

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、様々な生体適合高分子材料でコーティングした基材上で細胞を培養し、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。H24年度は組成比率の異なる MEA および HEMA のランダム共重合体でコーティングした表面がヒト間葉系幹細胞(hMSC)に与える影響を hMSC が産生するタンパク質網羅的発現比較解析で検討した。その結果、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年度は、検討細胞を血液球系細胞であるヒト単球細胞である THP-1 にし、PMEA および PHEMA によるコーティング表面が THP-1 細胞にどのような影響を与えるかを、THP-1 が産生するタンパク質網羅的発現比較解析にて検討した。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を制御できることが示唆された。さらに、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、H26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、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基材上で培養した THP-1 間で比較検討を行った。その結果、培養 24 時間後では、CD86 はいずれの培養下でも対照とほとんど変化がみられなかった。CD54 の相対蛍光強度および培養上清中の IL-8 量の比較から、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 > PMEA >> 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。その一方で PMEA は PHEMA よりも吸着タンパク質が脱離しやすく、かつタンパク質の変性が少ないことも知られている。これまでに、これらの表面へ結合するタンパク質の総量や特定のタンパク質の結合状態の違いを検討した研究はあるが、細胞に与える影響を細胞側のタンパク質発現挙動の比較から検討した報告はない。そこで本研究では、タンパク質発現挙動に焦点をおき、生体適合性高分子材料の表面構造の血液適合性を評価できるマーカー探索を試みた。H24 年度は組成比率の異なる MEA および HEMA のランダム共重合体でコーティングした表面がヒト間葉系幹細胞(hMSC)に与える影響を hMSC が産生するタンパク質網羅的発現比較解析にて、H25 年度は検討細胞を血球系の THP-1 に変えて、PMEA および PHEMA によるコーテ

ィング表面が THP-1 細胞にどのような影響を与えるかを、THP-1 が産生するタンパク質網羅的発現比較解析にて、H26 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 間で比較検討行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

シート(hMSC 実験): 厚さ 0.075 mm, 径 35 mm の三菱樹脂製 Pre-coated ポリエステル PET シート(ダイアホイル)(以下 PET と表記)

シート(THP-1 実験): 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: Poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA), Poly (2-hydroxy ethyl methacrylate)(PHEMA), 組成比の異なる MEA/HEMA ランダム共重合体(混合比 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 w/w%)

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

hMSC 実験: 1 w/v% メタノール溶液の組成比の異なる MEA/HEMA ランダム共重合体を、メタノール溶液で洗浄した未処理 PET の中央に 125 μ l 滴下し、KYOWARIKEN 製 スピンコータ (K-359SD-1 SPINNER) で以

下の3ステップ(Step1: 500 rpm, 5 sec, Step2: 2,000 rpm, 10 sec, Step3: 4,000 rpm, 5 sec)にてコーティングした後、一晚乾燥させたシートを実験に用いた。以下、作製されたシートを PMEA と PHEAM の混合比 (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 w/w%) 順にそれぞれを M100, M75H25, M50H50, M25H75 と表記する。

THP-1 実験：スピンコータの設置台上に 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

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC; LONZA)を 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 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM; LONZA) に Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement (MSCGS; Lonza) を添加した培地 (MSCGM)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 1×10^5 細胞/3 ml を播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37 °C で二日間培養した。

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. 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 hMSC はシートごと、新しいシャーレに移し、冷 PBS で 6 回洗浄後、Cell Dissociation Buffer (Gibco)を用いて剥離した。その後、Cell Dissociation Buffer の 10 倍量以上の冷 PBS で 3 回洗浄した。一方、各コーティングシート上で培養した THP-1 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、洗浄した。いずれの細胞も洗浄後、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 40 μ g (hMSC)、10 μ g (THP-1)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。この溶液に 50 mM NH₄HCO₃ (hMSC: 86.2 μ l, THP-1:77.2 μ l)、ProteaseMax Surfactant (1%, 5 μ l; Promega)及び Trypsin Gold (1 mg/ml, 1.8 μ l;

Promega)を添加し、37 °Cで一晩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 XL(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)に転送し、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 hMSC サンプルの場合: ± 1 分、THP-1 サンプルの場合は ± 5 分に設定した。

8-2. 比較定量解析

hMSC サンプル：タンパク質の多変量解析は i-RUBY ソフトウェア (メディカルプロテオスコープ) 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 (各試料 n = 2 x 2) を同ソフトウェアにインストールした後、Mascot/UniPort/Swiss-Prot データベースによるタンパク質同定、MS/MS スペクトル相同性に基づいたピークマッチングを行うことにより、タンパク質の比較定量解析を行った。

THP-1 サンプル：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づ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) を用いて行った。

9. THP-1 の活性化マーカー測定 (Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法) の一部改変)

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 μ l の 0.01% ヒト γ グロブリン含有 PBS に懸濁し、4 \square 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 μ l の F.B. に懸濁し、1.5 ml チューブ 3 本に 40 μ l ずつ分注し、各抗体希釈液を 10 μ l 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 μ l の F.B. に懸濁し、2 回洗浄後、400 μ l の F.B. に懸濁し、2.5 μ g/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。

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

MFI = Geometric Mean fluorescence intensity

h-CLAT 法における、試験対象物の陽性・陰性判定は下記の通りである。

陽性基準値 (CD54 RFI = 200, CD86 RFI = 150)

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する。

10. 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。

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質だけでなく、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係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係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、トロンピ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、トロンピ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、アンチトロンピンやプロテイン 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 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について検討したところ、細胞骨格タンパク質のミ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、ピンキュリン、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、研究分担者薮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(本報告書薮島の項、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 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 年度本報告書肥島の項、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、PMEА では、減少傾向（平均 0.81 倍）がみられ、PHEMA では、ほぼ変化なかつ

た。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 薮島の項を参照) 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, 藪島由二, 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, 藪島由二, 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)