

- [27] R. Sawada, T. Ito, T. Tsuchiya, Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells, *J. Artif. Organs* 9 (2006) 179–184.
- [28] D. Wang, J.S. Park, J.S. Chu, A. Krakowski, K. Luo, D.J. Chen, S. Li, Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor β 1 stimulation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 43725–43734.
- [29] H.V. Leskela, J. Risteli, S. Niskanen, J. Koivunen, K.K. Ivaska, P. Lehenkari, Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 1008–1013.
- [30] K. Ito, A. Hirao, F. Arai, S. Matsuoka, K. Takubo, I. Hamaguchi, K. Nomiyama, K. Hosokawa, K. Sakurada, N. Nakagata, Y. Ikeda, T.W. Mak, T. Suda, Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells, *Nature* 431 (2004) 997–1002.
- [31] G. Untergasser, R. Gander, C. Lilg, E.P. Lepperdinger, P. Berger, Profiling molecular targets of TGF- β 1 in prostate fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation, *Mech. Ageing Dev.* 126 (2005) 59–69.
- [32] R. Tremain, M. Marko, V. Kinnimulki, H. Ueno, E. Bottinger, A. Glick, Defects in TGF- β signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing *v-ras^{Ha}*, *Oncogene* 19 (2000) 1698–1709.
- [33] R.A. Weinberg, The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell* 81 (1995) 323–330.
- [34] R.E. Herrera, T.P. Makela, R.A. Weinberg, TGF beta-induced growth inhibition in primary fibroblasts requires the retinoblastoma protein, *Mol. Biol. Cell.* 7 (1996) 1335–1342.
- [35] Z. Yan, S. Hsu, S. Winawer, E. Friedman, Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) inhibits retinoblastoma gene expression but not pRB phosphorylation in TGF-beta 1-growth stimulated colon carcinoma cells, *Oncogene* 7 (1992) 801–805.
- [36] J. Lu, Z. Lu, P. Reinach, J. Zhang, W. Dai, L. Lu, M. Xu, TGF-beta2 inhibits AKT activation and FGF-2-induced corneal endothelial cell proliferation, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 3631–3640.
- [37] Q.M. Chen, V.C. Tu, J. Liu, Measurements of hydrogen peroxide induced premature senescence: senescence-associated beta-galactosidase and DNA synthesis index in human diploid fibroblasts with down-regulated p53 or Rb, *Biogerontology* 1 (2000) 335–339.

ナノ粒子の有害性評価とリスク対策

技 術 情 報 協 会

- 中村 彰一 大塚電子(株) 医用・分析機器事業部 営業技術グループ
グループリーダー 主査・・・・・・・・・・(第4章1節[5](3))
- 藤野 聡 東京ダイレック(株) 研究開発部 部長・・・・・・・・(第4章1節[5](4))
- 木下 健 (株)島津製作所 分析計測事業部 応用技術部 試験計測グループ
京都カスタマーサポートセンター 主任・・・・・・・・(第4章1節5)
- 後藤 雄一 (独)交通安全環境研究所 環境研究領域 環境研究領域長 工学博士
技術士(機械部門)・・・・・・・・・・(第4章1節[6])
- 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 部長 農学博士・・・(第4章2節[2])
- 増野 匡彦 共立薬科大学 医薬品化学講座 教授 薬学博士・・・・・・・・(第5章1節[1])
- 中村 成夫 共立薬科大学 医薬品化学講座 准教授 薬学博士・・・・・・・・(第5章1節[1])
- 佐藤 義倫 東北大学 大学院 環境科学研究科 助教 工学博士・・・(第5章1節[2])
- 田路 和幸 東北大学 大学院 環境科学研究科 教授 理学博士・・・(第5章1節[2])
- 亘理 文夫 北海道大学 大学院 歯学研究科 口腔健康科学講座 生体理工学教室
教授 工学博士・・・・・・・・・・(第5章1節[5])
- 小林 隆弘 東京工業大学 統合研究院ソリューション研究機構 特任教授 理学博士
・・・・・・・・・・(第5章2節,第7章1節)
- 柳下 皓男 ナノテクノロジービジネス推進協議会 事務局 事務局長代理
・・・・・・・・・・(第6章3節)
- 竹村 誠洋 (独)物質・材料研究機構 国際室 室長・・・・・・・・(第7章2節,第7章3節)
- 明星 敏彦 産業医科大学 産業生態科学研究所 労働衛生工学研究室 准教授
工学博士・・・・・・・・・・(第8章1節)
- 柳内 衛 (株)重松製作所 社長付海外情報担当 主任部員 工学博士
・・・・・・・・・・(第8章2節)

[2] in vitro

はじめに

粒子には、有機物質からなる粒子、たとえば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸やポリカプロラクトンなどや、それらの共重合体があげられる。これらの粒子については、重合度の違いにより、分子量が異なる。分子量が100万を超えるものから1000程度までであるが、分子量が高い粒子ほど、エステル分解に時間がかかり、その結果、分解物の培地への溶解速度が異なる。残留する粒子は、細胞の貪食能により、細胞にとりこまれるが、試験に使用する細胞の大きさによっても異なる。通常5ミクロン以下がとりこまれる。われわれの実験では、2ミクロン近辺がもっとも細胞に取り込まれた。ナノレベルの粒子としては、フラーレンに代表される粒子がある。フラーレンをin vitroの系で試験する場合には、培地などにどのように均一に分散させて試験するかが、問題となる。我々は、ポリビニルピロリドンに分散させて、試験をおこなっている¹⁾。最近、ポリビニルピロリドン以外の分散剤が使用されているが、その場合には、分散剤単独の影響も評価し、対象粒子の毒性を明らかにする必要がある。

無機粒子については、単一金属粒子、金属酸化物、アルミナ、酸化チタンのようなセラミックス、アスベストなど、各種粒子が知られている。各粒子も、化学構造式は、同一でも、球状粒子、針状粒子、結晶構造の違い、粒子サイズにより、毒性強度が異なるので、試験をする前に、顕微鏡観察や各種物理化学的性質などを調べておく必要がある。

また、同様な形状を示し、化学構造が同一でも、製造メーカーが異なる場合には、製造工程などから由来する微量の不純物等によって毒性試験の結果が異なることもある。

1. 試験系への適用方法

粒子をどのようにin vitroで試験するか、はじめに悩むところである。通常の水溶性の培地に均一に分散しない粒子や、凝集しやすい粒子がある。In vitroで粒子の毒性を評価するために、細胞をプレートに播種後、粒子を培地に添加し、試験しようとしても、粒子が培地の上層に浮いてしまって評価できないことがある。粒子の細胞への影響を評価するためには、まず、粒子が細胞と接触することが必要である。

沈む粒子については、細胞と接触するため、細胞をプレートに播種した後、粒子を添加する方法で試験できる。しかし、粒子が軽い場合には、培地の上層に浮遊してしまい、細胞に接触しないため、粒子が細胞へ与える影響を評価できない。

このような場合、粒子をあらかじめプレートに播種し、プレートに接着させた後、細胞を懸濁させた培地を添加して評価している。この場合、粒子が底面から剥離して浮遊しないようにする工夫が必要である。

粒子を予め、プレートにコーティング後、細胞を播種した場合の細胞の増殖阻害や細胞機能阻害と、細胞を播種後、粒子を添加して、粒子に接触した細胞の増殖阻害や細胞機能阻害への影響の度合いは、異なることが明らかになった²⁾。

2. 毒性試験の種類

粒子の毒性を評価する *in vitro* 試験として、細胞毒性試験、代謝協同阻害試験、形質転換試験、胎児の中脳細胞を用いた神経分化阻害試験、および胎児の肢芽細胞を用いた軟骨分化阻害試験がある。各試験法について紹介する。

3. 細胞毒性試験（コロニー形成阻害試験）

細胞毒性試験にも様々な試験法があるが、我々は、医用材料の細胞毒性試験としてガイドラインに使用されているコロニー形成阻害試験で評価している。

(1) 細胞を播種後、接触した粒子の影響を評価するコロニー形成阻害試験法

細胞はコロニー形成を良好に示すことから V79 細胞を使用している。

試験方法の詳細は、「医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について：第1部 細胞毒性試験」に記載されているので参照するとよい³⁾。

- ① 培地 (MO5) の作製方法は、Eagle の MEM で Earle の平衡塩類溶液を含む培地に、MEM 非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム (0.11g/L)、L-グルタミン (0.292g/L)、炭酸水素ナトリウム (2.2g/L)、および、牛胎児血清 (5% v/v) を加える。細胞に影響を及ぼさない濃度で抗生物質を添加している。
- ② V79 細胞を継代した細胞を、トリプシン処理して、単離細胞を調製し、培地に懸濁する。
- ③ 希釈した細胞懸濁液を 60mm シャーレには、100～200 個(培地 4～8mL)、35mm シャーレには、50～100 個 (1～3mL)、12 穴または 24 穴プレートには、40～50 個 (0.5～2mL) の出現コロニーになるように細胞を播種する。
- ④ シャーレ (またはプレート) を 37℃ の炭酸ガス培養器内に入れ、4～24 時間静置し、細胞をシャーレの底面に接着させる。
- ⑤ 培地を捨て、粒子を均一に懸濁した種々の濃度の試験液を、60mm シャーレには 4～8mL、

35mm シャーレには 1～3mL, 12 穴プレートには 1～2mL, 24 穴プレートには 0.5～1mL を加える。

- ⑥ 各同一濃度の試験液について, 3～8 穴あるいは 3～8 枚ずつのシャーレを使用する。
- ⑦ 試験液を加えたシャーレ (またはプレート) は, 直ちに, 炭酸ガス培養器内に入れ, 静置して培養する。
- ⑧ 培養期間は, 使用する細胞株により異なる。V79 細胞は 6～7 日間培養を行う。
- ⑨ 培養終了後, 培地を捨てる。平衡塩類溶液で洗った後, メタノールまたは 10%ホルマリン溶液等を加えて固定する。
- ⑩ ギムザ染色液 (市販) は, 使用直前にリン酸緩衝液 (M/15, pH6.4) で約 20 倍に希釈して使用する。
- ⑪ 固定後, 希釈したギムザ染色液を加え, コロニーを染色する。
- ⑫ コロニーが良く染色されたのを確認後, 染色液を捨て, 各シャーレ (又は各穴) のコロニー数を数える。
- ⑬ 迅速な判定法として, コロニーカウンターを用いたコロニー数測定も可能である。機械での測定結果の精度等に注意する。
- ⑭ 本試験法と異なる固定, 染色法やマイクロプレートリーダー等を使用した試験法も可能である⁴⁾。

(2) 結果の提示

- ① 各シャーレ (または各穴) 内の染色されたコロニー数を数える。コロニーは, 実体顕微鏡で観察し, 細胞が 50 個以上集まっている集落について数える。
- ② 新鮮培地のみで培養したシャーレ (または穴) をコントロール群とする。コントロール群に播種した細胞数と実際に形成されたコロニー数からコロニー形成能 (形成したコロニー数/播種した細胞数) を求める。コントロール群でのコロニー数の平均値を 100%として, 種々の濃度の粒子懸濁液で形成されたコロニー数を百分率で示す。
- ③ 実験結果は, 縦軸がコロニー形成率 (コントロール群のコロニー数の平均値を 100%とする) を, 横軸が試験した粒子懸濁液濃度をグラフ上にプロットする。グラフより, コントロール群のコロニー数を 50%阻害する試験液の粒子濃度 (%) を求め IC₅₀ (%) とする。
- ④ 統計理論式から得られる IC₅₀ を, コンピュータを利用して計算することもできる。
- ⑤ IC₅₀ (%) の値を, 試験粒子の細胞毒性強度の指標とする。

(3) 結果の評価

以下に記載する内容を満たした試験において, 粒子の細胞毒性を正しく評価できる。

- ① コントロール群での良好なコロニー形成能を確認する。

- ② 陰性対照粒子で試験した時、各シャーレ（又は各穴）で形成されたコロニー数は、コントロール群のコロニー数と同程度である。
- ③ 溶媒を使用した時は、使用溶媒濃度で試験した結果、各シャーレ（又は各穴）で形成されたコロニー数が、コントロール群のコロニー数と同程度である。
- ④ 必要に応じて、陽性対照粒子の細胞毒性強度（IC50）を調べ、試験系の検出感度および精度評価の参考とする。

(4) 粒子をプレートにコーティング後、細胞を播種し、粒子との直接接触法によるコロニー形成試験

試験可能な粒子について以下の試験を行う。

- ① 粒子の調製を行う。粒子は、滅菌されたものを、滅菌された溶媒中に懸濁する。均一になるように、懸濁液を調製する。
- ② 35mmのシャーレ、又は、12穴、24穴プレートのいずれかに粒子懸濁液をコーティングする。
- ③ 溶媒を無菌下で飛散させる。
- ④ 溶媒対照プレートも同様に準備する。
- ⑤ 陰性対照粒子および陽性対照粒子を、試験粒子と同様に準備し、コーティングする。
- ⑥ 粒子は、シャーレ（又は穴）によく密着させる。
- ⑦ 粒子をコーティングした35mmシャーレには50～100cells（培地2～3mL）、12穴プレートには40～50cells（培地1～2mL）、又は、24穴プレートには40～50cells（培地0.5～1.0mL）を加える。
- ⑧ 陰性対照粒子および陽性対照粒子は、試験粒子と同様に細胞および培地を加える。
- ⑨ シャーレ（又はプレート）を37℃の炭酸ガス培養器内に入れ、6～7日間静置して培養する。
- ⑩ 培養終了後、培地を捨てる。平衡塩類溶液で洗った後、試験材料に適した固定液で固定する。
- ⑪ ギムザ染色液（市販）は、使用直前にリン酸緩衝液（M/15, pH6.4）で約20倍に希釈して使用する。
- ⑫ 固定後、使用直前に希釈されたギムザ染色液を加え、コロニーを染色する。
- ⑬ コロニーが良く染色されているのを確認後、染色液を捨て、各シャーレ（又は穴）のコロニー数を数える。
- ⑭ 培養用シャーレ（又は穴）に直接細胞をまいた時に形成したコロニー数をコントロール群としその平均値を100%とする。
- ⑮ 試験粒子に直接細胞をまいた時に形成したコロニー数を数え、コントロールのコロニー数に対する割合（%）を求める。
- ⑯ 陰性対照粒子および陽性対照粒子のコロニー形成率（%）を求める。

4. V79 代謝協同阻害試験

代謝協同は、ギャップ結合細胞間連絡機能を評価する試験法である。ギャップ結合機能は、細胞の恒常性機能維持や細胞分化にも関連し、その重要性が注目されている。ASTMにおいて、ギャップジャンクションの機能測定が、医療材料や、再生医療品の生体適合性指標および安全性指標として期待され、文書作りのためのプロジェクトが組織された。著書がプロジェクトリーダーとなっている。このギャップ結合蛋白は、コネキシンからなる。コネキシンは、ほとんど全ての細胞に存在している。コネキシン6分子が集まって、コネキソンを形成し、コネキソンが膜で集合し、隣接した細胞膜中のコネキシンと結合して、ギャップ結合細胞間連絡機能 (gap junctional intercellular communication : GJIC) が発現する。粒子と接着した細胞の長期間安全性評価をする上で、このコネキシン機能の果たす役割を明らかにし、その有用性が明らかになれば、長期間の安全性評価を迅速に判断できる。その結果、新規粒子の開発、選別の段階で役立つばかりでなく、試験法が簡便なため、低コストで評価可能である。開発費のコストダウンと、安全性と有効性の高いバイオマテリアル・粒子の市場化を促進することを目的として、数年間以上、コネキシン研究を行っている。

ギャップ結合タンパク質コネキシン機能を調べる方法として、いくつかの方法が知られている。ここでは、特別な装置がなくても試験できる V79 代謝協同阻害試験法を紹介する。この方法は、Yotti らが、1979 年に開発した方法⁵⁾ であるが、著者は、12 穴のプレートおよび 22mm のシャーレを用いて試験できる方法に改変し、より少量の培地および粒子量で評価可能である。

本試験系は、細胞毒性と代謝協同に及ぼす影響、すなわち細胞間連絡阻害活性の 2 種の試験を行って判定する。細胞毒性の影響がない条件でのみ、細胞間の連絡機能の有無を判定できる。

(1) V79 代謝協同阻害試験法

- ① V79 細胞(野生株)8 万個と TG1 細胞(変異株)100 個の細胞をプレート内に 5 時間接着させる。
- ② 6-thioguanine (6-TG) 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度下で、37°C 炭酸ガス培養器で 7 日間培養する。
- ③ 培養期間終了後、前述した希釈ギムザ染色液でコロニーを染色し、カウントする。
- ④ 統計処理を行う。
- ⑤ コントロール群に比べて、有意に変異株が増加した場合を代謝協同阻害活性があると判断する。
- ⑥ 再現性を確認する。
- ⑦ 最終評価は、物質の濃度に応じて少なくとも 2 濃度で、有意に変異株の増加を認めたときを陽性、1 濃度のみ変異株の増加を認めたときは、擬陽性、いずれの濃度でも変異株の増加を認めなかったときは陰性と判定した。

(2) 解説

培養過程で、野生株は、6-TG を代謝して細胞毒性のある物質に変換し、自分自身細胞死を招く。接触し細胞間を連絡している変異株にも毒性物質がギャップ結合を介して渡すため、渡された細胞も死ぬ運命となる。ギャップ結合が阻害され、変異株に毒性物質が到達しなかったとき、変異株自身には、6-TG を毒性物質に変換する酵素が欠損しているため、そのまま生き続けて、コロニーとなる。変異株のコロニーが増加すればするほど、細胞間連絡機能の阻害作用は強い。

(3) 注意点

試験の原理上、細胞毒性が強い条件では、変異株のギャップと結合する隣接した野生株の細胞数が少ないため、6-TG は、毒性物質に変換されにくく、変異株に毒性物質が到達しないため、有意に高いコロニー数を観察することになる。この原因は、ギャップ結合機能の阻害ではなく、判断を誤らないようにすることが重要である。

5. Balb 3T3 細胞トランスフォーメーション試験

国際的に、*in vitro* 発癌試験として、評価されている方法⁶⁾である。

(1) 粒子の発癌作用を主に検出するための試験

- ① 培地は、Eagle MEM-10% FCS 培地を使用する。
- ② マウス胎児由来の細胞である A3111 細胞を 6cm プレートに 1 万個まき、炭酸ガスインキュベーターで、37℃で培養する。
- ③ 翌日試験する粒子を加える。
- ④ 4 日目に試験粒子を含む培地を捨て、新しい培地を加える。
- ⑤ その後、3～4 日ごとに、培地交換し、通常 6 週間培養して終了する。
- ⑥ 判定：細胞が癌化し形態を示しているかどうかは、ギムザ染色による染色性、形態、大きさにより判別する。
- ⑦ 試験粒子の細胞毒性試験も同時に行う。その原理は、コロニー法である。細胞数は、前述したコロニー法に従って、プレートに播種する。
- ⑧ 細胞毒性試験における試験粒子の添加は、細胞播種した翌日に添加し、4 日目に培地を新鮮培地に交換後、更に 6～8 日間培養する。全体で培養期間は、10 日～12 日間となる。
- ⑨ 培養終了後、前述した希釈ギムザ溶液で染色し、形成したコロニー数をカウントする。
- ⑩ コントロール群でのコロニー数の平均値を 100%として、試験粒子のコロニー形成率(%)を求める。

(2) 注意点

- ① 粒子は、固体であり、分解しない粒子は、細胞に取り込まれた後、細胞が死滅し、あるいは培地中に排泄されない限り、新鮮培地で交換しても、細胞内あるいは細胞表面に存在し続けることとなり、粒子の影響は持続する。
- ② 粒子を培地に添加すると、培地の上面に浮いてしまう粒子については、あらかじめ、工夫して粒子をコーティングしたプレートを調製する必要がある。
- ③ アスベストは、ヒトで発癌性が報告されている。また、酸化チタンは、ラットでの吸入実験で肺癌の発生が報告⁷⁾されている。この形質転換試験系では、発癌性リスクの高いアスベストであるクリソタイルおよびアナターゼ型酸化チタン粒子で有意な形質転換活性を認めている。

酸化チタンは、近年、様々な分野で、使用頻度が高まっていることから、適用される用途などを十分に吟味し、使用しても安全性上の問題はないのかリスク分析・リスク評価・リスク管理を行うことが重要である。

6. ラット胎児中脳細胞および肢芽細胞の細胞分化および増殖に及ぼす影響

この試験法は、従来、催奇形性の *in vitro* 試験として、用いられている試験法であり、胎児の中脳や肢芽の初代細胞を用いた微小集積培養 (micromass culture) 法^{8,9)} である。

この培養法は、通常単層に細胞を培養する方法と異なり、小さなスポット内に、細胞が接触するように高密度に培養する。いわば、三次元に近い状態で、細胞を培養し、スポット内に発現した分化の程度を、生化学あるいは、形態計測的な指標を用いて測定する方法である。

(1) 試験に必要な動物、試薬、器具など

- ① 妊娠 12 日のラット (plug = 0 日) 3 ~ 4 匹。
- ② Tyrode-CMF (Ca²⁺, Mb²⁺を除いた Tyrode 液), Ham の F12 培養液 + 10% ウシ胎児血清 (FBS)。
- ③ PBS, ホルマリン, ヘマトキシリン染色液, 0.5% アルシアンブルー染色液。
- ④ 各種ピペット, 24 ウェル (Corning) のプレート, 10cm のプラスチックまたはガラスシャーレ, 15ml あるいは, 50ml 遠心管, 眼科用ハサミ, 眼科用ピンセット, ナイロンメッシュ (20 μm)
- ⑤ 解剖用具一式: エーテル麻酔または炭酸ガス吸入装置, 70% アルコール, ハサミ, ピンセット。

(2) 試験方法

- ① ラットをエーテル麻酔あるいは、炭酸ガス吸入処理後、腹部の体表を 70% アルコールで消毒し、無菌的に開腹する。
- ② ついで、子宮を摘出し、あらかじめ Tyrode 液をいれたシャーレに入れる。つぎに、子宮を新

しいTyrode液の入ったシャーレに移しかえる。この操作を2～3回くり返して、血液をよく洗い流す。

- ③ 子宮壁にハサミで切れ目を入れ、胎児をつぶさないようにピンセットで摘みだす。胎児の周りを覆っている羊膜もきれいに実体顕微鏡下で取り除く。以上の操作はTyrode-CMFの入ったシャーレの中で行う。
- ④ 胎児の中脳および前肢芽を眼科用ハサミで切りだし、それぞれをプラスチック遠心管に集める。
- ⑤ 妊娠ラット3～4匹分から、胎児の中脳および前肢芽を、同様に集め、2～3回Tyrode-CMFで洗った後、1%トリプシン液を加えて、37℃で、15分間保温し、血清を加えて反応を停止させる。各組織片をHamのF12 + FBS培養液で洗い、ピペティングした後、ナイロンフィルターで濾過して、細胞浮遊液を得る。血球計算盤にて細胞数を算定する。
- ⑥ 中脳は 5×10^6 個/ml、前肢芽は 2×10^7 個/mlの細胞密度になるように、培養液を加えて調整する。つぎに、24ウエルプレートの各ウエルに、調整した各細胞浮遊液を、20 μ lずつスポットする。スポット操作には、通常、細胞培養液に使用するピペッターを用いている。
- ⑦ 炭酸ガスインキュベータに2時間静置し、細胞をプレートに接着させる。
- ⑧ 各ウエルにF12 + 10% FBS培養液を0.5mlずつ加える。また、試験する粒子を含む培養液も同様に加える。
- ⑨ 5日間培養した後、培養液を捨て、中脳細胞はホルマリン固定後、ヘマトキシリン染色を、肢芽の細胞は、アルシアンブルー染色を行う。
- ⑩ 中脳細胞は分化して神経細胞フォーカスを形成し、フォーカスは、ヘマトキシリンで濃く染まる。肢芽の細胞は、分化して、軟骨細胞フォーカスを形成し、アルシアンブルーで染まる。
- ⑪ 実体顕微鏡下で、各細胞スポット内のフォーカスの数を算定する。
- ⑫ 対照のフォーカスの数を100%とし、各試験物質濃度処理群で生成したフォーカスの数を百分率で表わす。用量反応曲線より50%阻害濃度(IC50)などを求める。

(3) 注意点

- ① プレートの種類については、35mmシャーレ、24ウエル、および96ウエルが用いられており、さらに、表面処理(プライマリア、コラーゲン)を施したものを使用している場合もある。われわれは、Corning製の24ウエルを使用している。
- ② 再現性のよいデータを得るためにも、プレートから、細胞がはがれないように培養する。そのためには、生存率の高い細胞を得ること、また、接着後の細胞に培養液を静かに加えることに、とくに注意する。また、培養後の染色操作においても、細胞がはがれないように、十分に注意しながら処理をする。

- ③ 分化形質の定量的な測定法として、肢芽細胞では、分化して生成する軟骨型プロテオグリカンをアルシアンブルー染色し、酢酸で洗浄後、4M グアニジン塩酸塩でアルシアンブルーと結合したプロテオグリカンを溶出し、600nmでの吸光度を測定する方法がある¹⁾。
- ④ 細胞の分化の尺度として、フォーカスの算定に比べ、より定量的な方法といえる。
- ⑤ 胎児細胞での微小集積培養は、検索する粒子の胎児細胞に対する直接作用を検出できる点で優れている。

7. あとがき

細胞培養を用いた *in vitro* 試験系は、動物代替法の重要性が国内外で叫ばれている中、ISO TC194 の医療機器の生物学的評価の各パートに使用されている試験法において、動物代替法が、提言され、文書化のためのプロジェクトが進んでいる。

各種細胞培養法は、低経費、操作の簡便性、さらには画像処理装置やコンピュータなどの周辺機器を駆使することにより、迅速性にも優れている。食品や、家庭用品および医用材料中の化学物質、環境汚染物質などの安全性評価試験の一環として、また、製薬会社、医療機器メーカーでは、薬品や医療機器の開発段階でプレスクリーニングとしても応用されはじめている。

微粒子に関する試験を行った国立医薬品食品衛生研究所 療品部の中岡竜介主任研究官に深謝する。

文 献

- 1) T. Tsuchiya, Y. Nakajima Yamakoshi and N. Miyata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 885-894, 1995
- 2) 中岡竜介, 土屋利江, “月刊バイオインダストリー” 2002年7月号, p.14-20
- 3) 厚生労働省医薬局審査管理課事務連絡(医療機器審査 No.36) “生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について” 2003, p.2-14
- 4) T. Tsuchiya, Y. Ikarashi, T. Arai, J. Ohhashi and A. Nakamura, *J. Applied Biomaterials*, 5, 361-367, 1994
- 5) L.P. Yotti, C.-C. Chang, and J. E. Trosco, *Science*, 206, 108901091, 1979
- 6) T. Tsuchiya, R. Nakaoka, H. Degawa and A. Nakamura, *J. Biomed. Master. Res.* 1996, 31, 299-303

- 7) K. P. Lee, H. J. Trochimowicz and C. F. Reinhardt, *Toxicol. Applied Pharmacol.* 79, 179-192, 1985
- 8) T. Tsuchiya, A. Takahashi, S. Asada, F. Takakubo, N. Yamashita- Ohsumi and K. Eto, *Teratology*, 43, 319-324, 1991
- 9) T. Tsuchiya, A. Nakamura, Y. Ohshima et al., *Tissue Engineering*. 4, 197-204, 1998

ORIGINAL ARTICLE

Rumi Sawada, PhD · Tomomi Ito
Toshie Tsuchiya, PhD

Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells

Abstract We investigated the expression levels of several genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells (hMSCs) during in vitro culture for use in clinical applications. In this study, we focused on the relationship between hMSC proliferation and transforming growth factor β (TGF β) signaling during in vitro culture. The proliferation rate of hMSCs gradually decreased and marked changes in hMSC morphology were not observed in 3 months of in vitro culture. The mRNA expressions of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β receptor type I (TGF β RI) in hMSCs increased with the length of cell culture. There had been no change in the TGF β 3, TGF β RII, and TGF β RIII mRNA expressions by the 12th passage from the primary culture (at about 3 months). The mRNA expression of Smad3 increased, but those of c-myc and nucleostemin decreased with the length of hMSC in vitro culture. In addition, the expression profiles of the genes that regulate cellular proliferation in hMSCs were significantly different from those of cancer cells. In conclusion, hMSCs derived from bone marrow seldom underwent spontaneous transformation during 1–2 months of in vitro culture for use in clinical applications. In hMSCs as well as in epithelial cells, growth might be controlled by the TGF β family signaling.

Key words Stem cells · Cell proliferation · TGF β signaling · TGF β receptors

Introduction

Several recent studies demonstrated the potential of bioengineering using somatic stem cells in regenerative medicine.^{1,2} Bone marrow includes both mesenchymal and

hematopoietic stem cells. Adult human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from bone marrow have the pluripotency to differentiate into cells of mesodermal origin, e.g., bone, cartilage, adipose, and muscle cells.^{1–5} Moreover hMSCs also have the capacity to differentiate into myocytes,^{6,7} hepatocytes,^{1,8} and neural cells.³ In addition, because they are comparatively easy to expand ex vivo, hMSCs have many potential clinical applications, not only in the field of orthopedic surgery but also for the treatment of cardiac infarction, cirrhosis, and diabetes. On the other hand, stem cells possess a self-renewal capability similar to that of cancer cells.⁹ Recently Rubio et al.¹⁰ reported spontaneous transformation of human adult stem cells derived from adipose tissue in long-term (4–5 months) in vitro culture. In practice, if hMSCs are to be used for clinical applications and tissue-engineered medical devices, they have to be expanded in vitro for about 1–2 months. The proliferation ability and the gene expression profile of hMSCs, however, might change during in vitro culture. In this study, we focused on the relationship between hMSC proliferation and transforming growth factor β (TGF β) signaling during in vitro culture. TGF β is a multifunctional protein that regulates cellular proliferation, differentiation, apoptosis, development, extracellular matrix formation, immunosuppression, and tumorigenesis. In humans, three TGF β isomers have been identified: β 1, β 2, and β 3. TGF β signals through three high-affinity cell surface receptors: TGF β type I (TGF β RI), type II (TGF β RII), and type III (TGF β RIII) receptors. TGF β RI and TGF β RII are serine-tyrosine kinases. TGF β RIII is known to be a betaglycan.¹¹ TGF β s are first bound to TGF β RII and TGF β RIII.¹² It has been considered that TGF β RIII regulates access to TGF β RII,^{12–14} and then TGF β signal transduction in the cellular pathway is started through stimulation of TGF β RI by TGF β RII. After that, activated TGF β RI phosphorylates Smad2 or Smad3, which are receptor-regulated Smads (R-Smad) activated by TGF β and activin.^{15,16} After Smad4, which is a common mediator Smad (C-Smad), is connected to phosphorylated R-Smads, the complex is transported to the cell nucleus and influences the transcription activity of TGF β -dependent genes.^{15,16} c-myc, which is one of the

Received: December 12, 2005 / Accepted: May 15, 2006

R. Sawada (✉) · T. Ito · T. Tsuchiya
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
Tel./Fax +81-3-3700-1487
e-mail: rsawada@nihs.go.jp

TGF β -dependent genes, is regarded as an oncogene and regulates cellular proliferation. In the present study, therefore, we investigated whether the gene expression levels of three TGF β isomers (TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3) and their receptors (TGF β R1, TGF β R2, and TGF β R3). Smad3 and c-myc were changed in hMSCs during in vitro culture.

Wnt-8B is related to cell self-renewal and tumorigenesis,⁹ and Wnt proteins can act as stem cell growth factors.¹⁷ Wnt signaling activates the genes that promote proliferation (c-myc and others) by accumulating β -catenin in some kinds of stem cells and cancer cells.⁹ Nucleostemin is involved in proliferation in both stem cells and cancer cells.¹⁸ Therefore we also investigated the gene expression levels of Wnt-8B and nucleostemin in hMSCs.

In addition to investigating the expression of these genes relating to cellular proliferation in hMSCs during in vitro culture, we compared them with those in two kinds of cancer cell lines, HeLa S3 (a human cervical cancer cell line) and HepG2 (a human hepatoma cell line).

Materials and methods

Cell culture. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from bone marrow were purchased from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD, USA). Their donor was an African American woman aged 19 years. The cells that we obtained from Cambrex Bio Science were second-passage cells. The hMSCs were cultured in mesenchymal stem cell basal medium (MSCBM; Cambrex Bio Science) supplemented with mesenchymal cell growth supplement (MCGS; Cambrex Bio Science), L-glutamine, and 100 U/ml penicillin-streptomycin at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. The cells were seeded at a density of 6000 cells/cm² and were subcultured when they were just subconfluent (approximately 90% confluent) up to the 10th passage, corresponding to the 12th passage from when the hMSCs were collected from the donor. The human cervical carcinoma cell line HeLa S3 (JCRB Cell Bank, Osaka, Japan) was

cultured using Ham's F-12 culture medium (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Intergen, Purchase, NY, USA) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The human hepatoma cell line HepG2 (Riken Bioresource Center, Tsukuba, Japan) was cultured using minimum essential medium (MEM) (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) containing 0.1 mM nonessential amino acids (NEAA) (Invitrogen), 10% FBS (Intergen), and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen).

Preparation of total RNA. Because the purchased hMSCs had been expanded in the manufacturing process as described above, we express the 1st passage of the hMSCs in this study as the 3rd from the primary culture. For quantitative real time-polymerase chain reaction (RT-PCR), total RNA was extracted from hMSC cultures during the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages from the donor with Isogen (Nippon Gene, Toyama, Japan). Total RNA was also extracted from HeLa S3 and HepG2 cells once only with Isogen (Nippon Gene).

Quantitative RT-PCR. RNA was then reverse-transcribed into cDNA using a First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Primers and annealing temperatures for the c-myc oncogene, nucleostemin, Wnt-8B, transforming growth factor (TGF) β 3, and TGF β R3 are summarized in Table 1. Amplifications were carried out for 10s at 95°C, for 15s at each annealing temperature, and for 12s at 72°C for 40 cycles. Amplifications of TGF β 1, TGF β 2, TGF β R1, TGF β R2, and Smad3, plus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene, were performed using Light Cycler Primer Sets (Roche Diagnostics). PCR was performed in Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) in a Roche Light Cycler (software version 4.0).

Statistical analysis. All results are shown as means \pm SD. The significance of the differences in mean values was evaluated by Student's *t* test.

Table 1. Primers and annealing temperatures used for real-time PCR

Gene name	GenBank accession number	Primer orientation	Nucleotide sequence	Starting sequence position	Size for the PCR amplicon(bp)	Annealing temp. (°C)
c-myc	V00568	Forward	5'- GCG AAC ACA CAA CGT C -3'	1626	315	50
		Reverse	5'- CAA GTT CAT AGG TGA TTG CT -3'	1940		
nucleostemin	X91940	Forward	5'- CCA TTC GGG TTG GAG TAA -3'	782	284	50
		Reverse	5'- CTG TCG AGC ATC AGC C -3'	1065		
Wnt-8B	NM_014366	Forward	5'- AGT GAC AAT GTG GGC T -3'	331	244	60
		Reverse	5'- CGT GGT ACT TCT CCT TCA G -3'	574		
TGF β 3	NM_003239	Forward	5'- AAA CAC CGA GTC GGA A -3'	535	284	60
		Reverse	5'- TGC CAC CGA TAT AGC G -3'	818		
TGF β R3	NM_003243	Forward	5'- TCC CTA TCC CGC AAG C -3'	2369	189	60
		Reverse	5'- AGA TTA TCG AGG CGT CC -3'	2557		

PCR, polymerase chain reaction; TGF β 3, transforming growth factor β 3; TGF β R3, TGF β receptor type III

Results

The proliferation rate of hMSCs decreased with the length of in vitro culture (Fig. 1). The effects of the in vitro culture term on hMSC proliferation and the mRNA expressions of three TGF β isomers (TGF β 1, β 2, β 3) and their receptors type I, II, and III (TGF β RI, RII, RIII) in hMSCs were investigated (Fig. 2). The mRNA expressions of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β RI increased with the length of cell culture (Fig. 2A,B,D), but there had been no change in the

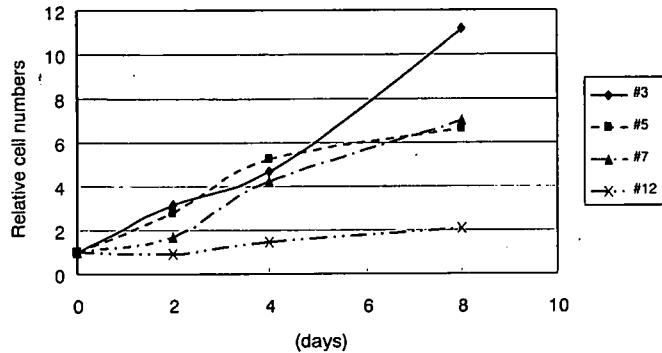


Fig. 1. Proliferation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages. hMSCs were seeded at 1.7×10^5 cells/F 60-mm dish (6000 cells/cm^2), and cells were counted after 2, 4, and 8 days. The initial cell number (0 days) is expressed as 1, and the other cell numbers (2, 4, and 8 days) are expressed relative to that of day 0. $n = 3$

TGF β 3, TGF β RII, and TGF β RIII mRNA expressions by the 12th passage (at about 3 months) (Fig. 2C,E,F). In addition, the mRNA expression of Smad3, which is one of the R-Smads activated by TGF β and activin, in hMSCs was investigated. The mRNA expression of Smad3 decreased in the 5th and 7th passages of hMSCs but increased in the 12th passage (Fig. 3). The mRNA expressions of c-myc in hMSCs were higher in the 5th and 7th passages than in the 3rd and 12th passages (Fig. 4A). The mRNA expressions of nucleostemin in hMSCs decreased with the length of cell culture (Fig. 4B).

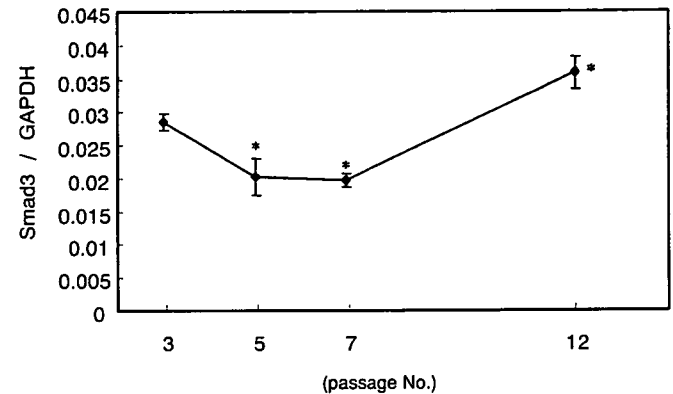
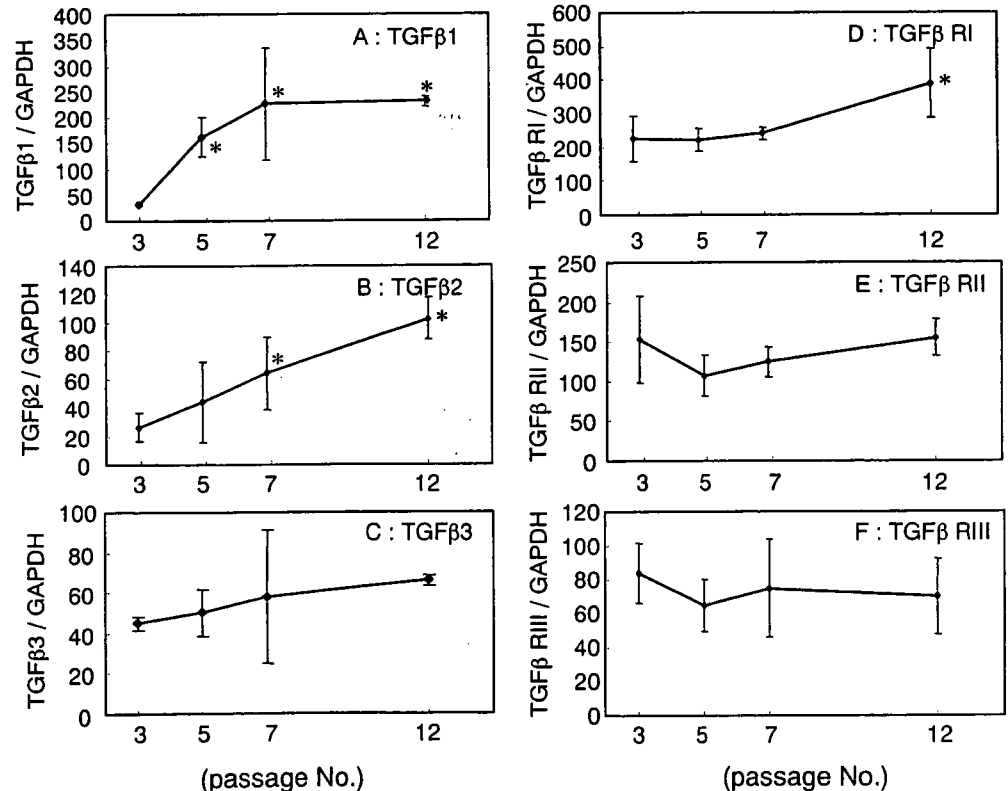


Fig. 3. Effect of in vitro culture length on mRNA expression of Smad3 in hMSCs. The expression of Smad3 relative to GAPDH in confluent cultures of hMSCs in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages was investigated by quantitative RT-PCR. Mean values with SDs are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with the 3rd passage (* $P < 0.05$)

Fig. 2. Effect of in vitro culture length on mRNA expressions of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) (A), TGF β 2 (B), TGF β 3 (C), TGF β receptor type I (TGF β RI) (D), TGF β RII (E), and TGF β RIII (F) in hMSCs. Expressions of the four genes, relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), in confluent cultures of hMSCs in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages were investigated by quantitative real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). Mean values with SDs from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with the 3rd passage (* $P < 0.05$)



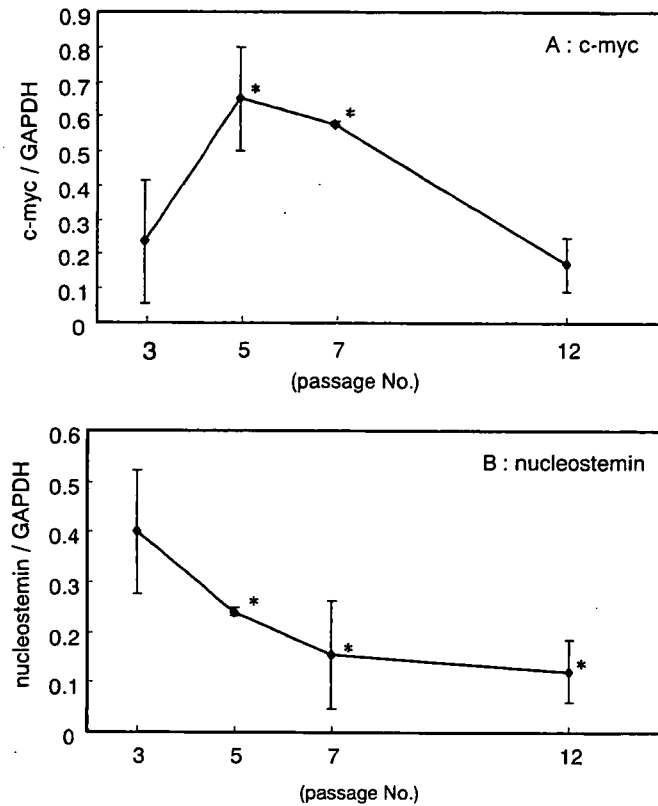


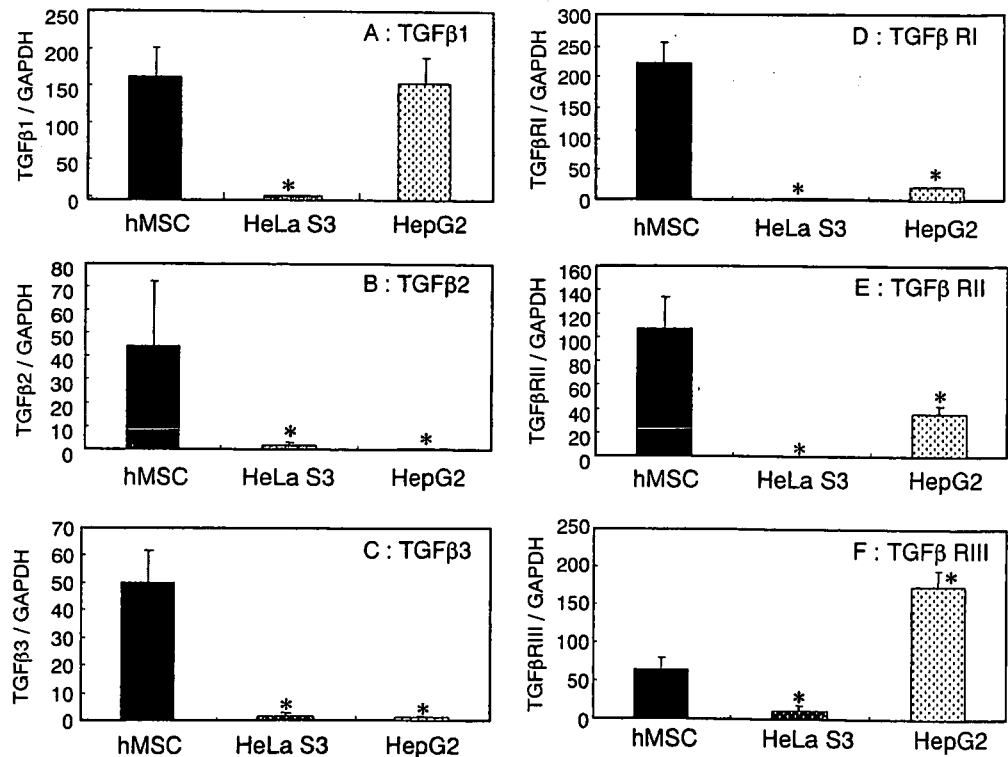
Fig. 4. Effect of in vitro culture length on the mRNA expressions of c-myc (A) and nucleostemin (B) in hMSCs. Expressions of the two genes relative to GAPDH in confluent cultures of hMSCs in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages were investigated by quantitative RT-PCR. Mean values with SDs from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with the 3rd passage ($*P < 0.05$)

The mRNA expressions of TGF β s and TGF β receptors in hMSCs of the fifth passage were compared with those of two kinds of cancer cells (HeLa S3 and HepG2) (Fig. 5). TGF β 1 mRNA levels in hMSCs and HepG2 cells were significantly higher than those in HeLa S3 cells (Fig. 5A). The mRNA expressions of TGF β 2, TGF β 3, TGF β RI, and TGF β RII in hMSCs were significantly higher than those in the cancer cells (HeLa S3 and HepG2) (Fig. 5B,C,D,E). TGF β RIII mRNA expression in hMSCs was significantly higher than that in HeLa S3, but lower than that in HepG2 (Fig. 5F). The expressions of several genes affecting cellular proliferation in all three cells were also investigated. The mRNA expressions of c-myc oncogene and nucleostemin in the cancer cells (HeLa S3 and HepG2) were significantly higher than those in hMSCs (Fig. 6A and B). Wnt-8B mRNA was expressed in the cancer cells (HeLa S3 and HepG2), but not in hMSCs (Fig. 6C). Wnt-8B mRNA was not expressed in any passage numbers of hMSCs (data not shown).

Discussion

In this study, we investigated the changes of gene expression profiles during in vitro culture of hMSCs to evaluate their safety for use in clinical applications and tissue-engineered medical devices. First, the time dependency of the growth speed of hMSCs derived from bone marrow up to the 12th passage (at about 3 months) was investigated. The proliferation rate of hMSCs decreased by degrees during 3 months of in vitro culture (Fig. 1). No marked changes of hMSC morphology in 3 months of in vitro culture were

Fig. 5. mRNA expressions of TGF β 1 (A), TGF β 2 (B), TGF β 3 (C), TGF β RI (D), TGF β RII (E), and TGF β RIII (F) in hMSC, HeLa S3, and HepG2 cells. The expressions of the four genes relative to GAPDH in confluent cultures of hMSCs, HeLa S3, and HepG2 were investigated by quantitative RT-PCR. Mean values with SDs from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences from hMSCs ($*P < 0.05$)



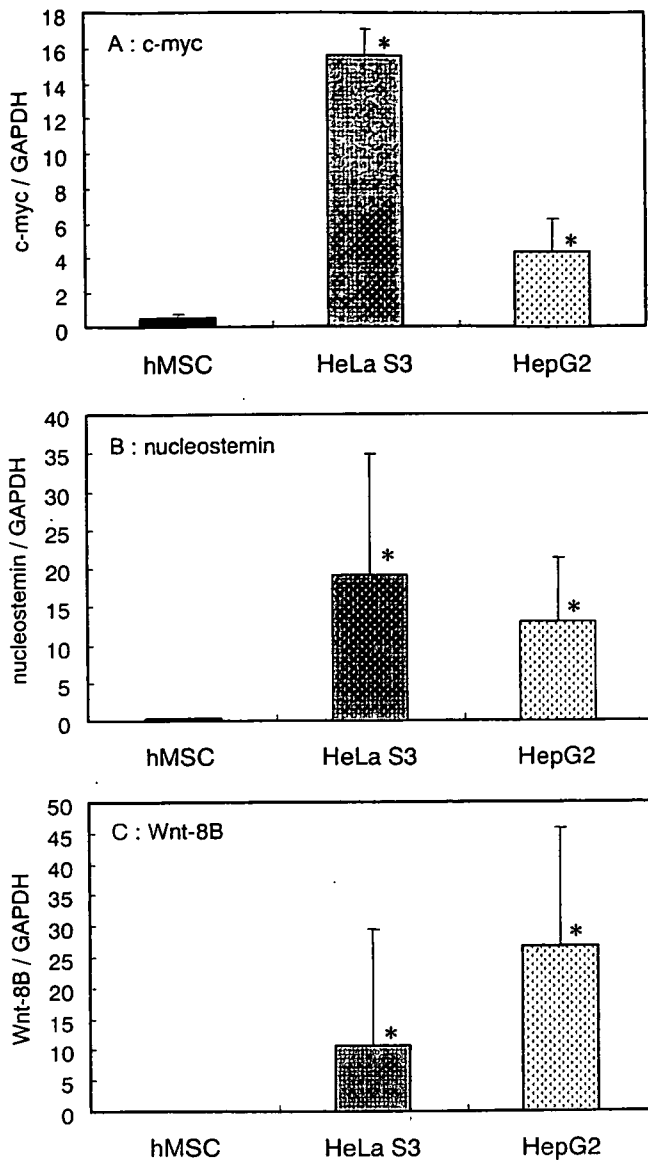


Fig. 6. mRNA expressions of c-myc (A), nucleostemin (B), and Wnt-8B (C) in hMSC, HeLa S3, and HepG2 cells. The expressions of the three genes relative to GAPDH in confluent cultures of hMSC, HeLa S3, and HepG2 cells were investigated by quantitative RT-PCR. Mean values with standard deviations from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences from hMSCs (* $P < 0.05$)

observed. Several hMSCs derived from other donors' bone marrow did not undergo extraordinary proliferation either (data not shown). Adult stem cells have a self-renewal ability and undergo multilineage differentiation to maintain adult tissues.⁹ In this study, however, hMSCs had more limited proliferative potential in in vitro culture. This phenomenon in hMSCs derived from bone marrow is the same result as that in hMSCs derived from adipose tissue reported by Rubio et al.¹⁰ In addition, a decreasing cellular proliferation rate is often observed in several types of normal cells during in vitro culture. Consequently, these results suggest that hMSCs derived from bone marrow will seldom undergo spontaneous transformation during the 1–2 month

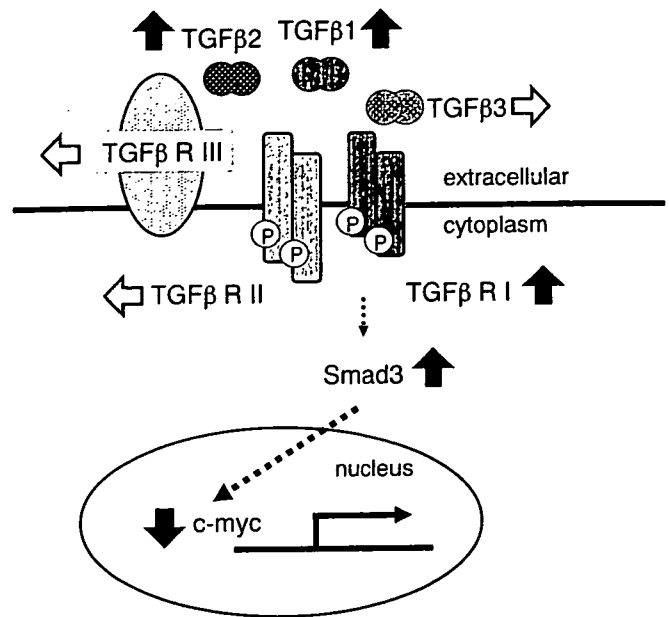


Fig. 7. Changes in the expressions of TGF β signaling genes during hMSC in vitro culture for 3 months. The dotted arrows indicate the TGF β signal pathway. White arrows, no changes; black arrows, up or down changes

period of in vitro culture necessary for use in clinical applications. But why does the proliferation of hMSCs decrease during in vitro culture? To focus on the proliferation mechanism of stem cells, we investigated whether the expressions of several genes related to cellular proliferation in hMSCs changed during in vitro culture. In the present study, we examined the expressions of TGF β s, their receptors, Smad3, c-myc, nucleostemin, and Wnt-8B. It has been proposed that the loss of TGF β RIII in renal cell carcinoma (RCC) is necessary for RCC carcinogenesis, and loss of TGF β RII leads to acquisition of the metastatic phenotype.¹⁹ Therefore, the absence of changes in TGF β RII and TGF β RIII in hMSCs during in vitro culture might be important. The changes in mRNA expression levels during in vitro culture were different in each TGF β isomer and receptor. TGF β signal transduction in the cellular pathway is only possible through activation of TGF β RI. It was interesting that only TGF β RI mRNA expression increased with the length of cell culture among the three kinds of receptors (Fig. 2). The mRNA expressions of Smad3 increased (Fig. 3), but those of c-myc and nucleostemin decreased (Fig. 4) with the length of cell culture. We summarize the changes of TGF β signaling gene expression during in vitro culture of hMSCs for 3 months in Fig. 7. TGF β inhibits the growth of the many kinds of epithelial cells and hematopoietic, lymphoid, and endothelial cells.^{20–23} In hMSCs as well as in the above-mentioned cells, hMSC growth might be controlled by TGF β family signaling. As shown in Fig. 7, we hypothesized that the expressions of TGF β 1 and TGF β 2 in hMSCs increased during the period of in vitro culture, and then activated TGF β RI repressed the transcription of c-myc through Smad3; consequently, the cell cycle and cell growth might be arrested in hMSCs.

In addition, we compared the gene expression profiles of hMSCs with two kinds of cancer cell lines. One was HeLa S3 (a human cervical cancer cell line), which is markedly transformed, and the other was HepG2 (a human hepatoma cell line), which retains some hepatic functions. The mRNA expressions of TGF β s and their receptors in hMSCs were significantly higher than in the two types of cancer cells (HeLa S3 and HepG2) (Fig. 5). On the other hand, the mRNA expressions of *c-myc* and nucleostemin of the stem cells (hMSCs) were significantly lower than those of the two types of cancer cells (Fig. 6). Wnt signaling promotes self-renewal of hematopoietic, intestinal epithelial, and keratinocyte stem cells, among others,⁹ however, Wnt-8B was not expressed in hMSCs derived from bone marrow (Fig. 6). These results suggest that expression of the genes that inhibit cellular proliferation and tumorigenesis were significantly higher and the genes that promote these processes were lower in hMSCs than in the cancer cells. Thus, the expression profiles of the genes that regulate cellular proliferation in hMSCs were significantly different from those of cancer cells.

Conclusion

In the present study, we confirmed that spontaneous transformation seldom occurred in hMSCs derived from bone marrow during 1–2 months of in vitro culture for use in clinical applications. In hMSCs, as in epithelial cells, growth might be controlled by TGF β family signaling. During the period of in vitro culture of hMSCs, the expressions of TGF β 1 and TGF β 2 increased, and then activated TGF β RI repressed the transcription of *c-myc* through Smad3; consequently, the cell cycle and cell growth might have been arrested in hMSCs. In addition, the expression profiles of the genes that regulate cellular proliferation in hMSCs were significantly different from those of the cancer cells.

Acknowledgments This work was partially supported by a grant for Research on Health Sciences Focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation, and Health and Labour Sciences research grants for Research on Advanced Medical Technology from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41–49
- Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med* 2003;349:267–274
- Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair – A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349:570–582
- Hishikawa K, Miura S, Marumo T, Yoshioka H, Mori Y, Takato T, Fujita T. Gene expression profile of human mesenchymal stem cells during osteogenesis in three-dimensional thermo-reversible gelation polymer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:1103–1107
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8932–8937
- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9:1195–1201
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913–1918
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WN, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168–1170
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:895–902
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005;65:3035–3039
- Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 1991;67:785–795
- Esparza-Lopez J, Montiel JL, Vilchis-Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, Lopez-Casillas F. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of transforming growth factor- β superfamily. *J Biol Chem* 2001;276:14588–14596
- Deng X, Bellis S, Yan Z, Friedman E. Differential responsiveness to autocrine and exogenous transforming growth factor (TGF) β 1 in cells with nonfunctional TGF- β receptor type III. *Cell Growth Differ* 1999;10:11–18
- Blöbe GC, Schiemann WP, Peppin M-C, Beauchemin M, Moustakas A, Lodish HF, O'Connor-McCourt MD. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor β receptor in regulating transforming growth factor β signaling. *J Biol Chem* 2001;276:24627–24637
- Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J* 2000;19:1745–1754
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin C-H. Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Sci* 2001;114:4359–4369
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR III, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448–452
- Tsai RYL, McKay RDG. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev* 2002;16:2991–3003
- Copland JA, Luxon BA, Ajani L, Maity T, Campagnaro E, Guo H, LeGrand SN, Tamboli P, Wood CG. Genomic profiling identifies alterations in TGF β signaling through loss of TGF β receptor expression in human renal cell carcinogenesis and progression. *Oncogene* 2003;22:8053–8062
- Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295–309
- Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15^{ink4B} transcription in response to TGF- β . *EMBO J* 2000;19:5178–5193
- Yagi K, Furuhashi M, Aoki H, Goto D, Kuwano H, Sugamura K, Miyazono K, Kato M. *c-myc* is a downstream target of the Smad pathway. *J Biol Chem* 2002;277:854–861
- Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massague J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to *c-myc* repression. *Cell* 2002;110:19–32

Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes

Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Rumi Sawada

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 8 September 2005; accepted 14 September 2005

Published online 14 December 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.30616

Abstract: Recent study has shown that biodegradable polymers are attractive candidates for chondrocyte fixation and further transplantation in cartilage tissue engineering. Poly (glycolic acid) (PGA), a polymer of glycolic acid, is widely used in orthopedic applications as a biodegradable polymer. Organotin, lead, antimony, and zinc are catalysts commonly used in synthesizing PGA. Here, we investigated the biocompatibility of PGA, synthesized with and without inorganic tin as a catalyst in chondrogenesis of human articular chondrocytes in a micromass culture system. Significant enhancement of chondrocyte proliferation and expression of the collagen type II protein gene were observed in

cultures treated with PGA synthesized with a tin catalyst. However, aggrecan gene expression was very similar to the control culture. Amount of collagen type II protein was also increased in the same group of cultured chondrocytes. In contrast, PGA without a catalyst caused overall inhibition of chondrogenesis. Despite several positive findings, extensive investigations are essential for the feasibility of this PGA(Sn) in future clinical practice. © 2005 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 77A: 84–89, 2006

Key words: poly (glycolic acid); inorganic tin catalyst; human articular cartilage; chondrogenesis; micromass culture

INTRODUCTION

Different synthetic biodegradable polymers are currently gaining importance in the fields of biotechnology and tissue engineering. Recently, many studies have evaluated the potential of various natural bioabsorbable polymers such as collagen,^{1,2} alginates,^{3–5} fibrin,^{6–8} and gelatin,⁹ but synthetic biodegradable polymers in general offer advantages over natural materials. The primary advantages include the capacity to change the mechanical properties and degradation kinetics to suit various applications. Among the families of synthetic polymers, polyesters are used in a number of clinical applications.^{10–12} Polyesters have also been used for development of tissue engineering applications,^{13,14} particularly for bone tissue engineering.^{15,12}

The attraction of poly (glycolic acid) (PGA), one of the aliphatic polyesters, as a biodegradable polymer in medical applications is that its degradation product, glycolic acid, is a natural metabolite. Several studies have indicated that copolymers of glycolic acid caused promotion of nerve regeneration in a rat model,^{16–18} and regeneration of an 80 mm nerve gap by an artificial nerve conduit made of PGA was also reported.¹⁹ PGA can be synthesized using different catalysts. The common catalysts used include organotin, lead, antimony, and zinc. It was reported that inorganic and organic tin compounds present in the aqueous ecosystem have toxic effects and are capable of producing behavioral abnormalities in living organisms.^{20,21} Organotin compounds are known to cause neurotoxicity,²² cytotoxicity,²³ immunotoxicity, and genotoxicity²⁴ in human and other mammalian cells both *in vitro* and *in vivo*. Organotin compounds were also reported to decrease *in vitro* survival, proliferation, and differentiation of normal human B cells.²⁵ The dose effect of inorganic tin in rats suggests that the critical organ in inorganic tin toxicity is bone,²⁶ and disproportionate dwarfing syndrome, which severely affects the limbs but not the trunk, was observed in rats that had been injected with certain tin compounds.²⁷ As far as we know, no study yet has reported the chondrogenic

Correspondence to: T. Tsuchiya; e-mail: tsuchiya@nihs.go.jp

Contract grant sponsor: Health and Labour Sciences Research

Contract grant sponsor: Ministry of Health, Labour and Welfare (Japan)

Contract grant sponsor: Japan Health Sciences Foundation