

っていく。今年度は、医用材料として純 Ti、細胞として hMSC に着目し、骨再生医療製品等を想定して検討を行った。純 Ti 上にて hMSC を培養して DNA マイクロアレイ解析を行い、hMSC の遺伝子発現に与える純 Ti の影響について網羅的に解析した。

B. 研究方法

1. 材料

1) 純チタン (Ti) ディスク

純 Ti のディスク (直径 33.5 mm、厚さ 2 mm、表面仕上げ: Ra=0.4 程度の研磨仕上げ; ナカシマメディカル(株)) を用いた。

2) 細胞

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞: hMSC (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) を用いた。

2. hMSC の遺伝子発現へ及ぼす純 Ti の影響について

1) 細胞培養

直径 35 mm のディッシュ (IWAKI) に純 Ti ディスクを入れたものと入れていないものを用いて、それぞれに hMSC を播種し、Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地で 7 日間培養した。培養期間中 2 回培地交換を行った。

2) Total RNA の調製

7 日間培養した hMSC から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製した。

3) DNA マイクロアレイ解析

total RNA を用いて、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus

2.0 Array にて mRNA 発現を網羅的に測定した。さらに、得られたマイクロアレイデータから GeneSpring GX 11 (Agilent Technologies) を用いて統計学的、生物学的解析を行った。

4) パスウェイ解析

DNA アレイ解析による mRNA 発現の網羅的解析の結果から、Ingenuity Pathway Analysis を用いてパスウェイ解析を行った。

3. 倫理面への配慮

本研究において用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞は市販品であり、倫理的問題はないと思われる。

C. 研究結果

hMSC が純 Ti ディスク上にて正常に培養されたかを確認するために、まず hMSC の播種細胞数を 2 点取り、それぞれ 7 日間培養後の total RNA 量を測定した (図 1)。播種細胞数に依存して、total RNA 量は増加した。また、その量は通常のディッシュ上で培養した場合と同等以上であった (data not shown)。さらに、培養後純 Ti ディスクを取り除いたディッシュ上の細胞の存在を確認したが、hMSC は認められなかった。これらのことから、hMSC は純 Ti ディスク上で正常に培養できたものと考えられる。

次に、純 Ti ディスク上での培養による hMSC の mRNA 発現への影響について検討するために、DNA マイクロアレイ解析を行い、通常のディッシュでの培養時と比較検討した。純 Ti 上での培養により hMSC の mRNA 発現が変化した遺伝子数について、表 1 に示した。純 Ti 上での培養により発現レベルが 2 倍以上上昇し

た遺伝子は 262、1/2 以下に減少した遺伝子は 497、また通常のディッシュでの培養では発現していなかったが、純 Ti 上での培養により発現が認められるようになった遺伝子 (AP) が 675、反対に通常のディッシュでの培養では発現していたが、純 Ti 上での培養により発現が認められなくなった遺伝子 (PA) が 975 であった。

また、純 Ti 上での培養により発現レベルが有意に変化した遺伝子群が、それぞれの様な生体機能に関わるのかについて、表 2～5 に示した。純 Ti 上での培養により様々な生体機能に対して影響を及ぼしており、Cell Growth and Proliferation や Cell Cycle への影響が伺われた。さらに、Skeletal and Muscular System Development and Function への影響も純 Ti 上での培養により観察された。

そこで、まず Cell Cycle に関するパスウェイについて、純 Ti 上での hMSC 培養による変化について検討した。細胞周期：G1/S チェックポイントの制御について図 2 に、サイクリンと細胞周期の制御について図 3 に示した。TGF- β の上昇及びそれに伴う p16^{INK4A} の上昇が認められた (図 2, 3)。さらに、Rb 及び E2F が純 Ti での培養により発現が認められなくなっており、hMSC が純 Ti 上での培養により Cell Cycle arrest の状態となっている事がわかった (図 2, 3)。それに伴い、S 期、G2 期、M 期に関わる遺伝子の発現が全体的に下がっていることも確認された (図 3)。

次に、純 Ti 上での hMSC 培養による Skeletal and Muscular System Development and Function への関与から、骨再生に関連するパスウェイについて検討した。骨芽細胞における機能につ

いて図 4 に、破骨細胞における機能について図 5 に示した。骨芽細胞においては、純 Ti 上での培養により骨分化のマーカの一つであるアルカリフォスファターゼ活性の上昇に関与する IL-6, IL-11, OPG (osteoprotegerin ; TNFRSF11B) の上昇が見られた (図 4)。また、骨芽細胞の分化に関わる OPN (osteopontin) も上昇していた (図 4)。さらに骨格系の発達や骨芽細胞の分化に関わる BMP は、通常のディッシュでの培養では発現していなかったにもかかわらず純 Ti 上で hMSC を培養する事により発現が認められるようになった (図 4)。破骨細胞においては、破骨細胞の分化に必須とされる M-CSF、同様に破骨細胞分化に必須の転写因子である NFAT が、純 Ti 上での培養により有意に上昇した (図 5)。

D. 考察

医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験として、細胞の遺伝子発現の網羅的解析を利用して検討を行った。今年度は、医用材料として純 Ti、細胞として hMSC に着目し、骨再生医療製品等を想定して検討を行った。

純 Ti 上にて hMSC を培養して DNA マイクロアレイ解析を行い、hMSC の遺伝子発現に与える純 Ti の影響について網羅的に解析した。その結果、純 Ti 上での培養により hMSC の Cell Cycle に影響を及ぼすことがわかった。TGF- β の発現上昇が見られ、TGF- β による Cell Cycle の制御から、G1 期→S 期への移行が抑制される Cell Cycle arrest の状態である事が推察された。筆者らは、hMSC において TGF- β の発現上昇に伴う Cell Cycle

arrest は、FGF-2 により抑制されることを確認しているため (Ito T., Sawada R., Fujiwara Y., Tsuchiya T., Biochem Biophys Res Commun., 359(1), 108-114, 2007)、今回、純 Ti 上での培養による FGF シグナル経路への影響について検討したところ (図 6)、FGF や FGFR (FGF レセプター) の発現が有意に低下しており、さらにその下流の STAT3 などの複数の遺伝子が純 Ti での培養により発現が認められなくなった。このことから、hMSC の純 Ti 上での培養により、細胞増殖が止まる方向に変化していると考えられた。

また、骨再生に関連する遺伝子の発現に対し、純 Ti 上での培養が影響を与えている事がわかった。骨芽細胞の分化、破骨細胞の分化、骨格系の発達などに重要な因子の発現が純 Ti 上での培養により有意に上昇しており、hMSC が骨への分化の方向へ変化している事が示唆された。

以上の結果から、hMSC を純 Ti 上で培養する事により、細胞の増殖が止まり、hMSC が骨への分化の方向へ変化する可能性が示唆された。hMSC は骨への分化能を有する幹細胞であるが、通常の増殖用培地を用いての培養時には分化することはなく、骨への分化を誘導するための専用の培地を用いる必要がある。しかしながら、本研究においては、培地による骨分化誘導を行っていないにもかかわらず hMSC の骨分化方向への変化が認められた。これは、Ti のもつ生体内でのリン酸カルシウム (アパタイト) 形成能といった骨適合性に優れた表面特性に起因するものかもしれない。本研究において、骨再生医療製品の材料として Ti 及び hMSC を想定した際における、Ti のもつ表面特性が幹細胞へ与える作用について

の一端を明らかに出来たと考える。

Ti や Ti 合金は様々な表面処理を施す事により、より高いリン酸カルシウム (アパタイト) 形成能を獲得するといわれている。次年度は、純 Ti の表面に処理を行うことにより、hMSC への作用がどのように変化するのかについて検討していく予定である。

E. 結論

純 Ti 上にて hMSC を培養して DNA マイクロアレイ解析を行い、hMSC の遺伝子発現に与える純 Ti の影響について網羅的に解析した。その結果、hMSC を純 Ti 上で培養する事により G1 期→S 期への移行が抑制される Cell Cycle arrest の状態となり、さらに骨芽細胞分化や破骨細胞分化において重要な役割を果たす因子の発現が上昇することがわかった。このことから、hMSC を純 Ti 上で培養する事により、細胞の増殖が止まり、hMSC が骨へと分化する方向へ変化する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

澤田留美、山田貴史、土屋利江、松岡厚子「ヒト間葉系幹細胞の網羅的遺伝子発現解析 —無血清培地を用いた *in vitro* 培養期間中の遺伝子発現の変化について—」 薬学雑誌, 130(10), 1387-1393 (2010)

2. 学会発表

1) 澤田留美、手嶋英樹、庄嶋賢弘、高木

数実、田山栄基、福永周司、青柳成明、土屋利江、松岡厚子「人工心臓弁の機能不全発症に関わる遺伝子多型の探索のための SNP 解析」 第 48 回日本人工臓器学会大会 (2010.11)

2) 澤田留美、土屋利江、松岡厚子「細胞組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価—細胞の凍結保存による遺伝子発現への影響—」 第 10 回日本再生医療学会 (2011. 3)

3) 松岡厚子、澤田留美、加藤玲子「次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG の活動報告」 第 10 回日本再生医療学会 (2011. 3)

4) 藪島由二、長谷川千恵、澤田留美、松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖・分化能に及ぼすエンドトキシンの影響評価」 第 10 回日本再生医療学会 (2011. 3)

5) 土屋利江、澤田留美、石川烈、名井陽、澤芳樹「ヒト間葉系幹細胞の染色体異常および遺伝子発現に及ぼす影響因子について—コネキシン遺伝子への影響—」 第 10 回日本再生医療学会 (2011. 3)

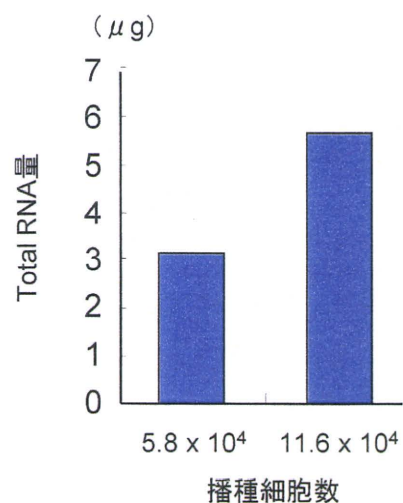


図1. hMSCを純 Ti 上にて 7 日間培養後の Total RNA 量

表1. 純 Ti 上での培養によりhMSCのmRNA発現が変化した遺伝子数

> 2 倍上昇	262
< 1/2 以下	497
AP*1	675
PA*2	975

analyzed by GeneSpring GX 11

*1 純 Ti 上での培養によりhMSCのmRNA発現が認められた遺伝子

*2 純 Ti 上での培養によりhMSCのmRNA発現が認められなくなった遺伝子

表2. 純 Ti 上での培養によりhMSCのmRNA発現が2倍以上上昇した遺伝子が関与する生体機能 (Top 5)

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Cancer	$< 4.19 \times 10^3$	102
Gastrointestinal Disease	$< 4.19 \times 10^3$	84
Immunological Disease	$< 2.99 \times 10^3$	85
Genetic Disorder	$< 4.19 \times 10^3$	164
Cardiovascular Disease	$< 4.01 \times 10^3$	85

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cellular Movement	$< 3.52 \times 10^3$	64
Cellular Growth and Proliferation	$< 4.01 \times 10^3$	94
Cell Death	$< 3.99 \times 10^3$	87
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	$< 4.04 \times 10^3$	54
Cellular Development	$< 4.25 \times 10^3$	79

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Skeletal and Muscular System Development and Function	$< 4.25 \times 10^3$	42
Connective Tissue Development and Function	$< 4.25 \times 10^3$	42
Tumor Morphology	$< 3.52 \times 10^3$	22
Tissue Development	$< 4.04 \times 10^3$	63
Cardiovascular System Development and Function	$< 3.15 \times 10^3$	36

表3. 純 Ti 上での培養によりhMSCのmRNA発現が1/2以下に減少した遺伝子が関与する生体機能 (Top 5)

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Cancer	$< 9.70 \times 10^3$	181
Gastrointestinal Disease	$< 8.03 \times 10^3$	92
Genetic Disorder	$< 5.76 \times 10^3$	88
Respiratory Disease	$< 5.76 \times 10^3$	36
Reproductive System Disease	$< 9.26 \times 10^3$	99

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cell Cycle	$< 9.99 \times 10^3$	97
Cellular Assembly and Organization	$< 9.98 \times 10^3$	66
DNA Replication, Recombination, and Repair	$< 8.66 \times 10^3$	80
Cellular Movement	$< 9.86 \times 10^3$	66
Cellular Growth and Proliferation	$< 1.04 \times 10^2$	146

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Tissue Morphology	$< 8.03 \times 10^3$	39
Skeletal and Muscular System Development and Fuction	$< 8.03 \times 10^3$	42
Connective Tissue Development and Function	$< 8.03 \times 10^3$	48
Embryonic Development	$< 8.07 \times 10^3$	44
Tissue Development	$< 8.03 \times 10^3$	40

表4. 純 Ti 上での培養によりhMSCのmRNA発現が認められた遺伝子が関与する生体機能(Top 5)

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Cardiovascular Disease	$< 3.58 \times 10^2$	134
Genetic Disorder	$< 3.58 \times 10^2$	308
Inflammatory Response	$< 3.58 \times 10^2$	35
Gastrointestinal Disease	$< 3.58 \times 10^2$	85
Inflammatory Disease	$< 2.13 \times 10^2$	152

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cellular Development	$< 3.58 \times 10^2$	69
Lipid Metabolism	$< 3.58 \times 10^2$	25
Molecular Transport	$< 3.58 \times 10^2$	41
Small Molecule Biochemistry	$< 3.58 \times 10^2$	41
Cellular Compromise	$< 3.58 \times 10^2$	19

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Nervous System Development and Function	$< 3.58 \times 10^2$	45
Endocrine System Development and Function	$< 3.58 \times 10^2$	10
Immune Cell Trafficking	$< 3.58 \times 10^2$	19
Reproductive System Development and Function	$< 3.58 \times 10^2$	17
Cardiovascular System Development and Function	$< 3.58 \times 10^2$	46

表5. 純 Ti 上での培養によりhMSCのmRNA発現が認められなくなった遺伝子が関与する生体機能 (Top 5)

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Developmental Disorder	$< 2.29 \times 10^2$	27
Ophthalmic Disease	$< 2.29 \times 10^2$	5
Genetic Disorder	$< 2.29 \times 10^2$	411
Skeletal and Muscular Disorder	$< 7.34 \times 10^3$	5
Cancer	$< 2.29 \times 10^2$	145

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cell Cycle	$< 2.29 \times 10^2$	101
Cellular Development	$< 2.29 \times 10^2$	145
Cellular Growth and Proliferation	$< 2.29 \times 10^2$	143
Cell Death	$< 2.29 \times 10^2$	168
DNA Replication, Recombination, and Repair	$< 2.29 \times 10^2$	73

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Connective Tissue Development and Function	$< 2.29 \times 10^2$	65
Reproductive System Development and Function	$< 2.29 \times 10^2$	27
Lymphoid Tissue Structure and Development	$< 8.49 \times 10^3$	10
Organ Development	$< 2.29 \times 10^2$	35
Nervous System Development and Function	$< 2.29 \times 10^2$	13

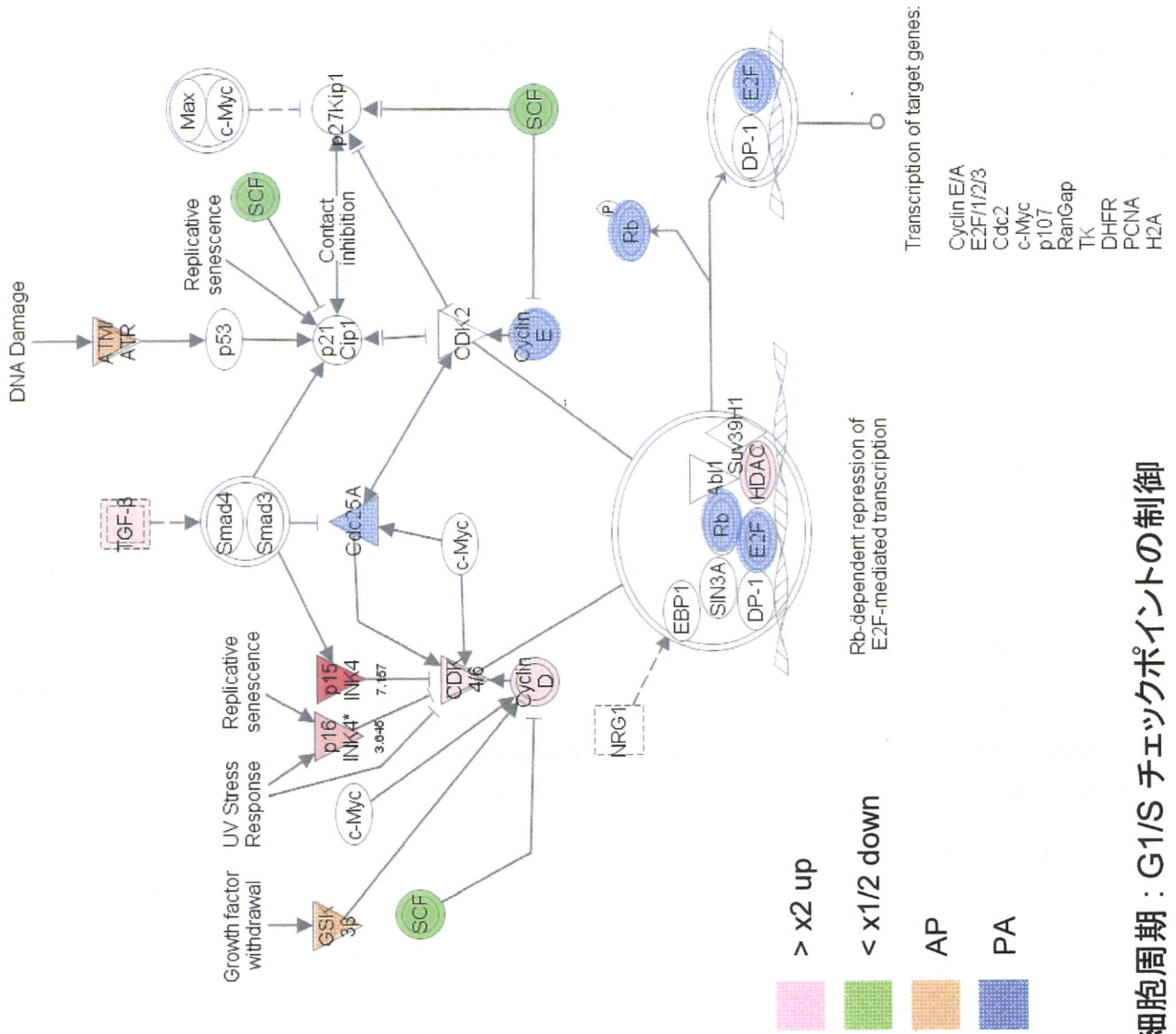


図2. 細胞周期：G1/S チェックポイントの制御

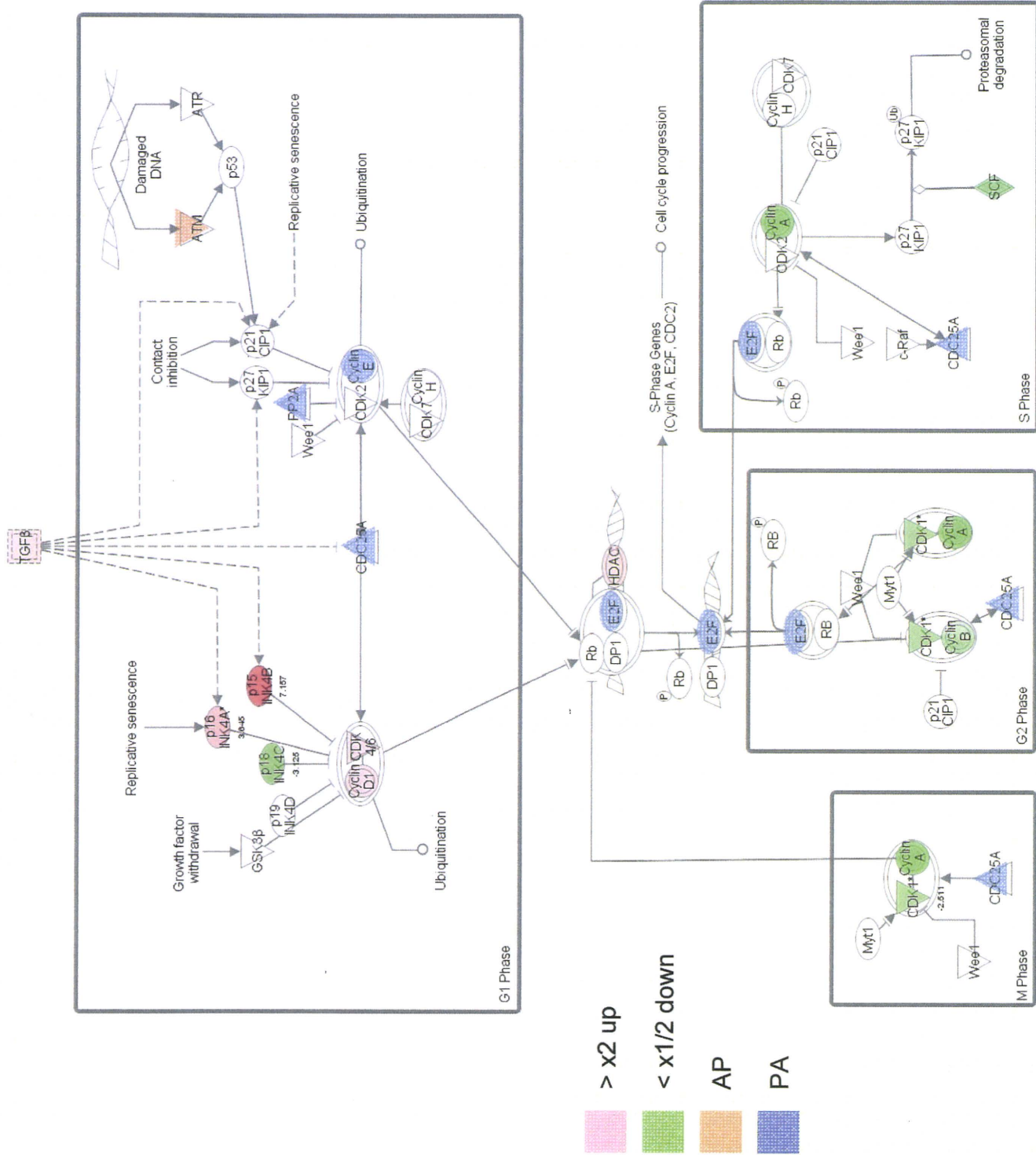


図3. サイクリンと細胞周期の制御

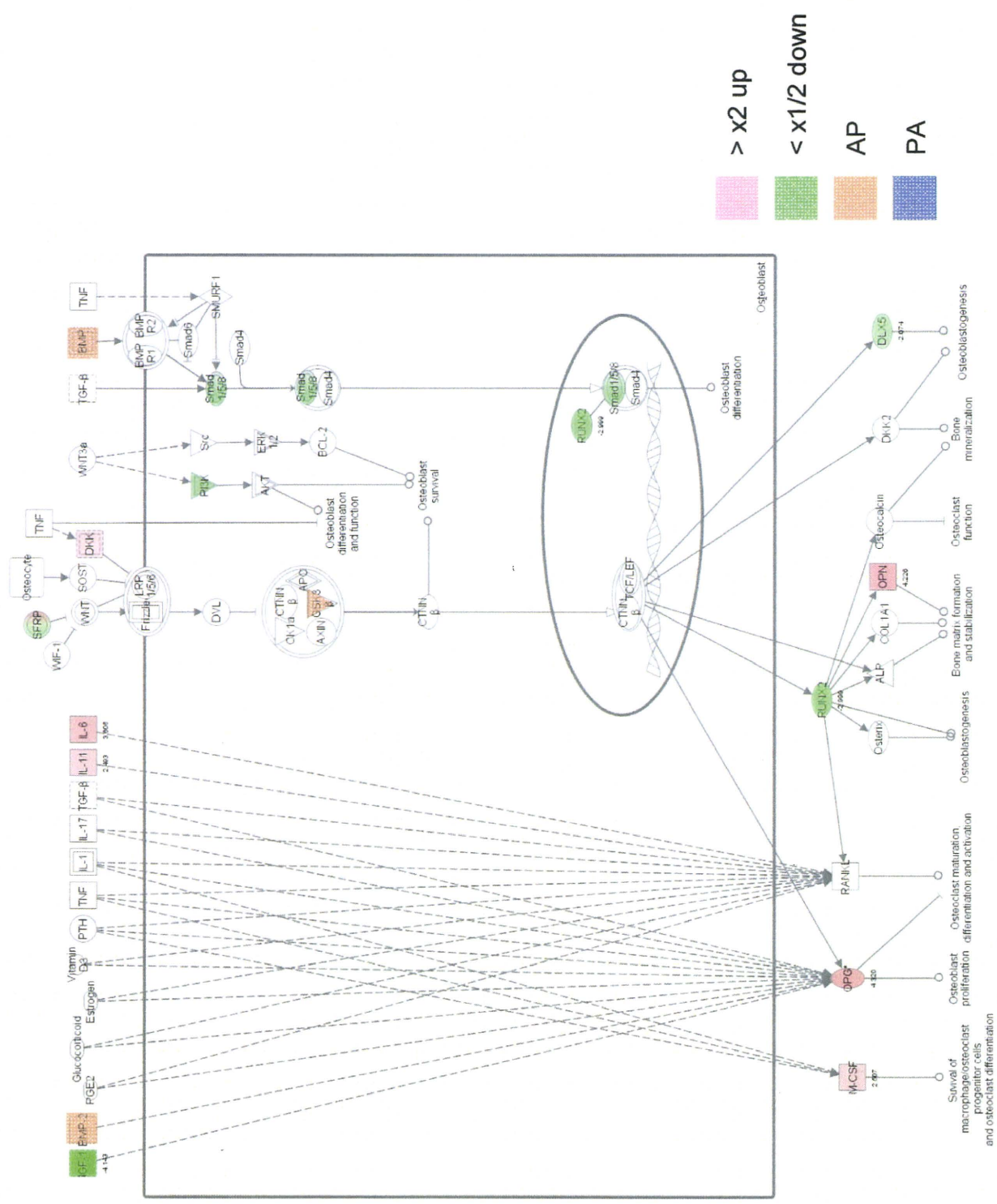


図4. 骨芽細胞の機能

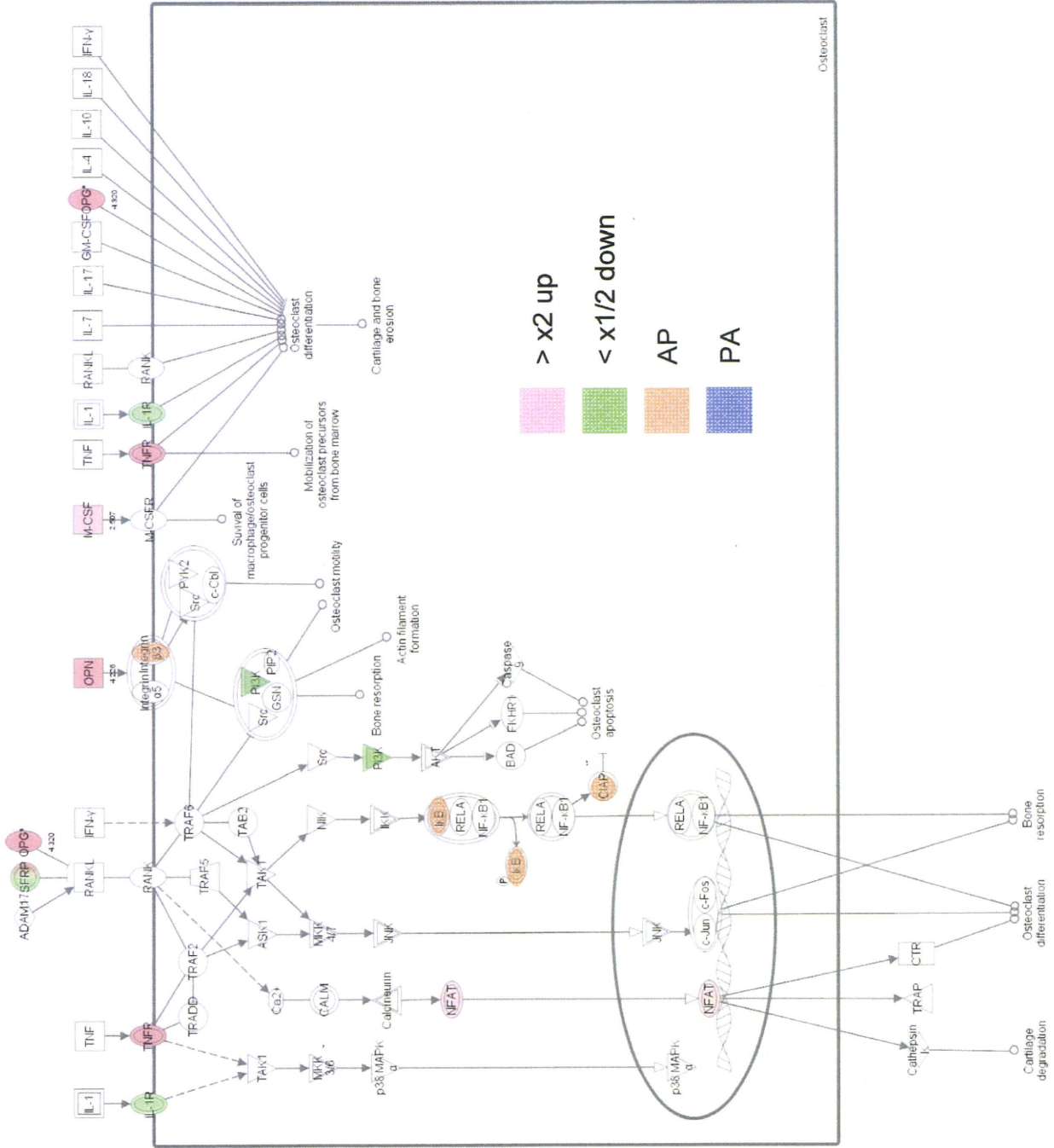


図5. 破骨細胞の機能

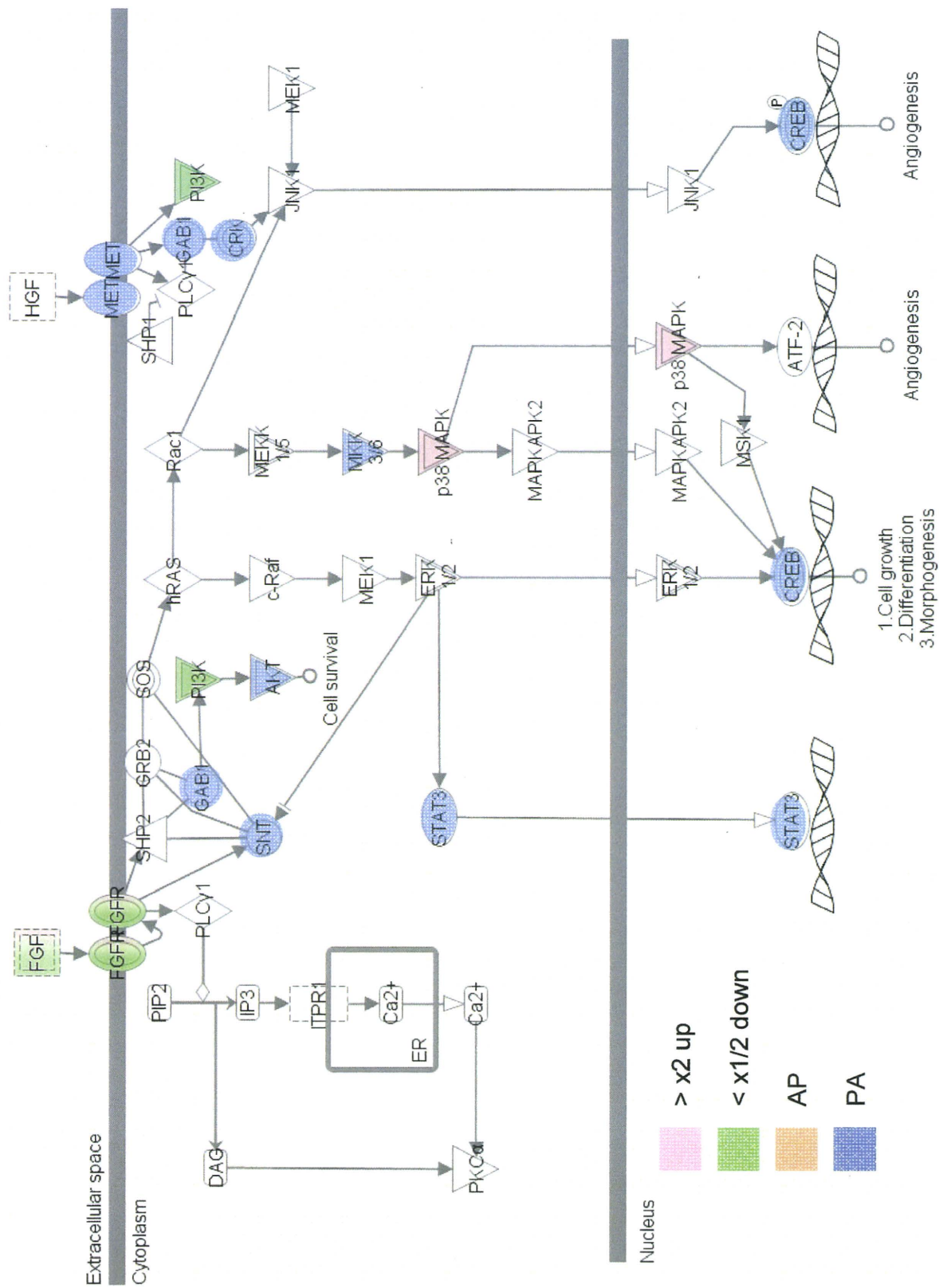


図6. FGF シグナル経路

分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
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
「材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究」

分担研究課題名
生体適合性材料の機能と生物学的特性評価に関する検証試験

研究代表者 松岡厚子 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究分担者 加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者 齋島由二 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部

研究要旨

本研究は、材料表面の違いが細胞の特性にどのような影響を与えるか、タンパク質発現の観点から検討することを目的とする。そのために、表面特性の異なる材料上で細胞を培養し、相互にタンパク質の発現の違いを比較しつつ、材料の生物学的特性との相関性を検討する。

今年度は、純チタンプレート上で培養した間葉系幹細胞 (hMSC)のタンパク質調製の検討を行い、通常の培養シャーレ上で培養した hMSC とのタンパク質の発現挙動を比較した。その結果、今回おこなったタンパク質調製法は血清由来タンパク質の混入が少なく、血清含有培地で培養した細胞のタンパク質解析用に適切な調製法であることが分かった。さらに、LC-MS/MS 解析の結果、チタンプレート上で培養した hMSC で有意に 2 倍以上発現量が高かいタンパク質が 122 個、発現量が 1/2 以下のタンパク質が 107 個あった。その内、チタンプレート上で培養した hMSC で 10 倍以上発現が高かった群 (10 個)には内皮細胞で細胞増殖を抑制すると報告のあるタンパク質が 1 個と、それ以外に細胞増殖の調節に関連すると思われるタンパク質が少なくとも 2 個含まれていた。一方、1/10 倍以下の発現しかなかった群 (7 個)には、細胞分裂に関与するタンパク質が 3 個含まれていた。これらのことからチタンプレート上では hMSC の増殖・分裂が抑制される傾向が示唆された。今後、残りのタンパク質の詳細な解析を行うと共に、様々な化学修飾をしたチタンプレート上で培養した hMSC のタンパク質の発現挙動を比較し、材料の表面特性とタンパク質発現挙動の関連性を検討する予定である。

A. 研究目的

医療機器の中でも、特に生体内に埋植されるものは、その表面がタンパク質や多糖類といった種々の生体分子や細胞と接触することになる。そのため、表面特性が異なれば、結合する生体分子の種類や量も異なり、生体適合性の違いを生み出す一因にな

ると考えられる。

一方、チタン系材料は軽量で耐食性があり、且つ生体適合性に優れていることから、主要な金属系生体材料となっている。特に、骨組織代替材料や骨組織近傍で用いられることが多い。(骨固定材、人工関節、人工歯根など) さらに、表面修飾により骨形成

能を促す研究はなされてきているが、実際に表面特性の異なる材料表面で培養された細胞の状態変化を分子生物学レベルで確認した報告はない。そこで本研究では、タンパク質発現に焦点をおいて、材料の生物学的特性と細胞の特性変化の相関性を検討する。

また、一般的な培養液中で培養した細胞からタンパク質を抽出する際、問題になるのは培養液中に含まれるウシ血清である。多量のアルブミンなど血清由来のタンパク質の混入は、目的サンプル内の微量タンパク質の同定の妨げになる。そこで今回は、まずサンプル調製の検討を行い、続いて発現解析を行った。

B. 研究方法 (図 1)

1. 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC, LONZA 社) を 6×10^3 cells/cm² の濃度で 100 mm 細胞培養用シャーレ (IWAKI 社: 底面積約 55 cm² に 3.3×10^5 cells)、もしくは細胞培養用シャーレに純チタンプレート (ナカシマメディカル社: ϕ 33.5 x 2 mm, 表面研磨仕上げ Ra 0.4) を静置した上に播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で一週間培養した。その間に培地 (MSCGM, LONZA 社) 交換を一回行った。なお、チタンプレートは ϕ 35 mm シャーレ内に静置し、底面積約 8.8 cm² と見積もり、 5.3×10^4 cells の細胞を播種した。細胞培養用シャーレと細胞数をあわせるため、同条件で 6 枚培養した。 ($5.3 \times 10^4 \times 6 = 3.18 \times 10^5$ cells)

2. タンパク質調製

細胞培養用シャーレ上で培養した細胞は

冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄、チタンプレート上で培養した細胞はチタンプレートごと、新しいシャーレに移し、冷 PBS で 6 回洗浄後、常法に従ってトリプシン処理により剥離した。その後、トリプシンの 10 倍量以上の冷 PBS で 3 回洗浄後、細胞数を計測した。同細胞を Nucleases Mix (GE Healthcare) および Protease inhibitor Mix (GE Healthcare) を含む Protein Extraction Reagent type 4 (SIGMA) に溶解した。遠心分離により不溶物を除去し、2D clean-Up Kit (GE Healthcare) を用いてタンパク質を精製した後、Protein Extraction Reagent type 4 に再溶解し、2D-Quant (GE Healthcare) によりタンパク質量を測定した。得られたタンパク質試料は試験に供するまで -80°C にて凍結保存した。

3. MS 解析用ペプチド試料の調製

上記のようにして調製したタンパク質各 40 μ g を常法に従って、還元 (リン酸トリブチル)、アルキル化 (ヨードアセトアミド) した。この溶液 10.6 μ l に 50 mM NH₄HCO₃ (94.1 μ l)、プロメガ社製 ProteaseMax Surfactant (1%, 3.3 μ l) 及び Trypsin Gold (1 mg/ml, 2 μ l) を添加し、37°C で一晩インキュベーションした後、10% TFA 5.78 μ l 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 OMIX Tip (C18, 100 μ l: VARIAN 社) を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant) に供して乾燥させた後、0.1 μ g/ μ l の濃度になるように 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 含有 2% アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析するまで 4°C で保存した。

4. LC-MS/MS ショットガン解析

質量分析計は、Thermo Scientific 社製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 XL 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及び分析用逆相カラムとしては、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) を使用した。スプレーチップとしては、KYA 社製 TI-30-150 チップを使用した。

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 30,000, 測定質量範囲 m/z 350-1, 400, 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, Normalized collision 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 90% 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 μg) はオートサンプラーを使用して行った。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、次の分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。測定の繰り返し数は $n=3$ とした。

分析終了後、得られた MS データに基づいて作成した Reject Mass List (5 参照) を Method File に登録し、同様の分析を更に 2 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。

5. タンパク質の同定と定量

5-1. Reject Mass List の作成

LC-MS/MS 解析において得られた MS データを Thermo Scientific 社製タンパク質解析プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェアにアップロードし、Mascot 検索 Work Flow/UniPort/Swiss-Prot データベースを利用してタンパク質同定を行った後、同定された全てのペプチドサーチ結果を Reject Mass List に指定した。リテンションタイムトレランスは $\pm 3-5$ 分に設定した。

5-2. 比較定量解析

タンパク質の多変量解析はメディカルプロテオスコープ社製 i-RUBY ソフトウェアを用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた全ての MS データ群 (各試料 $n = 3 \times 3$) を同ソフトウェアにインストールした後、Mascot/UniPort/Swiss-Prot データベースによるタンパク質同定、アルブミン由来ペプチドを利用したリテンションタイム補正、MS/MS スペクトル相同性に基づいたピークマッチングを行うことにより、タンパク

質の比較定量解析を行った。

6. 倫理面への配慮

研究に用いた hMSC は LONZA 社より購入しており、倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

今回のサンプル調製法により回収されたタンパク質の LC-MS/MS 解析において得られた MS データからタンパク質同定を行った結果、上位 3 個は細胞培養シャーレおよびチタンプレート上で培養した hMSC で共通しており、ビメンチン、フィラミン、ミオシンといった細胞骨格関連のタンパク質であり、血清由来のタンパク質はほとんど検出されなかった。(表 1)

さらに得られた MS データを i-RUBY ソフトウェアを用いたデータベース検索した結果、1,520 ($p < 0.05$) 個のタンパク質が同定された。この中で、チタンプレート上で培養した細胞で有意に 2 倍以上発現量が高かったタンパク質は 122 個、1/2 以下の発現量のタンパク質が 107 個あった。そのうち、10 倍以上のタンパク質は 10 個 (表 2-1)、1/10 倍以下のタンパク質は 7 個 (表 2-2) あった。チタンプレート上で培養した細胞でのみ発現がみられたタンパク質が 3 個 (collagen alpha-1(XVIII) chain(COL18A1), Interferon-induced guanylate -binding protein 1(GBP1), Transcription initiation factor TFIIID subunit 3(TAF3))、細胞培養用シャーレで培養した細胞でのみ発現していたタンパク質が 1 個 (Neuroblastoma -amplified sequence (NBAS)) あった。

D. 考察

今回、細胞内 (膜も含む) のタンパク質を解析するにあたり、培養液中の血清は解析の妨げになることが予想された。そこで血清の持ち込みを可能な限り排除するため、トリプシン処理前に冷 PBS で 3 回洗浄したが、チタンプレート培養系はチタンプレートの細胞が接着していない面への血清の付着を考慮し、さらに 3 回洗浄した。また、トリプシン処理後、通常血清入りの培地でトリプシン活性を抑制するが、今回は血清の混入を減らす為にトリプシンの 10 倍量の冷 PBS で 3 回洗浄し、トリプシンを希釈しつつ除くことでタンパク質消化を抑制した。このようにして調製したサンプル中には血清由来のタンパク質はほとんど含まれておらず、間葉系細胞に特有の中間系フィラメントであるビメンチンやアクチンおよびアクチンを制御するファラミンやミオシンといった細胞骨格タンパク質が上位にヒットしてきており、解析用に調製したタンパク質のほとんどが細胞由来であることが分かった。このことから今回実施したサンプル調製法で培養液中の血清由来のタンパク質を十分に除くことができることが示された。今後、様々な化学処理を施したチタンプレートもしくは材料表面上で培養した細胞からのタンパク質の調製に応用できる。

チタンは金属材料の中でも高い生体適合性を有し、特に骨親和性にすぐれていることから人工関節や人工歯根などの硬組織代替材料として用いられることが多い。さらに、共同研究者により表面をアルカリ処理などの化学修飾を受けることで、骨芽細胞による骨形成能が高くなることが示されてきている。今回は未処理のチタンプレート

上で hMSC を培養し通常の細胞培養用シャーレで培養した細胞とのタンパク質発現挙動の比較を行った。その結果、チタンプレート上で培養した細胞で有意に 2 倍以上発現量の高かったタンパク質は 122 個、1/2 以下の発現量のタンパク質が 107 個あった。今回は、特に発現が 10 倍以上と 1/10 倍に着目して解析した。まず、10 倍以上の発現がみられた、COL18A1 はコラーゲンの一種であるが、その C 末端断片であるエンドスタチンは内皮細胞の増殖を抑制することが知られている。また、GBP1 は内皮細胞においてインターフェロンによって発現誘導されるタンパク質であるが、内皮細胞はインターフェロンによって細胞増殖が抑制される。GBP1 と細胞増殖抑制の直接的な関連は示されていないが、GBP1 が細胞増殖抑制に関わっている可能性はある。さらに、Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4) や COP9 signalosome complex subunit 1 (GSP) も細胞増殖調節に関わるとの報告がある。さらに、1/10 以下しか発現していなかったタンパク質群には Regulator of microtubule dynamics protein 1 (FAM82B), Vacuolar protein sorting-associated protein 4A (USP4A), Titin (TTN) といった細胞分裂に関与するタンパク質が含まれていた。これらのことより、チタンプレートが細胞増殖・分裂に抑制的な影響を与えている可能性が示唆された。

一方、チタンプレート培養で全く発現が見られなかった Neuroblastoma-amplified sequence (NBAS) は神経芽細胞腫で増幅される遺伝子であるが、低身長症でミスセンス変異が確認されており、骨形成との関連が示唆されるが、そのメカニズムは不明で

ある。今回の解析から骨形成の促進に関与するタンパク質の発現が高くなっていることは見いだせなかった。ただし、同様の培養系の遺伝子発現の比較で骨形成促進に関連があると思われる遺伝子の発現の上昇が確認されているので (研究分担者澤田の項を参照)、さらに発現に変動のあるタンパク質の詳細な解析を行い、骨形成との関連を検討する一方、骨形成能以外にチタンプレートが hMSC に与える影響も検討する。

E. 結論

今回のタンパク質調製法は血清由来タンパク質の混入が少なく、血清含有培地で培養した細胞のタンパク質解析用に適切な調製法であることが分かった。

チタンプレートが hMSC の細胞増殖・分裂に抑制的に働いていることが示唆された。

今後、種々の化学処理をほどこしたチタンプレート上で培養した hMSC のタンパク質発現を比較し、且つ遺伝子の変動情報と照らし合わせながら、材料の生物学的特性との相関性を検討する。

F. 研究発表

学会発表

加藤玲子、佐藤正人、小久保舞美、持田譲治、松岡厚子 「in vitro における培養軟骨細胞の免疫応答におよぼす影響」 第 24 回日本軟骨代謝学会 (2011. 3)

材料: 純チタン(φ33.5 x 2 mm,表面仕上げは研磨仕上げRa0.4)

(対照:細胞培養用シャーレ)

細胞:ヒト間葉系幹細胞(hMSC)

培地:hMSC培養用培地(LONZA社:MECGM)

細胞培養シャーレ上で培養



チタンプレート上で培養



6 x 10³ cells/ cm²播種

↓
一週間培養

トリプシン処理前の洗浄3回

↓
細胞回収

トリプシン処理前の洗浄6回

トリプシン処理後の洗浄3回

↓
タンパク質調製

トリプシン処理後の洗浄3回



LC-MS/MSを用いて培養後の細胞中のタンパク質で
両者間で発現量に差がある分子を同定

図1 実験の流れ

表1: MS解析による上位ヒットタンパク質
細胞培養シャーレ上で培養(左表)・チタンプレート上で培養(右表)

Protein name	Score	Coverage
Vimentin	1998.56	59.66
Filamin-A	1706.59	19.98
Myosin-9	1459.57	20.77
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1029.07	43.13
Alpha-actinin-1	1021.42	30.61
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	977.09	15.91
Lamin-A/C	890.85	39.76
Talin-1	807.21	10.67
Alpha-enolase	784.96	38.48
Tubulin beta-2A chain	719.67	41.57

Protein name	Score	Coverage
Vimentin	1887.38	57.30
Filamin-A	1569.79	19.98
Myosin-9	1383.16	22.60
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	1335.47	20.90
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1079.06	41.62
Alpha-actinin-1	1015.83	34.19
Lamin-A/C	913.55	39.46
Talin-1	879.36	11.33
Plectin-1	850.74	7.09
Alpha-actinin-4	804.04	31.72

Score: Mascot score

Coverage: タンパク質の全長の何%カバーしているか