

図2: 播種24時間後および48時間後のTHP-1の生存率

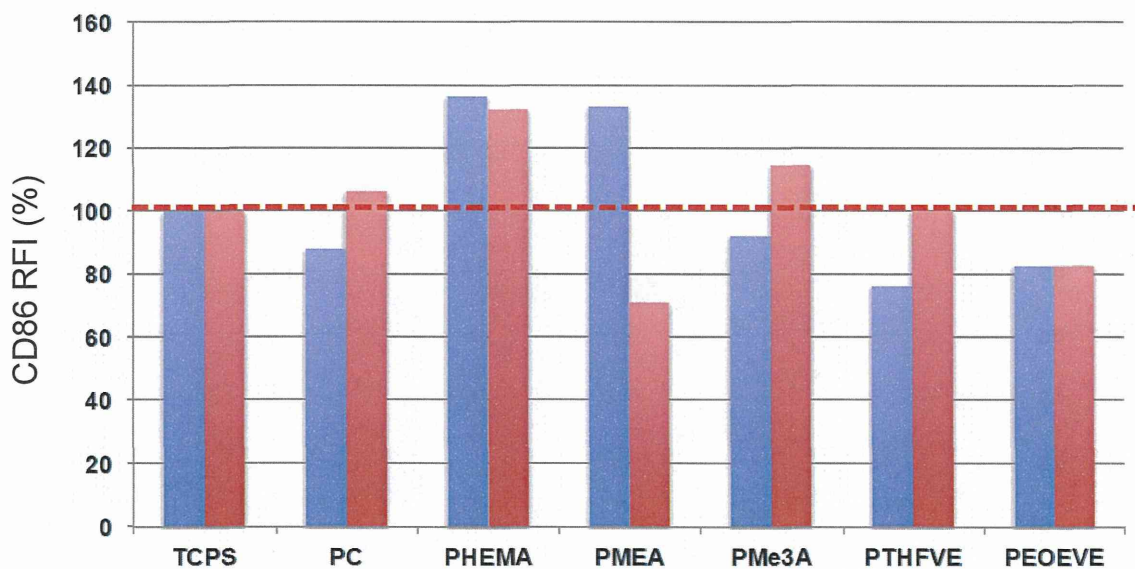
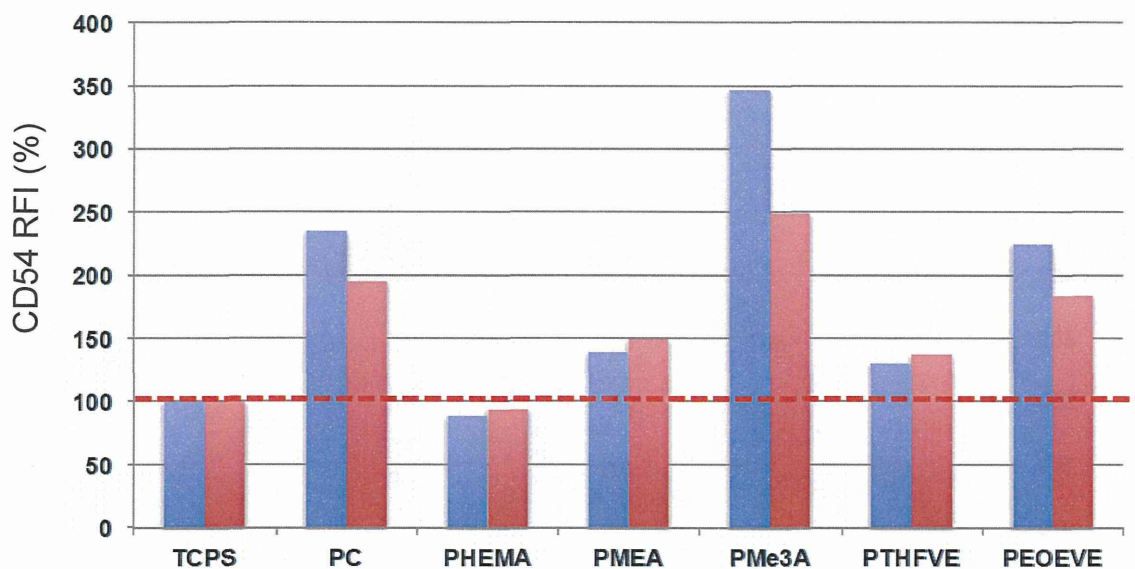


図3-1 : 播種24時間後のTHP-1のCD54およびCD86の発現強度

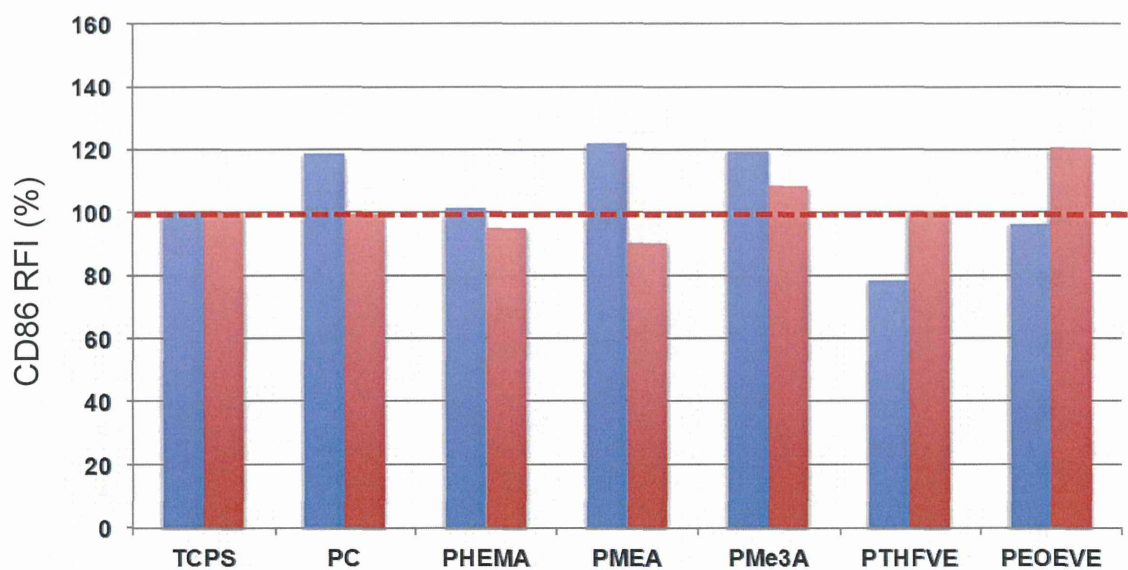
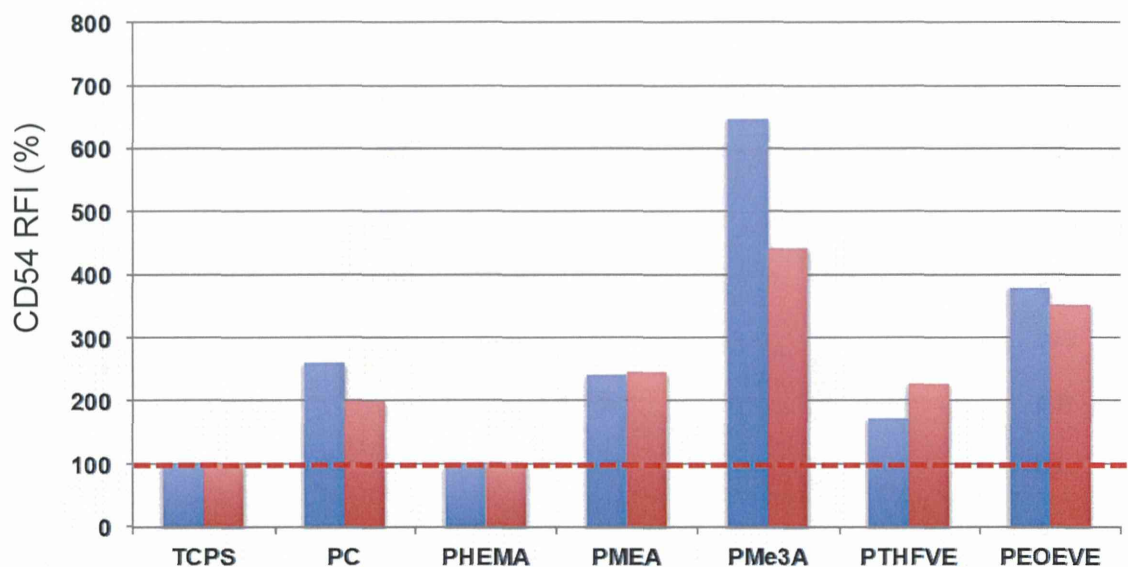


図3-2: 播種48時間後のTHP-1のCD54およびCD86の発現強度

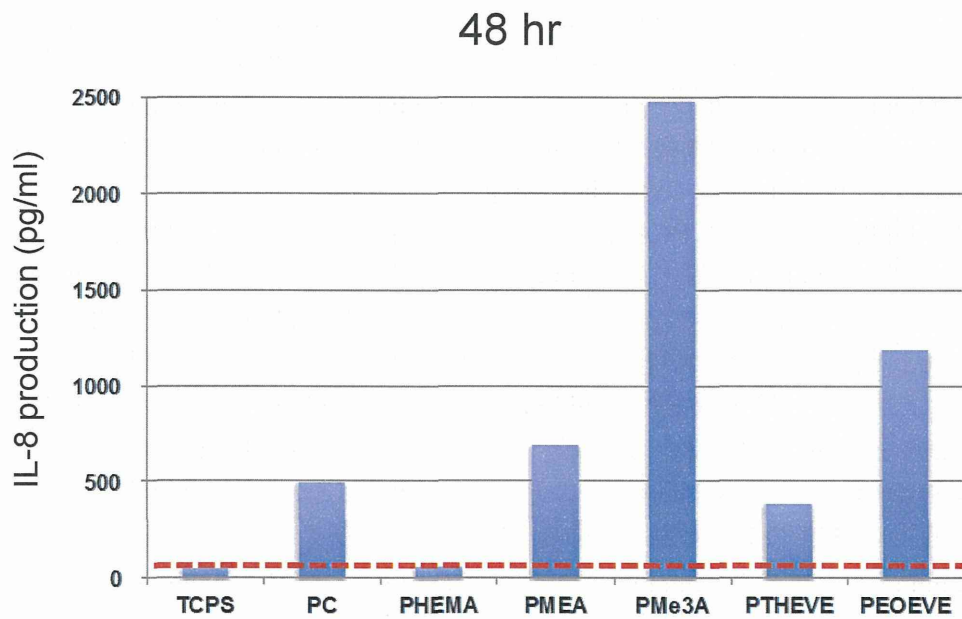
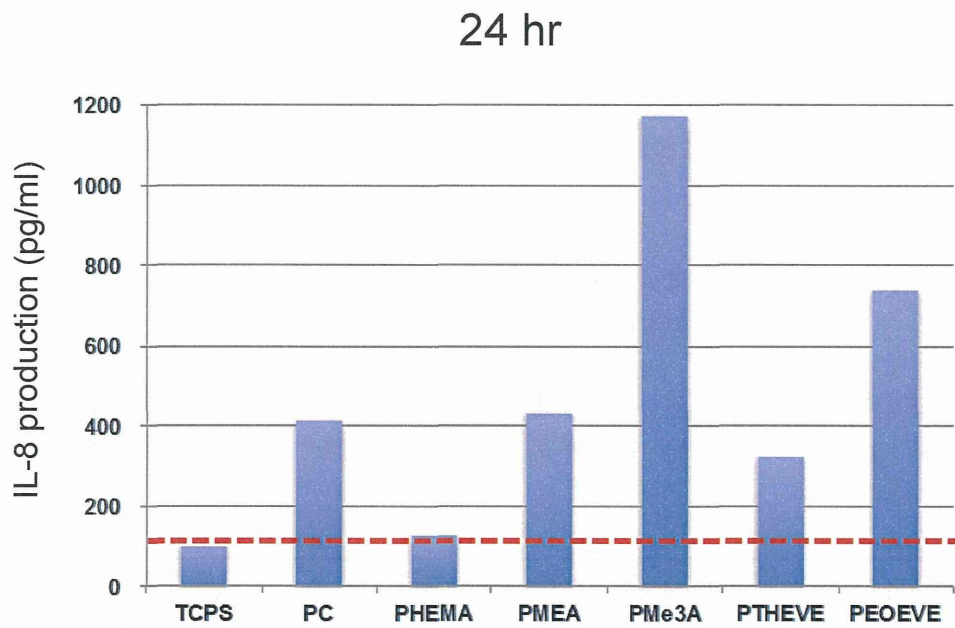


図4 : 播種24時間後および48時間後の培養上清中のIL-8量

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 再生・細胞医療製品部
研究協力者 河野 健 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部

研究要旨

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)やポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)に加え、3種類の類似体、ポリ[2-[2-(メトキシエトキシ)エトキシ]エチルアクリレート](PMe3A)、ポリ(テトラヒドロフラン-2-イルメチルビニルエーテル)(PTHFVE)、ポリ(2-エトキシエチルビニルエーテル)(PEOEVE)について、血液適合性評価の一つとして、血管内皮細胞を用いて材料における内皮化を評価するためのより最適な方法を探索するために、初代培養細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と最近開発された不死化させたヒト皮膚微小血管内皮細胞のTIME-GFPを用いて、高分子材料上で培養し、細胞接着と形態及び内皮化について比較検討した。

初代培養細胞であるHUVECの場合、ロットによる接着傾向や増殖にばらつきが見られたが、TIME-GFPは継代による細胞の変化もあまり見られず、またHUVECと同様の接着傾向を示し、さらに材料上でも血管内皮細胞としての機能を保持していた。これらのことから、血管内皮細胞を用いた材料の内皮化評価においてTIME-GFPを用いる有用性が示唆された。次に、TIME-GFPの材料への接着数を調べることで、ポリマーコーティング処理の割合をどの程度検出できるのか調べた結果、PCシートにPMEAを処理した場合、50%の処理の違いは細胞数を測定することで検出できることがわかった。実際に製品に使用する医用材料及びその表面処理において、この試験をバリデーションすることによって品質管理試験として使用できる可能性が示唆された。さらに、高分子材料によるTIME-GFPの機能への影響について、遺伝子発現の網羅的解析も行ったところ、コーティングするポリマーの種類によって血管内皮細胞の機能へ与える影響は異なることがわかった。ポリマーコーティングによる内皮化の評価として、ポリマー上へのTIME-GFPの接着や増殖について検討した上で、さらに血管内皮細胞の機能への影響についても考慮する必要があるだろう。TIME-GFPを用いてそれぞれのポリマーについて内皮化の評価を行った今回の結果からは、TIME-GFPの接着や増殖も比較的良く、細胞の機能へ与える影響が少ないと予想されるPTHFVEが、内皮化の評価は高いといえるのかもしれない。

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、細胞応答の観点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)、細胞としてヒト骨髓由来間葉系幹細胞 (hMSC) に着目した。我々はこれまでに、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たところ、Ti 表面へのカルシウムイオン導入処理により hMSC の骨分化が誘導されること、さらにそれは BMP2、Cox2、PTH1H 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。

また昨年度は、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。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、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とし、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。その結果、hMSC への生体親和性高分子材料の影響については、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、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は、PMEA のみ顕著に認められた。THP-1 への影響については、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が PMEA と PHEMA では大きく異なること等を見出した。

今年度は、医用材料として、PMEA や PHEMA に加え、3 種類の類似体、ポリ [2-[2-(メトキシエトキシ)エトキシ]エチルアクリレート] (PMe3A)、ポリ (テトラヒドロフラン-2-イルメチルビニルエーテル) (PTHFVE)、ポリ (2-エトキシエチルビニルエーテル) (PEOEVE) についても着目した。ステントや人工血管など生体内に留置され血液接触下で使用される医用材料の問題の一つに血栓形成があげられる。特に小口径人工血管の開存を維持するには、抗血栓性を高める必要がある。これまで、人工血管の内腔に血小板接着を抑制

させる処理や、内皮化を促進させる処理などを施し、抗血栓性を高めた人工血管の開発が進められてきた。最近、PMEA は血管内皮細胞の接着も促進することが明らかとなり、人工血管の内皮化促進処理としても期待されている。材料の *in vitro* における内皮化の評価は、一般的にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) が使われているが、初代培養細胞のためロット差や培養による細胞の変化等により、同じ材料であっても常に同じ結果が出るとは限らない。最近、ATCC 社からヒト皮膚微小血管内皮細胞に human telomerase reverse transcriptase (hTERT) を導入することで不死化させた細胞 (TIME-GFP) が開発された。本研究では、*in vitro* 内皮化評価において TIME-GFP が HUVEC と代替できないか検討するために、PMEA をはじめとする生体親和性高分子をコーティング処理した基材上に、TIME-GFP または HUVEC を播種し、その形態、接着数や抗血栓性に関わる遺伝子の発現量を比較した。さらに、それぞれのコーティング処理による TIME-GFP の機能への影響について検討するために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) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells ; HUVEC) (PromoCell) は、Endothelial Cell Growth Medium 2 (PromoCell) で培養した。

2) GFP 導入不死化ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (TIME-GFP) (ATCC) は Vascular Cell Basal Medium に Microvascular Endothelial Cell Growth Kit-VEGF、12.5

µg/mL Blasticidin (Life Technologies) 及び 200 µg/mL G418 (Clontech) を加えた培地で培養した。

2. 基材への高分子のコーティング処理

1) 基材

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

2) 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) , PMe3A, PTHFVE, PEOEVE の 8 種類を 1 w/v% (メタノール) に調製した。それぞれの構造式を表 1 に示した。

3) PC シートへの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 100µL 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、一晚乾燥した。

3. 高分子材料における血管内皮化細胞接着試験

各ポリマーでコーティングした PC シートを MPC ポリマー処理 6 ウェルプレート (Lipidure-Coat 6well plate ; 日油) に入れ、 1×10^4 個の HUVEC 又は TIME-GFP を播種し、培養した。1 日及び 4 日間培養後の細胞数の測定は、細胞を PBS で洗った後、0.05% トリプシン-EDTA 溶液 (Gibco) でシートから細胞を剥離し、800 x g で 5 分間遠心分離を行った。沈殿した細胞を 100 µl の培地で懸濁、AO/PI cell viability kit (logos biosystems) と細胞懸濁液を 1:9 の割合で混合し、Luna-FL™ 自動細胞計測装置 (logos biosystems) で細胞数を測定した。

4. デジタル PCR (dPCR) による mRNA 発

現量の定量的解析

培養4日後のHUVEC及びTIME-GFPからRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行い、cDNA へ変換した。得られた cDNA を使い Nitric oxide synthase-3 (NOS-3) 及び Thrombomodulin (TM) 発現量を dPCR (QuantStudio 3D ; applied biosystems) により定量した。NOS-3 及び TM の PCR 反応には TaqMan Gene Expression Assays (Hs01574659_m1, Hs00264901_s1 ; applied biosystems, cat. No. 431182) を用いた。内在性コントロールとして GAPDH を用い、その定量にはリアルタイム PCR (Roche LightCycler (version 4.0)) を使用した。PCR 反応はライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセットを用いて行った。

5. DNA マイクロアレイ解析

培養4日後の TIME-GFP から調製した 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。

6. 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。

7. 有意差検定

ポリマーコーティング処理の割合と接着細胞数についての統計解析は SigmaPlot 12.5 Software (Systat Software Inc) を用いて行った。データは一元配置分散分析

(One-Way ANOVA) を行った後、各間の有意差は Student-Newman-Keuls test (SNK 検定) による多重比較で確認した。

IPA 解析における統計解析は、Fisher's Exact Test にて行った。

8. 倫理面への配慮

本研究において用いたヒト臍帯静脈内皮細胞及び GFP 導入不死化ヒト皮膚微小血管内皮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

1. 高分子材料上における HUVEC の細胞接着と形態及び内皮化について

各高分子をコーティング処理した PC シートに HUVEC を播種し、細胞接着及びその形態を観察した。さらに、内皮化の指標の一つとして細胞数を測定した。PC シート以外への細胞接着を防ぐために、MPC 処理を施した 6 ウェルプレートに PC シートを入れ細胞を播種した。HUVEC (Lot No. 311301) の 1 日及び 4 日培養後の形態を図 1 と図 2 に、それぞれの細胞数は図 3 (A) に示した。培養 1 日後、PMEA でコーティングしたシートでは、HUVEC が接着していたが、PHEMA 及び PMEA/PHEMA のコポリマーでコーティングしたシートでは細胞が接着していなかった。PMEA で接着した細胞は、Dish と比べ接着面積が小さく、球形であった。PTHFVE は PMEA より細胞接着数は少なかったが、形は Dish 上で培養した細胞に近く、扁平状であった。PMe3A 及び PEOEVE でコーティングしたシートでは、培養 1 日後、細胞数は検出限界以下であったが、顕微鏡観察により、球形の細胞が僅かに接着していることを確認

した。未処理 (untreat) のシートも PTHFVE と同程度、細胞が接着していた。PCシートを入れていない MPC コート 6 ウェルプレートでは細胞は全く接着しておらず、シート以外の場所で接着する細胞は無視できることを確認した。

培養 4 日後、Dish 上の HUVEC は増殖しており、コンフルエントの状態であった。また、PMEA をコーティングしたシート上の細胞も増殖が認められ、ほぼコンフルエントに近い状態であったが、PHEMA 及び PMEА/PHEMA のコポリマーでコーティングしたシートでは培養 4 日後でも細胞は接着していなかった。PTHFVE は PMEА と同程度の増殖率を示していた。PMe3A 及び PEOEVE 上での細胞数は、培養 1 日後では検出限界以下であったが、培養 4 日後では検出できるまでに細胞が増殖していた。一方、未処理の PC シート上での細胞の増殖は他と比べて低かった。

HUVEC のロットによる影響を検討するために、他の 2 ロットでも同様の実験を行った。各ポリマーコーティングした PC シート上の細胞形態についてはロットによる大きな違いは見られなかった (data not shown)。一方、細胞数 (図 3 (B, C)) については、HUVEC (4031901.2) は PMEА と PTHFVE 上での細胞数は同程度であったが、HUVEC (4061601.1) は PTHFVE の方が PMEА よりも細胞数が多かった。また、HUVEC (4031901.2) は培養 1 日後で PMe3A 及び PEOEVE で細胞数を測定できたが、HUVEC (4061601.1) では 1 日後に細胞が接着していたものの、培養 4 日後でも細胞数は検出限界以下であった。PHEMA 及び PMEА/PHEMA のコポリマーはいずれのロットも接着しなかった。

2. 高分子材料上における TIME-GFP の細胞接着と形態及び内皮化について

hTERT 導入により不死化させたヒト皮膚微小血管内皮細胞 (TIME-GFP) を使って、HUVEC と同様の実験を行った。各ポリマーコーティングした PC シート上の細胞形態及び接着については、HUVEC と同じ傾向を示した (図 4, 5)。独立した実験を 3 回行った結果、PMEA と PTHFVE 及び PMe3A と PEOEVE は同程度の細胞数と増殖率を示した (図 6)。HUVEC 3 ロットの結果と同様に、untreat では細胞は接着するものの増殖率は低く、PHEMA 及び PMEА/PHEMA のコポリマーは接着しなかった。

3. 高分子材料上における HUVEC 及び TIME-GFP の血管内皮細胞としての機能確認

HUVEC 及び TIME-GFP が各ポリマーコーティングしたシートに接着して、血管内皮細胞としての機能を保持しているか確認するために、NOS-3 と TM の 2 遺伝子が各ポリマー上で培養した際に発現しているかどうか定量 PCR 法により調べた。Dish 上では、HUVEC と TIME-GFP は NOS-3 及び TM を同程度発現していた (図 7 A, B)。また、各ポリマーコーティングしたシート上においても、Dish と比較してそれぞれ NOS-3 及び TM の発現が低下することはない (図 7 C, D)。

4. ポリマーコーティング処理の割合と接着細胞数について

TIME-GFP の接着数を調べることで、ポリマーコーティング処理の割合をどの程度検出できるのか調べるために、面積の 100%、50%を PMEА 処理した PC シートに TIME-GFP を播種し、4 日間培養後の細

胞増殖を解析した。その結果、PMEA100%と50%及びPMEA50%と0%の間の細胞増殖率に有意な差がみられた(図8)。

5. 高分子材料による TIME-GFP の機能への影響について—遺伝子発現の網羅的解析

TIME-GFP が接着した材料 (PMe3A, PTHFVE, PEOEVE, PMEA と未処理の PC) 上で4日間培養した TIME-GFP 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。Dish 上での培養と比較して TIME-GFP の mRNA 発現が有意に変化した遺伝子数を表2に示した。未処理の PC 上での培養によって発現が有意に低下した遺伝子数は308でポリマーコーティングによって有意に変化した遺伝子数よりも比較的多めであったが、4種類のポリマーコーティングによってそれぞれ有意に変化(上昇または低下)した遺伝子の数は同程度であった。

次に、コーティング処理による TIME-GFP 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疾病及び生体関連機能について検討した(表3~7)。まず、未処理の PC では、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、“development of blood cells” など3種類であり、低下すると予想される機能は“metabolism of triacylglycerol” など10種類であった(表3)。また、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化と“metabolism of triacylglycerol”などの機能との関連について図9に示した。PMe3Aでは、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、“glucose metabolism disorder” など4

種類であり、低下すると予想される機能は“differentiation of cells” など8種類であった(表4)。また、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化と“differentiation of cells”などの機能との関連について図10に示した。PTHFVEでは、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は無く、低下すると予想される機能は“cell movement of epithelial cells” など4種類であった(表5)。しかし、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化等は特に認められなかった。PEOEVEでは、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、“aortic disorder” など心血管疾患に関わる3種類であり、低下すると予想される機能は“differentiation of epithelial cells” など25種類であった(表6)。また、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化と“aortic disorder”などの機能との関連について図11に示した。PMEAでは、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、“proliferation of hematopoietic progenitor cells” など2種類であり、低下すると予想される機能は“development of head” など2種類であった(表7)。また、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化と“proliferation of hematopoietic progenitor cells”の機能との関連について図12に示した。

D. 考察

本研究では、医用材料の血液適合性評価

の一つとして、血管内皮細胞を用いて材料における内皮化を評価するためのより最適な方法を探索した。

まず、従来材料の *in vitro* における内皮化の評価に使用されていた初代培養細胞の HUVEC と最近開発された不死化させた血管内皮細胞の TIME-GFP を用いて、高分子材料上で培養し、細胞接着と形態及び内皮化について比較検討した。3 ロットの HUVEC について検討したところ、材料への接着試験についてロットによる差が大きいことが明らかとなった (図3)。一方、TIME-GFP では HUVEC と同様の増殖傾向を示し、独立した 3 回の実験内での差も小さいことが確認された (図6)。

次に、TIME-GFP が各ポリマーコーティングしたシートに接着した際に、血管内皮細胞としての機能を保持しているか確認した (図7)。一酸化窒素合成酵素 3 (Nitric oxide synthase-3 ; NOS-3) は主に血管内皮細胞で発現しており、この酵素によって合成される一酸化窒素 (NO) には血小板凝集を抑制する作用がある。またトロンボモジュリン (Thrombomodulin ; TM) は血管内皮細胞表面に存在し、トロンピンと複合体を形成して血液凝固を抑制することが知られている。これら 2 遺伝子が各ポリマー上で培養しても発現しているかどうかについて定量PCR法により調べた。Dish 上で、TIME-GFP は NOS-3 及び TM を HUVEC と同程度発現しており、TIME-GFP は HUVEC と同程度の抗血栓作用が予測された。また、各ポリマーコーティングしたシート上でも Dish と比較して、NOS-3 や TM の発現が低下することはなかった。以上の結果により、材料に接着した TIME-GFP の細胞数を測定することで、材料の内皮化及

びそれに伴う抗血栓性を予測できることが示唆された。初代培養細胞である HUVEC の場合、ロットによる接着傾向の違いや培養による細胞の変化によって実験の再現性や妥当性が下がる可能性が考えられるが、不死化された TIME-GFP は継代による細胞の変化もあまり見られず、また HUVEC と同様の接着傾向を示し、さらに材料上でも血管内皮細胞としての機能を保持していることから、血管内皮細胞を用いた材料の内皮化評価において TIME-GFP を用いる有用性が示唆された。

また、TIME-GFP を使用した材料への接着試験の応用について検討した。人工血管の内腔に内皮細胞の接着を促す処理を施した製品が開発されている。このような製品の品質管理として、内腔に目的とする処理がきちんと施されているか調べる必要がある。これは、内腔表面の化学組成等を調べることで可能であるが、一方で、血管内皮細胞の接着数が上昇するか *in vitro* で調べることは直接的で有効であると考えられる。TIME-GFP の材料への接着数を調べることで、ポリマーコーティング処理の割合をどの程度検出できるのか調べるために、面積の 100%、50%を PMEA 処理した PC シートに TIME-GFP を播種し、4 日間培養後の細胞増殖を解析した。その結果、PMEA100%と 50%及び PMEA50%と 0% 間の細胞増殖率に有意な差がみられた (図8)。以上の結果から、PC シートに PMEA を処理した場合、50%の処理の違いは細胞数を測定することで検出できることがわかった。実際に製品に使用する医用材料及びその表面処理において、この試験を

バリデーションすることによって品質管理試験として使用できる可能性が示唆された。

高分子材料による TIME-GFP の機能への影響について、遺伝子発現の網羅的解析も行った。

PTHFVE 及び PMEa はどちらも TIME-GFP が比較的良く接着し、4 日間での増殖率も Dish と同程度であった (図 6)。PTHFVE では、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は無く、また低下すると予想される機能も少なく (表 5)、PTHFVE が細胞機能へ与える影響は少ないと考えられた。また、PMEa も変化すると予想される機能は少ないものの、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は「造血前駆細胞の増殖」など 2 種類であり (表 7)、PMEa により血球系の細胞や血小板に影響を与える可能性のある機能の上昇が認められた。

PMe3A 及び PEOEVE はどちらも TIME-GFP 培養 1 日後の接着は PTHFVE や PMEa よりも低かったが、4 日後にはどちらも増殖しており、増殖率はむしろ高い傾向を示した (図 6)。PMe3A では、変化すると予想される疾病及び生体関連機能は 12 種類あり、TIME-GFP の機能へ及ぼす影響は少なくなかった (表 4)。また、PEOEVE は変化すると予想される疾病及び生体関連機能は 28 種類と多く TIME-GFP へ与える影響が大きいことが伺われた。さらに、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能 3 種類は全て「心血管疾患」に関わる粥性大動脈硬化症などの大動脈疾患に関わる機能であった (表 6)。今後、実際に PEOEVE によって血管内皮細胞が動脈硬化症等の心血管疾患へとつながる変化を引き起こすのかどうかさらなる検討が

必要であろう。

以上の結果から、コーティングするポリマーの種類によって血管内皮細胞の機能へ与える影響は異なることがわかった。ポリマーコーティングによる内皮化の評価として、ポリマー上への TIME-GFP の接着や増殖について検討した上で、さらに血管内皮細胞の機能への影響についても考慮する必要があるだろう。TIME-GFP を用いてそれぞれのポリマーについて内皮化の評価を行った今回の結果からは、TIME-GFP の接着や増殖も比較的良く、細胞の機能へ与える影響が少ないと予想される PTHFVE が、内皮化の評価は高いといえるのかもしれない。

E. 結論

本研究では、血管内皮細胞を用いて医用材料における内皮化を評価するためのより最適な方法を探索した。

従来、材料の *in vitro* における内皮化の評価に使用されていた初代培養細胞の HUVEC と最近開発された不死化させた血管内皮細胞の TIME-GFP を用いて、高分子材料上で培養し、細胞接着と形態及び内皮化について比較検討したところ、TIME-GFP は継代による細胞の変化もあまり見られず、また HUVEC と同様の接着傾向を示し、さらに材料上でも血管内皮細胞としての機能を保持していることから、血管内皮細胞を用いた材料の内皮化評価において TIME-GFP を用いる有用性が示唆された。

また、TIME-GFP の材料への接着数を調べることで、ポリマーコーティング処理の割合をどの程度検出できるのか調べたところ、PC シートに PMEa を処理した場合、

50%の処理の違いは細胞数を測定することで検出できることがわかった。実際に製品に使用する医用材料及びその表面処理において、この試験をバリデーションすることによって品質管理試験として使用できる可能性が示唆された。

高分子材料による TIME-GFP の機能への影響について、遺伝子発現の網羅的解析も行ったところ、コーティングするポリマーの種類によって血管内皮細胞の機能へ与える影響は異なることがわかった。ポリマーコーティングによる内皮化の評価として、ポリマー上への TIME-GFP の接着や増殖について検討した上で、さらに血管内皮細胞の機能への影響についても考慮する必要があるだろう。TIME-GFP を用いてそれぞれのポリマーについて内皮化の評価を行った今回の結果からは、TIME-GFP の接着や増殖も比較的良く、細胞の機能へ与える影響が少ないと予想される PTHFVE が、内皮化の評価は高いといえるのかもしれない。

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., Takada N., Yasuda S., Sawada R., Niimi S., Matsuyama A., Sato Y. : Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*, 43, 146-149 (2015)
- 2) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Takada N., Kuroda T., Sawada R., Okura H., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y. : Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R γ^{null} mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regenerative Therapy*, 1, 30-37 (2015)
- 3) 澤田留美「再生医療等製品開発における動物実験—指針及び評価指標について—」*オベリスク*, 20(1), 25-31 (2015)
- 4) 澤田留美「再生医療等製品とバイオマテリアル, そして評価指標」*バイオマテリアル—生体材料—*, 33(1), 7-8 (2015)
- 5) Sasaki H., Takeuchi I., Okada M., Sawada R., Kanie K., Kiyota Y., Honda H., and Kato R. : Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells. *PLOS ONE*, 9(4), e93952 (2014).
- 6) Kono K., Niimi S., and Sawada R. : Cyclin D2 promotes the proliferation of human mesenchymal stem cells. *J. Bone*

Marrow Res., 2: 136. 1000136 (2013).

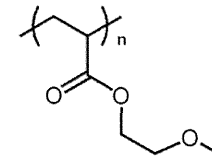
2. 学会発表

- 1) Kono K., Niimi S., Sawada R.;
Analysis of Line1 expression in human mesenchymal stem cells, 12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2014.6)
- 2) Sasaki H., Okada N., Kanie K., Kiyota Y., Honda H., Sawada R., Kato R.;
Image-based profiling of mesenchymal stem cells using non-label images, TERMIS-EU 2014 (2014.6)
- 3) 澤田留美, 河野 健, 比留間瞳, 加藤玲子, 新見伸吾「生体親和性高分子材料によるヒト単球細胞の機能の制御について—遺伝子発現の網羅的解析による検討」第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11)
- 4) 加藤玲子, 萩島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索」第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11)
- 5) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細胞における細胞分化と LINE-1 の発現について」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 6) 高田のぞみ, 河野健, 安田智, 澤田留美, 新見伸吾, 松山晃文, 佐藤陽治「細胞増殖特性を利用した不死化細胞検出試験法の性能評価」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 7) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 澤田留美, 本多裕之, 清田泰次郎, 加藤竜司「骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化モニタリング」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)

表1. 高分子材料の構造式

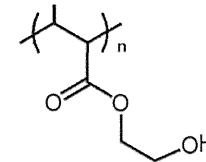
PMEA

Poly(2-methoxyethyl acrylate)



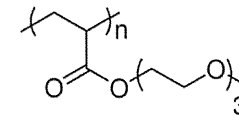
PHEMA

Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)



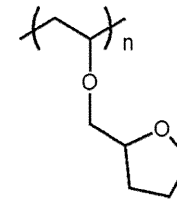
PMe3A

Poly [2-[2-(methoxyethoxy)ethoxy]ethyl acrylate]



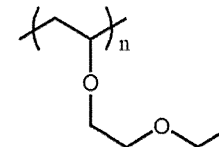
PTHFVE

Poly(tetrahydrofuran-2-ylmethyl vinyl ether)



PEOEVE

Poly(2-ethoxyethyl vinyl ether)



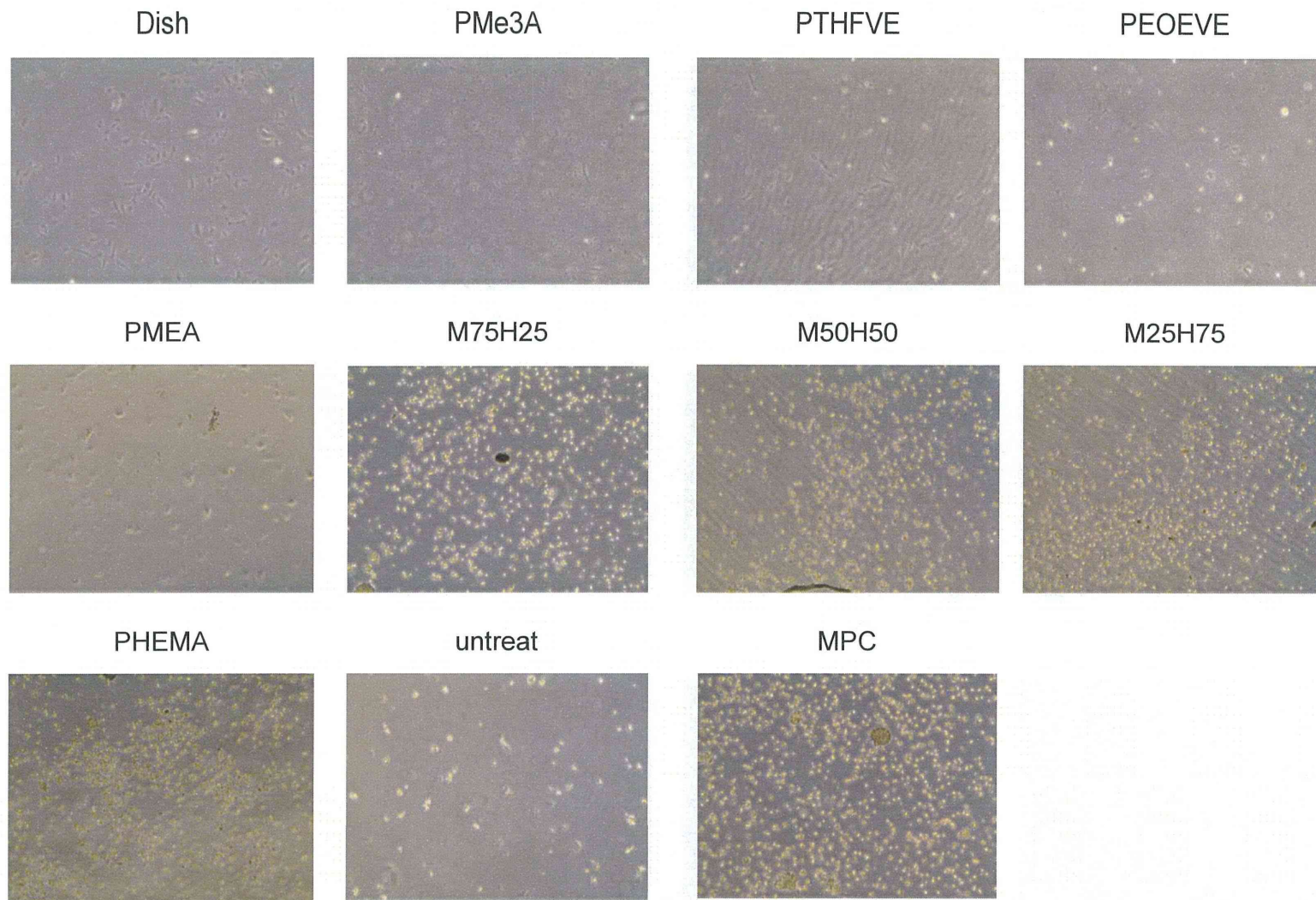


図1. ポリマーをコーティングしたシート上で1日培養したHUVEC (3111301)の細胞形態

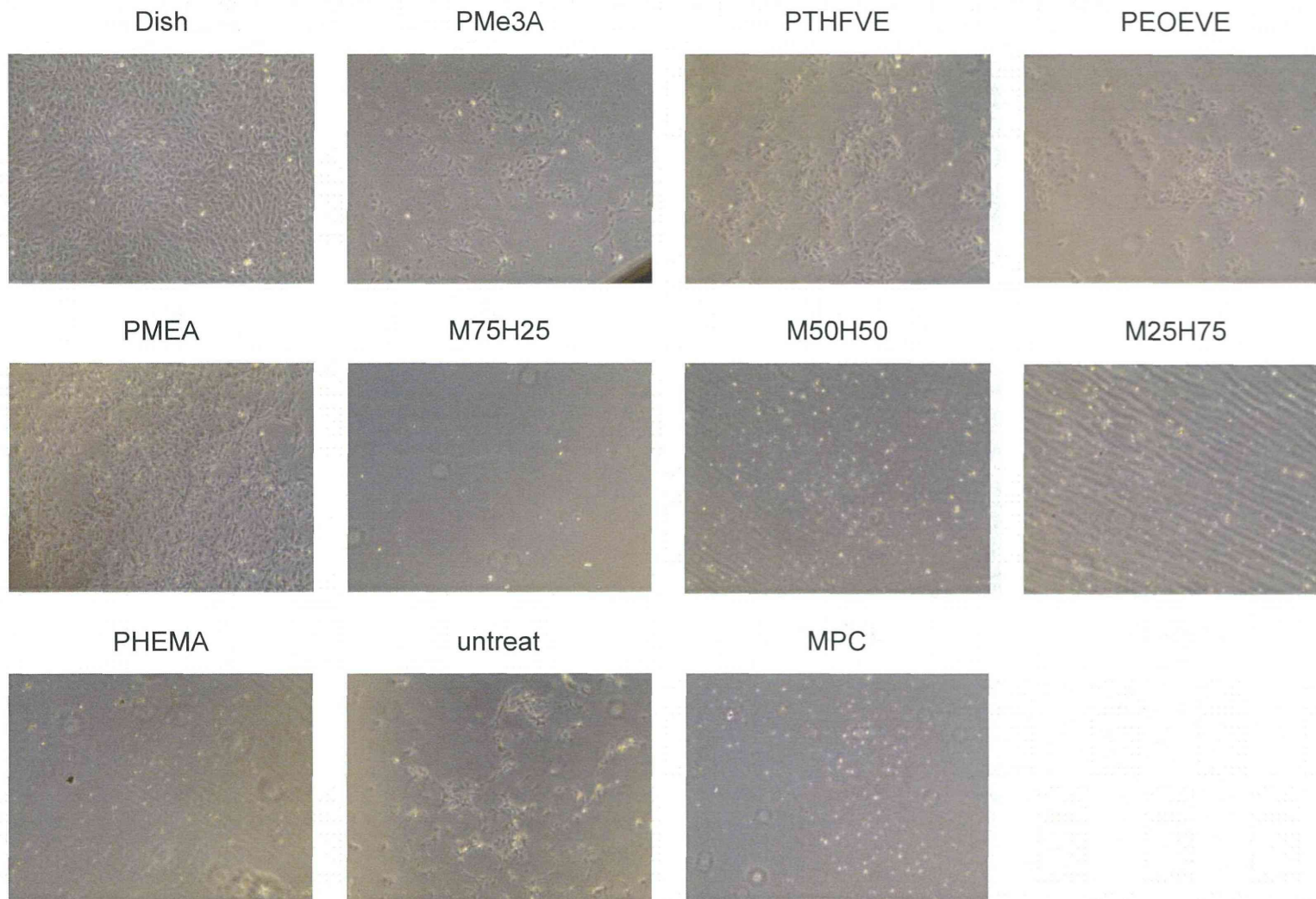


図2. ポリマーをコーティングしたシート上で4日培養したHUVEC(3111301)の細胞形態

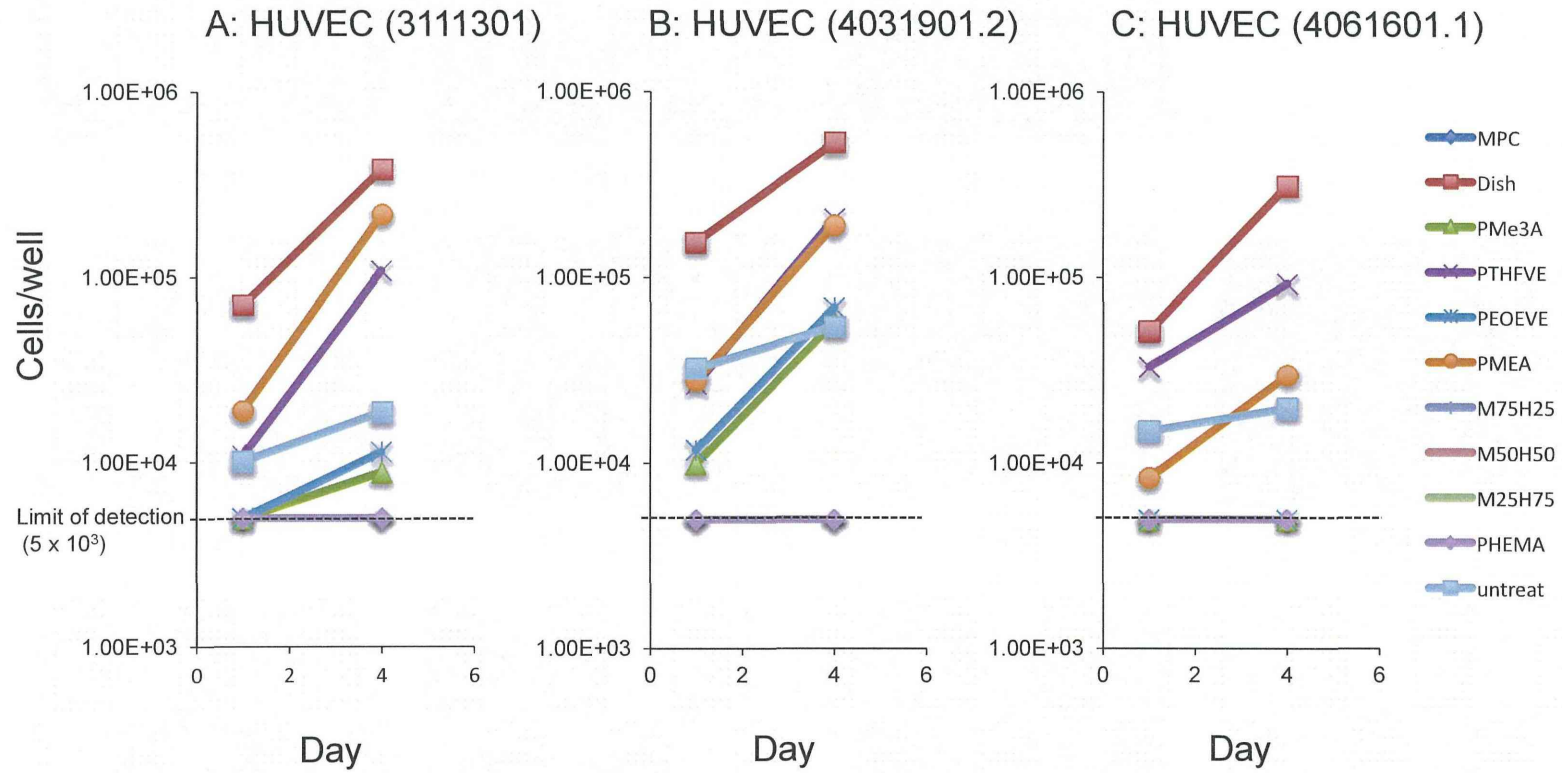


図3. ポリマーをコーティングしたシート上で培養したHUVECの増殖

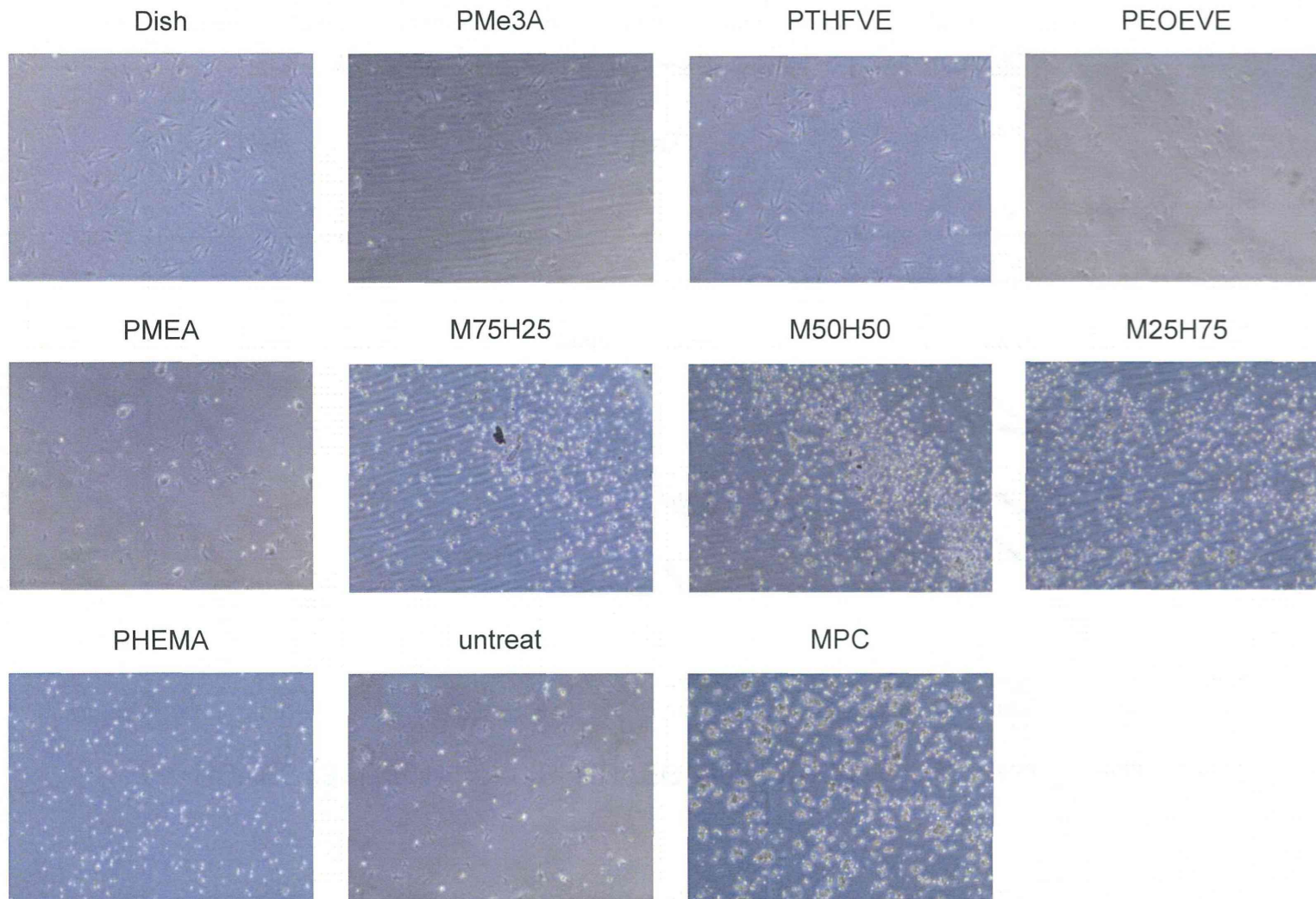


図4. ポリマーをコーティングしたシート上で1日培養したTIME-GFPの細胞形態

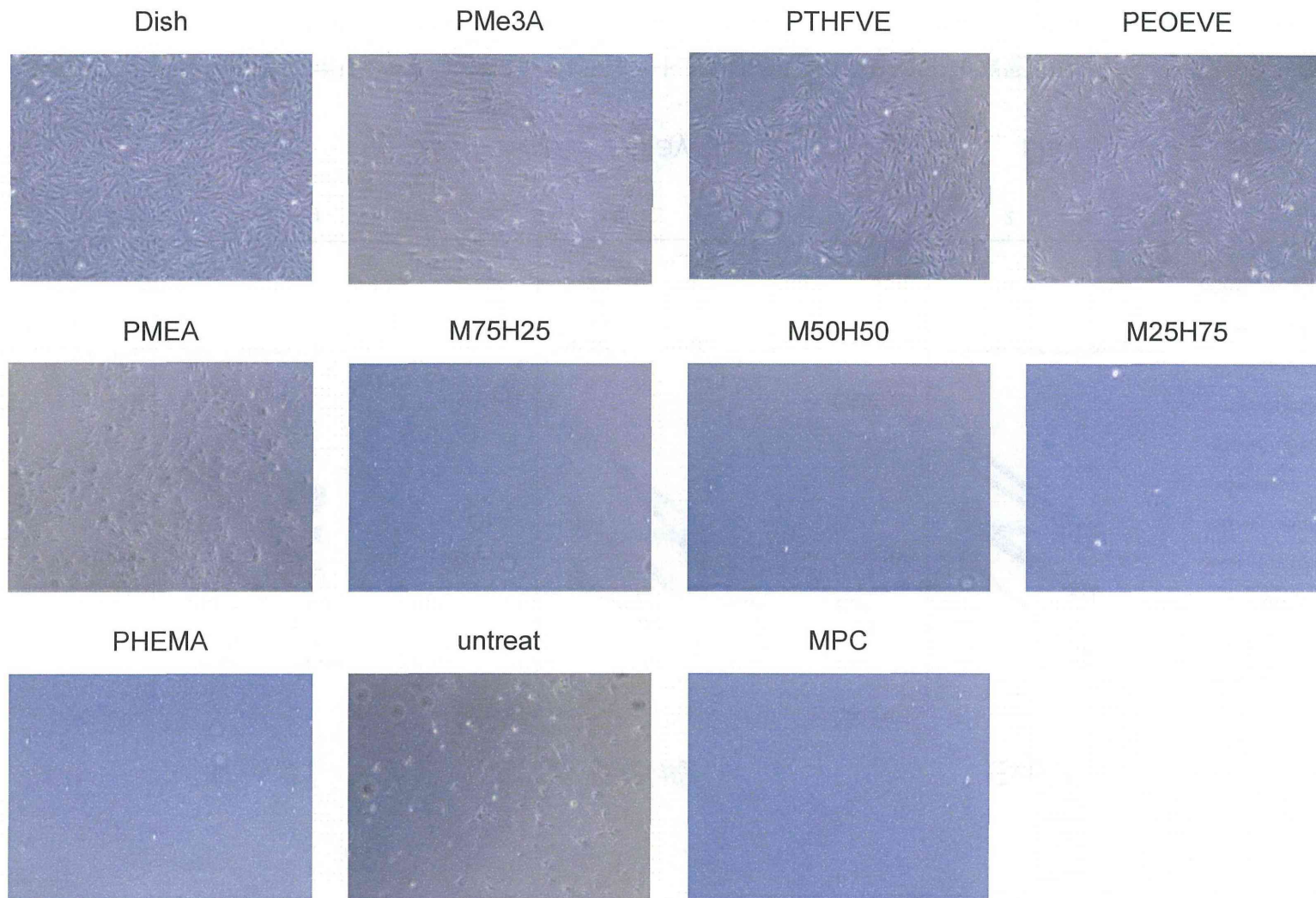


図5. ポリマーをコーティングしたシート上で4日培養したTIME-GFPの細胞形態