HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Cell adhesion behavior on micro/nano patterned structures [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	加我, 公行
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12591号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65519
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoyuki_Kaga_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　加　我　公　行

学　位　論　文　題　名

Cell adhesion behavior on micro/nano patterned structures

(マイクロ・ナノパターン構造に対する細胞付着挙動)

歯の欠損に対する補綴方法としてインプラント治療は臨床で広く応用され、優れた機能回復と良好な予後が数多く報告されている。インプラントはその構造上、口腔粘膜を貫通しているため、感染の危険性に常に曝され、インプラント周囲炎が大きな問題となっているが、その治療法は未だ確立されていない。そのため、インプラント体の組成や表面構造には、迅速なオッセオインテグレーションの確立することに加えてインプラント周囲炎を予防することも要求される。これまで、オッセオインテグレーションの早期成立を目的にインプラント体であるチタン表面に対する改質・微細構造の付与などの多くの研究がなされている。Li らはマイクロ・ナノパターン構造を持ったコラーゲンフィルムを調製し、これらの構造が細胞の接着と配向に影響することを報告した。コラーゲンは柔らかい素材であるため、これまでの研究では、グルタールアルデヒド、ホルムアルデヒドやゲニピンなどが架橋剤として使用されてきた。しかし、どれも細胞毒性があるため架橋剤が影響し、正常な細胞評価ができていない。Lu らはチタン表面に付与した Groove 構造は、骨芽細胞のコンタクトガイダンスに影響を与えることを報告した。しかし、彼らの研究では、Groove の幅が 4–38μm と大きく、小さい幅を持つ Groove での細胞評価がなされていない。従来の方法では、チタン表面に Groove の小さい幅を付与することや Pillar などの構造を付与することが難しいとされている。そのため、マイクロ・ナノレベルでの Groove 及び Pillar 上で細胞応答を比較した研究はなされていない。

我々は、微細な構造を持つ型を用いて他の材料へ微細構造を転写する技術であるナノインプリント法に着目した。ナノインプリント法を用いることで、パターンが転写された試料に他の材料をコートし、形状と材質を改良することに成功した。そこで本研究では、マイクロ・ナノパターン構造を持つゼラチンシートとチタンシートを製作し、骨芽細胞及び線維芽細胞の付着挙動の検討を行うことを目的とした。

初めに熱ナノインプリント法にて試料の製作を行った。マイクロ・ナノ Groove 及び Pillar 構造を持つ石英マスターモールド上に G-Pet フィルム、またはポリカーボネートフィルムを載せて小型熱プレス機にて熱プレス（0.2MPa、175℃、5 分間）を行い、パターン化レプリカモールドを製作した。得られたレプリカモールド上に 10%ゼラチン溶液を滴下し、24 時間乾燥後、パターンを持つゼラチ

ンシートを得た。その後、加熱架橋（200℃、2 時間）を行うことにより Groove 化ゼラチンシートを調製した。次に、パターン化レプリカモールド表面にチタンのスパッタコーティング（0.7MPa、80 分）を行い、Groove 及び Pillar 化チタンシートの調製を行った。Groove 化ゼラチンシート上においては、ヒト正常骨芽細胞 NHOst とヒト歯肉線維芽細胞 HGF を 10%FBS 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）中に 5000 個/cm^2 濃度にて播種し培養を行った。評価として、1 時間後の付着細胞数算出、Groove 構造に対する配向性の観察、ならびに走査型電子顕微鏡（SEM）による形態観察を行った。パターン化チタンシート上においては、骨芽細胞様細胞 Saos-2 を 10%FBS 含有 DMEM 中にて 5000 個/cm^2 濃度にて播種し培養を行った。評価として、1 時間及び 24 時間後の接着細胞数算出、SEM による形態観察、免疫染色による接着斑(ビンキュリン)の観察及び計量を行った。

SEM 観察で Groove 化ゼラチンシートには、幅 500nm、1μm 及び 2μm、高さ 500nm の Groove 構造が観察された。培養 1 時間後の付着試験において、NHOst 及び HGF ともに Groove 構造では、control である Plane と比較し付着細胞数が有意に多かった(p<0.05)。Groove の幅による付着細胞数には有意差は認められなかった(p>0.05)。Groove に対する配向性については、NHOst 及び HGF ともに Groove に対して 0°～15°の間に約 80%以上の細胞の配向が観察され、NHOst 及び HGF では Plane と比較し、Groove に対して強いコンタクトガイダンスが認められた。NHOst 及び HGF の SEM 観察では、Plane 上で四方に伸展しているのが認められたが、Groove 上では、細胞が Groove にそって縦に伸展しているのが観察された。

パターン化チタンシートでは、幅が 500nm、1μm 及び 2μm、高さが 500nm の Groove 構造、及び幅が 500nm、1μm 及び 2μm、高さが 500nm の Pillar 構造が観察された。Saos-2 の培養 1 時間及び 24 時間において、Groove 及び Pillar では、Plane と比較して接着細胞数が有意に多かった(p<0.05)。Saos-2 培養 1 時間の SEM 観察から、Groove 及び Pillar においてはパターン構造に細胞の仮足が伸展しているのが観察された。また、Plane と比較して細かい細胞の仮足がよく観察された。次に 24 時間培養後に接着斑であるビンキュリンの観察を行った。Groove 構造では、接着斑は、Groove に接着し、Plane よりも伸展しているのが観察された。Pillar 構造では、接着斑は Pillar に伸び、円形に接着しているのが観察された。続いて、接着斑であるビンキュリンの計量を行った。接着斑の数は 500nm と 1μm の Groove 及び Pillar において Plane よりも有意に多かった（p<0.05）。接着斑の数は 2μm の Groove 及び Pillar においては、Plane との間に有意差は認められなかった（p>0.05）。

本研究においては、ゼラチン及びチタンシートにマイクロ・ナノパターン構造がはっきりと付与されているのが観察された。これまでの研究では、Groove や Pillar 構造を正確に付与することは困難とされてきた。そのため、ナノインプリント法を利用することで、マイクロ・ナノ構造を持つ試料を容易に製作できることが示された。NHOst 及び HGF については、Groove 化ゼラチンシー

ト上において Plane よりも有意な接着細胞数の増加と配向性が認められた。これまで、報告されてきたチタンなどの金属材料表面と同様にソフトマテリアルであるゼラチンにおいてもマイクロ・ナノ Groove 構造が、細胞接着に有効であることが示された。また、本研究においては、500nm、1μm と 2μm の幅のサイズによる違いは認められなかった。ゼラチンは柔らかく加熱など架橋が必要なため様々なサイズのパターンを調製するのが困難であることから今後、さらなる材料の改良が必要であろう。パターン化チタンシートに関しては、Saos-2 では、Groove だけでなく Pillar 構造においても Plane よりも有意な接着細胞数及び接着斑の数の増加が認められ、Pillar 構造も Groove 同様に細胞接着に影響を与えることが示された。骨芽細胞及び線維芽細胞では、マイクロ・ナノパターン構造を付与することで接着細胞数が増加した。これは、マイクロ・ナノパターンにより細胞足場の表面積が増加したこと、また細胞の仮足がマイクロ・ナノパターンに伸び早期の接着の足がかりとなったことが影響したと考えられる。さらに、24 時間培養後では、接着細胞数と接着斑（ビンキュリン）の数に同様の傾向が認められたことから、細胞接着には接着斑が影響していることが示された。SEM 及び接着斑の観察からは、細胞の仮足が Groove のリッジ部分に伸展しているのが認められ、ビンキュリンがリッジに接着している可能性が示唆された。これは、リッジ部分を細胞の仮足が早期に認識、接着することにより、Groove にそって配向する可能性を示唆している。

本研究において、ナノインプリント法はマイクロ・ナノパターン構造を他の材料へ正確に転写する技術として有効であることが示された。マイクロ・ナノパターン形状は、骨芽細胞、線維芽細胞における細胞接着、配向性に影響を与えることまた、細胞接着には接着斑の影響が強く関与していることが示された。