

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 (CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理) により hMSC の骨分化へ影響を与え、Ca(OH)₂ 処理は骨分化を誘導するが、CaCl₂ 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)₂ 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 / -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 CaCl₂ 処理よりも Ca(OH)₂ 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、CaCl₂処理、Ca(OH)₂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 X ATCC)は Vascular Cell Basal Medium に Microvascular Endothelial Cell Growth Kit-VEGF、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin(Life Technologies)及び 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 (菅原工芸) 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 で 24 時間静置した。

2) CaCl_2 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 で 24 時間静置した。

3) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 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 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 μL 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、一晚乾燥した。

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 μL 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。

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 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 μ M CellTracker (Lonza) を添加した培地 (血清無添加の McCoy's medium) で 37、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、ブロッキング溶液 [10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 0.1% Triton X-100, 0.01% NaN₃ 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 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、 1×10^4 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 μ 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、CaCl₂ 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)₂ 処理では CaCl₂ 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 CaCl₂ 処理の方が多く、さらに CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 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 CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理では丸くなっていた。培養 4 日後には、NaOH 処理及び CaCl₂ 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)₂ 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)₂ 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 > CaCl₂ 処理 > Ca(OH)₂ 処理の順で多く、CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 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、CaCl₂ 処理で NaOH 処理と比較して有意に高かった。Ca(OH)₂ 処理では NaOH 処理及び CaCl₂ 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)₂ 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)₂ 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。CaCl₂ 処理または Ca(OH)₂ 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)₂ 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、CaCl₂処理とCa(OH)₂処理におけるhMSCの遺伝子発現について比較した。Ca(OH)₂処理した純Ti上で培養したhMSCにおいて、CaCl₂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 × 10⁻⁴)に重複していた。その遺伝子は、SPP1(OPN)、PTH1H、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/β-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-κB 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CaCl₂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CaCl₂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 3の発現も誘導された。純Ti表面のCa(OH)₂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)₂処理によって誘導された。また、BMP、IGF-1、integrin 3に加えて、破骨細胞分化因子であるRANKLがCa(OH)₂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)₂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 β 、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 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。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 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 PMEA/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 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、 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 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 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

mRNA 発現はカルシウム導入処理 (CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理) によって有意に増加し、Ca(OH)₂ 処理は CaCl₂ 処理と比較して有意に高かった。OCN のタンパク質発現については、Ca(OH)₂ 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ものの CaCl₂ 処理では影響は見られなかった。以上の結果から、Ti 表面へのカルシウム導入により hMSC の骨分化へ影響を与える事がわかった。また、Ca(OH)₂ 処理は骨分化を誘導するが、CaCl₂ 処理は限られた効果しか示さない事が判明した。

次に、Ti 表面へのカルシウムイオン導入による hMSC の骨分化誘導作用のメカニズムについて探るために DNA マイクロアレイ解析及びパスウェイ解析を行った。骨分化や骨代謝に関わるいくつかの遺伝子が、Ti の化学処理によって発現が有意に上昇した。IL6R や ITGB1 は NaOH 処理によって有意に上昇した (。SPP1 (OPN)、MMP13、ENPP1 は CaCl₂ 処理または Ca(OH)₂ 処理により有意に上昇した。そして Ca(OH)₂ 処理によって、ITGA2、BMP2、PTH1LH が有意に上昇した。さらに 2 種類のカルシウム導入法について比較するために、CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理とを比較したところ、CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 処理によって hMSC の BMP2、PTGS2 (Cox2)、PTH1LH、SPP1 (OPN) の発現が有意に高かった。これまでに、ラットにおいて Cox2 の機能が骨形成に必須であり、間葉系前駆細胞において Cox2 の誘導を通して骨分化が刺激される事が報告されている。また、骨芽細胞及び間葉系細胞において BMP2 は Cox2 を誘導する。さらに細胞外のカルシウム量の増加が BMP2 の発現を上昇さ

せるという報告もある。その上、カルシウムに関わるシグナル伝達系において Cox2 による PTH の誘導が重要な役割を果たすこともわかっている。以上のことから、Ca(OH)₂ 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。一方、Smad シグナル伝達系は Ti 表面の化学処理により抑制された。これまでに、noncanonical BMP シグナル伝達系が Cox2 の転写を制御するという報告もあるため、Smad シグナル伝達系とは独立した noncanonical BMP シグナル伝達系により Ca(OH)₂ 処理された Ti 表面上で培養した hMSC の骨分化を調整しているのかもしれない。

IPA によるパスウェイ解析を行ったところ、NaOH 処理によって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/β-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 の mRNA 発現が誘導された。また、RANKL decoy receptor である OPG の遺伝子発現が NaOH 処理により 2 倍以上上昇した。CaCl₂ 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 の発現が有意に上昇し、さらにそれに伴い integrin 3 の発現も誘導された。Ca(OH)₂ 処理によって Wnt 及び受容体 Frizzled に加えて Frizzled の共役受容体である LRP5/6 の遺伝子発現が誘導された。また、BMP、IGF-1、integrin 3 に加えて、破骨細胞分化因子である RANKL が Ca(OH)₂ 処理によって誘導された。さらに、OPN 及び OCN の遺伝子

発現が上昇した。

間葉系前駆細胞において Wnt / β -カテニンシグナル伝達経路は、骨分化を制御している。Ti の表面特性がカルシウム依存性の Wntシグナル伝達経路を介して骨分化を誘導し、Wnt5a が integrin との正のフィードバックを通して骨分化を増強するとの報告もある。これまでに、integrin ファミリーが様々な処理を施された Ti 表面上で骨分化における重要な役割を果たしている事が報告されている。本研究において、カルシウムイオン導入処理により、OPN 発現上昇に伴い integrin $\alpha 3$ の発現誘導が観察された。hMSC における Wnt / β -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促進され、その効果は CaCl_2 処理よりも Ca(OH)_2 処理の方が高かった。

本研究において、hMSC の骨分化誘導作用は Ca(OH)_2 処理の方が CaCl_2 処理よりも効果的であったが、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ものかもしれない。Ti 表面への Ca(OH)_2 処理により、1) CaCl_2 処理に比べて BMP2、Cox2、PTH1H の発現が上昇し、2) Wnt / β -カテニンシグナル伝達経路が活性化されることによって hMSC の骨分化が誘導されることが示唆された。

カルシウムイオン導入した純 Ti は hMSC の骨分化を誘導することを見出し、2 種類の導入処理法を比較する事によりそのメカニズムの一端を明らかに出来たと考える。

2. 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

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するために、

組成比の異なる PMEА / PHEMA コポリマーのコーティング処理した表面上で hMSC 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。

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。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。EMT は、TGF β , Notch, Wnt, Receptor tyrosine kinases によって誘導されるため、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。一方、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。

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。

3. 生体親和性高分子材料による THP-1 の機能への影響について

組成比の異なる PMEAL/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。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、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 PMEAL >

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。

4. 高分子材料の内皮化評価について 高分子材料による血管内皮細胞（HUVEC 及び TIME-GFP）の機能への影響について

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。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。

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。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%の間の細胞増殖率に有意な差がみられた。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。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、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、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。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。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。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

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

純 Ti の表面を化学処理 (NaOH 処理、CaCl₂ 処理、Ca(OH)₂ 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。カルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量は CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 処理の方が有意に高かった。hMSC における OPN 及び OCN の発

現の検討から、Ti 表面へのカルシウム導入により hMSC の骨分化へ影響を与える事がわかった。また、Ca(OH)₂ 処理は骨分化を誘導するが、CaCl₂ 処理は限られた効果しか示さない事が判明した。Ca(OH)₂ 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。さらに 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 / -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 CaCl₂ 処理よりも Ca(OH)₂ 処理の方が高かった。

2. 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

hMSC への生体親和性高分子材料 (PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理) 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。

3. 生体親和性高分子材料による THP-1 の機能への影響について

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。

4. 高分子材料の内皮化評価について 高分子材料による血管内皮細胞 (HUVEC) 及び TIME-GFP) の機能への影響について

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。

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。

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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) Sato Y., Tsutsumi H., Sawada R., Suzuki T., Yasuda S. : Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-proceed products. *Bull. Natl. Inst. Health. Sci.*, 131, 16-19, (2013).
- 10) 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の実際」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み、シーエムシー出版、東京 (2012) pp. 28-37
- 11) 松岡厚子、澤田留美、加藤玲子「次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療分野」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み、シーエムシー出版、東京 (2012) pp. 38-46
2. 学会発表
- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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の探索」第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)

9) 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)

10) 齋島由二, 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)

11) 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)

12) 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)

13) 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)

14) 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)

15) 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)

16) 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)

17) 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)

18) 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)

19) 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)

- 20) 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)
- 21) 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)
- 22) 澤田留美、齋島由二、福井千恵、河野 健、松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について 遺伝子発現の網羅的解析による検討 」第 12 回日本再生医療学会総会(2013.3)
- 23) 齋島由二、澤田留美、福井千恵、松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について 蛋白質発現の網羅的解析による検討 」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 24) 河野 健、澤田留美、松岡厚子「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 25) 草川森士、町田一彦、安田智、黒田拓也、澤田留美、伊藤守、堤秀樹、川真田伸、佐藤陽治「細胞・組織加工製品の製造工程管理法としての NOG マウス造腫瘍性試験系のバリデーション」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 26) 澤田留美、河野 健、松岡厚子「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価 がん化の指標探索のための遺伝子発現解析 」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
- 27) 河野 健、澤田留美、伊佐間和郎、齋島由二、松岡厚子「チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
- 28) Sasaki, H., Matsuoka, F., Takahashi, A., Takeuchi, I., Sawada, R., Kiyota, Y., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based prediction of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 3rd TERMIS World Congress2012 (2012.9)
- 29) 澤田留美、齋島由二、福井千恵、河野 健、松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について (2) —遺伝子発現の網羅的解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 30) 齋島由二、福井千恵、澤田留美、松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(1) —蛋白質の網羅的発現解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会 (2012.6)
- 31) 佐々木寛人、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司「骨髄由来間葉系幹細胞の画像情報解析による劣化度評価」第 11 回日本再生医療学会総会(2012.6)
- 32) 佐々木寛人、高橋厚妃、坪井泰樹、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司「間葉系幹細胞画像の情報解析による細胞状態分類法の有効性」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 33) Sasaki, H., Matsuoka, F., Takeuchi, I., Sawada, R., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based cell quality assessment of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012.6)