

表4. タンパク質比較定量解析結果:炎症・遊走関連タンパク質群

■: 1/2倍以下 ■: 2倍以上 ■: 5倍以上

Protein name	Peptides	Frames	Hits	Relative reation (sample/TCPS)			
				TCPS	PC	PMEA	PHEMA
Angiotensinogen	4	4	47	1.00	2.54	0.92	0.98
Interleukin_1 receptor accessory protein_like 1	1	1	12	1.00	3.52	0.92	1.04
Interleukin_3 receptor subunit alpha	2	1	3	1.00	3.31	0.87	0.88
Interleukin_11 receptor subunit alpha	1	1	1	1.00	2.24	0.77	1.11
Gamma_interferon_inducible lysosomal thiol reductase	1	1	2	1.00	3.36	0.72	1.01
Interferon lambda_1	1	1	1	1.00	2.43	0.83	0.73
Interferon regulatory factor 2_binding protein 2	1	1	6	1.00	3.69	0.75	0.96
Interferon regulatory factor 2_binding protein_like	2	2	3	1.00	2.55	1.20	0.99
Interferon regulatory factor 5	1	1	1	1.00	2.44	0.76	0.98
Interferon_induced 35 kDa protein	1	1	1	1.00	4.73	0.65	1.16
Interferon_induced GTP_binding protein Mx2	1	2	2	1.00	5.82	1.77	1.27
Interferon_induced guanylate_binding protein 1	1	1	2	1.00	2.65	0.74	1.03
Interferon_induced helicase C domain_containing protein 1	1	1	1	1.00	2.71	0.76	0.97
Interferon_induced_double_stranded RNA_activated protein kinase	2	2	15	1.00	2.02	1.01	0.89
Interferon_inducible double_stranded RNA_dependent protein kinase activator A	1	1	6	1.00	2.09	0.92	1.04
Interferon_inducible GTPase 5	1	1	11	1.00	2.88	0.85	1.06
Macrophage colony_stimulating factor 1 receptor	2	2	6	1.00	3.00	0.80	0.98
Complement C1q tumor necrosis factor_related protein 8	1	1	2	1.00	3.01	0.69	0.85
TNF receptor_associated factor 3	1	1	2	1.00	3.43	0.84	1.38
TNF receptor_associated factor 5	1	1	4	1.00	3.49	0.93	1.05
TNFAIP3_interacting protein 1	1	1	2	1.00	2.25	0.85	0.99
TNFAIP3_interacting protein 3	2	2	3	1.00	2.37	0.82	1.02
Tumor necrosis factor alpha_induced protein 8_like protein 2	2	3	11	1.00	2.51	0.81	1.11
Tumor necrosis factor_inducible gene 6 protein	1	1	1	1.00	3.19	0.76	0.99
Allograft inflammatory factor 1	1	1	2	1.00	4.22	0.22	0.88
C_C motif chemokine 16	1	1	3	1.00	4.55	0.71	1.35
C_C motif chemokine 23	1	1	2	1.00	3.54	0.81	1.12
C_C motif chemokine 24	1	1	1	1.00	2.36	0.69	1.02
C_X_C motif chemokine 14	1	1	2	1.00	2.42	0.84	1.09
Toll_like receptor 3	1	1	8	1.00	3.35	0.76	1.03
Toll_like receptor 7	2	2	6	1.00	4.14	0.83	1.09
Toll_like receptor 8	1	1	6	1.00	2.35	0.67	0.81
Prostamide/prostaglandin F synthase	1	1	1	1.00	2.67	0.85	1.25
Prostaglandin D2 receptor	1	1	1	1.00	6.40	0.80	1.63
Prostaglandin E synthase 3	6	7	63	1.00	3.53	0.77	0.97
N Leukotriene A_4 hydrolase	2	2	9	1.00	2.30	0.69	1.10
Cytosolic phospholipase A2 delta	1	1	1	1.00	2.40	0.73	1.05
Phospholipase A_2_activating protein	2	2	4	1.00	3.44	0.75	0.86
Secretory phospholipase A2 receptor	1	1	2	1.00	2.24	1.34	1.17
Phospholipase B1_membrane_associated	1	1	13	1.00	2.49	0.78	0.88
Phospholipase D2	2	2	2	1.00	3.19	0.66	0.95
Phospholipase D4	3	3	3	1.00	2.69	0.69	0.91
Phosphatidylinositol_glycan_specific phospholipase D	2	1	2	1.00	2.36	0.71	0.66
Phospholipase DDHD1	1	1	1	1.00	2.13	0.77	0.92
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_1	1	1	1	1.00	4.15	1.24	0.84
1_phosphatidylinositol_4_5_bisphosphate phosphodiesterase eta_2	2	3	11	1.00	3.20	0.87	1.06
1_phosphatidylinositol_4_5_bisphosphate phosphodiesterase gamma_2	1	1	3	1.00	1.59	0.85	0.98
Rap1 GTPase_GDP dissociation stimulator 1	6	7	21	1.00	2.80	0.80	1.13

表5-1. タンパク質比較定量解析結果:細胞骨格・伸展・接着関連タンパク質群

■: 1/2倍以下 ■: 2倍以上 ■: 5倍以上

Protein name	Peptides	Frames	Hits	Rslative reation (sample/TCPS)			
				TCPS	PC	PMEA	PHEMA
Alpha_actinin_1	18	28	218	1.00	3.53	0.79	1.13
Alpha_actinin_2	2	3	22	1.00	4.83	0.80	1.23
Alpha_actinin_4	42	56	420	1.00	3.21	0.83	1.13
Afadin_and_alpha_actinin_binding_protein	1	1	4	1.00	2.92	0.79	1.09
A_kinase_anchor_protein	4	4	8	1.00	2.86	0.83	1.05
Actin_cytoplasmic_2	20	102	769	1.00	2.00	0.76	0.92
Actin_related_protein_2	17	25	187	1.00	2.55	0.78	1.04
Actin_related_protein_2/3_complex_subunit_2	17	24	134	1.00	2.81	0.76	1.02
Actin_related_protein_2/3_complex_subunit_3	7	9	69	1.00	3.17	0.75	1.20
Actin_related_protein_2/3_complex_subunit_4	8	14	120	1.00	2.47	0.80	1.14
Actin_related_protein_2/3_complex_subunit_5	4	4	25	1.00	3.11	0.74	1.06
Actin_related_protein_3	16	24	144	1.00	2.74	0.80	1.09
Actin_related_protein_T3	1	1	4	1.00	2.78	0.86	1.07
F_actin_capping_protein_subunit_alpha_2	6	7	42	1.00	2.84	0.77	1.10
Angiotensin_converting_enzyme	1	1	9	1.00	3.06	0.79	0.98
Calnexin	17	25	210	1.00	3.14	0.82	1.02
Calponin_2	5	7	30	1.00	2.18	0.77	0.90
Cell_division_control_protein_42_homolog	7	7	54	1.00	2.44	0.82	1.12
Dihydropyrimidinase_related_protein_2	6	6	32	1.00	2.18	0.79	1.00
Dual_specificity_mitogen_activated_protein_kinase_kinase_2	1	1	1	1.00	2.67	0.73	0.95
Dynactin_subunit_1	3	3	7	1.00	2.94	0.76	1.16
Focal_adhesion_kinase_1	1	1	2	1.00	3.17	0.87	1.09
Fibronectin_type_III_and_SPRY_domain_containing_protein_2	1	1	1	1.00	4.59	0.79	1.04
Fibronectin_type_III_domain_containing_protein_4	1	1	1	1.00	3.48	0.84	1.31
Filamin_A	1	1	2	1.00	3.72	0.80	1.00
Filamin_A_interacting_protein_1_like	1	1	1	1.00	3.69	0.78	0.87
Filamin_C	1	1	1	1.00	7.52	1.81	1.96
Galectin_1	8	16	131	1.00	2.75	0.76	1.15
Importin_subunit_beta_1	21	38	239	1.00	2.17	0.84	0.88
Integrin_alpha_4	2	2	10	1.00	1.75	0.89	0.95
Integrin_alpha_5	1	1	1	1.00	3.30	1.01	1.32
Integrin_alpha_7	1	1	1	1.00	2.56	0.80	1.02
Integrin_alpha_9	2	2	2	1.00	4.38	0.88	1.34
Integrin_alpha_11	1	1	1	1.00	3.71	0.75	1.12
Integrin_alpha_E	1	1	1	1.00	2.53	0.64	0.98
Integrin_alpha_L	2	3	13	1.00	2.86	0.97	0.73
Integrin_alpha_V	1	1	6	1.00	3.03	0.74	1.16
Integrin_beta_2	24	30	168	1.00	2.81	0.86	1.01
Integrin_beta_4	2	2	8	1.00	2.47	0.88	1.18
Integrin_beta_5	1	1	14	1.00	2.87	0.85	1.04
Integrin_beta_7	1	1	14	1.00	2.87	0.85	1.04
Prelamin_A/C	30	40	275	1.00	3.57	0.90	1.15
Lamin_B1	12	15	110	1.00	2.93	0.79	1.13
Lamin_B2	5	6	10	1.00	3.03	0.89	1.04
Laminin_subunit_alpha_1	1	1	2	1.00	3.48	0.84	1.31
Laminin_subunit_alpha_4	1	1	1	1.00	2.50	0.84	0.99
Laminin_subunit_alpha_5	1	1	3	1.00	4.93	0.90	1.15
Laminin_subunit_beta_1	1	1	1	1.00	3.39	0.72	0.99
Laminin_subunit_beta_2	1	1	14	1.00	2.51	0.88	1.03
Laminin_subunit_gamma_1	1	2	7	1.00	4.91	0.91	1.13
Laminin_subunit_gamma_2	1	1	2	1.00	4.30	0.81	1.03
Laminin_subunit_gamma_3	1	1	1	1.00	5.67	0.88	1.19
Liprin_alpha_1	1	1	7	1.00	3.56	0.76	1.37

表5-2. タンパク質比較定量解析結果：細胞骨格・伸展・接着関連タンパク質群

■: 1/2倍以下 ■: 2倍以上 ■: 5倍以上

Protein name	Peptides	Frames	Hits	Relative reation (sample/TCPS)			
				TCPS	PC	PMEA	PHEMA
Microtubule_associated protein 1A	1	1	1	1.00	3.44	0.83	0.97
Microtubule_associated protein 1B	1	1	1	1.00	3.55	0.91	1.07
Microtubule_associated protein 1S	10	3	12	1.00	1.62	0.46	0.58
Microtubule_associated protein 4	2	2	3	1.00	2.95	0.90	1.00
Microtubule_associated protein RP/EB family member 1	5	5	13	1.00	3.86	0.77	1.06
Microtubule_associated serine/threonine_protein kinase 3	5	1	18	1.00	2.62	0.82	1.13
Microtubule_actin cross_linking factor 1_isoforms 1/2/3/5	3	3	5	1.00	3.34	0.72	1.08
Microtubule_associated serine/threonine_protein kinase 4	1	1	1	1.00	2.62	0.68	0.91
Myosin light chain kinase family member 4	2	2	4	1.00	2.57	0.90	0.86
Myosin light chain kinase_smooth muscle	1	1	2	1.00	2.70	0.98	0.89
Myosin light polypeptide 6	7	9	103	1.00	3.04	0.79	1.11
Myosin regulatory light chain 12B	1	1	14	1.00	3.16	0.86	1.16
Myosin regulatory light polypeptide 9	3	5	17	1.00	3.33	0.80	1.08
Myosin_1	1	1	2	1.00	2.97	0.78	0.95
Myosin_10	9	13	88	1.00	3.00	0.78	1.07
Myosin_11	1	1	2	1.00	2.43	0.74	0.88
Myosin_14	1	1	1	1.00	4.10	0.90	1.32
Myosin_15	1	1	1	1.00	3.73	0.69	1.11
Myosin_2	1	1	5	1.00	3.48	0.69	0.87
Myosin_3	1	1	1	1.00	3.82	0.90	1.13
Myosin_4	4	4	21	1.00	2.38	0.75	0.93
Myosin_9	40	55	388	1.00	2.91	0.75	1.01
Periostin	1	1	1	1.00	4.64	1.12	1.39
Plastin_1	5	5	47	1.00	2.45	0.79	1.01
Plastin_2	37	62	560	1.00	2.38	0.81	0.95
Profilin_1	11	16	179	1.00	2.73	0.74	1.13
Radixin	1	1	2	1.00	3.77	0.78	0.99
Talin_1	30	42	244	1.00	2.34	0.76	0.92
Talin_2	4	4	21	1.00	2.65	0.87	0.99
Thrombospondin type_1 domain_containing protein 7A	1	1	2	1.00	5.14	0.77	1.14
Thrombospondin_1	1	2	3	1.00	7.58	1.23	2.04
Tropomyosin alpha_1 chain	6	6	30	1.00	1.07	0.27	0.60
Tropomyosin alpha_3 chain	2	2	15	1.00	3.91	0.77	1.38
Tropomyosin alpha_4 chain	2	2	6	1.00	3.43	0.74	0.99
Putative tropomyosin alpha_3 chain_like protein	2	2	10	1.00	1.19	0.22	0.46
Tubulin alpha chain_like 3	5	8	79	1.00	2.82	0.74	0.96
Tubulin alpha_1C chain	8	18	170	1.00	2.09	0.85	0.75
Tubulin alpha_3E chain	5	7	44	1.00	2.33	0.78	0.99
Tubulin alpha_4A chain	8	12	111	1.00	2.99	0.74	1.07
Tubulin alpha_8 chain	8	14	177	1.00	3.34	0.76	1.03
Tubulin beta chain	8	14	166	1.00	2.68	0.79	1.01
Tubulin beta_1 chain	1	1	2	1.00	3.43	0.84	1.38
Tubulin beta_3 chain	11	20	220	1.00	2.80	0.77	0.99
Tubulin beta_4A chain	2	4	56	1.00	1.89	0.80	0.86
Tubulin beta_4B chain	5	9	103	1.00	2.82	0.78	1.01
Tubulin beta_6 chain	15	21	205	1.00	2.56	0.79	0.90
Tubulin beta_8 chain	4	8	63	1.00	2.44	0.80	1.02
Tubulin gamma_2 chain	2	4	9	1.00	2.32	1.16	0.96
Tubulin polyglutamylase TTL11	1	1	6	1.00	2.00	0.93	0.86
Tubulin_folding cofactor B	1	1	1	1.00	2.39	0.95	0.97
Tubulin_specific chaperone A	5	6	35	1.00	2.67	0.79	1.24
Tubulin_specific chaperone E	3	3	18	1.00	2.88	1.27	1.18
Vasodilator_stimulated phosphoprotein	3	4	32	1.00	2.45	0.87	1.04
Vimentin	11	15	95	1.00	3.55	0.85	1.03
Vinculin	5	5	11	1.00	2.23	0.84	0.93

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
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

本研究では、医用材料として生体親和性高分子材料であるポリ(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クリレート) (HEMA) の2種類のポリマーに着目し、細胞としてはヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) 及びヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line; THP-1) に着目して、組成比の異なる PMEA / HEMA コポリマーのコーティング処理した表面上で hMSC または THP-1 を培養し、それぞれの細胞へ与える影響について検討するために遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。

hMSC への生体親和性高分子材料の影響について検討したところ、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。さらに、TGF- β , FGF Receptor や EGF Receptor を介した経路の誘導による EMT Pathway の亢進は全てのコーティング処理で認められたが、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は、PMEA のみ顕著にみられた。このことから、PMEA の割合が高い方が EMT Pathway が亢進され易い可能性が示唆された。

THP-1 への生体親和性高分子材料コーティング処理による遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ、PMEA では有意に上昇する機能が多く見られ、反対に HEMA では有意に低下する機能が多く見られた。一方、コポリマー (M75H25, M50H50, M25H75) は有意に影響を受ける機能は少なかった。生体親和性高分子材料による影響の大きさは PMEA > HEMA > コポリマー (M25H75 > M75H25, M50H50) の順であった。このことから、コポリマーの方が、それぞれのポリマーのみよりも細胞が影響を受けにくい材料である可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では、医用材料と細胞との相互作用について、細胞側からの検討を目的として生化学的・生物学的試験を行っている。我々はまず骨親和性評価を目的として、医用材料として純チタン (Ti)、細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC)に着目した。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、さらに骨と直接結合するという性質を有しており、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、hMSCは、多分化能と自己複製能を持ち幅広い再生医療分野での臨床研究の場で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・組織加工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。我々は昨年度まで、骨再生医療製品等を想定した検討として、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検討してきた。その結果、Ti 表面へのカルシウム導入処理により hMSC の骨分化が誘導されることを見出し、さらに hMSC の骨分化誘導は BMP2、Cox2、PTH1LH の誘導によって引き起こされ、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や Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の活性化の寄与なども見出した。

今年度は、血液適合性評価を目的として、医用材料としてポリ (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クリレート) (PHEMA) の 2 種類のポリマーに着目した。どちらも血液適合性に優れている

材料であり、様々な医療製品のコーティングに利用されている。しかしながらその両者ではそれぞれの表面における中間水の存在の有無の違い等が指摘されており、両者の血液適合性発現のメカニズムは異なると考えられている。

そこで本研究では、両者の組成比の異なる 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細胞へ与える影響について検討を行う事にした。細胞としては、hMSC に加え、血液適合性評価を行うために血球系の細胞であるヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line ; THP-1) に着目し、これら 2 種類の細胞を用いてそれぞれの細胞の遺伝子発現の網羅的解析を行った。

B. 研究方法

1. 細胞培養

1) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 : hMSCs (Lonza) は、Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地 (MSCGM) で培養した。

2) ヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line) : THP-1 (医薬基盤研究所) は、RPMI に 10% FBS と 0.05mM のメルカプトエタノールを加えた培地で培養した。

2. 基材 (生体親和性高分子コーティング用シート)

1) pre-coated ポリエステルシート (ダイアホイル) (三菱樹脂(株)) で厚さ 0.075mm、直径 35mm のものを用いた。

2) ポリカーボネートシート (菅原工芸) で厚さ 0.1mm、直径 33mm のものを用いた。

3. 基材への生体親和性高分子のコーティング処理

1) コポリマー溶液の調製

PMEA:PHEMA = 100:0 (PMEA), 75:25 (M75H25), 50:50 (M50H50), 25:75 (M25H75), 0:100 (PHEMA) の 5 種類を 1 w/v% (メタノール) に調製した。

2) ポリエステルシートへのコポリマーコーティング処理

シートをメタノールで洗浄した後、それぞれの組成のコポリマー溶液を 125uL 滴下し、[1] 500rpm で 5 秒間、[2] 2000rpm で 10 秒間、[3] 4000rpm で 5 秒間の 3 段階でスピコートした。乾燥後、もう一度同条件でスピコートし、一晩乾燥した。

3) ポリカーボネートシートへのコポリマーコーティング処理

シートをメタノールで洗浄した後、それぞれの組成のコポリマー溶液を 100uL 滴下し、4000rpm で 10 秒間スピコートした。乾燥後、もう一度同条件でスピコートし、一晩乾燥した。

4. 表面処理を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

1) hMSC

6 ウェルプレート (Corning) に 5 種類のコポリマーコーティングを施したポリエステルシートまたはコーティングしていないポリエステルシートを入れて、それぞれに hMSC を播種し、MSCBM に MCGS を加えた培地 (MSCGM) で 24 時間培養した。

2) THP-1

6 ウェルプレート (Corning) に 5 種類のコポリマーコーティングを施したポリカーボネートシートまたはコーティング

していないポリカーボネートシートを入れて、それぞれに THP-1 を播種し、RPMI に 10% FBS と 0.05mM のメルカプトエタノールを加えた培地で 24 時間培養した。

3) Total RNA の調製

それぞれの生体親和性高分子をコーティングしたシート上で 24 時間培養した hMSC または THP-1 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 12.5 (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。

5. 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及びヒト単球は市販品であり、倫理的問題はないと思われる。

C. 研究結果

1. 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 (hMSC) の機能への影響について

まず、それぞれ組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーでコーティング処理された材料上で hMSC を培養した際の細胞の形態について検討した。hMSC の 24 時間培養後の形態は、PET 及び PMEA、

M75H25、M50H50、M25H75 でコーティングされた材料上では、hMSC が接着していたが、PHEMA でコーティング処理された材料には細胞が接着せず、浮遊の状態が存在している様子が認められた (図 1)。

次に、hMSC が接着した材料 (PMEA / PHEMA コポリマー 4 種類と PET) 上で培養した hMSC における遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。PET と比較し、生体親和性高分子材料によって発現が 2 倍以上上昇または誘導された遺伝子群について解析したところ、PMEA、M75H25、M50H50 の材料によって、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT ; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった (表 1)。

EMT は、TGF β 、Notch、Wnt、Receptor tyrosine kinases によって誘導される (図 2) ため、次にそれぞれのシグナル伝達について生体親和性高分子のコーティング処理による変化について検討した。TGF β が誘導するシグナル伝達経路については、PMEA、M75H25、M50H50、M25H75 のどの材料についても EMT への経路で有意に上昇または誘導される遺伝子が多く観察され、EMT が亢進される事がわかった (図 3-1~4)。Notch が誘導するシグナル伝達経路については、PMEA でのみ EMT への経路における遺伝子の発現上昇及び誘導が見られ、M75H25、M50H50、M25H75 ではその傾向は認められなかった (図 4-1~4)。Wnt が誘導するシグナル伝達経路については、EMT への経路における遺伝子の発現には有意な変化は認められなかった

(図 5-1~4)。Receptor tyrosine kinases が誘導するシグナル伝達経路については、PMEA、M75H25、M50H50、M25H75 のどの材料についても EMT への FGF Receptor や EGF Receptor を介した経路で有意に上昇または誘導される遺伝子が多く観察され、EMT が亢進される事がわかった (図 6-1~4)。

2. 生体親和性高分子材料によるヒト単球 (THP-1) の機能への影響について

それぞれ組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーでコーティング処理された材料上で THP-1 を培養した際の THP-1 における遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。

まず、各生体親和性高分子材料が THP-1 に与える影響について、THP-1 の遺伝子発現パターンによる階層的クラスタリングを行った。dish と最も類似したパターンを示したのが、M75H25 及び M50H50、次いで M25H75、PHEMA の順で、PMEA が最も違うパターンを示した (図 7)。次に、dish と比較して生体親和性高分子材料によって発現が 2 倍以上上昇または 1/2 以下に低下した遺伝子群の発現変化が、疾病及び生体に関わる機能に及ぼす影響について検討した。全体的な変化について、図 8 に示す。PMEA により有意に上昇すると予想される機能が多く認められ、反対に PHEMA により有意に低下すると予想される機能が多く認められた。一方、M75H25、M50H50、M25H75 のコポリマーによる影響はあまり認められなかった。

それぞれのコーティング処理による影響についてまとめてみた。PMEA 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾

病及び生体関連機能について表 2 に示した。上昇すると予想される機能は 42 種類もあり、PMEA による影響の大きさが伺われた。一方、有意に低下すると予想される疾病及び生体関連機能は、4 種類であった (表 3)。M75H25 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、2 種類であり (表 4)、低下すると予想される機能は 4 種類であった (表 5)。M50H50 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、3 種類であり (表 6)、低下すると予想される機能は 1 種類だけであった (表 7)。M25H75 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、3 種類であり (表 8)、低下すると予想される機能は 2 種類であった (表 9)。PHEMA 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は 11 種類であり比較的多かった (表 10)。また、有意に低下すると予想される疾病及び生体関連機能は、73 種類もあり (表 11) PMEA による影響の大きさが伺われた。

次に、コーティング処理による THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に変化すると予想される毒性関連機能について検討した。PHEMA 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される毒性関連機能は 6 種類あり、逆に低下すると予想される機能は 2 種類であった (表 12)。その他の生体親和性高分子材料上で培養した THP-1 については、有意に変化が予想

される毒性関連機能は認められなかった。

D. 考察

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人工肺などの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²⁾。一方、PHEMA は中間水の存在が認められない²⁾。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ヒト細胞 (hMSC または THP-1) を培養し、それぞれの細胞へ与える影響について検討を行った。

まず、生体親和性高分子材料による hMSC の機能への影響について検討した。播種 24 時間後において、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 1)。しかし、PMEA が 25% 以上含まれたコーティング処理のもの (PMEA, M75H25, M50H50, M25H75) では、hMSC は接着していた。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。次に、hMSC が接着した材料 (PMEA / PHEMA コポリマー4 種類と PET) 上で培養した hMSC における遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。その結果、PET と比較し、生体親和性高分子材料によって発現が 2 倍以上上昇または誘導された遺伝子群について解析したところ、PMEA, M75H25, M50H50 の材料によって、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT ; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった (表 1)。EMT は、TGF- β , Notch, Wnt, Receptor tyrosine kinases によって誘導される (図 2) ため、それぞれのシグナル伝達についてコーティング処理による変化について検討したところ、TGF- β 及び FGF Receptor や EGF Receptor を介した経路の誘導による EMT Pathway の亢進は全てのコーティング処理で認められた (図 3, 6)。一方、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は、PMEA のみ顕著にみられた (図 4)。このことから、PMEA の割合が高い方が EMT Pathway が亢進され易い可能性が示唆された。

EMT は近年、がん細胞の分化度の制御調節機構の一つとして着目されており、EMT の誘導により細胞の運動性の亢進や細胞外基質の蓄積、細胞老化の抑制、幹細胞様機能 (未分化性など) の獲得などが示されている。以上より、生体親和性高分子上で培養した hMSC の遺伝子発現プロファイルの変化から、PMEA / PHEMA コポリマーコーティング材料が hMSC の運動性の亢進や未分化性の維持などへ影響を与える可能性が示唆された。

次に、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 THP-1 を培養し、細胞へ与える影響について検討するために遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。各生体親和性高分子材料の THP-1 に与える影響について、THP-1 の遺伝子発現パターンによる階層的クラスタリングを行ったところ、dish と最も類似したパターンを示したのが、M75H25, M50H50、次いで M25H75、PHEMA、PMEA の順であった (図 7)。また、dish と比較して生体親和性高分子材料によって発現が有意に変化 (2 倍以上上昇または 1/2 以下に低下) した遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ (図 8, 表 3 ~ 11)、PMEA では有意に上昇する機能が多く見られ、反対に PHEMA では有意に低下する機能が多く見られた。一方、コポリマー (M75H25, M50H50, M25H75) は有意に影響を受ける機能は少なかった。この様に、生体親和性高分子材料によるコーティング処理は THP-1 の遺伝子発現に影響を与え、その大きさは PMEA > PHEMA > コポリマー (M25H75 > M75H25, M50H50) の順であった。このことから、コポリマー (両高分子ポリマーの共重合体) の方が、それぞれの高分子材料のみ (PMEA, PHEMA それぞれ 100% のもの) よりも細胞が影響を受けにくい材料である可能性が示唆された。

E. 結論

医用材料と細胞との相互作用について検討を行っている。本研究では、血液適合性評価を目的として、医用材料として

生体親和性高分子材料であるポリ (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クリレート) (PHEMA) の2種類のポリマーに着目し、細胞としてはヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) 及びヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line ; THP-1) に着目して、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 または THP-1 を培養し、それぞれの細胞へ与える影響について検討するために遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。

hMSC への生体親和性高分子材料の影響について検討したところ、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT ; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。さらに、TGF- β , FGF Receptor や EGF Receptor を介した経路の誘導による EMT Pathway の亢進は全てのコーティング処理で認められたが、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は、PMEA のみ顕著にみられた。

THP-1 への生体親和性高分子材料コーティング処理による遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ、PMEA では有意に上昇する機能が多く見られ、反対に PHEMA では有意に低下する機能が多く見られた。一方、コポリマー (M75H25, M50H50, M25H75) は有意に影響を受ける機能は少なかった。生体親和性高分子材料による影響の大きさは PMEA > PHEMA > コポリマー (M25H75 > M75H25, M50H50) の順であった。

参考文献

- 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., 101(9), 2573-85, (2013).
- 2) ^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) Kono K., Niimi S., and Sawada R. : Cyclin D2 promotes the proliferation of human mesenchymal stem cells. J. Bone Marrow Res., in press
- 2) 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., 101(9), 2573-85, (2013).
- 3) Ito-Nagahata T., Kurihara C., Hasebe M., Ishii A., Yamashita K., Iwabuchi M., Sonoda M., Fukuhara K., Sawada R., Matsuoka A., Fujiwara Y. : Stilbene Analogs of Resveratrol Improve Insulin Resistance through Activation of AMPK. Biosci. Biotechnol. Biochem., 77(6),

1229-1235, (2013).

4) Sato Y., Tsutsumi H., Sawada R., Suzuki T., Yasuda S.: Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-processed products. Bull. Natl. Inst. Health. Sci., 131, 16-19, (2013).

2. 学会発表

1) 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法の確立を目指して」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)

2) 松岡 厚子, 澤田 留美, 加藤 玲子, 河野 健「次世代医療機器評価指標作成事業—再生医療分野審査 WG 活動報告」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)

3) Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., Matsuoka A.: The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

4) Kono K., Sawada R., Matsuoka A.: Overexpression of cyclin D2 promotes cell proliferation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

5) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Kuroda T., Sawada R., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y.: Validation of in vivo tumorigenicity test for the process control of cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

6) 澤田留美, 河野 健, 加藤玲子, 新見伸吾「生体親和性高分子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)

7) 加藤玲子, 齧島由二, 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)

8) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究」第 36 回日本分子生物学会年会 (2013.12)

9) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Takada N., Kuroda T., Sawada R., Matsuyama A., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y.: Characterization of in vivo tumorigenicity test using severe immunodeficient NOG mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products, World Stem Cell Summit 2013 (2013.12)

10) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉系幹細胞の増殖培養過程における品質評価のための遺伝子発現解析」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

11) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

12) 齧島由二, 福井千恵, 澤田留美, 河野 健, 野村祐介, 新見伸吾「ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響評価」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

13) 佐々木寛人, 蟹江慧, 澤田留美, 清田

泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化の細胞形態と発現プロファイリングとの相関解析」第13回日本再生医療学会総会 (2014.3)

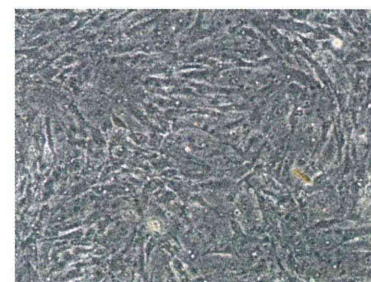
14) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 竹内一郎, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「細胞画像情報解析による間葉系幹細胞分化能の品質プロファイリング」第13回日本再生医療学会総会 (2014.3)



PME A100



PME A : PHEMA 75:25



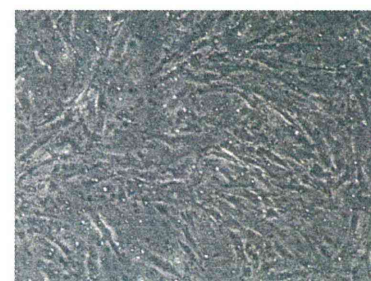
PME A : PHEMA 50:50



PME A : PHEMA 25:75



PHEMA100



untreated

図1. 生体親和性高分子材料上で24時間培養したhMSCの形態

表1. 生体親和性高分子材料によって発現が2倍以上上昇または誘導された遺伝子が関与するPathway (Top 5)

	Pathways	p-value	Ratio
PMEA	Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	1.15E-03	38/192 (0.198)
	γ -glutamyl Cycle	6.24E-03	6/29 (0.207)
	B Cell Receptor Signaling	6.62E-03	32/171 (0.187)
	Rac Signaling	7.60E-03	23/122 (0.189)
	Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	1.08E-02	23/120 (0.192)
M75H25	Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	5.50E-03	27/192 (0.141)
	Actin Cytoskeleton Signaling	5.67E-03	31/239 (0.130)
	Glucocorticoid Receptor Signaling	7.80E-03	36/294 (0.122)
	Regulation of IL-2 Expression in Activated and Anergic T Lymphocytes	9.57E-03	14/89 (0.157)
	FGF Signaling	1.11E-02	15/92 (0.163)
M50H50	Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	1.92E-03	33/192 (0.172)
	B Cell Receptor Signaling	2.18E-03	30/171 (0.175)
	Neurotrophin/TRK Signaling	2.71E-03	16/76 (0.211)
	Regulation of IL-2 Expression in Activated and Anergic T Lymphocytes	4.21E-03	17/89 (0.191)
	TGF- β Signaling	4.66E-03	18/89 (0.202)
M25H75	Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	1.24E-03	10/36 (0.278)
	Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	1.41E-03	15/69 (0.217)
	Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	2.37E-03	20/120 (0.167)
	Histidine Degradation VI	7.13E-03	4/20 (0.200)
	Glycerol Degradation I	7.57E-03	3/12 (0.250)

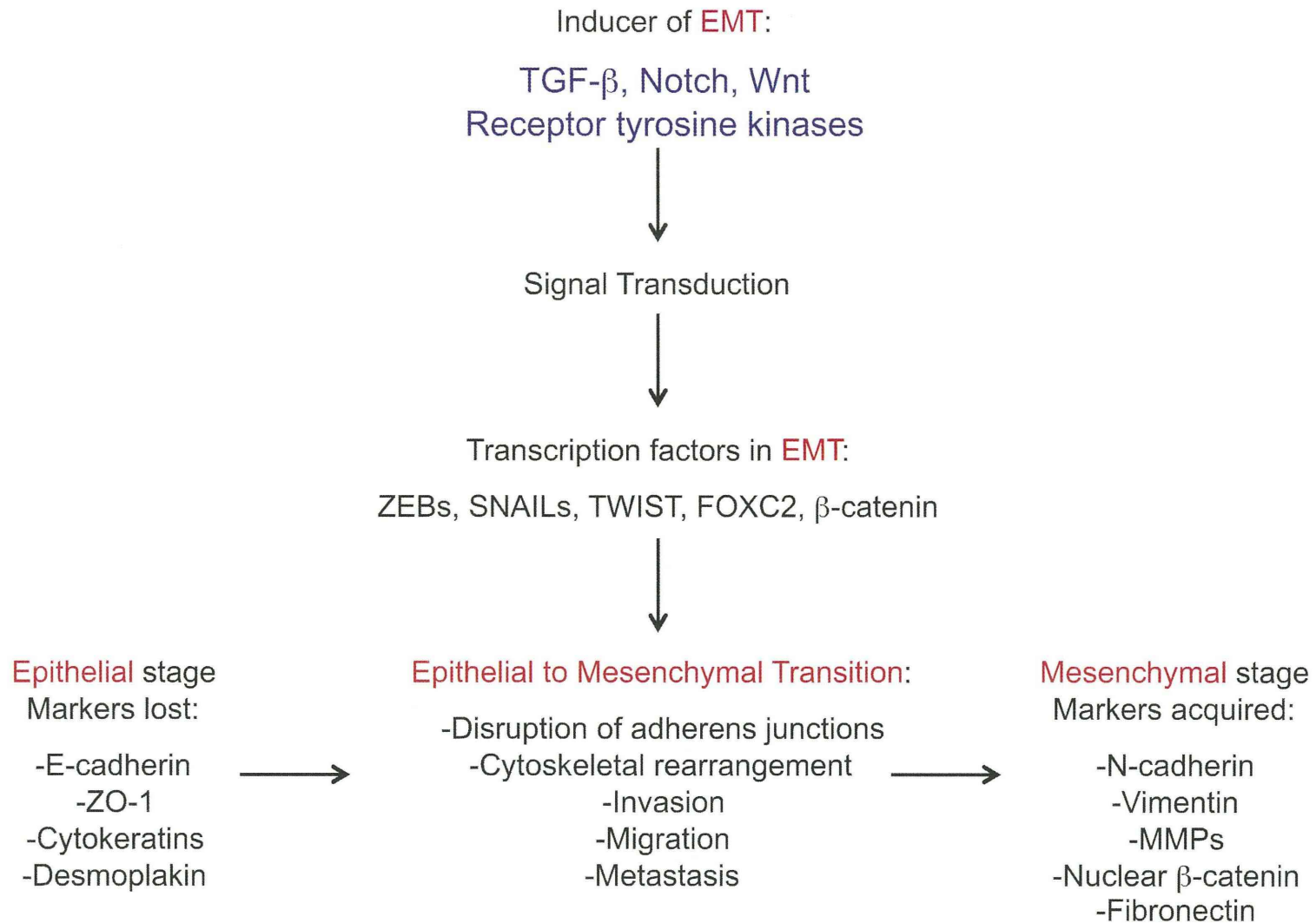


图2. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Pathway

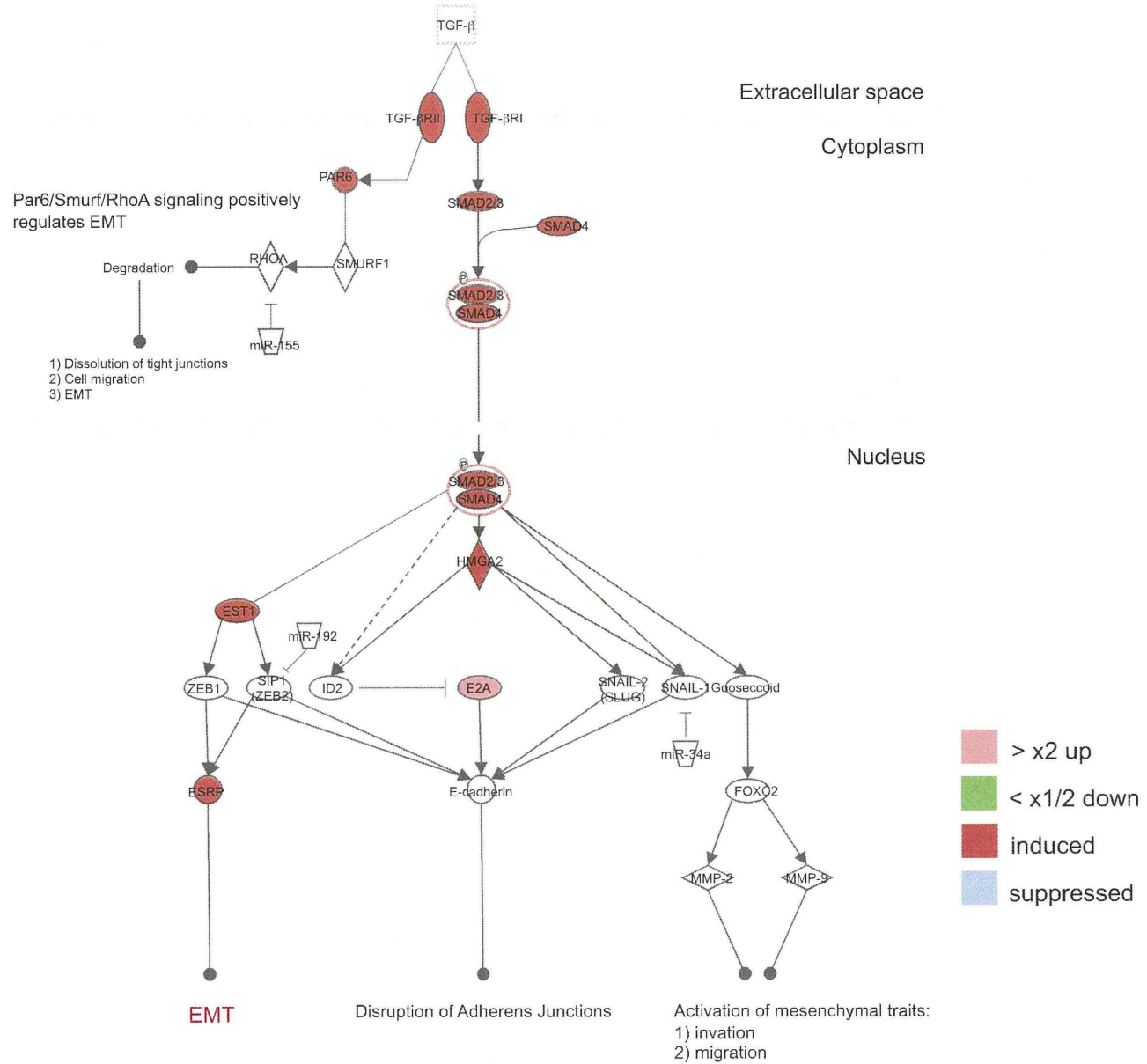


図3-1. TGF- β から誘導される EMT Pathway に及ぼす PMEAs の影響

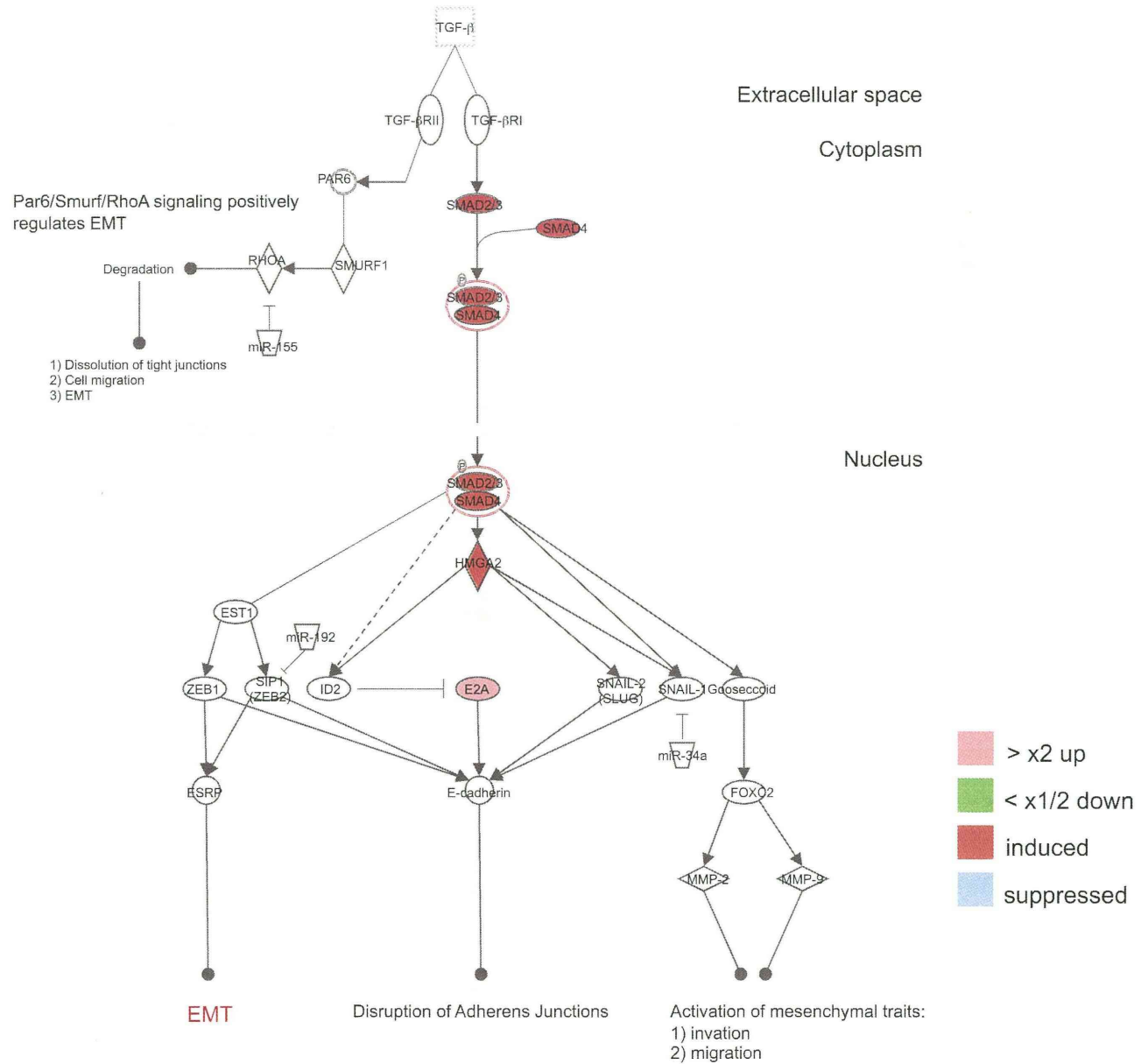


図3-2. TGF- β から誘導される EMT Pathway に及ぼす M75H25 の影響

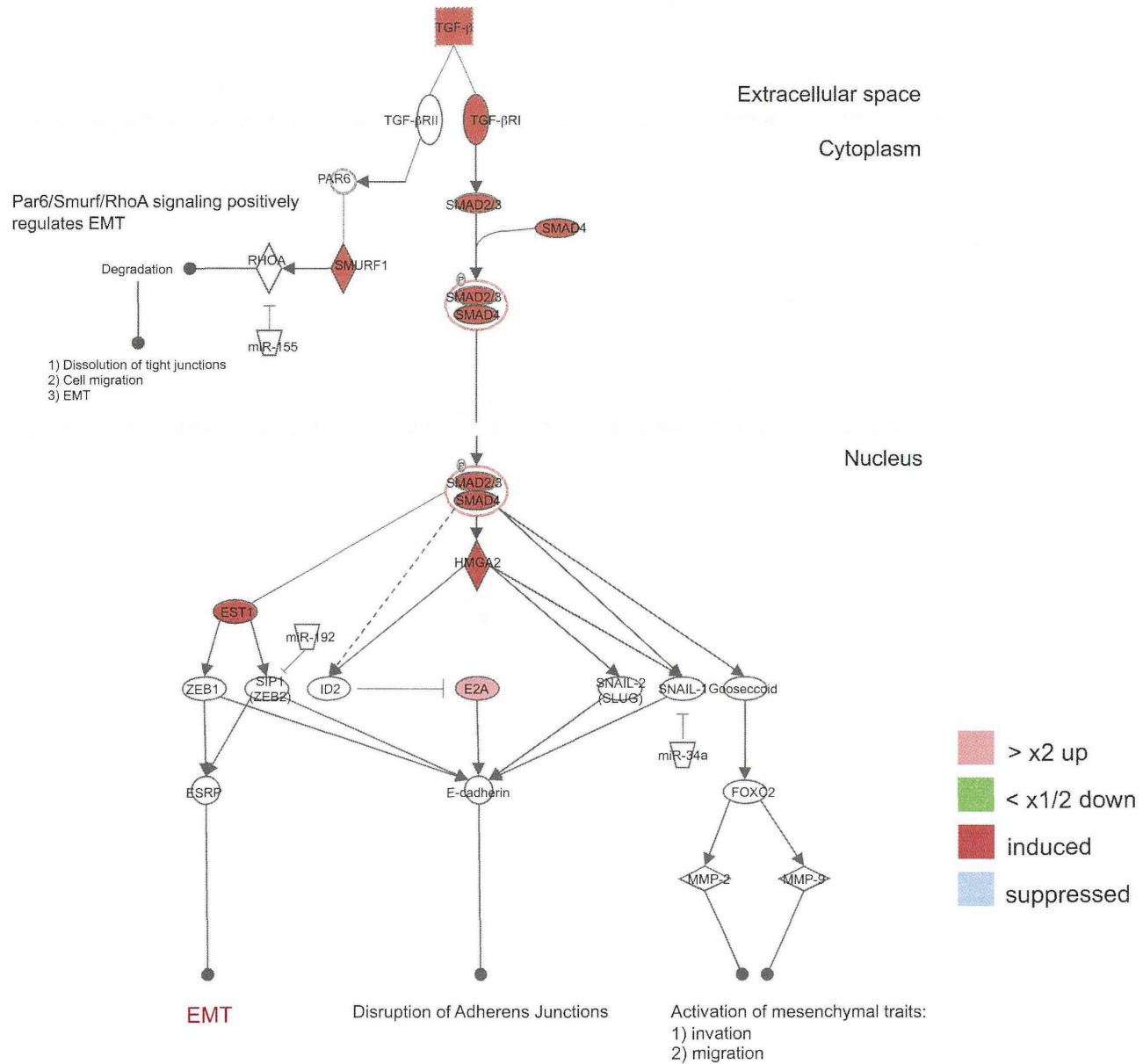


図3-3. TGF- β から誘導される EMT Pathway に及ぼす M50H50 の影響

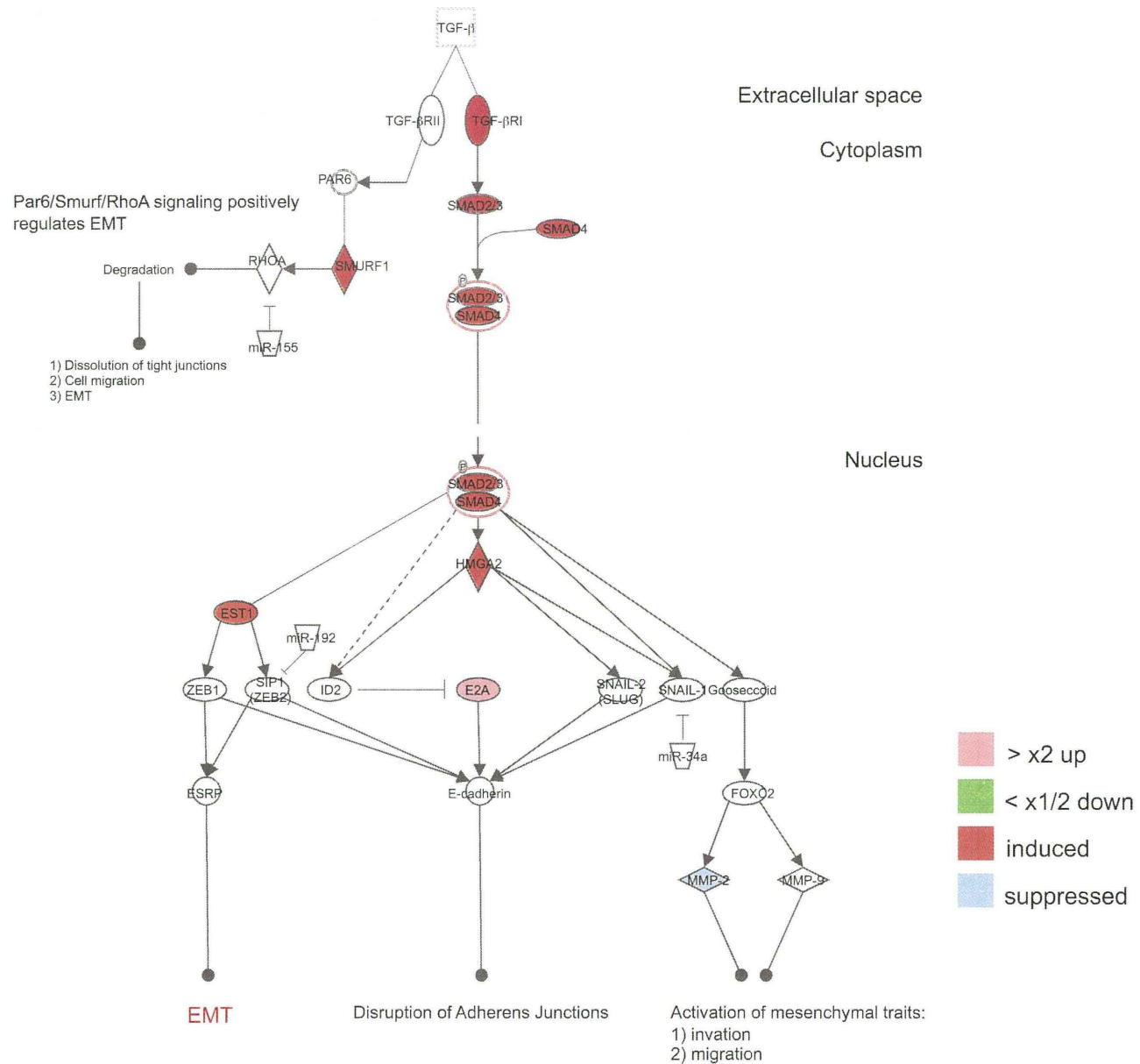


図3-4. TGF- β から誘導される EMT Pathway に及ぼす M25H75 の影響

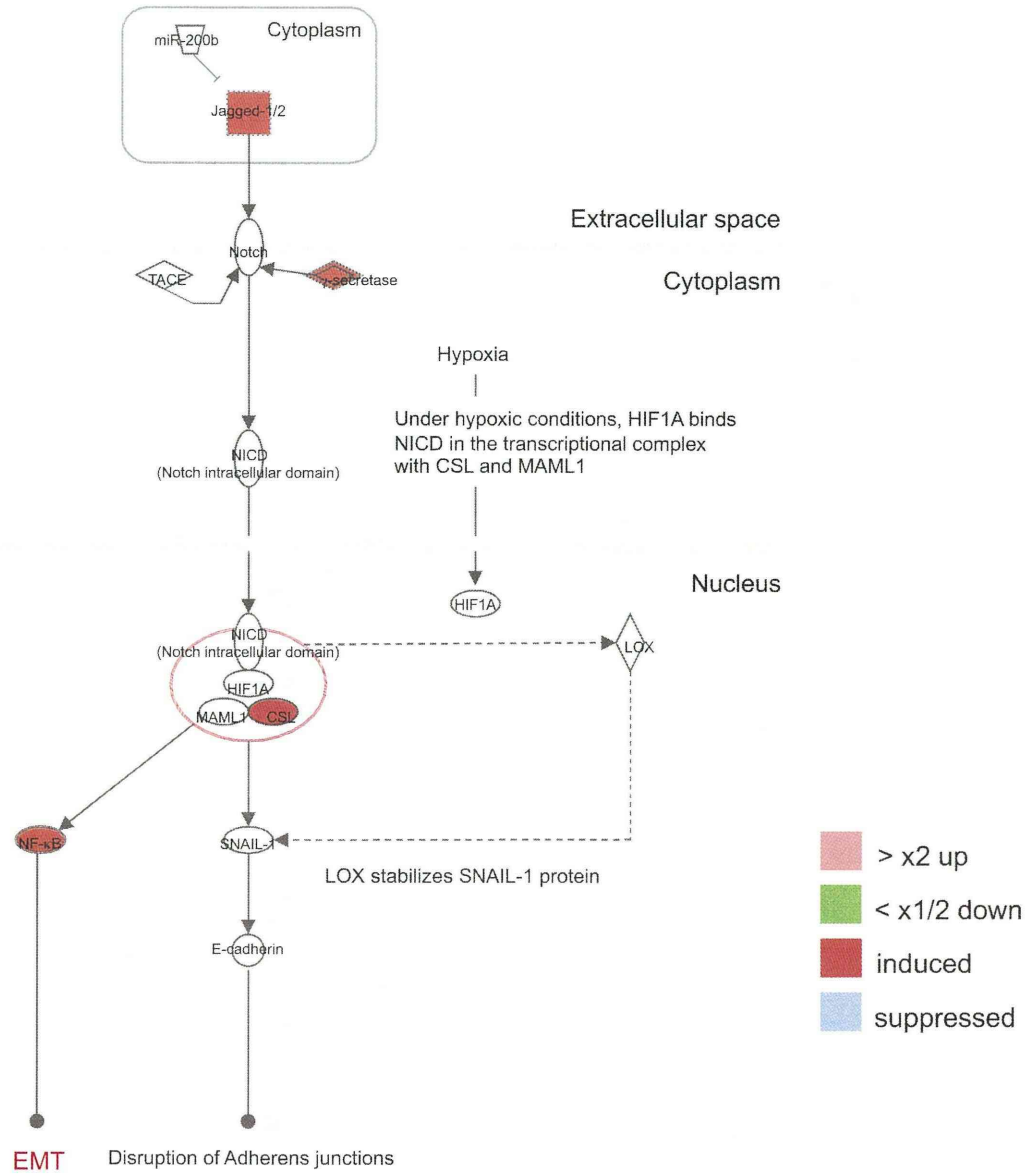


図4-1. Notch から誘導される EMT Pathway に及ぼす PMEA の影響