

and PEST domains, respectively (data not shown). Overall, we found 17 mutations in 16 of 33 childhood T-ALL cases (48.5%), recapitulating the previous observation.³

It is intriguing to consider γ -secretase inhibitors as antileukemia agents, with Notch signaling being a new therapeutic target, since their efficacy is predicted and there are ongoing clinical trials of γ -secretase inhibitors as anti-Alzheimer drugs. However, at least two issues must be considered further.

First, according to the previous report, many *Notch1*-mutated T-ALL cell lines are not likely to respond to γ -secretase inhibitors, although some are definitely sensitive to these agents. Indeed, we found that γ -secretase inhibitors that induce apoptosis in some T-ALL cell lines did not affect many *Notch1*-mutated T-ALL cell lines despite the fact that these γ -secretase inhibitors unambiguously blocked the activation of Notch1 (data not shown). These findings indicate that Notch1 activation is not always required for the growth of T-ALL cell lines even if they have mutations. This may be due to additional mutations during establishment of the cell line or presence of Notch-independent cell growth machinery in T-ALL cells from patients. To see whether Notch signaling is a good therapeutic target, it is important to examine fresh T-ALL cells for frequency of responsiveness to γ -secretase inhibitors.

Second, with the development of γ -secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, major effort has been made to find compounds that have less effect on Notch signaling. Indeed, it has been clearly shown that the administration of large amounts of Ly411575, a compound with a strong γ -secretase inhibiting activity, to mice induces severe abnormalities in the immune system and digestive tract.⁸ Therefore, it is unlikely that we can divert a γ -secretase inhibitor that has been developed for treatment of Alzheimer's disease to an anti-T-ALL drug. We need a careful strategy to find γ -secretase inhibitors or other Notch inhibitors that could be used for T-ALL and potentially other malignancies, with acceptable side effects due to the inhibition of Notch signaling, which is required for cell life physiologically.

Acknowledgements

This work was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas, KAKENHI-17013022 (to SO) and

KAKENHI-17390274 (to SC) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and by Japan Health Sciences Foundation (to SC).

S-Y Lee¹
 K Kumano^{1,2}
 S Masuda^{1,2}
 A Hangaishi²
 J Takita⁴
 K Nakazaki²
 M Kurokawa²
 Y Hayashi⁵
 S Ogawa^{2,3}
 S Chiba^{1,2}

¹Department of Cell Therapy and Transplantation Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan;
²Department of Hematology and Oncology, University of Tokyo, Tokyo, Japan;
³Department of Regeneration Medicine for Hematopoiesis, University of Tokyo, Tokyo, Japan
⁴Department of Pediatrics, University of Tokyo, Tokyo, Japan; and
⁵Department of Hematology and Oncology, Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan

References

- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; **284**: 770–776.
- Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 756–767.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris IV JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C *et al*. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004; **306**: 269–271.
- Wolfe MS. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov* 2002; **1**: 859–866.
- Hoelzer D, Gokbuget N. New approaches to acute lymphoblastic leukemia in adults: where do we go? *Semin Oncol* 2000; **27**: 540–559.
- Aplan PD. Adults are not simply big children. *Blood* 2004; **103**: 2437–2438.
- Ogawa S, Hangaishi A, Miyawaki S, Hirokawa S, Miura Y, Takeyama K *et al*. Loss of the cyclin-dependent kinase 4-inhibitor (p16; MTS1) gene is frequent in and highly specific to lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies. *Blood* 1995; **86**: 1548–1556.
- Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T *et al*. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 12876–12882.

JAK2 Val617Phe activating tyrosine kinase mutation in juvenile myelomonocytic leukemia

Leukemia (2005) **19**, 1843–1844. doi:10.1038/sj.leu.2403903; published online 4 August 2005

TO THE EDITOR

Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is a rare myeloproliferative/myelodysplastic disorder of early childhood.¹ Genetic abnormalities of the three genes *RAS* (15–20%), neurofibromatosis type I (*NF1*) (25%), and protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11 (*PTPN11*) (34%), all of which are positioned in the GM-CSF/Ras signal transduction pathway,

have been implicated in the pathogenesis of JMML.^{2–4} One of these genetic abnormalities is observed in 75% of JMML patients, leaving 25% of the reported cases in which a specific mutation has yet to be detected. Recent reports described an acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* gene that has been found in human myeloproliferative disorders, and the single-point mutation (Val617Phe) in exon 12 was identified.^{5–7} Several data demonstrate that *JAK2* is physically associated with the GM-CSFR β chain, becoming activated upon challenge of myeloid cells with GM-CSF.⁸ To clarify the involvement of *JAK2* in the pathogenesis of JMML, we searched for mutations in the *JAK2* gene in five JMML patients.

The diagnosis of JMML for each patient was confirmed according to diagnostic criteria agreed upon by the International JMML Working Group.¹ Genomic DNA was extracted from patients' bone marrow cells, and the human *JAK2* exon 12 was

Correspondence: Dr E Ito, Department of Pediatrics, Hirosaki University School of Medicine, 53 Honcho, Hirosaki, Aomori, 036-8563, Japan; Fax: 81 172 39 5071; E-mail: etou@cc.hirosaki-u.ac.jp
 Received 13 June 2005; accepted 5 July 2005; published online 4 August 2005

Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin

Kumiko Saeki, Etsuko Yasugi, Emiko Okuma, Samuel N. Breit, Megumi Nakamura, Tosifusa Toda, Yasushi Kaburagi and Akira Yuo

AJP - Endo 289:419-428, 2005. First published Apr 12, 2005; doi:10.1152/ajpendo.00512.2004

You might find this additional information useful...

This article cites 26 articles, 11 of which you can access free at:

<http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/full/289/3/E419#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/full/289/3/E419>

Additional material and information about *AJP - Endocrinology and Metabolism* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpendo>

This information is current as of March 14, 2006 .



Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin

Kumiko Saeki,^{1,*} Etsuko Yasugi,^{1,*} Emiko Okuma,¹ Samuel N. Breit,⁴
Megumi Nakamura,³ Tosifusa Toda,³ Yasushi Kaburagi,² and Akira Yuo¹

¹Departments of Hematology and ²Metabolic Disorder, Research Institute, International Medical Center of Japan;

³Proteomics Collaboration Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan;

and ⁴Centre for Immunology, St. Vincent's Hospital, and University of New South Wales, Sydney, Australia

Submitted 27 October 2004; accepted in final form 11 April 2005

Saeki, Kumiko, Etsuko Yasugi, Emiko Okuma, Samuel N. Breit, Megumi Nakamura, Tosifusa Toda, Yasushi Kaburagi, and Akira Yuo. Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E419–E428, 2005. First published April 12, 2005; doi:10.1152/ajpendo.00512.2004.—Insulin/IGF-I-dependent signals play important roles for the regulation of proliferation, differentiation, metabolism, and autophagy in various cells, including hematopoietic cells. Although the early protein kinase activation cascade has been intensively studied, the whole picture of intracellular signaling events has not yet been clarified. To identify novel downstream effectors of insulin-dependent signals in relatively early phases, we performed high-resolution two-dimensional electrophoresis (2-DE)-based proteomic analysis using human hematopoietic cells 1 h after insulin stimulation. We identified SRp20, a splicing factor, and CLIC1, an intracellular chloride ion channel, as novel downstream effectors besides previously reported effectors of Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor 2 and glutathione S-transferase-pi. Reduction in SRp20 was confirmed by one-dimensional Western blotting. Moreover, MG-132, a proteasome inhibitor, prevented this reduction. By contrast, upregulation of CLIC1 was not observed in one-dimensional Western blotting, unlike the 2-DE results. As hydrophilic proteins were predominantly recovered in 2-DE, the discrepancy between the 1-DE and 2-DE results may indicate a certain qualitative change of the protein. Indeed, the nuclear localization pattern of CLIC1 was remarkably changed by insulin stimulation. Thus insulin induces the proteasome-dependent degradation of SRp20 as well as the subnuclear relocalization of CLIC1.

HL-60 cells; PDQuest; matrix-assisted laser desorption ionization coupled to time-of-flight mass spectrometry; Mascot

INSULIN AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I (IGF-I) are known as important regulators of a variety of biological effects, including growth, development, and metabolism. Moreover, insulin-dependent signals contribute to the regulation of azurophil granule-selective macroautophagy in human hematopoietic cells (16). The molecular mechanisms for the actions of insulin and IGF-I have been intensively studied by various approaches, including gene-targeting animal experiments (1, 8, 14, 22) and molecular cloning techniques (20, 21). Now, the scenario for early intracellular signal transduction including a protein kinase activation cascade is well documented. It has been revealed that common intracellular signaling pathways are working downstream of insulin and IGF-I, including insu-

lin receptor substrates (IRSs) (12) and Shc (17). The IRSs phosphorylate phosphatidylinositol 3-kinase to activate Akt, which transmits signals for proliferation and survival as well as the hematopoietic macroautophagy regulation (16), and the mammalian target of rapamycin and S6 kinase, which transmit signals for growth and translation besides hepatic macroautophagy regulation (2). On the other hand, Shc transmits signals for differentiation in hematopoietic cells (25).

In contrast to the early signal transduction, the picture of the later signaling events remains rather obscure. A large number of still undetermined molecules may be working downstream of the insulin-dependent signals. To obtain the whole picture of the intracellular signaling events downstream of the insulin receptor, comprehensive studies such as transcriptome analysis and proteome analysis may be especially powerful. A transcriptome analysis can illuminate the intracellular signaling events if they require new transcriptions or altered message stabilities. However, changes in protein expression are not always associated with those of the message expression, and vice versa. Thus transcriptome analysis would occasionally bring about false positive and/or false negative results. In this sense, proteome analysis is thought to be a more practical tool. Moreover, proteome analysis has merit in demonstrating protein modification changes such as phosphorylation and acetylation besides the change in net expression amounts. Indeed, studies on proteome analysis have successfully identified the protein molecules associated with metabolic regulation in the liver (3, 7). However, proteome analysis on insulin signaling in hematopoietic cells has not been performed despite the significance of insulin-dependent signals in the hematopoietic system.

For the first time, we performed proteomic analysis using human hematopoietic cells with the high-resolution two-dimensional electrophoresis (2-DE) system. We show that SRp20, a splicing factor, and CLIC1, an intracellular chloride ion channel, are working as novel downstream effectors of insulin signaling. The biological relevance of these events is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Cells, growth factors, and inhibitors. HL-60 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; JRH Bioscience, Lenexa, KS). For insulin-stimulating experiments, cells

* These authors contributed equally to this work. The order of the authors' names was arbitrarily arranged.

Address for reprint requests and other correspondence: A. Yuo, Dept. of Hematology, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan (e-mail: yuoakira@ri.imcj.go.jp).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

had been previously cultured in serum-free RPMI 1640 medium supplemented with 5 $\mu\text{g/ml}$ human holo-transferrin (Sigma Chemical, St. Louis, MO) for 3 days, and then 5 $\mu\text{g/ml}$ insulin (Sigma) were added. Transferrin was suspended in RPMI 1640 medium, and insulin was solubilized by 1 N hydrochloride. In some experiments, MG-132 (Calbiochem, La Jolla, CA) was added 30 min before insulin stimulation.

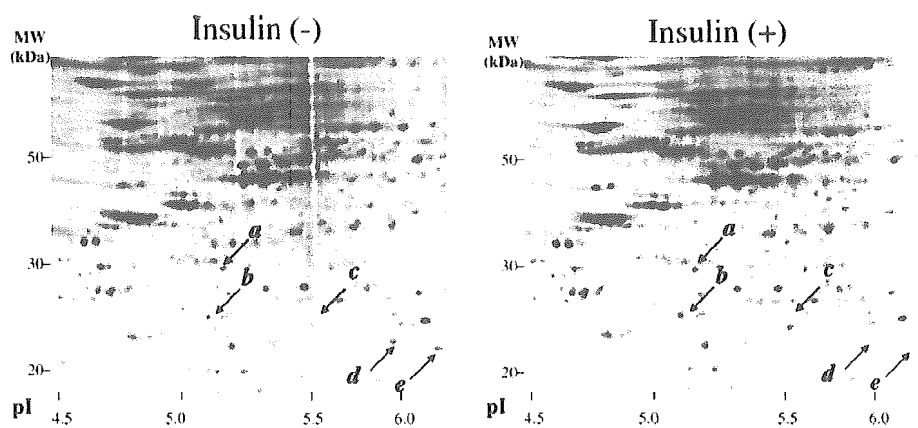
Two-dimensional gel electrophoresis with quantitative analyses. Insulin-depleted cells were stimulated by insulin. After a 1-h incubation, stimulated and nonstimulated cells were collected. After a washing with wash buffer (10 mM Tris·HCl buffer, pH 8.0, 5 mM magnesium acetate), 4×10^7 cells were suspended with 7 volumes of lysis buffer containing 2 M thiourea, 7 M urea, 4% (wt/vol) CHAPS, and 1 mM Pefabloc SC PLUS (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The cell suspensions were kept for 10 min on ice, sonicated intermittently, and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C, and the supernatant fractions were collected. The protein concentration was determined in the lysis solution with a dye reagent from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ), using BSA as a standard. The lysate was alkylated with Ready Prep Reduction-Alkylation Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The 120 μg of protein lysate per gel were subjected to two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). One-dimensional isoelectric focusing was carried out using Immobiline dry strip (18 cm long, pH 3–10 nonlinear or pH 4–7 linear, Amersham Biosciences) in a horizontal electrophoresis system (Ettan IPGphor, Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. After the one-dimensional electrofocusing, IPG gels were equilibrated with buffer containing 50 mM Tris·HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% (vol/vol) glycerol, 2% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.01% bromophenol blue, and 0.5% dithiothreitol, followed by alkylation with equilibration buffer containing 4.5% iodoacetamide instead of 0.5% dithiothreitol at room temperature for 15 min. The gels were subjected to two-dimensional SDS-PAGE (10% gel). Proteins were visualized in the gels by staining with SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Bio-Rad Laboratories) for overnight. The fluorescence intensity of each protein spot was digitally recorded by Fluor-Imager 595 (Amersham Biosciences) using ImageQuant software and the differential protein expression quantitatively analyzed by PDQuest software (Bio-Rad Laboratories). The density of each spot was normalized by that of the smallest β -actin spot. Initially, all of the spots were roughly matched by an automatic program in PDQuest software, which was followed by a more detailed manual matching process to correct inappropriate matching pairs. Three to six independent experiments were performed, and the results were statistically analyzed by Student's *t*-test.

Mass spectrometric analysis. Mass spectrometric analysis was performed according to the method reported by Toda et al. (23), with slight modifications. Briefly, each protein spot in SYPRO Ruby-

stained gels was picked by FluoroPhoreStar 3000 (Anatech, Tokyo, Japan). The pieces of gels were dehydrated in 50% acetonitrile and 50% ammonium bicarbonate, next in 100% acetonitrile, and dried. The proteins were digested with 5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin (sequencing grade modified trypsin; Promega, Madison, WI) at 30°C. After overnight protein digestion, peptide fragments in the digest were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) coupled to a time-of-flight (TOF) (MALDI-TOF) mass spectrometer (AXIMA-CFR; Shimadzu, Kyoto, Japan) for peptide mass fingerprinting (PMF). Protein identification was performed with the Mascot server (Matrix Science, Boston, MA) and Protein Prospector (UCSF Mass Spectrometry Facility, San Francisco, CA). We selected the *Homo sapiens* database of SWISS-PROT and parameters: peptide tolerance ± 0.4 Da and one missed cleavage. Carbamidomethyl modification of cysteine and acetylation of the NH₂-terminal end or lysine and phosphorylation of serine, threonine, or tyrosine were considered. Protein identification was repeated at least once with spots from different gels. Phosphorylated peptides were confirmed by MALDI-TOF-MS in a postsource decay (PSD) mode of AXIMA-CFR and AXIMA-CFRplus (Shimadzu). NH₂-terminal acetylation was determined by MALDI-QIT-TOF-MS in an MS/MS mode (AXIMA-QIT, Shimadzu).

One-dimensional Western blotting. Cells (5×10^5) were lysed with 100 μl of 1 \times Laemmli's sample buffer and boiled. Ten microliters of this lysate were subjected to SDS-PAGE with 15% gels. The electric transfer onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was carried out with a semidry blotting apparatus (Bio-Rad Laboratories) at 50 mA/cm² for 45 min at room temperature using buffer containing 2.25% Tris, 10.8% glycine, and 20% methanol. The first antibody reaction was performed using anti-SRp20 antibody (7B4; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor (Rho-GDI) antibody (A-20; Santa Cruz Biotechnology), anti- β -tubulin antibody (H-235; Santa Cruz Biotechnology), a sheep anti-CLIC1 antiserum (25), anti-cyclin D3 antibody (C-16; Santa Cruz Biotechnology), anti-cyclin E antibody (M-20; Santa Cruz Biotechnology), and anti-cyclin A antibody (BF683; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The second antibody reaction and the final detection procedure were performed using ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences) or SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) according to the manufacturers' guidance. Information of the chemical luminescence was analogically developed onto Hyperfilm (Amersham Biosciences). After scanning of the developed film, the band intensities were calculated by ImageQuant software (Amersham Biosciences). Stripping of the first antibody was performed by incubating the PVDF membrane with Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce Biotechnology) at room temperature for 30 min.

Fig. 1. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) profile of human hematopoietic HL-60 cells with or without insulin treatment. HL-60 cells were cultured with transferrin-supplemented serum-free medium for 3 days. Then buffer solution (left) or 5 $\mu\text{g/ml}$ insulin (right) was added, and cells were cultured for another 1 h at 37°C. Cell lysates were prepared as described in Experimental Procedures, and 2-DE was carried out. PDQuest software-based analysis demonstrated that the 5 spots (indicated by arrows) showed significant differences in their expressions with or without insulin treatment. *Spot a*, CLIC1, an intracellular chloride ion channel; *spot b*, Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor 2 (Rho-GDI-1); *spot c*, and glutathione S-transferase-pi (GST-pi); *spots d* and *e*, SRp-20, a splicing factor; *isoform of β -actin.



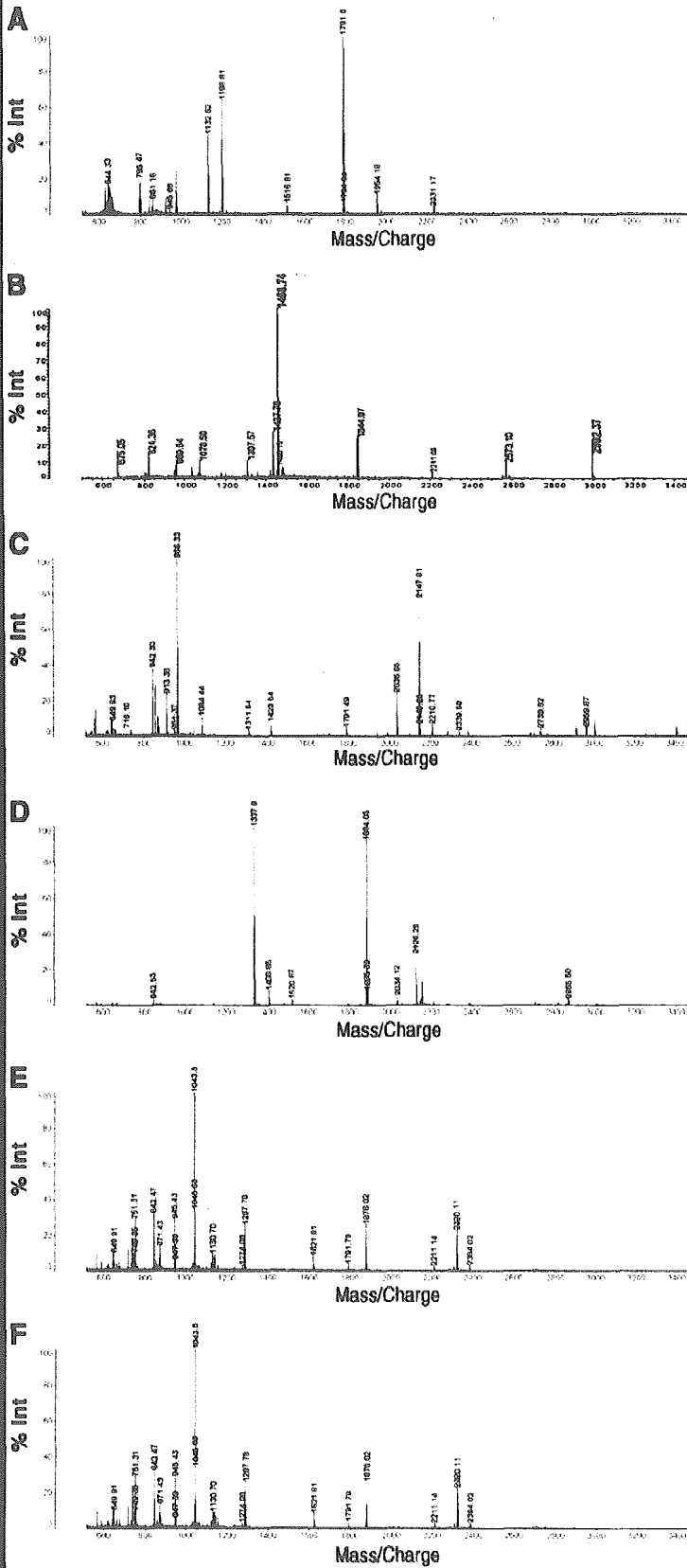


Fig. 2. Peptide mass fingerprinting (PMF) of spots a-e. Spots a (B), b (C), c (D), d (E), e (F) were picked, and, after trypsin digestion, matrix-assisted laser desorption ionization coupled to a time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF-MS) analysis was performed. As a positive control, a β -actin spot (* in Fig. 1) was picked and analyzed (A).



Two-dimensional Western blotting. SYPRO Ruby-stained proteins on gels were resolubilized and transferred according to our previously reported method (23). Briefly, the stained gel was incubated in resolubilization buffer (0.2% wt/vol SDS, 0.3% wt/vol Tris, 0.7% wt/vol glycine) for 10 min and mounted onto a PVDF membrane in a semidry blotting apparatus (Bio-Rad Laboratories). Electrotransfer was carried out at 4 V/cm² for 1 h at room temperature using buffer containing 0.3% (wt/vol) Tris, 1.5% (wt/vol) glycine, 0.1% (wt/vol) SDS. The fluorescence images of the blotted PVDF membranes were scanned and recorded by FluorImager 595 (Amersham Biosciences). The PVDF membranes were further subjected to immunoblotting as in cases of 1-DE Western blotting.

Cell cycle analysis. Cells (5 × 10⁵) were collected, washed with PBS, and fixed with 70% ice-cold ethanol for 4 h. After treatment with RNase A (100 µg/ml, Sigma) for 30 min at 37°C, DNA was stained with 50 µg/ml propidium iodide (Sigma). Cell cycle analysis was performed by FACScalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) using CELL Quest software according to the manufacturer's guidance.

Immunocytochemistry. Cells were fixed on slide glasses with a cytospin apparatus (Cytospin2; Shandon, Pittsburgh, PA) with further fixation with acetone-methanol solution (1:3). The immunostaining procedure was performed as described elsewhere (16) using anti-CLIC1 antibody (1:1,000 dilution) (24). The cells were observed by fluorescent microscopy with Normarsky differentiated interference contrast (Olympus Optical, Tokyo, Japan).

Statistical analysis. Student's *t*-test was used to determine statistical significance. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

2-DE protein expression profiles of human hematopoietic cells with or without insulin treatment. To identify novel downstream effectors in early phases of insulin-dependent signals in human hematopoietic cells, we performed the 2-DE-based differential protein expression analysis using human myeloblastic HL-60 cells. The cells which had been cultured in the absence of insulin for 3 days were treated with 5 µg/ml insulin or water. After 1 h, cell lysates were prepared according to the standard isoelectric focusing electrophoresis method described in MATERIALS AND METHODS. In this procedure, highly hydrophobic, urea-insoluble proteins were eliminated during the centrifugation step as precipitates, and only the supernatant fractions were used for 2-DE. In preliminary experiments, we used the immobilized pH gradient gel strip with a broad pH range (pH 3–10 nonlinear) for one-dimensional isoelectric focusing. Although more than 1,000 protein spots were visualized after SYPRO Ruby staining, PDQuest software-based analysis indicated that the spots having significant expression changes by insulin treatment were mainly located at pH 4–6 in the horizontal axis (data not shown). Thus we performed the

Table 2. Ratios of spot intensities (insulin +/insulin -)

Table with 4 columns: Spot, Protein, Means ± SD, P Value. Rows include CLIC1, Rho-GDI-2, GST-pi, SRp20.

Summarized results from 3–6 independent experiments are shown. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test.

following detailed analysis using the immobilized pH gradient gel strip with a narrower range (pH 4–7 linear) for finer resolution (Fig. 1). Over 600 protein spots were visualized by SYPRO Ruby staining. From these spots, we selected the candidates for the subsequent mass spectrometric analysis according to the following criteria. The basal expression level was higher than 5% of that of the largest β-actin spot, and the increase or decrease in the expression after insulin stimulation was greater than twofold or less than one-half, respectively. After statistical analysis of the multiple experiments (n = 3–6), five candidates were determined (Fig. 1). These spots were picked from the gel and, after trypsin digestions, MALDI-TOF-MS analysis was performed. Figure 2 shows the PMF of each spot, with a PMF of β-actin as a positive control. These data were further analyzed, being sent to the Mascot search server, and it was suggested that spot a was CLIC1, spot b was Rho-GDI-2, spot c was glutathione S-transferase-pi (GST-pi), and spots d and e were SRp20 (Fig. 2 and Table 1). The Mascot score of each search result was 175 (spot a), 80 (spot b), 98 (spot c), 100 (spot d), and 64 (spot e), indicating that the protein identifications by PMF were highly reliable (the data are summarized in Table 1). The results of the statistical analysis for the expression amounts of these spots are summarized in Table 2. Among these spots, Rho-GDI-2 (spot b) and GST-pi (spot c) have already been identified as downstream effectors of insulin. Rho-GDI-2 is reportedly released from the intracellular membrane fractions to the cytoplasm by insulin (19), and the expression of GST-pi markedly increases after insulin stimulation (6). Thus we focused our research on the evaluation of spot a and spots d and e.

To confirm the Mascot search results, we performed 2-DE western blotting by transferring SYPRO Ruby-stained 2-DE protein spots to PVDF membrane. As shown in Fig. 3A, most of the proteins were properly transferred to the membrane with a SYPRO Ruby pattern similar to that of the original gel. As shown in Fig. 3B, spot a was indeed recognized by anti-CLIC1

Table 1. Protein identification by mass spectrometry analysis

Table with 11 columns: Spot, GenBank Acc. No., Protein Name, Mr (Theo. Da, Obs. kDa), pI (Theo, Obs), Mascot Score, Peptides (Match, Total), Sequence Coverage. %.

Values of theoretical isoelectric points (pI) and molecular weights/masses (Mr) were obtained from Mascot search results. Theo, theoretical; Obs, observed; CLIC1, intracellular chloride ion channel; Rho-GDI-2, Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor 2; GST-pi, glutathione-S-transferase-pi; SRp20, a splicing factor. Calculations of experimental isoelectric point (pI) and molecular weight (Mr) were based on migration of the protein spot on 2-D gels using PDQuest.

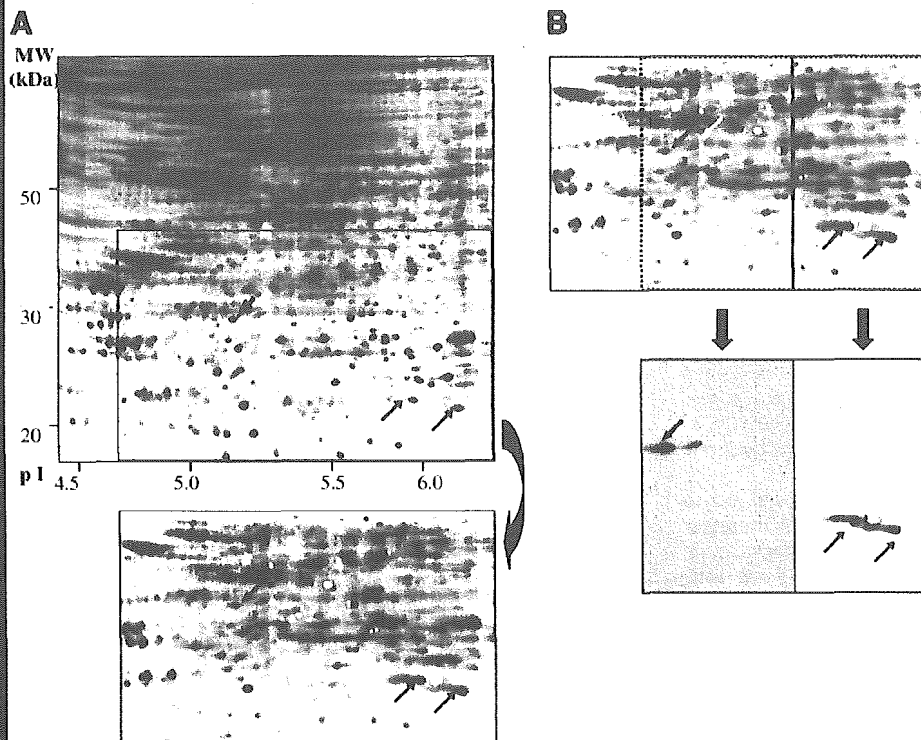
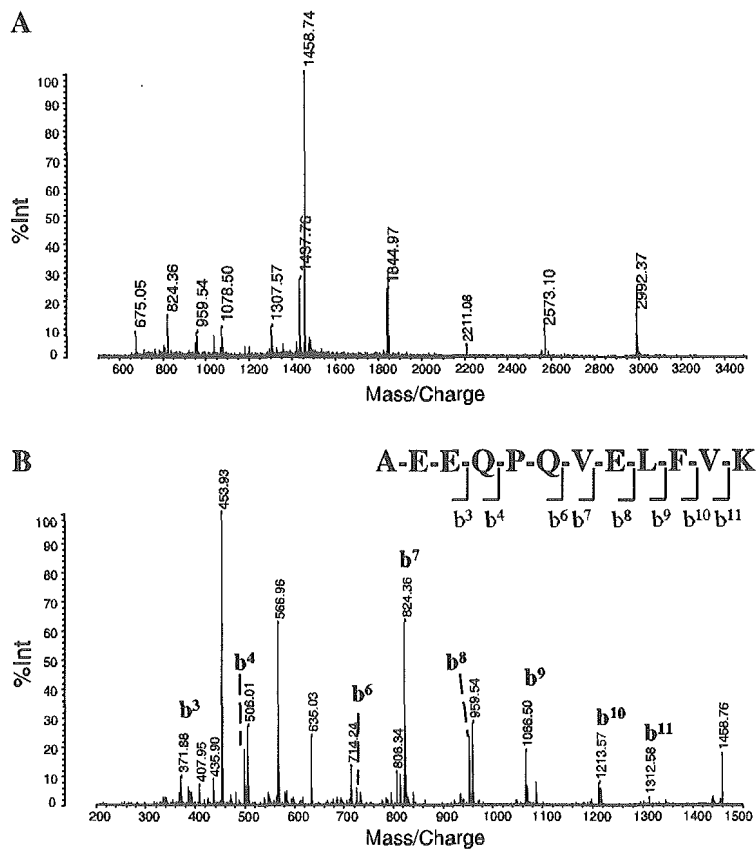


Fig. 3. 2-DE Western blotting. *A*: SYPRO Ruby-stained 2-DE gel, in which the lysate of buffer solution-treated cells were applied as in Fig. 1, left, was trimmed (top) and transferred onto a PVDF membrane (bottom). Transferred proteins were visualized by fluorescence image scanner. *B*: PVDF membrane was cut as indicated and blotted by anti-CLIC1 antiserum (bottom left) or anti-SRp20 antiserum (bottom right). Spots for CLIC1 and SRp20 are indicated with black arrows. Note that there is an extra spot on the anti-CLIC1-blotted membrane (indicated with white arrow).

Fig. 4. Amino acid sequencing of NH₂-terminal peptide fragment of CLIC1. Parent ion at m/z 1,458.74 in Fig. 2B in insulin-treated cells was subjected to subsequent analysis using MS/MS mode of MALDI-TOF-MS (AXIMA-QIT). The mass data of b-series of the product ions were analyzed by the PepSeq program in ProteinLynx software. NH₂-terminal acetylated peptides of *N*-acetyl-AEE (m/z 372.14, b³ ion), *N*-acetyl-AEEQ (m/z 500.20, b⁴ ion), *N*-acetyl-AEEQPQ (m/z 725.30, b⁶ ion), *N*-acetyl-AEEQPQV (m/z 824.38, b⁷ ion), *N*-acetyl-AEEQPQVE (m/z 953.42, b⁸ ion), *N*-acetyl-AEEQPQVEL (m/z 1,066.50, b⁹ ion), *N*-acetyl-AEEQPQVELF (m/z 1,213.57, b¹⁰ ion), and *N*-acetyl-AEEQPQVELFV (m/z 1,312.64, b¹¹ ion) were detected. Peptide mass fingerprinting (PMF: *A*) and MS/MS data of b-series (*B*) are shown. Similar analysis concerning control cells also demonstrated NH₂-terminal acetylation of CLIC1 (data not shown).



antibody and spots *d* and *e* were recognized by anti-SRp20 antibody. We also studied the possible modifications on these two proteins. As shown in Fig. 1A, the observed isoelectric point (pI) of CLIC1 was 5.16, which is similar to the Mascot information (the calculated pI was 5.09). Interestingly, there was an extra small spot with a higher pI value (Fig. 3B, white arrow). Indeed, we detected a doublet band in one-dimensional Western blotting, where the lysate prepared for 2-DE was mixed with an isovolume of 2× Laemmli's sample buffer and subjected to SDS-PAGE (data not shown and see Fig. 6B). Thus CLIC1 is expressed in at least two forms with different pI values in human hematopoietic cells, although the molecular basis for this difference was not elucidated. The MS digest analysis of spot *a* in the 2-DE profiles of both the insulin-treated and control cells demonstrated that the peptide fragment at mass-to-charge ratio (m/z) 1,458.74 in PMF of spot *a* represented the NH₂ terminus acetylated fragment acetyl-AEEQPVELFVK, indicating that the first methionine was eliminated and the second alanine was N-acetylated. This finding was indeed confirmed by the amino acid sequencing at the m/z 1,458.74 fragment by the MS/MS mode of MALDI-TOF-MS, as shown in Fig. 4.

As for SRp20, the observed pI values of spots *d* and *e* were 6.13 and 6.38, respectively (Fig. 1 and Table 1), in contrast to the Mascot software information (the calculated pI was 11.64).

This discrepancy may come from the modifications of SRp20. The MS digest analysis indicated that the SRp20 was phosphorylated at two sites, including Ser¹¹⁵ and Ser¹⁰⁸, from the existence of the peptide fragment ions of m/z 751.31 and m/z 945.43 (Fig. 5A). Mass value of m/z 751.31 is speculated amino acid sequences as RRSPR₍₁₁₃₋₁₁₇₎, RSPRR₍₁₁₄₋₁₁₈₎, or SPRRR₍₁₁₅₋₁₁₉₎ (Fig. 5E). As concerns m/z 945.43, MS digest suggests the amino acid sequence as RRSPPPR₍₁₀₆₋₁₁₂₎, RSPPRR₍₁₀₇₋₁₁₃₎, or SPPRRR₍₁₀₈₋₁₁₄₎. Phosphorylated peptide was confirmed by MALDI-TOF-MS in a seamless PSD mode (AXIMA-CFR) that detected the neutral loss of phosphate group. As shown in Fig. 5, B and C, phosphorylation-dependent neutral loss (-80 Da) and dehydration (-18 Da) were detected in the fragments at m/z 751.31 and m/z 945.43. Conversely, the MALDI-TOF-MS PSD spectrum of the control peptide ion gated at m/z 1,043.57 showed no significant neutral loss (Fig. 5D). Next, the amino acid sequences of m/z 751.31, m/z 945.43, and m/z 1,043.57 were examined by the same method as described above by using AXIMA-CFRplus. The amino acid sequences of m/z 751.31 could not be determined because the fragment ion was low intensity (data not shown). However, it is presumable that the Ser¹¹⁵ is phosphorylated. From the mass spectra of gated ion at m/z 945.43, the amino acid sequence was determined as RRSPPPR₍₁₀₆₋₁₁₂₎, and the position of phosphorylation was Ser¹⁰⁸ (Fig. 6A). As a

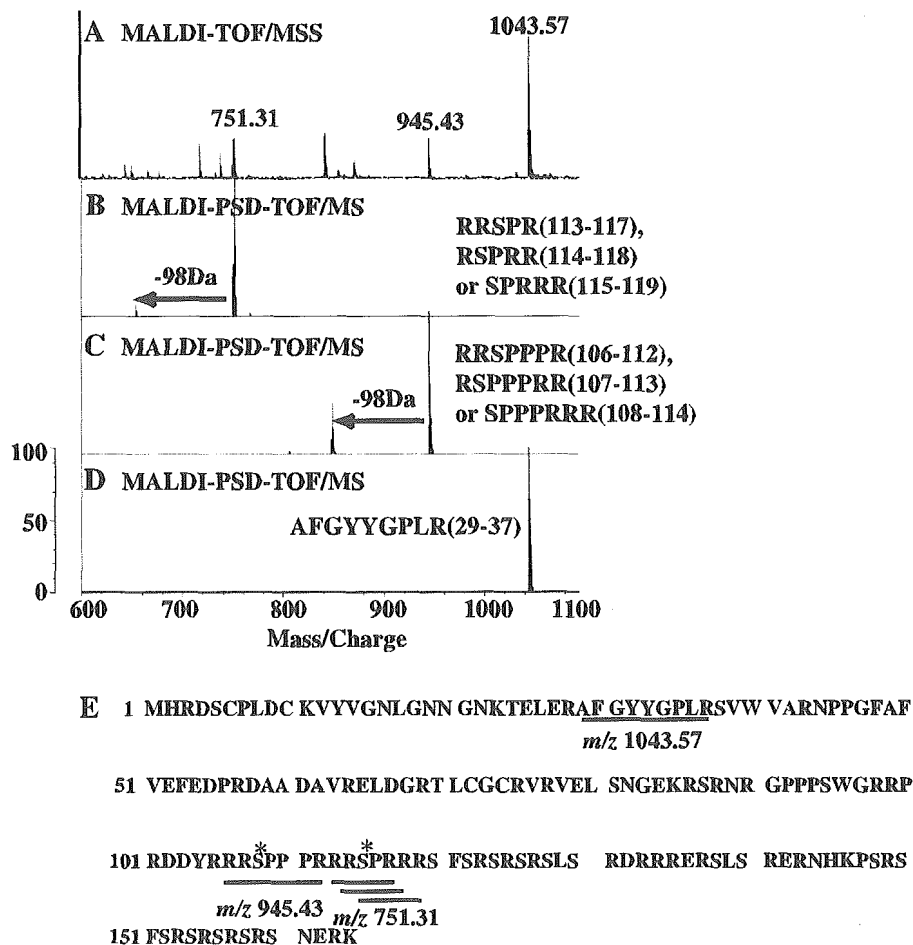


Fig. 5. Confirmation of SRp20 phosphorylation at specific serine residues. A: gated ions at m/z 751.31, 945.43, and 1,043.57 in Fig. 2E were subjected to analysis of neutral loss by MALDI-TOF-MS (AXIMA-CFR) in post-source decay (PSD) mode. The 98-Da loss of mass values was detected in gated ion at m/z 751.31 (B) and m/z 945.43 (C), but not in gated ion at m/z 1,043.57 (D) as a negative control. E: primary sequence of SRp20. *Phosphorylated amino acid.

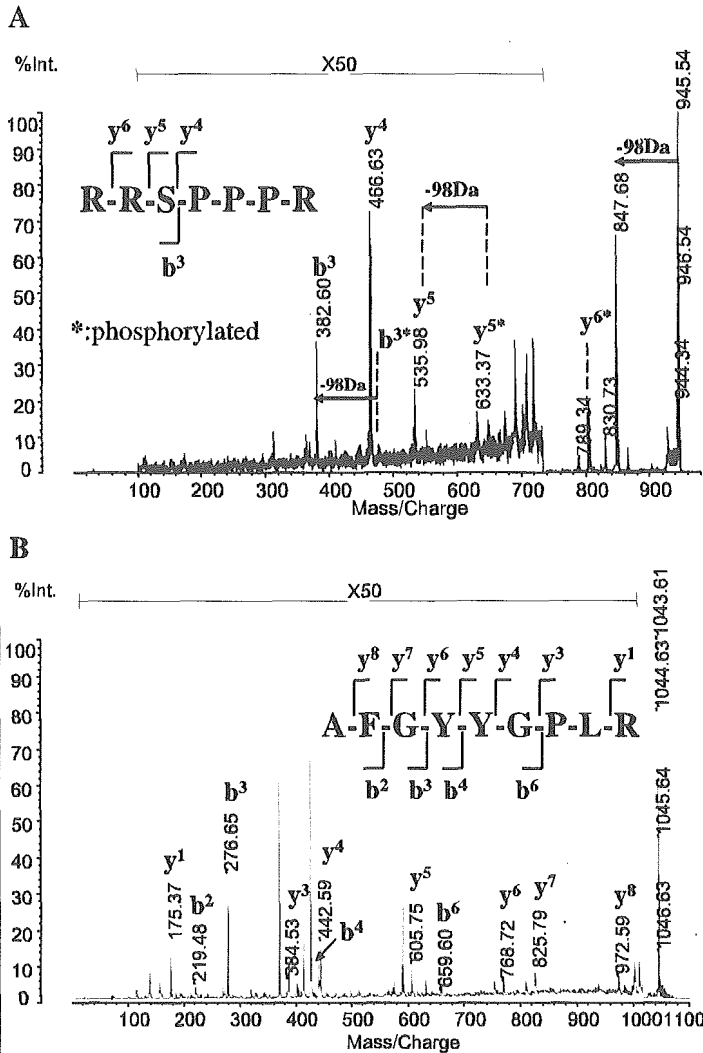


Fig. 6. Sequence analysis of gated ions at m/z 945.43 and 1,043.57 by MALDI-TOF-MS in PSD mode. *A*: gated ion at m/z 945.29 in Fig. 5C was subjected to subsequent analysis using PSD mode of MALDI-TOF-MS (AXIMA-CFRplus) *B*: three neutral loss ions (-98 Da) of m/z 480, 633, and 945 were detected. Gated ion at m/z 1,043.57 in Fig. 5D was subjected to the same analysis. Neutral loss ion (-98 Da) was not detected.

negative control, m/z 1,043.57 was subjected to analysis using PSD mode of AXIMA-CFRplus (Fig. 6B). The amino acid sequence was decided as AFGYGLR_(29–37), which was not phosphorylated. These results indicated that Ser¹¹⁵ and Ser¹⁰⁸ were phosphorylated in human hematopoietic cells (Fig. 5E). Thus the two phosphorylations of SRp20 may be responsible for the acidic shift of SRp20 in 2-DE.

Thus the 2-DE-based differential protein expression analysis identified CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin in human myeloblastic HL-60 cells.

1-DE study of CLIC1 and SRp20 expressions after insulin stimulations. It is known that there are occasionally discrepancies between the results of 2-DE and 1-DE. The difference in the protein solubilization capacities between the two systems is thought to be one of the reasons. During cell lysate preparation in 2-DE, highly hydrophobic proteins are prone to make precipitations and thus be eliminated from the lysates after centrifugation. Thus the protein expression changes in 2-DE-based proteome analysis not only means that the net protein expression changes but also the changes in protein solubilization. So we studied the expressions of CLIC1 and SRp20 after insulin stimulation by 1-DE Western blotting.

In contrast to the results of 2-DE, there was no significant difference in CLIC1 expression between insulin-treated and nontreated samples in 1-DE (Fig. 7A). Moreover, CLIC1 was detected as a single band, unlike the 2-DE results, where CLIC1 was detected as two spots. Interestingly, CLIC1 was detected as a doublet band, and the expression amounts of CLIC1 were indeed upregulated by insulin stimulation when the 2-DE lysates were treated by an isovolume of 2× Laemmli's buffer and subjected to 1-DE (Fig. 7B, lane 2). These findings strongly suggest that insulin treatment induced certain qualitative changes of CLIC1. Compared with 1-DE, the protein recovery rate in 2-DE was generally low: one-fourth the recovery as for CLIC1 (Fig. 7B, compare lanes 1 and 3) and one-eighth the recovery as for β -tubulin (Fig. 7B, compare lanes 1 and 3). However, the expression amounts of β -tubulin (Fig. 7B, compare lanes 1 and 2) and α -tubulin (data not shown) were not significantly changed by insulin treatment even in 2-DE lysates. By contrast, around a twofold increment in CLIC1 was reproducibly observed after insulin stimulation (Fig. 7, B and C, and data not shown). We then examined the possibility that the insulin-mediated increments in CLIC1 in 2-DE lysate were associated with the changes in its subcellular

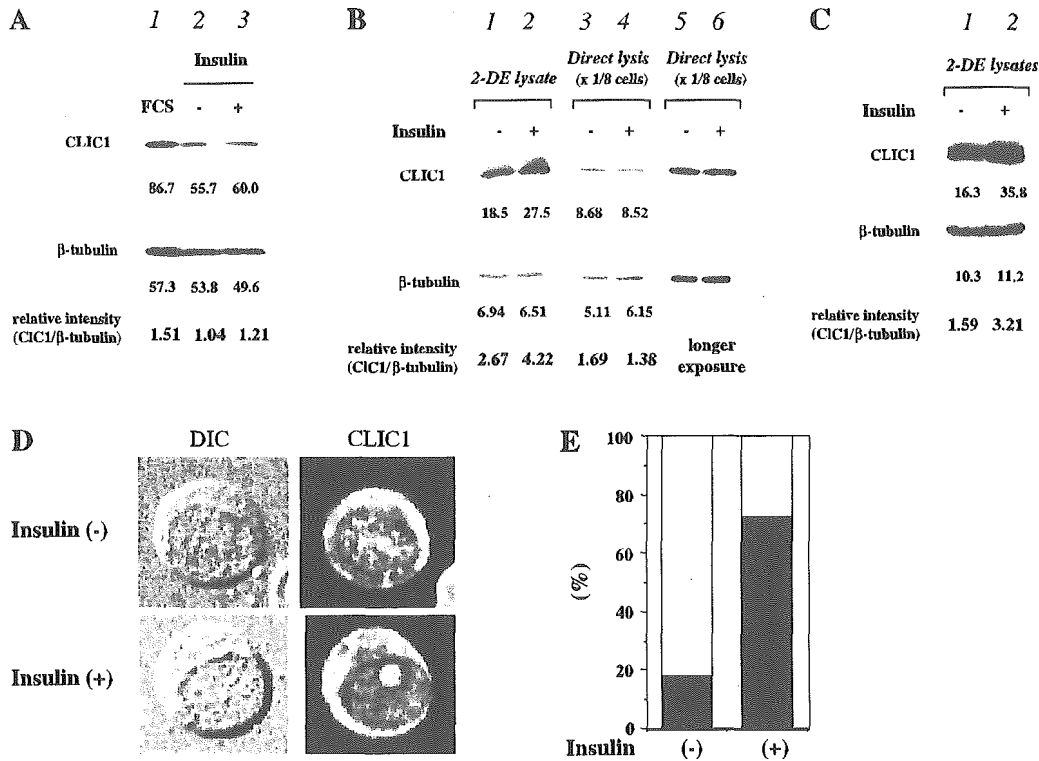


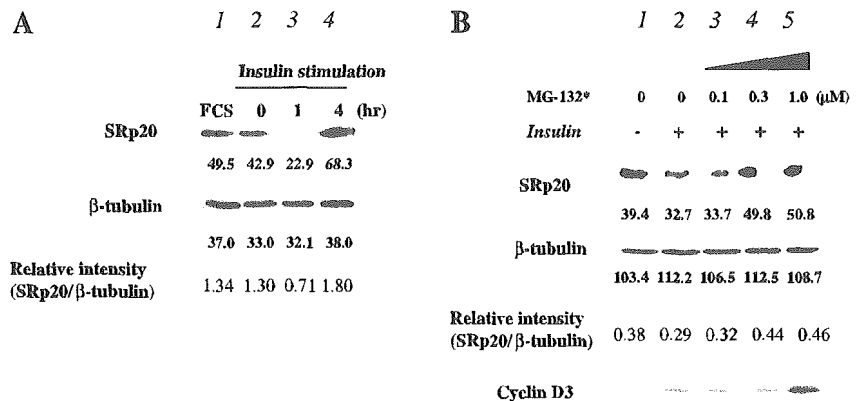
Fig. 7. 1-DE Western blotting of CLIC1. Cells that had been cultured with transferrin-supplemented serum-free medium for 3 days were stimulated by buffer solution (lane 2) or insulin (lane 3) and incubated for another 1 h at 37°C. A: cells were directly lysed with 1X Laemmli's sample buffer and subjected to 1-DE. Western blotting was performed using anti-CLIC1 antiserum. The lysate of the cells that had been cultured in the presence of FCS was also subjected to 1-DE (lane 1). Numeral under each band indicates intensity of the protein band. After the first antibody was stripped, the PVDF membrane was reblotted with anti- β -tubulin antibody. B: cell lysates prepared according to 2-DE protocol were mixed with isovolume of 2X Laemmli's sample buffer (lanes 1 and 2). One-eighth of the cells were directly lysed with 1X Laemmli's sample buffer and subjected to 1-DE (lanes 3 and 4). Longer exposure results of lanes 3 and 4 are shown in lanes 5 and 6, respectively. C: results of independently performed experiment from B are shown. D and E: subcellular localization of CLIC1. D: insulin-treated or nontreated HL-60 cells were stained with anti-CLIC1 antibody. DIC, photograph with Normarsky differentiated interference contrast. E: percentages of cells with nuclear speckled staining pattern (filled bars) and cells with nucleoli-staining pattern (gray bars) are shown.

localization. As shown in Fig. 7, D and E, the nuclear localization pattern of CLIC1 was clearly changed by insulin treatment: CLIC1 was detected mainly as speckled forms in nuclear matrix in nontreated cells, whereas CLIC1 was located mainly at nucleoli in insulin-treated cells. Thus the changes in subnuclear localization may be responsible for the expressional changes of CLIC1 in 2-DE.

Next, we studied the expression of SRp20 in 1-DE Western blotting. The SRp20 expression was actually reduced as in the

case of 2-DE (Fig. 8A), indicating that the total amount of SRp20 was reduced by insulin treatment. To further investigate the molecular basis of insulin-mediated reduction in SRp20, the effects of the proteasome inhibitor MG-132 were examined. As shown in Fig. 8B, MG-132 inhibited the insulin-mediated reduction of SRp20 in a dose-dependent manner. MG-132 also blocked the degradation of cyclin D3 and enhanced the accumulation of cyclin D3 after insulin stimulation (Fig. 8B, lane 5). Interestingly, the recovery of SRp20 expres-

Fig. 8. 1-DE Western blotting of SRp20. Cells were cultured with transferrin-supplemented serum-free medium for 3 days. A: cells were then stimulated with insulin, and cell lysates were prepared at indicated times (lanes 2–4). Western blotting was performed using anti-SRp20 antiserum. The lysate of cells cultured in the presence of FCS was also subjected to 1-DE (lane 1). Numeral under each band indicates intensity of protein band. After the first antibody was stripped, PVDF membrane was reblotted with anti- β -tubulin antibody. B: DMSO or increasing doses of MG-132 were added 30 min before insulin stimulation. Cell lysates were prepared 1 h after stimulation and subjected to 1-DE. Western blotting was performed using anti-SRp20 antiserum. PVDF membrane was reblotted with anti- β -tubulin antibody and further with cyclin D3 antibody.



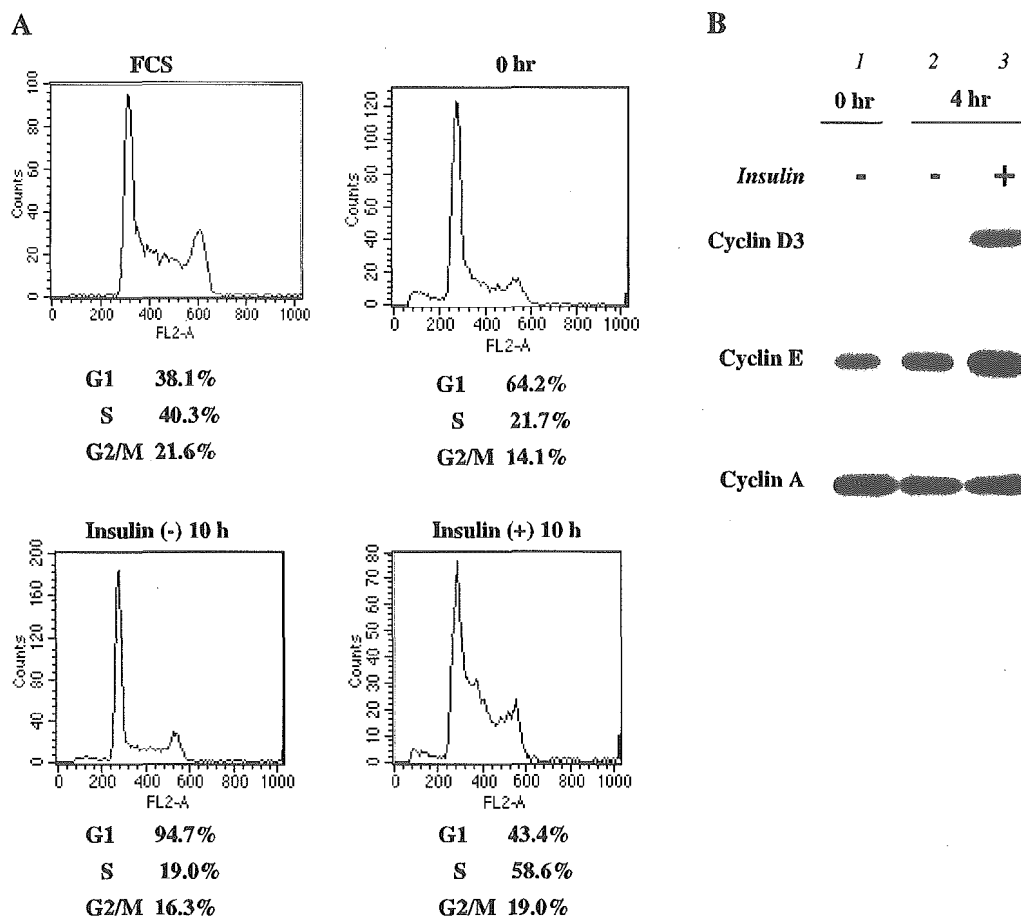


Fig. 9. Cell cycle analysis and expressions of cyclins. *A*: cells cultured with transferrin-supplemented serum-free medium for 3 days were stimulated with buffer solution (*bottom left*) or insulin (*bottom right*). After another 10-h incubation at 37°C, cells were fixed with 70% ethanol and subjected to DNA content assessment by fluorescence-activated cell sorting. Cells cultured in the presence of serum were also subjected to flow cytometric analysis (*top left*). *B*: cells cultured with transferrin-supplemented serum-free medium for 3 days were stimulated with buffer solution (*lane 2*) or insulin (*lane 3*). Cell lysates were prepared after another 4-h incubation. Western blotting was performed using anti-cyclin D3, followed by anti-cyclin E and anti-cyclin A reblotting.

sion was observed 4 h after stimulation (Fig. 8A, *lane 4*). Because serum stimulation activates SRp20 transcription and increases the protein expression of SRp20 as the cells enter into S-phase (9), the recovery in SRp2 expression would be associated with the cell cycling progression. As shown in Fig. 9, the insulin treatment significantly increased the S-phased population. Thus the recovery in SRp20 in later phases is associated with an enhanced S-entry.

Thus insulin treatment causes qualitative changes of CLIC1 that are associated with its subnuclear localization and the proteasome-dependent degradations of SRp20 as early as 1 h.

DISCUSSION

We identified CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin-dependent signals in human hematopoietic cells by using a 2-DE-based proteome analytic system.

A 2-DE-based proteome analysis has merit in managing a wide spectrum of protein expressions at one time. Moreover, it can illustrate the change in modifications and subcellular localization of the proteins besides the change in net amounts. As in the case of CLIC1, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expressions in 2-DE were upregulated by insulin

stimulation, although no significant changes were detected in 1-DE (K. Saeki, unpublished observation). Because serum stimulation, which often induces similar protein expression changes as insulin stimulation, reportedly induces cytoplasmic transport of GAPDH (18), the upregulated expression of GAPDH in 2-DE may be associated with similar subcellular translocation.

Although CLIC1 functions as a chloride ion channel when localized to membranes (26), it is known that CLIC1 localizes principally to the cell nucleus in human hematopoietic cells (24). CLIC1 is structurally homologous to the GST superfamily of proteins with a redox-active site at the NH₂ terminus (5). It is suggested that CLIC1 activity is under the control of redox-active signaling molecules *in vivo* (5). In this sense, it is interesting that GST-pi is also a downstream effector of insulin as we showed (Fig. 1A, *spot c*) and reported elsewhere (6). It is known that hyperglycemia and, to a lesser extent, insulin resistance cause oxidative stress (15, 13). Insulin signaling might possibly contribute to the reduction of oxidative stresses by changing the expression patterns of CLIC1 and GST-pi. Further investigations are required to understand the molecular basis and biological relevance of insulin-induced changes in CLIC1 in the 2-DE system.



As for spots *d* and *e* of SRp20, we could not find any differences in PMFs. One interpretation is that distinct phosphorylations took place at their COOH-terminal SR domains. Because the SR domain is extremely rich in arginine residues, this domain should be degraded into pieces after trypsin digestion, and, as a result, the peptide fragment ions might be hardly detectable. In any case, the expressions of spots *d* and *e* were both decreased by insulin stimulation, and thus the precise determination of structural differences between the two spots would be a less important subject for an understanding of biological effects of insulin. As we showed, the insulin-induced reduction in SRp20 was inhibited by pretreatment of the cells by MG-132, a reversible proteasome inhibitor (Fig. 8B). Quite unexpectedly, lactacystin, an irreversible proteasome inhibitor, could not inhibit the reduction of SRp20, although it effectively enhanced an insulin-dependent accumulation of cyclin D3 (K. Saeki, unpublished observation), suggesting that there might be at least two different proteasome-dependent protein degradation systems with distinct lactacystin susceptibilities.

What is the impact of SRp20 reduction by insulin? SRp20 is a splicing factor involved in the regulation of alternative splicing of certain precursor RNA, including SRp20 itself. Its roles for embryogenesis have been shown: an inactivation of SRp20 gene in mice resulted in a failure to form blastocysts, and embryos died at morula stage (11). Although complete loss of SRp20 functions is toxic, its mild reduction may play roles in particular situations. It is reported that overexpression of ASF/SF2, an alternative splicing regulator that antagonizes the function of SRp20 (10), was detected in malignant ovarian tissues (4). A transient reduction of SRp20 by insulin might upregulate the activity of ASF/SF2 and thus trigger signals for cell proliferation. Further investigations are required to determine the *in vivo* significance of a transient reduction of SRp20 after insulin stimulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly thank Masaki Yamada and Tsutomu Nishine of Shimadzu Corporation for technical assistance with the amino acid sequence analysis performed using an MS/MS and PSD mode of MALDI-TOF-MS (AXIMA-QIT and AXIMA-CFRplus).

GRANTS

This work was supported, in part, by a grant for diabetes research (MF-4) from the Organization for Pharmaceutical Safety and Research (to Y. Kaburagi).

REFERENCES

- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B III, Johnson RS, and Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372: 186–190, 1994.
- Blommaert EF, Luiken JJ, Blommaert PJ, van Woerkom GM, and Meijer AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 270: 2320–2326, 1995.
- Edvardsson U, Alexandersson M, Brockenhuus von Lowenhielm H., Nystrom AC, Ljung B, Nilsson F, and Dahllof B. A proteome analysis of livers from obese (ob/ob) mice treated with the peroxisome proliferator WY14,643. *Electrophoresis* 20: 935–942, 1999.
- Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, Watermann DO, Kieback DG, Stamm S, and Stickeler E. Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 11: 1085–1090, 2004.
- Harrop SJ, DeMaere MZ, Fairlie WD, Reztsova T, Valenzuela SM, Mazzanti M, Tonini R, Qiu MR, Jankova L, Warton K, Bauskin AR, Wu WM, Pankhurst S, Campbell TJ, Breit SN, and Curmi PM. Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution. *J Biol Chem* 276: 44993–5000, 2001.
- Hatayama I, Yamada Y, Tanaka K, Ichihara A, and Sato K. Induction of glutathione S-transferase P-form in primary cultured rat hepatocytes by epidermal growth factor and insulin. *Jpn J Cancer Res* 82: 807–814, 1991.
- Jaleel A and Nair KS. Identification of multiple proteins whose synthetic rates are enhanced by high amino acid levels in rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E950–E957, 2004.
- Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, and Bucchini D. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J* 15: 1542–1547, 1996.
- Jumaa H, Guenet JL, and Nielsen P. Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 17: 3116–3124, 1997.
- Jumaa H and Nielsen PJ. The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO J* 16: 5077–5085, 1997.
- Jumaa H, Wei G, and Nielsen PJ. Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20. *Curr Biol* 9: 899–902, 1999.
- Kaburagi Y, Yamauchi T, Yamamoto-Honda R, Ueki K, Tobe K, Akanuma Y, Yazaki Y, and Kadowaki T. The mechanism of insulin-induced signal transduction mediated by the insulin receptor substrate family. *Endocr J* 46, Suppl: S25–S34, 1999.
- King GL and Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol* 122: 333–338, 2004.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, and Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor 1 (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59–72, 1993.
- Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279: 42351–42354, 2004.
- Saeki K, Hong Z, Nakatsu M, Yoshimori T, Kabeya Y, Yamamoto A, Kaburagi Y, and Yuo A. Insulin-dependent signaling regulates azurophilic granule-selective macroautophagy in human myeloblastic cells. *J Leukoc Biol* 74: 1108–1116, 2003.
- Sasaoka T and Kobayashi M. The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor. *Endocr J* 47: 373–381, 2000.
- Schmitz HD. Reversible nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase upon serum depletion. *Eur J Cell Biol* 80: 419–427, 2001.
- Shisheva A, Buxton J, and Czech MP. Differential intracellular localizations of GDP dissociation inhibitor isoforms. Insulin-dependent redistribution of GDP dissociation inhibitor-2 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 269: 23865–23868, 1994.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, and White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73–77, 1991.
- Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, and White MF. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377: 173–177, 1995.
- Tobe K, Tamemoto H, Yamauchi T, Aizawa S, Yazaki Y, and Kadowaki T. Identification of a 190-kDa protein as a novel substrate for the insulin receptor kinase functionally similar to insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 270: 5698–5701, 1995.
- Toda T, Sugimoto M, Omori A, Matsuzaki T, Furuichi Y, and Kimura N. Proteomic analysis of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines before and after immortalization. *Electrophoresis* 21: 1814–1822, 2000.
- Valentinis B, Romano G, Peruzzi F, Morrione A, Prisco M, Soddu S, Cristofanelli B, Sacchi A, and Baserga R. Growth and differentiation signals by the insulin-like growth factor 1 receptor in hemopoietic cells are mediated through different pathways. *J Biol Chem* 274: 12423–12430, 1999.
- Valenzuela SM, Martin DK, Por SB, Robbins JM, Warton K, Bootcov MR, Schofield PR, Campbell TJ, and Breit SN. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J Biol Chem* 272: 12575–12582, 1997.
- Warton K, Tonini R, Fairlie WD, Matthews JM, Valenzuela SM, Qiu MR, Wu WM, Pankhurst S, Bauskin AR, Harrop SJ, Campbell TJ, Curmi PM, Breit SN, and Mazzanti M. Recombinant CLIC1 (NCC27) assembles in lipid bilayers via a pH-dependent two-state process to form chloride ion channels with identical characteristics to those observed in Chinese hamster ovary cells expressing CLIC1. *J Biol Chem* 277: 26003–26011, 2002.

ダイヤモンドライクカーボンおよび
フッ素添加ダイヤモンドライクカーボンの医用応用
～医療応用目的のナノメディカルデバイス研究開発の基盤作りについて～

長谷部光泉 ， 上條亜紀 ， 堀田 篤 ， 高橋孝喜 ， 鈴木哲也

表 面 技 術 第 56 卷 第 12 号 (2005) 別刷

ダイヤモンドライクカーボンおよび フッ素添加ダイヤモンドライクカーボンの医用応用 ～医療応用目的のナノメディカルデバイス研究開発の基盤作りについて～

長谷部光泉^{*,**}, 上條亜紀^{***}, 堀田 篤^{*}, 高橋孝喜^{***}, 鈴木哲也^{*}

^{*}慶應義塾大学大学院 理工学研究科 環境・資源・エネルギー専修 理工学部機械工学科
(〒223-8522 神奈川県横浜市日吉 3-14-1)

^{**}国家公務員共済組合連合会 立川病院 放射線科(〒190-8531 東京都立川市錦町 4-2-22)

^{***}東京大学医学部附属病院 輸血部(〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1)

Diamond-Like Carbon and Fluorinated Diamond-Like Carbon Films for Cardiovascular Medical Devices

Terumitsu HASEBE^{*,**}, Aki KAMIJO^{***}, Atsushi HOTTA^{*}, Koki TAKAHASHI^{***}
and Tetsuya SUZUKI^{*}

^{*}Center for Science of Environment, Resource and Energy, Keio University Faculty of Science and Technology
(3-14-1, Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 223-8522)

^{**}Department of Radiology, Tachikawa Hospital(4-2-22, Nishiki-cho, Tachikawa-shi, Tokyo 190-8531)

^{***}Department of Transfusion Medicine, the University of Tokyo Hospital(7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655)

Key Words : Diamond-Like Carbon (DLC), Fluorinated Diamond-Like Carbon, Medical Devices, Surface Coating, Nanotechnology

1. はじめに

わが国の主な疾患死亡原因である、がん、白血病、動脈硬化に関連する脳梗塞・脳出血などの脳血管障害や心筋梗塞などの生活習慣病に対し、医学、生命科学のみならず工学を含む科学技術全般の進歩を活かした質の高い医療が実現することが期待されている。上記の疾患の治療、予防は今日の医学、医療の主要な研究課題の一つであり、前者のがん治療に関しては、エコー、CT、MRIなどの画像診断を含む検査法が進歩したこと、定型的手術に加え腹腔鏡や胸腔鏡などの内視鏡を使用する低侵襲手術が普及したことなどが治療成績の向上をもたらしている。生活習慣病(いわゆる成人病)に関しては、高血圧、糖尿病、動脈硬化などが相互に密接に関連する危険因子であると注目され、合併症を含む病態の診断、薬剤療法の進歩および血行再建療法の普及により、延命効果とともにQOL(quality of life)を改善する効果が得られている。さらには新しい医療として、骨髄バンクおよび臍帯血バンクの発展により白血病などの血液疾患に対する根治的な治療法としての造血幹細胞移植が定着し、細胞免疫療法、再生医療、遺伝子治療が新しい有望な医療として模索されつつある。端的に言えば、現代科学技術の恩恵を享受した極めて高い水準の医療が実践されつつあると言って良いように思われる。

しかしながら我が国では、医療用具の研究、開発については、ユーザー側である医療サイドの関与が従来乏しく、有用

な「ものづくり」に必要不可欠である「医工連携」システムが真の意味では確立されていないという重大な問題があると考えられる。現在広く臨床使用されている医療用具の多くが外国で開発された製品であり、国内から供給される割合は極めて小さいという事実がその証左である。さらに重要なことは、長期的な生体適合性あるいは耐用性の問題が十分検討されているとは言い難いという現状である。たとえば、一般的治療として使用されるようになってきた、人工血管、ステント、人工骨、人工関節、歯科インプラントなどを10年以上生体内に留置した場合の安全性についてはなお未知の部分が多い。免疫という異物を排除する生物固有のシステムを有し、細菌感染の危険に不断に晒され、さらに凝固系の活性化によって重大な血行途絶などの問題を惹起する恐れがある生体内に、長期間にわたり留置し得る医療用具の開発は必ずしも容易でないと思われる。厳しい条件をクリアーするために、医学・医療分野の研究者が医療現場のニーズを集約し、共通の目標、共通の問題意識の下に、医学および工学の研究者らが有機的に協力する「医工連携」研究チームにより、ナノメディカルデバイスの開発を進めていくことが重要と考えている。

我々が検討している「フッ素添加DLCによる抗血栓性コーティング」は、工学系研究者の基礎的な検討を踏まえ、上記の厳しい条件の医療応用の可能性を追求しているところである。医療用具に関する厳しい要求を日常的に感じている

医療関係者と「ものづくり」の専門家の自由なディスカッションに基づく共同作業により、ブレークスルーが期待できると実感しており、日本が得意とするナノテクノロジー分野と医療機器分野との融合から、最終的には新しい日本発の医療機器を開発、商品化できると期待している。本稿では工学・医学の緊密な連携と、有機・無機材料の垣根を超えた我々の開発研究状況について解説したい。

2. 生体適合性材料(バイオマテリアル)研究とナノテクノロジー

バイオマテリアルという言葉が生まれて久しい。現在までのところ、金属、セラミックス、高分子(ポリマー)が有力なバイオマテリアルとして生体内で利用されてきた。バイオマテリアルに求められる条件は、「生体に優しくかつ安全性が高い材料」ということが大前提である。生体内に埋め込まれて使用される場合は、材料の機械的な特性として、生体組織に和み、生体組織を傷つけないものが求められる。そういう意味においては、たとえば硬いプラスチックよりは、柔軟なプラスチックあるいはゴムが使われた方が良いということになる。また、たとえば人工関節として使用する場合は、局所において大きな荷重が長期的にかかるため、弾性や繰り返し弾性回復能の他、力学的耐久性をもったバイオマテリアルが必要とされ、現状ではセラミックや、金属材料が用いられている。

生物学的な特性としてバイオマテリアルに要求される条件は、生体側に特有の炎症反応や、免疫反応を過剰に惹起しない物質・材質であることが絶対条件である。つまり「生体適合性」を有することが重要である。生体適合性の有無は、生物細胞培養実験や動物の皮下埋め込み実験などによって従来から評価研究されている。このようにバイオマテリアルを「bulk」として生体内で評価することは非常に重要である。しかしながら、バイオマテリアルの「真の生体適合性」を追究していくためには、反応の主座となる「生物細胞と人工材料の界面」についてナノ・ミクロンレベルで解き明かすことがナノテクノロジー応用のターゲットを決定する上で最も重要なプロセスとなると考える。

「抗血栓性」も生体適応に要求される代表的な性質の一つといえる。バイオマテリアルの抗血栓性を向上させるためには、血液成分に含まれるたんぱく質・血小板などが材料表面に付着凝集を防止することが重要である。開発の一例としては、生体に類似した脂質膜構造(MPC; 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンなど)や、薬物(ヘパリンなど)を含有し付着を防ぐ高分子材料やコーティング技術などの研究が行われている。抗血栓性については、以前は単に「血液が付着しやすい、しにくい」といった原始的な評価方法が議論の中心であったが、現在では、血液が付着するマテリアル界面そのものの性質の直接的な結果として抗血栓性が発揮されることが解明されつつあり、物質表面自由エネルギー、親水性・疎水性、さらにはミクロ相分離からくるナノ表面構造が抗血栓性に関与するといわれている。ただし、物質の表面エネルギーを単純に上昇させる、あるいは親水性・疎水性を付与することが抗血栓性効果を常にもたらすかとい

えば、必ずしも一律ではなく、マテリアルごとに複雑な因子が関連する。生物学的な観点からは、血小板、白血球、血漿タンパクの付着の仕方、また血小板や白血球などが物質表面の何を認識して抗血栓性を発揮するのか、また、工学的な観点からは、親水性か疎水性か、膜の表面の化学的組成や表面性状(表面粗さ、表面組織、表面の一定の規則性や多孔性表面など)がどのように抗血栓性に影響するかなどの研究結果が待たれる。

以上述べてきたように、バイオマテリアル界面における生体適合性・抗血栓性に関与するすべてのファクターを検討することによって、材料表面をナノレベルで改質(ナノテクノロジー)、「究極」の生体適合性・抗血栓性を有するバイオマテリアルを創造することが今後の重要課題となっている。

3. 高分子(ポリマー)と医療材料

高分子はその無限な化学構造からくる多様性、多機能性、柔軟性などから、バイオマテリアルとして最も用いられている材料の一つである。本来、生体は水を含むゲルといえるほどそれ自身がいわゆる「高分子材料」ともいえることから、生体内に使われる材料として高分子が注目されているのは理にかなっているといえる。高分子は生体医療用器具として既に多く使用され、その利用分野は大きく3つに分けることができる。第一に、医療用器具としての用途である。第二に人工臓器としての用途である。そして第三に薬品(ドラッグ)としての用途である。

医療用器具の例としてはカテーテル、注射筒、各種医療バッグ(血液バッグなど)、診断や治療用手術器具などがあげられ、ポリエチレン(PE)、ポリプロピレン(PP)、ポリスチレン(PS)などの汎用プラスチックからポリカーボネート(PC)、ポリウレタン(PU)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、エチレン-酢酸ビニル共重合体(EVA)、シリコンゴムなどのさまざまなプラスチックやゴムが用途別に使われている。これらは血液や薬品と接触するため、耐久性、抗血栓性が要求される。

人工臓器として、高分子(ポリマー)が我々の生活に最も身近に使われているのはコンタクトレンズであろう。これには柔らかいポリメタクリル酸メチル(PMMA)が使われている。さらには人工腎臓や人工心臓、人工血管など生体の臓器といわれているほとんどのものを含め、酸素運搬を目的とした人工血液までにもポリマーが応用される時代となっている。

薬品としての高分子の代表例はドラッグデリバリーシステム(DDS)であろう。ここでも高分子はドラッグキャリアミセルやスフィアとしてその材料あるいは生成に大きく関与している。DDSとして使用する場合は、使用薬物との組み合わせることが可能でかつ、薬物除放スピードをコントロールできることが必須となる。さらには薬物を放出し終わった後のポリマーそれ自身が、体内で有害作用を及ぼさないことが求められる。臓器の代替としての高分子においては、単に材料のメカニカルな特性および生体適合性を付加するだけでは不十分で、高分子それ自体または加工後の高分子に高機能性を付与し、全体として、複雑な生体機能を代替する“バイオマシン”を創り上げることが最終目標となる。薬剤としてのの

高分子には、上記メカニカル特性、生体適合性、高機能性はもちろん、ナノ・ミクロンサイズでの制御も必要となってくるため、ナノマテリアルとしての制御構造・自己組織化などが必要となってくる。このように高分子の医療応用は、バイオマテリアル・ナノ材料という時代のまさに最先端をいく研究開発が行われている分野である。医療分野においては、高分子材料はそれ単独だけではなく、他金属材料等とも組み合わせられて使用できる、あるいはコーティングのための中心的な基板となりうる可能性があり、さらにその応用範囲が拡大されてきている。

4. ダイヤモンドライクカーボン(無機物)の特徴と医用応用

バイオマテリアルの生体適合性・抗血栓性改善の方法の一つとして、薄膜を用いたコーティングによる表面改質が挙げられる。人体は主に炭素と水素で構成されており、炭素系薄膜は生体適合性膜として可能性があるとして古くから注目されていた。炭素の特徴は1) 原子番号が6と低原子番号であり、また2) 周期律表ではSiの上に位置し、半導体の性質も有する。さらに、3) シグマ結合とパイ結合を有することから、他の元素に見られない特性を示す。

我々が注目しているダイヤモンドライクカーボン(Diamond-like carbon:以下DLC)はダイヤモンドとグラファイトの中間の特性を有し、ガラスと同様に非晶質無機物である。硬さはセラミックスのように硬く、また摺動特性に優れ、宇宙材料としてもNASAでの使用実績がある。近年、DLC膜の優れた機械的特性を利用したベンチャー企業も日本で5~6社設立されるようになり、順調に実績を伸ばしている。DLCの工業分野への応用例は、多くのコンピュータのハードディスクに使用されている。ハードディスクに数十ナノメートルのDLC薄膜を被覆することにより高速回転-停止-高速回転-の摩擦に耐えることができる。また、DLC膜は優れたガスバリア特性を有することが確認されており、PETボトルの内面に被覆し、酸素の外部からの浸入および炭酸の外部への拡散を防止する開発も実用化寸前まで進んでいる。このようにDLC膜は炭素から構成され、優れた機械的特性および化学的特性を有することは幅広く知られている。また近年では、DLCの優れた特性を医療に応用することが注目されつつある。

また我々は、更なる膜の軟性化と密着性を改良するために、DLC膜をベースに高度変形部分でも追従するフッ素添加DLC(以下、F-DLC)の独自の開発をはじめている。F-DLCは、DLC膜生成の際にメタンガスあるいはアセチレンガスにフッ素ガスを添加混合し成膜化学蒸着法:CVD法)することで合成できる非晶質フッ素添加炭素膜であり、40~50nm程度のナノオーダーでの薄膜形成が可能となっている。DLCにフッ素を添加することでDLC膜の応力は下がりさらに軟性化する。基材との密着性を十分に得るためF-DLCにも中間層を設けはく離の問題にも対応できるように改良した。さらに我々は、F-DLCの優れた生体適合性²⁾および抗血栓性³⁾を示し、F-DLCあるいはDLC膜を医療材料に被覆し応用する試み⁴⁾を始めており、多くの成果を上げている。詳

細については、以下の4.6項にても概説する。

以下、主に心血管病変に対する治療デバイスとDLCに関する我々の研究成果について報告およびその展望について報告する。

4.1 我が国における心血管疾患の現状と治療

近年我が国では、高齢化および食生活の急激な変化により、いわゆる「成人病」(生活習慣病)患者が急増している。継続的な肥満、高血圧、高脂血症は、全身の血管病変発症を促し、重大な健康障害を引き起こす。わが国では単独の死因としては、悪性新生物が31.0%と最大の死因となっているが、循環器系および脳血管系を併せた血管系病変による死因は、悪性新生物による死亡率を上回る最大の死因となり、現在の医療の現場において非常に重大な課題となっている。

血管病変、特に高脂血症・動脈硬化によって引き起こされる疾患の治療法としては、初期の段階では食事療法や抗高脂血症薬が選択される。しかし一度狭くなってしまった血管や、逆に拡張しすぎた血管については自然回復を期待することは非常に困難であるために、病変血管を切除し、「人工血管」に置換する方法、つまり外科的治療=手術が選択される。また、近年の医療技術の発達により、人体にとってさらに非侵襲的な「血管内治療」が普及してきている。血管内治療においては、足の付け根部分の大腿動脈あるいは腕の動脈を注射針により穿刺し、ガイドワイヤーを用いて、小切開によって開けた穴から柔軟なチューブ状の手術器具である細いカテーテルを血管の内部に挿入し、造影剤を用いて放射線透視下で診断・血管内治療を行う。狭窄血管に対しては、バルーン(風船)付きカテーテルを用い血管拡張術を行う、あるいは、それに引き続き「ステント」(図1)と呼ばれるトンネル状(金網状)の金属管を入れて、再び血流を確保する。この治療は局所麻酔のみで行われるが、高度な熟練技術を必要とする。しかし通常の全身麻酔下での手術に比して患者負担が軽減されるため、世界中で広く普及しており、術式・手技の改善改

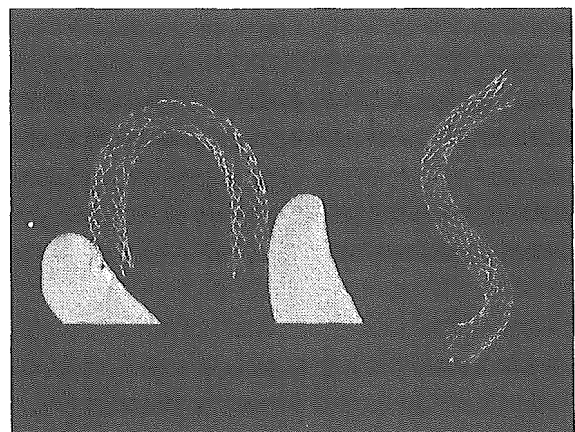


図1 自己拡張型金属ステントの一例

血管内金属ステントは、主に心筋梗塞および狭心症にともなう冠動脈閉塞・狭窄病変、閉塞性動脈硬化症にともなう腎動脈や下肢動脈の閉塞・狭窄病変を患者の負担を少なくして治療する治療機具である。バルーンカテーテル(風船付の管)と併用して使用されることもありうる。本ステントはNi-Ti合金でできており自己拡張性と柔軟性を有する。

良のみならず、ステント自体の研究も行われている。

特に現在までのステント開発の方向性は、他の人工臓器の開発と同様、まずは「いかに機能(=血管内での拡張力)を保つか?」という点を中心として、主にそのデザインの開発に主眼がおかれてきた。しかしながら、高齢化社会が加速し、長期留置成績の向上が求められる現代においては、いかに長期間、異物としての反応を軽減するか、つまり「生体適応性、耐久性」という点に重点をおいた開発が再度求められるようになってきている。現在、開発の中心はステント全体としての機能性という点に着眼するところから、ステントが血管内腔の細胞と接触する「界面機能」の追求へと主眼が変化している過渡期といえる。こういった流れの中で、細胞・分子レベルで効果を発揮する薬剤との組み合わせや、近年実用レベルまでに昇華しつつあるナノテクノロジーを応用したステント表面改質の展開が予想される。

以下、心血管疾患の治療に使われる人工血管およびステントの現状について解説し、表面改質への取り組みと、カーボン素材やダイヤモンドナノテクノロジーの関与について述べる。

4. 2 人工血管

人工の血管(人工血管)は成人では主に病的な生体血管を取り替え、バイパスあるいはシャントする目的に使用される。1952年、Voorheesが世界で初めて人工物を縫いつけて血管の代用にする動物実験に成功した。人工血管置換術は、狭窄あるいは閉塞してしまった元々の血管の代用品として人工物に取り替えるあるいは、新たに埋め込むという単純明快なコンセプトであるが、人工血管は、長期体内埋め込み材料であり、生体適応性・耐久性が重視される。現在用いられている人工血管の主な材料は布(ダクロンなど)、高分子材料(PTFE)あるいは、生体材料由来で、病変部位と材料特性に応じて使い分けられている。医療現場において人工血管は、大型(中一動脈)レベルでは満足できる治療成績を上げているが、6 mm以下の細い動脈では自己動脈と同等、もしくはそれ以上の治療効果をあげているものは残念ながら、まだ無い。これは、細径の血管では血流がより遅延しやすく、内腔の抗血栓性も不十分な結果といえるだろう。新規開発の余地が残る分野である。

また、近年、ステントグラフト(図2)と呼ばれる、これら人工血管にさらに金属の支えを併用したタイプの人工血管も開発され、主に大動脈瘤の治療に効果を上げている。しかし我が国では、ステントグラフトによる大動脈瘤治療は近年、健康保険適応が認められたものの、実際に国内で認可されているデバイス(製品)が存在しない、という大きな矛盾が存在している。そのため使用するデバイスは、海外からの個人輸入あるいは国内でホーム・メイドに近い形で作製、各施設の倫理委員会承認をうけて使用しているのが現実である。筆者らは、(長谷部ら：慶應義塾大学病院放射線診断科；栗林幸夫教授)国内開発型の「ホーム・メイドタイプのステントグラフト」や「井上ステントグラフト(図2)」を用いて大動脈瘤は治療の前臨床試験を行った経験があり有用性を報告しているが^{5)~7)}、その安全性、耐久性についてはまだ確定しておらず、国内における研究・臨床開発が急務である。

4. 3 ステント開発の現状

前述の人工血管は主に比較的大きな血管病変の治療に使用されることが多いが、ステントの治療対象部位は主に内腔数ミリメートル大の狭小な血管である。代表的には、心筋梗塞や、狭心症の治療に用いられている。金属ステント留置は人工血管と異なり放射線透視下での血管内手術(血管造影の診断技術を応用した治療：Intervention)で施行可能である。実施者の高度な技術を必要とするも、局所麻酔下で施行可能あり、患者に与える身体的な侵襲は全身麻酔下と比べて低い。そのため、入院期間の短縮や患者QOL(quality of life)の上昇に大きく貢献する。しかしながら、ステントの初期血管開存率は非常に良い成績を示すものの、中～長期時期におこる血管の再狭窄が大きな問題となる。これは、金属ステントそのものが「異物」として血管内に残ることに対する生体の過剰反応に他ならない。ステント周囲においては最初に、血栓形成が起こり、それを引き金として血管平滑筋細胞の増殖・遊走、血管内膜の過剰な新生が起こってくる。そして再びステントの内腔が狭窄してしまう。そのため、血液や血管と接触するステントの表面形質の加工、改善が重要になってくるのである。

4. 4 ステント素材と表面改質：生体適応性の向上に求められる条件

ステント留置後の再狭窄防止法として、さまざまな局所および経静脈的な薬物投与(遺伝子治療等を含む)の試みがなされてきているが、いまだ最適な薬物が確定されていない。ステント留置の問題点の根本は、前述したようにステント周囲の異物反応と血栓化が最初のステップとして挙げられる。現在、臨床上利用可能な一般的なステント基材は、ステンレススチール(SUS316L)あるいはナイチノール合金である。ナイチノールは、ニッケル-チタンからなる合金で、超弾性形状記憶合金として近年使用されてきている。SUS316Lはそ

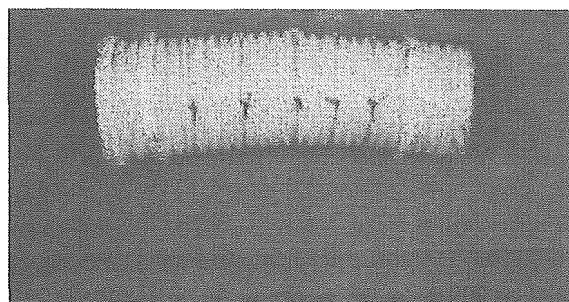


図2 ステントグラフトの一例(井上式ステントグラフト)

人工血管(ダクロン製)の内部にリング状のワイヤーが埋め込まれており自己拡張力を要する。開腹手術することなしに、足の付け根の動脈(大腿動脈)から器具血管内に挿入し、ステントグラフトを患部に留置することにより大動脈瘤を治療することができる。本ステントグラフトは、血管内手術前に行われるCTスキャン検査にて患者さんの血管径の詳細を測定し、特殊なソフトによってオーダーメイドされたストレートタイプの井上式ステントグラフトである。人工血管内部は抗血栓性が求められ、人工血管の外側は血管としっかりと密着し生着することが求められる。コーティングなど、内部と外部の表面加工を変えることによりニーズに応えられる可能性がある。

れ自体、抗血栓性と生体適合性に優れた金属系バイオマテリアルといわれているが、さらなる抗血栓性の向上、生体適合性の向上が臨床上の再狭窄の問題点を解決する糸口となりうるため、世界の研究者の間でさまざまな開発競争が進んでいる。

ステント用金属材料表面の改良、改質のためにさまざまな金属表面へのコーティングが試されている。コーティング材料には、生体物質、生体類似物質、高分子材料、金属材料、無機材料などがある。生体物質や生体類似物質のコーティングとして、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、フィブリン、ホスホリルコリンなどがある。高分子材料のコーティングとして先に述べた、ポリエチレンテレフタレート (PET)、ポリウレタン (PU)、セグメント化ポリウレタン (SPU)、シリコン、ポリ乳酸 (PLA)、ポリカプロラクトン、セルロース等が挙げられる⁹⁾。金属や無機材料系のコーティングとして金が、炭素系コーティング材としてグラファイト、シリコンカーバイド (Si-C) などがありステント用コーティング材に試みられている⁹⁾。我々が注目している炭素系素材である DLC もこのカテゴリーに属する。

これらコーティング材の有用性が示される一方で、その問題点も指摘されている。生体物質や生体類似物質のコーティング材の場合、基材とスペーサーの結合力の弱さ (特にイオン結合の場合に問題となる) から起こる、コーティング材脱落の可能性が考えられる。高分子系コーティング材の場合、基材との密着強度の低さに起因するはく離とコーティング方法に起因する厚みの問題、そして体内での変性劣化、炎症反応の誘発などの問題がある。そして金属や炭素系コーティング材の場合にも、基材との密着力の低さに起因するはく離と、高い膜の応力に起因するクラックの発生や炎症反応の誘発などの問題がある。材料の評価も問題で、材料評価項目には、抗血栓性評価、免疫補体反応そして炎症反応の評価があり、*in vivo* での生体反応を予測する上で単独評価するのではなく同時に評価することが必要であると考えている。バイオマテリアル全般に言えることだが、抗血栓性に優れた材料が必ずしも生体適合性には優れない場合もあり、体内に埋め込まれるインプラント材に抗血栓性、生体適合性の両面からの評価が必要である。コーティング材と血管内組織の間で起こる生体反応は、抗血栓性に優れなくとも血管内皮との親和性の高い材料が組織親和性の高い材料であれば、早期に被覆が完成し恒久的抗血栓性が獲得される。内膜被覆完成までの血栓形成期間は重要で、材料表面で形成される微小血栓による血栓症や血管内血栓閉塞、そして血栓沈着による内膜の過形成が誘発される可能性がある。特に血管内埋め込み医療器具表面は、抗血栓性と生体適合性の両者に優れなければならず、詳細な評価が必要となる。

次に、冠動脈ステント用コーティング材の物理的条件について考える。治療対象部位の血管径は狭小であるため、ステント用コーティング材には良好な通過性がもとめられ、薄く滑りやすくはく離しないなどの物理的条件が要求される。コーティング材が大きな摩擦抵抗を持ち、厚い膜であると治療対象部位での通過性が劣ることで血管損傷も惹起され、基材からはく離の可能性も高くなる。加えてはく離の問題は、

すべてのコーティング材が持つ解決しなければならない問題である。ステントは、その拡張時には主要な変形部分であるストラット頂点での変形は大きく、コーティング材にとって過酷な条件となる。最近、多くのステント用コーティング材が、はく離やコーティングむらを起こすことが指摘されている。これは基材との密着性が低いことや膜応力が高いためであると考えられる。DLC においては、シリコンやシリコンカーバイドを中間層として選択することにより密着性が向上することが示唆されている^{9),10)}。また、DLC 膜に他の元素を添加することによって (フッ素³⁾ やシリコン⁹⁾ など)、従来の DLC よりも膜が柔軟でかつ内部応力の低い薄膜を作製することによって基板への追従性が向上する。コーティング材のはく離の問題は、重要な関心事であり早期に改善されなければならない。

4. 5 抗血栓性コーティングに関する行政からの通達について—無機物を用いた開発の重要性—

近年、行政面からも、動物由来の医療材料の安全性については、特に厳しい基準が指導されている。たとえば、カテーテルの抗血栓性を保つためのヘパリンコーティングも、動物由来であり、その長期的な安全性の確保という点で疑問が残るため (未知のウイルスや免疫への影響など)、今後の方向としてはできるだけ別のものに代替することが望まれている。現実的に、病院臨床の場合においても、いくつかの血管内手術をする上で重要な医療器具や体内留置用カテーテルの発売中止例があり、治療をする上で患者様の不利益となりがねない状況に直面することがあり、代替品の開発は急務である。

上記で述べた DLC は炭素と水素 (人体の構成成分) で構成されており、体にもよりやさしい材料となっている。もちろん、上記の人工血管やステント以外のあらゆる医療器具や人工臓器などへのコーティングが可能と考えられる。加えてコーティングとして用いた場合、その高いバリア性能は、基材からの有害物質の溶出やイオンの溶出を防止できる可能性が高い。実際に輸血のラインや血液チューブなどの医療用具で用いられているポリ塩化ビニル樹脂については、優れた柔軟性を保持するために材質中に可塑剤が添加されているが、材質が接触する溶媒中に可塑剤 (DEHP: フタル酸ジ-2-エチルヘキシル) が溶出してくることが知られている。DEHP は主として精巣毒性を有する一般毒性物質であることから、耐容一日摂取量が設定されている。医薬品・医療用具等安全性情報 182 号 (厚生労働省医薬局 平成 14 年 10 月) により医療関係者等への情報提供と医療用具メーカーへの指示が出ており、DEHP を使用しない代替品開発が急がれる。

4. 6 カーボンナノテクノロジーの医療応用と展望

以上述べたように、血管病変の治療に対して用いられている人工血管や、ステントを長期にわたり体内に埋め込ませて使用させるためには、さらなる生体適合性、抗血栓性の向上が重要な課題となる。

現在ステントの分野では、「薬剤溶出性ステント」と呼ばれるステントが登場し、冠動脈ステント留置後の短期的な (一部、中期) 再狭窄率は飛躍的に改善している¹¹⁾。しかしながら、薬剤溶出性ステントはステンレススチールやナイチンール素材の上に直接ポリマーをコーティングし、そこに薬

剤を含浸させる, という非常に単純な技術を使っている。つまり, 依然として元のステント基材や薬剤の溶出を終えたポリマーは血管内に「異物」として存在しつづける。こういったことが, 晩期の血栓性閉塞などを助長するという報告もできてきている。また, 細径の下肢動脈(浅大腿動脈など)の領域においては, 薬剤溶出性ステントを用いてもよい成績が得られないことが大規模臨床試験にてわかっている。

我々は, 従来工業分野で優れた摺動特性(低摩擦係数)と耐摩擦性を併せ持つ材料として注目されてきている炭素系の新しい素材, DLC に注目し, ステントへの応用を試み, 国際学会にて報告してきた^{12)~14)}(図3)。炭素系薄膜である DLC は生体適合性に優れることが証明されており, 抗血栓性に優れるならステント用コーティング材として有望であると判断した。かつて DLC は, 硬質基材に限られるハードコーティングであったが, 近年ではその改良が進み基材の変形にも追従する軟性化 DLC が開発されるようになり, その医用応用も広がる可能性が出てきた。我々研究グループは, この軟性化した DLC をステント上に成膜することに成功し, ステント用コーティング材としての評価を行った。この改良型 DLC を *in vitro* の抗血栓性評価を行ったところ, ステント基材 SUS 316 L の抗血栓性を血小板系・凝固系の両系統を有意に改善することがわかった。この DLC をステントに应用することで, 基材表面を抗血栓性界面に改質できる可能性が示唆された。また, 我々の一連の生体適合性評価実験より, 抗血栓性および生体適合性に優れることが実証された^{2),3)}。

前述したとおり, 我々は, 更なる膜の軟性化と密着性を改良するために, DLC ベースに高度変形部分でも追従するフッ素添加 DLC (F-DLC) の独自の開発をはじめている。F-DLC は, 原料ガスとしてメタンガスあるいはアセチレンガスにフロンガスを添加し, 真空下にて rf (高周波) プラズマ

真空化学蒸着法 (rf-CVD 法) を用いて基板へのコーティングを行う。DLC にフッ素を添加成膜することで DLC 膜の応力は下がりさらに軟性化するため, 基板への追従性が向上すると考えられる。我々の実験においては, 全体のガスに対するフロンガスの分圧比を 20%~60% と変化させ, さまざまな F-DLC の成膜を行った³⁾。成膜後 XPS で測定すると, 実際は, 膜内のフッ素含有量は約 10% 以下と少ない割合であったが, 膜最表面に分布していることが証明された^{15),16)}。さらに基板への膜の追従性を高め, 基板の性質を損なわないために 40~50 nm 程度のナノオーダーでの薄膜形成が可能となっている。我々のグループでは初期実験として, F-DLC の *in vitro* での抗血栓性試験を行ったところ, 従来の DLC を上回る成績が認められた^{2),3),15),16)}(図4)。F-DLC の bioengineering の分野におけるインパクトはその応用性の広さを考えると非常に大きなものになるものと思われる。

ダイヤモンドテクノロジーは医療分野においても非常に魅力的な素材であり, 日本はこの分野で世界最高峰の研究水準にある。また, ナノテクノロジーの技術を用い, さらに薄いコーティングの作製, あるいは医療材料の界面そのものの表面改質を施すことによって, より優れたデバイスの開発が可能であると考えられる。

4.7 海外における DLC の医療応用と開発状況

医療材料は, その需要が国内で年々高まっているにも関わらず, 平均して 80% が輸入に頼っているのが現状で, 特に人工関節やカテーテルのような体内埋め込み部材や体内挿入部材については大半が輸入に頼っている。輸入超過の状態が続いている。世界最高水準の技術力を持ち, 安定した医療が受けられるわが国であるにもかかわらず, 人工血管やステントに関してはその大半を輸入に頼っているのでは, 健康を守る我々臨床医の観点からみれば, 非常に許しがたい状況にあ

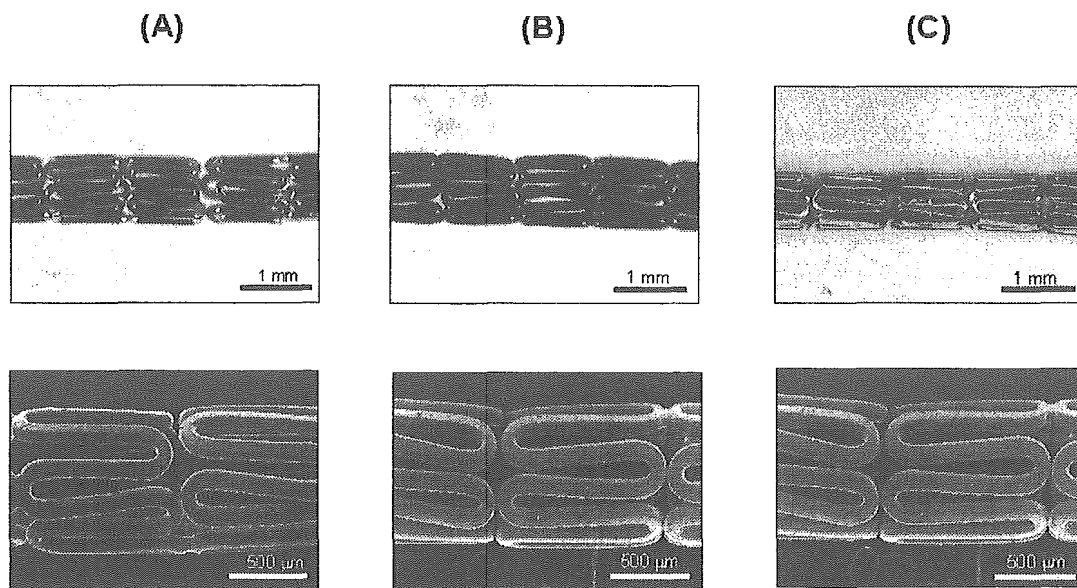


図3 金属ステントへの DLC および F-DLC コーティングの試み

市販の金属ステント表面上に, 化学蒸着法により DLC あるいは F-DLC を用いた抗血栓性コーティングを試みた。耐久性などについては, さらなる検討が必要であるが, 本図においては明らかな DLC および F-DLC コーティング像にはく離はない。A: コーティングなしステント, B: DLC コーティングステント, C: F-DLC コーティングステント (上段: マクロ像, 下段: SEM 像)

るといえる。

日本が得意とするナノテクノロジー分野と医療機器分野との融合から、最終的には新しい日本初の医療機器を開発する必要がある。そのためには、抗血栓性を客観的に評価することが不可欠である。抗血栓性評価は、血液に接触する医療機器を開発するポイントであるが、その方法は日本国内でも海外においても、各機関がそれぞれの方法で、それぞれの評価を下しているのが現状である。したがって、各機関から発表されたデータを異なる機関で再現することは不可能で、結果として学術論文自体の信頼度およびそのデータを用いた医療機器開発の助けとなっていない。今年3月、日本産業振興協会の依頼でヨーロッパの先駆的な論文を発表しているヨーロッパの3機関を訪ね、「DLCの医療機器への応用」に関する調査を実施した(鈴木および長谷部)。

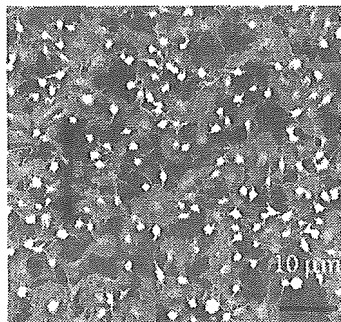
4. 7. 1 University of Nottingham

University of Nottinghamはロンドン中心部から、北へ約3時間列車かかり、町は古いイギリスの田舎町である。ヨーロッパには、「European union」という考えが濃く、事実ユニオンが多額の予算を握っており、国と国との連携も強い。D. M. Grant教授も、ヨーロッパの学会を飛び回る感じで、米国やアジアを(遠いということもあるが)あまり訪れな

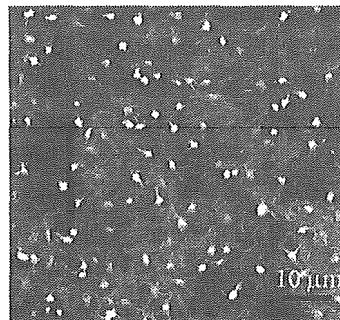
い。大型プロジェクトの予算は日本でいう財務省が握っており、(日本でいう)経済産業省が産業推進の目的で管理し、厚生労働省と協力して実施するとのことである。日本に比べて規制が緩いので省庁間の連携も上手くいっているのかもしれない。チューブの内面コーティングの需要が極めて高く、開発する必要があるとのことだった。もちろん日本でも多くがトライしたことはあるが、良い成果は生まれていない。今後、医療機器関連の大きな需要を考えても進める必要がありかもしれない。ステントの素材はステンレスまたはNi-Ti合金であるが、コーティングして抗血栓性を向上させる以前に、表面粗度や加工傷の問題が重要である¹⁷⁾。特にNi-Ti合金の表面はNiが偏析しており、抗血栓性に悪影響があるとのことだった。このように金属イオンの溶出に対しても生体適合性が高く、バリア性が高いDLCコーティングは有用であると考えられる。

4. 7. 2 University of Ulster, Nanotechnology Research Institute

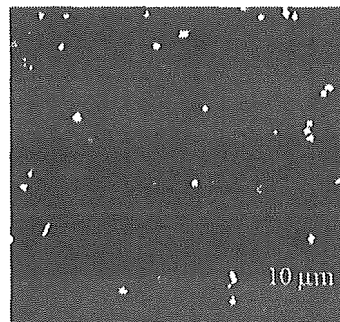
University of Ulsterはベルファストの北約15kmにあり、美しい敷地に大きな建物が4~5棟建っている。Nanotechnology Research Instituteは少々離れた場所にあり、デザインは米国風の研究所だった。J. A. McLaughlin教授およ



シリコン基板



DLCコーティング



F-DLCコーティング

図4 血小板付着試験(シリコン基板, DLC, F-DLC)

シリコン基板(1×1 cm)にDLCおよびF-DLCをコーティング後、各サンプルを濃厚血小板液(PRP)に30分間浸漬した後、脱水・乾燥。その後、SEMにて血小板付着について観察した(各基板における代表的サンプルを示す)。シリコン基板には、多くの活性化された血小板(べっとりとしてアメーバー状に足を伸ばしているもの)が付着している。DLCではシリコンよりやや付着数が少ない。F-DLCにおいては、著明に付着数が少なく、かつ活性化された血小板が少ない(活性化の弱い球状の血小板が多い)。F-DLCの有意な抗血栓性が示唆される。