



Title	細胞挙動に基づくヒト幹細胞の心筋分化方向性誘導に関する研究
Author(s)	小川, 祐樹
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61779">https://doi.org/10.18910/61779</a>
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

細胞挙動に基づくヒト幹細胞の  
心筋分化方向性誘導に関する研究

小川 祐樹

2017年1月

大阪大学大学院工学研究科



## 目次

概略紹介.....	1
第1章 培養面上での集塊形成を伴うヒト間葉系幹細胞の培養特性.....	6
1.1 緒言.....	6
1.2 実験方法.....	8
1.3 結果.....	11
1.3.1 ヒト間葉系幹細胞の動的挙動.....	11
1.3.2 ヒト間葉系幹細胞の心筋分化方向性の誘導.....	14
1.4 考察.....	16
1.5 小括.....	18
第2章 培養面上での自発的足場環境の構築によるヒト間葉系幹細胞挙動変化.....	19
2.1 緒言.....	19
2.2 実験方法.....	20
2.3 結果.....	26
2.3.1 足場環境の構築と細胞挙動.....	26
2.3.2 接着点の構築と骨格形成.....	35
2.4 考察.....	37
2.5 小括.....	40
第3章 細胞集塊挙動によるヒト間葉系幹細胞の集塊内挙動.....	41
3.1 緒言.....	41
3.2 実験方法.....	42
3.3 結果.....	45
3.3.1 ヒト間葉系幹細胞集塊の動的挙動.....	45
3.3.2 細胞間接着に関わるタンパク質の局在と心筋マーカーの確認.....	47
3.4 考察.....	49
3.5 小括.....	51
第4章 細胞集塊挙動に基づくヒト間葉系幹細胞の培養特性.....	52
4.1 緒言.....	52

4.2 実験方法.....	53
4.3 結果.....	57
4.3.1 細胞集塊挙動の継続による心筋分化方向性誘導の促進 .....	57
4.3.2 細胞集塊の崩壊と再形成を介した心筋分化方向性誘導の促進 .....	60
4.3.3 細胞挙動に基づく心筋分化方向性の誘導 .....	63
4.4 考察.....	67
4.5 小括.....	69
総括.....	70
略語リスト.....	74
参考文献.....	75
本報に関する論文.....	86
謝辞.....	87

## 概略紹介

組織工学における培養手法の発展は、生体外での細胞の増幅や分化誘導の効率化および組織化を可能とした (Matsuura *et al.*, 2012; Takebe *et al.*, 2015). 生体外での細胞培養において、増殖や分化などの機能を制御する為に、細胞外環境を構築する手法が採用されている (Antoniades and Owen, 1982; Higuchi *et al.*, 2015). 細胞外環境には、隣接する細胞、増殖因子や低分子化合物などが含まれる培地、支持体である足場材料が含まれている。細胞外環境を利用した研究を行うことによって、分化や組織内で細胞が果たす役割の理解が進んでいる (Kulangara *et al.*, 2012).

分化とは、細胞の形態や機能が特殊化し、細胞の特異性が確立していくことである (BurrIDGE *et al.*, 2012). 全ての細胞へ分化可能な受精卵から心筋細胞系統へと lineage commitment (分化方向性誘導)される過程では、中胚葉幹細胞へと分化し、間葉系幹細胞を介して心筋細胞系統へと誘導される (BurrIDGE *et al.*, 2012; Laflamme and Murry, 2011). 心筋細胞系統へと分化方向性誘導された細胞は未成熟心筋細胞として可逆的な分化状態から cell determination による不可逆な分化状態への変化を経て、maturation (成熟化)することで成熟心筋細胞へ誘導される (BurrIDGE *et al.*, 2012; Mery *et al.*, 2003; Slack 1991). 異なる分化方向性誘導の方法として、一旦他の系統へ分化方向性誘導された細胞に対して、direct reprogramming などを利用した分化転換による心筋細胞系統への誘導が行われている (Jopling *et al.*, 2011; Takeuchi and Bruneau, 2009).

心筋分化方向性誘導のメカニズムを理解する為、生体外において、自己複製能と多分化能を有する幹細胞を用いた研究が広く行われている (BurrIDGE *et al.*, 2012; Hemberger *et al.*, 2009). 幹細胞を用いた心筋分化方向性誘導において、分化系統の各段階毎に細胞外環境が設計されているが (BurrIDGE *et al.*, 2012), 未だ分化方向性誘導のメカニズムは不明な点が多

い。そこで、間葉系幹細胞から心筋分化方向性誘導過程を理解することが、最終的な心筋細胞への分化誘導効率上昇に向けた培養法の開発に貢献可能であると考えられる。

間葉系幹細胞は骨髄や脂肪などから採取可能であり、軟骨細胞や骨芽細胞、脂肪細胞、心筋細胞などへの分化能を有している (Bianco *et al.*, 2001; Caplan and Correa, 2011; Gimble *et al.*, 2008; Marban and Malliaras, 2010)。間葉系幹細胞から心筋分化方向性誘導の方法として、培地中への Transforming growth factor  $\beta$ 1 の添加や (Mohanty *et al.*, 2013), laminin コートした microcarrier 上での培養が報告されている (Karam *et al.*, 2011)。心筋分化方向性誘導された細胞を評価する為に、未成熟・成熟どちらの段階でも発現する心筋細胞マーカーである cardiac Troponin T (cTnT) や cardiac Troponin I (cTnI) などが研究に利用されている (BurrIDGE *et al.*, 2012; Mohanty *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009)。しかしながら、*in vitro* での培養系において遺伝子組換えを除いた系では、分化誘導効率が低い点が問題として存在している (表 1)。

表 1. 分化方向性誘導手法による hMSCs の心筋細胞マーカー陽性細胞比率

分化誘導手法	心筋細胞マーカー	陽性細胞比率	測定手法	参考文献
TGF $\beta$ 1 の添加	cTnI	21%	Flow cytometry	Mohanty <i>et al.</i> , 2013
5-azacytidine の添加	cTnT	47%	免疫蛍光染色	Zhang <i>et al.</i> , 2009

分化誘導培養によって均一な細胞群を得るためには、幹細胞の分化方向性誘導メカニズムを理解した培養法の開発が必要となる。多くの研究において、各分化系統段階に特異的なタンパク質の発現を誘導するように、増殖因子や低分子化合物などの培地中への添加や、細胞形態変化を誘導するような培養面を用いて研究が進められている (Kattman *et al.*,

2011; Minami *et al.*, 2012; Yuasa *et al.*, 2005). 細胞形態変化は、形態変化に由来する actin 骨格を制御する Rho シグナルを誘導することで、分化方向性誘導過程で重要な役割を果たしていることが知られている (Gao *et al.*, 2010; Kilian *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2015). Gao らは細胞形態が異なる条件では、Rho シグナルの発現変化を通して分化方向性が異なることを示している (Gao *et al.*, 2008). 細胞形態変化は細胞培養面間および細胞間の接着が時空間的に変化することで引き起こされている (Schultz *et al.*, 2015; Tibbitt and Anseth, 2012). 細胞の培養面との接着時には integrin を介して、細胞との接着時には cadherin を介してそれぞれ actin 骨格形成が制御されている (Fukata and Kaibuchi, 2001; Huvneers and Danen, 2009). 従って、細胞挙動を介した分化誘導メカニズムを理解する為には、細胞培養面相互作用及び細胞間相互作用のそれぞれの観点で考察する必要がある。

細胞培養面間相互作用は細胞基質間および基質培養面間の接着を通して形成される (Willson *et al.*, 2005). すなわち、培養面上に吸着した基質を介して細胞は培養面上に接着している。Fibronectin は生体内に大量に存在する基質の 1 種であり、面上に吸着した fibronectin の量および構築化に応じて、integrin を介した接着による focal adhesion や actin の形成変化を経て細胞形態が変化する (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2010; Ridley *et al.*, 2006; Rottner and Stradal, 2011). 従って、細胞挙動を理解する際には、fibronectin の吸着量と構築化に対する focal adhesion や actin 形成を踏まえた挙動モデルを考慮する必要がある。

細胞挙動の理解には、細胞基質間相互作用に加えて細胞間相互作用を考慮する必要がある。細胞間相互作用において、細胞間の接着構造は接着タンパク質同士の結合によって形成されている (Linask *et al.*, 2005). Cadherin は接着タンパク質の 1 つであり、cadherin 同士の接着の安定化には細胞質側での  $\beta$ -catenin との結合が必要となる (Nelson and Nusse, 2004). 細胞間接着の形成および安定化はそれぞれ細胞分化に関与している (Liu *et al.*, 2013; Wang

*et al.*, 2009b). Liu らは (Liu *et al.*, 2013), chitosan 培養面上において, 間葉系幹細胞の集塊形成時に cadherin の発現上昇を介した細胞間接着の形成を誘導することで, 心筋分化方向性が誘導されることを報告している. 従って, 細胞集塊の挙動を理解することが心筋分化方向性誘導における重要な役割を果たすと考えられる.

本博士論文は 4 章構成であり, 全ての章において, ヒト間葉系幹細胞を用いた培養工学の観点で研究を行っている. 図 1 に示すように, 細胞挙動の理解から, 挙動に基づく心筋分化方向性誘導までが含まれている.

第 1 章では, ヒト間葉系幹細胞の集塊挙動に基づく心筋分化方向性の誘導現象について確認している. 集塊挙動の異なる条件下で心筋細胞マーカーである cTnT 陽性細胞比率を比較することで, 集塊挙動の心筋分化方向性誘導に対する影響を確認した.

第 2 章では, 培養面上の遊走挙動のメカニズムを細胞基質間相互作用の観点から説明している. 異なる細胞挙動を示す条件下において, fibronectin の培養面への吸着量及び構築化を時空間的に解析することで, 細胞基質間相互作用による細胞挙動への影響を確認した.

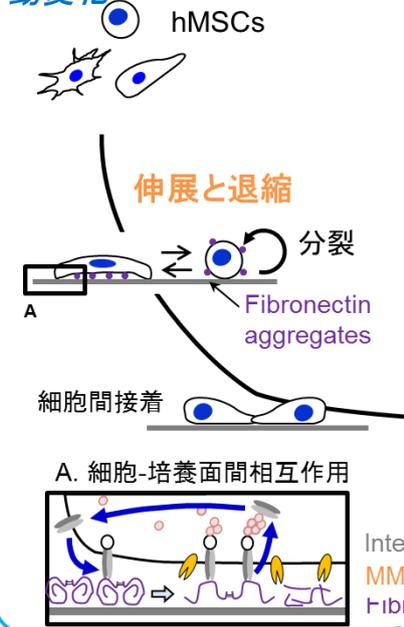
第 3 章では, 集塊挙動に基づく心筋分化方向性誘導のメカニズムを説明している. 集塊内での細胞挙動を時空間的に解析することで, 集塊内で混ぜられることの心筋分化方向性誘導への影響を確認した.

第 4 章では, 集塊挙動と分化誘導因子を組み合わせたヒト間葉系幹細胞の心筋分化方向性誘導を行っている. 集塊挙動に基づく心筋分化方向性誘導可能な培養方法について検討した後に, cTnT 陽性細胞比率および mRNA 発現への分化誘導因子の影響を確認した.

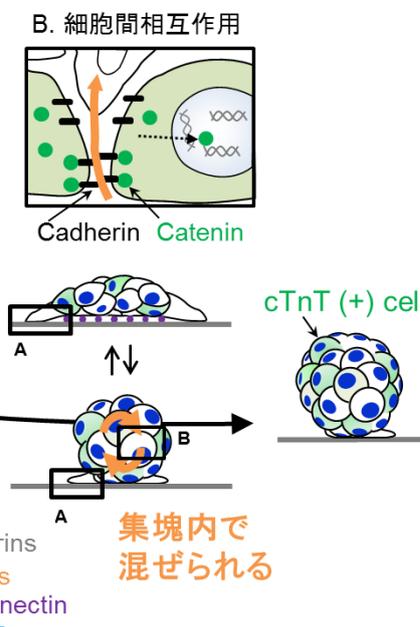
総括では, 本研究で得られた結果から, 細胞挙動に基づく初期の分化方向性の誘導についてまとめるとともに今後の展開について言及した.

第1章- 培養面上での集塊形成を伴うヒト間葉系幹細胞の培養特性

第2章- 培養面上での自発的足場環境の構築による挙動変化



第3章- 細胞集塊挙動による集塊内挙動



第4章- 細胞集塊挙動に基づくヒト間葉系幹細胞の培養特性

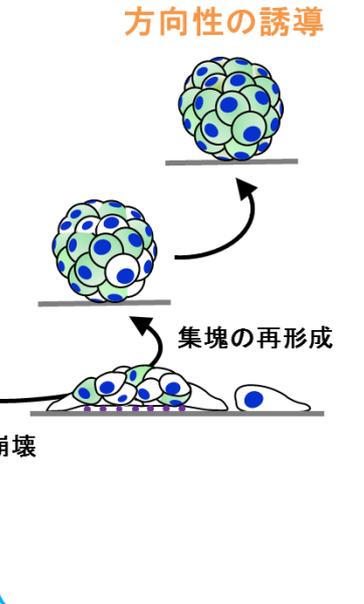


図1 博士論文の構成, 培養面上の細胞挙動を介した集塊形成による心筋分化方向性の誘導に関する概念図

## 第1章 培養面上での集塊形成を伴うヒト間葉系幹細胞の培養特性

### 1.1 緒言

間葉系幹細胞 (MSCs)は骨髄や脂肪などの組織から単離可能であり, 自己複製能と心筋細胞, 骨芽細胞, 軟骨細胞, 脂肪細胞などへ分化する多分化能を有している (Gimble *et al.*, 2008). 心筋細胞への分化は, Wnt や Transforming growth factor (TGF)などのタンパク質が転写因子を活性化することによって誘導される (BurrIDGE *et al.*, 2012; Mohanty *et al.*, 2013). そこで, 分化誘導の為に, 細胞外からタンパク質や低分子化合物を添加する手法や, 細胞自身が分化誘導因子を生産するように細胞外環境を構築する手法が広く採用されている (Gao *et al.*, 2010; Ghafar-Zadeh *et al.*, 2011). しかしながら, 幹細胞は分化誘導因子に時空間的に不均一な反応を示すことで様々な方向へ誘導された細胞群に分化する. 結果として, 不均一な細胞群が生じることが問題となっている (Santiago *et al.*, 2009). そこで, 細胞形態変化による分化方向性誘導への影響が注目されている (Kilian *et al.*, 2010). 分化誘導因子として TGF $\beta$ 3 をヒト MSC (hMSCs)培養時に添加すると, 伸展した形態の細胞では筋肉方向へ分化誘導されるのに対し, 丸い形態の細胞では軟骨方向へ分化誘導される (Gao *et al.*, 2010). 従って, 細胞形態変化が分化方向性誘導に関与していると考えられる.

これまでの研究において, ポリスチレン面上にポリアミドアミン dendrimer を提示した培養面を用いた培養が, 培養面上での伸展と退縮を伴う遊走を介した細胞形態変化を誘導する方法として提案されてきた (Kim *et al.*, 2010a; 2010b). 特に, ポリアミドアミン側鎖構造の分岐回数である世代数 5 の dendrimer 提示培養面(G5 面)では, hMSCs の培養面上の遊走を介して, 伸展した形態と丸い形態に形態変化が引き起こされ, 細胞同士の接着を介して形成された細胞集塊において, 心筋細胞マーカーである cardiac Troponin T の発現が

報告された (Kim *et al.*, 2010a). そこで, 第 1 章では, cTnT 陽性細胞比率を心筋分化方向性誘導の指標として用いて, G5 面を含む異なる培養面上での細胞挙動及び心筋分化方向性誘導に関する培養特性について研究した.

## 1.2 実験方法

### 細胞と培養条件

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs)は Lonza 社から購入した (Lot no. 8F3543; Walkersville, MD, USA). MSC growth medium (Lonza)を用いて hMSCs の継代培養を細胞培養用ポリスチレン面 (PS 面, Corning Costar, Cambridge, MA, USA)上で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスの加湿環境下で行った. 継代培養において, hMSCs が 70%コンフルエントに達すると, 0.1% trypsin/0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)で, 酵素处理的に細胞をはがして凍結保存を行った. 細胞は以下の実験において 5 継代以下のものを使用した.

以下の実験に対し, hMSCs を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) に, 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic; Thermo Fisher Scientific)を加えた培地中で液高さ 4 mm となるように培養した. 播種密度は世代数 5 のデンドリマー面 (G5 面)と PS 面に対し,  $5.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>とし ( $X_0$ ), 低接着性培養面 (U 底 96-well plate, 住友ベークライト, 東京)に対し,  $3.0 \times 10^2$  cells/well とした ( $X_0$ ). 培地交換を 3 日に 1 回行った.

### デンドリマー面の作成

8-well plate (Thermo Fisher Scientific)と 35 mm dish (ibidi, Am Klopferspitz, Germany)の PS 面を G5 面の初期培養面として使用した. 50  $\mu$ mol/ml potassium *tert*-butoxide (和光純薬工業, 大阪)を液高さ 4 mm となるよう PS 面上に添加し, 室温で 1 時間静置した. 滅菌水で 3 回洗浄後, 360  $\mu$ mol/ml の glutaraldehyde 溶液 (和光純薬工業)を液高さ 2.8 mm となるよう添加

して1時間静置した。滅菌水で3回洗浄後、0.1 mol/l 水酸化ナトリウム (和光純薬工業)で調整した pH 9.0 の滅菌水を用いて、360  $\mu\text{mol/ml}$  の tris (2-aminoethyl) amine 溶液 (東京化成工業, 東京)を液高さ 2.8 mm となるように添加して1時間静置した。滅菌水で洗浄後、glutaraldehyde と tris (2-aminoethyl) amine 反応を合計5回繰り返した。滅菌水で洗浄後、末端基として1.6  $\mu\text{mol/ml}$  の D-glucose 溶液を液高さ 2.8 mm となるように添加して2時間静置した。側鎖構造の還元反応の為に、0.5  $\mu\text{mol/ml}$  の sodium borohydride 溶液 (Sigma-Aldrich) を D-glucose 溶液を抜かずに同量添加し、24時間静置した。最終的に、滅菌水で洗浄後、デンドリマー面を使用した。

## 細胞挙動の観察

細胞形態のタイムラプス観察を、インキュベーター内に光学顕微鏡 (CK-40; オリンパス, 東京)と CCD カメラ (CS6931; 東芝, 東京)を設置した自動画像撮影装置 (Kino-oka *et al.*, 2004)を用いて行った。4倍の対物レンズを用いて、10分ごとに512 $\times$ 582 pixel の細胞画像を定点で培養1日目から10日目まで取得した。

## 心筋細胞マーカー陽性細胞比率の算出

hMSCs の心筋分化方向性誘導を評価する為、心筋細胞マーカーcardiac Troponin T (cTnT) 陽性細胞比率 ( $X_P/X_T$ )を cTnT 陽性細胞数 ( $X_P$ )と DAPI 陽性細胞数 ( $X_T$ )から求めた。cTnT 陽性細胞数 ( $X_P$ )と DAPI 陽性細胞数 ( $X_T$ )を求める為に、培養した細胞を、酵素処理によって回収した後に、播種密度  $2.0 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$  として PS 面上へ再播種した。3日間培養を行った細胞を核染色試薬と抗 cTnT 抗体を用いて以下の手順で免疫蛍光染色した。培養容器から培地を取り除き、PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde (和光純薬工業)を液高さ 0.5 mm

となるように添加して室温で 10 分間静置した。PBS で洗浄後、0.5% polyoxyethylene (10) octylphenyl ether (和光純薬工業)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 10 分間静置した。非特異的タンパク質 (Block Ace; 大日本住友製薬, 大阪)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 90 分間反応させた後に、抗 cTnT 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)を希釈率 1:300 で液高さ 0.5 mm となるように添加して 4°C で一晩静置した。TBS で洗浄後、二次抗体 (Alexa Flour 488-conjugated anti-mouse IgG; Thermo Fisher Scientific)を希釈率 1:200 で液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 60 分間静置した。TBS で洗浄後、核染色として、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo Fisher Scientific)を希釈率 1:15000 で液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 30 分間静置した。PBS で洗浄後、F-actin の染色として、蛍光標識された phalloidin (rhodamine phalloidin; Thermo Fisher Scientific)を希釈率 1:50 で液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 40 分間静置した。PBS で洗浄後、カバーガラス (松浪硝子工業, 大阪)を被せた。画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000; オリンパス)の 20 倍レンズ (UPLSAPO20X; 開口数=0.75)を用いて、ピンホール径 80  $\mu\text{m}$  で、解像度 512 $\times$ 512 の画像を scan speed 2.0  $\mu\text{sec}/\text{pixel}$  で取得した。レーザーの励起波長は 405, 473, 559 nm でレーザー強度はそれぞれ 15, 20, 20%で撮影した。得られた画像から、cTnT のフィラメント構造が確認できる細胞を cTnT 陽性細胞と定義し、cTnT 陽性細胞数 ( $X_P$ )と DAPI 陽性細胞数 ( $X_T$ )を 1 回の実験で 200 個以上細胞をカウントし、cTnT 陽性細胞比率 ( $X_P/X_T$ )を決定する為に解析した。

## 1.3 結果

### 1.3.1 ヒト間葉系幹細胞の動的挙動

G5 面と PS 面と低接着性培養面上で 10 日間 hMSCs を培養し，細胞形態を確認した (図 1.1). G5 面上の細胞は 1 日目に培養面に接着し，3 日目には丸い形態を示す細胞が確認された．5 日目以降には細胞同士が接着した細胞集塊が確認された (図 1.1A). タイムラプス観察から (図 1.2), 培養 3 日目には細胞の伸展と退縮を伴う遊走挙動が確認された (図 1.2 白矢印). 培養 5 日目には，培養面上の能動的な遊走を介して細胞同士が接着する様子が確認され (図 1.2 青矢印), 集塊が伸展と退縮を伴う挙動を示していた(図 1.2 黄矢印). 培養 9 日目から 10 日目には集塊の伸展と退縮を伴う挙動はほとんど確認されなかった．一方，PS 面上の細胞は 1 日目に紡錘形の形態で培養面上に接着していた．培養期間を経て，細胞が伸展した形態を示しながら，培養面上に増殖していく様子が確認された (図 1.1B). 低接着性培養面上の細胞は，1 日目に培養面上での遊走を介さずに受動的に丸い細胞集塊を形成した．細胞集塊は培養期間を経ても，大きさおよび形態を維持していた (図 1.1C).

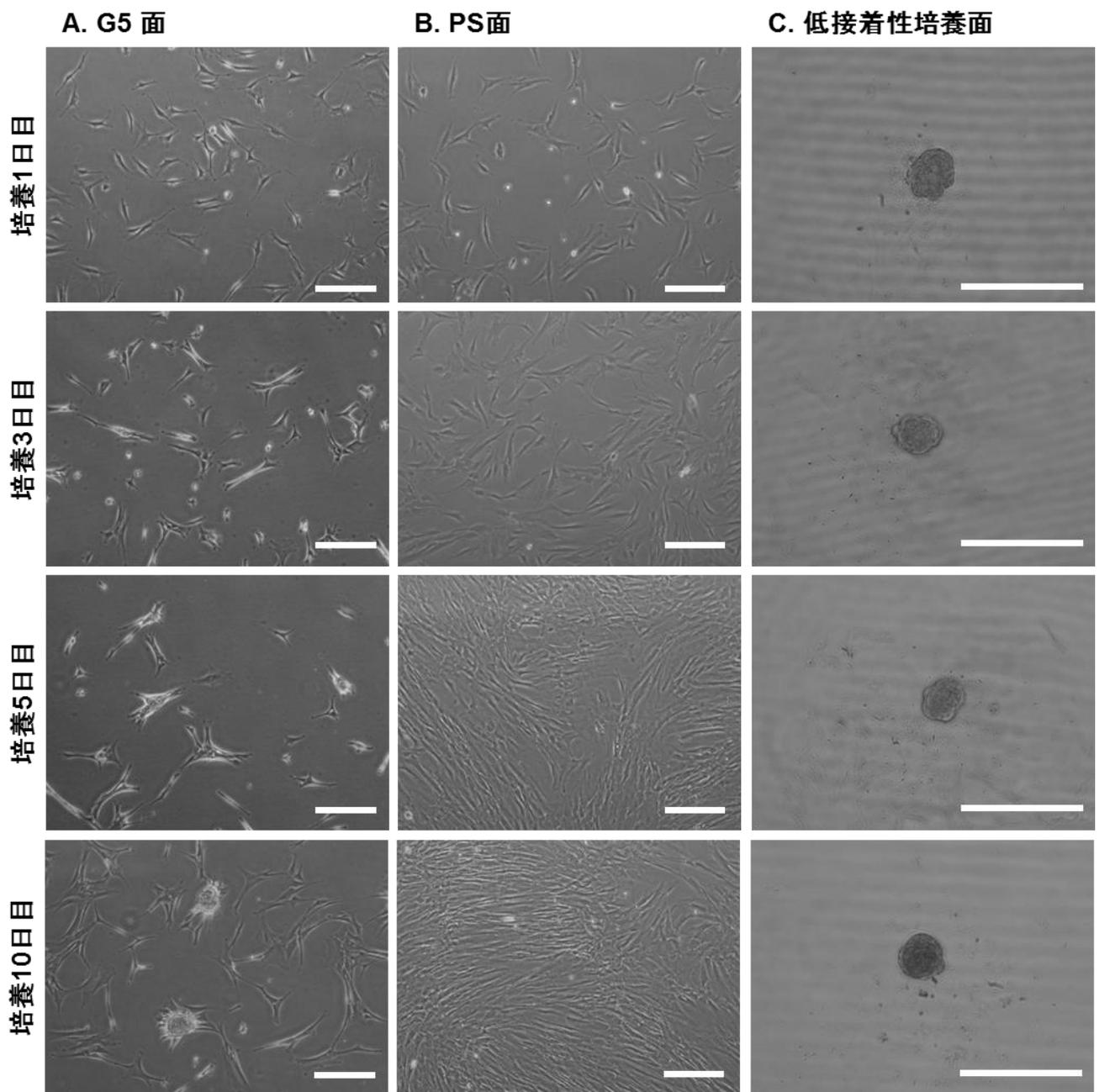


図 1.1 G5 面 (A)と PS 面 (B)と低接着性培養面 (C)で培養された hMSCs の培養 1, 3, 5, 10 日目の形態. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .

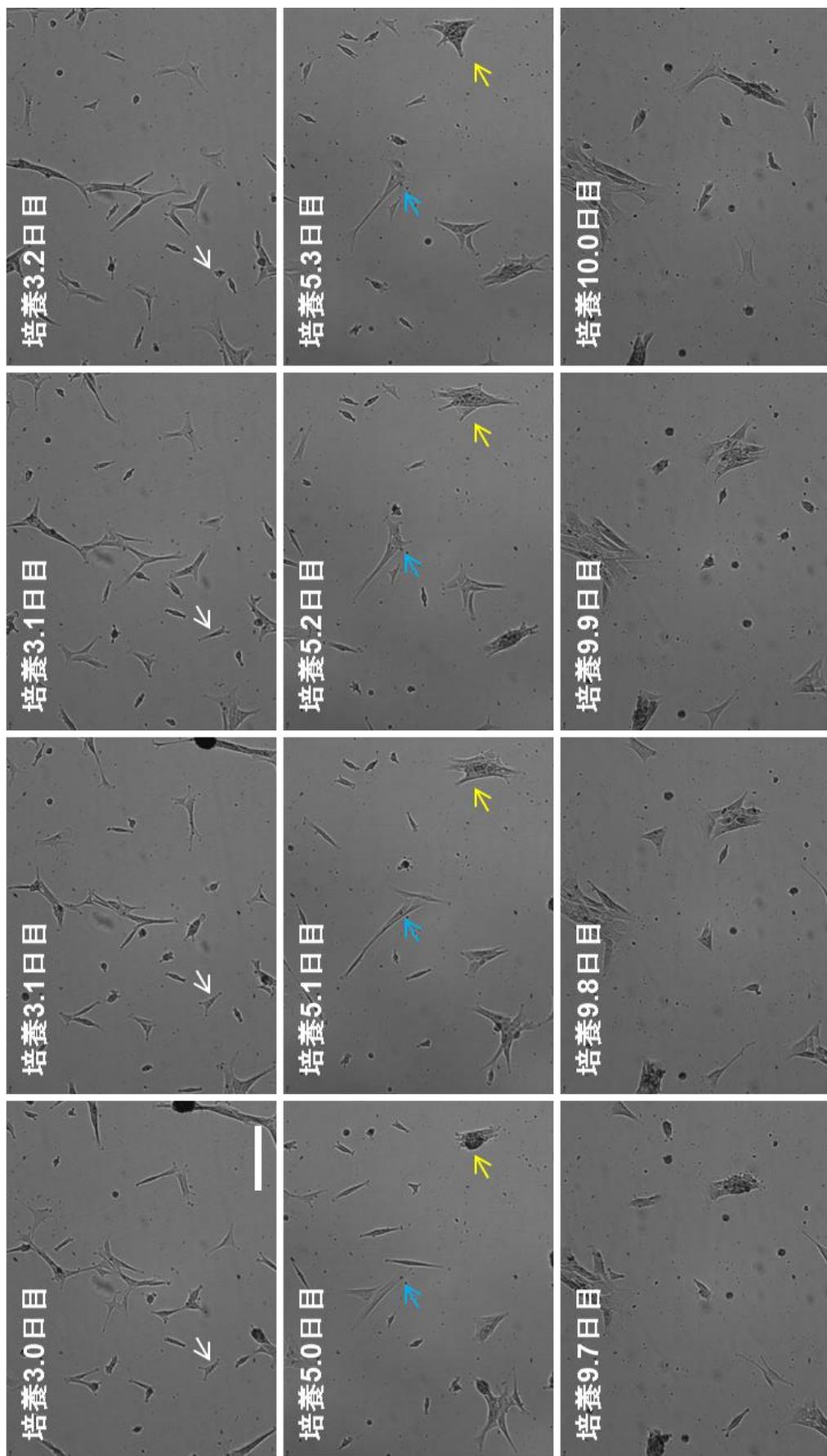


図 1.2 G5 面で培養された hMSCs のタイムラプス観察の画像. 白矢印は単細胞の伸展と退縮を伴う挙動を, 青矢印は細胞同士の結合を, 黄矢印は集塊の伸展と退縮を示している. Scale bars: 100 μm.

### 1.3.2 ヒト間葉系幹細胞の心筋分化方向性の誘導

心筋分化方向性の誘導を評価する為、各培養面で 10 日間培養後に酵素処理によって単分散した hMSCs を PS 面上に再播種し、cTnT と F-actin に対する免疫蛍光染色を行った。G5 面上で培養された細胞群には、角ばった形態 (図 1.3A1)と紡錘形 (図 1.3A2)の細胞が確認された。F-actin と同様に cTnT のフィラメント構造が角ばった細胞には存在したが、紡錘形の細胞には見られなかった。このような形態特徴的な傾向は、全ての培養面で培養された細胞で確認された (図 1.3)。

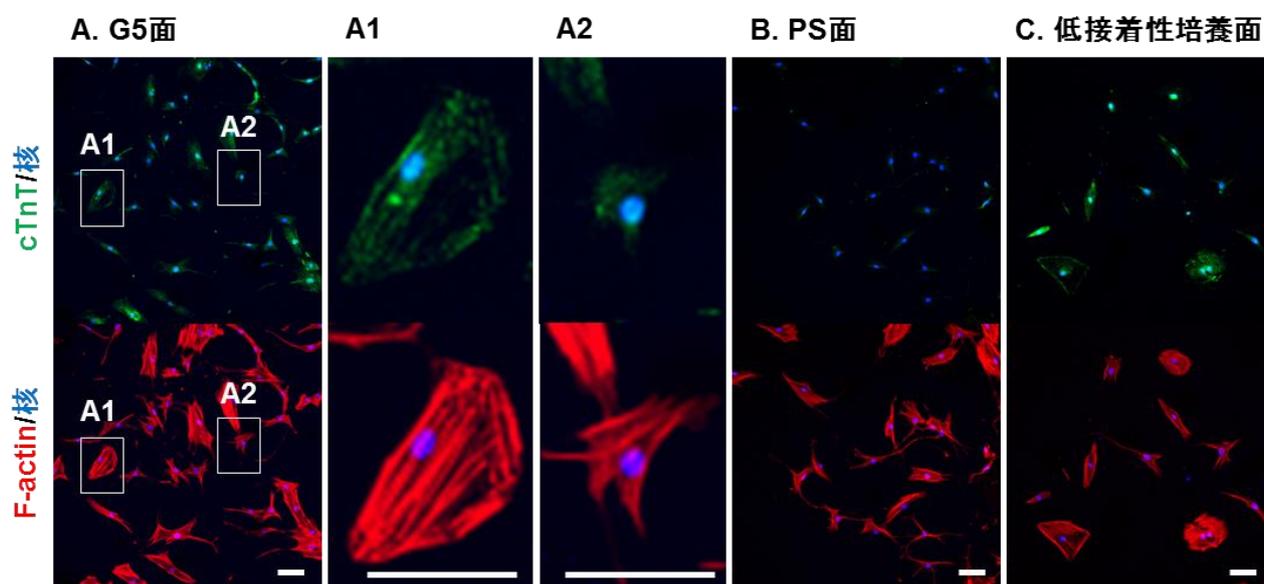


図 1.3 G5 面 (A)と PS 面 (B)と低接着性培養面 (C)で 10 日間培養された hMSCs を単分散処理した後の cTnT (緑)と F-actin (赤)と核(青)の免疫蛍光染色画像. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ . 画像 A1 (cTnT 陽性細胞)および A2 (cTnT 陰性細胞)は画像 A の四角領域の拡大図を示す.

培養環境による増殖性および心筋分化方向性の誘導に対する影響を確認する為、初期細胞密度に対する細胞密度の割合 ( $X_T/X_0$ )と cTnT 陽性細胞比率 ( $X_P/X_T$ )の時間変化を G5 面と PS 面と低接着性培養面で培養された細胞で比較した。図 1.4A に示すように、 $X_T/X_0$ は、G5 面では時間とともに徐々に増加し、培養 10 日目には 2.4 を示した。それに対し、10 日目の PS 面の  $X_T/X_0$ は、G5 面での  $X_T/X_0$ と比較して 2.5 倍高かった。低接着性培養面で培養した細胞の  $X_T/X_0$ は培養期間に関わらず 1 であった。G5 面で培養された細胞での  $X_P/X_T$ は、培養 5 日目に 3 日目と比較して増加し、培養 10 日目には 0.22 に達し、PS 面で培養された細胞と比較して 3.2 倍高かった。低接着性培養面上で培養された細胞の  $X_P/X_T$ は、培養 1 日目から 10 日目まで 0.1 を示していた (図 1.4B)。

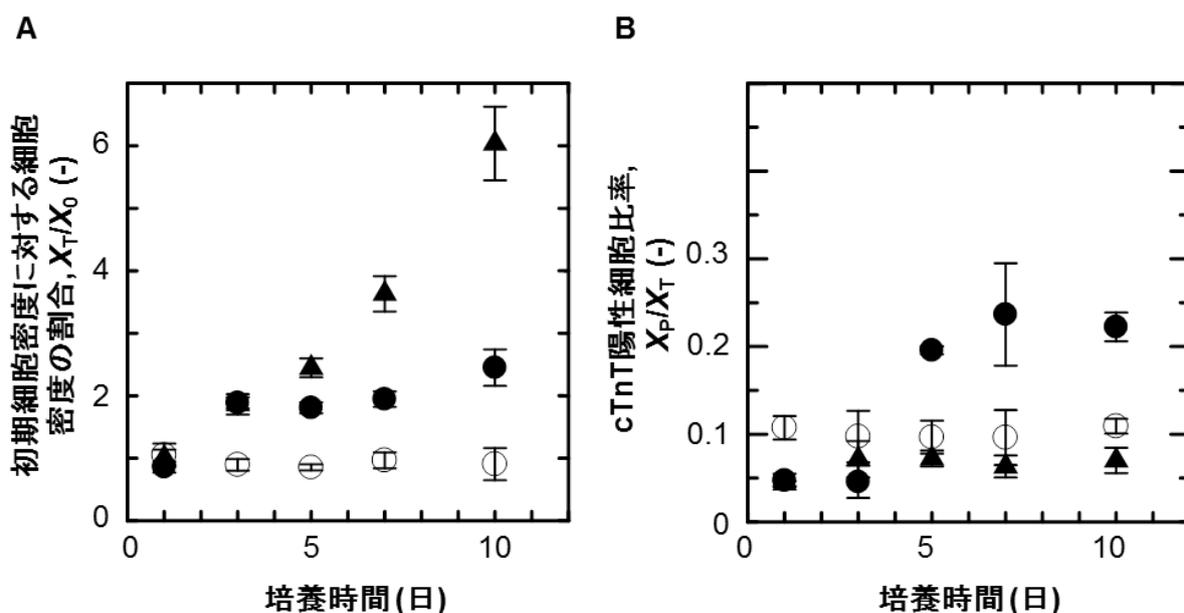


図 1.4 各培養条件における培養 10 日間での hMSCs の初期細胞密度に対する細胞密度の割合  $X_T/X_0$  (A)および心筋マーカー cTnT 陽性細胞比率  $X_P/X_T$  (B). シンボルはそれぞれ G5 面が黒丸, PS 面が黒三角, 低接着性培養面が白丸を示し, エラーバーは標準偏差を示す (n=3).

## 1.4 考察

幹細胞が特定の分化細胞へ誘導される際には、分化方向性の誘導を経て成熟化することで最終的な分化細胞の表現型が得られる。一旦、幹細胞の分化方向性が誘導されると多方向へ分化誘導されにくくなることが報告されている (Lee *et al.*, 2014; Nimmo *et al.*, 2015)。従って、分化方向性を誘導することが特定の分化細胞を得るための重要な戦略となると考えられる。これまでの研究において、G5 面上で形成された細胞集塊では N-cadherin を介した細胞間接着が生じ、心筋細胞マーカーである cTnT の発現が確認されたが、軟骨細胞や脂肪細胞や骨芽細胞マーカーの発現は確認されなかった (Kim *et al.*, 2010a)。本研究では、G5 面上での培養後に、PS 面へ再播種したにもかかわらず、cTnT のフィラメント構造を持つ細胞が PS 面で培養された細胞と比較して多く確認された (図 1.3 and 1.4)。培養面などの細胞外環境の変化は幹細胞の分化方向性の誘導を別方向へ誘導するが、分化方向性が誘導された細胞は細胞外環境の変化によっても分化マーカーの発現が変わらず発現することが報告されている (Lee *et al.*, 2014)。これらの結果から、G5 面上での細胞集塊形成によって、心筋分化方向性が誘導されていることが示唆された。

本研究では、G5 面上での培養面上の遊走を経て能動的に接着形成した集塊と (遊走性および増殖性を有する)、低接着性培養面上での培養面への接着が無く受動的に接着した集塊 (遊走性および増殖性を有さない) と、PS 面上での培養面上の遊走を経た単層細胞における細胞挙動及び心筋分化方向性誘導に関する培養特性について明らかにしている。G5 面での 10 日目における cTnT 陽性細胞比率は、低接着性培養面と PS 面の比率より高かった。また、G5 面での培養過程において、5 日目の集塊形成時に、3 日目の集塊が形成されていない時と比較して cTnT 陽性細胞比率が増加していた (図 1.4)。これらの結果から、G5 面上の遊走を介した細胞集塊形成が心筋分化方向性誘導に重要な役割を果たしていることが示唆さ

れた。培養面上の遊走挙動には、integrin を介した接着による細胞培養面間相互作用が関与している (Dufour *et al.*, 1986)。培養面に接着した細胞に対し、連続的な伸縮による刺激が Wnt や integrin-linked kinase シグナルを引き起こし、心筋分化誘導を引き起こすことが知られている (Heo and Lee, 2011; Salameh *et al.*, 2010)。また、細胞集塊形成過程において N-cadherin は細胞間接着を形成し、心筋細胞への分化過程において必要であることが報告されている (Bugorsky *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009a)。G5 面上での細胞集塊では、N-cadherin を介した細胞間接着が形成されていることが確認されている (Kim *et al.*, 2010a)。本研究から、G5 面上での細胞集塊では、培養面上での遊走を介した連続的な伸縮が確認された (図 1.2)。これらの結果から、G5 面上の遊走挙動を介した細胞集塊形成が心筋分化方向性誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。次章以下で集塊挙動に基づく心筋分化方向性誘導のメカニズムを細胞培養面間相互作用、細胞間相互作用の観点から明らかにしていく。

## 1.5 小括

本研究では, 培養面上での hMSCs の細胞集塊挙動および心筋分化方向性誘導に関する培養特性を確認した. G5 面上の挙動を伴う細胞集塊形成での cTnT 陽性細胞比率が単層の PS 面, 面への接着を行わない低接着性培養面よりも高かった. 従って, 面上の遊走挙動(細胞培養面間相互作用)を介した集塊形成(細胞間相互作用)がヒト間葉系幹細胞の心筋分化方向性を誘導することが示唆された.

## 第2章 培養面上での自発的足場環境の構築によるヒト間葉系幹細胞挙動変化

### 2.1 緒言

足場依存性細胞の培養において、培養面設計は細胞挙動を制御する為の重要な戦略の1つである (Bacakova *et al.*, 2004; Higuchi *et al.*, 2013). 細胞培養面間相互作用において、細胞側の integrin と培養面上に吸着した細胞外マトリックス(ECM)が相互作用することで細胞は培養面に接着し、細胞機能を誘導している (Lin *et al.*, 2012; Reilly and Engler, 2010; Ruoslahti, 1984). Fibronectin は大量に普遍的に存在する ECM の1つであり、integrin との結合ドメインを提示することで細胞基質間接着を助けている (Mao and Schwarzbauer, 2005; Pierschbacher and Ruoslahti, 1984). Fibronectin をコートした培養面上において、fibronectin の濃度による接着可能箇所の密度に依存して、細胞は様々な形態を示す (Dolatshahi-Pirouz *et al.*, 2011). Integrin は fibronectin と結合することで、細胞質側での paxillin との結合を介して、focal adhesion の形成を誘導する. その際に、fibronectin は立体構造の変化を通して fibronectin の重合化を促進する (Mao and Schwarzbauer, 2005; Gardel *et al.*, 2010; Lawson and Schlaepfer, 2012). Fibronectin の重合は細胞基質間接着およびF-actin 構造を安定化させることで細胞形態の変化に関与している (Huvencers *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2009; Sottie and Hocking, 2002). 従って、細胞形態変化は細胞基質間接着の密度および安定性の両方に依存していると考えられる.

これまでに、G5 面上の細胞挙動に由来する集塊形成が hMSC の心筋分化方向性を誘導することを確認してきた. 世代数の異なる dendritic 面上での hMSCs の培養では、骨格形成および細胞挙動が変化することが確認されている (Kim *et al.*, 2010a; 2010b). 第2章では、世代数の異なる dendritic 面を用いて、細胞挙動の異なる培養面上の細胞に対して、fibronectin の吸着量と構築化を比較することで培養面上での遊走挙動のメカニズムを確認している.

## 2.2 実験方法

### 細胞と培養条件

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs; Lot no. 0000183402; Lonza, Walkersville, MD, USA)を、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下において MSC growth medium (Lonza)を用いて細胞培養用ポリスチレン面 (PS 面)上で継代培養した。継代培養において、hMSCs が 70%コンフルエントに達すると、0.1% trypsin/0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いて細胞を回収し凍結保存を行った。5 継代以下の細胞を以下の実験で用いた。

全ての実験に対し、hMSCs を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) に、10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic; Thermo Fisher Scientific)を加えた培地中で液高さ 4 mm となるように培養した。世代数 1,3,5 のデンドリマー面 (G1, G3, G5 面)に対し、播種密度は  $5.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> とし、培地交換を 3 日に 1 回行った。

### デンドリマー面の作成

8-well plate (Thermo Fisher Scientific)と 35 mm dish (ibidi, Am Klopferspitz, Germany)の PS 面をデンドリマー面の初期培養面として使用した。G1 面, G3 面, G5 面を以下手順で無菌環境下において作成した。50 μmol/ml potassium *tert*-butoxide (和光純薬工業, 大阪)を液高さ 4 mm となるよう PS 面上に添加し, 室温で 1 時間静置した。滅菌水で 3 回洗浄後, 360 μmol/ml の glutaraldehyde 溶液 (和光純薬工業)を液高さ 2.8 mm となるよう添加して 1 時間静置した。滅菌水で 3 回洗浄後, 0.1 mol/l 水酸化ナトリウム (和光純薬工業)で調整した pH 9.0 の滅菌

水を用いて、360  $\mu\text{mol/ml}$  の tris (2-aminoethyl) amine 溶液 (東京化成工業, 東京)を液高さ 2.8 mm となるように添加して 1 時間静置した。滅菌水で洗浄後, glutaraldehyde と tris (2-aminoethyl) amine 反応を合計回数が G1 面では 1 回, G3 面では 3 回, G5 面では 5 回繰り返した。1.6  $\mu\text{mol/ml}$  の D-glucose 溶液を液高さ 2.8 mm となるように添加して 2 時間静置した。0.5  $\mu\text{mol/ml}$  の sodium borohydride 溶液 (Sigma-Aldrich)を D-glucose 溶液を抜かずに同量添加し, 24 時間静置した。最終的に, 滅菌水で洗浄後, デンドリマー面を使用した。

### ウェスタンブロッティング

培地のみを各培養面上に液高さ 4 mm となるように添加し, 1 日間インキュベートした。培地を回収し, 20% trichloroacetic acid (和光純薬工業)となるように添加して 4 °C で 30 分静置した。遠心分離後, 沈殿物を acetone (和光純薬工業)で 2 度洗浄し, lysis buffer を添加し, 15 分室温で静置した。4°C で遠心分離後, 上清を回収し, 培地中のタンパク質を回収した。また, 培養面上をリン酸緩衝溶液 (PBS)で 2 度洗浄し, lysis buffer (CellLytic M; Sigma-Aldrich)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 15 分静置した。4°C 条件下でスクレーパーを用いてタンパク質のサンプルを回収後, 4°C, 8000 xg で遠心分離し上清を回収し, 培養面上に吸着したタンパク質を回収した。タンパク質のサンプルは Laemmli buffer (表 1)と 1 : 1 で混合し, 95 °C で 10 分間静置した。タンパク質をゲル中 (スーパーセップエース 7.5%;和光純薬工業)で, 泳動バッファー(表 2)を用いて 20 mA で 75 分間泳動した後, ポリフッ化ビニリデンメンブレン (Hybond-P; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)に転写バッファー(表 3)を用いて 10 V で 90 分間転写した (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell; Bio-Rad, Berkeley, CA, USA)。非特異的なタンパク質を室温で 2 時間でブロッキングした後に (ECL Blocking Agent; GE Healthcare), 抗 fibronectin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology,

Dallas, TX, USA)を希釈率 1:100 で 4 °C で一晩反応させた. 0.1% Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate を含む PBS (PBS-T)で洗浄後, peroxidase-linked 二次抗体(GE Healthcare)を希釈率 1:100 で室温で1時間反応させた. メンブレンを PBS-T で洗浄後, 検出試薬 (ECL Detection Reagent; GE Healthcare)と 1 分間反応させ, X 線フィルム (富士フィルム, 東京)に露光した.

表 2.1 laemml buffer の組成

0.5M Tris-HCl (pH6.8)	2.5 ml
グリセリン	2.0 ml
Sodium dodecyl sulfate	0.4 g
2-メルカプトエタノール	1.0 ml
0.1%ブロモフェノールブルー	0.25 ml
蒸留水	合計 10 ml となるように添加

表 2.2 泳動バッファの組成

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン	1.5 g
グリシン	7.2 g
Sodium dodecyl sulfate	0.5 g
蒸留水	合計 500 ml となるように添加

表 2.3 転写バッファの組成

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン	5.82 g
グリシン	2.93 g
メタノール	200 ml
蒸留水	合計 1000 ml となるように添加

## 免疫蛍光染色

培養容器から培地を取り除き, PBS で洗浄後, 4% paraformaldehyde (和光純薬工業)を液

高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 10 分間静置した。PBS で洗浄後，0.5% polyoxyethylene (10) octylphenyl ether (和光純薬工業)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 10 分間静置した。非特異的タンパク質 (Block Ace; 大日本住友製薬, 大阪)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 90 分間反応させた後に，抗 fibronectin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 paxillin 抗体 (Millipore, Billerica, MA, USA)と抗リン酸化 paxillin 抗体 (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA)をそれぞれ希釈率 1:100, 1:1000, 1:50 で液高さ 0.5 mm となるように添加して 4°C で一晩静置した。TBS で洗浄後，二次抗体 (Alexa Flour 488-conjugated anti-mouse IgG or Alexa Flour 594-conjugated anti-rabbit IgG; Thermo Fisher Scientific)を希釈率 1:200 で液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 60 分間静置した。TBS で洗浄後，核染色として，4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo Fisher Scientific)を希釈率 1:15000 で液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 30 分間静置した。PBS で洗浄後，F-actin の染色として，蛍光標識された phalloidin (rhodamine phalloidin; Thermo Fisher Scientific)を希釈率 1:50 で液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 40 分間静置した。PBS で洗浄後，カバーガラス (松浪硝子工業, 大阪)を被せた。画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000; オリンパス, 東京)の 60 倍レンズ (UPLSAPO60XW; 開口数=1.20)を用いて，ピンホール径 120  $\mu\text{m}$  で，解像度 512 $\times$ 512 の画像を scan speed 2.0  $\mu\text{sec}/\text{pixel}$  で取得した。レーザーの励起波長は 405, 473, 559 nm でレーザー強度はそれぞれ 15, 15, 15% で撮影した。

### タイムラプス蛍光観察

hMSCs に baculovirus を含む試薬 (CellLight actin-RFP, Thermo Fisher Scientific)を 20  $\mu\text{l}/\text{ml}$  となるように培地中に添加して 1 晩インキュベートし，actin-RFP を形質転換した。その後，

5 µg/ml となるように蛍光標識された fibronectin (Hylite-488 labeled fibronectin; Cytoskeleton, Denver, CO, USA)を添加した培地で培養した. 培養 3 日目に画像を 5 分ごとにタイムラプス共焦点レーザー走査型顕微鏡(FV-10i; オリンパス)の 60 倍レンズ (開口数: 1.20)を用いて, ピンホール径 120 µm で, 解像度 512×512 の画像を scan speed 2.0 µsec/pixel で取得した. レーザーの励起波長は 405, 473, 559 nm でレーザー強度はそれぞれ 15, 15, 15%で撮影した.

## リアルタイム PCR 法

細胞を 0.1% trypsin/0.02% EDTA 溶液によって回収後, RNA をプロトコルに沿って細胞から抽出した (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany). 得られた RNA に対し, チミンヌクレオチドの連続からなるオリゴ dT プライマーを用いて逆転写反応を行った (SuperScript II Reverse Transcriptase kit; タカラバイオ, 滋賀). 得られた cDNA に対し, SYBR Green を用いて, 40 サイクル polymerase chain reaction (PCR)を行い, インターカレーター法による蛍光強度をサイクルごとに検出した (SYBR Premix EX Taq; タカラバイオと, StepOnePlus real-time PCR system; Thermo Fisher Scientific). 特異的なプライマーとして, membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), forward 5'-CCATTGGGCATCCAGAAGAGAGC-3'; reverse 5'-GGATACCCAATGCCCATTTGGCCA-3' and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), forward 5'-CAACGGATTTGGTCGTATTGG-3'; reverse 5'-GCCATGGGTGGAATCATATTG-3'を使用した (Gilles *et al.*, 2001; Kim and Kino-oka, 2014). 蛍光強度の閾値から, cycle threshold value ( $C_t$ )を求めた. 標的遺伝子に対して GAPDH で補正することで  $\Delta C_t$  を求め, 相対 mRNA 発現量を  $2^{-\Delta C_t}$  で算出した.

## 統計解析

各培養面上での培養は少なくとも 3 回行い，独立してデータを取得した．得られたデータは平均値をグラフにし，エラーバーとして標準偏差を表示した．**Tukey-Kramer method** をデータ間の有意差を決定するために用い，有意水準 1% または 5% で検定を行った．

## 2.3 結果

### 2.3.1 足場環境の構築と細胞挙動

10%FBS/DMEM で1日間培養し、G1, G3, G5 面上に吸着したタンパク質中および培地中に残ったタンパク質中の fibronectin に対し、ウエスタンブロッティングを行った。図 2.1 に示すように、世代数の増加と共に培養面上に吸着した fibronectin の量は増加していた。一方、培地中に含まれる fibronectin の量は減少していた。また、培養面上に吸着した fibronectin に対し、免疫蛍光染色を行ったところ、全ての培養面上で繊維性の fibronectin は確認されなかった (図 2.2)。

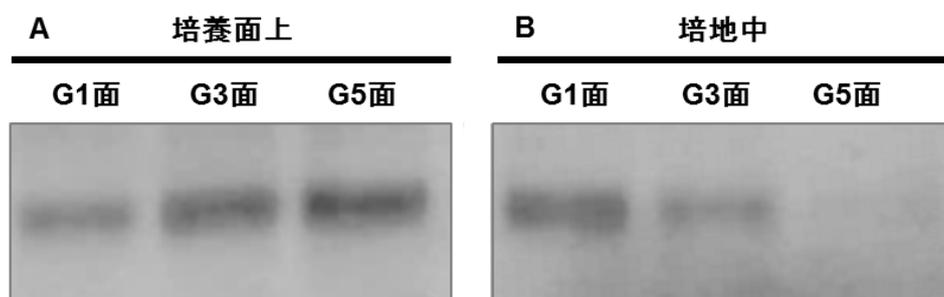


図 2.1 1日間培地のみで培養した G1 と G3 と G5 面上に吸着した (A)および培地中に残った (B)fibronectin のウエスタンブロッティング

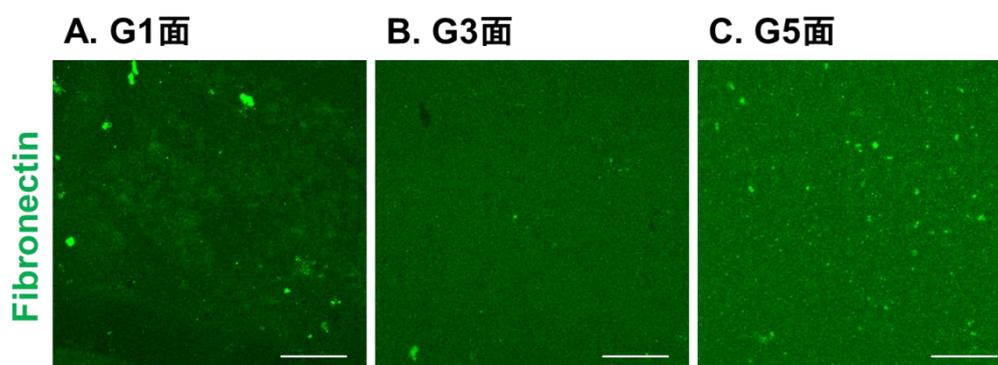


図 2.2 1日間培地のみで培養した G1(A)と G3(B)と G5(C)面上に吸着した fibronectin (緑色)の免疫蛍光染色。 Scale bars: 50  $\mu$ m.

G1, G3, G5 面で培養した hMSCs の F-actin と fibronectin を培養 1, 3 日目に免疫蛍光染色によって観察した. 図 2.3 に示すように, 1 日目に, 全ての培養面上の細胞において stress fiber 構造が確認された. Fibronectin は全ての培養面で, 細胞培養面間境界で確認された (図 2.4). 繊維性と小さな丸い構造の fibronectin が確認され (図 2.3), それぞれ fibronectin fibrils (長さ  $10^1$ – $10^3$   $\mu\text{m}$ ) と fibronectin aggregates (直径  $10^0$ – $10^1$   $\mu\text{m}$ ) を示している (Pellenc *et al.*, 2006). 特に, 細胞端で fibronectin fibrils は確認されず (図 2.3A1, B1, and C1), stress fiber と同様に, G1 と G3 面での細胞の長軸方向により多くの fibronectin fibrils が G5 面と比較して確認された (図 2.3A–C). 培養 3 日目に, 全ての培養面上において, 細胞端で fibronectin fibrils はほとんど確認されなかった. 加えて, G1 面上の細胞は 1 日目と比較して, 細胞全域において stress fiber 形成が維持されており, fibronectin の繊維化が促進されていた (図 2.3D). G3 面上の細胞では, stress fiber と fibronectin fibrils は細胞の半分に局在しており, 他方では fibronectin fibrils はほとんど確認されなかった (図 2.3E). 一方, G5 面上の細胞は, 他の培養面上の細胞と比較してより多くの lamellipodia が確認され, stress fiber がほとんど確認されなかった. Fibronectin aggregates は G5 面上のどちらの形態の細胞においても細胞全域に確認された (図 2.3F and G).

培養1日目

培養3日目

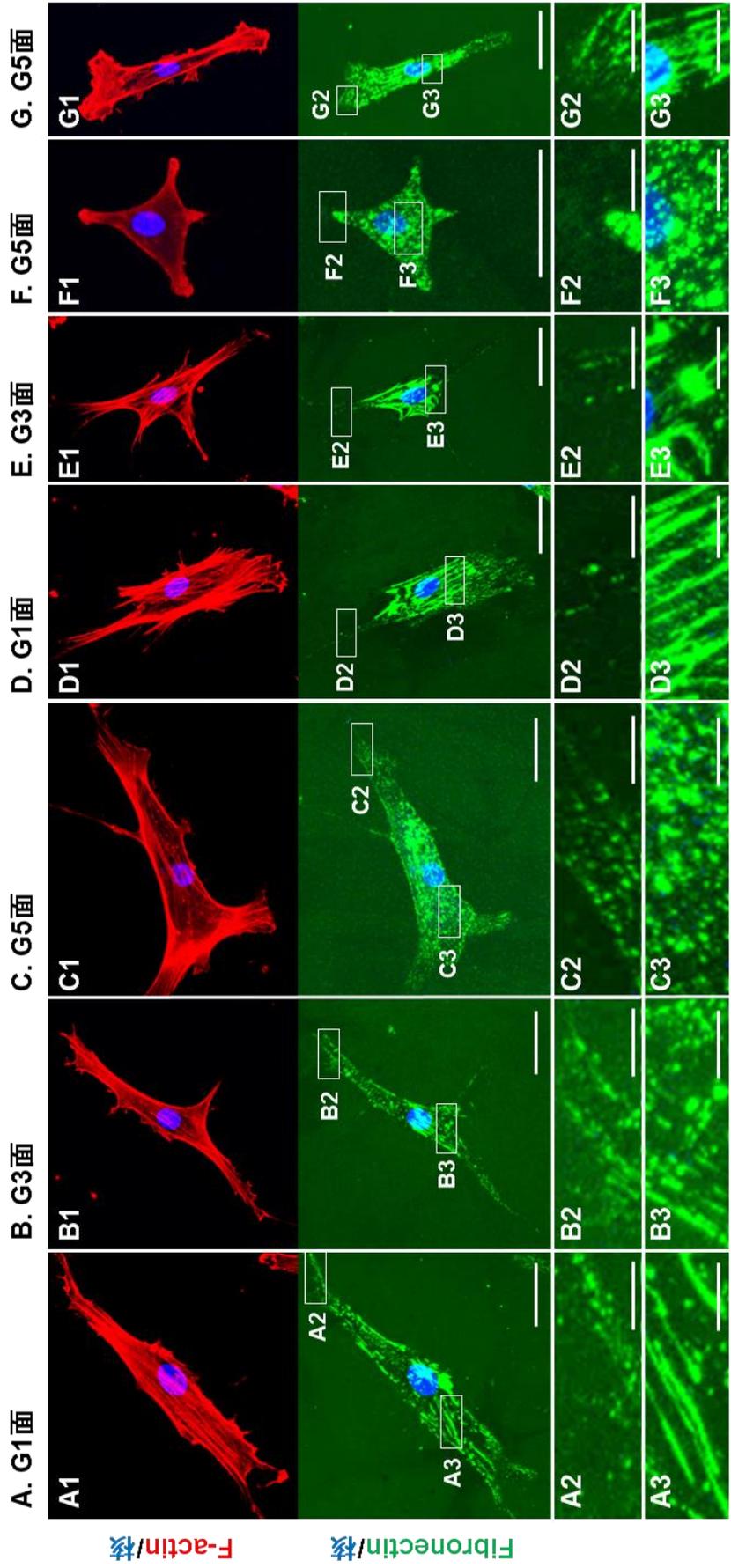


図 2.3 培養 1 日目 (A-C), 3 日目(D-F)における G1 (A と D)と G3 (B と E)と G5 面 (C と F と G)で培養された hMSCs の F-actin (赤)と fibronectin (緑)と核 (青)の免疫蛍光染色画像. 画像 A2-G3 はそれぞれ画像 A1-G1 での四角の領域の拡大図を示す. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (A1-G1)と 10  $\mu\text{m}$  (A2-G3).

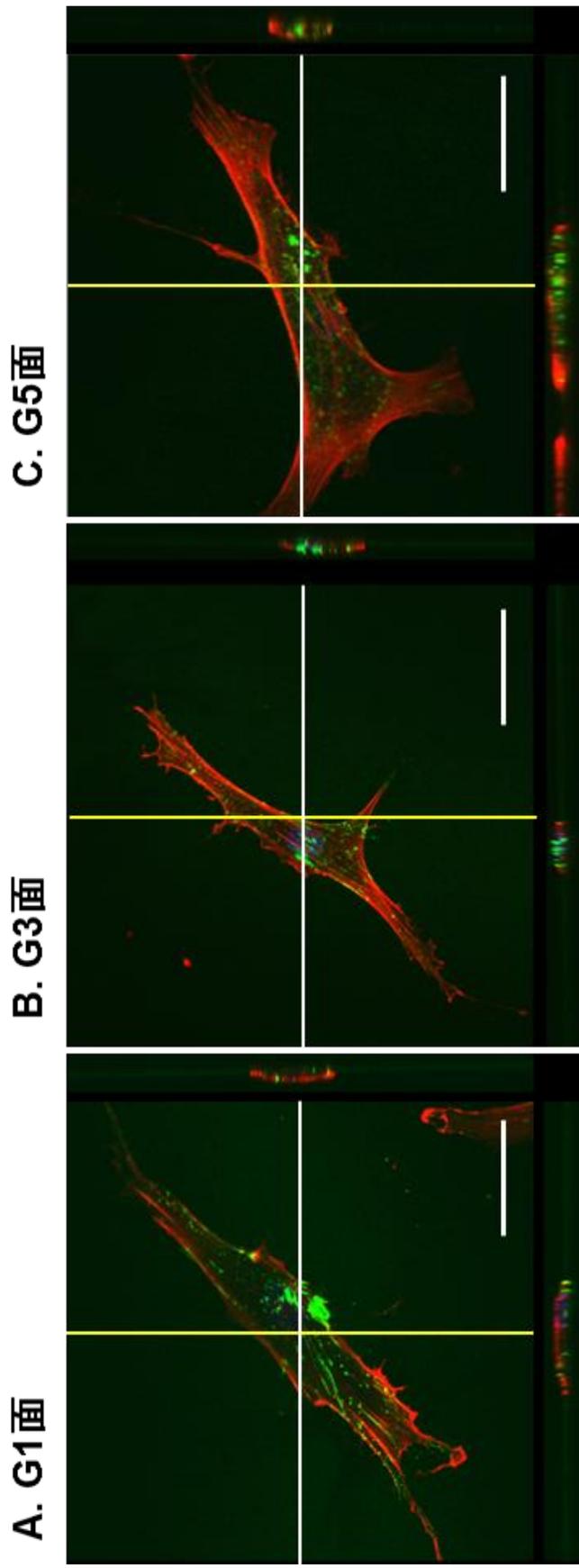


図 2.4 培養 1 日目における G1 (A)と G3 (B)と G5 面 (C)と hMSCs の間の境界における F-actin (赤)と fibronectin (緑)の免疫  
 蛍光染色画像. 下部と右側の画像はそれぞれ  $x-z$  (白線)と  $y-z$  (黄線)の断面図を示す. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .

Actin-RFP を発現する hMSCs を蛍光標識した fibronectin を添加した培地を用いて G1, G3, G5 面上で培養し、培養 3 日目にタイムラプス蛍光観察を行った。G1 面上での紡錘形の細胞では、先端部で lamellipodia 構造が確認され、fibronectin fibrils はほとんど確認されず、細胞体では、stress fiber が確認され、fibronectin fibrils が確認された (図 2.5A)。細胞遊走時において、先端部で lamellipodia の発達を確認され (図 2.5 白矢印)、細胞体で stress fiber 構造および fibronectin fibrils が維持されていることが確認された (図 2.5 黄矢印)。一方、細胞尾部では、stress fiber と fibronectin fibrils の短縮が確認された (図 2.5 青矢印)。G3 面での紡錘形の細胞では、先端部と尾部において、lamellipodia 構造が確認され、fibronectin fibrils はほとんど確認されなかった。また、細胞体では stress fiber と fibronectin fibrils が確認された (図 2.6A)。細胞遊走時において、lamellipodia の発達および、fibronectin fibrils の構築が細胞の前方で確認された (図 2.6 白矢印)。一方、細胞の後方部分では、stress fiber の崩壊および fibronectin fibrils の分解が確認された (図 2.6A1-A6 and C1-C6)。G5 面上での丸い形態の細胞では、先端部で lamellipodia 構造が確認され、細胞全域において stress fiber および fibronectin fibrils は確認されなかった (図 2.7A)。細胞遊走時において、細胞は左右両方向へ lamellipodia の発達の発達を確認され (図 2.7 白矢印)、細胞体で stress fiber の形成は確認されず、fibronectin aggregates が確認された (図 2.7B and C)。その後、尾部の退縮が確認された (図 2.7 青矢印)。退縮後の細胞において、fibronectin aggregates が細胞の周囲で確認された (図 2.8)。

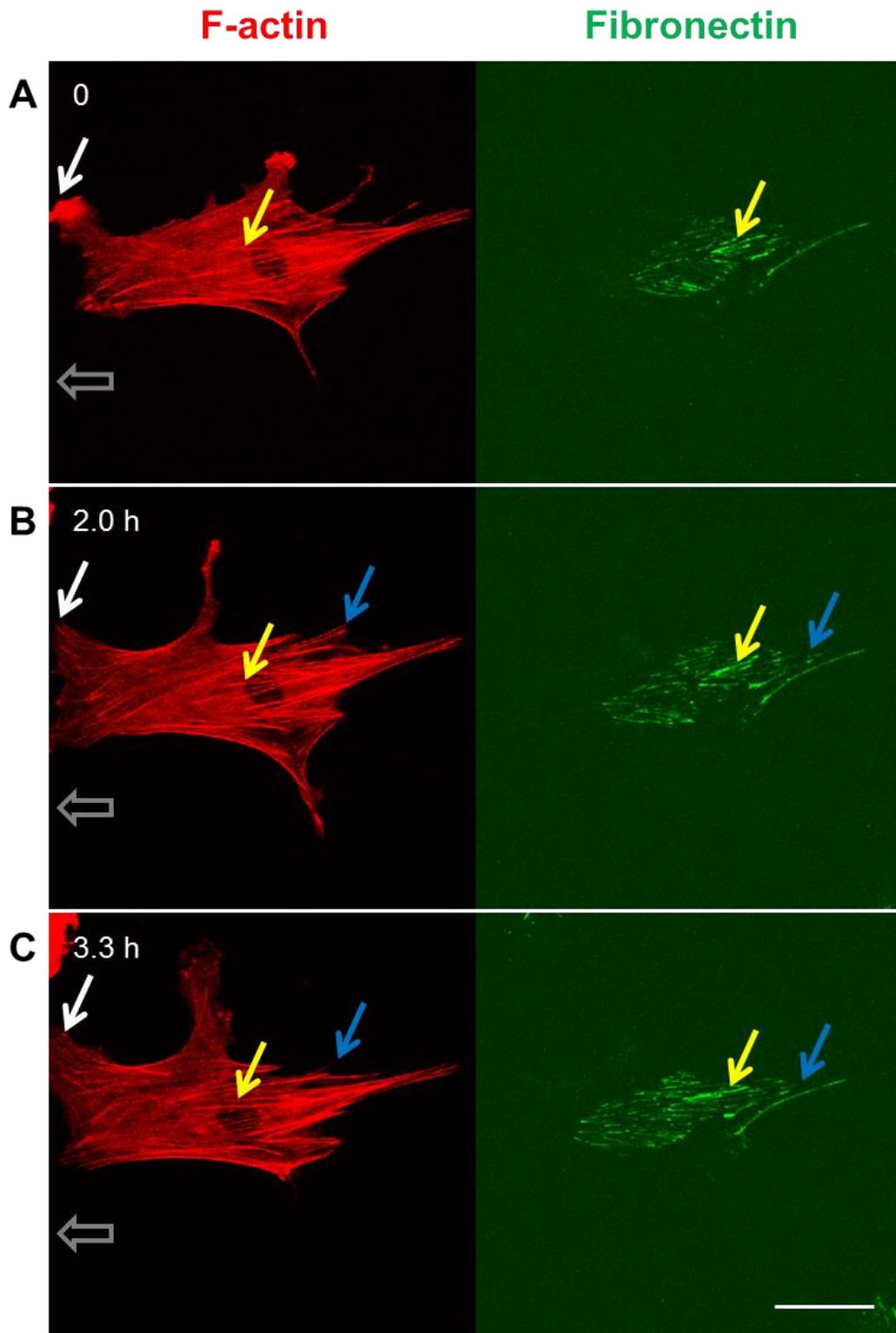


図 2.5 培養 3 日目における G1 面上で培養された hMSCs の F-actin (赤)と fibronectin (緑)のタイムラプス蛍光観察での画像. 白枠矢印は細胞遊走の方向を, 白と黄と青矢印はそれぞれ先端部, 細胞体, 尾部での構造変化を示す. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

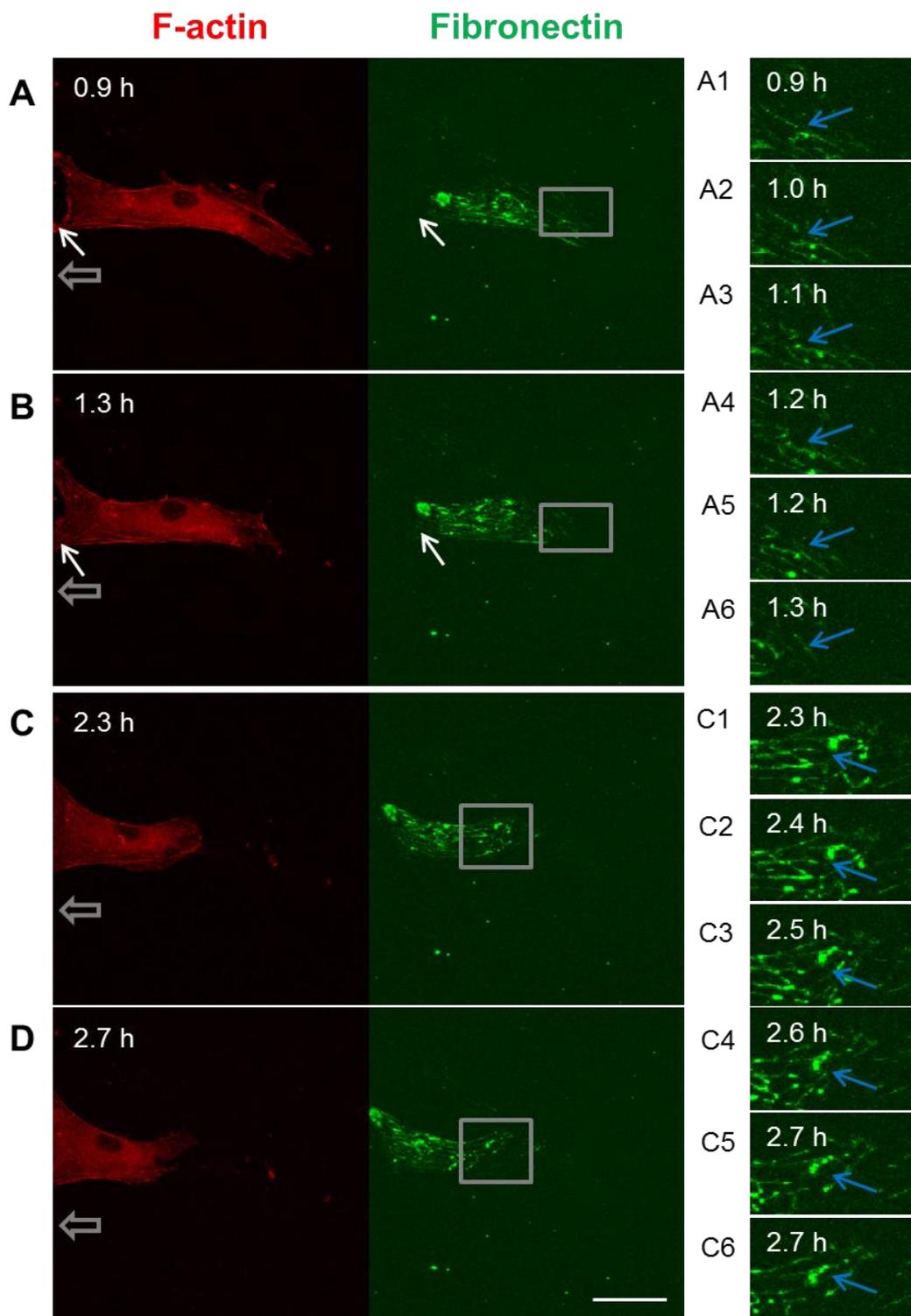


図 2.6 培養 3 日目における G3 面上で培養された hMSCs の F-actin (赤)と fibronectin (緑)のタイムラプス蛍光観察での画像. 画像 A1-A6 および C1-C6 はそれぞれ画像 A および C の四角領域の拡大図を示す. 白枠矢印は細胞遊走の方向を, 白と青矢印はそれぞれ細胞前方と後方の構造変化を示す. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

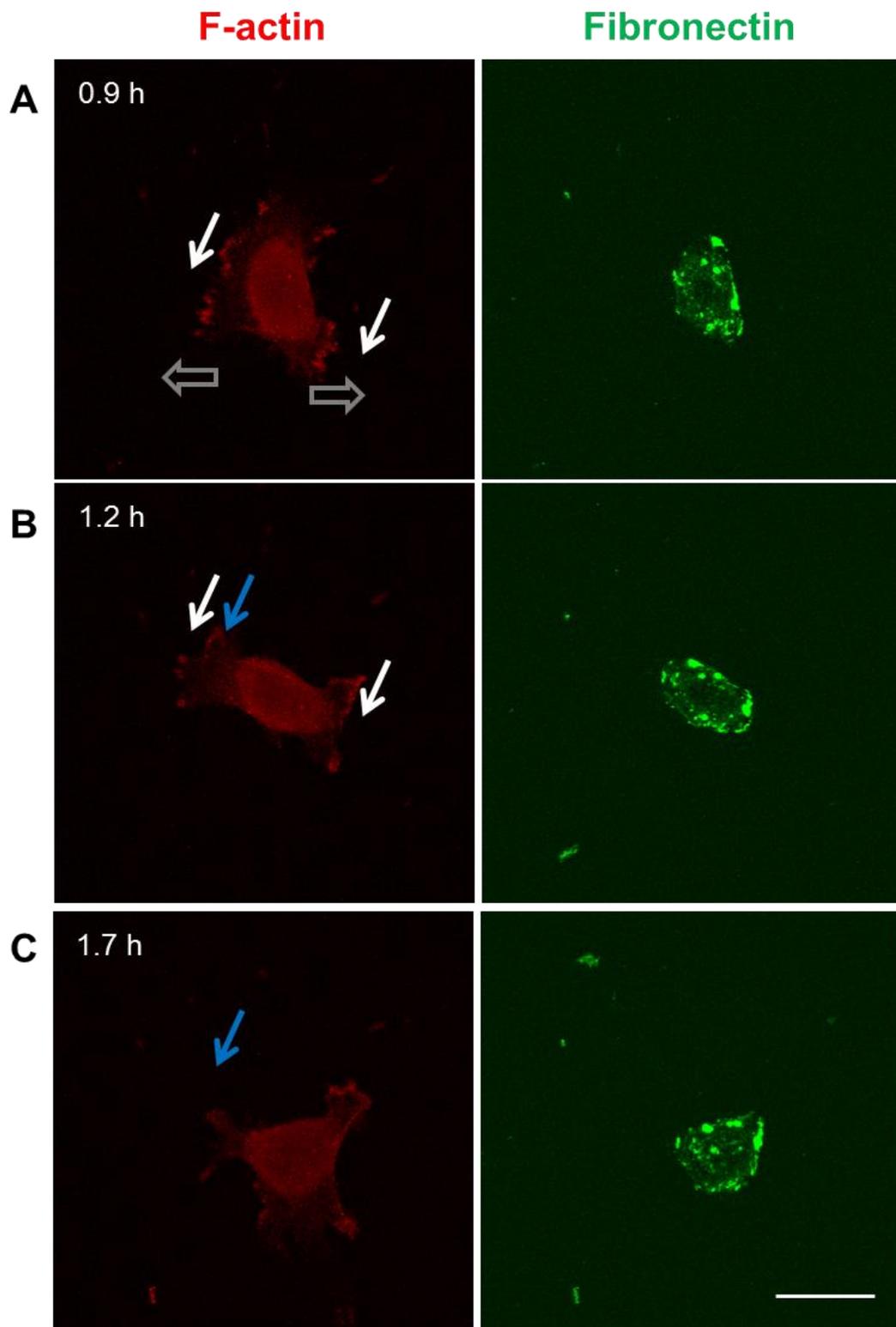


図 2.7 培養 3 日目における G5 面上で培養された hMSCs の F-actin (赤)と fibronectin (緑)のタイムラプス蛍光観察での画像. 白枠矢印は細胞遊走の方向を, 白と青矢印はそれぞれ細胞先端部と尾部の構造変化を示す. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

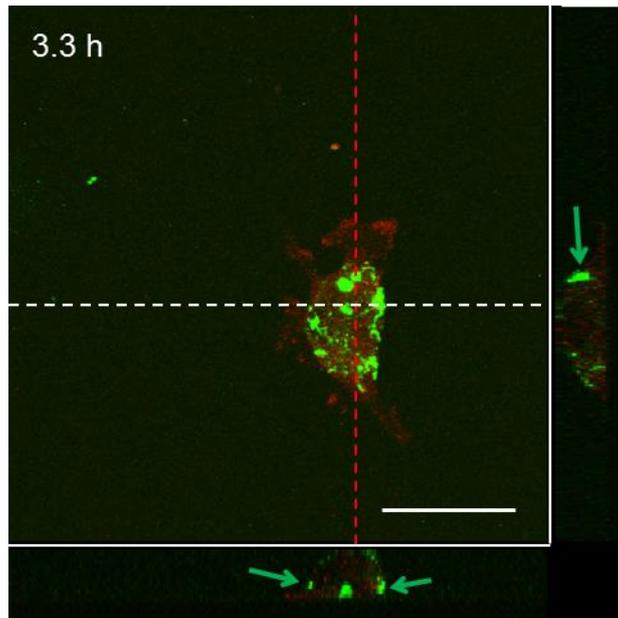


図 2.8 培養 3 日目における G5 面上で培養された hMSCs の退縮時における F-actin (赤)と fibronectin (緑)のタイムラプス蛍光観察での画像. 下側と右側の画像はそれぞれ  $x$ - $z$  (ドット状の白線)と  $y$ - $z$  (ドット状の赤線)の断面図を示す. 緑矢印は fibronectin aggregates を示す. Scale bars: 50  $\mu$ m.

培養 1, 3 日目にリアルタイム PCR によって G1, G3, G5 面で培養された hMSCs の MT1-MMP の相対 mRNA 量を確認した. 図 2.9 に示すように, 培養 1 日目の G5 面での MT1-MMP の相対 mRNA 発現量は G1, G3 面と比較してそれぞれ 1.3 倍と 1.4 倍高かった. さらに, 培養 3 日目には, 1 日目と比較して, G1 面での発現量は 0.5 倍になっていたが, G5 面では 2 倍発現量が高くなっていた.

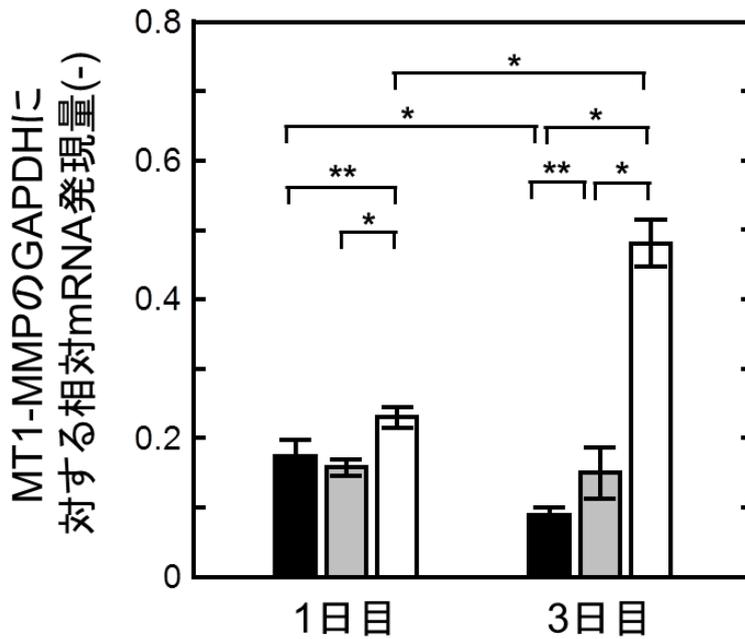


図 2.9 培養 1, 3 日目における G1 (黒棒)と G3 (灰棒)と G5 面 (白棒)で培養された hMSCs における GAPDH に対する MT1-MMP の相対 mRNA 発現量. エラーバーは標準偏差を示し (n=3), Tukey-Kramer 法で有意差判定している (\* $p < 0.01$  と\*\* $p < 0.05$ ).

### 2.3.2 接着点の構築と骨格形成

培養 3 日目において, G1, G3, G5 面上で培養された hMSCs に対し, F-actin と paxillin とリン酸化 paxillin の免疫蛍光染色を行った. 図 2.10 から G1 面上の hMSCs では, paxillin が stress fiber に沿って細胞全域に分布していた (図 2.10A). デンドリマー面の世代数の増加と共に, G1 面と比較して, paxillin の分布がより細胞先端部に集中し, 細胞体には少なくなっていた. 特に, G5 面では, 丸と紡錘形のどちらの細胞においてもほとんど全ての paxillin が細胞先端部の lamellipodia に局在していた (図 2.10C2-D3). その上, 図 2.11 に示すように, リン酸化 paxillin の発現は G1 面と G3 面では確認されなかったのに対し, G5 面では細胞先端部で確認された (図 2.11C1).

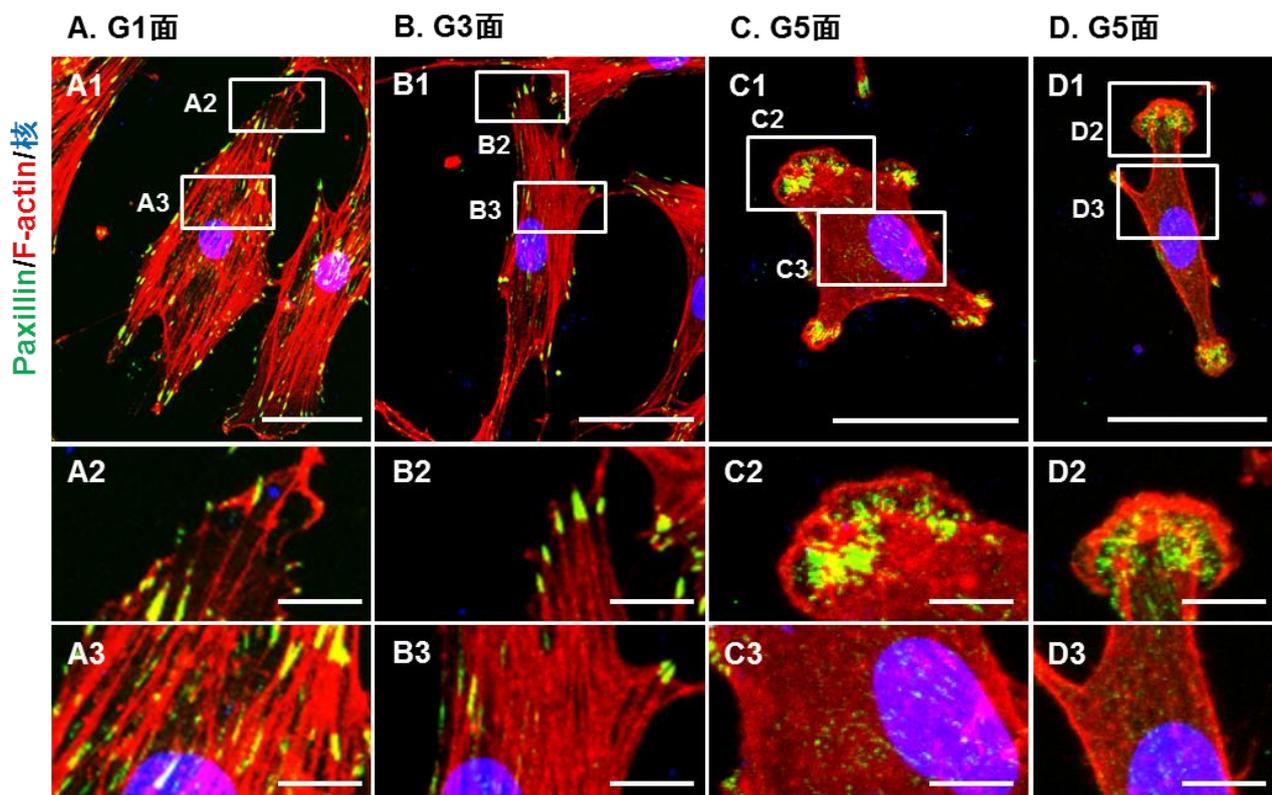


図 2.10 培養 3 日目における G1 (A)と G3 (B)と G5 面 (C と D)で培養された hMSCs の F-actin (赤)と paxillin (緑)と核 (青)の免疫蛍光染色画像. 画像 A2–D3 はそれぞれ画像 A1–D1 での四角の領域の拡大図を示す. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (A1–D1)と 10  $\mu\text{m}$  (A2–D3).

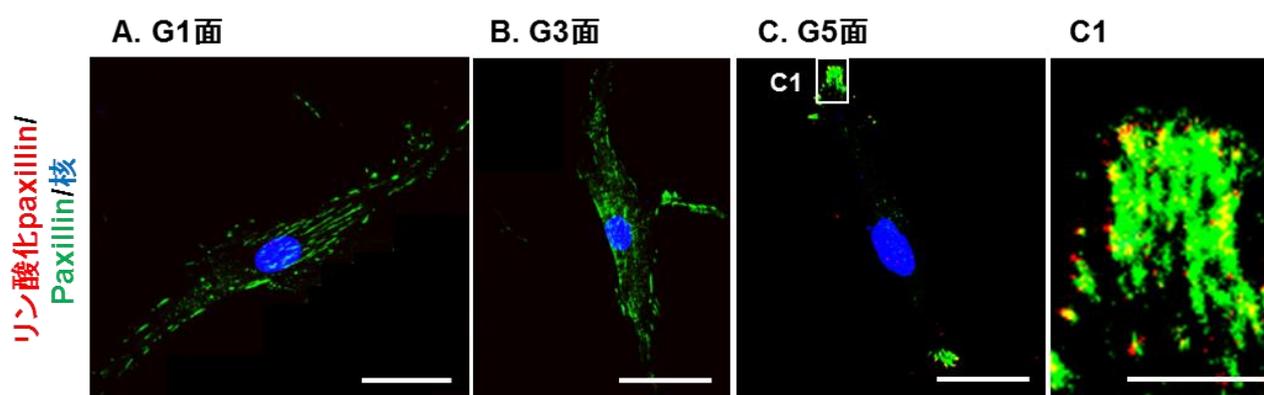


図 2.11 培養 3 日目における G1 (A)と G3 (B)と G5 面 (C)で培養された hMSCs の paxillin (緑)とリン酸化 paxillin (赤)と核 (青)の免疫蛍光染色画像. 画像 C1 は画像 C での四角の領域の拡大図を示す. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (A–C)と 10  $\mu\text{m}$  (C1).

## 2.4 考察

本研究では、異なる細胞挙動を示す G1 面と G3 面と G5 面上の細胞における fibronectin の吸着と構築化を比較することで、細胞挙動のメカニズムを考察した。細胞培養面間相互作用において、細胞は培養面と fibronectin に代表される細胞外マトリックスを介して接着している。すなわち、培養面上の細胞挙動を理解する為には、細胞と細胞外マトリックス間の相互作用、細胞外マトリックスと培養面の相互作用の時間・空間的变化を考慮に入れる必要がある。細胞挙動には、伸展した細胞膜上の integrin と培養面上に吸着した fibronectin との接着の形成と、細胞中心部での接着の安定性と、培養面からの接着の解離による尾部の退縮が含まれている (Friedl and Wolf, 2009)。細胞基質間接着の形成時において、Paxillin は integrin に細胞質側で結合して、focal adhesion を形成する。Paxillin のリン酸化は focal adhesion の turnover を促進し、Rac1 活性の促進および RhoA 活性の抑制を誘導している (Gupton and Waterman-Storer, 2006; Ishibe *et al.*, 2004; Tsubouchi *et al.*, 2002; Zaidel-Bar *et al.*, 2007)。Rac1 活性は lamellipodia の形成を通して細胞の伸展を促進しているのに対し、RhoA 活性は stress fiber の形成を通して伸展した形態の維持に働いている (Flevaris *et al.*, 2007; Nagayama and Matsumoto, 2008)。過去の研究において、G1 面上の細胞は、G3 および G5 面上の細胞より高い RhoA 活性を示し、紡錘形を維持した遊走を引き起こしていた一方で、G5 面上の細胞は lamellipodia の発達とともにより高い Rac1 活性を他の培養面上の細胞と比較して示していた (Kim *et al.*, 2010a)。こうした知見は、本研究で得られた focal adhesion と actin 形成の関係性を支持している。培養面上に吸着した fibronectin の量と構造に応答して、focal adhesion や actin 骨格形成が変化することが知られている。Fibronectin の吸着量が高い培養面では、paxillin のリン酸化が誘導される (Li *et al.*, 2009)。また、Fibronectin fibrils の形成阻害が、focal adhesion の不安定化および stress fiber の形成を阻害することが報告されて

いる (Hocking *et al.*, 2000; Sottile and Hocking, 2002). こうした傾向は本研究で得られている結果を支持している. 従って, G5 面上での伸展と退縮を伴う細胞挙動では, fibronectin の吸着量に応答した paxillin のリン酸化を通じた細胞の両方向への伸展と, fibronectin fibril の形成阻害による focal adhesion の不安定化, そして, stress fiber 形成の抑制による急激な細胞の退縮が起こっていることが示唆された(図 2.12A).

Fibronectin の吸着と構築化による細胞培養面間境界での focal adhesion と actin 骨格形成への可能性のあるプロセスについて図 2.12B に示した. 折りたたまれた構造を有している fibronectin は, 培養面上に吸着し, N-末端側の fibronectin 同士の結合ドメインを提示するために構造を開き, それが fibronectin fibrils の形成を誘導する (Mao and Schwarzbauer, 2005). Faucheux らは, ヒト fibroblast を用いた培養において, カチオン性の培養面上では, fibronectin fibrils が確認されるアニオン性の培養面と比較して, fibronectin の吸着量が増加し, fibronectin fibril 形成の阻害が引き起こされることを報告している (Faucheux *et al.*, 2006). Fibronectin fibril 形成の阻害は, matrix metalloproteinase のような特異的な酵素が fibronectin を分解することで引き起こされている (Jiao *et al.*, 2012; Shi and Sottile, 2011; Takino *et al.*, 2011). 特に, MT1-MMP は細胞の遊走性を促進するために fibronectin fibrils を分解する役割を有しており (Takino *et al.*, 2011), fibronectin によって MT1-MMP の発現が誘導されていた (Esparza *et al.*, 1999). これらの結果は, 私達の今回の結果である, MT1-MMP の mRNA 発現がデンドリマー面上への fibronectin の吸着量の増加と共に上昇していた点を支持している. 従って, G5 面上の hMSCs は MMP 発現による fibronectin fibrils の形成および分解を介して, 伸縮と退縮を伴う細胞挙動を引き起こすことが示唆された.

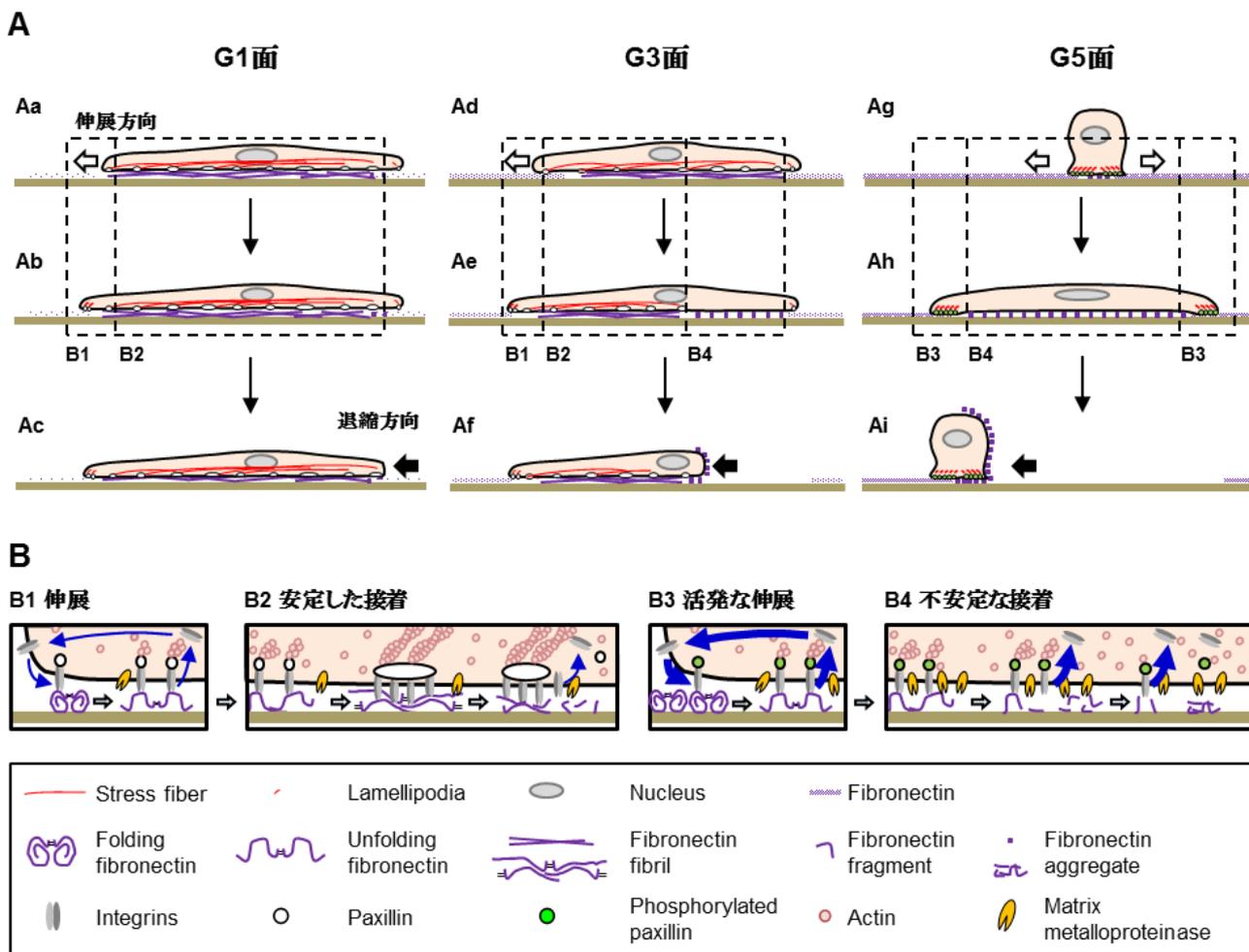


図 2.12 G1 (Aa–Ac)と G3 (Ad–Af)と G5 面 (Ag–Ai)における fibronectin の吸着と構築化による focal adhesion と細胞骨格の形成に関連した hMSCs の挙動変化 (A)と focal adhesion と細胞骨格の形成に関連した fibronectin の吸着と構築化での細胞と培養面の間の空間における細胞伸展 (B1)と安定した接着 (B2)と活発な伸展 (B3)と不安定な接着 (B4)の概念図.

## 2.5 小括

本研究では、fibronectin の吸着と MMP を介した細胞による fibronectin の構築化が動的細胞挙動を変化させることを示している。Fibronectin fibrils が形成される G1 面と G3 面と比較して、fibronectin の吸着量の高い G5 面上の細胞では、MT1-MMP の mRNA 発現が高く、fibronectin aggregates の形成が確認され、MMP を介した fibronectin の分解が fibronectin aggregates を構築化することが示唆された。また、G5 面上の細胞では、伸展時における先端部での lamellipodia の発達と stress fiber が形成されないこと、および paxillin の先端部への局在が確認され、focal adhesion の先端部への局在が細胞の伸展と退縮を引き起こすことが示唆された。これらの結果から、G5 面上の細胞は、培養面上の fibronectin を構築化することによって、伸展と退縮を伴う細胞挙動を引き起こすことが示唆された。

### 第3章 細胞集塊挙動によるヒト間葉系幹細胞の集塊内挙動

#### 3.1 緒言

細胞集塊の形成時には、細胞間接着の形成が誘導され、細胞間接着に関わるタンパク質の発現上昇が確認されている (Bartosh *et al.*, 2010). N-cadherin はヒト間葉系幹細胞 (hMSCs)の細胞間接着の形成時において細胞間で発現し (Wang *et al.*, 2009a), 細胞質側で  $\beta$ -catenin と複合体を形成する (Charrasse *et al.*, 2002). 心筋細胞への分化誘導過程において、N-cadherin の発現が必要であることが知られていることから (Bugorsky *et al.*, 2007), N-cadherin の発現誘導の為に細胞集塊の形成を伴う培養法が、心筋分化方向性誘導を目的として行われている (Bauwens *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). また、複合体を形成する  $\beta$ -catenin は異なる役割として、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを通して核内へ移行し、心筋分化に関わる遺伝子発現を誘導することが報告されている (Bond *et al.*, 2003). 従って、細胞間接着に代表される細胞間相互作用の解析が分化誘導のメカニズムの理解の助けとなると考えられる.

第1章では、G5 面上での遊走挙動を介した細胞集塊形成によって hMSCs の心筋分化方向性が誘導されることを確認してきた. 第2章では、集塊挙動における細胞培養面間相互作用の役割を確認してきた. そこで第3章では、遊走挙動を介した細胞集塊における集塊内挙動に着目し、細胞間相互作用に関する点から心筋分化方向性誘導のメカニズムを確認した.

## 3.2 実験方法

### 細胞と培養条件

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs; Lot no. 0000183402; Lonza, Walkersville, MD, USA)を以下の実験で使用した。継代培養を 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下において MSC growth medium (Lonza)を用いて細胞培養用ポリスチレン面 (PS 面)上で行った。70%コンフルエントに達すると, 0.1% trypsin/0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いて細胞を回収し, 凍結保存を行った, 5 継代以下の細胞を以下の実験で用いた。

以下の実験に対し, hMSCs を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) に, 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic; Thermo Fisher Scientific)を加えた培地中で液高さ 4 mm となるように培養した。播種密度は, 世代数 5 のデンドリマー面 (G5 面)に対し,  $5.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> とし ( $X_0$ ), 低接着性培養面 (U 底 96-well plate, 住友ベークライト, 東京)に対し,  $3.0 \times 10^2$  cells/well とした ( $X_0$ )。培地交換を 3 日に 1 回行った。

### デンドリマー面の作成

8-well plate (Thermo Fisher Scientific)と 35 mm dish (ibidi, Am Klopferspitz, Germany)の PS 面を G5 面の初期培養面として使用した。50 μmol/ml potassium *tert*-butoxide (和光純薬工業, 大阪)を液高さ 4 mm となるよう初期の PS 面上に添加し, 室温で 1 時間静置した。滅菌水で 3 回洗浄後, 360 μmol/ml の glutaraldehyde 溶液 (和光純薬工業)を液高さ 2.8 mm となるよう添加して 1 時間静置した。滅菌水で 3 回洗浄後, 0.1 mol/l 水酸化ナトリウム (和光純薬

工業)で調整した pH 9.0 の滅菌水を用いて, 360  $\mu\text{mol/ml}$  の tris (2-aminoethyl) amine 溶液 (東京化成工業, 東京)を液高さ 2.8 mm となるように添加して 1 時間静置した. 滅菌水で洗浄後, glutaraldehyde と tris (2-aminoethyl) amine 反応を合計 5 回繰り返した. 滅菌水で洗浄後, 末端基の提示として, 1.6  $\mu\text{mol/ml}$  の D-glucose 溶液を液高さ 2.8 mm となるように添加して 2 時間静置した. 側鎖構造の還元のために, 0.5  $\mu\text{mol/ml}$  の sodium borohydride 溶液 (Sigma)を D-glucose 溶液を抜かずに同量添加し, 24 時間静置した. 滅菌水で洗浄後, G5 面を使用した.

### タイムラプス観察

細胞に baculovirus を含む試薬 (CellLight nucleus-GFP; Thermo Fisher Scientific)を 20  $\mu\text{l/ml}$  となるように培地中に添加して 1 晩インキュベートし, nucleus-green fluorescence protein (GFP)を形質転換した. 単離を行わず, 細胞質標識試薬 (CellTracker™ Orange CMTMR; Thermo Fisher Scientific)を 5  $\mu\text{M}$  となるように培地中に添加し, 15 分間インキュベートした. タイムラプス共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-10i; オリンパス, 東京)で 20 分毎に, 60 倍の対物レンズ (UPLSAPO60XW; 開口数=1.20)を用いて, ピンホール径 120  $\mu\text{m}$  で, 解像度 512 $\times$ 512 の画像を scan speed 2.0  $\mu\text{sec/pixel}$  で取得した. レーザーの励起波長は 405, 473, 559 nm でレーザー強度はそれぞれ 15, 15, 15%で撮影した. 細胞集塊内での nucleus-GFP の画像解析はソフトウェア (Imaris; Bitplane AG, Zurich, Switzerland)を用いて行った.

### 免疫蛍光染色

培養容器から培地を取り除き, PBS で洗浄後, 4% paraformaldehyde (和光純薬工業)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 10 分間静置した. PBS で洗浄後, 0.5%

polyoxyethylene (10) octylphenyl ether (和光純薬工業)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 10 分間静置した. 非特異的タンパク質 (Block Ace; 大日本住友製薬, 大阪)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 90 分間反応させた後に, 抗 $\beta$ -catenin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)もしくは抗 cardiac Troponin T (cTnT)抗体 (Abcam, Cambridge, UK)を液高さ 0.5 mm となるように添加して 4°C で一晩静置した. TBS で洗浄後, 二次抗体 (Alexa Flour 488-conjugated anti-mouse IgG; Thermo Fisher Scientific)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 60 分間静置した. TBS で洗浄後, 核染色として, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo Fisher Scientific)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 30 分間静置した. PBS で洗浄後, F-actin の染色として, 蛍光標識された phalloidin (rhodamine phalloidin; Thermo Fisher Scientific)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 40 分間静置した. PBS で洗浄後, カバーガラス(松波硝子工業, 大阪)を被せた. 画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000; オリンパス)の 60 倍レンズ (UPLSAPO60XW; 開口数=1.20)を用いて, ピンホール径 120  $\mu\text{m}$  で, 解像度 512 $\times$ 512 の画像を scan speed 2.0  $\mu\text{sec/pixel}$  で取得した. レーザーの励起波長は 405, 473, 559 nm でレーザー強度はそれぞれ 15, 15, 15% で撮影した.

### 3.3 結果

#### 3.3.1 ヒト間葉系幹細胞集塊の動的挙動

細胞集塊内での細胞挙動を確認する為、nucleus-GFP を形質転換し、cell-tracker 蛍光色素で染色した hMSCs の集塊に対し、培養 8 日目に共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行った。G5 面上の細胞集塊において、面上に接着している細胞が集塊から完全に解離することなく面上を遊走することで、集塊が伸展していた (図 3.1A1)。退縮時には、2.0 h から 4.0 h において、集塊の端部での培養面からの脱離による急激な退縮が起こり、集塊が球状の形態を示していた (図 3.1B1)。この時、面上に接着していた細胞が、集塊上部に動いていた (図 3.1B2 白矢印)。退縮時において、赤、緑、青球で形作られた面に対して、白球が横切ることが確認され (図 3.1B3 and B4)、このことが集塊内で細胞が混ざること示している。一方、低接着性培養面上で形成された細胞集塊では、集塊内で細胞は混ざること示されなかった (図 3.2)。これらの結果は、G5 面上での能動的な遊走を介した細胞集塊挙動が細胞集塊内で混ざること誘導することを示している。

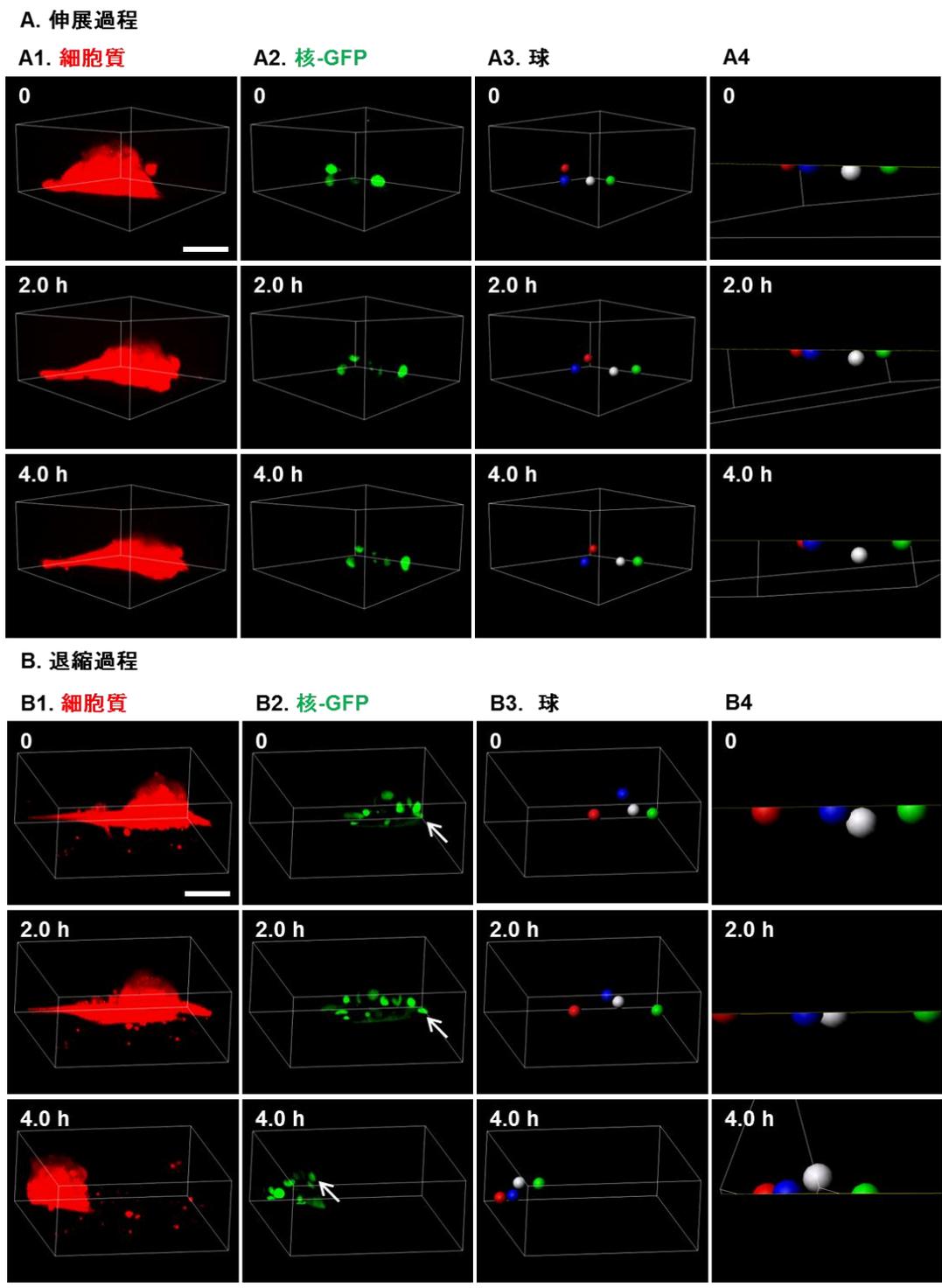


図 3.1 培養 8 日目の G5 面上で培養された hMSC 集塊の伸展 (A)および退縮過程 (B)における細胞質 (赤, A1 and B1)と GFP-核 (緑, A2 and B2)および核追跡の為の球 (A3 and B3)のタイムラプス画像. 画像 A4 and B4 はそれぞれ画像 A3 and B3 の赤と緑と青球で作られた断面に対する白球の相対位置を示す. 白矢印は培養面上の実際横隔を示す. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .

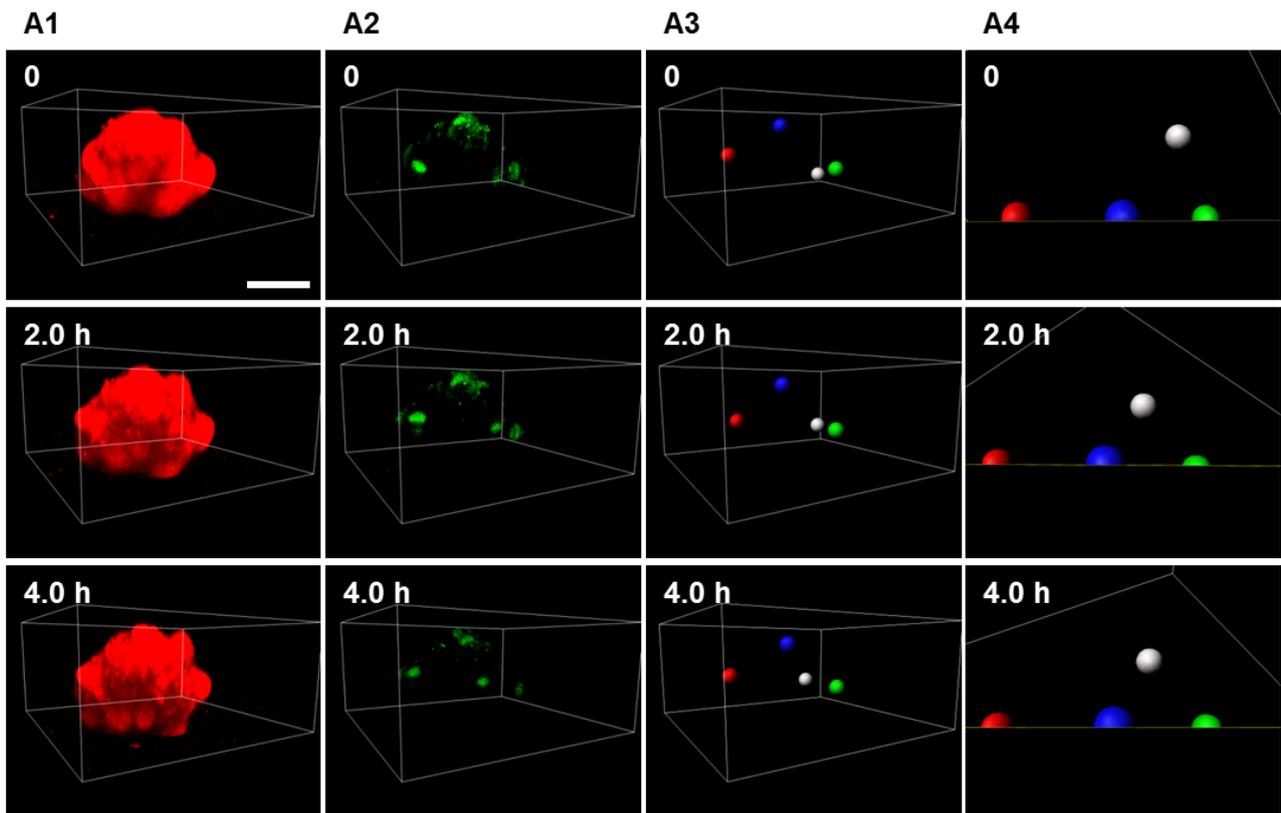


図 3.2 培養 8 日目での低接着性培養面上で培養された hMSC 集塊における細胞質 (赤, A1) と GFP-核 (緑, A2) および核追跡の為の球 (A3) のタイムラプス画像. 画像 A4 は画像 A3 の赤と緑と青球で作られた断面に対する白球の相対位置を示す. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2 細胞間接着に関わるタンパク質の局在と心筋マーカーの確認

$\beta$ -catenin の集塊内での局在および心筋細胞マーカー cTnT の発現を, 培養 8 日目の G5 面および低接着性培養面上の細胞集塊に対し,  $\beta$ -catenin および cTnT の免疫蛍光染色によって確認した. G5 面と低接着性培養面で培養された細胞集塊では, どちらの細胞集塊においても, 細胞間の接着面において  $\beta$ -catenin が確認された (図 3.3). その上, G5 面上の細胞集塊では細胞集塊の中心部 (図 3.3A1) から周辺部 (図 3.3A2) まで細胞集塊全域において,  $\beta$ -catenin が核内で確認された. 一方, 低接着性面上の細胞集塊では周辺部のみにおいて

$\beta$ -catenin が核内で確認された (図 3.3B). 同様に, 培養 8 日目において G5 面上の細胞集塊では集塊全域の細胞で cTnT が確認されたが (図 3.4A), 低接着性培養面上で培養された細胞集塊では周辺部のみに確認された (図 3.4B).

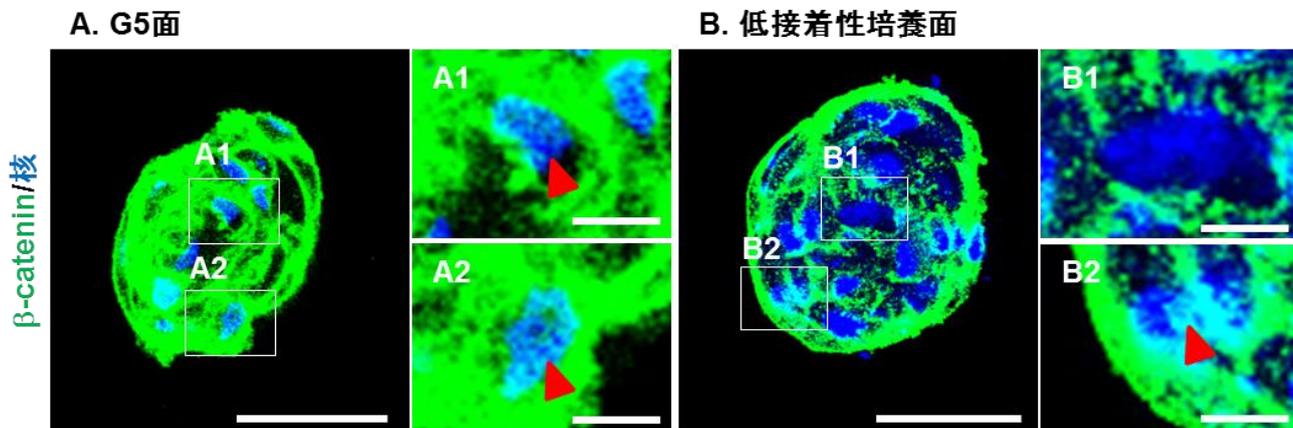


図 3.3 培養 8 日目における G5 面 (A)と低接着性培養面 (B)上で形成された hMSC 集塊の z 軸上中心付近の断面における $\beta$ -catenin (緑)と核 (青)の免疫蛍光染色画像. 画像 A1–B2 はそれぞれ画像 A と B 中における四角領域の拡大図. 赤矢印は核内への  $\beta$ -catenin の転移を示している. Scale bars: 50  $\mu$ m (A, B)と 10  $\mu$ m (A1, B2).

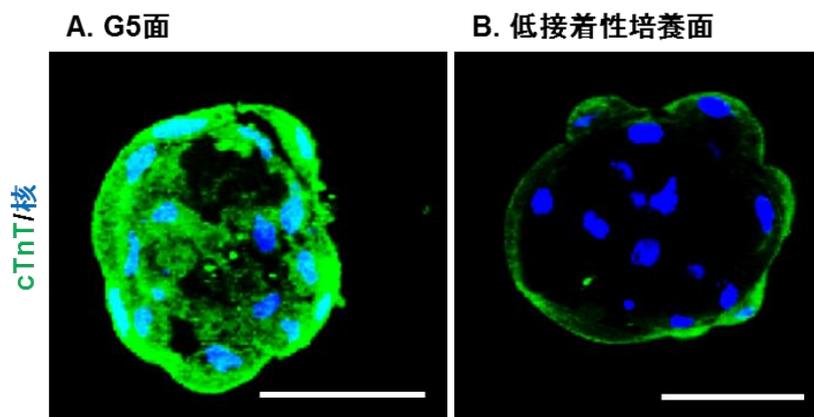


図 3.4 培養 8 日目における G5 面 (A)と低接着性培養面 (B)上で形成された hMSC 集塊の z 軸上中心付近の断面における cTnT (緑)と核 (青)の免疫蛍光染色画像. Scale bars: 50  $\mu$ m.

### 3.4 考察

細胞集塊形成は幹細胞の分化方向性を誘導する重要な手法であり、分化方向性誘導のメカニズムを理解する為に細胞集塊の挙動を考察する必要がある。本研究では、G5 面上での伸展と退縮を伴う挙動を示す細胞集塊と低接着性培養面上での伸展と退縮を伴う挙動を示さない細胞集塊を比較することで、伸展と退縮を伴う挙動の心筋方向への分化方向性の誘導に対する影響を確認している。細胞集団の挙動において、Rho family GTPases および actin の動的変化を通して、協同した cadherin および integrin 由来の接着構造が影響を与えている (Biname *et al.*, 2010; Petrie and Yamada, 2012; Vogel and Sheetz, 2009; Wang *et al.*, 2014)。こうした細胞挙動では、力学的な力が働くことで力学的シグナルが働き、幹細胞の分化誘導に貢献していることが知られている (Dado *et al.*, 2012)。本研究での結果を基に構築した細胞集塊挙動を通じた分化方向性の心筋方向への誘導に対する仮説を図 3.5 に示す。G5 面上での伸展と退縮を伴う細胞挙動では、面上に接着した細胞が培養面からの脱離によって細胞集塊の上部に動き、集塊内で混ざっている様子が確認された (図 3.1III and 3.5A)。こうした挙動には、細胞培養面間相互作用が関わっていることが示唆されている (図 3.5B)。従って、能動的な伸展と退縮を伴う細胞挙動によって、細胞集塊内で受動的に細胞が混ぜられていることが示唆された。G5 面および低接着性培養面で形成された細胞集塊では N-cadherin を介した細胞間接着が生じている (Kim *et al.*, 2010a)。 $\beta$ -catenin は N-cadherin が細胞間接着を形成する際に細胞側で複合体を形成し、細胞間接着の安定性に寄与する (Charrasse *et al.*, 2002)。また、 $\beta$ -catenin は Wnt シグナルなどによって核内へ移行することで転写因子として働き、T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor と協働することで心筋細胞への分化誘導過程で Mef2c などの標的遺伝子の転写活性を制御している (Arnsdorf *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2015; Heo and Lee, 2011; Nelson and Nusse, 2004)。細胞間接着の解離によって、遊離した

$\beta$ -catenin は Rac1 の活性化によって核内への転写が促進されることが知られている (Kam and Quaranta, 2009; Wu *et al.*, 2008). これらの知見は本研究で提案している G5 面上での細胞集塊における $\beta$ -catenin の核内移行による心筋分化方向性誘導を支持している. 従って, 本研究の結果から, G5 面上の細胞集塊の伸展と退縮を伴う挙動によって集塊内で細胞が混ざり, 細胞間接着の解離による  $\beta$ -catenin の核内移行が心筋分化方向性を誘導することが示唆された.

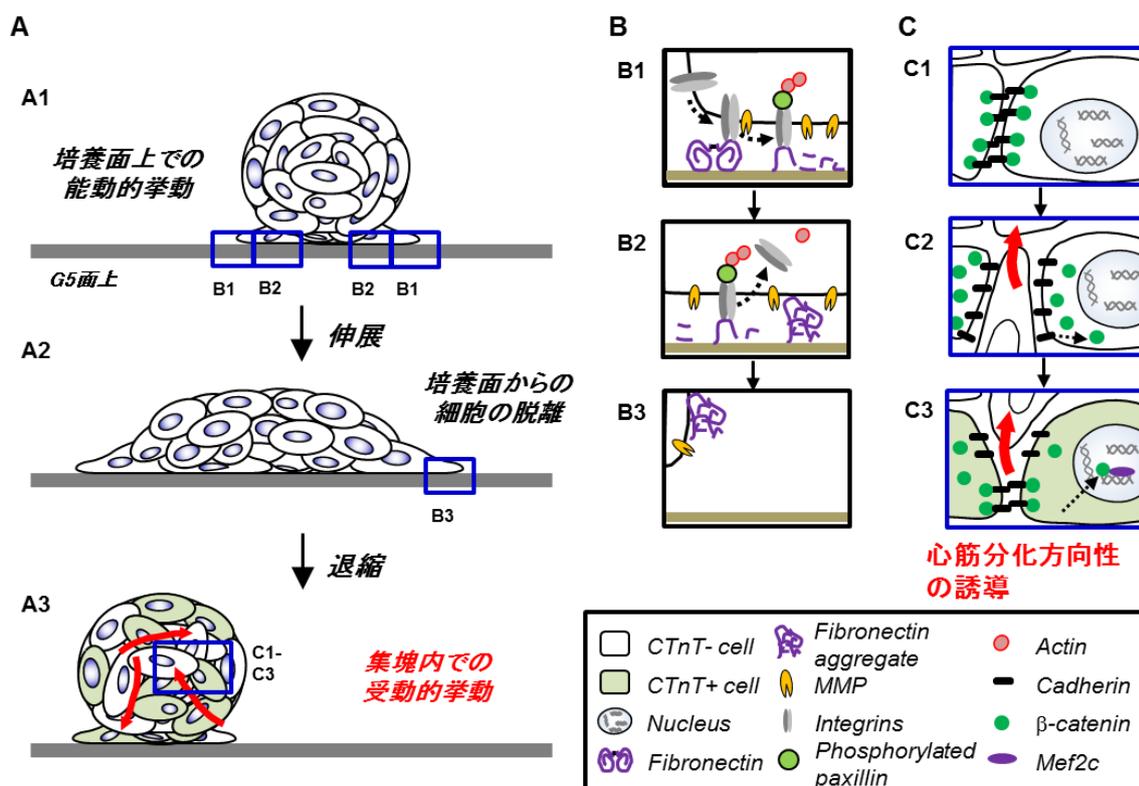


図 3.5 G5 面上の細胞集塊挙動に基づく hMSC の心筋分化方向性誘導の概念図. 面上の細胞が遊走し, 細胞集塊の伸縮を通して集塊内での受動的な細胞遊走を引き起こす (A). 培養面上の fibronectin への接着を通じた細胞の伸展を誘導し, fibronectin の分解を通じた接着の不安定化が細胞の培養面との接着の解離を誘導する (B). 集塊内での受動的な遊走が, 細胞間接着の解離および $\beta$ -catenin の核内移行を通して心筋分化方向性誘導を引き起こす (C).

### 3.5 小括

本研究では G5 面上で形成された細胞集塊の伸縮による形態変化を伴う遊走挙動が hMSC の心筋分化方向性誘導することを示唆している。培養面上の遊走を介した G5 面上の細胞集塊の伸展と退縮によって集塊内で細胞が混ざることが確認された。また G5 面上の細胞集塊全域において、 $\beta$ -catenin の核内での発現および cTnT の発現が確認された。これらの結果から、G5 面上の細胞集塊では、培養面上の遊走を介した伸展と退縮によって、集塊内で細胞が混ざり、細胞間接着の解離が生じ、 $\beta$ -catenin が核内移行することで心筋分化方向性誘導が引き起こされていることが示唆された。

## 第4章 細胞集塊挙動に基づくヒト間葉系幹細胞の培養特性

### 4.1 緒言

幹細胞の目的細胞への分化誘導手法は、分化誘導メカニズムを理解した上で、メカニズムを誘導するように培養環境を構築する手法が採用されている。ヒト間葉系幹細胞から心筋分化誘導を行う際には、TGF $\beta$ 1 を培地中に添加する方法が採用されている (Mohanty *et al.*, 2013)。加えて、外因性の分化誘導因子を継続的に添加し続けることによって、目的細胞への分化誘導が時間依存的に増加していくことが報告されており (Zhang *et al.*, 2009)、継続的な刺激を与え続けることも分化方向性誘導促進のための手法として有用であると考えられる。

これまでに、G5 面上での伸展と退縮を伴う細胞集塊挙動による心筋分化方向性の誘導を確認してきた。G5 面上での伸展と退縮を伴う細胞集塊挙動は、Rac1 が誘導する lamellipodia の発達を介して引き起こされ、培養 10 日目には抑制されていた。この時、cTnT 陽性細胞比率が 7 日目と 10 日目で有意差がなく、cTnT 陽性細胞比率の増加には、伸展と退縮を伴う細胞集塊挙動の継続および再始動が必要だと考えられる。そこで、第 4 章では、Rac1 activator を用いた細胞集塊挙動促進および継代操作による細胞集塊挙動の分散及び再形成を行うことで、集塊挙動に基づく心筋分化方向性誘導可能な培養方法について検討した。

## 4.2 実験方法

### 細胞と培養条件

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs; Lot no. 0000183402; Lonza, Walkersville, MD, USA)を以下の実験で使用した。継代培養を 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下において MSC growth medium (Lonza)を用いて細胞培養用ポリスチレン面 (PS 面)上で行った。70%コンフルエントに達すると, 0.1% trypsin/0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いて細胞を回収し, 凍結保存した。5 継代以下の細胞を以下の実験で用いた。

以下の実験に対し, hMSCs を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) に, 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic; Thermo Fisher Scientific)を加えた培地中で液高さ 4 mm となるように培養した。播種密度は世代数 5 のデンドリマー面 (G5 面)に対し,  $5.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> とし (X<sub>0</sub>), 培地交換を 3 日に 1 回行った。

細胞の遊走挙動促進の為に, 培養 3 日目から 10 日目において 50 µg/ml となるように Rac1 activator (HMG-1; Sigma-Aldrich) (Sugimoto *et al.*, 2014)を培地中に添加して培養を行った。また分化誘導促進剤として, 5 ng/ml となるように Transforming growth factor (TGF)β1 (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA)を培地中に添加して培養を行った。

### デンドリマー面の作成

8-well plate (Thermo Fisher Scientific)の PS 面を G5 面の初期培養面として使用した。50 µmol/ml potassium *tert*-butoxide (和光純薬工業, 大阪)を液高さ 4 mm となるよう PS 面上に添加し, 室温で 1 時間静置した。滅菌水で 3 回洗浄後, 360 µmol/ml の glutaraldehyde 溶液 (和

光純薬工業)を液高さ 2.8 mm となるよう添加して 1 時間静置した。滅菌水で 3 回洗浄後、0.1 mol/l 水酸化ナトリウム (和光純薬工業)で調整した pH 9.0 の滅菌水を用いて、360  $\mu\text{mol/ml}$  の tris (2-aminoethyl) amine 溶液 (東京化成工業)を液高さ 2.8 mm となるように添加して 1 時間静置した。滅菌水で洗浄後、glutaraldehyde と tris (2-aminoethyl) amine 反応を合計 5 回繰り返した。滅菌水で洗浄後、末端基の提示として、1.6  $\mu\text{mol/ml}$  の D-glucose 溶液を液高さ 2.8 mm となるように添加して 2 時間静置した。側鎖構造の還元のために、0.5  $\mu\text{mol/ml}$  の sodium borohydride 溶液 (Sigma-Aldrich)を D-glucose 溶液を抜かずに同量添加し、24 時間静置した。滅菌水で洗浄後、G5 面を使用した。

## 細胞挙動の観察

細胞形態のタイムラプス観察をインキュベーター内に光学顕微鏡 (CK-40; オリンパス, 東京)と CCD カメラ (CS6931; 東芝, 東京)を設置した自動画像撮影装置 (Kino-oka *et al.*, 2004)を用いて行った。4 倍の対物レンズを用いて 10 分ごとに  $512 \times 582$  pixel の細胞画像を定点で培養 1 日目から 10 日目まで取得する、もしくは観察装置 (BioStudio-T; ニコン, 東京)を用いて複数の観察点に対し、培養 8 日目から 10 日目まで 10 分毎に 4 倍の対物レンズを用いて細胞画像を取得することによって行った。

## 心筋細胞マーカー陽性細胞比率の評価

hMSCs の心筋分化方向性誘導を評価する為、心筋細胞マーカー cardiac Troponin T (cTnT) 陽性細胞比率 ( $X_P/X_T$ )を cTnT 陽性細胞数 ( $X_P$ )と DAPI 陽性細胞数 ( $X_T$ )から求めた。cTnT 陽性細胞数 ( $X_P$ )と DAPI 陽性細胞数 ( $X_T$ )を求める為に、培養した細胞を 0.1% trypsin/0.02% EDTA 溶液によって回収した後に、播種密度  $2.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>として PS 面上へ再播種し

た. 3 日間培養を行った細胞を核染色試薬と抗 cTnT 抗体を用いて以下の手順で免疫蛍光染色した. 培養容器から培地を取り除き, PBS で洗浄後, 4% paraformaldehyde (和光純薬工業 和光純薬工業)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 10 分間静置した. PBS で洗浄後, 0.5% polyoxyethylene (10) octylphenyl ether (和光純薬工業)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 10 分間静置した. 非特異的タンパク質 (Block Ace; 大日本住友製薬, 大阪)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 90 分間反応させた後に, 抗 cTnT 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)を液高さ 0.5 mm となるように添加して 4°C で一晩静置した. TBS で洗浄後, 二次抗体 (Alexa Flour 488-conjugated anti-mouse IgG; Thermo Fisher Scientific)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 60 分間静置した. TBS で洗浄後, 核染色として, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo Fisher Scientific)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 30 分間静置した. PBS で洗浄後, F-actin の染色として, 蛍光標識された phalloidin (rhodamine phalloidin; Thermo Fisher Scientific)を液高さ 0.5 mm となるように添加して室温で 40 分間静置した. PBS で洗浄後, カバーガラス (松浪硝子工業, 大阪)を被せた. 画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000; オリンパス)の 20 倍レンズ (UPLSAPO20X; 開口数=0.75)を用いて, ピンホール径 80  $\mu\text{m}$  で, 解像度 512 $\times$ 512 の画像を scan speed 2.0  $\mu\text{sec}/\text{pixel}$  で取得した. レーザーの励起波長は 405, 473, 559 nm でレーザー強度はそれぞれ 15, 20, 20%で撮影した. 得られた画像から, cTnT のフィラメント構造が確認できる細胞を cTnT 陽性細胞と定義し, cTnT 陽性細胞数 ( $X_P$ )と DAPI 陽性細胞数 ( $X_T$ )を 1 回の実験で 200 個以上細胞をカウントし, cTnT 陽性細胞比率 ( $X_P/X_T$ )を決定する為に解析した.

## リアルタイム PCR 法

細胞を 0.1%trypsin/0.02%EDTA 溶液によって回収後, RNA をプロトコルに沿って細胞から抽出した (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany). 得られた RNA に対し, チミンヌクレオチドの連続からなるオリゴ dT プライマーを用いて逆転写反応を行った (SuperScript II Reverse Transcriptase kit; タカラバイオ, 滋賀). 得られた cDNA に対し, SYBR Green を用いて, 40 サイクル polymerase chain reaction (PCR)を行い, インターカレーター法による蛍光強度をサイクルごとに検出した (SYBR Premix EX Taq; タカラバイオと, StepOnePlus real-time PCR system; Thermo Fisher Scientific). 特異的なプライマーとして以前の報告に沿って, cardiac Troponin T (cTnT), forward 5'- AGGCGCTGATTGAGGCTCAC -3'; reverse 5'- ATAGATGCTCTGCCACAGC -3' と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), forward 5'-CAACGGATTTGGTCGTATTGG-3'; reverse 5'-GCCATGGGTGGAATCATATTG-3' を使用した(Goncalves *et al.*, 2009; Kim and Kino-oka, 2014). 蛍光強度の閾値から, cycle threshold value ( $C_t$ )を求めた. 標的遺伝子に対して GAPDH で補正をすることで $\Delta C_t$ を求め, 相対 mRNA 発現量を  $2^{-\Delta C_t}$  で算出した.

## 統計解析

全ての培養は少なくとも 3 回行い, 独立してデータを取得した. 得られたデータは平均値をグラフにし, エラーバーとして標準偏差を表示した. Student's *t*-test および Tukey-Kramer method をデータ間の有意差を決定するために用い, 有意水準 1% または 5% で検定を行った.

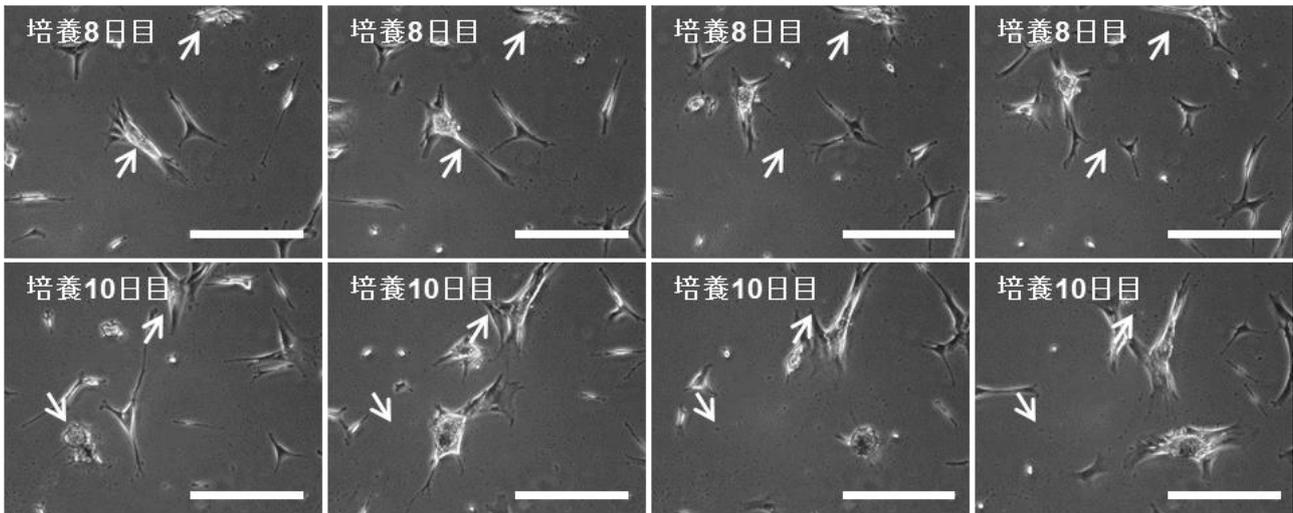
## 4.3 結果

### 4.3.1 細胞集塊挙動の継続による心筋分化方向性誘導の促進

細胞集塊の遊走挙動促進の為、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Rac1 activator を培養 3 日目から 10 日目まで培地中に添加し、培養 8 日目から 10 日目までタイムラプス観察した。Rac1 activator を添加した培養では、培養 8 日目から 10 日目において hMSC 集塊が伸伸展と退縮を伴う挙動を維持していた (図 4.1A 白矢印)。しかしながら、Rac1 activator を添加しない条件では、G5 面上の細胞集塊は、培養 8 日目には伸展と退縮を伴う挙動を示していたが、10 日目にはその挙動が抑制されていた (図 4.1B 白矢印)。

細胞集塊の遊走挙動による心筋分化方向性の誘導を評価する為、G5 面上で、Rac1 activator を添加した培地に切り替えて培養 3 日目から 10 日目まで培養した細胞に対し、cTnT 陽性細胞比率、 $X_p/X_T$  を求めた。Rac1 activator を添加した条件では、培養 8 日目から 10 日目において  $X_p/X_T$  が増加しており、10 日目には添加なしの条件と比較して 2.0 倍高くなっていたのに対し、添加なしの条件では、培養 8 日目と 10 日目の  $X_p/X_T$  ではそれぞれ 0.22 と 0.21 でほとんど違いが見られなかった (図 4.2)。

### A. Rac1 activatorの添加



### B. 添加なし

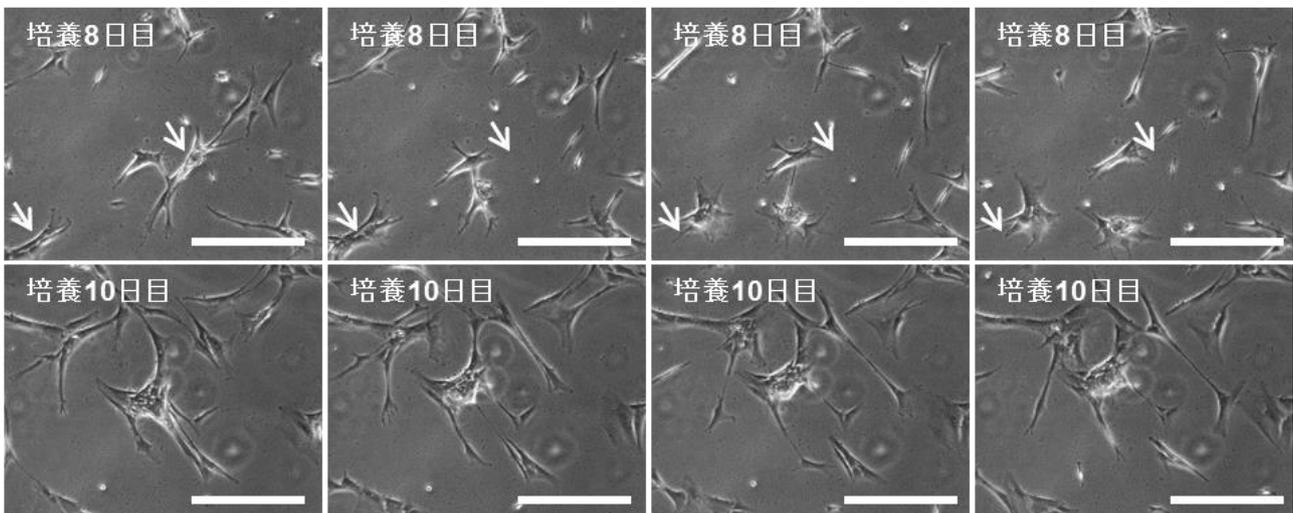


図 4.1 培養 8 日目から 10 日目における G5 面での Rac1 activator を添加した (A)および添加無し (B)の培地で培養された hMSCs のタイムラプス観察における 2 時間毎の画像. 白矢印は遊走挙動する細胞集塊を示す. Scale bars: 100  $\mu$ m.

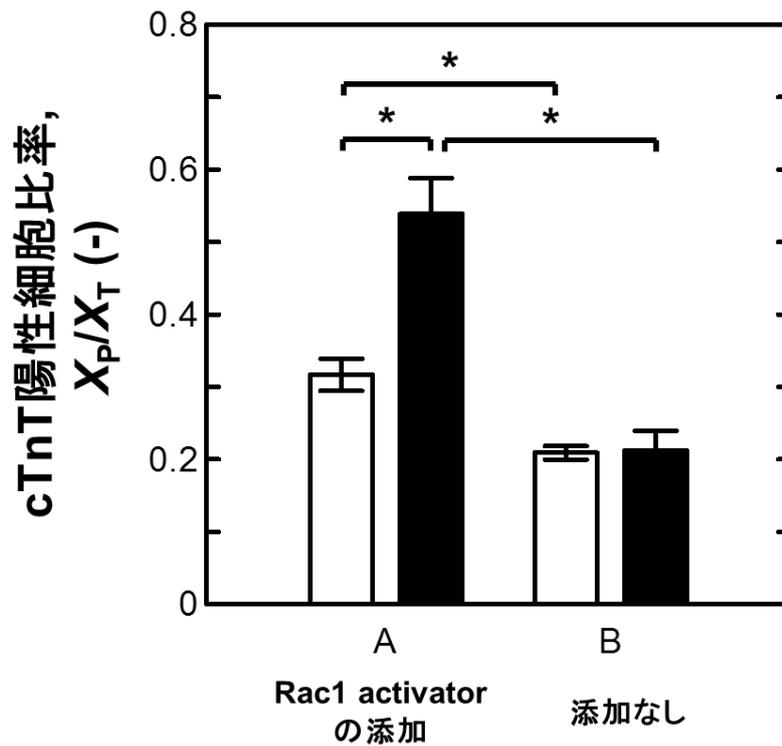


図 4.2 培養 8 日目 (白棒)と 10 日目 (黒棒)における G5 面で Rac1 activator を添加した (A)および添加なし (B)の培地で培養された hMSCs の cTnT 陽性細胞比率  $X_p/X_T$ . エラーバーは標準偏差を示し (n=3), Tukey-Kramer 法で有意差判定している (\* $p < 0.01$ ).

#### 4.3.2 細胞集塊の崩壊と再形成を介した心筋分化方向性誘導の促進

G5 面上で培養された細胞群の特性を把握する為、G5 面上で hMSCs を 10 日間培養した後、浮遊した細胞集塊群と培養面上に残った細胞群に分けた。得られた浮遊した細胞群と培養面上に残った細胞群に対し、cTnT 陽性細胞比率を算出した。図 4.3 に示すように、タッピングによって回収された細胞集塊の  $X_p/X_T$  は、0.31 であり、G5 面上に残った細胞群よりも 1.4 倍高かった。

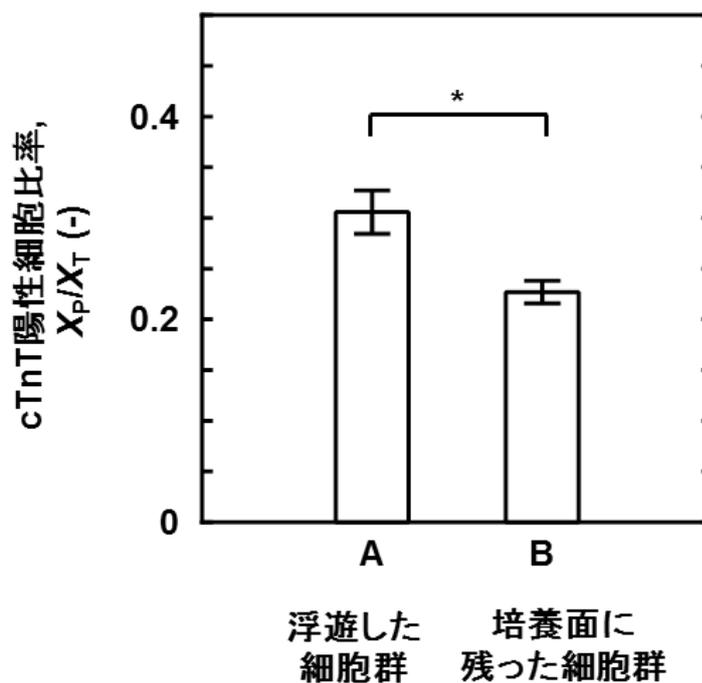
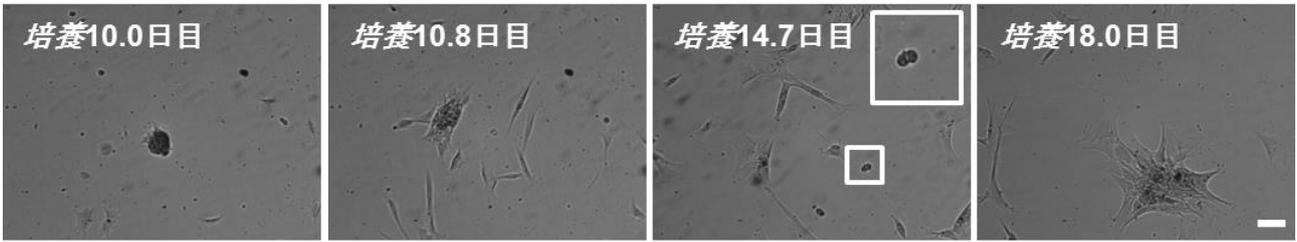


図 4.3 G5 面上で 10 日間培養された hMSCs に対し、浮遊した細胞群 (A)と、培養面上に残った細胞群 (B)の cTnT 陽性細胞比率. エラーバーは標準偏差を示し (n=3), Students' *t*-test で有意差判定している (\* $P < 0.01$ ).

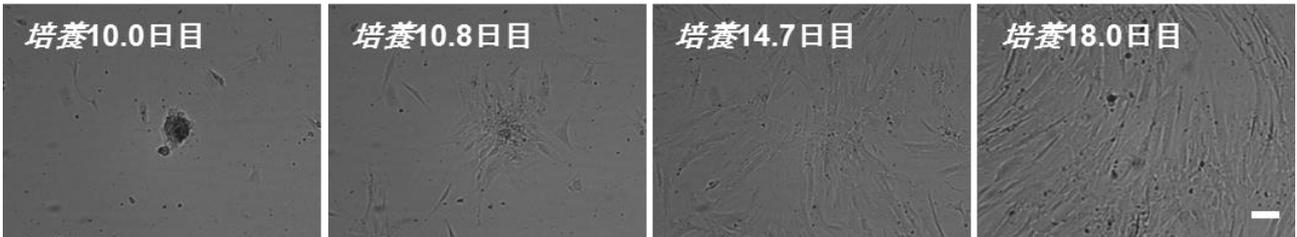
G5 面上で 10 日間培養し，浮遊した細胞集塊を回収し，新たな G5 面と PS 面に再播種した．タイムラプス観察によって，細胞集塊を G5 面上に継代した場合 (図 4.4IA)，細胞集塊は培養面に接着し，細胞集塊が崩壊することで単細胞が遊離し，増殖を伴いながら，伸展と退縮を伴う挙動を示していた．培養 20 日目には，細胞集塊の再形成が確認された．一方，PS 面上に継代した場合 (図 4.4IB)，細胞集塊は培養面に接着し，完全に分散することなく培養面上に広がる様子が確認された．培養 20 日目には単層形態の細胞群が確認された．この時，培養 20 日目において cTnT 陽性細胞比率 ( $X_p/X_T$ ) を求めると，G5 面では 0.39 であり，PS 面へ継代した条件よりも 2.0 倍高かった (図 4.4II)．

A

a. G5面への継代



b. PS面への継代



B

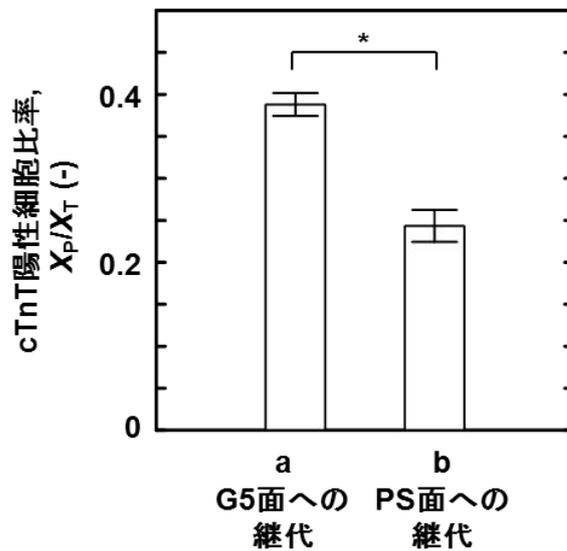


図 4.4 培養 10 日目に G5 面上で培養された hMSC 集塊を回収し, 新たに G5 面 (a)と PS 面 (b)に再播種した時のタイムラプス画像 (A)および培養 20 日目における cTnT 陽性細胞比率 (B). Scale bars: 100  $\mu$ m. a の培養 14.7 日目における画像中の四角領域は分裂途中を示す. エラーバーは標準偏差を示し (n=3), Student's *t*-test で有意差判定している (\* $p < 0.01$ )

### 4.3.3 細胞挙動に基づく心筋分化方向性の誘導

細胞挙動および分化誘導因子の心筋分化方向性誘導に対する影響を確認する為、G5 面上で hMSCs に対して、培養 3 日目から 10 日目まで Rac1 activator を添加した培地に切り替えた培養 (condition A) を行い、Rac1 activator を添加していない培養 (condition B) を行った後に、TGFβ1 を添加した培地と添加していない培地で培養を 10 日間行った。培養 20 日目に cTnT 陽性細胞比率および cTnT の相対 mRNA 発現量を解析した。さらに、心筋分化方向性誘導促進の為、Rac1 activator を添加した培地で 10 日目まで培養し、生じた細胞集塊を新たな G5 面へ継代した後に Rac1 activator を添加した培地で培養を 20 日目まで行った (condition C)。その後、それらの細胞に対し、TGFβ1 を添加しない培地と添加した培地で培養を 10 日間行った。培養 30 日目に cTnT 陽性細胞比率および cTnT の相対 mRNA 発現量を解析した (図 4.5)。

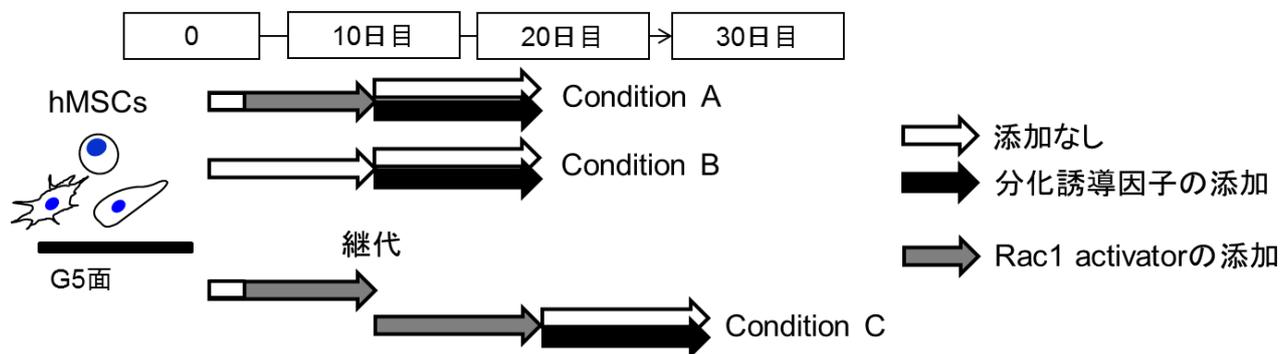


図 4.5 細胞挙動および分化誘導因子の心筋分化方向性誘導に対する影響を確認する為の実験の模式図。白、黒、灰矢印はそれぞれ、添加なしでの培地、TGFβ1 の添加した培地、Rac1 activator の添加した培地で培養された期間を示す。

Condition A では、TGFβ1 添加有無どちらの条件でも cTnT 陽性細胞比率は condition A と比較して高くなっていた。Condition A では、TGFβ1 を添加した培地で培養された細胞は、

TGFβ1 を添加しない培養の細胞と比較して 0.54 を示し、有為な差は見られなかったのに対し、condition B では、TGFβ1 の添加によって cTnT 陽性細胞比率が増加していた。また、condition C では、TGFβ1 を添加した条件では cTnT 陽性細胞比率が 0.76 を示し、condition A and B と比較して高かったが、TGFβ1 添加の有無による有為な差は確認されなかった (図 4.6)。G5 面での Rac1 activator の添加および継代によって cTnT 陽性細胞比率が増加した細胞群では、TGFβ1 の添加では cTnT 陽性細胞比率が増加しなかった。

また、cTnT の相対 mRNA 発現量を確認したところ、condition A で TGFβ1 を加えた培地で培養すると、TGFβ1 添加無しの条件に比べて 3.4 倍高い値を示していたのに対し、condition B では、TGFβ1 を添加した培地で培養した条件では、TGFβ1 を添加しない条件と比較して、mRNA 発現量が 2.2 倍しか上昇しなかった。また、condition C では、condition A and B と比較して高く、TGFβ1 を添加した培養での mRNA 発現量が TGFβ1 を添加しない条件のものと比較して 4.0 倍高くなっていた (図 4.7)。G5 面での Rac1 activator の添加および継代によって cTnT の mRNA 発現量が増加し、TGFβ1 の添加による cTnT の mRNA 発現量の増加率が高くなることが確認された。

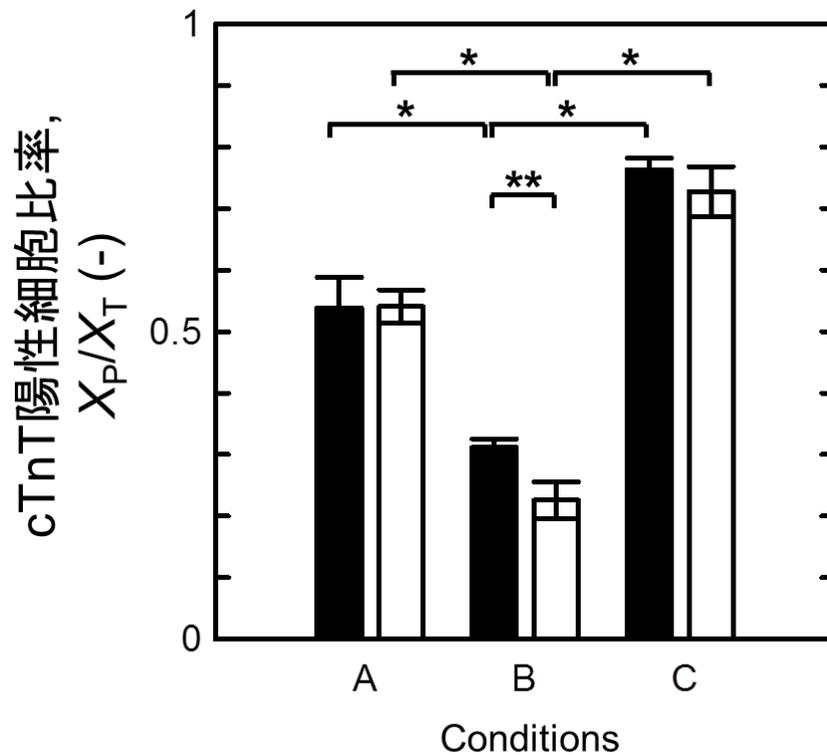


図 4.6 培養 20 日目における G5 面で Rac1 activator を添加した培地に 3 日目から 10 日目まで切り替えた培養 (A) および添加なしの培養 (B) を行い, 10 日目から 20 日目まで TGFβ1 を添加した (黒棒) および添加なし (白棒) の培地で培養された hMSCs と, 培養 30 日目における G5 面で Rac1 activator を添加した培地で培養し, 継代した後に Rac1 activator を添加した培地で培養し (C), 20 日目から 30 日目まで TGFβ1 を添加した (黒棒) および添加なし (白棒) の培地で培養された hMSCs の cTnT 陽性細胞比率  $X_p/X_t$ . 垂直方向の線は標準偏差を示し (n=3), 有意差は Tukey-Kramer post-hoc test に従った (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).

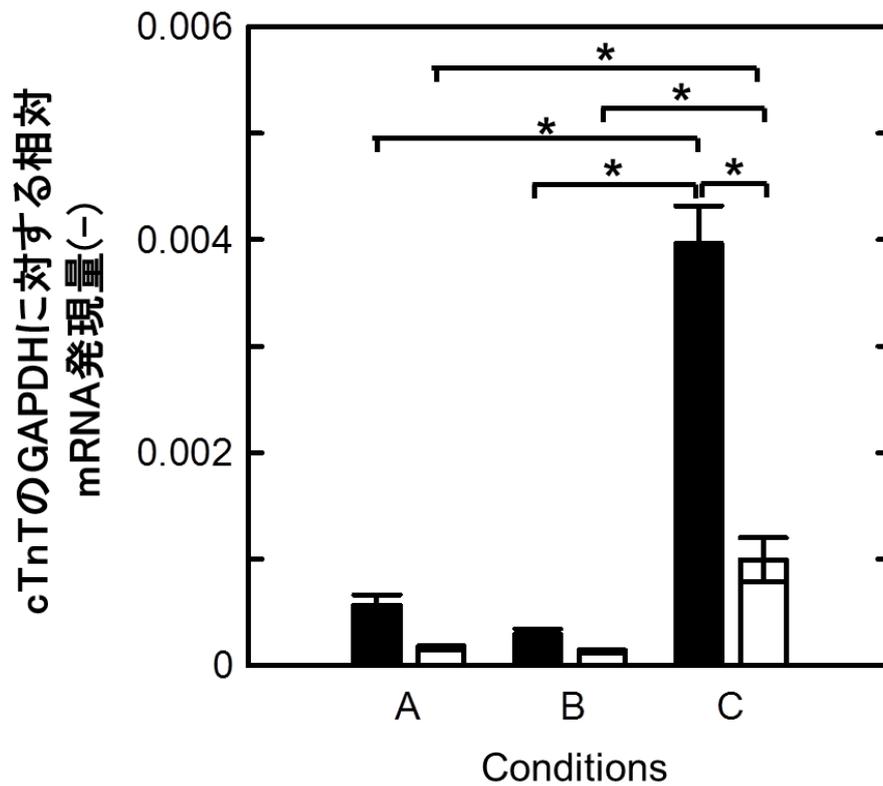


図 4.7 培養 20 日目における G5 面で添加なし (A)および Rac1 activator (B)を添加した培地で 3 日目から 10 日目まで培養し, 10 日目から 20 日目まで TGFβ1 を添加した (黒棒) および添加なし (白棒)の培地で培養された hMSCs と培養 30 日目における G5 面で Rac1 activator を添加した培地で培養し, 継代した後に Rac1 activator を添加した培地で培養し, 20 日目から 30 日目まで TGFβ1 を添加した (黒棒)および添加なし (白棒)の培地で培養された hMSCs の cTnT の mRNA 発現量. 垂直方向の線は標準偏差を示し (n=3), 有意差は Tukey-Kramer post-hoc test に従った (\* $p < 0.01$ ).

#### 4.4 考察

幹細胞分化における分化誘導比率は均一な細胞群取得へ向けた指標となる。分化誘導比率を高める手法としてこれまでに、培養法の改善などが行われてきた。本研究では、細胞挙動に基づく hMSCs の心筋分化方向性誘導に関する培養特性について言及した。Rac1 activator によって、G5 面上の細胞集塊の継続的な伸展と退縮を伴う挙動が誘導され、cTnT 陽性細胞比率が増加することが確認された (図 4.1 and 4.2)。また、細胞集塊の継代によって、細胞集塊の崩壊および再形成が誘導され、cTnT 陽性細胞比率が増加することが確認された。Rac1 は lamellipodia 構造を制御するタンパク質であり、細胞の伸展に関与することが知られている (Flevaris *et al.*, 2007)。従って、Rac1 activator の添加によって、培養面上の細胞の伸展が促進され、継続的な培養面上での伸展と退縮を伴う細胞集塊挙動が誘導されたと考えられる。第 3 章までに、培養面上での伸展と退縮を伴う細胞集塊挙動が、細胞集塊内で細胞が混ざること引き起こし、心筋分化方向性を誘導することが示唆された。これらの結果から、本研究での Rac1 activator の添加および継代操作による、細胞集塊の伸展と退縮を伴う挙動の継続が cTnT 陽性細胞比率を増加させ、hMSCs を心筋分化方向性誘導へ揃えていくことが示唆された。

幹細胞分化において、分化方向性が誘導された細胞は成熟過程を経て特異化し、単一方向への分化方向が決定される。本研究では分化誘導因子による心筋分化方向性の誘導への影響について確認した。TGF $\beta$ 1 は心筋方向へ間葉系幹細胞の分化を誘導することが報告されている (Mohanty *et al.*, 2013)。本研究では、Rac1 activator の添加および継代操作を行うことによって細胞挙動に基づく cTnT 陽性細胞比率の増加時における分化誘導因子 TGF $\beta$ 1 の影響を確認した。Rac1 activator の添加および継代操作を行った細胞群では、TGF $\beta$ 1 の添加有無によって有為な差が見られなかったのに対し、Rac1 activator を添加していない細胞群

では TGF $\beta$ 1 の添加による cTnT 陽性細胞比率の増加が確認された。このことから、細胞集塊挙動が分化誘導因子の添加なしでも心筋分化方向性誘導を促進させることが示唆された。一方で、Rac1 activator の添加および継代操作を行った細胞群では TGF $\beta$ 1 を添加することによる cTnT の mRNA 発現量の増加が、Rac1 activator を添加していない細胞群と比較して高くなっていることが確認され、細胞挙動による心筋分化方向性の誘導によって、分化誘導因子である TGF $\beta$ 1 が cTnT の mRNA 発現をより促進することが示唆された。これらのことから、細胞集塊挙動に基づく培養法が、hMSCs を心筋分化方向性誘導へ揃えていくことが示唆された。

## 4.5 小括

本研究では、細胞挙動を利用したヒト間葉系幹細胞の心筋分化方向性誘導について確認した。G5 面上の細胞集塊を新たな培養面へ継代することで、細胞集塊の崩壊および再形成を誘導することが可能であり、そうした継代操作が cTnT 陽性細胞の比率を増加させることを見出された。この時、分化誘導促進剤である TGF $\beta$ 1 を添加しても、cTnT 陽性細胞比率に有為な差はなく、分化誘導因子なしでも細胞挙動に基づく培養法が心筋分化方向性誘導を促進させることが示唆された。こうした結果から、細胞挙動に基づく培養法が幹細胞集団の分化方向性を特定方向へ揃えていくことが示唆された。

## 総括

本研究では、細胞挙動に基づく幹細胞の心筋分化方向性誘導に関する研究を行った。培養工学的観点から、細胞挙動を介した心筋分化方向性誘導に関するメカニズムを、細胞集塊での能動的および受動的挙動の時空間的解析を通して考察した。

第1章では、異なる培養面上での集塊形成を伴うヒト間葉系幹細胞の細胞挙動および心筋分化方向性誘導に関する培養特性を確認した。培養過程における細胞挙動観察によって、G5 面上の細胞は培養面上の伸展と退縮を伴う遊走を通して能動的に球状の細胞集塊形成が確認され、PS 面上の細胞は単層の細胞群形成が、低接着性培養面上の細胞は培養面への接着を介さずに受動的に細胞集塊の形成が確認され、培養面上の遊走を介した細胞集塊形成過程の違いが確認された。心筋分化方向性の誘導を評価する為に cTnT 陽性細胞比率を用いて、各培養面で培養された細胞群間で比較したところ、遊走を介して形成された細胞集塊群では、集塊形成時に cTnT 陽性細胞比率が増加し、単層の細胞群および遊走を介さない細胞集塊群と比較して、cTnT 陽性細胞比率が高かったことから、培養面上の遊走を介した細胞集塊形成がヒト間葉系幹細胞の心筋分化方向性誘導に関与していることが示唆された。

第2章では、培養面上の細胞挙動に対する fibronectin の吸着と構築化による影響について検討を行った。デンドリマー提示培養面の世代数の増加とともに fibronectin 吸着量の増加が確認された。G1, G3, G5 面上での hMSC 遊走挙動の過程において fibronectin の蛍光タイムラプス観察を行うことで、吸着量の低い G1 面では fibronectin fibril が細胞全域で形成され、伸展した形態を維持していたのに対し、吸着量の増加とともに、fibronectin fibril の分解を通じた fibronectin aggregates が形成される領域が増加し、伸展と退縮を伴う遊走挙動が確認された。この時、世代数の増加とともに fibronectin の分解酵素である MT1-MMP

の発現も増加していることが確認され、fibronectin の分解が fibronectin の構築化に関与していることが示唆された。さらに、接着点および細胞骨格の形成について免疫蛍光染色で確認したところ、fibronectin fibril 上では stress fiber に沿って接着点が形成され、fibronectin aggregates 上では接着点が形成されないことが確認された。これらの結果から、G5 面上の細胞は、培養面上の fibronectin を構築化することによって、伸展と退縮を伴う細胞挙動を引き起こすことが示唆された。

第 3 章では、伸展と退縮を伴う遊走挙動を介した集塊形成による心筋分化方向性誘導に及ぼす集塊内挙動の影響について検討した。伸展と退縮を伴う遊走挙動を示す G5 面上の細胞集塊では、伸展と退縮を伴わない挙動を示す低接着性培養面上で形成された細胞集塊と比較して、培養面上の細胞の能動的な遊走によって集塊内で細胞が受動的に混ぜられることが示された。細胞が混ぜられる集塊では細胞間接着に関わる  $\beta$ -catenin が核内に局在する様子が確認され、混ぜられることによる細胞間接着の解離が示唆された。この時、混ぜられる細胞集塊では全域で cTnT の発現が確認された。これらの結果から、培養面上の遊走挙動による集塊内での細胞が混ざることが、細胞間接着の解離を介して hMSCs の心筋分化方向性を誘導することが示唆された。

第 4 章では、細胞挙動に基づく分化方向性誘導可能な培養方法について検討し、分化誘導因子の心筋分化方向性誘導に対する影響を確認した。遊走挙動活性剤である Rac1 activator の添加によって、細胞集塊の継続的な伸展と退縮を伴う挙動が確認され、cTnT 陽性細胞比率の上昇が確認された。また、G5 面上で形成された細胞集塊を回収し、新たな G5 面へ継代すると、細胞集塊の崩壊・再形成が誘導され、cTnT 陽性細胞比率の増加が確認された。これらのことから、細胞集塊の伸展と退縮を伴う挙動の継続が cTnT 陽性細胞比率を上昇させ、細胞挙動が hMSCs を心筋分化方向性誘導へ揃えていくことが示唆された。

また、Rac1 activator の添加および継代操作を行った細胞群では、分化誘導促進剤である TGFβ1 を添加しても、cTnT 陽性細胞比率に有為な差はなく、分化誘導因子なしでも細胞挙動に基づく培養法が心筋分化方向性誘導を促進させることが示唆された。これらの結果から、細胞挙動に基づく培養法の開発が幹細胞集団の分化方向性を特定方向へ揃えていくことが示唆された。

総括として、本研究では、細胞挙動に基づくヒト幹細胞の心筋分化方向性誘導について研究を行った。細胞挙動に基づく分化方向性誘導を揃える概念は、従来とは異なる新たな知見となり、分化誘導方法を構築する際に重要な役割を果たすと考えられる。

将来への研究展望としていくつかの提案が挙げられる。分化誘導過程において本研究では間葉系幹細胞に対し、心筋分化方向性誘導を可能とした。そこで、他種の幹細胞を細胞源とした培養法への展開、異なる分化方向性への誘導、分化方向性誘導後の成熟化が必要であると考えられる。

他種の幹細胞を利用した研究においては、今回用いた hMSC は心筋分化で働く N-cadherin を元々発現する性質を有しているが、他種の例えば iPS 細胞や ES 細胞などは N-cadherin の発現が確認されず、異なる細胞挙動を示すことが知られている。こうした培養系においても同様の細胞挙動で分化方向性が同じ方向へ誘導可能なのか検証する必要があると考えられる。

異なる分化方向性への誘導に関する研究においては、本研究で得られた知見では集塊内で混ぜられることで心筋方向へ誘導されているが、間葉系幹細胞は心筋方向だけではなく、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞へも分化可能であり、それぞれ異なる細胞挙動が分化方向性誘導には必要となると考えられる。

成熟化段階での細胞挙動制御に関する研究においては、本研究で得られた心筋分化方向性誘導された細胞は cTnT を発現することが確認されたが、成熟心筋細胞マーカーである sarcomere  $\alpha$ -actinin の発現は確認されなかった。分化方向性誘導には細胞挙動が関与していることが示唆されたが、心筋細胞への成熟化過程に関しては未だ不明な点が多く、hMSCs による in vitro での成熟心筋細胞への誘導はいまだ報告されていない (Raynaud *et al.*, 2013)。成熟化過程においても細胞挙動の関与が考えられることから、成熟化過程に応じた培養法の検討が必要になると考えられる。

こうした各分化誘導プロセスを要素ごとに分けて研究を進めることによって、最終的に得られた知見から、各種分化誘導に適した培養手法の構築へと発展することが可能になるのではないかと考えられる。こうした研究は幹細胞分化誘導に対する工学的貢献に値することが期待される。

## 略語リスト

$C_t$ : cycle threshold value

$X_0$ : 播種密度

$X_T$ : DAPI 陽性細胞数

$X_p$ : cTnT 陽性細胞数

$X_p/X_T$ : cTnT 陽性細胞比率

cTnT: cardiac Troponin T

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

G1 面: 世代数 1 のデンドリマー面

G3 面: 世代数 3 のデンドリマー面

G5 面: 世代数 5 のデンドリマー面

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GFP: green fluorescence protein

hMSCs: human mesenchymal stem cells, ヒト間葉系幹細胞

MT1-MMP: membrane type 1-matrix metalloproteinase

PBS: リン酸緩衝溶液

PCR: polymerase chain reaction

PS 面: polystyrene 面, ポリスチレン面

TGF: Transforming growth factor

## 参考文献

- Arnsdorf, E. J., Tummala, P., and Jacobs, C. R.: Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related beta-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate, *PLoS One*, **4**, e5388 (2009).
- Antoniades, N. H. and Owen, J. A.: Growth factors and regulation of cell growth, *Ann. Res. Med.*, **33**, 445–463 (1982).
- Bacakova, L., Filova, E., Rypacek, F., Svorcik, V., and Stary, V.: Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering, *Physiol. Res.*, **53**, S35–S45 (2004).
- Bai, X. L., Zhang, Q., Ye, L. Y., Liang, F., Sun, X., Chen, Y., Hu, Q. D., Fu, Q. H., Su, W., Chen, Z., Zhuang, Z. P., and Liang, T. B.: Myocyte enhancer factor 2C regulation of hepatocellular carcinoma via vascular endothelial growth factor and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, *Oncogene*, **34**, 4089–4097 (2015).
- Bartosh, T. J., Ylöstalo, J. H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., Lee, R. H., Choi, H., and Prockop, D. J.: Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their anti-inflammatory properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 13724–13729 (2010).
- Bauwens, C. L., Song, H., Thavandiran, N., Ungrin, M., Masse, S., Nanthakumar, K., Seguin, C., and Zandstra, P. W.: Geometric control of cardiomyogenic induction in human pluripotent stem cells, *Tissue Eng. Part A*, **17**, 1901–1909 (2011).
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P. G.: Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications, *Stem Cells*, **19**, 180–192 (2001).
- Binamé, F., Pawlak, G., Roux, P., and Hibner, U.: What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility, *Mol. Biosyst.*, **6**, 648–661 (2010).

- Bond, J., Sedmera, D., Jourdan, J., Zhang, Y., Eisenberg, C. A., Eisenberg, L. M., and Gourdie, R. G.: Wnt11 and Wnt7a are up-regulated in association with differentiation of cardiac conduction cells in vitro and in vivo, *Dev. Dyn.*, **227**, 536–543 (2003).
- Bugorsky, R., Perriard, J.-C., and Vassalli, G.: N-cadherin is essential for retinoic acid-mediated cardiomyogenic differentiation in mouse embryonic stem cells, *Europ. J. Histochem.*, **51**, 181–192 (2007).
- Burridge, P. W., Keller, G., Gold, J. D., and Wu, J. C.: Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming, *Cell Stem Cell*, **10**, 16–28 (2012).
- Caplan A. I. and Correa, D.: The MSC: an injury drugstore, *Cell Stem Cell*, **9**, 11–15 (2011).
- Chang, H. H., Hemberg, M., Barahona, M., Ingber, D. E., and Huang, S.: Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells, *Nature*, **453**, 544–547 (2008).
- Charrasse, S., Mariane, M., Comunale, F., Blangy, A., and Gauthier-Rouviere, C.: N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts, *J. Cell Biol.*, **158**, 953–965 (2002).
- Dado, D., Sagi, M., Levenberg, S., and Zemel, A.: Mechanical control of stem cell differentiation, *Regen. Med.*, **7**, 101–116 (2012).
- De Jong, K. L., MacLeod, H. C., Norton, P. R., and Petersen, N. O.: Fibronectin organization under and near cells, *Eur. Biophys. J.*, **35**, 695–708 (2006).
- Dolatshahi-Pirouz, A., Jensen, T. H., Kolind, K., Bungler, C., Kassem, M., Foss, M., and Besenbacher, F.: Cell shape and spreading of stromal (mesenchymal) stem cells cultured on fibronectin coated gold and hydroxyapatite surfaces, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **84**, 18–25 (2011).
- Dufour, S., Duband, J. L., and Thiery, J. P.: Role of a major cell-substratum adhesion system in cell behavior and morphogenesis, *Biol. Cell*, **58**, 1–13 (1986).

- Esparza, J., Viardell, C., Calvo, J., Juan, M., Vives, J., Urbano-Marquez, A., et al. Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathway, *Blood*, **94**, 2754–2766 (1999).
- Faucheux, N., Tzoneva, R., Nagel, M. D., and Groth, T.: The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry, *Biomaterials*, **27**, 234–245 (2006).
- Flevaris, P., Stojanovic, A., Gong, H., Chishti, A., Welch, E., and Du, X.: A molecular switch that controls cell spreading and retraction, *J. Cell Biol.*, **179**, 553–565 (2007).
- Friedl, P. and Wolf, K.: Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process, *Cancer Metastasis Rev.*, **28**, 129–135 (2009).
- Fukata, M. and Kaibuchi, K.: Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 887–897 (2001).
- Gao, L., McBeath, R., and Chen, C. S.: Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin, *Stem Cells*, **28**, 564–572 (2010).
- Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C. M.: Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **26**, 315–333 (2010).
- Ghafar-Zadeh, E., Waldeisen, J. R., and Lee, L.P.: Engineered approaches to the stem cell microenvironment for cardiac tissue regeneration, *Lab Chip*, **11**, 3031–3048 (2011).
- Gilles, C., Polette, M., Coraux, C., Tournier, J. M., Menequzzi, G., Munaut, C., Volders, L., Rousselle, P., Birembaut, P., and Foidart, J. M.: Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5  $\gamma$ 2 chain degradation to mammary epithelial cell migration, *J. Cell Sci.*, **114**, 2967–2976 (2001).
- Gimble, J. M., Guilak, F., Nuttall, M. E., Sathishkumar, S., Vidal, M., and Bunnell, B. A.: In vitro

- differentiation potential of mesenchymal stem cells, *Transfus. Med. Hemother.*, **35**, 228–238 (2008).
- Gonçalves, V., Matos, P., and Jordan, P.: Antagonistic SR proteins regulate alternative splicing of tumor-related Rac1b downstream of the PI3-kinase and Wnt pathways, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 3696–3707 (2009).
- Gonzalez-Garcia, C., Sousa, S. R., Moratal, D., Rico, P., and Salmeron-Sanchez, M.: Effect of nanoscale topography on fibronectin adsorption, focal adhesion size and matrix organization, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **77**, 181–190 (2010).
- Gupton, S. L. and Waterman-Storer, C. M.: Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration, *Cell*, **125**, 1361–1374 (2006).
- Hemberger, M., Dean, W., and Reik, W.: Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 526–537 (2009).
- Heo, J. S. and Lee, J. C.:  $\beta$ -Catenin mediates cyclic strain-stimulated cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells through ROS-dependent and integrin-mediated PI3K/Akt pathways, *J. Cell Biochem.*, **112**, 1880–1889 (2011).
- Higuchi, A., Ling, Q. D., Chang, Y., Hsu, S. T., and Umezawa, A.: Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate, *Chem. Rev.*, **113**, 3297–3328 (2013).
- Hocking, D. C., Sottile, J., and Langenbach, K. J.: Stimulation of integrin-mediated cell contractility by fibronectin polymerization, *J. Biol. Chem.*, **275**, 10673–10682 (2000).
- Huveneers, S. and Danen, E. H.: Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho, *J. Cell Sci.*, **122**, 1059–1069 (2009).
- Huveneers, S., Truong, H., Fassler, R., Sonnenberg, A., and Danen, E. H.: Binding of soluble fibronectin to integrin  $\alpha 5\beta 1$  – link to focal adhesion redistribution and contractile shape, *J. Cell Sci.*, **121**, 2452–2462 (2008).
- Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z.-X., and Cantley, L. G.: Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for

- coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis, *Mol. Cell*, **16**, 257–267 (2004).
- Jiao, Y., Feng, X., Zhan, Y., Wang, R., Zheng, S., Liu, W., and Zeng, X.: Matrix metalloproteinase-2 promotes  $\alpha v\beta 3$  integrin-mediated adhesion and migration of human melanoma cells by cleaving fibronectin, *PLoS One*, **7**, e41591 (2012).
- Jopling, C., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J. C.: Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 79–89 (2011).
- Karam, J. P., Bonafe, F., Sindji, L., Muscari, C., and Montero-Menei, C. N.: Adipose-derived stem cell adhesion on laminin-coated microcarriers improves commitment toward the cardiomyogenic lineage, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **103**, 1828–1839 (2015).
- Kam, Y. and Quaranta, V.: Cadherin-bound  $\beta$ -catenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: evidence for an intersection between  $\beta$ -catenin pools, *PLoS One*, **4**, e4580 (2009).
- Kattman, S. J., Witty, A. D., Gagliardi, M., Dubois, N. S., Niapour, M., Hotta, A., Ellis, J., and Keller, G.: Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines, *Cell Stem Cell*, **8**, 228–240 (2011).
- Kilian, K. A., Bugarija, B., Lahn, B. T., and Mrksich, M.: Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 4872–4877 (2010).
- Kim, M.-H., Kino-oka, M., Maruyama, N., Saito, A., Sawa, Y., and Taya, M.: Cardiomyogenic induction of human mesenchymal stem cells by altered Rho family GTPase expression on dendrimer-immobilized surface with D-glucose display, *Biomaterials*, **31**, 7666–7677 (2010a).
- Kim, M.-H., Kino-oka, M., Saito, A., Sawa, Y., and Taya, M.: Myogenic induction of human

- mesenchymal stem cells by culture on dendrimer-immobilized surface with D-glucose display, *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 55–61 (2010b).
- Kim, M.-H. and Kino-oka, M.: Switching between self-renewal and lineage commitment of human induced pluripotent stem cells *via* cell–substrate and cell–cell interactions on a dendrimer-immobilized surface, *Biomaterials*, **35**, 5670–5678 (2014).
- 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).
- Kulangara, K., Yang, Y., Yang, J., and Leong, K. W.: Nanotopography as modulator of human mesenchymal stem cell function, *Biomaterials*, **33**, 4998–5003 (2012).
- Kuo, Y.-C., Chang, T.-H., Hsu, W.-T., Zhou, J., Lee, H.-H., Hui-Chun Ho, J., Chien, S., and Lee, O.-K.: Oscillatory shear stress mediates directional reorganization of actin cytoskeleton and alters differentiation propensity of mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, **33**, 429–442 (2015).
- Laflamme, M. A. and Murry, C. E.: Heart regeneration, *Nature*, **473**, 326–335 (2011).
- Lawson, C. and Schlaepfer, D. D.: Integrin adhesions: Who’s on first? What’s on second? Connections between FAK and talin, *Cell Adh. Migr.*, **6**, 302–306 (2012).
- Lee, J., Abdenn, A. A., and Kilian, K. A.: Rewiring mesenchymal stem cell lineage specification by switching the biophysical microenvironment, *Sci. Rep.*, **4**, 5188 (2014).
- Li, D., Ding, J., Wang, X., Wang, C., and Wu, T.: Fibronectin promotes tyrosine phosphorylation of paxillin and cell invasiveness in the gastric cancer cell line AGS, *Tumori*, **95**, 769–779 (2009).
- Lin, H., Yang, G., Tan, J., and Tuan, R. S.: Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential, *Biomaterials*, **33**, 4480–4489 (2012).
- Linask, K. K., Manisastry, S., and Han, M.: Cross talk between cell-cell and cell-matrix adhesion

- signaling pathways during heart organogenesis: implications for cardiac birth defects, *Microsc. Microanal.*, **11**, 200–208 (2005).
- Liu, B.-H., Yeh, H.-Y., Lin, Y.-C., Wang, M.-H., Chen, D. C., Lee, B.-H., and Hsu, S.-H.: Spheroid formation and enhanced cardiomyogenic potential of adipose-derived stem cells grown on chitosan, *BioRes. Open Access*, **2**, 28-39 (2013).
- Mao, Y. and Schwarzbauer, J. E.: Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process, *Matrix Biol.*, **24**, 389–399 (2005).
- Marban, E. and Malliaras, K.: Boot camp for mesenchymal stem cells, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **56**, 735–737 (2010).
- Mao, Y. and Schwarzbauer, J. E.: Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process, *Matrix Biol.*, **24**, 389–399 (2005).
- Matsuura, K., Wada, M., Shimizu, T., Haraguchi, Y., Sato, F., Sugiyama, K., Konishi, K., Shiba, Y., Ichikawa, H., Tachibana, A., Ikeda, U., Yamato, M., Hagiwara, N., and Okano, T.: Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 321–327 (2012).
- Mery, A., Papadimou, E., Zeineddine, D., Menard, C., Behfar, A., Zingman, V. L., Hodgson, M. D., Rauzier, J.-M., Kane, C. G., Perez-Terzic, C., Terzic, A., and Puceat, M.: Commitment of embryonic stem cells toward a cardiac lineage: molecular mechanisms and evidence for a promising therapeutic approach for heart failure, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **24**, 269–274 (2003).
- Minami, I., Yamada, K., Otsuji, G. T., Yamamoto, T., Shen, Y., Otsuka, S., Kadota, S., Morone, N., Barve, M., Asai, Y., Tenkova-Heuser, T., Heuser, E. J., Uesugi, M., Aiba, K., and Nakatsuji, N.: A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions, *Cell Reports*, **2**, 1–13 (2012).
- Mohanty, S., Bose, S., Jain, K. G., Bhargava, B., and Airan, B.: TGF $\beta$ 1 contributes to

- cardiomyogenic-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells, *Int. J. Cardiol.*, **163**, 93–99 (2013).
- Nagayama, K. and Matsumoto T.: Contribution of actin filaments and microtubules to quasi-in situ tensile properties and internal force balance of cultured smooth muscle cells on a substrate, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **295**, C1569–C1578 (2008).
- Nelson, W. J. and Nusse, R.: Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways, *Science*, **303**, 1483–1487 (2004).
- Nimmo, R. A., May, G. E., and Enver, T.: Primed and ready: understanding lineage commitment through single cell analysis, *Trends Cell Biol.*, **25**, 459–467 (2015).
- Pellenc, D., Berry, H., and Gallet, O.: Adsorption-induced fibronectin aggregation and fibrillogenesis, *J. Colloid Interface Sci.*, **298**, 132–144 (2006).
- Petrie, R. J. and Yamada, K. M.: At the leading edge of three-dimensional cell migration, *J. Cell Sci.*, **125**, 5917–5926 (2012).
- Pierschbacher, D. M. and Ruoslahti, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, *Nature*, **309**, 30–33 (1984).
- Raynaud, C. M., Halabi, N., Elliott, D. A., Pasquier, J., Elefanty, A. G., Stanley, E. G., and Rafii, A.: Human embryonic stem cell derived mesenchymal progenitors express cardiac markers but do not form contractile cardiomyocytes, *PLoS One*, **8**, e54524 (2013).
- Reilly, G. C. and Engler, A. J.: Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation, *J. Biomech.*, **43**, 55–62 (2010).
- Rico, P., Rodriguez-Hernandez, J. C., Moratal, D., Altankov, G., Monleon-Pradas, M., and Salmeron-Sanchez, M.: Substrate-induced assembly of fibronectin into networks: influence of surface chemistry and effect on osteoblast adhesion, *Tissue Eng. Part A*, **15**, 3271–3281 (2009).
- Ridley, A. J.: Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking,

- Trends Cell Biol.*, **16**, 522–529 (2006).
- Rottner, K. and Stradal, T. E.: Actin dynamics and turnover in cell motility, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**, 569–578 (2011).
- Ruoslahti, E.: Fibronectin in cell adhesion and invasion, *Cancer Metastasis, Rev.*, **3**, 43–51 (1984).
- Salameh, A., Wustmann, A., Karl, S., Blanke, K., Apel, D., Rojas-Gomez, D., Franke, H., Mohr, F. W., Janousek, and J., Dhein, S.: Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43, *Circ. Res.*, **106**, 1592–1602 (2010).
- Santiago, J. A., Pogemiller, R., and Ogle, B. M.: Heterogeneous differentiation of human mesenchymal stem cells in response to extended culture in extracellular matrices, *Tissue Eng. Part A*, **15**, 3911–3922 (2009).
- Schultz, K. M., Kyburz, K. A., and Anseth, K. S.: Measuring dynamic cell-material interactions and remodeling during 3D human mesenchymal stem cell migration in hydrogels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**, E3757–3764 (2015).
- Shi, F. and Sottile, J.: MT1-MMP regulates the turnover and endocytosis of extracellular matrix fibronectin, *J. Cell Sci.*, **124**, 4039–4050 (2011).
- Slack, J.: *From Egg to Embryo: Regional Specification in Early Development*. 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, England (1991).
- Sottile, J. and Hocking, C. D.: Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell–matrix adhesions, *Mol. Biol. Cell*, **13**, 3546–3559 (2002).
- Sugimoto, K., Ohkawara, H., Nakamura, Y., Takuwa, Y., Ishibashi, T., and Takeishi, Y.: Receptor for advanced glycation end products – membrane type1 matrix metalloproteinase axis regulates tissue factor expression via RhoA and Rac1 activation in high-mobility group box-1 stimulated endothelial cells, *PLoS One*, **9**, e114429 (2014).

- Takebe, T., Enomura, M., Yoshizawa, E., Kimura, M., Koike, H., Ueno, Y., Matsuzaki, T., Yamazaki, T., Toyohara, T., Osafune, K., Nakauchi, H., Yoshikawa, H. Y., and Taniguchi, H.: Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation, *Cell Stem Cell*, **16**, 556–565 (2015).
- Takeuchi, J. K. and Bruneau, B. G.: Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors, *Nature*, **459**, 708–711 (2009).
- Takino, T., Nagao, R., Manabe, R., Domoto, T., Sekiguchi, K., and Sato, H.: Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly to promote cell motility, *FEBS Lett.*, **585**, 3378–3384 (2011).
- Tibbitt, M. X. and Anseth, K. S.: Dynamic microenvironments: the fourth dimension, *Sci. Transl. Med.*, **14**, 160ps24 (2012).
- Tsubouchi, A., Skakura, J., Yagi, R., Mazaki, Y., Schaefer, E., Yano, H., and Sabe, H.: Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration, *J. Cell Biol.*, **159**, 673–683 (2002).
- Vogel, V. and Sheetz, M. P.: Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 38–46 (2009).
- Wang, C., Chowdhury, S., Driscoll, M., Parent, C. A., Gupta, S. K., and Losert, W.: The interplay of cell–cell and cell–substrate adhesion in collective cell migration, *J. R. Soc. Interface*, **11**, 20140684 (2014).
- Wang, C. C., Chen, C. H., Hwang, S. M., Lin, W. W., Huang, C. H., Lee, W. Y., Chang, Y., and Sung, H. W.: Spherically symmetric mesenchymal stromal cell bodies inherent with endogenous extracellular matrices for cellular cardiomyoplasty, *Stem Cells*, **27**, 724–732 (2009a).
- Wang, W., Itaka, K., Ohba, S., Nishiyama, N., Chung, U. I., Yamasaki, Y., and Kataoka K.: 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, **30**, 2705–2715 (2009b).

- Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I., and Pearcy, M. J.: Mediation of biomaterial–cell interactions by adsorbed proteins: a review, *Tissue Eng.*, **11**, 1–18 (2005).
- Wu, X., Tu, X., Joeng, K. S., Hilton, M. J., Williams, D. A., and Long, F.: Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling, *Cell*, **133**, 340–353 (2008).
- Yuasa, S., Itabashi, Y., Koshimizu, U., Tanaka, T., Sugimura, K., Kinoshita, M., Hattori, F., Fukami, S., Shimazaki, T., Okano, H., Ogawa, S., and Fukuda, K.: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells, *Nat. Biotech.*, **23**, 607–611 (2005).
- Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., and Geiger, B.: A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell–matrix adhesions, *J. Cell Sci.*, **120**, 137–148 (2007).
- Zhang, Y., Chu, Y., Shen, W., and Dou, Z.: Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells, *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **9**, 943–946 (2009).

## 本報に関する論文

Kim, M.-H., **Ogawa, Y.**, Yamada K., Taya M., and Kino-oka, M.: Directed differentiation of human mesenchymal stem cells toward a cardiomyogenic fate commitment through formation of cell aggregates. *Biochem. Eng. J.*, **84**, 53–58 (2014).

**Ogawa, Y.**, Kim, M.-H., and Kino-oka, M.: Changes in human mesenchymal stem cell behaviors on dendrimer-immobilized surfaces due to mediation of fibronectin adsorption and assembly. *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 55–61 (2015).

**Ogawa, Y.**, Kim, M.-H., and Kino-oka, M.: Migration-driven aggregate behaviors of human mesenchymal stem cells on a dendrimer-immobilized surface direct differentiation toward a cardiomyogenic fate commitment. *J. Biosci., Bioeng.*, **122**, 627–632 (2016).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始ご懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科の紀ノ岡正博教授に心より感謝申し上げます。また，本報の作成および博士論文公聴会での発表内容について，御指導，御助言を賜りました大阪大学産業科学研究所の永井健治教授，並びに大阪大学大学院工学研究科の渡邊肇教授に厚く感謝申し上げます。

本研究に当たり，御指導並びに日頃からの貴重な御助言と議論と励ましの言葉を賜りました大阪大学大学院工学研究科の金美海助教に心から感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，御指導，御助言を賜りました大阪大学大学院基礎工学研究科田谷正仁教授，山田浩二氏に心より感謝申し上げます。本研究にあたり，貴重な御指導，御助言を賜りました大阪工業大学工学部の長森英二准教授に厚く御礼申し上げます。

そして，本研究を進めるにあたり，常に温かい御助言と激励をしてくださった工学研究科生物プロセスシステム工学領域の皆様心から感謝の意を表します。

最後に，これまで常に支え続けてくれた亡き父の小川康浩，母の小川トモ子および妻の小川実香に心から感謝の意を表します。