

Online Fig. VIII. Potential and committed cardiac progenitor cells based on ES cell studies. The earliest cardiomyogenic population was the PRa cells. PRa cells include $Myhc^+$ nascent cardiomyocytes as well as $Myhc^-$ bipotential progenitors that can differentiate into cardiac or smooth muscle cells. PrP can also be used to isolate nascent cardiomyocytes that differentiate into atrial or ventricular cardiomyocytes.

ES細胞の臨床応用：心血管系の再生医療実現に向けて

森崎隆幸，日高京子

はじめに

ES細胞は、無限増殖能と様々な細胞に分化し得る多分化能を備えている細胞であり、動物では1個の細胞が個体の全構成細胞を構築することができる。1980年にマウスでES細胞が樹立され、その細胞特徴から、発生分化のモデルとして、また、遺伝子操作を施すことにより遺伝子改変動物作製の材料として研究に活用されてきた。さらに、1998年にヒトES細胞が樹立されて以来、傷害を受けた組織の機能を補うための再生医療の細胞ソースとしての期待がES細胞へ高まって研究が推進され、ヒトES細胞を用いた研究成果も次第に蓄積しつつある。しかしながら、他方、倫理的な問題や免疫拒絶の問題など、ES細胞の臨床応用に向けて乗り越えなければならない問題はまだまだ多い。

私たちは、ES細胞の多分化能に着目し、生後はほとんど細胞分裂せず、いったん傷害を受けると再生しない心筋について、その再

生に向けた方策を獲得することを最終目的に、これまで、ES細胞から心筋細胞を効率的に分化誘導し、それを単離するシステムの開発を行ってきた²⁾。その過程において、遺伝子の網羅的発現解析により、心筋細胞の分化とともに発現の増加する遺伝子群を同定することに成功した³⁾。これらの遺伝子群には、心筋細胞の分化形質を保つ上で必須な転写因子遺伝子のほか、細胞表面マーカーとなり得る候補遺伝子も含まれていた。現在、これらの因子・マーカーの利用により、さらに効率的な分化誘導法、単離法の確立が可能となることを期待して、大量調製に向けての準備を進めている。

本稿では、これまでに私たちがES細胞の心筋分化に関する研究の過程で明らかになった知見と問題点を近年の研究の進展とともに論ずる。

I. ES細胞の臨床応用に向けての問題点

はじめに述べたように、1998年にヒトES細胞が樹立されて以来、ES細胞の細胞移植ソースとしての期待が高まっている。しかし、臨床応用実現に向けての道りはまだ遠いと言わざるを得ない。ES細胞は、受精卵が細胞分裂を経て生ずる「胚盤胞」の「内部細胞塊」に由来する細胞で、生体内から外に取り出され試験管内で樹立された培養細胞である。ES細胞は、核移植によって得られた「クローン胚」からも樹立することが原理的に可能であり、クローン胚由来ES細胞の樹立が実用化されれば、患者本人のDNAを持

— Key word —

ES cells
Cardiomyocyte
cell differentiation
development

Application of ES cell-derived cardiomyocytes for the future cardiovascular regeneration therapy

Takayuki Morisaki, Kyoko Hidaka :

Department of Bioscience,

National Cardiovascular Center Research Institute

国立循環器病センター研究所 バイオサイエンス部

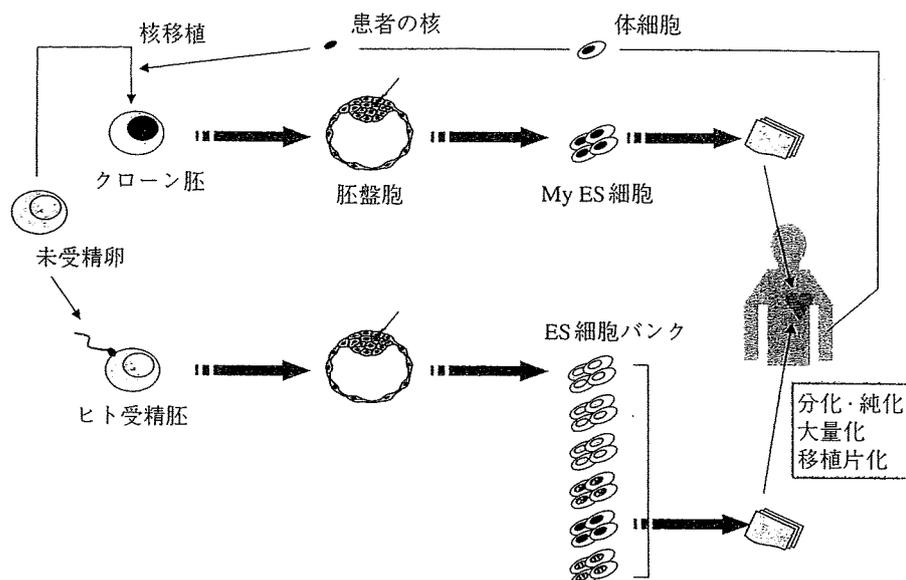


図1. 臨床応用に向けたES細胞株の樹立

免疫拒絶問題の克服には、患者本人の核を持つクローン胚を作製し、そこからES細胞を樹立する(My ES細胞)ことが考えられるが、所要費用・時間の面から現実的ではない。一方、様々なHLAタイプを有するES細胞のバンク化により、これを乗り越えるという方法も考えられる。いずれにしろ、ES細胞株の樹立を数多く行う必要があり、質の確保、目的の細胞利用に向けた再現性の高い分化誘導法の確立が必須である。

つてラーメイド細胞が利用できるということになり、まさに、移植ソースとしては免疫拒絶のない理想的なものとなり得る(図1)。現時点では、クローン胚よりヒトES細胞を作成することは成功していないものの、将来的には成功するだろうと考えられるが、クローン胚樹立のために核移植を行う際には、必然的に卵子を破壊する必要がある、その樹立ごとに倫理的な問題を伴うことはクローン胚由来ヒトES細胞の樹立の大きな障害となる。さらに、樹立の際にコストと時間がかかりすぎることも、このアプローチは現実的ではないとして、ES細胞の臨床応用に対しての否定的な考え方につながる。一方、こうしたラーメイドのES細胞の樹立に対して、ES細胞のバンク化を行えば、クローン胚を

樹立せずともES細胞の臨床応用は可能である、という考え方もある(図1)。その根拠として、200ものES細胞株を樹立すれば、組織適合性抗原のミスマッチは最小限に抑えることができ、ほとんどの患者に対応可能となり、臨床応用は可能になるだろうというものである。むしろ、これだけの数のES細胞株の樹立が現実的に可能なのか、余剰胚の提供が今後どのくらい進むのか、現時点では未知数の部分が多く、判断はまだ困難である。ただし、私たちは、研究者の立場として、基礎研究の成果を医療応用に向けて有意義なものとして示すことによって、一般的な理解とコンセンサスが一層高まり、理解が得られるよう努力していきたいと考えている。

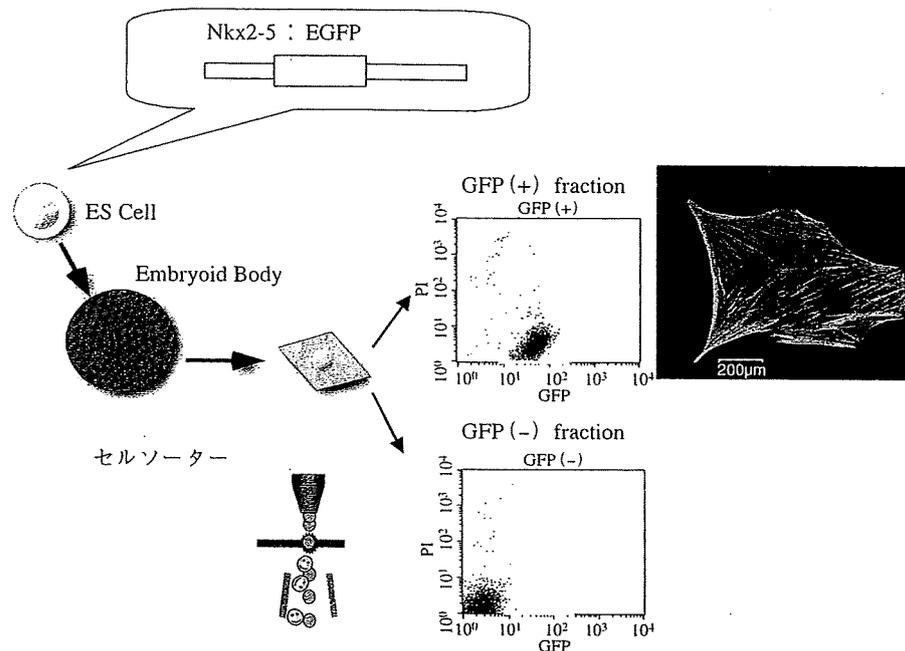


図2. セルソーターによるES細胞由来心筋細胞の単離
心筋ホメオボックス遺伝子Nkx2-5の遺伝子座に蛍光蛋白質遺伝子をノックインしたES細胞を用いて、分化誘導し、セルソーターを利用して心筋細胞を単離することができる。単離した細胞を培養し、収縮蛋白質に対する抗体で免疫染色を行うと、ほとんどの細胞は陽性を示す。

II. ES細胞からの心筋細胞の分化誘導と単離

私たちは、これまで数年来にわたり、マウスES細胞を用いて、ES細胞から心筋分化を誘導し、それを単離するための系を構築してきた。ES細胞は細胞塊を作らせると胚様体と呼ばれる三次元構造を構築し、おそらくは細胞同士の間接あるいは直接的相互作用などによって、一部が自動拍動する心筋細胞を生ずる。私たちは心筋特異的ホメオボックス転写因子Nkx2-5遺伝子座に緑色蛍光蛋白質EGFPをノックインしたマウスES細胞株を樹立し、その細胞を元に、セルソーターを用いてES細胞由来心筋細胞を単離することに成

功した(図2)²⁾。そのなかで、単離心筋細胞を培養皿にて培養すると、最初はほとんどがペースメーカー型の活動電位を示すのに対し、培養を続けることによって、心室筋型、心房筋型のパターンを示すものも現れることを明らかにした。また、レチノイン酸刺激を加えることにより、心房筋型細胞の割合が増える、という変化が確認された。こうして、EGFPなどの「(標識)レポーター」を導入することにより、すなわち遺伝子改変を施すことにより、ES細胞から心筋細胞を純化することは可能であることを実証した。レポーターとしては蛍光蛋白質のほかに、表面抗原として利用できる蛋白質(たとえばCD4など)も利用可能であるので、そうした方法で二次

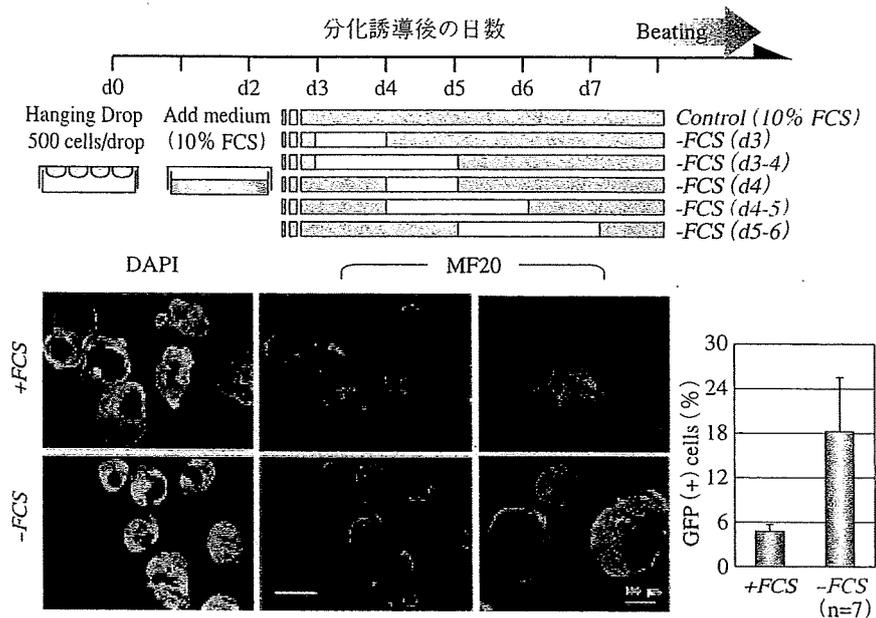


図3. 血清除去による心筋分化の促進

Hanging Dropの形成を経た分化誘導で、10%血清含有培地で継続して培養した細胞より、途中で血清除去培地を用いて培養した細胞のほうが心筋細胞への分化率が上昇した。この現象は血清除去のタイミングに大きく依存し、ここでは分化開始後4日に除去開始した場合に最も効果的であった。血清中に心筋分化の阻害物質が含まれているのか、心筋細胞以外の細胞の分化や増殖の抑制によるものか、そのメカニズムについてさらなる検討が必要である。

抗体の修飾を変えることによって、磁力による純化も可能であると考えられ、現在検討を行っている。また、レポーターを薬剤耐性遺伝子とした場合はさらなる大量調製が可能であると考えられるので、こうした手法を組み合わせることで、ES細胞からの心筋細胞の分化誘導を効率良く行って、目的とする心筋細胞を高純度で大量に獲得することすら、かなり現実に近いものになってきたと言える。

Ⅲ. 網羅的発現遺伝子解析による心筋特異的遺伝子の同定

前項では、ES細胞からの心筋細胞の分化研究の進捗と期待を述べたが、これまでの研

究では、通常血清添加培養条件下で5~10%の細胞が心筋細胞となるのみであり、これだけでは心筋細胞を単離し利用するには不十分であって、高効率の細胞分化系の確立が必要と考えられてきた。そこで、Wnt11などの既知の因子を添加することによって分化誘導の改善を試みるとともに、種々の細胞培養条件を比較検討し⁵⁾、その結果、一時的な血清の除去が心筋細胞への分化を20~30%まで促進することを見出した(図3)⁶⁾。この現象は、最近ヒトES細胞でも報告されており、細胞株による効果の違いは若干あるものの、一般的な現象であると考えられた。そこで私たちは、この心筋細胞を多く含む胚様体のマイクロアレイ解析により、どのような遺

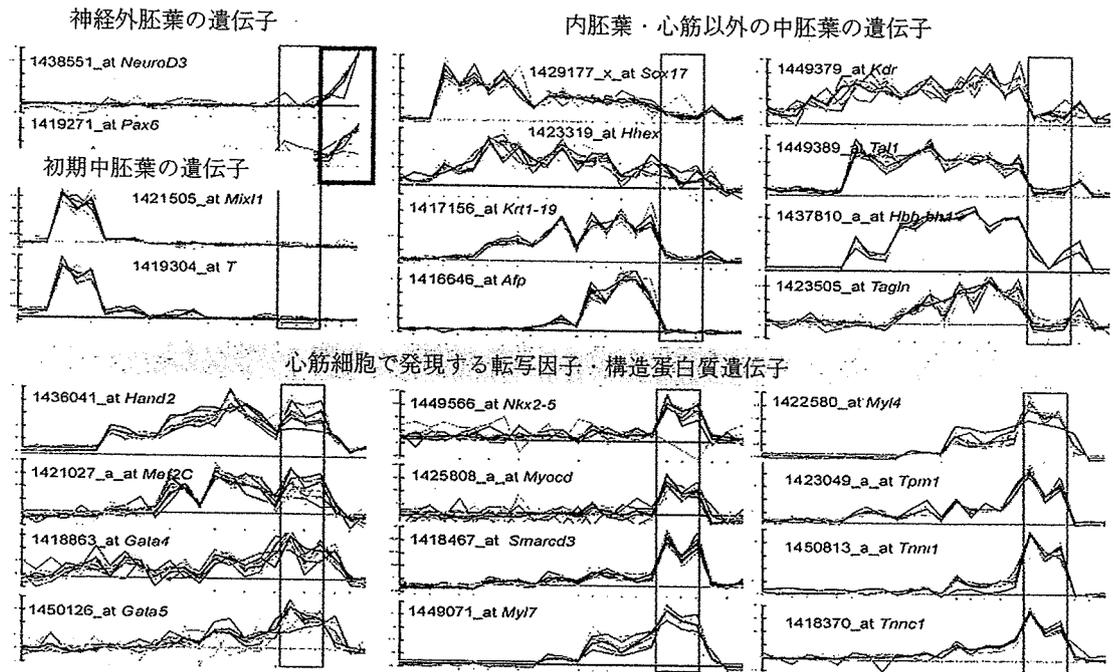


図4. 胚様体の網羅的発現遺伝子解析

マイクロアレイによる遺伝子発現解析により、細胞系譜により異なった発現パターンを示すことが明らかになった。一時的血清除去による心筋分化促進条件(図の赤枠内、分化後7日目)では心筋関連遺伝子のみが発現上昇を示した。血清除去による分化促進条件のほか、レチノイン酸添加による分化抑制条件(図の青枠内、分化後7日目)についても通常の条件とともに時間経緯を追跡して解析した〔理研で開発されたソフトウェア eXIntegrator (<http://www.cdb.riken.go.jp/scb/documentation/>) による解析〕。

遺伝子が胚様体の心筋分化誘導に伴い発現しているかを網羅的に解析して、分化誘導促進作用のある遺伝子の探索を試みた(図4)。この解析では、既知の心筋で働く転写因子と心筋細胞特異的構造蛋白質遺伝子は、ほとんど全て Nkx2-5 遺伝子と同様な発現パターンを示すことが確認された。次いで、先の解析で候補として抽出された遺伝子のうち、胚発生過程で組織特異的発現について調べられていなかった遺伝子について、マウス whole mount *in situ* hybridization を行い、その発現の組織特異性を確認したところ、Nkx2-5 と同様なパターンを示す遺伝子はほとんどが胚発生に

おいて心臓特異的に発現していることが明らかとなった(図5)。このことは、私たちのマイクロアレイ解析データは、発生過程での発現が心筋特異的である遺伝子を絞り込むのに有用であることを示唆している。また、こうした候補のうち、心筋特異的と考えられるパターンをとる転写因子遺伝子のなかには、原始心筒では必ずしも発現していないものも含まれていた。これらのなかには、第二の心臓系譜と言うべき Second Heart Field⁶⁾ で発現する *Isl1*, *Tbx1* などが含まれていることが明らかになった。また胚様体では、心筋細胞だけでなく、心内膜細胞に特徴的な遺伝子を発現

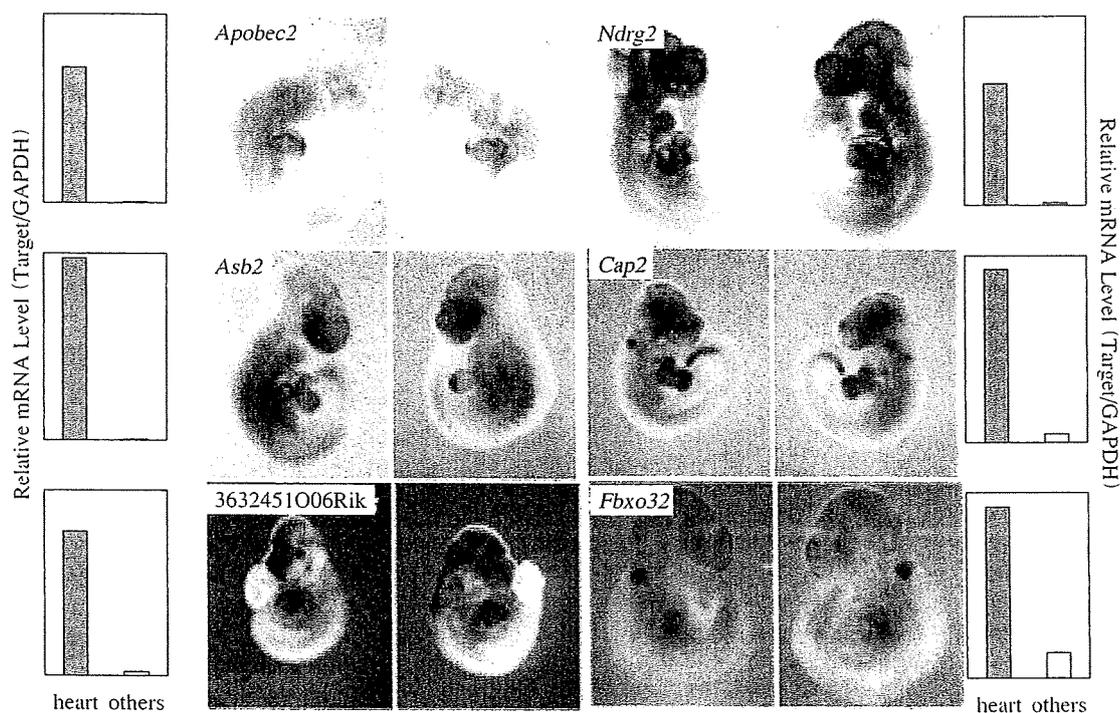


図5. ホールマウント *in situ* hybridization による心筋関連遺伝子の発現解析

胚様体のマイクロアレイにて心筋遺伝子と類似のパターンを示す遺伝子の多くはマウス胚でも心臓領域での発現が確認された。中央の写真は胎生9～10日目のマウス胚，両側のグラフは定量的RT-PCRの結果を示す。

する細胞の存在も明らかとなった(図6)'. この結果は、胚様体においても心筋分化に関わる複数の細胞系譜が存在している可能性を示唆するものであるとともに、これらの細胞系譜における共通した心筋分化誘導メカニズムの存在の可能性を示しているようであり、非常に興味深い。

IV. ES細胞由来心筋細胞の大量調製・移植片化に向けての課題

前述したように、ES細胞から心筋細胞を大量に獲得するための方策には、薬剤耐性遺伝子を導入したり、表面マーカー遺伝子を外来より導入したりして、選択や純化に利用する方法が考えられる。しかしながら、将来、

臨床応用の実用化に向けて、先に紹介したように仮に200種類のES細胞バンクを作ったとしよう。この場合、レポーターをそれぞれのES細胞株に安定に導入することは可能なのであろうか？ また、遺伝子改変されたES細胞の安全性は、どのようにすれば確保されるのであろうか？ このようなことを考えると、やはり、外来の選択マーカーの導入でなく、内在性の心筋細胞表面特異的なマーカーの同定とその利用が必須であると考えられる。しかしながら、現在のところ、心筋細胞には特異的な表面マーカーは知られていない。これまでには、心筋前駆細胞をFik1などのマーカーを利用して心筋細胞を単離することの報告⁶ はなされているが、Fik1陽性細

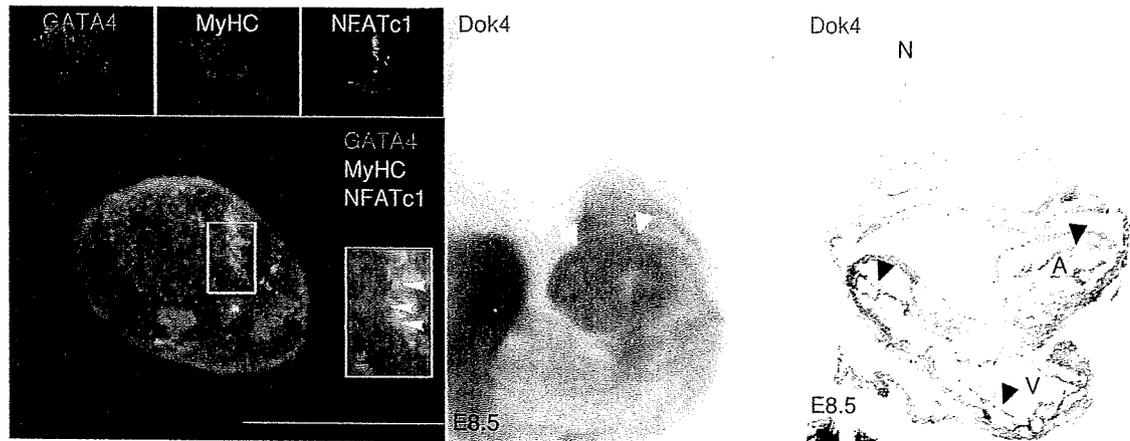


図6. 胚様体での心内膜遺伝子の発現

マイクロアレイによる解析では、心筋のみならず心内膜で発現する遺伝子についても検討を行った。左は胚様体の凍結切片の免疫染色像。MyHC(心筋)、NFATc1(心内膜)およびその両方で(Gata4)発現する蛋白質の染色像を示す。中央および右図はマウス *in situ* hybridization による解析で今回同定した遺伝子の1つ Dok4 が心筋と心内膜の両方で発現することを示す。

胞は分化前の前駆細胞であり、心筋細胞のみならず血管内皮などの系譜にも分化するため、心筋細胞についての特異性を高く純化するにはそのままでは不十分であり、工夫が必要と考えられる。そこで私たちは、マイクロアレイ解析で得られた遺伝子から、細胞の表面で発現している可能性のある遺伝子の抽出を行った。結果は、ごくわずかな遺伝子のみが細胞表面で発現していた。血清除去という条件を用いたためか、これまでに他の細胞系譜の特異マーカーとして利用され、心筋についても期待された増殖因子受容体遺伝子の多くは、むしろ、その発現が減少する傾向にあった。現在、候補となった数個のマーカーについて、胚および胚様体のFACS解析、*in situ* hybridizationなどで特異性を確認しているところであり、将来、その活用が応用につながる心筋細胞表面特異的なマーカーであることを期待して研究を進めている。

おわりに

KlugらがES細胞由来心筋細胞をmdxマウスに移植し、ES細胞由来心筋細胞が宿主心臓に取り込まれたことを示して、ES細胞由来心筋細胞の臨床応用への期待が高まって以来、すでに10年の月日が経過した。しかしながら、これまでのところ、障害を受けた心臓の機能を移植したES細胞由来心筋細胞により回復させたという報告はごくわずかである。また、単離した心筋細胞をそのまま生体に移植しても多くが生着せず、細胞はほとんど死んでしまうという報告もある¹⁰。大量に純化した心筋細胞が得られたとしても、ただ注入するだけでは心臓の機能はあまり回復しないのではないだろうか？ では、どのように移植片化することが必要なのであろうか？ 温度感受性シートやマトリゲルなどの足場が良いのだろうか？ 単に純化するだけでなく、共存すべき細胞種があるのであろうか？ こういった疑問を解決すべく、私たちは基盤

実験を推進しているが、そのためにも、ES細胞由来心筋細胞は、今こそ、しかも大量に、必要な状況である。ところで、最近、胚由来でない細胞に4つの遺伝子を導入することで、ES細胞に類似した性質を有する多能性幹細胞(iPS細胞)が樹立され得ることが報告された¹¹⁾。この報告は、途中で述べたヒトES細胞についての倫理的問題、とくにクローン胚由来ES細胞を巡る倫理的問題の多くが回避される可能性を示唆するものとしても注目される。しかし、この細胞を用いることができるとしても、心筋細胞を分化・純化して大量に使用するとすれば、ここで述べた研究の進展がやはり必要である。

私たちが、今後とも分化誘導の効率化、調製の大量化に向けて取り組み、ES細胞由来心筋細胞を材料としてより使いやすいものにし、様々な基礎実験に対応できるような系を構築して、臨床応用・再生医療実現に近づけるよう日夜努力しているところである。

§ 文 献

- 1) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
- 2) Hidaka K, Lee JK, Kim HS, et al : Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB J* 2003;17:740-2.
- 3) Terami H, Hidaka K, Shirai M, et al : Efficient capture of cardiogenesis-associated genes expressed in ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355:47-53.
- 4) Nakajima F, Tokunaga K, Nakatsuji N : Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem Cells* 2007;25:983-5.
- 5) Terami H, Hidaka K, Katsumata T, et al : Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:968-75.
- 6) Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S : Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 2005;6:826-35.
- 7) Narumiya H, Hidaka K, Shirai M, et al : Endocardio-genesis in embryoid bodies: Novel markers identified by gene expression profiling. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:896-902.
- 8) Kattman SJ, Huber TL, Keller GM : Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* 2006;11:723-32.
- 9) Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, et al : Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996;98:216-24.
- 10) Laflamme MA, Gold J, Xu C, et al : Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 2005;167:663-71.
- 11) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663-76.

ES細胞から心筋をつくる

▶ *Cardiomyocytes from ES cells*

森崎隆幸, 日高京子 (国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部)

キーワード

ES細胞, 心筋細胞, 細胞分化

ES (embryonic stem) 細胞は胚様体とよばれる3次元構造の形成を経て比較的容易に自動拍動を示すことが知られ, その際, 細胞は心筋細胞などさまざまな細胞へと分化する(図1)。こうした事実より, 心筋細胞をES細胞から胚様体形成を通して作成し取り出すことは簡単なようにも思われるが, 実はあまり容易ではない。拍動を示す胚様体であっても, その中に含まれる心筋細胞の数はそれほど多くなく, 心筋細胞以外の性質を有する種々の細胞が含まれているのである。それでは, ES細胞から心筋をつくる, いや, 心筋細胞を得て実用可能な移植片のような形にするためには, どのようなことを明らかにし, どのような手だてを講じる必要があるだろうか? 本稿では, 筆者らがES細胞を出発点として心筋細胞への分化研究を行っていくなかで, これまで明らかになったこと, これから明らかにすべきこと, 障害になっており解決すべきことなどについて述べる。

ES細胞の無限増殖能力と 多能性への期待

胚の内部細胞塊に由来し, 試験管内で樹立された胚性幹細胞, つまりES細胞は, 無限に近い増殖能力とさまざまな細胞へと分化する多能性の2つを合わせ有する細胞であり, ほかにこのような性質を有する細胞はないといわれてきた。成体に存在する幹細胞はある程度増殖するclonogenicityはもつ

ものの, 無限に継代が可能なほど増殖能力は高くない。また, 成体由来幹細胞の多能性はかつて期待されたほどあまり高くないとされる。したがって, 無限増殖と多分化能を表現する言葉として万能という言葉が適切かどうかはさておき, ES細胞は, 損傷を受けた臓器や組織の機能を補うものとして注目され, 特にヒトES細胞が樹立されて以来, その研究は世界的に注目を集めてきた。ES細胞を臨床応用するにあたり,

大きなハードルと考えられるのが免疫拒絶の問題であるが、ES細胞株を組織適合性を考慮して200種類ほどバンク化するなどにより解決の道が拓けるともいわれている¹⁾(図2)。一方、後述するが、近年、体細胞に遺伝子導入を行うことによって、ES細胞様の細胞が樹立できる²⁾ことが報告され、ES

細胞でなくとも、ES細胞としての性質を有する細胞を新たにつくりだすことは不可能ではないらしい(図2)。この方法が標準化されれば、特定の個人の細胞からES細胞様細胞が樹立することも現実のものとなるので、これによっても免疫拒絶の問題は解決される可能性がある。したがって、ES細胞、

あるいはそれに近い性質をもった細胞から、コントロールされた形で分化誘導を行い、目的とする細胞群を単離する技術を開発することは、近い将来のES細胞など幹細胞由来の特定の分化細胞を用いる臨床応用を見据えた重要な基礎研究となると考えられる。

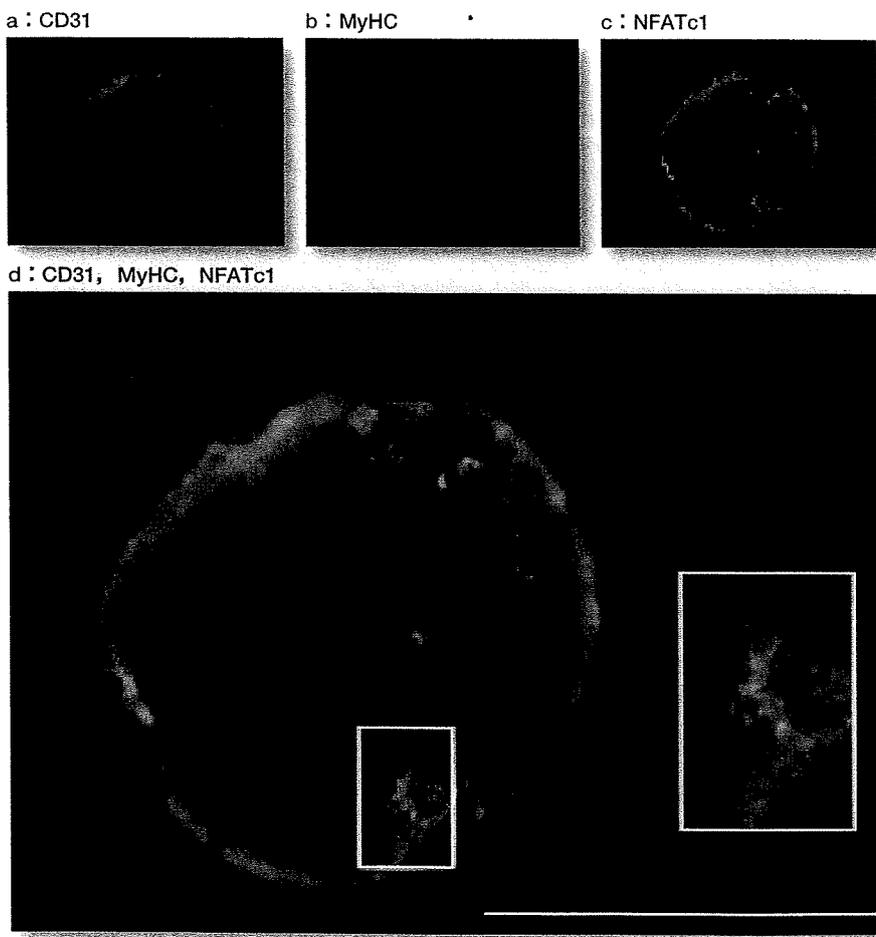


図1 胚様体は心筋を含むさまざまな細胞に分化する
ES細胞由来の胚様体の凍結切片をミオシン重鎖(MyHC)、NFATc1およびCD31抗体で三重染色したもの。MyHC陽性心筋細胞の周囲にはNFATc1、CD31陽性の細胞が存在する。これらの細胞は心内膜細胞であると考えられる。

胚および胚様体からの 心筋細胞の分化誘導過程

さて、ES細胞は人為的に作製された細胞ではあるが、ES細胞の胚盤胞への移植により個体が発生し、すべての系列の細胞への分化がみられることから、ES細胞の分化能は正常な胚発生における分化制御を受けるものであることが想定される。したがって、ES細胞からの心筋分化を促進し、分化した心筋を集めてこようとするならば、胚発生における心臓発生の制御因子を十分に理解し、ES細胞の分化において促進因子の機能を高め抑制因子の働きを抑えることが必要となる。

心臓の発生は胚発生において左右対称に存在する心臓中胚葉が正中面で融合することによって始まる。このとき生ずるcardiac crescentではすでに心筋特異的な転写因子や構造蛋白質の遺伝子の発現が観察される。融合した原始心筒はやがてルーピングおよび隔壁や弁の形成を経て心房心室からなる心臓を生じるが、原始心筒は系統進化上最も単純な心臓の構造と考えられ、その前後軸に沿って、すでに心室(前方)・

心房(後方)に特異的な遺伝子の発現が始まっている。このように、胚の心臓発生の一連の過程では、遺伝子発現が形態形成に先んじて誘導されているが、その発現を調節する分子として、WntやBMPなどの関与が示唆されている³⁾(図3)。これらの分子の関与は単純なものではなく、多重のポイントにわたり、しかも時期や場所に非常に特異的である。また、内在性の阻害分子の共存によって、量的に非常に微妙な調節を受けているものと考えられる。

一方、ES細胞は胚様体とよばれる3次元構造の形成を経て比較的高率に自律拍動を示し心筋細胞への分化が観察されるが、この過程においてもやはり中胚葉誘導に続き、心筋特異的遺伝子発現の誘導が再現されている。筆者らは心筋特異的転写因子Nkx2.5の遺伝

子座に蛍光蛋白質EGFP遺伝子をノックインしたES細胞を樹立し、FACS (fluorescence activated cell sorting)で検出される蛍光をマーカーとして、ES細胞が心筋へと分化誘導される程度の評価や、ES細胞に由来する心筋細胞の単離を行ってきた⁴⁾。さらに、この系により、ES細胞においても、胚発生の場合と同様にWnt蛋白質が心筋分化誘導に関与すること、レチノイン酸添加により心房心室特異的な遺伝子発現が変化することなどを明らかにしてきた(図4)。また、単離したES細胞由来心筋細胞はペースメーカー型、心房型、心室型の活動電位を示し、分化した心筋細胞にもある程度の多様性があることを明らかにしてきた。これらの研究結果はほかの研究者の報告と合わせ、ES細胞ははっきりとした形態は

もたないものの、胚における心臓発生をある程度模倣することを示している。

心筋分化誘導の効率化と心筋特異的遺伝子の単離

先に述べたES細胞の心筋分化誘導におけるWnt蛋白質の効果を検討する過程⁵⁾で、筆者らは一時的な血清除去が心筋への分化効率を上昇させることを見出した⁶⁾(図5)。実際に血清除去がなにをもたらずのかについては、阻害分子の除去あるいはほかの細胞種の増殖抑制などが考えられるが、まだ詳細は不明である。しかし、この現象はヒトES細胞でも報告されており⁷⁾、細胞株による効果の違いは若干あるものの、ES細胞の心筋分化に関して一般的な

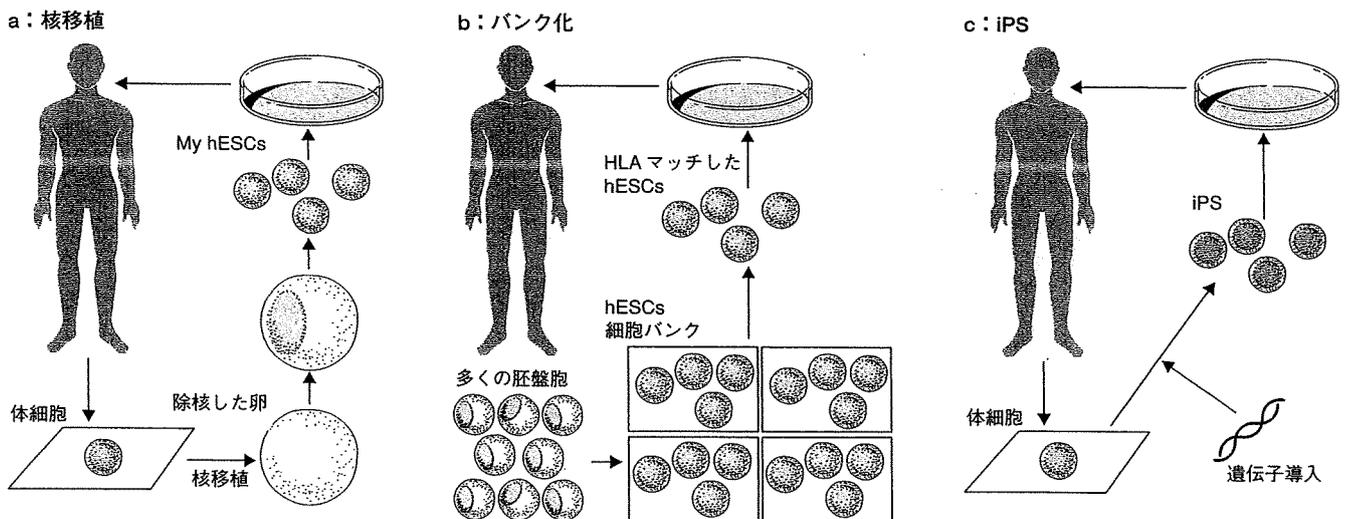


図2 免疫拒絶を克服するための戦略

ヒトES細胞(hESCs)を臨床応用に用いるには免疫拒絶の克服が必要である。そのための方策には、核移植によるMy hESCs細胞の作成のほか(a)、細胞のバンク化(b)、あるいは遺伝子導入によるiPS細胞(ES細胞に由来しない多能性幹細胞)の樹立(c)などが考えられる。

現象であると考えられる。そこで、筆者らは、心筋細胞を多く含む胚様体では、どのような遺伝子が胚様体の心筋分化誘導に伴い発現しているかの解析をマイクロアレイを用いて網羅的に行い、分化誘導促進作用のある候補遺伝子の探索を試みた(図5)。この検討では、既知の心筋で働く遺伝子(転写因子や心筋細胞特異的の構造蛋白質遺伝子など)はほとんどすべてNkx2.5遺伝子と類似の発現パターンを示していた。さらに、胚発生過程での組織発現パターンが既知でない遺伝子について、マウスにて whole mount in situ hybridization を行い、遺伝子発現の組織特異性を確認したところ、ES細胞の分化系でNkx2.5と類似の発現パターンを示す遺伝子は、そのほとんどが胚発生で心臓特異的に発現していることが明らかとなった。これにより、筆者らの探索法は心筋特異的である遺伝子を絞り込むのに有用であることが明らかになった。ところが、候補遺伝

子のなかの、心筋特異的な発現パターンをとる転写因子遺伝子のなかには原始心筒では必ずしも発現せず、第二の心臓系譜というべき second heart field⁸⁾で発現することが知られる、Isl-1, Tbx1などが含まれていることが明らかになった。この結果は、胚様体においても心筋分化にかかわる2つの細胞系譜が存在する可能性を示唆し、また、2つの細胞系譜で共通した心筋分化誘導メカニズムが存在する可能性も示しているようであり、今後の検討を要するが興味深い。

量の心筋細胞を獲得する必要があり、分化細胞の選択、純化により大量獲得を行う必要がある。また、ES細胞を出発点として用いる際の倫理的な問題や免疫拒絶の問題なども解決する必要がある。

ES細胞から心筋細胞を大量に獲得するための方策には、薬剤耐性遺伝子の導入や表面マーカー遺伝子の導入により選択や純化を行うことが考えられる(図6)。しかし、免疫拒絶を考慮して多数のES細胞バンクを作ることが可能になったとしても、これら外来遺伝子をそれぞれのES細胞株に安定的に導入することの問題や、遺伝子改変されたES細胞の安全性確保が問題とされる可能性があり、やはり、内在性の心筋細胞表面特異的なマーカーの同定とその利用(図6)が必須であると考えられる。ところが、現在のところ、心筋細胞には特異的な表面マーカーは知られておらず、これまでに、心筋前駆細胞をFlk1などのマーカーを利用して心筋細胞を単離することの報告⁹⁾はあるものの、心筋細胞のみならず血管内皮などの細胞も単離されるため、心筋細胞について特異性を高く純化する新たな手法の開発が必要である。そこで、筆者らは、先に述べたマイクロアレイ解析での遺伝子探索から、細胞の表面で発現する候補遺伝子の抽出を行い検討している。現在、候補となった数個の遺伝子について、胚および胚様体のFACS解析、in situ hybridization などにより特異性の確認を行っている。今後、これらの活用が応用につながる

ES細胞由来心筋細胞の 実用化にむけての課題

さて、ES細胞から分化した心筋細胞を実用化に供するとすれば、傷害を受けた心筋組織の機能を補うために再生医療の細胞ソースとして用いることが考えられる。そのためには、必要な

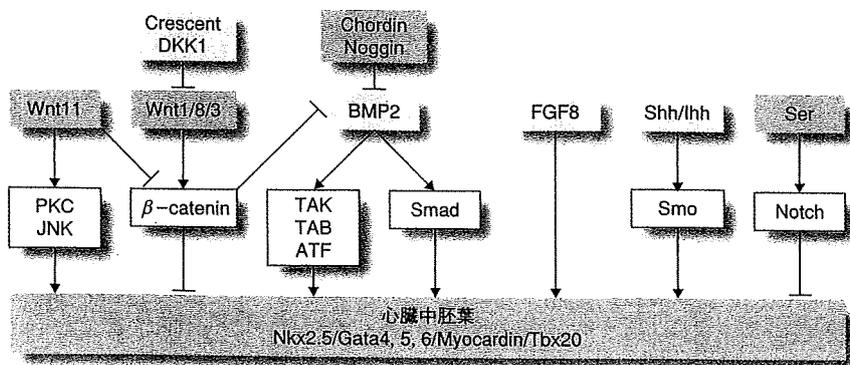


図3 心筋分化に関わるシグナル分子(文献3より改変引用)
心筋細胞の分化過程は、WntやBMPなど促進因子と阻害因子が空間的・時間的に複雑に絡み合い調節されている。

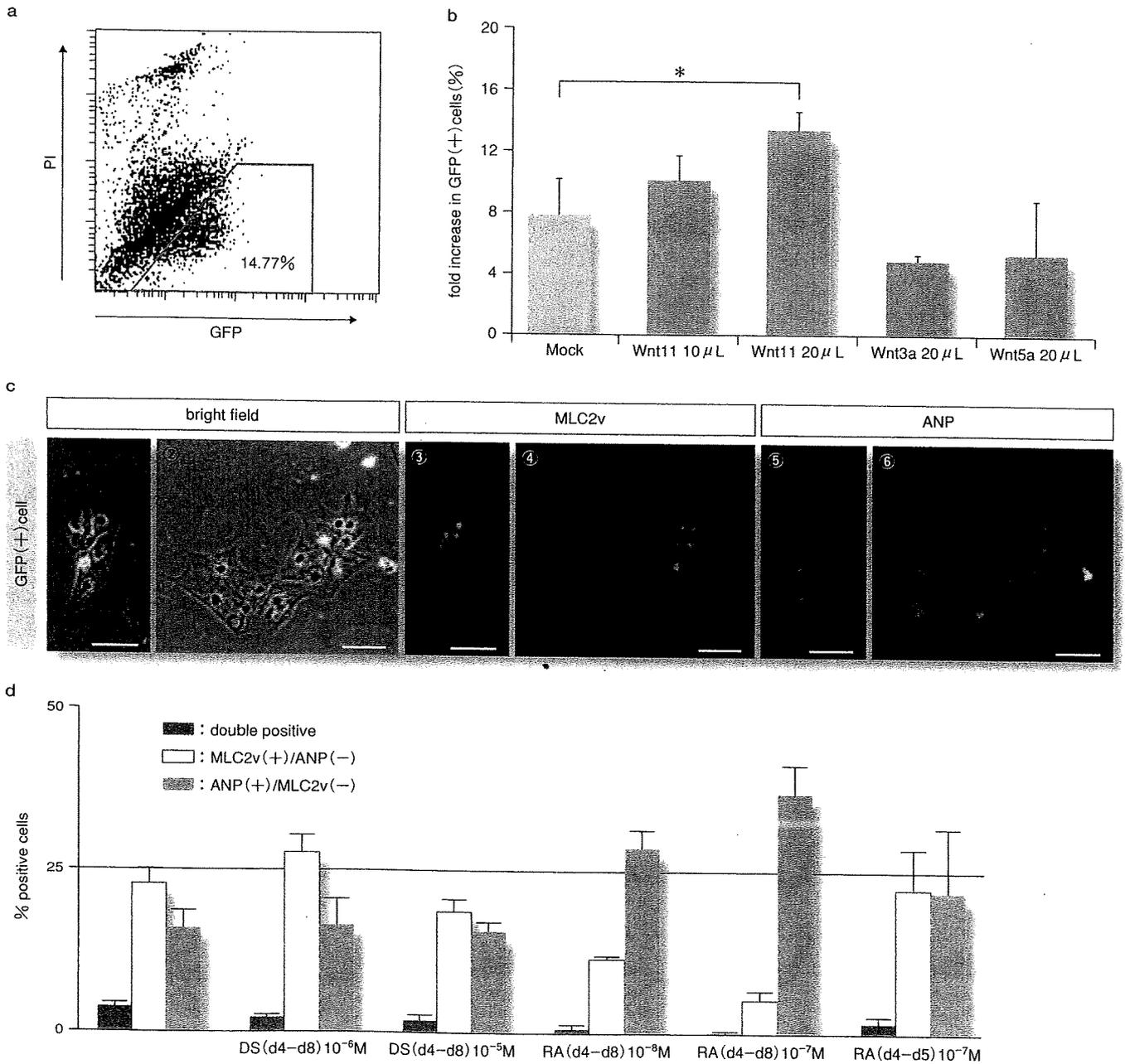


図4 Wnt11とRAの心筋分化への影響

Wnt11を発現する培養細胞を胚様体に添加するとNkx2.5-EGFP陽性細胞の割合が増加した(a, b)。一方、GFP陽性細胞のなかでの心筋は均一ではなく、レチノイン酸(RA)の添加によりミオシン軽鎖心室筋型MLC2vおよび心房性ナトリウムペプチド(ANP)陽性の細胞の割合が変化した(c, d)。
PI: propidium iodide, DS: disulfiram。

心筋細胞表面特異的なマーカーであることを期待している。

初めに紹介したが、最近、胚由来でない細胞に4種の遺伝子を導入することで、ES細胞に類似した性質を有する多能性幹細胞(iPS細胞)が樹立されると報告された²⁾。こうして得られた細胞の多能性は細胞が生殖細胞系列に

も分化する性質を有すると報告されている。この方法による細胞の樹立効率はまだまだ低いですが、ヒトES細胞についての倫理的問題、特にクローン胚由来ES細胞をめぐる倫理的問題の多くが回避される可能性につながることから注目されている。しかしながら、心筋細胞を分化・純化して応用しようと

すれば、前述の研究進展が必須であることに変わりはない。

おわりに

「ES細胞から心筋をつくる」ことに関しては、ES細胞由来心筋細胞のマ

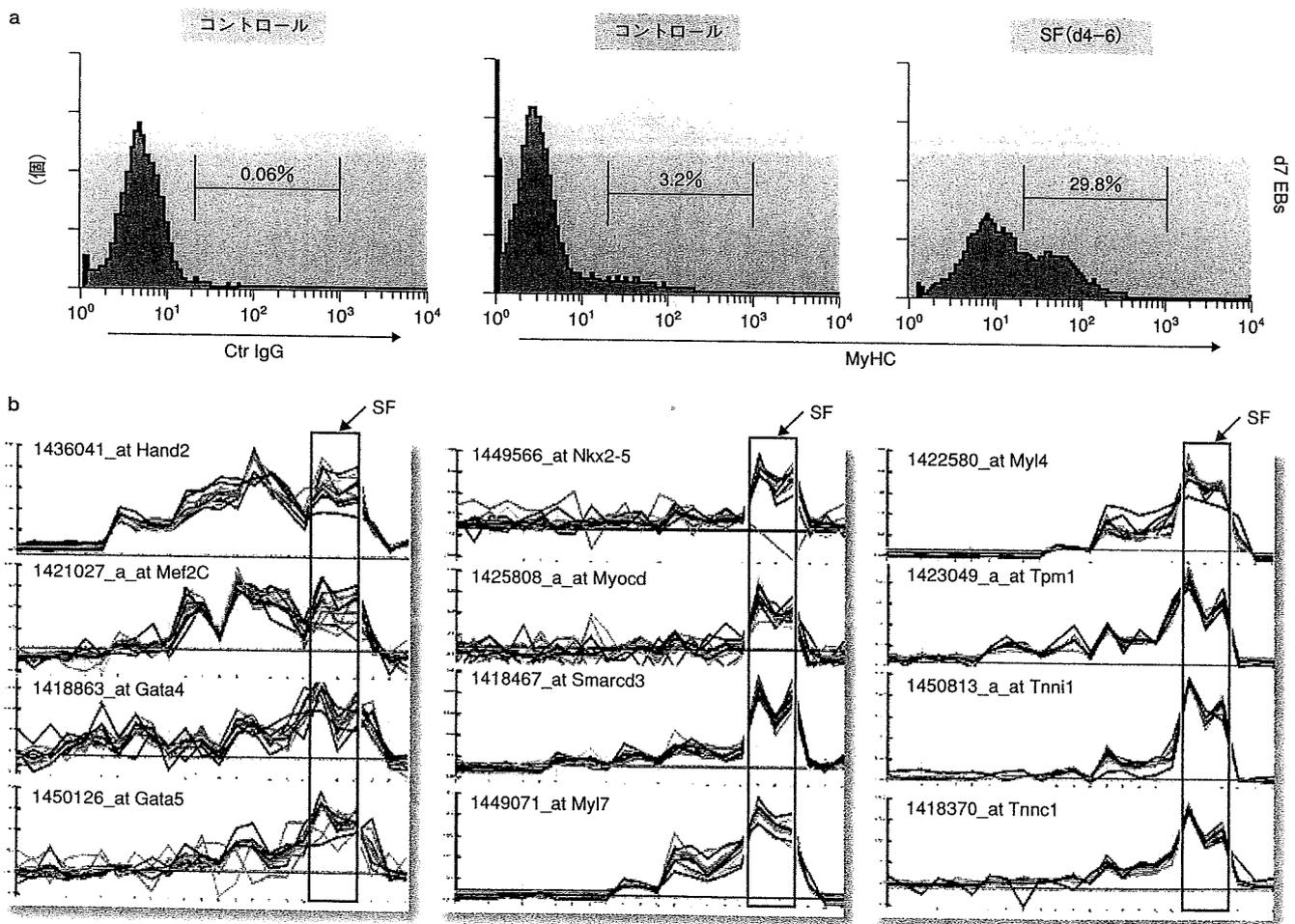


図5 血清除去による分化促進と網羅的遺伝子発現解析

胚様体の培養時に血清を一時的に除去する条件(SF)では、Nkx2.5-EGFP陽性細胞の割合が著しく増加した(a)。この条件を用いて通常の条件と比較すると、ほとんどの心筋特異的遺伝子は血清除去により上昇した(b)。赤枠はSF条件での変化を示す。

ウスへの移植により、ES細胞由来心筋細胞が宿主心臓に取り込まれた報告¹⁰⁾以来、すでに10年あまりの月日が経過したが、これまでのところ、障害を受けた心臓の機能を移植したES細胞由来心筋細胞により回復させたという報告はほとんどなく、単離した心筋細胞をそのまま生体に移植しても多くが生着せず、細胞はほとんど死んでしまうとされている¹¹⁾。研究が進展し、大量に純化した心筋細胞が得られたとしても、移植片化の工夫や共存すべき細胞種など明らかにすべき課題はまだ少なくない。さらに、ES細胞に類似した性質を有する多能性幹細胞(iPS細胞)樹立の報告にあるような技術進展により、ヒトES細胞についての倫理的問題、特にクローン胚由来ES細胞をめぐる倫理的問題の多くが回避されるようになったとしても、心筋細胞を分化・純化により大量の細胞を使用するとすれば、ここで述べた研究の進展がやはり鍵となる。したがって、「ES細胞から心筋をつくる」ことを実現する

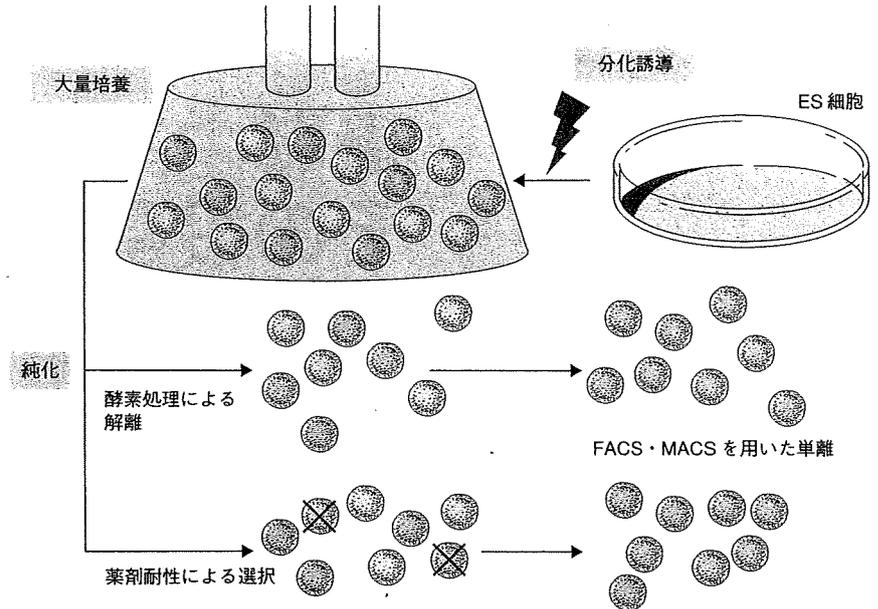


図6 ES細胞から心筋細胞を純化するための方策

ES細胞を臨床応用に利用できるようにするためには、①効率のよい分化誘導、のほか、②大量培養化、③純化、の各ステップの克服が必要である。純化は遺伝子導入による薬剤耐性細胞の選択やFACSによる蛍光蛋白質発現細胞の選択が考えられるが、表面抗原が同定できれば、遺伝子導入を経ずに純化が可能になると期待できる。

MACS : magnetic activated cell sorting。

ためには、今後とも分化誘導の効率化、調製の大量化の実現により、ES細胞由来心筋細胞を材料としてより使いやすいものにする必要がある。

また、さまざまな基礎実験に対応できるような系を構築して、臨床応用・再生医療実現に近づけるようにする必要がある。

文献

- 1) Nakajima F, Tokunaga K, Nakatsuji N: HLA matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem Cells* 25: 983-985, 2007.
- 2) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
- 3) Brand T: Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 258: 1-19, 2003.
- 4) Hidaka K, Lee JK, Kim HS, et al: Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB J* 17: 740-742, 2003.
- 5) Terami H, Hidaka K, Katsumata T, et al: Wnt1 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 968-975, 2004.
- 6) Terami H, Hidaka K, Shirai M, et al: Efficient capture of cardiogenesis-associated genes expressed in ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 47-53, 2007.
- 7) Beqqali A, Kloots J, Ward-van Oostwaard D, et al: Genome-wide transcriptional profiling of human embryonic stem cells differentiating to cardiomyocytes. *Stem Cells* 24: 1956-1967, 2006.
- 8) Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S: Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6: 826-835, 2005.
- 9) Kattman SJ, Huber TL, Keller GM: Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* 11: 723-732, 2006.
- 10) Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ: Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98: 216-224, 1996.
- 11) Laflamme MA, Gold J, Xu C, et al: Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 167: 663-671, 2005.

特集 心筋再生と心筋保護

ES細胞による心臓再生の可能性と課題*

森崎 隆幸¹ 日高 京子

はじめに

ES細胞は内部細胞塊から樹立された細胞株で *in vitro* での無限の増殖性と3胚葉全ての系統への分化能を有する。ES細胞は胚様体(embryoid body)と呼ばれる三次元構造を形成させると比較的容易に自動拍動する心筋細胞へも分化することから、胚発生における心臓発生の過程を模倣するモデルとして、以前より *in vitro* での細胞分化研究に用いられてきた。さらに、1998年にヒトES細胞が樹立されて以来、再生医療の細胞ソースとしてのES細胞への期待が高まり研究が推進され、ヒトES細胞を用いた研究成果も次第に蓄積されつつある。一方、ES細胞を移植ソースとして再生医療の目的に用いるためには免疫拒絶の問題が最も大きなハードルと考えられている。しかし、このハードルはいわゆる「治療のためのクローニング」を行わなくとも、複数のHLAタイプを有する細胞株を揃えることで解決できるかもしれないと考えられている。実際、中辻らはランダムに樹立した200株のヒトES細胞株があれば、80%の日本人にとってはHLAタイプのワンミスマッチの細胞株が見つかることを報告している¹⁾。では心臓の再生を考える際に、どのような特有のハードルがあるのだろうか？ ES細胞による心臓再生はどのくらい実現可能なのだろうか？ 本稿では以上の点を中心に論じてみたい。

心筋細胞の分化研究モデルとしてのES細胞

ES細胞を心臓再生医療に役立てることを目標に研究を行う場合、ES細胞そのものを細胞移植のソースとして利用するという直接的利用研究の他、ES細胞を *in vitro* での分化実験に利用し、その成果を応用するという間接的利用研究が想定され、その両者は密接に結びついている。そこで、まず、これら両者の研究の基盤となる、心筋細胞やその他の心臓構成細胞の起源や分化に関わる研究についての最近の研究の進歩を紹介する。これまでの心筋細胞の分化に関わる研究は、*in vivo* 研究の確認や後追いの研究であったことが多かったと思われるが、最近になってES細胞を用いて心筋を含む心臓幹細胞の解析がより積極的に行われるようになってきている²⁾。

1. 心臓を生じる2つの領域と系譜：新たに明らかになった第二心臓領域(図1)

心臓は胚発生の過程において、左右側板にある心臓中胚葉が正中線にて融合し、原始心筒を形成した後、ルーピング・隔壁の形成を経ることによって次第に形成される。正中線にて融合した心臓の前駆細胞は馬蹄形のcardiac crescentとして知られ、長い間、ここよりほとんどの心臓を構成する細胞が生じると信じられてきた。しかし最近、Isl1に代表されるいくつかの遺伝子がcardiac crescentよりも中央側・背側に存在する第

* Perspective on ES Cells and Cardiac Regeneration

¹ 国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部(〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1) Takayuki Morisaki, Kyoko Hidaka : Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute

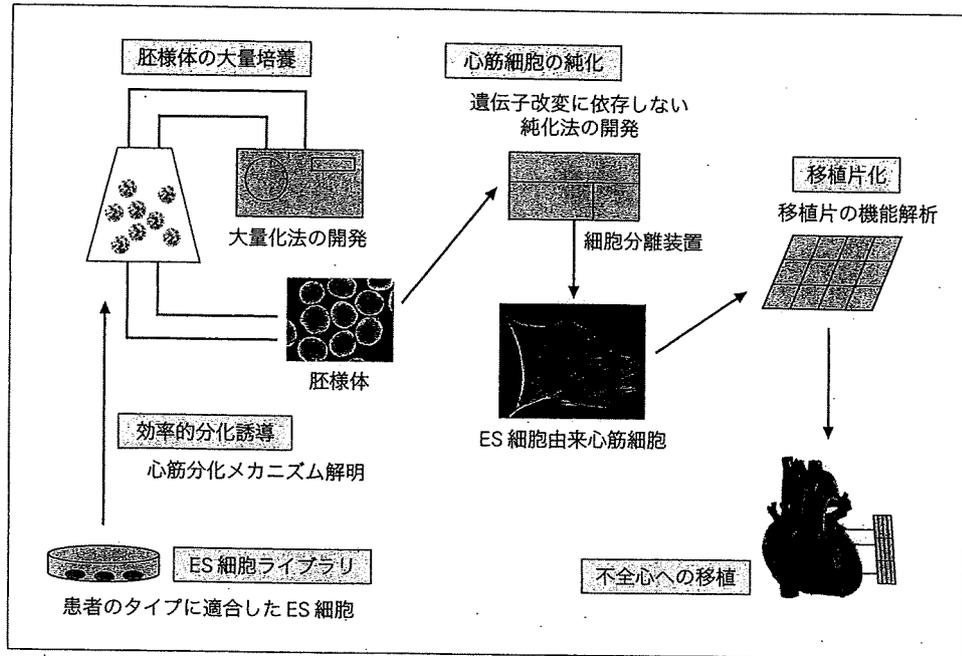


図3 心臓再生をめざしたES細胞利用のためのスキーム
患者のHLAタイプと同じES細胞をライブラリより選択し、大量培養によって得られた心筋細胞を効率的に誘導し、遺伝子改変を用いない方法で純化する。これを機能的な移植片とし、治療に役立てる。

については発生学における研究をヒントに、小分子については分化マーカーの発現を指標としたスクリーニングなどにより作用が明らかとなった。しかしながら、これらの因子の多くは幹細胞の維持や中胚葉誘導の過程など他の局面にも作用することから、どの段階で心筋分化への作用を発揮するのか不透明な部分も多い。さらに、血清成分や基本培地なども分化効率に大きく影響することが知られている。一方で、培養細胞として樹立されたES細胞は、内部細胞塊に由来することは共通であっても、原始外胚葉に若干分化した形質を持つ細胞の存在も知られており、株間の違いは無視できない。さらに、こうした株間の違いはマウスES細胞だけでなく、これまでに樹立されているヒトES細胞においても報告されている。したがって、細胞の違いに依存しない普遍的な分化に至る道筋を正しく理解することが効率的な誘導法の確立に必要であると考えられる。われわれは、最近、胚様体培養において血清を一時的に除去すると、心筋への分化が著しく上昇することを見出し

た¹⁰⁾。この現象はマウスES細胞の他の株やヒトES細胞でも報告されており、何らかの普遍的な共通の分化メカニズムの一端を示しているようである。さらに、われわれはこの心筋に富んだ胚様体の網羅的発現遺伝子解析により、心筋特異的に発現する遺伝子を絞り込むことに成功している。これらの遺伝子の発現や機能解析を通して、心筋分化のメカニズムを解く足がかりとしたいと考えている(図2)。

2. 心筋細胞の単離：心筋細胞のみでは生きられない？

以前、われわれは心筋特異的転写因子であるNkx 2-5 遺伝子座に緑色蛍光タンパク質(GFP)をノックインしたES細胞を樹立し、胚様体から心筋細胞を純化することに成功した¹¹⁾。同様な試みは心筋特異的なミオシン重鎖遺伝子、ミオシン軽鎖遺伝子、アクチン遺伝子などのプロモーターを用いて報告がなされており、レポーターを薬剤耐性遺伝子に変えればさらに効率よく細胞を得ることができると考えられる。このように遺伝子改

変を施したES細胞から心筋細胞を取り出すことは原理的に可能である。ところが、これらのES細胞由来の純化した心筋細胞を例えば心不全モデル動物に移植し、心臓の機能改善をみたという報告はこれまでにほとんどなされていない。これは間葉系幹細胞などの非心筋細胞の移植による治療効果を示す研究結果と比べると対照的であるが、いったいどうしてであろうか？ ひとつは、心臓という大きな臓器を修復するのに十分な数の細胞を得るのが難しいということがあろう。心臓を再生させるためには「10億個の細胞が必要」という計算もある。胚様体のバイオリクターなどを用いた大量培養の報告はまだ少ないが、大量化へ向けての技術開発は今後発展すべき研究方向の一つと考えられる(図3)。また、別の重要な問題は、そもそも心筋細胞を単離して用いることが手法として妥当であるのか、ということである。Murryのグループは、ある程度の数以上でない移植片として生着できないことをヒトES細胞を用いて示しているが¹²⁾、KolossovaらはES細胞由来の単離心筋細胞を心臓に移植する際に、線維芽細胞と混合したほうが生着しやすいことを報告している¹³⁾。この報告において、線維芽細胞の果たす役割は十分に明らかにされていないが、この現象はES細胞由来心筋細胞をどのようにして利用可能なものにしていくかを考えていくうえで重要と思われる。

3. グraft化の必要性：心筋シート vs マトリゲル

間葉系幹細胞などの骨髄由来細胞を移植すると不全に陥った心臓が再生すると報告されてきた。しかし、最近では、これは移植した細胞が心筋細胞に分化したというよりは、移植した細胞から放出されるサイトカインなどの効果によるものが多いのではないかと考えられている。したがって、すでに分化した心筋細胞を移植し、機械的な機能の改善を期待するには、全く別の移植戦略を考えることが必要かもしれない。そうした別の戦略として有望な方法の一つはシート化した細胞を移植することである。清水らのグループは心筋細胞を温度感受性皿に培養し、これを利用して細胞をシート化することに成功し

ている。さらにシートを重層し、より機能的な心筋シートの構築を試みている¹⁴⁾。一方でZimmermannらのグループはマトリゲルなどの支持体によって細胞の三次元構築を試みており、成型した人工組織片を用いて機能解析を行っている¹⁵⁾。これまでに行われたこれらの実験は、主としてラットなどの培養心筋細胞を用いているものが多いが、ES細胞の大量培養化、効率的な分化誘導・単離法の確立がさらに進めば、ES細胞由来心筋細胞を材料として同様な実験が可能となり、真に機能的な移植片や移植シートが得られることも期待できる。今後、実用化をめざすのであれば、ある時点よりヒトES細胞を以上のような研究の材料として用いるべきと考える。ただ、現在のところ、国内においては、ヒトES細胞の利用研究について(少なくとも研究者にとって)の規制が厳しいこともあり、国外の研究に対して遅れをとっていることも事実である。

4. ヒトES細胞研究が有する倫理的社会的課題とその対応

ヒトES細胞研究は細胞樹立に際して人の生命の萌芽であるヒト胚の滅失を伴うこと、また、ES細胞は無限増殖性とともにより胚葉すべての細胞に分化する能力を有するので、ヒトや動物の胎内に移植を行えば人間の創出につながるおそれがあるなど、人の尊厳に抵触しかねない生命倫理上の問題を有していると考えられる。したがって、ヒトES細胞研究は、その研究の有用性を踏まえながらも研究推進は慎重に検討する必要があると考えられる。日本では2001年に「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」¹⁶⁾が告示され、研究に際しての手続きが規定されている。加えて、韓国の黄教授の論文捏造問題や卵子提供についての手続きの問題が明らかとなり、ヒトES細胞ならびに関連領域の研究については、科学的な側面のみならず社会的な側面についても認識が高まっている。日本の2001年告示の指針ではヒトES細胞由来の分化した細胞もヒトES細胞として取り扱う規程となっているが、研究の進展により、ヒトES細胞の性質と分化細胞の性質についての理解が進んでいることから、ES細胞由来の分化細胞を使用する研究についてはES細胞と同じ手

続きは要しない、との主旨で指針改定作業が進んでいる。しかしながら、ヒトES細胞を使用する研究自体は引き続き文部科学省による研究計画の確認が必要とされている。一方、国際幹細胞学会は、2007年にヒトES細胞研究国際指針¹⁷⁾を策定し、そのなかで研究を1)ES細胞の利用研究、2)ES細胞の新規作製研究、3)ES細胞やクローン胚を人や動物の胎内に移植する研究に3分類し、1)の樹立されたES細胞の利用研究については医学生命科学での通常の審査監督手続きで良いとしている。

おわりに

ES細胞をそのまま移植するとテラトーマが生じることはよく知られており、これを回避するためにも必要な細胞を純化することが不可欠である。組織特異的プロモーターと選択可能なレポーターを導入したES細胞を用いることにより、心筋に分化した細胞を単離することは、すでに原理的には可能であるが、免疫拒絶の問題を回避するためには複数のHLAタイプのES細胞株を揃えておく必要があり、それぞれの細胞株に対して再現性高く遺伝子導入を行うのは現実的ではない。われわれの行ってきた胚様体発現遺伝子群の解析は心筋特異的遺伝子の効率的な絞込みを可能にするものであるが、このなかから心筋特異的の表面マーカーとなる遺伝子を探索することも可能である。このような表面マーカーを利用し、遺伝子改変を経ずに心筋細胞やその前駆細胞を単離することは近い将来に十分可能となると考える。また、心臓幹細胞の性質についても、ES細胞の分化研究を通して、さらに明らかにすることによって、より効率的な分化誘導法の確立が可能となると考えられる。単離した心筋細胞を移植する際には、その機能を補強する他のパーツが必要不可欠であると考えられるので、それらについての研究は培養の大量化へ向けての研究とともに、今後大きく進展しなければならないし、十分期待できると考えている。

文 献

1) Nakajima F, Tokunaga K, Nakatsuji N: Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in

- the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem Cells* 25: 983-985, 2007
- 2) Garry DJ, Olson EN: A common progenitor at the heart of development. *Cell* 127: 1101-1104, 2006
- 3) Cai CL, Liang X, Shi Y, et al: Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5: 877-889, 2003
- 4) Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S: Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6: 826-835, 2005
- 5) Moretti A, Caron L, Nakano A, et al: Multipotent embryonic isl1⁺ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127: 1151-1165, 2006
- 6) Kattman SJ, Huber TL, Keller GM: Multipotent flk-1⁺ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* 11: 723-732, 2006
- 7) Takahashi T, Lord B, Schulze PC, et al: Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 107: 1912-1916, 2003
- 8) Terami H, Hidaka K, Katsumata T, et al: Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 968-975, 2004
- 9) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23: 607-611, 2005
- 10) Terami H, Hidaka K, Shirai M, et al: Efficient capture of cardiogenesis-associated genes expressed in ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 47-53, 2007
- 11) Hidaka K, Lee JK, Kim HS, et al: Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB J* 17: 740-742, 2003
- 12) Laflamme MA, Gold J, Xu C, et al: Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 167: 663-671, 2005
- 13) Kolossov E, Bostani T, Roell W, et al: Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 203: 2315-2327, 2006
- 14) Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, et al: Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, *in vivo*. *Circ Res* 98: 705-712, 2006
- 15) Eschenhagen T, Zimmermann WH: Engineering myocardial tissue. *Circ Res* 97: 1220-1231, 2005
- 16) 平成13年文部科学省告示第155号2001; http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/2001/es/010901a.pdf
- 17) Daley GQ, Richter LA, Auerbach JM, et al: Ethics. The ISSCR guidelines for human embryonic stem cell research. *Science* 315: 603-604, 2007