

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Ma Chuang
論文審査担当者	主 査 柴 祐司 副 査 平塚 佐千枝 ・ 竹内 あかり ・ 松田 佳和
論文題目	Three-Dimensional Modeling with Osteoblast-Like Cells under External Magnetic Field Conditions Using Magnetic Nano-Ferrite Particles for the Development of Cell-Derived Artificial Bone (細胞由来人工骨開発に向けた外部磁界条件下の磁性ナノフェライト粒子による骨芽様細胞の3次元モデリング)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景・目的】</p> <p>現在、高齢者の増加に伴い、骨折や骨関連疾患が増加しており、その治療が社会的に大きな負担となっている。そのため、治療には人工骨研究の進歩が不可欠である。しかし、人工骨には生体適合性や構造の複雑性などの点で課題が残り、生体適合性の高い人工骨の開発が求められている。このような課題を解決する有望な手段として、ナノ材料である超常磁性のナノフェライト粒子 (NFPs) の導入が期待されている。NFPs を細胞内に取り込ませ、磁界を用いて細胞の位置を誘導することで、細胞に直接接触せず、設計した磁界形状に細胞位置誘導を行い、特定の形状を持つ細胞由来人工骨をカスタマイズできる新たな可能性が生まれる。</p> <p>そこで、NFPs を取り込んだ骨芽細胞を利用し、任意の形状で3次元的に構築し、石灰化を誘導することで、細胞由来人工骨 (CDAB) の開発に着手した。本研究では、マウス頭蓋骨由来の骨芽様細胞 (MC3T3-E1) に対する NFPs の影響を調べ、NFPs の潜在的な作用を解明する。また、磁場を利用して NFPs を取り込んだ MC3T3-E1 細胞の位置を3次元的に誘導し、細胞集合体の形状を制御することで、生体適合性の高い CDAB の開発を目指した。</p> <p>【方法・結果】</p> <p>NFP は塩化鉄(II) 四水和物と塩化鉄(III) 六水和物を 2 M 塩酸に完全に溶解し、その後水酸化ナトリウムで pH を弱酸性に調整して作製した。非ナノスケールのフェライト粒子は遠心分離で除去された後、高速遠心分離法を用いて NFPs を分離した。分離した NFPs を超純水中で分散させた後、フィルター滅菌を施した。滅菌された NFPs 溶液は濃度が 50 mg/mL になるように、ウシ胎児血清と超純水で作製した分散剤で調整し、<i>in vitro</i> 実験で使用した。NFPs は走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡 (TEM)、および粒子径・ゼータ電位・分子量測定装置を用いて評価され、粒径サイズが 16.5 ± 2.4 nm であり、ゼータ電位が -9.9 ± 1.6 mV であった。</p> <p>マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に異なる濃度の NFPs を曝露し、NFPs の細胞増殖率への影響を調べた。NFPs 濃度が 0.07 および 0.14 mg/mL の場合、細胞増殖率に有意な変化は見られなかった。NFPs 濃度が 0.28 と 0.57 mg/mL の場合は MC3T3-E1 細胞の細胞増殖率に与える影響はごくわずかであることが示された。</p> <p>MC3T3-E1 細胞において細胞増殖率に影響を与えない 0.14 mg/mL の NFPs 濃度で曝露後、NFPs の細胞内取り込みを調べた。ライソソームと細胞核を蛍光染色した後、光学顕微鏡と TEM を用いて観察を行った。光学顕微鏡の観察結果では、NFPs の位置がライソソームの染色信号と一致した。TEM による観察では、</p>

NFPs が細胞内に取り込まれたことを確認した。また、フローサイトメトリ (FCM) を用いて、各 NFPs 濃度に曝露した細胞内部の複雑度の変化を評価するために側方散乱光 (SSC) を測定した。FCM の測定結果から、NFPs の濃度が 0.14 mg/mL まで増加すると SSC 強度も増加し、濃度依存性の傾向が明らかになった。ただし、0.28 と 0.57 mg/mL の NFPs 濃度では、SSC 強度に有意な変化は見られなかった。

異なる濃度の NFPs に曝露した MC3T3-E1 細胞を石灰化誘導しながら 4、8 および 12 週間培養した。各培養期間の後、アリザリンレッド S (ARS) 染色を行い、石灰化領域を観察した。その後、石灰化結節を 5% のギ酸に溶解し、プレートリーダーで吸光度を測定した。ARS 染色の観察結果では、NFPs 曝露後培養期間の増加に伴い石灰化領域が増加したことが観察された。また、吸光度の測定結果では、4 週目の測定結果で NFPs に曝露されたすべての群が対照群と比較して有意に低下した。8 および 12 週目の測定結果では、NFPs 曝露群の吸光度が増加し、12 週間の測定結果では、0.07-0.28 mg/mL の NFPs 曝露群では対照群と比較して有意な低下は見られなかった。

5 kOe の面内外部磁界が印加された後、各濃度の NFPs に曝露した MC3T3-E1 細胞の移動速度を測定した。磁界が印加された後、0.14 mg/mL の NFPs に曝露された群では、磁界印加方向に 1.5 $\mu\text{m/s}$ の細胞移動速度が観察され、各曝露群中で最大の移動速度となった。

磁界による細胞の 3 次元造形の可能性を調べるために、培養チャンバー底面に対して垂直の外部磁界を印加しながら NFPs に曝露した細胞を培養チャンバーで 7 日間培養した。7 日間培養後、生細胞の細胞質と細胞核を蛍光染色し、z 軸方向に連続凍結切片を作製し、観察を行った。観察結果から、細胞の細胞質と細胞核が共に染色され、造形物内の細胞が正常であることを示した。さらに、NFPs を取り込んだ細胞が磁界に沿って z 軸方向のパターンで配置され、3 次的に造形されたことが観察された。

【結論】

磁界によって NFPs を取り込んだ細胞が 3 次元モデリング可能であることが示唆され、骨組織工学における NFPs の応用の可能性が示唆された。NFPs と細胞との相互作用を探求することは、骨組織工学や人工骨開発における NFPs の応用の可能性を明らかにするだけでなく、バイオメディカル分野におけるナノ材料の利用について新たな視点を提供することができる。濃度依存的な効果を包括的に理解することで、NFPs の適用条件を細かく最適化することができ、バイオメディカル分野における CDAB の作製において、その可能性を最大限に引き出すことができる。