

## 11. 倫理面への配慮

研究に用いた hMSC は LONZA 社より、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、倫理面の問題は無いと考えられる。

## C. 研究結果

H24 年度：基材の PET シートを含む、MEA/HEMA ランダム重合体コーティングした表面上で培養した hMSC は TCPS 上で培養した場合と同様に 24 時間後には紡錘状になり、回収時の 48 時間後も同様の形状を保っており、顕微鏡観察においては形状に大きな差はみられなかった。一方、タンパク質発現比較解析においては、IPA を用いて TCPS 上の培養に対して発現量が 2 倍以上および 1/2 以下になったタンパク質が関与すると思われる生体機能検索を行ったところ、細胞の集合および組織化や細胞機能と維持に関わる機能に関連するタンパク質変動数が多かったことから、これらに関与するタンパク質群の発現挙動を検討した。細胞骨格関連タンパク質群では TCPS に比べて PET と M75H25 はほとんど変化がないのに対して、M100 はアクチン関連タンパクだけでなく、Ena/VASP ファミリーのタンパク質である Vasodilator-stimulated phosphoprotein や Protein enabled homolog といった、細胞接着やアクチンの再構築部に会合する細胞骨格の重要な制御因子を含め全体的に発現低下がみられた。M50H50 では前述の Protein enabled homolog を含め発現上昇傾向がみられた。細胞伸展関連タンパク質群および細胞接着関連タンパク質群では、いずれも PET と M75H25 はほとんど変化がないのに対して、M100 では TCPS と

比して有意に発現が低下していた。一方、M50H50 では 2 倍以上になってはいないが、PET と M75H25 と比べると発現増加している傾向がみられた。さらに M100 が TCPS 上の培養に対して発現量の変化したタンパク質数が多かったことから、発現変化の方向から生物学的機能が亢進されるか抑制されるかの予測解析した結果、先にあげた細胞の集合および組織化や細胞機能と維持に関わる機能だけでなく細胞生存に関する機能が抑制され、細胞死に関連する機能が亢進する可能性が示唆された。そこで他の材料上でもこれらの機能に関係するタンパク質の変化を確認した。細胞生存関連タンパク質群では、M100 以外の PET, M75H25 および M50H50 で、確認したタンパク質のほとんどが、TCPS と有意差がなかった。

先述のように、M100 において細胞の形態に関するタンパク質群の発現が TCPS に比して低下していたことから、細胞外マトリックスに関するタンパク質群の発現挙動に着目し比較検討したところ、M100 ではコラーゲンやフィブロネクチンだけでなく、ヒアルロン酸合成酵素およびヒアルロン酸のレセプターである CD44 を含む検討したタンパク質のほとんどが有意差ありで発現低下していた。有意差がつかないタンパク質も TCPS に比して減少傾向がみられた。M50H50 では逆にコラーゲンやフィブロネクチンなどが有意に高発現しているだけでなく、TCPS と比べて有意に発現低下しているタンパク質はなく、全体的に増加傾向がみられた。PET および M75H25 での発現はほとんど TCPS と同様の傾向であった。

一方、インテグリン自身は細胞外マトリックスではないが、細胞外マトリックスと

の相互作用を介して細胞機能を制御していることから、インテグリンの発現に着目したところ、M100 では有意に発現減少がみられた。一方、PET, M75H25 および M50H50 では、M50H50 で若干上昇傾向がみられたが、いずれも有意な増減はみられなかった。

H25 年度：PMEA および PHEMA コーティングシート上に播種した THP-1 の培養 48 時間後の形態は 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、一部、扁平で PC 上に接着している細胞も混在していた。タンパク質発現比較解析においては、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、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、トロンビン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。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。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ニノゲンのレセプターコンプレックス C1QBP 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について検討したところ、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。

H26 年度：播種して 24 時間後では、未処理の PC で培養した THP-1 の一部に接着性の細胞が観察されたが、ほかには TCPS 上で培養した THP-1 と同様にほぼ球形で浮遊

していた。播種して 48 時間後でも未処理の 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。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、顕微鏡観察においては、大きな形状の変化はみられず、細胞生存率も TCPS と有意差はなかった。CD86 の発現強度は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、陽性基準である 150 % を超えたものはなかった。一方、CD54 で陽性基準である 200 を超えたのは、播種 24 時間後において、未処理 PC で 2 回、PMEA で 1 回、PMe3A で 3 回、PTHFVE で 1 回、PEOEVE で 2 回であった。播種 48 時間後になると、未処理 PC で 3 回、PMEA で 3 回、PMe3A で 3 回、PTHFVE で 2 回、PEOEVE で 3 回であった。PHEMA は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、1 回も 200 を超えなかった。培養上清中の IL-8 量は、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。

#### D. 考察

H24 年度: TCPS 上での培養と比較して、各シートでの hMSC のタンパク質発現変化 (2 倍以上および 1/2 倍以下) を検討した結果、PET および M75H75 では、ほとんどのタンパク質で大きな変化がみられなかった。

それに対して M100 は変化があったタンパク質が 1570 個と一番多く、そのほとんどのタンパク質で発現が低下していた(1544 個)。特に細胞形態や接着および細胞生存に関して正に制御するタンパク質や細胞死を負に制御するタンパク質が低下していたことから、細胞形態や接着および細胞生存を抑制し、細胞死を亢進している可能性が示唆された。一方、411 個のタンパク質の発現変化が観察された M50H50 では、M100 とは逆に、変化したタンパク質のほとんど(372 個)で発現が高くなっており、中でも生体機能と高い関連性が示唆されたのは、細胞骨格関連タンパク質群であった。また、細胞外マトリックス関連タンパク質においてもその発現挙動が M100 では低下しているのに対して M50H50 は 2 倍以上ではなくても TCPS に比べて高い傾向がみられた。細胞外マトリックスはコラーゲン、エラスチンなどの繊維成分とプロテオグリカン、グルコサミノグリカンなどの非繊維成分、さらにこれらと細胞との接着を調節するフィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどの接着物質などからなる物質であるが、生体内では、細胞や臓器を支持したり、境界になったりする以外に、細胞の接着、細胞の分化・増殖および細胞の移動にも大きく関わっている。特にインテグリンは細胞外マトリックスとの相互作用を介して細胞死を回避し、細胞の増殖、分化、形質発現の制御を行っているタンパク質である。M100 ではインテグリンシグナルの下流に関わるタンパク質も発現低下していた。その結果、細胞形態、細胞接着、細胞の分化、増殖および細胞の移動などの機能が落ちると推測される。実際、細胞形態や細胞接着

に関わるタンパク質群の発現低下が観察されていることから、タンパク質レベルにおいて M100 では細胞形態や細胞接着機能が低下していることが示唆された。一方、HEMA が混在すると、細胞骨格や細胞外マトリックス関連タンパク質の発現は TCPS と同等か高い傾向がみられた。PHEMA 表面は PMEA 表面と比べて、タンパク質が脱離しにくく、かつ変性しやすいことが知られており、MEA に HEMA を混在させたことで、PMEA 単独に比べて、表面により多くの変性タンパク質が吸着した状態が保たれるようになり、その変性タンパク質を介して hMSC との相互作用が強くなったと推測される。実際、研究分担者靛島による組成比の異なる MEA/HEMA ランダム共重合体表面への血清タンパク質吸着挙動の解析の結果、複数のタンパク質で吸着量に違いがあることが示されている(本報告書靛島の項、研究結果(2) 吸着蛋白質の解析を参照)。また、その強度は M50H50 までは PHEMA の量に依存することが示唆された。さらにその相互作用の強さが、hMSC で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の調節に働いているのではないかと考えられる。

H25 年度：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 PME A 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に変化したこと (H24 年度本報告書 甞島の項、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、凝固反応を開始する。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、PME A では、減少傾向(平均 0.81 倍)がみられ、PHEMA では、ほぼ変化なかつ

た。PME A も PHEMA もタンパク質吸着が比較的少ないが、PME A 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 PME A 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、PME A 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可能性がある。

H26 年度:敗血症性播種性血管内凝固症候群やアテローム血栓性疾患の発症に炎症が関わっていることが判明してきている。また、昨年度のタンパク質網羅的発現比較解析の結果、炎症関連分子の発現挙動に変化があったことから、接触面の表面構造の違いによる影響から、THP-1 が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、培養上清中になる 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、陽性基準である 150 %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 3 回の試験の中、2 回以上陽性基準値を超えており、h-CLAT の判定基準において陽性であると判定された。中でも PMe3A は 3 回とも、未処理 PC よりも発現強度が高かった。さらに 48 時間後では、PHEMA 以外のシートで陽性判定を満たしていた。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。このことより、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、他の生体適合高分子材料では 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 (H26 年度、本報告書分担研究者 齋島の項を参照) 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

H24 年度: PMEA/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。

H25 年度: 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。また、その傾向は PMEA の方が強かった。

H26 年度: 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) Miyajima-Tabata A., Sakai K., Kato R., Matsuoka a.: Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPA polyers., Eurotox 2012 (Stockholm,

- 2012.6)
- 2) 2. 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 持田讓治, 松岡厚子「積層化軟骨細胞シートの同種 T 細胞におよぼす影響」 第 50 回日本人工臓器学会大会 (福岡, 2012.11)
  - 3) 3. 宮島敦子, 加藤玲子, 酒井恵子, 松岡厚子「高分子医療材料上で培養した細胞の細胞毒性および遺伝毒性」2012 バイオマテリアル学会 (仙台, 2012.11)
  - 4) 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)
  - 5) 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 (東京, 2013.11)
  - 6) 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 (東京, 2013.11)
  - 7) 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)
  - 8) 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 (東京, 2013.11)
  - 9) 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)
  - 10) 宮島敦子, 河上強志, 加藤玲子, 酒井恵子, 小森谷薫, 新見伸吾, 伊佐間和郎. 「酸化金属ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性および遺伝毒性」. 日本薬学会第 134 年会 (熊本, 2014.3)
  - 11) 河上強志, 宮島敦子, 小森谷薫, 加藤玲子, 伊佐間和郎. 「NiO ナノ粒子の細胞毒性に及ぼす懸濁液中の二次粒子径の影響」. 日本薬学会第 134 年会 (熊本, 2014.3)
  - 12) 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)
  - 13) Miyajima-Tabata A., Kato R., Komoriya K., Niimi S. Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)
  - 14) 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, 持田讓治, 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 (鹿児島, 2014.10)
  - 15) 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)
  - 16) 加藤玲子, 齋島由二, 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ーの探索」. 第 36 回日本バイオマ

テリアル学会(東京, 2014.11)

- 17) Miyajima-Tabata A., Kawakami T., Komoriya K., Kato R., Niimi, S. Isama K. 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)



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)

平成 24—26 年度分担総合研究報告書

「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」

研究分担課題名

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

純 Ti 表面の化学処理がヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (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導入処理 (CaCl<sub>2</sub> 処理と Ca(OH)<sub>2</sub> 処理) により hMSC の骨分化へ影響を与え、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理は骨分化を誘導するが、CaCl<sub>2</sub> 処理は限られた効果しか示さない事が判明した。さらに、Ca(OH)<sub>2</sub> 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。また 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/ $\beta$ -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 CaCl<sub>2</sub> 処理よりも Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の方が高かった。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可能性が示唆された。

次に、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、hMSC 及びヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line ; THP-1) を用いて、組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理による細胞への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 では、生体親和性高分子材料により 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、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 と PHEMA では細胞に与える影響が大きく異なることが判明した。また、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。

医用材料として PMEA, 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した。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たことから、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。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い、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・生物学的試験として遺伝子発現の網羅的解析等を中心に検討を行った。

平成 24 年度は、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・組織加工製品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。そこで、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た。まず純 Ti 表面へ 3 種類の化学処理 (NaOH 処理、CaCl<sub>2</sub> 処理、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理) を行う事によって実際に hMSC の骨分化が誘導されるかどうかを確認した。さらに化学処理方法による効果の違い等の比較を行い、そのメカニズムについて探ることを目的とした。

平成 25 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。一方、PHEMA は中間水の存在が認められない。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。

平成 26 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。

3) 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。

4) 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  $\mu\text{g/mL}$  Blasticidin (Life Technologies) 及び 200  $\mu\text{g/mL}$  G418 (Clontech) を加えた培地で培養した。

## 2. 基材

### 1) 純チタン (Ti) ディスク

純 Ti のディスク (直径 33.5 mm、厚さ 2 mm、表面仕上げ: Ra=0.4 程度の研磨仕上げ; ナカシマメディカル(株) を用いた。

2) 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。

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

## 3. 純 Ti ディスクの表面処理

### 1) NaOH 処理

純 Ti ディスクをポリプロピレン製遠沈管に入れ、5mol/L の水酸化ナトリウム水溶液 (和光純薬(株)) を 100mL 加えて、60°C で 24 時間静置した。

### 2) CaCl<sub>2</sub> 処理

NaOH 処理後の純 Ti ディスクを蒸留水 50mL で 4 回洗浄後ポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.1mol/L の塩化カルシウム水溶液を 100mL 加えて、60°C で 24 時間静置した。

### 3) Ca(OH)<sub>2</sub> 処理

NaOH 処理後の純 Ti ディスクを蒸留水 50mL で 4 回洗浄後ポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.01mol/L の水酸化カルシウム水溶液を 100mL 加えて、60°C で 24 時間静置した。

## 4. 基材への高分子のコーティング処理

### 1) 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 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、それぞれのポリマー溶液を 125 $\mu\text{L}$  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) 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、それぞれのポリマー溶液を 100 $\mu\text{L}$  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。

## 5. 純 Ti ディスクの表面観察とカルシウムイオン導入及びアパタイト形成

### 1) 材料の表面観察

化学処理を施された純 Ti 表面は、Scanning electron microscopy (SEM) にて観察した。

### 2) カルシウムイオン導入とアパタイト形成

材料表面へのカルシウムイオン導入量は、硝酸に溶解して Agilent 7500ce ORS ICP-MS にて測定した。

材料表面へのアパタイト形成量は、Hank's balanced salt solution (Life Technologies Co.) に 37°C で 7 日間浸漬した後、硝酸に溶解し、Agilent 7500ce ORS ICP-MS にてカルシウムイオン量を測定した。

## 6. 表面処理をした純 Ti 上で培養した hMSC の生化学的・生物学的試験

### 1) 細胞培養

直径 35 mm のディッシュ (IWAKI) に 3 種類の表面処理を行った純 Ti ディスクまたは表面未処理の純 Ti ディスクを入れて、それぞれに hMSC を播種し、MSCBM に MCGS を加えた培地 (MSCGM) で培養した。培養期間中週に 2 回培地交換を行った。

### 2) 細胞の形態観察及び免疫染色

細胞の形態観察のために、それぞれの純 Ti ディスク上で培養した hMSC を、5  $\mu$  M CellTracker (Lonza) を添加した培地 (血清無添加の McCoy's medium) で 37°C、30 分間培養し、その後培地を MSCGM に取替えてさらに 30 分間培養した。培養後の細胞を PBS(-) で 1 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドにて室温 15 分間で固定後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

Osteocalcin (OCN) のタンパク質発現を検討するために、hMSC を CellTracker で染色し、4%パラホルムアルデヒドにて室温 15 分間で固定後、ブロッッキング溶液 [10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 0.1% Triton X-100, 0.01% NaN<sub>3</sub> in PBS] にて透過させた。hMSC は、一次抗体として anti-OCN 抗体 (Abcam) を用いて 4°C で 16 時間、二次抗体として Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-mouse 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いて室温で 30 分間染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### 3) 細胞の増殖

表面処理を行った純 Ti ディスク上で培養した hMSC の増殖については、

TetraColor ONE (生化学工業株) を用いて検討した。

## 7. 生体親和性高分子でコーティングした基材上での細胞培養

### 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。

## 8. 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、 $1 \times 10^4$  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  $\mu$ l 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。

## 9. Total RNA の調製

それぞれの細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製

した。

#### 10. Real time (RT) -PCR による mRNA 発現量の定量的解析

抽出した total RNA の cDNA への逆転写は SuperScript III First-Strand Synthesis System for real-time polymerase chain reaction (RT-PCR; Life Technologies) を用いて行った。そして化学処理された Ti 上で培養した hMSC における Osteopontin (OPN)、OCN 及び GAPDH の mRNA 発現レベルについて、それぞれライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセット (Search-LC) を用いて、PCR 条件もこのキットのプロトコールに従って行った。PCR 反応は、Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cycler (version 4.0) で行った。

#### 11. 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 を使い、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。

#### 12. DNA マイクロアレイ解析

それぞれの細胞から調製した 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。

#### 13. 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。

#### 14. 有意差検定

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

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。

#### 15. 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、ヒト単球、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全て市販品であり、倫理的問題はないと思われる。

### C. 研究結果

#### 1. 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

化学処理した純 Ti ディスクの表面観察とカルシウムイオン導入及びアパタイト形成について検討したところ、3 種類の化

学処理によって、純 Ti 表面に多孔性のネットワークが形成されている事が SEM により観察されたが、それぞれの化学処理法による違いは認められなかった。純 Ti 表面へのカルシウムイオン導入量は、未処理及び NaOH 処理では表面へのカルシウムイオン導入は認められなかったが、CaCl<sub>2</sub> 処理ではその両者に比べて有意にカルシウムイオンが導入され、さらに Ca(OH)<sub>2</sub> 処理では CaCl<sub>2</sub> 処理よりも有意にその導入量が増加した。純 Ti 表面へのアパタイト形成について検討するために、Ti ディスクを Hank's balanced salt 溶液に 37°C で 7 日間浸漬した結果、3 種類全ての化学処理によりアパタイトが形成されており、その量は NaOH 処理に比べて CaCl<sub>2</sub> 処理の方が多く、さらに CaCl<sub>2</sub> 処理に比べて Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の方が有意に多かった。

表面に 3 種類の化学処理を施した Ti 上で 1, 4, 7 日間培養した hMSC の形態について検討した。培養 1 日後には、化学処理したものはどれも細胞が小さくなっており、さらに CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理では丸くなっていた。培養 4 日後には、NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理では、未処理と比べて hMSC の形態に大きな差は見られなくなったが、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理においては、細胞の大きさや広がりには差が見られた。培養 7 日後には、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理においても他の処理群と大きな差は見られなくなった。

培養 7 日後の hMSC の細胞数を検討したところ、細胞数は未処理 > NaOH 処理 > CaCl<sub>2</sub> 処理 > Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の順で多く、CaCl<sub>2</sub> 処理と Ca(OH)<sub>2</sub> 処理では未処理に比べて有意に減少していた。

次に、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、培養 7 日後の OPN と OCN の mRNA 発現を調べた。hMSC における OPN 発現は、CaCl<sub>2</sub> 処理で NaOH 処理と比較して有意に高かった。Ca(OH)<sub>2</sub> 処理では NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理と比較して有意に高く発現していた。OCN の mRNA 発現は、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理において他の処理に比べて高い傾向が見られた。さらに、OCN のタンパク質発現についても検討した。hMSC 培養 28 日後の発現を観察したところ、Ca(OH)<sub>2</sub> 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。

次に、表面を 3 種類の化学処理を施した純 Ti ディスク上で hMSC を 7 日間培養した後 DNA マイクロアレイ解析を行い、表面未処理の純 Ti ディスク上での培養時と比較検討した。未処理と比較して化学処理によって mRNA 発現が有意に (2 倍以上) 上昇した遺伝子のうち上昇比率が高い順に 30 遺伝子をそれぞれの化学処理法について調べた。NaOH 処理によって、骨芽細胞の分化を上昇させる IL6R (interleukin 6 receptor) 及び骨芽細胞分化の過程で重要な働きを担う ITGB1 (integrin, beta 1) が、有意に上昇していた。CaCl<sub>2</sub> 処理または Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって、正常な骨のリモデリングに関わる SPP1 (=OPN) と MMP13 (matrix metalloproteinase 13)、また骨芽細胞の分化の促進に関わる ENPP1 (ectonucleotide pyrophosphatase) が有意に上昇していた。さらに Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって、骨芽細胞分化の際に重要な役割を担う IL6R、ITGA2 (integrin, alpha 2)、BMP2 (bone morphogenetic protein 2)、PTH1LH (parathyroid hormone-like

hormone)の有意な上昇が認められた。

また、カルシウム導入法の違いによる遺伝子発現へ影響について検討するために、CaCl<sub>2</sub>処理とCa(OH)<sub>2</sub>処理におけるhMSCの遺伝子発現について比較した。Ca(OH)<sub>2</sub>処理した純Ti上で培養したhMSCにおいて、CaCl<sub>2</sub>処理上の細胞と比較して2倍以上発現が上昇した遺伝子は94遺伝子であった(data not shown)。IPAによる解析により、その内の6遺伝子が「formation of bone (骨形成)」に関わる遺伝子と有意(p=3.96 × 10<sup>-4</sup>)に重複していた。その遺伝子は、SPP1(OPN)、PTH1LH、FGF1 (fibroblast growth factor 1)、BMP2、PTGS1 (cyclooxygenase 1)、PTGS2 (cyclooxygenase 2)であった。

次に、それぞれの純Tiディスク上で培養したhMSCの骨形成や骨の発達に関わる遺伝子発現への純Ti表面の化学処理の影響について調べるために、骨再生に関連するパスウェイについて検討した。骨芽細胞における機能について、それぞれ純Ti表面の3種類の化学処理の影響について未処理のものと比較した。

まず、純Ti表面のNaOH処理の影響について、骨芽細胞の機能に関しては、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/ $\beta$ -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 (adenomatous polyposis coli)のmRNA発現が、未処理の場合には認められなかったのに対し純Ti表面のNaOH処理によって発現が誘導された。また、RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) decoy receptor であるOPG (osteoprotegerin)の遺伝子発現が

NaOH処理により2倍以上上昇した。次に、Ti表面のCaCl<sub>2</sub>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CaCl<sub>2</sub>処理により有意に上昇した。さらに、OPNの発現上昇に伴いintegrin  $\beta$ 3の発現も誘導された。純Ti表面のCa(OH)<sub>2</sub>処理の影響については、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、純Ti表面のCa(OH)<sub>2</sub>処理によって誘導された。また、BMP、IGF-1、integrin  $\beta$ 3に加えて、破骨細胞分化因子であるRANKLがCa(OH)<sub>2</sub>処理によって誘導された。さらに、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化のマーカーとなるOCNの遺伝子発現が、Ca(OH)<sub>2</sub>処理により2倍以上上昇した。

## 2. 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。

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。

EMTは、TGF $\beta$ 、Notch、Wnt、Receptor tyrosine kinasesによって誘導されるため、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 $\beta$ 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。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。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。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。

### 3. 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。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は、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。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、低下すると予想される機能は4種類であった。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、低下すると予想される機能は1種類だけ

であった。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、低下すると予想される機能は 2 種類であった。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疾病及び生体関連機能は 11 種類であり比較的多かった。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 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。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。

#### 4. 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 PHEMA/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 PHEMA/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 PMEA 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。一方、細胞数については、HUVEC (4031901.2) は PMEA 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 PMEA 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 PMEA/PHEMA のコポリマーはいずれのロットも接着しなかった。

#### 5. 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。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。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 PMEA/PHEMA のコポリマーは接着しなかった。

#### 6. 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。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かった。

#### 7. 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 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%の間の細胞増殖率に有意な差がみられた。

#### 8. 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調べた。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。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。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。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。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。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。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示した。

## D. 考察

### 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

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  $\text{CaCl}_2$  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、 $\text{CaCl}_2$  処理と  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理とを比較した。

カルシウムイオン導入した  $\text{CaCl}_2$  処理と  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理によって、hMSC の形態が変化し細胞数が減少した。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  $\text{CaCl}_2$  処理に比べて  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理の方が有意に高かった。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