



Title	集密的な条件下で培養したヒト網膜色素上皮細胞の挙動解析に基づく成熟化の促進に関する研究
Author(s)	園井, 理恵
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/59596
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

集密的な条件下で培養したヒト網膜色素上皮細胞
の挙動解析に基づく成熟化の促進に関する研究

園井 理恵

2016 年 6 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

第 1 章	集密的な条件下で培養した細胞挙動の把握の重要性	1
1-1.	細胞－基質間接着と細胞－細胞間接着の相互作用	1
1-2.	培養細胞の挙動の変化による容器内の空間的、質的不均一	2
1-3.	細胞の分化状態を評価するための手法	3
1-4.	眼器官における網膜色素上皮細胞	4
1-5.	網膜色素上皮細胞の研究動向と再生医療	5
1-6.	本研究の目的	7
第 2 章	集密的な条件下で培養した網膜色素上皮細胞の未成熟逸脱細胞の定量的な解析	10
2-1.	緒言	10
2-2.	実験材料・方法	11
2-2-1.	ヒト不死化 RPE 細胞の培養条件	11
2-2-2.	ZO-1 と細胞核の染色	11
2-3.	結果	12
2-3-1.	RPE 細胞の成熟化における形態学的な特性	12
2-3-2.	核密度に基づく成熟化の定量的な解析	13
2-3-3.	未成熟を逸脱した細胞の定量的な評価	14
2-4.	考察	16
第 3 章	集密的な条件下で培養した集団倍加回数の異なる網膜色素上皮細胞の定量的な解析	17
3-1.	緒言	17
3-2.	実験材料および方法	18
3-2-1.	集団倍加回数に対する細胞の準備	18
3-2-2.	異なる PD を持つ細胞の集密的な培養	18
3-2-3.	免疫蛍光染色	19
3-2-4.	核密度と面積に基づく解析	19
3-3.	結果	20
3-3-1.	RPE 細胞の形態学的な特性	20
3-3-2.	核密度と面積に基づく形態学的な特性の定量的な解析	22
3-3-3.	異なる PD を持つ細胞の集密的培養における細胞特性の変化	25
3-4.	考察	27
第 4 章	動きの変化による網膜色素上皮細胞の位置的不均一性	30
4-1.	緒言	30
4-2.	実験材料および手法	31
4-2-1.	ヒト RPE 細胞の培養条件	31
4-2-2.	細胞遊走と成熟化の定量的な解析	32
4-2-3.	タイトジャンクションの形成評価	32
4-2-4.	統計解析	33
4-3.	結果	33

4-3-1. 成熟化における RPE 細胞の密度変化	33
4-3-2. RPE 細胞の成熟化に及ぼす遊走の効果	38
4-4. 考察	40
第 5 章 協調的集団運動によるヒト網膜色素上皮細胞の均一な成熟化の促進	42
5-1. 緒言	42
5-2. 実験材料および方法	43
5-2-1. ヒト RPE 細胞の培養条件	43
5-2-3. 統計解析	45
5-3. 結果	45
5-3-1. 容器内での RPE 細胞の成熟化	45
5-3-2. 成熟化に及ぼす遊走阻害の効果	46
5-4. 考察	52
第 6 章 総括	56
6-1. 結論	56
6-2. 今後の課題と展望	58
記号	60
引用文献	61
学会発表	85
謝辞	87

第1章 集密的な条件下で培養した細胞挙動の把握の重要性

1-1. 細胞－基質間接着と細胞－細胞間接着の相互作用

培養細胞は、気相（酸素等）、液相（培養液、血清や増殖因子などの必須添加物等）、固相（培養面上の細胞外マトリクス；Extracellular matrix, ECM）から生物学的及び物理化学的な影響を受けており、その刺激に応じて細胞運動や増殖が変化する（1-3）。組織の構築や維持には、運動や増殖の細胞挙動を制御することが不可欠であり、細胞接着は、遊走・増殖・分化・アポトーシスの基盤として機能していることが知られている（4-6）。この細胞接着は、カドヘリンを接着分子とする細胞－細胞間接着とインテグリンを接着分子とする細胞－基質間接着が知られており、これらを介して細胞の運動や増殖を適切に制御する。

近年、細胞－基質間接着と細胞－細胞間接着の連携機序が、分子レベルで説明できるようになってきた。1997年に、Duband ら（7）は、 $\beta 1$ 及び $\beta 3$ インテグリンシグナルに依存した、N-カドヘリン接着の制御を報告した。Huttenlocher ら（8）は、ウズラ初代培養筋芽細胞を用いて、 $\beta 5$ 及び $\beta 1$ インテグリン、インテグリン裏打ちタンパク質のうちチロシンリン酸化受容タンパク質であるパキシリン、Fak（focal adhesion kinase）を介して遊走を制御し、その制御に N-カドヘリンも関与していたことから、インテグリンシグナルとカドヘリン接着が協調して挙動制御に寄与していたことを報告している。2004年には、Yano ら（9）が、パキシリンと p130Cas（Crk associated substrate）、及び Fak と Pyk2 の発現を抑制した実験を通じて、その細胞形態、カドヘリン接着形成や細胞挙動に対する効果を明らかにした。この両接着様式の連携に介在すると考えられる分子の報告もしており、ILK（integrin linked kinase）、Fer（fes-related kinase）、Ras スーパーファミリーGTP 結合蛋白質 Rap1 がある。Rap1 は、カドヘリンとインテグリン両接着の制御に深く関与しており、活性型 Rap1 がインテグリン接着を増強することがわかっている（10）。Fukuhara ら（11）らは、血液内皮細胞を用いて、cAMP の上昇が、Rap1GEF である Epac の活性化を誘導し、VE-カドヘリン接着を増強することを示した。これらのことから、生物学的な分子メカニズムに基づいて、細胞－細胞間接着と細胞－基質間接着の相互作用を制御できると考えた。

1-2. 培養細胞の挙動の変化による容器内の空間的、質的不均一

上皮細胞では、細胞間接着の形成のプロセスにおいて、この2つの細胞接着様式が変化し、それに付随して細胞挙動も変化する(12-15)。シングルの細胞は、紡錘形の細胞形態を示し、インテグリンを介した Rho family GTPases の Rac1 活性化による活発な増殖と遊走を示しながら、集密的な状態になる。細胞と細胞が接触すると、接触領域で細胞間接着を形成しはじめる。細胞間接着を形成するとともに、細胞は小さくなりながら、緊密な敷石状の形態を示し、最終的に、細胞-基質間接着から細胞-細胞間接着へ接着様式が転換する(16)。この敷石状の細胞は、細胞接触により増殖性が抑制される『接触阻害 (Contact inhibition)』と呼ばれる現象が生じる(17, 18)。これは、カドヘリンを介した細胞間接着による Hippo シグナル経路の活性化が、Yes associated protein (Yap) の核移行を抑制し、転写因子 Tead の活性の低下を導くことで、細胞増殖が低下するというメカニズムがわかっている(19, 20)。その後、細胞間接着の成熟化とともに、細胞間接着で結合した細胞集団は、細胞間接着を維持するための協調的な動きを示し、このような動きは、『協調的集団運動 (Collective movement)』と呼ばれる(21-23)。この『協調的集団運動』では、Rho family GTPases の RhoA 活性化が、アクチンミオシンの収縮を制御することで、細胞間接着を維持できることが知られている(24, 25)。このように、集密的な条件下では、細胞-細胞間接着、細胞-基質間接着との相互作用により、細胞の増殖、形態、接着、及び遊走の細胞挙動が変化する(26-30)。

培養している細胞は、培養容器内の位置によって、異なる増殖、遊走、細胞間接着の細胞挙動や分化状態を示すことがわかっている。Kokkinopoulos ら(31)は、細胞シートの端側では、中心側と比較して、増殖能力が高いことを報告しており、その違いと一致して細胞間接着の状態が異なることを報告した。近年、集密的な条件下で培養した細胞を特異的な分化マーカーで染色し、培養容器内の位置によって異なる遺伝子発現を示すがわかってきた(32)。これらのことから、培養した細胞同士の相互作用による細胞挙動の変化が、カドヘリンを介した細胞間接着又はインテグリンを介した細胞間接着に基づく生物学的なシグナルを通じて、培養容器内の細胞の分化状態が不均一になる可能性が考えられた。

1-3. 細胞の分化状態を評価するための手法

集密的な条件下にある細胞の状態を知るためには、細胞の状態を個として評価するだけでなく、時空間的に細胞の状態を知る必要がある。これまでに培養した細胞の状態を評価するために、目的に応じて以下のような測定手法が利用されてきた。免疫染色法（33–35）や PCR 法（36–38）は、細胞を破壊・侵襲的に調べる手法として知られており、前者は、個のデータを取得できる一方、後者は、平均的なデータを取得できる。タイムラプス観察による細胞のトラッキング解析や培地中に含まれる代謝産物の分析（39, 40），バリア機能を調べるための経内皮電気抵抗（Transendothelial electrical resistance: TER）（41–44）は、非破壊・非侵襲的に評価できる手法であり、タイムラプス観察に基づくトラッキング解析は、個のデータを取得できる一方、後者の 2 つの手法は、平均的なデータを取得できる。

免疫染色法とタイムラプス観察によるトラッキング解析は、集密的に培養した細胞の位置的特性を知ることができ、個々の細胞の空間的な特性を把握することが可能である。さらに、タイムラプス観察は、細胞の挙動の変化を把握することができる一方、免疫染色は、細胞内でタンパク質の局在を把握することができ、細胞シグナルのメカニズム解明を導く。Puliafito ら（45）は、明視野と免疫染色画像を用いて、シングルから集密的な状態までの個々の細胞の面積と増殖の変化を時間依存的に解析し、上皮細胞での接触阻害のメカニズムを定量的に明らかにした。さらに、Nanba ら（15）は、タイムラプス観察に基づいて、ヒト角化幹細胞が、特有の『回転運動』を示すことを明らかにし、細胞挙動を把握することで、幹細胞性を非侵襲的に予測できることを示唆している。このことから、個々の細胞のレベルで、細胞挙動を把握し、免疫染色で分子メカニズムを調べることで、生物学的なメカニズムを理解できると考えた。

1-4. 眼器官における網膜色素上皮細胞

眼器官は、受容した外界の光を神経信号に変換し、その刺激を脳内に伝える役割を担う組織である。この外界の光は、網膜の奥にある視細胞で受容し、視細胞で光刺激から電気刺激に変換され、アマクリン細胞や双極細胞、水平細胞などの二次ニューロンからガングリオン細胞を経由して、視神経から脳内にその刺激が伝えられる。網膜は、双極細胞や神経節細胞などの神経細胞層とその神経細胞層の後ろにある網膜色素上皮層から構成され、この網膜色素上皮細胞層で構成される血液網膜関門（Blood-retinal barrier）は、細胞同士のタイトジャンクションによって、構造的・物質的に視細胞への栄養や代謝産物の物質移動の他、網膜の外側に位置する強膜および脈絡膜の物質移動を制御している（46）。また、網膜色素上皮細胞（Retinal pigment epithelial cell, 以下 RPE 細胞）は、光を受容するために必要なビタミン A の貯蔵ならびにロドプシンを合成し（47, 48）、メラニン顆粒を含んだ RPE 細胞は、光散乱を防ぐことで視覚情報を鮮明にするなどの重要な役割を果たしている（49, 50）。そのため、網膜色素上皮のバリア機能が低下すると、視機能を担う神経網膜の機能も低下してしまい、機能が損失した場合失明に至る（51, 52）。

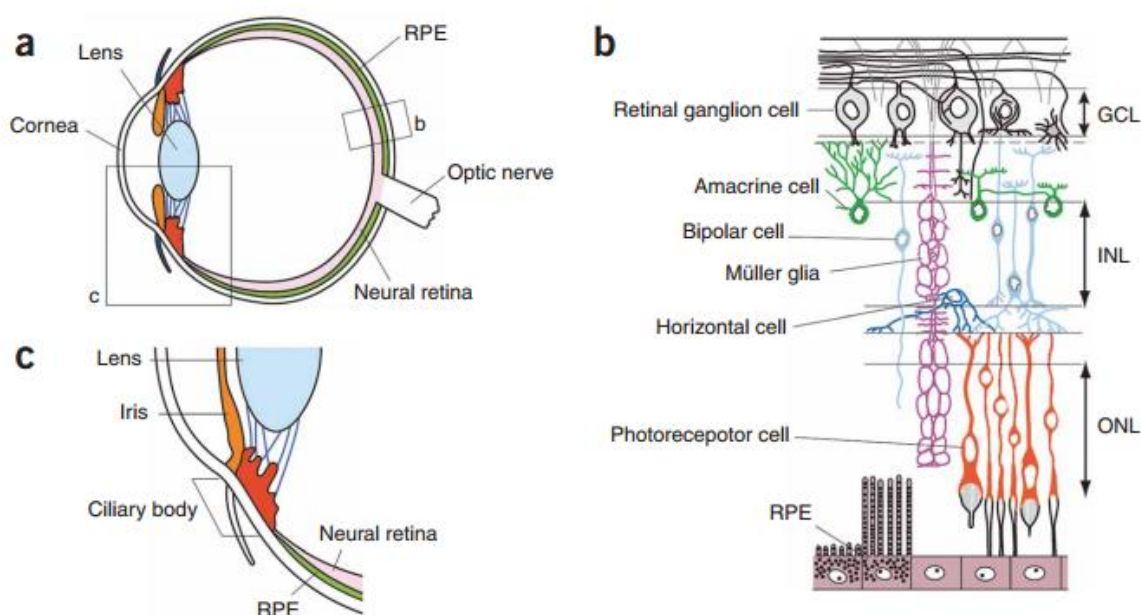


図 1. 眼器官（a, c）及び網膜の拡大図の断面図（b）⁽⁸⁾

1-5. 網膜色素上皮細胞の研究動向と再生医療

網膜の中心部の黄斑には、高密度に神経節細胞が存在しているため、黄斑部の網膜に損傷が生じると、他の部位が正常であったとしても、目の前に広がる映像の中心部が見えなくなる（中心暗点）、または、中心部がゆがんで見えるような症状があらわれ、網膜下に大きな出血が生じた場合、著しく視力が低下する。このような症状を示す加齢黄斑変性症は、加齢に伴って視力を担う黄斑に障害が生じる疾患であり、加齢や遺伝的要因などによる RPE の劣化が発症原因であることが指摘されている（51, 52）。さらに、この疾患は、先進国では成人の失明原因の大半を占めており、国内では、50 歳以上の約 1%が発症していることが報告されている（日本眼科学会統計データ、久山町研究）。しかしながら、この変性疾患に対する根本的な治療法は、移植以外に存在しないため、新たな治療法として、胚性幹細胞（Embryonic stem cell, 以下 ES 細胞）や人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell, 以下 iPS 細胞）から分化誘導した RPE 細胞の移植による再生医療や新薬の開発が期待されている。

近年、ES 及び iPS 細胞から分化誘導した視細胞や RPE 細胞などの移植による視機能再生に関する基礎及び臨床研究がおこなわれている（53–56）。Haruta らは、サル ES 細胞由来の RPE 細胞を、RPE 異常を原因とする視細胞変性モデルラットへ移植し、視細胞の生存と機能維持に成功している（57）。また、ヒト ES 細胞由来網膜細胞の色素変性モデルマウスへの移植に成功している（58）。さらに、Hirami ら（59）は、ヒト iPS 細胞からも ES 細胞の場合と遜色ない効率で、網膜細胞への分化誘導することができたことを報告している。Kamao ら（60）は、ヒト iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞シートが、生体の RPE 細胞と同じ特性を持ち、その細胞に造腫瘍性がなかったことを示している。さらに、2014 年 9 月には、網膜再生医療研究開発プロジェクトの高橋政代プロジェクトリーダーは、世界で初めて滲出型加齢性黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植に関する臨床研究を実施した。さらに、同研究グループは、移植から 1 年後に重篤な有害事象が生じていないことを公表しており、iPS 細胞を用いた再生医療の実現化は近いといえる。

成熟 RPE 細胞は、敷石状の形態を示すことから、細胞の形態を維持するために、集密的な

条件下で培養する。図 2 に示されるように、RPE 細胞の成熟化が進むと、N-カドヘリンに基づく細胞間接着の形成が進むとともに、細胞の上端側でタイトジャンクションを形成する (61, 62) 。そのタイトジャンクションの形成が、細胞の上端側での Na^+ , K^+ -ATPase の局在をもたらし、色素沈着に関連する RPE65 や Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) の遺伝子発現を増加する (63) 。このようなことから、RPE 細胞は、集密的な条件下で培養する (64, 65) 。しかしながら、Vugler ら (66) は、RPE 特異的分化マーカーを用いて調べたところ、集密的な条件下の ES 細胞由来のヒト RPE 細胞の分化状態が不均一であることを報告している。これらのことから、集密的な条件下で培養した時の細胞の特性を時空間的に理解する必要があり、取得したデータは、効率的な培養手法の改良や開発につながると考えた。

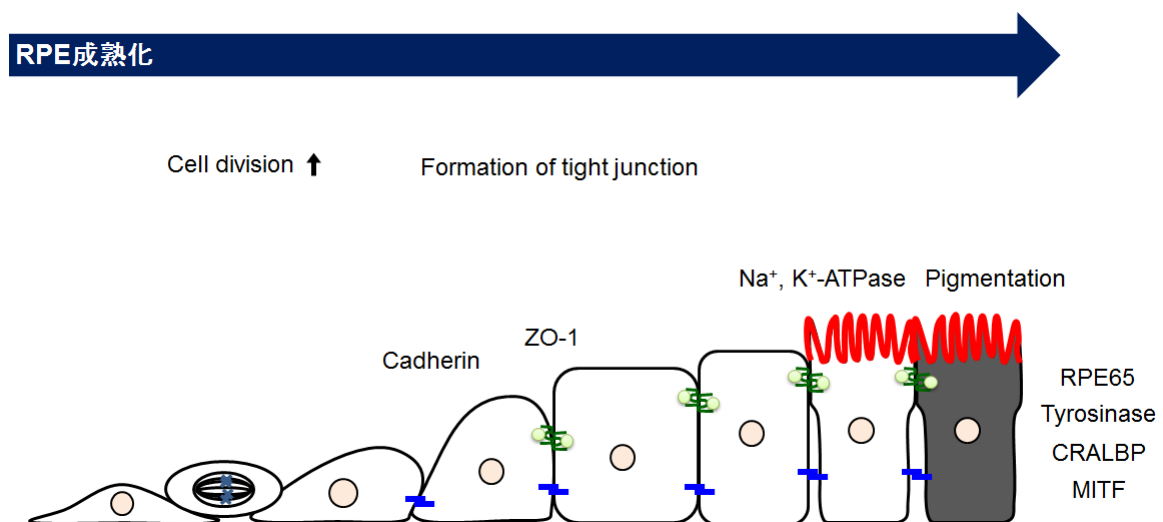


図 2. 成熟化における RPE 細胞の分化マーカー

1-6. 本研究の目的

本研究では, RPE 細胞を集密的な条件下で培養し, その細胞の形態や挙動の変化を調べた. さらに, その解析データに基づいて成熟化における動きのメカニズムを理解し, 動きを介して RPE 細胞の成熟化を促進させることを目的とした. 図 3 と 4 に, 博士課程での本研究の枠組みと概略図を示した.

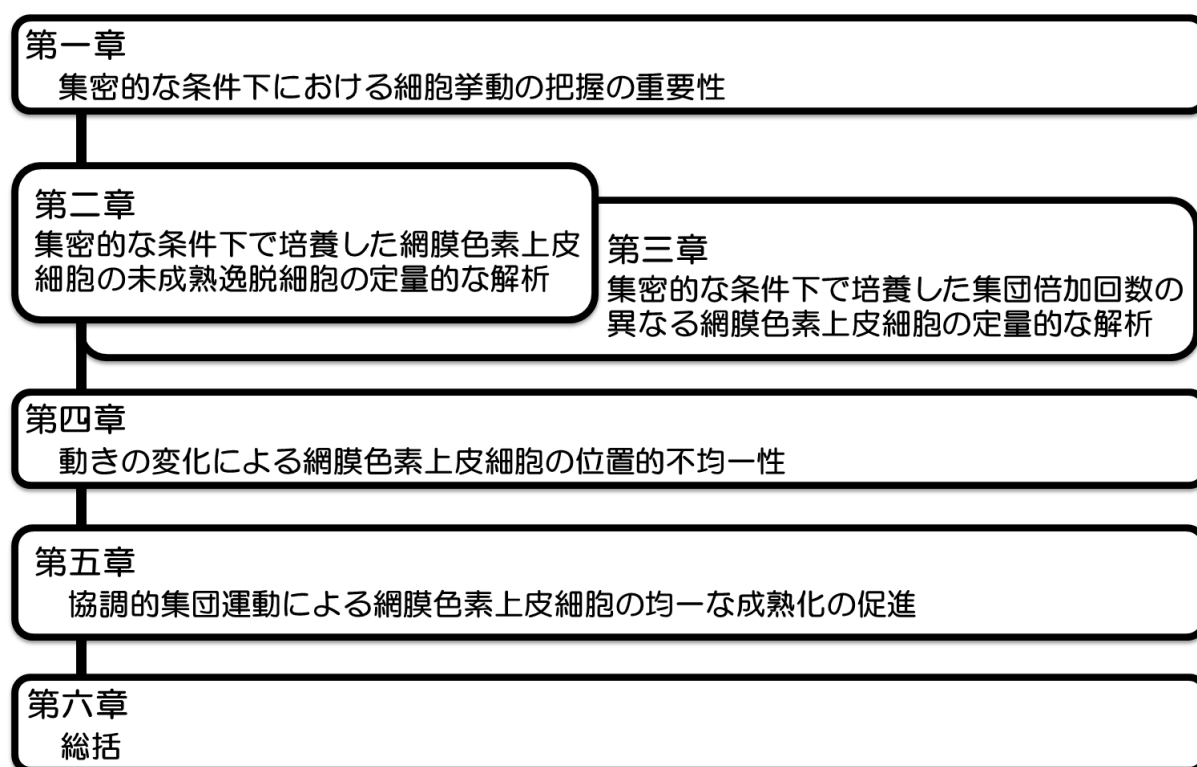


図 3. 本研究の枠組み

第 1 章では, 細胞－基質間接着と細胞－細胞間接着の連携機序を論述し, 集密的な培養条件下で培養した細胞の動きを時空間的に評価することの重要性を示し, 本研究の方針を述べた.

第 2 章では, 集密的に培養した RPE 細胞の形態学的な特徴を時間的に把握するために, タイトジャンクションタンパク質である ZO-1 と細胞核の染色画像を解析し, 未成熟逸脱細胞を定量的に評価した. その結果, 未成熟状態から成熟状態になるためには, 単層状態を維持し

たまま、集密的になることが重要であることを示した。

第 3 章では、異なる集団倍加回数を示す細胞を集密的に培養し、細胞形態観察後に ZO-1 と細胞核の免疫染色画像を取得した。継代培養した細胞は、4 つの形態学的な特徴を示し、その形態学的な特徴を示す細胞は、異なる核密度と面積を示すことがわかった。そこで、核密度と面積を測定し、そのデータに基づいて継代培養した RPE 細胞の運命を論じた。

第 2 章と第 3 章の結果から、培養環境が、RPE 細胞の成熟化に影響を及ぼすことを定量的に示した。

第 4 章では、集密的に培養した RPE 細胞の成熟化における挙動を把握するために、容器中心と端領域の細胞のタイムラプス観察と ZO-1 染色を同じ箇所で行い、個々の細胞の遊走速度と成熟度を比較した。その結果から、細胞の動きが、RPE 細胞の成熟化に影響を及ぼす重要な因子であること、そして、細胞の動きが、RPE 細胞の位置的不均一な成熟化を引き起こすことを示した。

第 5 章では、成熟化に伴って変化する動きを特徴づけし、RPE 細胞の成熟化のメカニズムを個々および集団のレベルで論じた。未成熟細胞の動きは、活発な遊走を示したのに対して、成熟細胞の動きは、協調的集団運動と中心方向を示す協調的集団運動を示した。さらに、遊走を阻害したところ、協調的集団運動から中心方向を示す協調的集団運動へ動きが変化し、均一に成熟化を促進できることがわかった。

第 6 章では、本論文の総括および本研究の展望と課題について述べた。

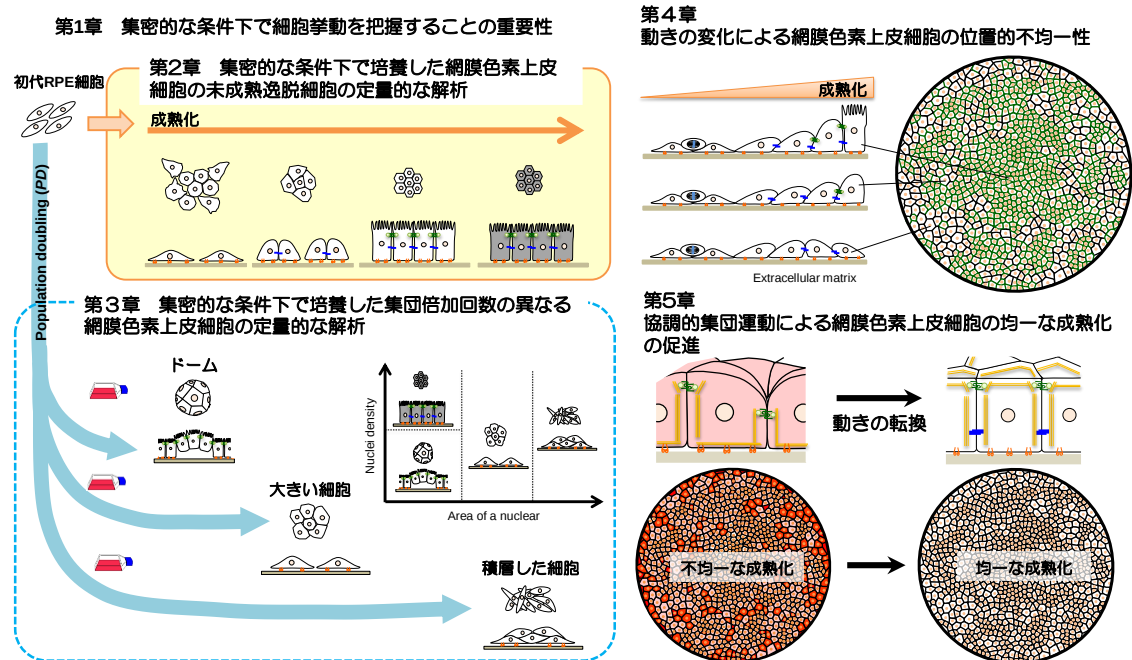


図 4. 本研究の概略図

第 2 章 集密的な条件下で培養した網膜色素上皮細胞の未成熟逸脱細胞の定量的な解析

2-1. 緒言

上皮細胞では，細胞間接着の形成及び維持のプロセスにおいて，細胞－細胞間接着と細胞－基質間接着様式の可逆的な変換が起こる（67, 68）．例えば，細胞－細胞間接着に基づく細胞同士の結合を維持した運動様式から細胞－基質間接着に基づく運動様式に転換し，その挙動に伴って上皮系から間葉系の形質に変化することが知られている（69）．この過程は，上皮－間充織形質転換（epithelial-mesenchymal transition: EMT）と呼ばれるのに対して，上皮組織の再構成に至る過程は，間充織－上皮形質転換（mesenchymal-epithelial transition: MET）と呼ばれている．このように，細胞接着様式は，細胞の形質を維持するために重要であるといえる．これまでに，上皮細胞では，ECM の種類や細胞間接着の形成状態に応じて細胞の形態や分化状態が変化することが報告されており，細胞の分化状態は，細胞－細胞間接着と細胞－基質間接着の相互作用に基づく生物学的な分子メカニズムを介して制御されることが示されてきた（70–78）．Palchesko ら（79）は，ラミニンが，インテグリンを介して EMT を阻害することを示している．これらのことから，ラミニンをコートした培養面上で細胞を培養すると，上皮細胞の形質を維持できる可能性が高いと考えられた．

第 1 章で述べたように，培養中の細胞形態の変化を解析することは，集密的な状態下で培養した細胞の成熟化に対して定量的な理解を導く．RPE 細胞は，緊密な敷石状の形態を維持するために，集密的な条件下で培養することから，細胞－細胞間接着と細胞－基質間接着の相互作用によって，細胞の形質が制御されていると考えられる．しかしながら，RPE 細胞の成熟化と細胞形態変化の関係に関する報告は少なく，形態学的な変化に着目した RPE 細胞の成熟状態を定量的に評価するための解析手法に関する報告も少ない．そこで，本研究では，集密的な培養条件下でヒト不死化 RPE 細胞を培養し，細胞形態の変化に基づいて，成熟化の初期段階の時間依存的な特性を定量的に理解することを試みた．

2-2. 実験材料・方法

2-2-1. ヒト不死化 RPE 細胞の培養条件

不死化遺伝子である SV40 ラージ抗原を導入したヒト不死化 RPE 細胞 (h1RPE; European collection of Animal Cell Culture, Porton Down, UK) は, 8 ウェルプレート (culture area in each vessel: 10.5 cm²; Corning Constar, Cambridge, MA, U.S.A.) の培養面にラミニン (laminin-1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) をコートし, 5.0 × 10⁴ cells/cm² になるように播種した. ラミニンでコートした培養面は, 8 ウェルプレートの底面に 2 μg/cm² になるように準備した. Ham's F-10, 非働化した 20% ウシ血清 (GIBCO Life Technologies), 2 mM L-グルタミン (GIBCO Life Technologies), 100 units/mL ストレプトマイシン (GIBCO Life Technologies), アンホテリシン B (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を含む培地を用いてこの細胞を培養した. 播種後 5 日間, 加湿した 37 °C, 5%CO₂ インキュベータでその細胞を培養し, 2 日毎に培地を交換した.

2-2-2. ZO-1 と細胞核の染色

RPE 細胞の成熟度を調べるために, ZO-1 と細胞核の免疫染色を実施した. PBS で洗浄後, 4 °C で 15 分間 4%パラホルムアルデヒドによって細胞を固定化し, 0.2% Triton X-100 で 5 分間インキュベートすることで透過処理した. 細胞は, ブロックエース (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka) を用いて 1 時間ブロッキングし, 4 °C で抗ウサギ ZO-1 抗体 (1:50, Abcam, Cambridge, MA, UK) を用いて一晩処理した. Tris-buffered saline (TBS, DAKO, Glostrup, Denmark) での洗浄後, 細胞は, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.) を用いて 1 時間インキュベートした. TBS で洗浄後, PBS で 50 倍希釈した 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Life Technologies Corporation) を用いて, 室温で 20 分間インキュベートし, 細胞核を染色した. その ZO-1 と細胞核の染色画像は, 画像分析機器 (IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) の 10 倍の対物レンズで撮影し, ZO-1 と DAPI の蛍光強度は, 488 nm と 358 nm の励起波長から得た. その画像 (1.83 pixels/μm² の解像度で 16 ビットグレースケール, 1.5 mm × 1.5 mm) は, 8 ウ

エルプレート の 3 ヶ所 から取得した。

2-3. 結果

2-3-1. RPE 細胞の成熟化における形態学的な特性

RPE 細胞の成熟化における形態学的な変化を明らかにするために、RPE 細胞は、ラミニンをコートしていない培養面とコートした培養面で集密的に培養した。ラミニンをコートした培養面上の RPE 細胞は、培養 7 日目で、伸展した細胞形態を示した。培養経過とともに、単層状態を維持しながら、細胞のサイズは小さくなった。培養 21 日目の高密度で集密的な領域では、緊密な敷石状の形態を示す細胞が観察された一方、同じ領域内で、伸展した形態を示し、積層している細胞が観察された。ラミニンをコートしていない面上で培養した RPE 細胞は、培養 21 日目まで、伸展した細胞形態を示し、ラミニンをコートした培養面で上の細胞と比較して、積層している領域が多いことがわかった。

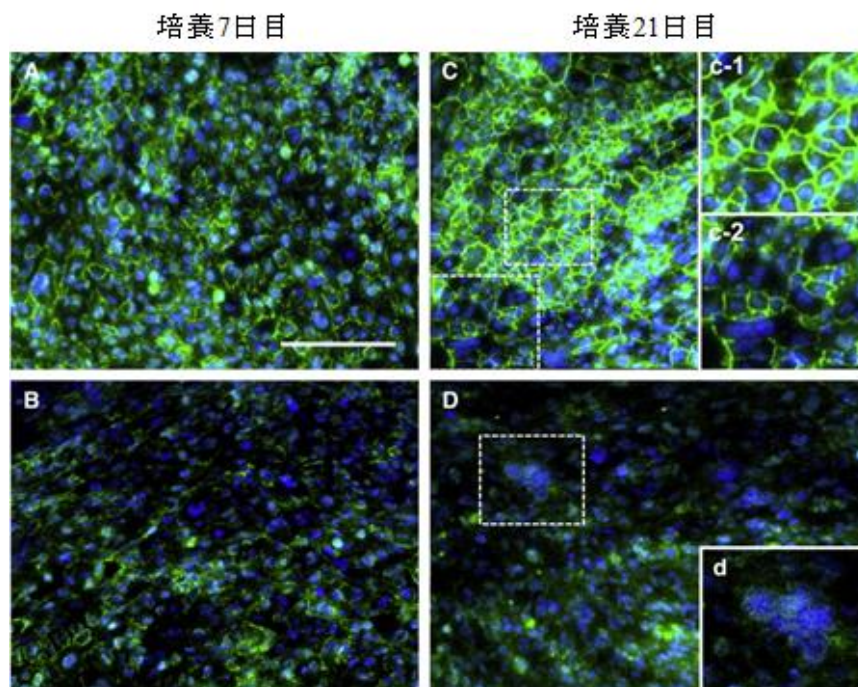


図 5. ラミニンコートした培養面 (A, C) とコートしていない培養面 (B, D) で培養した RPE 細胞の核 (DAPI, blue) タイトジャンクション (ZO-1, green) の免疫染色画像. c-1 及び c-2 と d は、C と D 内の点線領域の拡大図. スケールバー : 50 μm .

RPE 細胞の成熟度を調べるために、培養 7 日目と 21 日目のタイトジャンクションタンパク質である ZO-1 と細胞核の免疫染色をおこなった (図 5). ラミニンをコートしていない培養

面上の細胞と比較して、ラミニンをコートした培養面上の細胞の ZO-1 の発現は、顕著であり、その ZO-1 は、細胞膜状に局在していた。さらに、培養 21 日目では、ラミニンをコートした培養面上の細胞は、積層していない高密度の領域で、ZO-1 が線状に局在していたが、ラミニンをコートしていない培養面上の細胞は、積層していない高密度な領域はほとんど観察されず、ZO-1 の発現も観察されなかった。

2-3-2. 核密度に基づく成熟化の定量的な解析

RPE 細胞の成熟化における形態学的な変化を示す核密度に着目し、核密度に基づく未成熟逸脱細胞を定量的に評価するための手法を構築した (図 6)。In Cell Analyzer 2000 によって得られた核染色画像から $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 四方の正方形の画像を切り抜き、その画像をさらに 5×5 の 25 マスに分割した。これによってできた $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$ の正方形の画像を『ローカルスクエア』と定義し、1 画像につき 25 個ある『ローカルスクエア』ごとに核密度を求めた。この手法により、画像全体の核密度ではなく画像中の局所的な核密度を求め、各『ローカルスクエア』の核密度を求めた。『積層しているローカルスクエア』または『積層していないローカルスクエア』を決定するために、積層している細胞核数を算出し、1 画像につき 25 個の『ローカルスクエア』に対して『積層しているローカルスクエア』の割合を算出した。その積層率の分布から、50%を積層率の閾値 (R_0) とし、積層率が 50%以下を『積層していないローカルスクエア』と定義した。各ローカルスクエアの核密度 (X_d) を算出し、核密度に対する『ローカルスクエア』の頻度 (f_x) を算出した。

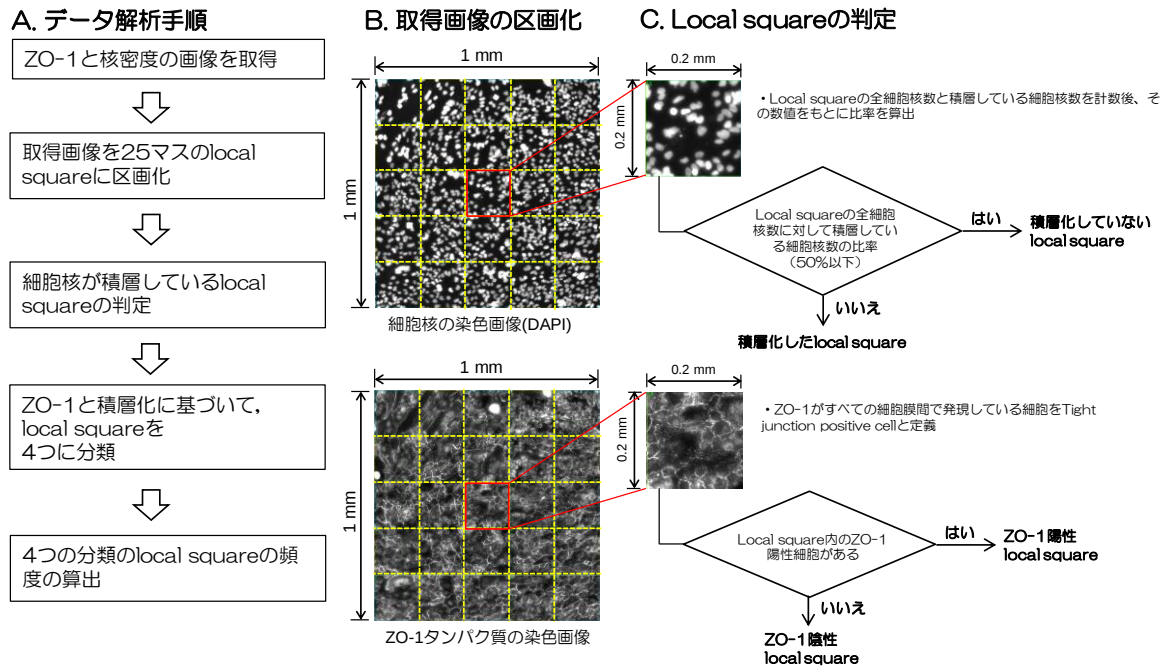


図 6. 集密的な培養条件下で培養した細胞の未成熟状態を逸脱したローカルスクエアを判定するための解析手順

(A) 全体の解析手順, (B) 取得した染色画像のローカルスクエア, (C) タイト Junctionと積層したローカルスクエアの判定基準

核染色をした同じ領域で撮影した ZO-1 の染色画像を用いて、『ZO-1 陽性細胞』と『ZO-1 陰性細胞』を定義した. 細胞膜に ZO-1 が局在し, 連続的に ZO-1 の線で囲まれている細胞を『ZO-1 陽性細胞』と定義し, そして, 連続的に ZO-1 の線で囲まれていない細胞を『ZO-1 陰性細胞』とした. その ZO-1 陽性細胞を 1 つ含むローカルスクエアの頻度を『ZO-1 陽性ローカルスクエア』として定義した. これらのデータは, 1 容器内の 3 ヶ所から無作為に選び, 3 つの容器から取得した.

2-3-3. 未成熟を逸脱した細胞の定量的な評価

未成熟逸脱細胞の程度を定量的に評価するために, 図 6 に示される核密度と ZO-1 の染色画像を用いた解析手法を構築し, その構築した評価手法を用いて, ラミニンをコートしていない, または, ラミニンをコートした培養面で培養した細胞の成熟度を調べた.

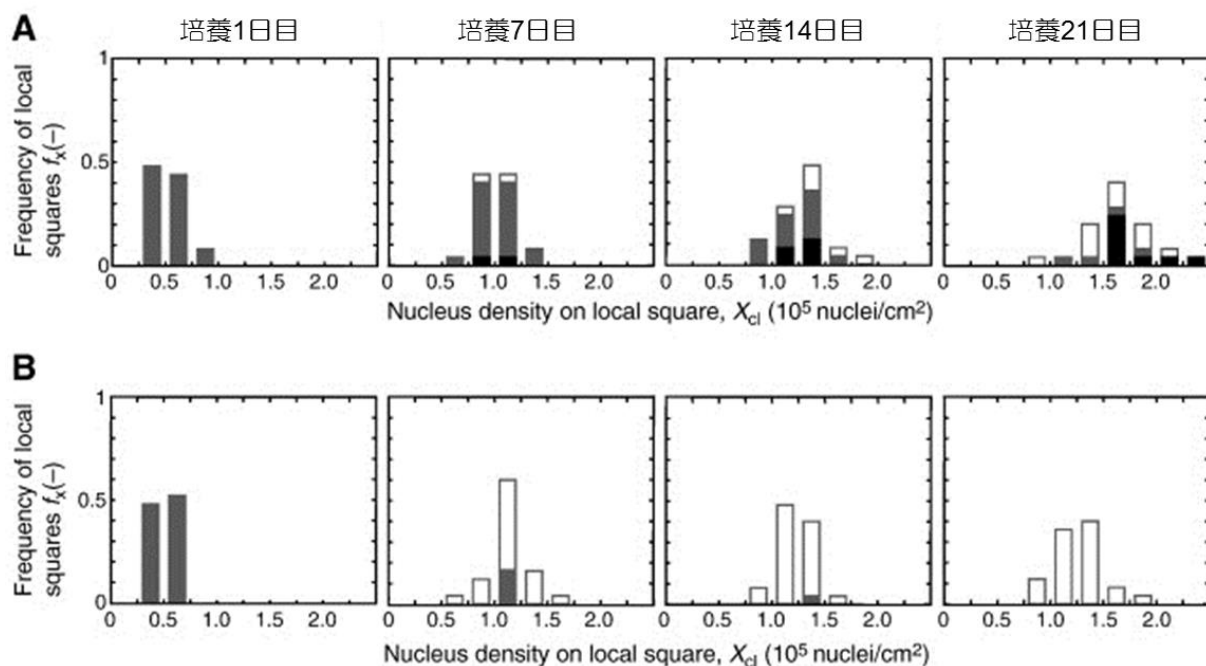


図7. ラミニンコートした培養面(A) と (B)ラミニンをコートしていない培養面上で培養したローカルスクエアの核密度 (X_d) に対する細胞の頻度. (□: ZO-1 陰性かつ積層したローカルスクエア, ■: ZO-1 陽性かつ積層したローカルスクエア, □: ZO-1 陰性かつ積層していないローカルスクエア, ■: ZO-1 陽性かつ積層していないローカルスクエア.)

図7に示されるように、ラミニンをコートした培養面上の細胞は、培養7日目で X_d は、 $X_d = 1.0 \times 10^5 \text{ nuclei/cm}^2$ 以下の値を示した。培養経過とともに、 X_d は、幅広い分布を示し、培養21日目で $X_d = 0.75 \times 10^5 \text{ nuclei/cm}^2$ から $X_d = 2.5 \times 10^5 \text{ nuclei/cm}^2$ の高密度の範囲に分布した。培養21日目のラミニン面上での培養では、『積層していないローカルスクエア』は、総ローカルスクエア数の52%であった一方、ラミニンをコートしていない面上での培養では、『積層しているローカルスクエア』のみであった。『ZO-1 陽性ローカルスクエア』は、ラミニンをコートした培養の培養7日目に出現した。培養経過とともに、『ZO-1 陽性ローカルスクエア』は増加し、培養21日目で『積層していないローカルスクエア』の69.2%が、『ZO-1 陽性ローカルスクエア』であることがわかった。一方、ラミニンをコートしていない面上で培養した細胞は、培養経過とともに『積層しているローカルスクエア』の頻度が増加し、『ZO-1 陽性ローカルスクエア』は観察されなかった。成熟化における核密度の傾向は、観察結果と一致していたことから、核密度に基づく評価手法は、タイトジャンクションの形成を定量的

に評価でき、集密的な条件下で単層状態を維持することが、成熟するために必要であると考えられた。

2-4. 考察

本研究では、RPE 細胞の成熟度を定量的に評価するために、ラミニンをコートしていない培養面とコートした培養面上で集密的に RPE 細胞を培養し、未成熟逸脱細胞を定量的に評価した。その結果、ラミニンをコートしていない培養面上の細胞は、伸長した形態を示し、積層していることがわかった。一方、ラミニンをコートした培養面上の細胞は、単層状態で敷石状の形態を示すことがわかった。これまでに、未成熟 RPE 細胞の基底膜側では、フィブロネクチンが堆積し、伸長した形態を示すことがわかっている (79, 80)。このとき、フィブロネクチンに結合した未成熟 RPE 細胞のインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介して、Protein Kinase C α (PKC α)、Rho family の Rac1, Cdc42, RhoA の活性化を導くことが知られている (81–84)。この Rho family の Rac1, RhoA や Cdc42 の活性化が、細胞骨格や足場タンパク質の形成及び張力を制御し、細胞挙動に影響を及ぼすことが報告されている (85, 86)。一方、成熟した RPE 細胞では、ZO-1 が、細胞膜上に局在し、その細胞の基底膜側では、フィブロネクチンではなく、パールカンやマイクロフィブリルのような ECM を堆積していることが報告されている (87)。これらのことから、成熟度の違いにより、RPE 細胞の基底膜側の ECM の組成が異なることが推測され、培養環境が細胞の成熟化に影響を及ぼすと考えられた。さらに、これらの文献から、ラミニンをコートした培養面上の細胞は、インテグリンを介した細胞–基質間接着と細胞–細胞間接着の相互作用の結果、成熟することができたと推定された。以上の点から、集密的な条件下で単層状態を維持できる環境が、RPE 細胞が成熟化するために重要であると考えた。

第 3 章 集密的な条件下で培養した集団倍加回数の異なる網膜色素上皮

細胞の定量的な解析

3-1. 緒言

継代を重ねると、RPE 細胞は、RPE 特異的な特性を失い、異なる特性を生じることが知られている。McKay ら (88) は、継代培養した RPE 細胞を集密的な条件下で培養したとき、敷石状、線維芽状、伸長した形態を示す細胞やドーム状の形態を示す細胞が生じ、線維芽状や伸長した細胞形態を示す細胞は、RPE 分化マーカーが発現していないことを示している。継代培養した細胞の形態学的な特徴を把握することは、細胞特性の定量的な理解を導き、その取得したデータは、成熟化を達成するための効率的な培養手法の改善につながる。しかしながら、継代培養した細胞の特性の不均一性を定量的に評価するための手法に関する報告は少ない (89)。

第 1 章で述べたように、培養した RPE 細胞は、PCR 法、免疫染色法や経内皮電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance: TER) 法を用いて、RPE 関連遺伝子発現量、合成量やバリア機能を調べることで、細胞の分化状態や機能を評価する (33-44)。さらに、PCR 法や TER 法などの評価手法から取得したデータは、容器内の細胞の平均的な情報である一方、免疫染色から取得したデータは、1 細胞レベルでの細胞の情報をもたらす。前章では、均質な細胞集団を異なる培養面で集密的に培養し、核密度に基づいて定量的に未成熟逸脱細胞を評価した (90)。その結果は、高密度の状態を維持できる培養環境が、成熟化に重要であることを示唆した。本研究では、継代を重ねた不均質な細胞集団を集密的な条件下で培養し、細胞の形態学的な特徴に基づいて細胞の運命を理解することを目的とした。

3-2. 実験材料および方法

3-2-1. 集団倍加回数に対する細胞の準備

正常ヒト RPE 細胞 (Lot no. 0F3292; Lonza Walkersville, MD, U.S.A..) は、以下の手順で準備した。2%FBS を含む培地を 0.2 mL/cm^2 になるように T-25 フラスコ (Nunc, Roskilde, Denmark) に加え、加湿した 37°C , $5\%\text{CO}_2$ インキュベータ内で 30 分間血清コートした後、 $1.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ になるように播種し、増殖培地を用いて前培養を行った。その培地交換は、2 日毎に行われ、80%コンフルエントに達したときにその細胞を継代した。

既報の手法 (91, 92) に従って、前培養の播種後 24 時間後に、 PD 値を算出するために、位相差顕微鏡の対物レンズ (4 倍) で細胞を撮影し、画像を取得した。その細胞写真から、培養容器内の培養面に接着した全細胞数 n_c を算出した。さらに、培養最終日に 0.1% トリプシン / 0.02% EDTA で剥離した細胞を、トリパンブルーと顕微鏡を用いて血球計算盤上の生細胞数を測定し、全生細胞数を培養面積で除算した値 $n_c + \Delta n_c$ を算出した。これらの数値を用いて、集団倍加回数 (population doubling, 以下 PD) を、以下のように定義した。

$$\Delta PD = \log_2 \left(\frac{n_c + \Delta n_c}{n_c} \right)$$

初代培養で播種後 24 時間以内に接着した生細胞を $PD = 0$ と定義し、累積集団倍加回数は、それぞれの前培養の ΔPD 値の総計を PD 値とした。

3-2-2. 異なる PD を持つ細胞の集密的な培養

PD 値が異なる細胞の集密的な培養は、以下の通りに実施した。48 ウェルプレート (culture area in each vessel: 0.95 cm^2 ; Corning Costar, Cambridge, MA, U.S.A.) の培養面にラミニン (laminin-1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) をコートし、前培養で準備した細胞を $5.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ になるように播種した。ラミニンコートした培養面は、48 ウェルプレートの底面に $2 \mu\text{g/cm}^2$ になるように準備した。その細胞は、播種後 28 日間、加湿した 37°C , $5\%\text{CO}_2$ インキュベータで本培養し、その培地は、2 日毎に交換した。

3-2-3. 免疫蛍光染色

継代を重ねた RPE 細胞の形態学的な違いに対する特性を調べるために、ZO-1, Na⁺, K⁺-ATPase, ZO-1 と細胞核の免疫染色をおこなった。培養した RPE 細胞は、PBS で洗浄し、4 °C で 15 分間 4%パラホルムアルデヒドによって固定化し、0.2% Triton X-100 で 5 分間インキュベートすることで透過処理した。細胞は、ブロックエース (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka, Japan) を用いて 1 時間ブロッキングし、4 °C で抗ウサギ ZO-1 抗体 (1:50, Abcam, Cambridge, MA, UK) を用いて一晩処理した。それを Tris-buffered saline (TBS, DAKO, Glostrup, Denmark) に 20 分間浸して洗浄した後、その細胞は、Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.) を用いて、室温で 1 時間インキュベートした。TBS で洗浄後、抗マウス Beta Sodium Potassium ATPase 抗体 (1:100, Abcam, Cambridge, MA, UK) を用いて 4 °C で一晩処理した。TBS で洗浄後、細胞は、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:200, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.) を用いて 1 時間室温でインキュベートした。TBS で洗浄した後、その細胞を Rhodamine phalloidin (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.) を含む溶液に室温で 1 時間浸し、F-actin を染色した。PBS で 500 倍希釈した 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.) を用いて、室温で 20 分間インキュベートし、細胞核を染色した。その ZO-1 と細胞核の染色画像は、画像分析機器 (IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) の 20 倍の対物レンズで撮影し、ZO-1, Na⁺, K⁺-ATPase と DAPI の蛍光強度は、それぞれ 488 nm と 358 nm の励起波長から得た。ZO-1, Na⁺, K⁺-ATPase と DAPI の Z 軸方向の観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (model FV-1000; Olympus, Tokyo, Japan) を用いておこなった。

3-2-4. 核密度と面積に基づく解析

継代培養した細胞の形態学的な特徴に基づいて特性を分類するために、同じ場所で撮影した ZO-1 と細胞核の染色画像を IN Cell Analyzer 2000 の 20 倍の対物レンズを使って撮影し、その 4 つのタイプに対する核密度と面積を測定した。細胞核および ZO-1 染色画像 (7.3

pixels/ μm^2 の解像度で8ビットグレースケール, 0.8 mm $\times$ 0.8 mm) は, 1 容器内の3ヶ所から無作為に選択し, 3つの容器から取得した. 画像解析ソフトウェア Image Pro Plus (Media Cybernetics, Washington, MD, U.S.A.) と gui-v3.exe (release 4) を用いて, 取得した画像を処理した. I と II 型を示す細胞の核密度と面積に基づいた閾値と III と IV 型を示す細胞の核密度と面積に基づいた閾値は, $PD = 5.6$ と 10.1 の染色画像から決定し, そのデータは, 500–700 個の細胞から取得した.

3-3. 結果

3-3-1. RPE 細胞の形態学的な特性

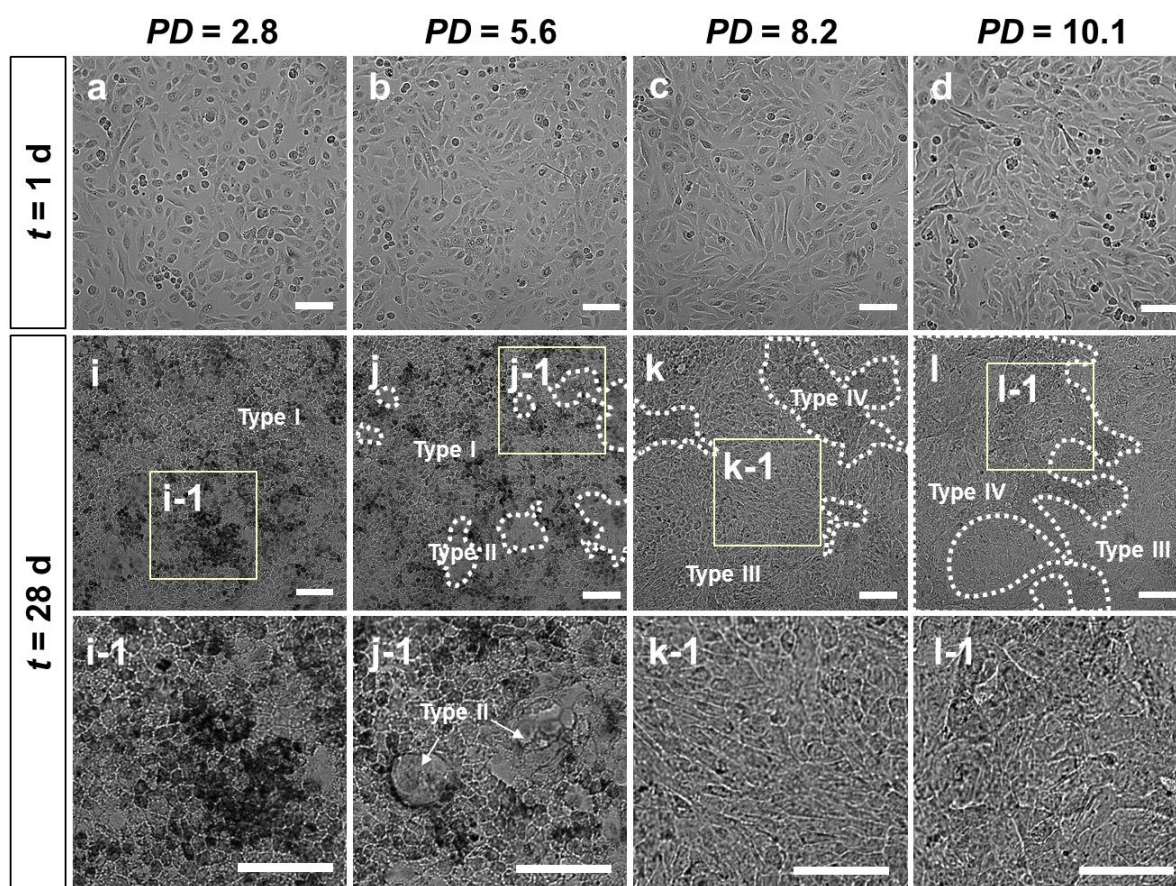


図 8. 培養 1 日目と培養 8 日目での $PD = 2.8, 5.6, 8.2, 10.1$ の明視野画像.i-1, j-1, k-1, l-1 は, i-1 内の四角で囲まれた領域の拡大図.

スケールバー : 100 μm .

継代した RPE 細胞の形態学的な特徴を把握するために, それぞれ $PD = 2.8, 5.6, 8.2, 10.1$ を示す細胞をラミニンコートした培養面上で集密的に 28 日間培養し, タイムラプス観察をお

こなった (図 8). $PD = 2.8-5.6$ の細胞を集密的な状態下で培養すると、細胞が小さくなりながら、高密度に敷石状の形態を示す、I 型の細胞が出現し、その細胞は、最終的に色素沈着を呈した. $PD = 5.6$ では、培養 7 日目以降に焦点の合わない細胞、II 型の細胞が出現しはじめ、培養経過とともに、ドームの形成と崩壊を繰り返した. $PD = 8.2$ 以降の細胞は、 $PD = 5.6$ までの細胞と比較して、集密的な状態に遅れて達し、その細胞の面積は、大きい値を示した (III 型). 培養 10 日目では、大きい細胞だけでなく積層を示す、IV 型の細胞が出現しはじめ、その細胞は、 $PD = 10.1$ で最も多く観察された.

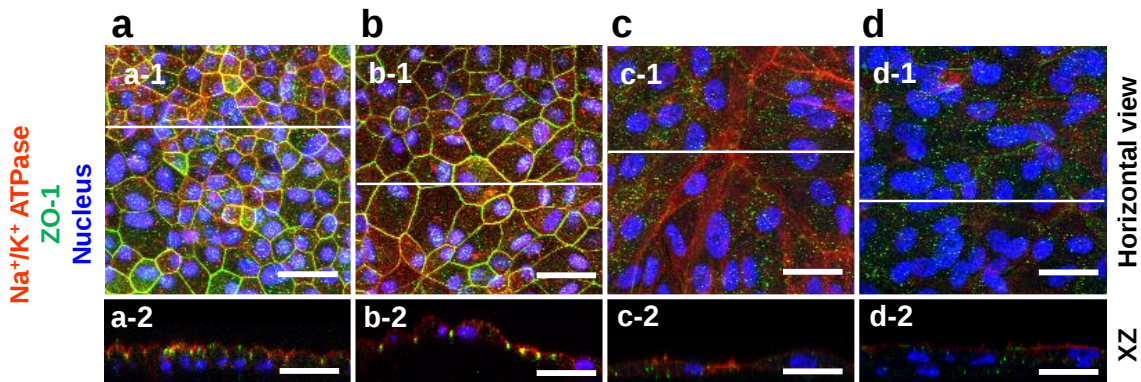


図 9. (a)I 型, (b)II 型, (c)III 型, (d)IV 型の細胞核 (DAPI, blue) とタイトジャンクション (ZO-1, green), Na^+ , K^+ -ATPase (Beta Na^+ , K^+ -ATPase, red) の染色画像. (a-1, b-1, c-1, d-1 : 水平方向の染色画像, a-2, b-2, c-2, d-2 : 白線の垂直方向の染色画像, スケールバー : $100 \mu\text{m}$)

各タイプの細胞の特性を理解するために、各タイプを示す細胞に対して、ポンプ機能を示す Na^+ , K^+ -ATPase, ZO-1 と細胞核を免疫染色し、その細胞の特徴づけを行った (図 9). 図 9 に示されるように、I 型の細胞核は、単層かつ緊密に分布し、その細胞の上端側に ZO-1 と Na^+ , K^+ -ATPase が局在していた. II も I 型の細胞と同様に、細胞の上端側に ZO-1 と Na^+ , K^+ -ATPase が局在していたが、その細胞は、培養面から脱離していた. III 型の細胞では、細胞核が大きく、 Na^+ , K^+ -ATPase が細胞質全体に局在し、ZO-1 の発現は陰性であった. IV 型の細胞では、細胞核が積層し、ZO-1 と Na^+ , K^+ -ATPase の発現は陰性であった.

3-3-2. 核密度と面積に基づく形態学的な特性の定量的な解析

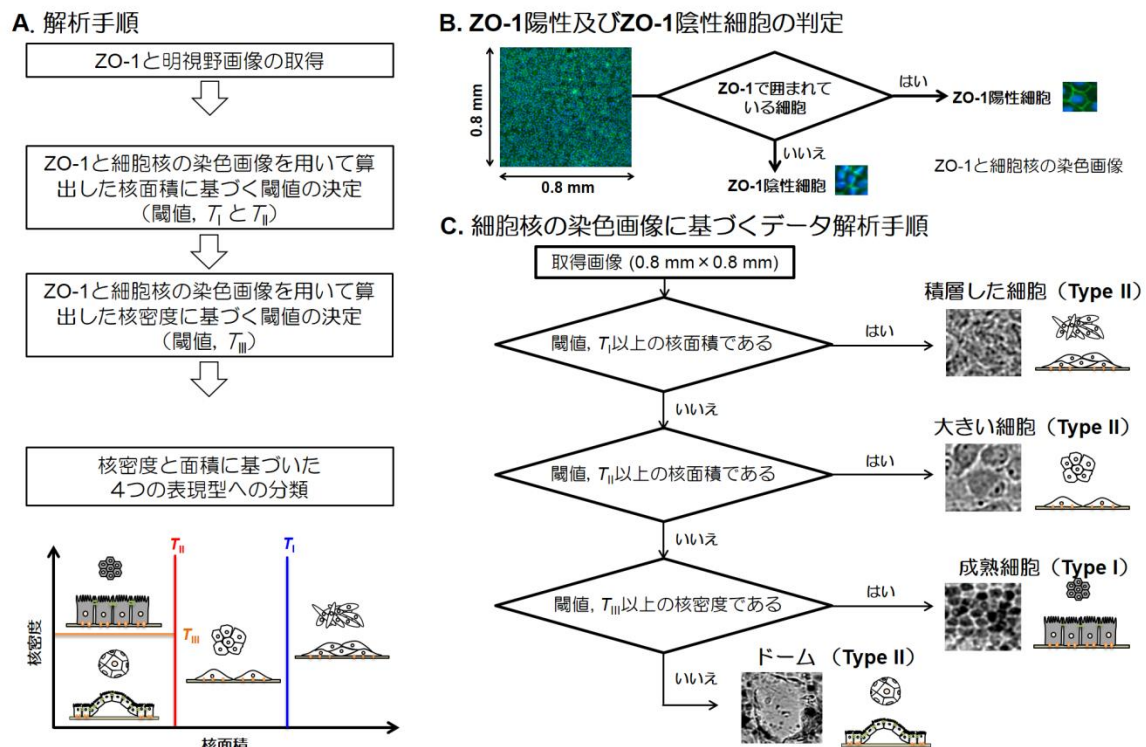


図 10. 細胞核の密度と面積に基づいて，Type I-IV に分類するための解析手順

RPE 細胞の形態学的な特徴に基づいて分類された 4 つのタイプを定量的に評価するために，細胞核の面積 (A_N) と密度 (X_N) を測定し，解析した (図 10)．図 10A の解析手順に従って，核密度と面積のデータ解析を行い，4 つのタイプを分類するための閾値を決定した．I と II 型を示す細胞の核密度と面積に基づいた閾値 (T_{II}) と III と IV 型を示す細胞の核密度と面積に基づいた閾値 (T_I) は， $PD = 5.6$ と 10.1 の染色画像から決定し，そのデータは，500–700 個の細胞から取得した．III 型を示す細胞核の面積の平均値に 2 倍の標準偏差を加算した値を III と IV 型の細胞の閾値 (T_I) として定義し，I 型を示す細胞核の面積の平均値に 2 倍の標準偏差を加算した値を III 型と I, II 型の閾値 (T_{II}) として定義した (図 11 と 12)．さらに，I 型の核密度の平均値に 2 倍の標準偏差を減算した値を I と II 型の閾値 (T_{III}) として定義し， $T_I = 2.7 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ ， $T_{II} = 1.0 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ ， $T_{III} = 3.2 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ とした (図 11 と 12)．

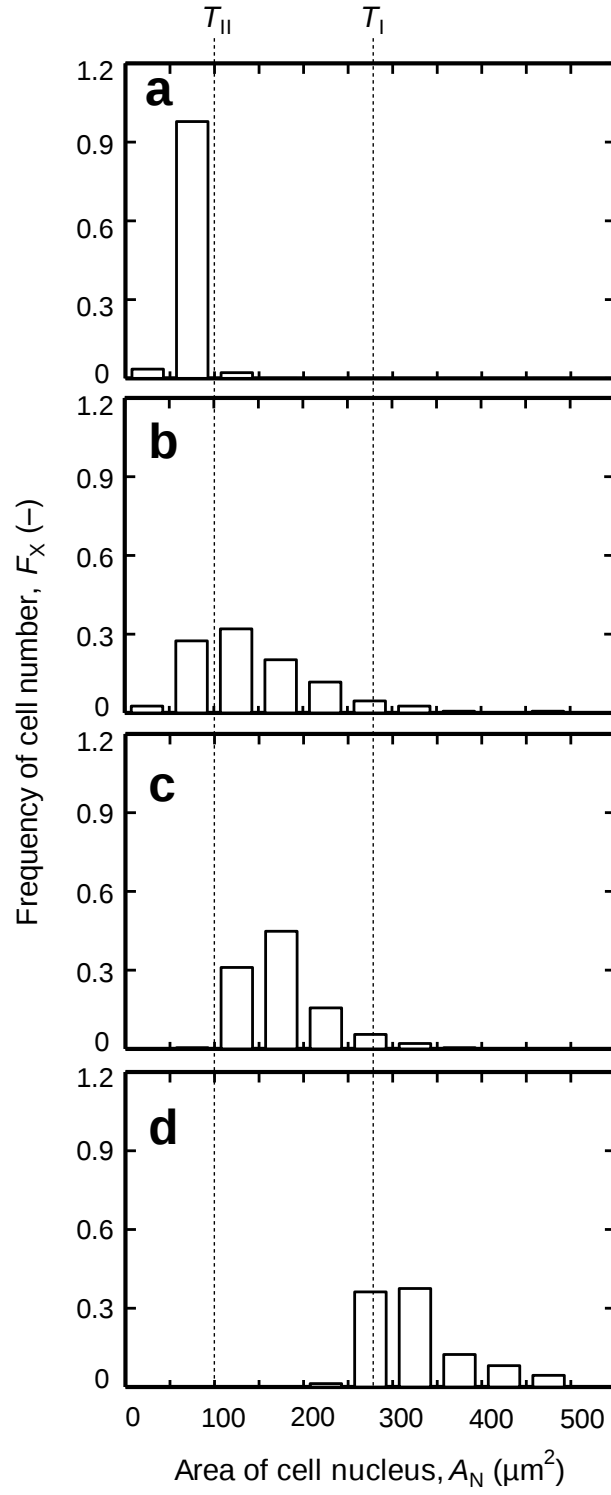


図 11. Type I (a), Type II (b), Type III (c), Type IV (d)の細胞核の面積に対する細胞の頻度. Type I and II, T_I , and T_{II} の閾値は, $PD = 5.6$ (a, b) and 10.1 (c, d)の細胞から算出した. ($n = 430-600$ 個)

次に, 図 10C に示される手順に従って, $T_I = 2.7 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ 以上の核面積を持っている細胞は, Type IV とし, $T_{II} = 1.0 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ 以上の核面積を持っている細胞を Type III とした. 細胞核の面積と密度に基づいて, $T_{III} = 3.2 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 以上の値を持っている細胞を Type I, それ以外の細胞を Type II として, 異なる PD を持つ細胞を 4 つのタイプに分類した. これらの閾値で区切られた範囲内の細胞の頻度は, 形態学的な特徴に基づいて目視で判定したときの各タイプを示す細胞の頻度と 78-98%一致した.

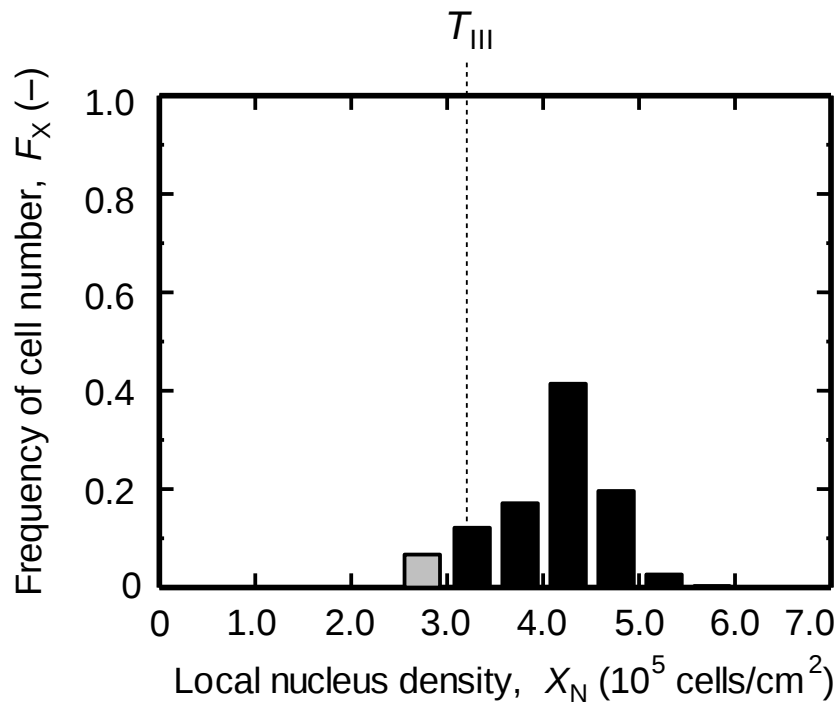


図 12. $PD = 5.6$ での type I and II の細胞の頻度. (黒 : Type I, 灰色 : Type II, $n = 500-600$ 個)

3-3-3. 異なる PD を持つ細胞の集密的培養における細胞特性の変化

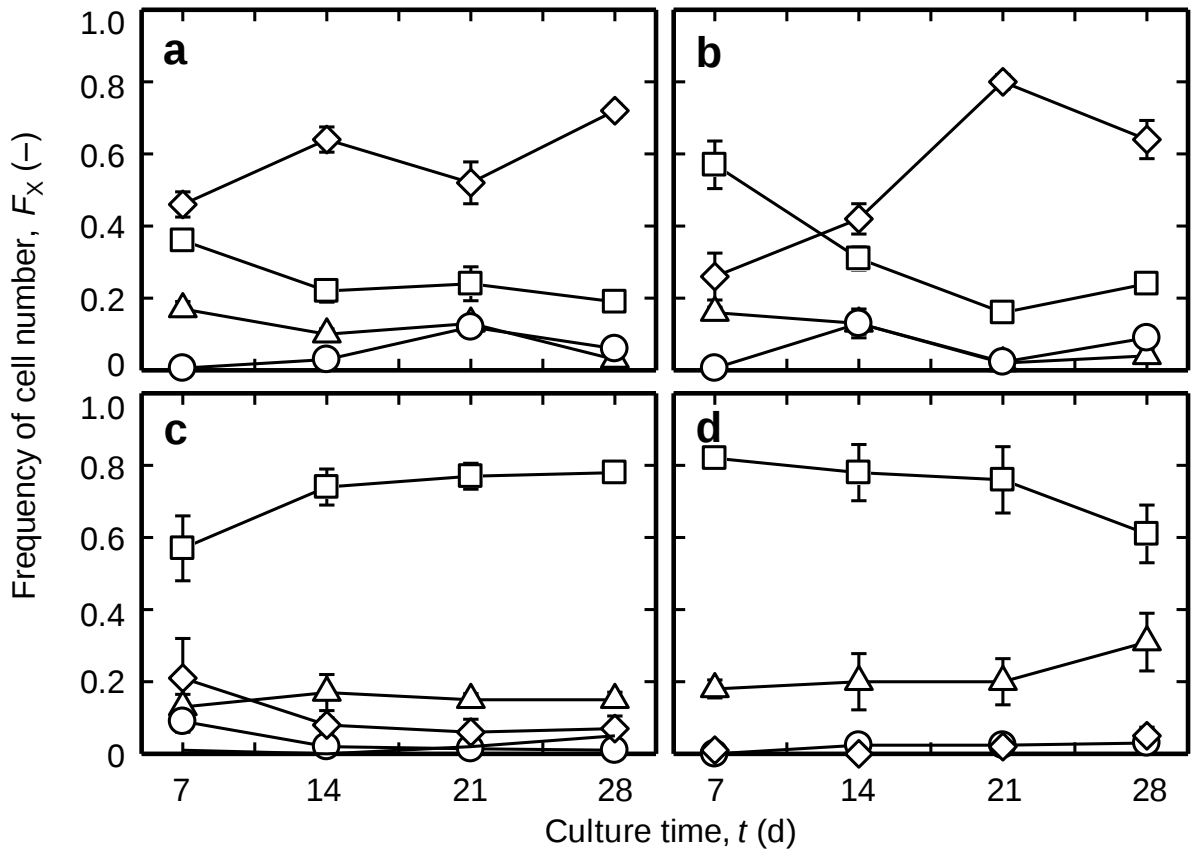


図 13. 培養 7, 14, 21, 28 日目での Type I-IV のタイプを示す細胞の頻度 ($PD = 2.8$ (a) , 5.6 (b) , 8.2 (c) と 10.1 (d), $n = 3$) ($\diamond$: Type I, $\circ$: Type II, $\square$: Type III, $\triangle$: Type IV)

図 10 に示す核密度と面積に基づく解析手法にしたがって、 $PD = 2.8, 5.6, 8.2, 10.1$ の細胞を集密的に培養したときの培養 7, 14, 21, 28 日目の各タイプの頻度を定量的に評価した。図 13 に示されるように、 $PD = 2.8-5.6$ では、培養経過とともに I 型の細胞が増加した一方、II 型の細胞の頻度は、増加と減少を繰り返した。 $PD = 5.8$ では、培養 28 日目になると、I 型の細胞が培養 21 日目の 80% まで減少した一方、II と III 型の細胞の頻度は、それぞれ、3.9 と 1.5 倍にまで増加した。 $PD = 8.2$ では、III 型の細胞が高い値を維持し、 $PD = 10.1$ においても、培養 21 日目まで III 型の細胞が最も高い頻度を示し ($F_x = 0.8$)、培養 21 から 28 日目までに III 型の細胞が減少し、それに伴って IV 型の細胞が増加した。

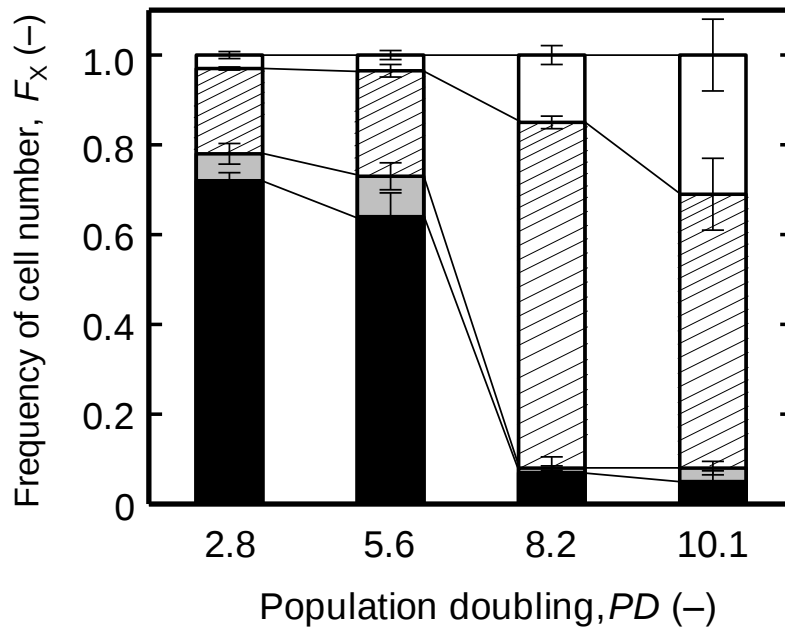


図 14. 培養 28 日目の $PD = 2.8, 5.6, 8.2$, and 10.1 での Type I-IV の頻度 ($n = 3$) . 黒 : Type I, 灰色 : Type II, 斜線 : Type III, 白 : Type IV)

$PD = 2.8$ では, I 型の細胞が最も多く, その頻度は, $F_x = 0.72$ であった. PD が増加するとともに, I 型の頻度は減少し, $PD = 10.1$ では, $F_x = 0.05$ まで減少を示した (図 14). II 型の細胞は, $PD = 5.6$ で II 型の頻度は最大となり, PD の増加とともに減少を示した. $PD = 8.2$ になると, I と II 型の細胞は, 急激に $F_x = 0.78$ から $F_x = 0.08$ まで減少した一方, III と IV 型の頻度は, $F_x = 0.92$ に達し, III 型の細胞の頻度は, $F_x = 0.77$ を示し, 最大であった. $PD = 10.1$ になると, III 型の頻度は, $PD = 8.2$ の 79%まで減少した一方, IV 型の細胞の頻度は, $PD = 8.2$ の 2 倍高い値を示した.

3-4. 考察

第1章で述べたように、細胞と細胞、細胞と細胞外マトリクス (Extracellular matrix; ECM) の相互作用が、細胞間接着、増殖、遊走などの細胞挙動や特性に影響を及ぼすことから、細胞形態や挙動の変化を通じてその特性を理解することは、培養手法の改善やメカニズムの解明につながる。これまでに、細胞挙動や形態学的な変化に着目し、定量的に評価する指標が提案されてきた (92-95)。本研究では、ヒト RPE 細胞を継代培養し、異なる集団倍加回数を持つ細胞集団を基底膜タンパク質であるラミニンをコートした培養面上で集密的に培養し、その集団を形態学的な特徴に基づいて分類した。その結果、継代培養した細胞は、敷石状の形態を示す成熟細胞 (I 型)、ドーム状の形態を示す細胞 (II 型)、大きな細胞 (III 型)、積層した細胞 (IV 型) の 4 つのタイプに分類できることがわかった。色素沈着を示す I 型の細胞は、タイトジャンクションを持つ緊密な敷石状の形態を示し (図 8 と 9)、遊走や増殖の低下を示した。II 型も I 型の細胞と同様に、タイトジャンクションを形成し、 Na^+ , K^+ -ATPase が上端側に局在していた (図 8 と 9)。しかしながら、I 型の細胞と異なり、その細胞は、膨らみながら培養面から剥離し、ドームを形成した後、色素沈着を示さなかった (図 8 と 9)。これまでに、ドーム形成に関する研究が報告されており、テロメア依存的な老化が、 Na^+ , K^+ -ATPase の活性化通じてドーム形成を引き起こすことがわかっている (96)。 Na^+ , K^+ -ATPase のリン酸化による活性化が、プロテインキナーゼ C (PKC) に関与しており、この PKC によるアクチンのリン酸化が、細胞骨格や接着点でのアクチンの再構築を導く (97, 98)。このようなメカニズムで活性化した Na^+ , K^+ -ATPase の機能上昇が、水輸送を過剰に誘導するとともに、アクチンダイナミクスを変化することで、ドーム形成を引き起こすことがわかっている (99)。したがって、老化した細胞内での PKC によるアクチンのリン酸化によって Na^+ , K^+ -ATPase の機能が向上した可能性が高く、この細胞は、アクチンダイナミクスが変化したために、細胞-細胞間接着、細胞-基質間接着とのバランスが崩れた結果、ドーム形成を引き起こしたと考えられた。PD = 8.2 になると、I と II 型を示す細胞の頻度は、PD = 5.6 の 11% まで急激に減少した一方、大きな細胞の頻度は、PD = 5.6 の 3.3 倍増加した。その大きな細胞は、タイトジャンクションを形成せず、低い増殖と活発な遊走を示した。これらの結果は、RPE 細胞は、一

定の分裂回数を超えると成熟化を達成することができないことを示している。これまでに、継代培養した RPE 細胞は、分裂回数が増加するとともに、老化を示す senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal) が増加し、増殖能が低下することが報告されている (100)。ヒト RPE 細胞は、老化にともなって、フィブロネクチンの分泌量が増加し (101, 102)、フィブロネクチンにインテグリン β 1 が結合することで、活発に遊走することが知られている (103)。したがって、III 型を示す細胞は、細胞の老化によって増殖能や成熟能を損失した段階に達したと考えられた。PD = 10.1 になると、積層した細胞が観察され、その細胞は、線維芽状に細長く伸長しながら遊走し、ZO-1 と Na⁺, K⁺-ATPase の発現は陰性を示した。これまでに、RPE 細胞は、上皮系の形質を失い、間葉系の形質を獲得するプロセス（上皮間葉転換；Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT）を経て間葉系の細胞になることがわかっている (70, 104)。RPE 細胞は、細胞間接着を損失すると、EMT を引き起こし (105)、その間葉系の形質を獲得した細胞は、Na⁺, K⁺-ATPase の発現が陰性であり (106)、増殖能と運動能を亢進することが示されている (107, 108)。その遊走性は、III 型の細胞が示したアメーバ様の遊走ではなく、間葉系のように細長く伸長した形態を示しながら活発に遊走し (109, 110)、細胞外マトリクスを過剰蓄積することによって、線維芽集塊を形成することが報告されている (111, 112)。したがって、IV 型の細胞は、未成熟を逸脱し、EMT を経て上皮系から間葉系の形質を獲得した可能性が高いと考えられた。これらのことから、形態学的な特徴に基づいて分類した 4 つの細胞は、老化と関係しており、最終的に老化した細胞は、EMT を引き起こすと考えられた。

本研究では、細胞核の密度と面積に基づく評価手法を構築し、集密的な培養条件下で培養した細胞を定量的に評価した。その結果、PD = 5.6 の細胞集団では、培養経過とともに II 型の細胞が出現しはじめ、培養 21 日目以降には、I 型の細胞が減少し、II と III 型の細胞が増加することがわかった。さらに、PD = 10.1 の細胞集団では、21 日目以降に III 型の細胞が減少するとともに、IV 型の細胞が増加することがわかった。これは、集密的な培養条件下で形成したドームが崩壊すると、隣接している細胞が増殖し、それが老化したために、III 型になったと考えられた。さらに、その III 型の細胞が、EMT を引き起こした結果、IV 型に移行した

と考えられた。以上のことから、本研究では、集団倍加回数に基づき RPE 細胞の運命を論じており、培養環境が、細胞挙動を通じて RPE 細胞の特性に影響を及ぼすことがわかった。

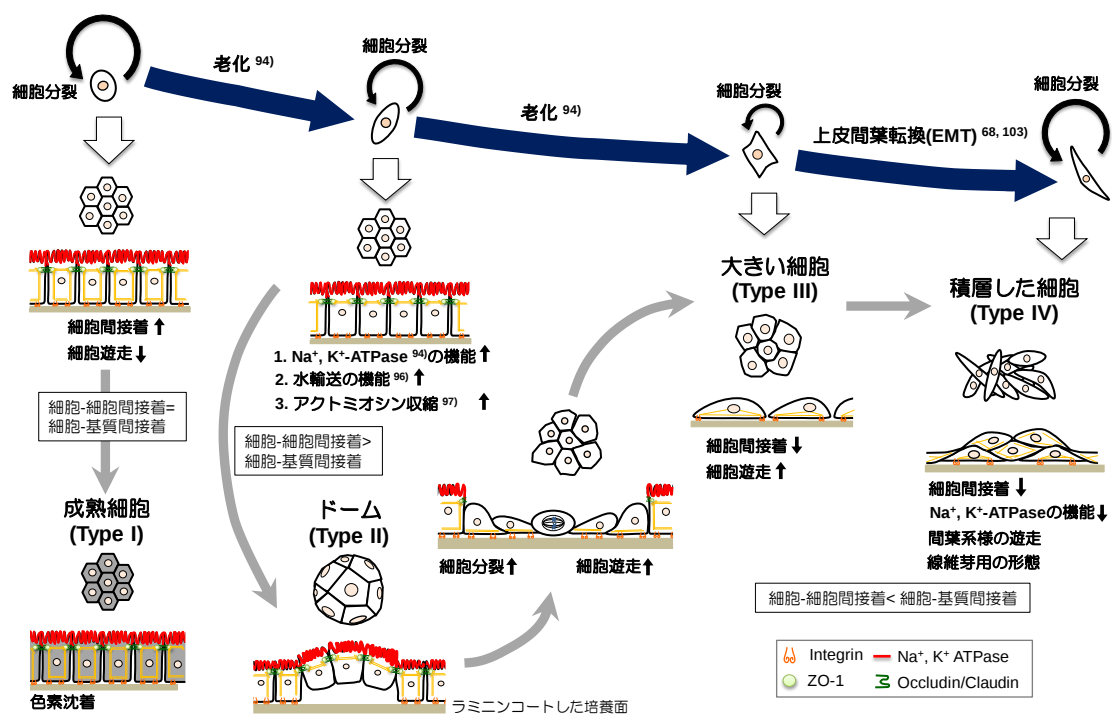


図 15. 集団倍加回数に対する RPE 細胞の形態学的な特徴の変化

第4章 動きの変化による網膜色素上皮細胞の位置的不均一性

4-1. 緒言

第1章で述べたように、細胞は、集密的な環境下で培養する中で、細胞の特性が不均一になることが知られており、培養過程における細胞挙動の変化が、細胞の成熟化に影響を及ぼすと考えられた。これまでに、RPE細胞の特性を評価するために、免疫蛍光染色やPCR法を用いて調べられてきた。特に、免疫蛍光染色は、細胞内での目的タンパク質の局在を知ることができるだけでなく、細胞集団の位置的特性を把握することができる技術である。しかしながら、成熟化に向かう細胞の特性の変化を侵襲的な手法を用いて評価することは難しい。

細胞のタイムラプス観察では、細胞を損失することなく細胞の形態、接着、遊走や分裂の変化を把握することができ、細胞の特性に応じた定量的なデータを得ることができる(113–115)。これまでに、タイムラプス観察に基づく遡及的な解析は、胚発生における細胞運命を決定するために利用されてきた(116, 117)。Kokkaliaris (118)らは、細胞のトラッキング解析は、培養中の細胞集団の特性変化を把握するために不可欠であることを論じている。これらの研究から、遡及的な解析は、RPE細胞の成熟化を把握するための手法として有用であるといえる。しかしながら、トラッキング解析から得られたデータは膨大であり、解析が困難であることから、集密的な条件下で培養をした細胞に対するトラッキング解析に関する報告は少ない(119)。細胞のトラッキング解析は、個々の細胞の位置の変化に基づく詳細なデータをもたらすだけでなく、培養中の個々のRPE細胞成熟度の評価や位置依存的な特性を理解することができる。

第2章で述べたように、細胞が伸長した細胞形態から緊密な敷石状の形態へ変化したことから、核密度の変化に着目し、未成熟逸脱細胞を評価するために核密度に基づいて解析した(90)。その結果、細胞を集密的に培養し、単層状態を維持することが成熟化するために重要であり、細胞挙動が成熟化に関与していることが示唆された。そこで、本研究では、細胞の動きに着目し、培養容器の中心と端領域でのRPE細胞の時間的・位置的な特性を遡及的に解析し、成熟化と動きの関係を理解することを目的とした。

4-2. 実験材料および手法

4-2-1. ヒト RPE 細胞の培養条件

正常ヒト RPE 細胞 (Lot no. 0F3292; Lonza Walkersville, MD, U.S.A.) を, 25-cm² T-flasks (Nunc, Roskilde, Denmark) に 1.0×10^4 cells/cm² になるように播種し, RPE 増殖培地 (Cat. No. 00195409; Lonza) を用いて細胞を増やした. その培地交換は, 2 日毎に実施し, 80%コンフルエントに達した後で, その細胞は, 0.1%トリプシン/0.02%EDTA 溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を用いて剥離した. その細胞は, タイムラプス観察をするために, ラミニン (laminin-1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) をコートした 48 ウェルプレート (culture area in each vessel: 0.95 cm²; Corning Constar, Cambridge, MA, U.S.A.) に, 5.0×10^4 cells/cm² になるように播種した. ラミニンでコートした培養面は, 48 ウェルプレートの底面に 2 μ g/cm² になるように準備した.

細胞は, 播種後 5 日目に 50 μ g/ml の Rac1 阻害剤 NSC23766 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany) を含む培地に 12 時間曝露した. その Rac1 阻害剤は, 培養 5 日目に添加し, Rac1 阻害剤を含む培地は, 12 時間後に除去した.

図 16 は, 遊走速度と方向のデータ解析に対する手順を示す. 細胞挙動を調べるために, タイムラプス画像は, 画像分析機器 (IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) の 10 倍の対物レンズを使って撮影した. 容器全体の 81 ヶ所を 12 時間, 20 分毎に撮影し, その画像 (1.83 pixels/ μ m² の解像度で 16 ビットグレースケール, 1.5 mm $\times$ 1.5 mm) は, 48 ウェルプレートの 3 ヶ所から得た. 容器の全視野画像は, タイリングした後, 対象領域 (ROI; 300 μ m $\times$ 300 μ m) での遊走を測定するために, 容器の直径は, タイリングイメージを用いて中心位置に設置した. 中心と端領域の細胞の数と遊走を調べるために, ROI は容器の中心と端領域に設置し, 端領域は, 容器中心から 4.5 mm の場所に決定した (図 16). 細胞密度 (X) は, 対象領域内の細胞数をその領域の面積で除法した値と定義し, そのデータは, 中心と端領域内の細胞から取得した. その中心 (X_C) と端領域 (X_P) の細胞密度を算出し, その端領域の細胞密度に対する中心領域の細胞密度の比率 (X_C/X_P) は, 細胞集団に対する不均一性の指標として定義した. さらに, 細胞遊走の定量化に対して, 既報の手段と同様に (119), ROI 内

でのそれぞれの細胞の重心位置 (x_i, y_i) は, LabVIEW ソフトウェア (National Instruments, Austin, TX, U.S.A.) を用いて決定した. 個々の細胞の遊走速度 (V) は, 6 時間での細胞の重心位置の変位から算出した. また, 平均遊走速度 (V_M) は, 3 つの ROI 内の 300–1100 個の細胞の遊走速度 (V) から算出した.

4-2-2. 細胞遊走と成熟化の定量的な解析

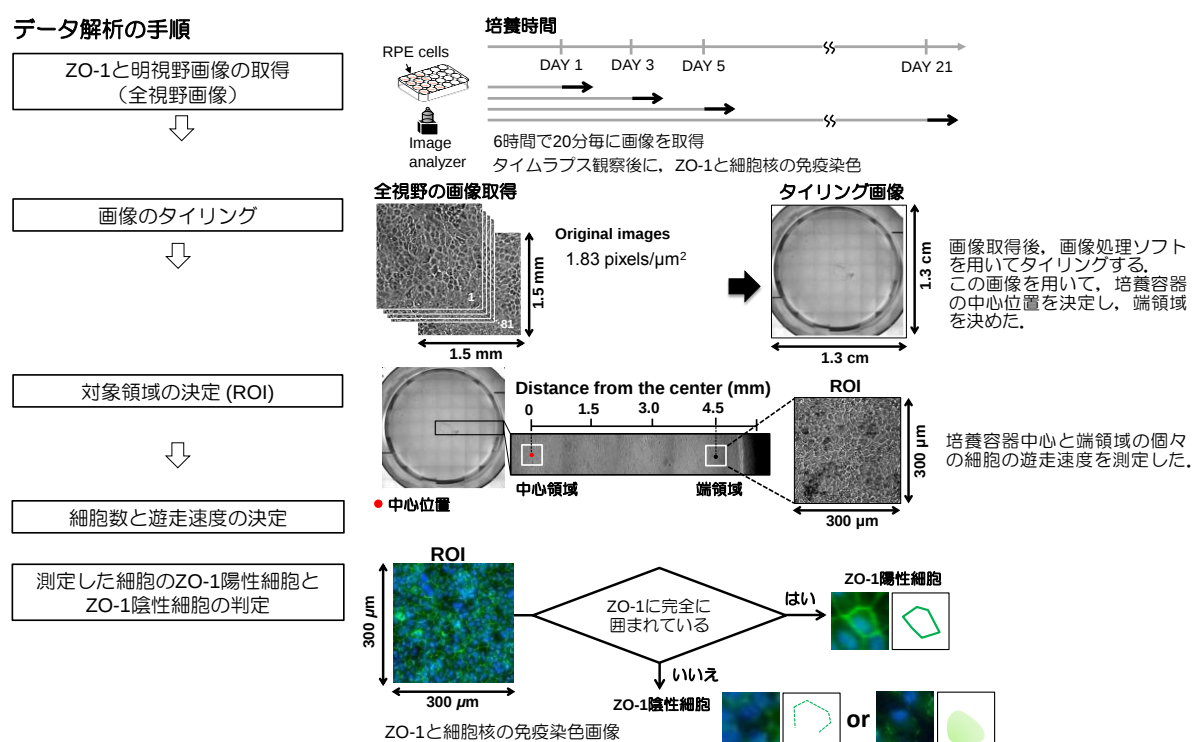


図 16. 集密的な条件下における細胞挙動に対する成熟度を評価するための解析手順

4-2-3. タイトジャンクションの形成評価

RPE 細胞の成熟度を調べるために, 遊走速度を解析した同じ位置で撮影した画像を用いて, ZO-1 に対する解析を実施した. ZO-1 と細胞核の免疫染色は, 既報の手法 (90) にしたがって実施した. PBS で洗浄後, その細胞は, 4 °C で 15 分間 4%パラホルムアルデヒドによって固定化し, 0.2% Triton X-100 で 5 分間インキュベートすることで透過処理した. 細胞は, ブロックエース (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka) を用いて 1 時間ブロッキングし, 4 °C で

抗ウサギ ZO-1 抗体 (1:50, Abcam, Cambridge, MA, UK) を用いて一晩処理した。Tris-buffered saline (TBS, DAKO, Glostrup, Denmark) での洗浄後, 細胞は, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.) を用いて 1 時間インキュベートした。TBS で洗浄後, PBS で 50 倍希釈した 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Life Technologies Corporation) を用いて室温で 20 分間インキュベートし, 細胞核を染色した。その ZO-1 と細胞核の染色画像は, IN Cell Analyzer 2000 の 10 倍の対物レンズで撮影し, ZO-1 と DAPI の蛍光強度は, 488 nm と 358 nm の励起波長から得た。

『ZO-1 陽性細胞』の頻度と『ZO-1 陰性細胞』の頻度を F_Z と F_N とそれぞれ定義した。ROI 内の遊走速度に対する ZO-1 陽性細胞と ZO-1 陰性細胞の頻度 (F_X) を調べた。

4-2-4. 統計解析

すべてのデータは, 3 つの培養容器から得られ, そのデータから, 標準偏差と平均値を算出した。そのグループ間での比較は, one-way Analysis of Variance (ANOVA) と Tukey-Kramer post-hoc test によって決定し, 0.05 より小さい p 値は, 有意差があるとみなした。

4-3. 結果

4-3-1. 成熟化における RPE 細胞の密度変化

RPE 細胞は, 21 日間集密的な培養条件下で培養し, その容器内の中心 (Central region) と端領域 (Peripheral region) での細胞密度の時間的特性を調べた。図 17A は, 同じ容器内での端領域に対する中心領域での細胞密度の比率を示している。図 17B に示されるように, 培養 1 日目の中心と端領域での細胞密度は, 同じであった ($X = 1.2 \times 10^5$ cells/cm² と $X = 1.1 \times 10^5$ cells/cm²)。培養経過とともに, 中心領域での細胞密度は, 培養 5 日目で $X = 3.4 \times 10^5$ cells/cm² に迅速に増加した。培養 21 日目で, 端領域での細胞密度は, $X = 3.3 \times 10^5$ cells/cm² であり, 中心領域と同じになった。図 17A に示されるように, 端領域に対する中心領域での細胞密度の比率である不均一性の指標 (X_C/X_P) は, 培養 1 日目で $X_C/X_P = 1.1$ であり, 細胞分布は, 局所的な均一性を示した。局所的な不均一性の増加とともに, この不均一性の指標は, 培養 3 日

目までに増加を示し、培養 21 日目で $R = 1.1$ の値まで緩やかに減少した。

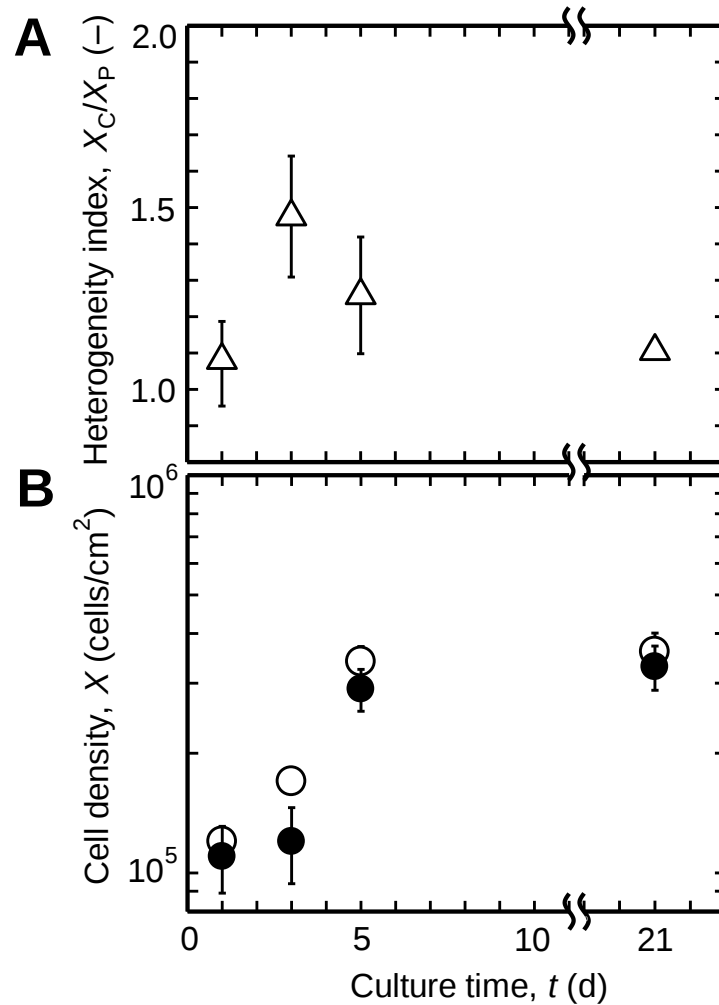


図 17. 培養 1, 3, 5, 21 日目で培養容器中心と端領域での細胞の不均一性指標の時間変化(A)と細胞密度の時間変化(B). (Δ : 培養容器端領域の細胞密度に対する中心領域に対する細胞密度の比率, $\circ$: 培養容器中心領域の細胞密度, $\bullet$: 培養容器端領域の細胞密度) ($n = 3$)

RPE 細胞の成熟化の変化を把握するために、ZO-1 と細胞核の蛍光染色は、培養 1, 3, 5 と 21 日目におこなった。図 18 は、中心と端領域での ZO-1 陽性細胞の頻度 (F_z) の時間的变化を示している。培養 1 日目の中心と端領域でのすべての細胞は、ZO-1 発現が陰性であった。培養経過とともに、中心領域での ZO-1 陽性細胞の頻度は、培養 5 日目で $F_z = 0.75$ にまで迅速に増加した。培養 21 日目で、ZO-1 陽性細胞の頻度は、ゆっくりと増加し、 $F_z = 0.82$ に達した。端領域での ZO-1 陽性細胞の頻度は、遅れて増加しはじめ、培養 5 日目の端領域での ZO-1 陽性細胞の頻度は、中心領域の 63%であり、培養 21 日目では、中心領域の 92%まで増

加した.

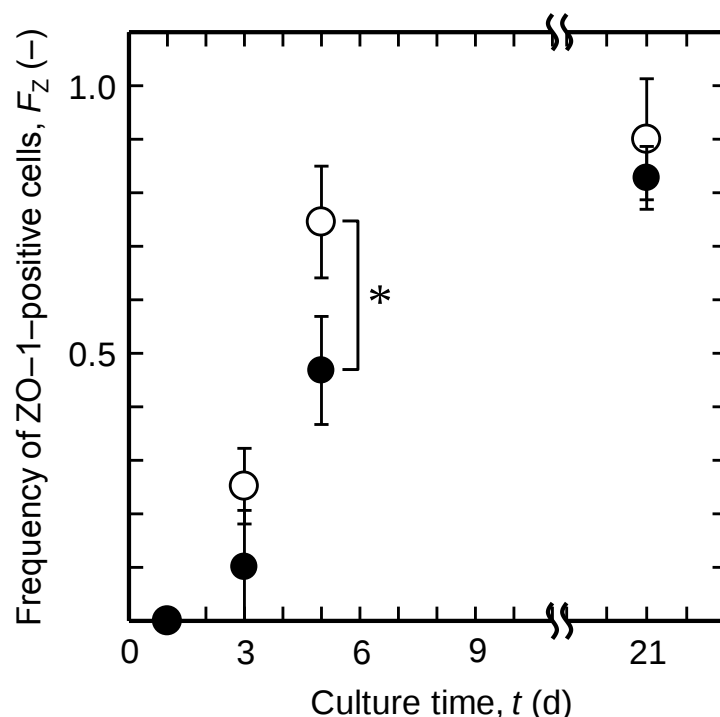


図 18. 培養 1, 3, 5, 21 日目の培養容器中心と端領域の ZO-1 陽性細胞の頻度. (○: 培養容器中心領域の細胞密度, ●: 培養容器端領域の細胞密度) (* $p < 0.05$)

個々の RPE 細胞の遊走と成熟化の相関関係を調べるために、容器中心と端領域での RPE 細胞に対してタイムラプス観察を実施し、その動画は、文献 (137) の Movie S1 に示す (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172314002114>). 培養 1 日目で、両方の領域でのほとんどすべての細胞は、播種後に伸長した形を示し、活発な遊走と分裂を通じて集密的な状態に達した. 培養 5 日目の中心領域での細胞は、遊走の低下を示し、細胞遊走と形態は、培養 21 日目まで維持した. 端領域での細胞は、中心領域の細胞と比較して、活発に遊走し、細胞の大きさは、培養 5 日目まで大きく、伸展した形を示した. 培養経過とともに、端領域での細胞遊走は、緩やかに減少し、培養 21 日目で、端領域での細胞形態と遊走は、中心領域と類似したパターンを示した.

容器の中心と端領域での RPE 細胞の遊走とタイトジャンクション形成との相関関係を明らかにするために、遊走速度に対する ZO-1 陽性細胞と ZO-1 陰性細胞の頻度を調べた. 図 19a に示されるように、中心領域での平均遊走速度は、培養 1 日目で、 $V_M = 15 \pm 4.9 \mu\text{m/h}$ であり、

時間とともに減少しはじめ、培養 3 日目に $V_M = 6.3 \pm 3.0 \mu\text{m/h}$ になった (図 19b). 培養 5 日目では、中心領域の細胞の平均遊走速度は、 $V_M = 3.8 \pm 1.8 \mu\text{m/h}$ であり、培養 21 日目の中心領域の平均遊走速度と同じであった (図 19c と図 19d). 端領域での平均遊走速度は、中心領域と比較して、遅れて減少しはじめ、培養 21 日目で $V_M = 3.7 \pm 1.8 \mu\text{m/h}$ であり、中心領域と同じであった (図 19d と図 19h). 培養 1 日目での中心と端領域での個々の細胞の遊走速度は、 $V = 6.0\text{--}34 \mu\text{m/h}$ の幅広い範囲に分布を示した (図 19a と図 19e). 中心領域での遊走速度の分布は、端領域での遊走速度の分布と比較して狭かった (図 19c と図 19g). 培養 21 日目になると、両方の領域での遊走速度は、 $V = 0\text{--}10 \mu\text{m/h}$ の範囲に収束した (図 19d と図 19h).

培養 21 日目までの両方の領域で、ZO-1 陽性細胞の遊走速度は、 $V = 0\text{--}5.0 \mu\text{m/h}$ の範囲に分布し (図 19A–19D), すべての測定した細胞の ZO-1 陽性細胞の頻度は、 $V = 5.0 \mu\text{m/h}$ 以下の遊走速度を有している細胞の頻度と 90%一致していた.

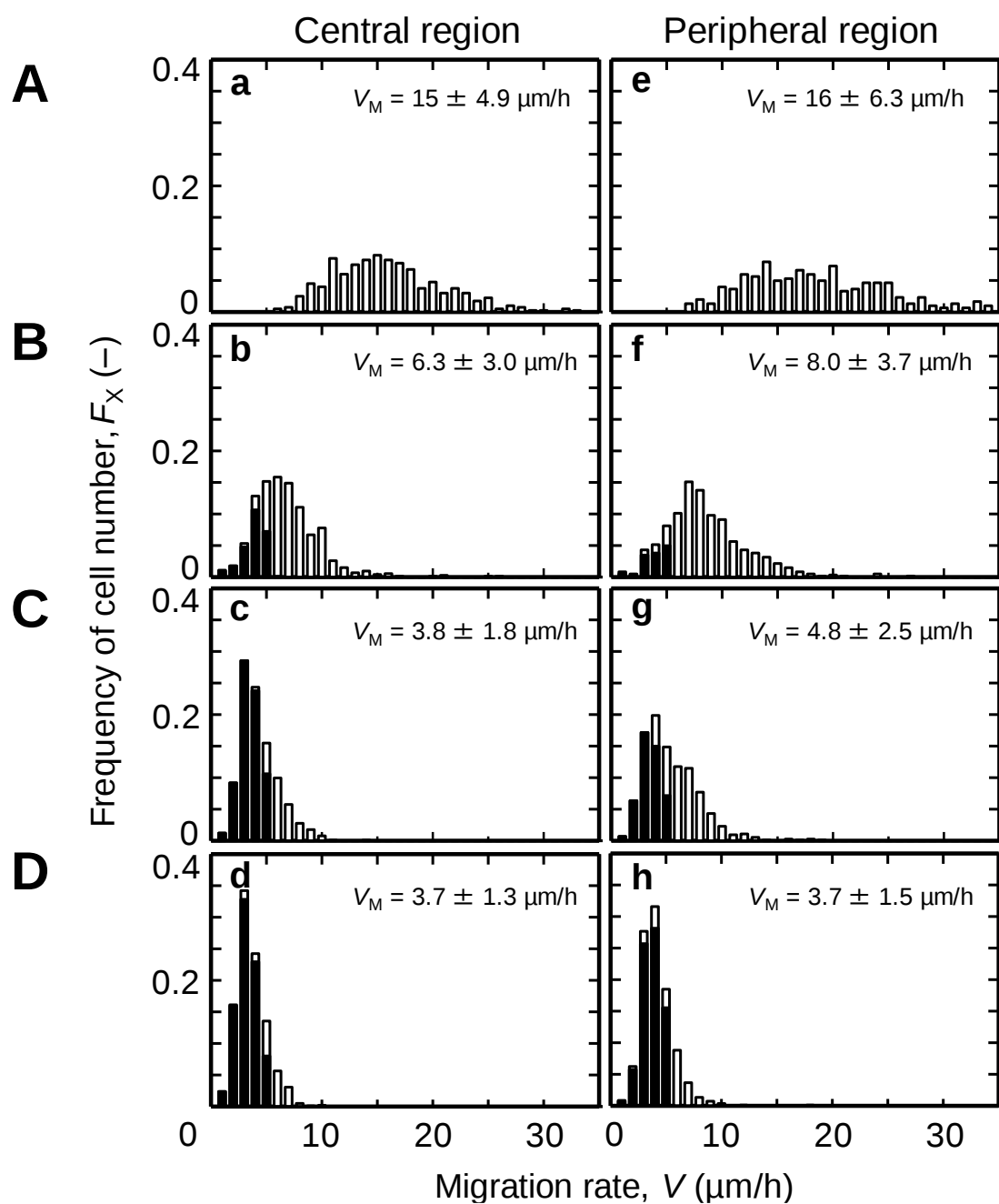


図 19. 培養 1 日目 (A), 培養 3 日目 (B), 培養 5 日目 (C), 培養 21 日目 (D) の培養容器中心 (Central region) と端領域 (Peripheral region) での個々の細胞の遊走速度に対する ZO-1 陽性細胞と ZO-1 陰性細胞の頻度. (□ : ZO-1 陰性細胞の頻度, ■ : ZO-1 陽性細胞の頻度). 平均遊走速度は, 3 つの培養容器の ROI 内の 300–1100 個の細胞から算出した.

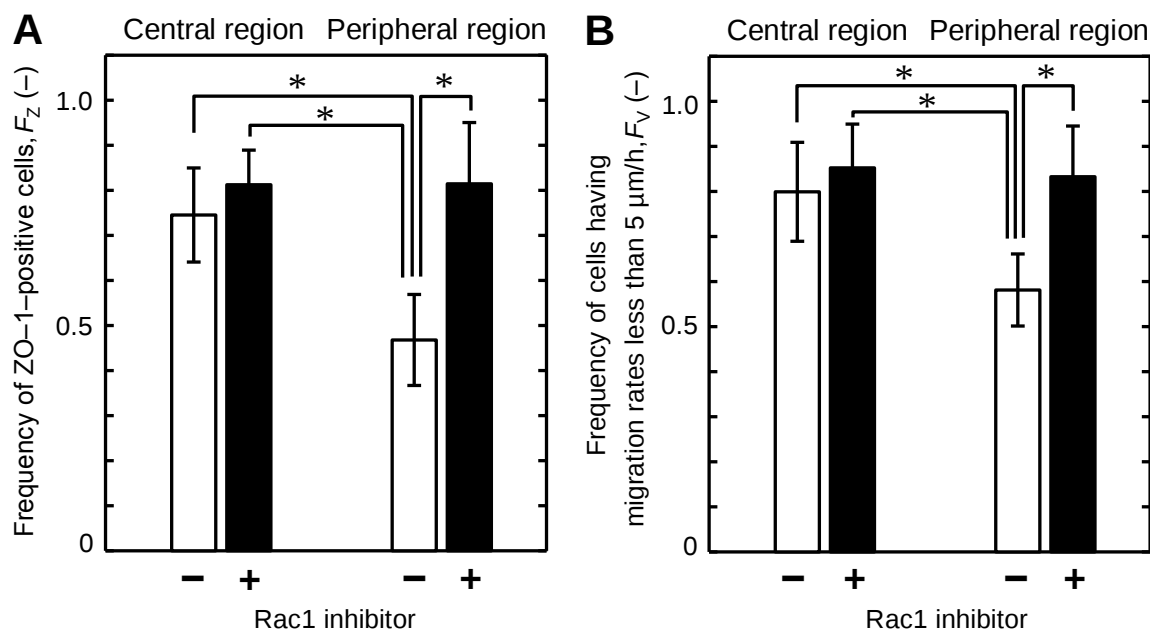


図 20. 培養 5 日目での容器中心 (Central region) と端領域 (Peripheral region) での Rac1 阻害剤を含む培地を暴露した細胞と暴露していない細胞の ZO-1 陽性細胞の頻度 (A) と $V = 5.0 \mu\text{m/h}$ 以下の遊走速度を持つ細胞の頻度 (B). (□ : Rac1 阻害剤を暴露していない細胞, ■ : Rac1 阻害剤を暴露した細胞, $n = 3$). one-way Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey-Kramer post-hoc test (* $p < 0.05$).

4-3-2. RPE 細胞の成熟化に及ぼす遊走の効果

Rac1 阻害剤を含む ($50 \mu\text{g/ml}$) または含まない培地に、培養 5 日目の細胞を暴露し、RPE 細胞の成熟化に及ぼす遊走の効果を調べた. ZO-1 陽性細胞の頻度 (F_z) と $V = 5.0 \mu\text{m/h}$ 以下の遊走速度を有している細胞の頻度 (F_v) は、RPE 細胞の異なるロットを用いた培養のデータから決定した (図 19 と 図 21). 『Rac1 阻害剤非暴露細胞』では、中心と端領域で ZO-1 陽性細胞の頻度が、それぞれ、 $F_z = 0.75$ と $F_z = 0.47$ の顕著に異なっていた (図 20). 『Rac1 阻害剤暴露細胞』では、中心領域において、Rac1 阻害剤を暴露した細胞としていない細胞の F_z と F_v 値に有意な差はなかった (図 20A と 図 20B). しかしながら、端領域での『Rac1 阻害剤暴露細胞』の F_z 値は、『Rac1 阻害剤非暴露細胞』よりも顕著に 1.7 倍も高くなった (図 20A). 端領域での『Rac1 阻害剤暴露細胞』の F_z と F_v 値は、中心領域と同じであった (図 20A と 図 20B).

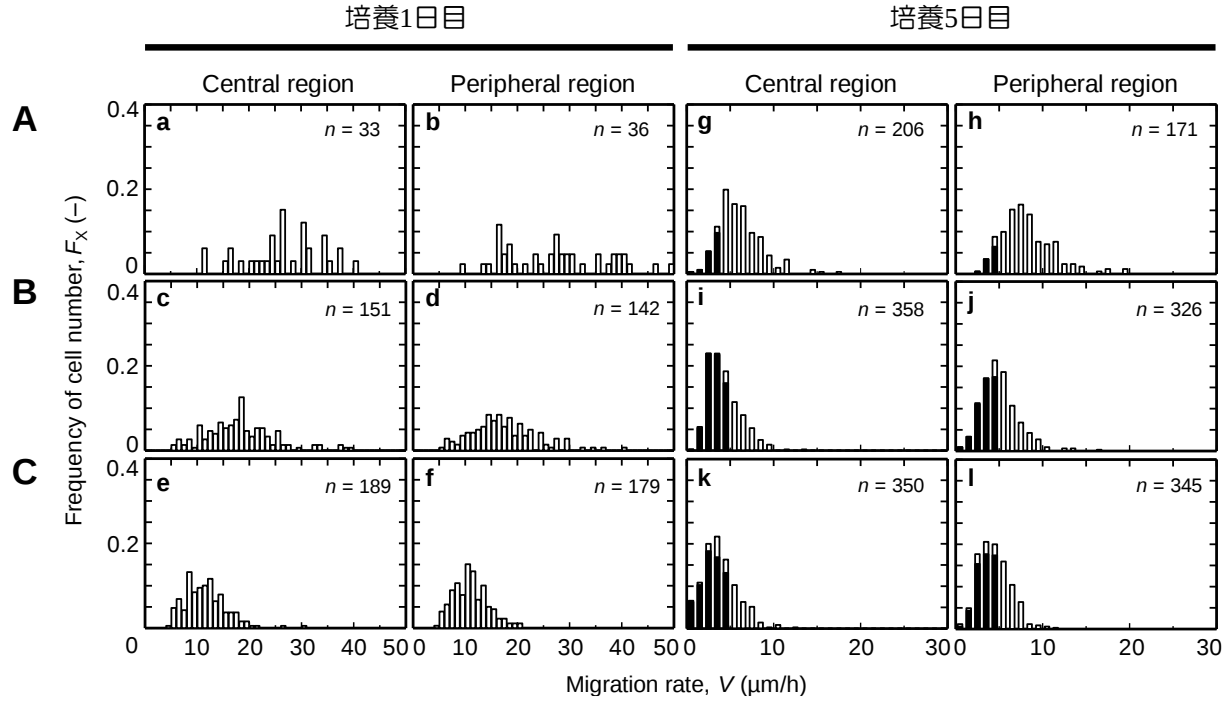


図 21. 個々の細胞の遊走速度に対する ZO-1 陽性細胞と ZO-1 陰性細胞の頻度 (播種密度; 1.0×10^4 cells/cm² (A), 5.0×10^4 cells/cm² (B), 1.0×10^5 cells/cm² (C)). (□ : ZO-1 陰性細胞の頻度, ■ : ZO-1 陽性細胞の頻度, $n = 30\text{--}360$ 個, Lot no. 0000319368; Lonza, Walkersville, MD, U.S.A.)

4-4. 考察

タイトジャンクションの形成や維持は、培養した RPE 細胞の成熟プロセスに影響する重要な事象である。成熟した RPE 細胞の時間・位置依存的な特性の取得するために、本研究では、細胞挙動を観察した同じ領域で ZO-1 の免疫染色をおこなった。成熟 RPE 細胞の遊走と分裂は、タイトジャンクションの形成と維持に付随し、その結果、細胞分布の局所的な不均一性をもたらすことを示した。RPE 細胞の分布は、培養 3 日目までに均一から不均一へ移行を示した (図 17)。中心と端領域での ZO-1 陽性細胞の頻度は、細胞分布が最も不均一であった培養 3 日目ではなく、培養 5 日目で有意に異なっていたことがわかった (図 18)。Kokkinopoulos ら (31) は、マウス RPE 細胞の増殖能力が、培養容器の中心と端で異なり、この違いは、培地中の可溶性の因子によるものではないことを報告している。これらの結果は、本研究での培養容器内の中心と端領域での RPE 細胞の培養で得られた結果と一致している。したがって、これらの結果から、成熟化の局所的な不均一性は、培養中の細胞挙動の変化のために異なる細胞間接触によって生じたと考えた。

上皮形態形成のプロセスでの細胞挙動は、メイディン・ダービー・イヌ腎臓細胞 (Madin-Darby canine kidney, 以下 MDCK 細胞) を用いて研究されている。Nobes (120) らは、活発に遊走している細胞は、細胞の先端側でラメリポディアやフィロポディアを形成し、その結果、アドヘレンスジャンクションとタイトジャンクションを形成する。初期の細胞間接着は、活発な遊走を示す細胞同士で衝突し、細胞分裂の結果としてつくられる (120-122)。成熟が進むとともに、培養した細胞は、増殖を停止し、アドヘレンスジャンクションとタイトジャンクションは、安定化するようになる (45)。その細胞間接着が不安定であった場合、細胞は、協調的な集団運動ではなく (105, 123)、細胞間接着形成と遊走による短い細胞間接触を繰り返すことで、細胞間接着を損失し、シングル細胞と同じ動きを示すようになる (124)。これらのことから、RPE 細胞の動きは、成熟度と密接に関与していると考えられた。本研究において、ZO-1 陽性細胞は、細胞同士の相互作用を経た細胞形態変化により重心位置の変位を示し、これらの細胞は、 $V = 5.0 \mu\text{m/h}$ 以下の遊走速度を示すことがわかった。一方、ZO-1 陰性細胞は、活発かつ各方向に動き、これらの細胞のほとんどは、 $V = 5.0 \mu\text{m/h}$ 以上の遊走速

度を示し、 $V = 5.0 \mu\text{m/h}$ 以下の遊走速度をもつ細胞の頻度は、ZO-1 陽性細胞の頻度と 90%一致した (図 19)。これらの結果は、異なるロット番号を持つ細胞でも同様の傾向を示していた。培養容器の端領域での遊走速度の低下は、中心領域と比較して遅れて低下し (図 19A-D)、中心領域で $V = 5.0 \mu\text{m/h}$ 以下の遊走速度を示す細胞の頻度は、培養 5 日目での端領域の値よりも 1.4 倍高かった (図 20B)。しかしながら、中心領域での細胞密度は、同時期の端領域の値と同じであった (図 20)。これらから、成熟度の違いは、タイトジャンクション形成の局所的な違いと一致した、異なる遊走挙動によって生じたと考えられた。

Rho small GTPases の Rho family において、Rac1 活性は、遊走や細胞骨格の制御に重要な役割を果たす (125)。高い Rac1 活性は、ラメリポディア形成を誘導し、初期の細胞間接着を促進することが知られている (120, 126)。タイトジャンクションの維持において、タイトジャンクションでの高分子成分の構築は、異なる GTPases によって協調的に制御されており、ZO-1 の局在は、Rac1 でなく、Rho と Cdc42 活性化に影響される (127)。これらの結果から、Rac1 活性の阻害は、後期段階でタイトジャンクションの維持に直接関与しない可能性が高いと考えられる。Rac1 シグナリング経路は、グアニンヌクレオチド交換因子と GTPase 活性化タンパク質の選択的な相互作用によって制御される (128, 129)。Gao (130) らは、GEF による Rac1 活性化をターゲットとしている NSC23766 が、Rac 特異的な小分子阻害剤に関与することを報告している。したがって、本研究では、培養中の RPE 細胞の成熟化に及ぼす遊走の効果を調べるために NSC23766 を利用し、RPE 細胞は、培養 5 日目で Rac1 阻害剤を含む培地に曝露した。中心領域での成熟状態は、Rac1 阻害剤への曝露による影響はなかった。一方、Rac1 阻害剤に曝露したとき、 $V = 5.0 \mu\text{m/h}$ 以下の遊走速度をもつ細胞の頻度と同様に ZO-1 陽性細胞の頻度は、顕著に増加し、中心領域と同じになった (図 20A と図 20B)。これらのことから、成熟度の局所的な違いは、異なる遊走速度を示している細胞の不均一な分布によって引き起こしたと考えられた。遊走を阻害することによって安定的な細胞間接触を促進し、タイトジャンクションの形成をもたらす。したがって、細胞の動きが、培養中の RPE 細胞の成熟度に影響している重要な因子であることが示唆された。

第 5 章 協調的集団運動によるヒト網膜色素上皮細胞の均一な成熟化の促進

5-1. 緒言

第 2 章と第 4 章で述べたように、RPE 細胞の成熟化は、遊走と増殖を通じて集密的な状態になり、初期の細胞間接着を形成する。細胞の遊走速度が低下するとともに、紡錘形から敷石状へと細胞形態が変化し、タイトジャンクションを形成する。さらに、成熟化が進むと、 Na^+ , K^+ -ATPase ポンプが細胞の上端側に局在しはじめ、RPE65 や CRALBP, MITF の発現し、色素沈着を引き起こす。Vugler ら (66) は、このような RPE 細胞の分化マーカーを用いて、集密的に培養した ES 細胞由来 RPE 細胞の中心から端に向かって、RPE65 や MITF のような RPE 細胞に対するマーカーの発現パターンに違いがあることを示しており、細胞の状態が不均一になっていることを報告している。集密的な培養条件下では、上皮細胞の遊走挙動は、細胞間接着レベルによって変化することから (131, 132)、RPE 細胞の成熟化は、培養容器内の遊走挙動の影響を受けると考えられる。

これまでに、細胞の動きは、アクチン細胞骨格の形成と分解によって制御され、Rho small GTPase family の RhoA, Rac1 や Cdc42 は、アクチン細胞骨格の制御因子として知られている (133)。Rac1 の活性化が、初期の細胞間接着の形成やアクチン重合の促進に重要な役割を果たす (134, 135)。さらに、RhoA と Cdc42 は、細胞間接着の維持のために必要であるが、Rac1 は阻害的作用を呈する (123, 124, 136)。第 4 章で述べたように、集密的な条件下で培養した RPE 細胞の動きは、成熟化に影響を及ぼす重要な因子であること、その動きの違いによって、容器内の細胞の成熟化が位置的に不均一になることを明らかにした (137)。本研究では、集密的な条件下で培養した RPE 細胞の成熟化における動きの特徴づけを行い、その動きを Rac1 阻害剤により阻害し、容器内の細胞の成熟化を均一に促進させることを目的とした。

5-2. 実験材料および方法

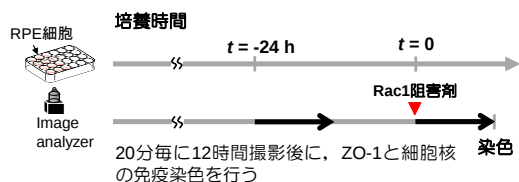
5-2-1. ヒト RPE 細胞の培養条件

正常ヒト RPE 細胞 (Lot no. 0F3292; Lonza Walkersville, MD, U.S.A.) は、既報した方法 (137) にしたがって、48 ウェルプレート (culture area in each vessel: 0.95 cm^2 ; 直径 : 5.5 mm ; Corning Costar, Cambridge, MA, U.S.A.) の培養面にラミニン (laminin-1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) をコートし、 $5.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ になるように播種した。ラミニンでコートした培養面は、48 ウェルプレートの底面に $2 \mu\text{g/cm}^2$ になるように準備した。その細胞は、播種後 5 日間、加湿した 37°C , $5\%\text{CO}_2$ インキュベータで培養し、その培地は、2 日毎に交換した。細胞は、播種後 5 日目に $50 \mu\text{g/ml}$ の Rac1 阻害剤 NSC23766 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany) を含む培地で 12 時間培養し、細胞核とタイトジャンクションタンパク質 ZO-1 の免疫染色をおこなった。培養時間 (t) は、Rac1 阻害剤の添加時間からとした。

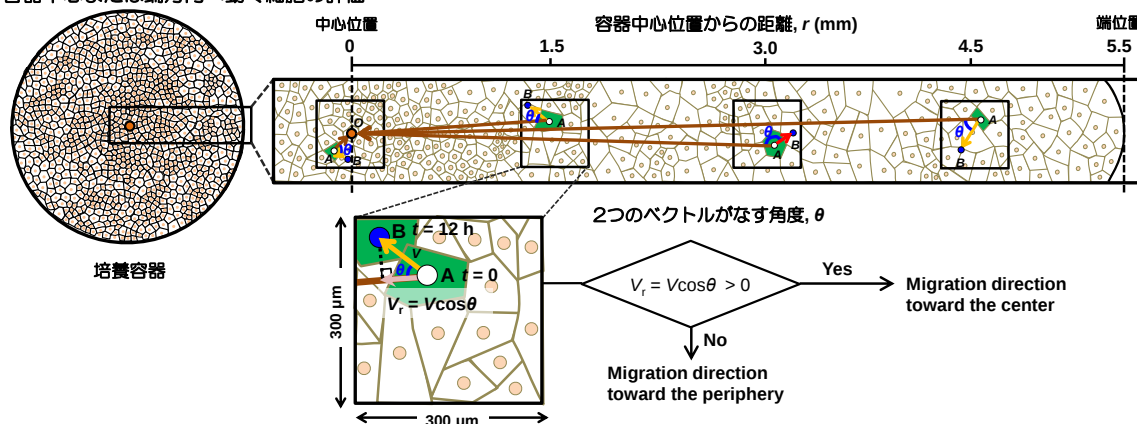
5-2-2. 細胞遊走と成熟化の定量的な解析

データ解析手順

A. タイムラプス観察とZO-1染色画像の撮影



B. 容器中心または端方向へ動く細胞の評価



C. ZO-1陽性細胞とZO-1陰性細胞の判定

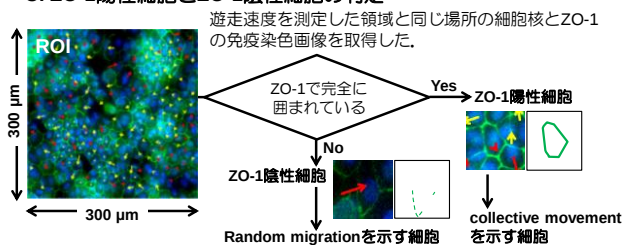


図 22. 容器中心又は端領域へ動く細胞を評価するための解析手順

図 22 は、遊走速度と方向のデータ解析に対する手順を示している。細胞挙動を調べるために、タイムラプス画像は、画像分析機器 (IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) の 10 倍の対物レンズを使って撮影した。容器全体の 81 ヶ所を 12 時間、20 分毎に撮影し、その画像 ($1.83 \text{ pixels}/\mu\text{m}^2$ の解像度で 16 ビットグレースケール, $1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$) は、48 ウェルプレートの 3 ヶ所から得た。容器の全視野画像は、タイリングした後、対象領域 (ROI; $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$) での遊走を測定するために、容器の直径は、タイリングイメージを用いて中心位置に設置し、容器端は、丸い培養容器の中心から 5.5 mm の位置に設置した。その解析データは、丸い容器の中心から 1.5 mm 間隔で設置した 4 つの ROI から取得し (図 22), 既報 (118) のとおりに、ROI 内でのそれぞれの細胞の重心位置 (x_i, y_i) は、LabVIEW ソフトウェア (National Instruments, Austin, TX, U.S.A.) を用いて決定した。個々の細胞の遊走速度 (V) は、12 時間の細胞の重心位置の変位から算出した。図 22B に示されるように、細胞の遊走方向は、 $t = 0$ での細胞の重心位置から容器の中心位置までのベクトルと $t = 0$ の重心位置から $t = 12 \text{ h}$ の重心位置までのベクトルがなす角度 (θ) を算出した ($0 \leq \theta \leq \pi$)。平均遊走速度 ($\bar{V}_r$) は、中心へ向かう遊走速度を表している $V \cos \theta$ (V_r) の平均値として定義し、そのデータは、3 つの容器内の 300 から 800 の細胞から得た。

RPE 細胞の成熟の程度を調べるために、ZO-1 と細胞核の免疫染色は、図 22C に示された判断基準にしたがって実施した。PBS で洗浄後、その細胞は、 4°C で 15 分間 4% パラホルムアルデヒドによって固定化し、0.2% Triton X-100 で 5 分間インキュベートすることで透過処理した。細胞は、ブロックエース (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka) を用いて 1 時間ブロッキングし、 4°C で抗ウサギ ZO-1 抗体 (1:50, Abcam, Cambridge, MA, UK) を用いて一晩処理した。Tris-buffered saline (TBS, DAKO, Glostrup, Denmark) での洗浄後、細胞は、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.) を用いて 1 時間インキュベートした。TBS で洗浄後、PBS で 50 倍希釈した 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Life Technologies Corporation) を用いて、室温で 20 分間インキュベートし、細胞核を染色した。その ZO-1 と細胞核の染色画像は、IN Cell Analyzer 2000 の 10 倍の対物レンズで撮影し、ZO-1 と DAPI の蛍光強度は、 488 nm と 358 nm の励起波長か

ら得た.

成熟と遊走との関係を明らかにするために, ROI 内の遊走速度に対する容器中心または容器端のほうへ向かって遊走している ZO-1 陽性細胞と ZO-1 陰性細胞の頻度 (F_x) を調べた ($n=3$). 図 22C に示されるように, 培養容器の各 ROI における ZO-1 陰性細胞と ZO-1 陽性細胞を容器中心または容器端に向かって遊走している細胞として区分し, ROI 内で測定した細胞に対する ZO-1 陽性細胞の頻度 (F_z) を算出した. さらに, その ZO-1 陽性細胞と ZO-1 陰性細胞は, それぞれ協調的集団運動と遊走を示した. したがって, 協調的集団運動と遊走を示す細胞の頻度は, それぞれ, F_z と F_N とし, 中心方向を示す協調的集団運動の細胞の頻度 (F_{zc}) は, 培養容器の中心方向に動く ZO-1 陽性細胞の頻度と定義した ($V_r > 0$).

5-2-3. 統計解析

すべてのデータは, 3 つの培養容器から得られ, そのデータから, 標準偏差と平均値を算出した. そのグループ間での比較は, One-way Analysis of Variance (ANOVA) と Tukey-Kramer post-hoc test によって決定し, 0.05 より小さい P 値は, 有意差があるとみなした.

5-3. 結果

5-3-1. 容器内での RPE 細胞の成熟化

培養容器の中心位置からの距離 (r), $r=0$ と $r=4.5$ mm での ROI 内の細胞に対してタイムラプス観察を行い, ZO-1 染色画像は, タイムラプス観察後に同じ箇所でも撮影した. 細胞播種後, 容器端領域と同様に中心領域の細胞は, 伸長しながら活発に遊走していた. 培養経過とともに, 容器中心の細胞は, 小さくなりながら遊走が低下した. 細胞播種後 5 日目に, その細胞は, 集密的に動きながら敷石状の形になった. しかしながら, 細胞播種後 5 日目の端領域の細胞は, 伸長しながら遊走を示し, 中心領域の細胞と比較して敷石状への形態変化は遅れた. どちらの領域においても, ZO-1 陽性細胞の挙動は, 協調的集団運動を示していることがわかった. したがって, ZO-1 陽性と ZO-1 陰性細胞の挙動は, 協調的集団運動と遊走にそれぞれ分類できると考えられた.

5-3-2. 成熟化に及ぼす遊走阻害の効果

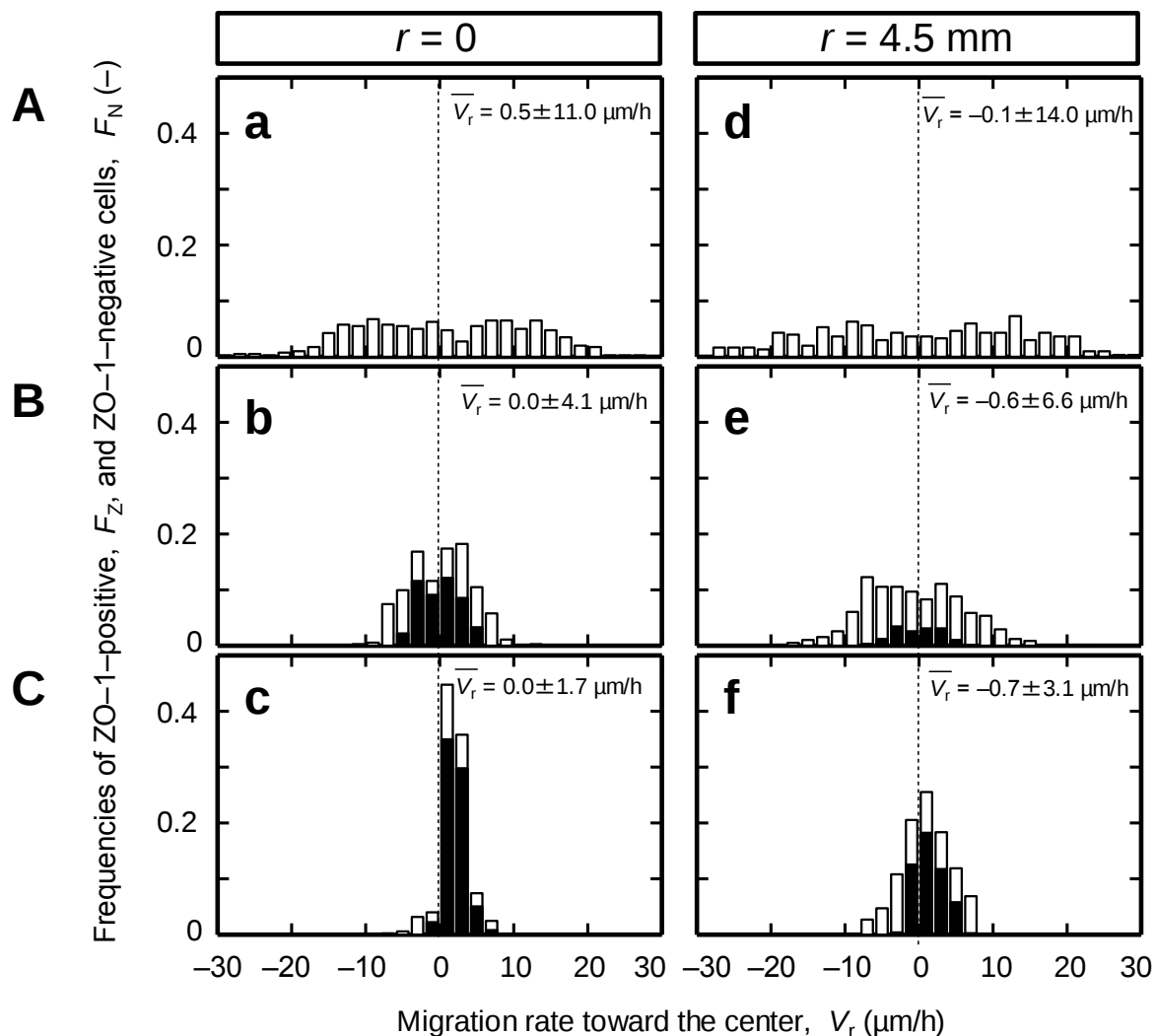


図 23. 培養 1 (A) , 3 (B) , 5 日目 (C) の容器内の個々の細胞の容器中心方向に対する遊走速度に対する ZO-1 陽性細胞と ZO-1 陰性細胞の頻度. (□ : ZO-1 陰性細胞の頻度, ■ : ZO-1 陽性細胞の頻度). 容器中心方向に対する遊走速度, V_r , は, 12 時間の重心位置の変位から算出し, これらのデータは, 300–800 個の細胞から取得した.

遊走阻害のタイミングは, 時間的な解析から得られたデータに基づいて決定した(図 23). 培養経過とともに, $|V_r|$ の絶対値が, 中心領域で減少し, 播種後 3 日目で, 遊走を示す ZO-1 陰性細胞は, 端領域で多く観察できたが, 協調的集団運動を示す ZO-1 陽性細胞は, 中心領域で増加を示していることがわかった. 播種 5 日目の中心領域では, ほとんどが ZO-1 陽性細胞であり ($F_Z = 0.75$), 容器内の細胞が, 中心方向を示す協調的集団運動であることを意味する

$V_r = 0$ 以上であった。一方、端領域での細胞は、 $|V_r|$ の高い値を示し、協調的集団運動と遊走を表すと考えられた。Rac1 阻害剤を細胞播種後 5 日目の細胞に添加し ($t = 0$), $t = 0$ から $t = 12$ h まで、容器内の $r = 0$ と $r = 4.5$ mm における細胞の遊走速度と方向を調べた。

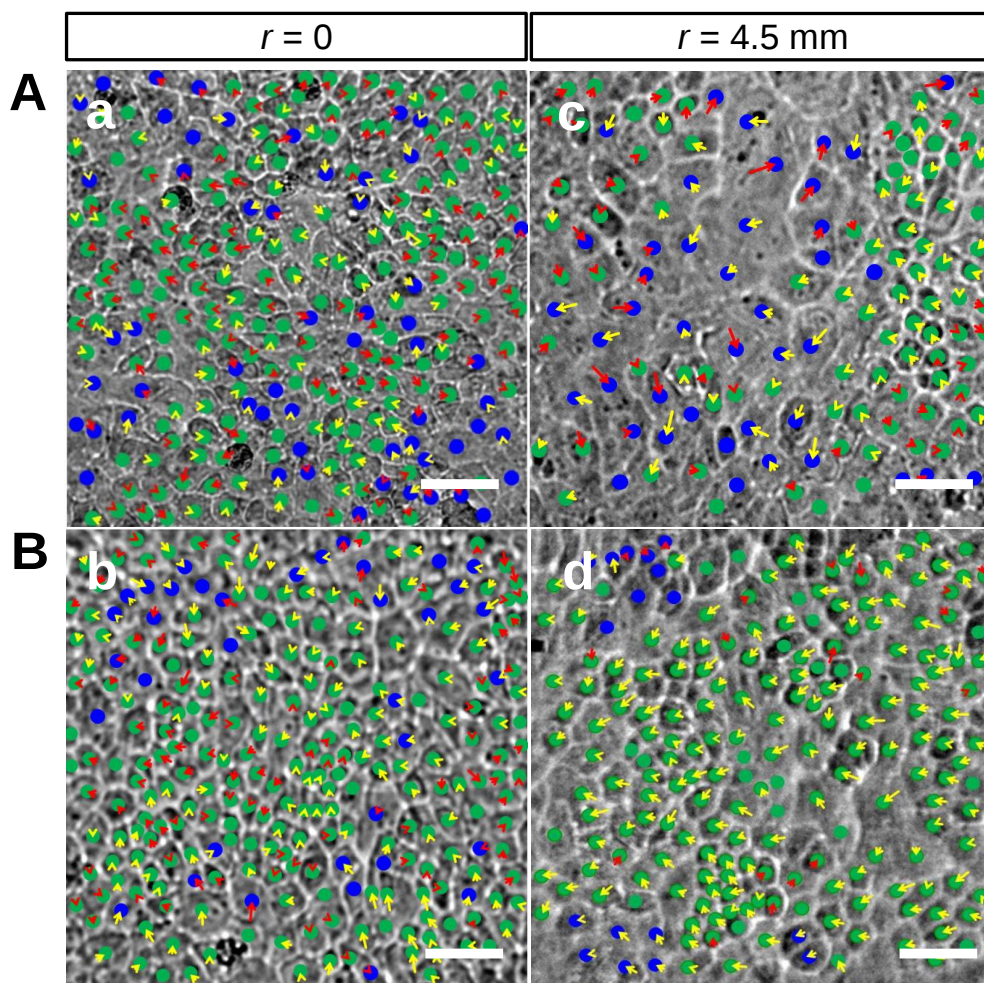


図 24. Rac1 阻害剤を暴露していない培養 (A) と Rac1 阻害剤を暴露した培養 (B) の細胞の遊走速度に対する ZO-1 陽性細胞と ZO-1 陰性細胞 ($300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$). 黄色のベクトル: $0 \leq \theta < \pi/2$ (中心方向へ向かう動き), 赤色のベクトル: $\pi/2 \leq \theta \leq \pi$ (端方向へ向かう動き). 青丸: ZO-1 陰性細胞, 緑丸: ZO-1 陽性細胞. スケールバー: $50 \mu\text{m}$.

図 24 に示されるように、どちらの培養条件における中心領域でも、接触細胞同士の相互作用によりゆっくりと遊走している細胞は、ZO-1 陽性であった (図 24a と b). Rac1 阻害剤を暴露していない培養では、端領域での細胞の遊走速度は中心領域よりも高く、遊走を示している細胞は、ZO-1 陰性であり、位置的不均一な成熟化を示した. Rac1 阻害剤を暴露した培養では、端領域での細胞の遊走は減少し、その向きは容器中心方向になり、容器中心と同様に ZO-1 陽性であった (図 24d).

図 25 に示されるように、中心方向の遊走速度と協調的集団運動を示している細胞の頻度を、容器の半径方向に沿って調べた (図 25). Rac1 阻害剤を暴露していない培養の $r = 0$ での平均遊走速度は、 $\bar{V}_r = 0.0 \pm 1.7 \mu\text{m/h}$ を示した (図 25a). Rac1 阻害剤を暴露していない培養における $r = 0\text{--}4.5 \text{ mm}$ での標準偏差は、容器中心から離れるとともに増加した (図 25A). $r = 4.5 \text{ mm}$ で、 V_r の幅広い分布は、 $V_r = -8.0 \mu\text{m/h}$ から $V_r = 8.0 \mu\text{m/h}$ までの範囲で観察され (図 25d), 遊走を示した. このことから、容器内で位置的に不均一な挙動を示すことがわかった. さらに、Rac1 阻害剤を暴露していない培養では、 $r = 0\text{--}4.5 \text{ mm}$ の V_r は、Rac1 阻害剤を暴露していない培養よりも顕著に狭い分布を示した (図 25a–d). 特に、 $r = 4.5 \text{ mm}$ での V_r の標準偏差は、Rac1 阻害剤を暴露していない培養の 5 分の 1 であった (図 25d と h). 両方の条件において、 $V_r = 0$ 以上かつ中心方向を示す協調的集団運動を持つ細胞の頻度は、半分以上であったことから (図 25A と B), 協調的集団運動が、中心方向を示す協調的集団運動を引き起こしたと考えた.

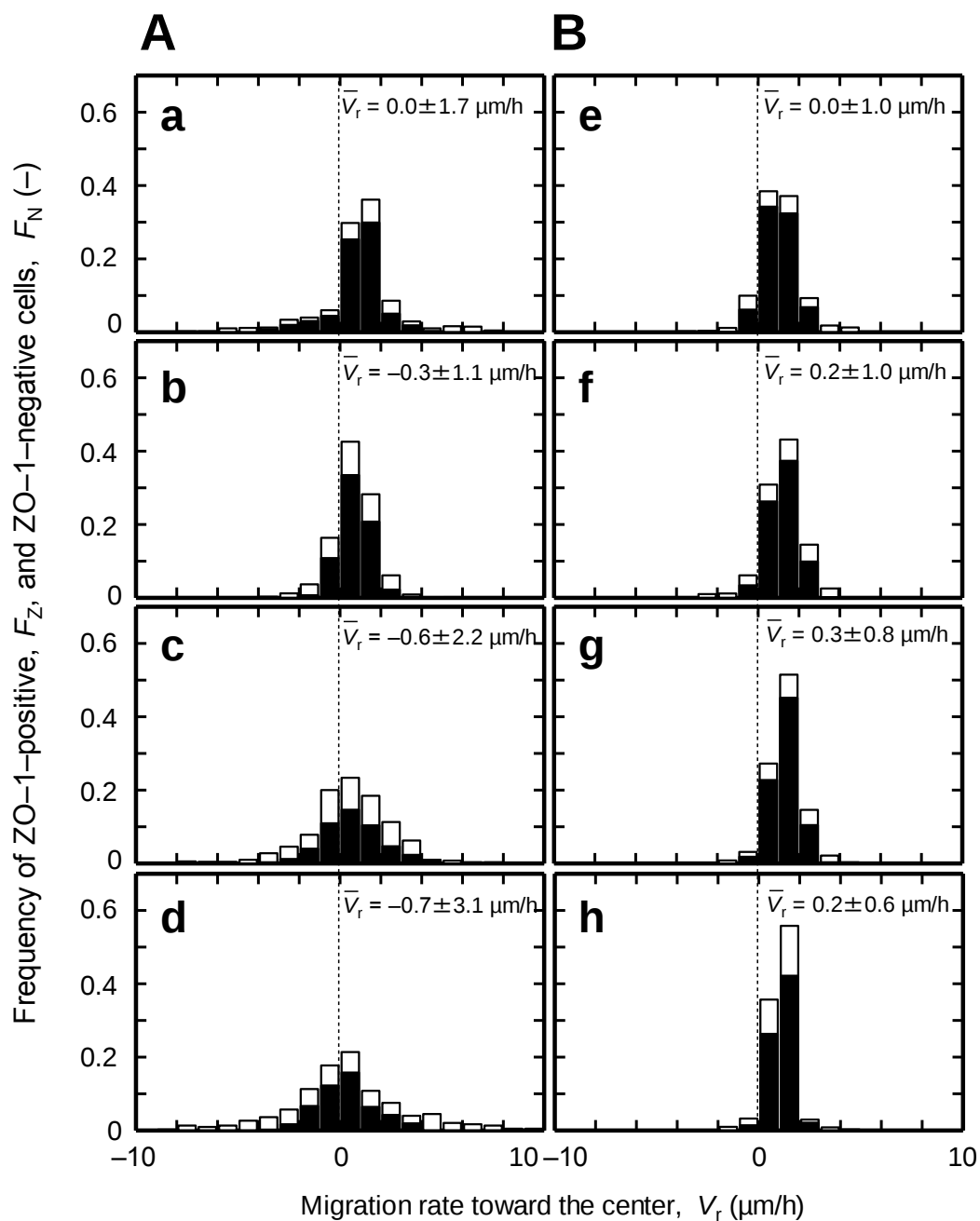


図 25. Rac1 阻害剤を暴露していない培養 (A) と Rac1 阻害剤を暴露した培養 (B) の $r = 0$ (a, e), 1.5 (b, f), 3.0 (c, g), and 4.5 (d, h) での遊走速度に対する ZO-1 陽性細胞の頻度, F_Z , と ZO-1 陰性細胞の頻度, F_N . (□ : ZO-1 陰性細胞の頻度, ■ : ZO-1 陽性細胞の頻度). 平均遊走速度は, 培養 5 日目の 3 つの容器内の 700–800 個の細胞から算出した.

成熟化に影響を及ぼす中心方向を示す協調的集団運動の効果を理解するために、 $t = 12\text{h}$ での $r = 0, 1.5, 3.0$ と 4.5 mm での F_Z と F_{Zc} 値を調べた (図 26). 図 26 に示されるように、中心領域での F_Z 値は最も高く (0.75 ± 0.10), 端領域に近づくにつれてその値は減少した. さらに、Rac1 阻害剤を暴露していない培養での F_Z と F_{Zc} 値の違いは、容器中心から離れるとともに増加し、 $r = 4.5\text{ mm}$ で $F_Z = 0.47 \pm 0.10$ と $F_{Zc} = 0.21 \pm 0.10$ であった. Rac1 阻害剤を曝露した培養では、 F_{Zc} 値は、Rac1 阻害剤を曝露していない培養よりも 3.5 倍高く、容器内の F_{Zc} 値は、 $0.72\text{--}0.78$ の高い値に達し、容器内の成熟化が均一になった. これらの結果から、遊走の阻害が、協調的集団運動から中心方向を示す協調的集団運動への迅速な転換を引き起こし、強固なタイトジャンクション形成と中心方向への動きを促進したことがわかった.

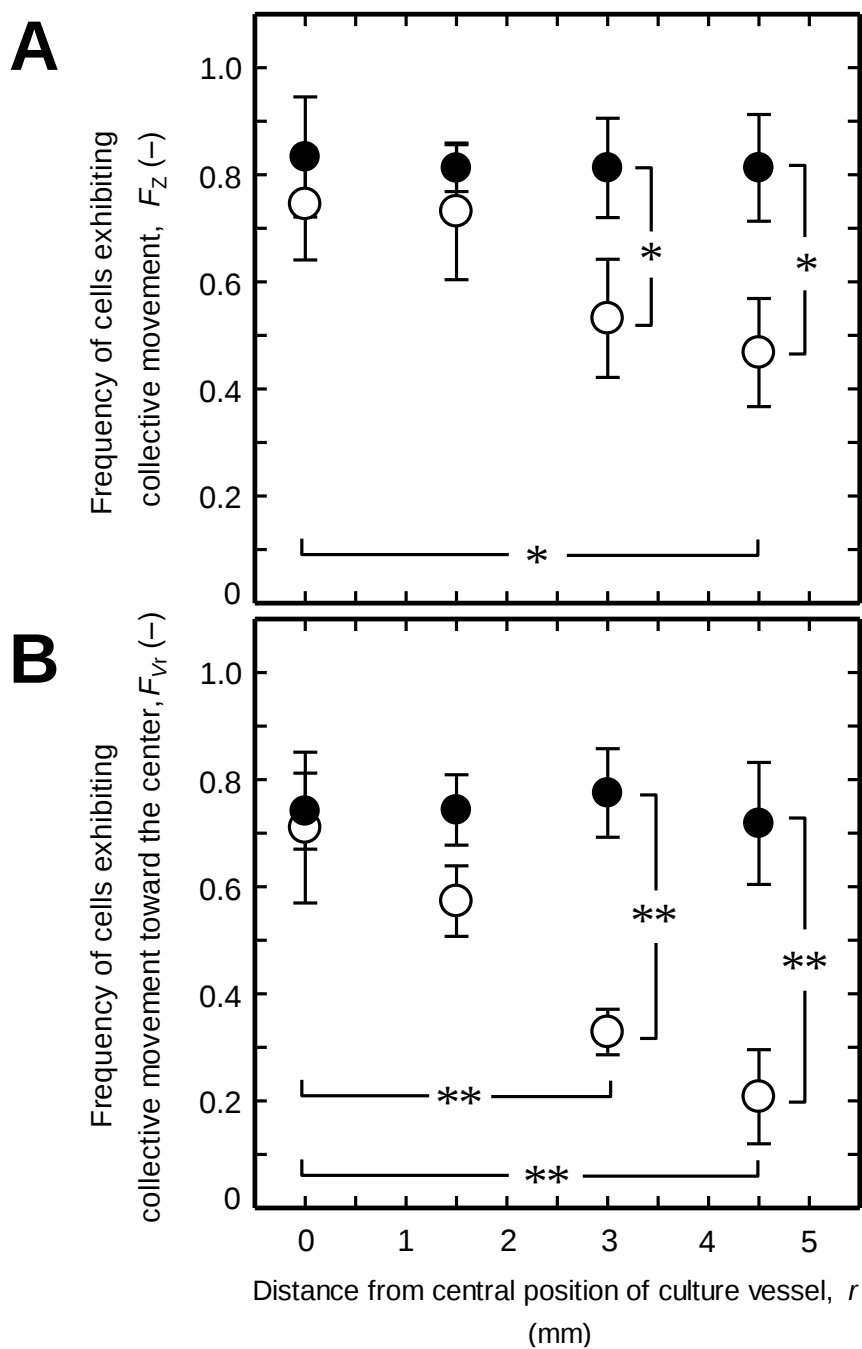


図 26. 培養 5 日目の $r = 0-4.5$ mm の F_z (A) と F_{vr} (B). (○ : Rac1 阻害剤を暴露していない培養, ● : Rac1 阻害剤を暴露した培養). ($n = 3$). one-way analysis of variance (ANOVA) と Tukey-Kramer post-hoc test (* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$).

5-4. 考察

動きは、細胞の特性に応じて変化することが知られており、これまでに個々の RPE 細胞の動きが、成熟化を示すタイトジャンクション形成や維持に深く関与することが示されてきた。本研究では、同じ箇所でのタイムラプス観察と免疫染色による成熟化の遡及的な動態解析を行い、ラミニン面上で培養された未成熟 RPE 細胞は、コンフルエント状態において伸長しながら『遊走』する様子がみられた。この遊走は、細胞の進行方向の先端側での lamellipodia の形成によるものであると考えられた。これまでにラミニン面で培養したヒト RPE 細胞が、フィブロネクチンを分泌し、フィブロネクチンと結合するインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ が、細胞の遊走に関与する重要な分子であることが報告されている (104)。Danen ら (138) は、フィブロネクチンへのインテグリン $\beta 1$ の結合が、Focal adhesion kinase (Fak) の自己リン酸化を介して Rac1 活性の増加を誘導し、lamellipodia の形成による遊走を引き起こしたことを報告している。これらから、本研究において観察された遊走は、インテグリンによる Fak の自己リン酸化を介した Rac1 活性化によって生じたと考えられた (図 27)。また、RPE 細胞は、細胞同士の接触領域で細胞間接着を発達させるとともに、遊走の低下を示し、ZO-1 の発現が上昇することが知られている (137)。一般的に、RPE 細胞は、主として N-cadherin を発現し (138, 139)、細胞膜間に局在し、N-cadherin に結合している p120 カテニンは、カドヘリンのエンドサイトーシスを抑制することで、細胞間接着の安定化を誘導する (140, 141)。さらに、p120 カテニンのチロシンリン酸化は、カドヘリンと p120 カテニンとの結合を解除し (142)、遊離した p120 カテニンは、細胞質で RhoA-GDP と複合体を形成することで、RhoA 活性化を阻害することが知られている (143)。p120 カテニンの siRNA を遺伝子導入した RPE 細胞において、RhoA 活性が増加したことから (144)、本研究においても、カドヘリンへの p120 カテニンの局在が、RhoA 活性化を誘導した可能性が高いと考えられた。さらに、RhoA の活性化が、Rac1 の負の活性を導き (145)、RhoA 活性化を介したミオシン軽鎖のリン酸化によるミオシンの活性化が、タイトジャンクションの形成を誘導することから (146)、本研究でのタイトジャンクション形成は、RhoA 活性化によって生じたと考えられた。この細胞は、成熟化が進むとともに、周囲の細胞と協調的に動きながら敷石状の形態を示した。このとき、ZO-1 と同様に

アクトミオシンネットワークが、この細胞のアピカル側で構築され (147, 148) , RhoA の活性化は、アクトミオシン収縮の増加を引き起こすことが報告されている (123, 149) . さらに、敷石状の形態を示す RPE 細胞は、 Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) が、チロシナーゼなどの色素合成を制御する遺伝子発現を誘導するために、色素沈着が増加することが知られている (150, 151) . このとき、この細胞は、『協調的集団運動』といわれる、細胞間接着を維持したまま動き (152, 153) を本研究でも示し、容器内でのアクトミオシン収縮が、中心方向を示す協調的集団運動を引き起こしたと考えた (図 27, 28) .

培養容器内の空間的な解析を行ったところ、容器中心から離れるとともに、遊走を示す細胞の増加に伴って成熟度が減少したことから、容器内での成熟化の位置的不均一の原因は、細胞の動きの違いであると考えた. そこで、本研究では、遊走を抑制するために、Rac1 阻害剤を用いて培養したところ、すでに協調的集団運動を呈した細胞の成熟化に影響はなく (図 27) , Rac1 阻害剤を含む培養における成熟度は (F_{zc}) , 中心と同様に増加した. 容器の端領域の細胞は、ゆっくりと容器中心方向へ動き、成熟化が均一になることがわかった. これは、容器の端領域で遊走を示している細胞が、中心方向を示す協調的集団運動に動きを変化したことによって生じたと考えられた. 図 27 に説明されるように、容器端の未成熟細胞は、Rac1 活性の低下によって lamellipodium の形成が阻害され、遊走が低下した結果、細胞間接着の安定化が導かれたと考えられた. その後、RhoA 活性化によってタイトジャンクションの構築が誘導され、その細胞は、容器中心と同様に中心方向を示す協調的集団運動を示しながら成熟に達したと推定した (図 28) . 以上のことから、本研究では、遊走の抑制が、協調的集団運動から中心方向を示す協調的集団運動への切り替えを促進することで、容器内における細胞の成熟化を均一にできることがわかった.

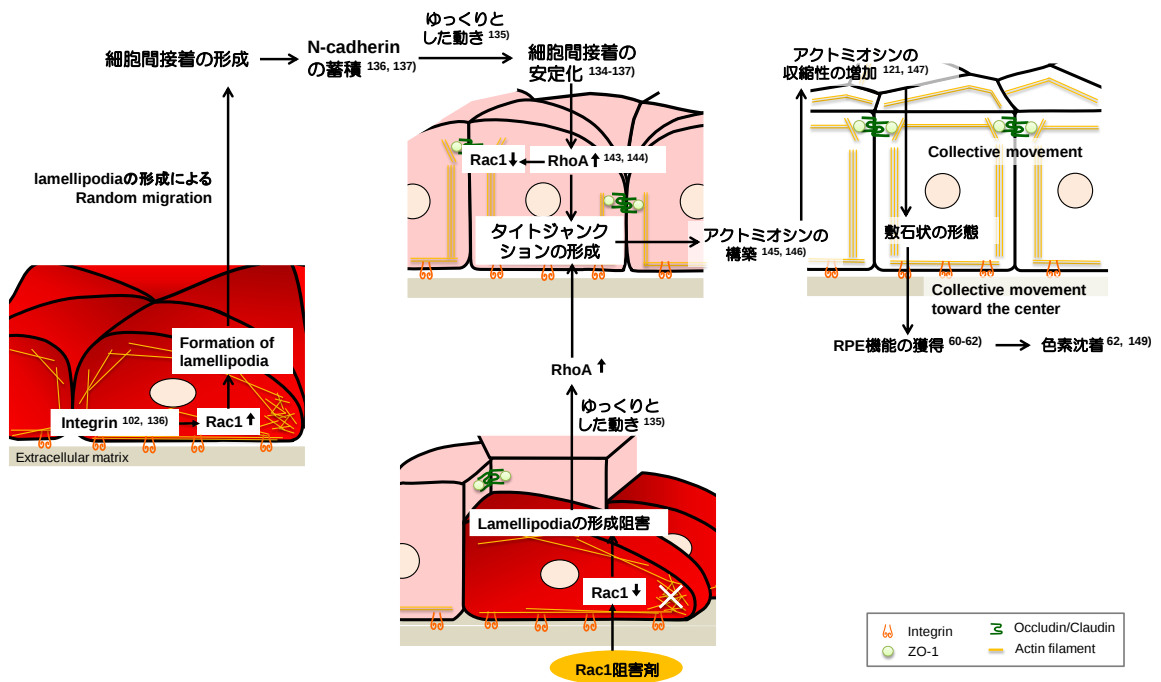


図 27. 培養した RPE 細胞の遊走挙動に基づいた成熟化のメカニズムの概念図

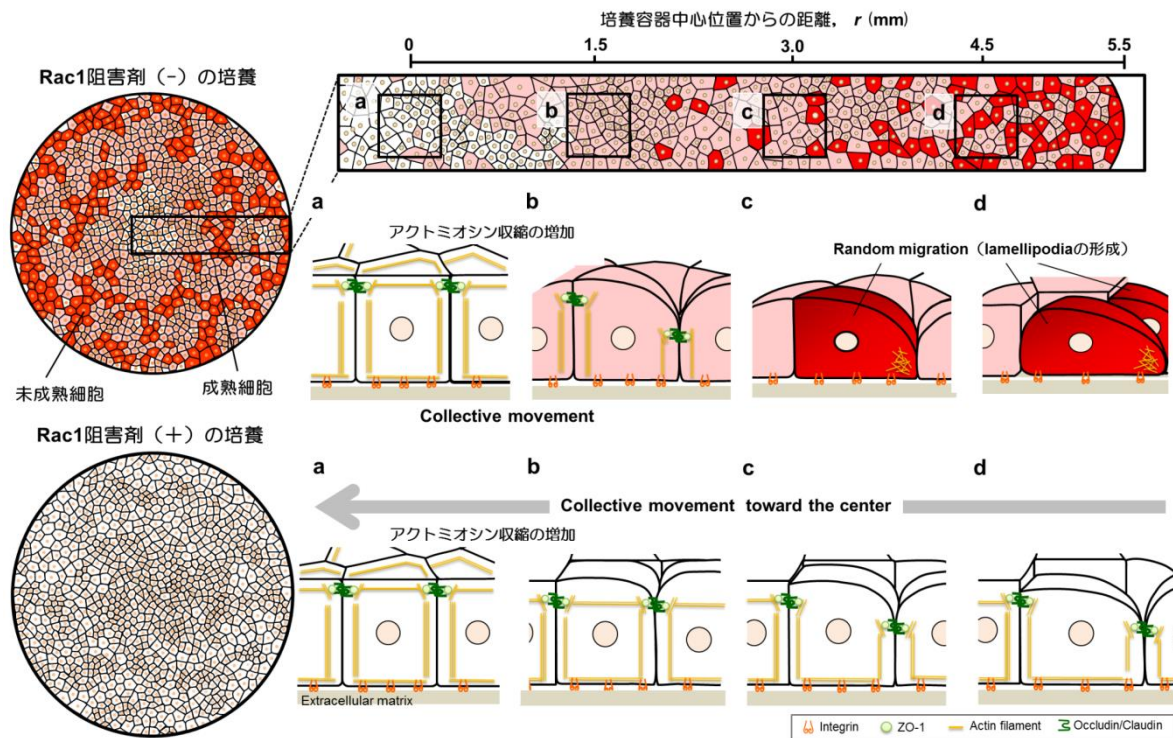


図 28. Rac1 阻害剤を暴露した培養と暴露していない培養での培養容器内での細胞の動きと均一な成熟化

第6章 総括

6-1. 結論

本学位論文は、集密的な条件下で培養したヒト RPE 細胞の細胞形態や挙動の変化を解析した。その結果、培養容器内の細胞の成熟化に付随した動きのメカニズムを示し、ゆっくりとした動きをそろえることで容器内の成熟化を均一に促進できることを明らかにした。

第2章では、RPE 細胞を集密的な培養条件下で培養し、同じ個所で撮影した ZO-1 と細胞核の染色画像を用いて時間依存的に成熟化を理解することを試みた。培養経過とともに細胞密度が高くなり、その細胞の ZO-1 の発現は、陽性であることがわかった。細胞核の核密度に基づく解析手法を用いて、集密的な培養条件下で培養した RPE 細胞の成熟度を定量的に理解し、単層状態を維持することがタイトジャンクションを形成するために重要であることを示した。

第3章では、継代培養した RPE 細胞の形態学的な特徴を定量的に評価するために、異なる集団倍加回数 (PD) を持つ細胞を集密的に培養し、形態学的な観察を行ったところ、敷石上の形態を示す細胞 (I 型)、ドーム状の形態を示す細胞 (II 型)、大きい細胞 (III 型)、積層している細胞 (IV 型) の4つのタイプに分類できることがわかった。そこで、この4つのタイプを示す細胞の核密度と面積の平均値と標準偏差から、閾値を決定した。その核密度と面積の閾値に基づいて、異なる集団倍加回数を示す細胞の特性を定量的に評価したところ、PD が増加するとともに、I 型を示す細胞は、14.4 倍減少した一方、III と IV 型の細胞は、それぞれ 3.2 と 10.3 倍増加した。細胞核の密度と面積に基づいて、RPE 細胞の特性を定量的に分類することができた。第2章と第3章の結果から、培養環境が、RPE 細胞の特性や挙動に影響を及ぼすことがわかった。

第4章では、集密的な培養条件下における RPE 細胞の成熟度を評価するために、RPE 細胞を培養し、容器内中心と端領域での遊走速度と成熟度の相関関係を調べた。ZO-1 陽性細胞数は遊走速度が減少するとともに増加し、培養5日目の中心領域の ZO-1 陰性細胞の頻度は、端領域の頻度よりも 1.6 倍高かった。そこで、動きを阻害するために、Rac1 阻害剤を細胞に暴

露したところ，中心領域と同様のレベルにまで端領域の細胞の成熟度が高くなった．この結果から，集密的な条件下での細胞の動きが，成熟化に影響している重要な因子であり，そして，集密的な条件下で培養した RPE 細胞の動きが，容器内での成熟化の位置的不均一性をもたらすことがわかった．

第 5 章では，容器内における細胞の成熟化の位置依存的な特性を理解するために RPE 細胞を集密的な条件下で培養し，その動きと成熟化の関係をタイムラプス観察と ZO-1 染色の画像を用いて空間的に調べた．ZO-1 陰性細胞は，伸長による遊走を示したのに対して，ZO-1 陽性細胞は，敷石状の形態を維持しながら協調的集団運動を示した．遊走と協調的集団運動の 2 つの動きは，位置的不均一であった．そこで，遊走を阻害したところ，協調的集団運動から中心方向を示す協調的集団運動へ動きが迅速に転換し，容器内の成熟化が均一になった．これらのことから，協調的集団運動を示す細胞のゆっくりとした動きの方向を一方向へそろえることが，容器内の細胞の成熟化を促進するうえで重要であることがわかった．

6-2. 今後の課題と展望

本研究では、集密的な条件下で培養した RPE 細胞の挙動に基づいて、細胞の特性を定量的に解析した。さらに、集密的な培養条件下での動きを遊走から中心方向を示す協調的集団運動へ転換させることで、容器内の細胞の成熟化を均一に促進することができることを明らかにした。

第 1 章から第 5 章で述べたように、細胞間接着を形成していないシングルセルは、活発な増殖や動きを通じて細胞と細胞が接触し、その領域で細胞間接着を形成する。培養経過とともに、細胞密度が高くなると、接触阻害により細胞の増殖は停止し、遊走速度も低下する。このように、上皮細胞では、細胞間接着の形成過程において、細胞挙動が変化することが知られている。本博士論文では、接触阻害による細胞増殖が停止してからの集密的な培養条件下での細胞の挙動と成熟化の関係を検討した。その結果、細胞間接着を維持するために、細胞は、協調的な動きである協調的集団運動を示し、さらに成熟化が進むと、中心方向を示す協調的集団運動という動きになること、そして、動きが、RPE 細胞の成熟化に重要な因子であることを示した。

Rho family GTPases を介して細胞骨格が制御されることで、細胞は遊走を示す一方、RhoA の活性化によるアクチオシンの収縮により協調的集団運動を示すことが知られている。これまでに、細胞間接着の形成には、Rho family GTPases の Rac1 活性が必要であり、接触阻害後の細胞間接着の維持には、Rac1 ではなく、RhoA 活性が重要な役割を果たしていることがわかっている (132–135)。そこで、本研究では、Rac1 阻害剤を用いて遊走を阻害したところ、細胞の『協調的集団運動』を『中心方向を示す協調的集団運動』に転換することで、培養容器内の細胞の成熟化を均一に促進できることを明らかにした。このことから、Rac1 阻害剤が、遊走を阻害し、協調的集団運動の方向を中心方向へそろえることで、最終的に、均一な成熟化をもたらしたと考えられた。このような結果から、細胞の動きをリアルタイムで評価し、制御することで、細胞の特性を制御できると考えた。

これまでに、細胞の成熟化を促進するための研究として、生物学的なメカニズムに基づい

た細胞特性の制御を目指した研究が試みられてきた (25–27, 153, 154). しかしながら, 細胞の動きを通じてその特性を理解し, 動きを制御することで, 細胞の成熟化を促進させることを目的とした研究は少ない. 細胞特性の評価方法の多くは, 生物学的な特性を調べるために, 細胞特異的なマーカーを用いた免疫染色法や PCR 法が用いられるが, これらの手法は, 侵襲的であるため, リアルタイムに細胞特性を理解し, 制御することは難しい. 一方, 動きは, 非侵襲的に定量的なデータを取得でき, 細胞の特性を理解し, 細胞特性を制御することができる. さらに, 細胞間接着の形成過程における細胞の動きは, さまざまな細胞種で調べられており, 共通していることがわかっている. このようなことから, 細胞の動きを評価し, 制御する考え方は, 本研究のオリジナルポイントであり, RPE 細胞だけでなく, さまざまな細胞に適用できると考えられ, 今後の研究や開発に貢献していくと考えている.

記号

パラ メータ	示す内容	単位
A_N	細胞核の面積	cm^2
F_Z	各 ROI 内において ZO-1 陽性細胞の頻度 (『協調的集団運動』を示す細胞の頻度)	–
F_V	各 ROI 内において $5.0 \mu\text{m/h}$ 以下の遊走速度を示す細胞の頻度	–
F_N	『遊走』を示す細胞の頻度	–
F_{Zc}	『中心方向を示す協調的集団運動』を示す細胞の頻度	–
f_X	核密度に対するローカルスクエアの頻度	–
F_X	細胞数の頻度	–
Δn_c	各継代における生細胞数の微分値	–
PD	集団倍加回数 (population doubling)	–
ΔPD	集団倍加回数の微分値	–
R_0	積層しているローカルスクエアと積層していないローカルスクエアを区別するための閾値	–
R	容器中心からの距離	cm
t	Rac1 阻害剤を暴露した時間	h
T_I	IV 型とそれ以外のタイプを示す細胞を区別するための閾値 (細胞核の面積)	cm^2
T_{II}	III 型と I, II 型のタイプを示す細胞を区別するための閾値 (細胞核の面積)	cm^2
T_{III}	I と II 型のタイプを示す細胞を区別するための閾値(細胞核の密度)	nuclei/cm^2
V	個々の細胞の遊走速度	$\mu\text{m/h}$
V_M	3 つの ROI 内の 300-1100 個の細胞から算出した平均遊走速度	$\mu\text{m/h}$
V_r	$V \cos \theta$	–
$ \overline{V_r} $	各 ROI 内における細胞の $V \cos \theta$ の平均値	–
X_N	細胞核の密度	nuclei/cm^2
X	対象領域 (ROI; $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$) の細胞の密度	cells/cm^2
X_C	培養容器の中心領域での細胞の密度	cells/cm^2
X_P	培養容器の端領域における細胞の密度	cells/cm^2
X_C/X_P	培養容器内の細胞集団の不均一の程度	–
(x_i, y_i)	各細胞の重心位置	–
θ	$t = 0$ での細胞の重心位置から中心位置までのベクトルと $t = 0$ の重心位置から $t = 12 \text{ h}$ の重心位置までベクトルがなす角度 ($0 \leq \theta \leq \pi$)	°

【引用文献】

1. **Lutolf, M. P., and Hubbell, J. A.:** Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 47–55 (2005).
2. **Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A.:** The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 76–83 (2000).
3. **Majumder, P. K., Febbo, P. G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L. M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T. J., Golub, T. R., Loda, M., Lane, H. A., and Sellers, W. R.:** mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways, *Nat. Med.*, **10**, 594–601 (2004).
4. **Khwaja, A., Rodriguez-Vician, 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.*, **16**, 2783–2793 (1997).
5. **Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E., and Chan-Hui, P. Y.:** Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase, *J. Cell Biol.*, **134**, 793–799

- (1996).
6. **Ferry, R. J. Jr., Katz, L. E., Grimberg, A., Cohen, P., and Weinzimer, S. A.:** Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins, *Horm. Metab. Res.*, **31**, 192–202 (1999).
 7. **Monier-Gavelle, F., and Duband, J. L.:** Cross talk between adhesion molecules: control of N-cadherin activity by intracellular signals elicited by beta1 and beta3 integrins in migrating neural crest cells, *J. Cell Biol.*, **137**, 1663–1681 (1997).
 8. **Huttenlocher, A., Lakonishok, M., Kinder, M., Wu, S., Truong, T., Knudsen, K. A., and Horwitz, A. F.:** Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity, *J. Cell Biol.*, **141**, 515–526 (1998).
 9. **Yano, H., Mazaki, Y., Kurokawa, K., Hanks, S. K., Matsuda, M., and Sabe, H.:** Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion, *J. Cell Biol.*, **166**, 283–295 (2004).
 10. **Bos, J. L.:** Linking Rap to cell adhesion, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 123–128 (2005).
 11. **Fukuhara, S., Sakurai, A., Sno, H., Yamagishi, A., Somekawa, S., Takakura, N., Saito, Y., Kangawa, K., and Mochizuki, N.:** Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway, *Mol. Cell Biol.*, **25**, 136–146 (2005).
 12. **Friedl, P., and Gilmour, D.:** Collective cell migration in morphogenesis, regeneration

- and cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 445–457 (2009).
13. **Friedl, P.:** Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 14–23 (2004).
 14. **Yilmaz, M., and Christofori, G.:** Mechanisms of motility in metastasizing cells, *Mol. Cancer Res.*, **8**, 629–642 (2010).
 15. **Nanba, D., Toki, F., Tate, S., Imai, M., Matsushita, N., Shiraishi, K., Sayama, K., Toki, H., Higashiyama, S., and Barrandon, Y.:** Cell motion predicts human epidermal stemness, *J. Cell Biol.*, **209**, 305–315 (2015).
 16. **Castillo, A.M., Laqunes, R., Urban, M., Frixione, E., and Meza, I.:** Myosin II-actin interaction in MDCK cells: role in cell shape changes in response to Ca²⁺ variations, *J. Muscle. Res. Cell Motil.*, **19**, 557–574 (1998).
 17. **Lei, Q.Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.Y., Bai, F., Pei, X.H., Zhao, S., Xiong, Y., and Guan, K.L.:** TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway, *Mol. Cell Biol.*, **28**, 2426–436 (2008).
 18. **Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S.:** A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors, *Cell*, **154**, 1047–1059 (2013).
 19. **Mamada, H., Sato, T., Ota, M., and Sasaki, H.:** Cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts is controlled by the activity of Tead family proteins and Myc,

- J.Cell Sci., **128**, 790–803 (2015).
20. **Iwasa, H., Maimaiti, S., Kuroyanagi, H., Kawano, S., Inami, K., Timalina, S., Ikeda, M., Nakagawa, K., and Hata, Y.:** Yes-associated protein homolog, YAP-1, is involved in the thermotolerance and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Exp. Cell Res.*, **319**, 931–945 (2013).
 21. **Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Brocker, EB., and Friedl, P.:** Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies, *Cancer Res.*, **62**, 2125–2130 (2002).
 22. **Montell, D.J.:** Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties, *Science*, **322**, 1502–1505 (2008).
 23. **Haga, H., Irahara, C., Kobayashi, R., Nakagaki, T., and Kawabata, K.:** Collective movement of epithelial cells on a collagen gel substrate, *Biophys. J.*, **88**, 2250–2256 (2005).
 24. **Mayor, R., and Carmone-Fontaine, C.:** Keeping in touch with contact inhibition of locomotion, *Trends Cell Biol.*, **20**, 319–328 (2010).
 25. **Macpherson, I.R., Hooper, S., Serrels, A., McGarry, L., Ozanne, B.W., Harrington, K., Frame, M.C., Sahai, E., and Brunton, V.G.:** p120-catenin is required for the collective invasion of squamous cell carcinoma cells via a phosphorylation-independent mechanism, *Oncogene*, **26**, 5214–5228 (2007).

26. **Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D.A., Wells, A., and Griffith, L.G.:**
Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering, *J. Cell Sci.*, **113**,
1677–1686 (2000).
27. **Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M.,
Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., and Piccolo,
S.:** Role of YAP/TAZ in mechanotransduction, *Nature*, **474**, 179–183 (2011).
28. **Martin, P.:** Wound healing—aiming for perfect skin regeneration, *Science*, **276**, 75–81
(1997).
29. **Duman, R.S., and Monteggia, L.M.:** A neurotrophic model for stress-related mood
disorders, *Biol. Psychiatry*, **59**, 1116–1127 (2006).
30. **Deverman, B.E., and Patterson, P.H.:** Cytokines and CNS development, *Neuron*, **64**,
61–78 (2009).
31. **Kokkinopoulos, I. Shahabi, G. Colman, A. and Jeffery, G.:** Mature peripheral RPE
cells have an intrinsic capacity to proliferate; a potential regulatory mechanism for
age-related cell loss, *PLoS. One*, **6**, e18921 (2011).
32. **Frechin, M., Stoeger, T., Daetwyler, S., Gehin, C., Battich, N., Damm, E. M.,
Stergiou, L., Riezman, H., and Pelkmans, L.:** Cell-intrinsic adaptation of lipid
composition to local crowding drives social behavior, *Nature*, **523**, 88–91 (2015).
33. **Sun, J.N., Mandai, M., Kamao, H., Hashiguchi, T., Shikamura, M., Kawamata, S.,**

- Sugita, S., and Takahashi, M.:** Protective effects of human iPS-derived retinal pigmented epithelial cells in comparison with human mesenchymal stromal cells and human neural stem cells on the degenerating retinal in rd1 mice, *Stem Cells*, **33**, 1543–1553 (2015).
34. **Chen, H.C., Zhu, Y.T., Chen, SY., and Tseng, SC.:** Wnt signaling induces epithelial-mesenchymal transition with proliferation in ARPE-19 cells upon loss of contact inhibition, *Lab. Invest.*, **92**, 676–687 (2012).
35. **Peng, S., Gan, G., Rao, V.S., Adelman, R.A., and Rizzolo, L.J.:** Effects of proinflammatory cytokines on the claudin-19 rich tight junctions of human retinal pigment epithelium, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**, 5016–5028 (2012).
36. **Singh, R., Phillips, M.J., Kuai, D., Meyer, J., Martin, J.M., Smith, M.A., Perez, E.T., Shen, W., Wallace, K.A., Capowski, E.E., Wright, L.S., and Gamm, D.M.:** Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **54**, 6767–6778 (2013).
37. **Okamoto, S., and Takahashi, M.:** Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**, 8785–8790 (2011).
38. **Muniz, A., Greene, W.A., Plamper, M.L., Choi, J.H., Johnson, A.J., Tsin, A.T., and Wang, H.C.:** Retinoid uptake, processing, and secretion in human iPS-RPE support the visual cycle, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **55**, 198–209 (2014).

39. **Haned, J., Nagar, S., and McGahan, M.C.:** Hypoxia controls iron metabolism and glutamate secretion in retinal pigmented epithelial cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1840**, 3138–3144 (2014).
40. **Senanayake, P.d., Calabro, A., Hu, J.G., Bonilha, V.L., Darr, A., Bok, D., and Hollyfield, J.G.:** Glucose utilization by the retinal pigment epithelium: evidence for rapid uptake and storage in glycogen, followed by glycogen utilization, *Exp. Eye Res.*, **83**, 235–246 (2006).
41. **Thurman, J.M., Renner, B., Kunchithapautham, K., Ferreira, V.P., Pangburn, M.K., Ablonczy, Z., Tomlinson, S., Holers, V.M., and Rohrer, B.:** Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury, *J. Biol. Chem.*, **284**, 16939–16947 (2009).
42. **Abe, T., Sugano, E., Saigo, Y., and Tamai, M.:** Interleukin-1beta and barrier function of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): aberrant expression of junctional complex molecules, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 4097–4104 (2003).
43. **Rajasekaran, S.A., Hu, J., Gopal, J., Gallemore, R., Ryazantsev, S., Bok, D., and Rajasekaran, A.K.:** Na, K-ATPase inhibition alters tight junction structure and permeability in human retinal pigment epithelial cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **284**, 1497–1507 (2003).
44. **Ablonczy, Z., and Crosson, C.E.:** VEGF modulation of retinal pigment epithelium

- resistance, *Exp. Eye Res.*, **85**, 762–771 (2007).
45. **Puliafito, A. Hufnagel, L. Neveu, P. Streichan, S. Sigal, A. Fygenon, DK. and Shraiman, BI.:** Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 739–744 (2012).
 46. **Strauss, O.:** The retinal pigment epithelium in visual function, *Physiol. Rev.*, **85**, 845–881 (2005).
 47. **Sparrow, J.R., Wu, Y., Kim, C. Y., and Zhou, J.:** Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids, *J. Lipid. Res.*, **51**, 247–261 (2010).
 48. **Saari, J. C.:** Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles, *Annu. Rev. Nutr.*, **32**, 125–145 (2012).
 49. **Sarna, T.:** Properties and function of the ocular melanin—a photobiophysical view, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **12**, 215–258 (1992).
 50. **Sparrow J.R., Hicks, D., and Hamel C. P.:** The retinal pigment epithelium in health and disease, *Curr. Mol. Med.*, **10**, 802–823 (2010).
 51. **Nowak, J.Z.:** Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy, *Pharmacol. Rep.*, **58**, 353–363 (2006).
 52. **Melville, H., Carpiello, M., Hollis, K., Staffaroni, A., and Golestaneh, N.:** Stem cells: a new paradigm for disease modeling and developing therapies for age-related macular degeneration, *J. Transl. Med.*, **11**, 53 (2013).

53. **Osakada, F., Ikeda, H., Sasai, Y., and Takahashi, M.:** Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells, *Nat. Protoc.*, **4**, 811–824 (2009).
54. **Schwartz, S.D., Hubschman, J.P., Heilwell, G., Cardenas, V.F., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R.:** Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report, *Lancet*, **379**, 713–720 (2012).
55. **Li, Y., Tsai, Y.T., Hsu, C.W., Erol, D., Yang, J., Wu, W.H., Davis, R.J., Egli, D., and Tsang, S.H.:** Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa, *Mol. Med.*, **18**, 1312–1319 (2012).
56. **Kaneko, H., Dridi, S., Tarallo, V., Gelfand, B.D., Fowler, B.J., Cho, W.G., Kleinman, M.E., Ponicsan, S.L., Hauswirth, W.W., Chiodo, V.A., Karikó, K., Yoo, J.W., Lee, D.K., Hadziahmetovic, M., Song, Y., Misra, S., Chaudhuri, G., Buaas, F.W., Braun, R.E., Hinton, D.R., Zhang, Q., Grossniklaus, H.E., Provis, J.M., Madigan, M.C., Milam, A.H., Justice, N.L., Albuquerque, R.J., Blandford, A.D., Bogdanovich, S., Hirano, Y., Witta, J., Fuchs, E., Littman, D.R., Ambati, B.K., Rudin, C.M., Chong, M.M., Provost, P., Kugel, J.F., Goodrich, J.A., Dunaief, J.L., Baffi, J.Z., and Ambati, J.:** DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration, *Nature*, **471**, 325–330 (2011).
57. **Haruta, M., Sasai, Y., Kawasaki, H., Amemiya, K., Ooto, S., Kitada, M., Suemori,**

- H., Nakatsuji, N., Ide, C., Honda, Y., and Takabashi, M.:** *In vitro* and *in vivo* characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**, 1020–1025 (2004).
58. **Steinle, J.J., Kern, T.S., Thomas, S.A., McFadyen-Ketchum L.S., and Smith, C.P.:** Increased basement membrane thickness, pericyte ghosts, and loss of retinal thickness and cells in dopamine beta hydroxylase knockout mice, *Exp. Eye Res.*, **88**, 1014–1019 (2009).
59. **Hirami, Y., Osakada, F., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Ikeda, H., Yoshimura, N., and Takahashi, M.:** Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells, *Neurosci. Lett.*, **458**, 126–131 (2009).
60. **Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S., Kiryu, J., and Takahashi, M.:** Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application, *Stem Cell Reports*, **2**, 205–218 (2014).
61. **Bok, D.:** The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision, *J. Cell Sci. Suppl.*, **17**, 189–195 (1993).
62. **Youn, Y.H., Hong, J., and Burke, J.M.:** Cell phenotype in normal epithelial cell lines with high endogenous N-cadherin: comparison of RPE to an MDCK subclone, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, 2675–2685 (2006).

63. **Burke, J.M.:** Epithelial phenotype and the RPE: is the answer blowing in the Wnt?, *Prog. Retin. Eye. Res.*, **27**, 579–595 (2008).
64. **Kurji, K.M., Cui, J.Z., Lin, T., Harriman, D., Prasad, S.S., Kojic, L., and Matsubara, J.A.:** Microarray analysis identifies changes in inflammatory gene expression in response to amyloid-beta stimulation of cultured human retinal pigment epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 1151–1163 (2010).
65. **Tian, J., Ishibashi, S., Honda, S., Boylan, S.A, Hjelmeland, L.M., and Honda JT.:** The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in different culture conditions, *Br. J.* **89**, 1510–1517 (2005).
66. **Vugler, A., Carr, A.J., Lawrence, J., Chen, L.L., Burrell, K., Wright, A., Lundh, P., Semo, M., Ahmado, A., Giasm, C., da Cruz, L., Moore, H., Andrews, P., Walsh, J., and Coffey, P.:** Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation, *Exp. Neurol.*, **214**, 347–361 (2008).
67. **Hay, E. D., and Zuk, A.:** Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced, *Am. Kidney Dis.*, **26**, 678–690 (1995).
68. **Hay, E. D.:** An overview of epithelia-mesenchymal transformation, *Acta. Anat.*, **154**, 8–20 (1995).
69. **Kalluri, R., and Weinberg, RA.:** The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J.*

- Clin. Invest., **119**, 1420-1428 (2009).
70. **Chen, Q. K., Lee, K., Radisky, D. C., and Nelson, C. M.:** Extracellular matrix proteins regulate epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells, *Differentiation*, **86**, 126–132 (2013).
71. **Liu, Y., Xin, Y., Ye, F., Wang, W., Lu, Q., Kaplan, HJ., and Dean, DC.:** Taz-tead1 links cell-cell contact to zeb1 expression, proliferation, and dedifferentiation in retinal pigment epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 3372–3378 (2010).
72. **Lee, H., O'Meara, SJ., O'Brien, C., and Kane, R.:** The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 4291–4299 (2007).
73. **Jin, M., He, S., Worpel, V., Ryan, SJ., and Hinton, DR.:** Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 4324–4332 (2000).
74. **Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., and Segall, JE.:** Classifying collective cancer cell invasion, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 777–783 (2012).
75. **Sachs, N., and Sonnenberg, A.:** Cell-matrix adhesion of podocytes in physiology and disease, *Nat. Rev. Nephrol.*, **9**, 200–210 (2013).
76. **Zhang, H., Tasnim, F., Ying, J.Y., and Zink, D.:** The impact of extracellular matrix coatings on the performance of human renal cells applied in bioartificial kidneys,

- Biomaterials, **30**, 2899–2911 (2009).
77. **Chaudhuri, O., Koshy, S. T., Branco da Cunha, C., Shin, J. W., Verbeke, C. S., Allison, K. H., and Mooney, D. J.:** Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium, *Nat. Mater.*, **10**, 970–978 (2014).
78. **Pattabiraman, P. P., Maddala, R., and Rao, P. V.:** Regulation of plasticity and fibrogenic activity of trabecular meshwork cells by Rho GTPase signaling, *J. Cell Physiol.*, **229**, 927–942 (2014).
79. **Palchesko, R. N., Lathrop, K. L., Funderburgh, J. L., and Feinberg, A. W.:** In vitro expansion of corneal endothelial cells on biomimetic substrates, *Sci. Rep.*, **5**, 7955 (2015).
80. **Teravainen, T. P., Myllymaki, S. M., Friedrichs, J., Strohmeyer, N., Moyano, J. V., Wu, C., Matlin, K. S., Muller, D. J., and Manninen, A.:** α V-integrins are required for mechanotransduction in MDCK epithelial cells, *PLoS. One*, **8**, e71485 (2013).
81. **Sharma, M., Tiwari, A., Sharma, S., Bhorla, P., Gupta, V., Gupta, A., and Luthra-Guptasarma, M.:** Fibrotic remodeling of the extracellular matrix through a novel (engineered, dual-function) antibody reactive to a cryptic epitope on the N-terminal 30 kDa fragment of fibronectin, *PLoS. One*, **8**, e69343 (2013).
82. **Baldwin, A.K., Cain, S.A., Lennon, R., Godwin, A., Merry, C.L.R., and Kielty,**

- C.M.:** Epithelial-mesenchymal status influences how cells deposit fibrillin microfibrils, *J. Cell Sci.*, **127**, 158–171 (2014).
83. **Bass, M.D, Morgan, M.R., Roach, K.A., Settleman, J., Goryachev, A.B., and Humphries, M.J.:** p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from alpha 5 beta 1 integrin and syndecan-4, *J. Cell Sci.*, **181**, 1013–1026 (2008).
 84. **Dovas, A., Yoneda, A., and Couchman, J.R.:** PKCbeta-dependent activation of RhoA by syndecan-4 during focal adhesion formation, *J. Cell Sci.*, **119**, 2837–2846 (2006).
 85. **Wang, H., Wittchen, E. S., Jiang, Y., Ambati, B., Grossniklaus, H. E., and Hartnett, M. E.:** Upregulation of CCR3 by age-related stresses promotes choroidal endothelial cell migration via VEGF-dependent and –independent signaling, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**, 8271–8277 (2011).
 86. **Ruiz-Loredo, A. Y., Lopez, E., and Lopez-Colome, A. M.:** Thrombin stimulates stress fiber assembly in RPE cells by PKC/CPI-17-mediated MLCP inactivation, *Exp. Eye Res.*, **96**, 13–23 (2012).
 87. **Singh, P., Caarraher, C., and Schwarzbauer, J.E.:** Assembly of fibronectin extracellular matrix, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **26**, 397–419 (2010).
 88. **McKay, BS., Irving, PE., Skumatz, CM., and Burke, JM.:** Cell-cell adhesion molecules and the development of an epithelial phenotype in cultured human retinal pigment epithelial cells, *Exp. Eye Res.*, **65**, 661–671 (1997).

89. **Honda, S., Hjelmeland, LM., Handa, JT.:** Senescence associated beta galactosidase activity in human retinal pigment epithelial cells exposed to mild hyperoxia in vitro, *Br. J. Ophthalmol.*, **86**, 159-162 (2002).
90. **Kim, MH., Sonoi, R., Yamada, K., Inamori, M., and Kino-oka, M.:** Analysis of locality of early-stage maturation in confluent state of human retinal pigment epithelial cells, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 778–781 (2012).
91. **Nadzir, M. M., Kino-oka, M., Maruyama, N., Sato, Y., Kim, M. H., Sugawara, K., and Taya, M.:** Comprehension of terminal differentiation and dedifferentiation of chondrocytes during passage cultures, *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 395–401 (2011).
92. **Kino-oka, M., Maeda, Y., Sato, Y, Maruyama, N., Takezawa, Y., Khoshfetrat, A. B., Sugawara, K., and Taya, M.:** Morphological evaluation of chondrogenic potency in passaged cell populations, *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 544–551 (2009).
93. **Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G.:** Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior, *J. Cell Biol.*, **147**, 1009–1022 (1999).
94. **Kumarswamy, R., Mudduluru, G, Ceppi, P., Muppala, S., Kozłowski, M., Niklinski, J., Papotti, M., and Allgayer, H.:** MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snai1 and is downregulated in non-small cell lung cancer, *Int. J.*

- Cancer, **130**, 2044–2053 (2012).
95. **Huang, Z. H., Wang, Y., Cao, L., Su, Z. D., Zhu, Y. L., Chen, Y. Z., Yuan, X. B., and He, C.:** Migratory properties of cultured olfactory ensheathing cells by single-cell migration assay, *Cell Res.*, **18**, 479–490 (2008).
 96. **Wieser, M., Stadler, G., Jennings, P., Streubel, B., Pfaller, W., Ambros, P., Riedl, C., Katinger, H., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R.:** hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **295**, 1365-1375 (2008).
 97. **Ruiz-Loredo, AY., Lopez, E., and Lopez-Colome, AM.:** Thrombin stimulates stress fiber assembly in RPE cells by PKC/CPI-17-mediated MLCP inactivation, *Exp. Eye Res.*, **96**, 13-23 (2012).
 98. **Ramirez-Rodriguez, G., Meza, I., Hernandez, ME., Castillo, A., and Benitez-King, G.:** Melatonin induced cyclic modulation of vectorial water transport in kidney-derived MDCK cells, *Kidney. Int.*, **63**, 1356-1364 (2003).
 99. **Liu, JP.:** Protein kinase C and its substrates, *Mol. Cell Endocrinol.*, **116**, 1-29 (1996).
 100. **Yu, AL., Birke, K., Burger, J., and Welge-Lussen, U.:** Biological effects of cigarette smoke in cultured human retinal pigment epithelial cells, *PLoS. One*, **7**, e48501 (2012).
 101. **An, E., Lu, X., Flippin, J., Devaney, JM., Halligan, B., Hoffman, EP., Strunnikova, N., Csaky, K., and Hathout, Y.:** Secreted proteome profiling in human RPE cell

- cultures derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors, *J. Proteome Res.*, **5**, 2599-2610 (2006).
102. **Chen, X., Xiao, W., Wang, W., Luo, L., Ye, S., and Liu, Y.:** The complex interplay between ERK1/2, TGFbeta/Smad, and Jagged/Notch signaling pathways in the regulation of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells, *PLoS. One*, **9**, e96365 (2014).
 103. **Li, R., Maminishkis, A., Zahn, G., Vossmeier, D., and Miller, S.S.:** Integrin alpha5beta1 mediates attachment, migration, and proliferation in human retinal pigment epithelium: relevance for proliferative retinal disease, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 5988–5996 (2009).
 104. **Tamiya, S., Liu, L., and Kaplan, HJ.:** Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 2755-2763 (2010).
 105. **Mony, S., Lee, SJ., Harper, JF., Barwe, SP., and Langhans, SA.:** Regulation of Na,K-ATPase beta1-subunit in TGF-beta2-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in human retinal pigmented epithelial cells, *Exp. Eye Res.*, **115**, 113-122 (2013).
 106. **Liu, Y., Xin, Y., Ye, F., Wang, W., Lu, Q., Kaplan, HJ., and Dean, DC.:** Taz-tead1 links cell-cell contact to zeb1 expression, proliferation, and dedifferentiation in retinal

- pigment epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 3372-3378 (2010).
107. **Lee, H., O'Meara, SJ., O'Brien, C., and Kane, R.:** The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 4291-4299 (2007).
 108. **Jin, M., He, S., Worpel, V., Ryan, SJ., and Hinton, DR.:** Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 4324-4332 (2000).
 109. **Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., and Segall, JE.:** Classifying collective cancer cell invasion, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 777-783 (2012).
 110. **Takahashi, E., Nagano, O., Ishimoto, T., Yae, T., Suzuki, Y., Shinoda, T., Nakamura, S., Niwa, S., Ikeda, S., Koga, H., Tanihara, H., and Saya, H.:** Tumor necrosis factor-alpha regulates transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction, *J. Biol. Chem.*, **285**, 4060-4073 (2009).
 111. **Maeda, M., Shintani, Y., Wheelock, MJ., and Johnson, KR.:** Src activation is not necessary for transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial to mesenchymal transitions (EMT) in mammary epithelial cells. PP1 directly inhibits TGF-beta receptors I and II, *J. Biol. Chem.*, **281** 59-68 (2005).
 112. **Loerke, D. Duc, QL. Blonk, I. Kerstens, A. Spanjaard, E. Machacek, M. Danuser,**

- G. and Rooij, JD.:** Quantitative imaging of epithelial cell scattering identifies specific inhibitors of cell motility and cell–cell dissociation, *Sci. Signal*, **5**, rs5 (2012).
113. **Verstraeten, TC. Buzney, SM. Macdonald, SG. and Neufeld, AH.:** Retinal pigment epithelium wound closure in vitro. Pharmacologic inhibition, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **31**, 481–488 (1990).
114. **Umegaki, R. Kino-oka, M. and Taya, M.:** Assessment of cell detachment and growth potential of human keratinocyte based on observed changes in individual cell area during trypsinization, *Biochem. Eng. J.*, **17**, 49–55 (2004).
115. **Herrero, J. Tejera, A. Albert, C. Vidal, C. de Los Santos, MJ. and Meseguer M.:** A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development, *Fertil. Steril.*, **100**, 1602–1609 (2013).
116. **Kirkegaard, K. Agerholm, IE. and Ingerslev, HJ.:** Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment, *Hum. Reprod.*, **27**, 1277–1285 (2012).
117. **Kokkaliaris, KD. Loeffler, D. and Schroeder, T.:** Advances in tracking hematopoiesis at the single-cell level, *Curr. Opin. Hematol.*, **19**, 243–249 (2012).
118. **Kino-oka, M. Agatahama, Y. Hata, N. and Taya, M.:** Evaluation of growth potential of human epithelial cells by motion analysis of pairwise rotation under glucose-limited condition, *Biochem. Eng. J.*, **19**, 109–117 (2004).
119. **Nobes, CD. and Hall, A.:** Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion

- during cell movement, *J. Cell Biol.*, **144**, 1235–1244 (1999).
120. **Yamada, S. and Nelson, WJ.:** Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell–cell adhesion, *J. Cell Biol.*, **178**, 517–527 (2007).
121. **Miyoshi, J. and Takai, Y.:** Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **57**, 815–855 (2005).
122. **Omelchenko, T. and Hall, A.:** Myosin-IXA regulates collective epithelial cell migration by targeting RhoGAP activity to cell–cell junctions, *Curr. Biol.*, **22**, 278–288 (2012).
123. **Hegerfeldt, Y. Tusch, M. Brocker, EB. and Friedl, P.:** Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell–cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies, *Cancer. Res.*, **62**, 2125–2130 (2002).
124. **McCormack, J. Welsh, NJ. and Braga, Vania MM.:** Cycling around cell–cell adhesion with Rho GTPase regulators, *J. Cell Sci.*, **126**, 379–391 (2013).
125. **Braga, Vania MM. and Yap, AS.:** The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signaling, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 466–474 (2005).
126. **Bruewer, M. Hopkins, AM. Hobert, ME. Nusrat, A. and Madara, JL.:** RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*,

- 287, C327–335 (2004).
127. **Zheng, Y.:** Dbl family guanine nucleotide exchange factors, *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 724–732 (2001).
128. **Burridge, K. and Wennerberg, K.:** Rho and Rac take center stage, *Cell*, **116**, 167–179 (2004).
129. **Gao, Y. Dickerson, JB. Guo, F. Zheng, J. and Zheng, Y.:** Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 7618–7623 (2004).
130. **Doxzen, K., Vedula, S.R., Leong, M.C., Hirata, H., Gov, N.S., Kabla, A.J., Ladoux, B., and Lim, C.T.:** Guidance of collective cell migration by substrate geometry, *Integr. Biol.*, **5**, 1026–1035 (2013).
131. **Ng, M.R., Besser, A., Danuser, G., and Brugge, J.S.:** Substrate stiffness regulates cadherin-dependent collective migration through myosin-II contractility, *J. Cell Biol.*, **199**, 545–563 (2012).
132. **Jaffe, A.B., and Hall, A.:** Rho GTPases: biochemistry and biology, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 247–269 (2005).
133. **Nobes, C.D., and Hall, A.:** Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement, *J. Cell Biol.*, **144**, 1235–1244 (1999).
134. **Yamada, S., and Nelson, W.J.:** Localized zones of Rho and Rac activities drive

- initiation and expansion of epithelial cell–cell adhesion, *J. Cell Biol.*, **178**, 517–527 (2007).
135. **Itoh, M., Tsukita, S., Yamazaki, Y., and Sugimoto, H.:** Rho GTP exchange factor ARHGEF11 regulates the integrity of epithelial junctions by connecting ZO-1 and RhoA-myosin II signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 9905–9910 (2012).
 136. **Sonoi, R., Kim, M.H., and Kino-oka, M.:** Locational heterogeneity of maturation by changes in migratory behaviors of human retinal pigment epithelial cells in culture, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 107–112 (2015).
 137. **Danen, E.H., van Rheenen, J., Franken, W., Huveneers, S., Sonneveld, P., Jalink, K., and Sonnenberg, A.:** Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway, *J. Cell Biol.*, **169**, 515–526 (2005).
 138. **Burke, J.M., Cao, F., Irving, P.E., and Skumatz, C.M.:** Expression of E-cadherin by human retinal pigment epithelium: delayed expression in vitro, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 2963–2970 (1999).
 139. **Kaida, M., Cao, F., Skumatz, C.M., Irving, P.E., and Burke, J.M.:** Time at confluence for human RPE cells: effects on the adherens junction and in vitro wound closure, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 3215–3224 (2000).
 140. **Ishiyama, N., Lee, S.H., Liu, S., Li, G.Y., Smith, M.J., Reichardt, L.F., and Ikura, M.:** Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the

- stability of cell-cell adhesion, *Cell*, **141**, 117–128 (2010).
141. **Nanes, B.A., Chiasson-MacKenzie, C., Lowery, A.M., Ishiyama, N., Faundez, V., Ikura, M., Vincent, P.A., and Kowalczyk, A.P.:** p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins, *J. Cell Biol.*, **199**, 365–380 (2012).
 142. **Ozawa, M., and Ohkubo, T.:** Tyrosine phosphorylation of p120(ctn) in v-Src transfected L cells depends on its association with E-cadherin and reduces adhesion activity, *J Cell Sci.*, **114**, 503–512 (2000).
 143. **Anastasiadis, P.Z., Moon, S.Y., Thoreson, M.A., Mariner, D.J., Crawford, H.C., Zheng, Y., and Reynolds, A.B.:** Inhibition of RhoA by p120 catenin, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 637–644 (2000).
 144. **Chen, H.C., Zhu, Y.T., Chen, S.Y., and Tseng, S.C.:** Selective activation of p120ctn-Kaiso signaling to unlock contact inhibition of ARPE-19 cells without epithelial-mesenchymal transition, *PLoS. One*, **7**, e36864 (2012).
 145. **Parri, M., and Chiarugi, P.:** Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control, *Cell Commun. Signal*, **8**, 23–37 (2010).
 146. **Terry, S.J., Zihni, C., Elbediwy, A., Vitiello, E., Leefa Chong San, I.V., Balda, M.S., and Matter, K.:** Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and morphogenesis, *Nat. Cell Biol.*, **13**, 159–166 (2011).

147. **Miyoshi, J., and Takai, Y.:** Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1778**, 670–691 (2008).
148. **Geisen, P., McColm, J.R., King, B.M., and Hartnett, M.E.:** Characterization of barrier properties and inducible VEGF expression of several types of retinal pigment epithelium in medium-term culture, *Curr. Eye Res.*, **31**, 739–748 (2006).
149. **Levayer, R., and Lecuit, T.:** Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics, *Trends Cell Biol.*, **22**, 61–81 (2012).
150. **Tachibana, M.:** MITF: a stream flowing for pigment cells, *Pigment Cell Res.*, **13**, 230–240 (2000).
151. **Menko, A.S., Bleaken, B.M., and Walker, J.L.:** Regional-specific alterations in cell-cell junctions, cytoskeletal networks and myosin-mediated mechanical cues coordinate collectivity of movement of epithelial cells in response to injury, *Exp. Cell Res.*, **322**, 133–148 (2014).
152. **Murrell, M., Kamm, R., and Matsudaira, P.:** Substrate viscosity enhances correlation in epithelial sheet movement, *Biophys. J.*, **101**, 297–306 (2011).
153. **Duman, R.S., and Monteggia, L.M.:** A neurotrophic model for stress-related mood disorders, *Biol. Psychiatry.*, **59**, 1116–1127 (2006).
154. **Deverman, B.E., and Patterson, P.H.:** Cytokines and CNS development, *Neuron*, **64**, 61–78 (2009).

発表論文

本学位論文に關与する論文

- 1) **Kim, M.H., Sonoi, R., Yamada, K., Inamori, M., and Kino-oka, M.:** Analysis of locality of early-stage maturation in confluent state of human retinal pigment epithelial cells, J. Biosci. Bioeng., **113**, 778–781 (2012).
- 2) **Sonoi, R., Kim, M.H., and Kino-oka, M.:** Locational heterogeneity of maturation by changes in migratory behaviors of human retinal pigment epithelial cells in culture, J. Biosci. Bioeng., **119**, 107–112 (2015).
- 3) **Sonoi, R., Kim, M.H., and Kino-oka, M.:** Facilitation of uniform maturation of human retinal pigment epithelial cells through collective movement in culture, J. Biosci. Bioeng., **121**, 220–226 (2016).

学会発表

【国際シンポジウム】

1. ○Sonoi, R., Kim, M.H., and Kino-oka, M. “Quantitative evaluation of human retinal epithelial cells in confluent states”, “The 11th Global COE international symposium”, P39, Osaka, JAP. (December 2011).
2. ○Sonoi, R., Kim, M.H., and Kino-oka, M. “Analysis of maturation of human retinal pigment epithelial cells in confluent state through a measurement of cell migration”, “Aachen-Osaka Symposium”, Aachen, GER. (December 2012).

【国内学会】

1. 金美海，園井理恵，山田健太，稲森雅和，紀ノ岡正博，「コンフルエント状態における不死化網膜色素上皮細胞の分化特性の解析」，『第63回日本生物工学会大会』，東京，2011年9月
2. 園井理恵，備瀬竜馬，金美海，紀ノ岡正博，「コンフルエント状態における網膜色素上皮細胞の遊走性による細胞成熟度の解析」，『化学工学会第44回秋季大会』，仙台，2012年9月
3. 園井理恵，金美海，紀ノ岡正博，「細胞遊走測定によるヒト網膜色素上皮細胞の成熟過程の解析」，『化学工学会第78回春季大会』，大阪，2013年3月

【学会賞】

園井理恵，備瀬竜馬，金美海，紀ノ岡正博，「コンフルエント状態における網膜色素上皮細胞の遊走性による細胞成熟度の解析」，『化学工学会第44回秋季大会，バイオ部会優秀ポスター賞受賞』，仙台，2012年9月

謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切なご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 紀ノ岡正博 教授に深く感謝の意を表します。時に応じて、厳しくまたは優しくご指導いただいたことを通じて、私自身の至らなさを実感し、励むことができたことは今後の糧となると考えております。

本論文の審査にあたり、様々なご助言を賜りました大阪大学工学研究科 藤山 和仁 教授、大政 健史 教授に深く感謝いたします。さらに、本研究を行うにあたり、温かく見守って下さいました大阪大学大学院工学研究科 長森英二 講師、丁寧かつ的確なご助言、研究への取り組み方などをご指導くださった大阪大学大学院工学研究科 金美海 助教に厚く恩礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、日頃よりご助言を頂きました 大阪大学工学研究科 稲森雅和 博士研究員（現 ヘリオス（株））や本研究グループとして共に頑張ってきた 山田健太 氏（現 ジョンソン・エンド・ジョンソン（株））や東瀬戸大志 氏（現 鹿児島県庁）、寺西陽友 氏（現 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（株））、Xie Yucheng（本学大学院博士後期課程）に感謝いたします。さらに、日頃の研究活動において、ともに励ましあい、支えてくれた Ngo Xuan Trung 博士研究員（大阪大学大学院工学研究科）、小川祐樹 氏（大阪大学大学院博士後期課程）、増田英里 氏（現 東和薬品（株））、栗坂和江 氏（現 メディコン（株））、中村匡 氏（大阪大学大学院博士後期課程）、岸京子 氏（現 構造計画研究所（株））には、深く感謝しております。

いつもあたたかく見守り、優しく接して下さいました事務補佐員 若松光子 氏、笑顔で周りを明るくして下さいました 西村智子 氏には、研究生活を遂行する上で甚大なるご協力をいただき、厚く恩礼申し上げます。

最後に，生物工学を志すにあたり，その道筋を温かく見守り，辛抱強く支援してくれた家族，紀ノ岡研の学生諸氏，友人無しに本研究を成し遂げることができなかったことを申し添え，謝辞と致します．