

ル系で再沈殿により精製した。

#### B-4. 生分解性ブレンド材料の調製

ブレンド系における生分解性挙動の解明のため、モデル系を構築した。二成分間の影響を明解にするため、易生分解性成分と非分解性成分からなる極端な系を設定した。易生分解性成分としてはコポリ(ε-カプロラクトン/L-ラクチド), (90/10)を用いた。その合成は、両モノマーにテトラフェニルスズを 0.3mol%を加え、130℃のバルク重合にて行った。非分解性成分としてはポリエチレンテレフタレート(PET)とポリエチレン(PE)を用い、液体窒素温度での凍結・粉碎処理した微細粉末として使用した。相溶化ブレンドの系としては、上記コポリマーと PE を 10/3 で混合し、130℃にてエクストルーダーを用いて溶融ブレンド化した。また、非相溶化ブレンドは上記ポリマーと PET を同じ組成で混合し、PET の溶融しない 120℃にてブレンド化を行った。これらのブレンド化物は凍結粉碎して生分解性評価試験を行った。

#### B-5. ポリマーのキャラクタリゼーション

得られたポリマーのキャラクタリゼーションは NMR、IR、DSC、GPC 等により行

った。

#### B-6. 生分解性試験

活性汚泥分解試験にて分解性評価を行った。JIS K6950 (ISO14851)に準拠した手法として、BOD 測定器 (TAITEC, BOD テスター-200F) を用い、無機培地中にて標準活性汚泥 (化学物質評価研究機構提供) による生分解実験を行い、分解によって消費する酸素量を定量した。

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究ではインフォームドコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National Society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

### C. 結果と考察

#### C-1. 水酸基を有するポリエステルへの機能性基の導入

各種条件での水酸基を有するポリエステルへの置換基の導入で得られたビニル化ポリエステルを表 1 に示し、Run1 で得られたビニル化ポリエステルの <sup>1</sup>H-NMR のデータを図 1 に示す。表 1 中、WSC は水溶性カルボジイミドを意味し、SA は無水コハク酸を意味し、GL はグリシドールを意味する。収率は 15 から 50% 程度で、ビニル側鎖の導入率は分子量 1000 当たり約 1 であった。置換基の導入は、ポリエステル鎖中の水酸基量の影響を大きく受けた。同一条件である表中 Run 1, 3 ではその導入量に 5 倍の開きがあった。添加する 4-ビニル安息香酸量を増やすと水酸基への導入効率が上がり、グリシドールリッチなコポリエステルエーテルでは分子量 1000 あたり、約 1.6 個、グリシドール成分が 50% のものでも 1 個近く導入することに成功した。置換基としてアクリル酸エステルの導入は 4-ビニル安息香酸の代わりに等モルのアクリル酸を用い、水酸基を有するコポリエステルとしてポリ(ε-カプロラクトン/グリシドール)を使用して、同様の操作にてアクリル酸基を導入したポリエステルを得た。

No.	Feed ratio (SA/GL)	VBA (mol)	WSC (mol)	Yield (%)	Amount of VBA in backbone (/1k)
1	48/52	12	15	26	0.22
2	48/52	36	46	38	0.87
3	9/91	12	24	51	1.02
4	9/91	36	72	16	1.57

SA: succinic anhydride, GL: glycidol  
 VBA: 4-vinyl benzoic acid  
 WSC: water-soluble carbodiimide

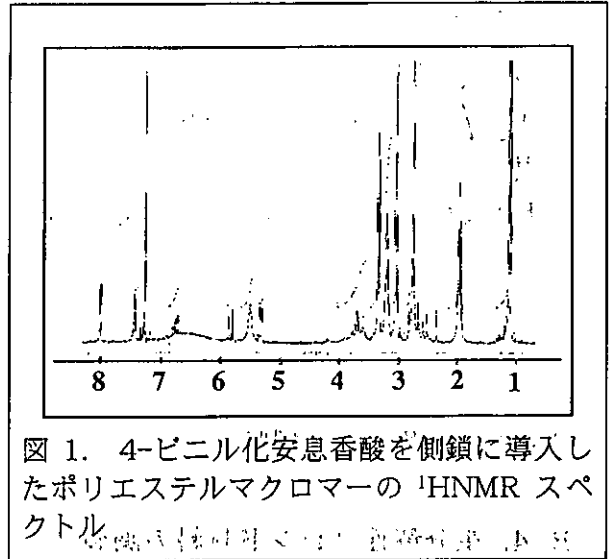


図 1. 4-ビニル安息香酸を側鎖に導入したポリエステルマクロマーの <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

#### C-2. ビニル化ポリエステルの性能評価

ガラスシャーレ上のビニル化ポリエステルにハロゲンランプの可視光を所定時間照射し、架橋を生成させた後、クロロホルムでのゲル化率を求め、さらにゲル化サンプルの水での膨潤度を測定した。その結果を表 2 に示した。ビニル化ポリエステルのゲル化率は  $(W_b - W_a) / W_a \times 100(\%)$  から求め、生成ゲルの膨潤度は  $(W_c - W_b) / W_b$  から求めた。

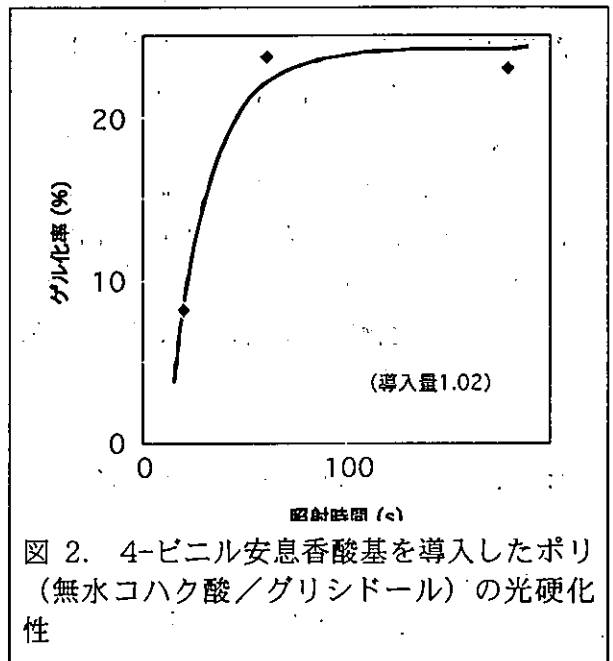


図 2. 4-ビニル安息香酸基を導入したポリ(無水コハク酸/グリシドール)の光硬化性

Table 2 Results of gelation of macromers by photoirradiation			
Run 1 Acrylation 50% (poly(CL/GL), (70/30))			
Irr. time (min)	1	3	5
Gelation (%)	>99	95.1	94.5
Swollen ratio	0.04	0.02	0.02
Run 2 Acrylation 25% (poly(CL/GL), (70/30))			
Irr. time (min)	1	3	5
Gelation (%)	73	74.1	74.3
Swollen ratio	0.06	0.19	0.18
Run 3 Acrylation 30% (polyGL, homo)			
Irr. time (min)	1	3	5
Gelation (%)	63	68	62
Swollen ratio	-	-	-

ゲル化はアクリル基導入率 50%の場合、1分の照射で 99%以上起こり、25%の導入率でも 70%以上が変換された。ポリエーテルであるポリグリシドールをビニル化したものでも光硬化させることができた。4-ビニル安息香酸基による修飾をしたポリ(無水コハク酸/グリシドール)も光硬化を受けた。その経時変化を図 2、表 2 に示した。この組合せでも 1 分程度の照射でゲル化がほぼ終了することがわかった。

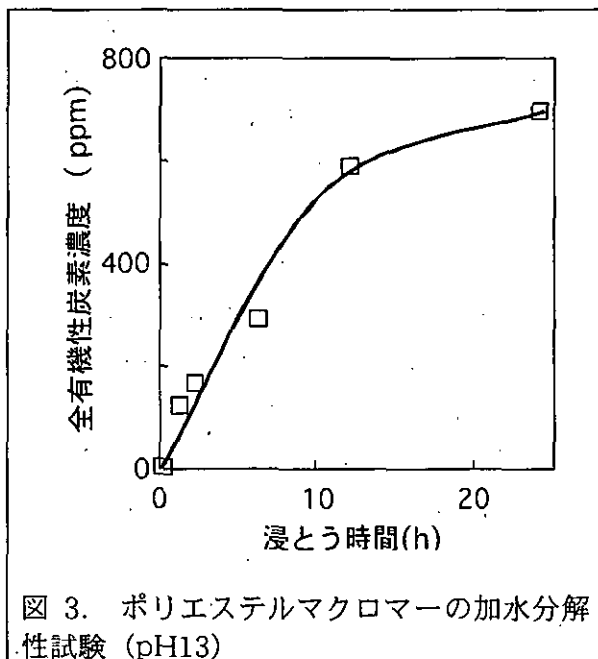


図 3. ポリエステルマクロマーの加水分解性試験 (pH13)

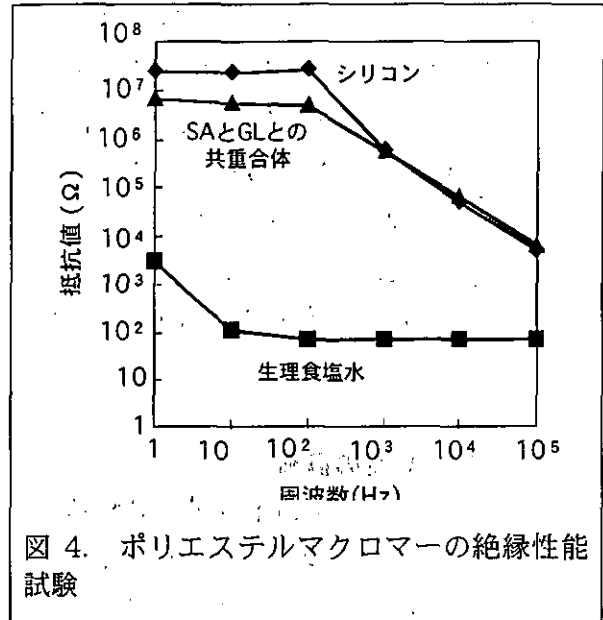


図 4. ポリエステルマクロマーの絶縁性能試験

ポリエステルマクロマーの加水分解性と電気絶縁性についても調べた (図 3, 4)。加水分解試験は pH13 において行い、加水分解により可溶化した成分を全有機性炭素濃度 (TOC) として定量した。その結果、15 時間程度まで分解は経時的に進行し、24 時間程度で大半が加水分解し、可溶化した。また、絶縁性能はシリコンとほぼ程度の性能を示した。

### C-3. アミノ酸系生分解性ポリマーの合成

アミノ酸系ポリマーはアミド結合をその主鎖に持っているため、耐熱性及び強度に優れている。また、用いるアミノ酸を選択することにより、生体への負荷を低減した材料となりうる。ここではω-アミノ酸系ポリマーとして 2-ピロリドンの開環重合及び 2-ピロリドン/ε-カプロラクタムの開環共重合について検討した。2-ピロリドンの開環重合は進行する場合としない場合との結果が極端であり、これは開始剤の調製に原

因があることが分かった。2-ピロリドン中に金属ナトリウムを完全に溶解させ、アジポイルクロリド等の酸塩化物をその後添加することによって、N-アシル化剤を系内に生成させる操作が重要である。単独重合は室温で速やかに進行し、30分以内に固化するが2時間程度反応を継続し、精製後、分子量数千から1万程度の白色固体としてナイロン-4を得た。

#### C-4. 生分解性の評価

ブレンド系モデルの生分解性試験結果を表3に示した。調製した2種のブレンド体と比較のためブレンドではない、単に二成分を混合しただけの試料の分解試験も行った。この結果から以下のことがいえる。

- ・PE、PETは生分解を受けない。
- ・コポリマーだけの場合がもっともよく分解された。
- ・PE/コポリマーの混合物とPET/コポリマーの混合物の生分解性はほぼ同じであり、どちらの場合もコポリマーの生分解に非分解成分は妨害をしなかった。また、コポリマー成分の量を考慮するとコポリマーのみの場合とほぼ同レベルであった。
- ・PET/コポリマーの（非相溶タイプ）ブレンドの生分解はPET/コポリマーの混合物の生分解とほとんど変わらなかった。
- ・PE/コポリマーの（完全相溶タイプ）ブレンドの生分解はPE/コポリマーの混合物の生分解に比べ分解速度が低下した。PET/コポリマーブレンドと比較しても分解速度は低下した。

以上のことから、相溶化により、海-島構造の海側成分である生分解性成分が非相溶成分によって希釈され生分解が遅くなったと解釈できる。非相溶タイプの、PETでの

Table 3 Biodegradation results of blends and each components by activate sludge

Sample (mL)	O2 consumption
LACL	11.6
PE	0.3
PET	0.2
Blend of PE / LACL, (22/78)	5.1
Mixture of PE / LACL, (22/78)	8.2
Blend of PET / LACL, (22/78)	7.3
Mixture of PET / LACL, (22/78)	6.4

LACL: copoly(L-lactide / ε-caprolactone), (10/90)

ブレンドの場合は生分解成分が非分解性分により希釈されることがないので、単なる混合と同程度の生分解速度を発現したと考えられる。

#### C-5. 電極被覆剤への応用

兎の腎臓交感神経あるいは減圧神経を露出させ、各神経束を約1mm間隔でステンレス製ワイヤー電極を巻き付けて引き上げ生体組織から離し、その電極部にビニル化ポリエステルを塗布した。ポリエステルは適度な粘度を有しているため局部に限極させることが容易であった。ビニル化ポリエステルの塗布部分にハロゲンランプを照射するとポリエステルはゲル状に硬化し、生理食塩水で洗浄しても硬化物は溶解することはなかった。また、硬化させた後に組織と接触させた状態で神経束から活動電気信号を取得することが可能であった。電極の減圧神経への固定化の結果を図5に示す。図5に示すように、電位信号は光処理の前後で変化せず、固定化剤として有効であることが示された。電極の腎臓交感神経への固定化の結果を図6に示す。図6に示すように、電位信号は光処理の前後で変化せず、固定化剤として有効であることが示された。これらの結果から、光硬化性基を側鎖として持つポリエステルマクロマーを光反応性化合物と混合した混合水溶液は、光により

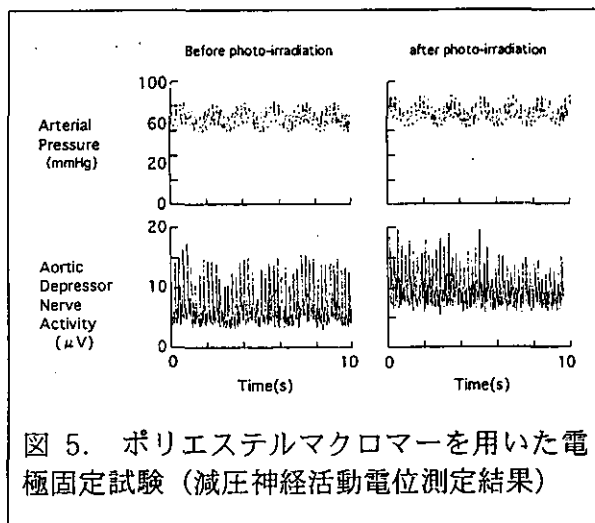


図 5. ポリエステルマクロマーを用いた電極固定試験 (減圧神経活動電位測定結果)

ゲル状に硬化させ、生体組織に接着することを特徴とする医療用組織接着剤として応用できることが期待される。

#### DE. 考察と結論

グリシドールを出発原料とするコポリエステルもしくはコポリエステルエーテルから得られるビニル化ポリエステルは油脂構造を持った光硬化性マクロマーとして有効であり、ビニル側鎖の導入率は分子量 1000 当たり約 1 程度で、コポリマー組成等により導入率の制御が可能であることがわかった。その光硬化は可視光 (ハロゲンランプ) の照射で架橋によるゲル化が容易に進行した。絶縁性はポリマー組成の影響も受けるがシリコン並みの性能も出ることから神経束のワイヤー電極への固定化剤としても応用可能であることがわかった。異なる生体吸収性を持つ複数の生分解性素材のブレンド系を用いる場合は相溶化系か、非相溶系かによって分解挙動が異なるので目的に応じた使い分けが必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

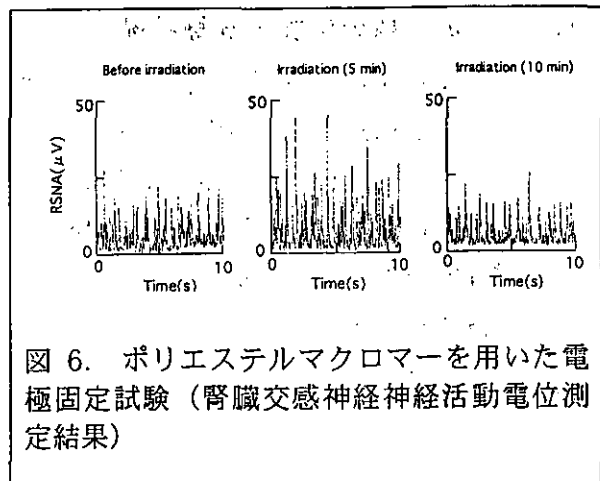


図 6. ポリエステルマクロマーを用いた電極固定試験 (腎臓交感神経神経活動電位測定結果)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, H. Yajima, N. Yamamori, Y. Ichinose, J. Sunamoto, S. Aiba, Chemical modification of chitosan. Part 15: Synthesis of novel chitosan derivatives by substitution of hydrophilic amine using N-carboxyethylchitosan ethyl ester as an intermediate" Carbohydr. Res., 338, 557-561 (2003)

##### 2. 学会発表

1. 西村 学、森内隆代、中山敦好、中山泰秀、光硬化性生体絶縁材の開発-ポリエステルマクロマーの合成と光硬化性と組織粘着性、高分子学会年次大
2. A. Nakayama, N. Yamano, N. Yamamoto, N. Kawasaki, and S. Aiba, Factors affecting biodegradation of polyesters in soil, Kyoto International Symposium on Biodegradable Polymers (KISBP 2003) (H15.1 1)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 光硬化性生体吸収材料、中山敦好、中山泰秀、西村 学、鎌田なぎさ、大高 敦、川田 徹、砂川賢二、出願日：平成15年11月7日、特願2003-379012、国立循環器病センター、(独)産業技術総合研究

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

遺伝子開発に関する研究：

ES細胞 *in vitro* 分化系を用いた血管分化関連遺伝子の同定

分担研究者 山下 潤（京都大学再生医科学研究所 附属幹細胞医学研究センター  
幹細胞分化制御研究領域 助教授）

研究要旨

循環器系遺伝子治療に用いる新しい遺伝子の開発研究を行っている。我々は、ES細胞を用いて、共通の前駆細胞（Flk1陽性細胞）から血管（血管内皮、血管壁細胞、血球細胞）を系統的に分化誘導する *in vitro* 血管分化系を構築した。本研究は、血管分化、特に内皮細胞分化に関与する遺伝子群を網羅的に検索し、血管発生分化の分子機構を包括的に明らかにすることを目的とし、DNAチップを用いたトランスクリプトーム解析とRNAiを用いた遺伝子機能阻害実験を組み合わせ、分化誘導から分化関連遺伝子の網羅的検索、さらには同定遺伝子の機能解析を行い、血管分化に関与する新規機能遺伝子の同定を試みる。本年度は、RNAiをES細胞の分化途上における任意の時間に作用させ、分化途上における遺伝子機能阻害することにより、分化に関与する遺伝子機能解析を培養細胞のみで行うことのできる新しい *in vitro* 分化実験システムの構築に成功した。ノックアウト動物モデルが不可能なヒトにおける分化研究への応用が期待される。

A. 研究目的

A-1. 背景

ES細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cell）は、初期胚（胚盤胞）内に存在する未分化幹細胞である内細胞塊（inner cell mass）を培養して樹立された細胞株であり、体中の全ての種類の細胞に分化することができるいわゆる「万能」幹細胞と考えられている。ES細胞

幹細胞と考えられている。ES細胞の全能性（pluripotency）は、ES細胞を胚盤胞に注入して得られたキメラマウスを交配することにより、ES細胞由来の動物個体を作ることができることで、*in vivo* において証明されている。この全能性を *in vitro* において引き出し、分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試み

が様々な臓器、細胞をターゲットに行われている。神経細胞、心筋細胞をはじめとして、血球細胞、内皮細胞、軟骨細胞、色素細胞等の細胞が *in vitro* において ES 細胞から誘導出来ることが明らかになっている。血管は、内腔を一層におおう内皮細胞とそれを外から取りまく壁細胞の2種類の細胞からなっている。その中を流れる血球細胞を含めてこれら血管構成細胞は互いに密接に連関しあい血管を形作る。VEGF の受容体の一つである Flk1 は血球・血管系細胞の最も早期の分化マーカーおよび中胚葉のマーカーと考えられている。最近我々は、ES 細胞を用いて *in vitro* において中胚葉、さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞（血管平滑筋細胞およびペリサイト）を選択的に分化誘導し、最終的に血管としての高次構造を *in vitro* および *in vivo* において構築すること、いわば血管の発生過程を再現することに成功した。すなわち、京都大学分子遺伝学西川らが開発した ES 細胞からの Flk1 陽性細胞の分化誘導と抗 Flk1 抗体を用いた FACS による Flk1 陽性細胞純化の技術（Development 1998, Blood 1999）を用い、(1) 単一の Flk1 陽性細胞から内皮細胞、壁細胞の双方が分化すること。(2) Flk1 陽性細胞からの内皮細胞及び壁細胞への分化はそれぞれ VEGF、PDGF-BB により誘導されること。(3) Flk1 陽性細胞の3次元培養により、内皮細胞の管腔形成とその周囲への壁細胞の接着をともなった成熟血管構造の形成が可能であること。(4) Flk1 陽性細胞のニワトリ胎仔への移植実験により、Flk1 陽性細胞が *in vivo* においても内皮

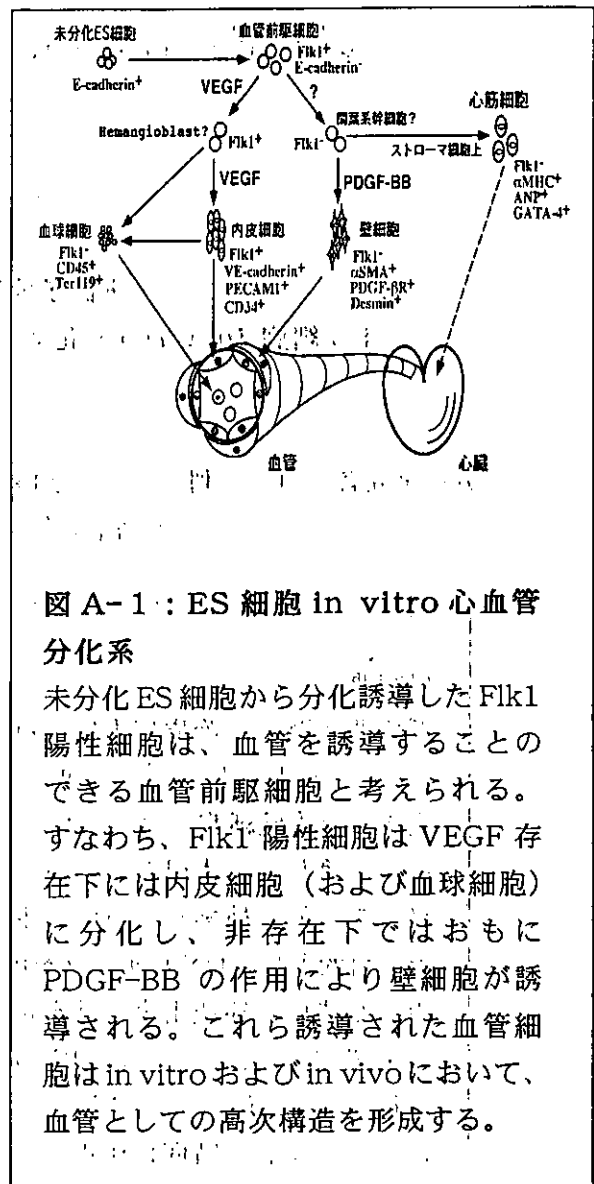


図 A-1 : ES 細胞 *in vitro* 心血管分化系

未分化 ES 細胞から分化誘導した Flk1 陽性細胞は、血管を誘導することのできる血管前駆細胞と考えられる。すなわち、Flk1 陽性細胞は VEGF 存在下には内皮細胞（および血球細胞）に分化し、非存在下ではおもに PDGF-BB の作用により壁細胞が誘導される。これら誘導された血管細胞は *in vitro* および *in vivo* において、血管としての高次構造を形成する。

細胞、壁細胞に分化し、新生血管の形成に寄与しうることを明らかにした (Yamashita et al. Nature, 2000)。この *in vitro* 分化系では、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞が分化し、さらにそれらの細胞が *in vitro* において血管としての高次構造を形成する (図 A-1)。



このように我々の ES 細胞を用いた *in vitro* 分化系は、血管および血球を系統的に分化誘導することができ、血管の発生分化過程を培養下に恣意的に操作しながらしかも経時的に観察できる。従って、この分化系を用いることにより血管の発生分化のメカニズムを細胞レベル、分子レベルで検討するという新しいアプローチが可能になったと考えられた。すなわち、これまで通常の細胞培養系では立ち入ることのできなかった分化という現象を培養細胞レベルで扱い、ノックアウトマウスの形質解析に頼らざるを得なかった分子の機能解析を *in vitro* で行うという、*in vitro* のみで発生分化機構の包括的解析を行うこれまでにない全く新しい実験系を構築できる可能性が示唆された。

#### A-2. 目的

本研究は、我々が開発した ES 細胞 *in vitro* 血管分化系を用いて、血管の発生分化に関与する遺伝子群を網羅的に検索するとともに機能解析も *in vitro* で行う新しい遺伝子探索システムを構築し、血管分化に関与する機能遺伝子の網羅的同定を行い、血管発生分化の分子機構を包括的に明らかにすることを目的とする。血管の発生分化に関しては様々な遺伝子群の関与が報告されているが、いずれもノックアウトマウスの表現型の解釈によるものであり、それらの細胞学的意味は不明なものが多い。また血管細胞としての形質を決定している因子は同定されていない。散発的なノックアウトマウスの結果を待つだけでなく、分化に関与する機能遺伝子を *in vitro* において簡便にかつ網羅的に検索することは、血管分化

メカニズムの全貌を明らかにするための近道である。またそこから発見された遺伝子群を新しい血管再生治療へ応用していくためにもこうした効率的な新システムを構築することは不可欠であると考えられる。また本研究は、血管分化のみならず、ES 細胞を用いて誘導できる細胞に関して、すべて同様のアプローチでその分化機構の解析に応用することが可能であり、本研究による新しい方法論の確立は、今後の分化・再生研究の新たな礎となる極めて重要な意義を有する。

#### B. 研究方法

##### B-1. 古典的サブトラクション法による内皮分化特異的遺伝子群の同定

未分化 ES 細胞より、Flk1 陽性細胞を分化誘導した後、抗マウス Flk1 抗体を用いたフローサイトメトリーにより Flk1 陽性細胞(Flk1+)を純化・再培養する。内皮細胞分化誘導 1 日後(EC1)の分化初期の内皮細胞を VE-カドヘリンおよび PECAM1 に対する抗体を用いて純化する。壁細胞に分化した細胞群 (SMA+) を内皮細胞マーカー陰性群として用意する。それぞれの細胞群から RNA を抽出し cDNA ライブラリーを作製する。また、抽出した RNA は DNA チップ解析に供する。Flk1+/EC1, Flk1+/SMA+, EC1/SMA+間でそれぞれサブトラクションクロニングを行い、それぞれの細胞群に特異的遺伝子群を同定する。

## B-2. DNA チップを用いた内皮分化特異的遺伝子群の網羅的同定

ヒトやマウスなど生物ゲノムの配列情報が次々と明らかになって来るにしたがい、ゲノム情報すべてを対象として遺伝子やタンパクの解析を試みるバイオインフォマティクス研究が盛んになってきた。トランスクリプトーム解析はある時点での細胞や組織における遺伝子発現を網羅的に解析し、それぞれの状況における遺伝子発現プロファイルを作成し比較検討することにより、対象とする生物現象に関与する遺伝子群を網羅的に検索しようとするもので、ポストゲノムにおける新しい研究法の主流の一つをなしている。共通の前駆細胞とそこから派生する細胞群を高純度で潤沢に、かつ時間的経過を追って集めることのできる申請者らの *in vitro* 分化系は、分化に関するトランスクリプトーム解析に非常に適した系である。我々の系を用いた DNA チップによる解析により、ゲノムレベルで網羅的にかつ効率よく、しかも高い信頼性で分化関連因子の候補遺伝子を絞り込むことができる。

我々の分化系では、分化各段階の細胞を潤沢に採取することが可能であり、PCR などによる増幅過程を経ずに DNA チップに供するだけの RNA を得ることができる。これにより増幅に伴うバイアスがかからない信頼性の高いデータを蓄積することができる。我々は神戸先端医療センターとの共同研究により解析を開始している。すなわち、未分化 ES 細胞、Flk1 陽性細胞および Flk1 陽性細胞の再培養に VEGF を添加して得られる分化 1 日目、2 日目、3 日目の内皮細胞 (VE-カ

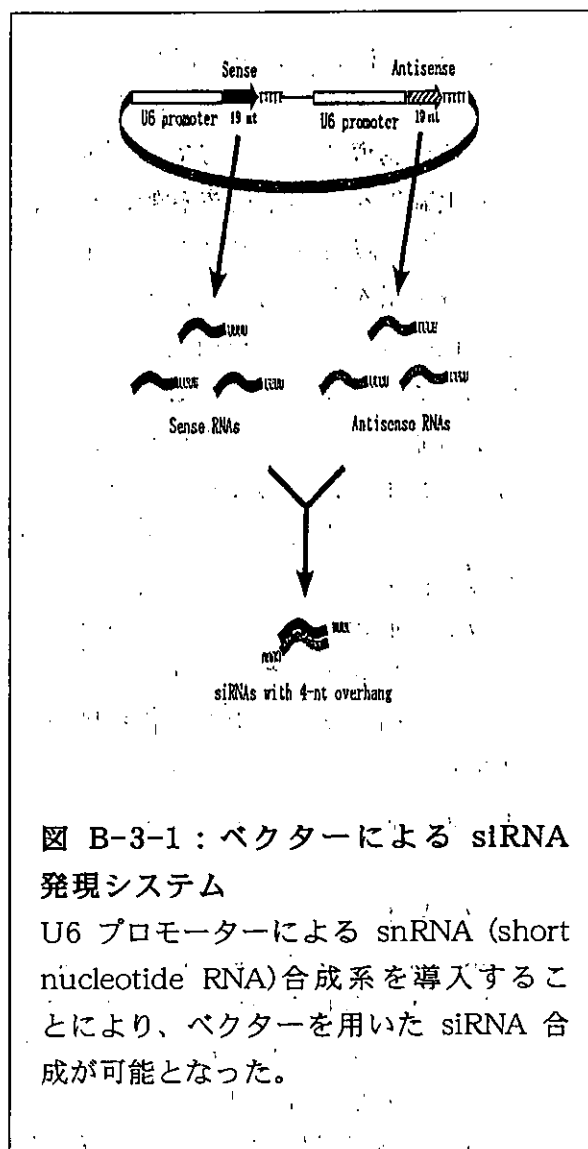


図 B-3-1 : ベクターによる siRNA 発現システム

U6 プロモーターによる snRNA (short nucleotide RNA) 合成系を導入することにより、ベクターを用いた siRNA 合成が可能となった。

ドヘリン陽性細胞) と血清または PDGF を加えて得られる壁細胞をそれぞれ純化し、RNA を抽出する。Affymetrix 社の Gene chip を用いて約 36000 個のマウスの遺伝子に関し、これらの細胞群由来 RNA を用いた遺伝子発現プロファイルを作製する。それぞれの細胞の分化に応じて特異的発現を示す遺伝子群をクラスター解析等により抽出し、分化に関与すると考えられる候補遺伝子を同定する。

### B-3. siRNA を用いた ES 細胞分化過程における in vitro 遺伝子機能解析系の構築

こうした DNA チップによる解析は、これまで盛んに行われてきたサブトラクション法やディフデレンシャルスクリーニング法などと共通の欠点を有している。すなわち、候補遺伝子は数多く同定できても、それらの機能解析ができないことには、真に重要な遺伝子を決定することができず、遺伝子リストの山を前に研究が停滞してしまうことである。したがってすぐれた機能解析系をもっていることが研究を進めるうえの重要なカギとなる。

RNAi (RNA interference; RNA 干渉) は、細胞に導入された 2 本鎖 RNA がそれに相当する配列をもつ遺伝子の発現を抑制する現象で、線虫において発見されたがその後ショウジョウバエや植物などにおいても効果があることが知られている。哺乳動物においては、21-23 塩基の短い 2 本鎖 RNA (siRNA: short interfering RNA) が遺伝子発現抑制に効果的であることが報告されたが、RNA 断片の細胞内導入効率の限界により、その応用範囲は限られていた。最近になりベクターを用いた siRNA 発現系が次々に報告され、哺乳動物細胞においても siRNA による高効率かつ選択的な遺伝子発現抑制を行える可能性が広がってきた。

ES 細胞における siRNA 発現システムは、東京大学工学系研究科化学生命工学の多比良教授らのグループとの共同研究により開発を進めている。多比良らのグループは U6 プロモーターを使ったベクターによる siRNA 発現システムを最近報告したが (Miyagishi et al. Nat. Biotech.,

2002) (図 B-3-1)

彼らはテトラサイクリンにより誘導性に発現を制御できる U6 プロモーター系も開発しており (Ohkawa et al. Hum. Gene. Ther., 2000)、これを siRNA 発現システムに応用することが可能である。恒常的な遺伝子発現の変化は ES 細胞の分化に大きな影響を与えてしまい、目的とする特異的な変化が検出しにくくなる可能性が高い。したがって ES 細胞の分化系においては、誘導性のプロモーターシステムを用いて、遺伝子発現の時間的調節ができることが非常に重要である。一般に ES 細胞は遺伝子導入効率が悪く、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターなどが有効な遺伝子導入法として知られている。レトロウイルスベクターの ES 細胞への遺伝子導入効率は約 40%、レンチウイルスベクターではほぼ 100%と報告されているが、これはいずれも未分化状態の ES 細胞への遺伝子導入効率である。ES 細胞の分化が始まると、大規模なエピジェネティックな遺伝子構造の変化がおり、これらのウイルスベクターによりゲノムに導入された遺伝子の多くはその発現が抑えられてしまう (サイレンシング)。そのため、ES 細胞分化における遺伝子発現を行うには、分化途上においてもサイレンシングを受けないゲノム上の位置に遺伝子が導入された株を選択することが必要である。このようにして選択された遺伝子導入細胞にテトラサイクリンを添加することにより、分化誘導中の任意の時間に siRNA を発現させ、標的遺伝子の発現を抑制することができる。

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究ではインフォームドコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

## C. 研究結果

### C-1. 定量的血管分化評価システムの構築

我々の分化系では血管構成細胞および心筋細胞をそれぞれ Flk1 陽性細胞を開始材料に誘導することができるが、誘導効率を定量的に評価できることが機能阻害実験を行うためには不可欠である。血管内皮細胞に関しては、分化誘導された内皮細胞数および細胞全体に占める割合を内皮細胞マーカーである VE-カドヘリンや PECAM1 に対する抗体を用いたフローサイトメトリーにより定量的に評価できる。

さらに本年は、細胞を培養状態のまま分化の定量的評価を行うため、倒立顕微鏡の画像を CCD カメラを用いて取り込み、細胞の蛍光強度を測定できるシステムを導入した。これにより、24-ウェルや 96-

ウェルディッシュにて培養した少量の細胞に関しても細胞分化を定量的かつ経時的に評価することが可能となった。

### C-2. サブトラクション法による内皮細胞分化特異的遺伝子群の同定

前述のように Flk1 陽性細胞と分化1日目の初期内皮細胞との間でサブトラクションライブラリーを作製し、Flk1+に比し、EC1 群において有意に発現が上昇している内皮細胞分化特異的遺伝子を約 30 個すでに同定している。

### C-3. DNA チップを用いた内皮分化特異的遺伝子群の網羅的同定

未分化 ES 細胞、Flk1 陽性細胞および Flk1 陽性細胞の再培養に VEGF を添加して得られる分化1日目、2日目、3日目の内皮細胞 (VE-カドヘリン陽性細胞) と血清または PDGF を加えて得られる壁細胞をそれぞれ純化し、RNA を抽出し、Affymetrix 社の Gene chip を用いて約 36000 個のマウスの遺伝子に関し、これらの細胞群由来 RNA を用いた遺伝子発現プロファイルを作製した。内皮細胞特異的マーカーと考えられる VE-カドヘリン遺伝子は、内皮細胞特異的発現パターンを示した。このような内皮特異的発現を示す遺伝子群を約 200 個同定した。

### C-4. レトロウイルスベクターを用いたテトラサイクリン誘導性 siRNA 発現システムの構築

多比良らのテトラサイクリン誘導性 U6 プロモーターのシステムをレトロウイルスベクターに持ち込んだ ES 細胞対

応の siRNA 発現システムの構築を行った。すなわち、多比良らのテトラサイクリン応答性 U6 プロモーター/siRNA 配列と導入細胞の選択マーカーとして GFP 遺伝子を CMV プロモーター下に挿入したものを MSCV レトロウィルスベクターに組み込み、ES 細胞への siRNA 導入用のレトロウィルスベクターを構築した。同ウィルスベクターをパッケージング細胞 Plat-E (293T 細胞を改変したもの)にリポフェクション法により導入し、導入遺伝子を含むウイルス上清を得た。

同上清を ES 細胞に添加したのち、siRNA を発現する細胞を FACS にて純化することを試みた。ES 細胞の分化途上においては遺伝子導入効率は著しく悪く(1%以下)、導入された siRNA の効果を検討することはできなかった。

本年は、同血清を未分化状態の ES 細胞に対して添加し、遺伝子導入を行った。未分化 ES 細胞に対しては、約 10 数%の細胞に遺伝子導入が可能であった。遺伝子導入細胞(GFP 陽性)を FACS にて純化した後分化誘導し、分化途上におけるテトラサイクリン添加により、siRNA 発現による遺伝子発現抑制を試みた。しかし、ほぼ 100%の純度に GFP 陽性細胞を純化しても、分化過程において GFP 発現は 10-40%に低下してしまい(サイレンシング)、siRNA の効果を検討することは難しかった。

これらの結果より、レトロウィルスを用いた siRNA 発現システムは、分化途上の ES 細胞において機能させることは難しいと考えられた。

#### C-5. 恒常的テトラサイクリン誘導性 siRNA 発現 ES 細胞株の樹立

次に、分化途上の ES 細胞においても siRNA を作用させるために、サイレンシングを受けない部位に siRNA 発現ベクターを導入した恒常的 siRNA 発現細胞株の樹立を行った。テトラサイクリン誘導性 siRNA 発現ベクターを導入した細胞株を樹立後、分化誘導を行い、内皮細胞への分化後もサイレンシングを受けない細胞株を選択した。選択された細胞株の分化途上において、テトラサイクリンを添加し、標的遺伝子の発現抑制を試みた。

VE-カドヘリンに対する siRNA を導入した細胞株を用いて、分化誘導 3 日目からテトラサイクリンを添加し、分化誘導 6 日目において、誘導された内皮細胞における VE-カドヘリンの発現を FACS にて検討した。分化誘導された CD31 陽性内皮細胞において、テトラサイクリン添加により VE-カドヘリン発現の低下を認めた。同結果により、ES 細胞分化途上においても siRNA により特異的遺伝子発現抑制が可能であることが明らかとなった。

この方法を用いることにより、内皮分化に関与すると考えられる候補遺伝子の機能解析を行うことが出来るようになり、本研究を推進するための中核的実験系の構築に成功した。

#### D. 考察

1) 我々の ES 細胞 *in vitro* 分化系は、内皮分化過程の詳細な検討において非常に有用な新しいツールとなる。

2) 古典的サブトラクション法では、2点間で発現に差がある遺伝子であるということのみが情報として得られるにすぎないが、DNA チップ解析では、各々の遺伝子発現の経時的変化を追えることから、内皮分化との関連性の高い、信頼度の高いデータを得ることができる。しかも、圧倒的に多数の遺伝子を容易にピックアップすることができる。

3) siRNA による遺伝子阻害実験は *in vitro* において遺伝子機能を検討できる非常に有用な方法であるが、ES 細胞に関しては、その細胞の特性、すなわち遺伝子導入の困難さ、分化することによりその性質を変化させていること、遺伝子発現のタイミングにより分化過程に変化が生じることなどを鑑み、通常の cell line などの場合とは異なる全く新しいシステムを構築する必要がある。

4) 分化途上の ES 細胞において siRNA を作用させるためには、誘導性 siRNA 発現細胞株の樹立が有効な方法であった。

#### E. 結論

ES 細胞 *in vitro* 分化系、DNA チップによる網羅的遺伝子発現解析、siRNA による *in vitro* 遺伝子機能解析の3つを組み合わせた本研究は、細胞分化の分子機構に新たな可能性を与える有力な新手法である。In vitro において分化に関する遺伝子機能解析が可能な実験系が構築されたことにより、ノックアウト動物モデルが使えないヒトにおいても、分化

遺伝子の探索が可能となり、再生医療応用可能な遺伝子群の同定が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. J. Yamashita, SI. Nishikawa. Embryonic stem cell-derived endothelial cells. **Methods in Endothelial Cell Biology**. Springer-Verlag GmbH, Berlin, New York, Tokyo. *in press*.
2. T. Watabe, A. Nishihara, K. Mishima, J. Yamashita, K. Shimizu, K. Miyazawa, SI. Nishikawa, K. Miyazono. TGF- $\beta$  receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cell. **J. Cell. Biol.** *in press*.
3. M. Fujita, Y. Nakao, S. Matsunaga, M. Seiki, Y. Itoh, J. Yamashita, RWM. van Soest, N. Fusetani. Ageladine A: an anti-angiogenic matrix metalloproteinase inhibitor from the marine sponge *Agelas nakamurai*. **J. Am. Chem. Soc.** *in press*.
4. M. Sone, H. Itoh, J. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, Y. Suzuki, Y. Kondo, A. Nonoguchi, N. Sawada, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, S. Nito, M.

- Shibuya, S.I. Nishikawa, K. Nakao. Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation* 107: 2085-2088, 2003.
5. T. Yurugi-Kobayashi, H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, H. Hirai, T. Kobayashi, M. Ogawa, S. Nishikawa, S.I. Nishikawa, K. Nakao. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood* 101: 2675-2678, 2003.
  6. K. Yamahara, H. Itoh, T.H. Chun, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi-Kobayashi, K. Miyashita, H. Tsujimoto, H. Kook, R. Feil, D.L. Garbers, F. Hofmann, K. Nakao. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 3404-3409, 2003.
  2. 山下 潤. 総説「幹細胞・ES細胞-血管」再生医療, 2: 111-119, 2003. 日本再生医療学会
  3. 山下 潤. 「ヒトES細胞と再生医療血液・免疫・腫瘍」, 8: 19-26, 2003. メディカルレビュー社
2. 学会発表
- (1) 学会・研究会発表
1. Yamashita J. : Vascular development in ES cell differentiation system. Endothelome Conference 2003 (2003.2.22 小樽)
  2. Yamashita J. : Cardiovascular development in ES cell in vitro differentiation system. Aso International Meeting (2003.5.16 熊本)
  3. 山下 潤 : ES細胞を用いた心血管分化研究、Cardiovascular Science 研究会 (2003.6.13 東京)
  4. 山下 潤 : ES細胞を用いた血管の分化多様化機構の解析と血管再生、動脈硬化 update 2003 (2003.6.14 東京)
  5. Yamashita J. : ES cell in vitro differentiation system for cardiovascular development. Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology (2003.8.21-23, Chuncheon, Korea)
  6. Yamashita J., Nishikawa S.I. : Cardiovascular development in ES cell in vitro differentiation system using Flk1-positive mesodermal progenitors. 13<sup>th</sup> International Symposium on Atherosclerosis.

#### 和文総説

1. 山下 潤. 「ヒトES細胞の樹立・分化研究と再生医療応用」病理と臨床, 21: 698-702, 2003.

(poster) (2003.9.28-10.2 京都)

管新生-」 (2003.11.27 京都)

## (2) 講演・シンポジウム

1. 山下 潤: ES 細胞を用いた心血管分化誘導と心血管再生への応用の可能性、第 9 回日本胎児心臓病研究会 (特別講演) (2003.2.15 兵庫県東浦町)
2. 山下 潤: ES 細胞 in vitro 分化系を用いた血管発生機構の解析、東北大学加齢医学研究所シンポジウム (2003.2.19 仙台)
3. 山下 潤: ES 細胞と心血管再生、第 2 回日本再生医療学会シンポジウム「心筋再生の現況と将来」 (2003.3.11 神戸)
4. 山下 潤: ES 細胞を用いた心血管分化誘導と再生医療、第 6 回日本組織工学会シンポジウム「循環器の再生医療」 (2003.6.13 東京)
5. 山下 潤: ES 細胞による心血管再生の可能性、新潟ポート心臓フォーラム (特別講演) (2003.7.12 新潟)
6. 山下 潤: ES 細胞を用いた血管分化・多様化システムと血管再生、第 51 回日本心臓病学会パネルディスカッション「血管新生治療における遺伝子治療と細胞治療: 現状と未来」 (2003.9.9 東京)
7. 山下 潤: ES 細胞における血管前駆細胞の分化・多様化と血管新生の機構、第 35 回日本動脈硬化学会シンポジウム (2003.9.27 京都)
8. 山下 潤: ES 細胞分化系による血管細胞分化・多様化メカニズムの解析、第 24 回日本炎症・再生学会シンポジウム「炎症と再生の接点-血

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。



循環器系疾患モデルの作成と  
血管ホルモン遺伝子細胞治療の開発に関する研究

分担研究者 伊藤 裕（京都大学大学院医学系研究科 内分泌代謝内科 助教授）

研究要旨

ナトリウム利尿ペプチドと同様に血管拡張ホルモンであり、cAMP カスケードを活性化するアドレノメジュリン (AM) の遺伝子を過剰に発現する AM トランスジェニックマウス (AM-Tg) を、変異型 AM 前駆体遺伝子 cDNA を肝細胞特異的な遺伝子過剰発現作用を有する Serum amyloid P (SAP) プロモーターと結合したコンストラクトを用いて作成した。これを用いて作成した下肢虚血血管再生モデル、脳梗塞モデルでの AM の血管保護再生ならびに虚血脳保護再生治療効果を調べた。AM-Tg マウスの下肢虚血血管再生モデルにおいて、約1月まで野生型マウスに比べて有意に高い血流回復を認めた。一方、脳梗塞モデルでは、虚血基底核での神経脱落の減少、梗塞域の減少、梗塞後の神経再生の促進を認めた。いずれも cAMP カスケードおよび IP3 キナーゼ/Akt カスケードを活性化することによる。また、ES 細胞由来の VPC への血管ホルモン遺伝子導入とその移植による血管再生遺伝子細胞治療を目指し、AM の ES 細胞由来 VPC の血管細胞分化に及ぼす効果を *in vitro* で調べた。マウス ES 細胞由来 VPC に AM を作用させると、VEGF の内皮分化誘導作用が著しく増強された。VPC 移植による血管再生療法の確立において、AM がその分化誘導および移植細胞数の確保において極めて有用であることが示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまで強力な利尿、ナトリウム利尿、血管拡張作用を有するナトリウム利尿ペプチドなかで、ANP、BNP が心臓から分泌されるホルモンであるのに対し、CNP は血管内皮細胞から分泌され NO と同様に、cGMP カスケードを活性する新しい内皮由

来血管弛緩因子であることを報告してきた。ANP、BNP はすでに欧米において、心不全治療へのペプチド投与が行われ、著明な臨床効果が得られている。しかし、ペプチドの生体への投与はその血中半減期が短く、持続静脈内投与が必要となる。

そこで、昨年度は、我々は本研究にお

いて、血管ホルモン遺伝子導入による血管再生医療の開発を目指し、ナトリウム利尿ペ

プチドが cGMP/cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化を通じて、損傷内皮保護修復、さらに血管再生に促進的に作用することを証明し、アデノウィルスおよびプラスミドを用いた生体血管壁および虚血部筋肉組織への遺伝子導入と局所での血管ホルモンの大量分泌効果の検討を行い、良好な内皮再生、抗血栓性の発現、血管新生促進治療効果を見出した。

本年度は、ナトリウム利尿ペプチドと同様に血管拡張ホルモンであり、cAMP カスケードを活性化するアドレノメジュリン (adrenomedullin; AM) に関して、その血管保護再生作用を *in vitro* および *in vivo* で検討した。更に、AM は、現在国立循環器病センターにおいて心不全患者への投与が行われているので、AM の持続的な血中濃度の上昇が、再生治療効果を発揮しうるのかについて、AM 遺伝子を過剰に発現する AM トランスジェニックマウス (AM-Tg) を開発し、このモデル動物を用いて、下肢虚血血管再生モデルさらに、今回新たに中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルを作成し、これらのモデルにおいて、AM の血管保護再生さらに虚血脳保護再生治療効果を検討した。

一方、我々は、無限の増殖能とほとんどすべての臓器細胞に分化しうる ES 細胞 (embryonic stem cells: 胚幹細胞) より血管を構成する内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方に分化する“血管前駆細胞 (vascular progenitor cells; VPC)”を同定単離した。VPC は *in vitro* で血管を再構成でき、また生体への移植により移植局所で血管再生に寄与し、局所血流を増加させることを我々

は報告した。そこで、この ES 細胞由来 VPC への血管ホルモン遺伝子導入とその移植による血管再生遺伝子細胞治療を目指し、AM の ES 細胞由来 VPC の血管細胞分化に及ぼす効果を *in vitro* で検討した。

## BC. 研究方法及び研究結果

### BC-1. AM 単独過剰発現 Tg マウスの開発

AM 前駆体遺伝子からは AM のみならず、生理活性作用を有するもうひとつのホルモンである PAMP (proadrenomedullin N-terminal 20 peptide) が産生される。AM 単独での効果を解析するために、PAMP が不活化されるよう塩基置換した変異型 AM 遺伝子を用いて AM が単独で過剰発現するトランスジェニックマウス (Tg) マウスを作成した。ヒト腎臓 cDNA ライブラリーより AM 前駆体 遺伝子 cDNA を増幅し、PAMP コード領域 3' 端のグアニンをシトシンに置換した。

その結果、導入遺伝子から産生される PAMP のアミド化シグナル内のグリシンがアラニンに変異し、PAMP 活性発現に必須の過程である C 端アミド化が阻害され、活性型の PAMP は分泌されない。その変異型 AM 前駆体遺伝子 cDNA を肝細胞特異的な遺伝子過剰発現作用を有する Serum amyloid P (SAP) プロモーターと結合したコンストラクトを用いて、ヒト AM を単独で過剰発現する Tg マウスを作成した。

AMTg マウス F1 3 ラインでヒト AM 血中濃度の上昇を認めた。尾から抽出した DNA のサザンプロット解析で、トランスジェンコピー数はそれぞれ 8, 11, 30 コピーであった。血漿ヒト総 AM 濃度は 11 コピーの Tg マウスで  $614.5 \pm 137.2$  fmol/ml、8 コピーの Tg マウスで  $166.3 \pm 98.0$  fmol/ml、

30 コピーの Tg マウスで  $138.9 \pm 40.6$  fmol/ml であった。11 コピーの Tg マウスで成熟型 AM は  $24.9 \pm 4.1$  fmol/ml まで上昇し、ヒトでの治療域に匹敵していた。一方、ヒト成熟型 PAMP 血中濃度を測定したところ、その上昇を認めなかった。

収縮期血圧は 16 週齢で野生型  $123.3 \pm 3.6$  mmHg に対し Tg  $114.0 \pm 3.3$  mmHg と有意な低下を認めた。脈拍数に有意差はなかった。

### BC-2. AMTg を用いた AM の虚血肢における血管再生作用の検討

AMTg マウスおよび野生型マウスで、我々がこれまで報告した方法に準じて、大腿動脈結紮下肢虚血モデルを作成した。レーザードップラー血流計にて、阻血後の虚血肢の血流を経時的に測定して AM の血管再生作用を検討した。動物実験は京都大学動物実験指針を遵守して行われた。

その結果、AMTg マウスでは第 14 日から血流回復が有意に促進し、第 28 日まで野生型マウスよりも良好な血流が保たれた(第 28 日において、健常肢に対する虚血肢の血流は、野生型:  $56.7 \pm 8.3\%$ 、AMTg:  $73.8 \pm 5.3\%$ ;  $P < 0.05$ )。

### BC-3. マウス中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルの確立と AM による虚血脳での血管、神経再生作用の証明

12 週齢マウスに対し、イソフルレンを用いて吸入麻酔を施行した。頸部正中切開にて左総頸動脈を露出して小孔を作成し、シリコンコートをした塞栓子(8-0 ナイロンモノフィラメント)を挿入した。塞栓子を総頸動脈から内頸動脈に注意深く進め、中大脳動脈起始部を閉塞し、血流の途絶を

側頭骨に設置したファイバー血流計にて確認した。20 分後に塞栓子を抜去し、血流の再開を血流計にて確認した。

AMTg マウスおよび野生型マウスで虚血作成後の脳血流を、レーザードップラーイメージャーを用いて第 56 日まで評価した。第 4~6 ないし第 7~9 日に BrdU を腹腔内投与し、第 56 日までに大脳を摘出して、虚血側基底核における梗塞域の大きさ、血管再生ならびに神経再生を組織学的に評価した。

マウスを 4%PFA を用いて還流固定し、摘出した大脳を 30%スクロース/PBS にて置換した後、OCT コンパウンドにて凍結包埋した。頭頂 3mm から 4mm の部分で 30mm 厚の切片をマイクロトームで作成し、室温で 2mol/l HCl に 30 分間浸漬した。ブロッキング処理後 4℃で一次抗体に 24 時間浸漬し、その後二次抗体に 12 時間浸漬した。用いた一次抗体は、抗 BrdU 抗体、抗 neonatal nuclear antigen (NeuN) 抗体、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体、抗 platelet-endothelial cell-adhesion molecule-1 (PECAM-1) 抗体である。PECAM-1 を用いた免疫染色で毛細血管密度を定量し、AMTg マウスと野生型マウスでの血管再生を評価した。NeuN を用いた免疫染色でニューロンの脱落を観察し、梗塞域の大きさを定量した。GFAP を用いた免疫染色でグリオシスを評価した。さらには、BrdU と NeuN が二重陽性となる細胞数を定量することで、神経再生を評価した。

20 分間の中大脳動脈閉塞にて、頭頂 3mm から 4mm に相当する部分の基底核を中心に、ニューロンの脱落とグリオシスを認めた。AMTg マウスの基底核虚血域において PECAM-1 染色で定量した毛細血

管密度は野生型と比較して術後 7 日目から有意に増加し、(第 28 日における毛細血管密度は、野生型:  $484.9 \pm 23.6/\text{mm}^2$ 、AMTg:  $541.1 \pm 23.1/\text{mm}^2$ ;  $P < 0.05$ )、これを反映して虚血域の脳血流も野生型と比較して有意に増加した(第 28 日において、健常側に対する虚血側の脳血流は、野生型:  $88.9 \pm 3.3\%$ 、AMTg:  $97.6 \pm 3.1\%$ ;  $P < 0.05$ )。

AMTg マウスでは第 28~56 日における虚血基底核での神経脱落が減少しており、梗塞域の大きさも AMTg マウスで有意に減少した(第 28 日における梗塞域は、野生型:  $0.33 \pm 0.02\text{mm}^2$ 、AMTg:  $0.25 \pm 0.02/\text{mm}^2$ ;  $P < 0.05$ )。またグリオーシスも AMTg マウスで軽減していた。BrdU と NeuN が二重陽性となった細胞数を定量すると、AMTg マウスで増加しており(第 28 日での二重陽性細胞数は野生型マウス:  $32.0 \pm 2.5/\text{mm}^2$  に対して、AMTg では  $60.0 \pm 8.6/\text{mm}^2$ ;  $P < 0.05$ )、AMTg マウスにおいて梗塞後の神経再生の促進も認められた。

#### BC-4. AM の ES 細胞由来血管前駆細胞からの内皮細胞分化誘導促進作用

AM は生体内において副腎、心臓、腎臓などに幅広く分布しているが、発生段階においても胎生早期から心血管等に発現し、AM 遺伝子のホモノックアウトマウスは血管構築不全により胎生致死となることから心血管系分化制御因子としての意義が注目されている。我々はこれまでに、AM が *in vitro* での wound healing assay を用いた検討で損傷内皮の再生を促すことを証明し、また *in vivo* においても、ゲルプラグを用いた移植実験でプラグ内の毛細血管密度と血流を増加させることを報告した(FEBS Letters 544: 86-92, 2003)。また我々はマウス ES 細胞由来 VEGFR2(VEGF

受容体 2) 陽性細胞が血管内皮細胞・壁細胞両者への分化能を有する血管前駆細胞 (Vascular progenitor cells: VPC) であることを報告した(Nature 408: 92-96, 2000)。今回我々は AM によるマウス ES 細胞由来 VPC からの血管内皮細胞への分化誘導作用について検討した。

未分化 ES 細胞を分化抑制因子である LIF (leukemia Inhibitory factor) 非存在下に 4 型コラーゲン上で 4 日間培養すると VEGFR2 陽性細胞が全体の約 30-40% 誘導される。これらの細胞を FACS を用いて 95% 以上の高い純度で sorting し、4 型コラーゲン上で再び培養をおこなった。培養液中には 10% FCS、VEGF (50ng/ml) および AM ( $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-6}\text{M}$ ) を添加した。3 日間の再培養後に PECAM-1 (内皮細胞マーカー) および VE-cadherin (内皮細胞マーカー) の発現について FACS による解析をおこなった。また、 $\alpha$ SMA (壁細胞マーカー) および PECAM-1 (内皮細胞マーカー) について免疫染色を施行し、各添加因子の VEGFR2 陽性細胞からの血管構成細胞分化に対する効果について検討した。免疫染色の結果では、FCS のみで VEGFR2 陽性 VPC を培養した場合には  $\alpha$ SMA 陽性壁細胞が 95% 以上を占め PECAM-1 陽性の内皮細胞はほとんど出現しなかった。FCS に加え VEGF を投与すると PECAM-1 あるいは VE-cadherin が陽性の内皮細胞が全体の約 30% に誘導された。AM は VEGF との併用において  $10^{-9}\text{M} \sim 10^{-6}\text{M}$  の範囲で濃度依存的な PECAM-1 陽性内皮細胞誘導作用を認めた (fig.1)。また、FACS による解析によって FCS+VEGF+ AM $10^{-6}\text{M}$  では内皮細胞が全体の約 50% に誘導されることが明らかとなった。また FCS+VEGF+AM $10^{-7}\text{M}$  によって認められ