

軟骨再生医療の細胞源となる弾性（耳介）軟骨細胞に
おける GFAP の発現と生物学的機能に関する研究

東京大学大学院医学系研究科 平成 19 年入学

医学博士課程 外科学専攻

金澤 三四朗

目次

1. 要旨	4
2. 序論	5
3. 方法	
ヒト軟骨細胞の単離	9
マウス軟骨細胞の単離	9
軟骨細胞培養	10
Cell adhesion assay	10
Wound-healing assay	10
Total RNA 抽出および real time PC	11
細胞伸展法	11
遺伝子導入による GFAP 強制発現	11
免疫蛍光染色法	12
GFAP ELISA	12
Western-blotting	13
Flow cytometry analysis	13
核形態計測	14
4. 結果	
ヒトおよびマウス由来の培養耳介軟骨細胞におけるGFAPの 発現変化	15
GFAP発現変化に伴う細胞増殖・接着・遊走の変化	16
GFAP発現と伸展刺激に対する反応との関連性について	17
耳介軟骨細胞の継代培養に伴う核形態変化	17
GFAP遺伝子欠損マウスの耳介軟骨細胞における多核細胞数の変化	18

GFAP発現変化に伴うエピジェネティック制御の変化	19
5. 考察と結論	20
6. 謝辞	25
7. 参考文献	26
図説	33

要旨

グリア細胞の細胞骨格であるグリア線維性酸性タンパク (GFAP) は、耳介軟骨由来の軟骨細胞にも発現している。われわれは再生軟骨の製造において GFAP を耳介軟骨細胞の基質産生指標として使用している。本研究では、経験的に評価指標として使用されている GFAP の、軟骨細胞での意義と役割を明らかにし、軟骨再生医療の品質管理に有用な情報を提供することを目的として、ヒトやマウス由来の培養軟骨細胞における GFAP の機能を評価した。その結果、GFAP は細胞の生存や機能発現に必須な核の形態や機能の保持に重要な役割を担っていた。したがって、GFAP が基質産生の指標として使用されることは合理的なことであると考えられた。

序論

顎顔面における先天性形態形成異常や悪性腫瘍切除後の顎顔面欠損に対しては、これまで、自家組織移植による組織修復・再建が行われてきた。しかし、自家組織移植には、採取できる組織の大きさの限界あるいは採植する部位への侵襲などといった課題が残されている。それに対し、近年、自家組織移植の代替として、自家細胞を用いた再生組織移植が脚光を浴び、臨床への導入とその早期普及が期待されている。その中でも軟骨再生医療は比較的臨床応用が進んでおり、現在、自家軟骨細胞を用いた移植法（ACI）が世界的に普及している。ACI 原法は 1995 年にスウェーデンの研究グループによって報告されたのが始まりであり、スポーツ外傷などによる関節軟骨の局所欠損に対し、自家培養軟骨細胞を細胞懸濁液として欠損部に投与し、さらに漏出を防ぐため骨膜パッチで被覆する方法である(1)。顎顔面領域では、シリコンインプラントによる隆鼻術再手術例や鞍鼻などに対して、自家軟骨細胞の懸濁液を注入した応用例も報告されている(2)。

自家軟骨細胞を用いた軟骨再生医療はおもに、①患者からの軟骨採取、②軟骨細胞の単離と培養、③培養軟骨細胞の回収あるいは再生軟骨の作製、④患者への移植、の 4 つのプロセスからなる。特に 2 番目の軟骨細胞の単離と培養は、細胞プロセッシングセンターという特殊な施設で行う再生医療に特徴的な作業であり、再生医療製品の製造の本質的な部分である。しかし、それと同時に、最も厳密な品質管理を求められる工程でもある。すなわち、軟骨細胞の単離と培養に不調を来すと、作製された再生軟骨の性能が悪化し、患者に予定通りに医療が提供できないことはもとより、患者の健康被害の原因に直接つながることになりかねない。

軟骨細胞の単離と培養の不調には、いくつかの原因が考えられる。細菌やウイルスなどによる微生物汚染、他の患者由来細胞との取り違え、軟骨細胞以外の混入、少量の軟骨細胞による過増殖、などが挙げられる。前 2 者は、頻回の微生物検査やトレーサビリティシステムの導入によりある程度回避できる。しかし、軟骨細胞以外の混入は軟骨細胞の純度を示す指標が未確立であるために生じる問題であり、また、少量の軟骨細胞による過増殖は、酵素処理による夾雑物のため単離時の軟骨細胞数の正確

な計測が困難であるために生じるものである。そのため、単離時の軟骨細胞数を過剰に評価した場合、培養継代を行い規定どおりの細胞数を入手すると、培養後に得られた細胞集団は、少量の軟骨細胞が過増殖したものとなり、培養による脱分化が著しく進行し、軟骨細胞としての特性が著しく減弱する可能性がある。このような場合、移植後の最終的な再生軟骨組織において基質蓄積や力学強度が低下する危険性がある。しかし、培養後の細胞が十分な基質産生能を有する細胞集団か否かを評価するための方法は適切なものが未確立である。

そのため、さまざまな研究グループで、培養後の軟骨細胞の品質管理についての研究開発が盛んに行われている (3)。継代培養に伴う軟骨細胞の表面マーカーの変化に関しては Diaz-Romero らの報告に詳しく、継代数の増加に伴いヒト関節軟骨細胞における発現が増強するマーカーは CD10、CD26、CD44、CD49c、CD81、CD166 などが挙げられ、それに対し減少するものは CD49a、CD106 などであった。しかし、細胞表面マーカーはフローサイトメーターにより解析されるものであるため、異なる実験同士を定量的に解析することは困難であるうえに、細胞接着状態などの培養環境によって変動していく可能性もあり、一定の基準を設けるのは困難である。

指標の候補となっている細胞接着分子の他に、セリンプロテアーゼインヒビター (Serpin) A1 および A3、線維芽細胞成長因子-18 (FGF-18) やメラノーマ抑制活性因子 (MIA) 等が確認されている (4)、(5)、(6)。特に、FGF-18 は平面培養を重ねていくことにより、遺伝子発現量が増加して行く因子であるため、軟骨細胞の基質産生能を示す指標として有用である可能性がある。しかしながら、これらの因子を指標として用いる場合、遺伝子レベルでの評価となるため、定量性に課題が残る。また、いずれも分泌タンパクであるため、細胞培養上清中のタンパクを測定できる可能性があるが、増殖中の培養軟骨細胞から分泌される生理活性物質はきわめて少量であると予想されるため、検出するのは困難であると思われる。

一方、著者らは、グリア線維性酸性タンパク Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) が 耳介軟骨細胞を用いる軟骨再生医療製品の品質管理に有用であることを明らかにした。GFAP は、アストロサイトやシュワン細胞に特異的に局在することが知られているが、神経系以外にも局在することが報告されている (7)。特に軟骨組織においては

喉頭蓋軟骨や耳介軟骨の弾性軟骨に局在することがわかっている (8) (9)。著者らはこのような GFAP が、軟骨再生医療の有用な細胞源となる耳介軟骨由来の培養軟骨細胞にも特異的に発現することを示し、さらに、継代培養に伴い徐々に遺伝子発現量、タンパク含有量が減少してゆくことを明らかにした。また、タンパク量の測定方法に関しては、培養上清においても GFAP タンパクの検出が可能で、耳介軟骨細胞の培養上清における GFAP 含有量を計測することにより、移植後における耳介軟骨細胞の基質産生能を、移植前に定量的に推定することができる手法を確立した (10)。実際に、培養軟骨細胞の最終培養液に含まれる GFAP 量として、0.05 ng/mL 以上の検出が認められれば軟骨再生に適した細胞であると考えられる。この評価に関しては、現在実施しようとしている臨床研究のプロトコールに組み込まれており、実際に臨床に用いることが可能であると考えている。この方法は貴重な培養細胞を 1 細胞も喪失することなく、かつ、ELISA という簡便な測定方法で測定できることから、培養軟骨細胞の画期的な品質管理法となっている。著者らの所属する研究室では GFAP 測定を含む品質管理体制を確立して、現在自己耳介軟骨細胞をもちいた軟骨再生医療の、口唇口蓋裂の鼻変形に対する臨床導入を準備している。

GFAP の細胞内機能としては、グリア細胞の主要な細胞骨格としての解析が進んでいる (11)。脳や神経の損傷において GFAP の発現が増加することが知られており (12)、GFAP は神経修復においても何らかの役割を果たしていると考えられている (13), (14), (15)。遺伝子欠損マウスを用いた解析では、神経系の発達、成長に対する影響は認められないが、野生型マウスと GFAP 遺伝子欠損型マウスを用いて、坐骨神経損傷モデルの作製を行い、損傷後の神経修復過程を経時的に評価したところ、切断面から形成される軸索線維の数と線維の太さに有意な差が生じた。これらの知見から、GFAP は神経修復の促進に役割を担うことが明らかとなった (16), (17)。しかし、神経系を中心に特異的に発現する細胞骨格である GFAP が耳介軟骨細胞においても発現している生物学的意義は全く検討されていない。また、培養耳介軟骨細胞における GFAP が培養時における細胞の基質産生を示す指標として使用できることの合理性も明らかにされていない。本研究の目的は、GFAP の耳介軟骨細胞における分子生物学的機能を明らかにし、GFAP が培養耳介軟骨細胞における基質産生の指標となることの合

理性を検証することにより、軟骨再生医療における再生軟骨の品質管理に有用な情報を提供することである。

軟骨細胞における GFAP の機能については、間葉系細胞の代表的な中間径線維である vimentin が参考になると思われる。vimentin 遺伝子欠損マウスの線維芽細胞、リンパ球や血管内皮細胞における知見から、vimentin の機能としては細胞の力学強度、安定性、遊走能などへの関与が示唆されている (18), (19), (20)。GFAP も同様な機能を有している可能性がある。また、耳介軟骨や喉頭蓋軟骨を含む弾性軟骨は、恒常的に機械的な応力が加わる部位に存在する。したがって耳介軟骨は、強力な応力に対する抵抗性や復元力・修復力を必要とする組織である。そのため、耳介軟骨細胞における GFAP 発現は、軟骨組織の復元力・修復力の起源となる細胞増殖、細胞接着、細胞遊走、あるいはメカニカルストレスに対する抵抗性、などに関与していると仮説した。そこで、本研究では、ヒト由来耳介軟骨細胞において、GFAP の発現が見られる第 3 継代 (P3) の細胞、および発現が著しく減少する第 8 継代 (P8) の細胞を用いて、あるいは、野生型マウスおよび GFAP 遺伝子欠損マウス由来の培養耳介軟骨を用いて、細胞形態や構造を比較するとともに、*in vitro* の実験系で細胞増殖、細胞接着、細胞遊走、あるいはメカニカルストレスに対する抵抗性、などを比較検討した。

方法

ヒト軟骨細胞の単離

当研究におけるすべての実験および操作は東京大学医学部附属病院の研究倫理委員会の承認（承認番号 622）を受けて行っている。小耳症患者から、インフォームドコンセントを取得のうえ、摘出された遺残耳介軟骨約 2-3g を尖刀および剪刀を用いて軟骨膜あるいは軟骨下骨を剥離し、 1mm^3 のサイズまで細切した。これを 0.15% コラゲナーゼ溶液中 (WAKO, Osaka, Japan) で 37°C 、4 時間、恒温槽で振とうさせながらインキュベートした。得られた溶解液を $100\ \mu\text{m}$ 孔径のセルストレイナー (BD Falcon, Bedford, MA) で濾過し、残渣を取り除いた後、遠心分離機にて 1500rpm、5 分間遠心し、ヒト耳介由来軟骨細胞を単離した。採取した細胞は、トリパンブルーにて染色し、カウントし生存率を確認した。

マウス軟骨細胞の単離

動物実験において東京大学大学院医学系研究科の動物実験委員会の承認（承認番号；医-P09-060）を受けている。また、国の「動物の保護及び管理に関する法律」等の法令に基づき、動物愛護の観点に十分配慮して行う。動物の虐待を防止し、動物を適正に扱い、専用の動物実験施設を用いて行った。

The Jackson Laboratoryにて交配された野生型汎用近交系マウス C57BL/6J および B6;129S-*Gfap*^{tm1Mes}/J (*Gfap*^{-/-}) を用いた。また、*Gfap*^{-/-} は、C57BL/6J とのバッククロスを 10 回行い、コンジェニックを完了した。

マウス前頭部正中より頸部にかけて縦切開を行い、モスキートペアンおよび形成剪刀を用いて皮膚を耳介外側部へ向けて剥離した。剥離後、中耳軟骨付近で耳軟骨を切断し、切断後耳介内側の皮膚を剥離して、剪刀を用いて 1mm^3 のサイズまで細切した。これを 0.15% コラゲナーゼ溶液中 (WAKO, Osaka, Japan) で 37°C 、3 時間、恒温槽で振とうさせながらインキュベートした。得られた溶解液を $100\ \mu\text{m}$ 孔径のセルストレイナー (BD Falcon, Bedford, MA) で濾過し、残渣を取り除いた後、遠心分離機にて 1500rpm、5 分間遠心し、ヒト耳介由来軟骨細胞を単離した。採取した細胞は、トリパ

ンブルーにて染色し、カウントし生存率を確認した。

軟骨細胞の培養

単離したヒトおよびマウス軟骨細胞はφ10cm の I 型コラーゲンコートディッシュ (IWAKI, Tokyo, Japan) 上に 6400 cells/cm² の密度で播種し、37°C/5% CO₂ のインキュベーター内で、ヒトでは 5% Human Serum (Sigma-aldrich, St. Louis, MO)、マウスでは 5% Fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA)、に加え、100ng/mL FGF2 (Fiblast spray; Kaken Pharmaceutical co.,Ltd, Tokyo, Japan)、5 μg/mL インスリン (MP Biomedicals Inc, CA) と 50 unit/mL ペニシリン・50mg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含む Dulbecco's Modified Eagle's medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F12; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 培地 (以下ヒトでは HFI 培地、マウスでは FFI 培地) にて 37°C 5% CO₂ で培養した。培地交換は週に 1 回行い、約 1 週間後、細胞がコンフルエントになってから、0.25% trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 溶液で処理をし、6400 cells/cm² の密度 (1: 10~20) で細胞継代を行った。比較検討には、再生医療における最適増殖数である 1000 倍増に相当する第 3 継代 (P3)、および過増殖により基質産生能が著減する 1 億倍相当の第 8 継代 (P8) を用いた。

Cell adhesion assay

φ10cm のノンコートディッシュおよび I 型コラーゲンコートディッシュ (IWAKI, Tokyo, Japan) 上に 6400 cells/cm² の密度で細胞を播種し、6 時間後、培地を除去、PBS(-) にて 2 回洗浄したのち、ディッシュ表面の接着細胞数を計測した。

Wound-Healing assay

2x2mm グリット付き 6cm ディッシュ上に 2x10⁵ 細胞を HFI 培地にて播種し、4 日間 37°C、5%CO₂ でインキュベートしたのち、P20 ピペットチップを用いてディッシュ底面を引掻き、生じた空間を 0 時間、6 時間、12 時間後で位走査顕微鏡にて観察を行い、細胞遊走程度を確認を行った。遊走能の評価には、空間閉鎖能率を空間の面積の割合

から計測した。

Total RNA 抽出および realtime RT-PCR

Total RNA は ISOGEN (Nippon gene, Tokyo, Japan) を用いてプロトコールに従い、サンプルから抽出し、精製した RNA から Prime Superscript 逆転写酵素キット (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて cDNA を得た。Realtime RT-PCR では、SYBER Green (Invitrogen, Carlsbad, CA) により、ABI Prism Sequence Detection System 7000 を用い、初回変性を 94°C で 10 分間、94°C、15 秒および 60°C、1 分から成るサイクルで 40 回反応させた。データ解析は誘導倍率を検討し、各遺伝子の発現量は GAPDH で補正を行った。使用したプライマー配列に関しては、表 1 にまとめた。

細胞伸展法

手動型細胞伸展装置 (Strex, Osaka, Japan) に装着した I 型コラーゲンコートシリコンチャンバー (ϕ 20x20mm) に 2×10^5 細胞を HFI または FFI 培地にて播種し、24 時間後、培地を除去、PBS(-)にて 2 回洗浄後、細胞飢餓培地 (0.5% Human Serum または FBS+DMEM/F-12) で 2 日間 37°C、5%CO₂ でインキュベートしたのち、30%伸展刺激を加え、刺激直後、6 時間後で接着細胞数の計測を CCK-8 (Dojindo, Tokyo, Japan) を用いて行った。

遺伝子導入による GFAP 強制発現

V5 タグ融合構成的活性ヒト GFAP 遺伝子を発現するアデノウイルスを invitrogen gateway Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて取得した。アデノウイルスを 293A 細胞にて増幅した後、AdenoX Virus Purification Kit (Clontech, Mountain View, CA) にて精製した。感染時の重複感染度 (multiplicity of infection-MOI) を一定にするため、細胞変性終末点法によりウイルス力価を測定した。

その後、24 ウェルマルチプレート上に I 型コラーゲンコートした ϕ 12mm のカバーガラス (IWAKI, Tokyo, Japan) を載せ、P8 の GFAP 遺伝子欠損型細胞 2×10^5 細胞を播種した後、アデノウイルスを MOI-50 となるように感染させた。LacZ を発現するアデノ

ウイルスを用いて各ウェルの MOI 総量が等しくなるように調整した。感染後、FFI 培地にて 37°C、5% CO₂ でインキュベートし、4 日後、培地を除去し、PBS (-) にて 2 回洗浄後、細胞飢餓培地 (0.5% FBS+DMEM/F12) で 2 日間 37°C、5% CO₂ でインキュベートしたのち、培地を除去、PBS (-) にて 2 回洗浄後、100% エタノールにて室温で 20 分間固定、PBS (-) で洗浄後、導入確認のために GFAP 抗体を用いて染色を行った。

免疫蛍光染色法

24 ウェルマルチプレート上に I 型コラーゲンコートした φ12mm のカバーガラス (IWAKI, Tokyo, Japan) を載せ、2x10⁴ 細胞を HFI または FFI 培地にて播種し、4 日後、培地を除去し、PBS (-) にて 2 回洗浄後、細胞飢餓培地 (0.5% Human Serum または FBS+DMEM/F12) で 2 日間 37°C、5% CO₂ でインキュベートした。そののち、培地を除去、PBS (-) にて 2 回洗浄後、100% エタノールにて室温で 20 分間固定、PBS (-) で洗浄後、染色を行った。非特異染色に対するブロッキングは 3% BSA を用いて 30 分間、室温で行った。用いた抗体として、1 次抗体は耳介軟骨細胞における GFAP とリン酸化型 GFAP および vimentin の細胞内局在検出のために anti-GFAP (Dako, Glostrup, Denmark)、anti-pGFAP (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, US)、anti-vimentin (Chemicon, MA, US) を、また、核内のヒストンのメチル化状態の検出のために anti-H3K4me3 (CST, Danvers, MA)、anti-H3K9me3 (Active Motif, CA, US) を使用した。2 次抗体は anti-mouse IgG、anti-Rabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark)、anti-goat IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, US) を使用した。対比染色として、DAPI (Vector Laboratories, Inc, CA, US) を用いた。また観察に際して、共焦点型レーザー顕微鏡 (Leica-micosystems, Heerburgg, Swiss) を用いて行った。

GFAP ELISA

培養細胞を氷冷 PBS (-) にて 2 回洗浄したのち、M-Per (Pierce, Rockford, IL) を用いて、細胞内全蛋白質の可溶化・抽出し、GFAP ELISA Kit (BioVender, Modrice, Czech) を用いてプロトコールに従い、サンプルを抗体と反応させる。反応後のサンプルはプレートリーダー (Perkinelmer) を用いて、450nm の波長域での蛍光強度を測定し、取り

込み量として GFAP 蛋白質の定量を行った。

Western-Blotting

培養細胞を氷冷 PBS (-) にて 2 回洗浄したのち、M-Per (Pierce, Rockford, IL) を用いて細胞内全蛋白質の可溶化・抽出を行った。細胞質分画・核分画の可溶化・抽出においては Qproteome Nuclear protein kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いた。Extraction Buffer にて処理したのち細胞溶液を 15,000rp にて 10 分遠心し、上清をタンパク質抽出液とした。

得られた蛋白質抽出液の濃度は Protein Assay Kit II (BIO-RAD, Hercules, CA) を用いて測定した。SDS-サンプルバッファーを加えた蛋白質抽出液のうち蛋白質重量 10 μ g 相当量を 5-20%ポリアクリルアミドゲル (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) にて泳動したのち (SDS-PAGE)、100V、1 時間通電させてニトロセルロース膜 (BIO-RAD, Hercules, CA) に転写した (Western-Blotting)。ニトロセルロース膜を 5%スキムミルク/Tris buffered saline+0.5% tween (TBS-T) にてブロッキング処理後、各一次抗体並びに horseradish peroxidase (HRP) にて標識した各二次抗体を反応させ、ECL Plus Kit (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire, U.K.) を用いて蛍光発色させ可視化した。

用いた 1 次抗体は anti-GFAP (Dako, Glostrup, Denmark, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA)、また、核内のヒストンのメチル化状態の検出のために anti-H3K4me3 (CST, Danvers, MA)、anti-H3K9me3 (Active Motif, Carlsbad, CA) を、さらに、内在性コントロールとして、anti-Lamin B1 (Active Motif, Carlsbad, CA) を使用した。2 次抗体は anti-mouse IgG、anti-Rabbit IgG、anti-goat IgG (Dako, Glostrup, Denmark) を使用した。

Flow cytometry

P3、P8 の野生型および GFAP 遺伝子欠損型マウス耳介軟骨細胞を ϕ 10cm の I 型コーゲンコートディッシュ (AGC Technoglass Co., Ltd, Chiba, Japan) 上に 6400 cells/cm² の密度で播種し、4 日間、FFI 培地にて 37°C/5% CO² でインキュベートし、

培地を除去、PBS(-)にて2回洗浄後、細胞飢餓培地(0.5%FBS+DMEM/F12)で2日間37°C、5% CO₂でインキュベートした。そののち、培地を除去、PBS(-)にて2回洗浄後、0.25% trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich)溶液で処理をした後、5ml ガラスチューブに移し、遠心分離機にて1500rpm、5分間遠心し、細胞回収を行った。その後上清を除去し、100% エタノールで攪拌した後、20分間固定した。固定後、1500rpm、5分間遠心し、Cycle TEST™ PLUS DNA Reagentg Kit (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)を用いてPI染色を行った。染色後、フローサイトメーター LSR2 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA)にて、倍数体の検出を行った。

核形態計測

DAPIで核染色したヒトまたは野生型およびGFAP遺伝子欠損型マウス耳介軟骨細胞P3、P8を、共焦点型レーザー顕微鏡を用いて各サンプルにおいて、無作為に5視野を選択し、画像を取得した。核形態の評価に関しては直径の評価のために核の平面像を、また、核の高さの評価のために断面像を取得した。さらに、核の多倍体評価に関しては、核の平面像のみ取得した。その後、モニター上でそれぞれについて計測を行った。

結果

ヒトおよびマウス由来の培養耳介軟骨細胞における GFAP の発現変化

ヒト耳介軟骨細胞 P3、P8 における GFAP の蛋白質局在を検索するため、各細胞の免疫蛍光染色を行った。P3 細胞において細胞質に GFAP の免疫局在が観察された。一方、P8 細胞において GFAP は細胞質に免疫局在を観察したものの、染色性は減弱傾向を示した(図 1 上段、中段)。代表的な間葉系細胞の中間径線維である vimentin と GFAP の局在性を比較したところ、両者同様に細胞質に局在が見られた(図 1 下段)。

また、マウス耳介軟骨細胞における GFAP の局在を、P3 細胞および P8 細胞を用いて検索したところ、P3 細胞において細胞質全体に GFAP が局在していたが、特に核周囲では核を取り囲むように密に局在していた(図 2 上段)。P8 細胞においては GFAP の局在性は減弱した(図 2 中段)。GFAP と vimentin の局在を検索したところ、vimentin はヒト細胞同様に全細胞に局在を認め、特に核周辺部付近に密な局在を認めた。GFAP も核周辺部付近に局在がみられたものの、局在は一部の細胞のみに限局していた(図 2 下段)。

実際に、ヒト P3、P8 細胞における GFAP の遺伝子と蛋白質の発現を生化学的に定量したところ、免疫蛍光染色で得られた所見同様に、GFAP の発現量は P3 で高く、P8 で減少していることが確認された(図 3)。

一方、先行研究ではグリア細胞の核近傍に GFAP が局在し、細胞質分裂が起こる際に、GFAP にリン酸化が生じ、さらに分裂期において分裂溝付近でリン酸化型の局在を示すという報告がある(21)。軟骨細胞においても GFAP は核周囲に局在することから、軟骨細胞においても細胞質分裂期に GFAP がリン酸化するのではないかと考え、耳介軟骨細胞においても各分裂期における GFAP のリン酸化状態を検索した。その結果、分裂期前中期において、リン酸化型 GFAP は核の周囲に集積し始め、中期になると、核の両極へ分離するように細胞質辺縁へと集積していき、後期においては、母核と娘核を分離するように核間、特に分裂溝に局在が集中し、終期では完全に細胞を分離するように細胞質両極へと線維を集積させた(図 4)。したがって、軟骨細胞の細胞分裂においても、GFAP のリン酸化が生じることが明らかとなった。

GFAP 発現変化に伴う細胞増殖・接着・遊走の変化

ついで、ヒト耳介軟骨細胞の継代培養における細胞増殖能とともに(図 5)、野生型マウスと GFAP 遺伝子欠損マウス耳介軟骨細胞における細胞増殖能を検索した(図 6)。ヒト耳介軟骨細胞の初代培養から順次継代した際の増殖能を比較検討したところ、P8 までは増殖能が維持され、成長曲線も順調に推移した。また、マウス耳介軟骨細胞においても、野生型、GFAP 遺伝子欠損型、いずれにおいても P8 までは増殖能が維持され、有意な差は認められなかった。

次にヒト P3 および P8 細胞における接着能を評価するために、培養ディッシュ上に接着した細胞数により比較を行った(図 7)。通常の培養ディッシュおよび COL1 コート培養ディッシュいずれも、P3 細胞での接着細胞数に対し P8 細胞では有意な減少が見られた。また、P3 および P8 細胞において軟骨細胞の細胞接着分子の発現変化を、代表的な接着分子である α 、 β インテグリンと N カドヘリンについて評価した(図 8)。その結果、P3 細胞に比べ P8 細胞で接着分子の発現量が増加しており、特に $\alpha 3$ インテグリンおよび $\beta 5$ インテグリンの遺伝子およびタンパク、いずれの発現も増強しており、両者の細胞の接着機構に明らかな変化が生じていることが示された。しかし、野生型と GFAP 遺伝子欠損マウス耳介軟骨細胞における細胞接着を比較したところ、野生型細胞および GFAP 遺伝子欠損型いずれにおいても、P8 細胞は P3 細胞と比較して接着能が低下しているものの(図 9)、野生型細胞と GFAP 遺伝子欠損型細胞で接着能に有意な差は認められず、GFAP が細胞接着の制御に関与していることを支持する積極的な所見はえられなかった。

さらに、GFAP が神経損傷後の修復に関係があるとの先行研究を勘案し、細胞の遊走能に何らかの機能を有していると考え、ヒト耳介軟骨細胞 (P3、P8) において *in vitro* wound-healing assay を行い、平面培養の一部を搔破し、周囲からの細胞遊走を経時的に評価した。その結果、ヒト P3 および P8 細胞いずれも搔破後 12 時間で、面積比にして 20%程度の細胞遊走が観察され、細胞の遊走能に有意な差は見られなかった(図 10)。

GFAP 発現と伸展刺激に対する反応との関連性について

細胞に動的な機械刺激として伸展刺激を加えた際の反応を評価した。ヒト耳介軟骨細胞 P3 および P8 を用いて、細胞に 30%の伸展刺激を加え、刺激前と刺激後の細胞接着の変化を評価した(図 11 上段)。その結果、P3 細胞は 4 割程度の細胞が剥離し、6 割が接着したままであったのに対し、P8 細胞の接着は 5 割にとどまっていた。しかし、両群に有意な差は見られなかった。一方、野生型および GFAP 遺伝子欠損型マウス P3、P8 細胞を用いて、同様に 30%伸展刺激を加えて比較検討を行った(図 11 中段、下段)。野生型における GFAP 発現が著しい P3 細胞においては、刺激後の細胞接着率はほぼ 100%であったのに対し、GFAP 遺伝子欠損型では 40%程度に低下し、野生型に対して接着能の著しい低下を認めた。しかしながら、野生型においても GFAP 発現が低下する P8 細胞においては、刺激後の接着率は野生型と GFAP 遺伝子欠損型細胞いずれも約 70%で有意な差は認められなかった。これらの結果から、GFAP は伸展刺激に対する抵抗性の獲得に役割を果たすことが示唆された。

耳介軟骨細胞の継代培養に伴う核形態変化

GFAP が核周囲に特に局在しているという所見から、GFAP は核形態と機能の維持に何らかの役割を果たす可能性があると考えられる。そのため、P3 および P8 ヒト耳介軟骨細胞において、核の形態を評価した(図 12)。まず、P3 細胞における核形態は球状を呈しており、核の直径が平均 $14\mu\text{m}$ であったのに対し、P8 細胞では平均 $17\mu\text{m}$ と形状も円形となっていた(図 12 中段)。また、同時に核の高さについても検索を行ったところ、P3 細胞において高さが平均 $4.56\mu\text{m}$ であったのに対し、P8 細胞では平均 $3.08\mu\text{m}$ となっており(図 12 下段)、継代が進み、GFAP が減少すると、核が扁平化することが示唆された。

ついで、野生型および GFAP 遺伝子欠損マウスの P3 および P8 細胞を用いて核形態を解析した(図 13)。P3 細胞は野生型においては、核の直径は平均 $14.4\mu\text{m}$ であったのに対して、GFAP 遺伝子欠損型細胞の直径は平均 $16.6\mu\text{m}$ で、GFAP 欠損細胞で有意に増加していた。また高さの評価においても野生型 P3 細胞が平均 $4.8\mu\text{m}$ だったのに対して、GFAP 遺伝子欠損型細胞は $3.7\mu\text{m}$ であり、GFAP の欠損により核が顕著に扁平

化することが明らかとなった(図 14 上段)。それに対し、継代が進んだ P8 細胞では、野生型は核の直径平均は $15\mu\text{m}$ であったのに対して、GFAP 遺伝子欠損型では $17\mu\text{m}$ で、有意な差がみられたものの、高さにおいては野生型が平均 $3.6\mu\text{m}$ であったのに対して、GFAP 遺伝子欠損型では $3.7\mu\text{m}$ であり、ほとんど変化はなかった(図 14 下段)。このように P3 で顕著であった野生型と GFAP 遺伝子欠損型の核形態の差異は P8 においては不明確になり、P8 では野生型の GFAP 発現量が減少するため、GFAP 遺伝子欠損型との差がわかりにくくなるものと思われた。

これまでの結果から、GFAP が核形態の維持安定に重要な働きをしていることが示唆されたが、これらの現象が GFAP の機能によるものであることを検証するために、P8 の GFAP 遺伝子欠損型細胞に GFAP 遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを導入し、核形態の変化を組織学的および形態計測的に確認した(図 15)。組織学的には、遺伝子導入細胞では野生型細胞と同様に GFAP の細胞内局在がみられ、ウェスタンブロッティングでもタンパクの発現が確認された。このような導入細胞では、P8 の GFAP 遺伝子欠損型細胞と比較して核は小さく、球状を呈していた。形態計測的に核の直径と高さを評価したところ、核の直径は約 $10\mu\text{m}$ 、高さは約 $6\mu\text{m}$ と明らかな形態の変化が認められた。この結果から、GFAP が核形態の維持に重要な役割を果たすことが確認された。

GFAP 遺伝子欠損マウスの耳介軟骨細胞における多核細胞数の変化

GFAP は核周囲に局在しており、また、分裂期においてリン酸化されることを考慮すると、GFAP が核形態のみならず、核や細胞の分裂にも関与している可能性があるため、野生型および GFAP 遺伝子欠損型の P3 および P8 細胞の多核化細胞数を検索した(図 16)。P3 において、GFAP 遺伝子欠損細胞は野生型に対して、多核化した細胞数が増加している傾向があったが、有意な差は認められなかった。一方、P8 において GFAP 遺伝子欠損細胞は明らかな多核細胞の増加が認められた。また、PI 染色した細胞をフローサイトメーターで評価し、核の倍数体を検討したところ、同様な傾向が見られた(図 17)。多倍体のほとんどが 2 倍体であったが、核の形態学的観察やフローサイトメーターで 3~7 倍体の存在も示唆された。

GFAP 遺伝子発現アデノウイルスベクターを GFAP 遺伝子欠損細胞に導入し、多核化につき評価したところ、導入後の細胞における多核化は顕著に抑制された(図 16)。この結果から、GFAP が継代培養における正確な細胞分裂に重要な役割を果たすことが示唆された。

GFAP 発現変化に伴うエピジェネティック制御の変化

最後に、GFAP の発現減少に伴う核形態変化が、核にどのような質的影響をもたらすかということを検索するため、ヒストン修飾、特にメチル化状態を蛍光免疫染色により検索した。

メチル化 H3K4 はおもに転写活性が維持されているユークロマチンに、メチル化 H3K9 は反対に転写活性が低いヘテロクロマチンに局在することが知られている(22)。メチル化 H3K4 は、P3 細胞の野生型細胞では瀰漫性に局在するに対し、GFAP 遺伝子欠損型では局在が減少し、局所に集簇する傾向を示した。また、メチル化 H3K9 は野生型細胞とは異なり GFAP 遺伝子欠損型では核内に斑状に集積することが明らかとなり、GFAP 欠損型細胞の扁平化した核では概して転写が低調であることが示唆された。またウェスタンブロッティングによる解析では、H3K4 における野生型細胞と GFAP 欠損型の差異は明らかではなかったが、H3K9 では野生型細胞にくらべ GFAP 欠損型でメチル化蛋白質の増加が認められた。これらの結果から、GFAP の遺伝子欠損による核形態変化が核のエピジェネティックな変化を惹起することが示唆された。

考察

弾性線維を豊富に含む軟骨は、耳介軟骨と喉頭蓋軟骨であり、これらを総称して、弾性軟骨という。弾性軟骨は耳介軟骨、喉頭蓋軟骨、いずれであっても恒常的に機械的な応力が加わる部位に存在しており、弾性軟骨の細胞外基質に含まれる豊富な弾性線維は、特に、曲げ応力に対する強力な復元力の根源となっていると思われる。一般に、頻回にかかる過度の外力は細胞の生存性を低下させる傾向にある(23)。しかし、軟骨細胞は、このような外力にさらされるような環境にあっても、外力に対して抵抗性を示す(24)。耳介軟骨においても曲げ応力が頻回に加わるため、細胞の生存性を維持するためには、他の軟骨と同様、外力に対する抵抗性が不可欠である。

力学抵抗性の機能の一端を担うのが細胞骨格である。細胞骨格とは蛋白質から成る細胞質中を縦横に走り、細胞の形態を内側から支持している。細胞骨格は主にアクチンフィラメント、微小管、中間径線維と呼ばれる3種類の線維より構成されている(25)、(26)、(27)。細胞膜裏側には、これらの細胞骨格を裏打ちする蛋白質が存在しており(28)、(29)、細胞膜と連結したそれらの線維成分が力学的な支柱となって、細胞の形態が決定する仕組みとなっている。これらの細胞骨格が形成あるいは分解されることにより、細胞は形態を柔軟に変えることが可能になり、時には細胞が動くことも可能となる(30)。

これまで多くの研究室で、機械的応力を細胞に加えた時の細胞骨格タンパクの反応として、アクチンに関する研究がなされてきた。アクチンは主に、細胞の収縮や仮足形成など、細胞形状の動的変化を担っており、また、機械的応力に反応して線維の再構築や組織化など劇的な変化が生じる(31)、(32)。実際に、アクチン線維形成に関連して myosin light chain kinase 遺伝子欠損モデルを用いて、細胞に機械的応力を付加すると、アクチン線維形成が阻害されることにより、応力に対して細胞生存性が減少する、という報告がなされている(33)。

それに対し、中間径線維は、細胞の基本形状、すなわち動的な変化の少ない基本構造の構築を担っている。中間径線維は細胞質において、線維同士がねじり合わさって丈夫な集合索となり、上皮細胞層の細胞間連結を維持したり、ニューロンの丈夫な軸索を伸張させたりするのに重要な役割を果たす(34)。したがって、曲げ応力の負荷

の大きい耳介軟骨由来の軟骨細胞においても中間径線維が細胞の基本構造の維持に重要な役割を果たしているものと予想された。そのため、本研究においては、中間径線維のなかでも培養耳介軟骨細胞に特異的に発現している GFAP に着眼し、生物学的機能の解析を行った。解析項目としては、軟骨細胞の細胞増殖、細胞接着、細胞遊走、伸展刺激に対する抵抗性、細胞や核の構造や機能、に着眼し、ヒト細胞の P3 および P8、あるいは野生型および GFAP 遺伝子欠損マウス由来の細胞で比較検討した。その結果、細胞の移動、接着など、動的な細胞形態の変化が大きく関わってくる細胞接着、細胞遊走などでは、GFAP 発現の増減による表現型変化は観察しにくく、むしろ、細胞の動的変化よりも、細胞の基本構造に関する表現型である核の形態、核数、あるいは、細胞基本構造に対する力学刺激への反応性などに、表現型の変化が観察された (図 19)。

中間径線維における伸展刺激に対する抵抗性に関する役割に関しては、皮膚表皮におけるケラチンの機能として研究が進んでいる (35)。この研究では、野生型培養皮膚表皮細胞シートと変異型 K5/K14 を発現する培養皮膚表皮細胞シートに対して伸展刺激を加え、ケラチンネットワークの変化を比較した。その結果、研究では、野生型表皮シートでは伸展刺激に対してケラチンネットワークが維持され、細胞間連結も維持されていたが、変異型 K5/K14 表皮シートではケラチンネットワークが破綻し、シートが断片化され、細胞間連結という上皮の根本的な機能が失われるという結果を呈していた。軟骨細胞における GFAP においても、細胞接着および生存の維持や、伸展刺激に対する抵抗性という弾性軟骨にとっての本質的な機能の減弱に至るという点で共通しており、中間径線維が細胞の基本構築の維持に重要な役割を担っていることが示唆された。一方、GFAP と相同性が高く、耳介軟骨細胞においては局在傾向が類似している vimentin においても、同様に力学刺激に対する抵抗性の根源として機能している可能性がある。現在、著者らも、vimentin 遺伝子欠損型マウスをもちいて、本研究と同様な項目の検討を開始している。GFAP と vimentin は、分子量がそれぞれ 50KDa、55KDa で、分子構造の骨格となる桿状部分のゲノム相同性は 70% であり、相同性が高い (36)。一方、構造が異なる領域は head 領域であり、GFAP が 69 アミノ酸から構成されるのに対し、vimentin は 103 アミノ酸からなっている (37)。head 領域は集合索の柔軟性を付与する領域であるため、同領域の小さい GFAP は細胞骨格に剛性や強度

をもたらす効果が高い可能性がある。そのため、GFAP は、特異的に曲げ応力に対する抵抗性に貢献するのかもしれない。

一般に、中間径線維は、細胞の基本的な形態を維持し、外力に対しては柔軟に構造を変化させ、細胞内に伝わる刺激を緩衝すると考えられる (38)。本研究における GFAP 遺伝子欠損型マウス由来細胞解析では GFAP は外力、特に曲げ応力に対する抵抗性の発現に関与していると考えられたが、中間径線維である GFAP が外力に対して緩衝作用を果たすとともに、連結しているヘミデスモソームに何らかの情報を伝達し、ヘミデスモソームを介して行われる細胞と細胞外マトリックスの接着に影響を及ぼしているものと推察された。一方、ヘミデスモソームには、インテグリンや接着斑キナーゼ (FAK) などの細胞内アンカータンパクなど、多くの要素が関与しているため、これらの分子との相互作用も外力に対する抵抗性には重要であると思われた。

GFAP が減弱した軟骨細胞あるいは欠失した細胞における核扁平化は、細胞内における GFAP 量の減少が核周囲の細胞骨格の構造に影響を及ぼすことによって生じる変化を推察される。GFAP が耳介軟骨細胞の細胞内において、核周囲に密に局在する所見 (図 1, 2) から、核の形態や構造に深く関与していることが示唆される。継代培養に伴う GFAP 量の減少は、細胞が平面培養ではきわめて人工的な環境におかれ、さらに継代培養では長期にわたりそのような非生理的環境に暴露されることに起因すると考えられる。非生理的環境への暴露によるストレス、たとえば平面培養における過剰増殖刺激は、p16 (INK4a) の老化シグナルを増強させる可能性があると思われる。p16 (INK4a) は c-jun の活性化を抑制し、AP-1 における転写活性を阻害することが知られている (39)。AP-1 は主要な GFAP の転写制御装置であるため (40), (41)、継代培養に伴う細胞老化シグナルを介して GFAP の転写が抑制され、最終的には核形態や構造に変化が生じるのかもしれない。

このように、細胞骨格の発現制御は細胞外からのシグナルに大きく依存することが多い。液性因子や細胞外基質との接着などによる細胞外シグナルを適切に調節することにより GFAP の発現を維持することが可能になるかもしれない。具体的には、細胞培養時に、培地中への因子の添加や培養ディッシュ上への因子の固着化などを行うことで、効率的に GFAP の発現を制御することが可能となるかもしれない。これらの技

術が確立され、平面培養技術に導入されることにより、軟骨細胞の基質産生能の低下を抑制し、細胞の分裂回数を増やしても軟骨細胞の機能の低下など軟骨特性の低下を引き起こすことなく最適な細胞培養方法が確立できるかもしれない。さらに、基質産生能が維持されることにより、患者自身から採取する細胞量を最小限に抑えることが可能となり、患者負担の軽減に大きく役立つものと期待される。

耳介軟骨細胞の GFAP 量と基質産生能との関連機序については確証的な所見は得られていないが、本研究における核形態変化とエピジェネティック制御に関する所見は相関のメカニズムを示唆するものと思われる。

本研究の所見では、GFAP の欠失に伴い、ヒストンタンパク H3K9 のメチル化状態が変化し、ヘテロクロマチンが増加し転写活性が概して低調になり、核の扁平化に加えて、核機能の質的な変化も生じていることが示唆された。それによりヒストンによる遺伝子転写調節機構が変化し、基質産生に関わる遺伝子の転写活性が制御され、細胞の基質産生能が低下すると推察された。もちろん、メチル化ヒストン蛋白の評価だけで GFAP が核の質的变化を誘導すると断定することは困難である。しかし H3K4 および H3K9 は、転写活性と不活性に関与する代表的なメチル化部位であり、両メチル化ヒストン蛋白を指標とした転写制御の研究が多数報告されている (42)。従って本研究においても、転写活性に深くかかわるヒストン蛋白の代表的なメチル化を総論的な核の質的变化として捉え、H3K4 および H3K9 のメチル化を検討した。今後は、ヒストン蛋白のアセチル化や DNA メチル化などのエピジェネティック制御を広く検討し、GFAP が核の質的变化に及ぼす影響をより詳細に検討していきたい。

一方、GFAP の欠失により生じた表現型のひとつに細胞の多核化があった。本研究で示した軟骨細胞で見られる多核化のメカニズムについては、今後さらなる検討が必要であると考えられる。先行研究で、リン酸化 GFAP がグリア細胞の細胞質分裂に際して、分裂溝に局在することが明らかとなっている (21)。この所見は GFAP のリン酸化が細胞分裂に重要な働きをすることを示唆している (43)。そのため、GFAP の欠損によって、細胞分裂に不調を来たしたのではないかと推測される。実際、耳介軟骨細胞においても、リン酸化 GFAP が細胞分裂期の分裂溝に集積することが明らかとなった。さらに、野生型および GFAP 遺伝子欠損型マウス由来軟骨細胞の比較では、野生型に

比べ GFAP 欠損型において多核化細胞が増加していた。GFAP 遺伝子欠損細胞における多核化細胞の増加は、GFAP の核形態の維持の障害の一所見と捉えることができるのかもしれない。

著者らが所属する研究室では、培養上清に含まれる GFAP タンパク含有量を計測し、移植する細胞の基質産生能を移植前に評価する方法を導入しようと試みている。GFAP は分泌タンパクのように、恒常的に細胞外に放出されるものではないにもかかわらず、培養上清中の蛋白として検出できるのは、細胞分裂時における GFAP の役割を関連していると推測している。中間径線維は細胞周期の間期においては重合状態が保たれ、密な構造を形成しているが、細胞質分裂時にはリン酸化をうけて急速に脱重合する。脱重合した中間径線維の一部は小胞輸送によって、細胞外へと排出されることが知られている (44)。したがって、耳介軟骨細胞の培養においても、活発に細胞分裂がおこなわれるため、脱重合した GFAP が細胞外へ放出される可能性があり、そのため GFAP の線維が培養上清中に存在すると考えている。

以上のことから、培養耳介軟骨細胞において GFAP は、細胞の生存や機能発現に必要な核の形態や機能の保持に重要な役割を担っていることが明らかとなった。上述のごとく、GFAP は耳介軟骨細胞に特異的に発現し、機械的な応力への抵抗性を確保する機能を担うため、周囲の軟骨膜由来の線維芽細胞などの混入によって GFAP 量に変化が生じることは容易に納得できる。また、継代数の増加によって GFAP 量減少や核形態の変化が起こり、相関して継代数の増加により軟骨細胞の基質産生能も減少するため、細胞の基質産生能の評価指標として使用可能であることは十分に理解できる。したがって、GFAP を培養耳介軟骨細胞における基質産生能の指標として用いることは合理的であり、このような科学的な根拠を有する評価指標を用いて、品質管理を行うことは、安全で確実な再生軟骨を患者に提供する上で有意義なことと考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ひとかたならぬご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の
東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学分野 口腔外科学講
座 高戸 毅教授に篤く御礼申し上げます。また、研究・実験を進めて行くにあたり、
さまざまな御助言、御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科 軟骨・骨再生
医療寄付講座 星 和人特任准教授をはじめ、同講座の皆様、口腔外科学教室の皆様、
そして、家族、友人、といった多くの方々に支えていただきました。本稿を終えるに
あたり、深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1, Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defect in the knee with autologous chondrocytes transplantation. *N Engl J Med* 331(14):889-895.
- 2, Yanaga H, Yanaga K, Imai K, Koga M, Soejima C, Ohmori K. 2006. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg* 117(6):2019-2030.
- 3, Romero J D, Nesic D, Grogan S P, Heini P, Varlet P M. 2008. Immunophenotype changes of Human Articular Chondrocytes monolayer culture reflect bona fide dedifferentiation rather than amplification of progenitor cells. *J Cell Physiol* 214:75-83.
- 4, Boeuf S, Steck E, Pelttari K, Henning T, Bune A, Benz K, Witte D, Sultmann H, Poustka A, Richter W. 2008. Subtractive gene expression profiling of articular cartilage and mesenchymal stem cells: serpins as cartilage-relevant differentiation markers. *Osteoarth Cartilage* 16:48-60.
- 5, Bosserhoff A K, Buettner R. 2003. Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocyte differentiation. *Biomaterials* 24:3229-3234.
- 6, Yamaoka H, Nishizawa s, Asawa Y, Fujihara Y, Ogasawara T, Yamaoka K, Nagata S, Takato T, Hoshi K. 2010. Involvement of fibroblast growth factor 18 in dedifferentiation of culture human chondrocytes. *Cell Prolif* 43(1):67-76.

- 7, Sundström J, Pelliniemi LJ, Kuopio T, Veräjänkorva E, Fröjdman K, Harley V, Salminen E, Pöllänen P. 1999. Characterization of the model for experimental testicular teratoma in 129/SvJ-mice. *Br J Cancer* 80(1-2):149-60.
- 8, Budka H. 1986. Non-glial specificities of immunocytochemistry for the glial fibrillary acidic protein (GFAP). Triple expression of GFAP, vimentin and cytokeratins in papillary meningioma and metastasizing renal carcinoma. *Acta Neuropathol* 72(1):43-54.
- 9, Kasantikul V, Shuangshoti S. 1989. Positivity to glial fibrillary acidic protein in bone, cartilage, and chordoma. *J Surg Oncol* 41(1):22-6.
- 10, 西澤 悟、金澤 三四朗、高戸 毅、星 和人. 2010. 日本再生医療学会. 培養耳介軟骨細胞の品質管理におけるグリア線維性酸性タンパクの有用性
- 11, Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestål YR, Pekna M. 2007. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int Rev Neurobiol* 82:95-111.
- 12, Lewis GP, Fisher SK. 2003. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 230:263-90.
- 13, Shibuya S, Miyamoto O, Itano T, Mori S, Norimatsu H. 2003. Temporal progressive antigen expression in radial glia after contusive spinal cord injury in adult rats. *Glia* 42(2):172-83.
- 14, Hanbury R, Ling ZD, Wu J, Kordower JH. 2003. GFAP knockout mice have increased levels of GDNF that protect striatal neurons from metabolic and

excitotoxic

insults. *J Comp Neurol* 461(3):307-16.

15, Triolo D, Dina G, Lorenzetti I, Malaguti M, Morana P, Del Carro U, Comi G, Messing A, Quattrini A, Previtali SC. 2006. Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *J Cell Sci* 119(Pt 19):3981-93.

16, Nakamura T, Miyamoto O, Auer RN, Nagao S, Itano T. 2004. Delayed precursor cell markers expression in hippocampus following cold-induced cortical injury in mice. *J Neurotrauma* 21(12):1747-55.

17, Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S, Ito H. 2007. Immature and mature neurons coexist among glial scars after rat traumatic brain injury. *Neurol Res* 29(7):734-42.

18, Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 313(10):2050-62.

19, Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S. 2006. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* 8(2):156-62.

20, Menet V, Giménez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E, Privat A. 2001. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci* 21(16):6147-58.

- 21, Maeda K, Mizuno M, Wakabayashi T, Takasu S, Nagasaka T, Inagaki M, Yoshida J. 2003. Morphological assessment of the development of multinucleated giant cells in glioma by using mitosis-specific phosphorylated antibodies. *J Neurosurg* 98: 854-859.
- 22, Martin C, Zhang Y. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(11):838-849.
- 23, Flachsmann R, Broom N D, Hardy A E. 2001. Deformation and rupture of the articular surface under dynamic and static compression. *J Orthopaedic Res* 19(6): 1131-1139.
- 24, Jurvelin J, Kiviranta I, Tammi M, Helminen HJ. 1986. Effect of physical exercise on indentation stiffness of articular cartilage in the canine knee. *Int J Sports Med* 7(2):106-10.
- 25, Tilney LG, Egelman EH, DeRosier DJ, Saunderson JC. 1983. Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. II. Packing of actin filaments in the stereocilia and in the cuticular plate and what happens to the organization when the stereocilia are bent. *J Cell Biol* 96(3):822-34.
- 26, Shoeman RL, Traub P. 1993. Assembly of intermediate filaments. *Bioessays* 15(9):605-11.
- 27, Hyams JS, Stebbings H. 1979. The mechanism of microtubule associated cytoplasmic transport. Isolation and preliminary characterisation of a microtubule transport system. *Cell Tissue Res* 196(1):103-16.

- 28, De Loof A, Callaerts P, vanden Broeck JV. 1992. The pivotal role of the plasma membrane-cytoskeletal complex and of epithelium formation in differentiation in animals. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 101(4):639-51.
- 29, Compton DA, Cleveland DW. 1994. NuMA, a nuclear protein involved in mitosis and nuclear reformation. *Curr Opin Cell Biol* 6(3):343-6.
- 30, Holwill ME, Foster GF, Hamasaki T, Satir P. 1995. Biophysical aspects and modelling of ciliary motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 32(2):114-20.
- 31, Geng W.D, Boskovic G, Fultz M.E, LI C, Niles R.M, Ohno S, Wright G.L. 2001. Regulation of Expression and Activity of Four PKC Isozymes in Con⁻uent and Mechanically Stimulated UMR-108 Osteoblastic Cells. *J Cell Phys* 189:216-228.
- 32, Uruno T, Liu J, Zhang P, Fan Yx, Egile C, Li R, Mueller SC, Zhan X. 2001. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* 145: 503-514.
- 33, Raj W, Saule N, Zaiman A L, Joe G.N. Garcia. 2003. Mutation Analysis of the Non-Muscle Myosin Light Chain Kinase (MLCK) Deletion Constructs on CV1 Fibroblast Contractile Activity and Proliferation. *J cell Biochem* 88: 623-634.
- 34, Alberts B, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W. 2008. *Molecular Biology of The Cell* 5th ed. 16. pp.965-1052.
- 35, Russell D, Andrews PD, James J, Lane EB. 2004. Mechanical stress induces profound remodeling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes. *J Cell Sci* 117(22): 5233-5243.

- 36, James TR, Murakami M, Peter BD, Sherri LH, Laurence EB, Fukuyama K, Shin J, Tsugu A, Matshuzawa K. 1997. Role of glial filaments in cells and tumor of glial origin: a review. *J Neurosurg* 87: 420-430.
- 37, Sergei VS, Harald H, Ueli A. 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25(3):243-251.
- 38, Helfand BT, Chang L, Goldman RD. 2003. The dynamic and motile properties of intermediate filament. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 445-467.
- 39, Choi BY, Choi HS, Ko K, Cho YY, Zhu F, Kang BS, Ermakova SP, Ma WY, Bode AM, Dong Z. 2005. The tumor suppressor p16 (INK4a) prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nat Struct Mol Biol* 12(8):699-707.
- 40, Milde-Langosch K. 2005. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur J Cancer* 41(16): 2449-61.
- 41, Tiziana B, Eleonora DZ, Francesca L, Francesco C, Stefano R, Mirella F, Innocenzo R, Salvatore G, Roberto C, Silvia R, Mario S, Davide P, Roberta B, Roberto R. 2010. A novel polymorphic AP-1 binding element of the GFAP promoter is associated with different allelic transcriptional activities. *Annal Hum Gene* 74: 506-515.
- 42, Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, Canaani E. 2002. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins of involved in transcriptional regulation.

Mol Cell 10(5): 1119-1128.

43, Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. 1994. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. Brain Pathol 4(3):239-43.

44, Hisanaga S, Matsuoka Y, Nishizawa K, Saito T, Inagaki M, Hirokawa N. 1994. Phosphorylation of native and reassembled Neurofilaments composed of NF-L, NF-M, and NF-H by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. Mol Biol Cell 5: 161-172.

図説

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、中断は 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 $10\ \mu\text{m}$ 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、中断は 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 $10\ \mu\text{m}$ である。

図 3: P3、P8 における GFAP 遺伝子および蛋白質発現の比較。

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: 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 $8\ \mu\text{m}$ である。

図 5: P3 および P8 ヒト耳介軟骨細胞における細胞増殖の比較。

上段は P3 および P8 における平面培養後の増殖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 $200\ \mu\text{m}$ である。

図 6: GFAP 遺伝子欠損型細胞の継代培養に伴う細胞増殖の比較。

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 $200\ \mu\text{m}$ である。

図 7: P3 および P8 のヒト耳介軟骨細胞における接着状態の変化

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 $200\ \mu\text{m}$ である。

図 8: P3 および P8 の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: GFAP 遺伝子欠損型細胞における接着状態の変化。

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 $200\ \mu\text{m}$ である。

図 10: P3 および P8 の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。

図 11: ヒトおよびマウスにおける伸展刺激後の反応性の変化

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 $100\ \mu\text{m}$ である。

図 12: P3 および P8 のヒト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 (*: $p < 0.005$, vs P3)。また、核の高さは P8 で明らかな減少を認めた (*: $p < 0.005$, vs P3)。スケールバーは $20\ \mu\text{m}$ である。

図 13: GFAP 遺伝子欠損型細胞の継代培養に伴う核形態の変化 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。

図 14: GFAP 遺伝子欠損型細胞の継代培養に伴う核形態の変化 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 μm および縦 3 μm である。

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 (*: $p < 10^{-12}$, vs *Gfap*^{-/-}) し高さも有意に増加した (**: $p < 10^{-12}$, vs *Gfap*^{-/-})。スケールバーは 10 μm である。

図 16: 野生型細胞と GFAP 遺伝子欠損型細胞の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*^{+/+})。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*^{-/-})。スケールバーは 20 μm である。

図 17: フローサイトメーターを用いた多核細胞の評価

PI 染色法を用いて細胞周期から多核の割合を評価した。他で示した結果と同様な傾向を示したが、全細胞数に対して検出された細胞数が明らか減少していたことと、多核細胞の割合が全細胞数に対して大きかった。

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 μm である。

図 19 : 総括

表 1 : プライマーリスト

表 2 : 耳介軟骨細胞における GFAP の機能