

に由来する細胞に分化しやすい傾向があるようである。例えば、血球細胞から誘導されたiPS細胞は血球細胞に分化しやすい傾向がある^{24)~26)}。これは、もとの細胞の性質(おそらくはエピジェネティックな情報)がiPS細胞になっても完全にリプログラムされるわけではなくて、ある程度記憶されている(エピジェネティックメモリー)のではないかということを示唆する。心筋細胞から誘導したiPS細胞は、よりよく心筋細胞に分化するかもしれない。さらに最近、iPS細胞樹立の技術を応用して、3個の転写因子を線維芽細胞に導入することにより、線維芽細胞を直接神経細胞(iN細胞)に形質転換できることが報告された²⁷⁾。この結果は、ある特定の転写因子の組み合わせを適切に発現させれば、iPS細胞に限らずさまざまな種類の細胞を誘導できるようになる可能性を示唆する。当然、線維芽細胞から直接心筋細胞を誘導する、というようなことが期待されるが、早くも線維芽細胞に特定の3個の転写因子(Gata4, Mef2C, Tbx5)を導入することにより心筋細胞が誘導し得ることが明らかにされた(iCM細胞)²⁸⁾。今後、これらの研究をベースに細胞の直接的形質転換(direct conversion)に関しても研究が急速に進むと考えられる。

このようにiPS細胞研究は、さまざまな方向に急速な広がりを見せている。iPS細胞研究は、ここに述べたようなことだけでなく、予想もしなかった形で再生医療や広く医学全体に貢献することになるかもしれない。実際、ラットのiPS細胞を用いてマウス体内でラットの膵臓を作らせる、といった試みが、最近報告された²⁹⁾。研究のスピードは想像を超えている。

文 献

- 1) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000 ; 408 : 92-96
- 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* 2005 ; 19 : 1534-1536
- 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* 2006 ; 26 : 1977-1984
- 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* 2006 ; 26 : 2070-2076
- 5) Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008 ; 118 : 498-506
- 6) Yanagi K, Takano M, Narazaki G, et al : Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and T-type calcium channels confer automaticity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells* 2007 ; 25 : 2712-2719
- 7) Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, et al : Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008 ; 118 : 507-517
- 8) Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, et al : Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 2008 ; 26 : 1537-1546
- 9) Mummery C, Ward-van Oostwaard D, et al : Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003 ; 107 : 2733-2740
- 10) 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* 2007 ; 25 : 1015-1024
- 11) Zhu WZ, Xie Y, Moyes KW, et al : Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ Res* 2010 ; 107 : 776-786
- 12) Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al : Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 2008 ; 453 : 524-528
- 13) Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, et al : Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature* 2009 ; 460 : 113-117
- 14) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2009 ; 104 : e30-e41
- 15) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, et al : In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 385 : 497-502
- 16) Yokoo N, Baba S, Kaichi S, et al : The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 387 : 482-488
- 17) Hattori F, Chen H, Yamashita H, et al : Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes.

- Nat Methods* 2010 ; 7 : 61-66
- 18) Shimizu T, Sekine H, Yamato M, Okano T : Cell sheet-based myocardial tissue engineering : new hope for damaged heart rescue. *Curr Pharm Des* 2009 ; 15 : 2807-2814
- 19) Chimenti I, Smith RR, Li TS, et al : Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res* 2010 ; 106 : 971-980
- 20) Yamanaka S : Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2007 ; 1 : 39-49
- 21) Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR : The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 ; 9 : 725-729
- 22) Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, et al : Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 379 : 115-120
- 23) Miura K, Okada Y, Aoi T, et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009 ; 27 : 743-745
- 24) Watarai H, Fujii S, Yamada D, et al : Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 2610-2618
- 25) Kim K, Doi A, Wen B, et al : Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010 ; 467 : 285-290
- 26) Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al : Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2010 ; 28 : 848-855
- 27) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al : Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010 ; 463 : 1035-1041
- 28) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al : Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010 ; 142 : 375-386
- 29) Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al : Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010 ; 142 : 787-799

血管発生メカニズム： 内皮細胞の分化と動静脈形成

Mechanisms of Vascular Development : Endothelial Cell Differentiation and Arterial-Venous Specification

山水康平, 山下 潤

Kohei Yamamizu, Jun K Yamashita

血管は、構成細胞である内皮細胞と壁細胞の分化・増殖を経て、体の隅々に精巧に張り巡らされる。その多様性は、動脈・静脈・リンパ管の分類だけではなく、様々な臓器において固有の役割を果たす。最近の研究では、血管形成の基盤となる内皮細胞分化メカニズムとその上に成り立つ血管の多様化メカニズムが存在することが明らかとなってきた。本稿では、血管前駆細胞からの内皮細胞分化の分子機構と動脈・静脈の運命決定機構について概説する。



ES細胞, iPS細胞, 血管内皮細胞, 動脈, 静脈

はじめに

生物発生過程において最も早く形成される臓器の1つが血管であり、生命体の形成・維持に深く関与している。血管は、内腔を一層に覆う内皮細胞とそれを外側から取り囲むペリサイト（血管周皮細胞）あるいは平滑筋細胞といった壁細胞から構成される。さらに、その外側に末梢神経など種々の細胞が存在し、相互に関連しながら血管ネットワークの形成および血管機能に関与すると考えられる。初期血管発生において、血管前駆細胞からの血管細胞の分化・増殖機構と、この上に成り立つ動脈・静脈・リンパ管の特異性や臓器特異性など多様化機構が連関し、複雑かつ精巧な血管網を体の隅々まで張り巡らす。

血管発生過程において、VEGF (vascular endothelial growth factor) をはじめ、多くの因子が遺伝子欠損マウスの検討を中心として明らかとなってきた。一方、筆者らは、ES (embryonic stem) 細胞、iPS (induced pluripotent stem) 細胞を用いた血管発生システムを構築し、血管の分化発生機構の解析を行ってきた。最近、セカンドメッセンジャーとして生体機能において重要な役割を果たすcAMP (cyclic adenosine monophosphate) シグナルが血管内皮細胞の分化、そして動脈の特異性の獲得にきわめて重要な役割を果たすことを明らかにしている^{1), 2)}。本稿では、血管発生・分化の機構、そして血管多様化の機構に焦点を当て、最新の知見を紹介し概説したい。

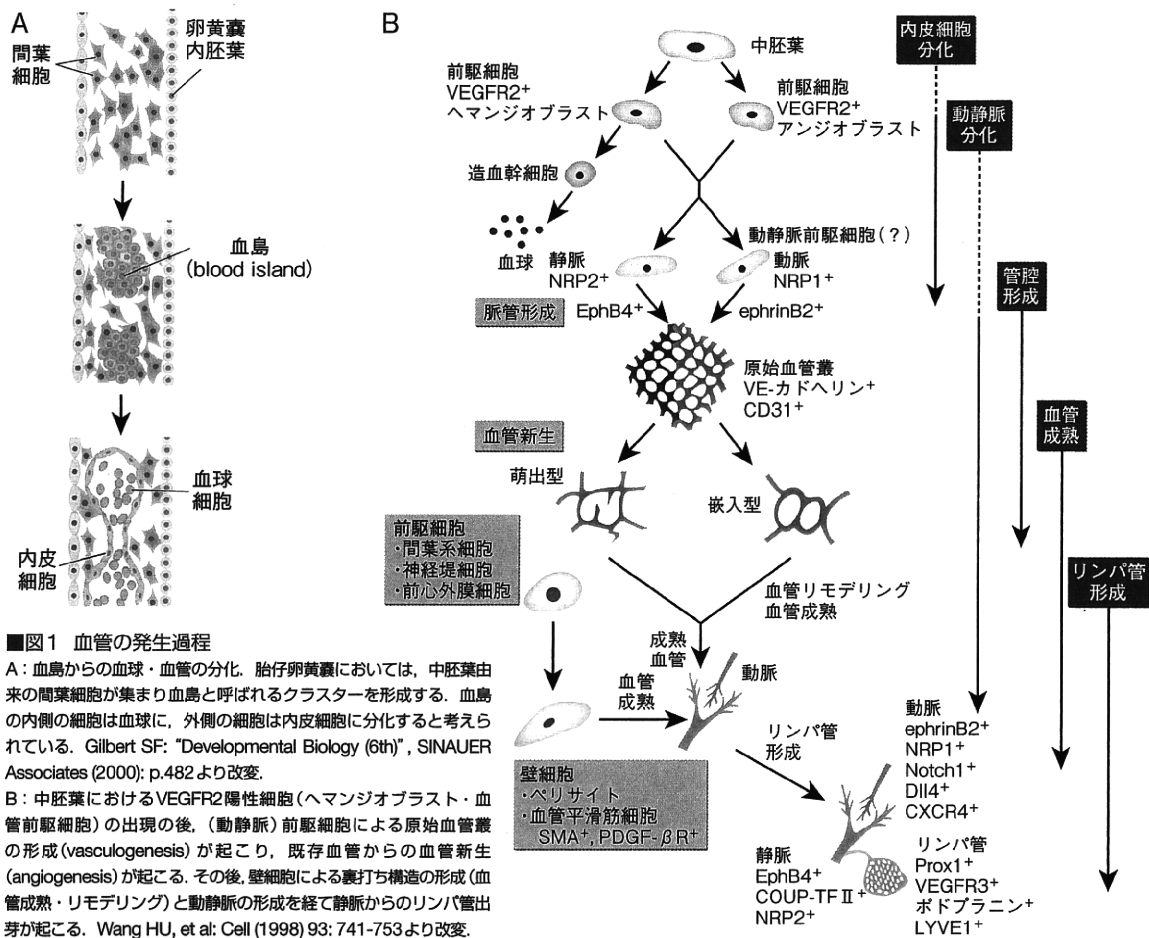
I 血管の発生過程

血管発生は、中胚葉細胞から血球血管芽細胞 (hemangioblast; ヘマンジオブラスト) または血管芽細胞 (angioblast; アンジオブラスト) と呼ばれる前駆細胞^{注1}が分化するという事象から始まると考えられている。この前駆細胞は互いに融合し、原始血管叢を形成する。この過程がvasculogenesis (脈管形成) と呼ばれている。卵黄嚢においては、ヘマンジオブラストが血島 (blood island) を形成した後、辺縁部の細胞は内皮細胞に分化し、中心部の細胞は血球細胞に分化すると推定されている (図1A)。胎仔において、アンジオブラストは中胚葉領域から全身の間葉組織に広がり、胎仔背側大動脈と総主静脈は、これらアンジオブラストの収束、分化・増殖を経て形成されたと考えられている (vasculogenesis)。その後、既存血管の内皮細胞が血管新生刺激に反応して新たな管腔形成を行い (angiogenesis)、階層性を持った大小血管からなるvascular treeの形成 (リモデリング)、基底膜の形成、壁細胞による血管細胞周囲の裏打ち構造の形成 (血管成熟) により新生血管が完成される^{3)~5)} (図1B)。

従来、動脈・静脈の区別は心拍と血流の開始後に主に物理力によって誘導されたと考えられてきたが、*ephrinB2* 遺伝子欠損マウスの解析により、原始血管叢形成の時点ですでに

注1 前駆細胞

分化した細胞を作り出し臓器組織の発生・再生に貢献しうる細胞であるが、自己増殖能は証明されていないもの。自己増殖能を有するものを幹細胞と呼ぶ。

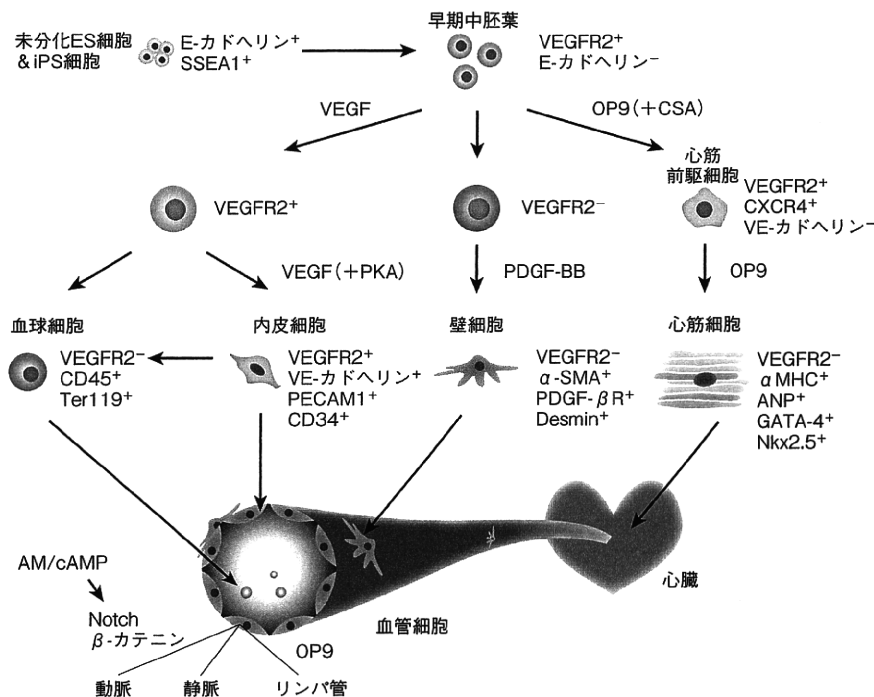


遺伝子的区別がなされていることが明らかとなった⁶⁾。ニトリ胎仔の血島においては、将来的に動脈および静脈に特異的発現を示すNRP1(neuropilin 1)とNRP2がそれぞれ異なる細胞分画に発現しており、動静脈の運命決定は血流が生じるよりも早い段階で遺伝的に決定されている可能性も示されている⁴⁾。しかし、形態的変化を含むその後の動静脈分化には血流による物理的刺激もやはり重要な役割を果たしていると考えられる。動静脈に加えてもう1つの主要な脈管系であるリンパ管は、マウスでは胎生10.5日ごろより静脈から出芽して形成されると考えられている⁷⁾。ほぼ体内のすべての組織臓器に存在する血管は、それぞれの位置する周囲組織との相互作用の中で、さらに様々な特異性を獲得し多様化していくものと考えられる。

II 血管内皮細胞の分化機構

1. VEGFシグナルの血管発生における役割

血管発生を制御する分子の同定を目的とした研究が、近年飛躍的に進展した。VEGF(vascular endothelial growth factor)、NRP、アンジオポエチン(angiopoietin)、TGF-β(transforming growth factor-β)、PDGF(platelet-derived growth factor)、FGF(fibroblast growth factor)、ephrin、Notchなどが見いだされており、中でもVEGFが発生初期から中心的な役割を果たす。VEGF2型受容体(VEGFR2)は側板中胚葉で発現が見られ、分化に従って血管前駆細胞、そして内皮細胞に局限し発現する。VEGFR2ノックアウトマウスは血島の形成不全により、血球・内皮細胞が共に欠損し胎生致



■図2 ES/iPS細胞からの心血管構成細胞の分化
ES/iPS細胞由来VEGFR2陽性細胞は、そこからすべての血管構成細胞（内皮細胞、壁細胞、血球細胞）が分化することができる血管前駆細胞である。VEGFはVEGFR2陽性細胞からの内皮細胞分化に必須である。VEGFR2陽性細胞から分化した内皮細胞は、一時的に血球形成能を有する時期があるが、その後、内皮細胞が成熟するに従って血球形成能は失われる。内皮細胞は成熟するとともに多様化し、動脈・静脈・リンパ管内皮細胞をはじめとして様々な内皮細胞に分化すると考えられる。
AM: adrenomedullin, ANP: atrial natriuretic peptide, CSA: cyclosporin A, PECAM1: platelet endothelial cell adhesion molecule-1, α-SMA: α-smooth muscle actin, SSEA1: stage-specific embryonic antigen 1.

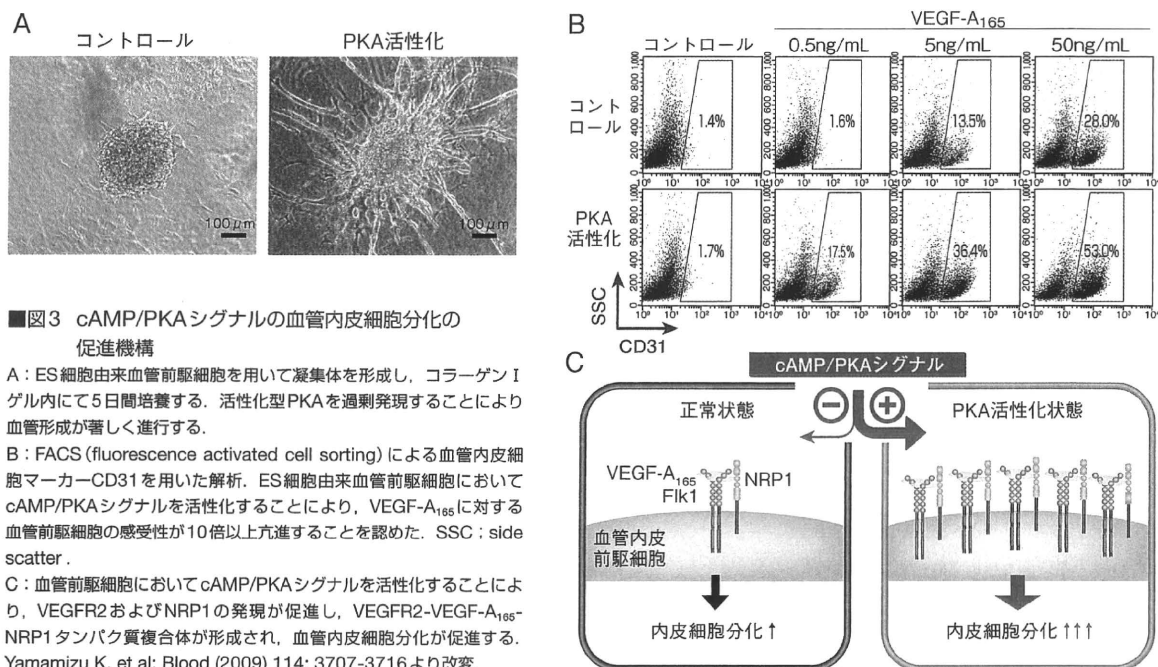
死となる。また、VEGF-Aは、ホモノックアウトマウスのみならずヘテロノックアウトマウスも血管系の多様な異常により胎生致死となること、さらに、正常の2～3倍という軽度のVEGF-A過剰発現マウスにおいても血管形成不全により胎生致死となることから、胎生期におけるVEGF-A濃度の微細なバランスが血管形成にきわめて重要であることを示している^{8)~10)}。

VEGF-Aの他の受容体としてNRP1が同定されている。NRP1はセマフォリン(semaphorin)の受容体としても働き、神経の軸索形成に関与する。NRP1はVEGFR2とともにVEGF-AのサブタイプであるVEGF-A₁₆₅と特異的にタンパク質複合体VEGFR2-VEGF-A₁₆₅-NRP1を形成し、VEGFR2シグナルを増強することが知られている¹¹⁾。NRP1ノックアウトマウスは、血管および心臓の発生異常により胎生致死となることから、VEGF-A₁₆₅とNRP1の相互作用が血管形成に重要な役割を果たすことが示唆される¹²⁾。

VEGF-Aの遺伝子発現は増殖因子や低酸素などにより誘導される。特に、発生期の低酸素状態におけるHIF(hypoxia responsive factor)の産生を介したVEGF-Aの発現亢進が血管形成に重要であることは、HIFおよび関連因子に対するノックアウトマウスを使った実験から明らかである¹³⁾。しかしなが

ら、VEGF-Aの受容体であるVEGFR2およびNRP1の遺伝子発現の制御機構は不明な点が多い。筆者らはcAMP/PKA(protein kinase A)シグナルがVEGFR2およびNRP1の遺伝子発現制御に関与していることを明らかにした¹⁾。筆者らが構築したES/iPS細胞血管分化系は、VEGFR2陽性の早期中胚葉の分化段階と考えられる細胞を共通の前駆細胞として動脈・静脈・リンパ管および心筋といった様々な心血管系の細胞へ分化させることが可能である¹⁴⁾(図2)。ES細胞由来血管前駆細胞においてcAMP/PKAシグナルを活性化することにより、VEGF受容体であるVEGFR2およびNRP1の発現が顕著に促進する一方、VEGFの発現には影響はなかった。さらに、cAMP/PKAシグナルの活性化は、VEGFR2-VEGF-A₁₆₅-NRP1タンパク質複合体形成を促進し、VEGF-A₁₆₅に対する血管前駆細胞の感受性が10倍以上亢進することを認めた¹⁾(図3)。最近の報告では、血管前駆細胞においてVEGFR2およびNRP1の両者が強発現していることが報告されていることから、VEGFおよびVEGF受容体の発現制御が血管細胞分化にきわめて重要に働くことが考えられる¹⁵⁾。

2. 血管新生促進因子と血管新生抑制因子のバランス VEGF1型受容体(VEGFR1)遺伝子はスプライシングのさ



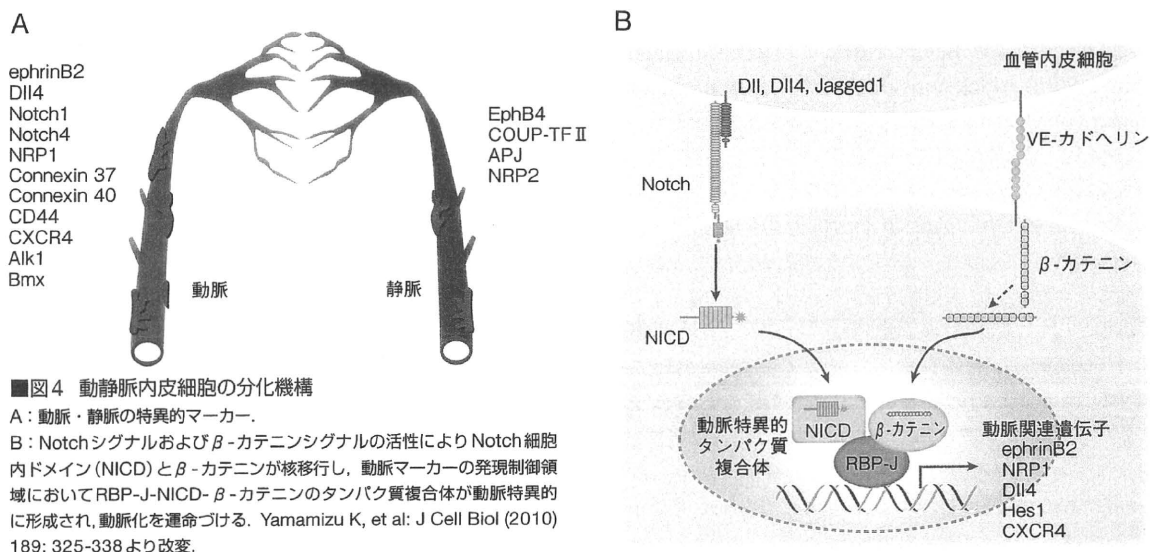
れ方によって膜貫通型受容体と分泌型受容体 (sVEGFR1) をコードする。sVEGFR1はVEGF-Aに強く結合し、VEGF-AのVEGFR1およびVEGFR2への結合を阻害し血管新生を抑制する。また、VEGFR1ノックアウトマウスは血管形成が過剰に起こることにより胎生致死となることから、胎生期においてVEGFR1は血管新生に対して抑制的に作用していることが考えられる¹⁶⁾。この抑制機構はVEGFR1のリガンド結合部位のみの発現によって認められることから、VEGF-AをVEGFR1が捕らえることによりVEGFR2の効果を調節していることが示唆される。

近年、神経発生に関与する因子が血管発生においても重要な役割を果たしており、その多くが血管新生に対して抑制的に作用し血管の走行を調節していることが報告されている¹⁷⁾。筆者らは様々な神経活動に関与するオピオイドが血管発生・新生において抑制的に作用していることを見いだした(筆者ら、投稿中)。κオピオイドアゴニストを添加することによりVEGFシグナルを抑制的に制御し、血管内皮細胞分化を抑制した。さらに、κオピオイド受容体ノックアウトマウスにおいて脳内血管の新生が亢進していることを明らかにした。このように血管新生促進因子と抑制因子のバランスの精密な制御により、三次元空間に広がる複雑な血管網を精巧に張り巡らすことができるものと考えられる。

3. 血管内皮細胞分化の転写因子制御

転写因子Ets, Sox, Forkhead, GATA, Klf (Krüppel-like families) などが血管および血球の形成に関与していることが報告された¹⁸⁾。特に、Etsファミリー転写因子が注目されており、ヒトの内皮細胞において少なくとも19種類存在している。その中でもEtv2(別名: ER71, Etsrp71など)は卵黄囊の血島から早期血管新生時に発現している。興味深いことに、Etv2は血管多様化の進行するマウス胎生9.5日では発現が減弱し、胎生10.5日にはほぼ消失することから血管形成の早期に特異的に作用していることが強く示唆される。Etv2ノックアウトマウスは、血管発生および血球発生の欠損により胎生致死となる¹⁹⁾。早期血管マーカーであるVEGFR2, CD31, Tie2などがEtv2欠損により消失することが報告されている。

このような転写因子は内皮細胞において発現がオーバーラップしており、協調的に血管内皮細胞の特異性獲得に関与しているものと考えられる。ゲノムの網羅的な解析により、EtsおよびGATAのDNA結合部位が、血管内皮細胞および血球の発生に関与するTal1, Fli1, Prhの転写制御領域に存在することが報告された²⁰⁾。さらに、ForkheadおよびEtsの隣り合ったDNA結合部位(FOX:ETS)が血管内皮細胞の誘導因子、Tal1, Tie2, Flk1, Mef2c, NRP1, VE-カドヘリ



■図4 動静脈内皮細胞の分化機構

A: 動脈・静脈の特異的マーカー。

B: Notchシグナルおよび β -カテニンシグナルの活性によりNotch細胞内ドメイン(NICD)と β -カテニンが核移行し、動脈マーカーの発現制御領域においてRBP-J-NICD- β -カテニンのタンパク質複合体が動脈特異的に形成され、動脈化を運命づける。Yamamizu K, et al: J Cell Biol (2010) 189: 325-338より改変。

ンなどの転写制御領域にあり、Forkheadファミリー因子FoxC2およびEtv2が早期血管発生過程において主要な役割を担っていることが明らかとなった²¹⁾。今後、このような転写因子の協調的な機構が血管発生に限らず、発生過程の細胞運命決定に関与することが明らかとなるであろう。

Ⅲ 動脈・静脈の運命決定機構

1. 動脈内皮細胞の分化機構

Wangらは、膜結合型リガンドephrinB2とそのチロシンキナーゼ型受容体EphB4が、心筋の拍動による血液循環が始まるよりも以前に卵黄嚢の後方領域と前方領域にそれぞれ発現し、ephrinB2陽性細胞は動脈を、EphB4陽性細胞は静脈を形成することを見いだした⁶⁾。この研究以降、動脈内皮特異的に発現する因子が数々報告され、Bmx, Dll4 (delta-like 4), Alk1 (activin receptor-like kinase 1) /ACVRL, Notch1, Notch4, NRP1, Connexin 37, Connexin 40, CD44, CXCR4などが動脈内皮マーカーとされている(図4A)。

Notchシグナルは胎生期において神経をはじめ多くの臓器において細胞分化の運命決定因子として働いている。血管発生においてNotchシグナルは動脈としてのアイデンティティを獲得するために必須であると考えられている。NotchのリガンドであるDll4, Jagged1, Jagged2, Notch1, Notch4が動脈内皮細胞に発現し、動脈周囲平滑筋細胞に

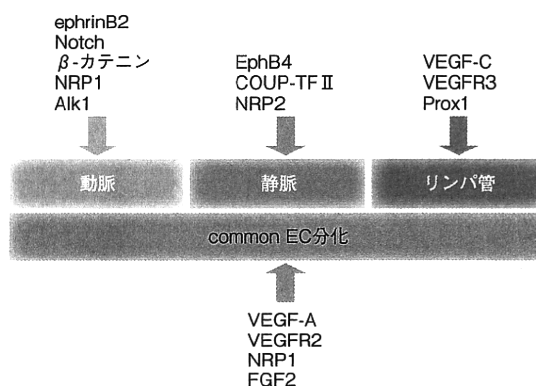
Jagged1, Notch3が発現している。Notch1, 4およびNotchリガンドDll4, そしてNotchシグナル下流の転写因子であるRBP-J, さらにNotchシグナルにより発現が制御されるHey1/Hes2のノックアウトマウスは血管の形成異常により胎生致死となる^{22)~25)}。筆者らは、Notchシグナルおよび胚発生において重要な役割を果たす β -カテニンシグナルが協調的に働き動脈の特異性を獲得することを報告した²⁾。 β -カテニンは細胞膜においてVE-カドヘリンに結合し、広範囲の血管に存在する。血管内皮特異的 β -カテニンノックアウトマウスでは血管が脆弱し胎生致死となることが報告されていた²⁶⁾。ES細胞を用いた内皮細胞分化システムにおいてNotch細胞内ドメイン(NICD)および活性化型 β -カテニンを同時に過剰発現することにより動脈マーカーephrinB2, CXCR4, Dll4などの発現が顕著に亢進することを見いだした。一方、NICDまたは β -カテニン単独では部分的な効果に留まった。興味深いことに、動脈マーカーの発現制御領域においてRBP-J-NICD- β -カテニンのタンパク質複合体が動脈特異的に形成され、動脈化を運命付けることを明らかにした²⁾(図4B)。最近の報告では、血管内皮細胞特異的に β -カテニンを過剰発現するトランスジェニックマウスの解析により、 β -カテニンシグナルがNotchシグナルを増強し、動脈特異性の獲得に重要であることが示され、 β -カテニンシグナルの動脈内皮細胞の運命決定機構への重要性が強く示唆された²⁷⁾。

2. 静脈内皮細胞の分化機構

今までの報告より, EphB4, NRP2, APJ (apelin receptor), COUP-TF II (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II) などが静脈マーカーとして知られている (図4A)。従来静脈は血管のいわゆるデフォルト経路であり, 特別な誘導シグナルがない場合には静脈が分化すると考えられていた。核内受容体COUP-TF IIはNRP1の発現抑制を介してNotchシグナルを抑制することにより静脈内皮分化を制御していることが報告され, 動静脈分化がそれぞれ特異的遺伝子因子で制御されている可能性が示唆された²⁸⁾。このように, 静脈決定因子は動脈決定因子を抑制することにより静脈の特異性を獲得することが考えられているが, それ以降, 静脈のアイデンティティーを制御する因子は報告されていない。また, 最近異なるモデル, すなわち血管は初め動脈でも静脈でもない原始 (primordial) 内皮細胞により動脈の位置に形成され, そこから内皮が静脈の位置へと遊走して静脈内皮となり静脈を形成し, 一方, 元の位置の原始内皮細胞は動脈内皮となるというモデルも提唱されている²⁹⁾。このように動静脈内皮分化機構に関してはいまだ不明な点も多い。さらなる今後の検討が必要である。

3. 動静脈内皮細胞の可塑性と環境因子

動静脈内皮細胞の特異性を誘導する遺伝的因子が明らかとなってきたが, 血流のシアストレスなどの物理的因子の関与も見逃すことはできない。ニワトリ胚の卵黄囊動脈の血流を遮断することにより血管の形態が静脈化し, 動脈マーカーの低下と静脈マーカーの上昇を引き起こす。その後, 血流を改善することにより動脈マーカーの発現が改善するという興味深い報告がされている³⁰⁾。また, ウズラの血管前駆細胞をニワトリ胚に移植する研究から, 発生期内皮細胞には可塑性があり, 移植細胞は局所に応じて動脈あるいは静脈の内皮細胞へとアイデンティティーを獲得することができると明らかとなっている³¹⁾。筆者らのES細胞分化系においてもES細胞から誘導した早期血管内皮細胞において可塑性を有することを見いだしている。すなわち, いったん動脈または静脈に分化したと考えられる初期内皮細胞においてNotchシグナルおよび β -カテニンシグナルをON/OFFすることにより, それぞれの細胞が示していた動静脈マーカー発現を可逆的に制御できる²⁾。このように, 早期内皮細胞は可塑性を有し, 遺伝的因子に加え, 物理的因子, 局所因子などの修飾を受け, 多様性を獲得していくと考えられる。今後, 動静脈を制御するエピジェネティクスの解明などにより, さらに動静脈分化機構が明らかにされることが期待される。



■図5 血管発生における内皮細胞分化および血管多様化

血管発生は, VEGFシグナルを代表格とする基盤となる内皮細胞分化メカニズムとその上に成り立つ動静脈リンパ管分化をはじめとする多様化メカニズムにより制御されると考えられる。

おわりに

血管はほぼすべての臓器形成に関与し, 生体の恒常性の維持を担っている。一見, 血管は一樣な臓器のように見受けられるが, 遺伝子発現変化や周囲環境の影響によりダイナミックに血管形成が行われ, 多様性に富み, 臓器特有の機能を果たす。この血管発生は, VEGFシグナルを代表格とする基盤となる内皮細胞分化メカニズムとその上に成り立つ動静脈リンパ管分化をはじめとする多様化メカニズムにより制御されると考えられる (図5)。しかしながら, 現状の見解のみでは精巧で複雑な血管網をすべて説明することはできない。どのように体内での血管の分岐が決定されているのか? どのように動脈と静脈が交わることなく体中に張り巡らすことができるのか? どのように血液脳関門や血液胎盤関門^{注2)}のような特殊な血管内皮細胞を作り出すことができるのか? など疑問は尽きない。このような疑問を1つ1つ解明していくことが我々の使命であり, 大変興味深い課題である。血管形成を多角的に解明することは, 個体発生・再生および腫瘍形成

注2 血液脳関門, 血液胎盤関門

脳, 脊髄および胎盤に存在する毛細血管は, 血液から組織への物質透過の選択性が体の他の部分の毛細血管と異なり, 様々な化学物質などの脳内または胎児への流入を妨げていると考えられている。脳内毛細血管は, 内皮同士の間隙がよりタイトであることや血管周囲に存在するグリア細胞などが血液脳関門形成に関与していると考えられているが, その分子・細胞基盤はいまだ不明である。

をはじめとする様々な病態の機序を理解することにつながり、新たな治療戦略の発展に貢献できるものと考えられる。

PROFILE 山水康平

- 京都大学再生医科学研究所 幹細胞分化制御研究領域／
京都大学IPS細胞研究所 増殖分化機構研究部門
- E-mail : yamamizu@frontier.kyoto-u.ac.jp
- 趣味：スポーツ、音楽鑑賞、宇宙に思いを馳せる

京都大学大学院医学研究科にてES細胞を用いた血管分化・多様化機構の研究で2010年学位取得(医学博士)。現在、日本学術振興会特別研究員(PD)として同研究室にてES細胞の初期分化および血管分化の研究を継続して行っている。

PROFILE 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／
京都大学IPS細胞研究所 増殖分化機構研究部門
- E-mail : juny@frontier.kyoto-u.ac.jp

文献

- 1) Yamamizu K, et al: Blood (2009) 114: 3707-3716
- 2) Yamamizu K, et al: J Cell Biol (2010) 189: 325-338
- 3) Risau W, et al: Nature (1997) 386: 671-674
- 4) Coultas L, et al: Nature (2005) 438: 937-945
- 5) Carmeliet P: Nature (2005) 438: 932-936
- 6) Wang HU, et al: Cell (1998) 93: 741-753
- 7) Alitalo K, et al: Nature (2005) 438: 946-953
- 8) Shalaby F, et al: Nature (1995) 376: 62-66
- 9) Carmeliet P, et al: Nature (1996) 380: 435-439
- 10) Miquerol L, et al: Development (2000) 127: 435-439
- 11) Soker S, et al: Cell (1998) 92: 735-745
- 12) Kawakami A, et al: J Neurobiol (1996) 29: 1-17
- 13) Dunwoodie SL: Dev Cell (2009) 17: 755-773
- 14) Yamashita J, et al: Nature (2000) 408: 92-96
- 15) Cimato T, et al: Circulation (2009) 119: 2170-2178
- 16) Fong GH, et al: Development (1999) 126: 3015-3025
- 17) Carmeliet P, et al: Nature (2005) 436: 193-200
- 18) De Val S, et al: Dev Cell (2009) 16: 180-195
- 19) Lee D, et al: Cell Stem Cell (2008) 2: 497-507
- 20) Donaldson IJ, et al: Hum Mol Genet (2005) 14: 595-601
- 21) De Val S, et al: Cell (2008) 135: 1053-1064
- 22) Xue Y, et al: Hum Mol Genet (1999) 8: 723-730
- 23) Lawson ND, et al: Development (2001) 128: 3675-3683
- 24) Duarte A, et al: Genes Dev (2004) 18: 2474-2478
- 25) Krebs LT, et al: Genes Dev (2004) 18: 2469-2473
- 26) Cattellino A, et al: J Cell Biol (2003) 162: 1111-1122
- 27) Corada M, et al: Dev Cell (2010) 18: 938-949
- 28) You LR, et al: Nature (2005) 435: 98-104
- 29) Herbert SP, et al: Science (2009) 326: 294-298
- 30) le Noble F, et al: Development (2004) 131: 361-375
- 31) Moyon D, et al: Development (2001) 128: 3359-3370

for beginners

- ・「血管研究がわかる」高倉伸幸 編：羊土社 (2004)
- ・「急速進展する血管研究」宮園浩平、佐藤靖史 編：羊土社 (2006)
- ・「心血管ネットワーク形成のダイナミクス」向山洋介 編：羊土社 (2009)

トピックス iPS細胞の発見が 心血管再生医学研究 に与えるインパクト

Impacts of iPS cells on research for cardiovascular regeneration

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
同 iPS細胞研究所増殖分化機構研究部門 准教授

山下 潤
Yamashita, Jun

KEY WORDS

Embryonic stem cells
induced pluripotent stem cells
regeneration
differentiation

はじめに

—iPS細胞誕生の背景

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。1981年にマウスES細胞が樹立されその数年後に胚様体(ES細胞の細胞塊)を用いた心筋分化誘導が報告されている。しかし、ES細胞樹立の生物学における当初の貢献はノックアウトマウスの作製を可能にしたことであり、実際2007年のノーベル賞受賞もノックアウトマウス開発の研究者と共受賞している。ヒトES細胞が1998年に樹立され、その前後での神経幹細胞等種々の幹細胞生物学の発展と相まって、ES細胞の再生医療への応用に期待が高まるようになった。しかし、ヒトES細胞においては、①技術・安全面の問題、特に未分化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。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未受精卵に移植したクローン胚)を作る必要

■ES細胞とiPS細胞はほぼ同様の心血管細胞分化特性を示す。

が考えられる。ということが応用への大きな障壁となっていた。実際ヒト体細胞クローンES細胞の樹立は、当時世界的競争となっており、2005年に韓国黄禹錫(ファン・ウソク)教授にて捏造事件が発覚するに至った。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等)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持たせることに成功した細胞である。最初のiPS細胞は2006年京都大学の山中らによって報告された¹⁾。2007年には山中らおよびトムソンら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、上記の②-i), ii)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上記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・がん化の問題」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。

マウスES/iPS細胞の 心血管細胞分化

筆者らはこれまでマウスおよびヒト

ES/iPS細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究を行ってきた。すなわち、マウス未分化ES細胞からVEGF(血管内皮増殖因子: vascular endothelial growth factor)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ーでもあるFlk1を発現する細胞を誘導し、この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⁶⁾や動静脈リンパ管内皮細胞をES細胞から誘導すること⁶⁾⁷⁾にも成功している。筆者らはいち早くiPS細胞からのこれら心血管細胞の分化誘導に成功した⁸⁾。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、分化効率等はほとんどマウス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あった(図1)。

ヒトES/iPS細胞の心筋細胞分化

ヒトES細胞からの心筋分化誘導は、胚様体を用いた方法やストローマ細胞との共培養(END2細胞)等により報告

されている。胎生期中胚葉誘導シグナルや内皮細胞・心筋細胞誘導シグナルとして報告されている因子をさまざまに組み合わせ分化誘導法の改善が試みられている⁹⁾¹⁰⁾。マウスES細胞に準じた形でヒトFlk1(KDR)陽性細胞やislet1陽性細胞が心血管系の共通の前駆細胞として機能することも示されている¹¹⁾¹²⁾。現在中胚葉系列への特異的誘導と心筋分化シグナルを組み合わせ70~80%の心筋分化誘導効率を達成したヒトES細胞で報告されている(Keller GM, 国際幹細胞学会, 2010)。論文報告上はヒトES細胞1個あたり3個の心筋細胞誘導が最も効率が良いが、現在はさらに効率は上がっていると考えられる。筆者らは、END2細胞を用いたヒトES細胞心筋分化誘導法¹³⁾に準じて培養することにより、機能的ヒト心筋細胞の誘導に成功している。また胚様体(embryoid body)法を用いてヒトiPS細胞から心筋を誘導した報告が2009年2月に最初になされ¹⁴⁾、その後わが国などから胚様体法を用いて薬剤に反応する心筋細胞を誘導したことが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。

iPS細胞研究の臨床への貢献

ES/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

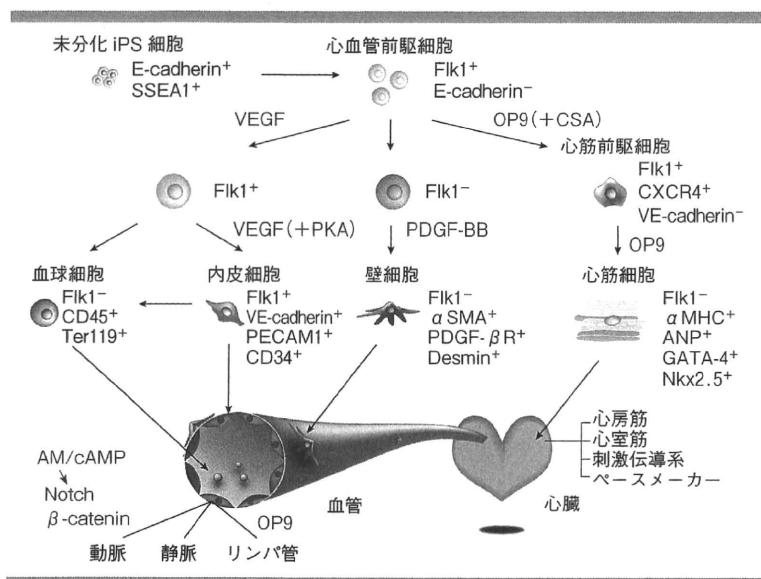


図1 マウスiPS細胞からの系統的心血管細胞分化

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、壁細胞、心筋細胞、さらには動脈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。

(文献8より改変)

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

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等の治療等が細胞治療ターゲットとして想定される。しかし、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おり、そうしたレベルに対応可能な効率の誘導法を開発する必要がある。また、奇形腫形成を避けるため未分化ヒトiPS細胞を厳密に除去できる細胞純化法が必要である。心筋細胞に関しては、ミトコンドリアをラベルする蛍光色素により、iPS細胞由来心筋が純化できることが示されている¹⁷⁾。

②移植用細胞の開発

ヒトに対して細胞を移植するためには、医薬品と同様なGMP基準の品質管理の元に移植用細胞を用意する必要がある。iPS細胞樹立・維持・分化過程から血清やフィーダー細胞等を極力排除する必要がある。またES/iPS細胞由来細胞の移植に関する法や手続き上の体制整備を行うことも不可欠である。

③細胞移植法の開発

最近、単純に心筋細胞懸濁液を作製して心臓に注入するだけでは、細胞が失われたり死滅したりして生着効率が非常に悪いことがコンセンサスとなっておりつつある。ある一定以上の細胞をmassとして移植する必要があると考えられ、主に2つの方法、①東京女子医科大学で開発された細胞シート作製技術を用いた心筋細胞シート移植(心臓に貼り付ける)および②心筋細胞の浮遊培養等により得られる心筋細胞塊の移植が試みられている。現在筆者らはマウスES細胞から誘導した心臓組織シートの開発を行っており、心筋梗塞モデルへの移植により明らかに心機能の改善が認められる予備的結果を得ている。

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、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¹⁸⁾¹⁹⁾。

■iPS細胞研究は疾患特異的モデル細胞を通して新しい病態解明・創薬研究に応用可能である。

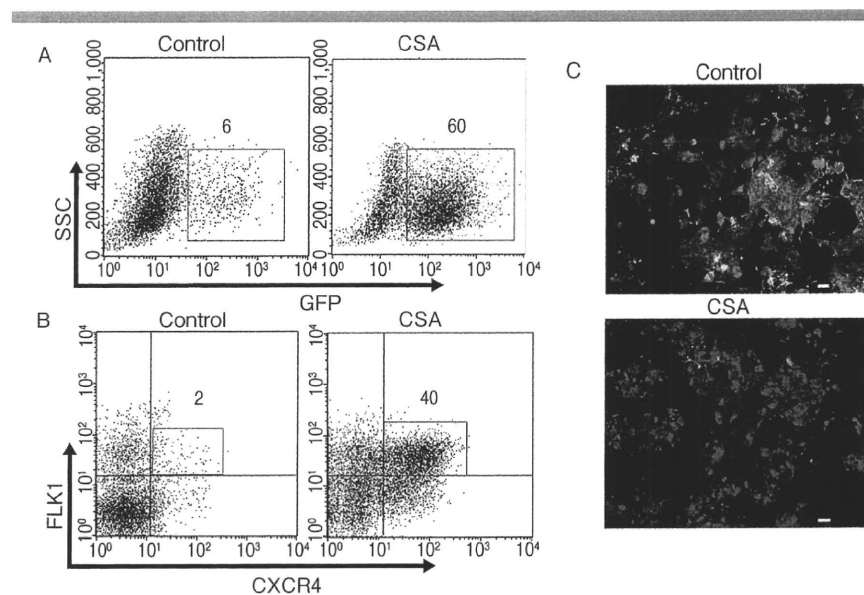


図2 サイクロスポリンA(CSA)による心筋前駆細胞および心筋細胞分化誘導効果

Flk1陽性細胞をOP9細胞上で培養する際にCSAを添加すると、心筋細胞および心筋前駆細胞が著しく増加する。

A, B: FACS解析。

A: 心筋特異的GFP(αMHCプロモーター/GFP)発現。誘導された細胞の約60%がαMHC/GFP陽性の心筋細胞になる。

B: 心筋前駆細胞。Flk1陽性/CXCR4陽性の心筋前駆細胞分画²⁾が約20倍増加する。

C: 免疫染色。CD31(赤; 内皮細胞)/cTnT(緑; 心筋細胞)2重染色。CSAにより内皮細胞の出現が抑制され、対照的に心筋細胞が著しく増加する。

(文献20より改変)

①病態解明

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研究が⁸⁾、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等を、実際の症例に関して繰り返し行うことが可能となる。しかし実際には、モデル細胞を樹立するために多数のiPS細胞を樹立・解析する必要があること、

そのようにして構築したモデル細胞が遺伝子異常や病態を反映した振る舞いを示すかどうかは不明であること、等未知数の部分も多い。

②創薬応用

iPS細胞の創薬応用には大きく、1) 新規薬剤の探索と2) 薬剤安全性試験への応用の2つが考えられる。1) 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。筆者らは最近、免疫抑制剤サイクロスポリンAが中胚葉段階に特異的に作用し強力な心筋前駆細胞および心筋細胞分化誘導作用を有することを見出した(図2)²⁰⁾。筆者らはさらに種々の化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、心筋分化促進作用を有する化合物や心筋の分裂増殖を促進する物質等種々の化合物の同定に成功している

(未発表)。

2) 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等を事前に検出できるかも知れない。さらには副作用を起こす症例に投薬を避ける「テーラーメイド医療」に貢献しうる可能性もある。また、特定の副作用のモニターにもモデル細胞は応用可能である。たとえば、薬剤性QT延長は、現在HERG試験と呼ばれるHERGチャネルを過剰発現させた細胞株(HEK293細胞等)に薬剤を添加することによりチェックされている。しかし、HERG試験ではQT延長が認められなかったにもかかわらず、生体への投与においてはQT延長を来す偽陰性の薬剤(ソタロール等)の存在が問題であった。ヒトES/iPS細胞から誘導した心筋細胞を用いた場合、このような偽陰性薬剤でもQT延長を検出できることが示されており²¹⁾、生体内の反応をより忠実に反映するモデル細胞として利用できることが期待されている。

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が数多くある(高血圧自然発症ラット、糖尿病モデルラット、

心筋症ハムスター等)。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。

おわりに

iPS細胞が樹立されてから、マウスでは4年、ヒトでは3年近い年月が経ち、iPS細胞樹立の技術を応用した新しい研究が急速に進みつつある。たとえば、iPS細胞は、樹立に使われたもとの細胞の性質をある程度保持しており、もとの細胞に分化しやすい傾向があるようである。すなわち、血球細胞から誘導されたiPS細胞は血球細胞に分化しやすい傾向がある²²⁾⁻²⁴⁾。心筋細胞から誘導したiPS細胞は、よりよく心筋細胞に分化するかも知れない。さらに最近、iPS細胞樹立の技術を応用して、3個の転写因子を線維芽細胞に導入することにより直接神経細胞(iN細胞)に形質転換できることが報告された²⁵⁾。当然、線維芽細胞から直接心筋細胞を誘導する、ということが期待されるが、早速線維芽細胞に特定の3個の転写因子(Gata4, Mef2C, Tbx5)を導入することにより心筋細胞が誘導しうることが明らかにされた²⁶⁾。今後これらの研究をベースに細胞の直接的形質転換(direct conversion)に関

しても研究が急速に進むと考えられる。

このようにiPS細胞研究は、さまざまな方向に急速な広がりを見せており、予想もしなかった形で再生医療や広く医学全体に貢献することになるかも知れない。

●文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126 : 663-676, 2006
- 2) 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
- 3) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318 : 1917-1920, 2007
- 4) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al : Flkl positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature 408 : 92-96, 2000
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) Zhu WZ, Xie Y, Moyes KW, et al : Neuregulin/ErbBSignalingRegulates Cardiac Subtype Specification in Differentiating Human Embryonic Stem Cells. *Circ Res*. 2010 Jul 29. [Epub ahead of print]
- 11) Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al : Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453 : 524-528, 2008
- 12) Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, et al : Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature* 460 : 113-117, 2009
- 13) 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
- 14) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104 : e30-41, 2009
- 15) 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
- 16) Yokoo N, Baba S, Kaichi S, et al : The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 387 : 482-488, 2009
- 17) Hattori F, Chen H, Yamashita H, et al : Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 7 : 61-66, 2010
- 18) Yamanaka S : Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1 : 39-49, 2007
- 19) 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
- 20) 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
- 21) Asai Y, Tada M, Otsuji TG, et al : Combination of functional cardiomyocytes derived from human stem cells and a highly-efficient microelectrode array system : an ideal hybrid model assay for drug development. *Curr Stem Cell Res Ther* 5 : 227-232, 2010
- 22) Watarai H, Fujii S, Yamada D, et al : Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest* 120 : 2610-2618, 2010
- 23) Kim K, Doi A, Wen B, et al : Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010 Jul 19. [Epub ahead of print]
- 24) Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al : Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2010 Jul 19. [Epub ahead of print]
- 25) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al : Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463 : 1035-1041, 2010
- 26) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al : Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142 : 375-386, 2010

1. 血管内皮細胞の発生・分化 —血管多様性研究のプロローグ—

山下 潤

単に血液や酸素などを運ぶ管と考えられてきた血管は、発生過程、臓器形成、病態形成過程等それぞれにおいて多彩な特徴や役割—血管多様性 (vasculodiversity)—を有している。血管内皮細胞は、さまざまな血管機能や血管多様性の形成に中心的役割を果たしており、その分化多様化の過程に関する研究は近年、幹細胞・前駆細胞研究等により急速に発展してきた。しかし内皮細胞の起源や分化経路は一様ではなく、より複雑な姿を示しつつある。本稿では、血管内皮細胞分化機構に関する最近の知見について概説する。

はじめに

全身にくまなく張り巡らされた血管は、「生命を運ぶ臓器」とも言われ、ヒトの生老病死のすべての過程に深く関与している。胎生期における血管形成不全の多くは胎生致死である。臓器形成においても血管形成が不可欠である。日本人の死因の第2位と3位を占める心疾患と脳血管障害はその多くは動脈硬化症など血管の老化に起因している。メタボリック症候群の発症・進展にも血管新生が深くかかわっている。日本人の死因第1位はがんであるが、がんの進展、予後を大きく左右する血行性およびリンパ行性転移は、血管・リン

パ管新生がその中心的役割を果たしている。単に血液や酸素、種々の因子などを運ぶ管と考えられてきた血管は、さまざまな形で周囲の組織と相互作用しあい、発生過程、臓器形成、病態形成過程等それぞれにおいて多彩な特徴や役割を有している。すなわち血管には、非常に大きな「血管多様性 (vasculodiversity)」が存在し、それぞれの局面において固有の機能を果たしていることが明らかになってきた。

血管は、内腔を一層に覆う内皮細胞とそれを外側から取り巻き、血管構造の支持や収縮・弛緩などの機能を負っている壁細胞 (毛細血管におけるペリサイトと動静脈における血管平滑筋細胞を指す) の2種類の細胞からなる。これら血管構成細胞は、中を流れる血球細胞をはじめとしてさまざまな細胞・組織と相互作用し最終的な臓器機能の発現に寄与している。その中で血管内皮細胞は、種々の物質を運ぶ管をつくるというだけでなく、さまざまな血管機能や血管多様性の形成においても中心的役割を果たしている。その分化・発生・新生の過程に関する研究は、近年のノックアウト

【キーワード&略語】

血管多様性, 前駆細胞, 動静脈分化, ES細胞

Alk1/ACVRL: Activin receptor-like kinase

EndMT: endothelial-mesenchymal transition

PKA: Protein kinase A

shh: sonic hedgehog

VEGF: vascular endothelial growth factor

Differentiation of vascular endothelial cells—a prologue for vasculodiversity

Jun K. Yamashita: Laboratory of Stem Cell Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences/Department of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University (京都大学再生医科学研究所幹細胞分化制御研究領域/京都大学iPS細胞研究所増殖分化機構研究部門)

マウスを用いた検討や幹細胞・前駆細胞^{*1}の研究により急速に発展してきた。動脈・静脈・リンパ管をはじめとしたさまざまな血管の多様性獲得機構に関しても分子生物学的解析が加えられるようになってきた。こうした血管の発生・新生のメカニズム、特に内皮細胞分化・多様化機構に対する理解は、さまざまな分子・細胞をターゲットとした新たな病態解析や治療法開拓の可能性を提供する。本稿では、血管、特に内皮細胞の分化多様化機構について、これまでの知見および最近のわれわれのデータをもとに概説する。

1 血管の発生過程

血管の発生は、前駆細胞/幹細胞からの血管構成細胞の分化、初期血管の形成、成熟血管の形成・血管リモデリング、動静脈分化^{*2}をはじめとする血管の多様化などの過程が、周囲組織を含めた複雑な相互連関の中で同時並行的に進行すると考えられる(図1)。

血球血管芽細胞(ヘマンジオブラスト:hemangioblast)または血管芽細胞(アンジオブラスト:angioblast)とよばれる前駆細胞は、主に中胚葉細胞から分化すると考えられているが、これが最も早期の血管発生イベントとして捉えられている。この前駆細胞は互いに融合し原始血管叢を形成する。この過程が脈管形成(vasculogenesis)とよばれている。卵黄嚢においては、ヘマンジオブラストが血島(blood island)とよばれる細胞の集簇を形成した後、辺縁部の細胞は内皮細胞に分化し、中心部の細胞は血球細胞に分化すると推定されている。胎仔においては、アンジオブラストは中胚葉領域から全身の間葉組織に広がり、胎仔背側大動脈と総主静脈は、これらアンジオブラストの集簇により直接形成されると考えられている。その後、既存血管の内皮細胞が血管新生刺激に反応して新たな

管腔形成を行い(angiotogenesis), 大小血管からなるvascular treeの形成(リモデリング), 基底膜の形成, 壁細胞による内皮細胞周囲の裏打ち構造の形成(血管成熟)により新生血管が完成される^{1)~3)}。従来動脈・静脈の区別は、心拍と血流の開始後に主に物理力によって誘導されると考えられてきたが、ephrinB2遺伝子欠損マウスの解析により、原始血管叢形成の時点ですでに遺伝子的区別がなされていることが明らかとなった。ニワトリ胎仔の血島においては、将来的に動脈および静脈に特異的発現を示すneuropilin(NRP)1と2がそれぞれ異なる細胞分画に発現していることが示されており、動静脈の運命決定は血流が生じるよりも早い段階で遺伝的に決定されているかもしれない²⁾。しかし、形態的变化を含むその後の動静脈分化には血流による物理的刺激もやはり重要な役割を果たしていると考えられる。動静脈に加えてもう1つの主要な脈管系であるリンパ管は、マウスでは胎生10.5日頃より静脈から萌出して形成されると考えられている⁴⁾。ほぼ体内のすべての組織臓器に存在する血管は、それぞれの位置する周囲組織との相互作用の中で、さらにさまざまな特異性を獲得し多様化していくものと考えられる。

このように血管発生には、数々の組織・細胞・分子レベルの事象が関与しており、これら多段階のプロセスが正しく組み合わせられ遂行されることによって初めて正常な血管の形成が達成される。

2 血管内皮細胞の起源と分化

前述のように血管内皮前駆細胞は中胚葉に由来すると考えられている。Flk1[2型VEGF(vascular endothelial growth factor)受容体:VEGF-R2]は、VEGF受容体であること、他の内皮マーカーであるflt-1(VEGF-R1), Tie-2, VE-カドヘリン(vascular endothelial cadherin)などより早期から発現が認められ、側板中胚葉に発現してから内皮細胞に局限していくこと、ノックアウトマウスでは血島の形成不全により、血球・内皮がともに分化しないこと等が示され、内皮細胞の分化過程における最も早期のマーカーと考えられている。Flk1陽性細胞は、VE-カドヘリン, CD31, CD34などの内皮細胞マーカーを順次発現しながら動静脈分化など多様化も同時に行い、次第に成熟

※1 前駆細胞

分化した細胞をつくりだし臓器組織の発生再生に貢献しうる細胞で自己増殖能は証明されていないもの。自己増殖能を有するものは幹細胞。

※2 動静脈分化

血管がその発生過程において動脈・静脈それぞれの特性を備えた血管に多様化していくこと。最近、血流による物理力が働くよりも以前に遺伝的に運命決定がなされていることが明らかとなった。

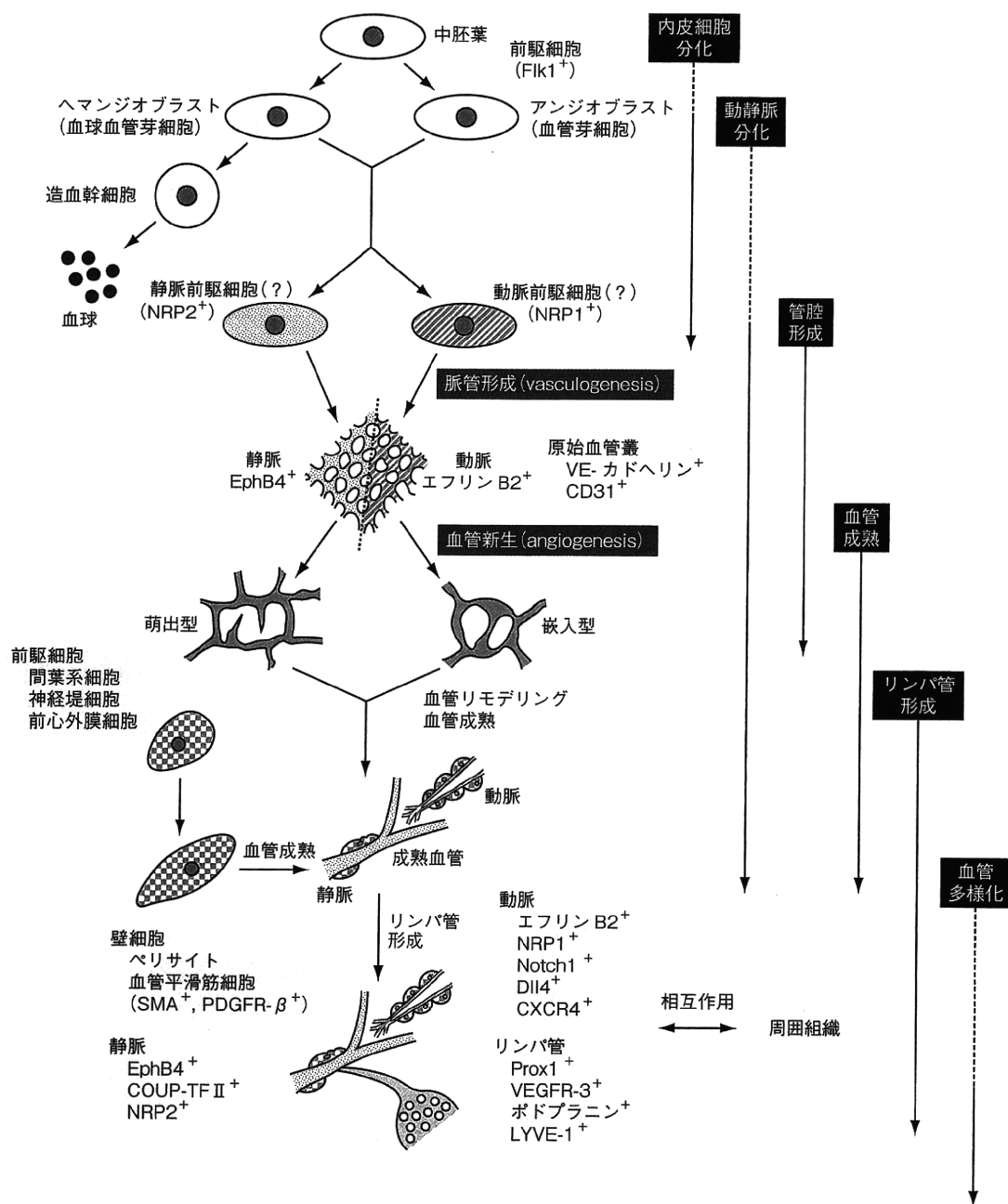


図1 血管の発生過程

中胚葉におけるFlk1陽性細胞（血球血管芽細胞・血管前駆細胞）の出現→（動静脈）前駆細胞による原始血管叢の形成（vasculogenesis）→既存血管からの血管新生（angiogenesis）→壁細胞による裏打ち構造の形成（血管成熟・リモデリング）→静脈からのリンパ管萌出→血管の多様化（文献1より改変）

した細胞に向かうと考えられる。Flk1は胎生早期の多能性血管芽細胞（mesoangioblast）および成体由来多能性幹細胞にも発現が認められる。またFlk1陽性細胞

は、血球・血管（内皮および壁細胞）・心筋細胞等に分化可能であること⁵⁾⁶⁾などより、Flk1陽性細胞は多能性中胚葉前駆細胞とも考えられる。しかし一方、ニ

ワトリー-ウズラのキメラ実験を中心に、血管や血球、心筋への運命決定は中胚葉レベルの段階で決定しているとの報告もあり、今なおFlk1陽性細胞をはじめとする血管細胞の起源および分化プロセスについては不明な点も多い。最近、中胚葉からFlk1の発現に至る過程において、Etsファミリー転写因子であるEtv2とフォークヘッドファミリーのFoxc2が協調的に作用し、内皮細胞系列への運命決定を行っていることが報告された⁷⁾。Fox:Etsモチーフと名付けられた近接したFoxc2とEtv2結合配列は、Flk1、Tie-2、Tall1、Notch4、VE-カドヘリンなど血管内皮分化に関与する遺伝子群に認められ、また同モチーフを含むLacZトランスジェンは血管内皮特異的発現を示すことから、Foxc2およびEtv2が内皮細胞分化の中心的役割を果たしている可能性が示唆される⁸⁾。

われわれはマウスES細胞を用いて、心血管細胞の分化および血管形成の初期過程を培養下に再現できる新しい分化誘導系を構築し、新たな視点から血管分化発生機構の解析を行ってきた。すなわち、ES細胞由来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、Flk1陽性細胞から内皮細胞および壁細胞の双方が分化誘導できること、およびFlk1陽性細胞から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（図2）⁹⁾。Flk1陽性の血管前駆細胞は、VEGFの刺激により内皮細胞に、主にPDGF-BB（血小板由来増殖因子）により壁細胞に分化すると考えられる。また、血流による物理的刺激であるshearストレスや拍動性進展刺激がFlk1陽性細胞からの内皮細胞分化や壁細胞分化を誘導することも明らかにされている。われわれはさらにVEGFに加えてサイクリックAMP（cAMP）シグナルを同時に活性化するとFlk1陽性細胞からの内皮細胞分化が促進されることを見出していたが¹⁰⁾、最近さらにその下流シグナルを解析し、Protein kinase A（PKA）がFlk1陽性細胞においてFlk1およびNRP1の発現を亢進させることを見出した¹¹⁾。発現増加したFlk1およびNRP1は、VEGF₁₆₅と複合体を形成し、VEGFのシグナルを増強することにより、従来の10倍以上低濃度のVEGFにより内皮細胞の誘導が認められた。すなわちPKAが、「前駆細胞の感受性を変化させることにより内皮細胞系列

への分化を促進する」という新しい作用を有することを明らかにした。現在PKAによるFlk1、NRP1の発現制御機構やFoxc2、Etv2との連関を通してさらに内皮細胞分化メカニズムの解析を進めている。

③ 血管内皮の多様化と成熟化

1) 動静脈リンパ管分化

1998年、主に神経系の分化に関与すると考えられていた膜型リガンド^① ephrinB2とそのチロシンキナーゼ型受容体であるEphB4が、それぞれ動脈内皮、静脈内皮細胞に特異的に発現し、両者を区別するマーカーとして初めて同定され注目を集めた。その後、動脈内皮特異的マーカーが数々報告され、Bmx、Delta-like 4（Dll4）、Activin receptor-like kinase（Alk1/ACVRL）、Notch1、4、neuropilin-1、Connexin 37、40、CD44、CXCR4¹⁰⁾、ゼブラフィッシュではgridlock（HRT2/Hey1）などが動脈内皮マーカーとされている。ゼブラフィッシュにおける解析では、VEGFがNotch1やephrinB2の発現に重要であることや、gridlockがNotch下流で作用していること、さらにはsonic hedgehog（shh）がVEGF発現を誘導することなどが報告され、shh→VEGF→Notch→gridlock→ephrinB2というような動脈発生におけるシグナルが想定されている¹²⁾。最近では、NotchリガンドDll4のヘテロノックアウトマウスやNotchシグナルにおける重要な転写分子であるRBP-Jのノックアウトマウスで動脈分化が異常になっていることが報告され、哺乳動物における動脈分化においてもNotchシグナルの重要性が示唆されている。

われわれはES細胞由来Flk1陽性細胞からの動静脈内皮分化を試み、VEGF（および血清）のみの添加ではephrinB2陰性の静脈内皮細胞が、VEGFに加えてcAMPシグナルを同時に活性化するとephrinB2陽性の動脈内皮細胞がそれぞれ誘導されることを見出した¹⁰⁾。しかし本実験系では、Notchシグナルの活性化のみでは動脈内皮の誘導には不十分であり、Notch以外のシグナルも動脈内皮分化へ関与していることが示唆された。そこで動脈内皮誘導におけるcAMPシグナルの意義をさらに解析し、cAMPの下流でPI3キナーゼの活性化を介してNotchおよび β -cateninシグナルが同時に活性化され、これら2つのシグナル—Notch細

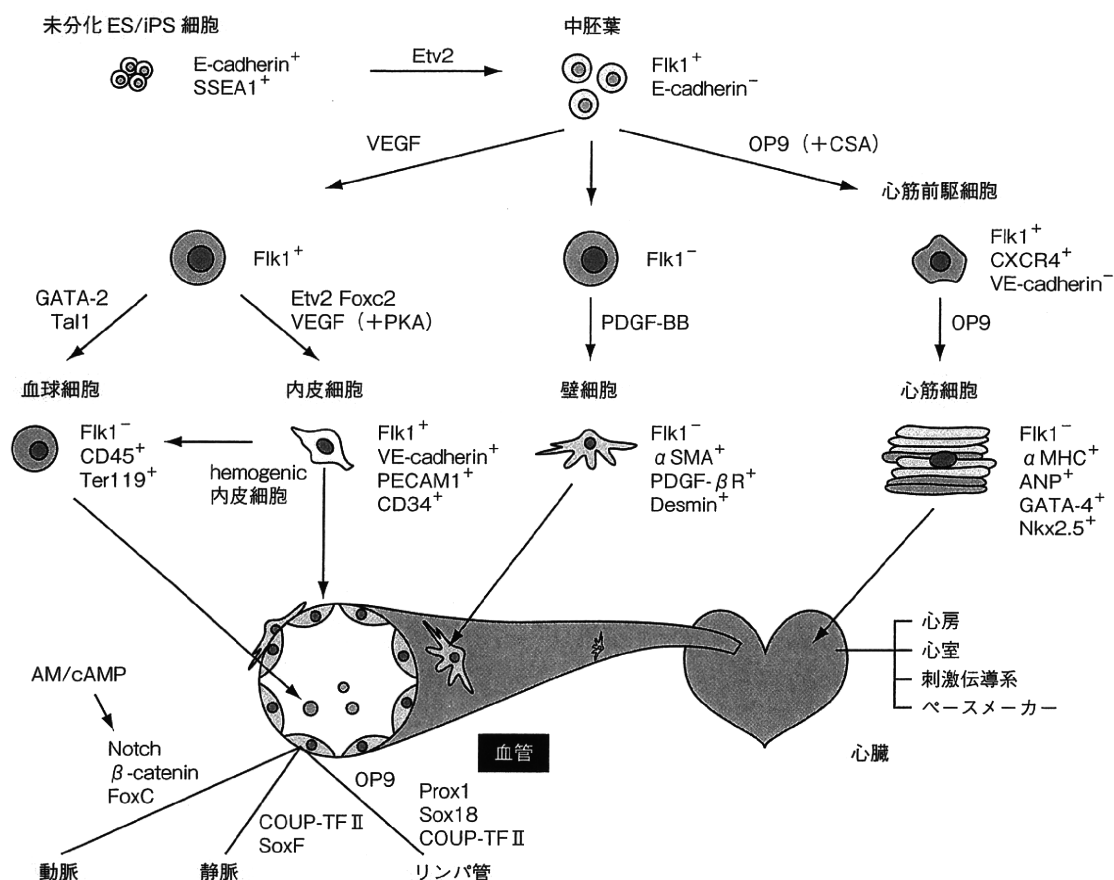


図2 Flk1 陽性細胞からの段階的心血管細胞の分化

ES細胞由来 Flk1 陽性細胞は、そこからすべての心血管構成細胞（内皮細胞、壁細胞、血球細胞、心筋細胞）が分化することのできる前駆細胞と考えられる。Flk1 陽性細胞から分化した内皮細胞は、一時的に血球形成能を有する時期（hemogenic 内皮）があるが、その後内皮細胞が成熟するに従って血球形成能は失われる。内皮細胞は成熟するとともに多様化も同時に行い、動脈、静脈、リンパ管内皮をはじめとしたさまざまな内皮細胞に分化すると考えられる。VEGF が Flk1 に結合することによるシグナルが不十分であると Flk1 の発現は失われ、主に PDGF-BB の作用により壁細胞が誘導される。これら誘導された血管構成細胞は、*in vitro* および *in vivo* において血管構造を形成できる（文献 6, 9 より改変）

胞内ドメインと β -catenin が ephrinB2 をはじめとするさまざまな動脈内皮特異的遺伝子上で複合体を形成し、動脈内皮誘導に働いていることを見出した¹³⁾。Notch と β -catenin シグナルの同時活性化により cAMP の作用は完全に再構築され、cAMP 非存在下でも cAMP 添加時と同等の動脈内皮細胞が誘導された。Notch シグナルと β -catenin シグナルが物理的に合流した β -catenin と Notch 細胞内ドメイン（およびその結合タンパク質である RBP-J）からなる複合体が動脈内皮誘導の核（動脈内皮複合体：arterial complex）

となる可能性を示した（図 3）。このように「種々の構成要素を組み合わせることにより細胞分化を培養下に構成的に再現する」という新しいアプローチ—構成的発生生物学（Constructive developmental biology）的アプローチにより¹²⁾、従来の遺伝子改変動物モデルでは示すことが困難であった形で細胞分化機構を示すことに成功した。

一方静脈は、血管内皮分化においてはデフォルト経路と考えられ、静脈特異的誘導シグナルは知られていなかったが、核内受容体 COUP-TFII が NRP1 の発現