

Fig. 2. Effect of cyclic strain on expression of various cell lineage marker proteins. *A*: visualization of bands of the VSMC markers SM α -actin and smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC). Total protein was isolated from Flk-1⁺ ES cells cultured under static conditions or exposed to cyclic strain (2, 4, 8, and 12%, 1 Hz) or to PDGF-BB (10 ng/ml) for 24 h. After electrophoresis and transfer to a PVDF membrane, the protein was immunoblotted with specific antibody to SM α -actin, SM-MHC, or the cytoskeletal protein β -actin, which was used as a protein loading control. *B*: relative protein levels of SM α -actin and SM-MHC. Cyclic strain dose dependently increased protein expression of both SM α -actin and SM-MHC. Values are means \pm SD of 5 different experiments. * $P < 0.01$ vs. static control. # $P < 0.01$ between the cells exposed to 2% and 4% strain and those exposed to 8% and 12% strain. *C*: relative protein levels of the EC markers Flk-1, Flt-1, VE-cadherin, and PECAM-1, the blood cell marker CD3, and the epithelial marker keratin. After exposure to cyclic strain (8%, 1 Hz) or PDGF-BB (10 ng/ml) for 24 h, cells were immunostained with specific antibody against each marker and examined for changes in cell surface expression by flow cytometry. Cyclic strain decreased protein expression of Flk-1 but had no effect on expression of Flt-1, VE-cadherin, PECAM-1, CD3, or keratin. Exposure to PDGF-BB had the same effect as cyclic strain. Values are means \pm SD of 4 separate samples. * $P < 0.01$ vs. static control.

effect on expression of these cell lineage marker proteins as 8% strain did.

Gene expression of cell lineage markers was examined by real-time PCR. Cyclic strain markedly increased the mRNA levels of the VSMC markers SM α -actin, SM-MHC, and smooth muscle 22 α in a dose-dependent manner (Fig. 3A). By contrast, the Flk-1 mRNA levels decreased in response to cyclic strain (8%, 1 Hz), but the mRNA levels of Flt-1, VE-cadherin, and PECAM-1 remained unchanged (Fig. 3B). Together, these results indicate that cyclic strain selectively promotes differentiation of Flk-1⁺ ES cells into VSMCs but not into the EC, blood cell, or epithelial cell lineages.

PDGFR β is involved in the cyclic strain-induced differentiation of Flk-1⁺ ES cells. Flk-1⁺ ES cells were subjected to cyclic strain (8%, 1 Hz) for 24 h in the presence or absence of AG-1296 and examined for changes in the expression of SM α -actin and SM-MHC proteins. Cyclic strain markedly increased the expression of SM α -actin and SM-MHC in the absence of AG-1296 but not in its presence (Fig. 4). AG-1296

decreased the basal levels of SM α -actin and SM-MHC, indicating that a slight degree of PDGF receptor phosphorylation occurs even under static conditions. AG-1296 seems to have inhibited both basal and cyclic-strain-induced PDGF receptor phosphorylation. These findings suggest that PDGFR β activation plays an important role in the cyclic strain-induced VSMC differentiation from Flk-1⁺ ES cells.

Cyclic strain activates PDGFR β in a ligand-independent manner. Because the experiments with AG-1296 showed the involvement of PDGFR β activation in cyclic-strain-induced ES cell differentiation, we investigated whether cyclic strain causes PDGFR β activation. When Flk-1⁺ ES cells were exposed to PDGF-BB or cyclic strain, phosphorylation of PDGFR β occurred within 10 min but was almost completely blocked by AG-1296 (Fig. 5A). The cyclic strain-induced PDGFR β phosphorylation was dose dependent (Fig. 5B). Neither neutralizing antibody against PDGF-BB nor against VEGF inhibited the cyclic strain-induced PDGFR β phosphorylation (Fig. 5C). To investigate whether a ligand released by the cells was involved in the

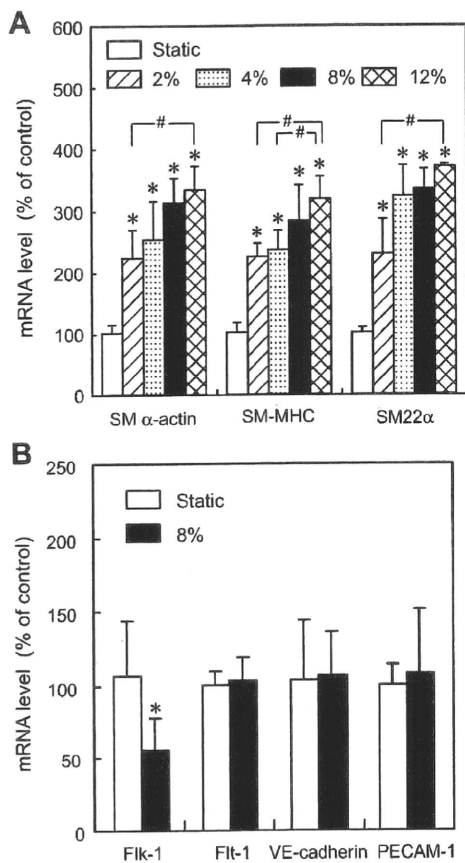


Fig. 3. Effect of cyclic strain on the gene expression of cell lineage markers. Flk-1⁺ ES cells were exposed to cyclic strain (2, 4, 8, and 12% strain, 1 Hz) for 24 h and examined for changes in gene expression by real-time PCR. **A**: changes in the mRNA levels of VSMC markers. Cyclic strain increased the mRNA levels of SM α -actin, SM-MHC, and smooth muscle 22 α (SM22 α) in a dose-dependent manner. Values are means \pm SD of 3 cell samples. * P < 0.01 vs. static control. # P < 0.01 between the cells exposed to 2% and 4% strain and those exposed to 8% and 12%. **B**: changes in the mRNA levels of the EC markers Flk-1, Flt-1, VE-cadherin, and PECAM-1. Cyclic strain (8%, 1 Hz, 24 h) decreased the mRNA level of Flk-1 but had no effect on the mRNA level of Flt-1, VE-cadherin, or PECAM-1. Values are means \pm SD of 6 cell samples. * P < 0.01 vs. static control.

PDGFR β activation, Flk-1⁺ ES cells were exposed to conditioned medium obtained from cells exposed to cyclic strain (8%, 1 Hz) for 10 min. However, the conditioned medium did not induce PDGFR β phosphorylation, and the extracellular ATP scavenger apyrase, the G protein-coupled receptor inhibitor pertussis toxin, and depletion of extracellular Ca²⁺ were incapable of attenuating the PDGFR β phosphorylation. These results indicate that cyclic strain causes PDGFR β phosphorylation in a ligand-independent manner and that transactivation of PDGFR β secondary to activation of ATP receptors or G-protein-coupled receptors or Ca²⁺ influx via ion channels is not involved in the cyclic strain-induced PDGFR β phosphorylation.

DISCUSSION

The results of this study demonstrated that cyclic strain significantly promotes the proliferation of Flk-1⁺ ES cells and increases the expression of SM α -actin, SM-MHC, and smooth muscle 22 α , which are markers of a differentiated VSMC

phenotype (20). Upregulation of VSMC markers by cyclic strain has been observed in other immature cell lines, such as rat bone marrow progenitor cells (6), human bone marrow mesenchymal stem cells (21), and murine embryonic mesenchymal progenitor cells (24). However, this study showed that cyclic strain decreases the expression of Flk-1 but has no effect on the expression of other EC markers, including Flt-1, VE-cadherin, and PECAM-1, the blood cell marker CD3, or the epithelial cell marker keratin. These findings suggest that cyclic strain induces selective differentiation of Flk-1⁺ ES cells into the VSMC lineage and not into other cell lineages. Our previous study showed that shear stress induces endothelial differentiation by Flk-1⁺ ES cells, indicating that shear stress and cyclic strain have very different effects on ES cell differentiation (32). It therefore appears that shear stress may inhibit a pathway that leads to ES cell differentiation into smooth muscle cells and that cyclic strain may inhibit a pathway that leads to ES cell differentiation into ECs. Because, under in vivo conditions, ES cells seem to be exposed to both cyclic strain and shear stress, to understand the roles of fluid-mechanical forces in cardiovascular differentiation and devel-

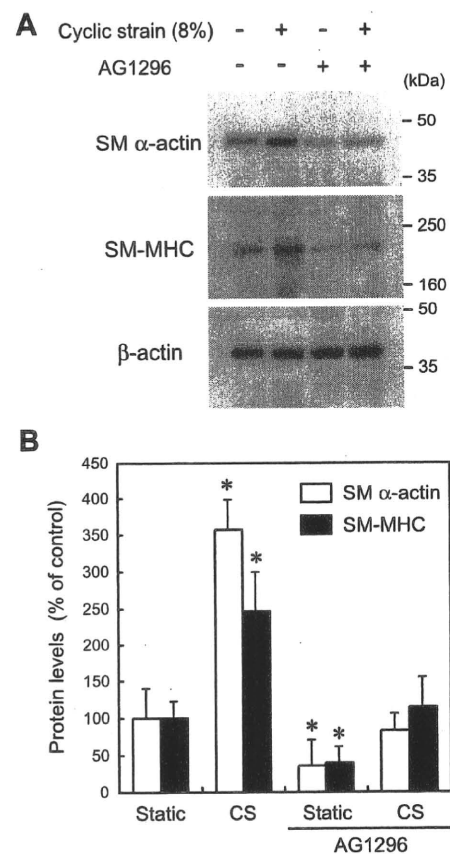


Fig. 4. Effect of the PDGFR β kinase inhibitor AG-1296 on cyclic strain-induced upregulation of VSMC markers. Flk-1⁺ ES cells were either cultured under static conditions or exposed to cyclic strain (8%, 1 Hz) for 24 h in the absence or presence of AG-1296 (10 μ mol/l). **A**: visualization of bands of SM α -actin, SM-MHC, and β -actin (used as a protein loading control). **B**: histograms of the relative protein levels of SM α -actin and SM-MHC. Cyclic strain (CS) increased protein expression of both SM α -actin and SM-MHC, and AG-1296 almost completely abolished the effects of cyclic strain. Values are means \pm SD of 4 cell samples. * P < 0.01 vs. static control.

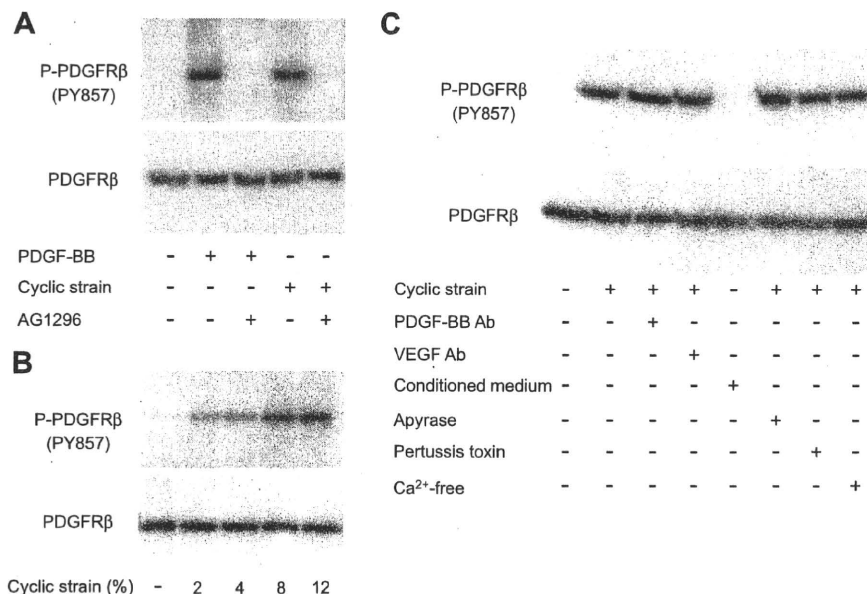


Fig. 5. Effect of cyclic strain on PDGFR β phosphorylation. **A:** cyclic strain-induced phosphorylation of PDGFR β . Flk-1⁺ ES cells were either cultured under static conditions or exposed to PDGF-BB (10 ng/ml) or cyclic strain (8%, 1 Hz) for 10 min. Tyrosine-phosphorylated proteins associated with anti-PDGFR β (P-PDGFR β) were detected by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody (PY-857). The total amount of PDGFR β in cell lysates was also determined with anti-PDGFR β antibody. Cyclic strain and PDGF-BB caused phosphorylation of PDGFR β , and it was completely blocked by AG-1296 (10 μ mol/l). Experiments were repeated 3 times, and similar results were obtained. **B:** dose dependency of cyclic strain-induced PDGFR β phosphorylation. **C:** effects of various inhibitors on PDGFR β phosphorylation. None of the neutralizing antibodies against PDGF-BB (1 μ g/ml; R&D Systems), VEGF (1 μ g/ml; R&D Systems), apyrase (20 U/ml; Sigma), or pertussis toxin (100 ng/ml; Sigma) attenuated the cyclic strain-induced PDGFR β phosphorylation. Addition of conditioned medium obtained from Flk-1⁺ ES cells exposed to cyclic strain (8%, 1 Hz) for 10 min did not cause PDGFR β phosphorylation. Cyclic strain caused PDGFR β phosphorylation even after the incubation for 10 min in Ca²⁺-free HBSS with EGTA (2 mM). Experiments were repeated 3 times, with similar results.

opment in embryo it will be necessary to know the ES cell responses, not only to cyclic strain alone and to shear stress alone but to combinations of the two.

The upregulation of Flk-1⁺ ES cell proliferation and expression of VSMC markers by cyclic strain were almost completely blocked by the PDGFR β kinase inhibitor AG-1296, suggesting that PDGFR β activation plays an important role in the effects of cyclic strain. Western blot analysis revealed that phosphorylation of PDGFR β occurs immediately after the application of cyclic strain to Flk-1⁺ ES cells. Because cyclic strain has been shown to cause mature ECs and VSMCs to release PDGF-BB, which is the ligand for PDGFR β (15, 29), we investigated whether Flk-1⁺ ES cells release PDGF-BB in response to cyclic strain. The concentration of PDGF-BB in the conditioned medium obtained from the cells exposed to cyclic strain for 10 min was below the limits of detection by ELISA (data not shown), indicating that very little, if any, PDGF-BB release occurred shortly after the onset of cyclic strain. However, because autocrine systems can be active even when no ligands are found in the extracellular medium (4), it is impossible to rule out the possibility based on the results of ELISA that a small amount of PDGF-BB is elicited by cyclic strain and that it acts on adjacent neighbor cells in a highly localized manner as an autocrine or paracrine signal. It was recently reported that VEGF-A binds and activates PDGFR α and PDGFR β in bone marrow-derived human adult mesenchymal stem cells (2). However, neutralizing antibody specific to PDGF-BB and VEGF did not block the cyclic strain-induced PDGFR β phosphorylation. In addition, phosphorylation of PDGFR β did not occur when Flk-1⁺ ES cells were exposed to conditioned medium obtained

from the cells subjected to cyclic strain for 10 min. From the above findings, the phosphorylation of PDGFR β induced by cyclic strain does not seem to involve any ligands, including PDGF or VEGF.

The ligand-independent activation of PDGFR β by cyclic strain seen in Flk-1⁺ ES cells is analogous to that observed in adult VSMCs (9). Cyclic strain rapidly induced phosphorylation of PDGFR α in VSMCs, but neither antibodies that bind to all forms of PDGFs nor conditioned medium from VSMCs exposed to cyclic strain blocked cyclic strain-induced PDGFR α activation. It is unclear, however, how cyclic strain activates PDGF receptor in a ligand-independent manner. The following possibilities can be considered. 1) Cyclic strain mechanically deforms the cell membrane, which may influence PDGF receptor conformation or dimerization, and lead to its phosphorylation. 2) Other molecules besides PDGF receptor, including other receptors, ion channels, and integrins, may transduce the mechanical stress into chemical signals and lead to PDGF receptor activation via a cross-talking mechanism. This study did not cover the involvement of stretch-activated ion channels or integrins, both of which are known to function as mechanotransducers (18, 27), but the results showed that apyrase, pertussis toxin, and depletion of extracellular Ca²⁺ had no effect on cyclic-strain-induced PDGFR β activation. These findings suggest that PDGFR β was not transactivated, at least not via ATP receptors, G protein-coupled receptors, or Ca²⁺ influx. Interestingly, our previous study (32) revealed that shear stress activates Flk-1 in a ligand-independent manner and that the activation of Flk-1 plays a critical role in endothelial differentiation of Flk-1⁺ ES cells. Thus cyclic strain and shear stress may act by

a common mechanism in which growth factor receptors are activated by mechanical forces without ligand binding. Elucidation of the mechanism would lead to a better understanding of mechanotransduction and its role in ES cell differentiation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Yuko Sawada for technical assistance.

GRANTS

This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas and from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology and by a research grant for cardiovascular diseases from the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare.

REFERENCES

- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168: 342–357, 1995.
- Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Biol* 177: 489–500, 2007.
- Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75: 519–560, 1995.
- DeWitt AE, Dong JY, Wiley HS, Lauffenburger DA. Quantitative analysis of the EGF receptor autocrine system reveals cryptic regulation of cell response by ligand capture. *J Cell Sci* 114: 2301–2313, 2001.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154–156, 1981.
- Hamilton DW, Maul TM, Vorp DA. Characterization of the response of bone marrow-derived progenitor cells to cyclic strain: implications for vascular tissue-engineering applications. *Tissue Eng* 10: 361–369, 2004.
- Hove JR, Koster RW, Forouhar AS, Acevedo-Bolton G, Fraser SE, Gharib M. Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature* 421: 172–177, 2003.
- Hu N, Clark EB. Hemodynamics of the stage 12 to stage 29 chick embryo. *Circ Res* 65: 1665–1670, 1989.
- Hu Y, Bock G, Wick G, Xu Q. Activation of PDGF receptor α in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *FASEB J* 12: 1135–1142, 1998.
- Jones EA, Baron MH, Fraser SE, Dickinson ME. Measuring hemodynamic changes during mammalian development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1561–H1569, 2004.
- Jones EA, Crotty D, Kulesa PM, Waters CW, Baron MH, Fraser SE, Dickinson ME. Dynamic in vivo imaging of postimplantation mammalian embryos using whole embryo culture. *Genesis* 34: 228–235, 2002.
- Kakisis JD, Liapis CD, Sumpio BE. Effects of cyclic strain on vascular cells. *Endothelium* 11: 17–28, 2004.
- Kovalenko M, Gazit A, Bohmer A, Rorsman C, Ronnstrand L, Heldin CH, Waltenberger J, Bohmer FD, Levitzki A. Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse sis-transformation. *Cancer Res* 54: 6106–6114, 1994.
- Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 92: 193–205, 2000.
- Ma YH, Ling S, Ives HE. Mechanical strain increases PDGF-B and PDGF beta receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 606–610, 1999.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634–7638, 1981.
- Nakazawa M, Morishima M, Tomita H, Tomita SM, Kajio F. Hemodynamics and ventricular function in the day-12 rat embryo: basic characteristics and the responses to cardiovascular drugs. *Pediatr Res* 37: 117–123, 1995.
- Naruse K, Yamada T, Sokabe M. Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274: H1532–H1538, 1998.
- Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418: 96–99, 2002.
- Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75: 487–517, 1995.
- Park JS, Chu JS, Cheng C, Chen F, Chen D, Li S. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng* 88: 359–368, 2004.
- Pedersen RA. Embryonic stem cells for medicine. *Sci Am* 280: 68–73, 1999.
- Raines EW, Ross R. Purification of human platelet-derived growth factor. *Methods Enzymol* 109: 749–773, 1985.
- Riha GM, Wang X, Wang H, Chai H, Mu H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Cyclic strain induces vascular smooth muscle cell differentiation from murine embryonic mesenchymal progenitor cells. *Surgery* 141: 394–402, 2007.
- Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 164: 87–101, 1994.
- Saha S, Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP. Inhibition of human embryonic stem cell differentiation by mechanical strain. *J Cell Physiol* 206: 126–137, 2006.
- Sasamoto A, Nagino M, Kobayashi S, Naruse K, Nimura Y, Sokabe M. Mechanotransduction of embryonic stem cells reflects myogenesis in response to uniaxial continuous stretch. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C1012–C1022, 2005.
- Schmelter M, Ateghang B, Helmig S, Wartenberg M, Sauer H. Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J* 20: 1182–1184, 2006.
- Sumpio BE, Du W, Galagher G, Wang X, Khachigian LM, Collins T, Gimbrone MA Jr, Resnick N. Regulation of PDGF-B in endothelial cells exposed to cyclic strain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 349–355, 1998.
- Takeda H, Komori K, Nishikimi N, Nimura Y, Sokabe M, Naruse K. Bi-phasic activation of eNOS in response to uni-axial cyclic stretch is mediated by differential mechanisms in BAECs. *Life Sci* 79: 233–239, 2006.
- Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 88: 3424–3431, 1996.
- Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, Ohura N, Matsushita A, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1915–H1924, 2005.
- Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* 95: 2081–2088, 2003.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408: 92–96, 2000.

ES 細胞および iPS 細胞からの血管細胞分化

Vascular cell differentiation from ES and iPS cells

Keywords

ES 細胞 (Embryonic stem cells)
iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells)
分化
血管再生

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

Summary

We have been investigating molecular mechanisms of vascular development and regeneration using embryonic stem (ES) cells. Previously, we established an ES cell differentiation system that reproduces early vascular development using vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk1) -positive cells as common vascular progenitors. Recently, we succeeded in inducing arterial, venous, and lymphatic endothelial cells (ECs) from ES cells. More recently, a novel pluripotent stem cell line, induced pluripotent stem (iPS) cells, was established from mouse and human somatic cells. We applied our ES cell differentiation system to mouse iPS cells, and succeeded in systematically inducing cardiovascular cells from iPS cells. Time course and efficiency of the mouse iPS cell differentiation were all comparable with those of mouse ES cells. This study would largely contribute to novel understanding for iPS cell biology and the development of novel cardiovascular regenerative medicine. Here I discuss perspectives for vascular biology and medicine using ES and iPS cells.

はじめに

虚血性心疾患を中心とする心疾患および脳血管障害は日本における死因のそれぞれ第2位(10万対126)と3位(10万対102)を占め、両者を合わせると第1位の悪性新生物(がん)(10万対254)に肉薄する。一方国民医療費では、虚血性心疾患と脳血管障害を合わせると悪性新生物を上回り(2兆5千億vs 2兆3千億円)(以上厚生労働省「平成16年度国民医療費の概況」)、心血管系疾患は、現在および未来にわたり日本の医療が取り組むべき最重要研究課題の1つと考えられる。近年の幹細胞生物学の発展を背景とした再生医療研究において、血管および心臓は最も急速に研究の進展が認められる臓器である。すなわち、さまざまな新しい心血管幹細胞・前駆細胞の発見や血管分化機構の解析、さらには前駆細胞をヒトに用いた再生医療の試みまで、

Yamashita, Jun K

Laboratory of Stem Cell Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University
E-mail: juny@frontier.kyoto-u.ac.jp

基礎研究から臨床応用に至る幅広い知見が蓄積されてきた。なかでも血管は、骨髄細胞や末梢血細胞の虚血組織への移植、という細胞移植治療がすでに臨床の場にも応用され成果をあげており、近年の再生医療の発展において先駆的役割を果たしている。本稿は其中で万能の幹細胞として期待されるES細胞および最近樹立された新しい多能性幹細胞iPS細胞の血管分化とその応用に関する知見を中心に概説する。

ES細胞由来血管前駆細胞とその分化

筆者らはES細胞由来VEGFR2(2型血管内皮増殖因子受容体; 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、VEGFR2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、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¹⁾。VEGFR2陽性の血管前駆細胞は、VEGF(血管内皮増殖因子)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VEGFR2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。

最近、動脈、静脈、リンパ管それぞれの内皮細胞特異的に発現している分子が数々報告され、内皮細胞の多様性

に分子的根拠が与えられるようになってきた²⁾。筆者らは最近、VEGFR2陽性細胞からの血管分化系を用い、ephrinB2陽性(動脈)内皮、ephrinB2陰性(静脈)内皮、およびprox-1陽性(リンパ管)内皮細胞と考えられる細胞の誘導と純化にそれぞれ成功した³⁾⁴⁾。すなわち、VEGFR2陽性細胞をVEGFおよび血清存在下に内皮細胞に誘導するとほとんど(>90~95%)の内皮細胞がephrinB2陰性の静脈内皮細胞となる。VEGFに加えて、cAMPアナログである8bromo-cAMPまたは細胞内cAMPを上昇させる液性因子の1つであるアドレノメデュリン(AM)を加えcAMP経路を活性化することにより、内皮細胞においてNotchシグナルの活性化が誘導され、ephrinB2陽性の動脈内皮細胞が誘導される。また一方、VEGFR2陽性細胞をOP9ストローマ細胞上で培養して内皮細胞を誘導したところ、prox-1陽性リンパ管内皮細胞が出現した。このOP9によるリンパ管誘導作用は、VEGF-Cおよびangiopoietinの作用をブロックすることによりほぼ完全に阻害された。これらの結果により、ES細胞を用いて、動脈、静脈、リンパ管内皮細胞のすべてを系統的に分化誘導することが可能になるとともにその新たな分化メカニズムが明らかになった⁵⁾(図1)。こうした新たなアプローチで血管分化多様化機構を解析することにより、動脈特異的血管新生やリンパ管特異的血管抑制による抗癌治療などの開発も期待される。さらに詳細に

臓器特異的な血管の多様性を解析し理解することは、血管を介した臓器機能や病態の理解とそれに基づくさまざまな新しい治療戦略の開拓に結びつくと考えられる。

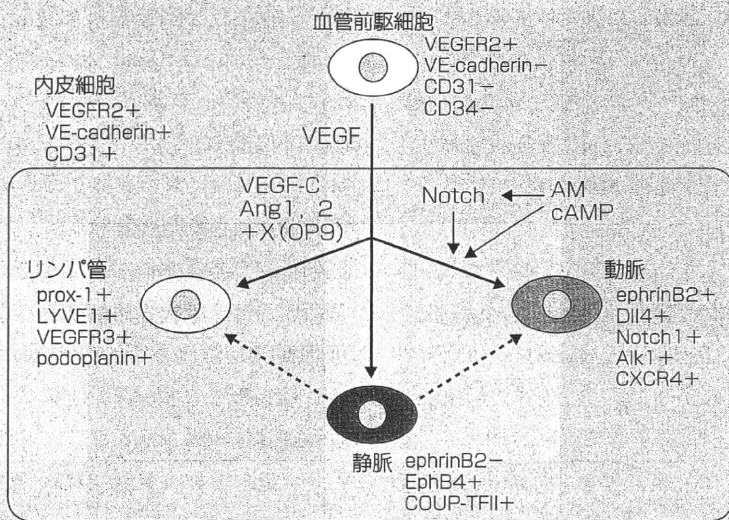
ES細胞による血管再生

筆者らはES細胞由来細胞の血管再生治療応用における可能性を検討するため、ES細胞由来血管細胞の成体に対する移植効果を検討した⁶⁾。すなわち、ES細胞由来血管細胞をヌードマウスに移植した腫瘍周囲に注入し、移植細胞の新生血管への寄与を検討したところ、ES細胞由来VEGFR2陽性細胞は、内皮細胞および壁細胞として新生血管へ寄与した。次に、成体への移植に適切な細胞の分化段階を検討するため、分化段階の異なる血管細胞、すなわち、ソート直後のVEGFR2陽性血管前駆細胞と、VEGFR2陽性細胞をさらに3日間培養して初期内皮細胞に分化した細胞(VE-カドヘリン陽性)の移植を比較した。VEGFR2陽性細胞を移植した群では、血管内皮細胞として寄与しているものの他に、内皮以外の細胞として組織内に存在するものが多数(約60%)認められた。一方、初期内皮を移植した群では、ほとんどすべての細胞(95%以上)が内皮細胞として血管に寄与していた。また、VEGFR2陽性細胞移植群では、細胞移植した腫瘍における血流増加は認められなかったが、分化させた血管細胞を移植した群では、有意な血流増加が認

な細胞移植治療のみならずさまざまな血管再生治療のターゲットとなる新たなシーズを生み出し、血管特異的血管新生なども含めさらに治療法を精緻に改善向上させていく上で、ES細胞の血管再生研究における意義は大きいと考えられる。

ヒトES細胞からの血管分化再生

ヒトES細胞を用いた血管細胞分化としては、胚様体を用いてCD31やVE-カドヘリン陽性内皮細胞の誘導と、フローサイトメトリーを用いての純化・再培養、培養下および免疫不全マウスに移植したゲル内における血管構造の形成が報告されている。京都大学のグループは、マウスES細胞と同様にサルES細胞においてもVEGFR2陽性細胞からの内皮細胞・壁細胞の分化⁷⁾、培養下における血管構造形成に成功している。さらに同グループは、2002年より日本最初のヒトES細胞分化研究を輸入ヒトES細胞を用いて開始し、ヒトES細胞においても血管構成細胞の分化誘導と*in vitro*における管腔構造形成、さらにはマウス血管新生モデルにおける新生血管への移植細胞の寄与と血流改善効果を認めることを明らかにした(図2)⁸⁾⁹⁾。また細胞移植の際に、純化した誘導内皮細胞のみを移植するよりも同時に誘導される壁細胞と混在した形で移植するほうが血管再生効果が高いことを見出している。同様の現象はES細胞由来心筋細胞移植の動物実験においても、純化



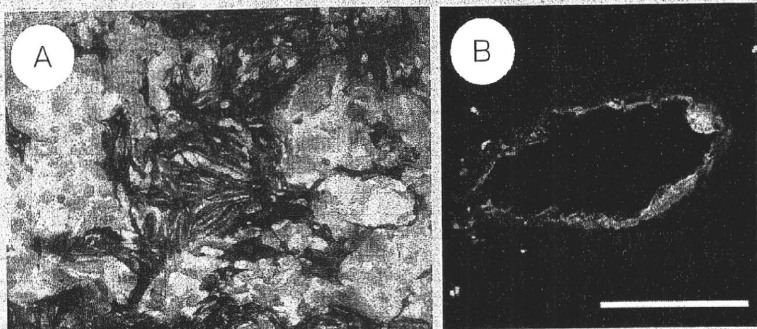
VEGFR2(FIK1)陽性血管前駆細胞は、主にVEGFのシグナルによりVE-カドヘリン陽性内皮細胞に分化する。静脈内皮細胞と考えられる細胞はVEGFおよび血清のみで誘導されるが、動脈内皮分化にはそれに加えてNotchおよびcAMPシグナルが、リンパ管内皮にはVEGF-C、angiopoietinとOP9細胞由来因子がそれぞれ必要である。動脈内皮およびリンパ管内皮は、静脈内皮(または厳密にはどれにも当てはまらないプロトタイプ内皮細胞?)からそれぞれ分化する可能性もある。

図1 VEGFR2陽性細胞からの動静脈リンパ管内皮分化

められた。これらの結果より、成体における血管新生をターゲットとした細胞移植においては、血管前駆細胞のレベルの細胞よりも、やや血管に分化した初期内皮細胞のステージがより有効かつ特異的であると考えられた。このように、ES細胞由来細胞の移植においては、むやみに未分化細胞を移植すればよいわけではなく、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—おそらくは標的細胞への分化が運命づけられた直近の前駆細胞—を選択する必要があると考えられた。また同時に、移植をされる側においても標的細胞の分化

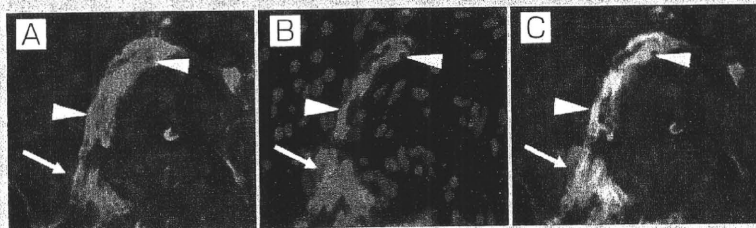
を効率的に促進できる微小環境ができるだけ再現されていることが、有効な再生の実現には重要であると考えられる。

血管再生治療においては、倫理面・安全面・技術面でハードルが低い骨髄細胞や末梢血、G-CSFなどの薬剤を用いた血管新生治療が先行して行われ、優れた効果をあげている。心筋や神経と異なり、既存の組織からの新生が可能な血管においては、細胞による純粋な再生は必ずしも必要ではなく、ES細胞治療がこれらの治療を凌駕して有用であるという知見は今のところない。しかし将来にわたっては、直接的



A: ヒトES細胞から誘導されたVEGFR2陽性細胞をFACSにより単離した後、IV型コラーゲン上で、VEGFおよび血清存在下に培養すると、CD31陽性内皮細胞(紫)と平滑筋 α アクチン陽性血管壁細胞(茶)が分化誘導される。
B: ノードマウス虚血肢に移植されたヒトES細胞由来内皮細胞は成体内血管再生に寄与する。全内皮細胞(isolectin染色: 緑)。ヒトES細胞由来内皮細胞(Dil染色: 赤)。Bar=50 μ m

図2 ヒトES細胞からの血管細胞分化(→巻頭Color Gravure参照)



ノードマウスの腫瘍周囲に移植されたマウスiPS細胞由来血管細胞は成体内再生に寄与する。A: CD31陽性内皮細胞(緑)。B: iPS細胞由来細胞(赤)。C: 合成画像。核(青)。iPS細胞由来CD31陽性内皮細胞(矢頭)およびそれに隣接してiPS細胞由来CD31陰性壁細胞(矢印)が認められる。

図3 マウスiPS細胞由来血管細胞による生体内血管新生(→巻頭Color Gravure参照)

iPS細胞からの血管分化再生

iPS細胞は、線維芽細胞などの成体由来分化細胞にOct4, Sox2, Klf4, c-mycの4因子(または3因子)を導入することにより誘導される新しい多能性幹細胞である^{10) 11)}。筆者らは、マウスおよびヒトiPS細胞を用いた心血管分化研究にもいち早く取り組んでいる。前述したマウスES細胞の血管分化誘導法をマウスiPS細胞に適用することにより、マウスES細胞と同様に、iPS細胞からの血管内皮細胞、壁細胞、動静脈リンパ管内皮細胞の分化誘導に成功した。内皮細胞および壁細胞からなる血管構造の三次元的形成にも成功した¹²⁾。また、担癌ノードマウスへの細胞移植実験により、内皮および壁細胞として生体内血管新生に寄与することも確認した(図3)。マウスiPS細胞3クローンを用いて検討したが、クローン間で多少の分化能、増殖能に差異を認めたが、ES細胞においても認められるクローン間の差異と同程度かそれ以下のものであり、マウスiPS細胞はマウスES細胞とほぼ同様の分化特性を有していると考えられた。ただし、1~2ヵ月以上の長期分化誘導培養中にc-mycをはじめとするiPS細胞誘導時の導入遺伝子群の再発現を認める例があり、iPS細胞における特性の1つとして注意する必要があると考えられる。現在ヒトiPS細胞の心血管系への分化誘導も行っているが、マウスiPS細胞はマウスES細胞と、ヒトiPS

心筋のみではなく、非心筋細胞と混在させたほうが心筋再生効率が良いことが報告されている。標的細胞に分化する前駆細胞のみならず、その分化や増殖、生存などを支える周囲の間質細胞の意義についても十分に考慮に入れる

必要性が示唆される。このようにヒト細胞において新たな血管分化再生機構が明らかになることにより、より治療応用に結びついた新たな知見が生まれることが期待される。

細胞はヒトES細胞とほぼ同様の性質をもっていると考えられる。iPS細胞は、さまざまな病態モデル動物やヒト症例から比較的簡便に多能性幹細胞が誘導できるため、薬剤の安全性試験や新たなドラッグスクリーニングなど直接的な細胞移植以外にも種々の応用が可能である。実際筆者らは、マウスiPS細胞からの三次元的血管形成モデルを用いて海洋生物由来HDAC阻害物質Ageladineの血管新生抑制作用を示すことに成功している¹⁹⁾。このようにiPS細胞を用いることにより、病態や疾患と幹細胞およびケミカルバイオロジーを結びつけた新しい再生医学や創薬研究が可能になると考えられる。

今後の可能性

このように、血管の発生・分化・再生機構に関してさまざまな知見が蓄積されてきているが、いまだ血管再生治療は発展途上にあると考えられる。臓器を構成する細胞を誘導して移植するあるいは前駆細胞を移植するというだけで臓器の再生が進むというほど単純ではないことがようやく学習されてきたというのが実情に近いであろう。今後は、細胞そのものの分化メカニズムの解析—細胞外シグナルから細胞内環境の変化と安定化の過程をエピジェネティックな視点も含めて解明する—に加えて、細胞間および細胞—細胞外マトリックス相互作用や臓器・組織間相互作用など臓器としての機能を果たしうる機能ユニットを形成するために必

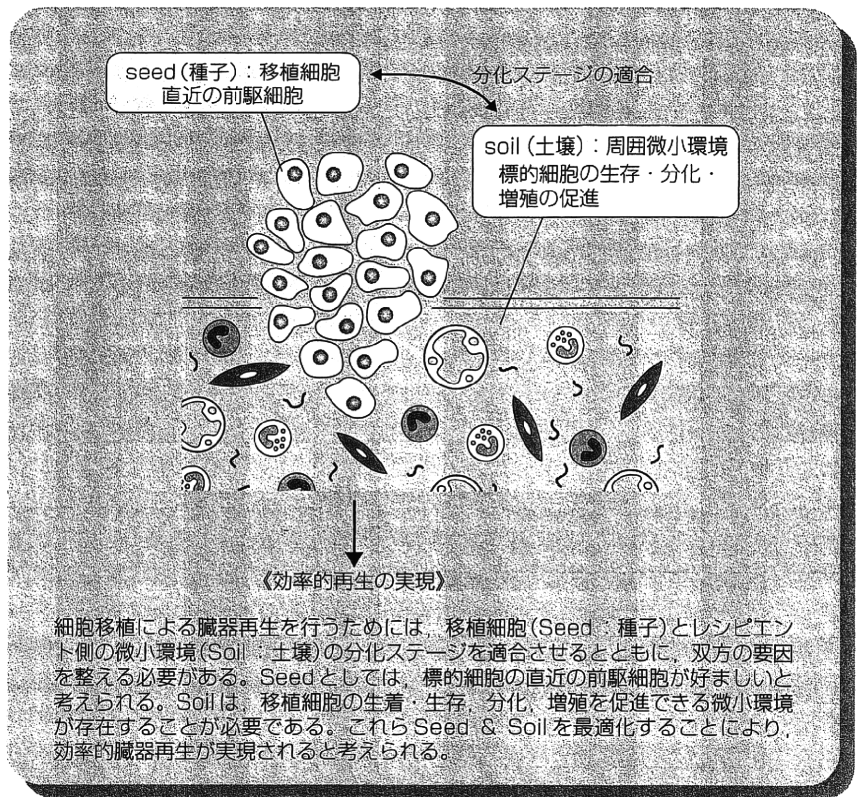


図4 Seed & Soil therapy

要な要素すべてに関して理解を深め、それらを生体内でできるだけ再構成することが重要であろう。有効に分化しうる幹・前駆細胞(seed : 種子)と、分化と機能発現を可能にする周囲環境(soil : 土壌)の双方を整えた治療(Seed & Soil Therapy)(図4)を目指すことにより、再生医療はより実効性が期待されるものに近づくと考えられる。

また、iPS細胞の出現は、これまでのES細胞をはじめとする再生医学研究に数多くの新たな可能性を与えた。iPS細胞研究が健全に成長することに

より、分化再生機構の基礎研究から、再生治療法の開発や創薬とその産業化に至るまで、ES細胞研究がもっていたポテンシャルがさまざまなかたちで臨床応用へ向けて花開き、人々の幸福に貢献していくことを期待する。

●文献

- 1) Yamashita JK: Differentiation and diversification of vascular cells from ES cells. *Int J Hematol* 80 : 1-6, 2004
- 2) 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

- 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* 26 : 1977-1984, 2006
- 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* 26 : 2070-2076, 2006
- 5) Yamashita JK : Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. *Trends Cardiovasc Med* 17 : 59-63, 2007
- 6) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, et al : Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood* 101 : 2675-2678, 2003
- 7) Sone M, Itoh H, Yamashita J, et al : Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation* 107 : 2085-2088, 2003
- 8) Sone M, Itoh H, Yamahara K, et al : Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 : 2127-2134, 2007
- 9) Yamahara K, Sone M, Itoh H, et al : Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS One* 3 : e1666, 2008
- 10) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 11) 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
- 12) 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
- 13) Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, et al : Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the *in vitro* vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg Med Chem Lett* 18 : 2982-2984, 2008

再生医療を考える

IPS細胞を用いた心血管再生 山下潤

はじめに

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)の段階において、将来胎仔を形成する内細胞塊(inner cell mass)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万能の幹細胞、ES細胞の原型となる元祖・万能細胞と考えられる。マウスES細胞の樹立は1981年であるが、ES細胞の医学生物学における大きな貢献は、再生医学ではなく様々な遺伝子改変マウスの樹立を可能にしたことであった。実際マウスES細胞を樹

立したマーティン・エバンス博士は、2007年ノーベル医学生理学賞をノックアウトマウスの開発を行った研究者らと共同受賞している。

ES細胞からの心血管分化

われわれは、ES細胞の出現などまだ遠く想像にも及ばない1998年頃からマウス、さらにはヒト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。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(2型VEGF

受容体)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^{1,2)}。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^{3,4)}。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^{5,6)}(京都大学内分泌代謝内科との共同研究)。

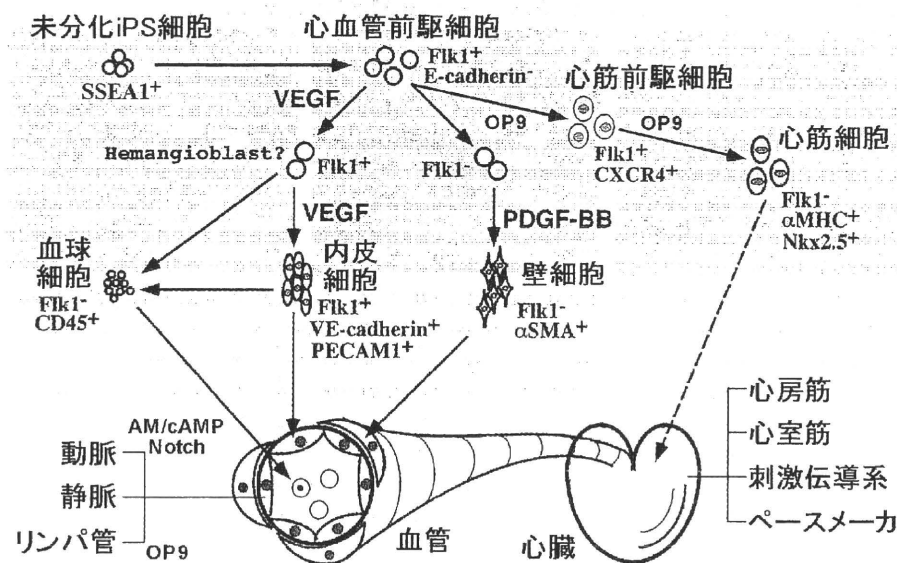
IPS細胞からの心血管分化

こうして構築してきたマウスES細胞分化システムをマウスES細胞に導入し、筆者らはいち早くIPS細胞からの心血管細胞の分化誘導に成功した⁷⁾。すなわち、未分化マウスES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ストローム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。内皮細胞および壁細胞からなる血管構造の3次元的形成にも成功した。マウスES細胞とマウスES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な心血管細胞を分化誘導することが可能であった(図①)。

ただし、1〜2カ月以上の長期分化誘導培養中にc-mycをはじめとするIPS細胞誘導時の導入遺伝子群の再発現を認める例があり、IPS細胞における特性の一つとして注意する必要があると考えられる。また、IPS細胞由来細胞の担がんヌードマウスへの細胞移植実験により、IPS細胞由来血管細胞が内皮および壁細胞として生体内血管新生に寄与し得ることも確認している(図②…未発表)。

① マウス iPS 細胞からの系統的心血管細胞分化



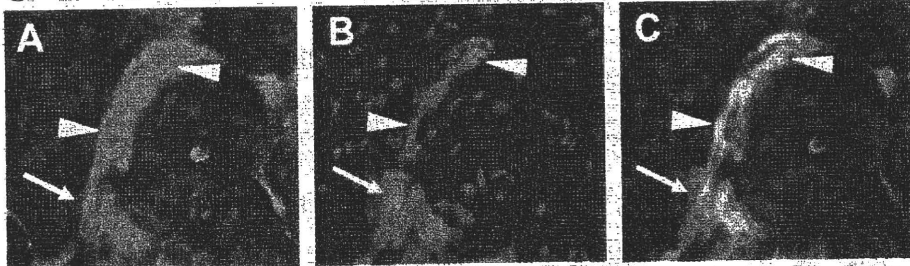
マウス iPS 細胞から誘導した Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、心血管系の構成細胞である血管内皮、壁細胞、心筋細胞、さらには動脈静脈リンパ管内皮細胞や種々の心筋細胞を系統的に分化誘導することができる。(文献 7) より改変)

ヒト iPS 細胞からの心血管分化

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⁸⁾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 Ca²⁺ 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)。

マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞、ヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞は維持・分化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、ES 細胞研究がその土台となり比較対象のスタンダードとなると考えられる。iPS 細

②マウス iPS 細胞由来血管細胞による生体内血管新生



ヌードマウスの腫瘍周囲に移植されたマウス iPS 細胞由来血管細胞は成体内血管再生に寄与する。A: CD31陽性内皮細胞 (緑) B: iPS 細胞由来細胞 (赤) C: 合成画像。核 (青)。iPS 細胞由来 CD31陽性内皮細胞 (矢頭) およびそれに隣接して iPS 細胞由来 CD31陰性壁細胞 (矢印) が認められる。

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細胞の創薬治療応用

ES細胞、ES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による病態解明や創薬治療応用など様々な形での臨床面への貢献が可能である。筆者らは、マウスES細胞を用いて3次元培養下における血管構造形成モデルを構築し、新規海洋生物由来HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) 阻害物質Azumamideの血管形成抑制作用を示すことに成功した⁹⁾。同モデルを用いて血管形成抑制または促進物質の探索が可能と考えられる。

(73ページへつづく)

(64ページよりつづく)

おわりに

クローン羊ドリーから10年を経て報告されたヒトiPS細胞樹立の報告がそれを上回る反響を持つて迎えられたのは、iPS細胞の持つ応用範囲の広さのせいであろう。iPS細胞誘導技術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が、それら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持ってiPS細胞の今後に対応していくことが必要と考えられる。

(京都大学再生医科学研究所 准教授)
幹細胞分化制御研究領域

文献

- (1) Yamashita, J., et al. : Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 408, 92~96(2000)
- (2) Yamashita, JK., et al. : Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB. J.*, 19, 1534~1536(2005)
- (3) 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)
- (4) 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)
- (5) Sone, M., et al. : Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27, 2127~2134(2007)
- (6) Yamahara, K., et al. : Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS. One*, 3, e1666(2008)
- (7) Narazaki, G., et al. : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 118, 498~506(2008)

(75)

⑧Mummery, C., et al : Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*, 107, 2733~2740(2003)

⑧Nakao, Y., et al : Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem(iPS)cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 2982~2984(2008)

血管再生

Frontier of vascular regeneration

特集

山下 潤
YAMASHITA Jun K.Regenerative Medicine—
期待される21世紀の新しい医療

Key words 骨髄細胞 細胞移植 ES細胞 iPS細胞

虚血性心疾患を中心とする心疾患および脳血管障害は、日本における死因のそれぞれ第2位(10万対126)と3位(10万対102)を占め、両者を合わせると第1位の悪性新生物(がん)(10万対254)に肉薄する。一方、国民医療費では、虚血性心疾患と脳血管障害を合わせると悪性新生物を上回り(2兆5千億 vs 2兆3千億円)(以上厚生労働省「平成16年度国民医療費の概況」)、心血管系疾患は、現在および未来にわたり日本の医療が取り組むべき最重要研究課題の一つと考えられる。近年の幹細胞生物学の発展を背景とした再生医療研究において、血管および心臓は最も急速に研究の進展が認められる臓器である。すなわち、さまざまな新しい心血管幹細胞・前駆細胞の発見や心血管分化機構の解析、さらには前駆細胞をヒトに用いた再生医療の試みまで、基礎研究から臨床応用に至る幅広い知見が蓄積されてきた。なかでも血管は、骨髄細胞や末梢血細胞の虚血組織への移植、という細胞移植治療がすでに臨床の場にも応用され成果を上げており、近年の再生医療の発展において先駆的役割を果たしている。本稿はそのなかで比較的基礎的研究に近い血管の前駆細胞と、その分化機構に関する知見を中心に、将来的な臨床応用に至る展望を含め概説する。

成体内血管前駆細胞

近年、骨髄や末梢血細胞を用いた血管再生治療の試みが世界各地で行われているが、これは1997年に浅原らが、骨髄単核球中のCD34⁺細胞が血管内皮の前駆細胞(endothelial progenitor cells; EPC)であると報告したことに端を発する¹⁾。その後、骨髄、末梢血単核球、単球/マクロファージ

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

ジなどさまざまな組織や細胞から、CD133, VEGFR2(2型血管内皮増殖因子受容体, Flk1), Sca-1, c-kit などさまざまなマーカーの組み合わせや形質をもとに、さまざまな“EPC”が報告されている。

たとえば、AC133(現CD133)は、造血幹細胞およびEPCに発現が認められるが、細胞の分化に伴って発現が低下し成熟内皮細胞では発現していない。末梢血中のCD133⁺/CD34⁺/VEGFR2⁺細胞は、血管新生に寄与する最も明確な細胞分

画の一つと考えられている。また末梢血単核球の中の単球/マクロファージ分画も EPC のソースとなることが報告されている²⁾。その他、EPC の培養時において、紡錘形をして培養 2～3 週で出現し 4 週以内に死滅する early EPC と、敷石状で培養 2～3 週以降に出現する late EPC が存在することも報告されている。このように、現時点では EPC は「そこから内皮細胞が分化しうる細胞分画」をすべて含めて語られており、その起源、細胞分画、細胞特性、分化過程などにさまざまな多様性を有する。

このなかで、ヒトの虚血性疾患に対する細胞治療においては、最もラフな形で EPC を含むと考えられる骨髄、または末梢血の単核球分画がおもに使われている。骨髄および末梢血単核球移植は、閉塞性動脈硬化症やパージャ病などにおいて優れた治療効果を上げているが、これら移植単核球分画において CD34⁺細胞など EPC に相当する細胞は約 1% 以下である。実際、単核球移植による血管再生効果は、EPC が血管に分化して直接血管新生に寄与している部分は少なく、単核球が分泌するさまざまな血管新生因子が既存の血管に働いて、既存の血管からの血管新生を誘導することがおもな作用であると考えられている。最近では、移植された単核球が、骨格筋に作用しそこから分泌された IL-1 β が血管新生を誘導することが報告されている³⁾。

生体内における血管新生は、血管前駆細胞のみならず、周囲組織や細胞、さまざまな増殖因子等の相互作用により進展する。例えば、虚血組織由来の VEGF や SDF-1 (stromal cell-derived factor 1; CXCL12) などが CXCR4⁺ の EPC に作用し、骨髄から EPC を標的組織に動員することや、血管新生因子により活性化されたマトリックスメタロプロテアーゼ 9 が可溶性 kit リガンドを切り出すことにより EPC の末梢血への動員が促進されることなどが報告されている。また、骨髄から EPC とともに動員される VEGFR1⁺ や c-kit⁺ 造血細胞が末梢での血管新生に関与していることも

報告されている。こうした血管新生における分子細胞間相互作用の解析は、血管再生治療戦略開発にさまざまな可能性をもたらすと考えられる。

下肢虚血疾患への骨髄細胞移植治療は、2003 年に厚生労働省から再生医療として初めて高度先進医療の保険給付が認められている。心筋梗塞に対しても骨髄単核球移植に関する大規模試験が世界各地で行われている。有効性も認められているが、これらの疾患を完全に治癒しうるような夢の治療というレベルにまでは至っていないようである。しかし、骨髄や末梢血細胞移植が簡便、安全かつ有効な血管再生治療法であることは揺るぎなく、血管再生治療において中心的役割を果たしていくことは疑いがないと思われる。さまざまな基礎的および臨床的知見を総合して、さらに有効な治療法として成長していくことが期待される。



胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来血管前駆細胞

1. ES 細胞由来血管前駆細胞とその分化

筆者らは ES 細胞由来 VEGFR2 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、VEGFR2 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、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⁴⁾。VEGFR2 陽性の血管前駆細胞は、VEGF の刺激により内皮細胞に、おもに 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、VEGFR2 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。

最近、動脈、静脈、リンパ管それぞれの内皮細胞特異的に発現している分子が数々報告され、内皮細胞の多様性に分子的根拠が与えられるようになってきた⁵⁾。筆者らは最近、VEGFR2 陽性細胞からの血管分化系を用い、ephrinB2 陽性 (動脈)

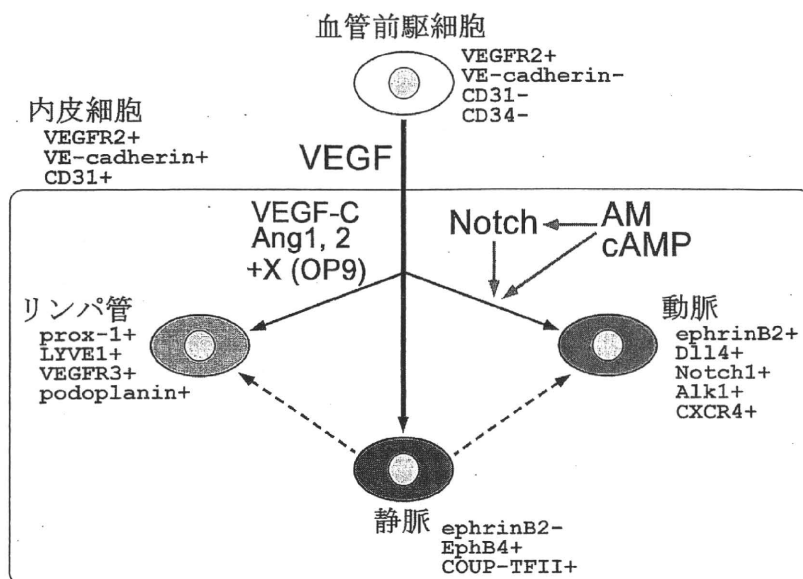


図1 VEGFR2陽性細胞からの動静脈リンパ管内皮分化(文献8より改変)

VEGFR2 (Flk1) 陽性血管前駆細胞は、おもに VEGF のシグナルにより VE-カドヘリン陽性内皮細胞に分化する。静脈内皮細胞と考えられる細胞は、VEGF および血清のみで誘導されるが、動脈内皮分化にはそれに加えて Notch および cAMP シグナルが、リンパ管内皮には VEGF-C, angiopoietin と OP9 細胞由来因子がそれぞれ必要である。動脈内皮およびリンパ管内皮は、静脈内皮(または厳密にはどれにもあてはまらないプロトタイプ内皮細胞?)からそれぞれ分化する可能性もある。

内皮, ephrinB2陰性(静脈)内皮, および prox-1陽性(リンパ管)内皮細胞と考えられる細胞の誘導と純化にそれぞれ成功した⁶⁾⁷⁾。すなわち、VEGFR2陽性細胞を VEGF および血清存在下に内皮細胞に誘導すると、ほとんど(>90~95%)の内皮細胞が ephrinB2陰性の静脈内皮細胞となる。

VEGF に加えて、cAMP アナログである 8bromo-cAMP または細胞内 cAMP を上昇させる液性因子の一つである アドレノメデュリン (AM) を加え cAMP 経路を活性化することにより、内皮細胞において Notch シグナルの活性化が誘導され、ephrinB2陽性の動脈内皮細胞が誘導される。また一方、VEGFR2陽性細胞を OP9 ストロマ細胞上で培養して内皮細胞を誘導したところ、prox-1陽性リンパ管内皮細胞が出現した。この OP9 によるリンパ管誘導作用は、VEGF-C および angiopoietin の作用をブロックすることにより、ほぼ完全に阻害された。これらの結果により、ES 細胞を用いて、動脈、静脈、リンパ管内皮細胞のすべてを系統的に分化誘導することが可能になるとともに、その新たな分化メカニズム

が明らかになった⁸⁾(図1)。

こうした新たなアプローチで血管分化多様化機構を解析することにより、動脈特異的血管新生やリンパ管特異的の新生抑制による抗がん治療などの開発も期待される。さらに詳細に臓器特異的な血管の多様性を解析し理解することは、血管を介した臓器機能や病態の理解と、それに基づくさまざまな新しい治療戦略の開拓に結びつくと考えられる。

2. ES 細胞による血管再生

筆者らは ES 細胞由来細胞の血管再生治療応用における可能性を検討するため、ES 細胞由来血管細胞の成体に対する移植効果を検討した⁹⁾。すなわち、ES 細胞由来血管細胞をヌードマウスに移植した腫瘍周囲に注入し、移植細胞の新生血管への寄与を検討したところ、ES 細胞由来 VEGFR2陽性細胞は、内皮細胞および壁細胞として新生血管へ寄与した。次に、成体への移植に適切な細胞の分化段階を検討するため、分化段階の異なる血管細胞、すなわち、ソート直後の

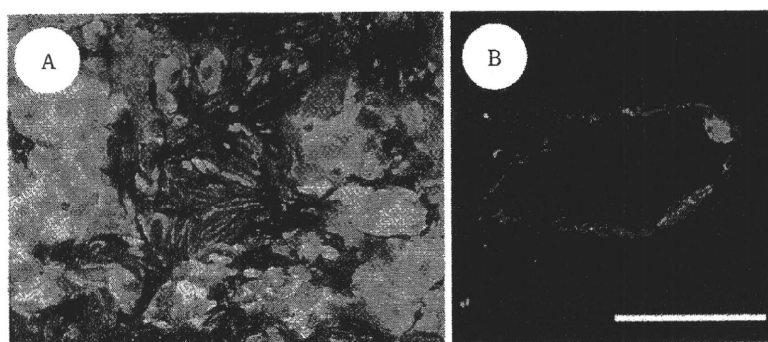


図2 ヒトES細胞からの血管細胞分化(文献11より改変)

A: ヒトES細胞から誘導された2型 VEGF 受容体陽性細胞をFACSにより単離した後, IV型コラーゲン上で, VEGF および血清存在下に培養すると, CD31陽性内皮細胞(紫)と平滑筋 α アクチン陽性血管壁細胞(茶)が分化誘導される。

B: ノードマウス虚血肢に移植されたヒトES細胞由来内皮細胞は成体内血管再生に寄与する。全内皮細胞(isolectin 染色: 緑)。ヒトES細胞由来内皮細胞(DiI 染色: 赤)。

VEGFR2陽性血管前駆細胞と、VEGFR2陽性細胞をさらに3日間培養して初期内皮細胞に分化した細胞(VE-カドヘリン陽性)の移植を比較した。VEGFR2陽性細胞を移植した群では、血管内皮細胞として寄与しているものの他に、内皮以外の細胞として組織内に存在するものが多数(約60%)認められた。一方、初期内皮を移植した群では、ほとんどすべての細胞(95%以上)が内皮細胞として血管に寄与していた。また、VEGFR2陽性細胞移植群では、細胞移植した腫瘍における血流増加は認められなかったが、分化させた血管細胞を移植した群では、有意な血流増加が認められた。これらの結果より、成体における血管新生をターゲットとした細胞移植においては、血管前駆細胞レベルの細胞よりも、やや血管に分化した初期内皮細胞のステージがより有効かつ特異的であると考えられた。

このように、ES細胞由来細胞の移植においては、むやみに未分化細胞を移植すればよいわけではなく、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—恐らくは標的細胞への分化が運命づけられた直近の前駆細胞—を選択する必要があると考えられた。また同時に、移植をされる側においても標的細胞の分化を効率的に促進できる微小環境ができるだけ再現されていることが、有効な再生の実現には重要

であると考えられる。

・血管再生治療においては、倫理面・安全面・技術面でハードルが低い骨髓細胞や末梢血、G-CSFなどの薬剤を用いた血管新生治療が先行して行われ、優れた効果を上げている。心筋や神経と異なり、既存の組織からの新生が可能な血管においては、細胞による純粋な再生は必ずしも必要ではなく、ES細胞治療がこれらの治療を凌駕して有用であるという知見は今のところない。しかし将来にわたっては、直接的な細胞移植治療のみならずさまざまな血管再生治療のターゲットとなる新たなシーズを生み出し、血管特異的血管新生等も含めさらに治療法を精緻に改善向上させていくうえで、ES細胞の血管再生研究における意義は大きいと考えられる。

3. ヒトES細胞からの血管分化再生

ヒトES細胞を用いた血管細胞分化としては、胚様体を用いたCD31やVE-カドヘリン陽性内皮細胞の誘導と、フローサイトメトリーを用いての純化・再培養、培養下および免疫不全マウスに移植したゲル内における血管構造の形成が報告されている。

京都大学のグループは、マウスES細胞と同様にサルES細胞においても2型VEGF受容体陽性細胞からの内皮細胞・壁細胞の分化¹⁰⁾、培養下