

全体に値が高く、共通に被験シートがあるものでデータを比較してみると、シートなしで6.5倍、他ではPMEA 3倍～PET 9倍の差があった。この理由として、予備試験と本試験において、採血方法、インキュベーション時における振盪方法等を変更しており、それらが影響している可能性が考えられた。また、採血時の血液の状態などが、特定の因子の活性化に関与している可能性も考えられる。今後、追試験等を進めていくことで、各評価項目に影響を与える要因について、背景データ、被験物質に対する感受性の違いなどについて情報を得ることが出来るのではないかとと思われる。

2回の試験において、共通にデータが得られているシートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPCの結果について比較検討した。TATでは、シートなしが低く、PMEA、MPCがPET、PC（未コート）、PHEMAに比べて低い傾向は共通であった。β-TGでは、シートなし、PMEA、MPCが他の被験シートに比べて低いという結果は共通であった。C3aでは、0時間のみが低く、2時間インキュベーション後、シートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPCの値はいずれも高かったが、その中では、PHEMAが一番高いという結果が共通していた。C5aでは、シートなし、PMEA、MPCが他の被験シートに比べて低く、PHEMAが一番高いという結果が共通していた。SC5b-9については、シートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPCの結果がほとんど一致しており、PHEMAの値だけが高く、他のデータの順はPMEA、MPC、シートなし、PC（未コート）、PETの順で共通していた。2回の試験の比較においては、5項目において、一部結果が異なる場合もあったが、全体に共通の結果が得られており、その中でも補体系の3項目は再現

性が高い結果が得られていた。

混合比の異なるMEA/HEMAシートを用いた本試験における5項目の測定結果を比較検討した。C3aを除くTAT、β-TG、C5a、SC5b-9において、MEA/HEMAの混合比と測定結果との間に関連が見られ、その傾向は2種類に大別された。TAT、β-TGでは、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25の順に値が小さくなる傾向があり、PMEAではM50H50、M75H25に比べると高い値になり、U字カーブを描いていた。これに対して、C5a、SC5b-9では、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEAの順に値が小さくなる傾向があり、右下がりのカーブを描いていた。PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25間でHEMAの比率が増えるに従って値が増加する傾向は、TAT、β-TG、C5a、SC5b-9の4項目において、共通に観察された。

今後は、試験に用いるチューブの材質の影響についての検討、タイムコース、組織因子を含む血液の影響等、各試験法の特性について検証を進めるための基礎的なデータの収集を続ける予定である。C3aに関しては、補体系の中でも3径路により活性化されC3a、C5a、SC5b-9の中でも初期の産物であることから、活性化が起こりやすい可能性が考えられた。今後、C3aに加えて、C3a-desArgのELISA等も検討してみる予定である。混合比の異なるMEA/HEMAシートを用いた試験については、再現性について確認試験を行う。引き続きPMEA、PHEMA、MPCポリマー等の高分子材料に対して、血液適合性試験を実施し、各試験法の特性、妥当性について検証を行い、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集する予定である。

E. 結論

本研究において、血液適合性試験の各評

価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、次に、混合比の異なる MEA/HEMA、MPC 等の高分子材料を被験試料として、実際に、血液適合性試験を実施した結果、

- TAT は両試験間で、値が異なっていた。
- TAT 及び β -TG では、大まかな傾向が似ていた。
- C3a、C5a、SC5b-9 では、両試験で結果がほぼ一致していた。
- C3a では、2 時間のインキュベーションによりシートなしでも値が上昇し、被験試料による差はほとんど観察されなかった。
- C5a、SC5b-9 では、特定のシートにおいて上昇が観察された。
- MEA/HEMA の混合比を変えたシート間では、TAT、 β -TG、C5a、SC5b-9 で HEMA の比率が増えるに従って値が増加する傾向が観察された。

今後、引き続き MEA、HEMA、MPC 等の高分子材料に対して、血液適合性試験を実施し、各試験法の特徴、妥当性について検証を行い、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集する予定である。

一方、混合比の異なる MEA/HEMA シートについて、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、抽出法により V79 細胞に対する細胞毒性試験を実施した。その結果、いずれの混合比の MEA/HEMA シートにおいても細胞毒性は認められなかった。

本研究の遂行にあたり、血液適合性試験の実施方法についてご指導いただきました、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性学研究室の新藤智子先生に感謝

致します。

F. 研究発表

1. 論文発表

Usami M., Mitsunaga K., Irie T., Miyajima A., Doi O. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos J. Toxicol. Sci. (in press)

2. 学会発表

- 1) Miyajima-Tabata A., Kato R., Sakai K., Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)
- 2) 宮島敦子、加藤玲子、小森谷薫、新見伸吾：生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2013.11）
- 3) 加藤玲子、齋島由二、福井千恵、澤田留美、宮島敦子、新見伸吾：生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響（2）：タンパク質発現の網羅的解析 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2013.11）
- 4) 加藤玲子、佐藤正人、岡田恵里、阿久津英憲、小久保舞美、河毛知子、宮島敦子、梅澤明弘、持田譲治、新見伸吾：多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響 第 27 回日本軟骨代謝学会（京都、2014.2）

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【試験ガイドライン】

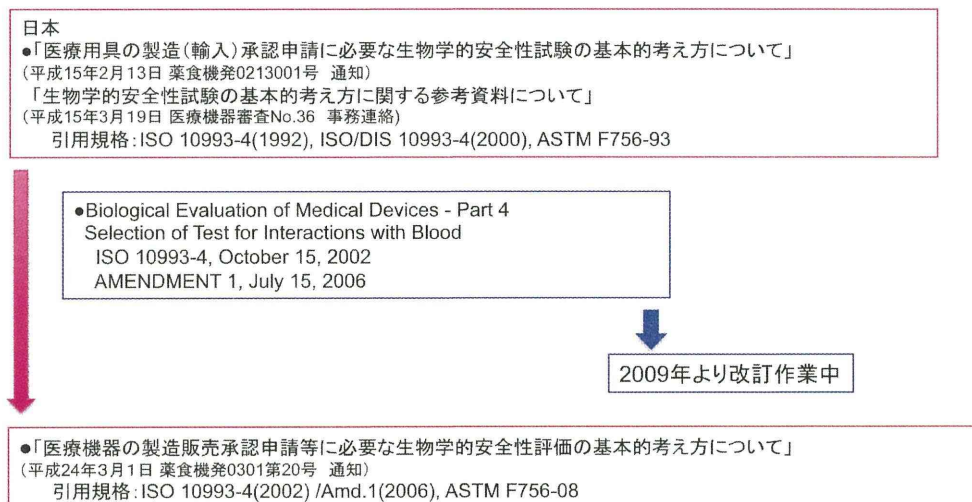


図1 血液適合性試験に関する通知

試験項目	評価項目
1 血栓形成	付着物/ 付着状態
2 血液凝固	トロンビン-抗トロンビン複合体(TAT)
	フィブリノペプチドA (FPA)
	部分トロンボプラスチン時間 (PTT)
3 血小板	血小板数
	血小板放出因子(β -トロンボグロブリン(β -TG))
	血小板第4因子(PF4)
4 血液学的項目	全血算 (CBC)
	溶血
5 補体系	補体活性化産物 (C3a)
	補体活性化産物 (C5a)
	補体活性化産物 (SC5b-9)

「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」
(薬食機発0301第20号 平成24年3月1日)より

図2 血液適合性試験における標準的な評価項目

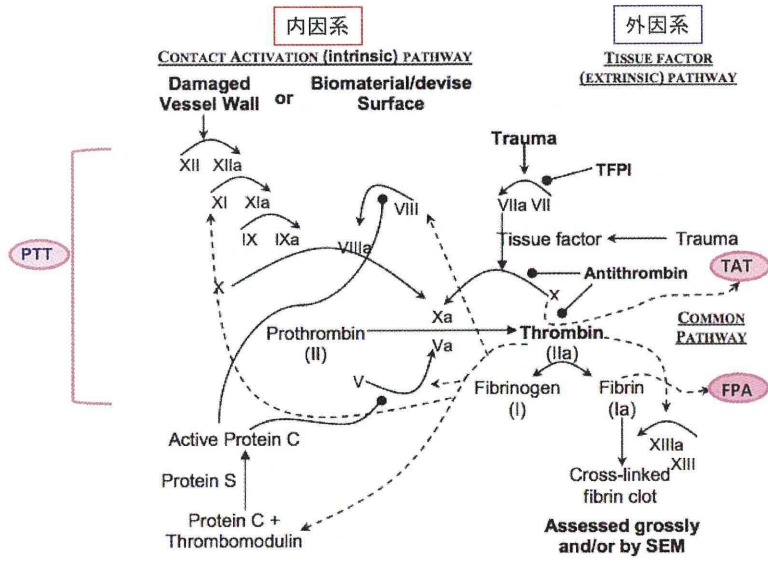
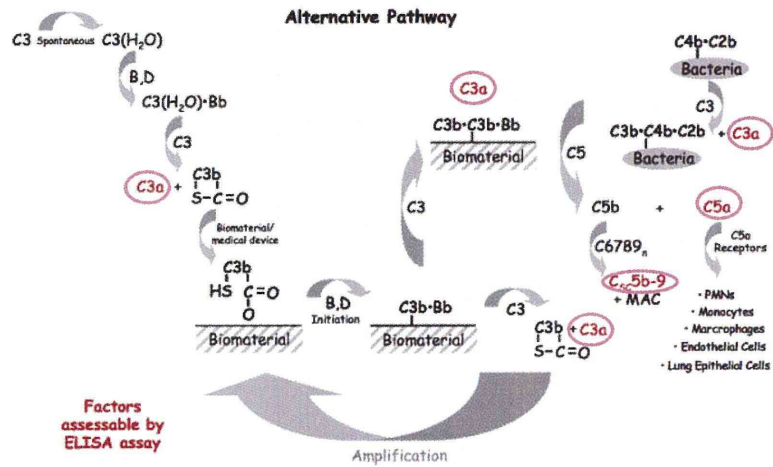


Figure B.1 — The coagulation cascade

ISO/WD 10993-4(2013) に追記

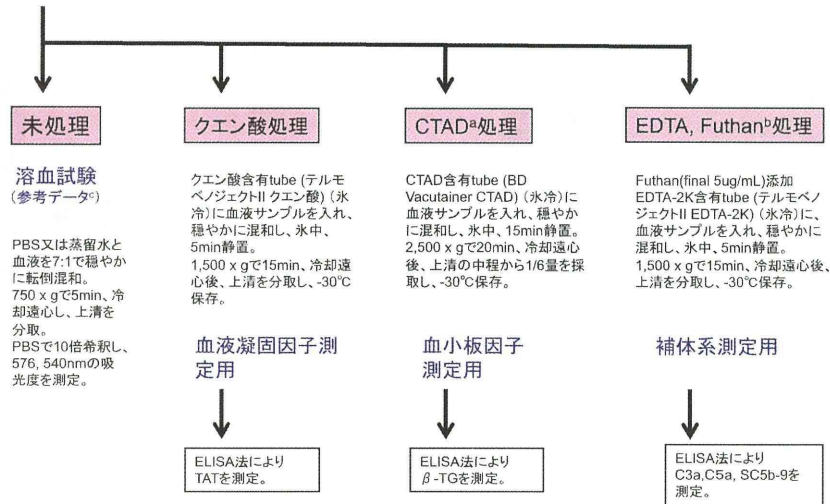
図3 血液凝固系カスケードと評価項目



ISO/WD 10993-4(2013) に追記

図4 補体系と評価項目

ヒト全血(ヘパリン2 U/mLを含む)と被験試料(6 cm² /1mL血液)を、37°C、2時間、緩やかに振盪(60 rpm)後、各試験項目に応じて血液をサンプリング。



^a CTAD: citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole (血小板凝集抑制)
^b Futhan: Nafamostat Mesilate (蛋白分解阻害剤)
^c ASTM法ではクエン酸処理血、NIH法ではシュウ酸処理血、MHLW法では脱繊維血、先に血液を希釈後、溶血試験

図5 血液適合性試験の実施方法の概略

表1 予備試験における溶血率

	ABS (576nm) mean		溶血率 (%)
	PBS	DDW	
0 time (no sheet)	0.035	0.895	
no sheet	0.033	0.995	
PET	0.036		0.26
PC	0.033		0.00
PHEMA	0.034		0.05
PMEA	0.034		0.05
MPC	0.030		0.00

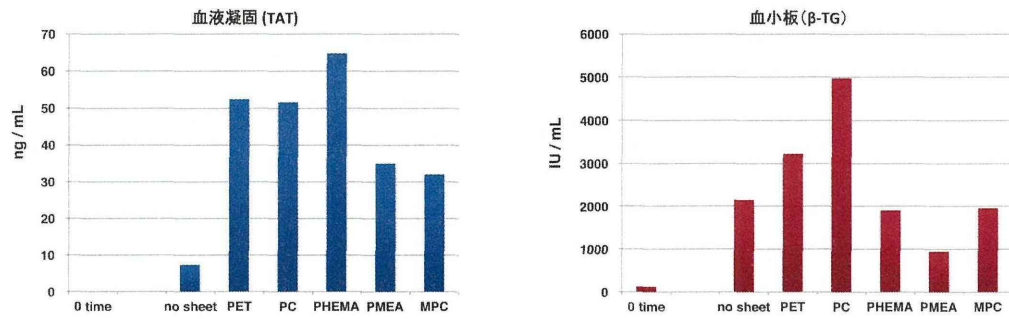


図6 予備試験における血液凝固系(TAT)及び血小板(β-TG)の活性化

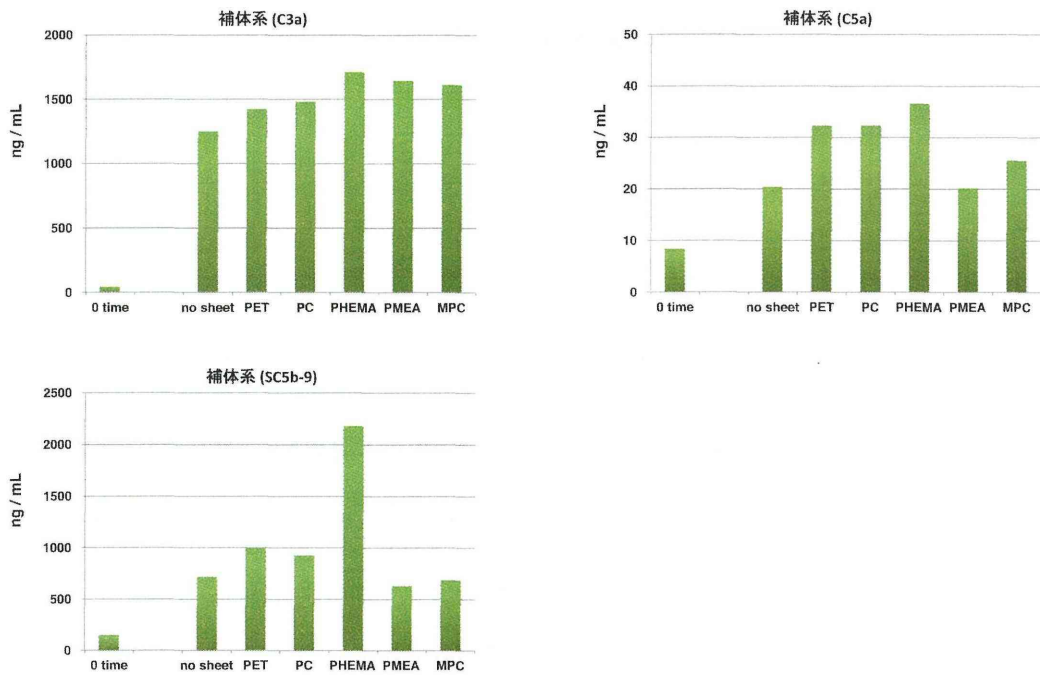


図7 予備試験における補体系(C3a, C5a, SC5b-9)の活性化

表2 本試験における溶血率

	ABS (576nm) mean		溶血率 (%)
	PBS	DDW	
0 time (no sheet)	0.034	0.923	
no sheet	0.033	0.965	
PET	0.033		0.00
PC	0.035		0.16
PHEMA	0.040		0.70
M25H75	0.035		0.21
M50H50	0.036		0.27
M75H25	0.034		0.11
PMEA	0.035		0.16
MPC	0.035		0.16

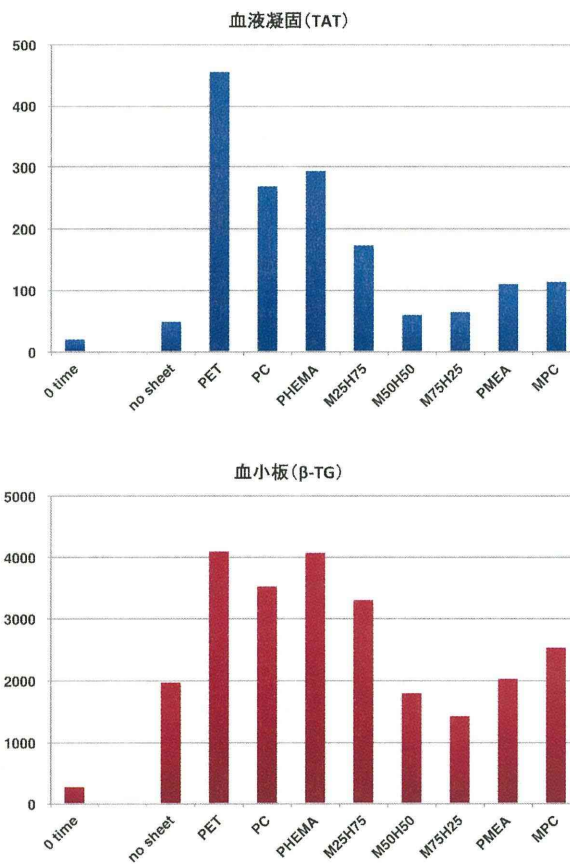


図8 本試験における血液凝固系(TAT)及び血小板(β-TG)の活性化

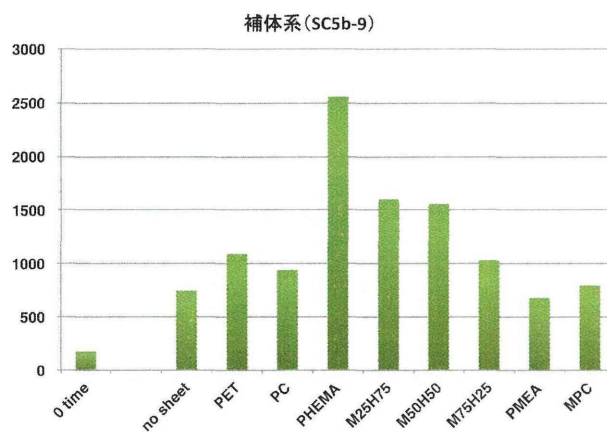
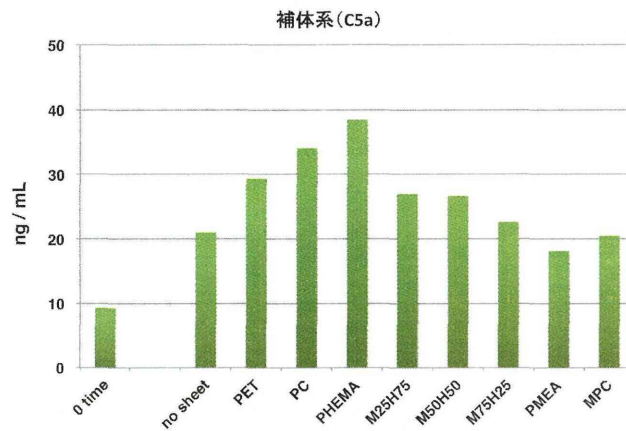
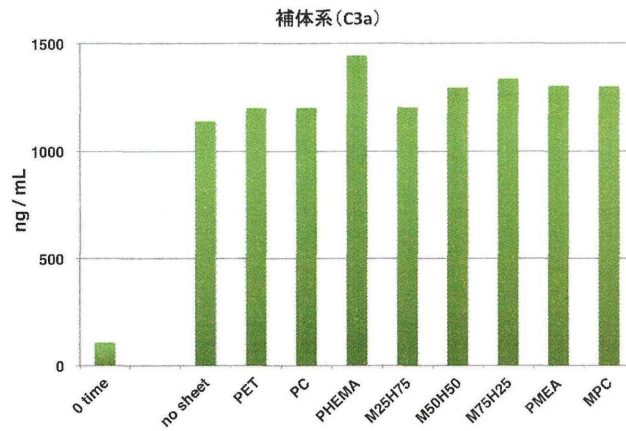


図9 本試験における補体系(C3a, C5a, SC5b-9)の活性化

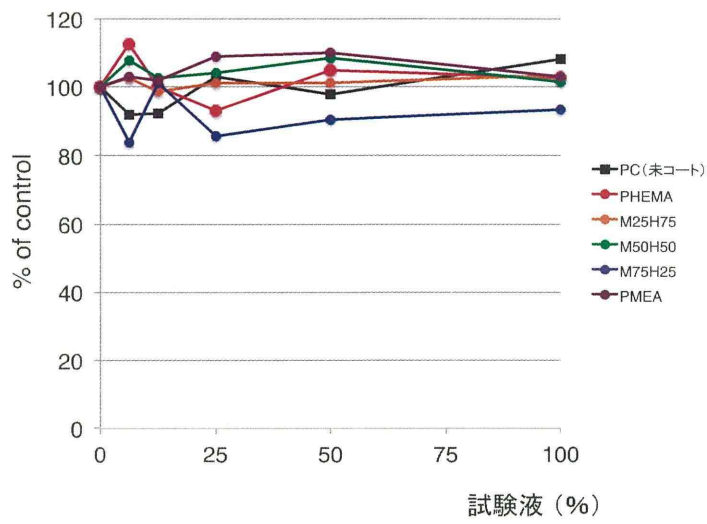


図10 V79細胞を用いた細胞毒性試験(コロニー法)

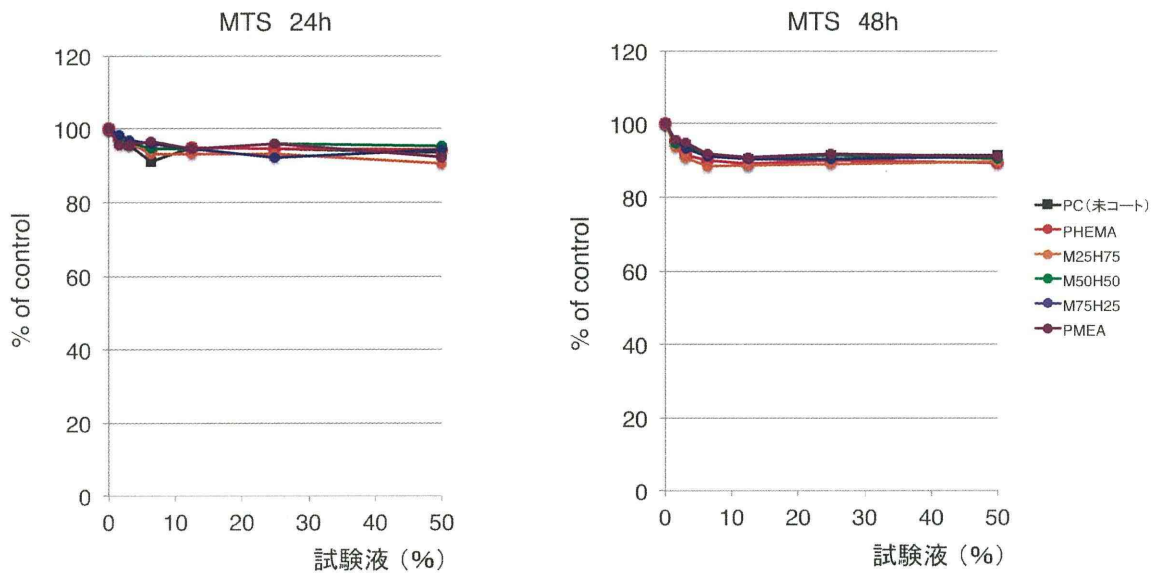


図11 V79細胞を用いた細胞毒性試験(MTS法)

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
細胞内タンパク質発現解析を利用した医用材料の血液適合性評価に関する研究

研究代表者	新見伸吾	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
研究協力者	比留間瞳	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部

研究要旨

近年、材料表面構造の違いが、その表面上へのタンパク質を始めとした種々の分子の吸着挙動の違いを生じさせ、その結果、細胞の接着や活性化などに影響を与えることが示唆されてきている。本研究では、材料表面構造の違いが、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) を対照として、ポリカーボネート (PC) シート、および PC シートをポリ-2-メトキシエチルアクリレート (PMEA) もしくはポリ-2-ヒドロキシエチルメタアクリレート (HEMA) でコーティングした上でヒト単球細胞である THP-1 を培養し、そのタンパク質発現の比較を行った。その結果、PC シート上で培養した THP-1 では、血液凝固に関わるタンパク質、炎症に関与するサイトカインやケモカイン、および細胞形態や接着に関与するタンパク質の発現が二倍以上高くなっていた。これらのタンパク質は HEMA でコーティングでは、対照と比してほとんど変化がなく、PMEA コーティングではやや低い傾向が見られた。以上のことより、基材を PMEA もしくは HEMA でコーティングすることで、血液凝固だけでなく炎症反応などを制御できることが示唆された。

A. 研究目的

人工血管や人工透析膜、人工心臓やカテーテルといった医療機器は、血液と接触することから血液適合性に優れていることが必要とされる。一般に、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。そこで昨年度、MEA/HEMA ランダム共重合体の組成比の違いが、間葉系幹細胞に及ぼす影響について検討した結果、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、間葉系幹細胞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。

PMEA および PHEMA は血液適合性に優れているという報告があることから、本年度は、検討細胞を血液球系細胞である THP-1 細胞にし、PMEA および PHEMA が THP-1 細胞にどのような影響を与えるかをタンパク質発現に焦点をおいて検討した。

B. 研究方法

1. 材料

シート：厚さ 0.1 mm, 径 35 mm の菅原工芸製 Pre-coated ポリカーボネートシート（ポリカーボネート 薄物）（以下 PC と表記）

ポリマー溶液： PMEA と PHEMA

2. ポリマーコーティングシートの作製

スピncerの設置台上に PTFE メンブレフィルターをのせ、その上にメタノール溶液で洗浄した未処理 PC を置き、4,000 rpm で回しながら、その中央に 1 w/v% メタノール溶液の PMEA もしくは PHEMA を 100 μ l 滴下し、4,000 rpm, 10 sec にてコーテ

ィングした後、乾燥させた後、再度同条件に計二回コーティングしたシートを実験に用いた。

3. 細胞培養

THP-1(Human acute monocytic leukemia : 急性単核球性白血病由来)は、10%FBS/0.05mM メルカプトエタノール含有 RPMI1640 中で二週間以上、前培養したものを使用した。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 RPMI1640 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 THP-1 を 5×10^5 細胞/2 ml で播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で二日間培養した。

4. 細胞形態表面観察

細胞形態は位相差倒立顕微鏡 (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 15ml チューブに回収し、遠心した後、10 ml の冷 PBS で 1 回洗浄後、上清を捨て、1ml の冷 PBS に懸濁し 1.5ml に移し、遠心後、同じ操作を二回繰り返して、洗浄した。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 10 µg 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 16 µl に 50 mM NH₄HCO₃ (77.2 µl)、ProteaseMax Surfactant (1%, 5 µl; Promega)及び Trypsin Gold (1 mg/ml, 1.8 µl; Promega)を添加し、37°Cで 3 時間インキュベーションした後、10% トリフルオロ酢酸 (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 OMIX Tip (C18, 100 µl: VARIAN 社)を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant)にて乾燥させた後、0.2 µg/µl の濃度になるように 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。

7. LC-MS/MS ショットガン解析

質量分析計は、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 Elite (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、HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics) を装備した ADVANCE NanoUPLC (AMR) 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 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm; CERI)、L-column Micro L-C18 (0.1 x 150 mm, 3 µm, 12 nm; CERI) を使用した。イオン源としては、バックグラウンド低減装置 (AMR 製 ABIRD) を装備した Captive Spray イオン源(AMR)を使用した。

試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.6 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 300-1,400; Lock mass = シロキサン及びフタル酸ジエチルヘキシル; 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 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)と B 溶媒 (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 (1.0 µg)はオートサンプラーを使用した。一分析当たりの溶出時間は 150 分とし、サンプル注入後、0-40%B/125 min → 40-55%B/130 min → 100%B/135 min → 100%B/140 min → 0%B/ 150 min のグラジエント条件により溶出した。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=2 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 (8 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。

8. タンパク質の同定と定量

8-1. Reject Mass List の作成

LC-MS/MS 解析において得られた MS データをタンパク質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェア v1.3 (PD1.3) (Thermo Scientific) 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±5分に設定した。

8-2. 比較定量解析

タンパク質の多変量解析は SIEVE2.0 ソフトウェア (Thermo Scientific) を用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた全ての MS データ群を同ソフトウェアにインストールし、標的イオンの m/z とリテンションタイムの相同性に基いたピークマッチングを行い、PD1.3 により同定したタンパク質情報をインストールして、多変量解析をおこなった。

8-3. オントロジー解析とパスウェイ解析

タンパク質への機能情報付加とパスウェイ解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA) と UniProtKB を用いて行った。

9. 倫理面への配慮

研究に用いた THP-1 はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入しており、倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

(1) 播種後の細胞の形状

播種して 48 時間後での THP-1 の形態を図 1 に示す。PMEA および PHEMA コーティングシート上で培養した THP-1 の形態は TCPS 上で培養した THP-1 と同様にほぼ球形で浮遊していた。これに対して、未処理の PC 上で培養した THP-1 は、ほとんどが球形で浮遊していたが、中には扁平で PC 上に接着している細胞も混在していた。(図

1 : 矢印)

(2) タンパク質発現比較解析

得られた MS データを SIEVE2.0 ソフトウェアを用いたデータベース検索した結果、 $p < 0.05$ のタンパク質が 4804 個ヒットしてきた。その内、TCPS 上の培養に対して発現量が 2 倍以上になったタンパク質は PC で 4087 個、PMEA で 11 個、PHMEA で 19 個であった。一方、発現量が 1/2 以下に減少したタンパク質は PC で 7 個、PMEA で 591 個、PHMEA で 35 個であった。(表 1)

表 2 に補体因子・血小板凝集・血液凝固・線溶系に関連するタンパク質群の発現挙動を示している。TCPS 上で培養した THP-1 と比較して未処理の PC 上で培養した THP-1 では、関連タンパク質のほとんどで有意に二倍以上の発現上昇がみられるのに対して、PMEA コートした上で培養した THP-1 では減少傾向、もしくは PHMEA でコートした上で培養した THP-1 では、ほとんど影響を受けていなかった。例えば、外因子系凝固反応の開始部分で働く組織因子は検出されていないが、血小板凝集の足場になるコラーゲンや、そのコラーゲンに付着し、さらに血小板をリクルートしてくる von Willebrand factor、引き続きおこる血液凝固に関与する凝固因子 V, VII の発現が PC 上で培養した THP-1 で有意に上昇が見られた。一方、トロンビンは検出されなかったが、IPA を用いたパスウェイ解析より、PC 上で培養した THP-1 では、トロンビシグナル関連タンパク質の発現が有意に上がっていることが分かった。(図 2) これらの関連タンパク質は PHMEA でコートした上で培養した THP-1 では、ほとんど影響を受けておらず、PMEA コートでは減少傾向がみ

られた。(表3)

フィブリノーゲンおよびフィブリンは検出されていないが、Fibrinogen silencer_binding proteinが、PC上で培養したTHP-1で有意に発現上昇していた。(表2) 凝固制御系では、アンチトロンビンやプロテインCの発現は検出できていないが、Protein Z_dependent protease inhibitorがPCとPHEMA上で培養したTHP-1で発現の亢進が見られた。線溶系関連タンパク質では血栓を溶かす作用のあるプラスミンとともに、その線溶阻止物質であるPlasminogen activator inhibitor 1 RNA_binding proteinの発現もPCで亢進していた。さらにPC上で培養したTHP-1では、血小板活性化因子群も発現上昇がみられた。内因系凝固反応系で接触因子として働く高分子キヌノゲンのレセプターコンプレックスCIQBPに含まれるケラチンタイプII細胞骨格1がPMEAおよびPHMEAでコートした上で培養したTHP-1で有意に発現減少していた。

また、全身の血管内で血液凝固反応が無秩序に起こる播種性血管内凝固症候群では、凝固反応の開始因子としてHigh mobility group protein1(HMGB1)やヒストンが働くと報告がある。これらのタンパク質はPC上で培養したTHP-1で発現上昇が見られた。

一方、感染症時などでは、内皮細胞だけでなく、単球やマクロファージも刺激され、血液凝固開始に重要な役割を果たす組織因子を発現するようになる。このように、炎症と血液凝固の間に関連性があることから、表4に炎症・遊走に関連するタンパク質群の発現挙動を示した。種々のインターロイキン、インターフェロン、Tumor necrosis factor やケモカイン関連タンパク質や Toll

like receptor-3,-7,-8、アラキドン酸産生に働くホスホリパーゼ A、さらにアラキドン酸カスケードの作用で産生されるプロスタグランジン類やロイコトリエン類に関連するタンパク質、血小板凝集に働くホスホリパーゼ C などの発現も PC 上で培養した THP-1 で二倍以上の発現亢進がみられた。

さらに顕微鏡観察において、PC 上で培養していた THP-1 に形態変化が観察されたことから、細胞骨格・伸展・接着関連タンパク質群の発現挙動を表5に示した。細胞骨格タンパク質のマイクロフィラメントを形成しているアクチン関連タンパク質、アクチン結合タンパク質であるフィラミン・ミオシン・トロポミオシン関連タンパク質、さらに中間系フィラメントである、ラミン、ビメンチン、微小管形成タンパク質でチューブリンおよび微小管関連タンパク質がPC 上で培養した THP-1 で二倍以上の上昇が見られた。それらのタンパク質は、TCPS 上で培養した THP-1 と比較して PMEA では減少傾向、PHEMA ではほとんど変わらなかったが、トロポミオシン関連タンパク質で発現低下が見られた。一方、細胞の裏打ちタンパク質である、テーリン、ビンキュリン、アクチニン関連タンパク質や細胞膜貫通の細胞接着分子であるラミニン類も PC 上で培養した THP-1 で発現が亢進していた。また、血管内皮との接着に重要な LFA-1 や VLA-4 を含む種々のインテグリンの発現も PC 上で増加が見られた。

D. 考察

本研究では、表面構造の違いが THP-1 に与える影響を細胞のタンパク質発現レベルで検討する目的で、通常の培養皿である

TCPS を対照として、基材 (PC シート) および血液適合性が高いと報告のある PMEА もしくは PHEMA でコーティングした PC シートの上で培養した THP-1 のタンパク質発現の網羅的解析を行った。

まず、播種して 48 時間後の THP-1 を顕微鏡観察したところ、TCPS 上では接触面で接着はせずに物理的に触れている状態であった。しかしながら未処理の PC 上では、シートの接触面に接着している細胞や接着はしていないが突起を出している状態の細胞が一部観察された。もともと THP-1 は未刺激では浮遊している細胞であるが、ホルボールエステルやリポポリサッカロイドなどで刺激されるとマクロファージ様の細胞に変化し接着するようになる。つまり、THP-1 は未処理の PC 表面から何らかの刺激を受けた可能性が考えられる。一方、各コーティングシート上で培養した THP-1 は TCPS と同様に接触面で触れている状態であった。これは PMEА や PHEMA コーティングにより、表面構造が変わったこと、さらに表面上への吸着タンパク質の種類や量が変化したこと (H24 年度本報告書葎島の項、研究結果(2) 吸着蛋白質の解析を参照) が影響していると考えられる。

一方、敗血症性播種性血管内凝固症候群は全身の血管内で血液凝固が起こり、その結果、微小血栓が多発する症候群である。その凝固活性化のイニシエーターとしては、病原体由来のエンドトキシン、炎症性のサイトカインや HMGB1 が考えられている。これらの因子が単球・マクロファージや血管内皮細胞の表面に組織因子を発現させ、凝固反応が開始する。このように、炎症と血液凝固との間には関連があることが知ら

れている。THP-1 は単球系の細胞であることから、接触面の表面構造の違いによる影響から、何らかの刺激を受け炎症反応と類似した活性化状態になっている可能性が考えられた。そこで、補体因子・血小板凝集・血液凝固・線溶系および炎症・遊走・細胞骨格・伸展・接着に関連するタンパク質群に着目し、その発現挙動を TCPS 上で培養した THP-1 を対照として検討したところ、未処理の PC 上での培養で、そのほとんどのタンパク質が発現上昇 (平均 3.09 倍) していた。一方、コーティングしたシート上で培養した THP-1 の上記関連タンパク質の発現は、PMEА では、減少傾向 (平均 0.81 倍) がみられ、PHEMA では、ほぼ変化なかった。(平均 1.03 倍) これらのタンパク質の中には Fibrinogen silencer binding protein や Protein Z dependent protease inhibitor といった凝固に抑制的に働くタンパク質や血栓溶解作用のあるプラスミンといったタンパク質が PC 上で有意に発現上昇していたが、これは一連のパスウェイが動くと、その制御機構として、連動して発現挙動に変化が起る結果なのかもしれない。

PMEА も PHEMA もタンパク質吸着が比較的少ないが、PMEАの方が吸着タンパク質を脱離しやすく、また変性しにくいこと、さらに PMEАには中間水が存在するが、PHEMAには存在しないことが知られている。これらの性質の違いが、PMEАは TCPS に比べて減少傾向がみられているが、PHEMAはほとんど発現パターンが変わらないという、今回の結果の差に関連があるのかもしれない。今後、組成比の違う MEA/HEMA ランダム共重合体でコーティングした上で培養した THP-1 でのタンパク

質発現を、相互に比較検討する必要がある。

PC 上で培養した THP-1 は一部接着していることが観察されていたが、今回のサンプル調製では、浮遊している細胞しか回収していなかったため、接着している細胞も含めてサンプル調製すると、今回より大きな差がみられる可能性がある。また、液性因子など、今回のサンプル調製では取りこぼしているタンパク質群もあることから、遺伝子発現解析の結果を参考にすることや、細胞上清からタンパク質精製など、サンプル調製を工夫することで、これらの問題を解決できると思われる。

E. 結論

今回の結果から、基材を PME A もしくは P HEMA でコーティングすることで、血液凝固だけでなく炎症反応なども制御できる可能性が示唆された。また、その傾向は PME A の方が強かった。

F. 研究発表

学会発表

1. Miyajima Tabata A., Kato R., Sakai K., Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals.

Eurotox 2013 (2013.9)

2. 澤田留美, 河野健, 加藤玲子, 新見伸吾
「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (1): 遺伝子発現の網羅的解析」

第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)

3. 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (2): タンパク質発現の網羅的解析」

第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)

4. 宮島敦子, 加藤玲子, 小森谷薫, 新見伸吾「生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答」

第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)

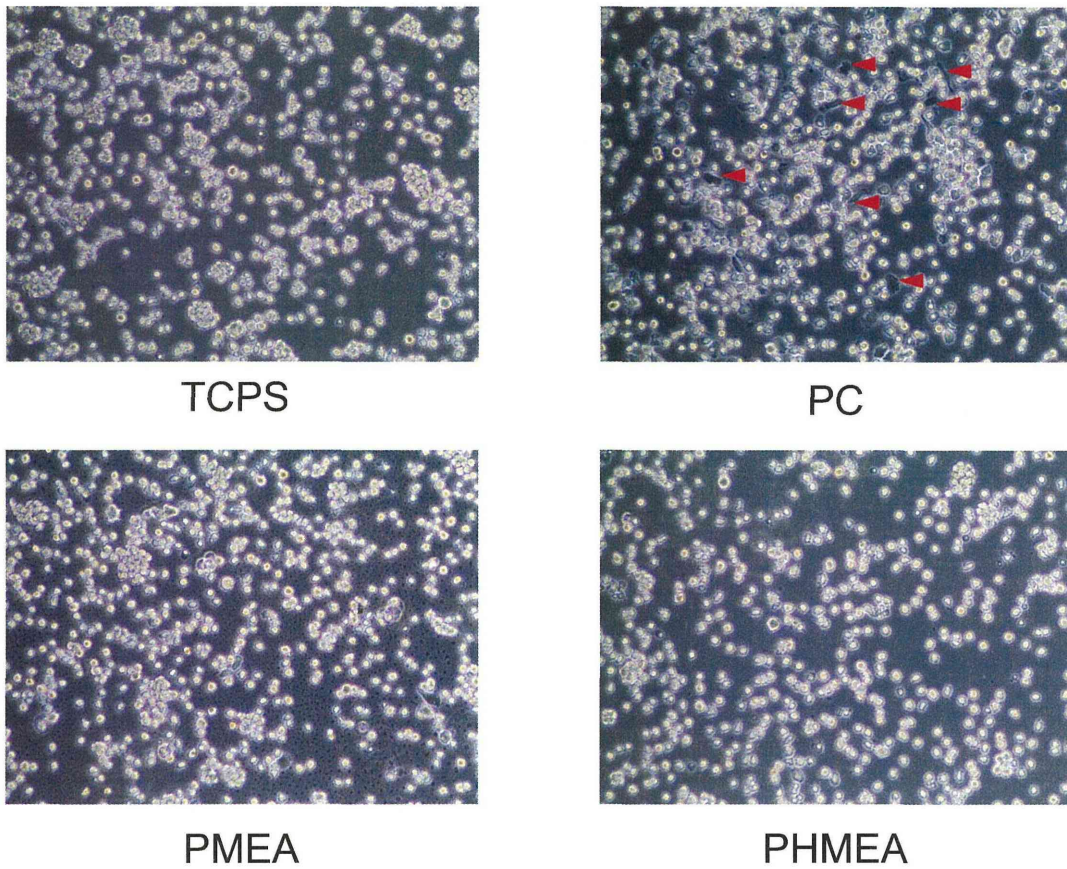


図1. 播種48時間後の細胞形態

表1. TCPS上での培養と比較してTHP-1での発現が変化したタンパク質数

Fold Change (vs TCPS)	PC	PMEA	PHEMA
5倍以上	190	1	1
2倍以上5倍未満	3897	10	18
1/5以上1/2以下	5	51	29
1/5未満	2	8	6
発現変化のあったタンパク質数	4094	70	54

表2.タンパク質比較定量解析結果:血液凝固・線溶系関連タンパク質群

■ : 2倍以上 ■ : 5倍以上

Protein name	Peptides	Frames	Hits	Rslative reation (sample/TCPS)			
				TCPS	PC	PMEA	PHEMA
Complement factor H	1	1	1	1.00	2.02	1.06	1.29
Complement component 1 Q subcomponent_binding protein_mitochondrial	1	1	1	1.00	8.71	1.04	1.36
Complement component C8 gamma chain	1	1	1	1.00	3.31	0.77	0.90
Complement factor H_related protein 5	1	1	1	1.00	3.26	0.95	1.16
Complement component C1q receptor	1	1	4	1.00	3.14	0.71	1.04
Complement C1q tumor necrosis factor_related protein 8	1	1	2	1.00	3.01	0.69	0.85
Complement C1q_like protein 3	1	1	1	1.00	2.66	0.59	0.83
Plasma protease C1 inhibitor	1	1	1	1.00	2.32	0.72	0.83
Keratin_type II cytoskeletal 1	2	2	6	1.00	0.80	0.20	0.50
Collagen alpha_1(II) chain	1	1	1	1.00	2.11	0.92	1.03
Collagen alpha_1(V) chain	1	1	1	1.00	3.26	0.82	1.16
Collagen alpha_1(VII) chain	1	1	2	1.00	2.69	0.79	0.97
Collagen alpha_1(VIII) chain	1	1	1	1.00	3.37	0.83	1.06
Collagen alpha_1(XII) chain	2	1	13	1.00	2.51	0.86	1.14
Collagen alpha_1(XIV) chain	2	2	3	1.00	2.69	0.88	0.98
Collagen alpha_1(XVI) chain	1	1	1	1.00	3.06	0.78	0.93
Collagen alpha_1(XVII) chain	1	1	1	1.00	3.11	0.94	1.26
Collagen alpha_1(XVIII) chain	2	2	3	1.00	2.90	0.83	1.12
Collagen alpha_1(XX) chain	1	1	3	1.00	2.62	0.85	0.99
Collagen alpha_1(XXI) chain	1	1	1	1.00	2.55	0.61	0.90
Collagen alpha_1(XXVIII) chain	1	1	4	1.00	2.86	0.73	0.77
Collagen alpha_2(I) chain	1	1	1	1.00	2.24	0.80	0.97
Collagen alpha_2(IX) chain	1	1	2	1.00	2.09	0.74	0.72
Collagen alpha_2(VI) chain	1	1	1	1.00	3.09	0.71	1.01
Collagen alpha_3(VI) chain	2	2	4	1.00	2.64	0.82	1.21
Collagen alpha_4(IV) chain	1	1	4	1.00	3.05	0.91	1.01
Collagen alpha_5(VI) chain	1	1	2	1.00	2.69	0.71	0.80
Collagen alpha_6(VI) chain	1	1	1	1.00	2.69	0.71	0.80
von Willebrand factor	1	1	1	1.00	3.38	0.79	0.87
von Willebrand factor A domain_containing protein 8	2	2	7	1.00	2.39	0.66	0.98
von Willebrand factor A domain_containing protein 5A	1	1	1	1.00	11.30	1.56	2.28
von Willebrand factor D and EGF domain_containing protein	1	1	3	1.00	2.06	0.79	1.13
von Willebrand factor C domain_containing protein 2_like	1	1	1	1.00	2.70	0.72	0.94
Coagulation factor V	2	2	2	1.00	3.36	0.70	1.13
Coagulation factor VII	1	1	6	1.00	3.97	0.69	1.09
Inter_alpha_trypsin inhibitor heavy chain H4	1	2	18	1.00	4.58	0.82	1.09
Fibrinogen silencer_binding protein	1	1	14	1.00	2.49	0.73	0.95
Protein Z_dependent protease inhibitor	2	1	2	1.00	5.61	1.38	2.31
Plasminogen	1	1	1	1.00	3.01	0.91	0.95
Plasminogen_like protein B	1	1	2	1.00	6.14	1.01	1.17
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA_binding protein	9	14	122	1.00	4.47	0.77	1.05
Platelet endothelial cell adhesion molecule	6	6	14	1.00	3.00	0.88	1.02
Platelet_activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	1	1	2	1.00	2.87	0.64	0.73
Platelet_activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	2	3	9	1.00	3.28	0.68	1.27
Platelet_derived growth factor receptor beta	1	1	2	1.00	2.85	0.86	1.06
Platelet_derived growth factor subunit A	1	1	2	1.00	2.62	0.74	0.97
High mobility group protein B1	7	15	85	1.00	2.70	0.78	1.02
High mobility group protein B2	8	14	106	1.00	2.97	0.83	1.03
High mobility group protein B3	4	5	37	1.00	2.79	0.71	1.00
Histone H2A type 1_D	1	3	41	1.00	4.01	0.75	1.08
Histone H2A type 3	5	14	154	1.00	3.63	0.78	1.07
Histone H2A.J	1	2	14	1.00	3.57	0.74	1.06
Histone H2B type 3_B	4	8	69	1.00	3.54	0.80	1.10
Histone H2A type 2_B	1	1	14	1.00	3.35	0.83	1.05

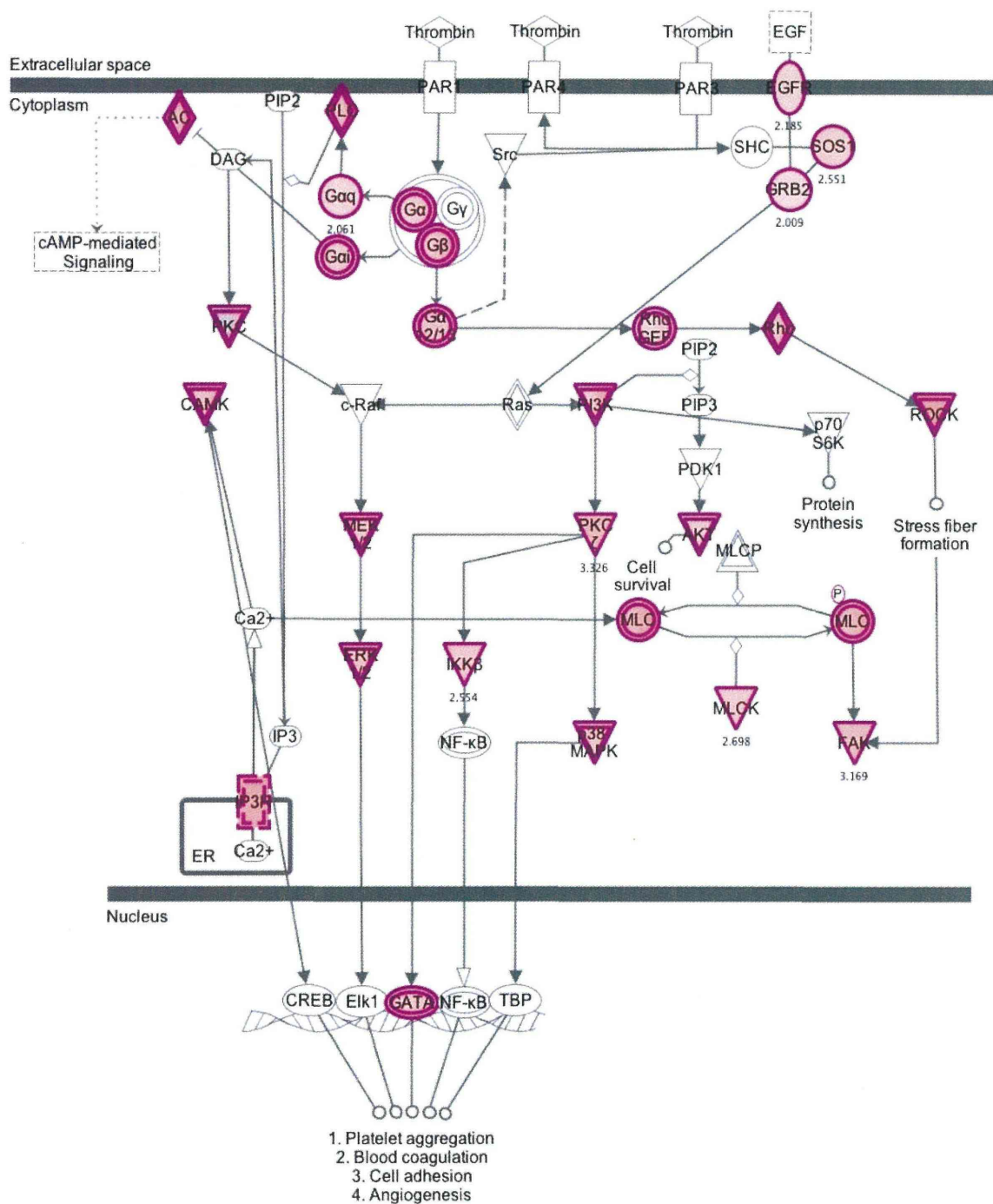


図2. PC上で培養したTHP-1における
 トロンビンシグナル関連タンパク質の発現挙動

表3.タンパク質比較定量解析結果:トロンビンシグナル関連タンパク質群

■ : 2倍以上

Protein name	Peptides	Frames	Hits	Rslative reation (sample/TCPS)			
				TCPS	PC	PMEA	PHEMA
Adenylate cyclase type 2	1	1	6	1.00	3.92	0.67	1.02
Adenylate cyclase type 9	1	1	1	1.00	2.74	0.74	0.93
Adenylate cyclase type 10	1	1	1	1.00	3.69	0.75	1.16
RAC_alpha serine/threonine_protein kinase	1	1	2	1.00	2.26	0.71	0.98
Rho guanine nucleotide exchange factor 1	5	6	22	1.00	2.43	0.84	1.03
Rho guanine nucleotide exchange factor 2	5	8	52	1.00	2.04	0.74	0.81
Rho guanine nucleotide exchange factor 10	1	1	3	1.00	2.32	0.76	0.93
Rho guanine nucleotide exchange factor 12	1	1	1	1.00	2.89	0.74	0.94
Rho guanine nucleotide exchange factor 15	1	1	1	1.00	2.55	0.61	0.90
Calcium/calmodulin_dependent protein kinase type 1G	1	1	1	1.00	2.39	0.77	0.92
Calcium/calmodulin_dependent protein kinase type II subunit alpha	1	1	1	1.00	3.48	0.69	0.87
Calcium/calmodulin_dependent protein kinase type II subunit delta	1	2	5	1.00	3.73	0.87	1.12
Epidermal growth factor receptor	1	1	1	1.00	2.18	0.71	0.87
Formin_binding protein 1	2	2	2	1.00	4.54	0.91	1.13
Transcription factor GATA_4	1	1	2	1.00	2.42	0.74	1.05
Transcription factor GATA_6	1	1	2	1.00	2.42	0.74	1.05
Guanine nucleotide_binding protein subunit alpha_13	1	1	1	1.00	2.73	0.89	1.02
Guanine nucleotide_binding protein G(i) subunit alpha_2	6	8	49	1.00	2.42	0.67	0.84
Guanine nucleotide_binding protein G(olf) subunit alpha	1	1	12	1.00	3.25	0.76	1.16
Guanine nucleotide_binding protein G(q) subunit alpha	1	2	5	1.00	2.06	0.86	1.16
Guanine nucleotide_binding protein G(t) subunit alpha_2	2	2	2	1.00	2.97	0.85	1.06
Guanine nucleotide_binding protein G(l)/G(S)/G(T) subunit beta_1	3	3	18	1.00	2.60	0.85	1.06
Guanine nucleotide_binding protein G(l)/G(S)/G(T) subunit beta_2	4	5	25	1.00	2.89	0.86	1.21
Guanine nucleotide_binding protein subunit beta_4	4	4	43	1.00	2.80	0.86	1.15
Guanine nucleotide_binding protein subunit beta_2_like 1	17	22	193	1.00	3.70	0.81	1.17
Growth factor receptor_bound protein 2	7	9	55	1.00	2.01	0.73	1.18
Inhibitor of nuclear factor kappa_B kinase subunit beta	1	1	5	1.00	2.55	0.76	1.02
Inositol 1_4_5_trisphosphate receptor type 3	1	1	12	1.00	3.55	0.91	1.07
Dual specificity mitogen_activated protein kinase kinase 2	1	1	1	1.00	2.67	0.73	0.95
Mitogen_activated protein kinase 1	3	3	15	1.00	3.07	0.92	1.18
Mitogen_activated protein kinase 3	1	1	1	1.00	2.60	0.82	0.94
Mitogen_activated protein kinase 13	1	1	2	1.00	2.70	0.98	0.89
Myosin light chain 1/3_skeletal muscle isoform	1	2	17	1.00	4.30	0.79	1.16
Myosin regulatory light chain 2_ventricular/cardiac muscle isoform	1	1	1	1.00	3.92	0.66	1.32
Myosin light polypeptide 6	7	9	103	1.00	3.04	0.79	1.11
Myosin regulatory light polypeptide 9	3	5	17	1.00	3.33	0.80	1.08
Myosin regulatory light chain 12B	1	1	14	1.00	3.16	0.86	1.16
Myosin light chain kinase_smooth muscle	1	1	2	1.00	2.70	0.98	0.89
Protein disulfide_isomerase A3	26	38	310	1.00	3.48	0.80	1.09
Phosphatidylinositol 4_5_bisphosphate 3_kinase C2 domain_containing subunit beta	1	1	1	1.00	2.26	0.61	0.83
Phosphatidylinositol 4_5_bisphosphate 3_kinase catalytic subunit alpha isoform	1	1	6	1.00	2.78	1.19	1.34
Phosphatidylinositol 4_5_bisphosphate 3_kinase catalytic subunit beta isoform	1	1	1	1.00	4.95	0.79	1.21
Phosphatidylinositol 4_5_bisphosphate 3_kinase catalytic subunit gamma isoform	1	1	1	1.00	3.81	0.72	1.02
Phosphatidylinositol 3_kinase regulatory subunit alpha	2	2	7	1.00	2.36	0.84	0.91
Phosphoinositide 3_kinase regulatory subunit 5	1	1	2	1.00	2.67	0.81	1.23
Phosphoinositide 3_kinase regulatory subunit 6	1	1	1	1.00	2.71	0.77	1.23
1_phosphatidylinositol 4_5_bisphosphate phosphodiesterase delta_1	1	1	3	1.00	3.87	0.91	1.05
1_phosphatidylinositol 4_5_bisphosphate phosphodiesterase delta_3	1	1	3	1.00	3.44	0.83	0.93
1_phosphatidylinositol 4_5_bisphosphate phosphodiesterase epsilon_1	1	1	7	1.00	2.53	0.80	1.03
1_phosphatidylinositol 4_5_bisphosphate phosphodiesterase eta_2	2	3	11	1.00	3.20	0.87	1.06
Protein kinase C zeta type	1	1	3	1.00	3.33	0.54	0.91
Focal adhesion kinase 1	1	1	2	1.00	3.17	0.87	1.09
Transforming protein RhoA	1	1	14	1.00	2.74	0.73	0.97
Rho_related GTP_binding protein RhoB	1	1	14	1.00	2.77	0.88	0.92
Rho_related GTP_binding protein RhoC	4	4	27	1.00	3.01	0.80	1.15
Rho_related GTP_binding protein RhoG	3	4	10	1.00	2.46	0.70	1.01
Rho_related GTP_binding protein RhoQ	1	1	14	1.00	2.37	0.75	1.02
Rho_associated protein kinase 2	1	1	1	1.00	4.16	0.87	1.32
Son of sevenless homolog 1	1	1	2	1.00	2.55	0.93	1.18