

2015 年度

東洋大学審査学位論文

ROCK 阻害剤が胚性幹細胞と人工多能性幹細胞の
分化に及ぼす影響

東洋大学大学院 生命科学研究科生命科学専攻 博士後期課程

学籍番号 4910130001 氏名 上芝原 佑

ROCK 阻害剤が胚性幹細胞と人工多能性幹細胞の
分化に及ぼす影響

上芝原 佑

ROCK 阻害剤が胚性幹細胞と人工多能性幹細胞の
分化に及ぼす影響

上芝原 佑

目次

	頁
序論	1
第1章 ROCK 阻害剤が ES 細胞及び iPS 細胞の 細胞増殖に及ぼす影響	8
第 1 節 緒言	8
第 2 節 実験方法	9
1.2.1 培地等の調製	9
1.2.2 培養プレートの調製	11
1.2.3 フィーダー細胞の培養	12
1.2.4 マウス ES 細胞の増殖培養	12
1.2.5 マウス ES 細胞の継代培養と凍結保存	13
1.2.6 マウス iPS 細胞の増殖培養	14
1.2.7 マウス iPS 細胞の継代培養と凍結保存	15
1.2.8 ES 細胞及び iPS 細胞の未分化状態の確認	16
1.2.9 ROCK 阻害剤による ES 細胞及び iPS 細胞の 細胞増殖への影響	16
第 3 節 実験結果	17
1.3.1 ES 細胞及び iPS 細胞の増殖	17
1.3.2 ROCK 阻害剤添加による ES 細胞及び iPS 細胞 の増殖への影響	17
第 4 節 考察	18
第 5 節 結言	19

第 6 節 参考文献	19
第 2 章 ROCK 阻害剤が ES 細胞及び iPS 細胞の 分化に及ぼす影響	29
第 1 節 緒言	29
第 2 節 実験方法	30
2.2.1 培地等の調製	30
2.2.2 培養プレートの調製	30
2.2.3 マウス ES 細胞の浮遊培養	30
2.2.4 マウス iPS 細胞の浮遊培養	31
2.2.5 浮遊培養で形成された細胞コロニーの 未分化状態の確認	31
2.2.6 細胞コロニーの分化培養	31
2.2.7 免疫蛍光染色	32
2.2.8 フローサイトメトリーによる陽性細胞数の計数	33
2.2.9 統計分析	33
第 3 節 実験結果	34
2.3.1 ES 細胞及び iPS 細胞コロニーの 未分化状態の確認	34
2.3.2 ROCK 阻害剤添加による神経細胞への 分化に及ぼす影響	34
2.3.3 分化した神経細胞の種類の間定	36
2.3.4 ROCK 阻害剤添加による筋肉細胞への 分化に及ぼす影響	37
2.3.5 分化した筋肉細胞の種類の間定	38

第 4 節	考察	39
第 5 節	結言	40
第 6 節	参考文献	40
第 3 章	ROCK 阻害剤による ES 細胞の神経細胞への 分化促進メカニズム	56
第 1 節	緒言	56
第 2 節	実験方法	57
3.2.1	培地等の調製	57
3.2.2	培養プレートの調製	57
3.2.3	マウス ES 細胞の浮遊培養	57
3.2.4	ウェスタンブロッティング法による ERK 及び Akt の検出	57
	(1) 細胞サンプルの調製	57
	(2) SDS-PAGE 電気泳動による ERK または Akt の 分離及びウェスタンブロッティングによる検出	58
3.2.5	各シグナル伝達経路の阻害	60
3.2.6	免疫蛍光染色	61
3.2.7	細胞内 Ca ²⁺ レベルの測定	61
3.2.8	統計分析	62
第 3 節	実験結果	62
3.3.1	ROCK 阻害剤が ERK シグナル伝達経路に及ぼす影響	62
3.3.2	ROCK 阻害剤が PI3K/Akt シグナル伝達経路に 及ぼす影響	64
3.3.3	ROCK 阻害剤が PLC シグナル伝達経路に及ぼす影響	65

3.3.4 ROCK 阻害剤が Cdc42/Rac に及ぼす影響	66
第 4 節 考察	66
第 5 節 結言	68
第 6 節 参考文献	69
終章 総括と今後の課題	87
本研究に関する原著論文と学会発表	91
その他の関係論文及び学会発表	94
謝辞	95

序論

(1) 胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞について

マウス胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) は、1981 年にマウス胚の発生 3.5 日目の胚盤胞の内部細胞塊 (inner cell mass) から樹立され [1]、続いてヒト ES 細胞が 1998 年に樹立された [2]。樹立された ES 細胞は、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor: LIF) を培地に添加して培養することで、未分化状態を維持したまま半永久的に増殖させることができる。さらに、ES 細胞は外胚葉、中胚葉、内胚葉の 3 胚葉全てに分化する多分化能を有している。これらの特徴から、創薬のための細胞源や移植を目的とした再生医療分野への応用が期待されている。しかし、ES 細胞は作製の際に受精卵を用いているため、倫理的な問題や拒絶反応といった課題がある [3]。一方、これらの問題をほぼ解決したのが人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) である。マウス iPS 細胞は、2006 年に 4 つの遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) をマウスの繊維芽細胞にウイルスベクターを用いて組み込むことで作製された [4]。続いて 2007 年にヒト iPS 細胞が樹立された [5]。iPS 細胞は ES 細胞と同様の増殖能及び多分化能を有しているだけでなく、体細胞から樹立することが可能なため、患者由来の iPS 細胞を用いることにより疾患の発症メカニズムの解明にも有効である [6]。

ES 細胞や iPS 細胞を創薬や再生医療分野に応用するには、分化を制御する基礎研究が重要である。そのため、多くの研究機関で特定の細胞に効率良く分化させる物質の探索や、遺伝子レベルで分化を制御する方法などが試みられている。我々は、ES 細胞や iPS 細胞から神経細

胞への効率的な分化方法について検討した。

(2) ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への分化

神経変性疾患には多くの場合、効果的な治療薬が少ないことがあり、ES 細胞や iPS 細胞を用いた創薬研究に期待が寄せられている [7]。ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への分化誘導法として、LIF を除いた培養により、3 胚葉に分化する能力を有する胚様体 (embryonic body : EB) を形成させ、レチノイン酸、繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor-2 : FGF) や上皮増殖因子 (epidermal growth factor : EGF) などを添加する方法が用いられている [8]。また、BMP シグナルと Nodal/Activin/TGF- β シグナルを同時に阻害剤で阻害することで、神経系への分化効率が上がるという報告がある [9]。これらの報告は、操作が難しく分化までに時間がかかるといった欠点がある。より簡便な操作で ES 細胞や iPS 細胞を神経細胞に分化させる方法として、我々の研究室では、ニワトリ 8 日胚脊髄後根神経節の培養上清液 (dorsal root ganglia-conditioned medium : DRG-CM) を ES 細胞や iPS 細胞の分化培養時に添加することで、効率良く神経細胞に分化させることが可能であることを報告した [10]。しかし、DRG-CM の添加による神経細胞への分化率は 50%程度であり、より簡便で効率的な分化促進剤の探索を行った。

(3) Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤について

Rho キナーゼ (ROCK) は、低分子量 G タンパク質 Rho の下流に位置するセリン/スレオニンキナーゼとして見出された [11]。Rho/ROCK シグナル伝達経路は、アクチン細胞骨格や細胞接着など様々な細胞機能

に関わっていることが知られている [12、13]。

ES 細胞や iPS 細胞の研究において、継代培養などの操作では細胞を分散させる必要があるが、これらの幹細胞は分散させた状態で培養するとアポトーシスにより細胞死を起こすことが知られている。Watanabe らは分散により起こるアポトーシスは、Rho/ROCK シグナル伝達経路が関わっており、ROCK 阻害剤を添加することによりアポトーシスが抑制されることを見出した [14]。さらに、細胞を凍結保存する際に ROCK 阻害剤を添加すると、解凍後の細胞生存率が上がることが報告された [15]。ROCK 阻害剤は、蒸留水に溶解でき、最低でも 4 週間は室温で安定しており、時間や濃度依存的に細胞内に取り込まれる [16]。これらの報告より、ES 細胞や iPS 細胞の増殖培養時に ROCK 阻害剤を添加することが行われるようになった。

Hirose ら及び Bito らは、Rho/ROCK シグナル伝達経路が神経細胞の軸索の退縮に関わっており、ROCK の選択的な阻害剤である ROCK 阻害剤 Y-27632 を添加することにより、軸索の退縮が抑制されることを報告した [17、18]。また、Rho や ROCK は、神経変性疾患のアルツハイマー病やパーキンソン病などにも関与しており、創薬のターゲットになる可能性が報告されている [19-22]。

以上のことから、ROCK 阻害剤が ES 細胞や iPS 細胞を神経細胞に分化させる新規分化促進剤として有効であると推測された。

(4) 本研究内容

Rho/ROCK シグナル伝達経路が様々な細胞機能に関わっていること、ROCK 阻害剤がアポトーシスや神経細胞の軸索の退縮を抑制することから、ROCK 阻害剤が ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への分化を促進さ

せる効果があるのではないかと考えた。ROCK 阻害剤はアポトーシスを抑制することから、ES 細胞や iPS 細胞の分化培養時の細胞死を抑制できる可能性があること、また神経細胞の軸索の退縮を抑制することから、ROCK 阻害剤が分化促進剤として利用できる可能性がある。そこで、ROCK 阻害剤が ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への分化に及ぼす影響について研究した。以下に、各章で述べる内容を示す。

第 1 章では、ROCK 阻害剤をマウス ES 細胞や iPS 細胞の培養液に添加することで、増殖や未分化状態維持に対する ROCK 阻害剤の影響について述べる。第 2 章では、浮遊培養により得られた細胞コロニーに ROCK 阻害剤を添加することで、神経細胞への分化を促進させる効果があるかどうかについて検討した結果を述べる。第 3 章では、神経細胞の分化、生存や増殖に関わるシグナル伝達経路について、タンパク質のリン酸化量の測定及び各シグナル伝達経路の阻害剤による標的タンパク質の働きを阻害する方法を用いて、ES 細胞から神経細胞への分化に対する ROCK 阻害剤の作用機作について検討した結果を述べる。

参考文献

- [1] M. J. Evans, M. H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature* 292 (1981) 154-156.
- [2] J. A. Thomson, J. I. Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science* 282 (1998) 1145-1147.
- [3] 発生・分化・再生研究 2005, 朝島誠編, 羊土社 (2005 年 1 月).
- [4] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells

from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126 (2006) 663-676.

[5] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* 131 (2007) 861-872.

[6] I.H. Park, N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, M.W. Lensch, C. Cowan, K. Hochedlinger, G.Q. Daley, Disease-specific induced pluripotent stem cells, *Cell* 134 (2008) 877-886.

[7] 神経系, 岡野栄之, 出澤真理編, 朝倉書店 (2013).

[8] K. Guan, H. Chang, A. Rolletschek, A.M. Wobus, Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells, *Cell Tissue Research* 305 (2001) 171-176.

[9] S.M. Chambers, C.A. Fasano, E.P. Papapetrou, M. Tomishima, M. Sadelain, L. Studer, Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling, *Nature Biotechnology* 27 (2009) 275-280.

[10] A. Kitazawa, N. Shimizu, Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia, *New Biotechnology* 28 (2011) 326-333.

[11] 阻害剤活用ハンドブック 秋山徹, 河府和義編, 羊土社, (2006年9月) .

[12] 石崎敏理, Rho 情報伝達とその生理的意義, *日薬理誌*, 121 (2003)

153-162.

[13] L. Castellani, E. Salvati, S. Alemá, G. Falcone, Fine regulation of RhoA and Rock is required for skeletal muscle differentiation, *Journal of Biological Chemistry* 281 (2006) 15249-15257.

[14] K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J.B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma, Y. Sasai, A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells, *Nature Biotechnology* 25 (2007) 681-686.

[15] D.A. Claassen, M.M. Desler, A. Rizzino, ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells, *Molecular Reproduction & Development* 76 (2009) 722-732.

[16] H. Kurosawa, Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114 (2012) 577-581.

[17] M. Hirose, T. Ishizaki, N. Watanabe, M. Uehata, O. Kranenburg, W.H. Moolenaar, F. Matsumura, M. Maekawa, H. Bito, S. Narumiya, Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells, *Journal of Cell Biology* 141 (1998) 1625-1636.

[18] H. Bito, T. Furuyashiki, H. Ishihara, Y. Shibasaki, K. Ohashi, K. Mizuno, M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Narumiya, A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons, *Neuron* 26 (2000) 431-441.

- [19] S. Leuchtenberger, M.P. Kummer, T. Kukar, E. Czirr, N. Teusch, S.A. Sagi, R. Berdeaux, C.U. Pietrzik, T.B. Ladd, T.E. Golde, E.H. Koo, S. Weggen, Inhibitors of Rho-kinase modulate amyloid- β (A β) secretion but lack selectivity for A β 42, *Journal of Neurochemistry* 96 (2006) 355-365.
- [20] Y. Zhou, Y. Su, B. Li, F. Liu, J.W. Ryder, X. Wu, P.A. Gonzalez-Dewhitt, V. Gelfanova, J.E. Hale, P.C. May, S.M. Paul, B. Ni, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic A β ₄₂ by inhibiting Rho, *Science* 302 (2003) 1215-1217.
- [21] Z. Zhou, J. Kim, R. Insolera, X. Peng, D.J. Fink, M. Mata, Rho GTPase regulation of α -synuclein and VMAT2: implications for pathogenesis of Parkinson's disease, *Molecular and Cellular Neuroscience* 48 (2011) 29-37.
- [22] B.K. Mueller, H. Mack, N. Teusch, Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders, *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (2005) 387-398.

第1章 ROCK 阻害剤が ES 細胞及び iPS 細胞の細胞増殖に及ぼす影響

第1節 緒言

マウス胚性幹 (ES) 細胞は受精後 3.5 日目の胚盤胞の内部細胞塊由来の細胞であり、自己複製能、多分化能、キメラ形成能といった特徴がある[1、2]。さらに、マウス人工多能性幹 (iPS) 細胞はマウス胚繊維芽細胞に 4 つの遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を導入することで樹立され、ES 細胞に類似した特徴を保持している細胞である[3]。これら ES 細胞と iPS 細胞を用いて、創薬や再生医療分野において広く応用研究が行われている。

Watanabe らは Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤の 1 つである Y-27632 が、ヒト ES 細胞の分散により誘導されるアポトーシスを抑制することを報告した[4]。Ohgushi らは分散により起こるアポトーシスの分子メカニズムを明らかにした[5、6]。これらのことから、ROCK 阻害剤を添加することでアポトーシスを抑制することによって、ES 細胞や iPS 細胞の分化を促進できるのではないかと推測した。さらに ROCK 阻害剤には、リプログラミング効率の向上[7、8]、セルソーティング後の細胞生存率の改善[9]や凍結保存した際の細胞生存率の改善[10-12]などが報告された。これらの報告より ES 細胞や iPS 細胞の培養に ROCK 阻害剤の添加が有効であることが示唆される。また ROCK シグナル伝達経路には、アクチン細胞骨格の制御や、様々な神経機能に寄与していることが報告されている[13、14]。そこで ROCK 活性を抑制することにより、*in vitro*において ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への分化を促進できる可能性があり、新規の分化促進剤として役立つのではないかと考えた。

本章では、ROCK 阻害剤を添加することにより、ES 細胞や iPS 細胞を

未分化状態で増殖できるかどうかについて検討し、ROCK 阻害剤を一定の濃度で添加することで細胞増殖を促進できることを見出した結果について述べる。

第 2 節 実験方法

1.2.1 培地等の調製

0.1%ゼラチン溶液

ゼラチン粉末 (214340; 和光純薬工業株式会社) を 0.1 mg を 99.9 mL の蒸留水に溶解した後、オートクレーブ滅菌 (121°C、5 分間) したものを 0.1%ゼラチン溶液とした。

10×リン酸緩衝液 (PBS)

蒸留水に塩化ナトリウム (NaCl; 191-01665; 和光純薬工業株式会社) を 80 g、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 196-02835; 和光純薬工業株式会社) を 27.5 g、塩化カリウム (KCl; 163-03545; 和光純薬工業株式会社) を 2 g、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4 ; 32379-00; 関東化学株式会社) を 2 g 溶解した後、pH を 1N 水酸化ナトリウム (NaOH; 197-02125; 和光純薬工業株式会社) 溶液で 7.01 に合わせ、蒸留水で 1000 mL にメスアップした。これをオートクレーブ滅菌 (121°C、15 分間) したものを 10×PBS とした。さらに、10×PBS を蒸留水で 10 倍希釈し、オートクレーブ滅菌 (121°C、5 分間) したものをプレートの洗浄に用いた。

フィーダー細胞用培地

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; SLM-220-B; Millipore) に 15% fetal bovine serum (FBS; 16140-063; GIBCO BRL)、1% nucleosides (ES-008-D; Millipore)、1% non-essential amino acid (NEAA; TMS-001-C; Millipore)、0.1 mM 2-mercaptoethanol (ES-007-E; Millipore)、1% L-glutamine (TMS-0020C; Millipore)、1% penicillin-streptomycin (15140; GIBCO BRL) を添加してフィーダー細胞用培地とした。

LIF 入りの ES 細胞用増殖培地：以下 ES 細胞用増殖培地と記述

Dulbecco's modified Eagle medium に 15% knockout serum replacement (KSR; 10828-028; GIBCO BRL)、1% L-glutamine、1% nucleosides、0.1 mM 2-mercaptoethanol、1% non-essential amino acid、1% penicillin-streptomycin、1000 U/mL leukemia inhibitory factor (LIF; 125-05603; 和光純薬工業株式会社) を添加して ES 細胞用増殖培地とした。KSR にはフィーダー細胞が培養プレートに接着するのを阻害する働きがあるため、フィーダー細胞の培養時には用いなかった。

LIF 入りの iPS 細胞用増殖培地：以下 iPS 細胞用増殖培地と記述

Dulbecco's modified Eagle medium に 15% fetal bovine serum、1% L-glutamine、0.1 mM 2-mercaptoethanol、1% non-essential amino acid、1% penicillin-streptomycin、1000 U/mL leukemia inhibitory factor を添加して iPS 細胞用増殖培地とした。

アルカリフォスファターゼ (AP) 染色用試薬

Alkaline Phosphatase Detection kit (SCR0004 ; Millipore) に含まれる Fast Red Violet solution と Naphthol Phosphate solution 及び滅菌水を直前に 2:1:1 の割合で混合して使用した。

AP 染色の際の洗浄には 1×rinse buffer を使用した。調製方法を以下に示す。

1×rinse buffer

蒸留水に 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris, 013-16385 ; 和光純薬工業株式会社) を 242.28 mg、塩化ナトリウム (NaCl ; 191-01665 ; 和光純薬工業株式会社) を 876.6 mg 溶解した後、塩酸 (HCl ; 080-01066 ; 和光純薬工業株式会社) で pH を 7.4 に合わせ、Tween20 (103168 ; 和光純薬工業株式会社) を 0.05 mL はかりとり溶解した。その後、蒸留水で 100 mL にメスアップし、オートクレーブ滅菌 (121℃、15 分間) したものを 1×rinse buffer とした。

1.2.2 培養プレートの調製

0.1%ゼラチン溶液を 100 mmφ 組織培養ディッシュ (430167; Corning, NY, USA) には 5 mL または 60 mmφ 組織培養ディッシュ (353002 ; BD Falcon) には 2 mL、96 穴組織培養プレート (3860-096 ; Iwaki) には各ウェル 50 μL 添加して、室温で 1 時間以上静置した。0.1%ゼラチン溶液を除去した後、等量の PBS で 1 回洗浄し、ゼラチンコートディッシュとした。

1.2.3 フィーダー細胞の培養

液体窒素中に保存したフィーダー細胞（R-PMEF-H；初代マウス胚繊維芽細胞、ハイグロマイシン耐性、マイトマイシン処理済み；Millipore）を取り出し、37℃のウォーターバスで急速に融解させた。融解したフィーダー細胞を 5×10^6 cells 取り、フィーダー細胞用培地を 9 mL 入れた 15 mL 遠心チューブ（1332-015S；Watoson）に入れて、軽くピペッティングして懸濁した。1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清液を除去した後、フィーダー細胞用培地を 1 mL 加え、軽くピペッティングして分散させた。9 mL のフィーダー細胞用培地を入れたゼラチンコート 100 mm φ ディッシュにフィーダー細胞を播種し、37℃、5%CO₂ 条件で 24 時間培養した。培養後、フィーダー細胞のディッシュ底への接着を確認し、全量培地を交換した。以後、3 日間毎に培地交換することで 1 週間程度フィーダー細胞の活性を維持できた。

1.2.4 マウス ES 細胞の増殖培養

フィーダー細胞を播種した 100 mm φ ディッシュの培地を、9 mL の ES 細胞用増殖培地に交換した。液体窒素中に保存した未分化マウス ES 細胞（R-CMTI-1A；129SV；継代数 11-12、Millipore）を取り出し、37℃のウォーターバス中で急速に融解させた。融解した ES 細胞を 2.0×10^6 cells 取り、2 mL の ES 細胞増殖用培地を入れた 15 mL の遠心チューブに移し、1 分間静置した。その後、2 mL の ES 細胞増殖用培地を添加して 1 分間静置し、さらに、4 mL の ES 細胞増殖用培地を添加して 1 分間静置した。ES 細胞懸濁液を軽くピペッティング後、730 rpm で 3 分間遠心分離した。上清液を除去した後、1 mL の ES 細胞用増殖培地を添加して軽くピペッティング後、フィーダー細胞接着培養プレートに

播種し、37℃、5% CO₂ 条件で培養した。毎日培地を全量交換し、細胞の継代培養を 3-4 日間毎に行った。

1.2.5 マウス ES 細胞の継代培養と凍結保存

培養 3-4 日目の対数増殖期にある ES 細胞培養中の培地を除去し、PBS を 5 mL 添加して ES 細胞を洗浄した。トリプシン/EDTA 溶液 (SM-2003-C; Millipore) を 2 mL 添加して室温で 30 秒間反応させた後、トリプシン/EDTA 溶液を除去した。2 分間静置して ES 細胞の剥離を確認し、ES 細胞用増殖培地を 5 mL 添加して軽くピペティングし、ES 細胞を脱離させた。15 mL 遠心チューブに細胞懸濁液を回収し、軽くピペティングして細胞を分散させた。730 rpm で 3 分間遠心分離して上清液を除去した後、1 mL の ES 細胞増殖用培地を添加し、軽くピペティングして細胞を分散させた。トリパンプルー溶液（使用前に 0.2%トリパンプルー：4.25% NaCl=4：1 となるように調製した）で ES 細胞を染色し、血球計数盤（B0746; サンリード硝子有限会社、埼玉）を用いて 1 μL 中に含まれる細胞数に希釈倍率をかけ、そこに全液量をかけて計数した。そのときの計算式を以下に示す。

$$\text{生細胞数} = (\text{4 区画の生細胞数の合計} \div 4 \times 10 \times 2) \times \text{全液量} (\mu\text{L})$$

継代培養を次のように行った。730 rpm で 3 分間遠心分離して上清液を除去した後、1 mL の ES 細胞用増殖培地を添加して細胞を分散させた。細胞数を計数した後、フィーダー細胞を接着させた 100 mm φ デイッシュに 0.5×10^6 cells/10 mL になるように播種し 37℃、5% CO₂ 条件で培養した。毎日培地を全量交換し、継代培養を 3-4 日毎に行っ

た。

凍結保存を次のように行った。730 rpm で 3 分間遠心分離して上清液を除去した後、1 mL の ES 細胞用増殖培地を添加して、ピペッティングにより細胞を分散させた。細胞数を 2×10^6 cells に調整した細胞懸濁液と凍結保存培地 (ES-0002-D ; Millipore) を 1 : 1 となるように混合し、セラムチューブ (2732-002 ; Iwaki) に加えた。4°C で 5 分間、-20°C で 30 分間、-80°C で 24 時間それぞれ静置した後、液体窒素容器内に保存した。

1.2.6 マウス iPS 細胞の増殖培養

フィーダー細胞を播種した 100 mmφ ディッシュの培地を、9 mL の iPS 細胞用増殖培地に交換した。液体窒素に保存した未分化マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17 ; APS0001 ; 継代数 14、RIKEN Cell Bank) を取り出し、37°C のウォーターバス中で急速に融解させた。融解した iPS 細胞を 1.0×10^6 cells 取り、5 mL の iPS 細胞用増殖培地を入れた 15 mL の遠心チューブに入れた。その後、iPS 細胞懸濁液を軽くピペッティング後、1000 rpm で 3 分間遠心分離した。上清液を除去した後、5 mL の iPS 細胞用増殖培地を添加して軽くピペッティング後、再度 1000 rpm で 3 分間遠心分離した。上清液を除去した後、1 mL の iPS 細胞用増殖培地を添加して軽くピペッティングして、フィーダー細胞を接着させた培養プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 条件で培養した。毎日培地を全量交換し、細胞の継代培養を 3-4 日間毎に行った。

1.2.7 マウス iPS 細胞の継代培養と凍結保存

培養 3-4 日目の対数増殖期にある iPS 細胞の培地を除去し、PBS を 5 mL 添加して iPS 細胞を洗浄した。トリプシン/EDTA 溶液を 2 mL 添加して 37°C で 10 分間反応させた後、iPS 細胞用増殖培地を 4 mL 添加して軽くピペッティングし、15 mL 遠心チューブに細胞懸濁液を回収した。培養に使用した 100 mm φ ディッシュに再度 4 mL の iPS 細胞用増殖培地を添加して、15 mL 遠心チューブに細胞懸濁液を回収した。730 rpm で 3 分間遠心分離して上清液を除去した後、2 mL の iPS 細胞用増殖培地を添加し、軽くピペッティングして細胞を分散させた。トリパンブルー溶液で iPS 細胞を染色し、血球計数盤を用いて細胞数を計数した。

継代培養を次のように行った。730 rpm で 3 分間遠心分離して上清液を除去した後、2 mL の iPS 細胞用増殖培地を添加して、ピペッティングにより細胞を分散させた。細胞数を計数した後、フィーダー細胞を接着させた 100 mm φ ディッシュに 1×10^6 cells/10 mL になるように播種し 37°C、5% CO₂ 条件で培養した。毎日培地を全量交換し継代培養を 3-4 日毎に行った。

凍結保存を次のように行った。730 rpm で 3 分間遠心分離して上清液を除去した後、2 mL の iPS 細胞用増殖培地を添加して細胞を分散させた。細胞数を 1×10^6 cells に調整した細胞懸濁液と、凍結保存培地 (DMSO (041-29351; 和光純薬工業株式会社) : iPS 細胞用増殖培地 = 1 : 4) を 1 : 1 となるように混合し、セラムチューブに加えた。4°C で 5 分間、-20°C で 30 分間、-80°C で 24 時間それぞれ静置した後、液体窒素容器内に保存した。

1.2.8 ES 細胞及び iPS 細胞の未分化状態の確認

ES 細胞や iPS 細胞は未分化状態では細胞膜アルカリフォスファターゼを高レベルで発現していることが知られている。未分化状態を維持するために LIF を含む培地で培養するが、未分化の状態を維持しているか、また ROCK 阻害剤の添加により未分化状態の維持に影響がないかを調べるため、AP 染色を次のように行った。3-4 日間培養した各細胞の培地を全て除去し、PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（163-20145；和光純薬工業株式会社）を添加して 1-2 分間静置することで細胞を固定した。4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を除去し、1×rinse buffer で洗浄した。遮光下で AP 染色用試薬を細胞が浸漬されるまで添加し、室温で 15 分間静置した。AP 染色用試薬を除去し、乾燥を避けるために PBS に細胞を浸漬し、倒立顕微鏡下で AP 染色により赤く染色されているかどうかを観察した。

1.2.9 ROCK 阻害剤による ES 細胞及び iPS 細胞の細胞増殖への影響

ES 細胞や iPS 細胞の特徴の 1 つとして、半永久的に増殖することが可能であることがある。ROCK 阻害剤の添加により細胞増殖に影響がないかを調べるために、トリパンブルー染色をして生細胞数を計数した。

フィーダー細胞を播種し 96 穴組織培養プレートに 500 cells/well となるように ES 細胞及び iPS 細胞を播種し、ROCK 阻害剤を添加して 37°C、5% CO₂ 条件で培養した。毎日培地を全量交換し、培養 2、4、6 日間毎にトリパンブルー染色を行い、生細胞数を計数した。

第3節 実験結果

1.3.1 ES細胞及びiPS細胞の増殖

ES細胞やiPS細胞は未分化状態を維持しながら、半永久的に増殖することが可能である。しかし、継代培養を繰り返すうちに性質が変化した細胞が現れる可能性があるため、性状が変化していないことが確認されている細胞を使用する必要がある。そこでES細胞の場合には継代数16-20、iPS細胞の場合には継代数15-17の細胞を実験に使用した。

フィーダー細胞を接着させた100 mmφディッシュに、ES細胞またはiPS細胞を播種して3日間培養したES細胞及びiPS細胞を光学顕微鏡で観察した結果をFig. 1-1 (A) (B) 及び Fig. 1-2 (A) (B) に示す。ES細胞やiPS細胞は、フィーダー細胞上にコロニーを形成しながら増殖していた。また、未分化状態を維持した細胞は写真のように輪郭がはっきりとしており、コロニー内の細胞が明確に区別できず、AP染色で赤く染まった。しかし、Fig. 1-1 (C) 及び Fig. 1-2 (C) に示すように、分化を始めたES細胞及びiPS細胞は赤く染まらず、かつコロニー内の細胞が区別できるようになった。そのため、顕微鏡で観察し、コロニー内の細胞が区別できるディッシュは実験に用いなかった。

1.3.2 ROCK阻害剤添加によるES細胞及びiPS細胞の増殖への影響

未分化状態を維持したES細胞及びiPS細胞の増殖におけるROCK阻害剤の影響について検討した。ROCK阻害剤を0-100 μM の濃度で培地に添加し、37°C、5% CO_2 条件で3日間培養後、AP染色により未分化状態が維持されているかどうかを検討した結果をFig. 1-3 及び Fig. 1-4に示す。0-20 μM のROCK阻害剤を添加した場合、AP染色により赤く染まり、未分化状態を維持していた。一方、50-100 μM のROCK阻害剤を

添加した場合、コロニーの形状が崩れ、AP染色により赤く染まらなかった。

ROCK 阻害剤を 0-40 μM の濃度で培地に添加し、2-6 日間培養した。培養後トリパンブルー染色を行い、血球計算盤を用いて生細胞数を計数した結果を Fig. 1-5 及び Fig. 1-6 に示す。ES 細胞、iPS 細胞ともに培養 2 日から 6 日と培養すると細胞数が増加した。また、ROCK 阻害剤を 10 μM の濃度で添加した場合に ES 細胞と iPS 細胞ともに増殖した細胞数が最も多くなった。

第 4 節 考察

ES 細胞及び iPS 細胞の増殖に対する ROCK 阻害剤の影響を検討した。5-20 μM の ROCK 阻害剤を添加した場合に、未分化状態を維持していた (Fig. 1-3 及び Fig. 1-4)。細胞数を計数した結果 (Fig. 1-5 及び Fig. 1-6)、10 μM の ROCK 阻害剤を添加した場合において生細胞数を大きく増加させた。これらのことから、ROCK 阻害剤は ES 細胞や iPS 細胞の増殖を促進させた。Watanabe らは、ROCK 阻害剤が接着培養において、分散したヒト ES 細胞の生存を可能にすることを報告した [4]。Koyanagi らは、Rho/ROCK 経路の抑制がマウス ES 細胞由来の神経前駆細胞の生存を増強することを報告した [15]。これらの報告は ROCK 阻害剤が様々な細胞種のアポトーシスを抑制することで生存を可能にすることを示している。また、Kitajima ら及び Pakzad らは、ゼラチンコートやフィブロネクチンといった細胞外マトリックスにおけるヒト多能性幹細胞の接着の増強を報告した [16、17]。これらの報告及び我々の研究結果から、ROCK 阻害剤はアポトーシスを抑制し、細胞接着を増強することにより増殖を促進していると考えられる。

第 5 節 結言

本研究において、ROCK 阻害剤を添加して ES 細胞及び iPS 細胞を培養した結果、培地に ROCK 阻害剤を 0-20 μM の濃度で添加した場合、未分化を維持したまま培養することができるが、それ以上の濃度で添加するとコロニーの形状が崩れ、未分化の状態を維持できないことが分かった。さらに、10 μM の ROCK 阻害剤を培地に添加して培養することで、細胞の増殖が促進されることを明らかにした。

以上の結果、ROCK 阻害剤には細胞増殖を促進させる効果があることが示された。次章では、分化促進剤として ROCK 阻害剤を用いて分化培養を行い、ES 細胞及び iPS 細胞から神経細胞や筋肉細胞への分化に及ぼす影響について検討した結果について述べる。

第 6 節 参考文献

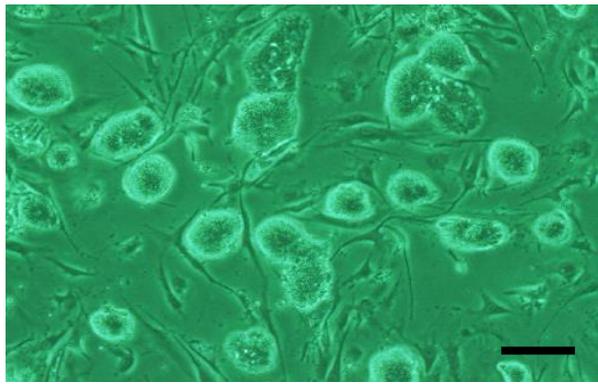
- [1] M. J. Evans, M. H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature* 292 (1981) 154-156.
- [2] G. R. Martin, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 78 (1981) 7634-7638.
- [3] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126 (2006) 663-676.
- [4] K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J. B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma,

- Y. Sasai, A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells, *Nature Biotechnology* 25 (2007) 681-686.
- [5] M. Ohgushi, M. Matsumura, M. Eiraku, K. Murakami, T. Aramaki, A. Nishiyama, K. Muguruma, T. Nakano, H. Suga, M. Ueno, T. Ishizaki, H. Suemori, S. Narumiya, H. Niwa, Y. Sasai, Molecular pathway and Cell State Responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell* 7 (2010) 225-239.
- [6] M. Ohgushi, Y. Sasai, Lonely death dance of human pluripotent stem cells: ROCKing between metastable cell states, *Trends in Cell Biology* 21 (2011) 274-282.
- [7] L. Warren, P.D. Manos, T. Ahfeldt, Y.H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P.K. Mandal, Z.D. Smith, A. Meissner, G.Q. Daley, A.S. Brack, J.J. Collins, C. Cowan, T.M. Schlaeger, D.J. Rossi, Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA, *Cell Stem Cell* 7 (2010) 618-630.
- [8] I.H. Park, R. Zhao, J.A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T.A. Ince, P.H. Lerou, M.W. Lensch, G.Q. Daley, Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors, *Nature* 45 (2008) 141-146.
- [9] N. Emre, J.G. Vidal, J. Elia, E.D. O' Connor, R.I. Paramban, M.P. Hefferan, R. Navarro, D.S. Goldberg, N.M. Varki, M. Marsala, C.T. Carson, The ROCK inhibitor Y-27632 improves recovery of human embryonic stem cells after fluorescence-activated cell sorting with multiple cell surface markers, *PLoS One* 5 (2010) e12148.

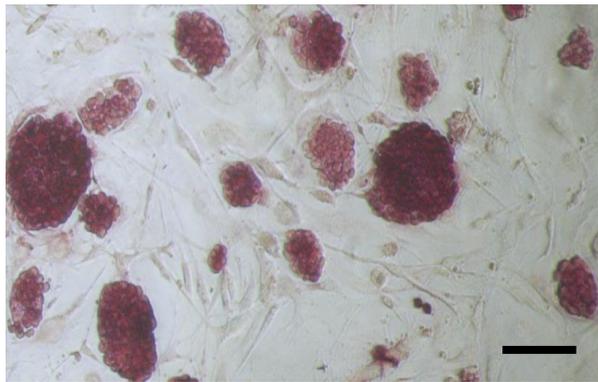
- [10] R.M. Ibanez, C. Unger, A. Stromberg, D. Baker, J.M. Canals, O. Hovatta, Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor, *Human Reproduction* 23 (2008) 2744-2754.
- [11] D.A. Claassen, M.M. Desler, A. Rizzino, ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells, *Molecular Reproduction & Development* 76 (2009) 722-732.
- [12] X. Li, R. Krawetz, S. Liu, G. Meng, D.E. Rancourt, ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells, *Human Reproduction* 24 (2009) 580-589.
- [13] A. Schmandke, A. Schmandke, S.M. Strittmatter, ROCK and Rho: Biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases, *Neuroscientist* 13 (2007) 454-469.
- [14] L. Castellani, E. Salvati, S. Alemá, G. Falcone, Fine regulation of RhoA and Rock is required for skeletal muscle differentiation, *Journal of Biological Chemistry* 281 (2006) 15249-15257.
- [15] M. Koyanagi, J. Takahashi, Y. Arakawa, D. Doi, H. Fukuda, H. Hayashi, S. Narumiya, N. Hashimoto, Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during Transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors, *Journal of Neuroscience Research* 86 (2008) 270-280.
- [16] H. Kitajima, H. Niwa, Clonal expansion of human pluripotent

stem cells on gelatin-coated surface, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396 (2010) 933-938.

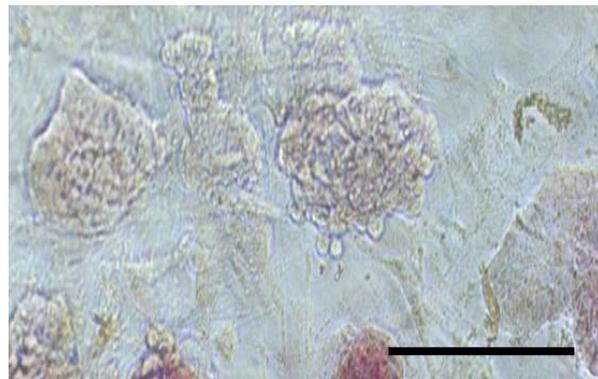
[17] M. Pakzad, M. Totonchi, A. Taei, A. Seifinejad, S.N. Hassani, H. Baharvand, Presence of a ROCK inhibitor in extracellular matrix supports more undifferentiated growth of feeder-free human embryonic and induced pluripotent stem cells upon passaging, *Stem Cell Reviews and Reports* (2010) 96-107.



(A) Control

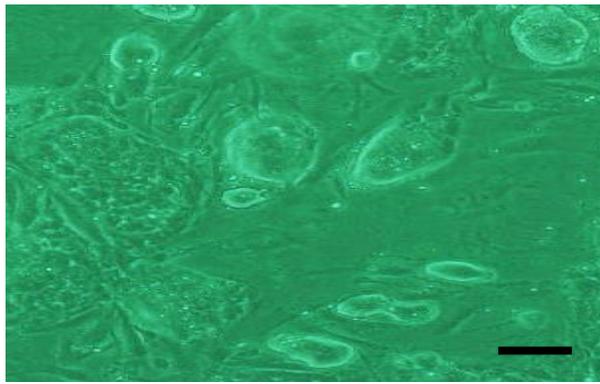


(B) AP staining

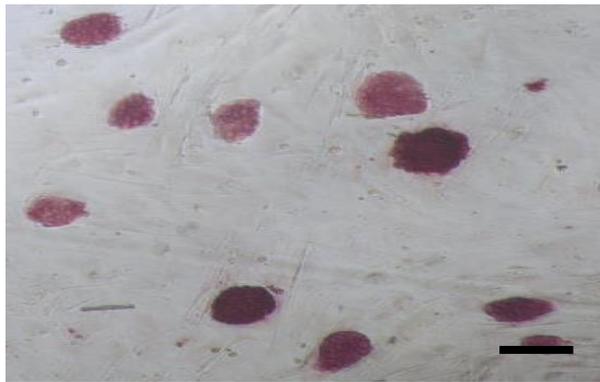


(C) AP staining

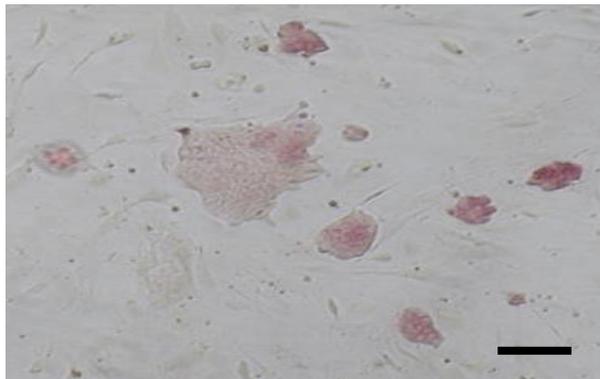
Fig.1-1 Optical micrographs of ES cells
Scale bar: 100 μm



(A) Control

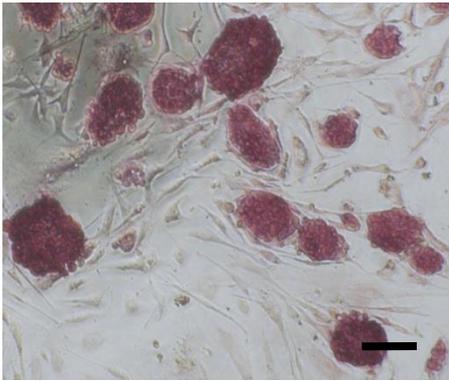


(B) AP staining

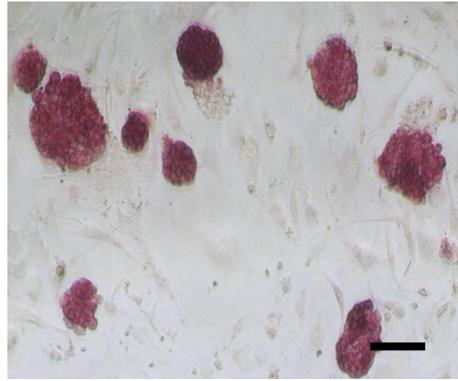


(C) AP staining

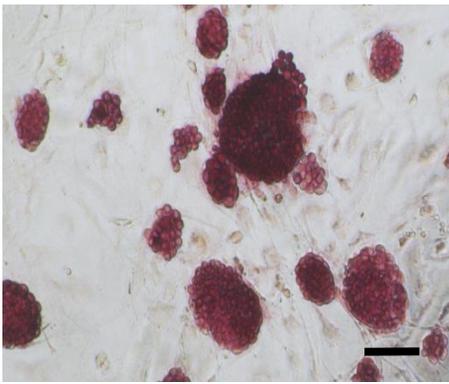
Fig.1-2 Optical micrographs of iPS cells
Scale bar: 100 μm



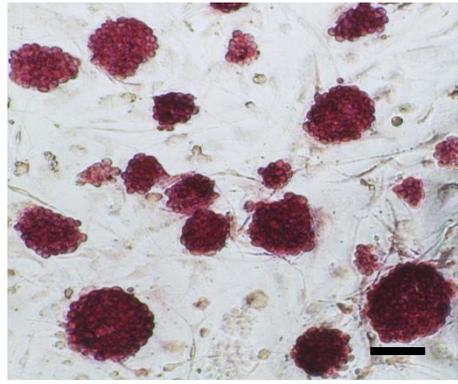
0 μM



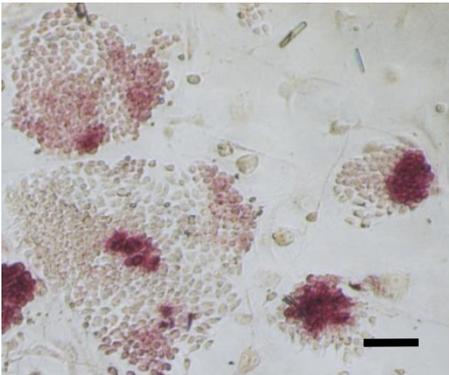
5 μM



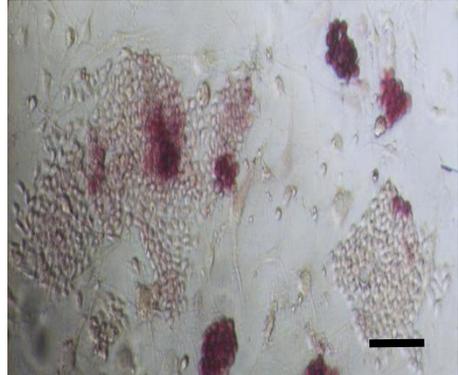
10 μM



20 μM



50 μM

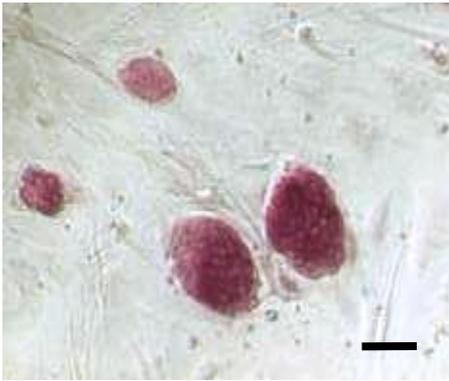


100 μM

Fig.1-3 Effects of ROCK inhibitor on the proliferation of undifferentiated ES cell colonies

ROCK inhibitor was added to the culture medium in the range of 0-100 μM

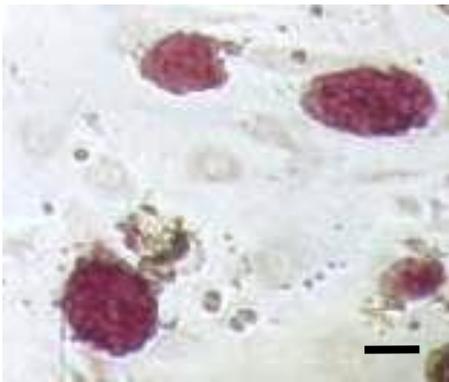
Scale bar: 100 μm



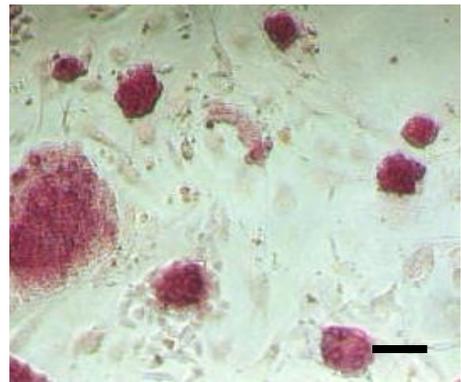
0 μM



5 μM



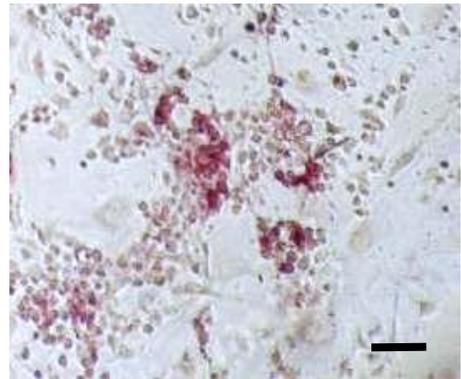
10 μM



20 μM



50 μM

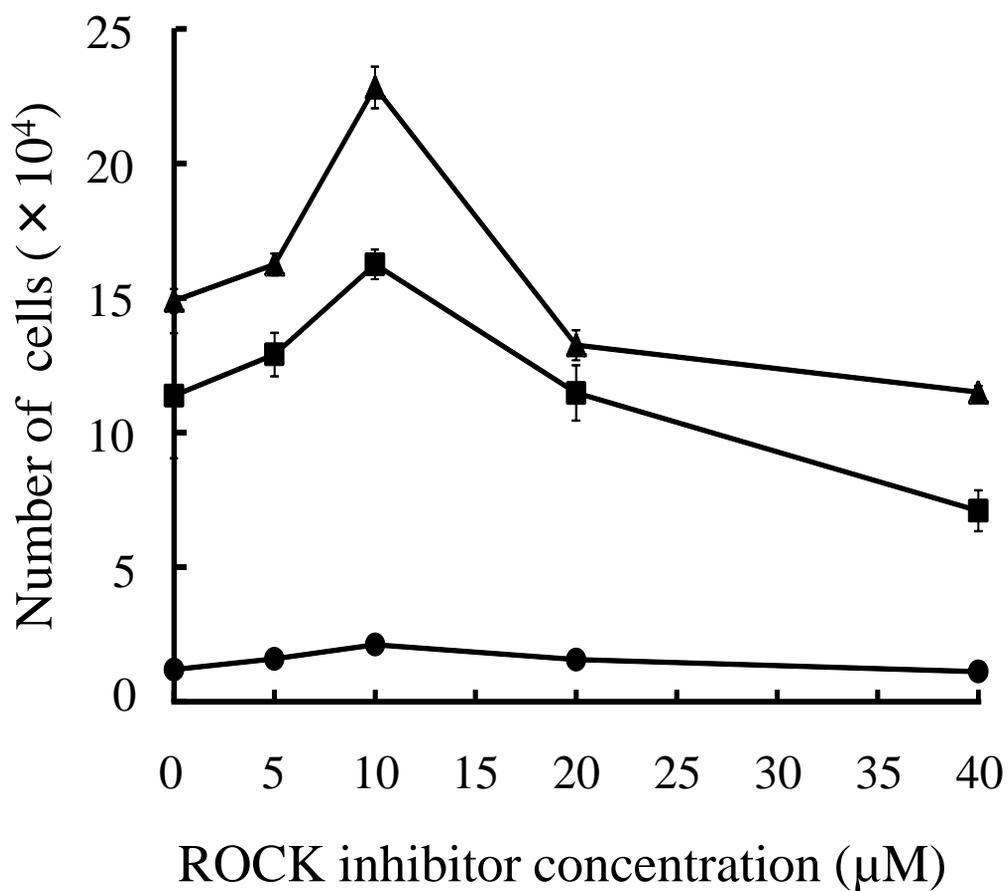


100 μM

Fig.1-4 Effects of ROCK inhibitor on the proliferation of undifferentiated iPS cell colonies

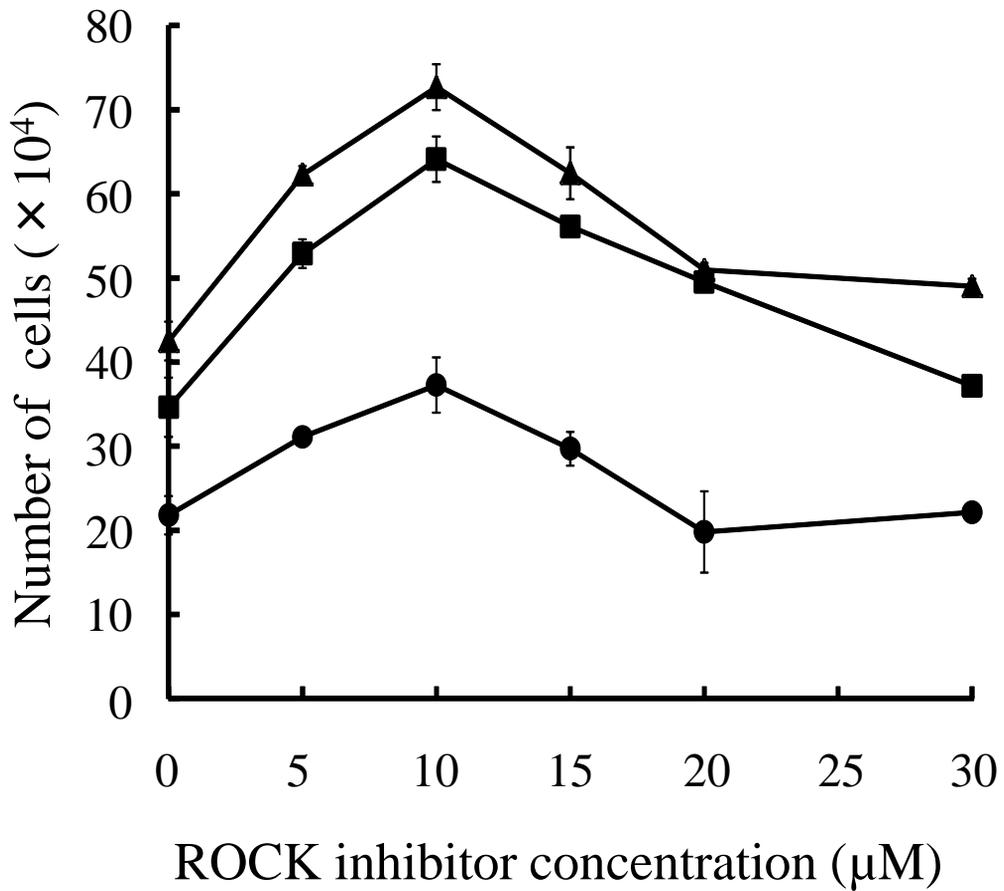
ROCK inhibitor was added to the culture medium in the range of 0-100 μM

Scale bar: 100 μm



● 2 d of culture ■ 4 d of culture ▲ 6 d of culture

Fig.1-5 Effects of ROCK inhibitor on the proliferation of ES cells



● 2 d of culture ■ 4 d of culture ▲ 6 d of culture

Fig.1-6 Effects of ROCK inhibitor on the proliferation of iPS cells

第 2 章 ROCK 阻害剤が ES 細胞及び iPS 細胞の分化に及ぼす影響

第 1 節 緒言

第 1 章では、増殖培養時に低濃度の ROCK 阻害剤を添加することにより、未分化状態を維持したまま効率良く増殖させることができることを明らかにした。本研究で用いた ROCK 阻害剤 Y-27632 は、最初に血管平滑筋弛緩薬として合成された化合物である [1]。その後の研究により、細胞遊走、アクチン細胞骨格やアポトーシスなど様々な細胞機能に関わっていることが報告された [2、3]。また、高血圧のモデルラットにおいて血圧を下げる効果があることや、血管攣縮に関連するくも膜下出血に対する有効性なども報告されている [4、5]。さらに Fasudil という ROCK 阻害剤は、眼圧を下げることで緑内障の治療薬として使われている。これらのことから、ROCK 阻害剤は人体に適用しやすいと考えられ、分化促進剤として ES 細胞や iPS 細胞の分化を促進させる効果があった場合、再生医療分野、とくに神経再生や移植治療などに用いる細胞を作成する際に利用できる可能性が期待できる。

Hirose ら及び Bito らは、神経芽細胞種 N1E-115 細胞や中枢神経系の神経細胞において Rho/ROCK シグナル伝達経路が軸索の退縮に関わっており、ROCK 阻害剤を添加することでその作用が抑制されることを報告した [6、7]。これらの報告から、ES 細胞や iPS 細胞の分化培養時に ROCK 阻害剤を添加することで、神経細胞への分化を促進させる可能性が示唆される。

本章において、分化培養時に ROCK 阻害剤を添加することによる、ES 細胞や iPS 細胞の分化に及ぼす影響について検討し、ROCK 阻害剤が神経細胞と筋肉細胞への分化を促進させる効果を有することを見出した

結果について述べる。

第 2 節 実験方法

2.2.1 培地等の調製

0.1%ゼラチン溶液

第 1 章 1.2.1 に記述したように調製した。

分化用培地

49% Dulbecco's modified Eagle medium に 49% F-12K nutrient mixture (21127-022; GIBCO BRL)、1% N-2 supplement (17502-048; GIBCO BRL)、1% penicillin-streptomycin を添加して分化用培地とした。

2.2.2 培養プレートの調製

0.1%ゼラチン溶液を用いて、第 1 章 1.2.2 項に記述したようにゼラチンコート 96 穴組織培養プレートを調製した。

2.2.3 マウス ES 細胞の浮遊培養

第 1 章に記述したように、ES 細胞をフィーダー細胞上で 3-4 日間培養し、継代培養を行った。細胞数を計数後、ES 細胞 (5×10^5 cells) を非接着性 100 mm φ ディッシュ (AU3100; 栄研化学株式会社) に播種し、ES 細胞用増殖培地を加えて全量を 10 mL にしたものを 37°C、5% CO₂ 条件で 8-9 日間培養した。3 日毎に半分量の培地を交換し、直径 200 μm の ES 細胞コロニーを形成させた。

浮遊培養の際に、播種する細胞数が多すぎるとコロニー同士が接着して直径が大きくなコロニーが多数形成され、細胞数が少なすぎると長

期培養してもコロニーが殆ど形成されない。

2.2.4 マウス iPS 細胞の浮遊培養

2.2.3 項に記述した ES 細胞の場合と同様に、浮遊培養により直径 200 μm の iPS 細胞コロニーを形成させた。なお、培養期間を 6-7 日間とし、3 日毎に半分量の培地を交換した。

2.2.5 浮遊培養で形成された細胞コロニーの未分化状態の確認

直径 200 μm の細胞コロニーを実体顕微鏡下で観察しながらピペットマンを用いて採取し、2 mL の PBS を入れた 35 mm ϕ ディッシュ (430165; CORNING) に入れて洗浄した。PBS を除去し、1.2.8 項で記述したように AP 染色を行い、浮遊培養により形成された細胞コロニーが未分化状態を維持しているかどうかを調べた。

2.2.6 細胞コロニーの分化培養

ES 細胞、iPS 細胞ともに浮遊培養することで得られた直径 200 μm の細胞コロニーを、実体顕微鏡下でピペットマンを用いて採取し、ゼラチンコート 96 穴組織培養プレートの 1 ウェルあたり 1 個のコロニーを播種した。培養開始時に、分化用培地に ROCK 阻害剤または ROCK 阻害剤と 10 ng/mL の神経成長因子 (Recombinant Human β -NGF : 256-GF-100/CF ; R&D Systems, Inc.) を添加して、37°C、5% CO_2 条件で 12 日間培養した。3 日毎に半分量の培地を交換した。ROCK 阻害剤の添加濃度の検討には、分化用培地に ROCK 阻害剤を 0、5、10、20、50 μM になるように添加して培養した。

2.2.7 免疫蛍光染色法

細胞を分化培養した 96 穴組織培養プレート各ウェルから培地を少し残して除去し、細胞を冷 PBS で 3 回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて、室温で 30 分間反応させて固定した。冷 PBS で 3 回洗浄後、細胞を 99.8%の冷メタノール (131-01826 ; 和光純薬工業株式会社) を用いて -80°C で 15 分間処理した。冷 PBS で 3 回洗浄した後、5% bovine serum albumin (BSA ; 019-21272 ; Wako) を含む 0.5% Triton X-100 溶液でブロッキングした。1 次抗体をサンプルに加え、 4°C で一晩インキュベートした。1 次抗体には、250 倍希釈した神経細胞のマーカである抗 β III-tubulin 抗体 (MAB1637 ; Millipore)、500 倍希釈した運動神経細胞のマーカである抗 Lim-3 抗体 (AB3202 ; Millipore)、500 倍希釈した感覚神経細胞のマーカである抗 Brn-3 抗体 (sc-6026 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、500 倍希釈した筋肉細胞のマーカである抗 α -actinin 抗体 (sc-7453 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、250 倍希釈した平滑筋細胞マーカである抗 α -smooth muscle 抗体 (A5228 ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、250 倍希釈した心筋細胞マーカである抗 cardiac troponin I 抗体 (ab47003 ; Abcam, Cambridge, UK)、250 倍希釈した骨格筋細胞マーカである抗 actin- α -1 抗体 (C0121 ; Assay Biotechnology, Sunnyvale, CA, USA) を使用した。1 次抗体を除去し、冷 PBS で 3 回洗浄した後、Alexa Fluor 488-labeled 2 次抗体 (A-11005 or A-11008 ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いて、振盪しながら室温で 30 分間蛍光標識した。2 次抗体を除去し、冷 PBS で 3 回洗浄した後、フルオロ・イメージアナライザー (FLA-3000GF ; 富士フイルム株式会社、東京) を用いてパソコ

ンに蛍光イメージを取り込み、画像解析ソフトにより蛍光強度を解析し、各細胞への分化率を求めた。

2.2.8 フローサイトメトリーによる陽性細胞数の計数

分化培養した細胞を冷 PBS で 3 回洗浄した後、トリプシン/EDTA 溶液を添加して室温で 2 分間インキュベートした。血清入りの培地を添加してトリプシン/EDTA の働きを止めた。15 mL 遠心チューブに細胞を移し、800 rpm、5 分間遠心分離した。冷 PBS で細胞を洗浄し、1.5 mL エッペンチューブに細胞を移した。ピペッティングにより細胞コロニーを分散させ、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて、室温で 30 分間反応させて固定した。1200 rpm、5 分間遠心分離した後、冷 PBS で洗浄した。1200 rpm、5 分間遠心分離した後、細胞を 99.8% の冷メタノールを用いて -80°C で 15 分間処理した。1200 rpm、5 分間遠心分離した後、冷 PBS で洗浄した。1 次抗体を加え 4°C で一晩反応させた。冷 PBS で 3 回洗浄した後、2 次抗体を加え室温で 30 分間蛍光標識した。冷 PBS で 4 回洗浄後、フローサイトメーター (JSAN ; Bay Bio-science, Kobe, Japan) を用いて陽性細胞数を計数した。

2.2.9 統計分析

測定値を平均値±標準誤差で示した。各データを多重比較法の一次元配置分散分析 (one-way ANOVA) における Tukey-Kramer test を用いて検定し、 $p<0.05$ のとき統計学的に有意であると判断した。

第3節 実験結果

2.3.1 ES細胞及びiPS細胞コロニーの未分化状態の確認

5×10^5 cellsの未分化マウスES細胞及びiPS細胞を、非接着性100 mm φディッシュに増殖用培地を用いて浮遊培養し、直径200 μmの細胞コロニーを形成させた。浮遊培養中のディッシュには、直径400 μm以上のもの、コロニー同士が接着しているものやコロニー内の細胞が詰まっていないものが混在していた。以前の研究で、コロニー内の細胞が詰まっていないものは分化能が悪く、直径が400 μm以上のものは分化を始めているコロニーである可能性があることが明らかになっている[8]。そこで本研究には直径200 μmで、かつコロニー内の細胞が詰まっているコロニーを用いた。Fig. 2-1 (1) 及び (2) に示す直径200 μmの細胞コロニーはAP染色により赤く染まっていたことから、未分化状態を維持できていた。

分化培養する際に一部の細胞コロニーをAP染色し、未分化状態を維持しているかどうかを確認してから使用した。

2.3.2 ROCK阻害剤添加による神経細胞への分化に及ぼす影響

ROCK阻害剤がES細胞及びiPS細胞から神経細胞への分化に及ぼす影響について検討した。浮遊培養を行い、直径200 μmの細胞コロニーを形成させた後、96穴組織培養プレートに播種した。ROCK阻害剤またはROCK阻害剤とNGF (10 ng/mL) を同時に添加して12日間分化培養し、フルオロ・イメージアナライザーを用いて神経細胞のマーカーであるβ III-tubulinの蛍光強度を測定した。ES細胞の結果をFig. 2-2(A)に、iPS細胞の結果をFig. 2-3に示す。ROCK阻害剤やNGFを添加せずに培養したES細胞とiPS細胞コロニーの蛍光強度を100%とした。ROCK

阻害剤を添加した場合の蛍光強度は、無添加の場合の蛍光強度より高いという結果が得られた。さらに、ROCK 阻害剤と同時に NGF を添加した場合の蛍光強度は、ROCK 阻害剤を添加した場合の蛍光強度より高く、神経細胞への分化促進効果が増大した。ES 細胞、iPS 細胞ともに 20 μ M の ROCK 阻害剤を添加した場合に最も神経細胞への分化が促進されたことから、これ以降の分化培養には 20 μ M の ROCK 阻害剤を用いた。蛍光顕微鏡を用いて ES 細胞由来の神経細胞を観察した結果を Fig. 2-2(B) に示す。コントロールと比較して、ROCK 阻害剤を添加することで神経突起の数が増加しており、NGF を同時に添加することでさらに増加した。

ROCK 阻害剤の分化促進効果が、アポトーシスを抑制したことで、生細胞数が増加した結果によるものかどうかについて検討した。ROCK 阻害剤または ROCK 阻害剤と NGF を同時に添加して 12 日間分化培養を行い、生細胞数を計数した結果を Fig. 2-4 に示す。ROCK 阻害剤を添加した場合、ROCK 阻害剤と NGF を同時に添加した場合ともに、コントロールと比較して細胞数に大きな差は見られなかった。これより、ROCK 阻害剤は生細胞のアポトーシスを抑制して、分化した細胞数を増加させるのではなく、ROCK 阻害剤には ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への分化を促進させる効果があると考えられる。

ROCK 阻害剤を添加することで、どの程度の割合で神経細胞に分化しているかについて検討した。12 日間分化培養を行った ES 細胞及び iPS 細胞コロニーを免疫蛍光染色し、フローサイトメーターを用いて陽性細胞数を計数した。ES 細胞の結果を Fig. 2-5 に、iPS 細胞の結果を Fig. 2-6 に示す。ES 細胞の場合、分化用培地で培養すると 44%が神経細胞に分化した。さらに、ROCK 阻害剤を添加した場合には 61%、ROCK

阻害剤と NGF を同時に添加した場合には 71%が神経細胞に分化した。このとき、ROCK 阻害剤や NGF を添加せずに培養したコントロールに対して統計処理したところ、ROCK 阻害剤を添加した場合に $p < 0.05$ 、ROCK 阻害剤と NGF を添加した場合に $p < 0.01$ で統計的に有意差があることが示された。iPS 細胞の場合、分化用培地で培養すると 25%が神経細胞に分化した。ROCK 阻害剤を添加した場合には 34%、ROCK 阻害剤と NGF を同時に添加した場合には 38%が神経細胞に分化した。このとき、ROCK 阻害剤や NGF を添加せずに培養したコントロールに対して統計処理したところ、ROCK 阻害剤を添加した場合及び ROCK 阻害剤を添加した場合ともに $p < 0.05$ で統計的に有意差があることが示された。また、フルオロ・イメージアナライザーによる蛍光強度の結果と、フローサイトメーターによる分化した神経細胞の割合の結果が一致した。

2.3.3 分化した神経細胞の種類の間定

ROCK 阻害剤を添加することで ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への分化が促進されるという結果が得られたことから、ROCK 阻害剤を添加して分化した神経細胞の種類について検討した。以前の研究では、ES 細胞は主に運動神経細胞及び感覚神経細胞に分化していた[9]。12 日間分化培養した ES 細胞を、運動神経細胞のマーカである Lim-3 と感覚神経細胞マーカである Brn-3 で標識し、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定した結果を Fig. 2-7 に示す。ROCK 阻害剤や NGF を添加せずに培養した ES 細胞コロニーの蛍光強度を 100% とした。運動神経細胞及び感覚神経細胞ともに ROCK 阻害剤を添加することで蛍光強度が高くなった。しかし、ROCK 阻害剤と同時に NGF を添加した場合、蛍光強度の増加は見られなかった。

ROCK 阻害剤を添加することで、どの程度の割合で各神経細胞に分化しているかについて検討した。12 日間分化培養を行った ES 細胞コロニーを免疫蛍光染色し、フローサイトメーターを用いて各種陽性細胞数を計数した結果を Fig. 2-8 (A) に示す。ROCK 阻害剤を添加することで運動神経細胞（抗 Lim-3 抗体により染色された細胞）が 28%、感覚神経細胞（抗 Brn-3 抗体により染色された細胞）が 24%という結果が得られた。ROCK 阻害剤を添加することで 61%が神経細胞に分化していたことから、分化した神経細胞の内約 50%が運動神経細胞、約 40%が感覚神経細胞に分化していることが明らかになり、この結果はフルオロ・イメージアナライザーで測定した蛍光強度の結果と一致した。また、蛍光顕微鏡観察の結果を Fig. 2-8 (B) に示す。蛍光写真からも、感覚神経細胞より運動神経細胞に多く分化している様子が観察できた。

2.3.4 ROCK 阻害剤添加による筋肉細胞への分化に及ぼす影響

これまでの研究で、ES 細胞や iPS 細胞は神経細胞以外に筋肉細胞にも分化することが明らかになっている [10]。また、ROCK は Rho ファミリーによるアクチン細胞骨格のコントロールなど、様々な細胞応答に関わっていることが明らかになっている [3]。これらのことから、ROCK 阻害剤の添加は神経細胞以外に筋肉細胞への分化も促進している可能性が示唆される。そこで、ROCK 阻害剤が ES 細胞や iPS 細胞から筋肉細胞への分化に及ぼす影響について検討した。12 日間分化培養を行い、筋肉細胞のマーカである抗 α -actinin 抗体で標識し、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定した。ES 細胞の結果を Fig. 2-9 (A) に、iPS 細胞の結果を Fig. 2-10 に示す。ROCK 阻害剤及び NGF を添加せずに培養した場合の蛍光強度を 100%とした。ES 細胞と iPS

細胞ともに、ROCK 阻害剤を添加することで蛍光強度が高くなった。一方、ROCK 阻害剤と NGF を同時に添加した場合、ROCK 阻害剤を添加した場合に比較して蛍光強度は低くなった。これは、NGF を添加することで神経細胞への分化が促進されたためであると考えられる。また、蛍光顕微鏡観察の結果を Fig. 2-9 (B) に示す。蛍光写真からも、ROCK 阻害剤を添加することで筋肉細胞に多く分化している様子が観察できた。

ROCK 阻害剤を添加することで、どの程度の割合で筋肉細胞に分化しているかについて検討した。12 日間分化培養を行った ES 細胞コロニーを免疫蛍光染色し、フローサイトメーターを用いて陽性細胞数を計数した結果を Fig. 2-11 に示す。ROCK 阻害剤及び NGF を添加せずに培養した場合、16%が筋肉細胞に分化した。ROCK 阻害剤を添加した場合に 28%、ROCK 阻害剤と同時に NGF を添加することで 18%が筋肉細胞に分化した。この結果は、フルオロ・イメージアナライザーで測定した蛍光強度の結果と一致した。

2.3.5 分化した筋肉細胞の種類の間定

ROCK 阻害剤を添加して分化した筋肉細胞の種類について検討した。12 日間分化培養した ES 細胞を、平滑筋細胞のマーカである α -smooth muscle の抗体、心筋細胞のマーカである cardiac troponin I の抗体や骨格筋細胞マーカである actin- α -1 の抗体で標識し、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定した結果を Fig. 2-12 に示す。ROCK 阻害剤及び NGF を添加せずに培養した ES 細胞コロニーの蛍光強度を 100%とした。平滑筋細胞では ROCK 阻害剤を添加しても蛍光強度はほとんど変わらず、心筋細胞及び骨格筋細胞において ROCK 阻害剤を添加することで蛍光強度が高くなった。

第4節 考察

浮遊培養により得られた直径 200 μm の細胞コロニーを AP 染色した結果 (Fig. 2-1)、赤く染まったことから未分化状態を維持していた。Osakada らは、ヒト多能性幹細胞を ROCK 阻害剤で処理することで、胚様体の形成が促進されることを報告した [11]。このことから、浮遊培養時に ROCK 阻害剤を添加することで、細胞コロニーの形成が改善される可能性が考えられる。

ROCK 阻害剤が ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への分化に及ぼす影響について検討した。ROCK 阻害剤を添加して 12 日間分化培養した結果 (Fig. 2-2 及び Fig. 2-4)、20-50 μM の ROCK 阻害剤を添加することで ES 細胞、iPS 細胞ともに神経細胞への分化が促進した。さらに、20 μM の ROCK 阻害剤と NGF を同時に添加することで、より神経細胞への分化が促進した。他の研究者たちが、骨髄由来間葉系幹細胞、胎盤由来の多能性細胞、脂肪組織由来幹細胞、マウス神経幹細胞、マウス ES 細胞における ROCK 阻害剤の影響について報告した [12-16]。また Minase らは、低濃度の NGF で処理した PC12 細胞に ROCK 阻害剤を添加することで、神経突起伸長が促進されることを報告した [17]。これらの報告及び我々の研究結果から、ROCK 阻害剤は ES 細胞及び iPS 細胞から神経細胞へ分化させる際の分化促進剤として有用であると考えられる。

また、ROCK 阻害剤が ES 細胞や iPS 細胞から筋肉細胞への分化に及ぼす影響について検討した。ROCK 阻害剤を添加して 12 日間分化培養した結果 (Fig. 2-9 及び Fig. 2-10)、ROCK 阻害剤を添加することで筋肉細胞への分化が促進された。Krawetz らは、胚性癌細胞の P19 細胞を ROCK 阻害剤で処理することで、外胚葉及び中胚葉系の細胞への分化

を増強することを報告した[18]。これらのことから、ROCK 阻害剤は神経細胞への分化だけでなく、筋肉細胞への分化も促進させる効果があると考えられる。

第 5 節 結言

ES細胞及びiPS細胞の分化培養時にROCK阻害剤を添加することで、神経細胞と筋肉細胞への分化を促進させる効果があることを見出した。さらに、ROCK阻害剤と同時にNGFを添加することで、相乗効果により神経細胞への分化が促進されることを見出した。また、分化した神経細胞と筋肉細胞の割合を比較すると、神経細胞に多く分化していることを明らかにした。

以上のことから、ROCK阻害剤はES細胞やiPS細胞を分化させる際の分化促進剤として有効であることが示唆される。次章では、ROCK阻害剤を添加することで、どのようなシグナル伝達経路を活性化させて神経細胞への分化を促進させるかについて検討した結果について述べる。

第 6 節 参考文献

[1] 石崎敏理, Rho 情報伝達とその生理的意義, 日薬理誌, 121 (2003) 153-162.

[2] K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J.B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma, Y. Sasai, A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells, Nature Biotechnology 25 (2007) 681-686.

[3] L. Castellani, E. Salvati, S. Alemá, G. Falcone, Fine

regulation of RhoA and Rock is required for skeletal muscle differentiation, *Journal of Biological Chemistry* 281 (2006) 15249-15257.

[4] M. Uehata, T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa, S. Narumiya, Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension, *Nature* 389 (1997) 990-994.

[5] M.F. Olson, Applications for ROCK kinase inhibitor, *Current Opinion in Cell Biology* 20 (2008) 242-248.

[6] M. Hirose, T. Ishizaki, N. Watanabe, M. Uehata, O. Kranenburg, W.H. Moolenaar, F. Matsumura, M. Maekawa, H. Bito, S. Narumiya, Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells, *Journal of Cell Biology* 141 (1998) 1625-1636.

[7] H. Bito, T. Furuyashiki, H. Ishihara, Y. Shibasaki, K. Ohashi, K. Mizuno, M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Narumiya, A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons, *Neuron* 26 (2000) 431-441.

[8] 北澤彩子 東洋大学大学院生命科学研究科生命科学専攻, 博士論文, (平成 19 年度).

[9] A. Kitazawa, N. Shimizu, Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia, *New Biotechnology* 28 (2011) 326-333.

[10] 原優里菜 東洋大学大学院生命科学研究科生命科学専攻, 修士

論文, (平成 22 年度).

[11] F. Osakada, Z.B. Jin, Y. Hirami, H. Ikeda, T. Danjyo, K. Watanabe, Y. Sasai, M. Takahashi, In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction, *Journal of Cell Science* 122 (2009) 3169-3179.

[12] E. Pacary, H. Legros, S. Valable, P. Duchatelle, M. Lecocq, E. Petit, O. Nicole, M. Bernaudin, Synergistic effects of CoCl_2 and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells, *Journal of Cell Science* 119 (2006) 2667-2678.

[13] T-C. Chang, Y-C. Chen, M-H. Yang, C-H. Chen, E-W. Hsing, B-S. Ko, J-Y. Liou, K.K. Wu, Rho kinases regulate the renewal and neural differentiation of embryonic stem cells in a cell plating density-dependent manner, *PLoS One* 5 (2011) e9187.

[14] Z-W. Xue, X-M. Shang, H. Xu, S-H. Lü, T-W. Dong, C-H. Liang, Y. Yuan, Rho-associated coiled kinase inhibitor Y-27632 promotes neuronal-like differentiation of adult human adipose tissue-derived stem cells, *Chinese Medical Journal* 125 (2012) 3332-3335.

[15] H. Gu, S-P. Yu, C-A. Gutekunst, R.E. Gross, L. Wei, Inhibition of the Rho signaling pathway improves neurite outgrowth and neuronal differentiation of mouse neural stem cells, *International Journal Physiology Pathophysiology & Pharmacology* 5 (2013) 11-20.

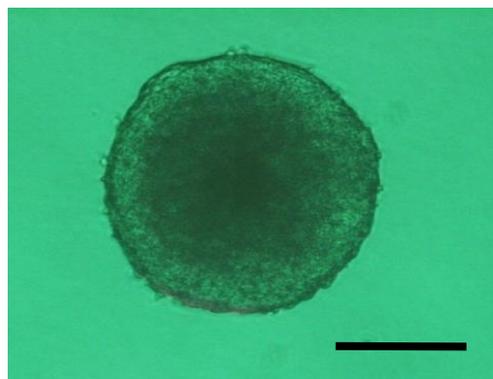
[16] C.H. Wang, C.C. Wu, S.H. Hsu, J.Y. Liou, Y.W. Li, K.K. Wu, Y.K. Lai, B.L. Yen, The role of RhoA kinase inhibition in human

placenta-derived multipotent cells on neural phenotype and cell survival, *Biomaterials* 34 (2013) 3223-3230.

[17] T. Minase, T. Ishima, K. Itoh, K. Hashimoto, Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by the ROCK inhibitor Y-27632: A possible role of IP₃ receptors, *European Journal of Pharmacology* 648 (2010) 67-73.

[18] R. J. Krawetz, J. Taiani, A. Greene, G. M. Kelly, D. E. Rancourt, Inhibition of Rho kinase regulates specification of early differentiation events in P19 embryonal carcinoma stem cells, *PLoS One* 6 (2011) e26484.

(1) ES cell colonies

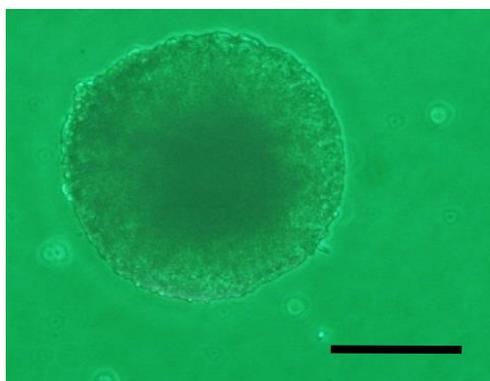


(A) Control

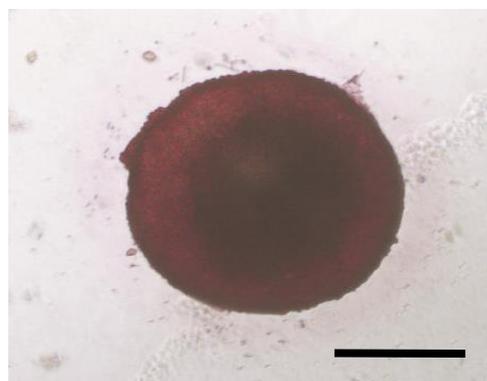


(B) AP staining

(2) iPS cell colonies



(A) Control



(B) AP staining

Fig.2-1 Optical micrographs of ES cell and iPS cell colonies
Scale bar: 100 μ m

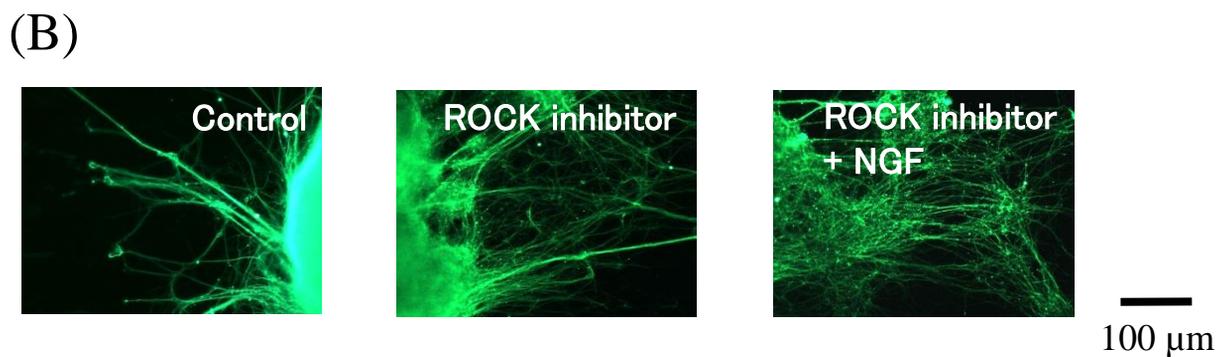
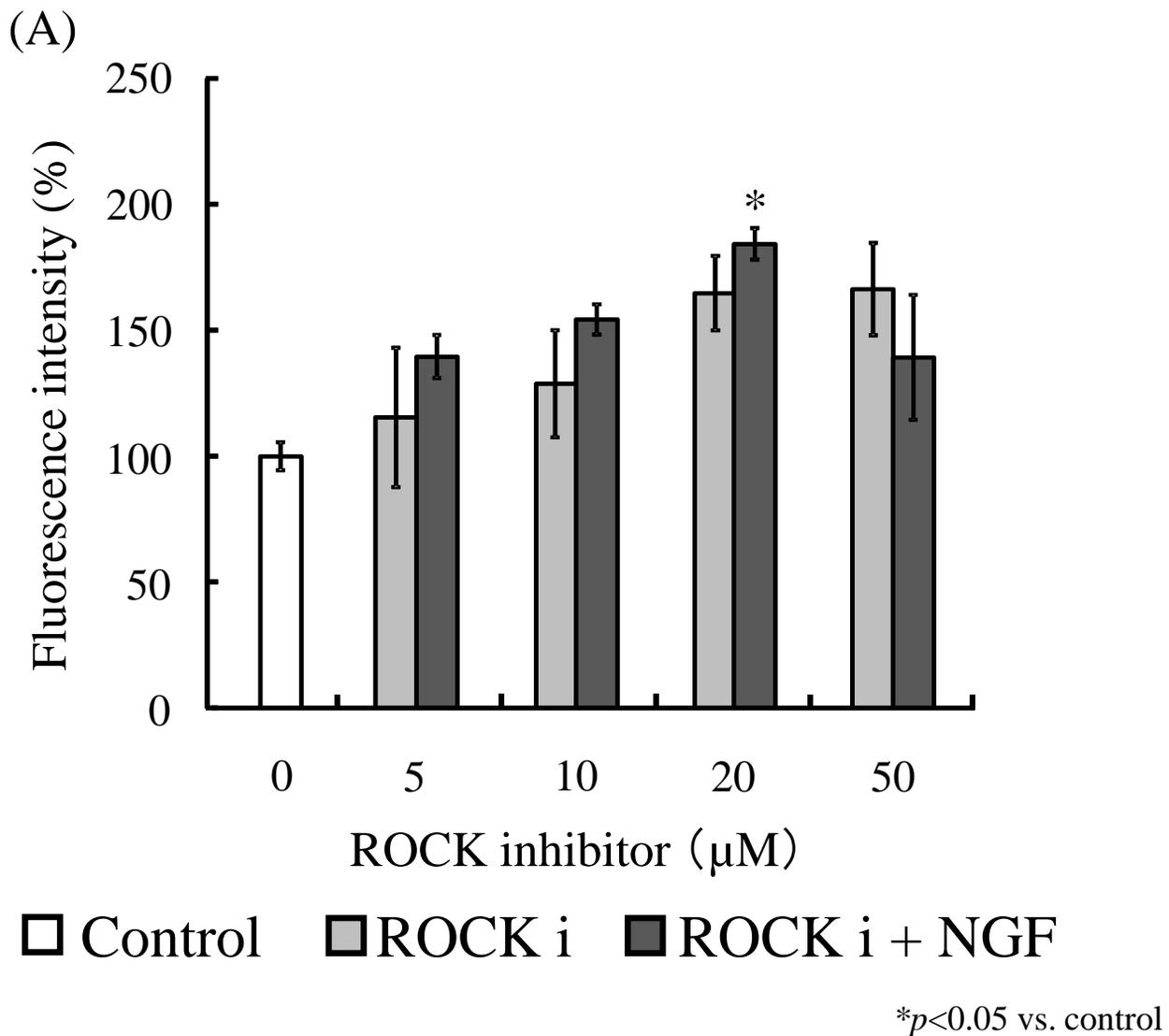


Fig.2-2 Effects of the ROCK inhibitor on the differentiation of the ES cells into neurons

- (A) ES cell differentiation into neurons by addition of ROCK inhibitor and NGF
 (B) Fluorescence micrographs of the ES cell colonies with neurite outgrowth
 The 20 μM ROCK inhibitor and 10 ng/mL NGF were added to the culture medium

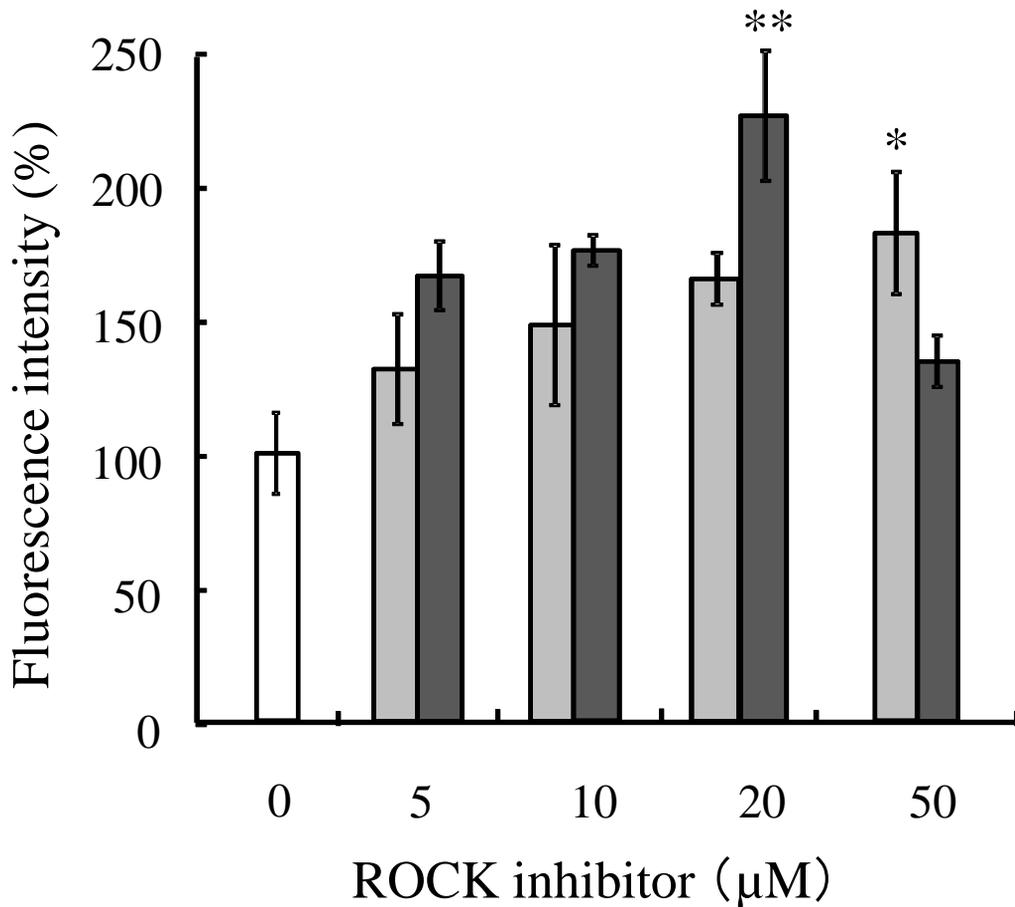


Fig.2-3 Effects of the ROCK inhibitor on the differentiation of the iPS cells into neurons

□ Control □ ROCK i ■ ROCK i + NGF

iPS cell differentiation into neurons by addition of ROCK inhibitor and NGF

* $p < 0.05$ vs. control ** $p < 0.01$ vs. control

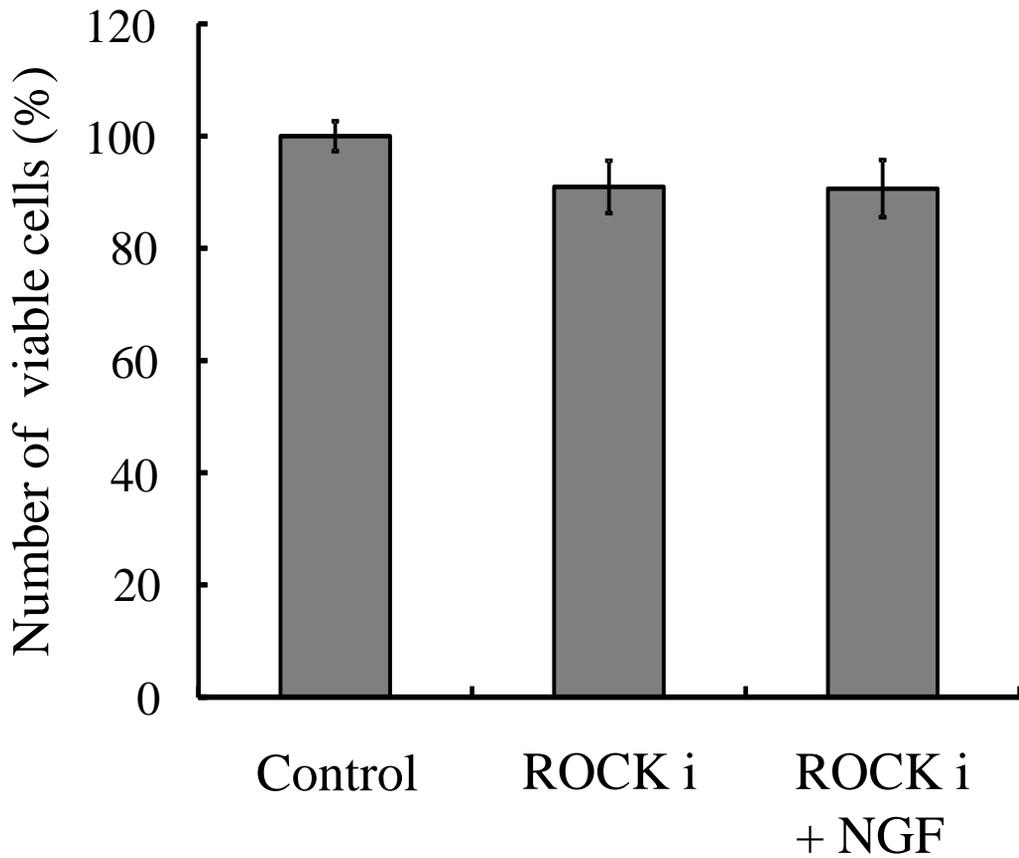


Fig.2-4 Number of viable cells after neuronal differentiation at 12 day cultivation

The 20 μ M ROCK inhibitor and 10 ng/mL NGF were added to the culture medium

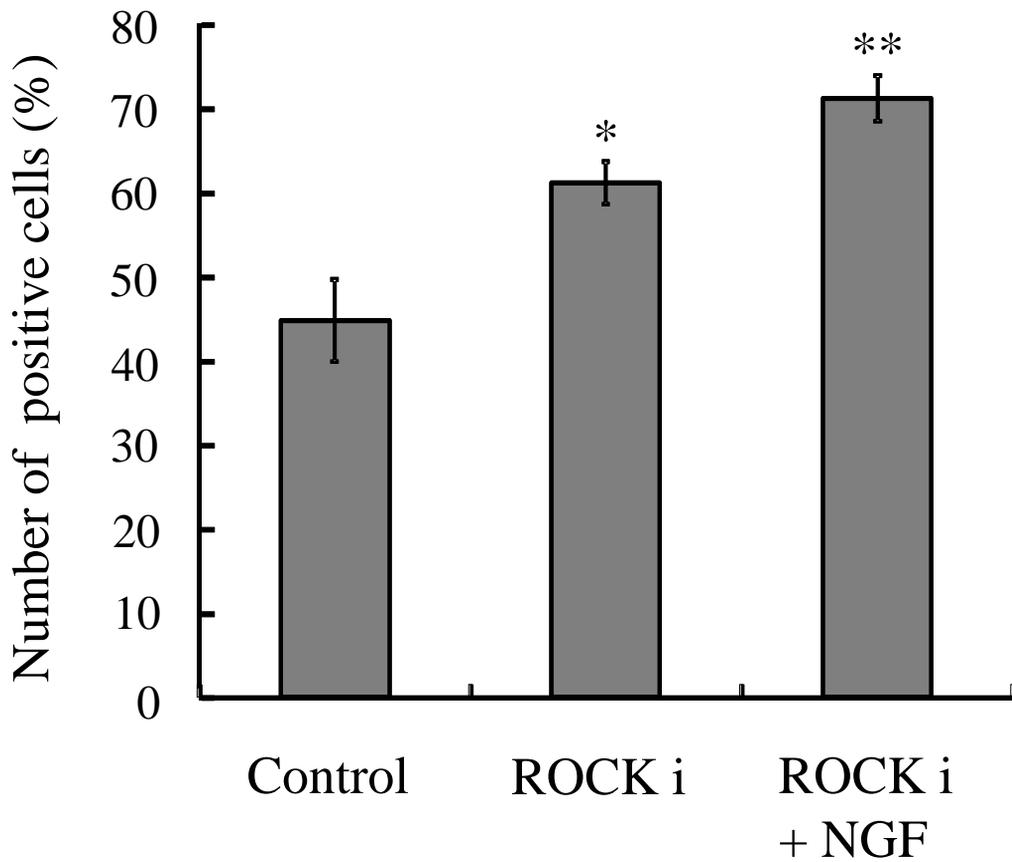


Fig.2-5 The number of neurons differentiated from ES cells

The 20 μ M ROCK inhibitor and 10 ng/mL NGF were added to the culture medium

* $p < 0.05$ vs. control ** $p < 0.01$ vs. control

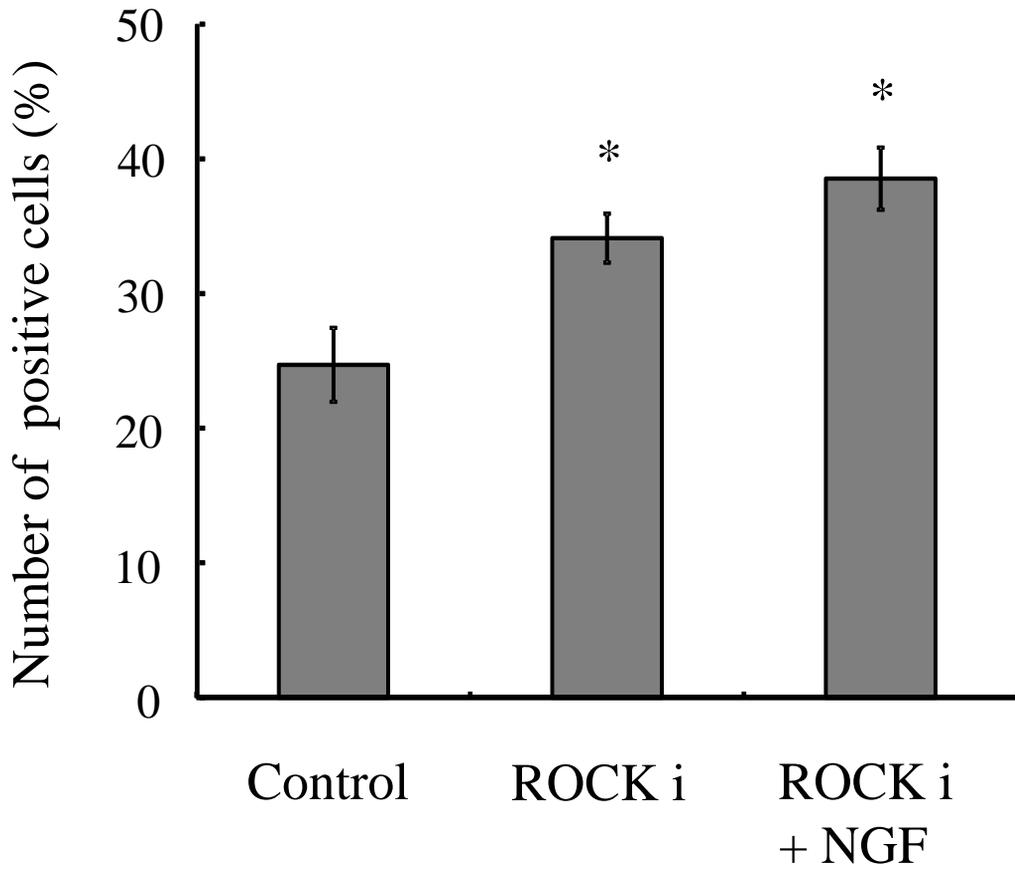


Fig.2-6 The number of neurons differentiated from iPS cells

The 20 μ M ROCK inhibitor and 10 ng/mL NGF were added to the culture medium

* $p < 0.05$ vs. control vs. control

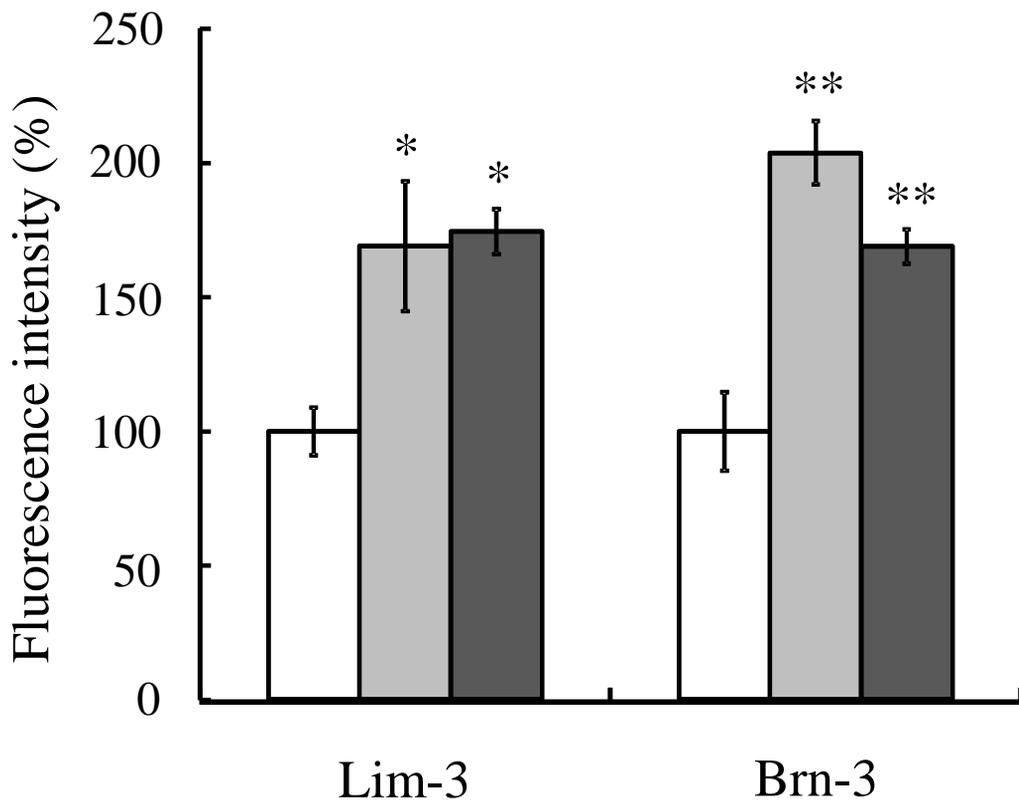


Fig.2-7 Fluorescence intensity of types of neurons from differentiated ES cells

□ Control ■ ROCK i ■ ROCK i + NGF

The 20 μ M ROCK inhibitor and 10 ng/mL NGF were added to the culture medium

* $p < 0.05$ vs. control ** $p < 0.01$ vs. control

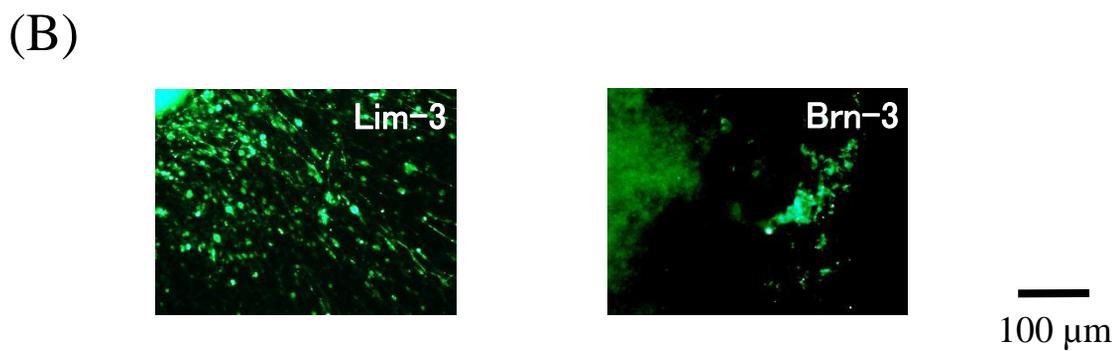
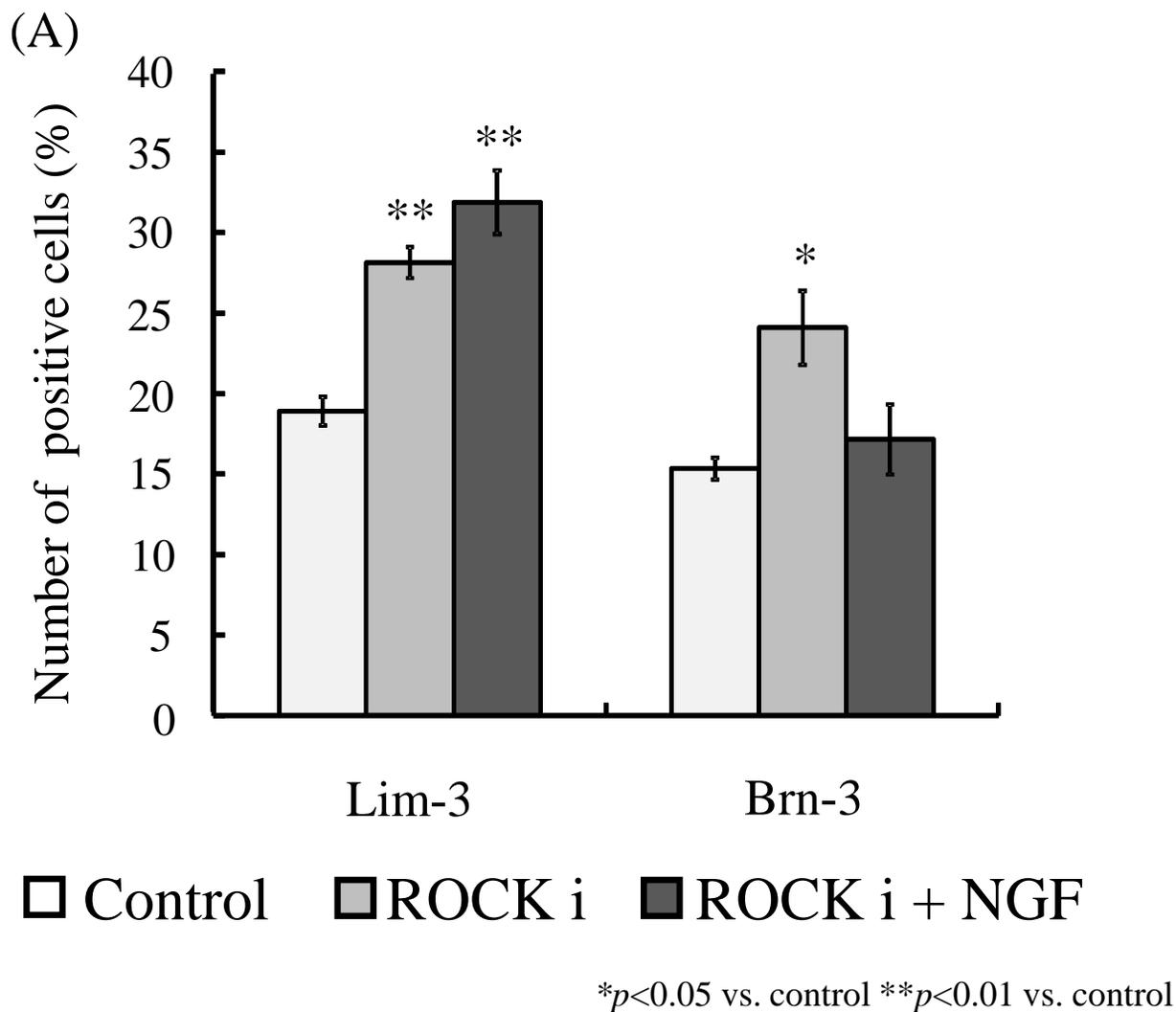


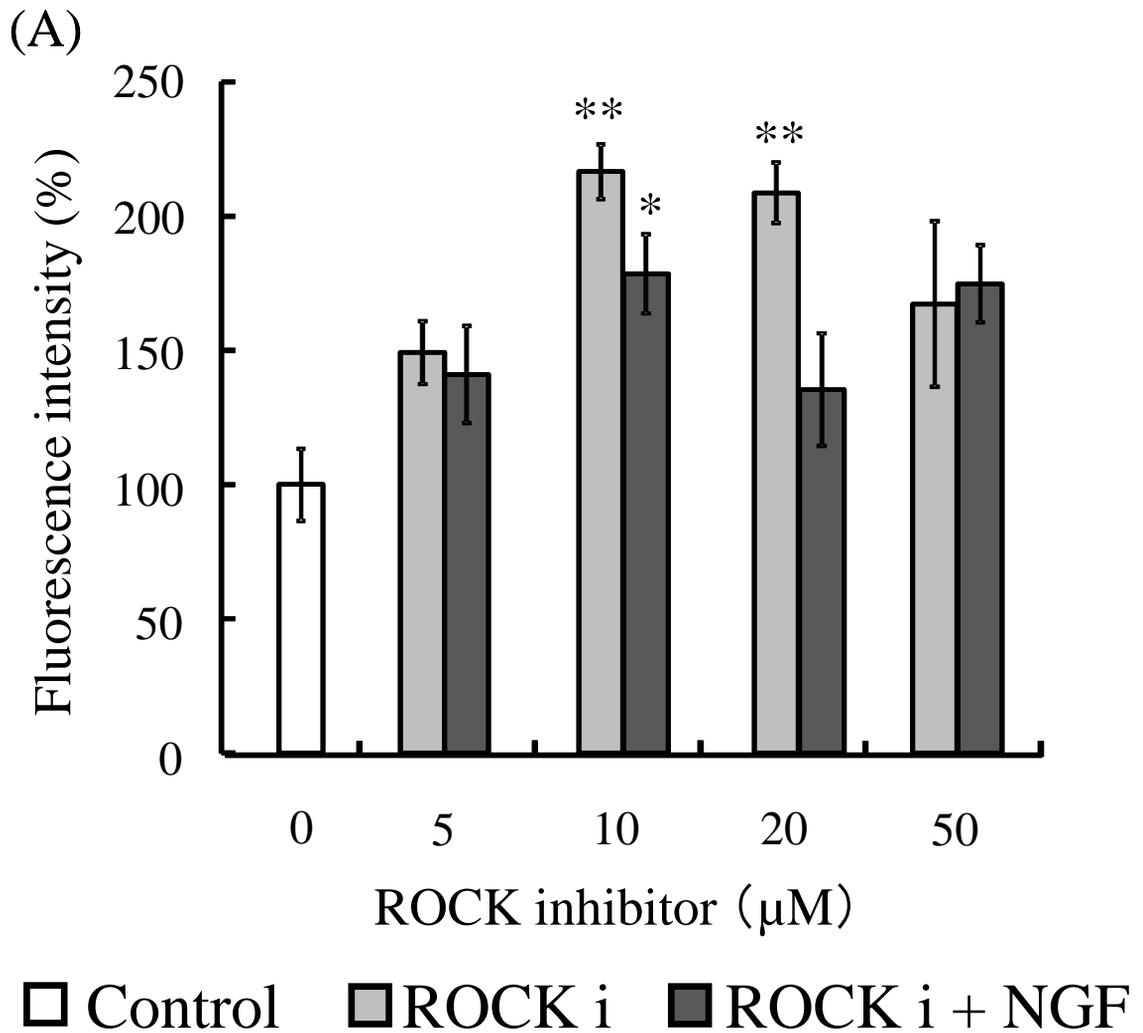
Fig.2-8 The number of types of neurons from differentiated ES cells

(A) ES cell differentiation into neurons

The 20 μ M ROCK inhibitor and 10 ng/mL NGF were added to the culture medium

(B) Fluorescence micrographs of differentiated ES cell colonies

The 20 μ M ROCK inhibitor was added to the culture medium



* $p < 0.05$ vs. control ** $p < 0.01$ vs. control

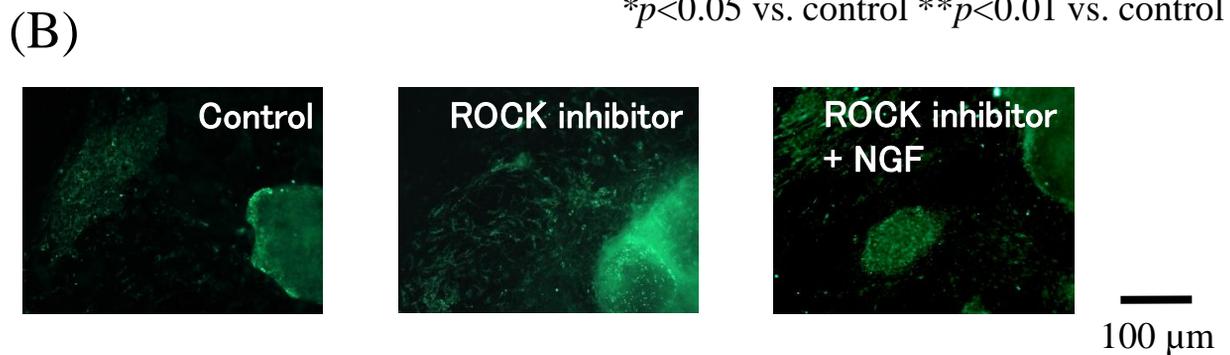
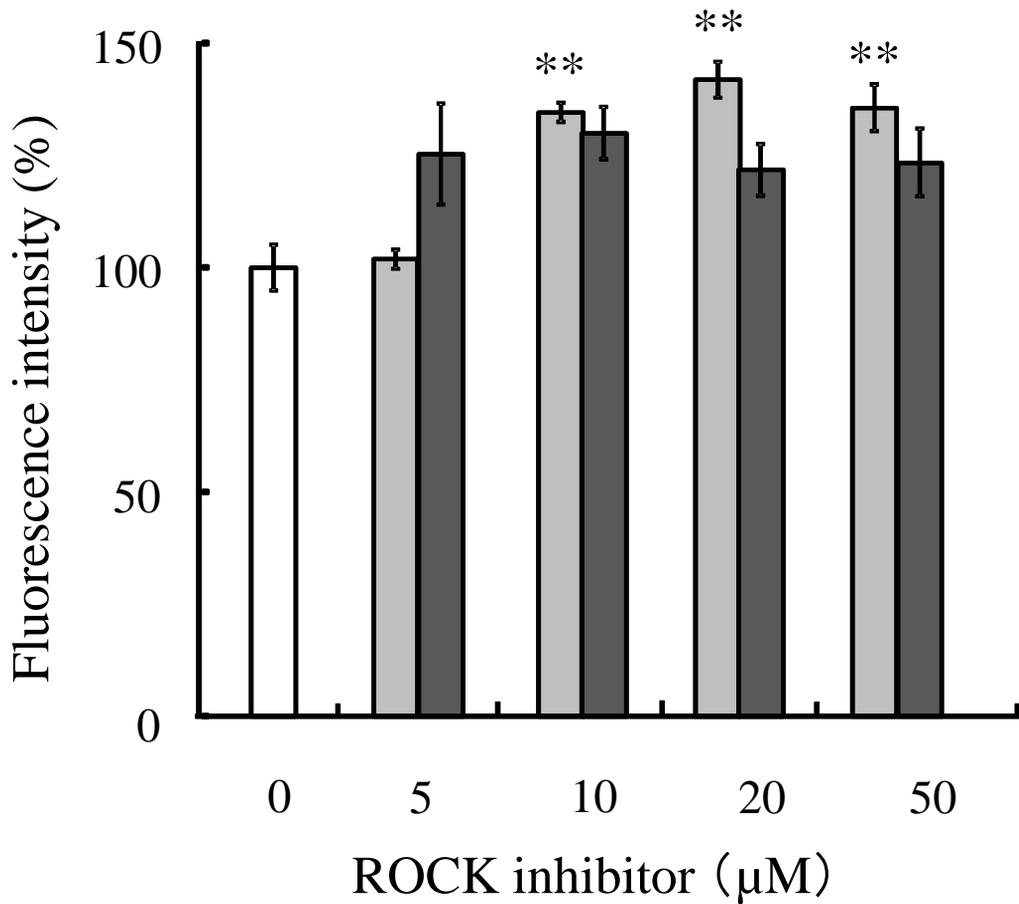


Fig.2-9 Effects of the ROCK inhibitor on the differentiation of the ES cells into muscle cells

- (A) ES cell differentiation into muscle cells by addition of ROCK inhibitor and NGF
 (B) Fluorescence micrographs of the ES cell colonies with neurite outgrowth
 The 20 μM ROCK inhibitor and 10 ng/mL NGF were added to the culture medium



Control
 ROCK i
 ROCK i + NGF

Fig.2-10 Effects of the ROCK inhibitor on the differentiation of the iPS cells into muscle cells

iPS cell differentiation into muscle cells by addition of ROCK inhibitor and NGF

** $p < 0.01$ vs. control

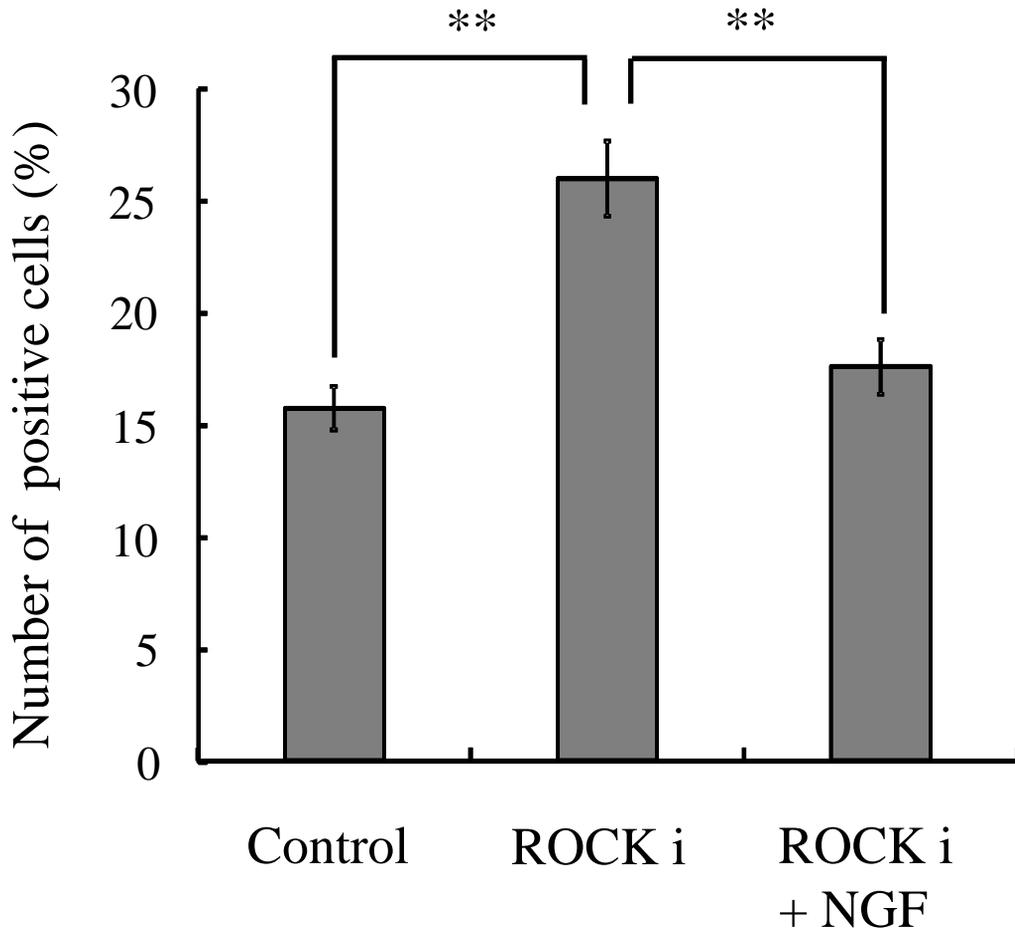


Fig.2-11 The number of muscle cells differentiated from ES cells

The 20 μ M ROCK inhibitor and 10 ng/mL NGF were added to the culture medium

** $p < 0.01$

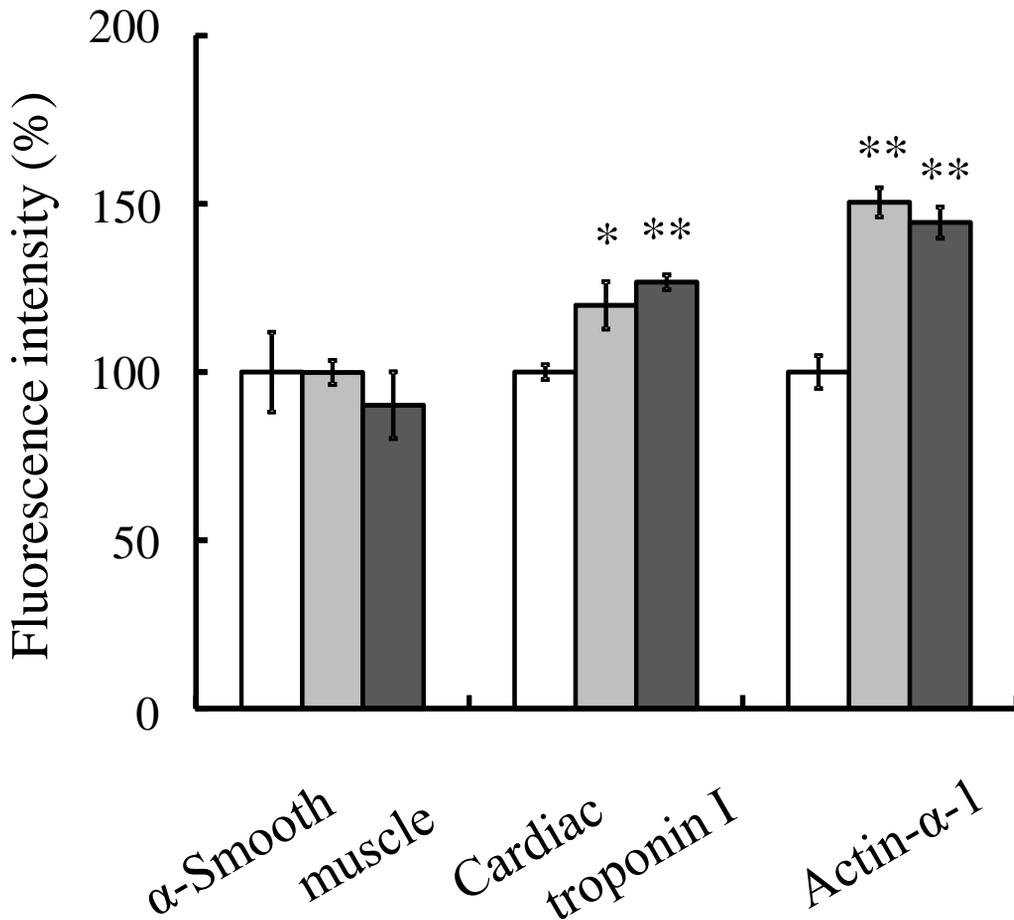


Fig.2-12 Fluorescence intensity of types of muscle cells from differentiated ES cells

□ Control □ ROCK i ■ ROCK i + NGF

The 20 μM ROCK inhibitor and 10 ng/mL NGF were added to the culture medium

* $p < 0.05$ vs. control ** $p < 0.01$ vs. control

第 3 章 ROCK 阻害剤による ES 細胞の神経細胞への 分化促進メカニズム

第 1 節 緒言

第 2 章では、ES 細胞及び iPS 細胞の分化培養時に 20-50 μM の ROCK 阻害剤を添加することにより、神経細胞への分化を促進させることを明らかにした。ROCK 阻害剤を ES 細胞や iPS 細胞の分化促進剤として用いる場合、どのような機構で ROCK 阻害剤が神経細胞への分化を促進させるのかを明らかにすることが重要である。

mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路には、様々な刺激によって活性化される MAP kinase 1 (ERK1) 及び MAP kinase 2 (ERK2) がある。MAPK シグナル伝達経路は細胞の増殖や分化または細胞運動や細胞死など様々な細胞機能に関わっていることが明らかにされている [1]。また Li らは、ES 細胞から神経細胞への分化や ES 細胞の生存には、ERK1/2 の活性化が重要であることを報告した [2]。ERK シグナル伝達経路は Fig. 3-1 に示すように、NGF 受容体である TrkA に NGF が結合することで Ras/Raf/MEK/ERK と活性化していく。また、ERK シグナル伝達経路以外にも、TrkA 受容体は PLC シグナル伝達経路や PI3K/Akt シグナル伝達経路にも関与しており、どの経路も細胞の生存や分化に重要な役割を果たしている。これらのことから、ROCK 阻害剤による神経細胞への分化促進にも、ERK が関わっている可能性が示唆される。

本章において、ウェスタンブロッティング法によりタンパク質のリン酸化量を測定する方法と、各シグナル伝達経路の阻害剤による標的タンパク質の働きを阻害する方法を用いて、ROCK 阻害剤による ES 細

胞から神経細胞への分化促進メカニズムについて検討した。その結果、ROCK 阻害剤が ERK 経路を活性化させることで神経細胞への分化を促進させていることを見出したのでそれらの経緯について述べる。

第 2 節 実験方法

3.2.1 培地等の調製

0.1%ゼラチン溶液

第 1 章 1.2.1 に記述したように調製した。

分化用培地

第 2 章 2.2.1 に記述したように調製した。

3.2.2 培養プレートの調製

0.1%ゼラチン溶液を用いて、第 1 章 1.2.2 項に記述したようにゼラチンコート 96 穴組織培養プレートを調製した。

3.2.3 マウス ES 細胞の浮遊培養

第 2 章、2.2.3 項で記述したように、非接着性 100 mm φ ディッシュに 5×10^5 cells となるように細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 条件で 8-9 日間浮遊培養して、直径 200 μm の ES 細胞コロニーを形成させた。

3.2.4 ウェスタンブロッティング法による ERK 及び Akt の検出

(1) 細胞サンプルの調製

浮遊培養により得られた直径 200 μm の細胞コロニーを各サンプルにつき 10 個ずつ、ゼラチンコートした 35 mm φ ディッシュ (153066: Nalge

Nunc International, Roskilde, Denmark) に播種し、20 μM の ROCK 阻害剤及び 10 ng/mL の NGF を添加して、37°C、5% CO_2 条件で 30 分間培養した。細胞コロニーを 15 mL 遠心チューブに回収し、1,500 rpm、5 分間遠心分離した。上清液を除去した後、500 μL の冷 PBS で洗浄し、1.5 mL エッペンドルフチューブに懸濁液を移した。再度 1,500 rpm、5 分間遠心分離した。上清液を除去した後、50 μL の Pathscan sandwich ELISA lysis buffer (7018 : Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) で細胞を処理し、タンパク質を抽出してウェスタンブロッティング用サンプルとした。

(2) SDS-PAGE 電気泳動による ERK または Akt の分離及びウェスタンブロッティングによる検出

各細胞サンプルを 10 μL 、30 ng の標準品 total ERK (MAP kinase p-42; sc-4042 : Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を 10 μL 、またはリン酸化 ERK の標準品として、5 ng の GST-tag 標準リン酸化 ERK (MAP kinase1/Erk1, active ; 14-439 : Upstate) を 10 μL 、total 及びリン酸化 Akt の標準品として、40 ng の標準 Akt (Akt1, active ; 7701-5 : Biovision) を 10 μL 、それぞれ等量の 2 \times loading buffer (2% SDS、2% 2-メルカプトエタノール、100 mM Tris-HCl pH6.8、40% グリセリン、0.01% bromophenol blue) を加えて混合した。100°C で 5 分間煮沸した後、サンプルをすぐに氷冷した。

PVDF 膜 (AE-6665 ; Atto, Tokyo, Japan) をゲルの大きさに切り、30 秒間メタノール処理した後、転写バッファー (0.1 M Tris、0.192 M グリシン、20% メタノール) を入れたバットに移し、60 rpm で 2 時間以上振盪した。5-20% e-PAGEL (E-T520L ; Atto, Tokyo, Japan) に各

標準品及び細胞サンプルを充填し、20 mA の定電流条件で 1 時間半電気泳動により分離した[3]。転写バッファーを入れたバットにゲルを移し、37°Cに設定したオーブンで 5 分間振盪しながら 3 回洗浄操作を行った。ブロッティング装置 (AE-6677 ; Atto, Tokyo, Japan) に、ゲルの大きさに切り、転写バッファーに浸したろ紙、PVDF 膜及びゲルを積層し、100 mA の定電流条件で 1 時間ブロッティングした。ブロッティング中に、0.1% TBS-T (10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、1 mL Tween-20) に 3%となるようにスキムミルク (198-10605 ; Wako) を溶解し、ブロッキングバッファーを調製した。ブロッティング後、PVDF 膜を TBS-T で 2 回洗浄した。PVDF 膜をタッパーに移し、ブロッキングバッファーを加え 37°Cのオーブンで 1 時間振盪させた。TBS-T と 0.3%ブロッキングバッファーを混合した溶液に、1 次抗体として 500 倍希釈となるように抗 ERK 抗体 (ERK1 (K-23) ; sc-94 : Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)を、1000 倍希釈となるように抗リン酸化 ERK 抗体(Phospho-p44/42 MAP kinase (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) antibody ; 9101 : Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を、1000 倍希釈となるように抗 Akt 抗体 (Akt antibody ; 9272 : Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を、1000 倍希釈となるように抗リン酸化 Akt 抗体 (Phospho-Akt (Ser473) antibody ; 9271 : Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を調製した。ブロッキング後、PVDF 膜を TBS-T で 5 分間、3 回繰り返し洗浄後、ERK 抗体については 37°Cに設定したオーブンで 1 時間反応させた。リン酸化 ERK の抗体、Akt の抗体及びリン酸化 Akt の抗体については 37°Cで 15 分間振盪させた後、4°Cで一晩反応させ、翌日に 37°Cで 1 時間反応させた。TBS-T と 0.3%ブロッキングバッファーを混合した溶液に、2 次抗体 (ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish

Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from donkey) ; NA934 : GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を 1250 倍希釈となるように調製した。1 次抗体を除去し、PVDF 膜を TBS-T で 5 分間、3 回繰り返し洗浄後、調製した 2 次抗体を用いて 37°C で 1 時間反応させた。2 次抗体を除去し、PVDF 膜を TBS-T で 5 分間、3 回繰り返し洗浄した。ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232 ; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に付属されている検出溶液 A 及び検出溶液 B を 1 : 1 の割合で混合し、洗浄した PVDF 膜に滴下して、室温、暗所で 5 分間反応させた。ECL Mini-Camera(RPN2069;GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) にセットして数秒間から 1 分間、インスタントフィルム (FP-3000B ; 富士フィルム) を感光させ、各バンドを検出した [4]。

3.2.5 各シグナル伝達経路の阻害

ES 細胞の分化培養時に各シグナル伝達経路をそれらの阻害剤を添加することで阻害した。用いた阻害剤を以下に示す。K252a (TrkA 阻害剤 ; 420298 : Calbiochem, Darmstadt, Germany)、lovastatin (Ras 阻害剤 ; 10-1222 : Funakoshi, Tokyo, Japan)、GW-5074 (Raf 阻害剤 ; 10-1031 : Funakoshi, Tokyo, Japan)、U0126 (mitogen-activated protein kinase (MAPK) /ERK kinase (MEK) 阻害剤 ; 662009 : Calbiochem, Darmstadt, Germany)、U-73122 (phospholipase C (PLC) 阻害剤 ; 662035 ; Calbiochem, Darmstadt, Germany)、bisindolylmaleimide I (protein kinase C (PKC) 阻害剤 ; 203290 : Calbiochem, Darmstadt, Germany)、LY294002 (phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) 阻害剤 ; 203290 : Calbiochem, Darmstadt, Germany)、AZA1 (Cdc42/Rac dual inhibitor ;

530152 : Calbiochem, Darmstadt, Germany)。浮遊培養により得られた直径 200 μm の細胞コロニーをゼラチンコートした 96 穴組織培養プレートに播種し、各シグナル伝達経路の阻害剤を添加して 37°C で 15 分間処理した。処理後、20 μM の ROCK 阻害剤を添加し、12 日間分化培養を行った。3 日毎に半量の培地替えを行い、試薬も添加した。培養後、免疫蛍光染色を行い、フルオロ・イメージアナライザーを用いてパソコンに蛍光イメージを取り込み、画像解析ソフトにより蛍光強度を解析し、神経細胞への分化率を求めた。

3.2.6 免疫蛍光染色

2 章、2.2.7 項で述べたように、分化培養した ES 細胞を免疫蛍光染色した。なお、1 次抗体に神経細胞マーカーである抗 β III-tubulin 抗体を、2 次抗体には Alexa Fluor 488 を用いた。

3.2.7 細胞内 Ca^{2+} レベルの測定

ES 細胞コロニーをゼラチンコートした 96 穴組織培養プレートに播種し、3 日間培養させることで底面に接着させた。培養液を除去後、2 μM fluo 4-AM (F14217 ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) と 0.008% pluronic F-127 (924150 ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を含む培地を 200 μL ずつウェルに添加し、37°C で 1 時間培養した。培養後、洗浄液 (solution A : 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES-NaOH, 5.5mM D-glucose, pH7.4) で 3 回洗浄し、再度培地を加えた。IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) を用いて 2 秒ごとに蛍光写真を撮影し、120 秒まで行った。20 μM の ROCK 阻害剤は、撮影開始 10 秒後に添加した。細胞内 Ca^{2+} レベルの蛍光強度は、撮影開

始を 100%とし、計数値を 3 ウェルの平均値と標準誤差で示した [5]。

3.2.8 統計分析

2.2.9 に記述したように統計処理した。

第 3 節 実験結果

3.3.1 ROCK 阻害剤が ERK シグナル伝達経路に及ぼす影響

神経細胞のモデル細胞として一般的に用いられるラット副腎髄質由来褐色細胞腫 (PC12 細胞) は Fig. 3-1 に示すように、NGF を添加すると ERK シグナル伝達経路を活性化させて神経突起を伸長させ、ERK シグナル伝達経路の ERK の上流にある MEK を阻害剤により阻害すると、NGF による神経突起の伸長が抑制される [6]。さらに、ES 細胞の神経細胞への分化にも ERK シグナル伝達経路が関わっていることが報告されている [2]。また、ES 細胞の分化培養時に ROCK 阻害剤と同時に NGF を添加することで相乗効果が得られたことから、ROCK 阻害剤の ES 細胞から神経細胞への分化促進には、ERK シグナル伝達経路が関わっているのではないかと推測した。

ROCK 阻害剤の添加が ERK シグナル伝達経路に影響を及ぼすかどうか検討するため、ROCK 阻害剤及び ROCK 阻害剤と NGF を同時に添加した場合の全 ERK 量及びリン酸化 ERK 量をウェスタンブロッティング法により検出した。全 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の割合を算出した結果を Fig. 3-2 に示す。ERK は写真のように、哺乳動物において ERK1 (分子量 ; 44kDa) と ERK2 (分子量 ; 42kDa) の 2 つの ERK が発現していることが知られている。ROCK 阻害剤及び NGF を添加しない場合と比較して、ROCK 阻害剤を添加することでリン酸化 ERK 量の割合が増加した。

さらに、ROCK 阻害剤と NGF を同時に添加することで、リン酸化 ERK 量がより増加した。以上の結果から、ROCK 阻害剤を添加することによる ES 細胞から神経細胞への分化促進には、ERK のリン酸化が関わっていることが示唆された。

ERK が活性化されたので、ROCK 阻害剤がどのように ERK を活性化させているかを、NGF 受容体 (TrkA) から ERK の上流に位置する MEK までの各シグナル伝達経路の阻害剤である K252a (TrkA 阻害剤)、lovastatin (Ras 阻害剤)、GW-5074 (Raf 阻害剤)、U0126 (MEK 阻害剤) を用いて働きを阻害することで検討した。Fig. 3-3 に示すように、ROCK 阻害剤及び TrkA 阻害剤を添加せずに培養した場合 (コントロール) を 100%としたとき、ROCK 阻害剤を添加することで蛍光強度が高くなった。神経細胞への分化が約 50%阻害される TrkA 阻害剤の濃度を使用した (0.01 nM) ところ、TrkA 阻害剤と ROCK 阻害剤を同時に添加した場合、ROCK 阻害剤により分化が促進された。これより、TrkA は ROCK 阻害剤による分化促進には無関係と考えられる。一方、Fig. 3-4~Fig. 3-6 に示すように、1.25 nM の Ras 阻害剤、10 nM の Raf 阻害剤及び 1 μ M の MEK 阻害剤と同時に ROCK 阻害剤を添加した場合、ROCK 阻害剤による分化促進効果は見られなかった。Fig. 3-7 に神経細胞に分化した ES 細胞コロニーの蛍光写真を示す。コントロールに比較して、ROCK 阻害剤を添加した場合、神経突起の数が増加した。TrkA 阻害剤を添加した場合、コントロールに比較してやや神経突起の数が増加しており、TrkA 阻害剤と ROCK 阻害剤を同時に添加することで神経突起の数が増加していた。Ras 阻害剤を添加した場合、神経突起の長さが短くなっており、Ras 阻害剤と ROCK 阻害剤を同時に添加した場合にも、ROCK 阻害剤による神経突起数の増加はなかった。これより、Ras/Raf/MEK は ROCK 阻害

剤による分化促進に関係していると考えられる。

3.3.2 ROCK 阻害剤が PI3K/Akt シグナル伝達経路に及ぼす影響

ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) /Akt シグナル伝達経路は主に細胞の生存に関わっており、その他細胞増殖、分化やアポトーシスにも関与することが知られている [7]。さらに、PI3K/Akt シグナルは PC12 細胞の神経突起の伸長にも関わっていることが報告された [8]。これらのことから、ROCK 阻害剤による神経細胞の分化促進には、PI3K/Akt シグナル伝達経路が関わっているのではないかと考え、LY294002 (PI3K 阻害剤) を用いて活性化を阻害することにより、ES 細胞から神経細胞への分化に及ぼす影響と、ROCK 阻害剤を添加した場合の全 Akt 量及びリン酸化 Akt 量をウェスタンブロッティング法により検出した。

PI3K 阻害剤及び ROCK 阻害剤を添加して分化培養を行い、フルオロ・イメージアナライザーで蛍光強度を測定した結果を Fig. 3-8 に示す。2 μ M の PI3K 阻害剤と ROCK 阻害剤を添加した場合、ROCK 阻害剤による分化促進効果はなかった。これより、PI3K は ROCK 阻害剤による分化促進に関係していると考えられる。

ROCK 阻害剤を添加した場合の全 Akt 量及びリン酸化 Akt 量をウェスタンブロッティング法により検出し、全 Akt 量に対するリン酸化 Akt 量の割合を算出した結果を Fig. 3-9 に示す。コントロール及び ROCK 阻害剤を添加した場合のリン酸化 Akt 量に大きな差はなかった。これより、Akt は ROCK 阻害剤による分化促進には無関係であると考えられる。

3.3.3 ROCK 阻害剤が PLC シグナル伝達経路に及ぼす影響

PLC シグナル伝達経路は、PLC から PIP_2 を経てイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3) 及びジアシルグリセロール (DAG) にシグナルが伝達せられ、PKC を活性化する。 IP_3 は、小胞体の IP_3 受容体を通じて貯蔵された Ca^{2+} を放出させる。PKC は DAG と放出された Ca^{2+} により活性化される。PLC シグナル伝達経路は、細胞増殖や分化に関わっていることが知られている [9、10]。さらに、PC12 細胞において、ROCK 阻害剤の神経突起伸長は、 IP_3 受容体に関わっていることが報告されている [11]。ROCK 阻害剤による神経細胞への分化促進に、PLC シグナル伝達経路が関わっているかどうかを調べるために、U-73122 (PLC 阻害剤) と bisindolylmaleimide I (PKC 阻害剤) を用いたシグナル伝達経路の阻害と、ROCK 阻害剤を添加することで細胞内 Ca^{2+} レベルが増加するかを検討した。Fig. 3-10 に示すように、0.1 μM の PLC 阻害剤を添加して分化培養をした場合、ROCK 阻害剤による分化促進効果が見られた。これより、PLC は ROCK 阻害剤による分化促進には無関係であると考えられる。細胞内 Ca^{2+} レベルの増加を検討した結果を Fig. 3-11 及び Fig. 3-12 に示す。ROCK 阻害剤を添加しても、 Ca^{2+} レベルの増加は見られず、コントロールと同様の結果であった。これより、ROCK 阻害剤は細胞内 Ca^{2+} レベルを増加させないと考えられる。一方、Fig. 3-13 に示すように、20 nM の PKC 阻害剤を添加して分化培養をした場合、ROCK 阻害剤による分化促進効果は見られなかった。これより、PKC は ROCK 阻害剤による分化促進に関係すると考えられる。

3.3.4 ROCK 阻害剤が Cdc42/Rac に及ぼす影響

Rho ファミリーの Cdc42/Rac は神経突起の伸長に関わっており、Rho/ROCK シグナル伝達経路が Cdc42/Rac による神経突起の伸長を抑制していること、ROCK 阻害剤を用いて Rho/ROCK シグナル伝達経路の働きを阻害することにより、Cdc42/Rac の活性化及び神経突起の伸長が誘導されるという報告がある [12]。この報告から、ROCK 阻害剤による神経細胞への分化促進には、Cdc42/Rac が関与している可能性があると考え、AZA1 (Cdc42/Rac dual 阻害剤) を分化培養時に添加し、ES 細胞から神経細胞への分化に及ぼす影響について検討した。Fig. 3-14 に示すように、1 μ M の Cdc42/Rac 阻害剤を添加して分化培養をした場合、ROCK 阻害剤による分化促進効果は抑制された。これより、Cdc42/Rac は ROCK 阻害剤による分化促進に関係していると考えられる。

第 4 節 考察

ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進メカニズムについて検討した。ERK シグナル伝達経路は、NGF などの刺激を伝達する細胞内シグナル経路として広く知られている。NGF 受容体の TrkA に NGF が結合することで、Ras-Raf-MEK-ERK とシグナルが伝達され、細胞増殖、生存及び分化の細胞応答が行われる [13]。ROCK 阻害剤を添加することで、リン酸化 ERK 量が増加するか検討した結果 (Fig. 3-2)、コントロールと比較して ROCK 阻害剤を添加することでリン酸化 ERK 量が増加した。TrkA 阻害剤を添加して分化培養した場合 (Fig. 3-3)、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進効果は見られたが、Ras 阻害剤、Raf 阻害剤、MEK 阻害剤を添加して分化培養した場合 (Fig. 3-4 ~ Fig. 3-6)、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進効

果は抑制された。これらの結果から、TrkA を除いた Ras/Raf/MEK/ERK シグナル経路は、ROCK 阻害剤による神経細胞への分化促進に関与している可能性が示唆された。

PI3K/Akt シグナル経路は主に、細胞の生存に関わっている [7]。Kimura ら及び Kim は、PI3K の活性化は PC12 細胞における神経突起の伸長に関わっている可能性があるとして報告している [8、14]。PI3K 阻害剤を添加して分化培養した場合 (Fig. 3-8)、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進効果は抑制された。一方、リン酸化された Akt 量をウェスタンブロッティング法により測定した結果 (Fig. 3-9)、コントロールと比較して、大きな差は見られなかった。これらの結果から、PI3K は ROCK 阻害剤による神経細胞への分化促進に関わっているが、Akt は関与していないことが示唆された。

PLC シグナル伝達経路は、細胞増殖や分化に関わっていることが知られている [9]。Itoh らは、PLC- γ 及び IP₃ 受容体の活性化は、筋弛緩薬のパパベリンによる PC12 細胞の神経突起伸長効果に関わることを報告している [15]。Minase らは、PC12 細胞における ROCK 阻害剤の神経突起伸長効果は、IP₃ 受容体に関わっていることを報告した [11]。しかし、PLC 阻害剤を添加して ES 細胞を分化培養した場合には (Fig. 3-10)、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進効果は抑制されず、ROCK 阻害剤による細胞内 Ca²⁺レベルの増加もなかった (Fig. 3-11 及び Fig. 3-12)。一方、PKC 阻害剤を添加して分化培養した場合 (Fig. 3-13)、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進効果は抑制された。これらの結果から、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進には、PKC が関わっており、PLC や細胞内 Ca²⁺は関わっていないことが示唆された。

Hirose らは、Rho/ROCK 経路の活性化は、Cdc42/Rac シグナルによる神経突起伸長効果を抑制しており、ROCK 阻害剤を添加することで ROCK の活性化を阻害すると、神経突起の伸長が見られることを報告した [12]。Cdc42/Rac 阻害剤を添加して分化培養した場合 (Fig. 3-14)、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進効果は抑制された。このことから、ROCK 阻害剤による神経細胞への分化促進には、Cdc42/Rac が関わっている可能性が示唆された。

PI3K は Cdc42/Rac と結合することが知られていることから、PI3K は Cdc42/Rac のシグナルを受けている可能性があり、また PI3K は Ras-Raf-MEK-ERK シグナル伝達経路を直接制御している可能性が報告されている [16、17]。PKC は PI3K または DAG と結合することによって活性化され、活性化された PKC は ERK シグナル伝達経路の活性化を促進するとの報告がある [16]。Rac 及び Raf シグナルは、MEK/ERK の活性化を促進する可能性が報告されている [18]。これらの報告及び本実験で得られた結果から、ROCK 阻害剤による神経細胞への分化促進メカニズムとして、Fig. 3-15 に概略図を示す。

第 5 節 結言

ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進には、ERK シグナル伝達経路の ERK の活性化が関与していることを見出した。さらに、ERK は、Ras/Raf/MEK シグナル経路、PI3K 及び PKC シグナル伝達経路と Cdc42/Rac シグナル伝達経路を介して活性化される可能性があることを見出した。以上のことから、ROCK 阻害剤による ES 細胞の分化促進メカニズムを明らかにすることができ、ROCK 阻害剤は ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞に分化させる際の強力な分化促進剤として有効であ

ると考えられる。

第6節 参考文献

- [1] 阻害剤活用ハンドブック 秋山徹, 河府和義編, 羊土社, (2006年9月) .
- [2] Z. Li, M.H. Theus, L. Wei, Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells, *Development Growth and Differentiation* 48 (2006) 513-523.
- [3] K. Matsumoto, C. Sato, Y. Naka, R. Whitby, N. Shimizu, Stimulation of neuronal neurite outgrowth using functionalized carbon nanotubes, *Nanotechnology* 21 (2010) 115101 (8pp).
- [4] 松本光太郎 東洋大学大学院生命科学研究科生命科学専攻, 博士論文 (平成 23 年度).
- [5] K. Matsumoto, N. Shimizu, Activation of the phospholipase C signaling pathway in nerve growth factor-treated neurons by carbon nanotubes, *Biomaterials* 34 (2013) 5988-5994.
- [6] 組織培養の技術 第三版, 日本組織培養学会編, 朝倉書店, (2004年6月20日).
- [7] B.D. Manning, L.C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream, *Cell* 129 (2007) 1261-1274.
- [8] Y. Kim, R. Seger, S.B. CV, S.Y. Hwang, Y.S. Yoo, A positive role of the PI3-K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation, *Molecules and Cells* 18 (2004) 353-359.
- [9] X.C. Bai, F. Deng, A.L. Liu, Z.P. Zou, Y. Wang, Z.Y. Ke, Q.S. Ji, S.Q. Luo, Phospholipase C- γ 1 is required for cell survival

in oxidative stress by protein kinase C, *Biochemical Journal* 363 (2002) 395-401.

[10] X.T. Wang, K.D. McCullough, X.J. Wang, G. Carpenter, N.J. Holbrook, Oxidative stress-induced phospholipase C- γ 1 activation enhances cell survival, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 28364-28371.

[11] T. Minase, T. Ishima, K. Itoh, K. Hashimoto, Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by the ROCK inhibitor Y-27632: A possible role of IP₃ receptors, *European Journal of Pharmacology* 648 (2010) 67-73.

[12] M. Hirose, T. Ishizaki, N. Watanabe, M. Uehata, O. Kranenburg, W.H. Moolenaar, F. Matsumura, M. Maekawa, H. Bito, S. Narumiya, Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in Neuroblastoma N1E-115 cells, *Journal of Cell Biology* 141 (1998) 1625-1636.

[13] T. Nishimura, T. Ishima, M. Iyo, K. Hashimoto, Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: Role of sigma-1 receptors, IP₃ receptors and cellular signaling pathways, *PLoS ONE* 3 (2008) e2558.

[14] K. Kimura, S. Hattori, Y. Kabuyama, Y. Shizawa, J. Takayanagi, S. Nakamura, S. Toki, Y. Matsuda, K. Onodera, Y. Fukui, Neurite outgrowth of PC12 cells is suppressed by Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 18961-18967.

[15] K. Itoh, T. Ishima, J. Kehler, K. Hashimoto, Potentiation of

NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells by papaverine: Role played by PLC- γ , IP₃ receptors, Brain Research 1377 (2011) 32-40.

[16] C.L. Carpenter, L.C. Cantley, Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth, Biochimica et Biophysica Acta 1288 (1996) 11-16.

[17] M.A. Krasilnikov, Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: The role in control of cell growth, survival, and malignant transformation, Biochemistry (Moscow) 65 (2000) 59-67.

[18] S.T. Eblen, J.K. Slack, M.J. Weber, A.D. Catling, Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes, Molecular and Cellular Biology 22 (2002) 6023-6033.

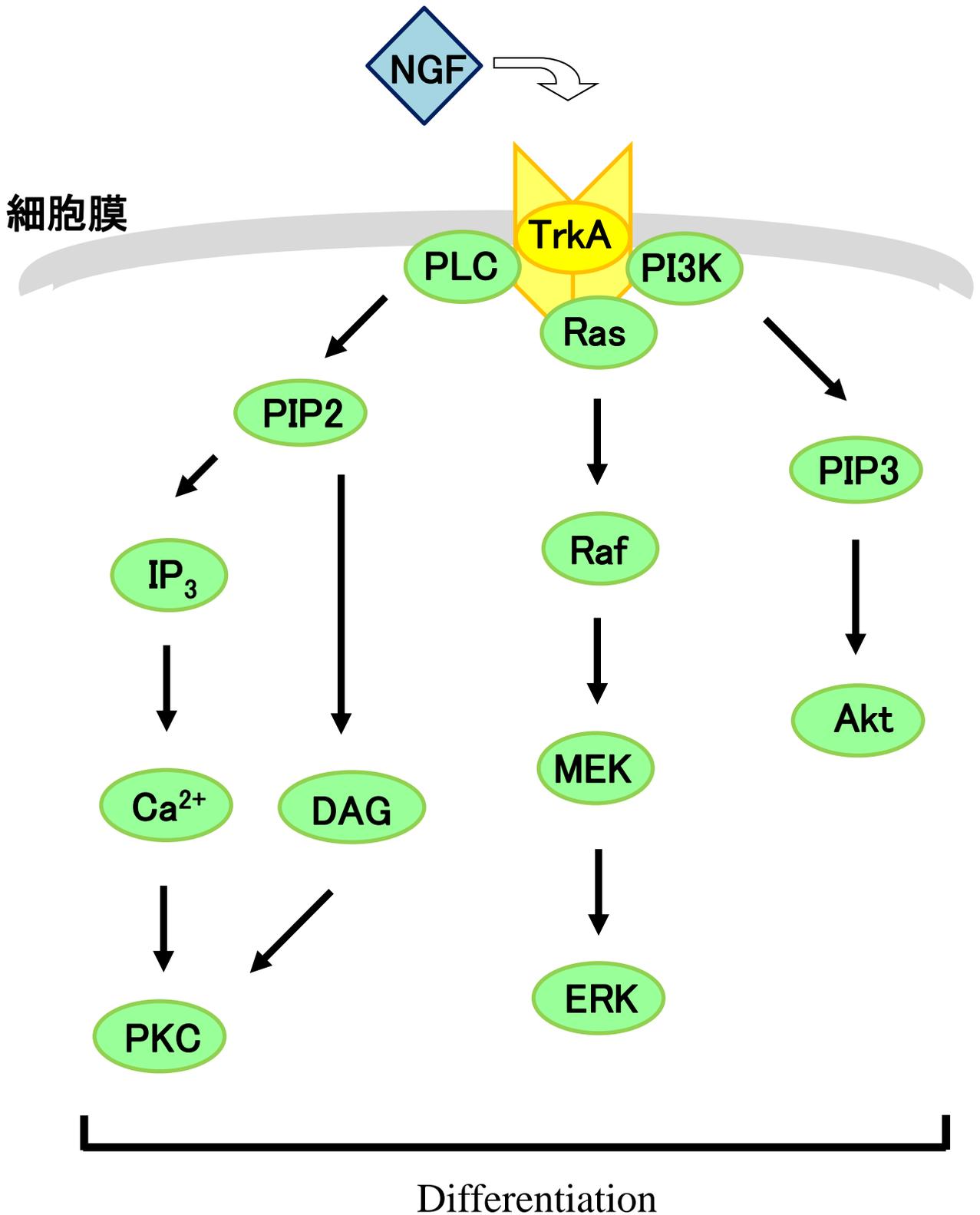


Fig.3-1 Signal transduction pathways by NGF stimulation

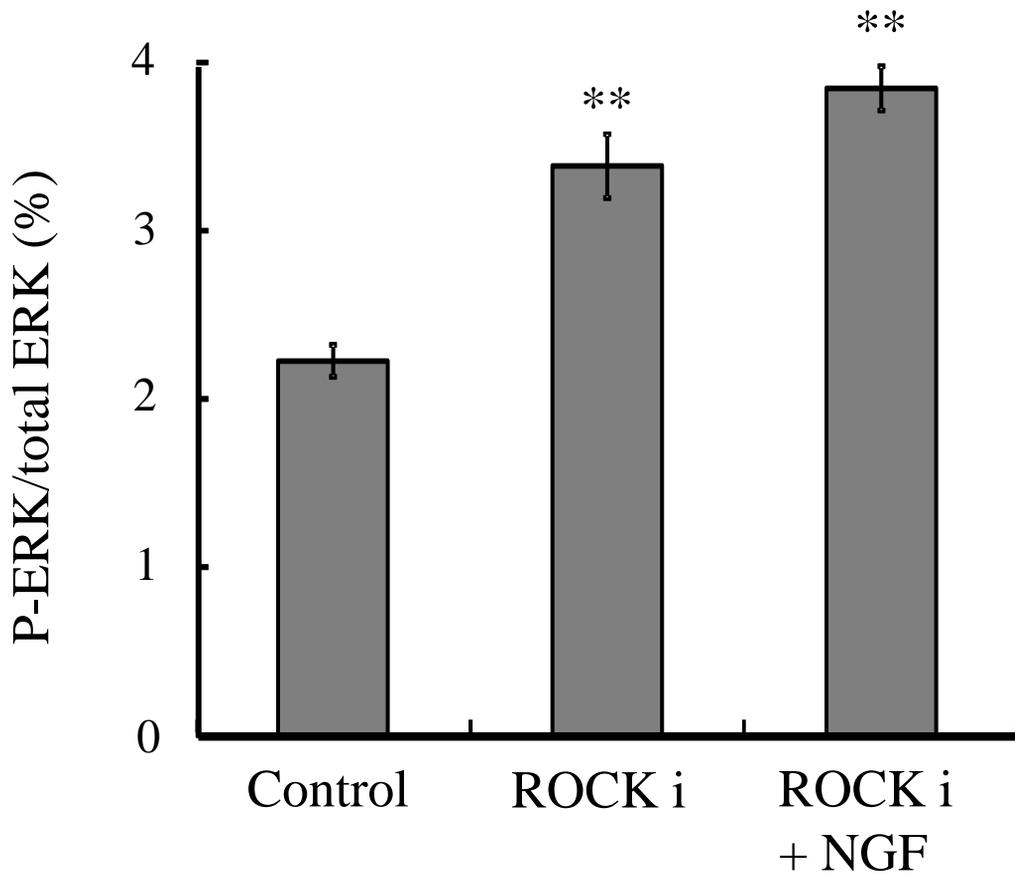
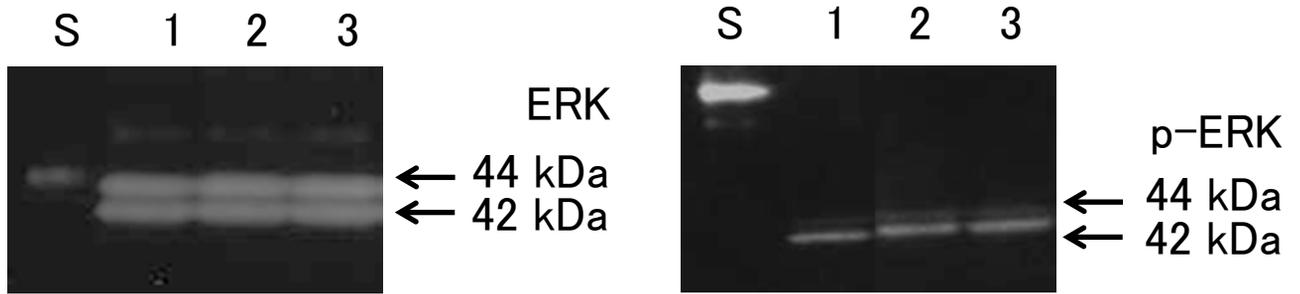


Fig.3-2 Detection of ERK by western blotting

Detection of ERK

S : Standard ERK

1 : Control

2 : ROCK inhibitor

3 : ROCK inhibitor + NGF

Detection of p-ERK

S : Standard p-ERK containing
N-terminal GST tag

1 : Control

2 : ROCK inhibitor

3 : ROCK inhibitor + NGF

** $p < 0.01$ vs. control

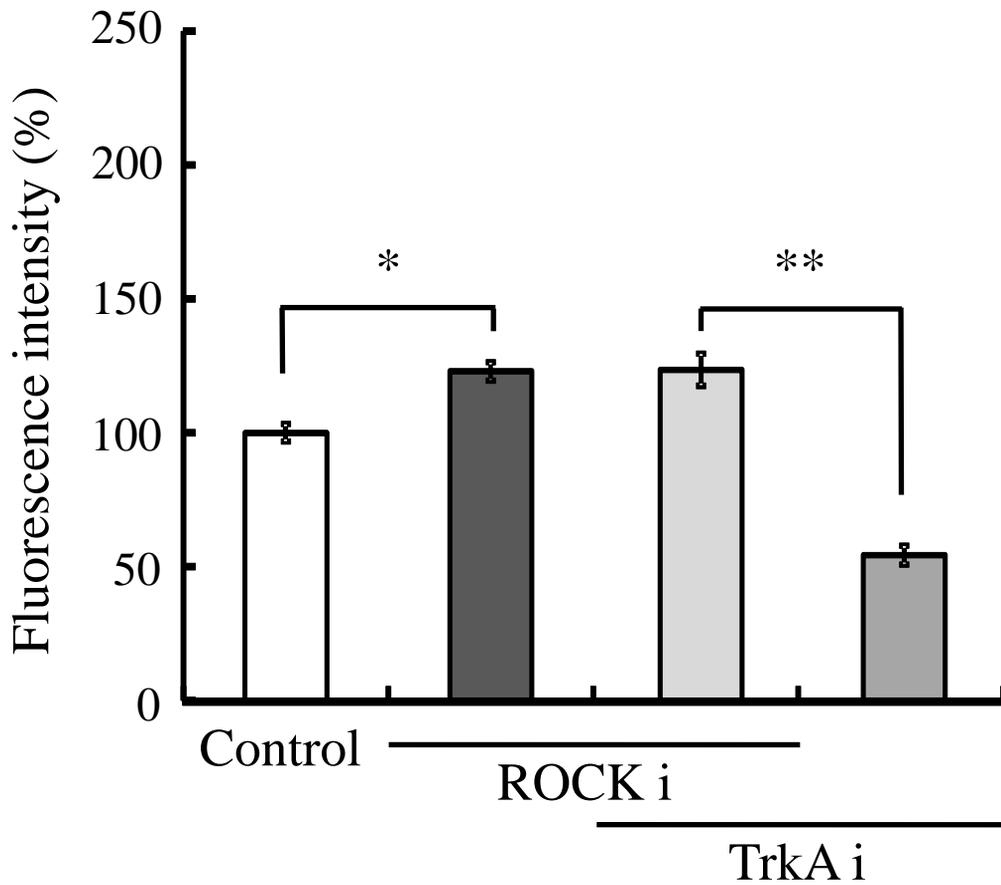


Fig.3-3 Effect of ROCK inhibitor on neuronal differentiation in TrkA inhibitor-treated ES cells

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

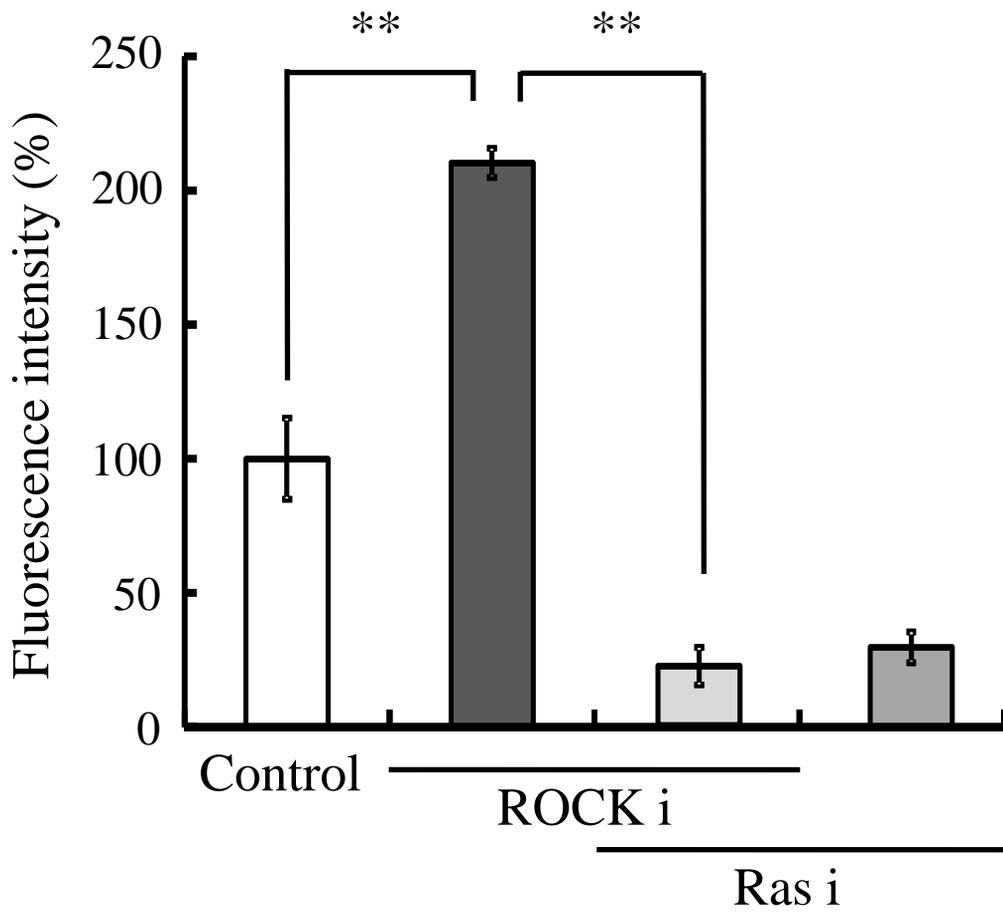


Fig.3-4 Effect of ROCK inhibitor on neuronal differentiation in Ras inhibitor-treated ES cells

** $p < 0.01$

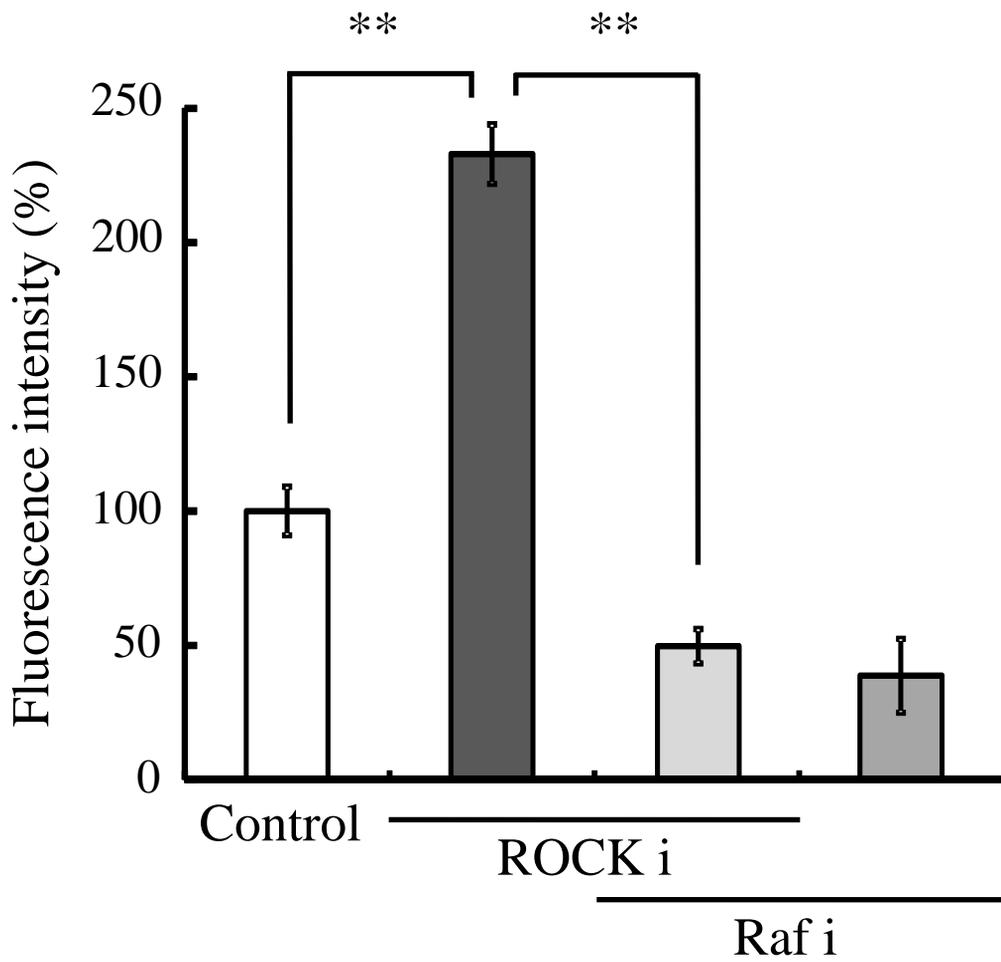


Fig.3-5 Effect of ROCK inhibitor on neuronal differentiation in Raf inhibitor-treated ES cells

** $p < 0.01$

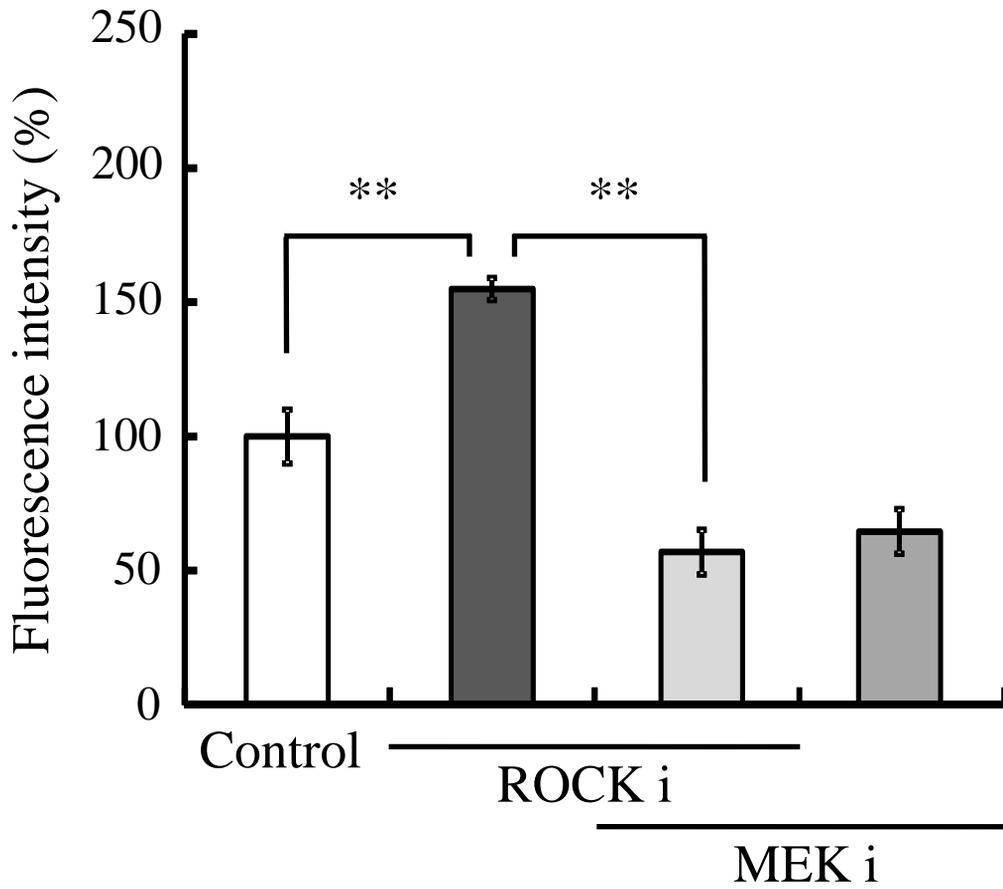


Fig.3-6 Effect of ROCK inhibitor on neuronal differentiation in MEK inhibitor-treated ES cells

** $p < 0.01$

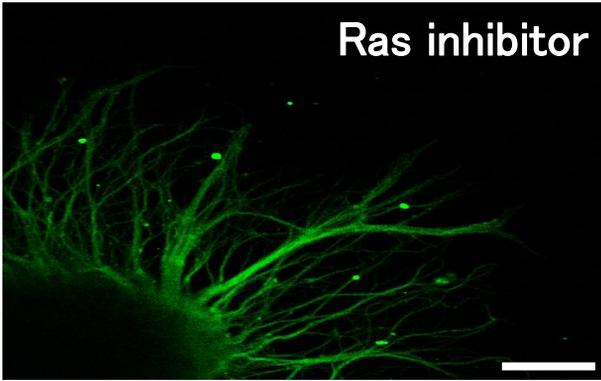
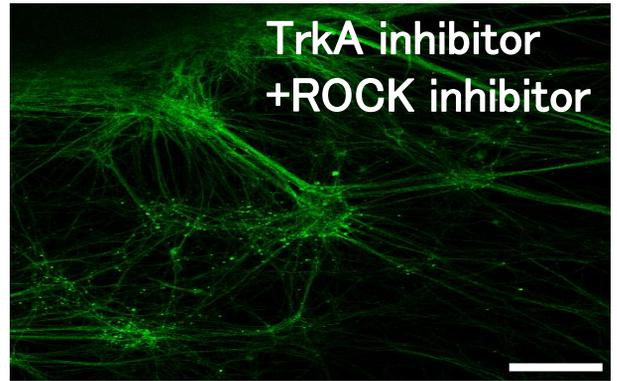
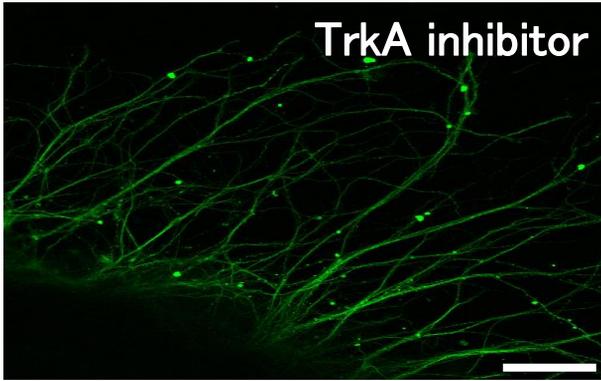
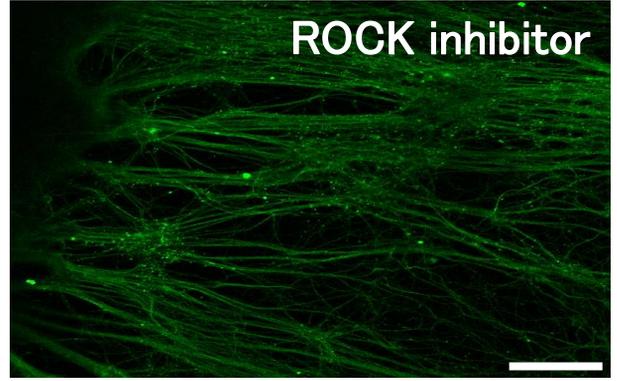
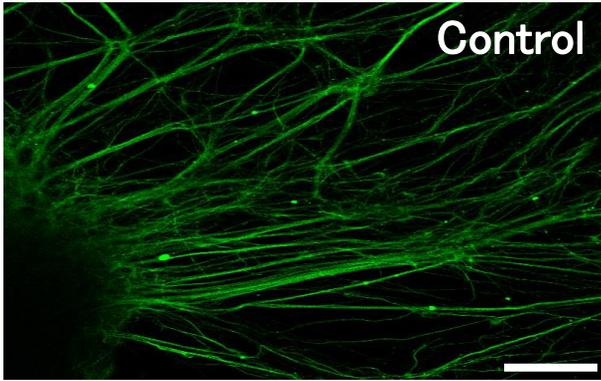


Fig.3-7 Fluorescence micrographs of the ES cell colonies with neurite outgrowth

Scale bar: 100 μ m

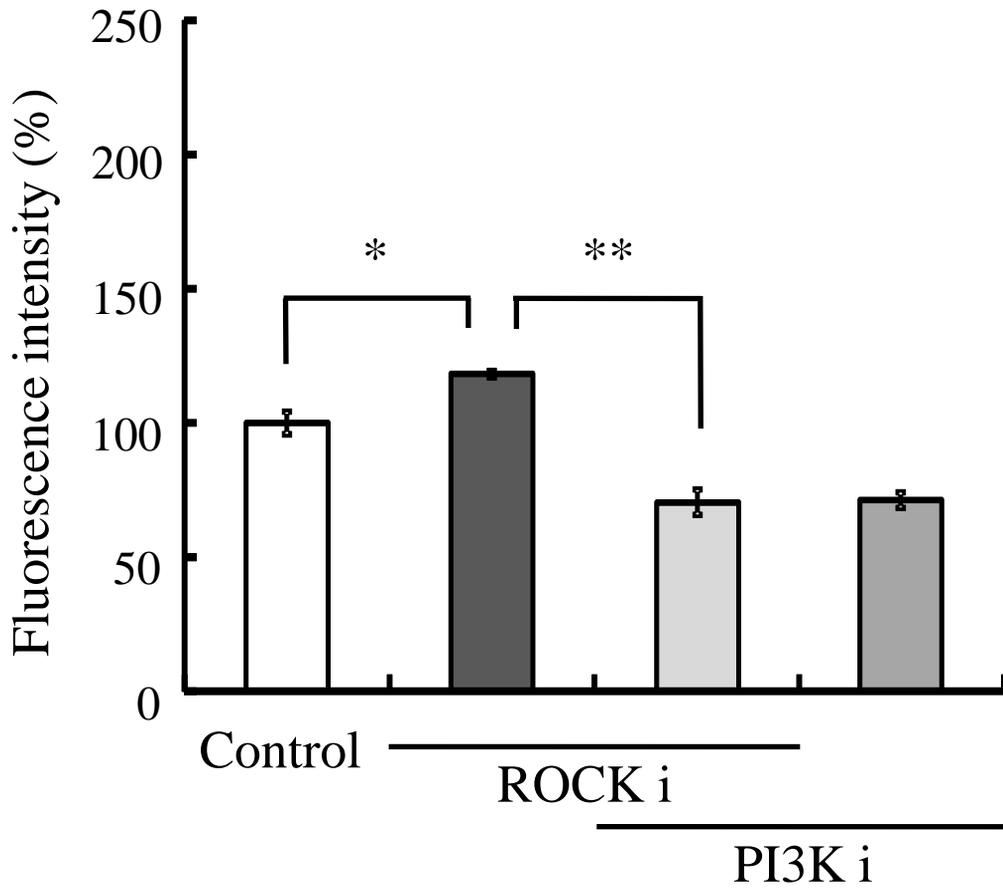


Fig.3-8 Effect of ROCK inhibitor on neuronal differentiation in PI3K inhibitor-treated ES cells

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

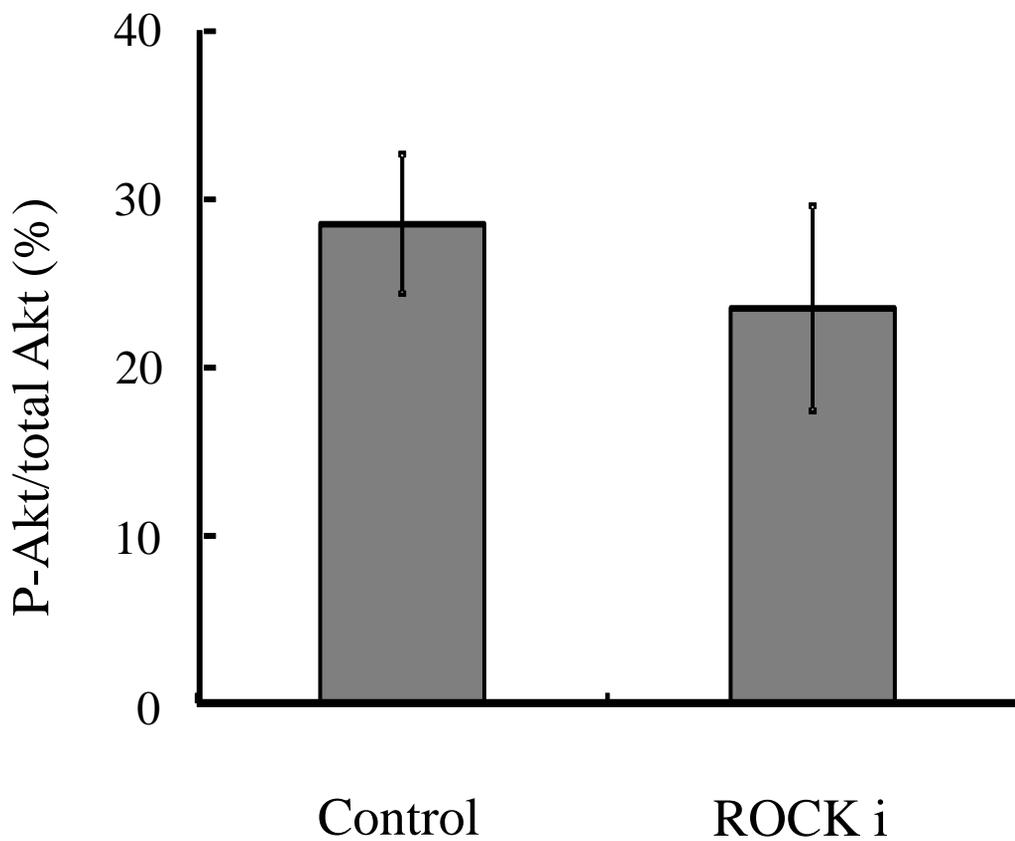


Fig.3-9 Detection of Akt by western blotting

Detection of Akt

S : Standard Akt

1,3,5 : Control

2,4,6 : ROCK inhibitor

Detection of p-Akt

S : Standard p-Akt

1,3,5 : Control

2,4,6 : ROCK inhibitor

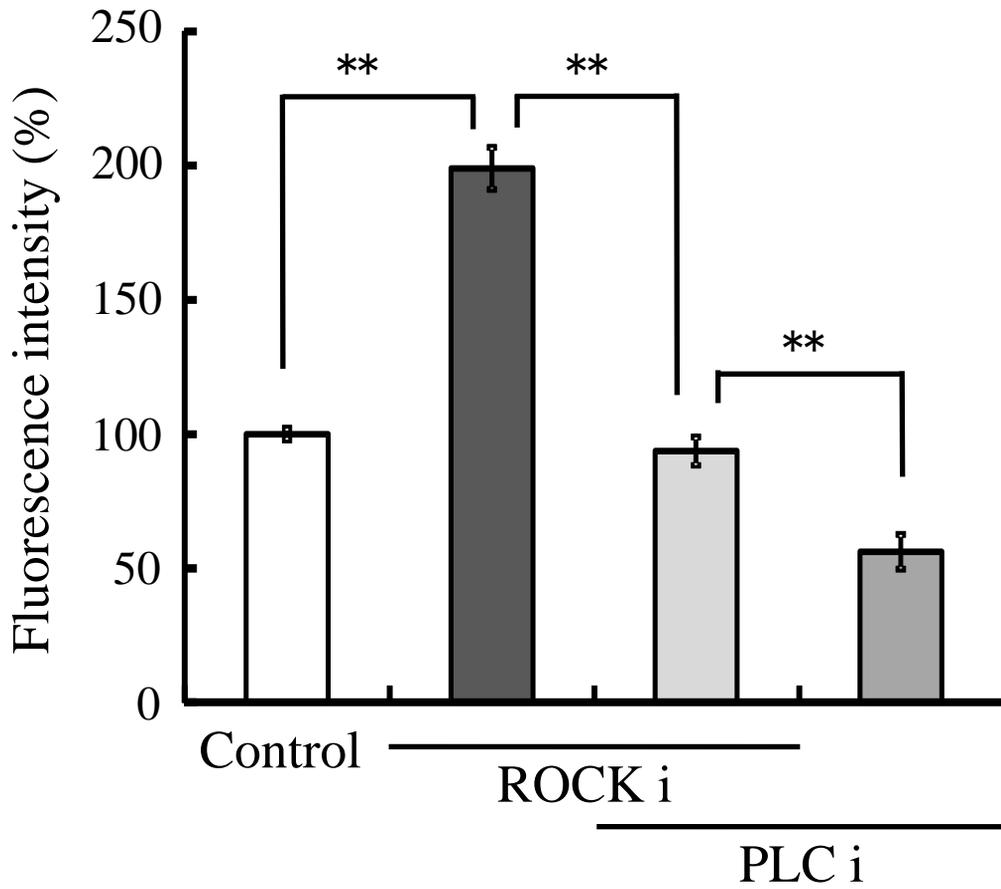


Fig.3-10 Effect of ROCK inhibitor on neuronal differentiation in PLC inhibitor-treated ES cells

** $p < 0.01$

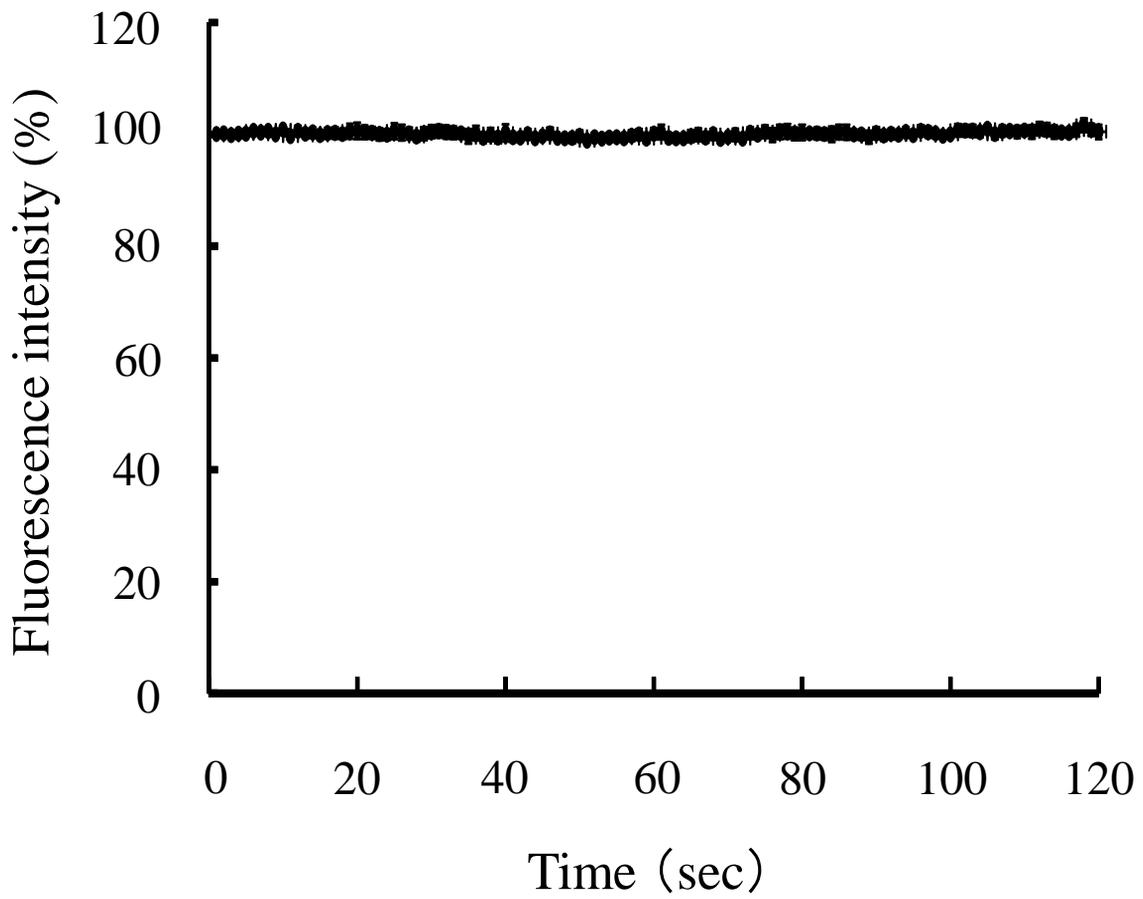


Fig.3-11 Detection of intracellular Ca^{2+} levels

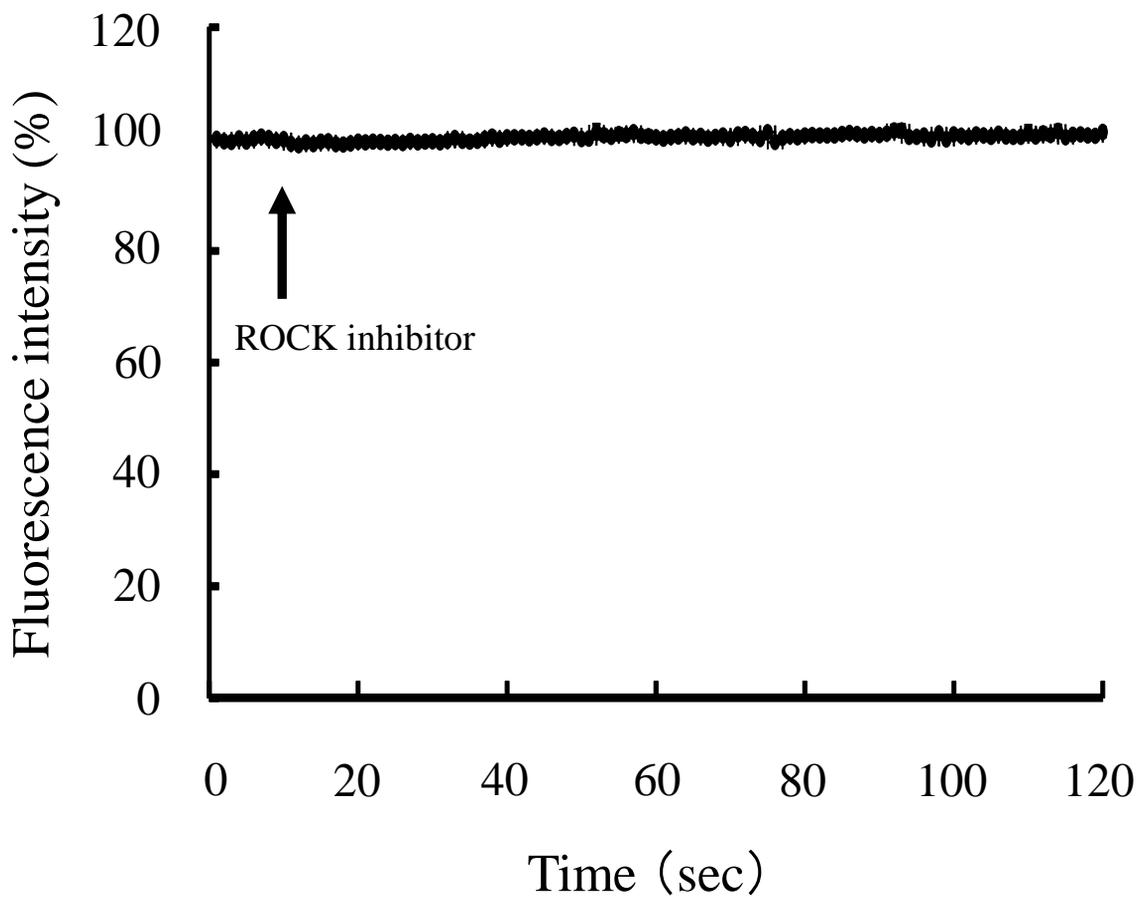


Fig.3-12 Effect of ROCK inhibitor on intracellular Ca^{2+} levels

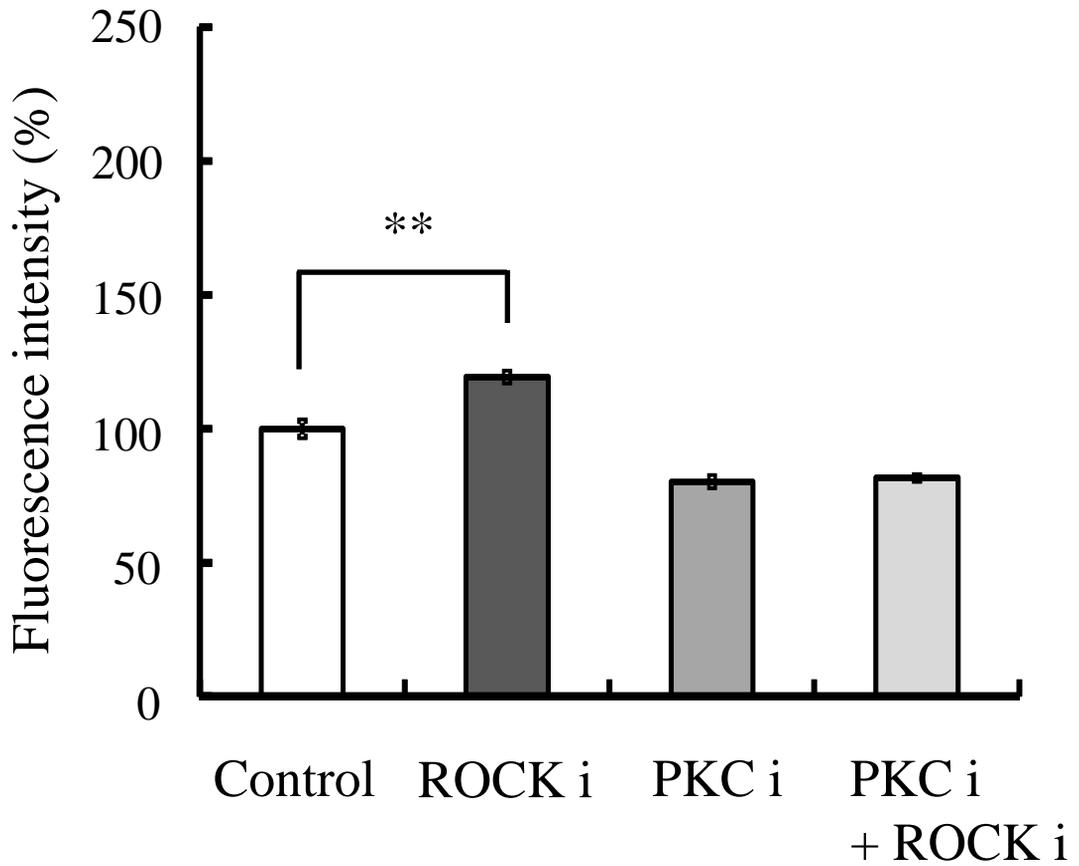


Fig.3-13 Effect of ROCK inhibitor on neuronal differentiation in PKC inhibitor-treated ES cells

** $p < 0.01$

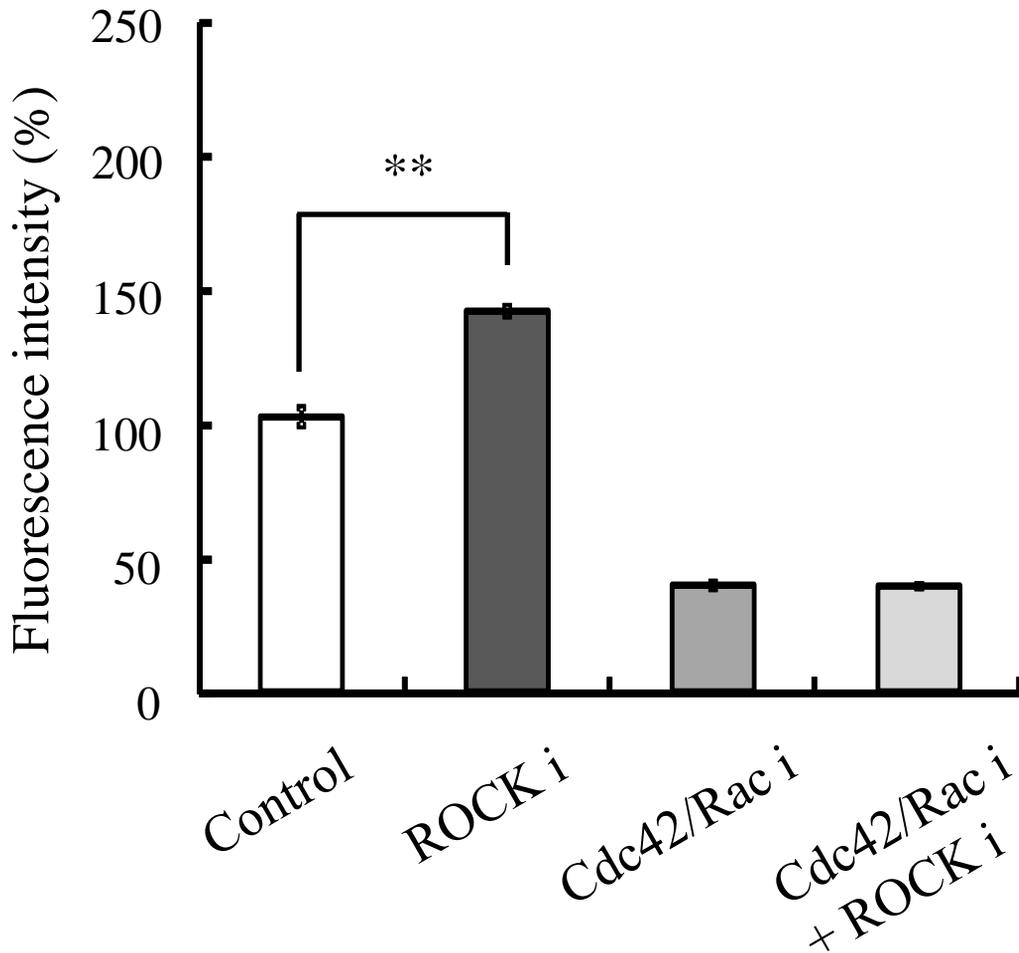


Fig.3-14 Effect of ROCK inhibitor on neuronal differentiation in Cdc42/Rac inhibitor-treated ES cells

** $p < 0.01$

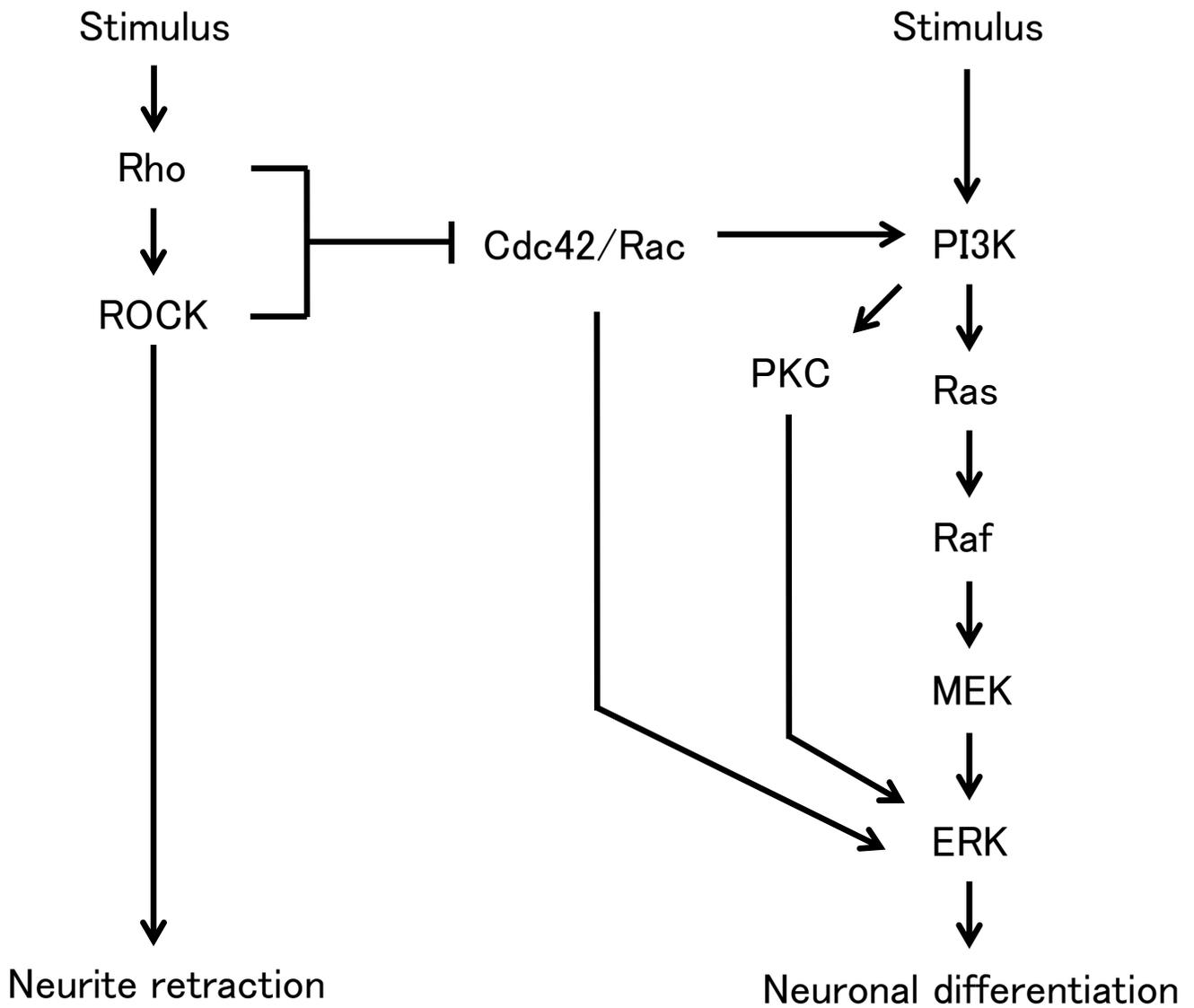


Fig.3-15 Model of ERK activation in the ERK signaling pathway in response to ROCK inhibitor

終章 総括と今後の課題

総括

本研究は、血管平滑筋弛緩薬として合成された化合物である Rho/ROCK 経路の阻害剤、ROCK 阻害剤 Y-27632 を ES 細胞と iPS 細胞に対する神経細胞への新規分化促進剤として使用できるかどうかについて検討したものである。

第 1 章では、ROCK 阻害剤添加による ES 細胞及び iPS 細胞の増殖について検討した。ES 細胞及び iPS 細胞を増殖培養する際に、ROCK 阻害剤を 0-100 μM の濃度で添加して増殖させた細胞を AP 染色した場合、20 μM の濃度まで、細胞は未分化状態を維持していた。また、トリパンプルー染色して細胞数を計数した結果、10 μM の濃度で ROCK 阻害剤を添加した場合に ES 細胞と iPS 細胞ともに増殖した細胞数が最も多くなった。このように、低濃度の ROCK 阻害剤には細胞増殖を促進させる効果があることを見出した。

第 2 章では、ROCK 阻害剤添加による ES 細胞及び iPS 細胞コロニーから神経細胞及び筋肉細胞への分化について検討した。ROCK 阻害剤を添加して分化培養した場合、無添加の場合に比較して ES 細胞及び iPS 細胞から効率良く神経細胞に分化できることを見出した。さらに、ROCK 阻害剤及び NGF を同時に添加することで、神経細胞への分化がより促進されることが明らかになった。また、ROCK 阻害剤を添加して分化培養すると、61%が神経細胞に分化しており、分化した神経細胞のうち約 50%が運動神経細胞、約 40%が感覚神経細胞に分化していることを見出した。一方、ROCK 阻害剤を添加することによる、ES 細胞及び iPS 細胞コロニーから筋肉細胞への分化についても、ROCK 阻害剤を添加するこ

とで無添加の場合と比較して効率良く筋肉細胞に分化できることを見出した。また、分化した神経細胞と筋肉細胞の割合を比較すると、神経細胞に多く分化していることを明らかにした。このように、ES 細胞や iPS 細胞の分化培養時に ROCK 阻害剤を添加することで、神経細胞だけでなく筋肉細胞への分化も促進させることから、ROCK 阻害剤は分化促進剤として有効であることを初めて見出した。

第 3 章では、ROCK 阻害剤添加による ES 細胞から神経細胞への分化促進メカニズムを明らかにするために、神経細胞の増殖、生存及び分化に関わることが知られている ERK シグナル伝達経路、PI3K/Akt シグナル伝達経路、PLC シグナル伝達経路について検討した。ROCK 阻害剤を添加することで、ERK シグナル伝達経路の ERK が活性化されることを見出した。さらに、ERK は Ras/Raf/MEK、PI3K、PKC 及び Cdc42/Rac を介して活性化される可能性を見出し、Fig. 3-15 に示した概略図のように、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化を促進させるメカニズムを示した。

まとめると、本研究では血管平滑筋弛緩薬として合成された化合物である ROCK 阻害剤を新規の分化促進剤として利用するために、ES 細胞と iPS 細胞に対する ROCK 阻害剤の影響を検討し、ROCK 阻害剤が ES 細胞と iPS 細胞から効率良く神経細胞に分化させる効果を有するという新しい知見を得ることができた。さらに、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進には ERK シグナル伝達経路の ERK の活性化が関わっていること、ERK のリン酸化は Ras/Raf/MEK、PI3K、PKC 及び Cdc42/Rac を介してなされる可能性を見出し、Fig. 3-15 に示したように ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進機構の概略図を示した。以上、ROCK 阻害剤を用いることで簡便に効率良く神経細胞

胞に分化させることができたことから、ROCK 阻害剤を創薬や移植治療などに用いられる細胞を作成する際の新規分化促進剤として利用できる可能性を見出した本研究の意義は非常に大きいと考えられる。

今後の課題

本研究では ROCK 阻害剤による分化促進機構を明らかにするために、分子機構の研究で広く用いられている手法である、各標的タンパク質に対する阻害剤を用いることで各シグナル経路の働きを阻害した。しかし、阻害剤は標的タンパク質だけでなく、他のタンパク質にも影響が出る可能性がある。そのため、ウェスタンブロッティング法により、今回得られた ROCK 阻害剤による分化促進に関わるタンパク質のリン酸化の測定を行い、また RNA 干渉 (RNA interference : RNAi) 法を用いて、ROCK 阻害剤の分化促進に関わる標的タンパク質をノックダウンさせることによる、ES 細胞から神経細胞への分化に及ぼす影響について検討する。

分化した神経細胞の種類を検討する際、約 50%が運動神経細胞、約 40%が感覚神経細胞に分化していたが、約 10%が何に分化したか不明のままである。そのため、GABA 作動性ニューロン、セロトニン作動性ニューロンやコリン作動性ニューロンなどの抗体を用いて、より詳細な神経細胞の種類を同定する。

ROCK 阻害剤を添加することで ES 細胞と iPS 細胞から分化した神経細胞の割合はどちらも高くなるが、ES 細胞と比較して iPS 細胞から分化した神経細胞の割合は少ない。そのため、今回明らかにした ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進メカニズムと、iPS 細胞から神経細胞への分化促進メカニズムが同様であるかどうか検討する。

以上、ES 細胞と iPS 細胞に対する ROCK 阻害剤の作用機作を明らかにすることにより、ROCK 阻害剤の新たな生理機能の解明に繋げ、将来的には再生医療分野への応用が期待できる。

本研究に関する原著論文と学会発表

原著論文

- 1) Yu Kamishibahara, Hideo Kawaguchi, Norio Shimizu: Promotion of mouse embryonic stem cell differentiation by Rho kinase inhibitor Y-27632, *Neuroscience Letters*, 579, 58-63(2014).
- 2) Yu Kamishibahara, Hideo Kawaguchi, Norio Shimizu: Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes neuronal differentiation in mouse embryonic stem cells via phosphatidylinositol 3-kinase, *Neuroscience Letters*, 615, 44-49(2016).

学会発表及びシンポジウム

国際学会-ポスター発表

- 1) Yu Kamishibahara, Hideo Kawaguchi, Norio Shimizu: Neuronal differentiation of mouse ES cells by Rho kinase inhibitor, FEBS-EMBO 2014 Conference, Paris, France, August 30-31, September 1-4(2014).
- 2) Yu Kamishibahara, Hideo Kawaguchi, Norio Shimizu: Effects of Rho kinase inhibitor Y-27632 on ES cell differentiation, the 11th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Hakusan Campus, Toyo University, Japan, November 15(2013).
- 3) Yu Kamishibahara, Mai Nakamura, Norio Shimizu: Promotion of stem cell differentiation into neurons by ROCK inhibitor, 9th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES), Istanbul, Turkey, September 23-26(2012).
- 4) Yu Kamishibahara, Mai Nakamura, Ayako Kitazawa, Norio Shimizu:

Neuronal differentiation of mouse induced pluripotent stem cells using condition medium of dorsal root ganglion and ROCK inhibitor, 10th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Yokohama, Japan, June 13-16(2012).

- 5) Yu Kamishibahara, Mai Nakamura, Norio Shimizu: Differentiation of iPS cells into neurons, 9th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Saitama, Japan, December 10(2011).
- 6) Yu Kamishibahara, Ayako Kitazawa, Norio Shimizu: Proliferation and differentiation of iPS cells, 8th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Tokyo, Japan, December 17-18(2010).

国内学会-口頭発表

- 1) 上芝原佑, 川口英夫, 清水範夫: ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進メカニズム, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学, 平成 27 年 3 月 27 日.
- 2) 上芝原佑, 川口英夫, 清水範夫: ROCK 阻害剤による ES 細胞および iPS 細胞の分化促進効果, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学, 平成 26 年 3 月 29 日.
- 3) 上芝原佑, 太田麗央, 中村麻衣, 清水範夫: ROCK 阻害剤による幹細胞の神経細胞への分化誘導, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学, 平成 25 年 3 月 26 日.
- 4) 上芝原佑, 中村麻衣, 清水範夫: ROCK 阻害剤 Y-27632 の添加が幹細胞の神経細胞への分化に及ぼす影響, 日本農芸化学会 2012 年

度大会，京都女子大学，平成 24 年 3 月 24 日．

国内学会-ポスター発表

- 1) 上芝原佑，川口英夫，清水範夫：ROCK 阻害剤による胚性幹細胞から神経細胞への分化促進メカニズム，平成 27 年度 理工学部－生命科学部研究者交流会，埼玉，2015 年 7 月 25 日．
- 2) 上芝原佑，川口英夫，清水範夫：ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進とそのメカニズムの解析，第 66 回日本生物工学会大会プログラム，北海道，2014 年 9 月 10 日．
- 3) 上芝原佑，川口英夫，清水範夫：ES 細胞の分化における Rho キナーゼ阻害剤の影響，平成 26 年度 理工学部－生命科学部研究者交流会，群馬，2014 年 7 月 26 日．
- 4) Yu Kamishibahara，Norio Shimizu，Hideo Kawaguchi：Effective differentiation of stem cells into neurons，平成 25 年度 理工学部－生命科学部研究者交流会，埼玉，2013 年 7 月 27 日．
- 5) 上芝原佑，中村麻衣，清水範夫：マウス iPS 細胞から神経細胞への分化を ROCK 阻害剤が促進した，平成 24 年 理工学部－生命科学部研究者交流会，群馬，2012 年 7 月 14 日．
- 6) 上芝原佑，中村麻衣，清水範夫：分散培養した iPS 細胞からの神経細胞への分化誘導，日本農芸化学会関東支部 2011 年度大会，大会講演要旨集，p. 30，東洋大学，平成 23 年 10 月 15 日．

その他の関係論文及び学会発表

原著論文

- 1) Mai Nakamura, Yu Kamishibahara, Ayako Kitazawa, Hideo Kawaguchi, Norio Shimizu: Differentiation patterns of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells into neurons, Cytotechnology (2014). DOI: 10.1007/s10616-014-9792-2.

学会発表及びシンポジウム

国内学会-口頭発表

- 1) 中村麻衣, 上芝原佑, 川口英夫, 清水範夫: マウス ES 細胞および iPS 細胞の神経細胞および筋肉細胞への分化解析日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学, 平成 25 年 3 月 26 日.

国内学会-ポスター発表

- 1) 北澤彩子, 上芝原佑, 清水範夫: マウス iPS 細胞と ES 細胞の分化誘導能の比較, 東洋大学 アカデミック・シーズ展, 群馬, 2010 年 11 月.

謝辞

本研究は、筆者が東洋大学生命科学部生命科学科 3 年から同大学大学院生命科学研究科生命科学専攻博士前期課程の間在籍した、細胞機能制御研究室及び同大学大学院生命科学研究科生命科学専攻博士後期課程の間在籍した脳神経科学研究室において行われたものです。

本研究論文をまとめるにあたり、終始ご指導頂いた東洋大学清水範夫名誉教授及び東洋大学生命科学研究科、川口英夫教授に心より感謝申し上げます。

また、本論文の作成にあたり、多くのご指導、ご助言を賜りました東洋大学大学院生命科学研究科の竹井弘之教授に深く感謝申し上げます。さらに、細胞培養する際の基本技術を教えて頂いた北澤彩子博士、松本光太郎博士に感謝いたします。

博士後期課程の研究を遂行するにあたり、研究施設を提供して頂いたバイオ・ナノエレクトロニクス研究センター(BNERC)センター長 前川透教授、及び BNERC の事務の方々に厚く御礼申し上げます。

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業、東洋大学井上円了研究助成の援助により遂行できたことを、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

著者の研究生活を常日頃支えて下さった、細胞機能制御研究室並びに脳神経科学研究室の皆様から心から感謝申し上げます。

最後に、多方面で支援を頂きました家族に、心から感謝いたします。