

博士論文（要約）

**Study on Cell Differentiation using
Nanostructural Controlled Functional Oxide Surfaces**

（機能性酸化物ナノ構造表面における
細胞分化誘導に関する研究）

山原 弘靖

博士論文（要約）

論文題目 Study on Cell Differentiation using
Nanostructural Controlled Functional Oxide Surface
(機能性酸化物ナノ構造表面における細胞分化誘導に関する研究)

氏 名 山原 弘靖

概要：酸化物材料の持つ構造制御・電気・磁気・光学特性など優れた多機能物性を利用して細胞培養環境を制御し、細胞活動を操作することを目指している。本論文では構造制御に重点的に焦点を絞り、レーザーアブレーション法による酸化物ナノ構造の形状制御を実施した。さらに酸化物ナノワイヤの電気・光学特性制御について報告する。ボトムアップの手法により作製した三次元ナノ構造に加えて、トップダウンの手法により加工した酸化物材料を細胞培養足場 (Scaffold) として用い、筋芽細胞と分化後の筋管細胞の観察を行った。単一相材料で数 10 nm~10 μ m サイズの構造作製を実現し、構造に依存した細胞の接着阻害や配向を確認した。

1. はじめに

近年の微細加工技術及び再生医療技術という異なる 2 領域の科学技術の発展に伴い、ナノ加工表面とバイオ・生体関連物質との相互作用が注目され盛んに研究されている。特に生物の基本単位である細胞に注目すると、構造加工された細胞足場 (Scaffold) 上での培養により、細胞形状・増殖率・分化誘導に著しく影響を与えることが報告されている [1,2]。またトポグラフィカルな刺激に加えて、機械・電気・光学的刺激が細胞分化に影響を及ぼすことを示唆する報告があり、培養における物理環境を総合的に管理制御する必要性が提案されている [3]。そこで本研究では酸化物材料の構造制御・電気・磁気・光学特性などの優れた多機能物性を利用して、細胞培養環境を制御することを目指している。論文前半ではインテグリン等、細胞接着分子のサイズスケールで酸化物ナノ構造を制御形成した。論文後半において、微細構造による細胞分化制御に焦点を絞り、ボトムアップ成長による三次元ナノ構造とリソグラフィ法による加工構造の細胞足場への適用を検討した。

2. トポグラフィカルナノ構造形成

本章では金を触媒とした Vapor-Liquid-Solid (VLS) 成長を利用し、レーザーアブレーション法 (PLD 法) による酸化物ナノ構造の成長について述べる。細胞接着分子 (インテグリン、8-12 nm) と同スケールの構造制御を目的とする。経時細胞観察と電界印加を可能とする透明電極材料 (バンドギャップ $E_g \geq 3.5$ eV) として、酸化ガリウム (Ga_2O_3 , monoclinic, $E_g=4.8$ eV) 及び酸化錫 (SnO_2 , ルチル構造, $E_g=3.9$ eV) を選択し、ナノ構造成長を実施した。

2-1. Ga_2O_3 ナノワイヤの不規則方向成長

VLS 成長により酸素雰囲気 0.1Pa の条件下でサファイア C 面基板上に成長した Ga_2O_3 ナノワ

ワイヤ形状の成長温度・金触媒厚み（金粒子径）依存性を図 1 に示す。1 nm 厚の金触媒に対しては約 15 nm 径のナノワイヤの成長が見られた一方、3 nm 厚の金触媒では 750°C ではワイヤ密度が低下し、850°C では約 50 nm 径の構造が形成された。金触媒径と成長温度によってナノワイヤ形状を制御できることを示している。さらにカソードルミネッセンスによる測定の結果(図 2)、UV(359nm)、Blue(411nm)、Green(512nm)、Red(696nm)に対応する発光が見られ、アニール条件によって UV 発光を増強することを確認した。局所場の紫外発光素子として利用が期待される。

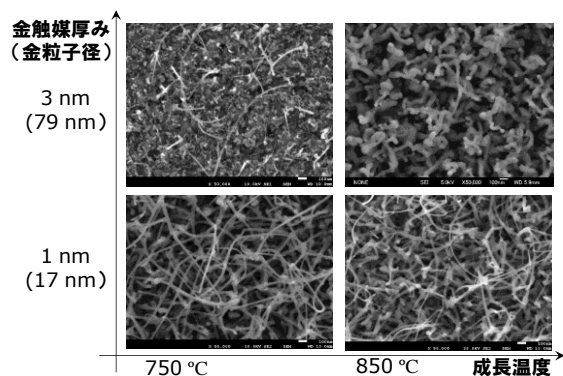


図 1. Ga_2O_3 ナノワイヤの成長温度、
金触媒径依存性

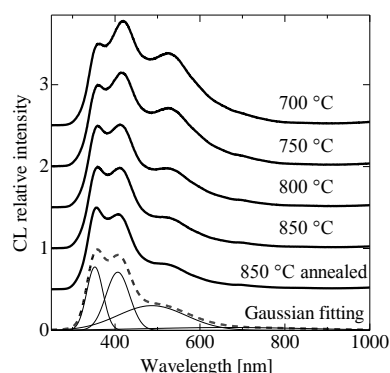


図 2. Ga_2O_3 ナノワイヤの CL 発光の
アニール条件依存性成長条件依存性

2-2. SnO_2 ナノワイヤのヘテロエピタキシャル成長によるナノスケール規則構造形成

Ga_2O_3 ナノワイヤは不規則に湾曲した形状を示しており、基板で用いたサファイア C 面が高対称性 (3 回対称) を有していることに起因すると考えられる。そこで低対称なサファイア R 面に対して $[010]\text{SnO}_2\| [100]\text{Al}_2\text{O}_3$ (ミスマッチ-0.42%)、 $[10-1]\text{SnO}_2\| [-1-21]\text{Al}_2\text{O}_3$ (ミスマッチ 11.08%) の方位関係でエピタキシャル成長をする SnO_2 ナノワイヤの成長を実施した。作製したナノワイヤの FE-SEM 像を図 3(a-c)、極点図を図 3(g,h) に示す。ワイヤ径約 20 nm、長さ約 500 nm の基板に対して 68° で高配向したナノワイヤを得た。さらに成長方向を操作することを目的として 22° オフカット基板を用いた結果、図 3(d-f) に示すように垂直に成長したナノワイヤを得ることに成功した。ナノワイヤの先端には VLS 成長を示す金粒子の存在が確認でき、チオール基による化学修飾を行うことで光触媒効果による細胞穿孔のツールとしての利用が提案できる。

さらにナノワイヤを微細電極として利用することを狙い、4 価の Sn サイトに 5 価のタンタル (Ta) を置換することによるキャリア増幅を実施した。ターゲット濃度 3% 以下のドーピングに対して 15-16 μm^{-2} のナノワイヤ密度を保ったが、6、10% においてそれぞれ 3、1 μm^{-2} とワイヤ成長の減少が見られた。XRD の結果、6% 以上のドーピングにおいて不純相 (TaO_2) の析出が見られ、高融点 Ta (3020°C) の存在が VLS 成長の液滴形成を阻害していると考えられる。3% 以下のドーピング試料に対して、Vis-UV 透過スペクトルを測定した結果、Burstein-Moss 効果によるバンド端のシフトが見られた。シフト量から 0→3% のドーピングによって $5.3 \times 10^{20} \rightarrow 2.2 \times 10^{21} \text{cm}^{-2}$ のキャリア増幅が算出された。ナノワイヤによって構成される電気化学的微小センサへの利用が期待される。

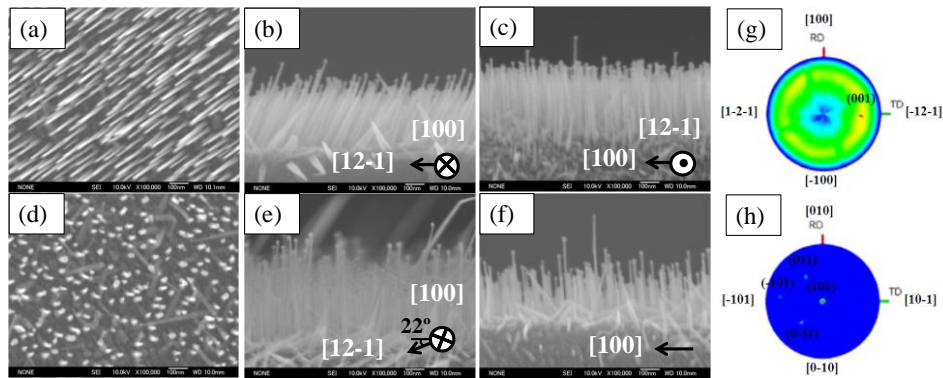


図 3.(a-c)Al₂O₃R 面、(d-f)22° オフカット基板に成長した SnO₂ ナノワイヤの FESEM 像、(g)Al₂O₃(0001)、(h)SnO₂(101)の極点図

3. Ga₂O₃ ナノ/マイクロ構造上での筋芽細胞分化

骨格筋は高度に配向した多核の筋繊維で構成され、筋繊維は未分化の筋芽細胞が融合することで形成され収縮力を発生する。しかし、一般的なディッシュで筋芽細胞を培養することで得た筋繊維は位置や配向がランダムになるため、groove のような異方的構造上での細胞配向に関する研究が多数報告されている[4]。本研究では細胞融合の際、形状に敏感に応答するという観点から C2C12 マウス筋芽細胞を選択した。細胞培養足場には Ga₂O₃ を選択した。リソグラフィ法により 1-10 μm 幅の groove 構造を作製すると共に、同一材料で細胞接着分子インテグリン(8-12 nm)と同スケールのサイズであるナノワイヤ(15 nm 径)を作成し細胞足場として用いた。

3-1. Ga₂O₃ ナノ/マイクロ構造上での C2C12 マウス筋芽細胞の培養

ポリスチレンディッシュ (コントロール)、Ga₂O₃ 薄膜、groove 構造、ナノワイヤを足場として、培養開始から 12 時間後の C2C12 筋芽細胞の位相差顕微鏡画像を示す (図 5)。画像から細胞面積、長軸、短軸長、伸長角度を計測し (n>50)、コントロールに対して p<0.05 を有意水準として Dunnett 法による統計分析を行っている。平坦な Ga₂O₃ 薄膜との間に有意差は見られなかったが、groove 及びナノワイヤにおいて接着面積の減少が見られた。groove 上では長軸長と比べて短軸長に顕著な減少が見られ、先行研究の溝に垂直な方向への細胞伸長が阻害される結果、細胞形状の配向がみられるとの結果に一致している。

3-2. Ga₂O₃ ナノ/マイクロ構造上での筋管細胞への分化

図 5 に分化用培地に交換後 5 日経過した筋管細胞の位相差顕微鏡画像と蛍光顕微鏡画像を示す。また、図 6 に筋管細胞径と配向角度の数値解析結果を示した。ポリスチレンディッシュ (コントロール) 及び Ga₂O₃ 薄膜ではランダムに配向した筋管細胞への分化を確認した。groove 構造上では溝に沿った方向に筋管細胞が配向し、溝幅が 1 μm から 3 μm に広がることで配向角度が 76.6±15.7° から 81.1±5.2° と配向促進する傾向が見られた。ナノワイヤ上では筋管細胞は疎であり筋管細胞径にも減少が見られる。この結果は筋芽細胞間の end-to-end contact が細胞融合にとって重要なイベントであるとの考え[5]に則している。ナノワイヤ上では細胞接着が阻害されるために細胞接触が制限され、溝構造上では仮足の伸長方向が制限されるために配向した筋繊維が形成されたと考えられる。

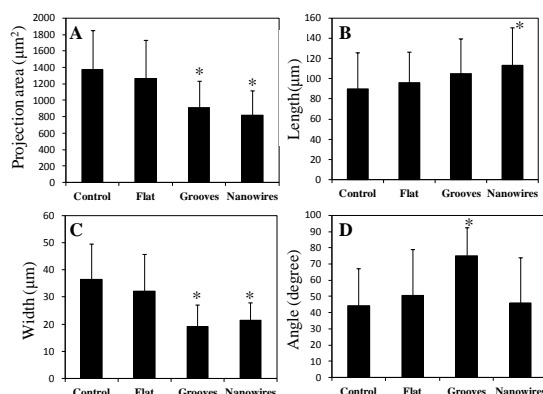
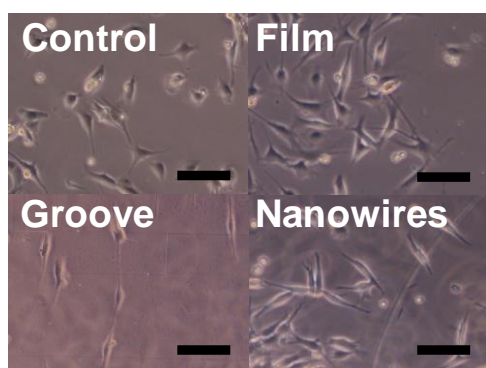


図4. C2C12 筋芽細胞の位相差顕微鏡像、(A)接着面積、(B)長軸長、(C)短軸長、(D)伸長角度の数値解析結果。アスタリスク(*)はコントロールに対して有意であることを示す ($p < 0.05$)。Scale bar = 100 μm。

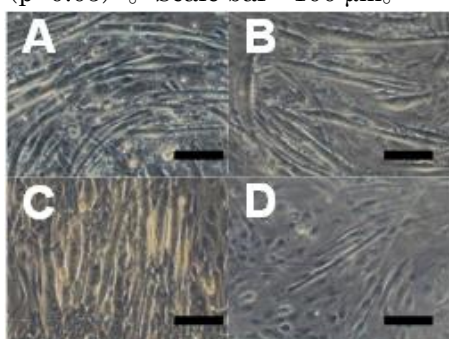


図5. (A)ポリスチレンディッシュ、(B)Ga₂O₃ 薄膜、(C)groove、(D)ナノワイヤ上の筋管細胞の位相差顕微鏡像、Scale bar = 100 μm。

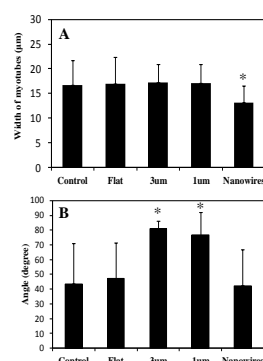


図6. (A)筋管細胞径、(B) 配向角度の数値解析結果。アスタリスク(*)はコントロールに対して有意であることを示す ($p < 0.05$)。

4. 総括

本論文では機能性酸化ナノ構造表面における細胞分化誘導を目指した。その為にまず透明酸化半導体 Ga₂O₃、SnO₂ を対象としてレーザーアブレーション法によるナノ構造成長と形状制御を実施した。ボトムアップの手法により作製した三次元ナノ構造に加えて、トップダウンの加工手法により、単一相材料で数 10 nm~10 μm サイズの構造作製を実現した。次にこれらを細胞培養足場 (Scaffold) として用い、筋芽細胞の接着、配向制御を確認した。本研究成果は酸化物多機能物性の細胞培養環境への利用を提案するものであり、酸化物ナノワイヤ形状制御という静的足場構造制御に留まらず電気・磁気場、光場などの動的制御と細胞分化の関係解析を目指した。さらにはエレクトロフォトンクス領域への応用を目指して電気特性・発光特性について評価・制御に取り組んでいる。

参考文献

- 1) K. Anselme et al. Acta Biomater. 6, 3824 (2010)
- 2) C. H. Seo et al. Biomaterials, 34, 1764 (2013)
- 3) E. G-Zadeh et al. Lab Chip, 11, 3031 (2011)
- 4) P-Y. Wang et al. Biotech. Bioeng. 106, 285 (2010)
- 5) P. Clark et al. Int. J. Biochem, Cell. Biol. 34, 816 (2002)