

Flk1 陽性細胞を OP9 細胞と共培養する際にサイクロスポリン A を加えることにより、心筋細胞および前駆細胞を約 10~20 倍効率的に誘導できることを示した。同方法をマウスおよびヒト iPS 細胞に応用することにより、心筋細胞を約 5 倍効率的に誘導することにも成功している(投稿中)。

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、マウスおよびヒト ES 細胞研究がその土台となり、また常に比較対象のゴールド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 細胞研究はさらにその重要性を増していると考えられる。

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り、病態解明や創薬治療応用など様々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、および患者特異的 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など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。

1) 効率的な心血管分化誘導法および純化法の開発

ヒトの心筋梗塞においては 10^9 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良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²⁰⁾。筆者らのマウス ES 細胞の系では、ES 細胞 1 個から約 200 個の心筋細胞誘導が可能であり、マウスに比してヒト細胞からの分化誘導効率はかなり低い。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。

2) 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。元になる 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り、1)から2)の間には実は大きな隔りがある。

3) 細胞移植法の開発

1)、2)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。

4) ヒトにおける評価

1)~3)を経てようやくヒトへの応用が可能となると考えられる。実験的医療としての患者への細胞移植例や有効例などは比較的早く数年単位で報告されるかも知れない。しかし、1つの細胞治療法が安全性と有効性の確認を経て一般的に使用される治療法として確立されるまでには通常の薬剤と同等以上の多大な労力と時間を要する可能性がある。

2. 患者特異的モデル細胞

患者自身から細胞を採取し患者特異的な iPS 細胞を樹立できるという iPS 細胞にしかない特性は、移植免疫を回避した細胞治療ということだけでなく、全く新しい形で病態の解明や創薬への応用が可能である^{21,22)}。

1) 病態解明

心筋症, QT 延長症候群, 洞不全症候群など心臓を構成する細胞そのものに起因すると考えられる疾患が中心となると思われるが, 患者自身の細胞から iPS 細胞を樹立し, そこから該当する細胞を分化誘導し種々のモデル細胞を構築できることは, 病態解明に全く新しい手段を提供する. すなわち, これまでごく少量の生検サンプルの解析に限局されていたものが, 個々の症例から生きた細胞を潤沢に得られることにより, 標的細胞の遺伝子解析, 機能解析や薬剤の効果判定などを, 実際の症例に関して繰り返し行うことが可能となる. 原因遺伝子不明の症例においてもモデル細胞が構築できるので, モデル細胞を用いた原因遺伝子探索も可能となる. このように病態解明に向けたアプローチの方法は飛躍的に増大すると考えられる.

2) 創薬応用

iPS 細胞の創薬応用には大きく, 新規薬剤の探索と薬剤安全性試験への応用の 2 つが考えられる. 疾患モデル細胞を用いて, 同細胞の異常を改善する新規薬剤や疾患特異的に作用する薬剤などの探索が可能となる. また培養下における分化モデルを用いることにより, 心筋分化促進物質などの新たな生理活性物質の探索も可能となる. 筆者ら²³⁾は, マウス iPS 細胞を用いて 3 次元培養下における血管構造形成モデルを構築し, 新規海洋生物由来ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase; HDAC) 阻害物質 azumamide の血管形成抑制作用を示すことに成功した. 同モデルを用いた血管形成抑制または促進物質の探索が可能と考えられる. さらにこうしたシステムを患者特異的 iPS 細胞を用いて構築することにより, 疾患特異的作用物質の探索などにも展開可能と考えられる.

受精卵を用意することが必要であるヒト ES 細胞と比べて, iPS 細胞は数多くの細胞株を樹立しやすく iPS 細胞バンクが構築しやすい. そこから細胞を誘導して array (アレイ) 化することにより, 種々のヒトモデル細胞パネルのようなものを構築することができる. こうしたヒトモデル細胞

パネルは, 薬剤の安全性試験に応用可能と考えられる. 例えば, 千人分や万人分などの心筋細胞や肝細胞を並べたパネルを用いて薬剤の細胞毒性をスクリーニングすることにより, 稀に発生する心毒性や肝障害などを事前に検出できるかもしれない. さらに障害を起こす細胞を解析し原因を明らかにすることにより, 副作用を起こす症例を事前に特定し投薬を避ける「テーラーメイド医療」に貢献しうる可能性もある.

3. その他動物モデルへの応用

循環器病関係のモデル動物には, マウスモデルばかりでなくマウス以外の動物種のものも数多くある (高血圧自然発症ラット, 糖尿病モデルラット, 心筋症ハムスターなど). これらモデル動物からの iPS 細胞の樹立が可能となれば, モデル動物と同動物由来細胞を用いて, 動物モデルと細胞実験を相互対応させながら新しい病態の解析を行うことなどが可能となると考えられる. またマウスと同様に遺伝子組み換えによる新たな動物モデルの作製も可能となる. 長らく不可能であったラットからの ES 細胞樹立が 2008 年によくなされたが²⁴⁾, iPS 細胞の樹立は種々の動物で盛んにすすめられ, ラット, ネコ, ゾウ, ミニブタなどにおける樹立がすでに報告されている^{25, 26)}.

おわりに

このように, 心血管の発生・分化・再生機構に関して様々な知見が蓄積されてきているが, 心血管再生治療はまだ開発初期段階にあると考えられる. 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. iPS 細胞の出現は, これまでの ES 細胞をはじめとする再生医学研究に数多くの新たな可能性を与えた. しかし, iPS 細胞の出現が解決した問題は, ヒト ES 細胞樹立に際する倫理的問題と移植免疫を受けない細胞を準備しうる, という点だけであり, その他すべてのハードルは残されたままである. ここで述べた iPS 細胞の新しい可能

性も含め研究はスタートしたばかりであり、地道なしかし迅速な研究を真摯に進めていくことが求められる。

文 献

- 1) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408 : 92-96, 2000
- 2) Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, et al : Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 19 : 1534-1536, 2005
- 3) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, et al : Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 1977-1984, 2006
- 4) Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al : Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 2070-2076, 2006
- 5) Sone M, Itoh H, Yamahara K, 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 : 2127-2134, 2007
- 6) Yamahara K, Sone M, Itoh H, et al : Augmentation of neovascularization [corrected] in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS One* 3 : e1666, 2008
- 7) Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118 : 498-506, 2008
- 8) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26 : 101-106, 2008
- 9) Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al : Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321 : 699-702, 2008
- 10) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al : Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322 : 949-953, 2008
- 11) Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, et al : Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118 : 507-517, 2008
- 12) Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, et al : Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 26 : 1537-1546, 2008
- 13) Xie C, Huang H, Wei S, et al : A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 18 : 741-748, 2009
- 14) Taura D, Sone M, Homma K, et al : Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 : 1100-1103, 2009
- 15) Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, et al : Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27 : 559-567, 2009
- 16) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104 : e30-41, 2009
- 17) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, et al : In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 385 : 497-502, 2009
- 18) Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al : Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107 : 2733-2740, 2003
- 19) Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, et al : Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 379 : 115-120, 2009
- 20) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al : Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25 : 1015-1024, 2007
- 21) Yamanaka S : A fresh look at iPS cells. *Cell* 137 : 13-17, 2009
- 22) Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR : The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 : 725-729, 2008
- 23) Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, 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 : 2982-2984, 2008
- 24) Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al : Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135 : 1299-1310, 2008
- 25) Trounson A : Rats, cats, and elephants, but still no unicorn : induced pluripotent stem cells from new species. *Cell Stem Cell* 4 : 3-4, 2009
- 26) Esteban MA, Xu J, Yang J, et al : Generation of induced pluripotent stem cell lines from tibetan miniature pig. *J Biol Chem* 284 : 17634-17640, 2009

iPS 細胞研究の現状と展望

山下 潤*

YAMASHITA Jun

*京都大学再生医科学研究所・幹細胞分化制御研究領域

SUMMARY

iPS 細胞（人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells）は、線維芽細胞など分化した細胞に特定の遺伝子群を導入することにより、ES 細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cells）様の万能の幹細胞の性質をもたせることに成功したまったく新しい幹細胞である。ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞における倫理的問題、すなわち i) ヒト ES 細胞樹立時にヒト受精卵を壊す必要、と ii) 免疫拒絶を受けない ES 細胞の樹立のためヒト体細胞クローン胚をつくる必要、の 2 点を一気に回避できる画期的発明である。しかし、iPS 細胞には依然として「未分化 iPS 細胞が移植されると奇形腫を形成する」という問題は存在しているし、iPS 細胞特有の「遺伝子導入による癌化の問題」などもある。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もって iPS 細胞の今後に対応することが必要であろう。

POINTS

- iPS 細胞は成体組織から誘導された ES 細胞様の万能幹細胞である。
- iPS 細胞は ES 細胞と同様に心血管細胞に分化する。
- iPS 細胞は、再生医療・病態解明・創薬研究などさまざまな形で臨床に貢献する。
- iPS 細胞は、臨床応用以外にも幅広い研究に応用が可能である。
- 良識と叡知をもって冷静に iPS 細胞の今後に対応することが必要である。

KEY WORDS

ES 細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cells）、iPS 細胞（人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells）、regeneration, differentiation

はじめに；iPS 細胞登場の背景と意義

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）と呼

ばれる部位を取り出して樹立した細胞株であり、体中すべ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（昭和 56）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（昭和 60）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 (KO) マウスなどのさまざま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 Sir Martin Evans は、2007 (平成 19) 年のノーベル医学生理学賞を KO マウスの開発をおこな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 (平成 10) 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、とくに未分化 ES 細胞が誤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した未受精卵に核移植したクローン胚) をつく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 (平成 18) 年京都大学の Yamanaka らによって報告された¹⁾。2007 年には Yamanaka らおよび 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、上述の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述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・癌化の問

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述べることにする。

■ I. マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞と同様に心血管細胞に分化する

われわれはこれまでマウスおよびヒト ES 細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究をおこなってきた。すなわち、マウス未分化 ES 細胞から血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の受容体の 1 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 細胞の系統的な心血管細胞分化システムをマウス iPS 細胞に導入し、われわれはいち早く 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 および血清存在下に培養することによりおもに静脈を中心とする内皮細胞および壁細胞が (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、分化効率などはほとんどマウス ES 細胞と変わりがなかった。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

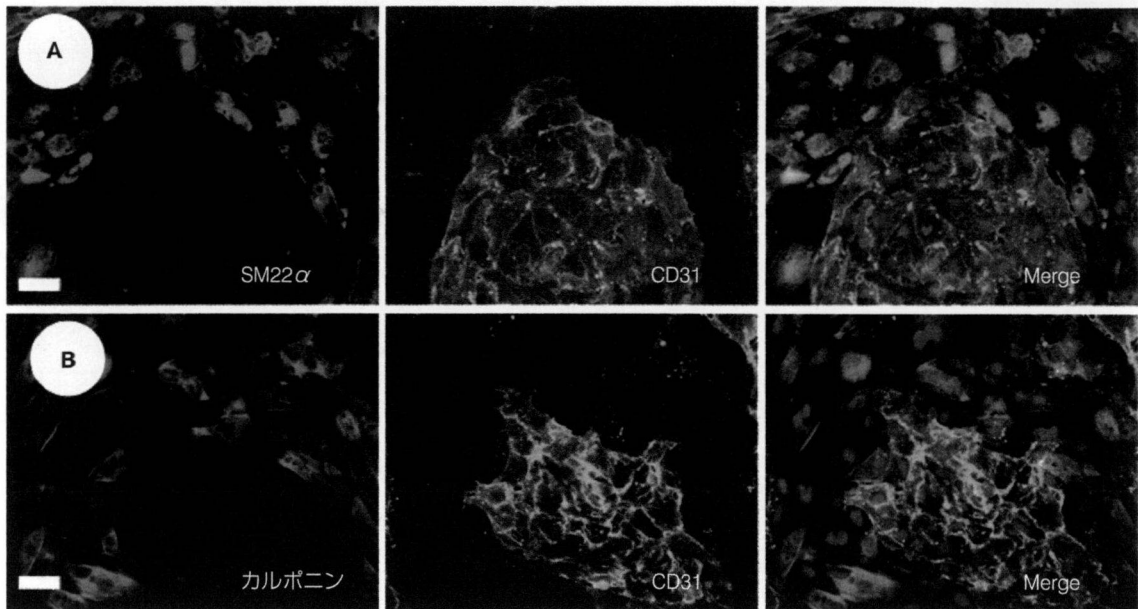


図1 マウス iPS 細胞からの血管内皮・壁細胞分化

マウス iPS 細胞由来 Flk1 陽性細胞を VEGF およ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 (A)またはカルボニン陽性壁細胞(B)(赤)が選択的に誘導される。(Narazaki G *et al.*, 2008¹⁰)より改変引用)

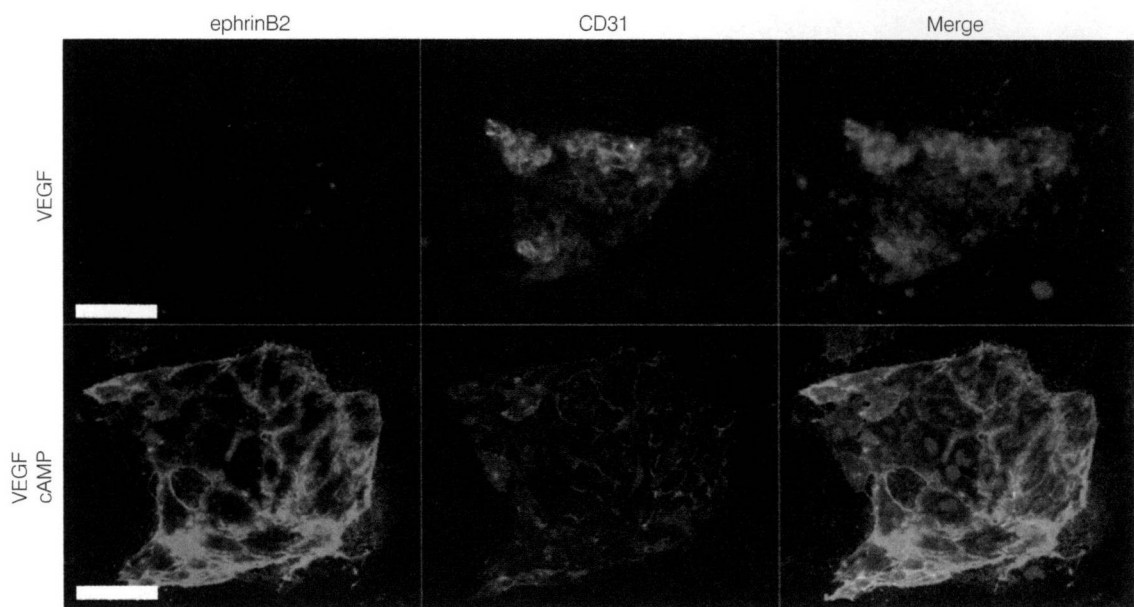


図2 マウス iPS 細胞からの動静脈内皮細胞分化

Flk1 陽性細胞を VEGF およ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)。(Narazaki G *et al.*, 2008¹⁰)より改変引用)

あった(図5)。また、iPS 細胞由来細胞の担癌ヌードマウスへの細胞移植実験により、iPS 細胞由来血管細胞が内皮および壁細胞として生体内血管新生に寄与しうるこ

とも確認している(未発表)。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見える例が観察された。

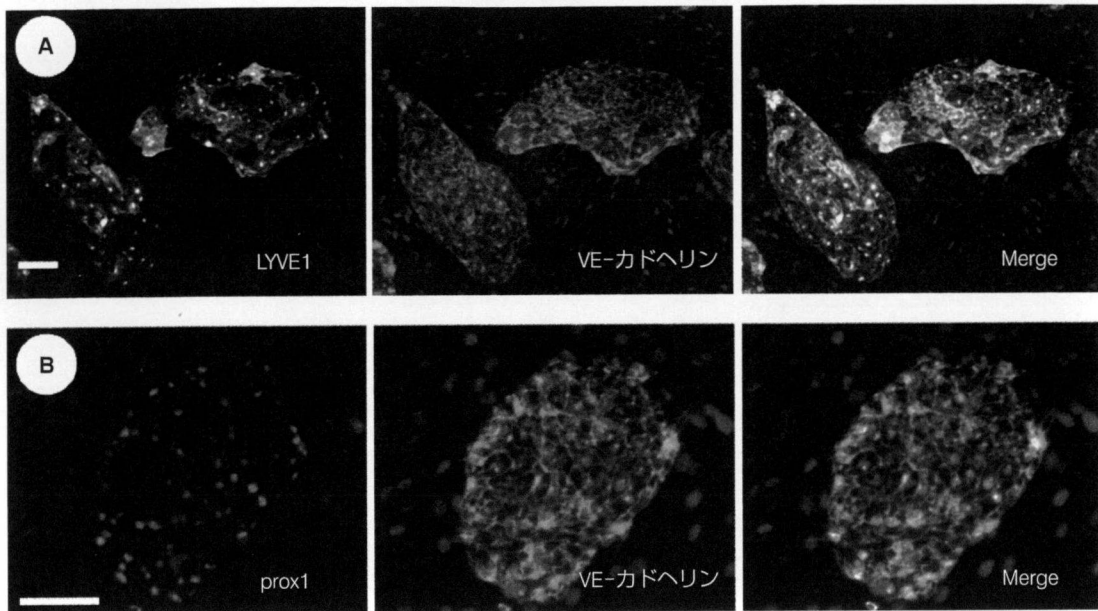


図3 マウス iPS 細胞からのリンパ管内皮細胞分化
Flk1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することにより、LYVE1 陽性 (A) または prox1 陽性 (B) かつ VE-カドヘリン陽性のリンパ管が誘導される。
(Narazaki G *et al.*, 2008¹⁰)より改変引用)

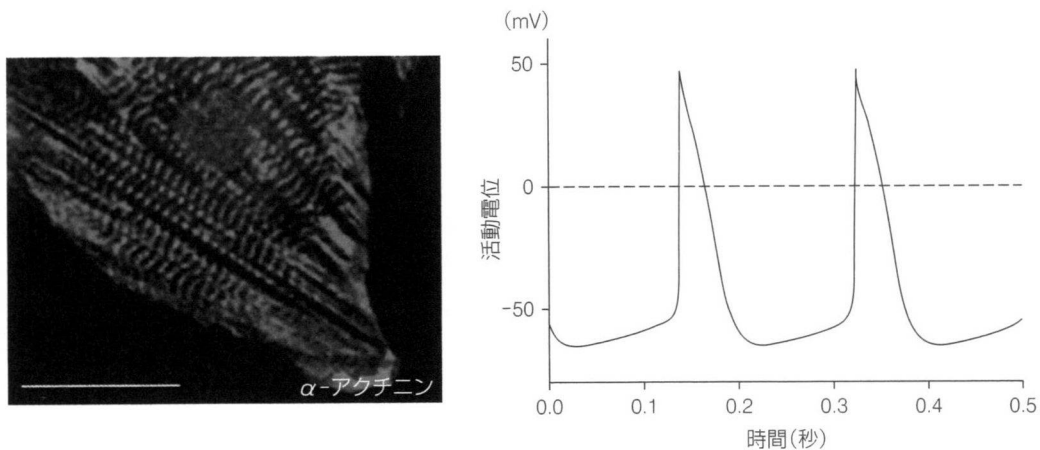


図4 マウス iPS 細胞からの心筋細胞分化
Flk1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することにより、拍動心筋細胞が出現する。拍動細胞は sarcomere 構造を示し (左: 赤: アクチニン染色), ペースメーカー細胞様の活動電位を示す (右)。
(Narazaki G *et al.*, 2008¹⁰)より改変引用)

明らかに癌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、心筋細胞を誘導したとの報告¹¹⁾およびわれわれに類似した分化システムを用いた心血管細胞分化の報告¹²⁾と血管平滑筋分化の報告¹³⁾のそ

れぞれ1報ずつがあるのみである(2008年10月末現在)。

■ II. ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様の特性を示す

われわれはヒト 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

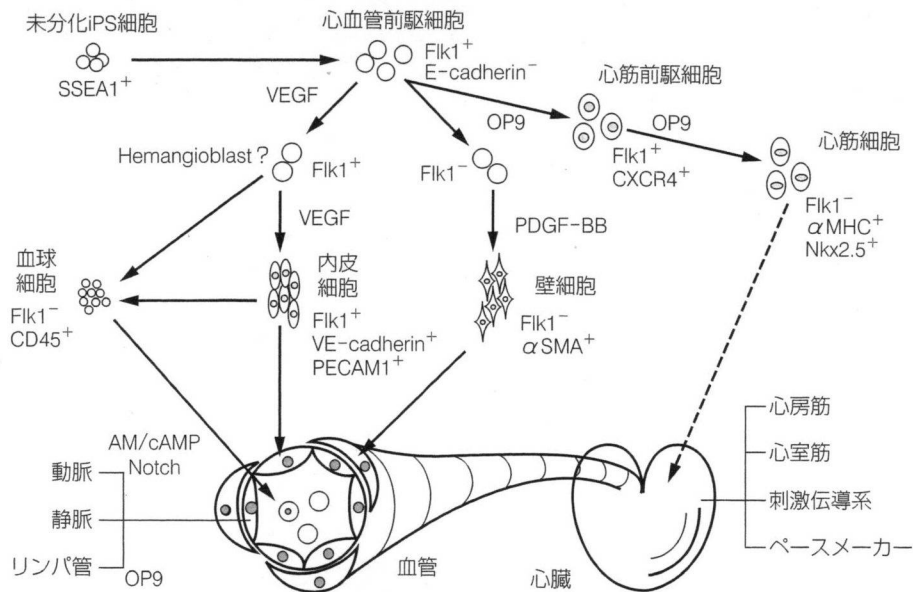


図6 マウス iPS 細胞からの系統的心血管細胞分化

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細胞、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。

(Narazaki G *et al*, 2008¹⁰)より改変引用)

誘導・樹立されたヒト iPS 細胞は、その維持およ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。われわれは、ヒト ES 細胞において報告されている心筋分化誘導法¹⁴⁾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 Ca^{2+} 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)。

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、マウスおよびヒト 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していると考えられる。

■ Ⅲ. iPS 細胞研究は、再生医療・病態解明・創薬研究などさまざまな形で臨床に貢献する

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り、病態解明や創薬治療応用などさまざまな形で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の問題、および患者特異的 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など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および純化法の開発

ヒトの心筋梗塞においては 10^9 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良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¹⁵⁾。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（医薬品および医薬部外品の製造管理および品質管理の基準）の医薬品と同様な品質管理のもと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・純化がおこな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。

d) ヒトにおける評価

a) からc) を経てようやくヒトへの応用が可能となると考えられる。実験的医療としての患者への細胞移植例や有効例などは比較的早く数年単位で報告されるかもしれない。しかし、1つの細胞治療法が安全性と有効性の確認を経て一般的に使用される治療法として確立されるまでには通常の薬剤と同等以上の多大な労力と時間を要する可能性がある。

2) 患者特異的モデル細胞

患者自身から細胞を採取し患者特異的なiPS細胞を樹立できるというiPS細胞にしかない特性は、移植免疫を回避した細胞治療ということだけでなく、まったく新しい形で病態の解明や創薬への応用が可能である¹⁶⁾¹⁷⁾。

a) 病態解明

心筋症、QT延長症候群、洞不全症候群など心臓を構成する細胞そのものに起因すると考えられる疾患が中心となると思われるが、患者自身の細胞からiPS細胞を樹立し、そこから該当する細胞を分化誘導し種々のモデル細胞を構築できることは、病態解明にまったく新しい手段を提供する。すなわち、これまではごく少量の生検サンプルの解析に限局されていたものが、個々の症例から生きた細胞を潤沢に得られることにより、標的細胞の遺伝子解析、機能解析や薬剤の効果判定などを、実際の症例に関してくり返しおこなうことが可能となる。原因遺伝子不明の症例においてもモデル細胞が構築できるので、モデル細胞を用いた原因遺伝子探索も可能となる。このように病態解明に向けたアプローチの方法は飛躍的に増大すると考えられる。

b) 創薬応用

iPS細胞の創薬応用には大きく新規薬剤の探索と薬剤安全性試験への応用の2つが考えられる。疾患モデル細胞を用いて、同細胞の異常を改善する新規薬剤や疾患特異的に作用する薬剤などの探索が可能となる。また培養下における分化モデルを用いることにより、心筋分化促進物質などの新たな生理活性物質の探索も可能となる。われわれは、マウスiPS細胞を用いて3次元培養下における血管構造形成モデルを構築し、新規海洋生物由来HDAC（ヒストン脱アセチル化酵素）阻害物質Azumamideの血管形成抑制作用を示すことに成功した¹⁸⁾。同モデルを用いた血管形成抑制または促進物質の探索が可能と考えられる。さらにこうしたシステムを患者特異的iPS細胞を用いて構築することにより、疾患特異的作用物質の探索などにも展開可能と考えられる。

受精卵を用意することが必要であるヒトES細胞とくらべて、iPS細胞は数多くの細胞株を樹立しやすくiPS細胞バンクが構築しやすい。そこから細胞を誘導してarray（アレイ）化することにより、種々のヒトモデル細胞パネルのようなものを構築することができる。こうしたヒトモデル細胞パネルは、薬剤の安全性試験に応用可能と考えられる。たとえば、千人分や万人分などの心筋細胞や肝細胞を並べたパネルを用いて薬剤の細胞毒性をスクリーニングすることにより、稀に発生する心毒性

や肝障害などを事前に検出できるかもしれない。さらには障害を起こす細胞を解析し原因を明らかにすることにより、副作用を起こす症例を事前に特定し投薬を避ける「テーラーメイド医療」に貢献しうる可能性もある。

3) その他動物モデルへの応用

循環器病関係のモデル動物には、マウスモデルばかりでなくマウス以外の動物種のものも数多くある(高血圧自然発症ラット, 糖尿病モデルラット, 心筋症ハムスターなど)。これらモデル動物からのiPS細胞の樹立が可能となれば、モデル動物と同動物由来細胞を用いて、動物モデルと細胞実験を相互対応させながら新しい病態の解析をおこなうことなどが可能となると考えられる。

■ IV. iPS細胞研究は今後、細胞の改良を中心にさまざまな基礎・臨床研究への応用へ進む

iPS細胞に関する研究は今後、iPS化(初期化)機構に関するもの、iPS細胞そのものを利用したもの、iPS化という現象を利用したものなど多岐にわたって進められると思われる。

1) iPS細胞の改良

iPS細胞は当初、3~4個の遺伝子をレトロウイルスを用いて導入することにより誘導されているが、細胞治療に用いることができるレベルのiPS細胞を樹立するためには、誘導法、誘導効率などの改良が必要である。

a) c-myc トランスジーンなし iPS細胞

iPS細胞誘導に用いた4因子の1つであるc-mycは癌遺伝子の1つであり、実際mycありiPS細胞由来のマウス個体では高率に癌が発生した。その後mycを除いた3因子でもiPS細胞誘導が可能となったが、mycなしiPS細胞由来マウス個体では癌の発生がほとんど認められなくなった¹⁹⁾。

b) レトロウイルスなし iPS細胞

現在iPS細胞誘導にはレトロウイルスによる遺伝子導入がおこなわれている。レトロウイルスにより導入された遺伝子はゲノム上のどこかに組み込まれることになる

ので、導入遺伝子が組み込まれた場所によっては、癌化を含む種々の細胞の変異をもたらす可能性がある。レトロウイルスを用いずゲノムをintactに保ったままの遺伝子導入の方がより安全なiPS細胞を樹立できると考えられる。2008(平成20)年9月に米国よりアデノウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現によるiPS細胞誘導が“Science”誌に報告された²⁰⁾。

c) ウイルスベクターなし iPS細胞

上述アデノウイルスによる報告のわずか1週間後、ウイルスベクターを用いずプラスミドのみによるiPS細胞誘導法がYamanakaらにより同じく“Science”誌に報告されている²¹⁾。このように、iPS細胞が報告されてからわずか2年であるがiPS細胞の改良は急速に進んでいる。

d) トランスジーンなし iPS細胞

ウイルスを用いない場合でも、遺伝子操作をした細胞のヒトへの移植応用は慎重におこなわれるべきと考えられている。遺伝子操作をおこなわず、蛋白を作用させたり低分子化合物を用いてiPS細胞を誘導しようとする試みが盛んにおこなわれている。しかし、たとえば低分子化合物の多くは催癌性を有していることは古くから知られている。誘導に成功しても誘導された細胞のiPS細胞としての機能および安全性は厳密に評価される必要がある。

e) 誘導効率の改善

患者特異的iPS細胞バンクの構築など将来的には多数の安定したiPS細胞株を樹立できることが必要となる。そのために現在数%以下であるiPS細胞誘導効率を上げて、さまざまなヒトや組織からiPS細胞を樹立可能にしておく必要がある。

f) 培養方法の改善

ヒトへの細胞移植応用に用いるiPS細胞の場合は、血清やフィーダー細胞を用いずに樹立し、GMP基準を満たすレベルのiPS細胞を用意する必要がある。

2) iPS化(リプログラミング)機構の解析

3個または4個の特定の遺伝子を導入することにより、線維芽細胞などからiPS細胞が誘導されるという事実は明らかとなったが、その分子メカニズムはまったく不明である。遺伝子を導入された細胞のうち、iPS細胞化するのはいったいどの細胞で、iPS細胞化される細胞

の条件は何か？導入遺伝子の発現量やその組み合わせはどのように影響するのか？実際導入遺伝子がどのようにはたらくてiPS細胞化させているのか？など解決すべき問題は尽きない。

3) iPS細胞の医療応用

iPS細胞化のプロセスやメカニズムの解析とはまったく独立して、iPS細胞として樹立させたものを出発点とし、これをさまざまな形で利用する方法の開発もiPS細胞研究の大きな柱である。上で述べた心血管細胞をはじめ、神経細胞、膵β細胞など、さまざまな臓器・組織がiPS細胞を用いた再生医学研究のターゲットとなる。

4) その他

「一旦分化した細胞を簡便にリプログラミングして元に戻すことができる。」という新しい技術は、さまざまな研究に新しいストラテジーを提供する。リプログラミングそのものに関する研究はもちろんのこと、分化/脱分化におけるエピジェネティクス研究や癌化メカニズムの解析などiPS細胞研究が新しい展開をもたらすと考えられる研究領域は数多く存在する。

■ おわりに

ほ乳類の成体の細胞がリプログラミングされて未分化なものに戻りうることはクローン羊ドリーによってすでに示されていたが、その後10年を経て報告されたヒトiPS細胞樹立の報告がそれを上回る反響をもって迎えられたのは、iPS細胞のもつ応用範囲の広さによるであろう。「世界中どこでも施行可能な簡単な方法で成人由来の分化細胞から未分化幹細胞を誘導できる」ということが将来的に科学や社会に及ぼす影響は計り知れない。そこには当然功罪両面が生まれてくることになる。それはすべて科学者と社会が自ら責任を負うものである。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もってiPS細胞の今後に対応していくことが必要と考えられる。



文 献

- 1) Takahashi K *et al* : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 2) Takahashi K *et al* : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861-872, 2007
- 3) Yu J *et al* : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318 : 1917-1920, 2007
- 4) Yamashita J *et al* : Fkl1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408 : 92-96, 2000
- 5) Yamashita JK *et al* : Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 19 : 1534-1536, 2005
- 6) Yurugi-Kobayashi T *et al* : Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 1977-1984, 2006
- 7) Kono T *et al* : Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 2070-2076, 2006
- 8) Sone M *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 : 2127-2134, 2007
- 9) Yamahara K *et al* : Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS ONE* 3 : e1666, 2008
- 10) Narazaki G *et al* : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118 : 498-506, 2008
- 11) Mauritz C *et al* : Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118 : 507-517, 2008
- 12) Schenke-Layland K *et al* : Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 26 : 1537-1546, 2008
- 13) Xie C *et al* : A Comparison of Murine Smooth Muscle Cells Generated from Embryonic versus Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2008 [Epub ahead of print]
- 14) Mummery C *et al* : Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107 : 2733-2740, 2003
- 15) Laflamme MA *et al* : Cardiomyocytes derived from human

- embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* **25** : 1015-1024, 2007
- 16) Yamanaka S : Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **1** : 39-49, 2007
- 17) Nishikawa S *et al* : The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9** : 725-729, 2008
- 18) Nakao Y *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** : 2982-2984, 2008
- 19) Nakagawa M *et al* : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26** : 101-106, 2008
- 20) Stadtfeld M *et al* : Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322** : 945-949, 2008
- 21) Okita K *et al* : Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322** : 949-953, 2008

YAMASHITA Jun

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

やました・じゅん

1965年, 京都府生まれ。

1990年, 京都大学医学部卒業。

1998年, 京都大学医学博士。

2000年, 京都大学大学院医学研究科分子遺伝学・助手。

2002年, 京都大学大学院医学研究科分子遺伝学・助教授。

2003年, 京都大学再生医科学研究所・幹細胞分化制御研究領域・助教授(独立)。

2007年, 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(名称変更)。

現在に至る。

専門: 幹細胞生物学, 再生医学, 循環器内科学。

研究テーマ: ES細胞, iPS細胞を用いた心血管分化再生研究。

趣味: 音楽鑑賞(最近はおもにクラシック), ワイン, 子守。



ES 細胞および iPS 細胞からの血管細胞分化

Vascular cell differentiation from ES and iPS cells

Keywords

ES 細胞 (Embryonic stem cells)
iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells)
分化
血管再生

山下 潤

京都大学再生医科学研究所 幹細胞分化制御研究領域

Summary

We have been investigating molecular mechanisms of vascular development and regeneration using embryonic stem (ES) cells. Previously, we established an ES cell differentiation system that reproduces early vascular development using vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk1) -positive cells as common vascular progenitors. Recently, we succeeded in inducing arterial, venous, and lymphatic endothelial cells (ECs) from ES cells. More recently, a novel pluripotent stem cell line, induced pluripotent stem (iPS) cells, was established from mouse and human somatic cells. We applied our ES cell differentiation system to mouse iPS cells, and succeeded in systematically inducing cardiovascular cells from iPS cells. Time course and efficiency of the mouse iPS cell differentiation were all comparable with those of mouse ES cells. This study would largely contribute to novel understanding for iPS cell biology and the development of novel cardiovascular regenerative medicine. Here I discuss perspectives for vascular biology and medicine using ES and iPS cells.

はじめに

虚血性心疾患を中心とする心疾患および脳血管障害は日本における死因のそれぞれ第2位(10万対126)と3位(10万対102)を占め、両者を合わせると第1位の悪性新生物(がん)(10万対254)に肉薄する。一方国民医療費では、虚血性心疾患と脳血管障害を合わせると悪性新生物を上回り(2兆5千億 vs 2兆3千億円)(以上厚生労働省「平成16年度国民医療費の概況」)、心血管系疾患は、現在および未来にわたり日本の医療が取り組むべき最重要研究課題の1つと考えられる。近年の幹細胞生物学の発展を背景とした再生医療研究において、血管および心臓は最も急速に研究の進展が認められる臓器である。すなわち、さまざまな新しい心血管幹細胞・前駆細胞の発見や心血管分化機構の解析、さらには前駆細胞をヒトに用いた再生医療の試みまで、

Yamashita, Jun K

Laboratory of Stem Cell Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University
E-mail : juny@frontier.kyoto-u.ac.jp

基礎研究から臨床応用に至る幅広い知見が蓄積されてきた。なかでも血管は、骨髄細胞や末梢血細胞の虚血組織への移植、という細胞移植治療がすでに臨床の場にも応用され成果をあげており、近年の再生医療の発展において先駆的役割を果たしている。本稿は其中で万能の幹細胞として期待されるES細胞および最近樹立された新しい多能性幹細胞iPS細胞の血管分化とその応用に関する知見を中心に概説する。

ES細胞由来血管前駆細胞とその分化

筆者らはES細胞由来VEGFR2(2型血管内皮増殖因子受容体; Flk1)陽性細胞が、血管を構成する細胞である血管内皮細胞と血管壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)の共通の前駆細胞であり、VEGFR2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¹⁾。VEGFR2陽性の血管前駆細胞は、VEGF(血管内皮増殖因子)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VEGFR2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。

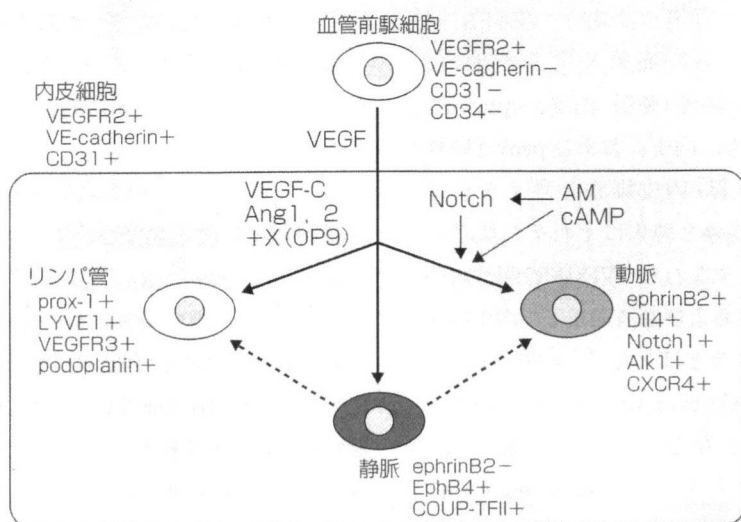
最近、動脈、静脈、リンパ管それぞれの内皮細胞特異的に発現している分子が数々報告され、内皮細胞の多様性

に分子的根拠が与えられるようになってきた²⁾。筆者らは最近、VEGFR2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³⁾⁴⁾。すなわち、VEGFR2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1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。また一方、VEGFR2陽性細胞をOP9ストロー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。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すべ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⁵⁾(図1)。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、動脈特異的血管新生やリンパ管特異的血管新生抑制による抗癌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。

ES細胞による血管再生

筆者らは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⁶⁾。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VEGFR2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VEGFR2陽性血管前駆細胞と、VEGFR2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。VEGFR2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他に、内皮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、ほとんどすべての細胞(95%以上)が内皮細胞として血管に寄与していた。また、VEGFR2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



VEGFR2 (Fik1) 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 1 VEGFR2 陽性細胞からの動静脈リンパ管内皮分化

められた。これらの結果より、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を合わせた至適な分化段階の細胞—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—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

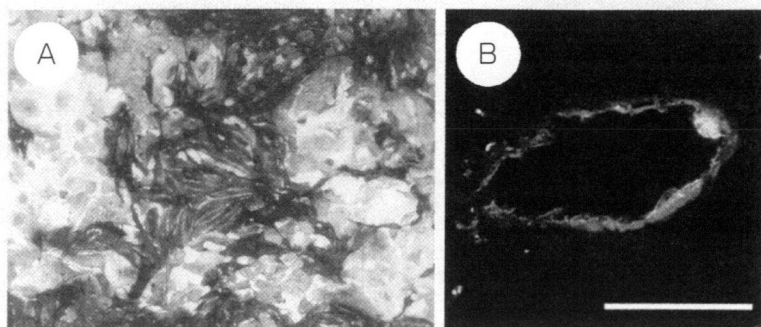
を効率的に促進できる微小環境ができるだけ再現されていることが、有効な再生の実現には重要であると考えられる。

血管再生治療においては、倫理面・安全面・技術面でハードルが低い骨髓細胞や末梢血、G-CSF などの薬剤を用いた血管新生治療が先行して行われ、優れた効果をあげている。心筋や神経と異なり、既存の組織からの新生が可能な血管においては、細胞による純粋な再生は必ずしも必要ではなく、ES 細胞治療がこれらの治療を凌駕して有用であるという知見は今のところない。しかし将来にわたっては、直接的

な細胞移植治療のみならずさまざまな血管再生治療のターゲットとなる新たなシーズを生み出し、血管特異的血管新生なども含めさらに治療法を精緻に改善向上させていく上で、ES 細胞の血管再生研究における意義は大きいと考えられる。

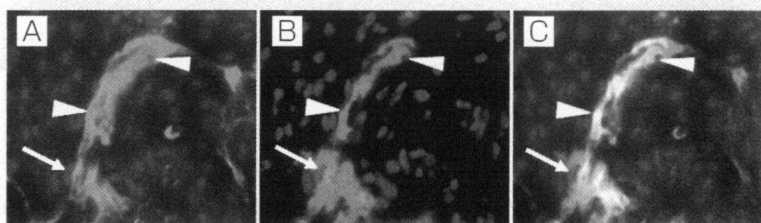
ヒト ES 細胞からの血管分化再生

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 VEGFR2 陽性細胞からの内皮細胞・壁細胞の分化⁷⁾、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(図 2)⁸⁾⁹⁾。また細胞移植の際に、純化した誘導内皮細胞のみを移植するよりも同時に誘導される壁細胞と混在した形で移植するほうが血管再生効果が高いことを見出している。同様の現象は ES 細胞由来心筋細胞移植の動物実験においても、純化



A : ヒトES細胞から誘導された VEGFR2 陽性細胞を FACS により単離した後、IV型コラーゲン上で、VEGF および血清存在下に培養すると、CD31 陽性内皮細胞(紫)と平滑筋 α アクチン陽性血管壁細胞(茶)が分化誘導される。
B : ノードマウス虚血肢に移植されたヒトES細胞由来内皮細胞は成体内血管再生に寄与する。全内皮細胞(isolectin 染色: 緑)。ヒトES細胞由来内皮細胞(Dil 染色: 赤)。Bar=50 μ m

図2 ヒトES細胞からの血管細胞分化(→巻頭Color Gravure 参照)



ノードマウスの腫瘍周囲に移植されたマウスiPS細胞由来血管細胞は成体内血管再生に寄与する。A: CD31 陽性内皮細胞(緑), B: iPS細胞由来細胞(赤), C: 合成画像。核(青)。iPS細胞由来CD31 陽性内皮細胞(矢頭)およびそれに隣接してiPS細胞由来CD31 陰性壁細胞(矢印)が認められる。

図3 マウスiPS細胞由来血管細胞による生体内血管新生(→巻頭Color Gravure 参照)

iPS細胞からの血管分化再生

iPS細胞は、線維芽細胞など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¹⁰⁾¹¹⁾。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。前述したマウス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三次元的形成にも成功した¹²⁾。また、担癌ノ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ていることも確認した(図3)。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ヵ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1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

心筋のみではなく、非心筋細胞と混在させたほうが心筋再生効率が良いことが報告されている。標的細胞に分化する前駆細胞のみならず、その分化や増殖、生存などを支える周囲の間質細胞の意義についても十分に考慮に入れる

必要性が示唆される。このようにヒト細胞において新たな血管分化再生機構が明らかになることにより、より治療应用到結びついた新たな知見が生まれることが期待される。

細胞はヒトES細胞とほぼ同様の性質をも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細胞からの三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¹³⁾。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。

今後の可能性

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は発展途上にあると考えられる。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・組織間相互作用など臓器としての機能を果たしうる機能ユニットを形成するために必

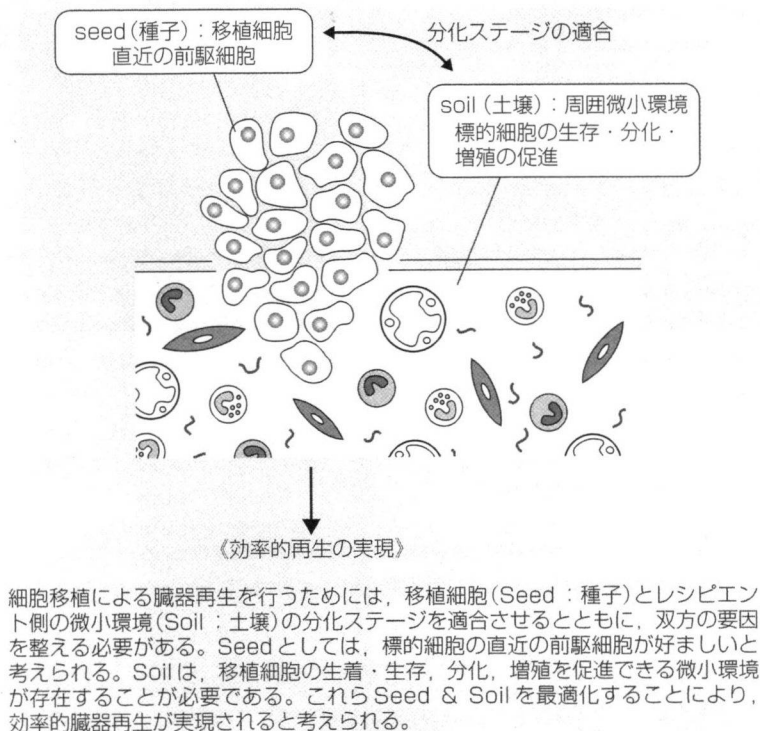


図4 Seed & Soil therapy

要な要素すべてに関して理解を深め、それらを生体内でできるだけ再構成することが重要であろう。有効に分化しうる幹・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4)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くと考えられる。

また、iPS細胞の出現は、これまでのES細胞をはじめとする再生医学研究に数多くの新たな可能性を与えた。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細胞研究がもっていたポテンシャルがさまざまなかたち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。

●文献

- 1) Yamashita JK : Differentiation and diversification of vascular cells from ES cells. Int J Hematol 80 : 1-6, 2004
- 2) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al : Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature 408 : 92-96, 2000

- 3) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, et al : Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26** : 1977-1984, 2006
- 4) Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al : Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26** : 2070-2076, 2006
- 5) Yamashita JK : Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. *Trends Cardiovasc Med* **17** : 59-63, 2007
- 6) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, et al : Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood* **101** : 2675-2678, 2003
- 7) Sone M, Itoh H, Yamashita J, et al : Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation* **107** : 2085-2088, 2003
- 8) Sone M, Itoh H, Yamahara K, 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** : 2127-2134, 2007
- 9) Yamahara K, Sone M, Itoh H, et al : Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS One* **3** : e1666, 2008
- 10) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676, 2006
- 11) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007
- 12) Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, et al : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* **118** : 498-506, 2008
- 13) Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, 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** : 2982-2984, 2008

