



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

博士学位論文

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

守隨 恵理

2019年6月

大阪大学大学院工学研究科

【目次】

序言	1
第1章 遊走解析による iPS 細胞の未分化状態からの逸脱現象の理解	6
1.1 緒言	6
1.2 実験方法	8
1.2.1 細胞および培養条件	8
1.2.2 タイムラプス観察	8
1.2.3 Rac1 inhibitor および activator の添加	9
1.2.4 遊走速度およびコロニーサイズの定量解析	9
1.2.5 免疫蛍光染色	11
1.2.6 有意差検定	11
1.3 結果	13
1.3.1 未分化状態から逸脱する細胞の特徴	13
1.3.2 コロニー内の未分化状態から逸脱した細胞の発生領域と遊走の関係	16
1.3.3 コロニー内およびコロニー間の個々の細胞の遊走速度の解析	19
1.3.4 細胞-細胞間および細胞-基質間接着の局在	26
1.3.5 細胞核への力学的ストレスに関わる核ラミナの局在	29
1.4 考察	31
1.5 小括	36
第2章 未分化状態から逸脱した細胞の発生防止	37
2.1 緒言	37

2.2 実験方法	40
2.2.1 細胞および培養条件	40
2.2.2 HA の添加	40
2.2.3 蛍光タイムラプス観察	41
2.2.4 遊走速度およびコロニー数の定量解析	41
2.2.5 免疫蛍光染色	42
2.2.6 分化能の検討	43
2.2.7 Quantitative polymerase chain reaction 法	43
2.2.8 有意差検定	44
2.3 結果	45
2.3.1 HA を用いたヒト iPS 細胞の継代培養	45
2.3.2 HA 添加によるコロニー内の個々の細胞遊走の変化	49
2.3.3 HA 添加後の細胞－細胞間接着および細胞－基質間接着の局在	53
2.3.4 細胞骨格および核ラミナの局在	56
2.4 考察	61
2.5 小括	66
総括	67
参考文献	69
本報に関する論文	82
謝辞	83

序言

多能性幹細胞の未分化維持培養における未分化状態から逸脱した細胞の発生

胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの多能性幹細胞は、自己複製能かつ多分化能を有する。線維芽細胞などの支持細胞 (フィーダー細胞) との共培養においてフィーダー細胞が提供する増殖因子や基質の存在下で、これら多能性幹細胞は個々の細胞の密集からなるコロニーを形成しつつ増殖し、小さな敷石状の形状を呈する (Thomson *et al.*, 1998)。しかし、未分化維持培養において、大きく伸展した形状の細胞が発生することが知られている。未分化細胞は未分化幹細胞マーカー (SSEA4, TRA-1-60, Oct3/4) 陽性であり、三胚葉である内胚葉、中胚葉、外胚葉に分化中の細胞は未分化幹細胞マーカー陰性、かつ、それぞれ外胚葉 (PAX6)、中胚葉 (Brachyury)、内胚葉 (SOX17) マーカー陽性であるのに対し (Takahashi *et al.*, 2007)、大きく伸展した形状の細胞は、未分化幹細胞マーカーおよび三胚葉マーカーのどちらも陰性、すなわち分化系列決定まで至っていないことが近年示されている (Takahashi *et al.*, 2007; Enver *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2017b)。この細胞は特定の陽性マーカーによって定義されておらず、未分化状態から逸脱した細胞としている。細胞が未分化状態から逸脱する現象について、コロニー内の個々の細胞レベルで定量的に解析されていない。

多能性幹細胞の細胞挙動と未分化維持の関係

隣接する細胞および基質との接着が無いと、細胞形状変化、増殖、遊走は起こらない (Gumber *et al.*, 1996; Lauffenburger *et al.*, 1996; Huttenlocher *et al.*, 1998; Kondo and Miura, 2010; Eiraku *et al.*, 2011)。以前より、細胞は周囲の細胞を感知し接着する機構を持っていることや (Townes and Holtfreter, 1955)、様々な基質は細胞にとって物理的な足場であり、かつ、

細胞の機能維持や自己増殖に関わるシグナルの活性化に関与していること (Bershadsky *et al.*, 2003) が報告されている。これらは、基質および隣接する細胞との接着が、細胞形状変化、増殖、遊走に関与するだけでなく、細胞機能への寄与も示している。ES 細胞や iPS 細胞では、E-cadherin を介した細胞-細胞間接着と integrin を介した細胞-基質間接着の相互作用が未分化状態の維持に必要とされている (Kovacs *et al.*, 2002; Vaezi *et al.*, 2002; Delon and Brown, 2007; Chen *et al.*, 2010; Redmer *et al.*, 2011; Soncin *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012)。さらに、細胞-細胞間および細胞-基質間接着から複数のシグナル分子を介して複雑なシグナルが伝達することが示されている。Integrin の β 鎖と基質との接着は、integrin と繊維状の actin フィラメント (F-actin) の結合部位から Rho ファミリーGTPase である RacGTPase が解離することを制御する (Ehrlicher *et al.*, 2011)。Cadherin による接着結合は、小分子 AF-6 が Ras ファミリーG タンパク質である Rap1 に結合することによって調節されており、接着結合が不安定になると Rap1 の活性化により接着結合が促進する (Bos *et al.*, 2001; Asuri *et al.*, 2008)。また、E-cadherin のエンドサイトーシスをトリガーとした Rap1 活性化は、integrin を介した基質との接着促進による Rac1 活性化と相互作用している (Balzac *et al.*, 2005)。細胞-細胞間接着と細胞-基質間接着の相互作用は、細胞内のシグナル活性化を介して細胞機能を制御する (Garcia *et al.*, 1999; Little *et al.*, 2008; Lampe *et al.*, 2012; Hynes *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Werner *et al.*, 2017)。

細胞遊走は、細胞-細胞間接着と細胞-基質間接着のバランスに依存して変化する。細胞-細胞間接着がほとんど形成されていない細胞は、遊走が速く、ランダム遊走する。Integrin を介した Rac1 活性化により細胞が活発に増殖・遊走し (Sugihara *et al.*, 1998)、最終的に小さな敷石状の細胞からなる集密的な状態になると、細胞-細胞間接着で結合した細胞集団は、その接着の維持のために協調的集団運動 (collective movement) と呼ばれる協調的な動きを示す (Hegerfeldt *et al.*, 2002; Montell, 2008)。細胞-基質間接着における F-actin

構造を変化させると、協調的集団運動がランダム遊走に変化し、細胞運命決定が乱れることが報告されている (Friedl and Gilmour, 2009; Mahmut and Gerhard, 2010). また、網膜色素上皮細胞の成熟には、ZO-1 による密着結合 (tight junction) が必要であり、その結合の形成を促進するためにはランダムな細胞遊走から協調的集団運動への変化が重要であることも確認されている (Sono *et al.*, 2016). そして、細胞が集密する条件では、細胞-細胞間および細胞-基質間接着とのバランスによって細胞遊走が変化する (Martin, 1997; Maheshwari, *et al.*, 2000; Duman and Monteggia, 2006). 幹細胞の細胞運命決定および自己複製は、細胞-細胞間接着、細胞-基質間接着、およびそれらの接着と相互作用し合う細胞遊走の 3 つの細胞挙動のバランスによって引き起こされると考えられている (Kim, M. H. and Kino-oka, 2015).

これまでの研究は単一で遊走する細胞に着目したものがほとんどであり、集密的な条件下にある個々の細胞の遊走については、細胞-細胞間接着、細胞-基質間接着および細胞遊走が時空間的に複雑であることからほとんど研究されていない。細胞の集密条件下では、その集団内の場所によって、異なる細胞形状、増殖、遊走、細胞-細胞間接着を示すことが知られている (Snijder and Pelkmans, 2011). したがって、コロニーを形成する条件下では、細胞遊走の空間的不均一性に着目する必要があると考えられる。

また、細胞形状の保持、増殖、および遊走は、細胞内で張り巡らされた細胞骨格分子を変化させ、物理的な力を発生することが示されている (Svitkina, 2018). 例えば、細胞骨格を形成するタンパク質である F-actin が伸縮すると機械的な張力が生じるが、F-actin は接着斑を形成する複合体と核を連結しているため、その張力が、生物学的には F-actin を通じたシグナルとなって核に伝達する (Tamber *et al.*, 2011; Uyeda *et al.*, 2011; Kourtidis *et al.*, 2015).

このことは、力学的ストレスによって、核ラミナが蓄積され、核内のクロマチン構造が変化することからも明らかである (Osmanagic-Myers *et al.*, 2015). つまり、細胞-細胞間接着

を有して遊走する細胞は、細胞骨格の変化を介して、コロニー内の細胞機能を決定すると考えられる。

本博士論文の章構成について

以上を踏まえ、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ついて研究することにより、未分化状態から逸脱した細胞が発生する現象の理解を目的とする。本博士論文は2章で構成される。第1章では、遊走解析により、ヒト iPS 細胞のコロニー内において未分化状態から逸脱する現象を理解した。第2章では、第1章の理解に基づき、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発生を防止し未分化維持を行う (**Fig. 1**)。

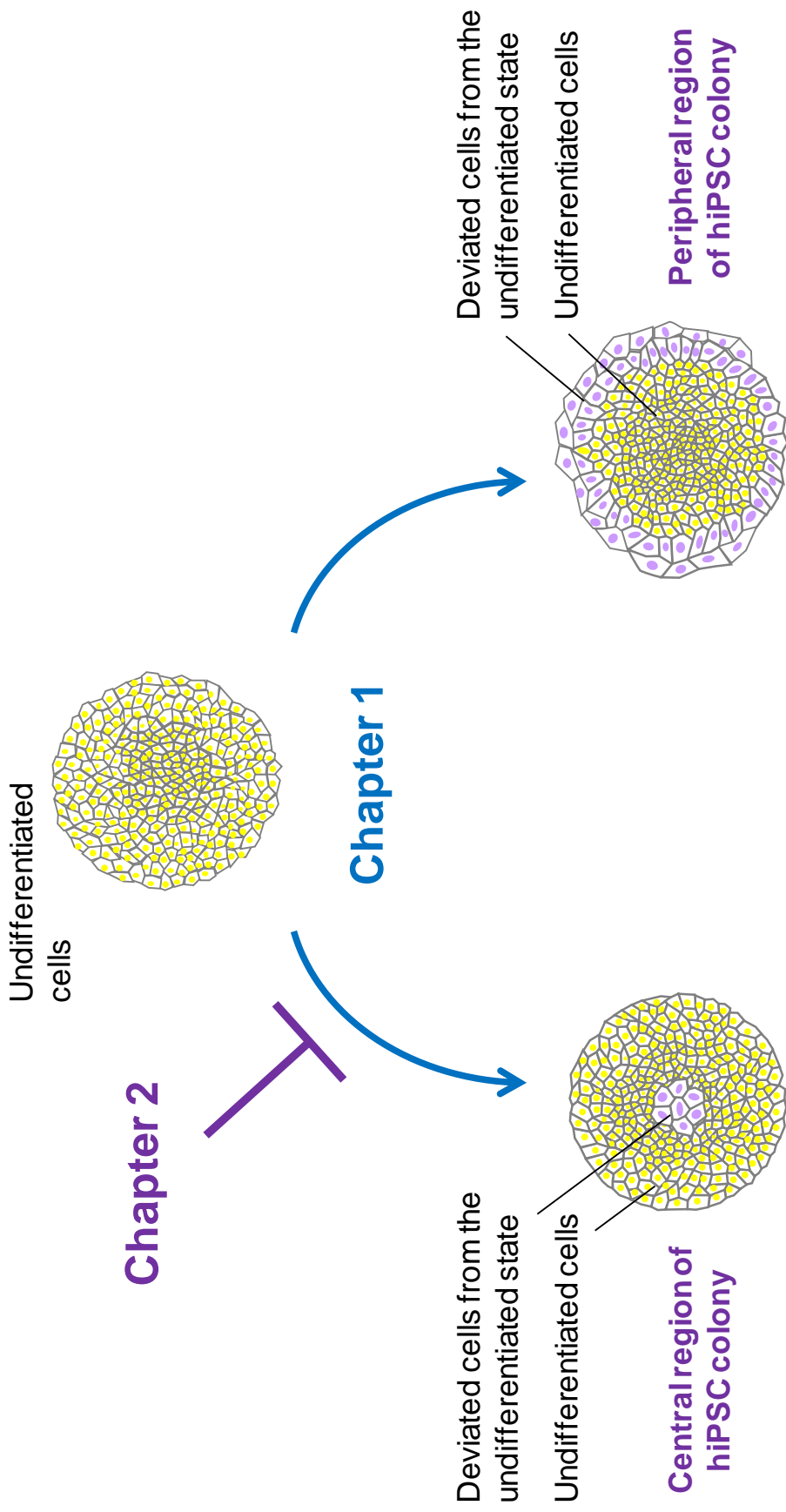


Fig. 1 Outline of this Ph.D. thesis

第1章 遊走解析による iPS 細胞の未分化状態からの逸脱現象の理解

1.1 緒言

ES 細胞や iPS 細胞に代表される多能性幹細胞は、培養中に自己複製能および多分化能を失うため、未分化細胞を増やすことは依然として困難である (Kim and Kino-oka, 2018). ヒト iPS 細胞は、E-cadherin の細胞-細胞間接着を介して密接に結合した高密度のコロニーを形成し、コロニー内の細胞は小さな敷石状の形状を示す (Chen *et al.*, 2010; Redmer *et al.*, 2011). 一般に、ヒト iPS コロニーは単層で育ち、かつ未分化状態を維持しているが、継代培養の過程で未分化状態から逸脱した細胞が出現する. この現象はコロニー中心部または周囲部で起こり、形状の劇的な変化、すなわち小さな敷石状の細胞から大きく伸展した形状の細胞への変化として観察される (Takahashi *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2014c). 未分化状態から逸脱した細胞の発生は培養の質を悪化させ、ヒト iPS 細胞の長期維持を困難にしている.

隣接する細胞や基質との接着は、細胞およびコロニーの形状変化において重要な役割を持つとともに、ヒト iPS 細胞の未分化維持またはその逸脱のいずれかに関わるシグナル経路を潜在的に活性化する (Kim and Kino-oka, 2015). 幹細胞内のシグナル経路などを含む生物学的な応答は、細胞遊走に依存する細胞-細胞間接着および細胞-基質間接着と密接に関わっている (Kim and Kino-oka, 2018). ヒト iPS コロニーは E-cadherin の細胞-細胞間接着と integrin による基質分子への接着を有した細胞で形成され、角化細胞と似た極性化上皮の特徴を示す (Kovacs *et al.*, 2002; Vaezi *et al.*, 2002; Delon and Brown, 2007). Cadherin による接着が細胞-細胞間接着結合を形成する一方で、integrin による細胞-基質間接着が接合斑を形成している (Li *et al.*, 2012). Cadherin と integrin のどちらもが細胞質ドメインを介して大きな細胞内多タンパク質複合体を形成し、さらにアダプタータンパク質を介して細胞骨格に結合することによりシグナルネットワークの調節を通じて細胞挙動を制御する.

また、Cadherin と integrin は、actin 骨格を細胞膜に連結するアンカーポイントとして働くため、両者とも actin 骨格に行き渡る myosin によって発生した力を受け (Osmanagic-Myer *et al.*, 2015), その力は細胞-細胞間接着を通じて隣接する細胞へと伝わってシグナル活性化の変化を導く。このことは、細胞-基質間接着と細胞-細胞間接着の強さを変化させるメカノトランスダクションを用いた細胞培養の研究により強く示唆されている (Rosowski *et al.*, 2015; Thorpe *et al.*, 2017)。一方で、最近の研究では、細胞遊走による細胞骨格の動態が核に直接作用することも示されており、細胞質内の生化学的な分子の動きとは無関係に、細胞挙動が遺伝子制御と核の機械的特性の両方に変化を与える可能性も示されている (Khatau *et al.*, 2012)。しかしながら、時空間的な力学的反応を決定する機構は非常に複雑であり、まだ十分には解明されていない。

これまでの研究から、細胞遊走に依存した細胞-細胞間接着および細胞-基質間接着のバランスに乱れが生じると、未分化状態からの逸脱が引き起こされると考えられてきた (Kim and Kino-oka, 2018)。そこで第 1 章では、ヒト iPS コロニー内の細胞が未分化状態から逸脱する現象のトリガーを、コロニー内の細胞遊走の解析を用いて理解した。

1.2 実験方法

1.2.1 細胞および培養条件

ヒト iPS 細胞は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクから得た (clone Tic, JCRB Number: JCRB1331). ヒト iPS 細胞の継代培養は, 培養容器 (表面積; 55 cm², Corning Costar, Cambridge, MA, USA) 中のマイトマイシン C 処理された SNL 76/7 細胞 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK), またはマウス胚線維芽細胞 (MEFs) (ReproCELL Inc., Tokyo, Japan) のフィーダー層上で, 5 ng/ml basic fibroblast growth factor を含む ReproStem 培地 (ReproCELL Inc.) を用いて 37°C で 5% CO₂ 環境下で行った.

フィーダー層は, フィーダー細胞を 2.5×10^4 cells/cm² になるように 0.1% gelatin をコートした培養面上に播種し, 7% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で 1 日間培養することにより得た (Kim *et al.*, 2014). ヒト iPS 細胞の継代のため, 0.1 mg/ml collagenase IV, 0.25% trypsin, 20% KSR (全て Thermo Fisher Scientific) および 0.1 mM CaCl₂ (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む剥離液で 1 分間インキュベート後, フィーダー細胞を除去した. 未分化コロニーをセルスクレーパー (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて注意深く回収した. 懸濁液を注意深くピペッティングした後に, フィーダー細胞を含む新しい培養容器に小さな細胞集塊を播種した. 培地は毎日新しい培地と交換した.

1.2.2 タイムラプス観察

フィーダー層上にヒト iPS 細胞を播種後, 4 倍の対物レンズ付きの画像解析装置 (Biostudio; Nikon engineering CO., Kanagawa, Japan) を用いて培養中のコロニーを観察した.

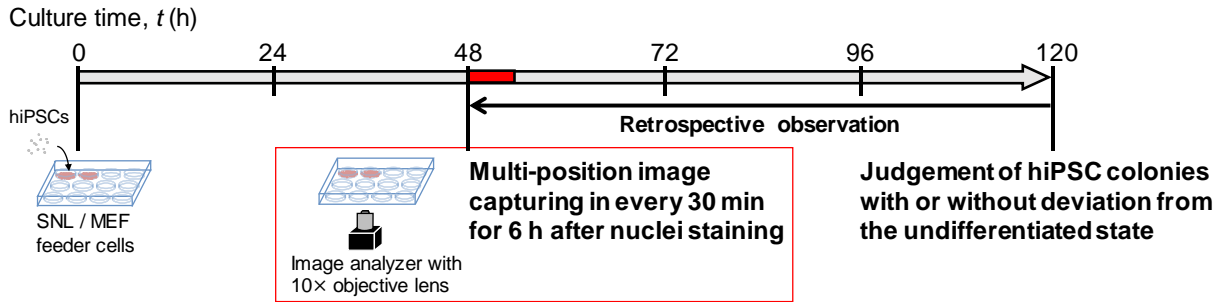
1.2.3 Rac1 inhibitor および activator の添加

細胞遊走を阻害または促進するため、Rac1 inhibitor (50 μ M NSC23766; Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany) または Rac1 activator (15 μ M HMG-1; Sigma-Aldrich) を培地交換の際に添加した。

1.2.4 遊走速度およびコロニーサイズの定量解析

Fig. 1.1 の概略図に遊走速度の定量化の手順を示す。ヒト iPS コロニー内の個々の細胞の遊走速度を評価するため、生細胞の細胞核を Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 30 分間染色し、洗浄後に新たな培地を加えた。細胞核のタイムラプス画像を、10 倍の対物レンズ付きの画像解析装置 (IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて培養 48 時間から 6 時間、30 分毎に撮影した。タイムラプス撮影後も培養を続け、培養 120 時間において、コロニー内における未分化状態から逸脱した細胞の有無を判断した。逸脱領域と遊走速度の相関性を定量化するため、遡及的な観察を行い、48 時間から 54 時間までのタイムラプス画像を用いてコロニー中心部と周囲部の細胞遊走速度を解析した。元画像 (6.9 mm \times 6.9 mm, 16 bit, 1.35×10^6 pixels/mm²) は多数の位置ごとの画像をタイリングして得た。データはコロニー中心部および周囲部に置かれた 2 つの対象領域 (ROIs; 150 μ m \times 150 μ m) から得た。コロニーの重心位置は、明視野画像のコロニー外周から設定した。細胞遊走速度の定量化のため、ROI 内の各細胞核の重心位置 (x_i, y_i) を画像解析ソフトウェア (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて測定した。個々の細胞の遊走速度 V は、核の重心位置が 6 時間で移動した距離から算出した。

A. Multi-position capturing of bright field and nuclei staining images



B. Analysis of cell migration rate at the central and peripheral regions of colonies

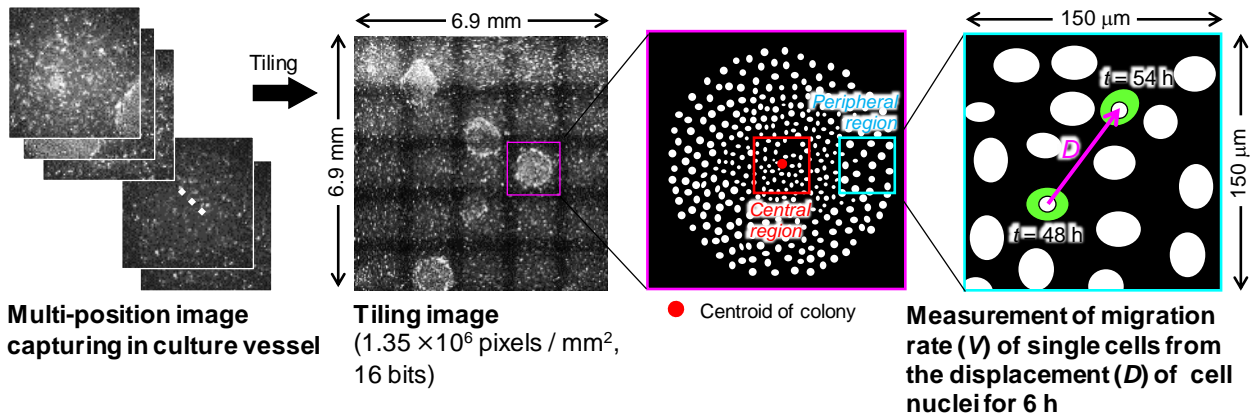


Fig. 1.1 Procedure of data analyses for the migration rate of the cells at each region of interest (ROI) in hiPSC colonies. (A) Multi-position capturing of bright field and nuclei staining images. (B) Analysis of cell migration rate at the central and peripheral regions of colonies.

1.2.5 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色で用いた手順は以前の論文と同様である (Kim *et al.*, 2010). 簡潔に述べると, 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Sigma-Aldrich) で洗浄し, 4%パラホルムアルデヒド (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を用いて室温で 10 分間固定した. PBS で洗浄後, 細胞を 0.5% Triton X-100 を含む PBS で 5 分間処理し, PBS で 2 回洗浄した. 非特異的なタンパク質を遮蔽するため, 細胞をブロックエース (Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd., Osaka, Japan) と 90 分間室温でインキュベートし, 続いて 10%ブロックエースを含む PBS で適切な濃度に希釈した一次抗体と 4°C にて一晩インキュベートした. 一次抗体としては, anti-Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-E-cadherin (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA), anti-paxillin (Millipore, Billerica, MA, USA), および anti-laminA/C (Santa Cruz Biotechnology) 抗体を用いた. トリス緩衝生理食塩水で洗浄後, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse または Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) と 1 時間インキュベートすることにより免疫標識した. F-actin と細胞核は Alexa Fluor 594-conjugated phalloidin (Thermo Fisher Scientific) および 4',6-diamidino-2-phenylindole (Thermo Fisher Scientific) を用いてそれぞれ染色した. 60 倍または 100 倍の対物レンズを装着した共焦点レーザー顕微鏡 (Model FV-1000; Olympus, Tokyo, Japan) および 10 倍の対物レンズを装着した画像解析装置 (IN Cell Analyzer 2000) を用い, 358, 488, および 594 nm の蛍光励起にて観察を行った.

1.2.6 有意差検定

それぞれの実験条件におけるヒト iPS コロニーの測定データは, 少なくとも 3 つの異なる培養から得た. 個々の細胞の遊走速度 V は, 未分化状態から逸脱の有るコロニー, 無いコロニーそれぞれ 5 つのコロニーから得た. 平均の遊走速度, V_M は 5 つのコロニーの ROIs

内の細胞の遊走速度 V から算出した。未分化状態から逸脱の有るコロニーと無いコロニー間の有意差を評価するため、統計解析として Student's t -test または Mann-Whitney U -test を使用した。有意水準は $P < 0.01$ とした。

1.3 結果

1.3.1 未分化状態から逸脱する細胞の特徴

フィーダー細胞との共培養におけるヒト iPS コロニー内において、未分化状態から逸脱する細胞の特徴を理解するためタイムラプス観察を行った。時間が経過するにつれ、フィーダー細胞の種類に関係なくコロニーは拡大し、細胞分裂と遊走が観察された (**Fig. 1.2**)。コロニー内で新しく分裂した細胞は、基本的に外側に向かって遊走し、コロニー内の全領域に存在する間隙を密接に埋めていった。SNL フィーダー細胞との共培養の場合、培養 62 時間において、拡大中の大きなコロニーの中心部にて細胞が集団から離れて浮きはじめ、その後、細胞形状も、小さな敷石状から大きく伸展した形状へと変化した。明白な細胞形状の変化を示す逸脱領域は急激に拡大し、培養 90 時間では中心部に逸脱領域をもつコロニーが観察された (**Fig. 1.2A**)。一方、MEF フィーダー細胞との共培養の場合、培養 88 時間でコロニー辺縁部から突出する細胞が現れ、培養 100 時間では逸脱領域が遠心性に拡大していた (**Fig. 1.2B**)。SNL フィーダー細胞との共培養においてコロニー中心部で発生した未分化状態から逸脱した細胞の核には Oct3/4 が発現しておらず、同様に、MEF フィーダー細胞との共培養においてコロニー周囲部で発生した未分化状態から逸脱した細胞の核でも Oct3/4 が発現していなかった (**Fig. 1.3**)。

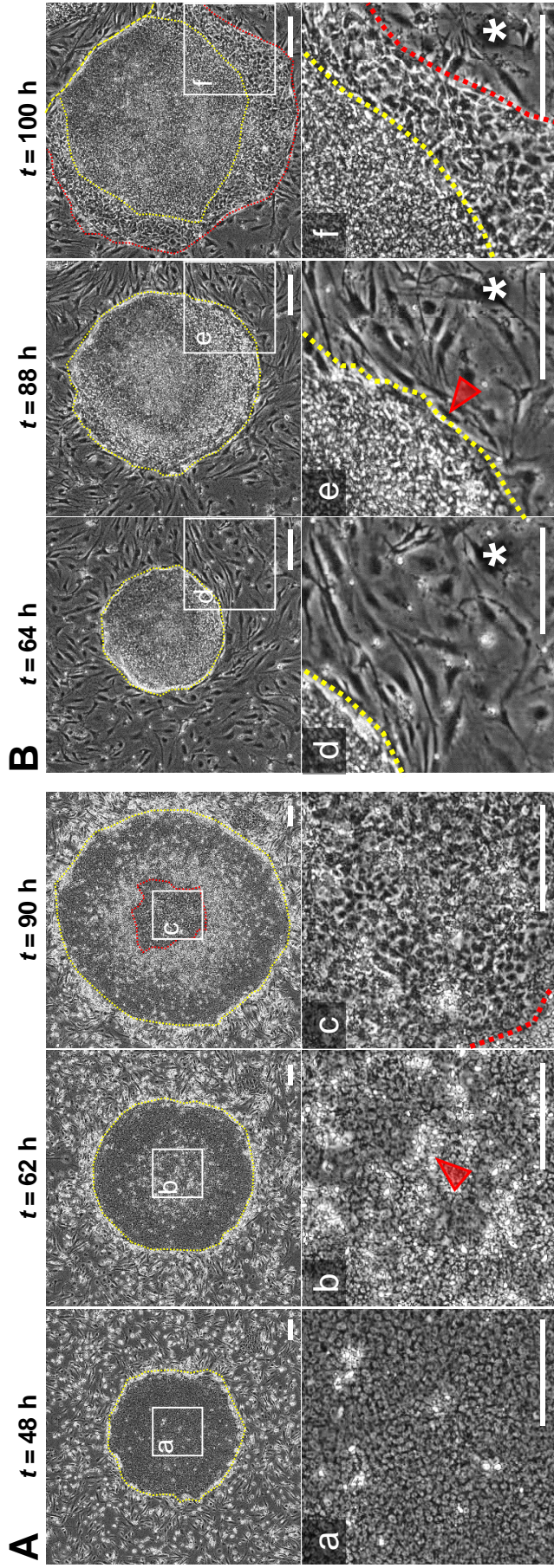


Fig. 1.2 Occurrence of deviated cells from the undifferentiated state in cultures with SNL (A) and MEF (B) feeder cells. Time-dependent changes of cells in hiPSC colonies are shown. Yellow and red dotted lines indicate the edge of the undifferentiated and deviated regions, respectively. Enlarged panels (a–f) represent cells in the indicated squares of hiPSC colonies. Red arrows show the deviation from the undifferentiated state of hiPSCs. The asterisks show feeder cells. Scale bars = 50 μ m. At the central region of colonies in culture with SNL feeder cells, some cells protruded; the region with the deviated cells then enlarged, pushing neighboring cells aside. At the peripheral region of colonies in culture with MEF feeder cells, the region with the deviated cells enlarged outward from the edge of hiPSC colonies.

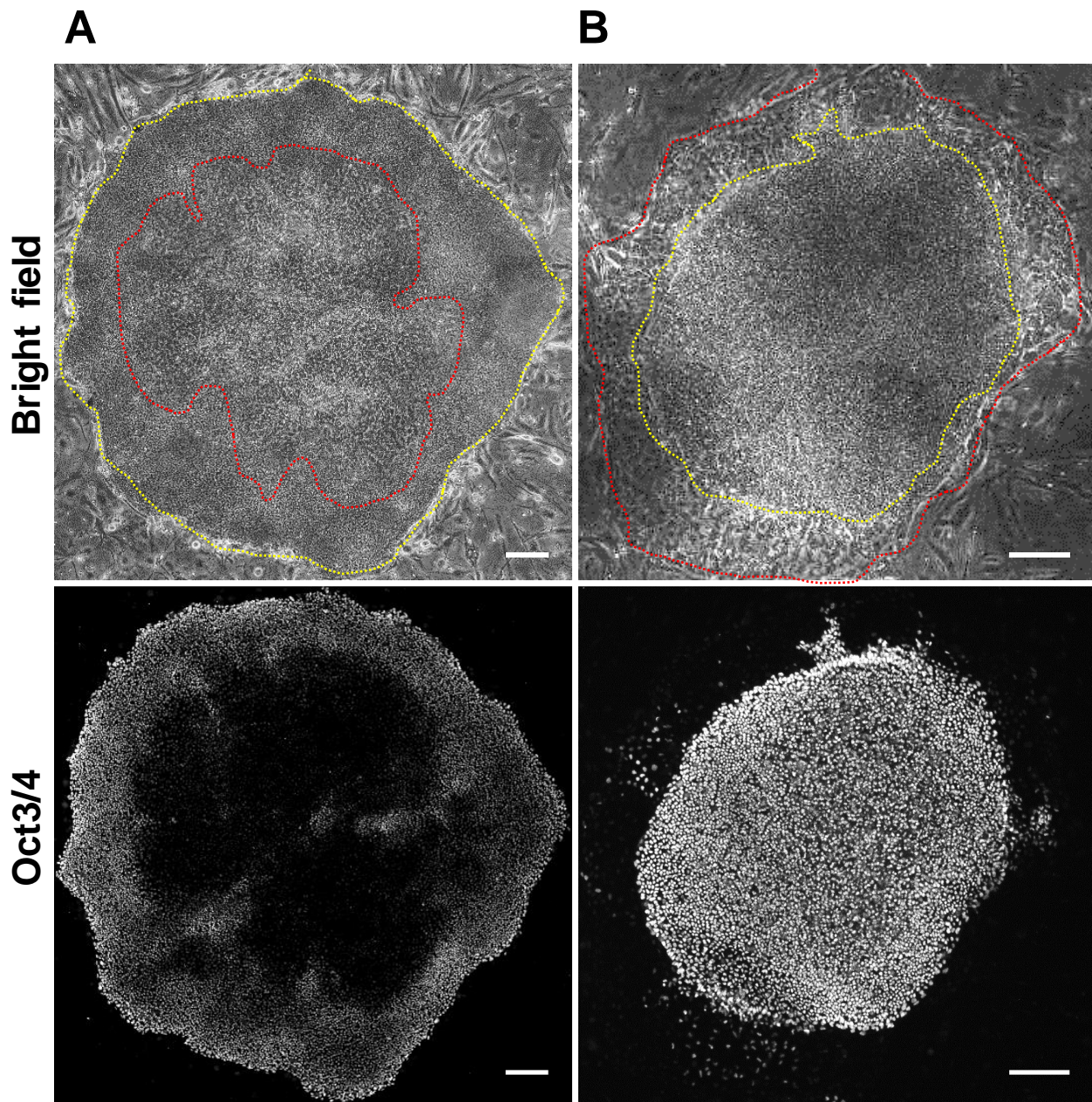


Fig. 1.3 Characterization of hiPSC colonies with deviated cells from the undifferentiated state in cultures with SNL (A) and MEF (B) feeder cells. Yellow and red dotted lines indicate the boundary between undifferentiated and deviated regions of an hiPSC colony. Immunofluorescence staining for Oct3/4. Scale bars = 50 μm . At the central region of hiPSC colonies in culture with SNL feeder cells, deviated cells with elongated shape and Oct3/4 (-) can be observed. At the peripheral region of hiPSC colonies in culture with MEF feeder cells, deviated cells with elongated shape and Oct3/4 (-) can be observed. Yellow and red dotted lines indicate the edge of the undifferentiated and deviated regions, respectively.

1.3.2 コロニー内の未分化状態から逸脱した細胞の発生領域と遊走の関係

細胞遊走の変化がコロニー内の未分化状態から逸脱した細胞の発生領域に変化を生じさせるかどうかを検討するため、培養3日目および4日目に、**Rac1 activator** または **inhibitor** を添加し、細胞遊走を促進または阻害した。6日目において、未分化状態から逸脱した細胞を有するコロニーについて、逸脱領域のパターンごとに分類し、その割合を算出した。算出には、各フィーダー細胞条件について3回以上の異なる培養を行い収集した未分化状態から逸脱した細胞を有するコロニーのデータ (30-47 コロニー) を用いた。**Rac1 activator** を添加すると、フィーダー細胞の種類に関わらず、コロニー周囲部に逸脱領域を有する割合が100%であった (**Fig. 1.4A, B**)。 **Rac1 inhibitor** を添加すると、SNLフィーダー細胞との共培養ではコロニー中心部に逸脱領域を有する割合が100%であり、MEFフィーダー細胞との共培養でもコロニー中心部で逸脱領域を有する割合が21.9%発生していた (**Fig. 1.4A, B**)。また、細胞遊走の変化がヒト iPS 細胞の未分化状態からの逸脱をさらに引き起こしうるかどうかを検討するため、SNL および MEF フィーダー細胞との共培養にてすでに未分化状態から逸脱した細胞を有するコロニーを、培養5日目から10日目まで、**Rac1 activator** または **inhibitor** を培地交換のたびに添加して細胞遊走を促進または阻害したところ、それぞれ、周囲部または中心部で未分化状態から逸脱した細胞がさらに発生した (**Fig. 1.5**)。以上から、ヒト iPS コロニー内の細胞遊走の変化が未分化状態からの逸脱する細胞の発生および逸脱領域の拡大に関連していると考えられた。

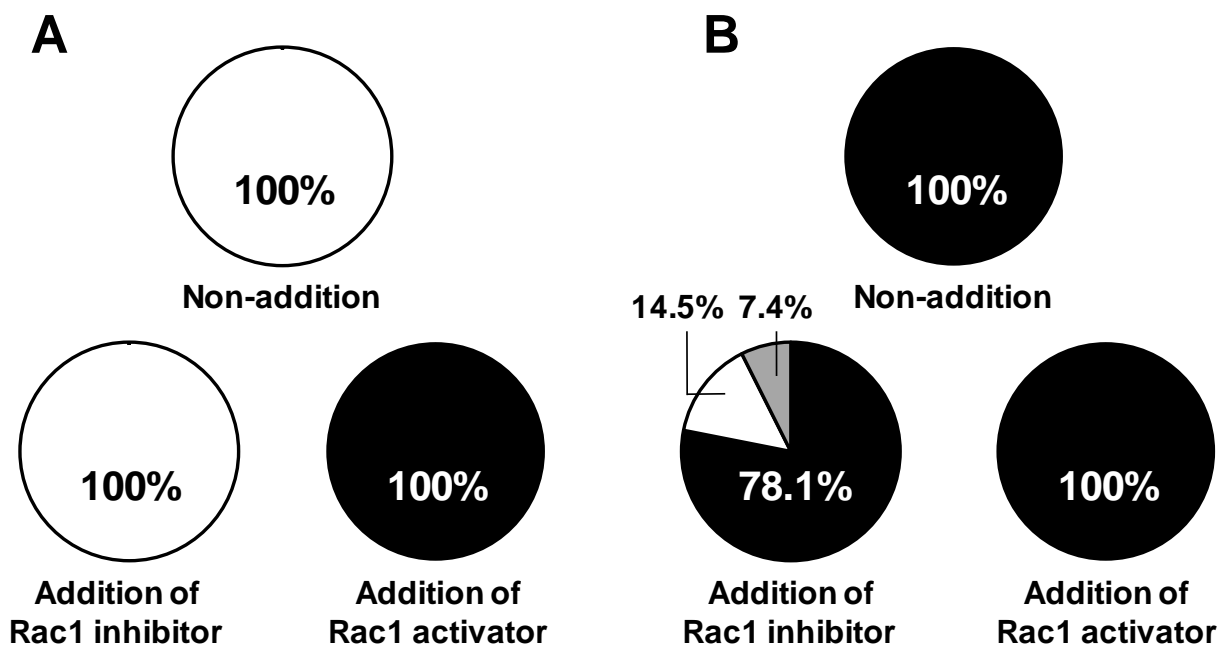


Fig. 1.4 Occurrence of deviated cells from the undifferentiated state in cultures with SNL (A) and MEF (B) feeder cells with exposure to Rac1 inhibitor (50 μ M NSC23766) or activator (15 μ M HMG1). White area, deviation from the undifferentiated state at the central region of colonies; Gray area, deviation from the undifferentiated state at the central and peripheral regions of colonies; Black area, deviation from the undifferentiated state at the peripheral region of colonies.

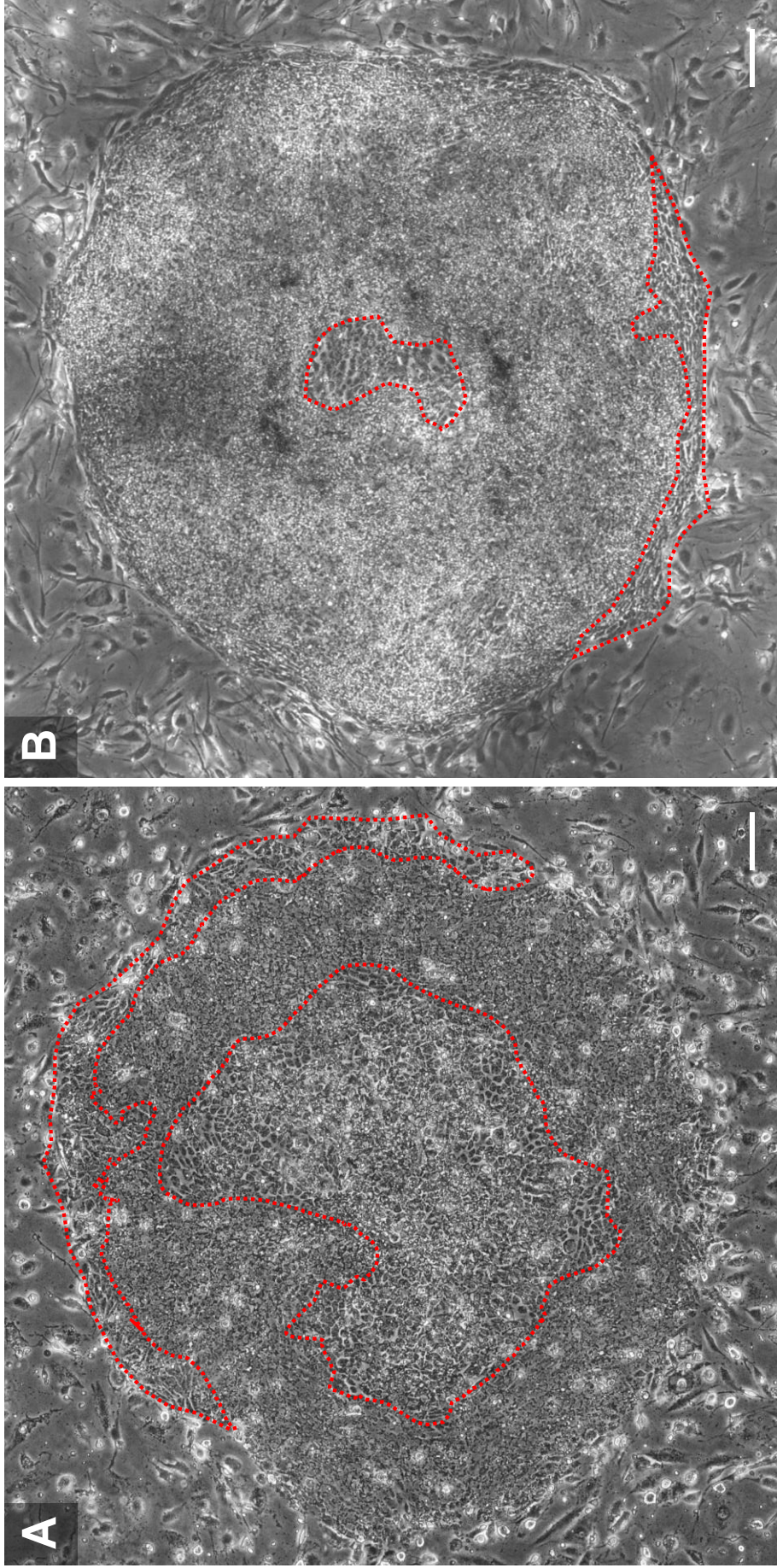


Fig. 1.5 Additional induction of the regions with deviated cells from the undifferentiated state at both the central and peripheral regions of hiPSC colonies exposed to the Rac1 activator (15 μ M HMG1) with SNL (A) or the Rac1 inhibitor (50 μ M NSC23766) with MEF (B) feeder cells. Red dotted lines indicate the edges of the deviated region. Scale bars = 100 μ m.

1.3.3 コロニー内およびコロニー間の個々の細胞の遊走速度の解析

ヒト iPS コロニーを形成する細胞の遊走と細胞が未分化状態から逸脱する関係性を明らかにするために、培養 120 時間までに、中心部または周囲部で未分化状態から逸脱した細胞を有するコロニーと逸脱した細胞の無いコロニー、それぞれの 5 つのコロニーから個々の細胞遊走速度を取得し、ヒストグラムを作成した (Fig. 1.6). SNL フィーダー細胞との共培養において、未分化状態から逸脱する細胞が無いコロニー内の細胞遊走速度の分布は、中心部で $V=0-9 \mu\text{m/h}$ 、周囲部で $V=3-13 \mu\text{m/h}$ であった。それに対し、未分化状態から逸脱する細胞が有るコロニーでは、中心部では $V=0-7 \mu\text{m/h}$ とより低い遊走速度に分布していたが、周囲部では $V=2-13 \mu\text{m/h}$ と逸脱する細胞が無いコロニーと比べて明らかな違いはみられなかった。一方、MEF フィーダー細胞との共培養において、未分化状態から逸脱する細胞が無いコロニー内の細胞遊走速度の分布は、中心部で $V=0-8 \mu\text{m/h}$ 、周囲部で $V=0-14 \mu\text{m/h}$ であった。それに対し、未分化状態から逸脱する細胞が有るコロニーでは、中心部では $V=0-10 \mu\text{m/h}$ と逸脱する細胞が無いコロニーと比べて明らかな違いはみられなかったが、周囲部では $V=0-20 \mu\text{m/h}$ と著しく高い遊走速度に分布が広がっていた。このように、逸脱領域では、遊走速度の分布が非正規分布であることが示された。

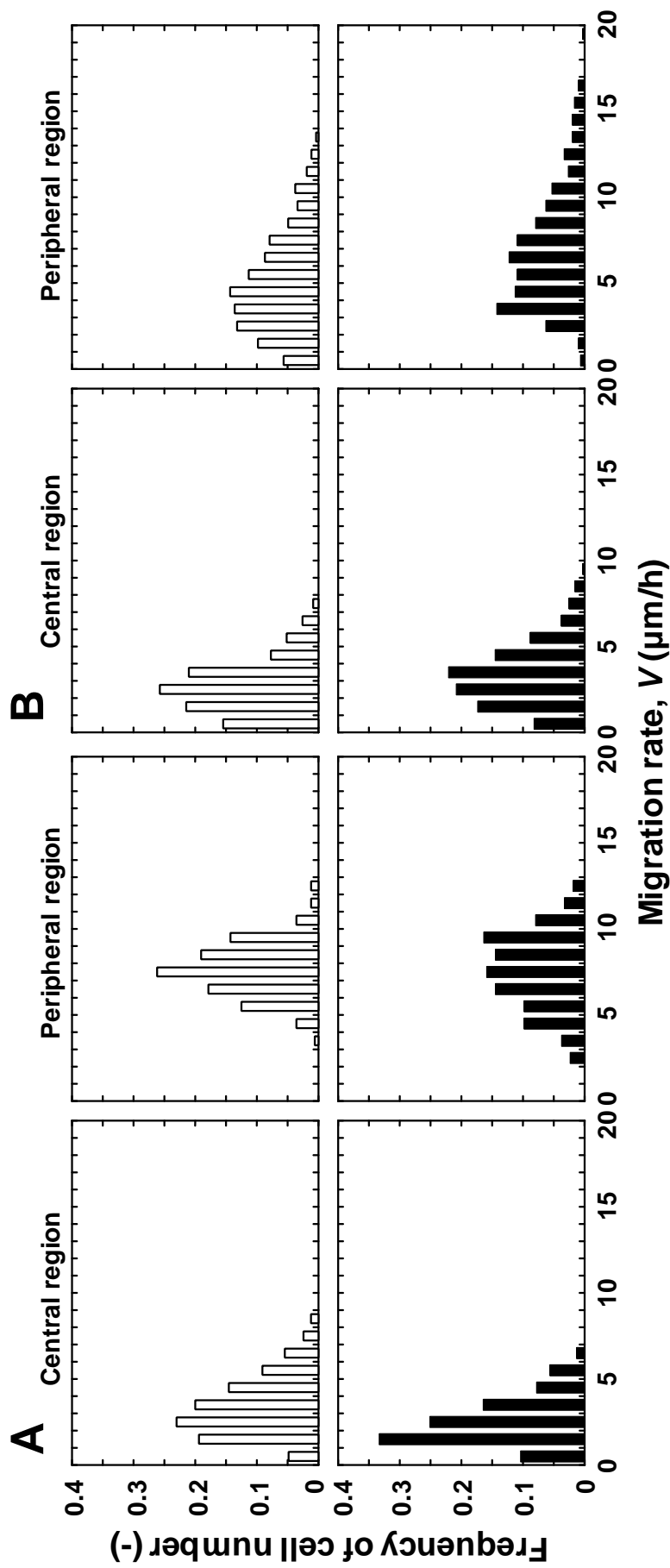


Fig. 1.6 Frequency of migration rates of single cells at the central and peripheral regions of hiPSC colonies with or without deviation from the undifferentiated state in cultures with SNL (A) and MEF (B) feeder cells. From the retrospective analysis, the data were obtained at $t = 48$ h from five hiPSC colonies. Open bars indicate hiPSC colonies without deviation by $t = 120$ h; Closed bars indicate hiPSC colonies with deviation by $t = 120$ h.

著しく異なった遊走速度の発生を、ボックスプロット (Tukey, 1977; Krzywinski and Altman, 2014) を用いて定量的に示した (Fig. 1.7). すなわち, 個々の細胞の遊走速度を, 以下の4つに定義された幅 (1) [25%値 - 1.5 × (75%値 - 25%値)]-25%値, (2) 25%値-75%値, (3) 75%値-[75%値 + 1.5 × (75%値 - 25%値)], (4) 外れ値, にグループ分けして示した. データが正規分布している場合, 群同士の差はパラメトリックな Student's *t*-test を使用し, データが正規分布ではない場合は, ノンパラメトリックな Mann-Whitney *U*-test を使用した. 培養 120 時間までに SNL または MEF フィーダー細胞との共培養において逸脱細胞が無かったコロニーでは, 個々の細胞の遊走速度は, それぞれ $V = 0.2\text{--}12.8 \mu\text{m/h}$ または $V = 0.1\text{--}13.1 \mu\text{m/h}$ の範囲で幅広い分布を示した. SNL および MEF フィーダー細胞との共培養どちらにおいても, 中心部の遊走速度の分布は周囲部に比べて狭く, 平均の遊走速度 V_M は中心部の方が周囲部よりも有意に低かった.

培養 120 時間までの SNL フィーダー細胞との共培養において未分化状態から逸脱する細胞が有ったコロニーでは, 個々の細胞の遊走速度は $V = 0.1\text{--}12.6 \mu\text{m/h}$ で幅広い分布を示し, 中心部および周囲部の平均の遊走速度はそれぞれ $V_M = 2.7 \pm 1.4 \mu\text{m/h}$ および $V_M = 7.6 \pm 2.3 \mu\text{m/h}$ であった (Fig. 1.7A). それと比較して, 培養 120 時間までの MEF フィーダー細胞との共培養において未分化状態から逸脱する細胞が有ったコロニーでは, 個々の細胞の遊走速度は $V = 0.1\text{--}19.5 \mu\text{m/h}$ と幅広い分布を示し, SNL フィーダー細胞との共培養と同様に, 中心部と周囲部間で有意差がみられた (Fig. 1.7B). SNL フィーダー細胞との共培養において中心部に未分化状態から逸脱する細胞が有るコロニーでは, $0.1\text{--}1.5 \mu\text{m/h}$ の低い V 値の細胞の割合が増加し, 一方, MEF フィーダー細胞との共培養において周囲部に未分化状態から逸脱する細胞が有るコロニーでは, $12.6 \mu\text{m/h}$ より高い V 値の細胞の割合が高く, フィーダー細胞の種類によるパターンの違いが示された. これらの結果から, ヒト iPS コロニーの中心部または周囲部で未分化状態から逸脱した細胞の発生は, それぞれ, 比較的遅く

または速く遊走している細胞をもった非正規分布を必要とすることが明らかになった。

SNL フィーダー細胞との共培養において中心部で細胞の未分化状態からの逸脱が有るコロニーでは、遊走速度の 0–25% 値の範囲が狭く、遅く遊走する割合が増加した事が示された (**Fig. 1.7A**)。しかし、MEF フィーダー細胞との共培養において周囲部で細胞の未分化状態からの逸脱が有るコロニーでは、遊走速度の 75–100% 値の範囲が広く、より速く遊走する事が示された (**Fig. 1.7B**)。MEF フィーダー細胞との共培養では、コロニー周囲部においてボックスプロットのヒゲより上の値が存在することから、SNL フィーダー細胞との共培養と比較して、より大きな遊走速度を有する事が明らかであった。逸脱する細胞の無いコロニーを基に設定した閾値を用い、逸脱する細胞を有するコロニー内に細胞遊走のアノマリーを示すことができるかどうかを検討した。閾値は、逸脱する細胞の無いコロニーにおける遊走速度分布の 25% および 75% 値と定義した。SNL フィーダー細胞との共培養において逸脱する細胞が有るコロニーの中心部では、25% 値より下の遊走速度の割合が、逸脱する細胞が無いコロニーにおける割合より 1.9 倍高かった (**Fig. 1.7A**)。MEF フィーダー細胞との共培養において逸脱する細胞が有るコロニーの周囲部では、75% 値より上の遊走速度の割合が、逸脱する細胞が無いコロニーにおける割合より 1.8 倍高かった (**Fig. 1.7B**)。このように、逸脱する細胞が有るコロニーではアノマリーの存在が確認され、また、中心部と周囲部の間、および SNL と MEF フィーダー細胞との共培養の間で遊走速度の中央値に有意差があった。

網羅的な解析として、**Fig. 1.7** のデータを、培養 48 時間の測定開始時の iPS コロニーサイズに対する個々の細胞の遊走速度を示すボックスプロットに再度プロットし直したところ、コロニーサイズと個々の細胞の遊走速度には関係性があった (**Fig. 1.8**)。培養 120 時間までの SNL および MEF フィーダー細胞との共培養にて逸脱する細胞が無かったコロニー周囲部においては、コロニーサイズの上昇とともに遊走速度の中央値の上昇が見られた。

一方、SNL フィーダー細胞との共培養にて逸脱する細胞が有ったコロニーでは、中心部の遊走速度の中央値は、逸脱する細胞無しのコロニーの場合と比較して、コロニー面積に依存せず低いようであった (**Fig. 1.8A**)。しかし、MEF フィーダー細胞との共培養にて逸脱する細胞が有ったコロニー周囲部の遊走速度の中央値は徐々に上昇しており、コロニー面積 0.21 mm^2 の $V = 4.9 \pm 1.9 \text{ } \mu\text{m/h}$ から 0.80 mm^2 の $V = 11.6 \pm 3.5 \text{ } \mu\text{m/h}$ と遊走速度の中央値が上昇していた (**Fig. 1.8B**)。SNL および MEF フィーダー細胞との共培養において逸脱する細胞が有ったコロニー中心部または周囲部の遊走測定から、個々の細胞がより小さいまたはより大きい値をとりやすい傾向が示された。特に、SNL フィーダー細胞との培養では、逸脱する細胞が有ったコロニー中心部の 0–25% 値の範囲は、75–100% 値の範囲よりも狭かった (**Fig. 1.8A**)。一方、MEF フィーダー細胞との共培養では、逸脱する細胞が有ったコロニー周囲部の細胞の 75–100% 値の範囲は、0–25% 値の範囲より広がった (**Fig. 1.8B**)。注目すべきことに、コロニーサイズの拡大とともに分布範囲は徐々に大きくなった。特に、MEF フィーダー細胞との共培養では、コロニー周囲部の細胞遊走速度の測定において外れ値があり、アノマリーに遊走している細胞はより高い遊走速度に達しようとする傾向がある事を示唆していた。

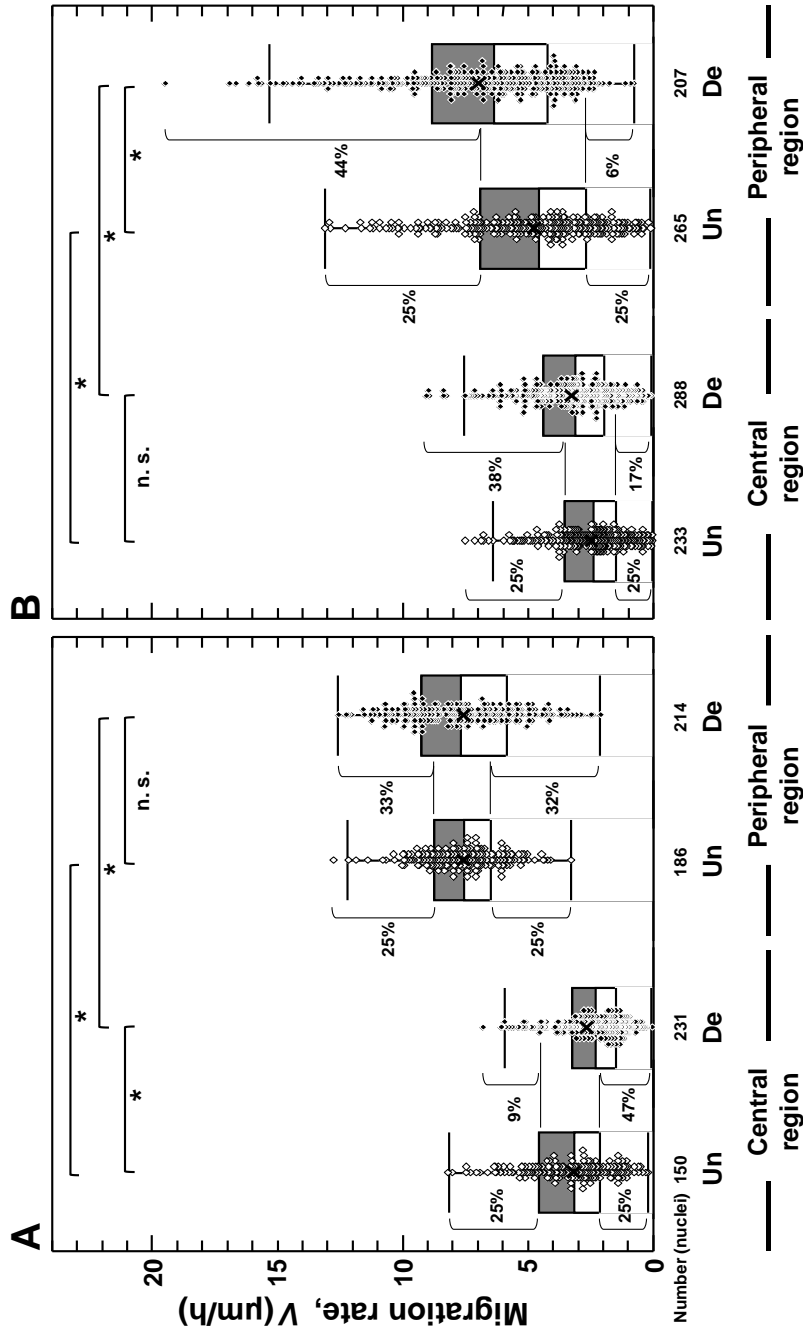


Fig. 1.7 Distribution of migration rates of single cells at the central and peripheral regions of hiPSC colonies with or without deviation from the undifferentiated state in cultures with SNL (A) and MEF (B) feeder cells. From the retrospective analysis, the data were obtained at $t = 48$ h from five hiPSC colonies. “Un” indicates hiPSC colonies without deviation by $t = 120$ h. “De” indicates hiPSC colonies with deviation by $t = 120$ h. Open squares, without deviation; closed squares, with deviation. Cross marks indicate average values. Box-and-whiskers plots of migration rates of single cells at the central and peripheral regions of hiPSC colonies. For each box, the central bar is the median, the edges are the 25th and 75th percentiles, and the whiskers extend to the most extreme data points (not including outliers). Outliers are values outside of the range; [25th percentile $- 1.5 \times$ (75th percentile $- 25$ th percentile)] $-$ [75th percentile $+ 1.5 \times$ (75th percentile $- 25$ th percentile)]. * $P < 0.01$ (Student’s t -test or Mann–Whitney U test, when appropriate).

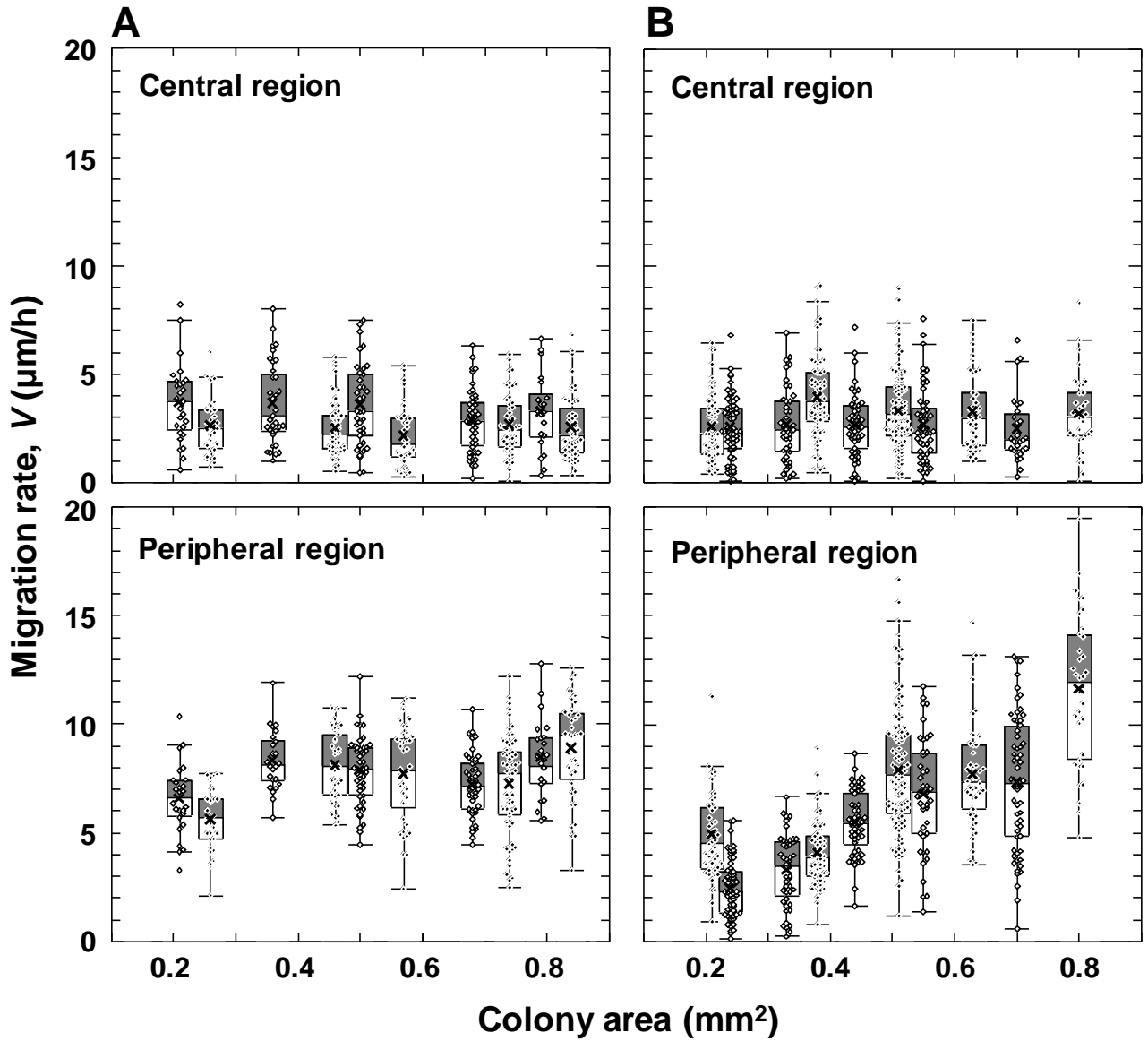


Fig. 1.8 Correlation between migration rates of single cells and areas of hiPSC colonies with or without deviation from the undifferentiated state in cultures with SNL (A) and MEF (B) feeder cells by $t = 120$ h. Open squares, without deviation; closed squares, with deviation. Cross marks indicate average values. Box-and-whiskers plots of migration rates of single cells at the central and peripheral regions of hiPSC colonies. For each box, the central bar is the median, the edges are the 25th and 75th percentiles, and the whiskers extend to the most extreme data points (not including outliers). Outliers are values outside of the range; $[25\text{th percentile} - 1.5 \times (75\text{th percentile} - 25\text{th percentile})] - [75\text{th percentile} + 1.5 \times (75\text{th percentile} - 25\text{th percentile})]$.

1.3.4 細胞－細胞間および細胞－基質間接着の局在

SNL および MEF フィーダー細胞との共培養にて、細胞が未分化状態から逸脱する発生機構を明らかにするため、細胞－細胞間接着に関わるタンパク質である E-cadherin, および細胞－基質間接着に関わるタンパク質である paxillin の免疫蛍光染色を、培養 72 時間において行った。F-actin および核の空間的な画像から、SNL または MEF フィーダー細胞との共培養において、コロニー周囲部または中心部の未分化細胞の頂端側と基底側に沿って、F-actin の発現が豊富であることが示された (**Fig. 1.9**)。未分化細胞は、通常、頂端－基底の極性の整合性によって構造を維持する。しかし、フィーダー細胞の種類によってコロニー周囲部または中心部の F-actin および核の分布に著しい違いが観察された。SNL フィーダー細胞との共培養では、コロニー中心部に位置する細胞の基底側では F-actin の減少が明らかであり (**Fig. 1.9Db, Eb**)、中心部の細胞は部分的に重なり合って基質から離れていた。一方、MEF フィーダー細胞との共培養では、コロニー中心部および周囲部の細胞のどちらにおいても、頂端側および基底側に F-actin の局在が観察された (**Fig. 1.9Kb, Lb**)。

また、E-cadherin と paxillin の免疫蛍光染色の結果から、これらの分子の位置依存的な発現が示された。E-cadherin の発現は、コロニー中心部と周囲部の細胞で顕著に異なっていた。SNL フィーダー細胞との共培養では、コロニー中心部で豊富な E-cadherin の発現が見られたのに対し (**Fig. 1.9Ba, Ca**)、MEF フィーダー細胞との共培養では、E-cadherin がコロニー周囲部で弱く非連続的に発現していた (**Fig. 1.9Ia, Ja**)。SNL および MEF フィーダー細胞との共培養におけるコロニー周囲部の細胞では、接着斑タンパク質である paxillin が収縮性を有した F-actin 構造として知られている actin ストレスファイバーの端に点状に局在していた (**Fig. 1.10Gb, Nb**)。特に、MEF フィーダー細胞との共培養においてコロニー周囲部の先端の細胞の基底側にラメリポディアと paxillin の多くの点状の染色が見られ、コロニーの最外端の細胞核がより収縮力を受けやすいと考えられた (**Fig. 1.10Nb**)。

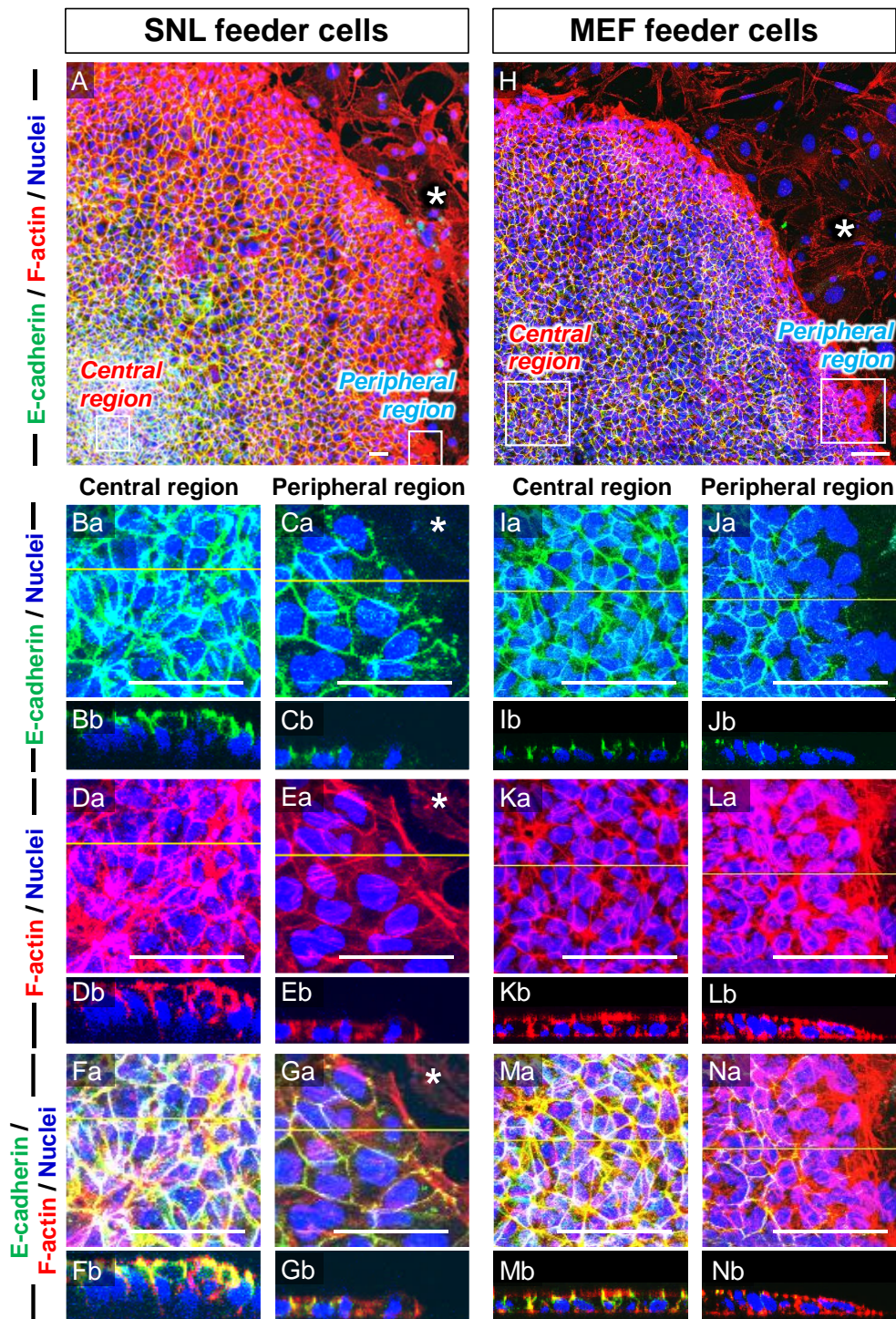


Fig. 1.9 Localization of E-cadherin associated with actin cytoskeleton in hiPSC colonies in cultures with SNL (A–G) and MEF (H–N) feeder cells at $t = 72$ h. Confocal fluorescence images of E-cadherin (green), F-actin (red), and nuclei (blue) show top-down views of 3D-reconstruction (XYZ planes) and 2D optical cross-sectioning (XZ planes). Panels are magnified in images of the top-down view (Ba–Ga and Ia–Na) with a cross-sectional side view (Bb–Gb and Ib–Nb). The yellow lines in the top-down views indicate the location of the cross-sectional side view. The asterisks show feeder cells. Scale bars = 40 μm .

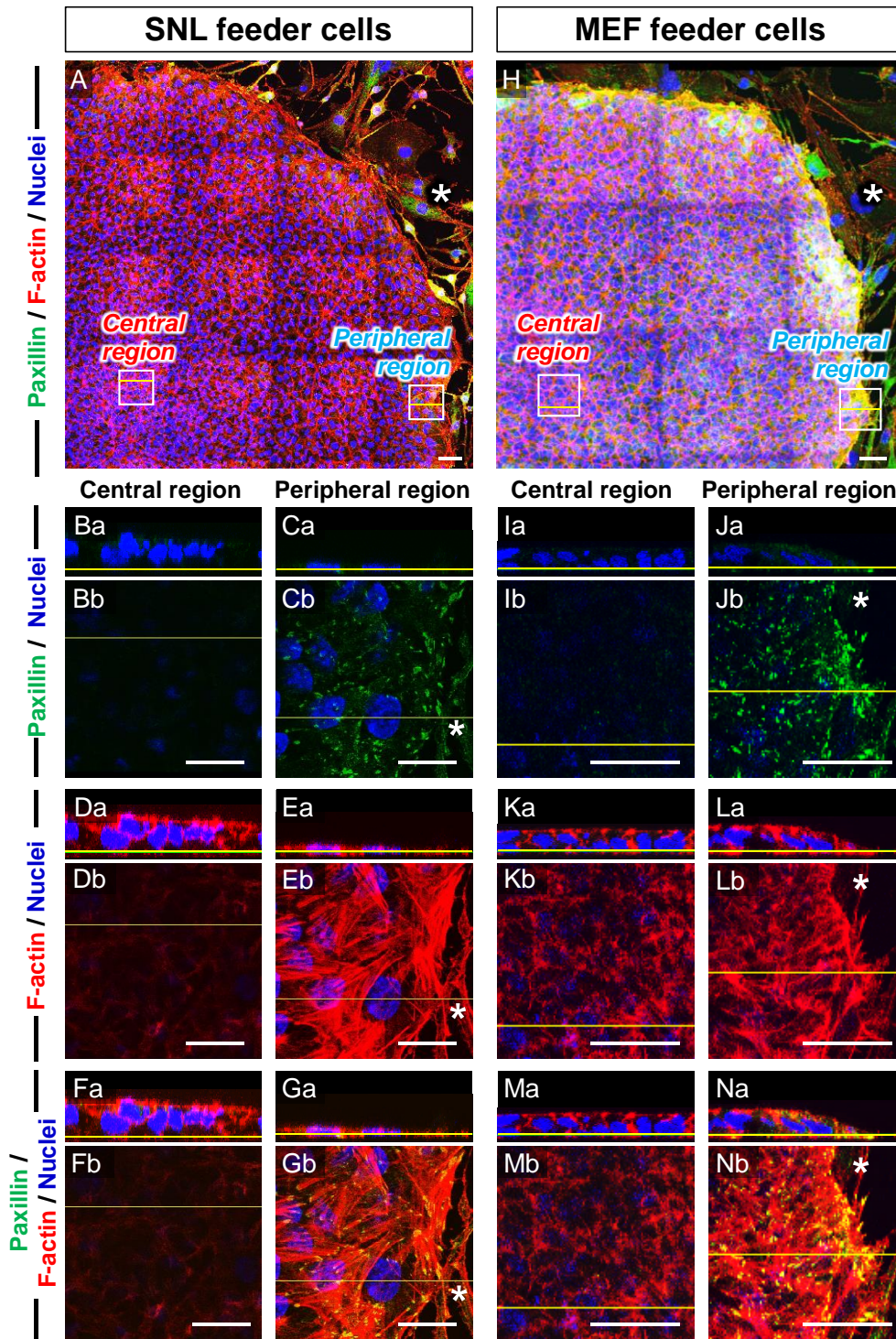


Fig. 1.10 Focal adhesion formation associated with actin cytoskeleton in hiPSC colonies in cultures with SNL (A–G) and MEF (H–N) feeder cells at $t = 72$ h. Confocal fluorescence images of paxillin (green), F-actin (red), and nuclei (blue) show top-down views of 3D-reconstruction (XYZ planes) and 2D optical cross-sectioning (XY and XZ planes). Panels are magnified in images of a cross-sectional side view in XZ (Ba–Ga and Ia–Na) or XY planes (Bb–Gb and Ib–Nb). The yellow lines indicate the location of the cross-sectional side view. The asterisks show feeder cells. Scale bars = 40 μm .

1.3.5 細胞核への力学的ストレスに関わる核ラミナの局在

細胞核への力学的ストレスの蓄積の有無を把握するため、核輪郭のラミナの主要な構成成分である laminA/C で核が覆われているかどうかを検討した。SNL フィーダー細胞との共培養ではコロニー中心部の細胞は周囲部よりも小さくかつ稠密であったが、MEF フィーダー細胞との共培養ではコロニー周囲部の細胞は中心部よりも顕著により大きく平らな形状を有していた。LaminA/C を持つ細胞は、SNL フィーダー細胞との共培養においてはコロニーの中心部に局在したが (Fig. 1.11A), MEF フィーダー細胞との共培養においてはコロニーの周囲部に多く局在していた (Fig. 1.11D)。拡大画像から、laminA/C は、SNL フィーダー細胞との共培養では中心部の細胞の多層構造の核周囲で、MEF フィーダー細胞との共培養ではコロニー周囲部の大きく平らな細胞の核周囲で、核の縁を囲っていた (Fig. 1.11Bb, Fb)。これらの結果から、細胞の未分化状態からの逸脱が発生しうるコロニー内の領域では、細胞が乱雑に並んでおり、laminA/C が核に蓄積していることが示された。

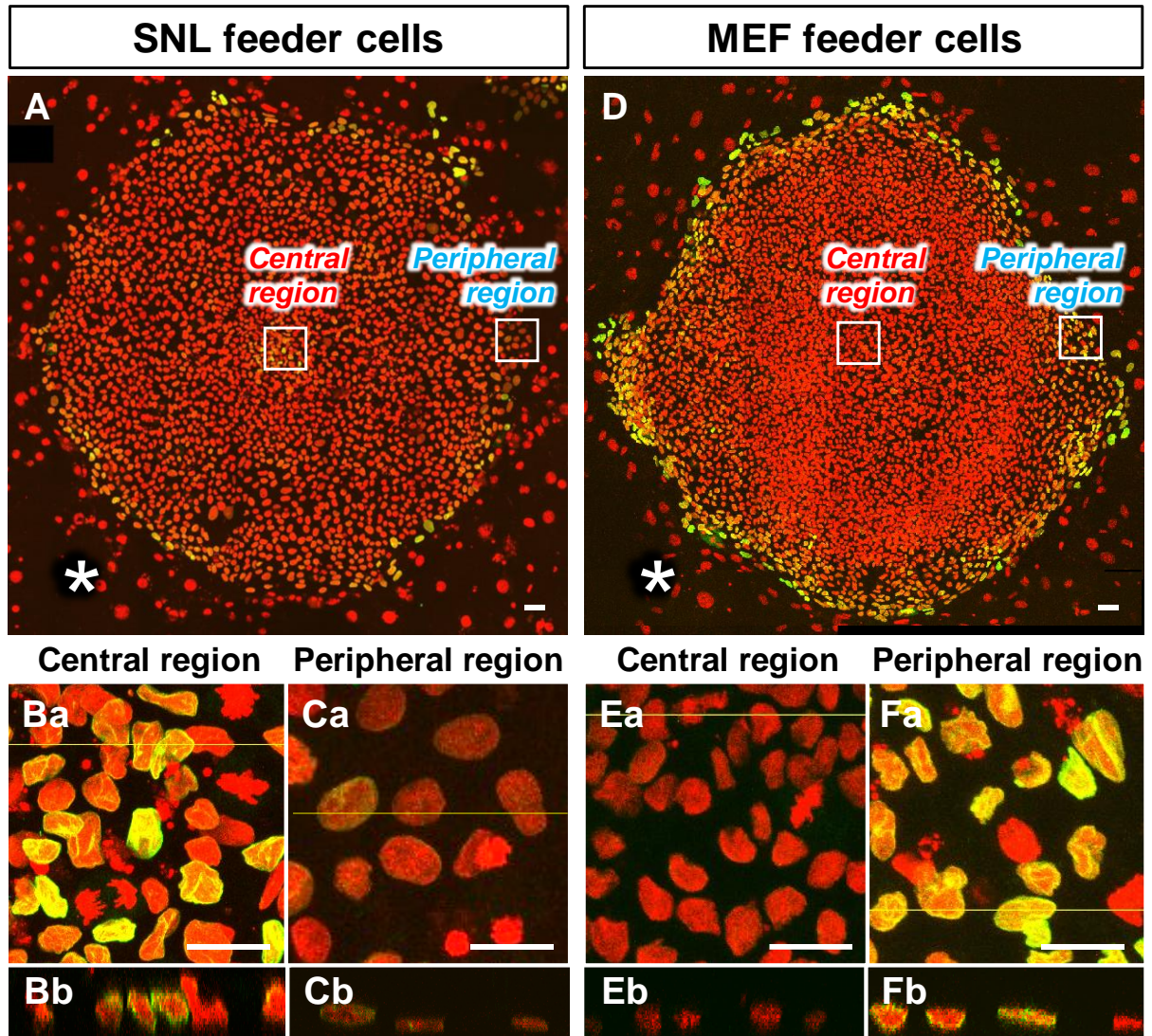


Fig. 1.11 Localization of laminA/C in hiPSC colonies in cultures with SNL (A–C) and MEF (D–F) feeder cells at $t = 72$ h. Confocal fluorescence images of laminA/C (green) and nuclei (red) show top-down views of 3D-reconstruction (XYZ planes) and 2D optical cross-sectioning (XZ planes) in hiPSC colonies. Panels are magnified in images of the top-down view (Ba, Ca, Ea, and Fa) with a cross-sectional side view (Bb, Cb, Eb, and Fb). The yellow lines in top-down views indicate the location of the cross-sectional side view. The asterisks show feeder cells. Scale bars = 20 μm .

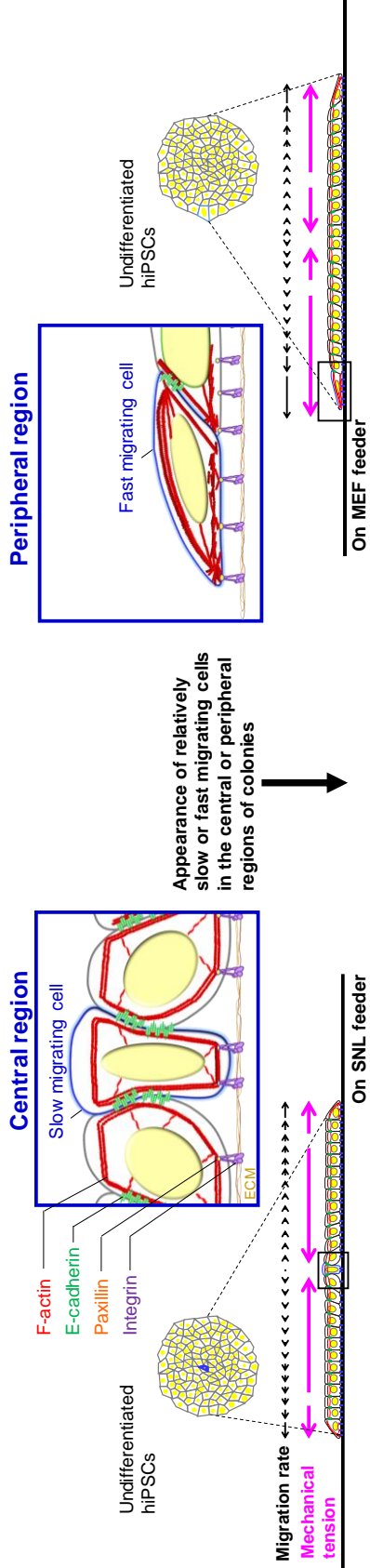
1.4 考察

これまで、多くの研究においてヒト iPS 細胞の分化を引き起こす基本的な機構が検討されていたが、培養中のヒト iPS 細胞が未分化状態から逸脱するトリガーについての研究は比較的少ない。ヒト iPS 細胞とフィーダー細胞の共培養では、フィーダー細胞の種類によって、未分化状態から逸脱した細胞が生じるコロニー内の領域に違いが観察される。本研究は、その差異がヒト iPS 細胞の細胞遊走能の違いにより引き起こされることを示した。SNL フィーダー細胞との共培養では、逸脱細胞を有するコロニーの中心部において、細胞の密集が進むにつれその運動性が着実に減少し細胞が重なっており、コロニー中心部の細胞が部分的に基質から引き離されることが示された (Fig. 1.2A)。これらの細胞は、大きく拡大したコロニー中心部で小さな敷石状の細胞から大きく伸展した形状の細胞へと変化し未分化状態から逸脱しており、逸脱領域はその後も拡大した。一方で、MEF フィーダー細胞と共培養したコロニーにおける細胞の未分化状態からの逸脱は、コロニー周囲部での急速な増殖および外側への遊走と関連していた。これらの細胞は、培養が進んでも高い増殖能を維持していた (Fig. 1.2B)。MEF フィーダー細胞との共培養でのヒト iPS 細胞の遊走能の上昇は、コロニー周囲部の細胞-細胞間接着を低下させ、細胞がより運動性の高い表現型を獲得することを促進していると考えられた。逸脱細胞を有したコロニー内の遊走速度の遡及的な解析から、逸脱領域では、逸脱細胞が発生していない領域と比較して細胞遊走のアノマリーがみられた (Fig. 1.7)。コロニー周囲部または中心部の逸脱領域においては、対応する非逸脱領域と比べて、細胞の遊走速度が、それぞれ、著しく高いまたは低かった。これらの結果によって、ヒト iPS コロニー中心部または周囲部で細胞が未分化状態から逸脱する機構の理解が進み、コロニー拡大に伴った接着細胞と基質との接着のバランスが逸脱細胞の発生と深く関わっていることが示唆された。

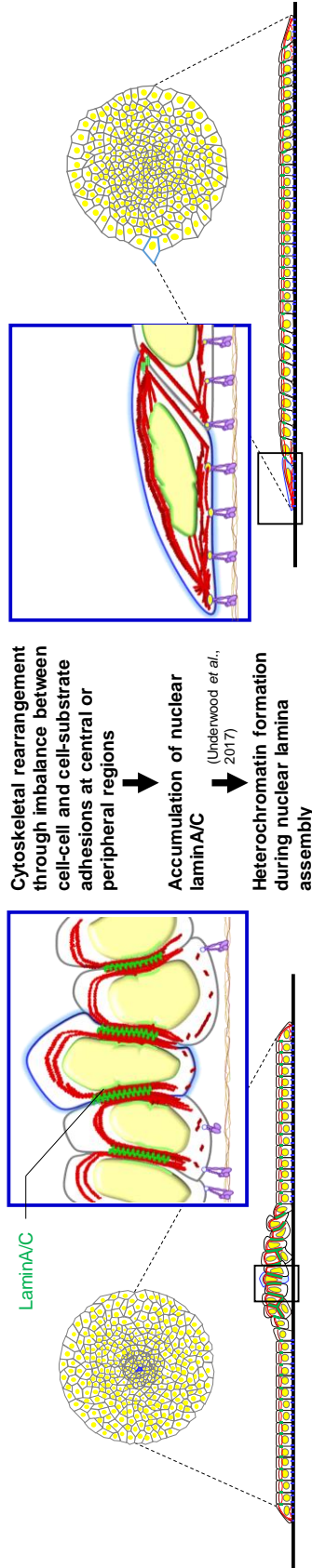
フィーダー層上のヒト iPS 細胞が未分化状態から逸脱する現象の観察に基づいた仮説の

概念図を **Fig. 1.12** に示した。すなわち，(1)ヒト iPS コロニー内の細胞遊走のアノマリーが細胞－細胞間および細胞－基質間接着のアンバランスを導く，(2)このアンバランスの結果として laminA/C が蓄積して未分化状態からの逸脱を導く，という仮説を立てた。細胞遊走速度の変化は，細胞骨格の再形成に関わる cadherin と integrin の立体構造に影響を及ぼす。本論文で示した核での laminA/C の蓄積は，核での laminA/C が多能性幹細胞では発現しないが分化とともに発現するという今までの結果と一致している (Ihalainen *et al.*, 2015; Heo *et al.*, 2016; Underwood *et al.*, 2017) 。核の内側への力学的刺激の伝達とそれに誘発された核の変形は，遊走速度の変化に依存し，その結果，直接的または間接的に遺伝子転写を調節する。この核での変化は，核－細胞骨格，細胞骨格－基質，細胞骨格－隣接細胞，等の結合部位で発生するストレスおよびそれら結合部の変形を増加すると予想される (Wang *et al.*, 2009) 。このように，核周囲の actin 重合による actin 動態は，細胞遊走中に観察されるような核の形と位置の制御に関与し，さらに，クロマチン構造のような核機能も制御すると推測できる (Meshorer *et al.*, 2006; Thorpe and Lee, 2017; Underwood *et al.*, 2017) 。クロマチン再形成は，転写制御とその記憶，遺伝子整合性，遊走中の細胞変形能にとって必要なステップであり，細胞の形状制約は細胞挙動の制御因子として重要である (Guenther *et al.*, 2010; Akanuma *et al.*, 2016) 。したがって，細胞挙動に関連するアノマリーを含む部分において，細胞－細胞間接着および細胞－基質間接着と関わる actin 骨格を通じて核周囲に laminA/C が蓄積し，それによりヘテロクロマチンへと移行することで細胞が未分化状態から逸脱することが示唆される (Francis *et al.*, 2011; Gaspar-Maia *et al.*, 2011; Versaevel *et al.*, 2014) 。

Step 1. Anomaly of cell migration between central and peripheral regions of hiPSC colonies



Step 2. Reorganization of lamina-cytoskeleton interaction by the imbalance between cell-cell and cell-substrate adhesions



Step 3. Occurrence of deviated cells from the undifferentiated state in hiPSC colonies

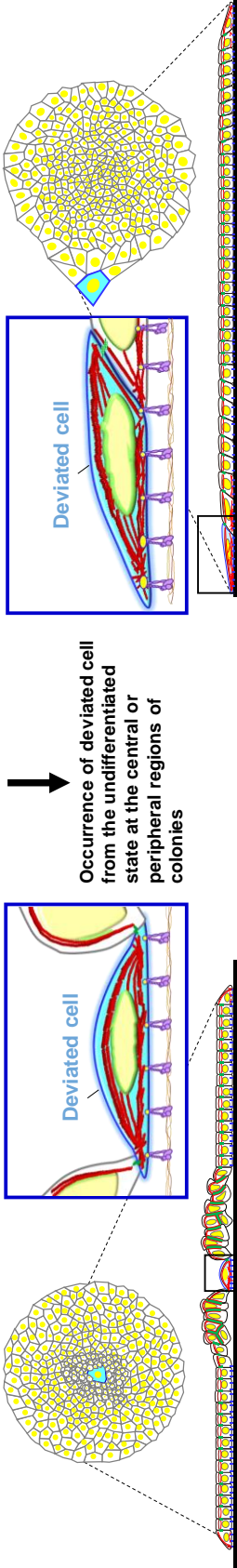


Fig. 1.12 Schematic drawing of our hypothetical mechanism by which anomalous cell migration acts as a key trigger for deviation

from the undifferentiated state of hiPSC colonies in culture with SNL and MEF feeder cells.

幹細胞または特定の細胞系列に分化していく細胞において、細胞挙動は、自己複製機構のトリガーとしての役割をもつだけでなく、細胞の多様性維持のための役割ももつ。生物学的な不均一性は、集団の不均一性、空間的な不均一性、時間的な不均一性の3つのカテゴリーに分けうる (Gough *et al.*, 2017)。培養中の細胞集団内の時空間的な挙動の研究によって、挙動の働きの変化を評価し、培養中の細胞運命決定を導く機構を解明する方法が生み出されている。幹細胞培養における不均一な集団の存在を示唆した様々な研究やデータを考慮すると、細胞挙動の不均一性を反映する多くの特徴を評価することが出来る (Altschuler *et al.*, 2010)。例えば、培養中の自己複製や分化の効果の不均一性から、個々の細胞の形状や挙動が、コロニー形成におけるそれらの位相的な関係によって決定されることが示される。細胞トラッキング解析からは膨大なデータが得られるが、データ解析が困難であるため、これらの解析を用いて高密度培養における細胞の表現型を明らかにした報告は少ない (Debeir *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Dzyubachyk *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2017)。しかしながら、細胞トラッキング解析は、個々の細胞の位置の変化から詳細なデータをもたらし、コロニー内の異なる領域の環境刺激に反応する細胞挙動について洞察を与える (Miyashita *et al.*, 2017)。培養中の細胞集団において、個々の細胞間にはある程度の違いが常に存在しているが、細胞集団全体としての挙動は個々の細胞の挙動を全く表していない。このような細胞の挙動は、平均および/または分散で要約された多様性として観察されるが、生物学的に意味のある情報は失われている。つまり、細胞集団の平均的なシグナルの解析では、興味のある細胞が少数派である場合、それらの挙動や動態は、その他の多くの細胞によって隠蔽される、または相殺されてしまう。

本研究から、細胞遊走の測定は、培養中における個々のヒト iPS 細胞の位置依存的な変化を理解するための有用な手法として役立ち、ヒト iPS 細胞培養プロセスの発展と設計に有用な情報を与えることが立証された。ヒト iPS 細胞が培養中に未分化状態から逸脱する

トリガーを理解するため、ノンパラメトリックな検定を使う重要性に焦点を当てた。一般的に、Student's *t*-test は集団の平均値の検定であり、Mann-Whitney *U* test は集団の中央値と四分位範囲の検定とみなされている (Hart, 2001)。コロニー中心部または周囲部で未分化状態から逸脱する細胞の遊走速度は正規性に分布していないので、ノンパラメトリックな検定として Mann-Whitney *U* test を使用し、統計的有意差を示す 2 群比較を行った。個々の細胞の遊走速度の解析から、コロニー周囲部または中心部で比較的速くまたは遅く遊走する細胞（それぞれ、75% 値より上、または 25% 値より下）が出現する結果、ヒト iPS コロニー内で未分化状態から逸脱した細胞が偶発することが立証された (Fig. 1.7)。個々の細胞遊走の測定から、ヒト iPS 細胞の未分化状態からの逸脱が、コロニー内の細胞遊走のアノマリーと関連していることを結論づけることができ、細胞遊走の違いから未分化状態から逸脱した細胞の発生点を特定できる可能性が示された。細胞遊走のアノマリーの結果としてヒト iPS 細胞の未分化状態からの逸脱が偶発的に発生することが分かり、遊走速度は、培養中の未分化状態から逸脱するトリガーを調べるための有用なパラメーターとなりうることが示唆された。これらの手法は、細胞挙動を用いて細胞内機能を評価することを可能にし、さらなる研究の発展に寄与する可能性を秘めている。

1.5 小括

コロニー中心部で未分化状態から逸脱する培養条件下では，遊走促進剤を添加すると，未分化状態から逸脱した細胞がコロニー周囲部で発生した．また，コロニー周囲部で未分化状態から逸脱する培養条件下では，遊走阻害剤を添加すると，未分化状態から逸脱した細胞がコロニー中心部で発生した．

コロニー中心部で未分化状態から逸脱する培養条件下では，コロニー内の細胞遊走の解析を用いると，中心部では極端に遅い細胞遊走をもつ細胞集団があったことから，アノマリーな細胞遊走があることが分かった．その後，コロニー中心部は，細胞－基質間接着を失って浮いた細胞を含んでおり，さらに，核ラミナの発現から力学的ストレスを蓄積した領域であることが示唆された．

コロニー周囲部で未分化状態から逸脱する培養条件下では，コロニー内の細胞遊走の解析を用いると，周囲部では極端に速い遊走の細胞があったことから，アノマリーな細胞遊走があることが分かった．その後，コロニー周囲部は，細胞－細胞間接着を失った細胞を一部含んでおり，さらに，核ラミナの発現から力学的ストレスを蓄積した領域であることが示唆された．

以上から，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必要な条件であることが示された．

第2章 未分化状態から逸脱した細胞の発生防止

2.1 緒言

ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞は、医療および工業応用に大量のヒト組織を生み出す機会を我々に与える (Hussein *et al.*, 2011; Robinton *et al.*, 2012; Serra *et al.*, 2012; Kimbrel *et al.*, 2015). 広汎な利用に必要な細胞量を調製するためには、培養規模を容易に拡大できる安定した培養システムを確立することが求められるが、そのような技術は未だ確立されておらず、ヒト iPS 細胞の技術応用への妨げとなっている。これらの細胞の多分化能を維持しながら培養するには、細胞の未分化状態および増殖に必要な因子を放出するフィーダー細胞、あるいはゼラチンやコラーゲン、フィブロネクチンのような細胞外基質構成成分の支持が必要である (Saha *et al.*, 2007; Burdick *et al.*, 2009; Lund *et al.*, 2009; Lutolf *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 2012; Jozefczuk *et al.*, 2012). 一般的な培養方法においては、ヒト iPS 細胞の接着が十分に考慮されているものの、細胞の増殖と性質の維持は十分に検討が行われているとは言い難い。事実、継代培養では未分化状態から逸脱した細胞が生じて増殖していくため、コロニー内のヒト iPS 細胞は自己複製能と多分化能を徐々に失っていく。したがって、大量培養プロセスにおいてヒト iPS 細胞の未分化状態を持続する手法の確立が待たれている。

ヒト iPS 細胞の増殖は、細胞-細胞間および細胞-基質間で発生する細胞挙動のバランスに依存している (Kim and Kino-oka, 2015; Kim and Kino-oka, 2018). 細胞挙動がどのように細胞機能に影響を与えるか、細胞外力による細胞挙動の制御によりどのように幹細胞の自己複製と分化を調整しうるか、についての糸口が多くの研究で示されている (Soncin *et al.*, 2009; Tamiya *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Nampe and Tsutsui, 2013; Kim and Kino-oka, 2014b). 特に、コロニーの形状は、actin 骨格と細胞-細胞間接着および細胞-基質間接着の相互作用によって生じる生体力学に依存することが報告されている (Kim *et al.*,

2012; Akiyama *et al.*, 2017; Narva *et al.*, 2017). 接着, actin 骨格ネットワーク, および生化学的なシグナルの統合は, 細胞内での力の発生を動的に調整し, シグナル伝達カスケードならびに細胞運命決定を根本的に調節する転写イベントを制御する (Maruthamuthu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2105a). 最近, フィーダー細胞とヒト iPS 細胞の共培養によりコロニーにおける細胞-細胞間接着を変化させることで, 細胞運命決定を早期に制御する手法の開発が試みられている (Kim *et al.*, 2012; Kim and Kino-oka, 2014b; Kim and Kino-oka, 2014c). 培養中, コロニーは徐々に大きくなって細胞がより密接に詰まった状態となり, コロニー内でアポトーシスが生じた後に, 細胞は小さな細胞から大きく平らな細胞へと変化する. これらの挙動を観察することは, ヒト iPS コロニーの中心部で細胞が未分化状態から逸脱する機構を理解するための重要な情報を我々に与えてくれる. コロニー内の細胞-細胞間接着, 細胞-基質間接着, 細胞遊走の 3 つの細胞挙動の適切な協調が, 未分化なヒト iPS 細胞を維持するために必要であるという考えが, 複数の研究によって支持されている (Kim and Kino-oka, 2015; Kim and Kino-oka, 2018).

近年, 細胞挙動制御が培養手法の開発に重要であることが分かっている. ヒト iPS 細胞を増殖するためには, 未分化状態から逸脱する細胞の発生を防止する, または逸脱した細胞を除去する必要がある. 最近, ボツリヌス菌由来のヘマグルチニン (HA) という E-cadherin 阻害剤を使うことで, ヒト iPS コロニー内の逸脱細胞を選択的に除去できることが示された (Kim *et al.*, 2017a; Kim *et al.*, 2017b). HA は, まず細胞膜の糖鎖に結合して細胞内に取り込まれ, その後に細胞間隙に放出されて E-cadherin に直接結合する. HA は, E-cadherin を介した細胞-細胞間接着を阻害し弱めることで上皮障壁機能を低下させる (Fujinaga *et al.*, 1997; Fujinaga *et al.*, 2000; Matsumura *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2009; Sugawara and Fujinaga, 2010; Sugawara *et al.*, 2010; Baum *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014; Sugawara *et al.*, 2014). ヒト iPS コロニー内の未分化状態から逸脱した細胞を HA が選択的に除去する過程において, E-cadherin

を介した細胞－細胞間接着が一時的崩壊する。HA 添加により E-cadherin の結合が阻害されたヒト iPS 細胞のコロニー内では、細胞が未分化状態であれば Rap1 を介した正のフィードバック機構により E-cadherin を再形成する能力を備えており、結果として未分化細胞のみがコロニー内に残されることとなる (Kim *et al.*, 2017b)。このような HA の効果は、E-cadherin による細胞接着の崩壊により未分化状態から逸脱した細胞が選択的に除去されるという知見とも合致する。また、HA による細胞接着の崩壊は、未分化状態から逸脱した細胞の選択的除去のみならず、コロニー内における逸脱した細胞の発生防止にも効果があると予想され、そのような効果を明らかにすることは、細胞挙動の観点から幹細胞の運命を操作する培養戦略の開発につながる。そこで、第 2 章では、簡便かつ確実にヒト iPS 細胞の未分化状態を維持したまま増殖させる培養手法を確立するため、HA を用いてヒト iPS 細胞の細胞－細胞間接着を緩和させることで未分化状態から逸脱した細胞の発生を防止できるかを検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 細胞および培養条件

ヒト iPS 細胞は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクから取得した (clone Tic, JCRB Number: JCRB1331). マイトマイシン C 処理された SNL 76/7 細胞 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) と共培養し, 5 ng/ml basic fibroblast growth factor を含む ReproStem 培地 (ReproCELL Inc., Tokyo, Japan) を用いて未分化状態を維持した. 細胞は 5 日ごとに継代し, 毎日培地交換した.

フィーダー層として, 0.1% ゼラチンでコートした培養面にマイトマイシン C 処理された SNL 76/7 細胞を 2.5×10^4 cells/cm² で播種し, 7% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で 1 日間培養した.

ヒト iPS 細胞の継代のため, 0.1 mg/ml collagenase IV, 0.25% trypsin, 20% KSR (全て Thermo Fisher Scientific) および 0.1 mM CaCl₂ (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む剥離液で 1 分間インキュベートした後, フィーダー細胞を除去した. 未分化コロニーをセルスクレーパー (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて注意深く回収した. 小さな集塊に分散するため, 未分化コロニーの懸濁液を優しくピペッティングし, フィーダー細胞を含む新しい培養容器に播種した. 培地は毎日新しい培地に切り替えた.

2.2.2 HA の添加

以前の論文に記載された手法 (Sugawara *et al.*, 2014) を用いて機能的な HA の複合体を構成した. HA 濃度は 5 および 50 nM とした. SNL フィーダー細胞を用いてヒト iPS 細胞を 48 時間培養し, HA を添加した. HA 添加から 24 時間後, 通常の培地に交換する過程で HA

を除去し、ヒト iPS コロニー内の未分化細胞の挙動変化を調べた。

2.2.3 蛍光タイムラプス観察

細胞挙動の識別に使用される細胞質色素 (CellTracker™ Green; Thermo Fisher Scientific) で細胞を染色し、タイムラプス共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-10i; Olympus, Tokyo, Japan) を用いヒト iPS コロニー内の細胞の動きを追跡した。蛍光励起波長を 488 nm とし、60 倍対物レンズを用いて 45 分毎に画像を取得した。コロニー内の個々の細胞の画像処理には画像処理ソフトウェア (Imaris; Bitplane AG, Zurich, Switzerland) を用いた。

2.2.4 遊走速度およびコロニー数の定量解析

ヒト iPS コロニー内の個々の細胞の遊走速度を評価するため、細胞核を生細胞の状態では Hoescht 33342 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 30 分間染色した。染色した細胞を洗浄し、新たな培地を加えた。細胞核のタイムラプス画像を 10 倍の対物レンズ付きの画像解析装置 (IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて培養 45 時間または 48 時間から 3 時間、30 分毎に撮影した。培養 120 時間においてコロニーが未分化の細胞で形成されているかを判断した。コロニー中心部と周囲部の細胞遊走速度の解析のために、元画像 (6.9 mm × 6.9 mm, 16 bit, 1.35×10^6 pixels/mm²) を画像のタイリングによって得た。データはコロニー中心部および周囲部に置かれた 2 つの対象領域 (ROIs; 150 μm × 150 μm) から得た。コロニーの重心位置は、明視野画像のコロニー外周から設定した。細胞遊走速度の定量化のため、ROI 内の各細胞核の重心位置 (x_i, y_i) を画像解析ソフトウェア (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて測定した。個々の細胞の遊走速度 V は、核の重心位置が 3 時間で移動した距離から算出した。ランダムに選択した 5 つのヒト iPS コロニーの中心部および周囲部それぞれにおける細胞の遊走速度 V から平均値 V_M

および中央値 V_m を計算し，HA 添加の有無で比較した．測定された遊走速度のデータを， $[25\% \text{値} - 1.5 \times (75\% \text{値} - 25\% \text{値})] - 25\% \text{値}$ ， $25\% \text{値} - 75\% \text{値}$ ， $75\% \text{値} - [75\% \text{値} + 1.5 \times (75\% \text{値} - 25\% \text{値})]$ ，および外れ側の値でグループ分けした．

コロニー数は以前報告された方法に基づいて測定した (Kim *et al.*, 2017a)．6 ウェルプレート (培養面積：9.5 cm², Corning Costar, Cambridge, MA, USA) を用い，各条件につき3つの異なる培養を行った．コロニーの明視野画像を培養 120 時間にて取得した．元画像 (16 bit, 2.92×10^5 pixels/mm²) は4倍の対物レンズ付きの画像解析装置 (IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare) を用いて取得した．多位置撮影によって各ウェル全体の画像を取得し，そのタイリング画像を用いて目視により未分化状態から逸脱した細胞が有るコロニーを検出した．コロニー数および未分化コロニー数を求め，全コロニーに対する未分化コロニーの割合を算出した．

2.2.5 免疫蛍光染色

細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Sigma-Aldrich) で洗浄し，4%パラホルムアルデヒド (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を用いて室温で 10 分間固定した．PBS で細胞を洗浄後，0.5% Triton X-100 を含む PBS で 5 分間処理し，PBS で 2 回洗浄した．細胞をブロックエース (Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd., Osaka, Japan) を用いて室温で 90 分間インキュベートすることにより非特異的なタンパク質を遮蔽し，10%ブロックエースを含む PBS で適度に希釈した一次抗体と 4°C で一晩インキュベートした．一次抗体には，anti-E-cadherin (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA)，anti-paxillin (Millipore, Billerica, MA, USA)，anti-laminA/C (Santa Cruz Biotechnology)，anti-PAX6 (Sigma-Aldrich)，anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) (Abcam, Cambridge, UK)，または anti-SOX17 (Abcam) 抗体を用いた．トリス緩衝生理食塩水で洗浄した後，Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-

mouse と 1 時間インキュベートすることにより免疫標識した。F-actin および細胞核の染色には、それぞれ、Alexa Fluor 594-conjugated phalloidin (Thermo Fisher Scientific) および 4',6-diamidino-2-phenylindole (Thermo Fisher Scientific) を用いた。60 倍の対物レンズ付きの共焦点レーザー顕微鏡 (Model FV-1000; Olympus, Tokyo, Japan) および 10 倍の対物レンズ付きの画像解析装置 (IN Cell Analyzer 2000) を用い、358, 488, および 594 nm の蛍光励起にて観察を行った。

2.2.6 分化能の検討

細胞を分散して新たな培養容器に移し、外胚葉、中胚葉、内胚葉系への分化誘導培地である STEMdiff trilineage differentiation kit (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) を用いて 7 日間培養することにより分化能の有無を評価した。

2.2.7 Quantitative polymerase chain reaction 法

回収した細胞からの RNA の単離、cDNA の合成、および PCR 分析は、以前に記載されたプロトコルに沿って行った (Kim and kino-oka, 2014a)。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) および TRIzol (Thermo Fisher Scientific) を用いて全 RNA を単離した。SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて 1 mg の全 RNA の逆転写反応を行った。1 μ L の cDNA を含んだ 25 μ L の反応液と SYBR Premix EX Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用い、7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にて quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) を 40 サイクル行った。用いた特異的なプライマーを **Table. 2.1** に示した。標的転写物の相対量を標準曲線から概算し、データを Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現レベルに基づいて標準化した。

全ての PCR 産物を融解曲線分析によってチェックし、複数の産物または不正確な産物の可能性を排除した。

Table 2.1 Polymerase chain reaction primers used in this study.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (base pairs)	Temperature (°C)	Reference
Oct4	Forward: AGCAAACCCGGAGGAGT Reverse: CCACATCGGCCTGTGTATATC	114	60	Lengerke <i>et al.</i> , 2011
Nanog	Forward: TGATTTGTGGGCCTGAAGAAAA Reverse: GAGGCATCTCAGCAGAAGACA	60	60	Li <i>et al.</i> , 2010a
SOX2	Forward: TGGCGAACCATCTCTGTGGT Reverse: CCAACGGTGTCAACCTGCAT	111	60	Kim <i>et al.</i> , 2009
GAPDH	Forward: CAACGGATTTGGTCGTATTGG Reverse: GCCATGGGTGGAATCATATTG	139	60	Chowdhury <i>et al.</i> , 2012

2.2.8 有意差検定

それぞれの実験条件につき少なくとも 3 つの異なる培養を準備し、ヒト iPS コロニーについて測定した。統計解析は、Student's *t*-test または Mann-Whitney *U*-test を使用した。有意水準は $P < 0.01$ および $P < 0.05$ とした。

2.3 結果

2.3.1 HA を用いたヒト iPS 細胞の継代培養

HA の存在下で iPS 細胞を数回継代し、細胞-細胞間接着の緩和によってコロニー内の iPS 細胞が未分化状態を維持することが可能かを検討した (Fig. 2.1). 容器内の未分化コロニーの割合を算出し、継代に伴うその割合の変化を検討した. HA 添加無しの場合、継代培養中の未分化コロニーの割合は次第に減少し、10 継代 (50 日) 時には、未分化コロニーの割合は HA 添加有りの培養よりも有意に高かった (Fig. 2.1B). これは、HA の存在下での培養法が、未分化状態から逸脱した細胞を手動的に除去せずともヒト iPS 細胞の未分化状態を維持できる有効な方法である事を裏付けている. また、HA 添加の有無それぞれの条件で培養されたヒト iPS 細胞を 10 継代後、多能性マーカー遺伝子の発現レベルを q-PCR を用いて測定し、その相対的な発現レベルを解析した. 多能性マーカー (Oct4, Nanog, SOX2) の発現レベルは、HA 添加の有った培養の方が無かった培養よりもわずかに高かった (Fig. 2.2). また、ヒト iPS 細胞が 10 継代後も多分化能を有しているかを確認するため、3 つの主要な胚葉 (外胚葉, 中胚葉, 内胚葉) に分化誘導する培養条件でさらに培養し、各胚葉マーカーに対して染色を行った. HA の存在下で継代後、各分化誘導条件で培養した iPS 細胞は、外胚葉マーカー PAX6, 中胚葉マーカー α -SMA, 内胚葉マーカー SOX17 がそれぞれ陽性であった (Fig. 2.3). これらの結果は、細胞に HA 添加することにより、継代を何回も繰り返しても多分化能を失うことのないヒト iPS 細胞の簡便な培養を可能にすることを示した.

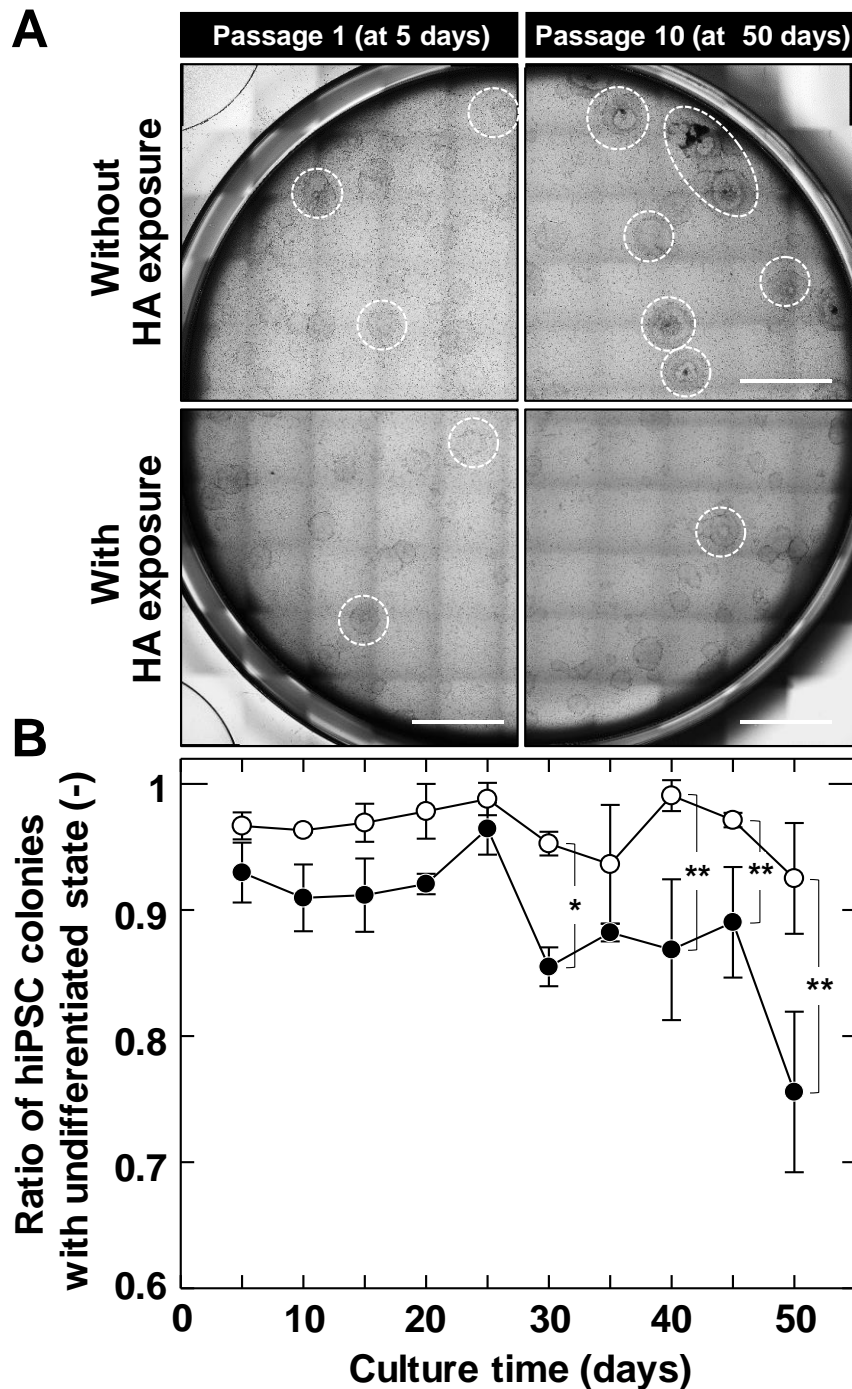


Fig. 2.1 Culture of hiPSCs in an undifferentiated state by several passages including HA exposure. hiPSCs were cultured with SNL feeder cells for 48 h and then added 5 nM HA to colonies. After HA exposure for 24 h, HA was removed during the course of routine medium changes. **(A)** Morphological properties of hiPSC colonies in dishes during serial-passage cultures without and with HA exposure. Dotted circles indicate hiPSC colonies with deviated cells from the undifferentiated state. Scale bars = 1 cm. **(B)** Ratio of hiPSC colonies with undifferentiated state in cultures with several passages. Closed circles, without HA exposure; open circles, with HA exposure. Data are given as mean and standard deviation ($n = 3$). * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ (Student's t -test).

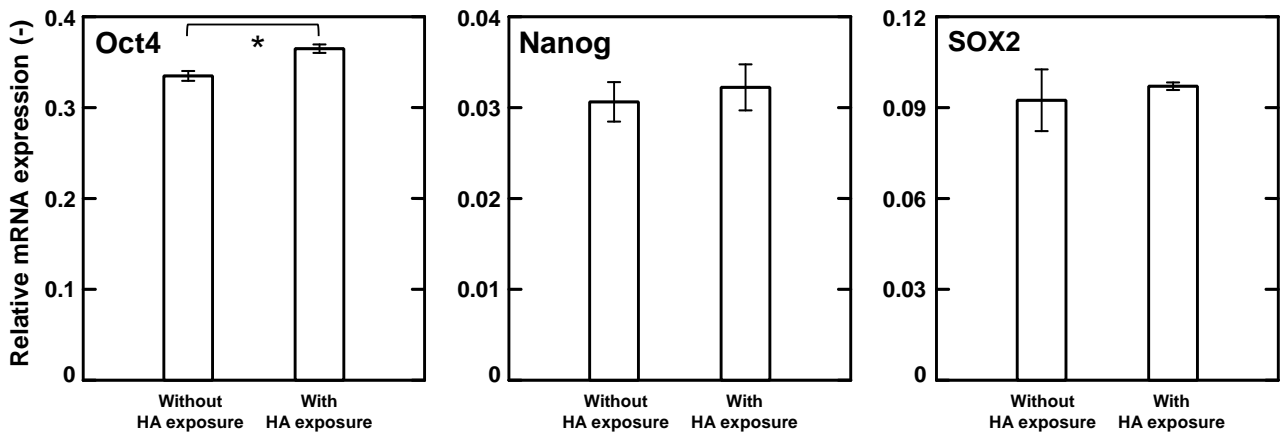


Fig. 2.2 Analysis by qPCR analysis of three markers of undifferentiated stem cells (Oct4, Nanog, and Sox2). Data are given as mean and standard deviation ($n = 3$). * $P < 0.01$ (Student's t -test).

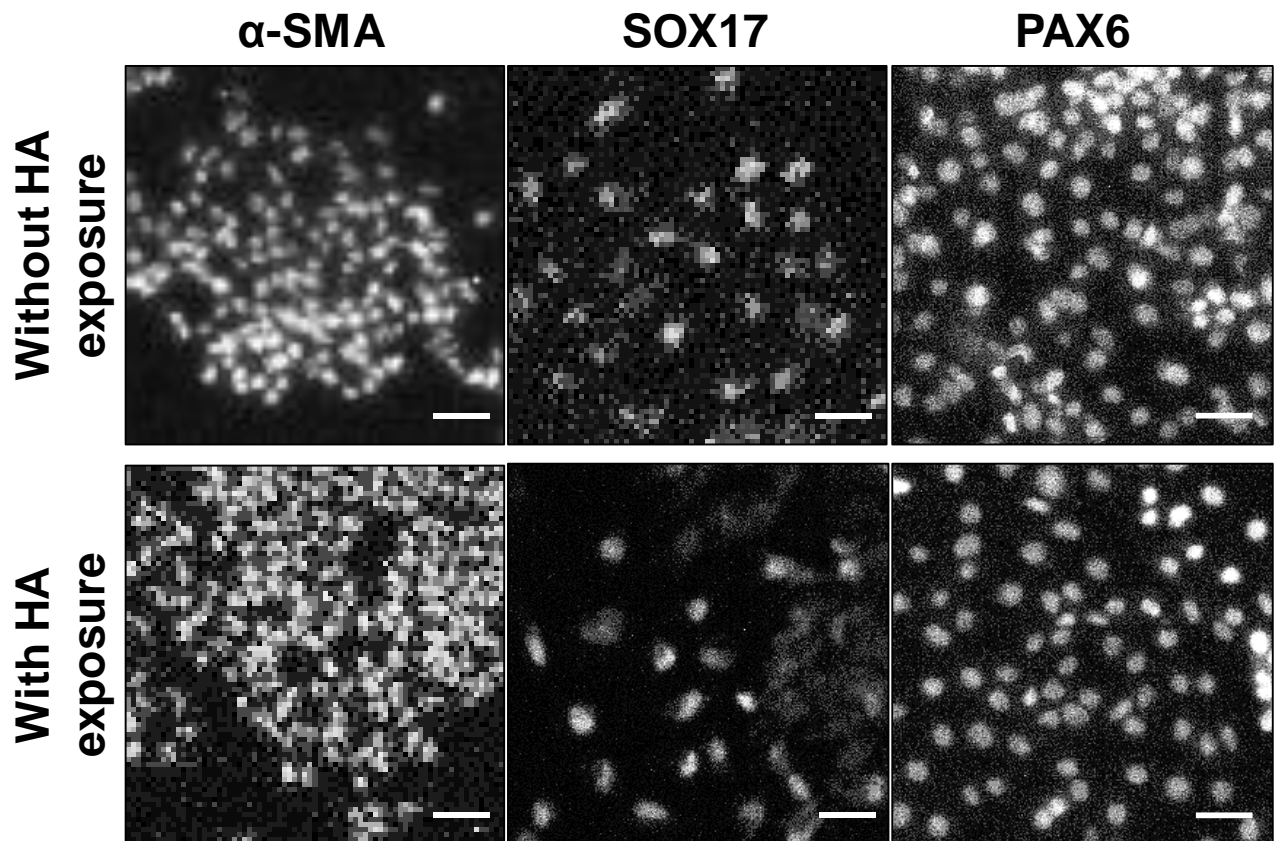


Fig. 2.3 Induction of directed differentiation of hiPSCs grown on SNL feeder layers using the HA-mediated passaging paradigm. Immunofluorescence staining for three germ-cell-layer markers [PAX6, ectoderm; α -SMA, mesoderm; and SOX17, endoderm] in cells dispersed and transferred into a new dish for 7 days culture in various media. Scale bars = 50 μ m.

2.3.2 HA 添加によるコロニー内の個々の細胞遊走の変化

SNL フィーダー細胞とヒト iPS 細胞の共培養では、未分化コロニーが徐々に拡大し、細胞がより密に詰まることに伴い未分化状態から逸脱した細胞を有するコロニーとなる。そこで、HA がもたらす未分化コロニー内の細胞の挙動変化を理解するため、HA 添加有無の両方の培養にて蛍光標識されたコロニーのタイムラプス撮影を行った。HA 添加無しの培養では、未分化コロニーは細胞分裂および遊走が組み合わさって拡大していった。コロニー中心部では、細胞同士が隣接しながら並んでいたが、HA 添加有りの培養では、コロニー内の細胞同士の接着が緩くほぐれて単層状に並んでおり (Fig. 2.4a, c)、特にコロニー周囲部の細胞は中心部の細胞と比較して遊走性が高く、HA 添加によって周囲部の細胞がより遊走していた (Fig. 2.4b, d)。

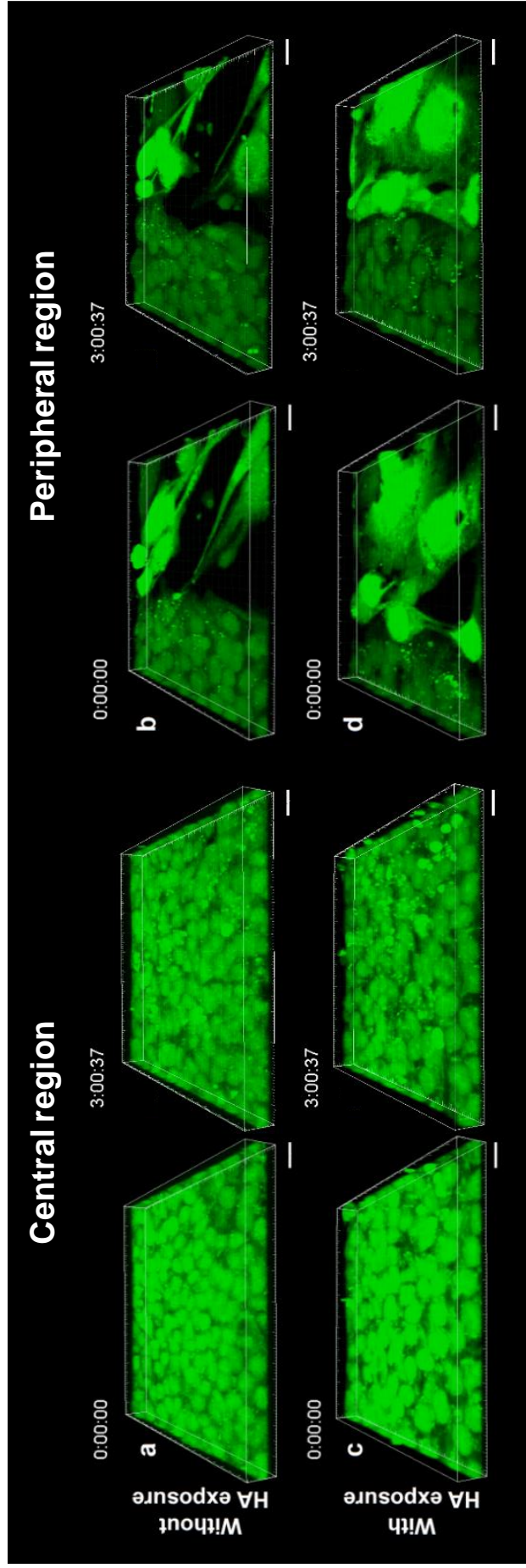


Fig. 2.4 Representative fluorescence images showing HA-induced behavioral changes in hiPSC colonies. Panels (a and b, c and d) show the central and peripheral regions of hiPSC colonies, respectively. Scale bars = 20 μm .

HA 添加がヒト iPS コロニー内の遊走に与える効果を詳細にするため、HA 添加無しおよび有りの培養それぞれにおいて、HA 添加後 3 時間におけるコロニー中心部および周囲部の個々の細胞の遊走速度を調べた (Fig. 2.5). HA 添加後 3 時間の中心部および周囲部における遊走速度 V のデータをボックスプロットして比較解析した. HA 添加の有無どちらにおいても中心部の遊走速度 V の分布範囲は周囲部に比べて狭かった. 遊走速度 75% 値を上回る集団 (速く動いている集団) の割合は、コロニーの中心部、周囲部の両方において、HA 添加があった場合は 36% で、無かった場合の 25% より大幅に大きかった (Fig. 2.5). それと同時に、中心部の 25% 値を下回る集団 (遅く動いている集団) の割合は、HA 添加があった場合は 19% で、無かった場合の 25% より小さかった. 細胞遊走速度 V の中央値には、HA 添加の有無間で有意差があった (中心部, $^{\#}P < 0.01$; 周囲部, $P < 0.05$; Mann-Whitney U test による). また、周囲部の平均の遊走速度は HA 添加により 1.2 倍に増加しており、2 群間で有意差があった ($^*P < 0.01$; Student's t -test による). これらの結果から、HA 添加により、コロニー内では細胞遊走が全体的に上昇し細胞間がほぐれた状態にあり、コロニー中心部での稠密が抑制されることが示された.

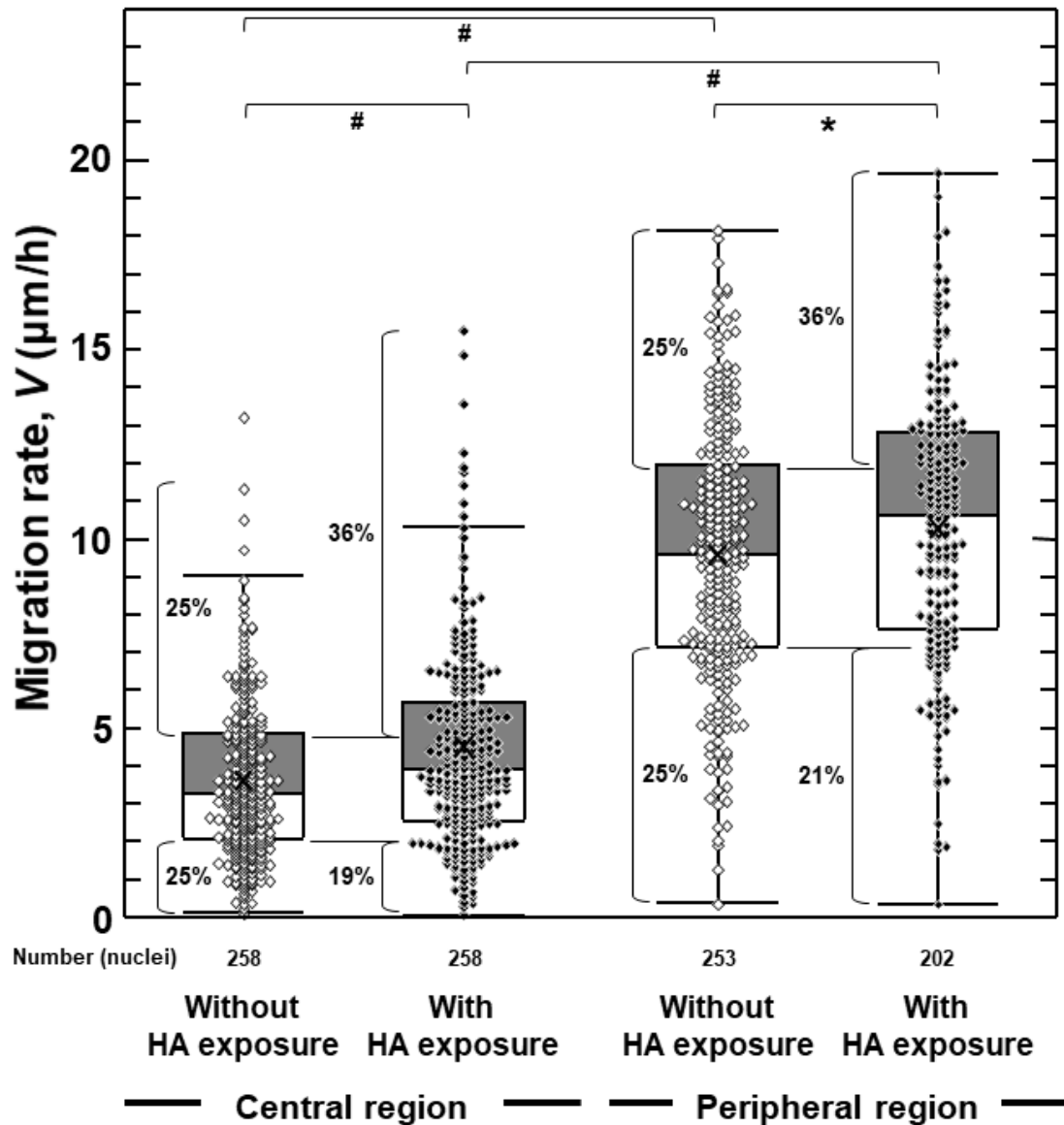


Fig. 2.5 Distribution of migration rates of single cells at the central and peripheral regions of hiPSC colonies with or without HA exposure. The data were obtained from cells within ROIs of five randomly selected hiPSC colonies at 48 h. Distributions of migration rates at the central regions of colonies without and with HA exposure followed a non-normal distribution. Cross marks indicate average values. Box-and-whiskers plots of migration rates of single cells at the central and peripheral regions of hiPSC colonies. For each box, the central bar is the median, and the edges are the 25th and 75th percentiles. The whiskers extend to the most extreme data points, not including outliers ($n = 169\text{--}293$ cells). Outliers are values outside of the range: $[25\text{th percentile} - 1.5 \times (75\text{th percentile} - 25\text{th percentile})] - [75\text{th percentile} + 1.5 \times (75\text{th percentile} - 25\text{th percentile})]$. $*P < 0.01$ (Student's *t*-test). $\#P < 0.01$ (Mann-Whitney *U* test).

2.3.3 HA 添加後の細胞－細胞間接着および細胞－基質間接着の局在

HA 添加後の細胞－基質間および細胞－細胞間接着に対する効果の機構を明らかにするため、integrin 関連タンパク質 paxillin, および細胞－細胞間接着に関わるタンパク質 E-cadherin の培養 120 時間における発現を、免疫染色により検討した。HA 添加無しのコロニー中心部の細胞において、F-actin は隣接する細胞との境界に沿って線状に分布し、paxillin は基底側の細胞－基質間接着に弱い発現が見られた (Fig. 2.6Aa)。周囲部の細胞の前縁では、paxillin が集中的に点在したラメリポディアが存在し、明瞭な直線状の F-actin 構造から actin ストレスファイバーの局在が観察された (Fig. 2.6Ba)。一方、HA 添加後のコロニーでは、中心部および周囲部の細胞の基底面では、F-actin と paxillin の局在および構造のパターンは似ていた (Fig. 2.6Ca, Da)。中心部では、paxillin が構成する接着斑および actin ストレスファイバーの両方とも、HA 添加無しのコロニー中心部と比較してより多くの局在がみられた。

一方、E-cadherin の発現は、HA 添加の有無の両方の培養において、中心部と周囲部で非常によく似ており位置依存的に顕著な違いは見られず、E-cadherin を発現している細胞は立方状の形状を示し、隣接する細胞間の境界で連続して線状に観察された (Fig. 2.7Aa, Ba, Ca, Da)。これらの結果から、HA 添加によりヒト iPS コロニー内の細胞遊走が変化した後、E-cadherin による細胞－細胞間接着が再形成されることが示唆された。

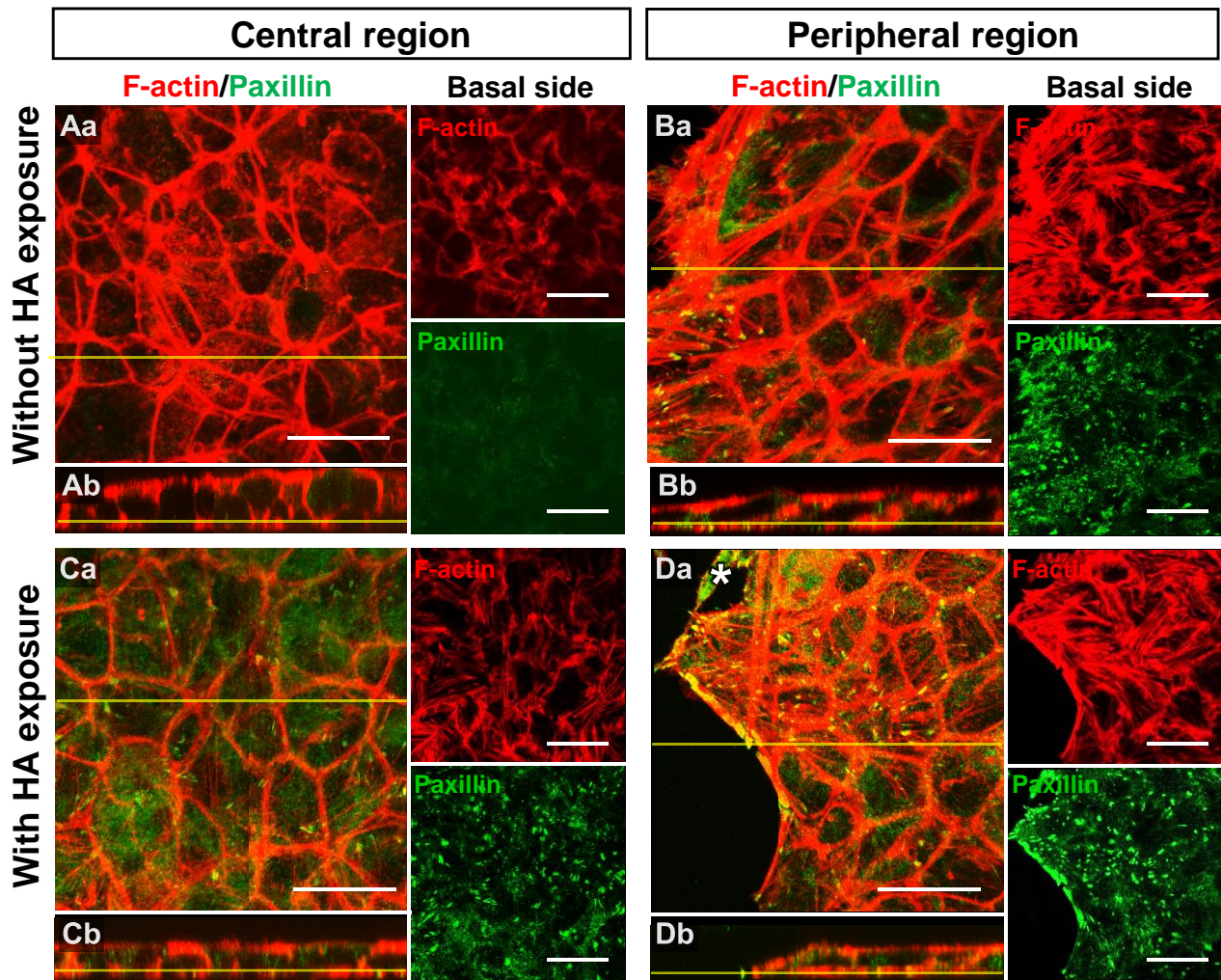


Fig. 2.6 Localization of paxillin associated with actin cytoskeleton in hiPSC colonies in cultures without and with HA exposure. Confocal fluorescence images show organization of F-actin filaments (red) and paxillin (green). Panels (Ab–Db) are the tomograms sectioned at XZ plane (yellow lines) in panels (Aa–Da). The asterisks show feeder cells. Images were acquired after 120 h of culture. Scale bars = 40 μm .

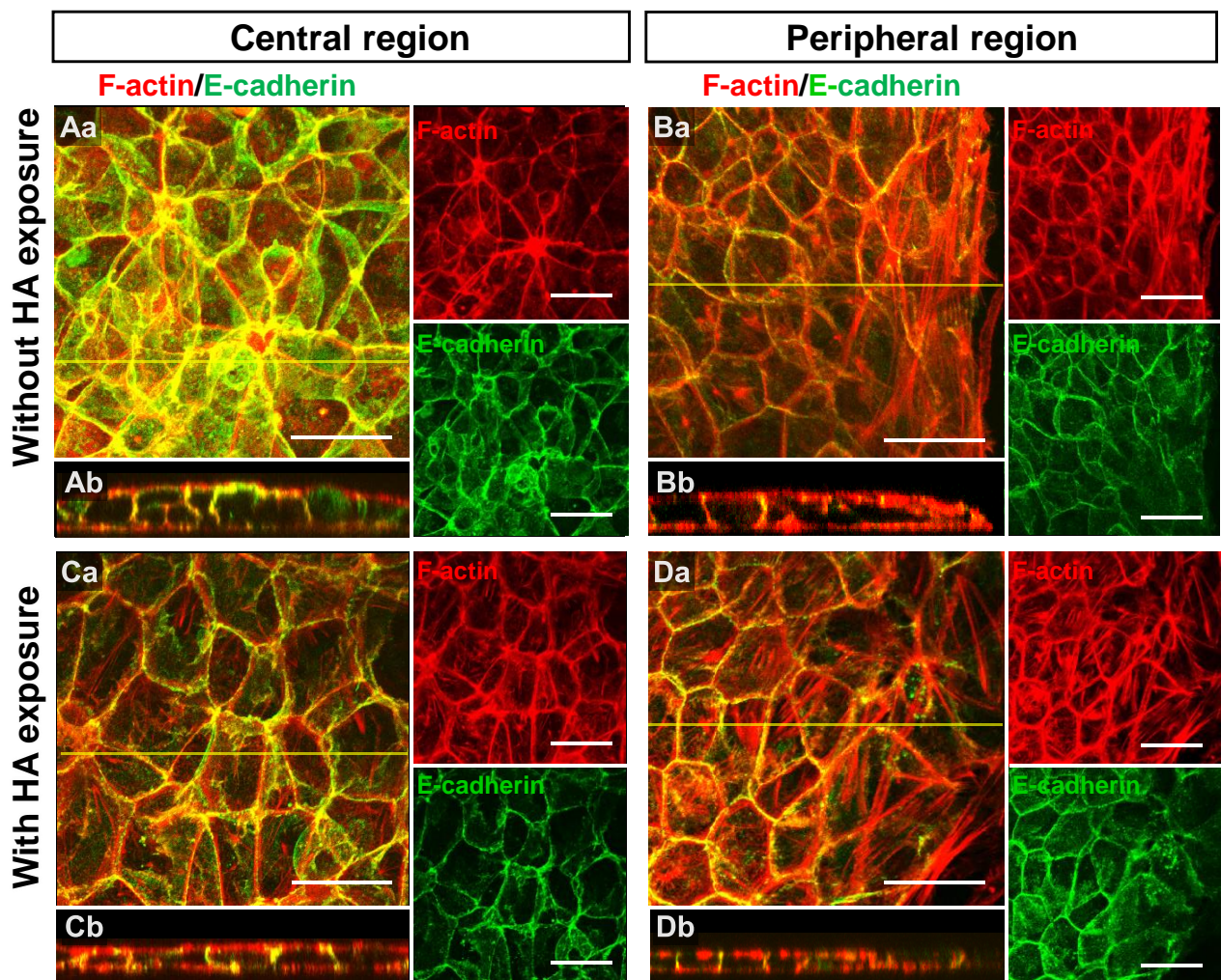


Fig. 2.7 Localization of E-cadherin associated with actin cytoskeleton in hiPSC colonies in cultures without and with HA exposure. Confocal fluorescence images show organization of F-actin filaments (red) and E-cadherin (green). Panels (Ab–Db) are the tomograms sectioned at XZ plane (yellow lines) in panels (Aa–Da). Images were acquired after 120 h of culture. Scale bars = 40 μm .

2.3.4 細胞骨格および核ラミナの局在

F-actin 構造は遊走挙動と関連して変化するため、HA 添加により、ヒト iPS コロニー内の F-actin 構造が変化するかどうかを調べた。Fig. 2.8 に、HA 添加の有無それぞれの培養条件におけるコロニー内の細胞の水平断面を表す共焦点画像を示す。また、F-actin 構造を xz 方向で立体的に捉えるため、F-actin / 核の連続的な断面図を Fig. 2.9 に示す。F-actin と核の空間的な画像から、F-actin がコロニー周囲部または中心部の未分化細胞内に形成されていることがわかった。周囲部では、F-actin が細胞-細胞間接着部の頂端側に局在している一方で、基底部では actin ストレスファイバーが細胞内を長く横断して存在していた (Fig. 2.9Bb, Bd, Db, Dd)。HA 添加の有無の顕著な違いは、コロニー中心部の基底側の F-actin で観察された (Fig. 2.9Ad, Cd)。HA 添加無しのコロニーでは、中心部の細胞核はかなり乱れて重なり合った層を形成し、分布がより制限されていた (Fig. 2.8Ab)。この領域の細胞は複雑な F-actin 構造を示し、基底側の actin ストレスファイバーが失われていた (Fig. 2.9 Ab-Ad)。一方で、HA 添加後では、コロニー中心部では細胞核が単層で分布していた (Fig. 2.8Cb)。基底側で actin ストレスファイバーの形成が明らかに観察され、これは周囲部の細胞と類似していた (Fig. 2.9Cd, Dd)。これらの結果から、コロニー中心部の細胞は、HA 添加後、細胞形状に沿った F-actin 構造かつ基底側の actin ストレスファイバーを示し、周囲部の細胞と類似していたことから、HA 添加によりコロニー内の細胞骨格の乱れが抑制されることが示された。

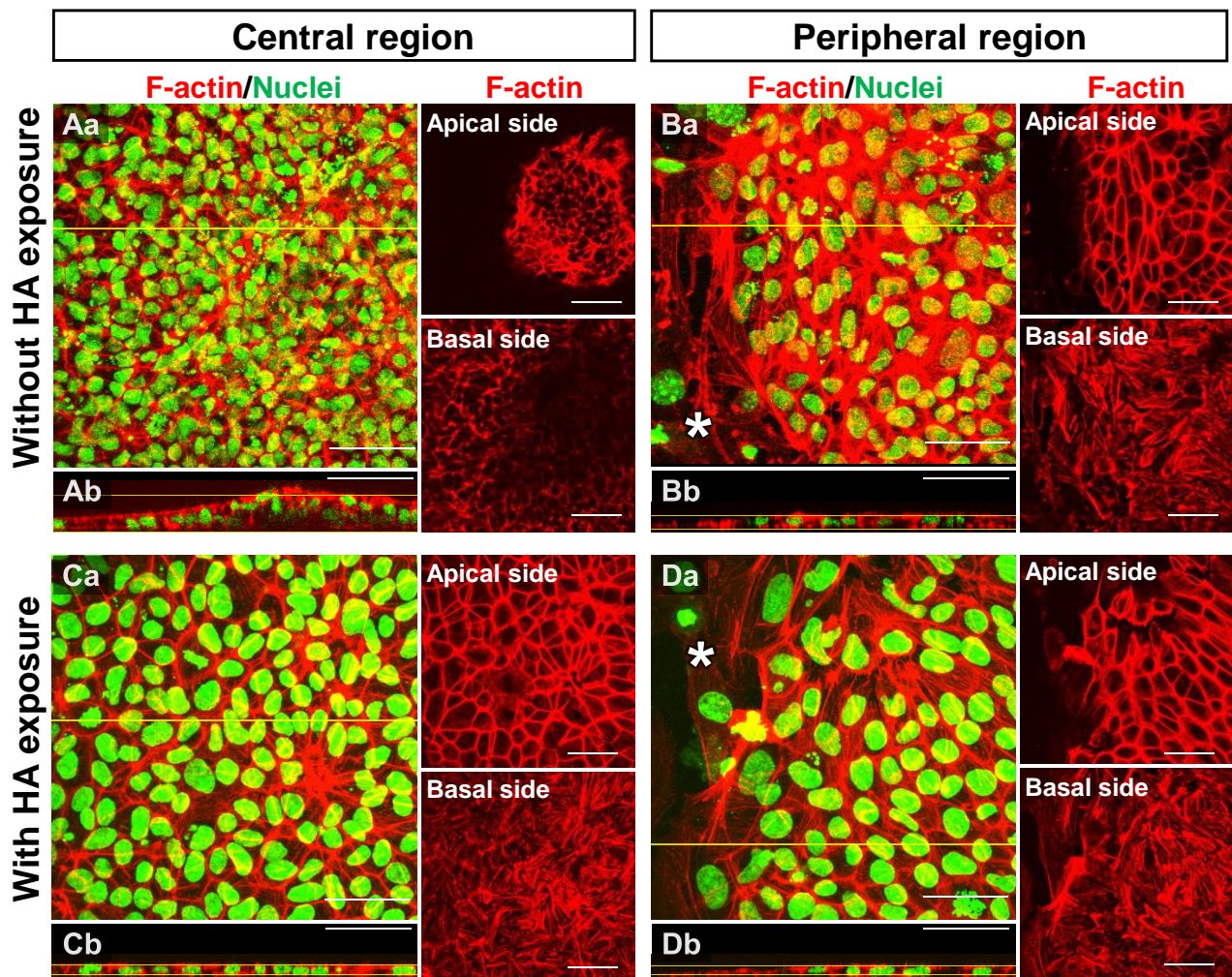


Fig. 2.8 Actin cytoskeletal formation related to nucleus distribution in hiPSC colonies without and with HA exposure. Confocal fluorescence images show organization of F-actin filaments (red) and nuclei (green). Panels (Ab–Db) are the tomograms sectioned at XZ plane (yellow lines) in panels (Aa–Da). The yellow lines indicate the location of the cross-sectional side view. The asterisks show feeder cells. Images were acquired after 120 h of culture. Scale bars = 50 μ m.

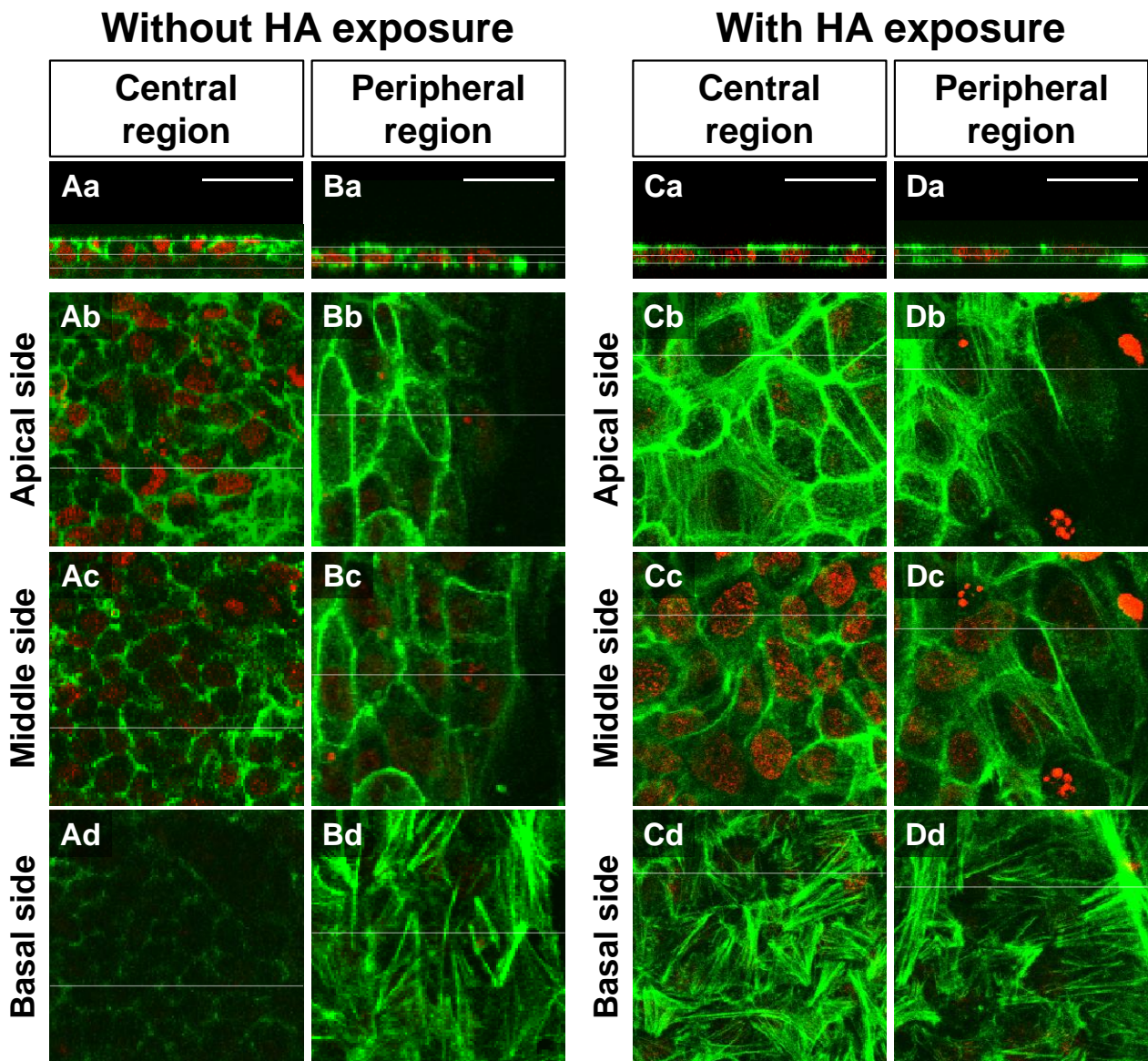


Fig. 2.9 Serial sectional images of actin cytoskeletal formation from basal side to apical side at central (Aa–Ad and Ca–Cd) and peripheral (Ba–Bd and Da–Dd) regions in hiPSC colonies without and with HA exposure. F-actin filaments (green) and nuclei (red). Panels are the tomograms sectioned at *XZ* (Aa–Da) and *XY* planes (Ab–Ad, Bb–Bd, Cb–Cd, and Db–Dd). The lines indicate the location of the cross-sectional side view. Images were acquired after 120 h of culture. Scale bars = 50 μm .

HA 添加によってコロニー内の核骨格タンパク質 laminA/C の発現パターンは変化した。コロニー周囲部においては、HA 添加の有無にかかわらず、laminA/C が発現し、核周りの輪郭の淵に沿って局在していた (Fig. 2.10Ab, Bb)。一方で、コロニー中心部においては、HA 添加が無い場合は laminA/C の強い発現が観察されたが、HA 添加が有った場合は発現がほとんど観察されなかった。これらのコロニー中心部の細胞の *xz* 方向の断面図を観察すると、HA 添加が無い場合は、多層状の核の側面に沿って laminA/C が局在していたが、HA 添加が有った場合は、細胞は単層状に並んでおりその核の輪郭に沿った laminA/C の発現はほとんど無かった (Fig. 2.10Aa, Ba)。これらの結果から、HA 添加後、コロニー中心部の細胞は多層構造を形成せず単層状に並び、laminA/C は蓄積しないことが示された。

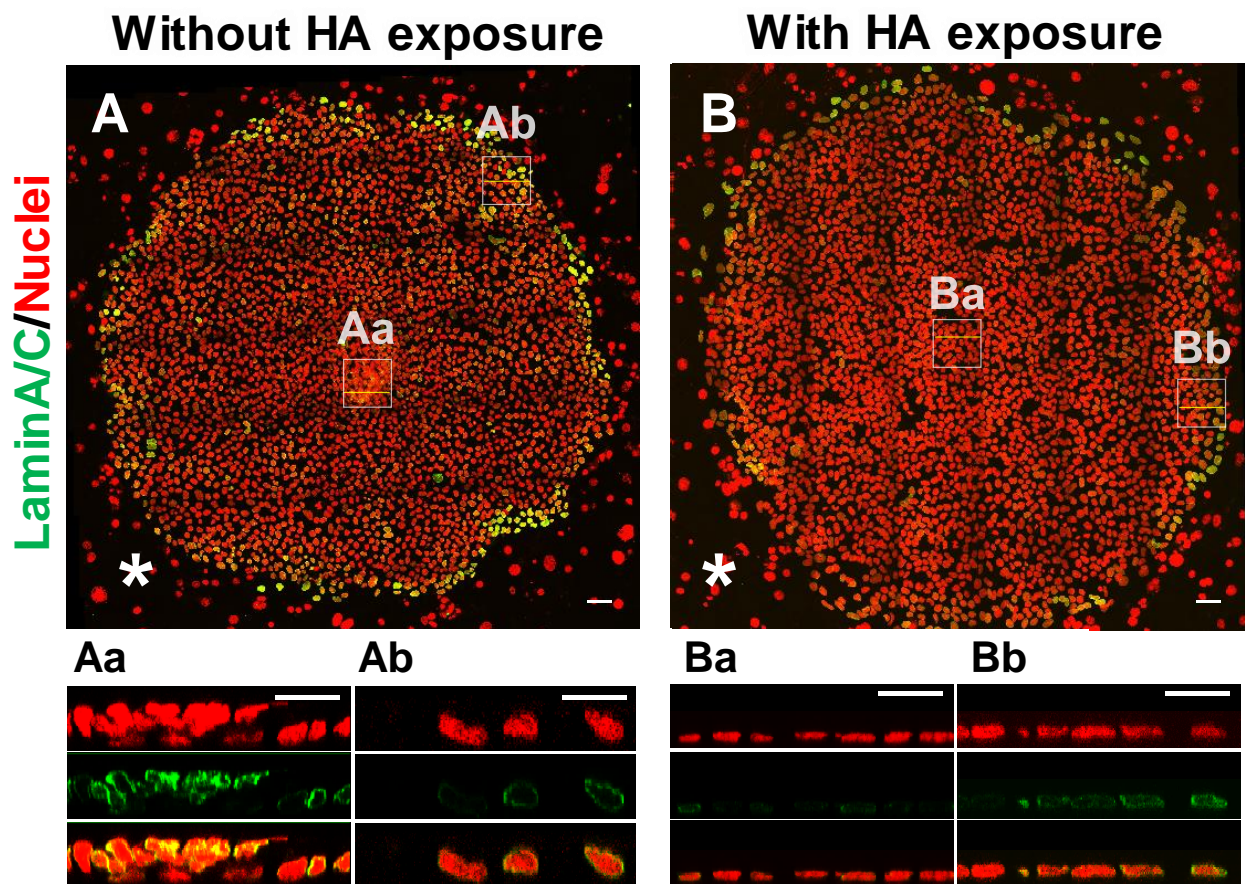


Fig. 2.10 Localization of laminA/C in hiPSC colonies in cultures without and with HA exposure. Confocal fluorescence images show laminA/C (green) and nuclei (red). The panels show tomograms sectioned at XZ plane (yellow lines) of demarcated box areas in panels (A and B), respectively. Images were acquired after 120 h of culture. The asterisks show feeder cells. Scale bars = 100 μm (panels A and B); 20 μm (panels Aa–Bb).

2.4 考察

幹細胞生物学の分野における研究の主な課題として、未分化状態から逸脱するトリガーの探索、自己複製をしている未分化細胞がどのように培養中の微小環境に応じて自身の細胞運命を調節するかの研究、外的要因により細胞運命を制御する培養戦略の設計、などが挙げられる (Bhatia *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2015; Hagbard *et al.*, 2018). 細胞挙動が、幹細胞の自己複製や分化系列決定の制御、および細胞の多様性の維持に関わることが知られている (Kim and Kino-oka, 2018). 第1章で観察されたように、細胞挙動の変化は複製能力の低下と関連し、結果的に機能的に不均一な細胞集団が形成される (Fig. 1.2). 例えば、コロニー内において、細胞増殖および遊走は空間的に異なることが予想される. この空間的な不均一性が未分化状態からの逸脱に影響を与えることが、その分子機構の一部とともにすでに明らかにされている (Kim *et al.*, 2014b; Kim and Kino-oka, 2015). コロニー内の細胞は、隣接する細胞との間に存在する細胞-細胞間、および細胞容器底面にコーティングされた基層との間に存在する細胞-基質間接着により挙動が制御される. Cadherin および integrin を介した接着複合体の相互作用は大きな細胞群の協調的な運動に必要であり、その機構の一端として、集団細胞遊走には Rho ファミリーGTPases および actin 動態の時空間的な制御が必須であることが報告されている (Kim *et al.*, 2014b; Kim and Kino-oka, 2015). 第1章で述べたように、未分化状態から逸脱した細胞を有するヒト iPS コロニーの場合、コロニー中心部での細胞密度の増加に伴って細胞の運動性が低下し、細胞が重なりあうことで基質から部分的に離れることが示された. これらの細胞は、小さな細胞から大きく平らな細胞へと形状を変化しながら増殖した. また、ヒト iPS 細胞の未分化状態からの逸脱は、アノマリーな細胞遊走の結果として偶発的に生じることも示した. 以前より、ヒト iPS 細胞の未分化状態からの逸脱は、コロニー中心部の細胞分裂および遊走による細胞-細胞間および細胞-基質間接着の程度に起因していることが報告されている (Puliafito

et al, 2012; Kim *et al.*, 2014b). 細胞遊走能の低下はコロニー中心部の細胞-細胞間接着を亢進し、コロニー内の細胞-細胞間および細胞-基質間接着のアンバランスを引き起こす。そして、コロニー中心部では、基質との接着を失った細胞の細胞骨格に働く力が核の表面を直接大きく圧迫し、核の形を変えると考えられる。コロニー内のアノマリーな領域では、actin 骨格を介した核周囲での laminA/C の蓄積がヘテロクロマチンの形成を引き起こし、未分化状態から逸脱する細胞が発生することが第 1 章で示唆された。これらの結果は、ヒト iPS コロニー中心部で生じる未分化状態から逸脱する機構を理解するための重要な知見であると考えられる。また、ヒト iPS コロニーが拡大する過程でコロニー内において細胞-細胞間および細胞-基質間接着のアンバランスが生じ、そのことが未分化状態から逸脱した細胞の発生と深く関わっていることも明らかとなった。

これらの第 1 章で得られた知見を踏まえた上で行った第 2 章の研究では、HA による細胞-細胞間接着の緩和により、ヒト iPS コロニー内における細胞の未分化状態からの逸脱を防止できることを示した。Fig. 2.11 に、今回の観察および以前の研究に基づいた仮説の概念図を示した。これまでの研究により、HA による E-cadherin の細胞-細胞間接着の崩壊機構が明らかとなってきている (Lee *et al.*, 2014; Sugawara *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017b)。HA は糖鎖と結合し細胞内に取り込まれた後、主に次の 3 つの段階を経由して細胞-細胞間接着の緩和と再形成を引き起こすと考えられている。(i) HA は細胞層を通過する際、細胞内を通るルート (細胞透過ルート) に続いて細胞間隙を通るルート (細胞外ルート) を選択する。(ii) HA が E-cadherin に結合し E-cadherin による細胞-細胞間接着を緩和する。(iii) E-cadherin による接着が失われた後、cadherin と integrin の間の相互作用が、Rap1 活性の制御を介して、細胞骨格の形成および接着斑の再形成を行う。HA 添加後のヒト iPS コロニーの再形成は、E-cadherin 接着を失ってから再び E-cadherin を発現させる細胞の能力に依存していると考えられる。ヒト iPS コロニー内では、コロニー中心部と周囲部の間に細胞

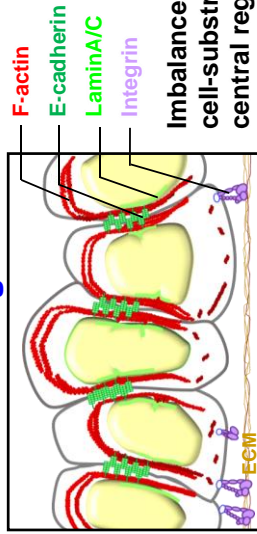
の空間的な分布の顕著な違いが見られ、その違いは、E-cadherin および integrin の発現の差異と相関していた。SNL フィーダー細胞を用いてヒト iPS 細胞を増殖させた場合、ヒト iPS 細胞は細胞分裂および遊走を繰り返して丸いコロニーを形成し、細胞密度はコロニー周囲部より中心部でより高くなった。しかし、HA 添加の有った培養では、コロニー中心部および周囲部の細胞は遊走性が高く緩い単層を形成しており、コロニー内で細胞が均一に分散した。コロニー中心部および周囲部の細胞は、基底側で actin ストレスファイバーを有することが観察された (Fig. 2.9Cd, Dd)。未分化な細胞に備わる E-cadherin の形成能力により、E-cadherin 結合を崩壊したコロニー内に未分化細胞のみを残すことができた (Fig. 2.1; Fig. 2.7Ca, Da)。これまでの研究から、Rap1 を介した正のフィードバック制御が、E-cadherin および integrin からなる接着複合体を再形成し、それによって未分化細胞の細胞間の関連性およびコロニー構造が回復することが示されている (Knox *et al.*, 2002; Hogan *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2004; Balzac *et al.*, 2005; Retta *et al.*, 2006; Asuri *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010b; Bonello *et al.*, 2018)。E-cadherin の阻害による細胞-細胞間接着の緩和は、細胞遊走を促し、コロニー中心部と周囲部での間に見られる細胞骨格および接着斑の形成の差異を減弱した。また、免疫染色の結果から、培養中のヒト iPS 細胞の細胞-細胞間および細胞-基質間接着のバランスは、遊走と同時に起こる細胞骨格形成および接着斑の形成に影響を与え、細胞分布の変化をもたらすことが明らかになった。細胞遊走の促進による細胞-細胞間接着と細胞-基質間接着の間のバランスの協調的な制御は、ヒト iPS コロニーの中心部における核周囲の laminA/C の蓄積を抑制した。核内における遺伝子発現変化や核力学的特性の変化は、細胞質の生化学的および細胞骨格応答とは独立して、HA 添加後の培養細胞の遊走制御に関わっている可能性が高い。このように、培養中の HA 添加によるヒト iPS コロニー内の集団遊走の促進は、細胞の挙動を変化させ、未分化細胞の維持を容易にすると考えられる。

結論として、HA による細胞挙動の調節を利用して、ヒト iPS 細胞の未分化状態を維持し

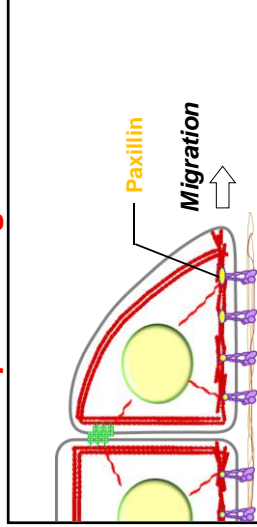
たまま培養する簡便かつ確実性の高い方法を開発した。未分化状態からの逸脱発生は、HA によるヒト iPS コロニー内の細胞遊走を介した細胞-細胞間接着と細胞-基質間接着のバランスの調節によって抑制されることも示した。これらの知見は、培養中のヒト iPS コロニーの細胞挙動の空間的な不均一性の影響を抑制する新たな手段を提供するとともに、未分化細胞を維持する培養戦略の合理的な設計にも寄与する。HA を用いた細胞挙動制御の原理をより深く理解することが、ヒト iPS 細胞をより安定かつ大量に培養する新たな手法の開発につながる。

Step 1 Spatial heterogeneity through behavioral changes in a hiPSC colony

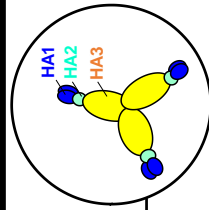
Central region



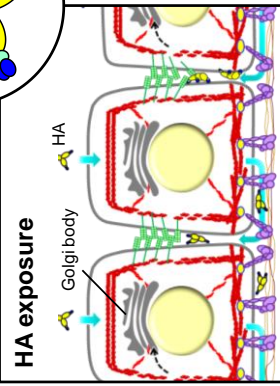
Peripheral region



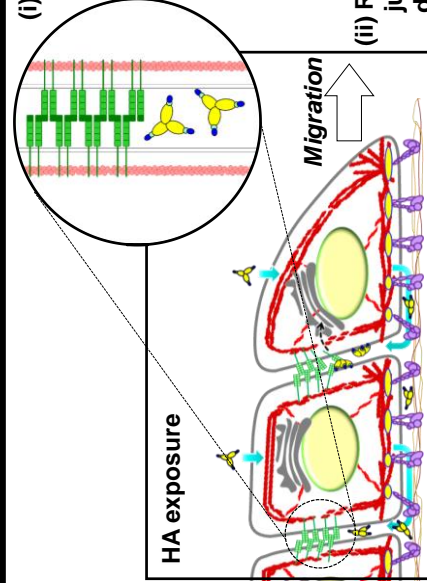
Step 2 Promotion of migratory behavior related to HA-mediated relaxation of tight cell-cell junction



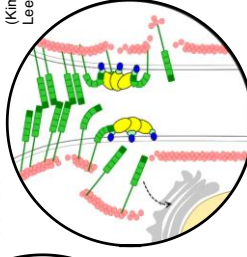
HA1 : Recognition of cell-surface carbohydrate
 HA2-HA3 : Disruption of E-cadherin mediated cell-cell adhesion
 (Sugawara et al., 2014)



HA-mediated relaxation of cell-cell adhesion
 → Increase of migratory behavior in a hiPSC colony

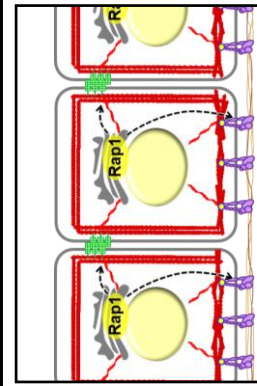


(i) HA transport through transcellular and paracellular routes
 (Kim et al., 2017, Lee et al., 2014)

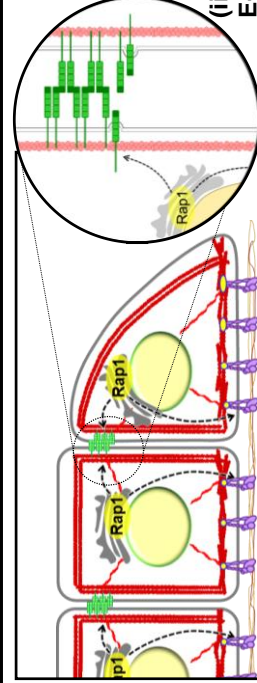


(ii) Relaxation of tight cell-cell junction through E-cadherin disruption

Step 3 Suppression of deviation from the undifferentiated state of hiPSC colony through spatial homogeneity



Dynamic coordination of balance between cell-cell and cell-substrate interactions in a hiPSC colony through Rap1 signaling
 → Maintenance of undifferentiated state of hiPSCs



(iii) Recycling of E-cadherin and integrin

(Kim et al., 2017, Asuri et al., 2008, Price et al., 2004, Retta et al., 2006, Bonello et al., 2018)

Fig. 2.11 Schematic drawings representing our hypothesis of the maintenance of an undifferentiated state of hiPSCs through HA-mediated cell-behavior regulation.

2.5 小括

HA を添加しない培養条件下では、コロニー内の細胞遊走の解析を用いると、中心部では極端に遅い細胞遊走をもつ細胞集団があった。その後、コロニー中心部は細胞-基質間接着を失って浮いた細胞を含んでおり、さらに核ラミナの発現から力学的ストレスを蓄積した領域であることが示唆された。その際、細胞骨格構造から、コロニー中心部の細胞は基底側で actin ストレスファイバーを形成しておらず、コロニー内の細胞骨格は乱れていた。

HA を添加した培養条件下では、コロニー内の細胞遊走の解析を用いると、中心部では極端に遅い細胞遊走の発生が阻害され、コロニー内の細胞遊走が揃えられた。その後、コロニー中心部の細胞は、細胞-基質間接着を形成し、基質からの浮き上がりを防止されていた。さらに、核ラミナの発現が無く力学的ストレスの蓄積が防止されることが示唆された。その際、コロニー中心部の細胞は、基底側で actin ストレスファイバーを形成し、周囲部と同様の細胞骨格を有しており、コロニー内の細胞骨格の乱れが抑制されていた。

以上から、HA 添加によって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の抑制を介して、未分化状態から逸脱した細胞の発生の防止につながることを示された。

総括

本研究では、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。未分化状態から逸脱した細胞がコロニー内に発生すると、逸脱領域は拡大していく。そのため、未分化状態から逸脱した細胞が発生するまでの機構を明らかにし、逸脱の発生を防止することは重要である。第 1 章では、ヒト iPS 細胞の未分化状態からの逸脱が発生する現象を明らかにした。細胞分裂と細胞遊走を繰り返してコロニーが拡大するにつれ、コロニー中心部では基質から離れた細胞が発生し、一方で、コロニー周囲部では一部の細胞が突出した後、それぞれの領域にて未分化状態から逸脱した細胞が発生した。細胞が逸脱する領域は遊走のアノマリーの発生する領域に依存しており、コロニー中心部では極端に遅い遊走をもつ集団、また、周囲部では極端に速い遊走をもつ細胞が発生していた。細胞遊走に依存した細胞-細胞間と細胞-基質間接着のバランスの乱れとともに、コロニー内局所的に核ラミナが発現し、その領域において未分化状態から逸脱した細胞が偶発することが示された。これらの結果から、細胞遊走の空間的不均一性が、未分化状態から逸脱した細胞の発生に関与することが示された。

第 2 章では、HA による細胞-細胞間接着の緩和を用い、未分化状態から逸脱した細胞発生の防止を行った。HA 添加によって、極端に遊走速度の遅い細胞をコロニー中心部に有する集団の発生が防止され、細胞-細胞間および細胞-基質間接着のバランスの乱れが解消され、基質から離れた細胞の発生が防止された。また、コロニー中心部の細胞は、周囲部と同様、基底側で actin ストレスファイバーを形成し、核ラミナをほとんど発現していなかった。この F-actin 構造は、コロニーが未分化を維持するために必要な秩序であるといえる。これらの結果から、コロニー内の細胞遊走を揃えることによって、未分化状態からの逸脱発生を防止できることが示された。

総括として、本研究では、細胞遊走速度を空間的かつ定量的に解析することにより、細

胞挙動のバランスの乱れによって未分化状態から逸脱した細胞が発生することを明らかにした。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て求めた遊走速度の分布からコロニー内のアノマリーがあり、その際アノマリーのあるコロニー内には細胞骨格の乱れがあることが分かった。基底側で actin ストレスファイバーを形成する actin 骨格が秩序であり、コロニー内の秩序の乱れを抑制することが iPS 細胞の未分化維持において重要であると考えられた。

他の細胞種の細胞集団においても、生物学的な細胞機能の保持に必要な秩序が空間依存的に乱れることが確認されている。上皮細胞は、E-cadherin による細胞-細胞間接着を有しながら集団で遊走するが、集団の先端の細胞形状が崩れると、cadherin のスイッチングを表す上皮間葉転換が生じてガン細胞が発生する事が知られている (Maeda *et al.*, 2005)。網膜色素上皮細胞の成熟においても、ZO-1 による密着結合が必要であるものの培養容器内における密着結合の空間的不均一が問題となっており、ランダムな細胞遊走から容器中心方向への集団遊走に整えることで密着結合の空間的均一化が可能であることが示されている (Sono *et al.*, 2016)。秩序を保持している細胞集団の中で、秩序の乱れが生じると細胞機能に変化し、反対に細胞集団内の秩序の乱れを整えることで細胞機能を保持できることが分かる。このように、集団内の個々の細胞が秩序を保持することは重要であり、本研究成果は、培養細胞の秩序を保つことに注目した培養手法の構築の発展に繋がると期待される。

参考文献

- Akanuma, T., Chen, C., Sato, T., Merks, R. M., and Sato, T. N.: Memory of cell shape biases stochastic fate decision-making despite mitotic rounding, *Nat. Commun.*, **7**, 11963 (2016).
- Akiyama, M., Sushida, T., Ishida, S., and Haga, H.: Mathematical model of collective cell migrations based in cell polarity, *Dev. Growth Differ.*, **59**, 471–490 (2017).
- Altschuler, S. J., and Wu, L. F.: Cellular heterogeneity: do differences make a difference? *Cell*, **141**, 559–563 (2010).
- Asuri, S., Yan, J. L., Parnavitana, N. C., and Quilliam, L. A.: E-cadherin dis-engagement activates the Rap1 GTPase, *J. Cell. Biochem.*, **105**, 1027–1037 (2008).
- Baker, B.M., and Chen, C.S.: Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues, *J. Cell Sci.*, **125**, 3015–3024 (2012).
- Balzac, F., Avolio, M., Degani, S., Kaverina, I., Torti, M., Silengo, L., Small, J. V., and Retta, S. F.: E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function, *J. Cell Sci.*, **118**, 4765–4783 (2005).
- Baum, B., and Georgiou, M.: Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling, *J. Cell Biol.*, **192**, 907–917 (2011).
- Bershadsky, A. D., Balaban, N. Q., and Geiger, B.: Adhesion-dependent cell mechanosensitivity, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 677–695 (2003).
- Bhatia, H., Sharma, R., Dawes, J., and Khillan, J. S.: Maintenance of feeder free anchorage independent cultures of ES and iPS cells by retinol/vitamin A, *J. Cell. Biochem.*, **113**, 3002–3010 (2012).
- Bonello, T. T., Perez-Vale, K. Z., Sumigray, K. D., and Peifer, M.: Rap1 acts via multiple mechanisms to position Canoe and adherens junctions and mediate apical-basal polarity establishment, *Development*, **145**, dev157941 (2018).
- Bos, J. L., de Rooij, J., and Reedquist, K. A.: Rap1 signalling: Adhering to new models, *Nat. Rev.*

- Mol. Cell Biol., **2**, 369–377 (2001).
- Burdick, J.A., and Vunjak-Novakovic, G.: Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation, *Tissue Eng. Part A*, **15**, 205–219 (2009).
- Chen, T., Yuan, D., Wei, B., Jiang, J., Kang, J., Ling, K., Gu, Y., Li, J., Xiao, L., and Pei, G.: E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation, *Stem Cells*, **28**, 1315–1325 (2010).
- Chowdhury, S.R., Muneyuki, Y., Takezawa, Y., Kino-oka, M., Saito, A., Sawa, Y., and Taya, M.: Growth and differentiation potentials in confluent state of culture of human skeletal muscle myoblasts, *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 310–313 (2012).
- Davey, R. E., and Zandstra, P. W.: Spatial organization of embryonic stem cell responsiveness to autocrine gp130 ligands reveals an autoregulatory stem cell niche, *Stem Cells*, **24**, 2538–2548 (2006).
- Debeir, O., Van Ham, P., Kiss, R., and Decaestecker, C.: Tracking of migrating cells under phase-contrast video microscopy with combined mean-shift processes, *IEEE Trans. Med. Imaging*, **24**, 697–711 (2005).
- Delaney, M. K., Liu, J. L., Zheng, Y., Berndt, M. C., and Du, X. P.: The role of Rac1 in glycoprotein Ib-IX-mediated signal transduction and integrin activation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **32**, 2761–2768 (2012).
- Delon, I. and Brown, N.: Integrins and the actin cytoskeleton, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 43–50 (2007).
- Duman, R. S. and Monteggia, L. M.: A neurotrophic model for stress-related mood disorders, *Biol. Psychiatry*, **59**, 1116–1127 (2006).
- Dzyubachyk, O., van Cappellen, W. A., Essers, J., Niessen, W. J., and Meijering, E.: Advanced level-set-based cell tracking in time-lapse fluorescence microscopy, *IEEE Trans. Med. Imaging*, **29**, 852–867 (2010).
- Ehrlicher, A. J., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Weitz, D. A., and Stossel, T. P.: Mechanical strain in

- actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A, *Nature*, **478**, 260–U154 (2011).
- Eiraku, M., Adachi, T., and Sasaki, Y.: Relaxation-expansion model for self-driven retinal morphogenesis, *Bioessays*, **34**, 17–25 (2011).
- Enver, T., Pera, M., Peterson, C., and Andrews, P. W.: Stem cell states, fates, and the rules of attraction, *Cell Stem Cell*, **4**, 387–397 (2009).
- Francis, R., Xu, X., Park, H., Wei, C. J., Chang, S., Chatterjee, B., and Lo, C.: Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics, *PLoS One*, **6**, e26379 (2011).
- Friedl, P., and Gilmour, D.: Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 445–457 (2009).
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Nomura, T., Sasaki, J., Marvaud, J. C., Popoff, M. R., Kozaki, S., and Oguma, K.: Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes, *FEBS Lett.*, **467**, 179–183 (2000).
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watanabe, S., Yokota, K., Hirai, Y., Nagamachi, E., and Oguma, K.: The haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin, *Microbiology*, **143**, 3841–3847 (1997).
- Garcia, A. J., Vega, M. D., and Boettiger, D.: Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation, *Mol. Biol. Cell*, **10**, 785–798 (1999).
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M.: Open chromatin in pluripotency and reprogramming, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 36–47 (2011).
- Gough, A., Stern, A. M., Maier, J., Lezon, T., Shun, T. Y., Chennubhotla, C., Schurdak, M. E., Haney,

- S. A., and Taylor, D. L.: Biologically relevant heterogeneity: metrics and practical insights, *SLAS Discov.*, **22**, 213–237 (2017).
- Guenther, M. G., Frampton, G. M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R. A.: Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **7**, 249–257 (2010).
- Gumbiner, B. M.: Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis, *Cell*, **84**, 345–357 (1996).
- Hagbard, L., Cameron, K., August, P., Penton, C., Parmar, M., Hay, D. C., and Kallur, T.: Developing defined substrates for stem cell culture and differentiation, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, **373**, 20170230 (2018).
- Harrison, R. G.: Observations on the living developing nerve fiber, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **4**, 140–143 (1907).
- Hart, A.: Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. *BMJ*, **323**, 391–393 (2001).
- Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Brocker, E. B., And Friedl, P.: Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies, *Cancer Res.*, **62**, 2125–2130 (2002).
- Heo, S. J., Driscoll, T. P., Thorpe, S. D., Nerurkar, N. L., Baker, B. M., Yang, M. T., Chen, C. S., Lee, D. A., and Mauck, R. L.: Differentiation alters stem cell nuclear architecture, mechanics, and mechanosensitivity, *Elife*, **5**, e18207 (2016).
- Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C. R., Bialucha, C. U., Feller, S. M., Braga, V. M. M., Birchmeier, W., and Fujita, Y.: Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell–cell contacts, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 6690–6700 (2004).
- Hussein, S. M. I., Nagy, K., and Nagy, A.: Human induced pluripotent stem cells: the past, present, and future, **89**, 741–745 (2011).

- Huttenlocher, A., Lakonishok, M., Kinder, M., Wu, S., Truong, T., Knudsen, K. A., and Horwitz, A. F.: Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity, *J. Cell Biol.*, **141**, 515–526 (1998).
- Hynes, R. O.: Stretching the boundaries of extracellular matrix research, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 761–763 (2014).
- Ihalainen, T. O., Aires, L., Herzog, F. A., Schwartlander, R., Moeller, J., and Vogel, V.: Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension, *Nat. Mater.*, **14**, 1252–1261 (2015).
- Jin, Y. J., Takegahara, Y., Sugawara, Y., Matsumura, T., and Fujinaga, Y.: Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins – differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C, *Microbiology*, **155**, 35–45 (2009).
- Jozefczuk, J., Drews, K., and Adjaye, J.: Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells, *J. Vis. Exp.*, **64**, UNSP e3854 (2012).
- Khatau, S. B., Kusuma, S., Hanjaya-Putra, D., Mali, P., Cheng, L. Z., Lee, J. S., Gerecht, S., and Wirtz, D.: The differential formation of the LINC-mediated perinuclear actin cap in pluripotent and somatic cells, *PLoS One*, **7**, e36689 (2012).
- Kimbrel, E. A., and Lanza, R.: Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic, *Nat Rev Drug Discov*, **14**, 681–692 (2015).
- Kim, D. H., and Wirtz, D.: Cytoskeletal tension induces the polarized architecture of the nucleus, *Biomaterials*, **48**, 161–172 (2015).
- Kim, J.B., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Schöler, H.R.: Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4, *Nature*, **461**, 649-653 (2009).
- Kim, M. H., and Kino-oka, M.: Bioprocessing strategies for pluripotent stem cells based on

- Waddington's epigenetic landscape, *Trends Biotechnol.*, **36**, 89–104 (2018).
- Kim, M. H. and Kino-oka, M.: Maintenance of an undifferentiated state of human induced pluripotent stem cells through migration-dependent regulation of the balance between cell–cell and cell–substrate interactions, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 617–622 (2015).
- Kim, M. H., and Kino-oka, M.: Maintenance of undifferentiated state of human induced pluripotent stem cells through cytoskeleton-driven force acting to secreted fibronectin on a dendrimer-immobilized surface, *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 716–722 (2014a).
- Kim, M. H., and Kino-oka: Switching between self-renewal and lineage commitment of human induced pluripotent stem cells via cell-substrate and cell-cell interactions on a dendrimer-immobilized surface, *Biomaterials*, **35**, 5670–5678 (2014b).
- Kim, M. H., Kino-oka, M., Maruyama, N., Saito, A., Sawa, Y., and Taya, M.: Cardiomyogenic induction of human mesenchymal stem cells by altered Rho family GTPase expression on dendrimer-immobilized surface with D-glucose display, *Biomaterials*, **31**, 7666–7677 (2010).
- Kim, M. H., Masuda, E., and Kino-oka, M.: Kinetic analysis of deviation from the undifferentiated state in colonies of human induced pluripotent stem cells on feeder layers, *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 1128–1138 (2014c).
- Kim, M. H., Matsubara, Y., Fujinaga, Y., and Kino-oka, M.: A simple and robust method for culturing human induced pluripotent stems in an undifferentiated state using botulinum hemagglutinin, *Biotechnol. J.*, **13**, 1700384 (2017a).
- Kim, M. H. Sonoi, R. Yamada, K. Inamori, M., and Kino-oka, M.: Analysis of locality of early-stage maturation in confluent state of human retinal pigment epithelial cells, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 778–781 (2012).
- Kim, M. H., Sugawara, Y., Fujinaga, Y., and Kino-oka, M.: Botulinum hemagglutinin-mediated selective removal of cells deviating from the undifferentiated state in hiPSC colonies, *Sci.*

Rep., **7**, 93 (2017b).

Knox, A. L., and Brown, N. H.: Rap1 GTPase regulation of adherens junction positioning and cell adhesion, *Science*, **295**, 1285–1288 (2002).

Kondo, S., and Miura, T.: Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation, *Science*, **329**, 1616–1620 (2010).

Kourtidis, A., Ngok, S. P., Pulimeno, P., Feathers, R. W., Carpio, L. R., Baker, T. R., Carr, J. M., Yan, I. K., Borges, S., Perez, E. A., Storz, P., Copland, J. A., Patel, T., Thompson, E. A., Citi, S., and Anastasiadis, P. Z.: Distinct E-cadherin-based complexes regulate cell behaviour through miRNA processing or Src and p120 catenin activity, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1145 (2015).

Kovacs, E. M., Ali, R. G., McCormack, A. J., and Yap, A. S.: E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts, *J. Biol. Chem.*, **277**, 6708–6718 (2002).

Krzywinski, M. and Altman, N.: Visualizing samples with box plots, *Nat. Methods*, **11**, 119–120 (2014).

Lampe, K. J., and Heilshorn, S. C.: Building stem cell niches from the molecule up through engineered peptide materials, *Neurosci. Lett.*, **519**, 138–146 (2012).

Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F.: Cell migration: A physically integrated molecular process, *Cell*, **84**, 359–369 (1996).

Lee, K., Zhong, X. F., Gu, S. Y., Krueel, A. M., Dorner, M. B., Perry, K., Rummel, A., Dong, M., and Jin, R. S.: Molecular basis for disruption of E-cadherin adhesion by botulinum neurotoxin A complex, *Science*, **344**, 1405–1410 (2014).

Lengerke, C., Fehm, T., Kurth, R., Neubauer, H., Scheble, V., Muller, F., Schneider, F., Petersen, K., Wallwiener, D., Kanz, L., Fend, F., Perner, S., Bareiss, P.M., and Staebler, A.: Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma, *BMC Cancer*, **11**, 42 (2011).

- Li, D., Zhou, J., Wang, L., Shin, M.E., Su, P., Lei, X., Kuang, H., Guo, W., Yang, H., Cheng, L., Tanaka, T.S., Leckband, D.E., Reynolds, A.B., Duan, E., and Wang, F.: Integrated biochemical and mechanical signals regulate multifaceted human embryonic stem cell functions, *J. Cell. Biol.*, **191**, 631–644 (2010a).
- Li, K., Miller, E. D., Chen, M., Kanade, T., Weiss, L. E., and Campbell, P. G.: Cell population tracking and lineage construction with spatiotemporal context, *Med. Image Anal.*, **12**, 546–566 (2008).
- Li, L., Bennett, S. A., and Wang, L.: Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells, *Cell Adh. Migr.*, **6**, 59–70 (2012).
- Li, L., Wang, S. A., Jezierski, A., Moalim-Nour, L., Mohib, K., Parks, R. J., Retta, S. F., and Wang, L. S.: A unique interplay between Rap1 and E-cadherin in the endocytic pathway regulates self-renewal of human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **28**, 247–257 (2010b).
- Little, W. C., Smith, M. L., Ebnetter, U., and Vogel, V.: Assay to mechanically tune and optically probe fibrillar fibronectin conformations from fully relaxed to breakage, *Matrix Biol.*, **27**, 451–461 (2008).
- Liu, L., Yoshioka, M., Nakajima, M., Ogasawara, A., Liu, J., Hasegawa, K., Li, S., Zou, J., Nakatsuji, N., Kamei, K., and Chen, Y.: Nanofibrous gelatin substrates for long-term expansion of human pluripotent stem cells, *Biomaterials*, **35**, 6259–6267 (2014).
- Li, W., Lucioni, T., Guo, X. Y., Smelser, A., and Guthold, M.: Highly stretchable, biocompatible, striated substrate made from fugitive glue, *Materials*, **8**, 3508–3518 (2015).
- Lu, M., Xu, B., Jiang, Z., Sheng, A., Zhu, P., and Shi, J.: Automated tracking approach with ant colonies for different cell population density distribution, *Soft Comput.*, **21**, 3977–3992 (2017).
- Lund, A.W., Yener, B., Stegemann, J. P., and Plopper, G. E.: The natural and engineered 3D microenvironment as a regulatory cue during stem cell fate determination, *Tissue Eng. Part*

- B Rev., **15**, 371–380 (2009).
- Lutolf, M. P., Gilbert, P. M., and Blau, H. M.: Designing materials to direct stem-cell fate, *Nature*, **462**, 433–441 (2009).
- Maeda, M., Hohnson, R. K., and Wheelock, J. M.: Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition, *J. Cell. Sci.*, **118**, 873–887 (2005).
- Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A., and Griffith L. G.: Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering, *J. Cell Sci.*, **113**, 1677–1686 (2000).
- Martin, P.: Wound healing — aiming for perfect skin regeneration, *Science*, **276**, 75–81 (1997).
- Maruthamuthu, V., Aratyn-Schaus, Y., and Gardel, M. L.: Conserved F-actin dynamics and force transmission at cell adhesions, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 583–588 (2010).
- Matsumura, T., Jin, Y., Kabumoto, Y., Takegahara, Y., Oguma, K., Lencer, W. I., and Fujinaga, Y.: The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption, *Cell Microbiology*, **10**, 355–364 (2008).
- Meshorer, E. and Misteli, T.: Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 540–546 (2006).
- Miyashita, T., Higuchi, Y., Kojima, M., Ochiai, A., and Ishii, G.: Single cell time-lapse analysis reveals that podoplanin enhances cell survival and colony formation capacity of squamous cell carcinoma cells, *Sci. Rep*, **7**, 39971 (2017).
- Montell, D. J.: Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties, *Science*, **322**, 1502–1505 (2008).
- Nampe, D., and Tsutsui, H.: Engineered micromechanical cues affecting human pluripotent stem cell regulations and fate, *J. Lab. Autom.*, **18**, 482–493 (2013).
- Nanba, D., Toki, F., Tate, S., Imai, M., Matsushita, N., Shiraishi, K., Sayama, K., Toki, H., Higashiyama, S., and Barrandon, Y.: Cell motion predicts human epidermal stemness, *J. Cell*

- Biol., **209**, 305–315 (2015).
- Narva, E., Stubb, A., Guzman, C., Blomqvist, M., Balboa, D., Lerche, M., Saari, M., Otonkoski, T., and Ivaska, J.: A strong contractile actin fence and large adhesions direct human pluripotent colony morphology and adhesion, *Stem Cell Reports*, **9**, 67–76 (2017).
- Osmanagic-Myers, S., Dechat, T., and Foisner, R.: Lamins at the crossroads of mechanosignaling, *Genes Dev.*, **29**, 225–237 (2015).
- Pan, C., Hicks, A., Guan, X., Chen, H., and Bishop, C. E.: SNL fibroblast feeder layers support derivation and maintenance of human induced pluripotent stem cells, *J. Genet. Genomics*, **37**, 241–248 (2010).
- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., and Yamada, K. M.: A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration, *J. Cell Biol.*, **170**, 793–802 (2005).
- Price, L. S., Hajdo-Milasinovic, A., Zhao, J., Zwartkruis, F. J. T., Collard, J. G., and Bos, J. L.: Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell–cell adhesion, *J. Biol. Chem.*, **279**, 35127–35132 (2004).
- Puliafito, A., Hufnagel, L., Neveu, P., Streichan, S., Sigal, A., Fygenson, D. K., and Shraiman, B. I.: Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 739–744 (2012).
- Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W., and Besser, D.: E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming, *EMBO Rep.*, **12**, 720–726 (2011).
- Retta, S. F., Balzac, F., and Avolio, M.: Rap1: a turnabout for the crosstalk between cadherins and integrins, *Eur. J. Cell Biol.*, **85**, 283–293 (2006).
- Robinton, D. A., Daisy, A., and Daley, G. Q.: The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy, *Nature*, **481**, 295–305 (2012).
- Rosowski, K. A., Mertz, A. F., Norcross, S., Dufresne, E. R., and Horsley, V.: Edges of human

- embryonic stem cell colonies display distinct mechanical properties and differentiation potential, *Sci. Rep.*, **5**, 14218 (2015).
- Saha, K., Pollock, J. F., Schaffer, D. V., and Healy, K. E.: Designing synthetic materials to control stem cell phenotype, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**, 381–387 (2007).
- Sato, A., Koshida, S., and Takeda, H.: Single-cell analysis of somatotopic map formation in the zebrafish lateral line system, *Dev. Dyn.*, **239**, 2058–2065 (2010).
- Serra, M., Brito, C., Correia, C., and Alves, P. M.: Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application, *Trends Biotechnol.*, **30**, 350–359 (2012).
- Snijder, B. and Pelkmans, L: Origins of regulated cell-to-cell variability, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 119–125 (2011).
- Soncin, F., Mohamet, L., Eckardt, D., Ritson, S., Eastham, A. M., Bobola, N., Russell, A., Davies, S., Kemler, R., Merry, C. L. R., and Ward, C. M.: Abrogation of E-cadherin-mediated cell-cell contact in mouse embryonic stem cells results in reversible LIF-independent self-renewal, *Stem Cells*, **27**, 2069–2080 (2009).
- Soncin, F., and Ward, C. M.: The function of E-cadherin in stem cell pluripotency and self-renewal, *Genes*, **2**, 229–259 (2011).
- Sonoi, R., Kim, M. H., and Kino-oka, M.: Facilitaiton of uniform maturation of human retinal pigment epithelial cells through collective movement in culture, *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 220–226 (2016).
- Sugawara, Y., and Fujinaga, Y: The botulinum toxin complex meets E-cadherin on the way to its destination, *Cell Adh. Migr.*, **5**, 34–36 (2010).
- Sugawara, Y., Matsumura, T., Takegahara, Y., Jin, Y. J., Tsukasaki, Y., Takeichi, M., and Fujinaga, Y.: Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin, *J. Cell Biol.*, **189**, 691–700 (2010).
- Sugawara, Y., Yutani, M., Amatsu, S., Matsumura, T., and Fujinaga, Y.: Functional dissection of the

- Clostridium botulinum* Type B hemagglutinin complex: identification of the carbohydrate and E-cadherin binding sites, *PLoS ONE*, **9**, e111170 (2014).
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., and Katsuki, M.: Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation, *Oncogene*, **17**, 3427–3433 (1998).
- Svitkina, T.: The actin cytoskeleton and actin-based motility, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **10**, a018267 (2018).
- Takahashi, K., Narita, M., Yokura, M., Ichisaka, T., and Yamanaka, S.: Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders, *PLoS One*, **4**, e8067 (2009).
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861–872 (2007).
- Tambe, D. T., Hardin, C. C., Angelini, T. E., Rajendran, K., Park, C. Y., Serra-Picamal, X., Zhou, E. H. H., Zaman, M. H., Butler, J. P., Weitz, D. A., Fredberg, J. J., and Trepap, X.: Collective cell guidance by cooperative intercellular forces, *Nat. Mater*, **10**, 469–475 (2011).
- Tamiya, S. Liu, L., and Kaplan, H. J.: Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell–cell contact, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 2755–2763 (2010).
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, **282**, 1145–1147 (1998).
- Thorpe, S. D. and Lee, D. A.: Dynamic regulation of nuclear architecture and mechanics—a rheostatic role for the nucleus in tailoring cellular mechanosensitivity, *Nucleus*, **8**, 287–300 (2017).
- Tong, Z., Solanki, A., Hamilos, A., Levy, O., Wen, K., Yin, X., and Karp, J. M.: Application of

- biomaterials to advance induced pluripotent stem cell research and therapy, *EMBO J.*, **34**, 987–1008 (2015).
- Townes, P. L., and Holtfreter, J.: Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells, *J. Exp. Zool.*, **128**, 53–120 (1955).
- Tukey, J. W.: *Exploratory data analysis*. Addison-Wesley, Reading, MA, Addison-Wesley (1977).
- Underwood, J. M., Becker, K. A., Stein, G. S., and Nickerson, J. A.: The ultrastructural signature of human embryonic stem cells, *J. Cell. Biochem.*, **118**, 764–774 (2017).
- Uyeda, T. Q. P., Iwadate, Y., Umeki, N., Nagasaki, A., Yumura, S.: Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin II motor domain, *PLoS One*, **6**, e26200 (2011).
- Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V., and Fuchs, E.: Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium, *Dev. Cell*, **3**, 367–381 (2002).
- Versaevel, M., Braquenier, J. B., Riaz, M., Grevesse, T., Lantoine, J., and Gabriele, S.: Super-resolution microscopy reveals LINC complex recruitment at nuclear indentation sites, *Sci. Rep.*, **4**, 7362 (2014).
- Wang, N., Tytell, J. D., and Ingber, D. E.: Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 75–82 (2009).
- Werner, M., Blanquer, S. B. G., Haimi, S. P., Korus, G., Dunlop, J. W. C., Duda, G. N., Grijpma, D. W., and Petersen, A.: Surface curvature differentially regulates stem cell migration and differentiation via altered attachment morphology and nuclear deformation, *Adv. Sci.*, **4**, 1600347 (2017).
- Yilmaz, M., and Christofori, G.: Mechanisms of motility in metastasizing cells, *Mol. Cancer Res.*, **8**, 629–642 (2010).

本報に関する論文

1) **Shuzui, E., Kim, M.-H., and Kino-oka, M:** Anomalous cell migration triggers a switch to deviation from the undifferentiated state in colonies of human induced pluripotent stems on feeder layers. *J. Biosci. Bioeng.*, **127**, 246–255 (2019).

2) **Shuzui, E., Kim, M.-H., Azuma, K., Fujinaga, Y., and Kino-oka, M:** Maintenance of an undifferentiated state of human-induced pluripotent stem cells through botulinum hemagglutinin-mediated regulation of cell behavior. *J. Biosci. Bioeng.* (available online 17 January 2019).

謝辞

本研究を行うにあたり、適切なお指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学 紀ノ岡正博 教授に深く感謝の意を表します。ご多忙のなか何度も時間を割きご指導いただいたことから、物事の目的を理解すること、本質を捉えることの大切さを学びました。また、個々の学術論文に沿った研究から纏めた概念が面白さであることも、学びました。これらの研究を用いた物の考え方や姿勢は、私の今後の糧となると考えております。

本論文の審査にあたり、丁寧かつ様々なご助言を賜りました大阪大学 大政健史 教授、内山進 教授に深く感謝致します。スライド内容のご助言、草稿の添削にて、何度もご指導いただき、私自身の勉強不足な箇所や、文章作成におけるコツを学びました。そして、本論文の審査にあたる丁寧なお助言、研究への取り組みなどをご指導くださった大阪大学 金美海 准教授に厚く御礼申し上げます。金先生には、研究だけでなく日常生活においてもご指導、ご鞭撻をいただき、私自身の至らなさを実感致しました。先生方のご指導およびご助言で言及されたことを今後も意識して、日常生活や仕事に励んでいく所存でございます。

さらに、本研究を行うにあたり、様々なご意見およびアドバイスを下さいました、大阪大学 堀口一樹 助教、大阪工業大学 長森英二 准教授、様々な知見を提供して下さいました金沢大学 藤永由佳子 教授に厚く御礼申し上げます。また、たくさんのご指導をいただきました増田英里 氏（現 東和薬品（株））、本研究グループで共に頑張ってきた松原佳史 氏（現（株）アシックス）、東敬祐 氏（現 シスメックス（株））に深く感謝致します。

最後に、いつも温かく見守りどんな時も優しく励ましてくださいました事務補佐員 若松光子 氏，西村智子 氏，花嶋潤子 氏には，研究生生活を遂行する上で甚大なるサポート，ご協力をいただき，厚く御礼申し上げます。また，紀ノ岡研のメンバー皆様のご助言，励ましがあつたからこそ，本研究を遂行することが出来ました。そして，大阪大学 博士後期課程の修了に至るまで，長く支え応援してくれた家族無しに大学生活および本研究を成し遂げることが出来なかったことを申し添え，謝辞と致します。