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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　高田　亮

審査担当者
主査　教授　吉田　靖弘
副査　教授　土門　卓文
副査　准教授　佐藤　嘉晃

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）

審査は，審査担当者全員の出席のもと，まず申請者より提出論文の概要の説明が行われ，審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭試問する形式で行われた。

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。

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。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されている。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，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が報告されている。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。

本研究では，ナノスケールの微細な形状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フィルムは，やや親水性があり，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RAW264.7細胞を使用した。なお、RAW264.7細胞はRANKL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。

細胞付着試験はRAW264.7細胞をHoleパターン上に76,000 cell/cm²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。ギムザ染色後，光学顕微鏡で観察し，付着した細胞数を計測した。

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/cm²で播種した。細胞は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TRAP染色で確認した。6日間培養した細胞をTRAP染色し，光学顕微鏡を用いて3核以上のTRAP陽性多核巨細胞数を

計測した。

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，標準時間の臨界点乾燥は行えなかった。

1時間培養後のRAW264.7細胞は，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。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倍であったが，有意差は無かった。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ことがわかった。

RANKL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類似した形態を示していた。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倍だったが，有意差は無かった。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スケール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。ただし，本研究におけるパターンの効果は小さいものであった。一方、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。

引き続き論文内容および関連事項について，以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

(1) 1 時間の培養とした理由
(2) 細胞の仮足がパターンの構造に伸びる影響について
(3) Hole パターンと乳歯の象牙細管の類似性について
(4) 理想的なパターンの形状とサイズについて

学位申請者は，本研究において，ナノスケール Hole パターンが RAW264.7 細胞の形状と仮足に影響を与えること，また，細胞付着数と分化に影響を与えることを明らかとした。骨や歯根表面の形状は平坦ではなく多様な形態を有し，歯科矯正治療ではこの多様な形態の中で歯を移動させる。本研究は，骨や歯根の多様な構造を模倣したものでは無いが，形状の違いが細胞数や分化に影響を与えることを示した点で，その内容を高く評価でき，臨床応用への重要な情報を提供する研究成果を得たと考える。加えて，質疑応答から，申請者は本研究の内容を中心とした専門分野について，様々な実験から得られたデータをもとに十分な理解と関連分野の幅広い知識を有していることを示した。以上から，審査担当者全員は，学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認めた。