

ミル(終濃度範囲:1.25-20.0  $\mu\text{M}$ )を含む10%FBS含有培養液あるいは0.1%DMSOを含む10%FBS含有培養液を100  $\mu\text{L}$ /well添加し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて24時間培養した。

細胞内阻害剤濃度を低下させるための洗浄操作として、阻害剤前処置24時間後に培養液を除去し、4%BSA含有培養液を100  $\mu\text{L}$ /well添加し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで60分間静置した。同じ洗浄操作を2回行った。

その後、基質代謝反応として5  $\mu\text{M}$  ミダゾラムおよび前述の終濃度範囲の各阻害剤を含む基質-阻害剤含有培養液、あるいは5  $\mu\text{M}$  ミダゾラムおよび0.1%DMSOを含む基質含有培養液に置換し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて60分間反応した。

代謝反応を停止するために、2倍量のメタノール/アセトニトリル=1/1溶液を加え混合した。遠心後、上清中の1'-水酸化ミダゾラムをLC/MS/MSにて測定し、基質代謝活性に対する各阻害剤の影響について、条件A、BおよびCでの阻害率の変化を確認した。

### (3) OATP1B1 および CYP3A4 共発現系の構築

10 cm ディッシュに培養した HepG2 細胞に、10  $\mu\text{g}$  の *OATP1B1* cDNA を含む pcDNA3.1 (積水メディカルにて作製) をリン酸カルシウム法により導入した。12時間後に培地 (FBS 含有 DMEM) を交換し、さらに2日間培養した。その後1 mg/mL の G418 (ナカライ) 含有培地で約3週間培養し、形成したコロニーを採取し、24ウェルプレート、6ウェルプレート、6 cm ディッシュおよび10 cm ディッシュで順次培養した。

### (4) OATP1B1 発現 Oocyte の調製

OATP1B1 発現 Oocyte は、活性測定の4日前に *Xenopus laevis* より摘出し、翌日に500 ng/ $\mu\text{L}$  の cRNA 溶液を50 nL (25 ng) 注入した。cRNA を注入した Oocyte は、培養液(modified Barth's solution, 88 mmol/L NaCl, 1.1 mmol/L KCl, 2.4 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.32 mmol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.82 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 10 mmol/L HEPES, 10 unit/mL penicillin, 10  $\mu\text{g}$ /mL streptomycin, pH 7.4) 中で18°C, 3日間培養した。培養期間中は1日2回培養液を交換した。cRNA 未注入 Oocyte をコントロール Oocyte とし、cRNA 注入 Oocyte と同様に調製を行った。

### (5) OATP1B1 による Luciferin 及びその誘導体の輸送活性の評価

OATP1B1 発現 Oocyte 及びコントロール Oocyte と1  $\mu\text{mol/L}$  の Luciferin, Luciferin-IPA,

Luciferin-ME, Luciferin-BE, Luciferin-PFBE, Luciferin-PPXE (図2) を、室温にて1時間インキュベーションした。インキュベーション終

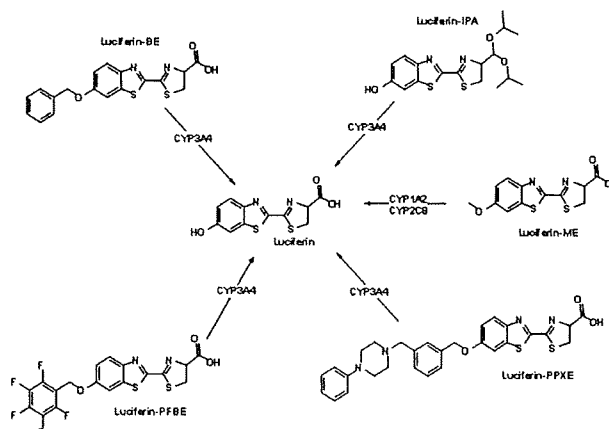


図2 ルシフェリン誘導体の代謝経路

了後、Oocyte を洗浄し、Oocyte を1個ずつチューブに移した。チューブに100  $\mu\text{L}$  の buffer (NaCl: 100 mmol/L, KCl: 2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 1 mmol/L, HEPES: 10 mmol/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 1 mmol/L) を添加し、超音波処理により Oocyte を破碎した。Oocyte 破碎液と、100  $\mu\text{L}$  の内標準物質 (Niflumic acid) 含有アセトニトリル溶液を混和し、15,000 rpm で10分間遠心した。得られた上清中の各化合物量を LC-MS/MS にて測定した。

## 2) HepaRG 細胞の細胞骨格の安定化による CYP 発現誘導の亢進

プラスチック培養皿上、または VECCELL 上で分化誘導を行った HepaRG 細胞は、分化完了後、DMSO を含まない培養培地で1日間培養した後、10  $\mu\text{M}$  の rifampicin または1 mM phenobarbital を添加し、3日間培養した。Docetaxel への曝露は、分化完了後、直ちに DMSO を除き、0~200 nM の docetaxel を加えた培養培地に交換して4日間行った。分化誘導後の HepaRG 細胞を高密度で VECCELL または12穴培養皿に再播種した場合、各種薬剤への曝露は、DMSO を含まない培養培地で1日間培養した翌日から行った。各種薬剤への曝露期間中、培地の交換は毎日行った。

## 3) ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発

(1) 5種の大腸癌細胞株 (LS180, HCT116, Caco-2, HT29, SW48) を対象に、*CYP3A4* (exon 3-4)、*PXR* (variant 1 または exon 5-6)、*YDR* (exon 10-11) および内因性コントロールとして  $\beta$ -actin の各遺伝子の mRNA 発現量を real-time

PCRにより解析した。

(2) 上記の培養細胞に脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azaC) (0, 0.5, 5  $\mu$ M) を 24 時間暴露して脱メチル化を誘導し、各細胞よりゲノム DNA および RNA を回収した。RNA については、(1)と同様に各遺伝子の mRNA 発現量を解析した。

(3) (2)のゲノム DNA を sodium bisulfite 処理した後、direct sequencing または COBRA (combined bisulfite restriction analysis) 法を用いて、CYP3A4(転写開始点より 25kb 上流)、PXR (exon 3 領域)、VDR (プロモータ領域)、PRMT1 (プロモータ領域) の各遺伝子の DNA メチル化の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本年度は該当事項なし。

### C. 研究結果

#### 1) アデノウイルスによる多型性ヒト型薬物代謝酵素発現カクテル細胞系の開発と応用

##### (1) アデノウイルス感染後の CYP3A4 酵素活性の経時変化

ヒト CYP2C19 あるいは 3A4 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて、HepG2 細胞に CYP2C19 と 3A4 活性を任意の割合で発現した共発現細胞を作製することにより、CYP2C19 の遺伝子多型を模倣した細胞を作製することが可能であり、この共発現細胞における酵素キネティックプロファイルは凍結ヒト肝細胞とほぼ同じであった (図 3)。

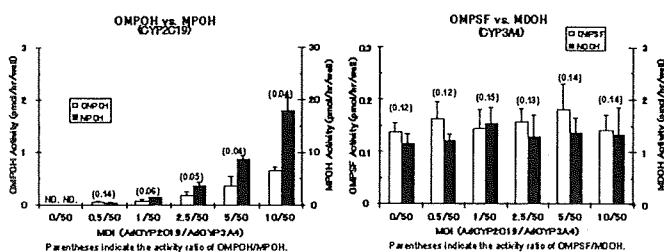


図 3 CYP2C19/3A4 発現細胞での OMPoH と MPOH 活性の比較および OMPsF と MDOH 活性の比較

今年度は新たに CYP2D6 について HepG2 細胞アデノウイルス (AdCYP2D6) を感染させた AdCYP2D6 発現系を用いて検討を加えた。Dextromethorphan を基質とした CYP2D6 代謝(0-脱メチル化)は、MOI および反応時間に依存的な活性の上昇が認められた。

アデノウイルスを用いた本 CYP 発現システムでは、感染操作後も細胞内にアデノウイルスが存在するため、経時的に CYP 発現量は増加する。一方、ヒトの肝臓や肝細胞においては、タンパク質合成と分解が平衡状態にある。これらの違いのため、本アデノウイルスを用いた CYP 発現系では、ヒト肝細胞に比べて mechanism-based inhibition (MBI) の効果が認められにくい可能性がある。そこで、ウイルス感染後の CYP 発現レベルの経時的変動を調べ、MBI に適した培養条件を探索した。

HepG2 細胞に AdCYP3A4 を 50 MOI で感染させ、CYP3A4 活性とタンパク質レベルを経時的に測定した。その結果、両者は感染 4 日目頃までは直線的に増加し、その後 10 日目頃まではほぼ一定であった。

CYP3A4 発現 HepG2 細胞における各阻害剤による時間依存的阻害評価法について検証した (図 4)。時間依存的阻害を示さないことが知られているケトコナゾールでは、時間依存的阻害を評価する条件 B (●) ではコントロールと同程度であるが、競合的阻害を評価する条件 A (□) および総合的阻害を評価する条件 C (▲) では同様の阻害効果が確認された。またシメチジンについても同様の傾向が確認された。一方、化合物の代謝により CYP3A4 が MBI を起こすことが知られている、マクロライド系抗生物質であるトロレアンドマイシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、Ca<sup>2+</sup>チャネルブロッカーであるミベフラジル、ジルチアゼム、ベラパミルにおいて、いずれも条件 A (□) と比べ阻害剤の前処置をした条件 C (▲) で阻害増強が確認された。また、トロレアンドマイシン、クラリスロマイシンを除く 4 阻害剤では阻害剤の前処置のみの条件 B (●) においても濃度依存的な阻害増強が顕著にみられた。

また、論文報告 (Drug Metab Dispos. 2009 Aug; 37(8):1658-66) されている臨床試験での薬物間相互作用例として、ミダゾラムと各阻害剤併用によるミダゾラムの AUC 変化比についてまとめた。AUC 変化比はシメチジンの 1.4 倍からトロレアンドマイシンの 15 倍まで確認されている。今回検討した時間依存的阻害評価法での総合的な阻害評価である条件 C において、各阻害剤の臨床血漿中濃度に外挿した阻害率と先の AUC 変化比では、順列において概ねの傾向を捉えることができた (図 5)。

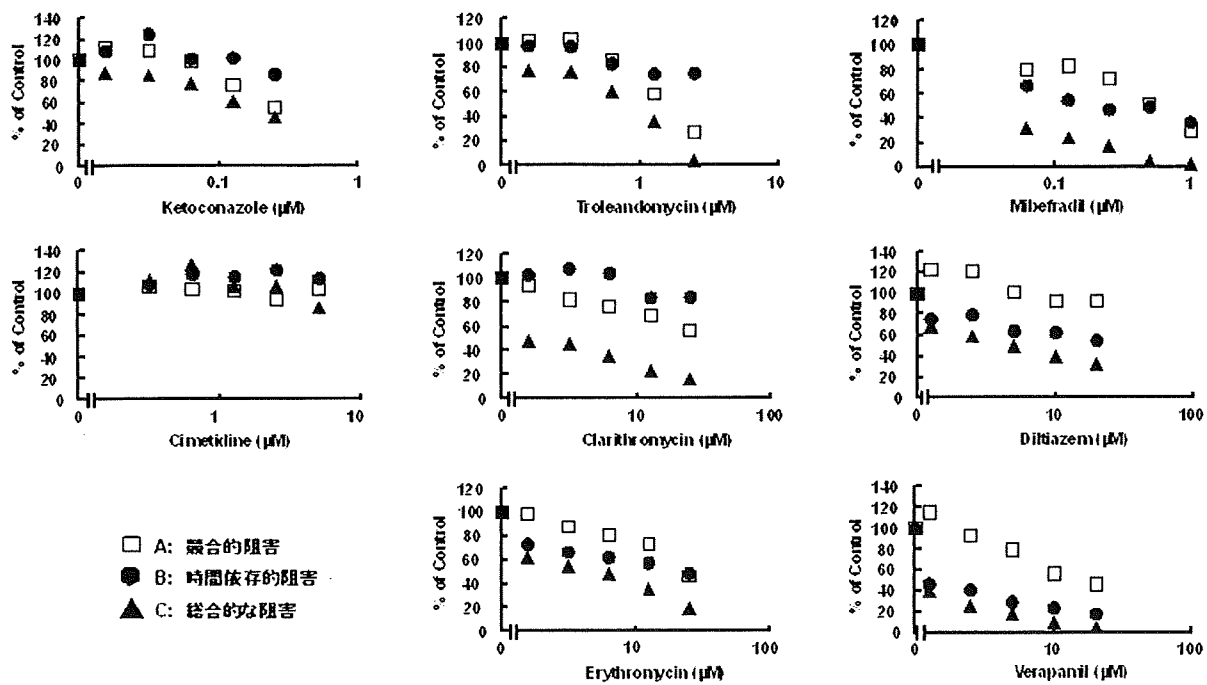


図4 CYP3A4発現HepG2細胞におけるミダゾラム1'-水酸化活性に対する各阻害剤の時間依存的阻害作用の影響

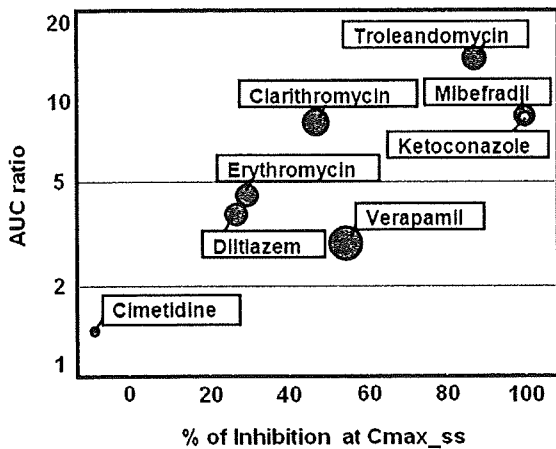


図5 CYP3A4 発現 HepG2 細胞による総合的阻害評価条件における臨床血漿中最高濃度での阻害率と臨床で見られた AUC 変化比との相関

(2) CYP 活性修飾因子の CYP3A4 酵素活性に対する影響

CYP を介した酵素反応には NADPH-チトクロム P450 還元酵素 (P450 還元酵素) からの 2 電子の供給が必須である。このうち 2 電子目はチトクロム  $b_5$  から供給される。チトクロム  $b_5$  は、電子供給だけでなく、タンパク質間相互作用によって CYP3A4 の酵素活性を増強することも知られている。最近、チトクロム  $b_5$  と類似した構造を有し、小胞体膜に局在するヘムタンパク質

の PGRMC1 が、ステロイド合成型の CYP21 の酵素活性を増強すること、また CYP3A4 と分子間相互作用することが報告された。したがって、PGRMC1 はチトクロム  $b_5$  と同様に、CYP3A4 酵素活性増強作用を有する可能性がある。そこで本研究では、ヒトチトクロム  $b_5$  およびヒト PGRMC1 発現アデノウイルスを作製し、本アデノウイルスシステムにおける両者の CYP3A4 酵素活性に対する影響を解析することとした。

PGRMC1 とチトクロム  $b_5$  の CYP3A4 活性に対する効果を調べるために、AdCYP3A4 と、AdCYB5A1 または AdPGRMC1 を同時に感染させ、CYP3A4 酵素活性を測定した (図 6)。その結果、AdCYB5A1 を同時感染した場合には、AdCYB5A1 感染量依存的な CYP3A4 活性の増加傾向が認められ、5 MOI では酵素活性は 1.2 倍になった。一方、AdPGRMC1 を同時に感染させた場合には、予想に反して CYP3A4 活性は AdPGRMC1 の感染量依存的に減少し、5 MOI では比感染時の 55% まで低下した。また、AdCYP3A4、AdCYB5A1 および AdPGRMC1 の 3 種のウイルスを同時に感染させた場合には、AdCYB5A1 感染による CYP3A4 活性増加作用ならびに AdPGRMC1 感染による活性低下作用が消失した。

この PGRMC1 とチトクロム  $b_5$  の CYP3A4 活性に対する効果が、CYP3A4 タンパク質レベルの変動に起因するか否かを調べるために、酵素活性測定後の細胞の総抽出液を調製し、ウェスタンブ

ロットにより CYP3A4 アポタンパク質レベルを測定した。その結果、CYP3A4 タンパク質レベルは AdCYB5A1 や AdPGRMC1 の感染量に関係なく一定であった。したがって、PGRMC1 は CYP3A4 タンパク質レベルには影響を与えず、CYP3A4 活性を低下させると考えられた。

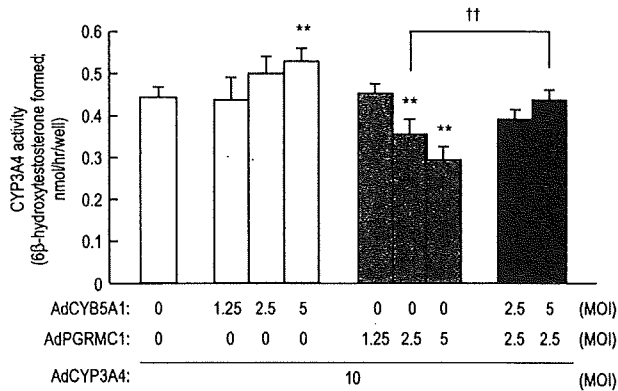


図6 チトクロム  $b_5$  および PGRMC1 の CYP3A4 活性に対する影響

### (3) OATP1B1 および CYP3A4 共発現系の構築

OATP1B1 と CYP3A4 共発現系作製のため、まず OATP1B1 を安定的に発現する HepG2 細胞を樹立することとした。現在までに、OATP1B1 安定発現株を 6 クローン、ベクターのみを導入した細胞を 3 クローン単離した。

輸送/代謝を共役的に評価しうる蛍光プローブ基質 (OATP1B1 により輸送され、CYP3A4 により代謝を受ける化合物) の探索を行った。

OATP1B1 発現 Oocyte を用い、Luciferin 及びその誘導体 (Luciferin-IPA, Luciferin-ME, Luciferin-BE, Luciferin-PFBE 及び Luciferin-PPXE) が OATP1B1 により輸送されるか否か検討を行った。その結果、OATP1B1 発現 Oocyte による Luciferin-PPXE 及び Luciferin-BE の取り込み量はコントロール Oocyte による取り込み量と比較して有意に高い値を示した。Luciferin, Luciferin-IPA, Luciferin-PFBE 及び Luciferin-ME の取り込み量は、OATP1B1 発現 Oocyte とコントロール Oocyte の間に有意な差は認められなかった。

## 2) HepaRG 細胞の細胞骨格の安定化による CYP 発現誘導の亢進

HepG2 細胞は、paclitaxel または docetaxel を用いて微小管を安定化させることにより、rifampicin による CYP3A4 の発現誘導倍率が亢進されることが分かっている (Horiuchi,

Ishida *et al.*, unpublished data)。そこで、HepaRG 細胞においても同様の現象が起こるかどうか検証した。HepaRG 細胞を 12 穴培養皿で培養して分化誘導を行った後、0~200 nM の docetaxel を含む培養培地に置換し、さらに翌日から 10  $\mu$ M rifampicin を添加し、3 日間培養を行った。その結果、CYP3A4 の発現誘導倍率は、25 nM docetaxel 存在下で最大の亢進が見られ、docetaxel 濃度の増加と共に低下した。一方、CYP2C9 の発現誘導倍率は、docetaxel の濃度増加と共に上昇し、100 nM で最大の亢進が見られた。

### 3) ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発

(1) 5 種の培養細胞は、CYP3A4, PXR, VDR 遺伝子の mRNA 発現量に関して、高発現あるいは低発現の二峰性を示した。CYP3A4 発現レベルに着目すると、CYP3A4-high 細胞 (LS180, HCT116) および CYP3A4-low 細胞 (Caco-2, SW48, HT29) に分類された (表 1)。

表 1 CYP3A4, PXR, VDR 遺伝子の発現プロファイルに基づく培養細胞の分類

	CYP3A4	PXR <sub>v1</sub> /PXR <sub>5-6</sub>	VDR
LS180	High	High	High
HCT116	High	Low	Low
Caco-2, SW48, HT29	Low	Low	Low

(2) 5-azaC 処理により、CYP3A4, PXR 遺伝子の mRNA 発現量のみが顕著に増加した (図 7)。この発現量の増加は CYP3A4-low 細胞のみで検出されたことから、CYP3A4 もしくは PXR 遺伝子のメチル化が、遺伝子発現の抑制に寄与する可能性が示唆された。

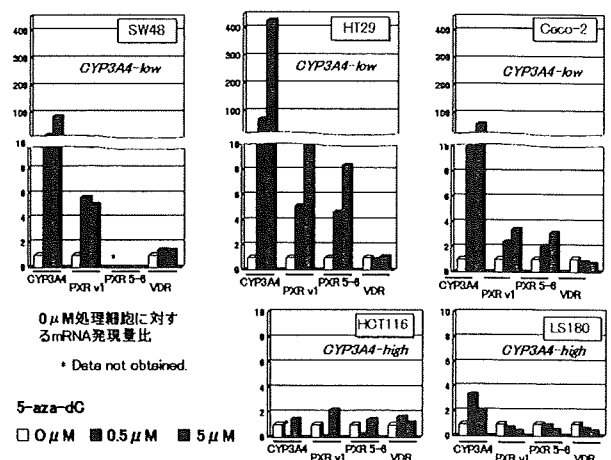


図7 5-aza-dC に対する異なる細胞応答性

(3) 5種すべての細胞に共通して、*CYP3A4* (5'上流)、*PXR* (exon 3) 遺伝子のメチル化、および *VDR* (プロモータ)、*PRMT1* (プロモータ) 遺伝子の非メチル化が検出された。このことから、上記の遺伝子領域のメチル化状態が、*CYP3A4/PXR* 遺伝子の発現レベルの差に關与する可能性は低いことがわかった。

#### D. 考察

##### 1) アデノウイルスによる多型性ヒト型薬物代謝酵素発現カクテル細胞系の開発と応用

本研究では、ヒト肝における薬物代謝を予測可能な新たな *in vitro* システムの開発を目指し、アデノウイルスベクターを用いたヒト CYP 発現システムの有用性について検討を行なっている。

本年度は昨年度に確立した AdCYP3A4 と AdCYP2C19 の共発現系についてはオメプラゾールを基質に用いて検証し、更に、AdCYP2D6 についても検討を加え、良好な発現が確認された。

本アデノウイルス発現システムは、医薬品の薬物代謝プロファイル試験だけでなく、阻害効果の解析にも有効であると考えられる。AdCYP3A4 感染後の酵素活性の経時変動を解析した結果、感染4日後まではほぼ直線的に活性が上昇した。また、10日後まではタンパク質レベルおよび酵素活性は4日後のレベルでほぼ一定に保たれることが明らかになった。これらの結果から、本アデノウイルス発現システムを用いて MBI などの試験を行なう際には、感染5日後から10日後くらいの細胞を使用するのが適切であると考えられた。CYP3A4 発現 HepG2 細胞を用いた時間依存的阻害評価の検討について、時間依存的阻害を示さないケトコナゾール、シメチジンにおいて阻害剤の前処置による阻害増強は認められなかった(図4)。一方で、阻害剤の代謝による CYP3A4 の MBI が知られるマクロライド系抗生物質(トロレアンドマイシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシン)や Ca<sup>2+</sup>チャネルブロッカー(ミベフラジル、ジルチアゼム、ベラパミル)では、阻害剤の前処置による阻害増強が確認され、時間依存的阻害を含めた総合的な CYP 阻害を評価可能であることが示された(図4)。

本 CYP3A4 発現 HepG2 細胞では、比較的長時間にわたり化合物曝露が可能であること、CYP3A4 の生合成が維持していることから、ミクロソームや遊離肝細胞と比べ生体に近い状態と言える。そこで臨床薬物間相互作用試験での AUC 変化比と本評価法での阻害率との相関を確認したとこ

ろ、総合的な阻害評価を行う条件 C において、臨床血漿中濃度を外挿した阻害率との間に概ねの順列傾向を捉えることができた(図5)。また本評価法では、条件 A と条件 C の比較による前処置の有無での阻害率の変化から、臨床血漿中濃度における MBI の影響を推察できると考え、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、ジルチアゼム、ベラパミルなどは競合阻害よりも CYP3A4 の MBI による影響が大きく、トロレアンドマイシンやミベフラジルでは競合阻害による影響が大きいものと示唆された。

本発現細胞を用いた時間依存的阻害評価法では、CYP3A4 の生合成を維持した条件下で化合物の総合的な阻害を評価できる方法であり、より生体に近い条件にて CYP3A4 の MBI による影響を評価できる有用な方法と考えられる。

昨年度までに、CYP3A4 と CYP2C19 共発現系を用いたジアゼパム代謝試験により、本システムではヒト培養肝細胞とほぼ同一の代謝プロファイルが得られることを確認している。しかしながら、本システムにおける絶対的な酵素活性は培養肝細胞に比べると低い。そこで本研究では、既知の CYP3A4 活性増強因子チトクロム *b<sub>5</sub>* と、チトクロム *b<sub>5</sub>* 様ドメインを有し CYP3A4 と物理的相互作用をすることが報告された PGRMC1 について、本システムにおける CYP3A4 酵素活性に対する影響を調べた。その結果、チトクロム *b<sub>5</sub>* については予想通り酵素活性増強作用が認められたのに対し、PGRMC1 は CYP3A4 活性を減弱させた。また、この活性減作用はチトクロム *b<sub>5</sub>* 共発現により軽減し、一方チトクロム *b<sub>5</sub>* による活性増強作用は PGRMC1 の共発現により消失した。したがって、PGRMC1 はチトクロム *b<sub>5</sub>* と類似した構造を有するにも関わらず、CYP3A4 活性に対しては相反する作用を有する可能性が示された。これまでに、PGRMC1 はプロゲステロン合成に関わる CYP21 の酵素活性増強作用を有することが報告されていたが、本研究結果により、CYP 活性に対する作用は分子種によって異なることが示された。

CYP3A4 の基質には OATP1B1 や OATP1B3 によって肝細胞に能動的に取り込まれるものがある。ヒト肝細胞と HepG2 細胞ではトランスポーターの発現プロファイルが異なり、このため薬物の細胞内取り込み量も異なる可能性がある。そこで本研究では、OATP1B1 安定発現細胞株を樹立し、この細胞にアデノウイルスを用いて CYP 分子種を発現させることで、トランスポーターを介した輸送をふまえた CYP 代謝システムの構築

を行なうこととした。これまでに、OATP1B1 安定発現株を6クローン単離することができたので、これらを用いて OATP1B1 発現量を測定すると共に輸送活性を測定し、適切なクローンを選定した後に、CYP3A4 の共発現試験を行なう予定である。OATP1B1 による Luciferin 及びその誘導体の輸送活性について評価した結果、Luciferin-BE 及び Luciferin-PPXE は OATP1B1 の基質となることが示唆された。Luciferin-BE 及び Luciferin-PPXE は CYP3A4 により Luciferin に代謝されることが知られており (図2)、蛍光測定により定量することが可能である。以上のことから、Luciferin-BE 及び Luciferin-PPXE は OATP1B1 による細胞内への輸送能及び CYP3A4 による代謝能を共役的に測定することが可能な化合物であることが示唆され、OATP1B1/CYP3A4 共発現細胞の蛍光プローブ基質として有用であることが示唆された。

### 2) HepaRG 細胞の細胞骨格の安定化による CYP 発現誘導の亢進

分化誘導した HepaRG 細胞を docetaxel に暴露後、rifampicin による誘導実験を行うと、CYP3A4 および CYP2C19 で発現誘導倍率の亢進が認められた。これらの結果により、HepaRG 細胞も HepG2 細胞と同様に細胞骨格の安定化により rifampicin による CYP の発現誘導倍率が亢進されることが分かった。

### 3) ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発

大腸癌細胞では、CYP3A4 およびその発現制御因子 (PXR, VDR, PRMT1) の発現プロファイルにおいて heterogeneity が認められた。また CYP3A4 高発現細胞と低発現細胞との間では、脱メチル化剤 5-azaC に対する異なる応答性が認められた。特に低発現細胞では、5-azaC 処理により発現量が回復することから、DNA メチル化による発現抑制機構の関与が示唆された。ただし、CYP3A4、PXR、VDR、PRMT1 遺伝子のメチル化により制御される可能性は低く、他の CYP3A4 発現制御因子が DNA メチル化の責任遺伝子となることが推測された。

今後の検討により上記の責任遺伝子が同定されたならば、腸管細胞における CYP3A4 発現および薬物応答性の多様性の要因として、DNA メチル化などエピジェネティックな機構の関与が確実となる。また、腸管代謝を評価するための *in vitro* モデル開発への応用も可能となる。

## E. 結論

本年度は AdCYP3A4、AdCYP2C19 においては昨年度と異なる基質を用いた活性評価を行い、また、新たに AdCYP2D6 について検討し、アデノウイルスによるヒトチトクロム P450 発現系が初期の創薬探索に応用が可能な代謝評価試験であることを示すデータの蓄積を行うことができた。

MBI に関連した阻害試験への応用を目指し、発現速度のコントロールを試みた。その結果、アデノウイルス感染 5 日後から 10 日後まで CYP3A4 ホロ酵素レベルがほぼ一定に保たれることを見出した。さらに、CYP3A4 発現細胞による時間依存的阻害評価法の可能性について検討した。その結果、代謝過程に伴う酵素の不活性化を含む総合的な阻害を確認できた。臨床での相互作用が報告されている薬物について、本阻害評価法における臨床血漿中濃度での阻害率と臨床で見られた AUC 変化比は概ね相関し、総合的な CYP 阻害による相互作用リスク予測法として有用であることが示唆された。

CYP 活性修飾因子の本システムにおける効果を検索し、チトクロム  $b_5$  は CYP3A4 酵素活性を増強するのに対し、PGRMC1 は活性を減弱させることを見出した。OATP1B1 を安定的に発現する HepG2 細胞株の単離を行なった。

HepaRG 細胞においても細胞骨格の安定化により CYP 遺伝子の発現誘導が亢進することを明らかにした。

大腸癌細胞における CYP3A4 発現レベルの多様性の原因として、DNA メチル化による遺伝子発現制御の可能性が強く示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

- (1) ヒトチトクロム P450 酵素活性に対するチトクロム  $b_5$  様ヘムタンパク質 PGRMC1 の効果：アデノウイルス発現系を用いた解析：新宮 究、吉成 浩一、山添 康、第 48 回日本薬学会東北支部大会 (2009 年 10 月 18 日、仙台)
- (2) アデノウイルス発現系を用いたヒト代謝研究のための薬物代謝酵素発現細胞の応用：藤島未来、安達弥永、二宮真一、吉成浩一、山添康、中澤憲一、第 24 回日本薬物動態学会年会 (2009 年 11 月 27 日、京都)

- (3) 大腸癌細胞における PXR、VDR、PRMT1 遺伝子のメチル化と CYP3A4 発現調節における役割: 幅野 渉、蒲生俊恵、寺島 潤、菅井 有、小澤正吾、第 24 回日本薬物動態学会年会 (2009 年 11 月 27 日、京都)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

## ヒト胚性幹細胞（ES細胞）に由来する血管内皮細胞の安定大量供給のための方法論の確立－基礎研究および薬効評価・毒性試験のためのヒト材料提供を目的として－

所 属 国立国際医療センター研究所血液疾患研究部  
研究者 佐伯 久美子  
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

**研究要旨** 本研究では、ヒトES細胞を用いて、無フィーダー分化誘導系を駆使して血管内皮細胞の産生を試みた。血液細胞の分化誘導に至適とされる培養条件で培養を行い、血管内皮細胞の分化誘導が極めて順調に進捗した。培養法の基本は、前半の sphere 形成浮遊培養と後半の接着平面培養であり、マウスフィーダー細胞との共培養は用いなかった。その結果、継代可能な高機能の成熟血管内皮細胞がほぼ100%の純度で誘導された。未分化ES細胞の残存、平滑筋細胞の混在、リンパ管内皮細胞の誘導は全て否定されたが、血管内皮細胞特異的マーカーである VE-cadherin、PECAM-1 の解析から、双方陽性群と双方陰性群が混在することが示された。また、ヒトES細胞由来の血管内皮細胞はヒト初代培養血管内皮細胞と同等かそれ以上に興味深く重要な機能や性質を保持していることが明らかとなり、これらを駆使した培養疾患モデル系を構築できることが示された。

### 分担研究者

- (1) 田辺三菱製薬（株）研究本部先端医療研究所先端医療研究部再生医療グループ  
近藤 靖  
(2) 筑波大学大学院人間総合科学研究科  
千葉 滋

### A. 研究目的

胚性幹細胞（embryonic stem cell（ES細胞））はその無限増殖能と多能性分化能とから再生医療における有望な材料と期待され、昨今は、ヒトES細胞の研究が注目されている。また、ここ2、3年は、体細胞を初期化してES細胞と同等の細胞（induced pluripotent stem cells、iPS細胞）を作成することに成功したとの報告が相次ぎ、ヒトiPS細胞を用いた研究が活発化してきた。しかし、再生医療への応用のためには、ヒトES細胞やヒトiPS細胞からの高効率で均一な分化誘導系を確立することが重要である。第2には、異種動物細胞（マウス由来フィーダー細胞）の混入を回避する培養法を開発することである。すなわち無フィーダーで高効率な分化誘導システムの開発が極めて重要である。

血管は全身の組織に分布しており、酸素や栄養成分の供給や老廃物の除去に必須であるのみならず、脳を含む様々な組織の再生過程における組織幹細胞の適切部位への移動に重要な役割を果たしている。また癌における腫瘍血管や、糖尿病性網

膜症における新生血管など、様々な疾患の病態進行への寄与も大きい。即ち、ヒト血管内皮細胞を材料とする基礎研究や臨床試験は、血管障害性疾患にとどまらず広範な疾患群を対象とする極めて需要の大きい分野である。換言すれば、ヒト血管材料の安定供給ベースを作成することは、創薬等の医療産業の発展における影響が甚大である。

しかしながら、ヒト生体から採取された血管内皮細胞は供給が非常に限られており、無限増殖能を持つヒトES細胞やヒトiPS細胞から血管内皮細胞を作成して供給することに大きな期待が寄せられてきたが、現在まで高効率にヒトES細胞やヒトiPS細胞から血管内皮細胞を分化誘導する技術は確立されていない。

本研究では、ヒトES細胞を用いて、まず、無フィーダー・無血清・増殖因子無添加で未分化維持維持継代培養を安定化させて、そこから更に、無フィーダー分化誘導系を確立して、高効率な血管内皮細胞の産生システムの開発を目指す。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞など研究材料

ヒトES細胞（KhES-1、KhES-3）は、MMC処理MEF上で20%KSR存在下に無血清培養により継代した。無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養に際しては、20%KSR存在下で、マトリゲル上で培養した。



## 2. 分化誘導プロトコール

未分化ES細胞をコラゲナーゼ・トリプシン含有剥離液処理により回収した後に、CellSeed社のHydro cellを用いて3日間スフェア (sphere) 形成させた。分化培養液には、15%牛胎児血清の他に、6種類のサイトカイン・増殖因子

(VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-L, IL-3, IL-6) を添加した。その後、スフェアはゼラチンコート培養皿での平面培養に移行した。2週間程度の平面培養で、スフェアが着地した箇所に囊状構造物が形成され、その継代培養によって血管内皮細胞が分化誘導された。

## 3. 形態学的観察方法

生細胞は、培養皿や培養フラスコのまま倒立顕微鏡により形態観察した。

## 4. フローサイトメトリー

膜表面抗原の同定は、細胞をPBS中で1時間1次抗体と反応させた後にFACSCaliburを用いて解析した。

## 5. ウェスタンブロッティング

既報の手法によってウェスタンブロッティングを行った。2次抗体と発色はECLキットを用いた。

## 6. 免疫染色法

細胞の免疫染色は、細胞をアセトン・メタノール固定した後に、1次抗体と反応させ、アレクサ標識2次抗体と反応させて、蛍光顕微鏡により観察した。

## 7. RT-PCR

既報の手法によりRT-PCRを行った。

## 8. 索状構造形成能

血管内皮細胞機能である索状構造形成能 (cord-forming activity) は、マトリゲルコートディッシュ上で行われた。培養液はEGM-2キットを用い、索状構造形成は倒立顕微鏡にて観察した。

## 9. アセチルLDL取込能

アセチルLDL取込能は、4穴チャンバースライド中で、LDLを対照として、Dil Ac-LDLを用いて行った。取込は、蛍光顕微鏡にて観察した。

## 10. in vivo 内皮機能

in vivo 内皮機能としては、マトリゲルプラクアッセーを行った。分化した血管内皮細胞を、マトリゲルに封入して、SCIDマウスの皮下に移

植した。3週間後に、FITCデキストランを尾静注して、マウス腹腔中の移植部分を取り出して固定し、HE染色、免疫染色を行った。それぞれ、正立顕微鏡と蛍光顕微鏡により観察して評価した。染色体分析は、SRLに外注した。

### 1.1. 細胞内活性酸素 (ROS) の測定

細胞内 reactive oxygen species (ROS) の測定に関しては、蛍光プローブ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA (Molecular Probes) を用いてFACSCalibur (日本ベクトン・ディッキンソン) により測定した。

### 1.2. 血管内皮細胞による平滑筋細胞の増殖抑制の測定

ヒト血管内皮細胞とヒト大動脈平滑筋細胞の共培養 (接触培養、非接触培養) による平滑筋細胞の増殖を検討した。血管内皮細胞はCFSEでラベルして放射線照射して用い、平滑筋細胞は細胞分裂回数測定のためのPKH-26でラベルした。特定期間の共培養の後に、PKH-26の蛍光強度をフローサイトメトリー (FACSCalibur、BD社) によって測定し、ModFitLTソフトウェアによって解析して細胞分裂回数を推定して増殖の指標とした。

(倫理面への配慮)

### ヒトES細胞研究を開始するための生命倫理に対する取り組み

平成17年11月9日に、ヒトES細胞の使用計画の文部科学大臣の確認を受けた(17諸文科振第734号)。

## C. 研究結果

### 1. 無フィーダー分化誘導系の確立

無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養で長期継代したヒトES細胞株2株 (KhES-1、KhES-3) を分化誘導実験に用いた。

霊長類ES細胞からの血液細胞の分化誘導に適とされる培養条件 (15%牛胎児血清と6種類のサイトカイン・増殖因子 (VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-L, IL-3, IL-6)) で培養を行い、2種類のヒトES細胞株 (KhES-1、KhES-3) のいずれにおいても血管内皮細胞の分化誘導に成功した。培養法の基本は、前半のsphere形成浮遊培養と後半の平面培養であり、どちらもマウスフィーダー細胞は用いない。

sphereをゼラチンコートディッシュに接着させた後に敷石状の (cobblestone) 細胞が周囲に

向かって増殖した。細胞形態は一部不均一な部分もあったが、概ね均一な形態を示し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と極めて類似の形態を示した。2種類のヒトES細胞株 (KhES-1、KhES-3) から誘導した血管内皮細胞の形態はやや異なり、KhES-1株由来の分化細胞の方がやや大型の細胞の存在が目立った。また、サルES細胞の分化誘導系の場合と異なり、嚢状構造物 (sac-like structure) は観察されなかった。

2種類のヒトES細胞株 (KhES-1、KhES-3) から誘導した敷石状の接着細胞に関して、まず、血管内皮細胞特異的な表面抗原である VE-cadherin と PECAM-1 の 2-color 解析を行った。その結果、KhES-3株から誘導した分化細胞はサルES細胞から誘導された分化細胞と同様に 20-30%の両抗原陽性細胞が認められ、継代と共にその比率は 50-60%程度まで増加したが、KhES-1株から誘導された分化細胞は全て両抗原陰性であった。このように、KhES-1株由来血管内皮細胞と KhES-3株由来血管内皮細胞は大きく異なる一面を有していたが、以下のような様々の結果からどちらも均一で質の高い血管内皮細胞と考えられた。すなわち、どちらも VE-cadherin 遺伝子発現陽性、N-cadherin 陽性、Tie-2 陽性、索状構造形成能陽性、アセチル LDL 取込能陽性、成熟血管内皮細胞の指標である eNOS と vWF が免疫染色にて陽性であった。従って、継代後の分化細胞は均一な血管内皮細胞として増殖、分化していることが示された。すなわち、我々の開発した無フィーダー分化誘導システムは、ほぼ 100%の純度の血管内皮細胞を産生することが出来る系であることが示された。

2. ヒトES細胞 (KhES-1株) から分化誘導された「非典型的」血管内皮細胞の in vivo における機能解析

以上の解析結果により、KhES-1株由来血管内皮細胞と KhES-3株由来血管内皮細胞はいずれも、成熟蛋白と成熟機能を有する高純度の血管内皮細胞であることが示された。しかし、KhES-1株由来血管内皮細胞は、その全てが VE-cadherin と PECAM-1 がどちらも陰性の「非典型的」血管内皮細胞であり、このような「非典型的」血管内皮細胞が真に生体内で血管構造を構築する機能があるかどうかを、マトリゲルプラクアッセーを行った。SCID マウスに移植後3週間で、移植した血管内皮細胞 (ヒト HLA を有しヒト由来細胞であること、内皮細胞マーカー PECAM-1 陽性であること、が確認された) は管空構造を形成し、しかも、その構造中には血液が流れ、マウス体循環と連結していること (マウス尾静注した

FITC デキストランが確認されること) が示された。すなわち、KhES-1株由来の非典型的な血管内皮細胞は、マウス体内で血管内皮細胞として機能していることが示された。

3. 高ブドウ糖濃度による酸化ストレスを介した内皮障害

各種のヒト初代培養血管内皮細胞 (HUVEC、HMVEC、HAEC、HGVEC) を用いて、高ブドウ糖負荷における酸化ストレスを測定したところ、何れのヒト内皮細胞においても、高ブドウ糖濃度培養によって、細胞内活性酸素 (ROS) の上昇が認められた。このような細胞内 ROS の発生源を同定するために、NADPH オキシダーゼ阻害剤である apocynin とミトコンドリア阻害剤である CCCP、TTFA の影響を検討したところ、HUVEC、HMVEC、HGVEC においては NADPH オキシダーゼ由来の ROS と判明したが、HAEC においてはミトコンドリア由来の ROS であることが判明した。一方、ヒトES細胞由来血管内皮細胞 (KhES-1株由来) においては、NADPH オキシダーゼ由来の ROS と判明した。

4. 平滑筋抑制作用

各種のヒト初代培養血管内皮細胞 (HUVEC、HAEC、HGVEC) を用いて、ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖に与える影響を検討したところ、いずれの組み合わせの共培養においても、接触培養、非接触培養を問わず、これらの内皮は平滑筋細胞に増殖を促進した。ヒトES細胞由来の血管内皮細胞のうち KhES-1株由来のものは、平滑筋細胞の増殖を抑制した。

5. 継代培養による細胞老化

ヒトES細胞においては、継代を重ねると細胞増殖の遅延と細胞サイズの増大など、細胞老化と考えられる状態に陥った。細胞老化に至るまでの継代数は、20継代程度であった。p16の細胞内局在に関しては、継代と共に細胞質から核に移行することが、免疫染色とウェスタンブローディングの両方で確認できた。

D. 考察

他の研究グループで達成できなかった高純度の血管内皮細胞分化誘導が、我々の研究室で可能であった理由として、以下の2点が推測される。まず第1に、我々の分化誘導系に用いたサイトカイン、増殖因子は、どちらかという血液細胞の分化に働く物が主体で、血管内皮細胞の分化誘導としては着想しにくい組み合わせである。第2には、

我々の分化誘導系は前半の細胞凝集塊形成浮遊培養と後半の平面培養の2段階システムからなる分化誘導系であることであると考えられる。血液、血管内皮細胞分化誘導などの中胚葉分化法においては、このような2段階培養は殆ど試みられておらず、我々の系の独自性が良好な結果につながった。

今回の検討から、とりわけ様々の成熟蛋白と成熟機能の存在から、あるいは極めて均一な形態から、分化細胞全てが血管内皮細胞と想定される。すなわち、ほぼ100%の分化誘導効率と考えられる。しかし、VE-cadherin、PECAM-1の細胞膜発現の有無に関しては、均一ではなく、双方が陽性の集団（典型的血管内皮細胞）と、双方とも陰性の集団（非典型的血管内皮細胞）に分かれることが明らかにされた。双方陽性集団（典型的血管内皮細胞）が血管内皮細胞であることは疑いの余地がないが、双方陰性の集団（非典型的血管内皮細胞）について、分画操作による詳細な解析が必要と考えられた。

このように作成されたヒトES細胞由来の血管内皮細胞を用いて、高ブドウ糖濃度負荷時の酸化ストレス反応、平滑筋細胞増殖抑制作用、細胞老化現象などが観察され、正常人由来ヒト初代血管内皮細胞と同等の、もしくは、それらよりさらに興味深い現象が観察され、研究ツールとしての霊長類ES細胞由来の血管内皮細胞の優越性が確認できた。

## E. 結論

無血清・無フィーダー・増殖因子無添加培養で未分化維持したヒトES細胞から、極めて高純度の成熟機能を有する血管内皮細胞を、血液細胞産生条件による無フィーダー分化誘導系を駆使して効率よく大量産生することに成功した。このような品質の高い培養系は、創薬などのアッセイ系として極めて有用と考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A: The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. *J Electrophoresis*

51:1-8, 2007.

2. Saeki K, Yogiashi Y, Nakahara M, Nakamura N, Matsuyama S, Koyanagi A, Yagita H, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from primate embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 217:261-280, 2008.
3. Nakahara M, Matsuyama S, Saeki K, Nakamura N, Saeki K, Yogiashi Y, Yoneda A, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: A feeder-free hematopoietic differentiation system with generation of functional neutrophils from feeder and cytokine-free primate embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 10:341-354, 2008.
4. Nakahara M, Saeki K, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, Yuo A: Human embryonic stem cells with maintenance under a feeder-free and recombinant cytokine-free condition. *Cloning Stem Cells* 11:5-18, 2009.
5. Nakahara M, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, Yuo A, Saeki K: High efficiency production of subculturable vascular endothelial cells from feeder-free human embryonic stem cells without cell-sorting technique. *Cloning Stem Cells* 11:509-522, 2009.
6. Saeki K, Saeki K, Nakahara M, Matsuyama S, Nakamura N, Yogiashi Y, Yoneda A, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:59-67, 2009.
7. Michibata H, Okuno T, Konishi N, Wakimoto K, Kyono K, Aoki K, Kondo Y, Takata K, Kitamura Y, Taniguchi T: Human GPM6A is associated with differentiation and neuronal migration of neurons derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Dev* 18: 629-640, 2009.
8. Muramatsu S, Okuno T, Nakahara M, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y, Tsukada H: Multitracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease. *Synapse* 63:541-548, 2009.
9. Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N: An efficient and xeno-free method for the neural differentiation of human embryonic stem cells: the use of the

conditioned medium from ES cell-derived astrocytes, PLoS ONE 4:e6318, 2009.

10. Kondo Y: Use of pluripotent stem cells (ES & iPS cells) in drug discovery. J Trad Med 27:45-49, 2010.

11. Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S : Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. Blood 113:6584-6592, 2009.

## 2. 学会発表

1. 中原正子、過足芳子、佐伯晃一、中村直子、松山さと子、米田麻子、佐伯久美子、湯尾明：サル・ヒトES細胞からの無フィーダー培養による高効率な血管内皮細胞分化法の開発。第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会・合同総会、2007年10月、横浜。

2. 横山泰久、鈴木隆浩、坂田（柳元）麻実子、熊野恵城、高戸 毅、黒川峰夫、小川誠司、千葉 滋：ヒトEmbryonic Stem Cell (hESC)からの機能的な中球誘導。第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会・合同総会、2007年10月、横浜。

4. 中村直子、過足芳子、中原正子、佐伯久美子、小柳 真、松山さと子、小柳明美、八木田秀雄、湯尾 明：霊長類胚性幹 (ES) 細胞からの高効率な血管内皮細胞分化。第7回日本再生医療学会総会、2008年3月、名古屋。

5. Saeki K, Nakahara M, Yogiashi Y, Nakamura N, Matsuyama S, Koyanagi A, Yagita H, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from monkey and human embryonic stem cells. 6th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2008, Philadelphia, PA, USA.

6. 佐藤千香子、五香麻衣子、過足芳子、松山さと子、小柳 真、高橋和利、山中伸弥、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾明：霊長類胚性幹細胞由来血管内皮細胞による血管平滑筋細胞の増殖制御機構。第8回日本再生医療学会総会、2009年3月、東京。

7. 五香麻衣子、佐藤千香子、過足芳子、松山さと子、小柳 真、高橋和利、山中伸弥、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾明：

霊長類 (ヒト、サル) 胚性幹細胞およびヒト iPS 細胞に由来する血管内皮細胞の老化機序。第8回日本再生医療学会総会、2009年3月、東京。

8. Saeki K, Yogiashi Y, Nakamura N, Matsuyama S, Sato C, Gokoh M, Takahashi K, Yamanaka S, Yuo A: A feeder-free hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells: towards a provision of rejection-free neutrophils for granulocyte transfusion therapy. 7th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, July 2009, Barcelona, Spain.

9. 佐藤千香子、五香麻衣子、過足芳子、松山さと子、安田和基、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾 明：ヒト胚性幹細胞由来血管内皮細胞および末梢血単球由来血管内皮細胞による血管平滑筋細胞の増殖抑制。第9回日本再生医療学会総会、2010年3月、広島。

10. 五香麻衣子、佐藤千香子、過足芳子、松山さと子、高橋和利、山中伸弥、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾 明：ヒトES/iPS細胞由来血管内皮細胞における継代培養に伴う老化誘発の機序解析。第9回日本再生医療学会総会、2010年3月、広島。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

国際特許  
霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法  
発明者：佐伯久美子、他  
出願人：国立国際医療センター、田辺三菱製薬株式会社  
PCT/JP2007/71811

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## ヒト胚性幹細胞（ES細胞）に由来する血管内皮細胞の安定大量供給のための方法論の確立—基礎研究および薬効評価・毒性試験のためのヒト材料提供を目的として—

所属 国立国際医療センター研究所血液疾患研究部  
研究者 佐伯 久美子

**研究要旨** 本研究では、ヒトES細胞（KhES-1、KhES-3）を用いて、無フィーダー分化誘導系を駆使して血管内皮細胞の産生を試みた。血液細胞の分化誘導に至適とされる培養条件で培養を行い、血管内皮細胞の分化誘導が極めて順調に進捗した。培養法の基本は、前半の sphere 形成浮遊培養と後半の接着平面培養であり、マウスフィーダー細胞との共培養は用いなかった。その結果、継代可能な血管内皮細胞がほぼ100%の純度で誘導された。今年度は更に、VEGF受容体等の内皮マーカー発現に関して、初代ヒト血管内皮細胞との詳細な比較解析を来なした。その結果、VEGF-R2に関しては、正常初代培養ヒト血管内皮細胞に比較してヒトES細胞由来血管内皮細胞においては低発現、VEGF-R1に関しては、正常初代培養ヒト血管内皮細胞、ヒトES細胞由来血管内皮細胞、いずれにおいても低発現、VEGF-R3はHUVECにおいてのみ発現が高かった。また、CD34に関しては、KhES-1株由来血管内皮細胞が陰性であったのに対して、KhES-3株由来血管内皮細胞は陽性群と陰性群とが相半ばした。Tie-2は、HAECとヒトES細胞由来血管内皮細胞において高発現であった。また、ヒトES細胞由来血管内皮細胞と正常人由来ヒト初代培養血管内皮細胞（HUVEC、HAEC、など）を用いて、高ブドウ糖負荷時の酸化ストレス、血管平滑筋増殖促進・抑制作用、継代による細胞老化、等の生体のホメオスターシスや疾患の病態に重要な現象を比較検討した。その結果、ヒトES細胞由来の血管内皮細胞はヒト初代培養血管内皮細胞と同等かそれ以上に興味深く重要な機能や性質を保持していることが明らかとなり、これらを駆使した培養疾患モデル系を構築できることが示された。さらに、本年度は分担研究者らにより分化誘導されたヒトES細胞由来血管内皮前駆細胞のin vivoでの治療効果が明らかにされた。即ち、ノードマウスを用いて作製した血管障害性疾患モデル（皮膚潰瘍モデル、下肢虚血モデル）において、ヒトES細胞由来血管内皮前駆細胞が有効であることが証明された。

### 分担研究者

- (1) 田辺三菱製薬（株）研究本部先端医療研究所先端医療研究部再生医療グループ  
近藤 靖
- (2) 筑波大学大学院人間総合科学研究科  
千葉 滋

### A. 研究目的

胚性幹細胞（embryonic stem cell（ES細胞））はその無限増殖能と多能性分化能とから再生医療における有望な材料と期待されている。すでにマウスES細胞から試験管内で成体組織の作成が報告され、昨今は、霊長類（サルおよびヒト）ES細胞の研究が注目されている。また、ここ2、3年は、線維芽細胞などの体細胞を初期化してES細胞と同等の細胞（induced pluripotent stem cells、iPS細胞）を作成することに成功したとの報告が相次ぎ、ヒトiPS細胞を用いた研究が活発化

してきた。しかし、再生医療への応用のためには、先ず第1に、均一な分化誘導が容易ではない霊長類ES細胞（ヒトiPS細胞を含む）の高効率で均一な分化誘導系を確立することが重要である。第2には、異種動物細胞（マウス由来フィーダー細胞）の混入を回避する培養法を開発することである。すなわち無フィーダーで高効率な分化誘導システムの開発が極めて重要である。

血管は全身の組織に分布しており、酸素や栄養成分の供給や老廃物の除去に必須であるのみならず、脳を含む様々な組織の再生過程における組織幹細胞の適切部位への移動に重要な役割を果たしている。また癌における腫瘍血管や、糖尿病性網膜症における新生血管など、様々な疾患の病態進行への寄与も大きい。即ち、ヒト血管内皮細胞を材料とする基礎研究や臨床試験は、血管障害性疾患にとどまらず広範な疾患群を対象とする極めて需要の大きい分野である。換言すれば、ヒト血管材料の安定供給ベースを作成することは、創薬等の医療産業の発展における影響が甚大である。

しかしながら、ヒト生体から採取された血管内皮細胞は供給が非常に限られており、無限増殖能を持つヒトES細胞やヒトiPS細胞から血管内皮細胞を作成して供給することに大きな期待が寄せられてきたが、現在まで高効率にヒトES細胞やヒトiPS細胞から血管内皮細胞を分化誘導する技術は確立されていない。とりわけ、1) FACS装置等を使用した分画精製を要せず、2) 無フィーダー培養で、3) 高効率(>20%以上)な血管内皮細胞産生を可能とする技術は世界的に報告がない。

すでに申請者らはカニクイザルES細胞から無フィーダー培養にて血管内皮細胞を従来より高効率で分化誘導する技術をほぼ確立している。しかも、この手法はマウスフィーダー細胞の混入を排除できる無フィーダー培養である。このような技術をヒトES細胞やヒトiPS細胞の研究にも応用することで「ヒト血管内皮細胞の安定大量供給」という医学研究界および医療産業界が待ち望んでいたシステムが完備されることとなり、基礎研究と医薬産業の発展における大きな貢献が期待される。

本研究では、ヒトES細胞を用いて、まず、無フィーダー・無血清・増殖因子無添加で未分化維持維持継代培養を安定化させて、そこから更に、無フィーダー分化誘導系を確立して、高効率な血管内皮細胞の産生システムの開発を目指す。本年度においては、ヒトES細胞は2株を使用して詳細な解析と比較検討を行ったので、株間の際なども含めて報告する。さらに、本年度においては、その様な培養法によって得られた純度の高いヒト血管内皮細胞を利用して、高ブドウ糖濃度による酸化ストレスを介した内皮障害、血管内皮細胞が本来有しているはずの平滑筋抑制作用、継代培養による細胞老化、など様々な応用研究を展開したので報告する。さらに本年度においては、分担研究者らがヒトES細胞由来の血管内皮前駆細胞のin vitroでの増幅法とin vivo疾患モデルでの有効性を明らかにしたので併せて報告する。

## B. 研究方法

### 1. 細胞など研究材料

マウス胎児線維芽細胞 (murine embryonic fibroblasts, MEF) はマイトマイシンC (MMC) 処理またはX線照射によって増殖を停止させて未分化維持用のフィーダー細胞として用いた。ヒトES細胞 (KhES-1, KhES-3) は、MMC処理MEF上で20%KSR存在下に無血清培養により継代した。無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養に際しては、20%KSR存在下で、マトリゲル上

で培養した。コロニーの大きさやディッシュ上でのコロニー密度に注意し、継代時の剥離はトリプシンとコラゲナーゼを用いた。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC)、ヒト微小血管内皮細胞 (Human MicroVascular Endothelial Cells, HMVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells, HAEC)、ヒト(腎)糸球体血管内皮細胞 (Human (Renal) Glomerular Vascular Endothelial Cells, HGVEC) は、大日本住友製薬株式会社もしくはロンザグループ社から購入した。

### 2. 分化誘導プロトコール

未分化ES細胞をコラゲナーゼ・トリプシン含有剥離液処理により回収した後に、CellSeed社のHydro cellを用いて3日間スフェア (sphere) 形成させた。分化培養液には、15%牛胎児血清の他に、6種類のサイトカイン・増殖因子

(vascular endothelial growth factor (VEGF), bone morphogenic protein 4 (BMP-4), stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (Flt3-L), interleukin 3 (IL-3), interleukin 6 (IL-6)) を添加した。その後、スフェアはゼラチンコート培養皿での平面培養に移行した。サイトカイン・増殖因子は同様の6種類である。2週間程度の平面培養で、スフェアが着地した箇所に嚢状構造物が形成され、その継代培養によって血管内皮細胞が分化誘導された。

一部の実験においては、ヒトES細胞 (HES-3) を、フィーダー細胞 (マウスストローマ細胞 OP9) と共培養した。

また、一部の実験においては、ヒトES細胞 (KhES-3) を、SCF, Flt3-L, BMP-4, TPO, IL-6/IL-6受容体キメラ蛋白質 (FP6) 存在下で17日間胚様体を形成させた後にフィーダー細胞 (マウスストローマ細胞 OP9) と共培養した。

### 3. 形態学的組織化学的観察方法

生細胞は、培養皿や培養フラスコのまま倒立顕微鏡により形態観察した。

### 4. フローサイトメトリー

膜表面抗原の同定は、細胞をPBS中で1時間1次抗体と反応させた後にFACSCaliburを用いて解析した。解析した抗原は、VE-cadherin、PECAM-1 (CD31)、VEGF-R2、VEGF-R1、VEGF-R3、CD34、Tie-2である。

### 5. ウェスタンブロッティング

既報の手法によってウェスタンブロッティングを行った。2次抗体と発色はECLキットを用いた。解析した抗原は、p16である。

## 6. 免疫染色法

細胞の免疫染色は、細胞をアセトン・メタノール固定した後に、1次抗体と反応させ、アレクサ標識2次抗体と反応させて、蛍光顕微鏡により観察した。解析した抗原は、N-cadherin、eNOS、von Willebrand factor (vWF)、p16である。

## 7. RT-PCR

VE-cadherin発現の確認のために、既報の手法によりRT-PCRを行った。

## 8. 索状構造形成能

血管内皮細胞機能である索状構造形成能(cord-forming activity)は、マトリゲルコートディッシュ上で行われた。培養液はEGM-2キットを用い、索状構造形成は倒立顕微鏡にて観察した。

## 9. アセチルLDL取込能

アセチルLDL取込能は、4穴チャンバースライド中で、LDLを対照として、Dil Ac-LDLを用いて行った。取込は、蛍光顕微鏡にて観察した。

## 10. 脂肪細胞への分化誘導

脂肪細胞への分化誘導は、市販のキットを用いて行った。脂肪的の同定は、OilRedO染色を行った。

### 11. 細胞内活性酸素(ROS)の測定

細胞内reactive oxygen species (ROS)の測定に関しては、以下の如くである。5.5 mMあるいは30 mMのグルコース含有EBM-2培地(10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF)で培養した内皮細胞をTrypsin/EDTAで剥離し(HUVECはday6、HMVECはday11、HGVECはday6、HAECはday6で細胞を回収)、細胞内の活性酸素種、ROSは蛍光プローブ2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA (Molecular Probes)を用いてFACS Calibur(日本ベクトン・ディッキンソン)により測定した。FACS buffer(5% FBS, 0.05% NaN<sub>3</sub>, PBS)に懸濁した細胞5 x 10<sup>5</sup>個に終濃度200 μMのDCFH-DAを添加、蛍光FL-1(励起波長480 nm / 蛍光波長530 nm)を測定し、meanの値を算出した。

### 12. 血管内皮細胞による平滑筋細胞の増殖抑制の測定

ヒト血管内皮細胞とヒト大動脈平滑筋細胞の共培養(接触培養、非接触培養)による平滑筋細胞

の増殖を検討した。血管内皮細胞はCFSEでラベルして放射線照射して用い、平滑筋細胞は細胞分裂回数測定のためのPKH-26でラベルした。特定期間の共培養の後に、PKH-26の蛍光強度をフローサイトメトリー(FACSCalibur、BD社)によって測定し、ModFitLTソフトウェアによって解析して細胞分裂回数を推定して増殖の指標とした。

13. フィーダー細胞(マウスストローマ細胞OP9)と共培養して分化させたヒトES細胞由来の血管内皮前駆細胞(EPC)からのフローサイトメトリー(FACS)によるVE cadherin陽性細胞の分取

OP9細胞株との共培養10日経過後の細胞群をCell Dissociation Buffer(Gibco)を用いて分散・単細胞化した後、VEカドヘリン陽性細胞を2003年11月々報記載の方法に準じてFACSで分取した。抗VE cadherin抗体(BD社)はモノクローナル抗体ラベリングキット(Molecular Probes社)でAlexa-647標識したものを使用。その他、必要に応じてCD34抗体(DACO社)についても同様の方法で蛍光標識を行い使用した。

14. フィーダー細胞(マウスストローマ細胞OP9)と共培養して分化させたヒトES細胞由来の血管内皮前駆細胞(EPC)のin vitro継代増幅法

FACSで分取したVEカドヘリン陽性細胞(5×10<sup>4</sup> cells)をヒト組換え型VEGF(50ng/ml; PeproTech社)を添加した分化誘導用培地を用い、IV型コラーゲンでコートした6穴プレート上に播種し、その後2日に1回の間隔で培地交換した。継代は細胞がコンフルエントになった段階で0.25%トリプシン溶液で細胞をディッシュより剥がし単細胞として分散させた後、分化誘導用培地で1:2~1:3の倍率で希釈して新しいディッシュに播種する様式で行った。

15. フィーダー細胞(マウスストローマ細胞OP9)と共培養して分化させたヒトES細胞由来の血管内皮前駆細胞(EPC)のin vivo機能のモデルマウスでの解析

### 皮膚潰瘍モデルマウスへの細胞移植:

<皮膚潰瘍の作成と細胞移植> KSNヌードマウス(8-11週齢; 日本SLC)の背部皮膚両側に、KAI Sterile Dermal Biopsy Punch(貝印)を用いて皮膚潰瘍を作成後、その片側にin vitro増幅したVEカドヘリン陽性細胞(5×10<sup>5</sup> cells / 50μl

PBS) を Vybrant CM-Dil cell-labeling solution (Molecular Probes 社) で製品添付のマニュアルに従って標識して皮下に注入した。反対側には、対照として PBS のみを 50 $\mu$ l 皮下注射し、外観変化 (潰瘍面積(mm<sup>2</sup>)を計測) を経時的に観察した。

<組織標本の作製>術後 7 日目に、KSN ノードマウスを体重 1 g あたり 10 $\mu$  l の 16%ネブタールを腹腔内に注射することによって麻酔後、門脈より Fluorescein Griffonia Simplicifolia LECTIN I, ISOLECTIN B4 (Vector Laboratory 社) を 100 $\mu$ l を静脈注射し、その後 30 分間 4%パラホルムアルデヒドを門脈から点滴静注し還流固定した。還流固定後に皮膚組織を切除し、凍結組織切片を作製し、DiI 標識された移植細胞とレクチン標識内皮細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

#### 下肢虚血 (下肢動脈阻血) モデルマウスへの細胞移植 :

<下肢虚血の作成と細胞移植> KSN ノードマウス (8 週齢 $\sigma$ ; 日本 SLC) をペントバルビタール腹腔内投与 (80mg/kg) にて麻酔後、右大腿部の皮膚を切開することで大腿動静脈を露出させ、動脈と静脈を剥離後に大腿静脈を結紮した。In vitro 増幅した VE カドヘリン陽性細胞 (1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells / 100 $\mu$ l PBS) を Vybrant CM-Dil cell-labeling solution (Molecular Probes 社) で製品添付のマニュアルに従って標識後、29G 針付き注射シリンジを用いて右大腿動脈から動脈注射し、直後に同動脈を結紮切除した (図 4 参照)。対照実験群は、細胞を含まない PBS のみを注入。術後 0、14、28、42 日目にレーザー Doppler 血流計 (Moor 社) を用いて、虚血側下腿の皮膚表面の血流を経時的に計測した。

<組織標本の作製>ペントバルビタール麻酔後、胸腔を開け左心室に 23G 注射針を挿入して右心室を解放した。生理的食塩水にて 15 分還流、更に 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝食塩水で 15 分還流固定後、虚血側下腿筋を採取した。30%スクロース入り PBS にて虚血側下腿筋を置換した後、クリオスタットで凍結切片 (4-10 $\mu$ m 厚) を作製した (術後 7 日目および 42 日目)。この虚血側下腿筋の組織標本は、蛍光実体顕微鏡によって観察した。

<レクチンによる標識>一部の被験マウスについては、術後 7 日目の屠殺直前に門脈から Fluorescein Griffonia Simplicifolia LECTIN I, ISOLECTIN B4 (Vector Laboratory 社) を静脈注射

した後、組織切片を作製し、DiI 標識された移植細胞とレクチン標識内皮細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

#### 16. hemogenic endothelium (2 次造血) の確認

一部の実験においては、内皮細胞を介するとされる 2 次造血の確認のために、血液細胞の分化誘導後の 2 次造血 (好中球産生) を、形態、機能、等により検討した。

(倫理面への配慮)

#### ヒト ES 細胞研究を開始するための生命倫理に対する取り組み

平成 17 年 11 月 9 日に、ヒト ES 細胞の使用計画の文部科学大臣の確認を初めて受けた (17 諸文科振第 734 号)。その後、研究者の追加・削除と研究業績の変更、使用期間と使用の方法の変更、使用機関の基準に関する説明の変更についても平成 18 年 11 月 24 日に文部科学大臣の確認を得た (18 諸文科振第 743 号)。さらにその後、文部科学省指針の改定に伴う変更と使用の方法の変更についても平成 19 年 12 月 18 日に文部科学大臣の確認を受けた (19 国文科振第 26 号)。さらにその後、研究者の追加・削除について平成 20 年 3 月 11 日、10 月 27 日に文部科学省に届け出た。さらにその後、使用の期間の変更、ヒト ES 細胞株の変更について平成 21 年 7 月 13 日に文部科学大臣の確認を得た (21 諸文科振第 6491 号)。

#### 分担研究者における倫理面での配慮

本研究は全能性幹細胞であるヒト ES 細胞を用いるものであり、ES 細胞は万一ヒト胚に戻された場合には個体発生も理論上可能であるため、研究を行う場合はその内容について厳しい倫理審査を経ることが義務づけられている。本研究は所定の手続き・審査を経て、東京大学および文部科学大臣の承認を受けている。そして研究にあたっては、実験を許可された者がガイドラインに従った厳しい管理の下で ES 細胞を扱い、ヒト ES 細胞研究に要求される高度な倫理意識を保ちながら適切な研究が行われるよう配慮した。

#### C. 研究結果

##### 1. 無フィーダー分化誘導系の確立とその他の解析

無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養で長期継代したヒト ES 細胞株 2 株 (KhES-1、



KhES-3) を分化誘導実験に用いた。

霊長類 E S 細胞からの血液細胞の分化誘導に至適とされる培養条件 (15%牛胎児血清と 6 種類のサイトカイン・増殖因子 (VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-L, IL-3, IL-6)) で培養を行い、2 種類のヒト E S 細胞株 (KhES-1, KhES-3) のいずれにおいても血管内皮細胞の分化誘導に成功した。培養法の基本は、前半の sphere 形成浮遊培養と後半の平面培養であり、どちらもマウスフィーダー細胞は用いない。

sphere をゼラチンコートディッシュに接着させた後に敷石状の (cobblestone) 細胞が周囲に向かって増殖した。細胞形態は一部不均一な部分もあったが、概ね均一な形態を示し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と極めて類似の形態を示した。2 種類のヒト E S 細胞株 (KhES-1, KhES-3) から誘導した血管内皮細胞の形態はやや異なり、KhES-1 株由来の分化細胞の方がやや大型の細胞の存在が目立った。また、サル E S 細胞の分化誘導系の場合と異なり、嚢状構造物 (sac-like structure) は観察されなかった。

2 種類のヒト E S 細胞株 (KhES-1, KhES-3) から誘導した敷石状の接着細胞に関して、まず、血管内皮細胞特異的な表面抗原である VE-cadherin と PECAM-1 の 2-color 解析を行った。その結果、KhES-3 株から誘導した分化細胞はサル E S 細胞から誘導された分化細胞と同様に 20-30% の両抗原陽性細胞が認められ、継代と共にその比率は 50-60% 程度まで増加したが、KhES-1 株から誘導された分化細胞は全て両抗原陰性であった。KhES-1 株の分化誘導に際して、マウスフィーダー細胞である OP9 細胞を用いての共培養を行っても、両抗原のは陰性であった。すなわち、KhES-3 株由来血管内皮細胞は「典型的」血管内皮細胞と「非典型的」血管内皮細胞の 2 群から成り立ち、KhES-1 株由来血管内皮細胞は全て「非典型的」血管内皮細胞であった。なお、KhES-1 株由来血管内皮細胞は、脂肪細胞への分化傾向は示さず、間葉系幹細胞の性質は有していないと考えられた。

このように、KhES-1 株由来血管内皮細胞と KhES-3 株由来血管内皮細胞は大きく異なる一面を有していたが、以下のような様々の結果からどちらも均一で質の高い血管内皮細胞と考えられた。すなわち、どちらも VE-cadherin 遺伝子発現陽性、N-cadherin 陽性、Tie-2 陽性、索状構造形成能陽性、アセチル LDL 取込能陽性、成熟血管内皮細胞の指標である eNOS と vWF が免疫染色にて陽性であった。従って、継代後の分化細胞は均一な血管内皮細胞として増殖、分化していることが示された。すなわち、我々の開発した無フィー

ダー分化誘導システムは、ほぼ 100% の純度の血管内皮細胞を産生することが出来る系であることが示された。

次に、様々の種類の正常ヒト血管内皮細胞との比較検討を行った。比較対照とした正常初代培養ヒト血管内皮細胞は、HGVEC、HMVEC、HAEC、HUVEC で、VEGF-R2、VEGF-R1、VEGF-R3、CD34、Tie-2 の発現をフローサイトメトリーを用いて比較検討した。VEGF-R2 に関しては、正常初代培養ヒト血管内皮細胞において高発現であるのに対して、KhES-1 株由来血管内皮細胞と KhES-3 株由来血管内皮細胞においては少なくともヒストグラム表示では低発現であった。VEGF-R1 に関しては、正常初代培養ヒト血管内皮細胞、KhES-1 株由来血管内皮細胞と KhES-3 株由来血管内皮細胞、いずれにおいても低発現であった。VEGF-R3 は HUVEC においてのみ発現が高かった。また、CD34 に関しては、KhES-1 株由来血管内皮細胞が陰性であったのに対して、KhES-3 株由来血管内皮細胞は陽性群と陰性群とが相半ばした。Tie-2 は、HAEC と KhES-1 株由来血管内皮細胞、KhES-3 株由来血管内皮細胞において高発現であった。

## 2. 高ブドウ糖濃度による酸化ストレスを介した内皮障害

各種のヒト初代培養血管内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC)、ヒト微小血管内皮細胞 (Human MicroVascular Endothelial Cells, HMVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells, HAEC)、ヒト (腎) 糸球体血管内皮細胞 (Human (Renal) Glomerular Vascular Endothelial Cells, HGVEC)) を用いて、高ブドウ糖負荷における酸化ストレスを測定したところ、何れのヒト内皮細胞においても、高ブドウ糖濃度培養によって、細胞内活性酸素 (ROS) の上昇が認められた。このような細胞内 ROS の発生源を同定するために、NADPH オキシダーゼ阻害剤である apocynin とミトコンドリア阻害剤である CCCP、TTFA の影響を検討したところ、HUVEC、HMVEC、HGVEC においては NADPH オキシダーゼ由来の ROS と判明したが、HAEC においてはミトコンドリア由来の ROS であることが判明した。

一方、ヒト E S 細胞由来血管内皮細胞 (KhES-1 株由来) においては、NADPH オキシダーゼ由来の ROS と判明した。

## 3. 平滑筋抑制作用

各種のヒト初代培養血管内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial

Cell、HUVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells、HAEC)、ヒト (腎) 糸球体血管内皮細胞 (Human (Renal) Glomerular Vascular Endothelial Cells、HGVEC) を用いて、ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖に与える影響を検討したところ、いずれの組み合わせの共培養においても、接触培養、非接触培養を問わず、これらの内皮は平滑筋細胞に増殖を促進した。サル ES 細胞由来の血管内皮細胞、ヒト ES 細胞由来の血管内皮細胞のうち KhES-1 株由来のものは、平滑筋細胞の増殖を抑制した。

#### 4. 継代培養による細胞老化

Human Umbilical Vein Endothelial Cell、HUVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells、HAEC) を用いて、増殖曲線を検討して細胞老化の可能性を解析したところ、21 継代前後で増殖速度が落ちて、細胞のサイズの増大が認められた。HUVEC を用いて p16 の細胞内の局在を、核と細胞質に分けてウェスタンブローディングによって検討したところ、継代と共に細胞質から核への移行が確認された。

サル ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞は 8 継代までは増殖したが、次第に細胞のサイズが増大して、細胞増殖が遅延し、最終的には増殖を停止した。p16 の発現を増殖期と老化期において検討したところ、老化期においてのみ発現が認められた (一部は核内集積を示していた)。

ヒト ES 細胞においても、サル ES 細胞からの分化誘導の場合と同様に、継代を重ねると細胞増殖の遅延と細胞サイズの増大など、細胞老化と考えられる状態に陥った。細胞老化に至るまでの継代数は、サル ES 細胞の場合と異なりヒト ES 細胞 (KhES-1) では 20 継代程度であった。p16 の細胞内局在に関しては、継代と共に細胞質から核に移行することが、免疫染色とウェスタンブローディングの両方で確認できた。

#### 5. 上記の 1-4 とは異なるヒト ES 細胞由来血管内皮 (前駆) 細胞の分化誘導と *in vitro* 継代増幅法の開発

ヒト ES 細胞由来血管内皮前駆細胞 (EPC) は、マウス頭蓋冠ストローマ細胞 OP9 株と共培養することによって生じる VE カドヘリン陽性細胞 (VEGFR-2<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VE cadherin<sup>+</sup>細胞) として同定することができる。この VE カドヘリン陽性細胞は、OP9 細胞共培養系で分化誘導約 8~10 日後の段階で生じるものであり、既に内皮細胞への分化が方向付けられた分化段階の細胞群である。すなわち、これらの細胞は殆どが PECAM1 等の内皮マーカーを発現する成熟血管

内皮細胞に分化できる一方で、 $\alpha$ SMA やカルボニン等を発現する血管平滑筋にはなり得ない。

我々は、このヒト ES 細胞の分化によって得られる EPC (VE カドヘリン陽性細胞) を FACS で選択的に分取した後、試験管内で培養継代増幅することを試みた。その結果、分化誘導用培地に VEGF を 50ng/ml の濃度で添加した培養液を用いて IV 型コラーゲン基質上で培養することによって安定に増殖させることができ、しかも酵素処理による 3~5 回の継代を繰り返すことによって約 100 倍程度にまで増幅・量産化できることがわかった。

#### 6. 上記の 1-4 とは異なるヒト ES 細胞由来血管内皮 (前駆) 細胞の *in vivo* 機能の解析

上記の操作で *in vitro* 継代増幅したヒト ES 細胞由来 EPC の生体内移植効果を確認するために、ヌードマウスを用いて作製した血管障害性疾患モデルでの検討を行った。

##### (1) 皮膚潰瘍モデルへの移植

ヌードマウスの背部皮膚に皮膚潰瘍を作製後、継代増幅した VE カドヘリン陽性細胞 ( $5 \times 10^5$  cells) を DiI 標識し、皮下に移植した。その結果、術後 3 日目では対照側と比較して潰瘍面積に差が見られなかったが、6 日めを経過する頃から細胞移植側のみで有意に潰瘍面積が縮小する傾向が観察された。また、細胞移植後 7 日めの段階でレクチン (ISOLECTIN B4) で血管内皮細胞の標識した後に作製した皮膚組織切片の解析では、移植部位の皮下組織にレクチン陽性かつ DiI 陽性の細胞が認められ、移植したヒト ES 細胞由来 EPC の一部が宿主の循環器系とコネクションをもち、レシピエントの血管内に取り込まれている様子が確認された。

##### (2) 下肢虚血モデルへの移植

ヌードマウスにおいて下肢虚血 (動脈阻血) モデルを作製し、*in vitro* 増幅後に DiI 標識した VE カドヘリン陽性細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を右大腿動脈から移植した。その後レーザードップラー血流計を用いて虚血側下腿の血流を経時的に計測したところ、対照群と比べて有意な血流回復が認められた。

また、虚血側下腿筋の組織標本の検討からは、移植部位において移植細胞 (DiI 標識) が脈管に沿った形での生着が確認できると同時に (術後 7 日め)、術後 42 日目の組織切片の免疫組織学的検討からは、ヒト血管内皮マーカー

(PECAM1) 陽性細胞が細胞移植部位に確認され、移植細胞が血管内皮細胞に分化している様子

が伺えた。更に、レクチン (ISOLECTIN B4) で血管内皮細胞を標識した移植マウスにおいては、レクチンとヒト PCAM1 の双方に陽性な細胞群が認められ、移植した細胞がレシピエントマウスの血管組織内に取り込まれている様子を観察することができた。

#### 7. 上記の 1 - 4 とは異なるヒト ES 細胞の血管内皮前駆細胞 (2 次造血) 分化誘導系の成果

ヒト ES 細胞 (KhES-3 株) を、SCF、Flt3-L、BMP-4、TPO、IL-6/IL-6 受容体キメラ蛋白質 (FP6) 存在下で 17 日間胚様体を形成させた後にフィーダー細胞 (マウスストローマ細胞 OP9) と共培養した。共培養後約 13 日目において、成熟好中球 (形態、機能の両面で) の分化誘導が認められた。すなわち、hemogenic endothelium を介する 2 次造血を再現することができた。

#### D. 考察

他の研究グループで達成できなかった高純度の血管内皮細胞分化誘導が、我々の研究室で可能であった理由として、以下の 2 点が推測される。まず第 1 に、我々の分化誘導系に用いたサイトカイン、増殖因子は、どちらかという血液細胞の分化に働く物が主体で、血管内皮細胞の分化誘導としては着想しにくい組み合わせである。第 2 には、我々の分化誘導系は前半の細胞凝集塊形成浮遊培養と後半の平面培養の 2 段階システムからなる分化誘導系であることであると考えられる。血液、血管内皮細胞分化誘導などの中胚葉分化法においては、このような 2 段階培養は殆ど試みられておらず、我々の系の独自性が良好な結果につながった。

今回の検討から、とりわけ様々の成熟蛋白と成熟機能の存在から、あるいは極めて均一な形態から、分化細胞全てが血管内皮細胞と想定される。すなわち、ほぼ 100% の分化誘導効率と考えられる。しかし、VE-cadherin、PECAM-1 の細胞膜発現の有無に関しては、均一ではなく、双方が陽性の集団 (典型的血管内皮細胞) と、双方とも陰性の集団 (非典型的血管内皮細胞) に分かれることが明らかにされた。双方陽性集団 (典型的血管内皮細胞) が血管内皮細胞であることは疑いの余地がないが、双方陰性の集団 (非典型的血管内皮細胞) について、分画操作による詳細な解析が必要と考えられた。

ヒト ES 細胞から異種動物由来細胞が混入しない安全な環境において、継代培養と凍結融解が可能な機能的血管内皮細胞を産生することに成功した。

ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞は機能を保ったまま少なくとも 20000 倍に増幅させることが可能である。また腫瘍形成性もなく、正常細胞と同様に一定の増幅の後に老化を誘発することから、極めて安全性が高く、薬理学試験の使用にも適した細胞であることが結論された。

このように作成されたヒト血管内皮細胞を用いて、高ブドウ糖濃度負荷時の酸化ストレス反応、平滑筋細胞増殖抑制作用、細胞老化現象などが観察され、正常人由来ヒト初代血管内皮細胞と同等の、もしくは、それらよりさらに興味深い現象が観察され、研究ツールとしての霊長類 ES 細胞由来の血管内皮細胞の優越性が確認できた。

高ブドウ糖濃度による酸化ストレス現象や平滑筋細胞の増殖動態に与える作用は、いずれも、代謝性血管疾患障害 (糖尿病細小血管障害や動脈硬化・動脈狭窄) において重要な現象であり、霊長類 ES 細胞由来の血管内皮細胞がこのような分野の研究の *in vitro* 病態モデル系として有効であることの意義は非常に大きい。特に、血管内皮細胞が血管の恒常性を保つために本来備えているはずの平滑筋抑制作用が、ヒト初代内皮では再現されずにヒト ES 細胞由来内皮で確認されたことは、学術的にも医療応用の面でも、今後の大きな展開を起こすであろう。

サル ES 細胞、ヒト ES 細胞 (更にはヒト iPS 細胞) から分化誘導される血管内皮細胞の共通の特徴としての細胞老化現象が明らかにされた。このような現象は、ヒト初代培養血管内皮細胞でも観察され、細胞老化研究の貴重な培養モデルと考えられる。その細胞内シグナル伝達機構としては、ストレス依存性細胞老化において報告されている p38MAK キナーゼ、p16Ink4a の経路の関与が示唆されたが、p21Cip1/WAF1 の関与が示唆される系もあり (予備検討の結果)、今後に向けての課題となった。また、このような細胞老化が克服できて増殖が低下しないような内皮細胞が作成できるか否かも重要な課題であるし、老化阻止薬探索のためのスクリーニングの系としての応用も有りうるであろう。

現状では、移植した EPC の生着率の詳細をはじめ、血管障害性モデル動物への細胞移植によって認められた効果 (影響) が、移植細胞自体が血管形成に参加した結果によるものであるのか、あるいはパラクライン的に血管新生因子 (VEGF, bFGF, angiopoietin など) を放出し、宿主内在細胞の血管新生を活性化することによるものであるのか等については明らかでない。しかし、分担研究者らによるヒト ES 細胞由来 EPC の細胞移植が血管障害性疾患の治療促進効果を示したという点において、新たな血管新生療法の開発に向けた

研究成果として重要であると考えている。

## E. 結論

無血清・無フィーダー・増殖因子無添加培養で未分化維持したヒトES細胞から、極めて高純度の成熟機能を有する血管内皮細胞を、血液細胞産生条件による無フィーダー分化誘導系を駆使して効率よく大量産生することに成功した。このような品質の高い培養系は、創薬などのアッセイ系として極めて有用と考えられる。しかも、このような内皮細胞は、ヒト初代内皮細胞と同等あるいはそれ以上に重要な機能と性質を有し、様々の基盤研究や疾病のモデル系として展開できるかが明らかとなり、本研究プロジェクトでの大きな成果となった。また、本年度においては分担研究者らにより誘導されたヒトES細胞由来EPCが血管障害性疾患の動物モデルにおいてin vivoで有効であることが明らかにされ、治療のツールとしての展望も大きく広がった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakahara M, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, Yuo A, Saeki K: High efficiency production of subculturable vascular endothelial cells from feeder-free human embryonic stem cells without cell-sorting technique. *Cloning Stem Cells* 11:509-522, 2009.
2. Nakahara M, Saeki K, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, Yuo A: Human embryonic stem cells with maintenance under a feeder-free and recombinant cytokine-free condition. *Cloning Stem Cells* 11:5-18, 2009.
3. Saeki K, Saeki K, Nakahara M, Matsuyama S, Nakamura N, Yogiashi Y, Yoneda A, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:59-67, 2009.
4. Michibata H, Okuno T, Konishi N, Wakimoto K, Kyono K, Aoki K, Kondo Y, Takata K, Kitamura Y, Taniguchi T: Human GPM6A is associated with differentiation and neuronal migration of neurons derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Dev* 18: 629-640, 2009.
5. Muramatsu S, Okuno T, Nakahara M, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y, Tsukada H: Multitracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease. *Synapse* 63:541-548, 2009.
6. Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N: An efficient and xeno-free method for the neural differentiation of human embryonic stem cells: the use of the conditioned medium from ES cell-derived astrocytes, *PLoS ONE* 4:e6318, 2009.
7. Kondo Y: Use of pluripotent stem cells (ES & iPS cells) in drug discovery. *J Trad Med* 27:45-49, 2010.
8. Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S: Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood* 113:6584-6592, 2009.
9. Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S: Notch activation induces the generation of functional NK cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of IL-15. *J Immunol* 182:6168-6178, 2009.

### 2. 学会発表

1. Saeki K, Yogiashi Y, Nakamura N, Matsuyama S, Sato C, Gokoh M, Takahashi K, Yamanaka S, Yuo A: A feeder-free hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells: towards a provision of rejection-free neutrophils for granulocyte transfusion therapy. 7th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, July 2009, Barcelona, Spain.
2. 佐伯久美子、中村直子、安田和基、湯尾明: ヒト血管内皮細胞の高ブドウ糖負荷時のROS産生源(ミトコンドリア電子伝達系vs NADPH oxidase)の多様性に関する解析。第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、横浜。
3. 佐藤千香子、五香麻衣子、過足芳子、松山さと子、安田和基、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾明: ヒト胚性幹細胞由来血管内皮細胞および末梢血単球由来血管内皮細胞による血管平滑筋細胞の増殖抑制。第9回