

I型およびIV型コラーゲン再構成会合体上での  
ヒト表皮角化細胞の接着様式と細胞挙動

Human keratinocyte adhesion styles and behaviors  
on the reconstituted type I and type IV collagen gels

藤崎 ひとみ

## 目次

序論	1
第1章 I型コラーゲン線維ゲル上で低濃度カルシウム培地を用いた ヒト表皮角化細胞培養における細胞挙動の解析	8
1.1 緒言	8
1.2 材料と方法	9
1.2.1 細胞ならびに培養基質の調製	9
1.2.2 抗体	10
1.2.3 生細胞と死細胞の測定	10
1.2.4 アポトーシス誘導と分化誘導細胞の解析	11
1.2.5 蛍光免疫染色解析	12
1.2.6 共焦点反射顕微鏡(CRM)観察	12
1.2.7 RNA抽出と RT-PCR	13
1.2.8 ウェスタンブロッティング解析	13
1.2.9 I型コラーゲン線維とラミニン5の相互作用解析	14
1.2.10 生存シグナルの活性化解析	15
1.3 結果	16
1.3.1 細胞形態	16
1.3.2 アポトーシスと分化誘導	16
1.3.3 インテグリンの局在	17
1.3.4 I型コラーゲン線維と接着斑様構造	18
1.3.5 ラミニン5の産生と沈着	19
1.3.6 I型コラーゲン線維とラミニン5の相互作用	20
1.3.7 Aktの活性化	20
1.4 考察	32
1.5 まとめ	34

## 第2章 I型コラーゲン線維ゲル上で高濃度カルシウム培地を用いた

ヒト表皮角化細胞培養における細胞挙動の解析	37
2.1 緒言	37
2.2 材料と方法	39
2.2.1 細胞ならびに培養基質の調製	39
2.2.2 抗体	39
2.2.3 アポトーシス誘導と分化誘導細胞の解析	40
2.2.4 走査型電子顕微鏡観察	41
2.2.5 蛍光免疫染色解析	41
2.2.6 タンパク質リン酸化酵素阻害アッセイ	41
2.2.7 ウェスタンブロッティング解析	42
2.3 結果	43
2.3.1 細胞形態	43
2.3.2 アポトーシスと分化誘導	43
2.3.3 ラミニン5の沈着	43
2.3.4 インテグリンの局在	44
2.3.5 ラミニン5以外の基底膜関連タンパク質の沈着	45
2.3.6 アポトーシス誘導に及ぼすリン酸化酵素阻害剤の作用	45
2.3.7 生存シグナル伝達制御関連タンパク質の活性化	46
2.3.8 接着斑キナーゼの活性化	47
2.4 考察	57
2.5 まとめ	61

## 第3章 IV型コラーゲン網目ゲル上で低濃度カルシウム培地を用いた

ヒト表皮角化細胞培養における細胞挙動の解析	64
3.1 緒言	64
3.2 材料と方法	65

3.2.1	細胞ならびに培養基質の調製	65
3.2.2	抗体	66
3.2.3	走査型電子顕微鏡観察	66
3.2.4	細胞増殖解析	67
3.2.5	アポトーシス誘導の解析	67
3.2.6	蛍光免疫染色解析	68
3.2.7	ウエスタンブロッティング解析	69
3.3	結果	70
3.3.1	細胞形態	70
3.3.2	増殖とアポトーシス誘導	71
3.3.3	分化誘導	71
3.3.4	インテグリンの局在	72
3.3.5	ラミニン5の沈着とインテグリン $\alpha6\beta4$ の発現	73
3.3.6	生存シグナルの活性化	73
3.3.7	接着斑構成成分の活性化	74
3.4	考察	83
3.5	まとめ	87
	総合討論	88
	学位論文要旨	93
	謝辞	95
	参考文献	96



## 略語一覽

BPAG1:bullous pemphigoid antigen 1  
BSA:bovine serum albumin  
CAM-DR:cell adhesion mediated drug resistance  
CD:circular dichroism  
CRM:confocal reflection microscopy  
DABCO:1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane  
DAPI:4',6-diamidino-2-phenylindole  
DDR:discoidin domain receptor  
EDTA:ethylenediaminetetraacetic acid  
EGF:epidermal growth factor  
EGFR:epidermal growth factor receptor  
EGTA:ethylene glycol tetraacetic acid  
Erk1/2:extracellular signal regulated kinase 1/2  
FAK:focal adhesion kinase  
GAPDH:glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
Grb2:growth factor receptor-bound protein 2  
HD:hemidesmosome  
HFFs:human foreskin fibroblasts  
HFKs:human foreskin keratinocytes  
HPV-16:human papillomavirus type 16  
HRP:horseradish peroxidase  
JNK:c-JUN N-terminal kinase  
LAMB3:laminin beta 3 gene (human)  
LAMC2:laminin gamma 2 gene (human)  
LAMA5:laminin alpha 5 gene (human)  
MAPK:mitogen-activated protein kinase

MEK:MAPK/ERK kinase

MMPs:matrix metalloproteinases

mTOR:mammalian target of rapamycin

MTT:methyl thiazolyl tetrazolium

PBS(-):phosphate-buffered saline without magnesium and calcium

PBS-T:PBS(-) with Tween 20

PCR:polymerase chain reaction

PI3K:phosphoinositide 3-kinase

PKB:protein kinase B

PMSF:phenylmethylsulfonyl fluoride

p38:p38 mitogen-activated protein kinase

QCM:quartz crystal microbalance

Ras:rat sarcoma

RT-PCR:reverse transcription polymerase chain reaction

SDS:sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE:sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Shc:sh2-containing sequence

TBS-T:tris buffered saline with Tween 20

TUNEL:TdT-mediated dUTP nick end labeling

## 学位論文を構成する論文

1. Fujisaki H., Hattori S. Keratinocyte apoptosis on type I collagen gel caused by lack of laminin 5/10/11 deposition and Akt signaling. *Exp. Cell Res.* 2002; 280 (2): 255-269.
2. Fujisaki H., Ebihara T., Irie S., Kobayashi T., Adachi E., Mochitate K., Hattori S. Keratinocyte apoptosis on type I collagen fibrils is prevented by Erk1/2 activation under high calcium condition. *Connect. Tissue Res.* 2007; 48 (3): 159-169.
3. Fujisaki H., Adachi E., Hattori S. Keratinocyte differentiation and proliferation are regulated by adhesion to the three-dimensional meshwork structure of type IV collagen. *Connect. Tissue Res.* 2008; 49 (6): 426-436.

## 序論

ヒト皮膚は生体と外界との境界組織で、複数の機能を担っている。皮膚は紫外線による刺激や物理的な力など外部刺激に対するバリア機能と、逆に皮脂や水分の体内からの排出調節機能、また温度感知や痛覚などの感覚機能も兼ね備える重要な器官である。皮膚構造は複雑な積層構造で体表面から表皮層、真皮層、皮下組織に分類され、それぞれの層が特徴的な細胞と細胞外マトリクスにより構成され、細胞と細胞外マトリクスは相関して各層を形成する。また、各層間も相関関係にあり、複合的に皮膚の正常な機能の恒常性を保つ。表皮層は大部分が分化状態の異なる表皮角化細胞の層(体表側から角層(角質層)、顆粒層、有棘層、基底層)で形成されている。残りの約5%は色素細胞(メラニン細胞)、免疫細胞(ランゲルハンス細胞)などである。皮膚の模式図を図1Aに示す。表皮角化細胞は、基底層の細胞が分裂することで増殖し、基底膜から離れるにつれて分化(角化)が進行し、特徴的な分化マーカーを発現する。たとえば、インボルクリンおよびロリクリンは、有棘層上層から顆粒層にかけて発現している。表皮角化細胞は、稠密な細胞-細胞間接着を維持しながら分化を続け、角層では核を失いながら生体防御壁として機能し、最終的には死んで生体から剥離脱落する。表皮層は、常に変化を続ける動的で複雑な、興味深い組織である。真皮層は、I型コラーゲンやIII型コラーゲンを主とした線維性コラーゲン会合体と線維芽細胞等の細胞から構成される。真皮層の構成タンパク質の70%がコラーゲンといわれ、他にエラスチン、ヒアルロン酸等からなる線維性結合組織で構成される。表皮は外胚葉組織由来で、真皮は中胚葉組織由来である。皮膚表皮層と真皮層をつなぎ止める薄い膜状構造が基底膜であり、主にIV型コラーゲン、ラミニン、ナイドジェン、パールカン等の細胞外マトリクス成分で構成される。基底膜は非常に薄く微量なため、成分の単離、精製が困難で、そのため形態学的な手法(電子顕微鏡観察)から研究が始まった。透過型電子顕微鏡下で、基底膜は通常細胞膜のすぐ外の電子密度の低い明るい層(透明層: lamina lucida、またはlamina rara)を介して、厚さ40~70 nmの電子密度の高い連続した層(基板: basal lamina、または緻密層: lamina densa)が観察される。さらに、緻密層の外側、結合組織に溶け込んでいく部分を線維細網板(lamina fibroreticularis)と呼

ぶ。線維細網板は主にIII型およびV型コラーゲンで構成される[1]。また、ラミニンは透明層に、IV型コラーゲンおよびパールカンは緻密層の領域に存在すると推定される。線維細網板のコラーゲン線維と基底板はVII型コラーゲンからなるアンカリングフィブリルによって結合している。一方、表皮角化細胞と基底板は、ヘミデスモソーム（半接着斑、hemidesmosome）とそれに結合するアンカリングフィラメントと呼ばれる微細な線維状構造によって結びついている。ヘミデスモソームは、プレクチン、BPAG1/BP230と細胞膜を貫通しているインテグリン $\alpha 6\beta 4$ 、XVII型コラーゲン/BPAG2/BP180等で構成される[2]。ヘミデスモソームから表皮基底膜にいたる構造の模式図を図1Bに示す。

ラミニンは多細胞生物の組織構築とその維持、細胞接着、細胞移動、細胞増殖に関与するヘテロ三量体の細胞外マトリクス成分で、少なくとも12種類が報告されている[3-8]。ラミニン5（ラミニン5は $\alpha 3$ 鎖、 $\beta 3$ 鎖、 $\gamma 2$ 鎖で構成されており2005年にラミニン332と改称された[9]が現在も両方の名称が使用されており、また本論文を構成する論文においてもラミニン5を使用しているため、本学位論文ではラミニン5と記載する。）は、アンカリングフィラメント構成成分で、表皮と真皮の結合に必須である。ラミニン5は健全な皮膚の維持のために重要な役割を果たしており、ラミニン $\alpha 3$ 鎖欠損マウスは新生児致死である[10]。遺伝子操作によりラミニン5を欠損すると、表皮-真皮間の接着が脆弱化し、水疱が生じる先天性皮膚水疱症を発症する。ラミニン10/11はラミニン5同様、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ によって認識される[5、11、12]。

コラーゲンは、脊椎動物の真皮、腱、骨や軟骨などを構成する主な細胞外マトリクス成分である。体内のコラーゲン総量は、ヒトでは全タンパク質のほぼ30%を占め、広い範囲に分布している。哺乳類のコラーゲンは28種類以上報告されており、スーパーファミリーを形成している[13]。I型コラーゲンは棒状タンパク質で、代表的線維性コラーゲンである。分子は3本のポリペプチド鎖がらせん構造を形成しており、分子の大きさは約300 nm、太さは約1.5 nmである[14]。生体内ではI型コラーゲン分子は三重らせん領域同士が規則的に相互作用した線維を形成し、さらに線維同士が線維束を形成している。線維芽細胞をはじめとする真皮層の細胞は、コラーゲン線維束間に空間的に配置されている。I型コラーゲン線維は走査型電子顕微鏡で明瞭に観察す

ることができ、太さは通常、数十～百数十 nm 程度である。I 型コラーゲンの線維束は培養系で自律的に再構成され、ゲル化が可能である。I 型コラーゲンは生体内では線維を形成しているため、再構成 I 型コラーゲンゲルは生体に近い三次元培養基材として用いられる [15]。I 型コラーゲンを細胞培養に用いる場合は、4 °C、酸性条件で薄く培養容器に処理する方法と、37 °C、中性の生理的条件で処理してゲルを形成させる方法がある [16]。

IV 型コラーゲンは主に基底膜を構成する非線維性コラーゲンである。IV 型コラーゲン分子は三本鎖らせん構造をとるが I 型コラーゲン分子とは異なり、C 末端側に NC1 ドメイン、N 末端側に 7S ドメインと名付けられたシステイン残基に富む非らせん領域があり、中央部にはらせん領域には 20 ヶ所以上らせん構造の中断がある。IV 型コラーゲンは I 型コラーゲンよりも大きく全長約 400 nm である [17]。分子の中央部に存在するらせん領域には、立体構造依存的にインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  が認識するアミノ酸配列が複数箇所ある [17]。このため、IV 型コラーゲンは細胞培養の基材として様々な細胞の接着性を亢進する。この特徴は I 型コラーゲンと共通である。またコラーゲンを精製する際、酵素処理を行うとコラーゲンが限定的に分解され非らせん領域が切断される。一方、酸抽出を行った場合は、非らせん領域は保持される [18-20]。非らせん領域を保持した IV 型コラーゲンは、*in vitro* で自律的に非らせん領域を介して自己会合し、生体組織で観察される形に近い会合体を再構成することが報告されている [19、20]。IV 型コラーゲン会合体は微細な網目構造を形成し上皮細胞接着の足場になる。会合体の網目構造は微細なため、走査型電子顕微鏡では観察することができない。会合の形式は I 型と IV 型で異なり、I 型コラーゲンはらせん部分が相互作用して棒状のまま平行に会合し線維を形成、さらに線維同士が集合して束となり立体的に会合した構造を形成しているが、IV 型コラーゲンの相互作用は NC1-NC1、7S-7S、らせん領域同士、らせん領域-NC1 間でおこることが報告されており、その結果 IV 型コラーゲン分子は複雑に連結され重なり合い、細密な網目構造を形成するといわれている [21-23]。IV 型コラーゲン再構成会合体はゲルを形成することが可能で、I 型コラーゲン同様に三次元培養基材として活用可能である [24]。しかし上述のように I 型とは分子の形状や会合体形成様式が異なり、ゲルとしての物性、性質は異なる。I 型コラー

ゲン会合体に比べて IV 型コラーゲン会合体は実験系での会合体形成の報告が新しく、その調製が困難なため培養基材としての報告は少なく、表皮角化細胞の培養例はほとんど報告がない。

I 型コラーゲンおよび IV 型コラーゲンの細胞接着の足場としての性質は、会合体形成により、(1)インテグリンに伝達される力学的情報が変化する、(2)立体的に形成された会合体は細胞外マトリクス成分や成長因子のリザーバーとして働き、濃度勾配が形成される等、接着足場としての性質が変化するといわれている [24]。会合体は立体的に形成されるので、コラーゲン分子の表面にある細胞認識配列が覆い隠される可能性も示唆される。I 型コラーゲン会合体や IV 型コラーゲン会合体を培養基質として用いる場合、細胞によってはコラーゲン分子上で培養したときとは増殖制御や分化誘導など重要な細胞挙動が全く異なる場合があるが、影響の種類や程度、その作用機序等の詳細は不明な点が多い。一般に培養系で I 型および IV 型コラーゲン分子は、細胞接着を促進する細胞外マトリクス成分である。細胞外マトリクス成分と相互作用する各種細胞接着受容体として、インテグリン、シンデカン、DDR (discoïdin domain receptor) 等が知られている。なかでもインテグリンは大きな役割を果たし、コラーゲン分子はインテグリンが認識するアミノ酸配列を複数有している。そのためインテグリンを発現している細胞は、培養系においてコラーゲン分子を塗布した培養容器を用いると未処理の培養容器より短時間に、大量に、伸展した形で接着する。インテグリンは細胞膜貫通タンパク質で、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖から構成されるヘテロ二量体である。 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の組み合わせはある程度固定的で、 $\alpha$  鎖は特異的な細胞外マトリクス成分を認識する。たとえばコラーゲン受容体とされるインテグリンは  $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 10\beta 1$ 、 $\alpha 11\beta 1$  で、ラミニン受容体としては  $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$  等が報告されている [25]。インテグリンは接着分子としての機能の他、免疫系細胞の分化マーカーとしても知られている [25]。培養系では接着斑 (focal adhesion) が形成され、パキシリンやビンキュリン等の接着斑構成タンパク質が集積し、構成タンパク質のリン酸化等によりシグナルが伝達される。接着した細胞は周囲の環境に応じて細胞機能を制御するが、そのためには外部から情報を取り入れ、また細胞内部から周囲の環境に情報を伝える必要がある。この情報伝達機構をシグナル伝達機構と称し、通常、様々なシグナル分子によって担われて

いる。

表皮角化細胞の培養法には 3T3 細胞をフィーダー細胞として用いる方法をはじめ、多数の報告がある。無血清培地を用いた培養法は 1983 年 Ham らにより報告され [26]、改良が重ねられた。この方法はフィーダー細胞が必要なく、分化誘導の調節が容易なため、表皮角化細胞の挙動解析に適している。培地含有カルシウム濃度が 30  $\mu\text{M}$  であることが特徴の一つで、この条件では細胞は単層で増殖しデスモソームは形成されず、角化も抑制される。カルシウム濃度を 1 mM 以上にすると分化マーカーの発現が誘導され（角化し）分裂能が失われる [26]。

I 型あるいは IV 型コラーゲン分子を薄く塗布した培養容器を用いて、表皮角化細胞培養しただけでは基底膜構造を伴う皮膚様構造は形成されない。すなわち表皮角化細胞は、自ら産生した細胞外マトリクス成分を用いて細胞周囲の微小環境を構築するが、表皮角化細胞だけでは基底膜構造を構成する細胞外マトリクス成分の十分な産生、および構造の構築ができない、ということを示唆している。一方、線維芽細胞を内包した I 型コラーゲン線維ゲル上で、表皮角化細胞を気相-液相境界で培養する（フローティングラフト法）三次元皮膚モデルの作成例は多い [27、28]。二次元の培養系では形成されず、フローティングラフト法で基底膜様構造が形成されるという結果から、I 型コラーゲン線維ゲルへの接着が皮膚様構造形成に必須であることが示唆される。しかしフローティングラフト法では足場以外にも多くの要素が関与しており、たとえば線維芽細胞の役割はコラーゲン線維ゲルの収縮と I 型コラーゲン産生、表皮角化細胞に作用する成長因子、増殖因子産生促進と多岐にわたるため、皮膚様構造が形成される際、I 型コラーゲン線維が表皮角化細胞に及ぼす影響はいまだあきらかではない。

そこで本研究は I 型コラーゲン会合体が表皮角化細胞の培養に果たす役割を解明するために、ヒト表皮角化細胞（HFKs）を単独で I 型コラーゲン会合体上で培養し、細胞挙動、形成される微小環境を解析することを目的とした。さらに HFKs は生体では基底膜に接着して生育しているため、IV 型コラーゲン会合体上での培養は I 型コラーゲン線維ゲルを用いた場合よりも健常な生体条件に近いことが考えられる。そこで IV 型コラーゲン会合体上での接着や、細胞挙動について検討し I 型コラーゲン会合体との差違を比較しコラーゲン会合体の役割を解明することにした。特に接着様式に着目

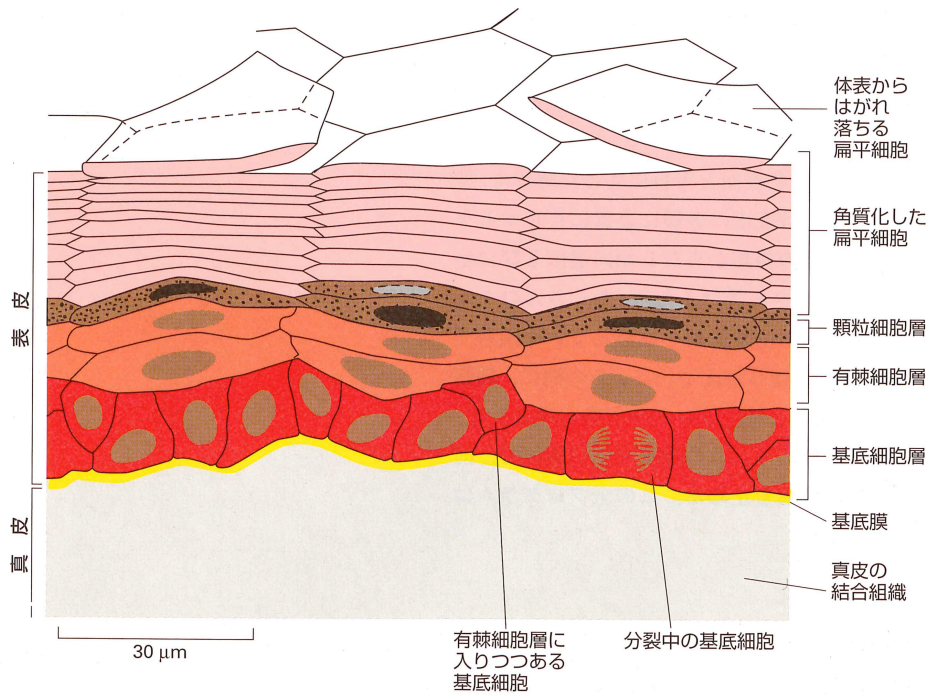


し、生存やアポトーシスの回避、分化誘導との相関性を検討した。第1章ではI型コラーゲン線維ゲル上で低カルシウム濃度培地を用いて培養したHFKsに、アポトーシスが惹起される現象の原因の解明、第2章では、第1章での知見を踏まえてHFKsの生存する条件を模索し、HFKsのゲルへの接着と生存の相関性を調べた。第3章では、基底膜様培養基質であるIV型コラーゲン網目ゲル上で、HFKsを低カルシウム濃度培地で培養しI型コラーゲン線維ゲル上での培養と生存や分化状態を比較し、IV型コラーゲン網目ゲルの培養基質としての特徴を調べることを目的とした。

再生医療や薬剤研究のためにさまざまな方法で人工皮膚モデルが作製、実用化されているが、通常、作製工程は煩雑で時間も長く必要である。より簡便な方法で作製できる高機能の人工皮膚の開発は、社会に広く貢献する技術と考えられる。I型コラーゲンは培養基材として既に広く用いられており、再生医療基材として大きな期待が寄せられているが、長期の細胞培養に関するI型コラーゲンが果たす役割は不明の点も残されている。またIV型コラーゲン会合体を培養基材とする研究は事例が少なく、取扱い方法や会合体形成法には研究の余地が残されており、今後非常に興味深い培養基材となる可能性がある。

細胞がI型あるいはIV型コラーゲン会合体への接着する際の経時的な接着様式の変化、およびその後に引き起こされる細胞挙動の解析は、コラーゲン会合体を用いた培養研究にとって有用であると考え、本研究を行った。

A



B

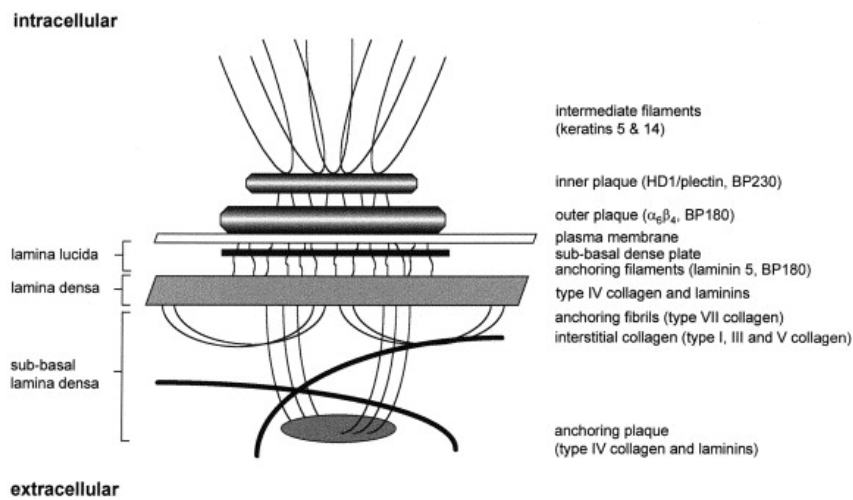


図1 皮膚ならびに表皮・真皮結合部領域の模式図

A 皮膚模式図 細胞の分子生物学 第4版 (2002) p1261 Fig. 22-2 より引用。

B ヘミデスモソームから表皮基底膜にかけての構造の模式図

Nievers, M.G., Schaapveld, R.Q., Sonnenberg, 1999. Matrix Biology 18: 5-17. Fig. 1 より引用。

# 第 1 章 I 型コラーゲン線維ゲル上で低濃度カルシウム培地を用いた ヒト表皮角化細胞培養における細胞挙動の解析

## 1.1 緒言

生体および培養系において、細胞は周囲の細胞外マトリクスから大きな影響を受けて、その挙動を決定する。I 型コラーゲン分子は HFKs を含む多くの細胞にとって、接着、伸展を促進する培養基材である[14、15]。細胞は I 型コラーゲンに接着することで、生存に関与するシグナル伝達経路が活性化し、アポトーシスが回避され、増殖が始まる。I 型コラーゲンは生体内で線維を構成しているが、実験系でも生体から精製した I 型コラーゲン分子を用いて、生体内と似た線維構造を再構成することが可能で、細胞培養に用いられている[16、31-33]。線維芽細胞の増殖や成長因子への応答、およびコラーゲン合成は、I 型コラーゲン分子上培養とゲル内培養では異なる[31、34]。さらに線維芽細胞自身によりコラーゲン線維ゲルが収縮した後には増殖や成長因子への応答反応がさらに低下する[34]。本研究では実験に用いた再構成 I 型コラーゲン会合体(1 mg/mL)を、I 型コラーゲン線維ゲルと称することとする。

HFKs は健全な皮膚では I 型コラーゲン線維に接することはない[1]。しかし表皮の一部が欠失して真皮に到達する重篤な創傷時には、HFKs は真皮部分に遊走して増殖し、基底膜を再生することが知られている。創傷治癒のモデルとして HFKs を I 型コラーゲン分子上で培養すると、培養初期には HFKs は接着斑を形成し、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  が接着斑に集積する[29、35]。その後、細胞はラミニン 5 を産生し、産生したラミニン 5 は培養皿に吸着する。沈着したラミニン 5 に接着するために、インテグリンは  $\alpha 3\beta 1$  あるいは  $\alpha 6\beta 4$  が接着斑に集積するようになり、細胞は増殖を維持する[29、30、36]。ラミニン 5 は HFKs の接着と細胞移動の両方を促進する[37]。ラミニン 5 は I 型コラーゲン分子および XII 型、XIV 型コラーゲン分子とは直接結合しない[38]。

インテグリンを介した接着は増殖、分化、アポトーシスといった細胞の運命に大きな影響を及ぼす。上皮細胞は細胞外マトリクスとの接着が失われると、接着不全のためアノイキスと呼ばれるアポトーシスを引き起こす[39]。細胞外マトリクスとの接着によりインテグリンが活性化することで、アポトーシス誘導因子が抑制され、アポト

ーシス抑制因子の働きが促進される[40]。

本章では、I型コラーゲン線維ゲル上で HFKs を低カルシウム濃度培地で培養したところ、はじめはインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  で接着伸展するが、やがて接着を維持できなくなりアポトーシスが誘導する現象をもとに解析を進めた。I型コラーゲン線維ゲル上でいったん形成された後に経時的に失われた接着様式と I型コラーゲン分子上での接着様式を比較し、細胞死が誘導される原因を探究した。I型コラーゲン溶液は2通りの方法で培養容器に塗布した。分子状に塗布するために、I型コラーゲン溶液(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を室温で2時間静置した。この条件ではI型コラーゲン線維形成が観察されず、HFKsの接着、伸展を促進することが報告されている[16]。I型コラーゲン線維ゲルのために、I型コラーゲン溶液を1  $\text{mg}/\text{mL}$ 濃度で中和し、培養容器に分注した後、37  $^{\circ}\text{C}$ に温度調節した  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で2時間、静置した。この条件ではI型コラーゲンはゲル状になる[16]。

## 1.2 材料と方法

### 1.2.1 細胞ならびに培養基質の調製

ヒト新生児包皮は Fred Hutchinson Cancer Research (Seattle, WA) 関連病院より入手した。新生児包皮より HFKs を Boyce and Ham の方法[26]をもとにした Carter らの方法[30, 35]に従って調製し、表皮角化細胞無血清培地 K110 Type II(極東製薬工業株式会社、東京、日本)を用いて培養した。HPV-16 導入で不死化した新生児包皮表皮角化細胞株である FEPE1L-8 細胞は、Dr. W. G. Carter (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA)から供与され、HFKs 同様に K110 Type II 培地を用いて培養した。ヒト包皮線維芽細胞(HFF)は新生児包皮よりコラーゲナーゼを用いて調製し、10%牛胎児血清含有 RPMI-1640 培地 (Sigma, St Louis, USA) 培地で培養を維持した。

I型コラーゲンは 新生仔牛皮膚より 0.5 M 酢酸を用いる Kleinman らの方法[15]で調製し、1 mM 塩酸に置換した I型コラーゲン溶液を用いた。培養容器に I型コラーゲンを分子状に塗布するために、I型コラーゲン溶液(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を室温で2時間静置した後、PBS(-)で洗浄した。I型コラーゲンを線維状に塗布するために、I型コラーゲン溶液を中性条件 1  $\text{mg}/\text{mL}$  で培養容器に分注した後、37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  インキュベーター

内で2時間、静置した。

### 1.2.2 抗体

免疫組織学的実験のため、以下の抗体を入手、使用した。

抗ヒトインボルクリン-ウサギポリクローナル抗体は Biogenesis Ltd. (UK)より、抗ヒトビンキュリン-マウスモノクローナル抗体は ICN Biomedicals, Inc. (OH, USA)より、抗ヒトエピライグリン(ラミニン5)-マウスモノクローナル抗体と抗ヒトラミニン( $\alpha 5$ 鎖)-マウスモノクローナル抗体は Chemicon International, Inc. (CA, USA)より購入した。抗ヒトインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -マウスモノクローナル抗体、P4B4 および抗ヒトインテグリン $\alpha 3\beta 1$ -マウスモノクローナル抗体、P1F2はDr. W. G. Carter (Fred Hutchinson Cancer Research Center)より供与された。抗ヒトラミニン $\alpha 3$ 鎖C末端-ヤギポリクローナル抗体、C-19 は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)より購入した。抗ヒトAkt-ウサギポリクローナル抗体 および 抗ヒトphospho-Akt (Ser473)-ウサギポリクローナル抗体はNew England Biolabs, Inc. (NE)より購入した。抗ウシI型コラーゲン抗体は LSL (日本)より購入して使用した。

### 1.2.3 生細胞と死細胞の測定

HFKs、FEPE1L-8、HFFsそれぞれの細胞をI型コラーゲン分子と線維ゲル上で培養し生細胞数と死細胞数をトリパンブルー染色法で計測した。生細胞は細胞膜の低分子透過性が低く染色されないが、死細胞は細胞膜の完全性が失われ透過性が上がるためトリパンブルー色素で染色されるようになる。細胞播種前に 24-well plate を前述(1.2.1)の方法で処理して、I型コラーゲン分子、線維ゲルを調製した。未処理の培養容器、I型コラーゲン分子およびI型コラーゲン線維ゲル上に、HFKs ( $2 \times 10^4$  cells/well)、FEPE1L-8( $1 \times 10^4$  cells/well)を K110 type II 培地に懸濁して播種し、9日間CO<sub>2</sub>濃度5%、37℃で培養した。HFFs( $2 \times 10^4$  cells/well)は10%牛胎児血清含有RPMI-1640培地を使用し8日間培養した。未処理の培養容器およびI型コラーゲン分子上で1日、3日、5日、7日、9日培養した時点で、0.02% EDTAを含む0.05%トリプシンを37℃、5分間処理して細胞を回収し、100  $\mu$ Lの培地に再懸濁した。同

量の 0.15 % トリパンブルー（和光純薬）を加えて位相差顕微鏡下で細胞を観察し、非染色細胞数（生細胞）と染色細胞（死細胞）を計数した。I 型コラーゲン線維ゲル上培養の細胞は培養後、培地を除去した後、0.1 % コラーゲナーゼ溶液（CLS1、Worthington, NJ）で 37 °C、2 分処理し細胞を回収した後、同様にトリパンブルー染色し、各細胞数を計測した。

#### 1.2.4 アポトーシス誘導と分化誘導細胞の解析

DNA 断片化を検出する TUNEL 法でアポトーシス誘導を定量した [41、42]。細胞播種前に、12-well heavy Teflon-coated slides (Thermo Fisher Scientific Inc.) を上述 (1.2.1) の方法でコラーゲン溶液を処理し、I 型コラーゲン分子でコートされたスライド、I 型コラーゲン線維ゲルでコートされたスライドを調製した。HFKs、FEPE1L-8 ( $5 \times 10^3$  cells/well) 細胞を基質上に播種し、HFKs は 4 時間、1 日、2 日間、4 日間培養し、FEPE1L-8 細胞は 1 日、4 日間、8 日間培養した後 2 %ホルムアルデヒド溶液を添加し、室温で 20 分間静置してタンパク質を固定した。その後 1 % trironX-100 溶液を添加し室温で 2 分間処理した。PBS(-)で細胞を洗浄した後、1 % BSA 溶液で室温、1 時間ブロッキング処理した後、DNA 鎖の分解断片を定量キット In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein kit (Roche Diagnostics GmbH、Mannheim、Germany) を用いて fluorescein-conjugated deoxyuridine 5'-triphosphate and terminal deoxynucleotidyl transferase で標識した。蛍光顕微鏡下で観察し、染色された細胞をアポトーシス誘導細胞とした。同時に DAPI (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA) (1 % BSA 溶液にて 500 倍に希釈)を添加して、細胞核を染色し、蛍光顕微鏡下で観察、計数しこれを全細胞数とした。各条件で総細胞数 500~1000 細胞となるように代表的な染色像を示す視野を観察した。TUNEL 陽性細胞数を DAPI 陽性細胞数で除算して百分率を計算し、アポトーシス誘導率とした。

細胞の分化を分化マーカーであるインボルクリンの発現で測定した。TUNEL法の場合と同様に細胞播種前に、12-well heavy Teflon-coated slidesを上述の方法でI型コラーゲン溶液を用いて処理し、I型コラーゲン分子でコートされたスライド、I型コラーゲン線維ゲルでコートされたスライドを調製した。HFKs、FEPE1L-8 ( $5 \times 10^3$  cells/well)

細胞を基質上に播種し、HFKsは4時間、1日、2日間、4日間培養し、FEPE1L-8細胞は1日、4日間、8日間培養した。その後2%ホルムアルデヒド溶液を用いて室温20分処理して、タンパク質を固定し、1% Triron X-100溶液で2分間処理をした。PBS(-)で細胞を洗浄し、1% BSA溶液で室温、1時間処理した後、抗インボルクリン抗体、およびDAPI (1% BSA溶液にて500倍に希釈)を用いて染色し、蛍光顕微鏡下で観察、染色された細胞数を計数した。インボルクリン陽性細胞数をDAPI陽性細胞数で除算して百分率を計算し、分化誘導率とした。

#### 1.2.5 蛍光免疫染色解析

細胞播種前に、12-well heavy Teflon-coated slidesを上述の方法でI型コラーゲン溶液を用いて処理し、I型コラーゲン分子でコートされたスライド、I型コラーゲン線維ゲルでコートされたスライドを調製した。HFKs ( $5 \times 10^3$  cells/well)を基質上に播種し、4時間、1日、2日間、培養した後、2%ホルムアルデヒド溶液を室温で20分間処理して固定し、1% Triron X-100溶液を用いて2分間透過処理をした。PBS(-)で細胞を洗浄し、1% BSA溶液で室温、1時間ブロッキング処理した後、各抗体を室温で4時間静置処理し、PBS-Tで洗浄後にAlexaFluor488標識抗体を室温で1時間、静置処理したのちPBS-Tで洗浄して余剰の抗体を洗い流し、DABCO (1,4-diazabicyclo-[2.2.2] octane, Sigma Chemical Co.) (2.5 mg/mL) 溶液を用いて封入、共焦点レーザー顕微鏡LSM 410 system Plan-Apochromat 63/1.40 Oil (Zeiss, Jena, Germany)を用いて観察、撮影した。

#### 1.2.6 共焦点反射顕微鏡(CRM)観察

I型コラーゲン線維ゲル上で培養したHFKsを固定し、細胞の免疫染色の観察を行った。同時にI型コラーゲン線維をconfocal reflection microscopy (CRM) 法により観察し、撮影した[43]。試料調製は前述の免疫染色解析 (1.2.5) に準じた。まず12-well heavy Teflon-coated slides上に調製したI型コラーゲン線維ゲル上でHFKsを4時間培養した。その後、2%ホルマリンで固定し、透過処理を行い、抗ビンキュリン抗体、抗インテグリン $\alpha 2\beta 1$ 抗体、抗インテグリン $\alpha 3\beta 1$ 抗体を用いて染色した。各試料を共焦点レーザー顕微鏡LSM 410 systemを用いて接着斑成分を免疫化学的に観察すると同時に、515 nm

の光学フィルターを除去して反射光の画像を取得し、細胞の足場となるI型コラーゲン線維の形状を評価した。

### 1.2.7 RNA抽出とRT-PCR

I型コラーゲン分子上で2日間培養したHFKs ( $6 \times 10^5$  cells/well) をPBS(-)で洗浄した後、細胞層をかき取り回収した。またI型コラーゲン線維ゲル上で2日間培養したHFKs ( $4 \times 10^5$  cells/well) をPBS(-)で洗浄した後、線維ゲルごと回収し、RNeasy Mini kit (Qiagen、Germany)を用いてtotal RNAを抽出した。I型コラーゲン分子上培養試料からは4  $\mu$ g、I型コラーゲン線維ゲル上培養試料からは0.4  $\mu$ gのtotal RNAを回収した。それぞれ100 ngのtotal RNAを用いてcDNAに逆転写し、Ready-To-Go reverse transcriptase-polymerase chain reaction beads (Amersham Pharmacia Biotech、USA)を定法通りに用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った[44]。ラミニン5に対してラミニン $\beta$ 3鎖、ラミニン $\gamma$ 3鎖の2種類のPCRを行った。用いたプライマーを以下に記す。

*LAMB3-F* : 5'-TGAGGTTTCAGCAGGTAAGTGC-3'

*LAMB3-R* : 5'-TAACTGTCCCATTTGGCTCAG-3'

*LAMC2-F* : 5'-CTGAGTATGGGCAATGCCAC-3'

*LAMC2-R* : 5'-GCTCTGGTATCAACCTTCTG-3'

PCR条件は95  $^{\circ}$ C、60秒後、55  $^{\circ}$ C、60秒、そして72  $^{\circ}$ C、90秒を35サイクル、続いて72  $^{\circ}$ C、10分とした。

ラミニン10/11に関しては共通のラミニン $\alpha$ 5鎖のPCRを行った。用いたプライマーを以下に記す。

*LAMA5-F* : 5'-GACTGCCTGCTGTGCCAGC-3'

*LAMA5-R* : 5'-GGGGTAGCCATGAAAGCCCG-3'

PCR条件は94  $^{\circ}$ C、60秒後、61  $^{\circ}$ C、60秒、そして72  $^{\circ}$ C、60秒を30サイクル、続いて72  $^{\circ}$ C、10分で行った。PCR産物は2 %アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドを用いて染色した。

### 1.2.8 ウェスタンブロッティング解析



HFKsが産生したラミニン5の局在（細胞接着の足場に沈着するか、培地中に放出されるか）を調べるために培養細胞の馴化培地と接着した細胞を足場ごと回収して、ウェスタンブロット解析を行った。細胞播種前に24-well plateを前述（1.2.1）の方法で処理して、I型コラーゲン分子、線維ゲルの足場を形成した。HFKs（ $5 \times 10^4$  cells/well）をK110 Type II培地に懸濁して、播種し、2日間培養した。培養上清を回収し、基質に接着している細胞をPBS(-)で洗浄した後、I型コラーゲン線維ゲルの場合はゲルと細胞をともに、1000 rpm、5分間遠心分離により沈殿を回収し、60 °C、10分間加熱処理をした。I型コラーゲン分子上での培養細胞は、PBS(-)で洗浄した後、0.5 % SDS、15 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 6.8)、0.1 mLを加えて、細胞をかき取り回収した。これらの（馴化培地2種およびI型コラーゲン線維ゲル、I型コラーゲン分子上で培養した細胞と細胞周囲の細胞外マトリクス）試料は等量のSDS-PAGE泳動用緩衝液（4 % SDS、125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、15 % glycerol、0.018 % bromophenol blue）を加えて3分、100 °C加熱処理後、7.5 % ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、電気泳動終了後に0.45  $\mu$ mポアサイズのニトロセルロース膜（Advantec S045A224D東洋濾紙）に転写しウェスタンブロッティング法で検出した[45]。転写後のニトロセルロース膜を1 % BSA/PBS(-)溶液でブロッキングし、抗ヒトラミニン $\beta$ 3鎖-ヤギポリクローナル抗体(C-19)（SantaCruz sc-16585）を添加して4時間静置した。続いてHRP標識抗ヤギIgG-ウサギポリクローナル抗体(ICN Pharmaceutical Inc.、USA.)を添加して1時間静置した。PBS-Tを用いて余剰の抗体を洗浄した後、Western blot detection system, Enhanced Chemiluminescence Plus (Amersham Pharmacia Biotech、UK)を用いてFuji RX-U medical X-ray film (Fuji Photo Film Co. Ltd.、日本)上で、ラミニン $\beta$ 3鎖を可視化した。

#### 1.2.9 I型コラーゲン線維とラミニン5の相互作用解析

ラミニン5とI型コラーゲンのタンパク質-タンパク質相互作用を定量するために、水晶振動子マイクロバランス法（Quartz Crystal Microbalance: QCM法）を応用したAffinix Q system（イニシウム、東京）を使用した。QCM法は水晶発振子（水晶結晶の極薄切片の両側に金属薄膜を取り付けた構造）の金属薄膜に交流電場を印加すると、一定の周波数（共振周波数）で振動する性質を応用した方法で、金属薄膜上にナノグラム程

度の物質が吸着すると物質の質量に比例して共振周波数が減少することがわかっており、水晶振動子の周波数変化を検出することで、その電極上での物質の質量変化を計測することができる。Affinix Q system では金属薄膜に30 pgの物質が吸着すると周波数が1 Hz減衰する[46、47]。金属薄膜上に0.1 mg/mL I型コラーゲン/PBS(-)溶液を3  $\mu$ L滴下し、37  $^{\circ}$ C、2時間静置することで、線維を形成した。金属薄膜を含むセンサーをPBS(-)で3回洗浄した後、2 mLのPBS(-)を満たした反応槽に浸し、37  $^{\circ}$ Cで30分センサーの安定を待ってから、ラミニン5、抗I型コラーゲン抗体 (LSL、日本)、BSAを最終濃度0.1  $\mu$ g/mLになるよう反応槽に添加し、振動数変化を1時間測定した。

#### 1.2.10 生存シグナルの活性化解析

細胞播種前に6-well plateを前述 (1.2.1) の方法で処理して、I型コラーゲン分子でコートされたプレート、線維ゲルでコートされたプレートを調製した。I型コラーゲン分子、線維ゲル上に、それぞれHFKs ( $1 \times 10^6$  cells/well) をK110 Type II培地に懸濁して播種し、1時間、4時間、22時間培養した。線維ゲル上で培養した細胞はPBS(-)を用いて洗浄し、線維ゲルを1.5 mL容エップンドルフチューブに回収し、10000 rpm、5分間、遠心分離し、得られた沈殿に0.5 mLのcell lysis緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 % TritonX-100、2.5 mM sodium pyrophosphate、1 mM  $\beta$ -glycerol phosphate、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1  $\mu$ g/mL leupeptin、1 mM PMSF) を添加して、氷上5分間静置した。I型コラーゲン分子上で培養したHFKsはPBS(-)を用いて洗浄後、上述のcell lysis緩衝液、0.5 mLを添加して、氷上5分間静置し、セルスクレイパーを用いてかきとった。いずれの試料も氷上で5秒間、4回超音波処理を施した後、4  $^{\circ}$ C、10000 rpmで10分間、遠心分離した上清を回収した。これを電気泳動試料とした。上清は同量の電気泳動用緩衝液 (4 % SDS、125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、15 % glycerol、0.018 % bromphenol blue) を加え、100  $^{\circ}$ C、2分間加熱後に 10 %ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後のアクリルアミドゲルは前述 1.2.8同様の方法でニトロセルロース膜に転写したのち、5 % nonfat dry milk / TBS-T溶液で1時間室温、振盪操作を行いブロッキング操作を行った。続いて 抗Akt 抗体あるいは抗リン酸化Akt (Ser473) 抗体を希釈しニトロセルロース膜を浸して4  $^{\circ}$ C、一晩静置した。TBS-T

溶液で10分、3回洗浄した後、HRP標識二次抗体に室温で1時間浸して静置した。ウェスタンブロット検出試薬 LumiGLO chemiluminescent reagent (Kirkegaard & Perry Labs., USA)のプロトコルに従いバンドを検出した。

### 1.3 結果

#### 1.3.1 細胞形態

HFKs、HFFs および FEPE1L-8 細胞を I 型コラーゲン線維ゲル上で培養し、細胞形態を位相差顕微鏡を用いて観察した。I 型コラーゲン分子上培養では 3 種類の細胞はそれぞれ特徴的な形態で、すべてよく接着し、伸展しながら増殖を続けた。HFKs および FEPE1L-8 細胞形態の位相差顕微鏡観察像を経時的に図 2 に示す。HFKs は、培養 3 時間 (図 2A)、1 日間 (図 2B)、3 日間 (図 2C)、FEPE1L-8 細胞は 4 時間 (図 2G)、1 日間 (図 2H)、2 日間 (図 2I) に示す。I 型コラーゲン分子上で 3 種すべての細胞は増殖を続けた。生細胞および死細胞数を図 3 に示した。(図 3 の■は I 型コラーゲン分子上で培養した生細胞数。A は HFKs、B は FEPE1L-8 細胞、C は HFFs)。

I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した HFKs (図 2D)、FEPE1L-8 細胞 (図 2J) は培養開始 3 時間ではゲル上で伸展形態をとるが、しかしその後数日間の培養で細胞形態は伸展が阻害されることにより丸くなり (図 2E、2F、2K、2L)、増殖も阻害された。生細胞数は減少し (図 3A、3B▲)、逆に死細胞数は増大した (図 3A、3B△)。この現象が液性成分に起因するか確認するために、培養皿の一部に I 型コラーゲン線維ゲルを形成し HFKs を培養した。するとコラーゲン未処理部分では細胞は伸展し、ゲル上では細胞は丸い形態をとった (図 2M)。I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した HFF は、表皮角化細胞とは異なり、未処理および I 型コラーゲン分子上で培養した場合と同様に、伸展形態を保ったまま増殖を続けた (図 3C▲)。

#### 1.3.2 アポトーシスと分化誘導

I 型コラーゲン線維ゲル上培養した HFKs、FEPE1L-8 細胞に誘導される細胞死がアポトーシスか確認するために TUNEL 法で DNA 断片化を検出した。その結果、表 1 に示すようにコラーゲン分子上で培養した HFKs は 4 時間から 4 日までの培養期間で、

FEPE1L-8 細胞は培養 1~8 日間でアポトーシス誘導はほとんど観察されなかった。一方、I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した HFKs は培養後 1 日まではアポトーシスは誘導されないが、2 日目にはすべての細胞に誘導された (表 1A)。I 型コラーゲン線維ゲル上で FEPE1L-8 細胞は、1 日目は 1.2 %、培養 4 日で 58 %、培養 8 日目で 80 %の細胞にアポトーシスが誘導された (表 1B)。

HFKs (表 1A)、FEPE1L-8 細胞 (表 1B) の I 型コラーゲン線維ゲル培養での分化誘導率を抗インボルクリン抗体で検出した。I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した細胞を抗インボルクリン抗体で染色し蛍光顕微鏡下で計数し、インボルクリン発現細胞を全細胞数で除算し分化誘導率とした。HFKs (4 日)、FEPE1L-8 細胞 (8 日) の培養期間を通じて、I 型コラーゲン分子上および I 型コラーゲン線維ゲルの上で分化誘導は観察されなかった。

### 1.3.3 インテグリンの局在

I 型コラーゲン分子上で培養した場合と I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した場合で HFKs に誘導される細胞形態の違いの原因は、細胞の足場となる接着様式に起因すると仮定し、それぞれの基質上での HFKs が形成する接着様式を観察することにした。そこで接着斑構成タンパク質であるビンキュリンやコラーゲン受容体であるインテグリン  $\alpha 2\beta 1$ 、ラミニン受容体であるインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  の集積を免疫染色法を用いて染色し観察した。同時にインテグリン  $\alpha 3$  が認識する基質となるラミニン 5、ラミニン  $\alpha 5$  鎖の足場への沈着を 4 時間、1 日、2 日と経時的に観察した。HFKs はラミニン 5、ラミニン  $\alpha 5$  鎖を産生することが報告されている [10]。まず I 型コラーゲン分子上培養の場合、培養数時間から 2 日までビンキュリンの接着斑への集積が継続して見られた (図 4A-C)。インテグリンは培養 4 時間には  $\alpha 2\beta 1$  がはっきりと観察されたが、時間が経つにつれて徐々に減少した (図 4D-F)。それとは逆にインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  は培養 4 時間では細胞周囲は全く観察されないが、時間経過につれ細胞周囲に点状の染色像として観察されるようになった (図 4G-I)。以上の観察により接着斑に集積するインテグリンは  $\alpha 2\beta 1$  から  $\alpha 3\beta 1$  に変換していくことが確認された。細胞接着部へのラミニン 5 の沈着は徐々に強くなった (図 4J-L)。これらの観察は Carter らの報告と一致する [28、

29]。ラミニン  $\alpha 5$  鎖沈着も経時的に増加した (図 4M-O)。

I 型コラーゲン線維ゲル上培養の場合は、培養 4 時間ではビンキュリンの接着斑様の集積がはっきり観察できた (図 5A)。この集積はコラーゲン分子上で培養した場合とは異なり細胞周囲全域に形成されるのではなく、細胞周囲の数カ所に強く局在しており、細胞形態は接着斑様部分に引かれるように変形していた。集積は 1 日目には少なくなり、2 日目には完全に失われ、一度は伸展した細胞形態が丸くなっていることが観察できた (図 5B-C)。インテグリンは培養 4 時間には  $\alpha 2\beta 1$  がビンキュリン染色像に似た形に強く染色されたが (図 5D)、培養 1 日では減弱し (図 5E)、2 日目には染色されなくなった (図 5F)。インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  は一貫して接着斑様には染色されず、はじめは細胞周囲に沿った細かい染色がみられるが徐々に減弱し (図 5G、H)、2 日目では失われた (図 5I)。ラミニン 5 (図 5J-L)、ラミニン  $\alpha 5$  鎖 (図 5M-O) の沈着は一貫して観察されなかった。

#### 1.3.4 I 型コラーゲン線維と接着斑様構造

共焦点反射顕微鏡 (CRM ; Confocal Reflection Microscopy) 観察法は、共焦点レーザー顕微鏡の反射波観察と、免疫蛍光染色法を組み合わせることで 1 つの試料から同時に複数の情報を得ることができる。蛍光色素で染色した試料にレーザー光を照射すると、励起された蛍光による免疫染色像と、光学的フィルターを通さない反射光による試料の三次元形態像を同時に得ることができる [43]。HFKs を I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した時に形成される特徴的な接着斑様構造を、三次元的な I 型コラーゲン線維構造と重ね合わせて CRM 法で観察することを試みた。I 型コラーゲン線維ゲル上で 4 時間培養し伸展している HFKs を抗ビンキュリン抗体 (図 6A)、抗インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  抗体 (図 6B)、抗インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  抗体で染色し (図 6C)、I 型コラーゲン線維像 (図 6D-F) と重ね合わせて観察した (図 6G-I)。接着斑様構造は緑、I 型コラーゲン線維は赤で表示し、共在部は黄色に観察された。ビンキュリンとインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  は伸展した細胞の先端に染色され、線維と強く相互作用していることが示唆される。細胞は線維を引きつけるように線維束が細胞周囲に形成されていた。インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  は接着斑様構造には共局在せず、細胞周囲に散らばって染色された。HFKs 伸展時の接着斑様

構造に集積するインテグリンはI型コラーゲン分子上培養時と同様インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  であった。

### 1.3.5 ラミニン5の産生と沈着

図4に示したように、HFKsはI型コラーゲン分子上で培養するとラミニン5を産生し、産生されたラミニン5はプレートに沈着が観察された。一方、図5で示したようにI型コラーゲン線維ゲル上にはラミニン5沈着が観察されない。そこで次にI型コラーゲン線維上培養で惹起されるHFKsのラミニン5の産生制御を調べることにした。I型コラーゲン線維上培養HFKsはラミニン産生も阻害されているかを確認するため、ラミニン10(ラミニン511) / ラミニン11(ラミニン521)に共通に含まれるラミニン $\alpha 5$ 鎖、ラミニン5(ラミニン332)を特徴的に構成する $\beta 3$ 鎖、 $\gamma 2$ 鎖についてRT-PCRを行うことにした。HFKsをI型コラーゲン線維、I型コラーゲン分子上で2日培養して全RNAを採取、精製し定法に従ってRT-PCRを行い、電気泳動を行った(図7)。I型コラーゲン線維ゲル上培養試料およびI型コラーゲン分子上培養試料はラミニン $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 3$ 鎖および $\gamma 2$ 鎖すべての遺伝子が発現していることを確認した(図7レーン5)。

次に抗ラミニン $\beta 3$ 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、ラミニン5タンパク質の培養系での局在を検討した。HFKsをI型コラーゲン線維ゲル、I型コラーゲン分子上で2日培養して、各々の培養上清画分および細胞とゲルを一緒に可溶化して泳動試料とした。I型コラーゲン線維ゲル、I型コラーゲン分子上で培養した場合の培養上清には、ゲル上(図8レーン5)でも分子上(図8レーン3)でもラミニン5が確認された。一方コラーゲン分子上培養の場合は細胞含有画分(図8レーン2)にラミニン $\beta 3$ 鎖が確認されるにもかかわらず、コラーゲンゲルには含有されていないことが示された(図8レーン4)。免疫染色像と考え合わせるとI型コラーゲン線維ゲル上で培養したHFKsはラミニン5をタンパク質として産生し、培養液中に放出しているものの、I型コラーゲン線維ゲルには検出限界以下しか沈着しないことが示された。

次にI型コラーゲン線維ゲルにラミニンが沈着しない原因は、I型コラーゲン線維ゲル上培養でHFKsのラミニン5産生量が少ないために沈着量が不十分である可能性を

考慮し、培養液中にラミニン 5 を添加して培養することで、細胞接着が保たれ HFKs が生存するか否かを検討することにした。ラミニン 5 分子を HFKs の培養基材として塗布する場合は、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度の濃度で処理することで十分に細胞挙動に影響が生じることは Decline らにより報告されている[48]。そこで終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるようにラミニン 5 を培地に添加して I 型コラーゲン線維ゲル上で HFKs を培養し、TUNEL 法でアポトーシス誘導を観察したところ、若干アポトーシス誘導率が低下した（培養 2 日目に平均約 80 % のアポトーシス誘導率）。しかし細胞形態の顕著な変化は認められず、結果として細胞死は回避されず、培養液に添加したラミニン 5 は HFKs のアポトーシス回避にほとんど影響しないことがわかった（データ非掲載）。

### 1.3.6 I 型コラーゲン線維とラミニン 5 の相互作用

さらに I 型コラーゲン線維ゲルとラミニン 5 が相互作用しないことを確認するため、細胞の関与を除外した系で添加したラミニン 5 と I 型コラーゲン線維ゲルの相互作用を測定した。水晶発振子を用いた分子天秤 AffinixQ 法で I 型コラーゲン線維ゲルへのラミニン 5 結合を定量することにした。水晶発振子を搭載したチップに I 型コラーゲン線維ゲル (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3  $\mu\text{L}$ ) を固定化し、PBS(-) (2 mL) を満たしたチャンバー中に浸し BSA あるいはラミニン 5 を最終濃度 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した。経時的に振動数を計測したがラミニン 5 は BSA と同程度しか I 型コラーゲン線維ゲルに沈着しなかった（図 9 ■、●）。BSA は I 型コラーゲンと相互作用しないことは Suzuki らにより報告されている[32]。抗 I 型コラーゲン抗体を添加すると、抗体は経時的に I 型コラーゲン線維ゲルに接着し、振動数が減少した（図 9、▲）。これらの結果からラミニン 5 は I 型コラーゲン線維ゲルにも I 型コラーゲン分子同様相互作用しないことが示された。

### 1.3.7 Akt の活性化

HFKs 生存に関与するセリン/スレオニンキナーゼ Akt の活性化を調べるため、抗 Akt 抗体、抗 Akt リン酸化 (ser473) 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。HFKs を I 型コラーゲン分子あるいは I 型コラーゲン線維ゲル上で 1 時間、4 時間、22 時間培養

し、泳動用試料として回収した後、電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写し、ウェスタンブロットを行った。Akt タンパク質は、I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した場合、I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した場合共、すべての培養期間を通じて発現していた。Akt タンパク質の発現量は I 型コラーゲン分子上では時間が経つにつれ増加し、I 型コラーゲン線維ゲル上では経時的に減少した (図 10A)。一方 Akt のリン酸化は I 型コラーゲン分子上で培養すると経時的に強まるが、I 型コラーゲン線維ゲル上では活性化しなかった (図 10B)。



表1 I型コラーゲン分子上および線維ゲル上培養表皮角化細胞のアポトーシス  
および分化誘導率

(A) HFKs

		4時間	1日	2日	4日
I型コラーゲン分子上 培養細胞	アポトーシス 誘導率	0%	0.1%	0%	0%
	分化誘導率	0%	1.0%	0%	0%
I型コラーゲン線維ゲル上 培養細胞	アポトーシス 誘導率	0%	0.2%	100%	100%
	分化誘導率	0%	5.0%	0%	0%

(B) FEPE1L-8 細胞

		1日	4日	8日
I型コラーゲン分子上 培養細胞	アポトーシス 誘導率	1.0%	4.0%	3.0%
	分化誘導率	0%	0%	0%
I型コラーゲン線維ゲル上 培養細胞	アポトーシス 誘導率	1.2%	58%	80%
	分化誘導率	0%	0%	0%

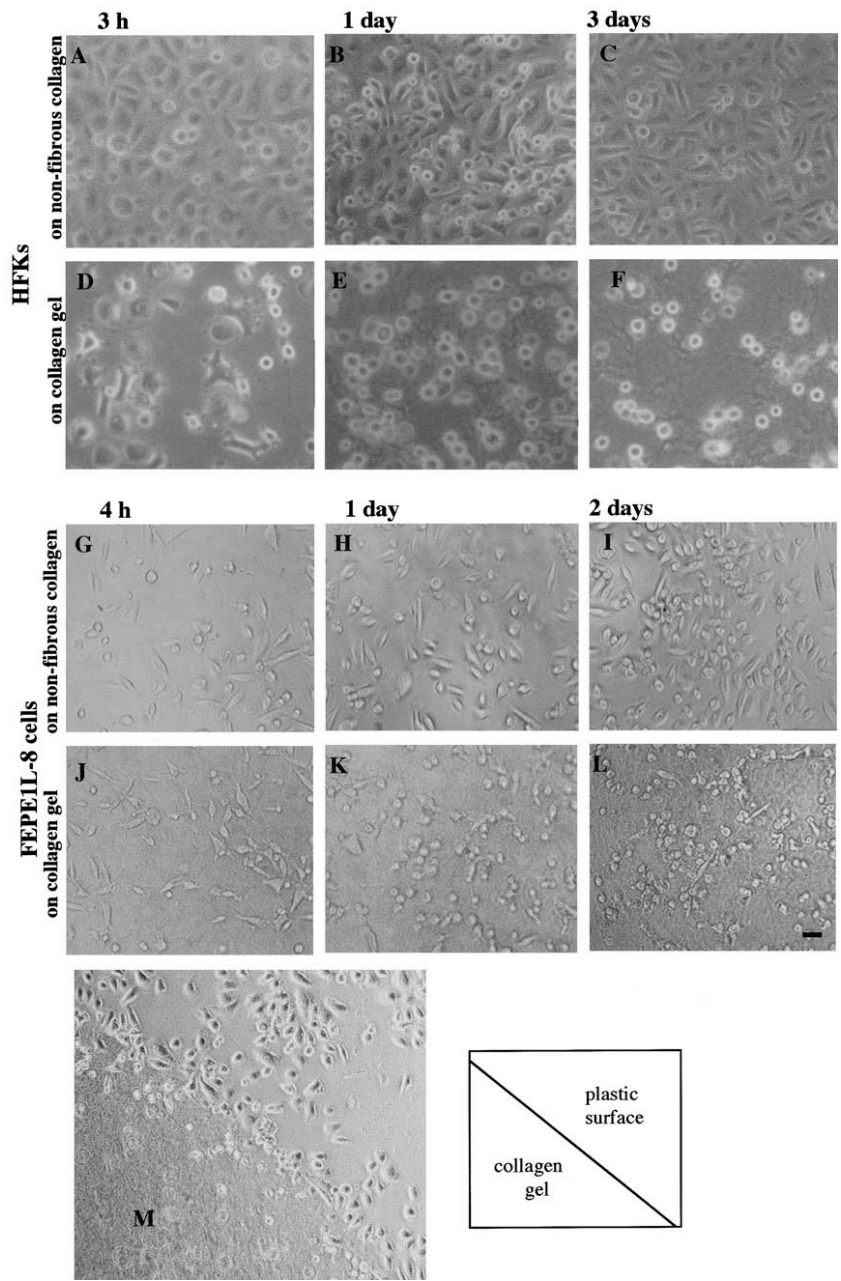


図2 位相差顕微鏡による細胞形態観察

HFKs を I 型コラーゲン分子上 (A-C) および I 型コラーゲン線維ゲル上(D-F)で 3 時間、1 日、3 日培養した細胞形態を観察した。株化表皮角化細胞 FEPE1L-8 細胞を I 型コラーゲン分子上 (G-I) および I 型コラーゲン線維ゲル上(J-L)で 4 時間、1 日、2 日培養した細胞形態を観察した。培養表面の一部に I 型コラーゲン線維ゲルを形成した培養皿で HFKs を 1 日培養して細胞形態を観察した(M)。(L)バーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

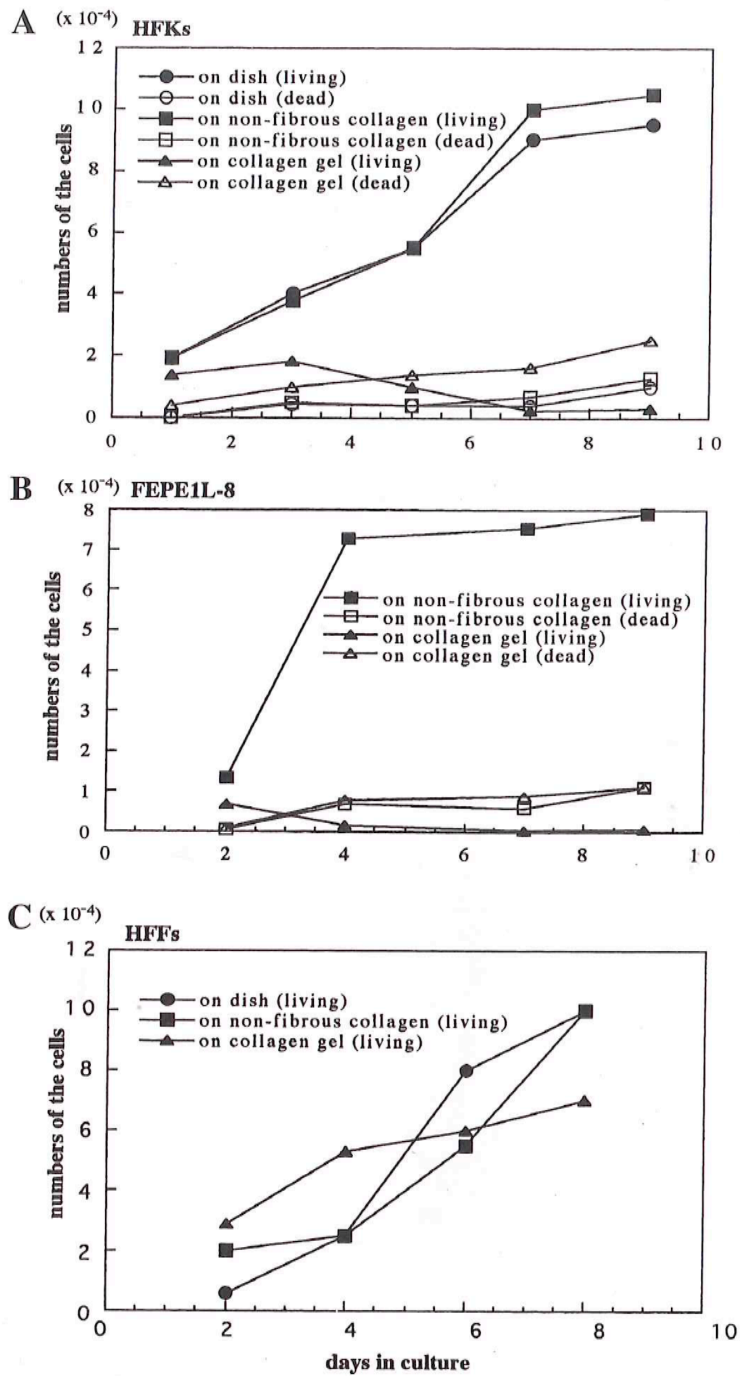


図3 I型コラーゲン分子およびI型コラーゲン線維ゲル上での細胞増殖

HFKs (A)、FEPE1L-8細胞(B)、およびヒト包皮線維芽細胞(HFFs)(C)をI型コラーゲン分子上、I型コラーゲン線維ゲル上および未処理プレート上で提示した時間培養し、トリパンブルーで染色した後、生細胞と死細胞を計数した。HFKs、FEPE1L-8細胞はK110 type II培地、HFFsは10%牛胎児血清含有RPMI1640培地を用いて培養した。

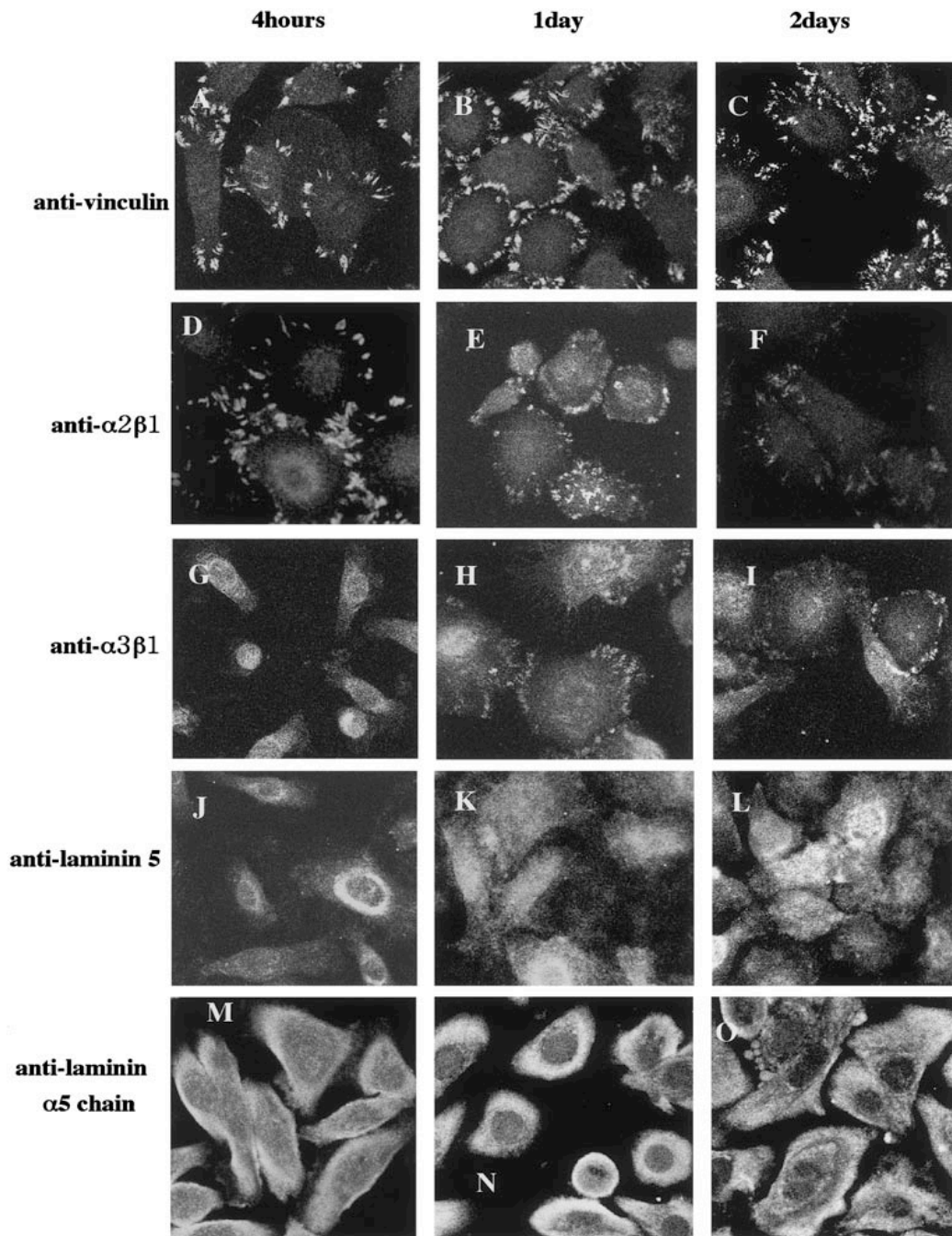


図4 I型コラーゲン分子上で培養した HFKs のインテグリン、ラミニンの蛍光免疫染色像

HFKs を I 型コラーゲン分子上で、4 時間(A、D、G、J、M)、1 日(B、E、H、K、N)および 2 日間(C、F、I、L、O) 培養し、以下の抗体を用いて免疫染色を行った。抗ビンキュリン (A-C)、抗インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  (D-F)、抗インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  (G-I)、抗ラミニン 5 (J-L)そして抗ラミニン  $\alpha 5$  鎖(M-O) 抗体を用いた。

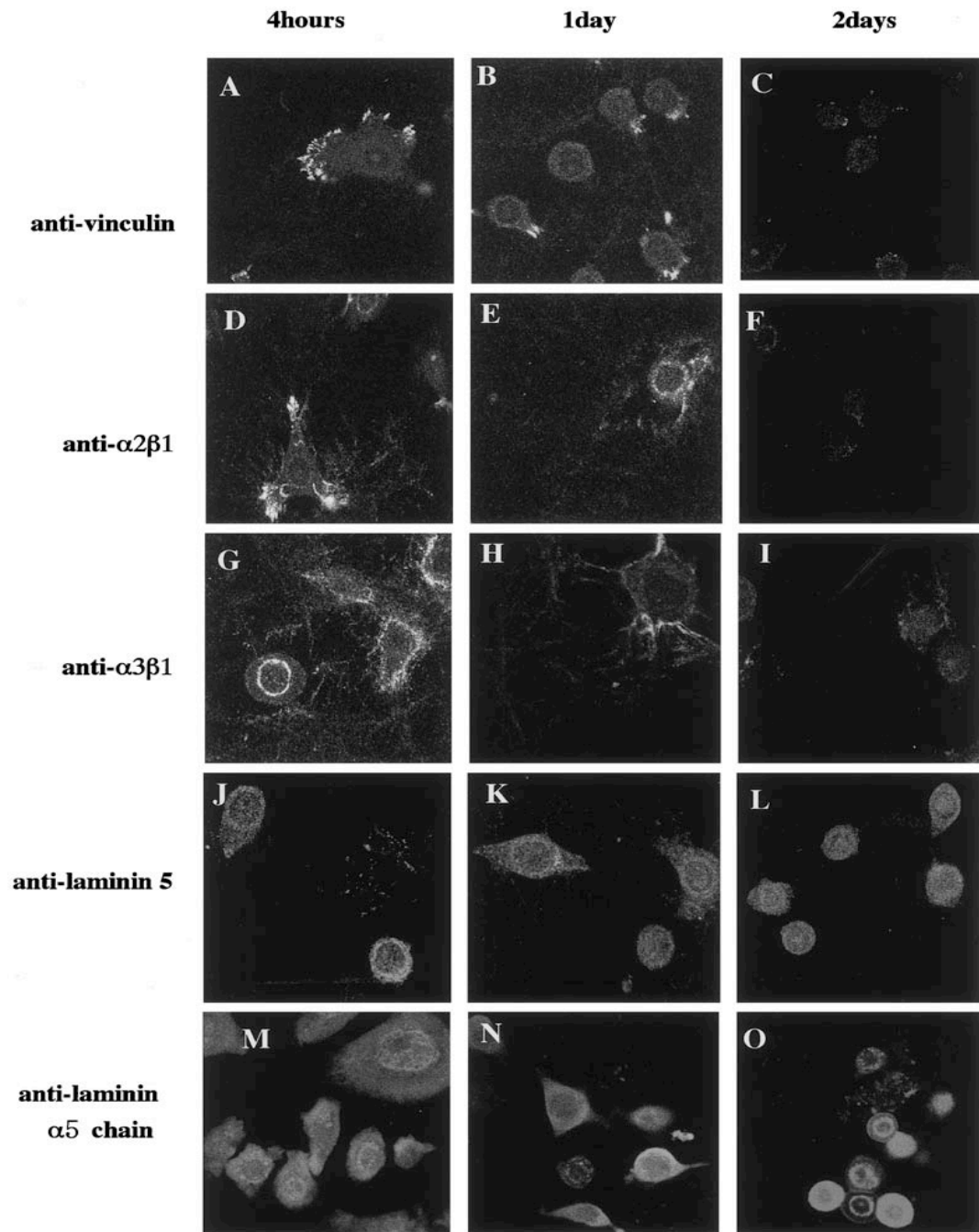


図5 I型コラーゲン線維ゲル上培養 HFKs インテグリン、ラミニンの蛍光免疫染色像

HFKs を I 型コラーゲン線維ゲル上で、4 時間(A、D、G、J、M)、1 日(B、E、H、K、N)および 2 日間 (C、F、I、L、O) 培養し、以下の抗体を用いて免疫染色を行った。抗ビンキュリン(A-C)、抗インテグリン  $\alpha 2\beta 1$ (D-F)、抗インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  (G-I)、抗ラミニン 5 (J-L)そして抗ラミニン  $\alpha 5$  鎖(M-O)抗体を用いた。

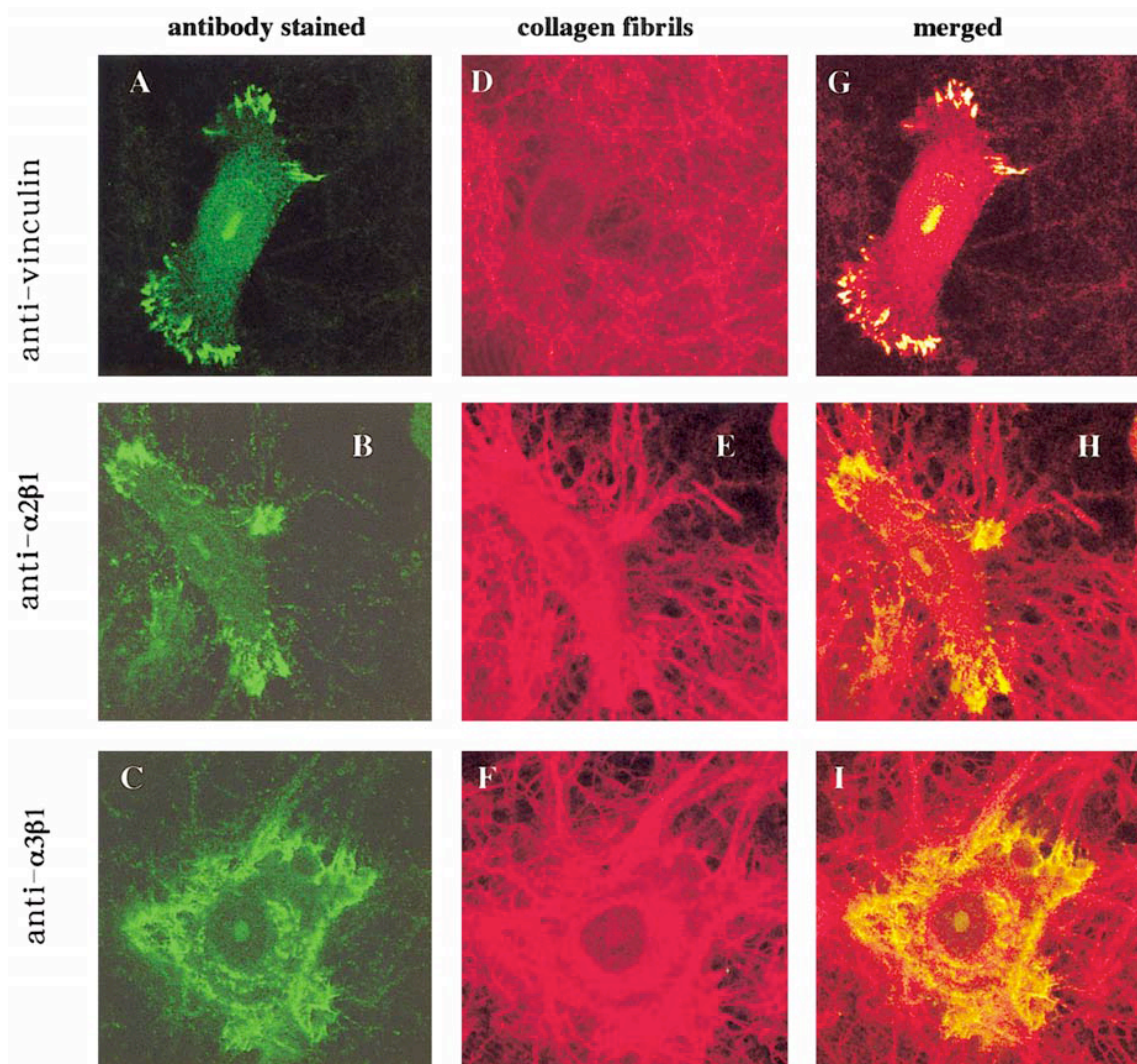


図6 共焦点反射顕微鏡 (CRM) による I 型コラーゲン線維と HFKs の接着斑形成の観察像

HFKs は I 型コラーゲン線維上で 4 時間培養し固定した。細胞を抗ビンキュリン抗体(A)、抗インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  抗体(B)、抗インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  (C)抗体で染色した。同視野を CRM 法でコラーゲン線維を観察して(D-F)重ね合わせた (G-I)。

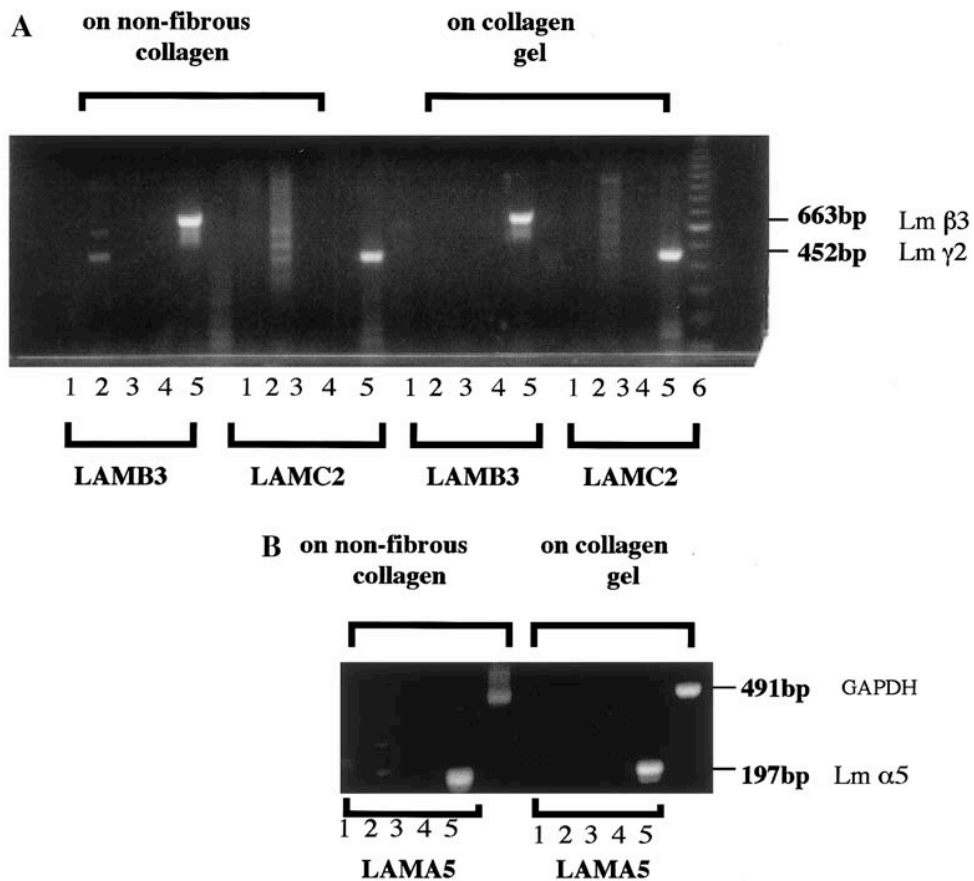


図7 HFKs が産生するラミニン β3、γ2、α5 鎖の mRNA 発現

HFKs を I 型コラーゲン分子上および I 型コラーゲン線維ゲル上で 2 日培養後、全 mRNA を回収して RT-PCR を行い得られた cDNA を 2 %アガロースゲルで電気泳動、エチジウムブロマイドで染色した。(A)ラミニン β3 鎖(Lm β3)、ラミニン γ2 鎖(Lm γ2)、(B) ラミニン α5 鎖(Lm α5)、GAPDH : レーン 1 ; 前後プライマー添加、逆転写酵素非添加、レーン 2 ; 後プライマーのみ添加、逆転写酵素添加、レーン 3 ; 前プライマーのみ添加、逆転写酵素添加、レーン 4 ; 前後プライマー非添加、逆転写酵素添加、レーン 5 ; 両プライマー添加、逆転写酵素添加、レーン 6 ; 分子量マーカー



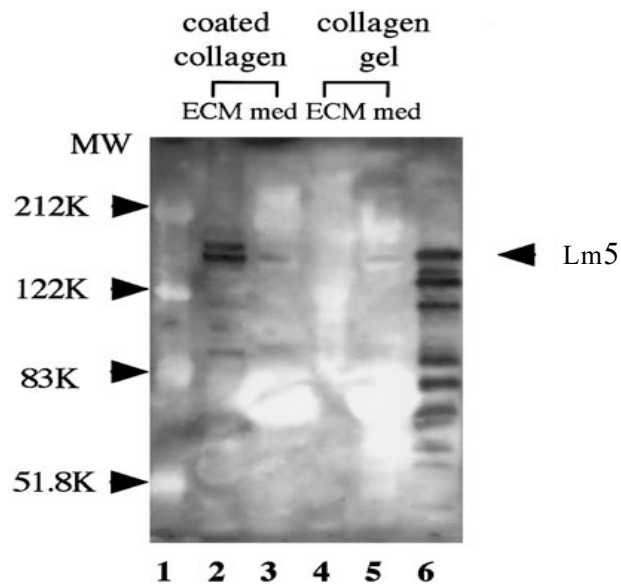


図 8 ラミニン 5 局在のウエスタンプロット解析

HFKs を I 型コラーゲン分子上（レーン 2、3）および I 型コラーゲン線維ゲル上（レーン 4、5）で 2 日培養後、細胞と基質（レーン 2、4）、および馴化培地（レーン 3、5）を回収して電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。転写膜を抗ラミニン  $\beta 3$  鎖抗体を用いて染色した。Lm 5 はラミニン 5 の泳動位置を示す。：レーン 1；分子量マーカー、レーン 6；ラミニン 5 を含む培養細胞が産生した細胞外マトリクス



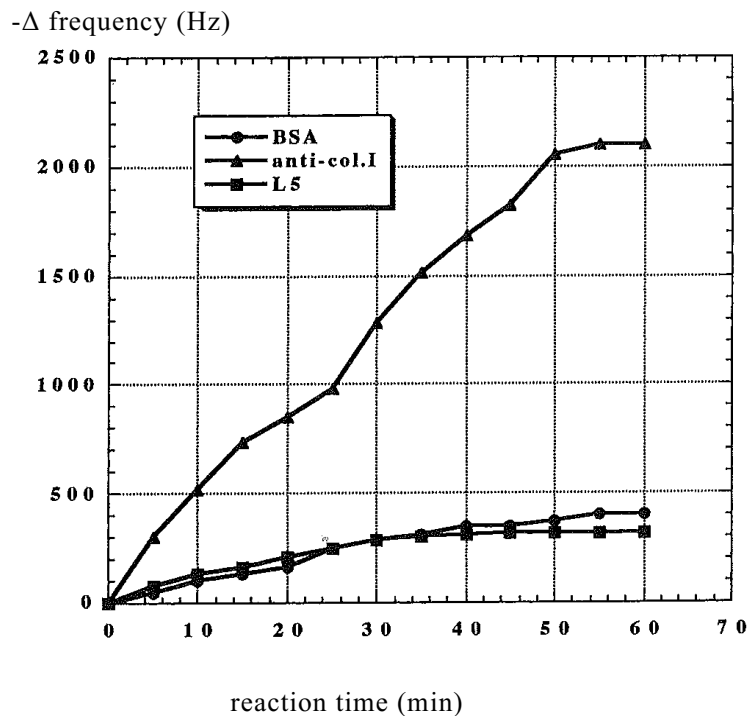


図9 I型コラーゲン線維とラミニン5の相互作用解析

I型コラーゲン線維とラミニン5の結合を、水晶発振子を用いる QCM システム(Affinix Q (イニシウム、日本))を用いて定量した。水晶発振子上に固定された金電極に I型コラーゲン (100  $\mu\text{g/ml}$ 、3  $\mu\text{l}$ ) を PBS(-)で中和し 37  $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間処理して線維を形成させた。電極を 2 ml の PBS(-)を満たしたチャンバーに浸し水晶発振子振動数の減少を定量した。ラミニン 5 (L5 : ■)、牛血清アルブミン(BSA : ●)、抗 I型コラーゲン抗体 (anti-col.I : ▲)

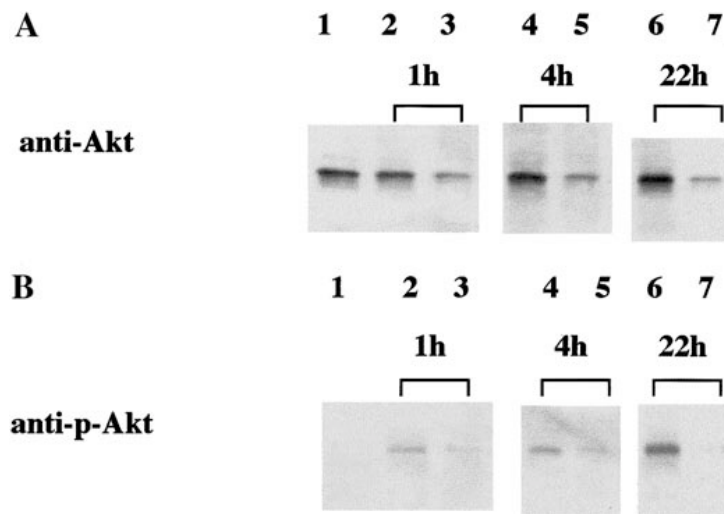


図 10 I 型コラーゲン分子および I 型コラーゲン線維ゲル上培養した HFKs における Akt の活性化

HFKs を I 型コラーゲン分子上 (レーン 2、4、6)、I 型コラーゲン線維上 (レーン 3、5、7) で、1 時間 (レーン 2、3)、4 時間 (レーン 4、5) および 22 時間 (レーン 6、7) 培養した。各条件で培養した細胞および播種前 (レーン 1) の細胞を可溶化し電気泳動試料とした。電気泳動を行った後、ニトロセルロース膜に転写し、(A) 抗 Akt 抗体、(B) 抗 p-Akt 抗体を用いてウエスタンブロッティング法で検出した。

## 1.4 考察

培養系において細胞接着の足場は細胞の運命に多大な影響をもたらす。細胞はインテグリン等受容体を用いて、細胞外マトリクスとの間に接着装置を形成し、細胞挙動を決するシグナルを細胞内に伝達し[49]、細胞外マトリクスの種類や形状により細胞に影響を与える。たとえばI型コラーゲン分子は、HFKsの接着と増殖を促進することが知られている[15、34、50]。本章でHFKsをI型コラーゲン線維ゲル上で培養したところ、一旦はインテグリン $\alpha 2\beta 1$ を介した接着装置（接着斑様構造）が形成された。しかしこの接着は培養1日目に失われ、細胞形態も伸展が阻害され丸くなった(図2、図5)。この現象を引き起こす原因は、ゲル上でHFKsが産生する液性因子にあるとも考えられたが、プレートの一部のみにI型コラーゲン線維ゲルを形成しHFKsを培養したところ、ゲル上の細胞は丸く、培養皿の未処理部分に接着した細胞は伸展形態を保っていた(図2M)。すなわち細胞形態を変化させた要因は細胞が産生する液性因子ではなく細胞接着にあることが示唆された。この現象は株化ヒト表皮角化細胞FEPE11-8細胞でも同様に観察されるが、ヒト線維芽細胞では見られず、表皮角化細胞に特徴的な現象であった。I型コラーゲン線維ゲル上に播種したHFKsの培養開始数時間での様子は、I型コラーゲン分子上と変るところはほとんどなく、その後の培養1日から2日の間に急激に変化がおこった。そのため原因は、I型コラーゲン分子の上でヒト表皮角化細胞の生存、増殖に寄与する機構に、I型コラーゲン線維ゲルの上では何らかの変化が生じたことにあると仮定し、この応答を誘導する機構について解析を行った。

細胞の運命は、細胞外マトリクスだけではなく液性因子、細胞にかかる機械的ストレス等様々な要因で決定されるが[51]、たとえばHFKsの生存にはEGF受容体とインテグリン $\alpha 3\beta 1$ を介したシグナルが特に大きな影響を与える[52]。またHFKsを浮遊培養すると、細胞は接着の足場を失うことにより、細胞塊を形成し分化が誘導され、DNA合成が停止する。このような現象はアノイクスと総称されている[53]。しかし今回認められた現象では、接着斑様の接着装置は失われるが、細胞塊は形成されず、分化誘導もおこらず直ちにアポトーシスが誘導された。したがって既報の浮遊培養でHFKsに惹起されるアノイクスとは別の現象である可能性が示唆される。

HFKsでは生死等の細胞挙動の決定に、インテグリン $\alpha3\beta1$ を介したラミニン5への接着は特に重要な役割を果たしている [54、55]。創傷治癒のモデルとして提唱されたI型コラーゲン分子上での培養で、HFKsははじめコラーゲンにインテグリン $\alpha2\beta1$ を介して接着し、Rho-GTPaseが活性化をうける。その後HFKsはラミニン5を自ら産生し、産生したラミニン5は細胞周囲の微小環境に沈着する。すると今度は沈着したラミニン5が主要な接着基質となり、ラミニン5への接着に用いられるインテグリンはコラーゲン受容体である $\alpha2\beta1$ から、 $\alpha3\beta1$ および $\alpha6\beta4$ へと転換する。それにつれてホスファチジルイノシトール3リン酸 (PI3K) 回路が活性化するようになることが報告されている [55]。PI3K回路は、線維芽細胞や上皮細胞等多くの細胞で重要な生存シグナルとして機能しており、細胞の足場への接着はPI3K回路の活性化に大きく寄与している [56、57]。正常上皮細胞は、接着していた細胞外マトリクスから離脱すると速やかにPI3Kのタンパク質量が減少するが、再接着により回復する [56]。細胞外マトリクスへの接着によりおこるPI3K回路の活性化は、生存シグナルの活性化を促すとともに、アポトーシス回避にも寄与していることが知られている [57]。またラミニン $\alpha3$ 鎖を欠失したノックアウトマウスは皮膚に水疱を生じ、新生児致死となる [10]。このノックアウトマウスから調製した上皮細胞は、細胞外マトリクスを未処理の培養容器上では増殖が阻害され死ぬ一方で、IV型コラーゲン分子を処理した培養容器上で培養すると野生型細胞と同様に増殖する [10]。

ラミニンスーパーファミリーの受容体であるインテグリン $\alpha3\beta1$ とインテグリン $\alpha6\beta4$ は、ラミニンへの接着に関してある程度相補的に働くことが報告されている [10]。またインテグリン $\alpha3\beta1$ の基質であるラミニン10/11は、ある程度ラミニン5の欠失を補うことが可能である [5、10]。

本章で解析したHFKsにアポトーシスが誘導される機構を、図11に模式的に示す。本実験系ではラミニン5を培養液に添加することによっては、細胞生存にとって顕著な効果はなかった。これは図9に示すようにラミニン5とI型コラーゲンの相互作用が低いと推測される。ラミニン5がI型コラーゲンと相互作用するためには、生体で形成されるヘミデスモソームに見られるような他の要素の関与が必要と推測される。

本章での解析では未解決であった問題としては、ラミニン5分子はI型コラーゲン

分子とは相互関係しない[38]ことがあきらかになっているにもかかわらず、なぜラミニニン5分子はコラーゲン分子を塗布したプレートには沈着するのかということである。これはおそらくは、ラミニニン5がI型コラーゲンではなく培養皿表面の空隙に沈着しているためと考えられる。プレートへのコラーゲン分子塗布は日常的に行われている技術であるが、塗布量があまりに微量なため定着量を測定する技術は確立していない。HFKsの場合、通常タンパク質染色法では検出限界以下の吸着量であっても細胞接着には影響を与えない。そのため塗布状況を正確に定量することは難しく、培養皿表面に未処理部分が残っている可能性もある。また細胞は移動の際、接着の足場を自ら産生したMMPsなど分解酵素で分解しながら移動するため、あらかじめ塗布されていたコラーゲン分子が切断、分解される可能性も示唆される。現時点では詳細は不明であるが、なんらかの原因で生じている培養皿表面空隙に、ラミニニン5が沈着すると可能性は高いと考えている。

本章では、増殖に適したカルシウム濃度の低い培地を用いて実験を行った。生体内でカルシウム濃度は変動し、複数の重要な細胞機能制御を司っている。HFKsの場合は培養液中のカルシウム濃度を上げると、速やかに分化誘導し増殖を止めることが知られている[58、59]。カルシウムはHFKsの生存を左右する重要な因子であり、次章ではI型コラーゲン線維ゲル上で培養液中のカルシウム濃度を分化誘導条件まで上げた場合のHFKsの挙動について解析する。

## 1.5 まとめ

I型コラーゲン分子上で培養したヒト表皮角化細胞はインテグリン  $\alpha2\beta1$  を介して、コラーゲン分子に接着し伸展する。その後表皮角化細胞はラミニニン5を産生し、産生されたラミニニン5が培養皿に沈着し、表皮角化細胞は沈着したラミニニン5にインテグリン  $\alpha3\beta1$ 、 $\alpha6\beta4$  を介して接着するようになる。本章では表皮角化細胞をI型コラーゲン線維ゲル上で培養し、細胞挙動を観察した。細胞ははじめインテグリン  $\alpha2\beta1$  を介して接着伸展した。その後1日経過すると、インテグリン  $\alpha2\beta1$  を含む接着斑が失われ、伸展が阻害されて丸くなり、アポトーシスが誘導された。このときインテグリン  $\alpha3\beta1$  を含む接着斑は観察されなかった。一方線維芽細胞はI型コラーゲン線維ゲル上

で伸展したまま増殖を続ける。I 型コラーゲン線維ゲル上培養でも表皮角化細胞はラミニン 5/10/11 を産生するが、産生されたラミニンは培養液中に放出され I 型コラーゲン線維ゲルには沈着しない。このとき細胞生存に関与するシグナル伝達物質である Akt は、I 型コラーゲン線維ゲル上でリン酸化が阻害されていた。I 型コラーゲン線維ゲルを表皮角化細胞培養の足場に用いると、ラミニン 5 のゲルへの沈着が認められず、I 型コラーゲン分子を用いた場合とは異なり、表皮角化細胞はラミニン 5 へのインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  を介した接着が阻害されてアポトーシスが誘導されることが示唆された。

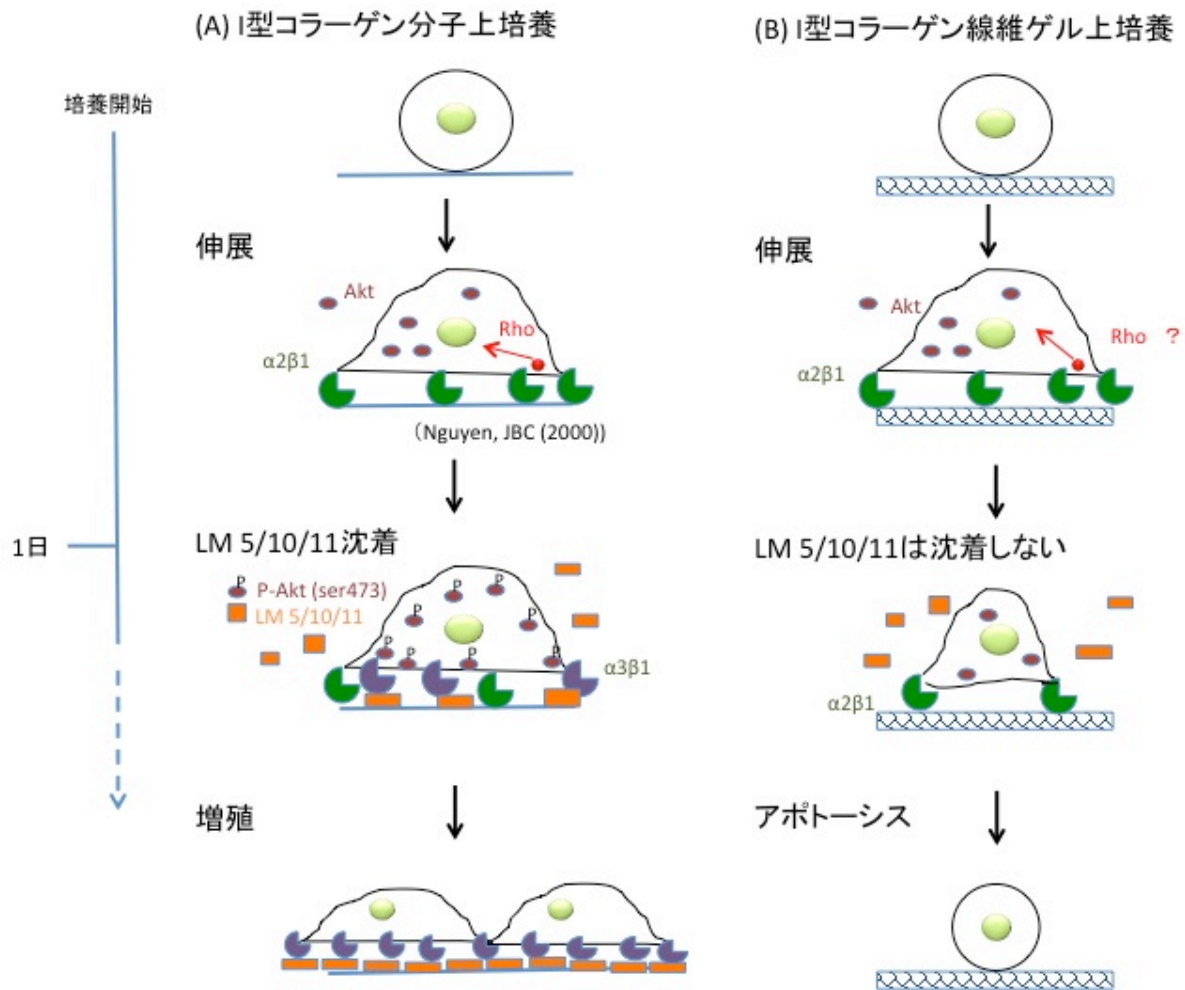


図 11 I型コラーゲン分子およびI型コラーゲン線維ゲル上で培養したHFKsが形成する接着様式の模式図

I型コラーゲン分子およびI型コラーゲン線維ゲル上で培養したHFKsは、培養初期にはインテグリン $\alpha 2\beta 1$ を介してコラーゲンに接着し、Rhoの活性化に依存して伸展する。その後HFKsは自らラミニン5を産生し、産生されたラミニン5は培養液中に放出される。ラミニン5はコラーゲン分子上での培養では培養皿の空隙に吸着するが、ゲル上には吸着しない。HFKsはI型コラーゲン分子上ではラミニン5が吸着するにつれてインテグリン $\alpha 3\beta 1$ を介して接着するようになり、PI3K/Akt経路が活性化し、伸展形態を維持したまま増殖を続ける(A)。その一方、I型コラーゲン線維ゲル上にはラミニン5が沈着しないため、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ を介した接着が形成されず、細胞は伸展が阻害されて接着が維持できなくなり、アポトーシスが誘導される(B)。

## 第2章 I型コラーゲン線維ゲル上で高濃度カルシウム培地を用いた ヒト表皮角化細胞培養における細胞挙動の解析

### 2.1 緒言

第1章では HFKs を I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した場合、生存に必要なラミニニン 5 が I 型コラーゲン線維と相互作用しないために、HFKs の足場への接着が阻害され、アポトーシスが誘導されることを示した。この細胞死の原因は、接着した足場において活性化される生存シグナルが接着不全により不活化したことにあると考えられる。そこで、不活性化した生存シグナルを別の方法で補うことができれば、細胞はゲル上でも生存する可能性が生じると仮定した。この仮定を検証するために、足場接着によらずに生存シグナルを活性化することで、HFKs が I 型コラーゲン線維ゲル上で生存する培養条件を探し、その際に HFKs が形成する接着様式を比較して、観察することにした。

カルシウムは HFKs の増殖や分化の制御因子として機能することが知られており [58、59]、培養系で細胞外カルシウム濃度が上昇すると HFKs にインボルクリン、ロリクリン等の分化マーカー発現が誘導され [60]、E-カドヘリン発現量が増加して、細胞間接着が強化される [61]。E-カドヘリンは膜 1 回貫通型細胞接着分子で、アドヘレンスジャンクションを形成して細胞間接着を強化する。膜貫通領域に隣接する部位には p120-カテニンが結合し、接着能の制御や低分子 G タンパク質の活性化などのシグナル分子として働く [62]。分化以外にも細胞外カルシウム濃度により制御される HFKs の細胞挙動は多岐にわたる。ケラチン 1/10、インボルクリン、フィラグリン等分化関連タンパク質の発現調節により、細胞骨格系の制御が行われ細胞形態が変化する [61、63]。また培養 HFKs の細胞外カルシウム濃度を 50  $\mu$ M から 2 mM に上昇すると、急速で不可逆な細胞周期停止を引き起こす [64]。逆に HFKs を培養する際、培地中のカルシウム濃度をあげて分化させると生存シグナルに関与するキナーゼである Extracellular signal regulated kinase 1/2 (Erk1/2) が一時的かつ急速に活性化する [65]。Erk1/2 活性化経路は複数あり、HFKs は細胞外カルシウム濃度による制御以外にも、



Epidermal growth factor 受容体(EGFR)の活性化によっても Erk1/2 は活性化する。この際は細胞外カルシウム依存的に活性化する機序とは異なるシグナル伝達経路が活性化している [66]。

インテグリンや EGFR など細胞表面の受容体から、細胞内部に生存、分化、アポトーシス等細胞挙動制御に関する複数のシグナルが同時に伝達される [67、68]。また活性化するインテグリンのサブタイプが異なると、下流において活性化される分子も異なり、各々のシグナルカスケードの活性化はクロストークすることも多い。たとえば生存制御に関しては古典的 MAPK(Ras、MEK、Erk1/2)経路ほか、p38 経路、JNK 経路、PI3K 経路等複数が報告されており、PI3K 下流で活性化する Akt リン酸化はアポトーシスを阻害することが知られている [68]。HFKs の場合、ラミニン 5 へのインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  を介した接着に続いて、インテグリン  $\alpha 6\beta 4$  を介した接着が惹起され、PI3K を活性化することが報告されている [55]。さらにインテグリン  $\alpha 6\beta 4$  を介した接着に引き続いて Shc がリン酸化し、Grb2 の集積、Erk および JNK の活性化が順次誘導される。この JNK カスケード活性化はインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  を介するコラーゲンへの接着によっては誘導されない [69]。インテグリン  $\alpha 6\beta 4$  は、生体ではプレクチン、BP230、BP180 と並んでヘミデスモソーム構成成分であるが、培養系ではラミニン 5 を認識して接着斑様に染色される [70]。接着斑は細胞膜内外の多種類の接着斑構成成分で形成される接着様式で、内外双方向にシグナルを伝達する機能があり、さらに重合したアクチンと相互作用し細胞形態に影響を与える [71]。基質への接着により活性化するシグナル伝達は、細胞外では細胞膜を貫通しているインテグリンの細胞外ドメインが特異的な接着基質を認識し、細胞内にシグナルを伝達する [49]。細胞内ではインテグリンの細胞内ドメインと相互作用するビンキュリン、パキシリン、接着斑キナーゼ (FAK) 等複数のタンパク質の集合、リン酸化によりシグナルカスケードが順次活性化され、生存制御因子の核内移行等が誘導され、細胞挙動を制御する [72]。

本章では生存シグナルをより活性化するために、HFKs 培養液のカルシウム濃度を 30  $\mu\text{M}$  から 1.8 mM に変換した培養条件で、I 型コラーゲン線維ゲル上で HFKs を培養し、ラミニン 5 の沈着、HFKs が形成する接着様式と活性化する生存シグナルを観察し、細胞接着と細胞死の関連性を調べた。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 細胞ならびに培養基質の調製

第1章同様、HFKsはBoyce and Hamらの方法に従って調製し[26]、表皮角化細胞用無血清培地K110 type II(極東製薬工業株式会社、東京)を用いて培養した。I型コラーゲンは新生仔牛皮膚より0.5 M酢酸を用いるKleinmanらの方法で調製し[15]、1 mM塩酸に置換した溶液を用意した。培養基質として用いるため2つの異なる方法でI型コラーゲンを培養容器に処理した。I型コラーゲンを分子状に培養容器に塗布(コート)するために、I型コラーゲン塩酸溶液を10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、室温で2時間静置した後、PBS(-)で洗浄し余剰のコラーゲンを除去した。I型コラーゲンの線維再構成のために、I型コラーゲン溶液を最終濃度1  $\text{mg}/\text{mL}$ になるようにPBS(-)で調製し、培養容器に分注した後、37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$ インキュベーター内で2時間、静置した。培養容器は12-well heavy Teflon-coated slides (Cell-lineAssociates、NJ、USA)、および12-well cell culture plateを用いた。

### 2.2.2 抗体

抗ヒトインボルクリン-ウサギポリクローナル抗体はBiogenesis (South Coast、UK)、抗ヒトビンキュリン-マウスモノクローナル抗体は ICN Biomedicals (CostaMesa、CA、USA)、抗ヒトエピライグリン(ラミニン)-マウスモノクローナル抗体はChemicon International (Temecula、CA、USA)より購入した。抗インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -マウスモノクローナル抗体(P4B4)および抗インテグリン $\alpha 3\beta 1$ -マウスモノクローナル抗体(P1F2)は、W. G. Carter博士(Fred Hutchinson CancerResearch Center、Seattle、WA、USA)により供与された。抗インテグリン $\alpha 6\beta 4$  (CD49f)-ラットモノクローナル抗体はImmunotech (Marseille、France)より入手した。抗Akt-ウサギポリクローナル抗体と抗リン酸化Akt (Ser473)-ウサギポリクローナル抗体はCell Signaling Technology (Beverly、MA、USA)より購入、抗Erk1/2-マウスモノクローナル抗体は、Stresgen Biotechnologies (Victoria、BC、Canada)より、抗リン酸化Erk1/2-ウサギポリクローナル抗体(E-4) (Tyr204) はSanta Cruz Biotechnology (Santa Cruz、CA、USA)、抗FAK-マウスモノクローナル抗体(クロ

ーン4.47) は Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)より購入した。抗リン酸化FAK (pY397) -ウサギポリクローナル抗体はBioSource International (Camarillo, CA, USA)より購入した。抗IV型コラーゲン (ウシ腎臓、基底膜) 抗体はLSL社より、抗VII型-マウスモノクローナル抗体、抗コラーゲン-マウスモノクローナル (クローン LH7.2) はSigma社より購入した。抗ヒトE-カドヘリン、抗ヒトBP180抗体は小林孝志博士(千葉大学)より供与された。

### 2.2.3 アポトーシス誘導と分化誘導細胞の解析

第1章同様、TUNEL法でアポトーシス誘導を定量した。細胞播種前に、12-well heavy Teflon-coated slides (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を上述の方法でI型コラーゲン溶液処理して、I型コラーゲン分子、コラーゲン線維ゲルを調製した。HFKs ( $5 \times 10^3$  cells/well)を基質上に播種し、4時間、1日、2日間、4日間培養した後、2%ホルムアルデヒド溶液を室温で20分間処理して固定し、1% Triron X-100 溶液を室温で2分間処理した。PBS(-)で細胞を洗浄し、1% BSA 溶液で室温、1時間ブロッキング処理した後、DNA鎖の分解断片を定量キット In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を用法通りに用いて細胞を標識し、蛍光顕微鏡下で観察、アポトーシス誘導細胞を計数した[41]。同時に DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) (1% BSA 溶液にて500倍に希釈)で細胞核を染色し、蛍光顕微鏡下で計数し、全細胞数とした。各条件で全計数細胞が500~1000細胞となるように代表的な染色像を示す視野を観察した。TUNEL陽性細胞数をDAPI陽性細胞数で除算し、アポトーシス誘導率とした。

細胞分化を、分化マーカーであるインボルクリン発現細胞で評価した。12-well heavy Teflon-coated slidesを上述の方法でI型コラーゲン溶液処理して培養基質とし、HFKs ( $5 \times 10^3$  cells/well)を基質上に播種し、4時間、1日、2日間、4日間培養した。2%ホルムアルデヒド溶液で細胞を固定し、0.1% Triron X-100 溶液を用いて透過処理を行った。PBS(-)で細胞を洗浄、1% BSA溶液でブロッキング後、抗インボルクリン抗体、およびDAPI (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) (1% BSA溶液にて500倍に希釈)を用いて染色し、蛍光顕微鏡下で観察、細胞数を計数した。各条件で全計数細胞が500

～1000細胞となるように観察し、インボルクリン陽性細胞数をDAPI陽性細胞数で除算し、分化誘導率とした。

#### 2.2.4 走査型電子顕微鏡観察

各基質上で培養した HFKs から培地を除去し細胞と基質を PBS(-)で洗浄した。その後改変ザンボーニ固定液 (0.2% ピクリン酸、4% パラホルムアルデヒド、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4)) を用いて 30 分処理したのち、1% オスミウム酸ザンボーニ固定液で 30 分固定した後、エタノールを用いて脱水した。試料を臨界点乾燥装置 (HITACHI Critical Point Dryer Model HCP-2、日立、東京) を用いて乾燥させた。イオンスパッタ法で Model 108 auto (Cressington Co., Watford, UK) を用いて白金を蒸着し、走査型電子顕微鏡 S-4500 (日立、東京) で観察した。

#### 2.2.5 蛍光免疫染色解析

細胞播種前に、12-well heavy Teflon-coated slides (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を 1 章 (1.2.1) と同様の方法で I 型コラーゲン溶液によって表面処理をして、I 型コラーゲン分子、コラーゲン線維ゲルを調製した。HFKs ( $5 \times 10^3$  cells/well) を基質上に播種し、4 時間、1 日、2 日間培養した後、2% ホルムアルデヒド溶液を室温 20 分処理で固定し、0.1% Triron X-100 溶液、2 分間処理した。PBS(-) で細胞を洗浄し、1% BSA 溶液で室温、1 時間ブロッキング処理した後、各一次抗体を室温で 4 時間静置し、PBS-T で洗浄後に AlexaFluor 488 標識抗体を室温で 1 時間静置したのち、PBS-T で洗浄して余剰の抗体を洗い流し、2.5 mg/mL 1,4-diazabicyclo-[2.2.2] octane (Sigma Chemical Co., USA) を含む 90% グリセロール溶液を用いて封入、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 410 system Plan-Apochromat 63/1.40 Oil (Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察、撮影した。

#### 2.2.6 タンパク質リン酸化酵素阻害アッセイ

細胞播種前に、12-well heavy Teflon-coated slides (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を I 型コラーゲン溶液で処理して、I 型コラーゲン分子、I 型コラーゲン線維ゲルを調製した。HFKs ( $5 \times 10^3$  cells/well) は K110 type II 培地に懸濁し、カルシウム濃度を調

整し、同時に PI3K 阻害剤 LY294002(最終濃度 50  $\mu\text{M}$ ) [73]、MAPK 阻害剤 SB202190(最終濃度 1  $\mu\text{M}$ ) [74]と U0126(最終濃度 500 nM) [75]を添加した。各リン酸化阻害剤は Merck Bioscience (東京) より購入した。細胞を基質上に播種し 2 日間培養した後 2 % ホルムアルデヒド溶液を用いて室温で 20 分間処理して固定し、1 % Triton X-100 溶液を室温で 2 分間透過処理を行った。DAPI (Vector Laboratories Inc., CA, USA)を用いて細胞核を染色し、形態を蛍光顕微鏡下で観察し計数した。

### 2.2.7 ウェスタンブロッティング解析

細胞播種前にI型コラーゲン溶液を用いて24-well plateを処理し、I型コラーゲン分子、I型線維ゲルの基質を調製した。基質上に、HFKs ( $1 \times 10^6$  cells/ well) をK110 type II培地に懸濁して播種し、1時間、4時間、22時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。PBS(-)で洗浄した後、I型コラーゲン線維ゲルの場合はゲルと細胞をPBS(-)で洗浄した後ともに回収し、1000 rpm、5分間遠心した後沈殿に0.5 mL、cell lysis緩衝液(20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 % Triton X-100、2.5 mM sodium pyrophosphate、1 mM  $\beta$ -glycerol phosphate、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>3</sub>、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin、1 mM PMSF)を加えて試料とした。I型コラーゲン分子上培養細胞は、PBS(-)で洗浄した後0.5 mL cell lysis緩衝液を加え、細胞層をかきとって回収し試料とした。各試料を5秒、4回超音波破碎し、10700 gで10分、4 °Cで遠心後上清を回収した。電気泳動用試料に等量のSDS-PAGE泳動用緩衝液(4 % SDS、125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、15 % glycerol、0.018 % bromophenol blue)を加えて 3分間湯煎し、10 % ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、ニトロセルロース膜 (Advantec S045A224D、東洋濾紙) に転写した。転写後のニトロセルロース膜を5 % nonfat dry milk/TBS-T溶液でブロッキングし、各一次抗体を5 % nonfat dry milk/TBS-T溶液を用いて希釈し、膜を浸して室温で4時間静置した。TBS-T溶液で洗浄後、希釈二次抗体を添加して室温で1時間静置した。TBS-Tを用いて余剰の抗体を洗浄した後、LumiGLO<sup>®</sup> chemiluminescent reagents (Kirkegaard & Perry Laboratories, MD, USA)を用いて可視化した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 細胞形態

低カルシウム濃度培地（含有カルシウム 30  $\mu\text{M}$ ）を用いた培養で、HFKs は I 型コラーゲン分子上で良く伸展した（図 12A、図 13A）。一方、低カルシウム濃度培地を用いて I 型コラーゲン線維ゲル上で培養すると、HFKs の伸展は阻害され丸くなった（図 12C、図 13C）。

高カルシウム濃度培地（含有カルシウム 1.8 mM）を用いて I 型コラーゲン分子上で培養すると、細胞間の相互作用が強まり細胞が隙間なく伸展し、単層に伸展するところが観察された（図 12B、図 13B）。高カルシウム濃度培地を用いて I 型コラーゲン線維ゲル上で培養すると、HFKs は部分的に層をなし、細胞同士が重なり合い細胞塊を形成した。細胞塊上部の細胞は比較的収縮しており、ゲルと接着している細胞は比較的伸展していた（図 12D、図 13D）。

### 2.3.2 アポトーシスと分化誘導

低カルシウム濃度培地を用いた HFKs 培養で、I 型コラーゲン分子上では培養 4 日までアポトーシス誘導および分化誘導はなかった（図 12E、F）。一方、低カルシウム濃度培地を用いて I 型コラーゲン線維ゲル上で培養すると、すべての HFKs は分化せず、培養 2 日目でアポトーシスを誘導した（図 12E、F、第 1 章）。

高カルシウム濃度培地を用いて培養すると、HFKs は I 型コラーゲン分子および I 型コラーゲン線維ゲル上で、培養 1 日から分化マーカーを発現し、培養 4 日ですべての細胞が分化マーカーを発現した（図 12F）。すべての細胞で培養 4 日までアポトーシスは誘導されなかった（図 12E）。

### 2.3.3 ラミニン 5 の沈着

I 型コラーゲン分子上で HFKs を培養すると、培地のカルシウム濃度に関わらずラミニン 5 は細胞周囲に沈着した。沈着量は高カルシウム濃度培地で培養した方が多く、細胞塊底面全体、特に中央部に多かった。沈着量は 2 日まで経時的に増大した（図 14A-F）。

第1章で示したように、低カルシウム濃度培地を用いたI型コラーゲン線維ゲル上での培養ではラミニン5は沈着しなかった(図14G-I)。高カルシウム濃度培地を用いたI型コラーゲン線維ゲル上での培養では、ラミニン5は細胞塊周辺に沈着した。沈着量はI型コラーゲン分子上培養の場合よりも少なかった(図14J-L)。

#### 2.3.4 インテグリンの局在

低カルシウム濃度培地を用いたI型コラーゲン分子上の培養では、HFKsは培養1日、2日目とも細胞周囲に接着斑が観察された(図15A、図16A)。1日目はインテグリン $\alpha 2\beta 1$ の接着斑への集積が強くインテグリン $\alpha 3\beta 1$ の集積は弱いですが、培養2日目には発現は逆にインテグリン $\alpha 3\beta 1$ の集積が強くなっていた(図15B、C、図16B、C)。インテグリン $\alpha 6\beta 4$ は細胞周囲に点状あるいは線状に強く染色された(図15D、図16D)。低カルシウム濃度培地を用いたI型コラーゲン線維ゲル上では、接着斑様構造はほとんど観察されず、2日目は完全に丸くなり接着は失われた(図16I-L)。これは第1章での知見と合致する。インテグリン $\alpha 6\beta 4$ もほとんど染色されなかった(図15L、図16L)。

高カルシウム濃度培地を用いて培養した場合、I型コラーゲン分子上では培養1日、2日目とも細胞塊周囲、および細胞塊の底面の個々の細胞周囲に、ビンキュリンによる接着斑のはっきりした染色が認められた(図15E、図16E)。接着斑に集積するインテグリンは経時的に $\alpha 2\beta 1$ から $\alpha 3\beta 1$ に変化した。インテグリン $\alpha 6\beta 4$ の集積も培養1日から2日目まで継続的に観察された(図15F-H、図16F-H)。高カルシウム濃度培地を用いたI型コラーゲン線維ゲル上の培養では、接着斑様のビンキュリンの集積は、細胞塊の底面周縁部に認められた。ビンキュリンの集積は、I型コラーゲン線維が集積している場所に、線維に添う形で染色された。染色された接着斑様構造はI型コラーゲン分子上培養の場合よりも細長い形であった。一方、細胞塊底面での染色は弱かった(図15M、図16M)。インテグリン $\alpha 2\beta 1$ の接着斑様構造への集積は2日目まで保持されていた(図15N、図16N)。インテグリン $\alpha 3\beta 1$ の細胞塊周辺部への集積は、培養1日目、培養2日目ともに観察された(図15O、図16O)。インテグリン $\alpha 6\beta 4$ の染色も維持されたが、強く染色される部分があり局在が示唆された(図15P、図16P)。

高カルシウム濃度培地を用いた場合、I型コラーゲン線維ゲル上で培養した HFKs と I型コラーゲン分子上で培養した HFKs のビンキュリン染色像を比較すると、接着斑様構造の形が異なることがわかった。培養2日目に形成された接着斑様構造の長軸の長さを計測すると、I型コラーゲン線維ゲル上では長さは様々で(2~9  $\mu\text{m}$  (平均 7.1  $\mu\text{m}$ , n=30))、線維上に細長く形成されていた。一方 I型コラーゲン分子上で培養で形成される接着斑様構造の形は比較的均一で、長さは短く 2~4  $\mu\text{m}$  (平均 3.4  $\mu\text{m}$ , n=30) であった (データ非掲載)。

### 2.3.5 ラミニン5以外の基底膜関連タンパク質の沈着

I型コラーゲン分子上では培地のカルシウム濃度に関わらず、IV型コラーゲン (図 17A、C)、BP180 (XVII型コラーゲン) (図 18A、D) が沈着したが、VII型コラーゲンは沈着しなかった、(図 18B、E)。

第1章で示したように低カルシウム濃度培地を用いた I型コラーゲン線維ゲル上培養では、HFKs とゲルとの接着は阻害され、解析したすべての型のコラーゲンは沈着していなかった (図 17E、図 18H、図 18G)。高カルシウム濃度培地を用いて I型コラーゲン線維ゲル上で培養した場合は、解析したすべての型のコラーゲン、IV型コラーゲン (図 17G)、BP180 (XVII型コラーゲン) (図 18J)、VII型コラーゲン (図 18K) の沈着が観察された。E-カドヘリンは高カルシウム濃度培地を用いた培養で I型コラーゲンの会合体形成の有無にかかわらず細胞間に発現した (図 17D、H、図 18F、L)。低カルシウム濃度培地を用いた培養条件では発現しなかった (図 17B、F、図 18C、I)。

### 2.3.6 アポトーシス誘導に及ぼすリン酸化酵素阻害剤の作用

I型コラーゲン線維ゲル上、あるいは I型コラーゲン分子の上で、HFKs の生存に依存するシグナル伝達経路を調べるために、3種類のリン酸化酵素阻害剤を用いて生存に関与するシグナル伝達経路の活性化を阻害し、HFKs に誘導されるアポトーシスを観察した。DAPI を用いて細胞核を染色すると、細胞核の凝集によりアポトーシス誘導細胞の判別ができる [41]。各基質上でリン酸化酵素阻害剤を添加し、2日間培養した HFKs を固定後、DAPI で染色し、アポトーシス誘導状態を観察した。MEK1/2 阻害



剤として U0126[73]を、p38MAPK 阻害剤として SB202190[74]を、そして PI3 キナーゼ活性化阻害剤として LY294002[75]を用いた。

I 型コラーゲン分子上で培養したとき、HFKs は培地カルシウム濃度に依らず、PI3K 阻害剤によりアポトーシスが誘導された (図 19D、H)。その一方、MEK1/2 および p38 MAPK 阻害剤の影響は受けなかった (図 19B、F)。

I 型コラーゲン線維ゲル上で低カルシウム濃度培地を用いて培養した場合は、リン酸化酵素阻害剤の種類、あるいは添加の有無にかかわらずゲル上に接着した細胞数は少なく、また接着した細胞にアポトーシスが誘導された (図 19I-L)。

I 型コラーゲン線維ゲル上で高カルシウム濃度培地を用いた培養では、細胞塊が形成されゲルに接着した細胞群と直接接着しない細胞群が生じた。PI3K 阻害剤添加により、ゲルに接着した細胞にアポトーシスが誘導されたが、ゲルに接着しない細胞には影響がなかった (図 19P)。一方 MEK1/2 阻害剤を添加すると逆に、ゲルに接着していた細胞にはアポトーシスが誘導されないが、細胞塊上部の細胞に誘導された (図 19N)。p38 経路の活性化阻害剤は今回の培養条件では HFKs 生存に影響を及ぼさなかった (図 19C、G、K、O)。

### 2.3.7 生存シグナル伝達制御関連タンパク質の活性化

前節の結果を考慮し、I 型コラーゲンの会合体形成の有無、および培養液のカルシウム濃度が HFKs の生存シグナル活性化に及ぼす影響を解析することにした。具体的には I 型コラーゲン線維ゲルおよび I 型コラーゲン分子上で、カルシウム濃度の異なる培養液を用いて培養した HFKs を試料とし、抗 Akt、抗 Erk1/2 リン酸化抗体を用いてウエスタンブロッティング解析を行った。

Akt の活性化に関しては、I 型コラーゲン分子上で培養した場合は、培養液のカルシウム濃度に関わらず、総タンパク質量およびリン酸化タンパク質量は共に経時的に増加した。(図 20 レーン 1、3)。一方 I 型コラーゲン線維ゲル上の培養ではカルシウム含有濃度に関わらず、Akt のタンパク質は発現しているがリン酸化は培養 1 時間目から抑制され経時的に低下した (図 20 レーン 2、4)。

コラーゲン分子上で培養ではカルシウム濃度に関わらず、Erk1/2 のタンパク質量およ

びリン酸化タンパク質量は共に経時的に増加した (図 20 レーン 1、3)。I 型コラーゲン線維ゲルの上で低カルシウム濃度培地を用いて培養した HFKs は、Akt 同様、Erk1/2 のタンパク質は発現しているがリン酸化は経時的に低下した (図 20 レーン 2)。一方、I 型コラーゲン線維ゲル上で高カルシウム濃度培地を用いた培養では Erk1/2 タンパク質およびリン酸化は経時的に増加した (図 20 レーン 4)。

#### 2.3.8 接着斑キナーゼの活性化

I 型コラーゲン分子上で培養した場合、培地のカルシウム濃度に関わらず、FAK のタンパク質量およびリン酸化タンパク質量は共に経時的に増加し、接着斑を介して細胞内にシグナルが伝達されていることが示唆された (図 20 レーン 1、3)。一方 I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した場合は、培地のカルシウム濃度に依存せず、Akt 同様 FAK のタンパク質は発現していたが、397 位のチロシンのリン酸化は 4 時間では観察されるが、その後経時的に抑制され、培養後 22 時間では検出できなかった (図 20 レーン 2、4)。

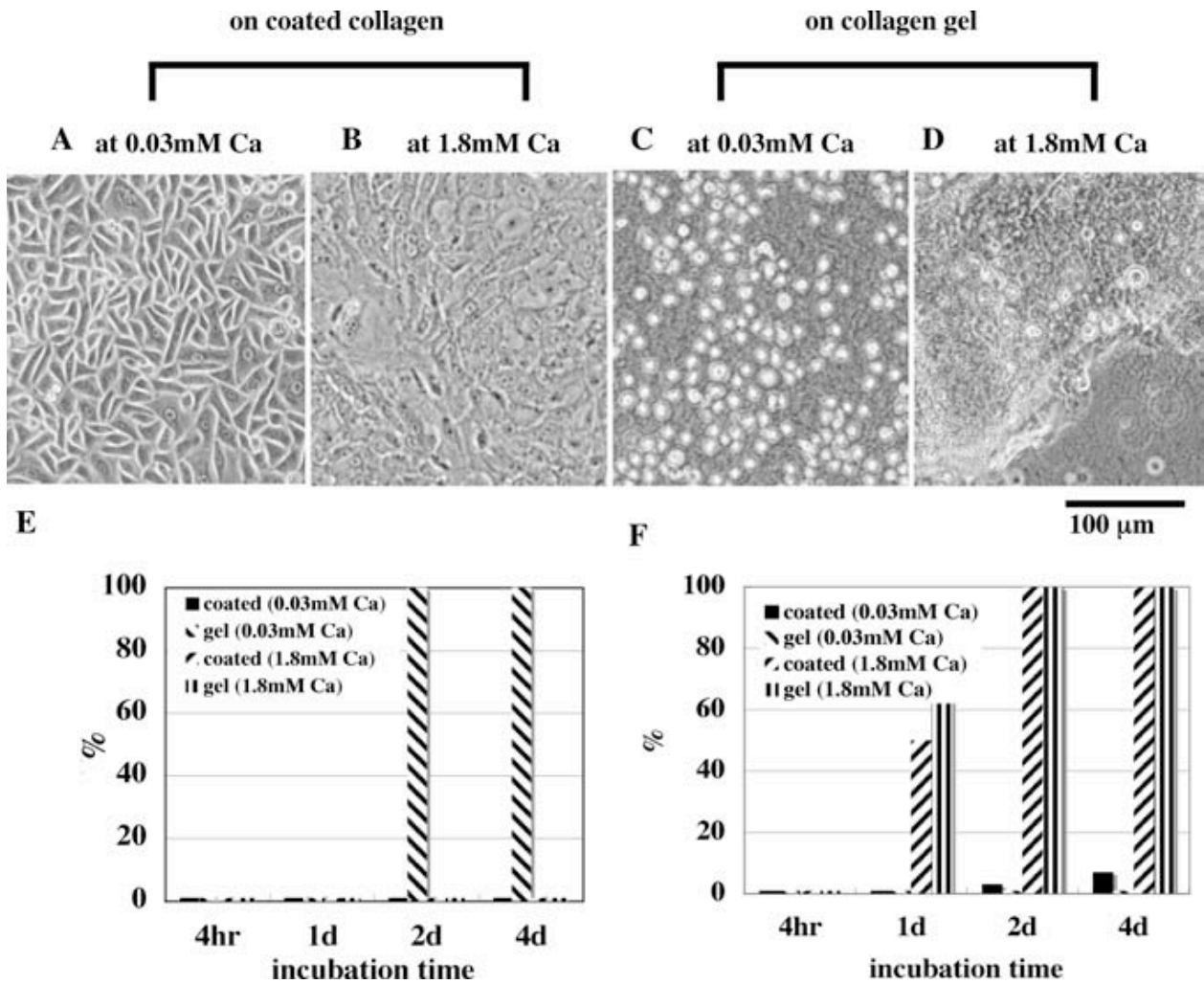


図 1 2 HFks の位相差顕微鏡観察、アポトーシス誘導率および分化誘導率

HFks を I 型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (A)、1.8 mM カルシウム含有培地 (B)、I 型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (C)、1.8 mM カルシウム含有培地 (D) を用いて 1 日間培養した。TUNEL 法でアポトーシス誘導細胞を検出し、アポトーシス誘導の割合を提示した (E)。インボルクリン発現細胞を検出し、分化誘導率を見積もった。(F)。

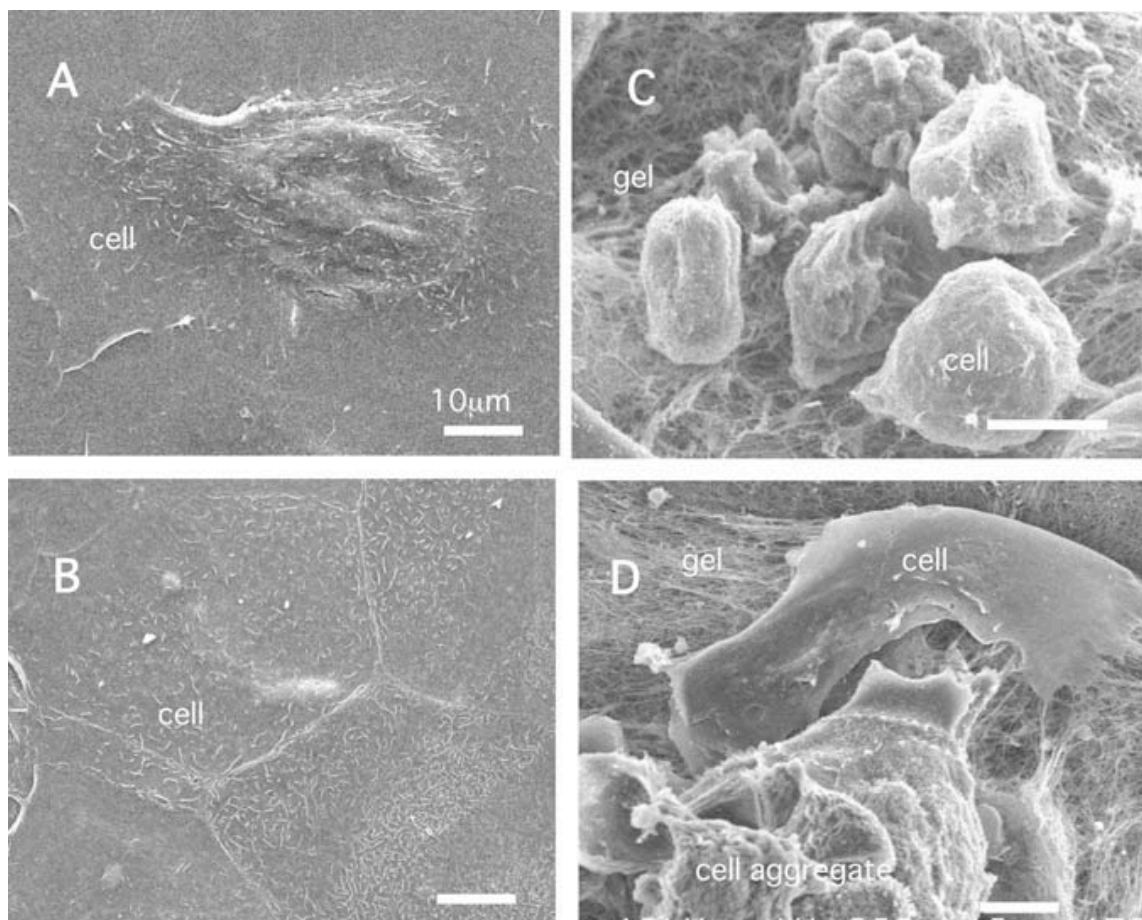


図 1 3 HFks の電子顕微鏡観察像

HFks を I 型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (A)、1.8 mM カルシウム含有培地 (B)、I 型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (C)、1.8 mM カルシウム含有培地 (D) を用いて 1 日間培養後に固定した後、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。バーは 10  $\mu$ m を示す。

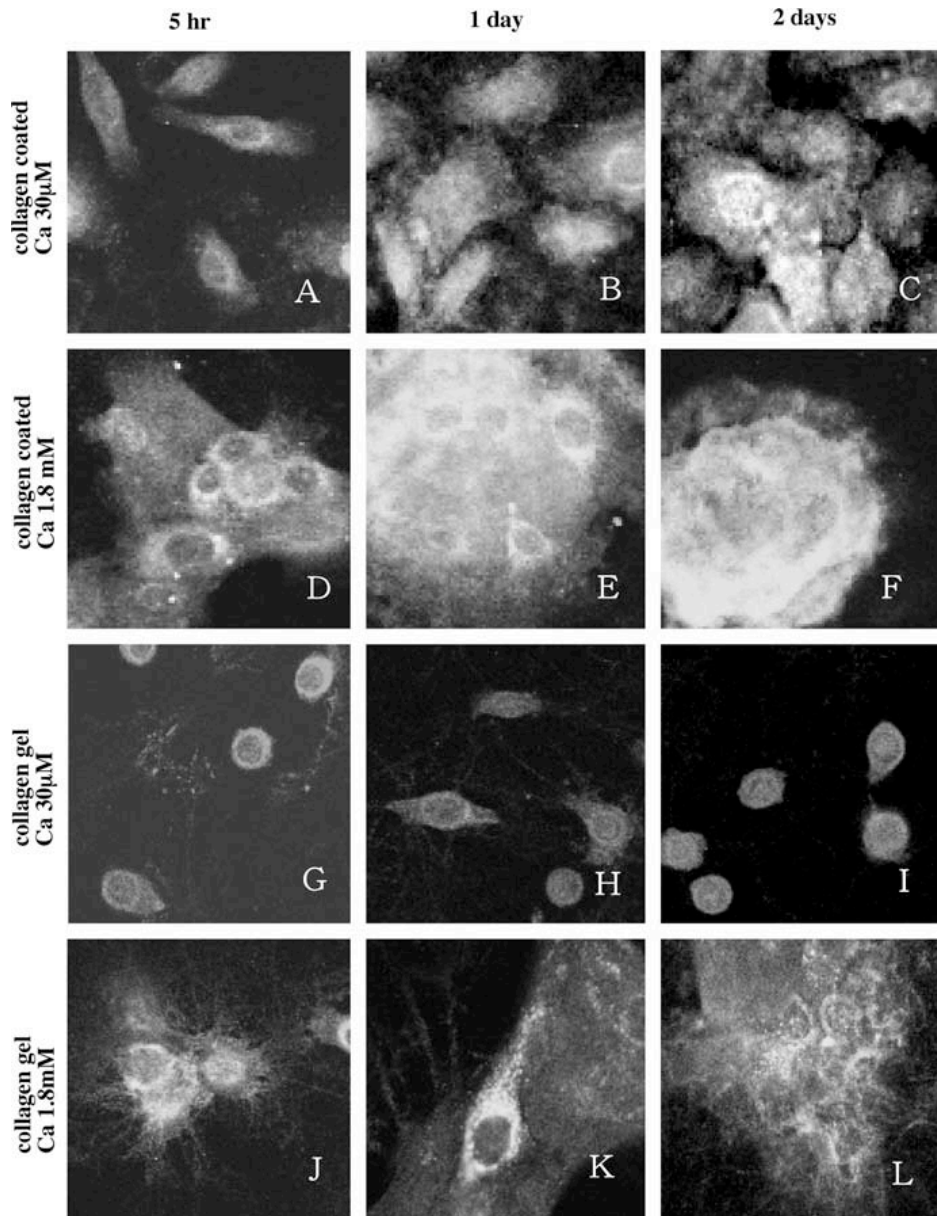


図 1 4 HFKs が産生するラミニン 5 の蛍光免疫染色像

HFKs は I 型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ Mカルシウム含有培地 (A-C)、1.8 mM カルシウム含有培地 (D-F)、I 型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ Mカルシウム含有培地 (G-I)、1.8 mM カルシウム含有培地 (J-L) を用いて 5 時間(A、D、G、J)、1 日(B、E、H、K)、2 日(C、F、I、L) 間培養した。その後固定し、抗ラミニン 5 抗体を用いて沈着したラミニン 5 を検出した。

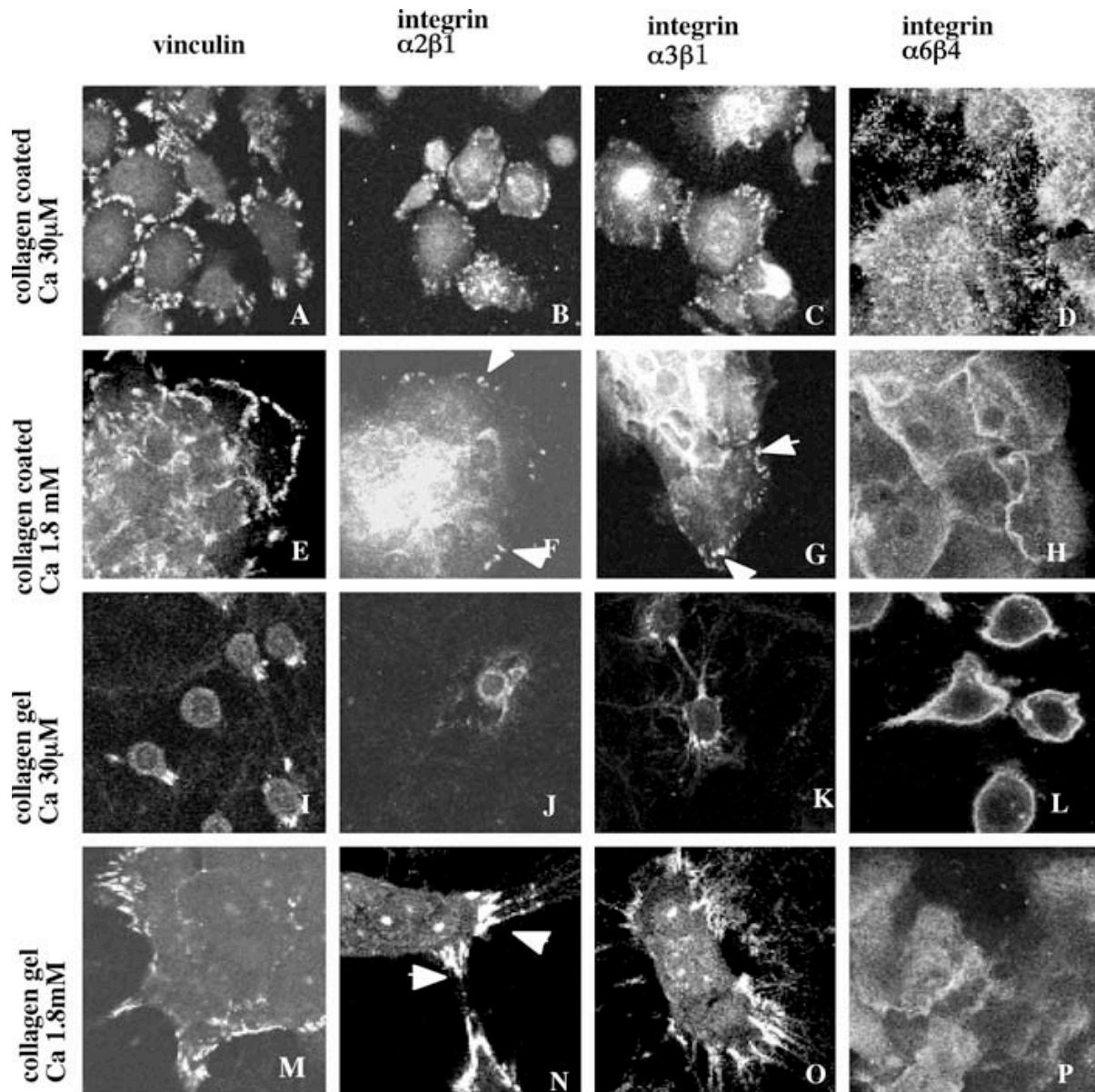


図 1 5 HFKs が形成する培養 1 日目の接着斑の蛍光免疫染色像

HFKs は I 型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (A-D)、1.8 mM カルシウム含有培地 (E-H)、I 型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (I-L)、1.8 mM カルシウム含有培地 (M-P) を用いて 1 日間培養した。その後固定し、抗ビンキュリン抗体(A、E、I、M)、抗インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  抗体(B、F、J、N)、抗インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  抗体(C、G、K、O)および、抗インテグリン  $\alpha 6\beta 4$  抗体(D、H、L、P)、を用いてインテグリンを検出した。

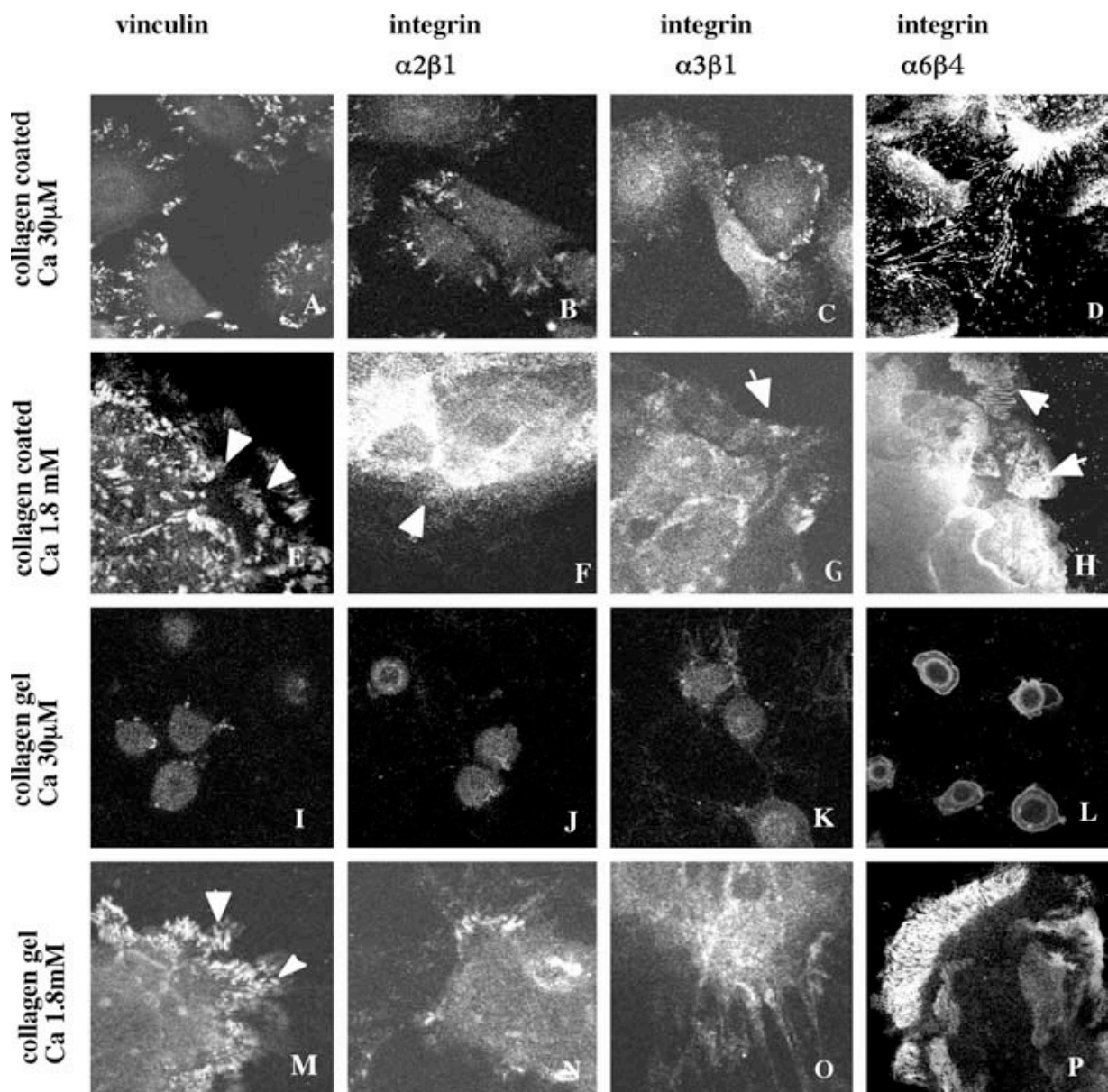


図 1 6 HFKs が形成する培養 2 日目の接着斑の蛍光免疫染色像

HFKs は I 型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (A-D)、1.8 mM カルシウム含有培地 (E-H)、I 型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (I-L)、1.8 mM カルシウム含有培地 (M-P) を用いて 2 日間培養した。その後固定し、抗ビンキュリン抗体(A、E、I、M)、抗インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  抗体(B、F、J、N)、抗インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  抗体(C、G、K、O)および、抗インテグリン  $\alpha 6\beta 4$  抗体(D、H、L、P)、を用いてインテグリンを検出した。

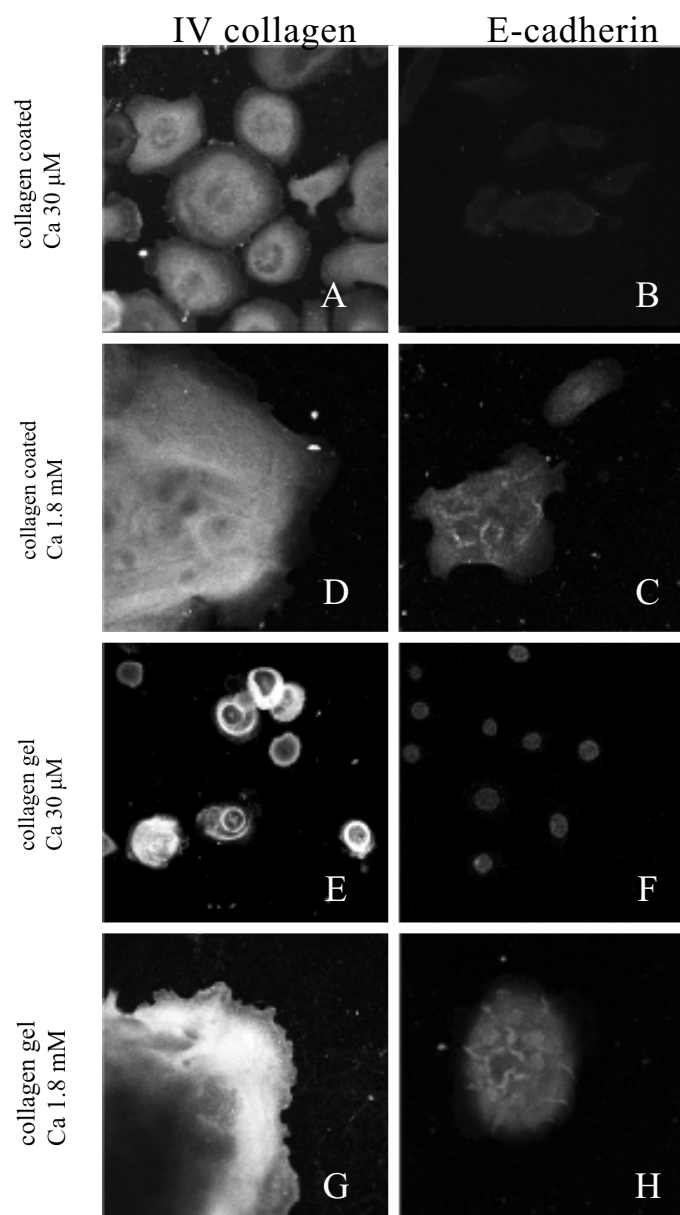


図 1 7 培養 1 日目 HFKs が産生する IV 型コラーゲンおよび E-カドヘリンの蛍光免疫染色像

HFKs は、I 型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地(A、B)、1.8 mM カルシウム含有培地(C、D)を、I 型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地(E、F)、1.8 mM カルシウム含有培地(G、H)を用いて 1 日間培養した。固定した後、抗 IV 型コラーゲン抗体(A、C、E、G)および、抗 E-カドヘリン抗体(B、D、F、H)を用いて染色した。



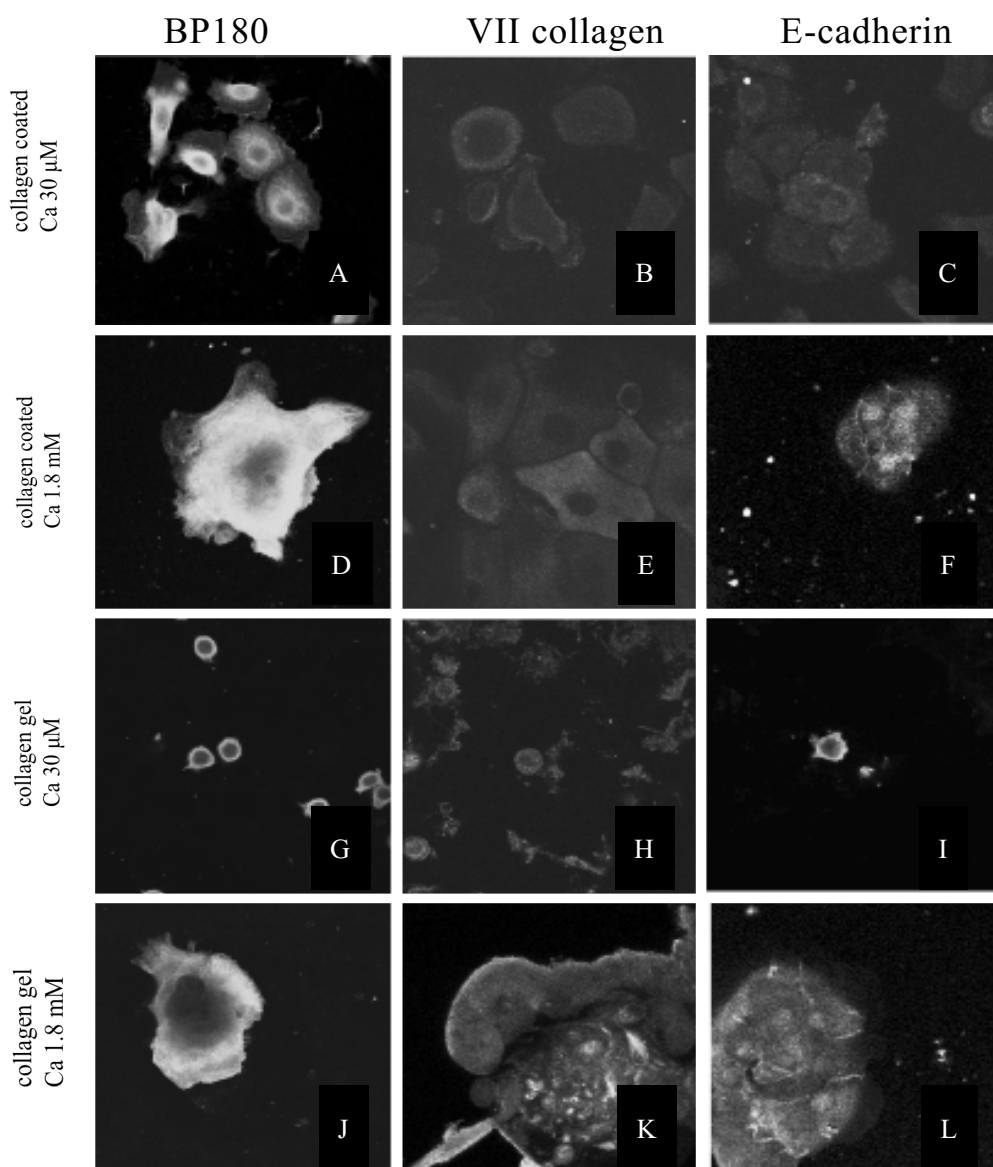


図 1 8 培養 2 日目に HFKs が産生する BP180、VII 型コラーゲンおよび E-カドヘリンの蛍光免疫染色像

HFKs は、I 型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ Mカルシウム含有培地(A-C)、1.8 mM カルシウム含有培地(D-F)を、I 型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ Mカルシウム含有培地(G-I)、1.8 mM カルシウム含有培地(J-L)を用いて 2 日間培養した。固定した後、抗 BP180 抗体(A、D、G、J)、抗 VII 型コラーゲン抗体(B、E、H、K)および、抗 E-カドヘリン抗体(C、F、I、L)を用いて検出した。

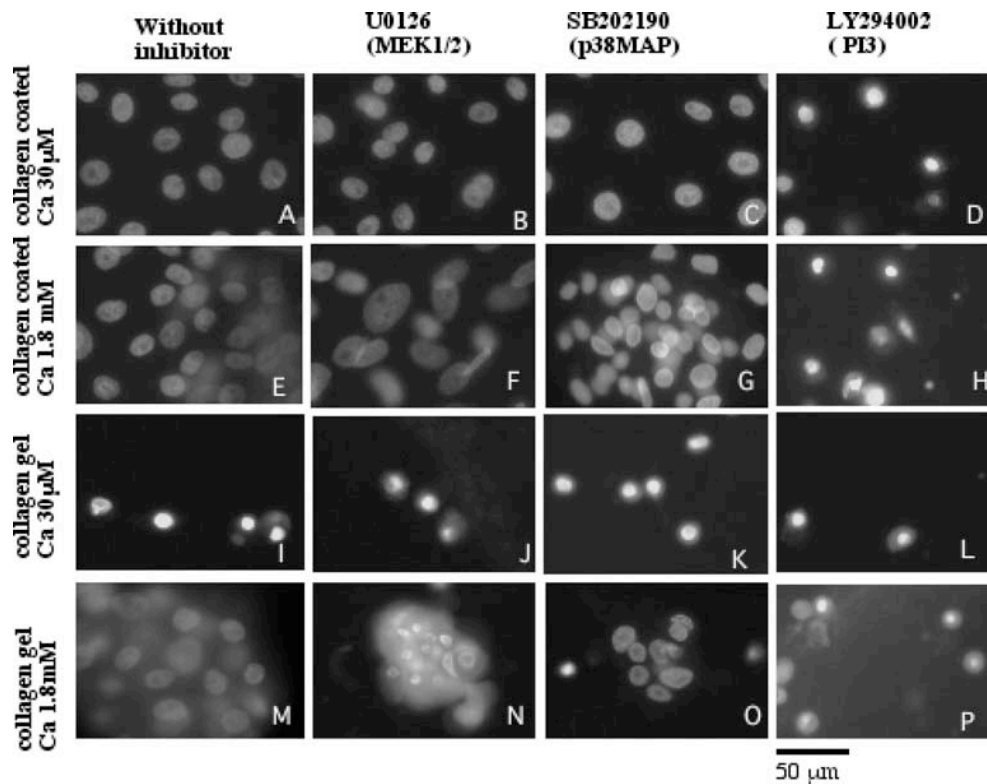


図 1 9 キナーゼ阻害剤とアポトーシス誘導の相関性

HFKs は I 型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ Mカルシウム含有培地 (A-D)、1.8 mM カルシウム含有培地 (E-H) を用いて、I 型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ Mカルシウム含有培地 (I-L)、1.8 mM カルシウム含有培地 (M-P) を用いて 2 日間培養し、DAPI を用いて染色し核の形態を観察し、アポトーシス誘導細胞を観察した。各種キナーゼ阻害剤は、PI3K 阻害剤として LY294002 (最終濃度 50  $\mu$ M)、MAPK 阻害剤として SB202190 (最終濃度 1  $\mu$ M)と U0126 (最終濃度 500 nM)を添加および無添加で培養を行った。

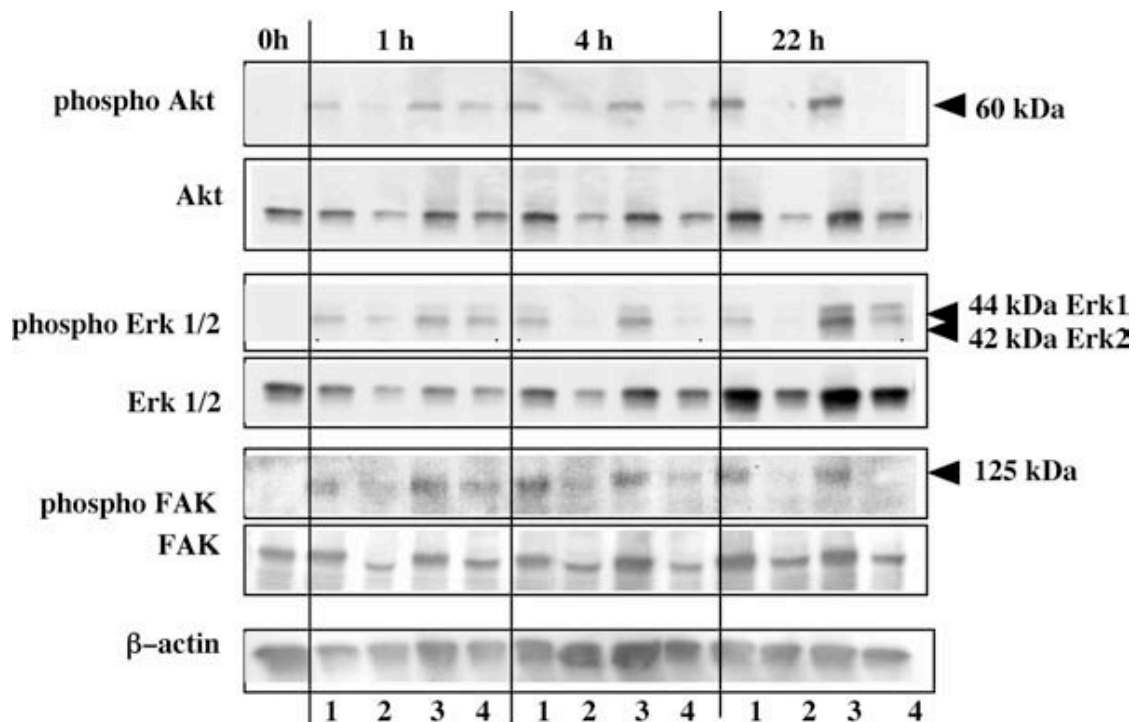


図 20 HFKs におけるリン酸化 Akt、Erk1/2、FAK のウエスタンブロッティング解析

HFKs は I 型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (レーン 1)、1.8 mM カルシウム含有培地 (レーン 3) を用いて、I 型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ M カルシウム含有培地 (レーン 2)、1.8 mM カルシウム含有培地 (レーン 4) を用いて培養した。1 時間 (1 h)、4 時間 (4 h) そして 22 時間 (22 h) 培養後、細胞を可溶化し試料とした。電気泳動後にニトロセルロース膜に転写して抗 Akt 抗体および抗 p-Akt 抗体、抗 Erk1/2 抗体および抗 p- Erk1/2 抗体、そして抗 FAK 抗体および抗 p-FAK 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。内部標準には  $\beta$ -アクチンを用いた。

## 2.4 考察

第1章の解析から、I型コラーゲン線維ゲルの上で低カルシウム濃度培地を用いたHFKsの培養では、I型コラーゲン線維ゲルとラミニン5が結合しないためにHFKsのゲルへの接着が不全になり、アポトーシスが誘導されることが示された。一方、フローティングラフト法を用いるとHFKsはI型コラーゲン線維ゲル上で接着を維持して生存し、ラミニン5を含む基底膜様構造を形成する[27、28]。本章ではこのような差異が生じる原因を解明するため、HFKsがI型コラーゲン線維ゲル上で生存する条件を求め、ゲル上に形成される接着様式をI型コラーゲン分子上で形成される接着様式と比較し、その差違をあきらかにすることを目的とした。HFKsの培養では細胞外カルシウム濃度を上げると、生存シグナル活性化が亢進する[76]。そのため培地のカルシウム濃度を上げることで、I型コラーゲン線維ゲル上でもHFKsが生存することが期待できる。そこでカルシウム量を1.8 mMに上げてHFKsを培養することにした。培地のカルシウム濃度が30  $\mu$ Mの場合、I型コラーゲン線維ゲル上でHFKsを培養すると培養2日目にはすべての細胞にアポトーシスが誘導された。この結果は1章の結果に合致する。一方、培地のカルシウム濃度を1.8 mMとした場合、I型コラーゲン線維ゲル上でもアポトーシスが回避された(図12E)。このときラミニン5はI型コラーゲン線維ゲルに沈着し、HFKsは自律的に重層して細胞塊を形成し、細胞塊底面の外縁の細胞はI型コラーゲン線維ゲルに接着していた。細胞塊形成により、細胞塊内部の細胞の位置関係に差が生じた。すなわち、細胞塊外縁部でゲルに接着する足場依存細胞群と細胞塊中央部のゲルに接着しない足場非依存細胞群である。免疫染色による観察で、I型コラーゲン線維ゲル上で形成された細胞塊の底面外縁部の細胞は、コラーゲン線維上に接着斑様構造が観察された。しかし細胞塊底面中央部および上部の細胞はI型コラーゲン線維上に接着様式が観察されなかった(図15M)。走査型電子顕微鏡観察による細胞形態も一様でなく、線維に接着した細胞は比較的伸展していたが、細胞塊上部の細胞は伸展が阻害されていた(図13D)。この2つの細胞群は(1)接着足場の有無に依存して足場から活性化される伝達シグナルに差が生じ、(2)細胞形態の変化に依存して、細胞骨格系制御に差違を生じた可能性が示唆される。

細胞塊がI型コラーゲン分子上では生じず、線維ゲル上で形成される原因は、HFKs

の I 型コラーゲン線維ゲルへの接着が、I 型コラーゲン分子に対する接着力よりも弱いことに起因するのではないかと推察している。接着する細胞数が基質への接着の強さを反映していると考え、HFKs の I 型コラーゲン分子を塗布した培養容器への接着力は、I 型コラーゲン線維に対する接着力よりも強い (図 3A)。細胞は培養開始期には接着、伸展して移動し、移動することで他の細胞と接触する。細胞同士が接触するとき、足場への接着力と、細胞間に働く力が釣り合っていれば両方とも保持されるが、細胞間接着に働く力が足場に働く力より強力である場合は、強固な細胞間接着に引かれて一部の細胞は足場への接着を失う可能性がある。足場を失った細胞は細胞間接着のみから力をうけることになり、さらに強く細胞同士で接着するようになり、立体的な細胞塊が形成されることが考えられる。以上の考察の模式図を図 21 に示す。

高カルシウム濃度培地を用いて培養した HFKs における、I 型コラーゲン分子上と I 型コラーゲン線維ゲル上での接着を比較すると、インテグリンの局在や接着装置の形態に異なる特徴が見られた。I 型コラーゲン分子上で培養すると、HFKs は密接に集合するがほとんど重層せず、敷石状に伸展し、細胞間には空隙が観察されない (図 13B)。伸展した個々の細胞の周囲にはビンキュリンを含む接着斑が観察され、個々の細胞が培養容器表面に接着していることがわかった。この接着斑は培養 1 日目、2 日目ともに継続して観察された (図 15E、図 16E)。インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  の集積は培養 1 日目には細胞集積部の周囲に接着斑様に認められたが (図 15F)、2 日目には細胞周縁部への集積は弱まった (図 16F)。一方、インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  は培養 1 日目からインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  と似た局在を示し (図 15G)、培養 2 日目も接着斑構成因子として維持されていた (図 16G)。インテグリン  $\alpha 6\beta 4$  は細胞集積周縁部に経時的に強く染色されたが、その部位はビンキュリンを含む接着斑とは一致していなかった (図 15H、図 16H)。一方、I 型コラーゲン線維ゲルの上で培養した HFKs では、培養 1、2 日目ともビンキュリンを含む接着斑様構造が立体的に形成された細胞塊の周囲に維持されたが、個々の細胞周囲には接着斑は観察されなかった (図 15M、図 16M)。インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  の集積は培養 1 日目には接着斑様に形成され、2 日間の観察期間を通して、細胞塊周辺のコラーゲン線維上に維持されていた (図 15N、図 16N)。一方、インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  は培養 1 日目にはインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  同様、I 型コラーゲン線維に沿って染色が観察され (図

15O)、2日目には細胞塊全体に染色されるようになった(図16O)。I型コラーゲンの線維に沿って形成される接着斑様構造の形態は、分子上に形成される形態と比較すると大きく細長かった。インテグリン $\alpha6\beta4$ 染色は培養1日目、2日目とも観察されるが、偏った分布をしており、接着斑様構造の局在パターンとは一致しなかった(図15P、図16P)。これらの接着装置の構成成分および形態の違いで、細胞内に伝達されるシグナルが異なる可能性がある。

細胞が細胞外マトリクスに接着することで、複数の生存シグナル伝達系が活性化する[15]。それぞれの培養条件で生存に関与するシグナルを特定するために、生存シグナル伝達経路の阻害剤を添加してHFKsを培養し、アポトーシス誘導をTUNEL法で観察した。I型コラーゲン分子上の培養では、培地のカルシウム濃度に依存せず、シグナル伝達系でAktの上流に位置するPI3K活性を阻害するとほとんどの細胞にアポトーシスが誘導された(図19D、H)。一方MAPK経路を阻害してもアポトーシスは誘導されなかった(図19B、F)。このことからI型コラーゲンに接着している細胞の生存にはPI3K経路の生存シグナルが重要であることが示唆された。高カルシウム濃度の培地を用いてI型コラーゲン線維ゲル上で培養する場合、PI3K経路活性化の阻害剤添加により細胞塊周辺部のゲルに接着している細胞にはアポトーシスが誘導されるが、細胞塊上部の、I型コラーゲンに接着していない細胞は生存した(図19P)。逆にMAPK活性化を阻害すると、細胞塊外縁部の細胞は生存していたが、細胞塊上部の細胞にはアポトーシスが誘導された(図19N)。このことからゲル上で形成された細胞塊上部の細胞の生存には、MAPK経路が重要であることがあきらかになった。つまり細胞塊上部と外縁部の細胞では、生存に寄与するシグナル伝達系が異なり、足場非依存細胞の生存は、強化された細胞間接着および、液性因子からの活性化されるMAPK経路の活性化に依存していること、一方ゲルに接している細胞は形成する接着斑様の接着装置からのPI3K経路のシグナル活性化に依存していることが示唆された。

高カルシウム濃度培地を用いてI型コラーゲン線維ゲル上で培養すると、異なる生存シグナルに依存する2種類の細胞が生じた可能性が示唆されたが、細胞塊全体を解析するウェスタンブロッティング法では、全体として、Erk1/2は活性化するが、Aktの活性化は徐々に阻害されるようになった(図20レーン4)。このことは細胞塊中で

ゲルに接着しない細胞が増加したか、あるいは個々の細胞の Akt 活性化が弱まったことを示唆している。I 型コラーゲン分子上での培養では培地のカルシウム濃度に依存せず、Akt、Erk1/2 共に活性化していた (図 20 レーン 1、3)。FAK は接着斑で機能するリン酸化酵素である [72]。I 型コラーゲン分子の上では培地のカルシウム濃度に依存せず、FAK は活性化していることがわかった。一方 I 型コラーゲン線維ゲル上では培地のカルシウム濃度に依存せず、FAK のタンパク質は発現していたが、リン酸化は減弱していった (図 20 レーン 2、4)。このことから I 型コラーゲン線維ゲル上で形成される接着斑様構造を介して活性化されるシグナルは、コラーゲン分子上培養時と比べて弱いことが示唆される。

HFKs の生存とラミニン 5 との接着は密接に相関している [29]。前述のようにラミニン 5 は I 型コラーゲン分子とは直接結合しない [38]。しかし今回の解析で、I 型コラーゲン線維ゲル上で HFKs を培養すると、ラミニン 5 が沈着することがわかった。この理由を考察すると、(1) 細胞外カルシウム濃度の上昇により HFKs のラミニン 5 産生量が増加し、非特異的に I 型コラーゲン線維に沈着した可能性、あるいは、(2) HFKs が産生するタンパク質を介して間接的にラミニン 5 と I 型コラーゲン線維が結合した可能性を考えている。後者については、生体でも真皮層と基底細胞層は直接接触せず、ヘミデスモソームや基板、アンカリングフィブリルなどの構造を介して結合している (図 1B)。この構造構成成分を HFKs が産生し連鎖的に相互作用すれば、実験系でも間接的にラミニン 5 を係留する可能性があると考えた。そこでヘミデスモソーム構成成分である BP180、アンカリングフィブリル構成成分である VII 型コラーゲン、および基底膜構成成分であるラミニン 5、IV 型コラーゲンの免疫染色を試みた。すると培養 1 日目で、I 型コラーゲン線維ゲル上で低カルシウム濃度培地を用いた場合を除き、ラミニン 5 (図 14B、E、H、K)、IV 型コラーゲン (図 17A、C、E、G) の沈着が認められた。さらに培養 2 日目になると I 型コラーゲン線維ゲル上低カルシウム培養の場合を除き、BP180 の沈着が観察された (図 18A、D、G、J)。生体で真皮層の I 型コラーゲン線維と基底膜を接続している VII 型コラーゲンの染色は I 型コラーゲン線維ゲル上高カルシウム培養の場合のみ、局所的に強く染色された (図 18B、E、H、K)。この免疫染色の結果から、I 型コラーゲン線維ゲルと細胞塊下面の間に、両者を間接

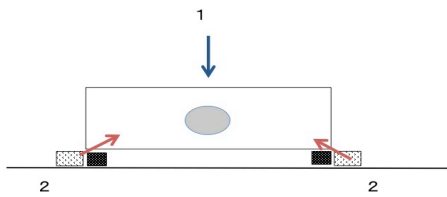
的につなぐ成分が保持されている可能性が示唆された。細胞間には培養 1 日目から E-カドヘリンが発現し(図 17H、図 18L)、稠密な細胞塊が形成されたことが示唆された。

細胞が接着の際に形成するインテグリンを含む接着装置の種類に関しては、複数の報告があり、たとえば Cukierman らは線維芽細胞が移動時に形成する「3D matrix」をいう接着装置を提唱している[78]。この「3D matrix」はファイブロネクチン上等で形成される古典的な接着斑同様、インテグリン  $\beta 1$ 、FAK、パキシリン、ビンキュリン、テンシンなどの接着斑構成タンパク質で構成されているが、FAK はほとんどリン酸化されない点が、代表的な接着斑とは異なっている。さらに「3D matrix」から活性化する生存シグナルも、古典的な接着斑に比べて Erk1/2 が強く活性化される等の違いがある[79]。「3D matrix」の形態は接着斑と比べると細長く[78]、本章で I 型コラーゲン線維ゲル上で高カルシウム濃度培地を用いて培養した場合の HFKs が形成する接着様式は、「3D matrix」に近い可能性もあると考えている。

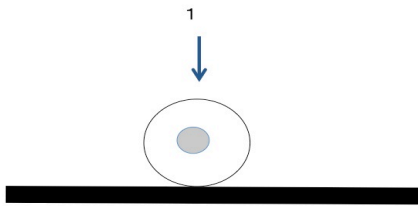
## 2.5 まとめ

第 1 章で、HFKs を I 型コラーゲン線維ゲル上で低カルシウム濃度培地を用いて培養すると、ラミニン 5 を介した接着が阻害されることにより、アポトーシスが誘導されることを示した。その現象から HFKs が生存する条件を求めて、第 2 章では含有カルシウム濃度の高い (1.8 mM) 培地を用いると、I 型コラーゲン線維ゲル上で HFKs を培養してもアポトーシスが回避され、HFKs は立体的な細胞塊を形成することがわかった。このとき HFKs が形成する接着様式、および使われる生存シグナルの解析をおこなうと、細胞塊を形成する細胞は I 型コラーゲン線維ゲルに接着している細胞と接着していない細胞の 2 種類にわかれ、性質が異なることがわかった。I 型コラーゲン線維ゲルにはラミニン 5 が沈着し、細胞塊外縁部の細胞は I 型コラーゲン線維ゲルに接して、線維上に接着斑様の構造を形成した。細胞塊内部の細胞はゲルと接触しなかった。この 2 つの細胞群は生存のために活性化するシグナル回路も異なっており、I 型コラーゲン線維ゲルに接着している細胞は PI3K 経路に依存し、接着していない細胞は MAPK に主に依存していることがわかった。細胞塊全体で生存シグナルである Akt および接着斑関連キナーゼ FAK の活性化は阻害された。

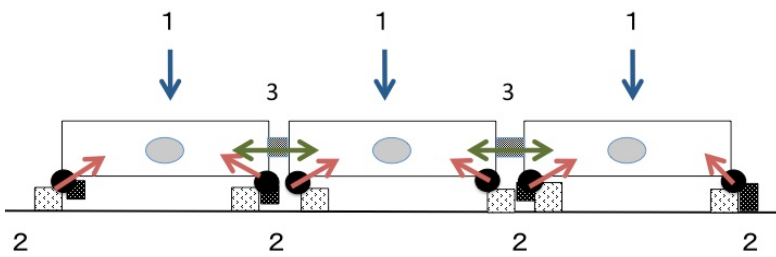




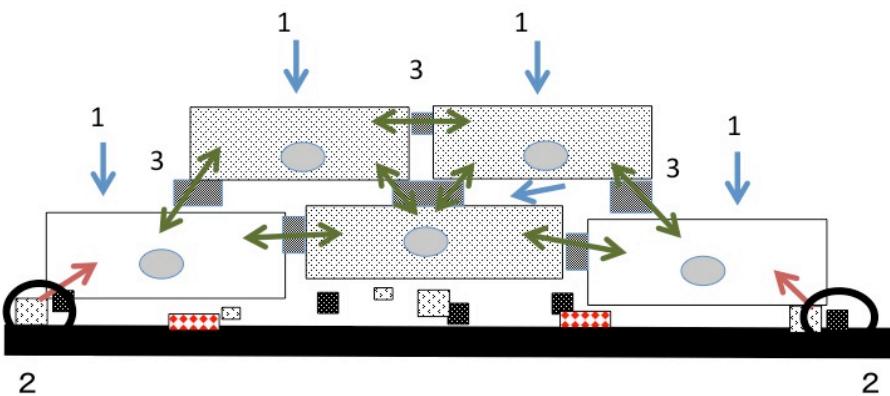
(A) I型コラーゲン分子上で 30  $\mu$ M Ca 含有培地を用いて培養した HFKs の接着様式



(B) I型コラーゲン線維ゲル上で 30  $\mu$ M Ca 含有培地を用いて培養した HFKs の接着様式



(C) I型コラーゲン分子上で 1.8 mM Ca 含有培地を用いて培養した HFKs の接着様式



(D) I型コラーゲン線維ゲル上で 1.8 mM Ca 含有培地を用いて培養した HFKs の接着様式

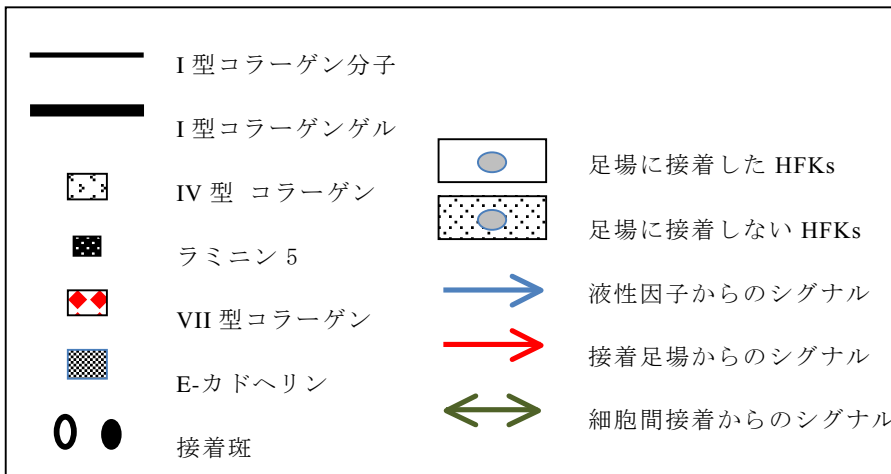


図 2 1 I 型コラーゲン分子上および I 型コラーゲン線維ゲル上で培養した、HFKs の生存に影響を与えると予想される伝達シグナルの模式図

HFKs を、低 (30  $\mu$ M) あるいは高 (1.8 mM) カルシウム含有培地を用いて I 型コラーゲン分子上、あるいは I 型コラーゲン線維ゲル上で培養する場合の接着を模式的に示した。

低カルシウム含有培地を用いて I 型コラーゲン分子上で培養した HFKs は (1) 培地に含まれる液性因子および (2) 細胞外マトリクスの足場への接着から活性化するシグナルの影響を受ける (A)。I 型コラーゲン線維ゲル上では、接着足場からのシグナルは阻害される (B)。

高カルシウム含有培地を用いて I 型コラーゲン分子上で培養すると、(1) 培地に含まれる液性因子および (2) 接着足場から活性化するシグナルに加えて、(3) 強化された細胞間接着からシグナルが伝達される (C)。I 型コラーゲン線維ゲル上では、分子上同様、細胞は細胞塊全体で (1)、(2)、(3) の影響を受ける。しかしゲルに接している細胞と接していない細胞では受ける影響が異なり、ゲルに接している細胞は分子上同様、(1)、(2)、(3) の影響を受ける。その一方ゲルに接着しない細胞は細胞外マトリクスへの接着により活性化するシグナルは阻害され、(1)、(3) の影響のみを受ける。

### 第3章 IV型コラーゲン網目ゲル上で低濃度カルシウム培地を用いた ヒト表皮角化細胞培養における細胞挙動の解析

#### 3.1 緒言

IV型コラーゲンは基底膜の主要な構成成分の1つであり、培養基材に用いる場合には分子としても会合体としても細胞接着の足場として用いることが可能である[24、80]。IV型コラーゲンは生体では会合体として観察されることが多く、羊膜基底膜、Engelbreth-Holm-Swam (EHS)肉腫組織、眼球レンズ嚢等に多く含まれ、よく似た会合体構造が観察される。透過型電子顕微鏡観察によるとIV型コラーゲン会合体は、平均41 nmから44 nmの間隔で3本から5本に分岐した網状の構造が重層し、微細な網目構造を呈している[17]。ヒト皮膚の基底膜ではIV型コラーゲンは会合体を形成しているため、実験系で再構成されたIV型コラーゲン会合体は、HFKsにとって、I型コラーゲン線維ゲルあるいはIV型コラーゲン分子上で培養するより健常な生体に近い条件となる可能性がある。実験系でIV型コラーゲンは単独ではゲル化しないといわれていたが[15]、非らせん領域を保持している酸可溶性IV型コラーゲンは、単独で、生体内で観察される会合体に類似の会合体を再構成可能であることが1996年に林らにより報告され[19、20]、大動脈平滑筋細胞の培養に用いられている[24]。本研究では実験に用いた再構成IV型コラーゲン会合体(2 mg/mL)を、IV型コラーゲン網目ゲルと称することとする。

IV型コラーゲンは分子の状態では細胞接着の足場に用いるときは、HFKsを含む多くの上皮細胞の接着、伸展、増殖などを促進する[14]。その一方で会合体を形成すると、IV型コラーゲン分子を用いる場合と細胞挙動に与える影響が異なる。大動脈平滑筋細胞をIV型コラーゲン網目ゲル上で培養すると、細胞はIV型コラーゲン分子上で培養の場合より細長く伸展し、増殖は抑制され、IV型コラーゲン分子上では発現しない分化マーカーであるミオシン重鎖を発現するようになる[24]。第2章で、I型コラーゲン線維ゲル上培養HFKsが形成する細胞塊中央部にはIV型コラーゲンの集積が観察され、同時にその周囲にHFKsをI型コラーゲン線維ゲルに繋ぎ止める機能を持つ、基底膜関連タンパク質やインテグリン $\alpha2\beta1$ の染色が観察された。しかしIV型コラーゲンの

集積状況、すなわち、会合体構造形成の有無は不明であった。

基底膜様の三次元培養基材として広く用いられている基材に、マトリゲルがある[81]。マトリゲルは EHS 肉腫から抽出した複数の基底膜成分で構成され、約 60 %が ラミニン 1、約 30 %が IV 型コラーゲンで多種類の成長因子を大量に含んでいる。室温で自律的かつ速やかにゲル化するため[81-83]、取扱いが比較的容易である。ゲル化したマトリゲルは、正常な肝細胞や神経細胞、または形質転換した足場依存性上皮細胞等の接着や分化に影響を及ぼす[82、83]。しかし肉腫由来であり、含有ラミニンのサブタイプはラミニン 1 である等、正常組織の基底膜とは異なる点も多く、大量に含有されている成長因子が、細胞に与える影響が大きい[81]。ロット差が大きいことも、細胞生物学の研究にとっては重要な問題点となっており[81]、基底膜様培養基材としては必ずしも十分ではない。

第 3 章では、IV 型コラーゲン網目ゲルが基底膜様培養基質として、HFKs に与える影響を調べることを目的とした。具体的には HFKs を IV 型コラーゲン網目ゲルの上で、規定のままのカルシウム濃度(30  $\mu$ M)含有 K110 type II 培地を用いて培養し、増殖や分化等の細胞挙動を研究した。平行してゲル化したマトリゲル上、および IV 型コラーゲン分子上で培養し、HFKs の増殖や分化状態を比較した。ラミニン 5 沈着状態にも着目し、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$ 、インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  等の発現を観察した。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 細胞ならびに培養基質の調製

HFKs は Cascade Biologics (Portland, OR, USA)より購入し、第 1 章同様、表皮角化細胞用無血清培地 K110 type II(極東製薬工業株式会社、東京)を用いて培養した。

IV 型コラーゲンは林らの方法[18、20]に準じ、ウシレンズ囊から 0.5 M 酢酸を用いて精製し、1 mM 塩酸で透析し、置換した溶液を調製した。IV 型コラーゲンを培養容器に分子状にコートするために、IV 型コラーゲン溶液を 1 mM 塩酸を用いて 10  $\mu$ g/mL に希釈し、2 時間、室温で静置した。IV 型コラーゲン網目ゲルを調製するために、IV 型コラーゲン溶液を 10 倍濃度の PBS(-)を用いて中和し、終濃度 2 mg/mL となるように調製後、4  $^{\circ}$ C で 5 日間静置しゲル化を確認した。96-well culture plate には 100  $\mu$ L/well、

12-well heavy Teflon-coated slides (ThermoFisher Scientific Inc., USA) には 3  $\mu$ L/well となるように、IV 型コラーゲン溶液を用いた。

マトリゲルは BD BioScience 社 (東京、日本) より購入した。氷上で融解し、プロトコルに準じて使用した。PBS(-)を用いて 2 mg/mL となるように希釈し、96-well culture plate には 100  $\mu$ L/well、12-well heavy Teflon-coated slides (ThermoFisher Scientific Inc., USA) には 3  $\mu$ L/well となるように溶液を処理し室温で静置し、ゲル化を確認した。

### 3.2.2 抗体

抗ヒトインボルクリン-ウサギポリクローナル抗体 (Biogenesis Ltd., UK)、抗ヒトビンキュリン-マウスモノクローナル抗体(ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA) を購入した。抗インテグリン $\alpha$ 2 $\beta$ 1-マウスモノクローナル抗体(P4B4)と抗インテグリン $\alpha$ 3 $\beta$ 1-マウスモノクローナル抗体(P1F2)はDr. W. G. Carter (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA)より供与された。抗Akt-ウサギポリクローナル抗体と抗リン酸化Akt (Ser473)-ウサギポリクローナル抗体、抗p44/42 MAP kinase-ウサギポリクローナル抗体は New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)より購入した。抗リン酸化ERK (Tyr-204) -ウサギポリクローナル抗体(E-4)はSantaCruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)より、抗 $\beta$ -actin-マウスモノクローナル抗体(clone AC-15)はSigma (St. Louis, MO, USA)より購入した。抗リン酸化FAK (pY397) -ウサギポリクローナル抗体と抗リン酸化パキシリン(pY31) -ウサギポリクローナル抗体はBiosource International (Camarillo, CA, USA)より、抗FAK (clone 4.47) -マウスモノクローナル抗体はUpstate (Lake Placid, NY, USA)より購入した。抗パキシリン-マウスモノクローナル抗体はBD Biosciencesから、抗インテグリン $\alpha$ 6 $\beta$ 4-ラットモノクローナル抗体 (CD49f) はImmunotech (Marseille, France)より入手した。抗ヒトエピライグリン (ラミニン) -マウスモノクローナル抗体はChemicon International (Temecula, CA, USA) より購入した。

### 3.2.3 走査型電子顕微鏡観察

中和した IV 型コラーゲン溶液を、2 mg/mL の濃度で 0.5 mL 用いて 24-well culture

plate に処理し、4 °C で 5 日間静置し、IV 型コラーゲン網目ゲルの形成を確認した。

1.2.1 に記述した方法で、24-well culture plate に中和した I 型コラーゲン溶液を 1 mg/mL の濃度で、0.5 mL 用いて I 型コラーゲン線維ゲルを調製した。ゲル化を確認した後、K110 type II 培地を添加、1 時間静置し置換した。HFKs ( $2.0 \times 10^4$  cells/well) を K110 type II 培地に懸濁後、IV 型コラーゲン網目ゲルおよび I 型コラーゲン線維ゲル上に播種し、2 日間培養した。培地を除去し試料を PBS(-) で洗浄した後、改変ザンボーニ固定液 (0.2 % ピクリン酸、4 % パラホルムアルデヒド、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4)) で 30 分間、室温で処理し、さらに 1 % オスミウム酸ザンボーニ固定液を 30 分間、室温で処理した。エタノール希釈系列を用いて脱水した後、試料を臨界点乾燥装置 (HITACHI Critical Point Dryer Model HCP-2、日立、東京)) を用いて乾燥させた。イオンスパッタ法で Model 108 auto (Cressington Co., Watford, UK) を用いて白金を蒸着したものを試料として、走査型電子顕微鏡 S-4500 (日立、東京) を用いて観察した。

#### 3.2.4 細胞増殖解析

細胞播種前に、96-well cell culture plate well に中和した IV 型コラーゲン溶液 (10  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{L}$ ) を処理し、2 時間、室温で静置し、IV 型コラーゲン分子を塗布した培養容器を用意した。96-well cell culture plate well に中和した IV 型コラーゲン溶液 (2 mg/mL、100  $\mu\text{L}$ ) を加え、4 °C で 5 日間静置し IV 型コラーゲン網目ゲルを調製した。マトリゲルは 2 mg/mL となるように PBS(-) で希釈し、96-well cell culture plate well に 100  $\mu\text{L}$  添加し、室温でゲル状に調製した。HFKs を各基質上に  $5 \times 10^3$  cells/well となるように、K110 type II 培地を用いて懸濁した後播種し、経時的に生細胞数を計測した。生細胞数は Cell Counting kit-8 (Dojindo、熊本) を用いて定量した。Cell Counting kit-8 をプロトコルに従い使用して、2 時間呈色後、マイクロプレートリーダー SH-9000 Lab, Corona Electric Co. Ltd. (茨城、日本) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。同じ条件の実験を 3 点で行い平均値を求めた。

#### 3.2.5 アポトーシス誘導の解析

TUNEL法でアポトーシス誘導細胞を検出した。細胞播種前にIV型コラーゲン溶液（10 µg/mL、3 µL/well）を 12-well heavy Teflon-coated slides（ThermoFisher Scientific Inc.、USA）に添加し、2時間、室温で静置し、IV型コラーゲン分子をコートした培養容器を調製した。12-well heavy Teflon-coated slidesに中和したIV型コラーゲン溶液（2 mg/mL、3 µL）を加え、4 °Cで5日間静置しIV型コラーゲン網目ゲルを調製した。マトリゲルは2 mg/mLとなるようにPBS(-)で希釈し、3 µL/wellで添加し、室温でゲル状に調製した。HFKsをK110 type II培地を用いて懸濁した後に、上記の基質および未処理の12-well heavy Teflon-coated slides上に $2 \times 10^3$  cells/well、30 µL/wellとなるように播種し、6時間、1日培養した後、培地を捨ててPBS(-)で3回洗浄し、2%ホルムアルデヒド/PBS(-)溶液を室温で20分間処理して固定した後、0.1% Triton X-100溶液で2分間透過処理をした。続いて1% BSA/PBS(-)溶液を用いて、室温で1時間ブロッキング処理を行った後、In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein kit（Roche Diagnostics GmbH、Mannheim、Germany）をプロトコルに準じて用い、DNA断片を蛍光標識した。全接着細胞数を求めるために細胞核を4,6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）（Vector Laboratories Burlingame、CA、USA）（1% BSA溶液にて500倍に希釈）を用いて染色し、蛍光顕微鏡下で観察、DAPIおよびFITCで染色された細胞数を計数した。各条件DAPIで染色された全計数細胞の数が、500~1000細胞となるように10カ所以上の顕微鏡の視野を観察した。DAPIで染色された計数細胞の中で、FITCの染色が観測されるTUNEL陽性細胞数を計数した。TUNEL陽性細胞数をDAPIで染色された細胞数で除算し、アポトーシス誘導率とした。

### 3.2.6 蛍光免疫染色解析

細胞播種前にIV型コラーゲン溶液（10 µg/mL、3 µL/well）を 12-well heavy Teflon-coated slides（ThermoFisher Scientific Inc.、USA）に添加し、2時間、室温で静置し、IV型コラーゲン分子をコートした培養容器を調製した。12-well heavy Teflon-coated slidesに中和したIV型コラーゲン溶液（2 mg/mL、3 µL）を加え、4 °Cで5日間静置しIV型コラーゲン網目ゲルを調製した。マトリゲルは2 mg/mLとなるようにPBS(-)で希釈し、3 µL/wellで添加し、室温でゲル状に調製した。HFKsをK110 type II培地を用いて懸濁し

た後に、上記の基質および未処理の12-well heavy Teflon-coated slides上に $2 \times 10^3$  cells/well、30  $\mu$ L/wellとなるように播種し、1日、2日培養後、培地を捨ててPBS(-)で3回洗浄し、2%ホルムアルデヒド/PBS(-)溶液を室温で20分間処理し固定した後、0.1% Triton X-100溶液で2分間透過処理をした。続いて1% BSA/PBS(-)溶液を用いて、室温で1時間ブロッキング処理を行った後、推奨プロトコルに従って1% BSA/PBS(-)溶液を用いて希釈した、各一次抗体を用いて4  $^{\circ}$ Cで終夜静置した。PBS-Tで3回洗浄後、Alexa Fluor<sup>TM</sup>488-conjugated goat antimouse IgG (Molecular Probes, Inc., OR, USA)、あるいはrhodamine-conjugated goat IgG fraction against rabbit IgG (Organon Teknika, Durham, NC, USA)抗体で室温、1時間染色し、さらにPBS-Tで3回洗浄後、DABCO (1,4-diazabicyclo-[2.2.2] octane, Sigma Chemical Co., USA) (2.5 mg/mL) 溶液を用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡LSM 410 system Plan-Apochromat 63/1.40 Oil (Zeiss, Jena, Germany)を用いて検鏡、撮影した。

### 3.2.7 ウェスタンブロッティング解析

細胞播種前に、IV型コラーゲン溶液を10  $\mu$ g/mLに希釈して、24-well culture plateに500  $\mu$ L/wellで処理しIV型コラーゲン分子をコートした培養容器を調製した。中和したIV型コラーゲン溶液(2 mg/mL)を24-well culture plateに500  $\mu$ L/wellとなるよう添加し、4  $^{\circ}$ Cで5日間静置してIV型コラーゲン網目ゲルを調製した。マトリゲルを2 mg/mLとなるようにPBS(-)で希釈し、24-well cell culture plate well に500  $\mu$ L添加して室温でゲル状に調製した。HFKs ( $5 \times 10^5$  cells/well) をK110 type II培地に懸濁して調製した基質および未処理の培養容器に播種し、1時間、4時間、22時間、37  $^{\circ}$ CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。培養後、培養上清を廃棄し、PBS(-)で3回洗浄した後、IV型コラーゲン網目ゲル、ゲル化マトリゲルの場合はゲルと細胞をともに回収し、終濃度50%となるように同量のエタノールを加え氷上で20分静置した。続いて10000 rpm、4  $^{\circ}$ C、5分遠心した後、沈殿を回収し、0.2 mLのcell lysis緩衝液(20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1% Triton X-100、2.5 mM sodium pyrophosphate、1 mM  $\beta$ -glycerol phosphate、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1  $\mu$ g/mL leupeptin、1 mM PMSF)を加えて、氷上5分間静置した。IV型コラーゲン分子上および未処理の培養容器上で培養した細胞



は、PBS(-)で3回洗浄した後、0.2 mLのcell lysis緩衝液を加えて氷上で20分間静置した。その後、細胞をかきとって回収し試料とした。これらの試料は氷上で5秒、4回超音波破碎機を用いて破碎し、4 °C、10000 rpm、10分間遠心した後、上清を回収した。等量のSDS-PAGE泳動用のサンプルローディング緩衝液（4 % SDS、125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、15 % glycerol、0.018 % bromophenol blue）を加えて3分間、100 °Cで加熱し、10 % ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。泳動終了後に、10 %メタノール含有50 mMホウ酸緩衝液（pH 9.0）を用いてサブマリン型転写装置にてニトロセルロース膜（Advantec S045A224D、東洋濾紙、日本）に転写した。転写後のニトロセルロース膜を1 % BSA溶液を用いて、室温で1時間静置してブロッキングした。さらに推奨プロトコルに従い、1 % BSA/PBS(-)溶液を用いて各一次抗体を希釈し、ニトロセルロース膜に添加して室温で4時間静置した。PBS-Tで3回洗浄後、HRP標識した二次抗体を各々添加して、室温で1時間静置した。PBS-Tで3回洗浄後、Western blot detection system, Enhanced Chemiluminescence Plus (Amersham Pharmacia Biotech, UK)を用いてFuji RX-U medical X-ray film (Fuji Photo Film Co. Ltd.、東京)を用いて可視化した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 細胞形態

IV型コラーゲン分子を接着の足場としたHFKsは、培養初期からよく接着、伸展した（図22M）。この結果は既報の結果と一致する[80]。細胞は伸展形態を保ったままコンフルエントになるまで増殖し、敷石状の形態を示した（図22N-P）。IV型コラーゲン網目ゲル上でHFKsを培養すると、培養開始1時間では伸展せず（図22A）、4時間培養すると細胞は細長く伸展し、枝分かれした特徴的な線状に整列した（図22B）。その後培養1日目から細長く伸展していた細胞は、個々の細胞の短軸方向に伸展し楕円形に伸展するようになり（図22C）、伸展を保ったまま移動し、細胞塊を形成した（図22D）。IV型コラーゲン網目ゲルの上で1日培養したHFKsを、走査型電子顕微鏡を用いて観察すると、IV型コラーゲン網目ゲルの表面は全体に平滑で、コラーゲン会合体の網目は識別できず、重層する細胞と伸展した細胞が観察された（図23B）。培養2日でIV型コラーゲン網目ゲルの表面が細胞で敷石状に覆われることはなかったが、伸展する

細胞が増加しゲルを覆う面積が増加した。一部の細胞は細胞塊を維持していた(図 22C、D 矢印)。ゲル化マトリゲル上で培養した HFKs は、培養初期は IV 型コラーゲン網目ゲルと同様の傾向を示し、培養 4 時間目で細胞は一定の方向に整列し集積した。このとき IV 型コラーゲン網目ゲル上で培養した HFKs とは異なり、集合した個々の細胞は伸展しなかった(図 22F)。培養 1 日目では凝集した細胞塊と伸展した細胞、両方の形態が観察された(図 22G)。培養 2 日目では大きな細胞塊が形成され、細胞塊を構成する個々の細胞は収縮していた(図 22H)。マトリゲルのゲル上では、観察期間を通して個々の細胞の伸展は抑制され(図 22E-H)、培養 2 日目では IV 型コラーゲン網目ゲル上でほとんどの細胞が伸展していることと対照的であった。未処理の培養容器(図 22I-L)および IV 型コラーゲン分子の上で培養した HFKs(図 22M-P)は、伸展を保ち単層の敷石状に接着した(図 22I-L、M-P)。培養 1 時間および 4 時間では IV 型コラーゲン分子の上では、未処理の培養容器上の培養より細胞の伸展が促進された(図 22I、J、M、N)。

### 3.3.2 増殖とアポトーシス誘導

HFKs を IV 型コラーゲン分子上(図 24A■)および未処理の培養容器上(図 24A●)で培養すると、細胞は 3 日間増殖を続けた。このときアポトーシスは誘導されなかった(図 24B)。IV 型コラーゲン網目ゲル上で培養した HFKs の増殖は抑制され、死細胞(アポトーシス誘導細胞)が徐々に増加し(図 24B■)、生細胞は減少した(図 24A×)。IV 型コラーゲン網目ゲル上で培養した場合のアポトーシス誘導は、急速にすべての細胞が死ぬことはなく、比較的緩やかに(培養 1 日目で 20 %程度)、ゲルに接着していない細胞塊上部の細胞にアポトーシスが誘導率された。ゲル化したマトリゲル上で培養した場合は、HFKs の増殖は抑制されたがアポトーシス誘導細胞は生じず(図 24B)、生細胞数は 3 日間維持された(図 24A▲)。

### 3.3.3 分化誘導

HFKs の分化誘導を分化マーカーであるインボルクリンの発現で評価した。生体内でインボルクリンは有棘層上層から顆粒層にかけて発現している。HFKs を IV 型コラー

ゲン網目ゲル上で培養した場合、培養 2 日目には一部の細胞は細胞同士が集積した細胞塊を形成し、細胞塊下部の IV 型コラーゲン網目ゲルに接着した細胞はインボルクリンを発現せず、細胞塊上部の細胞はインボルクリンを発現していた (図 25A)。マトリゲルのゲル上で培養した場合も同様に、形成された細胞塊下部のゲルに接着した細胞は、インボルクリンを発現せず、細胞塊上部の細胞はインボルクリンを発現した (図 25B)。IV 型コラーゲン分子の上 (図 25C) および未処理の培養容器表面上 (図 25D) で培養すると、すべての細胞に分化は誘導されなかった。

#### 3.3.4 インテグリンの局在

IV 型コラーゲン網目ゲル上に形成される接着様式を調べるため、抗ビンキュリン抗体、抗インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  抗体および抗インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  抗体を用いて蛍光免疫染色法で染色した。培養開始 7 時間で IV 型コラーゲン網目ゲル上、IV 型コラーゲン分子上、そしてゲル化マトリゲルの上で培養した HFKs は、それぞれ特徴的な形態を示した。IV 型コラーゲン分子上で培養した HFKs は、I 型コラーゲン分子の上で培養した HFKs で観察される形態によく似た楕円形の伸展形態をとり細胞周囲にビンキュリン (図 26A)、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  (図 26B) の集積が観察された。インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  の集積は鮮明には染色されなかった (図 26C)。IV 型コラーゲン網目ゲル上で培養した HFKs は、細長く伸展した形態をとり、枝分かれした管状に整列する細胞および単独で伸展する細胞の両方が観察された。整列した細胞ではビンキュリンの染色は伸展した HFKs の長軸の先端に集中し、隣り合う細胞と呼応するように、I 型コラーゲン分子の上で形成される接着斑の様に染色された (図 26G)。単独の細胞は、IV 型コラーゲン分子の上で培養した HFKs の染色像に似て細胞周囲に観察された (図 26G)。インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  も同様の染色像を示した (図 26H)。インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  の局在は見られなかった (図 26I)。一方マトリゲルのゲル上で培養した HFKs には、ビンキュリンの染色による接着斑様の構造は観察されなかった (図 26D-F)。

培養 2 日、IV 型コラーゲン網目ゲル上で培養した場合、長軸方向に細長く伸展していた HFKs は短軸方向にも伸展が進み、ゲルに接着したすべての細胞が楕円形に伸展するようになった。同時に細胞が重層している細胞塊も維持され、細胞塊上部の細胞

は IV 型コラーゲン網目ゲルに接着していない。細胞形態は IV 型コラーゲン分子上で培養した場合に似ていたが、細胞塊上部の細胞はビンキュリンの染色による接着斑は観察できなかった。細胞塊下部の細胞にはビンキュリンを含む接着斑が細胞周囲に観察された (図 27G)。このとき接着斑構造にはインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  (図 27H)、インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  (図 27I) 共に発現していた。ゲル化マトリゲル上ではビンキュリン染色による接着斑構造は形成されず (図 27D)、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  (図 27E)、インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  (図 27F) もともに接着斑の様に集積しなかった。IV 型コラーゲン分子上で培養した HFks のビンキュリン染色像は培養 7 時間の染色像に良く似ており、楕円状に伸展した細胞周囲にビンキュリンを含む接着斑が形成された (図 27A)。接着斑に集積するインテグリンは、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  (図 27B) は消失し、かわってインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  が染色された (図 27C)。

### 3.3.5 ラミニン 5 の沈着とインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の発現

HFks を 2 日間、IV 型コラーゲン分子の上で培養し、抗インテグリン  $\alpha 6\beta 4$  抗体および抗ラミニン 5 抗体を用いて免疫染色を行った。インテグリン  $\alpha 6\beta 4$  は細胞周辺に点状に染色され (図 28A)、ラミニン 5 の沈着も観察された (図 28B)。IV 型コラーゲン網目ゲル上で HFks を 2 日間培養し、抗インテグリン  $\alpha 6\beta 4$  抗体および抗ラミニン 5 抗体を用いて免疫染色を行った。インテグリン  $\alpha 6\beta 4$  は細胞周囲に点状に染色され (図 28C)、一部の細胞の周辺にラミニン 5 の沈着が観察された (図 28D)。

### 3.3.6 生存シグナルの活性化

HFks の生存に関与しているシグナル経路の活性化を調べるため、Erk1/2、Akt の活性化を解析した。HFks を IV 型コラーゲン分子上、ゲル化マトリゲル上、未処理培養基表面および IV 型コラーゲン網目ゲル上で 1 時間 (1 h)、4 時間 (4 h)、1 日 (1 d) 培養した細胞を回収して試料とし、ウエスタンブロッティングを行った。Erk1/2 の活性化は、培養期間を通して培養に用いたすべての基材上で、接着した細胞が検出可能な場合は維持されていた (図 29 p-Erk1/2)。

一方 Akt は培養 1 時間 (1 h)、4 時間 (4 h)、1 日 (1 d) で IV 型コラーゲン分子上 (図

29 4c、p-Akt)、ゲル化マトリゲル上 (図 29 mg、p-Akt) で培養した HFKs で活性化していた。未処理の培養容器表面で培養した HFKs は、培養開始 1 時間では接着細胞数が少なくシグナルが検出できないが (1 h)、4 時間 (4 h)、1 日 (1 d) では Akt は活性化していた (図 29 NT、p-Akt)。IV 型コラーゲン網目ゲル上で培養した HFKs は、培養期間を通して Akt の活性化が抑制された (図 29 4g、p-Akt)。

### 3.3.7 接着斑構成成分の活性化

接着斑様構造から伝達されるシグナルの活性化を調べるため、3.3.6 で調製した試料を用いて、接着斑を形成するリン酸化酵素である FAK および接着斑裏打ちタンパク質であるパキシリンの活性化を解析した。パキシリンの活性化は、培養期間を通して培養に用いたすべての基材上で、接着した細胞が検出可能な場合は維持されていた (図 29 p-paxillin)。

一方 FAK は、培養 1 時間 (1 h)、4 時間 (4 h)、1 日 (1 d) で IV 型コラーゲン分子上培養では活性化していた (図 29 4c、p-FAK)。未処理の培養容器表面 (図 29 NT、p-FAK) および IV 型コラーゲン網目ゲル上 (図 29 4g、p-FAK) で培養した HFKs は、培養開始 1 時間 (1 h) では接着細胞数が少なくシグナルが検出できないが、4 時間 (4 h)、1 日 (1 d) で FAK は活性化していた。ゲル化マトリゲル上 (図 29 mg、p-FAK) で培養した HFKs では培養期間を通して FAK の活性化が抑制された。

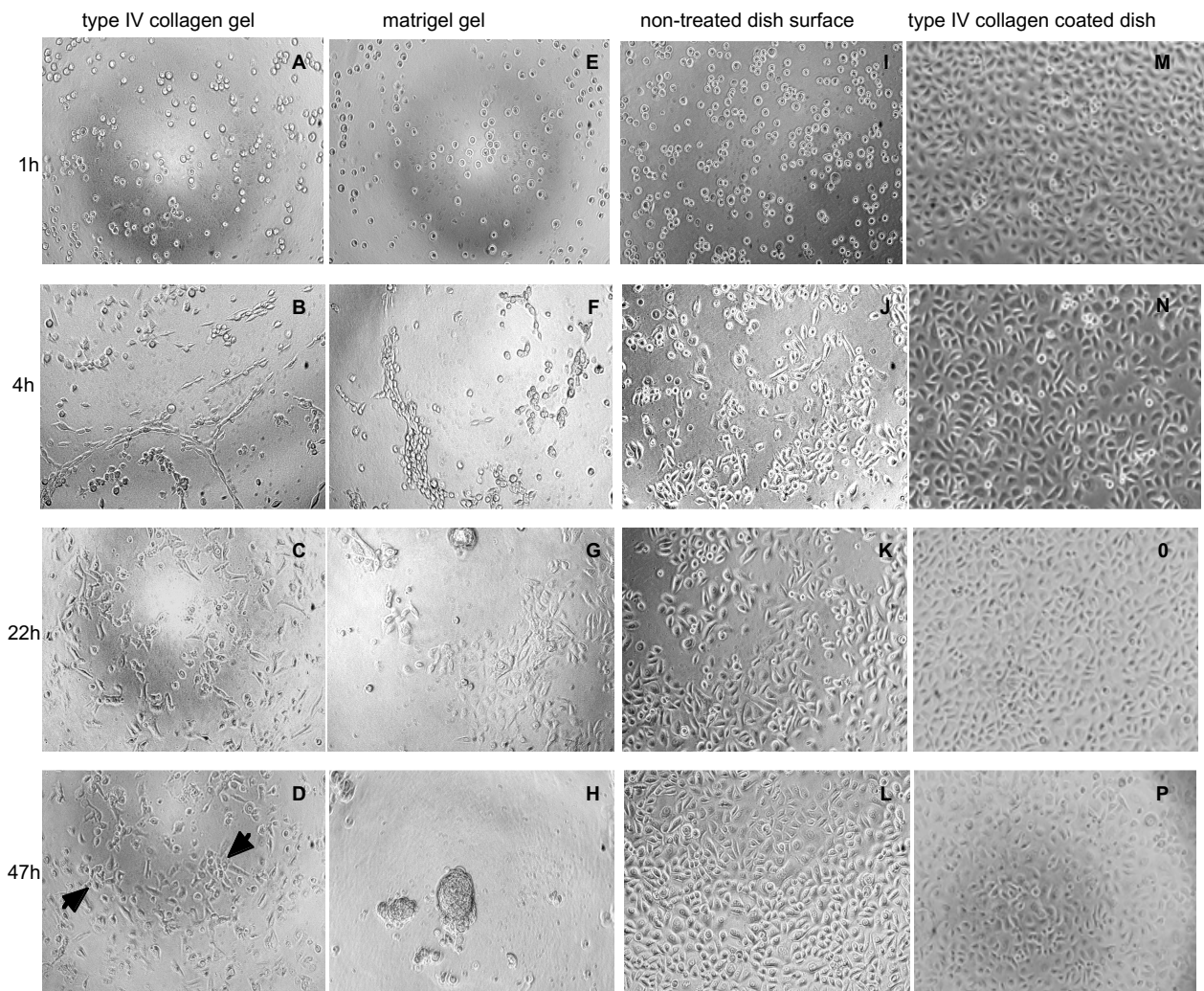
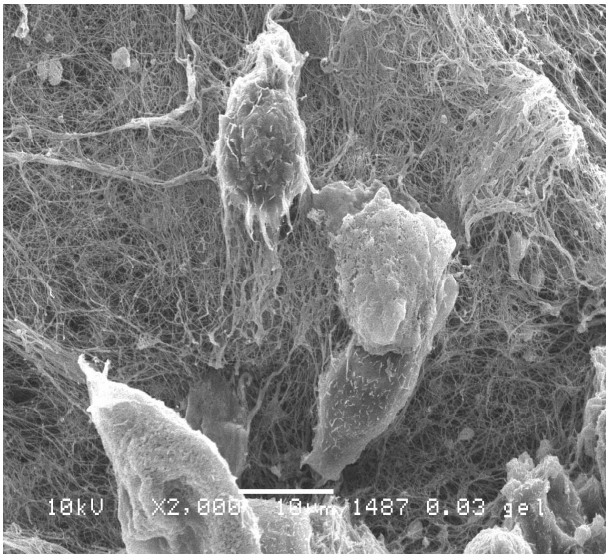
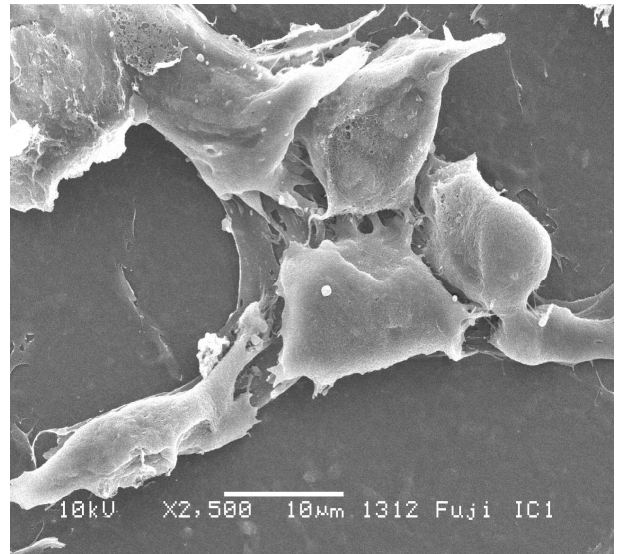


図 2 2 HFKs 細胞形態の位相差顕微鏡観察像

HFKs を IV 型コラーゲン網目ゲル上 (A-D)、ゲル化マトリゲル上 (E-H)、未処理培養容器表面 (I-L)、および IV 型コラーゲン分子上 (M-P) で培養し、培養 1 時間 (A、E、I、M)、4 時間 (B、F、J、N)、22 時間 (C、G、K、O)、47 時間 (D、H、L、P) に位相差顕微鏡を用いて、形態を観察した。D の矢印は細胞の集積、重層している箇所を示す。



A

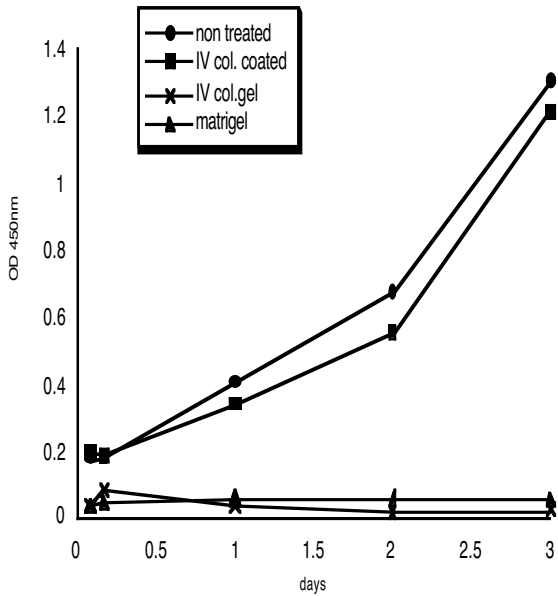


B

図 2 3 I 型コラーゲン線維ゲルおよび IV 型コラーゲン網目ゲル上で培養した HFks の走査型電子顕微鏡観察像

HFks を 30  $\mu$ M カルシウム含有培地を用いて I 型コラーゲン線維ゲル上 (A) および IV 型コラーゲン網目ゲル上 (B) で、1 日培養し、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。バーは 10  $\mu$ m を示す。

### A. proliferation



### B. apoptosis positive cell rates

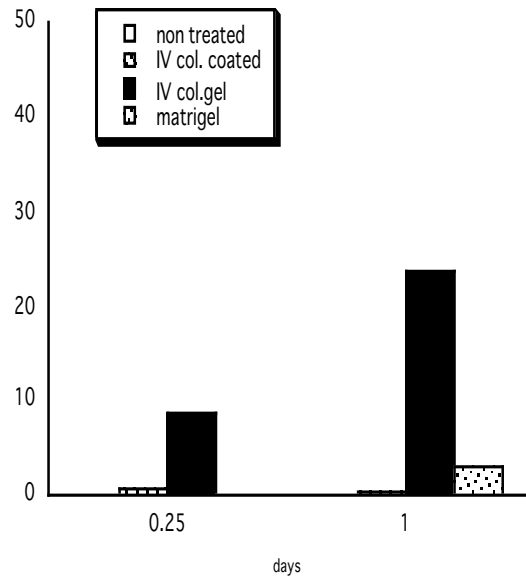


図 2 4 IV 型コラーゲン網目ゲル上で培養した HFks の増殖とアポトーシス誘導率

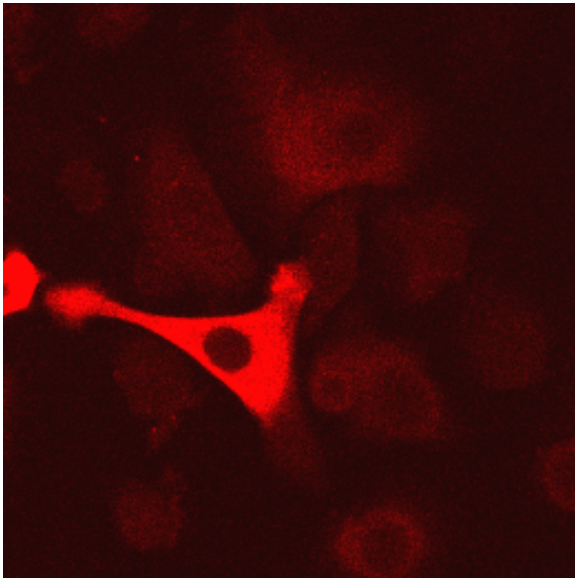
HFks を IV 型コラーゲン網目ゲル(IV col.gel)、IV 型コラーゲン分子(IV col.coated)、ゲル化マトリゲル(matrigel)および未処理培養皿 (non treated)上にて 30  $\mu$ M カルシウム含有培地を用いて培養した。培養 1 日、2 日、3 日後に MTT 法を用いて生細胞数を定量した。縦軸の数値は吸光度 (OD 450 nm) を示す (A)。培養 6 時間および 1 日後の TUNEL 陽性細胞の割合を計数した。縦軸の数値は百分率 (%) を示す (B)。



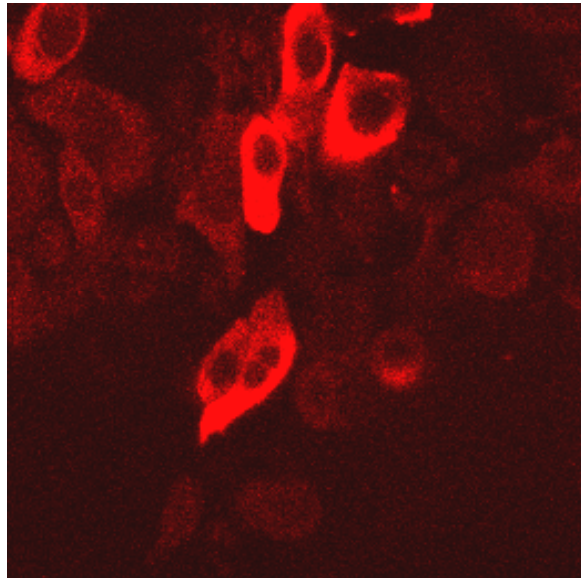
3D



A. on type IV collagen gel



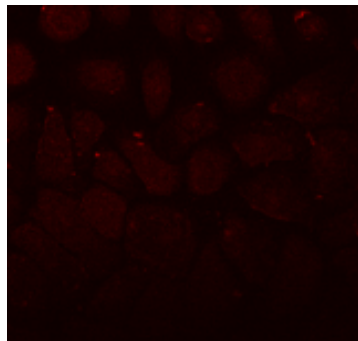
B. on matrigel gel



2D



C. on coated type IV collagen



D. on non-treated dish

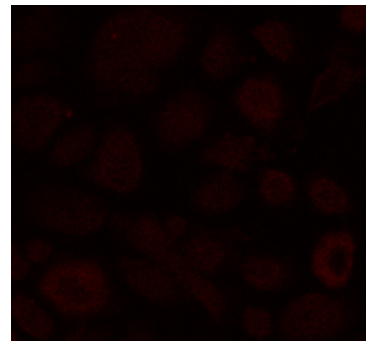


図 2 5 培養 2 日間の HFKs のインボルクリンの免疫染色像

(A) IV 型コラーゲン網目ゲル上、(B) ゲル化マトリゲル上、(C) IV 型コラーゲン分子上、および (D) 未処理培養容器表面で、HFKs を 2 日間培養し、抗インボルクリン抗体を用いて染色した (赤色)。

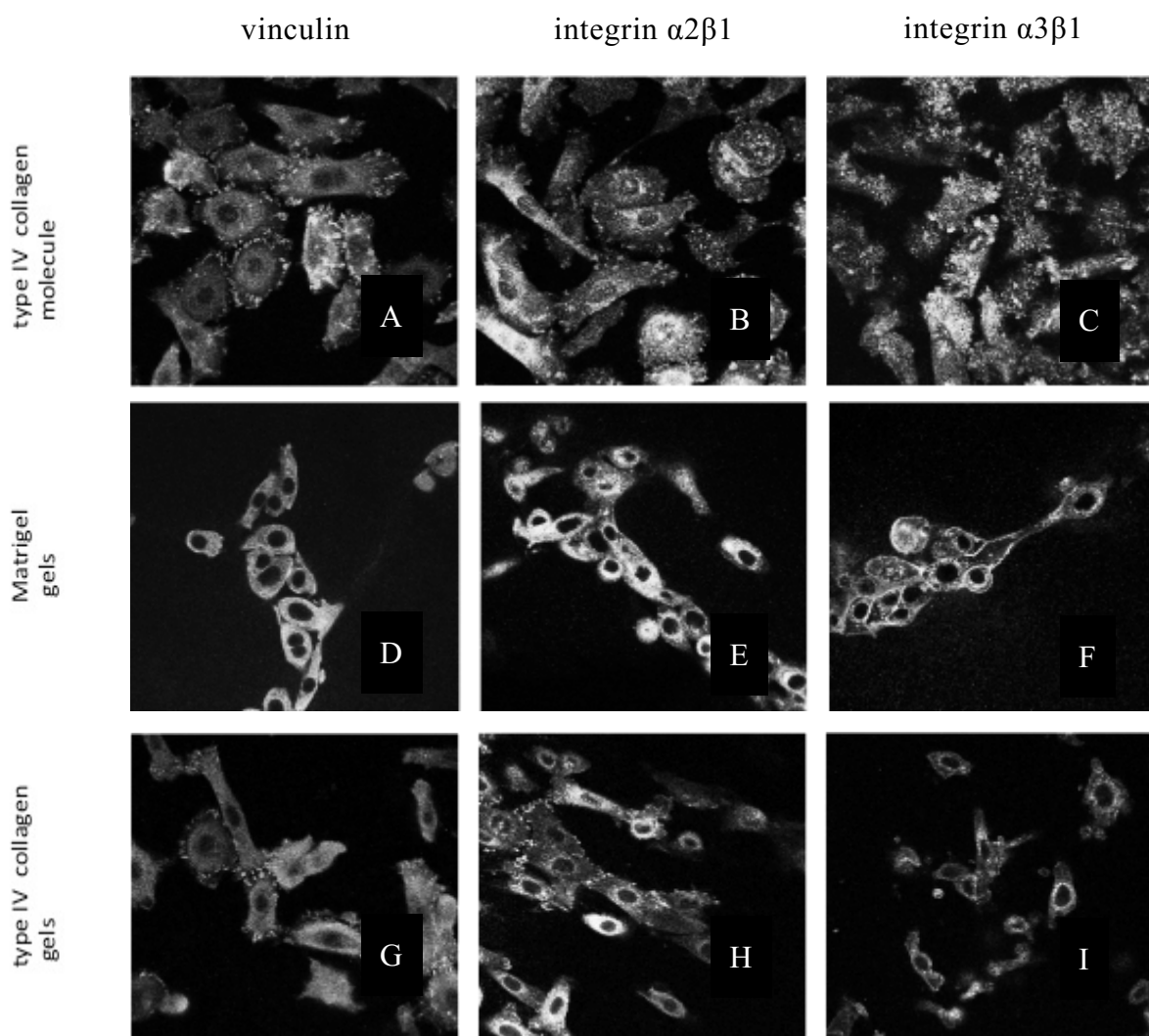


図 2 6 培養 7 時間の HFks の接着斑とインテグリン  $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$  の免疫染色像

HFks を IV 型コラーゲン分子上 (A-C)、ゲル化マトリゲル上 (D-F) および IV 型コラーゲン網目ゲル上 (G-I) で 7 時間培養後、免疫染色を行った。細胞を固定した後、抗ビンキュリン抗体 (A、D、G)、抗インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  抗体(B、E、H)および抗インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  抗体(C、F、I)を用いて染色した。

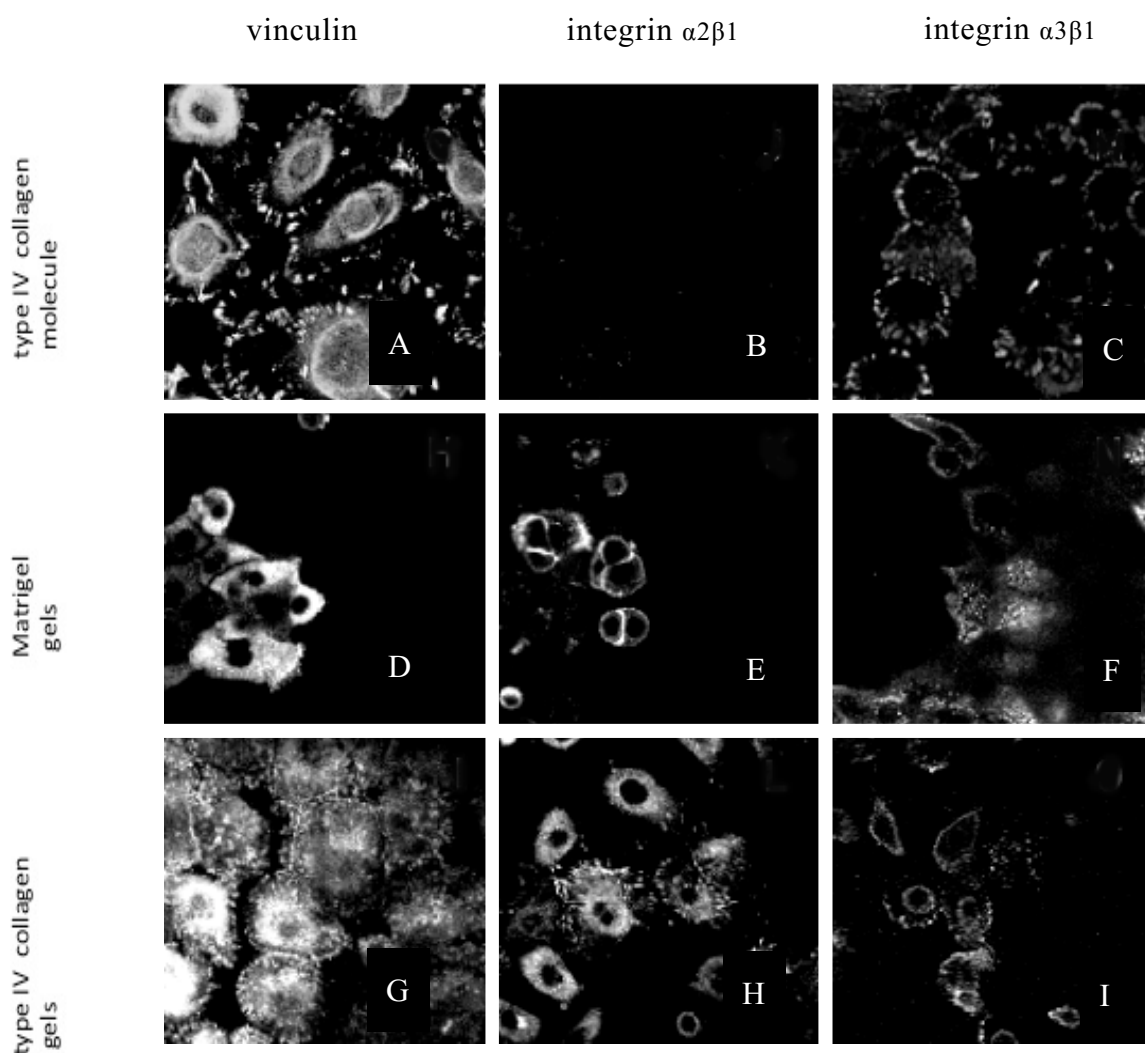


図 2 7 培養 2 日の HFks の接着斑とインテグリン  $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$  の免疫染色像

HFks を IV 型コラーゲン分子上 (A-C)、ゲル化マトリゲル上 (D-F)、IV 型コラーゲン網目ゲル上 (G-I) で 2 日間培養後、免疫染色を行った。細胞を固定した後、抗ビンキュリン抗体 (A、D、G)、抗インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  抗体(B、E、H)および抗インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  抗体(C、F、I)を用いて染色した。

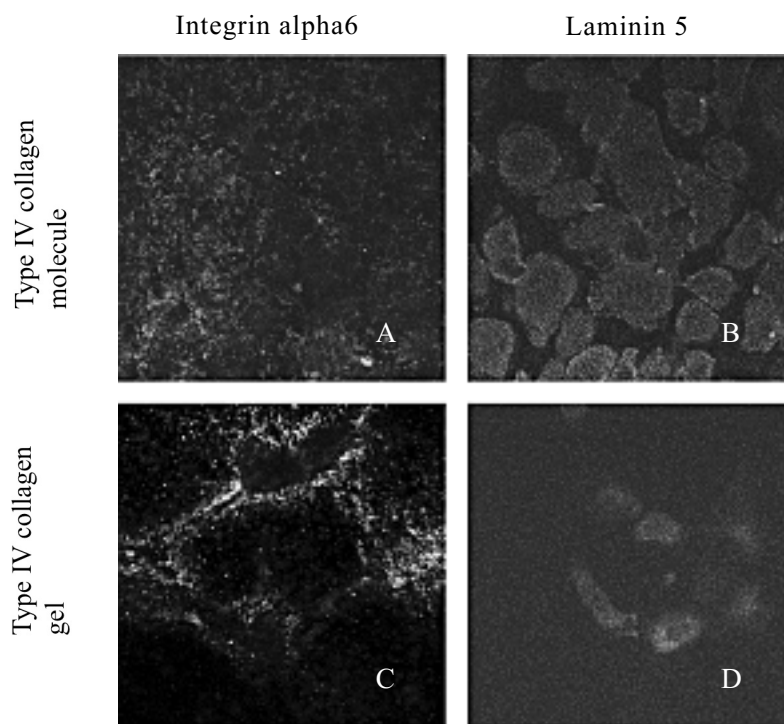


図 2 8 培養 2 日間のインテグリン  $\alpha 6 \beta 4$  とラミニン 5 の免疫染色像

HFKs を IV 型コラーゲン分子上 (A、B) あるいは IV 型コラーゲン網目ゲル上 (C、D) で 2 日培養後、免疫染色を行った。細胞を固定した後、抗インテグリン  $\alpha 6 \beta 4$  抗体 (A、C) および抗ラミニン 5 抗体 (B、D) を用いて染色した。

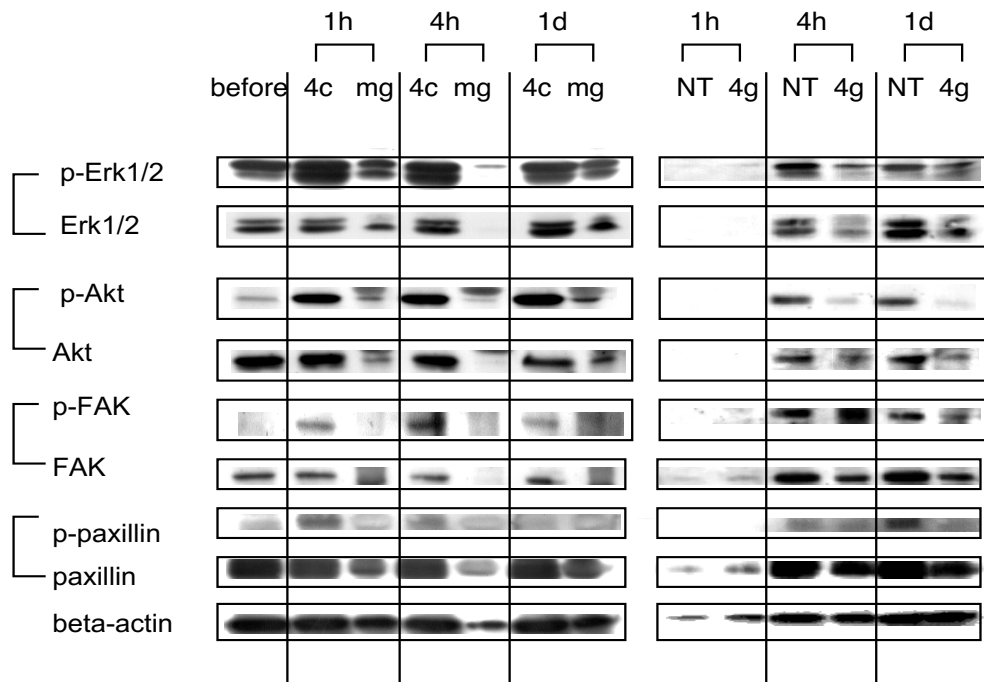


図 2 9 生存シグナルおよび接着斑構成成分の活性化

HFKs は IV 型コラーゲン分子上 (4c)、ゲル化マトリゲル上 (mg)、未処理培養皿上 (NT) および IV 型コラーゲン網目ゲル上 (4g) で培養した。1 時間 (1 h)、4 時間 (4 h) そして 1 日 (1 d) 培養後、cell lysis 緩衝液を用いて試料を調製し、生存シグナルである抗 Akt 抗体(Akt)、抗 p-Akt 抗体(p-Akt)、抗 Erk1/2 抗体(Erk1/2)および抗 p-Erk1/2 抗体(p-Erk1/2)、接着斑構成成分である抗 FAK 抗体(FAK)、抗 p-FAK 抗体(p-FAK)、抗パキシリン抗体(paxillin)および抗 p-パキシリン抗体(p-paxillin)を用いてウェスタンブロット解析を行った。内部標準には抗  $\beta$ -アクチン抗体を用いて染色した (beta-actin)。

### 3.4 考察

上皮細胞の挙動を研究するため、より生体の基底膜に近い培養系を構築することが試みられている。基底膜の細胞外マトリクス成分であるラミニンや、IV型コラーゲンを培養容器に薄く塗布すると、上皮細胞の伸展接着、移動能を促進することが報告されている[80]。さらに、生体でIV型コラーゲンは基底膜では会合体を形成しているため、IV型コラーゲン網目ゲルを用いた上皮細胞の培養は、IV型コラーゲン分子上の培養、あるいはI型コラーゲン線維ゲル上の培養より健全な生体に近い条件と考えることができる。しかしIV型コラーゲン会合体はIV型コラーゲン分子やI型コラーゲン線維に比べて取扱いが難しく、培養基材としての研究はほとんど進んでいない。立体的な基底膜を模倣する培養基材としては、EHS肉腫から抽出したマトリゲルが広く用いられており、培養容器表面での二次元的な培養とは異なる影響を細胞に与えることが知られている。しかしマトリゲルは腫瘍由来で、多くの成長因子を含み、タンパク質の構造も健全な基底膜とは異なる点が多い[81]。そこで本章では創傷治癒の状態に近いI型コラーゲン会合体上の挙動と比較して、より健全な皮膚に近い培養系としてIV型コラーゲン会合体がHFKsの挙動に与える影響を調べることにした。HFKsをIV型コラーゲン会合体上で培養し、IV型コラーゲン分子上やゲル化したマトリゲル上で誘導されるアポトーシスや分化の誘導状態を比較すると、HFKsはIV型コラーゲン分子、ゲル化マトリゲルのいずれとも異なる特徴的な接着様式でIV型コラーゲン網目ゲルに接着し、独特の挙動を示すことがあきらかになった。

IV型コラーゲン分子の上でHFKsを培養すると、I型コラーゲン分子上と同様に、未処理の培養容器表面と比べて速やかに接着、伸展し、接着細胞数は多かった。この結果は既報と一致した[80]。その後培養1日後からコンフルエントになるまでHFKsの挙動は、未処理の培養容器上で培養した場合と差は見られなくなった(図22M-P、図24A)。培養開始時にはHFKsは、IV型コラーゲン分子に対しておもにインテグリン $\alpha 2\beta 1$ を介して接着、伸展し(図26B)、その後の培養期間中にI型コラーゲン分子上の培養のときと同様に、HFKsにより産生されたラミニン5が足場に沈着し(図28B)、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ (図27C)、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ (図28A)を介した接着が優位に働くようになったためと考えられる。未処理の培養容器上でも培養1日目以降に、IV型

コラーゲン分子上で培養した場合同様に、接着斑部分に培養開始直後には発現していなかったインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  が発現してくる結果がこの推測を裏付けている（データ非掲載）。

IV型コラーゲン網目ゲルの上で培養したHFKsの形態はI型コラーゲン線維ゲル上とは異なり、伸展を維持しながら細胞同士で整列、集合して細胞塊を形成した。アポトーシス誘導はI型コラーゲン線維ゲルと比較すると緩慢で（培養1日で20%程度、図24B）、アポトーシスは、細胞塊上部のIV型コラーゲン網目ゲルとの接着を失い、分化マーカーを発現した細胞に誘導された。その一方、細胞塊下部の足場を保持した細胞は、培養2日間、接着斑を維持したまま分化マーカーを発現せず、アポトーシスも誘導しなかった。生体でHFKsは基底膜からの離脱により分化が進行する[26]。1つの細胞塊中でも細胞のゲルへの接着の有無により、分化度が異なる2種類の細胞群が生じた。足場の欠失による表皮角化細胞の分化誘導に関しては、表皮角化細胞を粘性の高い培養液中で培養すると、細胞は足場に接着することなく浮遊したまま細胞塊を形成し、分化した後にアポトーシスが誘導されることが報告されている。この浮遊培養系は生体でHFKs基底細胞が基底膜からの離脱により分化マーカーを発現する現象を模倣していると考えられている[84]。IV型コラーゲン網目ゲル上では、浮遊培養程ではなくともIV型コラーゲン網目ゲルへの接着が弱いために、細胞の集積が起こった可能性が示唆される。

HFKsをIV型コラーゲン網目ゲル上とゲル化マトリゲル上で培養した場合を比較すると、(1)増殖抑制、(2)細胞塊の形成および(3)細胞塊中に分化誘導度の異なる細胞群が生じるなどの点が共通していた。その一方、形成される細胞塊はマトリゲル上の方が稠密で、細胞塊の周縁部に接着斑が形成されない点は相違していた。細胞塊が形成される仕組みは2章のI型コラーゲンゲル上の場合と同じく、細胞-細胞間に働く力が足場への接着を上回った結果であると考察している。培養4時間で、ゲル化マトリゲル上で形成される細胞塊はIV型コラーゲン網目ゲル上で形成される細胞塊より稠密になっていた（図22B、F）。HFKsはIV型コラーゲン網目ゲル上ではゲル化マトリゲル上よりも伸展した細胞が多い。この原因は足場への接着力が、IV型コラーゲン網目ゲルにより強く接着することが原因と考えている。足場への接着の強

さを見積もる方法として、細胞が増殖する前、たとえば培養開始 3 時間での接着細胞数で評価を試みた (図 24A)。培養開始 3 時間で IV 型コラーゲン網目ゲルに接着した細胞数はゲル化マトリゲルに接着した HFKs 数を上回っていた (図 24×、▲)。いずれの場合も IV 型コラーゲン分子上での接着細胞数 (図 24■) の半分以下で、ゲル上での足場への接着は IV 型コラーゲン分子を塗布した培養皿への接着より弱異と考えられる。また培養 7 時間のビンキュリンの免疫染色では、細胞周囲に形成された接着斑の数は、IV 型コラーゲン分子上培養では多く、明確に染色されているが、IV 型コラーゲン網目ゲル上培養、ゲル化マトリゲル上培養の順番で接着斑の数は減り、染色もよわくなった。その結果、細胞に作用する相対的な細胞間引力は、IV 型コラーゲン分子上培養 < IV 型コラーゲン網目ゲル上培養 < ゲル化マトリゲル上培養の順で弱くなり、ゲル化マトリゲル上ではより稠密な細胞塊が形成されたと考えている。また細胞は移動して、細胞同士が接触することで細胞塊を形成する。ラミニン 5 は細胞遊走性を亢進することが知られており [88、89]、非常に平滑な IV 型コラーゲンゲル表面 (図 23B) にラミニン 5 が沈着することで、I 型コラーゲンゲル上よりも HFKs の移動が促進され、他の細胞に接触する機会が増えた可能性があると考えている。

ゲル化マトリゲルの上ではアポトーシスが誘導されないこと、接着斑が形成されない点など、両者ともゲル化しているのにもかかわらずこのような差を生じる原因は残念ながら解明に至らなかった。ひとつには固さや粘弾性等、ゲルの物理的性質が関与している可能性、もうひとつは構成成分の違いに起因すると推測している。物理的性質に関しては、マトリゲルで構成されるゲルは室温に数分放置するだけで形成される一方、IV 型コラーゲン網目ゲルは 4 °C で数日かけて会合し、調製した後数分では溶液状である。そのためマトリゲルに含有される IV 型コラーゲンが、再構成 IV 型コラーゲン網目ゲルと同じ会合体構造を形成しているとは考えにくい。形成される会合体構造の強靱さ、力学的強度の差違が、接着斑形成に影響を与えている可能性があると考えている。またマトリゲル成分の構成比は構成成分の約 60 % がラミニン 1、約 30 % が IV 型コラーゲンである [81]。ラミニンへの接着は HFKs の生存シグナルの亢進を促すため、構成成分の半分以上がラミニン 1 であるマトリゲルへの接着からは強い生存シグナル活性化が起こっており、アポトーシスが回避される可能性が考えられ



る。またラミニン 1 とラミニン 5 が HFKs に与える影響の違いが関与している可能性も示唆される。

ラミニン 5 の沈着に関しては、培養 2 日目で IV 型コラーゲン網目ゲル上には I 型コラーゲンとは異なりラミニン 5 が沈着していた (図 27D)。IV 型コラーゲン分子とラミニン 5 分子は直接相互作用する [85]。この相互作用の他にも、VII 型コラーゲンは I 型コラーゲンよりも、IV 型コラーゲンやラミニン 5 に親和性が高いので [86]、HFKs が産生した VII 型コラーゲンを介して足場の IV 型コラーゲン網目ゲルに間接的にラミニン 5 がより多く沈着する可能性も考えられる。他にも間接的に 2 つのタンパク質を結合させるタンパク質が報告されており、たとえば **Extracellular Matrix Protein 1 (ECM1)** は、ラミニン 5 と IV 型コラーゲンの両方に相互作用して、両者を結合させる [85]。これらタンパク質間の相互作用に加え、I 型コラーゲン会合体表面ではラミニン分子がすり抜けてしまうような大きな隙間が形成されているのに対し、IV 型コラーゲン会合体表面では細密な網目構造 (分岐まで約 40 nm) が重なりあっているため、全長が 100 nm 程度のラミニン 5 分子 [87] が細胞塊表面とゲル表面の間に物理的な接触、滞留をして会合体に相互作用する可能性も考えられる。これらの複数の要因から IV 型コラーゲン網目ゲルにはラミニン 5 が沈着しやすくなっていると考えられる。

足場の違いおよび、その結果形成される接着様式は、伝達されるシグナルにも影響を与えていた。生存シグナル **Erk1/2** は接着の足場に依存せず、3 章で行ったすべての培養条件で活性化していた。その一方で生存シグナルとして重要な役割を果たす **Akt** の活性化は IV 型コラーゲン網目ゲル上培養の場合のみ、顕著に抑制された。第 2 章で高カルシウム培地を用いた培養で、I 型コラーゲン線維ゲル上でも **Akt** のリン酸化が阻害されたことを考え合わせると、**Akt** 活性化の抑制は、コラーゲンの会合体上で共通に起こる現象である可能性がある。原因としてコラーゲン受容体インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  とラミニン受容体インテグリン  $\alpha 3\beta 1$  が共在することで生じるシグナルのクロストークの結果である可能性を考えているが、伝達制御機序をあきらかにするためには更なる解析が必要である。

本章では、IV 型コラーゲン会合体上で培養した HFKs の接着様式と挙動を解析し、

他の基底膜様培養基材、ゲル化マトリゲル上で培養した場合と比較し、IV 型コラーゲン会合体の培養基材としての可能性を追求した。

### 3.5 まとめ

HFKs を IV 型コラーゲン網目ゲル、IV 型コラーゲン分子およびゲル化マトリゲル上で、低カルシウム濃度培地を用いて培養し、細胞挙動、接着様式を観察、比較した。

IV 型コラーゲン網目ゲル上で HFKs は、I 型コラーゲン線維ゲル上とは異なり、急激なアポトーシスは誘導されないことがわかった。細胞形態も異なり HFKs は自律的に細胞塊を形成した。細胞増殖は抑制され、生細胞数は徐々に減少した。アポトーシスは分化マーカーを発現後に細胞塊上部の細胞に限り誘導された。ゲル化マトリゲル上でも細胞塊が形成され、細胞塊上部の細胞は分化マーカーを発現したが、アポトーシスは誘導されなかった。細胞増殖は抑制されたが、死細胞も生じなかった。IV 型コラーゲン分子上で HFKs はよく接着し、敷石状に伸展し増殖を続けた。IV 型コラーゲン網目ゲル上では、初期の接着はインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  を介するが、2 日培養後にはインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  およびインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  が共在していた。培養期間を通じて、ゲル化マトリゲル上では接着斑は観察されなかった。生存シグナル Erk1/2 は基質の種類にかかわらず活性化されたが、Akt は IV 型コラーゲン網目ゲル上で抑制された。HFKs の培養系で IV 型コラーゲン網目ゲルは、ゲル化マトリゲルとは異なる細胞挙動を引き起こすことがわかり、IV 型コラーゲン網目ゲルは新規な基底膜様培養基質として有用である可能性が示唆された。

## 総合討論

細胞外マトリクスは組織特異的な細胞機能を決定する重要な環境因子である[90]。細胞外マトリクスは培養容器に薄く塗布するだけで、細胞の接着性や分化に影響を与えることが知られている。しかし生体で形成されるものに近い細胞外マトリクスの会合体を用いる三次元培養は、より生体に近く、薄く塗布した場合とは異なる環境を提供すると考えられている[91]。逆にはじめは接着の足場のないところでも、細胞は微小環境を構築し[34、92]、遊走や増殖を可能にする。さらに形成された微小環境から接着装置を介して細胞内部へ情報がフィードバックされる[25、55]。生体で皮膚の創傷治癒時には、このような細胞の接着能を用いる組織修復機構が働くと考えられている[77]。

本研究は HFKs の生存および微小環境構築に、I 型および IV 型コラーゲン会合体が与える影響を、HFKs の接着様式に着目して解析することを目的とした。I 型および IV 型コラーゲン会合体はそれぞれコラーゲン分子上とは異なる影響を HFKs に及ぼし、真皮を模した I 型コラーゲン線維ゲル上で HFKs を培養すると、HFKs にアポトーシスが誘導された。これは ATP に依存する急速な細胞死なので、I 型コラーゲン線維ゲルへの接着により積極的な細胞死誘導がおきている可能性も考えられるが現時点では関与は不明である。この I 型コラーゲン線維ゲルへの接着によるアポトーシス誘導は、細胞外カルシウム濃度を上昇させてラミニン 5 産生量の増加、E-カドヘリンを介する細胞間接着の強化を誘導すると回避された。このことはラミニン 5 がゲルに沈着することで、HFKs はラミニン 5 を介した接着が可能になり、生存シグナル活性化が亢進されたためと考えている。正常な基底膜に近い接着基質と考えられる IV 型コラーゲン網目ゲル上での培養の場合は、細胞外のカルシウム濃度を上げなくても、ラミニン 5 は細胞接着足場への沈着し HFKs は接着を維持することが可能であった。そのため IV 型コラーゲン会合体の上では高カルシウム濃度培地を用いて培養しても、低カルシウム濃度培地を用いる場合と比較して、分化マーカーの発現を除いて細胞挙動に顕著な差は観察されなかった。HFKs は細胞塊を形成して生存を維持し、すべての細胞

は培養2日でインボルクリンを発現していた。培養開始直後はインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  の接着斑様構造が細胞塊周囲に存在したが、培養を継続するとインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  に加えてインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  が共在する様になった（データ非掲載）。これらの結果から、ゲル上で培養を行う場合もラミニン 5 を介した細胞接着が維持されていれば、HFKs は生存を維持できることがわかった。すなわち HFKs の生存にとっては、I 型および IV 型コラーゲン会合体がラミニン 5 を保持することが重要である。

本研究で用いた基質の上で、HFKs を、低カルシウム濃度培地を用いて培養した場合に誘導される細胞挙動の差違の特徴を表 2 に示す。未処理培養容器表面、および会合体を形成していないコラーゲン分子上での培養では、細胞挙動に差違はほとんど見られなかった。未処理培養容器表面に比べ、I 型あるいは IV 型コラーゲン分子を塗布した培養容器表面で培養する場合は、播種直後は細胞接着と伸展が促進される [33]。しかしその後培養を継続すると、コラーゲンを塗布した場合と未塗布の場合で細胞挙動に差違は観察されなくなり、いずれの場合も HFKs は伸展形態を保ったまま、接着の足場にはラミニン 5 とインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  が染色されるようになった（図 4、図 14、図 27、図 28）。即ち培養容器表面での長期（数日間）にわたる培養では、培養開始時の足場よりも HFKs が産生したタンパク質により形成される環境が優位に働くようになる。それとは異なり、ゲル上で培養した HFKs に誘導される細胞挙動は、ゲルの構成タンパク質に依存して大きな差違を生じることがあきらかになった。ゲル上培養では平面培養と比較して種々の異なる条件が生じるが、多く報告されているのはゲルの固さや粘弾性等の物理的性質の差違に着目した研究である。本研究ではラミニン 5 とコラーゲンの相互作用に着目し、ゲルの力学的な性質の他にも、タンパク質相互作用（結合）が細胞挙動に大きな影響を与えていることを示すことができた。このことは、生体で真皮と表皮基底細胞層間は直接接着しておらず、接着にはラミニン 5、IV 型コラーゲン、VII 型コラーゲン等複数の成分が介在していること（図 1B）とも呼応していると考えている。

HFKs が I 型あるいは IV 型コラーゲンのゲル上に構築する接着様式は、コラーゲン分子上で培養した場合に形成される接着斑とはインテグリンの集積した形態、集積場所が異なっており、活性化する生存シグナルも異なることがあきらかになった。ゲル

上に形成される接着様式もコラーゲンの型によっても異なっていたが、この差違を生じる原因が、細胞外カルシウム濃度上昇により変化した HFKs の性質の変化とゲルの性質のどちらに起因するかは、現在のところ不明である。ゲル上に形成される接着様式に共通する特徴は、接着斑様構造にインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  が失われず残存することと、生存シグナル Akt 活性化が抑制される点であった。接着斑から伝達されるシグナルは、細胞運動、分化、増殖等を制御する重要な要素であり、多くのシグナル伝達分子の活性化のクロストークにより細胞挙動は決定する [90]。Akt のように多くのシグナル伝達経路の中継点となるリン酸化酵素の活性が抑制されるという現象は、ゲル上で培養した細胞の性質が大きく変化している可能性を示唆している。腫瘍細胞では、インテグリンを介して固いマトリクスに接着することで足場から活性化する生存シグナルが増大し、相対的に液性因子（薬剤）の影響が弱まり薬剤への耐性を獲得する、接着依存性薬剤耐性（CAM-DR）という現象が報告されている [94]。ゲル上で HFKs における Akt の活性化が阻害される現象は、腫瘍細胞でなくても培養皿表面よりも柔らかいコラーゲン会合体への接着により、培養容器表面への接着よりも足場から伝達される生存シグナル活性化が弱くなることがあるのではないかと推測している。機構の解明のためにさらなる解析が必要であると思われる。

コラーゲンやマトリゲルのゲル上で形成される HFKs の細胞形態は、細胞塊を形成しやすい傾向にあることがわかった。細胞塊の形成はゲルへの接着の有無により細胞挙動の異なる細胞群を生じ、細胞の極性を決定する重要な現象である。個々の細胞は、細胞表面の接着分子インテグリン、シンデカン等を介した足場への接着と、細胞同士の接着の両方の機構が同時に働いており、それらの均衡により相対的に細胞形態が決まる。電氣的に処理をした培養皿やコラーゲン分子を塗布した培養皿上では、細胞は単独で接着し伸展形態を保つ。その一方、同じ細胞でも HEMA (poly(2-hydroxyethyl methacrylate)) のような細胞接着阻害物質を培養容器に塗布して細胞の足場をなくすと、細胞は基質に接着することができず細胞塊を形成するようになる。ゲル上での細胞塊形成もゲルへの接着力の弱化による可能性があると考えている。

I 型コラーゲン会合体は I 型コラーゲン分子同様、生体適合性と汎用性の高い培養基

材として注目を集めている。しかし本研究で、I型コラーゲン線維ゲルはHFKsにとっては接着性が低く、生存シグナルの活性化が抑制され、増殖条件の培養では細胞死を引き起こす培養基材であることが新たに示された。この誘導されるアポトーシスを抑制して細胞培養に適した環境を形成するためには、生存シグナルの活性化を亢進し、細胞接着を強化する細胞外マトリクスをコラーゲン会合体に沈着する工夫が有効であることがわかった。また、IV型コラーゲン網目ゲルの上では、HFKsは細胞塊を形成して接着の足場を保持し生存する培養基材であることがわかったが、増殖は抑制されるため長期の培養には適さない。組織再生に有効な培養系構築には、より細胞の生存シグナルを活性化する操作が必要であることが示唆される。

本研究により、コラーゲン会合体を用いた培養では通常培養容器を用いた培養に比べて、細胞による接着の足場の構築が困難になり、生存シグナル伝達活性化が弱化し、増殖や長期の生存維持が困難になることがあきらかになった。この知見が新規培養基材の開発に活用されることを期待したい。

表2 細胞外カルシウム濃度 30  $\mu$ M で培養した HFKs の接着様式と挙動の特徴

接着基質	細胞形態変化	接着斑形成	インテグリン $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 切替	増殖	アポトーシス	分化	細胞塊形成	ラミニン 5 沈着
未処理	丸い $\rightarrow$ 伸展	○	$\times \rightarrow \alpha 3$	○	$\times$	$\times$	$\times$	○
I型コラーゲン分子	伸展 $\rightarrow$ 伸展	○	$\alpha 2 \rightarrow \alpha 3$	○	$\times$	$\times$	$\times$	○
IV型コラーゲン分子	伸展 $\rightarrow$ 伸展	○	$\alpha 2 \rightarrow \alpha 3$	○	$\times$	$\times$	$\times$	○
ゲル化マトリゲル	丸い $\rightarrow$ 丸い	$\times$	$\times$	$\times$	$\times$	○	○	N.D.
I型コラーゲンゲル	丸い $\rightarrow$ 丸い	○ $\rightarrow$ $\times$	$\alpha 2 \rightarrow \times$	$\times$	○ (急)	$\times$	$\times$	$\times$
IV型コラーゲンゲル	丸い $\rightarrow$ 伸展	○	$\alpha 2 \rightarrow \alpha 2$ 、 $\alpha 3$	$\times$	○ (緩)	○	○	○

○：発現、誘導、 $\times$ ：発現なし、誘導なし、N.D.:データなし

## 学 位 論 文 要 旨

### I 型および IV 型コラーゲン再構成会合体上での ヒト表皮角化細胞の接着様式と細胞挙動 Human keratinocyte adhesion styles and behaviors on the reconstituted type I and type IV collagen gels

藤崎ひとみ

Hitomi Fujisaki

生体で皮膚は I 型コラーゲン線維束からなる真皮層、IV 型コラーゲンやラミニン等で形成される基底膜、さらに体表側に分化状態の異なる表皮角化細胞の稠密な細胞層で構成されている。皮膚でコラーゲンは主に会合体を形成している。基底層の表皮角化細胞は基底膜に接しているがその接着装置はヘミデスモソームと呼ばれる特徴的な構造を形成している。真皮層と基底膜もまた、アンカリングフィブリルと呼ばれる VII 型コラーゲンで構成される構造で繋ぎ止められており、表皮角化細胞と複数の細胞外マトリクスが協調して皮膚組織の形態、機能維持に関与している。正常組織では表皮角化細胞は I 型コラーゲン線維に直接接着することはないが、表皮が破損した創傷治癒時には周囲の表皮角化細胞は真皮の I 型コラーゲン線維上を遊走し、遊走した表皮角化細胞と真皮細胞とで、基底膜を再構築する。基底膜を含む皮膚構造の再構築に関する多くの研究は、I 型コラーゲン線維ゲルを用いた実験系を用いており、実際に人工皮膚が実用に供されている。しかし基底膜構造構築のためには線維芽細胞と表皮角化細胞の共培養等複雑な過程が必要で、個々の要素の関与はあきらかになっていない。通常の培養皿上での培養では基底膜構造は構築されず、I 型コラーゲン線維ゲルの役割が大きいことが推測できるが、構造形成に果たす詳細な機序は不明である。そこで本研究は、表皮角化細胞が基底膜構造を構築する際、コラーゲン会合体が果たす役割をあきらかにすることを目的とし、培養系で I 型あるいは IV 型コラーゲン会合体上に、表皮角化細胞が形成する接着装置および細胞挙動の解析を行った。

表皮角化細胞を I 型コラーゲン線維ゲル上で培養し、細胞挙動を観察した。I 型コラーゲン分子上での表皮角化細胞の培養法および詳細な接着様式の解析は既に報告されており、その研究に基づき細胞挙動を比較した。通常の増殖用培地（含有カルシウム濃度 30



μM) を用いて I 型コラーゲン線維ゲル上で培養したところ、表皮角化細胞ははじめコラーゲン受容体であるインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  を介してコラーゲンに接着し伸展するが、やがて接着は失われアポトーシスが誘導された。一方、I 型コラーゲン分子上で培養した表皮角化細胞は既報通りに、はじめはインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  を介してコラーゲンに接着、伸展しやがて自ら産生したラミニン 5 にインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  を介して接着するようになり、伸展形態を保ったまま敷石状に増殖した。この 2 つの結果を比較し、インテグリンの切り替えが線維ゲル上では阻害されていることから、原因は I 型コラーゲン線維へのラミニン 5 の沈着不全によるものと仮定し、実験的に I 型コラーゲン線維とラミニン 5 が結合していないことを証明した。以上の結果により I 型コラーゲン線維とラミニン 5 の相互作用というタンパク質間相互作用が、基底膜構造構築の前段階の細胞接着に重要であることをあきらかにした。

線維芽細胞を内包したコラーゲン線維ゲル上で分化誘導条件で培養した表皮角化細胞は、増殖、重層し、線維ゲルとの間に基底膜様の構造が形成される例が知られている。一方、線維芽細胞を除いた増殖条件で培養するとアポトーシスが誘導されることがわかったので、次にコラーゲン線維と表皮角化細胞の接着を維持しアポトーシスを回避する培養条件を探索した。表皮角化細胞の生存シグナルを促進する高カルシウム (1.8 mM) 濃度に調製した培地を用いて、I 型コラーゲン線維ゲル上で培養したところ、アポトーシス誘導は阻害されることがわかった。このとき細胞間接着は強くなり細胞塊が形成され、細胞塊周囲にラミニン 5 沈着とインテグリン  $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$  を含む接着班形成が観察された。生存シグナル Erk1/2 が活性化し、一方 Akt 活性化は抑制されていた。

表皮角化細胞は生体では基底膜に接着しているので、基底膜構成成分 IV 型コラーゲン会合体 (網目ゲル) を用いる培養系は、IV 型コラーゲン分子や I 型コラーゲン会合体を用いる系よりも生体条件に近いことが期待できる。そこで IV 型コラーゲン網目ゲル上で表皮角化細胞を増殖条件で培養し、細胞挙動を観察した。IV 型コラーゲン分子上で培養した細胞は I 型コラーゲン分子と同様、未分化を保ち増殖を続けた。その一方、IV 型コラーゲン網目ゲル上では、IV 型コラーゲン分子上あるいは I 型コラーゲン線維ゲル上培養のどちらとも異なり、細胞は増殖せず、しばらくの間生存した。細胞は自律的に重層化した後、細胞塊上部では、分化が誘導された後にアポトーシスがゆるやかに誘導された。下部の細胞は細胞周囲に接着班が形成され、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  と  $\alpha 3\beta 1$  の集積、ラミニン 5 の沈着が観察され、未分化状態で生存した。生存シグナル Akt の活性化は抑制され、Erk1/2 は活性化した。

本研究ではタンパク質相互作用の観点から、コラーゲン会合体がヒト表皮角化細胞に与える影響の解析を試みた。ヒト表皮角化細胞が形成する接着様式や分化誘導は、コラーゲンの会合体形成の有無、およびコラーゲンの型に依存して異なり、細胞の生死をも左右する重大な影響をおよぼしていることがあきらかになった。会合体を形成したコラーゲンはより生体に近い形であると考えうるため、本研究の成果は表皮角化細胞のための新規な培養基材開発などへの活用が期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切な御指導、御鞭撻を賜った、東京農工大学農学部 西山敏夫教授および、本論文の審査を快くお引き受けいただき有益なご助言を賜った 宇都宮大学農学部 蕪山由己人教授に深謝申し上げます。

また研究基盤を形成する上で多大なご尽力をいただいた、東京大学教養学部在籍時の恩師である林利彦教授、および株式会社ニッピ・バイオマトリックス研究所 服部俊治所長並びに所員の皆様、学位論文を構成する共著者の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. 安達栄治郎、澤田元 基底膜とそれに関連した構造、細胞外マトリックス-基礎と臨床-、小出輝、林利彦（編）、愛智出版、2000: 2-40.
2. Walko, G., Castanon, M. J. and Wiche, G. *Molecular architecture and function of the hemidesmosome*. Cell Tissue Res., 2015. 360: 529-544.
3. Kitagawa, Y., Niimi, T., and Kumagai, C. *Role of interchain disulfide-bonding in dimer-trimer switch during laminin heterotrimer assembly*. In “Extracellular Matrix-Cell Interaction” (Y. Ninomiya, B. R. Olsen, and T. Ooyama, Eds. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.) 1998.:41-69.
4. Sasaki, T., and Timpl, R. *Laminins*. In “Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins” (T. Kreis and R. Vale, Eds., Oxford Univ. Press, New York.) 1999.:434-443.
5. Kikkawa, Y., Sanzen, N., Fujikawa, H., Sonnenberg, A., and Sekiguchi, K. *Integrin binding specificity of laminin -10/11: Laminin-10/11 are recognized by  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$  and  $\alpha6\beta4$  integrins*. J. Cell Sci., 2000. 113:869-876.
6. Kikkawa, Y., Umeda, M., and Miyazaki, K. *Marked stimulation of cell adhesion and motility by ladsin, a laminin like scatter factor*. J. Biochem., 1994.116: 862-869.
7. Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G., and Quaranta, V. *Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5*. Science, 1997. 227: 225-228.
8. Salo, S., Haakana, H., Kontusaari, S., Hujanen, E., Kallunki, T., and Tryggvason, K. *Laminin-5 promotes adhesion and migration of epithelial cells: Identification of a migration related element in the  $\alpha2$  chain gene (LAMC2) with activity in transgenic mice*. Matrix Biol., 1999. 18: 197-210.
9. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD. *A simplified laminin nomenclature*. Matrix Biol., 2005. 24: 326-332.

10. Ryan, M. C., Keesook, L., Miyashita, Y., and Carter, W. G. *Targeted disruption of LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and stage differentiation of epithelial cells.* J. Cell Biol. 1999. 145: 1309–1323.
11. Kikkawa, Y., Sanzen, N., and Sekiguchi, K. *Isolation and characterization of laminin-10/11 secreted by human lung carcinoma cells.* J. Biol. Chem., 1998. 273: 15854–15859.
12. Tani, T., Lehto, V. P., and Virtanen, I. *Expression of laminins 1 and 10 in carcinoma cells and comparison of their roles in cell adhesion.* Exp. Cell Res., 1999. 248: 115–121.
13. Ricard-Blum, S. *The collagen family* Cold Spring Harb Perspect Biol., 2011. 3: a004911-004930.
14. Grinnell, F. *Cell–collagen interactions: Overview.* Methods Enzymol. , 1982. 82: 499–503.
15. Kleinman, H. K., Kibbery, M. C., Cannon, F. B., Weeks, B. S., and Grant, D. S. *Use of extracellular matrix and its components in culture.* In “Extracellular Matrix: A Practical Approach” (M. A. Haralson and J. R. Hassell, Eds.), 1st ed. 1995. : 289–301.
16. Hattori, S., Adachi, E., Ebihara, T., Shirai, T., Someki, I., and Irie, S. *Alkali-treated collagen retained the triple helical conformation and the ligand activity for the cell adhesion via  $\alpha 2\beta 1$  integrin.* J. Biochem., 1999. 125: 676–684.
17. Yurchenco, P. D. *Type IV Collagen and Self Assembly.* Extracellular Matrix Assembly and Structure (Academic Press) 1994.: 367–372.
18. Iwata, M., Imamura, Y., Sasaki, T., and Hayashi, T. *Evidence for a short form of alpha 1(IV) as a major polypeptide in bovine lens capsule.* J. Biochem., 1995. 117: 1298–1304.
19. Nakazato, K., Muraoka, M., Adachi, E., and Hayashi, T. *Gelation of lens capsule type IV collagen solution at a neutral pH.* J. Biochem., 1996. 120: 889–894.
20. Muraoka, M., Nakazato, K., and Hayashi, T. *Gel formation from the type IV collagen isolated from bovine lens capsule in guanidine-HCl and dithiothreitol.* 1996. J. Biochem., 119: 167–172.
21. Timpl, R. *Structure and biological activity of basement membrane proteins.* Eur J Blochem., 1989. 180: 487-502.
22. Yurchenco, P. D., Schittny, J. C. *Molecular architecture of basement membranes.* FASEB J., 1990. 4: 1577-1590.

23. Vanacore, R. M., Friedman, D. B., Ham, A. J., Sundadamoorthy, M., Hudson, B. G. *Identification of S-hydroxylysyl-methionine as the covalent cross-link of the noncollagenous (NC1) hexamer of the alpha1alpha1alpha2 collagen IV network: a role for the post-translational modification of lysine 211 to hydroxylysine 211 in hexamer assembly.* J. Biol. Chem., 2005. 280: 29300-29310.
24. Hirose, M., Kosugi, H., Nakazato, K., and Hayashi, T. *Restoration to a quiescent and contractile phenotype from a proliferative phenotype of myofibroblast-like human aortic smooth muscle cells by culture on type IV collagen gels.* J. Biochem., 1999. 125: 991–1000.
25. Hynes, R. O. *Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines.* Cell, 2002. 110: 673–687.
26. Boyce, S. T., and Ham, R. G. *Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum free media.* J. Tissue Cult. Meth., 1985. 9: 83–93.
27. Turksen, K., Choi, Y., Fuchs, E. *Transforming growth factor alpha induces collagen degradation and cell migration in differentiating human epidermal raft cultures.* 1991. Cell Regul., 2: 613–625.
28. Sobral, C. S., Gragnani, A., Cao, X., Morgan, J. R., Ferreira, L. M. *Human Keratinocytes Cultured on Collagen Matrix Used as an Experimental Burn Model.* 2007. J. Burns Wounds., 7: e6-10.
29. Yamato, M., and Hayashi, T. *Topological distribution of collagen binding sites on fibroblasts cultured within collagen gels.* In “Extracellular Matrix–Cell Interaction” Ninomiya, Y., Olsen, B. R. and Ooyama, T. Eds. 1998.: 123–140.
30. Suzuki, Y., Someki, I., Adachi, E., Irie, S., and Hattori, S. *Interaction of collagen molecules from the aspect of fibril formation: Acid-soluble, alkali-treated and MMP1-digested fragments of type I collagen.* J. Biochem., 1999. 126: 54–67.
31. Ruangpanit, N., Chan, D., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Polarek, J., Yang, C., Bateman, J. F., and Thompson, E. W. *Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: Dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form.* Matrix Biol., 2001. 20: 193–203.
32. Nishiyama, T., Akutsu, N., Horii, N., Nakayama, Y., Horii, I., Nakayama, Y., Ozawa, T., and Hayashi, T. *Response to growth factors of human dermal fibroblasts in a quiescent state owing to cell–matrix contact inhibition.* Matrix, 1991. 11: 71–75.

33. Carter, W. G., Kaur, P., Gil, S. G., Gahr, P. J., and Wayner, E. A. *Distinct functions for integrins  $\alpha 3\beta 1$  in focal adhesions and  $\alpha 6\beta 4$ /Bullous Pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: Relation to hemidesmosomes.* J. Cell Biol., 1990. 111: 3141–3154.
34. Carter, W. G., Wayner, E. A., Bouchard, T. S., and Kaur, P. *The role of integrins  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 3\beta 1$  in cell–cell and cell–substrate adhesion of human epidermal cells.* J. Cell Biol., 1990. 110: 1387–1404.
35. Carter, W. G., Ryan, M. C., and Gahr, P. J. *Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin  $\alpha 3\beta 1$  in epithelial basement membranes.* Cell, 1991. 65: 599–610.
36. Ryan, M. C., and Christiano, A. M. *The functions of laminins: Lessons from in vivo studies.* Matrix Biol., 1996. 15: 369–381.
37. Kariya, Y., Miyazaki, K. *The basement membrane protein laminin-5 acts as a soluble cell motility factor.* Exp. Cell Res., 2004. 297: 508-520.
38. Rousselle, P., Keene, D. R., Ruggiero, F., Champlaud, M.-F., van der Rest, M., and Burgeson, R. E. *Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen.* J. Cell Biol., 1997. 138: 719–728.
39. Frisch, S. M., and Francis, H. *Disruption of epithelial cell–matrix interactions induces apoptosis.* J. Cell Biol., 1994. 124: 619–626.
40. Miranti, C. K., and Brugge, J. S. *Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction.* Nature Cell Biol., 2002. 4: E83–E90.
41. Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben Sasoon, S. A. *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.* J. Cell Biol., 1992. 119: 493–501.
42. Gniadecki, R., Hansen, M., and Wulf, H. C. *Two pathways for induction of apoptosis by ultraviolet radiation in cultured human keratinocytes.* J. Invest. Dermatol., 1997. 109: 163–169.
43. Brightman, A. O., Rajwa, B. P., Sturgis, J. E., McCallister, M. E., Robinson, J. P., and Voytik-Harbin, S. L. *Timelapse confocal reflection microscopy of collagen fibrillogenesis and ECM assembly in vitro.* Biopolymer, 2000. 54: 222–234.
44. Manda, R., Kohno, T., Niki, T., Yamada, T., Takenoshita, S., Kuwano, H., and Yokota, J. *Differential expression of the LAMB3 and LAMC2 genes between small cell and nonsmall cell lung carcinomas.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000. 275: 440–445.

45. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979. 76: 4350–4354.
46. Matsuno, H., Niikura, K., and Okahara, Y. *Direct monitoring kinetic studies of DNA polymerase reactions on a DNA immobilized quartz-crystal microbalance*. Chem. Eur. J., 2001. 7: 3305–3312.
47. Okahata, Y., Niikura, K., Sugiura, Y., Sawada, M., and Morii, T. *Kinetic studies of sequence-specific binding of GCN4- bZIP peptides to DNA strands immobilized on a 27-MHz quartz-crystal microbalance*. Biochemistry, 1998. 37: 5666–5672.
48. Decline, F. and Rousselle, P. *Keratinocyte migration requires  $\alpha 2\beta 1$  integrin mediated interaction with the laminin 5  $\gamma 2$  chain* J. Cell Sci., 2000. 114: 811–823.
49. Hynes, R. O. *Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. 69: 11–25.
50. Hattori, S., Adachi, E., Ebihara, T., Shirai, T., Someki, I., and Irie, S. *Alkali-treated collagen retained the triple helical conformation and the ligand activity for the cell adhesion via  $\alpha 2\beta 1$  integrin*. J. Biochem., 1999. 125: 676–684.
51. Huang, S., and Ingber, D. E. *Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: Switching between attractors in cell regulatory networks*. Exp. Cell Res., 2000. 261: 91–103.
52. Jost, M., Huggett, T. M., Kari, C., Rodeck, U. *Matrix-independent Survival of Human Keratinocytes through an EGF Receptor/MAPK-Kinase-dependent Pathway*. Mol Biol Cell, 2001. 12: 1519–1527.
53. Paoli, P., Giannoni, E., Chiarugi, P. *Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression*. BBA-Mol. Cell Res., 2013. 1833: 3481–3498.
54. Nishiyama, T., Amano, S., Tsunenaga, M., Kadoya, K., Takeda, A., Adachi, E., and Burgeson, R. E. *The importance of laminin 5 in the dermal–epidermal basement membrane*. J. Dermatol. Sci., 2000. 25: s51–s59.
55. Nguyen, B. P., Gil, S. G., and Carter, W. G. *Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling*. J. Biol. Chem., 2000. 275: 31896–31907.
56. Danilkovitch, A., Donley, S., Skeel, A., and Leonard, E. J. *Two independent pathways mediate the antiapoptotic action of macrophage-stimulating protein on epithelial cells*. Mol. Cell. Biol., 2000. 20: 2218–2227.

57. Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P. H., and Downward, J. *Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway*. EMBO J., 1997. 16: 2783–2793.
58. Fuchs, E. *Epidermal differentiation: The bare essentials*. J. Cell Biol., 1990. 111: 2807–2814.
59. Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S.H. *Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture*. Cell, 1980. 19: 245–254.
60. Boyce, S.T., and Ham, R.G. *Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture*. J. Invest. Dermatol., 1983. 81: 33s–40s.
61. Tu, C.-L., Chang, W., and Bikle, D. D. *The extracellular calcium sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes*. J. Biol. Chem., 2001. 276: 41079–41085.
62. 新谷康 I型コラーゲンによる上皮間葉転換の誘導 生化学、2009、第81巻、第2号:113-117.
63. Watt, F. M., Jordan, P. W., and O'Neill, C. H. *Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988. 85: 5576–5580.
64. Yuspa, S.H., Kilkenny, A.E., Steinert, P.M., and Roop, D.R. *Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro*. J. Cell Biol., 1989. 109: 1207–1217.
65. Schmidt, M., Goebeler, M., Posern, G., Feller, S.M., Seitz, C.S., Brocker, E.-B., Rapp, U.R., and Ludwig, S. *Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes*. J. Biol. Chem., 2000. 275: 41011–41017.
66. Rodeck, U., Jost, M., Kari, C., Shih, D.-T., Lavker, R.M., Ewert, D.L., and Jensen, P.J. *EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival*. J. Cell Sci., 1997. 110: 113–121.
67. Giancotti, F.G., and Ruoslahti E. *Integrin signaling*. Science, 1999. 285: 1028–1032.
68. Miranti, C.K., and Brugge, J.S. *Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction*. Nature Cell Biol., 2002. 4: E83–E89.
69. Mainiero, F., Murgia, C., Wary, K.K., Curatola, A.M., Pepe, A., Blumemberg, M., Westwick, J.K., Der, C.J., and Giancotti, F.G. *The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation*. EMBO J., 1997. 16: 2365–2375.



70. Nievers, M.G., Schaapveld, R.Q., Sonnenberg, A. *Biology and function of hemidesmosomes*. 1999. *Matrix Biology* 18: 5-17.
71. Schwartz, M.A., and Assoian, R.K. *Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways*. *J. Cell Sci.*, 2001. 114: 2553–2560.
72. Kwong, L., Wozniak, M.A., Collins, A.S., Wilson, S.D., and Keely, P.J. *R-Ras promotes focal adhesion formation through focal adhesion kinase and p130 (Cas) by a novel mechanism that differs from integrins*. *Mol. Cell Biol.*, 2003. 23: 933–949.
73. Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., and Trzaskos, J.M. *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase*. *J. Biol. Chem.*, 1998. 273: 18623–18632.
74. Chen, W., and Bowden, G.T. *Activation of p38 MAP kinase and ERK are required for ultraviolet-B induced c-fos gene expression in human keratinocytes*. *Oncogene*, 1999. 18: 7469–7476.
75. Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., and Brown, R.F. *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*. *J. Biol. Chem.*, 1994. 269: 5241–5248.
76. Simon, M.C. *In The Keratinocyte Handbook*, I.M. Leigh, E.B. Lane, and F.M. Watt, (eds.), (Cambridge Univ. Press, New York), 1994. 275–292.
77. Nguyen, B. P., Ren, X.-D., Schwartz, M. A., Carter, W. G. *Ligation of Integrin  $\alpha3\beta1$  by Laminin 5 at the Wound Edge Activates Rho-dependent Adhesion of Leading Keratinocytes on Collagen*. *J. Biol. Chem.*, 2001. 276: 43860–43870.
78. Cukierman, E., Pankov, R., and Yamada, K. M. *Cell interactions with three-dimensional matrices*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002. 14: 633–639.
79. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., and Yamada, K.M. *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. *Science*, 2001. 294: 1708–1712.
80. Kleinman H. K., McGarvey, M. L., Hassel, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W., and Martin, G. R. *Basement membrane complexes with biological activity*. *Biochemistry*, 1986. 25: 312–318.

81. Wisdom, B. J., Gunwar, S., Hudson, M. D., Noelken, M. E., and Hudson, B. G. *Type IV collagen of Engelbreth-Holm-Swarm tumor matrix: Identification of constituent chains*. *Connect. Tissue Res.*, 1992. 27: 225 -234.
82. Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J. *Liver cell culture techniques*. *Methods Mol. Biol.*, 2009. 481:35-46.
83. Tonge, D, Edström, A, Ekström, P. *Use of explant cultures of peripheral nerves of adult vertebrates to study axonal regeneration in vitro*. *Prog Neurobiol.* 1998. 54: 459-480.
84. Pistritto, G., Jost, M., Srinivasula, S. M., Baffa, R., Poyet, J.-L., Kari, C., Lazebnik, Y., Rodeck, U., Alnemri, E. S. *Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia*. *Cell Death Differ.*, 2002. 9: 995-1006.
85. Sercu, S., Zhang, M., Oyama, N., Hansen, U., Ghalbzouri, A. E., Jun, G., Geentjens, K., Zhang, L., Merregaert, J. H. *Interaction of extracellular matrix protein 1 with extracellular matrix components: ECM1 is a basement membrane protein of the skin*. *J. Invest. Dermatol.*, 2008. 128:1397-408.
86. Brittingham, R., Uitto, J., Fertala, A. *High-affinity binding of the NC1 domain of collagen VII to laminin 5 and collagen IV*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006. 343: 692–699.
87. Baker, S. E., Hopkinson, S. B., Fitchmun, M., Andreason, G. L., Frasier, F., Plopper, G. , Quaranta, V., Jones, J.C. *Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly*. *J. Cell Sci.*, 1996. 109: 2509-2520.
88. Mizushima, H., Miyagi, Y., Kikkawa, Y., Yamanaka, N., Yasumitsu, H., Misugi, K., Miyazaki, K. *Differential expression of laminin-5/ladsin subunits in human tissues and cancer cell lines and their induction by tumor promoter and growth factors*. *J. Biochem.*, 1996. 120: 1196-1202.
89. Kariya, Y., Sato, H., Katou, N., Kariya, Y., Miyazaki, K. *Polymerized laminin-332 matrix supports rapid and tight adhesion of keratinocytes, suppressing cell migration*. *PLoS One*, 2012. 7: e33546.
90. 小川崇、宮崎香 細胞外マトリックス分子と細胞接着、タンパク質科学、後藤祐児、桑島邦博、谷澤克行（編）、科学同人、2005:555-565.
91. Sliva, G. *Biology's new dimension*. *Nature*, 2003. 424: 870–872.
92. Zillikens, D. *Acquired skin disease of hemidesmosomes*. *J. Dermatol. Sci.*, 1999. 20:134-154.
93. Folkman, J., Moscona, A. *Role of cell shape in growth control*. *Nature*, 1978. 273:345-349.

94. Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., Dalton, W. S. *Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines*. *Blood*, 1999. 93: 1658-1667.