

学位論文題名

Magnetic Nanoparticles for Improving Cell Invasion in Tissue Engineering

(細胞浸潤性の向上を目指した細胞接着性磁性体ビーズの開発)

学位論文内容の要旨

導入：Tissue engineering は一般的に vitro で増殖させた細胞を足場となる担体(scaffold)に播種し細胞外マトリックス形成を促すというステップを踏む。この際播種された細胞が scaffold 深層にまで到達しにくいため深層・中心部では細胞が粗になりやすく、その結果十分な細胞増殖までに時間を要しマトリックス産生効率が低下するという問題が生じる。そこで scaffold 深層部への低い細胞浸潤能を改善させる効率的な細胞播種法の開発が課題となっている。

近年ナノテクノロジーの進歩により開発された磁性体ビーズが様々な分野に応用されている。今回我々は磁性体ビーズの Tissue engineering への応用として、キトサンでコートした磁性体ビーズを開発し、これを付着させた細胞に磁力を与えることにより scaffold 深層部への低い細胞浸潤能の改善を試みた。

本研究の目的はこのシステムによる細胞浸潤能の変化を検討すること、磁性体ビーズ付着による細胞の反応および細胞浸潤に関わる因子を検討することである。

実験方法および結果：キトサンでコートした直径約 200nm の磁性体ビーズを開発しヒト線維芽細胞へ導入した。細胞増殖性による磁性体ビーズの毒性評価、invasion assay による細胞浸潤能の評価、real-time PCR による MMP および細胞接着分子発現を評価した。統計学的評価には分散分析(ANOVA)を用いた。

細胞への導入により電顕像において細胞表面に多数の磁性体ビーズが付着していることが確認された。また磁性体ビーズ付着細胞をキチナーゼ/キトサナーゼで 48 時間処理することによりほとんどの磁性体ビーズが除去されていることが確認された。

細胞増殖性は吸光度で 12、24、48 時間後の細胞数を測定し評価した。細胞対磁性体ビーズが $1:10^5$ の high density group、 $1:10^4$ の middle density group、 $1:10^3$ の low density group の 3 群で control 群と比較した。high density group では 24、48 時間後において control 群に対して有意な低下がみられた。middle および low density group では control 群に対して有意差は認められなかった。

Invasion assay と mRNA 発現測定には以下の 5 つの experimental group を設定した。磁性体ビーズを付着させ最も強い磁力を与えた group (MNs-MF100%)、50%の磁力を与えた group (MNs-MF50%)、25%の磁力を与えた group (MNs-MF25%)、磁性体ビーズを付着させただけで磁力を与えない group (MNs)、そして磁性体ビーズも磁力もない control group (C)。

invasion assay は 8 μm のポアを I 型コラーゲンで塞いだインサート内に、蛍光標識した細胞を播種し、下方から磁力を与えてインサート底面側に浸潤した細胞を 6、12、24 時間後にプレートリーダーで bottom reading した(Fig. 1)。MNs-MF100% group で測定したすべての時間において細胞浸潤能の有意な上昇を認めた(control 比 : 124%、133%、138%)(Fig. 2)。

mRNA は MMP-1、8、13 および細胞接着分子として integrin $\alpha 5$ 、fibronectin の 24 時間後の発現を測定した。磁性体ビーズを付着させた group で MMP-1、13、integrin $\alpha 5$ の発現が上昇し、かつ磁力と正の相関を示した。

また MMP の細胞浸潤能への関与をみるために MMP inhibitor(GM6001)を加えて invasion assay を再検した。MNs-MF100% group にみられた細胞浸潤性の有意な上昇は消失した。

考察

キトサンでコートした磁性体ビーズを細胞に導入し磁力を与えることにより細胞浸潤能は上昇した。この傾向は最も強い磁力を与えた group にみられ、高い細胞浸潤能の獲得のためには十分な磁力が必要であることが示唆された。

MMP-1、8、13 の mRNA の発現上昇および MMP inhibitor の添加により細胞浸潤性の上昇が消失した結果から本システムの細胞浸潤性の上昇には磁力と共に磁性体ビーズ付着細胞からの MMP の発現・分泌増加が大きく関与していると考えられた。

キトサンは自然界に存在する biocompatibility、biodegradability、antimicrobial などの性質を有する物質で毒性が低いため様々な分野に利用されている。今回細胞に付着した磁性体ビーズのほとんどをキチナーゼ/キトサナーゼ処理により除去できたことも臨床への応用を考慮した場合、新たな細胞播種法の有用な候補となり得る可能性を示している。

本研究で開発されたシステムを tissue engineering へ応用することにより、scaffold 深層部への低い細胞浸潤能を改善させ、より効率的な細胞播種法を実現させることが期待される。

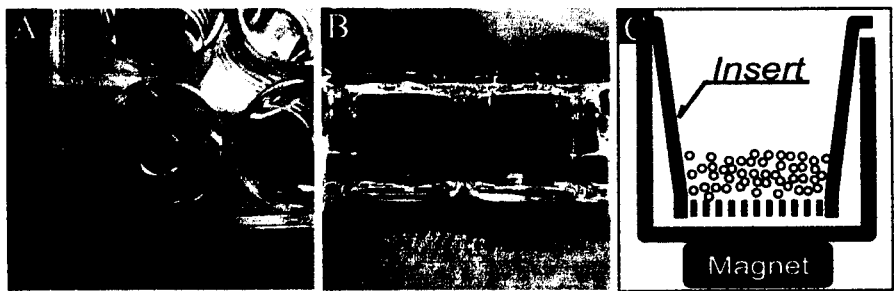


Fig. 1

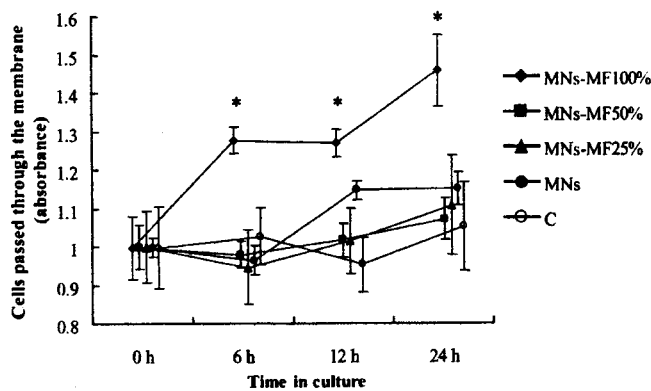


Fig. 2

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則
副 査 教 授 藤 堂 省
副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

Magnetic Nanoparticles for Improving Cell Invasion in Tissue Engineering

(細胞浸潤性の向上を目指した細胞接着性磁性体ビーズの開発)

Tissue engineering において細胞播種時に細胞が scaffold 深層にまで到達しないため深層・中心部で細胞が粗になり、その結果十分な細胞増殖までに時間を要しマトリックス産生効率が低下するという問題が生じる。そこで scaffold 深層部への低い細胞浸潤能を改善させる効率的な播種法の開発が課題となっている。本研究ではキトサンでコートした磁性体ビーズを付着させた細胞に磁力を与えることにより低い細胞浸潤能の改善を試みた。本研究の目的はこのシステムによる細胞浸潤能の変化を検討すること、磁性体ビーズ付着による細胞の反応および細胞浸潤に関わる因子を検討することである。直径約 200nm の磁性体ビーズをヒト線維芽細胞へ導入し、細胞増殖性による磁性体ビーズの毒性評価と、invasion assay による細胞浸潤能の評価と、real-time PCR による MMP および細胞接着分子発現の評価を行った。電顕像により細胞表面への多数の磁性体ビーズの付着が、さらにキチナーゼ/キトサナーゼ処理によりほとんどの磁性体ビーズの除去が確認された。細胞増殖性は吸光度で 12、24、48 時間後の生細胞数を測定し評価した。細胞対磁性体ビーズが $1:10^5$ の high density group で 24、48 時間後において control 群に対して有意な低下がみられた、 $1:10^4$ の middle density group、 $1:10^3$ の low density group では control 群に対して有意差は認められなかった。Invasion assay は底面膜の 8 μm のポアを I 型コラーゲンでコートし塞いだインサート内に蛍光標識した細胞を播種し、下方から磁力を与えて 6、12、24 時間後に膜底面側に浸潤した細胞をプレートリーダーで bottom reading した。磁性体ビーズを付着させ最も強い磁力を与えたグループですべての時間における細胞浸潤能の有意な上昇を認めた。mRNA は磁性体ビーズを付着させたグループにおいて MMP-1、13、integrin $\alpha 5$ の発現が上昇し、かつその発現上昇は磁力と正の相関を示した。また MMP inhibitor を加えた invasion assay の再検では最も強い磁力を与えたグループにみられた細胞浸潤能の有意な上昇は消失した。本研究の結果により高い細胞浸潤能の獲得のためには磁性体ビーズの細胞への付着と同時に十分な磁力の存在が必要であることが示唆された。また本システムの細胞浸潤能の上昇には磁力と共に磁性体ビーズ付着細胞からの MMP の発現・分泌増加が大きく関与していると考えられた。審査にあたり副査藤堂教授より tissue engineering において問題となる O_2 供給に関連して具体的に考えている scaffold の形態(長さ、厚さ)について質問があり、現在はインサートの厚さ $1\mu\text{m}$ 未満の底面膜を浸潤した細胞に有意差が出たという段階であり、応用にあたってはさらなる基礎研

究が必要であると回答した。副査三浪教授より磁性体ビーズの除去後の細胞増殖性への影響について質問があり、ビーズ除去後も細胞増殖に影響がみられなかったため問題はないと考えられると回答した。また、主査安田教授より磁場を与えることによる MMPs の発現上昇の理由について質問があり、印象としてではあるが、磁性体ビーズ付着という物理的な現象の他に I 型コラーゲンで塞いだポアを塞いだインサート底面膜に圧着させられることによるに力学的な要因も影響していると思われると回答した。

この論文は新しい細胞播種法における細胞浸潤能を評価し、それに関わる因子の検討まで行った独創的な研究であり、この新しい細胞播種システムにより scaffold 深層部への低い細胞浸潤能を改善させ、より効率的な細胞播種法を実現させることが期待される。

審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受ける資格を有すると判定した。