

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。

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

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

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、

- 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)