



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	FUSION OF RAW 264.7 MACROPHAGE CELLS ON MICRO-SCALE FINE PILLAR PATTERNS [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	本間, 淳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13477号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73973
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jun_Honma_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 本 間 淳

学 位 論 文 題 名

FUSION OF RAW 264.7 MACROPHAGE CELLS ON MICRO-SCALE FINE PILLAR PATTERNS
(マイクロスケールパターン上における RAW264.7 細胞の融合)

インプラント表面に対するマクロファージ依存性の免疫応答は、時にインプラントの失敗をもたらす。マクロファージはインプラント表面のマイクロナノパターンを含む表面性状因子に敏感である。これまでにマイクロナノグループ、ナノロッド、チタニアナノチューブや金属ガラスピラーにおけるマクロファージ融合は研究されているが、インプラント表面のマイクロナノパターンに対するマクロファージの働きに関してさらなる研究が必要である。

本研究はインプラント表面に見られるマイクロスケールピラーがマクロファージ付着、および融合に及ぼす影響を調べた。基礎的表面性状の研究のため、シクロオレフィンポリマー（COP）フィルム上にマイクロピラーを熱ナノインプリントにより作製した。マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞を用いてピラー上での細胞の付着と融合挙動について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。 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ の領域に直径 $2 \mu\text{m}$, $1 \mu\text{m}$, $0.5 \mu\text{m}$ 、深さ $0.5 \mu\text{m}$ の穴状構造を持つ石英製マスターモールド上に COP フィルムを載せて小型熱プレス機によって、 2 MPa 、 175°C 、4 分間の条件で熱プレスを行い、ピラーパターン化 COP フィルムを作製した。分析を行う前に、プラズマ発生装置内で低気圧プラズマ 4 秒間照射した。表面の安定化のためフィルムを空気中で 1 週間維持し、組織培養皿に固定し、6 分間紫外線滅菌した。

RAW264.7 細胞を 10 %FBS、1 %ペニシリン-ストレプトマイシン-アンホテリシン B 懸濁液を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中にて 37℃、5 %CO₂濃度の条件で培養した。培養した細胞を収集し、ピラーパターン化 COP フィルムに 50,000 個/cm²濃度にて播種し、37℃、5 %CO₂濃度の環境下にて 1 時間培養を行った。リン酸緩衝食塩水 (PBS) ですすぎ、2.5 %グルタルアルデヒド溶液にて固定し、ギムザ染色した。付着評価として、光学顕微鏡画像中の 10.7 mm²の範囲を無作為抽出し、付着細胞数を計測した。

また、融合の評価のため RAW264.7 細胞を 10 %FBS 含有 DMEM 培地で 1 日間培養した。細胞を収集し、6,000 個/cm²濃度でピラーパターン化 COP フィルムに播種した。細胞を 10 %FBS および 1 %ペニシリン-ストレプトマイシン-アンホテリシン B 懸濁液を含む α -minimum essential medium (α -MEM) 中 37℃、5 %CO₂濃度にて 6 日間培養した。培地は 2 日毎に交換した。細胞を 2.5 %グルタルアルデヒド溶液で固定しギムザ染色した。評価として光学顕微鏡画像から、35.7 mm²範囲について、3 核以上の細胞を多核細胞としてその数を計測した。

酒石酸抵抗性酸性ホスタファーゼ (TRAP) は破骨細胞マーカー酵素の 1 つであるが、いくつかの多核マクロファージは TRAP 陽性反応を示すことが知られている。その際、多核マクロファージの TRAP 活性は、培養期間、ヒドロキシアパタイトの微細構造、および血漿成分などの因子に影響を受ける。そのため本研究では、マクロファージの機能的特性解析のために TRAP 染色を行った。6 日間培養した細胞を固定し、TRAP 染色キットにて染色した。脱イオン水で洗浄し、2 mL の脱イオン水中 30 μ l 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) 溶液で核を染色した。最後に細胞を脱イオン水で 3 回洗浄し、ProLong Diamond antifade で固定しデジタル顕微鏡で観察した。赤色の TRAP 画像を可視モードで取得し、DAPI の青色蛍光画像を蛍光モードで取得した。

形態の評価として走査型電子顕微鏡（SEM）観察を行った。ピラーパターン化 COP フィルム上の細胞を PBS で洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、連続アルコール脱水（50%、60%、70%、80%、90%、99.5%、および100%）をして臨界点乾燥を行った。Pt-Pd スパッタリングによって被覆し SEM 観察を行った。

蛍光免疫染色による評価を行った。6日培養後、PBS で3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで5分間固定した。次いで、細胞を0.5%Trion X-100 で10分間透過処理し、PBS で3回洗浄し、1%ウシ血清アルブミン（BSA）中で30分間ブロックした。PBS で洗浄後、細胞を6 μ l の抗ビンキュリン Alexafluor 488、3 μ l の Acti-stain 555 蛍光ファイロジン、3 μ l の DAPI 溶液、1% BSA を含む 500 μ l の PBS 中で37℃、1時間培養し、その後4℃で一晩培養した。最後に染色された細胞を PBS で3回洗浄し、ProLong Diamond antifade にて固定し、蛍光顕微鏡下にて観察した。

付着試験の結果から RAW264.7 マクロファージの付着細胞数は直径1 μ m, 0.5 μ m のピラー上で平面上よりも1.1から1.2倍多かった。しかし直径2 μ m のピラー上と平面上の RAW264.7 マクロファージでは付着細胞数に有意差がなかった。SEM 画像による観察では、ピラー上も平面上も付着した細胞の形態は同様であった。ピラー上では細胞体から伸ばされた糸状仮足がピラー形状をしっかりと掴む。ピラーのフック効果のためより効率的な細胞付着を引き起こしたと考えられる。しかし、ピラーは培養の初期段階で細胞の伸展に相違を生じなかった。

融合試験の結果から、多数の単核細胞と少数の多核細胞がピラー上、平面上のそれぞれで認められた。多核細胞の形態は同様であった。直径1 μ m, 0.5 μ m のマイクロピラー上では、平面上よりも多核細胞の数が約1.4から1.5倍多かった。しかし、2 μ m のマイクロピラー上では平面上よりも多核細胞の数が少なかったが、

有意差はなかった。SEM 画像による観察では、多核細胞はピラー上と平面上の両方で大きな細胞領域として観察され、平らな形状をしていた。形状および面積に有意差はなかったが、興味深いことにピラー上の糸状仮足はピラーの端を掴むように伸びた。直径 $1\text{ }\mu\text{m}$ または $0.5\text{ }\mu\text{m}$ のピラーは RAW264.7 細胞の融合による多核細胞数を増加させた。

TRAP 染色の結果より、TRAP 陰性反応を示す多数の多核細胞を認めた。一方、少数の多核細胞および単核細胞は TRAP 陽性反応であった。

免疫蛍光染色より単核細胞および多核細胞における F-アクチン、ビンキュリンおよび核が染色された。平面上の単核細胞における F-アクチンおよびビンキュリンの発現は弱かった。F-アクチンとビンキュリンは、ピラー上の細胞において比較的強く発現され、ピラーの周囲に沿って局在化した。ピラー上の単核細胞における F-アクチンおよびビンキュリンのリング状発現は、基質を貪食しようとした不完全な食作用 ‘frustrated phagocytosis’ を表している。ピラー上のマクロファージにおける ‘frustrated phagocytosis’ は、マクロファージ融合の増加に寄与しているものと考えられる。多核細胞における F-アクチンおよびビンキュリンの発現パターンも、単核細胞と同様で、ピラー上の発現は平面上の発現よりも比較的強かった。F-アクチンとビンキュリンのリング状発現が認められたが、多核細胞の局所領域でのみに観察された。

本研究で、我々は、ナノインプリントにより直径 $2\text{ }\mu\text{m}$ 、 $1\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 、高さ $0.5\text{ }\mu\text{m}$ のピラーパターン化 COP フィルムを作製し、RAW264.7 細胞を用いたマクロファージの付着と融合に対するピラーパターンの影響を調べた。我々の結果は、細胞付着およびマクロファージ融合が、 $1\text{ }\mu\text{m}$ および $0.5\text{ }\mu\text{m}$ の直径を有するピラーパターン化によって改善されることを示唆している。