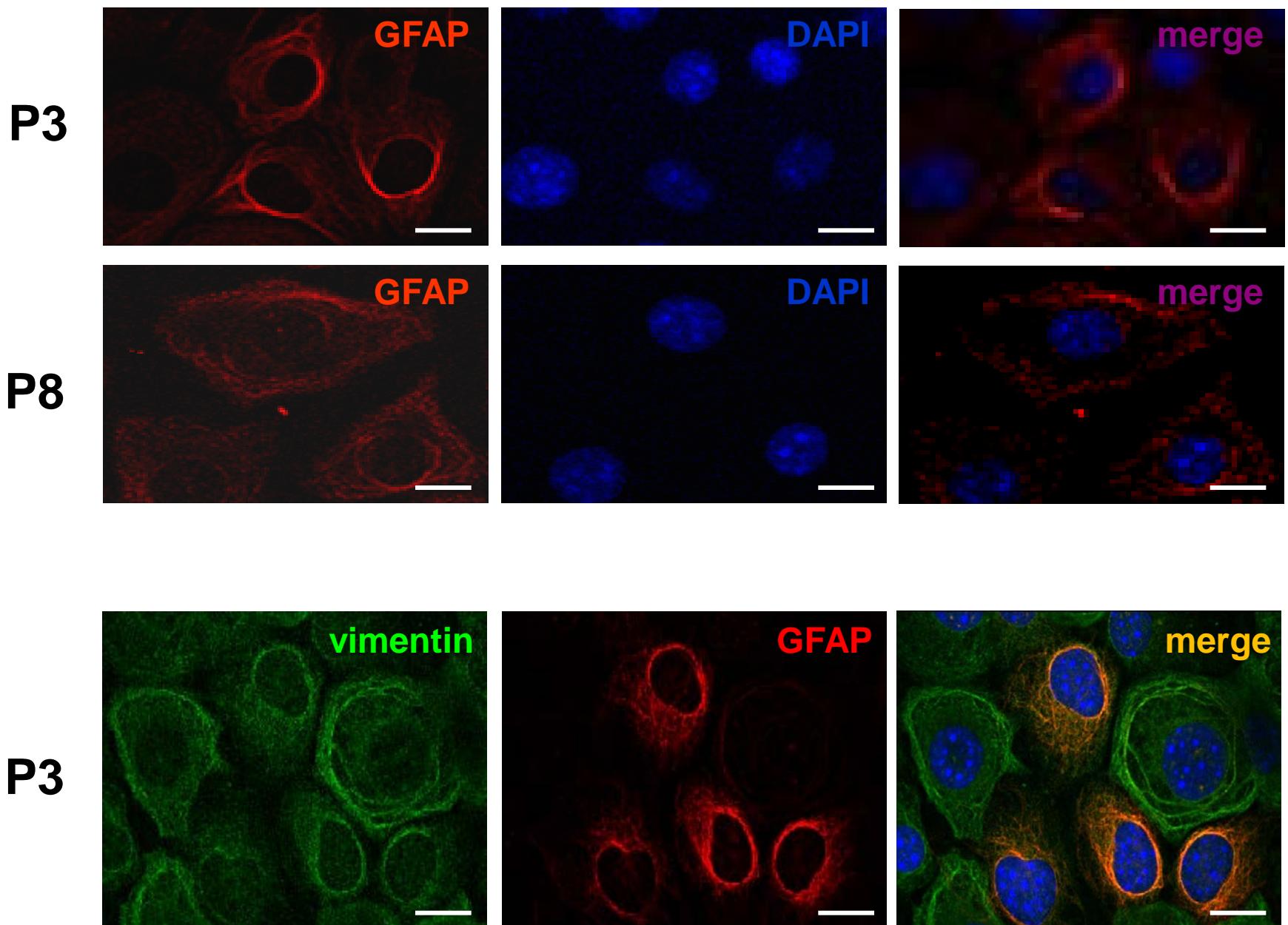


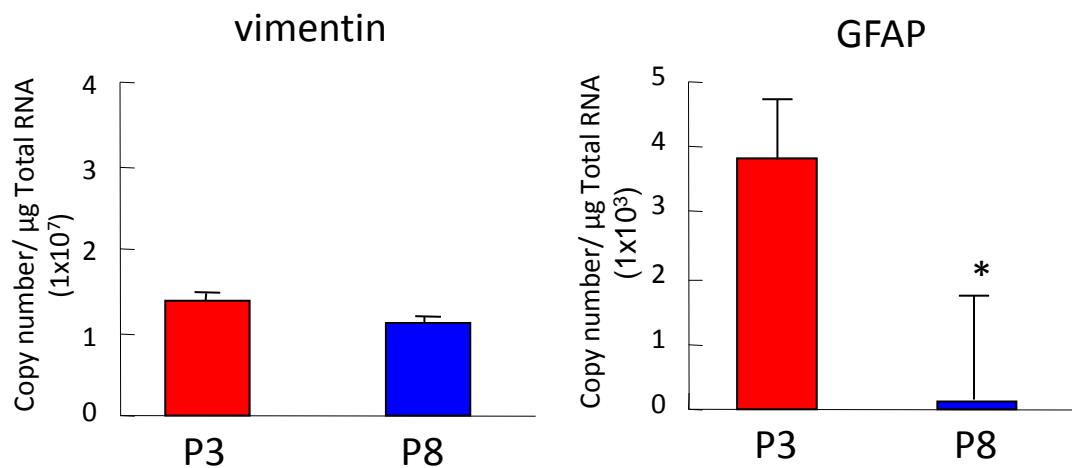
**図1 ヒト耳介由来軟骨細胞におけるGFAPの細胞内局在**  
 ヒト軟骨細胞の免疫蛍光染色所見。上段はP3におけるGFAPの局在を、中段はP8におけるGFAPの局在を示す。P3では、GFAPは免疫強陽性像を示すが、P8ではGFAPは局在の減弱が認められた。また、下段は、軟骨細胞に存在するGFAPと同型の間接線維であるvimentinとの3重染色像を示す。GFAPとvimentinの局在性が異なることを示している。スケールバーは10  $\mu$ mである。



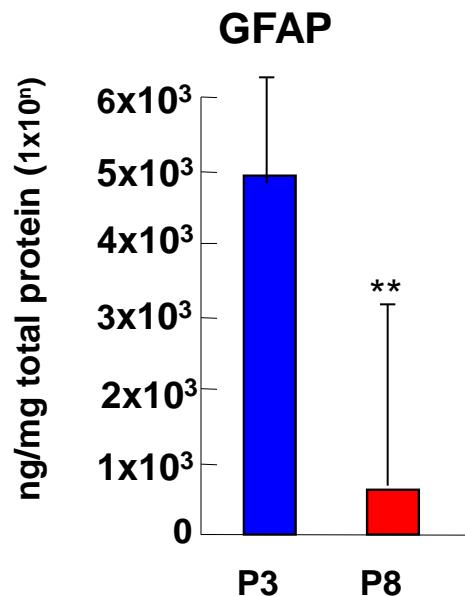
## 図2 マウス由来耳介軟骨細胞におけるGFAPの細胞内局在

マウス軟骨細胞における免疫蛍光染色所見。GFAPの局在はヒト細胞同様の所見を示す。マウスでは特に、GFAPは核周囲に強局在している所見を認める。上段はP3におけるGFAPの局在を示し、中段はP8におけるGFAPの局在を示す。また、下段はヒト細胞同様にvimentinとの3重染色所見を示す。スケールバーは10  $\mu$  mである。

## Gene expression

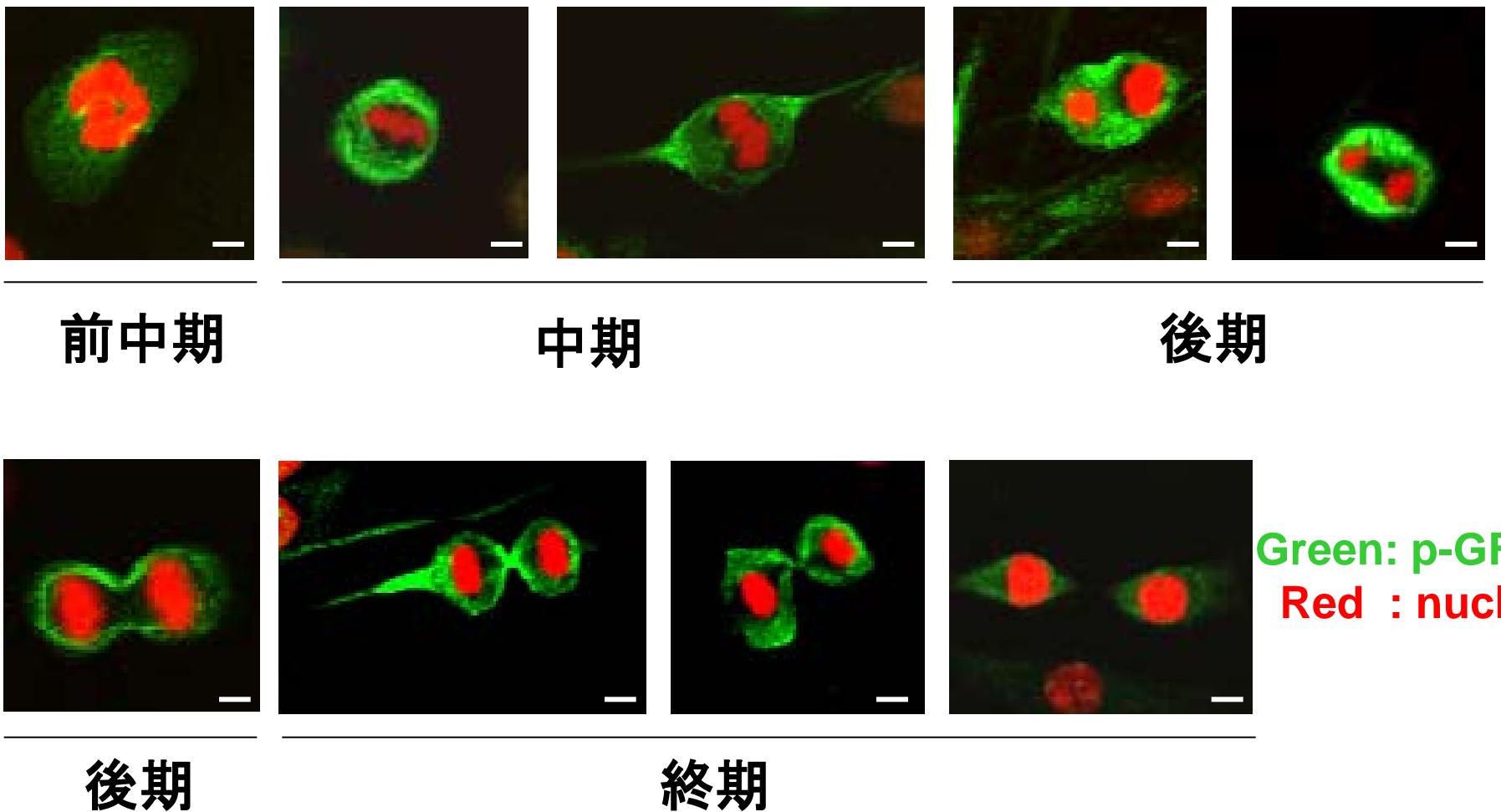


## protein expression



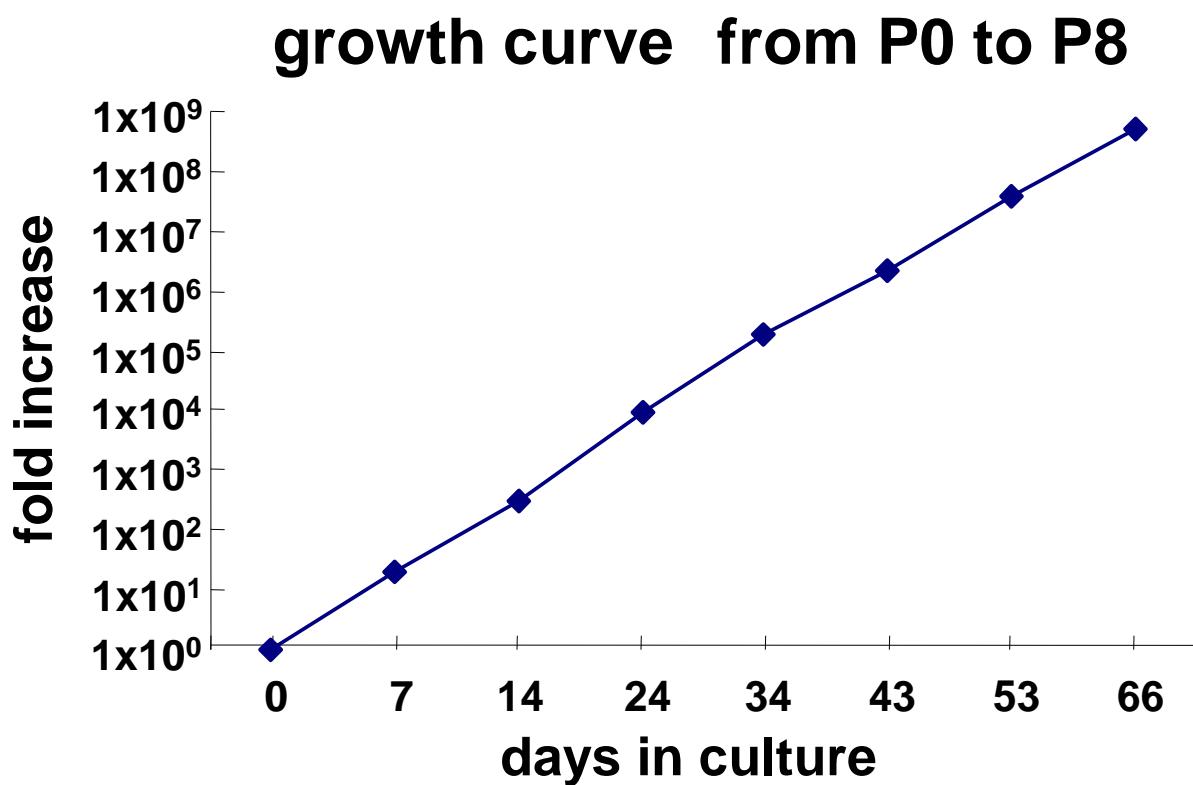
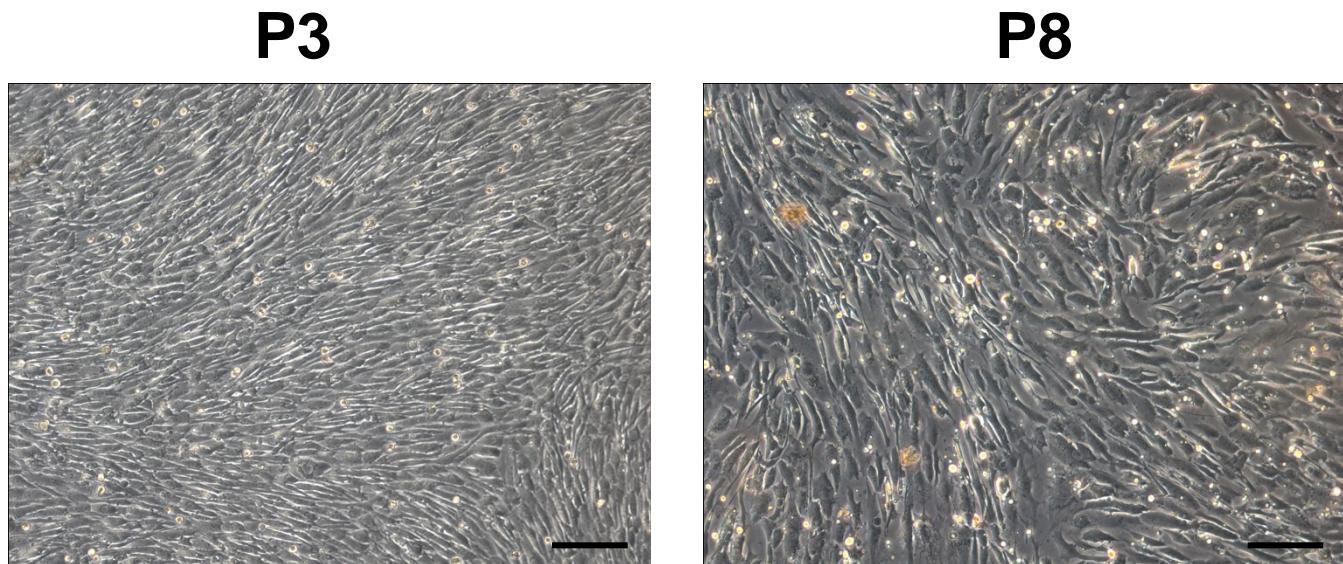
### 図3 GFAP遺伝子および蛋白質発現

GFAPの遺伝子および蛋白質発現を定量的に行った。遺伝子発現量はP3で高値を認めた(\*:  $P < 1 \times 10^{-7}$ , vs P3)。蛋白質発現量は免疫蛍光染色所見同様に、P3で発現が高く、P8になると発現が減少した(\*\*:  $P < 1 \times 10^{-7}$ , vs P3)。またvimentinの発現はP3,P8で変化は認められなかった。



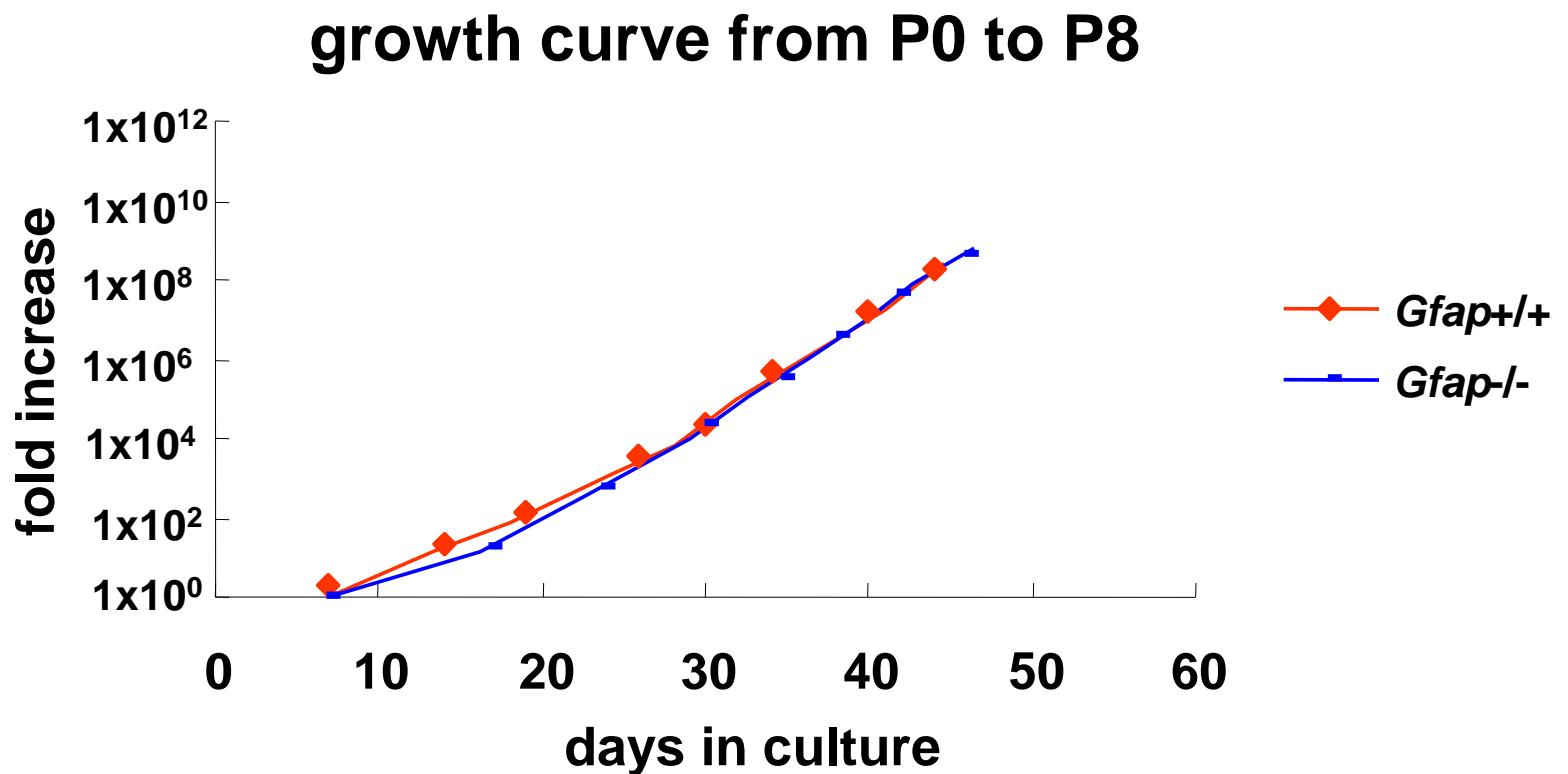
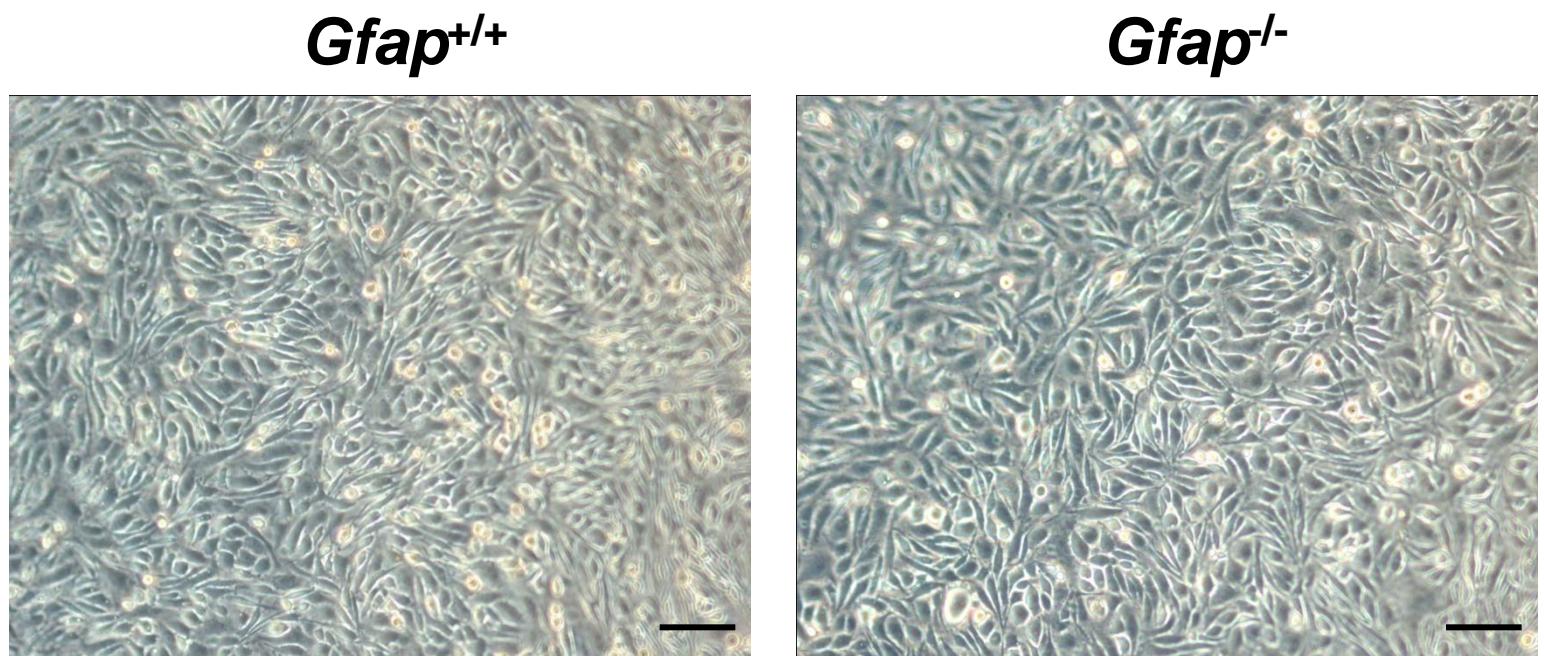
#### 図4 ヒト細胞質分裂期におけるGFAPの局在

分裂期の前中期にGFAPは核周囲に集積を始める。中期には核周囲の集積が強くなり、また、その後GFAPは染色体を両極に引き離すように細胞辺縁に線維の集積を始める。後期になるとGFAPは再度核周囲に集積し、娘核を分離させるために、母核と娘核の中間に線維を集積させる。分離後には細胞質を分離するために、細胞質に集積する。後期になると、GFAPは細胞間の分裂溝付近に線維を集積させ、最終的に細胞質を分離する。スケールバーは8  $\mu$  mである。



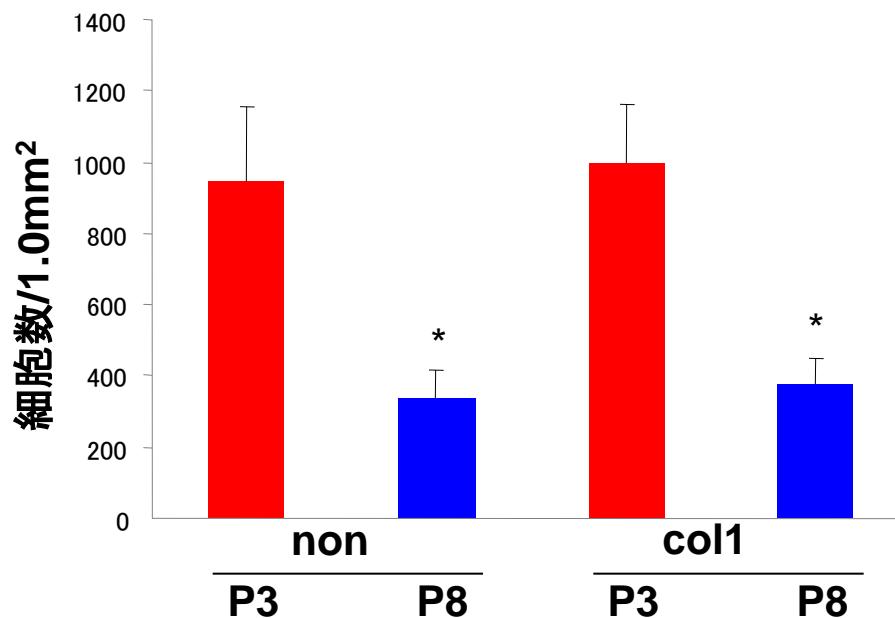
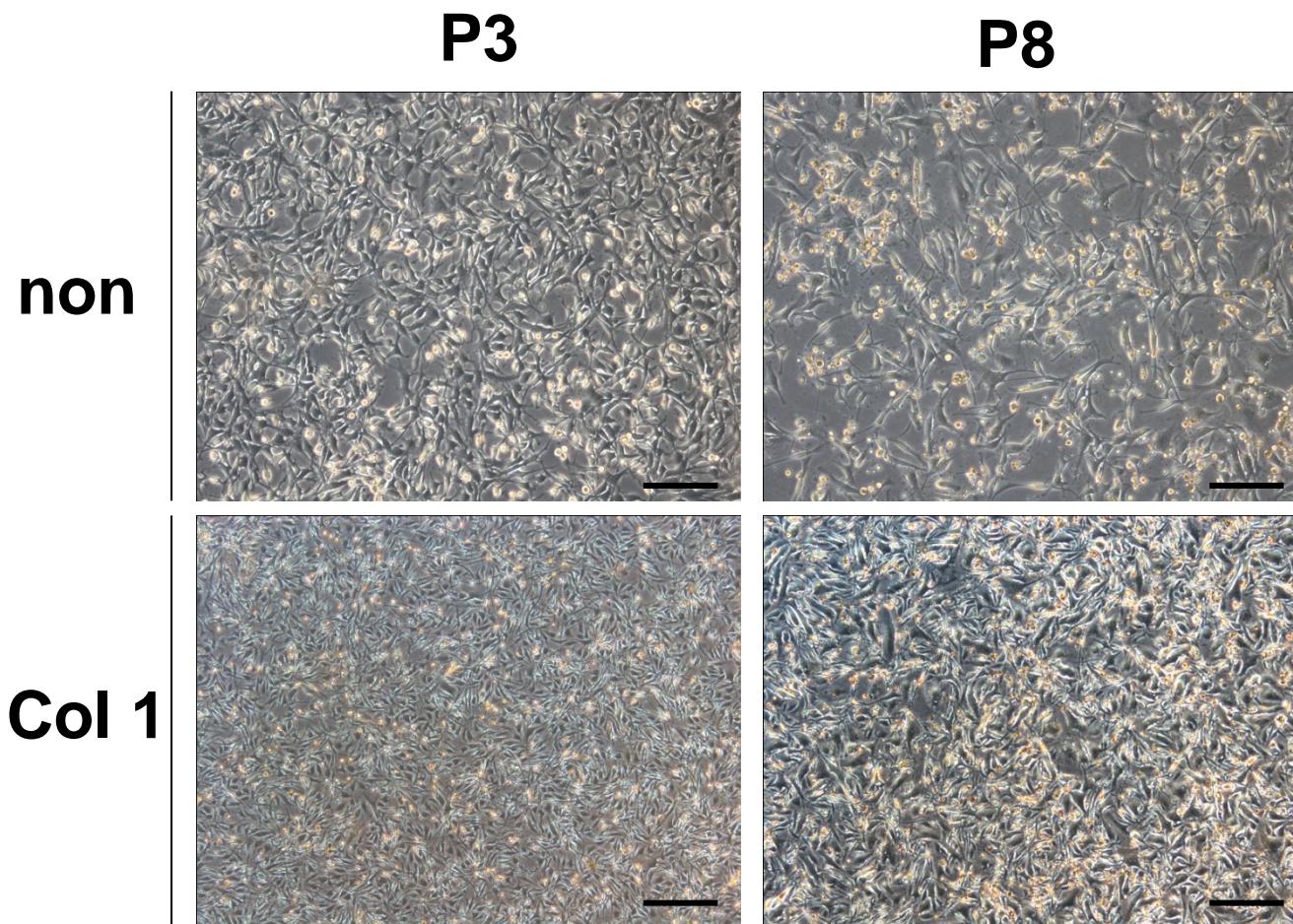
### 図5 ヒト耳介軟骨細胞における細胞増殖

上段はP3およびP8における平面培養後の増能を比較した所見である。P3、P8共にコンフル状態では増殖変化は認められなかった。また下段は軟骨細胞の初代培養(P0)からP8までの増殖曲線を示した図である。増殖能には変化は認めなかった。スケールバーは200  $\mu$ mである。



### 図6 マウス耳介軟骨細胞における細胞増殖

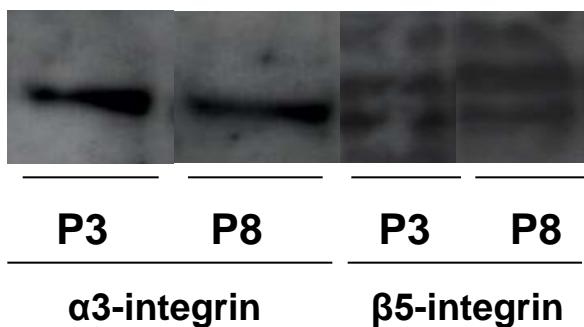
P3およびP8における増殖能の変化を示した所見。上段はGFAP遺伝子欠損型細胞の平面培養後の顕微鏡所見である。増殖は野生型と差は認めなかった。下段は、両者の増殖曲線を示したグラフである。差は認めなかった。スケールバーは200  $\mu$ mである。



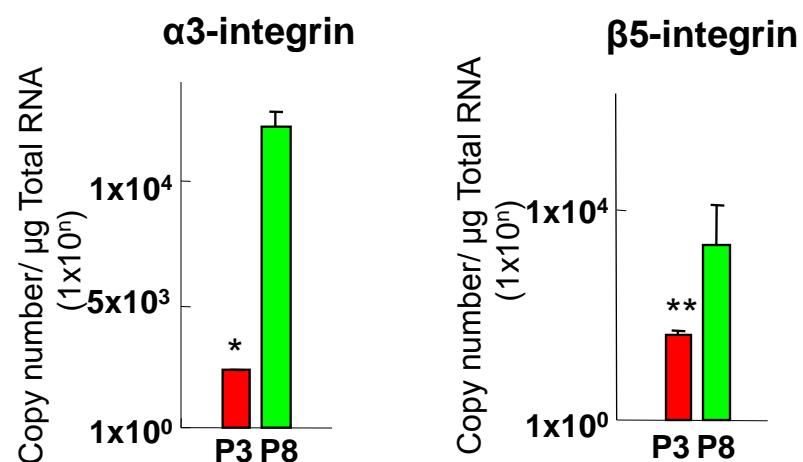
**図7 ヒト耳介軟骨細胞における培養環境による接着状態の変化**  
 培養後6時間における接着状態をP3およびP8で比較した。また、培養基質の違いによる細胞接着状態を比較した。P3に比べてP8は明らかな接着能の低下が認められた(\*:  $P < 0.005$ , vs P3)。また、培養基質の違いにおいて、差は認めなかった。スケールバーは200  $\mu$ mである。

## Adhesion molecule analysis

### Western-blotting



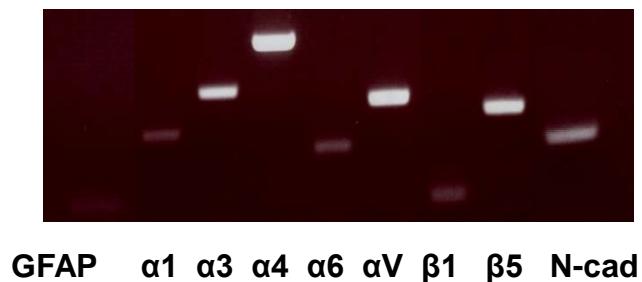
### Real time-PCR



### RT-PCR

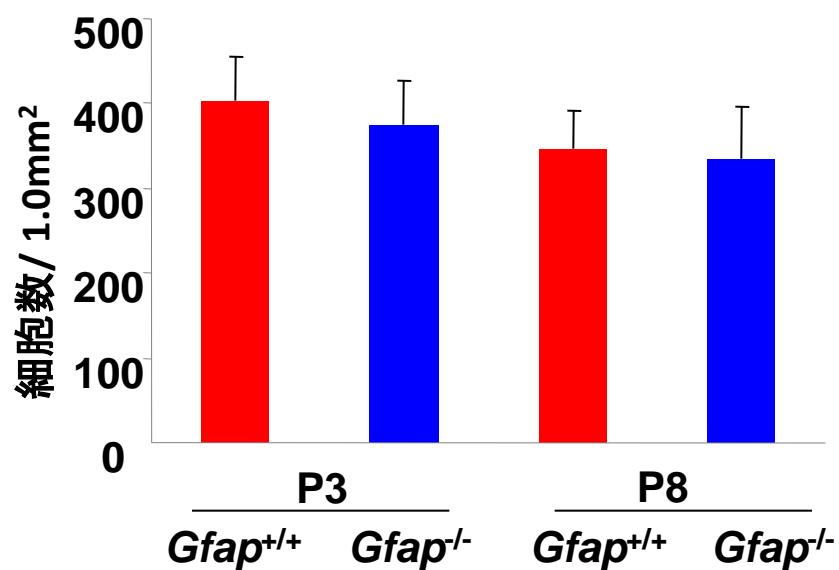
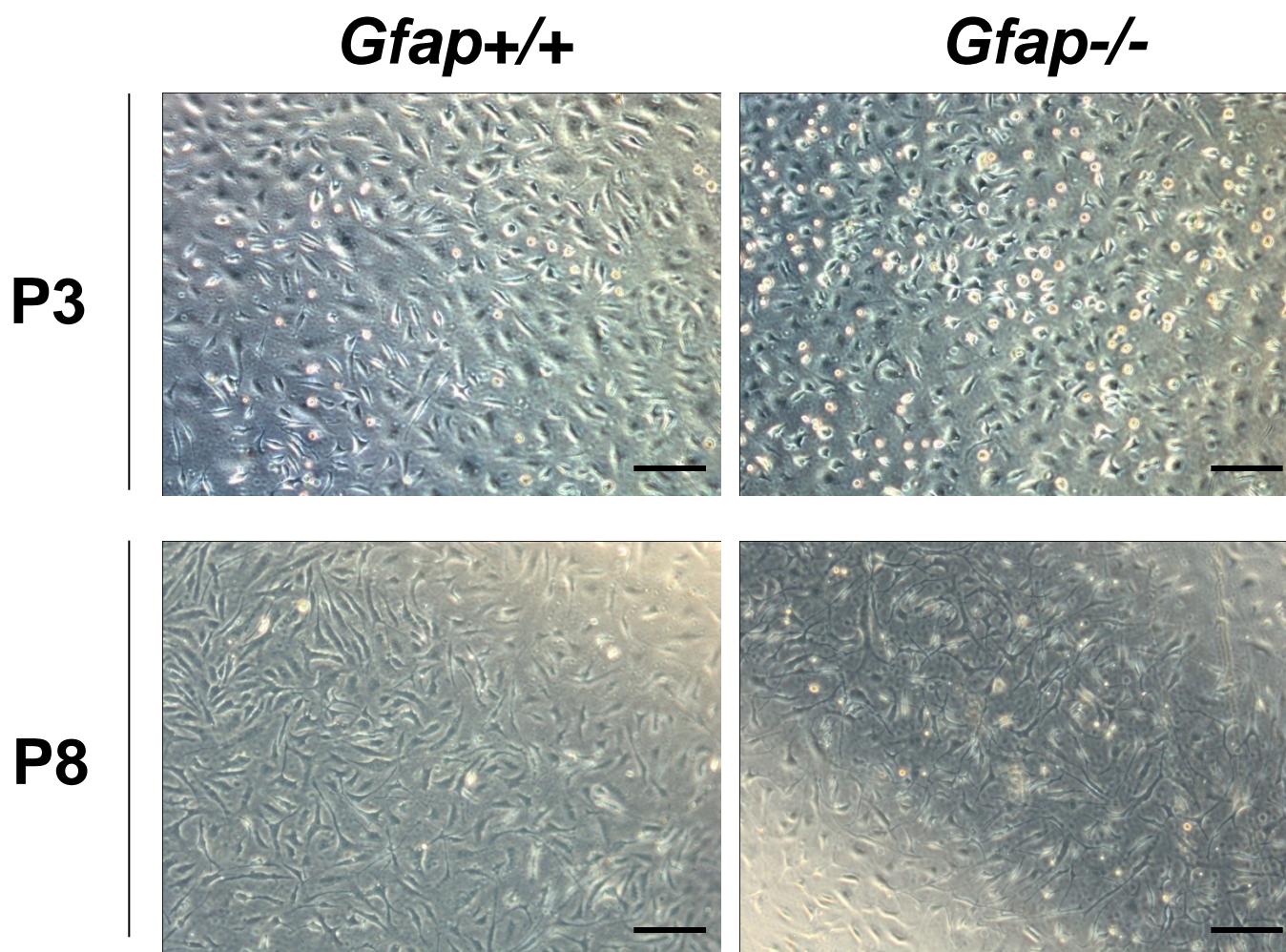


**P3**



**P8**

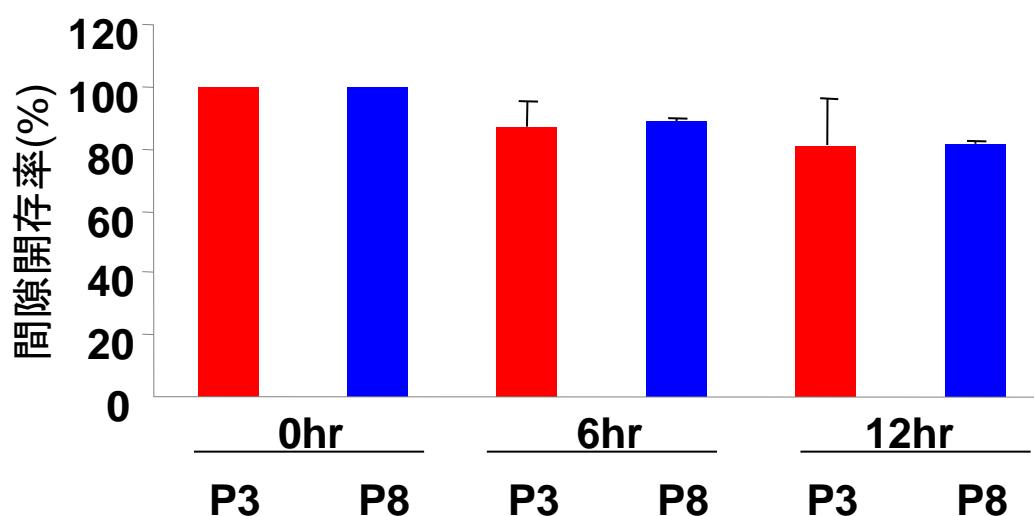
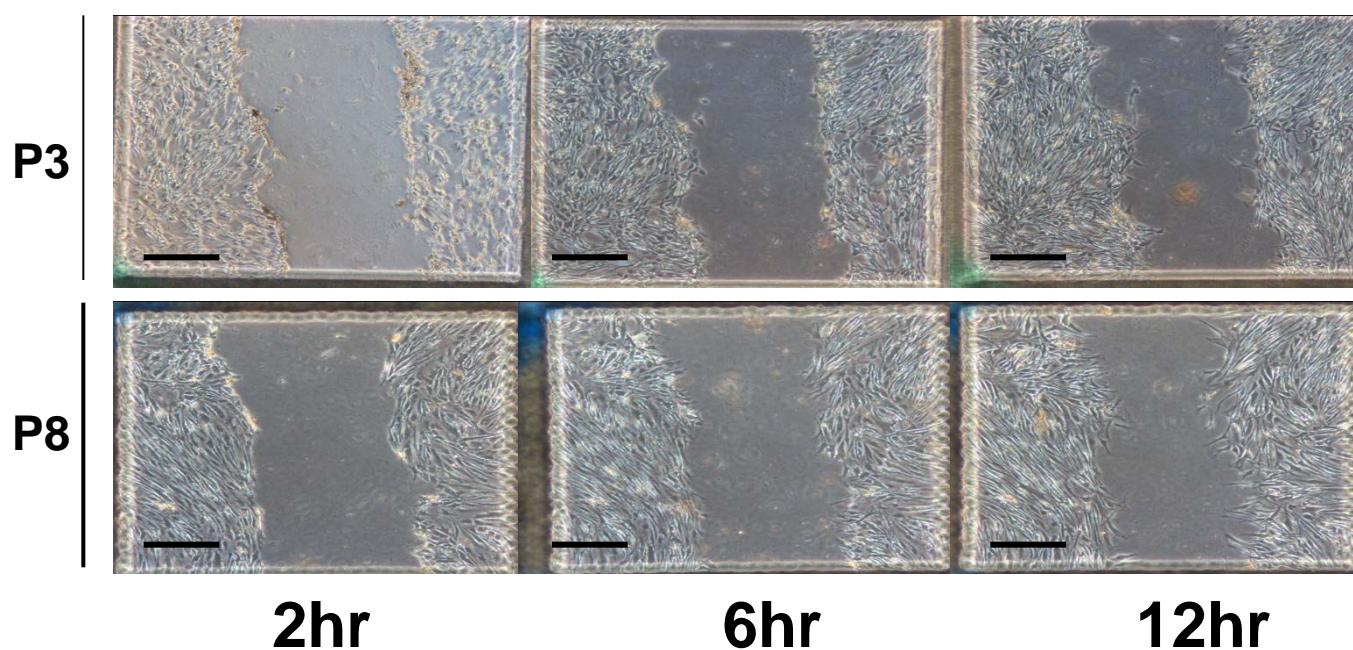
**図8 ヒト耳介軟骨細胞における細胞接着分子の発現変化**  
軟骨細胞に発現する代表的な細胞接着分子をP3およびP8を用いて比較を行った。P8における細胞接着分子の発現はP3に比べて、増強していた(\*:  $P < 0.0001$ , vs P8, \*\*:  $P < 0.01$ , vs P8)。



### 図9 培養環境による接着状態の変化

接着後6時間における細胞接着状態を比較した。上段は顕微鏡所見であり、下段は1視野辺りの接着細胞数を数値化したグラフである。両者共に差は認めなかった。スケールバーは200  $\mu$ mである。

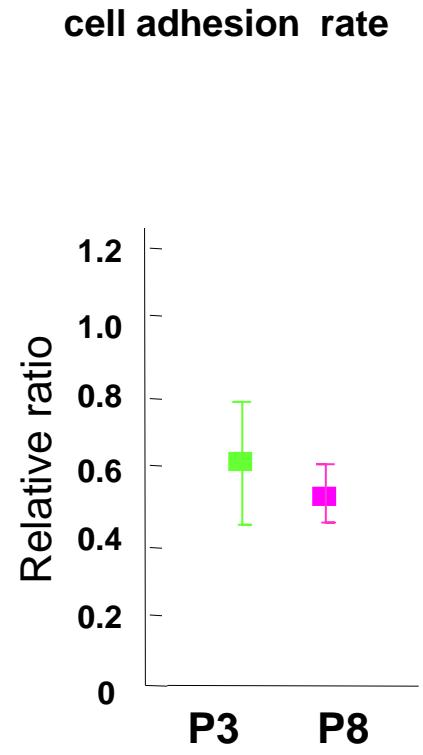
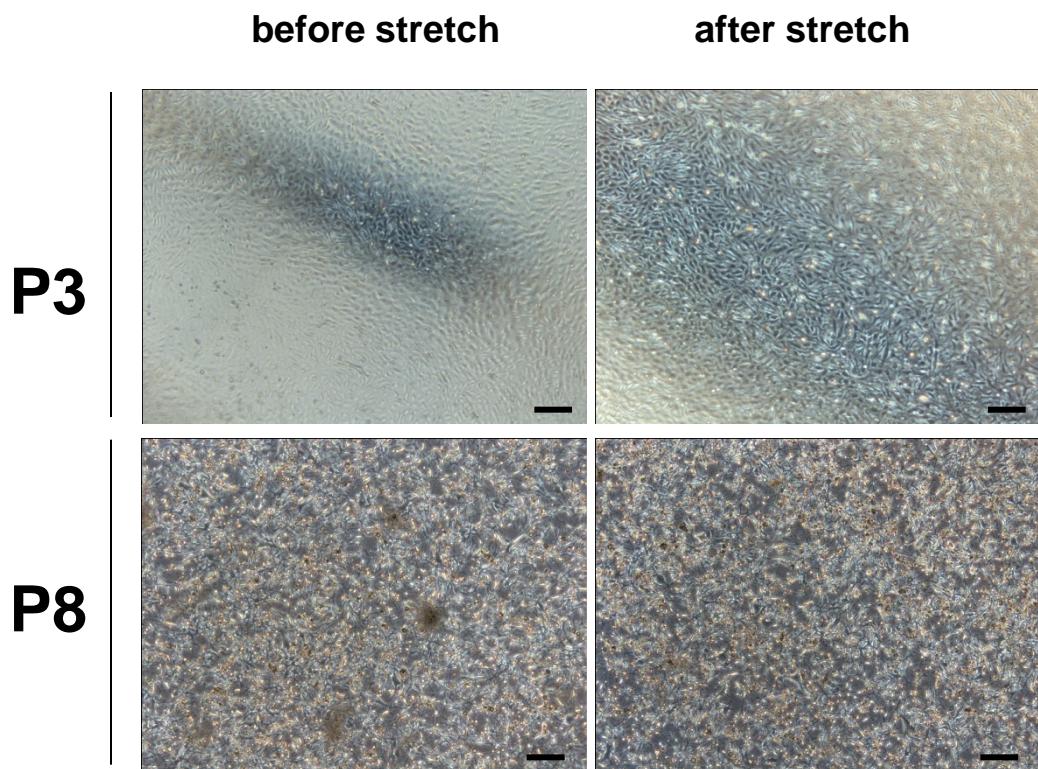
## Cell migration assay



### 図10 ヒト耳介軟骨細胞における細胞遊走の経時的変化

細胞剥離後2, 6, 12時間における遊走能の経時的変化を評価した。剥離直後の空間面積を100としたときの面積減少率を示した所見である。上段は剥離後の経時的な変化を示した顕微鏡所見であり、下段は空間面積の減少率を定量化したグラフである。スケールバーは400  $\mu\text{m}$ である。

# Human stretch assay



# Mouse stretch assay

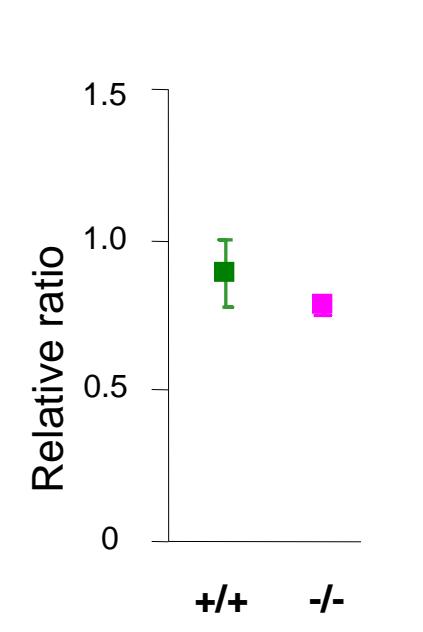
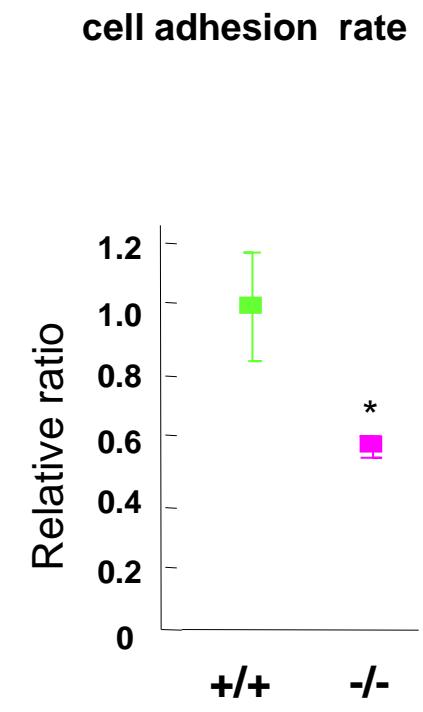
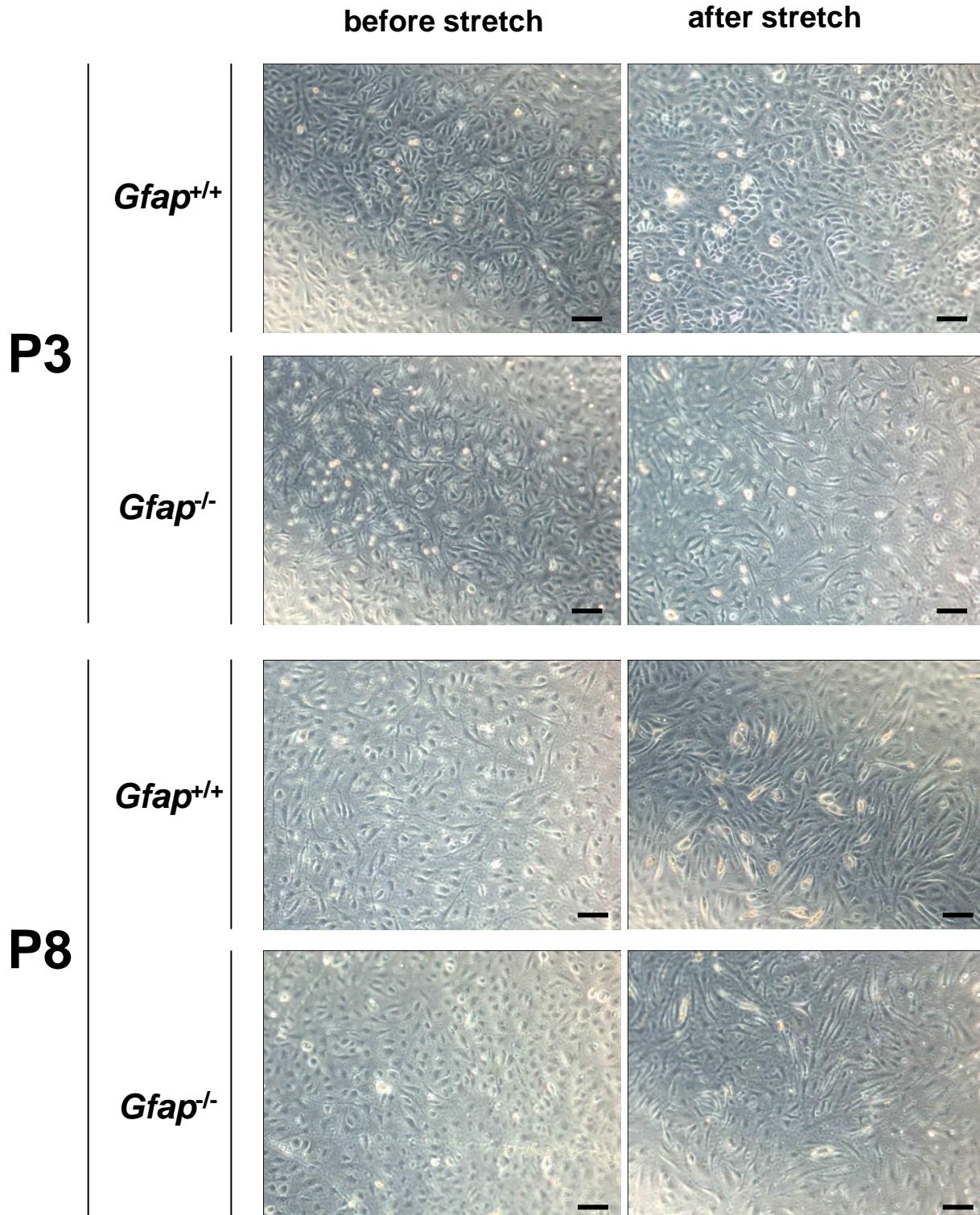
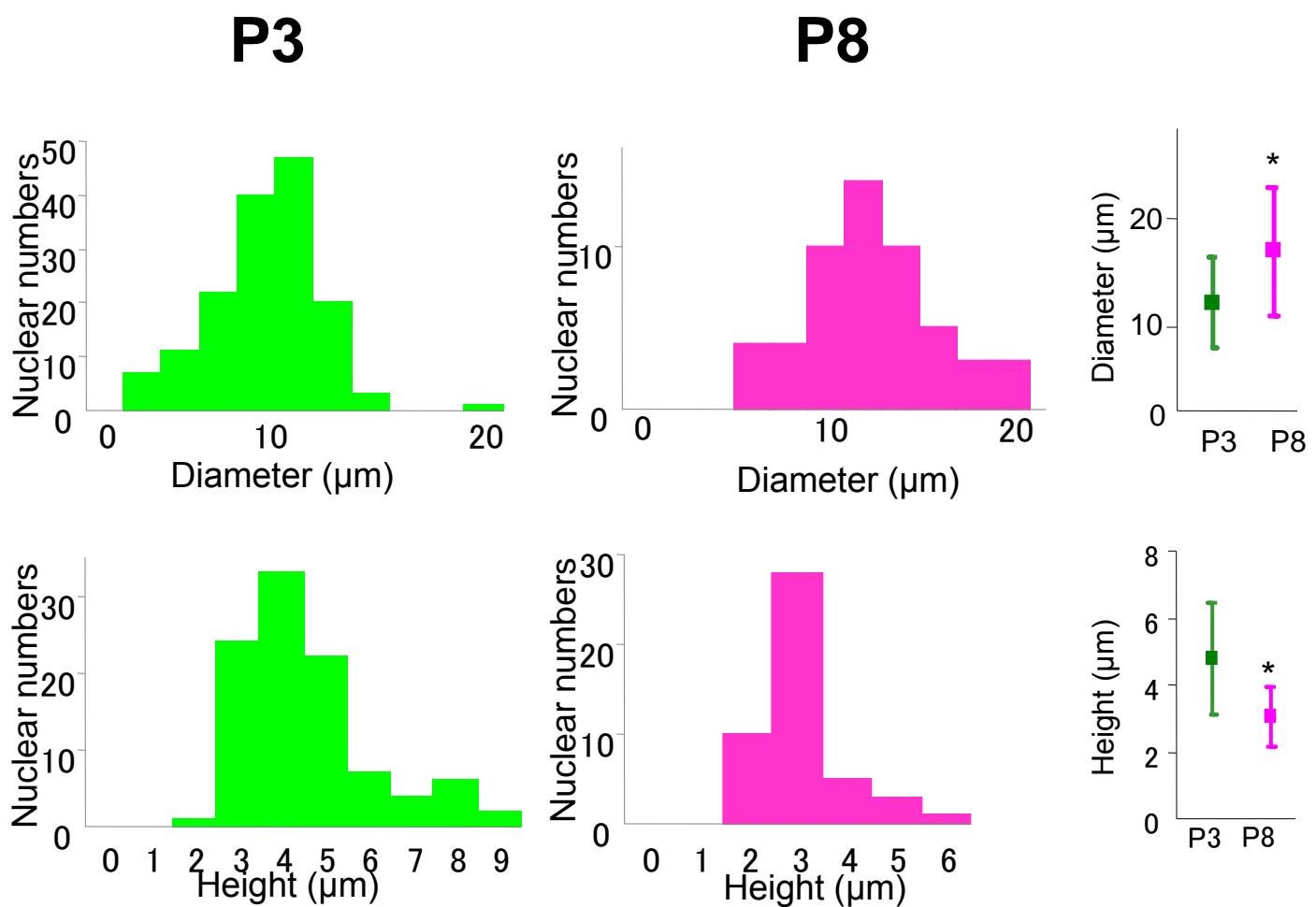
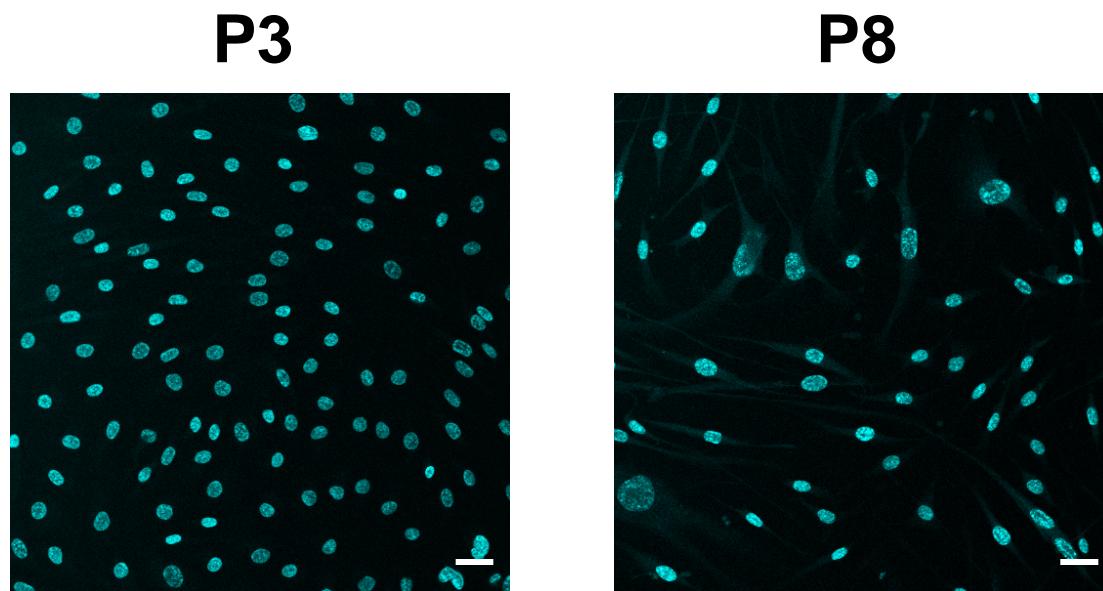


図11 伸展刺激後の細胞接着能の変化

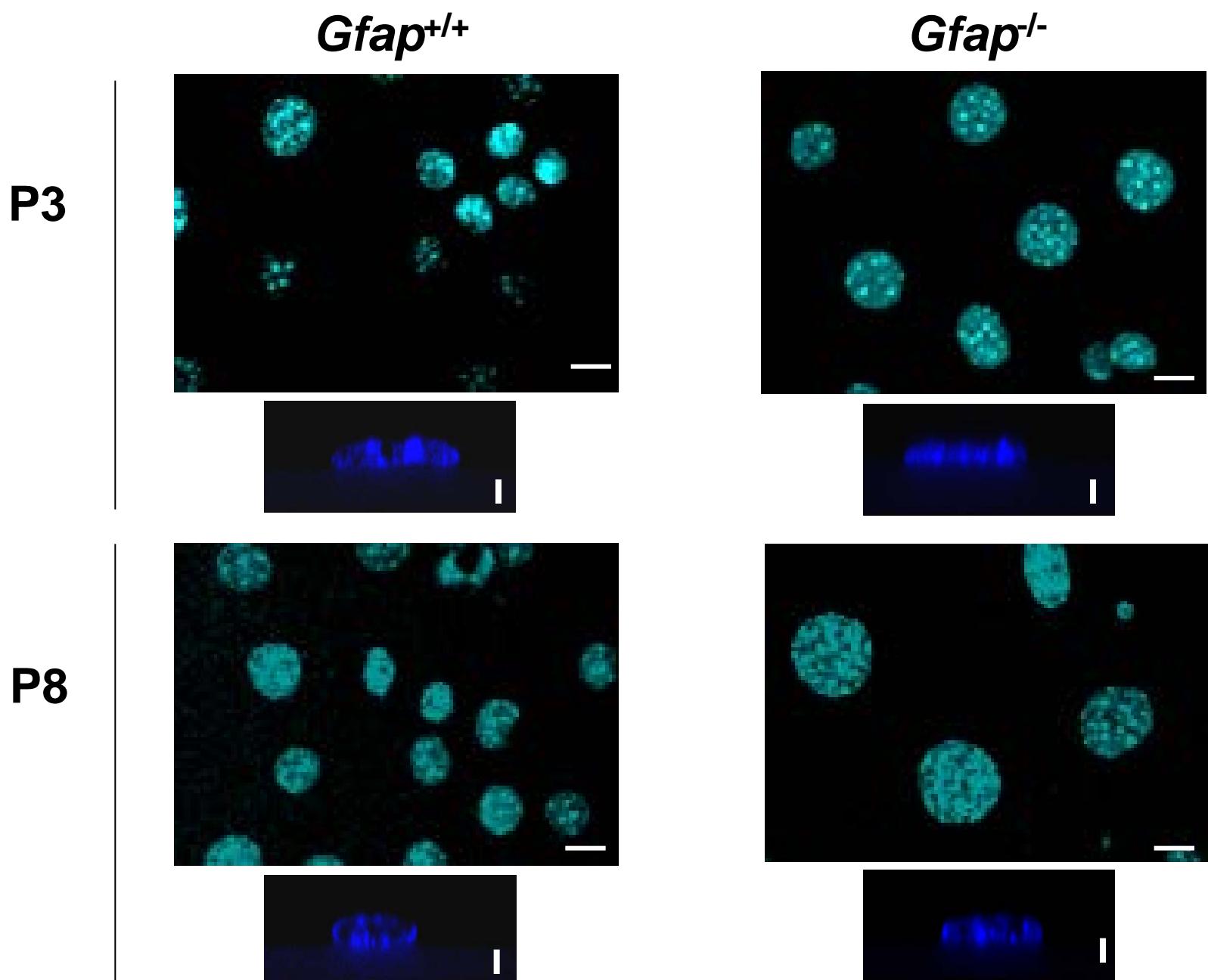
## 図11 伸展刺激後の細胞接着能の変化

30%伸展刺激後の細胞接着状態および接着細胞数を評価した。上段はヒト細胞P3、P8を用いた結果を顕微鏡(左)およびグラフ(右)で示した。P8は接着能の減少傾向がみられたが有意差は認めなかった。また、下段はマウスのGFAP遺伝子欠損型細胞P3、P8を用いて同様に評価した。P3における接着細胞数は明らかに減少していた(\*:  $p < 0.05$ , vs  $Gfap^{+/+}$ )が、P8では有意差は認めなかった。スケールバーは100  $\mu$ mである。



## 図12 ヒト培養耳介軟骨細胞における核形態の変化

上段はP3およびP8の細胞核を示した顕微鏡所見であり、中段は、P3およびP8の核の直径を、下段は核の高さを評価したグラフを示す。核の直径はP8で明らかな増大を認めたと(\*:  $p < 0.005$ , vs P3)。また、核の高さはP8で明らかな減少を認めたと(\*:  $p < 0.005$ , vs P3)。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ である。

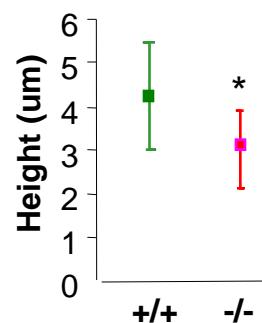
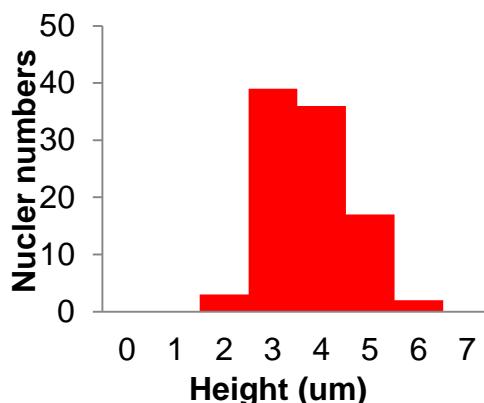
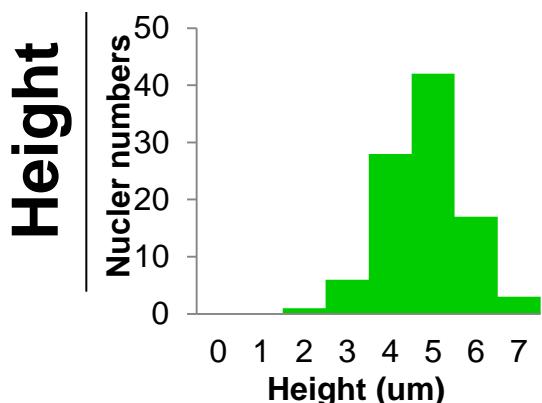
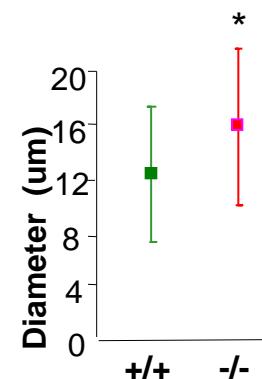
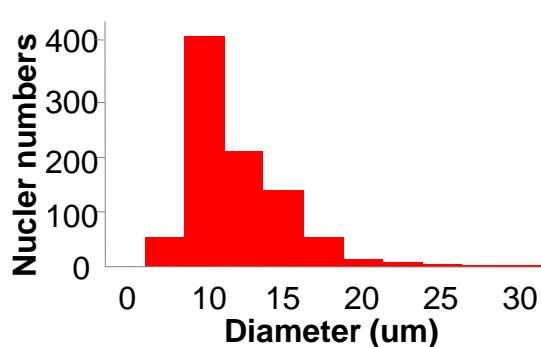
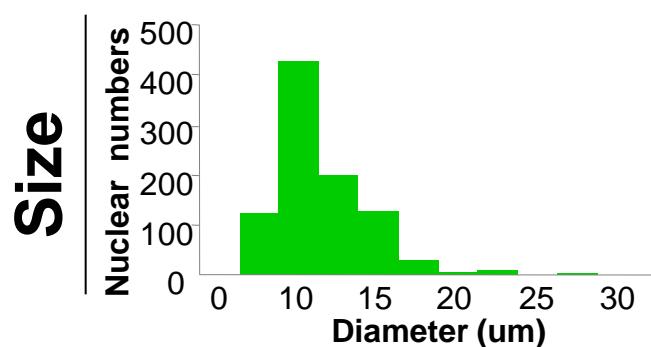


**図13 GFAP遺伝子欠損型細胞における核形態の変化1**  
 顕微鏡所見上段大枠はP3、P8野生型およびGFAP遺伝子欠損型細胞の細胞核を示した所見であり、その下の小枠の顕微鏡所見は核の3次元形態を示した所見である。

## P3における核形態の変化

*Gfap*<sup>+/+</sup>

*Gfap*<sup>-/-</sup>



## P8における核形態の変化

*Gfap*<sup>+/+</sup>

*Gfap*<sup>-/-</sup>

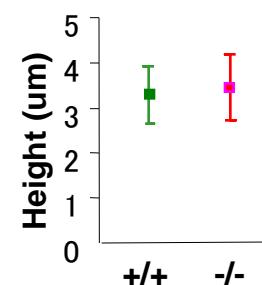
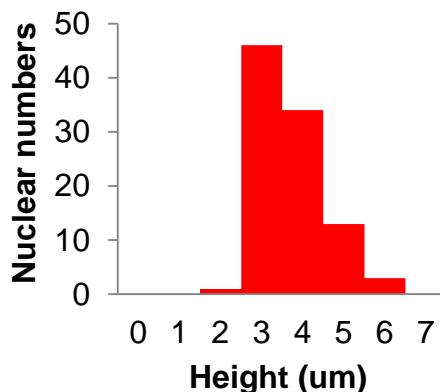
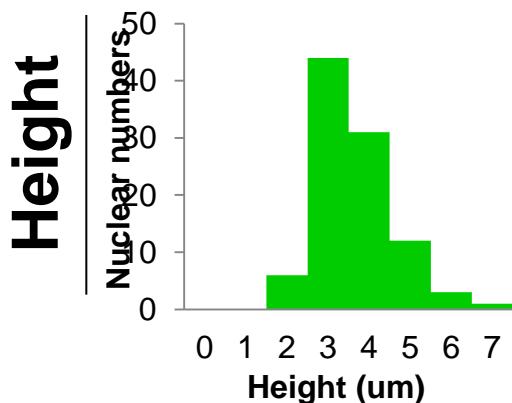
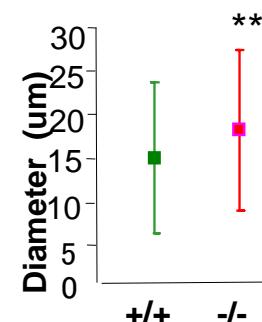
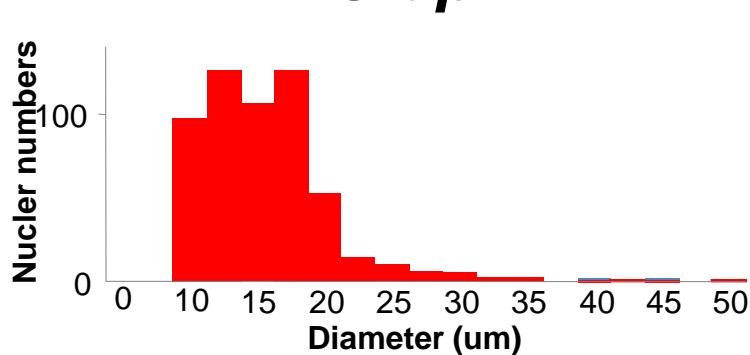
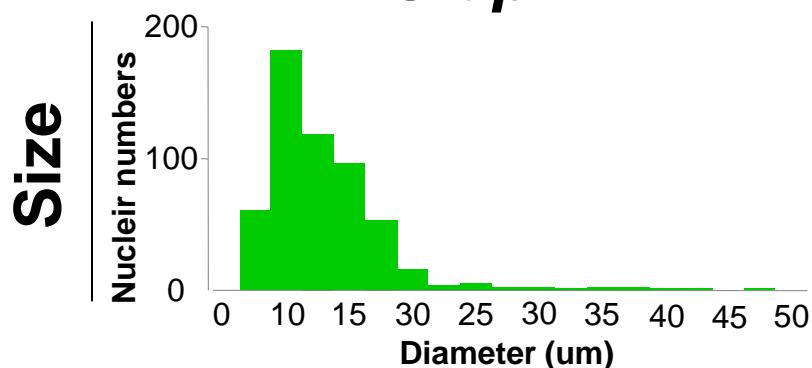


図14 GFAP遺伝子欠損型細胞における核形態の変化2

## 図14 GFAP遺伝子欠損型細胞における核形態の変化2

グラフはP3、P8野生型およびGFAP遺伝子欠損型細胞の細胞核の径および高さの分布を示し、平均化したものである。P3において、GFAP遺伝子欠損型細胞の核径は明らかな増大を示し(\*:  $p < 0.0001$ , vs  $Gfap^{+/+}$ )、P8においても増大していた(\*\*:  $p < 0.01$ , vs  $Gfap^{+/+}$ )が差は縮小していた。さらにP3における核の高さは有意に減少した(\*:  $p < 0.0001$ , vs  $Gfap^{+/+}$ )が、P8では有意差は認めなかった。スケールバーは横 $10 \mu\text{m}$ および縦 $3 \mu\text{m}$ である。

P8 *Gfap*<sup>+/+</sup>

P8 *Gfap*<sup>-/-</sup>

P8 *Gfap*<sup>-/-tg</sup>

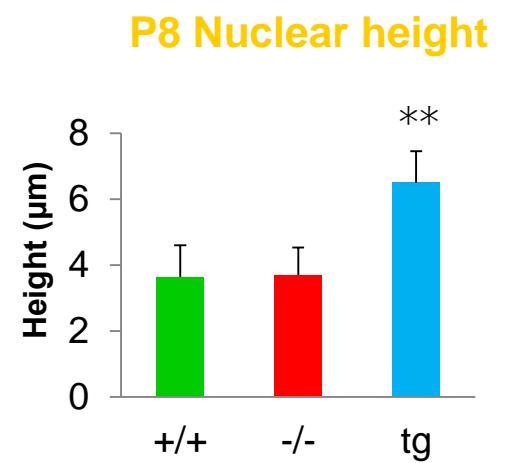
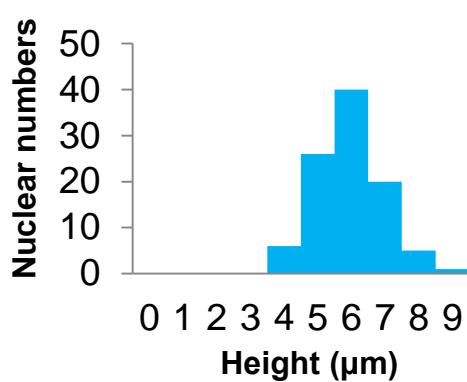
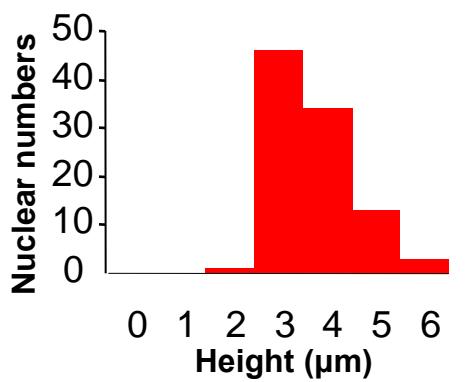
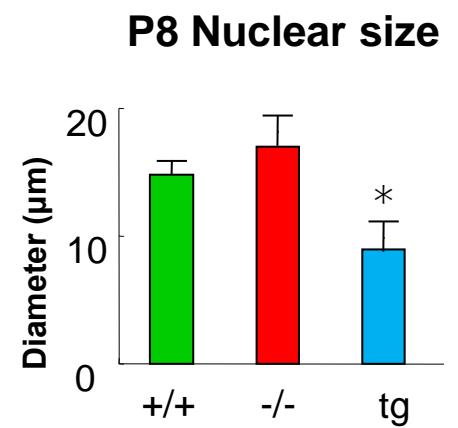
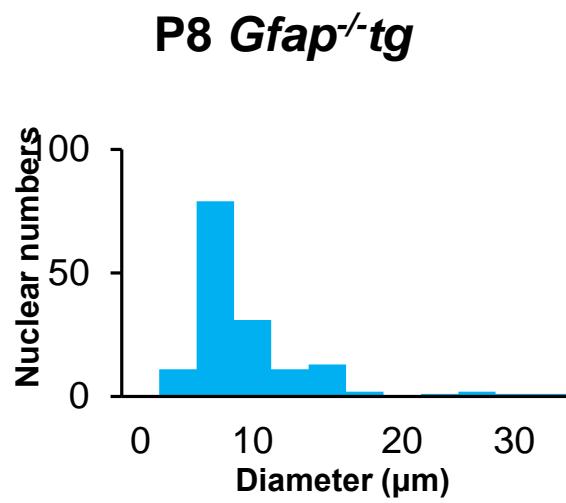
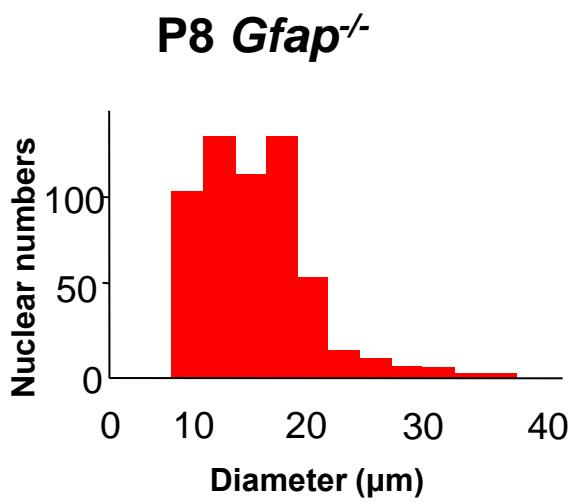
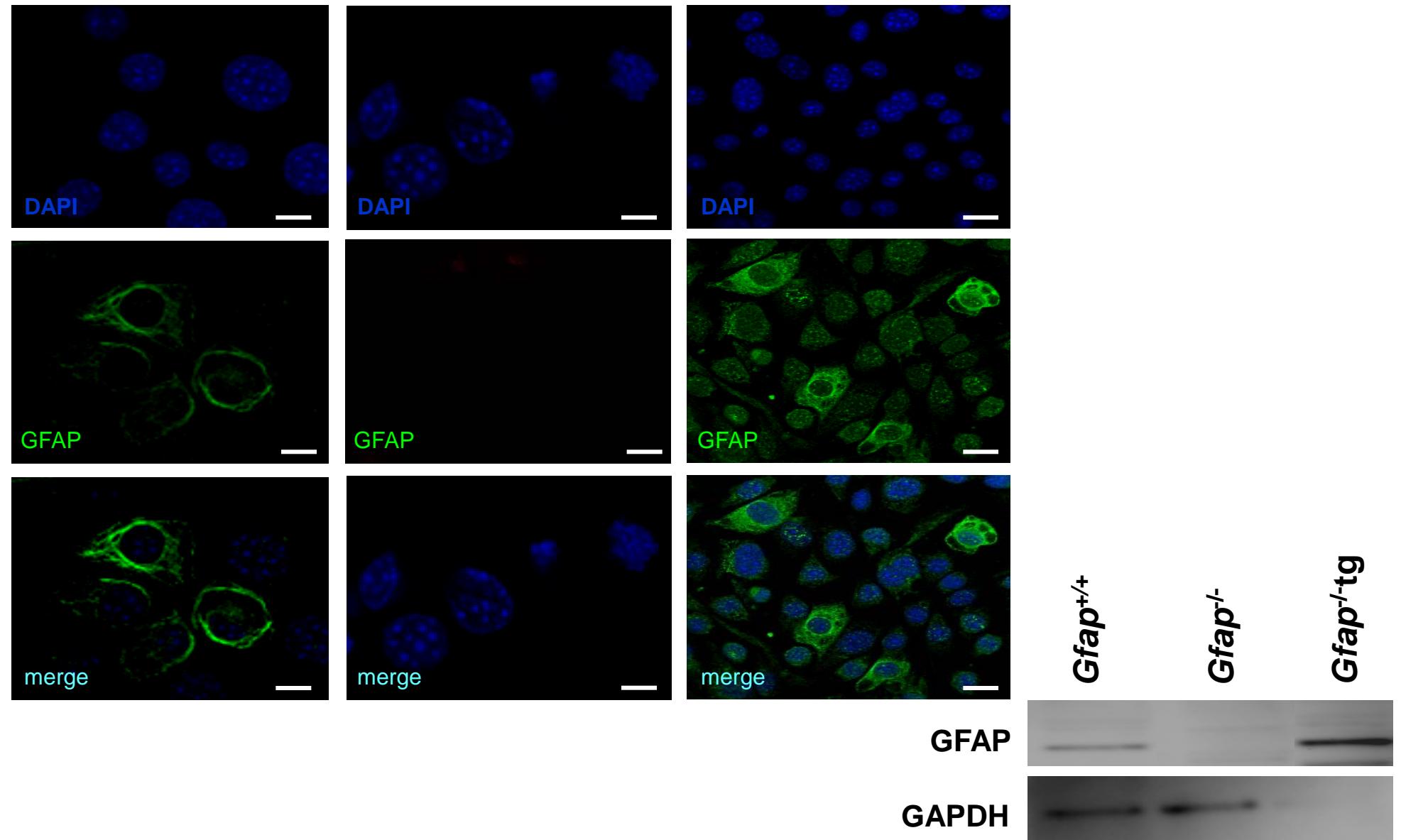
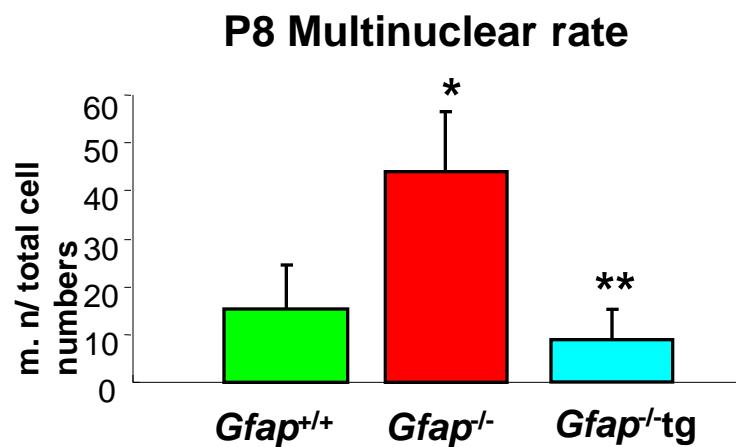
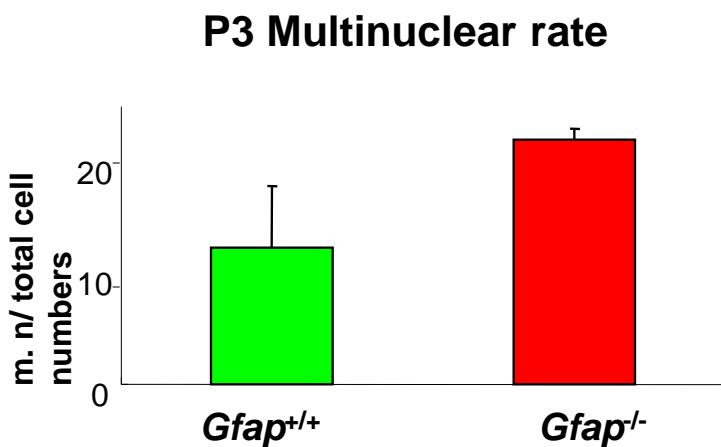
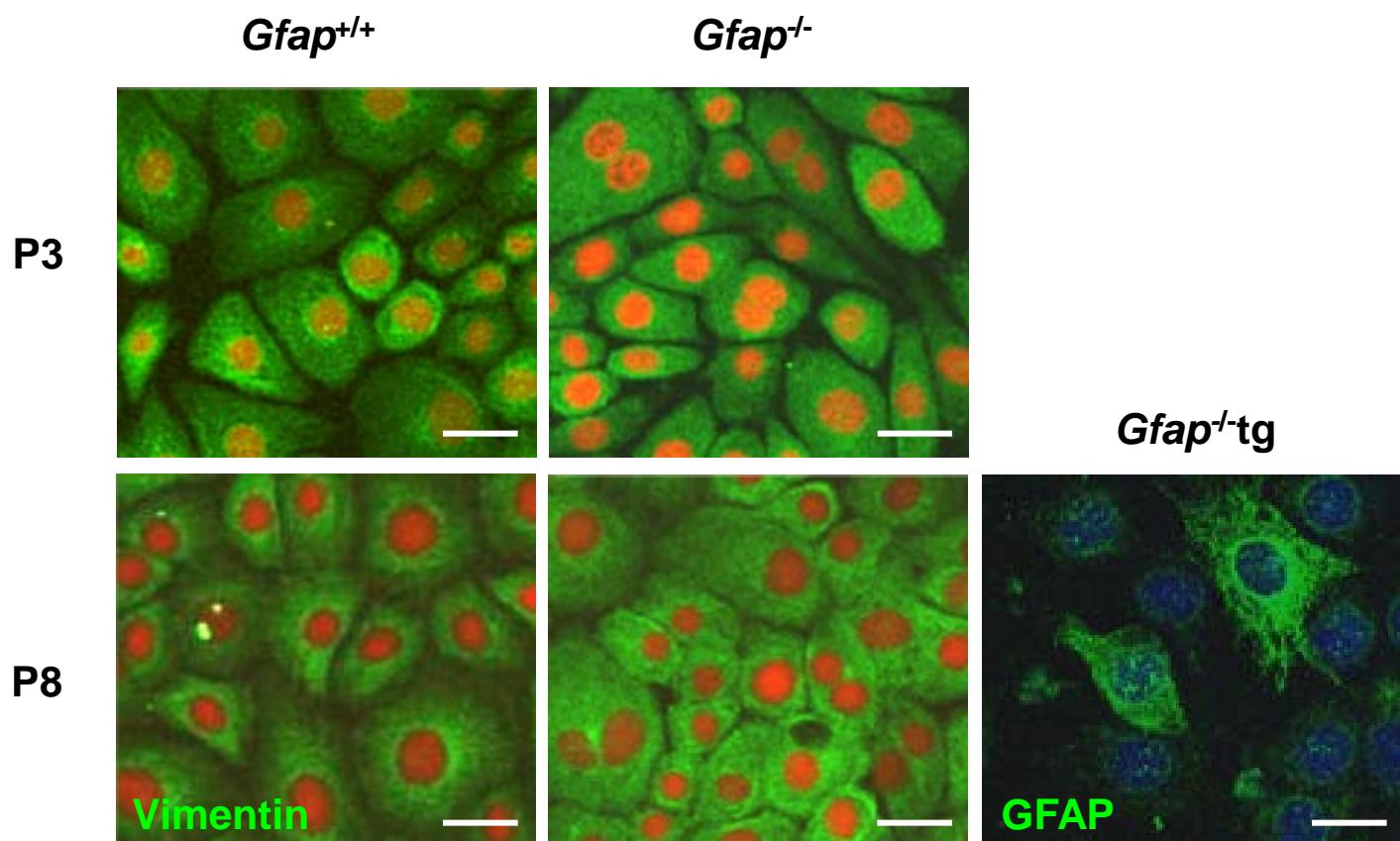


図15 GFAP遺伝子導入に伴う核形態の変化

## 図15 GFAP遺伝子導入に伴う核形態の変化

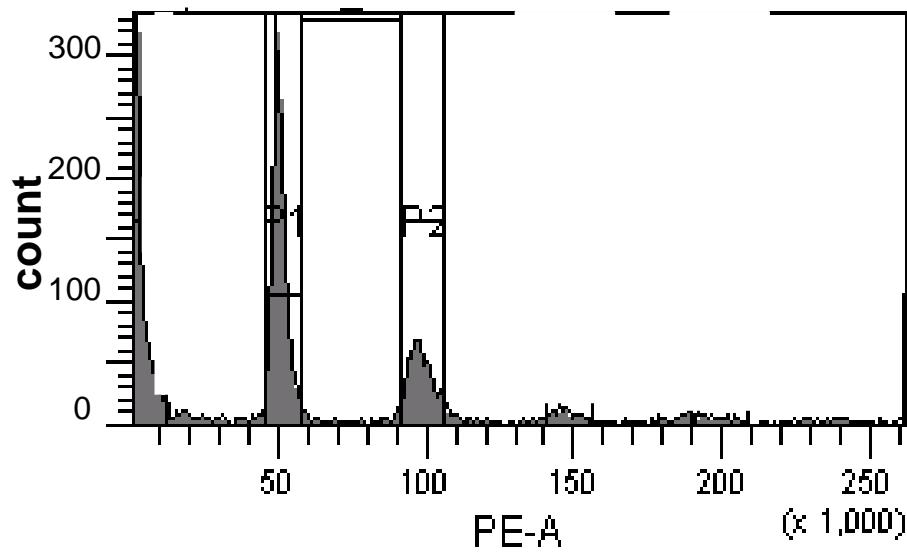
P8のGFAP遺伝子欠損型細胞にGFAP遺伝子発現アデノウイルスベクターの導入を行った。上段は免疫蛍光染色による導入GFAPの局在を示した所見であり、上段左はウェスタンブロットによるGFAP蛋白質発現量を示した所見である。下段グラフは遺伝子導入後の核径および高さの変化を示した。核径は有意に減少(\*:  $p < 1 \times 10^{-12}$ , vs  $Gfap^{-/-}$ )し高さも有意に増加した(\*\*:  $p < 1 \times 10^{-12}$ , vs  $Gfap^{-/-}$ )。スケールバーは10 $\mu$ mである。



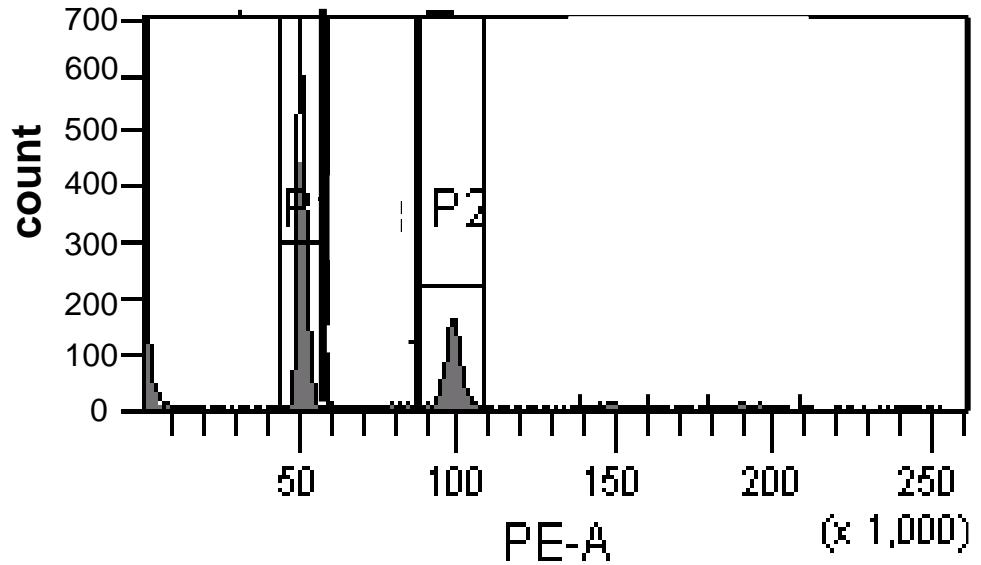
## 図16 継代培養に伴う多核細胞数の変化

GFAP遺伝子欠損型細胞での比較のため、細胞質の指標としてvimentin抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。P3における多核細胞数に有意差は認めなかったが、P8において有意に増加を認めた(\*:  $p < 0.01$ , vs *Gfap*<sup>+/+</sup>)。また、P8のGFAP遺伝子欠損型細胞にGFAP遺伝子を導入した時の多核細胞数は有意に減少した(\*\*:  $p < 0.001$ , vs *Gfap*<sup>-/-</sup>)。スケールバーは20  $\mu$ mである。

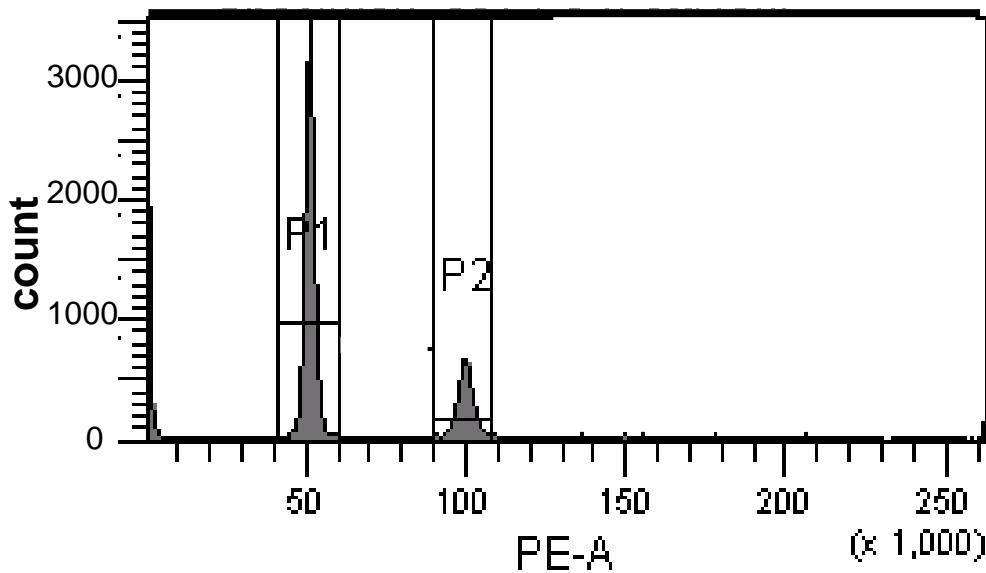
# FCM (multi nuclear)



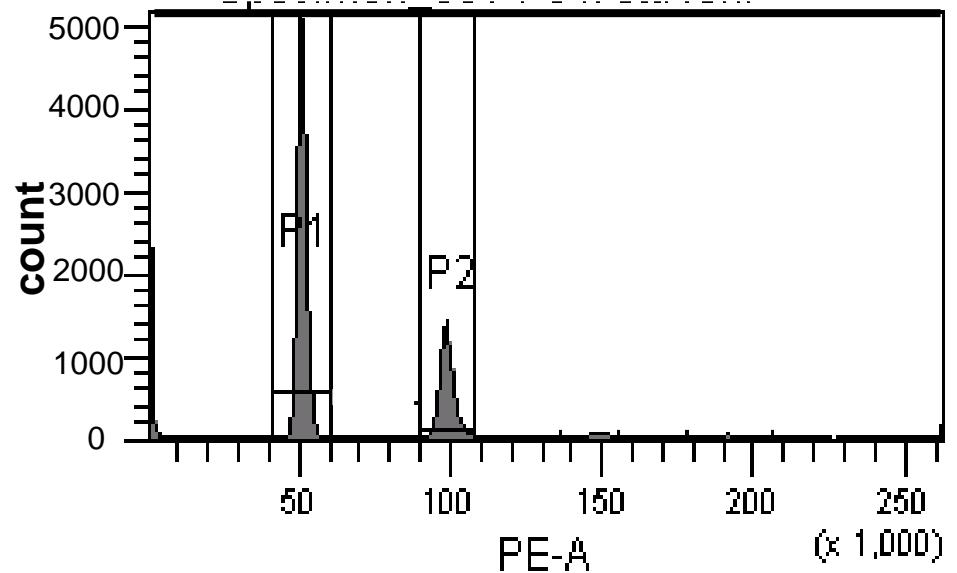
| P3 <i>Gfap</i> <sup>+/+</sup> |        |          |
|-------------------------------|--------|----------|
| Population                    | Events | %Percent |
| all events                    | 10,000 | ####     |
| P1                            | 1,700  | 17.0     |
| P2                            | 600    | 6.0      |



| P3 <i>Gfap</i> <sup>-/-</sup> |        |          |
|-------------------------------|--------|----------|
| Population                    | Events | %Percent |
| all events                    | 10,000 | ####     |
| P1                            | 2,000  | 20.0     |
| P2                            | 900    | 9.0      |



| P8 <i>Gfap</i> <sup>+/+</sup> |        |          |
|-------------------------------|--------|----------|
| Population                    | Events | %Percent |
| all events                    | 10,000 | ####     |
| P1                            | 5,900  | 59.0     |
| P2                            | 1,800  | 18.0     |

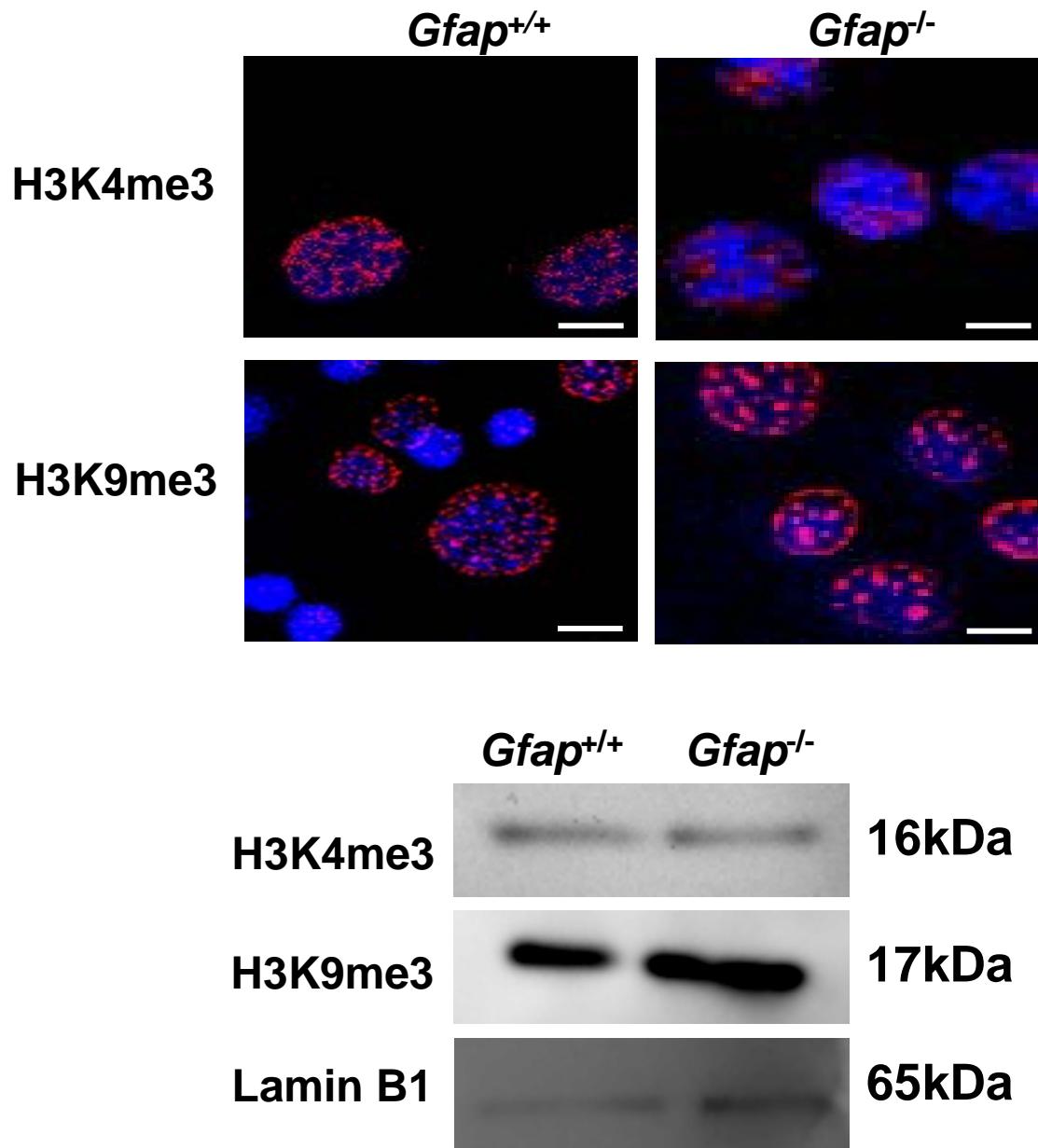


| P8 <i>Gfap</i> <sup>-/-</sup> |        |          |
|-------------------------------|--------|----------|
| Population                    | Events | %Percent |
| all events                    | 10,000 | ####     |
| P1                            | 5,500  | 55.0     |
| P2                            | 2,900  | 29.0     |

## 図17 フローサイトメーターによる多核細胞の評価

PI染色法を用いて細胞周期から多核の割合を評価した。P2分画で示される2倍体の割合が増加を認めた。

## Histone methylation protein



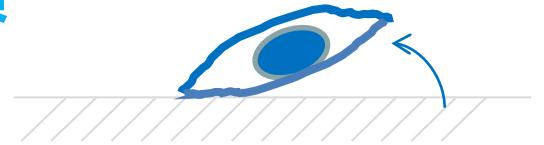
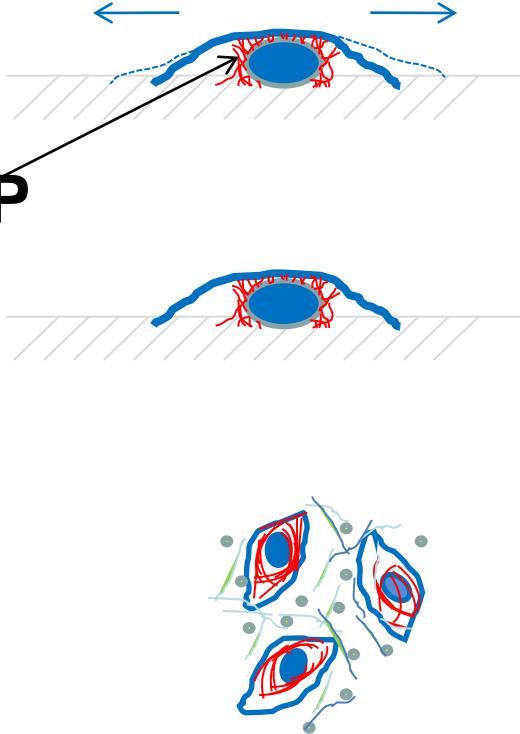
### 図18 GFAPのヒストンへのエピジェネティック制御

P3の野生型細胞とGFAP遺伝子欠損型細胞におけるヒストンの転写活性の変化を示した所見である。上図は免疫蛍光染色によりヒストン特異的蛋白質であるH3K4me3およびH3K9me3の局在を示した所見であり、下図はウェスタンブロットによる蛋白質発現量を示した所見である。スケールバーは5  $\mu$ mである。

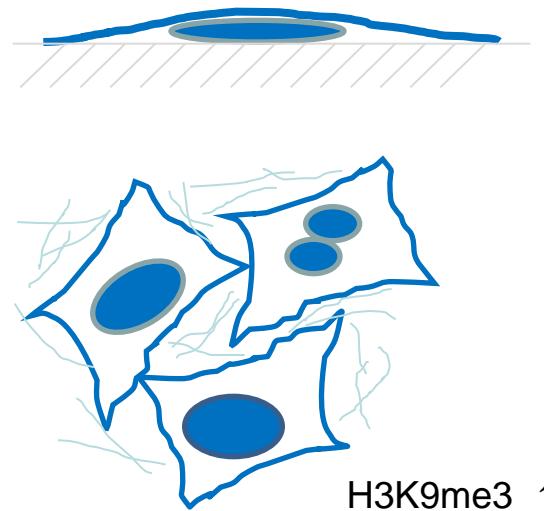
適正な培養耳介軟骨細胞

過増殖、遺伝子欠損

GFAP



GFAP減少・欠損



GFAPの欠損・減少は、伸展刺激に対する抵抗性の減少、核の扁平化・多核化、をもたらす。

図19 耳介軟骨細胞におけるGFAPの機能

| Gene                | forward 5'-                | reverse 5'-               |
|---------------------|----------------------------|---------------------------|
| GFAP                | caccatggagaggagacgca       | catctccacggtcttcaccac     |
| GAPDH               | gaaggtgaaggtcggagtca       | gaagatggtgatgggatttc      |
| vimentin            | gagaactttgccgttgaage       | ttcagcagcttctctgtaggt     |
| $\alpha$ 1-integrin | gcttattggttcgttagttggc     | aggttgaactcatgggtcacgtttt |
| $\alpha$ 3-integrin | tacgtgcgaggcaatgaccta      | tttgggggtgcaggatgaagct    |
| $\alpha$ 4-integrin | tggcgtggtacaacttgactg      | catgcgcaacattctcatcct     |
| $\alpha$ 6-integrin | ggagccccacagtattttga       | ttccatttgcagatccatga      |
| $\alpha$ v-integrin | ttggagcatctgtgaggtcgaaac   | accattgaaatctccgacagccac  |
| $\beta$ 1-integrin  | aaagtgaaacccggcatctg       | agttgcagtttgtggatcactgat  |
| $\beta$ 3-integrin  | gttcccagtgagtgaggccccgagta | aagcgggtcacctggtcagttagcg |
| $\beta$ 5-integrin  | accatcgtgaaagatgacca       | tgttgaaggtgaagtccaca      |
| N-cadherin          | gtgccattagccaaggggaattcagc | gcgttcctgttccactcataggagg |

表1 Real time PT-PCRで使用したプライマー配列

|              | ヒト           | マウス                    |                        |
|--------------|--------------|------------------------|------------------------|
| GFAP発現       | P3 > P8      | P3 > P8                |                        |
| 細胞増殖         | P3 = P8      | P3<br>wild = homo      | P8<br>wild = homo      |
| 細胞接着         | P3 > P8      | P3<br>wild = homo      | P8<br>wild = homo      |
| 細胞遊走         | P3 = P8      | P3                     | P8<br>—                |
| 外力に対する<br>反応 | P3 $\geq$ P8 | P3<br>wild > homo      | P8<br>wild = homo      |
| 核径           | P3 < P8      | P3<br>wild < homo      | P8<br>wild < homo      |
| 核高           | P3 > P8      | P3<br>wild > homo      | P8<br>wild = homo      |
| 多核化          | —            | P3<br>wild $\leq$ homo | P8<br>wild < homo      |
| ヒストン<br>メチル化 | —            | H3K4me3<br>wild = homo | H3K9me3<br>wild < homo |

表2 耳介軟骨細胞におけるGFAPの機能