

AM-Tgにおいてより顕著に認められた。

図25. 遺伝子解析システムを使ったアドレノメジュリンおよびアドレノメジュリン受容体(RAMP2)の血管発生分化過程における発現

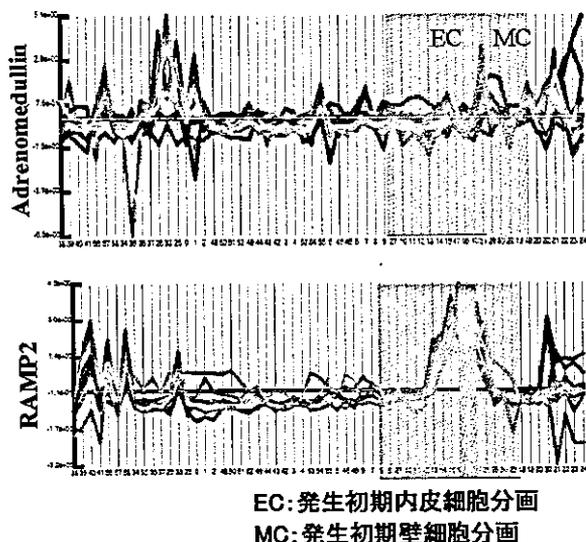
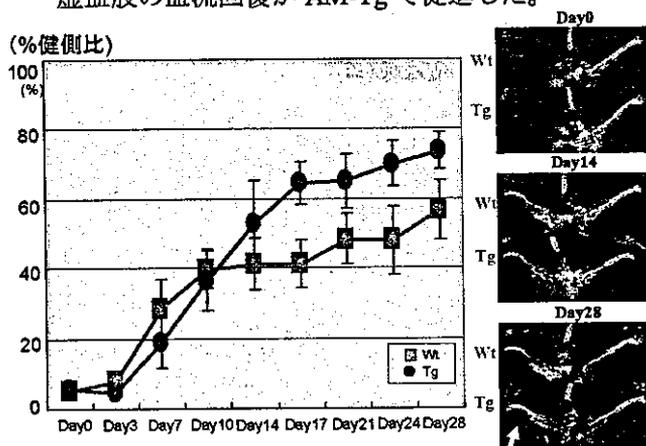


図26. AM-Tgでの大腿動脈結紮 下肢虚血モデルにおける虚血肢血流の改善
虚血肢の血流回復がAM-Tgで促進した。



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

血管再生の臨床応用に利用可能な血管分化誘導因子(遺伝子)を探索する目的で、マイクロアレイを利用したの霊長類(サル・ヒト)ES細胞の血管発生分化に関する遺伝子発現解析を計画している。

これまでの検討から、フィーダー細胞には、血管細胞の分化を誘導する、従来から知られているVEGFなど以外の因子が発現している可能性が示唆されたので、今回開発した機能的データ解析システム(特願S508-03-15)を用いて、マウスES細胞の血管分化のアレイデータと各種フィーダー細胞での遺伝子発現パターンを対比解析し、新規血管構成細胞分化誘導因子の絞り込みとその解析を行った。

フィーダー細胞うち、OP9細胞株の遺伝子発現プロファイリングデータ解析から、機能未知遺伝子を含む、25種類の遺伝子が発生過程のマウスを使ったin vivo実験から、血管形成部位での発現が確認された。

また、そのうち9種類の遺伝子は、心・血管部位に発現していることが判明した。

上述したように、独自に開発したデータ解析システムには、オリジナルデータ解析用ソフトウェアを含んでいる。

このプログラムには、一般的なデータ解析機能の他に、マウスES細胞のin vitro血管細胞分化誘導系の全遺伝子発現量変化を測定したデータベースとそのデータベース情報から細胞分化モデルの全遺伝子発現パターンの自動抽出を行うアルゴリズム(遺伝子発現パターン認識機能)を備えている。このデータ解析機能を用いて、約36,000種類の遺伝子情報から血管細胞分化誘導遺伝子群を選び出した。

これまでに血管細胞特異的発現パターンを示すもの、神経細胞にも発現するものなど、少なくとも神経冠細胞(血管細胞と神経細胞の起源)由来の細胞群に発現が認められるものが確認されている。これは、当方システムの解析精度の高さを示すものである。またその一方で、これら以外の幾つかの特徴的な発現パターンを示すデータが得られている。発現部位は、必ずしも血管特異的ではないものもあり、同一分子が時空間的にその機能を変化させて成体機能を司っていることが示唆された。

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ルリングとデータベース構築

ヒト ES 細胞は、移植治療のみならず、ES 細胞から成熟細胞への分化誘導課程を詳細に解析することにより、発生・分化のメカニズムを明らかにする目的にも有効なツールである。特にヒトにおいては、倫理上、遺伝子改変による特定遺伝子の発生・分化における役割の解析を行うことは不可能であり、その点からもヒト ES 細胞の有効性は高い。そこで、血管発生分化各段階の細胞を用いて、マイクロアレイ法にてヒト血管発生分化誘導に関与する遺伝子群を網羅的に解析し、データベースを構築することを試みた。今後、構築した遺伝子データベースとヒトゲノムデータベースとのリンクにより、血管再生に関与する各種因子を検索し、血管再生治療への応用を目指す予定である。

今回の検討ではヒト ES 細胞セルライン HES-3 および KhES-1 を使用した。

1. KhES-1 未分化 ES 細胞
2. HES-3 未分化 ES 細胞
3. HES-3 TRA-1 陽性細胞
4. HES-3 由来 TRA1 陰性 VEGF-R2 陽性細胞分離直後
5. HES-3 由来 TRA1 陰性 VEGF-R2 陽性細胞 collagenIV コートディッシュへの接着細胞
6. HES-3 由来 α 平滑筋アクチン陽性壁細胞 (10%血清により分化誘導)
7. HES-3 由来 α 平滑筋アクチン陽性壁細胞 (PDGF-BB により分化誘導)
8. HES-3 由来 VE カドヘリン陽性血管内皮細胞 (VEGF により分化誘導後、VE カドヘリンにて再分離)

の 8 群の細胞群のトータル RNA をそれぞれ 15 μ g ずつ回収し、マイクロチップにて遺伝子発現を網羅的に解析した。

すなわち、分離した各分画由来の RNA を分離精製し、DNA Chip 実験に供した。DNA Chip は、Human Genome U133A&B GeneChip (Affymetrix 社) を用いた。実験に用いたサンプルは、GeneChip Target Preparation 法に従って調整した。DNA Chip

用に精製した Total RNA を用いて、逆転写酵素による First strand cDNA、second strand cDNA 合成反応を行った。さらに 2 本鎖 cDNA を鋳型に試験管内 cRNA 合成反応後、cRNA Fragmentation による GeneChip 用サンプル調整を行った。各調整済み核酸 Target サンプルは、ハイブリカクテルとして上記 DNA Chip カートリッジ内に注入し、プレハイブリダイゼーションに続き、ハイブリダイゼーション (45°C 60 回転/分 16 時間) を行った。ハイブリダイゼーション反応終了後、各カートリッジを Fluidics station にセットし、指定のプロトコール (染色、洗浄) による処理を行い、最後にスキャナーでハイブリダイゼーションパターンを蛍光イメージとして読み取り、各プローブ・セルに対する蛍光強度情報を生データファイルとして取得した。

(<http://www.affymetrix.com/products/index.affx> 参照)

各生データファイルを The eXintegrator system (<http://www.cdb.riken.go.jp/scb/>参照) に登録、データベース化し、血管分化過程のアレイデータを利用した遺伝子発現パターンを対比解析し、血管構成細胞での遺伝子発現解析を行った。

未分化ヒト ES 細胞から血管前駆細胞、さらに血管内皮細胞への分化誘導細胞で特異的発現パターンを示す遺伝子の検索 (*in silico* primary screening) を行った。未分化ヒト ES 細胞特異的発現遺伝子 Top 50 中には、Nanog 遺伝子 (未分化維持機能を持つ) や developmental pluripotency associated 4 などの ES 細胞の多分化能に関連する遺伝子が認められた(表 1)。血管前駆細胞特異的遺伝子の検索結果では、Ephrin type A receptor7, G protein coupled receptor RDC1 homolog など細胞膜結合タンパク質をコードする遺伝子発現が優位であった(表 2)。また、HAND1, Sox6, EST downstream of HoxC4 などの造血系幹細胞や心血管系発生・分化に関連する転写因子群の遺伝子発現も優位であった。血管内皮細胞特異的遺伝子検索の結果は、VE-cadherin, Endoglin (CD105), CD34, PECAM1 などの血管内皮細胞特異的分子マーカーの発現の他に、MEF2C, PDGF-D, Angiopoietin-2 の遺伝子発現も高かった(表 3)。血管前駆細胞を、10% 胎仔牛血清 (FCS) を含む培養液中で 24 時間培養後、特異的遺伝子発現検索を行った。Collagen 8 alpha (血

管内皮細胞特異的マーカー)の発現も優位であるが、Skeletal muscle LIM protein 1, Myopodin 遺伝子の発現も高かった(表4)。

その他、FGF 5, IL-7 receptor, IGFBP5, BDNF などサイトカイン関連遺伝子の特異的発現が認められた。また、各対象のデータ解析結果には、EST (未知遺伝子) 情報も含まれていた。遺伝子発現プロファイルに基づく細胞間距離を2次元マップとして描写した。データマイニング手法として、188種類 (Anova Sort 法により)のプロープ情報を利用したマッピングを行った。データ解析結果は、未分化 ES 細胞から分化誘導開始後、血管前駆細胞を経て血管内皮細胞へ細胞分化が進むに従い、各細胞が遺伝子発現レベルにおいても生物学的な細胞分化プロセスと類似した距離にマッピングした。また、血管前駆細胞から時系列および培養(分化条件)が異なると遺伝子発現レベルでは異なる細胞に分化した。

表1
ES specific genes

Rank	Accession ID	Description	Notes
10	220435_s_at	Ameloblastin-like protein domain superfamily	
8	219948_s_at	Autism susceptibility gene 2 protein	
13	200248_s_at	Beta-actin (beta-actin) actin class beta subunit	
27	220471_s_at	C12orf4 or TERC protein	Uncertain match
19	220373_s_at	Caveolin-binding protein 1	
30	201150_s_at	CDH1, Epithelial cadherin precursor (E-cadherin)	
45	200708_s_at	CEHPEF, CEHNF-1 homologous protein (Cartilage protein 1)	
33	227840_s_at	CELSR4	
33	220988_s_at	Developmental polycomb target associated 4	
41	200749_s_at	Discs large homolog 7, DLG7, Guanylate kinase-associated protein, separate nuclear localization signal	
42	221312_s_at	EBF1	multi-match
39	220828_s_at	EBF1, domain 1 of CRYBA4 (beta crystallin A4)	
36	220734_s_at	GABRB3, Gamma-aminobutyric acid receptor beta-3 subunit precursor (GABA(A) receptor)	
46	227850_s_at	GABRB3, Gamma-aminobutyric acid receptor beta-3 subunit precursor (GABA(A) receptor)	
8	221911_s_at	HOXA10, homeobox gene 10	Uncertain match, multi-match
22	221921_s_at	H2O11 protein	Uncertain match
41	220229_s_at	KLHL7, Kloth-like 7	
12	210715_s_at	Ku80-type proteinase inhibitor 2 precursor	
44	200735_s_at	LITAF, Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor	
11	211809_s_at	Mastom 1 (M1) containing protein	multi-copy, multi-match
38	220194_s_at	MAMCO	
40	220413_s_at	MSL2, Protein kinase C-binding protein (MLL2) precursor	
24	200781_s_at	Repeat 2 (nuclear envelope spectin repeat protein 2)	
35	220846_s_at	RP, DDB1, Replication origin (REP-1) (RNA recognition factor)	
28	200445_s_at	RP, DDB1, Replication origin (REP-1) (RNA recognition factor)	
43	219978_s_at	nucleolar and spindle associated protein 1	
48	218039_s_at	NUPAP1, nucleolar and spindle associated protein 1	
17	227472_s_at	Occulpin 1	multi-copy, multi-match
25	200957_s_at	PDI and SFRS1 interacting protein 1	
30	200951_s_at	PDI and SFRS1 interacting protein 1	
2	200268_s_at	POU domain, class 5, transcription factor 1 (Octamer-binding transcription factor 5) (Oct-5) (Oct-5)	multi-copy
9	214822_s_at	POU domain, class 5, transcription factor 1-like protein 1 (Octamer binding protein 5-like)	multi-copy
1	214820_s_at	POU domain, class 5, transcription factor 1-like protein 1 (Octamer binding protein 5-like)	multi-copy
4	214820_s_at	POU domain, class 5, transcription factor 1-like protein 1 (Octamer binding protein 5-like)	multi-copy
18	200468_s_at	Rac-gep-type protein-tyrosine phosphatase catalytic precursor	
26	211347_s_at	Rho-GEF GTP-binding protein (rho GEF) (RhoGEF)	
15	219171_s_at	RNA-binding region RBP-1	
37	211803_s_at	Sa-like protein 2 (Dnc finger protein BALL2) (SPL2)	
7	220454_s_at	Samprorin 5A precursor	
21	222640_s_at	Samprorin 5A precursor	
29	211354_s_at	Serine/threonine protein phosphatase 3A	
34	220297_s_at	SLC1A3, Calcium amino acid transporter 3 (SLC1A3) (Solute carrier family 3 member 3)	
9	220942_s_at	Small nuclear ribonucleoprotein associated protein H	
20	201872_s_at	Small nuclear ribonucleoprotein associated protein H	
49	213721_s_at	SPO2, transcription factor 30A2	
32	200449_s_at	Tetraspanin repeat binding factor 1	
14	200206_s_at	Teratocarcinoma-derived growth factor 1 precursor	multi-match
6	201459_s_at	Tumor-associated calcium signal transducer 1 precursor	
47	220587_s_at	Upstream of HOXD10001-923.4 and cluster of very short intergenic sequences	

Search Pattern

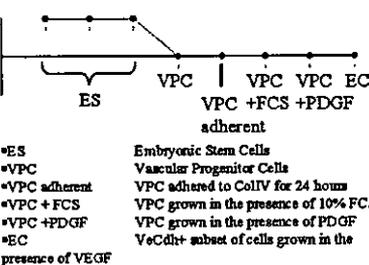


表2
VPC specific genes

Rank	Accession ID	Description
26	220511_s_at	A2M, Alpha-2-macroglobin precursor
30	202471_s_at	A79, Cyclo-AMP-dependent transduction factor A79-S
14	211962_s_at	CD40 IC, Cyclo-oxygenase inhibitor IC
20	211964_s_at	CD40 IC, Cyclo-oxygenase inhibitor IC
31	211964_s_at	CD40 IC, Cyclo-oxygenase inhibitor IC
45	212634_s_at	CDH1, Membrane protein (E-cadherin) (Alpha catenin) (A-catenin) (Rho GTPase-activating protein 2)
10	212771_s_at	CDH10, D-type protein-coupled receptor 10C1 homolog
44	221902_s_at	COL2A2, Collagen alpha 2(I) chain precursor (Endosteal collagen)
8	221019_s_at	COLE12, Colectin subfamily member 12 isoform 1
1	242484_s_at	DO, Ecto-ADP-ribosyltransferase 4 precursor
31	207720_s_at	DO, Ecto-ADP-ribosyltransferase 4 precursor
47	206991_s_at	DCM4, Downstream of tyrosine kinase 4
38	220570_s_at	EMP2, Epithelial membrane protein-2
35	200592_s_at	ENPP2, Ectonucleoside diphosphate aminopyridine nucleoside phosphatase 2 (E-ENPP 2)
49	211839_s_at	ENPP2, Ectonucleoside diphosphate aminopyridine nucleoside phosphatase 2 (E-ENPP 2)
13	200222_s_at	ENG, G-protein-coupled receptor, class C, group 1, member 1 (E-cadherin, EGF-like domain, Lamin-type EGF-like domain, Raster region)
18	220282_s_at	EPHA4.5, Erythrocyte membrane protein band 4.1 isoform 5
77	220633_s_at	EPHA7, Erythrocyte membrane protein band 4.1 isoform 7
28	214053_s_at	EPOR4, Receptor protein-tyrosine kinase subunit precursor
1	220827_s_at	ES1, domain 1 of HES4
17	220846_s_at	F3H3, Dendritic myosin cytochrome
28	200846_s_at	F3H3, F3H3-related protein precursor (F3H-1)
27	220480_s_at	FRZM, Interferon-gamma-inducible protein 1 (MCH receptor 5)
1	221018_s_at	HARD1, Heat- and alcohol-stable death domain-associated protein 1
35	200504_s_at	HAPLN1, Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 precursor
46	200204_s_at	HAPLN1, Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 precursor
49	200103_s_at	IFIT1, Interferon-induced protein with tetrakisulphate repeats 1
1	221026_s_at	LEF1, Lymphoid enhancer factor 1
31	210302_s_at	MAD2L2, Mad-2-like protein 2
41	220225_s_at	MCC, Colorectal metastasis cancer protein (MCC protein)
71	220208_s_at	MED1, Mediator complex subunit 1 (Mediator complex subunit 1)
3	220484_s_at	MP, 057083, C-type lectin-like receptor, Type 1 (retrosine protein, TLR1)
42	221443_s_at	MP, 060283, Tumor necrosis factor alpha-inducible kinase, Tumor necrosis factor alpha-inducible kinase 2 (TAK1)
11	220254_s_at	MP, 060310, Prostaglandin synthase-like protein with glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane domain
36	221724_s_at	MP, 060310, Prostaglandin synthase-like protein with glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane domain
28	220633_s_at	MP, 060308, Endoplasmic reticulum targeting sequence, Cytosolic tail
15	220497_s_at	MP, 703871, Membrane protein 10 isoform 1 precursor
17	220497_s_at	MP, 703871, Membrane protein 10 isoform 1 precursor
2	220452_s_at	MP, B61958, Tumor necrosis factor receptor 1
12	220454_s_at	MP, B61958, Tumor necrosis factor receptor 1
43	210252_s_at	ROB1, Regulator of G-protein signaling 13
1	220371_s_at	SIRT6, Sirtuin 6
38	220334_s_at	SLIT2, Slit transmembrane 2
4	220344_s_at	SLIT4, Slit transmembrane 4, member 1 (Plexinophilin 1)
1	211191_s_at	SLUG, SRY-related HMG box domain 1 (post-natal myeloid progenitor), Irf3-like 3 regulator 1
24	221488_s_at	SOX6
40	200890_s_at	TNFAIP8, TNFAIP8 domain 1 superfamily member 8
19	200503_s_at	TNFAIP8, TNFAIP8 domain 1 superfamily member 8
20	202644_s_at	TNFAIP8, TNFAIP8 domain 1 superfamily member 8

Search Pattern

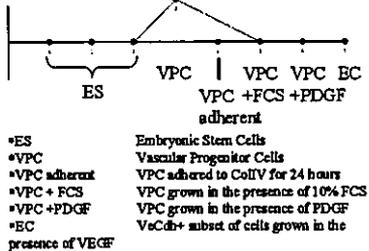


表3
Endothelial Specific Genes

Rank	Accession ID	Description
1	220572_s_at	ANGPT1, Angiotensin-2 precursor (ANG-2)
2	220572_s_at	ANGPT2, Angiotensin-2 precursor (ANG-2)
26	221281_s_at	ANGPT2, Angiotensin-2 precursor (ANG-2)
8	220469_s_at	Beta and gamma crystallin
7	220001_s_at	Beta and gamma crystallin
4	200978_s_at	C10RF1, Complement component C1q receptor precursor
13	200877_s_at	CD34, Vascular endothelial-cadherin precursor (VE-cadherin)
22	220722_s_at	CLEC3E2, C-type lectin superfamily member 2
30	201042_s_at	CTEMPR1, EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 precursor (Fibulin-3)
20	201324_s_at	EMP1, Epithelial membrane protein-1
41	201325_s_at	EMP1, Epithelial membrane protein-1
38	201808_s_at	EM3, Endoglin precursor (CD105 antigen)
19	201808_s_at	EM3, Endoglin precursor (CD105 antigen)
10	220590_s_at	ESAM, endothelial cell adhesion molecule
24	220538_s_at	ESTs
46	220780_s_at	ESTs
42	220385_s_at	FGO3, FYVE, RhoGEF and PH domain containing 3
32	220912_s_at	GNO11, Guanine nucleotide-binding protein G12(G12/G13) gamma-11 subunit
45	212651_s_at	GPR118, Probable G-protein coupled receptor 118 precursor
8	212650_s_at	GPR118, Probable G-protein coupled receptor 118 precursor
16	200543_s_at	Hematopoietic progenitor cell antigen CD34 precursor
46	447452_s_at	HEV1, Halyo-1/interferon-61 split, related with YFPW motif 1
22	220775_s_at	HSP, Heat shock-inducible protein
44	211920_s_at	ICAM2, Intercellular adhesion molecule-2 precursor
27	200883_s_at	ICAM2, Intercellular adhesion molecule-2 precursor
23	212943_s_at	IMPA, HUMAN immunity-associated protein 4
12	220222_s_at	LAM1A, Lamin alpha-1 chain precursor
43	201204_s_at	LMO2, Rho-binding 2 (Cytochrome protein TNF-2) (T-cell adhesion protein 2) (LM-only protein 2)
30	200540_s_at	LPL, Lipoprotein lipase precursor
40	210989_s_at	MUCAM, Cell surface glycoprotein MUC1B precursor
38	201180_s_at	MEC2, Myocyte-specific enhancer factor 2C
47	220897_s_at	MOSTRIN, myosin domain synthesis facilitating
37	221874_s_at	MP, 057328, endonuclease, likely ortholog of mouse Emx2, intermediate-2
48	211877_s_at	MP, 057397, Ependymal nuclear localization signal
28	221856_s_at	MP, 060613, Trk-like, Shg
17	220538_s_at	MP, 703181, Immune associated nucleotide 8
36	211934_s_at	PDGF, platelet derived growth factor D isoform 1 precursor
14	200881_s_at	PECAM1
3	210982_s_at	PECAM1
1	212219_s_at	PECAM1
31	201250_s_at	PITPRF, Protein-tyrosine phosphatase beta precursor
34	221840_s_at	PITPRF, Protein-tyrosine phosphatase beta precursor (EC 3.1.3.48) (PPTP, spleen)
25	221850_s_at	QSOX2, Protein-tyrosine phosphatase beta precursor
19	221200_s_at	QSOX2, Protein-tyrosine phosphatase beta precursor, HECT domain (Ligand-protein ligase), C2 domain
32	220496_s_at	RHO, Rho-related GTP-binding protein RhoA (Rho-like GTP-binding protein, TCL)
7	220229_s_at	ROBO4, Roundabout homolog 4 precursor (in eye roundabout)
20	220898_s_at	SOX7, Transcription factor SOX-7
15	201459_s_at	TE, Tyrosine-protein kinase receptor Tle-1 precursor

Search Pattern

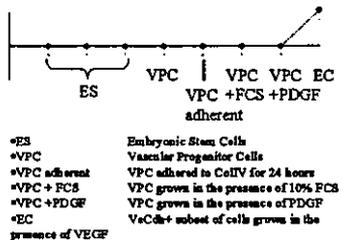
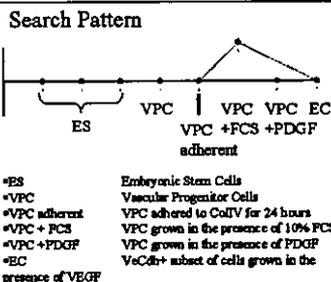


表 4

Genes induced in VPC grown in the presence of 10% FCS

Rank	Affymetrix id	Description
30	224610_x_at	ANKRD13 ankyrin repeat domain 13
20	213236_at	ATP10D Folate/pterin phosphotransferring ATPase VD
26	233397_at	BCRF1 Brain-derived neurotrophic factor precursor
50	221211_x_at	C2orf77 TAK1-like protein
6	234313_at	CDKN2B Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (p14-INK4b) (p15-INK4b)
3	226237_at	COL1A1 Collagen alpha 1(VI) chain precursor (Endothelial collagen)
33	214567_at	COL1A1 Collagen alpha 1(VI) chain precursor (Endothelial collagen)
29	228930_at	DCBLD1 Discolin, CLU8 and LCC1 domain containing protein 1 precursor
10	217435_at	DKF1 Dickkopf related protein-1 precursor
49	225361_at	Downstream of ENSG00000192056 non-coding transcript
11	210692_x_at	Downstream of ENSG00000191984 non-coding transcript
45	230487_at	EST8
44	202705_x_at	FNBI Fibulin 1 precursor
31	210310_x_at	FGF5 Fibroblast growth factor-5 precursor
22	214505_x_at	FHL1 Skeletal muscle LIM-protein 1
30	201530_x_at	FHL1 Skeletal muscle LIM-protein 1
21	15348_g_at	GAS5 Growth arrest-specific protein 5 precursor (GAS-5)
4	203150_at	GLS Glutaminase, kidney isoform, mitochondrial precursor
79	221373_at	GLS Glutaminase, kidney isoform, mitochondrial precursor
1	203425_x_at	IGFBP5 Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor
25	211928_at	IGFBP5 Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor
43	203424_x_at	IGFBP5 Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor
7	211636_at	IGFBP5 Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor
17	205708_at	LTR Interleukin-7 receptor alpha chain precursor
13	226216_at	LTR Interleukin-7 receptor alpha chain precursor
12	203015_x_at	KRT7 Keratin, type II cytoskeletal 7
37	242722_at	LMO7 LIM domain only protein 7
24	213640_x_at	LQX Protein-lysine 6-oxide precursor
42	202726_x_at	LTBP1 Latent transforming growth factor beta binding protein, isoform 1, precursor
47	203151_at	MAP1A Microtubule-associated protein 1A
38	213785_at	MFAP5 Microfibril-associated protein 5 precursor
15	234525_x_at	NP_000827 echovirus 2, unclassified LA Modif protein
41	227836_at	NP_008015 Dipyrrolic nuclear localization signal, Rhodospirillum rubrum
5	223510_at	NP_598407 mixed lineage kinase-related kinase MIR1-beta
2	225905_at	NP_598407 mixed lineage kinase-related kinase MIR1-beta
18	225982_at	NP_598407 mixed lineage kinase-related kinase MIR1-beta
8	226846_at	NRXN3 Neurexin 3-alpha precursor (Neurexin III-alpha)
23	212032_x_at	OPN3 Open 3 (Enkephalin) (Penicillin)
36	202818_x_at	PLCG2 Phospholipase C-gamma 2-occluding like 5-diglycerase 2 precursor
32	201462_at	RC3H9 a/b isoform 9
9	203108_at	RAV1 Receptor activity modifying protein 1 (G protein-coupled receptor family C group 5 member A)
34	220021_at	RDH10 retinol dehydrogenase 10
19	227487_at	RDH10 retinol dehydrogenase 10
16	226080_at	RGMB RGM domain family, member B
27	210674_x_at	SLC12A8 solute carrier family 12, member 8
40	227408_x_at	SNQ2 Sorting nexin 25 (MSTP043)
35	203001_at	STX12 Stx12 (STX12 protein)
46	225720_at	SYNP02 Synaptotagmin 2 (Synaptotagmin 2)
48	225721_at	SYNP02 Synaptotagmin 2 (Synaptotagmin 2)
14	213725_x_at	XYL1 xylose transferase 1



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)

生体移植用に調整したヒト ES 細胞由来 VPC より分化させた VE カドヘリン陽性細胞の腫瘍形成能の有無を検討するため、ヒト ES 細胞または ES 細胞由来 VE カドヘリン陽性血管内皮細胞を免疫不全マウスの皮下に移植して 5 ヶ月間観察したところ、ヒト ES 細胞群では 3 例中 2 例で腫瘍を形成したが、ES 細胞由来 VE カドヘリン陽性血管内皮細胞群では腫瘍形成は認められなかった。

ES 細胞を用いた移植治療の実現には腫瘍化の問題や免疫的な拒絶反応の問題など、いくつかの乗り越えなければならないハードルがある。我々の検討では適切な分化段階の細胞を移植した場合は、奇形種などの腫瘍形成は認められなかった。従って ES 細胞を体外で移植可能なまで分化させ移植することにより、安全性はある程度担保されると考えられる。

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)

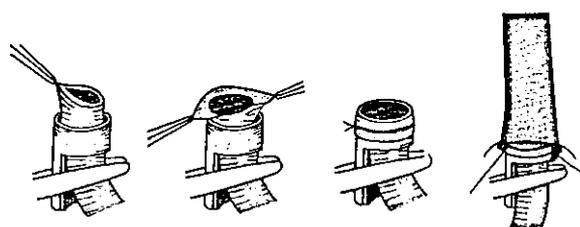
a. 微細口径ハイブリッド人工血管用血管接合具の開発

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 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は必要となり、かなり熟練した縫合技術が要求される。そこで近年、マイクロ手術での血管吻合を補助する器具としてカフテクニックが開発された。これは、図 27 に示すように移植血管をカフ器具にめくりあげて固定させ、宿主血管を重ね合わせて外側を縛ることによって吻合が行われる。これによって極めて困難である血管の端端を合わせて縫合する必要が無く、吻合部からのほとんど出血させることなく吻合することができる。また、血管内腔面を移植片と宿主血管で密着させられるため内皮細胞層の断絶が無くスムーズな接合面が得られる。従って、このカフ法は初心者にも習得が容易で、吻合時間の短縮化が可能であるため、しばしば実験移植の分野において用いられている。

しかし、このカフ法では 1 端の血管をめくり返す必要があり、口径 2mm 以下の場合には極めて操作が困難となる。従って、小口径血管の場合においても簡便、確実に接合できる方法の開発が要求されている。

本研究では、我々が移植対象とするラットやマウスの腹部大動脈(口径 1.5mm 以下)などの超小口径血管を適用対象とする血管接合具の開発について検討した。これは、本研究で開発を予定しているハイブリッド人工血管に用いるスポンジ状チューブなどと宿主血管を吻合させる際に必須な基盤技術と考えられる。

図 27. カフテクニックを用いた血管の接合方法



①鑄付テフロン製接合具の作製

直径 3mm のテフロン丸棒を 3 次元剪断加工機を用いて、内径 1.3mm 外径 1.6mm 長さ 4mm の円柱状に切り出し、中央部に直径 3mm 厚さ 0.5 のつばを設けた。

②多孔質ステンレス製接合具の作製

直径 1mm または 1.5mm のステンレスパイプを YAG レーザー加工機にて微細構造化させ、壁を格子状の網目構造化させた。次いで、長さ 2mm または 3mm に切り出した。

③接合具を用いた血管吻合

動物実験にはウイスター系の雄ラット(平均体重、250 g)を用いた。エーテル麻酔下に開腹し、ラット尾静脈より 200U/kg のヘパリンを投与した。顕微鏡下に腹部大動脈を露出させ、クランプにて血流を遮断させ血管を切断した。宿主血管の端端間に接合具を挿入し、外側を縛ることによって血管間を接合させた。また、一部では作製したポリウレタン製チューブ状のハイブリッド人工血管、あるいはスポンジ状のハイブリッド人工血管を切断した宿主血管の間に接合具を介して接合させた。所定期間後に接合具とその周囲の血管組織を取りだし、開存性を肉眼的に評価し、内腔面の微細構造を走査型電子顕微鏡にて観察した。

第一世代として作製した鑄付テフロン製接合具の外観を図 28 に示す。内径 1.3mm 外径 1.6mm のテフロン管のほぼ中央部に取り扱い性を考慮して直径 3mm の鑄が設計されている。これを遮断したラット腹部大動脈の端端間に挿入させ、接合具の両端を覆った宿主血管の外側を結紮することで接合は完了した。クランプを除去すると血流は再開され、全く出血は無かった。血流の遮断時間は 10 分ほどですみ、極めて短時間で血管を接合させることができた(図 29)。

また、人工血管の接合への応用を検討した。まず、先と同様に遮断したラット腹部大動脈を切断し、血管の両断端面に鑄付テフロン製接合具をそれぞれ挿入し、結紮固定した(図 30 上)。次いで、接続具の両端をスポンジ型人工血管の内腔内に挿入し、宿主血管と同様に結紮固定した(図 30 中)。両端のクラ

ンプを除去すると血流は再開され、接合部を含めて出血はほとんど認めなかった。スポンジ状の人工血管は宿主血管と接合させる場合、内腔面の断端を描えることが困難であるため、移植時の手技むらから結果を大きく変わることがしばしば経験される。しかし、この接合具を用いると簡便に接合でき、また内腔面をきれいに保つことができるため移植実験の結果の信頼性を大幅に高める事が期待できる。

スポンジ型人工血管を移植後、2 週間目に開腹した。血流は保たれ、末梢側での拍動を認めた(図 31 上)。移植した人工血管を摘出すると、人工血管の周囲は結合組織で覆われ、宿主血管とほぼ一体化されていた(図 31 中)。人工血管を割断し、内腔面を肉眼的に観察すると、血栓はほとんど認めず、薄フィブリン層での皮膜化を認めた(図 31 下)。

以上より、テフロン製接合具を使うと、縫合することなく短時間で確実に血管を接合することができた。虚血時間を大幅に短縮化できることより末梢臓器への影響を最小限に止めることができ、一種の低侵襲治療法とも位置づけられた。血管の接合において宿主血管には大きな損傷を与えないことから、繰り返しの移植実験にも耐えうると考えられ、同一個体を用いた再現性の高い実験移植が可能である。

一方、用いた接合具は口径が既に規定されているため宿主血管との口径差が大きい場合には接合することができない。また、接合具は比較的柔らかい高分子材料であるテフロンを用いているため、ある程度の強度を得るには壁厚が厚くなる。その結果、内腔面を狭窄させることになり、小口径の血管では極めて深刻な問題となる。また、接合部の内腔面はテフロン面が露出しており血管内腔面のように内皮化させることはほとんど期待できない。従って、慢性期にはテフロンと血管との端面において内膜肥厚が起こる可能性が高く、狭窄性閉塞になる危険性が高いと考えられる。そこで、上記の問題点を解決するため、第 2 世代となる多孔質接合具の開発について検討した。

基材は壁厚を薄くするため、強度の高い金属の中からステンレスを選択した。ステンレスはステントとして既に血管内治療器具として臨床応用されており、安全性が確立されている。ステンレスパイプ

を YAG レーザー加工機にてアブレーション加工すると金属の特定部位を除去することができた。CAD ソフトによって加工位置をミクロンレベルで厳密に設計すると、コンピューター制御によって厳密に多孔化することができた。四角い微細孔を繰り返し施すことによって格子状の壁構造を有する多孔質ステンレス製接合具が作製できた。用いるステンレスパイプの口径を変えることで、内径 1mm (図 32 上) と 1.5mm (図 32 下) の 2 種類の接合具が得られた。

接合具は格子状構造であるため (図 33 上)、内腔より圧を付加するとステントと同様な原理で拡張させることができた (図 33 下)。

接合具は、特殊な挿入具を用いることで血管の内腔面にスムーズに留置することができた (図 34)。

また、切断したラット腹部大動脈の方端の内腔内に多孔質ステンレス製接合具を挿入し、その外側を他端の動脈断端で覆い外側を結紮した。クランプを除去すると、拍動をともなって血流が再開された (図 35)。接合具を挿入して、切断血管断端を重ね合わせて結紮するのみで血管の接合が完了した。先の鍔付テフロン製接合具と同様に短い血流遮断時間内に確実、簡便に切断血管を接合させることができた。

一方、切断血管の両断端に挿入した血管接合具 (図 36 上) の外側にスポンジ型人工血管の一端を挿入させた (図 36 中)、人工血管の両端の内腔内に各接合具を挿入し、外側を結紮した。これも先の鍔付テフロン製接合具と同様に操作することができた。

スポンジ型人工血管を接合し、2 週間経過を観察した。開腹すると血流は保たれており、人工血管は開存していた。人工血管を摘出し、断端を観察すると、特に肥厚は認めなかった (図 37 上)。また、割断面で内腔面を観察すると、薄く透明なフィブリン様の層が認められたが、特に大きな血栓は観察されなかった (図 37 下)。

接合具の内腔面を走査型電子顕微鏡で観察すると宿主血管内腔面から浸潤したと考えられる血管壁細胞でほぼ完全に皮膜化されていた (図 38 上)。内皮細胞を選択的に染め分ける蛍光試薬を作用させると、ほぼ全ての細胞に蛍光が観察された (図 38 下) ことより、血管接合具を挿入すると、宿主血管の内腔面から内皮細胞の浸潤が起こり、接合具の内腔面がほ

ぼ完全に内皮化されたと言える。

以上より、多孔質ステンレス製接合具は、ある程度の拡張性を有していたため、接合させる宿主血管との口径をある程度適合理化させることができ、宿主血管内に挿入される管状部分の壁厚が薄くでき、さらに、組織侵入によって生着性が高まったと言える。

極小血管の吻合において虚血時間の大幅な短縮化、成功率の向上、また端側吻合への応用性が獲得される血管接合具が開発できた。本研究でめざしている、hES-VPC とのハイブリッド人工血管の研究を推進する上で基盤技術の一つが確立されたと言える。

図 28. 第一世代接合具として作製した鍔付テフロン製接合具 (上) とその拡大写真 (下)

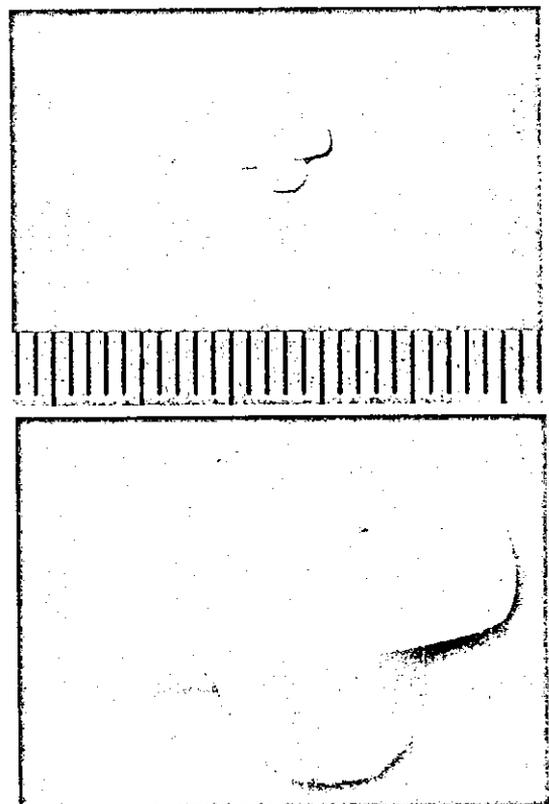


図 29. 鍔付テフロン製接合具を用いたラット腹部大動脈の接合例



図30. スポンジ型人工血管の接合例



図31. ラット腹部大動脈に2週間移植したスポンジ型人工血管 (上、中)、その内腔面 (下)

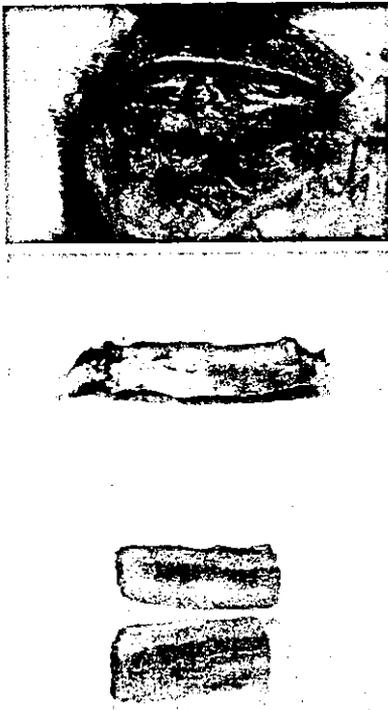


図32. 第二世代血管接合具として作製した多孔質ステンレス製接合具。上は直径1mm、下は直径1.5mm。いずれも秩序だった微細孔が均一に施され、格子状構造を形成している。

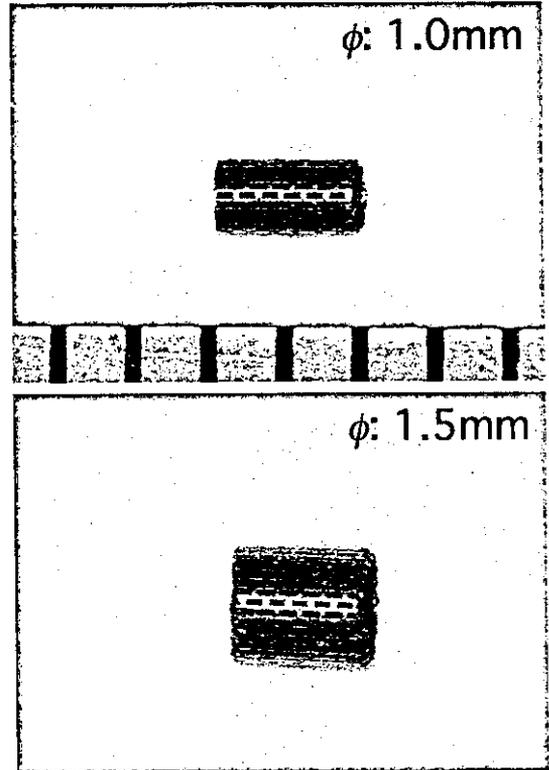


図33. 多孔質ステンレス製接合具の壁構造 (上)。その拡張後の壁構造 (下)。

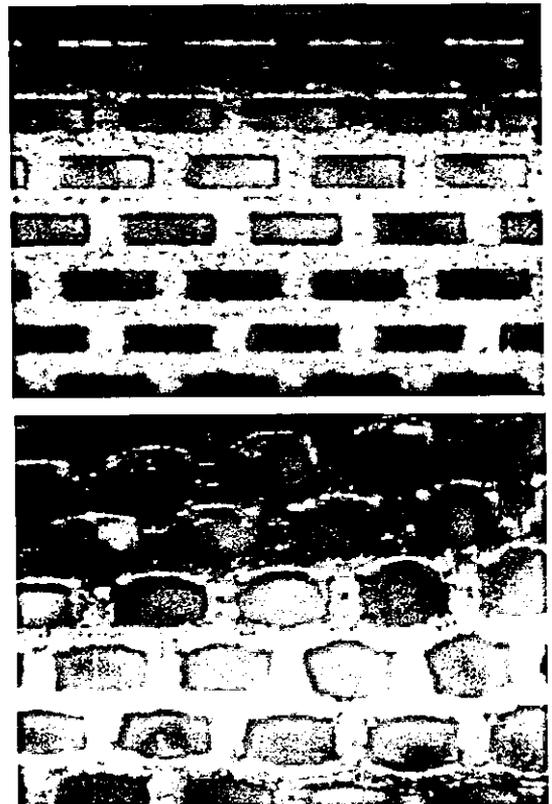


図34. 多孔質ステンレス接合具の宿主血管内への挿入方法。クランプにて血流を遮断し、血管壁の切開創（上）から挿入具を用いて接合具を血管内腔に挿入した（中）。切開面の両端にそれぞれ接合具を挿入した血管（下）。



図35. 多孔質ステンレス製接合具を用いて吻合したラット腹部大動脈



図36. スポンジ型人工血管の接合例



図37. 多孔質ステンレス製接合具を用いてラット腹部大動脈に2週間移植したスポンジ型人工血管。接合部の断面（上）と内腔面（下）

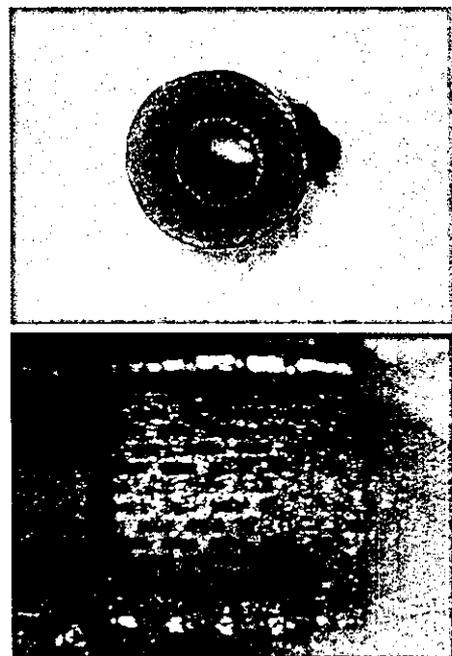
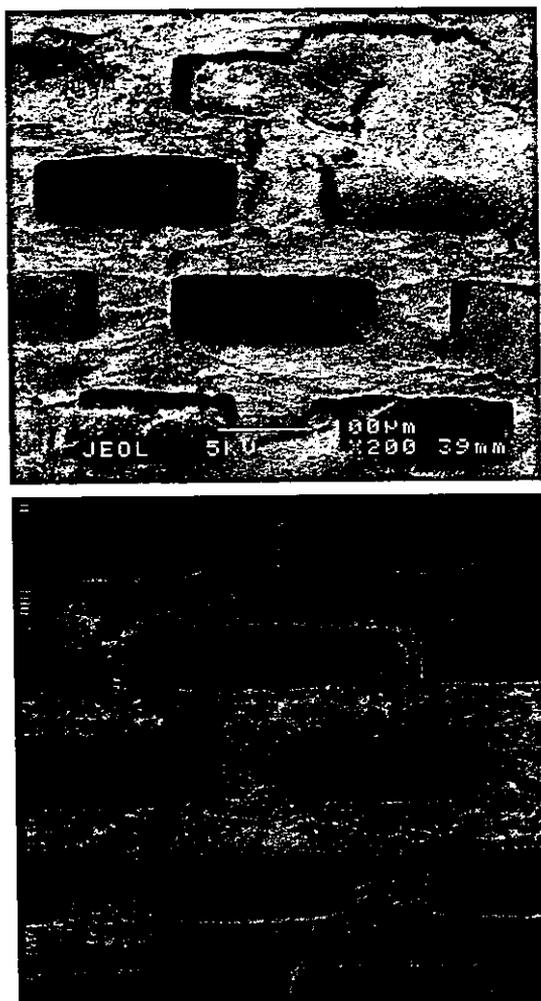


図38. ラット腹部大動脈への人工血管の移植に用いた接合具の内腔面。上：走査型電子顕微鏡写真。下：蛍光顕微鏡写真。



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

①人工血管基材の作製

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。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、孔径を数十 μm～数百 μm まで調整した連通路を形成させた。

水溶性セルロースとの層分離を利用することで、スポンジ状の多孔質構造を有する管状組織体を作製した。鋳型の大きさを調整することによって口径を任意に設定することができ (図 39)、鋳型の内径を 2mm に固定して外径を変化させることで、壁の厚い基材 (図 40) と薄い基材 (図 41) を作製した。基材

の作製時に良貧溶媒の混合比を調節すると、壁内に形成される連通路の孔径を制御することができ、緻密 (図 40) と粗 (図 41) なスポンジ状が得られた。

作製した 2 種類のスポンジ状基材のコンプライアンスを調べた。評価は、内腔内への水圧の付加による管外径変化を測定することによって求まるステイフネスパラメータ (β) を用いて行った。この値は、内圧 100mmHg 近傍での力学的強度を反映し、小さいことは、柔軟で伸縮性に富むことを示す。緻密で厚い壁を有する基材の場合 (図 39 下、図 40)、 β 値は、約 50 と大きく、一方、粗い孔の薄い壁を有する基材 (図 1 上、図 3) では約 20 と小さい値を示した。この値は、ヒト冠動脈 ($\beta=38$) の約半分、ヒト大腿動脈 ($\beta=20$) と同程度であり、生体血管に類似なコンプライアントな人工血管基材であった。さらに、この基材は、100mmHg の内圧負荷時に約 5% の管外径の拡張を示し、生体動脈の変化量に相当した。従って、人工血管基材として理想的な力学的性質を有していると言える。さらに、スポンジ構造は、内腔では細胞接着の際のアンカリング効果が、また、壁内においては血管壁再構築のスキヤホールド効果が期待される。以上より、以降の動物実験は、図 41 に示す、粗な連通路を有する壁の薄いスポンジ状の人工血管基材を用いて行った。

②多孔質ステンレス製接合具の作製

内径 1.5mm のステンレスパイプを YAG レーザーにて微細加工し、壁を円形の貫通孔を有する網目状に構造化させた。円の大きさは 200μm と 400μm の 2 種類に設定した。パターン設計は、CAD ソフトを用いてコンピューター上にて行った。

スポンジ状の人工血管用管状組織体の内腔面に予めフィブロネクチンをコーティングした。マウス血管内皮細胞 (EC) またはマウス胚性幹細胞 (ES) 細胞を播種した。独自に設計した回転培養機にて 30 分間予備培養を行い、その後静置培養に移行し、ハイブリッド人工血管を作製した。

我々は既に、基盤技術の一つとして、血管接合具を開発した (図 42 上)。これによって、縫合することなく短時間で確実に人工血管を接合することが可能となった。さらに、虚血時間を大幅に短縮化できることより末梢臓器への影響を最小限に止めること

ができ、また接合具が多孔化されていることより、接合部の内腔面の内皮化が促進され、抗血栓性の獲得と内膜肥厚の抑制によって開存率の向上が期待された。しかし、矩形の孔を有する接合具は滑動性が悪いため、血管内に挿入したり、血管内を誘導させる際に血管壁を傷つける危険性が高かった。一方、孔の周辺部は血流の滞留を伴うため、血栓形成の足場となる可能性が高い。そのため孔をできるだけ大きくして、孔側壁と血液との接触面積を少なくする必要がある。しかし、矩形の孔では孔を大きくすると、ストラットの強度が大幅に減少し、人工血管接合時の結紮操作によって接合具を变形させる。そのため、最大寸法は、200umx100um に制限しなけりばならなかった。

そこで、血管内での滑動性の向上と孔径の拡大を目的として、孔の形状を円に、また、段短部を波型に仕様変更した。孔の大きさは直径 200um と 400um の 2種類に設定した。作製した円形孔を有する新しい血管接合具の外観を図 42 に示す。いずれも、CAD データをもとに YAG レーザーによって微細加工した。

血管接合具の力学的強度を調べるため、圧縮強度試験を行った。結果を図 43 に示す。いずれの血管接合具も圧縮によって変形を加えると、耐圧縮荷重が増加し、約 0.1~0.2mm 変形時に破断した。破断時の荷重は、従来型で約 400gf であった。孔の形状を円形とすると、両孔径とも矩形孔に比べて耐圧縮荷重が増した。孔径 200um では約 0.1mm 変形させるのに約 600gf の荷重を要した。また、孔径 400um においても 400gf が必要であり、矩形孔の約 2 倍の強度を有していた。従って、孔の形状を円形とすることで、血管接合具の耐圧縮強度を高め、孔の面積を大きくすることが可能であった。また、孔が円形でかつ段短部を波形としていることより、血管内での移動はスムーズとなり、滑動性に優れていた。

図 39. 作製したスポンジ状人工血管基材の外観



図 40. ノンコンプライアント人工血管 (図 1 下) の走査型電子顕微鏡写真。内径 2mm、外径 5mm の壁厚を有し、血液の漏出を防ぐため最外層をスキン化させている。断面形状 (上) とその拡大 (下)。

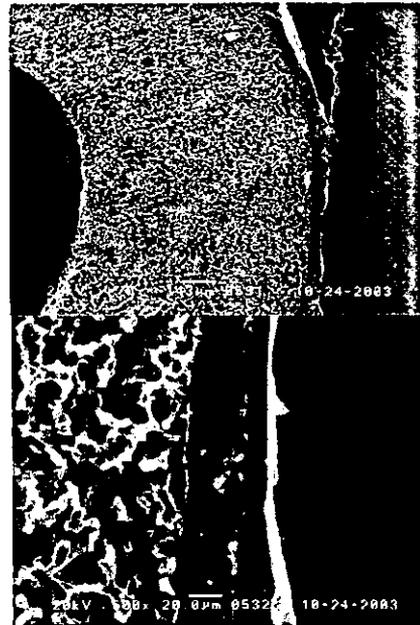


図 41. コンプライアント人工血管 (図 1 上) の走査型電子顕微鏡写真。内径 2mm、外径 3mm の壁厚を有し、最外層をスキン化させた。断面形状 (上) と内腔面 (中) と外側面 (下)。

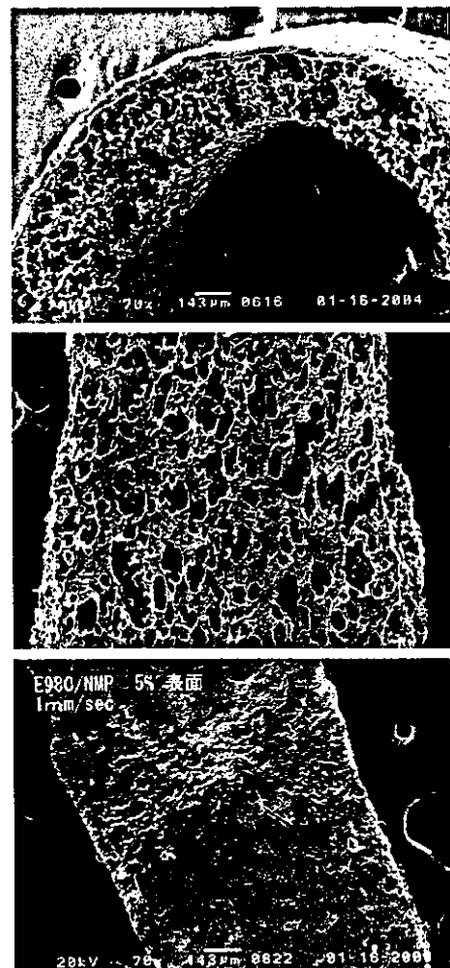


図42. 内径 1.5mm、外径 1.7mm の種々のステンレス製血管接合具の外観。従来使用していた矩形孔デザイン(上)。新しく設計した円形孔デザイン(中: 孔径 200 μ m、下: 孔径 400 μ m)。

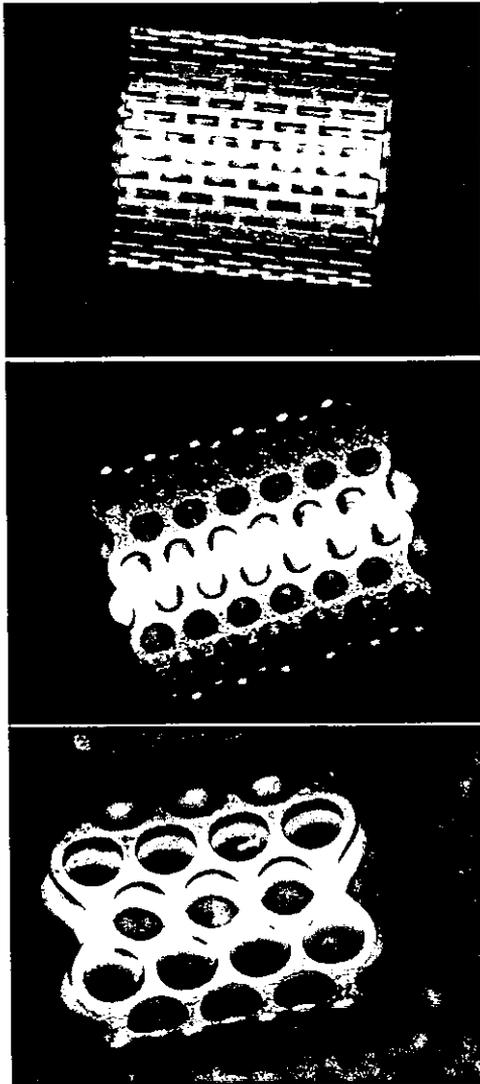
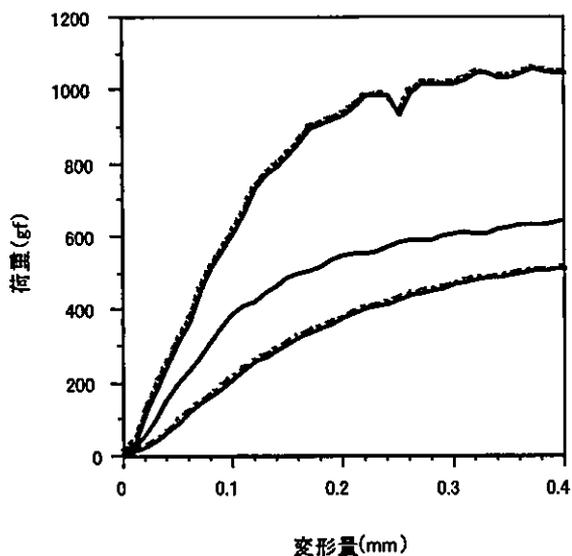


図43. 血管接合具の力学的強度の比較。従来の矩形孔デザイン(---)。新しく設計した円形孔デザイン(孔径 200 μ m:、孔径 400 μ m: ——)。



動物実験には雄ヌードラット (平均体重、250 g) を用いた。イソフルランの吸引麻酔下で開腹し、顕微鏡下に剥離操作によって腹部大動脈を露出させた。剥離部両端をクリップにて血流を遮断した。血流遮断部のほぼ中央に切開傷を作製した。切開口の両側に血管接合具を挿入した後、血管を切断した。接合具を覆うようにハイブリッド人工血管を接続した。移植時には、人工血管内にヘパリン (200U/kg) を満たしておいた。クリップを除去し、血流を再開させた。血流動態は超音波エコーによって調べた。所定期間後、人工血管を周囲組織とともに取り出し、内腔面の組織形態を走査型電子顕微鏡にて調べ、細胞の由来をLacZ染色によって同定した。また、薄切片を作製し、免疫染色等によって組織学的な評価を行った。

移植実験に際し、血管接合を用いる移植システムの信頼性を調べる目的で、マウス血管内皮細胞を用いてハイブリッド人工血管を作製し、ヌードラットへの移植を行った。人工血管の基材として、粗孔を有する壁の薄い、コンプライアント基材 (内径 2mm、外径 3mm、長さ 2cm) を用いた。

人工血管基材内部への細胞の接着は、独自に設計した回転培養器を用いて行った (図 44)。人工血管基材をローター部に固定し、基材内部を細胞懸濁液で満たした。1分間に1回転させながら30分間予備培養を行うと、内腔面をほぼ均一に内皮細胞で覆うことができた (図 45)。

図 46 に移植手順を示した。移植は、ヌードラットの腹部大動脈 (血管径約 1.5mm) を用いた。麻酔下に開腹し、剥離によって腹部大動脈を約 3cm 剥離した。剥離部の動脈枝は出来るだけ残すよう注意した。剥離部の両端をクリップで固定することによって血流を遮断し、動脈の中央部に短軸方向に約 2mm の切開傷を作成した。切開口を通して、独自に開発した血管接合具の挿入具を用いて、血管接合具を、切開創の両側に留置した。血管接合具は直径 400 μ m の円形孔を配したものを用いた。留置した接合具は生体血管で移動しないように、6.0 糸にて結紮固定した。血管接合具の段端の余分な血管組織を取り除き、接合具と血管壁との断面をそろえた。次いで、接合具が挿入された血管片を内装するように、ハイブリッ

ド血管を外側に装着した。最後に、ハイブリッド血管が外れないように、接合具周囲のハイブリッド血管基材を4.0糸にて結紮固定した。血流遮断から血管の接合までは10分ほどで完了した。

クリップを除去して血流を再開させると、ハイブリッド血管は拍動を始め、吻合部を含めて出血は全く認めなかった。超音波エコーによって血流量を測定すると、移植前は0.43m/sであったのが、移植5時間後において0.35m/sと少し減少したが大きな変動ではないと考える(図47)。特別な技能を必要とせず、約1.5mmの血管に内径約2mmのスポンジ状のハイブリッド血管を、短時間で接合することを可能とした。動物実験における術者の個人差などの影響をほとんど排除できる移植実験系が構築されたといえる。

移植1週間後にハイブリッドを摘出した。内面にはほとんど血栓を認めず、平滑であった(図48)。また、エバンスブルーを作用させても内面にはほとんど変化がなかったことより、内腔面は内皮細胞で皮膜化されていると考えられる。実際、内腔面を走査型電子顕微鏡にて観察すると血流方向に並んだ紡錘形の内皮細胞で覆われていた(図49)。移植期間は最大3週間まで行っているが、ほとんど血栓形成を認めず、開存した。

内径2mmの小口径人工血管においても、マウスEC細胞を内腔面に播種しておくことで、人工血管の開存性を大幅に向上できることが分かった。また、カフ部においてもほとんど血栓形成を認めず、カフ金属の表面は1週間で完全に内皮化されていた(図50)。従って、短期間の移植実験においては全く問題ないと判断される。ES細胞においても、出来るだけ内皮細胞に近く分化誘導させることによって人工血管の開存を高めることができると期待される。

予備的な検討として、ES細胞を用いたハイブリッド人工血管の移植を行った。ES細胞をFlk1陽性細胞に一部分化誘導させた(分化率:約10-30%)。これを、分離せず先で使用したスポンジ状の人工血管基材の内腔内に播種してES細胞化ハイブリッド人工血管を作成した。

作製したハイブリッド人工血管をヌードラットに移植した。1週間後、摘出すると多くの場合、内腔内には厚い血栓層が形成された。血栓層を除去すると、ES細胞の存在を認め、血流下においても接着を維持できていることが分かった(図51)。また、血栓内のES細胞をLacZとPECAM1で2重染色を行うと、両方に陽性反応を示す細胞群を認めた(図52)。生体血管内での分化誘導の可能性が示唆された。

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。また、EC細胞を用いたハイブリッド人工血管の予備的移植実験を終え、hES-VPCを用いたハイブリッド人工血管を開発する準備体制が整った。

図44. 独自設計による回転培養器。円形のロータ一部に人工血管を固定し、内部に細胞懸濁液で満たし1分間に1回転させながら30分間予備培養を行う。

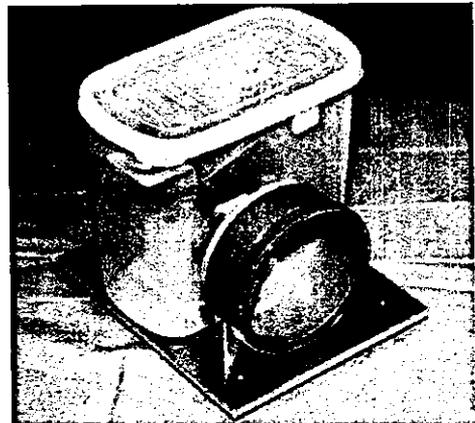
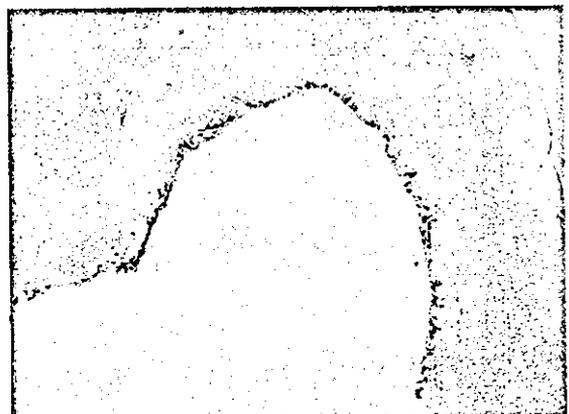


図45. EC細胞を播種して作製したハイブリッド人工血管の断面の光学顕微鏡写真。



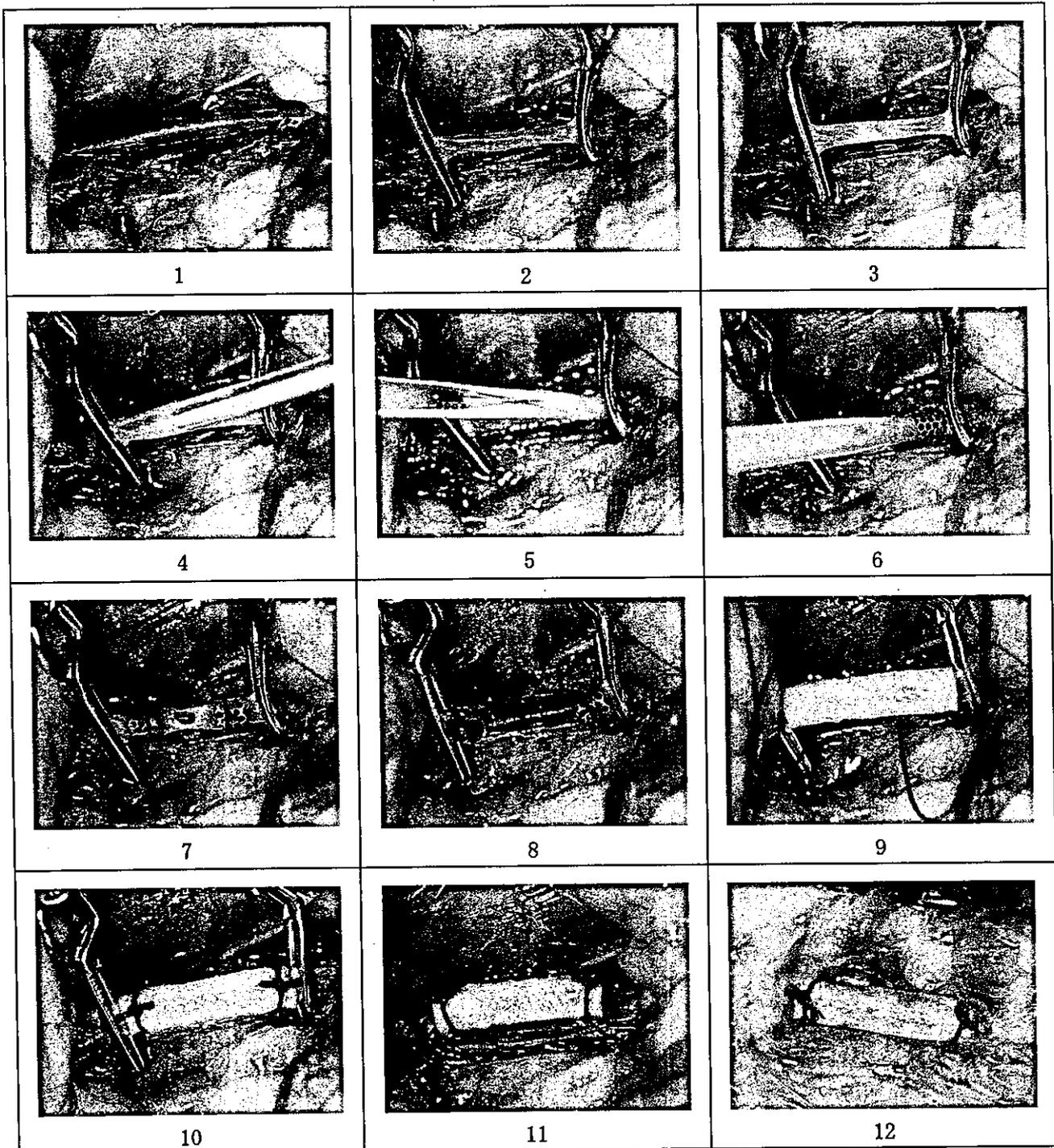


図46. EC細胞をコンプライアント基材に播種して作製したハイブリッド人工血管の移植手順。

1 : 剥離操作によって露出させたヌードラットの腹部大動脈、2 : 人工血管移植部の両端をクランプ処理によって、血流を遮断、3 : 人工血管接合位置を切開、4~6 : 独自に設計した挿入具を用いた血管内への血管接合具の留置 (左右)、7 : 血管接合具の生体血管との結紮固定、8 : 血管切断による段端処理、9 : 血管接合具の内装によるハイブリッド人工血管の装着、10 : 人工血管の生体血管への結紮固定、11 : クランプ除去後の血流の再開、12 : 7日移植後。

図47. 超音波エコーを用いたヌードラットの腹部大動脈の移植前後での血流量の測定。(上) 移植直前、0.43m/s、(下) 移植5時間後、0.35m/s。

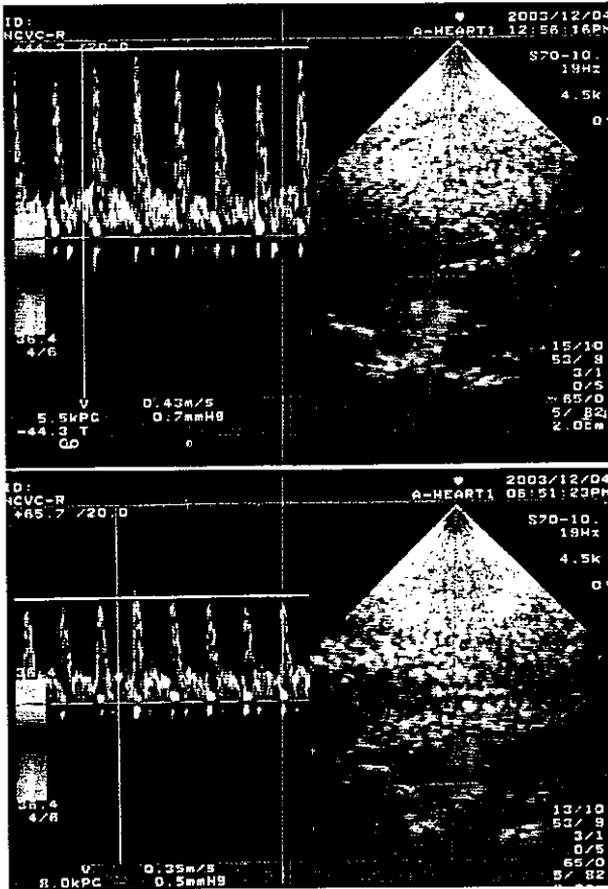


図48. EC細胞化ハイブリッド人工血管移植7日後の血管内腔面と血管接合具

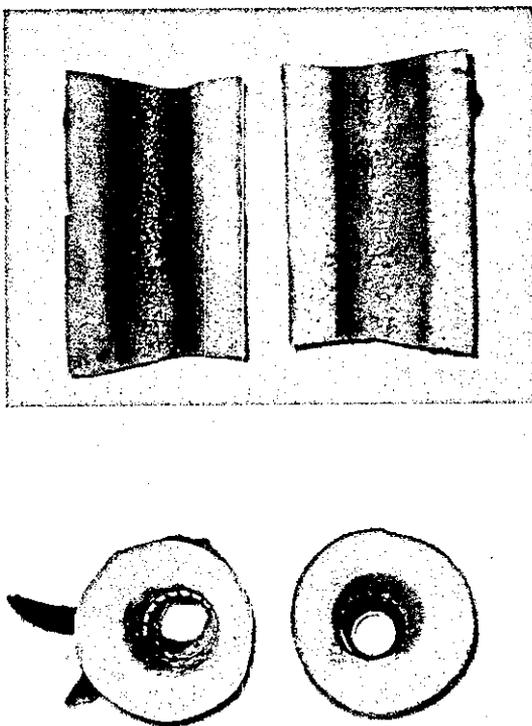


図49. EC細胞化ハイブリッド人工血管移植7日後の血管内腔面の走査型電子顕微鏡写真。(上) 全景像、(下) 内腔面の拡大像。

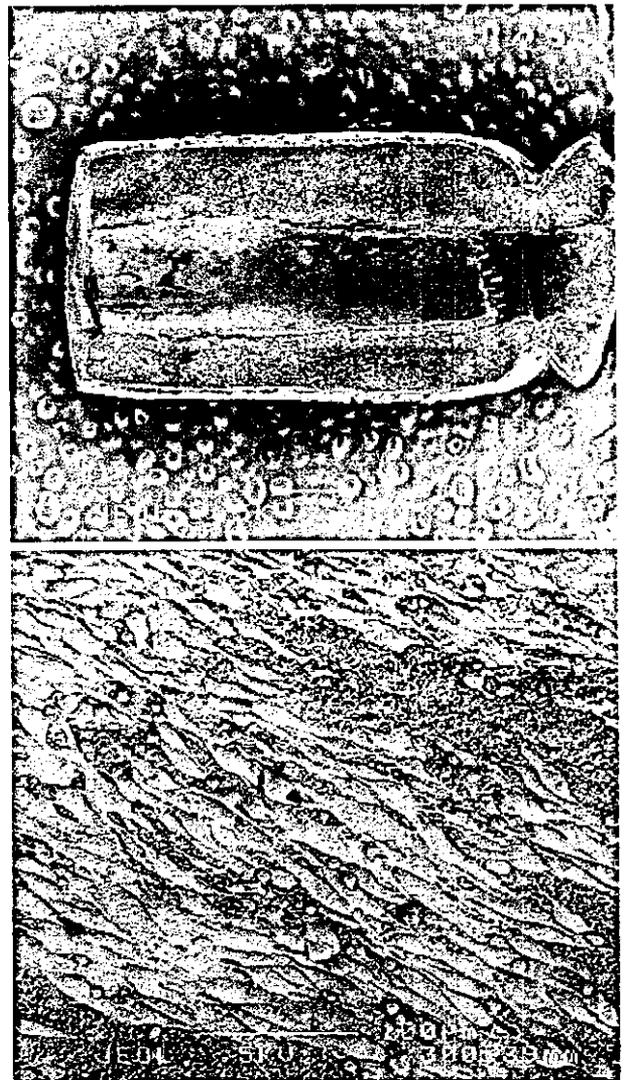


図50. ES細胞から分化誘導したFlk1陽性細胞を内腔面に播種して作製したハイブリッド人工血管。LacZ染色によってES細胞を染色することによって内腔のほぼ全面がES細胞で覆われていることが分かる。

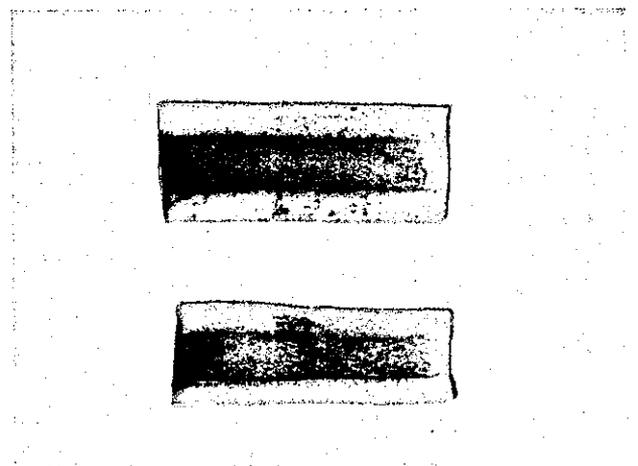


図51. ES細胞を播種したハイブリッド人工血管の移植7日後の内腔面(上)と形成された血栓層を除去した後にLacZ染色を行った(下)。

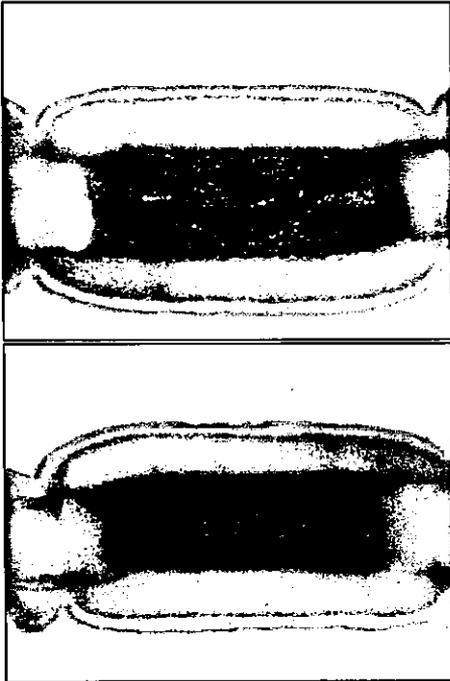


図52. 血栓内のES細胞をLacZとPECAM1の2重染色した後の光学顕微鏡写真。



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

①ES細胞ハイブリッド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50-100μm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。

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。

スキャ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53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50-100μmのほぼ均質な孔が形成されており、最外面には約50μm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。

Flk1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54)。

図53.

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).

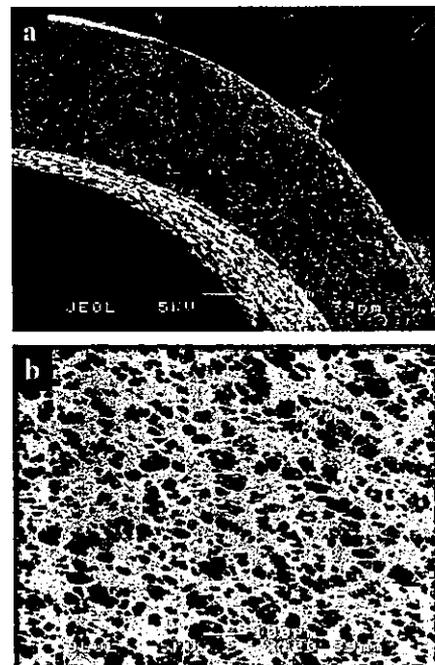
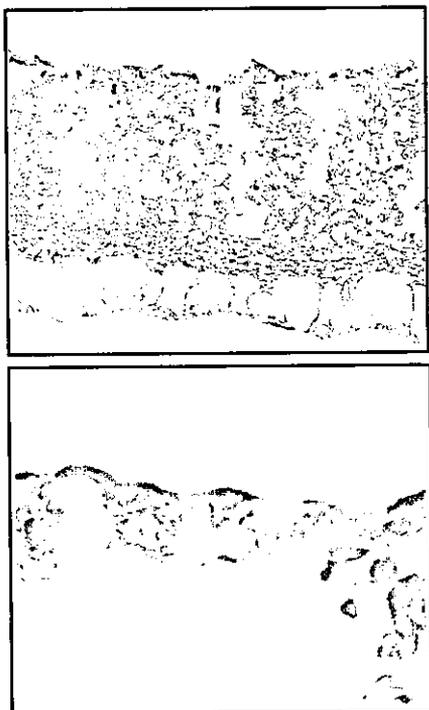


図54. Histological microphotos of the ES-derived cells (content of Flk1 positive cells: ca. 30%) -incorporated compliant PU microporous tube at the circumferential cross-section after LacZ staining. (upper) x 200. (lower) x 400. Almost entire luminal surface (upper side in the both photos) was fully covered with almost monolayered cells (stained in blue) and a little cell was observed into the media of the tube.



②拍動流負荷による In vitro 分化誘導

ES 細胞を内腔面に被覆化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、インキュベーター内で5% CO₂/95% air の環境下に設置した。

作製した拍動流回路は、ローラーポンプ、エアーコ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55）。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56b）。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皮膜化された（図56e）。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56f）。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56c）。しかし、細胞は扁平で、配向はなく、無秩序であった（図56d）。

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。先ず、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57b）、PECAM1は陰性であった（図57a）。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、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57c）、SMA陰性であった（図57d）。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。

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* 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、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、ま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。

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。

図 55. 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 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.

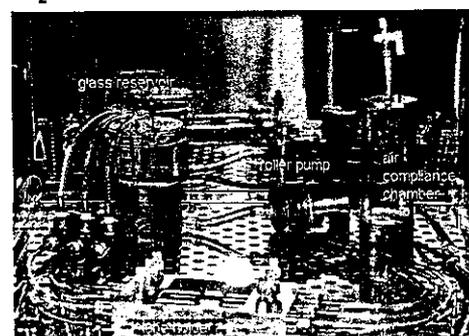


图 56. Cellular responses of ES-derived cells incorporated into the compliant PU microporous tube by loading with or without the pulsatile flow. Gross appearances of the luminal surface of the microporous tubes after *LacZ* staining (a, b, c, e). SEM photos of the luminal surface of the microporous tubes (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 flatted 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).

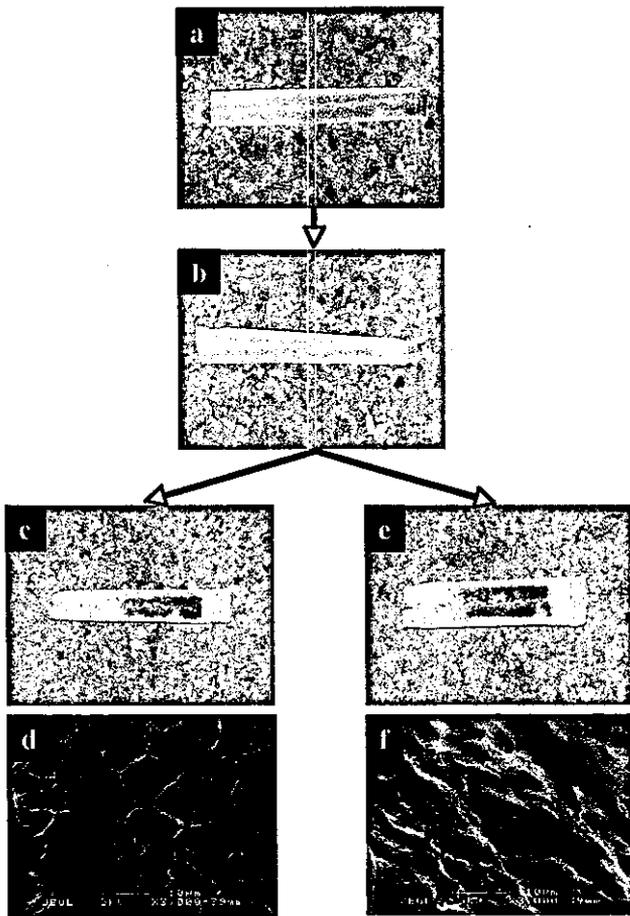
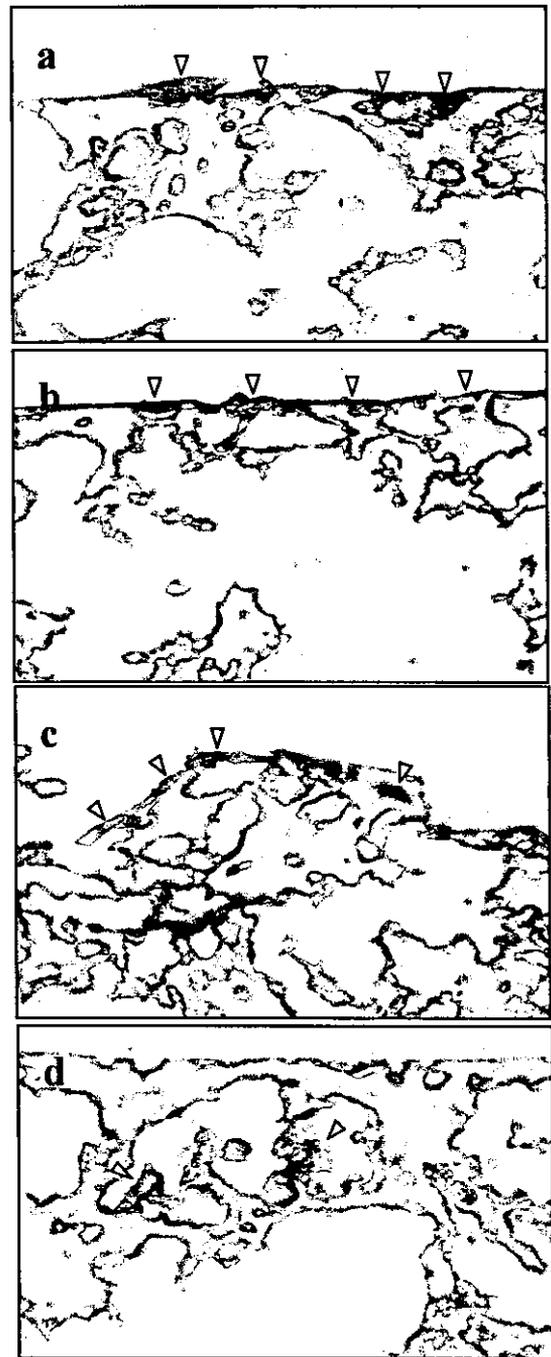


图 57. Histological microphotos (x 400) of the microporous tubes at the circumferential cross-section after staining with PECAM1 (a, c) and SMA (b, d). Upon further incubation without VEGF under static condition, almost all cells were PECAM1-negative (a) and SMA-positive (b) and layered on the luminal 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.



D. 考察

3年間の本研究課題において、我々は、まず、マウス ES 細胞由来血管前駆細胞 (vascular progenitor cells; VPC) の発見および本邦初の霊長類 ES 細胞の樹立のノウハウをもとに、サル ES 細胞における VPC の同定を行い、マウスとサル ES 細胞由来 VPC の分化動態の差異を明らかにすることにより、ES 細胞の再生医療への応用には是非とも、ヒト ES 細胞を用いた研究が不可欠であることを実感した。そこで、日本で初めてヒト ES 細胞を用いた研究を開始し、ヒト ES 細胞の未分化継代培養法ならびに凍結保存法を開発し、未分化ヒト ES 細胞から VPC への分化誘導に成功した。さらに、ES 細胞の生体移植による血管の創製およびその治療効果について、オーストラリアおよびわが国で初めて樹立されたヒト ES 細胞の2種類のヒト ES 細胞を用いて慎重に検討した。無限の増殖性と多分化能を有する ES 細胞は、確かに再生医療において魅力的な細胞ソースとして注目されてきたが、このようなヒト ES 細胞の生体移植による治療をめざした詳細な検討はこれまで世界的にも実施されておらず、我々の今回の成果は、ES 細胞の臨床応用において極めて貴重なデータを提供するものであると考えている。

我々は、ES 細胞の生体移植において、移植に用いる細胞の至適分化段階ならびに有効な移植法について検討を行った。分化段階を変化させ、その移植効率を自由に比較できることも ES 細胞の大きな利点である。その結果、VPC からある程度分化させた発生初期内皮細胞が、継代培養による増幅が可能であり、かつ、この分化段階の細胞から、皮下移植、筋肉内移植さらに動脈内移植の各移植方法に適した内皮細胞ならびに血管平滑筋細胞の双方を潤沢に得ることができることが明らかとなった。ES 細胞移植において移植細胞の分化段階が重要であることを示した我々の知見の意義は大きい。現在、内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells; EPC) など体性幹細胞を用いた再生医療に期待が寄せられているが、治療効果を得るだけの細胞数の確保が大きな問題となっている。我々は、同定したヒト ES 細胞由来 VPC より移植可能な血管細胞を十分量得ることに成功し、この

問題をある程度解決できる可能性が見いだされた。この点も、増殖性の高い ES 細胞ならではの利点であると考えられる。

更に本研究課題の目標である「寝たきり」病態の克服にむけて、我々は、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、同定したヒト ES 細胞由来 VPC から得られた血管細胞を移植し、その効果を検討した。その結果、病巣局所で移植細胞により血管を再生させ、血流回復、創傷治癒、神経機能回復などの治療効果を得ることができ、寝たきり医療へのヒト ES 細胞移植応用の有用性が動物実験レベルで示された。とくに現在注目されている EPC より、我々の移植細胞のほうが長期の安定した効果が得られたことは、ヒト ES 細胞の再生医療における意義を示唆している。更に我々は VPC から分化誘導できる内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方の移植が単独移植より有効であることを明らかにした。このような複数の移植細胞による治療効果の発現の報告はこれまでになく、本研究において、“ハイブリッド細胞移植治療”ともよべる新しい細胞治療のカテゴリーを示せた。

血管再生移植治療におけるセルプロセッシングにおいて、我々のヒト ES 細胞由来 VPC は大きなメリットを有するが、移植治療効果の更なる向上を目指し、幹細胞/前駆細胞が血管を創る種 (SEED) と考えた場合、血管を育てる土壌 (SOIL) に関しても、我々は本研究課題で検討した。我々は、これまで血管局所で産生され血管のトーンを調節する血管作動物質 (血管ホルモン) が血管リモデリングをも制御することを明らかにしていた。この知見をもとに、本研究課題において、生体への遺伝子導入および発生工学的手法により、血管拡張ペプチドである、ナトリウム利尿ペプチドおよびアドレノメジュリン (adrenomedullin; AM) が、それぞれ、cGMP/G キナーゼおよび cAMP/A キナーゼカスケードを活性化して、障害内皮細胞の再生さらに血管再生を促進することを明らかにした。これらの血管ホルモンは、既にヒトにおいて一般臨床の場あるいは試験的に患者に投与されており、ヒト ES 細胞による血管再生医療における補助薬剤となる可能性がある。特に、AM は

我々が本研究課題により開発した血管発生分化関連遺伝子のデータベースにおいて、その重要が示され、我々は、AMがES細胞由来VPCの内皮細胞への分化を促進することを *in vitro* で明らかにした。さらに、*in vivo* においても、下肢虚血モデルにおいて、ヒトES細胞由来血管細胞移植による血管再生をAMが実際に促進する結果も得られた。

新規血管再生促進薬剤の探索のため、本研究課題において、我々はヒトES細胞由来VPCを用いた *in vitro* 血管発生分化系において、血管細胞へ分化するさまざまな分化段階の細胞からRNAを回収し、マイクロアレイ法により、血管発生分化における遺伝子発現プロファイリングをおこない、さらにそのデータベースの情報を簡便に解析できるソフトウェアも開発した。このデータベースをもとにAMを候補因子として抽出することができた。現在、同定したヒトES細胞由来VPCを用いたデータベースから、ヒト血管再生に重要な遺伝子の絞込みを行っている。今後、新規の血管再生促進作用を有する遺伝子の同定が実現する可能性があると考えている。

我々はまた、ES細胞の生体移植においてティッシュエンジニアリングからの検討も重要であると考え、新たな人工生体基材を開発し、その壁にES細胞由来VPCを播種し、血流刺激により、内皮細胞と血管平滑筋細胞に分化させることで、生体血管壁の階層性を有した人工血管を作成することにもある程度成功した。ES細胞をマテリアルとしたことで、播種細胞を充分準備でき、また2種類の血管細胞を分化させることができ、さらにそれらの細胞による階層性を有した生体血管壁に近い構造を有する人工血管をつくることのできたことは画期的であると考えている。

本研究においては、移植に用いた、ある程度分化させた細胞からは腫瘍は形成されなかったが、さらに安全性については慎重に解析していく必要がある。今後、クローン技術の進歩を含めた、免疫的拒絶に関するグレイクスルーが見いだされれば、我々の得た知見をもとに、ES細胞の移植治療への応用が一挙に視野に入ってくると考える。

E. 結論

ヒトES細胞を用い血管前駆細胞を単離同定し、同細胞を用いて、*in silico* 解析、セルプロセッシング、ティッシュエンジニアリングなどからの多面的なアプローチを駆使して、寝たきり病態動物モデルに、ヒトES細胞由来血管前駆細胞から分化誘導、大量増幅した血管細胞を移植することで生体において血管を再生させ、治療効果を得ることに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

<伊藤 裕>

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. K. Nishizawa, E. Nakamura, T. Kobayashi, T.