

residue 1173 in Flk1 was revealed to be essential for vasculogenesis in the embryo [46]. Flk1 expression further serves various progenitor populations being combined with other molecular markers. Flk1⁺/Tal1⁺ cells [47] and Flk1⁺/brachyury⁺ cells [29] are reported as hemangioblasts. Flk1⁺/CXCR4⁺/VE-cadherin⁻ cells [43] and Flk1⁺/Isl1⁺ cells [48] are shown to be progenitors for ECs and cardiomyocytes.

Scl/Tal1

Scl/Tal1 is a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor expressed in yolk sac blood progenitors and ECs [49]. The most evident role of Scl/Tal1 is driving the commitment of progenitor cells to hematopoietic lineage. Scl/Tal1^{-/-} mice showed a defect of embryonic hematopoiesis even though the primitive vascular network was normal [50, 51]. Scl/Tal1^{-/-} ES cells did not contribute to hematopoietic tissues in chimeric animal models [52]. On the other hand, induced expression of Scl/Tal1 in the early differentiation stage of Scl/Tal1^{-/-} ES cells restored HPC differentiation [53]. Flk1⁺ mesoderm cells from Scl/Tal1^{-/-} ES cells gave rise only to mural cell lineage, whereas cell lines expressing Scl/Tal1 in the Flk1 locus could make ECs and HPCs [47]. Phenotypes of Scl/Tal1-deficient mice resemble those of LIM-only protein, LMO2 [54] and GATA-binding protein, GATA-1 [55]. LMO2 is posited to bridge Scl/Tal1 and GATA proteins [56]. The Scl/Tal1-LMO2-GATA protein complex should contribute to specify mesoderm to HPC lineage [57].

GATA

Among GATA-binding transcription factors, GATA1, 2, 3 (considered hematopoietic GATAs) are posited to be involved in early hematopoiesis [58]. Disruption of GATA2, which is expressed in HSCs and progenitors, induces impaired primitive and definitive hematopoiesis in mice, indicating that GATA2 has a role in the proliferation and expansion of early HPCs [59, 60]. Recently, GATA2 induction during an early differentiation stage of ES cell differentiation resulted in an increase in hemangioblasts, erythroid cells, and ECs, suggesting a GATA2 role in the early stage of EC and HPC differentiation [61]. GATA1 is postulated to be involved mainly in erythrocyte differentiation. GATA1^{-/-} mice show loss of erythrocytes [55]. ES cell-derived GATA1⁺/Flk1⁻ cells give rise only to primitive erythrocytes [62]. Recently, GATA1⁺/VE-cadherin⁺ cells in the early embryo (E7.0-7.5) were demonstrated to be a common precursor for both HPCs and ECs [63]. GATA3, which is expressed in hematopoietic progenitors as well as T cells, is necessary for the production of T-helper 2 cells [64]. GATA3 is also expressed in mesenchymal cells with stromal activity to generate definitive HPCs [65], suggesting that GATA3 may be involved in the formation of the microenvironment to support definitive HPC development.

Runx1

Runx1, also designated AML1 and CBFa2, is a transcription factor showing homology to the *Drosophila* pair-rule gene, *runt*. Runx1 plays pivotal roles in the development of definitive hematopoiesis. Runx1^{-/-} mice showed normal primitive hematopoiesis but completely impaired definitive hematopoiesis with disappearance of budding hematopoietic clusters from ECs in dorsal aorta [66, 67]. In a chimeric animal model,

Runx1^{-/-} ES cells failed to contribute to any hematopoietic tissues, whereas Runx1^{+/-} ES cells could contribute to bone marrow and peripheral blood, among others [66]. Studies using Runx1^{+LacZ} mice revealed that Runx1 expression marks HSCs [22, 68]. That is, LacZ expression is observed in the dorsal aorta, vitelline, and umbilical arteries where long-term repopulating HSCs reside. Runx1-LacZ cells localize in ECs of the dorsal aorta, HPCs budding from ECs, and in some mesenchymal cells surrounding the aorta. Recently, Runx1-LacZ cells in the yolk sac at E7.5 were demonstrated to contribute to definitive hematopoiesis [25]. These observations suggest that Runx1 is expressed in hemogenic ECs or their precursors and regulates the differentiation of HPCs from ECs. Runx1 directly suppresses Flk1 expression at the transcriptional level during ES cell differentiation [69]. Runx1 should be directly involved in EC-HPC transition by endowing the hematopoietic potential to their precursor cells.

Others

A Myb family transcription factor, c-myb is expressed in hemogenic ECs and is involved in definitive hematopoiesis. Rescue of c-myb expression in c-myb^{-/-} ES cell-derived ECs restores the generation and proliferation of definitive HPCs, indicating that c-myb endows hemogenic properties to early ECs [70]. Ets transcription factors are expressed in hemangioblast, and four of the Ets genes are demonstrated to be essential for early EC specification and differentiation in zebrafish [71]. A homeobox transcription factor, HoxA9, was reported to act as a master switch to regulate the expression of prototypical endothelial-committed genes such as endothelial nitric oxide synthase, VEGFR2, and VE-cadherin in adult EC progenitor cells [72].

Conclusion

Recent studies on EC and HPC development uncovered various cellular and molecular mechanisms in the differentiation processes of these cells. Nevertheless, these findings do not efficiently contribute to the better understanding of EC and HPC development. Current trends in this research area are mainly accumulating evidence of the existence of the "heterogeneity" in the developmental processes. That is, multiple origins (with early segregation), multiple pathways, and multiple molecular functions exist and complicatedly interact with each other to form the functional circulation system. Cell tracing studies *in vivo* demonstrated multiple origins of and their early segregation to ECs and HPCs [24, 25]. Novel hemangioblastic cell populations are still being reported, such as Oct3/4⁺/CD31⁺ cells [73] and GATA1⁺/VE-cadherin⁺ cells [63].

In the future, dual directions of studies will be required for a complete understanding of EC and HPC development. One direction is to extend the studies in various ways to accumulate novel results. *In vivo* animal models for cell tracing, *in vitro* analyses for the cell differentiation process, various large-scale biology, called "omics", for gene and protein expressions, epigenetic analyses, and so on—all of these strategies would provide novel outcomes from various points of view. The other direction is to make them relevant to each other and converge them to reconstitute a novel concept and understanding (although it is not easy). By repeating these processes, we should be able to approach a better or true "stereoscopic" understanding of the developmental processes.

References

1. Sabin FR (1920) Studies on the origin of blood-vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Carnegie Contrib Embryol* 272:214-262
2. Risaw W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674
3. Carmeliet O (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395
4. Eichmann A, Yuan L, Moyon D, et al (2005) Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks. *Int J Dev Biol* 49:259-267
5. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J (2005) Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438:937-945
6. Alitalo K, Tammela T, Petrova T (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438:946-953
7. Yamashita JK (2007) Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. *Trends Cardiovasc Med* 17:59-63
8. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al (2000) Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408:92-96
9. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, et al (2006) Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1977-1984
10. Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al (2006). Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2070-2076
11. Liersch R, Nay F, Lu L, et al (2006) Induction of lymphatic endothelial cell differentiation in embryoid bodies. *Blood* 107:1214-1216
12. Kreuger J, Nilsson I, Kerjaschki D, et al (2006) Early lymph vessel development from embryonic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1073-1078
13. Cumano A, Godin I (2001) Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Curr Opin Immunol* 13:166-171
14. Ueno H, Weissman IL (2007) Blood lines from embryo to adult. *Nature* 446:996-997
15. Nishikawa SI (2001) A complex linkage in the developmental pathway of endothelial and hematopoietic cells. *Curr Opin Cell Biol* 13:673-678
16. Jaffredo T, Nottingham W, Liddiard K, et al (2005) From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp Hematol* 33:1029-1040
17. Mikkola HKA, Orkin SH (2006) The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133:3733-3744
18. de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, et al (2000) Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J* 19:2465-2474
19. Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaun J, et al (2003) Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development* 130:5437-5444
20. Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, et al (2005) The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 8:365-375
21. Ottersbach K, Dzierzak E (2005) The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 8:377-387
22. North TE, de Bruijn MF, Stacy T, et al (2002) Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity* 16:661-672
23. Bertrand JY, Giroux S, Golub R, et al (2005) Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:134-139

24. Ueno H, Weissmann IL (2006) Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. *Dev Cell* 11:519-533
25. Samokhvalov IM, Samokhvalov NI, Nishikawa SI (2007) Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* 446:1056-1061
26. Yoder MC, Hiatt K, Mukherjee P (1997) In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6776-6780
27. Sabin F (1917) Origin and development of the primitive vessels of the chick and of the pig. *Contrib Embryol* 226:61-124
28. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, et al (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125:725-732
29. Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, et al (2004) Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432:625-630
30. Smith RA, Glomski CA (1982) "Hemogenic endothelium" of the embryonic aorta: does it exist? *Dev Comp Immunol* 6:359-368
31. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, et al (1998) Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125:1747-1757
32. Nishikawa SI, Nishikawa S, Kawamoto H, et al (1998) In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 8:761-769
33. Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, et al (1998) Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 125:4575-4583
34. Sugiyama D, Ogawa M, Hirose I, et al (2003) Erythropoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells at the preliver stage. *Blood* 101:4733-4738
35. Hirai H, Ogawa M, Suzuki N, et al (2003) Hemogenic and nonhemogenic endothelium can be distinguished by the activity of fetal liver kinase (Flk)-1 promoter/enhancer during mouse embryogenesis. *Blood* 101:886-893
36. Ogawa M, Kizumoto M, Nishikawa S, et al (1999) Expression of alpha4-integrin defines the earliest precursor of hematopoietic cell lineage diverged from endothelial cells. *Blood* 93:1168-1177
37. Shinoda G, Umeda K, Heike T, et al (2007) Alpha4-Integrin(+) endothelium derived from primate embryonic stem cells generates primitive and definitive hematopoietic cells. *Blood* 109:2406-2415
38. Fraser ST, Ogawa M, Yokomizo T, et al (2003) Putative intermediate precursor between hemogenic endothelial cells and blood cells in the developing embryo. *Dev Growth Differ* 45:63-75
39. Yamashita JK (2004) Differentiation and diversification of vascular cells from ES cells. *Int J Hematol* 80:1-6
40. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376:62-66
41. Kataoka H, Takakura N, Nishikawa S, et al (1997) Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells. *Dev Growth Differ* 39:729-740
42. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, et al (1993) Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118:489-498
43. Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, et al (2005) Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 19:1534-1536
44. Motoike T, Markham DW, Rossant J, et al (2003) Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage. *Genesis* 35:153-159
45. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, et al (1997) Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing

- vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5141-5146
46. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, et al (2005) Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1076-1081
 47. Ema M, Faloon P, Zhang WJ, et al (2003) Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* 17:380-393
 48. Moretti A, Caron L, Nakano A, et al (2006) Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127:1151-1165
 49. Green AR, Salvaris E, Begley CG (1991) Erythroid expression of the "helix-loop-helix" gene, SCL. *Oncogene* 6:475-479
 50. Robb L, Lyons I, Li R, et al (1995) Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7075-7079
 51. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH (1995) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373:432-434
 52. Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH (1998) Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* 12:473-479
 53. Endoh M, Ogawa M, Orkin S, et al (2002) SCL/tal-1-dependent process determines a competence to select the definitive hematopoietic lineage prior to endothelial differentiation. *EMBO J* 21:6700-6708
 54. Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, et al (1994) The oncogene cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 78:45-57
 55. Pevny L, Simon MC, Robertson E, et al (1991) Erythroid differentiation in chimeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349:257-260
 56. Wadman IA, Osada H, Grutz GG, et al (1997) The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA1, and Ldb1/NL1 proteins. *EMBO J* 16:3145-3157
 57. Cantor AB, Orkin SH (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21:3368-3376
 58. Orkin SH (1992) GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80:575-581
 59. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et al (1994) An early hematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371:221-226
 60. Ling KW, Ottersbach K, van Hamburg JP, et al (2004) GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 200:871-882
 61. Lugus JJ, Chung YS, Mills JC, et al (2007) GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. *Development* 134:393-405
 62. Fujimoto T, Ogawa M, Minegishi N, et al (2001) Step-wise divergence of primitive and definitive haematopoietic and endothelial cell lineages during embryonic stem cell differentiation. *Genes Cells* 6:1113-1127
 63. Yokomizo T, Takahashi S, Mochizuki N, et al (2007) Characterization of GATA-1(+) hemangioblastic cells in the mouse embryo. *EMBO J* 26:184-196
 64. Zheng W, Flavell RA. (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89:587-596
 65. Manaia A, Lemarchandel V, Klaine M, et al (2000) Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development* 127:643-653
 66. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, et al (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84:321-330
 67. Wang Q, Stacy T, Binder M (1996) Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3444-3449

68. North TE, Stacy T, Matheny CJ, et al (2004) Runx1 is expressed in adult mouse hematopoietic stem cells and differentiating myeloid and lymphoid cells, but not in maturing erythroid cells. *Stem Cells* 22:158-168
69. Hirai H, Samokhvalov IM, Fujimoto T, et al (2005) Involvement of Runx1 in the down-regulation of fetal liver kinase-1 expression during transition of endothelial cells to hematopoietic cells. *Blood* 106:1948-1955
70. Sakamoto H, Dai G, Tsujino K, et al (2006) Proper levels of c-Myb are discretely defined at distinct steps of hematopoietic cell development. *Blood* 108:896-903
71. Pham VN, Lawson ND, Mugford JW, et al (2007) Combinatorial function of ETS transcription factors in the developing vasculature. *Dev Biol* 303:772-783
72. Rossig L, Urbich C, Bruhl T, et al (2005) Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. *J Exp Med* 201:1825-1835
73. Furuta C, Ema H, Takayanagi S, et al (2006) Discordant developmental waves of angioblasts and hemangioblasts in the early gastrulating mouse embryo. *Development* 133:2771-2779

4 ES細胞、iPS細胞を用いた 血管再生医療技術

京都大学 山下 潤

1 はじめに

未分化性と分化能を維持したまま無尽蔵に増殖することができるES細胞(胚性幹細胞: Embryonic Stem cells)は、再生医療への応用がその大きな使命であり研究ターゲットとされているが、日本ではまだヒトES細胞の臨床応用は認められていない。世界的にもES細胞由来細胞をヒトに用いた治療の報告はない。また、最近の体性幹細胞(成体内に存在する幹細胞)研究は、細胞移植に至るハードルが倫理面、安全面等でES細胞よりも低いため、再生医療応用において注目されている。にもかかわらず、ヒトを含めたES細胞研究は国内および世界的広がりを見せている。ES細胞研究は、直接的な細胞治療応用のみならず、細胞分化機構に関する基礎研究をもとにした新たな遺伝子治療、創薬、薬品の効果や毒性等のドラッグスクリーニングへの応用等、基礎面臨床面に果たせる貢献は非常に大きい。2006年、2007年のマウスおよびヒトiPS細胞(人工多能性幹細胞)^{1)~3)}の樹立は、ヒトES細胞における倫理的問題および細胞移植における技術的問題の一部をクリアすることにより、ES細胞が有していたポテンシャルをさまざまな形で実現できる可能性を示し、幹細胞を用いた再生医学研究に大きなインパクトを与えた。本稿では、ES細胞およびiPS細胞を用いた血管再生分野の現況と将来における可能性等について概説する。

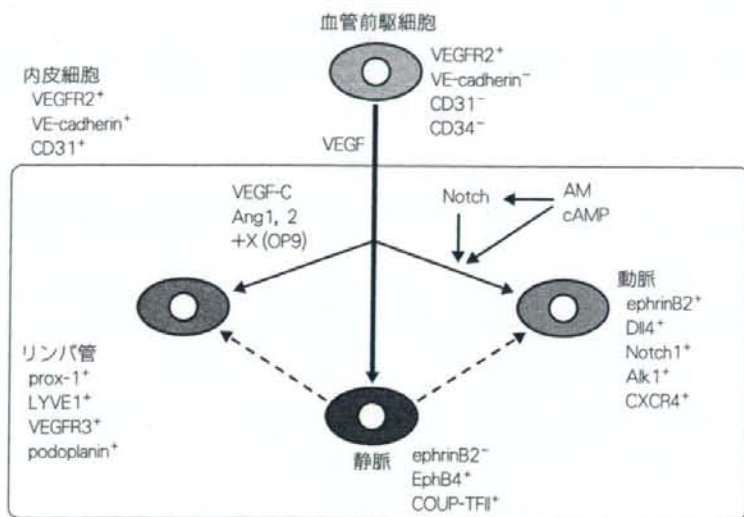
2 ES細胞からの血管細胞の分化多様化

血管壁の内側を一層に覆い血管腔を形成している血管内皮細胞と、血管内皮による管腔を外

側から取り巻き、収縮弛緩や血管構造の維持に寄与している血管壁細胞(動静脈における血管平滑筋細胞および毛細血管におけるペリサイト)の2種類の細胞は血管を構成する主要な細胞である。これら血管構成細胞は、胚様体を用いて分化誘導できることが以前より報告されている。未分化ES細胞は、フィーダー細胞やLIF(Leukemia Inhibitory Factor)などの非存在下で浮遊培養することにより、ES細胞が寄り集まった球形の胚様体(embryoid body)と呼ばれる構造を形成する。胚様体内では、さまざまな細胞間の相互作用が文字通り擬似胎仔のように働き、さまざまな細胞が分化誘導されてくる。胚様体法を用いてES細胞を分化誘導することにより、血管前駆細胞および中胚葉の分子マーカであるFlk1(2型VEGF(血管内皮増殖因子)受容体; VEGFR2)陽性の細胞、さらには内皮細胞のマーカであるCD31、Tie2、VE(Vascular Endothelial)-カドヘリン陽性細胞が順次出現し、内皮細胞の分化と網状に張り巡らされた原始的な血管構造の形成が起こることが観察されている。また、レチノイン酸とdibutyryl-cyclic AMPを添加することにより、胚様体中に血管平滑筋細胞が誘導されることも以前に報告されている。筆者らは、胚様体を用いない新しいES細胞分化誘導法により、ES細胞由来Flk1陽性細胞が、血管を構成する血管内皮細胞と血管壁細胞の共通の前駆細胞であり、Flk1陽性細胞から内皮細胞および壁細胞の双方が分化誘導でき、毛細血管様の高次構造を培養下に形成できることを示した⁴⁾。Flk1陽性の血管前駆細胞は、VEGFの刺激により内皮細胞に、主にPDGF-BB(血小板由来増殖因子)により壁細胞に分化すると考えられる。また、血流による物理的刺激であるshearストレスや拍動性進展刺激がFlk1陽性細胞からの内皮細胞分化や壁細胞分化を誘導することも明らかにされている。筆者らはさらに、Flk1陽性細胞から心筋細胞を分化誘導することにも成功し⁵⁾、Flk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、血球細胞、内皮細胞、血管壁細胞、心筋細胞といった循環器系の細胞を系統的に分化誘導できることを明らかにしてきた(図1)。最近になり、Flk1を含む種々のES細胞由来前駆細胞が心筋細胞や内皮細胞、血管平滑筋細胞に分化することが相次いで報告され⁶⁾、ES細胞の心血管分化研究は世界的広がりを見せている。

最近、動脈、静脈、リンパ管それぞれの内皮細胞特異的に発現している分子が数々報告され、内皮細胞の多様性に分子的根拠が与えられるようになってきた。それにより、生体内の位置情報がない培養細胞においても、動静脈リンパ管分化が解析できるようになった。筆者らは最近、Flk1陽性細胞からの血管分化系を用い、ephrinB2陽性(動脈)内皮、ephrinB2陰性(静脈)内皮、およびprox-1陽性(リンパ管)内皮細胞と考えられる細胞の誘導と純化にそれぞれ成功した^{7,8)}。すなわち、Flk1陽性細胞をVEGFおよび血清存在下に内皮細胞に誘導するとほとんど(>90~95%)の内皮細胞がephrinB2陰性の静脈内皮細胞となる。VEGFに加えて、cAMPアナログである8bromo-cAMPまたは細胞内cAMPを上昇させる液性因子の一つであるアドレノメデュリン(AM)を加えcAMP経路を活性化することにより、内皮細胞においてNotch

以上の結果をまとめると ES 細胞からの血管の分化多様化機構は図 2 のようになる。すなわち、Flk1 陽性前駆細胞からの血管内皮全般の分化には VEGF が必須であり、VEGF に加えて cAMP および Notch シグナルが働くと動脈内皮が、OP9 ストローマ細胞からの誘導作用によりリンパ管内皮細胞が出現すると考えられる。このように ES 細胞を用いて構成的系統的に血管細胞を分化誘導する新たなアプローチは、ノックアウトマウスなどでは困難であった血管の分化・多様化メカニズムの細胞レベル分子レベルでの解析を可能にする新たな手法と考えられる¹⁰⁾。こうした新たなアプローチで血管分化多様化機構を解析することにより、種々の血管特異的な血管新生やリンパ管特異的な新生抑制による抗ガン治療などの開発も期待される。さらに詳細に臓器特異的な血管の多様性を解析し理解することは、血管を介した臓器機能や病態の理解とそれに基づくさまざまな新しい治療戦略の開拓に結びつくと考えられる。



VEGFR2(Flk1)陽性血管前駆細胞は、主に VEGF のシグナルにより VE-カドヘリン陽性内皮細胞に分化する。静脈内皮細胞と考えられる細胞は VEGF および血清のみで誘導されるが、動脈内皮分化にはそれに加えて Notch および cAMP シグナルが、リンパ管内皮には VEGF-C、angiopoietin と OP9 細胞由来因子がそれぞれ必要である。動脈内皮およびリンパ管内皮は、静脈内皮(または厳密にはどれにも当てはまらないプロトタイプ内皮細胞?)からそれぞれ分化する可能性もある。

図 2 血管前駆細胞からの動静脈リンパ管分化機構

3 ES細胞による血管再生

筆者らはES細胞由来Flk1陽性細胞が生体内においても血管細胞に分化し、血管再生に寄与しうるかを検討するため、純化Flk1陽性細胞のニワトリ胎仔への移植実験を行った。心腔内注入により経血管的に移植されたFlk1陽性細胞は、内皮細胞および壁細胞に分化するとともにニワトリ胎仔発生にともなって形成された新生血管に寄与した⁹。筆者らはさらに、ES細胞由来細胞の血管再生治療応用における可能性を検討するため、ES細胞由来血管細胞の成体に対する移植効果を検討した¹⁰。すなわち、ES細胞由来血管細胞をヌードマウスに移植した腫瘍周囲に注入し、移植細胞の新生血管への寄与を検討したところ、ES細胞由来Flk1陽性細胞は、内皮細胞および壁細胞として新生血管へ寄与した。次に、成体への移植に適切な細胞の分化段階を検討するため、分化段階の異なる血管細胞、すなわち、ソート直後のFlk1陽性血管前駆細胞と、Flk1陽性細胞をさらに3日間培養して初期内皮細胞に分化した細胞（VE-カドヘリン陽性）の移植を比較した。Flk1陽性細胞を移植した群では、血管内皮細胞として寄与しているものの他に、それ以外の細胞として組織内に存在するものが多数（約60%）認められた。一方、初期内皮を移植した群では、ほとんど全ての細胞（95%以上）が内皮細胞として血管に寄与していた。また、Flk1陽性細胞移植群では、細胞移植した腫瘍における血流増加は認められなかったが、分化させた血管細胞を移植した群では、有意な血流増加が認められた。これらの結果より、ES細胞由来血管細胞の移植により、血管新生促進効果が認められるが、成体における血管新生をターゲットとした細胞移植においては、血管前駆細胞のレベルの細胞よりも、やや血管に分化した初期内皮細胞のステージがより有効かつ特異的であると考えられた。このように、ES細胞由来細胞の移植においては、むやみに未分化細胞を移植すればよいわけではなく、ドナー細胞の分化段階とレシピエント側の状況に対応させた至適な分化段階の細胞、一おそらくは標的細胞への分化が運命づけられた直近の前駆細胞一、を選択する必要があると考えられた。また同時に、移植をされる側においても標的細胞の分化を効率的に促進できる微小環境ができるだけ再現されていることが、有効な再生の実現には重要であると考えられる。

4 ヒトES細胞からの血管分化再生

ヒトES細胞を用いた血管細胞分化としては、胚様体を用いてCD31やVE-カドヘリン陽性内皮細胞の誘導と、フローサイトメトリーを用いての純化・再培養、培養下および免疫不全マウスに移植したゲル内における血管構造の形成が報告されている。京都大学のグループは、マウスES細胞と同様にサルES細胞においても2型VEGF受容体陽性細胞からの内皮細胞・壁細胞の分化¹²、培養下における血管構造形成に成功している。さらに同グループは、2002

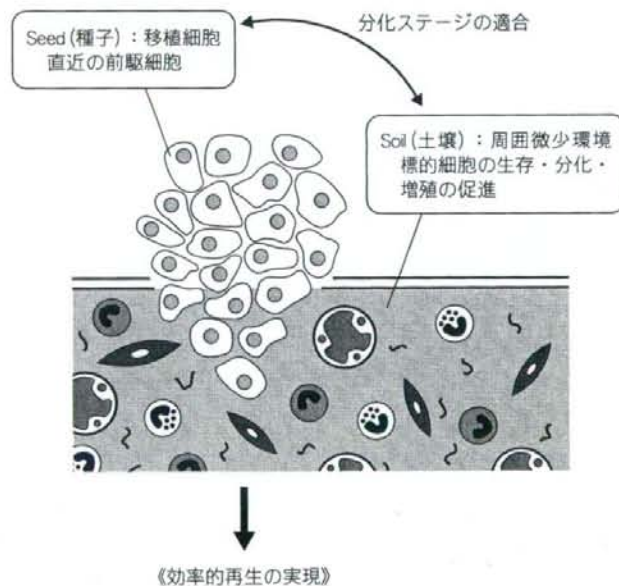
年より日本最初のヒト ES 細胞分化研究を輸入ヒト ES 細胞を用いて開始し、ヒト ES 細胞においても血管構成細胞の分化誘導と *in vitro* における管腔構造形成、さらにはマウス血管新生モデルにおける新生血管への移植細胞の寄与と血流改善効果を認めることを明らかにした^{13,14}。ヒト ES 細胞由来血管細胞の移植においては、純化した内皮細胞だけの移植よりも、血管壁細胞と混合した細胞群の方が血管新生作用が強かった¹⁴。類似の現象は、心筋や神経に関する細胞移植においても報告されている。すなわち、純粋な心筋細胞や神経細胞のみならず、心臓間質細胞やグリア細胞などが共存する形の移植の方が心筋や神経再生効果が高い可能性が示唆されており、純粋に必要とされる細胞だけを移植するのではなく、移植細胞と周囲環境との相互作用、効果的に標的組織の再生を促進する局所微小環境を考慮した細胞移植戦略が新たな再生治療法の開発に有効であると考えられる。

5 iPS 細胞からの血管・リンパ管分化

iPS 細胞は、線維芽細胞等の成体由来分化細胞に Oct4、Sox2、Klf4、c-myc の 4 因子(または 3 因子)を導入することにより誘導される新しい多能性幹細胞である¹¹⁻¹³。筆者らは、マウスおよびヒト iPS 細胞を用いた心血管分化研究にもいち早く取り組んでいる。[1]項に述べたマウス ES 細胞の血管分化誘導法をマウス iPS 細胞に適用することにより、マウス ES 細胞と同様に、iPS 細胞からの血管内皮細胞、壁細胞、動静脈リンパ管内皮細胞の分化誘導に成功した。内皮細胞および壁細胞からなる血管構造の 3 次元的形成にも成功した¹⁵。また、担がんヌードマウスへの細胞移植実験により、内皮および壁細胞として生体内血管新生に寄与し得ることも確認した。マウス iPS 細胞 3 クローンを用いて検討したが、クローン間で多少の分化能、増殖能に差異を認めたが、ES 細胞においても認められるクローン間の差異と同程度かそれ以下のものであり、マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞とほぼ同様の分化特性を有していると考えられた。ただし、1~2 ヶ月以上の長期分化誘導培養中に c-myc をはじめとする iPS 細胞誘導時の導入遺伝子群の再発現を認める例があり、iPS 細胞における特性の一つとして注意する必要があると考えられる。現在ヒト iPS 細胞の心血管系への分化誘導も行っているが、マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞と、ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞とほぼ同様の性質を持っていると考えられる。iPS 細胞は、さまざまな病態モデル動物やヒト症例から比較的簡便に多能性幹細胞が誘導できるため、薬剤の安全性試験や新たなドラッグスクリーニングなど、直接的な細胞移植以外にも種々の応用が可能である。実際筆者らは、マウス iPS 細胞からの 3 次元的血管形成モデルを用いて海洋生物由来 HDAC 阻害物質 Ageladine の血管新生抑制作用を示すことに成功している¹⁶。このように iPS 細胞を用いることにより、病態や疾患と幹細胞およびケミカルバイオロジーを結びつけた新しい再生医学や創薬研究が可能になると考えられる。

6 おわりに

このように、血管の発生・分化・再生機構に関してさまざまな知見が蓄積されてきているが、いまだ血管再生治療が明らかに有用な形で臨床応用されたといえるレベルには至っていない。臓器を構成する細胞を誘導して移植するあるいは前駆細胞を移植するというだけで臓器の再生が進むというほど単純ではないことがようやく学習されてきたというのが実情に近いであろう。今後は、細胞そのものの分化メカニズムの解析—細胞外シグナルから細胞内環境の変化と安定化の過程をエピジェネティックな視点も含めて解明する—に加えて、細胞間および細胞—細胞外マトリックス相互作用や臓器・組織間相互作用等臓器としての機能を果たし得る機能ユニットを形成するために必要な要素全てに関して理解を深め、それらを生体内ですできるだけ再構成することが重要であろう。[3][4]の項でも述べたように、有効に分化し得る幹・前駆細胞(Seed:種子)と、分化と機能発現を可能にする周囲環境(Soil:土壌)の双方を整えた治療(Seed & Soil Therapy)(図3)を目指すことにより、再生医療はより実効性が期待されるものに近づ



細胞移植による臓器再生を行うためには、移植細胞(Seed:種子)とレシピエント側の微少環境(Soil:土壌)の分化ステージを適合させるとともに、双方の要因を整える必要がある。Seedとしては、標的細胞の直近の前駆細胞が好ましいと考えられる。Soilは、移植細胞の生着・生存、分化、増殖を促進できる微少環境が存在することが必要である。これらSeed & Soilを最適化することにより、効率的臓器再生が実現されると考えられる。

図3 Seed & Soil therapy

くと考えられる。

iPS細胞の樹立によって、成体組織からES細胞様の多能性幹細胞を得ることができるようになったことにより、ヒトES細胞樹立における倫理的問題や移植における免疫の問題とそれに絡むヒトクローン胚の問題も回避され、これらの細胞の再生医療応用におけるハードルは一気に低くなると考えられる。しかし、未分化細胞による奇形腫形成という従来からES細胞に認められている問題は残っていることに加え、iPS細胞誘導時の導入遺伝子の再発現やゲノムへの遺伝子導入等による腫瘍形成の可能性等iPS細胞特有の新しい問題もあり、iPS細胞そのものの改良や分化誘導・純化法等さまざまな技術開発が今後必要である。iPS細胞の出現は、これまでのES細胞研究に数多くの新たな可能性を与えた。極端な熱狂や批判に走ることなく、冷静にかつ良識と叡知を持ってiPS細胞の今後に対応していくことが必要と考えられる。iPS細胞研究が健全に成長することにより、分化再生機構の基礎研究から、再生治療法の開発や創薬とその産業化に至るまで、ES細胞研究が持っていたポテンシャルがさまざまな形で臨床応用へ向けて花開き、人々の幸福に貢献していくことを期待する。

参考・引用文献

- 1) K. Takahashi et al. : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, pp.663-676(2006).
- 2) K. Takahashi et al. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, pp.861-872(2007).
- 3) M. Nakagawa et al. : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, *Nat. Biotechnol.*, **26**, pp.101-106(2008).
- 4) J. Yamashita et al. : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors, *Nature*, **408**, pp.92-96(2000).
- 5) J. K. Yamashita et al. : Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction, *FASEB J.*, **19**, pp.1534-1536(2005).
- 6) D. J. Garry et al. : A common progenitor at the heart of development, *Cell*, **127**, pp.1101-1104(2006).
- 7) T. Yurugi-Kobayashi et al. : Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, pp.1977-1984(2006).
- 8) T. Kono et al. : Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, pp.2070-2076(2006).
- 9) J. K. Yamashita : Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors, *Trends Cardiovasc. Med.*, **17**, pp.59-63(2007).
- 10) J. K. Yamashita : Differentiation and diversification of vascular cells from embryonic

- stem cells, *Int. J. Hematol.*, **80**, pp.1-6(2004).
- 11) T. Yurugi-Kobayashi et al. : Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage, *Blood*, **101**, pp.2675-2678(2003).
 - 12) M. Sone et al. : Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells, *Circulation*, **107**, pp.2085-2088(2003).
 - 13) M. Sone et al. : Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, pp.2127-2134(2007).
 - 14) K. Yamahara et al. : Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells, *PLoS One*, **3**, p.e1666(2008).
 - 15) G. Narazaki et al. : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells, *Circulation*, **118**, pp.498-506(2008).
 - 16) Y. Nakao et al. : Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells, *Bioorg Med Chem Lett.*, **18**, pp.2982-2984(2008).

1. iPS細胞と心血管再生

京都大学再生医科学研究所幹細胞分化制御研究領域准教授 山下 潤

key words embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, regeneration, differentiation

動 向

ES細胞（胚性幹細胞 embryonic stem cells）は、マウスやヒトの早期胚（胚盤胞 blastocyst）の段階において、将来胎仔を形成する内細胞塊 inner cell mass とよばれる部位を取り出して樹立した細胞株であり、体中全ての種類の細胞に分化することのできるいわゆる万能の幹細胞と考えられている。マウスES細胞の樹立は1981年であり、マウスES細胞から拍動心筋細胞が誘導されることは1985年には報告されているが、ES細胞の医学・生物学における大きな貢献は、再生医学ではなくノックアウトマウスなどの様々な遺伝子改変マウスの樹立を可能にしたことであった。実際マウスES細胞を樹立したMartin Evans博士は、2007年のノーベル医学生理学賞をノックアウトマウスの開発を行った研究者らと共同受賞している。1990年代後半から、神経幹細胞の発見など成体の中に存在する体性幹細胞/組織幹細胞に関する研究とともにES細胞を含めた幹細胞の再生医学応用に関する研究が急速に盛んになってきた。1998年末のヒトES細胞樹立により、幹細胞の再生医療応用はさらに現実味を帯びて語られるようになってきた。しかし、ヒトES細胞においては、①技術・安全面の問題、特に未分化ES細胞があやまって移植されると奇形腫を形成する

可能性がある、ということに加えて、②倫理面の問題、すなわち i) ヒトES細胞の樹立の際にヒト受精卵を壊す必要がある、ii) 免疫による拒絶を受けないES細胞を樹立するためにヒト体細胞クローン胚（成体細胞の核を除核未受精卵に核移植したクローン胚）を作る必要が考えられる、ということが実際の応用への大きな障壁になっていた。こうした状況を背景に生まれてきた新しい幹細胞がiPS細胞（人工多能性幹細胞 induced pluripotent stem cells）である。

iPS細胞は、線維芽細胞など分化した細胞に特定の遺伝子群（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-mycなど）を導入することにより、ES細胞様の万能の幹細胞の性質をもたせることに成功した細胞であり、形態、遺伝子発現パターンに加えて、分化能力やiPS細胞をもとに最終的にiPS細胞由来のマウス個体を作製できることなど、ES細胞としての大きな特性を満たしている。最初のiPS細胞は2006年京都大学の山中らによって報告された¹⁾。2007年には山中ら及びThomsonら^{2,3)}、その後さらに多くの他のグループによりヒトiPS細胞の樹立が報告された。ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞において認められた倫理的問題、上記の②-i), ii)を一気に回避できる画期的発明であり、「iPS細胞を用いてすぐにも再生医療が実現できるので

はないか」というようなある種の熱狂を生み出した。しかし、iPS細胞には依然として上記①の奇形腫の問題は存在しているし、iPS細胞特有の「遺伝子導入による細胞変異・がん化の問題」など新たな問題もあり、今後地道に解決すべき課題は多い。これら iPS細胞を巡る可能性と問題点について、循環器領域との関連を中心に概説する。

A. iPS細胞からの心血管細胞分化

筆者らはこれまでマウス及びヒトES細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究を行ってきた。すなわち、マウス未分化ES細胞から VEGF (血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor) の受容体の一つであり、血管内皮・血球の前駆細胞や中胚葉細胞のマーカーでもある Flk1 (2型 VEGF 受容体 VEGF receptor-2) を発現する細胞を誘導し、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞、血管壁細胞、血球細胞、心筋細胞といった循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功している^{4,5)}。この新しい分化誘導システムを用いて、ES細胞由来の

心筋前駆細胞の同定⁵⁾ や動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれES細胞から誘導すること^{6,7)} にも成功している。ヒトES細胞からの血管細胞の誘導や虚血モデルへの移植実験などにも関与している^{8,9)} (京都大学内分泌代謝内科との共同研究)。このマウスES細胞の系統的心血管細胞分化システムをマウス iPS細胞に導入し、筆者らはいち早く iPS細胞からのこれら心血管細胞の分化誘導に成功した¹⁰⁾。すなわち、未分化マウス iPS細胞を LIF (leukemia inhibitory factor) 非存在下に培養することにより Flk1 陽性細胞が誘導された。Flk1 陽性細胞を VEGF 及び血清存在下に培養することにより主に静脈を中心とする内皮細胞及び壁細胞が (図1), VEGFに加えてcAMPシグナルを刺激することにより動脈内皮細胞が (図2), OP9ストローマ細胞上で培養することにより血球、リンパ管内皮細胞 (図3), 心筋細胞が (図4), それぞれ誘導された。マウス iPS細胞からの Flk1 陽性細胞, (動静脈リンパ管) 内皮細胞, 壁細胞の分化様式, 分化効率等はほとんどマウスES細胞と変わりがなかった。心筋分化に関しては、多少分化効率が低い傾向が認められたが、ES細胞

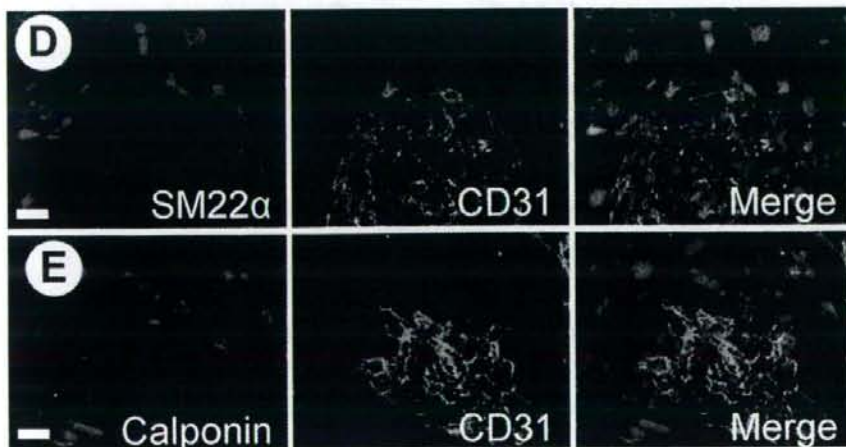


図1 マウス iPS細胞からの血管内皮・壁細胞分化 (文献10より改変)
マウス iPS細胞由来 Flk1 陽性細胞を VEGF 及び血清存在下で培養することにより、CD31 陽性内皮細胞 (緑) と SM22 α またはカルボニン陽性壁細胞 (赤) が選択的に誘導される。

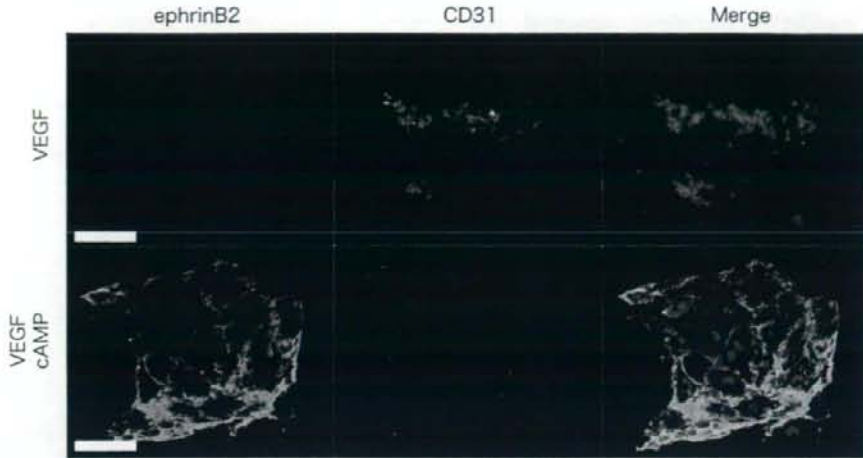


図2 マウスiPS細胞からの動静脈内皮細胞分化 (文献10より改変)

Flk1 陽性細胞を VEGF 及び血清存在下で培養した場合、その大部分が CD31 陽性 / ephrinB2 陰性の静脈内皮細胞となる (上段)。VEGF に加え 8bromo-cAMP を投与し cAMP シグナルを活性化すると CD31 陽性 / ephrinB2 陽性動脈内皮細胞が出現する (下段)。

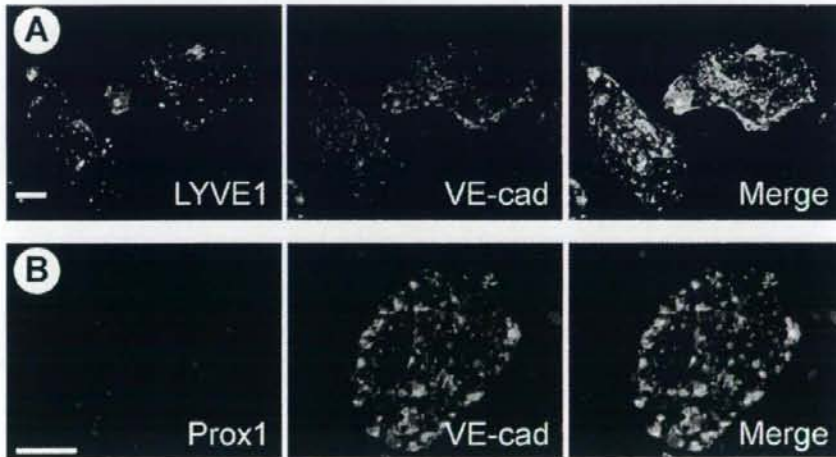


図3 マウスiPS細胞からのリンパ管内皮細胞分化 (文献10より改変)

Flk1 陽性細胞を OP9 ストロマ細胞上で培養することにより、LYVE1 陽性 (A) または prox1 陽性 (B) かつ VE-カドヘリン陽性のリンパ管が誘導される。

において通常認められる細胞株間の差異の範囲内のものであった。このように、マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞はほぼ完全に同等な心血管分化能と分化動態を示し、マウス ES 細胞と同様に系統的に心血管細胞を分化誘導することが可能であつ

た (図5)。ただし、マウス iPS 細胞を樹立する際に外来性に導入された遺伝子群の発現が長期分化培養中に再上昇したようにみえる例が観察された。明らかにがん化したような細胞や未分化になった細胞が出現することはなかったが、ES 細

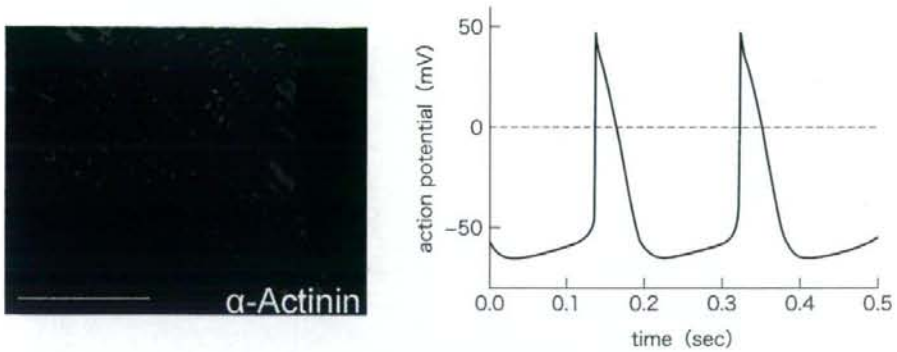


図4 マウスiPS細胞からの心筋細胞分化 (文献10より改変)

Flk1 陽性細胞を OP9 ストロマ細胞上で培養することにより、拍動心筋細胞が出現する。拍動細胞は sarcomere 構造を示し (左: 赤; アクチニン染色), ベースメーカー細胞様の活動電位を示す (右)。

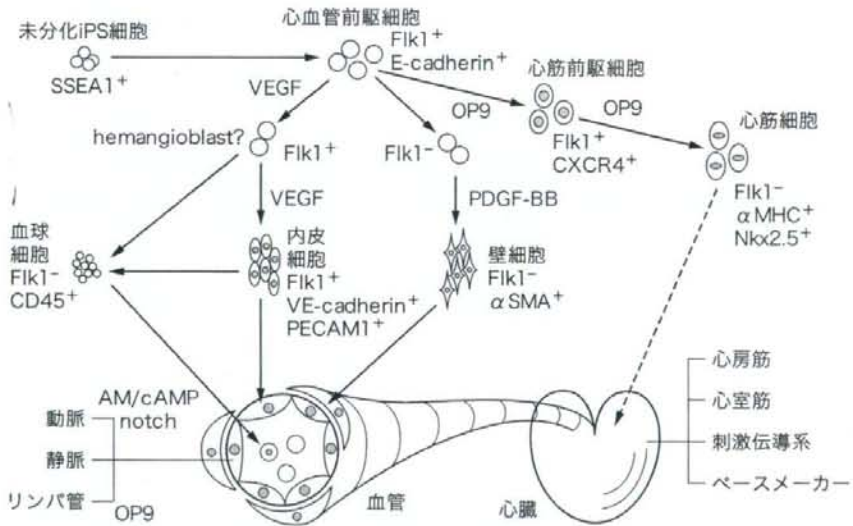


図5 マウスiPS細胞からの系統的心血管細胞分化 (文献10より改変)

マウスiPS細胞から誘導したFlk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、心血管系の構成細胞である血管内皮、壁細胞、心筋細胞、さらには動静脈リンパ管内皮細胞や種々の心筋細胞を系統的に分化誘導することができる。

胞とは異なりiPS細胞独特の問題である導入遺伝子の影響については慎重に対応する必要があると考えられた。他にマウスiPS細胞からの心血管細胞分化に関しては筆者らと同時期に、心筋細胞を誘導したとの報告¹¹⁾と筆者らに類似した分化システムを用いた報告¹²⁾のそれぞれ1報があるの

みである (2008年7月末現在)。

B. ヒトiPS細胞からの分化

筆者らはヒトiPS細胞の心血管細胞分化にも取り組んでいる。ヒトES細胞の維持培養条件に準

じた環境で誘導・樹立されたヒトiPS細胞は、その維持及び分化誘導においてもヒトES細胞に類似した動態を示した。心筋細胞分化に関しては、ヒトiPS細胞樹立の論文内において拍動細胞が誘導可能であったことはすでに報告されているが、その効率や機能的解析については明らかになっていない。筆者らは、ヒトES細胞において報告されている心筋分化誘導法¹³⁾に準じて培養することにより、自己拍動する心筋細胞コロニーの誘導にすでに成功している。心筋に特徴的なsarcomereの形成や自己拍動に同調したCa²⁺の取り込みなど形態的機能的特性も確認している(未発表)。現在のところヒトiPS細胞からの特定の細胞の分化誘導に関しては、心血管以外にも含めてまだ報告はない。

マウスES細胞とマウスiPS細胞、ヒトES細胞とヒトiPS細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有していると考えられる。今後のiPS細胞研究においては、マウス及びヒトES細胞研究がその土台となり、また常に比較対象のスタンダードとなると考えられる。iPS細胞の出現によって、ES細胞研究は衰退するどころかさらにその重要性を増すものと考えられる。

C. iPS細胞研究の循環器領域における意義

ES細胞、iPS細胞研究の循環器領域における意義はやはり心血管再生治療への応用が中心的に期待されると考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築という新しいアプローチができることによる病態解明や創薬治療応用などさまざまな形での臨床面への貢献が可能である。

1. 誘導細胞の細胞移植応用

ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞に存在した倫理

面的問題、及び患者特異的iPS細胞を樹立できることにより移植免疫の問題も回避できるため、細胞移植による再生医療応用が期待されている。循環器領域においても、心筋再生による心筋梗塞や心筋症その他の心不全治療、血管再生による虚血性疾患の治療、生物学的ペースメーカーによる洞不全症候群等の治療などが細胞治療ターゲットとして想定される。しかし、ヒトiPS細胞を用いたこれら細胞治療の実現に至るまでには数多くの乗り越えるべきハードルが残っている。

a. 効率的な心血管分化誘導法及び純化法の開発

ヒトの心筋梗塞においては10⁹個オーダーに至る心筋細胞が死ぬともいわれている。そのレベルの細胞数を用意することが可能な効率的誘導法を開発する必要がある。現在までで最も効率がよいと考えられるヒトES細胞からの心筋分化誘導法において、ヒトES細胞1個から心筋細胞3個と報告されている¹⁴⁾。また、ヒトiPS細胞はヒトES細胞と同様に奇形腫を形成するので、未分化ヒトiPS細胞を厳密に除去できる細胞純化法が必要である。

b. 移植用細胞の開発

最終的にヒトに対して細胞を移植するためには、単に細胞を誘導して純化するというだけでは不十分で、GMP基準の医薬品と同様な品質管理の元に移植用細胞を用意できるようにする必要がある。もともとなるiPS細胞から血清やフィーダー細胞なしで一貫して培養して、分化誘導・純化が行えるようにする必要がある。a. からb. の間には実は大きな隔りがある。

c. 細胞移植法の開発

a, b. を経て用意された細胞をヒトに移植する際に、いかなる細胞群をどのような方法をもって移植すれば有効かつ安全であるかを、サルなどの大型動物を含めたスタディで評価する必要がある。