

氏名(本籍地)	上芝原 佑 (栃木県)		
学位の種類	博士 (生命科学)		
報告・学位記番号	甲第396号 (甲生第35号)		
学位記授与の日付	平成28年3月25日		
学位記授与の要件	本学学位規則第3条第1項該当		
学位論文題目	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		
論文審査委員	主査 教授	博士 (工学)	川口 英夫
	副査 教授	Ph.D. (応用物理工学)	竹井 弘之
	副査 教授	医学博士	児島 伸彦
	副査 教授	工学博士	吉田 善一
	副査 元本学教授	農学博士	清水 範夫

【論文審査】

本学位請求論文は、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) およびマウス人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を対象とし、Rho/Rho キナーゼ (ROCK) シグナル伝達経路を阻害する ROCK 阻害剤がこれらの幹細胞に及ぼす影響を、その作用機序を含め解析したものである。

ES 細胞は、発生3.5日目の胚盤胞の内部細胞塊から樹立され、白血病抑制因子 (LIF) の存在下で培養することで、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、神経細胞を含む様々な細胞に分化する多分化能を有することから、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。一方、iPS 細胞は、マウスの繊維芽細胞に4つの遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を組み込むことで作製された。iPS 細胞は ES 細胞と同様の増殖能および多分化能を有している。ES 細胞や iPS 細胞を創薬や再生医療分野に応用するためには、分化を制御する基礎研究が重要であり、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などが行われている。そこで、本研究では ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への効率的な分化法を検討した。ここで、Rho/Rho キナーゼ (ROCK) シグナル伝達経路は、アポトーシスや神経細胞の軸索の退縮などに関わっており、ROCK の選択的な阻害剤である ROCK 阻害剤 Y-27632 を添加することでアポトーシスや軸索の退縮などが抑制されることが知られている。これらのことから、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促進剤として有効ではないかと推測した。そこで本研究では、この 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。まず、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検討した。次に、ES 細胞や iPS 細胞から神経細胞への分化を検討するために、浮遊培養により得られた細胞コロニーの培養液に ROCK 阻害剤または ROCK 阻害剤と神経成長因子 (NGF) を同時に添加し、分化培養を行った。さらに、運動神経細胞マーカー (Lim-3) の抗体と感覚神経細胞マーカー (Brn-3) の抗体を用いて、分化した神経細胞の種類を同定した。最後に、神経細胞の生存、増殖や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 シグナル伝達経路、PLC シグナル伝達経路について、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 阻害剤添加による神経細胞への分化メカニズムを検討した。

上記の研究結果より、低濃度の ROCK 阻害剤には ES 細胞や iPS 細胞の細胞増殖を促進させる効果があること、また ROCK 阻害剤は ES 細胞や iPS 細胞の神経細胞への分化促進剤として有効であることを初めて見出した。さらに、ES 細胞から神経細胞への分化機序について、Rho/ROCK 経路を介した細胞分化のメカニズムの一端を明らかにできたと考える。これらの成果は、ES 細胞や iPS 細胞を創薬や再生医療分野に応用する際の重要な知見になることが期待される。

第1章

本章では、まず、ROCK 阻害剤が ES 細胞および iPS 細胞の細胞増殖に及ぼす影響について解析した結果を述べている。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。また、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。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、セルソーティング後の細胞生存率の改善や凍結保存した際の細胞生存率の改善などが報告されている。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。さらに 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。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、新規の増殖促進剤かつ分化促進剤として役立つのではないかと考えた。そのため、まず 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促進できるかどうか検討した。その結果、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 μ M 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。以上の結果より、ROCK 阻害剤には細胞の増殖を促進する効果があることを見出した。

第2章

本章では、ROCK 阻害剤が ES 細胞および iPS 細胞の分化に及ぼす影響、具体的には神経細胞および筋肉細胞への分化について解析した結果を述べている。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。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。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。さらに Fasudil という ROCK 阻害剤の一種は、眼圧を下げることで緑内障の治療薬としての応用が考えられている。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、特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 らおよび 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。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。そこで、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 細胞の神経細胞と筋肉細胞への分化を促進させる効果を検討した。その結果、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、この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 細胞および 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することも見出した。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。以上の結果から、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、特に神経細胞への分化を促進することから、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

本章では、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、どのような機序で ROCK 阻害剤が神経細胞への分化を促進させるのか検討した結果を述べて

いる。具体的には、神経細胞の増殖、生存およ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ている。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) および 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。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。ERK シグナル伝達経路は、NGF により神経細胞が刺激されると、NGF 受容体である TrkA に NGF が結合し ERK シグナル伝達経路の 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、どの経路も神経細胞の生存や分化に重要な役割を果たしている。これらの知見から、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。そこで、ウェスタンブロット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 および 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の一端を明らかにすることができたと考える。

本学位請求論文は、Rho/ROCK 経路の阻害剤である ROCK 阻害剤 Y-27632 が 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可能かどうか検討したものである。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 および Cdc42/Rac を介してなされる可能性を見出し、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の概要を初めて明らかにした。以上より、ROCK 阻害剤を用いることで ES 細胞や iPS 細胞から簡便に効率良く神経細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る。

【審査結果】

本学位請求論文の研究は、マウス ES 細胞および iPS 細胞の分化に ROCK 阻害剤が及ぼす影響に関するものである。ROCK 阻害剤の添加によりこれらの幹細胞が神経細胞に分化促進されること、および ERK シグナル伝達経路の ERK が活性化され、この ERK の活性化に Ras/Raf/MEK、PI3K、PKC および Cdc42/Rac のシグナル伝達経路が関わっていることを初めて明らかにした。これらの成果は、ROCK 阻害剤の新たな生理機能の解明に繋げることが可能であり、ES 細胞や iPS 細胞を創薬や再生医療分野に応用する際の重要な知見になると考えられるとともに、将来は再生医療分野への応用が期待できる。上記の本学位請求論文に記載されている内容は、既に査読付き国際英文誌 2 報に掲載されており、多数の国内外の学会でも発表し外部評価を受けていることから、東洋大学大学院生命科学研究科の博士学位論文審査基準に照らしても妥当な研究成果と認められる。したがって、所定の試験結果と論文評価に基づき、本審査委員会は全員一致を持って上芝原佑氏の博士学位請求論文は、本学博士学位を授与するに相応しいものと判断する。