

学位論文

担体への間葉系幹細胞の接着能：
糖結合タンパク（レクチン）による亢進

学位申請者 西村 春樹

広島大学大学院歯学研究科
歯学系（歯科補綴学第二）専攻
（主任：濱田 泰三 教授）

2004年

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座歯科補綴学研究室濱田泰三教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究の遂行および論文作成上、御専門の立場から御教示、御校閲を賜りました本学創生医科学専攻探索医科学講座口腔生化学研究室加藤幸夫教授ならびに本学創生医科学専攻探索医科学講座生体材料学研究室岡崎正之教授に深厚なる謝意を表します。

本研究遂行および論文作成上、終始御配慮、御指導頂きました本学歯科補綴学研究室西村正宏博士に深く感謝いたします。さらに、本研究を進めるにあたりご協力頂きました本学歯科補綴学研究室ならびに本学口腔生化学研究室の諸先生方、本学保存修復学研究室尾田良博士、株式会社ツーセル関係者各位に感謝いたします。

最後に、常に私を支えてくれた両親に感謝いたします。

2004年

広島大学大学院歯学研究科 歯学系（歯科補綴学第二）専攻

西村 春樹

目次

第1章 緒論	1
第2章 再生医療における植物レクチンの有効性の評価	
第1節 細胞接着能に対する効果	
I. 緒言	3
II. 材料ならびに方法	4
III. 結果	9
IV. 考察	11
第2節 各種担体上でのレクチン作用の検討	
I. 緒言	17
II. 材料ならびに方法	18
III. 結果	19
第3節 初期付着・伸展能に対するレクチンの作用	
I. 緒言	20
II. 材料ならびに方法	20
III. 結果	22
IV. 考察	23
第4節 細胞為害性の検討	
I. 緒言	30
II. 材料ならびに方法	30
III. 結果	36
IV. 考察	37

第3章 接着力強化の機構の解明

I. 緒言	44
II. 材料ならびに方法	47
III. 結果	50
IV. 考察	51

第4章 臨床応用について

I. レクチンの使用法と臨床応用について	56
II. レクチンの生体に与える影響（生物活性）について	57

第5章 総括

参考文献

60

第1章 緒論

近年、多分化能を持つ幹細胞を利用した再生医療についての研究が盛んに行われており、すでに臨床応用も始まっている。再生医療を成功させるためには細胞、担体 (Scaffold)、成長因子が必要であり[1]、この3要素を利用して、患者から少量の間葉系幹細胞（以下 MSC）を採取し、これを培養して大量に増殖させた後、担体に接着させ、各種成長因子を用いて目的の組織をつくり、再び生体内に移植する方法がとられることが多い。しかし培養中や移植後において、細胞・担体複合体は、プロテアーゼやメカニカルストレス（機械的刺激）の影響を受け、一度接着させた細胞が担体から剥離する危険性がある（図1）。

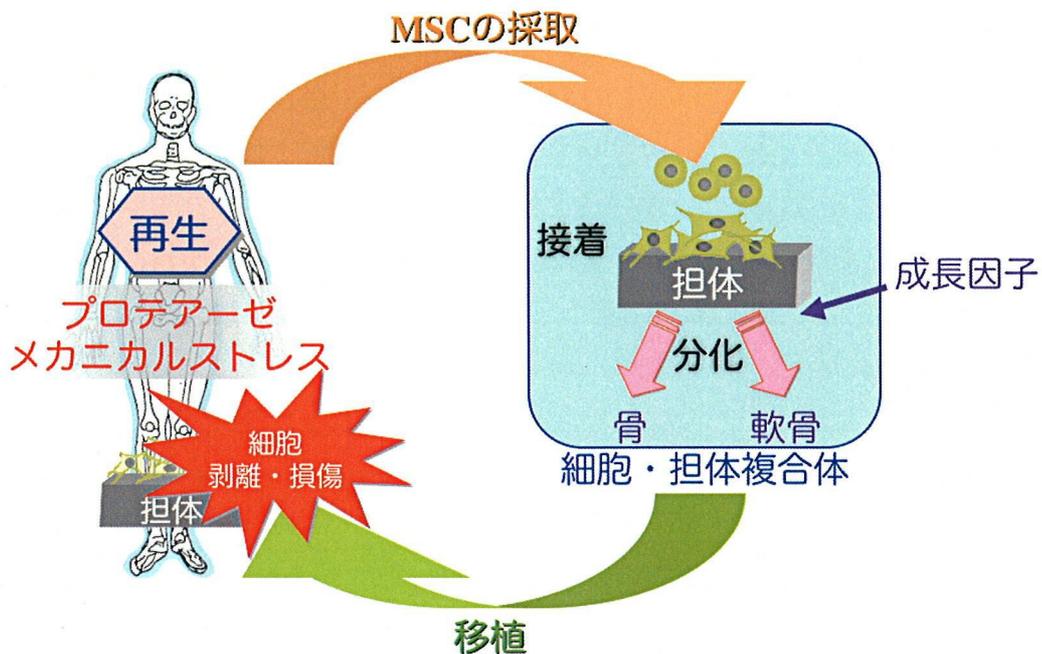


図1 間葉系幹細胞（MSC）を用いた再生医療（概略図）

接着性の細胞は足場依存性であり、適切な細胞外基質との接着を失うと、増殖・分化の停止、またはアポトーシスを引き起こすため[2, 3]、担体からの細胞の剥離は、組織の再生そのものを遅らせることになりかねない。すなわち、

再生医療において、細胞と担体との強固な接着を確立することが必要である。そこで本研究では、プロテアーゼ存在下あるいはメカニカルストレス下で、MSCの担体（生体材料）への接着力を強化する方法について検討した。

細胞表面上に存在するインテグリン、カドヘリン、セレクチンや細胞外に存在するフィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンなど多くの細胞接着性タンパク質が知られているが、これらはタンパク分子間の相互作用で接着機構を形成している。しかしなかにはセレクチンのように、糖鎖を認識して接着機構を形成しているものもある[4-8]。また細胞膜のリン脂質二重層のマイクロドメインにおける糖脂質分子が、接着に関わっているとの報告もあることから[2, 3, 9-25]、糖鎖を認識するレクチンが、細胞接着に影響する可能性があり、興味深い。

レクチンは、糖結合性タンパク質の総称で、自然界の多くの生物中に見いだされているが[26, 27]、タチナタマメから抽出されるレクチンである Concanavalin A（以下 ConA）やインゲンマメから抽出されるレクチンである Phaseolus vulgaris agglutinin（以下 PHA）は、リンパ球の活性化やがん細胞を識別するマーカーとして、昔から広く用いられている。また以前の研究で ConA は、軟骨細胞の分化や石灰化を誘導することも報告され[28-32]、PHA は、骨髄移植部における骨形成を促進することが報告されている[33, 34]。本研究では、担体への細胞接着に及ぼすこれらのレクチンの影響について検討した。

第2章 再生医療における植物レクチンの有効性の評価

再生医療における植物レクチンの有効性を評価するために、細胞接着への影響、担体特異性、初期付着・伸展能への影響、および細胞為害性の4つについて検討した。

第1節 細胞接着能に対する効果

I. 緒言

ほとんどのレクチンは多価の糖結合部位を持つため、細胞を凝集させる。また多数のレクチンが高い親和性で異なる種類の炭水化物構造を認識するので、糖鎖生物学などの分野を発展させるための有用な道具となっている[35]。しかし再生医療の分野でのレクチンの研究は少ない。

一方、生体材料（担体）への細胞の付着を促進させるために、材料の表面を改質（修飾）をする方法については、これまで多くの研究がある[36-43]。単に細胞接着分子（タンパク）の表面修飾や骨の組成物質（無機物）のコーティングだけではなく、物理的な「表面形状（粗さ）surface topography」の改質についての研究もある。これらの表面改質は、担体に対して行う処理であり、直接細胞に対して行うわけではない。しかし本研究では、担体ではなく細胞に対してレクチン処理を行う。そういった意味で、今回のような処理方法でレクチンが細胞接着能に影響を与えることは、大変興味深い現象であるといえる。

本節では、細胞にレクチン処理を行うことで、担体への接着力強化が得られる条件および、その効果の持続性について検討した。

II. 材料ならびに方法

1. 使用植物レクチンの種類

タチナタマメレクチンである Concanavalin A Type IV (ConA), インゲンマメレクチン Phaseolus vulgaris agglutinin (PHA) で, 赤血球に結合性を持つ E-サブユニットから成る 4 量体の Erythroagglutinin (PHA-E), 白血球に結合性を持つ L-サブユニットから成る 4 量体イソレクチンである Leucoagglutinin (PHA-L), コムギ胚芽レクチンである Triticum vulgaris (WGA), エンドウマメレクチンである Pisum sativum (PSA), ハリエニシダレクチンである Ulex europaeus UEA I+ UEA II (UEA), ピーナッツレクチンである Arachis hypogaea (PNA), ConA の 2 量体である Succinyl-Concanavalin A (s-ConA), ConA をビオチンで標識した Concanavalin A Type IV Biotin Labeled (biotin-labeled ConA) (以上はいずれも SIGMA), および PHA-E をビオチンで標識した Biotin-PHA-E₄ (biotin-labeled PHA-E) (HONEN) を用いた.

2. 使用培養細胞

ウサギ間葉系幹細胞 (rabbit MSC) は, Maniatopoulos や Davies らの方法に準じて[44, 45], 生後 4 週齢の雄性日本白色ウサギ (北山ラベス株式会社) の大腿骨骨髓をフラッシュアウトし, 10% ウシ胎仔血清 (以下 FBS) 及び抗生物質 (以下 Antibiotic-Antimycotic) (GIBCO BRL), 200U/ml heparin (Nakalai Tesque) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (SIGMA) にて, 100mm プラスチックティッシュカルチャーディッシュ (Corning Coster) 上に播種し, 37°C, 5% CO₂ 気相下にて培養し, 初代培養細胞とした. 継代数は 3~5 までのものを実験に用い, 以後, 特に言及しない限り rabbit MSC の実験データを示す.

ヒト間葉系幹細胞 (human MSC) (広島大学倫理委員会の許可を得て, 腸骨より採取), ヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts) (広島大学倫理委員会の許可を得て, 歯肉より採取), ウサギ軟骨細胞 (rabbit chondrocytes), ラット線維芽細胞 (rat fibroblasts), ラット歯髓細胞 (rat pulp cells), ラット歯根膜細胞 (rat periosteum cells), ウシ角膜内皮細胞 (bovine corneal endothelial cells) は, 加藤らの報告などに準じて培養した[46-52].

ヒト上皮細胞様細胞 (HeLa, HBL-100), サル上皮細胞様細胞 (COS-7), マウス多分化能間葉系細胞 (10T1/2), マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1), マウス間質細胞 (MC3T3-G2/PA6), マウス軟骨形成細胞 (ATDC5), マウス筋芽細胞様細胞 (C2C12) は理研細胞バンクより入手し, 適切な培養液にて培養して用いた.

3. 使用プロテアーゼの種類と細胞残存率の求め方

主に実験に用いたプロテアーゼは, 1mM EDTA を含有する 0.25% trypsin 溶液 (以下 Trypsin-EDTA) (GIBCO) で, その細胞剥離能を検討するため, rabbit MSC を Antibiotic-Antimycotic および 10% FBS 含有 Minimum Essential Medium Alpha Medium (以下 α -MEM) (GIBCO) にて 12 穴プラスチックティッシュカルチャープレート (以下 カルチャープレート) (Falcon) 上に 1×10^5 cells/穴で播種し, 90% コンフルエントになった時点で phosphate buffered saline (以下 PBS) で洗浄後, Trypsin-EDTA で 0~20 分間, 37°C, 5% CO₂ 気相下にて処置し, 剥離した細胞数を Coulter counter (Z1 Coulter : Beckman Coulter K.K.) にて計測し, 以下の式で細胞残存率を求めた.

$$\text{細胞残存率 (\%)} = (\text{総細胞数} - \text{剥がれた細胞数}) / \text{総細胞数} \times 100$$

Trypsin-EDTA で処置した細胞は, 3 分以内にカルチャープレート上より完全に剥離した (図 2). 以後実験データは, この濃度で 15 分間の処置を行ったものを示す.

その他のプロテアーゼとしては, rabbit MSC を 15 分間のインキュベートによって完全に剥離する濃度を求めた上で, 0.5% trypsin (EDTA を含まない), 50U/ml dispase, 1mg/ml pronase E (Protease type XIV) (全て SIGMA) を用いた.

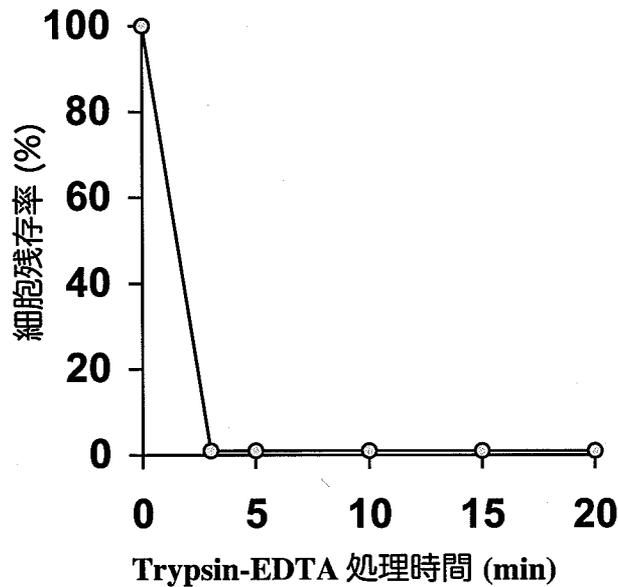


図2 0.25% Trypsin-EDTA 処理時間による細胞残存率

4. Trypsin-EDTA 抵抗性を与えるレクチンとその濃度および処理時間の検討法

Rabbit MSC を 10% FBS 含有 α -MEM にて 12 穴カルチャープレート上に播種し、90% コンフルエントになった時点で PBS で洗浄、0.5~30 μ g/ml の各種レクチンと 1% FBS 含有 α -MEM にて 20 分間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 気相下にてインキュベートしたあと、余剰なレクチンを PBS で洗浄した。その後 Trypsin-EDTA で 15 分間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 気相下にてインキュベートし、剥離した細胞数を Coulter counter にて計測し、細胞残存率を求めた。

処理時間については上記の方法で、rabbit MSC を、20 μ g/ml ConA あるいは 10 μ g/ml PHA-E と 1% FBS 含有 α -MEM 中で 1~60 分間インキュベートした後、Trypsin-EDTA で処置し、15 分後に剥離した細胞数を計測して、細胞残存率を求めた。

5. メカニカルストレス（機械的刺激）の加え方

接着力が弱く振動によって比較的容易に剥離する rat pulp cells を 12 穴カルチ

ャープレートに 90% コンフルエントまで培養し, 5 μ g/ml ConA あるいは PHA-E で 20 分間処理した後, 余剰なレクチンを洗浄し, PBS 500 μ l を入れ, Bio Shaker (BR-15LF, TAITEC) にて, 37 $^{\circ}$ C で 10 分間メカニカルストレス (振幅距離 3cm, 振幅 120rpm) を加えた.

6. レクチン処理後の効果持続時間の検討法

90% コンフルエントまで培養した rabbit MSC に 20 μ g/ml ConA あるいは 10 μ g/ml PHA-E で 20 分間処理した後, PBS で余剰なレクチンを洗浄し, 1% FBS 含有 α -MEM にて 0~36 時間培養した. その後 Trypsin-EDTA で 15 分間インキュベートした.

7. 細胞表面上の残存レクチン量の定量方法

96 穴カルチャープレート (Corning Coster) にて, 90% コンフルエントまで培養した rabbit MSC に 10 μ g/ml biotin-labeled ConA あるいは 10 μ g/ml biotin-labeled PHA-E 存在下で 20 分間インキュベートした後, PBS で余剰なレクチンを洗浄し, 1% FBS 含有 α -MEM にて培養した. レクチン処理後 0~120 時間で培養液を抜き PBS で洗浄後, ビオチンに特異的に結合する 0.5mU/ μ l Streptavidin (β -Galactosidase 標識) (SIGMA) 含有 50 μ l PBS にて 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした. PBS にて洗浄後, β -Galactosidase にて分解され発色する 1.33mg/ml o-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) (SIGMA) 含有 2mM MgCl₂ (片山化学) および 100mM β -mercaptoethanol (和光純薬) 含有 200mM sodium phosphate buffer (pH 7.3) (片山化学) を 50 μ l, PBS を 50 μ l 加えて, 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした. その後 1M Sodium Carbonate (片山化学) を 150 μ l 加えて反応を止め, Multiwell Spectrophotometer (ImmunoMini NJ-2300 : Nalge Nunc International) にて吸光度 (O.D. 420nm) を測定した. なおカルチャープレートや細胞表面上に直接付着したストレプトアビジンによる発色は数値より差し引いて補正した (図 3).

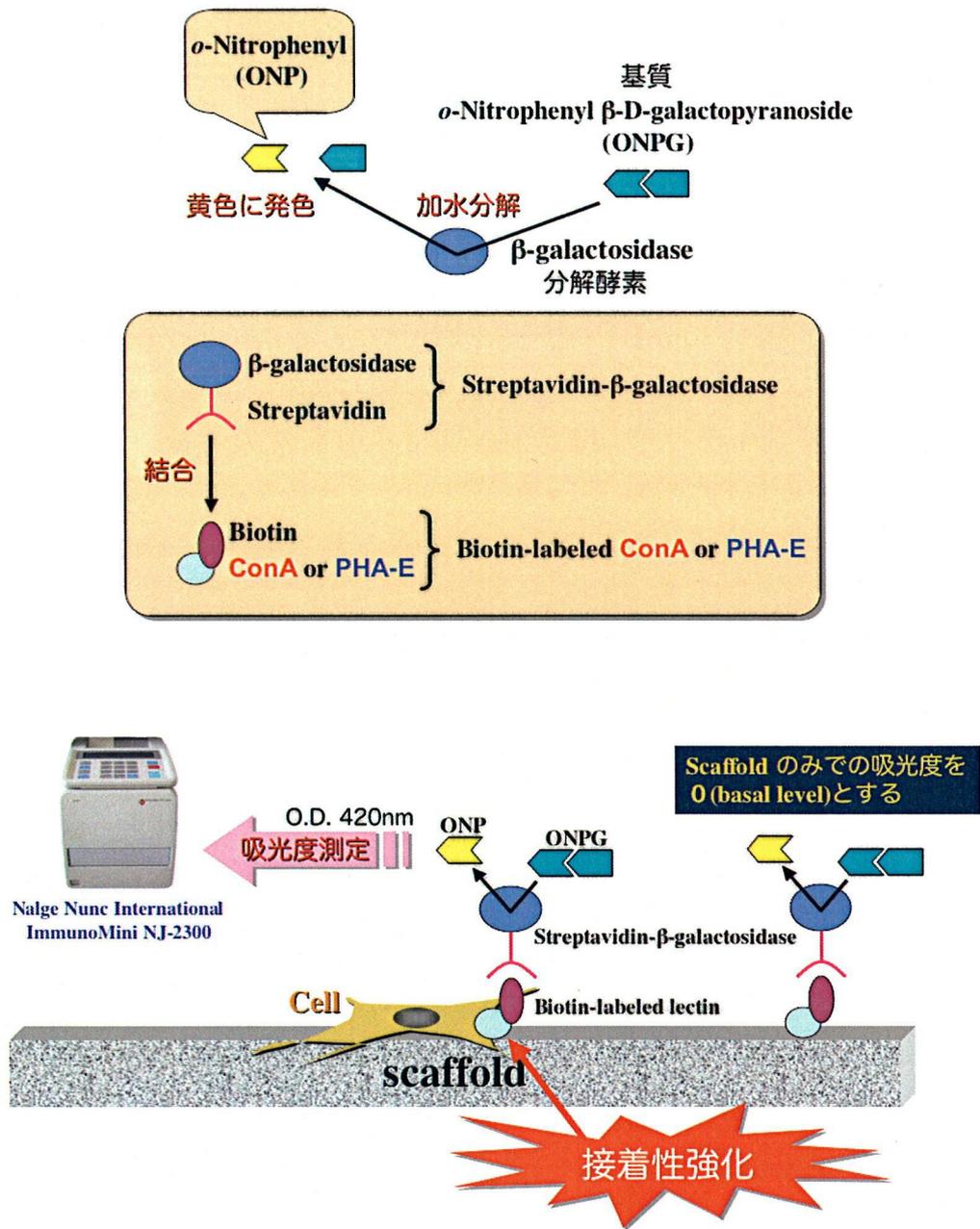


図3 残存レクチンの定量方法

III. 結果

1. Trypsin-EDTA 抵抗性を与えるレクチンの同定とその濃度および処理時間の影響

はじめに実験に用いた多くの植物レクチンのうち、プロテアーゼに抵抗性を与えるレクチンと、その濃度依存性を検討した。その結果、PHA-E が最も低い濃度で、続いて ConA, WGA が、濃度依存的に Trypsin-EDTA に対して抵抗性を与えた (図 4)。PHA-E は 2 μ g/ml, ConA は 10 μ g/ml, WGA は 20 μ g/ml でその効果が最大に達した。実験に用いた他のレクチンは、検討した全ての濃度で Trypsin-EDTA への抵抗性をほとんど与えなかった。なお以後の実験では、Trypsin-EDTA 耐性作用の最も大きい PHA-E と ConA を用いた。

次に、Trypsin-EDTA 耐性効果が発現するまでに必要なレクチン処理時間について検討した。その結果、PHA-E, ConA とのインキュベーションの時間依存的に Trypsin-EDTA に対する抵抗性が增大して、約 20 分間のレクチン処理により、効果が最大に達した (図 5)。そこで以後の実験では、レクチン処理時間を 20 分間とした。

2. 細胞特異性の検討

Trypsin-EDTA に対する抵抗性が他の細胞でも観察されるかを検討した。その結果、rabbit MSC 以外の様々な初代培養細胞と、樹立細胞株 (cell lines) に対して ConA と PHA-E は Trypsin-EDTA 耐性能を誘導した (表 1)。MSC をはじめ、線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞様細胞など、さらにヒト、ウサギ、ラットなど由来動物の違いに関わりなく、実験した全ての細胞に対して ConA あるいは PHA-E は Trypsin-EDTA に対する抵抗性を誘導した。

3. 各種のプロテアーゼに対する耐性

生体内に移植した後、様々なプロテアーゼが付着細胞を傷害する可能性がある。そこで Trypsin-EDTA 以外のプロテアーゼに対するレクチン処理の影響を検討した。その結果、ConA と PHA-E は、高濃度の trypsin や dispase, pronase E あるいは、細菌性の未精製 collagenase (35units/ml, Sigma type IA) (データは示さず) に対しても抵抗性を与えた (図 6)。

4. メカニカルストレス (機械的刺激) に対する耐性

メカニカルストレスによる細胞剥離に対するレクチン処理の影響を検討した。その結果、レクチン処理をしていない細胞は、振動を加えて 10 分後には完全に剥離したが、ConA あるいは PHA-E にて処理した細胞はほとんど剥離することはなく、メカニカルストレスに対しても抵抗性を獲得した (図 7)。

5. レクチン処理後の効果持続時間

レクチン作用の持続時間について検討した。その結果、ConA は 18 時間、PHA-E は 34 時間 Trypsin-EDTA 耐性効果が持続することが判明した (図 8)。

6. 細胞表面上の残存レクチン量の経時的変化

細胞表面上のレクチン量の経時的変化を検討した。その結果、レクチン処理により細胞表面上に付着した biotin-labeled PHA-E は、120 時間で完全に細胞表面上より消失した (図 9)。一方 biotin-labeled ConA は、120 時間後でも細胞表面上より完全には消失しなかったが、MeMan (詳細は第 3 章, 仮説 2. を参照) を添加することによって残存 ConA を取り除くことができた。

IV. 考察

実験に用いた植物レクチンのうち、4 価（4 量体）の ConA（天然型）は Trypsin-EDTA に対する抵抗性を与えたが、2 価（2 量体）の s-ConA は、抵抗性を与えなかった。これまでの報告によると、マメ科レクチンの個々の糖結合部位単独ではリガンドに対する結合定数は非常に低いが、多価になるとリガンドに対する結合定数が、数桁増大する[26, 53-56]。結果として、細胞表面の多価のリガンドに対して、多価のレクチンによる多数の弱い結合が集まり強い結合となる。このことから価数の違いが抵抗性の有無に大きな影響を与え、抵抗性を与えるには、多価である必要があると考えられる。また、ConA 作用の発現には、ConA 分子がその複数の糖結合価により、細胞表面レセプターと複数の架橋を形成することも必要条件である。

また、E-サブユニットからなる PHA-E は Trypsin-EDTA に対する抵抗性を与えたが、そのイソレクチンである L-サブユニットからなる PHA-L は、細胞の抵抗性に影響しなかった。PHA-L と PHA-E のハプテン糖は異なることから認識する糖構造が違うことが作用の有無を決定していた。

他のレクチンに作用がなかったことから、ConA および PHA-E の立体構造や糖特異性、および糖結合部位の糖結合親和性がプロテアーゼ抵抗性と関係していることが示唆された。平林によると ConA は、他のマンノース結合性レクチンと比べ、構造の違うマンノースとも結合できるという特殊性が示されている[57]。

再生医療においては、MSC 以外の細胞を細胞・担体複合体に用いることや担体に付着させた MSC を目的の細胞に分化させてから使用することもある[58-63]。よって Trypsin-EDTA に対する抵抗性が MSC 以外の細胞でも観察されるかを検討することは重要である。その結果、実験した全ての細胞において ConA と PHA-E は Trypsin-EDTA に対する抵抗性を誘導した。これによりレクチン処理を再生医療に応用する際に使用できる細胞が制限されることもなく、MSC を目的の細胞へ分化させたあとも、レクチン処理が有効であることが確認された。

植物レクチン自体は、プロテアーゼに対して非常に安定であることが報告されているが[35]、今回の実験結果からレクチン処理を行った細胞も、プロテアーゼに対して安定となることが認められた。しかも、プロテアーゼだけではな

く、メカニカルストレスに対しても抵抗性を示したことから、レクチン処理は、耐プロテアーゼ能の亢進のみではなく、広く接着力を強化させていることが示された。

ただし、レクチン処理による接着力強化作用は永続的ではなく有限であったので、有効時間を把握しておくことが必要である。さらにレクチンの生体に対する為害性が報告されていることから[64, 65]、レクチンが細胞表面上より自然消失するか否か、また自然消失するにせよどのくらいの時間残存し続けるのか、あるいは必要であれば強制的に除去できるか否かは、大きな問題点となる。実験結果より細胞表面上に付着したレクチンは、約 120 時間で完全にあるいはほぼ消失することが示されたが、これはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれたか、細胞表面よりはずれて培養液中に遊離したと考えられる[26]。

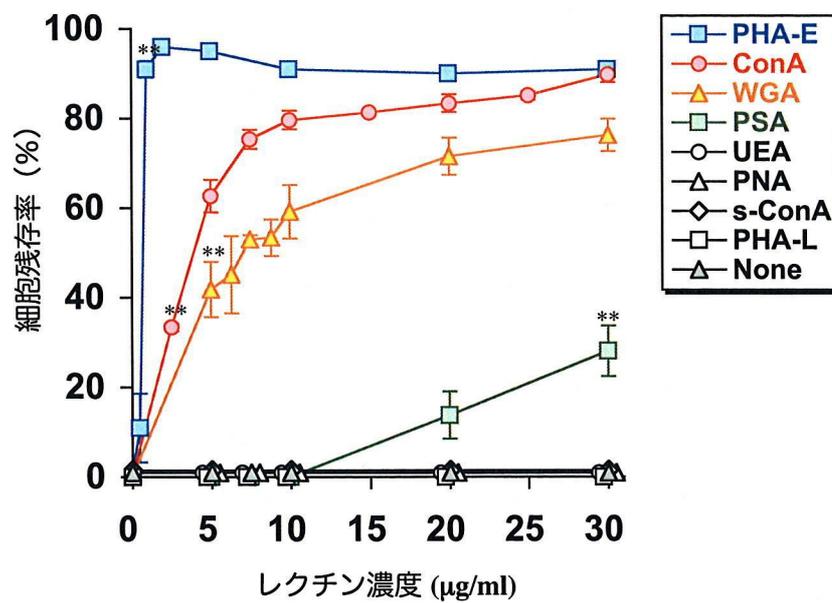


図4 Trypsin-EDTA 抵抗性を与えるレクチンとその濃度の影響 (MSC 培養系)

**は、レクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められた最小濃度を示す. PHA-E は $1\mu\text{g/ml}$ 以上, ConA は $2.5\mu\text{g/ml}$ 以上, WGA は $5\mu\text{g/ml}$ 以上, PSA は $30\mu\text{g/ml}$ 以上より有意差 ($p < 0.01$) が認められた.

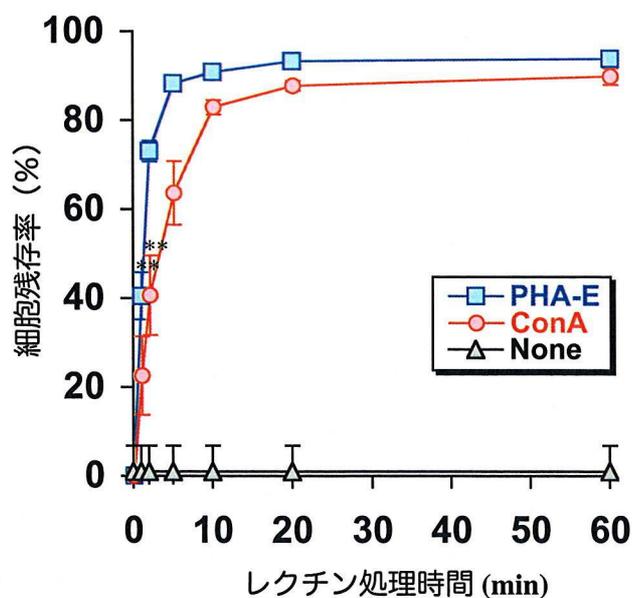


図5 レクチン処理時間の影響 (MSC 培養系)

**は、レクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。PHA-E は1分以上、ConA は2分以上から有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

表1 細胞特異性の検討

Cell type	Cell name	細胞残存率 (%)		
		None	ConA	PHA-E
Primary cells	Human MSC	0	67 ±5	87 ±2
	Human gingival fibroblasts	0	92 ±2	96 ±1
	Rabbit MSC	0	86 ±1	91 ±1
	Rabbit chondrocytes	0	64 ±7	88 ±3
	Rat fibroblasts	0	83 ±3	69 ±2
	Rat pulp cells	0	96 ±3	97 ±0
	Rat periosteum cells	0	96 ±1	97 ±2
	Bovine corneal endothelial cells	0	75 ±4	84 ±3
Cell lines	Human HeLa	0	86 ±2	85 ±0
	Human HBL-100	0	87 ±5	94 ±1
	Monkey COS-7	0	95 ±0	97 ±0
	Mouse 10T1/2	0	85 ±4	97 ±1
	Mouse MC3T3-E1	0	92 ±0	98 ±0
	Mouse MC3T3-G2/PA6	0	81 ±1	93 ±1
	Mouse ATDC5	0	99 ±0	98 ±1
	Mouse C2C12	0	93 ±2	92 ±3

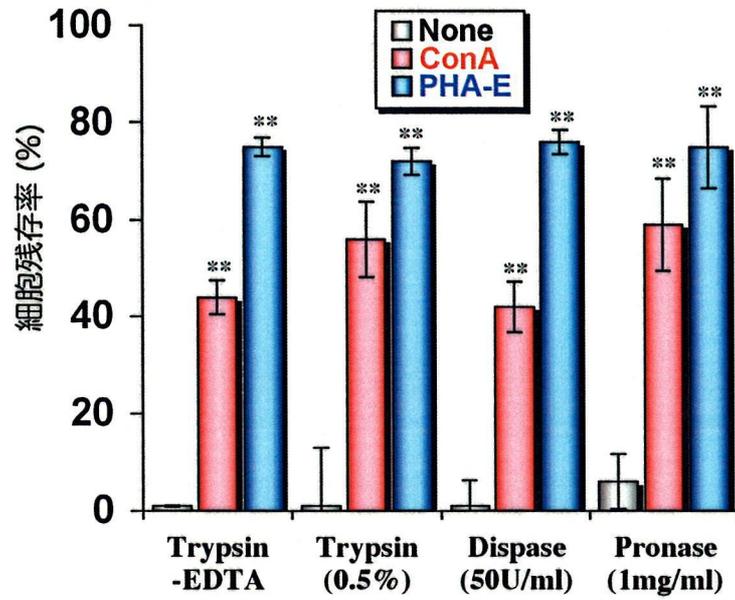


図6 各種プロテアーゼに対する効果 (MSC 培養系)

**は、各プロテアーゼ処理におけるレクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。

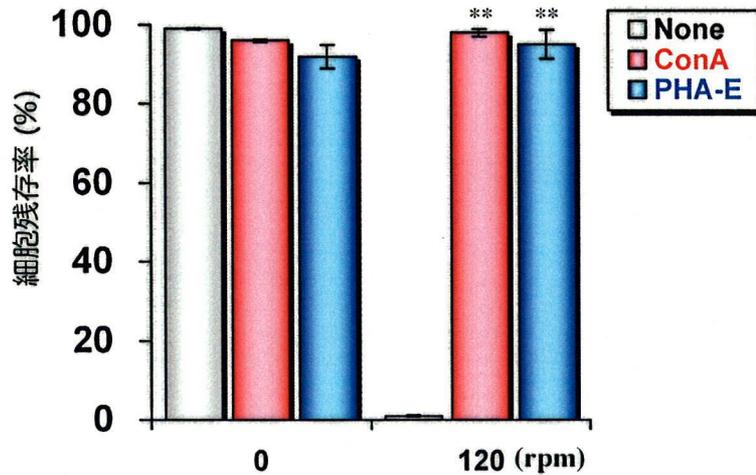


図7 メカニカルストレスに対する耐性 (rat pulp cells 培養系)

**は、振幅 120rpm におけるレクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。

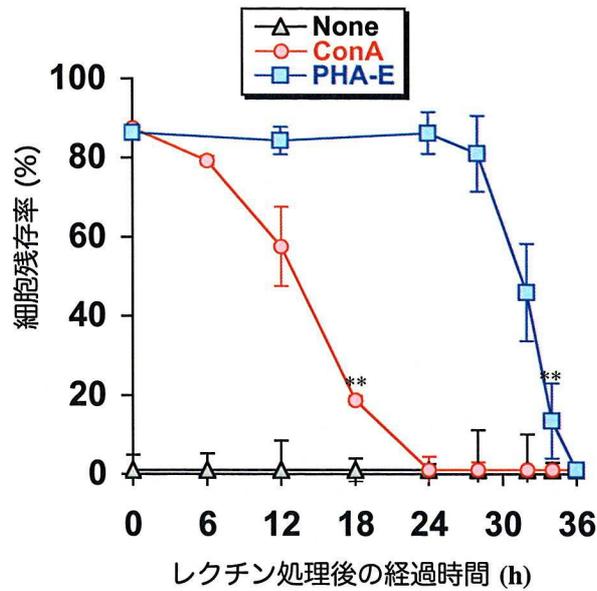


図8 レクチン処理後の効果持続時間 (MSC 培養系)

**は、レクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。PHA-E は 34 時間、ConA は 18 時間まで有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

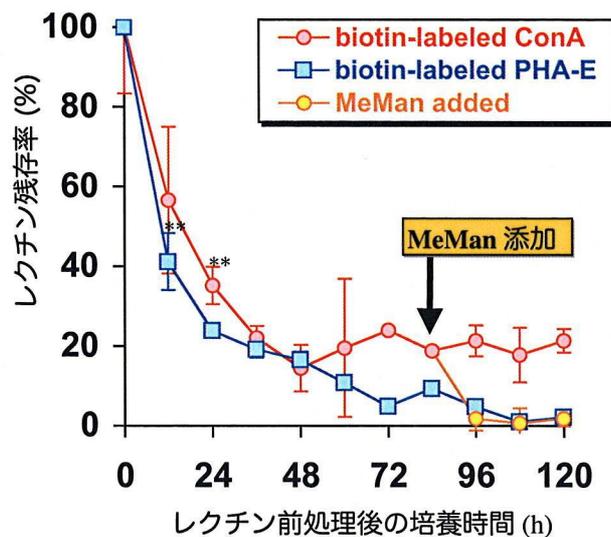


図9 残存レクチン量の経時的変化 (MSC 培養系)

**は、培養前 (0 時間) のレクチン残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。biotin-labeled PHA-E は 12 時間、biotin-labeled ConA は 24 時間から有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

第2節 各種担体上でのレクチン作用の検討

I. 緒言

ここまでの実験で、プラスチックカルチャープレート上でレクチンは Trypsin-EDTA 耐性誘導作用を示したが、実際の再生医療用の担体に対して、同様なレクチン作用が認められるかを検討した。

再生医療において多用されている、チタン、ハイドロキシアパタイト、および生分解性合成高分子についてレクチン作用を検討した。チタンは、従来の金属合金に比べ、軽く、優れた生体親和性を持ち、常温で瞬時に、金属表面に強固で安定した不動態皮膜を形成し、耐食性がよく、金属アレルギーを生じにくいなどの特徴を持つため、医科、歯科を問わず、幅広く応用されている金属材料である[36-43]。また、細胞接着力の強化を求めた表面改質法の開発研究が多くなされている。ハイドロキシアパタイトは、生体の骨や歯の成分として知られ、人工骨や骨補填剤として用いられている。またその六方晶系結晶の表面の帯電による静電的相互作用によって、タンパクを高親和性に吸着させる性質を持つので、タンパク精製クロマトグラフィーのカラムとして頻用されている[66-68]。生分解性合成高分子、poly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA)は、生体内で分解される生分解性基板材料として、再生医工学による軟骨、骨、リガメント、腱、皮膚などの再構築に用いられ、縫合糸や徐放性製剤の薬物送達システム (drug delivery system, DDS) 基剤として応用されている[72-76]。また、これまで実験に用いてきたプラスチックカルチャープレートは、製造メーカーによって処理方法は異なるが、メーカー独自のプラズマ処理、硫酸処理などによって、表面の親水化（親水性官能基の導入）が行われている[69-71]。これにより帯電しているタンパクが静電的相互作用により表面に吸着し、そのタンパクを介して細胞が付着する。本研究では、以上の生体材料について、レクチンによる細胞の Trypsin-EDTA 耐性誘導作用を検討した。

II. 材料ならびに方法

1. 使用担体の種類

チタンプレート（直径約 15mm, 厚さ約 1mm, 純度 >99.9%, Nippon Steel Corporation）は, #600 の耐水ペーパーの使用に至るまで研磨し, 5 分間の蒸留水による超音波洗浄, 5 分間の 100% アセトン（片山化学）による超音波洗浄, 15 分間の蒸留水による超音波洗浄, 30 分間の 30% 硝酸 (SIGMA) による酸処理, 20 分間の蒸留水による超音波洗浄, 10 分間の 100% エタノール (SIGMA) による超音波洗浄の順に処理を行い, 自然乾燥させたものを用いた.

ハイドロキシアパタイトプレート(1 辺が 10mm の正方形, 厚さ 2mm, PENTAX Co. APP-101) は, オートクレーブにて滅菌したものを用いた.

PLGA メンブレン (75 : 25, 1 辺が 7.5mm の正方形, 厚さ 0.25mm, 孔径 20 ± 10µm, GC. Co.) は, エタノールに浸漬したあと, α-MEM に浸漬したものをを用いた.

2. 各担体上への細胞の準備

チタンプレートおよびハイドロキシアパタイトプレートについては, 超低接着の 24 穴プラスチックプレート (Corning Coster) の底面に担体を設置し, その上で rabbit MSC を 6×10^4 cells/穴で播種して 10% FBS 含有 α-MEM 中で培養した. その際, 同条件で細胞密度の確認用のプレートも別に用意した. 細胞密度の確認用プレート上の細胞を 4% ホルムアルデヒド含有 PBS (Sigma) にて 10 分間固定し, 0.25% triton X-100 含有 PBS (Sigma) で 10 分間処理し, 2units/ml rhodamine phalloidin 含有 PBS (Molecular Probes, Inc.) にて 30 分間アクチン線維を染色したものを, Conforcal Laser Scanning Microscope (LSM 410, Carl Zeiss Co.,Ltd) にて観察し, 90% コンフルエントになったことを確認した上で, 細胞培養したチタンプレートおよびハイドロキシアパタイトプレートを新たな超低接着の 24 穴プレートに移して実験に用いた.

PLGA メンブレンについては, そのままでは培養液中に浮き上がってしまうため, 表面未処理の 48 穴プラスチックプレート上に PLGA を設置し, その上に内径 7.0mm のクローニングリングを重しとして載せた. クローニングリン

グの内外の液面が同じになるように培養液を添加したあとリング内に rabbit MSC (2.5×10^4 cells) を播種し培養した。チタンあるいはハイドロキシアパタイトプレートのとおり同様の方法で 90% コンフルエントに達したことを確認した上で、新たな表面未処理の 48 穴プラスチックプレートに移し、実験に用いた。すなわち、各担体上の細胞を 20 μ g/ml ConA あるいは 10 μ g/ml PHA-E 含有 α -MEM 中で 20 分間インキュベートした。その後 Trypsin-EDTA と 15 分間インキュベートして剥離した細胞数を計測した。

III. 結果

チタンプレート、ハイドロキシアパタイトプレート、PLGA メンブレン上でも、rabbit MSC に対してレクチンは Trypsin-EDTA 耐性誘導作用を示した(図 10)。

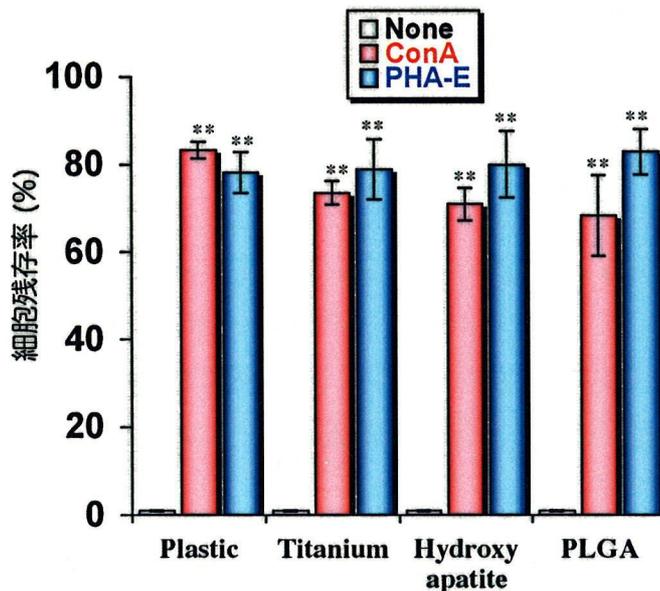


図 10 各種担体上でのレクチン処理効果 (MSC 培養系)

**は、各種担体上におけるレクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。

第3節 初期付着・伸展能に対するレクチンの作用

I. 緒言

生体材料（担体）に細胞を付着させやすくすることの重要性は、接着性細胞が足場依存性であることのほかに[2, 3], その後の増殖・分化を促進することにある。つまり再生医療において早期治癒につながる。これまで接着機構に関して多くの研究がなされてきたが[4-8], 多くの細胞接着分子が, 細胞の初期付着・伸展の促進に利用されている。

前節までは担体上に細胞を播種した後にレクチン処理したが, 本節では担体表面性状の改質の観点から, 担体に前もってレクチン処理した後に細胞を播種した。

II. 材料ならびに方法

1. 各種担体のレクチン処理方法と初期付着細胞数の求め方

表面未処理の 24 穴プラスチックプレート (Falcon) に, 20 μ g/ml ConA あるいは 10 μ g/ml PHA-E 含有 PBS を加えて 20 分間インキュベートした。余剰なレクチンは PBS にて洗い流した。また I 型コラーゲンあるいはフィブロネクチンでコートされた 24 穴プラスチックプレート (Falcon) も用いた。これらのプレートを 1% bovine serum albumin (BSA) (GIBCO) にてブロッキングした後, rabbit MSC を 6×10^4 cells/穴で播種し, 0.8ml の FBS 無添加の α -MEM にて 20 分間培養した。初期付着しなかった細胞を α -MEM で 2 回洗い流した後, 位相差顕微鏡にてデジタル撮影を行い, 0.34 mm²あたりの付着細胞数を NIH Image program (developed at U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) を用いて計測した。

同様な方法で, チタンプレート, ハイドロキシアパタイトプレート, PLGA メンブレンにレクチンをコートして, これらを超低接着の 24 穴プラスチックプレートあるいは表面未処理の 48 穴プラスチックプレートの底面に設置した。これら担体上の細胞を 4% ホルムアルデヒド含有 PBS にて 10 分間固定し,

0.25% triton X-100 含有 PBS で 10 分間インキュベートし, 2units/ml rhodamine phalloidin 含有 PBS にて 30 分間アクチン線維を染色したものを, Conforcal Laser Scanning Microscope にてデジタル撮影を行い, 1.64 mm²あたりの付着細胞数を計測した.

2. 細胞伸展状態の評価方法

表面未処理の 6 穴プラスチックプレート (Falcon) にレクチンコートした後, rabbit MSC を 3×10^5 cells/穴で播種し, 3ml の無血清の α -MEM にて 0.5~2.5 時間培養し, 位相差顕微鏡にてデジタル撮影を行い, 形態を観察することで評価した.

3. 縦置きチタン表面への細胞付着に及ぼすレクチンの影響の検討方法

レクチンコートしたチタンプレートを, 培養容器中に重力に対して平行になるように (縦置きして) 設置し, 細胞懸濁液を播種して 90 分間培養した. チタンプレート表面に付着した細胞を 4% ホルムアルデヒド含有 PBS にて 10 分間固定し, 0.25% triton X-100 含有 PBS で 10 分間処理し, 1 μ g/ml Propidium Iodide (PI) 含有 PBS (同仁化学) にて 20 分間核染色したものを, Fluorescence Microscope (IX71, OLYMPUS) にてデジタル撮影した.

4. 各種コート担体上での細胞の Trypsin-EDTA 耐性能の検討方法

レクチンコートした表面未処理の 24 穴プラスチックプレート及びチタンプレート, また I 型コラーゲンあるいはフィブロネクチンでコートされた 24 穴プラスチックプレートに, 細胞を播種し, 10% FBS 含有 α -MEM にて 3 時間培養した後, Trypsin-EDTA で処置, 15 分後に剥離した細胞数を計測した.

III. 結果

1. 初期付着に対する影響

MSC の播種 20 分後，対照のプラスチック表面上には，細胞付着を観察できなかったが，レクチンコートしたプラスチック表面上には，多数の細胞付着を観察した（図 11, 12）．またレクチンの作用は，I 型コラーゲンより強く，フィブロネクチンと同等以上であった．また，チタンプレート，ハイドロキシアパタイトプレート，PLGA メンブレン上においても，レクチンによるコーティングは初期付着を有意に ($p < 0.01$) 促進した（図 13-18）．

2. 細胞伸展に対する影響

担体へのレクチンコートによって，細胞の初期付着が促進することを認めたが，さらにその後の伸展にも影響するかを検討した．その結果，MSC の播種 0.5 および 2.5 時間後において，レクチンコートをしていないプラスチック表面上は，ほとんど細胞伸展が認められなかった（図 19 A, D）．しかし，レクチンコートしたプラスチック表面上では，0.5 時間後においても明らかに伸展した細胞が多く存在し，2.5 時間後には，ほとんどの細胞が伸展した（図 19 B, C, E, F）．

3. 縦置きチタン表面への細胞付着に及ぼすレクチンの影響

縦置きした対照のチタンプレート表面には，細胞の付着を認めなかったが，レクチンコートをしたチタンプレート表面には，多数の細胞付着を認めた（図 20）．

4. 担体上での Trypsin-EDTA 耐性能に及ぼすレクチン，I 型コラーゲン，フィブロネクチンの影響

レクチン前処理した各種担体は，細胞の初期付着・伸展を促進させたが，その状態で Trypsin-EDTA 耐性能が得られるかを検討した．また，I 型コラーゲン

とフィブロネクチンにも Trypsin-EDTA 耐性能があるのかを検討した。その結果、レクチンコートしたプラスチックおよびチタンに付着した細胞は、有意に ($p < 0.01$) Trypsin-EDTA 耐性となった (図 21)。一方、初期付着を促進した I 型コラーゲンやフィブロネクチンでコートされたプレート上では、Trypsin-EDTA 耐性能は観察されなかった。

IV. 考察

以前にもフィブロネクチンや ConA が細胞の接着を促進することが報告されている[77]。今回の実験結果からは、ConA と PHA-E がプロテアーゼやメカニカルストレスへの耐性を誘導することが判明した。一方、初期付着を促進していた I 型コラーゲンやフィブロネクチンでコートされたプレート上は、Trypsin-EDTA 耐性効果が認められなかったため、レクチンの作用は I 型コラーゲンやフィブロネクチンと異なることが判明した。

実際の生体材料に用いられる担体は、平坦な板状ではなく複雑な立体構造をとるものが多い。In vitro の実験においては、培養容器底面に、平坦な担体を設置しておけば、播種した細胞は重力により底面に沈着するため、付着細胞であれば、いずれ担体に付着し進展する。しかし、立体構造をとる担体の重力に対して平行な部位（以下 壁面）へは、細胞が付着しにくく、重力によって培養容器底面に落下してしまう。従って、レクチンによって立体物に均一に細胞を付着させられる本技術は、今後の再生医療に大きな展望を与える。

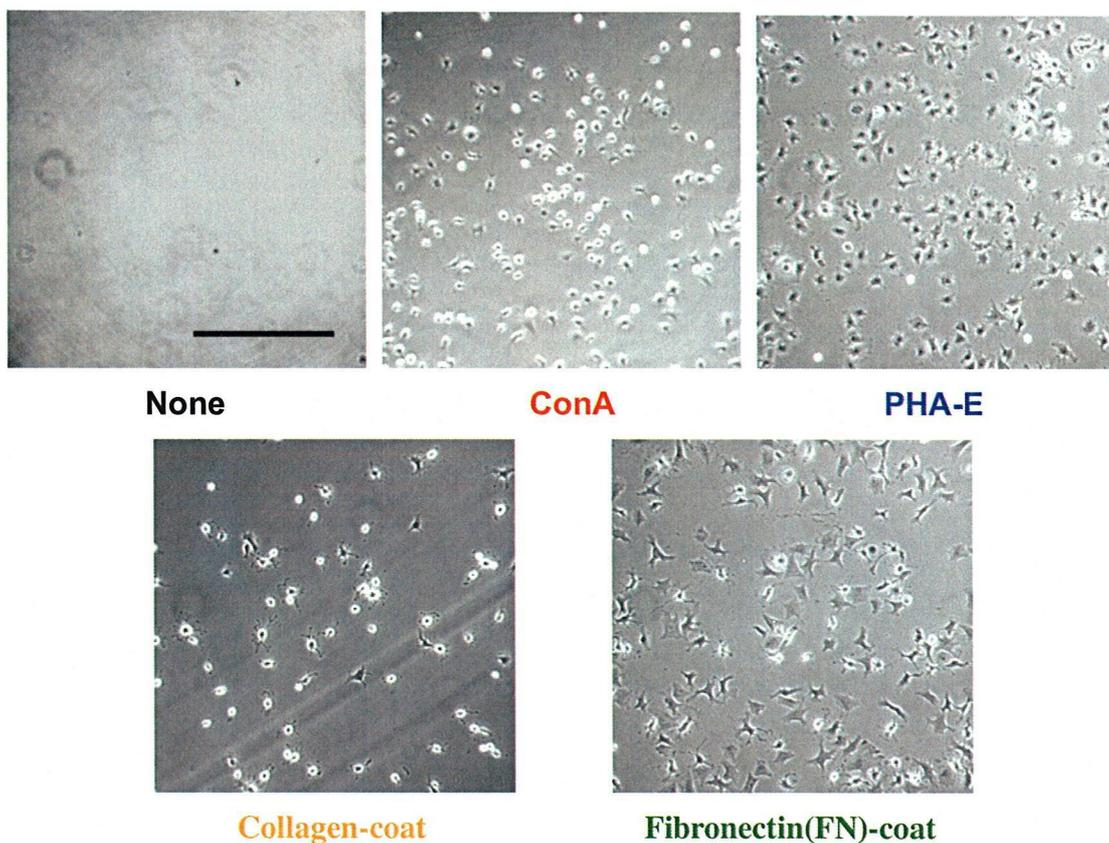


図 11 レクチンコートプラスチック上における細胞 (MSC) の初期付着に対する影響

細胞播種後 20 分後の位相差顕微鏡写真 Bar = 500 μ m

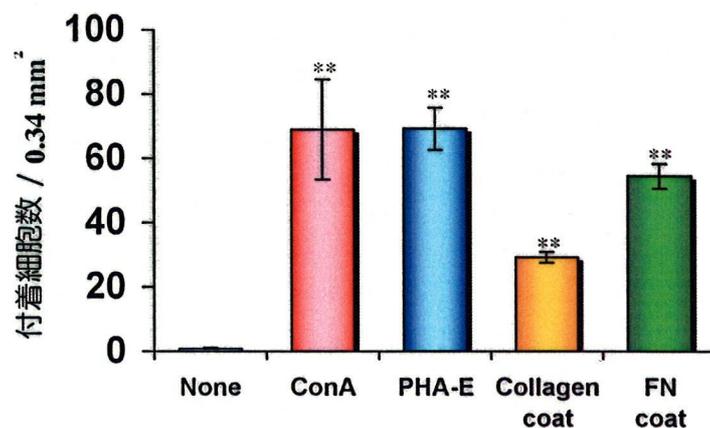


図 12 レクチンコートプラスチック上における MSC の初期付着
 **は、レクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。

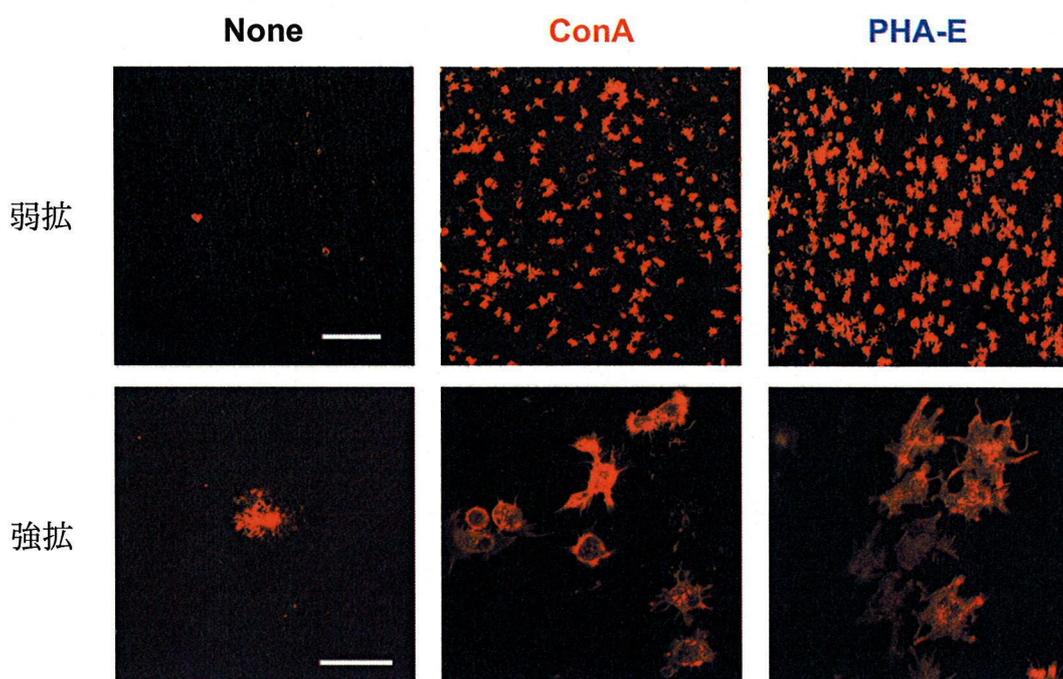


図 13 レクチンコートチタン上における細胞 (MSC) の初期付着に対する影響
細胞播種後 20 分後のアクチン線維染色による共焦点レーザー顕微鏡写真
弱拡 Bar = 250 μ m, 強拡 Bar = 50 μ m

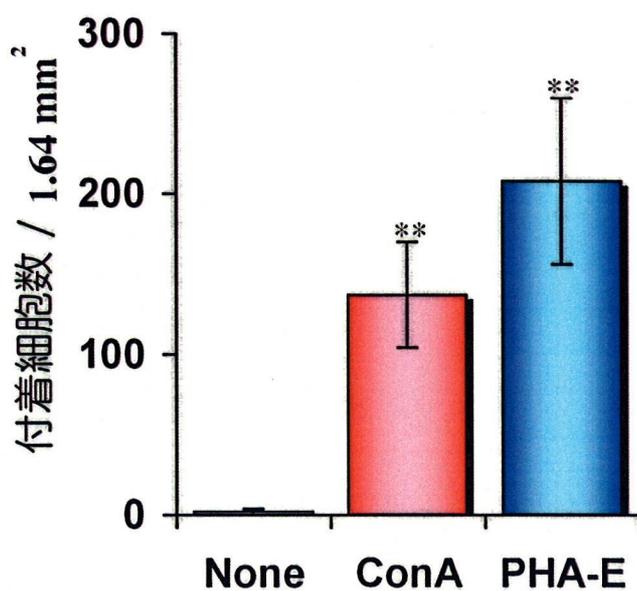


図 14 レクチン処理チタン上における MSC の初期付着
**は、レクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。

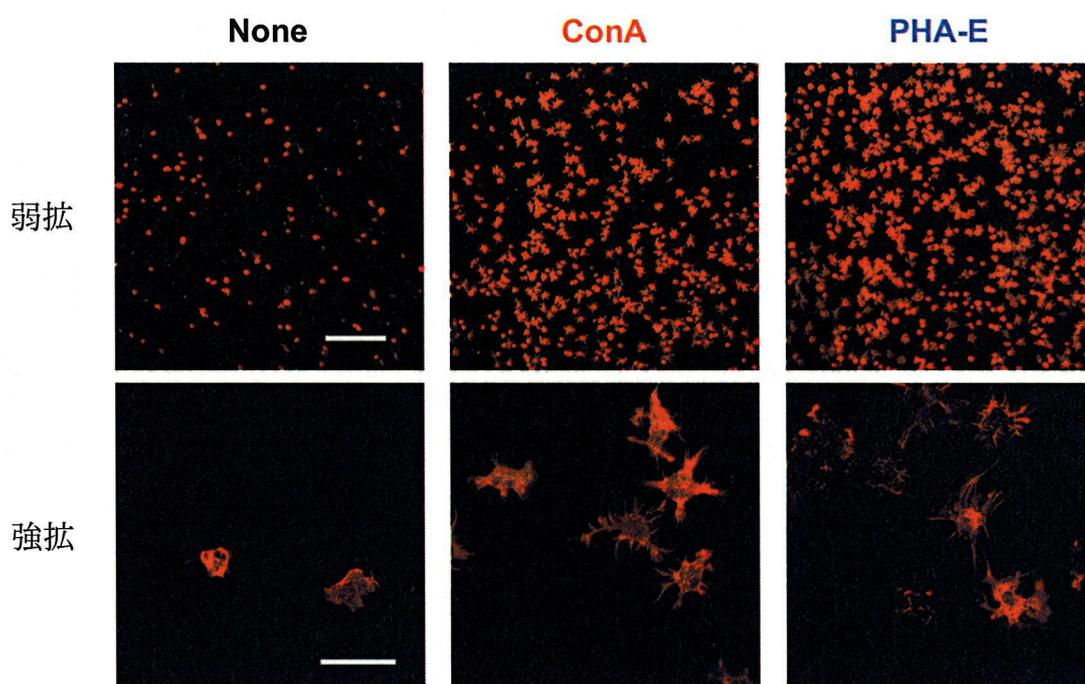


図 15 レクチンコートハイドロキシアパタイト上における細胞 (MSC) の初期付着に対する影響

細胞播種後 20 分後のアクチン線維染色による共焦点レーザー顕微鏡写真

弱拡大 Bar = 250 μ m, 強拡大 Bar = 50 μ m

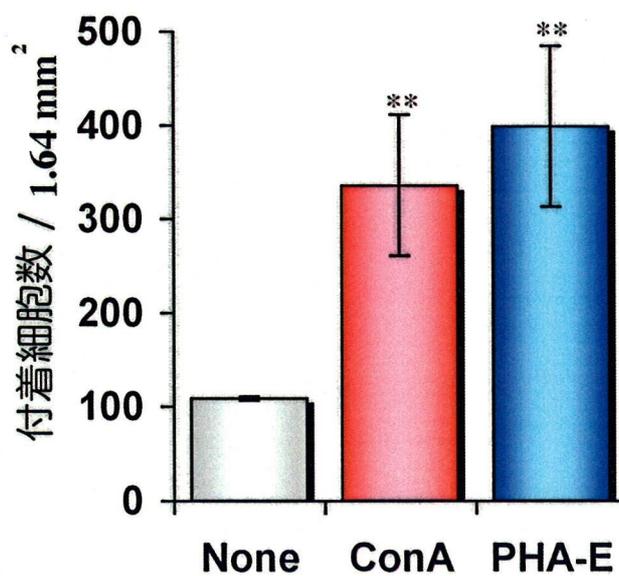


図 16 レクチンコートハイドロキシアパタイト上における MSC の初期付着
**は, レクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す.

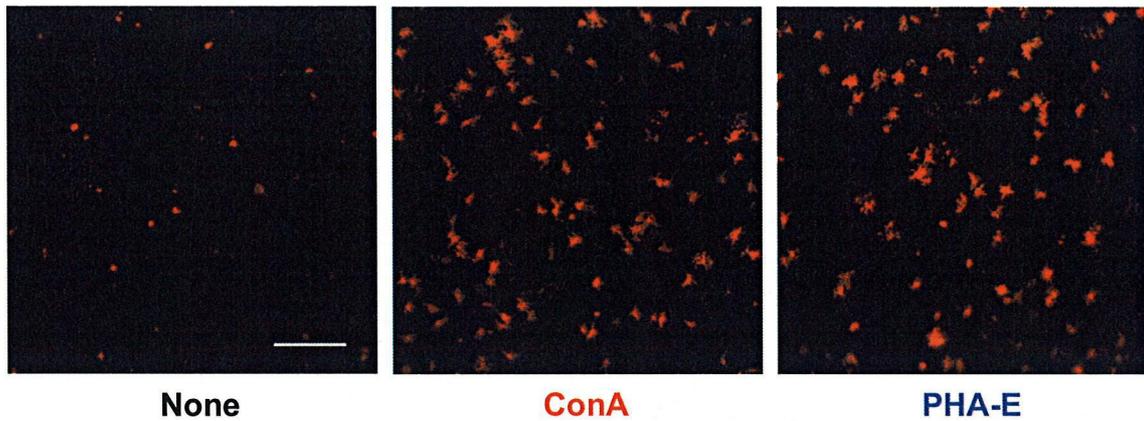


図 17 レクチンコート PLGA 上における細胞 (MSC) の初期付着に対する影響
細胞播種後 1 時間後のアクチン線維染色による共焦点レーザー顕微鏡写真
Bar = 250 μ m

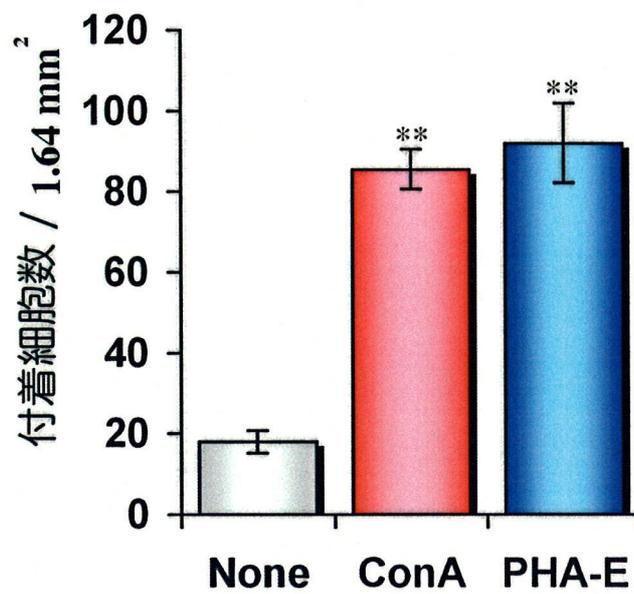


図 18 レクチンコート PLGA 上における MSC の初期付着
**は、レクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。

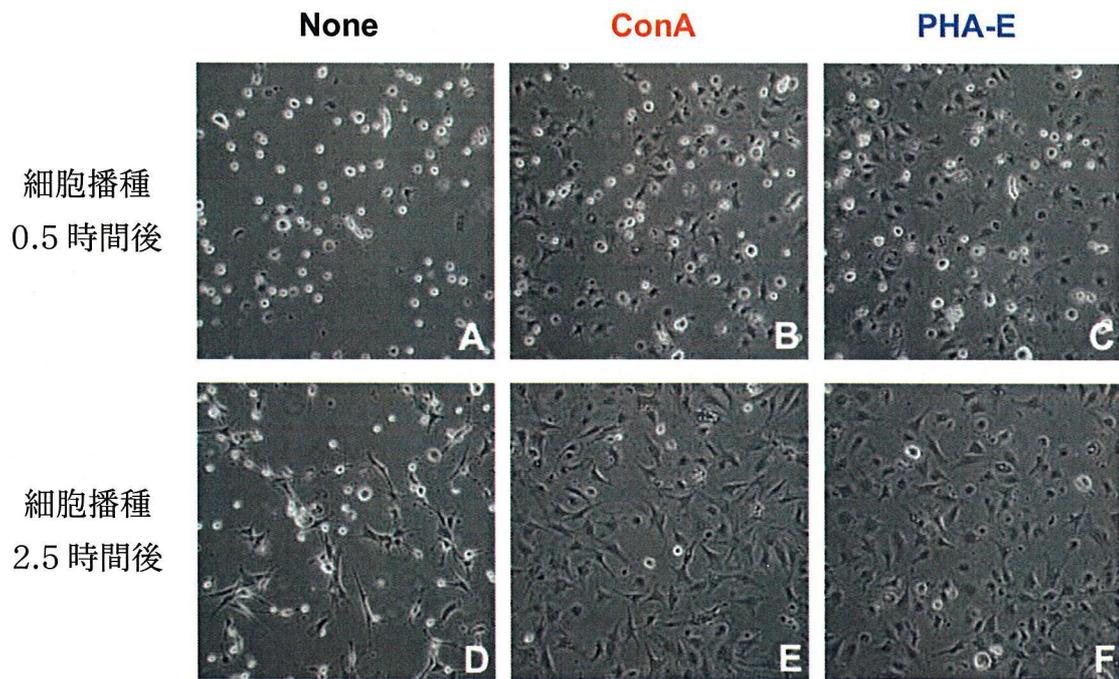


図 19 レクチンコートプレート上での細胞伸展
位相差顕微鏡写真



図 20 レクチンコートによる壁面への細胞付着の促進
細胞播種後 90min の PI 染色による蛍光顕微鏡像
Bar = 1mm

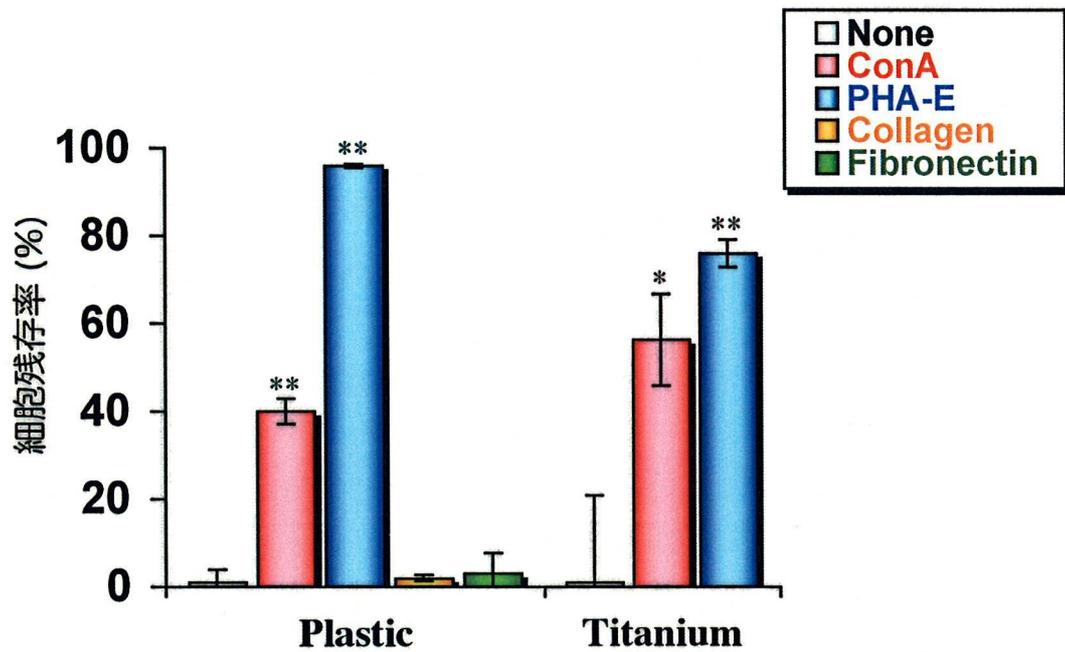


図 21 レクチンコートによる Trypsin-EDTA に対する抵抗性 (MSC)

* は、レクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められたものを示す。

**は、レクチン非処理の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。

第4節 細胞為害性の検討

I. 緒言

これまでの実験から ConA と PHA-E は、細胞の初期付着・伸展、そして接着力に影響することが示された。しかし、これらのレクチンは増殖や分化にも影響する可能性がある。つまり臨床応用に際して、レクチン処理が細胞に対して為害性を与えないかの検討は必須である。そこで次に細胞増殖、形態、移動、軟骨・骨分化に及ぼすレクチンの影響を検討した。

II. 材料ならびに方法

1. 細胞増殖の評価方法

1) 細胞数と ATP 量との相関

細胞の増加数が ATP 量の増加に相関があることを確認するために、human gingival fibroblasts を 10% FBS 含有 α -MEM にて 24 穴カルチャープレートに 3×10^3 cell/穴で播種し、細胞がプレート上に付着した時点を 0 日とし、6 日間、37°C、5% CO₂ 気相下で培養した。その間 1 日ごとにサンプルを PBS で洗浄したあと、細胞数と ATP 量をそれぞれ測定した。細胞数は、Trypsin-EDTA にて細胞を剥離し、Coulter counter にて計測した。ATP 量は、CellTiter-Glo™ (Promega Co.) にて抽出したものを Microplate Luminometer (The Reporter™ : TURNER BIOSYSTEMS) にて測定した。

その結果、細胞数と ATP 量との相関が認められたので (図 22)、以下の実験では、ATP 量の増加をもって細胞数の増加と見なした。

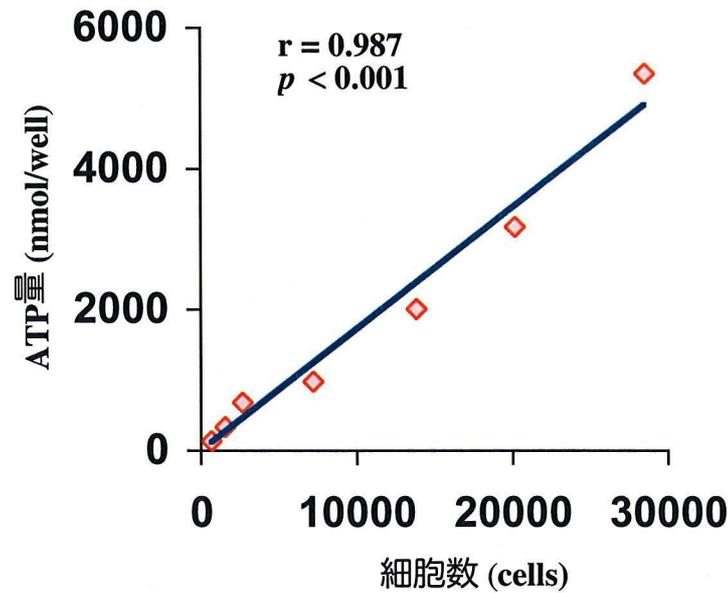


図 22 細胞数と ATP 量との相関関係

2) 増殖に及ぼすレクチン作用の評価

Rabbit MSC を 10% FBS 含有 α -MEM にて 24 穴カルチャープレートに播種し、50% コンフルエントになった時点で 10 μ g/ml ConA あるいは 5 μ g/ml PHA-E で 20 分間レクチン処理し、PBS で洗浄した後、10% FBS 含有 α -MEM にて 12~48 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 気相下で培養した。12 時間ごとにサンプルを PBS で洗浄したあと、CellTiter-Glo™ で ATP を抽出し、Microplate Luminometer を使って 1 穴あたりの ATP 量を計算によって求めた。

2. 細胞形態の評価

細胞をレクチン処理する前、レクチン処理 20 分後、レクチン処理後に Trypsin-EDTA を 15 分間添加し PBS で洗浄した後、Trypsin-EDTA 除去後 20 分、5 時間、28 時間後のそれぞれの細胞形態を位相差顕微鏡にてデジタル撮影を行った。

3. 細胞移動の評価方法

35mm ティッシュカルチャーディッシュ (SUMILON) 上で 90% コンフルエントまで培養した rabbit MSC に 20 μ g/ml ConA あるいは 10 μ g/ml PHA-E で 20 分間処理した後, 余剰なレクチンを洗浄し, シート状に増殖した細胞層を直線状に分割, 一片を cell scraper (Falcon) にて剥離し 1% FBS 含有 α -MEM にて 0 ~96 時間培養した. その間 12 時間ごとに, 細胞移動を位相差顕微鏡にてデジタル撮影した.

4. 軟骨分化の評価方法 (*in vitro*)

α -MEM に Antibiotic-Antimycotic, 4500mg/L D-(+)-glucose, ITS+" Premix (6.25 μ g/ml insulin, 6.25 μ g/ml transferrin, 6.25ng/ml selenous acid, 5.33 μ g/ml linoleic acid, 1.25mg/ml bovin serum albumin : BD Biosciences), 100nM dexamethasone (Sigma), 50 μ g/ml ascorbic acid 2-phosphate (Sigma), 100 μ g/ml sodium pyruvate (和光純薬), および 10ng/ml human transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3 : PeproTech EC Ltd) を添加したものを, 軟骨誘導培地として用いた[78, 79]. 96 穴カルチャープレートに 20 μ g/ml ConA あるいは 10 μ g/ml PHA-E で 20 分間前処理した後, rabbit MSC を 2×10^5 cell/穴で播種し, 上記の軟骨誘導培地にて培養した. 24 時間培養後, 再び同濃度のレクチンで 20 分間処理し, 余剰なレクチンを洗浄した後, 軟骨誘導培地 150 μ l で培養した. 2 日後に軟骨誘導培地 150 μ l を追加し, さらに 2 日後に同濃度のレクチンを追加した. これを 20 日間くり返し行い, 得られたペレットを PBS にて洗浄し, 4% パラホルムアルデヒド含有 PBS にて 4 $^{\circ}$ C で 24 時間以上固定し, その後通法に従いトルイジンブルー染色を行った.

5. 軟骨分化の評価方法 (*in vivo*)

in vivo での軟骨分化の影響を評価するためにウサギの膝関節軟骨欠損モデルを作成した。

1) 自家 rabbit MSC の採取と培養

Rabbit MSC は、麻酔下において生後 12~14 週齢の雄性日本白色ウサギ（北山ラベス株式会社）の腸骨より骨髓穿刺して約 5~7cc の骨髓を、200U/ml heparin 入りのシリンジにて採取し、10% FBS 及び Antibiotic-Antimycotic 含有 DMEM にて、100mm プラスチックティッシュカルチャーディッシュ上に播種し、37℃、5% CO₂ 気相下にて培養し、初代培養細胞とした（図 23）。継代数は 3~5 までのものを実験に用いた。



図 23 膝関節軟骨欠損モデルの作製の概略図

2) 細胞・担体複合体の作成

培養した rabbit MSC を Trypsin-EDTA にて回収し、FBS 無添加の DMEM に 5×10^6 cell/0.5ml になるように調整した。担体には、3% Atelocollagen Implant (以下コラーゲン) (高研) を用いた。細胞・担体複合体は、担体 1ml に細胞混濁液 0.5ml を加え、最終的に 5×10^6 cell/1.5ml の濃度になるように氷上で調整し、1ml の FBS 無添加の DMEM 中に 37°C で保存した。

複合体の構成としては、①何もなし (移植せず)、②コラーゲンのみ、③コラーゲン+ConA、④コラーゲン+MSC、⑤コラーゲン+MSC+ConA の 5 種類とした。⑤の MSC に ConA 処理を行うものは、担体と混ぜる前に 10 μ g/ml ConA で 20 分間処理し、③ではコラーゲンに直接 10 μ g/ml ConA が添加された 0.5ml の FBS 無添加の DMEM を加えた。また②コラーゲンのみには、0.5ml の FBS 無添加の DMEM を加えた (図. 23)。

3) 欠損モデルの作成と移植

麻酔下において、生後 18 週齢の骨髄採取したウサギの膝関節に、生理食塩水の注水下にて歯科用エンジンおよびカーバイトバーを用いて、直径 5.5mm、深さ 3.0mm の欠損を作成し、欠損部に細胞・担体複合体 (約 60 μ l) を移植後、縫合した。

4) 組織切片の作成

移植 4 週間後、膝関節を摘出、4% パラホルムアルデヒド含有 PBS で 24 時間以上固定し、その後通法に従い膝関節中央部の組織切片を作成、トルイジンブルーで染色した。

5) 評価方法

軟骨の修復程度を組織学的に 5 つのカテゴリーに分けて数値化する Wakitani Score を用いた[80]。なおスコアは、0~14 の値をとり、値が小さいほど修復が進んでいることを示す。

6. 骨分化の評価方法

1) 方法

80% コンフルエントまで培養した rabbit MSC に 20 μ g/ml ConA あるいは 10 μ g/ml PHA-E で 20 分間処理した後，余剰なレクチンを洗浄し 12 日間，骨誘導培地 (α -MEM に 10% FBS, Antibiotic-Antimycotic, 10⁻⁸ M dexamethasone (SIGMA), 10mM β -glycerophosphate (SIGMA), 50 μ g/ml ascorbic acid 2-phosphate (SIGMA) を添加) にて培養して，4 日ごとにアリザリンレッド染色および，カルシウム定量を行った。

2) アリザリンレッド染色

Medium を抜き，0.9% NaCl 含有の 10mM Tris \cdot HCl (pH 7.6) で 2 回洗浄したあと，95% エタノールで 1 時間以上固定し，1% Alizarin Red S (CHROMA-GESELLCHAFT) で常温，遮光にて 5 分以上染色し，その後水で洗浄した。

3) カルシウム定量

PBS にて洗浄した後，10% trichloroacetic acid 溶液 (片山化学) にてカルシウムを溶解し，ortho-cresolphthalein complexone method (OCPC 法) を利用した Ca C-test Wako Kit (和光純薬) を用いて Multiwell Spectrophotometer にて吸光度 (O.D. 570nm) を測定した。

III. 結果

1. 細胞増殖

レクチン処理した細胞は、非処理細胞と同様な ATP 量の増加を示した (図 24).

2. 細胞形態

20 分間レクチンとインキュベートした rabbit MSC は、レクチン処理する前 (図 25 A, B, C) と比較して、形態の変化は認められなかった (図 25 D, E, F). また、レクチン非処理細胞は、Trypsin-EDTA を添加して PBS で洗浄した後、プラスチック表面上より完全に剥離したが (図 25 G), レクチン処理細胞は、形態は丸くなるが、プラスチック表面上より剥がれることはなかった (図 25 H, I). さらに、この状態の細胞に 10% FBS 含有 α -MEM を加えて 28 時間培養を続けたところ、レクチン処理細胞の形態が回復した (図 26 E, F).

3. 細胞移動

レクチン処理により、MSC が担体に強固に付着して細胞移動能が低下する可能性が考えられた。しかし、レクチン処理細胞も、対照とほぼ同様に移動した (図 27).

4. 軟骨分化 (*in vitro*)

レクチン処理したペレットも、対照と同様に軟骨化した (図 28).

5. 軟骨分化 (*in vivo*)

移植後 4 週間では、欠損部は完全に修復していなかったが、細胞・担体複合体を移植したものは、組織の修復が良好であった (図 29). ただし、MSC (細胞) と ConA の影響は検出できなかった.

6. 骨分化

レクチン処理した MSC は、骨誘導培地中で対照と同程度に石灰化した（図 30, 31）。カルシウムの沈着量もほぼ同等であった。

IV. 考察

これまでの報告から、ConA は高濃度において細胞毒性を示す[35]。しかし本研究で検討した濃度範囲では細胞為害性は認められなかった。つまり、細胞接着力強化作用が得られる濃度や処理時間では、細胞に為害性を及ぼさなかった。一般にレクチンは低濃度と高濃度では、異なる作用を与える。また、Yan らの報告によると ConA 処理により軟骨細胞の分化・石灰化を誘導することがわかっており[28-32]、Wlodarski らによって PHA は、骨髄移植部における骨形成を増加させることが報告されている[33, 34]。さらに記述はしなかったが、レクチン処理の仕方によっては骨分化を促進するというデータを少なからず得ていることから、条件を整えればレクチンによる軟骨・骨分化促進作用が期待できる。

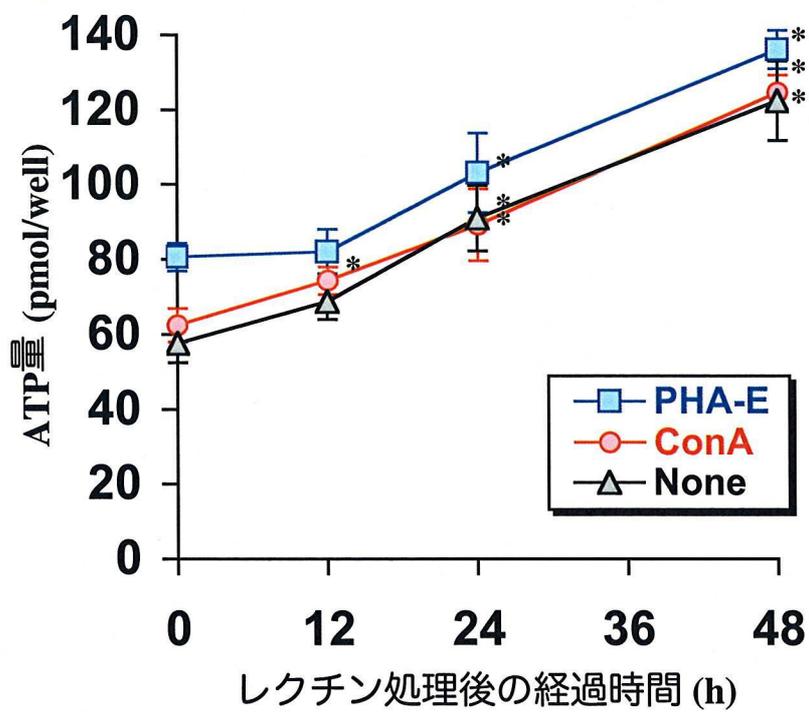


図 24 レクチン処理後の細胞増殖 (MSC) に対する影響

* は、それぞれの 0h での ATP 量との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められたものを示す。

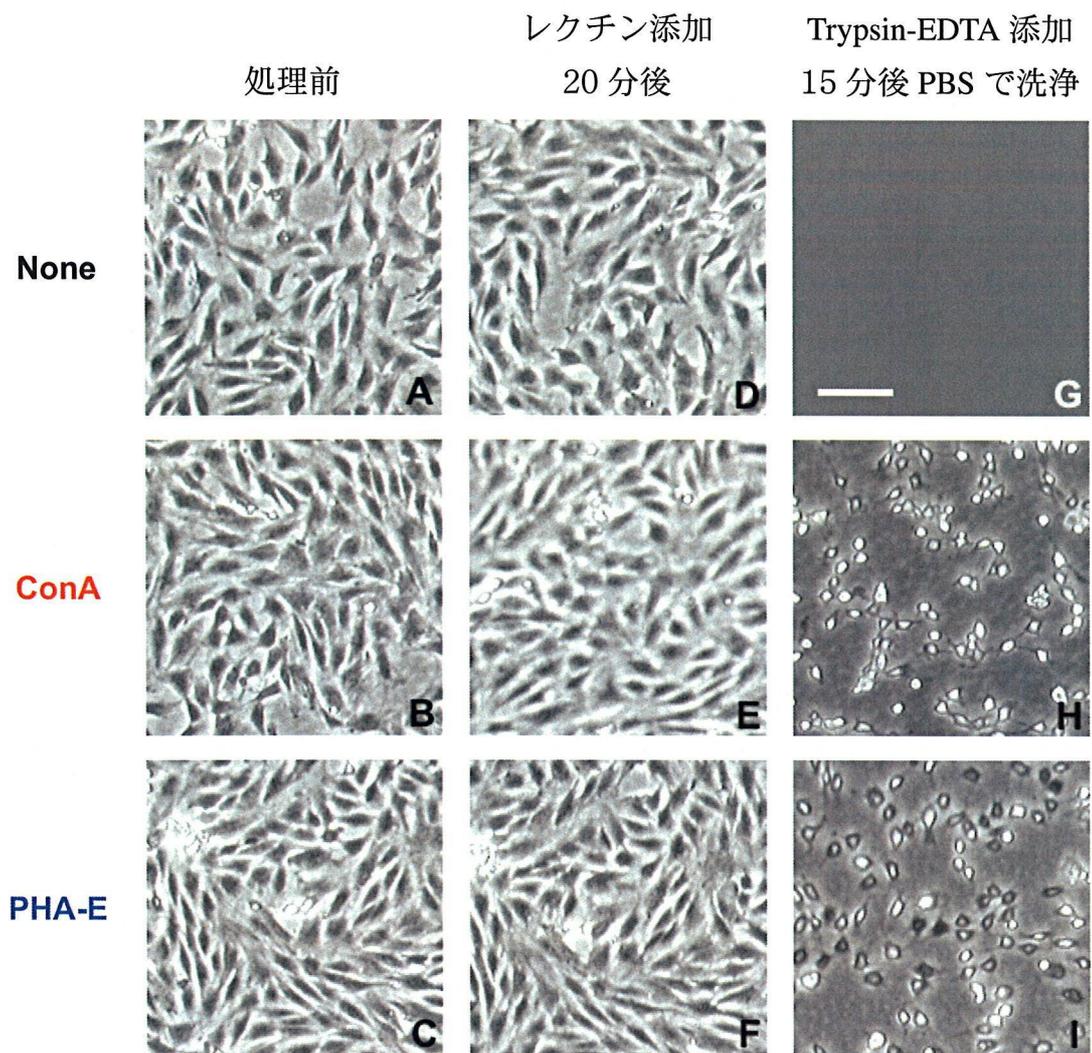


図 25 レクチン及び Trypsin-EDTA 処理後の細胞形態 (MSC) に与える影響
位相差顕微鏡写真
Bar = 100 μ m

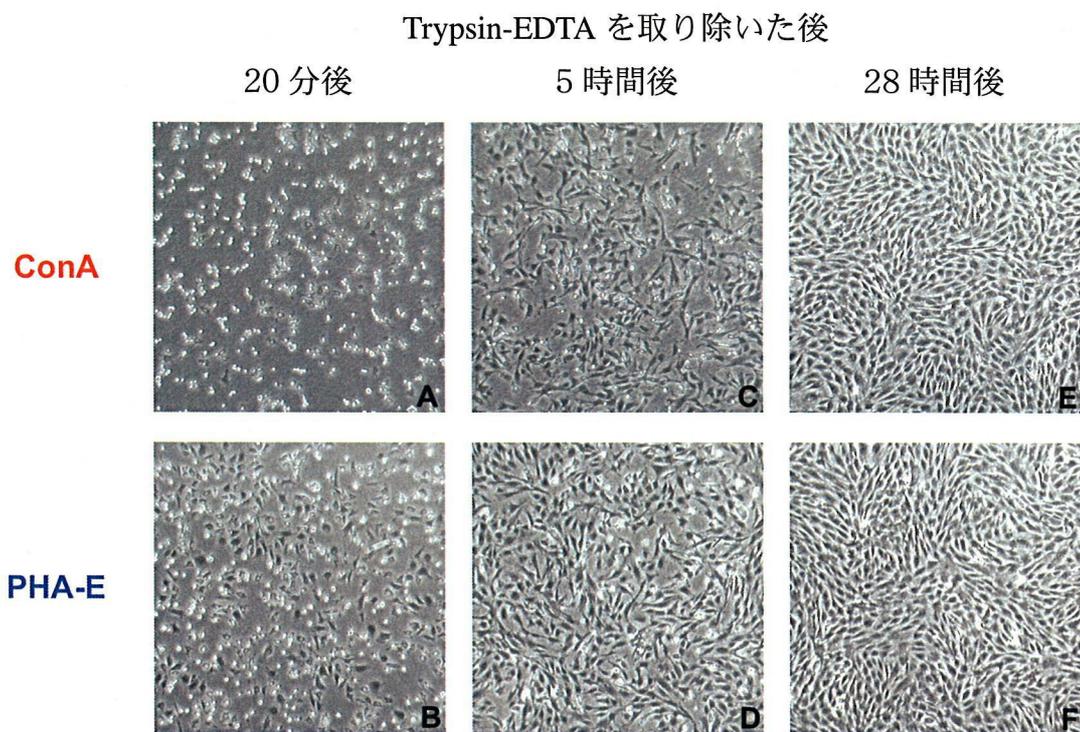


図 26 Trypsin-EDTA 処理後の細胞形態の回復及び増殖
位相差顕微鏡写真 (MSC)

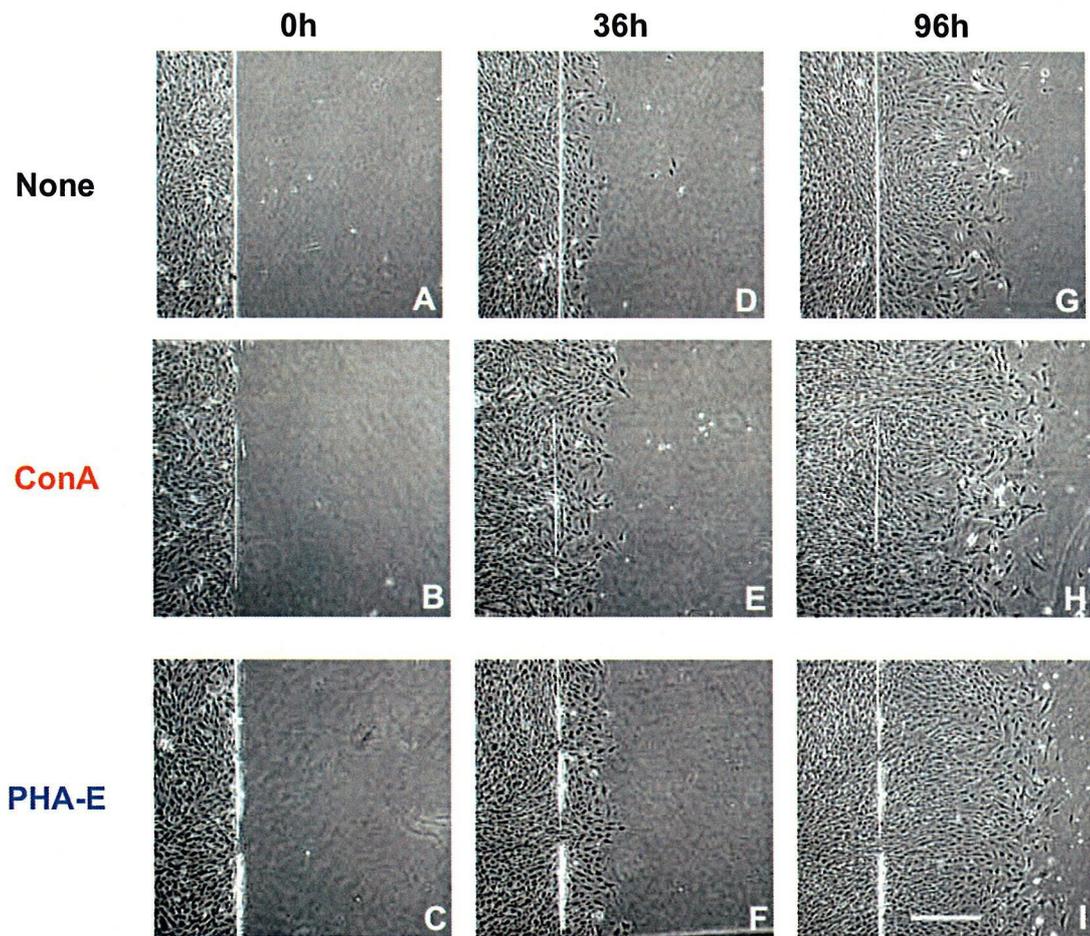


図 27 位相差顕微鏡写真 (MSC)
 培養後 0, 36, 96 時間のみ状態を示す Bar = 500 μ m

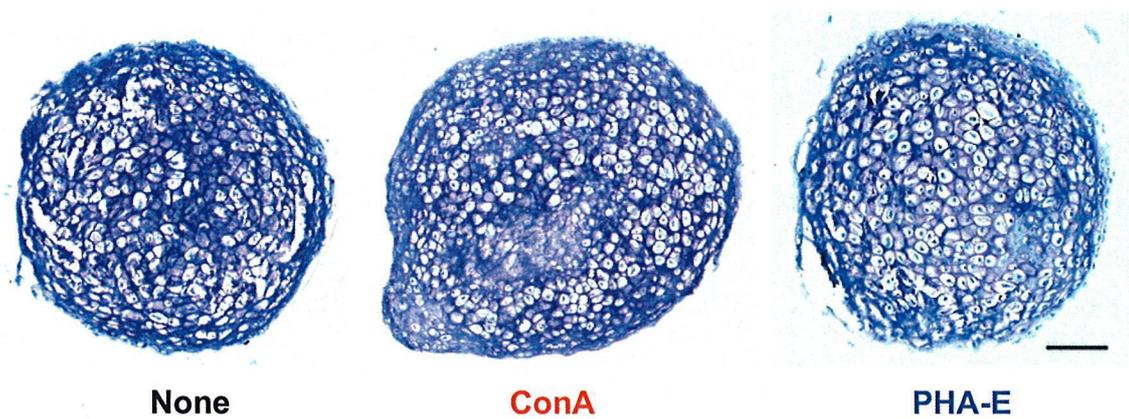


図 28 軟骨誘導組織切片像 トルイジンプルー染色 Bar = 100 μ m

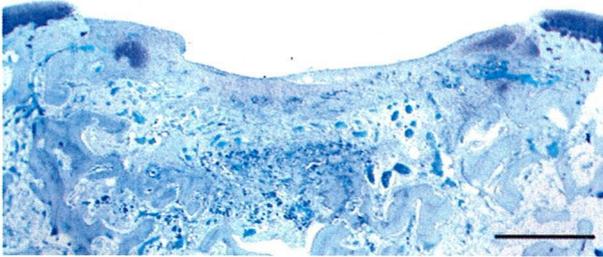
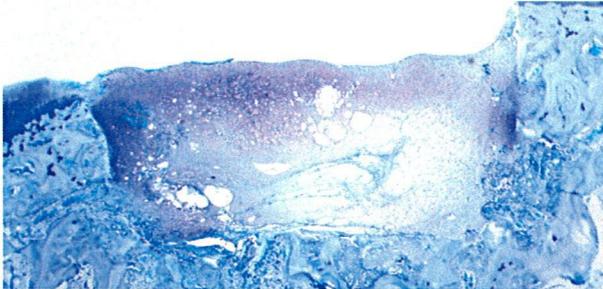
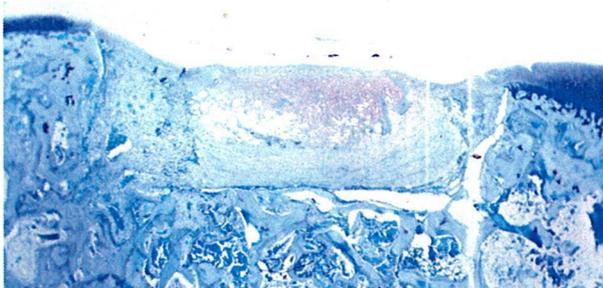
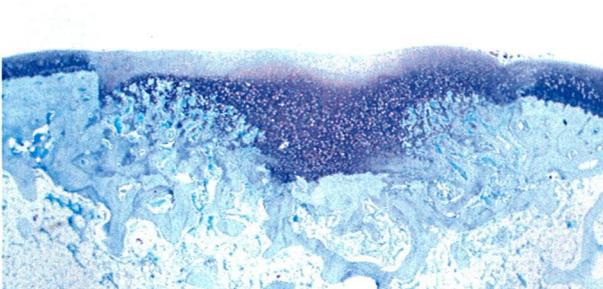
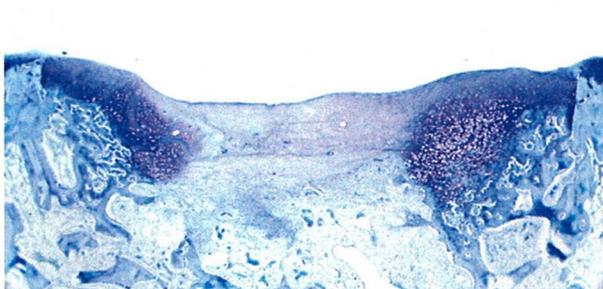
複合体構成	組織切片像	Wakitani Score
①何ものなし		8.7 ± 2.08 (n = 3)
②コラーゲンのみ		6.7 ± 3.14 (n = 6)
③コラーゲン + ConA		7.0 ± 2.28 (n = 6)
④コラーゲン + MSC		6.8 ± 4.87 (n = 5)
⑤コラーゲン + MSC + ConA		6.7 ± 2.98 (n = 7)

図 29 膝関節組織切片像 トルイジンブルー染色 Bar = 1mm

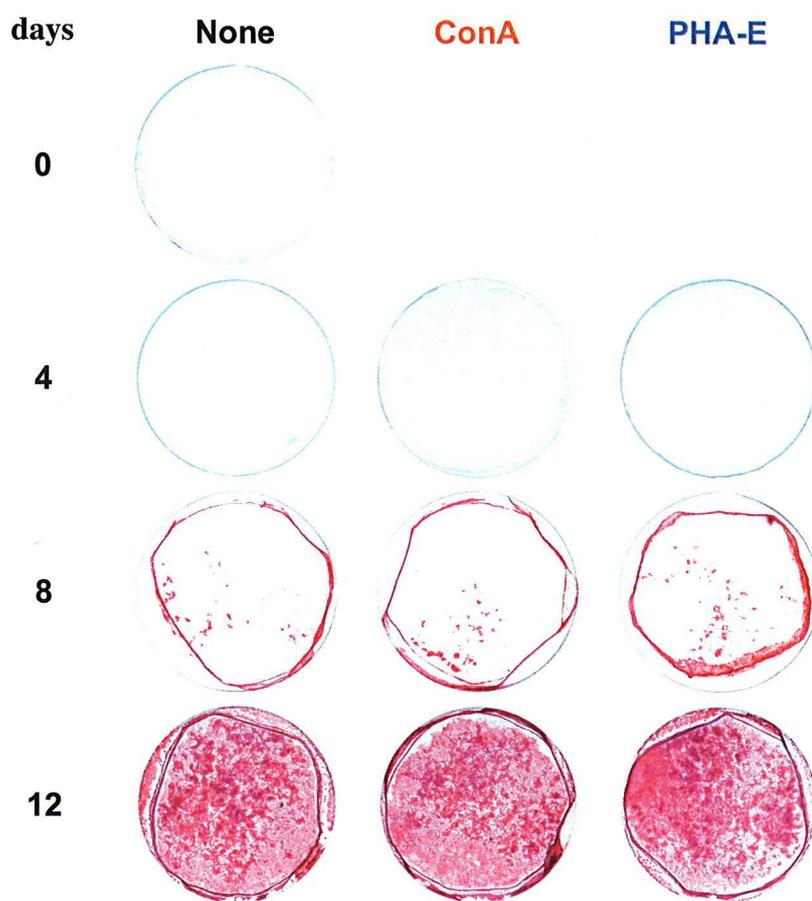


図 30 アリザリンレッド染色

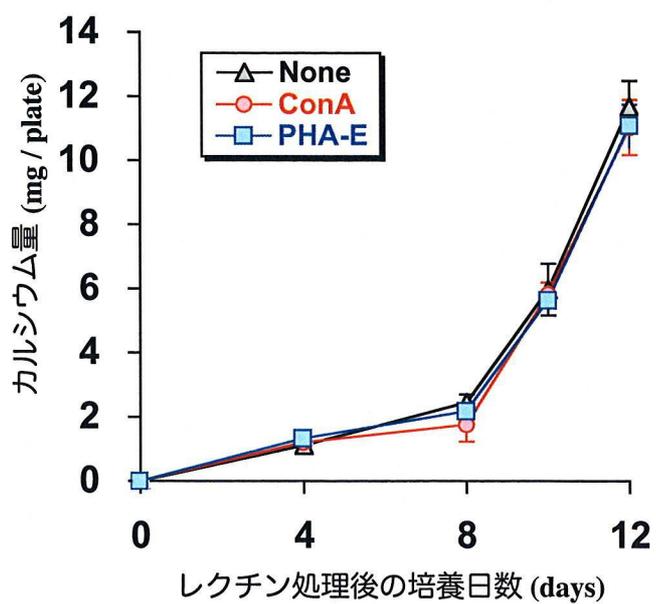


図 31 カルシウム量の経時変化

第3章 接着力強化の機構の解明

I. 緒言

レクチンによる接着力強化の機構は不明だが、以下の仮説が考えられる。

仮説1. プロテアーゼ阻害剤として作用する

レクチンがプロテアーゼに直接結合あるいは凝集させることで、酵素の機能を阻害する。またはレクチンが、細胞接着分子のプロテアーゼによる切断部位に競合して接着することで、プロテアーゼから保護する役割を果たす可能性がある。

仮説2. 特異的な糖を認識して細胞と結合し接着力を強化する

レクチンは糖結合性タンパク質であるが、レクチン処理によって得られる接着力強化効果は、特異的な糖タンパクを認識し結合することで起こる現象である可能性がある。

仮説3. 細胞表面上にレクチンが存続することで接着力を強化する

レクチンが、細胞表面の特異的な糖を認識して結合しているならば、レクチンが細胞表面上に存在し続けることが、細胞接着力強化に必要である可能性がある。

仮説 4. 細胞骨格のリモデリングを促進して、あるいは新たな接着分子を誘導して接着力を強化する

細胞接着は増殖や分化、生存にも影響することが明らかになりつつあり[2, 3], 細胞表面上で細胞接着性タンパク質が多数結合してクラスター化した接着斑を起点に、細胞質内で複雑なシグナリング経路が活性化される。また接着斑の裏側に細胞骨格分子が結合して細胞接着構造を細胞内から支えている。これによって細胞構造の維持や細胞運動を可能にしている[7, 9, 15, 25, 81] (図 32)。

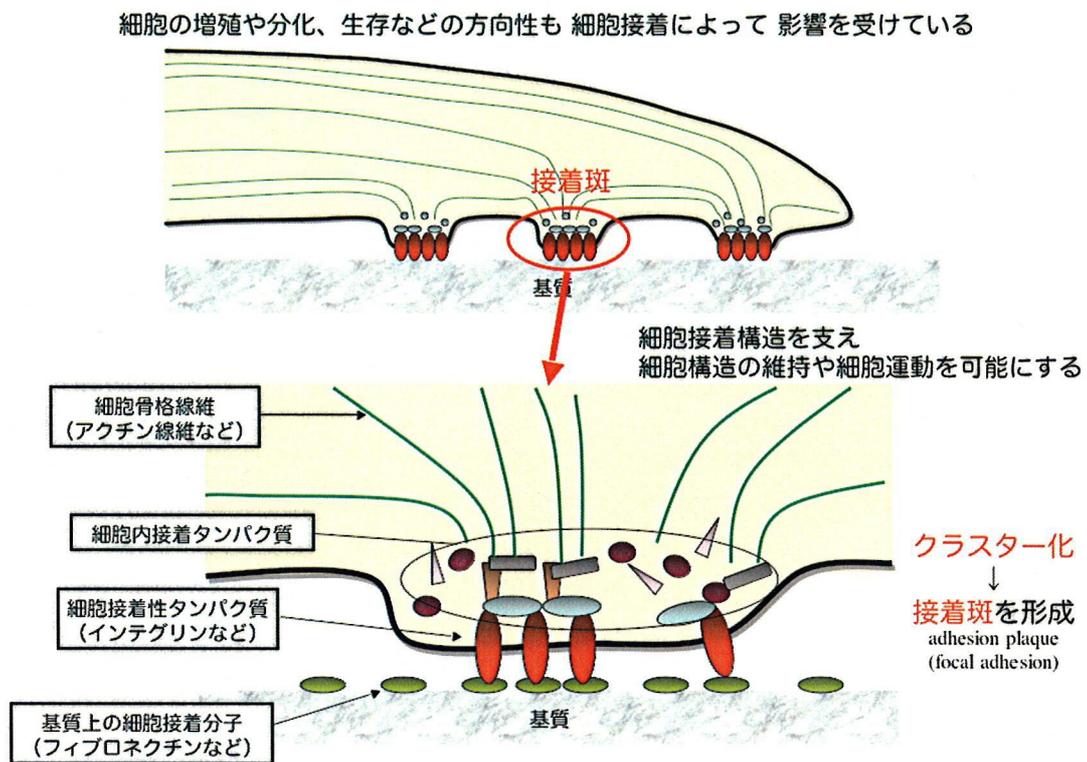


図 32 細胞接着過程と接着斑を構成するタンパク

また細胞膜上では、接着性タンパク質などの糖タンパク質だけではなく、マイクロドメインまたはラフトと呼ばれる糖脂質やコレステロールがクラスター化したものが局在している[13, 14, 20-24]. マイクロドメインには、糖タンパク質が集合したのも存在し、これらマイクロドメインを介して、膜タンパク質の機能の支持や、細胞内シグナル伝達、細胞接着、増殖、分化への関与が報告されている. このようなクラスター化が、細胞の生理活性の発現に関わっている[2, 3, 9, 10, 15-19, 25] (図 33).

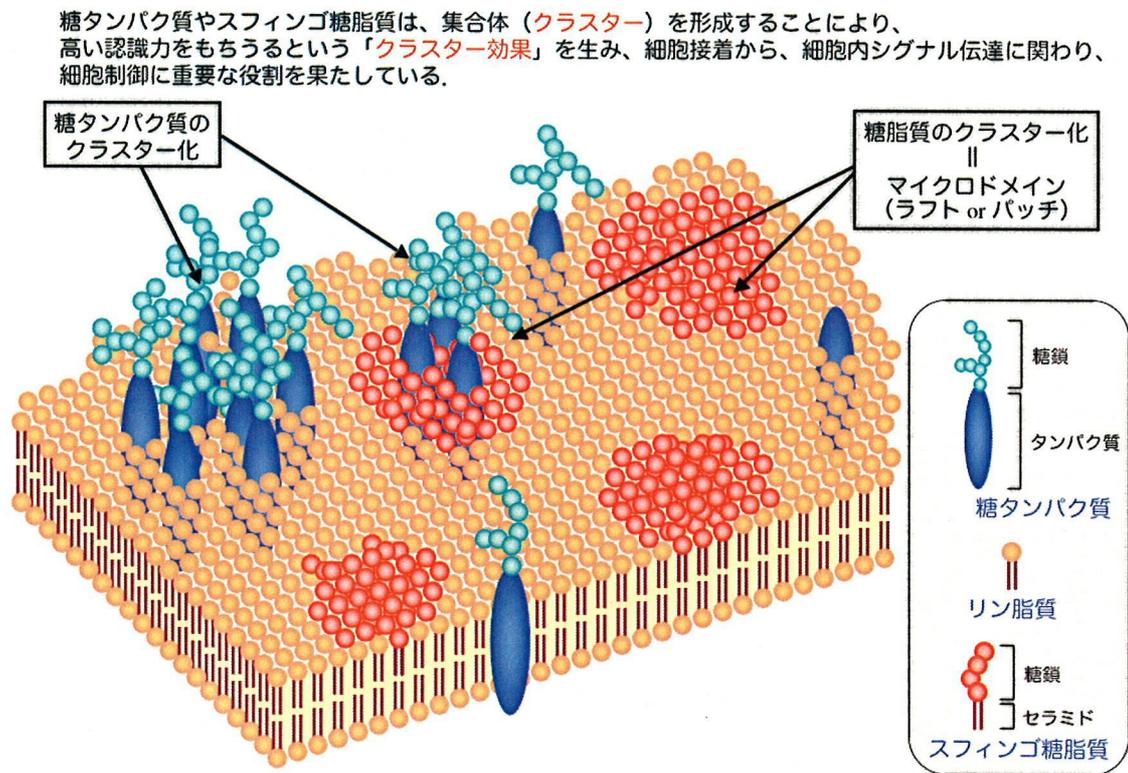


図 33 細胞表面におけるスフィンゴ糖脂質と糖タンパク質の分布状態

レクチンを細胞に添加すると、レクチンは細胞表面レセプターに均等に結合し、数分のうちに凝集してパッチを形成することがわかっている[26]。このパッチが、マイクロドメインや接着斑を形成する糖鎖を持った分子に結合してできたクラスターである可能性は高い。またこのパッチ形成後に細胞骨格であるマイクロフィラメントと結びつき、細胞の一方に集まる「キャップ形成」という現象が起こり、接着力が増大する可能性がある。(図 34) また、レクチンが細胞表面に付着することで、何らかのシグナルが生じるとタンパク合成を誘導し接着分子の産生を導く可能性がある。

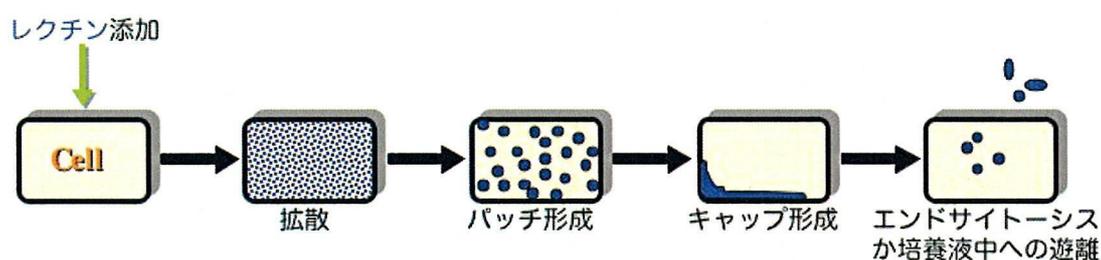


図 34 細胞表面におけるレクチンレセプターの挙動

本節では上記の 4 つの仮説を検証した。

II. 材料ならびに方法

仮説 1. の検討

細胞にレクチン処理を行ってから Trypsin-EDTA を添加したものと、はじめにレクチン処理を行わないで直接 Trypsin-EDTA にレクチンを混合した溶液を添加したものについて、細胞残存率を求めた。

仮説 2. の検討

90% コンフルエントまで培養した rabbit MSC に 40mM methyl α -D-mannopyranoside (MeMan) (SIGMA) を添加直後に 20 μ g/ml ConA あるいは 10 μ g/ml PHA-E を加えて 20 分間処理し, PBS で余剰なレクチンを洗浄した後, Trypsin-EDTA で 15 分間処置し, 剥離した細胞数を計測した.

仮説 3. の検討

1) MeMan 添加後の細胞表面上の残存 ConA 量の定量

96 穴カルチャープレートにて, 90% コンフルエントまで培養した rabbit MSC に 10 μ g/ml biotin-labeled ConA を加えて 20 分間インキュベートした後, PBS で余剰なレクチンを洗浄し, 1% FBS 含有 α -MEM および 40mM MeMan を添加した 1% FBS 含有 α -MEM にて培養した. レクチン処理後 0~6 時間の間で培養液を抜き PBS で洗浄後, 50 μ l の 0.5mU/ μ l Streptavidin 含有 PBS (β -Galactosidase 標識) にて 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした. PBS にて洗浄後, 1.33mg/ml ONPG 含有 2mM MgCl₂, および 100mM β -mercaptoethanol 含有 200mM sodium phosphate buffer を 50 μ l, PBS を 50 μ l 加えて, 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした. その後 1M sodium carbonate を 150 μ l 加えて反応を止め, Multiwell Spectrophotometer にて吸光度を測定した. 測定後, カルチャープレートと細胞表面上に付着したストレプトアビジンによる発色分は補正した.

2) MeMan 添加後の Trypsin-EDTA 耐性効果の評価

90% コンフルエントまで培養した rabbit MSC に 20 μ g/ml ConA で 20 分間処理した後, PBS で余剰なレクチンを洗浄し, 1% FBS 含有 α -MEM 培地に, 40mM MeMan を添加して培養した. レクチン処理後 0~6 時間の間で Trypsin-EDTA で 15 分間処置し, 剥離した細胞数を計測した.

仮説 4. の検討

1) 細胞骨格形成阻害剤およびタンパク合成阻害剤の影響の評価

MSC をマイクロフィラメントの形成阻害剤 (10 μ g/ml cytochalasin B (Sigma)) あるいは微小管 (microtubule) の重合阻害剤 (10 μ M colchicine (Sigma)) を含有する 10% FBS 含有 α -MEM 培地中で[82], 24 時間インキュベート後レクチン処理を行い, Trypsin-EDTA で 15 分間処置し, 剥離した細胞数を計測した.

同様にタンパク合成阻害剤 (10 μ g/ml cycloheximide (Sigma)) で 3.5 時間前処理した後レクチン処理を行い, Trypsin-EDTA で 15 分間処置し, 剥離した細胞数を計測した.

2) 接着斑形成及びアクチン線維の走行の観察方法

チャンバーカバーガラス上に細胞を播種し 20 分間レクチン処理を行った後, PBS で洗浄, 4% ホルムアルデヒド含有 PBS で 10 分間固定し, 0.25% triton X-100 含有 PBS で 10 分間処理し, 1% BSA 含有 PBS にて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間ブロッキングを行った. その後, 2units/ml rhodamine phalloidin 含有 PBS にて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間アクチン線維を染色し, さらに一次抗体として 1 : 400 希釈 monoclonal anti-human vinculin clone hVIN-1 mouse ascites fluid (SIGMA), 二次抗体として 1 : 100 希釈ウサギ anti-mouse IgG (Whole molecule) FITC conjugate IgG (SIGMA) 含有 PBS にてそれぞれ 37 $^{\circ}$ C で 30 分間処理し, ビンキュリンを染色したものを Conforcal Laser Scanning Microscope にて, アクチン (ローダミン) は 543nm の励起光で観察し, ビンキュリン (FITC) は 488nm のアルゴンレーザーで励起させ観察した.

3) レクチン処理による Trypsin-EDTA 処置後の細胞形態の観察

ハイドロキシアパタイト上に細胞を播種し 20 分間レクチン処理を行った後, Trypsin-EDTA で 15 分間インキュベートした. その後, 4% ホルムアルデヒド含有 PBS で 10 分間固定し, 0.25% triton X-100 含有 PBS で 10 分間処理, 2units/ml rhodamine phalloidin 含有 PBS にて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間アクチン線維を染色し, Conforcal Laser Scanning Microscope にて観察した.

III. 結果

1. プロテアーゼ阻害剤として作用する可能性について

レクチン前処理した MSC は、ここまでの結果通り、耐プロテアーゼ能を得た。しかしレクチン処理を行わず、Trypsin-EDTA にレクチンを混合した溶液を添加した場合、細胞は完全に剥離した（表 2）。

2. 特異的な糖を認識して細胞と結合するか否かについて

PHA-E のハプテン糖は、bisecting N-acetyl-D-glucosamine であるため[83]、MeMan を添加しても PHA-E の Trypsin-EDTA 耐性効果は依然として存続した（図 35）。しかし ConA の Trypsin-EDTA 耐性誘導作用は、MeMan の添加によって消失した。

3. 細胞表面上にレクチンが存続する必要性について

細胞・担体複合体に接着した ConA は、MeMan を添加しない場合、細胞表面上から徐々に消失するのに対し、MeMan を添加した場合には 60 分後に、ほぼ除去された（図 36 左軸）。一方、MeMan を添加しない場合、Trypsin-EDTA 耐性効果は経時的に減少するが、6 時間後でも約 60%の細胞残存率を維持した（図 36 右軸）。しかし、MeMan を添加した場合は、添加後 60 分後より Trypsin-EDTA 耐性効果は消失した。この ConA の残存率と細胞残存率には、有意な相関関係があった（図 37）。

4. 細胞骨格のリモデリングを促進して、あるいは新たな接着分子を誘導しているか否かについて

細胞骨格形成阻害剤やタンパク合成阻害剤では、レクチンの Trypsin-EDTA

耐性誘導作用を阻害しなかった (表 3)。

また、レクチン処理後の接着斑形成の様子をビンキュリンのクラスター化にて観察し、さらにアクチン線維の走行を観察したが、変化は観察されなかった (図 38)。さらに、レクチン処理した細胞の、Trypsin-EDTA 処置後の細胞形態を観察すると形態が球状に近づいているものの、細い細胞突起が放射線状に広がっていた (図 39)。一方、Trypsin-EDTA 処理したレクチン非処理細胞は細胞突起が消失していた。

IV. 考察

4 つの仮説を検討した結果、レクチンはプロテアーゼ活性を直接阻害しないこと。レクチンによる細胞接着力強化作用は、レクチンが特異的な糖を認識し結合することで起こること。また、細胞表面上より ConA が取り除かれたことで細胞接着力強化効果が速やかに低下することから、この効果は細胞表面上にレクチンが存在することが必要であることが示唆された。そしてレクチン添加によるキャップ形成や新たなタンパク合成は数時間を必要とするのに対し、今回の細胞接着力強化は、レクチンの約 20 分間という短時間での処理により得られたことから、また接着斑形成状態とアクチン線維の走行状態からみても、細胞接着力強化は、細胞骨格のリモデリングまたは新たなタンパク合成を介していないことが示唆された。しかし、レクチンの細胞表面への付着により、シグナル伝達系が活性化される可能性や、細胞接着力強化へのパッチ形成の役割については未だ不明である。

今回得られた結果より、レクチンそのものが特異的な糖を認識し、細胞表面上に存在することによって、接着力強化作用をもたらしたことから、この効果は、レクチンが細胞膜上の糖タンパクあるいは糖脂質と結合してマイクロドメイン内での糖タンパク/糖脂質のクラスター化を介して、細胞と担体の強固な接着を引き起こすのではないかと考えられる。

表2 レクチンの Trypsin-EDTA に対する影響 (MSC 培養系)

レクチン処理 (20min)	Trypsin-EDTA処理 (15min)	細胞残存率 (%)
None	Trypsin-EDTA only	0
None	ConA + Trypsin-EDTA	0
None	PHA-E + Trypsin-EDTA	0
ConA	Trypsin-EDTA only	88 ± 1.12
PHA-E	Trypsin-EDTA only	93 ± 0.69

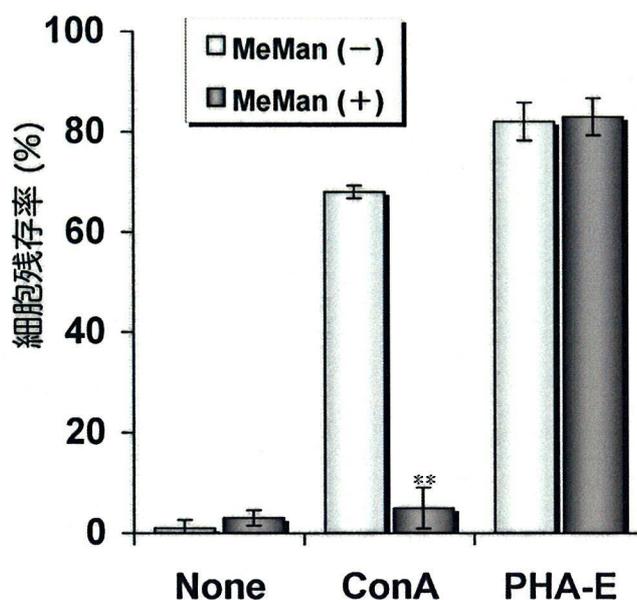


図 35 ConA のハプテン糖添加による Trypsin-EDTA 耐性効果に与える影響 (MSC 培養系)

**は、MeMan を添加しない ConA の細胞残存率との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す。

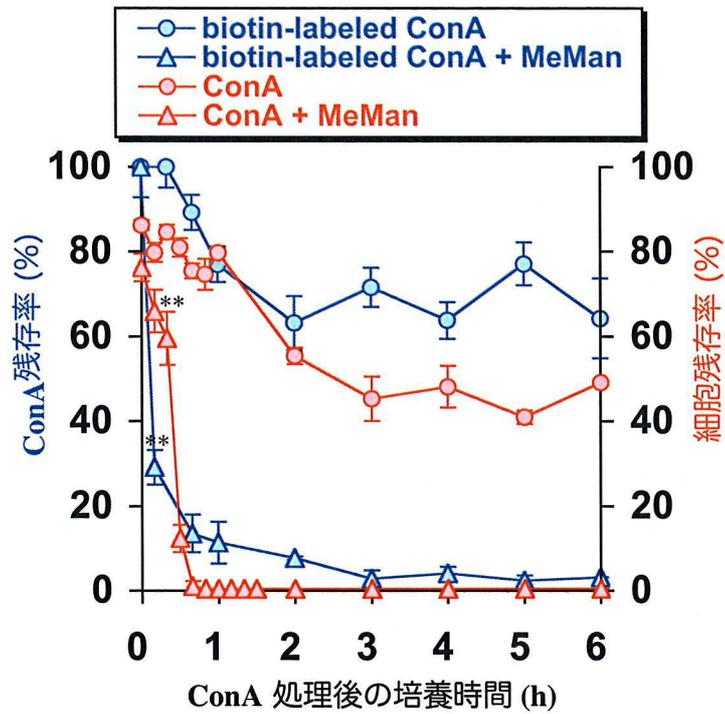


図 36 ConA の残存と Trypsin-EDTA 耐性効果の関係 (MSC 培養系)
 **は, MeMan を添加しない ConA の残存率, あるいは細胞残存率との間に
 有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを示す.

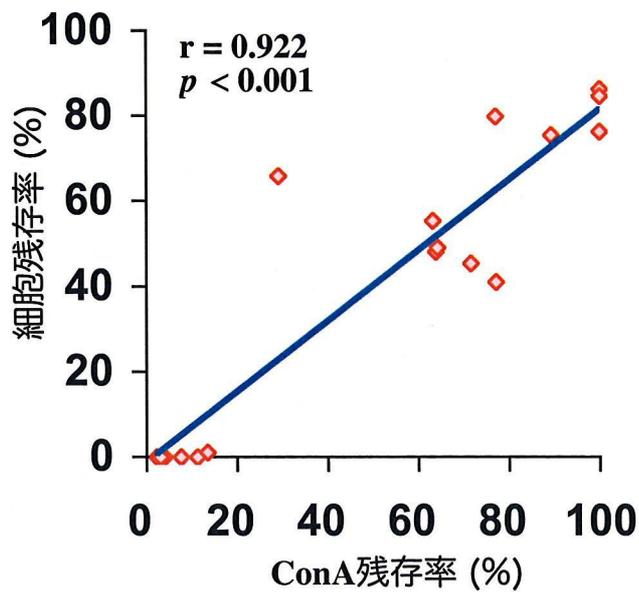


図 37 ConA の残存率と Trypsin-EDTA 処理後の細胞残存率との相関

表3 タンパク合成阻害剤 及び キャップ形成阻害剤の
レクチン処理による Trypsin-EDTA 耐性効果への影響 (MSC 培養系)

		細胞残存率 (%)		
		None	ConA	PHA-E
Cytochalasin B	-	0	85 ±4	90 ±2
	+	13 ±7	94 ±1	95 ±1
Colchicine	-	0	85 ±4	90 ±2
	+	10 ±15	78 ±2	91 ±3
Cycloheximide	-	0	89 ±2	89 ±3
	+	0	92 ±2	89 ±5

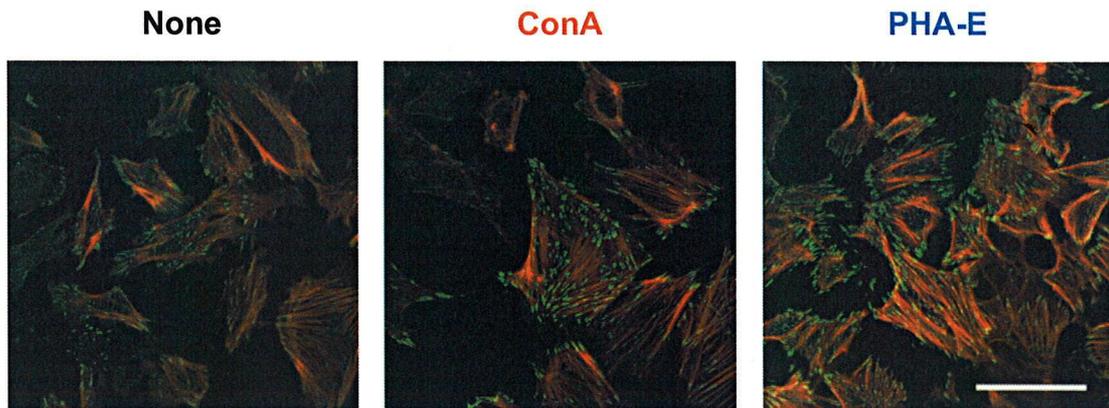


図 38 レクチン処理による接着斑形成及びアクチン線維の走行
共焦点レーザー顕微鏡写真 (MSC)
ビンキュリンは緑色, アクチンは赤色
Bar = 100 μ m

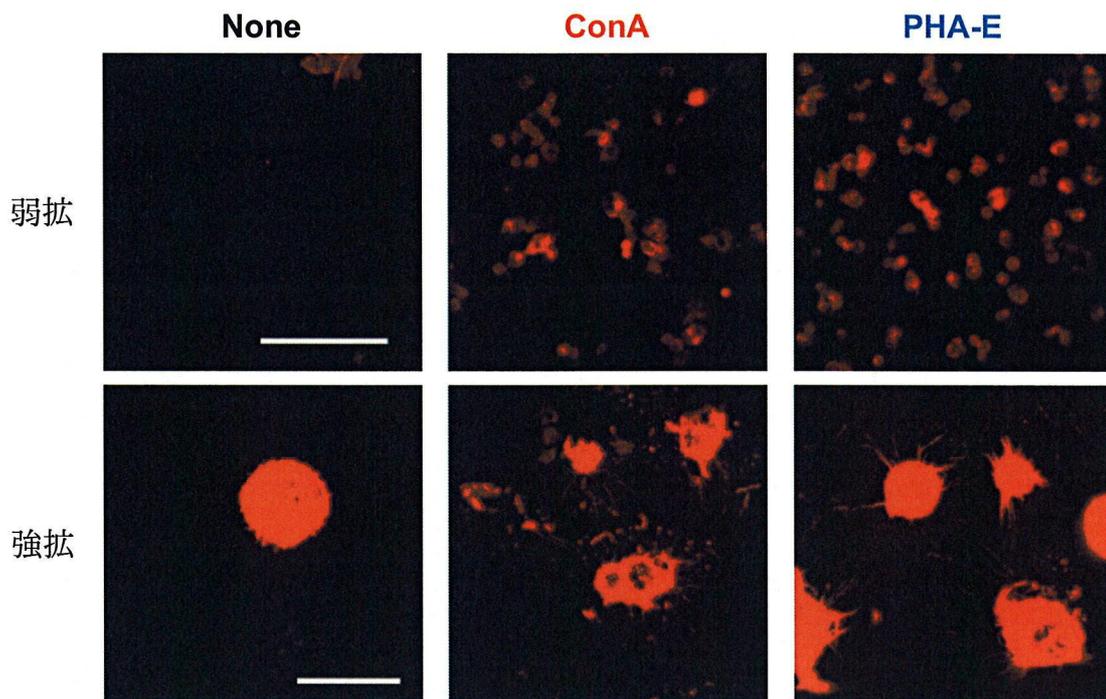


図 39 レクチン処理による Trypsin-EDTA 処置後の細胞形態
共焦点レーザー顕微鏡写真 (MSC)
弱拵 Bar = 250 μ m, 強拵 Bar = 50 μ m,

第4章 臨床応用について

I. レクチンの使用法と臨床応用について

1. レクチンの使用法

担体に細胞を付着促進させる目的でレクチンを使用する際は、細胞懸濁液中にレクチンを直接添加すると、細胞同士がお互いに結合しあって凝集し (aggregation), 担体への付着が逆に阻害される[82]. 従って、レクチンの有効な使用法としては、

- ①担体をレクチンで前処理することにより、細胞の初期付着・伸展を促進し、かつ細胞の接着力を強化させる。
 - ②担体へ細胞を接着させ、必要に応じて増殖・分化させた後、細胞に対してレクチンを添加することにより、接着力を強化させる。
- という2種類の使用法が考えられる。

2. 臨床応用の可能性

現在、失われた生体機能を補うあるいは回復させるために、医科と歯科において、人工材料であるインプラントを用いた医療が行われている。チタンなどの金属を用いた人工関節に対しても[36-43, 84], レクチンの応用が期待できる。特に歯科用インプラントに限って述べれば、メーカー独自の形態にもよるが、既存のスクリュータイプのインプラントやシリンダータイプ、また抜歯窩に直接埋入するタイプのインプラント法においては、インプラント体と抜歯窩（埋入窩）との間にかなりの隙間がある。従って表面に細胞を付着させレクチン処理したインプラントの移植は、隙間を埋めより早いオッセオインテグレーションを得るために有効と考えられる。また、チタンインプラント体表面にハイドロキシアパタイトをコーティングしているものにもレクチンの応用が可能である。またハイドロキシアパタイトビーズや β -TCPなどの骨補填剤にレクチン処理を施しMSCを接着させた細胞・担体複合体を用いて、骨の欠損部位を埋めることや、インプラントを移植する際に不足した骨欠損部位、あるいはサイナスリフト（上顎洞底挙上術）などにこれらを使用することが考えられる。

II. レクチンの生体に与える影響（生物活性）について

レクチン自体が生体に与える影響はいくつか報告されている[27, 64, 65]. レクチンは動物の赤血球を凝集することから発見されたタンパク質であることから、細胞凝集反応を起こす。これによりいくつかの弊害が考えられる。ただし、ConA に関しては、イヌ、ネコ、ラットなどの比較的下等な動物の赤血球は凝集させるが、ヒトやウシの赤血球に対しては凝集させない[85, 86]. またレクチンはリンパ球のマイトジェンとしてよく知られている。またレクチンが存在する場合、細胞障害性 T リンパ球は抗原性に無関係に細胞を攻撃対象とする（レクチン依存性細胞障害作用）。さらに、ConA と WGA はインスリンレセプターに結合できるため、インスリンの生物活性を模倣する。このため生体のホルモンバランスを変えてしまう可能性がある。一方、今回用いた植物レクチンはマメ科のレクチンであり、当然食物として経口摂取される。経口摂取されたレクチンが腸粘膜表面に付着することにより、栄養吸収を阻害したり、弱いアレルギーなどを起こすことがある。しかし、これらの障害は大量に経口摂取した場合のみに認められ、逆に少量の摂取の場合には、消化吸収を促進し、免疫系などに良い影響を与え、全体の代謝に有利な結果をもたらす。今回のレクチン作用を臨床に応用するには、レクチンを生体に直接添加する方法は避けたい。またレクチンは、10~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と低濃度を用いる。さらにレクチン処理した後、細胞に付着しなかった余剰なレクチンは除去するため、実際に細胞表面に残存している量はごくわずかであり、上述した生体に与える影響は少ないと考えられる。

第5章 総括

再生医療を行うにあたって、細胞の担体への付着や移植の段階において、細胞と担体との強固な接着を確立することが必要である。そこで本研究では、炎症部位を想定してプロテアーゼ存在下、あるいはメカニカルストレス下で、MSCの担体（生体材料）への接着力を強化する方法を検討して、以下の結果を得た。

1. ConA あるいは PHA-E を添加した MSC は、trypsin, dispase, pronase E などのプロテアーゼおよびメカニカルストレスに対して抵抗性を示した。一方フィブロネクチンと I 型コラーゲンは、プロテアーゼ存在下で細胞接着力強化作用を示さなかった。
2. レクチンのプロテアーゼ/メカニカルストレスに対する耐性誘導作用は、MSC だけではなく、骨芽細胞や軟骨細胞を含む検討した全ての細胞で観察された。
3. ConA と PHA-E は、チタン、ハイドロキシアパタイト、PLGA などの担体への細胞接着を強化するのにも有効であった。
4. ConA と PHA-E は、細胞の初期付着・伸展を促進させ、縦置き担体の壁面への均一な細胞付着を得るのに有効であった。
5. ConA と PHA-E の作用は、過剰なレクチンを洗浄した後も、18~34 時間持続したが、細胞増殖、細胞形態、細胞運動には影響せず、軟骨・骨分化に対しても阻害しなかった。
6. ConA と PHA-E の細胞接着力強化作用は、新規のタンパク合成や細胞骨格のリモデリングを必要としなかった。また ConA は特異的な糖を認識して細胞表面に存続することが接着力強化に必須であった。

以上、強固な細胞・担体複合体を作製するために、レクチンは有効な処理方法であることが判明した。従って細胞治療（再生医療）や組織工学にこのレク

チンの新しい作用が有用であると考えられる。さらに，本研究結果は，細胞接着機構を理解するためにも役立つと期待される。

参考文献

1. 加藤 幸夫, 堤 真一, 原 真依子, 小池 千加, 松原 全宏, 辻 紘一郎 (2003). I. 自家間葉系幹細胞の移植による骨, 軟骨, 歯周組織の再生医療. *THE BONE* **17**, 17-20.
2. Masserini, M., Ravasi, D., and Sonnino, S. (2001). Role of glycosphingolipids in formation and function of membrane microdomains. *Trends Glycosci Glycotechnol* **13**, 239-250.
3. 木岡 紀幸 (2002). 細胞膜裏打ちタンパク質による細胞接着/細胞骨格とシグナル伝達の制御. *実験医学* **20**, 113-117.
4. Bhati, R. S., Mukherjee, D. P., McCarthy, K. J., Rogers, S. H., Smith, D. F., and Shalaby, S. W. (2001). The growth of chondrocytes into a fibronectin-coated biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res* **56**, 74-82.
5. El-Ghannam, A., Starr, L., and Jones, J. (1998). Laminin-5 coating enhances epithelial cell attachment, spreading, and hemidesmosome assembly on Ti-6Al-4V implant material in vitro. *J Biomed Mater Res* **41**, 30-40.
6. Jeschke, B., Meyer, J., Jonczyk, A., Kessler, H., Adamietz, P., Meenen, N. M., Kantlehner, M., Goepfert, C., and Nies, B. (2002). RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. *Biomaterials* **23**, 3455-3463.
7. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2001). 分子細胞生物学 (下), 第4版, 東京化学同人
8. 林 正男 著 (2001). 新細胞接着分子の世界. 実験医学バイオサイエンス, 羊土社

9. Dráber, P., Dráberová, L., Kovářová, M., Hálová, I., Tolar, P., Černá, H., and Boubelík, M. (2001). Lipid Rafts and Their Role in Signal Transduction - Mast Cells as a Model. *Trends Glycosci Glycotechnol* **13**, 261-279.
10. Kasahara, K., and Sanai, Y. (2001). Functional roles of glycoconjugates in signal transduction via lipid rafts. *Trends Glycosci Glycotechnol* **13**, 251-259.
11. Hakomori, S. I. (2000). Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconj J* **17**, 143-151.
12. Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S., and Prinetti, A. (1998). New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain," a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. *Glycobiology* **8**, xi-xix.
13. Hakomori, S. (2001). Membrane microdomains defining cell adhesion and signaling. *Trends Glycosci Glycotechnol* **13**, 219-230.
14. Yokoyama, M., Inokuchi, J., and Kitajima, K. (2001). Preface for the special issue entitled "Roles of carbohydrate chains in formation and function of membrane microdomains". *Trends Glycosci Glycotechnol* **13**, 217-218.
15. 入村 達郎 (2002). 動物界における免疫系の進化 免疫系細胞表面のレクチンの進化と多様性. *医学の歩み* **200**, 969-974.
16. 尾野 雅哉 (2002). 糖鎖ドメインと癌. *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 365-370.
17. 笠原 浩二, 佐内 豊, 中村 京子, 橋本 康弘 (2001). 糖脂質分子集積, ラフトと細胞機能. *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 812-820.

18. Kojima, N. (1999). GLYCOTOPIC Glycosphingolipid-microdomain involved in cell adhesion coupled with signal transduction. *Trends Glycosci Glycotechnol* **11**, 35-36.
19. 鈴木 明身, 五十嵐 靖之 (2002). 総論：マイクロドメイン (ラフト) 概念の誕生と研究の新展開. *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 315-320.
20. 永福 正和, 小杉 厚 (2002). T細胞膜ラフトーその構造と機能ー. *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 385-393.
21. 新倉 謙一, 西村 紳一郎 (2002). 機能化を目指した糖脂質クラスターの構築. *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 543-550.
22. Hakomori, S. (1986). Glycosphingolipids. *Sci Am* **254**, 44-53.
23. 箱守 仙一郎 (1994). 進展するスフィンゴ糖脂質の研究. 入村 達郎 編, *別冊日経サイエンス 糖鎖と細胞ー細胞認識と細胞交通を担う生体分子ー*, 日経サイエンス社, 20-29.
24. 深澤 征義, 西島 正弘, 花田 賢太郎 (2002). 変異細胞を用いた膜ドメイン解析ー生体膜ドメイン形成・維持におけるスフィンゴ糖脂質の重要性ー. *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 321-325.
25. 藤本 豊土, 向後 寛, 中村 典子, 尾関 慎太郎 (2002). マイクロドメインとカベオリシ. *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 326-332.
26. 大沢 利昭 編 (1985). *レクチンと細胞生物学*, 講談社サイエンティフィック
27. Lis, H., and Sharon, N. (1986). "The Lectins : Properties, functions, and applications in biology and medicine," Academic Press, Inc., Orlando.

28. Nakamasu, K., Kawamoto, T., Shen, M., Gotoh, O., Teramoto, M., Noshiro, M., and Kato, Y. (1999). Membrane-bound transferrin-like protein (MTf): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells. *Biochim Biophys Acta* **1447**, 258-264.
29. Oda, R., Suardita, K., Fujimoto, K., Pan, H., Yan, W., Shimazu, A., Shintani, H., and Kato, Y. (2003). Anti-membrane-bound transferrin-like protein antibodies induce cell-shape change and chondrocyte differentiation in the presence or absence of concanavalin A. *J Cell Sci* **116**, 2029-2038.
30. Suardita, K., Fujimoto, K., Oda, R., Shimazu, A., Miyazaki, K., Kawamoto, T., and Kato, Y. (2002). Effects of overexpression of membrane-bound transferrin-like protein (MTf) on chondrogenic differentiation in Vitro. *J Biol Chem* **277**, 48579-48586.
31. Yan, W. Q., Nakashima, K., Iwamoto, M., and Kato, Y. (1990). Stimulation by concanavalin A of cartilage-matrix proteoglycan synthesis in chondrocyte cultures. *J Biol Chem* **265**, 10125-10131.
32. Yan, W., Pan, H., Ishida, H., Nakashima, K., Suzuki, F., Nishimura, M., Jikko, A., Oda, R., and Kato, Y. (1997). Effects of concanavalin A on chondrocyte hypertrophy and matrix calcification. *J Biol Chem* **272**, 7833-7840.
33. Wlodarski, K. H. (1991). Bone histogenesis mediated by nonosteogenic cells. *Clin Orthop* **272**, 8-15.
34. Wlodarski, K. H., and Galus, K. (1992). Osteoblastic and chondroblastic response to a variety of locally administered immunomodulators in mice. *Folia Biol (Praha)* **38**, 284-292.
35. 鈴木 康夫 監訳 (2003). 第30章 植物レクチン. コールドスプリング
グハーバー 糖鎖生物学, 丸善株式会社, 367-377.

36. Albrektsson, T., Branemark, P. I., Hansson, H. A., and Lindstrom, J. (1981). Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* **52**, 155-170.
37. Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B., and Branemark, P. I. (1981). A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* **10**, 387-416.
38. Boyan, B. D., Schwartz, Z., and Hambleton, J. C. (1993). Response of bone and cartilage cells to biomaterials in vivo and in vitro. *J Oral Implantol* **19**, 116-122; discussion 136-117.
39. 今村 嘉宣 (2002). チタン合金「T-アロイタフ」(Ti-6Al-7Nb)の金属床義歯への応用. *日本歯科評論* **62**, 159-168.
40. 宮山 直也, 吉成 正雄, 小田 豊 (1999). ドライブプロセスによるインプラント用チタンの表面改質 —表面の特性評価—. *歯材器* **18**, 109-121.
41. 吉成 正雄, 田中 輝男 (1996). 生体材料の表面改質 —生体に優しい表面をめざして—. *日歯医師会誌* **49**, 17-28.
42. 吉成 正雄 (2000). チタンインプラントの表面改質. *DE* **134**, 1-4.
43. 吉成 正雄, 小田 豊, 井上 孝, 松坂 賢一, 下野 正基 (2002). ドライブプロセス法によるチタンの表面改質. *生体材料* **20**, 10-22.
44. Davies, J. E., Chernecky, R., Lowenberg, B., and Shiba, A. (1991). Deposition and resorption of calcified materix in vitro by rat marrow cells. *Cells and Materials* **1**, 3-15.

45. Maniatopoulos, C., Sodek, J., and Melcher, A. H. (1988). Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* **254**, 317-330.
46. Gospodarowicz, D., Mescher, A. L., and Birdwell, C. R. (1977). Stimulation of corneal endothelial cell proliferations in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp Eye Res* **25**, 75-89.
47. Kato, Y., and Gospodarowicz, D. (1985). Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor. *J Cell Biol* **100**, 477-485.
48. Kato, Y., and Gospodarowicz, D. (1985). Effect of exogenous extracellular matrices on proteoglycan synthesis by cultured rabbit costal chondrocytes. *J Cell Biol* **100**, 486-495.
49. Ohno, S., Doi, T., Fujimoto, K., Ijuin, C., Tanaka, N., Tanimoto, K., Honda, K., Nakahara, M., Kato, Y., and Tanne, K. (2002). RGD-CAP (betaig-h3) exerts a negative regulatory function on mineralization in the human periodontal ligament. *J Dent Res* **81**, 822-825.
50. Shiba, H., Uchida, Y., Kamihagi, K., Sakata, M., Fujita, T., Nakamura, S., Takemoto, T., Kato, Y., and Kurihara, H. (2001). Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res* **80**, 1653-1659.
51. Shimazu, A., Bachchu, M. A., Morishita, M., Noshiro, M., Kato, Y., and Iwamoto, Y. (1999). Expression of syndecan-2, -4, and fibroblast growth factor receptor type 1 in human periodontal ligament fibroblasts and down-regulation of these membrane proteins during maturation in culture. *J Dent Res* **78**, 1791-1799.

52. Yokose, S., Kadokura, H., Tajima, Y., Fujieda, K., Katayama, I., Matsuoka, T., and Katayama, T. (2000). Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif Tissue Int* **66**, 139-144.
53. Brewer, C. F. (1997). Cross-linking activities of galectins and other multivalent lectins. *Trends Glycosci Glycotechnol* **9**, 155-165.
54. Etzler, M. E. (1998). From structure to activity : New insights into the functions of legume lectins. *Trends Glycosci Glycotechnol* **10**, 247-255.
55. Gunther, G. R., Wang, J. L., Yahara, I., Cunningham, B. A., and Edelman, G. M. (1973). Concanavalin A derivatives with altered biological activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 1012-1016.
56. Hamelryck, T. W., Loris, R., Bouckaert, J., and Wyns, L. (1998). Structural features of the legume lectins. *Trends Glycosci Glycotechnol* **10**, 349-360.
57. Hirabayashi, J. (1996). GLYCOTOPIC A secret of ConA popularity, solved. *Trends Glycosci Glycotechnol* **8**, 217-218.
58. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* **331**, 889-895.
59. Caplan, A. I., Reuben, D., and Haynesworth, S. E. (1998). Cell-based tissue engineering therapies: the influence of whole body physiology. *Adv Drug Deliv Rev* **33**, 3-14.
60. Frosch, K. H., Sondergeld, I., Dresing, K., Rudy, T., Lohmann, C. H., Rabba, J., Schild, D., Breme, J., and Stuermer, K. M. (2003). Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. *J Orthop Res* **21**, 213-223.

61. Menasche, P., Hagege, A. A., Scorsin, M., Pouzet, B., Desnos, M., Duboc, D., Schwartz, K., Vilquin, J. T., and Marolleau, J. P. (2001). Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* **357**, 279-280.
62. Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., and Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* **344**, 385-386.
63. Shimomura, Y., Yoneda, T., and Suzuki, F. (1975). Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif Tissue Res* **19**, 179-187.
64. Puztai, A., and Bardocz, S. (1996). Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract : metabolic consequences and applications. *Trends Glycosci Glycotechnol* **8**, 149-165.
65. Puztai, A., Ewen, S. W. B., Grant, G., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., Rubio, L. A., and Bardocz, S. (1991). Plant(food)lectins as signal molecules : effects on the morphology and bacterial ecology of the small intestine. *Lectin Reviews* **1**, 1-15.
66. El-Ghannam, A., Ducheyne, P., and Shapiro, I. M. (1997). Porous bioactive glass and hydroxyapatite ceramic affect bone cell function in vitro along different time lines. *J Biomed Mater Res* **36**, 167-180.
67. Sammons, R. L., Sharpe, J., and Marquis, P. M. (1994). Use of enhanced chemiluminescence to quantify protein adsorption to calcium phosphate materials and microcarrier beads. *Biomaterials* **15**, 842-847.
68. 牧野 圭祐, 金 福煥, 堀尾 武一 (1997). 第5章 11 ヒドロキシアパタイトクロマト. 堀尾 武一 編, 蛋白質・酵素の基礎実験法 改訂第二版, 南山堂, 266-278.

69. Curtis, A. S. G., Forrester, J. V., and Clark, P. (1986). Substrate hydroxylation and cell adhesion. *J. Cell Sci.* **86**, 9-24.
70. Ertel, S. I., Chilkoti, A., Horbett, T. A., and Ratner, B. D. (1991). Endothelial cell growth on oxygen-containing films deposited by radio-frequency plasmas: the role of surface carbonyl groups. *J Biomater Sci Polym Ed* **3**, 163-183.
71. Ramsey, W. S., Hertl, W., Nowlan, E. D., and Binkowski, N. J. (1984). Surface treatments and cell attachment. *In Vitro* **20**, 802-808.
72. 荒 昌晴 (2002). 生体分解性材料を利用した抗菌剤の放出システムに関する研究 *歯材器* **21**, 49-61.
73. 岡野 光夫, 根岸 直樹, 桜井 靖久 (1988). 薬物送達システムー未来型人工臓器へのアプローチ. *人工臓器* **17**, 1639-1646.
74. 久保田 浩三, 越智 玲子, 柘植 優三, 内藤 徹, 林川 貴志, 日高 理智, 宗 洋一郎, 山本 博武, 岡田 隆雄 (1989). 生体内吸収性膜使用による歯周組織再生に関する実験的研究. *日歯周誌* **31**, 870-881.
75. 立石 哲也 (2000). 再生医工学とバイオ新素材 *蛋白質 核酸 酵素* **45**, 2639-2645.
76. 陳 国平, 牛田 多加志, 立石 哲也 (2000). 生体分解性複合スポンジ材料の開発と軟骨細胞の3次元培養への応用. *人工臓器* **29**, 463-467.
77. Rauvala, H., Carter, W. G., and Hakomori, S. I. (1981). Studies on cell adhesion and recognition. I. Extent and specificity of cell adhesion triggered by carbohydrate-reactive proteins (glycosidases and lectins) and by fibronectin. *J Cell Biol* **88**, 127-137.

78. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.
79. Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., Pan, H., Koike, C., Yoshida, E., Takagishi, K., and Kato, Y. (2001). Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 413-419.
80. Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I., and Goldberg, V. M. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **76**, 579-592.
81. Bretscher, M. S. (1987). How animal cells move. *Sci Am* **257**, 130-138.
82. Prinz, R., and Von Figura, K. (1978). Adhesion of human skin fibroblasts. Effect of tetravalent, divalent and monovalent concanavalin A. *Exp Cell Res* **112**, 275-279.
83. Yamashita, K., Hitoi, A., and Kobata, A. (1983). Structural determinants of Phaseolus vulgaris erythroagglutinating lectin for oligosaccharides. *J Biol Chem* **258**, 14753-14755.
84. 埜 隆夫 (2002). チタンの表面と表面改質. *DE* **142**, 17-20.
85. 今堀 和友, 山川 民夫 (1998). 生化学辞典(第3版), 東京化学同人, 553.
86. 大沢 利昭, 小山 次郎, 奥田 研爾, 矢田 純一 編集 (2001). 免疫学辞典 (第2版), 東京化学同人, 267.



EXPERIMENTAL CELL RESEARCH

Editorial Office: CMB, Karolinska Institutet (von Eulers väg 3)
S-17177 Stockholm, Sweden. Phone +46 8 340453, Fax +46 8 345429
e-mail ecr@cmb.ki.se

EDITOR-IN-CHIEF

U. Lendahl

ASSOCIATE EDITOR, NORTH AMERICA

G. Carpenter

ASSOCIATE EDITOR

C. Höög

EDITORIAL BOARD

D. P. Barlow, Austria
J. Bartek, Denmark
R. Baserga, Philadelphia, PA
H. M. Blau, Stanford, CA
B. Calabretta, Philadelphia, PA
J. Campisi, Berkeley, CA
L. Claesson-Welsh, Sweden
H. Clevers, Netherlands
P. Comoglio, Italy
V. J. Cristofalo, Philadelphia, PA
Z. Darzynkiewicz, Hawthorne, NY
D. T. Denhardt, Piscataway, NJ
P-P. Di Fiore, Italy
G. Dreyfuss, Philadelphia, PA
W. C. Earnshaw, U.K.
S. Fakan, Switzerland
R. Fässler, Sweden
N. E. Fusenig, Germany
G. Gabbiani, Switzerland
F. Grinnell, Dallas, TX
F. Guillemot, France
J. L. Hamlin, Charlottesville, VA
C. Heyting, Netherlands
N. Hirokawa, Japan
J.H.J. Hoeijmakers, Netherlands
D. P. Lane, U.K.
L. F. Lau, Chicago, IL
C. Lehner, Germany
B. L. Margolis, Ann Arbor, MI
M. McBurney, Canada
W.H. Moolenaar, Netherlands
S. Nagata, Japan
P. Nicotera, Germany
C. Ordahl, San Francisco, CA
M. Oren, Israel
S. Orrenius, Sweden
M. Osborn, Germany
H. L. Ozer, Newark, NJ
M. G. Parker, U.K.
D. Paulin, France
L. Philipson, Sweden
E. Ruoslahti, La Jolla, CA
P. Sassone-Corsi, France
M. Serrano, Spain
G. S. Stein, Worcester, MA
G. Studzinski, Newark, NJ
L. Van Aelst, Cold Spring Harbor, NY
K. von der Mark, Germany
E. F. Wagner, Austria

Dr. Masahiro Nishimura
Department of Prosthetic Dentistry
Graduate School of Biomedical Sciences
Hiroshima University
1-2-3 Kasumi, Minamiku
Hiroshima 734-8553, JAPAN

2003-12-22

Re:

Ms #: 11183

Nishimura et al

Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells - including bone marrow mesenchymal stem cells - on various scaffolds

Dear Dr Nishimura:

I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication as a regular article in Experimental Cell Research.

In order to expedite the production process, authors are now required to provide a digital version of their manuscripts upon acceptance and forward this to the publisher (please see attached instructions) as soon as possible.

Galley proofs will be sent to you in due course.

Thank you for submitting your work to Experimental Cell Research.

Yours sincerely,

Urban Lendahl
Editor-in-Chief

Encl: