

6. 岡野理紗, 薮島由二, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 長谷川千恵, 松田良枝, 村松知明, 土屋利江. スルホン化プレート上で培養したヒト正常骨芽細胞の増殖・分化挙動の解析. 第29回日本バイオマテリアル学会大会 (2007年11月・大阪).
7. 松岡厚子: ナノマテリアルの粒子径分布と細胞毒性 平成19年度厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合事業研究成果発表会 (平成20年2月7日)
8. 澤田留美, 堀英嗣, 高木数実, 福永周司, 田山栄基, 青柳成明, 土屋利江「人工心臓弁の機能不全発症に関わる遺伝子の探索のためのSNP解析」第29回日本バイオマテリアル学会 (2007. 10)
9. 迫田秀行, 土屋利江 微小試験片を用いた人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価. 第34回 日本臨床バイオメカニクス学会 (2007年12月, 東京)
10. 迫田秀行 微小試験片を用いた人工関節用 UHMWPE疲労特性評価法. 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「医療機器・医用材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究」成果発表会 (2008年2月, 東京)
11. 佐藤道夫, 土屋利江: 医療機器の不具合報告について(2)、第43回全国衛生化学技術協議会年会 (2007. 11).
12. 角田正史, 吉田珠恵, 辻雅善, 張瑩, 菅谷ちえ美, 井上葉子, 三木猛生, 工藤雄一郎, 佐藤敏彦, 相澤好治 (2007) 低濃度 DBT 曝露によるマクロファージ系細胞の生存率の低下、サイトカイン産生に対する影響. Biomedical Research on Trace Elements, 18(2), 186.
13. 角田正史, 辻雅善, 木村幸子, 張瑩, 菅谷ちえみ, 井上葉子, 工藤雄一郎, 佐藤敏彦, 片桐裕史, 秋田久直, 佐治眞理, 土屋利江, 相澤好治 「人工硬膜埋め込みラットの行動学試験を用いた神経毒性評価」 第78回日本衛生学会総会 (2008.3)
14. M. Todo, K. Toshiyuki, S. Ide, J. Ito, M. Mawatari and T. Hotokebuchi, Stress analysis of complete flexion knee CFK under dynamic motion, Proceedings of the Third Asian Pacific Conference on Biomechanics, 2007, S156.
15. M. Todo and R. Nagamine, Explicit finite element analysis of PS type knee prosthesis under deep knee flexion, Second International Conference on Mechanics of Biomaterials & Tissues, 2007, P06.
16. 東藤貢, 歳行健蔵, 井手衆哉, 伊藤純, 馬渡正明, 佛淵孝夫, 完全屈曲型人工膝関節 CFK の深屈曲状態での応力解析, 第22回日本整形外科学会基礎学術集会抄録集, 2007, S987.
17. 東藤貢, 佛淵孝夫, 長嶺隆二, 人工関節のリスクアセスメントにおけるシミュレーション技術の応用, 第5回医療機器フォーラム, 2007, 5-14.
18. 東藤貢, 佛淵孝夫, 長嶺隆二, LS-DYNA による動作状態での人工関節の応力解析, LS-DYNA ユーザー会議講演論文集, 2007, D-2-2-D-2-11
19. 東藤貢, 長嶺隆二, 高橋祐二, PS 型人工膝関節における繰り返し屈曲動作と脛骨インサートの塑性変形の関係について, 第34回日本臨床バイオメカニクス学会, 2007, 232.
20. 東藤貢, 歳行健蔵, 伊藤純, 馬渡正明, 佛淵孝夫, 新型人工膝関節 CFK の深屈曲状態での応力集中解析と摩耗予測, 第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 2008, 371-372.
21. 高橋祐二, 東藤貢, 長嶺隆二, 繰り返し屈曲動作が PS 型人工膝関節の応力状態に及ぼす影響, 第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 2008, 373-374.
22. 高橋祐二, 東藤貢, 長嶺隆二, 屈曲・回旋を考慮した人工膝関節の応力解析, トライポロジー会議予稿集, 2007, 507-508.
23. 鄭, 加藤玲子, 土屋利江 「生体機能とその添加物による生体外の皮膚感作テストの開発に関する研究」 第7回日本再生医療学会 (2008. 3)
24. 中岡竜介, 土屋利江 「種々の官能基がヒト骨芽細胞に与える影響」, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 吹田市, 2007年11月26, 27日
25. 松岡厚子, 松田良枝, 中岡竜介, 薮島由二, 伊佐間和郎, 久保 敬, 中平 敦, 湯田坂雅子, 飯島澄男, 土屋利江 「ナノ材料の粒度分布と細胞毒性」, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 吹田市, 2007年11月26, 27日
26. 中岡竜介, 鄭 徳泳, 迫田秀行, 土屋利江, 「細胞接着性ペプチド修飾アルギン酸ゲルを用いた軟骨再生の可能性」, 第7回日本再生医療学会総会, 名古屋市, 2008年3月13, 14日
27. Saori Sourin, Takako Matsumoto, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya and Atsushi Kanai, Safety of fashion color contact lenses in Japan, CLAO (contact lens association of ophthalmologists) annual meeting in 2007, Las Vegas, USA. 2007.10.5, 6.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

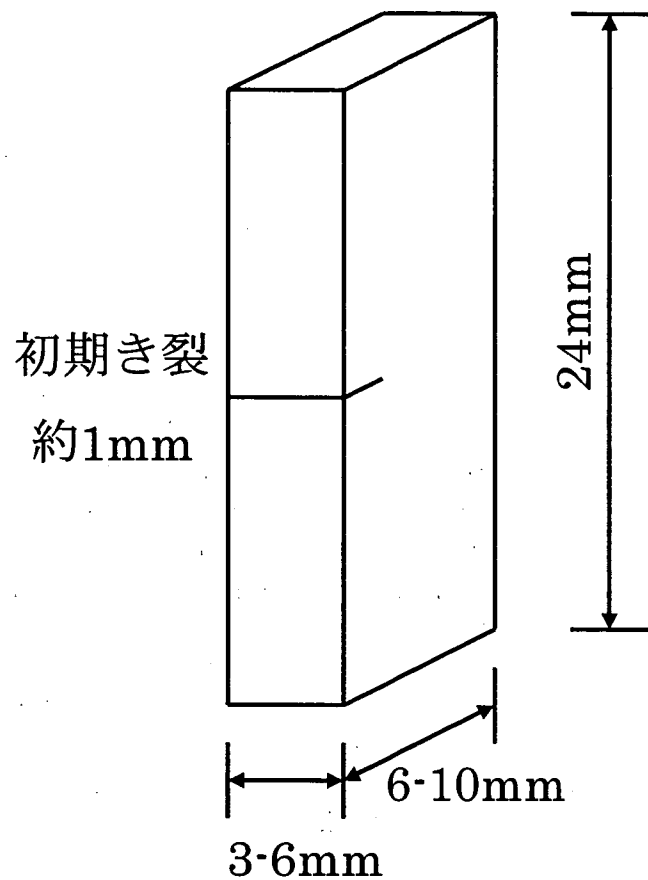


図1 ECT 試験片。

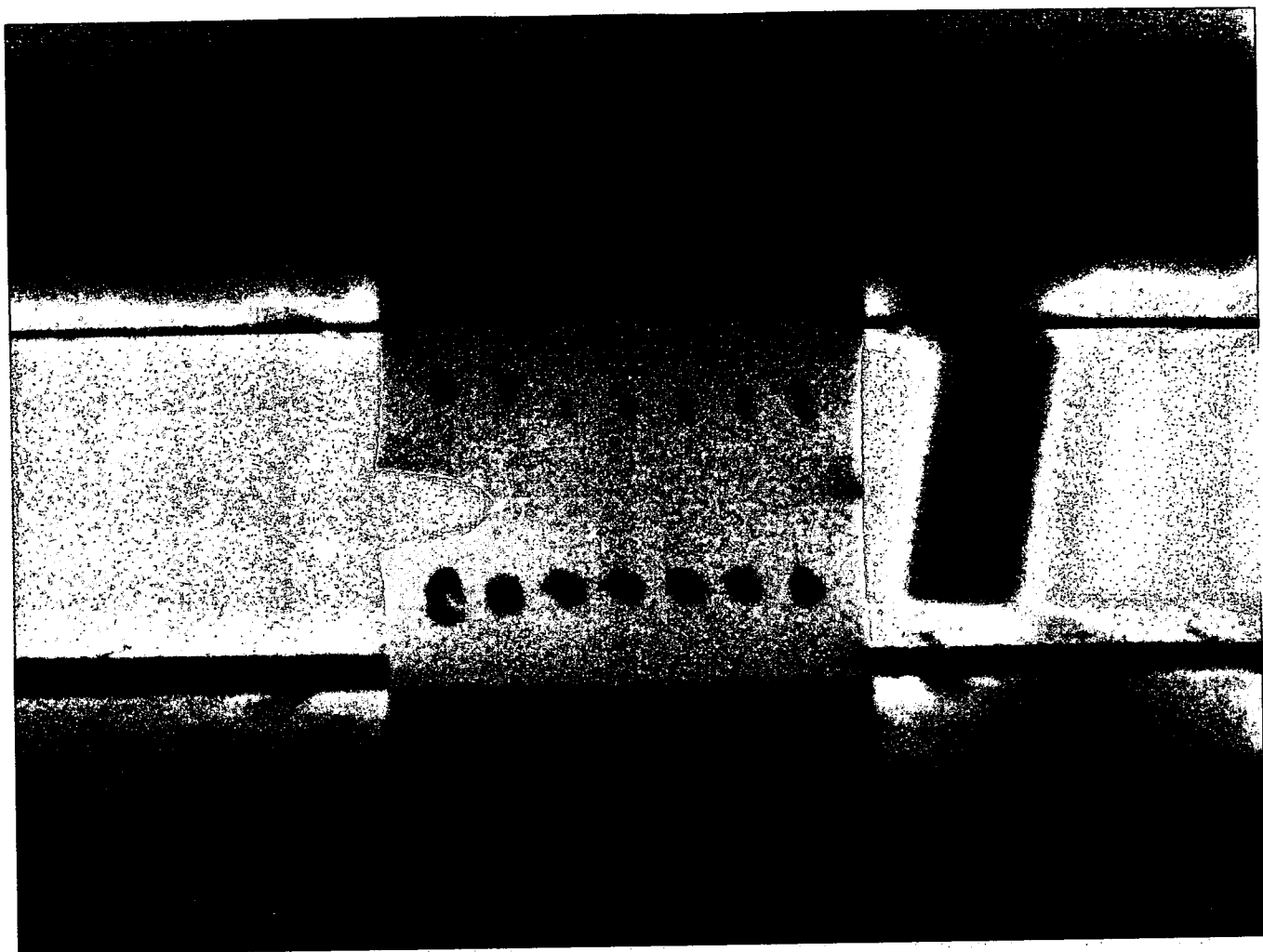


図2 試験中の試験片。き裂先端の鈍化が観察された。き裂の伸展方向は左から右。

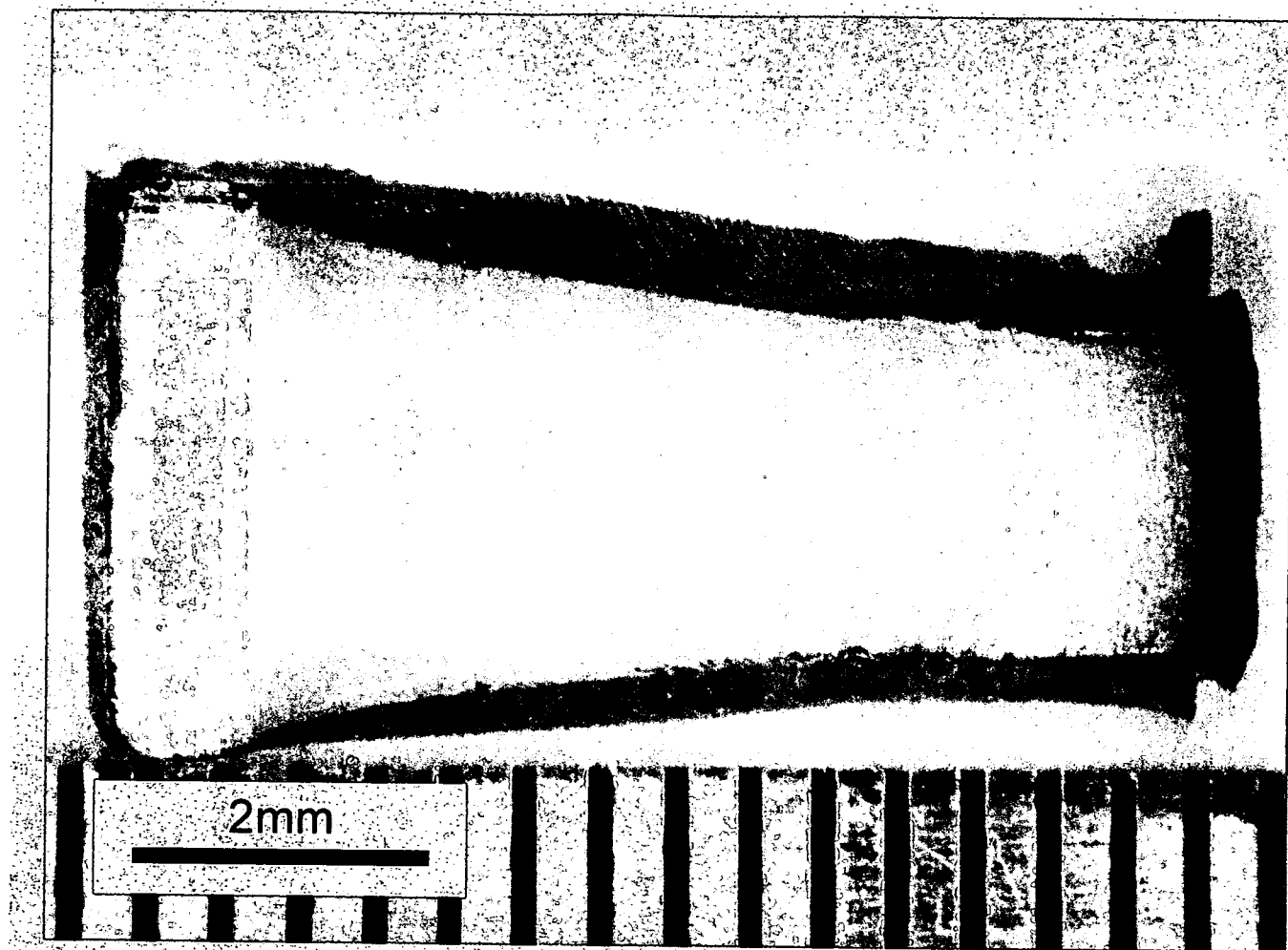


図3 破断面の光学顕微鏡写真。40倍。き裂の伸展方向は左から右。

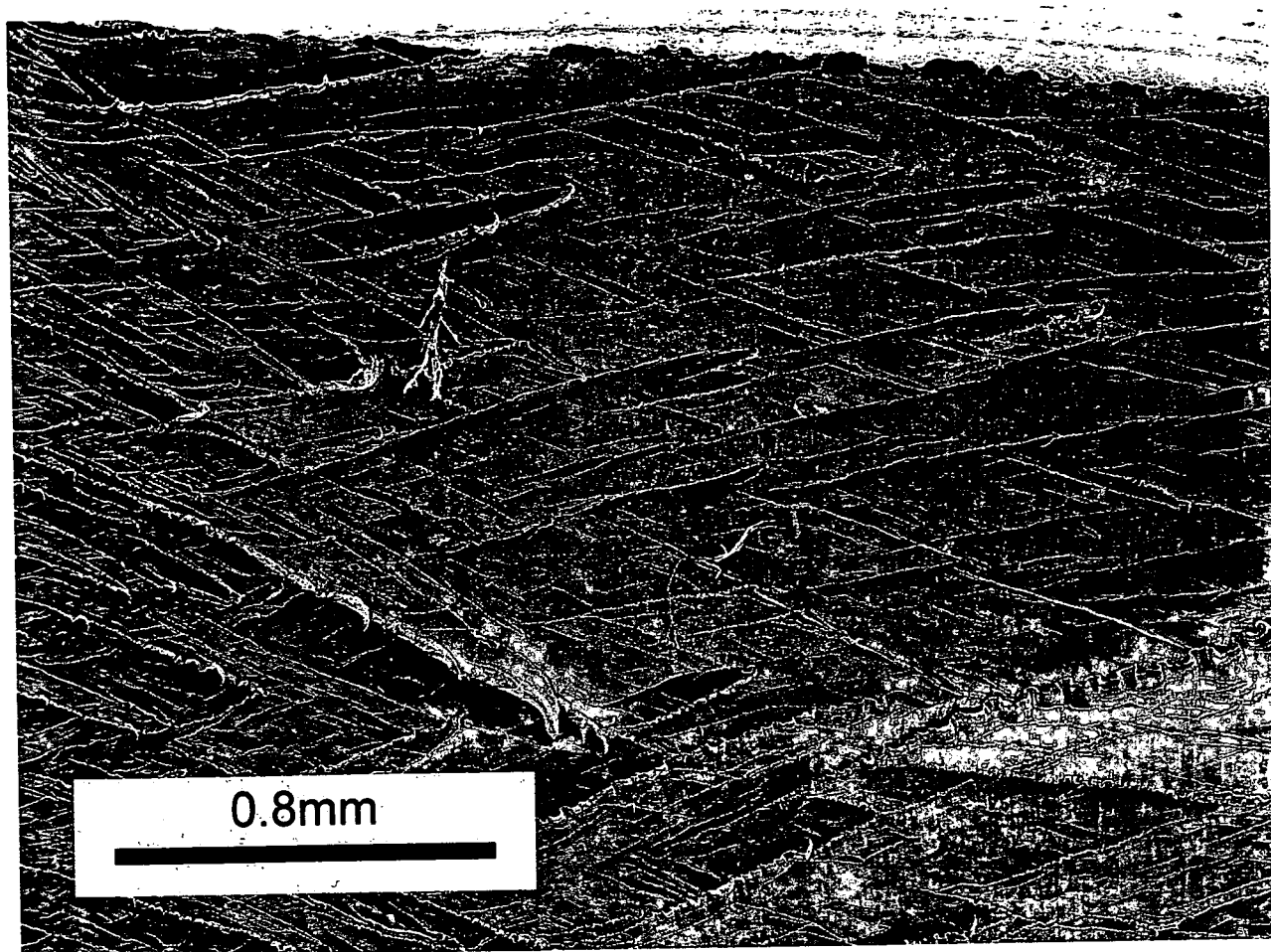


図5 破断面の電子顕微鏡写真。菱形状の模様が観察された。50倍。き裂の伸展方向は左から右。

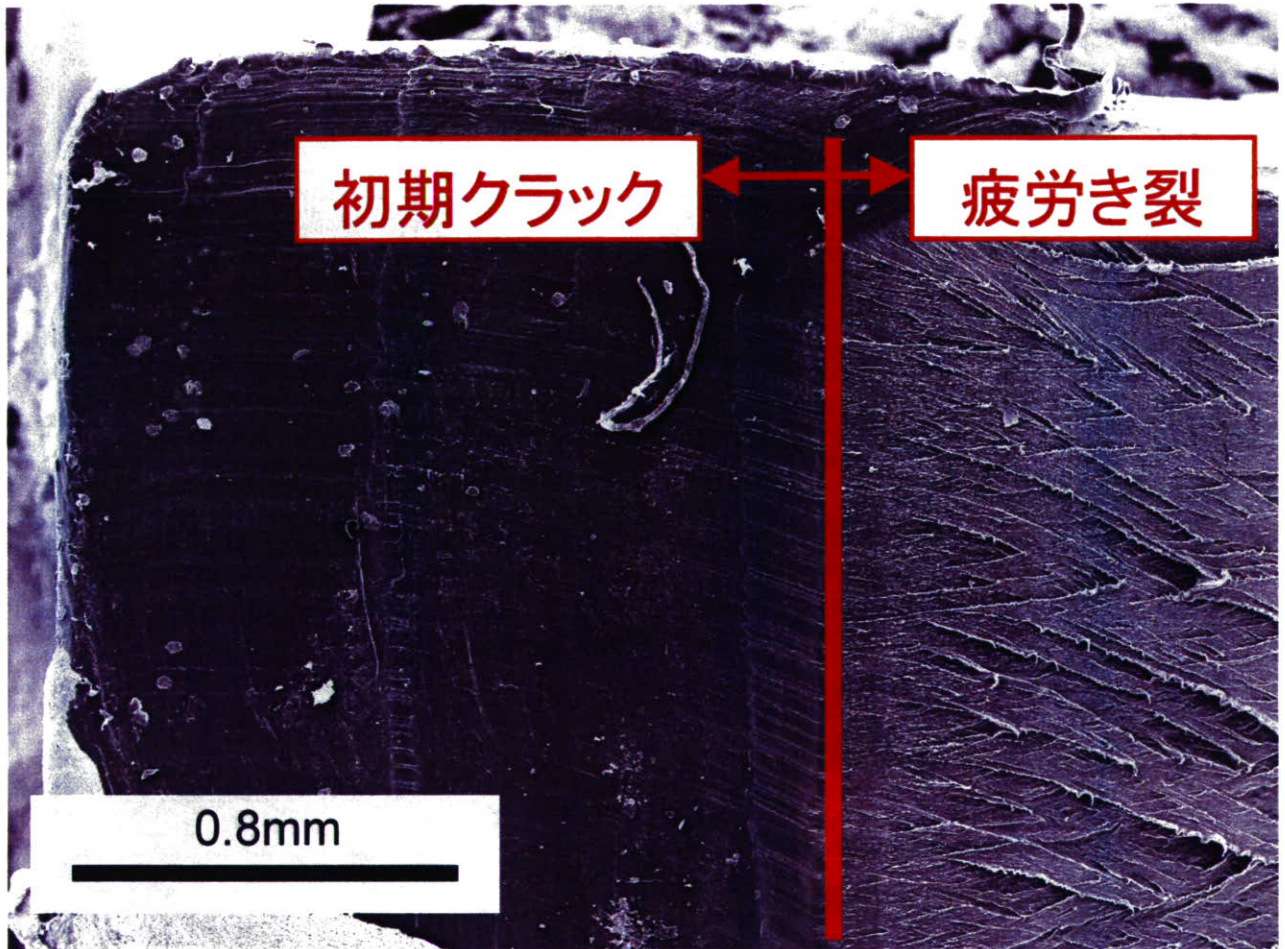


図4 破断面の電子顕微鏡写真。初期き裂の識別は容易に可能であった。50倍。き裂の伸展方向は左から右。

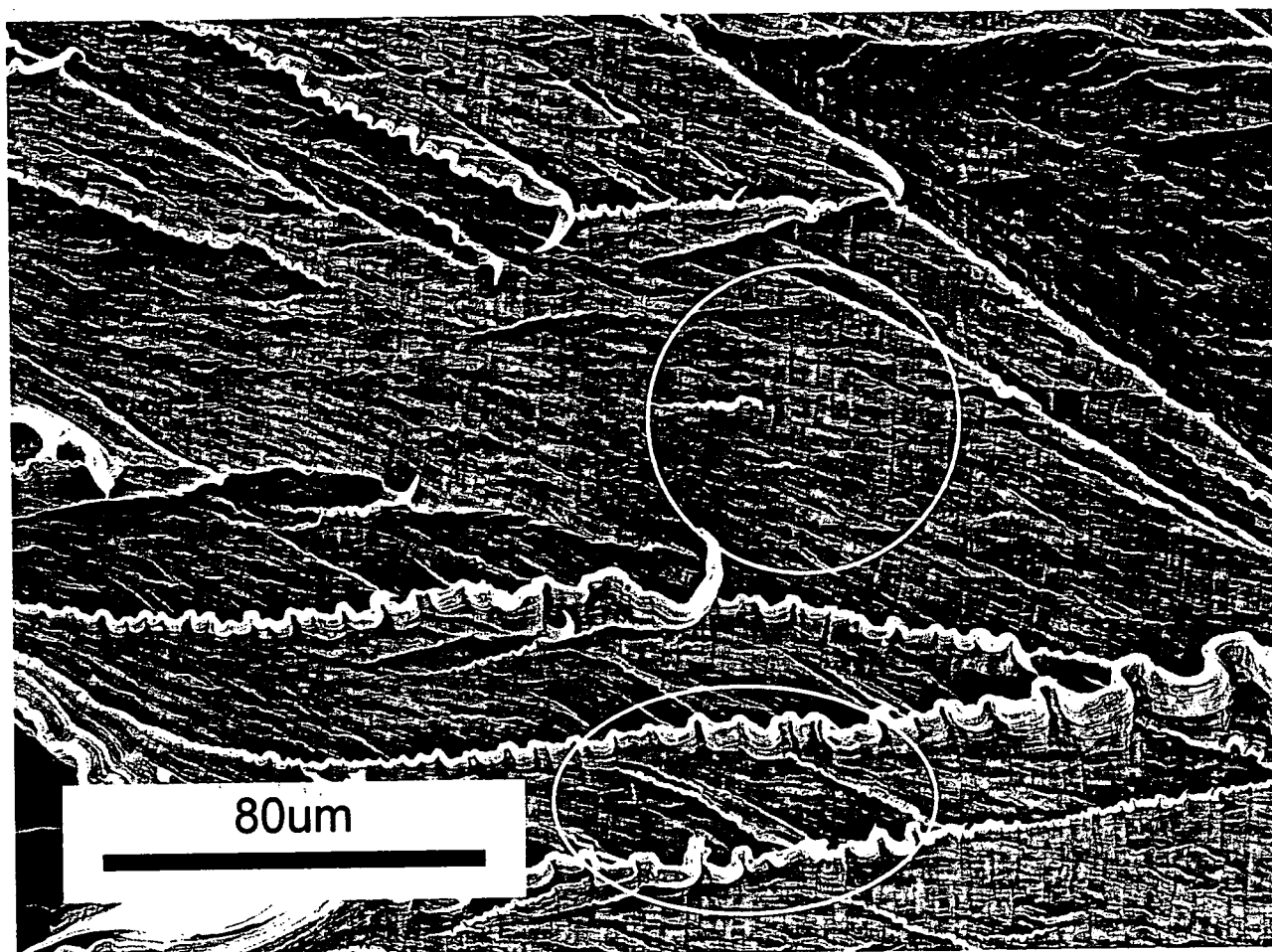


図6 破断面の電子顕微鏡写真。破断時の塑性変形を示すさざなみ状の模様（図中の楕円内など）やき裂の伸展と垂直方向に並んだストライエーション様の模様（図中円内など）が観察された。500倍。き裂の伸展方向は左から右。

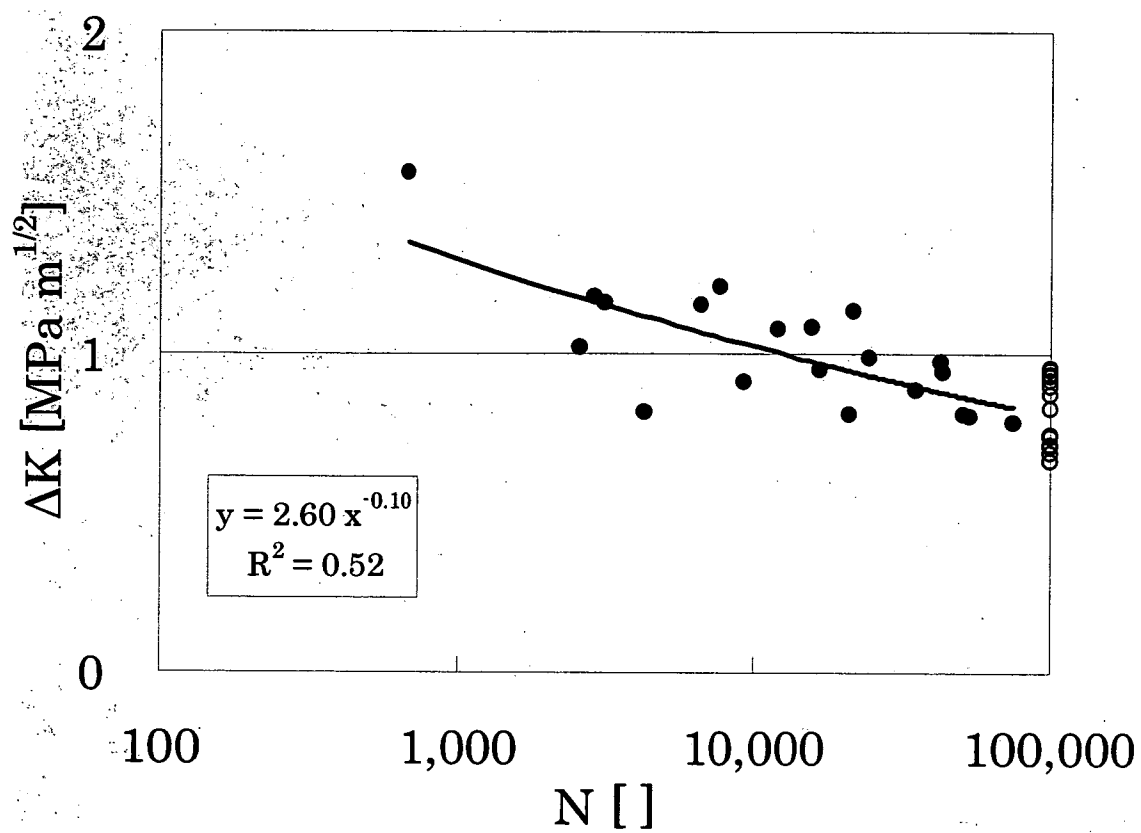


図7 試験結果 (K-N 線図)



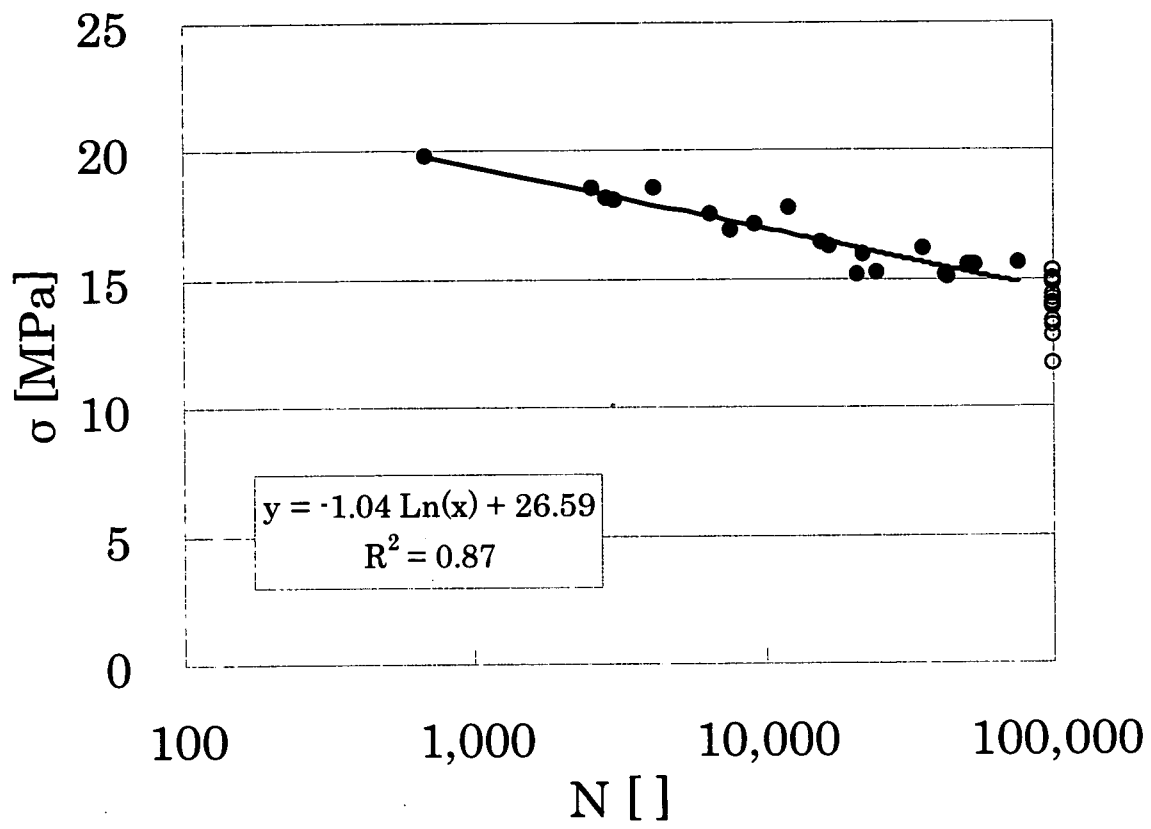


図8 試験結果 (S-N) 線図。

1. プロテオミクス解析による医用材料の  
リスクアセスメント手法開発

齋島 由二

## 分担研究報告書

平成 19 年度厚生科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合）研究事業  
「医療機器・医療材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究」（H19-医薬-一般-015）

### 分担研究課題名

#### プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

主任研究者	土屋 利江	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
分担研究者	靛島 由二	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
協力研究者	伊佐間和郎	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
	松岡 厚子	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
	長谷川千恵	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
	斎藤 博久	国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部
	中島 敏治	横浜薬科大学 健康薬学科 生体防御学教室

研究要旨：本研究では、機能性材料上で培養した細胞の安全性を評価する手法としてプロテオミクス解析の有用性について検討する。平成 19 年度の本研究では、第一のアプローチとして、モデル材料であるスルホン化プレートを作製し、その物理化学的性状を解析すると共に、ヒト正常骨芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響について検討した。

細胞培養プレート表面へのスルホン基の導入量は処理後 2 時間まで時間依存的に増加することが明らかになった。また、プレート表面の静的接触角はスルホン化処理時間に比例して低値を示すことも確認された。

TetraColor ONE を用いて測定した細胞増殖度はスルホン化処理により大きな影響を受けなかったが、蛍光イメージングにより細胞数を解析した結果、増殖率はスルホン化処理時間に比例して減少することが確認された。一方、分化マーカーである ALP 活性、オステオカルシン産生量、Ca 産生量はスルホン化時間に比例して顕著に上昇することが確認された。また、同プレートは CHL/1U 細胞に対して細胞毒性及び染色体異常誘発性を示さなかった。

スルホン化プレート上で培養したヒト正常骨芽細胞の遺伝子発現解析を行った結果、培養初期から培養後期の各段階において、IGF、EGF、TGF- $\beta$ 、BMP、PDGF などの成長因子が骨芽細胞の分化進行に関与していることが示唆された。今後、同プレートに吸着される蛋白質の同定を試みると共に、骨芽細胞の分化促進メカニズムを蛋白質発現解析により検討する。

#### A. 研究目的

超高齢化社会を迎える日本にとって、運動機能、感覚機能、内蔵機能、記憶力など、これらの生理機能の低下を予防或いは回復するための治療法の開発は、国民の健康と福祉の向上という観点から緊急の課題である。再生医療は、それに資する医療技術として大きな期待を集めている。

再生医療を行うにあたり、組織の再生を促進させる一つの技術として、組織工学的な手法による組織再生が挙げられる。組織工学的手法を

用いた再生医療における 3 つの大きな柱は、移植細胞、細胞増殖の足場（scaffold）及び成長因子である<sup>1)</sup>。細胞を保持或いは増殖・分化させるための生体材料としては、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸やヒドロキシアパタイトなどの生体関連物質のほか、ポリ乳酸を初めとした合成高分子など様々な物質が利用されている。

このような背景の中、近年、スルホン基を導入した医用材料が細胞機能を増進させることが報告された。Takada らは<sup>2)</sup>、ヘパリンを初めと

した幾つかの硫酸化多糖が BMP 群の活性を増加させ、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進することを明らかにしている。また、ヘパリンは FGFs や antithrombin III の作用を増強させることも報告されている<sup>3-5)</sup>。その他、Yang らは<sup>6)</sup>、GM-CSF 共存下でヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸が単球からマクロファージへの分化を顕著に促進することを明らかにしている。また、骨髄巨核芽球の細胞膜上に存在するグルコサミノグルカン類 (GAGs) の作用発現には幾つかの血清因子が必要であると共に、ヘパリンとコンドロイチン硫酸は GAGs とサイトカイン類 (IL-3, IL-6, G-SCF, GM-CSF, FGF $\alpha$ , TPO, EPO, PF4, TGF- $\beta$ 1) との相互作用を活性化することが示唆されている。このように、幾つかの細胞に対する硫酸化多糖類の機能発現に関する知見が報告されているが、スルホン化材料が及ぼす細胞機能の亢進に関する作用機序は未だ十分に解明されていないのが現状である。

再生医療では、成長因子を結合させた機能性材料や細胞シート工学において利用される温度応答性培養プレートなどに代表される機能性材料と幹細胞を初めとした様々な細胞を組み合わせ使用される場合がある。このようなハイブリッド医療機器の安全性を確保するためには、材料の評価や細胞の品質管理に加え、材料が及ぼす細胞への影響も詳細に評価する必要がある。

そこで本研究では、機能性材料上で培養した細胞の安全性評価や細胞機能の向上に関する因子を解明する手法としてプロテオーム解析の応用を試みる。平成 19 年度の本研究では、第一のアプローチとして、細胞機能を増進させるスルホン基含有医用材料に着目し、細胞に対するスルホン基自体の影響を純粋に評価するための実験系を確立するため、表面にスルホン基を共有結合させたポリスチレン製細胞培養用マルチウェルプレート(スルホン化プレート)を作製し、その物理化学的性状を解析した。また、ヒト正常骨芽細胞の増殖と分化に及ぼすスルホン化プ

レートの影響について検討した。

## B. 研究方法

### (1) スルホン化プレートの作製

Wakabayashi らの報告に従い、住友ベークライト社製 (SUMILON) 及び CORNING 社製のポリスチレン製細胞培養用 24 ウェルプレートの各ウェルに濃硫酸(和光純薬, 超微量分析用) 1 ml を添加した後、37°C で種々の時間インキュベートした<sup>7)</sup>。処理後、水道水、重曹水及び蒸留水により順次洗浄し、乾燥後、クリーンベンチ内で UV を照射して滅菌した。

### (2) XPS 解析及び静的接触角の測定

XPS 解析は、スルホン化プレート底面をウェル毎に 5 x 5 mm 程度に切断した試料片を用い、島津製作所製 ESCA-3200 により行った<sup>8)</sup>。

静的接触角( $\delta$ )は、スルホン化プレート底面をウェル毎に 1 x 1 cm 程度に切断した試料片上に 5  $\mu$ l の蒸留水を滴下し、1 分後に ERMA 接触角測定器 G-1-1000 を用いて液滴の幅と高さを計測し、以下の計算式から算出した<sup>9)</sup>。

$$\begin{aligned} L^2 &= (w/2)^2 + (L-h)^2 & L: \text{液滴の半径 (mm)} \\ \sin \delta &= (w/2)/L & w: \text{液滴の幅 (mm)} \\ & & h: \text{液滴の高さ (mm)} \\ & & \delta: \text{接触角} \end{aligned}$$

### (3) ヒト正常骨芽細胞の培養

ヒト正常骨芽細胞(CAMBREX, 1D, Female, 0/C)は三光純薬から購入した。培地としては、5 mM  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム、10 nM デキサメタゾン及び 10%牛胎児血清を含有する  $\alpha$ -MEM (GIBCO) 培地を使用した<sup>10)</sup>。細胞培養用プレートとしては未処理及び種々の時間スルホン化処理を施した 24 ウェルプレート (SUMILON) を使用し、1 ウェル当たり 4 x 10<sup>4</sup> 個のヒト正常骨芽細胞を播種し、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37°C で種々の期間培養した。

### (4) 増殖・分化能の測定

ヒト正常骨芽細胞の増殖度は、30  $\mu\text{l}/\text{ml}$  の生細胞測定用試薬 TetraColor ONE (生化学工業) を含有する培地 (1 ml) に交換し、37°C で 2 時間インキュベート後、150  $\mu\text{l}$  の培養上清を 96 穴プレートに分注し、450 nm (対照波長: 600 nm) における吸光度を測定して評価した<sup>10)</sup>。プレートリーダーとしては、BIO-TEK INSTRUMENTS, INC. 社製  $\mu\text{Quant}$  を使用した。

アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性は、TetraColor ONE 含有培地を廃棄し、PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄後、4 mM パラニトロフェニルリン酸、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1 mM  $\text{ZnCl}_2$  を含有する 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.5) 1 ml を各ウェルに添加し、37°C で 15 分間インキュベート後、上清 150  $\mu\text{l}$  を 96 穴プレートにサンプリングし、405 nm (対照: 600 nm) での吸光度を測定して評価した<sup>10)</sup>。

オステオカルシン量を測定するため、細胞を PBS で 3 回洗浄し、0.2% NP-40 含有 PBS (0.5 ml x 2 回) により細胞を回収後、氷冷下、超音波破碎した。オステオカルシン量は細胞破碎液の遠心上清を試料として、Gla type Osteocalcin EIA Kit (Takara) のプロトコールに従って測定した<sup>10)</sup>。

Ca 産生量を測定するため、細胞を PBS で 3 回洗浄し、ホルマリン固定 (10% ホルマリン/PBS) 後、蒸留水で 3 回洗浄し、0.1 M 塩酸 1 ml を各ウェルに添加し、室温下、15 時間放置して塩酸抽出液を調製した。同抽出液 10  $\mu\text{l}$  を試験管に分注し、カルシウム C-テストワコー (和光純薬工業) のプロトコールに従って、0.88 M モノエタノールアミン緩衝液 (pH 11.0) 1 ml、0.63 mM オルトクレゾールフタレインコンプレクソン / 69 mM 8-キノリノール混合液 100  $\mu\text{l}$  を添加し、室温下、15 分間インキュベート後、570 nm における吸光度を測定してウェル当たりの Ca 産生量を測定した<sup>10)</sup>。

各生化学的測定は 1 条件当たり 2 ウェル測定し、3 回の繰り返し実験から平均値と標準偏差

を算出した。

#### (5) 細胞の蛍光標識と画像解析

未処理及びスルホン化プレート上で種々の時間培養した細胞を PBS で 3 回洗浄した後、ホルマリン固定し、蒸留水で 3 回洗浄した。各ウェルに 5  $\mu\text{M}$  の Hoechst 33258 を含有する PBS 1 ml を添加し、室温下、15 分間放置して細胞核を蛍光染色した<sup>11)</sup>。同細胞を PBS、0.1% Triton X-100、1% BSA 及び PBS で順次洗浄後、5  $\mu\text{l}$  の rhodamine phalloidin (Invitrogen) を含む PBS 200  $\mu\text{l}$  を添加し、室温下、20 分間インキュベートしてアクチンを蛍光染色した<sup>12)</sup>。再度、同細胞を PBS で洗浄した後、FITC 含有 PBS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し、室温下、20 分間放置して細胞膜を蛍光染色した<sup>13)</sup>。同細胞を PBS で洗浄後、画像解析に供するまで 4°C で同緩衝液に浸潤させた状態で保存した。

細胞数の測定及び細胞形態の観察は In Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) を使用して行った。細胞核の測定波長は Ex 360 nm / Em 460 nm とし、アクチン及び細胞膜の観察は、それぞれ Ex 535 nm / Em 620 nm 及び Ex 475 nm / Em 535 nm で行った。細胞核及び細胞面積は 4 倍率画像 20 枚 (カバー率: 36.1%) から、In Cell Analyzer 1000 Workstation ソフトウェアを使用して計測した。細胞骨格長 (アクチン伸展長) は 3 枚の 20 倍画像 (カバー率: 1.1%) から、In Cell Analyzer 1000 Developer Tools ソフトウェアにより解析した。1 ウェル当たりの細胞面積及び細胞骨格長の総和を細胞核数で除すことにより、細胞当たりの平均面積と平均骨格長を算出した。

#### (6) 遺伝子発現解析

未処理及び 240 分処理したスルホン化プレートにヒト正常骨芽細胞 ( $4 \times 10^4$  個 / ウェル) を播種し、培養開始後、2 時間、4 時間、8 時間、1 日、3 日及び 6 日目の細胞から RNeasy Mini Kit

(Qiagen)を用いて tRNA を採取し、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop)により tRNA 量と純度を測定した。濃度の低い試料は必要に応じてエタノール沈殿を行って濃縮した。

試料の純度をバイオアナライザー (Agilent)により再度解析した後、Human Genome U133 Plus Array (Affymetrix)を用い、One-Cycle Target Labeling 法により、mRNA 発現を網羅的に解析した。試験は Technical duplicate で行い、得られた Gene Chip データは GeneSpring (Agilent Technologies)を用いて解析した。

#### (7) in vitro 毒性試験

染色体異常試験では、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) をプレートに播種し、10% FCS-MEM 培地を用いて 7 日間培養後、トリプシン処理、低張処理及び固定し、分裂中期像を顕微鏡下で観察することにより、構造異常の種類と数及び倍数性細胞の数を集計した。また、細胞毒性試験では、同細胞をプレートに播種し、7 日間培養後、固定、ギムザ染色し、コロニー数を測定した。

### C. 研究結果

#### (1) スルホン化プレートの物理化学的性状

##### 1-1. XPS 解析による表面元素組成分析

細胞培養用プレート表面のスルホン化度を評価するため、未処理及び種々の時間スルホン化処理を施したプレート表面の XPS 解析を行った。図 1A に示したように、未処理プレートの XPS 解析においては C1s 及び O1s に由来する 2 つのピークが観測されたが、240 分間スルホン化処理を行ったプレート表面からはこれら 2 つのピークに加え、S2p と Ca2p に由来するシグナルが確認された (図 1B)。

スルホン化時間とプレート表面へのスルホン基の導入量との相関性を表 1 に示した。10 分間のスルホン化処理により、プレート表面には重量比として 5.32% の S 原子が導入された。また、スルホン化処理による S 原子の導入量は 240 分まで処理

時間に比例して増加することが確認され、240 分処理時の S 原子導入量は 15.6% に達することが明らかになった。しかし、240 分以降は飽和状態に至り、S/C 比の増加は認められなくなった。

##### 1-2. 静的接触角の変化

医用材料の生体適合性を評価する一手法として、スルホン化処理に伴うプレート表面の静的接触角の変化を追跡した。表 2 に示したように、未処理プレート表面の静的接触角は 57.0 度を示した。一方、スルホン化プレートの静的接触角は処理時間の延長に伴い低値を示すことが確認され、240 分間の処理を施したプレート表面の静的接触角は 34.7 度まで低下した。

#### (2) ヒト正常骨芽細胞に対するスルホン化プレートの機能評価

##### 2-1. 細胞増殖能に対する影響

ヒト正常骨芽細胞をスルホン化プレート上で培養した際の増殖度の変化を生細胞測定用試薬である TetraColor ONE を用いて評価した。図 2 に示したように、骨芽細胞は培養期間の延長に伴って増殖することが確認されたが、20 分、60 分及び 240 分間スルホン化処理したプレート上での増殖度は対照プレートと同様であり、スルホン化の有無及びスルホン基導入量の相違に基づく細胞増殖度の違いは認められなかった。

一方、画像解析により 1 ウェル当たりの細胞数を核数として実測した結果、図 3 に示したように、培養 1 日目の実細胞数は対照及びスルホン化プレートともに大きな差異が認められなかったが、2 日目以降ではスルホン化時間に比例して増殖率が低下することが確認された。

##### 2-2. 細胞分化能に対する影響

骨芽細胞をスルホン化プレート上で培養した際の分化能の変化を評価した。ヒト正常骨芽細胞の初期分化マーカーである ALP 活性を測定した結果、図 4A に示したように、培養 2 日目までは対照及び

スルホン化プレートともに大きな変化が認められなかったが、培養 4 日目以降における同活性はスルホン化処理により上昇することが明らかとなった。

オステオカルシンの測定結果を図 4B に示した。20 分間スルホン化したプレート上で培養した骨芽細胞のオステオカルシン産生量は対照と同等であったが、60 分間スルホン化処理したプレート上で培養した骨芽細胞では、培養 4 日目からオステオカルシン産生量が顕著に上昇した。また、240 分間スルホン化処理したプレート上で培養した骨芽細胞では比較的早期にオステオカルシンの産生誘導が起こり、培養 2 日目から産生量が有意に増加することが確認された。

図 4C に示したように、最終的な分化マーカーである Ca 産生量を測定した結果、培養 4 日目までは大きな差異がなかったが、培養 7 日目ではスルホン化処理時間に比例して顕著に上昇することが確認された。

### 2-3. 細胞の形態変化

ヒト正常骨芽細胞をスルホン化プレート上で培養した時の細胞形態を図 5 に示した。In Cell Analyzer 1000 Workstation ソフトウェアを用いて、細胞当たりの平均面積を解析した結果、培養 1 日目においては大きな変化が観察されなかったが、培養 2 日目以降はスルホン化処理時間に比例して平均面積が増加する傾向が認められた。また、In Cell Analyzer 1000 Developer Tools ソフトウェアを用いて解析した細胞当たりの平均骨格長 ( $\mu\text{m}$ ) も平均面積と同様に変化し、スルホン化処理時間に比例して増加する傾向があることが確認された。

### 3-4. 作用機構の解析

未処理プレート上で培養した骨芽細胞の遺伝子発現パターンを対照として、スルホン化プレート上で培養した同細胞の遺伝子発現状況を検討した。本実験では、対照に対するサンプルの変動を培養

時間毎に解析したと共に、培養 2 時間目の遺伝子発現パターンに基づいて対照内及びサンプル内の変動も追跡し、発現量が 2 倍以上又は 0.5 倍以下に変動した遺伝子を抽出した。これらの遺伝子中、比較グループ毎に変動率の大きい上位各 100 個の遺伝子を選択した後、成長因子に関連する 119 個の遺伝子を抽出し、その変動パターンを解析した。

スルホン化プレート上で培養した時に対照と比較して発現量が上昇する遺伝子群を表 3 に示した。初期に発現する TIS-11 ファミリーの 1 つであり、成長因子に対する応答を制御する機能を持つ ZFP36L1 の発現量が培養開始後 2 時間目に顕著に上昇した。同遺伝子はホルポールエステル TPA や EGF のようなアゴニストを誘導する機能を持ち、培養開始後 8 時間目及び 1 日目に EGF と ERBB2 遺伝子の発現が上昇した。IGFBP ファミリーの 1 つであり、IGF と結合することにより同成長因子の寿命を延ばし、細胞表面上にあるレセプターとの相互作用を変化させる機能を持つ IGFBP4 遺伝子の発現量も培養開始後 2 時間目に顕著に上昇した。IGF 関連遺伝子として、IGFBP7 と IFG2 の発現量が、それぞれ 8 時間目及び 1 日目に上昇した。また、IGF1R 遺伝子は培養時間の経過に伴い発現量が低下するが、その発現量はスルホン化プレート上で培養することにより保持されることが確認された。また、IGF1 の作用を仲介する細胞質内シグナリング分子をコードする IRS2 遺伝子の発現も対照と比較して保持されていた。増殖抑制因子として機能する TGF- $\beta$  関連遺伝子としては、ACVR1C、TGF $\beta$ 2 及び TGF $\beta$ 3 遺伝子の発現量が 8 時間目から 1 日目にかけて上昇し、BMP や TGF- $\beta$  スーパーファミリーのメンバーである GDF5 及び GDF15 がそれぞれ 4 時間目と 6 日目に上昇した。その他、VEGF チロシンキナーゼレセプターの膜結合型コレセプターをコードする NRP1 遺伝子も早期に誘導されていたと共に、転写活性化因子として機能し、成長因子により活性化される STAT2 遺伝子の発現量も培養開始後 4 時間目に上昇していた。また、CTGF に属する Wnt1 inducible signaling pathway protein をコー

ドする WISP1 遺伝子の発現も 8 時間目に上昇した。

スルホン化プレート上で培養した時に対照と比較して発現量が減少する遺伝子群を表 4 に示した。細胞の分裂促進機能や生存活性を持つ FGF1、FGF2 及び FGF5 遺伝子は培養開始後 4 時間目から 8 時間目にかけて発現量が顕著に低下した。また、TGF- $\beta$  関連遺伝子は培養初期に発現量の増加が見られたが、TGFBR2 は 1 日目、TGFBR3 は 3 日目に発現量が低下した。

スルホン化プレート上で培養した時に対照と比較して発現量が変化しない遺伝子群を表 5 に示した。多くの TGF- $\beta$  関連遺伝子の発現量は培養初期に増加し、培養中期に減少したが、TGF- $\beta$  の II 型受容体とコンプレックスを形成する TGFBR1 遺伝子はその発現量に変化が認められなかった。その他、骨形成に関与する BMP のレセプターファミリーの 1 つである BMPRII 遺伝子やヘパリンが結合した成長因子のコレセプターとして作用する SULF1 遺伝子なども発現量が変化しなかった。

#### (4) 毒性評価

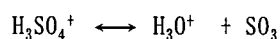
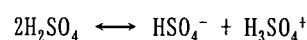
スルホン化プレート上で培養した CHL/IU 細胞の染色体異常試験の結果を表 6 に示した。同細胞に観察された染色体の構造異常の種類と数及び倍数体の数は未処理（対照）プレート上で培養した細胞と同等であり、スルホン化プレートは CHL/IU 細胞に対して染色体異常誘発性を示さないことが確認された。また、スルホン化プレートは CHL/IU 細胞に対して細胞毒性を示さないことも明らかになった（表 7）。

一方、図 6A に示したように、通常、CHL/IU 細胞は細胞が密集したコロニーを形成するが、スルホン化プレート上では各細胞が分散して増殖することが確認された（図 6B）。また、個々の細胞サイズに大きな差異はないが、スルホン化プレート上で培養した場合、巨大細胞の発現頻度が若干上昇していた。

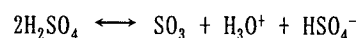
#### D. 考察

平成 19 年度の本研究では、細胞に対するスルホン基自体の影響を純粋に評価するための実験系を確立することを目的として、スルホン化プレートを作製すると共に、同プレート上でヒト正常骨芽細胞を培養した際の細胞機能の変化を経時的に評価した。

スチレン分子のスルホン化には、通常、濃硫酸のほか、発煙硫酸や三酸化硫黄ガスなどが使用されるが、本研究においては操作性及び安全性を考慮して濃硫酸を用いたスルホン化反応を選択した。細胞培養用プレートを構成するスチレン分子はオルト・パラ配向性を示し、共鳴効果により芳香環のオルト位とパラ位の電子密度が増加し易い構造を持っている。一方、硫酸は以下に示すような平衡状態にあり、 $\text{SO}_3$  種が親電子試薬となることが知られている。ポリスチレンに濃硫酸を作用させると、図 7 に示す反応機構に基づいて  $\sigma$  錯体を経て芳香族スルホン酸が得られる。



全体として、



前述したとおり、芳香環のオルト位の電子密度も増加しているが、同部位ではポリスチレンの主鎖を形成するアルキル鎖との立体障害が生じるため、パラ位が優先的に修飾を受けるものと思われる。スチレン分子のパラ位がスルホン化された際の分子中に占める S 原子の重量比は理論的に 17.4%と算出される。本研究において、ポリスチレン製プレート表面へのスルホン基の導入は 240 分間の処理により飽和に達したが、その際の S 原子の重量比は 15.6%であり、理論値と相関することが確認された。また、スルホン化時間の延長に伴うプレート表面の静的接触角の低下はスルホン基の導入により親水性が上昇することに起因する。これらの物理化学的性



質から、本研究で作製したスルホン化プレートの表面には処理時間依存的にスルホン基が導入されていることが明らかとなった。

ヒト正常骨芽細胞をスルホン化プレート上で培養すると、平均細胞面積と平均骨格長がスルホン化処理時間依存的に増加する傾向があった。また、染色体異常試験と細胞毒性試験の結果は数値的には陰性であったが、同試験に使用した CHL/IU 細胞のコロニー形態も顕著に変化した。これらの現象もスルホン基の導入に伴い、プレート表面の特性が変化したことに基づいているものと思われる。

TetraColor ONE を用いて WST-8 法により測定した増殖度はスルホン化処理により大きな影響を受けなかったが、実細胞数を測定した結果、増殖率はスルホン化処理時間に比例して減少することが確認された。TetraColor ONE は生細胞内ミトコンドリアのデヒドロゲナーゼ活性を利用して生細胞数を測定する比色定量法であり<sup>14)</sup>、原理上、生細胞数のほか、細胞活性の相違による影響を受ける。本実験において、スルホン化処理により増殖率が減少しているにも拘わらず、TetraColor ONE により対照プレートと同等の増殖活性が観察されたことから、骨芽細胞の代謝活性はスルホン化プレート上で培養することにより顕著に上昇することが示唆された。

スルホン化プレートはヒト正常骨芽細胞の分化能を顕著に増強する作用を持つことが確認されたが、スルホン基自体が同細胞に直接的な影響を及ぼしているとは考え難い。前述のように、硫酸化多糖類は BMPs、FGFs、antithrombin III や GM-CSF などと相互作用することにより細胞機能を増進させることが示唆されていることから<sup>2-6)</sup>、骨芽細胞の分化を促進するスルホン化プレートの機能も血清中に存在する何らかの蛋白質を介して発現されている可能性が高い。そこで、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、ヒト正常骨芽細胞の分化進行には IGF、EGF、TGF- $\beta$ 、BMP、PDGF などの成長因子が密接に関与していることが示

唆された。また、培養初期においては、BCL-2 蛋白質群をコードする BCL2L11 遺伝子の発現量が上昇していたことから、アポトーシスが抑制されていることも示唆された。

現在、これらの遺伝子発現情報に基づき、IPA を使用した Pathway 解析を進めている。また、スルホン化プレートに吸着する蛋白質の同定作業や同プレート上で培養したヒト正常骨芽細胞の蛋白質発現解析も進めている。今後、遺伝子解析結果と相関する蛋白質が同定され次第、候補遺伝子を決定し、RT-PCR を用いた定量解析を実施する予定である。

## E. 結論

スルホン化プレートはヒト正常骨芽細胞の分化進行を促進する機能を持つことが判明したと共に、同機能の発現には IGF、EGF、TGF- $\beta$ 、BMP、PDGF などの成長因子が密接に関与していることが示唆された。今後、同プレートに吸着される蛋白質の同定を試みると共に、骨芽細胞の分化促進機構を蛋白質レベルで検討する。

## F. 研究発表

- 1) 岡野理紗, 薮島由二, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 長谷川千恵, 松田良枝, 村松知明, 土屋利江. スルホン化プレート上で培養したヒト正常骨芽細胞の増殖・分化挙動の解析. 第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007 年 11 月・大阪).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## 参照論文

- 1) 安達伸生, 越智光夫. 組織工学的手法を用いた関節軟骨再生. 医学のあゆみ, 216(6):443-446 (2006).
- 2) Takada T, Katagiri T, Ifuku M, Morimura N, Kobayashi M, Hasegawa K, et al. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. J Biol Chem, 278:43229-43235 (2003).

- 3) Barrowcliffe TW, Johnson EA, Thomas D. Antithrombin III and heparin. *Br Med Bull*, 34(2):143-150 (1978).
- 4) Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, 64(4):841-848 (1991).
- 5) Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 252(5013):1705-1708 (1991).
- 6) Yang R, Yan Z, Chen F, Hansson GK, Kiessling R. Hyaluronic acid and chondroitin sulphate a rapidly promote differentiation of immature DC with upregulation of costimulatory and antigenpresenting molecules, and enhancement of NF- $\kappa$ B and protein kinase activity. *Scand J Immunol*, 55:2- 13 (2002).
- 7) Wakabayashi Y, Sasaki J, Fujita H, Fujimoto K, Morita I, Murota S-I, Kawaguchi H. Effects of surface modification of materials on human neutrophil activation. *BBA*, 1243:521-528 (1995).
- 8) Ito R, Seshimo F, Haishima Y, Hasegawa C, Isama K, Yagami T, Nakahashi K, Yamazaki H, Inoue K, Yoshimura Y, Saito K, Tsuchiya T, Nakazawa H. Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical devices. *Int J Pharm*, 303(1-2):104-112 (2005).
- 9) Haishima Y, Seshimo F, Higuchi T, Yamazaki H, Hasegawa C, Izumi S, Makino T, Nakahashi K, Ito R, Inoue K, Yoshimura Y, Saito K, Yagami T, Tsuchiya T, Nakazawa H. Development of a simple method for predicting the levels of di(2-ethylhexyl)phthalate migrated from PVC medical devices into pharmaceutical solutions. *Int J Pharm*, 298(1):126-142 (2005).
- 10) Isama K, Matsuoka A, Haishima Y, Tsuchiya T. Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity to fibroblast L929 and V79 cells. *Mater. Trans.*, 43:3155-3159 (2002).
- 11) Lydon MJ, Keeler KD, Thomas DB. Vital DNA Staining and Cell Sorting by Flow Microfluorometry. *J Cell Physiol*, 102(2):175-181 (1980).
- 12) John AC. Effects of Cytochlasin and Phalloidin on Actin. *J Chem Biol*, 105:1473-1478 (1987).
- 13) Souchier C, Ffrench M, Benchaib M, Catallo R, Bryon PA. Methods for cell proliferation analysis by fluorescent image cytometry. *Cytometry*, 20:203-209 (1995).
- 14) Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull*, 19(11):1518-1520 (1996).

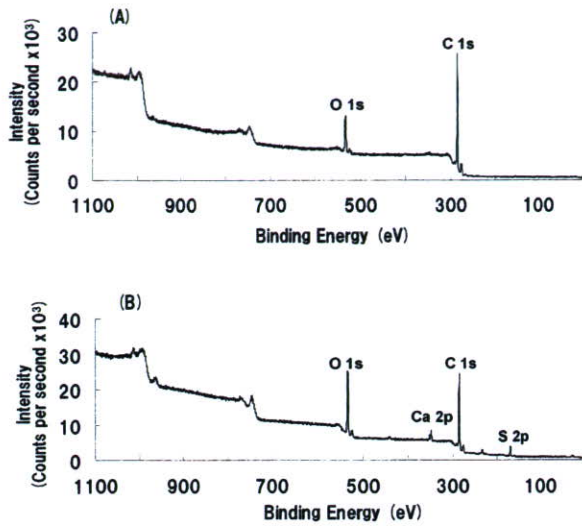


図1. ポリスチレン製細胞培養用プレート表面のXPS解析スペクトル。  
(A) 未処理プレート。(B) 240分間スルホン化処理プレート。

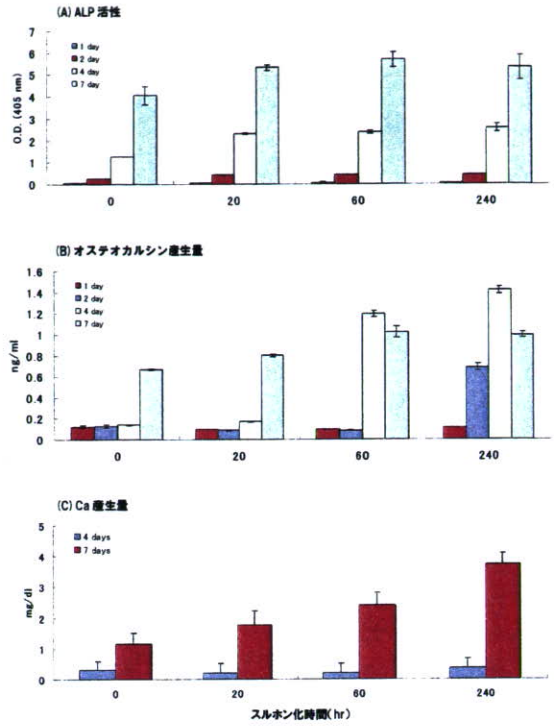


図4. スルホン化プレート上で培養した骨芽細胞の分化能の評価。  
(A) ALP活性。(B) オステオカルシン産生量。(C) Ca産生量。

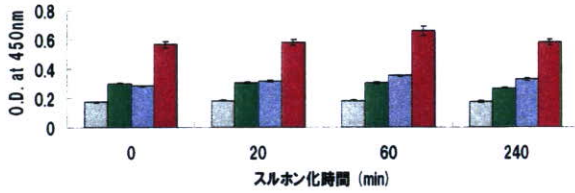


図2. スルホン化プレート上で培養した骨芽細胞の増殖度評価。  
(□) 1 day. (■) 2 days. (■) 4 days. (■) 7 days.

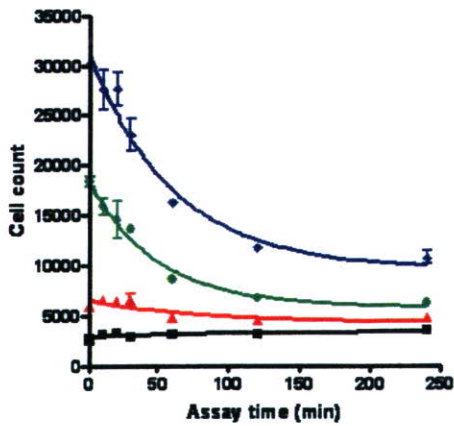


図3. スルホン化プレート上で培養した骨芽細胞の実細胞数の計測。  
(■) 1 day. (▲) 2 days. (●) 3 days. (◆) 4 days.

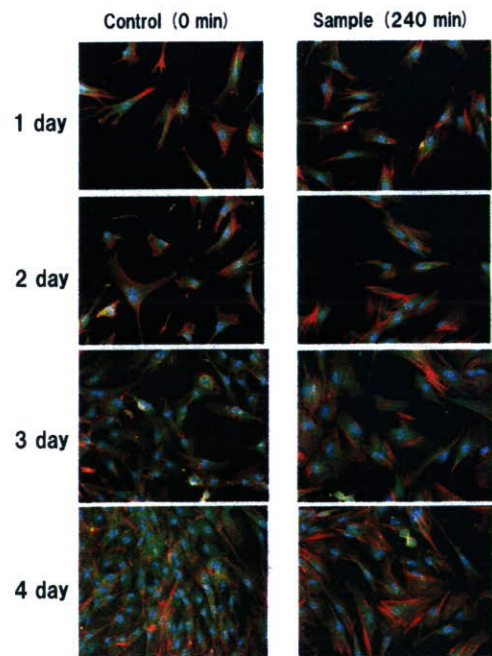


図5. スルホン化プレート上で培養した骨芽細胞の形態

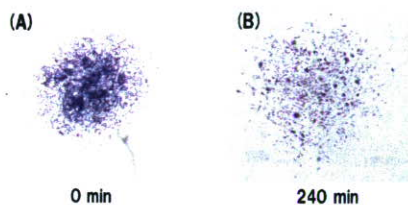


図6. スルホン化プレート上で培養したCHL/IU細胞のコロニー形態

表1. XPS解析によるスルホン化処理時間とS原子導入量の相関性

スルホン化時間 (min)	重量比 (%C)	重量比 (%S)	S/C
0	87.2	-	-
10	74.7	5.32	0.07
20	70.2	6.88	0.10
30	72.0	7.48	0.10
60	64.5	10.2	0.16
120	59.9	13.1	0.22
240	57.9	15.6	0.27
480	58.4	15.4	0.26
1440	59.0	14.5	0.25

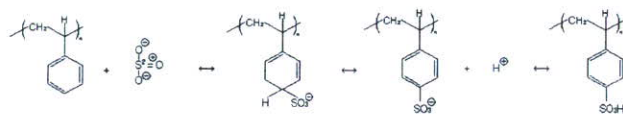


図7. ポリスチレン分子のスルホン化反応機構

表2. スルホン化処理に伴う静的接触角の変化

スルホン化時間 (min)	接触角(度)
0	57.0
10	47.7
20	43.0
30	37.8
60	32.6
120	32.6
240	34.7

表3. スルホン化プレート上での骨芽細胞培養時に発現量が増加する遺伝子群

変動パターン	2 hour	4 hour	8 hour	1 day	3 day	6 day
Control よりも早期に誘導される遺伝子	ZFP36L1	BCL2L11		PDGFRL		
	IGFBP4			GPC6		
	NRP1			ACVR1C		
Control : 変動なし Sample : 発現上昇		MAB21L2	EGF	NRP2		STAT4
			WISP1	IGF2		GDF15
			ENRP2	TGFB2		
Control : 発現減少 Sample : 変動なし		GDF5	IGF1R	ITGBL1		C5orf13
		SOCS1				IGF2BP1
		STAT2				
Control : 発現減少 Sample : 発現減少 (Control > Sample)				IRS2	JAG1	SULF1
					INHBA	SPHK1
Control : 発現減少 Sample : 発現上昇		CXCL12	TGFBR3	ERBB2	PDGFA	

表4. スルホン化プレート上での骨芽細胞培養時に発現量が減少する遺伝子群

変動パターン	2 hour	4 hour	8 hour	1 day	3 day	6 day
Control よりも早期に抑制される遺伝子	NTF3	HBEGF	NRXN3	STS-1		NFKB2
	CYR61	IL11	NGFB			EGFR
	IL1B	EREG	SGK			
	DUSP1		SOCS2			
	IL6		MET			
	SPRY2		PHLDA1			
Control : 変動なし Sample : 発現減少			LIF			HHIP
			FGF5		CD97	ANGPTL2
			BDNF		OGFR	TGFBR3
Control : 発現上昇 Sample : 変動なし						PPAP2B
			DKK1	FGF2		PAPPA
						ANGPTL2
Control : 発現上昇 Sample : 発現上昇 (Control > Sample)						IGFBP2
				SPP1	TGFBR2	SMAD6
Control : 発現上昇 Sample : 発現減少						FGF1

表5. スルホン化プレート上での骨芽細胞培養時に発現量が変動しない遺伝子群

Control 及び Sample 内で変動しない遺伝子	BMPR1B	TGFBR1	CRIM1	VEGFB	CSF1	SPRED1	GRB2
Control 及び Sample 共に発現量が上昇する遺伝子	SULF1	INSR					
Control 及び Sample 共に発現量が減少する遺伝子	NRG1						