

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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 19 年度 総括研究報告書
主任研究者 宮島 篤
平成 20 (2008) 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／リンパ管再生医療の基盤技術の確立に関する研究	
	宮島 篤	1
II	研究成果の刊行に関する一覧表	17
III	研究成果の刊行物・印刷	19

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

研究課題：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

主任研究者：東京大学分子細胞生物学研究所・教授 宮島 篤

研究要旨

生体内に存在する脈管内皮前駆細胞は、各種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、①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、各種血管およびリンパ管の細胞移植療法における移植細胞源としての可能性を検討した。また、②生体内で多種多様な脈管内皮細胞が形成される分子基盤を明らかにすることで、幹細胞から目的とする組織特異的内皮細胞を選択的に分化誘導するシステムを開発し、脈管内皮前駆細胞の効果的な利用法の確立を目指した。

マウス胎児肝臓に存在する Podocalyxin-like protein1 (PCLP1)強陽性細胞は、ストローマ細胞非存在下において stem cell factor、oncostatin M、basic FGF の添加により増殖し数石状のコロニーを形成した。増殖した細胞は alphaSMA や Mesothelin など間葉系細胞のマーカーを発現する一方で、CD31(PECAM1)や Lyve-1 などの脈管内皮細胞のマーカーは発現していなかった。サイトカイン依存的に増殖した細胞をマウス新生児肝臓に移植したところ、肝臓門脈周囲の間葉系組織に生着が認められ、一部の細胞は CD31 や Lyve-1 を発現していた。PCLP1 強陽性細胞は、生体内では肝臓の表面に存在しており、胎生 14 日目以降では Mesothelin を共発現することから中皮（前駆）細胞であると考えられた。移植実験の結果および発生過程において内皮細胞や壁細胞が中皮組織より生じるとの報告があることから、PCLP1 強陽性細胞は脈管系再生のための細胞源として有用である可能性が示唆された。

ES 細胞から内皮細胞を誘導する系において、VEGF に加え TGF シグナルの阻害剤を添加することにより、胎児型未成熟肝類洞内皮細胞が分化誘導されることを示した。成熟類洞内皮細胞の移植により疾患モデルマウスの症状が改善するとの報告もあることから、本研究で樹立した ES 細胞からの組織特異的内皮細胞の分化誘導系は、あらかじめ試験管内で内皮細胞を分化させたのちに細胞移植に供する治療戦略への利用が考えられる。

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、脳血管疾患はいずれも血管系の構築が深く関与するか、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、外科的血行再建術が治療効果を上げている。一方、血管新生の分子機構の解明が進展したことや、血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、血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。また、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、これら研究を進展させ、①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とともに、②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の実現に向けた研究を展開した。

B. 研究方法

胎児肝臓細胞のフローサイトメトリー解析およびセルソーティング

胎生12.5日肝臓はトリプシン処理により、胎生14.5-16.5日の肝臓はコラゲナーゼ/ディスペラーゼ処理により細胞を分散し、細胞懸濁液を調整した。細胞はラット抗マウスFc受容体モノクローナル抗体にてFc受容体ブロッキング処理を行った後に各種蛍光標識モノクローナル抗体（ラット抗マウスPCLP1、Flk-1、PECAM1）またはビオチン化ラット抗マウスMesothelinモノクローナル抗体を反応させた。ビオチン化抗体についてはストレプトアビジン-APCを反応させ、FACS Calibur (Becton Dickinson社) またはEPICS ALTRA (BECKMANCOULTER社) にて解析した。セルソーティングにはEPICS ALTRAを使用した。

ストローマ細胞非依存的な胎児肝臓PCLP1強陽性細胞培養系の確立

ストローマ細胞を使用しない *in vitro* 増幅系の確立を目的に、培養ディッシュのコートティング、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。

免疫組織化学染色

胎児、新生児および成体肝臓の凍結切片を作製し、ラット抗マウスPCLP1モノクローナル抗体、ヤギ抗マウスPCLP1ポリクローナル抗体、ラット抗マウスMesothelinモノクローナル抗体および蛍光標識ウサギ抗GFPポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行った。未標識抗体の検出には二次抗体として蛍光標識抗ラットIgGまたは蛍光標識抗ヤギIgGを用いた。移植個体の免疫組織化学染色には、ウサギ抗GFPポリクローナル抗体、ラット抗マウスPECAM1モノクローナル抗体およびラット抗マウスLyve-1モノクローナル抗体を用いた。必要に応じて核をDAPIで共染色した。染色後の切片は直ちに蛍光顕微鏡で観察/撮影した。

PCLP1強陽性細胞の新生児肝移植法による *in vivo* 機能解析

胎生12.5日 GFP トランスジェニックマウスの胎児肝臓より PCLP1 強陽性細胞をセルソーターで分離し、ストローマ細胞非依存的培養系で増幅した。これをテスト細胞として野生型新生児肝臓に移植した。新生児肝移植法は他文献 (Yoderら、1997) に準じた。移植 3-5 週後に肝臓を摘出し、ゲノミック PCR および免疫組織化学染色を行った。

組織特異的な内皮細胞の分化制御因子の探索

(1) 遺伝子発現解析

胎生14日目のマウス胎児より肝類洞内皮細胞、Stab2陰性内皮細胞をセルソーターを用いて分離し、RNAを精製、マイクロアレイ解析のサンプルとした。マイクロアレイ解析はAffymetrix社製GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いた。得られたデータは解析ソフトGeneSpringを用いて解析を行った。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。

(2) *In vitro* 分化誘導系

マウスCCE ES細胞はゼラチンコートディッシュ上、LIFを添加して維持した。Flk1陽性の脈管前駆細胞の誘導は、LIF非存在下、IV型コラーゲンコートディッシュ上で4日間培養することで行った。Flk1陽性脈管前駆細胞は磁気ビーズを用いて分離したのち、さらに3-6日間、VEGFを加えて培養し内皮細胞へと分化させた。TGFシグナルの阻害剤は培養4-6日目で加えた。内皮細胞の分化の評価は、フローサイトメトリ法、RT-PCR法、異物取り込み解析などで行った。

C. 結果

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

PCLP1は、腎系球体上皮細胞に発現する膜タンパク質として同定されたが、その後、我々を含むいくつかのグループの研究成果により、造血幹細胞や、血液細胞と血管内皮細胞の共通の前駆細胞であるヘマンジオ

ブラストにおいても発現することが明らかとなった。

肝臓は、成体においては解毒、タンパク合成などさまざまな代謝反応が行われる臓器であるが、胎児では造血器官として機能することが知られている。すなわち、胎児肝臓には造血幹細胞が維持/増幅しうる微小環境(幹細胞ニッチ)が備わっている。成体における主要な造血組織は骨髄であり、骨芽細胞が造血幹細胞の維持に重要であることが知られている。胎児期の主要な造血組織である肝臓においては、肝芽細胞に造血支持機能がある可能性が示唆されているが、十分な解析はなされていない。

我々はまず始めに、マウス胎児肝臓においてヘマンジオブラストのマーカであるPCLP1を発現する細胞が、何らかの幹細胞・前駆細胞活性を有する細胞である可能性について検討し、前年度までに以下の結果を得た。

1) マウス胎生14日目の肝臓にはPCLP1の発現強度が異なる4つの細胞集団、すなわち、PCLP1強陽性、PCLP1中等度陽性、PCLP1弱陽性、PCLP1陰性細胞が存在する。

2) PCLP1強陽性細胞は、OP9細胞株をストローマ細胞として培養すると高い増殖活性(数十倍-)を示し、敷石状のコロニーを形成した。

3) OP9との共培養により形成されたPCLP1強陽性細胞由来のコロニー形成細胞は、そのままでは内皮細胞マーカを発現しないが、VEGFを添加するとPECAM1、VE-Cadherin、CD34などの内皮細胞マーカを

発現した。また、培養前後のPCLP1強陽性細胞では、リンパ管内皮細胞マーカーであるLyve-1, podoplanin, Prox-1の発現も認められた。

4) OP9共培養前後のPCLP1強陽性細胞を移植すると、移植細胞は肝臓、小腸、腎臓、心臓などの血管壁に生着した。

5) PCLP1強陽性細胞はストローマ細胞非存在下においても、培養条件により高い増殖活性(70倍⁻)を有した。

6) ストローマ細胞非依存的培養系では、ストローマ細胞存在下で培養した場合と比較し成熟内皮細胞への分化誘導効率が低下した。

7) PCLP1強陽性細胞は、マウス肝臓において、胎生14.5日目のみならず、11.5日目から18.5日目まで存在する。肝臓以外では胎生11.5日目のaorta-gonad-mesonephros (AGM)領域、胎生18.5日目の脾臓においても認められた。

1-4の結果より、マウス胎生14.5日目の肝臓に存在するPCLP1強陽性細胞は、高い増殖活性を有し、*in vitro* (ストローマ細胞存在下) および*in vivo* においてリンパ管・内皮細胞へと分化可能な新規の脈管内皮前駆細胞であると考えられた。また、同様の発現様式を示す細胞が、11.5日目のAGM領域や18.5日目の脾臓など造血組織に存在することから、PCLP1強陽性脈管内皮前駆細胞は、発生過程に存在する前駆細胞である可能性が考えられた。しかしながら、PCLP1強陽性細胞は、(a)ストローマ細胞の有無によってリンパ管・内皮細胞への分化誘導効

率が異なること、(b)生体内における存在部位の情報が不十分であることなどから、細胞移植療法等に応用可能な前駆細胞である可能性は十分には示せていなかった。

そこで、平成19年度は

A) ストローマ細胞非存在下におけるPCLP1強陽性細胞の詳細な性状解析

B) 移植実験についての詳細な検討

C) 生体内におけるPCLP1強陽性細胞の存在部位についての検討

を行うことで、PCLP1強陽性細胞が当初の仮説通り、細胞移植療法へと利用可能な脈管内皮前駆細胞である可能性を検証しようと試みた。

A) ストローマ細胞非存在下におけるPCLP1強陽性細胞の詳細な性状解析

ストローマ細胞非存在下における至適な培養条件を探索するために、基本培地、血清、培養皿のマトリックスクーティング、サイトカインの有無などを様々な組み合わせで検討した。至適であるかどうかについては、増殖能、増殖した細胞の形態、マーカー遺伝子の発現を指標とし、ストローマ細胞存在下の培養と同等の結果が得られることを目標とした。その結果、alpha-MEM、10%血清、IV型コラーゲンコートで、stem cell factor (SCF)、oncostatin M (OSM)、basic fibroblast growth factor (bFGF)の添加により、ストローマ細胞存在下に匹敵する増殖能を示し、敷石状の形態を呈するコロニーが出現することが明らかとなった(図1A)。このときの内皮細胞マーカー遺伝子の発現を、

フローサイトメトリーおよびRT-PCRにより検討したところ、Flk-1の発現は認められるものの、PECAM1はほぼ陰性であり、成熟内皮細胞への分化は誘導できていないと考えられた(図1B, C)。そこで、増殖しコロニーを形成した細胞の形質を明らかにするために、胚発生的に脈管内皮細胞と近縁な間葉系細胞、すなわち平滑筋細胞、繊維芽細胞、中皮細胞などのマーカー遺伝子の発現を検討した。その結果、WT1、Mesothelin、vimentin、alpha SMAなど平滑筋細胞や中皮細胞で発現するマーカーの発現が認められた(図1C)。以上の結果から、ストローマ細胞非存在下で増殖しコロニーを形成する細胞は、主に間葉系細胞であると考えられた。

B) 移植実験についての詳細な検討

ストローマ細胞非存在下で培養し、増幅したPCLP1強陽性細胞は、*in vitro*では脈管内皮細胞への分化は認められなかった。しかしながら、間葉系細胞から脈管内皮細胞への分化の報告もあることから、移植後、生体内で周辺組織から何らかの作用を受けることにより内皮細胞へと分化する可能性は十分に考えられる。そこで、GFPトランスジェニックマウスより分離したPCLP1強陽性細胞をストローマ細胞非存在下で培養し、増幅させたのち、マウス新生児肝移植を行った。まず、生着の有無を確認するために、GFPトランスジェニックの有无をゲノミックPCRにより検討した。その結果、肝臓組織片由来のゲノムDNAにおいてGFPトラ

ンスジェニックが発見された(図2A)。次に、生着部位を明らかにするため、抗GFP抗体を用いた免疫組織化学染色により肝臓組織を観察した。その結果、GFP陽性細胞は門脈および胆管周囲にクラスター状に集積していることが明らかとなった(図2B)。このときのマーカー遺伝子の発現を検討したところ、一部のGFP陽性細胞で内皮マーカーPECAM1あるいはリンパ管マーカーLyve-1の発現が認められた(図2B)。GFP陽性細胞は、中皮領域には認められなかった。以上の結果から、移植細胞はレシピエントの肝臓内に生着し、少なくとも一部は脈管内皮細胞と間葉系細胞に分化/機能していると考えられた。

C) 生体内における存在部位についての検討

これまでの解析結果から、PCLP1強陽性細胞はマウス胎児肝臓において胎生11.5日目から18.5日目まで継続して存在することが示されている。しかしながら、これまでの解析は胎児肝臓をコラゲナーゼにより分散したのちフローサイトメトリー法により行ったものであり、肝臓中の局在部位については不明であった。PCLP1強陽性細胞の組織学的情報は、この細胞の性状を理解する上で有効であると考え、免疫組織化学染色による観察を行った。胎生11.5日目から成体までの肝臓組織を観察したところ、PCLP1のシグナルが最も強い部位は胎児肝臓の表層であることが明らかとなった(図3A)。さらに胎生16.5日の胎児肝臓の中

皮組織を顕微鏡下で剥離し、中皮と中皮以外の細胞を別々に蛍光標識抗PCLP 1抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った結果、PCLP 1強陽性細胞は中皮組織サンプルからのみ検出され、非中皮領域(実質領域)サンプルからは検出されなかった(図3B)。肝臓の表層には一層の中皮組織が存在すること、また(A)で述べたように、培養したPCLP1強陽性細胞は中皮細胞のマーカーであるWT1やMesothelinを発現していたことから、PCLP1強陽性細胞は中皮系細胞であると考えられた。興味深いことに、生体のPCLP1強陽性細胞は胎生14.5日目以前では、Mesothelinを発現していなかった。したがって、PCLP1の発現を指標にすることで、Mesothelinを発現する以前の未分化な中皮前駆細胞をマークできる可能性が示唆された。

内皮細胞が多様性を獲得する分子機構の解明

肝臓の血管系には、少なくとも門脈、肝静脈、肝動脈、類洞、リンパ管の5種類の血管が存在する。肝類洞は肝特異的な毛細血管網であり、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。すなわち、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。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活性が報告されている。肝臓には様々な血管が存在すること、また肝臓の体積は多臓器に比して極めて大きいこと、内皮細胞を含む分画を多量に分離することが可能であることなどから肝臓は血管内皮細胞多様性獲得の様式や分子機構を解析するモデル臓器として適している。

我々は平成18年度までに、以下のことを明らかにしてきた。

1) 組織特異的な血管内皮細胞を分離・識別するマーカー分子の同定

肝臓特異的な肝類洞内皮細胞、リンパ管内皮細胞、それ以外の血管内皮細胞をマーカー分子の発現に基づいて明確に区別可能であることを、フローサイトメトリー、RT-PCRなどにより明らかにした。また、肝類洞内皮細胞がマウス発生過程のどの時期から、他の内皮細胞と区別可能であるかを免疫組織化学により明らかにした(図4)。

2) 組織特異的な血管内皮細胞が多様性を獲得する分子機構の解明

マイクロアレイによって肝類洞内皮細胞と、それ以外の血管内皮細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、それぞれの分化を制御する候補遺伝子を多数同定した。ES細胞からの内皮細胞誘導モデルにおいてStab2陽性、Lyve-1陽性の肝類洞内皮細胞が誘導される培養条件を見出した。

平成19年度では、上記1、2の研究を更に推進させた。

我々は既に、ES細胞より誘導したFlk1陽性脈管前駆細胞を、TGFシグナルの阻害剤存在下で培養することにより肝類洞内皮細胞様の内皮細胞を誘導できることを見出していたが、今回は更に誘導条件および誘導された内皮細胞の性状について詳細な解析を行った。

ES細胞由来Flk1陽性脈管前駆細胞からのCD34陽性CD31陽性内皮細胞の誘導は、VEGFを添加することにより培養3日目において既に認められる。誘導された内皮細胞は、培養6日目まで増殖を続ける(図5)。まず始めに、6日間の培養期間において、効率よくStab2陽性内皮細胞が誘導される条件を検討した。その結果、TGFシグナルの阻害剤を培養3日目から6日目まで添加した場合と、培養開始時から添加した場合とでは、前者の方が効率よく(2倍以上)Stab2陽性内皮細胞を誘導できることが明らかとなった。

次に、ES細胞から誘導された内皮細胞の特徴を明らかにするために、培養3日目から6日目に阻害剤を添加した細胞と、添加しなかった細胞との間で、マーカー分子の発現を比較した。その結果、阻害剤(−)群は、内皮細胞マーカーのCD31およびCD34を発現するが、Stab2などの肝類洞内皮細胞マーカーやLyve-1, podoplaninなどのリンパ管内皮細胞マーカーを発現しないこと、阻害剤(+)群では、CD31、CD34に加え、Stab2、Lyve-1、factor VIII (F8)などの肝類洞内皮細胞マーカーを発現するが、podoplaninやCcl21cなどのリンパ管内皮細胞

マーカーを発現しないことが明らかとなった。阻害剤(+)の内皮細胞は、成体型成熟肝類洞内皮細胞のマーカーであるFcyRsは発現していなかった。胎児型未成熟肝類洞内皮細胞はCD34陽性FcyRs陰性であることから、阻害剤(+)で誘導されたStab2陽性内皮細胞は胎児型未成熟肝類洞内皮細胞であると考えられた(図4)。

成体型成熟肝類洞内皮細胞の形態的な特徴にfenestraeがある。阻害剤(+)でES細胞から誘導された内皮細胞が、この特徴を有するかどうかを検討するために、走査型電子顕微鏡による観察を行ったが、阻害剤(+)で誘導された内皮細胞にはfenestraeは認められなかった。前述のマーカー遺伝子の発現(CD34+, FcyRs-)と同様、この結果は、阻害剤(+)のStab2陽性内皮細胞が胎児型未成熟肝類洞内皮細胞であることを示唆する。

マウス胎生14日目において、胎児型未成熟肝類洞内皮細胞は、他の内皮細胞に比べて高いエンドサイトーシス活性を有している。そこで、阻害剤添加によりin vitroでES細胞から誘導した胎児型未成熟肝類洞内皮細胞においても同様の機能的差異が認められるか否か検討した。阻害剤(+)で誘導した内皮細胞は、阻害剤(−)と比較しアセチル化LDLの取り込み活性が3〜4倍、高かった。また、阻害剤(+)の内皮細胞においてはヒアルロン酸の取り込みが認められたが、阻害剤(−)の内皮細胞では認められなかった。したがって、阻害剤(+)でES細胞から誘導した内皮細胞は、機能的

にも胎児型未成熟肝類洞内皮細胞と同様であることが確認された。

マイクロアレイ解析により同定された、肝類洞内皮細胞でより強く発現する遺伝子は、組織特異的内皮細胞の分化に重要であることが予想された。そこで、これら遺伝子について、ES細胞からの胎児型未成熟肝類洞内皮細胞分化誘導系における発現を検討した。阻害剤(+) (-)での発現をRT-PCRによって確認した結果、今回調べた11遺伝子については顕著な差を示すものは存在しなかった。

D. 考察

PCLP1強陽性細胞の脈管内皮前駆細胞としての可能性

本年度の研究成果から、胎児肝臓に存在するPCLP1強陽性細胞は中皮（前駆）細胞である可能性が示唆された。中皮細胞は胚発生過程において、内皮細胞や壁細胞にも分化することがトリ胚や遺伝子改変マウスを用いた研究から示されており、ストローマ細胞存在下でPCLP1強陽性細胞を培養した後に脈管内皮細胞マーカー陽性の細胞が誘導されたことは、この現象を*in vitro*で再現していたと考えられる。一方、ストローマ細胞非存在下では、成熟脈管内皮細胞マーカーの誘導は認められないことから、ストローマ細胞からのシグナルが、*in vitro*における未分化中皮細胞から内皮細胞への分化誘導に必要であると考えられた。しかしながら、移植実験の結果、ストローマ細胞非存在下で培養したPCLP1強陽性細胞は、

生体内では中皮組織ではなくむしろ肝臓門脈内皮細胞および周囲の間葉系細胞へと分化し得ることが明らかとなった。したがって、本年度の研究成果からは *in vitro*培養系では、脈管内皮細胞ではなく主に中皮細胞の性質を有する細胞が増幅されているものの、*in vivo*ではこれらの細胞が脈管内皮および脈管壁へと分化しうる可能性が示された。さらに、移植実験では、既存の細胞をあらかじめ除去しておくことにより生着率が劇的に向上することが様々な移植モデルにおいて明らかにされていることから、既存の脈管内皮を障害するなどの処理を施すことにより、培養後のPCLP1強陽性細胞がより効率良く脈管内皮へ分化する可能性も残されている。

胎児肝臓に存在するPCLP1強陽性細胞は未分化中皮細胞であること、同細胞はストローマ細胞非存在下で増幅可能なこと、中皮細胞は胚発生過程では脈管系の細胞へと分化することを考え合わせると、発生過程において未分化中皮細胞から内皮細胞への分化誘導因子を同定することにより、我々が目的としていた、PCLP1強陽性細胞を用いた脈管内皮再生医療が実現可能であると考えられる。

ES細胞より誘導した肝類洞内皮細胞の有用性

ごく最近、分化した内皮細胞が細胞移植療法の細胞源として有用であるとの報告が国外の研究グループよりなされた (Follenziら、2008)。血液凝固因子であるF8を欠損

するマウスはhemophiliaモデルマウスとして知られている。一方で、肝類洞内皮細胞はF8を産生する細胞として知られている。そこで、野生型マウス由来の肝類洞内皮細胞をF8欠損マウスへ移植したところhemophiliaの症状の改善が認められた。しかしながら、生体からは少量の肝類洞内皮細胞しか調製できないことから、この細胞の医療応用には大きな課題がある。

本研究では、ES細胞からの胎児型未成熟肝類洞内皮細胞の分化誘導が可能であることを明らかにした。この分化誘導系の利点は細胞の大量調製が可能であることであり、上述の細胞移植療法に利用可能であると考えられる。

また、肝類洞内皮細胞はF8の産生以外にも、血中ヒアルロン酸の取り込みや、免疫反応の抑制、肝実質細胞の増殖促進など、肝機能や生体防御の側面からも大変興味深い活性を有している。今後、このような活性と疾患との関わりについて明らかにし、我々の構築した肝類洞内皮細胞の分化誘導法を応用することで、細胞移植療法の適用幅を拡大できる可能性もある。

ES細胞からの分化誘導系は、脈管内皮細胞の初期発生を理解する上でも有用である。マウスを用いた初期発生の解析は、得られる細胞数が少量であること、生体内での遺伝子操作には遺伝子改変マウスの作成など多大な労力と時間が必要であることなどから容易ではない。しかし、ES細胞を用いることで、これら問題についての一部は克服され、この分野における研究がさらに推進

すると期待される。また、ES細胞での知見はiPS細胞にも適応可能であると考えられるので、ヒトiPS細胞を用いた細胞治療への応用が期待される。

F. 結論

マウス胎児肝臓に存在するPCLP1強陽性細胞は、*in vitro*においてストローマ細胞非依存的に増殖可能であり、培養後に移植すると一部はPECAM1やLyve-1を発現するようになる。PCLP1強陽性細胞はマウス胎生14.5日目まではMesothelin陰性であり、その後、Mesothelin陽性となる中皮前駆細胞であると考えられた。中皮細胞は発生過程において内皮細胞や壁細胞へと分化することが知られており、脈管再生医療の移植細胞源として利用できる可能性が考えられた。

ES細胞から胎児型の未成熟肝類洞内皮細胞が誘導可能であることが明らかとなった。ES細胞を用いた分化誘導系は細胞の大量調製が可能であり、脈管内皮細胞の発生研究や、分化した内皮細胞を用いた細胞移植療法へと応用可能である。

参考文献

- Chapman et al., Tissue and Cell 39, 343-351 (2007)
- Pererz-Pomarres et al., Dev. Dyn. 229, 465-474 (2004)
- Munoz-Chapuli et al., Tex Heart Inst J, 29, 243-9 (2002)
- Perez-Pomares et al., Int. J. Dev. Biol. 46,

1005-1013 (2002)

Wilms et al., *Development* 132, 5317-5328 (2005)

Follenzi A et al., *J Clin Invest* 118, 935-945 (2008)

G. 研究発表

論文発表

Watanabe N., Tanaka M., Suzuki K., Kumanogoh A., Kikutani H., and Miyajima A. Tim2 is expressed in mouse fetal hepatocytes and regulates their differentiation.

Hepatology 45(5):1240-49, 2007.

Tanimizu N., Miyajima A. and Mostov KE. Liver Progenitor Cells Develop Cholangiocyte-type Epithelial Polarity in Three Dimensional Culture. *Mol Biol Cell*. 18(4):1472-9. 2007.

Nonaka H., Tanaka M., Suzuki K. and Miyajima A. Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev Dyn*. 236(8):2258-67, 2007.

Tanimizu N. and Miyajima A. Molecular mechanism of liver development and regeneration. *Int Rev Cytol*. 259:1-48, 2007.

Sugano Y., Takeuchi M., Hirata A., Matsushita H., Kitamura T., Tanaka M. and Miyajima A. Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells.

Blood 111, 1167-72, 2008.

Suzuki K., Tanaka M., Watanabe N., Saito S., Nonaka N. and Miyajima A.

P75 neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver. *Gastroenterology in press*

Nonaka H., Watabe T., Saito S., Miyazono K. and Miyajima A. Generation of liver-specific endothelial cells from mouse embryonic stem cells by inhibition of TGF- β /activin signaling. *Submitted*

学会発表

Ito H., Esashi E. and Miyajima A.

Role of Oncostatin M in dendritic cell function.

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 2007 "Intracellular and Intercellular Signaling in Dendritic Cell Function"

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
パシフィコ横浜 平成19年3月13日～
14日

谷水 直樹、宮島 篤、Keith Mostov
3次元培養中での肝前駆細胞の胆管上皮
細胞への分化
第14回肝細胞研究会
城山観光ホテル(鹿児島)、2007.6.22-23

鈴木 香、田中 稔、宮島 篤
p75^{NTR}抗体を用いたマウス肝形成にお
ける間葉系細胞の解析
第14回肝細胞研究会
城山観光ホテル(鹿児島)、2007.6.22-23

河村 由布子、田中 稔、齊藤 滋、宮
島 篤
成体の正常肝臓における肝幹細胞の分離
第14回肝細胞研究会
城山観光ホテル(鹿児島)、2007.6.22-23

マーカー遺伝子の発現より明らかとなっ
た血管内皮細胞の時空間的多様性
野中 秀紀、鈴木 香、田中 稔、宮島
篤
BMB2007(第30回日本分子生物学会年
会、第80回日本生化学会大会合同大会)
平成19年12月11日～15日、横浜

河村 由布子、齊藤 滋、田中 稔、宮島 篤
マウス成体肝臓における肝幹細胞の同定
BMB2007(第30回日本分子生物学会年会 第80
回日本生化学会大会 合同大会)
パシフィコ横浜、2007.12.11-15

田中 稔、鈴木 香、齊藤 滋、宮島 篤
抗 p75^{NTR}抗体を用いた胎生肝臓にお
ける間葉系前駆細胞の分離・同定
BMB2007(第30回日本分子生物学会年
会 第80回日本生化学会大会合同大会)
パシフィコ横浜、2007.12.11-15

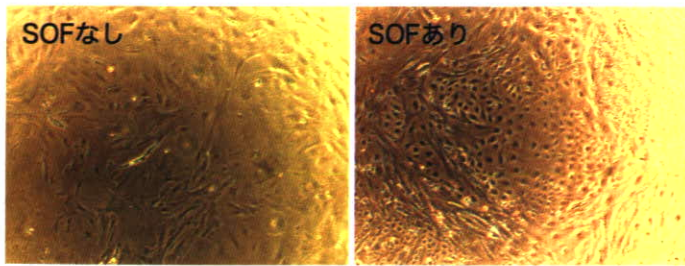
Sugano Y., Takeuchi M., Hirata A.,
Matsushita H., Kitamura T., Tanaka M.
and Miyajima A.
Junctional adhesion molecule-A (JAM-
A/JAM-1/F11R) marks long-term
repopulating hematopoietic stem cells.
*The American Society of Hematology 49th
Annual meeting and exposition*
Georgia World Congress Center, Atlanta,
Georgia December 8-11, 2007

菅野安喜、田中稔、宮島篤
Junctional adhesion molecule-A (JAM-
A/JAM-1/F11R)は、長期骨髄再構築能を
有する造血幹細胞を分離する有用なマ
ーカーである。
BMB2007(第30回日本分子生物学会年
80回日本生化学会大会 合同大会)
パシフィコ横浜、2007.12.11-15

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：該当なし

A



B

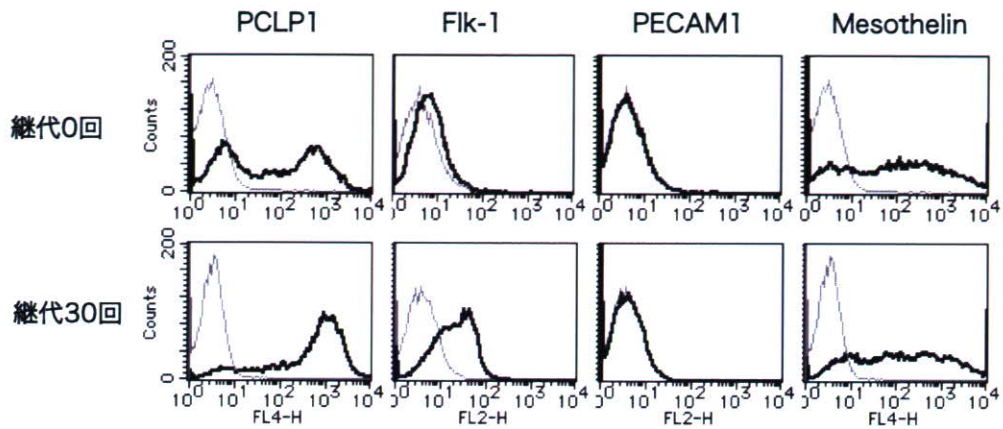


図1： PCLP1強陽性細胞のストローマ細胞非依存的in vitro培養系

(A) 胎生12.5日肝臓よりPCLP1強陽性細胞をセルソーターで分離し、SOF存在下または非存在下で培養し、7日に撮影した。SOF存在下では増殖活性が高い敷石状のコロニーを生じた。(B) PCLP1強陽性細胞はSOF存在下で継代培養可能であり、Flk-1および中皮マーカの発現が見られたが成熟内皮マーカは陰性であった。

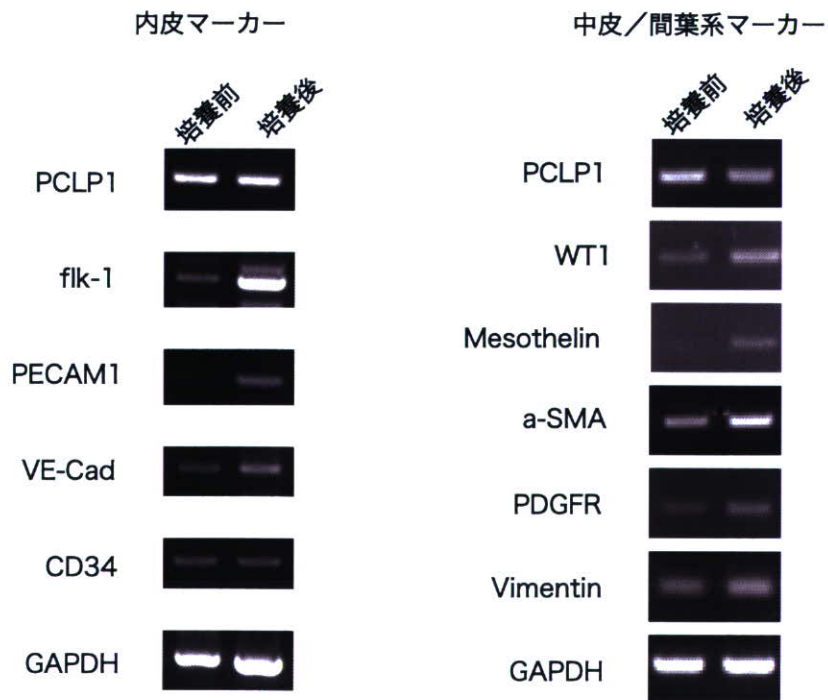


図1C： PCLP1強陽性細胞の内皮マーカおよび中皮/間葉系マーカの発現解析

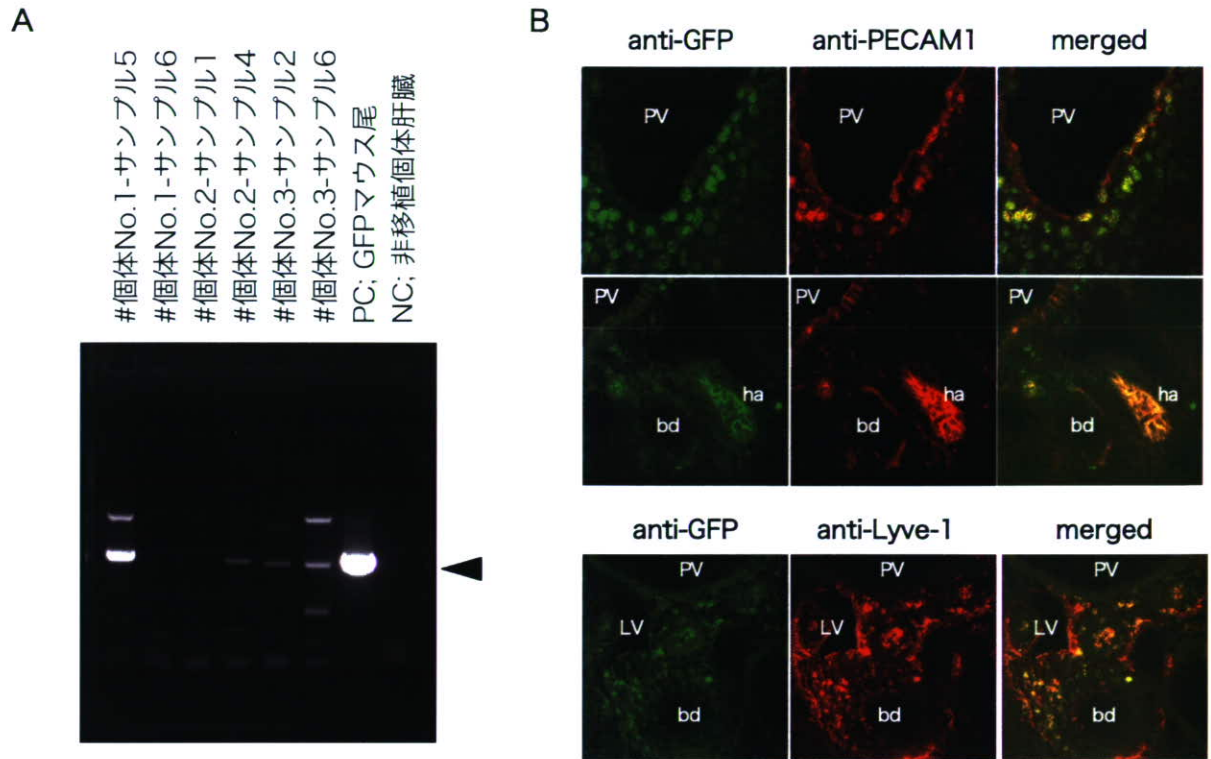


図2: ストローマ非依存的培養系で増幅したPCLP1強陽性細胞の*in vivo*機能解析

GFPトランスジェニックマウスから分離したPCLP1強陽性細胞をストローマ非依存的に増幅し、野生型マウス新生児肝臓へ移植した。3-5週後に肝臓を摘出し、ゲノミックPCRにてGFP遺伝子を検出した (A)。肝臓切片の免疫組織染色により、門脈壁またはその周囲にGFP陽性細胞を認めた (B)。GFP陽性細胞の一部はPECAM1陽性門脈壁および肝動脈壁、ならびにLyve-1陽性リンパ管壁に認められた。PV:門脈、ha;肝動脈、bd;胆管、LV;リンパ管

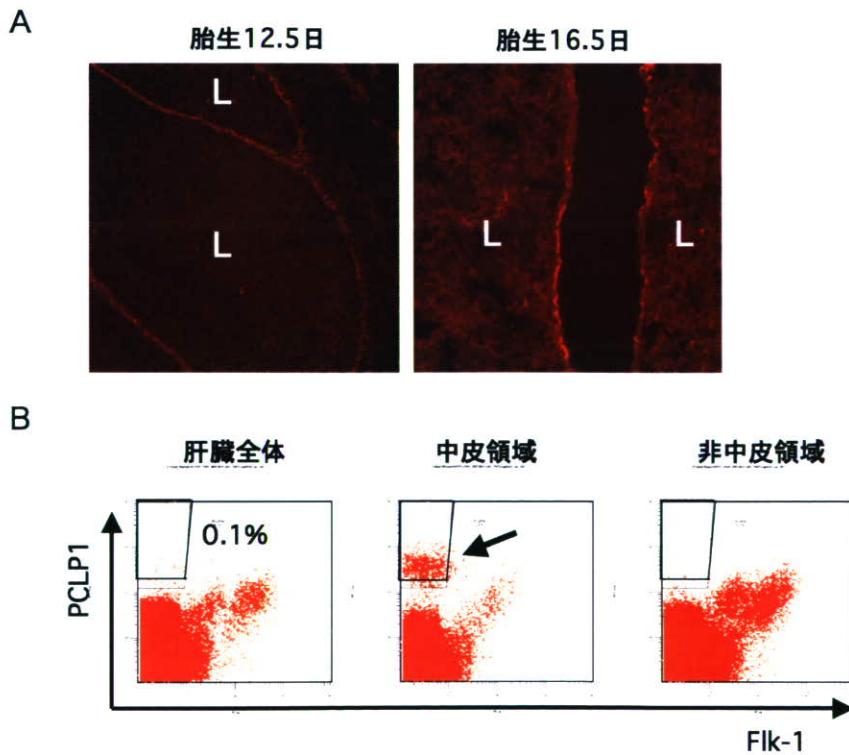


図4: PCLP1強陽性細胞は胎児肝臓のローブ表面に存在する

(A) ラット抗マウスPCLP1ポリクローナル抗体を用いた胎児肝臓切片の免疫組織染色。L; ローブ
 (B) 胎生16.5日肝臓全体 (左)、中皮領域 (中) および非中皮領域 (右) のフローサイトメトリー解析。

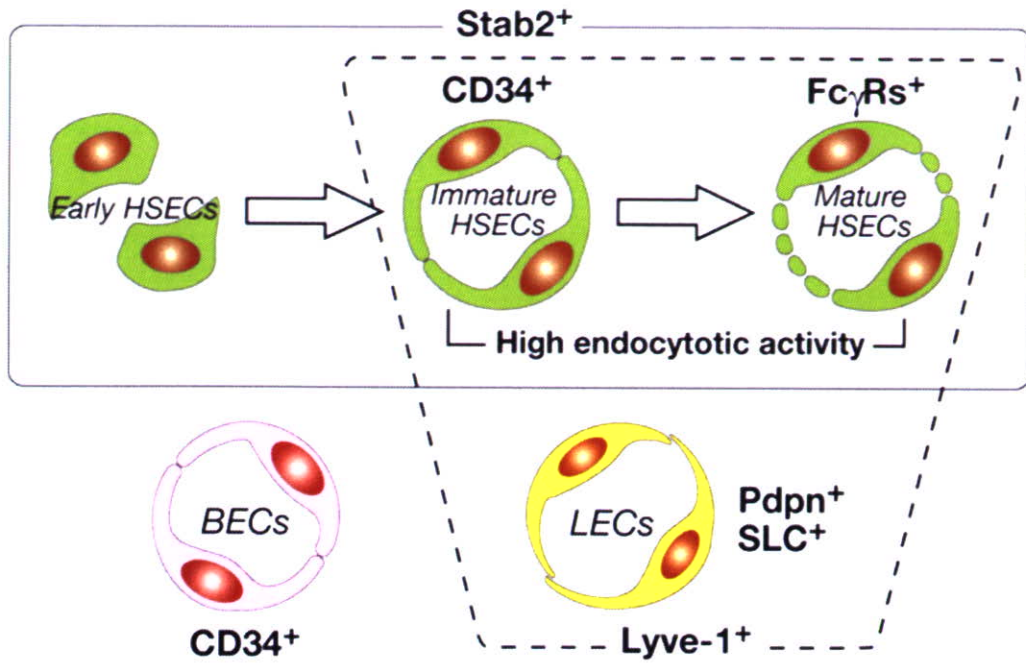


図4：肝類洞内皮細胞、リンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞の識別
肝類洞内皮細胞（HSEC）のマウス発生過程における変化と、リンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞の特徴

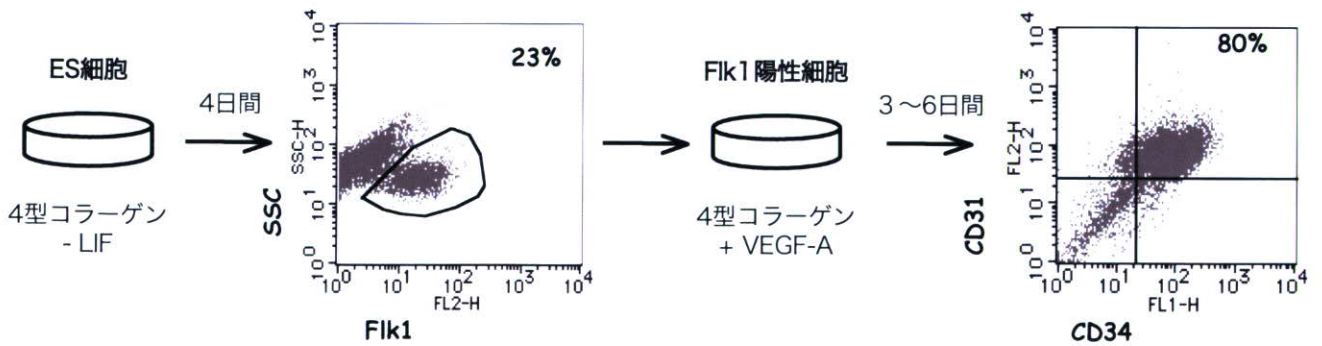


図5：ES細胞からの内皮細胞分化誘導系

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。

II 研究成果の刊行に関する一覧表

II.研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

書籍 なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Nonaka H., Watabe T., Saito S., Miyazono K. and Miyajima A	Generation of liver- specific endothelial cells from mouse embryonic stem cells by inhibition of TGF- β /activin signaling	<i>Submitted</i>			
Suzuki K., Tanaka M., Watanabe N., Saito S., Nonaka N. and Miyajima A.	P75 neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver	<i>Gastroenterolo gy</i>	<i>In Press</i>		
Sugano Y., Takeuchi M., Hirata A., Matsushita H., Kitamura T., Tanaka M. and Miyajima A.	Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells	<i>Blood</i>	111	1167- 72	2008
Tanimizu N., Miyajima A.	Molecular mechanism of liver development and regeneration.	<i>Int Rev Cytol.</i>	259	1-48	2007
Watanabe N., Tanaka M., Suzuki K., Kumanogoh A., Kikutani H., and Miyajima A.	Tim2 is expressed in mouse fetal hepatocytes and regulates their differentiation.	<i>Hepatology</i>	45	1240- 49	2007