



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	EXTRACELLULAR MATRIX MODULATES EXPRESSION OF CELL-SURFACE PROTEOGLYCAN GENES IN FIBROBLASTS
Author(s)	Sawagichi, Naohiro
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第7630号
Issue Date	2006-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k7630
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32663
Type	doctoral thesis
File Information	7630.pdf



学位論文

EXTRACELLULAR MATRIX MODULATES EXPRESSION OF
CELL-SURFACE PROTEOGLYCAN GENES IN FIBROBLASTS

（ 細胞外マトリックスによる
線維芽細胞表面プロテオグリカン遺伝子発現の変化 ）

北 海 道 大 学

沢 口 直 弘



緒言

細胞表面プロテオグリカンは、細胞外微小環境の構成体との相互作用において様々な機能を有している。細胞表面プロテオグリカンは様々な細胞接着因子、成長因子、サイトカインと結合し co-receptor として機能しているとの報告もある[1]。これら細胞表面プロテオグリカンはコアタンパクと酸性ムコ多糖の一部が構造的な多様性を有しており、その発現形態が厳密に制御されているため、それぞれの細胞表面プロテオグリカンには明晰とした役割が備わっている[2] [3]。このことは、様々な生物学的活性因子に対する細胞表面プロテオグリカンの反応は選択的でありかつ細胞種特異的であることを示している。

生体において、多くの細胞の土台となっているのは細胞外基質である。細胞外基質は細胞膜貫通型のレセプターであるインテグリンを介し細胞と接着する。この接着を通して細胞外基質は物理的なシグナルを細胞に送り、細胞の成長、増殖、分化、細胞外基質の産生などを制御している[4]。それゆえ、細胞と細胞外基質の相互作用が生体組織の発達や修復、再構築などに大きな役割を果たしているといえる。組織工学的手法を用いた再生医療では、生体適合性があり生体吸収性のある素材を用いた基材に培養細胞を播種培養することにより組織再生を達成している。多くの研究が、細胞が接着し増殖するためには基材を構成する生体材料の適切な選択が重要であると報告している[5-10]。これらの理由から、基材となる材料と単離された細胞との相互作用をより組

組織特異的な生体内環境に近づけることが組織再生を成功させるためには必要である [6].

細胞外基質や成長因子, サイトカインなどの刺激因子に対する細胞の反応はプロテオグリカンによって調節されているといわれている [1-3]. 代表的な細胞表面プロテオグリカンには CD44 (ヒアルロン酸レセプター) , betaglycan (transforming growth factor [TGF]- β type III receptor), syndecan (transmembrane heparan sulfate proteoglycan), glypican (glycosylphosphatidyl inositol [GPI]-anchored heparan sulphate proteoglycan) ファミリーがある [1, 11-15]. しかし, これらのプロテオグリカンの発現が培養あるいは, 成長過程においてにどのように変化するかは明らかではない. 再生医療においては, この点を解明することが組織特異的な本来の環境を模倣するような基材材料の開発につながる.

ヒアルロン酸はグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンを交互に成長する鎖に添加しながら繰り返す, 2 糖を単位とした線状大分子ポリマー構造で, 生体において一生涯にわたりそれぞれ異なった目的, 生産量で細胞より産生される. ヒアルロン酸の生物学的活性はとても重要である. なぜなら, ヒアルロン酸は生体内において発生の最も早い段階から存在する酸性ムコ多糖だからである. 我々は腱・靱帯の組織工学的再生に用いる基材材料としてキトサン・ヒアルロン酸ハイブリッドファイバーを独自に開発した [16]. これまでの研究でヒアルロン酸は線維芽細胞の活動性を高めその細胞

接着能, 細胞増殖能, 基質産生能が向上することを報告してきた. しかし, ヒアルロン酸の線維芽細胞表面のプロテオグリカンに与える影響は明らかにされていない.

本実験では細胞表面プロテオグリカンの発現は細胞を培養する環境によって変化するという仮説をたてた. この仮説を実証するため, 我々は *in vitro* で線維芽細胞を様々な環境下で培養し, 細胞表面プロテオグリカンの発現を定量した. 本研究の第1の目的は線維芽細胞を単離, 平面培養し継代を重ねていく過程における細胞表面プロテオグリカンの発現の変化を評価すること. 第2の目的は組織中の主要な細胞外マトリックス構成体である type I コラーゲンおよび, ヒアルロン酸の線維芽細胞表面プロテオグリカンに与える影響を明らかにすること. そして, 2次元培養環境と3次元培養環境でそれぞれのプロテオグリカンの発現の違いを明らかにすることである. 本実験で得られた結果は, 今後の組織工学的手法を用いた腱・靱帯再生において, 基材料の開発に有用な情報を提供し得ると考える.

材料と方法

細胞の単離および単層培養

線維芽細胞は雄 Wister rat (体重: 280-320g) のアキレス腱および膝蓋腱より単離した。腱組織を 0.25% コラゲナーゼ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) および 0.25% トリプシン (Invitrogen Corp.) にて酵素処理することにより細胞を腱組織より単離した[17]。この段階の細胞を P-0 と定義した。培養には Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) + 10% 仔牛血清 (Invitrogen Corp.), 抗生剤 (Penicillin-Streptomycin-Fungizone 100 ×, BioWhittaker, Walkersville, MD) を用いて行った。単離した細胞はポリスチレン製細胞培養皿 (well diameter 60 mm; CORNING, Corning, NY), type I コラーゲンコートした培養皿 (Nitta Gelatin, Tokyo, Japan) に播種 (10,000 cells/cm²) し 37°C, 5% CO₂ で培養した[18]。プロテオグリカンの発現に対するヒアルロン酸の効果を明らかにするため 0.3% type I コラーゲンにヒアルロン酸 (分子量 = 210- kDa; Denkikagaku Kogyo, Tokyo, Japan) を最終濃度 0.1% となるよう混ぜたものをコートし、同様に培養した。細胞培養は 37°C, 5% CO₂ 環境下で行い、週に 2 回培養液を交換した。コンフルエントとなった細胞を P-1 と定義し、トリプシン処理することにより引き続き継代培養を行い、コンフルエントとなった細胞をそれぞれ P2, P3 と定義した。継代に当たっては 1:3 の割合で細胞を分割した。

3 次元培養

3 次元培養環境での影響を調べるため、6 穴の平面底培養皿 (well diameter 35 mm; Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ) に 0.3% type I コラーゲングル (Nitta Gelatin) および 0.3% type I コラーゲングル + 210-kDa ヒアルロン酸 (最終濃度 0.1 %) に細胞を包埋 (5×10^4 /mL) し包埋培養した[18]. 事前に培養皿に 1 mL のコラーゲングルを入れ 30 分 37 °C 環境下でゲルを硬化させ、その上層に 2 mL の細胞を包埋したゲルを加え、さらに 3 mL の培養液を加え培養した. コンフルエントとなった細胞を P-1 と定義した. 引き続き継代培養をコラゲナーゼ, トリプシンを用いて行い, 1:3 の割合で細胞を分割, コンフルエントとなった細胞をそれぞれ P-2, P-3 とした.

RNA 抽出

細胞全 RNA を臍組織, それぞれの継代細胞 (P0, P1, P2, and P3) より RNA 抽出試薬 TRIzol (Reagent) (Invitrogen) を用いてメーカーの手技書通りに抽出した. 臍組織は RNA 抽出前に液体窒素で氷結, 組織粉碎の後 RNA を抽出した. 細胞は平面培養では細胞をトリプシン処理し培養皿から剥がしてから RNA を抽出し, 3 次元培養ではコラゲナーゼ処理しコラーゲンから細胞を単離してから RNA を抽出した. 得られた RNA は RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した. 得られた全 RNA サンプルは濃度と純度を分光光度計を用いて評価した.

RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction)

1 μg の RNA を random hexamer primers (Promega, Madison, WI) と 逆転写酵素 (Improm-II reverse transcriptase, Promega) を用いて, cDNA の合成を手技書に従って行った. Real-time PCR はサーマルサイクラー (OPTICON II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用い 20- μL の反応量で行った. 反応は SYBR Green qPCR Kit (Finzymes, Espoo, Finland) を用い, 遺伝子特異的なプライマーをプライマー設計ソフト (OLIGO, Molecular Biology Insights, Cascade, CO) (表 1) で設計した. Real-time PCR は 95 °C 15 分変性ステップに引き続き 94 °C 10 秒, 56 °C 20 秒, 72 °C 30 秒のサイクルを 40 回行った. 蛍光強度の計測は 72 °C のサイクル毎に行い定量評価した. 遺伝子発現の定量には比較 Ct 法を用いた. ハウスキーピング遺伝子と目的遺伝子の平均 ΔCt 値の差 ($\Delta-\text{Ct}$) をキャリブレーターサンプルの Ct 値と引き算し $\Delta-\Delta-\text{Ct}$ とし, $\text{Log}_2 (\Delta-\Delta-\text{Ct})$ が臍組織中の発現を 1 としたときの相対定量値とした. ハウスキーピング遺伝子には Gapdh (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) を用い, 得られた結果は t-test を用いて統計学的に評価した.

結果

単離した細胞および初代培養におけるプロテオグリカンの発現

示されているすべての結果は膵組織中の mRNA の発現と、それぞれの細胞で発現している mRNA を比較した相対値で示した (図 1). 膵組織を酵素処理することによって単離した細胞では, CD44 ($p<0.01$), syndecan-4 ($p<0.01$) の発現が有意に上昇していた. しかしその他のプロテオグリカン (syndecan-1, -2, betaglycan, glypican-1) では, P-0 において有意にその発現が減少していた (図 1-A). 引き続き何もコートしていない培養皿で継代すると, CD44, syndecan-4 の発現は膵組織中での発現と比較し大きな差はなかった. その他のプロテオグリカンに関しては, 継代によって有意にその発現が減少した ($p<0.05$) (図 1-B).

細胞外基質をコートした培養皿の影響

何もコートしていない培養皿での培養と type I コラーゲンをコートした培養皿での培養において, CD-44, syndecan-4 の発現に関して有意な差はなかった. type I コラーゲンをコートした培養皿での培養では betaglycan, syndecan-1 の mRNA の発現が何もコートしていない培養皿での培養と同様、その発現は組織中の発現と比べ低値であった. また syndecan-3 に関しても、何もコートしていない培養皿での培養と同様に type I コラーゲンをコートした培養皿での培養においてはその発現が継代によって漸減し、

glypican-1 の発現も継代とともに減少した(図 1-C). コラーゲンにヒアルロン酸を添加すると, syndecan-2 の発現が P-1 で上昇したものの ($p<0.05$), その後漸減した. syndecan-4, CD-44 の発現は P-3 で有意に上昇した ($p<0.05$) (図 1-D). 形態学的には, 細胞外基質をコートすることにより細胞は突起を多く出す構造へと変化するが, ヒアルロン酸の有無では大きな違いは認めなかった. また, 細胞の接着性や増殖性はコラーゲンをコートすることにより有意に向上するが, ヒアルロン酸の有無では大きな違いは認めなかった (データ未掲載) .

3 次元培養環境

細胞を 3 次元培養環境に移すことにより, 2 次元培養環境に比べ各継代時における CD44 の発現が有意に上昇した (2 次元培養, P-1, P-2, P-3 : $p=0.22, 0.35, 0.61$ vs. 3 次元培養, P-1, P-2, P-3 : $p<0.05, 0.05, 0.05$) . また, syndecan-4 の発現も継代とともに上昇し, P-3 において有意な上昇がみられた (2 次元培養, P-1, P-2, P-3 : $p=0.40, 0.41, 0.94$ vs. 3 次元培養, P-1, P-2, P-3 : $p=0.12, 0.10, <0.01$) (図 1-E). ヒアルロン酸をコラーゲンゲルに加えることにより, CD-44, syndecan-4 の発現が P-1 から有意に上昇した (CD-44, P-1, P-2, P-3 : $p<0.01, <0.01, <0.01$, syndecan-4, P-1, P-2, P-3 : $p<0.05, <0.01, <0.01$) (図 1-F). syndecan-3 の発現は 2 次元培養環境と同様に, ヒアルロン酸の有無に関係なく継代と

もに, syndecan-1, betaglycan の発現も 2 次元培養と同様にヒアルロン酸の有無に関係なく, 組織中の発現に比べ低値だった. glypican-1 の発現は低値だった。

考察

本研究は、本来成長因子やサイトカインによってその発現が調節されているとされる細胞表面プロテオグリカンが、線維芽細胞を組織から単離することや培養条件によっても変化することを明らかにした。細胞を組織より単離し単層培養する過程で、syndecan-1, -2, -3, betaglycan, glypican-1 の mRNA の発現は漸減した。一方、細胞を単離することにより、細胞接着に強く関わっているとされる CD-44 および syndecan-4 mRNA の発現が大きく増加した。syndecan-4 は接着斑の広範囲に及ぶ構成体である唯一の syndecan である[11]。syndecan-4 を Chinese Hamster Ovary 細胞に過剰発現させると、cell spreading が増し、接着斑の数や大きさも増えると報告されている[11]。CD-44 はヒアルロン酸特異的接着に作用し、線維芽細胞を含め数多くの異なった細胞種でも観察されている[19]。また、ヒアルロン酸は膝蓋腱中のムコ多糖類の 22%を占める[20]ことから腱・靱帯の線維芽細胞にとってヒアルロン酸は重要な分子であると考えられる。syndecan-2 は fibroglycan とも呼ばれており、線維芽細胞にとって主要な syndecan の一つであり、おもに TGF- β の情報伝達に関っており[21]、laminin や fibronectin などの基質蛋白とも相互作用する[22] [23]。betaglycan も同様に、TGF- β type III レセプターであるがこれらのプロテオグリカンは平面培養での発現は低かった。

線維芽細胞を平面培養から 3 次元コラーゲン培養に移すことは、線維芽細胞の機能的特性をより in vivo の環境に近づけることができる[24] [25]。本研究では、培養環境を

3次元にすることによって syndecan-4 の発現が劇的に増加した。他の報告では、線維芽細胞を 3 次元培養することによりデルマタン硫酸やムコ多糖類の産生量が上昇したとの報告もある[26]。これらの結果は細胞の反応において、細胞外の環境が重要であることを示している。従来から、より *in vivo* の環境を模倣するため細胞培養において培養液の組成や、周囲の混合ガスの組成などの重要性が強く強調されてきた。しかし、細胞反応における培養構造の影響に関してはあまり議論されてきていない。生体内の環境との明らかな違いは、周囲を取り巻く細胞外基質との接触が少ないことである。3 次元の培養環境は、プロテオグリカンの遺伝子発現ではより生体の環境に近い状況を作ることが可能だといえる。本研究は、従来より行われている 2 次元での培養だけでなく 3 次元の培養においても、細胞表面プロテオグリカンの遺伝子発現を定量化したという点で、意義のあるものと考ええる。

コラーゲンにヒアルロン酸を添加することにより、平面培養では P-3 において CD-44, syndecan-4 の発現が有意に上昇していた。また、3 次元培養では P-1 から syndecan-4 mRNA の発現が有意に上昇していた。これらの結果は、ヒアルロン酸が細胞反応に影響を与えていることを示しており、軟骨細胞で提唱されているヒアルロン酸が細胞と基質の相互作用を伝えているという報告とも一致する[27]。最近の研究では、平滑筋細胞や、血管外膜線維芽細胞においてヒアルロン酸がコラーゲンの収縮を増強する[28]が、皮膚の線維芽細胞では増強しない[29]といった報告がある。これらの結果は細胞外

のヒアルロン酸は細胞株により異なった効果があることを示している。細胞の活動性に与えるヒアルロン酸の効果に関しては異論が多い。いくつかの研究ではヒアルロン酸の高い細胞接着性が報告されている[30-34]。一方 Zimmerman らは[35]、過剰なヒアルロン酸は細胞接着を強く阻害すると報告し、Hang-Lee らは[31]高濃度のヒアルロン酸は線維芽細胞と基質の間の直接的な伝達を阻害するバリアーとして作用すると報告している。これらの報告を受け、本実験では 0.1%と低濃度のヒアルロン酸をコラーゲンに添加しその効果を検討した。本研究では、細胞活動を促進するために適切なヒアルロン酸濃度を吟味していないが、以前の研究では低濃度のヒアルロン酸が腱由来線維芽細胞の接着性や増殖性、基質産生能を促進すると報告している[16]。

本研究の結果から、細胞外基質に対する線維芽細胞表面プロテオグリカン発現の反応は可變的であることが明らかとなった。このことは細胞表面プロテオグリカン産生制御の一つのメカニズムを示している。これまでに、成長因子やサイトカインがこれらのプロテオグリカンの発現を制御しているという報告はある[36]。しかし、本研究では腱・靱帯由来線維芽細胞において、細胞外基質や培養するディメンジョンの違いで細胞表面プロテオグリカンの発現を制御できる可能性が示唆された。これらプロテオグリカンの発現の制御は、異なった細胞外基質への細胞の反応が腱・靱帯組織の修復にかかわるメカニズムの 1 つとなりうる可能性がある。

本研究の限界は、細胞表面プロテオグリカンの mRNA の発現しか定量していない点である。蛋白の発現に関しては今後明らかにしなければならない問題点である。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり、始終御指導、御助言を賜りました北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野 三浪明男教授に深く感謝いたします。

また直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野 眞島任史助教授、岩崎倫政講師に心より感謝します。また、様々な面で御協力頂きました整形外科学分野の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1 Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M.
Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999; **68**:
729-777.
- 2 Cizmeci-Smith G, Langan E, Youkey J, Showalter LJ, Carey DJ. Syndecan-4 is a
primary-response gene induced by basic fibroblast growth factor and arterial injury in
vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 172-180.
- 3 Cizmeci-Smith G, Stahl RC, Showalter LJ, Carey DJ. Differential expression of
transmembrane proteoglycans in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; **268**:
18740-18747.
- 4 Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: M33-37.
- 5 Jackson DW, Simon TM, Lowery W, Gendler E. Biologic remodeling after anterior
cruciate ligament reconstruction using a collagen matrix derived from demineralized
bone. An experimental study in the goat model. *Am J Sports Med* 1996; **24**: 405-414.
- 6 Lu HH, Cooper JA, Jr., Manuel S, Freeman JW, Attawia MA, Ko FK, Laurencin CT.
Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro
optimization studies. *Biomaterials* 2005; **26**: 4805-4816.

- 7 Jackson DW, Heinrich JT, Simon TM. Biologic and synthetic implants to replace the anterior cruciate ligament. *Arthroscopy* 1994; **10**: 442-452.
- 8 Dunn MG, Liesch JB, Tiku ML, Zawadsky JP. Development of fibroblast-seeded ligament analogs for ACL reconstruction. *J Biomed Mater Res* 1995; **29**: 1363-1371.
- 9 Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 2002; **23**: 4131-4141.
- 10 Bourke SL, Kohn J, Dunn MG. Preliminary development of a novel resorbable synthetic polymer fiber scaffold for anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Eng* 2004; **10**: 43-52.
- 11 Woods A. Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. *J Clin Invest* 2001; **107**: 935-941.
- 12 Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* 2001; **108**: 497-501.
- 13 Fransson LA. Glypicans. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 125-129.
- 14 Tumova S, Woods A, Couchman JR. Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; **32**: 269-288.

- 15 Yoneda A, Couchman JR. Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. *Matrix Biol* 2003; **22**: 25-33.
- 16 Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N, Yamane S, Masuko T, Minami A, Harada K, Tamura H, Tokura S, Nishimura S. Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005; **74**: 338-346.
- 17 Banes AJ, Donlon K, Link GW, Gillespie Y, Bevin AG, Peterson HD, Bynum D, Watts S, Dahners L. Cell populations of tendon: a simplified method for isolation of synovial cells and internal fibroblasts: confirmation of origin and biologic properties. *J Orthop Res* 1988; **6**: 83-94.
- 18 Senoo H, Imai K, Sato M, Kojima N, Miura M, Hata R. Three-dimensional structure of extracellular matrix reversibly regulates morphology, proliferation and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells (vitamin A-storing cells). *Cell Biol Int* 1996; **20**: 501-512.
- 19 Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 726-733.

- 20 Gassler N, Tugtekin I, Decker B, Bosch U, Delbruck A. Changes in the extracellular matrix of the autogenous patellar tendon graft after posterior cruciate ligament reconstruction: a biochemical study in sheep. *Matrix Biol* 1994; **14**: 87-99.
- 21 Chen L, Klass C, Woods A. Syndecan-2 regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 2004; **279**: 15715-15718.
- 22 Utani A, Nomizu M, Matsuura H, Kato K, Kobayashi T, Takeda U, Aota S, Nielsen PK, Shinkai H. A unique sequence of the laminin alpha 3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4. *J Biol Chem* 2001; **276**: 28779-28788.
- 23 Kusano Y, Oguri K, Nagayasu Y, Munesue S, Ishihara M, Saiki I, Yonekura H, Yamamoto H, Okayama M. Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Exp Cell Res* 2000; **256**: 434-444.
- 24 Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001; **294**: 1708-1712.
- 25 Moulin V, Castilloux G, Jean A, Garrel DR, Auger FA, Germain L. In vitro models to study wound healing fibroblasts. *Burns* 1996; **22**: 359-362.

- 26 Lee PH, Trowbridge JM, Taylor KR, Morhenn VB, Gallo RL. Dermatan sulfate proteoglycan and glycosaminoglycan synthesis is induced in fibroblasts by transfer to a three-dimensional extracellular environment. *J Biol Chem* 2004; **279**: 48640-48646.
- 27 Knudson CB, Nofal GA, Pamintuan L, Aguiar DJ. The chondrocyte pericellular matrix: a model for hyaluronan-mediated cell-matrix interactions. *Biochem Soc Trans* 1999; **27**: 142-147.
- 28 Travis JA, Hughes MG, Wong JM, Wagner WD, Geary RL. Hyaluronan enhances contraction of collagen by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts: Role of CD44 and implications for constrictive remodeling. *Circ Res* 2001; **88**: 77-83.
- 29 Boraldi F, Croce MA, Quaglini D, Sammarco R, Carnevali E, Tiozzo R, Pasquali-Ronchetti I. Cell-matrix interactions of in vitro human skin fibroblasts upon addition of hyaluronan. *Tissue Cell* 2003; **35**: 37-45.
- 30 Huang-Lee LL, Wu JH, Nimni ME. Effects of hyaluronan on collagen fibrillar matrix contraction by fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1994; **28**: 123-132.
- 31 Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, Kumta SM. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A* 2003; **66**: 880-884.

- 32 Roy F, DeBlois C, Doillon CJ. Extracellular matrix analogs as carriers for growth factors: in vitro fibroblast behavior. *J Biomed Mater Res* 1993; **27**: 389-397.
- 33 Hu M, Sabelman EE, Lai S, Timek EK, Zhang F, Hentz VR, Lineaweaver WC. Polypeptide resurfacing method improves fibroblast's adhesion to hyaluronan strands. *J Biomed Mater Res* 1999; **47**: 79-84.
- 34 Lokeshwar VB, Iida N, Bourguignon LY. The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 1996; **271**: 23853-23864.
- 35 Zimmerman E, Geiger B, Addadi L. Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J* 2002; **82**: 1848-1857.
- 36 Worapamorn W, Haase HR, Li H, Bartold PM. Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 2001; **186**: 448-456.

図および表

図1. それぞれの遺伝子の発現量を、腱組織中の発現量と細胞の発現量を比較定量し fold difference ($2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SE$) で示した ($n = 3-5$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). A: P0. B: 何もコートしていない培養皿で培養した細胞. C: type I コラーゲンをコートした培養皿で培養した細胞. D: type I コラーゲン+0.1% ヒアルロン酸をコートした培養皿で培養した細胞. E: type I コラーゲンゲル中で培養した細胞. F: type I コラーゲン+ 0.1% ヒアルロン酸ゲル中で培養した細胞. (SDC, syndecan; BGC, betaglycan; GPC, glypican) GPC-3 は検出限界以下だった.

表 1
プライマー Sequences

Gene	Sequence	GenBank Accession No.
CD44	5'-CCGTTACGCAGGTGTATTCC-3' 5'-TGTTGAAAGCCTCGCAGAG-3'	U96139
SDC1	5'-CCTACCGCTGTGCCGTCT-3' 5'-TGCACCCAAGCTTCTAGCAG-3'	M81785
SDC2	5'-TGTTCAAGCGGACGGAGGT-3' 5'-TTGCGTTCTCCAAGGTCGTA-3'	NM_013082
SDC3	5'-CTTGGCCTCCACGACAAT-3' 5'-GCACCTCCTTCCGCTCTAGT-3'	U52825
SDC4	5'-GATTGTGGGCGGCGTAG-3' 5'-CTTGCCCAAGTCGTAAGTGC-3'	NM_012649
BGC	5'-GCCGCCGAAGGTTGTG-3' 5'-CTGGAAAGCGCTGTAAGGGT-3'	M77809
GPC1	5'-GGTGTGGCCAGTGACGTAG-3' 5'-TTGAGCACATTTCGGCAATA-3'	NM_030828
GPC3	5'-GAGCTCGTGAACGGCATGTA-3' 5'-GGAGTGGGCGCACAACT-3'	NM_012774
Gapdh	5'-GCTGGTCATCAACGGGAAA-3' 5'-ACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'	X02231
Gapdh, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase gene		

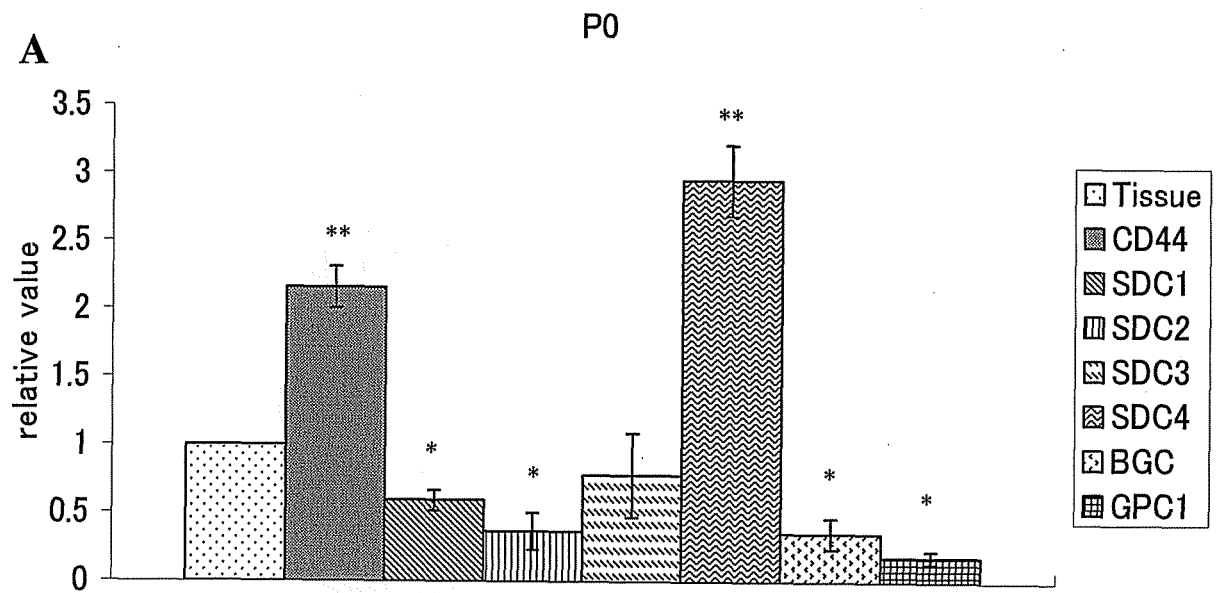


図 1-A 沢口 直弘

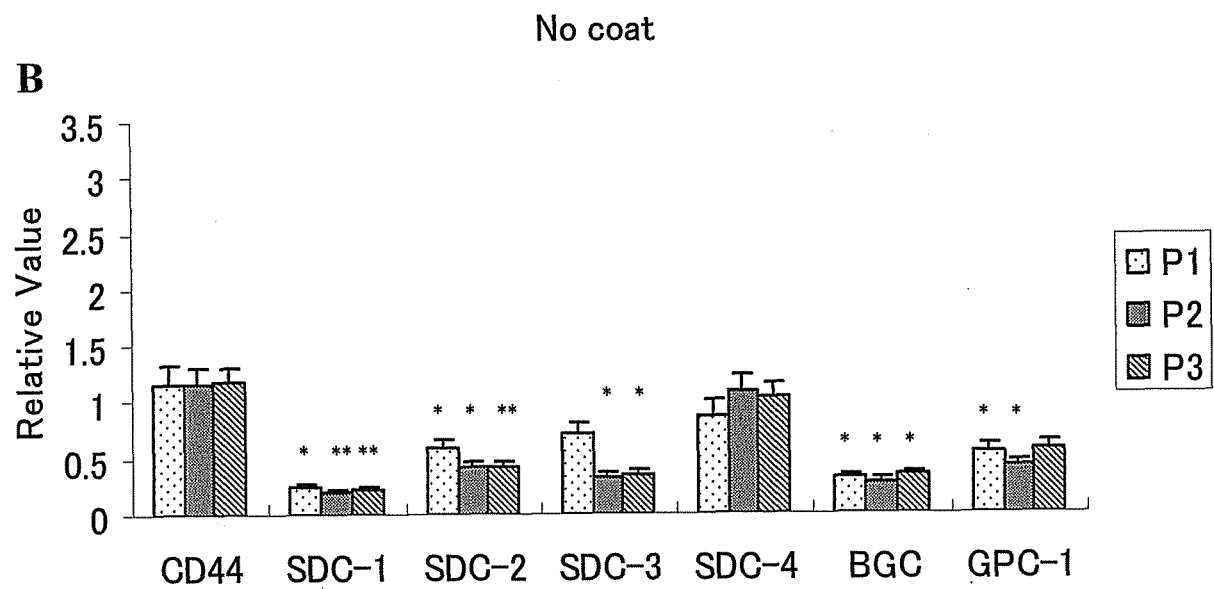


図 1-B 沢口 直弘

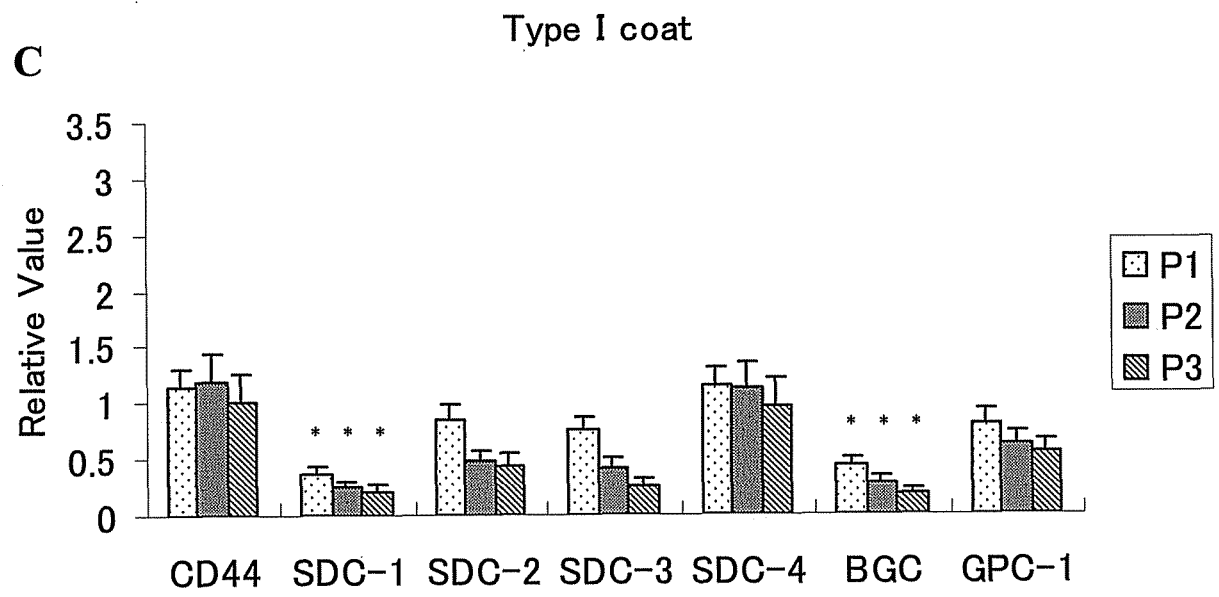


図 1-C 沢口 直弘

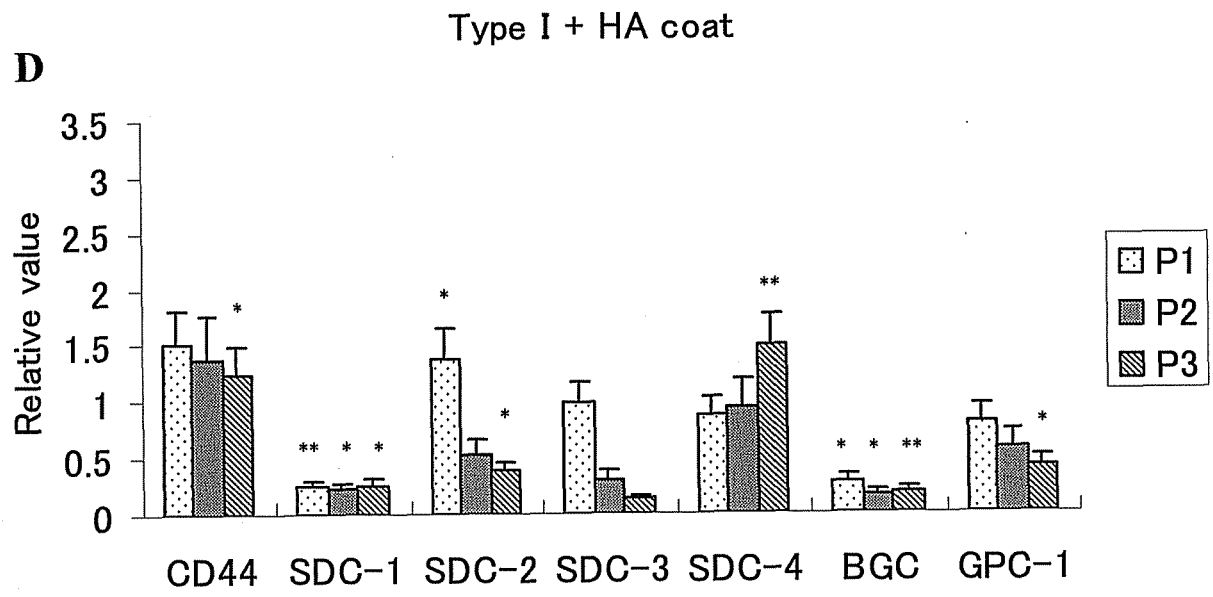


図 1-D 沢口 直弘

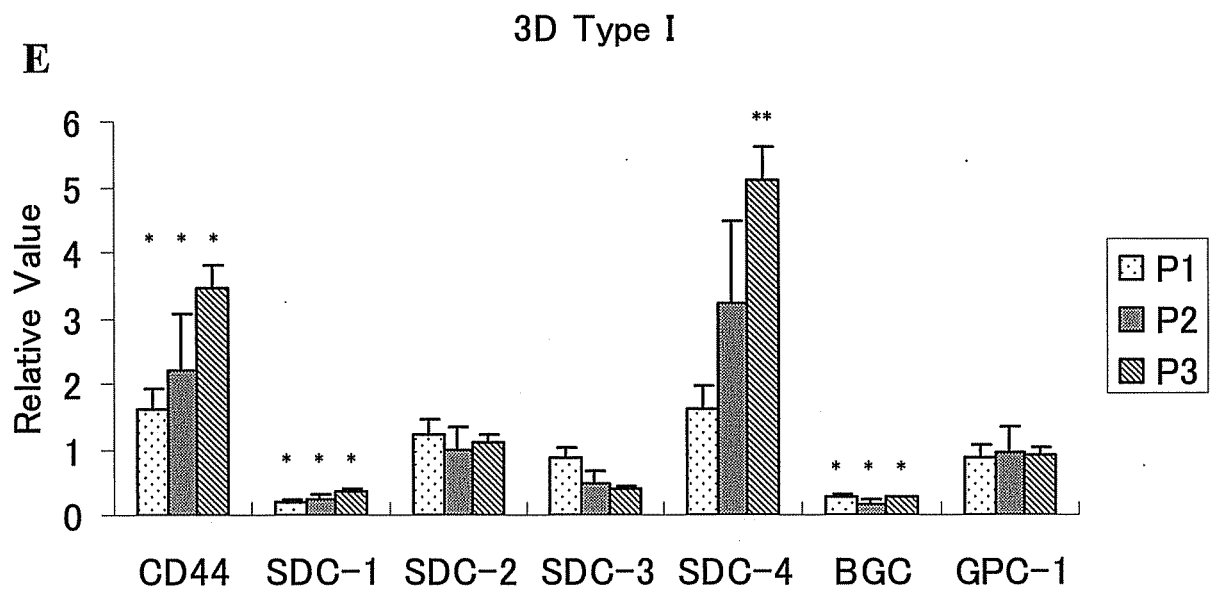


図 1-E 沢口 直弘

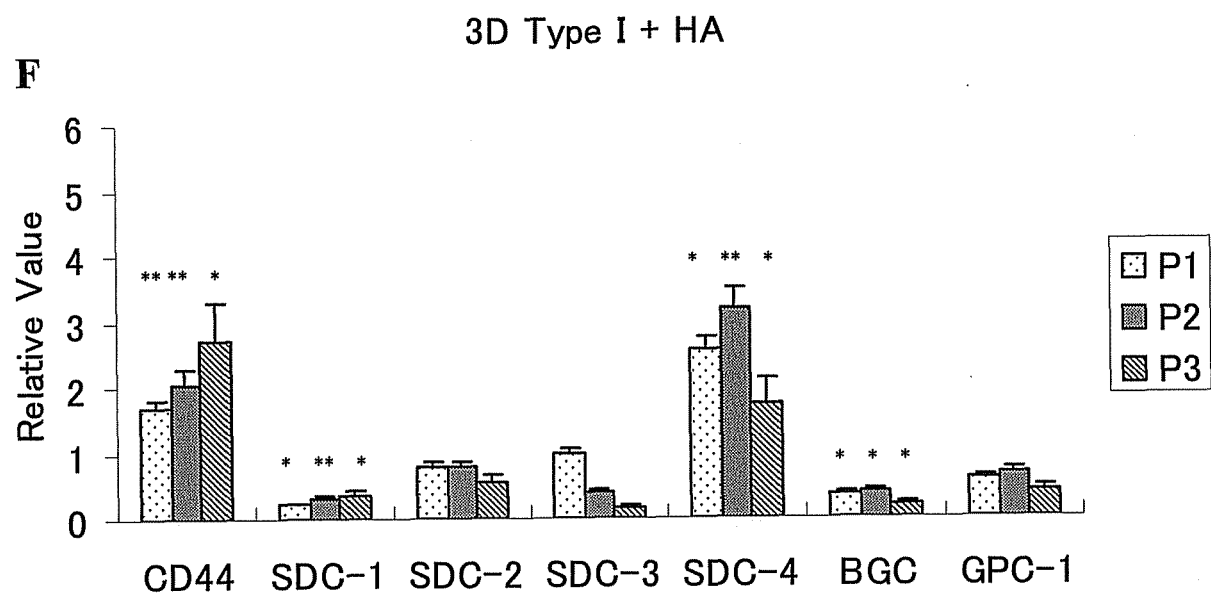


図 1-F 沢口 直弘