

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

シアロムチンPCLP1による脈管内皮幹細胞の分離とその培養系を用いた
血管／リンパ管再生医療の基盤技術の確立に関する研究

平成18年度 総括研究報告書
主任研究者 宮島 篤
平成19（2007）年 4月

目 次

I	総括研究報告	
	シアロムチン PCLP1 による脈管内皮幹細胞の分離とその培養系を用いた 血管／リンパ管の再生医療の基盤技術の確立に関する研究	
	宮島 篤	4
II	研究成果の刊行に関する一覧表	21

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

シアロムチンPCLP1による脈管内皮幹細胞の分離とその培養系を用いた
血管／リンパ管再生医療の基盤技術の確立に関する研究

主任研究者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

研究要旨

生体内に存在する脈管内皮前駆細胞は、血管およびリンパ管内皮細胞への分化能を有している。本研究では、この脈管内皮前駆細胞の性状を明らかにするとともに、その培養技術を確立し、血管およびリンパ管再生医療の移植細胞として有用であるかを検証する。また、生体内で脈管内皮細胞が多様性を獲得する分子基盤を明らかにすることで幹細胞からの選択的な分化誘導を可能にし、脈管内皮前駆細胞の効果的な利用法の確立を目指す。

A. 研究目的

血管系は血液を全身に循環させる器官系であり心臓、動脈、静脈、毛細血管よりなる。血管系は組織の機能維持に必須であるばかりでなく、さまざまな疾患、たとえば癌、炎症、動脈硬化などにおいても重要な役割を果たしている。本邦における三大死因、悪性新生物、心疾患、脳血管疾患は血管系の構築が深く関与する疾患あるいは血管系そのものの疾患であることから、血管系を対象にした研究は広範に展開されている。その焦点は、血管新生の分子機構の解明であり、いかに血管新生を人為的に制御するかが重要となる。冠動脈疾患や閉塞性末梢血管疾患などの虚血性疾患は血管の閉塞や狭窄によって組織への血流が阻害される疾患であり、内科的薬物療法による保存的治療や外科的血行再建術に治療が効果を上げている。一方、血管新生の分子機構の解明が進展したことや、脈管内皮前駆細胞が同定されたことにより、血管新生を促す因子を用いた遺伝子治療や前駆細胞の移植によって血管を再生させるという新たな治療戦略が近年注目されている。

リンパ系は血管系を補完する第二の循環系であり、リンパ液の循環、脂質の運搬、免疫系において重要な役割を果たしている。代表的なリンパ管疾患であるリンパ浮腫は、還流障害によりリンパが組織間に停滞して生じる手足の局所的な浮腫である。これには、先天的なリンパ系形成不全による一次性リンパ浮腫と、感染症、悪性腫瘍、あるいは子宮癌・乳癌の外科手術などにより生じる二次性リンパ浮腫がある。本邦においては外科手術後の二次性リンパ浮腫が圧倒的に多く、乳癌および子宮癌手術後の10～25%に発症するとの報告もあり、国内患者数は約10万人と推計される。リンパ浮腫による運動障害、疼痛、感染症の合併、外見上の問題は、患者のQOLを著しく損なわせているが、その根治的な治療法は確立されておらず、マッサージや弾性ストッキングなどの保存的治療が行われているにすぎないのが現状である。

遺伝子治療や細胞移植療法など、血管疾患に対する治療法開発が進展した背景には、脈管内皮前駆細胞やその分化・増殖の制御機構に関する知見の蓄積がある。一方、リンパ管内皮細胞の分化・増殖に

関しては、ここ数年で徐々に解明が進んでいるものの未だ不十分であり、またリンパ管前駆細胞に関する知見はほとんどないのが現状である。

我々は、これまでに血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞の双方に分化可能な脈管内皮前駆細胞と考えられる細胞集団をマウス胎児肝臓より分離・同定し、その性状を解析すると共に、生体外および生体内での増殖・分化能についての検討を進めてきた。同時に、動脈、静脈、類洞、リンパ管といった多種類の脈管が存在する肝臓に着目し、組織特異的な内皮細胞を分離・同定することが可能なマーカー遺伝子の同定、およびそれらマーカー遺伝子の発現様式について検討を行ってきた。本研究では、これら研究を発展させ、(1) 脈管内皮前駆細胞から組織特異的な内皮細胞へと至る階層性獲得の分子基盤を解明し、リンパ管および血管を含む脈管再生医療実現のための知見を蓄積し、また、真に実現可能な細胞移植療法開発のため(2) 実用的な細胞ソースからの脈管内皮前駆細胞の分離、分化誘導、および増幅技術の開発を行う(図1)。

本研究による成果は、血管疾患およびリンパ管疾患に対する根治的な治療法開発へとつながることが期待される。

B. 研究方法

1, ストローマ細胞非依存的な培養系の確立

胎生14.5日目のマウス胚より肝臓を摘出し、コラーゲンゼ処理により細胞を分散させた。溶血処理後、抗PCLP1モノクローナル抗体による抗体染色を行いセルソーターを用いてPCLP1強陽性細胞を分取した。得られたPCLP1強陽性細胞は様々な培養条件のもとで一定期間培養し、細胞の形態を顕微鏡下で観察した。培養後の細胞からRNAを回収し、RT-PCR法によりマーカー遺伝子の発現検討を行った。

2, 移植可能な細胞ソースからの脈管内皮前駆細胞の同定、分離

2-1: マウス胚のいくつかの発生段階において、AGM領域、肝臓、脾臓などの造血組織を摘出し、フローサイトメトリー法によりPCLP1およびFlk1の発現について解析した。PCLP1強陽性Flk1陰性の細胞が認められたサンプルについては、セルソーターを用いて細胞を分取し培養を行い、増殖能の検討を行った。培養後の細胞はRNAを回収しRT-PCR法によりマーカー遺伝子の発現検討を行った。

2-2: LIF存在下、ゼラチンコートディッシュ上で維持していたES細胞を、LIF非存在下、4型コラーゲンコートディッシュへ播種し、Flk1陽性細胞の誘導を開始した。培養1日目、2日目、3日目、4日目と細胞を回収しPCLP1、Flk1の発現についてフローサイトメトリー法にて解析した。培養4日目においてPCLP1陽性Flk1陰性、PCLP1陽性Flk1陽性、PCLP1陰性Flk1陽性の細胞について、それぞれセルソーターを用いて分取し、4型コラーゲンコートディッシュ上に播種し、VEGF-A存在下で更に4日間培養した。培養における増殖活性について観察するとともに、抗CD31モノクローナル抗体を用いた染色染色法により分化した内皮細胞の頻度を調べた。

3, 内皮細胞多様性獲得の分子機構の解明

3-1: マウス胎生11.5日目のAGM領域および肝臓、14.5日目の肝臓よりPCLP1強陽性細胞をセルソーターにより分取しRNAを回収し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。また、マウス胎生14.5日目の上半身からCD45陰性CD31陽性Lyve-1陰性の内皮細胞を、

肝臓からCD45陰性CD31陽性Lyve-1陽性の肝類洞内皮細胞をセルソーターを用いて分取し、RNAを回収してマイクロアレイ解析に用いた。マイクロアレイ解析はAffymetrix社製GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを、データ解析には解析ソフトGeneSpringをそれぞれ用いた。転写因子の抽出はGene Ontologyのタームにおいて'transcription', 'DNA binding'を含むものを選んだ。

3-2:2-2と同様、ES細胞よりFlk1陽性細胞を誘導した後、磁気ビーズを用いてFlk1陽性細胞を分離し、更に3~6日間VEGF-A存在下および4型コラーゲンコートディッシュ上で培養した。シグナル分子阻害剤を添加するときは培養1日目から加えた。培養後の細胞はフローサイトメトリー法、RT-PCR法、免疫染色法によってマーカー遺伝子の発現を解析した。

倫理面への配慮

本研究はマウスが主体であり、倫理問題は発生しないが、動物実験に関しては学内規則に則り行う。ヒト由来サンプルを使う実験に関しては、学外有識者を含む生命倫理委員会に諮り承認を得ている。

C. 結果

(1) 研究の背景

血管の内腔を一層に覆う内皮細胞はおもに中胚葉由来であり、その前駆細胞として、血液細胞への分化能をも有する血球血管芽細胞（ヘマンジオブラスト）と血液細胞への分化能を持たない血管芽細胞（アンジオブラスト）が同定されている。胎児期における血管形成は、前駆細胞あるいは分化した内皮細胞が集合して新たな血管を形成する脈管形成

(Vasculogenesis) と、既存の血管の萌出、分枝により血管が形成される血管新

生 (Angiogenesis) の二つの過程がある。成体における血管形成は血管新生によるものと考えられてきたが、近年、末梢血中には骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在し、この細胞による脈管形成も新たな血管形成に寄与することが明らかとなった。これらの前駆細胞から成熟した血管内皮細胞が分化する分子機構については、多くの知見が報告されている。特に、動脈、静脈、リンパ管については、それぞれの内皮細胞に特異的なマーカー遺伝子が同定されており、その発現を指標とすることで分化制御機構の詳細が明らかになりつつある。一方で、組織特異的毛細血管を構成する内皮細胞については、これまでこれらの細胞を分離、識別するマーカー遺伝子がほとんど同定されていなかったために解析が遅れている。また、前駆細胞の増殖能や多分化能、成熟内皮細胞の組織特異性、分化可塑性についての包括的な議論は十分になされていない。

我々は、以下に述べる二つの理由から肝臓に注目している。

成体における肝臓は、解毒、血漿タンパク質の産生などさまざまな代謝反応が行われる臓器であるが、胎児期の肝臓は主要な造血器官として機能している。すなわち、あらゆる血液細胞を供給することが可能な造血幹細胞が存在し維持される微小環境（ニッチ）が胎児肝臓には備わっている。成体における造血幹細胞ニッチである骨髄には、造血幹細胞以外にも血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞などの幹細胞が存在することが知られている。胎児肝臓においても成体骨髄と同様に、造血幹細胞以外の血管内皮前駆細胞や間葉系幹細胞が存在すると考えられている。しかし、成体骨髄に比して胎児肝臓に関するこれらの研究報告は少なく、知見の集積は十分ではない。さらに、幹細胞の存続を可能にしているニッチについても、詳細は明らかではない。そこで、

我々は第一に、胎児期の幹細胞ニッチとして胎児肝臓に着目している。

肝臓の脈管系には、少なくとも門脈、肝静脈、肝動脈、類洞、リンパ管の5種類の脈管が存在する。肝類洞は肝特異的な毛細血管網であり、内皮細胞間の接着が緩く基底膜が十分に発達していないため血液の透過性が高いなど、血管と組織間との物質交換を容易にするための構造的な特徴がある。さらに、肝類洞を構成する肝類洞内皮細胞にはfenestraeと呼ばれる小孔が存在し、不溶性の脂質コロイドも透過することが可能である。その他にも、肝類洞内皮細胞は異物取り込み能が高い、免疫抑制活性を有する、肝細胞の分化や増殖を制御するなどの特徴的な活性が報告されている。しかしながら、このような肝類洞内皮細胞を含めた種々の内皮細胞の特徴や多様性がどのように獲得されるのかという問題については、ほとんど不明である。そこで、我々は第二に、多様な血管が存在することから、その分化機構を解析するモデル臓器に適するという点で肝臓に注目している。

(2) これまでの研究成果

Podocalyxin-like protein 1

(PCLP1) は、腎糸球体上皮細胞に発現する膜タンパク質として発見された (図 2A)。その後、我々を含むいくつかのグループの研究成果から、PCLP1はヘマンジオブラストや造血幹細胞、血管内皮細胞など様々な分化段階の血球、血管内皮細胞で発現していることが明らかとなった (図 2B)。本研究では、PCLP1が幹細胞においても発現していることに着目し、マウス胎児肝臓におけるPCLP1の発現について詳細に解析した。フローサイトメトリー法による解析によると、PCLP1は胎生14.5日目の胎児肝臓の約80%の細胞で発現が認められた。これらのPCLP1陽性細胞は、その発現量と細胞の大きさからさらに3つの集団に分離可

能であった。我々はこれらの細胞集団をPCLP1強陽性 (0.2-0.5%)、PCLP1中等度陽性 (40%)、PCLP1弱陽性細胞 (40%) とし、これらの性状を解析した (図 3)。これらの細胞集団の増殖活性について検討するために、OP9支持細胞 (ストローマ細胞) 上での培養 (OP9共培養法) を行った (図 4)。マウス頭蓋由来の細胞株であるOP9細胞は、血球/血管内皮幹細胞の分化、増殖支持活性を有することが知られており、この培養系において高い増殖活性を示すことはその細胞集団に幹細胞・前駆細胞が含まれる可能性を示唆する。OP9共培養法および血球コロニー形成法による解析の結果、PCLP1中等度陽性細胞は未分化な血球および成熟内皮細胞を含む細胞集団であり、PCLP1弱陽性細胞は赤血球系、またPCLP1陰性細胞(20%)は造血前駆/幹細胞を含む血球集団であった。PCLP1強陽性細胞は、OP9細胞共培養系において内皮細胞様のシート状のコロニーを形成し、高い増殖活性 (数十倍~) を示した (図 5A)。そこで増殖した細胞が内皮細胞である可能性について検討するため、培養前後のPCLP1強陽性細胞における各種マーカー遺伝子の発現について検討した。その結果、培養前後においてCD31、VE-Cad、CD34などの内皮細胞マーカー遺伝子の発現は認められないことが明らかとなった (図 5B)。しかし、興味深いことに、OP9共培養系に内皮細胞の分化・増殖を正に制御することが知られているVEGF-Aを添加することで、CD31、VE-Cad、CD34などの内皮細胞マーカー遺伝子の発現誘導が認められた (図 5B)。以上の結果から、PCLP1強陽性細胞はストローマ細胞との共培養で高い増殖活性を示し、かつVEGF-A存在下において内皮細胞へと分化可能な血管内皮前駆細胞を含む可能性が示唆された。また、リンパ管内皮細胞マーカー遺伝子の発現について同様に検討したところ、培養前の

PCLP1強陽性細胞においてProx-1、Lyve-1、podoplaninの発現が認められること、VEGF-A存在下で培養した細胞ではこれらリンパ管内皮細胞マーカー遺伝子の発現が維持されることが明らかとなった。さらに、PCLP1強陽性細胞が移植により成体の血管に生着する可能性を検討したところ、培養前 (図6A) と培養後 (図6B) のいずれの細胞を移植した場合でも、肝臓、小腸、腎臓、心臓などの複数の臓器において血管壁への生着を認めた。以上の結果から、PCLP1強陽性細胞は試験管内で高い増殖能を持ち、かつ血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞への分化能を有した新規の脈管内皮前駆細胞を含むと考えられた。我々は、このような性質を有した細胞を詳細に解析することで、未だ不明な点の多い内皮細胞の増殖、分化機構の理解を深め、さらには細胞療法へ応用できると期待される。

これまで述べてきたように、胎児肝臓には未熟な脈管内皮前駆細胞が存在するが、その一方で、肝臓には特異的な成熟内皮細胞も存在する。肝類洞内皮細胞は、肝特異的な毛細血管である肝類洞を構成する内皮細胞であり、その特徴の一つに血中ヒアルロン酸の取り込みがある。我々は、肝類洞内皮細胞をその他の内皮細胞と分離・識別するためのマーカー遺伝子として、最近報告された2つのヒアルロン酸受容体膜タンパク質、stabilin-2 (Stab2) およびLyve-1に着目した。Stab2は肝、脾、骨髄、リンパ節などの類洞内皮細胞特異的に発現するヒアルロン酸受容体としてクローニングされた。一方、Lyve-1はリンパ管内皮細胞特異的に発現するヒアルロン酸受容体として発見されたが、後の研究から肝類洞内皮細胞においても発現することが報告された。本研究では、これら2つの受容体に対するモノクローナル抗体を作製し、免疫染色、細胞分離に用いることで内皮細胞多様性獲得の様式、およびその分子機構の

解明を目指した (図7)。はじめに、肝類洞内皮細胞がリンパ管内皮細胞のマーカー遺伝子、すなわちLyve-1を発現していることに着目し、肝類洞内皮細胞とリンパ管内皮細胞とをいかに識別するかについて検討を行った。その結果、肝類洞内皮細胞にはこれまで報告のあったマーカー遺伝子、FcγRsや第8因子 (F8) が発現する一方で、リンパ管内皮細胞のマーカー遺伝子として知られているSLCやPdpnが発現しないこと、リンパ管内皮細胞にはStab2、FcγRs、F8の発現は認められないことが明らかとなった (図8)。

(3) 平成18年度の研究課題

これまでの研究成果から、PCLP1強陽性細胞が脈管内皮前駆細胞としての活性を有しており、移植細胞として有用であることが示唆された。また、リンパ管内皮細胞や組織特異的内皮細胞を、細胞表面抗原の発現により分離、識別することで内皮細胞分化多様性獲得の分子機構解明への糸口が得られた。平成18年度では、以下に述べる課題に対し、さらに研究を進展させた。

1 ; ストローマ細胞非依存的な培養系の確立

PCLP1強陽性細胞はOP9ストローマ細胞との共培養により、数十倍に増幅するとの結果を得ていたが、OP9のストローマ細胞としての活性が不安定であり実験ごとの増幅効率が安定しない等の問題があった。さらに、臨床の場で我々の見出したPCLP1強陽性細胞を実際に細胞移植療法の材料として供するには、ウイルス感染や免疫反応の原因となりうる異種生物由来物質の混入を極力避ける必要がある、マウス由来であるOP9ストローマ細胞の利用は好ましくない。これらの理由から、ストローマ細胞を使用しない培養系の確立が必要である (図9A)。

2 ; 移植可能な細胞ソースからの脈管内皮前駆細胞の同定、分離

現在、我々は胎生14.5日目のマウス胚においてPCLP1強陽性細胞を同定、分離し解析を行っている。しかし、ヒト胎児肝臓は移植細胞ソースとしては非現実的であり、成体骨髄や臍帯血、ES細胞などの移植可能な細胞ソースにおいて同様の前駆細胞活性を有した細胞を同定、分離する必要がある (図9A)。

3 ; 内皮細胞多様性獲得の分子機構の解明

我々は、複数のマーカー遺伝子を組み合わせることでリンパ管内皮細胞、肝臓洞内皮細胞、その他の内皮細胞を分離、識別することが可能であることを見出した。しかし、これらの内皮細胞がどのような分子機構によってその多様性を獲得するのかという問題については、依然不明であり明らかにする必要がある。

(4) 平成18年度の研究成果

1 ; ストローマ細胞非依存的な培養系の確立

胎生14.5日目のマウス胚より分離したPCLP1強陽性細胞をストローマ細胞非依存的に増殖させる培養系を探索するため、培養ディッシュのコーティング、培地、血清、増殖因子の添加など、さまざまな培養条件を網羅的に検討した。その結果、4型コラーゲンコート、alpha-MEM培地、血清有り、増殖因子無しの条件において10-20倍に増殖可能であることを見出した (図9B)。培養後の細胞における遺伝子発現プロファイルをRT-PCR法により確認したところ、内皮前駆細胞から内皮細胞まで一貫して発現が認められるFlk1の発現が誘導されていた。一方、成熟内皮細胞のマーカーであるCD31やVE-Cad、リンパ管内皮細胞のマーカーであるProx1、Flt4、Lyve-1の発現は認められなかった。同様の条件にSCF、OSM、bFGF

の増殖因子を添加すると70-80倍に増幅し、内皮細胞やリンパ管内皮細胞のマーカー遺伝子の発現誘導も認められた (図9B)。以上の結果から、PCLP1強陽性細胞はストローマ細胞非依存的に増幅させることが可能であり、かつ増殖因子の添加により内皮細胞への分化を誘導可能である可能性が示唆された。しかしながら、その内皮細胞マーカー遺伝子の発現誘導はOP9共培養法に比べると弱いことから、現在のストローマ細胞非依存的培養法ではPCLP1強陽性細胞の有する内皮分化能を最大限には再現できていないと考えられる。そこで現在、さらなる増殖因子の検討により、より効率的な内皮細胞分化誘導法の条件探索を続けている。また、PCLP1強陽性細胞は均一な細胞集団ではないため、この細胞集団の中でコロニー形成能を有する細胞の頻度の検討およびクローン化を行っている。さらに、継代培養における増殖能の定量的な評価、免疫染色法およびフローサイトメトリー法による内皮細胞の分化誘導効率の検討も進行中である。

2 ; 移植可能な細胞ソースからの脈管内皮前駆細胞の同定、分離

2-1, 生体内におけるPCLP1強陽性細胞の時空間的分布

新規の脈管内皮前駆細胞であるPCLP1強陽性細胞は、マウス胎生14.5日目の肝臓より分離、同定された。しかし、胎児肝臓はヒトへ応用する際の移植ソースとしては不適である。そこで、同等の性状を有する細胞が発生段階の異なる肝臓および肝臓以外の臓器にも存在するか否かについて検討を行った。評価の基準として、PCLP1の発現強度、試験管内での増殖能、マーカー遺伝子の発現 (Flk1陰性、CD31陰性) の3点を用いた。その結果、マウス胎児肝臓では14.5日目のみならず、11.5日目から出生直前の18.5日目に至るまで同様の細胞が存在することが明らか

となった。さらに、成体型の造血幹細胞が生じる領域として知られる胎生11.5日目のaorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域、および胎生18.5日目の脾臓においても認められたことから、PCLP1強陽性細胞は、胎児発生における造血部位の移行に伴い、複数の造血器官に存在すると考えられた。一方で、出生直前の胎児血（ヒト臍帯血に相当）、マウス成体における主要な造血器官である骨髓、および成体末梢血中にはPCLP1強陽性細胞は認められなかった。ヒト臍帯血においても多数の検体を用いて同様の検討を行ったが、現時点では脈管内皮前駆細胞の活性を有するPCLP1陽性細胞は認められていない。

2-2, マウスES細胞からのPCLP1強陽性細胞の分化誘導

ES細胞は倫理面や技術的な面で課題があるものの、移植医療用細胞ソースとして有望視されているものの一つである。そこで、マウスES細胞を用いて、PCLP1強陽性細胞が誘導可能であるかどうかについて検討した。我々は、他のグループにより既に確立されたES細胞からの血管内皮細胞分化誘導系におけるPCLP1の発現について解析を行った。ES細胞をLIF非存在下、4型コラーゲンコートディッシュ上で培養すると、Flk1陽性の内皮前駆細胞が誘導される（図10）。このFlk1陽性内皮前駆細胞誘導過程におけるPCLP1の発現をフローサイトメトリー法によって解析した結果、胎児肝臓に類似した発現プロファイル、すなわちPCLP1強陽性Flk1陰性の細胞集団を見いだした。またFlk1陽性細胞集団はPCLP1陽性と陰性の二つの亜集団に分離出来ることが明らかとなった。これら3つの細胞集団における増殖能および内皮細胞マーカー分子の発現について検討した。その結果、PCLP1強陽性Flk1陰性細胞は、胎児肝臓のPCLP1強陽性細胞と同様に不均一な細胞集団であり、

様々な形態のコロニーを形成すること、胎児肝臓のPCLP1強陽性細胞に比べると増殖活性は低いこと、培養後形成されたコロニーでは内皮細胞マーカー分子の発現は認められないことが明らかとなった。Flk1陽性PCLP1陽性細胞は内皮細胞マーカー陽性のコロニーを形成したが、増殖活性は極めて乏しかった。一方、Flk1陽性PCLP1陰性細胞は極めて高い増殖活性を示し、増殖した細胞は高頻度に内皮細胞マーカーを発現していた。

以上の結果から、マウスES細胞からFlk1陽性の内皮前駆細胞を誘導する系においては、我々が見出した新規の脈管内皮前駆細胞は誘導されないと思われる。一方で、胎児肝臓では認められなかった増殖活性の高い細胞集団（Flk1陽性PCLP1陰性細胞）は、極めて高い増殖活性を示すことも見出しており新たな展開も期待される。

3; 内皮細胞多様性獲得の分子機構の解明

3-1, 脈管内皮前駆細胞、内皮細胞における遺伝子発現解析

脈管内皮前駆細胞から、成熟した内皮細胞へ分化する過程において重要な役割を果たす因子の同定を目的として、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。脈管内皮前駆細胞としては、マウス胎生11.5日目のAGM領域および肝臓、胎生14.5日目の肝臓から分離したPCLP1強陽性細胞を、分化した内皮細胞としては、胎生14.5日目の胎児上半身、肝臓から分離したStab2陰性内皮細胞およびStab2陽性類洞内皮細胞を用いた。内皮細胞多様性獲得に関わる因子として細胞内で遺伝子発現調節に直接関わる転写因子に注目した。Stab2陰性内皮細胞とStab2陽性類洞内皮細胞との間で発現に差の認められた転写因子のうち11遺伝子についてRT-PCRによる解析を行った。

11 遺伝子のうち5遺伝子については、RT-PCRにおいても顕著な発現の差を示しており、Stab2陽性類洞内皮細胞の分化制御に関わる候補遺伝子として注目している。

3-2, ES細胞からの組織特異的内皮細胞の誘導

ES細胞からの内皮細胞分化誘導系は、試験管内で内皮細胞の分化を解析する優れた系である。我々はこの系を用いて組織特異的な内皮細胞を誘導できるかどうかについて検討した。ES細胞からFlk1陽性内皮細胞を誘導した後、更にVEGF-A存在下で4日間培養するとCD31陽性CD34陽性的の内皮細胞が誘導される(図10)。我々はこの培養系にシグナル分子の阻害剤を添加することでLyve-1陽性Stab2陽性的の内皮細胞が誘導されることを見いだした。この細胞はProx1陰性、Pdpn陰性でありリンパ管内皮細胞というよりはむしろ肝類洞内皮細胞の遺伝子発現パターンを示していた(図8)。現在、マイクロアレイの結果とあわせ、どのような分子機構によって組織特異的内皮細胞の分化が制御されているのかを検討中である。

D. 考察

幹細胞、前駆細胞のもつ性質として高い増殖能と多分化能の二つがあげられる。例えば、ES細胞から誘導したFlk1陽性細胞は血管内皮細胞と壁細胞へと分化可能であり、またヘマンジオブラストは血液細胞と血管内皮細胞への分化能を有している。我々が見いだした新規脈管内皮前駆細胞、PCLP1強陽性細胞は高い増殖能を有するという点は満たすものの多分化能については明らかでない。内皮細胞のみならず壁細胞など他の細胞系譜への分化能力を有しているのかについては興味深い問題である。

OP9ストローマ細胞は、内皮細胞分化誘導活性については非常に優れている反面、この細胞株の使用は、その性質の安定性および移植への実用性において適切でなかった。我々は、PCLP1強陽性細胞をストローマ細胞非存在下で増殖させる培養系を確立し、この培養系に増殖因子を添加することで少なくとも一部はFlk1を発現することを見出した。したがって、ストローマ細胞非依存的な培養系においても内皮細胞へ分化誘導が可能であると考えている。しかし現時点では、高感度のRT-PCR法を解析手段としているため、分化誘導効率、すなわちFlk1陽性細胞の頻度についての詳細は不明である。今後は、免疫染色法やフローサイトメトリー法を併用することにより、定性的のみならず定量的な情報を蓄積する必要がある。また、ストローマ細胞非依存的に増殖させた細胞が、移植により生体に生着するかどうかについては検討すべき重要な課題であり、検討予定である。

PCLP1強陽性細胞は、胎児発生過程においてAGM領域、肝臓、脾臓など複数の造血組織に存在することが明らかとなった。また、ES細胞から内皮細胞を誘導する過程においても出現しており、内皮細胞が分化する過程において普遍的に出現する前駆細胞である可能性が示唆された。既に、成体の末梢血中には骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在し、血管疾患の移植治療へ応用可能であることが報告されている。我々のこれまでの解析結果では、成体末梢血あるいは骨髄にPCLP1強陽性細胞を見いだしていない。従って、既知の血管内皮前駆細胞とPCLP1強陽性細胞は異なる細胞であると考えられる。これらの二つ細胞種が細胞系譜の上でどのような上下関係にあるのか、あるいは関連性のないまったく異なる細胞なのかは興味深い問題である。

ES細胞の分化誘導系を用いた解析から、Flk1陽性細胞からシグナル分子を人為的

に制御することで組織特異的内皮細胞様の表現型を誘導できることが明らかとなった。このように内皮細胞の分化を人為的に方向づけることで、移植の効率化が図れるものと期待している。PCLP1強陽性細胞は、移植後様々な組織の血管への生着が認められたことから、ES細胞から誘導したFlk1陽性細胞と同様、組織特異的内皮細胞への分化能を有していると考えられる。今後は生着したPCLP1強陽性細胞由来内皮細胞の表現型や試験管内でPCLP1強陽性細胞から組織特異的内皮細胞が分化可能であるかについて検討する必要がある。

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、Stab2陰性内皮細胞とStab2陽性類洞内皮細胞との間で、発現に差のある転写因子を複数同定した。これらの転写因子が、組織特異的な内皮細胞の分化に関わるという報告はこれまでにない。我々は、ES細胞からのStab2陽性内皮細胞誘導に成功しており、この系を用いることで実際にこれらの転写因子がStab2陽性内皮細胞の分化に関与しているのかを検討することが可能である。更に、シグナル分子から転写因子へとつながるシグナル伝達の機構を明らかにすることで組織特異的内皮細胞分化の分子機構の詳細を明らかにすることができるものと期待される。

脈管内皮系の増殖、分化階層性について、その起点となる脈管内皮前駆細胞と終点となる組織特異的内皮細胞の両端から解析するという我々の戦略は非常にユニークなものであり、脈管の包括的な理解を実現することで脈管再生医療の基盤確立に寄与できると考えている。

E. 結論

我々の発見したPCLP1強陽性細胞は、これまで報告のある血管内皮前駆細胞とは異なる細胞であり、試験管内でストローマ細胞非依存的に増幅でき、増幅後の

細胞も脈管壁への分化能を保持しているという点で、細胞移植治療を目指す上で有用性の高い細胞であるといえる。一方で、移植可能な細胞ソースから同様の活性をもつ細胞を同定する必要などの課題も残る。また、ES細胞から内皮細胞を誘導する系において、組織特異的な内皮細胞を誘導することが可能であることが明らかとなった。内皮細胞の増殖・分化の人為的な制御は、特定の標的組織を対象とした血管新生誘導など、有効性、効率ともに優れた新たな治療戦略の開発につながるものと期待される。

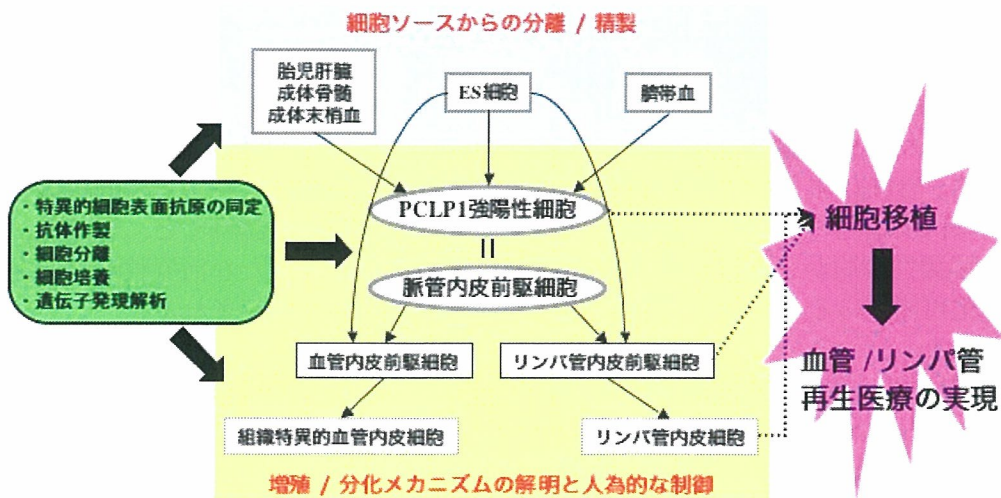


図1：本研究の概略図

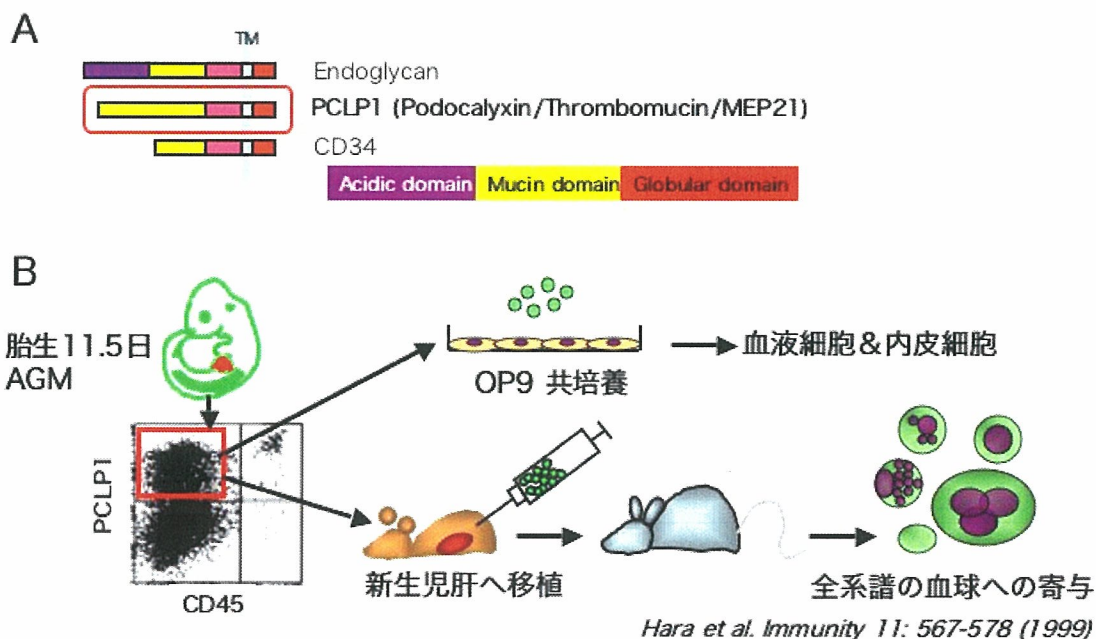


図2：PCLP1の分子構造とマウスヘマンジオプラストにおける発現

(A)PCLP1の分子構造。PCLP1はCD34と同じくシアロムチンファミリーに属する糖タンパク質である。(B)PCLP1はヘマンジオプラストで発現が認められる。OP9共培養系及びマウス新生児肝への移植実験の結果、AGM領域のPCLP1陽性CD45陰性細胞集団にはヘマンジオプラストが含まれると考えられた。

PCLP1 強陽性細胞のソーティング

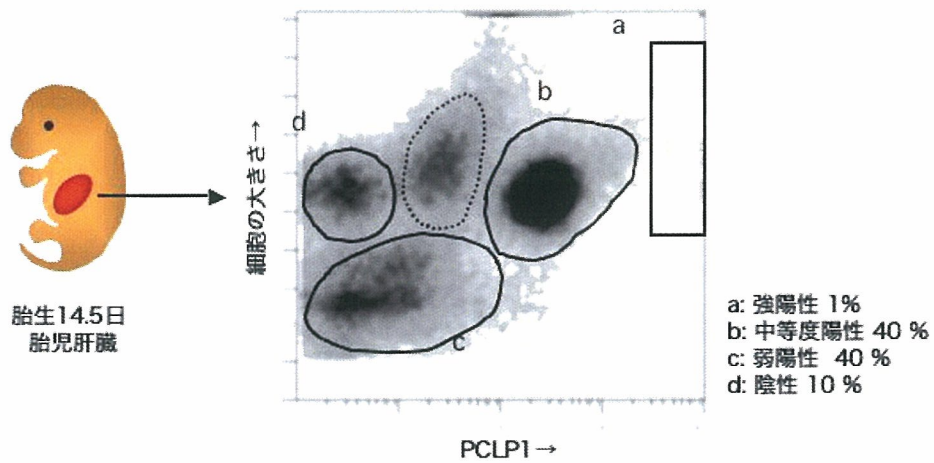


図3：マウス胎児肝臓にはPCLP1強陽性細胞が存在する

胎生14.5日目のマウス胎児肝臓よりセルソーターを用いてPCLP1強陽性細胞を分離した。

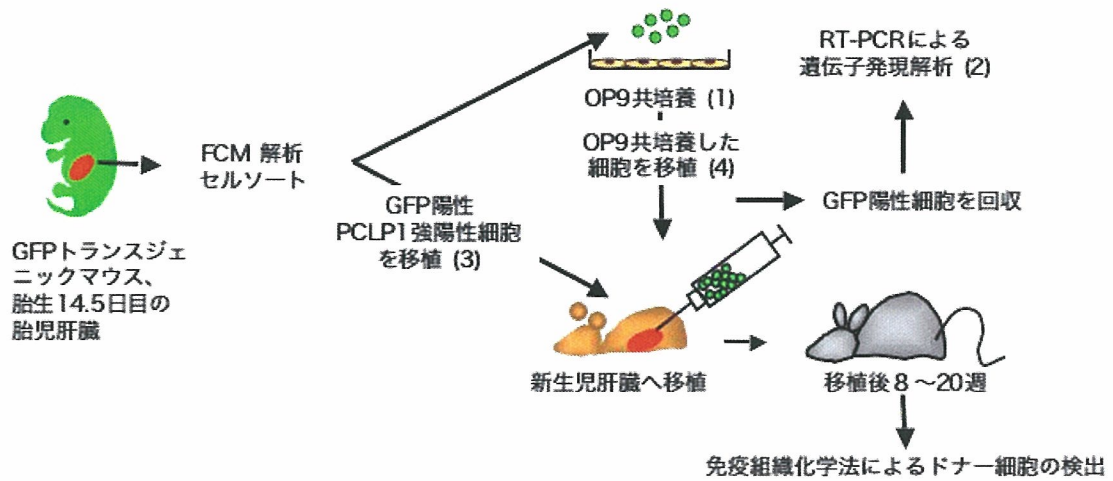


図4：PCLP1 強陽性細胞の性状解析-1-

GFPトランスジェニックマウスからPCLP1強陽性細胞を分離し、OP9共培養系での増殖性を観察し(1)、各種サイトカイン存在下での遺伝子発現の変化をRT-PCR法により検討した(2)。さらに*in vivo*での分化能を検討するため、GFP陽性PCLP1強陽性細胞を直接(3)、またはOP9共培養後に(4)マウス新生児肝臓へ移植し8~20週後に臓器を取り出し免疫組織化学法でドナー由来細胞の性状を解析した。

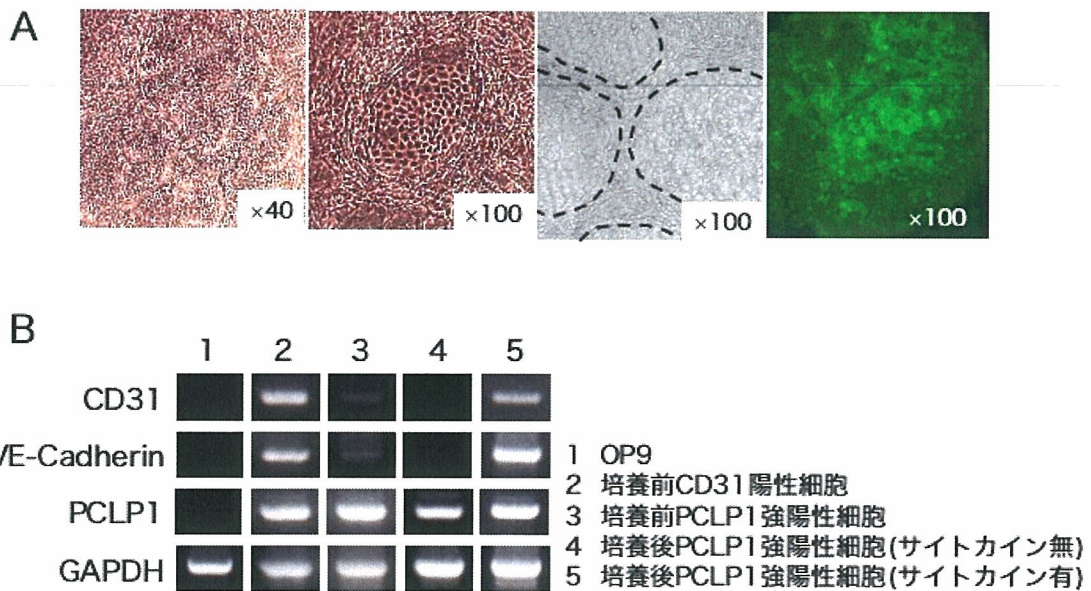


図5：PCLP1強陽性細胞の性状解析—2—

(A)OP9ストローマ細胞上で培養したPCLP1強陽性細胞。GFP陽性PCLP1強陽性細胞をOP9ストローマ細胞と共培養したところ、内皮細胞様の形態のコロニーを形成し、高い増殖性を示した。コロニーの形態は、各種サイトカインの添加により変化を認めなかった。

(B)OP9共培養系における内皮細胞マーカー遺伝子の誘導。培養前後のPCLP1強陽性細胞における内皮細胞マーカー遺伝子の発現をRT-PCRにより検討した。サイトカインの添加により内皮細胞マーカー遺伝子の発現が誘導された。

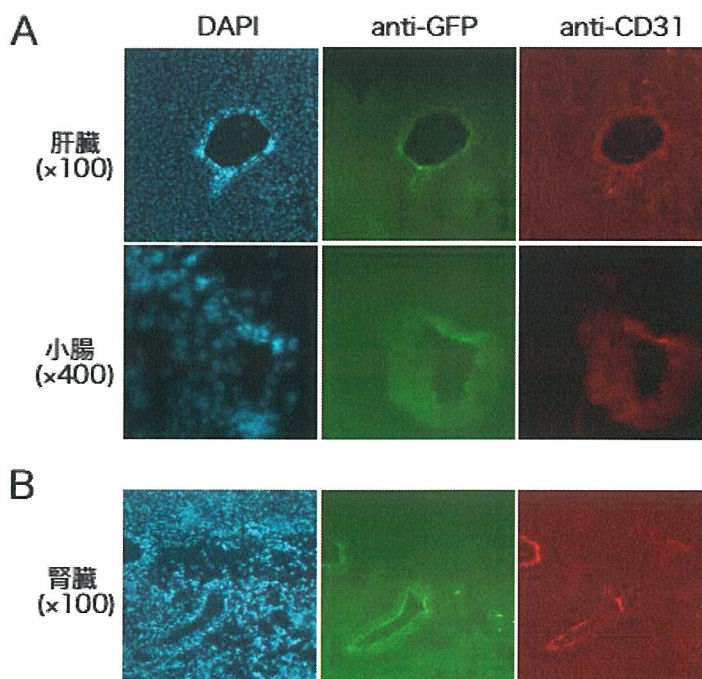


図6：PCLP1強陽性細胞の性状解析—3—

GFPトランスジェニックマウスから分離したPCLP1強陽性細胞を野生型マウス新生児肝臓へ移植し、8-20週後に免疫組織化学法により移植細胞の生着の有無を検討した。胎児肝臓から分離したPCLP1強陽性細胞を直接移植した場合(A)のみならず、OP9共培養後に移植した場合(B)においても、GFP陽性CD31陽性の細胞が血管部位に認められた。

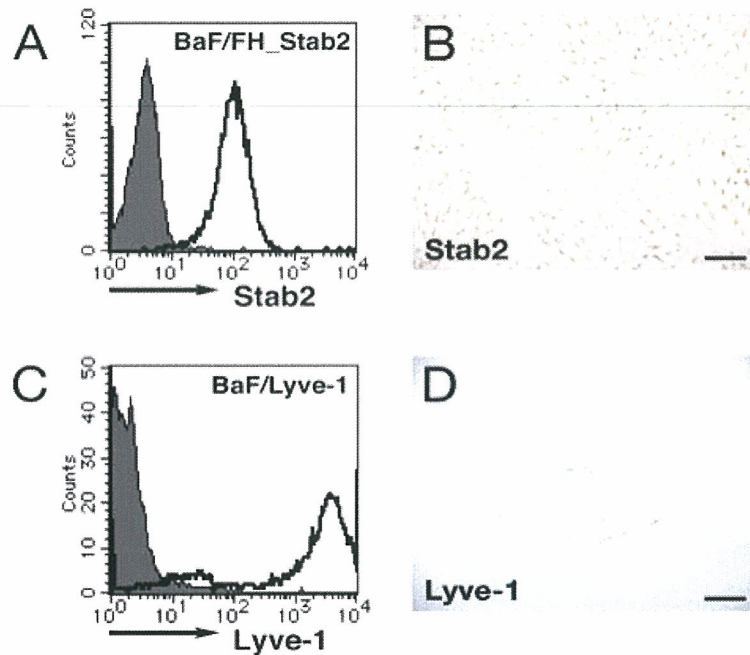


図7：組織特異的内皮細胞を分離、識別可能なヒアルロン酸受容体膜タンパク質
ヒアルロン酸受容体膜タンパク質Stab2およびLyve-1の抗体作製 (A, C) と、それらを用いたマウス成体肝臓の免疫組織化学
(B, D)。

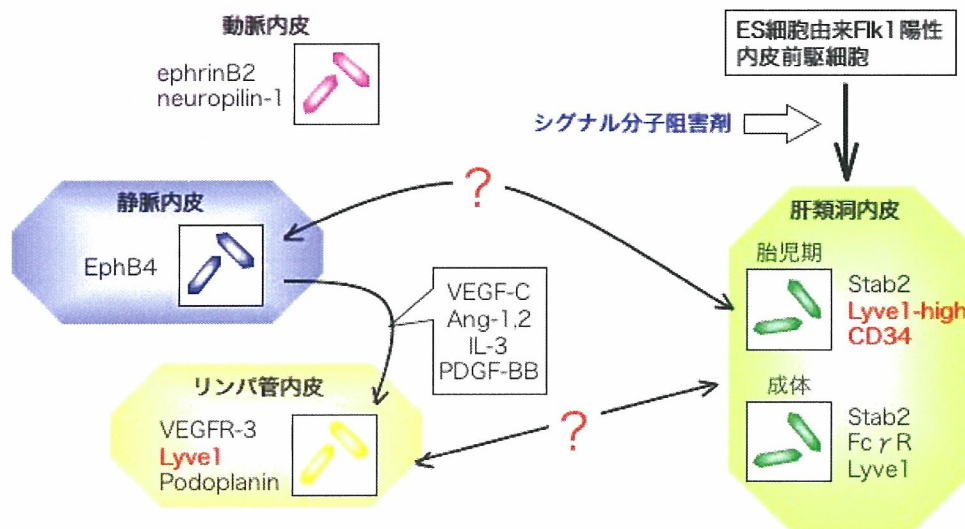


図8：内皮細胞の多様性

生体内には動脈、静脈、リンパ管のほか組織特異的な毛細血管があり、それら構成する内皮細胞は分子レベルで識別可能である。リンパ管内皮細胞と肝類洞内皮細胞はともにリンパ管内皮細胞のマーカであるLyve1を発現するが、Stab2およびPodoplaninの発現の有無により識別可能である。ES細胞より誘導したFlk1陽性内皮前駆細胞はシグナル分子阻害剤を用いることで肝類洞内皮細胞へと分化可能であることが明らかとなった。

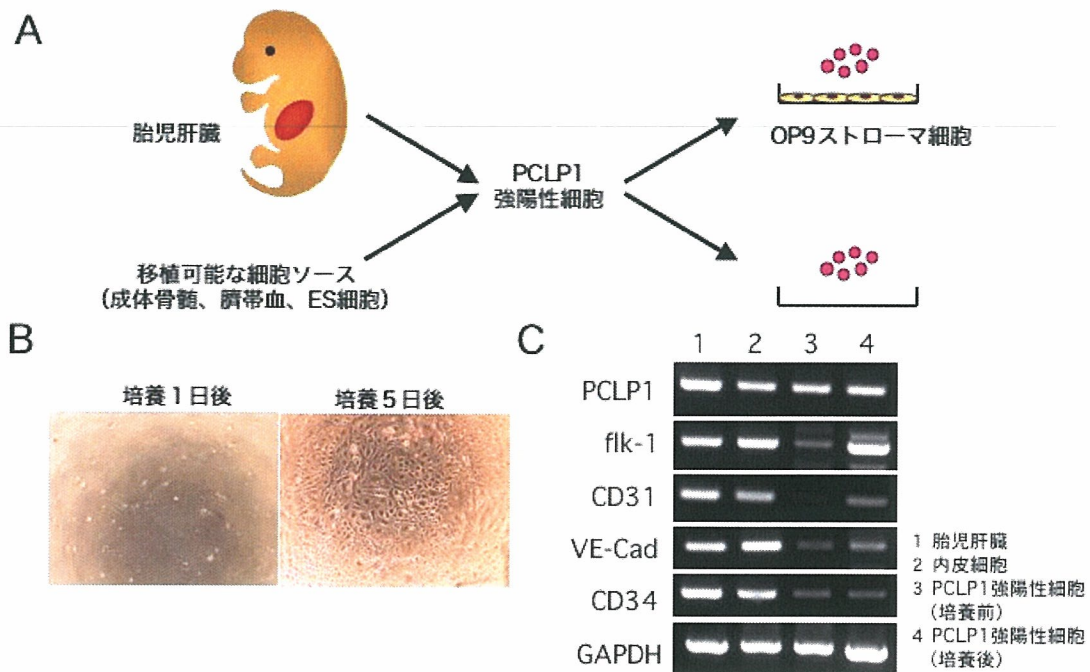


図9：PCLP1強陽性細胞のストローマ細胞非依存的な培養系の確立

(A)ストローマ細胞と共培養した細胞はウイルス感染や免疫反応を引き起こす可能性があるため移植細胞としては不適である。また、細胞ソースとして胎児肝臓は現実的ではない。(B) PCLP1強陽性細胞はストローマ細胞非存在下においても高い増殖活性を示す。(C) ストローマ細胞非存在下で培養したPCLP1強陽性細胞のRT-PCRによる遺伝子発現解析。ストローマ細胞非存在下で培養したPCLP1強陽性細胞は、OP9と共培養したときと同様に、増殖因子を添加することで少なくとも一部は内皮細胞へと分化誘導可能である。

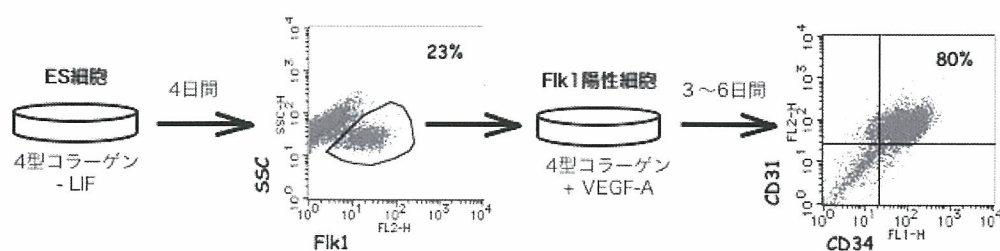


図10：ES細胞からの内皮細胞分化誘導系

ES細胞を4型コラーゲンコートディッシュ上、LIF無しで培養すると4日後にはFik1陽性の内皮前駆細胞が誘導される。Fik1陽性細胞を分離し、更に4型コラーゲンコートディッシュ上でVEGF-A存在下、3～6日間培養するとCD31陽性CD34陽性の内皮細胞が誘導される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

“Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors”

Hidenori Nonaka, Minoru Tanaka, Kaori Suzuki and Atsushi Miyajima. Submitted.

“Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells”

Yasuyoshi Sugano, Masaki Takeuchi, Ayami Hirata, Hirokazu Matsushita, Toshio Kitamura, Minoru Tanaka and Atsushi Miyajima. Submitted.

“Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow”

Minehata K, Takeuchi M, Hirabayashi Y, Inoue T, Donovan PJ, Tanaka M, Miyajima A. *Int J Hematol.* 84(4), 319-27. (2006)

“Transcription elongation factor S-II is required for definitive hematopoiesis”

Ito T, Arimitsu N, Takeuchi M, Kawamura N, Nagata M, Saso K, Akimitsu N, Hamamoto H, Natori S, Miyajima A, Sekimizu K. *Mol Cell Biol.* 26(8), 3194-203. (2006)

“Anti-angiogenic activity of basic-type, selective cyclooxygenase (COX)-1 inhibitors”

Sano H, Noguchi T, Miyajima A, Hashimoto Y, Miyachi H. *Bioorg Med Chem Lett.* 16(11):3068-3072, 2006.

“Tim2 is expressed in mouse fetal hepatocytes and regulates their differentiation”

Watanabe N, Tanaka M, Kaori Suzuki, Atsushi Kumanogoh, Hitoshi Kikutani, and Atsushi Miyajima *Hepatology* (2007) in press

学会発表

Shumpei Yamauchi, Hiroaki Ito, Atsushi Miyajima
Anti-inflammatory activity of endothelial cells in LPS-induced endotoxin shock.
第36回日本免疫学会総会・学術集会
大阪国際会議場（グランキューブ大阪）
平成18年12月11日～12月13日

Hidenori Nonaka, Shumpei Yamauchi, Ayami Hirata and Atsushi Miyajima
Developmental stages of liver sinusoids and endothelial cells defined by the expression of cell surface antigens
20th IUBMB(International Congress of Biochemistry and Molecular Biology) and 11th FAOBMB Congress
Kyoto JAPAN, 2006.6.18～23

Kaori Suzuki, Minoru Tanaka, Natsumi Watanabe, Atsushi Miyajima
Isolation and characterization of p75^{NTR} positive cells from mouse fetal liver
IUBMB(International Congress of Biochemistry and Molecular Biology) and 11th FAOBMB Congress
Kyoto JAPAN, 2006.6.18～23

Hiroaki Ito, Eiji Esashi and Atsushi Miyajima
Role of Oncostatin M in dendritic cell function
Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 2007 "Intracellular and Intercellular Signaling in Dendritic Cell Function" (J8)
Keystone Restort, Colorado, U.S.A.
2007.2.25-3.1

宮島 篤、岡部 繭子、鈴木 香、田中 稔
肝幹細胞の分離と性状解析
第6回日本再生医療学会総会
パンフィコ横浜 平成19年3月13日
～14日

Minoru Tanaka, Yuko Okazaki, Kaori Suzuki, Atsushi Miyajima
Involvement of Lutheran blood group in the maturation of mouse fetal hepatocytes
20th IUBMB(International Congress of Biochemistry and Molecular Biology) and 11th FAOBMB Congress
Kyoto JAPAN, 2006.6.18—23

田中 稔、岡部 繭子、鈴木 香、宮島 篤
肝幹細胞の細胞表面タンパク質の同定と性状解析
第13回肝細胞研究会
旭川グランドホテル 平成18年6月30日
～7月1日

渡辺 夏巳, 田中 稔, 鈴木 香, 熊ノ郷 淳, 菊谷 仁, 宮島 篤
マウス胎仔肝細胞分化における細胞膜表面タンパク質 Tim2 の機能解析
第13回肝細胞研究会
旭川グランドホテル 平成18年6月30日
～7月1日

Natsumi Watanabe, Minoru Tanaka and Atsushi Miyajima
Tim2, a member of the immunoglobulin superfamily, is implicated in liver development
2006 FASEB Summer Research Conferences; Liver Biology, Development and Disease
Snowmass Village, Colorado, U.S.A.,
2006.7.22-27

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得：該当なし
2. 実用新案登録：該当なし
3. その他：該当

II. 研究成果の刊行に関する一覧表