

学 位 論 文 題 名

Application of carbon nanotubes for 3D cell culture scaffold

(カーボンナノチューブの 3 次元細胞培養担体への応用)

学位論文内容の要旨

【緒言】

カーボンナノチューブ (CNTs) は炭素六員環がチューブ状に結合したものである。機械的特性や化学的安定性に優れ、良好な細胞増殖や強固な細胞接着を示すことから生体材料への応用が期待されている。一方、多孔性の 3 次元細胞培養担体は培養面積の増加や立体的な構造の構築が期待されているが、担体内部、特に深部における細胞の接着や増殖については明らかにされていない。今回、CNTs 特有の立体構造に着目し、3 次元細胞培養担体の 1 つであるコラーゲンスポンジの表面を CNTs でコートすることを考案した。本研究の目的は、CNT を応用した優れた細胞付着性を有する 3 次元培養担体を開発し、その細胞培養特性を評価するとともに、CNTs が細胞に及ぼす影響を明らかにすることである。

【材料と方法】

1. CNT コートスポンジの作製

精製および親水化処理した多層カーボンナノチューブ (CNT Co.Ltd.) を界面活性剤水溶液 (コール酸ナトリウム: 0.1w/v%) に 100ppm になるよう分散させた。コラーゲンスポンジハニカム(サイズを明記 AteloCell; Koken) に同分散液を浸透後に、余剰 CNTs を洗浄し、CNT コートスポンジを作製した。

2. 細胞培養特性の評価

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を、 1.0×10^5 個/scaffold となるよう同スポンジに播種した。14 日間培養した後、スポンジ全体に付着した細胞について、DNA 量および ALP 活性を測定した。また、7 日目における同スポンジの中央部の切片を作製し、HE 染色を施し、光学顕微鏡による細胞付着状況の観察を行った。

3. 担体中心部における細胞付着状態の観察

ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (Saos2) を、 1.0×10^5 個/scaffold となるよう同スポンジに播種した。7 日間培養後、細孔の走行に沿ってスポンジを縦断し、走査電子顕微鏡 (SEM: Hitachi, S4000) にてスポンジ中心部での細胞の付着状態と形態を観察するとともに、その細胞数を測定し細胞付着性を評価した。さらに、播種直後である 15 分後と 60 分後における付着細胞の形態観察を行った。

4. TEM 観察

ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (Saos2) を、 1.0×10^5 個/scaffold となるよう同スポンジに播種した。14 日間培養し、固定後エポキシレジンに包埋し 80nm に薄切し、CNT コートスポンジに接触した細胞を透過型電子顕微鏡 (TEM: Hitachi, H800)にて観察した。

さらに核内に取り込まれた CNTs について高分解能透過電子顕微鏡 (HRTEM: JEOL, JEM-2010) にて観察を行った。

【結果】

1. CNT コートスポンジの形態

CNTs は、特有の線維状構造を保持した状態でコラーゲンスポンジ表面を均一に被覆していた。また、CNTs コート後もコラーゲンスポンジの細孔構造は保たれていた。

2. CNT コートスポンジの細胞培養特性

細胞培養 1 および 2 週後において、CNT コートスポンジ全体に付着した細胞の DNA 量と ALP 活性は未処理のスポンジのものと比較して有意に高い値を示した。光学顕微鏡による観察では、未処理のスポンジ内壁にはほとんど細胞が付着していなかったが、CNT コートスポンジ内壁には細胞が付着し壁に沿って伸展している状態が観察された。

3. 担体中心部における細胞付着状態の観察

スポンジ中心部において、培養 3 日後では未処理のスポンジ内表面には細胞はほとんどみられないのに対し CNT コートスポンジ中心部では、多くの細胞が付着していた。7 日後には、未処理のスポンジ中心部では細胞数はやや増加しているものの、CNT コートスポンジ中心部に付着した細胞数は有意に高いことが示された。細胞播種 15 分後、未処理のスポンジ中心部に付着した細胞は極めて少なく、その細胞も仮足は数本伸展しているのみであった。一方 CNT コートスポンジでは中心部においても多くの細胞が付着しており、多数の仮足が伸展し、CNTs と絡まっているような像が観察された。細胞播種 60 分後には、未処理のスポンジ中心部に付着した細胞は仮足の伸展がみられるものの、細胞形態は球状であるのに対し、CNT コートスポンジでは扁平化した細胞から多くの仮足が伸展し、CNTs と交差している状態が観察された。無血清培地を使用し、細胞播種 1 時間後において、同様に中心部に付着した細胞数を計測したところ、有血清培地と比較して付着細胞数に変化はみられなかった。

4. TEM 観察

3 日後において、CNTs は細胞膜を貫通し、細胞内にとりこまれている像が観察された。また、CNT の凝集物はエンドソームの中にも観察された。7 日後においても、CNT は細胞質内で観察され、一部の短いものは、核内にとりこまれている状態が観察された。この CNTs について HRTEM により詳細な観察を行ったところ、CNTs の多層構造は明瞭であり、核内に取り込まれた後でもその構造の変化はみられなかった。14 日後においても CNT コートスポンジ上で細胞内小器官は未処理のスポンジ上のものと比較し、形態的にはほとんど変化がない状態が観察された。

【考察】

CNTs 分散液にコラーゲンスポンジを浸漬させることにより、コラーゲンスポンジの立体構造を保ちながら、CNTs を表面に均一にコートした CNT コートスポンジの作製が可能となった。CNT コートスポンジ全体に付着した細胞の DNA 量は未処理のスポンジと比較して有意に高いことから、CNT コートによって細胞の付着量が向上したと考えられた。スポンジ中央部の光学顕微鏡による観察から、とくに中心部への細胞の付着性が改善したと考えられた。

これを定量的に評価するため、スポンジ中心部に限定した SEM 観察を行ったところ、培養 3 日後および 7 日後において CNT コートスポンジ中心部に付着した細胞は未処理のスポンジのものと比較して有意に高いことが判明した。さらに、細胞播種 15 分後および 60 分後における、両スポンジ中心部の観察より、CNT コートスポンジでは細胞播種直後から、良好に細胞が付着し、早期に伸展すると考えられた。また、無血清培地を使用した場合の、スポンジ中心部の細胞付着量は有血清培地のものと同等であった。これより CNTs が血清中の細胞接着タンパクと結合し、それを介して細胞の初期接着が誘導されるというよりも、CNTs 特有の微細構造に細胞がトラップされることによるものと推察された。

CNT コートスポンジに付着した細胞について、TEM による詳細な観察を行ったところ、3 日および 7 日後において、CNT は細胞質内で観察され、一部の短いものは核内にとりこまれている状態が観察された。HRTEM により詳細な観察を行ったところ、CNT の多層構造は明瞭であり、核内に取り込まれた後でもその構造にほとんど変化はみられなかった。14 日後においても CNT コートスポンジ上で細胞内小器官は未処理のスポンジ上のものと比較し、形態的にほとんど変化ない状態が観察された。以上より、CNT コートスポンジ表面の一部の CNTs は細胞内に取り込まれ、短いものにおいては核内にも移行するが、細胞内小器官の形態や細胞増殖に与える影響は少ないと考えられた。

【結論】

CNT コートスポンジは、細胞播種時において担体細孔内への優れた細胞付着性を持つ 3 次元細胞培養担体であることが明らかになった。この性質を利用して、骨細胞移植などへの応用が期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 山 敦 郎

副 査 教 授 亘 理 文 夫

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Application of carbon nanotubes for 3D cell culture scaffold

(カーボンナノチューブの3次元細胞培養担体への応用)

審査は、主査、副査が一堂に会し、論文提出者が論文内容の要旨を説明しながら、その内容について審査担当者が口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文要旨

カーボンナノチューブ(CNTs)は炭素六員環がチューブ状に結合したものであり機械的特性や化学的安定性に優れ、良好な細胞増殖や強固な細胞接着を示すことから生体材料への応用が期待されている。本研究においては、CNTs 特有の構造に着目し、3次元細胞培養担体の1つであるコラーゲンスポンジの表面をCNTs でコートすることにより優れた細胞付着性を有する CNT コートスポンジを開発し、細胞培養特性およびCNTs が細胞に及ぼす影響を評価した。

多層カーボンナノチューブ分散液にコラーゲンスポンジハニカムを浸漬し、CNT コートスポンジを作製した。次にヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞(Saos-2)を、同スポンジに播種し、SEM にてスポンジ内部での細胞の付着状態や形態を観察するとともに、中心部に付着している細胞数を測定し細胞付着性を評価した。また、TEM にて細胞とスポンジの界面ならびに細胞内小器官を観察した。コラーゲンスポンジ表面はCNTs 特有の構造を保持した状態で均一にコートされており、CNTs コート後もコラーゲンスポンジの細孔構造は保持されていた。細胞培養後のスポンジ中心部の SEM 観察においては、CNT コートスポンジ内側面には良好な Saos2 の付着が認められた。また、細胞播種直後ではコラーゲンスポンジ内側面に細胞が付着していなかったが、CNT コートスポンジ内側面では細胞は播種直後に付着し、伸展していた。この細胞播種直後における付着性の向上は、CNTs 特有の微細構造によるものと推察された。また、TEM 観察の結果、核内にCNTs が観察されたが、培養後の細胞内小器官の構造の変化は見られず、細胞増殖に与える影響は少ないことが示された。以上より、CNT コートスポンジは担体細孔内への優れた細胞付着性を有し、3次元細胞培養に有効であることが明らかになった。

審査の内容

1. CNTs を 3 次元化する理由について

従来の 3 次元細胞培養担体は中心部にまで細胞を付着させることは困難であった。これまでの CNTs 膜上での細胞培養の結果、細胞の特徴的な接着状態が観察されており、CNTs 特有の構造を表面修飾することによって細胞の付着性を向上させることができると考えた。

2. CNTs を親水化した上で、さらにコール酸を使用して分散させる理由について

未処理の CNTs は分散性が極めて低いため、コハク酸を使用してカルボキシル基を付与した。コラーゲンスポンジ表面を均一にコートするためには、さらに分散性を向上させる必要があり、界面活性剤であるコール酸を使用した。

3. CNTs はどのように細胞に取り込まれ、核に移行するか。その細胞への影響について。

CNTs は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、短いものは核孔より核内へと移行することが報告されている。本研究では、CNT コートスポンジ表面の CNTs の一部が細胞内に取り込まれ短いものが核内に侵入したと考えられる。CNTs が核内に移行しても未処理のスポンジと比較して細胞増殖、ALP 活性、および細胞内小器官の変化もないことから、その影響は低いと考えられる。

4. CNT コートスポンジの臨床応用への可能性について

CNT コートスポンジは播種時において細胞が中心部にまで付着する。しかしながら、3 次元細胞培養担体では長期間培養すると表面における細胞の増殖が早いため、内部への培地循環が低下し中心部の細胞が増殖しにくい。そこで、回転式バイオリアクターを使用して、内部への培地循環を向上させ、細胞を 3 次元的に担体内で増殖させ、骨欠損部に移植する応用法が考えられる。

本研究は、コラーゲンスポンジの表面を CNTs にて均一に修飾した CNT コートスポンジの開発とその培養特性の評価に関するものであり、CNT コートスポンジは、播種時に細胞が内部にまで付着する特徴を有することを明らかにした。この特徴を利用した骨芽細胞移植等の骨再生療法への応用が期待される。また、歯科臨床においてインプラントの支持に必要な骨増生法としても応用可能な有意義な研究であると評価され、今後の発展も期待できる。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいものと認めた。