



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_review.pdf, 審査の要旨



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 本 間 淳

主査 教授 吉 田 靖 弘
審査担当者 副査 教授 網 塚 憲 生
副査 准教授 佐 藤 嘉 晃

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）

審査は、審査担当者全員の出席のもと、はじめに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により試問する形式で行われた。申請者からは研究内容について次のように説明された。

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と報告されているが、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。5×5 mm²の領域に直径2 μm, 1 μm, 0.5 μm, 深さ0.5 μm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。

次に、RAW264.7細胞を作製したフィルム上で1時間培養し、光学顕微鏡画像中の付着細胞数を計測した。また、融合の評価のためRAW264.7細胞を作製したフィルムに播種し、6日間培養した。光学顕微鏡画像から、3核以上の細胞を多核細胞としてその数を計測した。形態の評価として走査型電子顕微鏡（SEM）観察を行い、蛍光免疫染色による評価を行った。

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 μm, 0.5 μmのピラー上で平面上よりも1.1から1.2倍多かった。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 μm 、0.5 μm 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。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 μm または0.5 μm 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。

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。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。

以上の結果は、細胞付着およびマクロファージ融合が、1 μm および0.5 μm の直径を有するピラーパターン化によって促進されることを示唆している。

引き続き以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

1. 本研究の特徴について
2. プラズマ処理について
3. アクチンの発現とポドソームの関係について

学位申請者は本研究において、マイクロナノピラーパターン構造はマクロファージにおける細胞接着、融合に影響を与えることを明らかにした。表面構造の違いが、細胞付着およびマクロファージ融合に影響をあたえることは、インプラントの生着や生存率に大きな影響を与える可能性を有する。また、歯科矯正治療においても、骨や歯根表面の構造は多様なことから、歯の移動様相に影響を与える可能性がある。現時点では実際の臨床に直結するようなデータではないものの、本研究の成果はインプラントや歯科矯正治療のみならず、医学全体の今後の発展に貢献する重要な基礎的情報を提供したものと高く評価できる。

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、他の自身の研究データも紹介しながら、十分な知識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。