

学位論文題名

Culture of ES cells and mesenchymal stem cells on
carbon nanotube scaffolds

(カーボンナノチューブ上における ES 細胞, 間葉系幹細胞の培養)

学位論文内容の要旨

[緒言]

カーボンナノチューブ(CNT)をスカフォールドとして培養した骨芽細胞様細胞(Saos2)は強い接着・伸展性を示す事が知られている。しかし、分化度の低い幹細胞や ES 細胞に及ぼす影響はまだよく知られていない。本研究では、マウス ES 細胞 (embryonic stem cell)とラット骨髄由来間葉系幹細胞(Marrow derived mesenchymal stem cell: MSC)の CNT に対する細胞付着増殖性を調べ、さらに MSC の伸展性、ALP 活性、石灰化に及ぼす影響を調べることを目的とした。

[材料および方法]

胚性幹細胞としてマウス ES 細胞(EL M3)、骨髄由来間葉系幹細胞としてラット MSC を用いた。多層カーボンナノチューブ(MWCNT:直径 20-30nm)を吸引濾過法でポリカーボネートメンブレンフィルター上に高密度に全面コートしたスカフォールドを作成し、24well ディッシュ上に固定した。ES 細胞は、①24 well ディッシュ (ゼラチン(-)ディッシュ)、ES 細胞培養で推奨されている②ゼラチン・コートディッシュ(ゼラチン(+))ディッシュ、③CNT・コートディッシュ(CNT ディッシュ)の3種の培養基盤上に 10^5 cells/well 播種し、ES 細胞用培地を用いて、37°C、5% CO₂ で 1、3 日間、培養した。

MSC は、5 週齢ラット大腿骨骨髄から Maniopoulos 法により採取、分離し、①24 well ディッシュ (control)、②CNT・コートディッシュの培養基盤に 10^5 cells/well 播種し、 α MEM 培地に 10%FBS、1% 抗生剤、さらに骨芽分化誘導剤 DEX および β -GP を添加し、37°C、5% CO₂ で 1 日、2、3、4 週間培養した。

DNA 量測定は蛍光法、ALP 活性測定は Kind-King 法、Calcium 量測定は orthocresolphthalein complexone 法、Calcium 検出は Alizarin red S 染色を用いた。培養液中の浮遊細胞数は、血球計算盤で、細胞数を測定した。

電子顕微鏡で形態観察を行い、CNT 以外では光学顕微鏡でも形態観察を行った。

[結果]

1) ES 細胞

ES 細胞培養 1 日後で、ゼラチン(+)ディッシュでは、ディッシュ上に、細胞が増殖した集合体が多数観察され、培養液中には単独での細胞が浮遊しているのが、認められた。ゼラチンコート(-)ディッシュでは、細胞集合体が少なく、単独での細胞がみられ、全体の付着細胞数は少なく、培養液中には単独での細胞の他にスフェロイドが観察された。CNT ディッシュには、付着せず、培養液中には単独細胞の他に大きなスフェロイドが観察された。浮遊細胞数を測定すると、ゼラチン(+)ディッシュに比べゼラチンコート(-)ディッシュ、CNT で増加しており、培養液中の細胞観察の結果と、定性的に一致していた。

3 日後、ゼラチン(+)ディッシュでは、細胞が増殖した集合体が、ディッシュ上に一様に多数観察された。ゼラチンコート(-)ディッシュでは、細胞数は少なく単独での細胞のほかに、培養時間の経過とともに、大きくなったスフェロイドが多数認められた。CNT ではほとんど細胞がみられなかった。

このときの付着細胞の DNA 量はゼラチン(+)ディッシュで最も多かった。CNT で最も少なかった。この結果は、電位顕微鏡および光学顕微鏡観察の結果と定性的に一致していた。

2) MSC

MSC 培養 1 日後、control では細胞間はスペースを置くことなく、敷石状に 1 層で増殖したが、CNT では細胞数が少なく、細胞間のスペースに CNT が観察された。一部の細胞では、細胞末端から仮足を長く伸展する傾向が観察された。

2 週後、control では細胞同士が上下に重なって増殖し、細胞数は増加した。3 週では、細胞の上に、石灰化様球状構造物が現れ、一部の細胞では高密度に形成されていた。4 週では、3 週よりもさらに、石灰化様球状構造物が拡大した。Alizarin red S 染色により、3 週、4 週とも、カルシウムが検出され、石灰化が認められ、4 週ではより進展していた。

CNT 上では、2 週後、細胞数は増加したが、control のようなコンフルエントに達していなかった。3 週ではコンフルエントでないが、さらに増殖し、各細胞上には石灰化様球状構造物が多数認められた。4 週では、さらに石灰化様球状構造物が形成された領域が拡大した。Alizarin red S 染色により、3 週、4 週とも、カルシウムが検出され、石灰化が認められ、4 週ではより進展していた。

DNA 量は、control、CNT とともに 2 週から 3 週にかけて増加し、control に比べると CNT では少なかった。細胞あたりの ALP 活性は、control、CNT とともに 2 週で最高値を示した後、3 週で減少し、control に比べ CNT で高い値を示した。細胞あたりのカルシウム量は control、CNT とともに 2 週から 3 週にかけて増加し、control に比べ CNT で増加した。

[考 察]

従来、骨芽細胞様細胞の Saos2 では CNT に対し、強い接着、伸展性が報告されてきたが、本研究における ES 細胞、MSC ともに Control に比べ低い接着性を示した。

ES 細胞では培養に推奨されているゼラチン(+)ディッシュでは、ディッシュに付着する細胞が多く、培養液中の浮遊細胞は少ないのに対し、CNT では ES 細胞はほとんど付着せず、かわりに培養液中に、3 次元的に大きなスフェロイドを形成・増殖する傾向を示した。細胞や臓器の種類に依存して、スキャフォールドに付着増殖するタイプと、培養液中で浮遊し 3 次元的に増殖するタイプがあるが、CNT は ES 細胞に対して後者の非付着性材料として、浮遊液中での 3 次元増殖・組織再生に有効であると考えられた。

MSC は、CNT 上で十分増殖し、細胞あたりの ALP 活性、カルシウム量は高い値を示し、石灰化も進行して高い機能性を発現した。CNT は骨組織再生のためのスキャフォールドとして有効であると示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農 夫 男
副 査 教 授 亘 理 文 夫
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Culture of ES cells and mesenchymal stem cells on carbon nanotube scaffolds

(カーボンナノチューブ上における ES 細胞, 間葉系幹細胞の培養)

審査は, 審査員全員出席の下に, 申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。以下に, 論文の要旨と審査の内容を述べる。

カーボンナノチューブ(CNT)をスカフォールドとして培養した骨芽細胞様細胞(Saos2)は強い接着・伸展性を示す事が知られているが,分化度の低い ES 細胞や幹細胞に及ぼす影響はまだよく知られていない。本研究では,マウス ES 細胞とラット骨髓由来間葉系幹細胞(Marrow derived mesenchymal stem cell: MSC)の CNT に対する細胞付着増殖性を調べ,さらに MSC の伸展性,ALP 活性,石灰化に及ぼす影響を調べることを目的とした。

[材料および方法]

胚性幹細胞としてマウス ES 細胞(EL M3),間葉系幹細胞としてラット MSC を用いた。多層 CNT(直径 20-30nm)を吸引濾過法でポリカーボネートメンブレンフィルター上に全面コートしたスカフォールドを作成し,24well ディッシュ上に固定した。ES 細胞は,①ゼラチン(-)ディッシュ,ES 細胞培養で推奨されている②ゼラチン(+)ディッシュ,③CNT 上で,1,3 日間,培養した。

MSC は,5 週齢ラット大腿骨骨髓から Maniopoulos 法により採取,分離し,①control,②CNT 上で,通常の培地に骨芽分化誘導剤 DEX および β -GP を添加し,1 日,2,3,4 週間培養した。

DNA 量測定は蛍光法,ALP 活性測定は Kind-King 法,Calcium 量測定は orthocresolphthalein complexone 法,Calcium 検出は Alizarin red S 染色を用いた。

電子顕微鏡で形態観察を行い,CNT 以外では光学顕微鏡でも形態観察を行った。

[結 果]

1) ES 細胞

培養 1 日後で,ゼラチン(+)ディッシュでは,ディッシュ上に,付着増殖した細胞が多数観察され,培養液中には単独での細胞が浮遊しているのが観察された。ゼラチンコート(-)ディッシュでは,付着細胞数は少なく,培養液中には単独での細胞の他にスフェロイドが観察され

た。CNT ディッシュには、付着せず、培養液中には単独細胞の他に大きなスフェロイドが観察された。浮遊細胞数を測定すると、ゼラチン(+)ディッシュに比べゼラチンコート(-)ディッシュ、CNT で増加していた。

3 日後、ゼラチン(+)ディッシュでは、細胞がディッシュ上に一様に広がり増殖していた。ゼラチンコート(-)ディッシュでは、細胞数は少なく、培養時間の経過とともに、大きくなったスフェロイドが多数認められた。CNT ではほとんど細胞がみられなかった。このときの付着細胞の DNA 量はゼラチン(+)ディッシュで最も多く、CNT で最も少なかった。

2) MSC

培養 1 日後、control に比べ CNT では細胞数が少なく、CNT の一部の細胞では、細胞末端から仮足を長く伸展させていた。

2 週後、control では細胞が多層に増殖し、3 週では、細胞上に、石灰化様球状構造物が現れ、4 週では、さらに球状構造物が拡大した。

CNT 上では、2 週後、細胞数は増加し、3 週ではさらに増殖し、各細胞上には球状構造物が認められた。4 週では、さらに球状構造物が拡大した。control と CNT とともに Alizarin red S 染色により、3 週、4 週とも、Ca が検出され、石灰化が認められ、4 週ではより進展していた。DNA 量は、control、CNT とともに 2 週から 3 週にかけて増加し、control に比べ CNT では少なかった。細胞あたりの ALP 活性は、control、CNT とともに 2 週でピークを示し、control に比べ CNT で高い値を示した。細胞あたりの Ca 量は control、CNT とともに 2 週から 3 週にかけて増加し、control に比べ CNT で増加した。

[考察]

Saos2 では CNT に対し、強い接着、伸展性が報告されてきたが、本研究における ES 細胞、MSC とともに Control に比べ低い接着性を示した。ES 細胞はゼラチン(+)ディッシュでは、ディッシュに付着する細胞が多く、培養液中の浮遊細胞は少ないのに対し、CNT では ES 細胞はほとんど付着せず、培養液中に、3 次元的に大きなスフェロイドを形成・増殖する傾向を示した。CNT は ES 細胞に対して非付着性材料として、浮遊液中での 3 次元増殖・組織再生に有効であると考えられた。一方、MSC は、CNT 上で十分増殖し、細胞あたりの ALP 活性、Ca 量は高い値を示し、石灰化も進行して高い機能性を発現した。CNT は骨組織再生のためのスcaffolds として有効であると示唆された。

以上、論文について概要が説明された後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。主な質問内容は、①本実験における ES 細胞の分化能、②Maniopoulos 法、③スフェロイドを形成した ES 細胞のバイオリティ、④CNT における種々の細胞の増殖特性などであった。論文提出者はいずれの質問に対しても明確かつ的確に回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

試問の結果、本論文は、CNT 上では ES 細胞と MSC の増殖様式が異なり、MSC に対しては付着増殖材料として、いっぽう ES 細胞には非付着性材料として有効であることを明らかにし、CNT のスcaffolds の特性とその有用を示唆した点が、今後の歯科医学の発展に大きく貢献するものと評価された。さらに、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野は

もとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。
よって、学位申請者は博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。