

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	<a href="https://doi.org/10.18910/92887">https://doi.org/10.18910/92887</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

博士学位論文

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

松本崇揮

2023 年 4 月

大阪大学大学院工学研究科

# 目次

第1章 序論 .....	3
1.1 序言 .....	3
1.2 ヒト iPS 細胞集塊の形成過程と構成要素 .....	5
1.3 ROCK 阻害剤添加したヒト iPS 細胞培養 .....	7
1.4 本研究の目的と構成 .....	9
第2章 ROCK 阻害剤添加培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の反応速度論的解析 .....	11
2.1 緒言 .....	11
2.2 実験材料および方法 .....	13
2.2.1 ヒト iPS 細胞の維持培養 .....	13
2.2.2 ヒト iPS 細胞の浮遊培養 .....	13
2.2.3 タイムラプス観察 .....	16
2.2.4 ヒト iPS 細胞の増殖挙動の反応速度論的解析 .....	17
2.2.5 統計解析 .....	18
2.3 実験結果 .....	19
2.3.1 ROCK 阻害剤の暴露がヒト iPS 細胞集塊形態に与える影響 .....	19
2.3.2 ROCK 阻害剤の暴露がヒト iPS 細胞の増殖に与える影響 .....	25
2.4 考察 .....	32
2.5 小括 .....	37
第3章 ROCK 阻害剤添加したヒト iPS 細胞集塊の構造特性の解明 .....	38
3.1 緒言 .....	38
3.2 実験材料および方法 .....	39
3.2.1 ヒト iPS 細胞の培養 .....	39
3.2.2 ヒト iPS 細胞の浮遊培養 .....	39
3.2.3 凍結切片の作成と染色 .....	40
3.2.4 走査型電子顕微鏡による観察 .....	41

3.3 実験結果 .....	42
3.1.1 ROCK 阻害剤に暴露した細胞集塊の collagen type I の生成量と collagen type I と pMLC の局在性 .....	42
3.1.2 ROCK 阻害剤の暴露による細胞集塊表面の微細構造の時間依存性変化 .....	47
3.4 考察 .....	52
3.5 小括 .....	58
第4章 総括 .....	59
略語一覧 .....	63
参考文献 .....	65
本報に関する論文 .....	78
謝辞 .....	79

## 第1章 序論

### 1.1 序言

細胞培養とは、培地や基質を用いて人工的に体内に似せた環境を整え、生体内から取り出した細胞を維持・増殖させることであり、19世紀から生物学および医学分野の中で大きなテーマとして研究されてきた (Yao *et al.*, 2017). 細胞培養は 1882 年における器官培養に始まり (Ringer 1882), 1900 年代にかけて組織・細胞培養技術が開発されたことで、細胞生存や増殖のための培地を開発する研究が始まった (Harrison *et al.*, 1907). 1950 年代にかけて、天然培地内にある細胞生存と増殖に必要な成分の解明が進められ、既知の成分が含まれた合成培地が開発された (Fischer *et al.*, 1948 ; Eagle *et al.*, 1955). その後、様々な種類の動物細胞培養に関する研究が盛んになるにつれて、細胞特性及び遺伝的背景が均一な細胞集団を獲得するために細胞株を樹立する研究が始まった (Sanford *et al.*, 1948). 1952 年にヒト由来の最初の細胞株である Hela 細胞が樹立されたことにより、一般的なヒト細胞のモデルとしてこの細胞株は利用され、動物細胞培養研究が推進された (Gey *et al.*, 1952). 1973 年に細胞が培養面に接着するために重要な ECM の発見に伴い (Richard, 1973), 1985 年には細胞-基質間接着に必要なインテグリンが発見された (Pierschbacher *et al.*, 1985). また、同時期に細胞-細胞間接着に必要なカドヘリンが発見され、細胞の生存・増殖には細胞接着分子が大きく関わっていることが分かった (Shirayoshi *et al.*, 1986). このように、培養面上の基質に細胞を接着させることで安定した細胞生存・増殖を行うことができる方法は接着培養として確立された. 一方で、接着培養は生体内と比較して細胞を取り巻く環境が大きく異なるため、生体内に近い環境と構造で評価できる培養方法の開発が求められた.

1980年代において浮遊した細胞同士が凝集して細胞集塊を形成させる浮遊培養が提案されてから (Roskelley *et al.*, 1994), 様々な浮遊培養法が開発された。現在までにウェル内で細胞同士を接触させて個々の細胞集塊を形成させるハンギング・ドロップ法等の静置浮遊培養法 (Keller *et al.*, 1995; Höpfl *et al.*, 2004) や攪拌した培養槽内で細胞同士を衝突させて細胞集塊を形成させる懸濁浮遊培養法が開発されている (Olmer *et al.*, 2012; Matsuura *et al.*, 2012)。静置浮遊培養は細胞集塊のサイズを均一に形成できる再現性の高い培養が行うことが可能である (Shinohara *et al.*, 2014)。また、懸濁浮遊培養法は省スペースで高密度の培養が可能であり、スケールアップが容易なため大量培養にも適している (Olmer *et al.*, 2012)。以上のことから、浮遊培養方法の開発によって細胞同士の凝集および細胞集塊の増幅が容易となり、細胞集塊の特性や組織における細胞応答に関する基礎研究 (Shirinifard. *et al.*, 2009) やオルガノイドを用いた組織形成解明や薬物動態に関する応用研究が推進された (Lancaster *et al.*, 2014)。しかし、浮遊培養は接着培養と比較して培養環境が複雑であるため、細胞集塊の特性や組織における細胞応答に影響を与える要因が多い。細胞に対して適切な培養環境を整えるためには、栄養分・老廃物濃度による化学的制御や pH や酸素濃度による物理学的な制御に加えて、懸濁浮遊培養は攪拌翼によって生じるせん断応力に対する対策も重要である。特に近年樹立された自己複製能と分化能を有するヒト iPS 細胞 (Takahashi *et al.*, 2007) は栄養分・老廃物濃度, pH, 酸素濃度やせん断応力による影響が顕著であるため、浮遊培養において細胞収量の低下がみられる (Nath *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2010; Toh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013)。このように、ヒト iPS 細胞の浮遊培養において細胞株, 試薬や培養方法の組み合わせによって生じる細胞応答のばらつきがあり、培養条件に関

ならず大量に細胞を獲得できる浮遊培養技術の確立のため、浮遊培養プロセスに寄与する要素の理解やその制御方法が求められている。

## 1.2 ヒト iPS 細胞集塊の形成過程と構成要素

ヒト iPS 細胞の浮遊培養プロセスに寄与する要素の一つである細胞集塊の形成過程を理解するために、細胞集塊の挙動を反応速度論的に解釈する研究が進められている (Moreira *et al.*, 1995; Hashida *et al.*, 2020). 細胞集塊の挙動は細胞凝集, 細胞分裂, 集塊崩壊, 集塊分割, 集塊合一の 5 つのプロセスで構成されている (図 1. 1). ヒト iPS 細胞が単細胞状態で播種されたとき, 一部の細胞は接着する前にアポトーシスがおき, 細胞集塊形成の効率が低くなることがわかっている (Kim *et al.*, 2019). 生存した細胞は細胞-細胞間接着によって細胞凝集し, 細胞集塊が形成される (Kim *et al.*, 2019; Ohgushi *et al.*, 2010). その後, 細胞-細胞間接着は強固になり, 安定した接着によって細胞は ECM を分泌する. 細胞から分泌された ECM と細胞の細胞-基質間接着によって細胞同士はより強固に接着し, 再編成された細胞内骨格が細胞集塊内の細胞形態を変化させ, 細胞集塊自体が力学的に効率的な形態である球状へと細胞集塊が形成される (Shirinifard. *et al.*, 2009). その際, 分泌された ECM との細胞-基質間接着は FAK シグナルを誘導し, 細胞集塊内の細胞分裂が誘導される (Wang *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018). しかし, 細胞集塊内の ECM の生成量が不十分である場合, 細胞-基質間接着の不安定性によって細胞集塊から細胞が放出される (Kim *et al.*, 2019), また液流から生じるせん断ストレスに対して細胞が脱接着することにより細胞集塊が崩壊する (Kato *et al.*, 2019). ECM の 1 種である collagen type I の繊

維構造が互いに架橋構造を形成することにより, collagen type I の殻様構造が形成される (Zeng *et al.*, 2013; Sachlos *et al.*, 2008). この殻様構造は液流に対する細胞集塊の形態を維持する役割を持つ一方で, collagen type I の殻様構造は細胞集塊内部への栄養分と酸素を律速にするだけでなく (Sachlos *et al.*, 2008), 細胞集塊内部の細胞への圧迫による接触障害を起こすことで細胞分裂の低下に関連していると考えられる (Kato *et al.*, 2019; Nath *et al.*, 2017). 培養を通して, 培養時に細胞集塊同士が接触した際, 細胞集塊表面のカドヘリンによって接着し, 細胞集塊表面を細胞が遊走することで融合が開始され, 集塊合一により球状の細胞集塊が形成される (Stephen *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2015). また, 細胞集塊が分割してより小さな細胞集塊が形成される (Nath *et al.*, 2017). このように, 細胞集塊の形成における細胞応答のばらつきは主に細胞集塊の崩壊と細胞分裂の低下によって起きていると考えられる. そして, これらの現象は細胞-細胞間接着, 細胞-基質間接着, 遊走からなる細胞挙動によって制御されているため (Kim *et al.*, 2020), 細胞接着分子を制御する方法や ECM 等を用いて細胞挙動を制御し, 細胞集塊の崩壊や細胞死についての研究がなされている (Lin *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2017; Calori *et al.*, 2022). 細胞挙動を制御するより詳細な知見を得るために, 細胞骨格に着目した細胞集塊形成のプロセス理解とその制御方法は浮遊培養技術の確立には必要である.



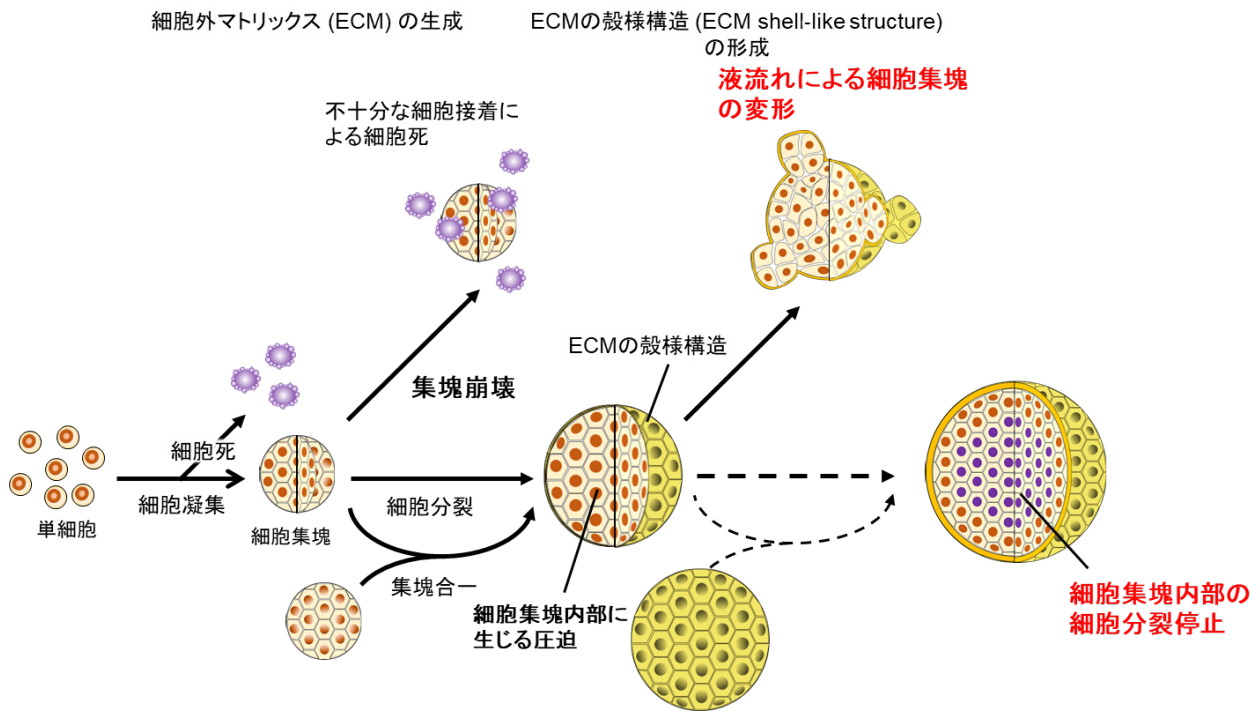


図 1.1 浮遊培養におけるヒト iPS 細胞の集塊挙動

### 1.3 ROCK 阻害剤添加したヒト iPS 細胞培養

ヒト iPS 細胞を含む動物細胞内で生じる ROCK 経路依存的な細胞骨格の形成は細胞接着や遊走などの細胞挙動に影響を及ぼす (図 1.2). 細胞内の細胞骨格は中間系フィラメント, 微小管とアクチンフィラメントの 3 つの異なるタンパク質構造が構成されている. 上皮細胞等の接着斑や半接着斑の結合補助の役割を持つ中間系フィラメントや細胞内タンパク質の輸送の役割を持つ微小管と比較して, アクチンフィラメントは細胞接着分子や核膜と結合し細胞の形状維持ができるだけでなく, 細胞外部から受ける刺激を生化学的なシグナルに変換し細胞内部へと伝えることができる (Vining *et al.*, 2006; Fletcher *et al.*, 2010). アクチンフィラメントはアクチン単量体が重合し, F-actin がらせん状に組み合わさることにより形成する. このアクチンフィラメントはモータータンパク質であるミオシンと結合しアクチンミオシンとして細胞の形態変化や細胞遊走に大きく関わっている

(Pollard *et al.*, 2009). ミオシンを制御する Rho タンパク質は単量体で働く低分子量 G タンパク質であり, GDP に結合した不活性化状態から GEF が作用して可逆的に GTP に結合した活性化状態に変換される (Cherfils *et al.*, 2013). 活性化された Rho タンパク質は標的タンパク質である ROCK に結合し, MLCP を抑制することでミオシン軽鎖をリン酸化する (Amano *et al.*, 1996). 活性化されたミオシンによって収縮するアクチンミオシンは細胞-細胞間接着, 細胞-基質間接着, 遊走に影響を及ぼし, 生化学的なシグナル経路の変化することが知られている (Ohashi *et al.*, 2017).

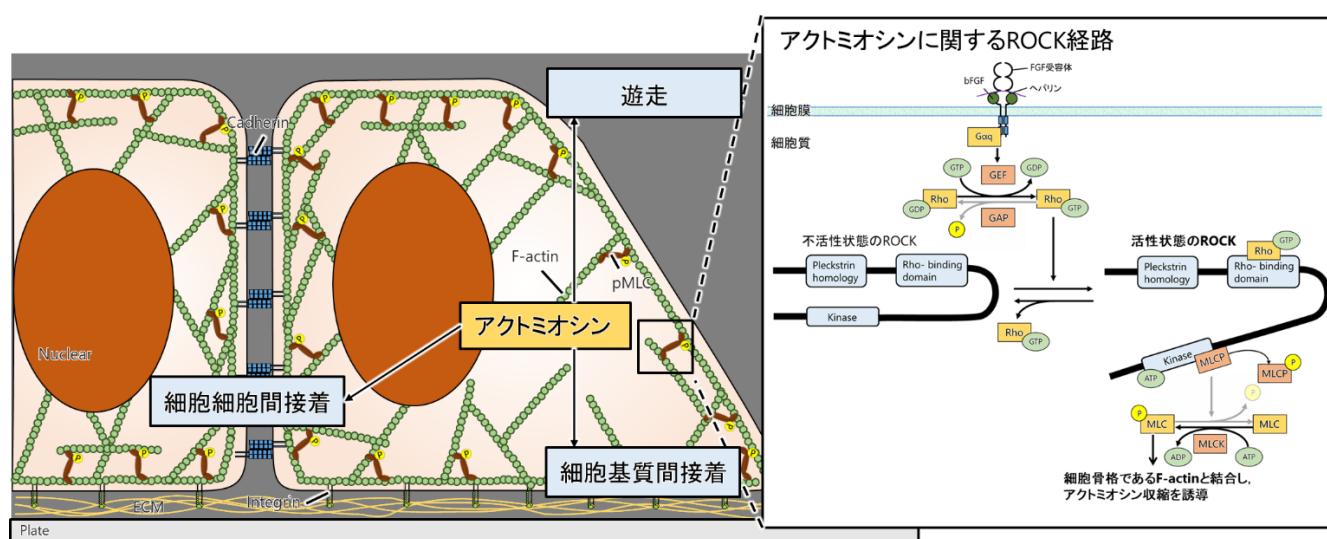


図 1.2 細胞内におけるアクチンミオシンに関する ROCK 経路と細胞挙動の関係

Rho-ROCK 経路は血管攣縮, 高血圧, 血管の炎症, 動脈硬化を引き起こすことが分かっており, 病態に対する治療薬として ROCK 阻害剤が開発された. 1992 年に脳血管攣縮に対する治療薬として初めて Fasudil が開発された (Shibuya *et al.*, 1992). この Fasudil は非選択的な ROCK 阻害剤であるのに対し, 1997 年には特異性の高い選択的な ROCK 阻害剤である Y-27632 が開発された (Uehata *et al.*, 1997). Rho が ROCK に結合した後, 構造変化が起こり露出した活性部位に

ATP と競合的に Y-27632 が結合することで基質のリン酸化を抑制する (Ishizaki *et al.*, 2000). これにより, Rho-ROCK シグナル伝達を詳細に解明することが可能となり, 動物細胞における細胞増殖などの細胞応答の制御機構解明が推進された. 現在までに ROCK 阻害剤は細胞培養において様々な効果を示しており (Abe *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015), 接着培養においてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞では複製寿命の延長, 創傷治癒, 細胞生存や細胞増殖の促進, 未分化性の維持, 細胞分化の選択的な誘導を行うことができる (Croze *et al.*, 2016; Pakzad *et al.*, 2010). また, 浮遊培養においてヒト iPS 細胞の凝集時における細胞間接着の増強と継続, 細胞増殖の促進だけでなく, 多能性の維持や単細胞の解離誘発性アポトーシスの減少も報告されている (Gao *et al.*, 2019; Watanabe *et al.*, 2007; Coleman *et al.*, 2001). このように, 浮遊培養において ROCK 阻害剤が凝集時におけるヒト iPS 細胞の細胞機能に与える影響に関する研究が進んでおり, その上で ROCK 阻害剤が凝集後のヒト iPS 細胞の集塊挙動に与える影響とその要因を明らかにすることは更なる浮遊培養プロセスの理解に必要である. このような背景から, ヒト iPS 細胞の集塊形成プロセスの理解とその制御方法の確立のため, 細胞骨格を制御する ROCK 阻害剤を用いることは有用であると考えられる.

#### 1.4 本研究の目的と構成

本研究の目的は, ヒト iPS 細胞集塊の増殖過程において ROCK 阻害剤が細胞集塊の挙動に与える影響を明らかにすることである.

第 1 章では, ヒト iPS 細胞培養における細胞集塊の形成プロセスと構造に関する現状について

述べ、これらの制御が可能な ROCK 阻害剤の効果について述べた。

第 2 章では、ROCK 阻害剤の種類と濃度の検討を行った後、懸濁浮遊培養において ROCK 阻害剤がヒト iPS 細胞集塊の挙動に与える影響に関して反応速度論的解析を行った。さらに、異なる細胞集塊形成を行う 2 種類のヒト iPS 細胞株間で比較し、ROCK 阻害剤による細胞集塊の形成プロセスの変化について考察した。

第 3 章では、第 2 章で示された ROCK 阻害剤によるヒト iPS 細胞集塊の挙動変化に寄与する構造的な因子を明らかにした。ROCK 阻害剤による細胞集塊の挙動変化に寄与する ECM の一部である collagen type I に着目し、collagen type I の生成量と局在や細胞集塊表面上の構造について調査した。その結果を受けて、ROCK 阻害剤による細胞集塊の構造特性変化と細胞集塊挙動との関連性について考察した。

第 4 章では、総括として第 2 章と第 3 章で得られた結果をまとめ、第 1 章で述べたヒト iPS 細胞集塊の形成プロセスにおける課題と結び付け、ヒト iPS 細胞の集塊挙動に対する考えと展望について述べた。

## 第2章 ROCK 阻害剤添加培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の反応速度論的解析

### 2.1 緒言

ヒト多能性幹細胞 (ヒト PS 細胞) は, ヒト iPS 細胞とヒト ES 細胞を含み, 自己複製能と多能性を有することから, 臨床および産業的によく用いられている (Takahashi *et al.*, 2006; Kimbrel *et al.*, 2015). そのため, 大量のヒト PS 細胞が必要とされ, 効率的にヒト PS 細胞を製造するための培養技術が研究されている. 浮遊培養は, 省スペースで高密度の培養が可能であり, 平面培養に比べてスケールアップが容易なため, ヒト PS 細胞の大量培養に適している (Shafa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). しかし, 細胞株, 試薬, 培養系の組み合わせによって, 細胞集塊の挙動が異なることが分かっている (Kim *et al.*, 2019; Nath *et al.*, 2017; Kato *et al.*, 2018; Hashida *et al.*, 2020). 大量の細胞を低コストで得るためには, このようなばらつきを抑え, 安定供給できる培養プロセスを設計することが望まれる (Sanders *et al.*, 2012). そのため, 上記の入力変数の組み合わせに対して, 細胞集塊形成などの出力変数の変化がどのように反応するのか, その変化を支配する因子を特定するための基礎知識が必要である. さらに, 浮遊培養において効率的で再現性の高い培養戦略の確立が不可欠である.

ROCK 経路はリン酸化ミオシンの過剰発現によりヒト PS 細胞のアポトーシスを誘導するため, ROCK 阻害剤は浮遊培養においてアポトーシスを抑制することにより細胞の凝集を促進する (Gao *et al.*, 2019; Watanabe *et al.*, 2007; Coleman *et al.*, 2001). Rho A のエフェクターである ROCK は, 細胞接着時のカドヘリンやインテグリン由来の F-アクチンを制御することにより, 細胞増殖や遊走を制御している (Ohashi *et al.*, 2001). 細胞集塊には細胞結合が重要な要素であるため, 細胞

接着における ROCK 経路の役割はよく研究されている (Evers *et al.*, 2001). このような背景から, ROCK 阻害剤は様々な細胞培養において有益な効果を示し, 平面培養中のヒト PS 細胞の創傷治癒や細胞生存を促進し, 未分化能を維持する (Croze *et al.*, 2016; Pakzad *et al.*, 2010). ROCK 阻害剤は, アクトミオシンの消失によって細胞骨格を変化させ, それによって平面培養における様々な細胞種の増殖と遊走を誘導する (Sun *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018; Ohgushi *et al.*, 2010). 浮遊培養において, ROCK 阻害剤がヒト PS 細胞の単細胞の解離誘発性アポトーシスの低減により細胞生存, 細胞-細胞間接着の増加, 細胞増殖の促進, 多能性の維持を誘導する (Kim *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2019; Croze *et al.*, 2016; Pakzad *et al.*, 2010). しかし, 浮遊培養において ROCK 阻害剤が凝集後の細胞集塊挙動に与える影響は明らかにされていない.

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反応速度論的に解析することである. この目的を達成するために, 細胞集塊形成の性質が異なる 2 種類の細胞株 (Tic 株と 1383D2 株) を使用する. Tic 株は生後 14 週の男児のヒト胎児肺細胞由来, 1383D2 株は 36 歳の男性の末梢血由来である (Nakagawa *et al.*, 2014). 2 種類の細胞株の細胞集塊形成において, 浮遊培養において細胞から分泌される ECM の生成量が高くなることで, 大きな球状の細胞集塊が形成される (Kim *et al.*, 2019). そこで, ROCK 阻害剤が 2 種類の異なるヒト iPS 細胞の集塊挙動 (細胞分裂, 集塊合一, 集塊崩壊) に与える影響について検討した.

## 2.2 実験材料および方法

### 2.2.1 ヒト iPS 細胞の維持培養

ヒト iPS 細胞 (Tic 株と 1383D2 株) は, それぞれ JCRB 細胞バンク (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Osaka, Japan) と京都大学 iPS 細胞研究所 (Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Kyoto, Japan) (Nakagawa *et al.*, 2014) から入手した. ヒト iPS 細胞は, ラミニン 511-E8 フラグメント (iMatrix-511; Nippi, Inc., Tokyo, Japan) でコートしたポリスチレンプレートを用いて iPS/ES 細胞用未分化維持培地 (StemFit AK02N medium; Ajinomoto, Tokyo, Japan) で培養された.  $7.50 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>として単細胞播種し, ROCK 阻害剤である 10  $\mu$ M CultureSure Y-27632 (Fujifilm Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan) を用いて, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気下で培養した. その後, 24 h ごとに培地交換した.

### 2.2.2 ヒト iPS 細胞の浮遊培養

ヒト iPS 細胞の静置浮遊培養の実験概要を図 2.1 に示す. ヒト iPS 細胞の継代操作として, 播種してから培養面上で 96 h 培養した細胞に対し, 10  $\mu$ M で Y-27632 を溶解した 5 mM のエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (0.5 mmol/L EDTA/PBS solution; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を 10 min 処理した. その後, 10  $\mu$ M で Y-27632 を溶解した細胞剥離液 (TrypLE Select™; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を加えて 7 min 処理し, 細胞を培養面から剥離した. 回収した細胞懸濁液は 1000 rpm で 3 min 遠心分離を行った後, ピペッティング操作により細胞の単分散を行った. 静置浮遊培養では, 単細胞状態の細胞を低接着

性の 96-well V-bottom plate (Sumitomo Bakelite Co., Ltd. Tokyo, Japan) に, 10  $\mu\text{M}$  Y-27632 を含む懸濁液を  $2.00 \times 10^2$  cells/well で播種した. 播種後, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  の加湿雰囲気下で培養し (Sasano *et al.*, 2020), 培養開始時における培養時間  $t$  (h) を  $t=0$  として 24 h ごとに培地交換した. 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, ヒト iPS 細胞を ROCK 阻害剤に暴露しない培養方法を ROCK 阻害剤非暴露 (Without exposure to ROCK inhibitor) と定義した (Kim *et al.*, 2019; Nakagawa *et al.*, 2014). 一方,  $t = 120$  h まで ROCK 阻害剤に暴露する培養方法を ROCK 阻害剤暴露 (With exposure to ROCK inhibitor) と定義した.

ROCK 阻害剤の比較では ROCK1 阻害剤である 10  $\mu\text{M}$  Y-27632, ROCK2 阻害剤である 10  $\mu\text{M}$  Fasudil (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) および ROCK1/2 阻害剤である 10  $\mu\text{M}$  Thiazovivin (ReproCELL, Inc., Kanagawa, Japan) を用いて培養した. Y-27632 と Fasudil は滅菌水に, Thiazovivin は DMSO に濃縮した原液として予め調製した. ROCK 阻害剤の濃度検討において, Y-27632 では細胞集塊形成後, 2, 10, 20  $\mu\text{M}$  の濃度で検討し, Thiazovivin では細胞集塊形成後, 2, 4, 10  $\mu\text{M}$  の濃度で検討した.

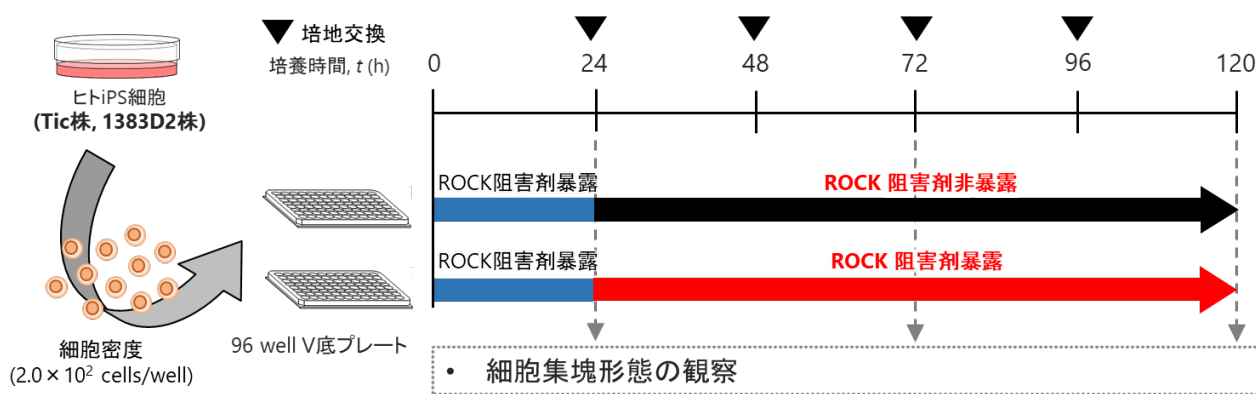


図 2.1 ROCK 阻害剤を用いたヒト iPS 細胞の静置浮遊培養実験の概要



培地交換時における液流が細胞集塊の崩壊を誘導する培養系として、培地交換装置 (Micronix, Kyoto, Japan) を用いて先行研究と同様に培養を行った (Kato *et al.*, 2019) (図 2.2). 単細胞状態の細胞を 96-well V-bottom plate に、 $10 \mu\text{M}$  Y-27632 を含む懸濁液を  $5.00 \times 10^2$  cells/well で播種した. 播種後,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  の加湿雰囲気下で培養し (Sasano *et al.*, 2020), 培養開始時における培養時間  $t$  (h) を  $t=0$  として 24 h ごとに培地交換した. 培地交換時には  $5.0 \times 10^1$  mm/s の流束で行った.  $2, 10 \mu\text{M}$  の濃度の Y-27632 を用いて検討を行った.

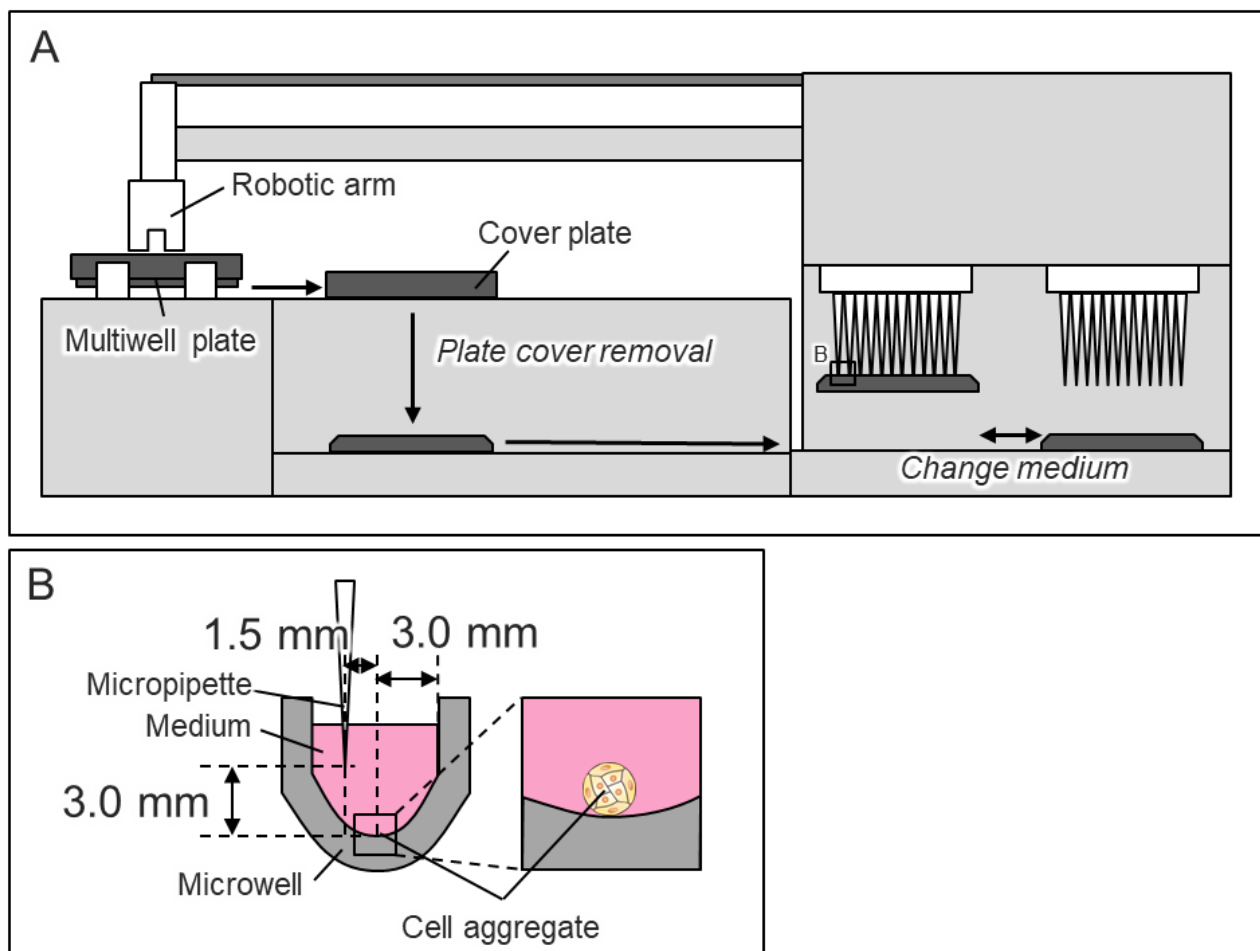


図 2.2 ヒト iPS 細胞集塊培養における機械式培地交換システム. (A) 培地交換装置 (B) 各 well へのマイクロピペット先端の挿入位置

また、懸濁浮遊培養の実験概要を図 2.3 に示す。懸濁浮遊培養では、30 mL の攪拌型懸濁バイオリアクター (BWV-S03A, Able Co., Tokyo, Japan) に 10  $\mu$ M Y-27632 を含む培地 30 mL に対して  $1.00 \times 10^5$  cells/mL の細胞密度で単細胞播種した。バイオリアクターの攪拌速度は 55 rpm に設定し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の加湿雰囲気下で培養した (Sasano *et al.*, 2020)。播種後、24 h ごとに培地交換した。ROCK 阻害剤暴露の条件では 10  $\mu$ M Y-27632 を用いた。

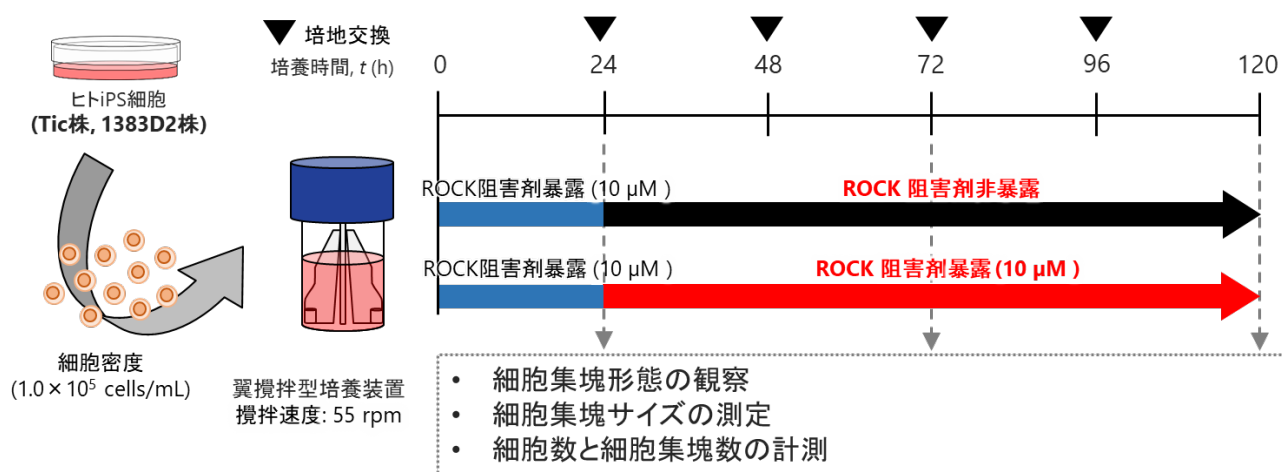


図 2.3 ROCK 阻害剤を用いたヒト iPS 細胞の懸濁浮遊培養実験の概要

### 2.2.3 タイムラプス観察

ヒト iPS 細胞の集塊合一に関するタイムラプス観察の実験概要を図 2.4 に示す。2 種類のヒト iPS 細胞株における細胞集塊同士の合一を明らかにするために、位相差顕微鏡 (BioStudio-T; Nikon Engineering, Co., Ltd., Kanagawa, Japan) を用いて、静置浮遊培養で 2 種類の細胞集塊同士の合一過程を観察した。96-well V-bottom plate に、10  $\mu$ M Y-27632 を含む懸濁液を  $2.00 \times 10^2$  cells/well で播種した。 $t = 24, 72, 120$  h に形成された細胞集塊を 2 つ回収し、96-well V-bottom plate の 1 well に再播種した。細胞集塊を再播種してから細胞集塊の合一を 4 $\times$ 対物レンズで観察

し、観察時間  $t_c$  (h) における観察開始時を  $t_c = 0$  として 20 min 間隔で  $t_c = 100$  min まで画像を取得した。

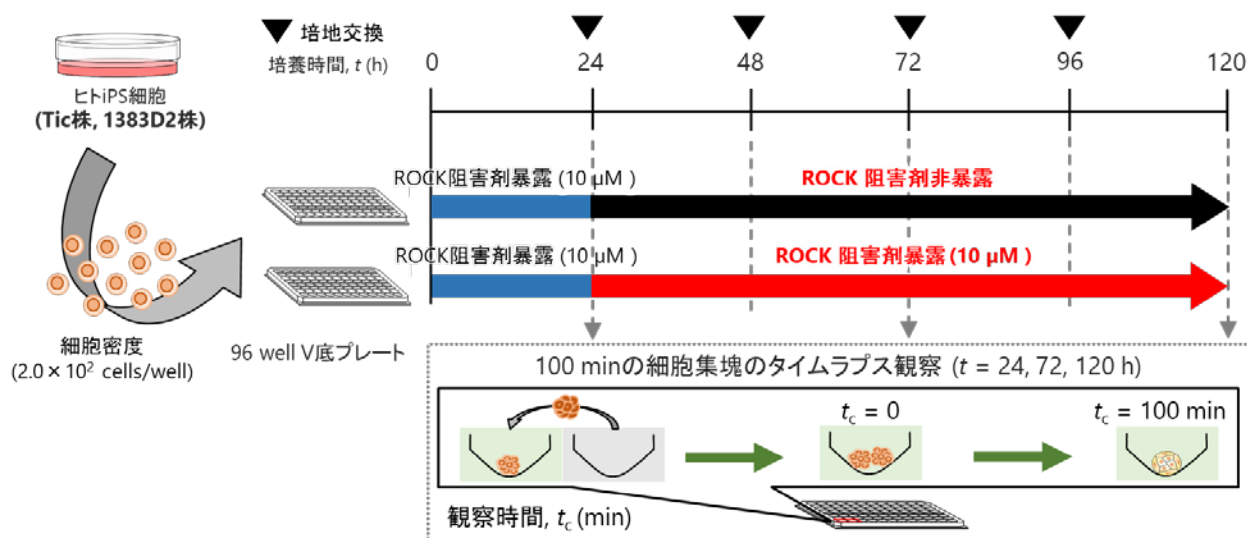


図 2.4 ROCK 阻害剤を用いたヒト iPS 細胞の集塊合一に関する実験の概要

## 2.2.4 ヒト iPS 細胞の増殖挙動の反応速度論的解析

細胞数を測定するために、異なる培養時間 ( $t = 24, 72, 120$  h) で細胞集塊を回収した。細胞集塊は PBS で洗浄し、 $10 \mu\text{M}$  ROCK 阻害剤を溶解した Accumax (Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA, USA) を用いて単細胞にした。単細胞状態のヒト iPS 細胞は、全自動セルカウンター (TC20, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) を用いて細胞数を計測した。浮遊培養における細胞集塊の反応速度論的解析のために、見かけの比増殖速度  $\mu^{\text{app}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) および見かけの細胞集塊数減少速度  $\eta_{\text{ag}}^{\text{app}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) は培養時間  $t$  (h) における細胞密度  $X$  (cells/mL) と細胞集塊数  $n_a$  (aggregates) を用いて以下のように算出した。

$$\mu^{\text{app}} = \frac{1}{X_t} \cdot \frac{dX_t}{dt} \quad (1)$$

$$\eta_{\text{ag}}^{\text{app}} = \frac{1}{n_a} \cdot \frac{dn_a}{dt} \quad (2)$$

懸濁浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の増殖過程において、見かけの比細胞増殖速度および見かけ比細胞集塊減少速度は以下の式で評価した (Hashida *et al.*, 2020).

$$\mu^{\text{app}} = \mu_g - k_d \quad (3)$$

$$\eta_{\text{ag}}^{\text{app}} = k_{\text{bu}} - k_{\text{coa}} \quad (4)$$

$\mu_g$  は比増殖速度 ( $\text{h}^{-1}$ ),  $k_d$  は比死滅速度 ( $\text{h}^{-1}$ ),  $k_{\text{bu}}$  と  $k_{\text{coa}}$  は細胞集塊の比分割速度と比合一速度 ( $\text{h}^{-1}$ ) である. 細胞集塊の投影面積  $S$  ( $\mu\text{m}^2$ ) は, 播種してから 24, 72, 120 h の細胞集塊を回収後, 既述のように測定した (Hashida *et al.*, 2020). 3 つの独立した実験において, 30 mL バイオリアクターから細胞集塊を含む培地 500  $\mu\text{L}$  を播種してから 24, 72, 120 h に採取し, 培地内の全細胞集塊の明視野画像を画像分析装置 (IN Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて撮影し,  $S = 3.00 \times 10^2 \mu\text{m}^2$  を超えるサイズの細胞集塊の数を計測した. すべての条件で 3 回独立した実験の数を合計し, 細胞集塊の投影面積の分布を作成した.

### 2.2.5 統計解析

すべての実験は, 標準偏差を含む平均値を示すために, 少なくとも独立した実験を 3 回行った. 統計解析は, 2 群間のデータ比較のために Student's *t*-test を使用して有意水準 5% として実施した. 細胞集塊サイズの分布に関するデータは, Shapiro-Wilk 検定を用いて正規性を評価した.

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 ROCK 阻害剤の暴露がヒト iPS 細胞集塊形態に与える影響

浮遊培養における 2 種類のヒト iPS 細胞の集塊形態に対する ROCK 阻害剤の効果を理解するために、ROCK 阻害剤を用いて静置浮遊培養した細胞集塊の形態を観察した。ROCK には ROCK1 と ROCK2 のアイソフォームがあり、高い相同性をもつが異なる表現型をしめすため (Coleman *et al.*, 2001; Sebbagh *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2005), それぞれのターゲット阻害剤である Y-27632, Fasudil および Thiazovivin を用いて検討を行った。ROCK1 の阻害剤である Y-27632 の非暴露と暴露の条件において 2 種類の異なるヒト iPS 細胞株間の細胞集塊の形態の差異を図 2.5 に示した。Tic 株の ROCK 阻害剤非暴露では、培養 24 h では 100  $\mu\text{m}$  の細胞集塊が形成され、サイズが徐々に大きくなり、120 h では 200  $\mu\text{m}$  の細胞集塊が形成された (図 2.5 A1-A3)。ROCK 阻害剤暴露では、72, 120 h までに 400  $\mu\text{m}$  のより大きな球状の細胞集塊が形成された (図 2.5 A4-A6)。1383D2 株の ROCK 阻害剤非暴露では、72, 120 h にかけて 300  $\mu\text{m}$  の球状の細胞集塊が形成された (図 2.5 B1-B3)。ROCK 阻害剤暴露では、72, 120 h にかけて 400  $\mu\text{m}$  のより大きな球状の細胞集塊が形成された (図 2.5 B4-B6)。1383D2 株の細胞集塊はアポトーシス細胞の多い Tic 株の小さく歪な細胞集塊より大きく、ROCK 阻害剤暴露は両細胞株において大きな球状の細胞集塊を形成させた。ROCK2 の阻害剤である Fasudil (図 2.5 A7-A12, B7-B12) も同様の効果が観察された。ROCK1/2 の阻害剤である Thiazovivin では、Tic 株の ROCK 阻害剤非暴露では、培養 120 h まで細胞集塊が形成されなかった (図 2.5 A13-A15)。ROCK 阻害剤暴露では、培養 120 h までに 50  $\mu\text{m}$  の細胞集塊が形成された (図 2.5 A16-A18)。これにより、Y-

27632 は細胞集塊の崩壊を抑制し、球状の細胞集塊を形成させた。1383D2 株の ROCK 阻害剤非暴露では、72, 120 h にかけて 50  $\mu\text{m}$  の球状の細胞集塊が形成された (図 2.5 B13-B15)。ROCK 阻害剤暴露では、72, 120 h にかけて 200  $\mu\text{m}$  のより大きな球状の細胞集塊が形成された (図 2.5 B16-B18)。このことから、全ての ROCK 阻害剤は細胞集塊の形態に影響を与えることが示唆された。

次に、浮遊培養における 2 種類のヒト iPS 細胞集塊の形態に対する ROCK 阻害剤の濃度依存性を理解するために、静置浮遊培養した 2 種類の異なる細胞株間の集塊形態の差異を図 2.6 に示した。Tic 株において、Y-27632 が 0 の濃度の時、播種してから 24 h までに 100  $\mu\text{m}$  の細胞集塊が形成され、サイズが徐々に大きくなり、120 h までに 200  $\mu\text{m}$  の小さく歪な細胞集塊が形成された (図 2.6 A1-A3)。また、培養 120 h において Y-27632 が 2  $\mu\text{M}$  の濃度では 300  $\mu\text{m}$  の球状の細胞集塊が形成され、Y-27632 が 10, 20  $\mu\text{M}$  の濃度では 400  $\mu\text{m}$  の球状の細胞集塊が形成された (図 2.6 A4-A12)。また 1383D2 株において、Y-27632 が 0 の濃度の時、播種してから 24 h までに 100  $\mu\text{m}$  の細胞集塊が形成され、サイズが徐々に大きくなり、120 h までに 300  $\mu\text{m}$  の球状の細胞集塊が形成された (図 2.6 B1-B3)。ROCK 阻害剤が 2  $\mu\text{M}$  以上の濃度の時、500  $\mu\text{m}$  の球状の細胞集塊が形成された (図 2.6 B4-B12)。次に Tic 株において、Thiazovivin が 0, 2, 4  $\mu\text{M}$  の濃度の時、播種してから 24 h までに細胞集塊が形成されなかった (図 2.6 A13-A21)。また、Thiazovivin が 10  $\mu\text{M}$  の濃度では  $t = 120$  h において 50  $\mu\text{m}$  の球状の細胞集塊が形成された (図 2.6 A22-A24)。また 1383D2 株において、Thiazovivin が 0, 2, 4  $\mu\text{M}$  の濃度の時、播種してから 24 h までに 50  $\mu\text{m}$  の細胞集塊が形成され、120 h まで維持された (図 2.6 B13-B18)。Thiazovivin が 4  $\mu\text{M}$  の

時,  $t = 120$  h において  $100 \mu\text{m}$  の歪な形状の細胞集塊が形成された (図 2.6 B19-B21).  $10 \mu\text{M}$  の時,  $t = 120$  h において  $200 \mu\text{m}$  の球状の細胞集塊が形成された (図 2.6 B22-B24). どちらの株でも ROCK 阻害剤の濃度が  $10 \mu\text{M}$  において, ROCK 阻害剤暴露では非暴露よりも大きな球状の細胞集塊が形成された. このことから, ROCK 阻害剤は濃度依存的に細胞集塊の形態に影響を与えることが示唆された. これにより, ターゲットに関わらず ROCK 阻害剤は細胞集塊に対して同様の効果がみられたため, ROCK 阻害剤として代表的に Y-27632 を用いた.

細胞集塊崩壊に対する ROCK 阻害剤の影響を確認するために, 液流れによる細胞集塊崩壊を促す培養系に対して ROCK 阻害剤に暴露することで確認を行った. ROCK 阻害剤の非暴露と暴露の条件において Tic 株の細胞集塊の形態の差異を図 2.7 に示した. Tic 株の ROCK 阻害剤非暴露では, 培養 24 h では  $100 \mu\text{m}$  の細胞集塊が形成され, サイズが徐々に大きくなり,  $t = 120$  h では  $200 \mu\text{m}$  の歪な形状の細胞集塊が形成された. また, 細胞集塊周辺には単細胞状態の細胞が観察された.  $t = 72$  h の培地交換前から細胞集塊の表面から突出している細胞が観察された.  $2 \mu\text{M}$  の ROCK 阻害剤暴露では, 120 h までに  $300 \mu\text{m}$  の歪な形状の細胞集塊が形成された.  $t = 96$  h の培地交換前から細胞集塊表面から突出した細胞はなく, 変形していた.  $10 \mu\text{M}$  の ROCK 阻害剤暴露では, 120 h までに  $500 \mu\text{m}$  の球状の細胞集塊が形成された. これにより, ROCK 阻害剤の暴露は濃度依存的に細胞集塊崩壊を抑制し, 球状の細胞集塊を形成させることを示唆した.

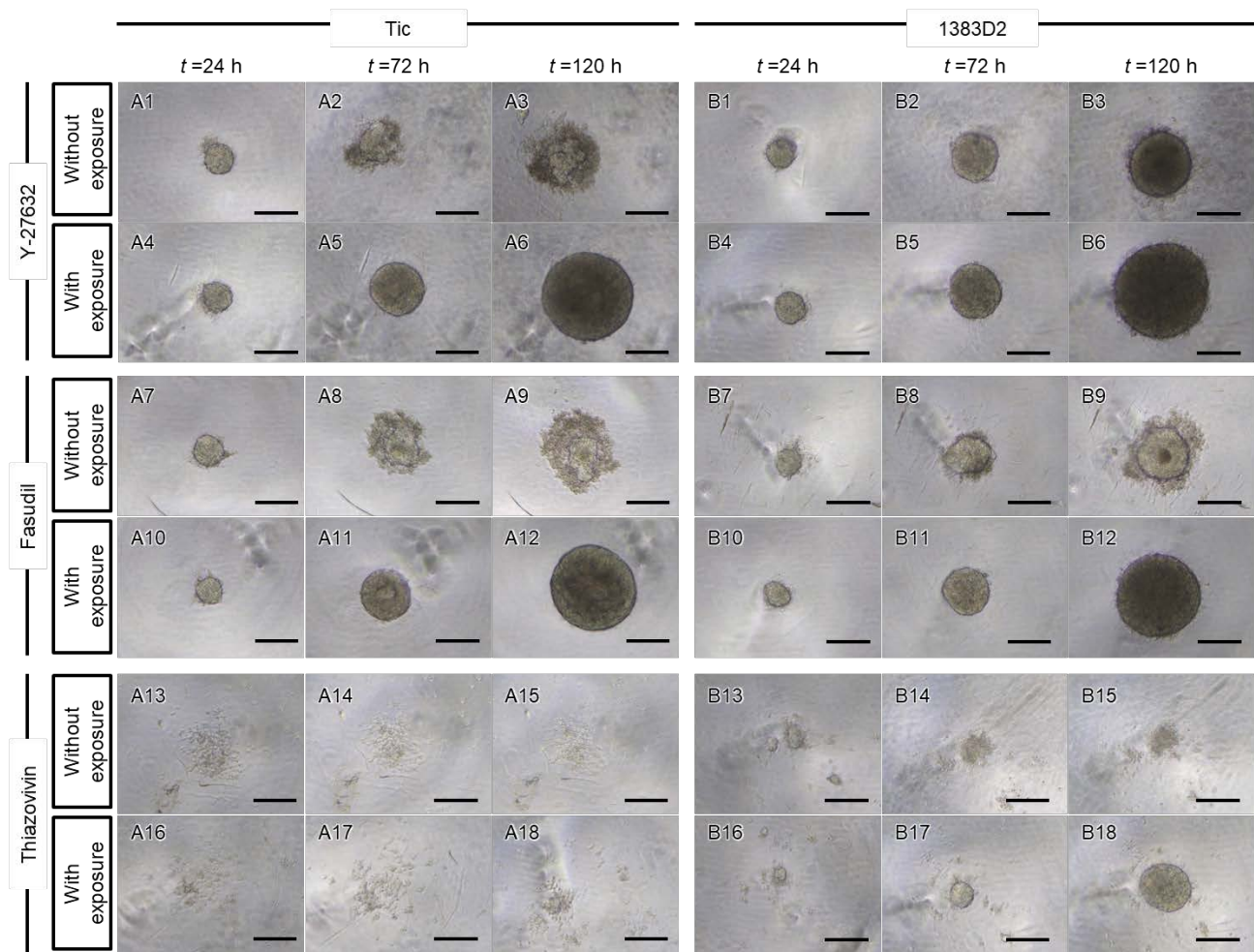


図 2.5 静置浮遊培養における ROCK 阻害剤が 2 種類のヒト iPS 細胞株 (A, Tic; B, 1383D2) の細胞集塊形態に与える影響. 細胞集塊は ROCK 阻害剤である Y-27632 (A1-6, B1-6), Fasudil (A7-12, B7-12), および Thiazovivin (A13-18, B13-18) に非暴露および暴露して培養された. スケールバー; 200  $\mu$ m



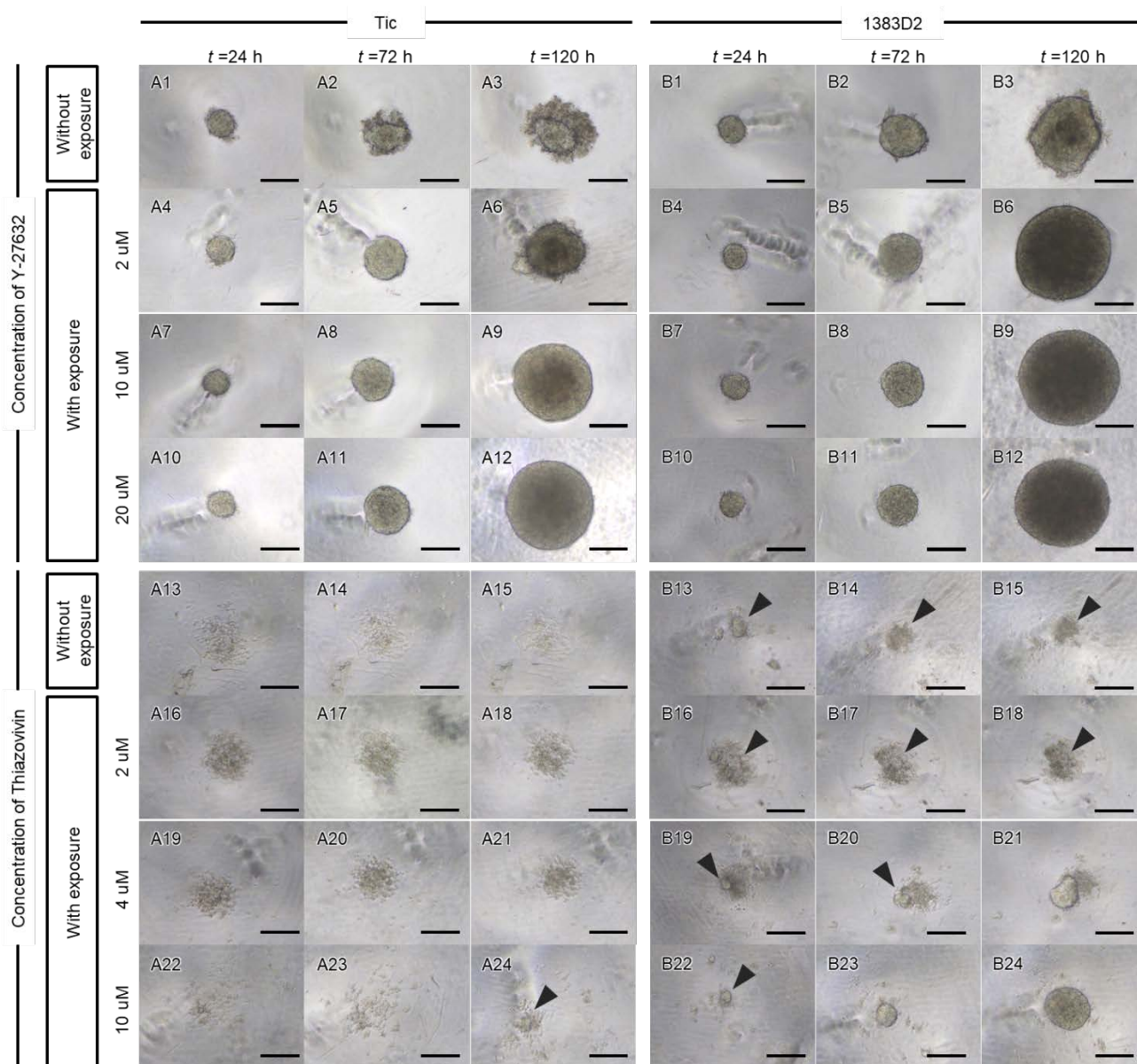


図 2.6 静置浮遊培養において ROCK 阻害剤 (Y27632, Thiazovivin) が 2 種類のヒト iPS 細胞株 (A, Tic; B, 1383D2) の細胞集塊形態に与える濃度依存的な影響. Y27632 の濃度は 0 (A1-3, B1-3), 2  $\mu$ M (A4-6, B4-6), 10  $\mu$ M (A7-9, B7-9), 20  $\mu$ M (A10-12, B10-12) で, Thiazovivin の濃度は 0 (A13-15, B13-15), 2  $\mu$ M (A16-18, B16-18), 4  $\mu$ M (A19-21, B19-21), 10  $\mu$ M (A22-24, B22-124) である. 黒三角は 50  $\mu$ m の細胞集塊を示す. スケールバー; 200  $\mu$ m

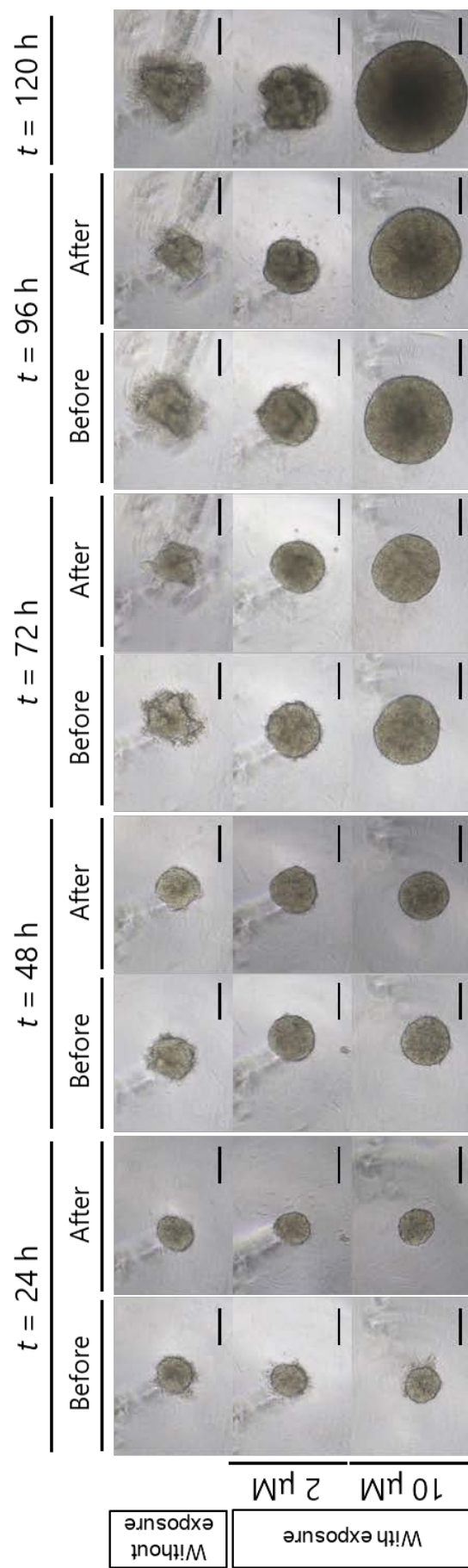


図 2.7 集塊崩壊する系における ROCK 阻害剤に暴露した Tic 株の細胞集塊形態に与える濃度依存的な影響. Before は培地交換前;

After は培地交換後を示す. スケールバー; 200  $\mu\text{m}$

### 2.3.2 ROCK 阻害剤の暴露がヒト iPS 細胞の増殖に与える影響

懸濁浮遊培養での 2 種類のヒト iPS 細胞の増殖過程における ROCK 阻害剤の暴露依存性の違いを調べるために、30 mL バイオリアクターにヒト iPS 細胞を播種した。図 2.8 と図 2.9 に ROCK 阻害剤の非暴露および暴露における 2 種類の異なる細胞株間の細胞集塊形態および細胞増殖の違いを示した。すべての条件において培養 24 h で細胞集塊が観察され、120 h までに細胞集塊が徐々に大きくなった。ROCK 阻害剤の非暴露において細胞集塊の形態とサイズを比較すると、1383D2 株は Tic 株よりも大きな球状の細胞集塊を形成した (図 2.8 A1-A3, B1-B3)。ROCK 阻害剤の暴露では、どちらの細胞株もより大きな球状の細胞集塊を形成し、1383D2 株の 120 h においてより大きな細胞集塊が形成された (図 2.8 A4-A6, B4-B6)。Tic 株の ROCK 阻害剤の非暴露における見かけの比増殖速度 ( $\mu^{\text{app}}$ ) は  $(9.51 \pm 4.05) \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  であり、 $(1.73 \pm 0.63) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  である。1383D2 株の  $\mu^{\text{app}}$  よりも低い値であった。Tic 株の ROCK 阻害剤の暴露における  $\mu^{\text{app}}$  の値は  $(2.86 \pm 0.86) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  であり非暴露の  $\mu^{\text{app}}$  よりも高くなり、最終到達細胞密度は非暴露の 5.93 倍であった (図 2.9 A1, A2)。1383D2 株の ROCK 阻害剤の非暴露における  $\mu^{\text{app}}$  値は  $t = 72\text{-}120 \text{ h}$  で  $(6.96 \pm 0.77) \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  と徐々に減少したが、暴露における  $\mu^{\text{app}}$  値は  $t = 24\text{-}72 \text{ h}$  で  $(2.67 \pm 0.90) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  ,  $t = 72\text{-}120 \text{ h}$  で  $(2.87 \pm 0.27) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  と培養中高い値で維持された (図 2.9 B1)。また、ROCK 阻害剤暴露の最終到達細胞密度は非暴露と比較して 4.17 倍となった (図 2.9 B2)。また、2 種類のヒト iPS 細胞株において ROCK 阻害剤の暴露では、非暴露で形成された細胞集塊と比較して細胞密度は高くなった一方で細胞集塊数は変化しなかった (図 2.9 A3-4, B3-4)。

図 2.10 は全てのサイズの細胞集塊に対する各サイズの細胞集塊の頻度(-)を示したヒストグラ

ムを示した. 細胞集塊のサイズ分布は,  $3.00 \times 10^2 \mu\text{m}^2$  から  $2.55 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  までの範囲とした.  $2.55 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  より大きい細胞集塊は各ヒストグラムの右側に示した. Tic 株において ROCK 阻害剤の非暴露では 120 h まで分布モードが  $2.25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  で維持していたが, ROCK 阻害剤暴露では 120 h のヒストグラムのモードが非暴露よりも高い値 ( $8.25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ) であり, 幅広いヒストグラムであった (図 2.10 A1-6). Tic 株において ROCK 阻害剤は大きな細胞集塊を誘導した. 1383D2 株において ROCK 阻害剤の非暴露は 24 h から 120 h までヒストグラムのモードが増加した (120 h のモード:  $8.25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ). ROCK 阻害剤暴露では 120 h の細胞集塊が  $1.50 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  から  $9.00 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  の範囲に存在し, より大きな細胞集塊は  $1.20 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  から  $2.55 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  の範囲に均一に分布した. また,  $2.55 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  よりもはるかに大きな細胞集塊が存在した (図 2.10 B1-6). ROCK 阻害剤暴露の細胞集塊は 120 h では 72 h のヒストグラムの 2 倍以上の細胞集塊が確認された (図 2.10 B6). 1383D2 株の ROCK 阻害剤非暴露では, Tic 株と同様に 24 h から 72 h まで右裾が長い分布が形成された. 1383D2 株の ROCK 阻害剤暴露では, 非暴露と比較して 2 種類の平坦な分布が形成された. これらの結果から ROCK 阻害剤の暴露により細胞集塊同士の合一を促進する可能性を示した.

さらに, ROCK 阻害剤の暴露が細胞集塊同士の合一に与える影響を確認するために, プレートの 1 well 内に存在する ROCK 阻害剤の非暴露および暴露した 2 つの細胞集塊の挙動をタイムラプス観察により評価した (図 2.11). 2 種類のヒト iPS 細胞株において  $t = 24 \text{ h}$  に形成された細胞集塊同士の合一は  $t_c = 20 \text{ min}$  から開始した. ROCK 阻害剤の非暴露において, どちらの株も  $t = 72, 120 \text{ h}$  に形成された細胞集塊同士の合一は  $t_c = 1440 \text{ min}$  まで開始されなかった (図 2.11 A2, A3,

B2, B3). 一方で, ROCK 阻害剤の暴露において, どちらの株も  $t = 72, 120$  h に形成された細胞集塊同士の合一は  $t_c = 20$  min から開始された (図 2.11 A5, A6, B5, B6) .  $t = 72$  h に形成された細胞集塊同士の合一は  $t_c = 1440$  min までに一つの球状が形成された (図 2.11 A5-3, A6-3, B5-3, B6-3). また, これらの結果から, ROCK 阻害剤の暴露により, 細胞集塊の合一開始がより早くなることが示された.

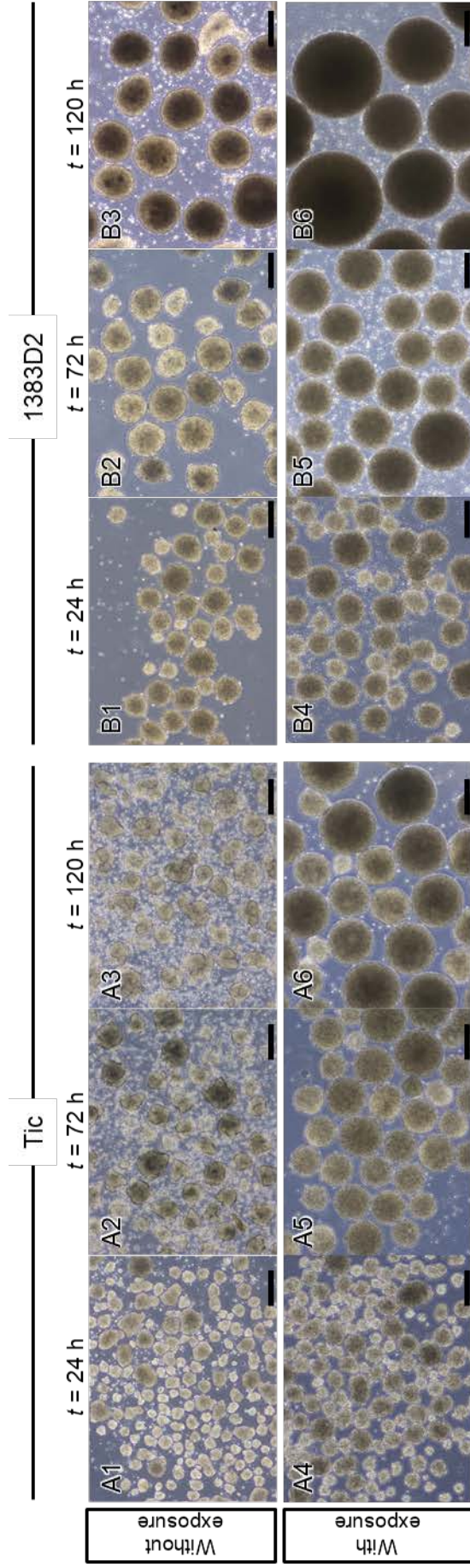


図 2.8 懸濁浮遊培養における ROCK 阻害剤に非暴露および暴露および暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞株 (A, Tic; B, 1383D2) の細胞

集塊形態に与える影響. スケールバー; 200  $\mu\text{m}$

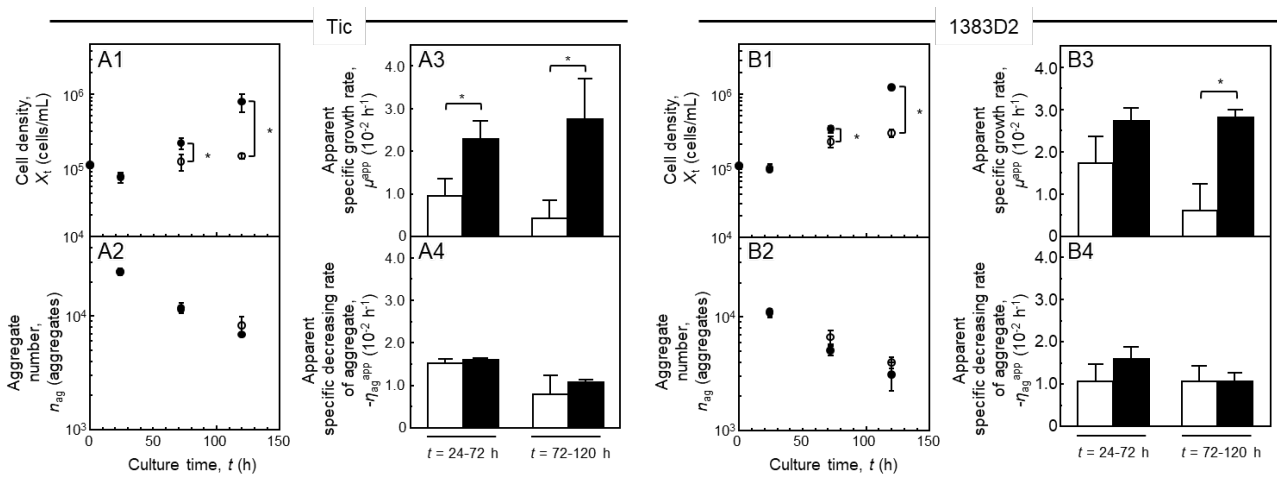
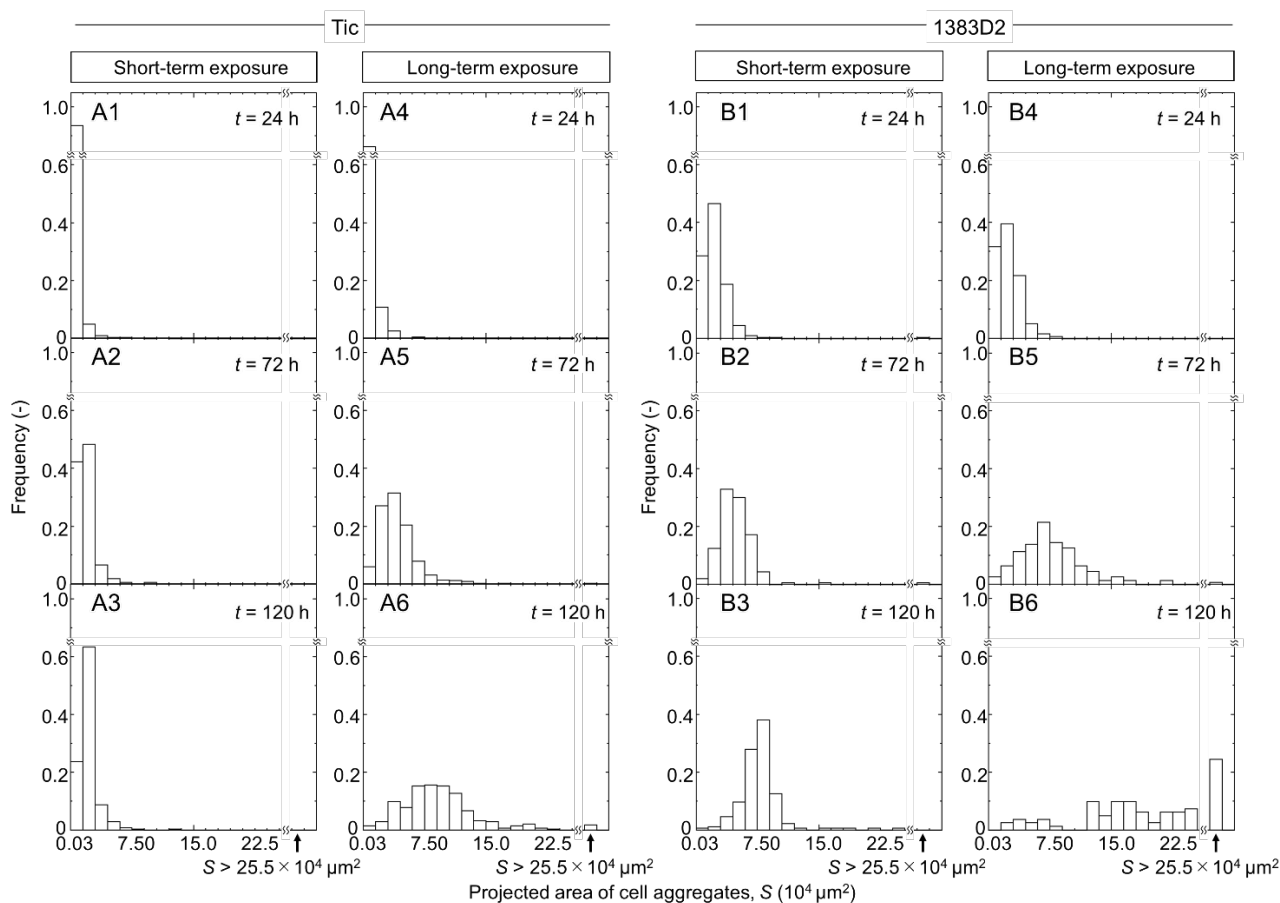


図 2.9 懸濁浮遊培養における ROCK 阻害剤に非暴露および暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞株 (A, Tic; B, 1383D2) の細胞密度および細胞集塊数に与える影響. A1-4, B1-4 に細胞密度, 細胞集塊数, 見かけの比増殖速度, 見かけの比細胞集塊減少速度を示す. エラーバーは標準偏差を示し, 有意性は Student's *t*-tests により分析した  $*p < 0.05$  ( $n = 3$  per culture). 白丸と白バーは ROCK 阻害剤の非暴露; 黒丸と黒バーは ROCK 阻害剤の暴露を示す.



**図 2.10** 懸濁浮遊培養における ROCK 阻害剤に非暴露および暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞株 (A, Tic; B, 1383D2) の  $t = 24, 72, 120$  h の投影面積分布 (A1-6, B1-6).  $0-3.00 \times 10^2 \mu\text{m}^2$  は細胞集塊とみなさない.  $25.5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  より大きな細胞集塊のグラフはヒストグラムの右側にまとめた (A1-B6). すべての分布は Shapiro-Wilk test を用いて正規分布でないことを確認した ( $p < 0.05$ ).



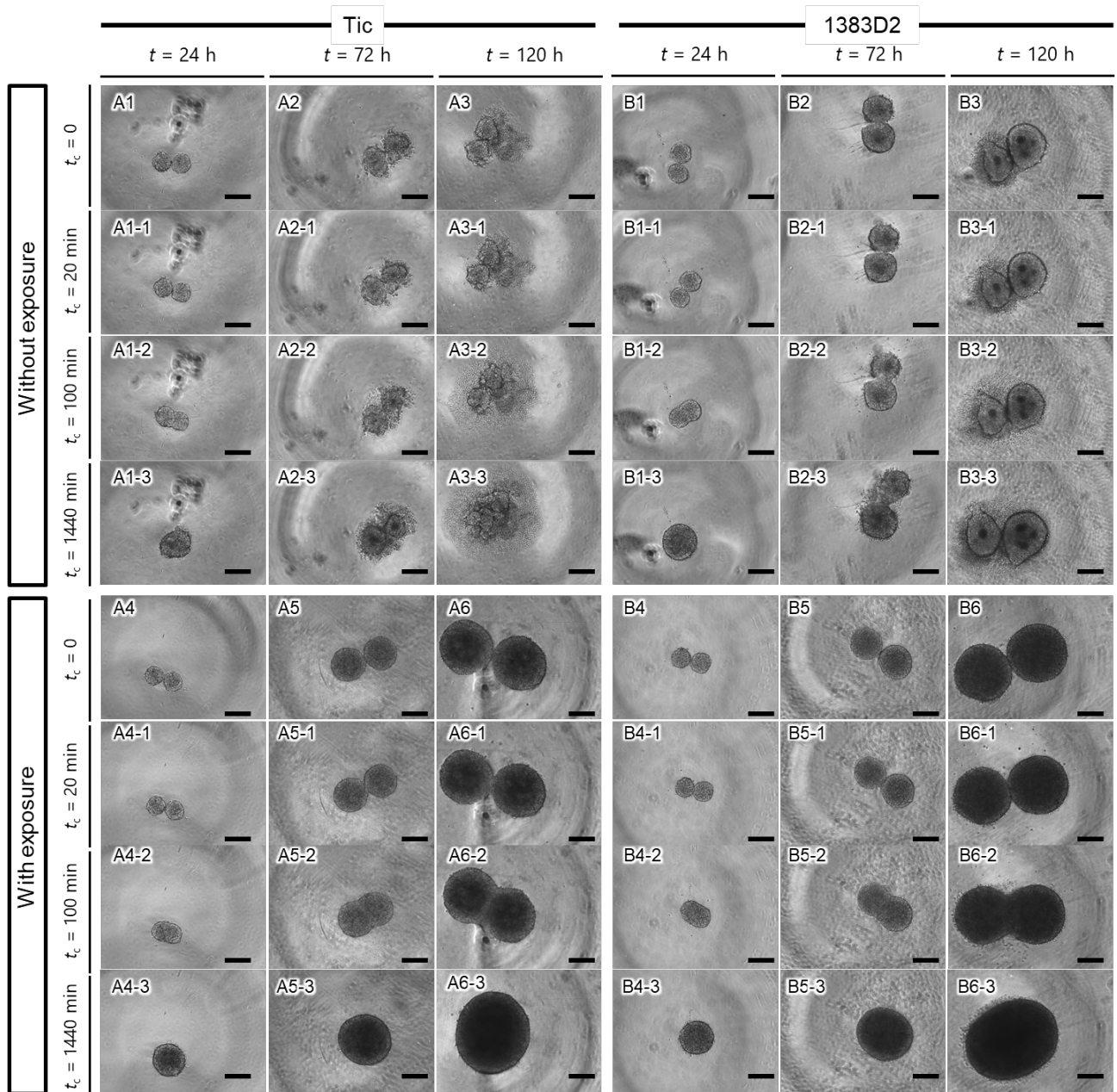


図 2.11 静置浮遊培養において  $t = 24, 72, 120\text{ h}$  に形成された ROCK 阻害剤に非暴露および暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞集塊 (A, Tic; B, 1383D2) の合一の観察. A1-1-B6-1 は  $t_c = 20\text{ min}$  での画像, A1-2-B6-2 は  $t_c = 100\text{ min}$  での画像, A1-3-B6-3 は  $t_c = 1440\text{ min}$  での画像を示す. スケールバー;  $200\text{ }\mu\text{m}$

## 2.4 考察

ROCK 阻害剤による細胞増殖に有益な治療法がいくつか報告されているが (Evers *et al.*, 2001; Croze *et al.*, 2016; Pakzad *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018), 浮遊培養における凝集後のヒト iPS 細胞の集塊挙動に対する影響を検討した研究はない. そこで, 本研究では, 懸濁浮遊培養において ROCK 阻害剤の暴露が培養系における細胞集塊挙動の頻度を定量的に明らかにするために, 反応速度論的解析を行った (図 2.12). 本章の目的は, ROCK 阻害剤の暴露による細胞集塊の挙動への影響に対して反応速度論的解析を用いて明らかにすることで, ヒト iPS 細胞の集塊挙動における ROCK 阻害剤の効果を理解することである. その結果, 集塊崩壊, 細胞分裂, 集塊合一といった集塊形成のためのヒト iPS 細胞の集塊挙動が ROCK 阻害剤により変化することを見出した. 本章では細胞集塊を形成する対照的な 2 種類のヒト iPS 細胞株を用いて検討を行った (図 2.13).

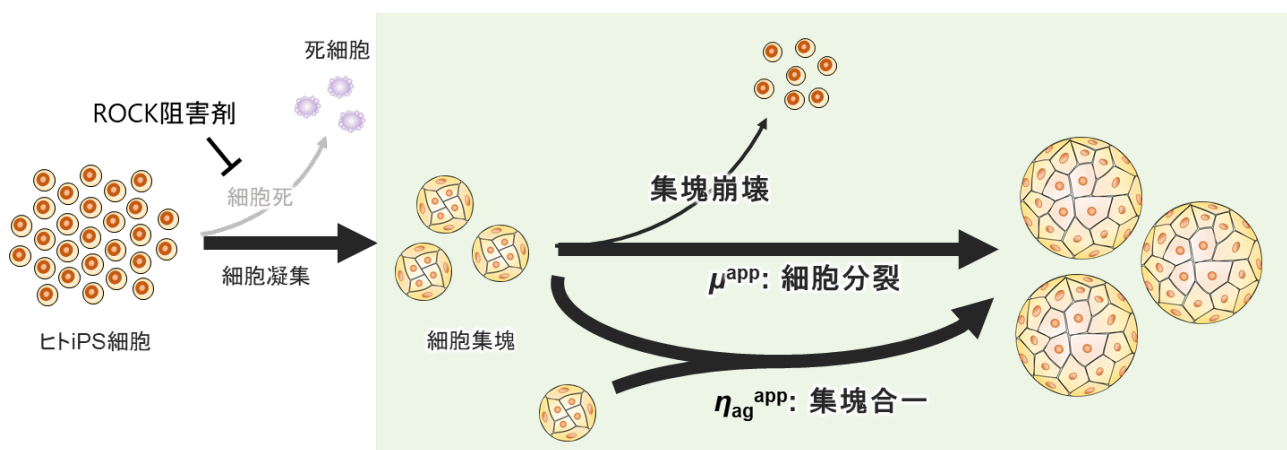


図 2.12 懸濁浮遊培養におけるヒト iPS 細胞の集塊挙動の反応速度

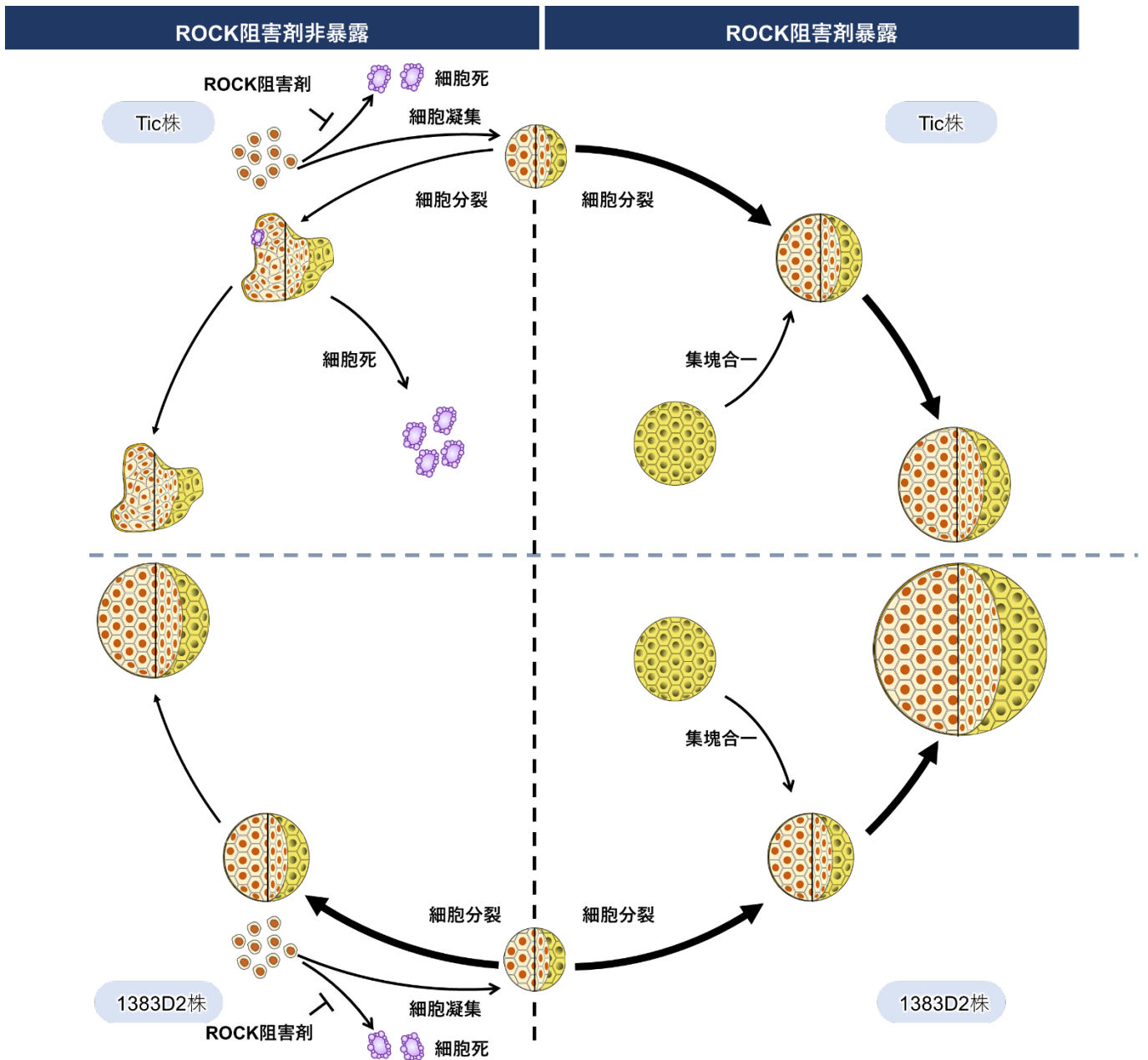


図 2.13 懸濁浮遊培養における ROCK 阻害剤に非暴露および暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞株 (Tic 株と 1383D2 株) の集塊挙動の概念図

ROCK 阻害剤が細胞集塊の形態に与える影響を調べるために、異なるターゲットの ROCK 阻害剤である Y-27632, Fasudil と Thiazovivin に暴露すると、Tic 株と 1383D2 株のどちらも濃度依存的に大きく球状の細胞集塊を形成され、周囲部に単細胞が少なくなった (図 2.5, 図 2.6). よっ

て、ROCK の相同性であり異なる機能を持つ ROCK1 (Coleman *et al.*, 2001) と ROCK2 (Sebbagh *et al.*, 2005) のどちらも細胞集塊の形態に影響を及ぼすことが示唆された。また、ROCK1 と ROCK2 は細胞分裂における収縮環であるアクチンミオシンを誘導するため (Robinson and Spudich, 2000), ROCK1/2 阻害剤である Thiazovivin は細胞-細胞間接着後の細胞増殖を低下させ、細胞集塊の形成を抑制したと考えられる。一方、Thiazovivin を暴露することで細胞集塊が形成されており、ROCK 阻害剤によって細胞基質間接着による細胞分裂することが分かっており (Kanada *et al.*, 2005), Thiazovivin によってアクチンミオシン依存ではなく細胞基質間接着依存で細胞増殖が促進すると考えられた。よって、ROCK の相同性に関わらず ROCK 阻害剤を暴露することで細胞集塊の形態を維持すると示唆された。また、細胞集塊が崩壊する系において、ROCK 阻害剤の暴露によって両株のヒト iPS 細胞集塊が変形し、非暴露と比較して異なる集塊崩壊の形態を示していた (図 2.7)。ROCK 阻害剤暴露することで細胞集塊が変形し、細胞集塊の周囲に単細胞状態の細胞が減少したことは、培養系に ROCK 阻害剤を暴露することで細胞集塊からの単細胞の放出を抑制し (Kato *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2019), 細胞集塊の崩壊を抑制すると考えられた。そのため、ROCK 阻害剤は Rho-ROCK 経路を通して集塊形態を維持すると示唆された。

次に ROCK 阻害剤の暴露が培養系における細胞集塊挙動の頻度に与える影響を定量的に明らかにするために、集塊挙動に対する反応速度論的解析を行った。細胞集塊を形成する対照的な 2 種類のヒト iPS 細胞株間における細胞集塊の挙動について比較した。1383D2 株の見かけの比増殖速度は Tic 株よりも高くなった一方で、両株において見かけの比細胞集塊減少速度に変化はなかった (図 2.8)。これにより、1383D2 株は Tic 株と比較して細胞集塊サイズが増大しており

(図 2.9), 細胞集塊サイズの増大は見かけの比増殖速度と見かけの比細胞集塊数減少速度によって構成されていることから (Hashida *et al.*, 2020), 細胞増殖によって細胞集塊が増大していると示唆された. Tic 株の細胞集塊は 1383D2 株よりも液流れによって細胞集塊が変形しやすく単細胞が多くみられる (Kato *et al.*, 2019). このような細胞集塊の形態変化は液流によって引き起こされる ECM の破壊によってアクチンが影響を受け, 細胞集塊を形成する能力が変化することを示していた (Kato *et al.*, 2019; Tsai *et al.*, 2015). また, 先行研究から ECM の分泌能が低いことで細胞集塊の周囲部から剥離する細胞の頻度が高くなっており (Kim *et al.*, 2019), Tic 株の細胞集塊の形態は歪であり, 単細胞が多数みられたことから比死滅速度が高くなると考えられた. 一方, 1383D2 株では培養後期に細胞集塊の見かけの比増殖速度が低下しており, これは分泌された ECM によって形成される collagen type I の殻様構造による細胞集塊内部の圧迫が接触阻害を引き起こしているためと考えられる (Nath *et al.*, 2017). 以上のことから, 細胞生存と増殖には十分な ECM 生成量が必要である一方で, 分泌された ECM は細胞集塊表面上に collagen type I の殻様構造を形成し, 細胞増殖の低下を促す可能性がある.

次に ROCK 阻害剤の暴露が懸濁培養における細胞集塊の挙動に与える影響について比較した. ROCK 阻害剤の暴露によって, 細胞集塊の形態とサイズから細胞集塊の挙動について 2 種類のヒト iPS 細胞株間で異なることが分かった. ヒト iPS 細胞の両株において, ROCK 阻害剤に暴露した細胞集塊は, 非暴露の細胞集塊と比較して高い増幅率と見かけの比増殖速度を示した. さらに, 1383D2 株では ROCK 阻害剤の非暴露の条件では見かけの比増殖速度が培養後期になると徐々に低下したが, ROCK 阻害剤暴露では見かけの比増殖速度が維持された (図 2.8, 図 2.9).

ROCK 阻害剤の暴露において安定した細胞集塊が形成された。ROCK 阻害剤は細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) 経路を活性化することにより、細胞増殖および分化を制御することが示されている (Wang *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018)。また、ROCK 阻害剤は p53 経路を介したヒト iPS 細胞の単細胞のアポトーシスを抑制することにより、細胞生存を促進すると考えられた (Gao *et al.*, 2019; Watanabe *et al.*, 2007; Coleman *et al.*, 2001; Okumura *et al.*, 2016; Setoguchi *et al.*, 2016; Okumura *et al.*, 2016)。したがって、ROCK 阻害剤は細胞シグナル伝達経路を制御することにより安定した細胞分裂を行うことができると考えられた。また、浮遊培養中における細胞集塊の増大に伴い、 $t = 120 \text{ h}$  における 1383D2 株では様々な大きさの細胞集塊が形成され、より大きな細胞集塊 ( $S > 2.55 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ) が形成されていた (図 2.10)。このような大きな細胞集塊の形成は細胞集塊同士の合一によって起きると考えられた。細胞集塊同士の合一は、細胞集塊のサイズが大きいほど集塊同士の合一速度は低くなることが分かっている (Adam *et al.*, 2009)。しかし、ROCK 阻害剤に暴露した細胞集塊は合一開始までの時間が速く (図 2.11)、細胞集塊同士の合一は促進されていると考えられた。細胞集塊の合一は細胞-基質間接着や細胞-細胞間接着した後、遊走することで行われる (Stephen *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2015; Sébastien *et al.*, 2013)。そのため、ROCK 阻害剤は細胞-基質間接着と遊走の促進がされるため、ROCK 阻害によって細胞集塊同士の合一が促進されると考えられる。したがって、ROCK 阻害剤は集塊崩壊を抑制することで細胞分裂を維持し、細胞集塊同士の合一が促進されることが示唆された。

## 2.5 小括

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 阻害剤に暴露することで、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 経路の阻害が集塊形態を維持し、細胞増殖を促進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 阻害剤に暴露することで  $t = 24-72$  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 阻害剤に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 阻害剤に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、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 ROCK 阻害剤添加したヒト iPS 細胞集塊の構造特性の解明

#### 3.1 緒言

浮遊培養によって形成されるヒト iPS 細胞集塊は接着分子がもたらす生化学的な作用や細胞骨格による力学的な作用によって構成されている (Wang *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018; Boot *et al.*, 2021). 細胞集塊内部において細胞-細胞間接着や細胞-基質間接着は細胞集塊の形態に寄与することが分かっている (Shirinifard *et al.*, 2009). また, 細胞集塊内の ECM は細胞集塊の崩壊を抑制することが知られている (Kim *et al.*, 2019). このように細胞集塊内部の細胞挙動を制御し, 接着分子によるシグナル伝達を介して細胞集塊の形態や細胞機能を向上させることが知られている (Lin *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2017; Calori *et al.*, 2022). 一方, 接着分子に結合している細胞骨格は細胞挙動の制御に伴い再編成され, 細胞集塊内部に張力をもたらすことで細胞集塊の構造維持に寄与しており (Paszek *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2014), 細胞骨格と細胞集塊形態や細胞機能の関連性についての更なる理解が必要である. そこで, 前章では細胞骨格を制御する ROCK 阻害剤に着目したところ, ROCK 阻害剤に暴露することで細胞集塊形態と細胞分裂を維持することを見出し, これらの現象を支配する構造的な因子について詳細な研究が必要である.

本章の主な目的は, ヒト iPS の細胞集塊に対する ROCK 阻害剤の集塊崩壊抑制による細胞分裂維持に寄与する構造的な因子を明らかにすることである. この目的を達成するために, ECM の生成量が異なる 2 種類の細胞株 (Tic 株と 1383D2 株) を使用する. そこで, ROCK 阻害剤の効果を介して, 浮遊培養における 2 種類の異なるヒト iPS 細胞株における集塊形態と細胞増殖維持の機構に対する ROCK 経路の役割について検討した.



## 3.2 実験材料および方法

### 3.2.1 ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞 (Tic 株と 1383D2 株) は, それぞれ JCRB 細胞バンク (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) と京都大学 iPS 細胞研究所 (Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University) (Nakagawa *et al.*, 2014) から入手した. ヒト iPS 細胞は, ラミニン 511-E8 フラグメント (Nippi, Inc.) でコートしたポリスチレンプレートを用いて iPS/ES 細胞用未分化維持培地 (StemFit AK02N medium; Ajinomoto) で培養された. 単細胞を  $7.50 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> として播種し, ROCK 阻害剤である 10  $\mu$ M CultureSure Y-27632 (Fujifilm Wako Pure Chemical Corp.) を用いて, 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> の加湿雰囲気下で培養した. その後, 24 h ごとに培地交換した.

### 3.2.2 ヒト iPS 細胞の浮遊培養

ヒト iPS 細胞の懸濁浮遊培養を図 3.1 に示す. 浮遊培養の継代操作として, まず培養面上で 4 日間培養した細胞に対し, 10  $\mu$ M の Y-27632 を溶解した 5 mM のエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (0.5 mmol/L EDTA/PBS solution; Nacalai Tesque, Inc.) を 10 min 処理した. その後, 10  $\mu$ M の Y-27632 を溶解した細胞剥離液 (TrypLE Select<sup>TM</sup>; Thermo Fisher Scientific Inc.) を加えて 7 min 処理し, 細胞を培養面から剥離した. 回収した細胞懸濁液は 1000 rpm で 3 min 遠心分離を行った後, ピペッティング操作により細胞の単分散を行った. その後, 30 mL の攪拌型懸濁バイオリアクター (BWV-S03A, Able Co.) に 10  $\mu$ M の Y-27632 を含む培地 30 mL に対して  $1.00 \times 10^5$  cells/mL の細胞密度で単一細胞を播種した. バイオリアクター

の攪拌速度は 55 rpm に設定し、加湿雰囲気下 37°C で培養した (Sasano *et al.*, 2020). 播種後、24 h ごとに培地交換した. ROCK 阻害剤を  $t = 24$  h まで暴露後、ヒト iPS 細胞を ROCK 阻害剤に暴露しない培養方法を ROCK 阻害剤非暴露 (Without exposure to ROCK inhibitor) と定義した. 一方、 $t = 120$  h まで ROCK 阻害剤に暴露する培養方法を ROCK 阻害剤暴露 (With exposure to ROCK inhibitor) と定義した.

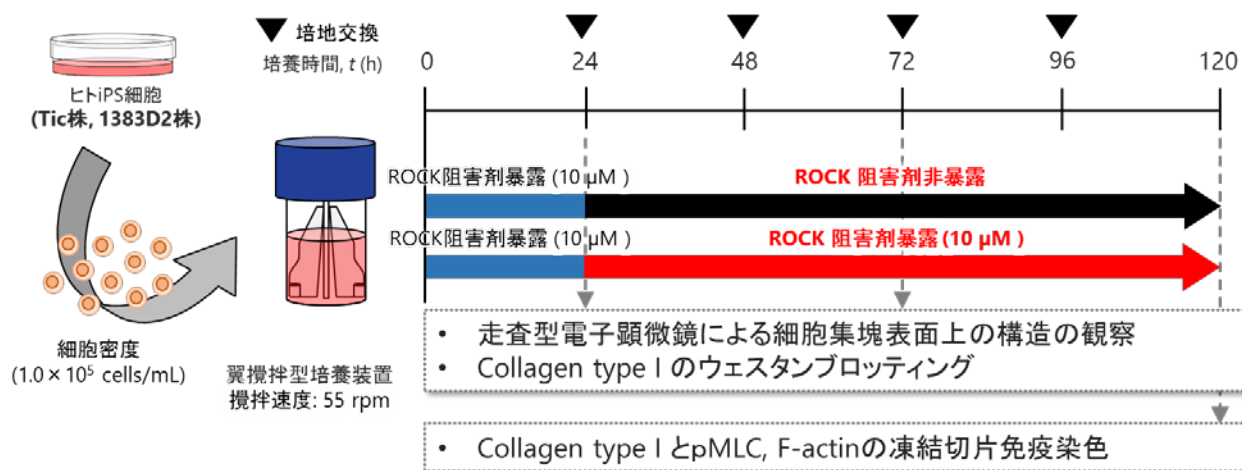


図 3.1 ROCK 阻害剤を用いたヒト iPS 細胞の浮遊培養実験の概要

### 3.2.3 凍結切片の作成と染色

クライオスタット (Leica CM1850; Leica, Wetzlar, Germany) を用いて凍結した細胞集塊を切断し、 $10 \mu\text{m}$  の厚さの細胞集塊の切片を作成した後、接着性スライドガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) に接着させた. 0.25% Triton X-100 を含む PBS に 5 min 浸した後、Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて非特異的タンパク質を 1 h ブロッキングし、一次抗体として collagen type I (Abcam, Cambridge, MA, USA) とリン酸化ミオシン軽鎖 (pMLC) 2 (Ser19) (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA) で  $4^\circ\text{C}$  にて一晩浸漬させ

た. その後, トリス緩衝液 (TBS)で洗浄し, Alexa Fluor 488 抗ウサギ抗体または Alexa Fluor 594 抗マウス抗体 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) で 1 h 免疫標識し, 細胞核と F-アクチンをそれぞれ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life Technologies) および rhodamine phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で染めた. 60×対物レンズを備えた共焦点レーザースキャン顕微鏡 (FV1000; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて, 488 - 594 nm の蛍光励起下で画像を取得した. 各画像は, 2×2 枚で (ROCK 阻害剤の暴露条件における Tic 株と ROCK 阻害剤の非暴露条件における 1383D2 株) および 3×3 枚で (ROCK 阻害剤の暴露条件における 1383D2 株) でタイリングされた.

### 3.2.4 走査型電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡の観察のために, 播種後  $t = 24, 72, 120$  h に回収した細胞集塊を 0.1M リン酸緩衝液 (PB) に対して 2%のグルタルアルデヒド (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) で試料を前固定し, PB で 4 °C 一晩静置した. 2%四酸化オスmium (Heraeus Chemicals, South Africa) で後固定を 4°C 2 h おこなった. その後, 細胞集塊を段階的にエタノール (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) で脱水し, t-ブチルアルコール (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) で凍結乾燥した. 脱水乾燥した細胞集塊をオスmiumプラズマイオンコーターで 20 nm でコーティングし, 走査型電子顕微鏡 (S-4800; Hitachi High-Tech America Inc., Schaumburg, IL, USA) で観察した.

### 3.3 実験結果

#### 3.1.1 ROCK 阻害剤に暴露した細胞集塊の collagen type I の生成量と collagen type I と pMLC の局在性

ROCK 阻害剤の暴露による細胞増殖と集塊同士の合一の促進と細胞集塊内の ECM の一種である collagen type I との関連性を検討した. ROCK 阻害剤に非暴露および暴露した培養における細胞集塊形成と産生された collagen type I との相関を調べるために, 細胞が産生する collagen type I を調べた. Western blotting を用いて  $t = 24, 72, 120$  h における collagen type I の生成量を評価し (図 3.2), 免疫蛍光染色を用いて  $t = 120$  h の細胞集塊における collagen type I の発現を評価した (図 3.3).

Tic 株において ROCK 阻害剤の非暴露では  $t = 24$  h で collagen type I は生成されており,  $t = 72, 120$  h に濃いバンドがみられたが ( $n = 2$ ),  $t = 72, 120$  h に薄いバンドもみられた ( $n = 2$ ). 同様に, ROCK 阻害剤の暴露でも,  $t = 72, 120$  h に濃いバンドがみられたが ( $n = 2$ ),  $t = 72, 120$  h に薄いバンドもみられた ( $n = 2$ ).  $t = 120$  h における ROCK 阻害剤暴露の collagen type I の生成量は非暴露と比較して有意差はないが平均を比較すると 2.10 倍高くなった. 1383D2 株において ROCK 阻害剤の非暴露では Tic 株と比較して collagen type I は変化なく,  $t = 72, 120$  h の生成量は  $t = 24$  h と比較して有意な差はなかった. ROCK 阻害剤の暴露では,  $t = 72, 120$  h の生成量は増加し,  $t = 120$  h において collagen type I の生成量は有意に増加した.  $t = 120$  h における ROCK 阻害剤暴露の collagen type I の生成量は非暴露と比較して 7.31 倍となった. したがって, ROCK 阻害剤の暴露は collagen type I の生成を促進させることが示唆された.

次に Collagen type I の生成量で変化がみられた  $t = 120$  h において collagen type I の局在を確認した。ROCK 阻害剤非暴露では, collagen type I は細胞株に関係なくヒト iPS 細胞集塊内部の全体に存在し, 特に細胞集塊縁周部に局在していた。2 種類の細胞株間で発現の違いを比較すると大きな球状の細胞集塊を形成する 1383D2 株では, Tic 株の小さく歪な細胞集塊における発現よりも, 細胞集塊内での collagen type I の局在が均一であった。また, 細胞株によらず ROCK 阻害剤暴露での collagen type I の発現は非暴露と同様に細胞集塊縁周部に局在していることが確認された。したがって, ROCK 阻害剤の暴露は細胞集塊内での collagen type I の局在に変化がないことが示唆された。

続いて, 細胞骨格であるアクチンミオシンの局在に影響を与えるかどうかを検討した (図 3.4)。そのため, ROCK 阻害剤の暴露によって F-actin と pMLC がどのように変化するかを調べた。ROCK 阻害剤非暴露では, Tic 細胞の小さく歪な細胞集塊は, 細胞集塊内の細胞間の境界で F-actin と pMLC が局在した。1383D2 株の大きな球状の細胞集塊全体の核間に F-actin と pMLC が局在し, 特に細胞集塊の縁周部でリング状に局在した。ROCK 阻害剤暴露では, 2 種類のヒト iPS 細胞株において細胞集塊全体の核間で F-actin が局在したが, 細胞集塊において大きな球状の細胞集塊全体で pMLC は発現しなかった。したがって, ROCK 阻害剤の暴露は細胞集塊内での pMLC の発現を抑制することが示唆された。

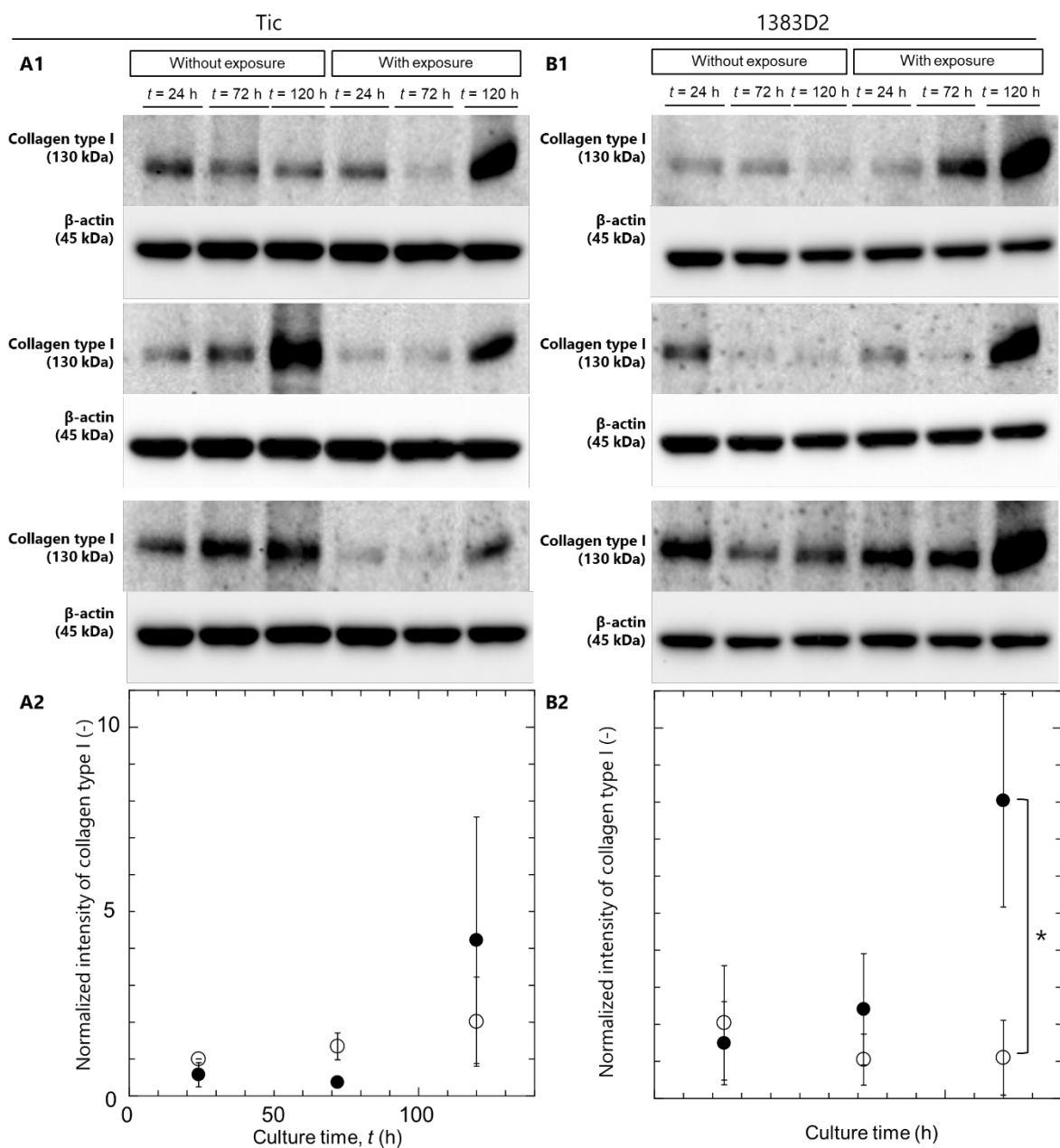


図 3.2 ウェスタンブロッティングを用いた ROCK 阻害剤に非暴露および暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞株 (A, Tic; B, 1383D2) の collagen type I の生成量に与える影響の確認. 試行回数 3 回の collagen type I のウェスタンブロッティング画像 (A1, B1) と定量分析 (A2, B2) を示す. Collagen type I のシグナル強度は、β-アクチンのシグナル強度で正規化した. エラーバーは標準偏差を示し, 有意性は Student's *t*-tests により分析した \* $p < 0.05$  ( $n = 3$  per culture). 白丸は ROCK 阻害剤の非暴露; 黒丸は ROCK 阻害剤の暴露を示す.

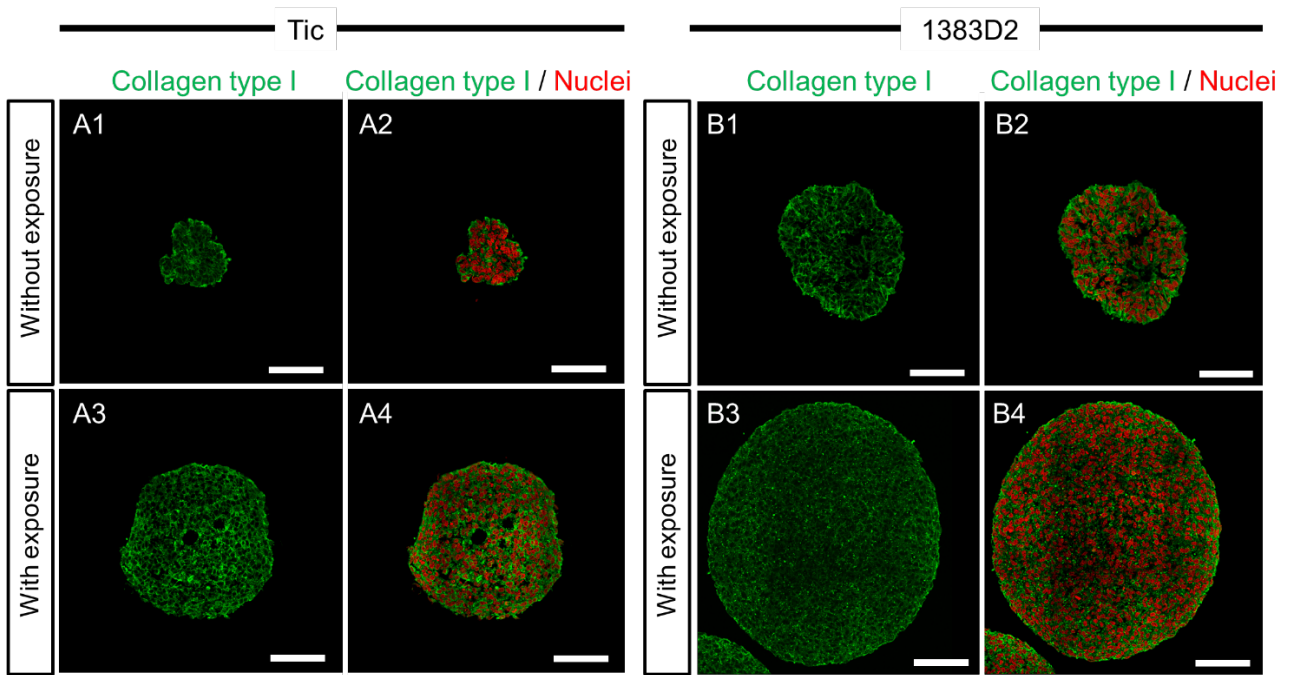


図 3.3 ROCK 阻害剤に非暴露および暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞株 (A, Tic; B, 1383D2) の collagen type I の局在に与える影響. 赤色が核, 緑色が collagen type I の  $t = 120$  h の染色画像を示す(A1-4, B1-4). スケールバー; 100  $\mu\text{m}$ .

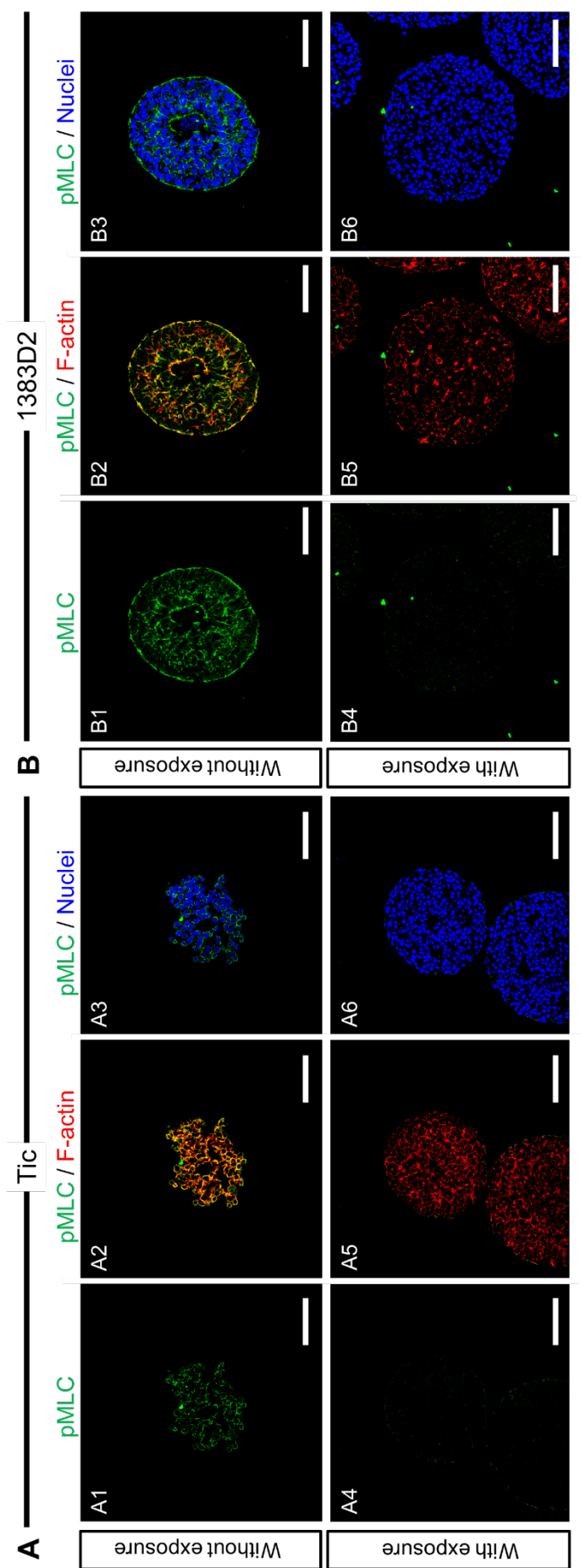


図 3.4 ROCK 阻害剤に非暴露および暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞株 (A, Tic; B, 1383D2) の pMLC と F-actin の局在に与える影響.

青色が核, 緑色が pMLC, 赤色が F-actin の  $t = 120$  h の染色画像を示す (A1-6, B1-6). スケールバー; 100  $\mu\text{m}$ .

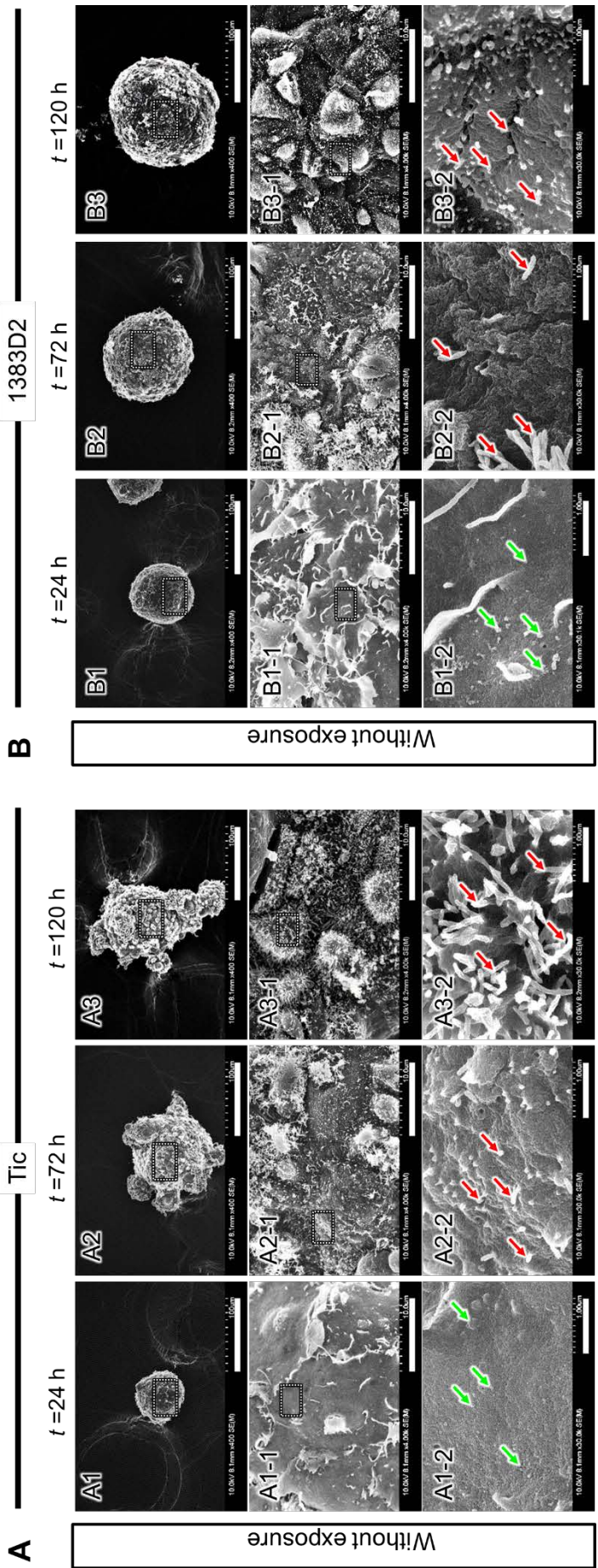


### 3.1.2 ROCK 阻害剤の暴露による細胞集塊表面の微細構造の時間依存性変化

浮遊培養における 2 種類のヒト iPS 細胞の集塊合一の機構に対する ROCK 阻害剤の効果を理解するために、細胞集塊同士の合一に関与する細胞集塊表面の構造を観察した。ROCK 阻害剤に非暴露および暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞株の細胞集塊の表面微細構造の違いを、SEM を用いて検討した (図 3.5)。

どちらのヒト iPS 細胞株も  $t = 24$  h で  $80 \mu\text{m}$  の球状の細胞集塊を形成し、その表面は細胞で覆われ滑らかであった。細胞集塊表面上に堆積した細胞の直径は  $10 \mu\text{m}$  であった (図 3.5 A1-1)。  $t = 120$  h における細胞集塊の表面微細構造を 2 種類のヒト iPS 細胞株で比較すると、1383D2 株は表面が滑らかで球状の細胞集塊を形成したが、Tic 株は表面が粗く緩い細胞集塊を形成した(図 3.5 A3, B3)。2 種類のヒト iPS 細胞株では、 $t = 72$  h で細胞集塊の表面は凸凹構造になっており、拡大すると線維構造が観察され、時間の経過とともに突出した線維構造の数が増加した (赤矢印)。  $t = 120$  h でのヒト iPS 細胞株間の構造の違いを比較すると、大きな球状の細胞集塊を形成する 1383D2 株では、Tic 株の ROCK 阻害剤非暴露で観察される線維構造よりも短い線維構造であった。拡大すると、直径  $50 - 200 \text{ nm}$  の粒子同士が付着した構造が観察された。その中には線維構造も存在した(赤矢印)。直径  $100 \text{ nm}$  で  $50 \text{ nm}$  の縞模様の線維構造が観察された (図 3.5 A3-1, A3-2, B3-1, B3-2)。細胞集塊の断面構造は密であり、その内部は Tic 株と同様の密な構造であった (図 3.6 A1-1, B1-1)。拡大すると、細胞表面から垂直に線維構造が形成された(赤矢印) (図 3.6 A1-2, B1-2)。どちらのヒト iPS 細胞株によらず、ROCK 阻害剤暴露では細胞集塊表面の線維構造の伸長促進が抑制された。ROCK 阻害剤暴露では、 $t = 72, 120$  h の細胞集塊表面の粒子構

造 (緑矢印) が確認された (図 3.5 A4-2-A6-2, B4-2-B6-2). 細胞集塊の断面構造では, 120 h 後に細胞間隙が大きくなった (図 3.6 A2-1, B2-1). 拡大すると, 粒子構造が細胞集塊の表面で互いに結合していた (緑矢印) (図 3.6 A2-2, B2-2). これらの結果から, ROCK 阻害剤の暴露により細胞集塊表面に細胞分泌された粒子構造体が維持され, 細胞間隙が大きくなったことを示唆した.



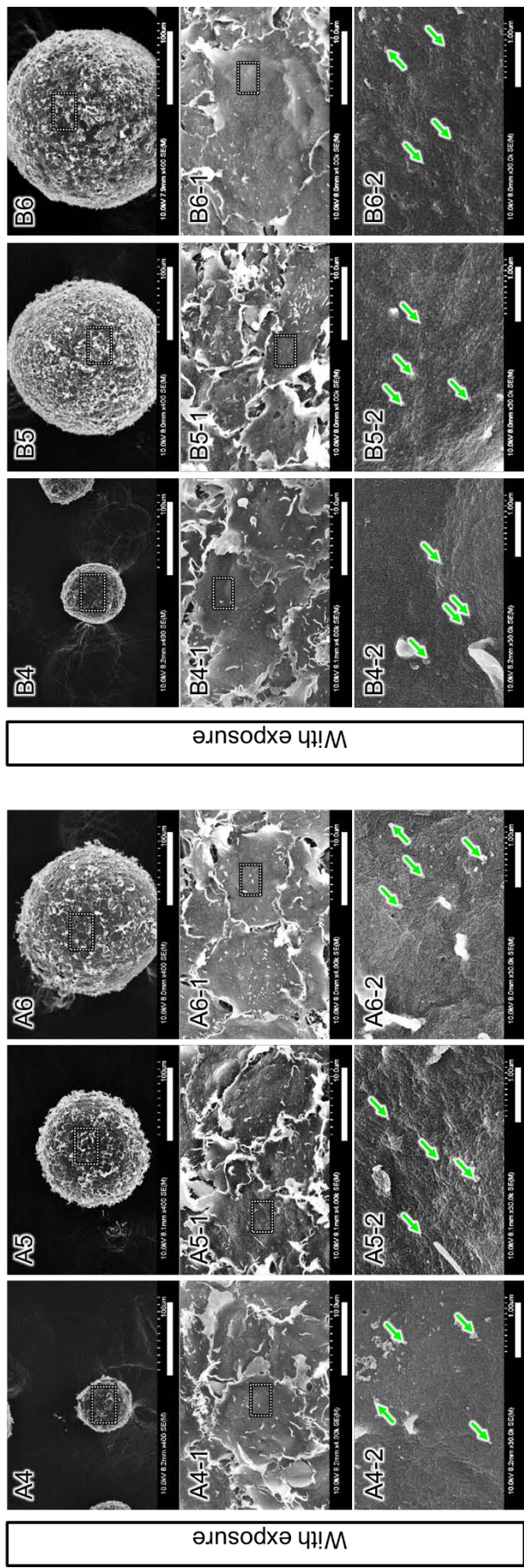


図 3.5  $t = 24, 72, 120 \text{ h}$  における ROCK 阻害剤の非暴露および暴露した細胞集塊表面構造の走査型電子顕微鏡画像 (A, Tic; B, 1383D2). パネル A1-1-B6-1 および A1-2-B6-2 は、枠で囲んだ部分の拡大画像を示す. 緑矢印は粒子構造, 赤矢印は線維構造を示す. スケールバー; 100  $\mu\text{m}$  (A1-B6), 10  $\mu\text{m}$  (A1-1-B6-1), 1  $\mu\text{m}$  (A1-2-B6-2).

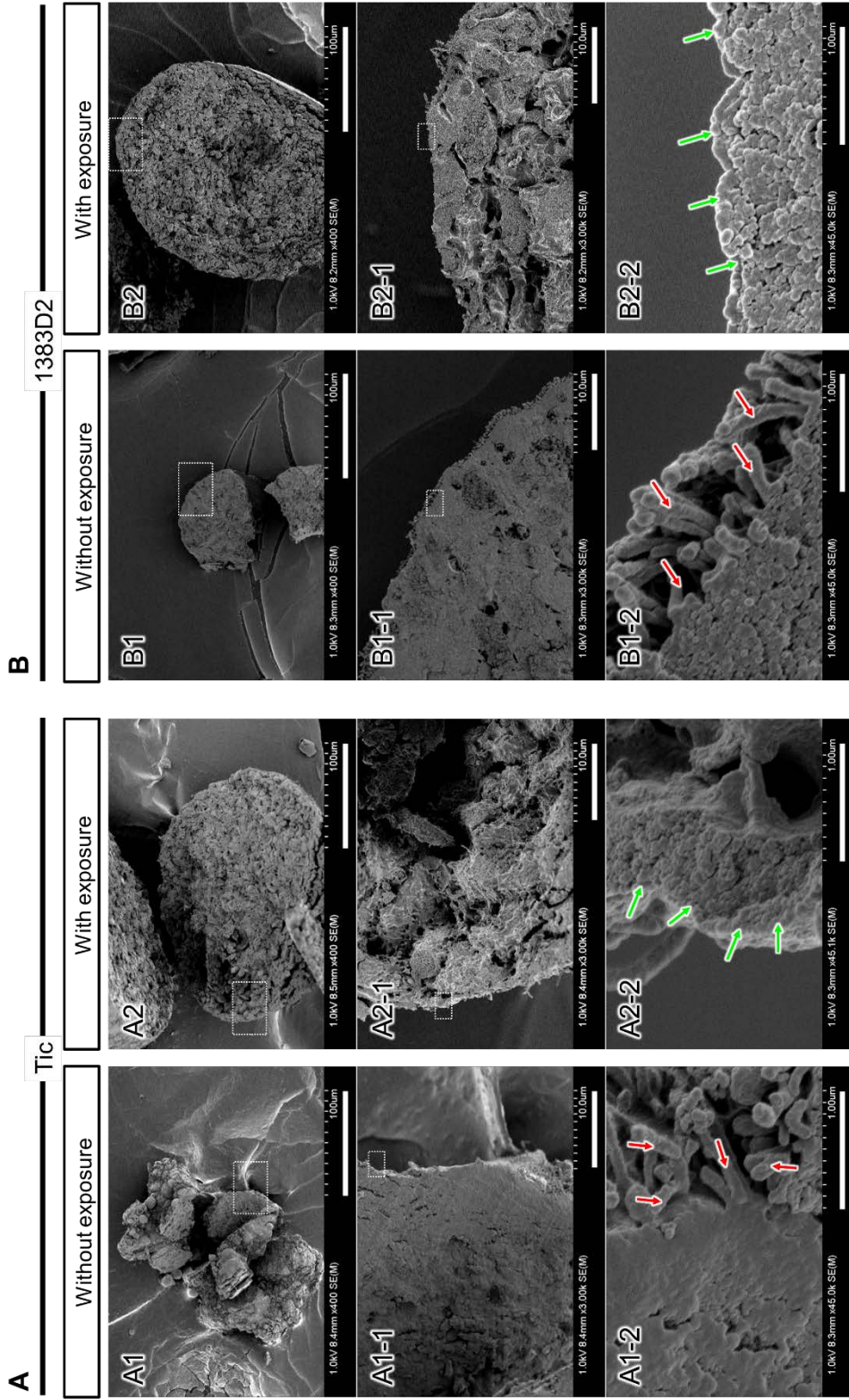


図 3.6  $t = 120$  h における ROCK 阻害剤の非暴露および暴露した細胞集塊の断面構造の走査型電子顕微鏡画像 (A, Tlc; B, 1383D2). パネル A1-1-B2-1 および A1-2-B2-2 は、枠で囲んだ部分の拡大画像を示す. 緑矢印は粒子構造, 赤矢印は線維構造を示す. スケールバー; 100  $\mu\text{m}$  (A1-B2), 10  $\mu\text{m}$  (A1-1-B2-1), 1  $\mu\text{m}$  (A1-2-B2-2).

### 3.4 考察

ROCK 阻害剤による細胞増殖に有益な先行研究は数多く報告されており (Evers *et al.*, 2001; Croze *et al.*, 2016; Pakzad *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018), 浮遊培養におけるヒト iPS 細胞の集塊挙動を解析したところ, 細胞増殖と細胞集塊同士の合一が促進されることが示された. 本章の目的は, ROCK 阻害剤の暴露によるヒト iPS 細胞の集塊挙動の変化を引き起こした構造的因子を明らかにすることである. そのために, 懸濁培養において ROCK 阻害剤暴露した細胞集塊に対して細胞骨格である pMLC と ECM の一部である collagen type I の局在と生成量を調べ, SEM を用いて細胞集塊表面構造を調べた. その結果, ROCK 阻害剤暴露により細胞骨格である pMLC の発現が抑制し, collagen type I の生成量の増加と細胞集塊の表面構造が変化することを見出した. 本章では細胞集塊を形成する対照的な 2 種類のヒト iPS 細胞株を用いて検討を行った (図 3.7).

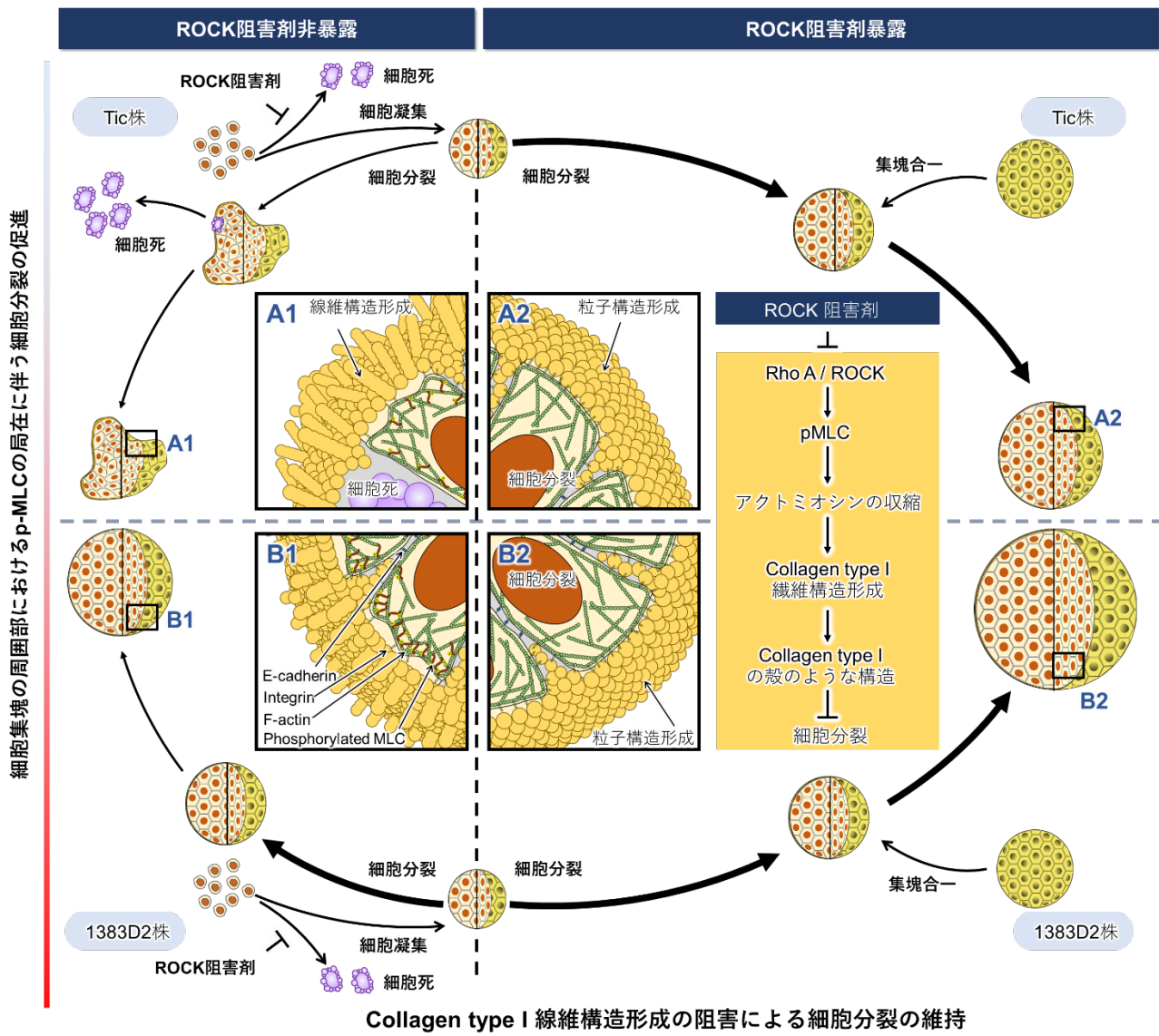


図 3.7 ROCK 阻害剤暴露を行った細胞集塊内のアクチン収縮を阻害することにより，細胞から分泌した collagen type I の構造変化が 2 種類の hiPSC 株 (A, Tic; B, 1383D2) の細胞分裂と集塊合一を制御することを示す概念図. パネル A1-B2 は枠で囲んだ部分の拡大図を示す.

2 種類のヒト iPS 細胞株の細胞集塊の形態と大きさを比較すると，Tic 株では歪で小さな細胞集塊が形成され (図 3.7 A)，一方で 1383D2 株では大きく球状の細胞集塊が形成された (図 3.7 B). Tic 株の細胞集塊は 1383D2 株よりも液流れに敏感であるため，崩壊しやすかった. このような細

細胞集塊の形態変化は、液流によって引き起こされる ECM の破壊によってアクチオシンの収縮力が影響を受け、細胞集塊を形成する能力が変化することを示していた (Kato *et al.*, 2019; Tsai *et al.*, 2015). リン酸化されたミオシン軽鎖 (pMLC) は細胞骨格の力学的特性を制御し、細胞増殖を大きく変化させることが分かっている (Cai *et al.*, 1998). したがって、細胞集塊の形態と細胞増殖の形成は細胞骨格に関連している. 免疫染色において、Tic 株では細胞集塊内部の細胞縁周部に pMLC の局在が見られたが、1383D2 株では細胞縁周部だけでなく細胞集塊の縁周部にも pMLC が局在していた (図 3.4). さらに、1383D2 株の細胞集塊の周囲部に collagen type I が局在していた (図 3.3). 細胞集塊内の ECM は生化学的なシグナル伝達分子として働くだけでなく、細胞骨格と細胞外微小環境との間の張力のバランスに影響を与える力学的な役割を示す (Paszek *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2014). これは、細胞-細胞間接着および細胞-基質間接着を介する細胞接着分子が寄与している可能性がある. このような接着はアクチンフィラメントの形成を促進し、細胞集塊の形態を構成する機械的な力を発生させる. Collagen type I などの ECM 分泌能が低いヒト iPS 細胞は、細胞集塊の周辺領域から剥離したアポトーシス細胞の頻度が高いことを発見した (Kim *et al.*, 2019). そのため、安定した細胞集塊形成と細胞集塊内での細胞増殖は、細胞内の張力の恒常性が必要であることを示している可能性がある (Thanuthanakhun *et al.*, 2021; Paszek *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2014). 細胞集塊の縁周部に存在する ECM や他の細胞を通して、細胞自身の特徴的な表現型と同様に周辺環境を変化させる可能性がある (Paszek *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2014). これらの変化は、ECM や隣接する細胞と細胞骨格とが結合する部位で発生する力を増大させると予想される. 1383D2 株は Tic 株と比較して球状の細胞集塊を



形成することができるが、 $t = 72-120 \text{ h}$  において見かけの比増殖速度が低下する。細胞から分泌される ECM の蓄積により、細胞集塊における細胞分裂は培養後期に低下する (Nath *et al.*, 2017; Kato *et al.*, 2018)。また、collagen type I と pMLC が細胞集塊の周辺部に局在していた。懸濁培養において、アクチオシンによる収縮によって大きな球状の細胞集塊が安定的に形成されたことから、細胞集塊の表面には collagen type I の殻様構造が形成されている可能性がある。先行研究と同様に、この仮説は細胞集塊表面上に collagen type I のような線維構造が観察されたことにより支持された (Zeng *et al.*, 2013; Sachlos *et al.*, 2008)。しかし、collagen type I の殻様構造の形成は細胞集塊内の圧迫によって接触障害が生じ細胞分裂が低下する (Nath *et al.*, 2017; Sachlos *et al.*, 2008)。したがって、培養後期には細胞分裂が低下するため、より安定した細胞集塊の形成を可能にする培養方法が求められている。これらの知見は、懸濁浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊の挙動を理解する上で重要である。このことから、細胞集塊の増殖期において、隣接する細胞と ECM の相互作用が安定した細胞集塊形成と細胞分裂の促進に密接に関係していることが示唆された。

ROCK 阻害剤に暴露した 2 種類のヒト iPS 細胞株は、細胞集塊の形態とサイズから細胞分裂と細胞集塊同士の合一が促進することが分かった。液流等の機械的ストレスで容易に崩壊する Tic 株では、ROCK 阻害剤に暴露することで安定して細胞集塊を形成した。これは ROCK 阻害剤の暴露では ECM の生成量が増加しており (図 3.2)、細胞集塊の周辺領域から剥離したアポトーシス細胞の頻度が低下していると考えられる。また、ROCK 阻害は Rho-ROCK 経路依存的な機械的ストレスによるアクチオシン収縮を制御することにより、コロニー形態や細胞集塊圧迫、多能性

などを制御すると考えられる (Du *et al.*, 2019). アクチオシン収縮力は細胞や核の形状に影響を与える (Versaevel *et al.*, 2012). これまでの研究と同様に, アクチオシン収縮力が細胞集塊の核の形と完全性に影響を与え, 細胞内の生化学的シグナルを変化させるという仮説を支持するものである (Takaki *et al.*, 2017). したがって, ROCK 阻害剤はアクチオシン収縮や細胞接着による細胞形態の変化が間接的に生化学的シグナルに影響を与える可能性がある. また, 長時間の ROCK 阻害は細胞集塊表面の構造変化を阻害することでヒト iPS 細胞集塊の細胞増殖が促進された. 免疫蛍光染色により, ROCK 阻害剤非暴露では pMLC が細胞集塊内部と周縁部に空間的に不均質であることが確認されたが (図 3.7 A1 and B1), ROCK 阻害剤暴露の細胞集塊では pMLC が集塊内に局在していなかった (図 3.7 A2 and B2). ROCK によって pMLC が生成されることが分かっている (Amano *et al.*, 1996). pMLC によって誘導されたアクチオシンは個々の細胞に対して張力を発生させる. Collagen type I は細胞膜で procollagen から成る核が形成されてから, アクチオシンによる細胞膜収縮に伴って procollagen が結合していき, collagen type I の線維構造形成される (図 3.8) (Kalson *et al.*, 2013). そのため, アクチオシン収縮の阻害によって生成される collagen type I の粒子構造は, collagen type I の殻様構造の形成を抑制する可能性がある. したがって, アクチオシン収縮阻害による ECM 構造の維持は, collagen type I の殻様構造の形成阻害による細胞分裂の維持と関連していることが示唆された. さらに, 凝集後の細胞集塊の ROCK 経路を阻害すると, 細胞集塊のサイズが大きくなる一方で, 細胞集塊同士が合一して, ヒト iPS 細胞集塊の数が減少することが分かった. 細胞集塊同士の合一によってより大きな細胞集塊が形成されることで細胞分裂が低下することが分かっている (Nath *et al.*, 2017). ROCK 阻害剤は, 細胞

集塊内での接触阻害による Hippo 経路を阻害することで、細胞分裂を維持すると考えられる。したがって、ROCK 阻害による ROCK 経路の降下制御は、pMLC が発現せずに collagen type I の粒子構造を維持し、安定して細胞集塊形成を促進し、ヒト iPS 細胞の分裂を維持することができた。これらの知見は、細胞集塊の増殖期における pMLC 局在化による ECM 構造の制御が細胞増殖と細胞集塊同士の合一に密接に関係していることを示唆し、懸濁培養におけるヒト iPS 細胞の培養プロセスの開発に寄与するものである。

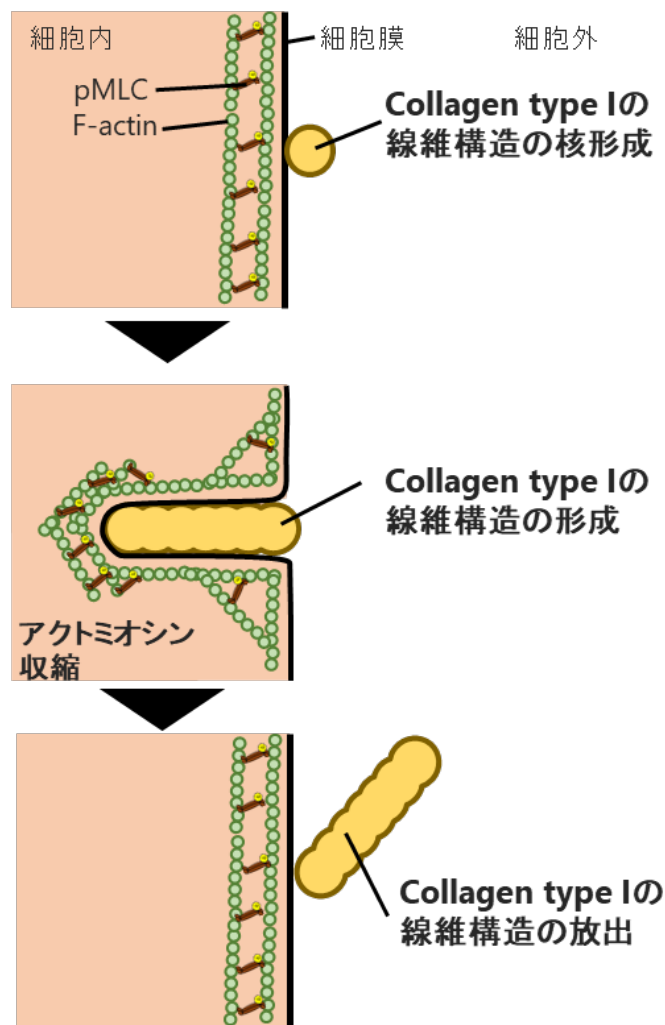


図 3.8 細胞表面上の Collagen type I の繊維構造の形成

### 3.5 小括

細胞分裂に関連する 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の局在した. 次に, 細胞集塊内の細胞骨格であるアクチ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 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 で縞間隔が 50 nm の繊維構造が形成され, 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.

## 第4章 総括

本学位論文では、細胞集塊の形成プロセスの理解と形成プロセスを制御する培養技術の開発のために、ヒト iPS 細胞の浮遊培養における ROCK 阻害剤がヒト iPS 細胞集塊の挙動に与える影響に関する研究を行った。

第1章では、ヒト iPS 細胞培養における細胞集塊の形成プロセスと構造に関する現状について述べ、これらの制御が可能な ROCK 阻害剤の効果について述べた。ヒト iPS 細胞集塊の形成プロセスにおいて、集塊崩壊と細胞分裂の低下を伴い細胞増殖が低下することが分かっている。この集塊形成プロセスに寄与する細胞挙動は Rho-ROCK 経路を通して細胞骨格によって制御されており、ヒト iPS 細胞の集塊形成プロセスの理解とその制御方法の確立のため、細胞骨格を制御する ROCK 阻害剤を用いる有用性を示した。

第2章では、ヒト iPS 細胞集塊挙動に対する ROCK 阻害剤を用いた新たな制御方法を提案した。ROCK 阻害剤に暴露した浮遊培養に対し反応速度論的解析を行った結果、ROCK 阻害剤の濃度依存的に細胞集塊崩壊を抑制し、細胞分裂を促進した。培養期間中、ROCK 阻害剤の非暴露と比較して見かけの比増殖速度は高く維持されていた。また、ROCK 阻害剤の暴露による細胞集塊サイズの過剰な増大に伴い、細胞集塊同士の合一開始時間が速くなった。これにより、ROCK 阻害剤の暴露によって細胞集塊形態と細胞集塊崩壊が抑制されることで、細胞分裂が維持され集塊合一が促進された。以上の結果から、細胞集塊形成過程において ROCK 経路の阻害が細胞分裂と細胞集塊同士の合一と密接に関係することを示唆された。この知見は浮遊培養における細胞集塊崩壊と細胞分裂の低下に対する新たな解決方法として提案でき、浮遊培養に

におけるヒト iPS 細胞の培養プロセスの制御方法に寄与するものである。

第 3 章では、ヒト iPS 細胞集塊挙動の理解とその制御方法に対する新たな知見を得た。ROCK 阻害剤への暴露培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の変化を支配する因子を明らかにするために、ヒト iPS 細胞集塊の構造特性の解明を行った結果、ROCK 阻害剤に暴露したことにより、細胞集塊内における collagen type I の生成量が増加し、pMLC の発現が抑制された。また、ヒト iPS 細胞集塊の表面構造において培養中は粒子状構造が維持された。これにより、ROCK 阻害剤に暴露することで、細胞集塊内の collagen type I の生成量が増加し、また pMLC が阻害されることで細胞集塊表面上の構造が粒子状に維持された。以上の結果は、Rho-ROCK 経路の阻害が細胞集塊内の ECM 生成量の増加や細胞集塊表面の粒子状構造維持によって細胞集塊の崩壊や細胞分裂の低下を抑制したことを示唆し、ECM の生成量や構造の知見がヒト iPS 細胞の集塊挙動に対する理解の一助となることを示した。

以上より、ヒト iPS 細胞集塊挙動の理解とその制御方法に対する新たな知見と方法を提案した。浮遊培養において細胞株、試薬や培養方法、実験者の技量とセンスの組み合わせによって生じる細胞応答のばらつきは顕著であり、様々な培養条件に関わらず安定して大量に細胞を獲得できる浮遊培養技術の確立のため、培養プロセスに寄与する因子の理解やその制御方法が求められている。しかし、細胞集塊形成のばらつきは細胞集塊内の ECM 生成量不足やせん断応力に対する耐性不足による細胞集塊の崩壊と collagen type I の殻様構造が細胞集塊内部を圧迫することによる細胞分裂の低下が要因であると考えられている。これまでに、細胞接着分子や ECM を用いることで細胞集塊の形成能を向上させる方法が示されてきた (Ivascu and Kubbies, 2006,

2007; Froehlich *et al.*, 2016). しかし, 培養後期における collagen type I の殻様構造形成による細胞分裂の低下に対してのアプローチはされておらず, 細胞集塊形成の制御方法は不十分である. これに対し, ROCK 阻害は細胞集塊内の ECM 生成増加や collagen type I の殻様構造の形成抑制を誘導し, 細胞集塊形態と細胞分裂を維持する可能性を示した. このように, せん断応力による負荷がかかる懸濁浮遊培養において細胞集塊内の ECM が豊富で collagen type I の殻様構造のない細胞集塊を形成することは集塊崩壊を抑制し, 細胞分裂を維持することに寄与する.

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. 先行研究から細胞集塊の形態維持と細胞増殖の促進は接着分子や ECM の量が重要であると考えられてきた. 本研究は初めて細胞集塊の表面上構造に着目し, 細胞機能との関連性を示した. 細胞集塊表面上の構造変化に関する知見を明らかにしたことは, 細胞集塊内の細胞機能を向上するための新たな方法の足掛けとなると考えられる. また, 本研究で不明な点である細胞集塊表面上の粒子構造が collagen type I であるかを明らかにすることは, collagen type I の生化学的研究に役立つだけでなく, 懸濁培養における細胞集塊の形成プロセスの更なる理解にもつながる. これより, 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.

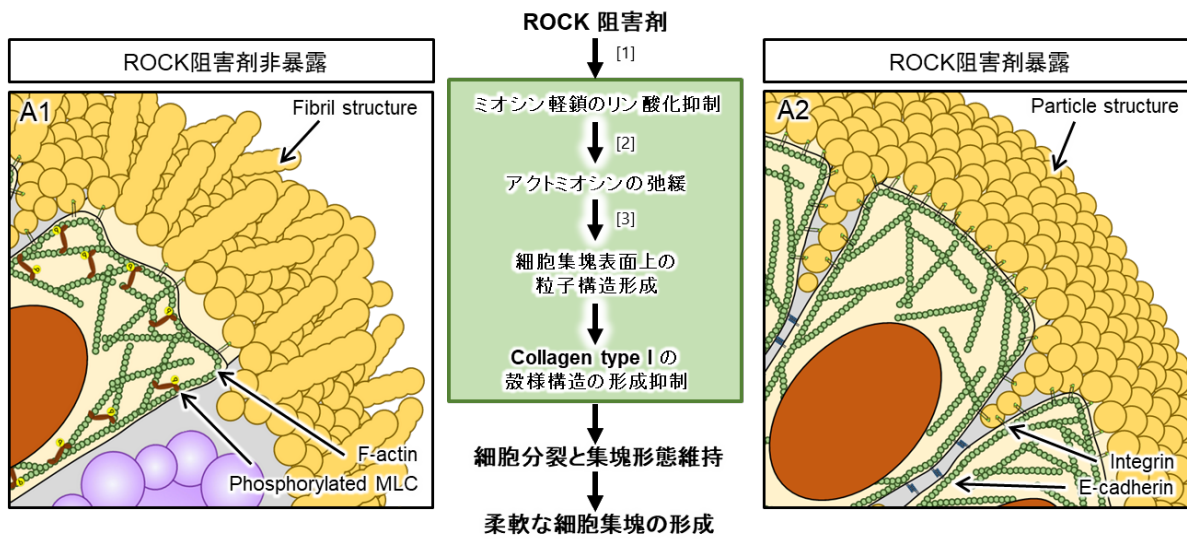
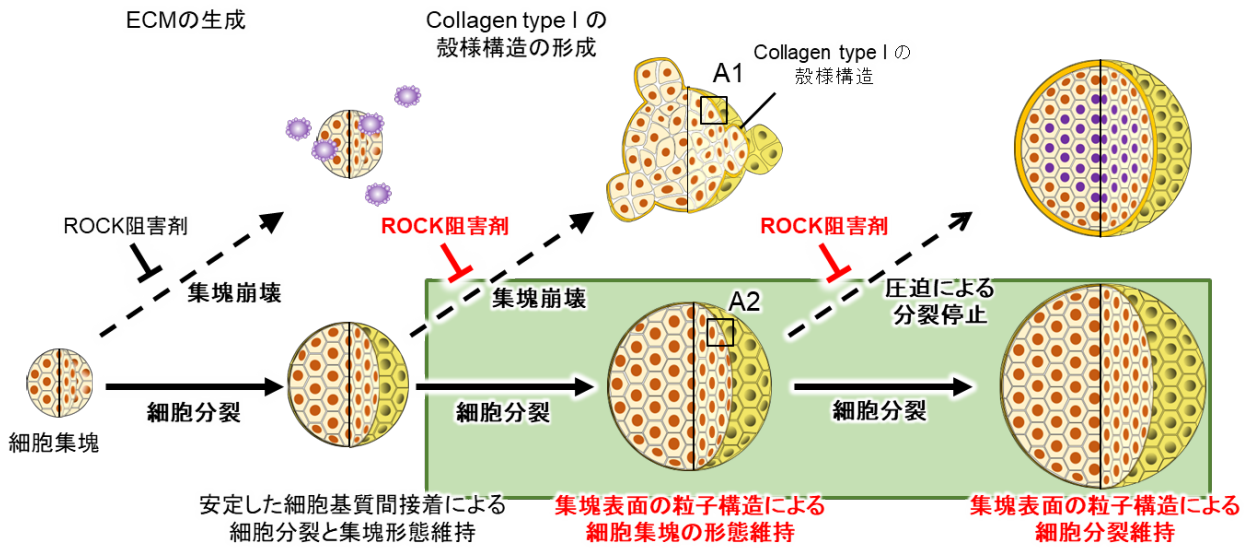


図 4.1 ROCK 阻害剤がヒト iPS 細胞の集塊挙動に与える影響を示す概念図



## 略語一覧

ES 細胞: Embryonic stem cell. ヒト胚性幹細胞

iPS 細胞: Induced pluripotent stem cell, 人工多能性幹細胞

PS 細胞: Pluripotent stem cells, 多能性幹細胞

ADP: Adenosine diphosphate, アデノシン二リン酸

ATP: Adenosine triphosphate, アデノシン三リン酸

ECM: Extracellular matrix, 細胞外基質

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸

FAK: Focal adhesion kinase, 焦点接着キナーゼ

GAP: GTPase-activating protein, GTP アーゼ活性化タンパク質

GDP: Guanosine diphosphate, グアノシン二リン酸

GEF: Guanine nucleotide exchange factor, グアニンヌクレオチド交換因子

GTP: Guanosine triphosphate, グアノシン三リン酸

JCRB 細胞バンク: Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank

MLCK: Myosin light chain kinase, ミオシン軽鎖キナーゼ

MLCP: Myosin light chain phosphatase, ミオシン軽鎖ホスファターゼ

PB: Phosphate buffer, リン酸緩衝液

PBS: Phosphate buffered salts, リン酸緩衝生理食塩水

ROCK: Rho-associated protein kinase, Rho 関連タンパク質キナーゼ

SEM: Scanning Electron Microscope, 走査型電子顕微鏡

TBS: Tris-buffered salt, トリス緩衝生理食塩水

pMLC: phosphorylated myosin light chain, リン酸化ミオシン軽鎖

## 参考文献

- Abe, H., Kamai, T., Hayashi, K.:** The Rho-kinase inhibitor HA-1077 suppresses proliferation/migration and induces apoptosis of urothelial cancer cells. *BMC Cancer*, **14**, 412, (2014)
- Adam, P.R., Dylan, M.D, Jeffrey, R. M.:** Controlling cell position in complex heterotypic 3D microtissues by tissue fusion. *Biotechnol. Bioeng.*, **102**(4), 1231-1241. (2009)
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K.:** Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.*, **271**, 20246–20249, (1996)
- Boot, R.C., Koenderink, G.H., Boukany, P.E.:** Spheroid mechanics and implications for cell invasion. *Advances in Physics: X*, **6**, (2021).
- Cai, S., Pestic–Dragovich, M.E., O’Donnell, Wang, N., Ingber, D., Elson, E., Lanerolle, P.E.:** Regulation of cytoskeletal mechanics and cell growth by myosin light chain phosphorylation. *Am. J. Phys.*, **275**, C1349–C1356. (1998)
- Calori, I.R., Alves, S.R., Bi, H.: Tedesco, A.C.:** Type-I Collagen/Collagenase Modulates the 3D Structure and Behavior of Glioblastoma Spheroid Models. *ACS Appl. Bio Mater.*, **5**, 723–733. (2022)
- Chang, F., Zhang, Y., Mi, J., Zhou, Q., Bai, F., Xu, X., Fisher, D.E., Sun, Q., Wu, X.:** ROCK inhibitor enhances the growth and migration of BRAF–mutant skin melanoma cells. *Cancer*

*Sci.* **109**, 3428–3437. (2018)

**Chen, X., Chen, A., Woo, T.L., Choo, A.B.H., Reuveny, S., Oh, S.K.W.:** Investigations into the metabolism of two-dimensional colony and suspended microcarrier cultures of human embryonic stem cells in serum-free media. *Stem Cells Dev.*, **19** (11), 1781-1792. (2010)

**Cherfils, J., Zeghouf, M.:** Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.*, **93**, 269-309, (2013)

**Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M.F.:** Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 339–345. (2001)

**Croze, R.H., Thi, W.J., Clegg, D.O.:** ROCK inhibition promotes attachment, proliferation, and wound closure in human embryonic stem cell-derived retinal pigmented epithelium. *Transl. Vis. Sci. Technol.*, **5**, 7. (2016)

**Cui, X., Hartanto, Y., Zhang, H.:** Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society Interface*, **14**(127), 20160877. (2017)

**Du, J., Fan, Y., Guo, Z., Wang, Y., Zheng, X., Huang, C., Liang, B., Gao, L., Cao, Y., Chen, Y.:** Compression generated by a 3D supracellular actomyosin cortex promotes embryonic stem cell colony growth and expression of Nanog and Oct4. *Cell Syst.*, **9**, 214–220. (2019)

**Eagle, H.:** The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture. *J. Biol. Chem.*, **214**, 839–852. (1955)

- Evers, E.E., Zondag, G.C., Malliri, A., Price, L.S., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A., Collard, J.G.:** Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur. J. Cancer*, **36**, 1269–1274. (2000)
- Fischer, A., Astrup, T., Ehrensvar, G., Oehlenschlager, V.:** Growth of animal tissue cells in artificial media. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **67**, 40–46. (1948)
- Fletcher, D.A., Mullins, R.D.:** Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, **463**, 485–492 (2010).
- Gao, L., Nath, S.C., Jiao, X., Zhou, R., Nishikawa, S., Krawetz, R., Li, X., Rancourt, D.E.:** Post-Passage rock inhibition induces cytoskeletal aberrations and apoptosis in Human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.*, **41**, 101641. (2019)
- Gey, G., Coffman, W., Kubicek, M.:** Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, **12**, 264–265. (1952)
- Gozde, E., Laurence, V., Xi, Y., Mélanie, E., Audrey, C., Emmanuelle, T., Christophe, V., Christian, D., Louis, C., Laurent, M.:** Cell aggregation is a generic term describing the clustering and adhesion of initially separate cells to form an aggregate. *Cells*, **11**(9), 1394, (2022)
- Harrison, R.G., Greenman, M.J., Mall, F.P., Jackson, C.M.:** Observations of the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.*, **1**, 116–128. (1907)
- Hashida, A., Uemura, T., Kino-Oka, M.:** Kinetics on aggregate behaviors of human induced

pluripotent stem cells in static suspension and rotating flow cultures. *J. Biosci. Bioeng.*, **129**, 494–501. (2020)

**Höpfl, G., Gassmann, M., Desbaillets, I.:** Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies Methods. *Mol. Biol.*, **254**, 79-98, (2004)

**Ishizaki T., Uehata, M., Tamechika, I., Keel, J., Nonomura, K., Maekawa, M., Narumiya, S.:** Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases, *Mol. Pharmacol.* **57**(5), 976-83, (2000),

**Jiang, L., Wen, J., Luo, W.:** Rho-associated kinase inhibitor, Y27632, inhibits the invasion and proliferation of T24 and 5367 bladder cancer cells. *Mol. Med. Rep.*, **12**, 7526–7530, (2015)

**Jones, J.M.:** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **6**, 1145-1147, (1998)

**Kalson, N.S., Starborg, T., Lu, Y., Mironov, A., Humphries, S.M., Holmes, D.F., Kadler, K.E.:** Nonmuscle myosin II powered transport of newly formed collagen fibrils at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4743–4752. (2013)

**Kanada, M., Nagasaki, A., Uyeda, T.Q.:** Adhesion-dependent and contractile ring-independent equatorial furrowing during cytokinesis in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 3865-3872. (2005)

**Kato, Y., Kim, M.H., Kino-oka, M.:** Comparison of growth kinetics between static and dynamic cultures of human induced pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 736–740. (2018)

- Kato, Y., Matsumoto, T., Kino-oka, M.:** Effect of liquid flow by pipetting during medium change on deformation of hiPSC aggregates. *Regen. Med.*, **12**, 20–26. (2019)
- Kawamura, M., Miyagawa, S., Fukushima, S., Saito, A., Miki, K., Ito, E., Sougawa, N., Kawamura, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Toda, K., Sawa, Y.:** Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart, *Circulation*, **128**, 87-94, (2013)
- Kim, M.H., Kino-oka, M.:** Bioengineering considerations for a nurturing way to enhance scalable expansion of human pluripotent stem cells. *Biotech. J.*, **15**, 1900314, (2020).
- Keller, G.M.:** In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**, 862-869, (1995)
- Kim, M.-H., Ogawa, Y., Yamada, K., Taya, M., and Kino-oka, M.:** Directed differentiation of human mesenchymal stem cells toward a cardiomyogenic fate commitment through formation of cell aggregates. *Biochem. Eng. J.*, **84**, 53–58. (2014)
- Kim, M.H., Takeuchi, K., Kino-oka, M.:** Role of cell-secreted extracellular matrix formation in aggregate formation and stability of human induced pluripotent stem cells in suspension culture. *J. Biosci. Bioeng.*, **127**, 372–380. (2019)
- Kimbrel, E.A., Lanza, R.:** Current status of pluripotent stem cells: Moving the first therapies to the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **14**, 681–692. (2015)

- Lancaster, M.A., Knoblich, J.A.:** Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science*. **345**, 1247125. (2014)
- Li, S., Wang, C., Dai, Y., Yang, Y., Pan, H., Zhong, J., Chen, J.:** The stimulatory effect of ROCK inhibitor on bovine corneal endothelial cells. *Tissue Cell*, **45**(6), 387-396. (2013)
- Lin, R.Z., Chou, L.F., Chien, C.C., Chang, H.Y.:** Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: Roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res.*, **324**, 411–422. (2006)
- Moreira, J. L., Cruz, P. E., Santana, P. C.:** Formation and disruption of animal cell aggregates in stirred vessels: mechanisms and kinetic studies. *Chem. Eng. Sci.*, **50**, 2747-2764 (1995).
- Nakagawa, M., Taniguchi, Y., Senda, S., Takizawa, N., Ichisaka, T., Asano, K., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J., Nishizawa, M.:** A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.*, **4**, 3594. (2014)
- Nath, S.C., Horie, M., Nagamori, E., Kino-oka, M.:** Size- and time dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate. *J. Biosci. Bioeng.* **124**, 469–475. (2017)
- Nath, S.C., Nagamori, E., Horie, M., Kino-Oka, M.:** Culture medium refinement by dialysis for the expansion of human induced pluripotent stem cells in suspension culture. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **40**(1), 123-131, (2017)
- Ohashi, K., Fujiwara, S., Mizuno, K.:** Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction. *J. Biochem.*, **161**, 245–254. (2017)



**Ohgushi, M., Matsumura, M., Eiraku, M., Murakami, K., Aramaki, T., Nishiyama, A.,**

**Muguruma, K., Nakano, T., Suga, H., Ueno, M.:** Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **7**, 225–239. (2010)

**Okumura, N., Fujii, K., Kagami, T., Makiko, N., Kitahara, M., Kinoshita, S., Koizumi, N.:**

Activation of the Rho/Rho kinase signaling pathway is involved in cell death of corneal endothelium. *Investigat. Ophthalmol. Visual Sci.* **57**, 6843–6851. (2016)

**Okumura, N., Sakamoto, Y., Fujii, K., Kitano, J., Nakano, S., Tsujimoto, Y., Nakamura, S.,**

**Ueno, M., Hagiya, M., Hamuro, J.:** Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction. *Sci. Rep.*, **6**, 26113. (2016)

**Olmer, R., Lange, A., Selzer, S., Kasper, C., Haverich, A., Martin, U., Zweigerdt, R.:**

Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled stirred bioreactors. *Tissue Eng. Part C Methods*, **18**, 772–784, (2012)

**Matsuura, K., Wada, M., Konishi, K., Sato, M., Iwamoto, U., Sato, M., Tachibana, A.,**

**Kikuchi, T., Iwamiya, T., Shimizu, T., Yamashita, J, K., Yamato, M., Hagiwara, N. and**

**Okano, T.:** Fabrication of Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Layered Cardiac Cell Sheets Using a Bioreactor Culture System. *PLOS ONE*, **7**, e52176, (2012)

**Pakzad, M., Totonchi, M., Taei, A., Seifinejad, A., Hassani, S.N., Baharvand, H.:** Presence of a

ROCK Inhibitor in Extracellular Matrix Supports More Undifferentiated Growth of Feeder-

Free Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells upon Passaging. *Stem Cell Rep.*, **6**, 96–107. (2010)

**Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart–King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D.:** Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, **8**, 241–254. (2005)

**Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E.:** Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, **309**(5963), 30-33. (1984)

**Pollard, T.D., Cooper, J.A.:** Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, **326**(5957), 1208-1212. (2009)

**Richard, O.H.:** Alteration of Cell-Surface Proteins by Viral Transformation and by Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**(11), 3170–3174. (1973)

**Ringer, S.:** Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *J. Physiol.*, **3**, 380–393. (1882)

**Robinson, D. N., and Spudich, J. A.:** Towards a molecular understanding of cytokinesis. *Trends Cell Biol.* **10**, 228 –237. (2000)

**Roskelley, C.D., Desprez, P.Y., Bissell, M.J.:** Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**(26), 12378–12382, (1994)

**Sachlos, E., Auguste, D.T.:** Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive

biochemicals: A strategy for stem cell differentiation. *Biomaterials*, **29**, 4471–4480. (2008)

**Sanders, J.P.M., Clark, J.H., Harmsen, G.J., Heeres, H.J., Heijnen, J.J., Kersten, S.R.A., Van**

**Swaij, W.P.M., Moulijn, J.A.:** Process Intensification process intensification in the future production of base chemicals from biomass. *Chem. Eng. Process.*, **51**, 117–136. (2012)

**Sart, S., Tsai, A.C., Li, Y., Ma, T.:** Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells:

cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **20**(5), 365-80. (2014)

**Sasano, Y., Fukumoto, K., Tsukamoto, Y., Akagi, T., Akashi, M.J.:** Construction of 3D cardiac

tissue with synchronous powerful beating using human cardiomyocytes from human iPS

cells prepared by a convenient differentiation method. *Biosci. Bioeng.*, **129**, 749–755. (2020)

**Sanford, K.K., Earle, W.R., Likely, G.D.:** The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J.*

*Natl. Cancer Inst.*, **9**, 229– 246. (1948)

**Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E., and Breard, J.:** Direct cleavage of ROCK II

by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J.*

*Exp. Med.*, **201**, 465–471. (2005)

**Setoguchi, K., TeSlaa, T., Koehler, C.M., Teitell, M.A.:** P53 regulates rapid apoptosis in human

pluripotent stem cells. *J. Mol. Biol.*, **428**, 1465–1475. (2016)

**Shafa, M., Sjonnesen, K., Yamashita, A., Liu, S.Y., Michalak, M., Kallos, M.S., Rancourt,**

**D.E.:** Expansion and long-term maintenance of induced pluripotent stem cells in stirred

suspension bioreactors. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**, 462–472. (2012)

**Shibuya, M., Suzuki, Y., Sugita, K., Saito, I., Sasaki, T., Takakura, K., Nagata, I., Kikuchi, H.,**

**Takemae, T., Hidaka, H.:** Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal

subarachnoid hemorrhage: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J.*

*Neurosurg.*, **76**, 571–577. (1992)

**Shimizu, Y., Thumkeo, D., Keel, J., Ishizaki, T., Oshima, H., Oshima, M., Noda, Y.,**

**Matsumura, F., Taketo, M.M., Narumiya, S.:** ROCK-I regulates closure of the eyelids and

ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles. *J. Cell Biol.*, **168**, 941–953.

(2005)

**Shinohara, M., Kimura, H., Montagne, K., Komori, K., Fujii, T., Sakai, Y.:** Combination of

microwell structures and direct oxygenation enables efficient and size-regulated aggregate

formation of an insulin-secreting pancreatic  $\beta$ -cell line. *Biotechnol Prog.*, **30**, 178-187,

(2014)

**Shirayoshi, Y., Hatta, K., Hosoda, M., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Takeichi, M.:** Cadherin cell

adhesion molecules with distinct binding specificities share a common structure. *The EMBO*

*Journal*, **5**(10), 2485 -2488. (1986)

**Shirinifard, A., Gens, J.S., Zaitlen, B.L., Poplawski, N.J., Swat, M., Glazier, J.A.:** 3D Multi-

Cell Simulation of Tumor Growth and Angiogenesis. *PLoS ONE*, **4** (10), e7190, (2009)

**Stephen, M.D., Sharon, G.N., Jinny, C., Joseph, I.E., Peter, W. Z.:** Controlled, scalable

embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells*, **22**(3), 275-282. (2004)

**Sun, C.C., Chiu, H.T., Lin, Y.F., Lee, K.Y., Pang, J.H.:** Y-27632, a ROCK Inhibitor, Promoted

Limbal Epithelial Cell Proliferation and Corneal Wound Healing. *PLoS ONE*, **10**, e0144571.

<https://doi.org/10.1371/0144571>. (2015)

**Takahashi, J.:** iPS cell-based therapy for Parkinson's disease: *Regen. Ther.*, **13**, 18-22, (2020)

**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)

**Takahashi, K., Yamanaka, S.:** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult

fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663–676. (2006)

**Takaki, T., Montagner, M., Serres, M.P., Le Berre, M., Russell, M., Collinson, L., Szuhai, K.,**

**Howell, M., Boulton, S.J., Sahai, E.:** Actomyosin drives cancer cell nuclear dysmorphia

and threatens genome stability. *Nat. Commun.*, **8**, 16013. (2017)

**Thanuthanakhun, N., Kino-oka, M., Borwornpinyo, S., Ito, Y., Kim, M.H.:** The impact of

culture dimensionality on behavioral epigenetic memory contributing to pluripotent state of

iPS cells. *J. Cell. Physiol.*, **236**, 4985–4996. (2021)

**Tsai, A.C., Liu, Y., Yuan, X., Ma, T.:** Compaction, fusion, and functional activation of three–

dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. *Tissue Eng. Part A*, **21**, 1705–1719.

(2015)

- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., Narumiya, S.:** Calcium Sensitization of Smooth Muscle Mediated by a Rho-Associated Protein Kinase in Hypertension. *Nature*, **389**, 990–994, (1997)
- Versaevel, M., Grevesse, T., Gabriele, S.:** Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endo-thelial cells. *Nat. Commun.*, **3**, 671. (2012)
- Vining, K.H., Mooney, D.J.:** Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 728–742. (2017)
- Wang, T., Kang, W., Du, L., Ge, S.:** Rho-kinase inhibitor Y-27632 facilitates the proliferation, migration and pluripotency of human periodontal ligament stem cells. *J. Cell Mol. Med.*, **21**, 3100–3112. (2017)
- Wang, Y., Chou, B. K., Dowey, S., He, C., Gerecht, S., Cheng, L.:** Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions. *Stem Cell Res.*, **11**, 1103-1116 (2013)
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K.:** A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **25**, 681–686. (2007)
- Webster, K.D., Ng, W.P., Fletcher, D.A.:** Tensional homeostasis in single fibroblasts. *Biophys. J.*, **107**, 146–155. (2014)

**Yao, T., Asayama, Y.:** Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues

*Reprod. Med. Biol.*, **16** (2), 99-117, (2017)

**Zeng, D., Ou, D.B., Wei, T., Ding, L., Liu, X.T., Hu, X.L., Li, X., Zheng, Q.S.:** Collagen/ $\beta$ 1

integrin interaction is required for embryoid body formation during cardiogenesis from

murine induced pluripotent stem cells. *BMC Cell Biol.*, **14**, 5. (2013)

本報に関する論文

Matsumoto, T., Kim, M. H., Kino-oka, M.: Effect of Rho-associated kinase inhibitor on growth behaviors of human induced pluripotent stem cells in suspension culture, *Bioengineering*, **9** (11), 613-613 (2022)



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、格別なご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科の紀ノ岡正博教授に心より感謝申し上げます。また、論文作成にあたり、有益なご助言およびご校閲を賜りました大阪大学大学院工学研究科の大政健史教授、内山進教授に厚く感謝申し上げます。さらに、研究活動に関するご指導、ご助言のみならず、研究室生活全般にてお世話になりました大阪大学大学院工学研究科の金美海准教授、山本陸助教に心から感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、実験のご指導、ご助言を賜りました大阪大学超高压電子顕微鏡センターの光岡薫教授、井渕康史氏、齊藤厚子氏に深く感謝申し上げます。研究室生活において、事務手続きなどでお世話になりました特任事務職員若松光子氏、事務補佐員花嶋潤子氏、今泉潤子氏、福井めぐみ氏、浦和美氏、田中順子氏、永井理恵氏に感謝の意を表します。さらに、公私ともに多くのご協力を頂きました大阪大学大学院工学研究科生物プロセスシステム工学領域および共同研究講座の先生方、実験補助員・特任研究員の皆様、学生諸氏の皆様に心より御礼申し上げます。特に同期である上岡惇也氏と宇野友貴氏、大阪大学基礎工学研究科堀口一樹助教には深く感謝申し上げます。

最後に、9年間に渡り、大学・大学院で学ぶ機会を頂き、生活面及び精神面で常に温かく支えていただいた両親に感謝の意を表します。