HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	EFFECT OF A NANO-SCALE FINE HOLE PATTERN ON THE DIFFERENTIATION OF RAW264.7 CELLS INTO OSTEOCLASTS [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	高田, 亮
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13473号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73972
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Takata_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　高　田　亮

学　位　論　文　題　名

EFFECT OF A NANO-SCALE FINE HOLE PATTERN ON THE DIFFERENTIATION OF RAW264.7 CELLS INTO OSTEOCLASTS

（RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化におよぼすナノスケール HOLE パターンの影響）

骨は常に骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収を繰り返すバランスのとれた活動により常に新しくリモデリングしている。破骨細胞は、単球やマクロファージ等の破骨細胞前駆細胞から派生し、細胞が融合して骨吸収能を持った多核巨細胞となる。破骨細胞は大理石病、骨粗しょう症、骨融解、炎症性関節炎、骨パジェット病等特定の疾患に関連付けられている。

これまでに、破骨細胞の分化と機能は基材表面性状の影響を受けることが知られている。Marchisioらは、マウスマクロファージ様細胞(RAW264.7細胞)の破骨細胞への分化が滑らかなチタン表面上より粗いチタン表面上で促進されたと報告している。Davisonらは、リン酸カルシウムディスク上の破骨細胞が、マイクロスケールの表面構造よりサブマイクロスケールの表面構造でより大きく成長しており、より活性化していることを報告している。Parkらは、直径15～100nmの異なる細孔径のチタン・ナノチューブの中で、15nmでの分化した破骨細胞数が最も多いと報告している。また、破骨細胞の分化と機能は微細な立体構造に影響を受けることが知られており、新井田らは、破骨細胞がチタンコートマイクログルーブ構造に沿って配向したことについて報告している。ただし、マイクロ・ナノスケールの微細構造が破骨細胞の分化の効率性等におよぼす影響の解明は不十分である。

基材表面のマイクロ・ナノパターンは、細胞接着、広がり、形態、増殖、分化に大きく影響している。以前の報告では、アパタイトペースト、チタンコート、フロアブルコンポジットレジン、および硬化性歯科材料でのマイクロ・ナノパターン形状の開発について報告している。異なった材料および表面パターンを設計することにより、骨芽細胞や線維芽細胞の微細構造表面上の挙動を制御できる。

本研究では、ナノスケールの微細な形状をしたパターン上での破骨細胞の分化におよぼす影響を調べた。規則的に配列された直径500nmで高さ500nmのHole形状をした立体構造を、グリコール変性ポリエチレンテレフタレート(G-PET)フィルムに付与した。G-

PETフィルムの利点は、典型的なPETフィルムと比べると低いガラス転写温度のため簡単に転写でき、やや親水性がある。さらに、細胞毒性が無く培養培地中で安定している。パターンフィルムでの細胞付着と分化挙動を評価するためマウスマクロファージ様細胞（RAW264.7細胞）を使用した。RAW264.7細胞はNF-κB ligand（RANKL）の受容体活性化剤の添加により破骨細胞に分化誘導させることができる。

G-PETのHoleパターンフィルムは熱ナノインプリント法で作製した。直径500nmで高さ500nmにパターン化された石英マスターモールドを原型とし、G-PETフィルムで覆い、小型熱プレス機を用いて、105℃の熱を加え2MPa以下の圧力下で4分間プレスし、G-PETフィルムにHoleパターンを転写した。パターンフィルムを細胞培養用ディッシュに固定し、6分間紫外線滅菌し、細胞付着と分化試験を行った。

細胞付着試験はRAW264.7細胞をHoleパターン上に76,000 cell/cm^{2}で播種し、37℃、5%CO_2の環境下で1時間インキュベートした。非付着細胞を除去するためリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、グルタールアルデヒド溶液で固定、ギムザ染色後、光学顕微鏡で観察し、付着した細胞を数えた。

細胞分化試験は破骨細胞の前駆細胞であるRAW264.7細胞を用いて、RAW264.7細胞をHoleパターン上に5,000 cell/cm^{2}で播種した。細胞は10%FBS、α-MEM 、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB、sRANKL(200ng/ml)の培養液で6日間、37℃、5%CO_2環境下で培養し、培養液は2日ごとに交換した。破骨細胞の分化は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色で確認した。6日間培養した細胞はPBSで洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定した。その後、蒸留水で洗浄、TRAP染色し、光学顕微鏡を用いて3核以上のTRAP陽性多核巨細胞を数えた。

パターン上の細胞形態は走査型電子顕微鏡(SEM)を使用して観察した。細胞はPBSで洗浄し、グルタールアルデヒドで固定後、段階的アルコール脱水(50%、60%、70%、80%、90%、95%、99.5%、100%)を行い、25℃液化二酸化炭素で乾燥させた。G-PETフィルムが化学的に弱い材料のため、臨界点乾燥の標準的な時間まで行えなかった。乾燥した細胞はPt-Pdスパッタコーティングし SEMで観察した。

統計分析はGraphPad Prism version 6.04を用いたt検定で有意差を評価した。

1時間培養後のRAW264.7細胞の付着した細胞の形態はHoleと平面で異なっていた。Holeパターン上では細胞形態は丸い形だったが平面では細胞が放射状に広がり平面的な形をしていた。細胞の広がりは、ナノグルーブポリスチレンフィルムと比較した平面ポリスチレンの過去の報告例に類似していた。形態の違いはRAW264.7細胞のサイズの異なるアルミナナノ細孔上で培養されたものでも認められた。1時間培養後のRAW264.7細胞の平均付着数は、平面と比較しHoleパターンでは1.5倍であった。しかし、有意差は無かった(p>0.05)。他の報告でも、パターンの形状とサイズおよび表面の化学組成により細胞付着数に違いが出ることが報告されている。G-PETフィルムでの1時間培養の段階ではHoleパターンは細胞付着を誘導するが、細胞の広がりを抑制している。

sRANKLで分化誘導した6日後の破骨細胞分化試験において、光学顕微鏡での細胞形態観察ではHoleパターンでも平面でも似た形態をしていた。SEM観察では、Holeパターン上の破骨細胞からHole形状の角に接する突起が認められた。この仮足の把持のため、破骨細胞の付着強度が強い可能性がある。また、Holeパターンの3核以上の破骨細胞の平均数は平面と比較し約1.9倍だった。ただし、有意差は無かった($p>0.05$)。パターン上での細胞数の増加は、粗いチタン表面で破骨細胞数が増加した報告と同じであり、今回のHoleパターンはRAW264.7細胞の破骨細胞への分化誘導を若干活性化した。

G-PETフィルムに付与したナノレベルのHoleパターンにより細胞付着、破骨細胞の分化をやや向上させることが示唆された。しかし、本研究におけるパターンの効果は小さいものであった。Holeパターンの破骨細胞の突起はHoleの角を把持するように伸びていた。これらのHoleと平面の細胞付着と分化の挙動の違いが破骨細胞の機能に影響を与え、基材のナノパターニングが破骨細胞の分化と細胞機能を制御する１つの要因であることを示唆する。理想的なマイクロ・ナノパターンの形はまだ解明されておらず、さらなる研究が必要である。