

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	配島由二	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	宮島敦子	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
研究協力者	小森谷薫	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している。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してきた。昨年度は、ヒト単球細胞である THP-1 を用いたタンパク質比較発現解析の結果より、基材を PMEА もしくは PHEMA 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を示した。様々な血栓性の疾患において、血液凝固と炎症反応は関連性があることが示されてきていることから、今年度は THP-1 の活性化表面マーカー (CD54:ICAM-1, CD86: B7-2) の発現に着目して、PMEА と PHEMA に加え、分子構造から血液適合性が高いと予測される新規の生体適合高分子材料である PMe3A、PTHFVE および PEOEVE でコーティングしたシート上で培養した THP-1 間で比較検討を行った。その結果、培養 24 時間後で、細胞培養用シャーレ (TCPS) を対照とした時、基材であるポリカーボネート (PC)、PMe3A コーティング PC および PEOEVE コーティング PC において、CD54 の発現量から相対蛍光強度 (RFI) を算出したところ、約 2 倍以上であった。それに対して、PHEMA、PMEА、PTHFVE コーティング PC 上で培養すると約 0.9~1.5 倍であった。一方、CD86 は PC を含む評価したすべてのコーティング PC において、TCPS とほぼ同等の発現強度であった。さらに炎症系サイトカインである IL-8 の培養上清中の量を比較したところ、PHEMA が対照と同等である以外は、いずれも対照の 3 倍以上の発現がみられ、PMe3A >> PEOEVE >> PC = PMEА > PTHFVE の順に高発現していた。これらの結果から、今回検討した生体適合高分子材料は、THP-1 の活性化に与える影響が小さい順に PHEMA < PTHFVE < PMEА << PEOEVE << PMe3A であることが示された。

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、血液適合性に優れている PMEA と、高い生体適合性を有する 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。その結果、基材を PMEA もしくは PHEMA 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。さらに接着因子の発現も未処理の基材と比較して抑制されていた。これらのことより、未処理の基材上で THP-1 が活性化されている可能性が考えられた。そこで、今年度は THP-1 の活性化表面マーカーである CD54 (ICAM-1) と CD86 (B7-2) の発現に着目して、PMEA と PHEMA に加え、新規の生体適合高分子材料である PMe3A、PTHFVE および PEOEVE

でコーティングしたシート上で培養した THP-1 間で比較検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

シート：厚さ 0.1 mm, 径 35 mm の菅原工業製 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： Poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) , Poly (2-hydroxy ethyl methacrylate)(PHEMA) , Poly [2-{2-(2-methoxy-ethoxy) ethoxy} ethyl acrylate-co-butyl acrylate] (PMe3A), Poly (tetrahydrofurfuryl vinyl ether) (PTHFVE) , Poly (2-ethoxy- ethyl vinyl ether) (PEOEVE)

2. ポリマーコーティングシートの作製

KYOWARIKEN 製スピナー (K-359SD-1 SPINNER) の設置台上に PTFE メンブレンフィルターをのせ、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℃で一～二日間培養した。

4. 細胞形態・シート表面観察

位相差倒立顕微鏡 (LEICA DM IL; Laica) を用いて観察した。

5. THP-1 の活性化マーカー測定 (Human Cell Line Activation Test(h-CLAT 法)の改変)

各コーティングシート上で培養した細胞を 24 時間後、48 時間後に 2 ml のチューブに回収し、遠心後、1 ml の冷 FACS Buffer (F.B.:0.1% BSA 含有 PBS)に懸濁し、2 回洗浄後、600 μl の 0.01% ヒトγグロブリン含有 PBS に懸濁し、4℃で 15 分間静置して FcR のブロッキングを行った。ブロッキング後、遠心して、上清を除き、120 μl の F.B.に懸濁し、1.5 ml チューブ 3 本に 40 μl ずつ分注し、各抗体希釈液を 10 μl ずつ添加して、氷温上で 30 分間静置した。抗体は FITC ラベルされた、1: anti-human CD54 (clone: 6.5B5, DAKO 社) 3/5 希釈、2: anti-human CD86 (clone: Fun-1, BD PharMingen 社) 3/10 希釈、3: アイソタイプコントロールとして mouse IgG1 (clone; DAK-G01, DAKO 社) 3/10 希釈を使用した。抗体染色後、遠心して、上清を除き、200 μl の F.B.に懸濁し、2 回洗浄後、400 μl の F.B.に懸濁し、2.5 μg/ml の PI を添加して、5 分後に Flow Cytometry (FACS Calibur Cell Quest, Becton Dickinson 社) で解析した。死細胞は Propidium Iodide (PI)によって染め分け、生細胞が 10,000 個になるまで測定した。細胞生存率は FACS で取り込んだ細胞中、PI で陰性だった割合より算出し、生存率 50%以

上のものだけ解析に用いた。

CD54 及び CD86 発現の評価法としては、以下の式に基づいた相対蛍光強度(Relative fluorescence intensity (RFI))を用いた。

$$\text{RFI}(\%) = \left(\frac{\text{各シート上で培養した細胞の MFI} - \text{各シート上で培養した細胞の isotype control の MFI}}{\text{TCPS 上で培養した細胞の MFI} - \text{TCPS 上で培養した細胞の isotype control の MFI}} \right) \times 100$$

MFI = Geometric Mean fluorescence intensity

6. IL-8 の測定

培養上清中の IL-8 の量は、ELISA kit Human IL-8 (invitrogen 社)を用いて、マニュアルに則して測定した。

7. 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とシート表面

播種して 24 時間後での THP-1 の形態を図 1-1 に示す。いずれも顕微鏡観察下においては TCPS 上で培養した THP-1 と同様にほぼ球形で浮遊していた。コーティングしたシート表面は、PHEMA 以外で亀裂やまだら模様が観察された。播種して 48 時間後での THP-1 の形態は未処理の 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 1-2) コーティングした PC 上で培養した THP-1 にも、若干接着している細胞が観察されたが、大きな形状の変化はみられなかった。

(2) 細胞生存率

播種 24 時間後および 48 時間後とも、PMe3A と PEOEVE の両者で 85-87%であったが、これは他のシートが対照の TCPS を含め 90%前後の生存率であったのと、有意差はなかった。(図 2)

(3) CD54 および CD86 の RFI (%)

CD54 および CD86 の RFI (%) の 2 回の試験結果を図 3-1 (播種 24 時間後) と図 3-2 (48 時間後) に示す。TCPS を対照とした時、CD86 は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、2 倍を超えたものはなかった。一方、CD54 では、播種 24 時間後において、未処理 PC、PMEA、PMe3A、および PEOEVE で平均 2 倍以上になっていた。播種 48 時間後になると、PMe3A で 4 倍以上、PEOEVE で 3 倍以上であった。さらに PC だけでなく、PMEA と PTHFVE も 2 倍前後まで上がっていた。一方、PHEMA は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、TCPS とほぼ同等であった。

(4) 培養上清中の IL-8 量

培養 24 時間後および 48 時間後で TCPS と同等であったのは PHEMA のみであった。他のシートでは、24 時間後、対照と比較して、PMe3A:約 12 倍、PEOEVE:約 7 倍、PC:約 4 倍、PMEA:約 4 倍、PTHFVE:約 3 倍であった。48 時間後も傾向は大きく変わらなかったが、さらに TCPS より高い発現がみられ、PMe3A:約 49 倍、PEOEVE:約 23 倍、PC:約 10 倍、PMEA:約 13 倍、PTHFVE:約 8 倍であった。(図 4)

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している。今年度は、通常の培養皿である TCPS を対照として、基材(PCシート)および様々な生体適合性高分子でコーティングした PC シートの上で培養した THP-1 の活性化マーカーである CD54 および CD86 の発現比較解析を行った。

まず、播種して 24 時間後および 48 時間後の THP-1 を顕微鏡観察したところ、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。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。これは昨年度の 48 時間の観察と一致していた。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 PC と比べて少ないながら一部接着している細胞も観察されたが、ほとんどが TCPS と同様に接触面で触れている状態であった。これは各高分子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 (H26 年度本報告書分担研究者配島の項、研究結果(2)高分子材料の蛋白質吸着挙動を参照) 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が、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 などが考えられている。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。さらにアテローム血栓性疾患の発症にも炎症が重要な役割を果たすことが明らかにされてきており、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-12、IL-18)などが、アテロームプラーク形成、プラーク破綻や血栓形成に関与する分子として同定されている。このように、炎症と血液凝固(血栓形成)の間には関連があることが知られてきている。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る可能性が考えられた。一方、THP-1 を利用した、遅延型炎症性反応(感作性)を調べる *in vitro* 試験法として、国内の化粧品会社により、Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法)が開発されている。この方法は THP-1 の培養液中に化学物質のような被験物質を培養添加し、THP-1 の活性化マーカーである CD54 と CD86 の発現を指標として、被験物質が感作性を評価する試験法である。今回は、表面構造が THP-1 に与える影響を検討するため、ポリマー溶液自身や抽出物の添加ではなく、各ポリマーでコーティングされた表面上で THP-1 を培養し、CD54 と CD86 の発現強度と、培養上清中の IL-8 量を測定した。通常の h-CLAT では培養 24 時間後のみで判定しているが、培養条件の一部が化学物質の場合と異なるため、培養 24 時間後と 48 時間後で検討した。その結果、CD86 は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、2 倍を超えたものはなかった。一方、

CD54 は播種 24 時間後において、未処理 PC、PMe3A および PEOEVE が平均 2 倍以上になっていた。中でも PMe3A は 2 回とも、基材である処理 PC よりも発現強度が高かった。さらに 48 時間後では、PHEMA が TCPS と同等であるのに対して、それ以外のシートでは発現強度が 2 倍を超えていた。h-CLAT 法では培養時間は 24 時間で、対照の RFI を 100 とした時に、CD54 RFI = 200, CD86 RFI = 150 を陽性基準値、結果判定は 3 回中 2 回の試験において、CD54 もしくは CD86 のいずれかの陽性基準値を超えた場合を陽性と判定と定めてある。しかしながら、化粧品のような化学物質ではなく、今回の様に材料表面構造が細胞におよぼす影響を評価する場合は、培養時間および陽性基準値や判定法について検討する必要があると思われる。次に、炎症性サイトカインである IL-8 の培養上清中の量を測定したところ、播種 24 時間後において、CD54 の 48 時間後の発現強度パターンと類似した産生パターンがみられ、48 時間後の IL-8 の産生量は、パターンを増強していた。他の炎症性のサイトカイン量を検討することや、タイムコースを追った確認が必要であるが、より早期の培養上清中の IL-8 の量を測定することで、CD54 の発現強度を推測できる可能性が考えられた。また CD54 発現強度測定においても、皮膚に長時間直接接する化粧品や薬剤とは異なり、これらの生体適合性高分子材料が血液に接触する医療機器に使用される際は、血液が循環している環境下であり、その中に含まれる単球などは、同じ細胞が常に接触していることはないと考えられることから、今後、培養時間について検討する必要があると思われる。

今回の結果から、1: 基材である PC を含め、検討した生体適合高分子材料で CD86 の発現を顕著に上げるものはなかった。2: PHEMA の表面構造は THP-1 を活性化することはなく、他の高分子材料では THP-1 の活性化に与える影響が小さい順に PTHFVE < PMEA << PEOEVE << PMe3A であることが示された。これは吸着タンパク質挙動から判断した血液適合性が良い順番 (H26 年度、本報告書分担研究者配島の項を参照) PMEA>PTHEVE>PEOEVE>PHEMA>>PMe3A とは PMEA と PHEMA の位置付けが異なるが、新規生体適合高分子材料に関しては、同様の傾向がみられている。体内で血液に触れる環境下では、血漿タンパク質だけでなく、単球を始めとした、血液細胞との相互作用もあることから、両方の結果を加味して判定を検討する必要もあると思われる。

E. 結論

今回検討した生体適合高分子材料は、THP-1 の活性化に与える影響が小さい順に PHEMA < PTHFVE < PMEA << PEOEVE << PMe3A であることが示された。

F. 研究発表

学会発表

1. 学会発表

1) Atsuko Miyajima-Tabata, Tsuyoshi Kawakami, Kaoru Komoriya, Reiko Kato, Shingo Niimi, Kazuo Isama. Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology

(San Diego, 2015.3)

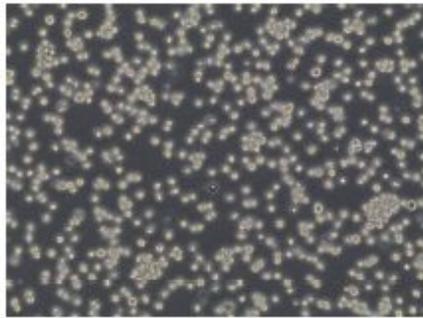
2) 加藤玲子, 配島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京, 2014.11)

3) 宮島敦子, 小森谷薫, 田中賢, 加藤玲子, 新見伸吾. 「血液適合性評価における HEMA/MEA ランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京, 2014.11)

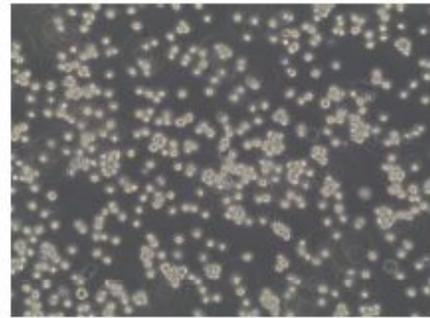
4) 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田譲治, 新見伸吾. 「多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析」. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2014.10)

5) Atsuko Miyajima-Tabata, Reiko Kato, Kaoru Komoriya, Shingo Niimi. Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)

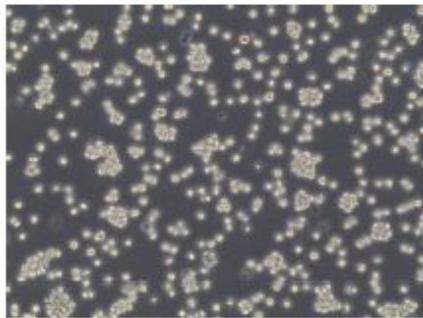
6) 宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, 加藤玲子, 新見伸吾, 伊佐間和郎. 「酸化金属ナノマテリアルに対する THP-1 細胞の細胞応答」. 第 41 回日本毒性学会 (神戸, 2014.7)



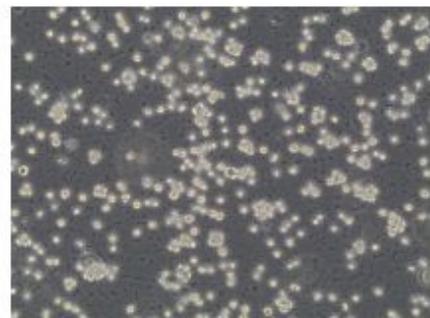
TCPS



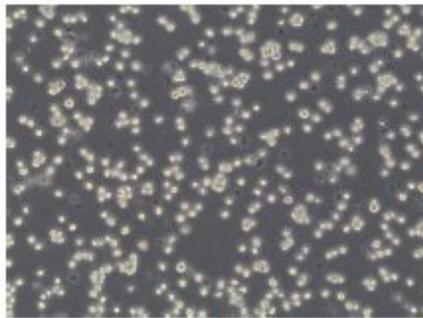
PC



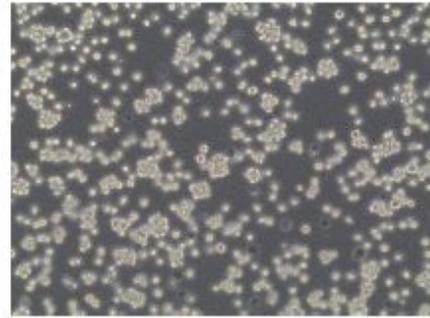
PHEMA



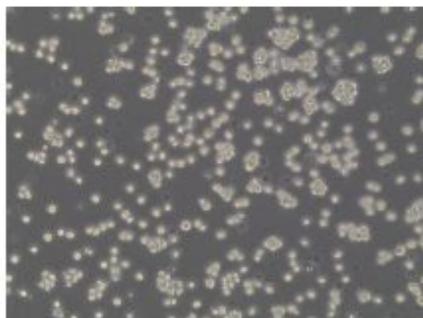
PMEA



PMe3A



PTHFVE

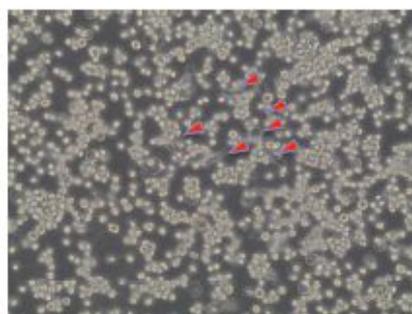


PEOEVE

図1-1: 播種24時間後のTHP-1形態とシート表面



TCPS



PC



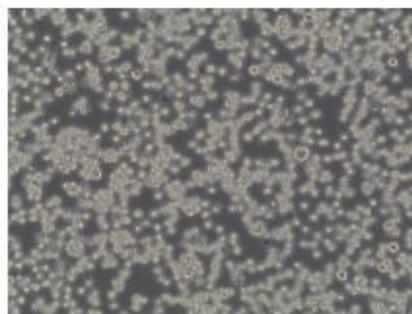
PHEMA



PMEA



PMe3A



PTHFVE



PEOEVE

図1-2: 播種24時間後のTHP-1形態とシート表面

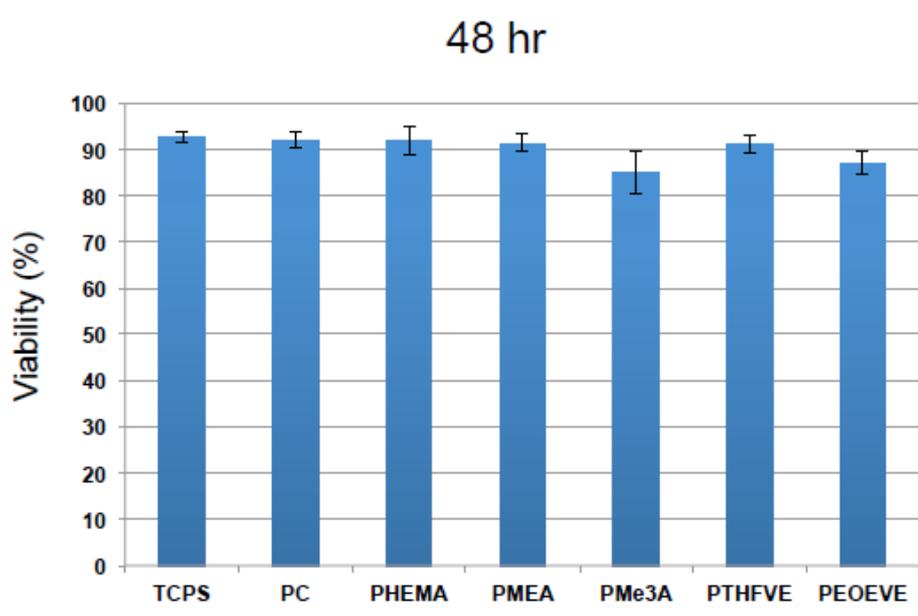
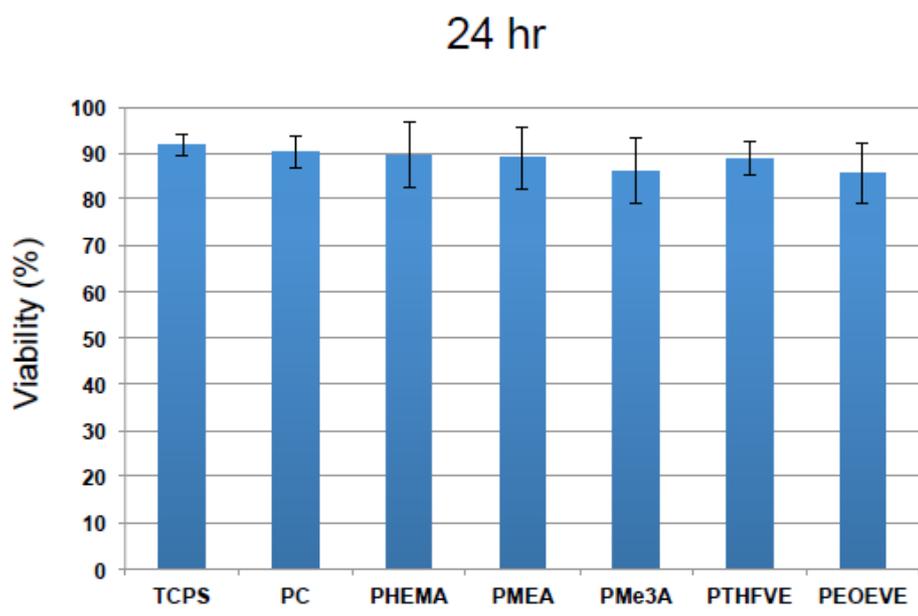


図2: 播種24時間後および48時間後のTHP-1の生存率

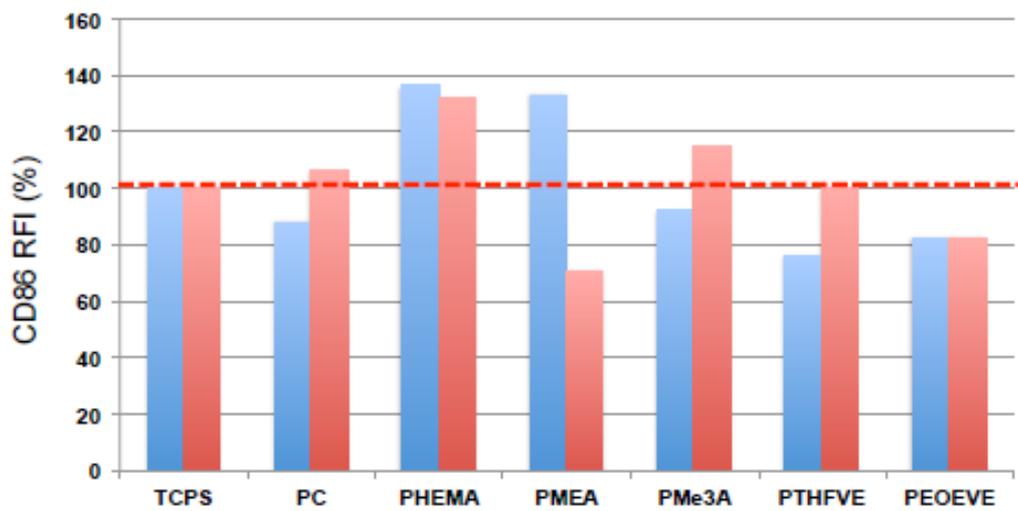
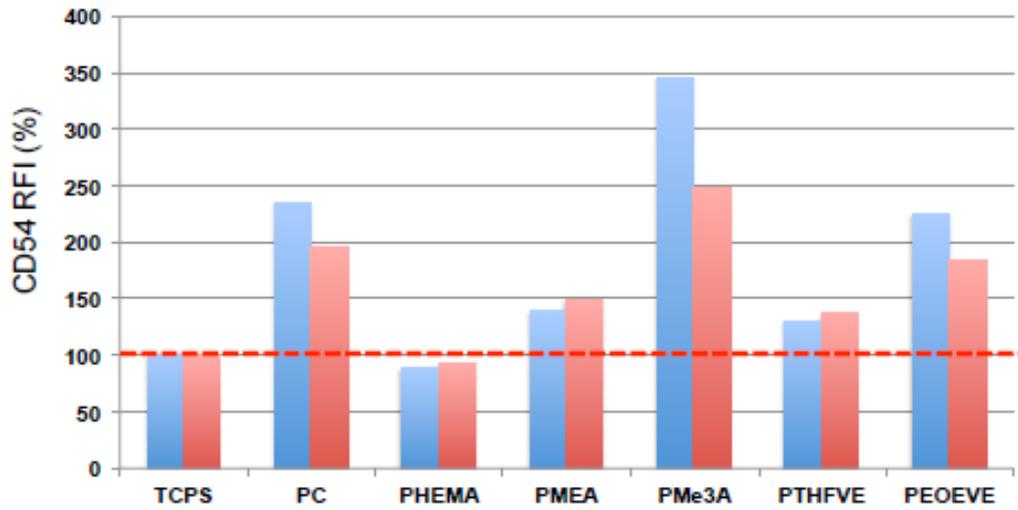


図3-1: 播種24時間後のTHP-1のCD54およびCD86の発現強度

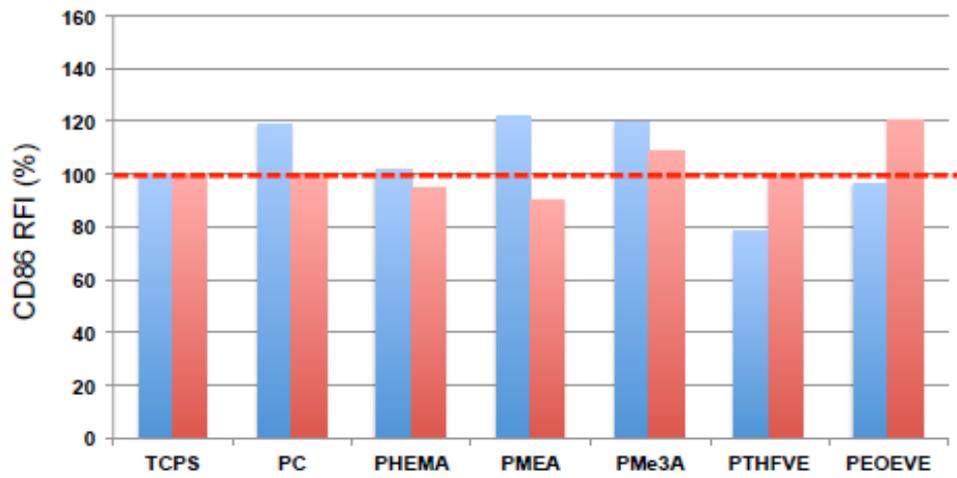
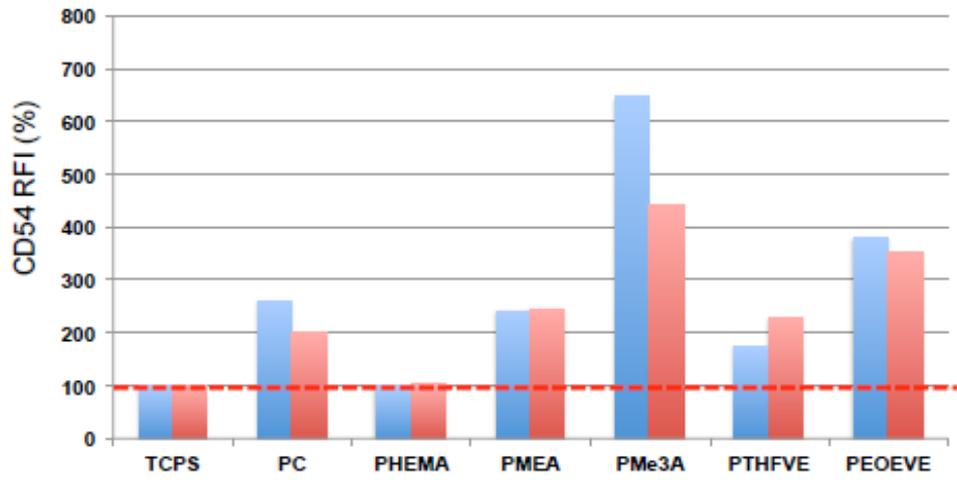


図3-2: 播種48時間後のTHP-1のCD54およびCD86の発現強度

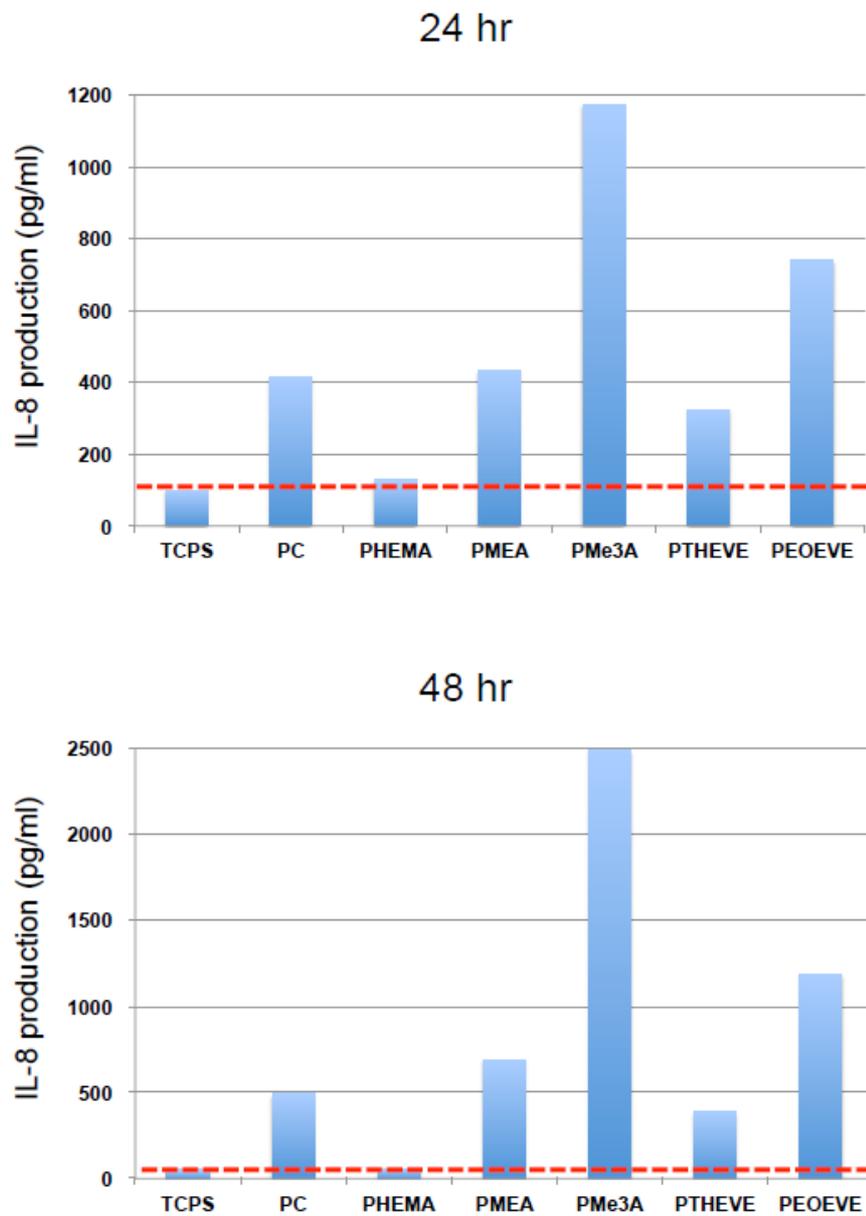


図4: 播種24時間後および48時間後の培養上清中のIL-8量