

200400073B

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14年度～16年度 総合研究報告書

平成17(2005)年4月

主任研究者 伊 藤 裕

目 次

I. 総合研究報告	
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 伊藤 裕	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	59
III. 研究成果の刊行物・別冊	70

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

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、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。本研究課題は、我が国で最初に開始したヒト ES 細胞を用いた研究により、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。我々は、サル更にヒト ES 細胞の未分化維持培養系を確立し、未分化 ES 細胞からサル及びヒト VPC の分化誘導とその同定に成功した。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及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) をそれぞれ単独及び混合し、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ことが明らかとなった。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及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。一方、我々がこれまで一貫して研究を続けてきた血管トーンス及びリモデリング制御に関わる血管ホルモンについて、血管拡張ペプチドであるナトリウム利尿ペプチド及びアドレノメジュリン (adrenomedullin; AM) が血管再生作用を有することを明らかにした。そして AM が VPC から内皮細胞への分化を促進することを見出し、ES 細胞移植治療において有用であることを示した。更に、マウス ES 細胞由来 VPC を用いた *in vitro* 血管発生分化システムにおいて、マイクロアレイ法により血管発生分化に伴う遺伝子発現のプロファイリングを行い、そのデータベースを構築し、また機能的データ解析システムを開発した。同様の手法を用い、ヒト ES 細胞由来 VPC についてもデータ取得を行い、ヒト VPC から血管細胞に至る遺伝子発現の特性を明らかにした。今後この構築したデータベースをもとに、新規の血管再生薬剤の探索を行っていく予定である。また本研究課題においては、ティッシュエンジニアリングからの検討も実施し、独自の人工生体基材を開発し、ES 細胞由来 VPC を含有させることで血流刺激により内皮細胞と血管平滑筋細胞に分化し、しかも生体血管壁での階層構築を有するハイブリッド人工血管の製作にある程度成功した。以上本研究課題により、ヒト ES 細胞の同定、同細胞を用いた *in silico* 解析、セルプロセッシング技術、ティッシュエンジニアリングからのアプローチを駆使することにより、「寝たきり」病態の克服を目指す再生医療の基盤研究を遂行することができた。

分担研究者

中山泰秀 国立循環器病センター研究所
生体工学部・室長

仁藤新治 田辺製薬株式会社創薬研究所
先端医学研究所・所長

小川佳宏 東京医科歯科大学
難治疾患研究所・教授

(平成 14 年度のための分担研究者)

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、あるいは心筋梗塞は、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、ジーンターゲット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。最近我々は、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。しかしながら、この知見はマウスES細胞における成績であり、実際の臨床応用を考えた場合、是非とも霊長類でのVPCの存在の実証とその移植治療への応用の検討並びに、新たな複数の分化誘導因子の同定を要すると考えられる。海外においてヒト胚細胞よりES細胞が樹立されたが、霊長類由来ES細胞はマウスと比べその細胞増殖パターン、LIF要求性等いくつかの異なった性質を有することが見出されている。一方本邦においては、研究分担者の仁藤らが京都大学再生医科学研究所中辻憲夫教授らのチームと共同し、カニクイザルよりES細胞株の樹立に成功した。そこで本研究課題においては、主任研究者伊藤らの有するES細胞由来VPCに関する知見の集積並びにFACSセルソーターを用いたVPCの純化のノウハウと、研究分担者の仁藤らが樹立保有するサルES細胞とその維持培養系を融合させ、ES細胞の血管再生医療への実用化に向け、伊藤

らが日本で最初に承認を得たヒトES細胞を使用した研究により、サル更にヒトES細胞由来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。すなわち、ヒトES細胞由来VPCの性状、分化動態を正確に解析するとともにその知見をもとにVPCより移植可能な血管細胞を選択し、その大量体外増幅を目指す。更に、複数の「寝たきり」病態動物モデルを開発し、これら疾患モデル動物に調整したヒトES細胞由来血管細胞を移植することにより、治療効果を認める有効な方法を確立することを目指した。

血管の再生は、“SOIL（土壌）”因子と“SEED（種子）”因子の双方が重要である。血管再生のSEEDとなるES細胞由来VPCの研究に加え、我々はこれまでSOIL側の因子として血管局所で産生される血管ホルモンに着目し、その血管リモデリングにおける意義に関して一貫して研究を続けてきた。血管収縮のペプチドであるアンジオテンシンIIが、血管壁で産生されるPDGFやTGF- β 、bFGFを介して血管平滑筋細胞の増殖、肥大に対して促進的に作用し、一方ナトリウム利尿ペプチドなど血管弛緩因子が抑制的に作用することを報告した。更に、ナトリウム利尿ペプチドの一つであるCNPがNOと並ぶ内皮由来血管拡張因子（EDRF）として作用することを明らかにした。また、血流刺激を内皮細胞が感知し、内皮由来血管作動性物質が協調的な遺伝子発現制御を受け（ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメジュリン、NO、プロスタサイクリン等血管拡張因子の分泌増加とアンジオテンシンIIやエンドセリン等血管収縮因子の産生低下）、血管弛緩、血管増殖抑制の方向に働くことを報告した。動脈硬化病変の内皮細胞では、CNPの発現が低下しており、このことが動脈硬化症の発症進展に関与する可能性を示した。更に、アデノウィルスを用いたCNPの遺伝子導入により、CNPが血管平滑筋細胞の遊走や増殖を抑制するのみならず、その分化を誘導することを示し、CNPが血管保護的に作用することを明らかにした。そこで本研究では、発生工学的手法を用いてこれら血管ホルモンの血管再生作用及びそのES細胞由来VPCの

有効なセルプロセッシングへの応用を検討した。

一方、新たな血管再生の SOIL 探索、すなわちヒト ES 細胞由来移植用血管細胞の体外セルプロセッシング用薬剤、あるいは移植治療時の補助薬剤としての新規血管再生誘導遺伝子の網羅的探索を、研究分担者の田辺製薬創薬研究所の仁藤らが中心に行った。すなわち、マウス更にヒト ES 細胞由来 VPC を用いた *in vitro* 血管発生分化系において、DNA マイクロアレイ法を用い、血管発生分化に関連する遺伝子群の発現プロファイリングを行い、そのクラスタリング解析によるデータベースの構築を行った。更に、ヒト血管細胞分化誘導因子群の絞り込みを実施した。

血管再生の SOIL としては、VPC 生育の足場の問題も重要である。そこで本研究では、研究分担者の国立循環器病センター生体工学部の中山らを中心に、独自の人工多孔質基材を開発し、ES 細胞由来 VPC を含有したハイブリッド型人工血管とその生体移植を試みた。本研究においては、内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方に分化し得る VPC に生体における血流刺激を加えることで、実際の血管の階層構造を有した微細口径の人工血管の開発を目指した。

三年間の本研究課題で得られた研究成果は、以下の項目として総括される。

1. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の同定(伊藤、仁藤)
 - a. サル ES 細胞からの血管前駆細胞の同定と霊長類とマウス ES 細胞での分化動態比較
 - b. ヒト ES 細胞未分化維持培養法及び凍結保存法の開発
 - c. 未分化ヒト ES 細胞の細胞特性の解析
 - d. ヒト ES 細胞からの血管前駆細胞の分化誘導と細胞表面マーカーの解析
2. 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及びその体外大量増幅技術の確立(伊藤)
 - a. マウス ES 細胞由来血管前駆細胞の生体移植における移植細胞の至適分化段階の決定
 - b. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞から移植可能な血管細胞の分化誘導とその大量増幅
3. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞セルプロセッシングへの血管ホルモンの応用の検討(伊藤、小川)

- a. 生体遺伝子導入法によるナトリウム利尿ペプチドの障害内皮再生作用の発見とその分子機構の解析
 - b. 発生工学的手法によるナトリウム利尿ペプチドの虚血時血管再生作用の発見と遺伝子治療への応用
 - c. アドレノメジュリンの障害内皮再生作用及び血管再生作用の発見とその分子機構の解析
 - d. 発生工学的手法によるアドレノメジュリンの虚血脳における血管神経保護再生作用の発見
 - e. アドレノメジュリンによる ES 細胞由来血管前駆細胞からの内皮細胞分化誘導作用の発見
4. 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(伊藤)
 - a. 閉塞性動脈硬化モデルを用いた血管細胞成分移植の治療効果の比較
 5. 「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(伊藤)
 - a. 褥創モデルを用いたヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の皮下移植治療効果の検討
 - b. 脳卒中モデルを用いたヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の動脈内投与治療効果の検討
 6. 血管ホルモンのヒト ES 細胞由来血管前駆細胞移植治療の補助製剤としての応用の基礎検討(伊藤)
 - a. マウス ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた有効なティッシュエンジニアリングの検討
 - b. アドレノメジュリンを用いたヒト ES 細胞由来血管前駆細胞移植治療効果の増強作用の検討
 7. 新規血管再生薬剤創薬を目指したヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を用いたヒト血管発生分化関連遺伝子のデータベース構築(伊藤、仁藤)
 - a. マウス ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた DNA マイクロアレイ法による血管細胞発生分化関連遺伝子の網羅的探索と遺伝子解析システムの開発
 - b. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を用いたヒト血管発生分化関連遺伝子発現のジーンプロファイリングとデータベース構築
 8. ヒト ES 細胞生体移植の安全性の検討:腫瘍形成毒性試験(伊藤、仁藤)
 9. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞含有ハイブリッド人

工血管の開発(中山)

- a. 微細口径ハイブリッド人工血管用血管接合具の開発
- b. ハイブリッド人工血管基材となる管状構造物の開発と生体への移植
- c. マウス ES 細胞由来血管前駆細胞の人工血管への播種と拍動流負荷による血管細胞への分化誘導—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構築の試み

B.C. 研究方法及び結果

1. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の同定(伊藤、仁藤)

a. サルES細胞からの血管前駆細胞の同定と霊長類とマウスES細胞での分化動態比較

マウスES細胞では、未分化なES細胞はFlk1を発現していないが、コラーゲンIVコートディッシュ上で4日間分化誘導を行うと30~40%がFlk1陽性となる。一方、サルES細胞はマウスES細胞と異なり、未分化な状態で既に大部分の細胞がFlk1を発現していた。しかし、これらの未分化ES細胞に含まれるFlk1陽性細胞は、フィーダー細胞上で血清及びVEGF存在下で5日間培養を続けても、内皮細胞あるいは血管平滑筋細胞は分化せず、血管前駆細胞としての働きを持たなかった。サルES細胞をコラーゲンIVコートディッシュ上で分化誘導を試みたが、マウスES細胞と同等の細胞密度・条件ではコラーゲンIV上に生着しなかった。次に、マウス頭蓋冠由来のフィーダー細胞との共培養にて分化誘導を試みたところ、一度Flk1陽性分画がほぼ消失したのち、8日後に再び約8%がFlk1陽性でかつ内皮マーカーVEカドヘリン陰性となった。これらの細胞は未分化ES細胞が持つアルカリフォスファターゼ活性を持たず、Flk1陽性の未分化ES細胞とは異なるものであった。このFlk1陽性VEカドヘリン陰性細胞をFACSにて分離し、再培養したところ、VEカドヘリン陽性PECAM1陽性eNOS陽性の内皮細胞及び α 平滑筋アクチン(α SMA)陽性カルボニン陽性の壁細胞が出現し、それらはコラーゲンゲルによる3次元培養にて血管様構造を構築した。これらの結果により、分化誘導後出現したFlk1陽性VEカドヘリン陰性細胞が霊長類における血管前駆細胞として働くことが示され、血管前駆細胞は霊長

類においても血管再生医療の有力な材料となりうることが示唆された。

b. ヒト ES 細胞未分化維持培養法及び凍結保存法の開発

標準プロトコールにおいてヒト ES 細胞の継代維持培養法は、Cutting pipette と称するガラスキャピラリーのエッジ部分で個々のコロニーを実体顕微鏡下で数個の塊に細分し、その塊を新しい MEF 上に手作業で植え継ぐ手法 (Cut 継代) が採用されている。この Cut 継代は確かにヒト ES 細胞の未分化性を維持できる安定な継代法であるが、その操作には熟練したスキルが要求されるうえ、コロニーのひとつひとつをハンドリングするため細胞の大量調製法としては時間的・労力的に限界がある。本研究課題においては、一度に大量の未分化 ES 細胞が必要とされるため、サル ES 細胞で用いられているようなコラゲナーゼ等を用いる酵素法が適用できることが望まれる。

そこで、細胞の量産が可能な継代法として、酵素法によるヒト ES 細胞の継代法の確立を目指した検討を行った。マウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) 上で、ヒト ES 細胞のコロニーが十分生育した段階でコラゲナーゼで一定時間処理した。その後、タッピングにてヒト ES 細胞コロニーを MEF より遊離させ、軽くピペッティングの後小片にし、一定の比率で新しい MEF 上に散布した。

本酵素法で数回継代培養したヒト ES 細胞のコロニーのアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定し、その未分化性を確認した。ほとんどのコロニーの全体で強い ALP 活性が検出され、酵素法によっても未分化状態を維持したままでの継代・維持が十分行い得ることが確認できた。また、サル ES 細胞と同様に、ALP 活性は分化状態の判断指標としてある程度、利用できる指標であることが確認できた (図 1)。また、未分化ヒト ES 細胞の一つの指標である表面抗原マーカー SSEA-4 の発現を免疫細胞組織化学的に解析した。その結果、SSEA-4 の発現は、酵素法によって継代・維持されたコロニー (細胞) についても発現しており、未分化性を維持できていることが示唆された (図 2)。

更に、胚様体形成能についても検討したが、約 1 週間～2 週間の浮遊培養で Cystic Embryoid Body と 思われる形態への変化が確認できた。

研究開始当初、培養増幅したヒト ES 細胞を安定に凍結保存する際、通常細胞保存に頻用されている市販の凍結保存液（セルバンカー等）は生存率の著しい低下をきたすので使用できない状況にあった。また、通常サル ES 細胞に用いられる簡便な凍結保存条件も、ヒト ES 細胞へは適用困難であることが確認されていた。研究を効率的に進めるうえにおいて、細胞ストックの大量確保が不可欠である。そこで、簡便な操作で、一度に、且つ大量の未分化ヒト ES 細胞を凍結保存できる条件を確立すべく検討を行った。

通常の培養細胞で頻用される方法に準じた形で行えることを基本とし、まず凍結保存液の組成の改良のみで生存率を高める条件を見出す方針で検討を行った。酵素法で継代を続けたヒト ES 細胞をコラゲナーゼ処理で分散させ、遠心分離操作（1000rpm×5分）で細胞を 5 等分し、組成が異なる 5 種類の凍結保存液のそれぞれに懸濁し、クリオチューブに入れた。プログラムフリーズ容器（ナルゲン社ミスターフロスティ）に入れて一晩で -80℃まで冷却した。その後、液体窒素タンクに保存した。液体窒素保存 2 日以上経過後、クリオチューブを液体窒素タンクから取り出し、37℃温浴で急速解凍したものを HES 培地とともに MEF プレートに播種し、約 1 週間かけてコロニーの生育程度やアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定観察し、比較した。

今回検討した中では、いずれの条件でもヒト ES 細胞の生存は確認できたが、特に条件 3 と条件 5 が良好な生存率を示した。また、未分化状態を解析すべく行った ALP 活性測定の結果においても、条件 3 と条件 5 で強 ALP 活性を示すコロニーが多数確認でき、これら保存条件が使用可能なレベルにあることが示された (図 3)。

図 1 : アルカリフォスファターゼ活性



図 2 : SSEA-4 の発現

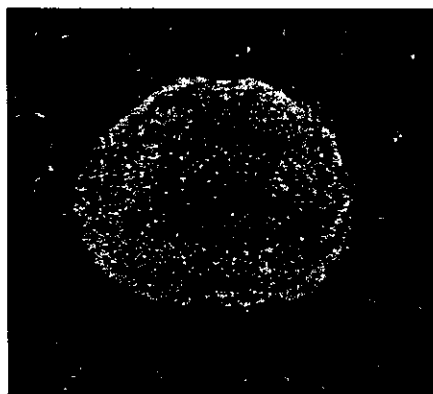
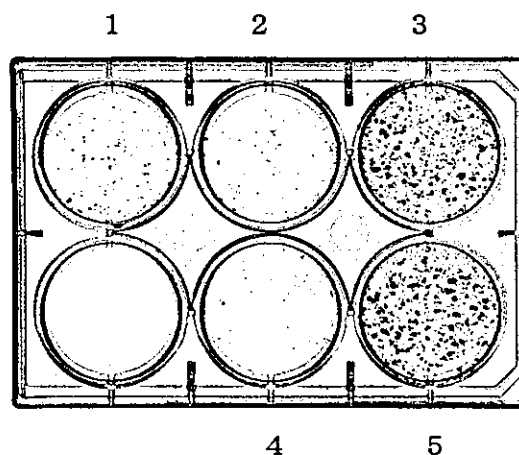


図 3 : 凍結保存条件検討結果 (ALP 活性)



c. 未分化ヒト ES 細胞の細胞特性の解析

我々は、サル ES 細胞では、マウス ES 細胞とは異なる点として、その未分化状態において既に VEGF-R2 を発現しており、マウス頭蓋冠由来ストローマ細胞株 (OP9 細胞) と共培養することで分化誘導を行うと、一旦消失後、再び発現してくるという発現様式をとることを明らかにした。

ヒト ES 細胞 (HES3 株: オーストラリア産 (ES Cell International ; ESI 社) のヒト ES 細胞を輸入使用) に関して、こうした基本的性状に関する情報を取得す

る目的で、先ず未分化維持状態下での各種中胚葉(造血・血管)系幹細胞マーカーの発現をフローサイトメトリー解析した。

その結果、ヒト ES 細胞でも既に未分化状態で VEGF-R2 を発現しており、更にこの他にも AC133 陽性、c-Kit 弱陽性、CD34 陰性であるとの性状が明らかとなった。

上記各種マーカーの未分化維持段階での発現の意味については不明であるが、血管系前駆細胞では、少なくとも未分化 ES 細胞の指標とされる SSEA-4 (Stage-specific embryonic antigen-4) 発現や TRA1 (Tumor Rejection Antigen 1;TRA1-60) の発現、及び高いアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性は通常検出されないはずである。これら未分化維持条件下で存在する VEGF-R2 発現細胞や AC133 発現細胞では、その細胞表面で SSEA-4 や TRA1 が発現しており、また、高 ALP 活性を示したことから判断して、“未分化 ES 細胞”と呼ぶことのできる(あるいは、それに匹敵する)状態にあると考えられた。

d. ヒト ES 細胞からの血管前駆細胞の分化誘導と細胞表面マーカーの解析

ヒト ES 細胞をマウス頭蓋冠から分離したストローマ細胞株 (OP9 細胞) と共培養することで分化誘導を試み、未分化状態および分化誘導下での TRA1 マーカーと Flk1 マーカーの発現の経時変化をフローサイトメトリー解析した。その結果、OP9 細胞との共培養の時間経過に伴って Flk1⁺/TRA1⁺細胞 (未分化 ES 細胞と考えられる) が次第に減少する一方で、4 日目あたりから Flk1⁺/TRA1⁻細胞 (分化細胞と考えられる) が出現し始め、共培養 (分化誘導) 後 8 日目には全細胞の 15%程度にまで増加することがわかった。

この分化誘導 8 日目の Flk1⁺/TRA1⁻細胞集団にはヒト ES 細胞由来 VPC が含まれるものと考えられるが、この細胞分画における VEcadherin の発現を解析すると若干 (約 2%程度) の陽性細胞の混在 (内皮細胞段階まで分化が進んでいる細胞) が認められた。そこでこの分化誘導後 8 日目の細胞集団から Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞分画のみを改めて分取し、この細胞分画の内皮細胞と壁細胞への双方向分化能

(VPC 能) を検討した。その結果、IV 型コラーゲン基質上で 10% 血清と VEGF (50ng/ml) 存在下に更に 8 日間再培養により、CD34⁺細胞、PECAM1⁺細胞、VEcadherin⁺細胞、および eNOS⁺細胞が出現し、内皮細胞への分化が示唆された (図 4 A-D)。また、ここで生じた分化細胞集団の中に観察される PECAM1⁻細胞は α SMA を発現しており、細胞形態からも判断して血管平滑筋に分化したものと考えられた。(図 4 E)。

一方、同 Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞は、IV 型コラーゲン基質上で 10%血清存在・VEGF 非存在下で再培養する条件下では、逆に内皮細胞にはあまり分化せず、その殆どが壁細胞と考えられる α SMA⁺/calponin⁺細胞に分化した (図 4 F, G)。

成体組織に存在する VPC は、VEGF 受容体と PDGF 受容体の双方を同時に発現しており、VEGF や PDGF の刺激によってそれぞれ血管内皮細胞と壁細胞への分化の方向付けがなされるといわれている。ヒト ES 細胞由来 VPC のマーカーを詳細に定義する目的で、上記 Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞について PDGF 受容体の発現の有無も検討した。その結果、殆どの Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞は PDGFR β を発現しており、一方 VEcadherin⁺細胞 (既に内皮細胞にコミットしている) となった段階では PDGFR β 発現を消失していることがわかった。

この Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻/PDGFR β ⁺細胞を純化して行った分化誘導実験では、この細胞細胞画分を IV 型コラーゲン上に播種し、再培養を行い、PDGF-BB 刺激 (10ng/ml) あるいは VEGF 刺激 (50ng/ml) を加えることによって、それぞれ PECAM1⁺細胞 (内皮細胞) と α SMA⁺細胞 (壁細胞) を高効率に選択誘導、増殖促進することを確認した (図 4 H, I)。

以上の結果から、Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻/PDGFR β ⁺細胞はヒト ES 細胞由来 VPC といえる細胞群であると判断された。

図4 ヒトES細胞由来VPCの血管系細胞への分化(免疫組織化学的解析結果)

A-D: Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞の血管内皮細胞への分化

CD34 (A), VEcadherin (B), PECAM1 (C), eNOS (D)

E: Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞の再培養後のPECAM1と α SMAの発現

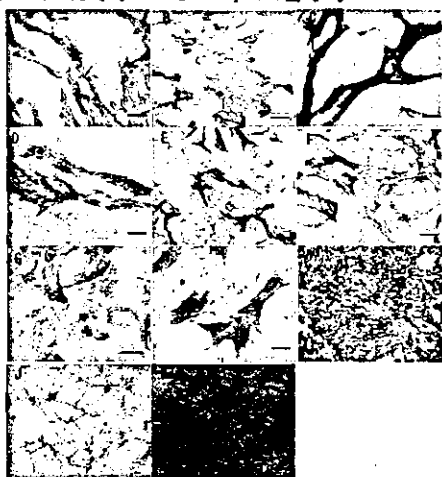
F,G: Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞の壁細胞への分化 α SMA (F), calponin (G).

H: PDGF-BB 刺激によるヒトES細胞由来VPCの壁細胞への分化(α SMA発現)

I: VEGF 刺激によるヒトES細胞由来VPCの内皮細胞分化(PECAM1と α SMA)

J,K: ヒトES細胞由来VPCの*in vitro*3次元培養における血管構築の再構成

※ スケールは、すべて50 μ mを示す



2. 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及びその体外大量増幅技術の確立 (伊藤)

a. マウスES細胞由来血管前駆細胞の生体移植における移植細胞の至適分化段階の決定

マウスES細胞由来VPCの血管再生医療への応用を目指し、VPCの成体における血管新生への寄与、更には移植による血流改善効果をもたらす至適細胞分化段階について検討した。

我々は、恒常的にLacZ遺伝子を発現するマウスES細胞を確立し、4つの分化段階のVPCを調整した。すなわち、未分化ES細胞を10%FCS存在下に4型コラーゲン上で4日間培養して誘導されるFlk1陽性細胞を“未分化VPC”と名付け、“未分化VPC”を更に10%FCS及び50ng/ml VEGF存在下で3日間培養した細胞を“分化VPC”と名付けた。また、“分化VPC”の内皮細胞分画であるVEcadherin陽性細胞をソーティングした“VEcadherin陽性VPC”、未分化VPCを無血清条件でPDGF-BB存在下に3日間培養した壁細胞分画を“PDGF-BB添加後VPC”と

名付けた。これら4つの分化段階のマウスES細胞由来VPCのマウス成体における血管新生への寄与について検討するため、腫瘍血管新生モデルマウスを作製した。腫瘍の形成にはVEGFを豊富に産生するラット神経膠芽種由来のC6細胞種を使用した。6-8週齢のヌードマウス体幹部両側にC6細胞種を移植し、7日後に4つの異なる分化段階のVPCをマウスの左側腫瘍周囲に皮下注射した。右側腫瘍周囲にはコントロールとして生理的食塩水を注入した。また我々は、“未分化VPC”と“分化VPC”の静脈内への注入も行った。5日後にレーザードップラーを用いて各腫瘍の血流を測定した。血流測定後に各腫瘍を摘出し、ホルマウントLacZ染色及び凍結切片による免疫染色を施行し、各移植VPCの血管新生への寄与について検討した。

血管前駆細胞そのものである“未分化VPC”はFlk1陽性であり、その他の内皮細胞マーカー(VEcadherin、PECAM1、CD34)壁細胞マーカー(α -smooth muscle action (SMA))は陰性であった。一方、“未分化VPC”は、Flk1陽性及び陰性の2種類の細胞分画に分化していた。Flk1の発現を維持していた細胞分画は約30%で、VEcadherin、PECAM1、CD34陽性の内皮細胞分画であると考えられた。約70%はFlk1の発現を喪失しており、 α SMA陽性の壁細胞分画であると考えられた。また、“PDGF-BB添加後VPC”では95%以上が壁細胞であった。“未分化VPC”移植群では生着したLacZ陽性細胞のうちPECAM-1と共陽性で内皮細胞と考えられる細胞を約40%認めたものの、LacZ陽性細胞は塊状を呈し、血管構造はほとんど構築されなかった。一方、“分化VPC”移植群では、生着したLacZ陽性細胞のうち約87%がPECAM-1と共陽性であり、移植したVPCによって構築された管腔構造が認められた。また、管腔構造内部にはLacZ陰性血球細胞が確認されES細胞由来分化VPCと宿主循環系との吻合が示唆された。更に、“分化VPC”移植群においては、コントロール側と比較し、約50%の血流増加を認めたが、“未分化VPC”及び“PDGF-BB添加後VPC”移植群では有意な血流増加を認めなかった。また“未分化VPC”と“分化VPC”の静脈内への注入による移植実験ではマウス腫瘍内にはLacZ陽性細胞は認められなかった。

以上の成績より、マウス ES 細胞由来 VPC 移植がマウス成体における血管新生に寄与し、血管新生部位において血流を増加させることが示された。また、我々は本研究で移植 VPC の分化段階を詳細に検討することで最も効果的に血管新生に寄与する VPC を同定した。移植する VPC の分化段階と移植方法の選択は、血管新生部位への寄与効率に質的にも量的にも関与しうることが証明された。本研究から ES 細胞由来血管前駆細胞の血管再生治療への応用の可能性が示唆された。

b. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞から移植可能な血管細胞の分化誘導とその大量増幅

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 5)。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 6)。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 7)。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 7)。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してきた 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5.

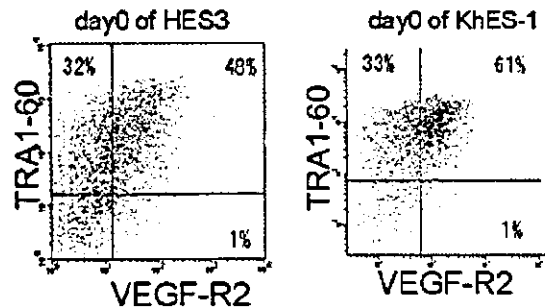


図6.

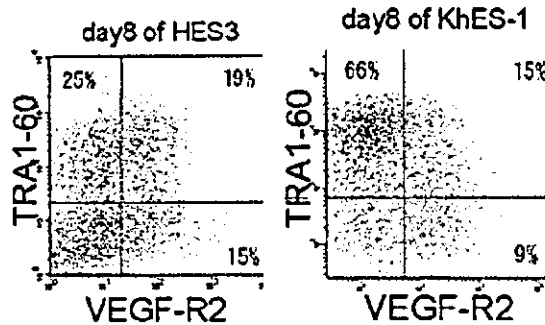
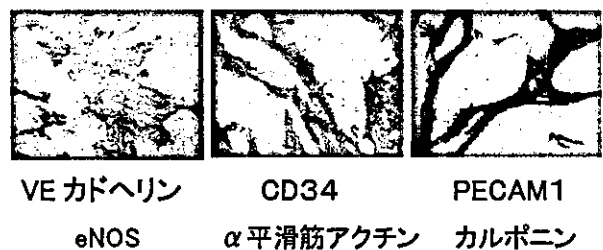


図7.



3. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞セルプロセッシングへの血管ホルモンの応用の検討(伊藤、小川)

a. 生体遺伝子導入法によるナトリウム利尿ペプチドの障害内皮再生作用の発見とその分子機構の解析

我々がクローニングしたラット CNPcDNA をアデノウイルスベクターに組み込み、ウサギ静脈グラフトモデルにおいて血管壁への遺伝子導入を行った。すなわち、ウサギ carotid artery に同側の jugular vein

を端端吻合した。吻合の際、CNP アデノウイルス (5×10^8 PFU) を含有したリング液 $150 \mu\text{l}$ をグラフト静脈内に 30 分間停留させ感染させた。グラフト後 2 週間、4 週間後の静脈血管を検討したところ、CNP アデノウイルス感染群では対照の LacZ 遺伝子アデノウイルス感染群に比べ、内膜肥厚が 40~50% に抑制されていた。更に、エバンスブルーを用いた生体染色により、内皮の再生が著しく亢進することが明らかとなった。すなわち、4 週間後も対照群では内皮化面積は $46 \pm 8\%$ であったのに対し、CNP アデノウイルス感染群では $96 \pm 1\%$ であった。更に、内皮化の促進に伴い、血栓形成も抑制された。

以上の結果より、ナトリウム利尿ペプチドは我々が以前に報告したように、血管平滑筋細胞の遊走・増殖抑制、分化誘導のみならず損傷内皮細胞に対し、その再生を促進し抗血栓性等内皮機能の回復を促す作用があることが明らかとなった。

ヒト冠動脈、臍帯静脈及びウシ大動脈由来培養内皮細胞を用いて、ナトリウム利尿ペプチドの内皮細胞再生促進作用を検討した。ナトリウム利尿ペプチドは、生理的あるいは病態生理的濃度の範囲内 ($10^{-11} \sim 10^{-9}$ M) において、内皮細胞の増殖及び遊走を有意に促進した。更に、損傷内皮再生の *in vitro* モデルである wound healing assay (10cm 培養皿にコンフルエントに培養した内皮細胞の 1/2 をスクレイパーにて剥離し、3 日間の細胞の遊走・増殖を計測する) においても同様に、内皮の修復を促進した。これらのナトリウム利尿ペプチドの作用は、cGMP プロテインキナーゼ (cGK) の阻害剤 (Rp-8-pCPT-cGMP) により抑制され、また MAP キナーゼの一つである Erk1/2 の阻害剤 (PD-98059) 及び Akt 阻害剤 (Wortmannin) で有意に抑制されたが、p38MAP キナーゼ阻害剤 (SB-203580) では抑制されなかった。更に、ナトリウム利尿ペプチド添加により、1.5 時間以内に Erk1/2 及び Akt のリン酸化の亢進を認めた。以上の結果より、ナトリウム利尿ペプチドは cGK の活性化に引き続く Erk1/2 及び Akt 活性の亢進により、培養内皮細胞の再生を促進すると考えられた。更に、*in vivo* においても BNP トランスジェニックマウス大腿動脈結紮モデルにおいて阻血部血管では、

Erk1/2 のリン酸化が上昇した。また *in vitro* のコラーゲンゲル 3 次元培養系において、ナトリウム利尿ペプチド (10^{-8} M) は培養内皮細胞の毛細血管網の形成を促進し、この作用は Erk1/2 阻害剤により抑制された。

b. 発生工学的手法によるナトリウム利尿ペプチドの虚血時血管再生作用の発見と遺伝子治療への応用

我々が開発した BNP を肝臓にて過剰発現するトランスジェニックマウス (BNP-Tg) (J. Clin. Invest. 1994)、ドイツミュンヘン大学 Hofmann 教授より供与されたナトリウム利尿ペプチドのシグナル伝達分子である cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK) のアイソザイムの一つである cGK type1 (cGKI) ノックアウトマウス、および我々が作成した CAG プロモーターを持つ cGKI トランスジェニックマウス (cGKI-Tg) を用い、大腿動脈を結紮切除した下肢虚血モデルを作成し、血管再生への影響を検討した。レーザードップラーでの解析では、術後 14 日間虚血部における血流の回復は BNP-Tg において有意に促進した。術後 10 日目における虚血筋の血管内皮および平滑筋マーカーである PECAM1/ α SMA による免疫染色では、BNP-Tg において有意に再生血管の増加を認めた。また、虚血筋の白血球マーカーである CD45 による免疫染色から、術後 3,5,7,10 日目いずれにおいても、BNP-Tg における浸潤白血球数は non-Tg と比較し同等あるいはむしろ減少していた。Dihydroethidium および 4-hydroxy-2-nonenal 染色の結果から、虚血側の血管壁におけるスーパーオキシドの産生は BNP-Tg において抑制された。NO 合成酵素阻害剤 L-NAME 投与における同様の解析では、non-Tg において有意に血管再生が抑制されたが、BNP-Tg では非投与群とほぼ同様の血流の回復が認められた。cGKI ノックアウトマウスにおける検討では、術後 28 日間にわたり虚血部における血管再生は有意に抑制された。一方、cGKI トランスジェニックマウスを用いた検討では、術後 28 日間にわたり虚血部における血管再生が有意に促進した。また、HUVEC を用いたマトリゲル法による検討では、ANP・BNP・CNP ($10^{-10} \sim 10^{-8}$ M) によるネットワーク

形成の促進が認められ、その作用は cGK 阻害剤である Rp-8-pCPT-cGMP により抑制された。以上の結果から、ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGK 系を介した血管再生作用が明らかとなった。

この結果を踏まえ、ナトリウム利尿ペプチドの虚血性疾患に対する血管再生療法への応用を目指し、下肢虚血モデルにおいて CNP の遺伝子導入を行った。ラット CNP cDNA を組み込んだ CMV プロモーターを持つプラスミド (500 μ g/匹) を虚血筋に術直後筋注にて導入したところ、術後 20 日目において虚血部における血管再生が有意に促進した。

c. アドレノメジュリンの障害内皮再生作用及び血管再生作用の発見とその分子機構の解析

アドレノメジュリン (AM) は内皮細胞から産生され、cAMP/プロテインキナーゼ A (PKA) カスケードを活性化し、CNP 同様内皮由来血管拡張ペプチドとして作用する。AM 過剰発現マウスでは血圧低下を認め、一方 AM ノックアウトマウスでは血管構築不全により胎生致死となる。これらの知見より、AM が血管の機能構築制御において重要な意義を有することが示唆されたので、今回我々は、AM の血管保護再生作用について *in vitro*、*in vivo* 双方において検討した。

- ① AM のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対する増殖遊走効果を検討した。増殖効果は一定数の細胞を血清 0.5% で 48 時間培養した後の細胞数を測定することで評価した。遊走効果は、Transwell apparatus を用いて評価した。その結果、AM は 10^{-9} M ないし 10^{-7} M 添加にて培養内皮細胞の増殖と遊走をともに有意に促進した。
- ② 損傷内皮再生過程の *in vitro* モデルである wound healing assay にて AM の内皮再生作用を検討した。HUVEC をオーバーコンフルーエントまで培養し、スクレイパーで 2mm 幅の wound を作成して、40 時間での内皮再生面積を測定した。その結果、AM 10^{-11} M から 10^{-8} M の添加にて内皮再生面積は容量依存的かつ有意に増加した。
- ③ マトリゲルを用いた *in vivo* の系で AM の血管新生作用を検討した。AM 含有プラグの血流量をレーザー Doppler にて計測すると、プラグの

血流量は 10^{-9} M から 10^{-5} M まで用量依存的かつ有意に増加した。また、プラグを PECAM-1 で染色し新生血管を観察すると、AM 含有プラグでは 10^{-9} M から 10^{-5} M まで用量依存的かつ有意に PECAM-1 陽性細胞数が増加した。

- ④ 以上 *in vitro* および *in vivo* で明らかにした AM の血管再生作用の細胞内分子メカニズムとして、HUVEC における AM による Akt 活性化を検討した。その結果、HUVEC に対する AM 10^{-8} M 刺激により Akt リン酸化は 30 分をピークに亢進した。更には、コンフルーエントに達した HUVEC に短冊状の wound を 5mm 間隔で作成すると、その刺激のみで Akt リン酸化が亢進し、その状態で AM を添加するとリン酸化がより亢進した。
- ⑤ AM の血管再生作用に対する各種インヒビターの作用を検討した。AM/PKA/Akt カスケードのインヒビターとして、AM 受容体拮抗剤の AM (22-52) 及び CGRP (8-37)、PKA 阻害剤の Rp-cAMP 及び細胞膜透過型の PKA inhibitor peptide、PI3 キナーゼ阻害剤である LY294002 及び Wortmannin の計 6 種を用いた。これら 6 種のインヒビターはいずれも AM による HUVEC における Akt 活性化を抑制し、更には wound healing assay での内皮再生促進作用とゲルプラグでの血流量増加作用も抑制した。

Akt は内皮細胞の増殖遊走のみならず、*in vivo* での血管新生でも重要な意義を有することが報告されている。今回、AM は HUVEC において PKA と PI3 キナーゼの両者に依存して Akt を活性化し、増殖と遊走を促進した。更には、AM が *in vitro*、*in vivo* 双方で PKA と PI3 キナーゼを介して、血管再生を促進することも明らかとなった。これらの結果より、動脈硬化性疾患や虚血性疾患における AM による血管再生治療の可能性が示唆された。

d. 発生工学的手法によるアドレノメジュリンの虚血脳における血管神経保護再生作用の発見

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 のサザンブロット解析で、トランスジー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 ± 137 fmol/ml、8 コピーの Tg マウスで 166 ± 98 fmol/ml、30 コピーの Tg マウスで 138 ± 40 fmol/ml であった。11 コピーの Tg マウスで成熟型 AM は 24 ± 4 fmol/ml まで上昇し、ヒトでの投与の際得られる血中濃度に匹敵していた。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 mmHg に対し Tg 114 ± 3 mmHg と有意な低下を認めた。脈拍数に有意差はなかった。

8 週齢 C57BL/6 に Streptozotocin (STZ) 70mg/kg を 5~10 日間腹腔内投与したところ、4 週後に高血糖(平均 308mg/dl) を認めた。高血糖を認めた 26 週後、大腿動脈結紮を施行し、下肢阻血後の血管再生についてレーザードップラーによる術後 8 週間までの経時的血流変化および Lectin 染色による capillary density の評価にて検討した。高血糖マウスにおける結紮肢の血流改善は 39 日目で対照に比し 70% に抑制され [$p < 0.05$, $n = 10$ (STZ), 9 (対照)], また capillary density は約 70% ($p < 0.05$, $n = 4$) に減少していた。同様の検討を糖尿病発症から 16 週後のマウスを用いて検討したところ、22 日目に対照と比べて約 70% [$p < 0.05$, $n = 9$ (STZ), 9 (対照)] に抑制されており、

糖尿病マウスにおいて下肢結紮後の血流回復が遅延していることが示された。

STZ により糖尿病化した AM Tg における検討では、AMTg における血流回復は下肢結紮後 17 日目において野生型に比べ約 50% [$p < 0.05$, $n = 6$ (Tg), 4 (野生型)] 促進されていた。

以下の方法にてマウス中大脳動脈閉塞脳卒中モデル確立に成功した。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、シリコンコートを施した塞栓子(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 30 μ m 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°C 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 neuronal 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た。

e. アドレノメジュリンによるES細胞由来血管前駆細胞からの内皮細胞分化誘導作用の発見

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VEGF-R2陽性細胞が全体の約30-40%に誘導されてくる。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^{-5}M ~ 10^{-6}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VEcadherin (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、 α 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VEGF-R2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、ウシ胎児血清(FCS)のみでVEGF-R2陽性VPCを培養した場合には α 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VEGFを投与するとPECAM-1あるいはVEcadherin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}M ~ 10^{-6}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(図8)。また、FACSによる解析によってFCS+VEGF+AM 10^{-6}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}M によって認められた内皮細胞誘導作用はAM受容体アンタゴニストであるAM22-52の添加によって、AM非添加時であるFCS+VEGF添加時と同程度にまで阻害されることが示された(図9)。以上より、AMによるマウスES細胞由来VEGF-R2陽性VPCからの血管内皮細胞への分化誘導作用が明らかになった。

図8. AMによるES細胞由来VPCからの濃度依存的な内皮細胞誘導効果

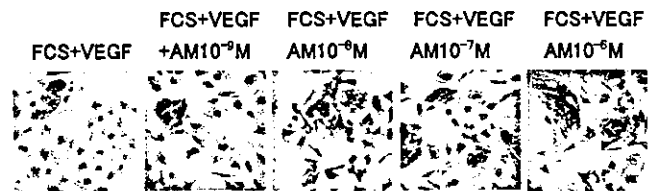
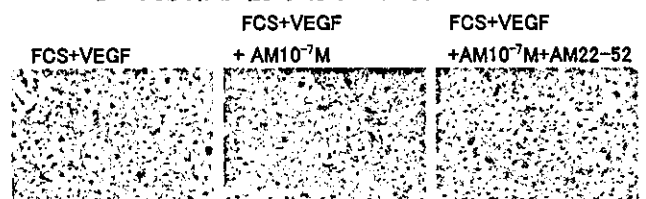


図9. AM22-52を用いたAM依存的ES細胞由来VPCからの内皮細胞誘導効果の阻害



ES細胞の血管再生への応用を考えた場合、どのような分化段階の血管構成細胞をどのような経路で生体内に移植すべきであるのか、また移植する血管構成細胞をいかに量的に確保することができるのかということを検討する必要がある。我々は腫瘍血管新生モデルマウスへのES細胞由来VPC移植においてVPCをさらに分化させた状態で移植することによって腫瘍部分の血流を増加させることに成功し、移植VPCの分化段階が宿主生体の血流増加に重要であることを明らかにした。本実験結果の手法を用いることで、AMによってES細胞由来VPCから血管構成細胞である内皮細胞を潤沢に確保することがで

きる可能性が示された。

4. 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(伊藤)

a. 閉塞性動脈硬化モデルを用いた血管細胞成分移植の治療効果の比較

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10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ー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ー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ーが陰性であり、右下の免疫染色の結果から、壁細胞マーカーである α SMA陽性細胞であった。

図11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ーの発現を解析した。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、 α SMA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12、13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12は、各群における代表的な皮膚表面血流の経過、図13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14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15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16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17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 18、19 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 18 は各群における代表的な染色写真、図 19 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

図 10.

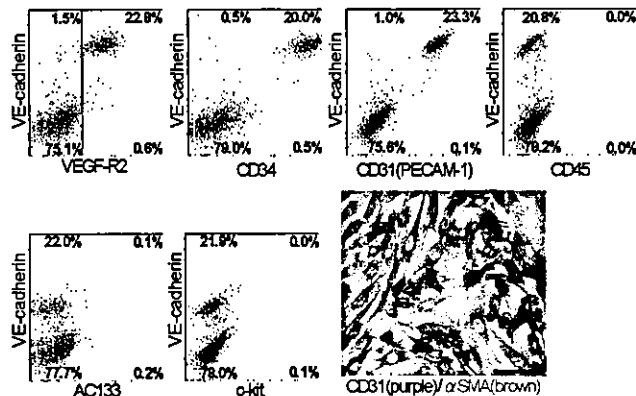
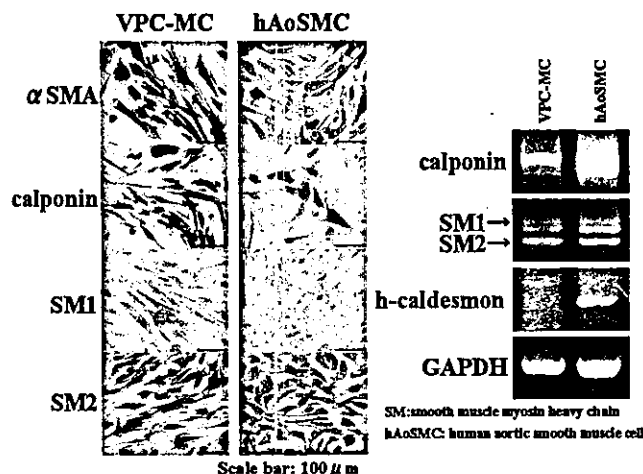


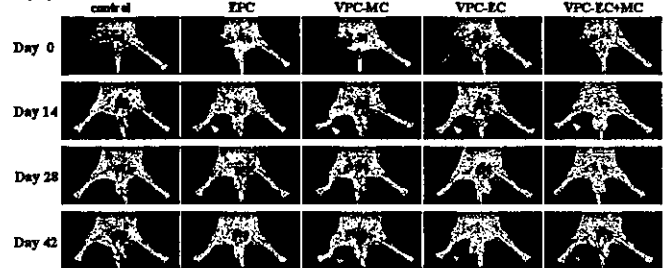
図 11.



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 12.



VPC-MC: ヒト VPC 由来壁細胞(ペリサイト、血管平滑筋細胞)
VPC-EC: ヒト VPC 由来内皮細胞

図 13.

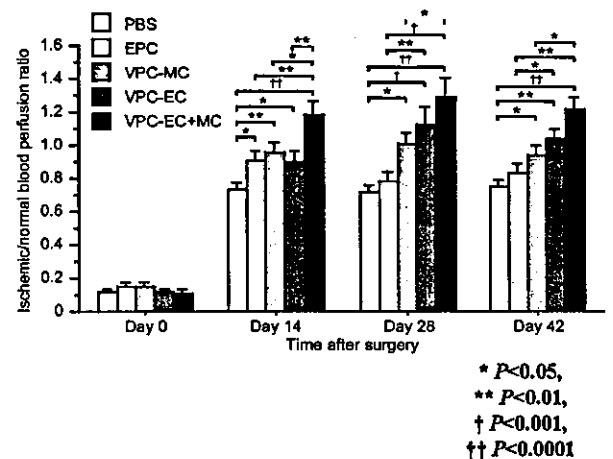


図14.

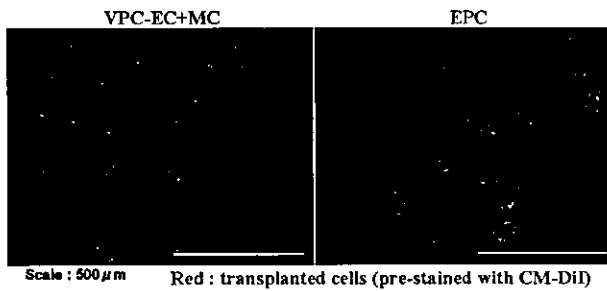


図15.

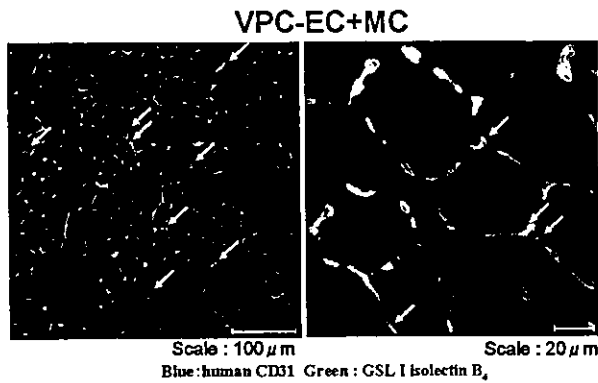


図16.

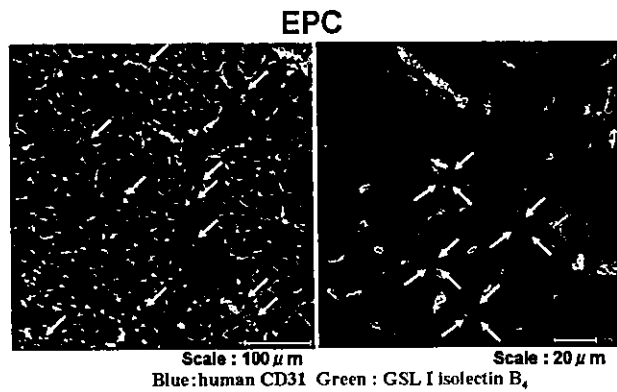


図17.

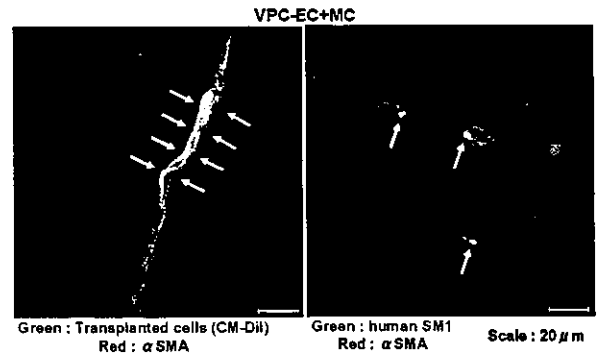


図18.

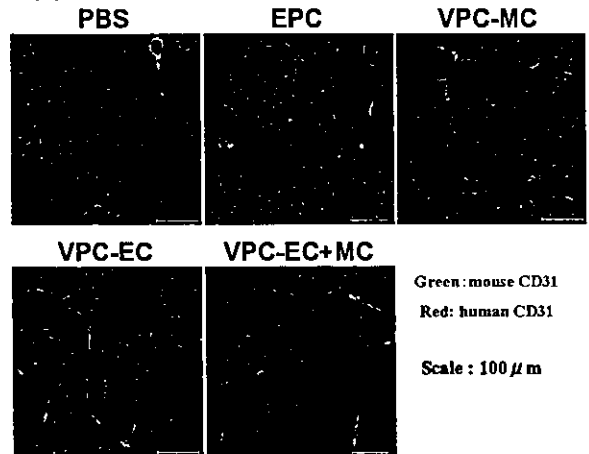
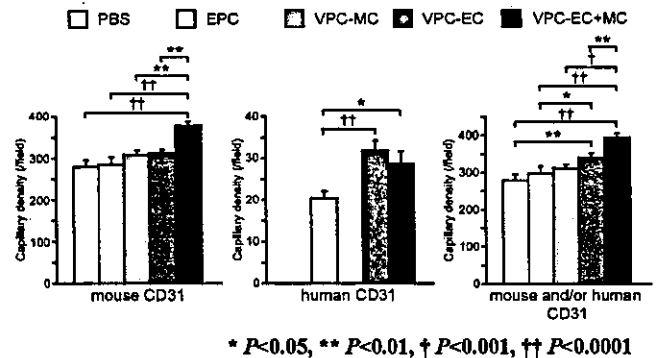


図19.



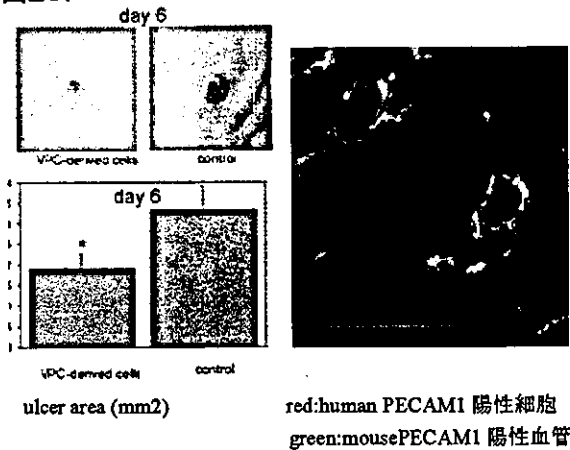
5. 「寝たきり」病態の実験モデル動物へのヒト ES 細胞由来血管前駆細胞移植の治療効果の検証(伊藤)

a. 褥創モデルを用いたヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の皮下移植治療効果の検討

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 Dil 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 20)。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オンをもち、レシピエントの血管内に取り込まれている様子が確認された (図 20)。

図20.



b. 脳卒中モデルを用いたヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の動脈内投与治療効果の検討

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 日目で、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ホスト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。

6. 血管ホルモンのヒト ES 細胞由来血管前駆細胞移植治療の補助製剤としての応用の基礎検討 (伊藤)

a. マウス ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた有効なティッシュエンジニアリングの検討

マウス下肢虚血モデルにおいてマウス VPC の移植を行った。移植に用いた VPC の作成であるが、Elongation factor-1 の promoter をつないだ LacZ 遺伝子を導入し、恒常的に LacZ を核内で発現させた未分化 ES 細胞を Leukemia Inhibitory Factor(LIF)非存在下、IV 型コラーゲンコートディッシュ上にて 4 日間培養し、FACS にて 95%以上の純度で Flk1 陽性細胞を単離した。FACS による解析結果から、この段階の細胞(undifferentiated VPC と名付けた)は、Flk1 のみ陽性であり、VEcadherin や PECAM1 といった他の内皮細胞マーカーは発現していなかった。更に、この Flk1 陽性細胞を VEGF 存在下に IV 型コラーゲンコートディッシュ上で 3 日間再培養した。この段階の細胞 (differentiated VPC と名付ける) は、約 30%は Flk1 の発現を維持し、加えて VEcadherin や PECAM1 も陽性であった。残りの約 70%の細胞は、免疫染色の結果から、 α SMA 陽性の壁細胞に分化しており、differentiated VPC は内皮細胞および壁細胞からなる細胞集団であることがわかった。

マウス下肢虚血モデルは、6~10 週令、雄の KSN ヌードマウスを用い、右大腿動静脈を結紮切除し、作成した。このモデルを作成直後に 1 匹当たり $0.3 \sim 1.2 \times 10^6$ 個の VPC を計 10 カ所に分けて筋注した。結紮後 6 あるいは 12 日目に屠殺し、虚血側下肢筋の whole mount での LacZ 染色を行った後、凍結切片を作成し、PECAM1 および α SMA による免疫染色を行った。VPC 移植法としては、undifferentiated VPC に関しては、PBS に浮遊させ、筋注した。differentiated VPC の移植には、PBS 以外に I 型コラーゲンゲルに浮遊させ、筋注した。コラーゲンゲルには、増殖因子である VEGF や塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を混ぜた群も作成した。コラーゲンゲルは、細胞外マトリックスであり、VPC の生着率の改善、あるいは、その増殖因子の徐放作用を期待し、用いた。

図 21 は、虚血下肢に undifferentiated VPC を移植した結果を示している。図左上は、移植後 6 日目における whole mount での LacZ 染色であるが、undifferentiated VPC は移植部位に cell aggregate を形成し、周囲に拡散している様子はなかった。図左下は凍結切片の PECAM1 による免疫染色の弱拡大であるが、LacZ 陽性細胞が血管腫様構造を形成してい

た。図右の強拡大では、矢印で示すように、LacZ 陽性細胞の中には PECAM1 陽性を示すものがあり、移植後 undifferentiated VPC が内皮細胞に分化していることが確認された。更にこれら細胞が血管腫様構造を形成しており、内部には血球成分も認められた。その他、血管腫様構造の周囲には LacZ 単独陽性細胞が散在し、内皮細胞以外へ分化している可能性が考えられた。

図 22 は、differentiated VPC を PBS に浮遊させ、虚血下肢に移植した結果を示している。図左上は、移植後 6 日目の whole mount での LacZ 染色であるが、血管腫様構造はなく、筋膜に沿うような形で、capillary loop 様に LacZ 陽性部位を認めた。図左下は、凍結切片の PECAM1 染色であるが、LacZ/PECAM1 両者陽性の細胞が血管構造をとっていた。図右の強拡大において、血管は undifferentiated VPC 移植の場合と比較し、内径が小さく、周囲に LacZ 単独陽性細胞は認めなかった。移植された undifferentiated VPC は、血管腫様構造を取ったのに対し、differentiated VPC はより成熟した形の脈管構造となっていたことから、以後の実験は undifferentiated VPC ではなく、differentiated VPC を用いた。

図 23 は、I 型コラーゲンに浮遊させた differentiated VPC を移植した結果である。図左上は、移植後 12 日目の whole mount LacZ 染色であるが、筋注部に LacZ 陽性部位を認めた。PBS に浮遊させて移植した場合と比較し、LacZ 陽性部位はより大きくなっていった。図左下および右は、凍結切片の PECAM1 と α SMA による二重染色の結果を示している。LacZ/PECAM1 両者陽性細胞が脈管構造を形成し、これらは矢印で示すように、 α SMA 陽性細胞で囲まれる成熟した血管であった。

更に、移植した VPC の生着率を上げるために、VPC の移植における増殖因子の効果を検討した。図 24 は、2 μ g の VEGF を I 型コラーゲンに混ぜて differentiated VPC と共に移植した結果を示している。図左上は、移植後 12 日目の whole mount LacZ 染色であるが、コラーゲンのみに浮遊させて移植した場合と比較し、LacZ 陽性部位は更に大きくなっていった。図左下および右は、凍結切片の PECAM1 と α SMA

による二重染色を示している。LacZ/PECAM1 両者陽性の細胞が非常に増加しており、発達した脈管構造を認め、矢印で示すように、LacZ/PECAM1 両者陽性の脈管は、より多くの α SMA 陽性細胞で囲まれていた。

図21. Undifferentiated VPC (PBS、術後6日間)

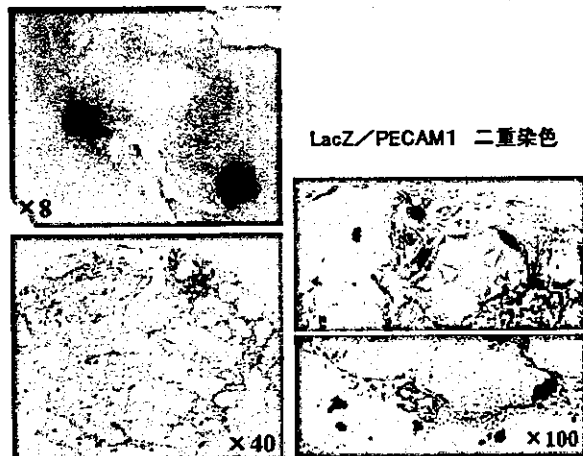


図22. Differentiated VPC (PBS、術後6日目)

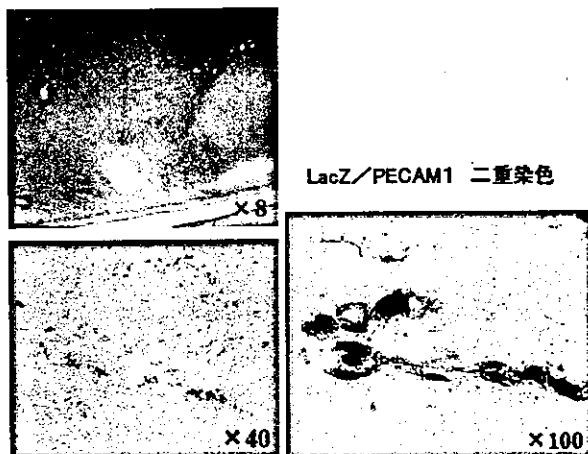


図23. Differentiated VPC (I型コラーゲン、術後12日目)

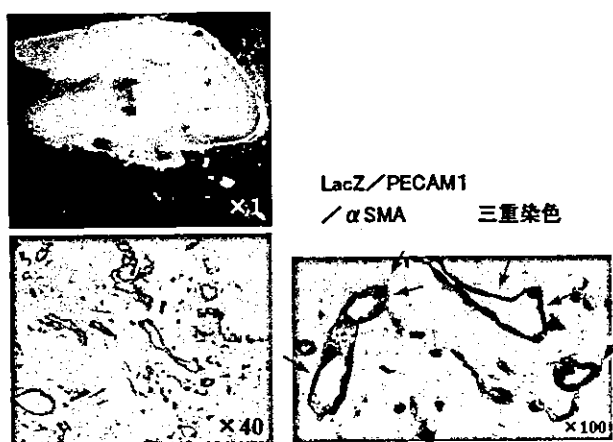
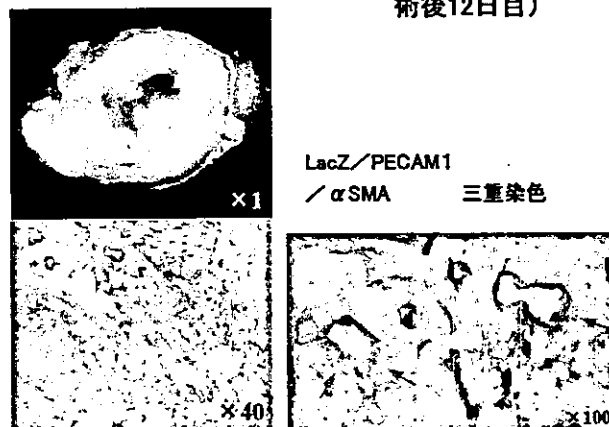


図24. Differentiated VPC (I型コラーゲン+bFGF、術後12日目)



b. AMを用いたヒト ES 細胞由来血管前駆細胞移植治療効果の増強作用の検討

我々が構築したマウス ES 細胞由来 VPC を用いた血管発生分化に関連する遺伝子群のデータベースを用い、AM およびその受容体である RAMP-2 の発現を解析したところ、それら遺伝子の発現上昇が明らかとなり血管発生における AM の意義が示唆された (図 25)。このことは AM のマウス ES 細胞由来 VPC から内皮細胞への分化誘導作用と合致するものである。

一方、我々は血管拡張ペプチドである AM 単独過剰発現トランスジェニックマウス (AM-Tg) を開発した。この AM-Tg の血中 AM 濃度は、現在ヒトでの投与の際、治療効果の認められる血中濃度に匹敵するものであった。AM-Tg 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ところ、AM-Tg 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、健康肢に対する虚血肢の血流は、野生型: $56 \pm 8\%$ 、AM-Tg: $73 \pm 5\%$; $P < 0.05$) (図 26)。以上より、生体において AM の血管再生促進作用が証明された。

そこで、ヒト ES 細胞由来 VPC 移植による再生治療における AM の薬剤としての有用性を更に検討した。AM-Tg および対照マウスを用い、主任研究者伊藤らが本年度行ったように、下肢虚血モデルを作成し、ヒト ES 細胞由来 VPC から分化させた発生初期の内皮細胞および血管平滑筋細胞を移植したところ、VPC 由来血管細胞移植による血流改善効果は、