と比較し有意に増加した ($p < 0.05$)。24 時間, 5 日間培養後では、グループ上で接着細胞数が有意に多かった ($p < 0.05$)。Ca9-22 では、パターン上よりも滑沢面で細胞接着数は有意に増加した ($p < 0.05$)。ピラー上で、細胞接着数は最も少なく、24 時間, 5 日間と細胞数は変わらず、細胞増殖は認められなかった。

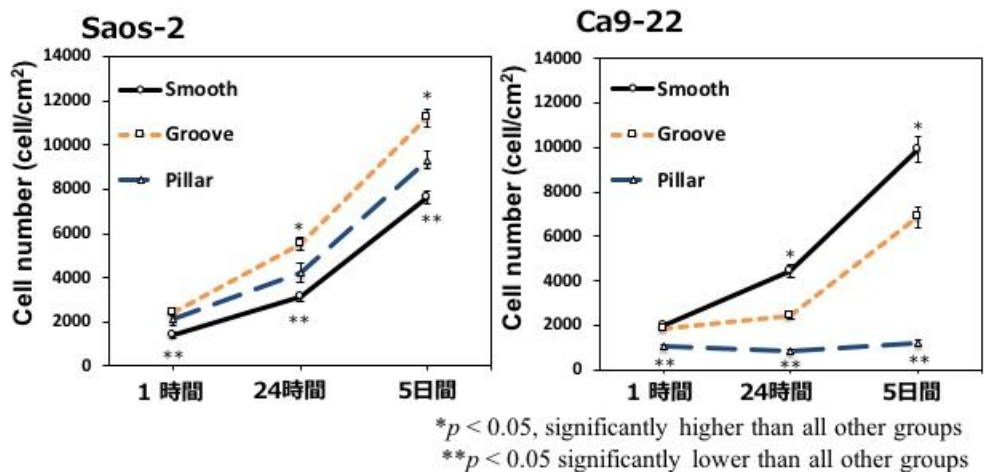


Fig.2. パターン化チタンシート上で Saos-2 と Ca9-2 の細胞接着数

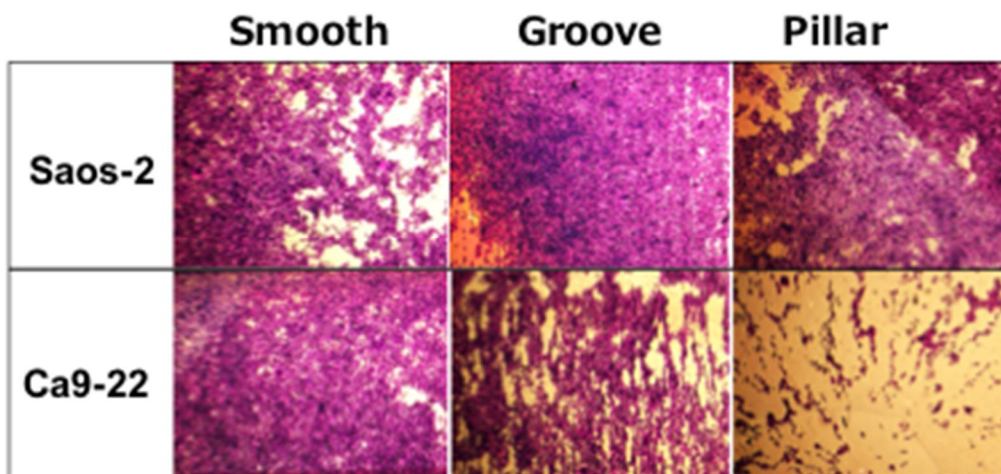


Fig.3. 培養 5 日後の各パターン上での細胞接着の様子

Saos-2 ではグループ上で、細胞が最も多く観察された。一方、Ca9-2 ではピラー上で、細胞が最も少ないのが観察された。Saos-2 と Ca9-2 とともにグループ上では細胞が溝に沿って配向しているのが観察された。以上より、細胞種によってパターンの形状が与える影響が異なることが示唆された。

(3) Saos-2 の免疫染色

Saos-2 を 24 時間培養後、anti-vinculin AlexaFluor 488 (Bioscience), Acti- stain 555 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA), and DAPI solution (Dojindo)を用いて、蛍光免疫染色を行った。

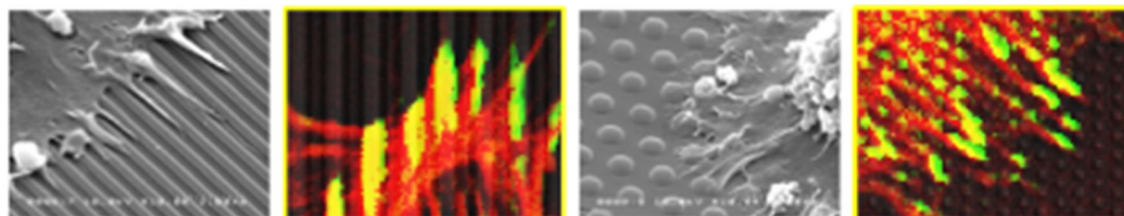


Fig.4. Saos-2 のピンキュリンの観察

細胞の仮足がグループ、ピラーのパターン形状にそって走行しているのが観察された。蛍光免疫染色の結果から、パターンのリッジ部分に細胞が伸展し、形状を変化させている可能性が示唆された。

(4) Ca9-2 におけるパターンでの細胞数の変化

Ca9-2 でパターン形状における細胞接着数の比較を示す。ピラーではグループより接着細胞数が少なかった ($p < 0.05$) 以上より、Ca9-2 ではピラー構造を付与することで細胞接着・増殖を抑制する可能性が示唆された。

Ca9-22の細胞接着数(24h)

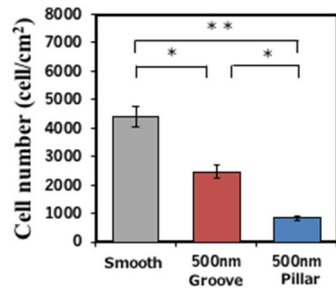
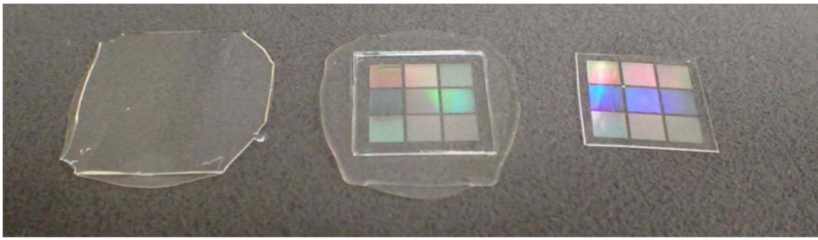


Fig.5 Ca9-22 のパターン間による細胞接着数の比較

ANOVA, Bonferroni 補正検定 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

(6) パターン化 PLGA シートの作製

グリコール酸/L-乳酸共重合体 (PLGA, BMG, Kyoto, Japan) グラニューを熱プレス機にて, 130 °C, 2MPa の条件下にて PLGA シートに加工後, 85 °C, 2MPa の条件下にてマスターモールドを熱インプリントすることで, PLGA へのマイクロ・ナノパターンの転写に成功した.



本研究結果から熱ナノインプリント法を用いることで, 異なる生体材料へマイクロ・ナノパターンの転写を可能となった. また, パターンの形状によって骨芽細胞および上皮細胞で異なる細胞接着・増殖することがわかった. 今後, このパターンが細胞種の違いに与える影響を利用することで, 再生医療へのさらなる可能性が示唆された.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaga Naoyuki, Akasaka Tsukasa, Matsuura Takashi, Yokoyama Atsuro, Yoshida Yasuhiro	4. 巻 30
2. 論文標題 Proliferation of Saos-2 and Ca9-22 cells on grooved and pillared titanium surfaces	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 559 ~ 567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/BME-191074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加我公行、赤坂司、吉田靖弘
2. 発表標題 Groove/Pillar パターン化チタン表面が細胞接着及び増殖に与える影響
3. 学会等名 第73回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 加我公行、赤坂司、横山敦郎、吉田靖弘
2. 発表標題 マイクロ・ナノパターン表面構造における細胞応答
3. 学会等名 第31回 代用臓器・再生医学研究会総会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----