

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462365

研究課題名(和文)カーボンナノチューブによる骨芽細胞の石灰化促進メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the calcified promotion mechanism of osteoblasts by the carbon nanotubes

研究代表者

羽二生 久夫(HANIU, Hisao)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：30252050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は多層カーボンナノチューブ(MWCNT)とMC3T3-E1前骨芽細胞の関係を調べた。MWCNTは3種類(FBS、gelatin、CMC)の分散剤で分散した。細胞増殖への影響は様々な条件下で評価し、細胞増殖抑制は石灰化をさせない培養条件下の細胞でgelatin分散されたMWCNTという特定の条件下でのみ示された。しかし、他の分散剤では細胞増殖抑制は見られず、むしろ、増殖が亢進した。また、石灰化培地中でのMWCNT暴露では全て細胞増殖が亢進した。分化マーカーはBglap1のみが分散剤に関わらず増加した。我々の結果はMWCNTの作用は分散剤の影響を受けており、その作用は細胞増殖の促進であった。

研究成果の概要(英文)：We examined the relationship between Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and a MC3T3-E1 preosteoblast cell line. MWCNTs were combined with three different dispersants (FBS, gelatin, or CMC). Cell viability was measured under various culture conditions and morphological analysis was performed. We also assessed several osteoblast differentiation markers. Inhibition of cell proliferation was witnessed only under specific conditions, such as when MC3T3-E1 not cultured in calcification medium was exposed to MWCNTs dispersed in gelatin. Furthermore, cell proliferation increased with all dispersants when the cells were cultured in calcification medium. In morphological observations, whereas the cells displaying proliferation inhibition had internalized MWCNTs into the cytoplasm, the biomaterial was found to be adhered to the cell membrane in other conditions. MWCNTs up-regulated the expression of one marker of osteoblast differentiation, regardless of the dispersant.

研究分野：生体材料学

キーワード：骨・軟骨代謝学 バイオマテリアル カーボンナノチューブ 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) カーボンナノチューブ (CNT) は 2 年前にノーベル化学賞の対象となった炭素でできたグラフェンシートを筒状にした繊維状の物質であり、多層 CNT (MWCNT) はその物性から石油採掘現場からバッテリーの開発まで様々な方面で研究開発が行われており、信州大学ではカーボン科学研究所を設置して、その産業応用のための研究を行っている。

(2) その一つの分野として医療応用のプロジェクトがあり、我々は整形外科分野におけるインプラント複合材料としての可能性を検討してきた。その成果として、骨形成において CNT が *in vivo* において骨基質形成の核となってマウスの骨形成を促進すること (図 1: Small 2008) や骨芽細胞の石灰化を促進すること (図 2: Adv Mater 2012) を報告してきた。

(3) これまでの報告は主として CNT のバイオマテリアルとしての可能性を主眼としてきたため、現象として報告してきた CNT の骨形成促進作用のメカニズムについては、まだ不明な所が多かった。

2. 研究の目的

本申請では CNT による骨芽細胞の石灰化促進のメカニズムが CNT の直接的作用によるものか、あるいは CNT のカルシウムなどの吸着効果によるものかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MWCNT の調製

MWCNT は保土ヶ谷化学工業製の MWNT-7 を用い、分散剤は 0.1% gelatin、2% ウシ胎児血清 (FBS)、0.1% カルボキシメチルセルロース (CMC) を用いた。MWCNT 濃度は 10 mg/ml とし、水槽式超音波処理装置で 30 min 分散処理を行った。各実験では必要に応じて分散剤で希釈後、終濃度になるように暴露した。

(2) 細胞増殖性試験

細胞増殖性試験は前骨芽細胞のセルライ

ンであるマウス MC3T3-E1 を用いた。細胞を 96 ウェルプレートに細胞を撒き、24 時間後、CNT を暴露し、経時的な細胞増殖性をアラマーブルー法で測定した。アラマーブルー法は培地に 1/10 量を加え、適当な時間に蛍光プレートリーダーで蛍光輝度を測定した (Ex/Em=550/600 nm)。また、石灰化処理した時の増殖性は細胞を撒いてから 48 時間後、アスコルビン酸と β -グリセロリン酸入石灰化培地に培地交換し、24 時間後に CNT を暴露した。

(3) 形態観察

操作型電子顕微鏡 (SEM) 用の細胞はカバーガラス上で培養した上で、CNT の暴露を行った。また、蛍光顕微鏡観察用の細胞はガラスボトムディッシュ、あるいはチャンバースライド上で細胞を培養し、CNT 暴露を行った。

(4) RT-PCR

MC3T3-E1 を 6、または 12 ウェルプレートに蒔き、48 時間後に石灰化培地処理した細胞に CNT を暴露し、経時的に細胞から mRNA を抽出し、骨芽細胞の各種分化マーカーとカルシウムセンシングレセプター (CaSR) の mRNA の発現を未石灰化細胞と比較した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖性試験

MC3T3-E1 に CNT を暴露した時の細胞増殖性はその暴露する時期、初期濃度、そして分散剤によってさまざまに変化した。その結果を図 3A~C に示す。

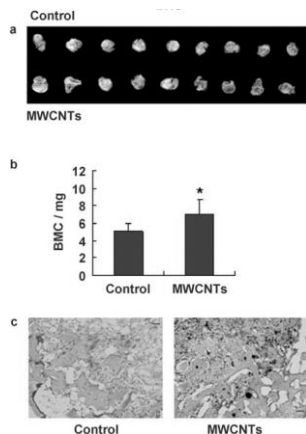


図 1. CNT によって骨塩量(BMC)が増加

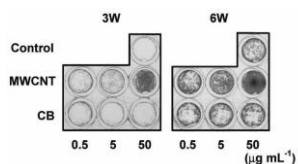
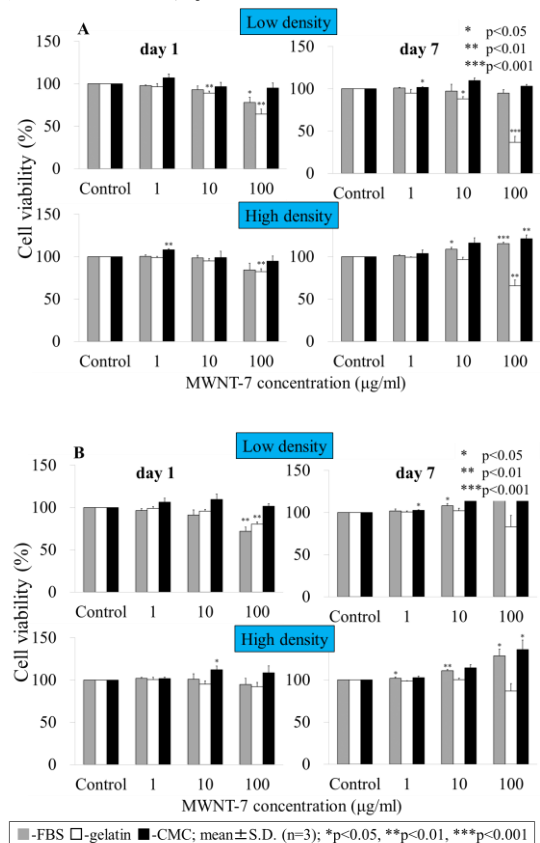


図 2. CNT が骨芽細胞の石灰化を促進



■-FBS □-gelatin ■-CMC; mean±S.D. (n=3); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

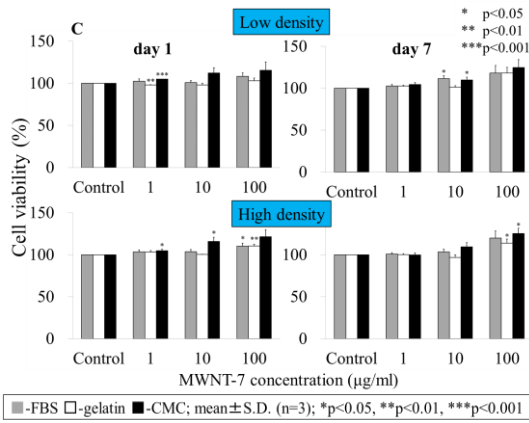


図 3. CNT 暴露 MC3T3-E1 の細胞増殖性

これらの結果は疎水性の CNT を分散させるために用いる分散剤が CNT 表面の物性に影響を与えるため、CNT の骨芽細胞に与える影響は CNT 自体が有している CNT 表面の物性由来ではないと考えられる。

(2) 形態観察

① 蛍光顕微鏡観察

CNT 暴露後、24 時間で細胞核を bisbenzimidazole H333342 で青く染め、ライソソームを CytoPainter-lysosomal で染め、生きたまま観察した (図 4)。

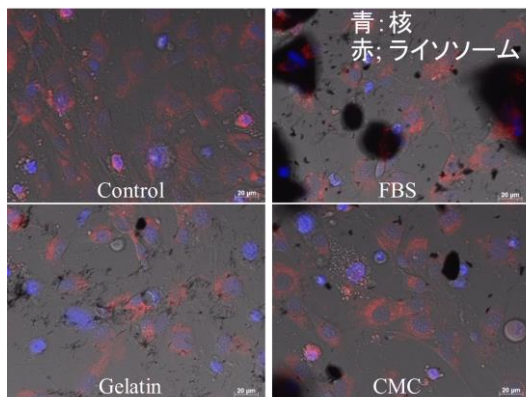


図 4. CNT 暴露 MC3T3-E1 の取り込み像

gelatin や FBS では CNT が細胞内に取り込まれているのに対し、CMC ではほとんど取り込まれていない事が明らかとなった。

② SEM 観察

蛍光顕微鏡で観察された細胞と CNT の関係をさらに SEM を使って確認した (図 5)。

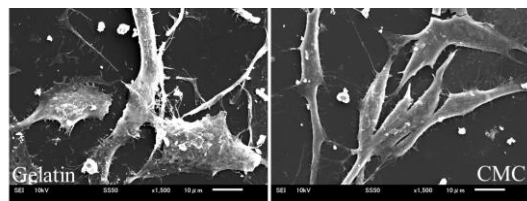


図 5. CNT 暴露 MC3T3-E1 の SEM 像

gelatin で分散した CNT を暴露した細胞は CNT が細胞に刺さったように見えるものがあるのに対し、CMC で分散された CNT は細胞表面にほとんど観察されなかった。CMC で分散された CNT は SEM サンプル調製時の洗浄操作

でほとんどが流されてしまった。

(3) RT-PCR

CNT 暴露による MC3T3-E1 の分化マーカーの mRNA の発現変化を測定した (図 6)。

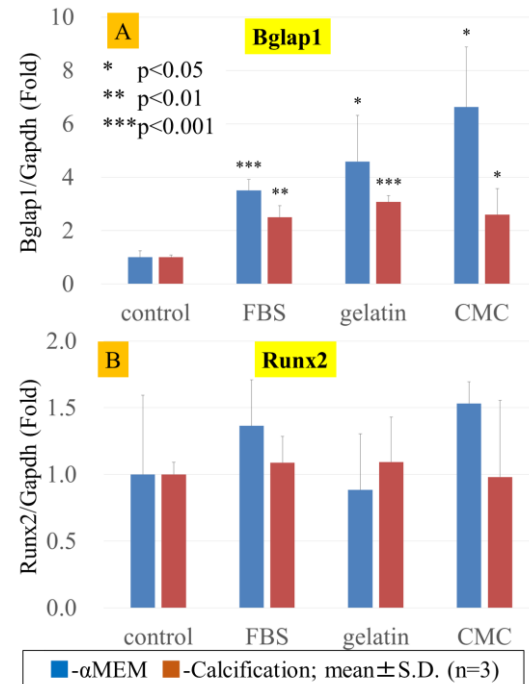


図 6. CNT 暴露 MC3T3-E1 の分化マーカーの発現変化

分化マーカーである Bglap1 は CNT 暴露によって発現が増加するものの石灰化培地中での発現変化は増殖培地中での発現変化より抑制された。その一方で Runx2 をはじめ、Sp2、Alp1、Col1a2 等の発現は CNT 暴露によって大きな変化は見られない事が多かった。また、CaSR の発現も非常に少なく、かつ、CNT 暴露による変化が見られなかった。

【総括】

CNT の前骨芽細胞と言われている MC3T3-E1 に対する影響は CNT と分散剤の複合的影響であることが明らかとなった。これまでの in vivo 実験では我々は CMC を用いてきたことから、CNT と CMC の複合物が細胞表面に接することで増殖促進効果を発揮していた事が明らかとなった。また、分散剤で処理された CNT が一部の細胞分化マーカーを変化させている事から前骨芽細胞表面に存在するレセプターを介して、細胞全体の分化ではなく、特定のシグナル伝達系について刺激している事が示唆された。

【捕捉】

(4) 骨芽細胞の分化について

MC3T3-E1 を用いた CNT 暴露による影響は細胞増殖や形態観察においては再現性が良かったのに対し、細胞分化マーカーの評価は非常に再現性に乏しかった。これは上記の mRNA の発現だけでなく、ALP 活性やアリザリンレッド染色による前骨芽細胞から骨芽細胞に

なることによって増加すると言われている指標でも同様であった。その理由としてアスコルビン酸の影響が考えられる。骨芽細胞研究に良く使われるαMEM 培地はもともとアスコルビン酸が入っている。それでありながら、骨芽細胞の石灰化処理は同程度の濃度のアスコルビン酸の更なる添加処理である。つまり、MC3T3-E1 の標準的培養法はすでに石灰化処理を通常の培養時に行っていることになる。実際、American Type Culture Collection (ATCC) の MC3T3 シリーズの培養はαMEM のアスコルビン酸なしのタイプを指定している。我々はこの点を考慮してMC3T3-E1 を ATCC と同じ培地を用いても実験を行ったが、この場合でも再現性については改善されなかった。

そこで我々はさらにアスコルビン酸入りαMEM 培地にさらされていないラットの前骨芽細胞を購入し、アスコルビン酸の影響を検討してきたが、本課題の研究機関中で分化誘導マーカーに対する結論を出すには至らなかった。

(5) CNT 評価に対する分散剤の影響

CNT は疎水性のため、通常、細胞での評価を行う際は分散剤が用いられる。このため、本申請での結論としてはCNT と分散剤の複合的影響として骨芽細胞に影響しているという結論に至ったが、我々はCNT を直接固めたCNT ブロックを作製し、骨形成における影響を評価したところ、in vivo で明確な骨形成の促進効果、in vitro でも骨芽細胞の増殖促進性を示した。このCNT ブロックは高いタンパク質吸着性を示したことから、本申請で行ったFBS で分散された状態と近いと考えられる。よって我々はこれらの結果からCNT の骨形成に対する影響は分化誘導への影響より、細胞増殖自体の亢進作用であると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

①Tsukahara T, Matsuda Y, Haniu H. The Role of Autophagy as a Mechanism of Toxicity Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes in Human Lung Cells. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 40-8. 査読有

②Nomura H, Takanashi S, Tanaka M, Haniu H, Aoki K, Okamoto M, Kobayashi S, Takizawa T, Usui Y, Oishi A, Kato H, Saito N. Specific biological responses of the synovial membrane to carbon nanotubes. *Sci Rep*. 2015;5: 14314. 査読有

③Kobayashi S, Tsuruoka S, Usui Y, Haniu H, Aoki K, Takanashi S, Okamoto M, Nomura H, Tanaka M, Aiso S, Saito M, Kato H, Saito N. An advanced in situ imaging method

using heavy metal-doped hollow tubes to evaluate the biokinetics of carbon nanotubes in vivo. *NPG Asia Mater*. 2015;7:e203. 査読有

④Maruyama K, Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Kobayashi S, Tanaka M, Aoki K, Takanashi S, Okamoto M, Kato H. Endocytosis of multiwalled carbon nanotubes in bronchial epithelial and mesothelial Cells. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 793186. 査読有

⑤Saito N, Haniu H, Usui Y, Aoki K, Hara K, Takanashi S, Shimizu M, Narita N, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Kato H, Nishimura N, Taruta S, Endo M. Safe clinical use of carbon nanotubes as innovative biomaterials. *Chem Rev*. 2014; 114: 6040-79. 査読有

⑥Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Usui Y, Maruyama K, Takanashi S, Aoki K, Kobayashi S, Nomura H, Tanaka M, Okamoto M, Kato H. Biological responses according to the shape and size of carbon nanotubes in BEAS-2B and MESO-1 cells. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 1979-90. 査読有

⑦Tsukahara T, Matsuda Y, Usui Y, Haniu H. Highly purified, multi-wall carbon nanotubes induce light-chain 3B expression in human lung cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 440: 348-53. 査読有

⑧Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Maruyama K, Usui Y, Aoki K, Takanashi S, Kobayashi S, Nomura H, Okamoto M, Shimizu M, Kato H. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. *Toxicol In Vitro*. 2013; 27: 1679-85. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

①Haniu H. Effect of multi-walled carbon nanotubes in three different dispersants on MC3T3-E1 cell line proliferation. 5th International Conference on Nanotek & Expo, San Antonio, USA. November 16-18, 2015

②Tanaka M, Saito N, Zhang M, Sato Y, Haniu H, Takizawa T, Nomura H, Kobayashi S, Okamoto M, Takanashi S, Aoki K, Usui Y, Kato H. A capacity of porous multi-walled carbon nanotube blocks as scaffold of bone regeneration. 12th Bone Biology Forum, Chiba, Japan, August 3, 2015

③Tanaka M, Saito N, Zhang M, Sato Y, Haniu H, Takizawa T, Nomura H, Kobayashi S, Okamoto M, Takanashi S, Aoki K, Usui Y, Kato H. The effect of carbon nanotube blocks on bone regeneration. Sixth Symposium on Carbon Nanomaterials Biology, Medicine & Toxicology, Nagoya, Japan, June

28, 2015

④Haniu H, Saito N, Maruyama K, Matsuda N, Tanaka M, Aoki K, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Takizawa T, Ohishi A, Usui Y, Kato H. Evaluation of Multi-walled Carbon Nanotubes Using the MC3T3-E1 Cell Line. TechConnect World Innovation Conference & Expo-2015, Washinton, DC, USA, June 14-17, 2015.

⑤野村博紀, 羽二生久夫, 高梨誠司, 小林伸輔, 青木薫, 丸山佳与, 薄井雄企, 加藤博之, 齋藤直人. ラット膝関節内における多層カーボンナノチューブの生体応答. 第41回日本毒性学会学術年会, 神戸, 2014. 7. 2-4

⑥丸山佳与, 羽二生久夫, 薄井雄企, 青木薫, 高梨誠司, 岡本正則, 小林伸輔, 野村博紀, 田中学, 松田佳和, 加藤博之, 齋藤直人. BEAS-2B 細胞の多層カーボンナノチューブの取り込み. 第41回日本毒性学会学術年会, 神戸, 2014. 7. 2-4.

⑦Haniu H, Saito N, Matsuda N, Maruyama K, Tsukahara T, Usui Y, Takanashi S, Aoki K, Kobayashi S, Nomura H, Okamoto M, Shimizu M, Kato H. Endocytosis of MWCNT in BEAS-2B cells are affected by the culture medium type. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Nagoya, Japan, October 28-31, 2013.

⑧羽二生久夫, 齋藤直人, 松田佳和, 丸山佳与, 薄井雄企, 青木薫, 高梨誠司, 小林伸輔, 野村博紀, 岡本正則, 清水政幸, 加藤博之. 培養液による多層カーボンナノチューブのBEAS-2B細胞におけるバイオレスポンスへの影響. 第40回日本毒性学会学術年会, 千葉, 2013. 6. 17-19.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽二生 久夫 (HANIU, Hisao)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号：30252050

(2) 研究分担者

薄井 雄企 (USUI, Yuki)
信州大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号：00467169

塚原 完 (TSUKAHARA, Tamotsu)
長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授
研究者番号：00529943

(3) 連携研究者

齋藤 直人 (SAITO, Naoto)
信州大学・学術研究院保健学系・教授
研究者番号：80283258