

分化へ及ぼす影響について

Ti の表面特性は、生体適合性に大きく関わる。Ti 表面の特徴は、タンパク質の吸着や細胞-材料の相互作用に影響を与え、骨結合を制御する。本研究では、純 Ti の表面を化学処理することによってカルシウムイオンの導入や Ti 上で培養した hMSC の骨分化へ及ぼす影響について検討した。アルカリ (NaOH) 処理によって Ti 表面にチタン酸水素ナトリウムの層が形成され、化学処理した表面へのアパタイト形成が始まるが、その後 CaCl₂ 処理しカルシウムイオンを表面へ導入する事によってアパタイト形成がわずかに促進したという報告¹⁾があったため、本研究では Ti 表面へのカルシウムイオン導入に着目し、カルシウム導入の方法として 2 種類、CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理とを比較した。

カルシウムイオン導入した CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理によって、hMSC の形態が変化し細胞数が減少した (図 2A, B)。hMSC において、細胞の形態と骨分化は関連しているとの報告²⁻⁵⁾もあるため、両処理によって Ti 表面にカルシウムイオンを導入する事によって hMSC の骨分化に影響を与えたと考えられる。さらに、カルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量は CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 処理の方が有意に高かった (図 1B, C)。hMSC の骨分化へ純 Ti 表面の化学処理が及ぼす影響について検討するために、骨マトリックスである OPN と骨形成マーカーの OCN の mRNA 発現及び OCN のタンパク質発現についても検討したところ、hMSC における OPN の mRNA 発現はカルシウム導入処理 (CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理) によって有意に増加し、Ca(OH)₂

処理は CaCl₂ 処理と比較して有意に高かった (図 3A)。OCN のタンパク質発現については、Ca(OH)₂ 処理において OCN 発現が他の処理群と比較して有意に高かったものの CaCl₂ 処理では影響は見られなかった (図 4)。以上の結果から、Ti 表面へのカルシウム導入により hMSC の骨分化へ影響を与える事がわかった。また、Ca(OH)₂ 処理は骨分化を誘導するが、CaCl₂ 処理は限られた効果しか示さない事が判明した。

次に、Ti 表面へのカルシウムイオン導入による hMSC の骨分化誘導作用のメカニズムについて探るために DNA マイクロアレイ解析及びパスウェイ解析を行った。骨分化や骨代謝に関わるいくつかの遺伝子が、Ti の化学処理によって発現が有意に上昇した。IL6R や ITGB1 は NaOH 処理によって有意に上昇した (表 1)。SPP1 (OPN)、MMP13、ENPP1 は CaCl₂ 処理または Ca(OH)₂ 処理により有意に上昇した (表 2, 3)。そして Ca(OH)₂ 処理によって、ITGA2、BMP2、PTH1H が有意に上昇した (表 3)。さらに 2 種類のカルシウム導入法について比較するために、CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理とを比較したところ、CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 処理によって hMSC の BMP2、PTGS2 (Cox2)、PTH1H、SPP1 (OPN) の発現が有意に高かった (表 4)。これまでに、ラットにおいて Cox2 の機能が骨形成に必須であり⁶⁾、間葉系前駆細胞において Cox2 の誘導を通して骨分化が刺激される⁷⁾事が報告されている。また、骨芽細胞⁸⁾及び間葉系細胞⁹⁾において BMP2 は Cox2 を誘導する。さらに細胞外のカルシウム量の増加が BMP2 の発現を上昇させるという報告^{10,11)}もある。その上、カル

シウムに関わるシグナル伝達系において Cox2 による PTH の誘導が重要な役割を果たすこともわかっている¹²⁾。以上のことから、Ca(OH)₂ 処理による hMSC の骨分化誘導は BMP2、Cox2、PTH LH の誘導によって引き起こされる可能性が示唆された。一方、Smad シグナル伝達系は Ti 表面の化学処理により抑制された (図 5-7)。これまでに、noncanonical BMP シグナル伝達系が Cox 2 の転写を制御する⁹⁾という報告もあるため、Smad シグナル伝達系とは独立した noncanonical BMP シグナル伝達系により Ca(OH)₂ 処理された Ti 表面上で培養した hMSC の骨分化を調整しているのかもしれない。

IPA によるパスウェイ解析を行ったところ、NaOH 処理によって骨分化におけるプロモーターである WNT 及びその細胞表面受容体 Frizzled、さらにその下流の Wnt/ β -カテニン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 mRNA 発現が誘導された (図 5)。また、RANKL decoy receptor である OPG の遺伝子発現が NaOH 処理により 2 倍以上上昇した (図 5)。CaCl₂ 処理によって、Frizzled、Axin、APC 及び骨分化マーカー BMP と IGF-1 が誘導された。骨マトリックスタンパク質である OPN の発現が有意に上昇し、さらにそれに伴い integrin β 3 の発現も誘導された (図 6)。Ca(OH)₂ 処理によって Wnt 及び受容体 Frizzled に加えて Frizzled の共役受容体である LRP5/6 の遺伝子発現が誘導された (図 7)。また、BMP、IGF-1、integrin β 3 に加えて、破骨細胞分化因子である RANKL が Ca(OH)₂ 処理によって誘導された (図 7)。さらに、OPN 及び OCN の遺伝子発現が

上昇した (図 7)。

間葉系前駆細胞において Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は、骨分化を制御している¹³⁾。Ti の表面特性がカルシウム依存性の Wnt シグナル伝達経路を介して骨分化を誘導し、Wnt5a が integrin との正のフィードバックを通して骨分化を増強するとの報告もある¹⁴⁾。これまでに、integrin ファミリーが様々な処理を施された Ti 表面上で骨分化における重要な役割を果たしている事が報告されている¹⁵⁻¹⁸⁾。本研究において、カルシウムイオン導入処理により、OPN 発現上昇に伴い integrin β 3 の発現誘導が観察された。hMSC における Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路も、カルシウムイオン導入処理により促進され、その効果は CaCl₂ 処理よりも Ca(OH)₂ 処理の方が高かった。

本研究において、hMSC の骨分化誘導作用は Ca(OH)₂ 処理の方が CaCl₂ 処理よりも効果的であったが、これは両処理間における Ti 表面へのカルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量の違いによるものかもしれない。Ti 表面への Ca(OH)₂ 処理により、1) CaCl₂ 処理に比べて BMP2、Cox2、PTH LH の発現が上昇し、2) Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路が活性化されることによって hMSC の骨分化が誘導されることが示唆された。

カルシウムイオン導入した純 Ti は hMSC の骨分化を誘導することを見出し、2 種類の導入処理法を比較する事によりそのメカニズムの一端を明らかに出来たと考える。

2. 組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理がその表面上で培養した hMSC へ与える影響について

PMEA は、細胞が異物と認識しにくい高分子ポリマーとして開発され、その優れた生体適合性から様々な医療機器のコーティングに利用されている。生体適合性の高さには高分子が含む中間水の量との関連性が指摘されている。PMEA におけるこの中間水の存在が血液適合性発現に大きく寄与していると考えられている¹⁹⁾。一方、PHEMA は中間水の存在が認められない¹⁹⁾。また PHEMA は、細胞の接着を防ぐためのコーティング剤としても利用されている。この両者について組成比を変えて共重合させた材料は、それぞれ中間水の含有率も異なり表面特性も変化する事から、細胞との相互作用にも異なる影響を及ぼすと想定される。そこで本研究では、組成比の異なる PMEA /PHEMA コポリマーのコーティング処理した表面上で hMSC を培養し、細胞へ与える影響について検討する事にした。播種 1 日後において、やはり PHEMA100% のコーティング処理したシート上では、hMSC が接着せず、浮遊の状態が存在していた (図 8)。しかし、PMEA が 25% 以上含まれたコーティング処理のものでは、hMSC は接着していた (図 8)。この様に、コーティングしたポリマーの組成比を変える事で、hMSC の形態等に変化が見られることが分かった。現在、それぞれのシート上で培養した hMSC における遺伝子発現について網羅的に解析中である。今後、ポリマーコーティングによる遺伝子発現レベルでの影響についてさらなる検討を行っていく予定である。

E. 結論

1. 純 Ti 表面の化学処理が hMSC の骨

分化へ及ぼす影響について

純 Ti の表面を化学処理 (NaOH 処理、CaCl₂ 処理、Ca(OH)₂ 処理) することによってカルシウムイオンの導入や Ti 上で培養した hMSC の骨分化へ及ぼす影響について検討した。カルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量は CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 処理の方が有意に高かった。hMSC における OPN 及び OCN の発現の検討から、Ti 表面へのカルシウム導入により hMSC の骨分化へ影響を与える事がわかった。また、Ca(OH)₂ 処理は骨分化を誘導するが、CaCl₂ 処理は限られた効果しか示さない事が判明した。Ca(OH)₂ 処理による hMSC の骨分化誘導は BMP2、Cox2、PTH1LH の誘導によって引き起こされる可能性が示唆された。さらに Smad シグナル伝達系とは独立した noncanonical BMP シグナル伝達系の関与も示唆された。hMSC における Wnt / β -カテニンシグナル伝達経路も、カルシウムイオン導入処理により活性化され、その効果は CaCl₂ 処理よりも Ca(OH)₂ 処理の方が高かった。

2. 組成比の異なる PMEA /PHEMA コポリマーのコーティング処理がその表面上で培養した hMSC へ与える影響について

コーティングしたポリマーの組成比を変える事で、表面上で培養した hMSC の形態等に変化が見られることが分かった。今後、ポリマーコーティング表面による hMSC の遺伝子発現レベルでの影響について網羅的な解析を行っていく予定である。

参考文献

- 1) Kizuki T, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T. Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment. *Acta Biomater* 2010;6:2836-2842.
- 2) McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004;6:483-495.
- 3) Rodriguez JP, Gonzalez M, Rios S, Cambiazo V. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *J Cell Biochem* 2004;93:721-731.
- 4) Kumar G, Tison CK, Chatterjee K, Pine PS, McDaniel JH, Salit ML, Young MF, Simon CG, Jr.. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials* 2011;32:9188-9196.
- 5) Kumar G, Waters MS, Farooque TM, Young MF, Simon CG, Jr.. Freeform fabricated scaffolds with roughened struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shape. *Biomaterials* 2012;33:4022-4030.
- 6) Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:963-976.
- 7) Lee HW, Kim SY, Kim AY, Lee EJ, Choi J-Y, Kim JB. Adiponection stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 2009;27:2254-2262.
- 8) Chikazu D, Li X, Kawaguchi H, Sakuma Y, Voznesensky OS, Adams DJ, Xu M, Hoshi K, Katavic V, Herschman HR, Raisz L, Pilbeam CC. Bone morphogenetic protein 2 induces cyclo-oxygenase 2 in osteoblasts via Cbfa1 binding site: Role in effects of bone morphogenetic protein 2 in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 2002;17:1430-1440.
- 9) Susperregui ARG, Gamell C, Rodríguez-Carballo E, Ortuño MJ, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F. Noncanonical BMP signaling regulates Cyclooxygenase-2 transcription. *Mol Endocrinol* 2011;25:1006-1017.
- 10) Peiris D, Pacheco I, Spencer C, MacLeod RJ. The extracellular calcium-sensing receptor reciprocally regulates the secretion of BMP-2 and the BMP antagonist Noggin in colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G753-G766.
- 11) Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:1093-1097.
- 12) Huang H, Chikazu D,

Voznesensky OS, Herschman HR, Kream BE, Drissi H, Pilbeam CC. Parathyroid hormone induction of cyclooxygenase-2 in murine osteoblasts: Role of the calcium-calcineurin- NFAT pathway. *J Bone Miner Res* 2010;25:819-829.

13) Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005;8:739-750.

14) Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Park JH, Dunn GR, Haithcock DA, Wasilewski CE, Boyan BD, Schwartz Z. Mediation of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium surfaces by a Wnt-integrin feedback loop. *Biomaterials* 2011;32:6399-6411.

15) Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-681.

16) Lavenus S, Berreur M, Trichet V, Pilet P, Louarn G, Layrolle P. Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores. *Eur Cell Mater* 2011;22:84-96; discussion 96.

17) Olivares-Navarrete R, Raz P, Zhao G, Chen J, Wieland M, Cochran DL, Chaudhri RA, Ornoy A, Boyan BD, Schwartz Z. Integrin alpha2beta1 plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates.

Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:15767-15772.

18) Wang L, Zhao G, Olivares-Navarrete R, Bell BF, Wieland M, Cochran DL, Schwartz Z, Boyan BD. Integrin beta1 silencing in osteoblasts alters substrate-dependent responses to 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Biomaterials* 2006;27:3716-3725.

19) ²H-NMR によるポリ (2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA) およびポリ (2-ヒドロキシエチルメタクリレート) (PHEMA) 中に存在する水の状態分析, 三輪優子, 田中賢, 押山広明, 望月明, バイオマテリアル - 生体材料, 21 (2003) 143-148.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., and Matsuoka A. : Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, in press.

2) 澤田留美 「再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価の実際」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み、シーエムシー出版、東京 (2012) pp. 28-37

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—再生医療分野—」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み、シーエムシー出版、東京 (2012) pp. 38-46

2. 学会発表

- 1) 澤田留美、齋島由二、福井千恵、河野健、松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(2)―遺伝子発現の網羅的解析による検討―」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 2) 齋島由二、福井千恵、澤田留美、松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(1)―蛋白質の網羅的発現解析による検討―」第 11 回日本再生医療学会 (2012.6)
- 3) 佐々木寛人、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司「骨髄由来間葉系幹細胞の画像情報解析による劣化度評価」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 4) 佐々木寛人、高橋厚妃、坪井泰樹、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司「間葉系幹細胞画像の情報解析による細胞状態分類法の有効性」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 5) Sasaki, H., Matsuoka, F., Takeuchi, I., Sawada, R., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based cell quality assessment of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012.6)
- 6) Sasaki, H., Matsuoka, F., Takahashi, A., Takeuchi, I., Sawada, R., Kiyota, Y., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based prediction of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 3rd TERMIS World Congress2012 (2012.9)
- 7) 澤田留美、河野 健、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―がん化の指標探索のため

- の遺伝子発現解析―」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
- 8) 河野 健、澤田留美、伊佐間和郎、齋島由二、松岡厚子「チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
- 9) 澤田留美、齋島由二、福井千恵、河野健、松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について―遺伝子発現の網羅的解析による検討―」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 10) 齋島由二、澤田留美、福井千恵、松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について―蛋白質発現の網羅的解析による検討―」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 11) 河野 健、澤田留美、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」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 12) 草川森士、町田一彦、安田智、黒田拓也、澤田留美、伊藤守、堤秀樹、川真田伸、佐藤陽治「細胞・組織加工製品の製造工程管理法としての NOG マウス造腫瘍性試験系のバリデーション」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)

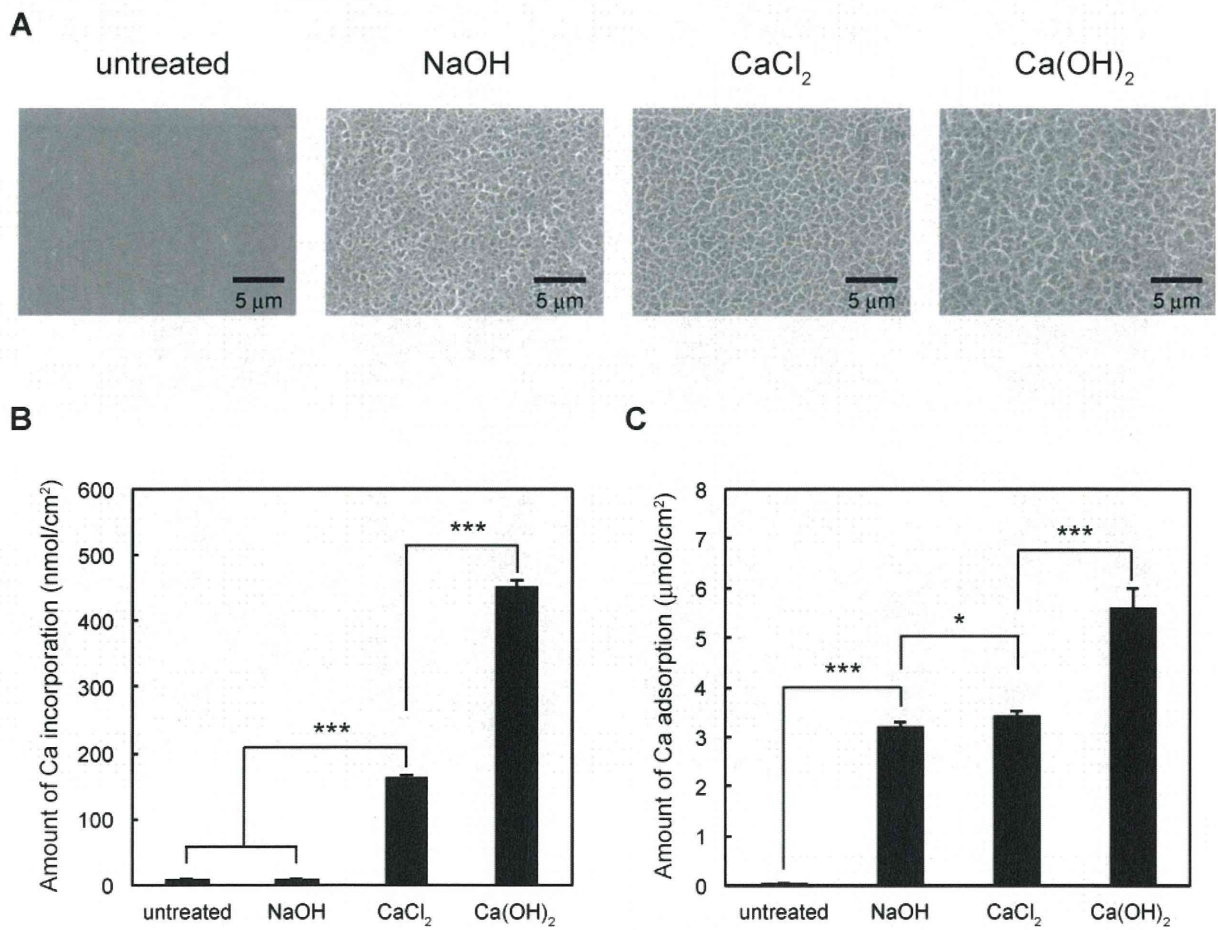


図1. 化学処理した純Tiディスクの表面観察(A)とカルシウムイオン導入量(B)及びアパタイト形成量(C)

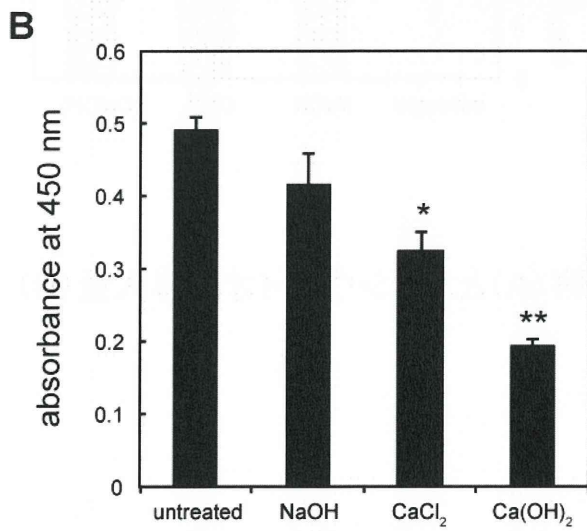
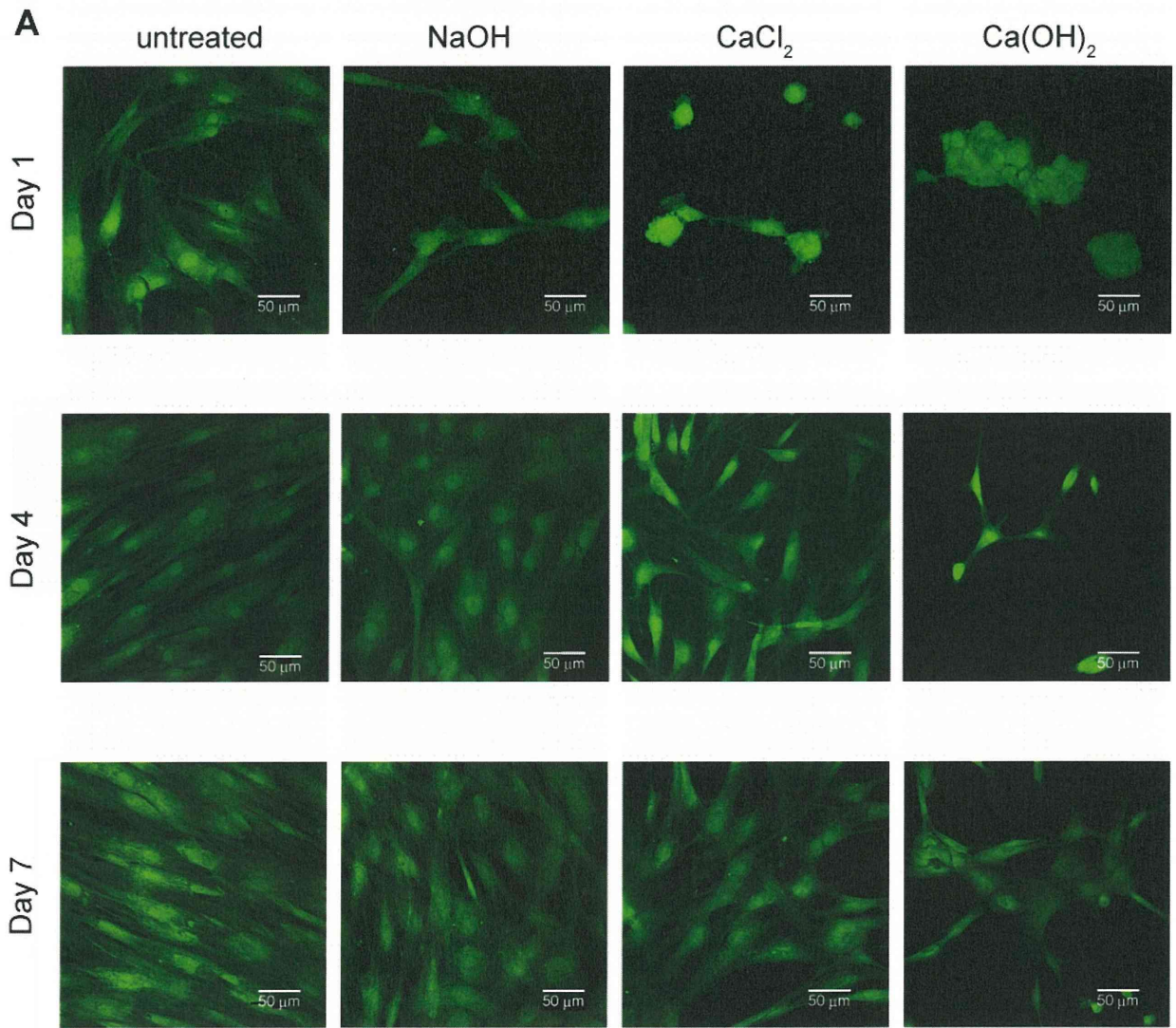


図2. 化学処理した純Tiディスク上で1, 4, 7日間培養したhMSCの形態(A)と培養7日後の細胞数(B)

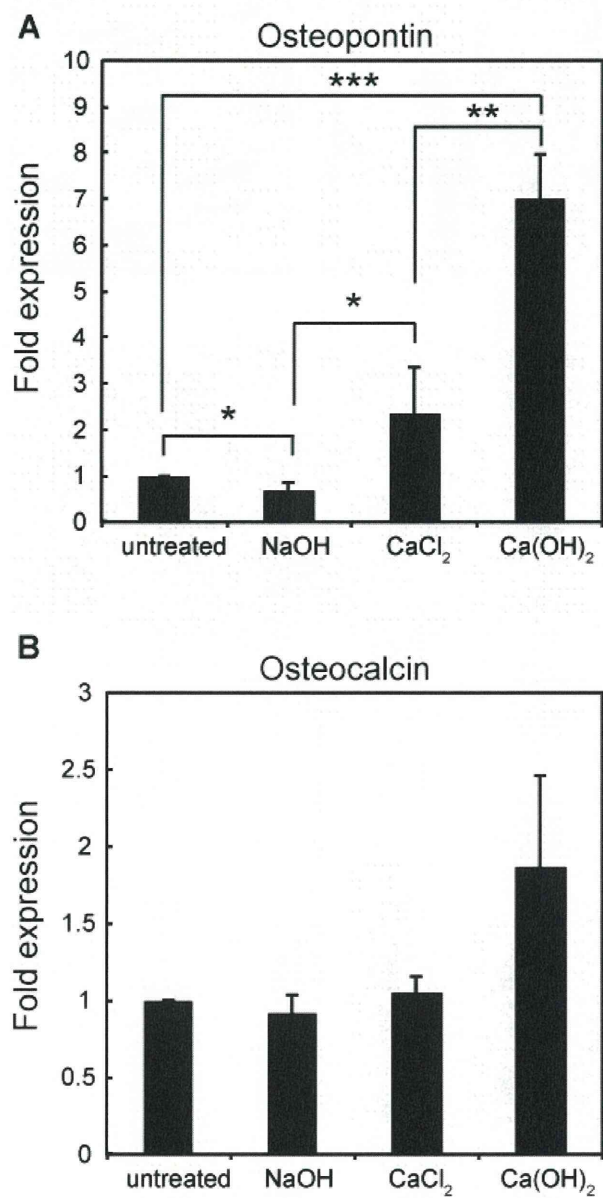


図3. 化学処理した純Tiディスク上で7日間培養したhMSCのOPN(A)とOCN(B)のmRNA発現量

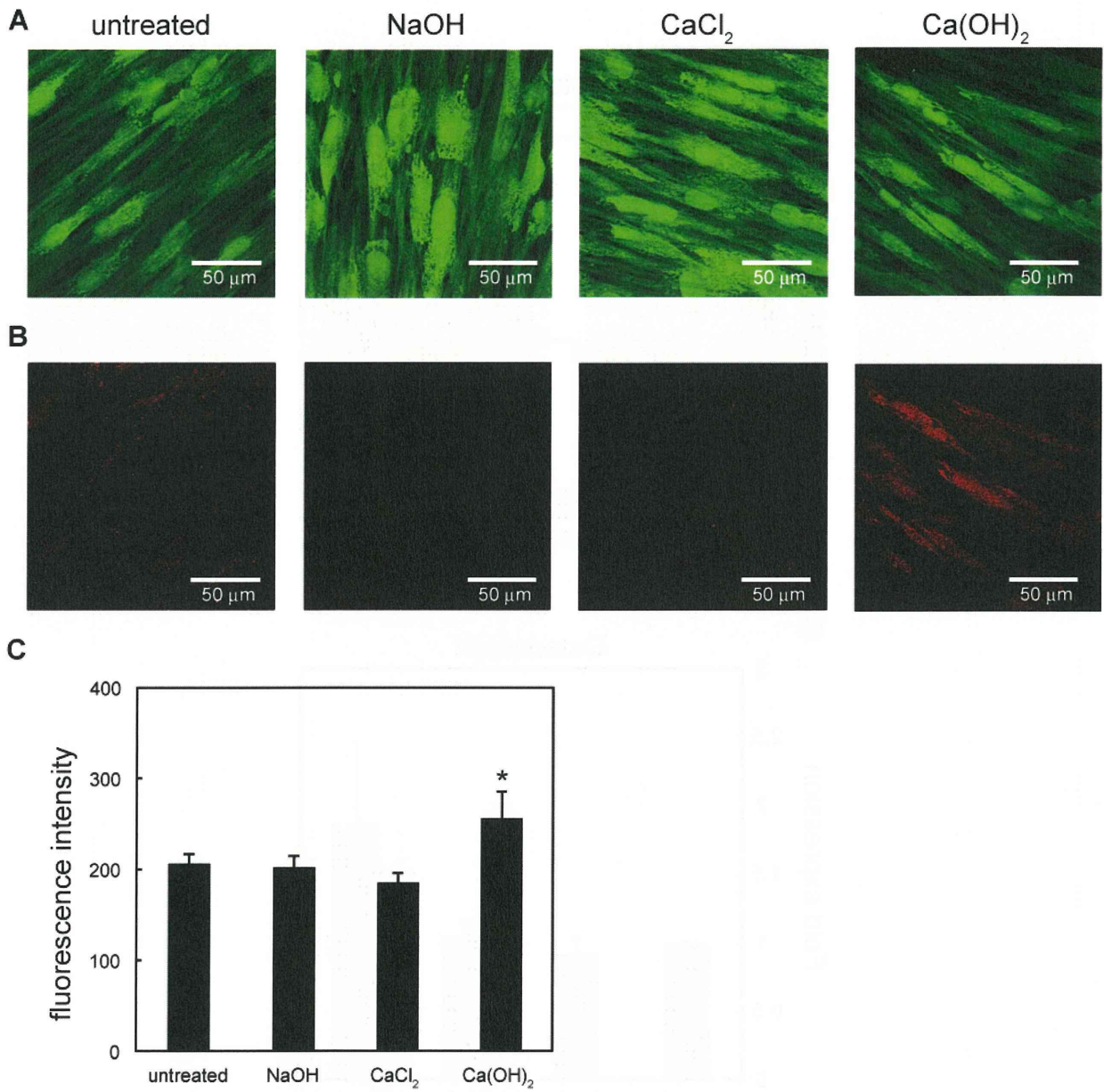
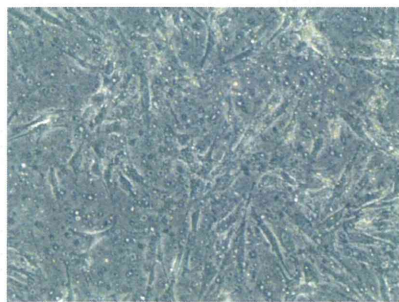
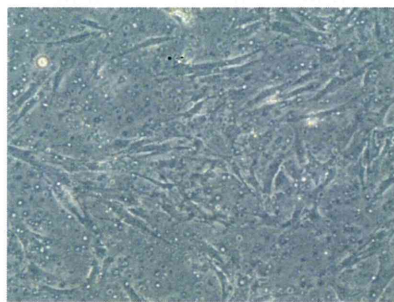


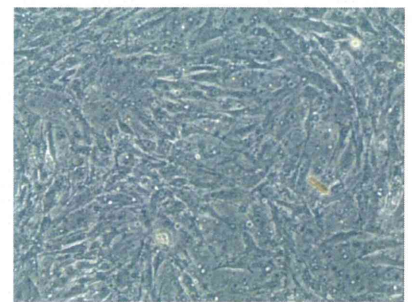
図4. 化学処理した純Tiディスク上で28日間培養したhMSCの細胞形態(A)とOCNのタンパク質発現(B, C)



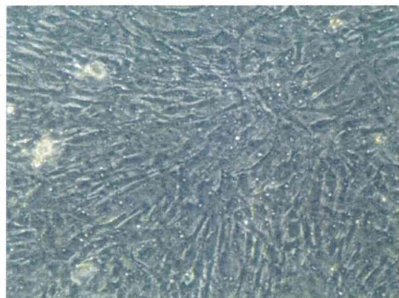
PMEA = 100



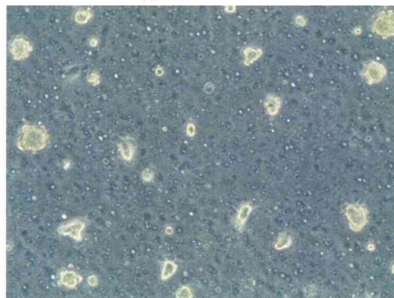
PMEA : PHEMA = 75:25



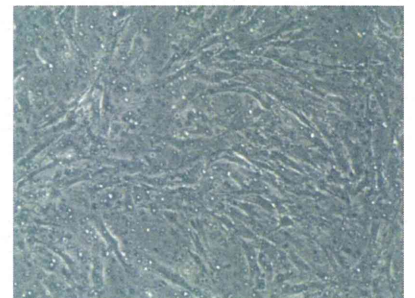
PMEA : PHEMA = 50:50



PMEA : PHEMA = 25:75



PHEMA = 100



untreated

図8. 組成比の異なるPMEA/PHEMAコポリマーコーティング処理したシート上で1日培養したhMSCの形態

表5. hMSCを 1.5×10^5 /well 播種して24時間後の細胞数

| PMEA | PHEMA | Cell No. |
|-----------|-------|----------|
| 100 | 0 | 1.2 |
| 75 | 25 | 1.1 |
| 50 | 50 | 0.925 |
| 25 | 75 | 1.175 |
| 0 | 100 | 0.825 |
| untreated | | 1.475 |

表1. Ti表面未処理と比較してNaOH 処理によって発現が有意に上昇した遺伝子 (Top 30)

| Symbol | Entrez Gene Name | Fold Change |
|-------------|--|-------------|
| TFPI2 | tissue factor pathway inhibitor 2 | 4.990 |
| PTGS1 | prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | 4.821 |
| CXCL6 | chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2) | 4.387 |
| PRSS1/PRSS3 | protease, serine, 1 (trypsin 1) | 4.290 |
| SERPINB2 | serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 | 3.989 |
| IL6R | interleukin 6 receptor | 3.612 |
| PAPPA | pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1 | 3.434 |
| AOX1 | aldehyde oxidase 1 | 3.223 |
| CSGALNACT1 | chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 | 3.197 |
| YTHDC1 | YTH domain containing 1 | 3.169 |
| GPR56 | G protein-coupled receptor 56 | 3.155 |
| OASL | 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like | 3.091 |
| C10orf18 | family with sequence similarity 208, member B | 3.056 |
| ITGB1 | integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) | 2.996 |
| HIST1H2BD | histone cluster 1, H2bd | 2.992 |
| GALNTL2 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2 | 2.911 |
| IL17RC | interleukin 17 receptor C | 2.892 |
| TNFSF13B | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b | 2.736 |
| FAM65B | family with sequence similarity 65, member B | 2.655 |
| RIN3 | Ras and Rab interactor 3 | 2.653 |
| CCL2 | chemokine (C-C motif) ligand 2 | 2.647 |
| FRAT1 | frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas | 2.645 |
| CENPM | centromere protein M | 2.634 |
| TPD52 | tumor protein D52 | 2.624 |
| TNFSF15 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15 | 2.597 |
| SFTPA2 | surfactant protein A2 | 2.574 |
| NR4A2 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 | 2.571 |
| IFI6 | interferon, alpha-inducible protein 6 | 2.567 |
| SMCHD1 | structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1 | 2.541 |
| PLCL2 | phospholipase C-like 2 | 2.488 |

表2. Ti表面未処理と比較してCaCl₂処理によって発現が有意に上昇した遺伝子 (Top 30)

| Symbol | Entrez Gene Name | Fold Change |
|-------------|---|-------------|
| SPP1 (OPN) | secreted phosphoprotein 1 | 6.252 |
| PRSS1/PRSS3 | protease, serine, 1 (trypsin 1) | 4.009 |
| MMP13 | matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) | 3.882 |
| GPR56 | G protein-coupled receptor 56 | 3.640 |
| C13orf15 | regulator of cell cycle | 3.578 |
| IGFBP1 | insulin-like growth factor binding protein 1 | 3.540 |
| PTGS1 | prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | 3.500 |
| TFPI2 | tissue factor pathway inhibitor 2 | 3.406 |
| YTHDC1 | YTH domain containing 1 | 3.371 |
| CENPM | centromere protein M | 3.235 |
| COL15A1 | collagen, type XV, alpha 1 | 3.174 |
| AQP1 | aquaporin 1 (Colton blood group) | 3.149 |
| RPL18A | ribosomal protein L18a | 3.098 |
| DUSP4 | dual specificity phosphatase 4 | 3.095 |
| DIXDC1 | DIX domain containing 1 | 3.016 |
| TMEM158 | transmembrane protein 158 (gene/pseudogene) | 2.791 |
| C16orf57 | chromosome 16 open reading frame 57 | 2.787 |
| SMC1A | structural maintenance of chromosomes 1A | 2.761 |
| ARID5B | AT rich interactive domain 5B (MRF1-like) | 2.655 |
| TNFSF10 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 | 2.648 |
| IL17RC | interleukin 17 receptor C | 2.624 |
| DCTN4 | dynactin 4 (p62) | 2.605 |
| ING3 | inhibitor of growth family, member 3 | 2.557 |
| NOL6 | nucleolar protein family 6 (RNA-associated) | 2.555 |
| PLTP | phospholipid transfer protein | 2.555 |
| SLC29A1 | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1 | 2.507 |
| MCM5 | minichromosome maintenance complex component 5 | 2.502 |
| ENPP1 | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 | 2.497 |
| ADAMTS16 | ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 16 | 2.493 |
| SMURF1 | SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 | 2.491 |

表3. Ti表面未処理と比較してCa(OH)₂処理によって発現が有意に上昇した遺伝子 (Top 30)

| Symbol | Entrez Gene Name | Fold Change |
|-------------|---|-------------|
| SPP1 (OPN) | secreted phosphoprotein 1 | 17.721 |
| MMP13 | matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) | 16.725 |
| RGS2 | regulator of G-protein signaling 2, 24kDa | 8.677 |
| TFPI2 | tissue factor pathway inhibitor 2 | 7.763 |
| PTGS1 | prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | 7.343 |
| SLC16A6 | solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7) | 7.286 |
| IGFBP1 | insulin-like growth factor binding protein 1 | 6.677 |
| DUSP4 | dual specificity phosphatase 4 | 6.649 |
| PCDH19 | protocadherin 19 | 5.943 |
| PTH1H | parathyroid hormone-like hormone | 5.630 |
| GPR56 | G protein-coupled receptor 56 | 5.129 |
| SLC29A1 | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1 | 4.924 |
| C13orf15 | regulator of cell cycle | 4.750 |
| ENPP1 | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 | 4.717 |
| EREG | epiregulin | 4.712 |
| TNFSF10 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 | 4.436 |
| CXCL6 | chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2) | 4.404 |
| TMEM158 | transmembrane protein 158 (gene/pseudogene) | 4.403 |
| PRSS1/PRSS3 | protease, serine, 1 (trypsin 1) | 4.397 |
| BMP2 | bone morphogenetic protein 2 | 4.140 |
| COL10A1 | collagen, type X, alpha 1 | 3.739 |
| FOXQ1 | forkhead box Q1 | 3.670 |
| MGP | matrix Gla protein | 3.488 |
| PLAU | plasminogen activator, urokinase | 3.364 |
| CENPM | centromere protein M | 3.288 |
| IL6R | interleukin 6 receptor | 3.223 |
| ITGA2 | integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor) | 3.205 |
| CLU | clusterin | 3.163 |
| FPR1 | formyl peptide receptor 1 | 3.114 |
| ESCO2 | establishment of cohesion 1 homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>) | 3.084 |

表4. CaCl₂処理と比較してCa(OH)₂処理によって発現が有意に上昇した遺伝子の内「骨形成」に関わる遺伝子

| Symbol | Entrez Gene Name | Fold Change |
|--------------|--|-------------|
| SPP1 (OPN) | secreted phosphoprotein 1 (Osteopontin) | 2.835 |
| PTH1H | parathyroid hormone-like hormone | 2.308 |
| FGF1 | fibroblast growth factor 1 (acidic) | 2.202 |
| BMP2 | bone morphogenetic protein 2 | 2.175 |
| PTGS1 | prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase 1) | 2.098 |
| PTGS2 (Cox2) | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase 2) | 2.008 |

These genes significantly overlapped with the genes associated with 'formation of bone' by IPA ($p=3.96 \times 10^{-4}$).

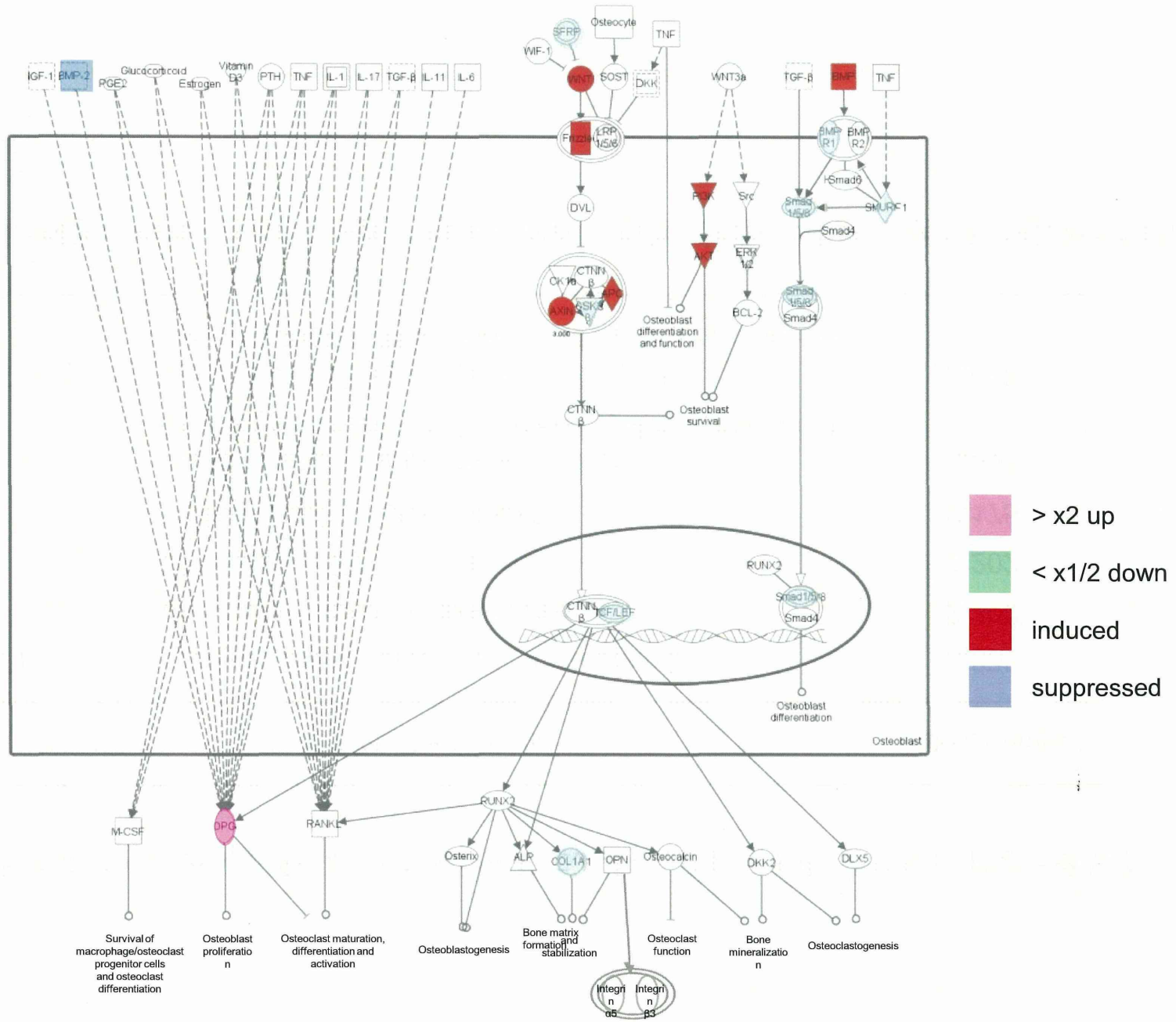


図5. 骨芽細胞の機能に及ぼすTi表面のNaOH 処理の影響

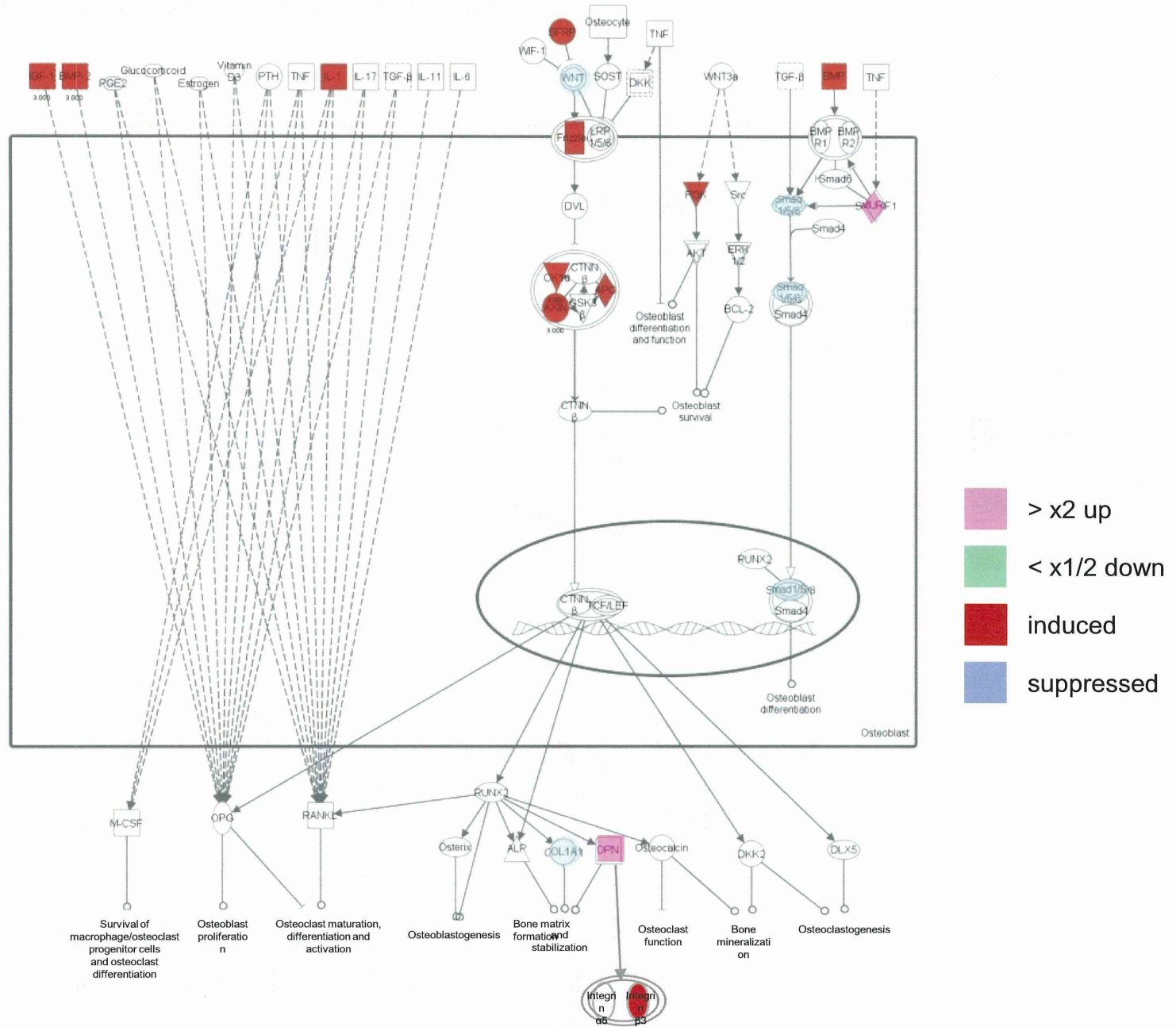


図6. 骨芽細胞の機能に及ぼすTi表面のCaCl₂ 処理の影響

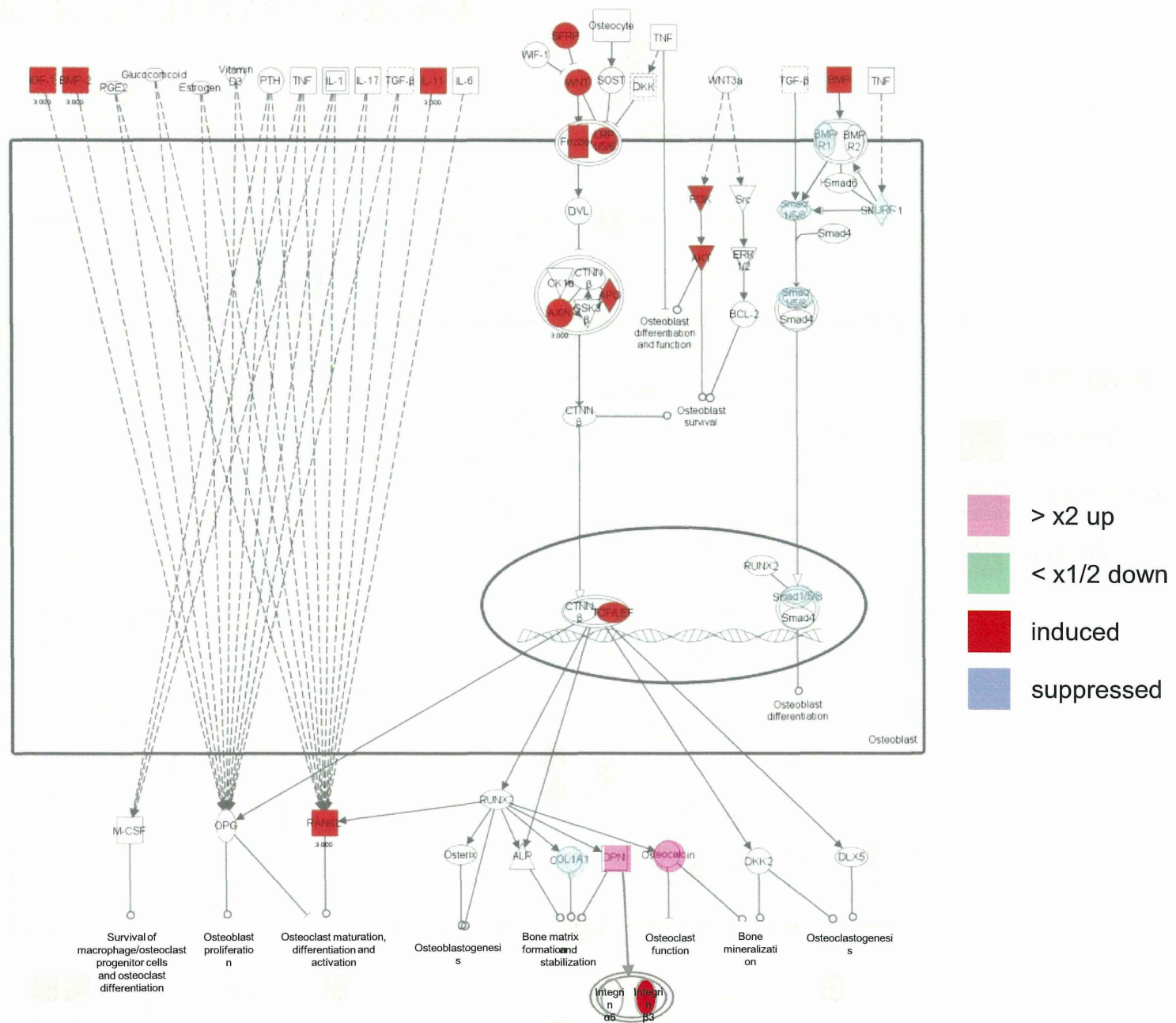


図7. 骨芽細胞の機能に及ぼすTi表面のCa(OH)₂ 処理の影響

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
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

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、細胞培養用シャーレ (TCPS) と、ポリ-2-メトキシエチルアクリレート (PMEA) とポリ-2-ヒドロキシエチルメタアクリレート (PHEMA) の組成比の異なる PMEА/PHEMA ランダム共重合体でコーティングした材料の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。その結果、TCPS と比較して 100%PMEA 上で培養した hMSC では細胞骨格・細胞伸展などの細胞形態や細胞接着に関わるタンパク質や細胞外マトリックスの発現が減少しており、これらの機能が低下していることが示唆された。それに対して、PHEMA が 25% もしくは 50% 混在した PMEА/PHEMA ランダム共重合体コーティングでは、これらの発現が TCPS と同等か高い傾向がみられた。今回の結果から、PMEА/PHEMA ランダム共重合体の組成比の違いが、コーティング表面上への吸着タンパク質の種類や量を変化させることを介して、hMSC の細胞形態や接着および細胞外マトリックスに関連するタンパク質群の発現に影響をおよぼすことが示唆された。

A. 研究目的

人工材料を用いた医療機器が生体内に埋植されると、直ちに材料表面にイオンや水が吸着し、そのあと生体内のタンパク質や多糖が吸着してくる。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ると考えられる。一方、細胞は直接材料表面に結合するのではなく、吸着し変性したタンパク質などを介して材料と相互作用するため、

材料の表面構造の違いが細胞自身の挙動に影響をおよぼし、これが生体適合性の違いを生み出す一因になると考えられる。

PMEA および PHEMA は他の類似ポリマーに比べてタンパク質の吸着が少なく、生体適合性が高いことから、それぞれに様々な埋植医療機器のコーティングやソフトコンタクトレンズなどの材料として広く用いられている。その一方で PMEА は PHEMA

よりも吸着タンパク質が脱離しやすく、かつタンパク質の変性が少ないことも知られている。これまでに、これらの表面へ結合するタンパク質の総量や特定のタンパク質の結合状態の違いを検討した研究はあるが、細胞に与える影響を細胞側のタンパク質発現挙動の比較から検討した報告はない。そこで本研究では、タンパク質発現に焦点を置いて、組成比の異なる PMEА/PHEMA ランダム共重合体が hMSC にどのような影響を与えるか検討した。

B. 研究方法

1. 材料

シート：厚さ 0.075 mm, 径 35 mm の三菱樹脂製 Pre-coated ポリエステル PET シート (ダイアホイル) (以下 PET と表記)

ポリマー溶液：PMEA と PHEMA の組成比の異なる PMEА/PHEMA ランダム共重合体 (混合比 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 w/w%)

2. ポリマーコーティングシートの作製

1 w/v%メタノール溶液の組成比の異なる PMEА/PHEMA ランダム共重合体を、メタノール溶液で洗浄した未処理 PET の中央に 125 μ l 滴下し、スピンコーターで以下の 3 ステップ(Step1: 500 rpm, 5 sec, Step2: 2,000 rpm, 10 sec, Step3: 4,000 rpm, 5 sec)にてコーティングした後、一晩乾燥させたシートを実験に用いた。以下、作製されたシートを PMEА と PHEMA の混合比 (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 w/w%) 順にそれぞれを M100, M75H25, M50H50, M25H75 と表記する。

3. 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC; LONZA) を 6 well, cell culture plate (TCPS; Costar) 上、もしくは TCPS に各コーティングシートを静置

した上に Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM; LONZA) に Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement (MSCGS; Lonza) を添加した培地 (MSCGM) を入れ、一度その培地を抜き取った後、各コーティングシート上に 1×10^5 細胞/3 ml を播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で二日間培養した。

4. 細胞形態およびシート表面観察

細胞形態およびシート表面は、それぞれ位相差倒立顕微鏡 (LEICA DM IL; Laica) を用いて観察した。

5. 細胞タンパク質の回収

各コーティングシート上で培養した細胞はシートごと、新しいシャーレに移し、冷 PBS で 6 回洗浄後、Cell Dissociation Buffer (Gibco) を用いて剥離した。その後、Cell Dissociation Buffer の 10 倍量以上の冷 PBS で 3 回洗浄後、Complete Protease inhibitor Cocktail (Roche) 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。

6. 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 7 μ l に 50 mM NH₄HCO₃ (86.2 μ l), ProteaseMax Surfactant (1%, 5 μ l; Promega) 及び Trypsin Gold (1 mg/ml, 1.8 μ l; Promega) を添加し、37°C で一晩インキュベ