

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の分化誘導技術を用いた高度肺血管性肺高血圧症の病態生理解析と創薬に関する先端研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山原 研一

平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の分化誘導技術を用いた高度肺血管性 肺高血圧症の病態生理解析と創薬に関する先端研究 -----	1
---	---

山原 研一

II. 分担研究報告

1. 肺動脈性肺高血圧症の病態生理に関する諸問題の検討-肺動脈高血圧症患者に おける血中 VEGF、serotonin、endothelin 濃度に関する検討 -----	5
--	---

中西 宣文

2. ヒト iPS 細胞由来血管内皮・平滑筋細胞の分化誘導に関する研究 -----	9
---	---

曾根 正勝

3. ヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞の細胞機能に関する研究 -----	13
--	----

本間 康一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧 -----	15
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I . 総括研究報告

ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の分化誘導技術を用いた高度肺血管性肺高血圧症の
病態生理解析と創薬に関する先端研究

研究代表者 山原 研一 国立循環器病研究センター研究所 再生医療部 室長

研究要旨 本研究計画の基盤となるヒト線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立、および iPS 細胞からの血管内皮細胞・平滑筋細胞の分化誘導技術を確立した。更に高度肺血管性肺高血圧症の病態生理解析を目指し、同患者由来 iPS 細胞を樹立し、血管内皮細胞に分化誘導させるための周辺基盤を確立した。今後は、高度肺血管性肺高血圧症患者 iPS 由来血管内皮細胞を樹立し、同患者の病態解明につながる研究を推し進めていきたい。

研究分担者：

国立循環器病センター 内科動脈硬化代謝
部門 部長 吉政康直

国立循環器病センター 内科心臓血管部門
医長 中西宣文

京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科
助教 曾根正勝

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科
助教 本間康一郎

り、PAH/CTEPH における肺血管内皮機能異常に関しては不明な点が多い。

山原、曾根、本間はこれまで血管構成細胞の発生分化に着目し、その過程を容易に再構築可能な ES 細胞を用いた研究を行ってきた。最近、我が国最初に研究認可を受けたヒト ES 細胞を用い、ヒト血管前駆細胞（vascular progenitor cell：VPC）の同定に成功し（Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27:2127-34 2007）、その下肢虚血モデルへの移植により、ヒト VPC の血管再生効果をも証明している（PLoS ONE. 3(2):e1666 2008）。

最近、京都大学再生医科学研究所・山中伸弥教授はヒト皮膚線維芽細胞から人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を樹立することに成功した。この細胞はヒト ES 細胞と極めて良く似た性質を持つことから、我々が持つヒト ES 細胞からの血管構成細胞樹立技術を用いることでヒト iPS 由来血管構成細胞を分化誘導可能であると考

A. 研究目的

従来原発性肺高血圧症として知られていた肺動脈性肺高血圧症（PAH）と慢性肺血栓塞栓症（CTEPH）末梢型の発症において、肺血管内皮細胞の機能異常がその病態に重要な要因であると考えられているが、その詳細は不明である。PAH/CTEPH 発症メカニズムを解明するためには、PAH/CTEPH 患者における肺血管内皮細胞の機能解析が必要不可欠であるが、現実的には患者からの肺血管内皮細胞の採取は困難であ

えられる。

そこで本研究では、PAH/CTEPHにおいて深い関与が疑われている肺血管内皮細胞の機能障害メカニズムを解明するため、

1) ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞を樹立し、2) 当該施設の倫理委員会承認の元、PAH/CTEPH 患者由来線維芽細胞・血管内皮細胞を単離し、更には3) 得られた PAH/CTEPH 患者 iPS 由来血管内皮細胞を用い、PAH/CTEPH における肺血管内皮機能異常の病態生理メカニズムの同定を試みることをその目的とした。

B. 研究方法

曾根、本間は、ヒト成人線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の4つの遺伝子を導入して作製された 201B6, 201B7、および c-Myc を除く3つの遺伝子を導入して作製された 253G1, 253G4 の4つの iPS セルラインを用いて、ヒト ES 細胞で我々がすでに確立している分化誘導法 (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; Oct;27 (10):2127-34.)にて血管細胞の分化誘導を試みた。

山原、吉政、中西は、本研究を遂行するに当たり、PAH/CTEPH 患者からの血管内皮細胞、線維芽細胞の採取を目的に、国立循環器病センター倫理委員会において倫理審査申請を行った。更に、中西は適切な患者選定を各種血中増殖因子濃度との比較から検証し、山原は市販ヒト皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞誘導を試みた。

(倫理面への配慮)

ヒト iPS 細胞の培養については、ヒト ES 細胞の使用に関する指針に準じて行った。患者からの iPS 細胞の樹立および臨床試

験においては事前に策定し当該施設倫理委員会の承認を得たプロトコルを遵守し、患者のインフォームドコンセントを得た上で適切に実施した。

C. 研究結果

曾根、本間の検討から、ヒト iPS 細胞を OP9 フィーダー細胞との共培養にて10日間分化誘導を行うと、Fik1 陽性 TRA1-60 陰性細胞が出現した (図1)。

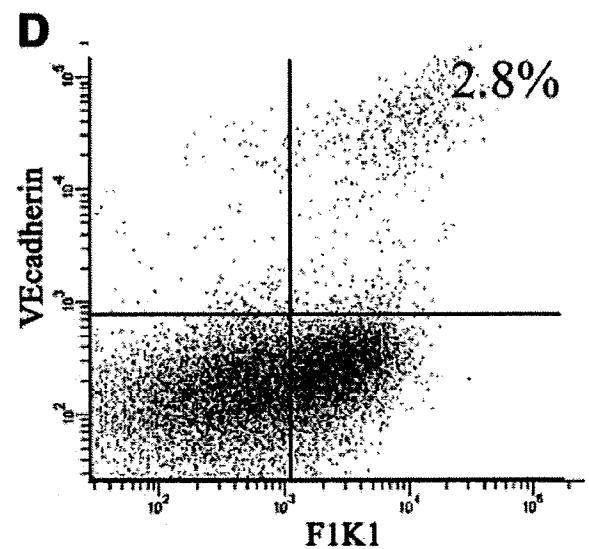


図1. ヒト iPS 細胞(201B6)を用いた血管構成細胞誘導：誘導後10日目におけるFACS解析

FIK1 陽性 TRA1-60 陰性細胞は VECadherin 陽性細胞と陰性細胞に分けられ、FIK1 陽性 TRA1-60 陰性 VECadherin 陽性細胞は、CD34、CD31、eNOS も陽性で、培養ディッシュ上にて内皮細胞特有の敷石状の形態およびマトリゲル上で管腔構造をとり、血管内皮細胞であると考えられた (図2)。FIK1 陽性 TRA1-60 陰性 VECadherin 陰性細胞は、カルポニン、平滑筋ミオシン重鎖も陽性で、血管平滑筋

細胞であると考えられた (図3)。それらヒト iPS 細胞からの血管細胞の分化過程はヒト ES 細胞とほぼ同等であった。また、ヒト iPS 細胞からの血管細胞の分化効率は B セルラインと G セルライン間で有意な差は認められなかった。

山原、吉政、中西は、PAH/CTEPH 患者からの肺動脈血管内皮細胞、線維芽細胞の採取を目的に、国立循環器病センター倫理委員会において倫理審査申請を行い、承認を受けた (平成 21 年 6 月 11 日)。

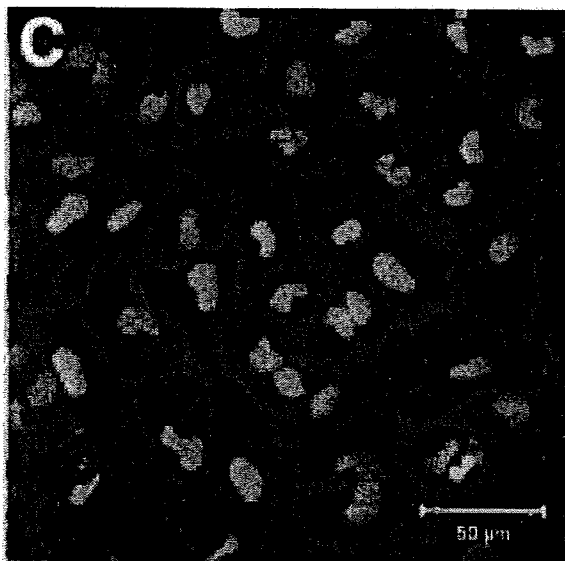


図2.ヒト iPS 細胞(201B6)由来血管内皮細胞の免疫染色 (赤 : CD31、緑 : 核染色)



図3. ヒト iPS 細胞(201B6)由来血管平滑筋細胞の免疫染色(茶色 : α SMA 染色)

結果を受け、中西は本研究遂行にあたり適切な患者の選定を血中 VEGF、serotonin、endothelin 濃度との比較を含め行ってきたが、平成 21 年 12 月までの剖検例等に候補患者は認めなかった。

山原は、市販ヒト線維芽細胞を用い、山中らが樹立した方法 (<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/protocol.html>)を用いて、ヒト iPS 細胞樹立を試みた。既報の如く、ヒト iPS 様細胞の樹立に成功し、現在その未分化能、多分化能を解析中である。

平成 22 年度以降、本手法を用いて、PAH/CTEPH 患者由来 iPS 細胞から血管内皮細胞を分化誘導し、解析する予定であったが、平成 21 年度にて本事業は終了となった。

D. 考察

平成 21 年度の研究目標として、患者由来細胞の樹立は候補者がおらず至らなかったものの、倫理委員会の承認および周辺技術の確立は終了しており、当初目標はほぼ達成したと考えている。しかしながら、本研究計画が当初の 3 年から 1 年に短縮となり、平成 22 年度以降に行う予定であった PAH/CTEPH 患者 iPS 由来血管内皮細胞の機能解析や遺伝子発現プロファイル解析や、新規肺高血圧症治療薬のスクリーニングシステム開発などについては施行できなかった。

ヒト線維芽細胞からの iPS 細胞樹立に独自に成功し、更に iPS 細胞からの血管

内皮細胞・平滑筋細胞の分化誘導・単離技術を確立できたことは、国際的に見ても大きな成果であった。しかしながら、研究期間の短縮により、本研究計画の本来の目的であった PAH/CTEPH 患者の病態解明と治療に関する成果は得ることが出来なかった。今後は、当初の本研究の目的の通り、PAH/CTEPH 患者 iPS 由来血管内皮細胞を樹立し、同患者の病態解明につながる研究を推し進めていきたい。

E. 結論

平成 21 年度は、本研究計画の基盤となる、ヒト線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立、更に iPS 細胞からの血管内皮細胞・壁細胞の分化誘導技術を確立した。今後、PAH/CTEPH 患者 iPS 由来血管内皮細胞を樹立し、同患者の病態解明につながる研究を推し進めていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Homma K, Sone M, Taura D, Yamahara K, Suzuki Y, Takahashi K, Sonoyama T, Inuzuka M, Fukunaga Y, Tamura N, Itoh H, Yamanaka S, Nakao K. Sirt1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS derived vascular endothelial cells. *Artherosclerosis, in press.*
- 2) Yamahara K, Itoh H. Potential use of endothelial progenitor cells for regeneration of the vasculature. *Ther*

Adv Cardiovasc Dis. 3(1):17-27, 2009.

2. 学会発表

- 1) 山原研一 iPS 細胞由来血管前駆細胞を用いた新規下肢動脈閉塞性疾患治療法の開発 第 50 回日本脈管学会 共催シンポジウム 東京 2009 年 10 月 30 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

肺動脈性肺高血圧症の病態生理に関する諸問題の検討-肺動脈高血圧症患者における血中
VEGF、serotonin、endothelin 濃度に関する検討-

研究分担者 中西宣文 国立循環器病センター心臓血管内科 医長

研究要旨 肺動脈性肺高血圧症（PAH）を対象にVEGF、serotonin、endothelinを測定し、これらの指標と病態との関連を検討した。対象とした特発性/家族性PAH、膠原病性肺高血圧症、先天性心疾患合併肺高血圧症の何れの疾患例でも今回測定指標は高値を示し、これらが共通して肺高血圧症の成立に関与している可能性が示された。特に肺血管のリモデリングの指標と考えられるVEGFは予後不良例で高値を示し、病状の評価に有用である可能性が示された。

A. 研究目的

肺動脈性肺高血圧症（PAH）の病態生理、特に本症の発症に係わる病態についてはこれまで多くの研究がなされているが未だ十分解明されているとは言い難い。PAHの本態は、当初は肺血管の収縮物質と拡張物質の不均衡を原因とする強力な血管攣縮が生じ、この状態が長期持続することにより肺血管のリモデリングが生じて病変が固定して完成するとの仮説が当初は提唱されていた。そして各種のPAH疾患において種々の血管作動物質の測定が行われ、endothelinやserotoninなどの血管収縮作用を有する物質の血中濃度が高値、prostacyclin代謝物やNOなど血管拡張作用を有する物質が低値であることが報告されている。しかし、どの物質が病態の主体であるかとの疑問や、複数の血管作動物質の相互関係についての検討は行われていない。また近年ではPAHの発症には血管作動物質の変化に加え、血

管の異常増殖が関与しているとの説も提唱されている。そこで今回我々は血管作動物質の代表としてendothelinとserotoninを、血管新生の指標としてVEGFを測定し、どの指標がPAHの病態や予後と関連が深いかを検討し、今後の本症創薬に有益な基礎資料を作成することを目的とした。

B. 研究方法

対象はendothelin受容体拮抗薬bosentanが投与されていないPAH：38例とした。PAH例の内訳は特発性/家族性PAH：24例（男性5例、女性19例；平均年齢43歳）、膠原病性肺高血圧症（CoPH）：2例（男性0例、女性2例；平均年齢34歳）、先天性心疾患合併肺高血圧症（Shunt PH）：12例（男性2例、女性10例；平均年齢2歳）であった。対象例の肘静脈より静脈血を採取しVEGF、serotonin、endothelinの各々の濃度を同時に測定した。ついで各指標相互の関連と、

これら指標の予後との関連についても検討をおこなった。採血検査後の経過観察中、特発性または家族性 PAH : 24 例中 9 例が死亡した。死亡例の平均追跡期間は 347 日、生存例の平均追跡期間は 1307 日であった。(倫理面への配慮)

今回用いた資料はすべて診断と治療目的で患者が当院に入院した時点で検査を行った結果を調査した後ろ向き研究で、治療介入試験ではない。

C. 研究結果

対象例の VEGF 血中濃度は 642 ± 703 pg/mL、serotonin : 14.6 ± 13.9 pg/mL、endothelin : 1.78 ± 1.0 pg/mL であった。特発性/家族性 PAH と Shunt PH 間では VEGF、serotonin、endothelin の 3 指標ともに両群間で差は認められなかった。VEGF と serotonin、endothelin と serotonin の間には有意な相関関係は見られなかったが、VEGF と endothelin の間には $P < 0.05$ の正の相関関係が認められた。生存例と死亡例で今回行った諸指標を比較すると、endothelin 濃度と serotonin 濃度においては、生存例と死亡例間に有意差は認められなかったが、VEGF 濃度については両者間に有意差が認められ ($P < 0.05$)、死亡例で VEGF 濃度が大きかった。

D. 考察

PAH に属する各疾患では肺動脈収縮を惹起する endothelin、serotonin 濃度は、これまでの報告と同様に高値を示し、これらの物質は PAH の病態に関与している可能性

が示唆された。CoPH は症例数が少なく統計作業は行えなかった。しかし特発性/家族性 PAH と Shunt PH 間では VEGF と serotonin、endothelin の各々の指標に差は見られず、今回の検討では基礎疾患によって特異的な昇圧物質の存在は指摘できなかった。各々の例においても endothelin と serotonin 濃度には相関は認められず、症例によって関与する因子が異なる可能性が示唆された。血管内皮増殖作用を持つ VEGF も高値を示し、PAH で血管新生が亢進している状態が存在することが示唆された。さらに endothelin、serotonin 濃度と予後との関連は示されなかったが、VEGF は死亡例で有意に高値であることが示された。VEGF は予後の指標となる可能性が示唆された。

E. 結論

PAH 例では endothelin、serotonin とともに VEGF 高値を示し、肺高血圧症の成立に関与している可能性が示された。また特に VEGF 高値例は予後不良で、病態の評価に有用である可能性が示された

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 中西宣文 第4回肺高血圧症ワールドシンポジウム報告について 血栓と循環 2009 ; 17, 251-255

2) 中西宣文 肺高血圧症、定義と分類の変遷-ダナポイントからのメッセージ 総合臨床 2009 ; 58, 2224 -2229

3) 中西宣文 特発性肺動脈性肺高血圧症・家族性（遺伝性）肺動脈性肺高血圧症 呼吸器科 2009 ; 16, 184 -191

4) Kunieda T, Nakanishi N, Matsubara H, Ohe T, Okano Y, Kondo H, Nishimura M, Shirato K, Tanabe N, Homma S, Yoshida S, Inokuma S, Kodama M, Koike T, Hishida H. Effects of Long-Acting Beraprost Sodium (TRK-100STP) in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. Int Heart J. 2009 Jul;50(4):513-29.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト iPS 細胞由来血管内皮・平滑筋細胞の分化誘導に関する研究

研究分担者 曾根正勝 京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 助教

研究要旨 ヒト iPS 細胞から血管内皮及び平滑筋細胞を分化誘導する技術確立を目指した検討を行った。これまでに我々がヒト ES 細胞を用いて樹立した血管細胞分化誘導法と同様の方法により、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの遺伝子を導入して作製されたヒト iPS 細胞、および c-Myc を除く 3 つの遺伝子を導入したヒト iPS 細胞両者において、同等に血管内皮および平滑筋細胞を樹立することに成功した。

A. 研究目的

既に我々はヒト ES 細胞から血管内皮細胞及び平滑筋細胞へと分化誘導する技術を樹立している (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27(10):2127-34, 2007)。近年ヒト ES 細胞と極めて性質に近いヒト iPS 細胞が同じ京都大学山中教授らのグループにより樹立された (Cell. 30;131(5):861-72, 2007)。そこで、先行供与を受けたヒト iPS 細胞を用い、血管細胞の分化誘導技術の確立を行った。

B. 研究方法

ヒト成人線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの遺伝子を導入して作製された 201B6, 201B7、および c-Myc を除く 3 つの遺伝子を導入して作製された 253G1, 253G4 の 4 つの iPS セルラインを用いて、ヒト ES 細胞で我々がすでに確立している分化誘導法にて血管細胞の分化誘導を試みた。

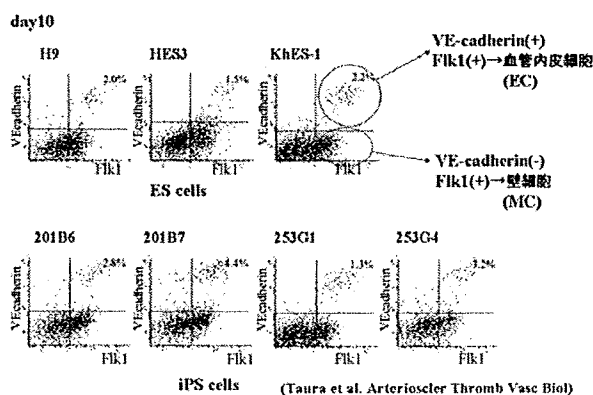
(倫理面への配慮)

ヒト iPS 細胞の培養については、ヒト ES 細胞の使用に関する指針に準じて行った。患者からの iPS 細胞の樹立および臨床試験においては事前に策定し当該施設倫理委員会の承認を得たプロトコルを遵守し、患者のインフォームドコンセントを得た上で適切に実施した。

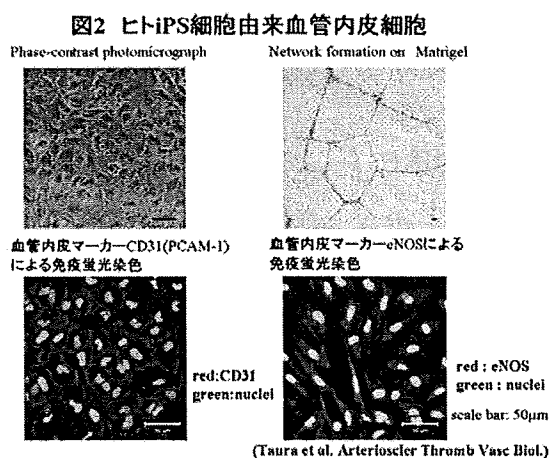
C, D. 研究結果および考察

iPS 細胞を OP9 フィーダー細胞との共培養にて 10 日間分化誘導を行うと、Flk1 陽性 TRA1-60 陰性細胞が出現した (図 1)。

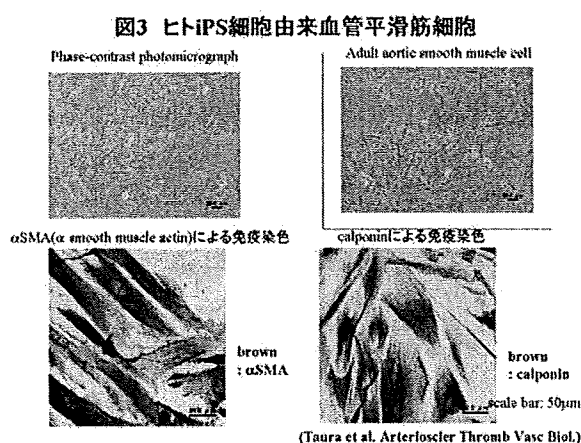
図1 ヒトES・iPSの血管分化の比較(フローサイトメトリー)



Flk1 陽性 TRA1-60 陰性細胞は VEcadherin 陽性細胞と陰性細胞に分けられ、Flk1 陽性 TRA1-60 陰性 VEcadherin 陽性細胞は、CD34、CD31、eNOS も陽性で、培養ディッシュ上にて内皮細胞特有の敷石状の形態およびマトリゲル上で管腔構造をとり、血管内皮細胞であると考えられた (図2)。



Flk1 陽性 TRA1-60 陰性 VEcadherin 陰性細胞は、カルポニン、平滑筋ミオシン重鎖も陽性で、血管平滑筋細胞であると考えられた (図3)。



それらヒト iPS 細胞からの血管細胞の分化過程はヒト ES 細胞とほぼ同等であった。また、ヒト iPS 細胞からの血管細胞の分化効率は B セルラインと G セルライン間で有意な差は認められなかった。さらに、我々は、上記のヒト ES・iPS 細胞分化誘導法を改良し、OP9 フィーダー細胞

を用いずに分化誘導する手法を確立し、血管内皮細胞分化誘導効率も約 2%から 5-20%まで上昇させることに成功した。また、ヒト ES・iPS 由来血管内皮細胞と成人の大動脈内皮細胞の機能を比較検討したところ、ヒト ES・iPS 由来血管内皮細胞は成人の大動脈血管内皮細胞に比べ、MTT アッセイにて細胞増殖能が高く、Wound Healing Assay にて内皮欠損の回復能が高く、マトリゲル上でのネットワーク形成能も高かった。

E. 結論

本年度は、ヒト iPS 細胞からの血管内皮細胞・壁細胞の分化誘導過程が、ヒト ES 細胞と大きくは異なる事を確認した。また、ヒト iPS 細胞からの効率的な血管内皮細胞分化誘導法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, Yamanaka S, Nakao K. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jul;29(7):1100-3.

2. 学会発表

1) 曾根正勝、他: ヒト ES および iPS 細胞を用いたヒト血管保護・再生因子の探索 第 82 回日本内分泌学会学術総会 公募シ

ンポジウム1 前橋、日本 2009年4月
23日

2) Masakatsu Sone, Kazuwa Nakao:
Induction and Isolation of Vascular
Cells from Human ES and iPS cells: as
a research tool for vascular biology
5th SEOUL Conference on Cardiovascular
Research Seoul, Korea. October 31, 2009

3) 曾根正勝、他: ヒト ES および iPS 細
胞を用いたヒト血管分化・再生・老化機
構の解明 第9回日本再生医療学会総会
広島、日本、3月18日、2010年

4) Masakatsu Sone, et al.: The
characteristic and potential of human
ES and iPS -derived vascular cells.
14th International Congress of
Endocrinology Kyoto, Japan, March 28,
2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞の細胞機能に関する研究

研究分担者 本間 康一郎 慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科 助教

研究要旨 ヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞の細胞機能は、成人血管内皮細胞と比較し、その増殖・遊走能が優れている。その細胞機能の優位性には、抗老化因子 Sirt1 発現亢進が関与していた。即ち、ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞は、成人血管内皮細胞と比較し Sirt1 発現が亢進しており、その抑制は細胞増殖・遊走能の低下をもたらした。血管内皮細胞機能における Sirt1 の意義が明らかとなり、Sirt1 を用いた今後の血管再生医療応用の可能性が期待される。

A. 研究目的

近年ヒト ES・iPS 細胞を用いた分化誘導研究は盛んに行われている。我々は以前よりヒト ES/iPS 細胞から血管内皮細胞 (EC) への分化誘導研究を行い、ヒト ES 由来 EC (ESEC) は成人 EC に比べ、移植生着率が高いことを見出している (PLoS One. 2008 3(2):e1666)。この事実を踏まえ、ヒト ESEC および iPS 由来 EC (iPSEC) の細胞機能を成人 EC と相互比較し、その機能維持に関与している因子を明らかにすることをその目的とした。

B. 研究方法

研究分担者曾根らにより開発された手法により、ヒト ES および iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導を行った。得られた血管内皮細胞の増殖、遊走、酸化ストレス耐性能といった細胞機能や tube formation assay による血管新生能を、成人血管内皮細胞と比較検討した。さらに、

研究代表者山原らにより ES/iPSEC や成人 EC における遺伝子発現を chip 解析により網羅的に検討し、細胞機能の差異に関与している因子を同定し、その因子を siRNA を用いて抑制することによる細胞機能への影響も検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト ES 細胞を用いた研究を行うことについて、2008 年 12 月に文部科学省から使用許可が得られている。京都大学再生医科学研究所より、使用した KhES-1、KhES-2、KhES-3 細胞株の分与を受け、ヒト ES 細胞倫理研修会にも定期的に参加している。ヒト iPS 細胞の培養については、ヒト ES 細胞の使用に関する指針に準じて行った。患者からの iPS 細胞の樹立および臨床試験においては事前に策定し当該施設倫理委員会の承認を得たプロトコルを遵守し、患者のインフォームドコンセントを得た上で適切に実施した。

C, D. 研究結果および考察

ESEC やヒト iPS 由来 EC (iPSEC) は、成人 EC に比べて、細胞増殖、内皮欠損後の回復能、酸化ストレス耐性能が高かった。これら各種内皮細胞の遺伝子発現を研究代表者山原らと網羅的に解析した結果、最近抗老化因子として血管内皮細胞機能との関連が指摘されている NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素 Sirt1 発現が ESEC, iPSEC ではヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) に比べて高いことが分かった。ESEC, iPSECs において Sirt1 特異的抑制薬および siRNA を用いて Sirt1 発現を抑制すると、細胞増殖・遊走能、酸化ストレス耐性能が低下した。さらに、in vitro における tube 形成能は ESEC, iPSEC では成人 EC に比べて高かったが、Sirt1 を抑制することでその効果も減弱した。一方で、ヒト未分化 ES 細胞から ESEC への分化過程における Sirt1 発現は有意な変化を認めず、また、Sirt1 を抑制しても分化効率への影響は認めなかった。

E. 結論

Sirt1 は我々の分化誘導法において ESEC や iPSEC の分化過程に関与しないが、その細胞機能維持には重要な役割を担っていることが示唆され、今後 Sirt1 をターゲットとした移植療法に最良な ESEC, iPSEC の作製が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Homma K, Sone M, Taura D, Yamahara K, Suzuki Y, Takahashi K, Sonoyama T, Inuzuka M, Fukunaga Y, Tamura N, Itoh H, Yamanaka S, Nakao K. Sirt1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS derived vascular endothelial cells. *Arthrosclerosis, in press.*

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Homma K, Sone M, Taura D, Yamahara K, Suzuki Y, Takahashi K, Sonoyama T, Inuzuka M, Fukunaga Y, Tamura N, Itoh H, Yamanaka S, Nakao K.	Sirt1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS derived vascular endothelial cells.	Arthrosclerosis	In press		2010
Yamahara K, Itoh H.	Potential use of endothelial progenitor cells for regeneration of the vasculature.	Ther Adv Cardiovasc Dis.	3(1)	17-27	2009
Taura D, Noguchi M, Sone M, Hosoda K, Mori E, Okada Y, Takahashi K, Homma K, Oyamada N, Inuzuka M, Sonoyama T, Ebihara K, Tamura N, Itoh H, Suemori H, Nakatsuji N, Okano H, Yamanaka S, Nakao K.	Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells.	FEBS Lett.	583(6)	1029-33	2009
Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, Yamanaka S, Nakao K.	Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells.	Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biol.	29(7)	1100-3	2009
Kunieda T, Nakanishi N, Matsubara H, Ohe T, Okano Y, Kondo H, Nishimura M, Shirato K, Tanabe N, Homma S, Yoshida S, Inokuma S, Kodama M, Koike T, Hishida H.	Effects of Long-Acting Beraprost Sodium (TRK-100STP) in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension.	Int Heart J.	50(4)	513-29	2009
中西宣文	特発性肺動脈性肺高血圧症・家族性（遺伝性）肺動脈性肺高血圧症	呼吸器科	16	184-91	2009
中西宣文	肺高血圧症、定義と分類の変遷-ダナポイントからのメッセージ	総合臨床	58	2224-9	2009
中西宣文	第4回肺高血圧症ワールドシンポジウム報告について	血栓と循環	17	251-5	2009

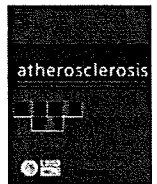
IV. 研究成果の刊行物・別刷



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis



Q1 Rapid communication

Sirt1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS-derived vascular endothelial cells

Koichiro Homma^{a,e}, Masakatsu Sone^{a,*}, Daisuke Taura^a, Kenichi Yamahara^a, Yutaka Suzuki^b, Kazutoshi Takahashi^{c,d}, Takuhiro Sonoyama^a, Megumi Inuzuka^a, Yasutomu Fukunaga^a, Naohisa Tamura^a, Hiroshi Itoh^e, Shinya Yamanaka^{c,d}, Kazuwa Nakao^a

^a Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

^b Stem Cell and Drug Discovery Institute, Kyoto, Japan

^c Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

^d Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto, Japan

^e Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2009

Received in revised form 18 March 2010

Accepted 14 April 2010

Available online xxx

Keywords:

Stem cells
Endothelium
Sirt1

ABSTRACT

Objective: We previously succeeded in inducing and isolating vascular endothelial cells (ECs) from both human embryonic stem (ES) and induced pluripotent stem (iPS) cells. Here, we compared the functionality of human adult ECs (HAECs), human ES-derived ECs (ESECs) and human iPS-derived ECs (iPSECs). **Methods and results:** We compared the cell proliferative potential, potential for migration, and tolerance to oxidative stress. ESECs were significantly superior to HAECs in all of these cell functions. The cell functions of iPSECs were comparable to those of ESECs and also superior to HAECs. We then analyzed the gene expressions of HAECs, ESECs and iPSECs, and observed that the expression level of Sirt1, a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent histone deacetylase, is higher in ESECs and iPSECs than in HAECs. The inhibition of Sirt1 with a Sirt1-specific inhibitor and siRNA antagonized these differences between the three types of cells.

Conclusions: Sirt1 plays a key role in the high cellular function of ESECs and iPSECs. Although further in vivo investigations are required, this study initially demonstrated the potential of ESECs and iPSECs as the cell source for regenerative medicine, and also showed the potential of ES cells as a useful tool for elucidating the molecular mechanism of cell aging.

© 2010 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

We have succeeded in selectively inducing mouse, monkey and human ES cells to differentiate into ECs and mural cells and in isolating those cells [1–3]. In addition, we recently succeeded in inducing human iPS cells to differentiate into ECs and mural cells and in isolating those cells [4]. We have also intra-arterially transplanted human ES cell-derived ECs (ESECs) into murine hindlimb ischemia models and found that the transplanted ECs are incorporated into the host vasculature, where they promote the restoration of blood flow. By contrast, almost no transplanted adult aorta-derived ECs were incorporated into the host vasculature, and they did not promote blood flow restoration [3,5]. Other groups comparing the efficiency of engraftment of ESECs and human adult ECs obtained similar results [6–8]. Apparently, there are functional differences

between ESECs, which are at a relatively early stage of development, and human adult ECs, which have already been subject to aging.

The aims of the present study were to analyze the functional differences between human adult ECs, ESECs and human iPS cell-derived ECs (iPSECs), to identify factors responsible for these functional differences, and to determine at least part of the mechanism of vascular aging.

2. Methods

2.1. Cell culture

Human aortic endothelial cells (HAECs) were purchased from Lonza and maintained in endothelial growth medium (EGM-2, EGM-2 singleQuots, Lonza). Human saphenous vein endothelial cells (HVECs) were purchased from VEC Technologies, Inc., and maintained in EGM-2 (EGM-2 singleQuots). The khES1 human ES cell line and the 201B7 human iPS cell line were used and

* Corresponding author. Tel.: +81 75 751 3170; fax: +81 75 771 9452.
E-mail address: sonemasa@kuhp.kyoto-u.ac.jp (M. Sone).