

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

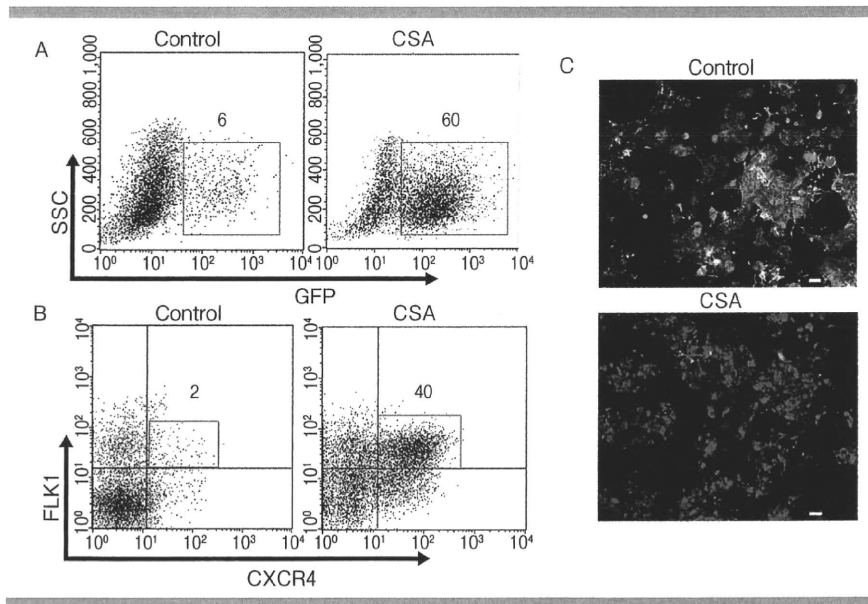


図2 サイクロスポリンA(CSA)による心筋前駆細胞および心筋細胞分化誘導効果

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

A, B: FACS解析。

A: 心筋特異的GFP(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⁶⁾が約20倍増加する。

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

(文献20より改変)

①病態解明

これまではごく少量の生検サンプルの解析に限局されていた研究が、個々の症例から生きた細胞を潤沢に得られることにより、標的細胞の遺伝子解析、機能解析や薬剤の効果判定等を、実際の症例に関して繰り返し行うことが可能となる。しかし実際には、モデル細胞を樹立するために多数のiPS細胞を樹立・解析する必要があること、

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

②創薬応用

iPS細胞の創薬応用には大きく、1)新規薬剤の探索と2)薬剤安全性試験への応用の2つが考えられる。1)疾患モデル細胞を用いて、同細胞の異常を改善する新規薬剤や疾患特異的に作用す

る薬剤などの探索が可能となる。筆者らは最近、免疫抑制剤サイクロスポリンAが中胚葉段階に特異的に作用し強力な心筋前駆細胞および心筋細胞分化誘導作用を有することを見出した(図2)²⁰⁾。筆者らはさらに種々の化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、心筋分化促進作用を有する化合物や心筋の分裂増殖を促進する物質等種々の化合物の同定に成功している

(未発表)。

2) 受精卵を用意することが必要であるヒトES細胞と比べて、iPS細胞は数多くの細胞株を樹立しやすくiPS細胞バンクが構築しやすい。そこから細胞を誘導して薬剤の細胞毒性をスクリーニングすることにより、稀に発生する心毒性や肝障害等を事前に検出できるかも知れない。さらには副作用を起こす症例に投薬を避ける「テーラーメイド医療」に貢献しうる可能性もある。また、特定の副作用のモニターにもモデル細胞は応用可能である。たとえば、薬剤性QT延長は、現在HERG試験と呼ばれるHERGチャネルを過剰発現させた細胞株(HEK293細胞等)に薬剤を添加することによりチェックされている。しかし、HERG試験ではQT延長が認められなかったにもかかわらず、生体への投与においてはQT延長を来す偽陰性の薬剤(ソタロール等)の存在が問題であった。ヒトES/iPS細胞から誘導した心筋細胞を用いた場合、このような偽陰性薬剤でもQT延長を検出できることが示されており²¹⁾、生体内の反応をより忠実に反映するモデル細胞として利用できることが期待されている。

3. その他動物モデルへの応用

循環器病関係のモデル動物には、マウスモデルばかりでなくマウス以外の動物種のものも数多くある(高血圧自然発症ラット、糖尿病モデルラット、

心筋症ハムスター等)。これらモデル動物からのiPS細胞の樹立が可能となれば、モデル動物と同動物由来細胞を用いて、動物モデルと細胞実験を相互対応させながら新しい病態の解析を行うことなどが可能となると考えられる。

おわりに

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

しても研究が急速に進むと考えられる。

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

●文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007
- 3) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920, 2007
- 4) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al: 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 progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 19: 1534-1536, 2005
- 6) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, et al: Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch

- activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 1977-1984, 2006
- 7) Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al : Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 2070-2076, 2006
- 8) Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, et al : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118 : 498-506, 2008
- 9) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al : Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25 : 1015-1024, 2007
- 10) Zhu WZ, Xie Y, Moyes KW, et al : Neuregulin/ErbB Signaling Regulates Cardiac Subtype Specification in Differentiating Human Embryonic Stem Cells. *Circ Res*. 2010 Jul 29. [Epub ahead of print]
- 11) Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al : Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453 : 524-528, 2008
- 12) Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, et al : Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature* 460 : 113-117, 2009
- 13) Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al : Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107 : 2733-2740, 2003
- 14) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104 : e30-41, 2009
- 15) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, et al : In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 385 : 497-502, 2009
- 16) Yokoo N, Baba S, Kaichi S, et al : The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 387 : 482-488, 2009
- 17) Hattori F, Chen H, Yamashita H, et al : Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 7 : 61-66, 2010
- 18) Yamanaka S : Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1 : 39-49, 2007
- 19) Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR : The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 : 725-729, 2008
- 20) Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, et al : Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 379 : 115-120, 2009
- 21) Asai Y, Tada M, Otsuji TG, et al : Combination of functional cardiomyocytes derived from human stem cells and a highly-efficient microelectrode array system : an ideal hybrid model assay for drug development. *Curr Stem Cell Res Ther* 5 : 227-232, 2010
- 22) Watarai H, Fujii S, Yamada D, et al : Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest* 120 : 2610-2618, 2010
- 23) Kim K, Doi A, Wen B, et al : Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010 Jul 19. [Epub ahead of print]
- 24) Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al : Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2010 Jul 19. [Epub ahead of print]
- 25) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al : Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463 : 1035-1041, 2010
- 26) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al : Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142 : 375-386, 2010

1. 血管内皮細胞の発生・分化

—血管多様性研究のプロローグ

山下 潤

単に血液や酸素などを運ぶ管と考えられてきた血管は、発生過程、臓器形成、病態形成過程等それぞれにおいて多彩な特徴や役割—血管多様性 (vasculodiversity)—を有している。血管内皮細胞は、さまざまな血管機能や血管多様性の形成に中心的役割を果たしており、その分化多様化の過程に関する研究は近年、幹細胞・前駆細胞研究等により急速に発展してきた。しかし内皮細胞の起源や分化経路は一樣ではなく、より複雑な姿を示しつつある。本稿では、血管内皮細胞分化機構に関する最近の知見について概説する。

はじめに

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

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

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

[キーワード&略語]

血管多様性, 前駆細胞, 動静脈分化, ES細胞

Aik1/ACVRL: Activin receptor-like kinase

EndMT: endothelial-mesenchymal transition

PKA: Protein kinase A

shh: sonic hedgehog

VEGF: vascular endothelial growth factor

Differentiation of vascular endothelial cells—a prologue for vasculodiversity

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

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

1 血管の発生過程

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

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

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

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

2 血管内皮細胞の起源と分化

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

※1 前駆細胞

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

※2 動静脈分化

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

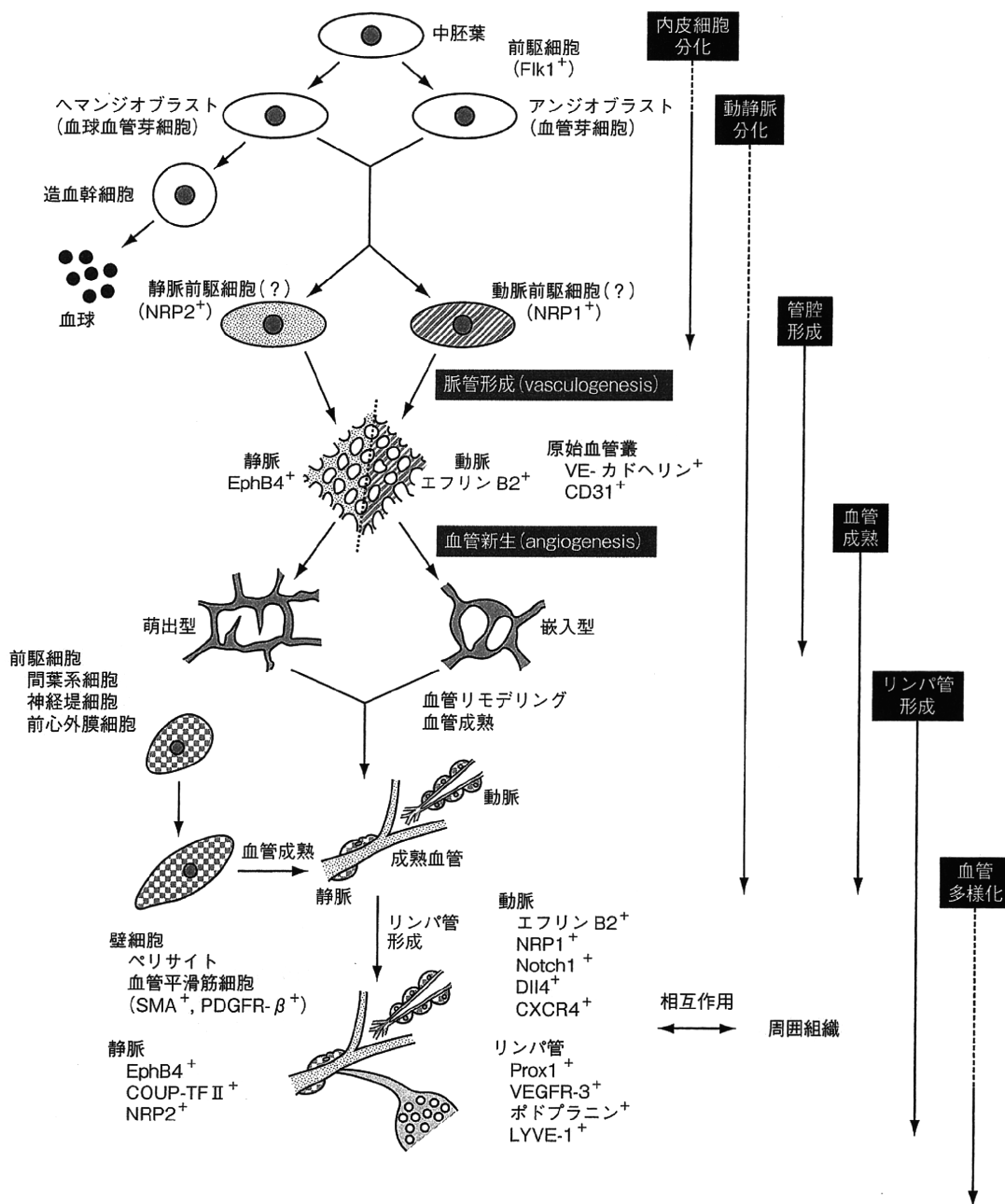


図1 血管の発生過程

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

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

は、血球・血管 (内皮および壁細胞)・心筋細胞等に分化可能であること⁵⁾⁶⁾ などより、Flk1 陽性細胞は多能性中胚葉前駆細胞とも考えられる。しかし一方、二

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

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

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

③ 血管内皮の多様化と成熟化

1) 動静脈リンパ管分化

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

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

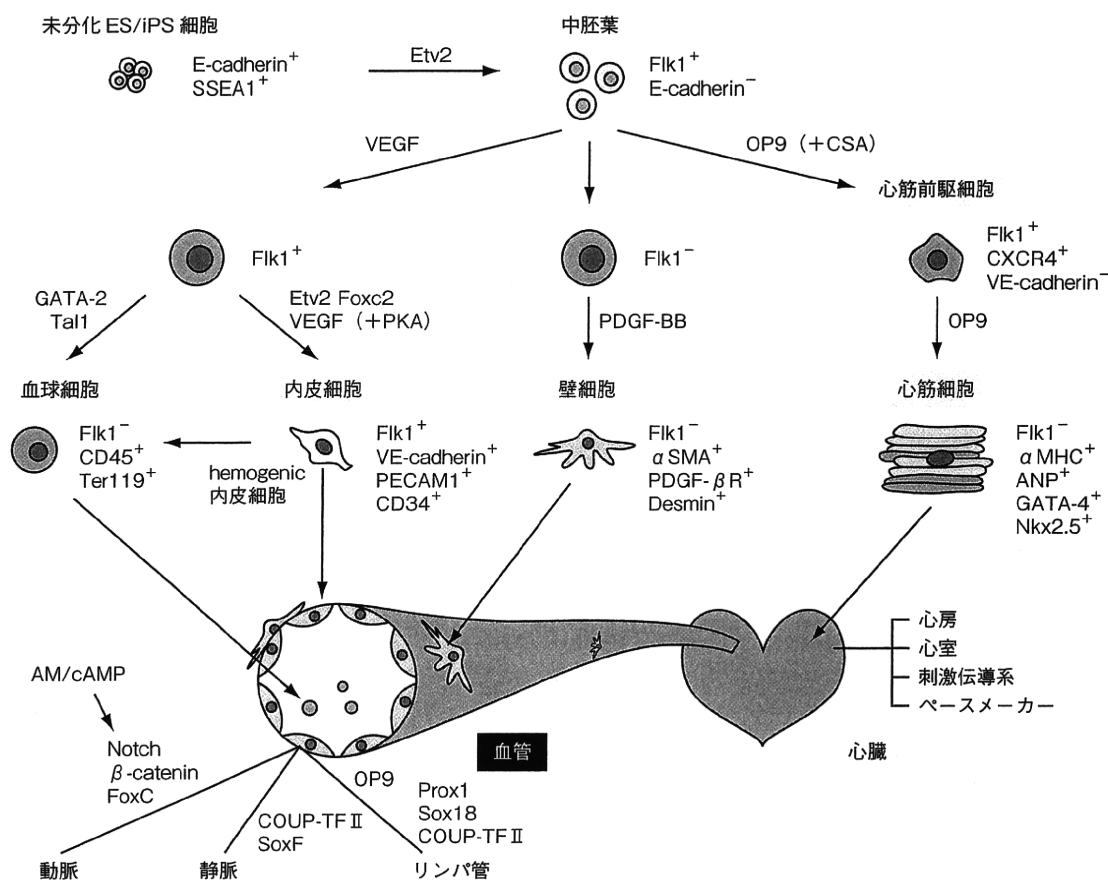


図2 Flk1 陽性細胞からの段階的心血管細胞の分化

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

胞内ドメインとβ-catenin一が³ephrinB2をはじめとするさまざまな動脈内皮特異的の遺伝子上で複合体を形成し、動脈内皮誘導に働いていることを見出した¹³⁾。Notchとβ-cateninシグナルの同時活性化によりcAMPの作用は完全に再構築され、cAMP非存在下でもcAMP添加時と同等の動脈内皮細胞が誘導された。Notchシグナルとβ-cateninシグナルが物理的に合流したβ-cateninとNotch細胞内ドメイン（およびその結合タンパク質であるRBP-J）からなる複合体が動脈内皮誘導の核（動脈内皮複合体：arterial complex）

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

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

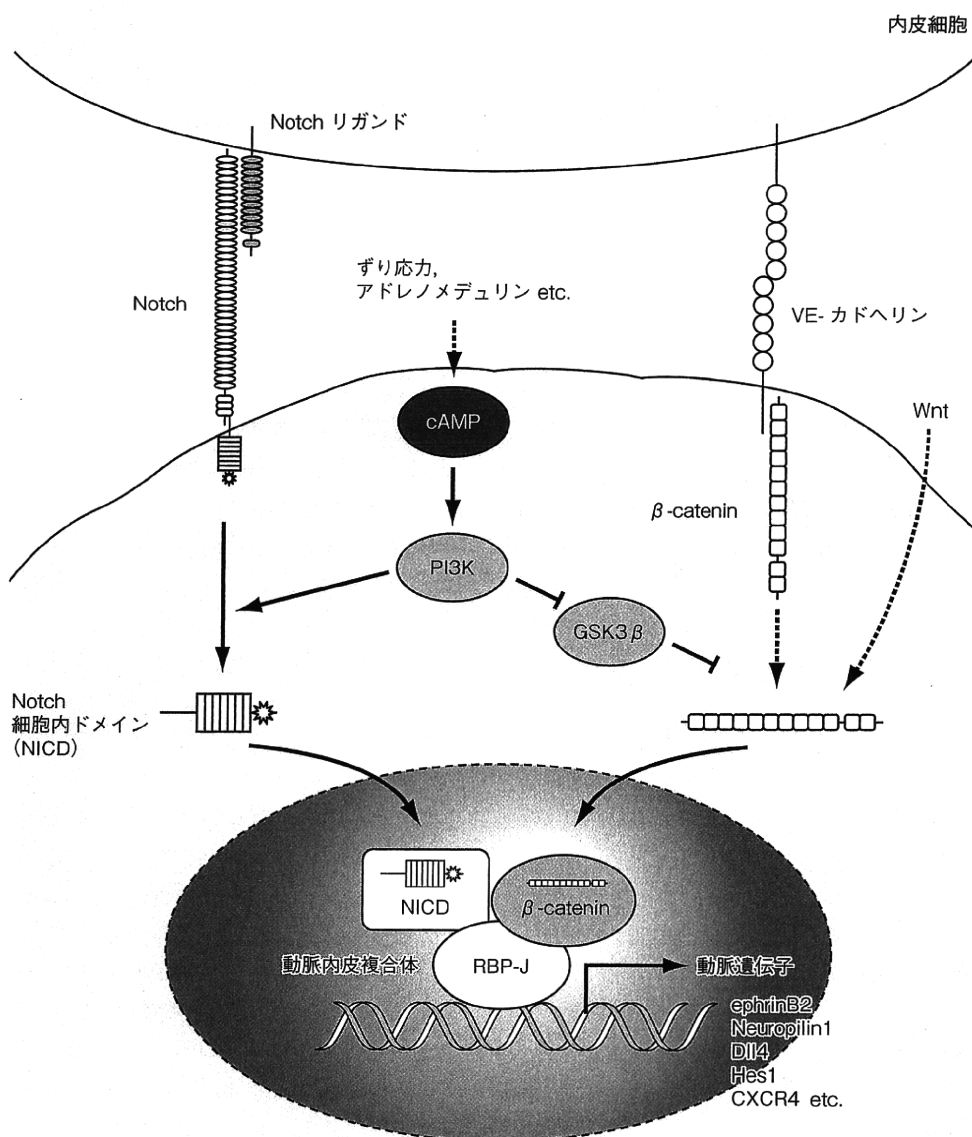


図3 Notch-β-cateninシグナルによる動脈内皮誘導機構

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¹⁴⁾。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する異なるモデル、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¹⁵⁾. 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^{16)~19)}. 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²⁰⁾. 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、還元解析と組織・システムとしての解析を組み合わせるにより、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、静脈を通して流れ始める^{17) 18)}. 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²¹⁾. 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¹³⁾. 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、ということは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⁹⁾. 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- β 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²²⁾. 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¹³⁾。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¹⁾。2007年には山中らおよびThomsonら^{2,3)}、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^{4,5)}。この新しい分化誘導システムを用いて、ES細胞由来の心筋前駆細胞の同定⁶⁾や動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^{6,7)}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⁸⁾。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⁹⁾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¹⁰⁾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¹¹⁾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¹²⁾、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¹²⁻¹⁴⁾。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

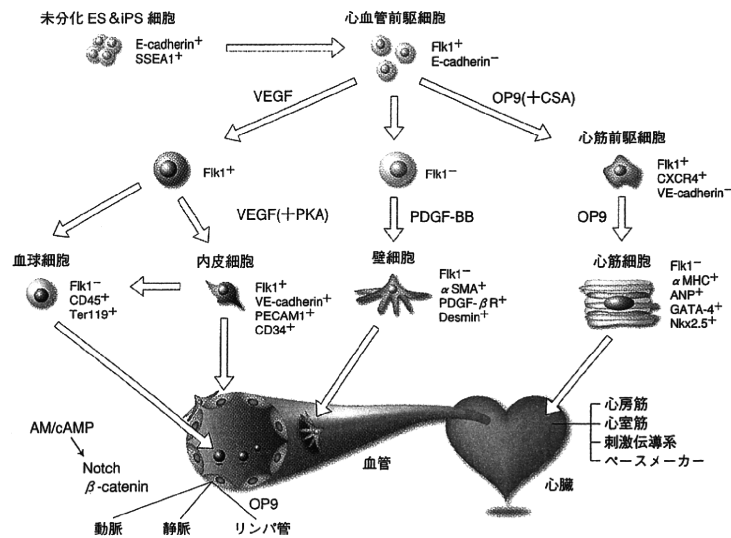


図1 マウス iPS 細胞からの系統的な心血管細胞分化

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細胞、平滑細胞、血球細胞、心筋細胞、さらには動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10⁹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¹⁵⁾。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¹⁶⁾。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

(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、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¹⁸⁾。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¹⁹⁾。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^{20,21)}。

(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局限されていたものが、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

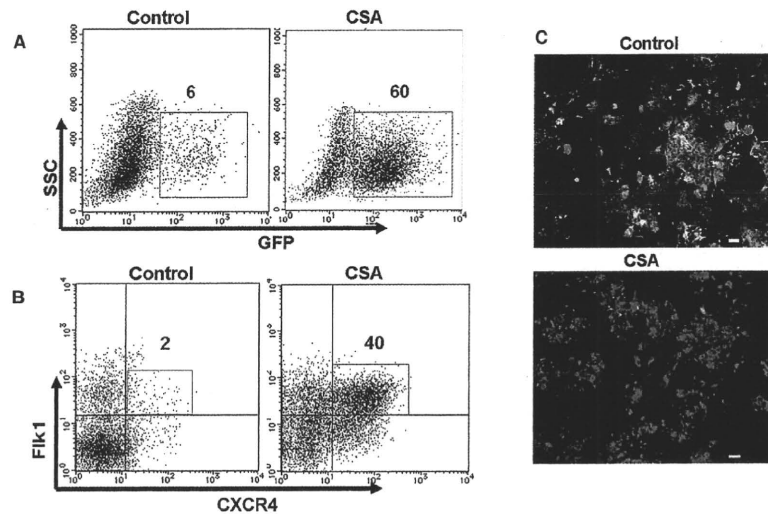


図2 サイクロスポリン A(CSA)による心筋前駆細胞および心筋細胞分化誘導効果

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(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。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 μ 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)¹⁰。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1万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²²⁾、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も多くある(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

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¹⁹⁾。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²³⁾。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。



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・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:

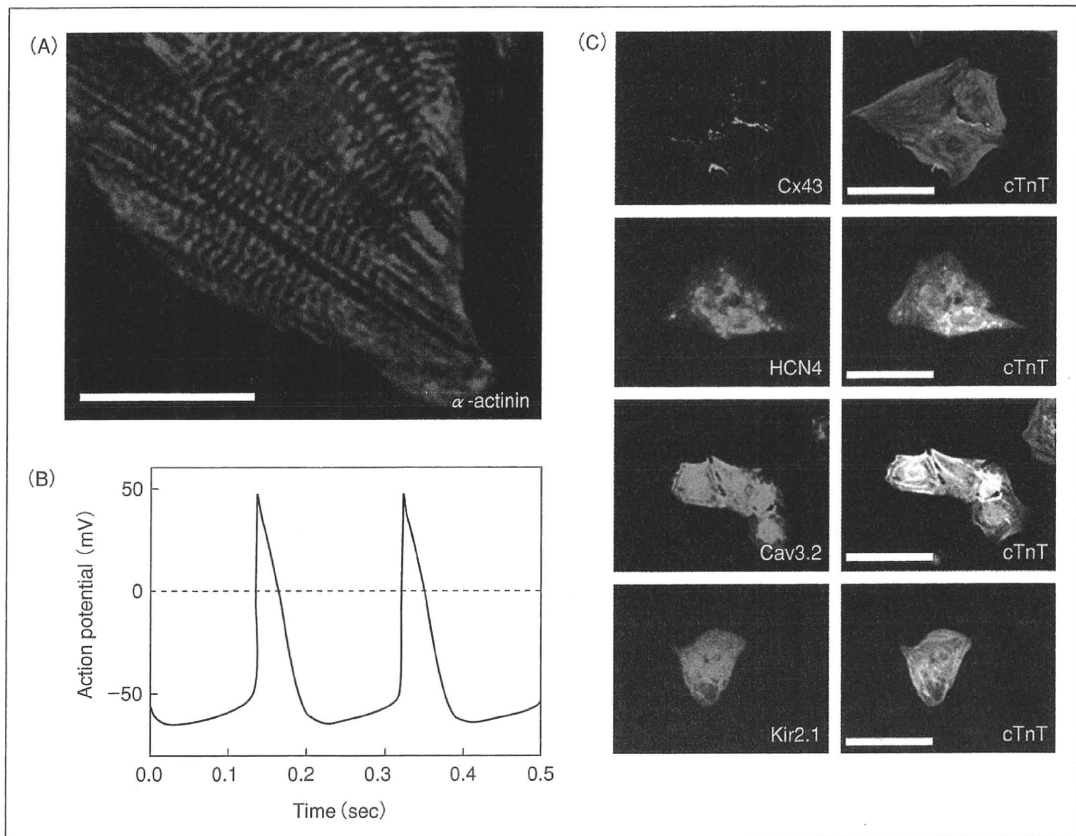


図 1 マウスiPS細胞からの心筋細胞分化⁸⁾

Flk1 陽性細胞を OP9 ストロ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 μm .

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 μm .

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^{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それぞれ ES 細胞から誘導すること^{6,7)}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(京大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⁸⁾. 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