OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト人工多能性幹細胞のコロニー内における遊走の空間的不均一性に関する研究
Author(s)	守隨, 恵理
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73502
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　守隨　恵理　）	
論文題名	ヒト人工多能性幹細胞のコロニー内における遊走の空間的不均一性に関する研究

序言　人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の自己複製および細胞運命決定に関わるシグナルは，細胞遊走，細胞－細胞間接着，細胞－基質間接着の3つの細胞挙動のバランスの保持または崩れによって，活性化される．培養中のiPS細胞は，コロニーを形成することで小さな敷石様の形状を呈するが，培養が経過するにつれ大きく伸展した形状に変化することが知られている．この形状の異なった細胞は，未分化幹細胞マーカーも三胚葉マーカーも陰性であり，発現するマーカーが無いため，未分化状態から逸脱した細胞としている．これまでに，未分化状態から逸脱した細胞が発生する現象を，3つの細胞挙動のバランスを用いて空間的かつ定量的に評価した研究は無い．本研究では，iPS細胞のコロニー内において，遊走解析によってその現象を理解し (第1章)，ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンを用いた細胞－細胞間接着の緩和により，未分化状態から逸脱した細胞の発生を防止することを目的とした（第2章）．

第1章 遊走解析によるiPS細胞のコロニー内における未分化状態から逸脱する現象の理解　コロニー内の細胞遊走速度の解析を用いて，未分化状態から逸脱する現象の理解を行った．SNLフィーダー条件下ではコロニー中心部における細胞の稠密，MEFフィーダー条件下ではコロニー周囲部における一部の細胞の突出が観察され，それぞれの領域から未分化状態から逸脱した細胞が発生していた．どちらの条件下とも，遊走抑制/促進剤の添加によってその発生領域が変化したことから，細胞遊走と逸脱の発生およびその領域の関連が示された．そこで，未分化状態から逸脱した細胞を有するコロニーを遡及的に観察し，コロニー内の個々の細胞遊走速度を解析した．コロニー中心部で未分化状態から逸脱する場合では，コロニー中心部における細胞遊走速度の分布が極端に低い遊走速度に偏っていた．一方，コロニー周囲部で未分化状態から逸脱する場合では，コロニー周囲部における細胞遊走速度の分布が極端に高い遊走速度に広がっていた．このように，コロニー内の細胞遊走速度の非正規分布である部分は，後に未分化状態から逸脱した細胞の発生を有するため，アノマリーな部分といえる．また，コロニー中心部では，細胞集団が細胞－細胞間接着を豊富に有しつつ基質との接着を失った結果，浮いていた．一方，コロニー周囲部では，一部の細胞が細胞-細胞間接着を失いかつ豊富な細胞－基質間接着を有した結果，突出していた．さらに，それぞれの領域では力学的ストレスの蓄積を示唆する核ラミナlaminA/Cが発現していた．以上から，未分化状態から逸脱する細胞を有するコロニーは，アノマリーな細胞遊走を有し，アノマリーな部分で細胞挙動のバランスの崩れと核ラミナを発現することが示された．

第2章 ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンを用いた細胞－細胞間接着の緩和による未分化状態から逸脱した細胞の発生防止　コロニー中心部で未分化状態から逸脱した細胞が発生する培養条件下において，E-cadherinの接着を阻害する試薬としてボツリヌス菌由来ヘマグルチニン (HA) を用いることで，未分化状態から逸脱した細胞の発生を防止することを目的とした．培養が経過するとコロニー中心部の細胞は，稠密かつ多層状の並びを形成した．しかし，HA曝露有りの培養条件下では，コロニー中心部における個々の細胞遊走速度の分布が極端に低い遊走速度へ偏らず，細胞は単層状の並びを維持していた．培養後，コロニー中心部の細胞は細胞－細胞間接着と細胞－基質間接着を形成し，さらに，核ラミナの主要成分であるlaminA/Cを発現しておらず力学的ストレスを蓄積していないことが示唆された．その際，細胞内の繊維状構造であるF-actinを観察すると，HA曝露無しの培養後では，コロニー中心部の細胞は基底側においてF-actin構造をほとんど形成していなかった．一方で，HA曝露有りの培養後では，コロニー中心部の細胞は基底側にてactinストレスファイバーを形成し，コロニー周囲部の細胞と似た構造を示していた．基底側でactinストレスファイバーを有した細胞骨格は，細胞集団が未分化状態を維持するための秩序といえる．以上から，HAによる細胞－細胞間接着の緩和を用いることで，コロニー内の細胞遊走が揃い，細胞挙動のバランスが調節されることが示された．その際，コロニー内の細胞骨格の乱れが抑制され，未分化状態から逸脱した細胞の発生が防止されると考えられた．

総括　本博士論文では，ヒトiPS細胞のコロニー内における遊走の空間的不均一性に関する研究を行った．第1章では，コロニー内の細胞遊走の不均一性は，未分化状態から逸脱した細胞を発生させる条件であることが示された．第2章では，コロニー内の細胞遊走の不均一性を無くすことが，コロニー内の細胞骨格の乱れを抑制し，未分化状態から逸脱した細胞の発生を防止することが示された．以上から，秩序の乱れの抑制が重要であるという考え方を提案している．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　守隨　恵理　）

	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	紀ノ岡　正博
	副 査　教授	福崎　英一郎
	副 査　教授	渡邉　肇
	副 査　教授	内山　進
	副 査　教授	村中　俊哉
	副 査　教授	大政　健史
	副 査　教授	藤山　和仁
	副 査　教授	永井　健治
	副 査　准教授	金　美海

論文審査の結果の要旨

本博士論文では，ヒト iPS 細胞のコロニー内における遊走の空間的不均一性に関する研究を行っている．第 1 章では，コロニー内の細胞遊走速度の解析を用いて，未分化状態から逸脱する現象の理解を行っている．SNL フィーダー条件下ではコロニー中心部における細胞の稠密，MEF フィーダー条件下ではコロニー周囲部における一部の細胞の突出が観察され，それぞれの領域から未分化状態から逸脱した細胞が発生したことを示している．また，未分化状態から逸脱した細胞を有するコロニーを遡及的に観察し，コロニー内の個々の細胞遊走速度を解析している．コロニー中心部で未分化状態から逸脱する場合では，コロニー中心部における細胞遊走速度の分布が極端に低い遊走速度に偏っており，一方，コロニー周囲部で未分化状態から逸脱する場合では，コロニー周囲部における細胞遊走速度の分布が極端に高い遊走速度に広がっていることを示している．このように，コロニー内の細胞遊走速度の非正規分布である部分は，後に未分化状態から逸脱した細胞の発生を有するため，アノマリーな部分と示唆している．さらに，それぞれの領域では力学的ストレスの蓄積を示唆する核ラミナ laminA/C が発現を確認し，未分化状態から逸脱する細胞を有するコロニーは，アノマリーな細胞遊走を有し，アノマリーな部分で細胞挙動のバランスの崩れと核ラミナを発現すると結論付けている．

第 2 章では，コロニー中心部で未分化状態から逸脱した細胞が発生する培養条件下において，E-cadherin の接着を阻害する試薬としてボツリヌス菌由来ヘマグルチニン（HA）を用いることで，未分化状態から逸脱した細胞の発生を防止することを目的としている．培養が経過するとコロニー中心部の細胞は，稠密かつ多層状の並びを形成したが，HA 曝露有りの培養条件下では，コロニー中心部における個々の細胞遊走速度の分布が極端に低い遊走速度へ偏らず，細胞は単層状の並びを維持していることを示している．培養後，コロニー中心部の細胞は細胞－細胞間接着と細胞－基質間接着を形成し，HA 曝露後では，コロニー中心部の細胞は基底側にて actin ストレスファイバーを形成し，コロニー周囲部の細胞と似た構造を示している．以上から，HA による細胞－細胞間接着の緩和を用いることで，コロニー内の細胞遊走が揃い，細胞挙動のバランスが調節されることが示された．その際，コロニー内の細胞骨格の乱れが抑制され，未分化状態から逸脱した細胞の発生が防止されると結論付けている．

以上より，本博士論文では，ヒト iPS 細胞のコロニー内における遊走の空間的不均一性に関する研究を行っており，第 1 章では，コロニー内の細胞遊走の不均一性は，未分化状態から逸脱した細胞を発生させる条件であることが示されている．第 2 章では，コロニー内の細胞遊走の不均一性を無くすことが，コロニー内の細胞骨格の乱れを抑制し，未分化状態から逸脱した細胞の発生を防止することを示している．これらは，秩序の乱れの抑制が重要であるという新しい考え方を提案しており，本論文は博士論文として価値あるものと認める．