

Ti 表面形状が骨芽細胞 MC3T3-E1 の伸展性に及ぼす影響

化学・材料系技術班 岡野 聡

1. はじめに

現在の我が国の高齢者は2千万人を超え、2050年には日本の人口の40%が65歳以上という、超高齢化社会を迎えようとしている。急速な高齢化が進む日本において、骨粗鬆症に対する骨組織再建についての研究が進められている。骨組織再建材料としてTi合金やハイドロキシアパタイト(HAp)が現在すでに実用化されているが、「材料」から細胞へ積極的に働きかけ、骨の高次組織構築を行う技術は確立されていない。今年で3年目となる“骨再生プロジェクト”では、「骨再生を材料側から制御する技術の開発」を目指し、工学部、教育学部、医学部が連携し、研究が進められている。筆者は、骨芽細胞の培養及び播種試験全般を立ち上げ段階から担当している。

生体内には、骨芽細胞と呼ばれる骨を形成する細胞が存在している。この骨芽細胞は、骨あるいは骨代替材料表面を遊走する(=動く)ことで、その方向に良質な骨を形成する。つまり、骨芽細胞の遊走方向を制御することが、スムーズな骨組織の形成につながる。その初期段階として、骨芽細胞が骨の表面に接着し、増殖するという段階が重要となる。骨代替材料表面が骨芽細胞の接着性に及ぼす影響として、表面粗さ、表面エネルギー、表面電荷状態などが挙げられる。本研究では表面粗さの異なる純Ti板上に骨芽細胞を播種し、表面の粗さと骨芽細胞の接着・伸展性との関係性を明らかにすることを目的とした。なお本報告は、2015年度第15回愛媛大学工学部等技術部技術発表会にて報告を行ったものであり、その内容について報告する。

2. 実験方法

市販の純Ti板をφ3mm, t=0.3mmのサイズに打ち抜き、各種粗さの研磨紙(#80, 120, 220, 800, 1200)でそれぞれの粗さに研磨後、表面粗さ測定を行った。この試験片をアセトンによる超音波洗浄(10min)、オートクレーブによる滅菌(120°C, 20min)後、エタノールに一晩浸漬させた。得られた試料に対して純水0.5μLに対する接触角試験及び骨芽細胞の培養試験を行った。骨芽細胞は、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞MC3T3-E1を用いた。細胞の培養試験は、試験片表面のエタノールを風乾後、96穴プレートに入れ、そこに 5×10^3 cells/wellの骨芽細胞を播種し、37°C, 5%CO₂湿潤下、1h~72hのインキュベートを行った。各時間培養後、PBS溶液で洗浄、4%パラホルムアルデヒドで固定化、トリトン-Xで5分処理後、核はDAPI、細胞骨格であるアクチンはファロイジンで染色した。こうして得られた試料に対して、蛍光顕微鏡を用いて細胞接着数のカウント及び細胞の形態観察を行った。細胞の接着数は、蛍光顕微鏡による観察画像から1mm四方の領域をランダムに選択し、そこに含まれる核の数を細胞接着数とした。細胞のカウントにはImage Jを用いた。

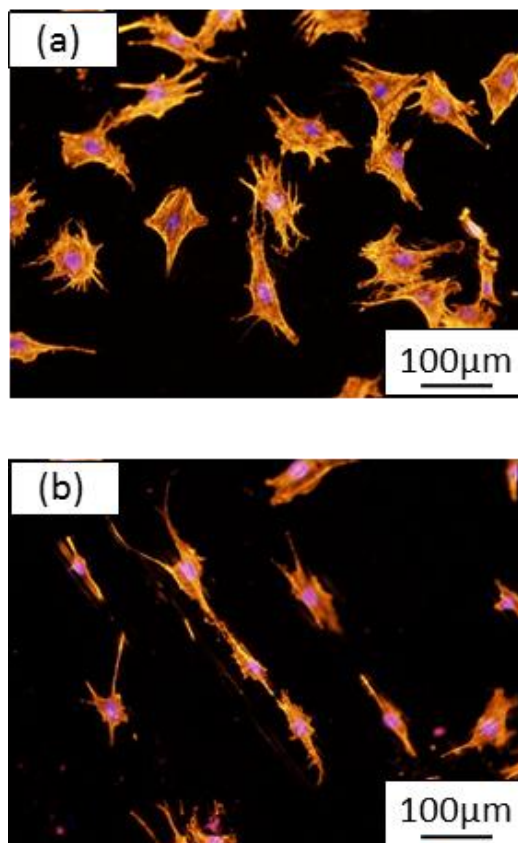


図-1 各Ti板上に播種した骨芽細胞
(a) Ra=0.18μm (b) Ra=1.42μm

3. 結果

表面粗さ測定の結果、研磨紙の番手が高くなるにつれて、Ti板の表面粗さRaは1.42, 1.08, 0.71, 0.25, 0.18 μm と、次第に滑らかな表面状態が得られていることが分かった。この5種類のTi板上に細胞を播種し、72h培養した結果、Ti板上の表面粗さが高くなるほど、細胞数が多いという結果が示された。

図-1に、表面粗さRa=0.18 μm と1.42 μm のTi板上の骨芽細胞の蛍光観察結果を示す。なお72h培養したTi板上の表面には細胞が全面に増殖しており、細胞形状の解析が不可能であったため、図-1には、培養時間1hのものを示している。表面が滑らかなTi板上では骨芽細胞は等方的に伸展しているのに対し、表面が粗いTi板上では、骨芽細胞は配向性をもって伸展していることが分かる。また、同じ視野を明視野像で観察した結果、表面が粗いTi板には溝状に研磨傷が残存しており、播種された細胞はこの研磨傷に沿って伸展している様子が確認された。この配向した細胞のアスペクト比を算出し、先ほどの細胞数と比較した結果、アスペクト比の増加に伴い、細胞数も増加するという相関性が確認された。

4. 考察

一般的に細胞を播種した場合、図-2に示すように、材料上への接着、その場での伸展、細胞分裂による増殖、という3段階の過程を経る。このうち増殖過程においては、細胞骨格を伸展し隣り合う他の細胞とネットワークを組むことで初めて増殖が開始される。この際、細胞単体で細胞分裂が開始されることは無い。つまりスムーズな細胞増殖過程の進行は、細胞同士が効率良くネットワークを組むことが重要であると言える。本実験においては、Ti板表面が粗い場合、骨芽細胞がその溝に沿って伸展していた。同期間におけるアクチンの伸展する面積を一定だとすると、溝が存在することで骨芽細胞の伸展方向を一方向に集中することができ、より遠くまでアクチンを伸ばすことができる。さらに、隣り合う細胞もその溝に沿ってアクチンを伸展しているため、ちょうど溝がガイドの役割を果たし、他の骨芽細胞と容易にネットワークを組むことが可能であったものと考えられる。その結果、増殖開始時期が早まり、細胞数が増加したものと推察される。

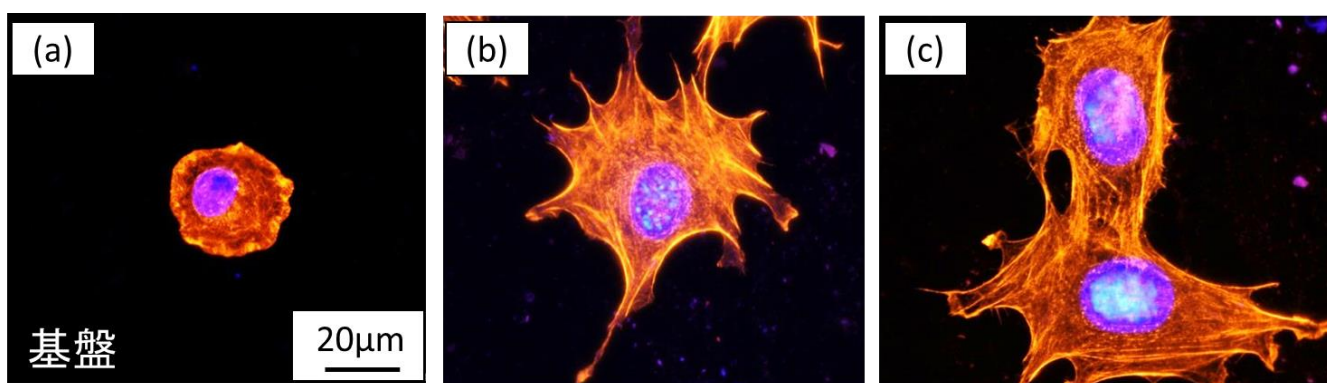


図-2 各過程における細胞の形態変化
(a)接着過程 (b)伸展過程 (c)増殖過程

謝辞：本研究の一部は、工学部長裁量経費「研究拠点形成プロジェクト経費」の支援により実施しました。