

図3 擬似体液浸漬3日目までのカルシウム量及びリン量の推移

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  
遺伝子発現の網羅的解析を利用した  
医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験

研究分担者 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
研究協力者 河野 健 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

研究要旨

優れた骨適合性を持つといわれているチタン (Ti) と、その採取技術及び培養技術も確立されておりすでに幅広い再生医療分野での臨床研究にて利用されているヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いて骨再生医療製品を想定し、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、純 Ti にアパタイト形成能を付与するために化学処理を施して純 Ti 表面にカルシウムイオンを導入することによって、純 Ti 上で培養した hMSC の遺伝子発現に与える影響について、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、純 Ti 表面にカルシウムイオンを導入することにより hMSC の Wnt シグナル伝達経路 ( $\beta$ -カテニンを介した経路では Wnt, Frizzled, LRP5/6, Axin, APC 等、 $Ca^{2+}$ シグナル経路関連では NFAT 等) が活性化され、さらに骨形成に関与する因子 (BMP, OPN, osteocalcin) などの発現が誘導または上昇する事を見出した。またそれは、純 Ti 表面へのカルシウムイオン導入量やアパタイト形成能の増加に依存する可能性が示唆された。

A. 研究目的

チタン (Ti) 及び Ti 合金は、耐食性、低アレルギー性などの優れた生体適合性を持つ事が知られ、さらに他の金属系バイオマテリアルにはない特性として骨と直接結合するという性質を有している。Ti の表面特性として、生体内において Ti 表面にはアパタイト相が形成され、このアパタイト形成速度は、他の金属系バイオマテリアルよりも速く、Ti の優れた骨

適合性の一因とされている。このため、人工骨や歯根などの医用材料として広く利用されている。

一方、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) は、骨、軟骨、脂肪、筋肉などへの分化能を持つ細胞であり、さらに神経細胞や肝細胞、心筋、皮膚など胚葉を越えた分化も可能なため幅広い再生医療分野での臨床研究にてすでに利用されている。また、その採取技術及び *in vitro*

での培養技術も確立されていることから、間葉系幹細胞は細胞組織医療機器の材料として現段階で最も実用に近いものの一つであると考えられる。

本研究では、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、遺伝子発現の網羅的解析を利用して検討を行っている。昨年度は、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た検討として、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を見出した。骨再生医療製品への応用を考えた場合、材料のアパタイト形成能は重要な要素のひとつと考えられる。そこで今年度は、純Tiにアパタイト形成能を付与するために化学処理を施して純Ti表面にカルシウムイオンを導入することによってhMSCの遺伝子発現に与える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 (Lonza) を用いた。

### 2. 材料の表面処理

#### 1) NaOH 処理

純Tiディスクをポリプロピレン製遠沈管に入れ、5mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液(和光純薬(株))を100mL加えて、60°Cで24時間静置した。

#### 2) CaCl<sub>2</sub> 処理

NaOH処理後の純Tiディスクを蒸留水50mLで4回洗浄後ポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.1mol/Lの塩化カルシウム水溶液を100mL加えて、60°Cで24時間静置した。

#### 3) Ca(OH)<sub>2</sub> 処理

NaOH処理後の純Tiディスクを蒸留水50mLで4回洗浄後ポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.01mol/Lの水酸化カルシウム水溶液を100mL加えて、60°Cで24時間静置した。

### 3. hMSCの遺伝子発現へ及ぼす純Ti表面処理の影響について

#### 1) 細胞培養

直径35 mmのディッシュ(IWAKI)に3種類の表面処理を行った純Tiディスクまたは表面未処理の純Tiディスクを入れて、それぞれにhMSCを播種し、Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM; Lonza)にMesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS; Lonza)を加えた培地(MSCGM)で7日間培養した。培養期間中2回培地交換を行った。

#### 2) 細胞の形態観察

それぞれの純Tiディスク上で培養したhMSCを、5μM CellTracker (Lonza)を添加した培地(血清無添加のMcCoy's medium)で37°C、30分間培養し、その後培地をMSCGMに取替えてさらに30分間培養した。培養後の細胞をPBS(-)で

1 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドにて室温 15 分間で固定後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### 3) Total RNA の調製

それぞれの純 Ti ディスク上で 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。

### 4) DNA マイクロアレイ解析

それぞれの 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。

### 5) 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 (IPA) を用いてパスウェイ解析を行った。

## 4. 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

表面に 3 種類の化学処理を施した Ti 上で 7 日間培養した hMSC の形態について、図 1 に示した。NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理では、未処理と比べて hMSC の形態に大きな変化は見られなかったが、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理においては、細胞の大きさや広がりにも多少の変化が見られた。

次に、純 Ti ディスクの表面処理が hMSC の mRNA 発現への影響について検討するために、表面を 3 種類の化学処

理を施した純 Ti ディスク上で hMSC を培養した後 DNA マイクロアレイ解析を行い、表面未処理の純 Ti ディスク上での培養時と比較検討した。純 Ti ディスク表面の様々な化学処理により hMSC の mRNA 発現レベルが変化した遺伝子数について、表 1 に示した。純 Ti の表面処理により発現レベルが 2 倍以上上昇した遺伝子は NaOH 処理で 104、CaCl<sub>2</sub> 処理で 133、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理で 219、1/2 以下に減少した遺伝子は NaOH 処理で 296、CaCl<sub>2</sub> 処理で 99、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理で 146、また純 Ti の表面未処理の場合は発現していなかったが、表面の化学処理により発現が認められた遺伝子 (AP) は NaOH 処理で 1240、CaCl<sub>2</sub> 処理で 1397、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理で 1409、反対に表面未処理の場合は発現していたが、表面の化学処理により発現が認められなかった遺伝子 (PA) は NaOH 処理で 1566、CaCl<sub>2</sub> 処理で 1235、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理で 1244 であった。

また、純 Ti 表面の化学処理により hMSC の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、IPA にて解析した結果を表 2～5 に示した。純 Ti 表面の化学処理により様々な生体機能に関わる遺伝子発現に対して影響を及ぼしており、Cell Growth and Proliferation や Cell Cycle、また Cellular Development や Movement といった細胞の増殖や発達に関わる機能への影響、さらに、Skeletal and Muscular System Development and Function、Connective Tissue Development and Function 等の骨形成や骨の発達に関わる機能への影響が観察された。

そこで、それぞれの純 Ti ディスク上で

培養した hMSC の骨形成や骨の発達に関わる遺伝子発現への純 Ti 表面の化学処理の影響について調べるために、骨再生に関連するパスウェイについて検討した。骨芽細胞及び破骨細胞における機能について、それぞれ純 Ti 表面の 3 種類の化学処理の影響について未処理のものと比較した。

まず、純 Ti 表面の NaOH 処理の影響について、骨芽細胞の機能に関しては図 2 に、破骨細胞の機能に関しては図 3 に示した。骨形成に関わるシグナル伝達系のひとつである Wnt シグナリングにおける Wnt 及びその細胞表面受容体 Frizzled、さらにその下流の Wnt シグナル伝達経路の様々な構成分子を結合させる足場タンパク質である Axin や APC (adenomatous polyposis coli) の mRNA 発現が、未処理の場合には認められなかったのに対し純 Ti 表面の NaOH 処理によって発現が誘導された (図 2)。そして、破骨細胞形成抑制による骨形成促進に関わる OPG (osteoprotegerin) の遺伝子発現が NaOH 処理により 2 倍以上上昇した (図 2)。さらに、破骨細胞分化の制御に関与する NFAT (nuclear factor of activate T cell) の遺伝子発現も誘導された (図 3)。

次に、Ti 表面の  $\text{CaCl}_2$  処理の影響について、骨芽細胞の機能に関しては図 4 に、破骨細胞の機能に関しては図 5 に示した。NaOH 処理の際にみられた変化に加えて、間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化する過程や石灰化ならびに骨形成に関与するタンパク質である BMP (bone morphogenetic protein)、同様に骨芽細胞への分化に関与する IGF-1 の遺伝子発現が、純 Ti 表面の  $\text{CaCl}_2$  処理によって誘導された (図 4)。また、骨芽細胞への分

化に関与する OPN (osteopontin) の遺伝子発現が  $\text{CaCl}_2$  処理により 2 倍以上上昇した (図 4)。さらに、OPN の発現上昇に伴い integrin  $\beta 3$  の発現も誘導された (図 5)。また、 $\text{CaCl}_2$  処理によっても NFAT の遺伝子発現が誘導された (図 5)。

次に、純 Ti 表面の  $\text{Ca(OH)}_2$  処理の影響について、骨芽細胞の機能に関しては図 6 に、破骨細胞の機能に関しては図 7 に示した。Wnt 及び受容体 Frizzled に加えて Frizzled の共役受容体である LRP5/6 の遺伝子発現が、純 Ti 表面の  $\text{Ca(OH)}_2$  処理によって誘導された (図 6)。さらに破骨細胞分化因子である RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) の遺伝子発現が  $\text{Ca(OH)}_2$  処理によって誘導された (図 6, 7)。また、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化のマーカーとなる osteocalcin の遺伝子発現が、 $\text{Ca(OH)}_2$  処理により 2 倍以上上昇した (図 6)。また、 $\text{Ca(OH)}_2$  処理によっても NFAT の遺伝子発現が誘導された (図 7)。

NFAT について、表面処理による遺伝子発現レベルへの影響について比較したところ、発現レベルは NaOH 処理 <  $\text{CaCl}_2$  処理 <  $\text{Ca(OH)}_2$  処理の順で上昇する傾向が見られた (図 8)。

#### 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。医用材料として純 Ti、細胞として hMSC を用いて骨再生医療製品等を想定し、今年度は純 Ti 表面に化学処理を施してカルシウムイオンを導入することにより、純 Ti 上で培養した hMSC の遺伝子

発現に与える影響について調べた。

純 Ti 表面の化学処理により、未処理に比べて、hMSC の遺伝子の発現レベルが2倍以上もしくは1/2以下に変化した遺伝子数よりも発現の有無に変化が見られた遺伝子数の方がはるかに多く（表1）、純 Ti の表面処理がその上で培養した hMSC において発現する遺伝子の種類を変化させたことがわかった。

Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達経路は骨芽細胞の分化に深く関わっており、体内の骨量調節にとって重要なシグナル経路である。さらに Wnt タンパク質が骨芽細胞を成熟した骨細胞へ促すだけでなく、未分化の間葉系細胞から骨芽細胞への分化にも必要である可能性も示されている。本研究において、純 Ti 表面の NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理によって  $\beta$ -カテニンを介した Wnt のシグナル経路に関わる Wnt、その細胞表面受容体である Frizzled、そして Wnt シグナル伝達経路の様々な構成分子を結合させる足場タンパク質である Axin や APC の遺伝子発現が誘導された（図2,4）。Ca(OH)<sub>2</sub> 処理ではさらに、Frizzled の共役受容体である LRP5/6 の遺伝子発現までも誘導された（図6）。一方、Wnt に関連するシグナル伝達経路には  $\beta$ -カテニン非依存性の経路もあり、細胞内の Ca<sup>2+</sup> の上昇が関連する Ca<sup>2+</sup> シグナル経路がその一つであるが、これは NFAT による破骨細胞分化の制御に関係している。本研究において、純 Ti 表面の化学処理によって hMSC の NFAT 遺伝子の発現が誘導された（図3,5,7）。以上の結果から、純 Ti 表面にカルシウムイオンを導入することにより hMSC の Wnt シグナル伝達経路が活性化されることが示唆された。

さらに、CaCl<sub>2</sub> 処理によって間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化する過程や石灰化ならびに骨形成に関与するタンパク質である BMP や同様に骨芽細胞への分化に関与する IGF-1 の遺伝子発現が誘導され、骨芽細胞への分化に関与する OPN の遺伝子発現が純 Ti 表面未処理に比べて2倍以上上昇した（図4）。Ca(OH)<sub>2</sub> 処理では、上記に加えてさらに破骨細胞分化因子である RANKL の遺伝子発現が誘導され（図6,7）、また、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化の後期で細胞が石灰化する時に高いレベルで発現する osteocalcin の遺伝子発現が、純 Ti 表面未処理に比べて2倍以上上昇した（図6）。また、破骨細胞分化の制御に関与する NFAT の遺伝子発現レベルは NaOH 処理 < CaCl<sub>2</sub> 処理 < Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の順で上昇する傾向が見られた（図8）。以上の結果から、純 Ti にアパタイト形成能を付与するために化学処理を施して純 Ti 表面にカルシウムイオンを導入することにより、hMSC の骨芽細胞への分化や骨形成に関わる遺伝子の発現が誘導または上昇していることがわかった。

また、伊佐間らの報告<sup>1)</sup>によると、純 Ti 表面の化学処理によるカルシウムイオン導入量は未処理 = NaOH 処理（ほとんどなし） < CaCl<sub>2</sub> 処理 < Ca(OH)<sub>2</sub> 処理であり、さらに表面処理後の純 Ti を擬似体液に浸漬後のアパタイト形成能は、未処理（ほとんどなし） < NaOH 処理  $\leq$  CaCl<sub>2</sub> 処理 < Ca(OH)<sub>2</sub> 処理であった。これらのことから、純 Ti 表面へのカルシウムイオン導入量やアパタイト形成能の増加に依存して、Wnt シグナル伝達系の活性化や骨形成に関する転写因子などの発現誘導や上昇が起こることにより hMSC の骨分

化反応が高められている可能性が示唆された。本研究において、骨再生医療製品の材料として Ti 及び hMSC を想定した際の、カルシウムイオン導入という Ti 表面特性の変化が幹細胞の遺伝子発現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。

#### E. 結論

純 Ti にアパタイト形成能を付与するために化学処理を施して純 Ti 表面にカルシウムイオンを導入することによって hMSC の遺伝子発現に与える影響について、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、純 Ti 表面にカルシウムイオンを導入することにより hMSC の Wnt シグナル伝達経路 ( $\beta$ -カテニンを介した経路と  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル経路) が活性化され、さらに骨形成に関する転写因子などの発現が誘導または上昇する事を見出した。またそれは、純 Ti 表面へのカルシウムイオン導入量やアパタイト形成能の増加に依存する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

- 1) 澤田留美、松岡厚子「チタンディスク上で培養したヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現に関する網羅的解析」 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11)
- 2) R. Sawada, Y. Haishima, K. Isama, A. Matsuoka; Effect of surface-modified titanium by chemical treatment on the gene expression profile in osteogenic differentiation of human mesenchymal

stem cells, SOT's 51st Annual Meeting (2012.3)

##### 参考文献

- 1) 伊佐間和郎「アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析」平成22年度総括・分担研究報告書 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 p47-57

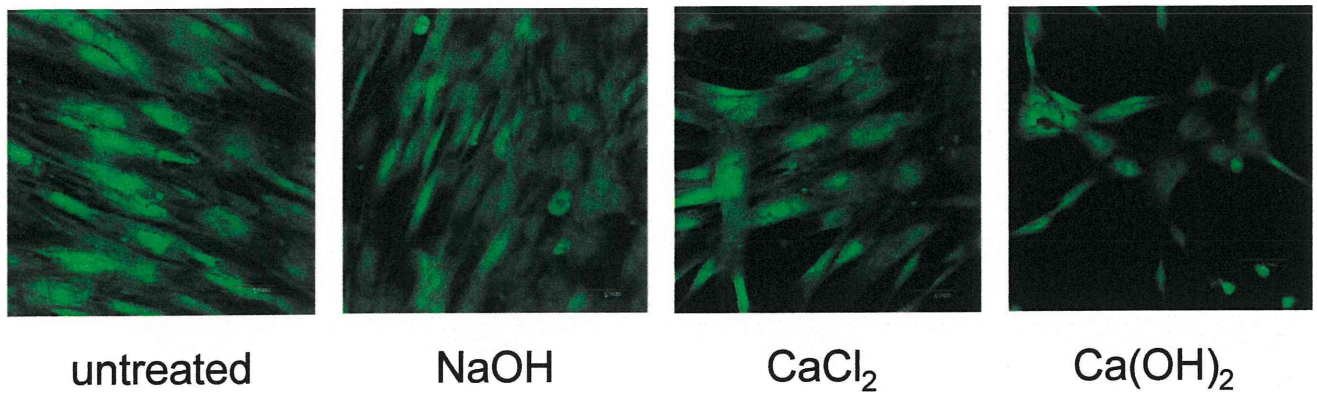


図1. 表面に化学処理を施したTi上で7日間培養したhMSCの形態

表1. 表面が未処理の純Ti上での培養と比較してhMSCのmRNA発現が変化した遺伝子数

	NaOH	CaCl <sub>2</sub>	Ca(OH) <sub>2</sub>
> 2 倍	104	133	219
< 1/2 倍	296	99	146
AP* <sup>1</sup>	1240	1397	1409
PA* <sup>2</sup>	1566	1235	1244

analyzed by GeneSpring GX 11

\*<sup>1</sup> 純Tiの表面処理によりhMSCのmRNA発現が認められた遺伝子

\*<sup>2</sup> 純Tiの表面処理によりhMSCのmRNA発現が認められなくなった遺伝子



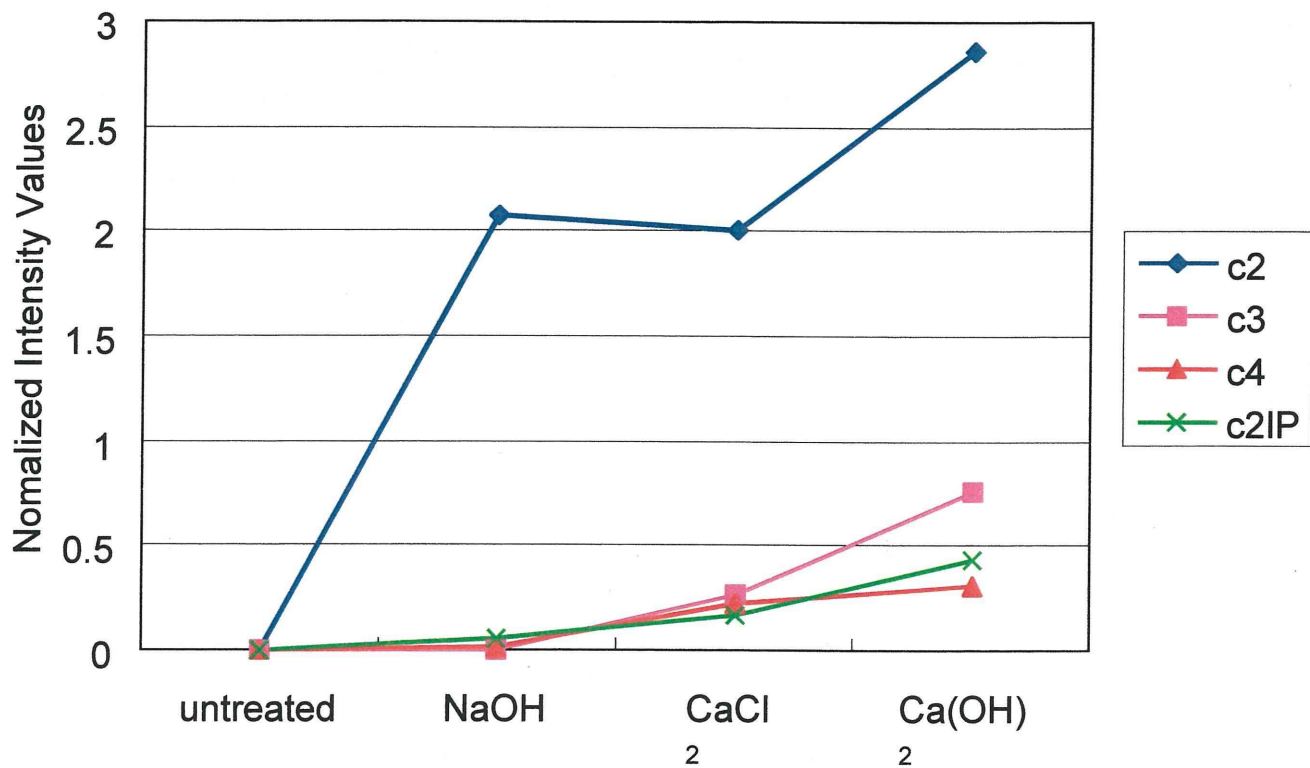


図8. hMSCにおけるNFAT mRNA発現レベルに及ぼす純Ti表面の化学処理の影響

表2. Ti 表面の化学処理により 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 (Top5)

NaOH

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Connective Tissue Disorders	$< 1.03 \times 10^{-2}$	28
Genetic Disorder	$< 1.54 \times 10^{-2}$	44
Inflammatory Disease	$< 1.28 \times 10^{-2}$	38
Skeletal and Muscular Disorders	$< 1.03 \times 10^{-2}$	31
Immunological Disease	$< 1.54 \times 10^{-2}$	31

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cellular Movement	$< 1.33 \times 10^{-2}$	23
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	$< 1.54 \times 10^{-2}$	22
Cellular Growth and Proliferation	$< 1.17 \times 10^{-2}$	27
Cell Death	$< 1.52 \times 10^{-2}$	32
Lipid Metabolism	$< 1.54 \times 10^{-2}$	10

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Hematological System Development and Function	$< 1.54 \times 10^{-2}$	18
Immune Cell Trafficking	$< 1.54 \times 10^{-2}$	17
Tissue Development	$< 1.54 \times 10^{-2}$	18
Connective Tissue Development and Function	$< 1.54 \times 10^{-2}$	8
Tissue Morphology	$< 1.03 \times 10^{-2}$	13

CaCl<sub>2</sub>

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Reproductive System Disease	$< 6.61 \times 10^{-3}$	31
Cancer	$< 6.61 \times 10^{-3}$	53
Gastrointestinal Disease	$< 6.61 \times 10^{-3}$	47
Organismal Injury and Abnormalities	$< 6.61 \times 10^{-3}$	16
Connective Tissue Disorders	$< 6.61 \times 10^{-3}$	31

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cellular Development	$< 6.61 \times 10^{-3}$	33
Post-Translational Modification	$< 5.73 \times 10^{-3}$	12
Cellular Growth and Proliferation	$< 6.61 \times 10^{-3}$	43
Cellular Movement	$< 6.61 \times 10^{-3}$	28
Cell Morphology	$< 6.61 \times 10^{-3}$	17

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Tissue Morphology	$< 6.61 \times 10^{-3}$	20
Connective Tissue Development and Function	$< 6.61 \times 10^{-3}$	27
Skeletal and Muscular System Development and Function	$< 6.61 \times 10^{-3}$	22
Tissue Development	$< 6.61 \times 10^{-3}$	35
Organismal Survival	$< 1.17 \times 10^{-5}$	14

Ca(OH)<sub>2</sub>

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Cancer	$< 1.63 \times 10^{-3}$	90
Connective Tissue Disorders	$< 1.08 \times 10^{-3}$	55
Inflammatory Disease	$< 1.17 \times 10^{-3}$	63
Skeletal and Muscular Disorders	$< 1.08 \times 10^{-3}$	58
Gastrointestinal Disease	$< 8.92 \times 10^{-4}$	83

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cellular Movement	$< 1.81 \times 10^{-3}$	58
Cellular Growth and Proliferation	$< 2.05 \times 10^{-3}$	77
Cell Death	$< 1.98 \times 10^{-3}$	69
Cellular Development	$< 2.04 \times 10^{-3}$	63
Post-Translational Modification	$< 1.97 \times 10^{-7}$	12

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Skeletal and Muscular System Development and Function	$< 2.05 \times 10^{-3}$	47
Tissue Development	$< 1.92 \times 10^{-3}$	68
Connective Tissue Development and Function	$< 2.05 \times 10^{-3}$	39
Cardiovascular System Development and Function	$< 1.90 \times 10^{-3}$	34
Organismal Development	$< 1.76 \times 10^{-3}$	48

表3. Ti 表面の化学処理により 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 (Top5)

NaOH

Diseases and Disorders		
	p-value	Molecules
Gastrointestinal Disease	$< 3.76 \times 10^{-2}$	70
Cancer	$< 3.82 \times 10^{-2}$	96
Connective Tissue Disorders	$< 3.12 \times 10^{-2}$	53
Genetic Disorder	$< 3.72 \times 10^{-2}$	119
Inflammatory Disease	$< 3.63 \times 10^{-2}$	50
Molecular and Cellular Functions		
	p-value	Molecules
RNA Post-Transcriptional Modification	$< 1.97 \times 10^{-2}$	14
Cellular Development	$< 3.17 \times 10^{-2}$	29
Cell Morphology	$< 3.43 \times 10^{-2}$	28
Cellular Assembly and Organization	$< 3.76 \times 10^{-2}$	44
Molecular Transport	$< 4.08 \times 10^{-2}$	40
Physiological System Development and Function		
	p-value	Molecules
Nervous System Development and Function	$< 3.76 \times 10^{-2}$	28
Skeletal and Muscular System Development and Function	$< 2.92 \times 10^{-2}$	22
Tissue Development	$< 3.94 \times 10^{-2}$	57
Cardiovascular System Development and Function	$< 3.12 \times 10^{-2}$	15
Organismal Development	$< 3.12 \times 10^{-2}$	19

CaCl<sub>2</sub>

Diseases and Disorders		
	p-value	Molecules
Connective Tissue Disorders	$< 4.77 \times 10^{-2}$	4
Infectious Disease	$< 3.23 \times 10^{-2}$	4
Inflammatory Disease	$< 4.77 \times 10^{-2}$	4
Skeletal and Muscular Disorders	$< 4.77 \times 10^{-2}$	4
Endocrine System Disorders	$< 4.77 \times 10^{-2}$	25
Molecular and Cellular Functions		
	p-value	Molecules
Cell Morphology	$< 4.25 \times 10^{-2}$	5
Cellular Assembly and Organization	$< 4.77 \times 10^{-2}$	8
Carbohydrate Metabolism	$< 2.15 \times 10^{-2}$	4
Molecular Transport	$< 4.77 \times 10^{-2}$	8
Cell Cycle	$< 2.15 \times 10^{-2}$	2
Physiological System Development and Function		
	p-value	Molecules
Skeletal and Muscular System Development and Function	$< 4.77 \times 10^{-2}$	6
Cell-mediated Immune Response	$< 4.77 \times 10^{-2}$	3
Connective Tissue Development and Function	$< 3.20 \times 10^{-2}$	3
Digestive System Development and Function	$< 4.77 \times 10^{-2}$	4
Embryonic Development	$< 1.62 \times 10^{-2}$	5

Ca(OH)<sub>2</sub>

Diseases and Disorders		
	p-value	Molecules
Cardiovascular Disease	$< 4.91 \times 10^{-2}$	22
Connective Tissue Disorders	$< 4.97 \times 10^{-2}$	7
Genetic Disorder	$< 4.27 \times 10^{-2}$	41
Inflammatory Disease	$< 4.97 \times 10^{-2}$	7
Skeletal and Muscular Disorders	$< 4.27 \times 10^{-2}$	10
Molecular and Cellular Functions		
	p-value	Molecules
Amino Acid Metabolism	$< 2.87 \times 10^{-2}$	4
Protein Synthesis	$< 2.16 \times 10^{-2}$	3
Small Molecule Biochemistry	$< 4.97 \times 10^{-2}$	16
Lipid Metabolism	$< 4.97 \times 10^{-2}$	10
Molecular Transport	$< 4.97 \times 10^{-2}$	10
Physiological System Development and Function		
	p-value	Molecules
Tissue Morphology	$< 4.97 \times 10^{-2}$	12
Cardiovascular System Development and Function	$< 4.97 \times 10^{-2}$	5
Embryonic Development	$< 4.97 \times 10^{-2}$	11
Organ Development	$< 4.97 \times 10^{-2}$	9
Organismal Development	$< 4.97 \times 10^{-2}$	9

表4. Ti 表面の化学処理により hMSC の mRNA 発現が認められた遺伝子が関与する生体機能 (Top5)

NaOH

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Cancer	$< 3.56 \times 10^{-2}$	267
Hematological Disease	$< 3.40 \times 10^{-2}$	64
Immunological Disease	$< 3.40 \times 10^{-2}$	221
Connective Tissue Disorders	$< 2.71 \times 10^{-2}$	171
Skeletal and Muscular Disorders	$< 3.40 \times 10^{-2}$	244

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cell Cycle	$< 3.79 \times 10^{-2}$	121
Cellular Development	$< 3.56 \times 10^{-2}$	173
Cellular Assembly and Organization	$< 3.63 \times 10^{-2}$	64
Drug Metabolism	$< 3.40 \times 10^{-2}$	9
Nucleic Acid Metabolism	$< 3.48 \times 10^{-2}$	23

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Tumor Morphology	$< 2.25 \times 10^{-2}$	11
Cell-mediated Immune Response	$< 1.32 \times 10^{-2}$	14
Hematological System Development and Function	$< 3.40 \times 10^{-2}$	100
Nervous System Development and Function	$< 3.72 \times 10^{-2}$	20
Tissue Development	$< 3.72 \times 10^{-2}$	36

CaCl<sub>2</sub>

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Cancer	$< 3.89 \times 10^{-2}$	194
Psychological Disorders	$< 3.75 \times 10^{-2}$	169
Genetic Disorder	$< 3.89 \times 10^{-2}$	623
Endocrine System Disorders	$< 3.04 \times 10^{-2}$	243
Hematological Disease	$< 3.89 \times 10^{-2}$	197

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	$< 3.80 \times 10^{-2}$	50
Cellular Function and Maintenance	$< 3.46 \times 10^{-2}$	48
Cellular Movement	$< 3.37 \times 10^{-2}$	71
Cell Cycle	$< 3.89 \times 10^{-2}$	85
Cell Death	$< 3.78 \times 10^{-2}$	173

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Hematological System Development and Function	$< 3.46 \times 10^{-2}$	26
Immune Cell Trafficking	$< 3.37 \times 10^{-2}$	24
Nervous System Development and Function	$< 3.80 \times 10^{-2}$	85
Organismal Survival	$< 1.13 \times 10^{-2}$	14
Skeletal and Muscular System Development and Function	$< 3.16 \times 10^{-2}$	43

Ca(OH)<sub>2</sub>

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Cancer	$< 2.92 \times 10^{-2}$	315
Genetic Disorder	$< 2.92 \times 10^{-2}$	610
Reproductive System Disease	$< 2.92 \times 10^{-2}$	14
Skeletal and Muscular Disorders	$< 2.92 \times 10^{-2}$	289
Gastrointestinal Disease	$< 3.19 \times 10^{-2}$	224

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cellular Development	$< 3.17 \times 10^{-2}$	124
Cellular Growth and Proliferation	$< 3.19 \times 10^{-2}$	60
Molecular Transport	$< 3.19 \times 10^{-2}$	65
Small Molecule Biochemistry	$< 3.19 \times 10^{-2}$	68
Cell Cycle	$< 2.99 \times 10^{-2}$	96

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Organ Morphology	$< 2.92 \times 10^{-2}$	17
Connective Tissue Development and Function	$< 2.92 \times 10^{-2}$	46
Skeletal and Muscular System Development and Function	$< 2.92 \times 10^{-2}$	42
Nervous System Development and Function	$< 2.92 \times 10^{-2}$	53
Tissue Development	$< 3.17 \times 10^{-2}$	40



表5. Ti 表面の化学処理により 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 (Top5)

NaOH

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Endocrine System Disorders	$< 1.30 \times 10^{-2}$	282
Gastrointestinal Disease	$< 1.89 \times 10^{-2}$	352
Genetic Disorder	$< 2.27 \times 10^{-2}$	677
Metabolic Disease	$< 2.27 \times 10^{-2}$	309
Ophthalmic Disease	$< 1.89 \times 10^{-2}$	16

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
DNA Replication, Recombination, and Repair	$< 2.27 \times 10^{-2}$	93
Cellular Development	$< 2.27 \times 10^{-2}$	247
Gene Expression	$< 2.22 \times 10^{-2}$	203
Cellular Movement	$< 1.89 \times 10^{-2}$	27
Cellular Growth and Proliferation	$< 2.27 \times 10^{-2}$	281

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Organismal Development	$< 2.22 \times 10^{-2}$	150
Embryonic Development	$< 2.22 \times 10^{-2}$	93
Hematological System Development and Function	$< 2.27 \times 10^{-3}$	121
Hematopoiesis	$< 1.89 \times 10^{-2}$	102
Cardiovascular System Development and Function	$< 2.16 \times 10^{-2}$	78

CaCl<sub>2</sub>

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Cardiovascular Disease	$< 2.77 \times 10^{-2}$	222
Hematological Disease	$< 2.77 \times 10^{-2}$	190
Genetic Disorder	$< 2.77 \times 10^{-2}$	542
Metabolic Disease	$< 1.12 \times 10^{-2}$	245
Endocrine System Disorders	$< 2.75 \times 10^{-2}$	214

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
Cellular Movement	$< 2.15 \times 10^{-2}$	15
Cellular Development	$< 2.79 \times 10^{-2}$	111
Cell Signaling	$< 2.41 \times 10^{-2}$	39
Small Molecule Biochemistry	$< 2.77 \times 10^{-2}$	33
Vitamin and Mineral Metabolism	$< 1.63 \times 10^{-2}$	35

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Hematological System Development and Function	$< 2.79 \times 10^{-2}$	92
Hematopoiesis	$< 2.79 \times 10^{-2}$	76
Embryonic Development	$< 2.75 \times 10^{-2}$	21
Tissue Development	$< 2.79 \times 10^{-2}$	58
Cardiovascular System Development and Function	$< 2.75 \times 10^{-2}$	74

Ca(OH)<sub>2</sub>

Diseases and Disorders

	p-value	Molecules
Cancer	$< 4.72 \times 10^{-2}$	79
Hematological Disease	$< 4.37 \times 10^{-2}$	177
Psychological Disorders	$< 4.58 \times 10^{-2}$	143
Endocrine System Disorders	$< 4.83 \times 10^{-2}$	206
Gastrointestinal Disease	$< 3.40 \times 10^{-2}$	263

Molecular and Cellular Functions

	p-value	Molecules
DNA Replication, Recombination, and Repair	$< 2.19 \times 10^{-2}$	9
Nucleic Acid Metabolism	$< 3.50 \times 10^{-2}$	15
Small Molecule Biochemistry	$< 4.98 \times 10^{-2}$	54
Cellular Assembly and Organization	$< 4.64 \times 10^{-2}$	50
Cellular Function and Maintenance	$< 4.67 \times 10^{-2}$	34

Physiological System Development and Function

	p-value	Molecules
Connective Tissue Development and Function	$< 3.50 \times 10^{-2}$	22
Embryonic Development	$< 3.78 \times 10^{-2}$	51
Nervous System Development and Function	$< 4.45 \times 10^{-2}$	75
Skeletal and Muscular System Development and Function	$< 3.50 \times 10^{-2}$	33
Hematological System Development and Function	$< 4.67 \times 10^{-2}$	91

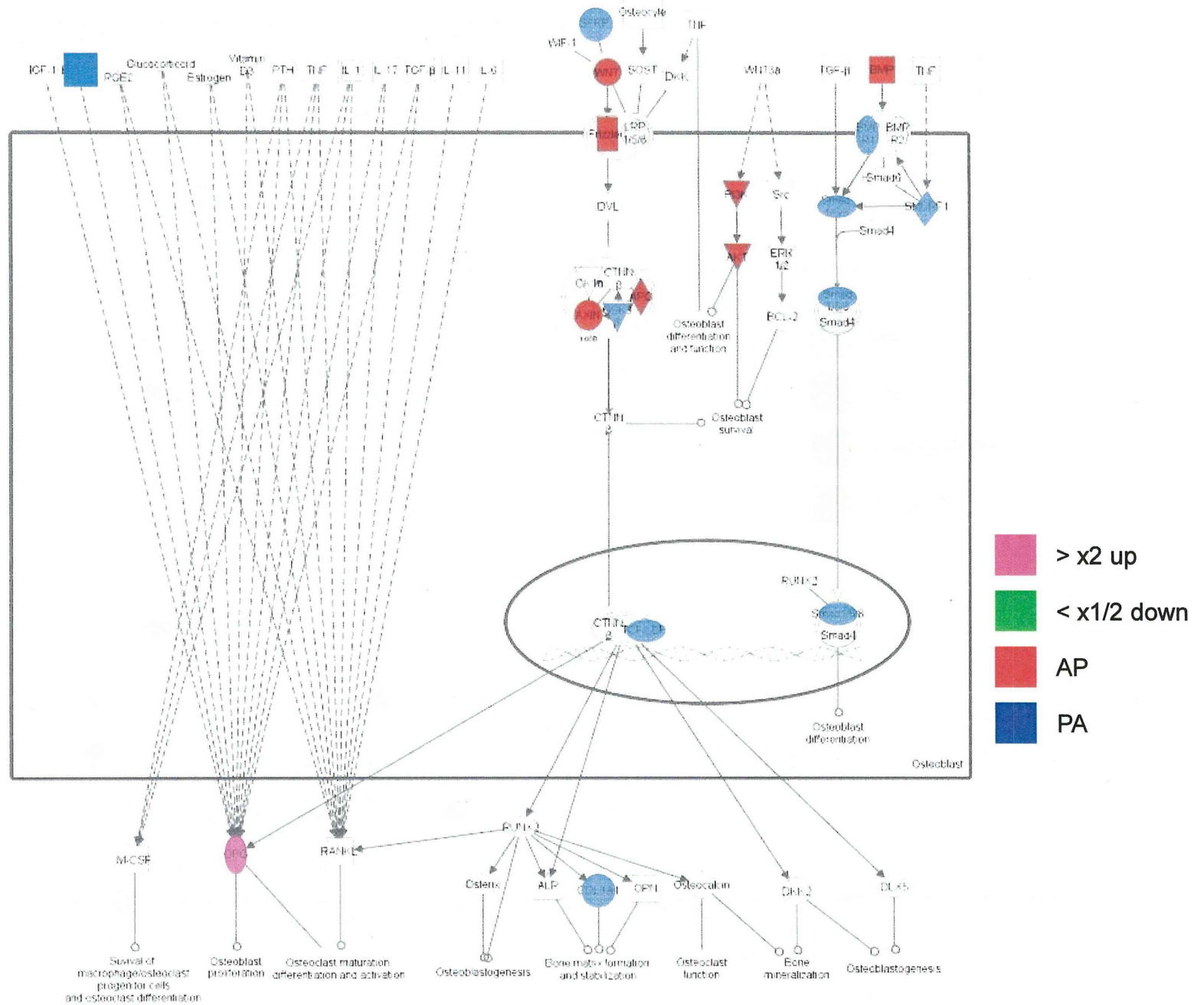


図2. 骨芽細胞の機能に及ぼすTi表面のNaOH 処理の影響

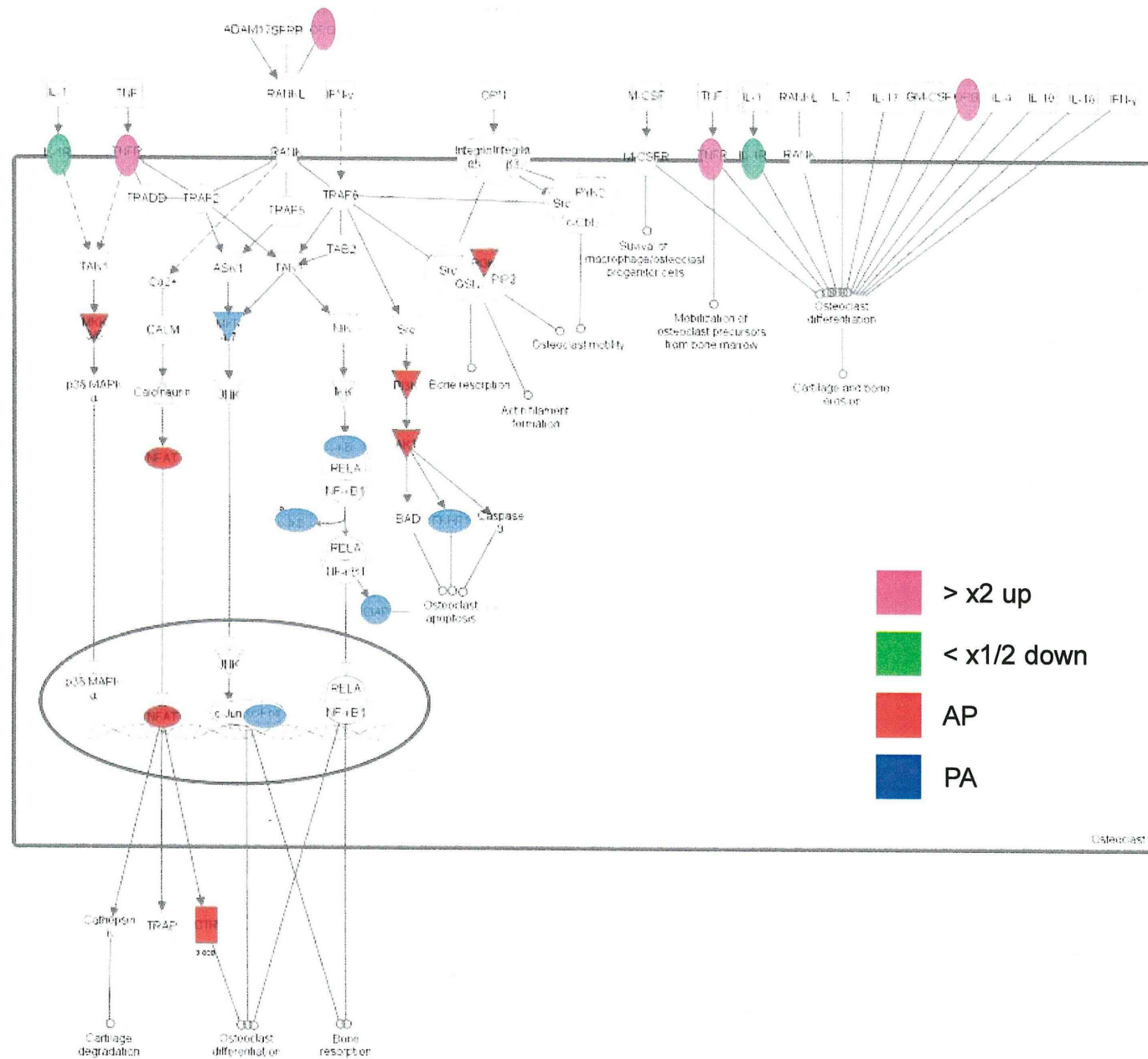


図3. 破骨細胞の機能に及ぼすTi表面のNaOH 処理の影響

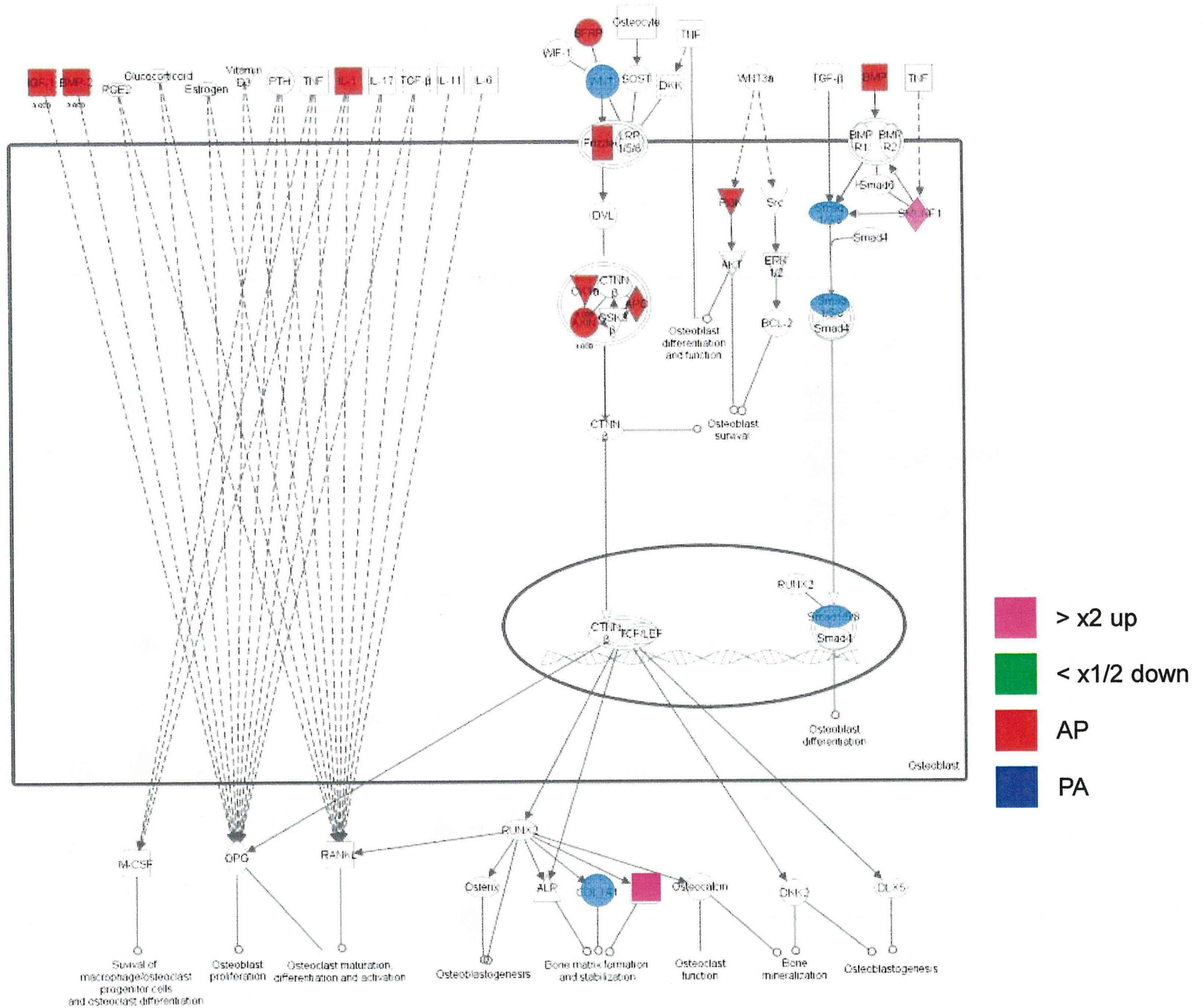


図4. 骨芽細胞の機能に及ぼすTi表面のCaCl<sub>2</sub> 処理の影響



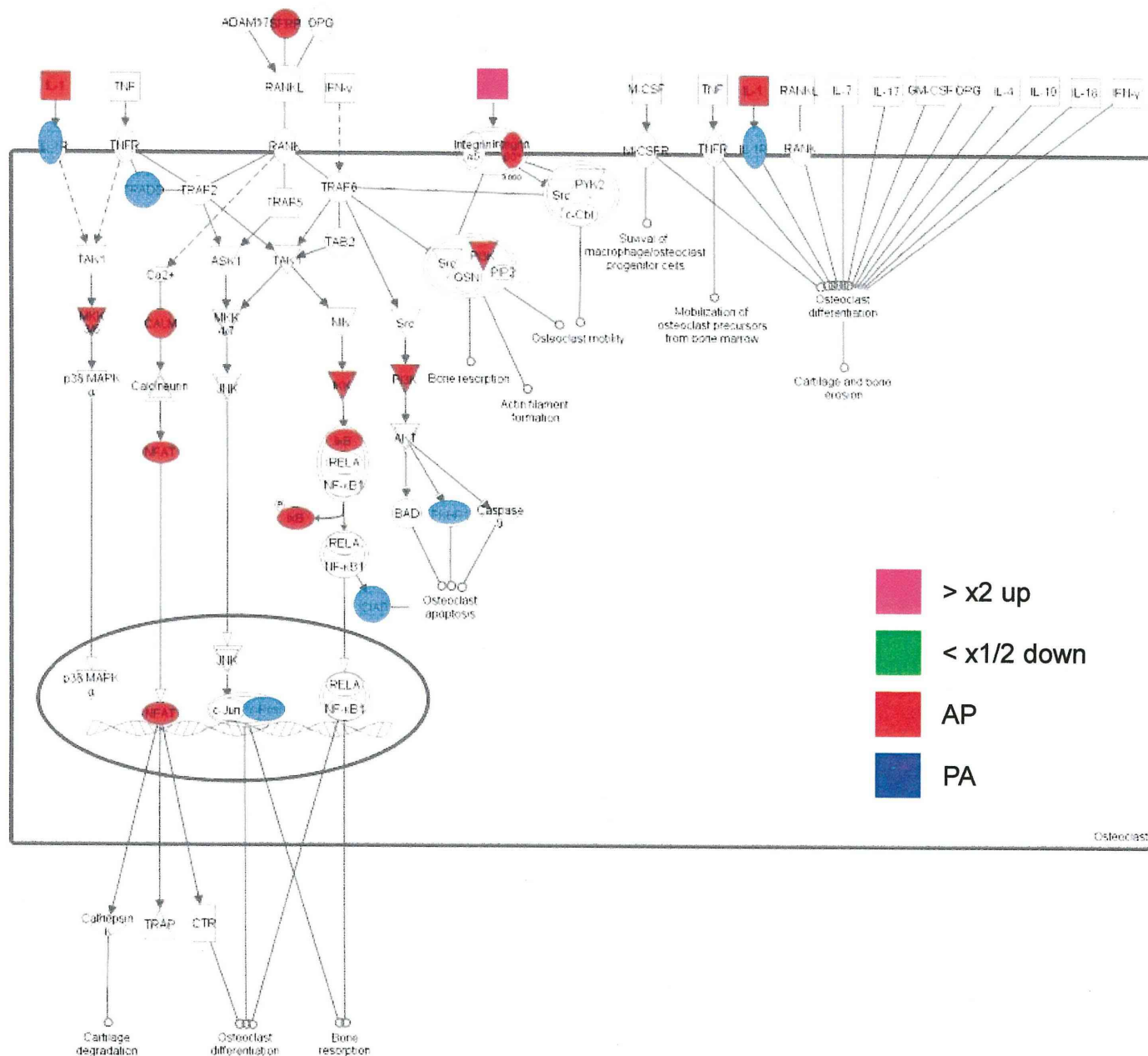


図5. 破骨細胞の機能に及ぼすTi表面のCaCl<sub>2</sub> 処理の影響

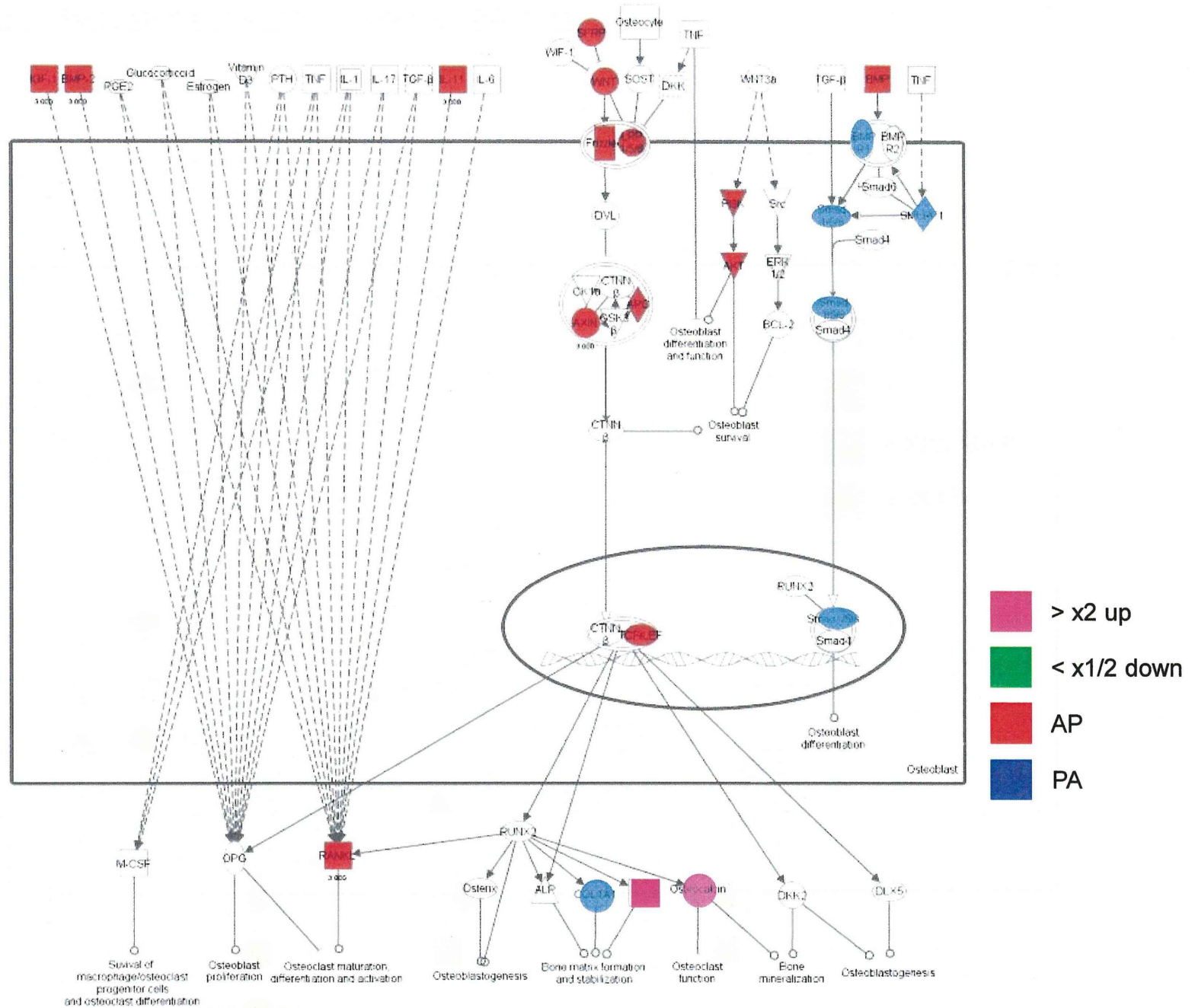


図6. 骨芽細胞の機能に及ぼすTi表面のCa(OH)<sub>2</sub> 処理の影響

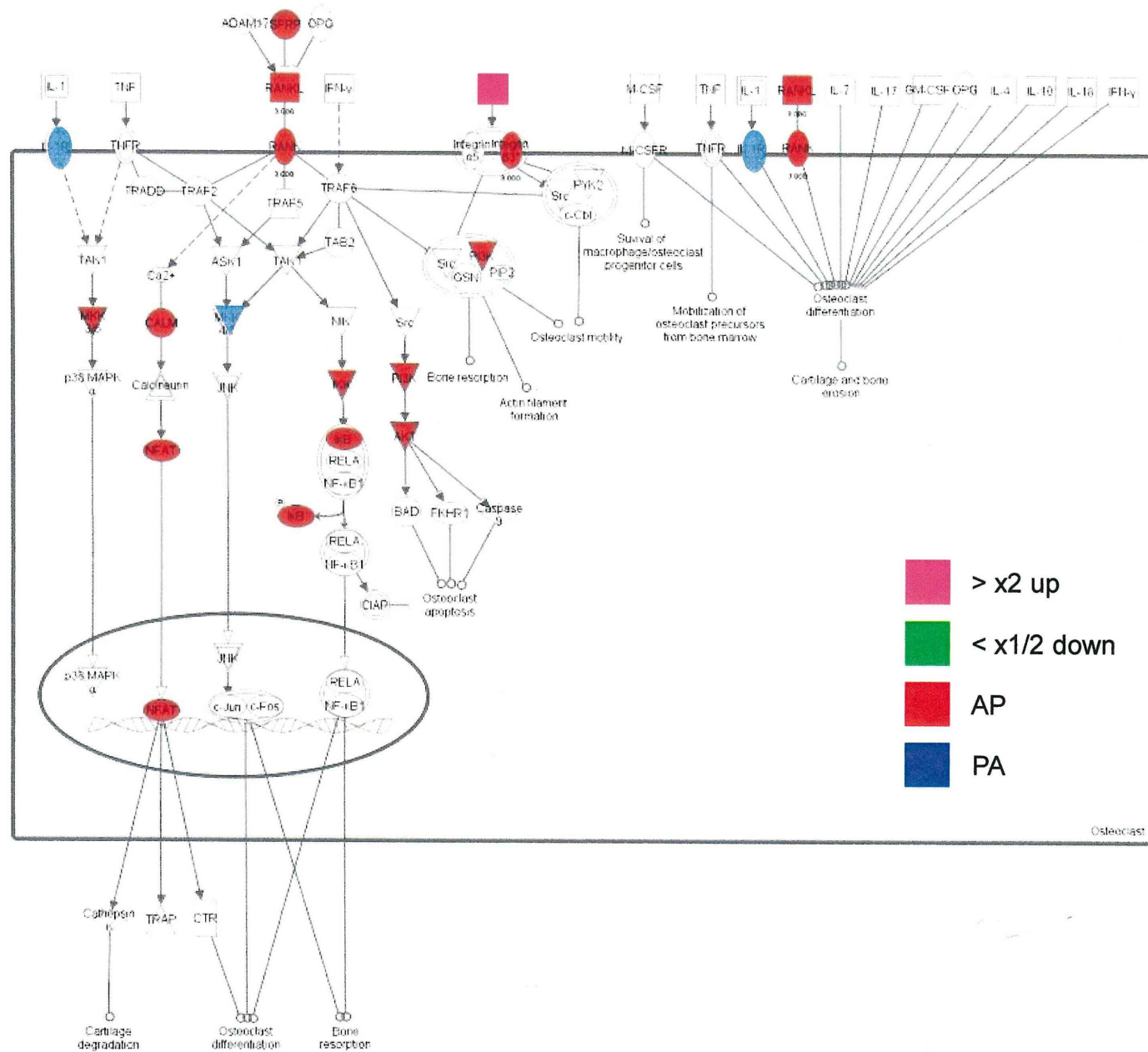


図7. 破骨細胞の機能に及ぼすTi表面のCa(OH)<sub>2</sub> 処理の影響

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 齧島由二 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、未処理のチタンプレート(Ti)と表面に化学処理 (NaOH 溶液を用いてアルカリ処理のみ、もしくは NaOH 溶液を用いてアルカリ処理した後、CaCl<sub>2</sub> 溶液あるいは Ca(OH)<sub>2</sub> 溶液を用いてカルシウム導入) を施した Ti 上で培養したヒト間葉系幹細胞 (hMSC) のタンパク質発現を比較した。骨形成に関連のある分子に着目して解析したところ、化学処理を施した Ti 上で、骨形成に関与するタンパク質の発現上昇が観察された。これらのことから、未処理の Ti よりも化学処理を施した Ti 上で培養した方がより hMSC が骨分化しやすい可能性が示唆された。

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、Ti の化学処理の有無がヒト間葉系幹細胞のタンパク質発現にどのような影響を与えるか検討した。

B. 研究方法 (図 1)

1. 純チタンプレート(Ti)の化学処理

純 Ti はナカシマメディカル社の φ 33.5 x 2 mm, 表面研磨仕上げ Ra 0.4 を用いた。Ti はオートクレーブ滅菌をした後に使用した (未処理)。

化学処理はすべて、オートクレーブ滅菌済みの純 Ti をポリプロピレン製遠心管に入れ、滅菌した各水溶液を 100 ml 使用した。

NaOH 処理 : 5 M 水酸化ナトリウム水溶液