

図3 Notch-β-catenin シグナルによる動脈内皮誘導機構

cAMPの下流でPI3キナーゼを介してNotchとβ-cateninが同時に活性化され、Notch細胞内ドメインとβ-cateninが核内に移行し、動脈特異的の遺伝子上でRBP-Jとタンパク質複合体を形成し (arterial complex)、種々の動脈遺伝子の発現と動脈内皮化を誘導する (文献13より改変)

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、動脈内皮分化がそれぞれ特異的シグナルにより担われている可能性が示唆された<sup>14)</sup>。リンパ管は静脈からの出芽により形成されると考えられているもう1つの脈管系である。ホ

メオボックス遺伝子のprox1は、内皮細胞のリンパ管内皮への分化に関し中心的役割を果たしていると考えられている。すなわち、胎生8.5日頃の静脈内皮は、VEGF-R3およびLYVE-1を発現し、リンパ管分化刺激に対応できる状況になっている (Lymphatic com-

petence). 胎生10日前後になると、静脈内皮のうち一部がprox1陽性となり、リンパ管内皮へのコミットメントが始まる(Lymphatic bias). そしてprox1陽性細胞は静脈から萌出、遊走するとともにリンパ管を形成する(Lymphatic specification).

最近動静脈分化に関しての異なるモデル、すなわち、血管ははじ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<sup>15)</sup>. このように動静脈リンパ管内皮分化機構に関してはいまだ不明な点も多い(動静脈リンパ管発生に関する詳細は別稿に譲る).

## 2) hemogenic (血球形成性) 内皮細胞

血管の中を流れる血球細胞は、その起源や分化過程が内皮細胞と深く関連し、「血球がどこからやってくるのか」というのは血液学界で長く論争的であった。最近、造血幹細胞が血管内皮細胞から生まれる、ということがいくつかのモデルを用いて相次いで報告された<sup>16)~19)</sup>. この「血球を生み出す内皮細胞—hemogenic endothelial cells—」の存在は古くから知られ、マウス胎仔では胎生10.5日背側大動脈の腹側に一過性に認められる。ES細胞分化系においては、ES細胞分化5日目の内皮細胞の中で、Flk1プロモーター/エンハンサー—GFP [Flk (e/p) GFP] 遺伝子陰性かつVE-カドヘリン陽性の内皮細胞として一過性に認められる<sup>20)</sup>. その後約1日でFlk (e/p) GFPは陽性となり血球形成性も失われる。

このように内皮細胞分化・多様化・成熟化は、時間的空間的制御のもと、同時並行的に行われていると考えられる。動静脈リンパ管内皮細胞、原始内皮細胞、hemogenic内皮細胞等々さまざまな内皮細胞の個々の解析と相互の位置づけ、還元的解析と組織・システムとしての解析を組み合わせることにより、その全体像を把握していく努力が必要であると考えられる。

## 4 その他

### 1) 種差

現在血管発生の研究には主にマウス動物モデル(遺伝子改変動物、網膜血管新生モデル等)、ES細胞モデル、その他培養内皮細胞、ゼブラフィッシュ、ニワト

り漿尿膜(chorioallantoic membrane)モデルなどが使われている。しかし、血管発生・新生の様式や内皮多様性に関してはさまざまな種差が存在する可能性がある。例えば、hemogenic内皮細胞に関して、マウスにおいては背側大動脈腹側に認められ、内皮細胞から生まれた血球細胞は大動脈内腔に放出される。一方ゼブラフィッシュでは、背側大動脈腹側の内皮から血球が産生されるのは同じであるが、生まれた血球は大動脈から間質へ移動し静脈(cardinal vein)に入り、静脈を流れて流れる<sup>17)18)</sup>. また、ゼブラフィッシュにおいてはPI3キナーゼは静脈内皮分化に関与しており、PI3キナーゼ阻害剤投与により静脈形成が阻害される<sup>21)</sup>. 一方、マウスES細胞系においては、PI3キナーゼは動脈内皮細胞分化に関与しており、PI3キナーゼ阻害剤は動脈内皮分化を阻害する<sup>13)</sup>. このように動静脈の位置づけなど種差に注意しながら議論する必要があると考えられる。

### 2) 可塑性(plasticity)

細胞分化は、幹細胞や前駆細胞がさまざまな外的シグナルを受け取り、それに応じて遺伝子発現パターンやクロマチン構造などを変化させ、細胞内部の分子的平衡を別の状態に移動させて安定した運命として決定する現象と考えられる。この決定の変更が可塑性に当たると考えられるが、内皮細胞もその分化過程においてさまざまな可塑性を有していることが報告されている。内皮細胞が血管平滑筋細胞になりうるのではないかと、以前より培養内皮細胞や胎仔モデルを用いて示されている。ES細胞分化系においては、Flk1陽性前駆細胞の段階では少なくとも内皮細胞・壁細胞双方への運命決定の道が開かれており、十分なVEGFシグナルを受けたときには内皮細胞に、不十分であったときには壁細胞になると考えられる<sup>9)</sup>. それぞれ内皮細胞・壁細胞のマーカーを発現した後は、壁細胞から内皮細胞が出現することは全く観察されなくなり、この段階で内皮-壁細胞間の可塑性は著しく小さくなると考えられる。最近、心臓の線維化やがんの進展過程において内皮細胞が間質細胞に転換し(EndMT: endothelial-mesenchymal transition)、線維芽細胞のソースとなることが報告された。ES細胞由来内皮細胞においては、TGF- $\beta$ シグナルによってEndMTが誘導されることが観察されている<sup>22)</sup>. 一方、

動静脈間の可塑性に関しては、内皮細胞分化後しばらくは保たれているようであり、ES細胞から誘導した動脈・静脈それぞれの内皮細胞を培養3日後に静脈条件・動脈条件を逆に変更すると、動脈内皮細胞からは動脈マーカーの消失が、静脈内皮細胞においては動脈マーカーの発現が認められるようになる<sup>13)</sup>。現在こうした可塑性を構成する分子的本体についてエピジェネティックな制御を中心に解析を試みている。

## おわりに

現在明らかになっている血管発生や動静脈分化などの多様化過程は基本的なプロトタイプとも言うべきものに過ぎず、時間空間、種、臓器組織、病態などさまざまなパラメーターに依存して非常に大きな多様性が血管には存在すると考えられる。今後内皮細胞の分化や血管の発生・再生に関する研究は、さまざまな血管多様性に言及していくことが必要となるであろう。内皮細胞の起源や分化経路、血管構造の形成過程などはすべて一様ではなく、multi-origin, multi-pathway, heterogeneousであると考えべきである。はじめに述べたように血管はヒトの生老病死すべてに深くかかわっているが、そのかかわり方はsituation-dependentであり、血管の生物学・病態生理学の知見を臨床へと応用しようとする場合には、対象とする臓器組織、病態特異的な状況を解析し理解する必要があるだろう。ゼブラフィッシュで起こっていることは必ずしもマウスやヒトには当てはまらない。同様に、胎仔で起こっていることは成体には当てはまらない。肝臓で起こっていることは脳には当てはまらないし、虚血心で起こっていることはがんには当てはまらない。こうした可能性を常に念頭においておくべきである。これら血管多様性を正確に解析し理解することは、困難ではあるがしかし、臓器組織や病態に対して特異性が非常に高い全く新しい診断・治療法を切り開く可能性がある。血

管は生命現象を広く理解し操作するためのgatewayでもある。

## 文献

- 1) Risau, W. : Nature, 386 : 671-674, 1997
- 2) Coultas, L. et al. : Nature, 438 : 937-945, 2005
- 3) Carmeliet, P. : Nature, 438 : 932-936, 2005
- 4) Alitalo, K. et al. : Nature, 438 : 946-953, 2005
- 5) Carmeliet, P. : Nat. Med., 6 : 389-395, 2000
- 6) Yamashita, J. K. et al. : FASEB J., 19 : 1534-1536, 2005
- 7) De Val, S. et al. : Cell, 135 : 1053-1064, 2008
- 8) De Val, S. & Black, B. L. : Dev. Cell, 16 : 180-195, 2009
- 9) Yamashita, J. et al. : Nature, 408 : 92-96, 2000
- 10) Yurugi-Kobayashi, T. et al. : Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 26 : 1977-1984, 2006
- 11) Yamamizu, K. et al. : Blood, 114 : 3707-3716, 2009
- 12) Yamashita, J. K. : Trends Cardiovasc. Med., 17 : 59-63, 2007
- 13) Yamamizu, K. et al. : J. Cell Biol., 189 : 325-338, 2010
- 14) You, L. R. et al. : Nature, 435 : 98-104, 2005
- 15) Herbert, S. P. et al. : Science, 326 : 294-298, 2009
- 16) Eilken, H. M. et al. : Nature, 457 : 896-900, 2009
- 17) Julien, Y. et al. : Nature, 464 : 108-111, 2010
- 18) Kissa, K. & Herbomel, P. : Nature, 464 : 112-115, 2010
- 19) Boisset, J. C. et al. : Nature, 464 : 116-120, 2010
- 20) Yamashita, J. K. : A linkage in the developmental pathway of vascular and hematopoietic cells. In Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008 (Tanaka, K. & David, E. W. eds.) p363-373, Springer, 2008
- 21) Hong, C. C. et al. : Curr. Biol., 16 : 1366-1372, 2006
- 22) Kokudo, T. et al. : J. Cell Sci., 121 : 3317-3324, 2008

## <著者プロフィール>

山下 潤 : 1990年京都大学医学部卒業, '98年京都大学医学博士, 2000年京都大学大学院医学研究科分子遺伝学・助手, '02年同・助教授, '03年より現職にて独立. '08年よりiPS細胞研究センター(現・研究所)准教授(兼任). 専門: 幹細胞生物学, 心血管発生・再生, 研究テーマ: ES細胞/iPS細胞を用いた心血管分化機構の解析と医療応用.  
E-mail : juny@frontier.kyoto-u.ac.jp  
URL : <http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/es02/index.htm>

# iPS 細胞の展望

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  
京都大学 iPS 細胞研究所増殖分化機構研究部門准教授

山下 潤

## Summary

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、線維芽細胞などの分化した細胞から誘導された ES 細胞様の新しい幹細胞である。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を回避できる画期的発明であるが、奇形腫形成や iPS 細胞特有の「遺伝子導入による細胞変異・がん化の問題」など今後地道に解決すべき課題は多い。マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞、ヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有しており、ES 細胞で培われた技術を導入することにより心血管系細胞を分化誘導することが可能であった。iPS 細胞研究の循環器疾患への応用としては、心筋細胞シートや心筋ボールなどの移植技術を用いた細胞移植治療が主たるターゲットと考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築などにより、病態解明や創薬治療応用などさまざまななかたちで臨床へ貢献することが期待される。また最近、iPS 細胞のさまざまな新しい性質や iPS 細胞樹立の技術を活かした分化細胞からほかの分化細胞への直接的な細胞の形質変換などが明らかとなり、iPS 細胞研究はさまざまな新しい広がりを見せている。

..... KEY WORDS .....  
embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, regeneration, differentiation

## はじめに：iPS 細胞登場の背景と意義

ES細胞(胚性幹細胞：embryonic stem cells)は、マウスやヒトの早期胚(胚盤胞：blastocyst)の段階において、将来胎仔を形成する内細胞塊と呼ばれる部位を取り出して樹立した細胞株であり、体中すべての種類の細胞に分化することのできるいわゆる万能の幹細胞と考えられている。マウスES細胞の樹立は1981年、ヒトES細胞は1998年に樹立され、再生医療への応用に期待が寄せられた。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、①ヒトES細胞の樹立の際にヒト受精卵を壊す必要がある、②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)を作る必要が考えられる、ということが実際の応用への大きな障壁になっていた。こうした状況を背景に生まれてきた新しい幹細胞がiPS細胞(人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells)である。

iPS細胞は、線維芽細胞など分化した細胞に特定の遺伝子群(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-mycなど)を導入することにより、ES細胞様の万能の幹細胞の性質をもたせることに成功した細胞である。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<sup>1)</sup>。2007年には山中らおよびThomsonら<sup>2,3)</sup>、その後さらに多くのほか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)-①、②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。

## 1 マウス 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でもあるFlk1(2型VEGF受容体: VEGF receptor-2)を発現する細胞を誘導し、Flk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞、血管壁細胞、血球細胞、心筋細胞といった循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功している<sup>4,5)</sup>。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<sup>6)</sup>や動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれES細胞から誘導すること<sup>6,7)</sup>にも成功している。ヒトES細胞からの血管細胞の誘導や虚血モデルへの移植実験などにも関与している(京都大学内分泌代謝内科との共同研究)。このマウスES細胞の系統的な心血管細胞分化システムをマウスiPS細胞に導入し、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<sup>8)</sup>。すなわち、未分化マウスiPS細胞をLIF(leukemia inhibitory factor)非存在下に培養することによりFlk1陽性細胞が誘導された。Flk1陽性細胞をVEGFおよび血清存在下に培養することによりおもに静脈を中心とする内皮細胞および壁細胞が、VEGFに加えてcAMPシグナルを刺激することにより動脈内皮細胞が、OP9

ストローマ細胞上で培養することにより血球、リンパ管内皮細胞、心筋細胞が、それぞれ誘導された。誘導された心筋細胞は、種々の心筋細胞マーカー発現やsarcomere構造、心筋様活動電位などの心筋細胞としての特性を示した。またペースメーカー細胞特異的イオンチャンネルHCN4、T型Caチャンネル(Cav3.2)や心室筋特異的チャンネルKir2.1を発現する細胞などが存在し、種々の心筋細胞が混在して誘導されていると考えられた。マウスiPS細胞からのFlk1陽性細胞、(動静脈リンパ管)内皮細胞、壁細胞の分化様式、分化効率などはほとんどマウスES細胞と変わりがなかった。このように、マウスES細胞とマウスiPS細胞はほぼ完全に同等な心血管分化能と分化動態を示し、マウスES細胞と同様に系統的に心血管細胞を分化誘導することが可能であった(図1)。ほかにマウスiPS細胞からの心血管細胞分化に関しては、心筋細胞を誘導したとの報告<sup>9)</sup>および筆者らに類似した分化システムを用いた心血管細胞分化の報告<sup>10)</sup>などがある。

## 2 ヒト iPS 細胞の心血管細胞分化

筆者らはヒトiPS細胞の心血管細胞分化にも取り組んでいる。ヒトES細胞の維持培養条件に準じた環境で誘導・樹立されたヒトiPS細胞は、その維持および分化誘導においてもヒトES細胞に類似した動態を示した。筆者らは、ヒトES細胞において報告されている心筋分化誘導法<sup>11)</sup>に準じて培養することにより、自己拍動する心筋細胞コロニーの誘導にすでに成功している。心筋に特徴的なsarcomereの形成や自己拍動に同調したCa<sup>2+</sup>の取り込みなど形態的機能的特性も確認している(未発表)。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<sup>12)</sup>、その後日本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<sup>12-14)</sup>。マウスES細胞とマウスiPS細胞、ヒトES細胞とヒトiPS細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有し

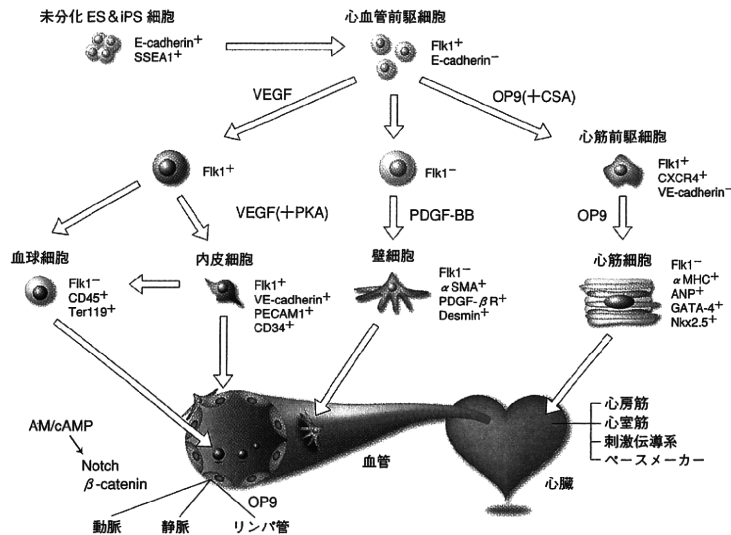


図1 マウス iPS 細胞からの系統的心血管細胞分化

マウスiPS細胞から誘導したFik1陽性細胞を共通の前駆細胞として、心血管系の構成細胞である血管内皮細胞、壁細胞、血球細胞、心筋細胞、さらには動静脈リンパ管内皮細胞や種々の心筋細胞を系統的に分化誘導することができる。(文献24より改変引用)

ていると考えられる。今後のiPS細胞研究においては、マウスおよびヒトES細胞研究がその土台となり、また常に比較対象のスタンダードとなると考えられる。iPS細胞の出現によって、ES細胞研究は衰退するどころかさらにその重要性を増していると考えられる。

### 3 iPS 細胞研究の臨床への貢献

ES細胞、iPS細胞研究の循環器領域における意義はやはり心血管再生治療への応用が中心的に期待されると考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築という新しいアプローチができることにより、病態解明や創薬治療応用などさまざまなかたちでの臨床面への貢献が可能である。

#### 1. 誘導細胞の細胞移植応用

ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞に存在した倫理面の問題、および患者特異的iPS細胞を樹立できることにより移植免疫の問題も回避できるため、細胞移植による再生医療応用が期待されている。循環器領域においても、心筋再生による心筋梗塞や心筋症そのほかの心不全治療、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などが細胞治療ターゲットとして想定される。しかし、ヒトiPS細胞を用いたこれら細胞治療の実現に至るまでには数多くの乗り越えるべきハードルが残っている。

##### (1) 効率的な心血管分化誘導法および細胞純化法の開発

ヒトの心筋梗塞においては10<sup>9</sup>個オーダーに至る心筋細胞が死ぬともいわれている。そのレベルの細胞数を用意することが可能な効率的な分化誘導法を開発する

必要がある。現在までで最も効率が良いと考えられるヒトES細胞からの心筋分化誘導法において、ヒトES細胞1個から心筋細胞3個と報告されている<sup>15)</sup>。マウスES細胞においては、ES細胞1個から約200個以上の心筋細胞が誘導可能である<sup>16)</sup>。こうした客観的に比較可能な指標に基づいた効率的分化誘導法がヒトにおいても開発されることが望まれる。また、ヒトiPS細胞はヒトES細胞と同様に奇形腫を形成するので、未分化ヒトiPS細胞を厳密に除去できる細胞純化法が必要である。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<sup>17)</sup>。

## (2) 移植用細胞の開発

最終的にヒトに対して細胞を移植するためには、単に細胞を分化誘導して純化するというだけでは不十分で、GMP基準の医薬品と同様な品質管理のもとに移植用細胞を用意できるようにする必要がある。もともとなるiPS細胞から血清やフィーダー細胞などを極力排除して、分化誘導・純化が行えるようにする必要がある。①から②のあいだには実は大きな隔りがある。

## (3) 細胞移植法の開発

①②を経て用意された細胞をヒトに移植する際に、いかなる細胞群をどのような方法をもって移植すれば、有効かつ安全であるかを評価していく必要がある。最近ES細胞から誘導された心筋細胞の移植に関しては、単純に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ということがコンセンサスとなりつつある。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、現在おもに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の移植(心臓に貼り付ける)および②心筋細胞の浮遊培養により得られる心筋細胞塊(cardiosphere)の移植が試みられている。いずれの方法でも生着心筋効率は改善していると思われる。機能的回復が十分なレベルまで技術が発展することが期待される。最近ヒトiPS細胞を未分化のまま20万

個をマウス心筋梗塞モデルに移植すると奇形腫の出現は認めずに心筋、血管に分化して心機能が回復したという報告がなされている<sup>18)</sup>。一方、マウスiPS細胞由来神経細胞移植の実験では0.05%以下の未分化細胞の混入(100個以下/合計)でも奇形腫を形成したとの報告もある<sup>19)</sup>。種差や臓器の違いがあるとはいえ、こうした大きな落差をもった報告がなされることは、細胞移植法の評価の大きな問題点である。厳密な評価法が確立されることが望まれる。

## 2. 患者特異的モデル細胞

患者自身から細胞を採取し患者特異的なiPS細胞を樹立できるというiPS細胞にしかない特性は、移植免疫を回避した細胞治療ということだけでなく、全く新しいかたちで病態の解明や創薬への応用が可能である<sup>20,21)</sup>。

### (1) 病態解明

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

### (2) 創薬応用

iPS細胞の創薬応用には大きく、新規薬剤の探索と薬剤安全性試験への応用の2つが考えられる。疾患モデル細胞を用いて、同細胞の異常を改善する新規薬剤や疾患特異的に作用する薬剤などの探索が可能となる。筆者らは最近、筆者らのES細胞心筋分化系を用いて免疫抑制剤サイクロスポリンAが中胚葉段階に特

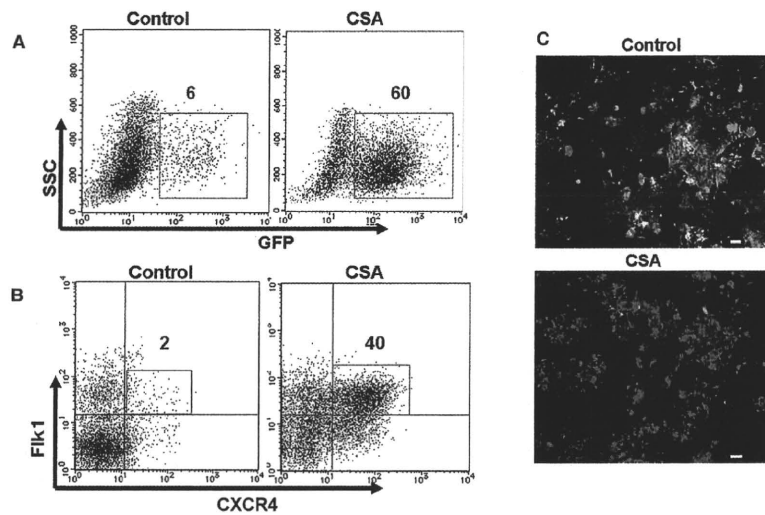


図2 サイクロスポリン A(CSA)による心筋前駆細胞および心筋細胞分化誘導効果

Fik1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( $\alpha$ MHCプロモーター/GFP)発現。誘導された細胞の約60%が $\alpha$ MHC/GFP陽性の心筋細胞になる。B: 心筋前駆細胞。Fik1陽性/CXCR4陽性の心筋前駆細胞分画(文献5)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。スケールバー: 400  $\mu$ m。(文献16より改変引用)

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)<sup>16)</sup>。こうした培養下における分化モデルを用いることにより、心筋分化促進物質などの新たな生理活性物質の探索も可能となる。さらに同様のシステムを患者特異的iPS細胞を用いて構築することにより、疾患特異的作用物質の探索などにも展開可能と考えられる。

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

応用可能と考えられる。たとえば、千人分や万人分の心筋細胞や肝細胞を並べたパネルを用いて薬剤の細胞毒性をスクリーニングすることにより、まれに発生する心毒性や肝障害などを事前に検出できるかもしれない。さらには障害を起こす細胞を解析し原因を明らかにすることにより、副作用を起こす症例を事前に特定し投薬を避ける「テーラーメイド医療」に貢献し得る可能性もある。また、特定の副作用の出現をモニターする薬剤安全性試験にもモデル細胞は応用可能である。たとえば、薬剤性のQT延長は、現在おもにHERG試験と呼ばれるHERGチャンネルを過剰発現させた細胞株(HEK293細胞など)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延長をきたす偽陰性の薬剤(ソタロールなど)の存在が問題であった。ヒトES細胞・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<sup>22)</sup>、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. そのほか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多い(高血圧自然発症ラット、糖尿病モデルラット、心筋症ハムスターなど)。これらモデル動物からのiPS細胞の樹立が可能となれば、モデル動物と同動物由来細胞を用いて、動物モデルと細胞実験を相互対応させながら新しい病態の解析を行うことなどが可能となると考えられる。

## 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、樹立、分化、移植などにおけるさまざまなiPS細胞に関する研究や、「分化した細胞を別の細胞にリモデリングする」という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、樹立されたiPS細胞の株により奇形腫の形成性は異なり、分化誘導を行っても分化せずに未分化状態にとどまろうとする「分化抵抗性」のiPS細胞は、移植後に奇形腫を形成する頻度が高いことが報告された<sup>19)</sup>。また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、分化誘導させたときに由来する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(私信)。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<sup>23)</sup>。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、その胎動はすでに起こっており、線維芽細胞に特定の3個の転写因子を導入することにより心筋細胞が誘導し得ることが発表されている(第74回日本循環器学会)。

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みせている。iPS細胞研究は、ここに述べたようなことだけでなく、予想もしなかったかたち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。

### ● References

- 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 : Flk1 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 progenitor potentials 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) Mauritz C, Schwanke K, Reppel M et al : Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* **118** : 507-517, 2008
  - 10) Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E et al : Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* **26** : 1537-1546, 2008
  - 11) 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
  - 12) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG et al : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* **104** : e30-41, 2009
  - 13) 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
  - 14) 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
  - 15) 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
  - 16) 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
  - 17) Hattori F, Chen H, Yamashita H et al : Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* **7** : 61-66, 2010
  - 18) Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S et al : Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* **120** : 408-416, 2009
  - 19) Miura K, Okada Y, Aoi T et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* **27** : 743-745, 2009
  - 20) Yamanaka S : Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **1** : 39-49, 2007
  - 21) Nishikawa SI, 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
  - 22) Asai Y, Tada M, Otsuji TG, Nakatsuji N : 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*, 2010(Epub ahead of print)
  - 23) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP et al : Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463** : 1035-1042, 2010
  - 24) Yamashita JK : ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration. *Exp Cell Res* (in press).

## 心不全に対するiPS細胞の臨床応用

Clinical application of iPS cells to heart failure



山下 潤

Jun K. YAMASHITA

京都大学再生医科学研究所幹細胞分化制御研究領域, 同物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター

◎人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、線維芽細胞などの分化した細胞から誘導されたES細胞様の新しい幹細胞である。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を回避できる画期的発明であるが、奇形腫形成やiPS細胞特有の“遺伝子導入による細胞変異・癌化の問題”など今後地道に解決すべき課題は多い。マウスES細胞とマウスiPS細胞、ヒトES細胞とヒトiPS細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有しており、ES細胞で培われた技術を導入することにより心血管系細胞を分化誘導することが可能であった。iPS細胞研究の心不全治療応用としては、心筋細胞シートや心筋ボールなどの移植技術を用いた細胞移植治療がおもなターゲットと考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築などにより、病態解明や創薬治療応用などさまざまな形で臨床へ貢献することが期待される。

**Key word** : ES細胞, iPS細胞, 再生, 分化

### ● iPS細胞登場の背景と意義

胚性幹細胞(embryonic stem cells: ES細胞)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よばれる部位を取り出して樹立した細胞株であり、体中すべての種類の細胞に分化することのできる、いわゆる万能の幹細胞と考えられている。マウスES細胞の樹立は1981年、ヒトES細胞は1998年に樹立され、再生医療への応用に期待が寄せられた。しかし、ヒトES細胞においては、①技術・安全面の問題、とくに未分化ES細胞があやま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)をつくる必要が考えられる、ということが実際の応用への大きな障壁になっていた。こうした状況を背景に生まれてきた新しい幹細胞が人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS細胞)である。

iPS細胞は、線維芽細胞など分化した細胞に特定の遺伝子群(*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-myc* など)を導入することにより、ES細胞様の万能の幹細胞の性質をもたせることに成功した細胞である。最初のiPS細胞は2006年に京都大学の山中らによって報告された<sup>1)</sup>。2007年には山中らおよびトムソンら<sup>2,3)</sup>、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・癌化の問題”などあらたな問題もあり、今後地道に解決すべき課題は多い。

### ● マウスiPS細胞の心血管細胞分化

著者らはこれまで、マウスおよびヒトES細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究を行ってきた。すなわち、マウス未分化ES細胞から血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor:

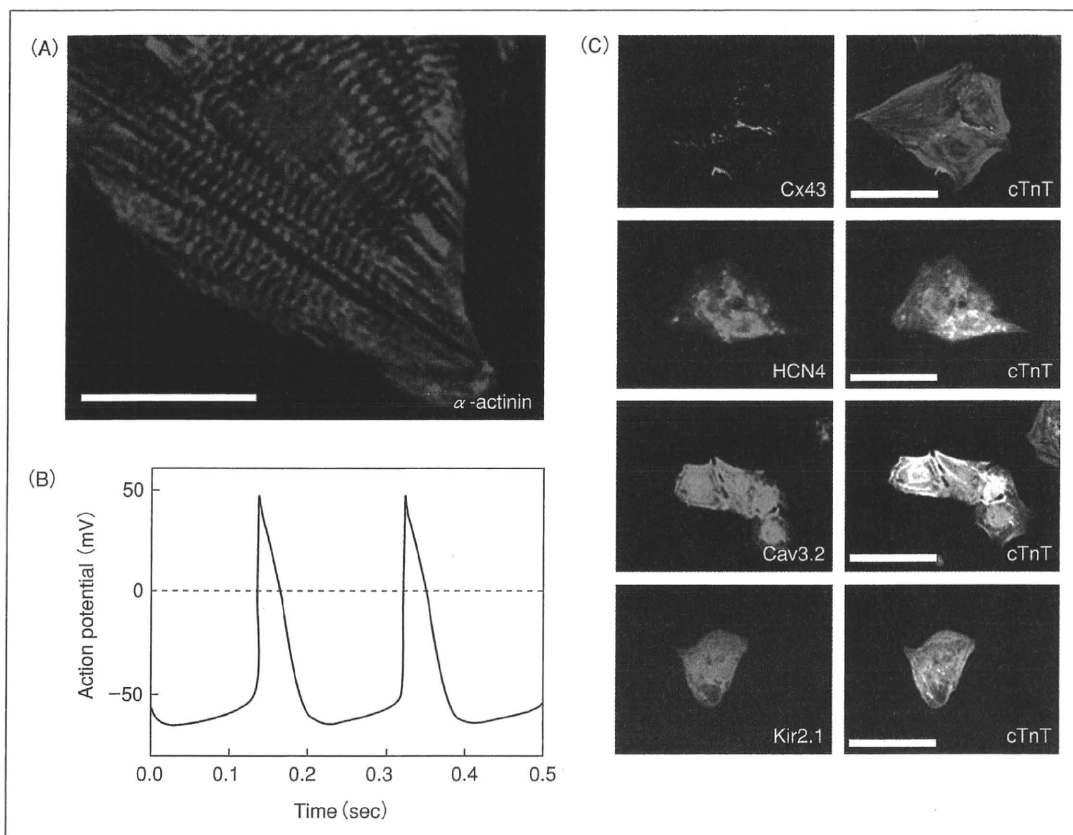


図 1 マウスiPS細胞からの心筋細胞分化<sup>8)</sup>

Flk1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することにより拍動心筋細胞が出現する。

A: 拍動細胞は sarcomere 構造を示す(赤; アクチニン染色)。スケールバー: 25  $\mu\text{m}$ 。

B: ペースメーカー細胞様の活動電位を示す。

C: 誘導された心筋細胞(右: 赤; cTnT 陽性)は Cx43, HCN4, Cav3.2, Kir2.1 など(左: 緑)の種々の心筋細胞マーカーの発現を認めた。スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ 。

VEGF)の受容体のひとつであり、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(2 型 VEGF 受容体; VEGF receptor-2)を発現する細胞を誘導し、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞、血管壁細胞、血球細胞、心筋細胞といった循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功している<sup>4,5)</sup>。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<sup>5)</sup>や動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれ ES 細胞から誘導すること<sup>6,7)</sup>にも成功している。ヒト ES 細胞からの血管細胞の誘導や虚血モデルへの移植実験などにも関与している(京都大学内分泌代謝内科との共同研究)。

このマウス ES 細胞の系統的心血管細胞分化システムをマウス iPS 細胞に導入し、著者らはいち

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<sup>8)</sup>。すなわち、未分化マウス iPS 細胞を LIF(leukemia inhibitory factor)非存在下に培養することにより Flk1 陽性細胞が誘導された。Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下に培養することにより、おもに静脈を中心とする内皮細胞および壁細胞が、VEGF に加えて cAMP シグナルを刺激することにより動脈内皮細胞が、OP9 ストローマ細胞上で培養することにより血球、リンパ管内皮細胞、心筋細胞が、それぞれ誘導された。誘導された心筋細胞は、種々の心筋細胞マーカー発現や sarcomere 構造、心筋様活動電位などの心筋細胞としての特性を示した。またペースメーカー細胞特異的イオンチャンネル HCN4、T 型 Ca チャンネル(Cav3.2)や心室筋特異的チャンネル Kir2.1

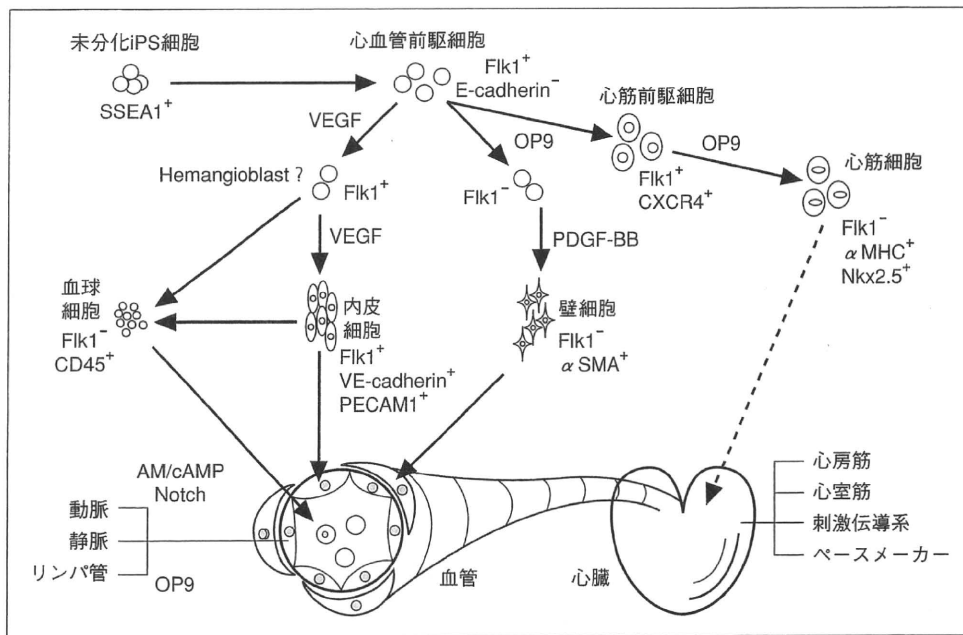


図2 マウスiPS細胞からの系統的心血管細胞分化<sup>8)</sup>

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。

を発現する細胞などが存在し、種々の心筋細胞が混在して誘導されていると考えられた(図1)。マウス iPS 細胞からの Flk1 陽性細胞、(動静脈リンパ管)内皮細胞、壁細胞の分化様式、分化効率などはほとんどマウス ES 細胞と変わりがなかった。このように、マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞はほぼ完全に同等な心血管分化能と分化動態を示し、マウス ES 細胞と同様に系統的に心血管細胞を分化誘導することが可能であった(図2)。ほかにマウス iPS 細胞からの心血管細胞分化に関しては、心筋細胞を誘導したとの報告<sup>9)</sup>、および著者らに類似した分化システムを用いた心血管細胞分化の報告<sup>10)</sup>などがある。

### ヒトiPS細胞の心血管細胞分化

著者らはヒト iPS 細胞の心血管細胞分化にも取り組んでいる。ヒト ES 細胞の維持培養条件に準じた環境で誘導・樹立されたヒト iPS 細胞は、その維持および分化誘導においてもヒト ES 細胞に類似した動態を示した。著者らは、ヒト ES 細胞において報告されている心筋分化誘導法<sup>11)</sup>に準じ

て培養することにより、自己拍動する心筋細胞コロニーの誘導にすでに成功している。心筋に特徴的な sarcomere の形成や自己拍動に同調した  $Ca^{2+}$  の取込みなど形態的機能的特性も確認している(未発表)。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<sup>12)</sup>、その後日本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<sup>13-15)</sup>。マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞、ヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有していると考えられる。今後の iPS 細胞研究においては、マウスおよびヒト ES 細胞研究がその土台となり、またつねに比較対象のスタンダードとなると考えられる。iPS 細胞の出現によって、ES 細胞研究は衰退するどころかさらにその重要性を増していると考えられる。

### iPS細胞研究の臨床への貢献

ES 細胞、iPS 細胞研究の循環器領域における意義は、やはり心血管再生治療への応用が中心的に

期待されると考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築という新しいアプローチができることにより、病態解明や創薬治療応用などさまざまな形で臨床面への貢献が可能である。

### 1. 誘導細胞の細胞移植応用

ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞に存在した倫理面的問題、および患者特異的 iPS 細胞を樹立できることにより移植免疫の問題も回避できるため、細胞移植による再生医療応用が期待されている。循環器領域においても、心筋再生による心筋梗塞や心筋症その他の心不全治療、血管再生による虚血性疾患の治療、生物学的ペースメーカーによる洞不全症候群などの治療などが細胞治療ターゲットとして想定される。しかし、ヒト iPS 細胞を用いてこれら細胞治療の実現に至るまでには数多くの乗り越えるべきハードルが残っている。

① 効率的な心血管分化誘導法および純化法の開発……ヒトの心筋梗塞においては  $10^9$  個オーダーに至る心筋細胞が死ぬともいわれている。そのレベルの細胞数を用意することが可能な効率的誘導法を開発する必要がある。現在まででもっとも効率がよいと考えられるヒト ES 細胞からの心筋分化誘導法において、ヒト ES 細胞 1 個から心筋細胞 3 個と報告されている<sup>16)</sup>。また、ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様に奇形腫を形成するので、未分化ヒト iPS 細胞を厳密に除去できる細胞純化法が必要である。

② 移植用細胞の開発……最終的にヒトに対して細胞を移植するためには、単に細胞を誘導して純化するというだけでは不十分で、GMP 基準の医薬品と同様な品質管理の元に移植用細胞を用意できるようにする必要がある。元になる iPS 細胞から血清やフィーダー細胞などを極力排除して、分化誘導・純化が行えるようにする必要がある。①から②の間には実は大きな隔りがある。

③ 細胞移植法の開発……①、②を経て用意された細胞をヒトに移植する際に、いかなる細胞群をどのような方法をもって移植すれば、有効かつ安全であるかを評価していく必要がある。最近 ES 細胞から誘導された心筋細胞の移植に関しては、単純に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

効率が非常に悪いということがコンセンサスとなりつつある。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、現在おもに 2 つの方法、i) 東京女子医大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の移植(心臓に貼り付ける)、および、ii) 心筋細胞の浮遊培養により得られる心筋細胞塊(cardiac ball)の移植、が試みられている。いずれの方法でも生着心筋効率は改善していると思われる。今後機能的回復が十分なレベルまで技術が発展することが期待される。最近、ヒト iPS 細胞を未分化のまま 20 万個をマウス心筋梗塞モデルに移植すると、奇形水腫の出現は認めずに心筋、血管に分化して心機能が回復したという報告がなされている<sup>17)</sup>。一方、マウス iPS 細胞由来神経細胞移植の実験では 0.05% 以下の未分化細胞の混入(100 個以下/合計)でも奇形水腫を形成したとの報告もある<sup>18)</sup>。種差や臓器の違いがあるとはいえ、こうした大きな落差をもった報告がなされることは、細胞移植法の評価の大きな問題点である。厳密な評価法が確立されることが望まれる。

### 2. 患者特異的モデル細胞

患者自身から細胞を採取し患者特異的な iPS 細胞を樹立できるという iPS 細胞にしかない特性は、移植免疫を回避した細胞治療ということだけでなく、まったく新しい形で病態の解明や創薬への応用を可能にする<sup>19,20)</sup>。

① 病態解明……心筋症、QT 延長症候群、洞不全症候群など心臓を構成する細胞そのものに起因すると考えられる疾患が中心となると思われるが、患者自身の細胞から iPS 細胞を樹立し、そこから該当する細胞を分化誘導し種々のモデル細胞を構築できることは、病態解明にまったく新しい手段を提供する。すなわち、これまではごく少量の生検サンプルの解析に限局されていたものが、個々の症例から生きた細胞を潤沢に得られることにより、標的細胞の遺伝子解析、機能解析や薬剤の効果判定などを実際の症例に関して繰り返し行うことが可能となる。原因遺伝子不明の症例においてもモデル細胞が構築できるので、モデル細胞を用いた原因遺伝子探索も可能となる。このように病態解明に向けたアプローチの方法は飛躍的に

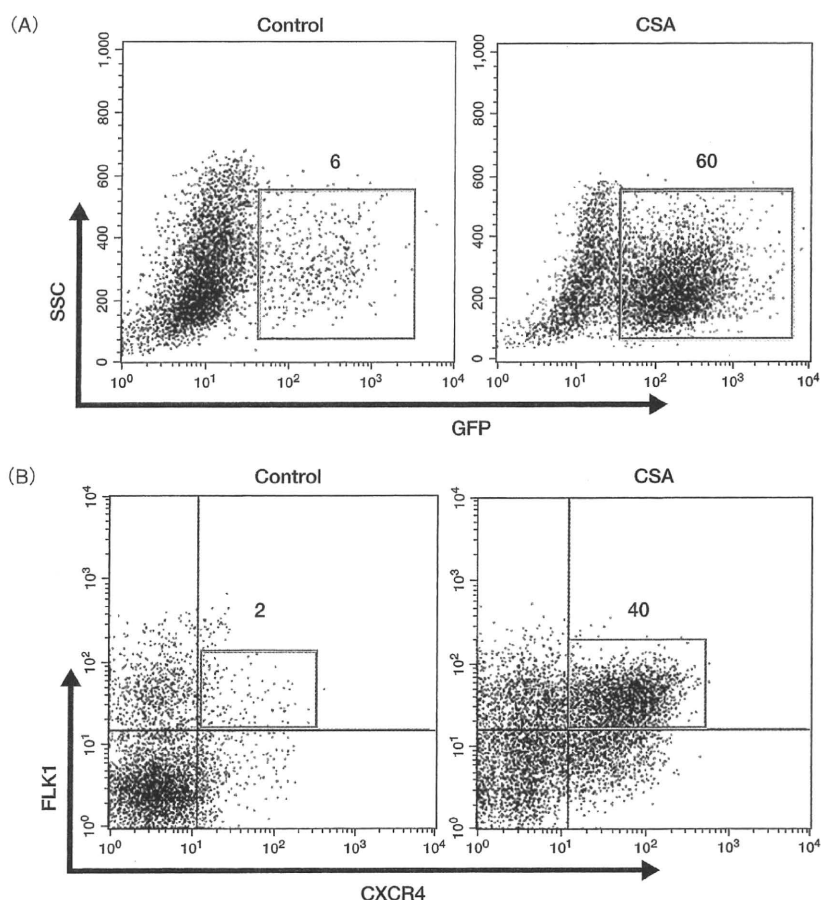


図3 シクロスポリンA(CSA)による心筋前駆細胞および心筋細胞分化誘導効果：FACS解析

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：心筋特異的 GFP( $\alpha$ MHC プロモーター/GFP)発現。誘導された細胞の約 60%が  $\alpha$ MHC/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<sup>5)</sup>が約 20 倍増加する。

増大すると考えられる。

② 創薬応用……iPS 細胞の創薬応用には大きく、新規薬剤の探索と薬剤安全性試験への応用の 2 つが考えられる。疾患モデル細胞を用いて、同細胞の異常を改善する新規薬剤や疾患特異的に作用する薬剤などの探索が可能となる。著者らは最近、著者らの ES 細胞心筋分化系を用いて免疫抑制剤シクロスポリン 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 3, 4)<sup>21)</sup>。こうした培養下における分化モデルを用いることにより、心筋分化促進物質などのあらたな生理活性

物質の探索も可能となる。さらに同様のシステムを患者特異的 iPS 細胞を用いて構築することにより、疾患特異的作用物質の探索などにも展開可能と考えられる。

受精卵を用意することが必要であるヒト ES 細胞と比べて、iPS 細胞は数多くの細胞株を樹立しやすく iPS 細胞バンクが構築しやすい。そこから細胞を誘導して array(アレイ)化することにより、種々のヒトモデル細胞パネルのようなものを構築することができる。こうしたヒトモデル細胞パネルは、薬剤の安全性試験に応用可能と考えられる。たとえば、1,000 人分や 10,000 人分などの心筋細

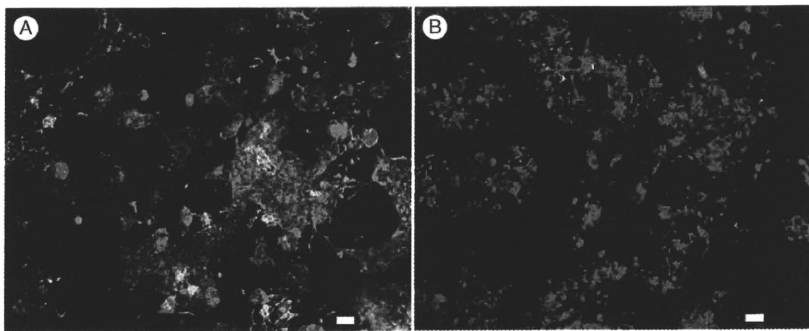


図 4 シクロスポリンA(CSA)による心筋前駆細胞および心筋細胞分化誘導効果：免疫染色  
A : control, B : CSA.  
CD31(赤；内皮細胞)/cTnT(緑；心筋細胞)二重染色. CSA により内皮細胞の出現が抑制され、対照的に心筋細胞が著しく増加する。スケールバー：400  $\mu$ m.

胞や肝細胞を並べたパネルを用いて薬剤の細胞毒性をスクリーニングすることにより、まれに発生する心毒性や肝障害などを事前に検出できるかもしれない。さらには障害を起こす細胞を解析し原因を明らかにすることにより、副作用を起こす症例を事前に特定し投薬を避ける“テーラーメイド医療”に貢献しうる可能性もある。

### 3. その他動物モデルへの応用

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

## ● おわりに

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

ものである。極端な熱狂や批判に走ることなく、冷静にかつ良識と叡知をもってiPS細胞の今後に対応していくことが必要と考えられる。

## 文献

- 1) Takahashi, K. and 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. et al. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131** : 861-872, 2007.
- 3) Yu, J. et al. : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, **318** : 1917-1920, 2007.
- 4) Yamashita, J. et al. : Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, **408** : 92-96, 2000.
- 5) Yamashita, J. K. et al. : Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J.*, **19** : 1534-1536, 2005.
- 6) Yurugi-Kobayashi, T. et al. : Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26** : 1977-1984, 2006.
- 7) Kono, T. et al. : Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26** : 2070-2076, 2006.
- 8) Narazaki, G. et al. : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, **118** : 498-506, 2008.
- 9) Mauritz, C. et al. : Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*, **118** : 507-517, 2008.
- 10) Schenke-Layland, K. et al. : Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascu-



- lar and hematopoietic lineages. *Stem Cells*, **26** : 1537-1546, 2008.
- 11) Mummery, C. et al. : Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*, **107** : 2733-2740, 2003.
  - 12) Zhang, J. et al. : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ. Res.*, **104** : e30-e41, 2009.
  - 13) Tanaka, T. et al. : *In vitro* pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385** : 497-502, 2009.
  - 14) Yokoo, N. et al. : The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **387** : 482-488, 2009.
  - 15) Zhang, J. et al. : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ. Res.*, **104** : e30-e41, 2009.
  - 16) Laflamme, M. A. 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.
  - 17) Nelson, T. J. et al. : Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*, **120** : 408-416, 2009.
  - 18) Miura, K. et al. : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat. Biotechnol.*, **27** : 743-745, 2009.
  - 19) Yamanaka, S. : Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **1** : 39-49, 2007.
  - 20) Nishikawa, S. I. et al. : The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9** : 725-729, 2008.
  - 21) Yan, P. et al. : Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379** : 115-120, 2009.

\* \* \*

## 【iPS細胞による血管再生治療の展望】

Vascular regeneration with iPS cells

山下 潤

Jun K. Yamashita, MD, PhD

## Key words

Embryonic stem cells,  
induced pluripotent stem cells,  
regeneration, differentiation

## 要約

人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、線維芽細胞などの分化した細胞から誘導されたES細胞様の新しい幹細胞である。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を回避できる画期的発明であるが、奇形腫形成やiPS細胞特有の「遺伝子導入による細胞変異・がん化の問題」など今後地道に解決すべき課題は多い。マウスES細胞とマウスiPS細胞、ヒトES細胞とヒトiPS細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有しており、ES細胞で培われた技術を導入することにより心血管系細胞を分化誘導することが可能であった。iPS細胞研究の治療応用としては、誘導細胞を用いた細胞移植以外にも患者特異的モデル細胞の構築等により、病態解明や創薬治療応用などさまざまな形で臨床へ貢献することが期待される。

## はじめに：iPS細胞登場の背景と意義

ES細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cells）は、マウスやヒトの早期胚（胚盤胞：blastocyst）の段階において、将来胎仔を形成する内細胞塊と呼ばれる部位を取り出して樹立した細胞株であり、体中全ての種類の細胞に分化することのできるいわゆる万能の幹細胞と考えられている。マウスES細胞の樹立は1981年、ヒトES細胞は1998年に樹立され、再生医療への応用に期待が寄せられた。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細胞があやま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）を作る必要が考えられる。ということが実際の応用への大きな障壁になっていた。こうした状況を背景に生まれてきた新しい幹細胞がiPS細胞（人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells）である。

iPS細胞は、線維芽細胞など分化した細胞に特定の遺伝子群(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-mycなど)を導入することにより、ES細胞様の万能の幹細胞の性質を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<sup>1)</sup>。2007年には山中ら及びトムソンら<sup>2, 3)</sup>、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。

## 1. iPS細胞の心血管細胞分化

筆者らはこれまでマウス及びヒトES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、

京都大学再生医科学研究所 幹細胞分化制御研究領域 京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS細胞研究センター：Laboratory of Stem Cell Differentiation, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Center for iPS cell Research and Application (CiRA), Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University.  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53 Tel：075-751-3853 Fax：075-751-4824

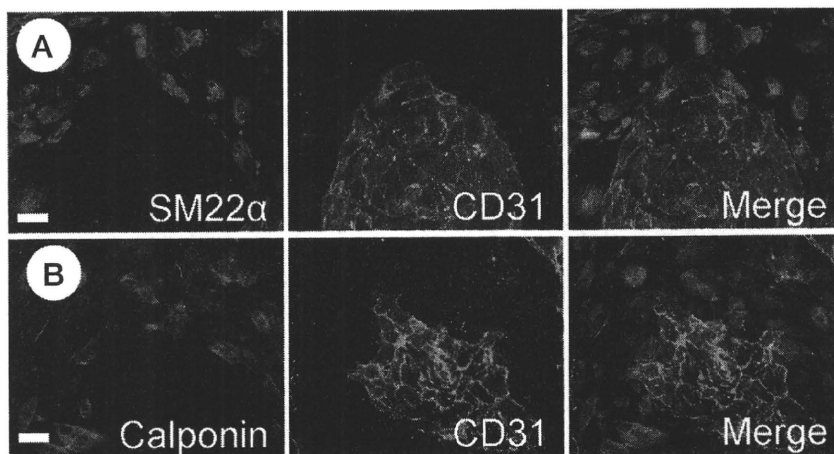


図1 マウスiPS細胞からの血管内皮・壁細胞分化  
 マウスiPS細胞由来Flk1陽性細胞をVEGF及び血清存在下で培養することにより、CD31陽性内皮細胞(緑)とSM22 $\alpha$ (A)またはカルポニン陽性壁細胞(B)(赤)が選択的に誘導される。(文献6より改変)

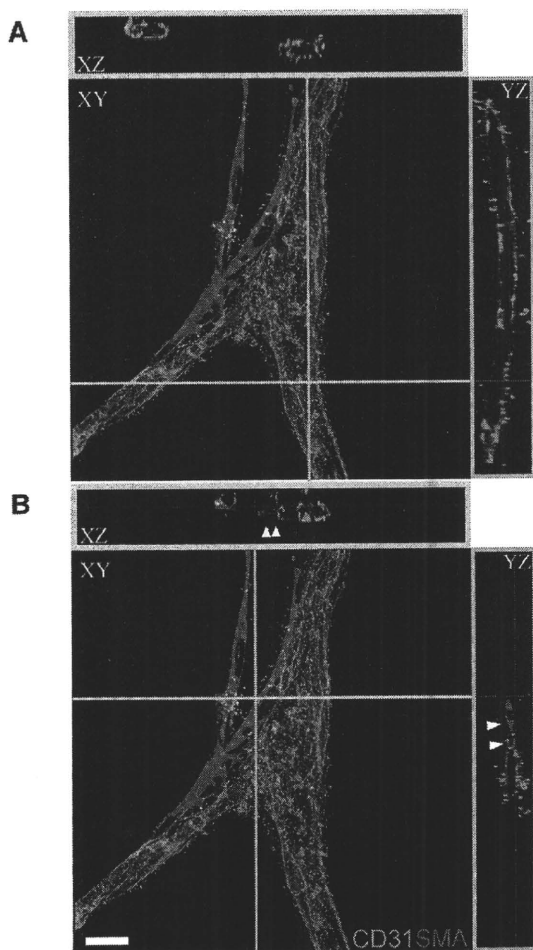


図2 マウスiPS細胞からの3次元血管形成  
 マウスiPS細胞由来Flk1陽性細胞をI型コラーゲンゲル内で3次元的に培養した。CD31陽性内皮細胞(緑)による管腔形成(a)と平滑筋 $\alpha$ アクチン(SMA)陽性血管壁細胞(赤)の管腔への接着(b)を認める。内皮細胞と壁細胞による毛細血管様構造が再現された。(文献6より改変)

マウス未分化ES細胞からVEGF(血管内皮増殖因子)の受容体の一つであり、血管内皮・血球の前駆細胞や中胚葉細胞のマーカでもあるFlk1を発現する細胞を誘導し、Flk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞、血管壁細胞、血球細胞、心筋細胞といった循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功している<sup>4,5)</sup>。さらに動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれES細胞から誘導することにも成功している。ヒトES細胞からの血管細胞誘導と同細胞の移植により虚血が改善できることも示している(京大大学内内分泌内科との共同研究)。筆者らは最近、このマウスES細胞の系統的心血管細胞分化システムをマウスiPS細胞に導入し、いち早くiPS細胞からの心血管細胞の分化誘導に成功した<sup>6)</sup>。すなわち、未分化マウスiPS細胞をLIF(leukemia inhibitory factor)非存在下に培養することによりFlk1陽性細胞が誘導された。Flk1陽性細胞をVEGF及び血清存在下に培養することによりおもに静脈を中心とする内皮細胞及び壁細胞が選択的に誘導され(図1)、3次元培養により血管構造が再現された(図2)。VEGFに加えてcAMPシグナルを刺激することにより動脈内皮細胞が、OP9ストローマ細胞上で培養することにより血球、リンパ管内皮細胞、心筋細胞が、それぞれ誘導された(図3)。マウスiPS細胞からの心血管細胞の分化様式、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。

筆者らはヒトiPS細胞の分化にも取り組んでいる。ヒトES細胞の維持培養条件に準じた環境で誘導・樹立されたヒトiPS細胞は、その維持及び分化誘導にお

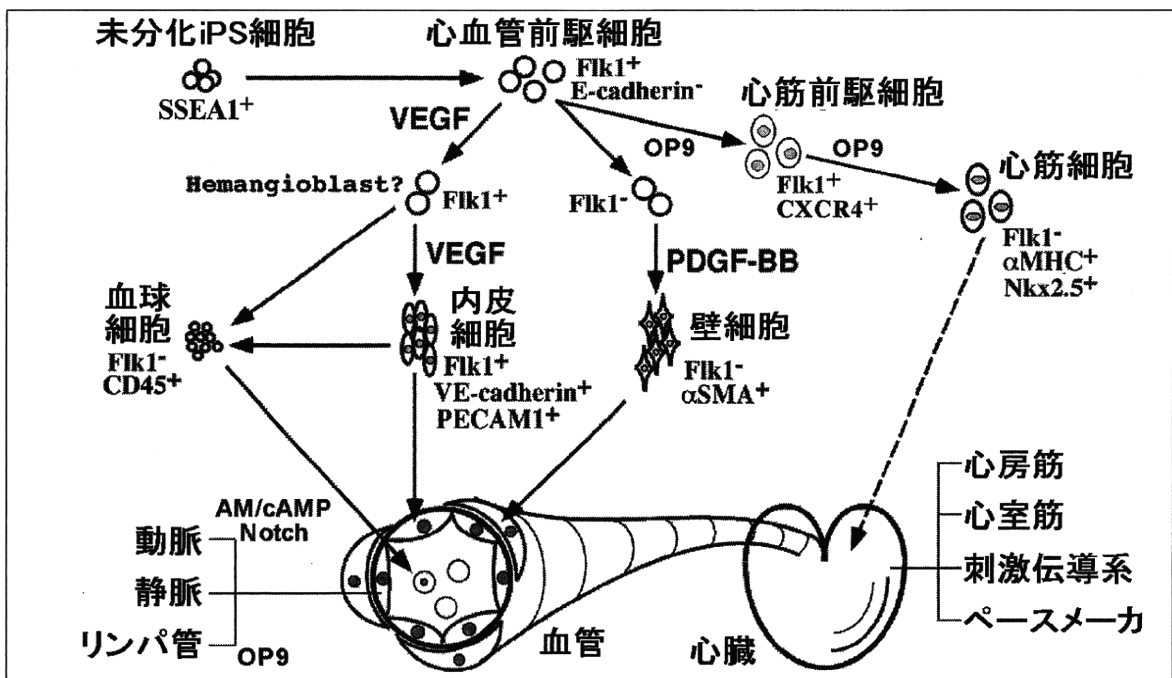


図3 マウスiPS細胞からの系統的心血管細胞分化

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6より改変)

いてもヒトES細胞に類似した動態を示した。血管に関しては京都大学のグループが、ヒトES細胞と同様の2段階分化誘導法を用いてヒトiPS細胞から血管内皮細胞及び壁細胞を誘導することに成功している<sup>7)</sup>。マウスES細胞とマウスiPS細胞、ヒトES細胞とヒトiPS細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有していると考えられる。今後のiPS細胞研究においては、マウス及びヒトES細胞研究がその土台となり、また常に比較対象のスタンダードとなると考えられる。iPS細胞の出現によって、ES細胞研究は衰退するどころかさらにその重要性を増していると考えられる。

## 2. iPS細胞研究の臨床への貢献

ES細胞、iPS細胞研究の治療応用としては、誘導細胞を用いた細胞移植がおもにイメージされると考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築という新しいアプローチができることにより、病態解明や創薬治療応用などさまざまな形で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

- i) 適切な移植細胞の分化誘導法及び純化法の開発：ES細胞由来血管細胞の移植においては、Flk1陽性の中胚葉レベルの細胞よりもVE-カドヘリンなど内皮細胞マーカーを発現し始めた初期の内皮細胞の方が効率的に血管新生を促進した<sup>8)</sup>。このようにES細胞由来細胞の移植には、ドナー細胞の分化段階とレシピエント側の状況を合わせた至適な分化段階の細胞を選択する必要があると考えられた。また、ヒトiPS細胞はヒトES細胞と同様に奇形腫を形成するので、未分化ヒトiPS細胞を厳密に除去できる細胞純化法が必要である。
- ii) 移植用細胞の開発：最終的にヒトに対して細胞を移植するためには、GMP基準の医薬品と同様な品質管理の元に移植用細胞を用意できるようにする必要がある。もともとなるiPS細胞から血清やフィーダー細胞なしで一貫して培養して、分化誘導・純化が行えるようにする必要があり、i)からii)の間には実は大きな隔りがある。
- iii) 細胞移植法の開発：i) ii)を経て用意された細胞をヒトに移植するには、有効性・安全性を厳密に評価していく必要がある。最近iPS細胞を未分化のまま