

報告番号	甲 第 14248 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Study on the application of carbon nanowalls for culturing osteoblasts
(カーボンナノウォールの骨芽細胞培養用足場応用に関する研究)

氏 名 市川 知範

論 文 内 容 の 要 旨

フラーレン、カーボンナノチューブ、グラフェンシートなどのカーボンナノ材料は、その発見以来様々な研究分野で大きな注目を集めている。カーボンナノウォール (CNWs) は、基板に対して多層グラフェンが垂直に配向したカーボンナノ材料であり、高伝導率や高アスペクト比といった特徴を有するため、電池の電極材料やセンサへの応用が研究されてきた。

臓器を移植することでしか有効な治療法がない病がある一方で、臓器の提供者が不足しているという、ドナー不足が世界的に深刻な問題であり、人工的に臓器や組織を再生する再生医療の分野に大きな注目が集まっている。この再生医療の技術開発に生体親和性の高いカーボンナノ材料が応用されており、これまで様々な研究がされてきた。また、骨組織では常に骨再生を行っており、その中でも骨芽細胞は、細胞が分化する際にオステオカルシンと呼ばれるたんぱく質を生成し、骨の形成だけでなく、筋力や記憶力を維持する働きがある。そのため、骨の再生医療のみならず、効率よくオステオカルシンを得るために、骨芽細胞を制御しながら培養し、効率よく細胞の増殖及び分化させることに大きな期待が集まっている。これまでの研究で、細胞を培養する上で、細胞の接着する足場の微細構造や、導電性の足場を用いた電気刺激の有無の影響によって、増殖・分化の仕方が変わることが報告されているが、その細胞増殖・分化の制御方法は確立されていなかった。CNWs は、液中でもその微細構造が凝集しない頑健性や、高導電率といった特徴を有することから、骨芽細胞の培養足場に応用し、骨芽細胞の増殖・分化を制御することを目的として研究を行った。本研究では、CNWs の作製方法から見直して、その微細構造を制御し、骨芽細胞培養足場

への応用する方法を新たに開発し、細胞増殖と分化の制御に関するメカニズムを明らかにしている。本論文は7章で構成されており、以下に各章の概要を示す。

第1章では、カーボン材料の細胞培養足場への応用可能性、ならびに再生医療の背景について述べた。医療技術の向上があるにもかかわらず、臓器ドナー不足が世界的に深刻な問題となっており、自身の細胞を培養し、目的の細胞・組織を得る再生医療に大きな注目が集まっている。その中でも、骨密度の減少は、加齢やアルコール、たばこ等の影響で進展するため、現代社会の生活習慣から骨密度の減少が影響する人口は増加傾向にある。一方、骨の役割は骨形成だけでなく、骨芽細胞が分化する際に生成されるオステオカルシンが筋力や記憶力の維持に重要な役割を果たしており、骨の再生技術の確立の波及効果は極めて広い領域に及んでいる。また、細胞培養における、足場の微細構造や電気刺激は細胞増殖と分化に影響を与えるため、微細構造を有し、高伝導率である CNWs を足場として用いる利点について詳細を説明している。これらを踏まえた本論文の目的および構成についても述べた。

第2章では、CNWs の合成手法、細胞の培養方法、およびその評価方法について述べた。初めに、CNWs の合成に用いたラジカル注入型プラズマ励起化学気相堆積法(RIPECVD)、合成時のプラズマ活性種診断に用いた発光分光分析装置 (OES)、CNWs の結晶性評価に用いたラマン分光法、CNWs の壁間隔の計測方法について述べた。次に、アクリルチャンバーを用いた細胞の培養方法、染色による細胞の形態評価、増殖評価方法、リアルタイム PCR を用いた骨芽細胞の分化の評価方法について述べた。

第3章では、CNWs 足場で培養された骨芽細胞様細胞に電気刺激(ES)を印加した際の増殖及び骨形成について述べた。微細構造を有する足場上では、細胞の接着形態が変化し、増殖・分化の様子が変わることや、骨芽細胞では ES の影響があることが知られている。しかしながら、微細構造足場上で培養しながら、ES を細胞に与えた例はなかった。本章では、CNWs を細胞培養の足場として使用しながら、CNWs 足場のみに 10Hz の矩形波の電流を流すことによって ES を印加する方法を新しく開発した。この CNWs 上で ES 印加した際の増殖及び骨形成についてヒト骨芽細胞様細胞 (Saos-2) を使って評価を行い、CNWs 足場上で培養された細胞は ES の印加により増殖は促進され、骨形成の指標である細胞外カルシウムの沈着は抑制される一方、一般的に骨形成のときに見られる細胞間の接着は促進される、特異な細胞応答を示すことが明らかとなった。本現象は、ES が細胞の膜に刺激が加わり細胞の増殖を促進したことや、細胞が CNWs の先端のみに接着する特異な接着形態であることにより引き起こされたと考察しており、本培養手法の有用性を述べた。

第4章では、CNWs の壁構造の隙間の平均間隔(壁間隔)を変化させた際に、CNWs 足場を使って ES を印加した細胞の増殖と遺伝子発現に与える影響について述べた。CNWs

は、多層グラフェンが垂直に配向したカーボンナノ材料であり、CNWs の合成条件を調整することで隣り合う多層グラフェンの間隔を変化させることが可能である。細胞の培養において、細胞が足場の表面に接着する際、微細な表面構造は細胞接着に影響を与えるため、足場の壁間隔の変化により、先行研究では、CNWs の壁間隔が Hela 細胞の細胞伸展率や増殖率に影響を与えると報告していた。本研究では、CNWs の壁間隔を変えた微細構造が、細胞の増殖・分化に与える影響について初めて明らかにした。本章では、骨芽細胞の分化への影響を述べた。壁間隔が 132 nm と 220 nm の異なる CNWs 足場を準備し、その足場上で培養した骨芽細胞様細胞に ES を印加した際の増殖および遺伝子発現量について評価した。壁間隔が 220 nm の CNWs 足場上では、ES を印加によって増殖が促進された。通常の商用ディッシュと比較して壁間隔が 132 nm の CNWs 上では約 7 倍、220 nm の CNWs 足場上では約 13 倍のオステオカルシンの発現量を確認し、壁間隔が大きい CNWs 足場上では、分化が促進された。また、CNWs 足場上の細胞は、細胞の骨格であるアクチンの重合が抑制され、ES を印加することでそのアクチンの発現箇所に変化が見られた。これらの結果から、CNWs 足場および ES が細胞内の骨格に影響を与え、その結果 ES による増殖促進と、CNWs 足場による分化が促進することが示唆された。したがって、本手法を用いることで、CNWs 足場上で二つの別々の効果である増殖・分化を制御でき、効率よくオステオカルシンを得られることが示された。

第 5 章では、CNWs の合成時に、基板に高電圧ナノ秒パルス印加し、壁間隔が疎な CNWs を合成する手法について述べた。前章では、壁間隔が大きくなることによって分化が促進されることを示した。しかし、従来の手法では、CNWs の壁間隔は 200-400 nm の狭い範囲でしか変更できていなかった。この課題に対して、静電誘導サイリスタを用いた誘導性エネルギー蓄積回路を合成基板側に接続し、高電圧ナノ秒パルスを RI-PECVD 法の合成中に印加することで、CNWs の壁間隔を拓げること成功した。パルス発生装置の入力電圧依存性を評価し、CNWs 合成中のナノ秒パルスの電圧電流特性は、パルスの最大電圧は一定に保たれたまま、入力電圧に従いパルスの最大電流量が増え、入力電圧の増加に伴いはパルスの電圧の時間変化は広がった。最適な条件を探索することで、入力電圧 150 V の時に、今までにない広い間隔をもつ約 3 μ m の平均壁間隔の CNWs が合成された。さらに、合成時間依存性を評価した結果、壁間隔は時間経過に従い減少していた。ナノ秒パルス印加中のプラズマの活性種に大きな変化がないことを示し、ナノ秒パルス印加に伴う間欠的な基板への高エネルギーイオン衝撃によって、ウォール成長核を阻害する形で、疎な CNWs が成長するメカニズムを考察した。本章では、高電圧ナノ秒パルスを RI-PECVD 法の下部電極に印加することで、基板へのイオン衝撃が、壁間隔が広がる現象を示し、新たな CNWs の合成方法を示した。

第 6 章では、疎な CNWs 足場が細胞の挙動に及ぼす影響について述べた。4 章で

は、壁間隔が 220 nm の CNWs 上で骨芽細胞の分化が促進されており、壁間隔の広い CNWs による分化促進効果を示した。また、5 章では疎な CNWs の合成方法を示し、本章ではこの疎な CNWs の足場の骨芽細胞の分化への影響を評価した。壁間隔が 100, 700, 3300 nm の CNWs 足場を作製し、細胞の分化への影響を評価した結果、壁間隔が 700 nm の CNWs 足場上で最もオステオカルシンが発現した。細胞の接着形態が分化に影響を及ぼすその理由の一つとして細胞の接着形態に着目し、細胞の接着形態は化学固定された上で走査型電子顕微鏡 (SEM) により評価し、壁間隔が 700 nm では CNWs の多層グラフェン構造の一つ一つが楔のように刺さり、細胞は CNWs を包み込んで、足場の底部分のカーボン膜にまで接着していた。それに対し、壁間隔が 100 nm では CNWs の先端のみに接着することや、壁間隔が 3300 nm では足場の底部分のカーボン膜にのみ接着している様子が観察された。また、アクチンの発現の蛍光観察も行い、細胞の大きさと同程度の壁間隔の CNWs 足場上では、細胞が足場に接着する際、微細構造の影響を受けやすくなり、細胞骨格の形成に影響して、分化が促進されたと考察した。本章は、平均壁間隔 1 μ m 程度の CNWs は骨芽細胞の分化を促進させるのに有用な足場であることを示した。

第 7 章では、本論文の要約および将来の展望について述べた。本研究では、CNWs の骨芽細胞の培養足場への応用可能性について、細胞の増殖、分化、形態の評価に基づき、CNWs 足場はその壁間隔や電気刺激の有無による増殖・分化の制御可能性を示した。故に、CNWs は骨芽細胞培養用足場として有用な材料であると結論付けた。本研究では、細胞培養において、CNWs 足場のみに電流を流すことで、細胞の増殖が促進されたことが明らかとなった。将来的には、骨芽細胞の培養足場として実用化するに向けて、足場のみに流した電流が細胞に、どのように影響しているのか、細胞の膜電位測定などを進めることによって、そのメカニズムを解明する必要がある。また、壁間隔によって細胞の分化の度合いが変化することを評価することで、壁間隔が 1 μ m 程度の CNWs で、分化が促進されることが明らかとなった。本現象の要因として、CNWs のもつ微細構造に対して特異な接着形態が細胞の分化を促進したことを考察した。この CNWs 足場の微細構造を、3 次元の立体構造として捉まえ、さらに構造を制御したときの分化への影響評価を実施することで、より高効率な分化促進用足場としての実現可能性が高まると考える。さらには、接着と分化の関係性について、より詳細な遺伝子発現を評価しメカニズムの解明することで、骨の再生医療に貢献していくことが期待される。