The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ROCK阻害剤がヒト人工多能性幹細胞の集塊挙動に与える影響に関する研究
Author(s)	松本, 崇揮
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92887
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　（　　松本　崇揮　　）	
論文題名	ROCK阻害剤がヒト人工多能性幹細胞の集塊挙動に与える影響に関する研究

論文内容の要旨

第1章では，ヒト人工多能性幹細胞 (ヒトiPS細胞) は再生医療のための有望な幹細胞源であり，大量のヒトiPS細胞を得るための培養技術の確立が求められている．細胞の安定供給が可能な培養工程を設計するためには，細胞株や培地，試薬，培養系といった組合せに対応した細胞集塊挙動の変化の仕方などの集塊形成プロセスに関する基礎的な知見の更なる蓄積が必要である．そこで，単細胞状態のヒトiPS細胞の細胞死を抑制するRho-associated protein kinase (ROCK) 阻害剤に着目した．本研究の目的はROCK阻害剤がヒトiPS細胞の集塊挙動に与える影響を明らかにすることである．

第2章では，ROCK阻害剤がヒトiPS細胞集塊の挙動に与える影響の現象を反応速度論的解析することで明らかにした. 細胞播種時を$t = 0$とし, 単離したヒトiPS細胞のアポトーシスを防ぐためにROCK阻害剤を$t = 24$ hまで暴露後, ROCK阻害剤を暴露しない培養方法をROCK阻害剤非暴露と定義した．一方，$t = 120$ hまでROCK阻害剤を暴露する培養方法をROCK阻害剤暴露と定義した．初めに様々な種類のROCK阻害剤を用いて静置浮遊培養を行った結果，濃度依存的に細胞集塊の増大と球状の維持が確認された．また，集塊崩壊する系で培養を行ったところ，ROCK阻害剤を暴露することで，細胞集塊の崩壊ではなく細胞集塊の変形が確認された．そのため，ROCK経路の阻害が細胞増殖を促進し，集塊形態を維持することが示唆された．次に，懸濁浮遊培養において反応速度論的解析を行った結果，ROCK阻害剤を暴露することで$t = 24$-72 hにおける見かけの比増殖速度は高い値を示し，$t = 72$-120 hまで高い値を維持したため，ROCK阻害による細胞分裂の維持が示唆された．また，ROCK阻害剤を暴露することで細胞集塊のサイズの増大とともに過剰に増大した細胞集塊が確認された. ROCK阻害剤を暴露した細胞集塊の合一のしやすさを確認するためにタイムラプス観察を行ったところ，ROCK阻害剤非暴露では観察開始から100 minまで集塊合一が確認されず，一方ROCK阻害剤暴露では20 minから集塊合一が開始され，ROCK阻害によって集塊合一の促進が示唆された．以上のことから，ROCK阻害剤の暴露は集塊崩壊を抑制することで細胞分裂の維持と集塊合一の促進を誘導することが示唆された．

第3章では，ROCK阻害剤による細胞分裂維持に寄与する因子を細胞集塊構造の観点から明らかにした．細胞分裂に関連する細胞外マトリックス (ECM) の一部であるcollagen type Iの生成量と局在を調べた結果，ROCK阻害剤の暴露を行うことでcollagen type Iの生成量が増加し，一方でcollagen type Iの局在は非暴露と同様に細胞集塊縁周部に局在した．次に，細胞集塊内の細胞骨格であるアクトミオシンの局在を調べた結果，ROCK阻害剤を暴露することで，細胞集塊内のリン酸化ミオシン軽鎖 (pMLC) は発現しなくなった．そこで，細胞集塊表面構造と断面構造を調べた結果，ROCK阻害剤の非暴露では細胞集塊表面上において経時的に太さ100 nm縞間隔50 nmの繊維構造が形成され，一方ROCK阻害剤暴露では$t = 24$ hから50-200 nmの粒子構造が維持された．以上のことから，ROCK阻害剤の暴露はヒトiPS細胞集塊内のpMLCの発現を抑制し，collagen type Iの粒子構造を維持する可能性を示した．

本研究では，ヒトiPS細胞集塊形成過程においてROCK阻害剤の暴露が細胞集塊表面の粒子状構造維持によって細胞集塊崩壊を抑制し，細胞分裂を維持したことを示唆した．本研究成果を利用することで，細胞集塊表面構造と細胞集塊挙動との関連性に関する新たな考えを示すことができるとともに，集塊形成プロセスの新たな制御法が期待される．本研究成果が見出した新たな知見は更なる集塊形成プロセスの理解と制御方法の研究の手がかりとなる点で極めて重要であると考えられる．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　松本　崇揮　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
主 査	教授	紀ノ岡　正博
副 査	教授	内山　進
副 査	教授	大政　健史
副 査	准教授	金　美海

論文審査の結果の要旨

本論文では、ヒト iPS 細胞の細胞死を抑制する Rho-associated protein kinase (ROCK) 阻害剤に着目し、ROCK 阻害剤がヒト iPS 細胞の集塊挙動に与える影響を明らかにしている。

第 1 章では、ヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) は再生医療のための有望な幹細胞源であることを示し、大量のヒト iPS 細胞を得るための培養技術の確立が求められていることを提示している。その際、細胞の安定供給が可能な培養工程を設計するために、細胞株や培地、試薬、培養系といった組合せに対応した細胞集塊挙動の変化の仕方などの集塊形成プロセスに関する基礎的な知見の蓄積が必要であることを示している。特に、単細胞状態のヒト iPS 細胞の細胞死を抑制する Rho-associated protein kinase (ROCK) 阻害剤に着目し、ROCK 阻害剤がヒト iPS 細胞の集塊挙動に与える影響を明らかにすることの目的を提示している。

第 2 章では、ROCK 阻害剤がヒト iPS 細胞集塊の挙動に与える影響を反応速度論的解析することで明らかにしている。細胞播種時を $t = 0$ とし、単離したヒト iPS 細胞のアポトーシスを防ぐために ROCK 阻害剤を暴露後の有無による影響を検討している。集塊崩壊する系で、ROCK 阻害剤を暴露することで、細胞集塊の崩壊ではなく細胞集塊の変形が確認され、ROCK 経路の阻害が細胞増殖を促進し、集塊形態を維持することを示唆している。さらに、ROCK 阻害剤を暴露することで細胞集塊のサイズの増大とともに過剰に増大した細胞集塊を報告している。また、様々な種類の ROCK 阻害剤を用いて静置浮遊培養を行い、濃度依存的に細胞集塊の増大と球状の維持が確認している。タイムラプス観察により、ROCK 阻害剤非暴露では観察開始から 100 min まで集塊合一が確認されないが、ROCK 阻害剤暴露では 20 min から集塊合一が開始され、ROCK 阻害によって集塊合一の促進されることを明らかにしている。

第 3 章では、ROCK 阻害剤による細胞分裂維持に寄与する因子を細胞集塊構造の観点から明らかにしている。細胞分裂に関連する細胞外マトリックス (ECM) の一部である collagen type I の生成量と局在を調べ、ROCK 阻害剤の暴露を行うことで collagen type I の生成量が増加し、細胞集塊縁周部に局在していることを示している。また、細胞集塊内の細胞骨格であるアクトミオシンの局在は、ROCK 阻害剤を暴露することで、細胞集塊内のリン酸化ミオシン軽鎖 (pMLC) は形成しなくなり、細胞集塊表面構造と断面構造を調べた結果、ROCK 阻害剤の非暴露では細胞集塊表面上において経時的に太さ 100 nm 縞間隔 50 nm の繊維構造が形成され、ROCK 阻害剤暴露では 50-200 nm の粒子構造が形成されることを示している。

以上のように、本論文は、ヒト iPS 細胞集塊形成過程において ROCK 阻害剤の暴露が細胞集塊表面の粒子状構造維持によって細胞集塊崩壊を抑制し、細胞分裂が維持されることを示唆し、細胞集塊表面構造と細胞集塊挙動との関連性に関し、学問分野に重要な知見を与えている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。