

2004000820 A

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

ヒト胚性幹細胞(ES細胞)を用いた「寝たきり」
高齢者に対する再生医療の開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17(2005)年4月

主任研究者 伊 藤 裕

目 次

I. 総括研究報告

ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞 (human ES cell-derived vascular progenitor cells; VPC) の単離と体外大量培養及び hES-VPC の生体移植による心筋梗塞、脳卒中に対する心筋・脳保護再生治療効果の検証

一ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞からの生体移植用細胞製剤調整の基盤技術開発および「寝たきり」病態モデル動物への移植治療効果の検証に関する研究

..... 1

伊藤 裕

II. 分担研究報告

1. hES-VPC 含有ハイブリッド人工血管の開発とその血管再生効果の検証

拍動流負荷による ES 細胞の血管壁細胞への分化誘導と血管壁層構造を有する ES 細胞含有ハイブリッド人工血管の一体構築の可能性に関する研究

..... 12

中山泰秀

2. 霊長類 ES 細胞由来血管前駆細胞による血管発生分化系を用いた新規血管再生薬剤の開発

一ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた血管再生薬剤探索の基盤研究および細胞移植治療の安全性の検討に関する研究

..... 24

仁藤新治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 33

IV. 研究成果の刊行物・別冊

..... 37

ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞(human ES cell-derived vascular progenitor cells; VPC)の単離と体外大量培養
及び hES-VPC の生体移植による心筋梗塞、脳卒中に対する心筋・脳保護再生治療効果の検証
—ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞からの生体移植用細胞製剤調整の基盤技術開発および
「寝たきり」病態モデル動物への移植治療効果の検証

主任研究者:伊藤 裕(京都大学大学院医学研究科 助教授)

無限の増殖性とほとんど全ての臓器に分化し得る ES 細胞は、再生医療において魅力的なマテリアルである。我々はこれまで、マウス ES 細胞より血管を構成する内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方に分化し、*in vitro* で血管を構築する能力を有する血管前駆細胞 (vascular progenitor cells; VPC) を同定した。本研究は、ヒト ES 細胞より VPC を同定し、体外で大量に分化培養を行い移植することで生体において有効な血管を再生させ、虚血脳や心筋を回復させる新しい脳卒中、心筋梗塞に対する治療法を開発し、「寝たきり」の解消を目指すものである。本年度は、我々が同定したヒト ES 細胞由来 VPC から、生体に移植可能なヒト内皮細胞および血管平滑筋細胞の双方を大量に増幅することができることを見出し、この血管細胞の各成分(内皮細胞、血管平滑筋細胞)をそれぞれ単独および混合し、閉塞性動脈硬化症モデルに移植すると長期安定した血流改善作用が認められるが明らかとなった。更に「寝たきり」病態の実験モデル動物である皮膚潰瘍褥創モデルおよび中大脳動脈閉塞脳卒中モデルへの移植実験で、生体でのヒト ES 細胞由来の血管構築に成功し、移植局所の血流量の増加による治療効果を見出した。

A. 研究目的

現在、「寝たきり」の原因の第一位は脳血管障害である。動脈硬化性病変によりもたらされる脳卒中、心筋梗塞は、急性期を除いてほとんど有効な治療法のないまま文字通り保存的に患者を見守るしかない状況である。その結果、「寝たきり」患者の QOL は著しく障害され、医療経済に与える負担も極めて大きい。虚血壊死に陥った脳細胞や心筋細胞を再生させることは不可能であり、障害された血管を再生させることが虚血脳、心筋のレスキューにおいては重要である。

21 世紀の新しい医療として「再生医療」が注目されている。無限の増殖性とほとんど全ての臓器に分化し得る能力を有する ES 細胞(胚性幹細胞、embryonic stem cells)は再生医療において魅力的なマテリアルである。強力な内皮細胞遊走・増殖刺激因子である VEGF (vascular endothelial growth factor) の受容体の一つである Flk1 (VEGF-R2) は、ジーン

ターゲティングにより内皮細胞と血球細胞の発生に必須であることが明らかになっている。我々は、マウス ES 細胞から抗 Flk1 抗体を用いた FACS による cell sorting 技術により、Flk1 陽性細胞から血管を構成する内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方を *in vitro* 培養系で分化誘導できることを明らかにした。すなわち、Flk1 陽性細胞は VEGF 及び PDGF を添加すると、それぞれ内皮細胞と血管平滑筋細胞に分化した。更に、この細胞をコラーゲンゲル内で 3 次元的に培養することにより、内皮細胞による管腔形成と壁細胞による内皮細胞の支持を伴った完全な血管構造を *in vitro* において再現することに成功した。すなわち ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞が“血管前駆細胞”(vascular progenitor cells; VPC)であることを報告した。

本研究は、我々が日本で最初で承認を得たヒト ES 細胞を使用した研究により、ヒト ES 細胞より VPC を同定単離し、同細胞を用いて新しい血管再生医療

を構築し、脳卒中、心筋梗塞の根治治療を実現し、「寝たきり」の解消を目指すことをその目的としている。

昨年度までの本研究課題により、マウス ES 細胞由来 VPC を体外である程度、血管構成細胞に分化させた後生体に移植することにより、生体において ES 細胞由来の血管が構築され、移植局所の血流が増加することを明らかにした。更に、ES 細胞由来 VPC の臨床応用を目指し、ヒト ES 細胞からの VPC の同定単離に成功した。一方、我々がこれまで一貫して研究を続けてきた心血管ホルモンであるナトリウム利尿ペプチドが cGMP / c GMP 依存プロテインキナーゼ (G キナーゼ) の活性化に引き続く IP3 キナーゼ / Akt 及び Erk1/2 の活性化により、損傷内皮再生促進及び虚血時血管再生を促進することを明らかにした。更に、ヒト ES 細胞由来 VPC 移植のための有効なセルプロセッシング法の確立を目指し、ナトリウム利尿ペプチド同様血管拡張ペプチドであるアドレノメジュリン (Adrenomedullin; AM) に注目し、発生工学的手法を用い AM 過剰発現トランスジェニックマウスを開発し、脳卒中モデル動物を確立して、AM の虚血脳保護再生治療効果を見いだした。更に、AM は ES 細胞由来 VPC から移植用の内皮細胞を高効率に分化誘導させる作用があることも明らかにした。

本年度は、本研究課題の最終年度として以下に示すように同定したヒト ES 細胞由来 VPC からの移植用の細胞製剤の調整法の開発と、その生体移植による「寝たきり」病態改善再生医療の開発を目指した基礎検討を実施した。

B.C. 研究方法及び結果

1. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞からの移植用血管細胞の分化誘導法およびその体外大量増幅技術の確立:

我々が同定したヒト ES 細胞由来血管前駆細胞から分化させた発生初期の内皮細胞を継代培養することで、生体に移植可能なヒト内皮細胞および血管平滑筋細胞の双方を大量に増幅することができることを明らかにした。

我々は、これまで、マウス ES 細胞から誘導され

た VEGF-R2 陽性細胞が、血管内皮細胞・血管平滑筋細胞いずれにも分化する能力を有する血管前駆細胞(VPC)として働くこと (Nature 2000)、マウス VPC は腫瘍血管新生モデルに移植すると生着し腫瘍の血流が増大すること (Blood 2003)、霊長類 ES 細胞にも VPC は存在するがその分化動態はマウスと異なること (Circulation 2003) などを明らかにしてきた。今回、ヒト ES 細胞の血管再生治療への臨床応用を目指し、ヒト ES 細胞における血管前駆細胞の存在およびその分化動態並び増幅を検討した。

今回の検討では、ヒト ES 細胞セルライン HES-3 及び KhES-1 を用いた。フローサイトメトリーでの解析において、未分化ヒト ES 細胞は、マウス ES 細胞とは異なり、全体に dull に VEGF-R2 を発現していた。これらの VEGF-R2 陽性細胞はすべて未分化ヒト ES 細胞マーカーの一つである TRA-1 は強陽性であった (図 1)。当初ヒト ES 細胞をマウス ES 細胞と同様コラーゲン IV コートディッシュ上にて分化誘導を試みたが、マウスと異なりヒト ES 細胞はコラーゲン IV コートディッシュ上に生着しなかった。そこで、線維芽細胞系ストローマ細胞株 OP9 細胞との共培養系にて分化誘導を行うと、8 日後に VEGF-R2 陽性でかつ TRA-1 陰性である細胞群が出現した (図 2)。この細胞群は VEGF-R1 および PDGF 受容体も発現していた。この細胞群をフローサイトメトリーにて分離し、VEGF 存在下にて再培養したところ、VE カドヘリン陽性 CD34 陽性 PECAM1 陽性 eNOS 陽性の血管内皮細胞が出現した (図 3)。また、同じ細胞群を PDGF-BB 存在下にて培養したところ α 平滑筋アクチン (α SMA) 陽性カルポニン陽性の壁細胞が出現した (図 3)。従って、8 日目に得られた VEGF-R2 陽性 TRA-1 陽性細胞がヒト ES 細胞由来 VPC であると考えられた。この VPC を更に培養を続け分化誘導された VE カドヘリン陽性血管内皮細胞をフローサイトメトリーにて分離し培養を続けると、in vitro にて約 100 倍に増幅可能であった。増幅された細胞は 30% が VEGF-R2 陽性であり、かつ VE カドヘリン陽性 CD34 陽性 PECAM-1 陽性であり増幅前の内皮細胞の性状を維持していた。一方、70% の細胞は、VEGF-R2 陰性となり α SMA 陽性カルポニン陽性の血管平滑筋細胞に分化していた。

図1.

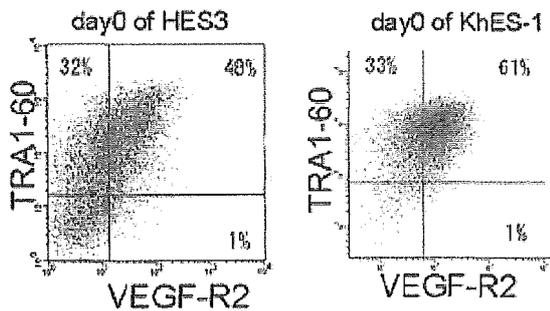


図2.

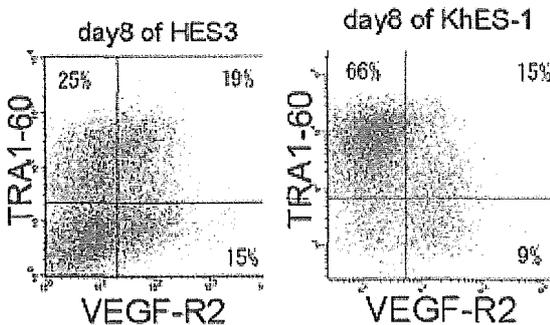
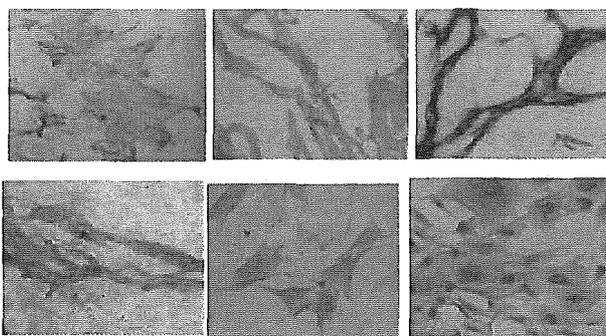


図3.



VE カドヘリン CD34 PECAM1
eNOS α平滑筋アクチン カルポニン

2. ヒト血管前駆細胞由来移植血管細胞の製剤化を目指した長期生体移植効率の基礎検討:

1. で得られたヒト ES 細胞由来血管前駆細胞から分化誘導させた血管細胞の各成分(内皮細胞、血管平滑筋細胞)をそれぞれ単独および混合し、閉塞性動脈硬化モデルに移植し、その治療効果を2ヶ月にわたり長期観察、比較することで、ヒト ES 細胞由来の混合血管細胞製剤の移植治療における有用性を見出した。

ヒトES細胞由来VPCを用いた虚血性疾患に対する血管再生療法の確立を目指し、マウス下肢虚血モデルにおいてヒトVPC由来各種血管細胞の移植を行った。

マウス下肢虚血モデルは、8週令、雄のKSNヌードマウスを用い、右大腿動脈からヒトVPC由来内皮細胞(EC)(VPC-EC)(5×10^5 /匹)、ヒトVPC由来壁細胞(MC)、(ペリサイトあるいは血管平滑筋細胞)(VPC-MC)(5×10^5 /匹)、およびこれらECとMCの混合細胞(VPC-EC+MC)を動注し、直後に右外腸骨～膝窩動静脈を結紮切除した。対照はヒト末梢血由来内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell (EPC))(1×10^6 /匹)およびPBSとした。血管再生の評価として、レーザードップラー血流計を用い、虚血側下腿部における血流回復を経時的に観察し、更には、術後42日目における虚血側下腿筋の凍結切片標本を用い、血管内皮のみを免疫染色し、血管数を定量化した。

図4はヒトVPCから、移植のために増殖して得られたECを解析した結果である。ヒトVPCから得られる血管内皮マーカ―VEcadherin陽性ECをVEGF存在下にて5代継代培養し、FACSにて各種血管内皮表面マーカ―発現を解析したところ、20～40%はVEGF-R2, VE-cadherin, CD31, CD34陽性のECであることを確認した。残りの60～80%はこれら血管内皮マーカ―が陰性であり、右下の免疫染色の結果から、壁細胞マーカ―であるαSMA陽性細胞であった。

図5は、ヒトVPCから、移植のために増殖して得られたMCを解析した結果である。ヒトVPCから得られたVEcadherin陰性細胞をPDGF-BB存在下にて5代継代培養し、各種血管平滑筋マーカ―の発現を解析した。免疫組織学的な解析では、VPC-MCにおいては、ポジティブコントロールであるヒト大動脈由来血管平滑筋細胞(hAoSMC)同様、αSMA以外にcalponinやSM1,2(smooth muscle myosin heavy chain 1,2)の発現を認めた。RT-PCRでの解析では、hAoSMCにおいて認められたh-caldesmonの発現は、VPC-MCにおいてはその発現を認めなかった。

図6、7は術後42日間にわたるレーザードップラー血流計による解析結果を示している。図6は、各群における代表的な皮膚表面血流の経過、図7は血流計から得られた値を定量評価した結果であるが、

術後 14 日目においては、EPC 群において、VPC 群同様 PBS 群と比較し、血流の回復を認めるが、術後 28 日目以降は EPC 群と PBS 群に血流差は認めず、VPC 群においてのみ有意な血流の回復を認めた。VPC 群の中では、VPC-EC+MC 群が VPC-MC 群と比較し、有意な血流回復が認められ、VPC-EC 群との比較では、有意差はないものの、血流増加傾向を認めた

図 8 は、虚血下肢に VPC-EC+MC と EPC を移植し、術後 7 日目において蛍光実体顕微鏡にて観察した結果を示している。移植された細胞は予め CM-DiI にて染色している。図左は、VPC-EC+MC、図右は EPC 移植群であるが、両者とも移植された細胞が下腿筋全体に広がっている様子がわかる。

図 9 は、術後 14 日目における VPC-EC+MC 移植マウスの虚血側下腿筋において、GSL I isolectin B4 およびヒト CD31 を免疫染色した結果を示している。GSL I isolectin B4 は屠殺直前に経門脈的に投与し、還流している血管内皮を予め標識しておいた。移植された CD31 陽性血管内皮細胞を青色、還流していた血管内皮を緑色で示しているが、両者陽性細胞を多数認めており、更に、強拡大を見ると、これら細胞が宿主の内皮細胞とともに血管を形成していることから、移植されたヒト VPC 由来 EC が血管内皮再生に寄与していると考えられた。

図 10 は、EPC 群における同様の結果である。同様に両者陽性を多数認めるが、強拡大を見ると、ほとんどが宿主の血管内に存在し、血管形成に寄与していない可能性が考えられた。

図 11 は、VPC-EC+MC 移植マウスの虚血側下腿筋において、 α SMA およびヒト平滑筋特異的マーカー SM1(smooth muscle myosin heavy chain type 1)を免疫染色した結果である。左は、術後 14 日目における標本であるが、移植された細胞(CM-DiI にて予め染色: 緑色)の中には、 α SMA 陽性(赤色)のものが存在している。右は術後 42 日目における標本を用い、 α SMA(赤色)およびヒト SM1(緑色)を染色した結果であるが、両者陽性細胞を多数認め、即ち、移植されたヒト VPC 由来 MC が血管壁再生に寄与していると考えられた。

図 12、13 は、術後 42 日目における虚血側下腿筋を、抗マウスおよび抗ヒト特異的 CD31 抗体を用いて、宿主および移植血管内皮細胞を染色した結果を示している。図 12 は各群における代表的な染色写真、図 13 は、これら写真から得られた capillary density を定量的に評価したものである。マウス CD31 陽性である宿主血管数は VPC-EC+MC 群においてのみ、有意な増加を認めた。ヒト CD31 陽性の移植された血管内皮細胞からなる血管数であるが、EPC 群と比較し、VPC-EC 群および VPC-EC+MC 群において有意な増加を認めた。マウスおよびヒトいずれかが陽性、即ち、すべての血管数であるが、他群と比較し、VPC-EC+MC 群において、最も有意な増加を認めた。PBS 群、EPC 群、VPC-MC 群の間に有意差は認めなかった。

即ち、下肢虚血モデルにおける VPC 由来各種血管構成細胞の移植において、①EPC と比較し、有意な血管再生の促進を認め、②移植された VPC-EC や VPC-MC は、それぞれ宿主の EC や MC と共に再生血管構築に寄与し、更には、③VPC-EC あるいは VPC-MC 単独細胞移植群と比較し、VPC-EC+MC 混合細胞移植群において、有意な血管再生の促進を認めた。従来の血管内皮前駆細胞のみの移植と比較し、VPC 由来 EC、更にはそれに加えて VPC 由来 MC を共に移植することで、血管再生の更なる促進を認めた。現在、この VPC 由来内皮細胞と壁細胞を組み合わせた“ハイブリッド療法”が新たな血管再生療法として確立することを目指し、研究を進めている。

図4.

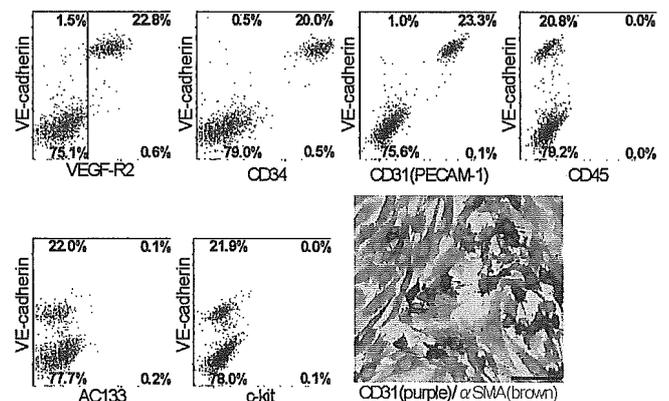


图5.

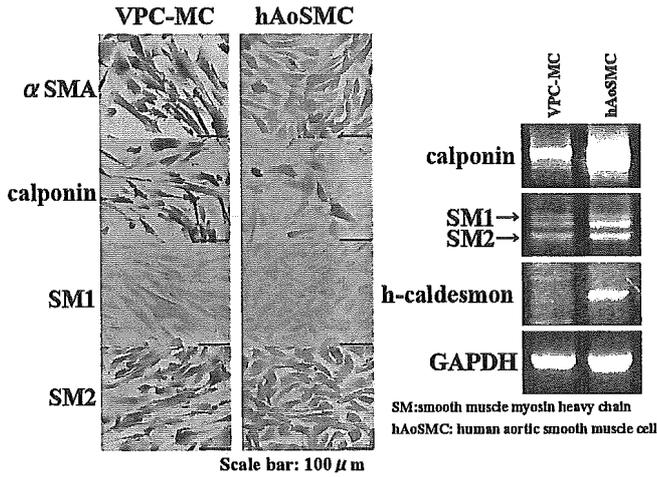


图6.

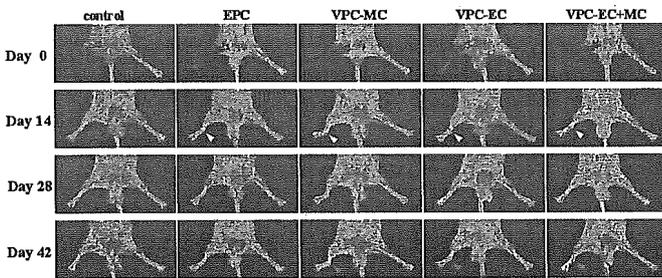


图7.

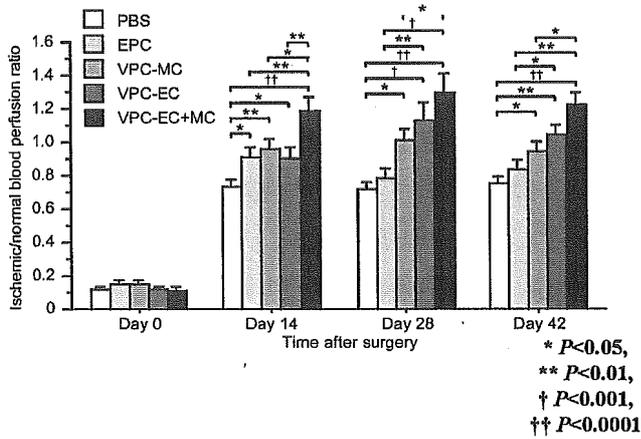


图8.

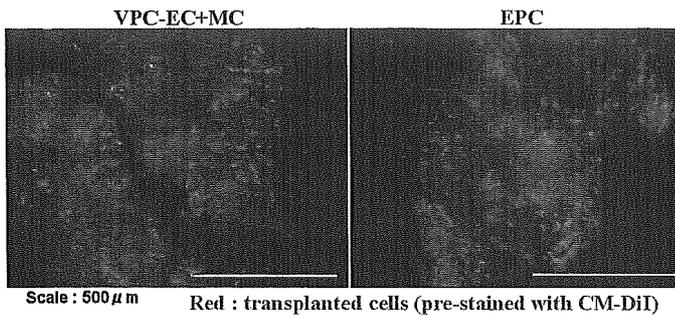


图9.

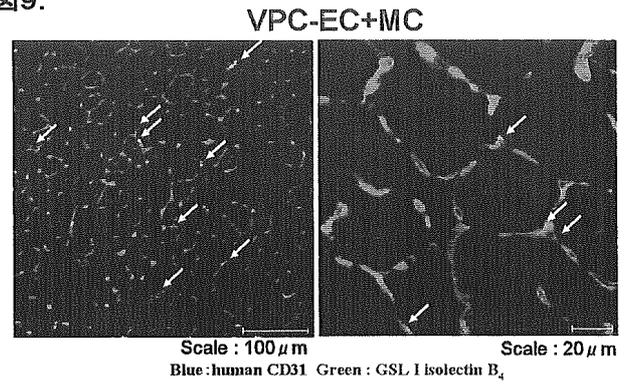


图10.

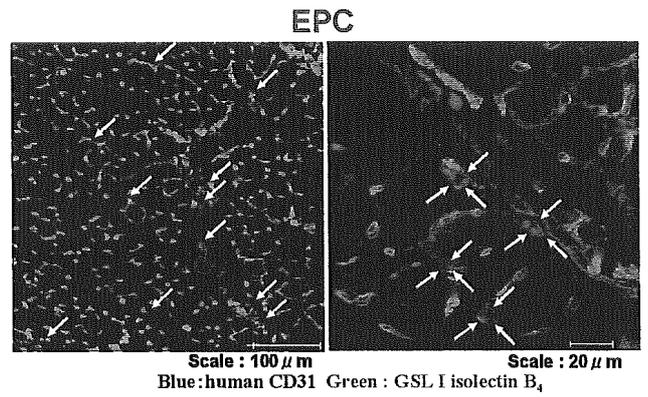


图11.

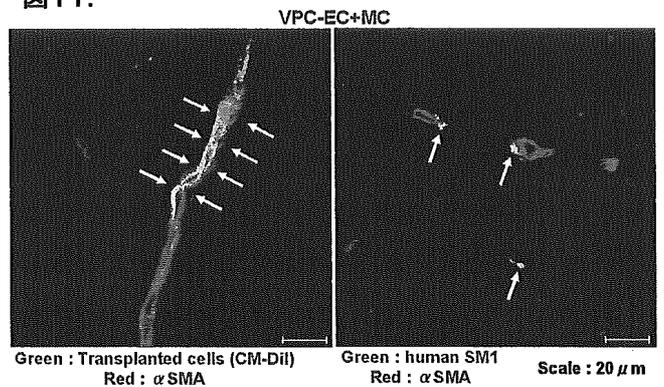


图12.

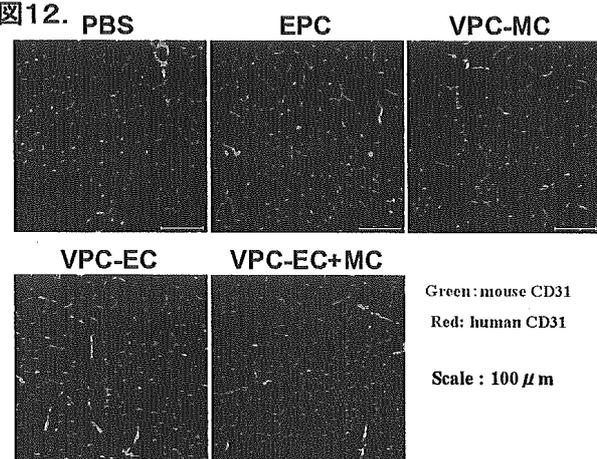


図13.

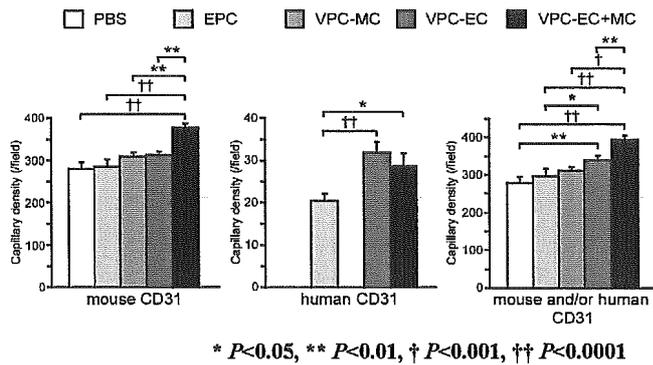
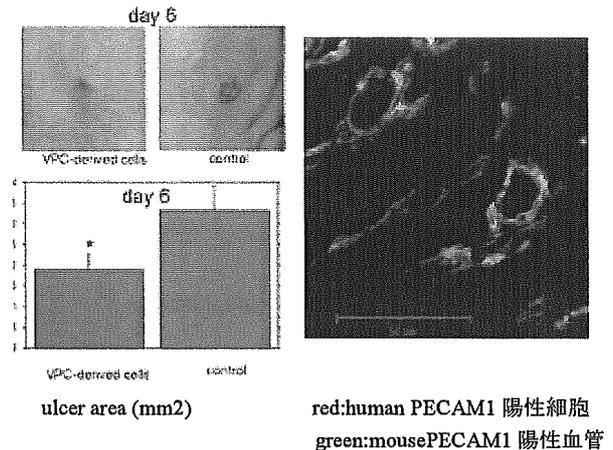


図14.



3. 「寝たきり」病態の実験モデル動物へのヒト ES 細胞由来血管前駆細胞移植の治療効果の検証:

ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を用いて、パンチバイオプシーによる皮膚潰瘍褥創モデルでの皮下移植および、中大脳動脈閉塞脳卒中モデルでの動脈内投与を行い、それぞれの病態において生体でのヒト ES 細胞由来の血管の構築に成功し、更に移植局所の血流量の増加による治療効果（潰瘍治癒の促進、梗塞サイズの縮小と神経脱落症状の改善）を見出した。

a. 皮膚潰瘍褥創モデルでの検討

ヌードマウス (KSN マウス 8-11 週齢) の背部皮膚に KAI Sterile Dermal Biopsy Punch (貝印) を用いて皮膚潰瘍を作製後、*in vitro* 継代増幅した発生初期血管内皮細胞 (VEcadherin⁺細胞 5×10^5 cells) を DiI 標識し、皮下に移植した。その結果、術後 3 日目では対照側 (PBS のみの皮下注射) と比較して潰瘍面積に差が見られなかったが、6 日目を経過する頃から細胞移植側のみで有意に潰瘍面積が縮小する傾向が観察された (図 14)。また、細胞移植後 7 日目の段階でレクチン (ISOLECTIN B4) で血管内皮細胞の標識した後に作製した皮膚組織切片の解析では、移植部位の皮下組織にレクチン陽性かつ DiI 陽性の細胞が認められ、移植したヒト ES 細胞由来発生初期血管内皮細胞の一部が宿主の循環器系とコネクションをもち、レシピエントの血管内に取り込まれていることが確認された (図 14)。

b. 中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルでの検討

ヒト ES 細胞を線維芽細胞系ストローマ細胞株 OP9 細胞と共培養することにより血管前駆細胞への分化誘導を行い、10 日目にフローサイトメトリーにて VEGF-R2 陽性かつ VE カドヘリン陽性細胞 (約 1~2%) を分離し、collagenI V(+)dish 上にて血清 VEGF(50ng/ml) 添加培養し増幅させた。分離培養後 30 日目のフローサイトメトリーによる解析においては、VEGF-R2 陽性・VE カドヘリン陽性細胞群が約 31%、VEGF-R2 陰性・VE カドヘリン陽性細胞群が約 46%、VEGF-R2 陰性・VE カドヘリン陰性細胞群は約 23%であった。VEGF-R2 陰性・VE カドヘリン陽性細胞群は、VEGF-R2 陽性・VE カドヘリン陽性細胞群に比べ、分化段階の進んだ内皮細胞と考えられ、又、VEGF-R2 陰性・VE カドヘリン陰性細胞群は、 α SMA 陽性であり、血管平滑筋細胞系統に分化した細胞分画と考えられ、増幅後の細胞は血管内皮細胞・血管平滑筋系統細胞を共に含む血管構成細胞群であることが示された。今回、この血管構成細胞群を移植ソースとして用いた。

8~9 週齢マウスを吸入麻酔下に頸部切開し、内頸・外頸・総頸動脈を露出させた後に、塞栓子を総頸動脈より挿入し、20 分間中大脳動脈を一時的に閉栓し、大脳基底核に脳梗塞を作成した。塞栓子を除去した後に、マイクロチューブを用いて、ヒト ES 細胞由来血管構成細胞 (3×10^5 個/50ul/body) を梗塞側総頸動脈より頸動脈的に移植し、総頸動脈の塞栓子挿入部より遠位部を結紮し、皮膚縫合にて終了した。

また、対照には生理食塩水移植投与群と、ヒト末梢をヒコール分離することによって得られた単核球細胞 (hMNC) を同数移植投与した群を用いた。レーザードップラーによる経時的脳血流測定においては、ヒト ES 細胞由来血管構成細胞移植群は、対象群に比べ梗塞後 14 日目より 28 日目にかけて有意に梗塞側の血流増加を認めた (28 日目における健常側との血流比は、生食投与群 : 0.916 ± 0.0101 、hMNC 移植群 : 0.923 ± 0.099 、ヒト ES 細胞由来血管構成細胞移植群 : 1.018 ± 0.0107 であった)。また、梗塞後 28 日目において、免疫組織染色 (20 倍視野) における梗塞内でのヒト PECAM-1 陽性細胞の生着を検討したところ、hMNC 投与群が 0~2 個/視野であるのに対し、血管構成細胞移植群は 10~40 個/視野と有意に多く生着を認めた。また、梗塞側と健常側の毛細血管密度比を測定したところ、梗塞後 28 日目にて、生食投与群で 1.81 ± 0.006 、hMNC 移植群で 1.90 ± 0.004 であるのに対し、ヒト ES 細胞由来血管構成細胞移植群では 2.52 ± 0.005 と有意に増加を認めた。また、ヒト ES 細胞由来血管構成細胞移植群における毛細血管密度の増加分におけるヒト PECAM-1 陽性細胞の割合は約 10% であった。

更に、Rota-rod による梗塞後の運動神経機能評価を経時的に検討した。梗塞後 28 日目において、ヒト ES 細胞由来血管構成細胞移植群は対照と比べ、約 10% の改善を認めた。脳梗塞モデルマウスへのヒト ES 細胞由来血管構成細胞移植により、梗塞側への移植細胞の生着と毛細血管密度の増加が認められ、血流増加に伴う神経機能改善効果に寄与する可能性が示唆された。梗塞側の脳血流増加の要因としては、内因性の毛細血管密度の増加に加え、移植細胞そのものが host の梗塞域内において、血管構成細胞成分となっている可能性も考えられた。

以上により、ヒト ES 細胞由来血管構成細胞は、虚血脳において、血管再生とそれに伴う神経機能改善のための有力な移植素材となりうる可能性が示唆された。

D. 考察

昨年度までの研究により、我々の同定したマウス ES 細胞由来 VPC を、体外においてある程度内皮細

胞及び血管平滑筋細胞に分化させ成人生体に移植することで、ホスト側の循環系と吻合を有した血管を構築し、有効な血流量の改善が認められることが明らかとなった。この成績は我々の ES 細胞由来血管前駆細胞移植による虚血臓器の機能改善治療が可能であることを示している。更に、分担研究者の仁藤らとともに、彼らが中心になり成功したサル ES 細胞由来 VPC の同定の知見をもとに、我々が日本で最初に承認されたヒト ES 細胞を用いた研究を行うことにより、ヒト ES 細胞由来 VPC の同定単離に成功した。また同細胞からの有効な内皮細胞、血管平滑筋細胞の分化誘導を行い、*in vitro* で ES 細胞由来ヒト血管を構築した。

本年度は、本研究課題の最終年度として、同定したヒト ES 細胞由来 VPC から分化誘導した血管細胞の生体移植を実施し、生体においてヒト ES 細胞由来の血管の構築に成功した。更に、生体移植可能な血管細胞すなわち内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方が、ヒト ES 細胞由来 VPC より分化させた“発生初期内皮細胞”より大量増幅して得ることができることも明らかとなった。従って、ヒト ES 細胞由来 VPC より分化誘導できる発生初期内皮細胞は、血管再生医療において好適の細胞製剤になる可能性が示された。更に、この発生初期内皮細胞より得られる内皮細胞および血管平滑筋細胞の単独移植及び混合移植を、現在臨床試験に入りつつある末梢血由来内皮前駆細胞 (EPC) 移植と比較したところ、EPC 細胞よりヒト ES 細胞由来の血管細胞移植の方が長期にわたりより効果的な血流回復が認められ、その有用性が示された。また内皮細胞、血管平滑筋細胞単独移植に比べ、混合移植の方が更に有効な血管再生が得られた。これまで血管再生医療を目指した幹/前駆細胞移植の試みは単一細胞の移植のみが行われており、我々の今回の混合移植の試みは全く独創的なものであり、この“ハイブリッド細胞移植療法”の有用性が期待されるとともに、他の領域での細胞移植治療の新しいプロタイプともなり得ると考えられる。

本年度は、本研究課題の最終テーマである「寝たきり」病態に対する再生医療の開発に迫るため、昨年確立した中大脳動脈閉塞脳梗塞モデル並びに皮膚潰瘍褥創モデルに、ヒト ES 細胞由来 VPC から得ら

れた血管細胞を移植し、その治療効果を検討した。いずれのモデルにおいてもヒト VPC より分化誘導した血管細胞は移植部に生着し血管再生に寄与し、血流回復治療効果が認められた。この成果は、ヒト ES 細胞由来 VPC を「寝たきり」病態に対する再生医療に応用し得る可能性を示唆している。

E. 結論

本年度の研究により、同定したヒト ES 細胞由来 VPC より移植可能な血管細胞への分化誘導およびその大量増幅法が見出された。更に、VPC により分化誘導調整した血管細胞を移植することにより、下肢虚血壊疽モデル、皮膚潰瘍褥創モデル、中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルにおいて、血管再生を介した治療効果が認められた。

以上より、ヒト ES 細胞を用いた「寝たきり」の再生医療による解消の方向性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Nishizawa, E. Nakamura, T. Kobayashi, T. Kamoto, A. Terai, T. Terachi, O. Ogawa, H. Itoh, K. Nakao.
Successful treatment of primary aldosteronism due to computed tomography-negative microadenoma.
Int. J. Urol. 10: 544-546, 2003.
2. T. Tanaka, Y. Fukunaga, H. Itoh, K. Doi, J. Yamashita, T-H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, T. Saito, N. Sawada, S. Sakaguchi, H. Arai, K. Nakao.
Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferators-activated receptor γ for monocyte recruitment and endothelial regeneration.
Eur. J. Pharmacol. 508: 255-265, 2005.
3. T. Saito, H. Itoh, J. Yamashita, K. Doi, T-H. Chun, T. Tanaka, M. Inoue, K. Masatsugu, Y. Fukunaga, N. Sawada, S. Sakaguchi, H. Arai, K. Tojo, N. Tajima, T. Hosoya, K. Nakao.

Angiotensin II suppresses growth-arrest specific homeobox (Gax) expression via redox-sensitive mitogen-activated protein kinase (MAPK).

Regul. Pept. 127: 159-167, 2005.

4. H. Iwakura, K. Hosoda, C. Son, J. Fujikura, T. Tomita, M. Noguchi, H. Ariyasu, K. Takaya, H. Masuzaki, Y. Ogawa, T. Hayashi, G. Inoue, T. Akamizu, H. Hosoda, M. Kojima, H. Itoh, S. Toyokuni, K. Kangawa, K. Nakao.
Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagons promoter-ghrelin transgenic mice.
J. Biol. Chem. 2005.

2. 学会発表

1. 宮下和季、荒井宏司、伊藤 裕、向山政志、菅波孝祥、曾根正勝、山原研一、万木-小林貴美、朴 貴典、中尾一和
アドレノメデュリン単独過剰発現トランスジェニックマウスの開発とアドレノメデュリンの血管再生作用の検討
第33回日本心脈管作動物質学会
2004.2.1 (東京)
2. Hiroshi Itoh
Application of Embryonic Stem (ES) Cells for Vascular Regeneration Medicine
The 68th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
2004.3.27-29 (Tokyo)
3. 山原研一、伊藤 裕、朴 貴典、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドの血管再生作用とそのメタボリックシンドローム血管合併症への臨床応用
第101回日本内科学会
2004.4.8-10 (東京)
4. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、野々口あかね、澤田直樹、山原研一、宮下和季、西川伸一、中尾一和
ヒト ES 細胞からの「血管前駆細胞」の同定と血管再生医療への応用

- 第 101 回日本内科学会
2004.4.8-10 (東京)
5. 山原研一、曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木 (小林) 貴美、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた血管再生療法の開発 —マウス下肢虚血モデルによる検討
第 2 回幹細胞シンポジウム ポスター発表
2004.4.26-27 (東京)
 6. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、小林貴美、野々口あかね、山原研一、宮下和季、朴 貴典、西川伸一、中尾一和
霊長類 ES 細胞由来血管前駆細胞の同定と血管再生治療への応用
第 2 回幹細胞シンポジウム
2004.4.26-27 (東京)
 7. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、澤田直樹、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和
糖尿病における血管再生障害に対するナトリウム利尿ペプチドの治療応用の検討
第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会
2004.5.13-15 (東京)
 8. 伊藤 裕
ヒト ES 細胞を用いた血管再生とメタボリックシンドローム合併症への医療応用の可能性第 77 回日本内分泌学会学術総会 メインシンポジウム
2004.6.24-26 (京都)
 9. 宮下和季、伊藤 裕、荒井宏司、向山政志、菅波孝祥、曾根正勝、山原研一、万木 (小林) 貴美、朴 貴典、中尾一和
アドレノメデュリン単独過剰発現トランスジェニックマウスの開発と脳梗塞モデルにおけるアドレノメデュリンの血管再生作用および神経再生作用の検討
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004.6.24-26 (京都)
 10. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、小林貴美、野々口あかね、山原研一、宮下和季、朴 貴典、西川伸一、中尾一和
ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の同定と血管再生治療への応用
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004.6.24-26 (京都)
 11. 万木貴美、山下 潤、伊藤 裕、西川伸一、中尾一和
アドレノメデュリンのマウス ES 細胞由来血管前駆細胞からの血管内皮分化誘導作用
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004.6.24-26 (京都)
 12. 山原研一、曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木 (小林) 貴美、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた血管再生療法の開発—マウス下肢虚血モデルによる検討
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004.6.24-26 (京都)
 13. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、澤田直樹、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和
糖尿病における血管再生障害とナトリウム利尿ペプチドの再生医療への応用
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004.6.24-26 (京都)
 14. 野口倫生、別所和久、三浦晶子、澤田直哉、富田 努、岩倉 浩、山原研一、曾根正勝、藤倉純二、益崎裕章、細田公則、伊藤 裕、中尾一和
ヒト乳歯歯髄由来幹細胞の単離と成熟脂肪細胞への分化誘導の試み
第 77 回日本内分泌学会学術総会 ポスター
2004.6.24-26 (京都)
 15. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、小林貴美、山原研一、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の同定
第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 シンポジウム「血管リモデリングの制御」
2004.7.23-24 (福岡)
 16. 山原研一、曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
マウス下肢虚血モデルにおける ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた血管再生療法の検討

- 第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 ポスター
2004.7.23-24 (福岡)
17. 万木-小林貴美、山下 潤、伊藤 裕、西川伸一、
中尾一和
マウス ES 細胞由来血管前駆細胞からの血管内
皮分化誘導におけるアドレノメデュリンの意義
第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 ポスター
2004.7.23-24 (福岡)
18. 伊藤 裕
ES 細胞による血管再生療法
第 52 回日本心臓病学会学術集会 パネルディス
カッション
2004.9.13-15 (京都)
19. 伊藤 裕
ヒト ES 細胞を用いた脂肪細胞分化の解析: 脂肪
細胞と血管細胞のクロストークに関する発生細
胞学的検討
第 25 回日本肥満学会 シンポジウム「脂肪細胞
の分化と機能調節」
2004.9.29-30 (大阪)
20. Hitoshi Itoh
Clinical potentials of embryonic stem cells for
vascular regeneration medicine.
第 8 回日本心不全学会学術集会 Plenary
Session ”Regeneration Therapy to Cardiovascular
Diseases”
2004.9.30-10.2 (岐阜)
21. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、曾根正勝、宮
下和季、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドの血管再生作用と糖尿
病血管合併症としての末梢動脈閉塞性疾患に対
する応用の検討
第 8 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2004.11.25-26 (宮崎)
22. 宮下和季、伊藤 裕、荒井宏司、向山政志、菅
波孝祥、曾根正勝、山原研一、小林 (万木) 貴
美、朴 貴典、中尾一和
アドレノメデュリンの虚血脳再生治療への展開
応用の可能性
第 8 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2004.11.25-26 (宮崎)
23. 伊藤 裕
シンポジウム「心脈管の再生・遺伝子治療」オ
ーガナイザー
第 34 回日本心脈管作動物質学会
2005.2.4 (京都市)
24. 伊藤 裕
血管再生療法
第 39 回糖尿病学の進歩 シンポジウム「心血管
疾患の進展阻止を目指して: 適切な治療法選択
のポイント」
2005.2.18-19 (仙台)
25. 宮下和季、伊藤 裕、荒井宏司、向山政志、菅
波孝祥、曾根正勝、山原研一、朴 貴典、中尾
一和
アドレノメデュリンの虚血脳における血管神経
再生作用の検討
第 4 回日本再生医療学会総会
2005.3.1-2 (大阪)
26. Masakatsu Sone, Hiroshi Itoh, Jun Yamashita,
Kenichi Yamahara, Takami Yurugi-Kobayashi,
Yutaka Suzuki, Naoki Sawada, Yasutomo Fukunaga,
Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi
Oyamada, Naoya Sawada, Yasushi Kondo, Shinji
Nito, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Shin-Ichi
Nishikawa, Kazuwa Nakao.
Identification of vascular progenitor cells from
human embryonic stem cells and their application to
vascular regeneration therapy.
The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese
Circulation Society / YIA
2005.3.19-21, 2005 (Yokohama)
27. Kenichi Yamahara, Masakatsu Sone, Hiroshi Itoh,
Jun Yamashita, Takami Yurugi-Kobayashi,
Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi
Oyamada, Naoya Sawada, Kazuwa Nakao.
Synergistic augmentation of neovascularization by
transplantation of human ES cells-derived
endothelial cells and mural cells-approach towards
hybrid stem cell therapy.
The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese
Circulation Society / YIA

2005.3.19-21, 2005 (Yokohama)

H. 知的財産権の出願・登録状況

「霊長類動物胚性幹細胞から血管系細胞への分化方法」米国特許出願（平成 16 年 2 月 27 日）

「内皮細胞分化増殖方法」特願 2004-25631 号

「霊長類動物胚性幹細胞から発生初期血管内皮細胞の製造方法及びその細胞の使用」特願2004-184138号

「細胞分化誘導法」特願 2005-066683 号

hES-VPC 含有ハイブリッド人工血管の開発とその血管再生効果の検証

拍動流負荷による ES 細胞の血管壁細胞への分化誘導と

血管壁層構造を有する ES 細胞含有ハイブリッド人工血管の一体構築の可能性

分担研究者：中山泰秀（国立循環器病センター研究所 室長）

研究要旨：

未分化胚性幹（ES）細胞の *in vitro* での血管壁構成細胞への分化誘導に関してこれまでは、生化学的手法を利用して、VEGF や PDGF などのサイトカインによって血管内皮細胞や周皮細胞が誘導され、さらに 3 次元培養によって毛細血管様の管状組織体が形成されることが報告されている。一方、最近、力学的手法を利用して、流れによるずり応力を培養 ES 細胞へ負荷することで、血管内皮細胞へ選択的に分化誘導できることが明らかにされた。本研究では、未分化 ES 細胞の拍動流負荷による血管壁構成細胞への分化誘導の可能性を探るとともに、チューブ状の多孔質基材を用いた階層性血管組織体の一体構築によるハイブリッド型人工血管の開発をめざした。未分化マウス ES 細胞由来の Flk1 陽性細胞を主構成成分とする細胞浮遊液を、外周面にスキン層を設けたポリウレタン製スポンジチューブ（内径 5 又は 1.8mm）に回転法によって内腔面より播種した。VEGF 存在下にて 2 日間静置前培養を行った後、VEGF 非存在下にて、体外拍動流培養回路を用いて、2 日間本培養を行った。所定期間後に、凍結組織切片を作成して細胞種を免疫組織的に調べ、内腔面の細胞形態を走査型電子顕微鏡で観察した。ポリウレタンスポンジチューブは細胞接着性に乏しかったが、フィブロネクチンをコーティングすることで ES 細胞の接着の改善がみられた。また、チューブの壁厚と孔径を調節することで、そのコンプライアンスをヒト動脈に近似できた。Flk1 陽性細胞を含む ES 細胞を拍動流回路（収縮期 0.3 秒、拡張期 0.5 秒、ずり応力 $0-17.5 \text{ dyn/cm}^2$ 、周辺応力 $2.7-3.9 \times 10^6 \text{ dyn/cm}^2$ ）にて培養を行うと、血管内皮細胞マーカー（CD31、CD144）陽性細胞と平滑筋細胞マーカー（ αSMA ）陽性細胞を認めた。拍動流負荷によって生じる、ずり応力によって内皮細胞が、周期的伸縮と圧拍動によって平滑筋細胞が分化誘導できたと考えられる。管状の人工基材を用いて複数の血管壁構成細胞が同時に分化誘導できることから、本システムによって 3 次元的な階層構造を有するハイブリッド型人工血管を構築できる可能性が示唆された。

研究協力者 黄 海瑛
周 えつみん
国立循環器病センター研究所
生体工学部

神田圭一
坂井 修
京都府立医科大学
心臓血管外科

A. 研究目的

本研究では、hES-VPC を用いて新しい血管壁のバイオニックデザインを行うことを目的とする。すなわち、人工血管の基材としてセグメント化ポリウレタン製のスポンジ状の管状構造物を用い、その内腔内に hES-VPC を播種する、あるいは hES-VPC を包埋したコラーゲンをコーティングして、ハイブリッド人工血管を作製する。これを移植し、血液成分との接触や血流と拍動の付加を伴う生体内において、宿主血管とのコンプライアンスを一致させたスキャホールド上での、hES-VPC の分化と血管壁の再構築を検討する。その成果をもとに、微細口径ハイブリッド血管あるいはハイブリッド毛細血管床の開発をめざす。

初年度は、hES-VPC を用いたハイブリッド人工血管の開発における基盤技術として血管接合具の開発について報告した。血管の接合は通常、縫合による吻合によって行われている。その中でも口径 3mm 以下の小口径血管の場合には顕微鏡下でのマイクロ手術が必要となり、外科医においても、かなりの熟練した縫合技術が要求される。そこで我々は、カフテクニックを応用した血管接合具を開発した。これを用いると、内径 2mm の小口径ハイブリッド人工血管と宿主血管との接合を容易にし、工学研究者レベルでも特別な訓練を必要とせず可能とした。また、宿主血管にほとんど傷害を与えないため、繰り返しの移植実験にも耐えることが可能であった。虚血時間の大幅な短縮化と成功率の向上、さらに端側吻合への応用性が獲得された。虚血時間の短縮化は末梢臓器への負担の大幅な軽減をもたらせた。

次年度は、1) hES-VPC 化ハイブリッド人工血管の基材となる管状構造物を開発し、2) 血管接合具の最適構造設計を行い、さらに、3) マウス EC 細胞を播種したハイブリッド人工血管をヌードラットに移植することによって、移植システムの完成度の検証を行い、最後に、4) マウス ES 細胞を播種したハイブリッド人工血管を作製し、ヌードラットへの予備的な移植実験を行った。基盤技術として人工血管基材ならびに血管接合具

の開発を行い、簡便で確実な実験的移植システムが構築できた。

今年度は、未分化 ES 細胞の拍動流負荷による血管壁構成細胞への分化誘導の可能性を探るとともに、チューブ状の多孔質基材を用いた階層性血管組織体の一体構築によるハイブリッド型人工血管の開発をめざした。

B. 研究方法

1. コンプライアント多孔質チューブの作製

人工血管の基材として、セグメント化ポリウレタン製のスポンジ状管状構造体を設計した。長さは約 20mm とし、内径は約 5mm、外径は約 6.5mm とした。作製は、水溶性セルロースとの層分離を利用して行った。また、良溶媒に N-メチル-2-ピロリドン、貧溶媒に加熱低級アルコールを使用し、両溶媒の比率を変化させることによって、孔径を 50~100 μ m とした。

チューブのコンプライアンスは、 $\beta=57.2$ であった。

チューブの内腔面はフィブロネクチンでコーティングした。

2. ES 由来細胞を含む多孔質チューブの作製

マウス胚性幹細胞から Flk1 陽性細胞を約 30% 含む細胞の混合浮遊液を多孔質チューブ内に播種した。細胞の分化率は、FACS にて測定した。一定時間毎に回転させ、播種を繰り返し、全周に細胞を接着させた。VEGF 存在下にて 2 日間前培養を行い、内腔面をほぼ完全に細胞で被覆させた。

3. 拍動流負荷回路

ES 細胞を内腔面に被覆させた多孔質チューブをサンプルホルダに縛って固定し、拍動流回路に設置した。拍動流回路は、コンピューター制御のローラーポンプ、コンプライアンスチャンバー（高さ 15cm、内径 4cm）、ステンレス製の 3 チャンネルサンプルホルダ、圧調整バルブとガラス製リザーバーから構成された。回路内は、VEGF を含まない分化用培地で満たした。回路は、インキュ

ウベーター内で 5% CO₂/95% air の環境下に設置した。

4. 細胞の形態と配向の観察

ES 細胞の同定は、LacZ 染色によって行った。内腔面の細胞形態と配向は、走査型電子顕微鏡観察によって行った。

5. 細胞種の同定

チューブ断面の凍結組織切片を作製し、免疫染色によって PECAM1 と SMA 陽性細胞を同定した。

C. 研究結果

1. ES 細胞ハイブリッド多孔質チューブの作製

スキヤホールド基材として用いたポリウレタン製のコンプライント多孔質チューブの内腔面と円周断面を走査型電子顕微鏡で観察した。図 1 に示すように、チューブの壁の厚さは $750 \pm 200 \mu\text{m}$ であった。壁には直径 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ のほぼ均質な孔が形成されており、最外面には約 $50 \mu\text{m}$ のスキン層を有していた。チューブの生理学的な圧力変化内におけるコンプライアンスを測定すると、約 55 と求まり、ヒト冠動脈の 40 に近い値を示した。

F1k1 陽性細胞を約 30% 含む ES 細胞塊を回転法によってチューブの内腔内に播種した。VEGF 存在下にて 2 日間前培養を行うと、チューブの内腔面はほぼ完全に ES 細胞によって被覆化された。しかし、壁内にはほとんど細胞を認めなかった (図 2)

2. 拍動流負荷による In vitro 分化誘導

作製した拍動流回路は、ローラーポンプ、エアークンプライアンスチャンバー、サンプルホルダー、圧調整バルブ、リザーバーから構成されている (図 3)。ローラーポンプの収縮期は、0.3 秒、拡張期は、0.5 秒に設定した。ポンプの

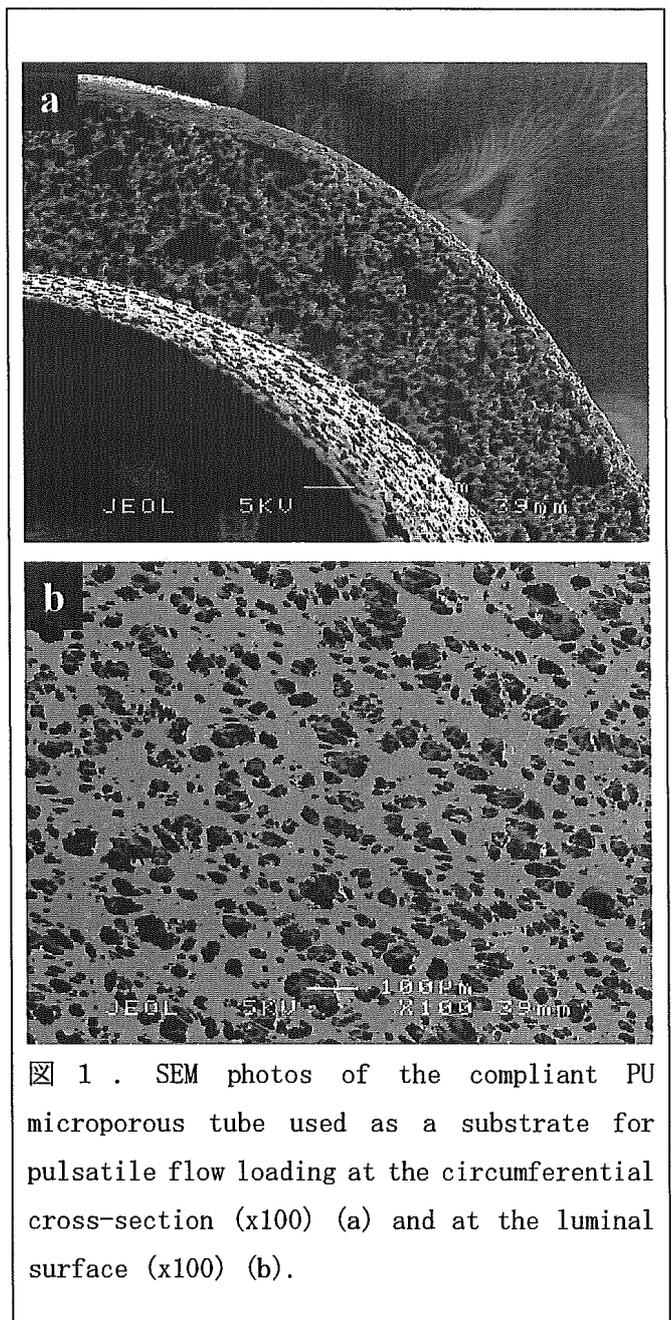


図 1 . SEM photos of the compliant PU microporous tube used as a substrate for pulsatile flow loading at the circumferential cross-section (x100) (a) and at the luminal surface (x100) (b).

回転数を変化させることで、壁応力と周辺応力をヒト静脈から動脈まで自在に調節することが可能であった。

本研究では、ポンプの回転数を 600rpm に設定して、静脈 (壁応力: $-0.98 \sim 2.2 \text{ dyn/cm}^2$ 、周辺応力: $4.6 \sim 9.6 \times 10^4 \text{ dyn/cm}^2$) に相当する弱い拍動流を負荷することとした。

1 時間拍動流回路にかけると、多孔質チューブの内腔面を皮膜化していた ES 由来細胞のほとんどは脱落した (図 4b)。しかしながら、引き続き拍動流回路にて 2 日間負荷をかけ続けると、内腔面の細胞は増殖し、内腔面は再び細胞層で



図 2 . Histological microphotos of the ES-derived cells (content of Flk1 positive cells: ca. 30%) -incorporated compliant PU microporous tube at the circumferential cross-section after LacZ staining. (upper) x 200. (lower) x 400. Almost entire luminal surface (upper side in the both photos) was fully covered with almost monolayered cells (stained in blue) and a little cell was observed into the media of the tube.

皮膜化された (図 4 e)。走査型電子顕微鏡にてチューブの内腔面を観察すると、細胞が内腔面をほぼ隙間無く覆い、互いに密に結合している様子が観察された (図 4 f)。

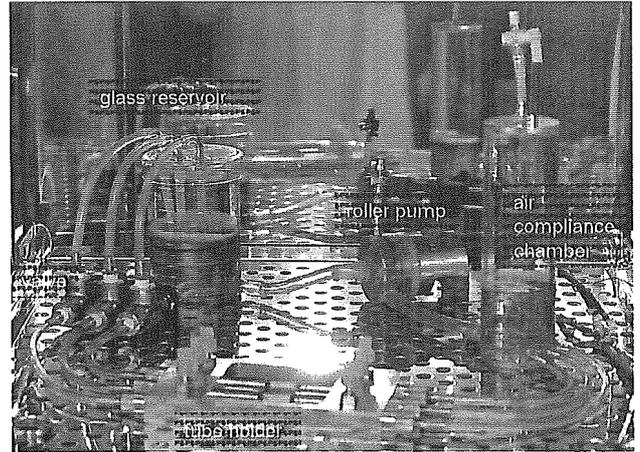


図 3. Gross appearance of the pulsatile flow culturing circuit, which was consisted of a roller pump, an air compliance chamber, a tube holder made of stainless steel, a valve of stainless steel and a glass reservoir. The circuit was filled with the differentiation medium (ca. 250 ml) without VEGF, and placed into an incubator with a humid atmosphere of 95% air and 5% CO₂.

また、細胞はほぼ全て、流れの方向に配向していた。一方、先に示した、1時間の拍動流負荷によって細胞がほとんど脱落したチューブを拍動をかけずに、静置で培養を続けても、2日後には細胞は増殖して内腔面のほぼ全面を覆った (図 4 c)。しかし、細胞は扁平で、配向はなく、無秩序であった (図 4 d)。

拍動流負荷をかけたものと静置して2日間培養を行ったチューブ内に存在する細胞の種類を2種類の免疫染色によって調べた。PECAM1は血管内皮細胞のマーカーとして、SMAは血管平滑筋細胞のマーカーとして使用した。拍動流負荷をかける前にはPECAM1陽性細胞は全く認められなかった。まず、VEGF非存在下で静置培養した場合、ほとんど全ての細胞はチューブの内腔面に存在し、壁の内部ではほとんど認めなかった。観察された細胞はほぼ全てSMA陽性であり (図 5 b)、PECAM1は陰性であった (図 5 a)。対照的に、拍動流下で培養すると、内腔面と壁と内部の両方において、

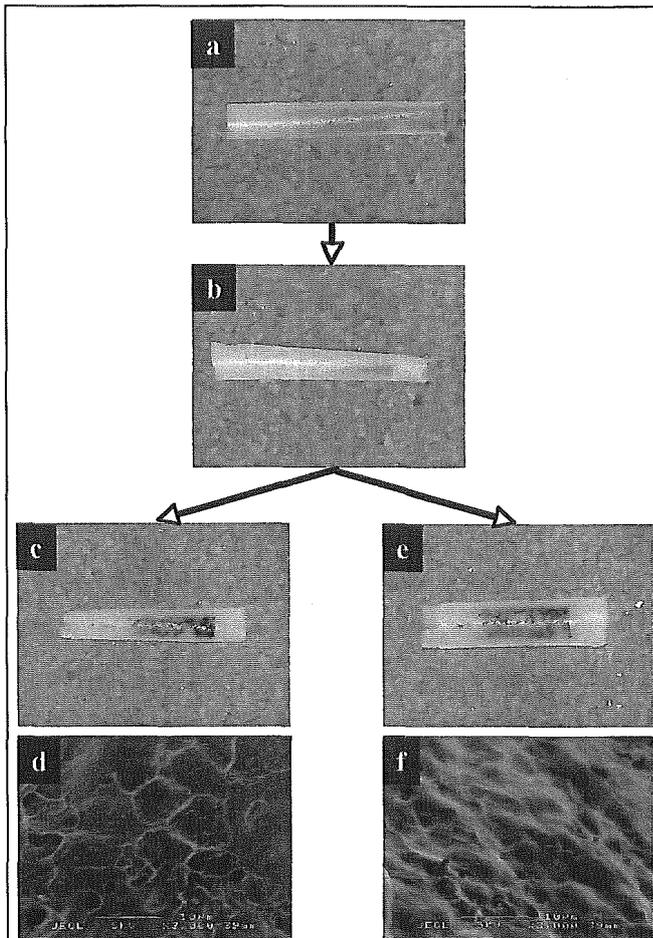


図4. Cellular responses of ES-derived cells incorporated into the compliant PU microporous tube by loading with or without the pulsatile flow. Gross appearances of the luminal surface of the microporous tubes after *LacZ* staining (a, b, c, e). SEM photos of the luminal surface of the microporous tubes (d, f). (a) The obtained cells-incorporated microporous tube prepared by seeding of ES-derived mixed cells including 30 % of Flk1-positive cells on the luminal surface of the microporous tube by the rotation method and pre-incubation in the presence of VEGF for 2 days. The cells were fully covered the surface. (b) After exposed to pre-loading of the pulsatile flow in the absence of VEGF for 1 h, almost all cells adhered on the microporous tube were detached. (c) Upon further incubation without VEGF under static condition, the remained cells were grown well and covered fully the luminal surface. (d)

The cells was flattened in shape and random-oriented. (e) Upon further incubation under the pulsatile flow without VEGF up to 2 days, fully covering with cells was observed on the luminal surface. (f) The cells were oriented in the direction of the pulsatile flow (arrow indicates the direction of pulsatile flow).

細胞の増殖が起こった。内腔面に存在する細胞は、ほとんどが PECAM1 陽性であり (図 5 c)、SMA 陰性であった (図 5 d)。VEGF や PDGF などの細胞成長因子が存在しなくとも、拍動流負荷をかけると、ES 由来の血管前駆細胞から、内皮様と平滑筋様細胞が同時に分化誘導できた。

D. 考察

本研究において、*in vitro* で物理的な刺激を負荷することで、ES 細胞を内皮細胞と平滑筋細胞に分化誘導できる可能性を初めて示した。

細胞移植すると、幹細胞が生体内での適切な組織や臓器環境に応じて、目的とする機能細胞に分化誘導されることが報告されている。例えば、ES 細胞由来の Flk1 陽性を腫瘍内に移植すると、内皮細胞と周皮細胞に分化して血管新生に寄与することが報告されている。

それ故、我々は未分化 ES 細胞を生体内の血管内に移植すれば、環境に応じて血管壁細胞に分化誘導できるのではと仮定している。本研究では *in vivo* での動物実験の基礎として、*in vivo* 環境下に存在する因子を *in vitro* で再現することによって、*in vitro* での分化誘導の可能性について調べた。生体血管では、血管壁細胞の恒常性を維持するための因子として、血液の化学成分などの生化学的な因子に加えて、内腔面では連続的な血液の流れによるずり応力と、壁内では拍動による壁の動きによる周辺応力といった生物学的な因子も存在する。従って、ずり応力は、ES 由来の Flk1 陽性細胞から内皮細胞への分化誘導を行い、

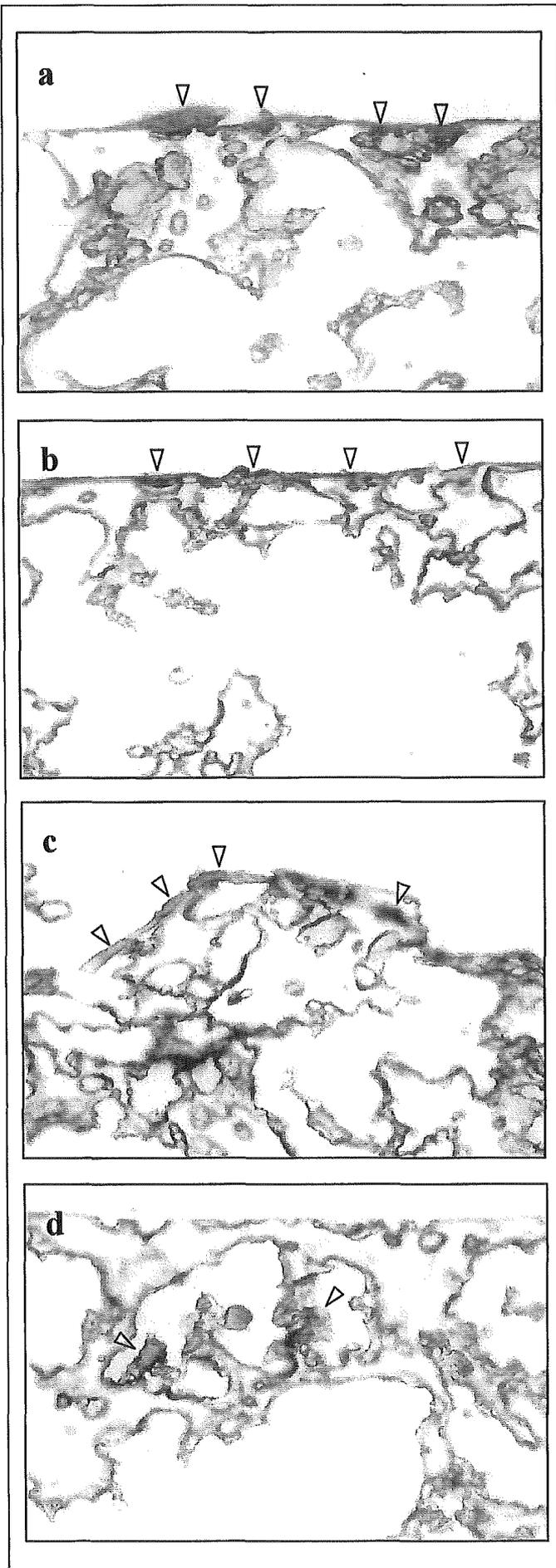


図5. Histological microphotographs (x 400) of the microporous tubes at the circumferential cross-section after staining with PECAM1 (a, c) and SMA (b, d). Upon further incubation without VEGF under static condition, almost all cells were PECAM1-negative (a) and SMA-positive (b) and layered on the luminal surface. Upon further incubation under the pulsatile flow without VEGF up to 2 days, almost monolayered PECAM1-positive cells on the luminal surface (c) and SMA-positive cells in the media (d) were observed.

また周辺応力は平滑筋細胞への分化誘導を行う可能性が期待された。

それ故、ずり応力と周辺応力を同時に負荷することによって、内皮細胞と平滑筋細胞が同時に分化誘導できると予想される。

この仮定を検証するために、先ず生理学的な拍動流環境を再現できる *in vitro* 培養回路を開発する必要があった。そのために、ローラーポンプと、エアコンプライアンスチャンバー、サンプルホルダー、リザーバーからなる拍動流回路を設計した。回路の拍動周期はヒトの心臓とほぼ同じように調節した。圧力はヒト静脈程度に弱く設定した。拍動流回路下で培養すると、2つ興味深い現象が観察された。一つは、スポンジ基材内への細胞の侵入と増殖である。もう一つは、以下に示す多分化誘導である。細胞が直接ずり応力を感じる内腔面においては、細胞は PECAM1 陽性を示す血管内皮細胞様を示した。また、主として拍動による周辺応力を受ける壁の内部の細胞は SMA 陽性を示す血管平滑筋様を示した。即ち、内皮細胞と平滑筋細胞からなる生体血管と同様な階層構造が拍動流を負荷することによって一体構築できる可能性が示唆された。ES 細胞を播種したハイブリッドチューブを生体血管に移植すれば、血流と血圧による拍動流によって、血管壁細胞に分化誘導できる可能性が多いに高まった。

本研究で用いたスキャホールド基材はスポンジ状であり、スポンジ基材の空間部にはほとんど細胞外マトリックス成分は存在しなかった。従って、細胞はスポンジ表面に接着しており、壁内での配向はスポンジ形状に規定されていた。現在、スポンジ空間をコラーゲンなどで埋める工夫を検討しており、それによって、壁内に侵入した細胞が圧拍動を感じて、円周方向に配向するなど、より生体血管に近い構造化が可能であると予想される。

また、ES細胞ハイブリッドチューブを生体内に移植する場合、血管内皮細胞にまで分化が進んでいないES細胞には抗血栓性はないため、小口径の場合、移植後早期に血栓閉塞を起こすと予想される。そこで、ES細胞に抗血栓性を付与するために、遺伝子操作によってトロンボモジュリンを強制発現する遺伝子をES細胞内に導入することを検討している。ES細胞が抗血栓性をもてば、血液と接触しても血栓を形成することなく、分化誘導させることが可能であると考えられる。

E. 結論

ポリウレタン製の管状スポンジにマウスES細胞由来のFlk1陽性細胞を含む混合細胞を播種して作製したハイブリッド組織管に拍動流負荷をかけると、流れによるシェアストレスによって内腔面には内皮細胞が分化誘導され、壁であるスポンジ内では圧拍動を感じてSMA陽性細胞が侵入することを認めた。ES細胞由来のハイブリッド人工血管のin vitro 一体構築の可能性を示した。本研究において蓄積された要素材料と要素技術をもとに、近い将来、ES細胞由来の小口径人工血管が現実のものとなることを確信する。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Keiichi Takamizawa, In vivo Tissue-engineered Small Caliber Arterial Graft Prosthesis Consisting of Autologous Tissue (Biotube). *Cell Trans* 13: 439-449, 2004.
2. Hiroshi Naito, Yoshiaki Takewa, Toshihide Mizuno, Shoji Ohya, Yasuhide Nakayama, Eisuke Tatsumi, Soichiro Kitamura, Hisateru Takano, Shigeki Taniguchi, Yoshiyuki Taenaka. Three-dimensional Cardiac Tissue Engineering Using a Thermoresponsive Artificial Extracellular Materix. *ASAIO J* 50: 344-348, 2004.
3. Shoji Ohya, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, In vivo evaluation of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as an in situ-formable scaffold, *J Artif Organs* 7: 181-186, 2004.
4. Shoji Ohya, Hiromichi Sonoda, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda. The Potential of Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted Hyaluroran and PNIPAM-grafted Gelatin in the Control of Post-surgical Tissue Adhesions, *Biomaterials* 26: 655-659, 2005.
5. Yasuhide Nakayama, Takeshi Masuda, Makoto Nagaishi, Michiko Hayashi, Moto Ohira, Mariko Shiba, high Performance Gene Delivery Polymeric Vector: Nano-structured Cationic Star Polymers.