

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：37114
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：20K18568
研究課題名(和文) マイクロ・ナノパターン構造付与による生理活性機能が発現する吸収性メンブレンの開発

研究課題名(英文) Development of bioabsorbable membranes with bioactive functions by applying micro/nano-patterned structures

研究代表者
加我 公行 (Kaga, Naoyuki)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：50824083
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：熱ナノインプリント法を応用することで、生分解性ポリマーであるPoly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) 表面に、マイクロ/ナノパターン構造を持つ生体吸収性メンブレンを製作することが可能となった。骨芽細胞では、マイクロ/ナノパターンを付与することで細胞接着・増殖能が向上し、上皮細胞では、細胞接着・増殖能が抑制されることが示された。吸収性メンブレン表面そのものへの接着・形態・分化などの生理活性機能を発現できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、再生療法で用いる吸収性メンブレンで細胞腫の接着・増殖・分化をコントロールできる可能性が示された。このことは、メンブレンの上皮側では上皮細胞の増殖を抑制し、骨欠損側では骨芽細胞の増殖と分化を促進することで理想的なメンブレンの開発に繋がる一歩であり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：By applying the thermal nanoimprinting method, it has become possible to fabricate bioabsorbable membranes with micro/nano-patterned structures on the surface of the biodegradable polymer Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA). It was shown that the application of micro/nano-patterns improved cell adhesion and proliferation in osteoblasts, while inhibited cell adhesion and proliferation in epithelial cells. This results were suggested the possibility that bioactive functions such as adhesion, morphology, and differentiation can be expressed on the absorbable membrane surface itself.

研究分野：Biomaterial

キーワード：マイクロ/ナノパターン PLGA ナノインプリント メンブレン 再生療法 骨芽細胞 上皮細胞 細胞接着

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メンブレン上の細胞増殖・分化を制御し得る高い生理機能活性と細胞親和性を付与した高分子ポリマーを基材とする生体内吸収性メンブレンの開発は、歯周組織再生誘導法 (GTR) や骨再生誘導療法 (GBR) に極めて有用である。メンブレンの上皮側では上皮細胞の増殖を抑制し、骨欠損側では骨芽細胞の増殖と分化を促進することができれば、理想的な組織再生が得られる。本研究では、ナノインプリント法を用いることで、吸収性メンブレンの両面で異なる細胞への活性を有するメンブレンを開発できないかと考えた。

2. 研究の目的

異なるマイクロ・ナノパターン構造を有する Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) メンブレンを作製し、材料学的評価および骨芽細胞および上皮細胞の細胞接着、増殖、分化能を調節するメカニズムを解明する。本研究の目的は、生体吸収性高分子ポリマーである PLGA にマイクロ・ナノパターン構造を付与することで生理活性機能を賦活させることにある。

3. 研究の方法

(1) パターン化 PLGA メンブレンの作製

PLGA グラニューを熱プレス機でシート状に成型し、熱ナノインプリント法にて Groove, Pillar, Hole 構造を有した PLGA メンブレンを製作した (20mm×20mm)。

(2) パターン化 PLGA メンブレンの材料学的評価

a) 表面構造の観察

作製したパターン化 PLGA メンブレン表面を、走査型電子顕微鏡 (SEM) および、形状解析レーザー顕微鏡にて表面粗さの計測を行った。

b) 接触角測定

各パターン化 PLGA 表面のぬれ性を評価するため、接触角計 (B100:ASUMI GIKEN, Limited, Tokyo) にて水成分に対する接触角の測定を行った。

(3) パターン化 PLGA メンブレン上での細胞培養

a) マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 および上皮系細胞 Ca9-22 の細胞をパターン化 PLGA メンブレン上に 5000 cells/cm² にて播種し、10%FBS を含む MEM- 中で 3 時間培養し、細胞接着数の計測を行った。また、MC3T3-E1 細胞のアクチンの蛍光染色し、アクチンフィラメントの形成の違いを観察した。

b) パターン化 PLGA 上で、MC3T3-E1 細胞の培養 14 日後にアルカリホスファターゼ染色を行い ALP 活性能、培養 28 日後にアリザリンレッド染色を行い石灰化基質産生能の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 図 1 に PLGA メンブレンに付与したマイクロ・ナノパターン構造の SEM 像及びレーザー顕微鏡による表面形状解析像を示した。熱ナノインプリント法により 0.5 μm, 1 μm, 2 μm の幅を持つ (高さはすべて、1 μm) Groove, Pillar, Hole 形状が付与された PLGA シートを製作することができた。SEM 及びレーザー顕微鏡から各パターン形状が PLGA メンブレン表面に転写されているのが観察された。

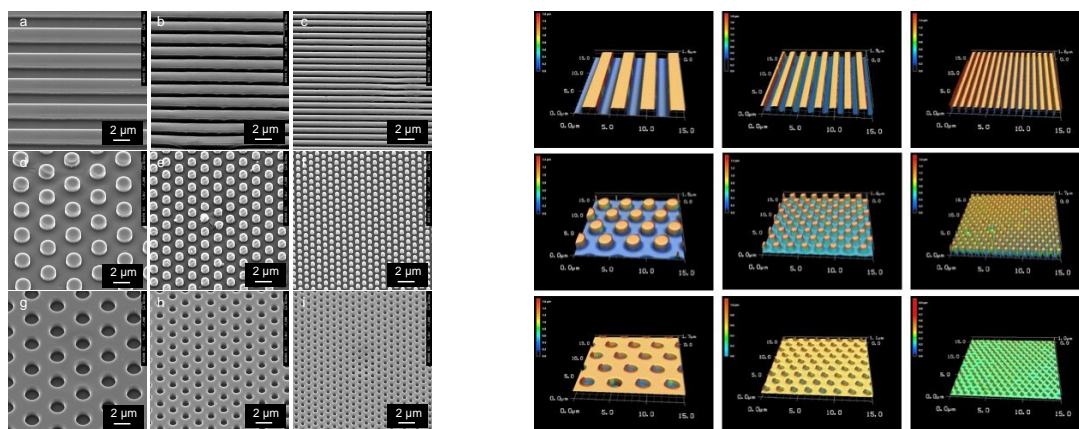


図 1 SEM images and Laser microscope images of the patterned PLGA membrane.

(2) ぬれ性の評価

図2にPLGAメンブレン表面への滴下試験時の図を示した。Pillar と Hole 構造のPLGAメンブレンは、パターンがないPLGAメンブレン(control)よりも有意に疎水性であった ($p<0.05$)

0.5 μm と1 μm の Groove 構造のPLGAメンブレンは、vertical 方向では control よりも有意に親水性であった ($p<0.05$)

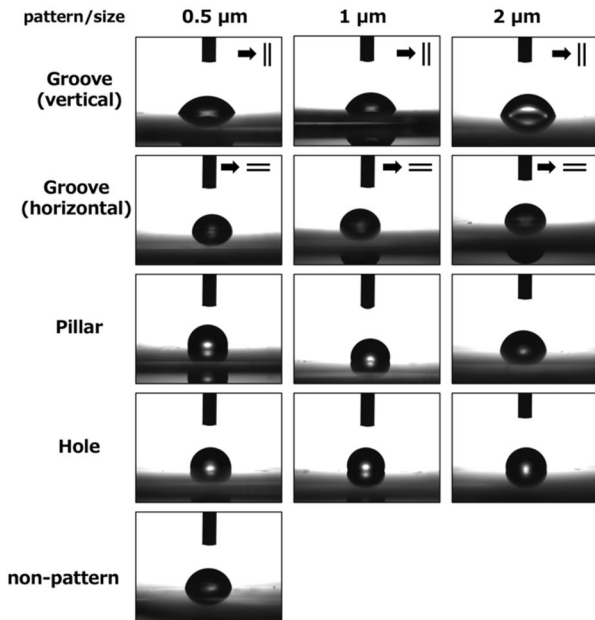


図2 Contact angle images for micro/nano patterned PLGA membranes.

(3) 細胞接着試験

図3に培養3時間後の初期の細胞接着数を示した。MC3T3-E1の3時間培養後の細胞接着数は、平面(control)と比較し、マイクロナノパターン上で有意に多かった。Ca9-22の3時間培養後の細胞接着数は、平面(control)と比較し、マイクロナノパターン上で有意に少なかった。

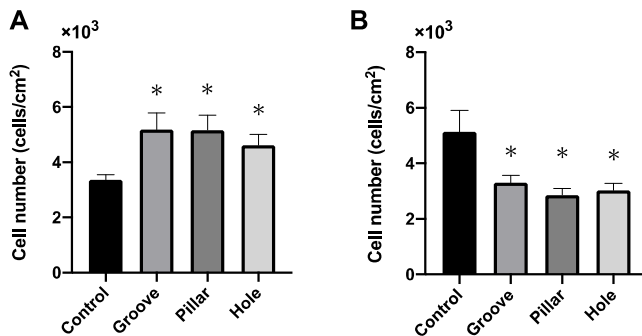


図3 The number of attached MC3T3-E1 cells(A)and Ca9-22 cells (B) on non-patterned PLGA (control) and patterned PLGA over 3 hours incubation.

(4) 骨芽細胞の蛍光染色および機能評価

図4にMC3T3-E1細胞のアクチンフィラメントの蛍光顕微鏡像を示した。MC3T3-E1細胞は、マイクロナノパターン上で、多数のアクチンフィラメントの形成とパターンに沿った細胞骨格の形成が観察された。

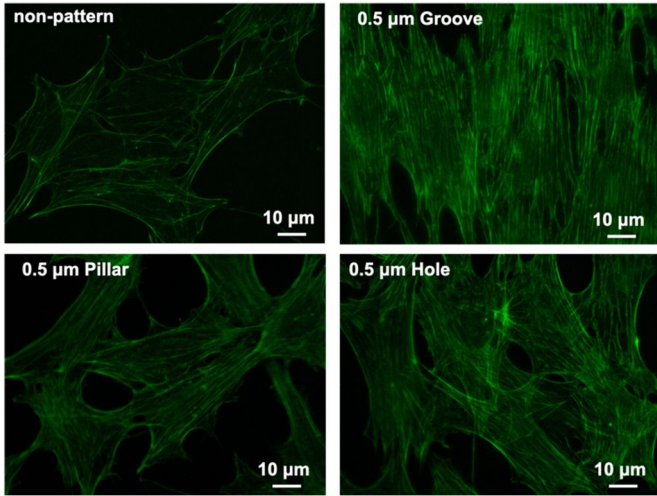


図4 Confocal laser scanning microscopy images of actin filaments of MC3T3-E1 cells on non-patterned or patterned PLGA membranes.

図5にMC3T3-E1細胞の石灰化能およびALP活性を示した。MC3T3-E1細胞は、マイクロナノパターン上で高い石灰化能およびALP活性を認めた。

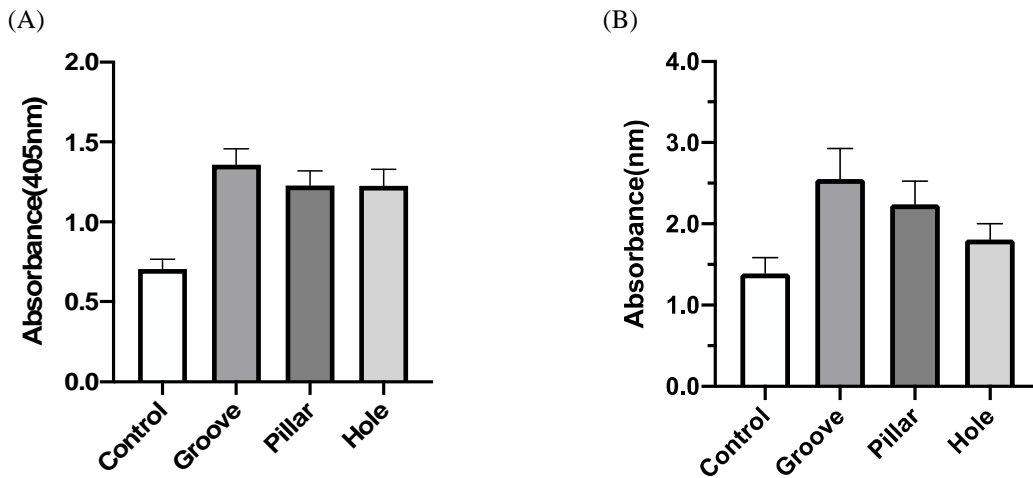


図5 Calcification induction ability of MC3T3-E1 cells after 28 days of culture (A). ALP activity in MC3T3-E1 cells after 14 days of culture (B).

骨芽細胞では、マイクロナノパターンを付与することで細胞接着・増殖能が向上し、上皮細胞では、細胞接着・増殖能が抑制されることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaga Naoyuki, Fujimoto Hiroki, Morita Sho, Yamaguchi Yuichiro, Matsuura Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Contact Angle and Cell Adhesion of Micro/Nano-Structured Poly(lactic-co-glycolic acid) Membranes for Dental Regenerative Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 124 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dj9110124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 加我 公行	4. 巻 7
2. 論文標題 マイクロナノパターン構造とS-PRGフィラーの吸収性メンブレンへの応用	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 37-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sho Morita, Naoyuki Kaga, Yuki Magori, Takashi Matsuura
2. 発表標題 Effect of particle sizes and contents of S-PRG filler on flexural strength of auto-polymerizing resin
3. 学会等名 INTERNATIONAL DENTAL MATERIALS CONGRESS 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加我公行
2. 発表標題 マイクロ・ナノパターン構造を有する生分解性ポリマーメンブレンのぬれ性と細胞接着の基礎的検討
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第39回九州支部学術大会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 加我公行, 松浦尚志
2. 発表標題 マイクロ・ナノパターン化PLGAシートの表面特性
3. 学会等名 第47回福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2020年～2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------