



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | カーボンナノホーンコートチタン上でのマクロファージの挙動                                                                    |
| Author(s)           | 木村, 貞仁                                                                                          |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(歯学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第14521号                                                                                        |
| Issue Date          | 2021-03-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14521">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14521</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/96789">https://hdl.handle.net/2115/96789</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Sadahito_Kimura.pdf                                                                             |



# 博 士 論 文

---

## カーボンナノホーンコートチタン上での マクロファージの挙動

---

令和3年3月申請

北海道大学  
大学院歯学院口腔医学専攻

木 村 貞 仁

## 緒言

カーボンナノチューブ (CNTs), カーボンナノホーン (CNHs), グラフェンなどのナノカーボン材料 (CNMs) は, 化学的・物理的特性に加えて良好な生体適合性を有していることから, バイオマテリアルへの応用が期待されている<sup>1-4</sup>. CNH は直径 2~5 nm, 長さ 40~50 nm の炭素のみが円錐状の構造をとったものであり, 数千本で直径 100 nm 程度の球体集合体を形成する<sup>5</sup>. CNMs の中でも CNHs は金属触媒を使用せずに合成することが可能であるため, 他のカーボンナノ物質と比較して毒性が低いと報告されている<sup>6-9</sup>.

我々は, これらの CNHs の特徴を利用して, 骨再生用材料へ応用する研究を行ってきた. CNHs をポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 膜に固着した CNH/PTFE 膜でラット頭蓋冠骨欠損部を被覆した結果, 2 週間後の初期段階において CNHs/PTFE 膜下での骨形成が促進され, 新生骨周囲には CNHs を貪食したマクロファージが多数観察されることを報告した<sup>7</sup>. この研究結果を基に CNHs を貪食したマクロファージが骨形成に影響を与えているのではないかという仮説を構築し, ヒト末梢血単核球から分化させたマクロファージとヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSCs) を CNHs 添加培地で共培養した. CNHs 添加培地においては, CNHs 非添加培地と比較し, アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が有意に上昇したことから, CNHs を貪食したマクロファージはオンコスタチン M の産生により, hMSC の分化を促進することを明らかにした<sup>4</sup>. この特性を用いて CNHs はデンタルインプラントの表面修飾に適しているのではないかと考えた.

これまでの研究では, CNHs 添加培地でのマクロファージの挙動を明らかにしてきたが, インプラントに応用するための Ti 基盤上の CNHs に対するマクロファージの挙動については不明な点が多い. さらに, マクロファージは, 炎症性サイトカインを分泌する M1 マクロファージと, 抗炎症・免疫抑制機能を持ち, 組織修復に関与する M2 マクロファージに分極化することが知られており<sup>10-15</sup>, インプラント周囲では, 遊走してきたマクロファージが M2 に

分極することによって骨再生を促進することが報告されている<sup>16-18</sup>。以上から, Ti などの基盤に表面処理により固着した CNHs は, マクロファージの M2 への分極を促進するのではないかという仮説を構築した。本研究では, チタンに修飾した CNHs (CNH/Ti) がマクロファージに与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 1. CNH/Ti の製作

CNHs について, は金属触媒を用いることなく, グラファイトを CO<sub>2</sub> レーザーで焼灼することによって製作し<sup>19</sup>, 純度は 95%であった. CNHs を Fan らの方法により酸化し, カルボキシル基を付与した CNH-COOH を製作した<sup>20</sup>. この CNH-COOH を濃度 62.5 µg/mL となるよう 99.5%エタノール中で超音波分散 (100 kHz, 15 分間) し, CNH 分散液を製作した. 直径 9mm 厚さ 1mm のチタン円板 (99.5 %, T&I, 埼玉, 日本) に, 直径 1mm のチタンワイヤーをレーザー溶接した. チタン円板 (Ti) をエタノール中で超音波洗浄後, チタンワイヤーを陽極とし, 陰極として対極板であるチタン板を接続し, 両電極を電極間距離 8.0mm で CNH 分散液を入れたキュベット内に配置した. その後, PMC500-0.1A 電源を用いて, 電極間に 300V の直流電圧を 180 秒間印加し, Ti 表面に CNHs を電着した (CNH/Ti) (図 1). 走査型電子顕微鏡 (SEM; S-4000, 日立, 東京, 日本) を用いて CNH/Ti の表面構造を観察するとともに, フィールドエミッション走査型電子顕微鏡 (FE-SEM; JIB-4600F, 日本電子株式会社, 東京, 日本) を用いた断面解析により, CNH 成膜の厚さを計測した.

### 2. マクロファージの培養

マウス単球・マクロファージ様細胞 J774A1 (JCRB9108) を, 10%ウシ胎児血清 (Biowest, Riverside, MS) および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Thermo Fischer Scientific, Gibco, Waltham, MA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium 培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 中に懸濁した. 溶接したワイヤーを除去した CNH/Ti と Ti を, 48 ウェルマルチプレート (AGC テクノグラス株式会社, 静岡, 日本) に静置し,  $1.3 \times 10^5$  cells/mL の細胞懸濁液 300 µL を播種した. 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下, 37°C で 3 日間培養した.

### 3. 走査型電子顕微鏡観察

細胞培養 1 および 3 日後に、サンプル表面をリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) で 3 回洗浄後、2.5%グルタルアルデヒドで細胞を固定した。エタノール系列で脱水した後、臨界点法で乾燥させパラジウム白金でスパッタコーティングして SEM (S-4000, 日立, 東京, 日本) 観察を行った。

### 4. DNA 量の測定

細胞培養 3 日後、サンプル表面をリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) にて 3 回洗浄し、0.2% IGEPAL CA630 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 300  $\mu$ L を各サンプルに添加した。これを凍結融解した後、ホモジナイズした。サンプル溶液 100 $\mu$ L に 4M 塩化ナトリウム, 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) を 100 $\mu$ L 添加し、遠心分離後の上清を DNA 量測定に使用した。PicoGreen (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) を添加し、励起フィルター 356nm, 発光フィルター 458nm に設定した蛍光光度計 (Infinite F200 PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland) を介して DNA 量を測定した。統計分析は GraphPad ソフトウェアを用いて、Student の t 検定に従った二元配置分散分析を用いた。  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### 5. 透過型電子顕微鏡観察

細胞培養 3 日後に、サンプル表面を 0.1mol/L カコジル酸緩衝液 (pH 7.4, Taab, Reading, UK) で 3 回洗浄し、1%オスミウム酸水溶液 (Taab, Reading, UK) で細胞を固定した。エタノール系列で脱水後、エポキシレジン (日新 EM, 東京, 日本) を充填したゼラチンカプセルをサンプル表面に静置し、細胞を封入した。エポキシレジン硬化させた後にアルコールランプで加熱して、レジンブロックをサンプル表面から除去した。細胞接着界面を観察するために、レジンブロックの一部を切り出して 90 度に回転させ、ダイヤモンドナイフ (DiATOME, PA) を用いて薄片し、ウルトラミクローム (Leica, Wetzlar, ドイツ) を用いて超薄切片を得

た. これらの超薄切片を透過型電子顕微鏡 (TEM ; JEM1400 80V, 日本電子株式会社, 東京) で観察した.

## 6. サイトカイン産生量の定量

培養 1 および 3 日後の細胞上清を採取し, 炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), インターロイキン 6 (IL6), 抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 10 (IL10) のレベルを, それぞれ, TNF $\alpha$  と IL6 は ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe set (biolegend, San Diego, CA, USA) を, IL10 は DuoSet (R&D systems Minneapolis, MN, USA) を使用して Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA 法) により検出した. Polyvinyl microtiter plate (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) をキャプチャー抗体にて一晩処理した. 0.05% Tween (PBS-T) を含む PBS で洗浄した後, ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS-T を 37℃ で 1 時間添加してブロッキングを行った. PBS-T で洗浄した後, 100  $\mu$ L の培養上清を 37℃ で 2 時間添加した. 次に, プレートに PBS-T で洗浄し, 二次的にビオチン化された抗ヒト/マウス TNF $\alpha$ , IL6 または IL10 を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ L 添加し, 室温で 1 時間インキュベートした. その後, プレートを PBS-T で洗浄し, ワサビペルオキシダーゼに結合したストレプトアビジン (1:200 希釈) を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ L 添加した. 室温で 30 分間インキュベーションした後, プレートを洗浄した. 上清中のサイトカインの存在を明らかにする酵素反応を, 過酸化水素水の存在下で 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を添加することによって可視化した. 反応を 2N 硫酸で停止させた後, 吸光度を 450 nm で測定した. 統計分析は GraphPad ソフトウェアを用いて, Bonferroni の事後検定に従った二元配置分散分析を用いた.  $p < 0.05$  を有意差ありとした.

## 7. DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイ解析は Hirata らの報告した方法で行った<sup>4</sup>. 培養後 1 日に, マウス単球・マクロフ

アージ様細胞 J774A1 の RNA を ISOGEN(ニッポンジーン, 東京, 日本)を用いて抽出し, Low Input Quick Amp Labeling Kit, one color (Agilent, Santa Clara, CA, USA)を用いて増幅し, Cy3 で標識した. SurePrint G3 Mouse GE Microarray 8x60K Ver. 2 (Agilent, Santa Clara, CA, USA)を用いて包括的遺伝子発現解析を行った. 各スポットにおける Cy3 の蛍光強度を SureScan G4900DA (Agilent, Santa Clara, CA, USA)でスキャンし, Feature Extraction (Agilent, Santa Clara, CA, USA)で検出した. 蛍光強度から得られた遺伝子発現データを 75Percentile Shift normalization 法により調整を行った. 抽出された発現が増加した遺伝子と発現が減少した遺伝子は, DAVID Bioinformatics Resources 6.8 を用いて Gene Ontology バイオプロセスカテゴリについて Enrichment Analysis を行った.

#### 8. CD206 の検出

培養2日目に細胞を血清飢餓し, さらに2日間培養した. 細胞を100%メタノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)で固定し, 10%Goat Serum (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)で60分間, 室温でブロッキングを行った. 1次抗体として Rabbit anti mouse CD206 antibody (1:200, abcam, Cambridge, UK)を使用し, 60分間, 室温で反応させ, PBS で3回洗浄後, 2次抗体として AlexaFluor488 Goat anti Rabbit IgG (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて30分間, 室温にて反応させた. 2次抗体と同時に, Cellstain DAPI Solution (1:1000, Doujindo, Kumamoto, Japan)を加えた. PBS で3回洗浄後, 免疫染色した試料を Glass base dish (AGC テクノグラス株式会社, 静岡県)に静置し, Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM; A1Rsi, Nikon, Tokyo, Japan)にて観察を行った. CLSM で z 軸方向の撮影を行い, 3 次元的な蛍光データを採取し, ImageJ/Fiji を用いて, 細胞ごとの蛍光強度を集計して数値化した. TiおよびCNH/Ti上での蛍光強度の正規分布の平均を基準として規格化し,

D'Agostino-Pearson normality test にて分布の歪度を検定し, その有意差の有無を Kolmogorov-Smirnov test で分析した.  $p < 0.05$  を有意差ありとした.

## 結果

### 1. CNH/Ti の観察

図 2a に CNHs を電着する前の Ti の実体顕微鏡写真を示す. CNHs の電着により, 図 2b に示すように表面は, 黒色に変化した. 図 2c ならびに d は SEM 観察像である. CNHs 電着前の Ti には加工時の痕が観察された(図 2d). CNHs 電着後の Ti は CNHs で被覆されており(図 2e), 拡大により球状の CNHs が認められた(図 2f). FIB-SEM による断面観察では, Ti 表面に CNHs が 0.2~0.3  $\mu\text{m}$  の厚さで積層しているのが観察された(図 2hi)

### 2. CNH/Ti 上のマクロファージの観察と DNA 量の測定

図 3 に細胞培養後の SEM 観察像を示す. 培養 1 日後の CNH/Ti 上の細胞数は, Ti 上に比較し少なかった(図 3a および b). 拡大像においては, Ti 上には紡錘形の細胞が観察されたが(図 3c), CNH/Ti 上には球形を呈する細胞が確認された(図 3d). さらに強拡大にすると CNH/Ti 上の細胞(図 3e)には, Ti 上の細胞に比較し多くの仮足が観察された(図 3f). 3 日後では, Ti, CNH/Ti のいずれにおいても, 細胞数は増加したが, CNH/Ti 上の細胞のほうが少なかった(図 3g ならびに i). また, Ti 上の細胞は 1 日後より伸展していたが(図 3h), CNH/Ti 上の細胞は球形を呈したままであった(図 3j). 培養 3 日後の CNH/Ti と Ti の DNA 量の間には有意差が認められた. (図 4)

### 3. 細胞接着界面の観察

細胞と CNH/Ti ならびに Ti の界面を観察するため, 細胞培養 3 日後の培養ディッシュに垂直に薄切した切片の TEM 観察を行った(図 5). Ti 上で培養した細胞の形態は平坦であったが(図 5a および b), CNH/Ti 上の細胞では, CNHs 層に接する細胞膜が凹凸を呈していた(図 5c および d). CNHs が食包内に観察された(図 4e). 細胞中の CNHs の構造は, 図 2c と比較して変化はなかった.

#### 4. サイトカインの定量

炎症性サイトカイン(IL6, TNF $\alpha$ ), 抗炎症性サイトカイン(IL10)の培地上清中の濃度を ELISA 法で測定した結果を図 6 に示す. 培養 1 日後の TNF $\alpha$ , IL6, ならびに IL10 については, Ti と CNH/Ti 間では有意差は認められなかった. 培養 3 日後の CNH/Ti の TNF $\alpha$ , IL6 は Ti と比較して有意に低かった. IL10 には Ti と CNH/Ti 間では有意差は認められなかった.

#### 5. DNA マイクロアレイ解析

転写産物単位の発現比で average が 1 以上の 424 個または-1 以下の 989 個について Gene Ontology 解析を行なった結果, Ti と比較して CNH/Ti 上で発現が有意に高い転写産物はみられなかった. 有意に発現が減少した転写産物については DNA からの転写, DNA の修復や DNA 複製などに関与する遺伝子が多かった(図 7).

#### 6. CD206 の検出

マクロファージの極性を調べるために, M2 マクロファージマーカーの一つである CD206 を蛍光免疫染色し, レーザー共焦点顕微鏡で観察し像を図 7ab に示す. CNH/Ti 上では青色で標識された核と, 緑色で標識された CD206 の発光が共に減弱していた. 蛍光強度を数値化し, 正規分布の平均を基準として規格化した結果, CNH/Ti の蛍光強度が強い細胞は, Ti に比較して有意に多いことが示された. (図 8c)

## 考察

本研究では、CNHs のインプラント表面処理への応用を検討するために、Ti 上の CNHs がマクロファージに与える影響を検索した。これまでに申請者の研究室では、CNHs を貪食したマクロファージは骨髄間葉系細胞の分化を促進することを報告した<sup>4</sup>。しかし、CNHs を培地に添加した場合と CNHs を Ti などの基盤表面に固着した場合では、マクロファージの挙動は異なるのではないかと考え、本研究では、泳動電着法により Ti 表面に CNHs を修飾した CNH/Ti を用いてその影響を検討した。泳動電着法は、常温の雰囲気下で小型の装置を用いて行うことが可能であり、他の化学物質など不純物を使用しないため、簡便で安全な方法である<sup>21</sup>。これまでに申請者の研究室では、陽極酸化チタン (AnTi) 表面に CNHs を泳動電着し (CNH/ANTi), *in vitro* ならびに *in vivo* における骨再生に対する影響を評価する研究を行ってきた<sup>22</sup>。CNH/AnTi をラット骨髄腔に埋入したところ、AnTi よりも早期に骨形成が観察され、CNH/AnTi 上では骨芽細胞様細胞 SaOs2 の増殖が促進されることが明らかになった。陽極酸化処理によりチタン表面には特有の微細構造が形成されるが<sup>23</sup>、本研究においては CNHs の影響を明確にするため陽極酸化処理を行わず、旋盤加工により製作された Ti 円板を使用した。泳動電着の電圧と電流時間は、高田らの報告<sup>23</sup>をもとに 300V, 180 秒とした。泳動電着後の CNH/Ti の SEM 観察像 (図 2gh) にて、Ti 表面全体を CNHs がほぼ均一に被覆していること、さらに FIB-SEM 観察により、CNHs が 0.2~0.3  $\mu\text{m}$  の厚さで積層していることを確認した。

SEM 観察ならびに DNA 量の計測 (図 3) から、CNH/Ti 上ではマクロファージの増殖が制御されていることが示され、またマイクロアレイ解析の結果 (図 6) から、DNA からの転写、DNA の修復複製などに関与する遺伝子が制御されていることが明らかとなった。これらの結果より、CNH/Ti 上のマクロファージは DNA からの転写が制御されることによって増殖が抑制されることが推測された。Hirata らは、比較的高濃度の CNHs (5.0  $\mu\text{g/mL}$ ) を培地に

添加した場合、非添加に比較してマクロファージの増殖に変化はみられないこと、さらにマイクロアレイ解析で白血球遊走因子の上方制御はみられたが、DNA 転写に関与する遺伝子の下方制御は認められなかったとし<sup>4</sup>、本研究の結果とは異なる結果を報告している。また、培養 3 日後のマクロファージ断面を TEM にて観察したところ (図 3)、CNHs と細胞膜は近傍で接触しているのが観察されたが、細胞内部に取り込まれた CNHs は、CNHs 添加培地で培養したときよりも少なかった。この結果より、細胞内部に貪食された CNHs よりも Ti 表面の CNHs がマクロファージに影響を及ぼしている可能性も考えられ、今後さらなる研究を進める予定である。

次に、炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ , IL6)、抗炎症性サイトカイン (IL10) の発現量を比較した。TNF $\alpha$  について、Yumoto らは、骨芽細胞では、骨形成に必要な遺伝子の発現を阻害し、破骨細胞を誘導する遺伝子の発現を刺激すると報告している<sup>24,25</sup>。また、TNF $\alpha$  の大量投与により、ALP, オステオカルシン (OCN), Runx2 のレベルが低下し、骨髄間葉系細胞の分化が抑制されることが報告されている<sup>26-28</sup>。IL6 は破骨細胞の形成と機能を促進すること<sup>29</sup>、一方、IL10 は骨形成を促進すると報告されている<sup>30</sup>。図 4 に示すように、マクロファージの TNF $\alpha$  と IL6 の発現量は、CNH/Ti において有意に低い値を示した。CNH/Ti 上の細胞数は Ti に比較し少ないことから、培地中のサイトカイン発現量も減少した可能性が考えられた。一方で、IL10 の発現量は Ti と CNH/Ti 間で同等であったことから、CNH/Ti 上での細胞あたりの IL10 量は、Ti 上の細胞と比較して高い可能性があると考えられた。マクロファージは、サイトカインなどの細胞外シグナルに応答して、M1 マクロファージと M2 マクロファージの 2 つのタイプに分極し特異的な機能発現を行うことが報告されている<sup>31-34</sup>。TNF- $\alpha$ , IL-6 などの炎症性サイトカインは、M1 マクロファージによって高いレベルで発現し、IL-10 は、M2 マクロファージにおいて高いレベルで発現する<sup>29,35</sup>。本研究では、TNF- $\alpha$ , IL-6 ならびに IL-10 の結果から、CNH/Ti においては、Ti に比較し、M2 マクロファージへの分極が生じているのではないかと考え、M2 への分極について検索した。

M2 マクロファージの発現を検索するために、M2 マクロファージマーカーの一つである CD206 の蛍光免疫染色を行い、CLSMにて観察を行った。CNH/Ti 上では青色で標識された核と、緑色で標識された CD206 の発光が共に減弱していた。これは、Ti 表面では CLSM の励起光が反射され蛍光が増強される一方で、CNH/Ti 表面では CNHs の励起光吸収により蛍光が減弱するためと推察された。そこで、蛍光強度を規格化し、比較を行ったところ、Ti に比べ、CNH/Ti の方が CD206 の蛍光強度が高い細胞の割合が有意に高いことが示され、M2 マクロファージが多いことが示唆された。マクロファージの DNA の修復・増殖抑制と分極の関係については未だ明らかにされておらず、M2 のみならず M1 への分極や、M1 と M2 の比も含めて今後さらなる検討が必要である。しかしながら、本研究の結果、CNH/Ti 上のマクロファージは、Ti 上と比較して M2 マクロファージに分極する傾向があることが示唆された。

## 結論

1. CNHs を培地に添加して培養した場合と Ti 表面に固着した上で培養した場合では、マクロファージの挙動が異なることが明らかとなった.
2. Ti 表面の CNHs はマクロファージの DNA の転写・修復・複製を制御し細胞増殖を抑制する一方で、組織修復に関与する M2 マクロファージへの分極を誘導する可能性が示唆された.

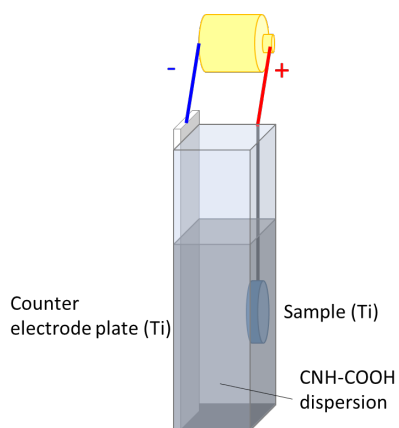


图 1.

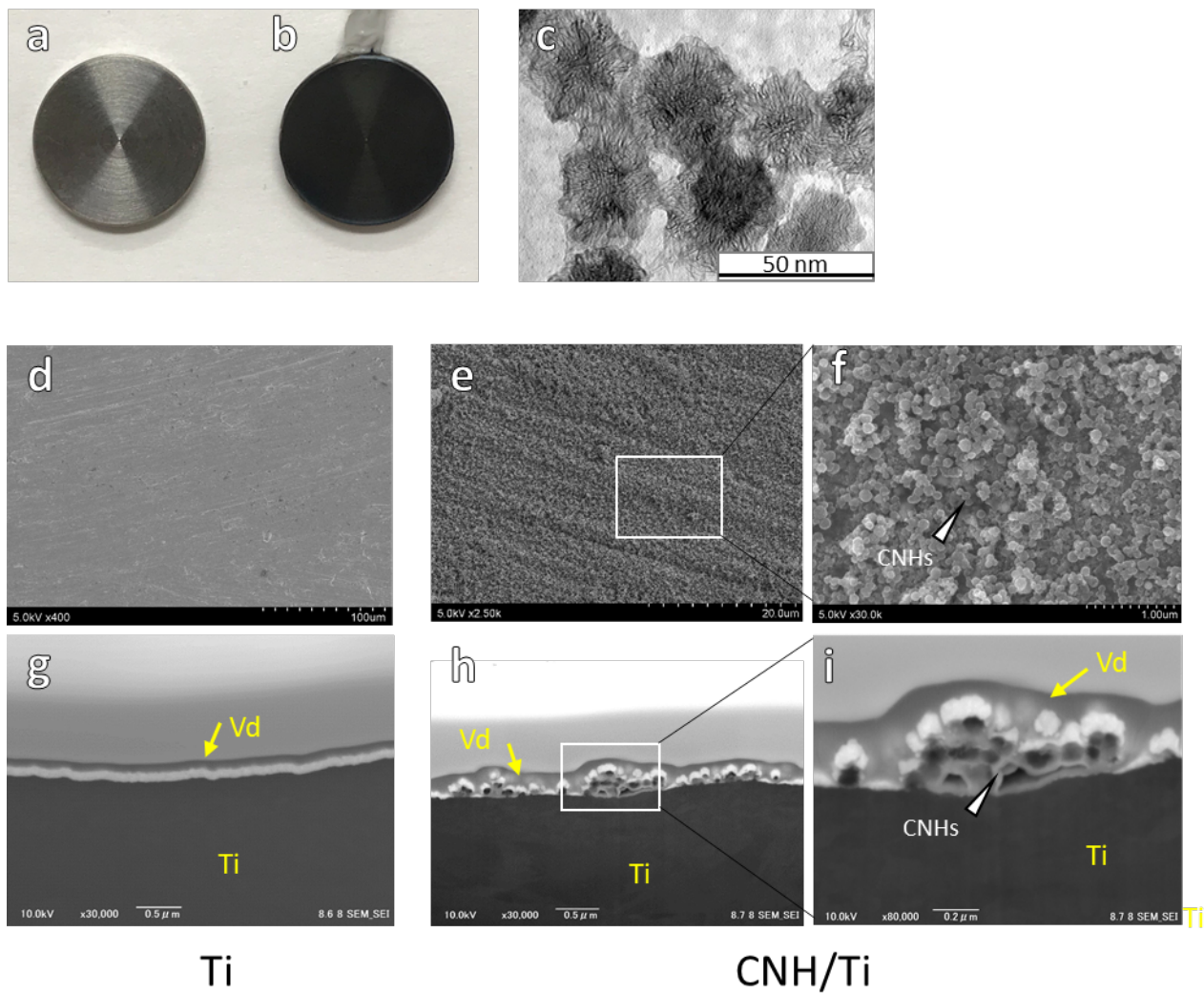


图 2.

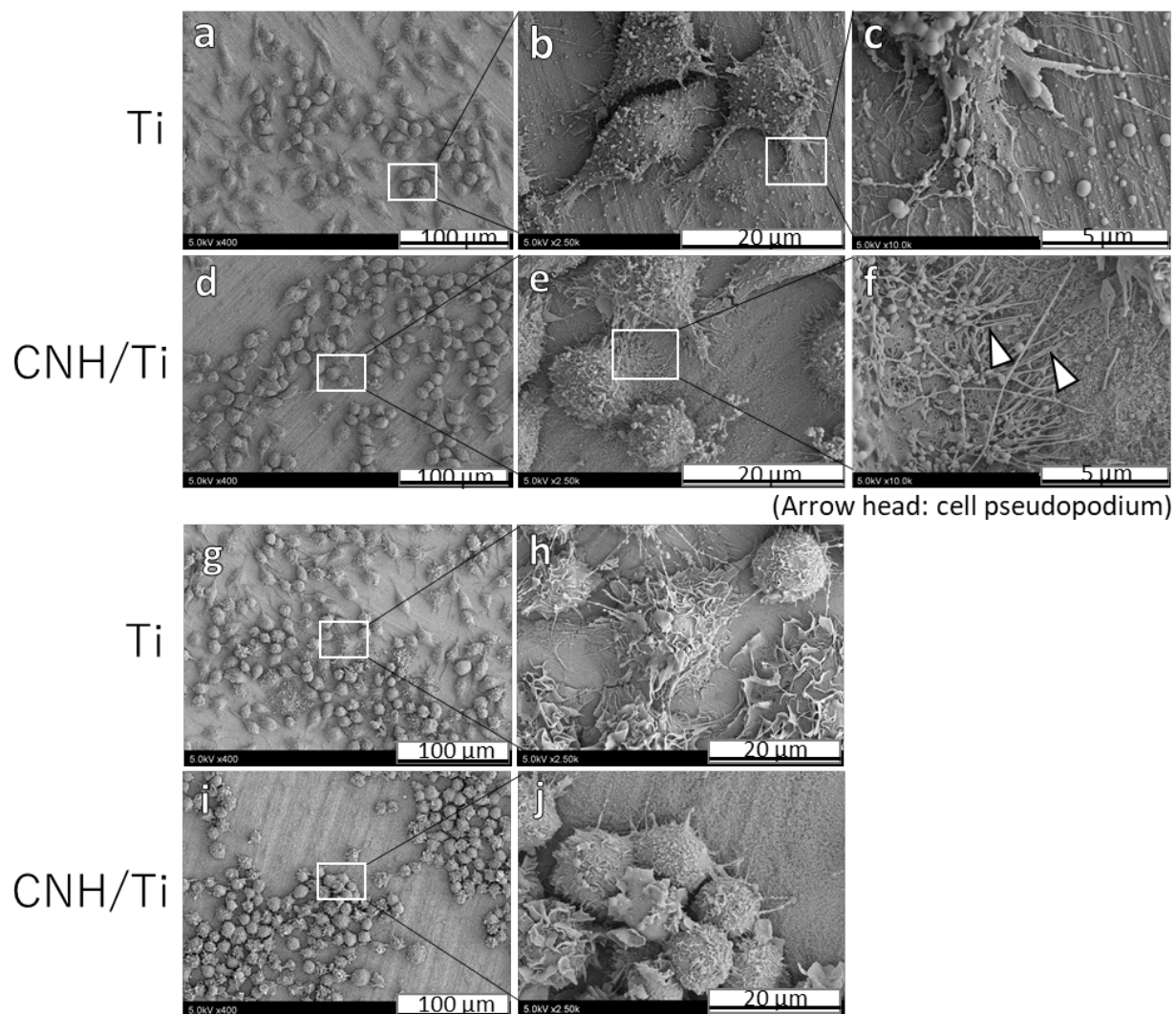


图 3.

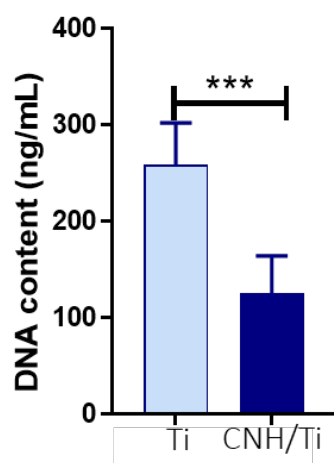


图 4.

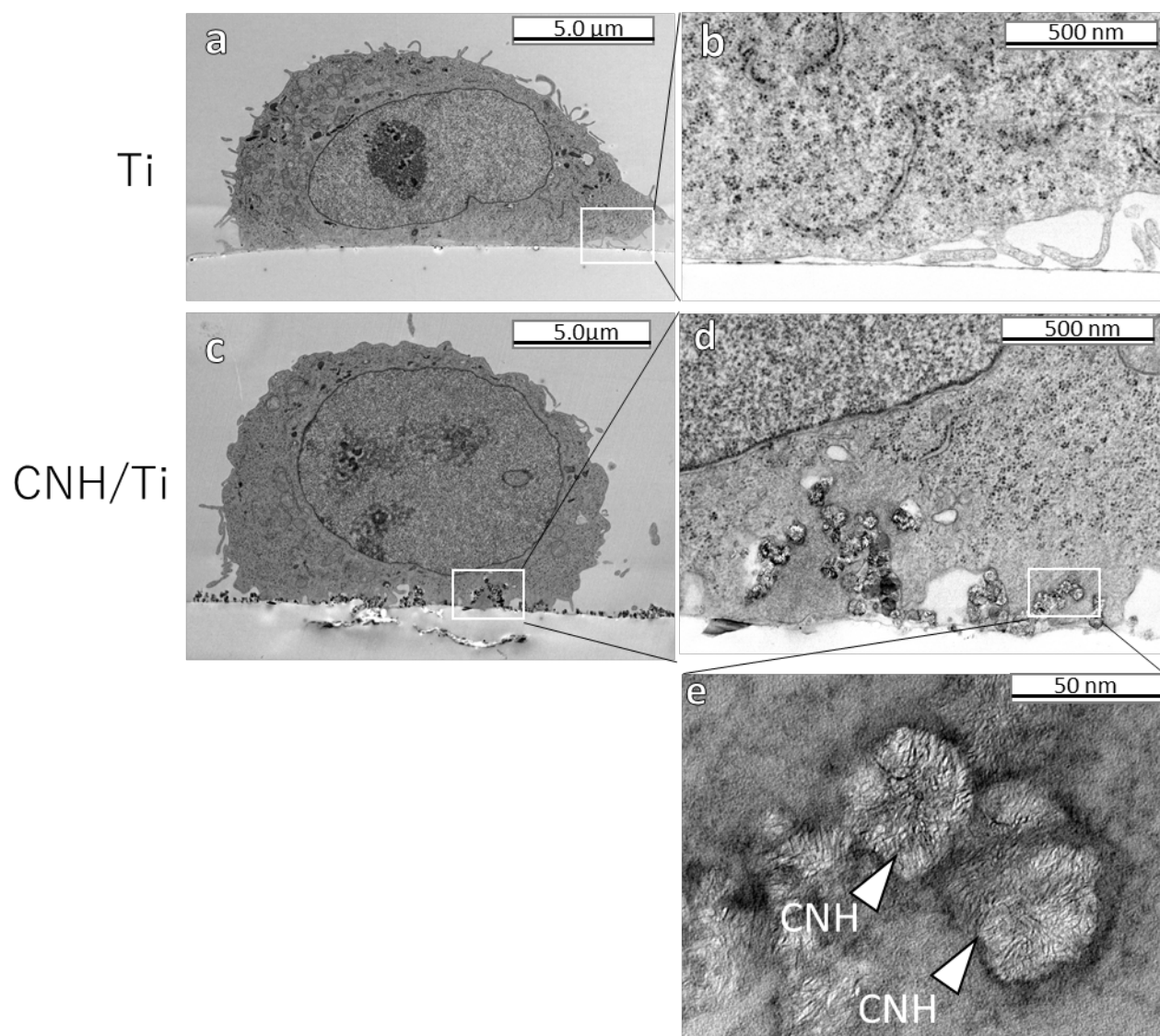
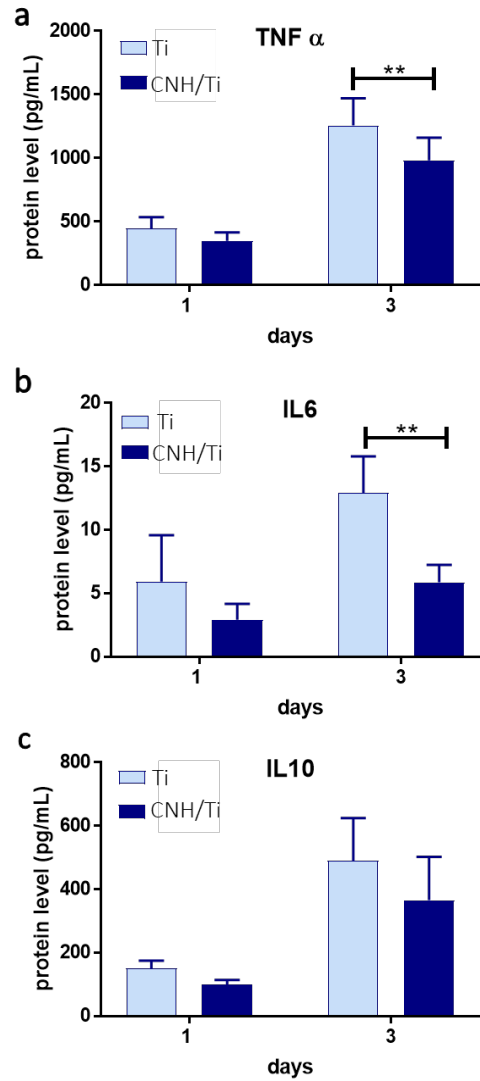


图 5.



6.

(a) up-regulated (average\_strict)

| Term   | Count | % | PValue | List Total | Pop Hits | Fold | Bonferroni | FDR |
|--------|-------|---|--------|------------|----------|------|------------|-----|
| (none) |       |   |        |            |          |      |            |     |

(b) down-regulated (average\_strict)

| Term                                                                            | Count | %     | PValue   | List Total | Pop Hits | Fold | Bonferroni | FDR      |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|----------|------------|----------|------|------------|----------|
| GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated                           | 198   | 22.15 | 2.76E-22 | 794        | 2279     | 1.98 | 8.31E-19   | 4.97E-19 |
| GO:0006351 transcription, DNA-templated                                         | 160   | 17.90 | 1.92E-16 | 794        | 1885     | 1.93 | 6.69E-13   | 4.00E-13 |
| GO:0006974 cellular response to DNA damage stimulus                             | 58    | 6.49  | 2.64E-14 | 794        | 420      | 3.14 | 7.96E-11   | 4.76E-11 |
| GO:0007049 cell cycle                                                           | 72    | 8.05  | 6.47E-14 | 794        | 614      | 2.67 | 1.95E-10   | 1.16E-10 |
| GO:0006281 DNA repair                                                           | 46    | 5.15  | 3.49E-12 | 794        | 318      | 3.29 | 1.05E-08   | 6.28E-09 |
| GO:0016569 covalent chromatin modification                                      | 39    | 4.36  | 1.29E-10 | 794        | 266      | 3.34 | 3.90E-07   | 2.33E-07 |
| GO:0051301 cell division                                                        | 45    | 5.03  | 2.59E-09 | 794        | 374      | 2.74 | 7.80E-06   | 4.67E-06 |
| GO:0007067 mitotic nuclear division                                             | 37    | 4.14  | 5.41E-09 | 794        | 277      | 3.04 | 1.63E-05   | 9.75E-06 |
| GO:0007059 chromosome segregation                                               | 20    | 2.24  | 7.98E-09 | 794        | 89       | 5.12 | 2.40E-05   | 1.44E-05 |
| GO:0006468 protein phosphorylation                                              | 52    | 5.82  | 1.52E-06 | 794        | 576      | 2.06 | 4.56E-03   | 2.74E-03 |
| GO:0045944 positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter | 77    | 8.61  | 1.57E-06 | 794        | 995      | 1.76 | 4.71E-03   | 2.83E-03 |
| GO:0006397 mRNA processing                                                      | 35    | 3.91  | 2.08E-06 | 794        | 322      | 2.48 | 6.25E-03   | 3.75E-03 |
| GO:0008380 RNA splicing                                                         | 29    | 3.24  | 2.63E-06 | 794        | 241      | 2.74 | 7.89E-03   | 4.73E-03 |
| GO:0006260 DNA replication                                                      | 19    | 2.13  | 6.86E-06 | 794        | 123      | 3.52 | 2.04E-02   | 1.24E-02 |
| GO:0045893 positive regulation of transcription, DNA-templated                  | 49    | 5.48  | 1.57E-05 | 794        | 576      | 1.94 | 4.61E-02   | 2.82E-02 |
| GO:0016310 phosphorylation                                                      | 51    | 5.70  | 1.78E-05 | 794        | 612      | 1.90 | 5.21E-02   | 3.20E-02 |

7.

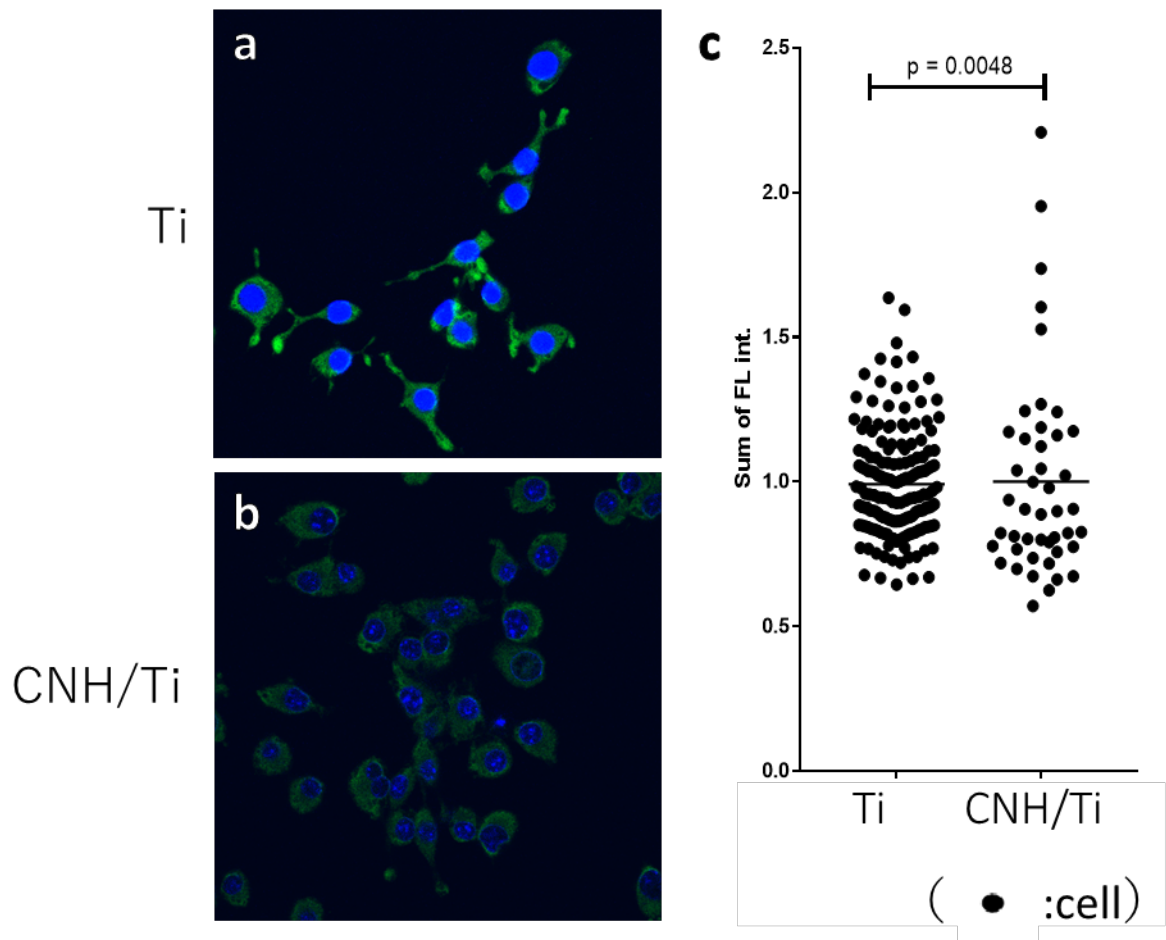


図 8.

## 付図説明

図 1. 泳動電着法の模式図.

図 2. Ti (a) と CNH/Ti (b)の実体顕微鏡写真, CNH-COOH の観察像 (c), Ti 表面 (d)と CNH/Ti 表面 (e, f) の SEM 観察像. Ti 断面 (g)と CNH/Ti 断面 (h, i) の FIB-SEM 観察像. Vd: 蒸着 Au 層.

図 3. SEM 観察像. 細胞培養 1 日後の Ti (a)ならびに高倍率 (b,c). CNH/Ti (d)ならびに高倍率での観察像 (e,f). 矢頭は伸展した細胞の仮足を示す. 培養 3 日後の Ti (g)ならびにその高倍率での観察像 (h). CNH/Ti (i)ならびにその高倍率 (j).

図 4. 培養 3 日目の細胞の DNA 含有量; n=5. \*p<0.001

図 5. 培養 3 日後の細胞断面の TEM 観察像. Ti の細胞 (a)と Ti への接着部分 (b). CNH/Ti の細胞 (c)と CNH/Ti への接着部分 (d) 高倍率での観察像 (e). 白矢頭: CNHs.

図 6. ELISA によるサイトカイン量の測定結果. TNF $\alpha$  (a), IL6 (b), IL10 (c). \*p<0.01 . (IL-6: n=4, TNF $\alpha$ : N=6, IL-10: N=6)

図 7. DNA マイクロアレイの Gene Ontology 解析によって有意差みられた遺伝子セット. 上方制御された遺伝子セット 0 件 (a), 下方制御された遺伝子セット 16 件 (b).

図 8. CD206 を蛍光免疫染色し CLSM で観察した Ti 上 (a)と CNH/Ti 上 (b)でのマクロファージ . (青色: DAPI, 緑色: CD206) 蛍光強度を数値化し, 正規分布の平均を基準として規格化したグラフ (c).

## 参考文献

- (1) Hirata, E.; Uo, M.; Takita, H.; Akasaka, T.; Watari, F.; Yokoyama, A. Multiwalled Carbon Nanotube-Coating of 3D Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Carbon N. Y.* **2011**, *49* (10), 3284–3291.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.04.002>.
- (2) Pei, B.; Wang, W.; Dunne, N.; Li, X. *Applications of Carbon Nanotubes in Bone Tissue Regeneration and Engineering: Superiority, Concerns, Current Advancements, and Prospects*; 2019; Vol. 9.  
<https://doi.org/10.3390/nano9101501>.
- (3) Usui, Y.; Aoki, K.; Narita, N.; Murakami, N.; Nakamura, I.; Nakamura, K.; Ishigaki, N.; Yamazaki, H.; Horiuchi, H.; Kato, H.; Taruta, S.; Kim, Y. A.; Endo, M.; Saito, N. Carbon Nanotubes with High Bone-Tissue Compatibility and Bone-Formation Acceleration Effects. *Small* **2008**, *4* (2), 240–246.  
<https://doi.org/10.1002/sml.200700670>.
- (4) Hirata, E.; Miyako, E.; Hanagata, N.; Ushijima, N.; Sakaguchi, N.; Russier, J.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Bianco, A.; Yokoyama, A. Carbon Nanohorns Allow Acceleration of Osteoblast Differentiation: Via Macrophage Activation. *Nanoscale* **2016**, *8* (30), 14514–14522. <https://doi.org/10.1039/c6nr02756c>.
- (5) Iijima, S.; Yudasaka, M. Nano-Aggregates of Single-Walled Graphitic Carbon Nano-Horns. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *309* (August), 165–170. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(99\)00642-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(99)00642-9).
- (6) Miyawaki, J.; Yudasaka, M.; Azami, T.; Kubo, Y.; Iijima, S. Toxicity of Single-Walled Carbon Nanohorns. *ACS Nano* **2008**, *2* (2), 213–226. <https://doi.org/10.1021/nn700185t>.
- (7) Kasai, T.; Matsumura, S.; Iizuka, T.; Shiba, K.; Kanamori, T.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Yokoyama, A. Carbon Nanohorns Accelerate Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defect. *Nanotechnology* **2011**, *22* (6), 065102.

<https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/6/065102>.

- (8) Tahara, Y.; Miyawaki, J.; Zhang, M.; Yang, M.; Waga, I.; Iijima, S.; Irie, H.; Yudasaka, M. Histological Assessments for Toxicity and Functionalization-Dependent Biodistribution of Carbon Nanohorns. *Nanotechnology* **2011**, *22* (26). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/26/265106>.
- (9) Zhang, M.; Jasim, D. A.; Ménard-Moyon, C.; Nunes, A.; Iijima, S.; Bianco, A.; Yudasaka, M.; Kostarelos, K.; Cho, I. H.; Chung, Y. M.; Park, C. K.; Park, S. H.; Li, H. Y.; Kim, D.; Piao, Z. G.; Choi, S. Y.; Lee, S. J.; Park, K.; Kim, J. S.; Jung, S. J.; Oh, S. B.; Zhang, M.; Jasim, D. A.; Ménard-Moyon, C.; Nunes, A.; Iijima, S.; Bianco, A.; Yudasaka, M.; Kostarelos, K. Radiolabeling, Whole-Body Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography Imaging, and Pharmacokinetics of Carbon Nanohorns in Mice. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11* (1), 3317–3325. <https://doi.org/10.2147/IJN.S103162>.
- (10) Sica, A.; Mantovani, A. Plasticity and Polarization. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (3), 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643DS1>.
- (11) Graney, P. L.; Lurier, E. B.; Spiller, K. L. Biomaterials and Bioactive Factor Delivery Systems for the Control of Macrophage Activation in Regenerative Medicine. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4* (4), 1137–1148. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00747>.
- (12) Italiani, P.; Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* **2014**, *5* (OCT), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>.
- (13) Kinaret, P. A. S.; Scala, G.; Federico, A.; Sund, J.; Greco, D. Carbon Nanomaterials Promote M1/M2 Macrophage Activation. *Small* **2020**, *16* (21). <https://doi.org/10.1002/sml.201907609>.

- (14) Martinez, F. O.; Gordon, S. The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment. *F1000Prime Rep.* **2014**, *6* (March), 1–13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>.
- (15) Orecchioni, M.; Ghosheh, Y.; Pramod, A. B.; Ley, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.* **2019**, *10* (MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>.
- (16) Schmitz, T.; Jannasch, M.; Weigel, T.; Moseke, C.; Gbureck, U.; Groll, J.; Walles, H.; Hansmann, J. Nanotopographical Coatings Induce an Early Phenotype-Specific Response of Primary Material-Resident M1 and M2 Macrophages. *Materials (Basel)*. **2020**, *13* (5), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ma13051142>.
- (17) Brown, B. N.; Londono, R.; Tottey, S.; Zhang, L.; Kukla, K. A.; Wolf, M. T.; Daly, K. A.; Reing, J. E.; Badylak, S. F. Macrophage Phenotype as a Predictor of Constructive Remodeling Following the Implantation of Biologically Derived Surgical Mesh Materials. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (3), 978–987. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.031>.
- (18) Vi, L.; Baht, G. S.; Whetstone, H.; Ng, A.; Wei, Q.; Poon, R.; Mylvaganam, S.; Gryn timer, M.; Alman, B. A. Macrophages Promote Osteoblastic Differentiation In-Vivo: Implications in Fracture Repair and Bone Homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* **2015**, *30* (6), 1090–1102. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2422>.
- (19) Iijima, S.; Yudasaka, M. Nano-Aggregates of Single-Walled Graphitic Carbon Nano-Horns. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *309* (August), 165–170. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(99\)00642-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(99)00642-9).
- (20) Fan, J.; Yudasaka, M.; Kasuya, D.; Azami, T.; Yuge, R.; Imai, H.; Kubo, Y.; Iijima, S. Micrometer-Sized Graphitic Balls Produced Together with Single-Wall Carbon Nanohorns. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (21),

10756–10759. <https://doi.org/10.1021/jp050548y>.

- (21) Umeyama, T.; Tezuka, N.; Kawashima, F.; Seki, S.; Matano, Y.; Nakao, Y.; Shishido, T.; Nishi, M.; Hirao, K.; Lehtivuori, H.; Tkachenko, N. V.; Lemmetyinen, H.; Imahori, H. Carbon Nanotube Wiring of Donor-Acceptor Nanograins by Self-Assembly and Efficient Charge Transport. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (20), 4615–4619. <https://doi.org/10.1002/anie.201007065>.
- (22) Sari, T.; Eri, H.; Masatoshi, S.; Eijiro, M.; Yuta, T.; Natsumi, U.; Masako, Y.; Sumio, I.; Atsuro, Y. Carbon Nanohorn Coating by Electrodeposition Accelerate Bone Formation on Titanium Implant. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2021**, *in press*. <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1865388>.
- (23) Beranek, R.; Hildebrand, H.; Schmuki, P. Self-Organized Porous Titanium Oxide Prepared in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HF Electrolytes. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2003**, *6* (3), 12–15. <https://doi.org/10.1149/1.1545192>.
- (24) Yumoto, H.; Hirao, K.; Tominaga, T.; Bando, N.; Takahashi, K.; Matsuo, T. Electromagnetic Wave Irradiation Promotes Osteoblastic Cell Proliferation and Up-Regulates Growth Factors via Activation of the ERK1/2 and P38 MAPK Pathways. *Cell. Physiol. Biochem.* **2015**, *35* (2), 601–615. <https://doi.org/10.1159/000369722>.
- (25) Gilbert, L. C.; Rubin, J.; Nanes, M. S. The P55 TNF Receptor Mediates TNF Inhibition of Osteoblast Differentiation Independently of Apoptosis. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2005**, *288* (5 51-5). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00534.2004>.
- (26) Mountziaris, P. M.; Tzouanas, S. N.; Mikos, A. G. Dose Effect of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  on in Vitro Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Biodegradable Polymeric Microfiber Scaffolds. *Biomaterials* **2010**, *31* (7), 1666–1675. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.058>.

- (27) Qin, Z.; Fang, Z.; Zhao, L.; Chen, J.; Li, Y.; Liu, G. High Dose of TNF- $\alpha$  Suppressed Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells by Activating the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *J. Mol. Histol.* **2015**, *46* (4–5), 409–420. <https://doi.org/10.1007/s10735-015-9630-7>.
- (28) Huang, H.; Zhao, N.; Xu, X.; Xu, Y.; Li, S.; Zhang, J.; Yang, P. Dose-Specific Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Cell Prolif.* **2011**, *44* (5), 420–427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2011.00769.x>.
- (29) Shen, X.; Gu, H.; Ma, P.; Luo, Z.; Li, M.; Hu, Y.; Cai, K. Minocycline-Incorporated Multilayers on Titanium Substrates for Simultaneous Regulation of MSCs and Macrophages. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *102* (October 2018), 696–707. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.074>.
- (30) Mahon, O. R.; Browe, D. C.; Gonzalez-Fernandez, T.; Pitacco, P.; Whelan, I. T.; Von Euw, S.; Hobbs, C.; Nicolosi, V.; Cunningham, K. T.; Mills, K. H. G.; Kelly, D. J.; Dunne, A. Nano-Particle Mediated M2 Macrophage Polarization Enhances Bone Formation and MSC Osteogenesis in an IL-10 Dependent Manner. *Biomaterials* **2020**, *239* (January), 119833. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119833>.
- (31) Gordon, S. Alternative Activation of Macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3* (1), 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>.
- (32) Mosser, D. M.; Edwards, J. P. Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation. *Nat. Publ. Gr.* **2008**, *8*. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- (33) Benoit, M.; Desnues, B.; Mege, J.-L. Infections Macrophage Polarization in Bacterial. *J Immunol Ref.* **2008**, *181*, 3733–3739. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3733>.

- (34) Murray, P. J.; Wynn, T. A. Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11* (11), 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>.
- (35) Tan, K. S.; Qian, L.; Rosado, R.; Flood, P. M.; Cooper, L. F. The Role of Titanium Surface Topography on J774A.1 Macrophage Inflammatory Cytokines and Nitric Oxide Production. *Biomaterials* **2006**, *27* (30), 5170–5177. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.002>.