

200906004A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

「ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の

分化誘導と移植医療応用に関する研究」

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山下 潤

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	1
ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究	
山下 潤	
II. 分担研究報告	7
1. ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究	
池田 義	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	9
IV. 研究成果の刊行物・別刷	11

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

総括研究報告書

ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究

研究代表者 山下 潤

研究要旨

2007年京都大学山中伸弥教授らにより樹立されたヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、再生医療への応用が期待されている。本研究は、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、ヒト iPS 細胞の心臓細胞分化誘導法・純化法、純化細胞の移植法の開発と移植細胞に関する安全性の検討を行うものである。

平成 21 年度においては、マウス iPS 細胞からの心血管分化誘導法とマウス ES 細胞からの新しい高効率心筋および心筋前駆細胞誘導法を応用したヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導と、誘導心筋細胞 (マウス) のラット心筋梗塞モデルへの移植、特に新しい細胞シートを用いた移植法の検討を行った。

分担研究者

池田 義 (京都大学医学部心臓血管外科学 准教授)

研究協力者

山中伸弥 (京都大学再生医科学研究所教授、京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター センター長)

A. 研究目的

2007年京都大学再生医科学研究所山中伸弥教授らにより樹立された成人皮膚細胞由来の幹細胞であるヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)

(Takahashi, Cell, 2007)は、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同等の分化能を有する万能の幹細胞と考えられ、再生医療を中心とする臨床応用が大いに期待されている。iPS 細胞は ES 細胞とほぼ同様の性質を有する細胞であり、再生医療応用にはヒト ES 細胞と同様に、1) 目的細胞の分化誘導・純化・移植法、2) 奇形腫形成を防ぐ方法、に加えて、3) がん形成性をはじめとする iPS 細胞そのものの安全性の検討が必要である。

研究代表者はこれまで ES 細胞を用いた心血管分化再生研究を行ってきた。すなわち、ES 細胞から心血管細胞の

新しい分化誘導法を開発した(Nature, 2000; FASEB J, 2005)。サルおよびヒト ES 細胞の心血管分化研究も行っている(Circulation, 2003; Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007)。

本研究は、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、1) ヒト iPS 細胞の心臓細胞(心筋および心筋前駆細胞)分化誘導法、2) 誘導細胞純化法、3) 純化細胞の移植法の開発、及び移植細胞の4) 奇形腫形成、5) がん形成等に関する安全性の検討、の5項目の研究を行う。ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、ヒト iPS 細胞の心臓細胞(心筋および心筋前駆細胞)分化誘導法、誘導細胞純化法、純化細胞の移植法の開発、及び移植細胞の奇形腫形成、がん形成等に関する安全性の検討に関する研究を行う。

B. 研究方法

①マウス iPS 細胞からの心血管細胞分化誘導法の開発

研究代表者らは、未分化マウス ES 細胞から中胚葉マーカーFlk1 を発現する細胞を分化誘導・純化し、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として種々の心血管系細胞を分化誘導するシステムを構築している(Nature, 2000; FASEB J, 2005 ほか)。同システムをマウス iPS 細胞に適用し、マウ

ス iPS 細胞からの系統的心血管細胞誘導システムの構築を行った。

②マウス ES 細胞からの新しい高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞分化誘導法の開発

研究代表者は、マウス ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することにより、2次元培養下・単一細胞から心筋細胞を分化誘導できる新しい ES 細胞心筋分化系を構築し、高い心筋分化能を有する新しい心筋前駆細胞(FCV 細胞)の同定に成功している(FASEB J, 2005)。研究代表者及び分担研究者は、この分化系を用いて効率的な心筋分化を誘導する物質・増殖因子等の探索をおこなった。

③心筋前駆細胞及び心筋細胞のラット心筋梗塞モデルへの移植実験

研究分担者は、ラット陳旧性心筋梗塞モデルを用いて骨髄細胞由来細胞の移植実験を行い、細胞移植の心臓機能回復における効果を明らかにしてきた(Circulation, 2005)。②において効率的に誘導・純化して潤沢に調製することが可能となった心筋細胞及び心筋前駆細胞をこのラット心筋梗塞モデルに適用し、マウス ES 細胞由来心臓細胞の細胞移植を行った。

④ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導

研究代表者らはすでに心血管分化に関するヒト ES 細胞の使用研究の認

可を受け、ヒト ES 細胞からの心筋細胞誘導に成功している。また①②を通して iPS 細胞からの効率的な心筋分化誘導も可能となっている。これらの手法をヒト iPS 細胞に適用し、ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導を試みた。

⑤細胞シート技術を用いた心筋細胞シート移植

研究代表者は、東京女子医科大学岡野光夫教授・清水達也准教授らとの共同研究を約 8 年前より開始しており、温度応答性培養皿を用いた細胞シート技術の ES 細胞への導入を進めてきた。②により潤沢に心筋細胞が得られるようになり、本研究が急速に進展した。マウス ES 細胞から誘導した心筋細胞を温度応答性培養皿上で培養後、心筋細胞シートとして回収する。心筋細胞シートをラット心筋梗塞モデルの梗塞巣上に貼付し、心機能や梗塞巣の変化を解析した。

C. 研究結果

①マウス ES 細胞において用いた方法をマウス iPS 細胞に適用した。誘導効率・時間などほぼすべての分化特性はマウス ES 細胞と同等と考えられた。マウス iPS 細胞からの種々の心血管細胞分化誘導法を開発した(Narazaki, *Circulation*, 2008)。本論文は、2008 年 *Circulation* 誌掲載全論文中から基

礎科学部門第 1 位 Best Paper Award を受賞し高く評価された。

②純化 Flk1 陽性細胞を OP9 上で培養する際に、免疫抑制剤サイクロスポリン A を添加すると心筋細胞の著しい増加を認めた (約 10-20 倍)。サイクロスポリン A は、Flk1 陽性中胚葉細胞に特異的に作用し、FCV 心筋前駆細胞を特異的に増加させた (約 20 倍)。ES 細胞由来心筋前駆細胞を特異的に増加させる初めての方法として *Biochem Biophys Res Commun* 誌に報告する(Yan, 2009)とともに国際特許出願を行った(PCT/JP2008/066033)。

③②で誘導された心筋及び心筋前駆細胞を用いて、心筋梗塞モデルラットに needle injection により 0.4×10^6 および 1.0×10^6 細胞移植を行った。心筋細胞移植においては組織学的に少量の生着細胞を認めるのみであったが、前駆細胞移植では明らかに多い移植細胞由来の心筋細胞を認めた。移植細胞による再生心筋の量は、分化心筋細胞の移植に比べ、心筋前駆細胞移植では約 20 倍多いと考えられた。

④ヒト iPS 細胞をマウス内胚葉系支持細胞 END2 上で培養することにより、拍動心筋細胞を誘導することに成功している。誘導された細胞は、同期した Ca 取り込みや心筋型活動電位を示し、サルコメア構造、筋線維や豊富なミトコンドリア、グリコーゲン顆粒

など心筋としての機能的構造的特徴を備えていた。ヒト iPS 細胞からの機能心筋細胞の誘導に成功した。

⑤積層化したマウス ES 細胞由来心筋細胞シートをラット心筋梗塞モデルに移植した。移植後 2 週、4 週において、対照に比し明らかな心収縮力の改善を認めた。梗塞巣の縮小及び移植心筋がサルコメア構造を有する心筋細胞として存在することも確認された。

D. 考察

マウス iPS 細胞からの心筋など循環器系細胞の分化誘導は、2008 年に研究代表者らのものを含めて計 3 報が報告されたのが最初である。中でも研究代表者らの業績は 2008 年に *Circulation* 誌に掲載されたすべての論文の中から、Basic Science 部門第 1 位の **Best Paper Award** を受賞するなど非常に高い評価を得ている。サイクロスポリン A による心筋前駆細胞特異的分化促進効果は、心筋前駆細胞を大量に調製し、心筋前駆細胞移植治療という新しい可能性を開く重要な成果である。実際、本方法の開発により、⑤の心筋細胞シート移植実験が飛躍的進展を示した。さらにマウス及びヒト iPS 細胞への応用展開が期待される。細胞移植に関しては、従来行ってきた *needle injection* による組織への局所注入では移植した幹細胞の生着

率が低いことが推察される。*Needle injection* に代わる移植法として、最近では細胞シートまたは細胞塊である *cardiosphere* を用いた方法が主流となりつつある。本実験においても、分化誘導した幹細胞を温度感受性培養皿を用いてシート化したものを移植に用い、明らかな心機能の改善を認めている。移植条件の最適化と移植効果を確認し、ヒトを含めた iPS 細胞への応用を行う。ヒト iPS 細胞からの心筋細胞の誘導とその機能確認にすでに成功している。サイクロスポリン法などとの併用により分化誘導効率の向上を試みる。

E. 結論

iPS 細胞からの心筋分化誘導法、その促進方法、細胞移植法等、本研究課題推進において必要とされるヒト iPS 細胞心筋分化技術に関して基盤となる成果を着実にあげることができたと考えられる。さらに心筋シート移植法の進展により当初の予想以上の成果が認められており、今後これらの成果を複合的にヒト iPS 細胞へ応用することにより、同細胞の臨床応用に向けた展開が開けることが大いに期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita JK. ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration. **Exp Cell Res**, in press
2. Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, Mitani K, Yamashita JK*. Convergence of Notch and β -catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. **J Cell Biol**, 189:353-367, 2010
3. Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK*. Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. **Blood**, 114: 3707-3716, 2009
4. Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu SI, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita JK, Arai Y, Kuwahara K, Takano M. The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. **Cardiovasc Res**, 83: 682-687, 2009
5. Sasaki D, Shimizu T, Masuda S, Kobayashi J, Itoga K, Tsuda Y, Yamashita JK, Yamato M, Okano T. Mass preparation of size-controlled mouse embryonic stem cell aggregates and induction of cardiac differentiation by cell patterning method. **Biomaterials**, 30: 4384-4389, 2009.
6. Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK*. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 379: 115-120, 2009

<和文総説>

1. 山下 潤. 「心不全に対する iPS 細胞の臨床応用」医学のあゆみ 232: 599-605, 2010. 医歯薬出版社
 2. 山下 潤. 「iPS 細胞研究の現状と展望」循環器科・特集「循環器疾患の再生医療 update」66: 472-480, 2009. 科学評論社
 3. 山下 潤. 「iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導とその応用」臨床検査 53: 1097-1103, 2009. 医学書院
 4. 山下 潤. 「iPS 細胞研究の現状と展望」分子血管病・特集「幹細胞研究の新展開」10: 18-26, 2009. 先端医学社
 5. 山下 潤. 「ES 細胞および iPS 細胞からの血管細胞分化」再生医療 8: 28-33, 2009. 日本再生医療学会雑誌
 6. 山下 潤. 「ES 細胞、iPS 細胞を用いた血管再生医療技術」幹細胞の分化誘導と応用 - ES 細胞・iPS 細胞・体性幹細胞研究最前線-. 第 3 章 p253-261, 2009. NTS.
 7. 山下 潤. 「iPS 細胞と心血管再生」Annual Review 循環器 2009. p1-p9, 2009. 中外医学社
 8. 山下 潤. 「iPS 細胞を用いた心血管再生」CLINICIAN「再生医療を考える」56: 61-74, 2009. エーザイ株式会社
 9. 山下 潤. 「血管再生」総合臨床 58: 72-78, 2009. 永井書店
- ### 2. 特許
- なし

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

分担研究報告書

ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究

研究分担者 池田 義

研究要旨 ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生療法の確立を目的とし、幹細胞から分化誘導した心筋細胞、心筋前駆細胞を用いて、in vivo における細胞移植法の開発と移植後のがんや奇形腫形成性など安全性の検討を行う。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、ヒト iPS 細胞の心臓細胞 (心筋および心筋前駆細胞) 分化誘導法、誘導細胞純化法、純化細胞の移植法の開発、及び移植細胞の奇形腫形成、がん形成等に関する安全性の検討に関する研究を行う。

昨年度の研究で、needle injection による移植では in vivo で十分な正着が得られないことが明らかになり、本年度はそれに変わる移植法の開発を重点的に研究した。

B. 研究方法

iPS 細胞由来心筋細胞移植の前段階として、より心筋分化効率が高いマウス EMG7 細胞 (α MHC-EGFP transgenic EB5) を用いて研究を行った。既に発表した方法により、マウス ES 細胞から心筋細胞等への分化誘導

を行い (Yamashita J et al. Nature 408: 92-6, 2000, Yamashita JK et al. FASEB J. 19: 1534-6, 2005)、温度感受性培養皿上で培養して心筋細胞シートを作製した。作製した心筋細胞シートを in vitro で積層化し、左前下行枝結紮により心筋梗塞を誘導した無胸腺ラット (F344/N Jcl-rnu/rnu) モデルに対して、梗塞部に貼付することで細胞移植を行った。移植後 2 週および 4 週目に心臓超音波および心臓カテーテル検査による生理学的心機能評価、病理組織学的評価を行った。

C. 研究結果

心筋細胞シートを貼付した群では、2 週後、4 週後のいずれにおいても心臓超音波検査によって左室収縮率の有意な改善が認められた。同様に心臓カテーテル検査によっても、左心室の収縮能の指標である Emax が有意に

上昇することが明らかとなった。

組織学的検討ではシリウスレッド染色による線維化部位の計測を行い、細胞シート貼付群で、梗塞部の繊維化領域の有意な縮小が認められた。

また、移植後1週目の段階で梗塞巣に移植されたマウス心筋細胞の生着が確認された。現在、移植された細胞の経時的変化を検討中である。心機能改善メカニズムの検討も進めている。

D. 考察

マウス ES 細胞から分化誘導させた心筋細胞等からなる細胞シートを製作した。このシートを用いてラット心筋梗塞モデルに対して、細胞移植を行い、*in vivo* で心機能改善効果が認められることを明らかにした。

E. 結論

幹細胞から分化誘導させた心筋細胞を用いて、ラット心筋梗塞モデルに対して細胞シート移植を行い、心機能の改善、左室リモデリングの抑制を得ることができた。

G. 研究発表

1. Yoshikawa E, Marui A, Tsukashita M, Nishina T, Wang J, Muranaka H, Ikeda T, Komeda M. Carvedilol may alleviate late cardiac remodelling following surgical ventricular restoration. Eur J

Cardiothorac Surg. 2010; 37(2):362-367.

2. Shimamoto T, Marui A, Nagata Y, Sato M, Saito N, Takeda T, Ueda M, Ikeda T, Sakata R, Inoue K. A novel approach to prevent spinal cord ischemia: Inoue stent graft with a side branch of small caliber for the reconstruction of the artery of Adamkiewicz. J Thorac Cardiovasc Surg. 2010;139(3):655-659.

3. Yamazaki K, Miwa S, Toyokuni S, Nemoto S, Oriyanhan W, Takaba K, Saji Y, Marui A, Nishina T, Ikeda T, Komeda M. Effect of edaravone, a novel free radical scavenger, supplemented to cardioplegia on myocardial function after cardioplegic arrest: in vitro study of isolated rat heart. Heart Vessels. 2009; 24(3):228-235.

4. Wang J, Tsukashita M, Nishina T, Marui A, Yoshikawa E, Muranaka H, Matsuoka S, Ikeda T. Chronic partial unloading restores beta-adrenergic responsiveness and reverses receptor downregulation in failing rat hearts. J Thorac Cardiovasc Surg. 2009; 137(2): 465-470.

5. Lin X, Tambara K, Fu M, Yamamoto M, Premaratne GU, Sakakibara Y, Marui A, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y. Controlled release of matrix metalloproteinase 1 with or without skeletal myoblasts transplantation improves cardiac function of rat hearts

with chronic myocardial infarction. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(9): 2699-2706.

6. Esaki J, Sakaguchi H, Marui A, Bir SC, Arai Y, Huang Y, Tsubota H, Kanaji T, Ikeda T, Sakata R. Local sustained release of prostaglandin E1 induces neovascularization in murine hindlimb

ischemia. *Circ J*. 2009;73(7):1330-1336.

7. Bir SC, Esaki J, Marui A, Yamahara K, Tsubota H, Ikeda T, Sakata R. Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: characterization in-vitro and in the ischemic hind limb of the mouse. *J Vasc Surg*. 2009;50(4):870-879 e872.

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山下 潤	ES細胞、iPS細胞を用いた血管再生医療技術	中辻憲夫	幹細胞の分化誘導と応用 - ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線-	NTS	東京	2009	253-261
山下 潤	iPS細胞と心血管再生	山口徹、高本真一、中澤誠、小室一成	Annual Review 循環器2009	中外医学社	東京	2009	1-9

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamashita JK.	ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration.	Exp Cell Res			in press
Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, Mitani K, Yamashita JK.	Convergence of Notch and β -catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors.	J Cell Biol	189	353-367	2010
山下 潤	心不全に対するiPS細胞の臨床応用	医学のあゆみ	232	599-605	2010
Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK	Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1.	Blood	114	3707-3716	2009
Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu SI, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita JK, Arai Y, Kuwahara K, Takano M.	The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2.	Cardiovasc Res	83	682-687	2009

Sasaki D, Shimizu T, Masuda S, Kobayashi J, Itoga K, Tsuda Y, Yamashita JK, Yamamoto M, Okano T.	Mass preparation of size-controlled mouse embryonic stem cell aggregates and induction of cardiac differentiation by cell patterning method.	Biomaterials	30	4384-4389	2009
Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK	Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells.	Biochem Biophys Res Commun	379	115-120	2009
山下 潤	iPS細胞研究の現状と展望	循環器科	66	472-480	2009
山下 潤	iPS細胞からの心血管細胞の分化誘導とその応用	臨床検査	53	1097-1103	2009
山下 潤	iPS細胞研究の現状と展望	分子血管病	10	18-26	2009
山下 潤	ES細胞およびiPS細胞からの血管細胞分化	再生医療	8	28-33	2009
山下 潤	iPS細胞を用いた血管再生	Clinician「再生医療を考える」	56	61-74	2009
山下 潤	血管再生	総合臨床	58	72-78	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

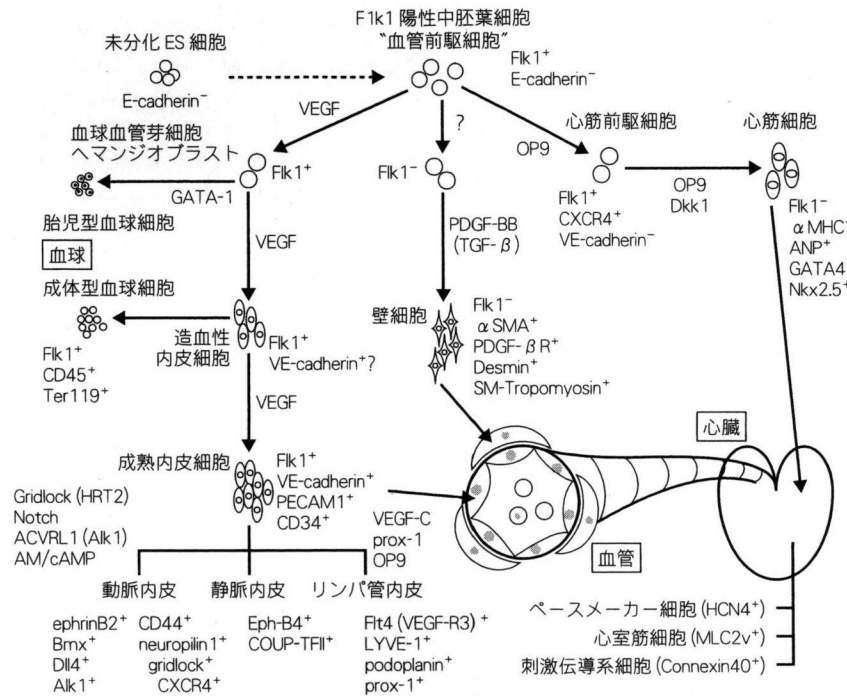
未分化性と分化能を維持したまま無尽蔵に増殖することができるES細胞(胚性幹細胞: Embryonic Stem cells)は、再生医療への応用がその大きな使命であり研究ターゲットとされているが、日本ではまだヒトES細胞の臨床応用は認められていない。世界的にもES細胞由来細胞をヒトに用いた治療の報告はない。また、最近の体性幹細胞(成体内に存在する幹細胞)研究は、細胞移植に至るハードルが倫理面、安全面等でES細胞よりも低いため、再生医療応用において注目されている。にもかかわらず、ヒトを含めたES細胞研究は国内および世界的広がりを見せている。ES細胞研究は、直接的な細胞治療応用のみならず、細胞分化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

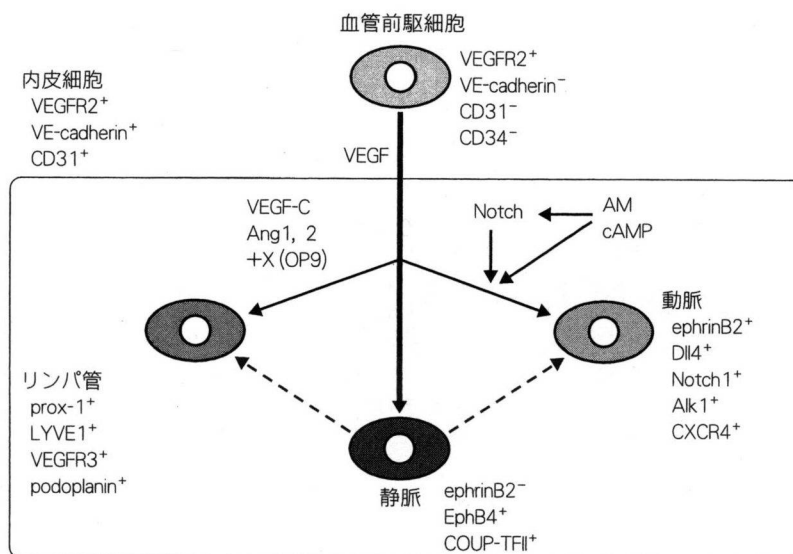


ES細胞由来 Flk1 陽性細胞は、そこから全ての心血管構成細胞(内皮細胞、壁細胞、血球細胞、心筋細胞)が分化することのできる共通の前駆細胞と考えられる。Flk1 陽性細胞から分化した内皮細胞は、一時的に血球形成能を有する時期があるが、その後内皮細胞が成熟するにしたがって血球形成能は失われる。内皮細胞は成熟するとともに多様化も同時に行い、動脈、静脈、リンパ管内皮をはじめとしたさまざまな内皮細胞に分化すると考えられる。VEGF が Flk1 に結合することによるシグナルが不十分であると Flk1 の発現は失われ、主に PDGF-BB の作用により壁細胞が誘導される。これら誘導された血管構成細胞は、培養下および体内において血管構造を形成できる。誘導された内皮細胞は、培養条件によりさらに動静脈リンパ管に分化する。また Flk1 陽性細胞を OP9 ストロマ細胞上で培養することにより、心筋前駆細胞を経て心筋細胞が分化誘導される。誘導心筋細胞には、ペースメーカー細胞、心室筋細胞、刺激伝導系細胞に類似した多様な細胞が含まれる。

図1 Flk1 陽性細胞からの心血管細胞の分化

シグナルの活性化が誘導され、ephrinB2 陽性の動脈内皮細胞が誘導されることを明らかにした⁷⁾。また一方、Flk1 陽性細胞を OP9 ストロマ細胞上で培養して内皮細胞を誘導したところ、prox-1 陽性リンパ管内皮細胞が出現した。この OP9 によるリンパ管誘導作用は、VEGF-C および angiopoietin の作用をブロックすることによりほぼ完全に阻害されたが⁸⁾、VEGF-C と angiopoietin のみではリンパ管内皮は誘導されず、OP9 細胞由来の何某かの因子が必要であると考えられた。これらの結果により、ES 細胞を用いて、動脈、静脈、リンパ管内皮細胞の全てを系統的に分化誘導することが可能になるとともにその新たな分化メカニズムが明らかになった⁹⁾。現在、それぞれの分化誘導因子や分化機構のさらなる検討を行っている(投稿中)。

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