

三次元培養下のヒト歯根膜由来細胞の 機能制御に関する研究

土 井 直 美

A Study on Regulation of Human Periodontal Ligament-Derived Cell Functions in Collagen Gel Culture

Naomi Doi

(平成10年1月13日受付)

緒 言

歯根膜組織は、歯の支持、歯周組織への栄養の供給、外力の感知と緩衝などの機能を有する。また、近年、歯根膜からの求心性の刺激と脳の高次機能との関わりが注目されるようになってきている¹⁾。したがって、歯周疾患などによって失われた歯根膜組織を再生させることは口腔局所の機能の維持だけでなく全身的にも大きな意義がある。

歯根膜組織の再生は、歯根膜に存在する細胞の遊走、増殖および分化という機能に依存している。一般に、細胞の遊走、増殖あるいは分化といった機能は、液性因子の作用、細胞と細胞との接着、そして細胞と細胞外基質 (ECM) との相互作用によって調節されていると考えられる。ECM は単に細胞構築成分として存在しているだけでなく、細胞と相互作用することによって、細胞の機能発現に重要な役割を演じていることが明らかになってきている²⁻⁴⁾。特に、I型コラーゲンは歯根膜組織に存在する主要なECMであり⁵⁾、歯根膜組織におけるECM-細胞の相互作用に深く関わっていると考えられる。

インテグリンはECMと細胞骨格とを連結する膜貫通型の糖蛋白で、 α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマー構造を持つレセプター群である⁶⁻⁸⁾。インテグリン $\beta 1$ サブファミリーの多くがECMレセプターとして機能している^{8,9)}。 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ はコラーゲンをリガ

ンドとするレセプターである¹⁰⁻¹⁴⁾。また、 $\alpha 5\beta 1$ は、フィブロネクチンのレセプターであり¹⁵⁻¹⁷⁾、細胞の産生するフィブロネクチンについてコラーゲン・ゲル収縮との関与が報告されている¹⁸⁾。

一方、創傷治癒に関連する液性因子として transforming growth factor- β (TGF- β) や basic fibroblast growth factor (bFGF) などの増殖因子が歯根膜由来細胞に発現している^{19,20)}。bFGFは歯根膜組織に発現していることが免疫組織学的検索から明らかになっている²¹⁾。また、歯根膜由来細胞の細胞増殖と増殖因子の関係について、過去にいくつかの報告がある。TGF- β はラットの抜歯窩由来の歯根膜細胞のDNA合成および細胞数の増加を抑制するが²²⁾、ヒト歯根膜由来細胞のDNA合成を促進する²³⁾。さらに、bFGFはヒトの歯根膜由来細胞の細胞増殖を促進する^{24,25)}。しかし、これらの *in vitro* の研究はいずれも単層培養系で行われている。一方、生体内における細胞の存在環境を考えると、単層培養系での細胞応答とECM中でのそれとは異なっている可能性がある。したがって、ECM、液性因子および細胞との相互作用が細胞機能をどのように調節しているかを明らかにする必要がある。

コラーゲン・ゲル内培養法は、線維芽細胞をコラーゲン基質中に埋入して培養する方法で、Bellらによって創傷治癒過程の真皮モデルとして開発された²⁶⁾。線維芽細胞をコラーゲン・ゲル中で培養すると、創傷治癒時の組織収縮に類似したコラーゲン・ゲル収縮が生じる²⁷⁻³⁰⁾。さらに、サイトカラシンがコラーゲン・ゲル収縮を阻害すること^{26,31)}、あるいは細胞の移動力によってコラーゲン・ゲル収縮が発現すること^{32,33)} から、線維芽細胞とコラーゲンとの相互作用をコラーゲン・ゲル収縮として捉えることができる。したがって、コ

* 広島大学歯学部歯科保存学第二講座 (主任: 栗原英見教授)

本論文の要旨は平成8年10月の第39回日本歯周病学会秋季大会、平成8年12月の第80回広島大学歯学会例会において発表した。

ラーゲン・ゲル内培養法は、歯根膜組織に存在する細胞と同組織の主たる ECM である I 型コラーゲンの相互作用を研究する上でも利用できると思われる。

本研究では、ECM と歯根膜細胞との相互作用および ECM と増殖因子との相互作用が歯根膜細胞の機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、コラーゲン・ゲル内培養系におけるヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 (HPDL) と I 型コラーゲンの相互作用、コラーゲン・ゲル収縮および HPDL 増殖における細胞接着分子の役割、HPDL と I 型コラーゲンとの相互作用に対する TGF- β と bFGF の関与について検討した。

材料ならびに方法

1. ヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 (HPDL) の分離および培養

(1) HPDL の分離

細胞分離は移植片培養法によって行った。すなわち、抜去したヒト第三大臼歯から、歯肉が含まれる歯頸部と他の結合組織が含まれる根尖部を可及的に除去後、歯根中央部の健康な歯根膜をメスを用いて剥離した。剥離した歯根膜を細切し、直径 60 mm の細胞培養用シャーレ (CORNING 社) に貼り付け、10% 牛胎児血清 (FBS: Upstate Biotechnology Inc.), 100 units/ml の penicillin (10万単位, 明治製薬), 100 μ g/ml の streptomycin (明治製薬), 2 μ g/ml の fungizone (GIBCO) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: NaHCO₃-free, 日本製薬) を 5 ml 加え、組織片培養を開始した。培養は 37°C, 5% CO₂ 気相条件で行った。歯根膜組織片から遊離・増殖してきた HPDL を 6~8 代継代後、以下の実験に供した。

(2) コラーゲン・ゲル内培養

コラーゲン・ゲルの作製には仔牛真皮由来 I 型コラーゲン (0.5%, pH 3.0, KOKENCELLGEN I-AC, 高研) を使用した。コラーゲン・ゲルの調整は添付のマニュアルに従った。すなわち、初めに 5 倍濃度の DMEM, 100 倍濃度の NaHCO₃, 100 倍濃度の HEPES を作製し、それぞれを 20:1:1 の割合で混合した液を氷冷下で調整した。この混合液と FBS, および、I 型コラーゲン水溶液 (pH 7.4) を 2.2:1:6.8 の割合で混和しコラーゲン溶液とした。I 型コラーゲン水溶液は、コラーゲンの最終濃度にしたがって混水比をあらかじめ調整した。このコラーゲン溶液に、HPDL を懸濁し、48穴マルチウエルプレート (CORNING 社) に 250 μ l ずつ播種後、CO₂ インキュベーター内で 30 分間インキュベートしてコラーゲンをゲル化させた。その後、50 μ g/ml のアスコルビン酸 (AsA, SIGMA) を添加した 10% FBS および抗生物質を含む DMEM 250 μ l をゲル上に重層

した。培地交換は 2 日毎に行った。

(3) 単層培養

単層培養には I 型コラーゲンをコーティングしたプレート (SUMIRON セルタイト C-I, 48穴, 住友ベークライト社) を使用した。培養液にはコラーゲン・ゲル内培養時と同様の、50 μ g/ml の AsA を添加した 10% FBS および各種抗生物質を含む DMEM を用いた。培地交換は 2 日毎に行った。

2. コラーゲン・ゲル収縮の測定

コラーゲン・ゲル収縮は、コラーゲン・ゲルの直径の変化によって評価した。すなわち、コラーゲン・ゲル収縮が開始した日から、経日的にゲルをウエルの真上から写真撮影した。撮影した写真上で収縮したコラーゲン・ゲルの長径と短径を測定し、その平均値をゲルの直径とした。コラーゲン・ゲル収縮は、ゲルの直径の減少をウエルの内径に対する百分率として換算した。

3. 細胞数の計測

コラーゲン・ゲル内培養系での細胞数の計測は以下の方法で行った。コラーゲン・ゲルを、5 mg/ml の細胞分散用 collagenase (クロストリジウム属由来 collagenase, 150~300 units/mg, 和光純薬) で 37°C, 1 時間処理しコラーゲンを分解した。続いて、遠心分離によって細胞を分離し、分離した細胞をさらに 0.05% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含む phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3~7.65, 日本製薬) で 37°C, 3 分間処理し分散後に、コールターカウンター (Coulter® Z1, Coulter) を用いて細胞数を計測した。

4. ヒトインテグリン分子に対するマウスモノクローナル抗体

マウス抗ヒト IgG1 モノクローナル抗体 (抗 IgG 抗体), マウス抗ヒトインテグリン α 1 モノクローナル抗体 (抗インテグリン α 1 抗体, FB12), マウス抗ヒトインテグリン α 2 モノクローナル抗体 (抗インテグリン α 2 抗体, P1E6), マウス抗ヒトインテグリン α 3 モノクローナル抗体 (抗インテグリン α 3 抗体, ASC-6), マウス抗ヒトインテグリン α 5 モノクローナル抗体 (抗インテグリン α 5 抗体, PID6) はケミコン社から購入, マウス抗ヒトインテグリン β 1 モノクローナル抗体 (抗インテグリン β 1 抗体, Lia1/2) はコスモ・バイオ社から購入した。

5. 免疫沈降法

HPDL の細胞膜表面のインテグリン分子の発現は Stephens らの方法³⁴⁾ に準じて免疫沈降法で調べた。直

径 10 cm のシャーレ (CORNING 社) でサブコンフルエントになるまで単層培養した HPDL を PBS で洗浄し, 0.05% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含む PBS で 37°C, 3 分間処理して細胞を単離し, PBS で 2 回遠心洗浄した後, 細胞膜表面の蛋白をビオチン標識した。すなわち, 得られた細胞塊を 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂ 含有の PBS (PBS(+)) 1 ml 中に懸濁し, 10 μg/ml の濃度で Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE 社) を加え, 4°C で 60 分間インキュベートした。その後, PBS で 3 回遠心洗浄し, 得られた細胞塊を 1 ml の 1% NP40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS および 0.15 M の NaCl を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4, RIPA バッファー) 中で 4°C, 30 分間インキュベートした。次に, ビオチン標識した 100 μl の細胞抽出液に RIPA バッファーで平衡化した 40 μl の Protein G-Sepharose (Pharmacia Biotech 社) 懸濁液を加え, ロータリーシェーカーで攪拌しながら 4°C, オーバーナイトでインキュベートした。インキュベート後遠心し, 4 に示したヒトインテグリンに対するマウスモノクローナル抗体を各々 10 μg/ml の濃度で添加し, 4°C, 2 時間反応させた。さらに 40 μl の Protein G-Sepharose 懸濁液を加え, 4°C, 2 時間反応させた。Protein G-Sepharose を RIPA バッファーで 3 回遠心洗浄した後, 3 倍濃度の Laemmli バッファー³⁵⁾ を 40 μl 加え, 5 分間煮沸し, 氷冷後に, 遠心分離した上清を電気泳動用サンプルとした。

20 μl のサンプルを非還元条件下で SDS 電気泳動 (40 mA, 60 min., 4-20%ゲル) した後, 展開したサンプルを PVDF 膜 (ミリポア) にブロッティングした。メンブレンを 5% スキムミルクで 1 時間処理後, PBS で 3 回洗浄した。メンブレンを 1.5 μg/ml の horseradish peroxidase streptavidin (Vector Laboratories Inc.) / PBS 中で 30 分間インキュベート後, 0.05% の Tween 20 を含む PBS で 15 分間の洗浄を 1 回と, さらに, PBS で 15 分間の洗浄を 2 回行った。その後, メンブレンを ECL Western blotting detection reagents (Amersham Life Science Ltd.) と反応し陽性バンドを発光させた後, X 線フィルム (コダック) に感光した。

6. 増殖因子

TGF-β1 (ヒト血小板由来) および bFGF (牛脳由来) は R & D Systems Inc. から購入した。

7. DNA 合成能

DNA 合成能は [³H]-Thymidine の細胞への取り込みを測定することによって評価した。コラーゲン・ゲル内培養系では, 48 穴マルチウエルプレートにコラーゲ

ン濃度 0.2%, HPDL の播種細胞数 1 × 10⁵ cells/well で培養を開始した。培養開始時より FBS の濃度は 2% とした。培養 24 時間後に, 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 5 ng/ml の濃度の TGF-β あるいは bFGF を添加し, さらに 24 時間培養した。

単層培養系では, 48 穴セルタイト C-I プレートに HPDL を 3 × 10⁴ 個播種し, 10% FBS を含む DMEM で 10 日間培養した後, FBS の濃度を 2% に下げて 24 時間培養した。ウエルに, 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 5 ng/ml の濃度の TGF-β あるいは bFGF を添加した後, さらに 24 時間培養した。

いずれの培養系においても, 培養終了 3 時間前に 1 ウエルあたり 2 μCi の [³H]-Thymidine を添加した。単層培養した HPDL は, PBS で 2 回洗浄後, 氷冷した 10% Trichloroacetic acid で 5 分間 2 回処理した。さらに, 氷冷したエタノールエーテル混合液 (混合比 3:1) を添加し, 速やかにその溶液を除去し, 細胞を乾燥させた。引き続き, 1N の NaOH を 200 μl 添加し 30 分間常温に静置して細胞を溶解した後, 1N の HCl 40 μl を加えて試料を中和した。続いて, 240 μl の試料に 4 ml のシンチレーション溶液を混合し, 液体シンチレーションカウンターで [³H] の放射活性を測定した。コラーゲン・ゲル内培養した HPDL は, 60~90 分のコラーゲナーゼ処理 (750~1250 units/ml) によってコラーゲンを消化後, 細胞を回収し, 単層培養と同様の方法で [³H]Thymidine の取り込み量を測定した。

8. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

コラーゲン・ゲル内培養系および単層培養系における HPDL のインテグリン α2 および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の mRNA の発現を RT-PCR 法で検出した。

直径 60 mm のセルタイト C-I シャーレにコラーゲン濃度 0.2%, 播種細胞数 5 × 10⁵ 個でコラーゲン・ゲル内培養を開始した。培養開始時に TGF-β を 3 ng/ml の濃度で添加し, 24 時間後に培養を終了した。単層培養系では HPDL を同様のシャーレにシャーレあたり 5 × 10⁵ 個を播種した。7 日間培養後, TGF-β を 3 ng/ml の濃度で添加しさらに 24 時間培養した。培養終了後, ISOGEN® (ニッポンジーン) を用いて総 RNA を抽出し, サンプルとした。

ヒトインテグリン α2 に対するプライマーは, ヒトのインテグリン α2 cDNA³⁶⁾ の塩基配列をもとに上流特異的プライマーとして 5'-ATC CTC ACC AGG AAC ATG GG-3', 下流特異的プライマーとして 5'-CIT TCG TAG CAC TTC GTC GC-3' を設計した (サワディー・テク

ノロジー社)。ヒトの G3PDH に対するプライマーは、ヒトの G3PDH cDNA³⁷⁾ の塩基配列をもとに上流特異的プライマーとして 5'-GTC AAG GCT GAG AAC GGG AA-3', 下流特異的プライマーとして 5'-GCT TCA CCA CCT TCT TGA TG-3' を設計した (サワディー・テクノロジー社)。予想される PCR 産物の大きさはインテグリン $\alpha 2$ が 478 bp, G3PDH が 613 bp である。

RT-PCR には, GeneAmp[®] RNA PCR kit および GeneAmp[®] PCR System 2400 (Perkin-Elmer Cetus Instrument 社) を使用した。10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1 U ribonuclease inhibitor, 2.5 U reverse transcriptase 中にコラーゲン・ゲル内培養系 HPDL 由来 RNA 0.3 μ g, あるいは単層培養系 HPDL 由来 RNA 1 μ g および 0.2 μ g の下流特異的プライマーを添加し, 42°C, 15分間逆転写反応を行った。続いて, 0.2 μ g の上流特異的プライマーおよび 2.5 U AmpliTaq[®] DNA polymerase を加え, 変性反応は 95°C で 30秒間, アニールおよび伸長反応は 63°C で 1分間それぞれ行い, これを 1 サイクルとして, コラーゲン・ゲル内培養系では 35 サイクル, 単層培養系では 30 サイクルの PCR 反応を行って, PCR 産物を得た。PCR 産物は 1% アガロースゲル電気泳動し, エチジウムブロマイド染色した。

実験結果

1. コラーゲン・ゲル内培養系および単層培養系における HPDL の位相差顕微鏡像

図 1A には, コラーゲン・ゲル内培養系の HPDL の位相差顕微鏡所見を示す。HPDL は紡錘形で線維芽細胞

様の形態を呈していた。単層培養系でも HPDL は紡錘形で線維芽細胞様の形態を呈していた (図 1B)。

2. コラーゲン・ゲル内培養系での HPDL と I 型コラーゲンの相互作用

コラーゲン・ゲル内培養系において生じるコラーゲン・ゲル収縮と, コラーゲン・ゲル収縮を伴う培養条件下における HPDL の細胞増殖について検討した。

コラーゲン・ゲル収縮の培養開始時から 12 日目までの経日的変化を図 2 に示す。図 2A は, 培養開始時に 3×10^4 個の HPDL を播種した時の, 図 2B は, 1×10^5 個の HPDL を播種した時の結果である。同じ播種細胞数で培養開始時のコラーゲン濃度の影響を比較すると, いずれの播種細胞数においても, コラーゲン濃度が低い方がコラーゲン・ゲル収縮が早く開始した。一方, 同じコラーゲン濃度で培養開始時の播種細胞数の影響を比較すると, いずれのコラーゲン濃度でも播種細胞数の多い方がコラーゲン・ゲル収縮が早く開始した。

コラーゲン・ゲル内培養における細胞数の経日的な変化を図 3 に示す。細胞数の変化を同じ播種細胞数で比較すると, コラーゲン濃度の高い条件の方が低い条件においてよりも細胞数の増加が著明であった。また, 同じコラーゲン濃度で細胞数の変化を比較すると, 最終細胞密度は培養開始時の播種細胞数に関わらず, 培養開始時のコラーゲン濃度が同じであるとほぼ同じ細胞数に達する傾向を示した。

また, いずれの培養条件でもコラーゲン・ゲル収縮が停止すると共に, 細胞増殖は停止する傾向を示した (図 2, 図 3)。

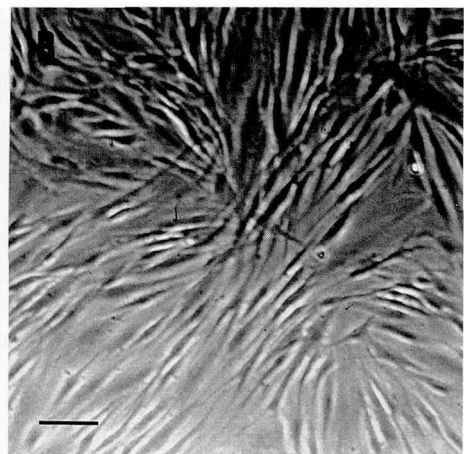
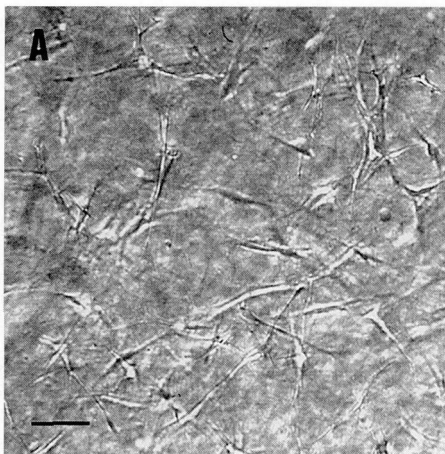


図 1 HPDL の位相差顕微鏡像。

コラーゲン・ゲル内培養系 (A, 1×10^5 cells/well), および単層培養系 (B, 3×10^4 cells/well) における HPDL の位相差顕微鏡像。培養開始から 24 時間後の位相差像で, いずれも線維芽細胞様の形態を呈していた。バーは 20 μ m。

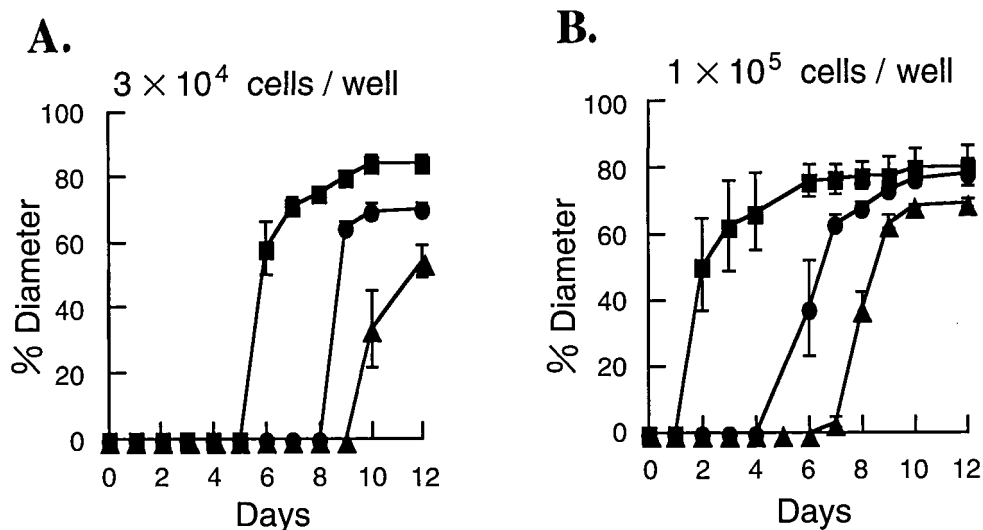


図2 HPDLのコラーゲン・ゲル内培養系におけるコラーゲン・ゲル収縮に及ぼす播種細胞数とコラーゲン濃度の影響。

ゲル収縮量はウエルの直径を100%として換算した。A. 播種細胞数 3×10^4 cells/well, B. 播種細胞数 1×10^5 cells/well。■; コラーゲン濃度0.1%, ●; コラーゲン濃度0.2%, ▲; コラーゲン濃度0.3%。それぞれの値は3ウエルの測定値の平均値 \pm SDを示す。

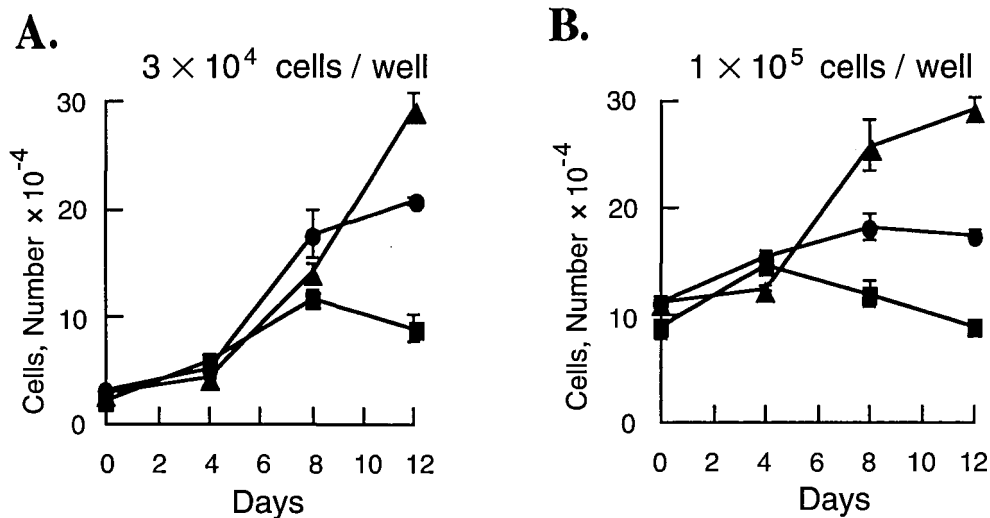


図3 HPDLのコラーゲン・ゲル内培養系の細胞増殖に及ぼす播種細胞数とコラーゲン濃度の影響。

A. 播種細胞数 3×10^4 cells/well, B. 播種細胞数 1×10^5 cells/well。■; コラーゲン濃度0.1%, ●; コラーゲン濃度0.2%, ▲; コラーゲン濃度0.3%。それぞれの値は3ウエルの測定値の平均値 \pm SDを示す。

3. HPDLにおけるインテグリン分子の発現

抗インテグリン抗体を用いた免疫沈降法によって、HPDLにおけるインテグリン分子の発現を検討した結果を図4に示す。

インテグリン $\beta 1$ は電気泳動上約 120 kDa 付近のバ

ンドとして検出された。インテグリン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ および $\alpha 5$ 各抗体で免疫沈降した試料にも $\beta 1$ の共沈と考えられるバンドが存在し、また、約130-150 kDa 付近にインテグリン $\alpha 2$, $\alpha 3$ および $\alpha 5$ の発現が認められた。しかしインテグリン $\alpha 1$ の発現は極僅かであった。

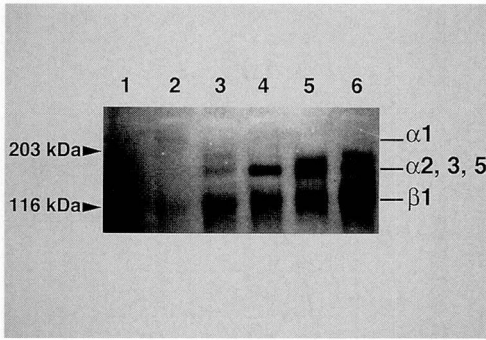


図4 免疫沈降法によるHPDLが発現するインテグリン分子の検出(単層培養系)。

lane 1は抗IgG抗体, lane 2は抗インテグリン $\alpha 1$ 抗体, lane 3は抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体, lane 4は抗インテグリン $\alpha 3$ 抗体, lane 5は抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体, lane 6は抗インテグリン $\beta 1$ 抗体によって免疫沈降を行った試料である。

4. 抗インテグリン抗体のコラーゲン・ゲル収縮および細胞増殖に及ぼす影響

インテグリン分子がコラーゲン・ゲル内培養におけるコラーゲン・ゲル収縮と細胞増殖に果たす役割を明らかにするために, 抗インテグリン抗体を添加し, その影響を調べた。培養開始時のコラーゲン濃度と播種細胞数は, それぞれ0.2%とウエルあたり 1×10^5 個と

した。抗インテグリン抗体は, 免疫沈降に使用したものと同一モノクローナル抗体を用いた。各インテグリン抗体は, 培養開始時より培養液の交換の度に培養液中に1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した。培養液の交換は2日毎に行い, 8日間培養した。

図5に培養8日目のコラーゲン・ゲル収縮および細胞数を示す。5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ の抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体と抗インテグリン $\beta 1$ 抗体はコラーゲン・ゲル収縮をほぼ完全に阻害した(図5A)。一方, 細胞数の変化に関しては, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ の抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体, および10 $\mu\text{g/ml}$ の抗インテグリン $\beta 1$ 抗体を添加した場合は, 培養開始時の播種細胞数よりも細胞数は減少していた。また, 5 $\mu\text{g/ml}$ の抗インテグリン $\beta 1$ 抗体添加では細胞数は播種細胞数よりも増加していたが, 細胞数の増加は, 抗体を添加していないコントロールよりも少なかった(図5B)。

5. コラーゲン・ゲル収縮と細胞増殖に及ぼすTGF- β とbFGFの影響

コラーゲン・ゲル内培養のコラーゲン濃度と播種細胞数は, それぞれ0.2%とウエルあたり 1×10^5 個とした。TGF- β およびbFGFの濃度は3 ng/mlとし, 培養開始時から培養液中に添加した。培養液の交換は2日毎に行い, 培養液の交換の度に同濃度のTGF- β あるいはbFGFを添加し8日間培養した。

図6に培養8日目のコラーゲン・ゲル収縮および細

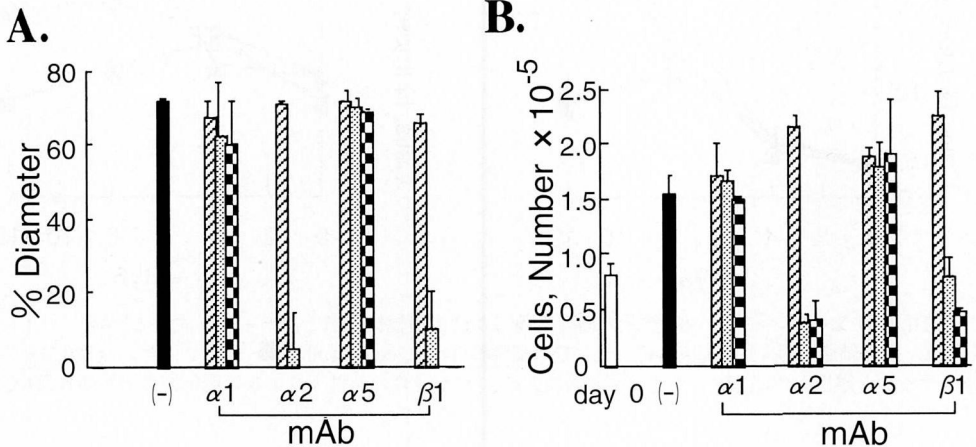


図5 コラーゲン・ゲル内培養系におけるコラーゲン・ゲル収縮(A)および細胞数(B)に及ぼす抗インテグリン抗体の影響。

抗インテグリン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ および $\beta 1$ 抗体を1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した。測定値は培養8日目のもの。

□; day 0, 培養開始時, ■; 抗体非添加, ▨; 1 $\mu\text{g/ml}$, ▩; 5 $\mu\text{g/ml}$, ▤; 10 $\mu\text{g/ml}$ 。それぞれの値は3ウエルの測定値の平均値 \pm SDを示す。

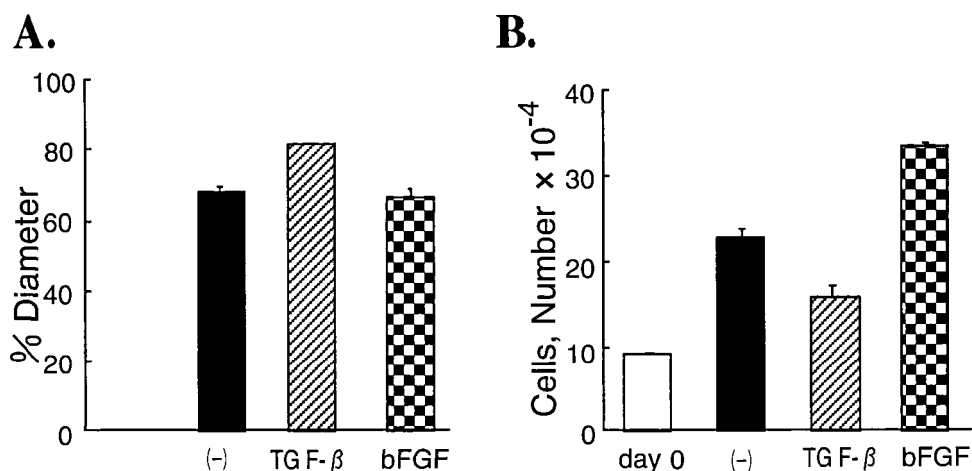


図6 コラーゲン・ゲル内培養系におけるコラーゲン・ゲル収縮 (A) および細胞数 (B) に及ぼす TGF- β および bFGF の影響。

TGF- β あるいは bFGF を 3 ng/ml の濃度で培養開始時から添加した。測定値は培養 8 日目のもの。

□; day 0, 培養開始時, ■; 増殖因子非添加, ▨; TGF- β , ▩; bFGF。

各値は 3 ウェルの測定値の平均値 \pm SD を示す。

胞数の結果を示す。TGF- β はコラーゲン・ゲル収縮を増強させた。一方、bFGF はコラーゲン・ゲル収縮に影響を及ぼさなかった (図 6A)。また、TGF- β は細胞数の増加を抑制するのに対して、bFGF は細胞数の増加を促進した (図 6B)。

6. HPDL の DNA 合成能に及ぼす TGF- β と bFGF の影響

TGF- β および bFGF の HPDL の DNA 合成能に及ぼす影響をコラーゲン・ゲル内培養系と単層培養系とで比較検討した。DNA 合成能は [³H]-Thymidine の細胞への取り込みによって評価した。

各培養系における HPDL の DNA 合成に及ぼす TGF- β と bFGF の効果を図 7 に示す。bFGF は、いずれの培養系においても濃度依存的に DNA 合成を促進した。一方、TGF- β は、コラーゲン・ゲル内培養系では DNA 合成を抑制する傾向を示したのに対して、単層培養系では bFGF 同様濃度依存的に DNA 合成を促進した。

7. 抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体の細胞増殖阻害効果に及ぼす TGF- β の影響

コラーゲン・ゲル内培養系において抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体添加によって生じた細胞増殖阻害効果に及ぼす TGF- β の影響を検討した。コラーゲン濃度と播種細胞数は、それぞれ 0.2% とウェルあたり 1×10^5 個とした。抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体の濃度は 10 μ g/ml, TGF- β の

濃度は 0.1, および, 3 ng/ml とした。抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体および TGF- β は、培養開始時より培養液の交換の度に培養液中に添加した。培養液の交換は 2 日毎に行い、8 日間培養した。

図 8 に培養 8 日目の細胞数を示す。TGF- β は濃度依存的に、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体添加によって減少した細胞数を有意に回復させた。しかし、添加した TGF- β の濃度範囲では、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体非添加の細胞数までは回復しなかった。

8. インテグリン $\alpha 2$ 遺伝子の発現に及ぼす TGF- β の影響

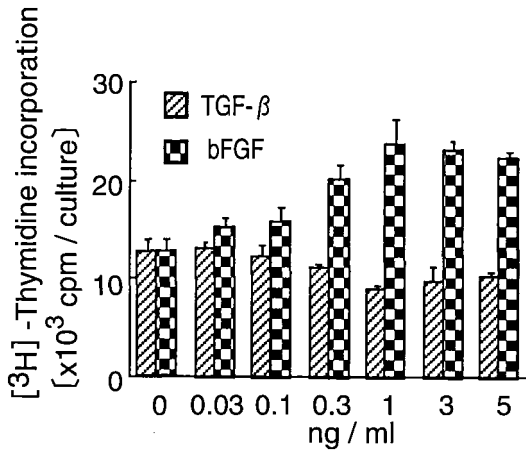
HPDL のインテグリン $\alpha 2$ 遺伝子発現に対する TGF- β の影響は RT-PCR 法によって解析した (図 9)。

TGF- β はコラーゲン・ゲル内培養系および単層培養系いずれの培養系でも HPDL のインテグリン $\alpha 2$ 遺伝子の発現を増加させる傾向が見られた。

考 察

近年、ECM と細胞との相互作用が増殖や分化などの種々の細胞機能の制御に関わることが注目されている²⁻⁴⁾。本研究では、コラーゲンと細胞との相互作用を視覚化し評価することのできるコラーゲン・ゲル内培養法を用いて、HPDL、増殖因子およびコラーゲンの相互作用を検討した。初めに、培養開始時のコラーゲン濃度および播種細胞数の違いが HPDL の増殖とコ

A.



B.

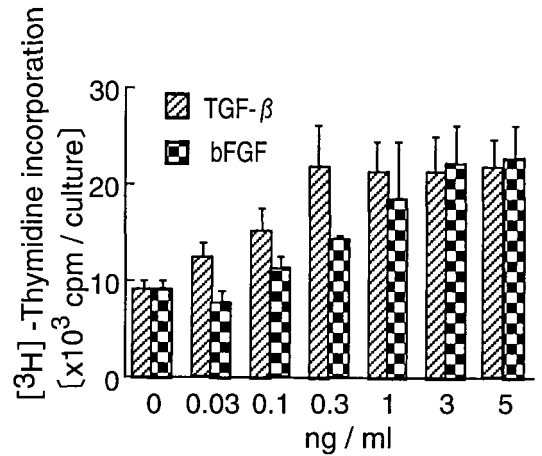


図7 コラーゲン・ゲル内培養系 (A) と単層培養系 (B) のHPDLのDNA合成に及ぼすTGF- β およびbFGFの影響.

TGF- β あるいはbFGFを3 ng/mlの濃度で各培養系に添加した。

それぞれの値は、3ウエルの測定値の平均値 \pm SDを示す。

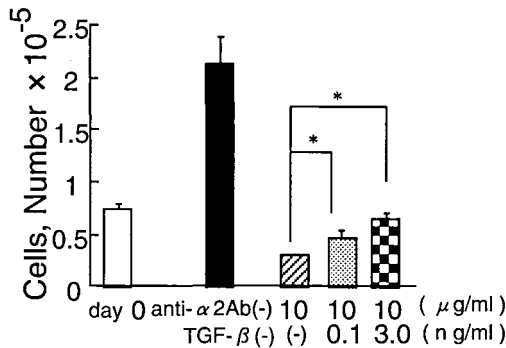


図8 抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体による細胞数減少に対するTGF- β の効果.

day 0は培養開始時の細胞数を示す。その他の測定値は、いずれも培養8日目のものである。それぞれの値は3ウエルの測定値の平均値 \pm SDを示す。

* $P < 0.001$ (Student t-test).

ラーゲン・ゲル収縮に及ぼす影響について検討した。ヒト2倍性線維芽細胞をコラーゲン・ゲル内培養系で培養すると、培養開始時のコラーゲン濃度が低いほど、また播種細胞数が多いほどコラーゲン・ゲル収縮は、早期に開始する²⁶⁾。また種々の線維芽細胞においてもコラーゲン・ゲル収縮が終了した後は細胞増殖能は抑制される²⁷⁻³⁰⁾。HPDLを用いた本研究のコラーゲン・ゲル内培養系においても、同様の結果が得られた。さらに、

コラーゲン・ゲル内でのHPDLの増殖能は、コラーゲン濃度が高いほど強いこと、そしてコラーゲン濃度が等しい場合、最初の播種細胞数が異なってもコラーゲン・ゲル収縮後には細胞数がかほぼ同じになる傾向を明らかにした。これらの結果は、コラーゲン・ゲル内培養系においては、HPDLの増殖能と細胞周囲のコラーゲン濃度の間に密接な関わりがあることを示唆する。

インテグリンは細胞表面に発現される細胞接着分子で、 α 鎖と β 鎖から構成されている⁶⁻⁸⁾。現在、少なくとも15種類の α 鎖、8種類の β 鎖が知られており、それぞれの組み合わせによって約20種類のインテグリンが存在し、殆どの細胞がいずれかのインテグリンを発現している。その内、インテグリン $\beta 1$ サブファミリーの多くがECMレセプターとして機能している^{8,9)}。本実験で使用したHPDLは単層培養系において少なくとも $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 5$ および $\beta 1$ 分子を発現していた。したがって、機能分子としてはコラーゲンをリガンドとして認識する $\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1$ および $\alpha 3\beta 1$ と¹⁰⁻¹⁴⁾、フィブロネクチンのレセプターである $\alpha 5\beta 1$ ¹⁶⁻¹⁸⁾が、HPDLに発現していることが判明した。

コラーゲン・ゲル収縮は細胞とECMとの相互作用の結果として生じる現象であるので、ECMレセプターである細胞表面のインテグリンが、コラーゲン・ゲル中のHPDLの機能制御に関与していると考えられる。そこで、本実験では、コラーゲン・ゲル内培養系にお

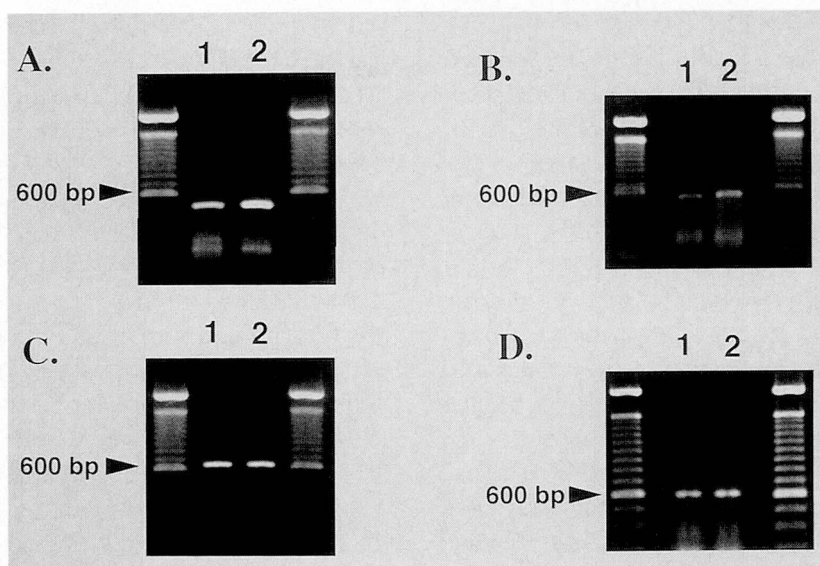


図9 HPDLによるインテグリン $\alpha 2$ 遺伝子の発現 (RT-PCR 法).

A. コラーゲン・ゲル内培養系のインテグリン $\alpha 2$ 遺伝子; B. 単層培養系のインテグリン $\alpha 2$ 遺伝子; C. コラーゲン・ゲル内培養系の G3PDH 遺伝子; D. 単層培養系の G3PDH 遺伝子。

lane 1; TGF- β 非添加, lane 2; TGF- β (3 ng/ml) 添加。

いてどのインテグリン分子が HPDL の機能制御に関わっているかを検討した。その結果, 抗インテグリン $\alpha 1$ 抗体および抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体はコラーゲン・ゲル収縮に影響を及ぼさなかった。一方, 抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体および抗インテグリン $\beta 1$ 抗体はゲル収縮を阻害した。用いた抗体はいずれも, インテグリンと ECM との結合を阻害する抗体であることから^{17,38-40}, ゲル内培養系における HPDL と I 型コラーゲンの相互作用は $\alpha 2\beta 1$ インテグリンを介していると考えられる。これは, ヒト皮膚由来線維芽細胞のコラーゲン・ゲル収縮にインテグリン $\alpha 2$ が重要な役割を担っているという過去の報告^{41,42} に一致した。しかしながら, ラット心臓由来線維芽細胞では, コラーゲン・ゲル収縮にインテグリン $\alpha 1\beta 1$ が関与している⁴³。したがって, 細胞の由来する生物種や細胞の種類によって, 細胞と ECM の相互作用に関わっているインテグリンが異なると考えられる。

Asaga ら¹⁸ は, ヒト真皮由来の線維芽細胞と I 型コラーゲンの接着によるコラーゲン・ゲル収縮は細胞の産生したフィブロネクチンを介していると報告している。この報告は, 血漿性フィブロネクチンはコラーゲン・ゲル収縮に関与しないが, 細胞性フィブロネクチンはコラーゲン・ゲル収縮に関与するというものである。本研究では抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体は HPDL とコラーゲンの相互作用に影響を及ぼさなかった。本研究

の結果は, ヒト真皮由来線維芽細胞について検討した Tomasek らの報告⁴⁴ と一致する。インテグリン $\alpha 5$ はフィブロネクチンの RGD 配列と結合することから⁴⁵, フィブロネクチンの RGD 配列はコラーゲン・ゲル収縮に関与しないものと考えられる。したがって, HPDL において, フィブロネクチンがコラーゲン・ゲル収縮に関与しているとするれば, フィブロネクチンの RGD 配列以外の領域がインテグリンとの結合に関与していると推察される。ECM 中では本研究で注目した I 型コラーゲンだけでなく, フィブロネクチンやプロテオグリカンが細胞機能の調節に重要な役割を演じている^{3,45-47}。特に, 本研究で検討したコラーゲン・ゲル収縮に関しては, 細胞性フィブロネクチンの関与が報告されていること, コラーゲンとフィブロネクチンは結合すること, また HPDL は培養期間中にフィブロネクチンを産生している可能性があることから, フィブロネクチンをリガンドとするレセプターについてさらに詳細に検討する必要がある。

コラーゲン・ゲル収縮に影響を及ぼさなかった抗インテグリン抗体は, 細胞増殖にも作用しなかった。一方, コラーゲン・ゲル収縮を阻害した抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体および抗インテグリン $\beta 1$ 抗体の添加によって, 最初に播種した細胞数よりも細胞数が減少したことは興味深い。最近, Madin-Darby canine kidney cells (MDCK 細胞) のアポトーシスにインテグリン $\alpha 2\beta 1$ が

関与していることが報告された⁴⁸⁾。すなわち、インテグリン $\alpha 2$ のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入しインテグリン $\alpha 2$ の発現を抑制した MDCK 細胞は、コラーゲン・ゲル内培養でアポトーシスを起こした。したがって、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体および抗インテグリン $\beta 1$ 抗体の添加による HPDL の細胞数の減少はアポトーシスによる可能性がある。

TGF- β はラットの抜歯窩由来の歯根膜細胞の DNA 合成および細胞数の増加を抑制するが²²⁾、ヒト歯根膜由来細胞の DNA 合成を促進する²³⁾。bFGF はヒトの歯根膜由来細胞の細胞数および DNA 合成を促進する²⁴⁾。Okamoto ら²⁵⁾ も、無血清培養系で、ヒトの歯根膜由来細胞の細胞増殖を bFGF が促進すると報告している。これらの研究はいずれも単層培養下で行われており、コラーゲン・ゲル内で培養した歯根膜由来細胞の増殖に対する TGF- β や bFGF の効果は報告されていない。Nakagawa ら⁴⁹⁾ はヒト皮膚由来線維芽細胞において、bFGF は単層培養系およびコラーゲン・ゲル内培養系いずれの培養系においても DNA 合成を促進する一方、TGF- β は単層培養系では DNA 合成を抑制し、コラーゲン・ゲル内培養系では DNA 合成を促進することを報告した。本研究では、bFGF は単層培養系およびコラーゲン・ゲル内培養系のいずれの培養系でも HPDL の増殖を促進した。一方、本研究においては TGF- β は単層培養系では HPDL の増殖を促進したのに対してコラーゲン・ゲル内培養系では増殖を抑制し、Nakagawa ら⁴⁹⁾ の結果とは逆の結果を得た。しかしながら、細胞増殖に及ぼす TGF- β の効果が培養系の違いによって影響を受けるという点では一致した。

TGF- β はヒト真皮由来線維芽細胞⁵⁰⁾、ヒト包皮由来線維芽細胞⁵¹⁻⁵³⁾ およびヒト歯根膜由来細胞⁵⁴⁾ によるコラーゲン・ゲル収縮を増強する。本研究においても、TGF- β は HPDL によるコラーゲン・ゲル収縮を増強した。一方、これまでに報告されている bFGF のコラーゲン・ゲル収縮に対する作用は、細胞種によって異なる。すなわち、Yang ら⁵⁵⁾ はヒト正常皮膚由来線維芽細胞では bFGF はゲル収縮には影響せず、Vernon と Sage⁵⁶⁾ は血管内皮細胞培養系ではゲル収縮を促進し、Imazumi ら⁵⁷⁾ はヒト正常真皮由来線維芽細胞ではゲル収縮を抑制したと報告している。また、Finesmith ら⁵⁸⁾ は、bFGF の濃度によってコラーゲン・ゲル収縮に対する作用が異なると報告している。すなわち、ヒト肉芽組織由来の線維芽細胞に対して低濃度 (0.1-1.0 ng/ml) の bFGF はコラーゲン・ゲル収縮を促進し、高濃度 (10 ng/ml 以上) の bFGF はコラーゲン・ゲル収縮を抑制した⁵⁸⁾。本研究では、bFGF は HPDL によるコラーゲン・ゲル収縮に影響を及ぼさなかった。このように、

bFGF のコラーゲン・ゲル収縮に与える影響は bFGF の標的となる細胞種によって様々である。

TGF- β はヒト骨肉腫由来細胞 (MG-63)^{59,60)}、ラット糸球体間質由来細胞⁶¹⁾、および正常ヒト皮膚由来線維芽細胞⁶²⁾ の単層培養系で、インテグリン $\alpha 2$ およびインテグリン $\alpha 2$ mRNA の発現を増加させる。本研究では、RT-PCR による解析の結果ではあるがコラーゲン・ゲル内培養系でインテグリン $\alpha 2$ の遺伝子発現が増加する傾向を示した。また、TGF- β はコラーゲン・ゲル内培養系で、HPDL の DNA 合成および細胞増殖を抑制したが、細胞数は培養開始時の播種細胞数と比較して増加した。さらに、TGF- β は抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体による細胞数の減少を回復させた。また、コラーゲン・ゲル収縮に対しては TGF- β はゲル収縮を増強し、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体はゲル収縮を阻害した。したがって、HPDL の増殖およびコラーゲン・ゲル収縮に対する TGF- β の作用は、インテグリン $\alpha 2$ を介したコラーゲンと HPDL の相互作用に密接に関連していると考えられる。加えて、TGF- β はインテグリン $\alpha 2$ の発現を制御し、細胞の生存に関わっている可能性が考えられる。

単層培養下においては、TGF- β は HPDL の DNA 合成とインテグリン $\alpha 2$ の発現を促進した。このことは、コラーゲン・ゲル内培養系におけるインテグリン $\alpha 2$ を介した TGF- β の増殖抑制作用に矛盾しているようであるが、単層培養系において、インテグリン $\alpha 2$ の HPDL の増殖における役割はコラーゲン・ゲル内培養系とは異なる可能性も考えられる。あるいはコラーゲン・ゲル内培養系での TGF- β の HPDL 増殖抑制は、コラーゲン・ゲル収縮が増強されたため生じた二次的な効果かもしれない。TGF- β は HPDL に対する直接的な制御と、コラーゲンの HPDL に対する作用をインテグリンを介して間接的に制御することにより HPDL の機能を調節していると考えられる。

HPDL の増殖とコラーゲン・ゲル収縮に対する TGF- β と bFGF の作用の結果から考察すると、bFGF は HPDL とコラーゲンの相互作用に影響を受けることなく HPDL の細胞増殖を調節し、TGF- β の HPDL の増殖に及ぼす作用は HPDL とコラーゲンの相互作用に影響を受けることが示唆された。本研究の結果では bFGF が HPDL とコラーゲンとの相互作用に影響を示さなかったことから、HPDL のインテグリン発現に対する bFGF の作用については検討しなかった。しかし、これまでの報告では bFGF は血管内皮細胞⁶³⁻⁶⁵⁾ や癌細胞⁶⁶⁾ の単層培養系でインテグリン発現を調節していることから、bFGF の HPDL のインテグリン発現に及ぼす作用についても今後検討する必要がある。

総 括

歯根膜細胞の機能発現に及ぼす、細胞と ECM の相互作用および ECM と増殖因子との相互作用を明らかにするために、コラーゲン・ゲル内培養系におけるヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 (HPDL) とコラーゲンの相互作用、コラーゲン・ゲル収縮および HPDL 増殖におけるインテグリンの役割、HPDL と I 型コラーゲンとの相互作用への TGF- β と bFGF の関与について検討し以下の結果を得た。

1. HPDL と I 型コラーゲンはインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ を介して相互に作用した。
2. TGF- β はインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ を介して、HPDL と I 型コラーゲンの相互作用を調節した。
3. TGF- β は HPDL におけるインテグリン $\alpha 2$ の発現を増加する傾向を示したが、細胞増殖に与える影響は単層培養とコラーゲン・ゲル内培養とは異なった。
4. bFGF は HPDL の細胞増殖を促進したが、I 型コラーゲンと HPDL の相互作用には直接関与しなかった。

結論として、TGF- β や bFGF などの増殖因子と ECM は個々に独立して HPDL の機能を制御しているのではなく、相互に密接に関連して、HPDL の機能を制御していることが明らかになった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導および御校閲を賜った本学歯科保存学第二講座栗原英見教授ならびに本学歯科保存学第二講座前教授、岡本莫名誉教授に衷心より感謝の意を表します。本研究遂行上、御指導、御助言、御校閲を賜った本学口腔生化学講座加藤幸夫教授ならびに本学口腔外科学第一講座岡本哲治教授に深謝いたします。

また、本研究の遂行上および本論文作成上、御指導、御助言を頂いた本学附属病院第二保存科東富恵講師ならびに終始御指導、御助言を頂いた本学歯科保存学第二講座柴秀樹助手に心から感謝の意を表します。さらに、本研究遂行上、御指導、御協力下さった本学歯科保存学第二講座河口浩之助手ならびに歯科補綴学第二講座牧平清超先生に深謝いたします。

最後に、本研究を進めるに際し、多大なる御支援を頂いた本学歯科保存学第二講座関係各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Kato, T., Usami, T., Noda, Y., Hasegawa, M., Ueda, M. and Nabeshima, T.: The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. *Behav. Brain Res.* **83**, 239-242, 1997.
- 2) Kleinman, H.K., Klebe, R.J. and Martin, G.R.: Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.* **88**, 473-485, 1981.
- 3) Yamada, K.M.: Cell surface interactions with extracellular materials. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 761-799, 1983.
- 4) 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.
- 5) Becker, J., Schuppan, D., Rabanus, J.P., Rauch, R., Niechoy, U. and Gelderblom, H.R.: Immunoelectron microscopic localization of collagens type I, V, VI and of procollagen type III in human periodontal ligament and cementum. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 103-110, 1991.
- 6) Hynes, R.O.: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549-554, 1987.
- 7) Hynes, R.O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25, 1992.
- 8) Hemler, M.E.: Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunol. Tod.* **9**, 109-113, 1988.
- 9) Bosman, F.T.: Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem. J.* **25**, 469-477, 1993.
- 10) Kramer, R.H. and Marks, N.: Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 4684-4688, 1989.
- 11) Belkin, V.M., Belkin, A.M. and Koteliansky, V.E.: Human smooth muscle VLA-1 integrin: purification, substrate specificity, localization in aorta, and expression during development. *J. Cell Biol.* **111**, 2159-2170, 1990.
- 12) Staatz, W.D., Fok, K.F., Zutter, M.M., Adams, S.P., Rodriguez, B. A. and Santoro, S.A.: Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the $\alpha 2 \beta 1$ integrin in collagen. *J. Biol. Chem.* **266**, 7363-7367, 1991.
- 13) Elices, M.J. and Hemler, M.E.: The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9906-9910, 1989.
- 14) Takada, Y., Wayner, E.A., Carter, W.G. and Hemler, M.E.: Extracellular matrix receptors, ECMRII and ECMRI, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the VLA family of heterodimers. *J. Cell Biochem.* **37**, 385-393, 1988.
- 15) Aota, S., Nagai, T. and Yamada, K.M.: Characterization of regions of fibronectin besides the arginine-glycine-aspartic acid sequence required for adhesive function of the cell-binding do-

- main using site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **266**, 15938–15943, 1991.
- 16) Nagai, T., Yamakawa, N., Aota, S., Yamada, S.S., Akiyama, S.K., Olden, K. and Yamada, K.M.: Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly. *J. Cell Biol.* **114**, 1295–1305, 1991.
 - 17) Wayner, E.A., Carter, W.G., Piotrowicz, R.S. and Kunicki, T.J.: The function of multiple extracellular matrix receptors in mediating cell adhesion to extracellular matrix: preparation of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins Ic-IIa. *J. Cell Biol.* **107**, 1881–1891, 1988.
 - 18) Asaga, H., Kikuchi, S. and Yoshizato, K.: Collagen gel contraction by fibroblasts requires cellular fibronectin but not plasma fibronectin. *Exp. Cell Res.* **193**, 167–174, 1991.
 - 19) Yamaji, Y., Kubota, T., Sasaguri, K., Sato, S., Suzuki, Y., Kumada, H. and Umemoto, T.: Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **63**, 3576–3581, 1995.
 - 20) Ohgi, S. and Johnson, P.W.: Glucose modulates growth of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells: correlation with expression of basic fibroblast growth factor. *J. Periodontol Res.* **31**, 579–588, 1996.
 - 21) Gao, J., Jordan, T.W. and Cutress, T.W.: Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in human periodontal ligament (PDL) tissue. *J. Periodontol Res.* **31**, 260–264, 1996.
 - 22) Matsuda, N., Lin, W.-L., Kumar, N.M., Cho, M.I. and Genco, R.J.: Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors *in vitro*. *J. Periodontol.* **63**, 515–525, 1992.
 - 23) Oates, T.W., Rouse, C.A. and Cochran, D.L.: Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells *in vitro*. *J. Periodontol.* **64**, 142–148, 1993.
 - 24) Terranova, V.P., Odziemiec, C., Tweden, K.S. and Spadone, D.P.: Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. *J. Periodontol.* **60**, 293–301, 1989.
 - 25) Okamoto, T., Yatsuzuka, N., Tanaka, Y., Kan, M., Yamanaka, T., Sakamoto, A., Takata, T., Akagawa, Y., Sato, G.H., Sato, J.D. and Takada, K.: Growth and differentiation of periodontal ligament-derived cells in serum-free defined culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **33**, 302–309, 1997.
 - 26) Bell, E., Invarsson, B. and Merrill, C.: Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1274–1278, 1979.
 - 27) Buttle, D.J. and Ehrlich, H.P.: Comparative studies of collagen lattice contraction utilizing a normal and a transformed cell line. *J. Cell. Physiol.* **116**, 159–166, 1983.
 - 28) Elsdale, T. and Bard, J.: Collagen substrata for studies on cell behavior. *J. Cell Biol.* **54**, 626–637, 1972.
 - 29) Sarber, R., Hull, B., Merrill, C., Soranno, T. and Bell, E.: Regulation of proliferation of fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. *Mech. Age. Dev.* **17**, 107–117, 1981.
 - 30) Schor, S.L.: Cell proliferation and migration on collagen substrata *in vitro*. *J. Cell Sci.* **41**, 159–175, 1980.
 - 31) Nishiyama, T., Tominaga, N., Nakajima, K. and Hayashi, T.: Quantitative evaluation of the factors affecting the process of fibroblast-mediated collagen gel contraction by separating the process into three phases. *Collagen Rel. Res.* **8**, 259–273, 1988.
 - 32) Stopak, D. and Harris, A.K.: Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. 1. Tissue culture observations. *Develop. Biol.* **90**, 383–398, 1982.
 - 33) Harris, A.K., Stopak, D. and Wild, P.: Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature (London)* **290**, 249–251.
 - 34) Stephens, L.E., Sonne, J.E., Fitzgerald, M.L. and Damsky, C.H.: Targeted deletion of $\beta 1$ integrins in F9 embryonal carcinoma cells affects morphological differentiation but not tissue-specific gene expression. *J. Cell Biol.* **123**, 1607–1620, 1993.
 - 35) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680–685, 1970.
 - 36) Takada, Y. and Hemler, M.E.: The primary structure of the VLA-2/collagen receptor $\alpha 2$ subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain. *J. Cell Biol.* **109**, 397–407, 1989.
 - 37) Tokunaga, K., Nakamura, Y., Sakata, K., Fujimori, K., Ohkubo, M., Sawada, K. and Sakiyama, S.: Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res.* **47**, 5616–5619, 1987.
 - 38) Fabbri, M., Castellani, P., Gotwals, P.J., Kotlianski, V., Zardi, L. and Zocchi, M.R.: A functional monoclonal antibody recognizing the human alpha 1-integrin I-domain. *Tissue Antigens* **48**, 47–51, 1996.

- 39) Carter, W.G., Wayner E.A., Bouchard, T.S. and Kaur, P.: The role of integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J. Cell Biol.* **110**, 1387–1404, 1990.
- 40) Campanero, M.R., Arroyo, A.G., Pulido, R., Urso, A., de Matías, M.S., Sánchez-Matcos, P., Kassner, P.D., Chan, B.M.C., Hemler, M.E., Corbí, A.L., de Landázuri, M.O. and Sánchez-Madrid, F.: Functional role of $\alpha 2/\beta 1$ and $\alpha 4/\beta 1$ integrins in leukocyte intercellular adhesion induced through the common $\beta 1$ subunit. *Eur. J. Immunol.* **22**, 3111–3119, 1992.
- 41) Klein, C.E., Dressel, D., Steinmayer, T., Mauch, C., Eckes, B., Krieg, T., Bankert, R.B. and Weber, L.: Integrin $\alpha 2\beta 1$ is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J. Cell Biol.* **115**, 1427–1436, 1991.
- 42) Schiro, J.A., Chan, B.M.C., Roswit, W.T., Kassner, P.D., Pentland, A.P., Hemler, M.E., Eisen, A.Z. and Kupper, T.S.: Integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell* **67**, 403–410, 1991.
- 43) Carver, W., Molano, I., Reaves, T.A., Borg, T.K. and Terracio, L.: Role of the $\alpha 1\beta 1$ integrin complex in collagen gel contraction in vitro by fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **165**, 425–437, 1995.
- 44) Tomasek, J.J. and Akiyama, S.K.: Fibroblast-mediated collagen gel contraction does not require fibronectin- $\alpha 5\beta 1$ integrin interaction. *Anat. Rec.* **234**, 153–160, 1992.
- 45) Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**, 491–497, 1987.
- 46) Yamada, K.M.: Fibronectins: structure, functions and receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1**, 956–963, 1989.
- 47) Ruoslahti, E.: Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.* **264**, 13369–13372, 1989.
- 48) Saelman, E.U.M., Keely, P.J. and Santoro, S.A.: Loss of MDCK cell $\alpha 2\beta 1$ integrin expression results in reduced cyst formation, failure of hepatocyte growth factor/scatter factor-induced branching morphogenesis, and increased apoptosis. *J. Cell Sci.* **108**, 3531–3540, 1995.
- 49) Nakagawa, S., Pawelek, P. and Grinnell, F.: Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness. *Exp. Cell Res.* **182**, 572–582, 1989.
- 50) Reed, M.J., Vernon, R.B., Abrass, I.B. and Sage, E.H.: TGF- $\beta 1$ induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J. Cell. Physiol.* **158**, 169–179, 1994.
- 51) Tingström, A., Heldin, C. H. and Rubin, K.: Regulation of fibroblast-mediated collagen gel contraction by platelet-derived growth factor, interleukin-1 α and transforming growth factor- $\beta 1$. *J. Cell Sci.* **102**, 315–322, 1992.
- 52) Montesano, R. and Orci, L.: Transforming growth factor β stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4894–4897, 1988.
- 53) Guidry, C. and Hook, M.: Endothelins produced by endothelial cells promote collagen gel contraction by fibroblasts. *J. Cell Biol.* **115**, 873–880, 1991.
- 54) MacNeil, R.L., D'Errico, J., Strayhorn, C., Pickrum, H. and Somerman, M.J.: Agents with periodontal regenerative potential regulate cell-mediated collagen lattice contraction *in vitro*. *J. Dent. Res.* **75**, 903–911, 1996.
- 55) Yang, C.C., Lin, S.D. and Yu, H.S.: Effect of growth factors on dermal fibroblast contraction in normal skin and hypertrophic scar. *J. Dermatol. Sci.* **14**, 162–169, 1997.
- 56) Vernon, R.B. and Sage, E.H.: Contraction of fibrillar type I collagen by endothelial cells: a study *in vitro*. *J. Cell. Biochem.* **60**, 185–197, 1996.
- 57) Imaizumi, T., Jean-Louis, F., Dubertret, M.L., Bailly, C., Cicurel, L., Petchot-Bacque, J.P. and Dubertret, L.: Effect of human basic fibroblast growth factor on fibroblast proliferation, cell volume, collagen lattice contraction: in comparison with acidic type. *J. Dermatol. Sci.* **11**, 134–141, 1996.
- 58) Finesmith, T.H., Broadley, K.N. and Davidson, J.M.: Fibroblasts from wounds of different stages of repair vary in their ability to contract a collagen gel in response to growth factors. *J. Cell. Physiol.* **144**, 99–107, 1990.
- 59) Heino, J. and Massagué, J.: Transforming growth factor- β switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J. Biol. Chem.* **264**, 21806–21811, 1989.
- 60) Riikonen, T., Koivisto, L., Vihinen, P. and Heino, J.: Transforming growth factor- β regulates collagen gel contraction by increasing $\alpha 2\beta 1$ integrin expression in osteogenic cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 376–382, 1995.
- 61) Kagami, S., Kuhara, T., Yasutomo, K., Okada, K., Löster, K., Reutter, W. and Kuroda, Y.: Transforming growth factor- β (TGF- β) stimulates the expression of $\beta 1$ integrins and adhesion by rat mesangial cells. *Exp. Cell Res.* **229**, 1–6, 1996.
- 62) Osada, K., Seishima, M., Kitajima, Y., Yaoita, H. and Mori, S.: Decreased integrin $\alpha 2$, but normal response to TGF- β in scleroderma fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* **9**, 169–175, 1995.
- 63) Klein, S., Giancotti, F.G., Presta, M., Albelda, S.M.,

- Buck, C.A. and Rifkin, D.B.: Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* **4**, 973–982, 1993.
- 64) Sepp, N.T., Li, L.-J., Lee, K.H., Brown, E.J., Caughman, S.W., Lawley, T.J. and Swerlick, R.A.: Basic fibroblast growth factor increases expression of the $\alpha v\beta 3$ integrin complex on human microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 295–299, 1994.
- 65) Enenstein, J., Waleh, N.S. and Kramer, R.H.: Basic FGF and TGF- β differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **203**, 499–503, 1992.
- 66) Elliott, B., Östman, A., Westermark, B. and Rubin, K.: Modulation of growth factor responsiveness of murine mammary carcinoma cells by cell matrix interactions: correlation of cell proliferation and spreading. *J. Cell. Physiol.* **152**, 292–301, 1992.