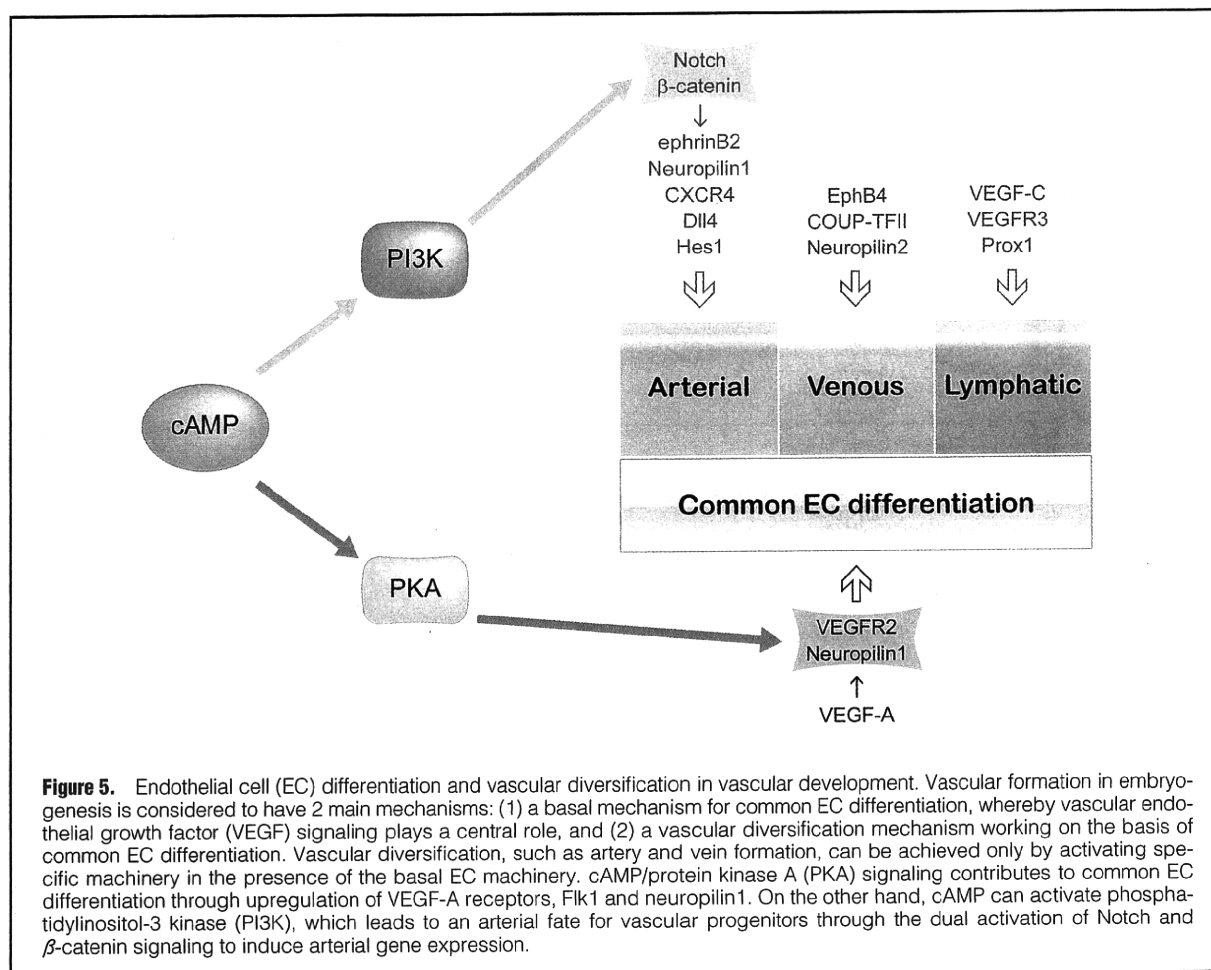




mon role in ECs and a specific role in arterial ECs. A recent study showing that EC-specific β -catenin transgenic mice had enhanced Notch signaling and induced artery formation, also indicated that β -catenin signaling plays an important role in arterial EC specification.⁵⁴

Mechanisms of Vein Formation

Venous ECs are known to express EphB4,^{32,55} NRP2,³⁷ COUP-TFII,⁵⁶ and the Apj receptor⁵⁷ (Figure 3). The vein was considered to be the default character in vascular development. However, You et al reported that the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII) acts as an inducer of venous EC specification.⁵⁶ COUP-TFII establishes venous identity by suppressing arterial fate through downregulating Notch signaling. Other mechanisms involved in venous specification are still largely unknown.

Environmental Factors and Plasticity of Arterial-Venous Specification

Although the molecular pathways for arterial-venous specification is now becoming clear, we cannot ignore the involvement of physical factors such as flow shear stress. Chick embryo studies have shown that hemodynamic forces can alter EC identity after the onset of circulation. Ligation of specific arteries in the avian embryo can result in a reversible switch from arterial-specific markers, such as ephrinB2 and

NRP1, to venous markers such as EphB4.⁵⁸ Furthermore, vascular progenitors or early ECs determined the arterial-venous specification by environmental conditions in a quail chick model. That is, the dorsal aorta, carotid artery and the cardinal and jugular veins were isolated with the vessel wall from quail embryos and grafted into the coelom of chick hosts. Early ECs, arterial ECs and venous ECs, can populate both artery and vein in host embryos and assume the appropriate molecular identity in their new locales,⁵⁹ indicating that even after the acquisition of arterial or venous identity the endothelium during vascular development remains plastic for arterial-venous differentiation. We also revealed that ECs derived from ES cells and at the early differentiation stage possess plasticity for arterial-venous specification.¹³ Activation of Notch and β -catenin signaling in venous ECs derived from ES cells induced ephrinB2-positive arterial ECs. When activation of Notch and β -catenin signaling ceased in arterial ECs, ephrinB2 expression was attenuated and disappeared. Early arterial or venous ECs thus possess plasticity between the arterial and venous identities by the on/off of Notch and β -catenin signaling.¹³ This evidence suggests that ECs in the early developmental stage are still plastic, and acquire their diverse identities from physical and environmental factors, as well as genetic factors, which leads to the formation of an elaborate and complex vascular network in the body.

Conclusion

Blood vessels are involved in the formation of most organs during ontogenesis, and they maintain homeostasis in the body. They have an abundance of diversification and play a specific role in respective organs. Our 2 recent studies of cAMP signaling in EC differentiation and other previous works present the concept that vascular formation in embryogenesis has 2 main mechanisms: (1) basal EC differentiation, and (2) vascular diversification in the context of ECs. cAMP signaling has the pivotal abilities of enhancing common EC differentiation through upregulation of Flk1 and NRP1, and determining the fate of arterial EC through dual activation of Notch and β -catenin signaling (Figure 5). These findings, however, only partially explain the vascular developmental processes in the body. How is vascular branching determined in vascular development? How are specific blood vessels formed, such as the blood-brain barrier and the blood-placenta barrier? A more detailed investigation into the local environment of ECs, such as interaction between SMCs, pericytes, bloods, and nerves, may lead to a more profound understanding of vascular diversity. Elucidation of all the cellular and molecular machinery of vascular formation will lead to a better understanding of various pathophysiology, as well as ontogenesis/regeneration, and provide novel strategies for new drugs and future medical therapies.

Acknowledgments

We thank our colleagues and laboratory members for their excellent experimental assistance and stimulating discussions. We thank S. Katayama (Kyoto University, Kyoto, Japan) for editing the figures. This study was supported by grants from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, the Project for Realization of Regenerative Medicine, and the Japan Society for the Promotion of Science.

References

- Rall TW, Sutherland EW. The regulatory role of adenosine-3', 5'-phosphate. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1961; **26**: 347–354.
- Choi EJ, Xia Z, Villacres EC, Storm DR. The regulatory diversity of the mammalian adenylyl cyclases. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 269–273.
- Cooper DM, Mons N, Karpen JW. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 1995; **374**: 421–424.
- Cheng X, Ji Z, Tsalikova T, Mei F. Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008; **40**: 651–662.
- Feldman RD, Gros R. New insights into the regulation of cAMP synthesis beyond GPCR/G protein activation: Implications in cardiovascular regulation. *Life Sci* 2007; **81**: 267–271.
- Bornfeldt KE, Krebs EG. Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* 1999; **11**: 465–477.
- Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, et al. Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. *Hypertens Res* 2003; **26**(Suppl): S93–S98.
- Birukova AA, Zagranichnaya T, Fu P, Alekseeva E, Chen W, Jacobson JR, et al. Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Exp Cell Res* 2007; **313**: 2504–2520.
- Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, et al. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 136–146.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000; **408**: 92–96.
- Yamashita JK. ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration. *Exp Cell Res* 2010; **316**: 2555–2559.
- Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK. Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. *Blood* 2009; **114**: 3707–3716.
- Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, et al. Convergence of Notch and beta-catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. *J Cell Biol* 2010; **189**: 325–338.
- Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; **39**: 469–478.
- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 26988–26995.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; **376**: 62–66.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; **380**: 435–439.
- Miquerol L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 2000; **127**: 3941–3946.
- Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis* 2008; **11**: 31–39.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; **92**: 735–745.
- Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 1995; **121**: 4309–4318.
- Kawakami A, Kitsukawa T, Takagi S, Fujisawa H. Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J Neurobiology* 1996; **29**: 1–17.
- He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; **90**: 739–751.
- Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997; **90**: 753–762.
- Dunwoodie SL. The role of hypoxia in development of the mammalian embryo. *Dev Cell* 2009; **17**: 755–773.
- Yurugi Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, 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.
- Cimato T, Beers J, Ding S, Ma M, McCoy JP, Boehm M, et al. Neuropilin-1 identifies endothelial precursors in human and murine embryonic stem cells before CD34 expression. *Circulation* 2009; **119**: 2170–2178.
- Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3789–3794.
- Orellana SA, McKnight GS. Mutations in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase result in unregulated biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4726–4730.
- Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology: Endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J* 2009; **73**: 1983–1992.
- Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, et al. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 2001; **104**: 1964–1971.
- Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; **93**: 741–753.
- Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, et al. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: Demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999; **13**: 295–306.
- Zhong TP, Childs S, Leu JP, Fishman MC. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 2001; **414**: 216–220.

35. Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* 2001; **108**: 161–164.
36. Sorensen I, Adams RH, Gossler A. DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood* 2009; **113**: 5680–5688.
37. Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. *Trends Cardiovasc Med* 2007; **17**: 59–63.
38. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998; **393**: 591–594.
39. Ara T, Tokoyoda K, Okamoto R, Koni PA, Nagasawa T. The role of CXCL12 in the organ-specific process of artery formation. *Blood* 2005; **105**: 3155–3161.
40. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 2005; **436**: 193–200.
41. Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, et al. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 723–730.
42. Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, et al. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 2001; **128**: 3675–3683.
43. Duarte A, Hirashima M, Benedito R, Trindade A, Diniz P, Bekman E, et al. Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes Dev* 2004; **18**: 2474–2478.
44. Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev* 2004; **18**: 2469–2473.
45. Fischer A, Schumacher N, Maier M, Sendtner M, Gessler M. The Notch target genes *Hey1* and *Hey2* are required for embryonic vascular development. *Genes Dev* 2004; **18**: 901–911.
46. Carlson TR, Yan Y, Wu X, Lam MT, Tang GL, Beverly LJ, et al. Endothelial expression of constitutively active Notch4 elicits reversible arteriovenous malformations in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 9884–9889.
47. Goodwin AM, D'Amore PA. Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis* 2002; **5**: 1–9.
48. Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ. Targeted disruption of the *Wnt2* gene results in placental defects. *Development* 1996; **122**: 3343–3353.
49. Ishikawa T, Tamai Y, Zorn AM, Yoshida H, Seldin MF, Nishikawa S, et al. Mouse *Wnt* receptor gene *Fzd5* is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development* 2001; **128**: 25–33.
50. Cattelino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, Corsi A, et al. The conditional inactivation of the *beta*-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol* 2003; **162**: 1111–1122.
51. Shimizu T, Kagawa T, Inoue T, Nonaka A, Takada S, Aburatani H, et al. Stabilized *beta*-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 7427–7441.
52. Mochizuki N. Vascular integrity mediated by vascular endothelial cadherin and regulated by sphingosine 1-phosphate and angiopoietin-1. *Circ J* 2009; **73**: 2183–2191.
53. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: Only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 1999; **252**: 13–19.
54. Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, Caprini A, Giampietro C, Taketo MM, et al. The *Wnt/beta*-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating *Dll4*/Notch signaling. *Dev Cell* 2010; **18**: 938–949.
55. Muto A, Model L, Ziegler K, Eghbalieh SD, Dardik A. Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: Insights into the neointimal algorithm and management strategies. *Circ J* 2010; **74**: 1501–1512.
56. You LR, Lin FJ, Lee CT, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature* 2005; **435**: 98–104.
57. Saint-Geniez M, Argence CB, Knibiehler B, Audigier Y. The *msr/apj* gene encoding the apelin receptor is an early and specific marker of the venous phenotype in the retinal vasculature. *Gene Expr Patterns* 2003; **3**: 467–472.
58. le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Djonov V, Matthijsen R, et al. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* 2004; **131**: 361–375.
59. Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Breant C, Eichmann A. Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* 2001; **128**: 3359–3370.



iPS細胞の循環器疾患への応用

企画：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)

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells；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，京都大学の山中伸弥らによって報告された。2007年には，山中らおよびトムソンらによりヒト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，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，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技術・安全面の問題，特に未分化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，という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。

iPS細胞研究の循環器疾患への応用としては，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形で臨床へ貢献することが期待される。本特集は，iPS細胞が循環器医療全体に，実際にはどのようなことをもたらし得るのか，またそれにはどんなハードルがあるのかについて，できるだけ多角的視点から迫ることを目標とした。そこで，①細胞治療を中心としたiPS細胞の心筋再生への応用の試みと，②疾患特異的細胞モデルを用いた研究，さらに③それら細胞の商業レベルでの応用の可能性と，④再生医療実現のために必要とされる制度面の問題，をそれぞれのフロンランナーの方々に解説いただいた。iPS細胞研究の現状と未来について，多次元的な位置づけと包括的理解に貢献できれば幸いである。

iPS細胞を用いた心筋再生

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, 京都大学iPS細胞研究所増殖分化機構研究部門

● マウスES/iPS細胞の心血管細胞分化研究

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(embryonic stem)細胞から血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)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(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¹⁾²⁾。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²⁾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³⁾⁴⁾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⁵⁾。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、主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ネルHCN4、T型Caチャネル(Cav3.2)や心室筋特異的チャネルKir2.1を発現する細胞など⁶⁾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⁷⁾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⁸⁾などがある。

● ヒトES/iPS細胞の心筋細胞分化

ヒトES細胞は、1998年米国James Thomsonらによって樹立されたが、マウスES細胞とは、①維持培養に必要とされるシグナルが異なる、②単一細胞からコロニーを形成しにくい、③フィーダー細胞なしでの培養が難しい、④相同組み換えなどの遺伝子導入が困難である、⑤導入遺伝子のサイレンシングがしばしば起こる、⑥分化誘導にも時間がかかる、⑦単一細胞からの分化も困難である、等々性質上のさまざまな相違点があり、そのいずれもがヒトES細胞を用いた研究開発をより困難なものとしている。ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞とその維持方法、分化などの性質はほぼ同等と考えられる。ヒトiPS細胞の応用には、こうした基本的な技術的問題が解決されていく必要がある。

ヒトES細胞からの心筋分化誘導は、胚様体を用い

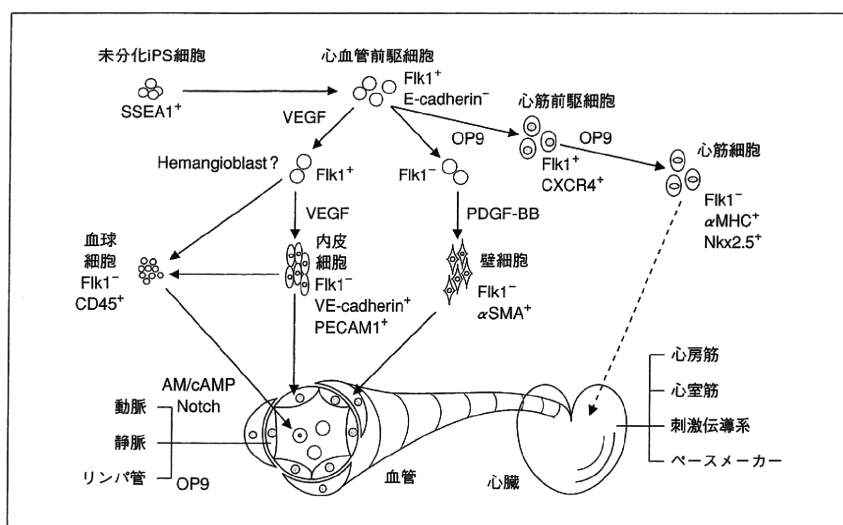


図1
マウスiPS細胞からの系統的
心血管細胞分化

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5より改変引用)

た方法やストローマ細胞との共培養(END2細胞)などにより報告されている⁹⁾。その後、胎生期の中胚葉誘導シグナルや内皮細胞・心筋細胞誘導シグナル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¹⁰⁾¹¹⁾。マウスES細胞に準じた形でヒトFlk1(KDR)陽性細胞¹²⁾やislet1陽性細胞¹³⁾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。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ることで70~80%の心筋分化誘導効率というのがヒトES細胞で報告されている(Keller, 国際幹細胞学会, 2010, San Francisco)。筆者らは、END2細胞を用いたヒトES細胞心筋分化誘導法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)。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、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¹⁵⁾¹⁶⁾。ヒトES細胞で開発された手法を導入し、ヒトiPS細胞からの心筋細胞誘導はさらに改善されていくものと

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細胞を用いたこれら細胞治療の実現にいた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 個オーダーにいたる心筋細胞が死ぬともいわれている。その10分の1量の細胞の補充を行うとしても、 10^7 から 10^8 オーダーの細胞数を用意することが可能な効率的な誘導法を開発する必要がある。また、未分化ヒトiPS細胞が移植されると、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¹⁷⁾。

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、技術的には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ことを目指す必要がある。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り、①から②の間には実は大きな隔りがある。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こうした細胞治療の実現には不可欠である(Selection 4参照)。

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集団として移植する必要があると考えられ、現在、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の移植(心臓に貼り付ける)¹⁸⁾、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)¹⁹⁾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されていると思われる。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。現在筆者らはマウスES細胞から誘導した心筋細胞を用いた心筋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。同モデルをヒトiPS細胞へ拡張していくことが望まれる。

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、全く新しい形で病態の解明や創薬への応用が可能である^{20) 21)}(Selection 2, 3参照)。

①病態解明

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。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、など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、筆者らのES細胞心筋分化系を用いて免疫抑制薬サイクロスポリン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)²²⁾。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。実際、筆者らは、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など、種々の化合物の同定に成

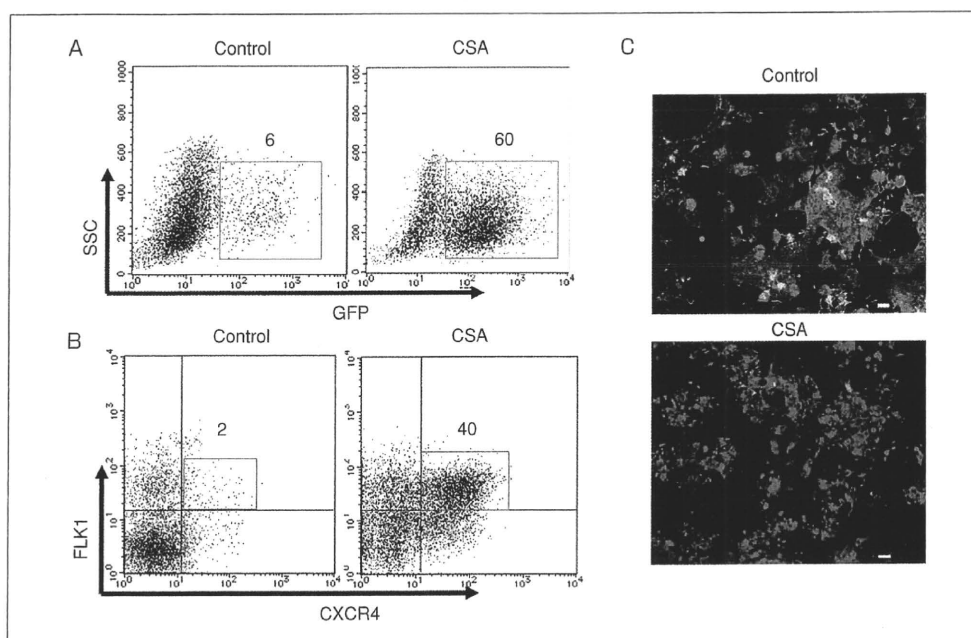


図2 サイクロスポリンA(CSA)による心筋前駆細胞および心筋細胞分化誘導効果

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(α MHCプロモーター/GFP)発現。誘導された細胞の約60%が α 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(文献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22より改変引用)

功している(未発表)。これらの中から生体においても効果を発揮するものがみつければ、新しい心臓再生薬の誕生につながるかもしれない。

- 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、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により、薬剤の安全性試験に応用可能と考えられる。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。

● 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。例えば、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²³⁾。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、分化誘導させた時

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臓器を作らせる、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, Hamaoka 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、相互に関連し合い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。

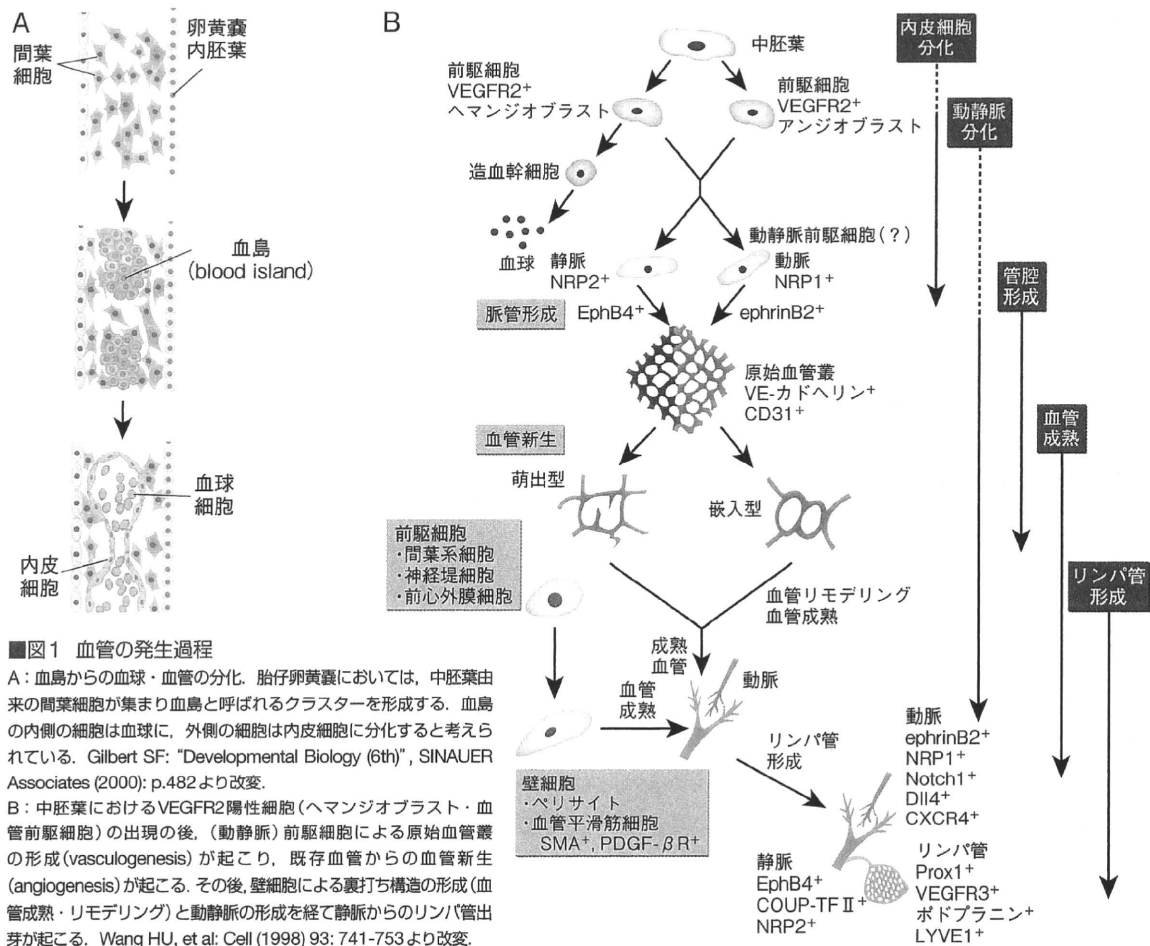
I 血管の発生過程

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³⁾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ると考えられている (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

注1 前駆細胞

分化した細胞を作り出し臓器組織の発生・再生に貢献する細胞であるが、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。

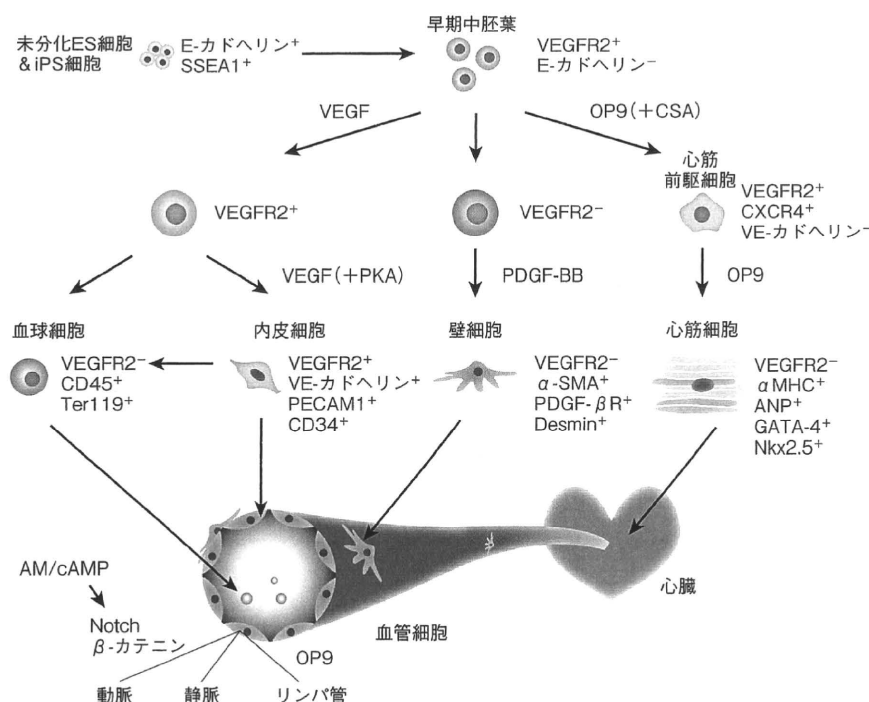


遺伝子的区別がなされていることが明らかとなった⁶⁾。ニワトリ胎仔の血島においては、将来的に動脈および静脈に特異的発現を示すNRP1 (neuropilin 1) とNRP2がそれぞれ異なる細胞分画に発現しており、動静脈の運命決定は血流が生じるよりも早い段階で遺伝子的に決定されている可能性も示されている⁴⁾。しかし、形態的变化を含むその後の動静脈分化には血流による物理的刺激もやはり重要な役割を果たしていると考えられる。動静脈に加えてもう1つの主要な脈管系であるリンパ管は、マウスでは胎生10.5日ごろより静脈から出芽して形成されると考えられている⁷⁾。ほぼ体内のすべての組織臓器に存在する血管は、そ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

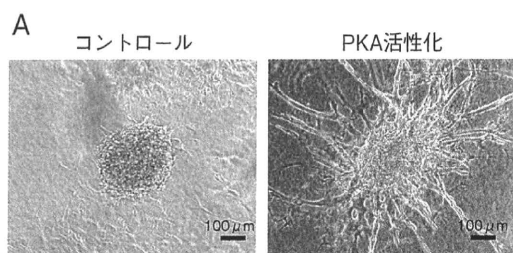
死となる。また、VEGF-Aは、ホモノックアウトマウスのみならずヘテロノックアウトマウスも血管系の多様な異常により胎生致死となること、さらに、正常の2～3倍という軽度のVEGF-A過剰発現マウスにおいても血管形成不全により胎生致死となることから、胎生期におけるVEGF-A濃度の微細なバランスが血管形成にきわめて重要であることを示している^{8)~10)}。

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

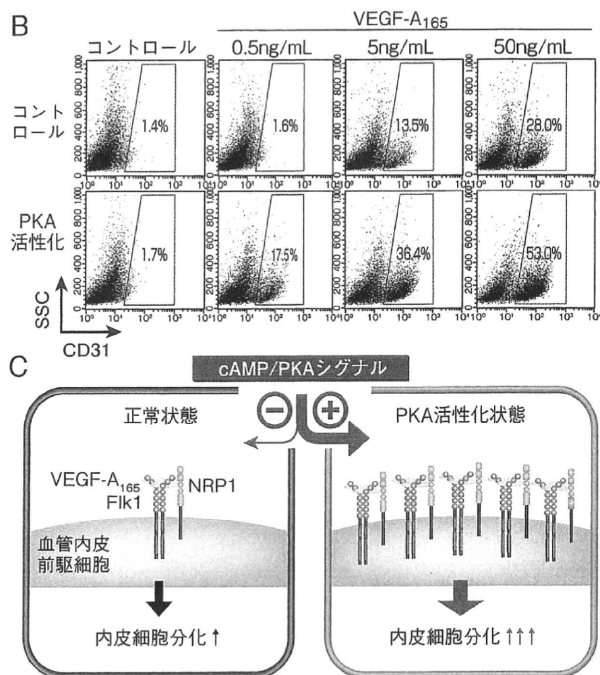


■図3 cAMP/PKAシグナルの血管内皮細胞分化の促進機構

A: ES細胞由来血管前駆細胞を用いて凝集体を形成し、コラーゲンIゲル内に5日間培養する。活性化型PKAを過剰発現することにより血管形成が著しく進行する。

B: FACS (fluorescence activated cell sorting) による血管内皮細胞マーカーCD31を用いた解析。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-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。SSC: side scatter。

C: 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、VEGFR2およびNRP1の発現が促進し、VEGFR2-VEGF-A₁₆₅-NRP1タンパク質複合体が形成され、血管内皮細胞分化が促進する。Yamamizu K, et al: Blood (2009) 114: 3707-3716より改変。



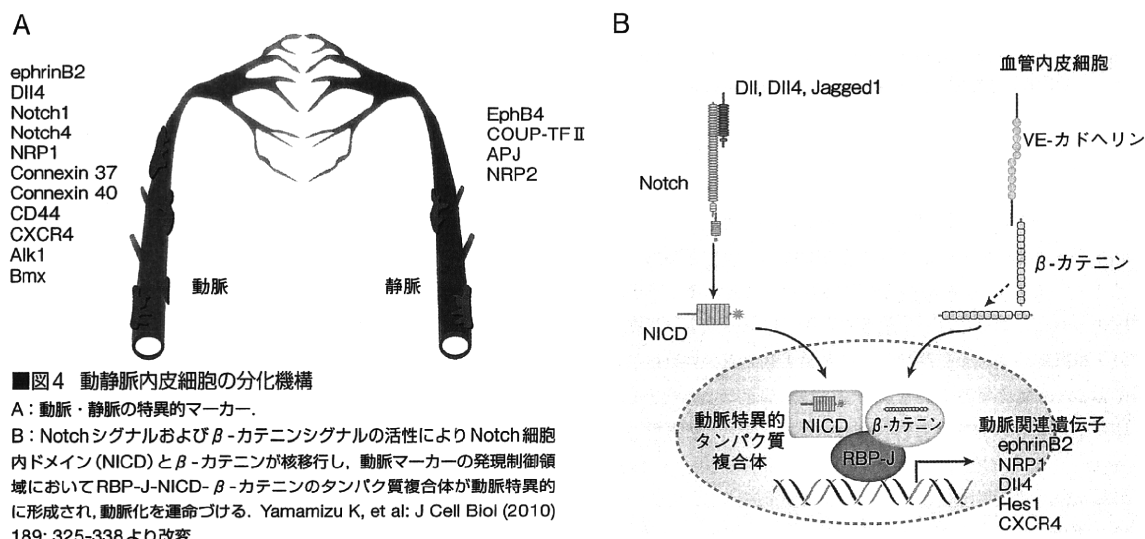
れ方によって膜貫通型受容体と分泌型受容体(sVEGFR1)をコードする。sVEGFR1はVEGF-Aに強く結合し、VEGF-AのVEGFR1およびVEGFR2への結合を阻害し血管新生を抑制する。また、VEGFR1ノックアウトマウスは血管形成が過剰に起こることにより胎生致死となることから、胎生期においてVEGFR1は血管新生に対して抑制的に作用していることが考えられる¹⁶⁾。この抑制機構はVEGFR1のリガンド結合部位のみの発現によって認められることから、VEGF-AをVEGFR1が捕らえることによりVEGFR2の効果を調節していることが示唆される。

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



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, Dil4 (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Dil4, 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

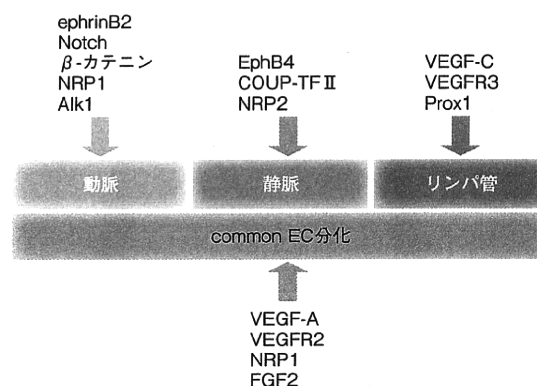
Jagged1, Notch3が発現している。Notch1, 4およびNotchリガンドDil4, そしてNotchシグナル下流の転写因子であるRBP-J, さらにNotchシグナルにより発現が制御されるHey1/Hey2のノックアウトマウスは血管の形成異常により胎生致死となる^{22)~25)}。筆者らは、Notchシグナルおよび胚発生において重要な役割を果たす β -カテニンシグナルが協調的に働き動脈の特異性を獲得することを報告した²⁾。 β -カテニンは細胞膜においてVE-カドヘリンに結合し、広範囲の血管に存在する。血管内皮特異的 β -カテニンノックアウトマウスでは血管が脆弱し胎生致死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, Dil4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になってきたが, 血流のシェ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, 移植細胞は局所に定着して動脈あるいは静脈の内皮細胞へとアイデンティティを獲得することができることが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, 血管は様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, 現状の知見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⁵⁾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よいが、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

■IPS細胞の細胞治療応用には、分化誘導法・純化法・移植法・安全性評価、制度的整備等が必要である。

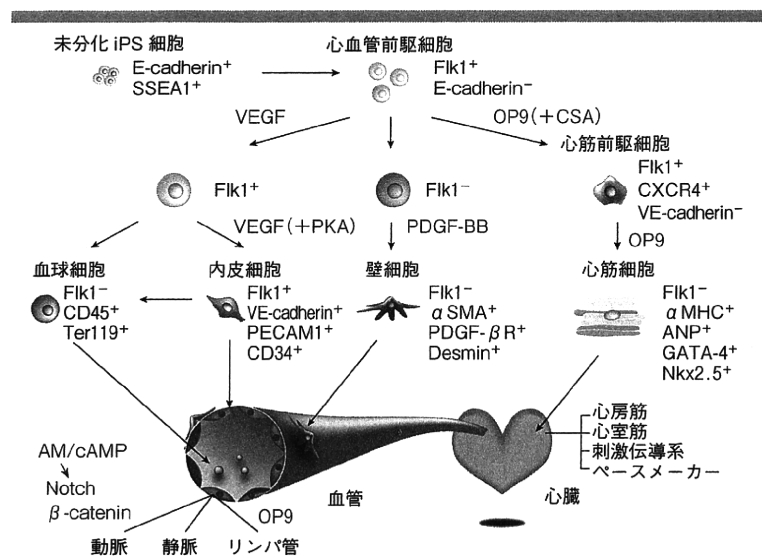


図1 マウスiPS細胞からの系統的心血管細胞分化

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10⁹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的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⁾。