

図 4 2 : h-CLAT - 本試験 (RFI値) -

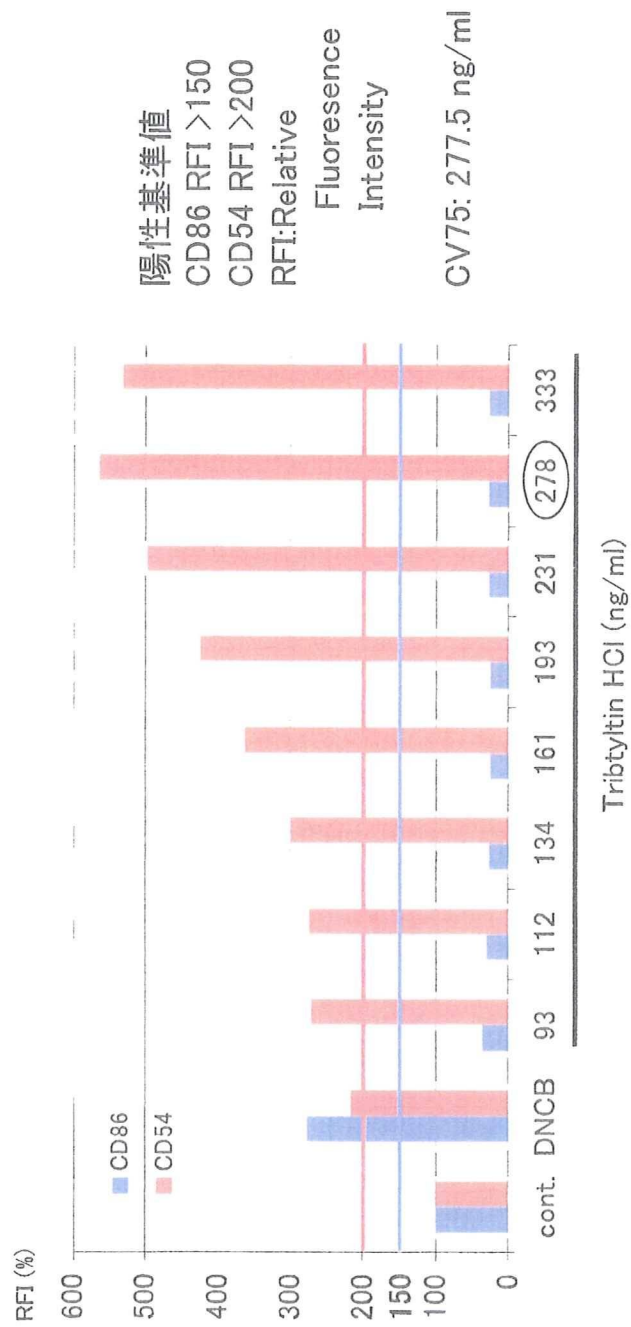


図 4 3 : LLNA

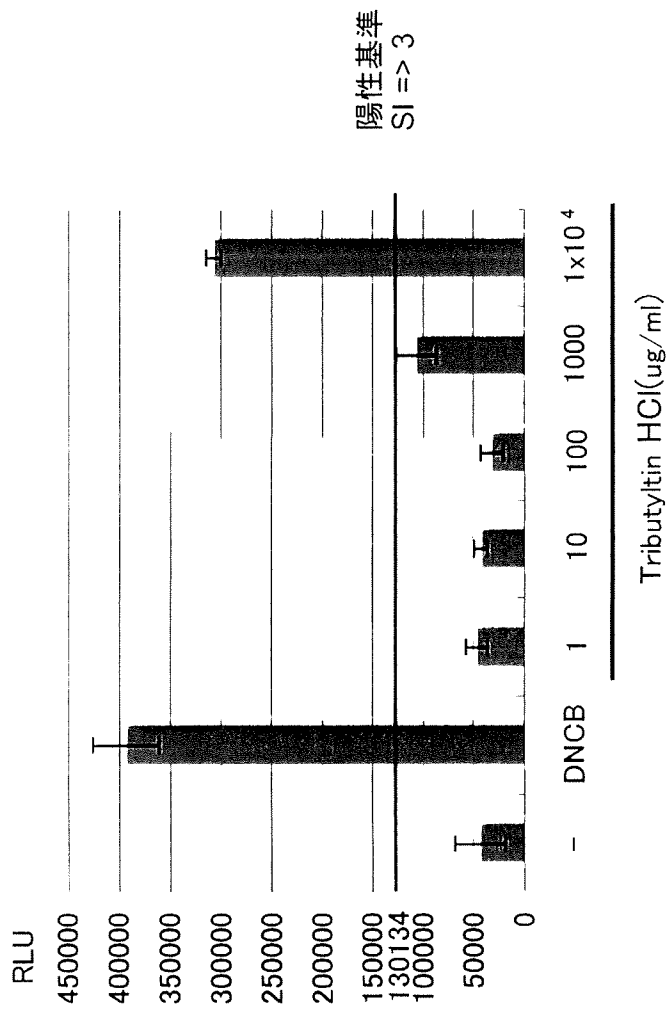


図4-4 メチル基と他の官能基から構成される2官能基モデル表面上で培養したヒト骨芽細胞の増殖挙動変化
 (細胞数は、Tetracolor One を加えて一定時間培養した後の培地の吸光度で示した)

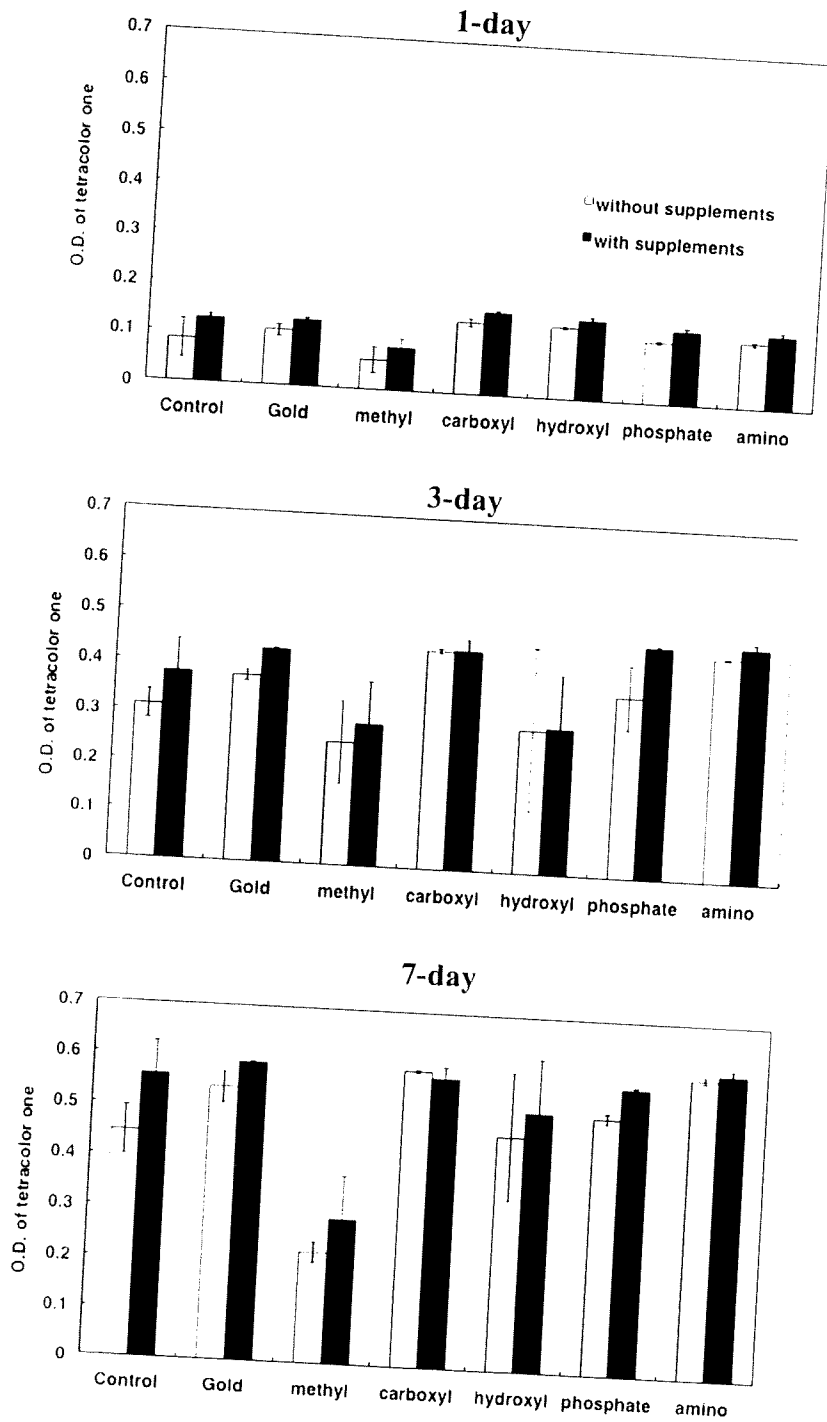


図4.5 メチル基と他の官能基から構成される2官能基モデル表面上で培養したヒト骨芽細胞のALP活性変化
 (ALP活性は、図44に示した吸光度の値を用いて規格化した値を示す)

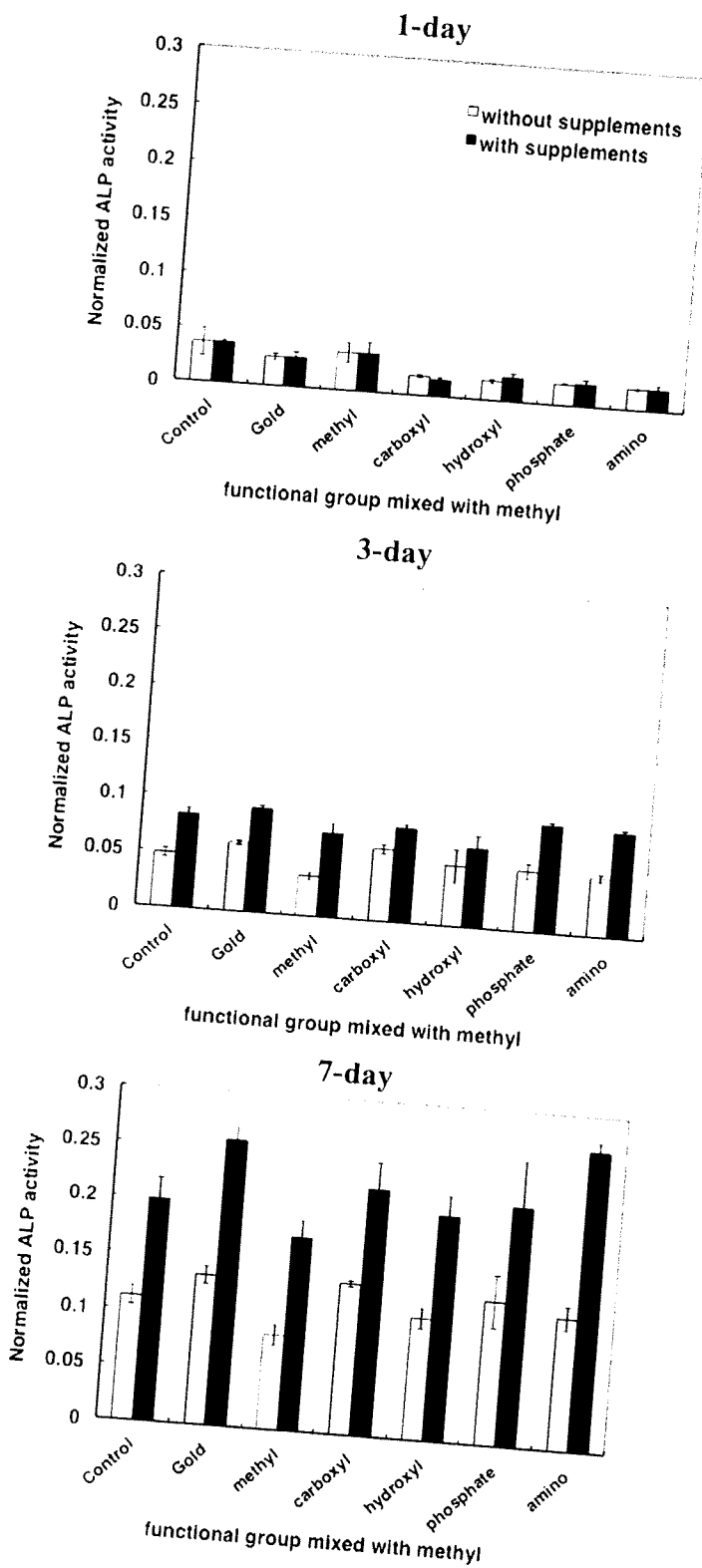


図46 種々の単一官能基表面上における代謝協同阻害試験結果

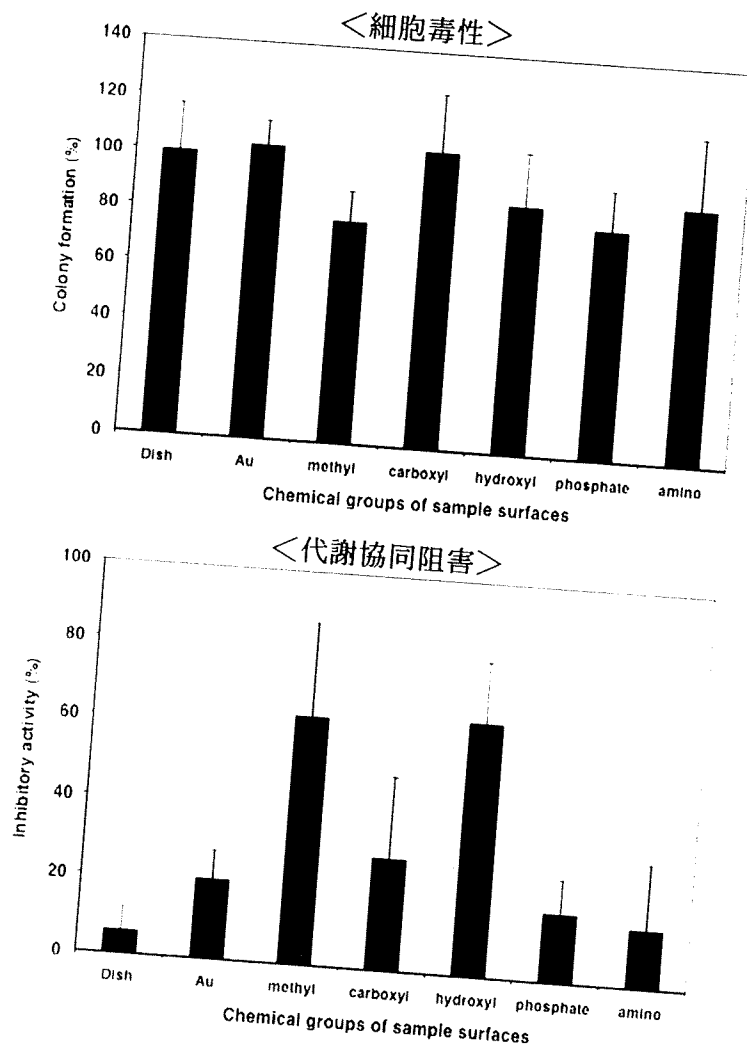


図47 単一官能基表面の接触角と接着1日後の細胞占有面積との関連性

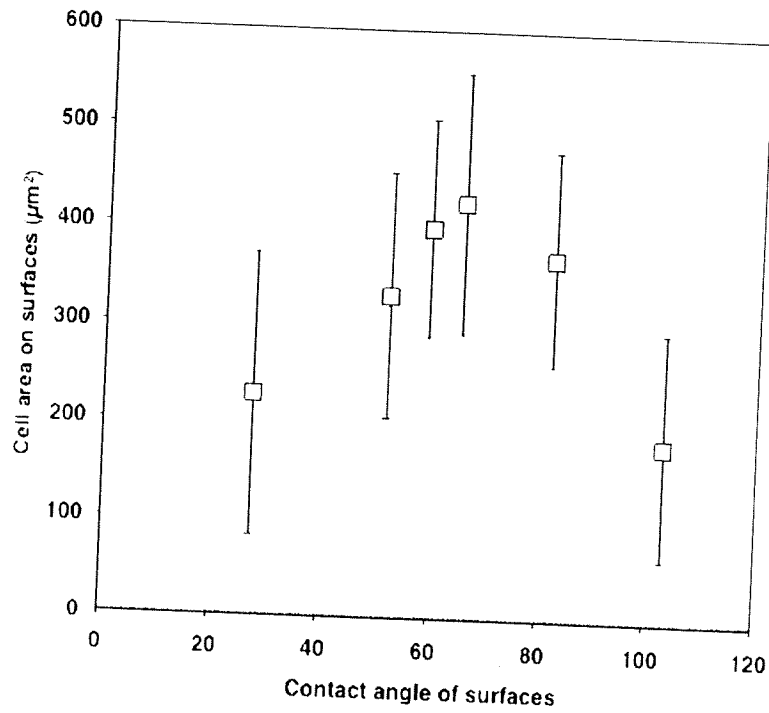


図48 単一官能基表面に接着した細胞占有面積と細胞毒性及び代謝協同阻害との関連性

(○：細胞毒性、●：代謝協同阻害活性)

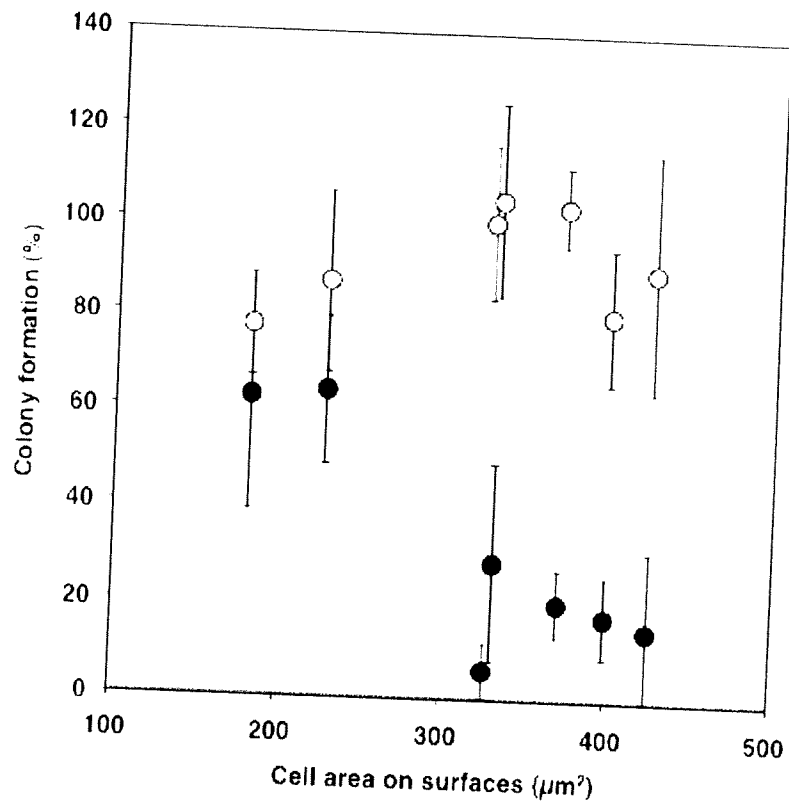
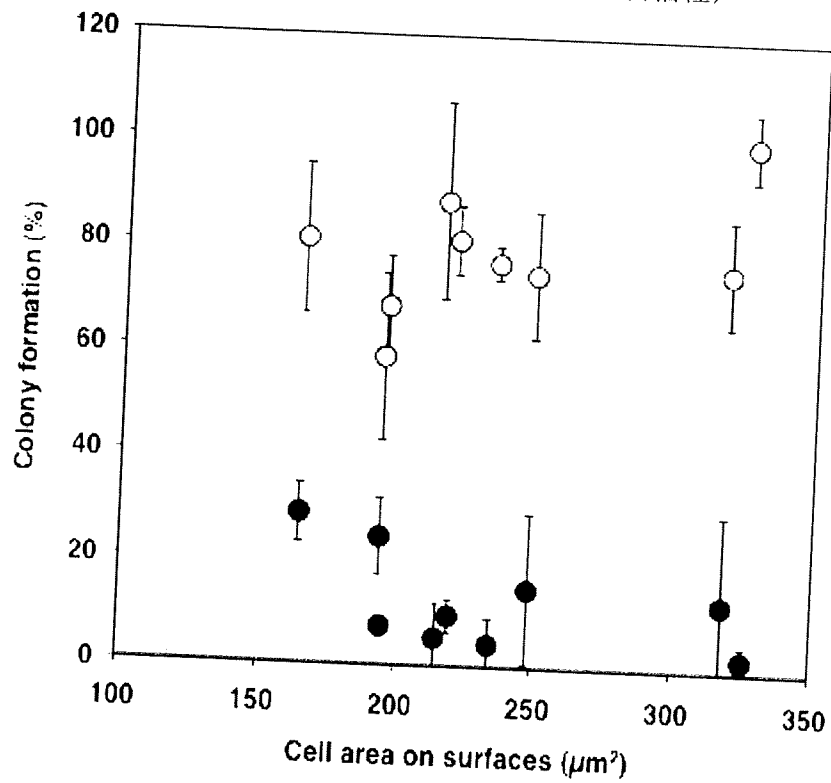


図49 メチル基と水酸基とからなるモデル表面の代謝協同阻害活性とそれらの表面上に接着した細胞の占有面積（1日後）との関連性
(○：細胞毒性。●：代謝協同阻害活性)



II 分 担 研 究 報 告

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

薮島 由二

分担研究報告書

平成 21 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	薮島 由二	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
協力研究者	松岡 厚子	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
	伊佐間和郎	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

研究要旨

本研究では、ヒト正常骨芽細胞（NH0st）に対する分化促進機能を示すスルホン化プレートをモデル材料として、医用材料の機能評価や生体適合性評価におけるプロテオミクス解析の有用性について検討している。現在までに、スルホン化プレート上で培養した NH0st 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、種々の成長因子が同細胞の分化進行に関与していることを明らかにした。また、同プレートには NH0st の分化進行と密接に関与すると思われる種々の血清蛋白質が吸着することも確認された。

平成 21 年度の本研究では、NH0st の分化促進を司る機能性蛋白質を同定するため、スルホン化プレートに吸着する蛋白質の定量解析を行った。二次元電気泳動/DeCyder 2D 解析の結果、スルホン化プレート吸着蛋白質からはウシ胎児血清蛋白質と比較して含量が 2 倍（ $p < 0.05$ ）以上増加した蛋白質が 134 スポット検出された。MS 解析の結果、134 スポット中、TETN、IBP2、CO1A1、CO1A2 を含む 129 スポットの蛋白質が同定された。同吸着蛋白質のショットガン解析を行った結果、96 種類の蛋白質が同定され、NH0st の分化促進に関与すると思われる増殖因子関連蛋白質（IGF2、IBP1-4、TGBR3）、骨代謝関連蛋白質（TETN、MIME、SPP24、VTDB）、細胞接着関連蛋白質（VASP、HABP2、CO1A2、COMP、FINC）、脂質結合性蛋白質（FABPL、PEBP1）、Toriose-Phosphate 結合性蛋白質（TPIS）の含量がウシ胎児血清蛋白質と比較して有意に濃縮されていることが判明した。また、細胞側の挙動変化を追跡するため、スルホン化プレート上で培養した NH0st の蛋白質発現解析を行い、過去に実施した遺伝子発現解析結果と比較検討した結果、細胞サイクルに関与する各種転写因子のほか、骨形成やアポトーシス等に関与する種々の蛋白質及び遺伝子発現量が培養初期から変動することを見出した。

以上、スルホン化プレートが示す NH0st の分化促進機能とプロテオミクス解析結果の間には密接な相関性が認められたことから、プロテオミクス解析は医用材料の機能や生体適合性を評価する新しい手法として非常に有益であることが示された。

A. 研究目的

医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、材料表面の物理化学的特性に大きく影響され

る。これは、医用材料が細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面（バイオインターフェース）で起こる分子間相互作用を介して機能を発揮することに由来する。医用材料を生体内に

埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体蛋白質の吸着が起こる。細胞は材料表面上で構造変化した吸着蛋白質を介して材料に接着することにより、最終的な生体反応を誘導する。すなわち、医用材料と細胞は吸着蛋白質層を介して相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。

医用材料の蛋白質吸着については、血栓形成や細胞接着等に着眼した研究が行われてきたが、材料に吸着する蛋白質の種類を網羅的に解析し、その吸着パターンから材料の機能や生体適合性を評価する研究は現在までに実施されていない。材料表面への蛋白質吸着挙動から細胞や組織に対する影響を評価する手法は材料プロテオームと呼ぶべき新しい分野のプロテオミクスとなる。プロテオミクスの技術は培養細胞や埋植材料周辺域における組織の性状変化の解析等にも利用できる。網羅的解析により特定のバイオマーカーを決定することができれば、標的プロテオミクスを利用した同マーカーの微量定量が可能となり、材料の機能や生体適合性、細胞又は組織の状態等を判断するための有益な評価手法となり得る。

そこで本研究では、近年、機能性材料の1つとして注目されているスルホン化材料の作用機序を分子レベルで解明することを通じて、プロテオミクス解析が医用材料のリスクアセスメント手法として利用できるか評価している。平成19年度に実施した予備的研究では、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プレート（スルホン化プレート）がヒト正常骨芽細胞（NH0st）に対して分化促進機能を示すことを見出した。また、

同プレート上で培養した NH0st の遺伝子発現解析を行った結果、成長因子に対する応答を制御する機能を持つ ZFP36L1 遺伝子の発現量が培養開始後 2 時間目に顕著に上昇することが確認された。その他、IGF 関連遺伝子 (IGFBP4, IGFBP7, IGF2, IGF1R, IRS2)、TGF- β 関連遺伝子 (ACVR1C, TGFB2, TGFB3)、BMP 及び TGF- β スーパーファミリー遺伝子 (GDF5, GDF15) や、NRP1, STAT2 及び WISP1 遺伝子の発現量も早期に上昇するなど、培養初期から培養後期の各段階において、種々の成長因子が NH0st の分化進行に関与していることを明らかにした。

平成 20 年度の本研究では、NH0st への影響を蛋白質レベルで解析した。スルホン化プレート吸収血清を用いた培養系では、NH0st の増殖能及び分化能ともに低下することが確認された。同プレートに吸着した蛋白質は全血清蛋白質の 0.4% 程度に相当し、二次元電気泳動解析において血清蛋白質とは明らかに異なる泳動パターンを示した。スルホン化プレートに吸着する蛋白質のショットガン解析を行った結果、成長因子関連蛋白質 (IGF2, IBP2, TFBR3)、細胞外マトリックス (COMP, HBP2, FNC, CO1A) のほか、NH0st の分化に重要な役割を果たしている TETN、MIME、骨代謝関連蛋白質として SPP24、VTDB など興味ある蛋白質が同定された。

平成 21 年度の本研究では、昨年度に同定された各種蛋白質の定量解析を行ったと共に、細胞側の挙動変化を追跡するため、スルホン化プレート上で培養した NH0st の蛋白質発現解析を行い、過去に実施した遺伝子発現解析結果と比較検討した。

B. 研究方法

(1) スルホン化プレートの調製

Wakabayashi らの報告に従い、住友ベークライト社製 (SUMILON) のポリスチレン製細胞培養用 90 φ mm シャーレ及び細胞培養用トレイ (22.5 x 22.5 cm) に濃硫酸 (和光純薬, 超微量分析用) を添加した後、37°C で 4 時間インキュベートした¹⁾。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 10 分間照射して滅菌した。

(2) ヒト正常骨芽細胞の培養

NH0st (CAMBEX, 1D, Female, 0/C) は三光純薬から購入した。培地としては、5 mM β-グリセロリン酸ナトリウム、10 nM デキサメタゾン、10% 牛胎児血清を含有する α-MEM (GIBCO) 培地を使用した²⁾。培養には、未処理及びスルホン化処理を施した細胞培養用 90 φ mm シャーレを使用し、1 シャーレ当たり 12.2×10^5 個の NH0st を播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で 24 時間培養した。

(3) スルホン化プレート吸着蛋白質の調製

スルホン化トレイに 25 ml の牛胎児血清を添加し、4°C で 24 時間緩やかに振とうした後、同血清を除去した。次いで、同プレートを氷冷した 1 mM PBS により 5 回洗浄した後、20 ml の細胞溶解液 (8M 尿素, 30mM Tris, 4% CHAPS, pH 8.5) を添加し、室温で 20 分間、緩やかに振とうした。同溶液を Corning 製 Spin-X UF (Cut Off = 5 kDa) により濃縮し、冷メタノール沈殿法により粗蛋白質画分を回収し、Sigma 社製 Chaotropic Membrane Extraction Reagent 3 (Reagent 3) に溶解後、GE 社製 2DQuant により蛋白質量を測定した。得られた粗蛋白質は GE 社製 2D

Clean-Up Kit により精製し、Reagent 3 に再溶解して蛋白質量を測定した後、試験に供するまで凍結保存した。また、ウシ胎児血清 5 ml から冷メタノール沈殿法により粗蛋白質画分を回収した後、上記の方法に従って、血清蛋白質試料を調製した。

(4) 細胞由来蛋白質の調製

スルホン化シャーレ上で培養した NH0st を常法に従ってトリプシン処理により剥離した後、冷 PBS で 3 回洗浄後、細胞数を計測した。同細胞に GE 社製 Nuclease Mix 及び Protease inhibitor Mix を含む Reagent 3 を添加し、室温で 60 分間、緩やかに振とうした。遠心分離により不溶物を除去し、2D Clean-Up Kit を用いて蛋白質を精製した後、Reagent 3 に再溶解し、2DQuant により蛋白質量を測定した。得られた蛋白質試料は試験に供するまで凍結保存した。

(5) 二次元電気泳動とスポット分取

蛋白質の蛍光標識 (Minimal labeling 法) 及び二次元電気泳動は Ettan DIGE 簡易マニュアル (GE 社製) に記載された標準プロトコールに従って実施した³⁾。

ウシ胎児血清蛋白質及びスルホン化トレイ吸着蛋白質各 50 μg を常法に従って、還元 (TBP)、アルキル化 (ヨードアセトアミド) した後、血清蛋白質は Cy3、スルホン化トレイ吸着蛋白質は Cy5 により蛍光標識した。また、等量 (各 25 μg) の両蛋白質を混合し、還元・アルキル化した後、Cy2 標識して内部標準試料とした。上記の全ての標識蛋白質を混合して試料とし、電気泳動に供した (n=3)。

一次元目の等電点電気泳動は、GE 社製

ドライストリップ (3-11NL, 24 cm) を使用して、同社製 IPGphor II により行った。回収したドライストリップは平衡化した後、二次元目の SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は、バインドシラン処理された DRC 社製低蛍光プレキャストゲル (12.5%, 20 x 26 cm) を使用し、GE 社製 DALT6 システムにより行った。

二次元電気泳動終了後、GE 社製 Typhoon 9400 により蛍光画像を取り込み、DeCyder 2D ソフトウェアを利用してデータ解析を行った後、発現量が 2 倍 ($p < 0.05$) 以上変動しているスポットを候補蛋白質としてピックアップリストを作成した。

分取用試料として、還元・アルキル化したスルホン化プレート吸着蛋白質 150 μg を CyDye 標識することなく、同スケールの二次元電気泳動に供した。泳動終了後、ゲルを固定及び DeepPurple (GE 社製) により蛍光染色し、Typhoon 9400 を使用してイメージを取り込んだ。DeCyder 2D ソフトウェアを利用して先に泳動した CyDye 標識ゲル (Cye 5 画像) とマッチングした後、ピックアップリストに従って、アズワン社製 ProHunter を用いて各スポットを超純水入りの PCR プレートに自動分取した。

(6) MS 解析用ペプチド試料の調製

6-1. In-Solution Digestion

還元・アルキル化したウシ胎児血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質 (各 50 μg) を含む Reagent 3 溶液 8 μl に 50 mM NH_4HCO_3 (87.2 μl)、プロメガ社製 ProteaseMax Surfactant (1%, 3 μl) 及び Trypsin Gold (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.8 μl) を添加し、37°C で 3 時間インキュベーションした後、10% TFA 5.25 μl を加え、室温で

5 分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドはバリアン社製 OMIX Tip (C18, 100 μl) を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant) に供して乾燥させた後、0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になるように 0.1% TFA 含有 2% アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析に供するまで 4°C で保存した。スルホン化プレート吸着蛋白質は直接、NH₄OH 由来蛋白質は TMT 標識した後、LC-MS/MS 分析に供した。

6-2. In-Gel Digestion

PCR プレートから超純水を取り除き、アセトニトリル/50mM 重炭酸アンモニウム混合液 (1:1 v/v) を各ウェルに 100 μl ずつ加え、軽く振とうした後、10 分間インキュベートした。インキュベート終了後、同溶液を除去し、新たにアセトニトリル 100 μl を加え、軽く振とうし、10 分間インキュベートした後、アセトニトリルを除去し、Speed Vac を用いて乾燥させた。

乾燥ゲルに Trypsin Gold (120 ng) 含有 0.025% Protease MAX/50mM 重炭酸アンモニウム溶液を 10 μl 添加し、シールした後、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、10 μl の 0.025% Protease MAX/50mM 重炭酸アンモニウム溶液を加えて密栓した後、軽く遠心し、37°C で一晩インキュベートした。トリプシン消化終了後、10 μl の 0.01% Protease MAX を添加し、5 分間攪拌した後、遠心上清全量を新たな PCR プレートに回収した。ゲル残渣に 0.01% Protease MAX/1% TFA 溶液を加えて攪拌し、5 分間インキュベートしてトリプシン消化反応を停止した後、得られて遠心上清を先のチューブに合わせて回収した。得られたペプチドは OMIX Tip (C18,

100 μ l) を使用して脱塩し、Speed Vac により乾燥させた後、10 μ l の 0.1% TFA 含有 2% アセトニトリルに溶解し、MALDI-TOF/TOF 及び LC-MS/MS 分析に供した。

6-3. TMT 標識ペプチドの調製

ウシ胎児血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質由来の脱塩済みペプチド試料 (各 50 μ g) を 200mM Treithylammoniu bicarvonate 100 μ l に溶解した。126 及び 127 ラベル TMT 試薬をアセトニトリル 41 μ l に溶解した後、ウシ胎児血清蛋白質由来ペプチドには 126 ラベル TMT 試薬、スルホン化プレート吸着蛋白質由来ペプチドには 127 ラベル TMT 試薬を添加し、室温下、1 時間インキュベートとして標識した。次いで、5% Hydroxylamine をそれぞれ 8 μ l ずつ添加し、室温下、15 分間インキュベートして過剰な標識試薬を失活させた後、両試料を等量ずつ混合した。混合サンプルを Speed Vac に供して、アセトニトリルを揮発させた後、脱塩処理を行った。脱塩したペプチド溶液を、再度、Speed Vac に供して乾燥させた後、0.2 μ l/ μ l の濃度になるように 0.1% TFA 含有 2% アセトニトリルを加えて溶解し、質量分析に供するまで 4°C で保存した。

(7) LC-MS/MS 解析

7-1. 1DLC-MS/MS 解析

質量分析計としては、リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計 LTQ-Orbitrap (Thermo scientific) を使用し、測定前に Tyrosine 1, 3, 6 Standard (CS Bio Co.) を用いてチューニング及び質量校正を行った。Nano-LC としては、DiNa-A オートサンプ

ラー (KYA Tech) を装備した DiNa システム (KYA Tech) を使用した。トラップカートリッジ、分析用逆相カラム及び二次元 LC 用強陽イオン交換カラムとしては、それぞれ、CERI 社製 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm)、KYA 社製 HiQ sil C18W-3 (0.1 x 100 mm) 及び KYA 社製 HiQ Sil SCX (0.3 x 35 mm) を使用した。スプレーチップとしては、PicoTip™ (FS150-20-10-D-20, NEW OBJECTIVE) を使用した。

試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.8 kV) により行った。スキャンデータ (MS スペクトル) は FT analyzer (分解能 60,000, 測定質量範囲 m/z 200-2,000, Lock mass = シロキサン, Profile mode) により取得し、XCalibur data dependent mode により、各スキャンにおけるイオン強度の高い 3 種のピークを順次選択してイオントラップにより MS/MS スペクトルを測定した (CID, Nomalized colisnnsion energy 35 kV, Activation time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。測定時間はサンプル注入 10 分後から 150 分間とし、価数判別機能を利用して 1 価イオンの MS/MS スペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1% ギ酸含有 2% アセトニトリル) と B 溶媒 (0.1% ギ酸含有 80% アセトニトリル) を使用した。流速は 300 nl/min とし、サンプル注入 (0.5-1 mg) はオートサンプラーを使用して行った。2DLC 用陽イオン交換カラムの流路は閉鎖した。一分析当たりの溶出時間は 160 分とし、サンプル注入後、脱塩ステップとして 10 分間は A 溶媒のみを送液した後、120 分かけて B 溶媒濃度を 50% まで直線的に上昇させた。その後、5 分間

かけて B 溶媒濃度を 100%まで増加させ、10 分間保持後、15 分間 A 溶媒のみを送液して流路を平衡化した。また、次ぎの分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。

分析が終了した後、得られた MS データに基づいて、後述するタンパク質解析プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェア (Thermo scientific) を使用して作成した Reject mass list を method file に登録し、同様の分析を数回繰り返すことにより、MS/MS データを取得するペプチド数を増加させた。

7-2. 2DLC-MS/MS 解析

Nano-LC の 2DLC 用強陽イオン交換カラムの流路を開放した状態でサンプルを注入して、同カラムにペプチドを吸着させた後、20 mM 重炭酸アンモニウム溶液 20 ml を送液した。同溶液により溶出するペプチドをオンラインでトラップカートリッジに吸着させた後、陽イオン交換カラムの流路を閉鎖して、1DLC-MS/MS 分析と同様の条件により、グラジエント溶出させた。但し、サンプル注入後の脱塩ステップは 25 分間とした。次いで、重炭酸アンモニウム溶液の濃度を 50 mM、80 mM、120 mM、200 mM 及び 500 mM に段階的に上昇させ、同様の分析を繰り返した。500 mM 重炭酸アンモニウム溶液による溶出は 3 回行った。なお、質量分析装置は Reject mass list の利用も含めて、1DLC-MS/MS 分析と同様に設定した。

7-3. TMT 標識ペプチドの LC-MS/MS 解析

スキャンデータを取得する FT analyzer は、分解能 30,000、測定質量範囲 m/z 350-1,200 に設定した。タンパク質同定に必要な MS/MS データは、上記と同様の data

dependent mode により、CID で測定したと共に、ペプチド定量に必要なレポーターイオンを HCD (Normalized collision energy 45 kV, Activation time 100 ms) により検出した。その他の測定条件は上記と同様に設定した。Nano-LC は 1DLC 及び 2DLC 分析ともに上記と同様の条件を設定した。

(8) MALDI-TOF/TOF 解析

脱塩済みペプチド試料 2 ml をチューブに採取し、等量の 50%アセトニトリル/CHCA (Sigma) 飽和溶液を加えて攪拌した後、同混合液 1 μ l を MALDI 測定用ターゲットの各ウェルにスポットした。質量分析装置としては、アプライド社製 ABI4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer を用いた。MS スペクトルの測定は Reflector/Positive ion mode (測定質量範囲 m/z 800-4000, 加速電圧 20 kV) で行い、CHCA 由来のバックグラウンドピークを Reject mass list に指定した Interpretation method により、イオン強度の高い上位 20 種のペプチドピークの MS/MS スペクトルを自動的に取得した。

(9) 蛋白質の同定と定量

9-1. 定性解析

LC-MS/MS 解析において得られた MS データを蛋白質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェア (Thermo scientific) にアップロードした後、MASCOT 検索ワークフローを利用してタンパク質の同定を行った。データベースとしては Swiss Prot を使用した。また、同定される蛋白質数を増加させるために行った繰り返し測定時に利用する Reject mass list も同ソフトウェアを利

用して作成した。

MALDI-TOF/TOF 解析における蛋白質の同定は MS 及び MS/MS データに基づき、アプライド社製 GPS Explore ソフトウェアを用いて行った。検索エンジンとしては MASCOT を利用し、データベースとして Swiss Prot を使用した。

9-2. Progenesis LC-MS ソフトウェア解析

非標識条件下における蛋白質の定量解析は Progenesis LC-MS ソフトウェア (Nonlinear Dynamics) を用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた MS データ (n=2) を同ソフトウェアにインストールした後、リテンションタイム補正、ノイズ除去、価数及び統計解析結果等によるフィルタリングを行った。同ソフトウェアにより作成したピーク情報を MASCOT 検索に供し、得られた情報を同ソフトウェアにインストールすることにより、蛋白質の同定と発現定量解析を行った。

9-3. TMT 標識ペプチドの定性・定量解析

TMT 標識ペプチドの LC-MS/MS 解析において得られた MS データを Proteome Discoverer ソフトウェアにアップロードした後、CID/HCD 併用 MASCOT 検索ワークフローを利用して蛋白質の同定と発現量の比較定量を行った。

(10) 遺伝子発現解析

未処理及びスルホン化プレート上で 24 時間培養した NHOst 由来の細胞内蛋白質の同定結果に基づいて、平成 19 年度に実施した NHOst の DNA チップデータを再解析した。

C. 研究結果

(1) スルホン化プレート吸着蛋白質の定性・定量解析

1-1. 二次元電気泳動解析

昨年度実施した二次元電気泳動/DeCyder 2D 解析結果 (Fig. 1A) に基づき、ウシ胎児血清蛋白質と比較して含量が 2 倍以上変動しているスルホン化プレート吸着蛋白質を分取用ゲルからピッキングリストに従って 134 スポット分取した (Fig. 1B)。MALDI-TOF/TOF 及び LC-MS/MS 解析を行った結果、Table 1 に示したように、134 スポット中 129 スポットの蛋白質が同定された。多くの蛋白質は血清中に含まれる雑多な成分であったが、TETN (11 スポット: 平均 15.9 倍)、IBP2 (4 スポット: 平均 13.5 倍)、C01A1 (2 スポット: 平均 5.8 倍)、C01A2 (1 スポット: 5.6 倍) 等、NHOst の分化促進に関与すると思われる興味ある蛋白質も同定された。

1-2. LC-MS/MS ショットガン解析

LTQ/Orbitrap を使用してスルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析を行った結果、96 種類の蛋白質が同定され、NHOst の分化促進に関与すると思われる増殖因子関連蛋白質 (IGF2、IBP1-4、TGBR3)、骨代謝関連蛋白質 (TETN、MIME、SPP24、VTDB)、細胞接着関連蛋白質 (VASP、HABP2、C01A2、COMP、FINC)、脂質結合性蛋白質 (FABPL、PEBP1)、Toriose-Phosphate 結合性蛋白質 (TPIS) 等が検出された (Table 2)。

Progenesis LC-MS ソフトウェアにより、ウシ胎児血清蛋白質を対照として含量に関する比較定量解析を行った結果、スルホン化プレート吸着蛋白質では、VASP (451 倍)、FABPL (315 倍)、IGF2 (207 倍)、TPIS (152 倍)、HABP2 (42.3 倍)、TETN (32.3 倍)、PEBP1 (20.6 倍)、C01A2 (11.2 倍)、COMP (7.72 倍)、

IBP2 (1.53 倍) が有意に濃縮されていることが判明した (Table 3)。

(2) 細胞内蛋白質の定性・定量解析

スルホン化プレート上で培養した NH0st の初期段階における細胞挙動変化を追跡するため、24 時間培養後の同細胞から蛋白質を回収してショットガン解析を行った。Reject list を使用して 1DLC 分析を 2 回繰り返した後、2DLC 分析を行って蛋白質の同定を試みた結果、低スコアの蛋白質も全て含めて、1,702 種の蛋白質が検出された。Table 4 に示すように、同定された蛋白質の中には Heat shock protein、サイトカイン・ホルモン・成長因子関連蛋白質、骨形成関連蛋白質、アポトーシス関連蛋白質、転写因子を含む細胞サイクル関連蛋白質、細胞外マトリクス関連蛋白質等、NH0st の分化進行に関与していると思われる 207 種の蛋白質が含まれていた。

TMT レポーターイオンを測定することにより、これら 207 種の蛋白質の発現変動解析を行った結果 (Table 5)、未処理プレート上で培養した NH0st 由来の細胞内蛋白質発現量と比較して、スルホン化プレート上で培養した NH0st では CH60、ANXA2、CALD1、CTND1、ENPL、XP01、XP02、CCNB3、GELS、ITB1、MIF、AT2B4、SEPT9、NEK10、SAPS3、GRP75、TLN1、TAGL、TAGL2、VDAC1 及び VDAC2 の発現量が増加し、CDC37、PA2G4、TGM2、IQGA1、RAB5A 及び 2A5D の発現量は低下する傾向にあることが確認された。各蛋白質の機能は Table 5 に記載した。

(3) 遺伝子発現解析

Table 4 及び 5 に示したように、Mascot

スコアが低く、Peptide confidence も良好でない多くの蛋白質群は検出感度の問題により、蛋白質レベルでの発現変動を確認することができなかった。そこで、平成 19 年度に行った DNA アレイ解析のデータを利用して、Table 5 に掲げた 207 種の蛋白質をコードする遺伝子の変動状況を再解析した結果、未処理プレート上で培養した NH0st と比較して、スルホン化プレート上で培養した同細胞における発現量が 24 時間以内に 2 倍以上又は 1/2 以下に変動する遺伝子は 38 種類存在した。Table 6 に示したように、NH0st の初期分化マーカーである ALPL や骨形成に直接関与する BMP1 のほか、IGF1 の取り込みに関与する EHD2、EGF と相関性を持つ NRD1、EGF レセプターの発現調整に関与する SNX1 の発現量は増加する傾向が認められた。AIFM2、GBP2、IRF6 を初めとした遺伝子群の変動結果から、スルホン化プレート上で培養した NH0st は培養初期におけるアポトーシスが抑制されていることが確認された。また、増殖抑制や分化誘導等に関与する遺伝子である KIAA1524、GSG2、PA2G4、HSP90AA1、PHB、RAB7A、STIP1 の発現量は低下すると共に、細胞増殖、分化、転写調節等の細胞サイクルに関与する ARID2、ITPR3、MAPK8、NEK11、PTPRD、SEPT2 及び SEPT9 の発現量は増加する傾向にあることが判明した。但し、増殖抑制を示す RAB11B 及び BRAB15 の発現量は増加していた。

D. 考察

平成 21 年度の本研究では、スルホン化プレートに吸着する蛋白質の定量解析を行うことにより、NH0st の分化進行に関与すると思われる機能性蛋白質の絞り込みを行った。

また、スルホン化プレート上で培養した同細胞の蛋白質発現状況を定量的に解析し、培養初期における細胞挙動を検討した。

スルホン化プレート吸着蛋白質の二次元電気泳動解析では、NH0st の分化進行に影響を及ぼすと考えられる TETN、IBP2、C01A1 及び C01A2 が有意に濃縮されていることが確認されたが、機能性蛋白質の検索に関しては LC-MS/MS を利用したショットガン解析が有益であった。また、ショットガン解析に利用する MS 装置を Paladigm MG4/QTRAP4000 から DiNa/LTQ-Orbitrap に変更することにより、蛋白質の同定数と Mascot 検索における同定精度が共に向上した。

IGF や TGF- β などの成長因子は NH0st の増殖と分化に深く関与していることが報告されており⁴⁾、スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析において、IGF 関連蛋白質 (IGF2 及び各種 IBP) と TGF- β 関連蛋白質 (TGBR3) が検出されたことは興味ある知見である。

骨代謝には様々な蛋白質が関与している。TETN は NH0st の分化初期に重要な役割を果たしている蛋白質であり⁵⁾、PLMN と親和性を持つことが報告されている⁶⁾。Thiol protease inhibitor としてシステインファミリーに分類される SPP24 は非コラーゲンの骨蛋白質であり、骨代謝の調節機能を持つことが知られている。また、VTDB は骨成長や骨リモデリングに関与する蛋白質である。

スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析では、上記の成長因子関連蛋白質、骨代謝関連蛋白質のほか、細胞外マトリクス関連蛋白質も検出されている。近年、細胞外マトリクスが細胞の増殖と分化に大きな影響を及ぼしており、コラーゲンは増

殖促進、フィブロネクチンは分化進行に関与していることが明らかになってきた⁷⁾。スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析においても C01A1、C01A2、FINC が検出されているが、その他、軟骨系細胞外マトリクスである COMP と HABP2 が同定されたことは非常に興味深い知見である。また、VASP はアクチンフィラメント形成、細胞接着、遊走のほか、インテグリン細胞外マトリクス相互作用を制御する細胞内シグナル伝達に関与する蛋白質である。

これらの蛋白質のほか、スルホン化プレート吸着蛋白質においては、TPIS や PEBP1 等が濃縮されていることも確認された。TPIS は ALPL の基質となる Toriose phosphate と親和性を持つ蛋白質であり、NH0st のアパタイト形成に間接的に関与する可能性がある。また、PEBP1 は種々の細胞内シグナル伝達に関与する Phosphatidylethanolamine と結合親和性を持つ蛋白質である。

スルホン化プレートは NH0st の分化進行を顕著に促進する機能を持つが、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。現在までに、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と共に⁸⁻¹²⁾、本研究においても、スルホン化プレートには NH0st の分化進行に深く関与すると思われる種々の蛋白質が吸着することが明らかになった。これらの知見から、スルホン化プレートが持つ NH0st の分化促進機能はバイオインターフェースに介在する蛋白質により制御されていることが容易に推察できる。

スルホン化プレート上で培養した NH0st の培養初期における細胞挙動を検

討するため、細胞内の蛋白質及び遺伝子発現解析を行った結果、骨形成、アポトーシス、転写因子を含む細胞サイクル等に関与する幾つかの蛋白質・遺伝子が変動していることが確認された。ANXA2 はアパタイト形成時、Bone matrix vecicle 内に発現する蛋白質であり、同 vecile への Ca^{2+} の取り込みと Endocytosis に関与している。AT2B4 は細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスを制御する蛋白質である。CAD11 は NH0st の分化過程において発現が増強される蛋白質であり、Ca 依存的細胞接着、骨形成、骨メンテナンスに関与している。CAD11 は蛋白質レベルでは大きく変動していなかったが、遺伝子レベルでは培養開始後 1 日目において、有意に発現量が上昇していた。CAD の機能制御に関与する CTND1 は蛋白質レベルで発現量が増加していた。ITB1 は細胞増殖、分裂、生存性、分化、アポトーシスの細胞内シグナル伝達に関与する細胞外マトリクスである。TLN1 はインテグリンと親和性を持つ蛋白質であり、細胞接着や Cell-cell contact に関与している。TAGL 及び TAGL2 の機能は未知の部分が多いが、トランスフォーメーションマーカーや平滑筋の分化初期マーカーとして知られている蛋白質である。ALPL の発現変動は蛋白質レベルでは確認できなかったが、遺伝子レベルでは培養開始後 8 時間から上昇する傾向が認められた。成長因子関連蛋白質としては BMP1、CCNB3、EHD2 及び SNX1 が同定された。EHD2 は蛋白質レベルでは変動していなかったが、遺伝子レベルでは培養開始後 1 日目における発現量が上昇していた。BMP1 及び SNX1 の発現量も遺伝子レベルで増加することが確認された。CCNB3 は TGF- β 誘導性細胞サイクル制御に関与する蛋白質

である。これらの蛋白質及び遺伝子群が細胞内で機能することにより、NH0st の分化進行が促進されているものと思われる。

アポトーシス誘導性蛋白質である AIFM2 の発現量は遺伝子レベルで低下していた。アポトーシスと正負の関係にある ATG2A 遺伝子は培養開始後 8 時間目で増加する傾向が認められた。アポトーシス抑制蛋白質である GELS 及び STAT6 と相関して抗アポトーシス機能を司る BCL2L1/BCL-X(L) 遺伝子の発現を誘導する IRF6 は共に発現量が上昇していた。BCL2-like 1 や GELS と相関してアポトーシスを制御する VDAC1 及 VDAC2 の発現量も増加していた。TNF α 、Fas ligand pathway と相関して、NF- κ B を活性化することによりアポトーシスを抑制する OPTN も遺伝子レベルで発現量も増加した。また、アポトーシス、細胞分化、マトリクスの安定化等に関与する TGM2 の発現量は低下していたことから、スルホン化プレート上で培養した NH0st は、その培養初期においてアポトーシスが抑制されていることが判明した。

スルホン化プレート上で培養した NH0st は分化進行が促進されるため、増殖率自体は低下するが、培養開始後 7 日目までは経時的に増殖する。研究結果 (2) 及び (3) 項に記載したように、増殖抑制や分化を誘導する PA2G4、増殖抑制効果を示す IQGA1、RAB5A、RAB7A、CIP2A、2A5D 及び PPP2R5C 等の発現量は蛋白質又は遺伝子レベルで低下している反面、Mitosis、細胞増殖、分化、転写調節等の細胞サイクルに関与する MAPK8、NEK10、SEPT9、GRP75、PTPRD 等の因子の発現量は上昇しており、初年度に実施した NH0st の培養実験と相関する結果が得られた。但し、増殖抑制

を示す RAB11B、BRAB15 及び SAPS3 は発現量が増加しており、スルホン化プレート上で NH0st を培養した際に認められる増殖率の低下には、分化進行の影響に加え、これらの蛋白質が関与している可能性も示唆された。

初年度に実施した遺伝子発現解析において、スルホン化プレート上で培養した NH0st では、EGF、IGF、BMP 及び TGF- β スーパーファミリーの蛋白質をコードする遺伝子群の発現が早期に誘導されることが明らかになっており、本年度に実施したスルホン化プレート吸着蛋白質及び NH0st 細胞内蛋白質の発現解析結果と相関性が認められた。また、スルホン化プレート吸着蛋白質では、抗アポトーシス作用を示すことが知られている PEDF が有意に濃縮されていたと共に、NH0st 細胞内蛋白質の発現解析においてもアポトーシスを抑制する一連の蛋白質が変動していることが判明した。初年度に実施した遺伝子発現解析においても、培養初期において 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、蛋白質及び遺伝子発現解析間に良好な相関性が認められた。

以上、スルホン化プレートが示す NH0st の分化促進機能には、同プレートに吸着する成長因子や細胞外マトリクスが深く関与していることが示唆された。また、培養初期における増殖、分化、アポトーシス等の細胞挙動変化に関する分子レベルの情報も得ることができた。今後、本研究において同定された興味ある蛋白質の絶対定量解析を行うと共に、各候補蛋白質の機能解析を行う予定である。また、分子モデリングツールを利用して、スルホン基/蛋白質間相互作用の有無についても検討する予定である。

E. 結 論

スルホン化プレートが示す NH0st の分化促進作用は同プレートに吸着される蛋白質の機能により説明できる結果が得られた。また、同プレート上で培養した NH0st の細胞挙動に関する情報も得られたことから、プロテオミクス解析は医用材料の機能や生体適合性を評価する上で有益な手法になることが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) 藪島由二, 伊佐間和郎, 長谷川千恵, 松岡厚子, 土屋利江. スルホン化材料が持つ骨芽細胞分化促進機能と材料吸着蛋白質の相関性. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会 (2009 年 11 月・京都).

参照資料

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) Ettan DIGE 簡易マニュアル: User Manual Proteomics (GE ヘルスケアサイエンス).
- 4) Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng.*, 13:2311-2320 (2007).
- 5) Iba K, Sawada N, Chiba H, Wewer UM, Ishii S, Mori M. Transforming growth factor-beta 1 downregulates dexamethasone-induced tetra-