

平成 26 年度 修士論文

間葉系幹細胞の上皮分化メカニズムの解明

三重大学大学院工学研究科  
博士前期課程分子素材工学専攻  
水田 裕磨

# 目次

<b>1. 緒言</b> .....	<b>1</b>
1-1. 再生医療	
1-2. 間葉系幹細胞	
1-3. 間葉系幹細胞の分化制御	
1-3-1. 足場の物性による分化制御	
1-3-2. 間葉系幹細胞の上皮分化と Cytokeratin18 (CK18)	
1-4. 細胞骨格と integrin	
1-4-1. actin の重合・脱重合	
1-4-2. integrin	
1-4-3. FAK (focal adhesion kinase)・ILK (integrin linked kinase)	
<b>2. 目的</b> .....	<b>14</b>
<b>3. 方法</b> .....	<b>15</b>
3-1. 間葉系幹細胞の培養	
3-2. collagen gel 上培養	
3-2-1. collagen gel の作製	
3-2-2. 細胞培養	
3-2-3. F-actin, FAK, ILK, GSK3 $\beta$ , integrin の阻害	
3-3. 免疫蛍光染色	
3-4. real-time PCR	
3-5. 二次元電気泳動・TOF-MS	
3-5-1. タンパク抽出	
3-5-2. 二次元電気泳動	
3-5-3. TOF-MS	
3-6. 統計処理法	
<b>4. 結果</b> .....	<b>21</b>
4-1. collagen gel 上における CK18 の発現メカニズム	
4-1-1. CK18 と F-actin の発現の経時的変化	
4-1-2. F-actin が CK18 の発現に及ぼす影響	
4-1-3. integrin mRNA の発現	

4-1-4. integrin が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響	
4-1-5. FAK・ILK が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響	
4-1-6. GSK3 $\beta$ が CK18 の発現に及ぼす影響	
4-2.collagen gel 上培養 MSC のタンパク質発現	
4-2-1. 二次元電気泳動によるタンパク質発現の解析	
4-2-2. タンパク質の同定	
<b>5. 考察</b>	<b>34</b>
5-1. CK-18 の発現メカニズム	
5-1-1. CK18 発現と actin 脱重合	
5-1-2. integrin による影響	
5-1-3. FAK・ILK による影響	
5-1-4. GSK3 $\beta$ による影響	
5-1-5. collagen gel 上培養 MSC のタンパク質発現	
5-1-6. CK18 の発現メカニズム(まとめ)	
5-2. ゲル上培養における間葉系幹細胞の応用	
<b>6. 結論</b>	<b>50</b>
<b>7. 参考文献</b>	<b>51</b>
<b>8. 謝辞</b>	<b>58</b>

# 1. 諸言

## 1-1. 再生医療

外傷・疾患の合併症・薬剤・先天性の要因などによって重度のダメージを受けた臓器は自己回復が望めない。現在、これらの治療法としては臓器移植や人工臓器治療が行われているが、ドナー不足や生体機能の再現の限界などの問題がある。さらに現状の医療では根治しきれない場合もある<sup>[1]</sup>。そこで、我々の体を構成する細胞や組織がもつ潜在能力を利用する新たな医療として再生医療が期待されている<sup>[2]</sup>。再生医療の1つのモデルでは患者自身の体から幹細胞を単離、体外で増殖、必要な組織細胞へ分化させ再び患者へ移植するという方法が考えられている。実現すればドナー不足の解消、生体機能の再現性の向上に繋がるが、再生医療においては単離・増殖技術の開発、分化制御方法の開発、移植方法の確立などの課題がある。

## 1-2. 間葉系幹細胞

再生医療の主役となるのが、自己増殖する能力と様々な機能細胞に分化する能力を有する幹細胞とよばれる細胞である<sup>[2]</sup>。血液、皮膚、腸管上皮、生殖器などの細胞はいったん分化し成熟すると、それぞれ定まった寿命をもって死滅する。それを補給するために、幹細胞は新たに増殖、分化し、成熟して定常状態を保っている。このように我々の体に存在している幹細胞は特に体性幹細胞とよばれる。一方、胚性幹細胞(Embryonic Stem cell : ES 細胞)は、個体を構成するすべての種類の細胞に分化できる細胞で、生体外で安定に増殖可能であるため再生医療のソースとしての適用が期待される。しかし、未受精卵を用いたクローン技術が必要であり、ヒト胚を破壊する操作が必要であることから、倫理的問題は避けられない<sup>[1]</sup>。ES 細胞同様の分化万能性をもつ人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS 細胞)はマウス線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc という四つの遺伝子を導入することによって誕生した。また、マウス iPS 細胞樹立の翌年にはヒト iPS 細胞の樹立が報告された。患者自身の細胞から iPS 細胞を作製すれば倫理的問題や免疫拒絶の問題は無いため再生医療への応用の期待も高い。しかし、腫瘍化やヒト iPS 細胞作製の際のマウス由来支持細胞との共培養の必要性といった問題がある。

造血幹細胞・神経幹細胞・皮膚幹細胞・間葉系幹細胞などの体性幹細胞は、体の恒常性を維持する役割を担う。中でも間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)は主に骨髓から単離され、ヒト新生児では骨髓細胞中に 1/10000 の割合、高

齢者では新生児の 1/200 の割合で含まれる<sup>[2]</sup>。加齢に伴い MSC の数が劇的に減少することから、高齢者の組織変性の治療に MSC の移植が有効であると考えられている<sup>[3]</sup>。また、骨髄以外にも脂肪や臍帯血などに存在することが報告されている<sup>[4]</sup> (Fig.1-1)。MSC は国際細胞療法学会(ISCT)により次のように定義されている<sup>[1]</sup>。①プラスチックに接着性を持つ。②表面マーカーは CD14<sup>-</sup>または CD11b<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>または CD79α<sup>-</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、HLA-DR<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>。③軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞へ分化できる。1990 年代の研究では骨、軟骨、脂肪などの中胚葉系の細胞に分化することから”間葉系幹細胞”という言葉が用いられたが、③の定義にもかかわらず、最近の研究では神経細胞などの外胚葉系の細胞や骨格筋細胞、心筋細胞にも分化することが報告されている<sup>[4]</sup> (Fig.1-1)。

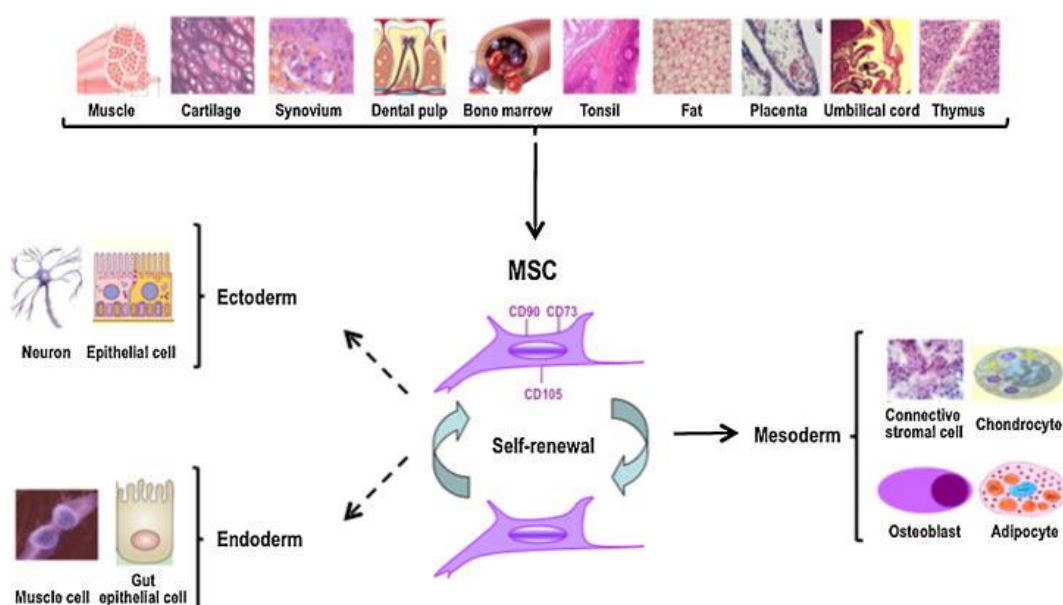


Fig 1-1. MSC の単離と分化<sup>[4]</sup>

図は Kuhn N Z: J Cell Physiol, 2010 より転載

ここからは、MSC の臨床応用の現状について記す<sup>[5]</sup>。初めて MSC が臨床試験に用いられたのは 1995 年である。そこから、2011 年 12 月 12 日までに 206 例もの臨床試験に MSC が用いられた。Fig 1-2 は 206 例の対象となった病気の内訳である。骨や軟骨の病気に対して利用された例が多く、次に心臓病、肝臓病、GVHD (graft versus host disease: 移植片対宿主病)となり、多くの治療は MSC の注入投与で行われる。

日本での MSC の臨床応用については、GVHD に対する治療として製造販売承認申請中(2015 年1月現在)のものがあるが、他については臨床研究段階である。また、MSC は特徴的な分化能を持つにもかかわらず、*in vitro* で分化誘導させた細胞を移植するという治療は未だ行われていないというのが現状である。

**Clinical trials of MSCs are classified by disease types  
(by 2011/12/13 n=206)**

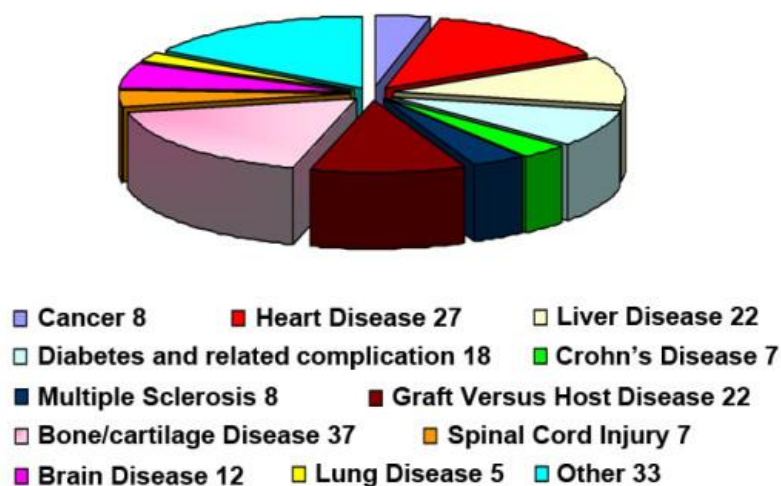


Fig 1-2. MSC を用いた臨床試験<sup>[5]</sup>

図は Shihua Wang: J Hematol Oncol, 2012 より転載

### 1-3. 間葉系幹細胞の分化制御

MSC を用いた再生医療の実現において、分化制御技術の開発は極めて重要である。MSC は多分化能を有する事から、再生医療で用いる場合には目的の細胞に分化させる必要がある。分化制御する際には大きく分けて次の 3 つが用いられる。①化学的因子、②生物学的因子、③物理学的因子である。

#### ①化学的因子

化学的因子とは低分子化合物やタンパク質を指す。これらを MSC に添加する事で分化を制御する。例えば、dexamethasone,  $\beta$ -glycerol phosphate, ascorbic acid を添加する事で骨分化への誘導が可能である。他にも 3-isobutyl-1-methylxanthine, hydrocortisone, indomethacin を添加する事で脂肪分化、TGF- $\beta$ 3 を添加する事で軟骨分化を誘導する事が可能である事が知られている<sup>[6]</sup>。

#### ②生物学的因子

生物学的因子とは細胞外マトリックス(ECM: Extracellular Matrix)の事を指す。MSC は接着する ECM によって分化が異なる事が知られている<sup>[7][8]</sup>。適切な ECM を利用する事によっても分化の制御が可能である。

#### ③物理学的因子

物理学的因子とは物理的な力の事を指す。例えば、重力やせん断応力を利用する事によって MSC の分化が制御されるという報告もある<sup>[9][10]</sup>。さらに、細胞足場の弾性(硬さ)によっても MSC の分化を制御出来る事が明らかとなっている。これについては、1-3-1 で詳しく述べる。これらの物理的な力は生体内に良く似た環境を作り出す事で分化誘導するという意味でも、生体内環境の理解にも役立ち、重要な因子として注目されている。

これらによって、あるいはこれらの適切な組み合わせによって、安全に効率よく分化誘導させる必要がある。他にも MSC をペレット培養する事によって軟骨分化が誘導出来るといった報告や、細胞密度によっても分化が制御されるという報告もある(これらは物理学的因子に近いように思われる)<sup>[11][12][13]</sup>。

### 1-3-1. 足場の物性による分化制御

足場の弾性は MSC の分化を制御する重要な因子である。2006 年に Engler らは、MSC を 1、10、100kPa の弾性の足場で培養すると、それぞれ神経細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞に分化すると報告した(Fig 1-3) <sup>[14][15]</sup>。その後も、足場の弾性が MSC の分化に影響するという多くの報告がされている<sup>[10][16][17]</sup>。

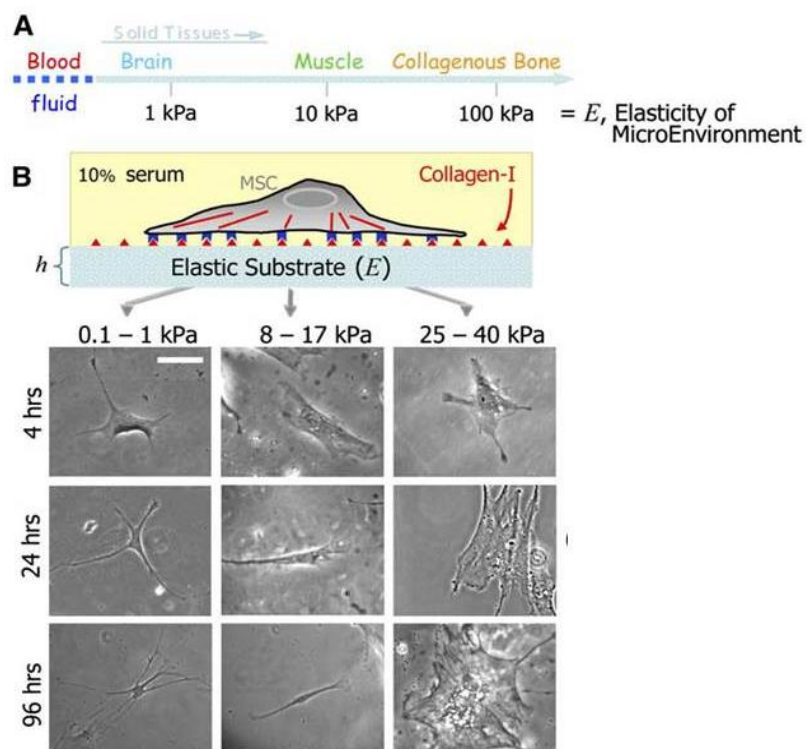


Fig.1-3 足場の弾性による MSC の分化制御<sup>[15]</sup>

図は Engler AJ: J Musculoskelet Neuronal Interact, 2007 より転載



### 1-3-2. 間葉系幹細胞の上皮分化と Cytokeratin18 (CK18)

上皮は体表面や臓器を覆う膜を構成する。つまり、体の中で何かの空間に面する表面のほとんどは上皮であり、これを構成する細胞が上皮細胞である。上皮細胞の大きな特徴は次の3つの面を持つ事である。①外気や液体にさらされる面。②結合組織に接着する基底面。③隣り合う細胞と接する面。これらの特徴により、シート状の構造を造り、分泌や吸収などの機能を果たす。さらに、隣り合う細胞とは細胞間結合により接着し、細胞同士が情報伝達を事で様々な細胞機能が発現する。

また、上皮細胞は中間径フィラメント(1-4 参照)であるサイトケラチンを構成タンパク質として有し、これにより細胞の形態を維持している。CK1~CK20 の 20 種類の単量体サイトケラチンが存在し、酸性の Type I ケラチンと塩基性・中性の Type II ケラチンに別けられる。この単量体のサイトケラチンは長い繊維状分子であり、中央の棒状ドメインは、7 残基反復とよばれる独特なアミノ酸配列が何度も繰り返されている長い  $\alpha$  ヘリックス構造をとっている。Type I ケラチンと Type II ケラチンが 2 本で対を作り二量体となり、二量体同士が会合し四量体になる。さらにこの四量体同士が結合し、最終的に太さ 10nm のロープ状の中間系フィラメントを形成している(Fig 1-4)<sup>[18]</sup>。また、単量体サイトケラチンの種類によって、対となる単量体サイトケラチンと発現する上皮細胞が異なるが、Cytokeratin18(CK18)は CK8 と二量体を形成し、ほとんどの腺上皮細胞と皮膚以外の重層扁平上皮の基底細胞で発現する。

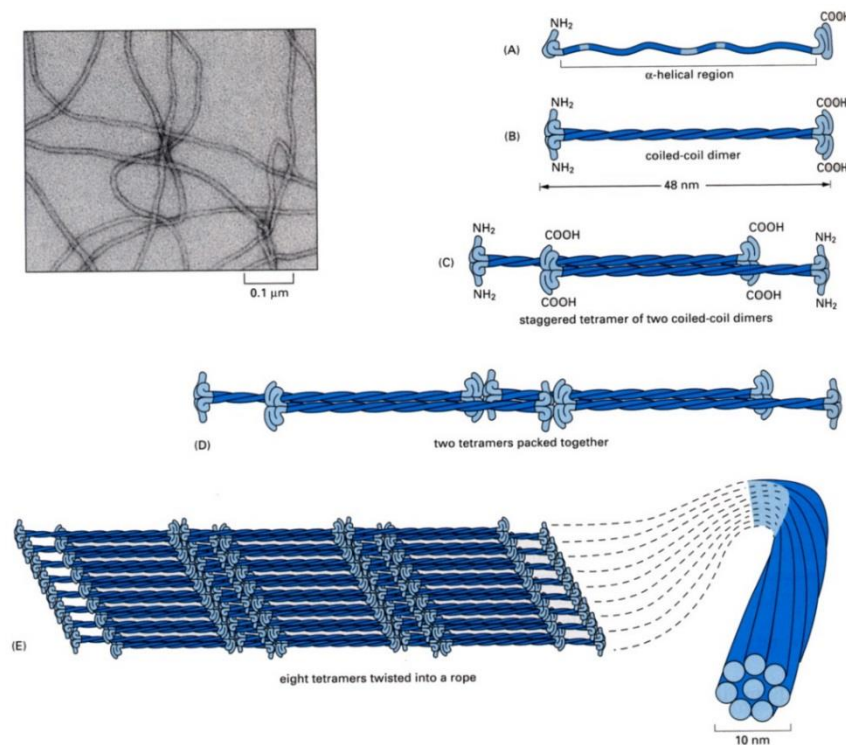


Fig 1-4. 中間径フィラメントの形成<sup>[18]</sup>

図は Bruce Alberts: Newton Press, 1995 より転載

1-2 でも述べたように、MSC は中胚葉由来以外の細胞への分化も確認されている。上皮細胞はそのうちの 1 つであり、内胚葉由来の細胞であるが MSC からの分化が確認されている。*In vitro* においては気管上皮細胞との共培養、あるいはレチノイン酸(retinoic acid)の添加により MSC が上皮細胞に誘導される事が報告されている。Table 1-1 は MSC の上皮分化に関する報告と、そこで用いられた上皮マーカーである [19]。

Table 1-1. MSC の上皮分化に関する報告とマーカー

	上皮細胞の種類	マーカー*1	Reference
<i>In vivo</i>	網膜色素上皮	ZO-1 PEDF	[20][21]
	皮膚上皮	CK	[22]
	脂腺上皮	CK	[23]
	尿細管上皮	CK	[24][25]
<i>In vitro</i>	気管上皮	CK17, CK18	[26]
		CK19, CC26	
		E-cad, B-cat	
	気管上皮	CK18, occludin CFTR	[27]
	上皮*2	CK18, vimentin <sup>-</sup>	[28]
	上皮*2	CK18, vimentin <sup>-</sup> occluding, SMA <sup>-</sup>	[29]

\*1 ZO-1: zonula occludens-1, PEDF: pigment epithelial-derived factor, CK: cytokeratin, CC: clara cell protein 26kDa, E-cad: E-cadherin, B-cat:  $\beta$ -catenin, CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, SMA: smooth muscle actin

\*2 上皮の詳しい種類については言及されていない

## 1-4. 細胞骨格と integrin

細胞骨格は細胞内の線維状構造であり、細胞を内側から支えて細胞の形態を決定する。また、物理的な力を発生させたり、細胞小器官の移動を行う事で様々な細胞機能に影響を及ぼす。細胞骨格は主に、中間径フィラメント・微小管・actin に別けられる。中間径フィラメントは 1-3-2 でも記した様に、ロープ状の構造を形成する。細胞の種類により発現する中間径フィラメントが異なり、上皮細胞ではサイトケラチン、神経細胞ではニューロフィラメント、繊維芽細胞ではビメンチン、グリア細胞ではグリアフィラメントが発現する。これらは主に、細胞の強度やテンションを保つ役割を持つ。微小管は球状タンパク質の  $\alpha$ -チューブリンと  $\beta$ -チューブリンが交互に会合した中空の線維である。中心体から細胞周囲に線維が伸びており、細胞小器官の移動や細胞分裂の際に重要な役割を果たす。actin については 1-4-1 で詳しく記す。

### 1-4-1. actin の重合・脱重合

actin は細胞の構造を形作り、さらに細胞内において物理的な力を発生させる事で細胞運動において重要な役割を果たす。42kDa の G (globular)-actin が連なって出来た F (filamentous)-actin が 2 本、撚り合わさった構造をとる(Fig 1-5)。この線維の一端では G-actin の会合が起こりプラス端と呼ばれる。反対側では G-actin の解離が起こりマイナス端と呼ばれる。F-actin の端では常に G-actin の会合と解離が起こっており、会合と解離の速度のバランスにより F-actin の長さが決定される。また、会合する際は G-actin は ATP と結合し、解離する際には ADP と結合する。

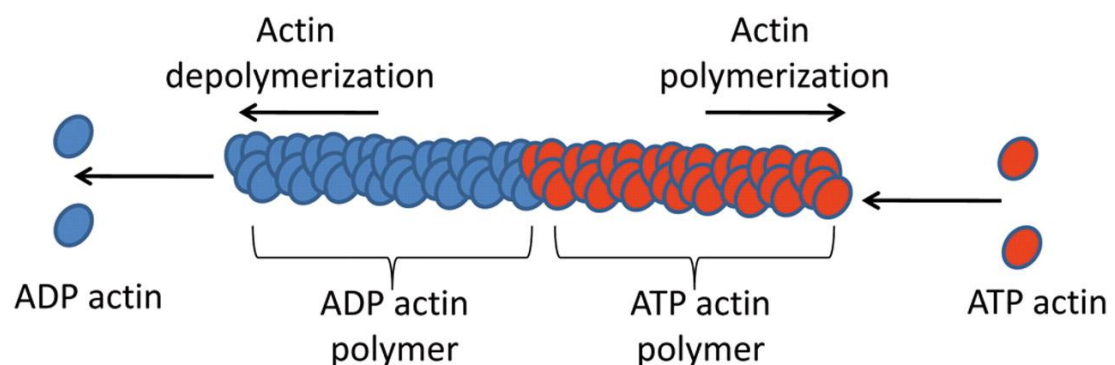


Fig 1-5. actin の形成<sup>[30]</sup>, (赤丸、青丸は G-actin)

図は Street CA: Anticancer Res, 2011 より転載

本研究では細胞の観察において、F-actin が細胞内である程度長く線維状に観える状態を重合状態、F-actin が線維状に観えない状態を脱重合状態と呼ぶ。細胞内での actin の重合・脱重合は細胞形態の変化、遊走、分裂、分化等の細胞機能において重要である。この actin の重合・脱重合の制御は actin 単体で行われる事は無く、他のタンパク質によって制御される。これは、細胞内の actin 濃度は非常に高く、actin 単体でも自然発生的な重合が起こる(actin 単体では actin の長さは調節できない)為である。Table 1-2 は actin の重合・脱重合を制御する代表的なタンパク質である。

Table 1-2. actin の重合・脱重合を制御するタンパク質

タンパク質	機能	Reference
Arp2/3	自身を起点として actin 重合を開始させるタンパク質。WASP/WAVE によって活性化される。	[31]
profilin, thymosin	G-actin 結合タンパク質。結合する事で F-actin の形成を阻害し、G-actin を細胞内にプールする。	[32]
cofilin	活性化(脱リン酸化)状態では F-actin の脱重合を誘導する。LIMK(LIM kinase)によって不活性化(リン酸化)する。	[32]
gelsolin	F-actin を切断し、更なる重合が起きない様にキャッピングする。	[33]

ここで、Gelsolin についてさらに詳しく記す。Gelsolin は 82-84kDa のタンパク質であり 6 つの G domain からなる(Fig 1-6)<sup>[34]</sup>。Ca<sup>2+</sup>で活性化し、F-actin を切断する。さらに、切断した F-actin のプラス端に結合し、再び actin が重合するのを防ぐ(Fig 1-7)<sup>[35]</sup>。また、PIP2 (phosphatidylinositol 3, 4 or 4, 5 -bisphosphate)によって actin の切断が阻害される<sup>[36]</sup>。

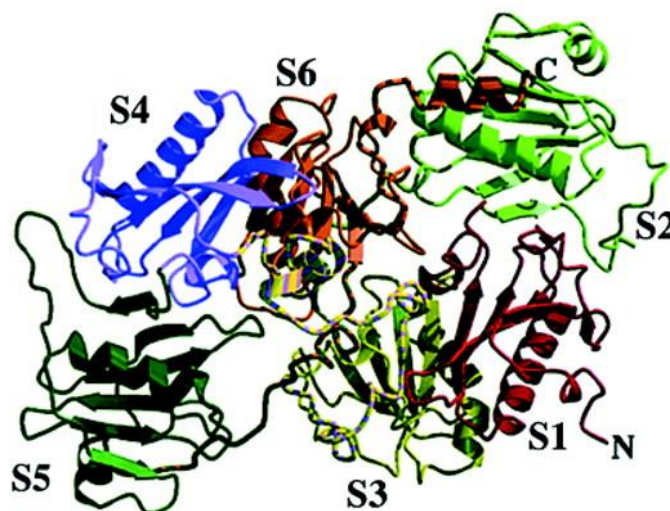


Fig 1-6. gelsolin の構造<sup>[34]</sup>, {S(segment)1つが G domain}

図は Sun HQ: J Biol Chem, 1999 より転載

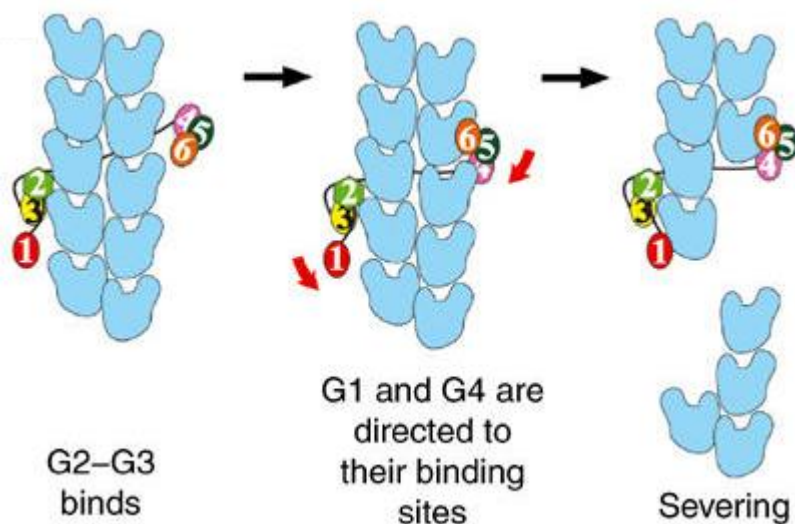


Fig 1-7. gelsolin による F-actin の切断<sup>[35]</sup>, (水色は actin, 1-6 は gelsolin)

図は Burtneck LD: EMBO J, 2004 より転載



### 1-4-2. integrin

integrin は ECM との接着を担う膜タンパク質である。α integrin と β integrin でヘテロ二量体を形成する。脊椎動物では、18 種類の α integrin (120~180kDa) と 8 種類の β integrin (90~110kDa) が存在し、その中で 24 種類の α integrin と β integrin のペアを形成する。また、α integrin と β integrin のペアにより接着する ECM が決定する(Fig 1-8)<sup>[37]</sup>。type I collagen に対しては α1β1 integrin, α2β1 integrin, α11β1 integrin が接着を担う<sup>[38]</sup>。

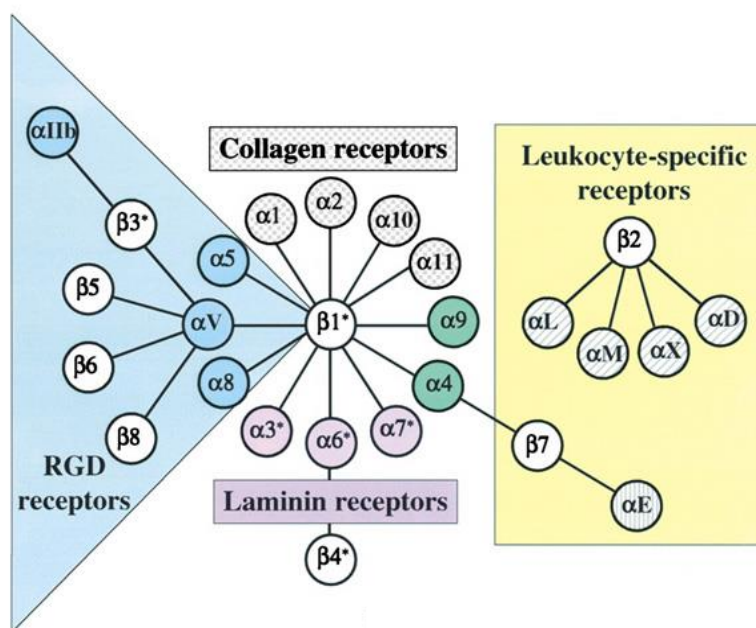
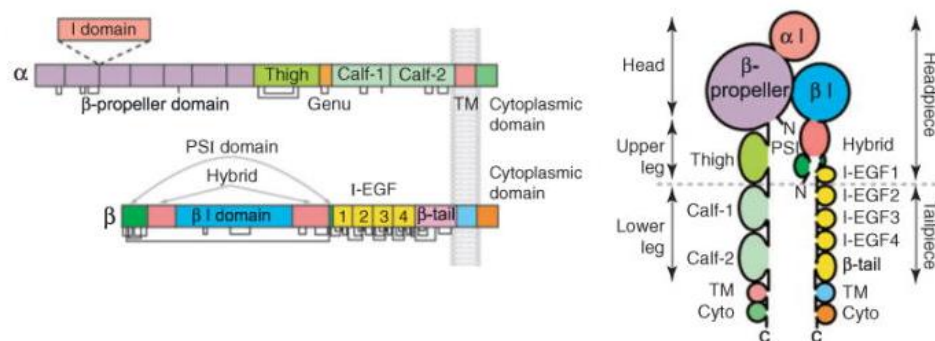


Fig 1-8. α integrin と β integrin の組み合わせ<sup>[37]</sup>

図は Hynes RO: Cell, 2002 より転載

integrin は Fig 1-9(左上)に示されたドメインから成り、Fig 1-9(右上)の構造を持つ。また、ECM に結合する、あるいは細胞内からのシグナルにより活性化された場合は、integrin が起き上がった構造をとる。一方、不活性化した場合は integrin が折れ曲がった構造をとり、この場合 ECM には結合出来ない{Fig1-9(下)}<sup>[39]</sup>。



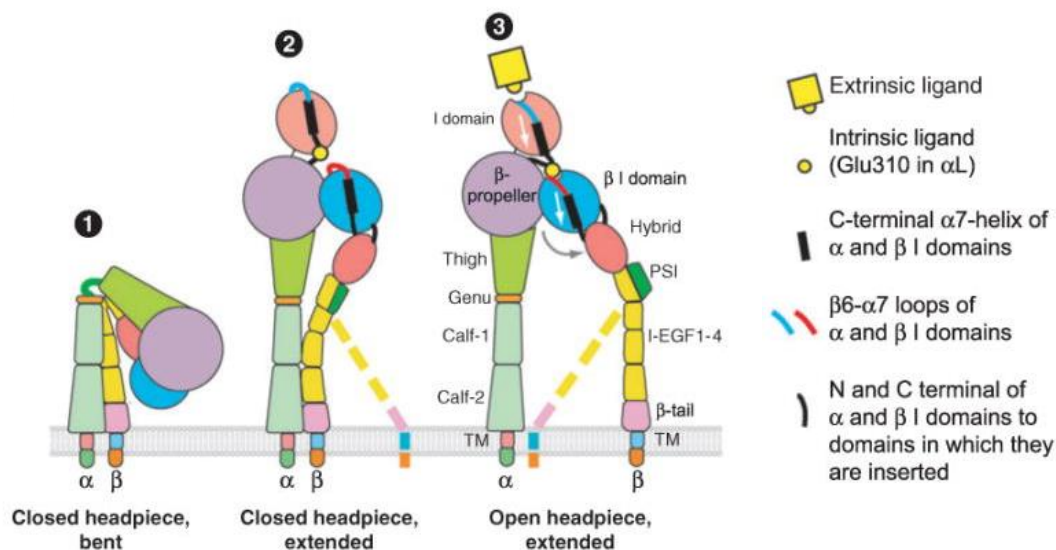


Fig 1-9. integrin の構造<sup>[39]</sup>

図は Luo BH: Annu Rev Immunol, 2007 より転載

この integrin が ECM に接着する事により、接着斑が形成される。接着斑は integrin とそれに結合し、さらに集積されるタンパク質も含めて形成される接着装置全体を指す。Fig 1-10 は接着斑の構造であり、細胞内では一般的に接着斑から接着斑に actin が橋渡しされている。接着斑を構成するタンパク質には FAK や Src などが存在し、その多くは外部から integrin を経由して入ってきたシグナル、あるいは細胞内から integrin を経由して出ていくシグナルを伝達するタンパク質である。この事からも明らかな様に、integrin は接着だけでなく細胞外部からのシグナルと細胞内部からのシグナルを伝達するという極めて重要な役割も担い、細胞の生存・遊走・分化等に関係する<sup>[40]</sup>。

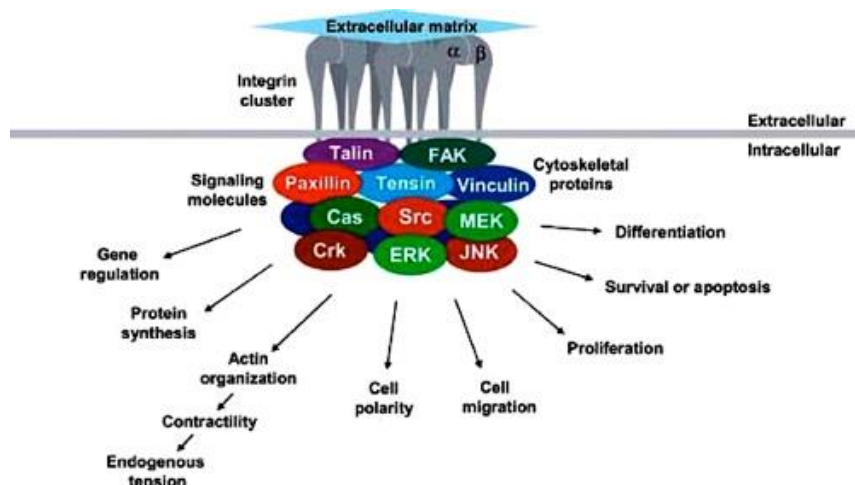


Fig 1-10. 接着斑の形成<sup>[41]</sup>

図は IISER Pune HP より転載

### 1-4-3. FAK (focal adhesion kinase)・ILK (integrin linked kinase)

FAK は接着斑を構成するタンパク質であり、integrin からのシグナルを伝達する最も重要なタンパク質の1つである(Fig 1-11)。FAK の N 末端に位置する FERM ドメインは  $\beta$  integrin と直接結合する事で FAK 自身がリン酸化する事によって活性化される<sup>[42]</sup>。リン酸化部位の1つとしては Y397 があり、リン酸化すると Src 結合、さらには Src の活性化を誘導する<sup>[43]</sup>。活性化した Src は様々な細胞機能に参与する。

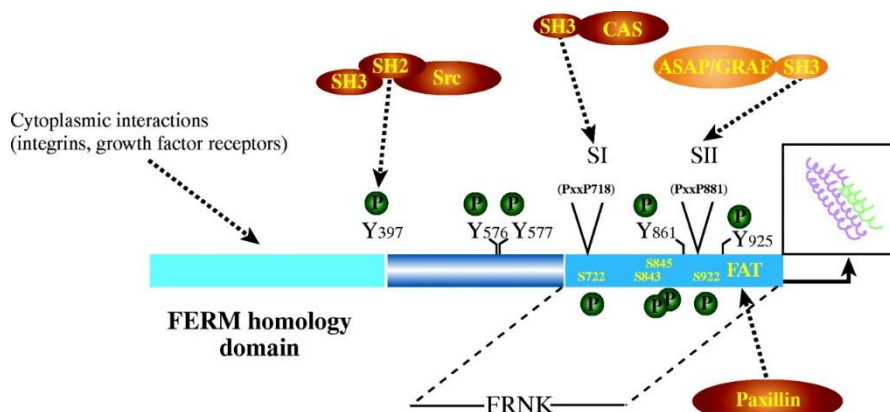


Fig 1-11. FAK の構造<sup>[42]</sup>

図は Parsons JT: J Cell Sci, 2003 より転載

ILK も FAK と同様に接着斑を構成するタンパク質である(Fig 1-12)。N 末端の Ankyrin repeat は ILK の接着斑への局在に参与する。C 末端の kinase ドメインは  $\beta 1$  または  $\beta 3$  integrin が結合する事で活性化し、下流にシグナル伝達する<sup>[43]</sup>。この事からも明らかな様に、ILK も integrin のシグナルを伝達する重要なタンパク質である。活性化した ILK は Src や AKT の活性を誘導する事が知られている<sup>[44]</sup>。

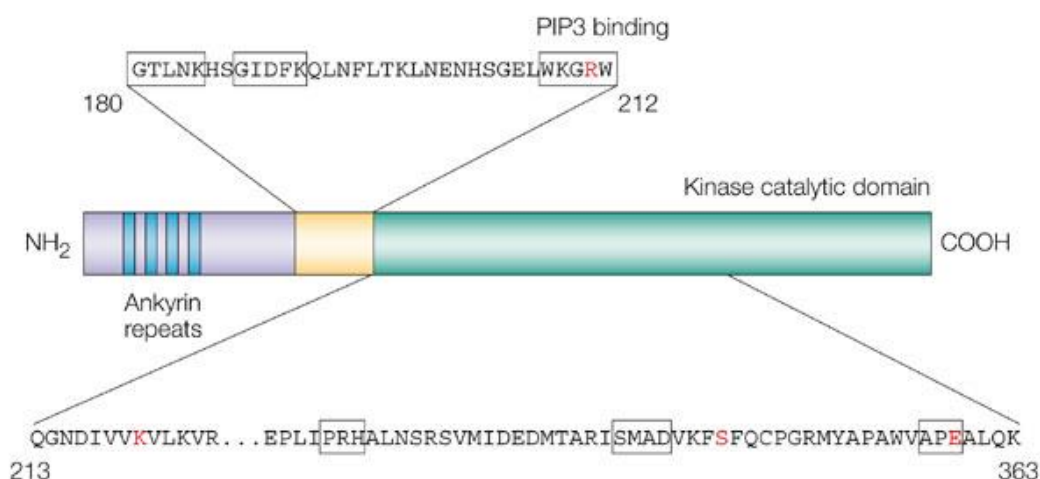


Fig 1-12. ILK の構造

図は Hannigan G: Nat Rev Cancer, 2005 より転載



## 2. 目的

幹細胞を用いた再生医療の実現には分化制御技術の確立が必要不可欠である。また、近年では細胞足場の弾性によって MSC の分化制御が可能である事が明らかとなっており、足場の物性により分化を制御する技術が注目されている<sup>[14]</sup>。

本研究室では厚さの異なる type I collagen gel 上で MSC を培養する実験を行ってきた<sup>[45][46][47][48]</sup>。その結果、ある範囲のゲルの厚みが cytokeratin18(CK18)の発現を誘導する事を明らかにした(Fig 2-1)。CK18 は MSC の上皮分化マーカーとして知られており、この系を利用する事で上皮分化制御技術の確立が期待できる。また、このメカニズムを解明する事は上皮分化制御、さらに細胞足場の物性による分化制御を可能にするだけで無く、幹細胞周囲の環境(幹細胞 niche)の解明にも繋がる。

そこで、本研究では collagen gel 上で培養した MSC の CK18 の発現メカニズムの解明を目的として実験を行った。

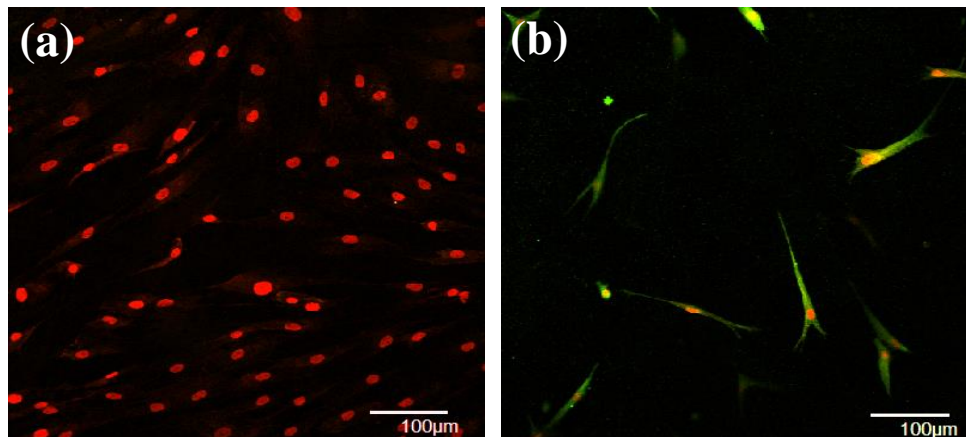


Fig 2-1. 本研究室の成果(collagen gel 上での MSC の CK18 発現) <sup>[45][46][47][48]</sup>

(a)厚さ 100 $\mu$ m の collagen gel 上で培養した MSC, (b) 厚さ 1900 $\mu$ m の collagen gel 上で培養した MSC, 【赤: 核染色, 緑: CK18 染色】, 厚さ 100 $\mu$ m の collagen gel 上で培養した MSC では CK18 が発現しないが、厚さ 1900 $\mu$ m の collagen gel 上で培養した MSC では CK18 が発現する。

### 3. 方法

#### 3-1. 間葉系幹細胞の培養

本研究に使用した細胞は理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室より購入した研究用ヒト間葉系幹細胞(39 歳/男性/passage number:2/HMS0049)を用いた。

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell:MSC)は、5000cells/cm<sup>2</sup> で播種し、DMEM + 10%FBS + 3ng/ml bFGF の培地を用いて培養し、10% Trypsin/PBS を使用して継代した。継代は sub-confluent にまで増殖した際に行い、初めに播種した代を passage 1(P=1)として定義した。P=2-5 を実験に使用した。培養条件は 37°C/5%CO<sub>2</sub> でインキュベート、3 日に 1 回培地交換を行った。MSC の同定として CD29、CD44、CD45、CD34、CD14 (BECKMAN COULTER, California, USA)の表面抗原を Flow cytometry にて解析を行った細胞を使用した<sup>[49]</sup>。

#### 3-2. collagen gel 上培養

##### 3-2-1. collagen gel の作製

type I collagen(porcine tendon, pepsin solubilized /nippi, Tokyo, Japan)を凍結乾燥し、最終濃度 3.0mg/ml になるように 1mM 希塩酸で溶解した。

本実験には厚さの異なる 2 種類のゲルを用いた。以下の方法で作製したゲルの厚さはそれぞれ約 1900μm と 100μm である。

(a)厚いゲル(厚さ:1900μm、表記:thick gel)

24 well plate に濃度 0.3w/v%(3mg/ml)に調製した type I collagen 中和溶液を 350μl 添加し、37°C インキュベータ内で 1 日間静置した。PBS 溶液により洗浄したものを以下の実験に使用した。

(b)薄いゲル(厚さ:100μm、表記:thin gel)

滅菌したプレートとゲルの鋳型、セルディスクを Fig 3-1 のように組み立てた。セルディスク上に濃度 3mg/ml に調製した type I collagen 中和溶液を約 100μl 滴下し、37°C インキュベータ内にて 1 日間静置した。その後 PBS 溶液により洗浄したものを以下の実験に使用した。

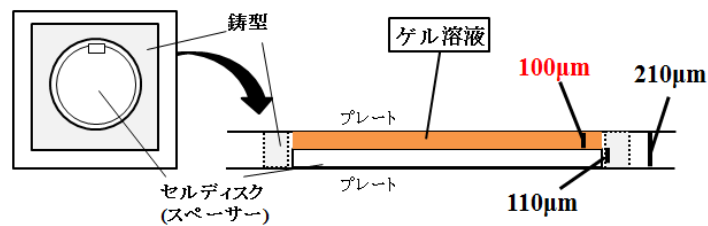


Fig 3-1. thin gel 作製の概略

### 3-2-2. 細胞培養

24well plate(底面積  $1.8 \text{ cm}^2$ )に 3-2-1 で作製した collagen gel を移し、ゲル上に MSC を播種し基本培地(DMEM+10%FBS)にて培養を行った。播種密度は RT-PCR のみ  $5,000 \text{ cells/cm}^2$  で行い、それ以外は  $1,500 \text{ cells/cm}^2$  で行った。また、播種日を 0 日目とし、二次元電気泳動では 14 日間(4-2)、CK18 と F-actin の経時的発現の変化の調査では 1, 3, 6, 12, 24 時間(4-1-1)、それ以外の実験では 24 時間、培養を行った。

### 3-2-3. F-actin, FAK, ILK, GSK3 $\beta$ , integrin の阻害

F-actin, FAK, ILK, GSK3 $\beta$  の阻害は以下の阻害剤を基本培地に添加する事でを行った。F-actin:  $0.2 \mu\text{M}$  cytochalasin D (Enzo Life Sciences, New York, USA)<sup>[50]</sup>、FAK:  $10 \mu\text{M}$  PF-573228 (sigma, Tokyo, Japan)<sup>[51]</sup>、ILK:  $5 \mu\text{M}$  Cpd22 (Millipore, MA, USA)<sup>[52][53]</sup>、GSK3 $\beta$ :  $10 \mu\text{M}$ ,  $20 \mu\text{M}$  Lithium Chloride (和光, Osaka, Japan)<sup>[54]</sup>。(濃度は最終濃度)

integrin の阻害は以下の手順で行った。細胞懸濁液を DMEM で作成し、そこに DMEM で希釈した integrin 阻害剤(integrin antibody)を加え、 $10 \mu\text{g/ml}$  の阻害剤添加細胞懸濁液を作成した。阻害剤添加細胞懸濁液を 90 分間インキュベート後、播種した。integrin 阻害には以下の阻害剤を用いた。 $\alpha 1$  integrin: Anti-Human CD49a (clone SR84/BD BioSciences, NJ, USA)<sup>[55][56]</sup>、 $\alpha 2$  integrin: Anti-Human CD49b (clone 12F1/BD BioSciences)<sup>[57]</sup>、 $\alpha 11$  integrin: ITGA11 polyclonal antibody (Abnova, Taipei, Taiwan)<sup>[58]</sup>、 $\beta 1$  integrin: Anti-Human CD29 (clone Mab13/BD BioSciences)<sup>[57]</sup>

### 3-3. 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色法により、F-actin と cytokeratin18 の観察を行った。培養後の細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.5% Triton-X で浸透処理を行った。その後、F-actin は 1:200 Rhodamin phalloidin(cytoskeleton, CO, USA)を室温にてインキュベートし、蛍光を観察した。cytokeratin18 は 1:200 rabbit anti-cytokeratin18 antibody(santa cruz, CA, USA)を 4°Cにて一晩インキュベートし、さらに 1:200 Goat anti-Rabbit IgG(H+L) FITC conjugate(Millipore)と 1:200 Propidium Iodide(sigma)を室温にてインキュベート後、蛍光を観察した。蛍光は Fluoview FV1000(Olympus, Tokyo, Japan)または LSM710 ZEN(Zeiss, Oberkochen, German)を用いて観察した。

### 3-4. real-time PCR

mRNA の抽出は以下の手順で行った。培養した細胞に対して RNA iso plus(TaKaRa, Shiga, Japan)を加えて細胞を掻き取った。chloroform-isoamylalcohol 24:1 (SIGMA)を加え室温で 15 分静置した。12000G/4°C/15 分にて遠心分離し、最上層より 350 $\mu$ L 採取、その後 isopropanol を 500 $\mu$ L 加えて 12000G/4°C/10 分で遠心分離し、上澄みを除去して 75%EtOH/DEPC 処理水を 500 $\mu$ L 加え、さらに 10000G/4°C/5 分で遠心分離した。再び上澄みを除去し、減圧乾燥後 DEPC 処理水を 20 $\mu$ L 加え、55°C/5 分加温後、4°Cに冷却した。

抽出した mRNA は Smart SpecTM3000 Spectrophotometer (BIO RAD, CA, USA)を用いて各サンプルの mRNA を定量後、Super Script (Life Technologies, MD, USA)または prime script (TaKaRa)を用いて cDNA を合成した。

合成した cDNA に目的の遺伝子に対するプライマー(Table 3-1)と SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)を加え Step One Plus (Life Technologies, MD, USA)を用いて real-time PCR を行った。また、内部標準には GAPDH を使い、 $\Delta\Delta C_t$  法により相対的な mRNA の発現量を算出した。

Table 3-1. PCR プライマー

Primer		Sequence	Size	Ref
GAPDH	sense	5'- GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT -3'	323bp	[59]
	antisense	5'- CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC -3'		
$\alpha 1$ integrin	sense	5'- ACA TCA GCC AAG TCA ATG TTT CG -3'	241bp	[40]
	antisense	5'- AGC ATT AAC AGC AAC AAT CCG G -3'		
$\alpha 2$ integrin	sense	5'- GCT GCT GTG CAT TAG ATA TTA G -3'	216bp	[40]
	antisense	5'- CTG TAA CTT CTG GTG AAA TCC T -3'		
$\alpha 11$ integrin	sense	5'- TGG GCG CAC CCA TGT ACT TC -3'	223bp	[40]
	antisense	5'- ATG GCT CCT GCG TGG TTG TC -3'		
$\beta 1$ integrin	sense	5'- GAC CTG CCT TGG TGT CTG TGC -3'	313bp	[60]
	antisense	5'- AGC AAC CAC ACC AGC TAC AAT -3'		
Gelsolin	sense	5'- GTG AGA CCC CAC TGT TCA AGC -3'	269bp	[61]
	antisense	5'- CTG TCG CCT CCA TAG AAC TGT -3'		

### 3-5. 二次元電気泳動・TOF-MS

#### 3-5-1. タンパク抽出

ゲル上で培養した MSC からタンパク抽出を行った。タンパク質を抽出するためにコラゲナーゼ処理により足場の collagen を分解し細胞のみを取り出した。コラゲナーゼ処理にはフィルター滅菌を行った 100 units/ml のコラゲナーゼ/PBS 溶液を用い、インキュベータ内で 30 分静置後、遠心(5000rpm、4℃、5min)・上澄み除去を 3 回繰り返した。取り出した細胞の湿重量に対して 4 倍量のタンパク抽出液を加えた後、氷冷下で超音波破碎し、遠心分離(15000rpm、4℃、20min)した。この上澄みを試料とした。

#### 3-5-2. 二次元電気泳動

前日にゲル膨潤液で膨潤させておいた一次元目のゲルストリップ (Immobiline DryStrio pH4-7NL, 18cm)を取り出し、一次元目ゲル電気泳動槽にセットし、Milli-Q を染み込ませた電極用ろ紙を一次元目のゲルストリップゲルの両端にセットした。試料塗布用ろ紙に抽出した試料を染み込ませ、電極用ろ紙の 1mm 離れた場所にセットした後に、白金線の付いた電極とサンプルアタッチメントを取り付けた。空気との遮断のため、シリコンオイルを約 150mL~200mL 流し込んだ後、電源装置とつなぎ、18 時間の等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動のプログラムは Table 3-2 に記した。

Table 3-2. 等電点電気泳動のプログラム

ステップ	モード	設定電圧	設定電流	時間
1	V	500V	250mA	2:00M
2	SG	3500V	2mA	6:00M
3	SV	3500V	2mA	10:00M
4	SV	3500V	2mA	∞

一次元目の泳動が終わったゲルストリップを SDS 処理液に入れ、30 分間振とうさせた後、アルキル化処理液に入れ 15 分間振とうさせた。その間に、10%アクリルアミドゲルを二次元目電気泳動槽にセットした。アルキル化が終了したゲルストリップの端を切り取り、二次元目のアクリルアミドゲルの上にゲル面が内側になるように載せ、ゲルが浮き上がらないようにゲルストリップの上にシャークコームを載せた。その後、Tris-Glycine バッファーを陽極、陰極の両方に同じ高さになるように入れ、電源装置とつなぎ、最初に 20mA、約 20 分後に 30~40mA の定電流で電気泳動を行った。

二次元電気泳動で得たゲルを固定液で浸し、30 分振とうした。Milli-Q で 3 回洗浄した後、10 倍希釈した Flamingo 染色液でゲルを浸し、1 時間振とうさせた。染色が終わり次第、Milli-Q で 1 回洗浄し、フルオロホレスター 3000(anatec, Tokyo, Japan)によりスポット検出を行った。また、2 つのゲル染色画像をマッチングさせて比較するため、Progenesis PG200/PG220(SHIMADZU, Kyoto, Japan)を使用した。画像解析後、必要なスポットをピックアップした。

### 3-5-3. TOF-MS

二次元電気泳動から得られたスポットについてタンパク同定を行った。ピッキングしたゲル片を脱色し、アセトニトリルを加え 5 分振盪を 1 回行った。Air Dry 後、トリプシン消化液を加え氷上で 30 分静置した。さらに、トリプシン消化緩衝液を加え 30 分静置後、30°C のインキュベータ内で 8~16 時間静置した。得られた消化液を回収し、DNAmmini (Thermo Scientific, MA, USA) で濃縮した。濃縮後、プレートにサンプル 0.5  $\mu$ l とマトリックス(CHCA:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)(Sigma)0.5  $\mu$ l を添加し、乾燥させた(overnight)。

サンプルは MALDI TOF-MS (4800plus, Life Technologies) にて質量分析を行った。質量分析は MS/MS を行い、測定後の MS/MS データは Protein Pilot (Life Technologies) ソフトウェアにてデータベース検索を行った。データベースは NCBI (National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を使用した。得られた検索結果をもとにタンパク質を同定した。

### 3-6. 統計処理法

統計ソフトウェアは StatView-J5.0 (SAS, Tokyo, Japan) を使用した。解析には Tukey-Kramer 法を用い、P values < 0.05 のとき有意差があると判断した。

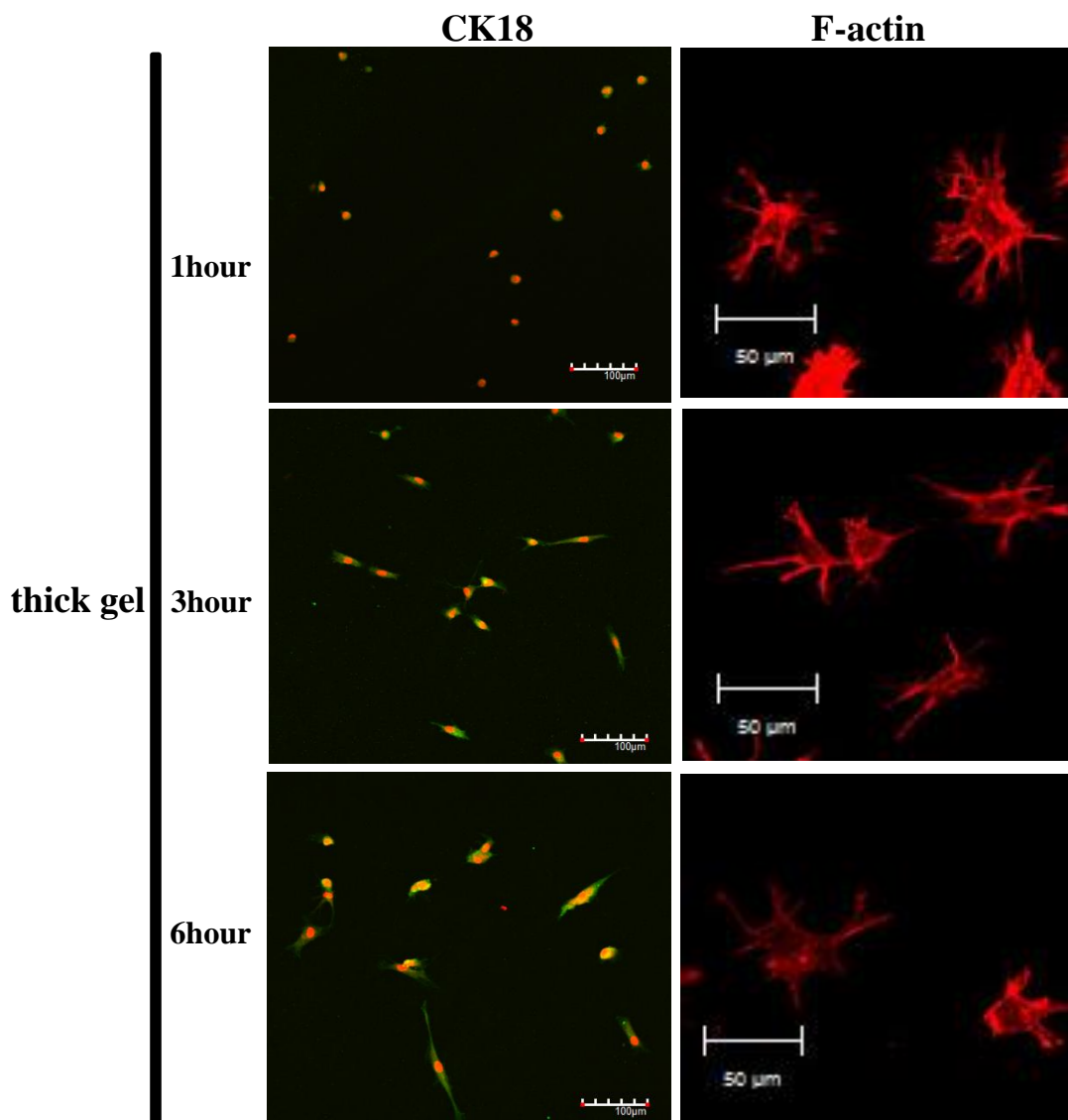


## 4. 結果

### 4-1. collagen gel 上における CK18 の発現メカニズム

#### 4-1-1. CK18 と F-actin の発現の経時的変化

0.3w/v% thick type I collagen gel(厚さ 1900 $\mu$ m)上において CK18 と F-actin の経時的な発現の変化を観察した(Fig 4-1)。1hour 培養した MSC においては CK18 の発現はほとんど確認出来なかったが、3hour 以降では CK18 の発現が確認出来た。また、その際の actin は脱重合状態である事が確認出来た。一方、0.3w/v% thin type I collagen gel(厚さ 100 $\mu$ m)上で 24hour 培養した MSC では CK18 の発現は認められず、その際の actin は重合状態である事が確認出来た。これらの事から、actin の脱重合と CK18 の発現には密接な関係がある事が示唆された。





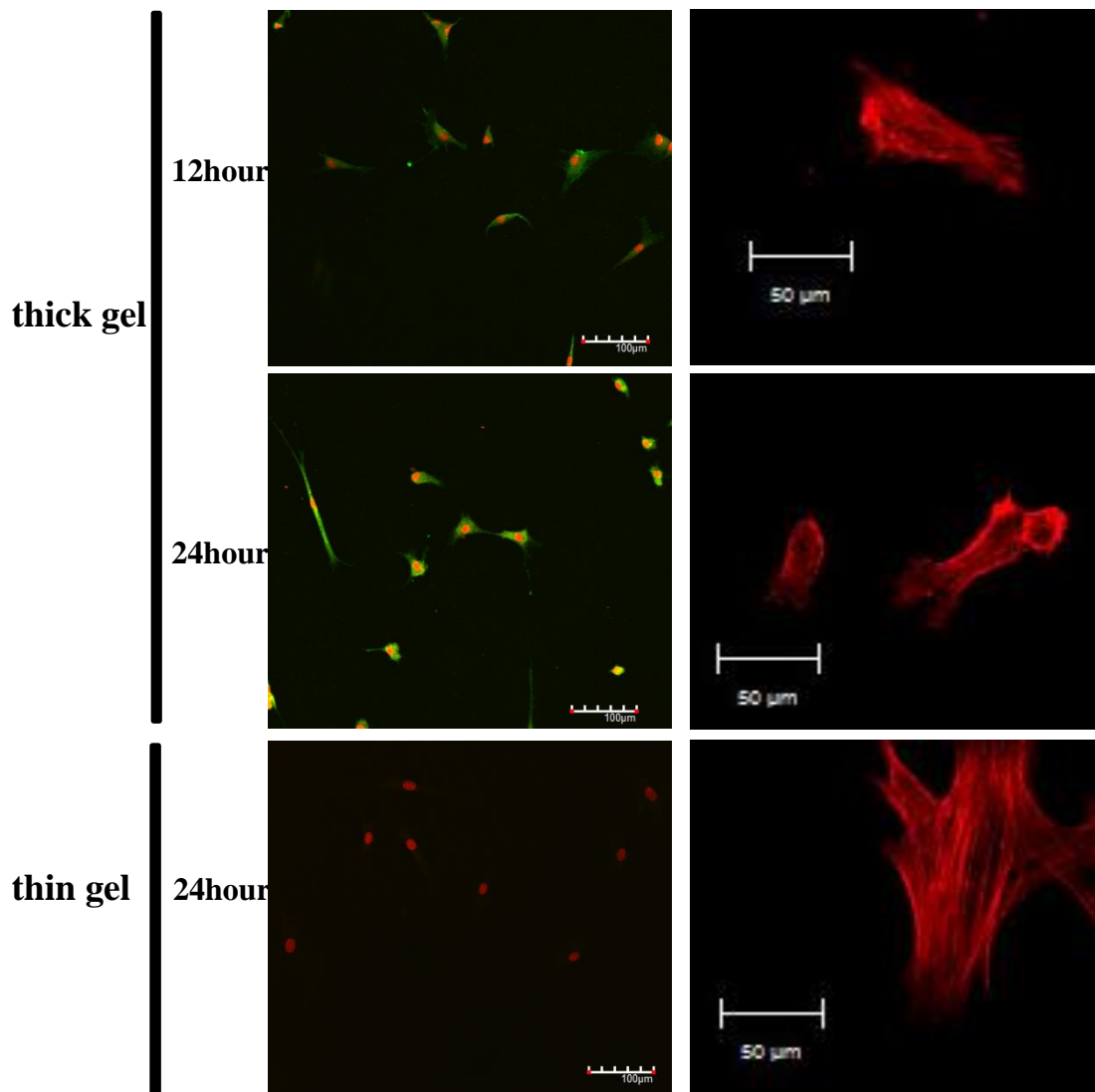


Fig 4-1. CK18 と F-actin の発現の経時的変化  
scale bar: CK18; 100 $\mu\text{m}$ , F-actin; 50 $\mu\text{m}$

#### 4-1-2. F-actin が CK18 の発現に及ぼす影響

actin 重合阻害剤(0.1 $\mu$ M CD: Cytocalasin D)を用いて F-actin の脱重合が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響を調査した(Fig 4-2, 4-3)。thin gel 上において Cytocalasin D を添加(actin の重合を阻害)する事で CK18 の発現が増加した。この結果から、CK18 の発現は actin の脱重合により誘導される事が明らかとなった。Fig 4-3 は CK18 の蛍光強度を示したグラフである。

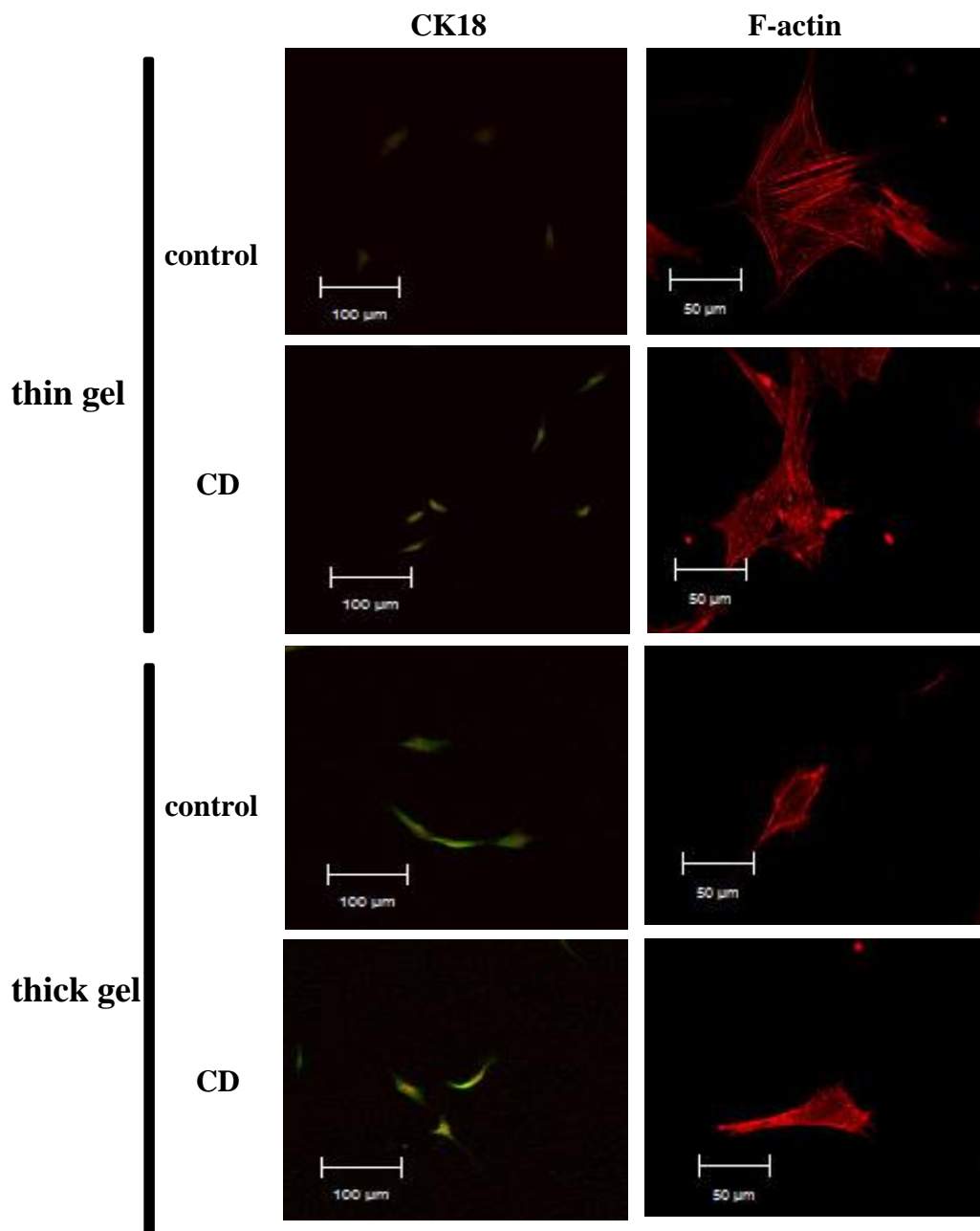


Fig 4-2. F-actin が CK18 の発現に及ぼす影響(染色画像)  
scale bar: CK18;100 $\mu$ m, F-actin;50 $\mu$ m

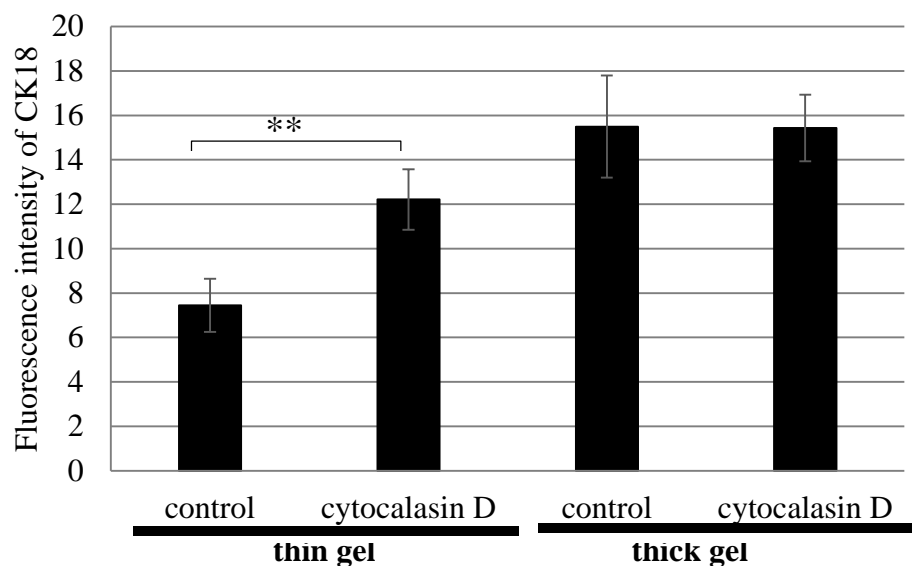


Fig 4-3. F-actin が CK18 の発現に及ぼす影響(蛍光強度解析)

\*\*P<0.01, n=6

#### 4-1-3. integrin mRNA の発現

collagen gel 上で培養した MSC の integrin mRNA の発現を調査した(Fig 4-4)。α1, α11, β1 integrin mRNA の発現において、thin gel と thick gel の間で有意な差が得られた。α2 integrin mRNA の発現においては有意な差は得られなかった。この結果から、integrin α1, α11, β1 の発現が actin の脱重合あるいは CK18 の発現に関与している事が明らかとなった。

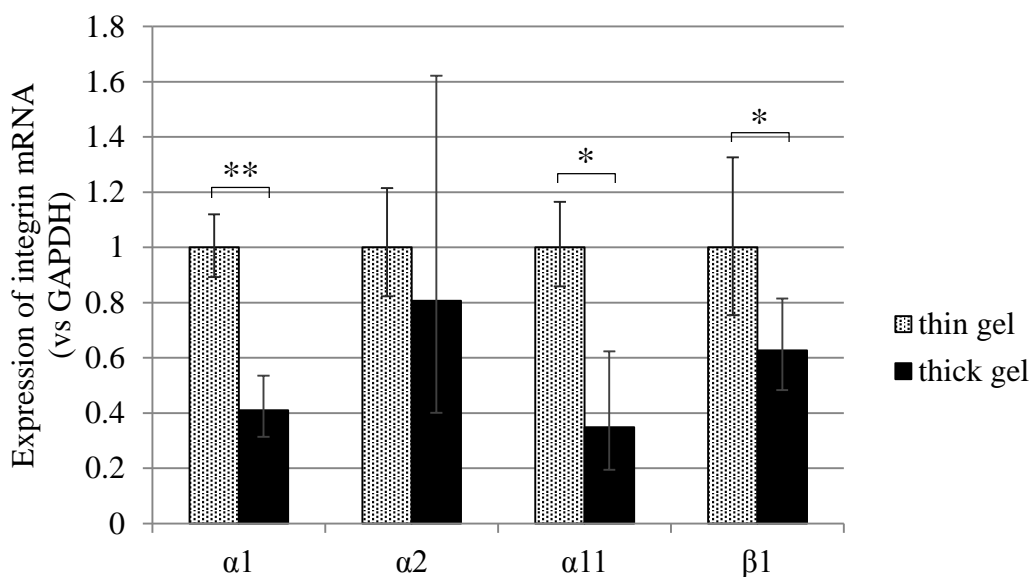
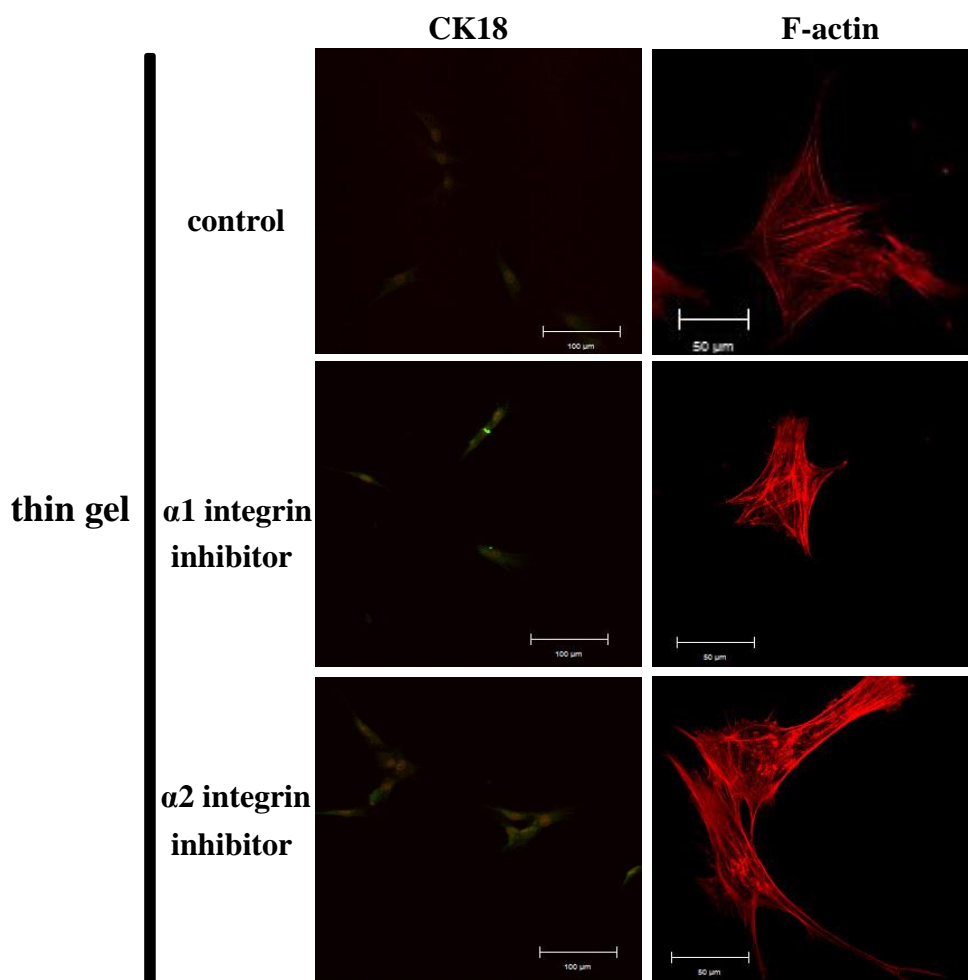


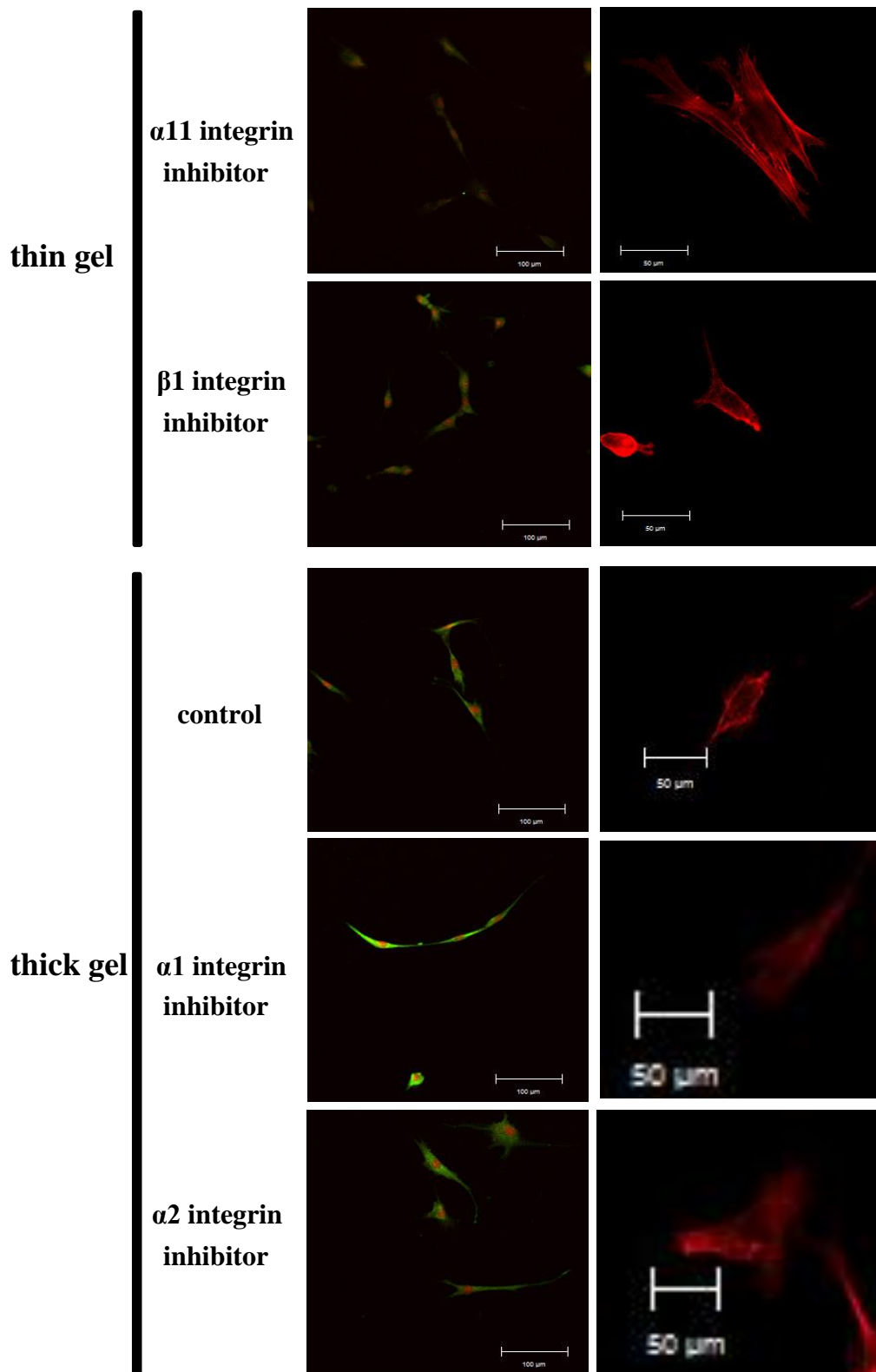
Fig 4-4. collagen gel 上での integrin mRNA の発現

thin=1 とした時の相対値, \*P<0.05, \*\*P<0.01, thin gel: n=3, thick gel: n=6

#### 4-1-4. integrin が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響

4-1-3 から thin gel と thick gel において integrin の発現量が異なる事が示された。この結果から、integrin が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響を調査した(Fig 4-5, 4-6)。thin gel においては  $\alpha 2$  integrin 阻害剤,  $\alpha 11$  integrin 阻害剤を用いた際には CK18 の発現に大きな影響を与えなかったが、 $\alpha 1$  integrin 阻害剤,  $\beta 1$  integrin 阻害剤を用いた際には CK18 の発現が有意に増加した。また、 $\beta 1$  integrin 阻害剤は actin の脱重合を誘導したが、 $\alpha 1$  integrin 阻害剤では actin の脱重合が不十分(線維が確認出来る状態)であった。 $\alpha 2$  integrin 阻害剤,  $\alpha 11$  integrin 阻害剤を用いた際でも actin の重合が認められた。さらに、thick gel においても  $\beta 1$  integrin 阻害剤を用いた際に CK18 の発現の有意な上昇がみられた。これらの事から、 $\beta 1$  integrin(あるいは  $\alpha 1\beta 1$  integrin)が CK18 の発現と actin の脱重合に関与している事が示された。





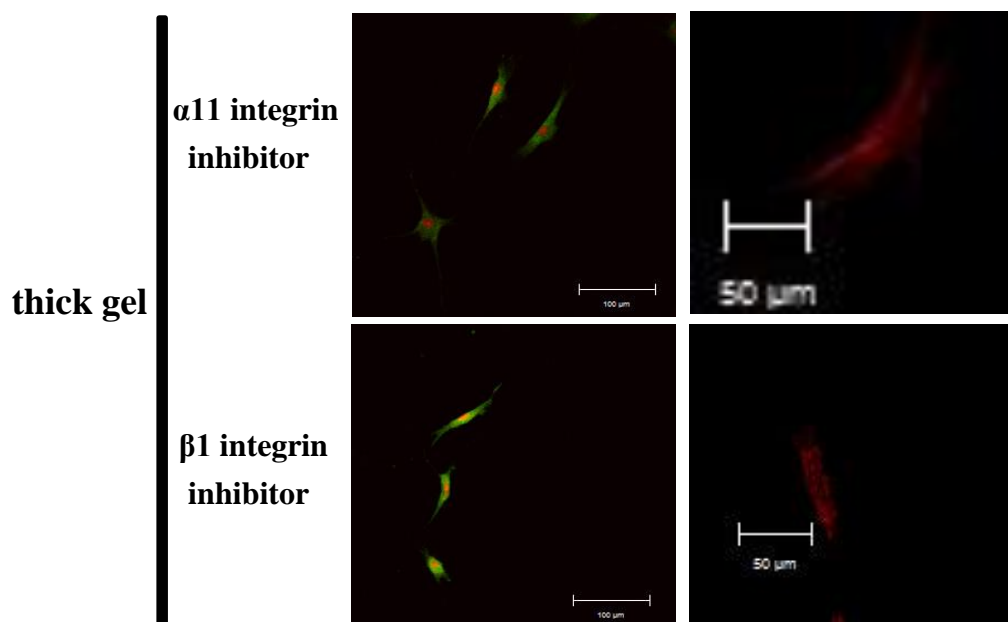


Fig 4-5. integrin が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響(染色画像)  
scale bar: CK18;100 $\mu\text{m}$ , F-actin;50 $\mu\text{m}$

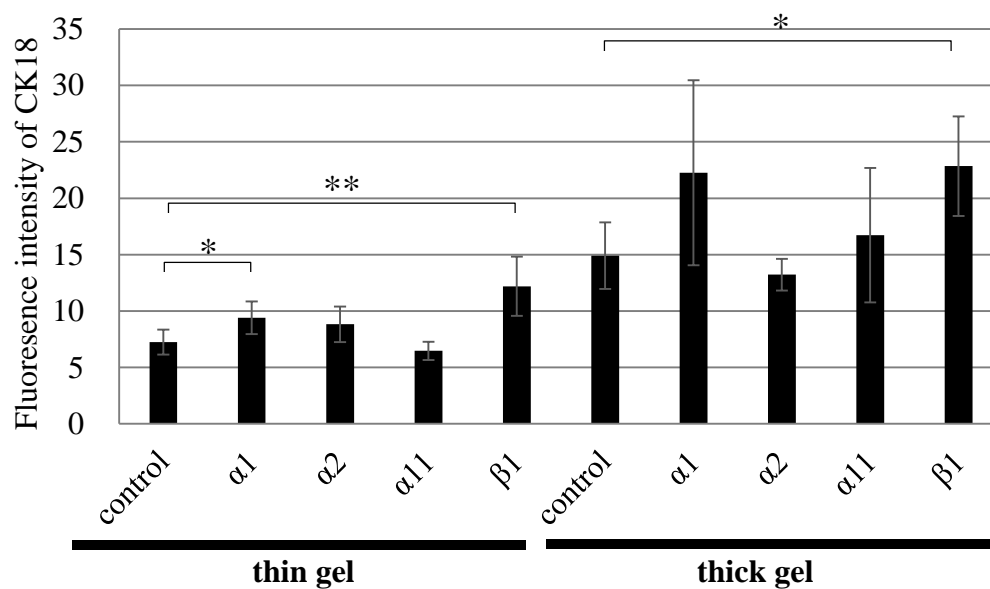
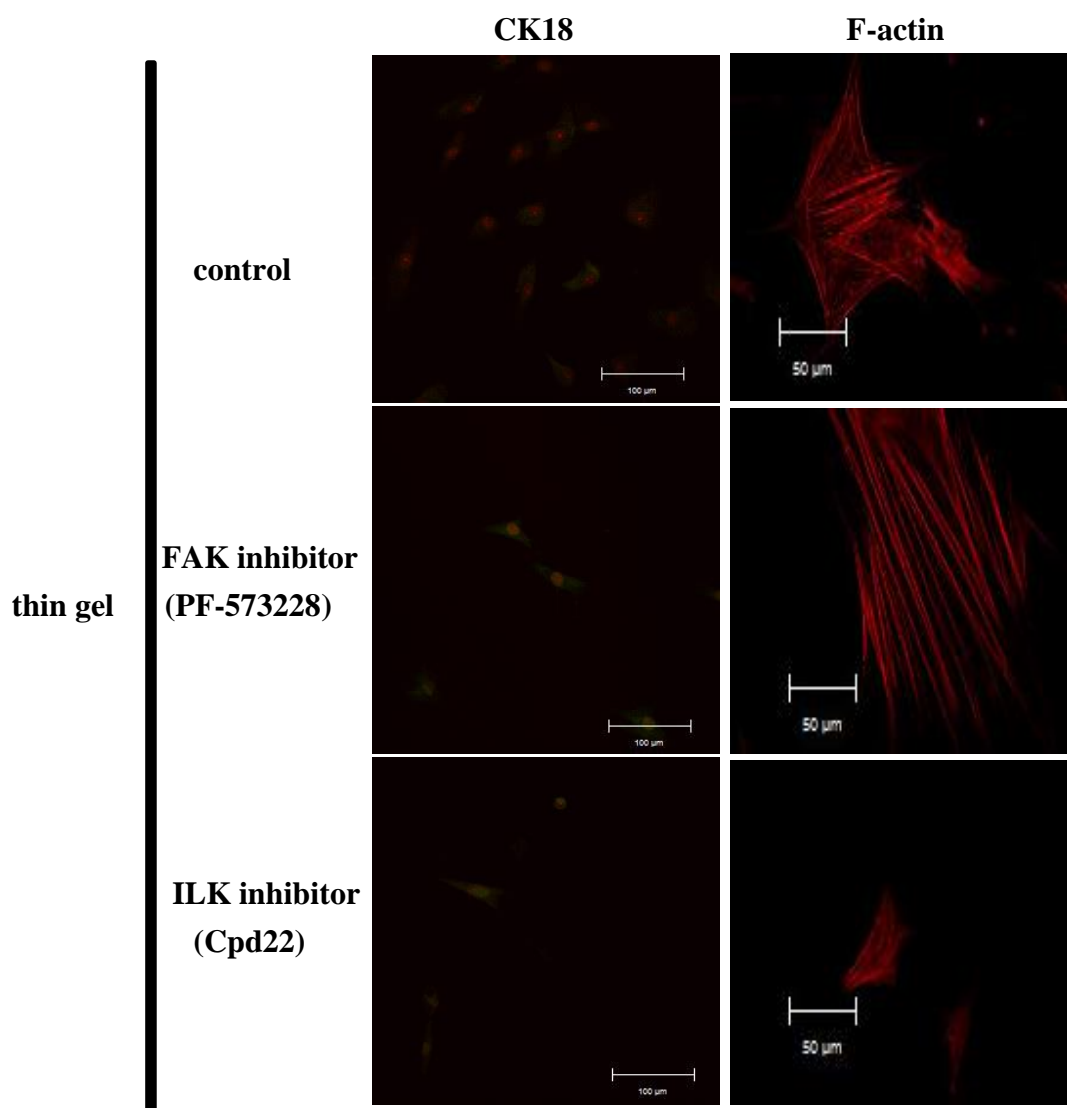


Fig 4-6. integrin が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響(蛍光強度解析)  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 6$

#### 4-1-5. FAK・ILK が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響

integrin の下流シグナルである FAK, ILK が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響を FAK 阻害剤(10 $\mu$ M PF-573228), ILK 阻害剤(5 $\mu$ M Cpd22)を用いて調査した (Fig 4-7, 4-8, 4-9)。PF-573228 を用いた際には、control と比べて、thin gel 上と thick gel 上の MSC の CK18 と F-actin の発現に大きな違いは見られなかった。しかし、Cpd22 を用いた際には CK18 の発現が増加し、thin gel において F-actin の脱重合を誘導した。この結果から、ILK が CK18 の発現と actin 脱重合に関与する事が示された。



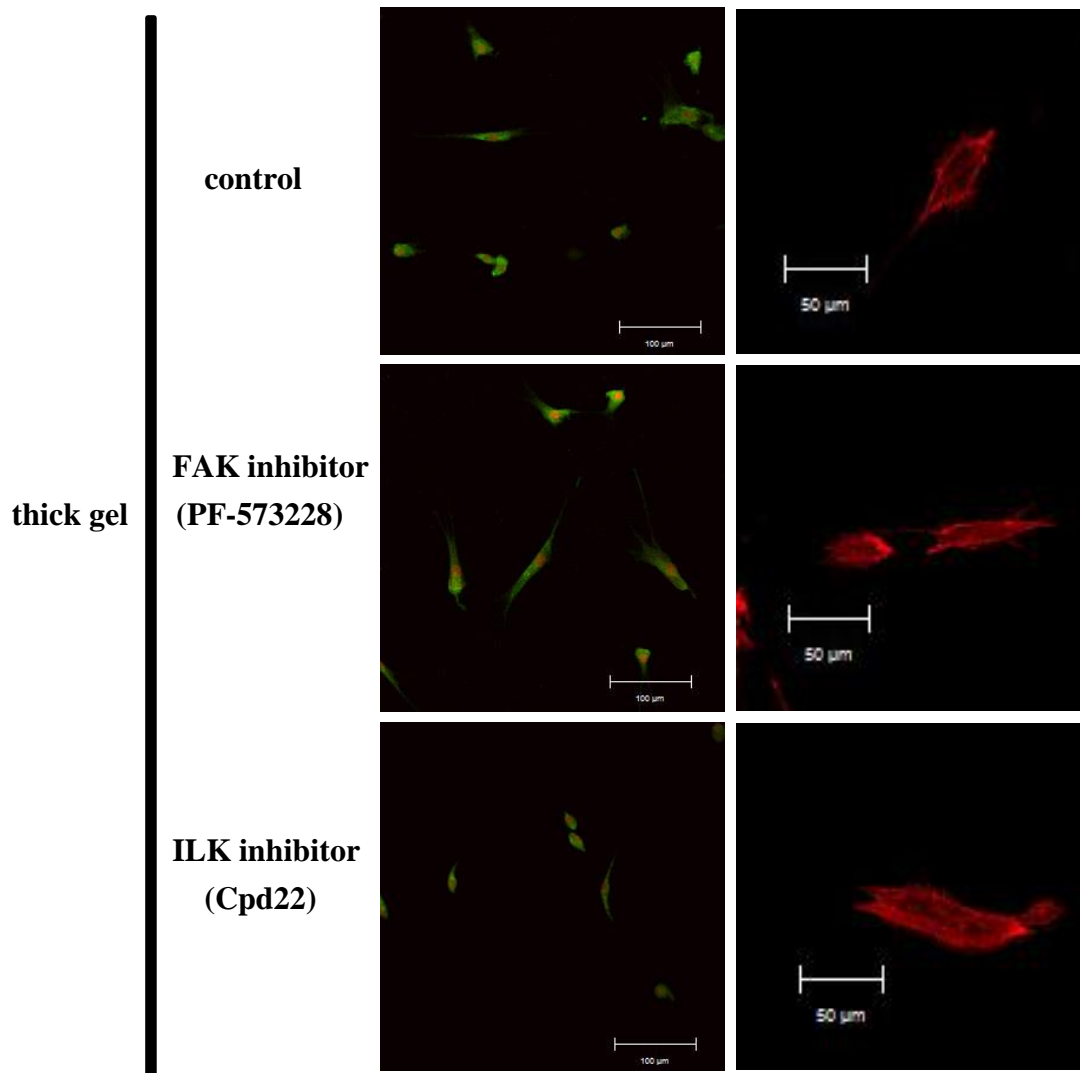


Fig 4-7. FAK・ILK が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響(染色画像)  
scale bar: CK18;100μm, F-actin;50μm



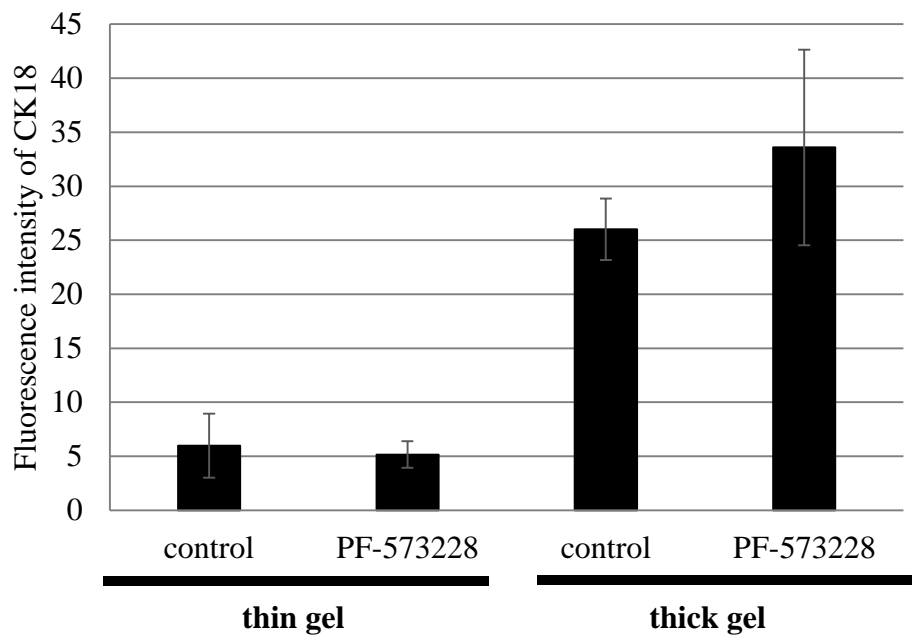


Fig 4-8. FAK が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響(蛍光強度解析)  
 \*\*P<0.01, n $\geq$ 3

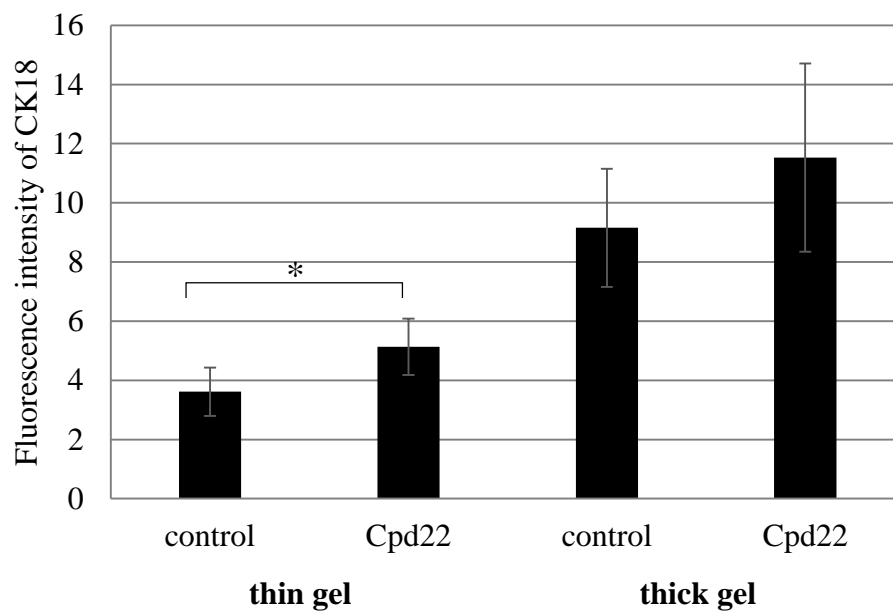


Fig 4-9. ILK が CK18 と F-actin の発現に及ぼす影響(蛍光強度解析)  
 \*P<0.05, n=6

#### 4-1-6. GSK3 $\beta$ が CK18 の発現に及ぼす影響

ILK の下流シグナルである GSK3 $\beta$  が CK18 の発現に及ぼす影響を GSK3 $\beta$  阻害剤(10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M LiCl: Lithium Chloride)を用いて調査した(Fig 4-10, 4-11)。10 $\mu$ M LiCl を用いた際には CK18 の発現に大きな違いは見られなかったが、20 $\mu$ M LiCl においては CK18 の発現が減少した。この結果から、GSK3 $\beta$  が CK18 の発現に関与する事が示された。

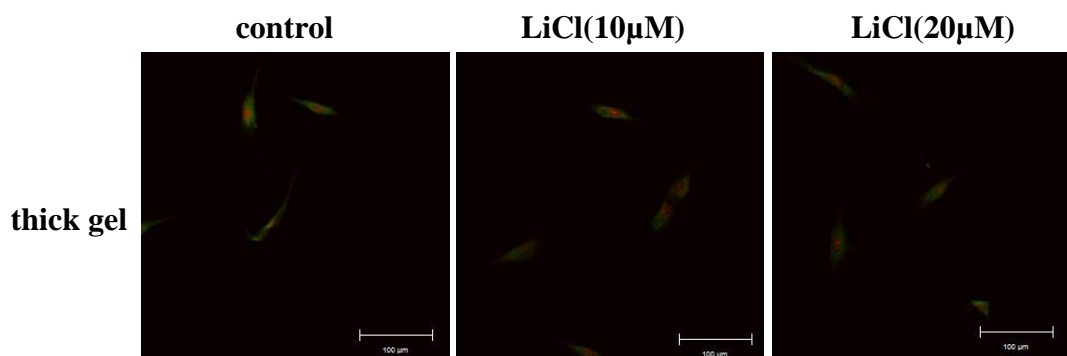


Fig 4-10. GSK3 $\beta$  が CK18 の発現に及ぼす影響(染色画像)  
scale bar:100 $\mu$ m

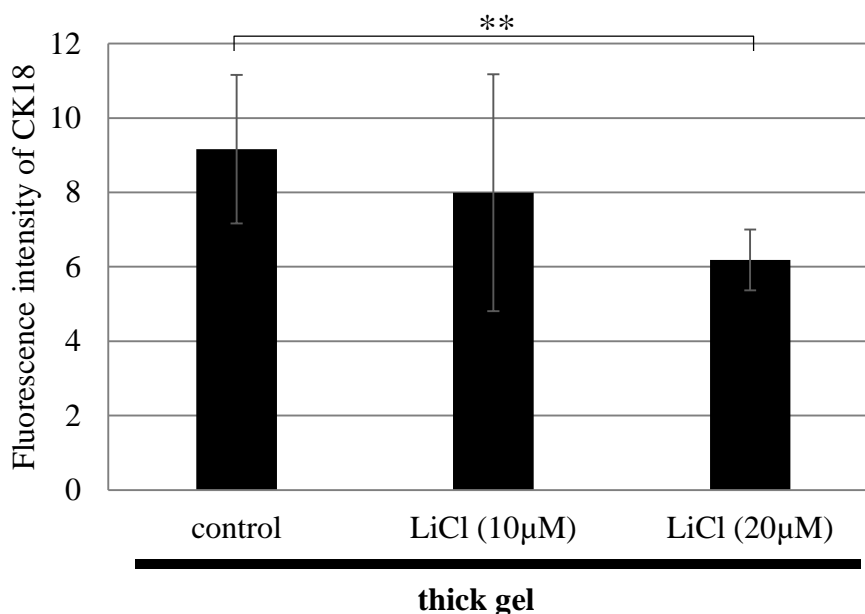


Fig 4-11. GSK3 $\beta$  が CK18 の発現に及ぼす影響(蛍光強度解析)  
\*\*P<0.01, n=6

## 4-2. collagen gel 上培養 MSC のタンパク質発現

### 4-2-1. 二次元電気泳動によるタンパク質発現の解析

thin gel 上で培養した MSC のタンパク質発現と thick gel 上で培養した MSC のタンパク質発現を二次元電気泳動により網羅的に調査し、比較した(Fig 4-12)。いくつかのスポットにおいてスポット強度の違いがみられた。

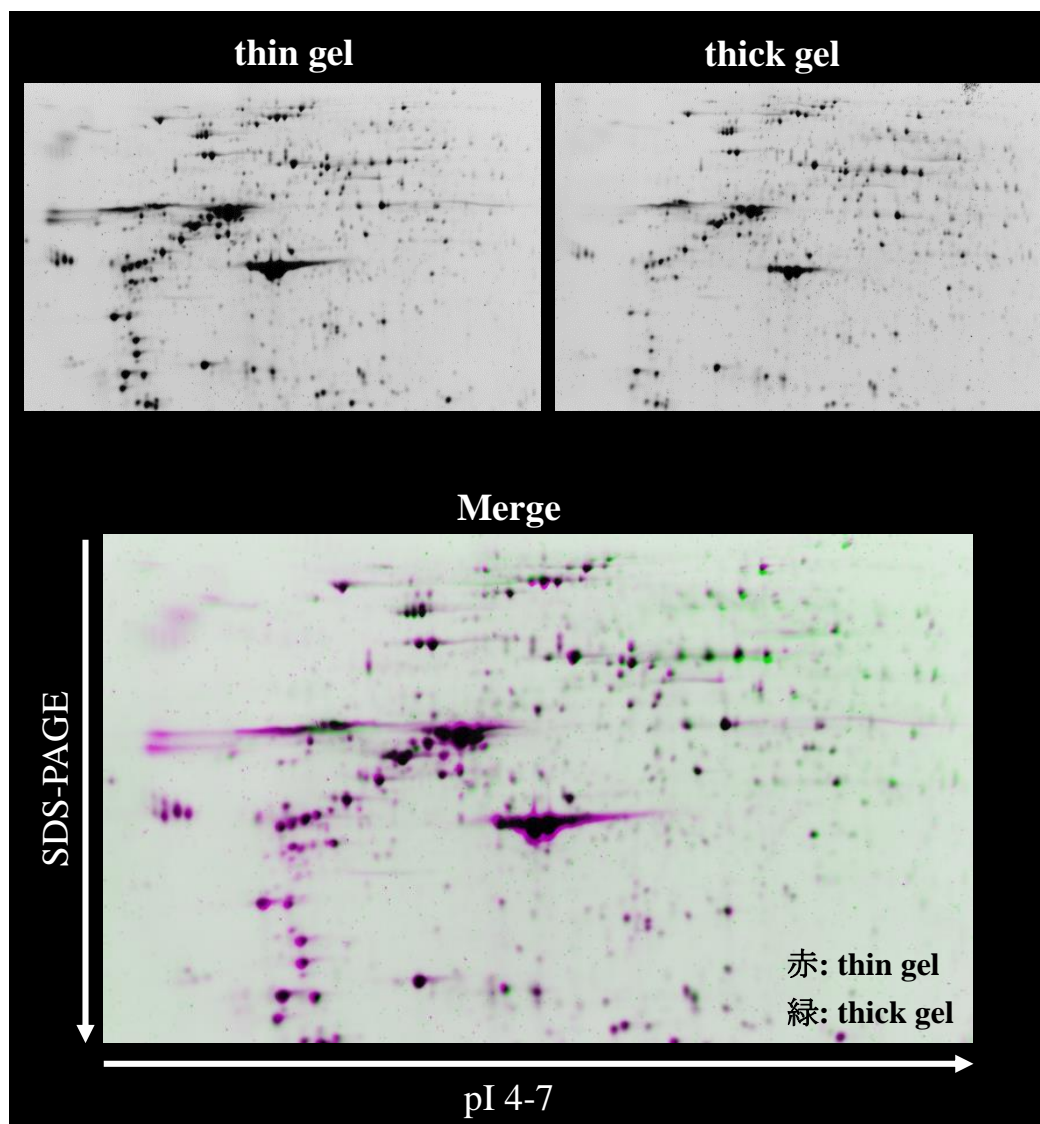


Fig 4-12. thin gel, thick gel 上で培養した MSC のタンパク質のスポット

#### 4-2-2. タンパク質の同定

発現量の異なるいくつかのスポットについて、TOF-MS によりタンパク質同定を行った。その内の1つのスポットにおいて Gelsolin が検出された(Fig 4-13)。Gelsolin は thick gel 上で培養した MSC において発現の増加が確認出来た(Fig 4-14)。

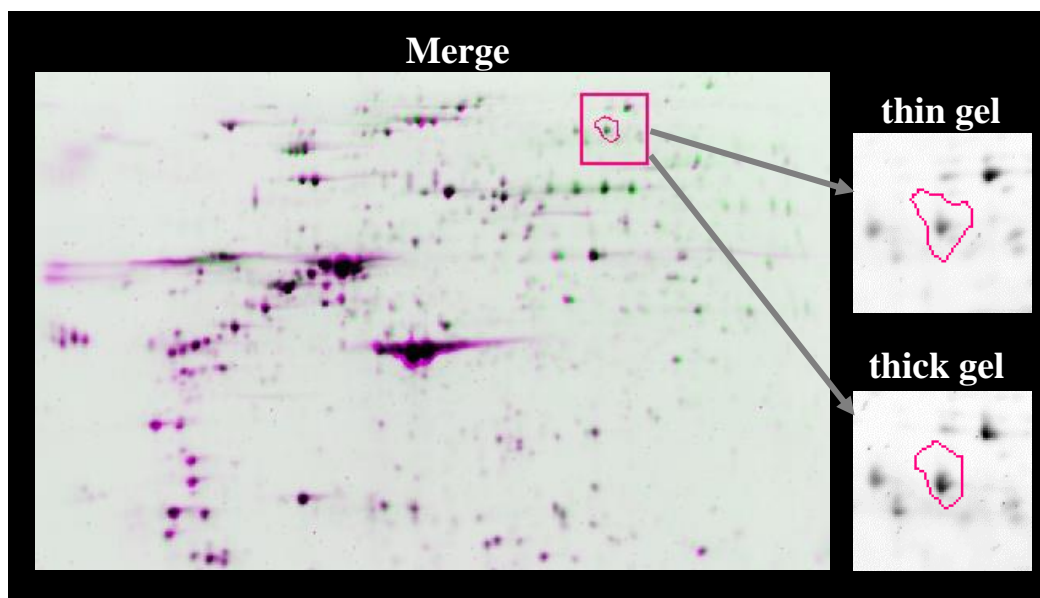


Fig 4-13. thin gel, thick gel 上で培養した MSC の Gelsolin のスポット

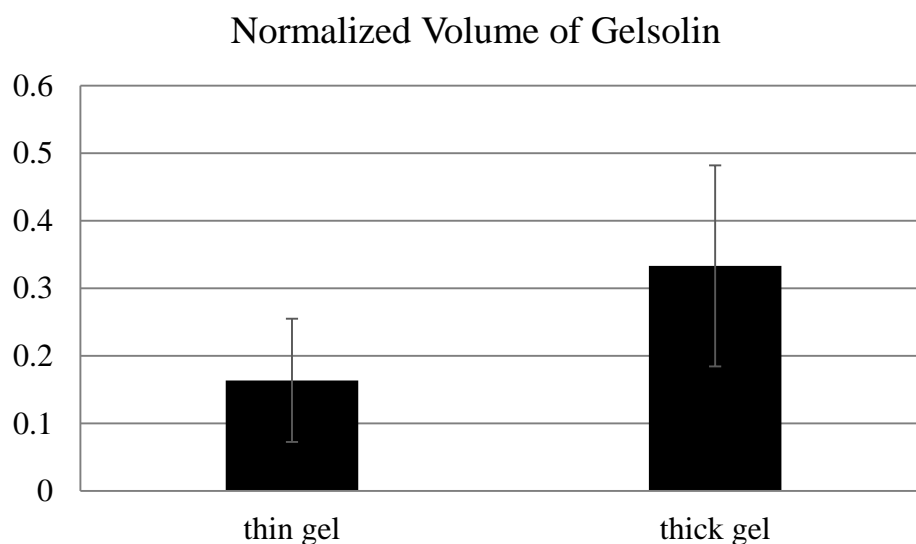


Fig 4-14. Gelsolin の発現量

Normalized volume: 二次元ゲル上に発現した全スポットの体積の合計を 100 とした時の相対量,

## 5. 考察

### 5-1. CK-18 の発現メカニズム

4-1-1 では 0.3w/v% thick type I collagen gel(厚さ 1900 $\mu$ m)上の MSC の CK18 と F-actin の発現変化を経時的に観察した。本研究室では 7 日間と 14 日間、collagen gel 上で培養した MSC を観察してきたが<sup>[46][47]</sup>、本研究では初めて 1 日間以内という短期間での観察を試みた。その結果、thick gel 上で 7 日間、あるいは 14 日間培養した MSC と同様に、1 日間 thick gel 上で培養した MSC においても CK18 の発現を確認した。この事は、thick gel 上で培養した MSC は 1 日程度で上皮分化に向かっている可能性を示唆した。さらに、培養 3 時間程度でも CK18 の発現が確認できた。また、thick gel 上では全ての条件において actin の脱重合が確認できた(actin 線維は確認できない)。一方、0.3w/v% thin type I collagen gel(厚さ 100 $\mu$ m)上では 1 日間培養を行っても CK18 の発現は確認できなかった。この時、actin は重合状態であった(actin 線維が確認できる)。これらの事から、collagen gel の厚みが MSC の CK18 と actin の発現に影響を及ぼすという事が示された。5-1 では、このメカニズムについて本研究で得られた結果を交えて考察する。

#### 5-1-1. CK18 発現と actin 脱重合

ここでは、CK18 の発現と actin の脱重合の関係について考察する。4-1-2 では actin の脱重合を誘導した場合の CK18 の発現を調査した。その結果、actin の脱重合は CK18 の発現を誘導する事が示された。この事から、actin の脱重合と CK18 の発現には密接な関係があり、actin が脱重合状態である場合には CK18 が発現し、actin が重合状態である場合には CK18 が発現しないという事が明らかとなった。Table 5-1 に本研究で得られた、actin の脱重合と CK18 の発現の関係を示す。ここからも、actin の脱重合が CK18 の発現に大きく寄与している事が分かる。

Table 5-1. CK18 の発現と actin 脱重合の関係  
 ※collagen gel 上(24h 培養)、※<sup>2</sup>+:重合, -:脱重合

結果	条件	thin gel		thick gel	
		CK18	※ <sup>2</sup> actin	CK18	※ <sup>2</sup> actin
[46]	collagen gel 上(7day 培養)	—	+	+	—
	collagen gel 上(14day 培養)	—	+	+	—
4-1-1	collagen gel 上(24h 培養)	—	+	+	—
4-1-2	※ actin 重合阻害剤添加	+	—	++	—
4-1-4	※ $\alpha$ 1 integrin 阻害剤添加	+	+/-	+	—
	※ $\alpha$ 2 integrin 阻害剤添加	—	+	+	—
	※ $\alpha$ 11 integrin 阻害剤添加	—	+	+	—
	※ $\beta$ 1 integrin 阻害剤添加	+	—	++	—
4-1-5	※FAK 阻害剤添加	—	+	+	—
	※ILK 阻害剤添加	+	—	+	—
[47]	25w/v% elastin gel 上	—	+	—	+
	25w/v% elastin gel 上	+	—	—	—
	+ actin 重合阻害剤				

actin の重合・脱重合が MSC の分化に関係している事は以前から知られており、MSC が上皮分化や脂肪分化、軟骨分化した際に actin の脱重合が起こる事が報告されている[8][14][62][63]。しかし、本研究で用いた thick gel 上では脂肪分化や骨分化といった他系統への分化は確認できず、CK18 の発現のみが確認できた(Fig 5-1)[64]。

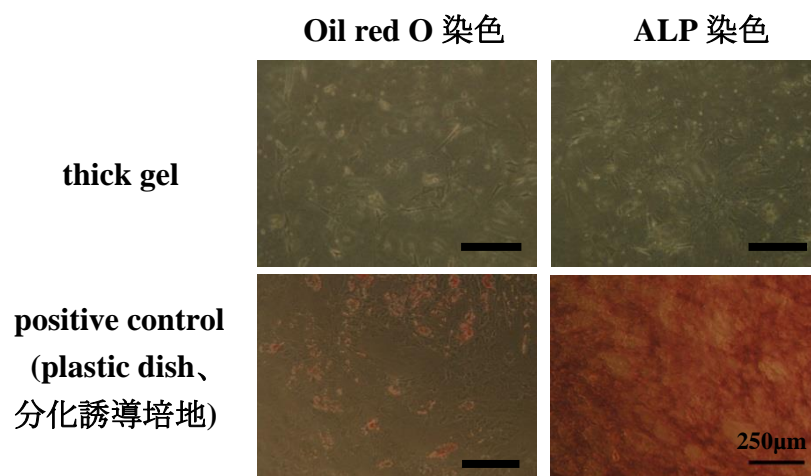


Fig 5-1. thick gel 上の脂肪分化・骨分化

これらの事から、actin の脱重合は必ずしも特定の1つの分化を誘導する訳ではない事が分かり、その他の因子によっても MSC の分化が決定されと考えられる。細胞足場に起因する actin の重合・脱重合には以下の3つの因子が関与すると考えられる。

- ①細胞足場の厚さ
- ②細胞足場の硬さ
- ③細胞足場の種類(ECM: Extracellular Matrix)

#### ①細胞足場の厚さ

本研究室の報告や本研究において、足場の厚さが分化を決定する因子であることを示した<sup>[46][47]</sup>。また、細胞足場の厚さは MSC の分化を決定する因子であるという報告もされている<sup>[62]</sup>。上記の様な actin が脱重合した際に脂肪分化や軟骨分化が起こるという報告における実験では、足場にゲルが多く用いられている。そのため、たとえ actin が脱重合していても、足場の厚さによって MSC の分化が異なるという可能性が挙げられる。

#### ②細胞足場の硬さ

細胞足場の硬さも MSC の分化を決定する重要な因子の 1 つである<sup>[8][14][16][63][65]</sup>。さらに、足場の硬さによっても actin の脱重合が誘導されることが知られているが、その硬さの中でもそれぞれの分化に適した足場の硬さが存在すると考えられる。本実験の場合は、thin gel においても actin の脱重合を誘導する事で CK18 の発現を誘導する事ができた。thin gel と thick gel では厚さのみが異なり、足場の硬さは同じである。そのため、用いた collagen 濃度(足場の硬さ)が CK18 の発現に最適であったと考えられる。

#### ③細胞足場の種類(ECM)

細胞足場の種類によっても MSC の分化が異なる事が報告されている<sup>[7][8]</sup>。本研究室においても thick collagen gel と同じ厚さの elastin gel 上で MSC を培養した結果、CK18 の発現は確認できなかった<sup>[47]</sup>。この事からも、ECM による違いで MSC の分化が異なる事が示されている。

MSC の分化はこれらの因子、あるいはこれらの因子の組み合わせによって、複雑に決定されと考えられるが、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。



### 5-1-2. integrin による影響

5-1-1 でも述べたが、本研究室の実験において、elastin gel 上での CK18 の発現は認められなかった<sup>[47]</sup>。しかし、本研究で用いた 0.3%w/v collagen gel とは足場の硬さが異なるため、単純に ECM の違いとして議論する事はできない。そこで、本研究室では elastin gel と同等の硬さを有する 1% collagen gel を用いて(つまり、用いた collagen gel と elastin gel の厚さと硬さは同等である) CK18 の発現を観察した。その結果、0.3% thick collagen gel と同様に 1.0% thick collagen gel 上においても CK18 の発現を確認した(Fig 5-2)<sup>[48]</sup>。さらに、1.0% thick collagen gel においては actin の脱重合、25%w/v elastin gel では actin の重合を確認している。これらの事から、ECM の違い、つまり type I collagen と MSC の接着が CK18 の発現と actin の脱重合に影響したと考えられる。ここで、type I collagen と MSC の接着は  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha11\beta1$  integrin が担っている<sup>[38]</sup>。そのため、これらの integrin が CK18 の発現に関与すると考え、4-1-3 では integrin の発現を、4-1-4 では integrin が CK18 と actin 脱重合に与える影響を調査した。

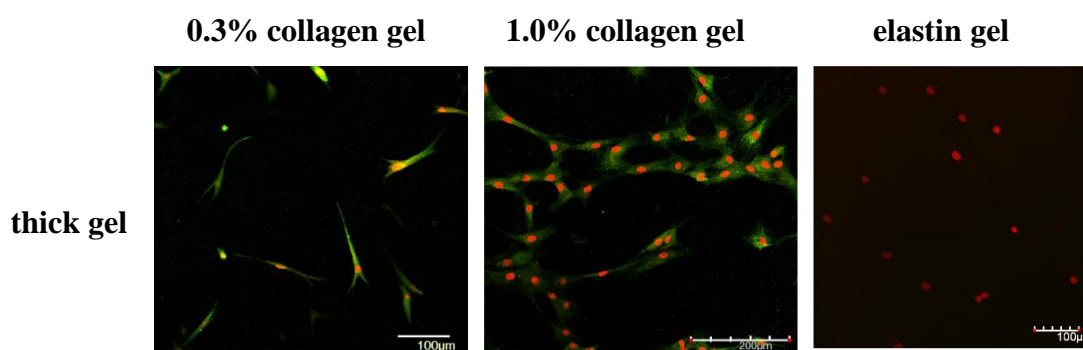


Fig 5-2. elastin gel, 1.0% collagen gel 上で培養した MSC の CK18 の発現

integrin が MSC の分化に関与するという事は既に報告されている。collagen コーティングされた plastic dish 上で  $\beta1$  integrin を阻害して培養する事で軟骨に分化する事が知られている<sup>[63]</sup>。さらに、柔らかい基質上で MSC を培養すると  $\beta1$  integrin が内在化し、その結果神経分化が誘導されるという事が報告されている<sup>[66]</sup>。これらの事からも、integrin が CK18 の発現に関与している可能性が高いと考えられる。

4-1-3 では thin gel 上と thick gel 上で培養した MSC の  $\alpha1$  integrin,  $\alpha2$  integrin,  $\alpha11$  integrin,  $\beta1$  integrin mRNA の発現を調査した。その結果、 $\alpha1$  integrin,  $\alpha11$  integrin,  $\beta1$  integrin mRNA の発現が thick gel 上の MSC で減少した。この結果から  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha11\beta1$  integrin の発現の減少が CK18 の発現と actin の脱重合に寄与した可能性が示唆された。integrin は ECM との結合により接着斑を形成し、その細胞中の接着斑同士に actin が橋渡しされる。そのため、 $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha11\beta1$  integrin の発現量が



減少した結果、type I collagen と MSC の  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 11\beta 1$  integrin の結合(接着斑)が減少し、actin の脱重合と CK18 の発現を誘導したと考えられる。integrin mRNA の発現量が変化した理由としては、thin gel において  $\alpha 1$ ,  $\alpha 11$  integrin の mRNA を上方調節(または維持)させるシグナル、あるいは thick gel において  $\alpha 1$ ,  $\alpha 11$  integrin を下方調節するシグナルが存在したためと考えられる。

次に 4-1-4 の結果について考察する。この実験で用いた試薬は integrin antibody であり、細胞表面において、用いた integrin antibody に対応する integrin とその対となる integrin の type I collagen への結合が阻害される<sup>[67]</sup>。つまり、 $\beta 1$  integrin antibody(inhibitor)を用いた場合は  $\alpha 1\beta 1$  integrin,  $\alpha 2\beta 1$  integrin,  $\alpha 11\beta 1$  integrin が阻害される。 $\alpha 1$  integrin antibody(inhibitor)を用いた場合は  $\alpha 1\beta 1$  integrin、 $\alpha 2$  integrin antibody(inhibitor)を用いた場合は  $\alpha 2\beta 1$  integrin、 $\alpha 11$  integrin antibody(inhibitor)を用いた場合は  $\alpha 1\beta 11$  integrin がそれぞれ阻害される。結果として thick gel と thin gel において  $\beta 1$  integrin inhibitor を用いた際に CK18 の発現が増加し actin の脱重合を誘導した。このことから、 $\beta 1$  integrin の collagen への結合の阻害(減少)が actin の脱重合を誘導し、CK18 の発現を増加させる事が示された。これは、thin gel において考えると  $\beta 1$  integrin と collagen への結合が減少し、MSC が thick gel と同様の状態となったと考えられ、thick gel において  $\beta 1$  integrin mRNA が減少したという 4-1-3 の結果と一致する。また  $\alpha 1$  integrin inhibitor においても同様の考え方ができる。 $\alpha 2$  integrin inhibitor では thin gel, thick gel においても actin の脱重合と CK18 の発現には影響を与えなかった。この事も 4-1-3 の結果と一致する。 $\alpha 11$  integrin inhibitor では actin の脱重合と CK18 の発現に影響を与えず、4-1-3 の結果と一致しなかった。これは  $\alpha 11$  integrin の発現は減少するものの、actin の脱重合のシグナル経路には関与しなかった可能性がある。また、 $\alpha 1$  integrin inhibitor を用いた際には不十分な actin 脱重合がみられ、 $\alpha 2$ ,  $\alpha 11$  integrin inhibitor を用いた際には actin の脱重合が見られなかった。一方、 $\beta 1$  integrin inhibitor を用いた際には actin の脱重合を誘導したことから  $\beta 1$  integrin が actin 脱重合を誘導した可能性が極めて高い。 $\alpha$  integrin を阻害した際にも  $\beta 1$  integrin が同時に阻害されるが、用いた  $\alpha$  integrin inhibitor 以外と対となる  $\beta 1$  integrin の結合は存在しているため、actin の脱重合への影響が少なくなったと考えられる。CK18 の発現に関しては  $\alpha 2$ ,  $\alpha 11$  integrin では影響がなく  $\alpha 1$  integrin のみ影響があった。このことから、 $\alpha 1\beta 1$  integrin、あるいは  $\alpha 1$  integrin が CK18 の発現に関与していると考えられる。

integrin の actin 脱重合と CK18 の発現への関与が示されたが、この integrin の下流シグナル経路には FAK と ILK が存在する。このことから、FAK と ILK による actin 脱重合と CK18 への影響を調査した(4-1-5)。これらの結果について 5-1-3 で考察する。

### 5-1-3. FAK・ILK による影響

integrin の関与が示されたことから、4-1-5 ではその下流シグナルである FAK と ILK が CK18 と actin 脱重合に与える影響を調査した。

FAK は actin の重合・脱重合に関与する事が報告されている<sup>[68]</sup>。いくつかの報告によると、FAK は RhoA タンパクを活性化し、さらに ROCK, LIM Kinase, Cofilin をリン酸化する<sup>[69]</sup>。リン酸化されたコフィリンは actin の脱重合を阻害し、actin の重合を安定させる事が知られている(Fig 5-3)<sup>[70]</sup>。

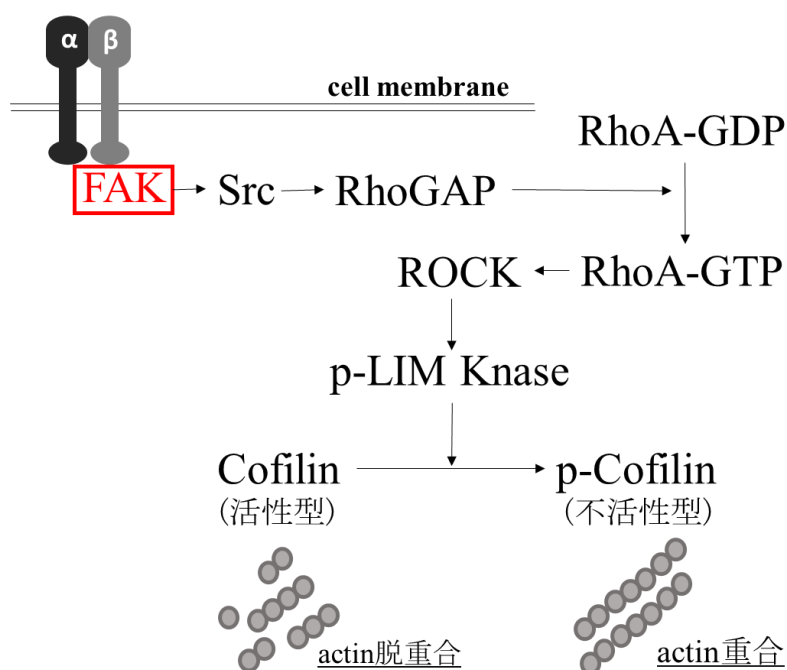


Fig 5-3. FAK による actin の重合・脱重合メカニズム

しかし、FAK は actin の重合・脱重合には関与せず、actin の引張力に関与するという報告もある<sup>[66]</sup>。本研究においても FAK は actin の脱重合と CK18 の発現には影響を及ぼさなかった。このことから、FAK は CK18 の発現に関与しないという事が示された。

ILK に関しても actin の重合・脱重合に影響するという報告がされている<sup>[71][72]</sup>。本研究においても、ILK の阻害が actin の脱重合と CK18 の発現を誘導した。このことから、ILK が actin 脱重合と CK18 の発現に関与する事が示された。ILK は integrin からのシグナルを伝達し、Src のリン酸化を介し、cofilin をリン酸化する。その結果、actin 脱重合を阻害し、F-actin を安定化する(Fig 5-4)<sup>[73]</sup>。

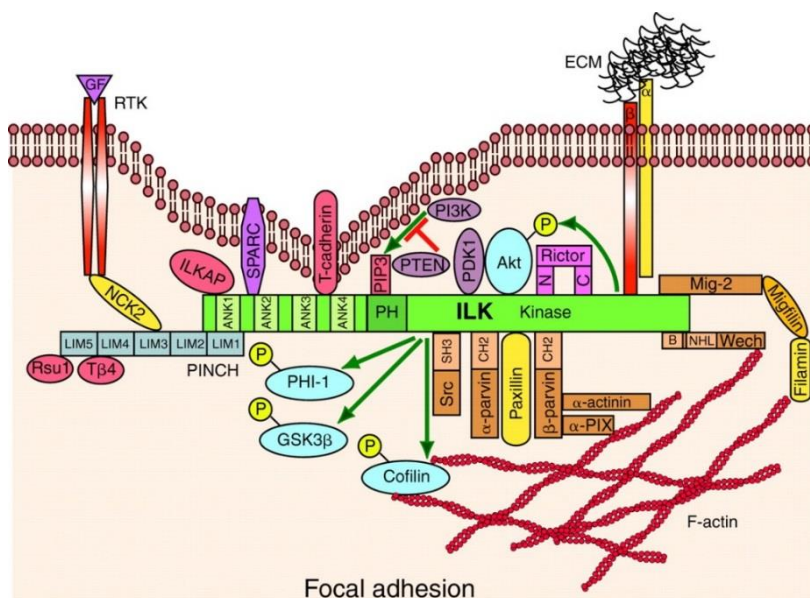


Fig 5-4. ILK による actin の重合・脱重合メカニズム

図は McDonald PC, J Cell Sci, 2008 より転載

FAK と ILK は共に、MSC での存在は確認されている<sup>[74][75]</sup>。では、なぜ actin の重合・脱重合メカニズムを有する ILK と FAK が存在するにもかかわらず、ILK のみで actin の脱重合が誘導されたのか。一般的に、FAK と ILK は共に integrin からのシグナルを伝達するタンパク質であるが、FAK と ILK によってもたらされる機能は異なると考えられる<sup>[66][76][77]</sup>。そのため、本実験の場合 ILK が actin の脱重合機能を担っていたと考えられる。以上のことから、これまでの考察をまとめると、thick gel 上においては(α1)β1 integrin の発現が減少し、ILK へのシグナルが抑制され、actin の脱重合が誘導されたと考えられる。さらに、actin の脱重合により CK18 の発現が誘導されたと考えられる。

次に、ILK の下流シグナルである GSK3β が CK18 の発現に関与している可能性も考慮し、ILK の下流シグナルであるが CK18 の発現に与える影響を 4-1-6 で調査した。

#### 5-1-4. GSK3 $\beta$ による影響

GSK3 $\beta$  は ILK の下流シグナルである(Fig 5-4)<sup>[73]</sup>。Fig 5-5 から、本研究で用いた ILK inhibitor(Cpd22)により GSK3 $\beta$  のリン酸化が減少する事が示されている<sup>[78]</sup>。さらに、AKT のリン酸化の減少も示されている。一般的に、GSK3 $\beta$  のリン酸化は AKT を介して起こる<sup>[79]</sup>。リン酸化した GSK3 $\beta$  は不活性化する。本研究で用いた GSK3 $\beta$  阻害剤(LiCl)は GSK3 $\beta$  をリン酸化させ、不活性化するものである(Fig 5-6)<sup>[80]</sup>。

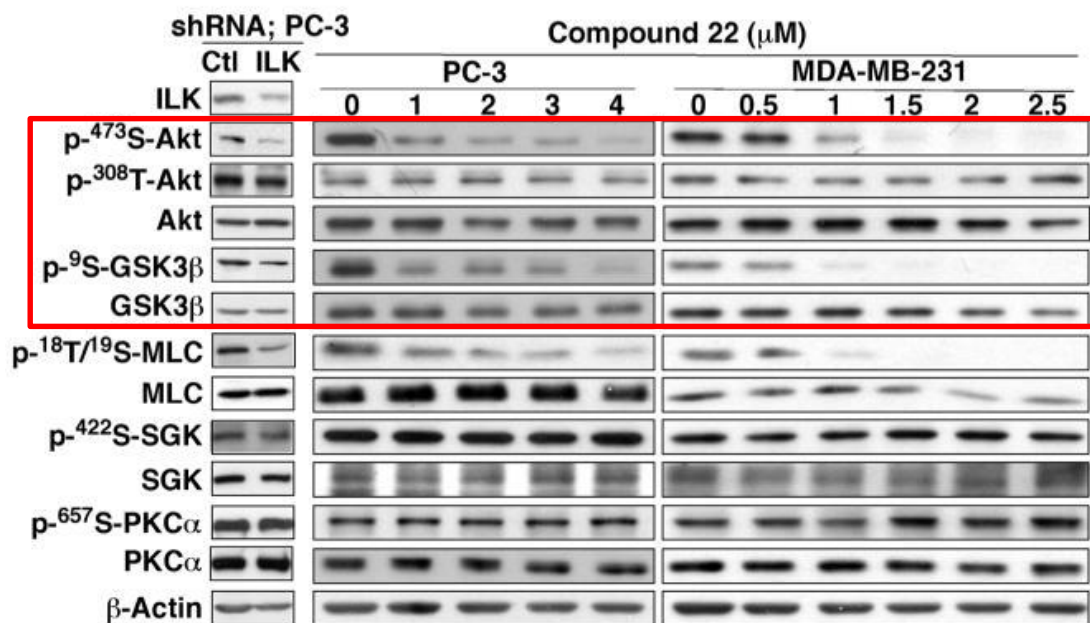


Fig 5-5. ILK inhibitor による GSK3 $\beta$  への影響

図は Lee SL, J Med Chem, 2011 より転載

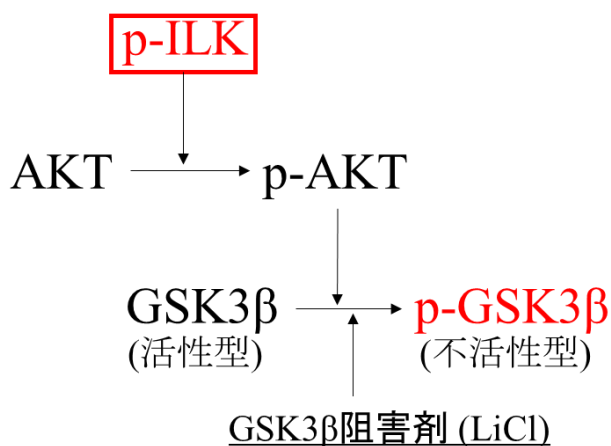


Fig 5-6. ILK による GSK3 $\beta$  への影響と GSK3 $\beta$  inhibitor の役割

4-1-6 では ILK の下流シグナルタンパク質である GSK3 $\beta$  が CK18 の発現に及ぼす影響を調査した。その結果、GSK3 $\beta$  阻害剤により CK18 の発現が抑制された。このことから、GSK3 $\beta$  が CK18 の発現を促進している事が示された。

GSK3 $\beta$  による CK18 の発現メカニズムとしては wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの関与が考えられる。GSK3 $\beta$  は wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路に関連するタンパク質の 1 つである<sup>[81]</sup>。リン酸化していない GSK3 $\beta$ (活性化型)は wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路において  $\beta$ -catenin をリン酸化する。リン酸化された  $\beta$ -catenin は分解される。この時、wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは OFF の状態になる。逆に GSK3 $\beta$  がリン酸化すると、 $\beta$ -catenin は分解されずに核内に移行し、転写因子として働く。この時、wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは ON になる。この wnt/ $\beta$ -catenin シグナルにおいて、 $\beta$ -catenin が分解された時、即ち wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが OFF の状態の時には CK18 の発現が増加する事が知られている<sup>[82]</sup>。これらのメカニズムの概略を Fig 5-7 に示す。そのため、thick gel においては wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが OFF の状態になり、CK18 が発現したと考えられる。この事は、4-1-6 から得られた GSK3 $\beta$  の阻害(リン酸化)が CK18 の発現を減少させるという結果に一致する(GSK3 $\beta$  の阻害が  $\beta$ -catenin の分解を抑制するという報告もされている<sup>[83]</sup>)。

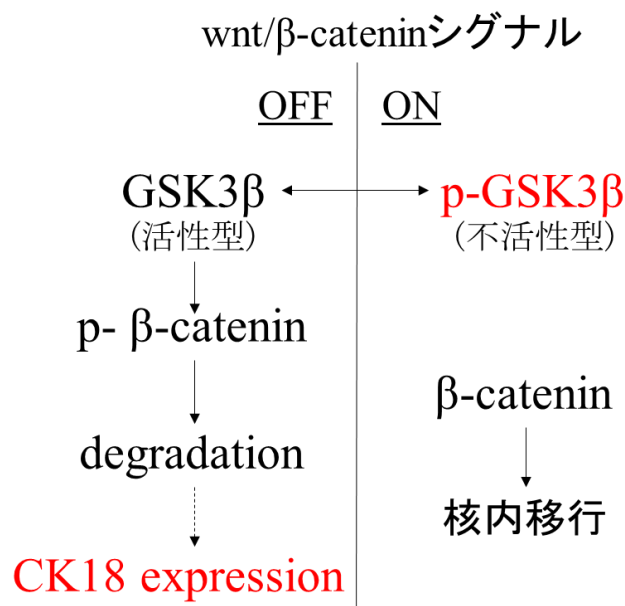


Fig 5-7. GSK3 $\beta$  による CK18 の発現メカニズム

wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが CK18 の発現に関与する事が明らかとなったが、ここで actin の重合・脱重合を起点とするシグナルとして知られている、Hippo シグナルの関与についても考察する。4-1-2 から cytochalasin D を用いた場合に、CK18 の発現の増加が確認できた。Hippo シグナルでは actin が脱重合する事により Hippo シグナルの中核を担う Yap/Taz がリン酸化し、逆に actin が重合すると Yap/Taz が脱リン酸化し、核内に移行する<sup>[81][84] [85][86]</sup>。どのように actin の重合・脱重合の情報が Yap/Taz に伝わるのか、詳細なメカニズムは明らかとなっていないが、本実験系においても関与している可能性がある。そこで、Hippo シグナルが関与するか調査するために、Hippo シグナルの下流で働く遺伝子 CTGF(connective tissue growth factor)を調査した。この CTGF は actin が重合し、Yap が核内移行する事によって発現が上昇する<sup>[87]</sup>。しかし、thin gel において CTGF mRNA の有意な増加は認められなかった(Fig 5-8)。

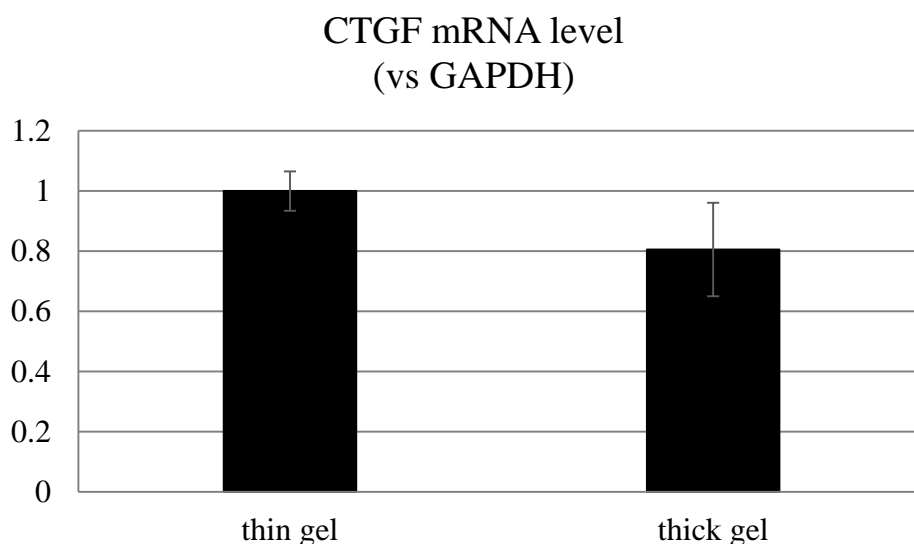


Fig 5-8. CTGF mRNA の発現  
thin=1 とした時の相対量

この事から、Hippo シグナルは本実験系に関与しないという事が示された。現在では actin の脱重合を起点とする他のシグナル伝達経路は知られていないが、actin の脱重合が他の経路によって GSK3 $\beta$  あるいは  $\beta$ -catenin に影響を与え、CK18 の発現を誘導した可能性も今後さらに検討し、本現象を俯瞰的に捉えることが重要である。



#### 5-1-5. collagen gel 上培養 MSC のタンパク質発現

ここでは、二次元電気泳動の結果と Gelsolin による actin 脱重合について考察する。4-2-1 では thin gel 上で培養した MSC のタンパク質と thick gel 上で培養したタンパク質の発現を調査し、比較した。ここから、発現に違いが出たタンパク質を探し、collagen gel 上での CK18 の発現メカニズムの解明の手掛かりにする目的で本実験を行った。その結果、いくつかのタンパク質(スポット)においてスポット強度の違いが確認できた。Fig 5-9 は Fig 4-12 の Merge と同じである。赤で示されたスポットは thin gel で得られたスポットであり、Merge において赤く見えるスポットは thick gel に比べて thin gel での発現量が多かったことを示している。逆に、Merge において緑に見えるスポットは thick gel での発現量が多かったことを示している。Fig 5-9 の青丸(1)で囲まれたスポットは actin である。このスポットでは明らかに thin gel 上での発現量が多い(スポットの体積が大きい、スポットも広がっている)。このことから、thick gel 上では actin が脱重合状態であるだけでなく、actin の発現量自体が thin gel 上に比べて少ないという事を示している。また、青丸(2)で囲まれたスポットの多くは細胞骨格タンパク質 vimentin である<sup>[88]</sup>。これも thin gel 上における発現量が多い。vimentin は間葉系細胞に発現する中間径フィラメントである。このことから、thick gel 上の MSC は間葉系の性質が減少しているという事が示されている。

青丸(3)は Gelsolin である。スポットが緑に見えることから、thick gel での発現量が多い事が明らかである。この事は、Fig 4-14 から明らかである。Gelsolin は重合している actin を切断し、再びその actin が重合しない様にキャッピングするタンパク質である。すなわち、actin の脱重合を促進するタンパク質である。これらのことから、thick gel 上においては gelsolin のタンパク質発現量が増加し、脱重合を誘導、また脱重合状態を維持したと考えられる。

gelsolin が actin に働いたメカニズムとしては、PIP5KI $\gamma$  が考えられる。PIP5KI $\gamma$  は FAK によってリクルートされる。リクルートされた PIP5KI $\gamma$  は PIP<sub>2</sub>を生成し、PIP<sub>2</sub>は Gelsolin のキャッピングを阻害する<sup>[89]</sup>。Gelsolin のキャッピングが阻害されると actin の重合が起こる。thick gel において、integrin の発現量が減少した事(4-1-3)と合わせると、FAK の活性が減少し、これらのメカニズムが影響せずに actin の脱重合が起こったと考えられる。しかし、gelsolin 自体の発現量がこのメカニズムの際に調節されるかは明らかでないため、今後 gelsolin の発現メカニズムに関する調査が必要である<sup>[89]</sup>。



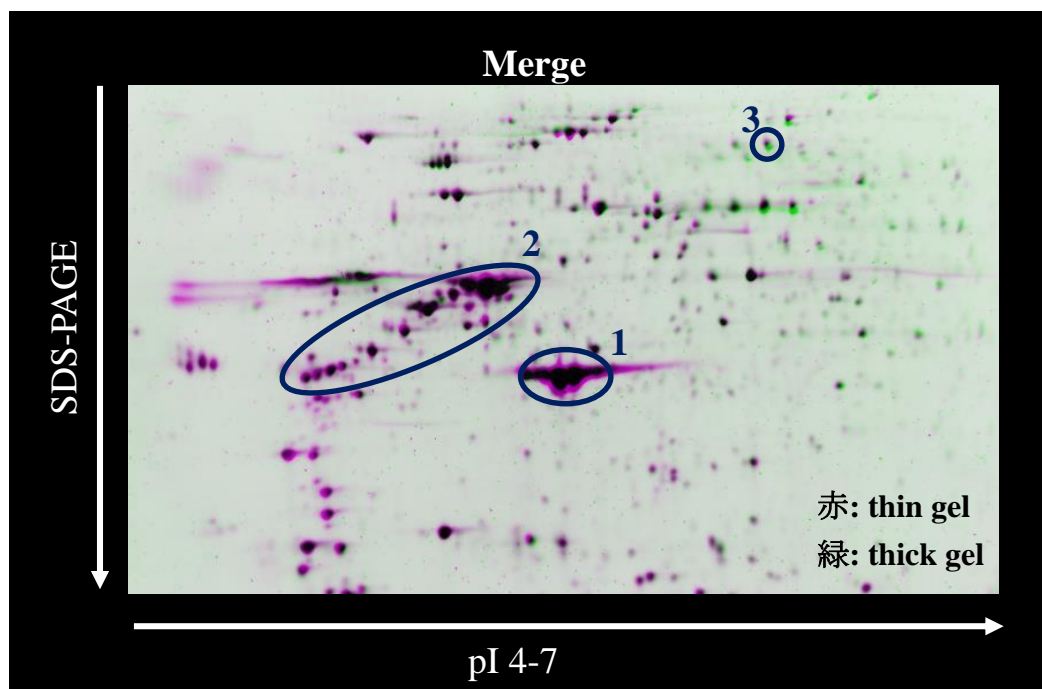


Fig 5-9. thin gel, thick gel 上で培養した MSC のタンパク質のスポット

#### 5-1-6. CK18 の発現メカニズム(まとめ)

これまでの考察をふまえて actin 脱重合と CK18 の発現メカニズムの仮説を Fig 5-10 にまとめた。thin gel 上(Fig 5-10 左)では integrin の発現が増加し、ILK によりそのシグナルが伝達される。ILK によって Src, cofilin がリン酸化され actin の重合が起こる。また、ILK は AKT, GSK3 $\beta$  もリン酸化する事で wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを促進する。またこの時、actin の脱重合を起点とするシグナルが GSK3 $\beta$  のリン酸化や wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性を誘導し、CK18 の発現を抑制している。一方、thick gel 上(Fig 5-10 右)では integrin の発現が減少し、ILK からのシグナルが減少する。これにより、Src, cofilin のリン酸化が抑制され actin の脱重合が起こる。さらに、gelsolin による actin 脱重合機構も存在する。また、ILK からのシグナルの減少により AKT, GSK3 $\beta$  のリン酸化が抑制され、wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの抑制が起こる。これにより、CK18 の発現が誘導されたと考えられる。

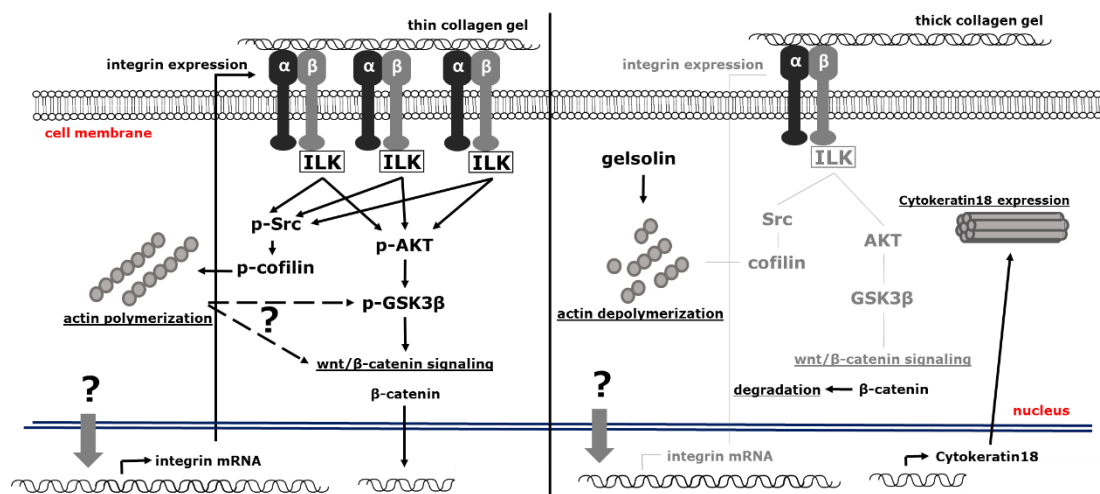


Fig 5-10. collagen gel 上における actin 脱重合と CK18 の発現メカニズムの仮説  
左が thin gel 上、右が thick gel 上

以上から、本研究により collagen gel 上の MSC の actin 脱重合と CK18 の発現メカニズムを一連のシグナル伝達の流れとして仮説を立案するに至った。しかし、未だ不明な点も多い。ここからは、本仮説の信頼性をさらに高めるために不明な点・今後の課題について記す。

#### ①elastin gel 上との違い

4-1-4 の結果から  $\alpha 1 \beta 1$  integrin、あるいは  $\alpha 1$  integrin と MSC の結合の抑制は actin 脱重合と CK18 の発現を誘導する。しかし、5-1-2 でも示した様に elastin gel 上では  $\alpha 1(\beta 1)$  integrin との結合がないにもかかわらず、actin の脱重合と CK18 の発現が誘導されなかった。これは、elastin gel 上において  $\alpha 1(\beta 1)$  integrin ではない結合が actin の重合を誘導したと考えられる。ここで、細胞のエラスチンレセプターの1つとして  $\alpha v \beta 3$  integrin が知られている<sup>[90]</sup>。また、 $\beta 3$  integrin は ILK に結合する事が知られている<sup>[43]</sup>。この事から、 $\beta 3$  integrin によって actin の重合が誘導された可能性がある。しかし、その他にもエラスチンレセプターとして ERC(elastin receptor complex)や Galectin-3, Lactose-insensitive receptor が存在し、実際にどのようなレセプターが関与するか詳しく調査する必要がある。

#### ②integrin の発現の調節方法

Fig 5-10 に示すように、本仮説ではゲルの厚さによって integrin の発現量が調節される事が、MSC の actin と CK18 の発現を決定する単一の起点としている。しかし、ゲルの厚みがどのように integrin の発現を調節しているかは不明であり、これを

解明する事はゲルの厚みの違いによる CK18 の発現メカニズムの全容解明にさらに近づく事ができる。細胞の形が変化すると、actin の形態(重合状態)が変化し、それが MSC の分化に影響するという報告もある<sup>[50][91]</sup>。本研究室の実験結果から thick gel 上の細胞は thin gel 上の細胞に比べて細胞面積が小さい事が分かっている<sup>[92]</sup>。この事から、それぞれの gel の厚さによって、まず始めに細胞の形が決定し、actin の形態に影響し、それが integrin の発現に影響する可能性も考え、plastic dish 上で cytochalasin D を添加し(細胞の形態を変化させ)integrin mRNA の発現を調査した(Fig 5-11)。その結果、cytochalasin D を添加しても integrin mRNA の発現には影響を与えなかった。

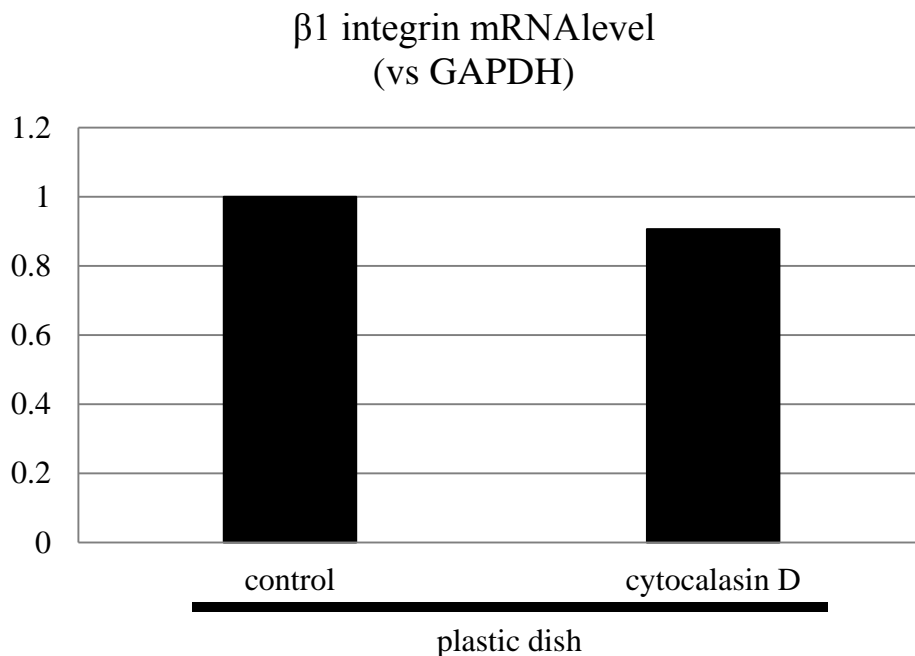


Fig 5-11. cytochalasin D 添加による integrin mRNA の発現

この事から、integrin の発現は actin の重合・脱重合に影響を与えるが、actin の重合・脱重合(細胞形態)は integrin の発現に影響を与えないという事が示された。即ち、細胞の形態は integrin の発現調節を行う因子ではない。この事から、細胞自らが厚さを感じ取り、それによって integrin の発現調節を行ったと考えられる。これは細胞を基質間の界面問題(特に変形を伴う界面形成)であり不明な点が多く、新分野を拓くものであり、今後の重要な課題である。

### ③gelsolin の発現の調整方法

thick gel 上の MSC の actin 脱重合メカニズムの1つとして、4-2-2 で gelsolin の関与を示した。thick gel 上において gelsolin の発現量は増加しており、ゲルの厚さ、または Fig 5-10 で示した仮説中のシグナル、その他の因子など、どの因子がどのように gelsolin の発現量を調節したかは不明であり、これを明らかにすることは今後の重要な課題である。

### ④actin の重合・脱重合が CK18 の発現に関与するメカニズム

4-1-2 の結果から、CK18 の発現は actin の脱重合によっても誘導されるのは明らかである。この機序について、5-1-4 で述べた様に actin の脱重合が Hippo シグナルは介さずに GSK3 $\beta$  あるいは  $\beta$ -catenin に影響を与えた可能性が高いと考えられる。しかし、詳しいメカニズムは不明であり、これを明らかにすることは今後の重要な課題である。

### ⑤wnt/ $\beta$ -catenin シグナルによる CK18 の発現

wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの抑制が MSC の CK18 の発現を誘導する事は明らかとなっているが、詳しいメカニズムは明らかでない。CK18 を発現する際は wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは OFF の状態で  $\beta$ -catenin は分解に向かう。しかし、この状態では  $\beta$ -catenin の核移行によるシグナルは伝達されない。ON の状態であれば核移行によるシグナルは伝達される。このときに、CK18 の発現を抑制する様な仕組みがあるのかもしれない。あるいは、さらに複雑なメカニズムによって CK18 の発現が制御されているのかもしれないが、その様な報告は見られず不明なままであり、これを明らかにすることは今後の重要な課題である。

以上が主な課題である。この様な課題を解決する事で、MSC の上皮分化メカニズムの全容が解明される事を期待したい。

## 5-2. ゲル上培養における間葉系幹細胞の応用

本研究では、collagen gel 上で培養した MSC の CK18 の発現メカニズムの解明を目指した。integrin の発現量、ILK、さらに GSK3 $\beta$  の影響が CK18 の発現に影響を及ぼす事を示した。本研究の最終目標である上皮分化制御技術の確立、また、そのためのメカニズムの全容解明に大きく寄与するものである。しかし、不明な点も多く残っており、更なる研究により詳細な CK18 の発現メカニズムの解明を行う必要がある。さらに、本研究で観察してきた CK18 を発現した MSC は本来の玉石状の上皮細胞とは全く異なる。そのため、より上皮細胞の表現型・形態に近づける必要がある。これについては細胞足場のみによる分化誘導だけでなく液性因子(サイトカイン・化合物)の添加を合わせて行う事により、より効率的な分化誘導が可能であるかもしれない。

本研究では collagen gel の厚さによる CK18 の発現の変化を観察した。ここからも、細胞足場の厚さが MSC のタンパク質発現に寄与する事は明確である。そのため、様々な足場の厚み、足場の種類(ECM)をコントロールする事で CK18 以外のタンパク質の発現を制御する事が期待できる。即ち他の分化も制御する事ができる。これは、生体内の環境を再現している事に他ならず、様々な細胞分化メカニズムの解明の貢献にも期待できる。

## 6. 結論

本研究より、以下の事が明らかとなった。

- ✓ collagen gel 上における MSC の actin 脱重合と CK18 の発現メカニズムが解明された。
  - actin 脱重合と CK18 の発現には integrin の発現が関与する。
  - actin 脱重合と CK18 の発現には ILK(integrin linked kinase)が関与する。
  - CK18 の発現には GSK3 $\beta$  が関与する。
  - actin の脱重合には Gelsolin が関与する。

以下に本研究から明らかとなった collagen gel 上の MSC の actin 脱重合と CK18 の発現メカニズムの概略図を示す(Fig 6-1)。

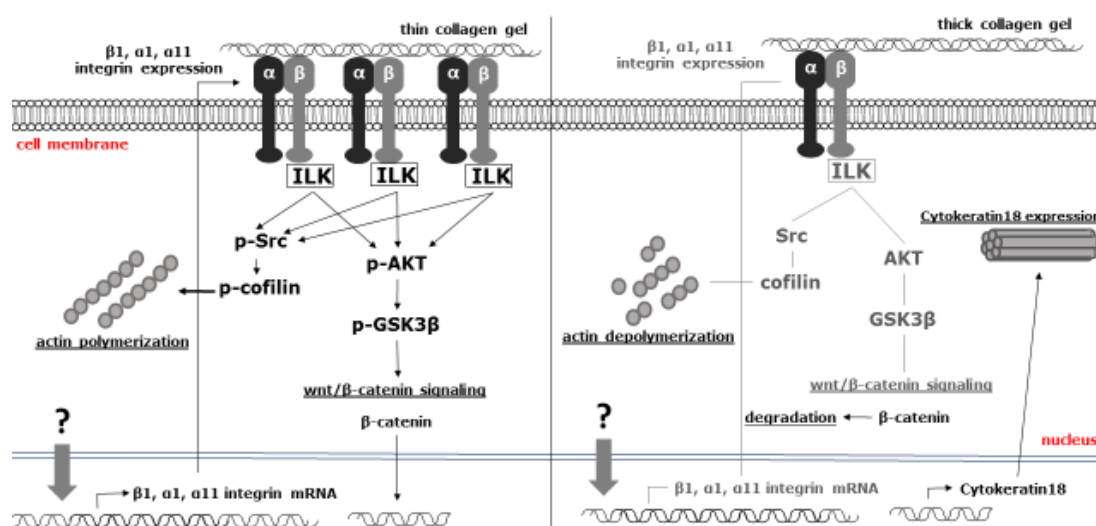


Fig 6-1. actin 脱重合と CK18 の発現メカニズム

thin gel 上(左)では integrin の発現が増加し、ILK によりそのシグナルが伝達される。ILK によって Src, cofilin がリン酸化され actin の重合が起こる。また、ILK は AKT, GSK3 $\beta$  もリン酸化する事で wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを促進する。またこの時、actin の脱重合を起点とするシグナルが GSK3 $\beta$  のリン酸化や wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性を誘導するかもしれない。一方、thick gel 上(右)では integrin の発現が減少し、ILK からのシグナルが減少する。これにより、Src, cofilin のリン酸化が抑制され actin の脱重合が起こる。さらに、gelsolin による actin 脱重合機構も存在する。また、ILK からのシグナルの減少により AKT, GSK3 $\beta$  のリン酸化が抑制され、wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの抑制が起こる。これにより、CK18 の発現が誘導されたと考えられる。

## 7. 参考文献

1. 山中伸弥他: 再生医療叢書1 幹細胞/ 朝倉書店(2012)
2. 室田誠逸: 再生医学・再生医療/ 東京化学同人(2002)
3. 横田崇: 再生医学が分かる/ 羊土社(2002)
4. Kuhn NZ, *et al.* Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* 2009; 222: 268-277.
5. Wang S, *et al.* Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol* 2012; 5: 19-28.
6. Lee OK, *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103(5): 1669-75.
7. Santiago JA, *et al.* Heterogeneous differentiation of human mesenchymal stem cells in response to extended culture in extracellular matrices. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(12): 3911-22.
8. Rowlands AS, *et al.* Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295(4) :C1037-44.
9. Zayzafoon M, *et al.* Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis. *Endocrinology* 2004; 145(5): 2421-32.
10. Huang Y, *et al.* Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 2010;41(7): 497-505.
11. Bosnakovski D, *et al.* Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol* 2004; 32(5): 502-9.
12. Hui TY, *et al.* In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials* 2008; 29(22): 3201-12.
13. Neuhuber B, *et al.* Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol* 2008; 36(9): 1176-85.
14. Engler AJ, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126: 677-89.
15. Engler AJ, *et al.* Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7: 335.



16. Shih YR, *et al.* Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 2011; 26(4): 730-8.
17. Murphy CM, *et al.* Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater* 2012; 11: 53-62.
18. Bruce Alberts, *et al.* molecular biology of the cell third edition/ *Newton Press* (1995)
19. Phinney DG, *et al.* Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* 2007; 25(11): 2896-902.
20. Arnhold S, *et al.* Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4121–4129.
21. Arnhold S, *et al.* Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245: 414–422.
22. Nakagawa H, *et al.* Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol* 2005; 153: 29–36.
23. Fu X, *et al.* Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 325–335.
24. Morigi M, *et al.* Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1794–1804.
25. Herrera MB, *et al.* Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 2004; 14: 1035–1041.
26. Spees JL, *et al.* Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2397–2402.
27. Shi C, *et al.* Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in epithelial differentiation of lung resident mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2014.
28. Brzoska M, *et al.* Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(1): 142-50.

29. Mario Ricciardi, *et al.* Comparison of Epithelial Differentiation and Immune Regulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Human Lung and Bone Marrow. *PLoS One* 7(5): e35639; 2012.
30. Street CA, *et al.* Rho kinase proteins--pleiotropic modulators of cell survival and apoptosis. *Anticancer Res* 2011; 31(11): 3645-57.
31. Goley ED, *et al.* The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(10): 713-26.
32. Pollard TD, *et al.* Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 2009; 326(5957): 1208-12.
33. Kwiatkowski DJ, *et al.* Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(1): 103-8.
34. Sun HQ, *et al.* Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem* 1999; 274(47): 33179-82.
35. Burtnick LD, *et al.* Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing. *EMBO J* 2004; 23(14): 2713-22.
36. Silacci P, *et al.* Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(19-20): 2614-23.
37. Hynes RO, *et al.* Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110(6): 673-87.
38. Barczyk M, *et al.* Integrins. *Cell Tissue Res* 2010; 339(1): 269–280.
39. Luo BH, *et al.* Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 619-47.
40. Popov C, *et al.* Integrins  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 11\beta 1$  regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. *Cell Death Dis* 2011; 2: e186.
41. IISER Pune HP: [http://www.iiserpune.ac.in/~nagaraj/Cell\\_Adhesion.html](http://www.iiserpune.ac.in/~nagaraj/Cell_Adhesion.html)
42. Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003; 15, 116(Pt 8): 1409-16.
43. Wheeler DL, *et al.* The role of Src in solid tumors. *Oncologist* 2009; 14(7): 667-78.
44. Dedhar S, *et al.* Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(2): 250-6.
45. 堀井貴司著: 間葉系幹細胞の増殖・分化に及ぼす Niche の影響/ 平成 23 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文
46. 田野裕美著: 材料表面の物性によるヒト間葉系幹細胞の分化制御/ 平成 24 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文

47. 中町信敏著: ゲルの厚さによる間葉系幹細胞の上皮分化への影響/ 平成 25 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文
48. 杉田夏美著: 細胞外マトリックスによる間葉系幹細胞の上皮分化/ 平成 25 年度三重大学工学部分子素材工学科卒業論文
49. 水本健著: 間葉系幹細胞の未分化・増殖制御技術の開発/ 平成 21 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文
50. Kilian KA, *et al.* Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(11):4872-7.
51. Xu B, *et al.* RhoA/ROCK, cytoskeletal dynamics, and focal adhesion kinase are required for mechanical stretch-induced tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2012; 227(6): 2722-9.
52. Liuliu Pan, *et al.*  $\beta$ 1-Integrin and Integrin Linked Kinase Regulate Astrocytic Differentiation of Neural Stem Cells. *PLoS One* 2014; 9(8): e104335.
53. Lee SL, *et al.* Identification and characterization of a novel integrin-linked kinase inhibitor. *J Med Chem* 2011; 54(18): 6364-74.
54. Gregory CA, *et al.* How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1049: 97-106.
55. Ng CP, *et al.* Interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation and collagen alignment in vitro. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 20): 4731-9.
56. Ravanti L, *et al.* Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1999; 274(4): 2446-55.
57. Adam Byron, *et al.* Anti-integrin monoclonal antibodies. *J Cell Sci* 2009; 122: 4009-4011.
58. Semon JA, *et al.* Integrin expression and integrin-mediated adhesion in vitro of human multipotent stromal cells (MSCs) to endothelial cells from various blood vessels. *Cell Tissue Res* 2010; 341(1): 147-58
59. Inagi R, *et al.* Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: *FEBS Lett* 1999; 463(3): 260-4.
60. Rennian Wang, *et al.* Role for  $\beta$ 1 Integrin and Its Associated  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5, and  $\alpha$ 6 Subunits in Development of the Human Fetal Pancreas. *Diabetes* 2005; 54(7): 2080-9.
61. Primeau M, *et al.* Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 2003;103(2): 177-84.

62. Leong WS, *et al.* Thickness sensing of hMSCs on collagen gel directs stem cell fate. *iochem Biophys Res Commun* 2010; 401(2): 287-92.
63. Park JS, *et al.* The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- $\beta$ . *Biomaterials* 2011; 32(16): 3921-30.
64. 水田裕磨著: 間葉系幹細胞の分化とタンパク質発現に与える足場の厚さの影響/ 平成 24 年度三重大学工学部分子素材工学科卒業論文
65. Du J, *et al.* Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(23): 9466-71.
66. Schober M, *et al.* Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol* 2007; 176(5): 667-80.
67. Fernandez C, *et al.* Regulation of the extracellular ligand binding activity of integrins. *Front Biosci* 1998; 3: d684-700.
68. Hirakawa M, *et al.* Sequential activation of RhoA and FAK/paxillin leads to ATP release and actin reorganization in human endothelium. *J Physiol* 2004; 558(Pt 2): 479-88.
69. Lessey EC, *et al.* From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry* 2012; 51(38): 7420-32.
70. Bamburg JR, *et al.* Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol Rep* 2010; 2: 62.
71. Qian Y, *et al.* ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene* 2005; 24(19): 3154-65.
72. Shafiei MS, *et al.* The function of integrin-linked kinase in normal and activated stellate cells: implications for fibrogenesis in wound healing. *Lab Invest* 2012; 92(2): 305-16
73. McDonald PC, *et al.* Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 19): 3121-32.
74. Salaszyk RM, *et al.* Activation of FAK is necessary for the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on laminin-5. *J Cell Biochem* 2007; 100(2): 499-514.
75. Song SW, *et al.* Integrin-linked kinase is required in hypoxic mesenchymal stem cells for strengthening cell adhesion to ischemic myocardium. *Stem Cells* 2009; 27(6): 1358-65.

76. Docheva D, *et al.* Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *Cell Mol Med* 2007; 11(1): 21-38.
77. Li JJ, *et al.* Osteopontin stimulates vascular smooth muscle cell migration by inducing FAK phosphorylation and ILK dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356(1): 13-9.
78. Lee SL, *et al.* Identification and characterization of a novel integrin-linked kinase inhibitor. *J Med Chem* 2011; 54(18): 6364-74.
79. Seira O, *et al.* Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) at the tip of neuronal development and regeneration. *Mol Neurobiol* 2014; 49(2): 931-44.
80. Minamoto, *et al.* Molecular Targets of CNS Tumors, The Pivotal Roles of GSK3 $\beta$  in Glioma Biology; chapter27 (2011)
81. Wada K, *et al.* Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 2011; 138(18): 3907-14.
82. Wang Y, *et al.* Roles of Wnt/beta-catenin signaling in epithelial differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(4): 1309-14.
83. Zhou AD, *et al.*  $\beta$ -Catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/ $\beta$ -catenin-signaling pathway. *Oncogene* 2012; 31(24).
84. Reddy P, *et al.* Actin cytoskeleton regulates Hippo signaling. *PLoS One* 2013; 8(9): e73763.
85. Mauviel A, *et al.* Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene* 2012; 31(14): 1743-56.
86. Hong W, *et al.* The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23(7): 785-93.
87. Sirio Dupont, *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011; 474: 179-183.
88. 中村雅広著: エラスチン結合タンパクの探索/ 平成 24 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文
89. Chan MW, *et al.* FAK, PIP5K $\gamma$  and gelsolin cooperatively mediate force-induced expression of alpha-smooth muscle actin. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 15): 2769-81.
90. Bax DV, *et al.* Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRK $\alpha$  motif and integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3. *J Biol Chem* 2009; 284(42): 28616-28623.

91. McBeath R, *et al.* Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004; 6(4): 483-95.
92. Takebayashi T, *et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate to epithelial cells when cultured on thick collagen gel. *Biomed Mater Eng* 2013; 23(1-2): 143-53.

## 8.謝辞

本修士論文を執筆するにあたり、時に厳しくも親身になり、適切な助言や懇切丁寧なご指導を賜りました三重大学工学研究科 堀内 孝教授、宮本 啓一准教授に深く感謝申し上げます。

また、実験に使用したヒト間葉系幹細胞を提供していただきました広島大学 加藤幸夫先生、bFGFを提供していただきました科研製薬株式会社、研究室生活を支えていただきました村上 節子さんに深く感謝いたします。さらに、日々の研究室生活を楽しく、明るいものにしてくれた研究室の皆様にも深く感謝いたします。

そして、研究グループの先輩として丁寧なご指導をしていただいた田野 裕美先輩、中町 信敏先輩、また熱心に研究に取り組んで頂いた杉田 夏美さんには大変お世話になり、深く感謝申し上げます。研究グループの一員として何事にも真面目に取り組んで頂いた久保田 捷君、溝口 誠也君には研究に関して不憫をおかけしたにもかかわらず研究グループの支えとなって頂いた事に感謝すると共に、皆さんとグループのますますの発展を願っております。

最後に、3年間ともに研究に励んできた傍嶋 達也君、西町 早織さん、畑 俊宏君、古藏 史子さん、堀江 俊貴君、山口 直也君、山田 将義君に心より感謝するとともに、これからの社会でのご活躍を心より願っております。

平成 27 年 2 月

水田 裕磨