

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制
御等の医療基盤技術」
研究課題「生理的細胞リプログラミング機構の解明
とその応用」

研究終了報告書

研究期間 平成21年10月～平成27年3月

研究代表者: 高倉 伸幸
(大阪大学微生物病研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究プロジェクトでは、人工的ではなく、生理的に生じる終末分化した細胞の幹細胞化の現象の分子機序を解明することにより、より自然な組織再生の方法論を確立することを目的に研究を遂行した。対象としては、既存の血管に存在する血管内皮幹細胞である。この細胞は胎児期には発見することができないが、出生後に内皮細胞として分化した細胞から発生してくることが示唆されてきた。まず、この血管内皮幹細胞様細胞であるが、当初ヘキスト DNA dye 排出能が高い side population(SP)細胞として単離したが、本研究期間において、この内皮 SP 細胞の幹細胞的な特徴として、1) 定常状態では90%以上が静止期にとどまっている細胞であること、2) 下肢筋肉内における解析で、大腿動脈結紮後における虚血状態においては、40%ほどの SP 細胞は RNA 合成を開始して、分裂期になること、3) 内皮 SP 細胞は、通常の内皮細胞(MP 細胞)とは異なり、一つの細胞から大量の内皮細胞の産生が誘導されること、4) 従来の内皮細胞移植には観察されなかったような、移植された SP 細胞により分化した内皮細胞のみで虚血領域に新規血管を構築しうること、また骨髓、末梢血以外の組織ではどのような臓器においても全血管内皮細胞中約1%の頻度で存在しており、そのうちの約10%の細胞に血管内皮細胞の生存を維持しうる OP9 ストロマ細胞上でのコロニー形成能が観察されることなどを解明し得た。

さらに幹細胞の特徴としての幹細胞性といわれている未分化能の長期維持、そして自己複製能についても移植モデルを構築して証明し得た。つまり、既存の血管にはこれまで報告されていなかった、幹細胞性を有する内皮細胞が存在することを証明し得た。

内皮幹細胞として定義するため、そして内皮細胞から内皮幹細胞への脱分化(リプログラミング)の解析の為に、ヘキスト法というような細胞の状況による細胞の分画ではなく、細胞表面に発現する分子の差による分化の階層性が明らかになる必要がある。そこで、SP 細胞と MP 細胞に発現する遺伝子の網羅的解析を通して、幹細胞性を示す marker1 陽性 marker2 陽性内皮幹細胞様細胞から、marker1 陽性 marker2 陰性の前駆細胞、そして終末分化した marker1 陰性 marker2 陰性の内皮細胞の分化系譜が明らかになった。この分化系譜を利用して、出生後の marker1 陰性 marker2 陰性から marker1 陽性 marker2 陽性内皮幹細胞が発生することが判明した。このような内皮幹細胞様細胞の発生の分子機序が明らかになれば、虚血疾患の患部の内皮細胞に幹細胞性を誘導して、機能的側副血管の再建が可能になると考えられ、有用性が高いと考えられた。

一方で、リプログラミングを生じさせる際に重要とされる、体細胞の細胞周期の回復について、DNA 複製因子である GINS 複合体の中の PSF1 遺伝子の発現がどのように ON、OFF されるのかについて、PSF1 遺伝子プロモーター活性の制御機構の解明を行なった。その結果、PSF1 プロモーター領域のヒストンアセチル化により、本領域に E2F4 が結合し、PSF1 の無機能分子である short form PSF1 が産生された際に細胞が休眠期に入ることが解明された。そして、PSF1 のプロモーター制御下に EGFP を発現させたマウスを作製し、急速に増殖する細胞を GFP で可視化することに成功した。また再生医療の実現に向け、混入した iPS 細胞に細胞死を誘導する、あるいは iPS 細胞由来のがん組織のがん幹細胞に細胞死を誘導する分子の候補として、PSF1 の阻害剤の単離に成功した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 既存の末梢血管において血管内皮細胞の中に幹細胞が存在することは報告されていなかった。しかし、種々の組織で用いられる幹細胞の同定法の一つである side population 法を用いて内皮細胞としてすでに分化決定している細胞の中に、極めて増殖活性が高く、その細胞だけで血管を構築可能な血管内皮幹細胞様細胞を同定することに成功した。
2. 内皮幹細胞の細胞表面マーカーは発見されていなかった。内皮 SP 細胞と内皮 MP 細胞の遺伝子発現の差を詳細に比較することで、内皮幹細胞に特異的に発現する分子を同定し得た。このマーカーを用い、内皮細胞の分化系譜には、幹細胞性を示す内皮細胞から、前駆細胞、そして終末分化した内皮細胞という階層性があることが明らかになった。
3. 胎児期に存在する内皮細胞には内皮幹細胞性は発見されないこと、そして胎児期に発生した内皮細胞から内皮幹細胞が脱分化して発生することが示唆された。またこの内皮幹細胞化においては、出生後の臓器内の特異的な細胞によって誘導される可能性が明らかになった。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 従来の骨髄細胞移植を用いた虚血性疾患に対する血管再生では、新生血管内に一時的にそして部分的に血管内皮細胞として貢献するのみであった。しかし、既存の血管内に内皮幹細胞様細胞が存在することが明らかになり、この細胞を用いた血管再生では、長期的に内皮幹細胞からの血管内皮細胞への分化供給が生じることで、新生血管は退縮せずに恒久的に血管としての機能を維持し、虚血の改善効果が高まることが判明した。このことは、今後の血管再生の医療法のパラダイムをシフトできると考えられる。
2. 血管内皮細胞が幹細胞性を有する血管内皮細胞に脱分化しうることを示唆する所見を得たことで、その分子機序を明らかにし、内皮幹細胞様細胞へのリプログラミング因子が同定できれば、血管再生医療に用いることのできる内皮幹細胞を大量に得ることができる。また、成体内で内皮細胞を内皮幹細胞にリプログラミングさせれば、例えば心筋梗塞等の側副血行となりえる太い血管の形成を成体内で誘導し得る。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「高倉」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
高倉 伸幸	大阪大学微生物病研究所	教授	H21.10～H27.3
木戸屋 浩康	同上	助教	H21.10～H27.3
神本 高宏	同上	助教（終了時）	H21.10～H21.12
衣笠 由美	同上	学振 PD（終了時）	H21.10～H26.4
内藤 尚道	同上	助教	H21.10～H27.3
韓 瑛路	同上	ポスドク	H21.10～H27.3
毛利 友美	同上	学振 PD（終了時）	H21.10～H25.3
長濱 由美	同上	D4（終了時）	H21.10～H22.3
山川 大史	同上	ポスドク	H21.10～H27.3
崎元 晋	同上	D4（終了時）	H21.10～H24.3
賈 維臻	同上	ポスドク	H21.10～H27.3
松井 崇浩	同上	D4（終了時）	H23.4～H25.3
田原 秀一	同上	特別研究生	H23.4～H27.3
若林 卓	同上	学振 PD	H23.4～H27.3
河原 弘宜	同上	D4(学振 DC)	H21.10～H27.3
宮 志遠	同上	D4	H23.4～H27.3
高良 和宏	同上	D4(学振 DC)	H23.4～H27.3
張 黎	同上	D3	H24.4～H27.3
神崎 隆	同上	D3	H24.4～H27.3
村松 隆史	同上	D2	H25.4～H27.3
小坂 智子	同上	D2	H25.4～H27.3
山根 恵太郎	同上	D2	H25.4～H27.3
林 弓美子	同上	M2	H25.4～H27.3
細島 祥子	同上	M2	H26.3～H27.3
藤本 則子	同上	研究補助員	H21.10～H27.3
福原 恵晶	同上	技術員	H21.10～H23.3 H24.4～H27.3
竹下 千恵	同上	研究員	H22.4～H27.3
橘田 未来	同上	D1	H26.4～H27.3

研究項目

- ・ 体細胞の幹細胞化／初期化の誘導とその分子機序の解明
- ・ 体細胞初期化効率の改善を目的とした DNA 複製因子 GINS の発現とその制御
- ・ GINS 抑制因子による iPS 細胞の細胞死誘導

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

【理化学研究所 予防医療・診断技術開発プログラム】

血管内皮細胞から血管内皮幹細胞に分化転換する際に、どのような遺伝子ネットワークが変化しているのかをCAGEおよびRNA-seq解析で共同研究し、内皮細胞から内皮幹細胞へリプログラミングできる転写因子の単離を開始した。本共同研究では、最終的には成体の血管内

皮細胞を内皮幹細胞にリプログラミングさせ、虚血疾患などの患者への臨床応用に向けて研究開発を行なう。

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 体細胞の幹細胞化／初期化の誘導とその分子機序の解明 (大阪大学 高倉グループ)

この研究項目では

1) 内皮細胞と他の臓器細胞との相互作用による内皮幹細胞化の誘導、2) 内皮幹細胞化にかかわる分子機構の解明を目標として研究を遂行した。

(1) 研究実施内容及び成果

【目的】

成体の終末分化した細胞の未分化幹細胞化の現象は、実際には成体内でも生じうると考えられる。例えば、遺伝子の変異により形質転換した細胞が、徐々に周囲環境によって、たとえば染色体不安定性が誘導され、いくつかの遺伝子変異が重なって生じると、がん細胞化、そしてがん幹細胞化へと細胞の脱分化状態ともいえる現象が生じることが明らかになっている。そして、このようながん幹細胞は ES 細胞と同様の遺伝子発現パターンを示すことや、組織によっては血管内皮細胞に分化するという多分化能も有することが明らかにされてきている。このような組織細胞の幹細胞化の現象が、正常細胞として生じる可能性があれば、そのリプログラミングのメカニズムは、果たしていわゆる iPS 細胞化との類似性があるのかどうか興味深い。再生医療において、その成功の為の要素は、組織の再生にはターンオーバー可能な幹細胞移植が重要であるという点である。分化した細胞をいくら移植しても、最終的に細胞死が誘導されれば、組織の維持はできない。生理的に生じる組織特異的な体細胞の組織幹細胞化 (ES 細胞ではなく、組織特異的幹細胞化) が解明されれば、iPS 化を介さない、組織再生の方法論が確立できる可能性がある。そこで、本研究では、分化後の組織細胞の脱分化による組織幹細胞化についての検証と、その分子機構の解明に向けて解析をおこなった。

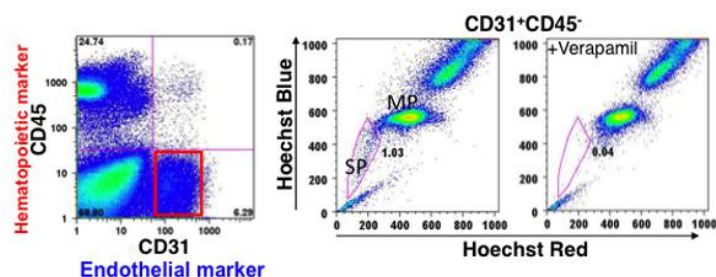
【研究実施内容】

体細胞の幹細胞化が生じる可能性として、血管内皮細胞の幹細胞様細胞として解析していた細胞が、胎児期には存在せず、出生後に徐々に発生してくることから、本研究項目では内皮細胞の生理的なリプログラミング過程で生じる内皮幹細胞化の研究を主に実施することとした。ただし、内皮幹細胞として同定途中であった細胞の内皮幹細胞性を証明することも必要であったため、本研究項目では、1) 下肢に存在する内皮幹細胞の同定、2) 内皮幹細胞の幹細胞性の解析、3) 内皮幹細胞の幹細胞マーカーの発見、4) 内皮細胞から内皮幹細胞への分化とその機序、の順に研究を行なった。

【研究の方法と研究成果】

内皮幹細胞の同定

種々の組織に存在する組織幹細胞は、DNA dye を取り込ませてもすぐに排出する side population 分画の細胞 (SP 細胞) として分画されることが報告されてきている。マウスの下腿筋の中の CD45 陰性 CD31 陽性血管内皮細胞のヘキスト処理後のフローサイトメトリ解析により、1% 前後の内皮細胞が SP 細胞分画に入ることが判明した (図①-1)。



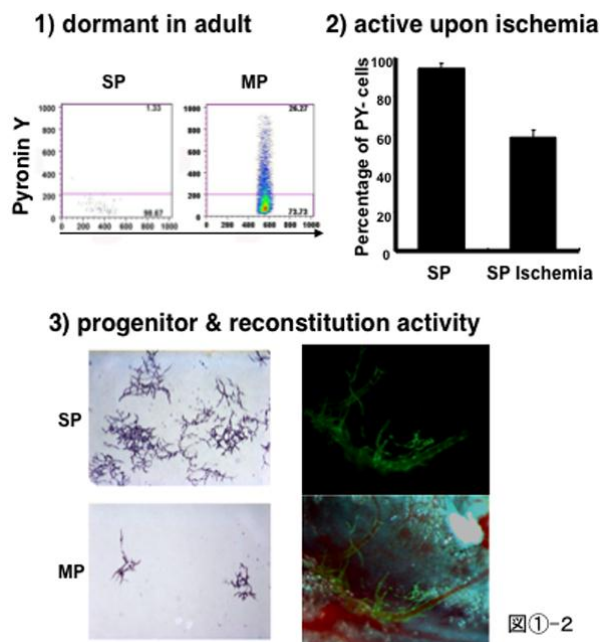
図①-1

この SP 細胞は ABC トランスポーターの阻害剤として知られている verapamil を添加すると消失することから確かに SP 細胞分画であることが確認された (図①-1)。

この細胞とHoechst DNA dyeを取り込むmain population (MP 細胞)を比較することにより、SP 細胞が幹細胞としての性質を有するかどうかを1)細胞周期、2)外来性ストレスによる細胞増殖活性、3)前駆細胞活性および組織再構築能の観点で解析した(図①-2)。その結果、SP 細胞はほぼすべてが pyronin Y(PY)を取り込まない、RNA 合成の休止した休眠期の細胞であることが判明した(図①-2-1))。血管は虚血により新規血管を形成する為に、内皮細胞の増殖が誘導される臓器である。そこで、大腿動脈を結紮した後に、SP 細胞の増殖能を観察すると、40%程度の SP 細胞は PY を取り込む増殖期の細胞に変化した(図①-2-2))。続いて、この SP 細胞に前駆細胞活性があるかどうかを解析する為に、造血幹細胞で汎用される LTC-IC 法を用いて解析した。その結果、SP 細胞は MP 細胞に比べて OP9 ストロマ細胞上で非常に大きな内皮細胞のコロニーを形成し、またコロニー形成の発生率も10%以上と MP 細胞の 1%以下と比べて非常に高かった(図①-2-3))。また一回目の培養から細胞を回収し、再度 OP9 細胞上で培養すると、SP 細胞の培養からスタートした培養条件において、再度コロニーの形成が観察されたことから、SP 細胞には前駆細胞の産生能があることが判明した。そして、この SP 細胞と MP 細胞を用いて虚血肢における血管再生能力を観察すると、SP 細胞においてこれまで観察されなかったような、SP 細胞由来の内皮細胞のみで血管が形成されている領域が多数観察された(図①-2-3))。このように再生された血管は少なくとも6ヶ月後にも減少せずに観察されており、SP細胞で形成された血管は、内皮細胞の幹細胞からの産生が持続してターンオーバー可能になっていることが考えられた。以上のことから内皮 SP 細胞は、これまでに報告のない内皮幹細胞としての性質を有していることが示唆された。

このような内皮 SP 細胞は培養株として利用可能な内皮細胞には存在せず、内皮前駆細胞の局在領域ともいわれている骨髓にも存在しなかったが、その他の臓器においては必ず 1～1.5%程度の頻度で内皮細胞中に存在しており(図①-3)、血管の長期維持に機能している細胞であることが示唆された。

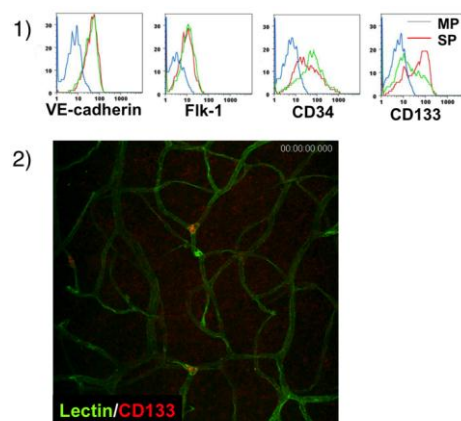
内皮幹細胞の局在が血管内腔側の内皮細胞であるのかどうかを解析する為に、通常の内皮細胞と発現の異なる分子で、内皮幹細胞に特異的に発現する分子を探索した。その結果、下肢の内皮 SP 細胞は MP 細胞と比較して、VE-cadherin, Flk-1, CD34 といったいわゆる血管内皮細胞に発現する分子は同程度発現しており、特に内皮幹細胞における内皮細胞としての特異性は観察されなかった。一方で、網膜の血管内皮細胞においては、上記内皮細胞マーカーの発現は下肢と同様であったが、CD133 の発現が MP 細胞より SP 細胞で極めて高いことが判明した。そこで、網膜における内皮 SP 細胞の



図①-2

	Percentage of EC-SP cells		Percentage of EC-SP cells
Lung	0.96±0.09	bEnd3	Undetectable
Hindlimb muscle	1.15±0.11	EOMA	Undetectable
Heart	1.55±0.14	HUAEC(P=4)	Undetectable
Brain	Hoechst method did not work	HUVEC(P=4)	Undetectable
Bone marrow	Undetectable	mouse EC (P=4)	Undetectable
Peripheral blood	Undetectable		

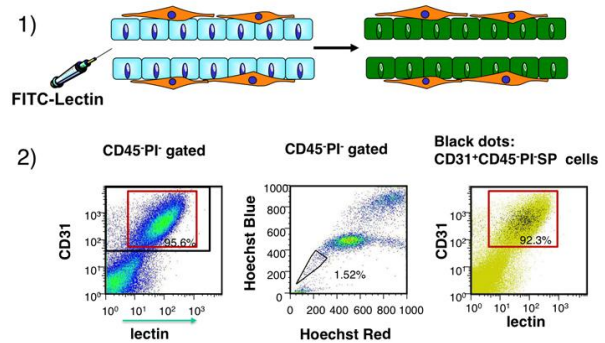
図①-3



図①-4

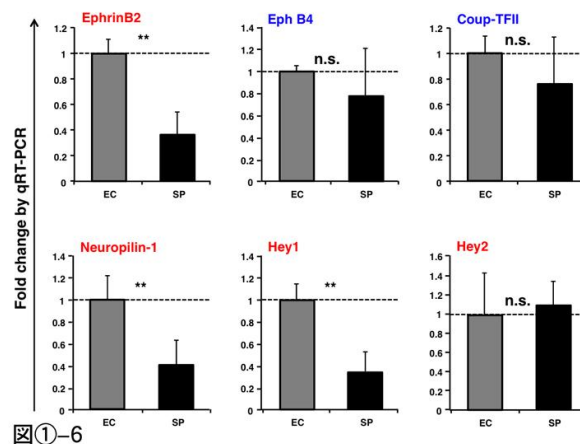
局在を CD133 の発現で解析した。その結果、Lectin を取り込んだ内皮細胞において一部 CD133 が陽性であり、内皮幹細胞は血管内腔面に存在することが示唆された(図①-4)。

しかし、CD133 の発現は MP 細胞でも一部で高く発現している為に、SP 細胞と CD133 陽性細胞が完全に一致しているとは考えられない。そこで、一旦血管内に FITC で標識した Lectin を投与して、内腔面の血管内皮細胞を FITC で染色した後に、ヘキスト染色を行った。その結果、下肢の血管の血管内皮細胞の SP 細胞の90%以上がLectin 陽性の血管内腔に存在する細胞であることが確認された(図①-5)。

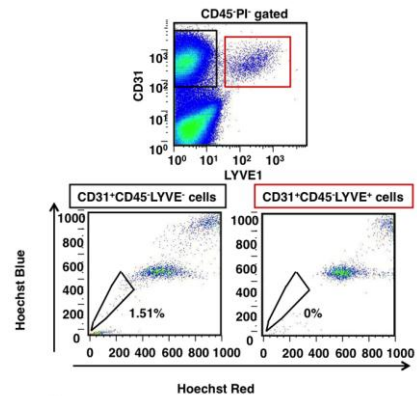


図①-5

そこで引き続き、血管内皮幹細胞が、動脈、静脈、リンパ管など、どの血管に存在するのかを検討した。これは下肢の血管内皮細胞の解析であるが、すべての血管内皮細胞の遺伝子発現を1とした場合、動脈マーカー(図①-6 中の赤字の分子)が、1を超えることはなく、特に動脈に特異的に多いというわけではないことが判明した。もちろん動脈マーカーも陽性であり、動脈にも存在することが判明した。一方で、静脈マーカー(図①-6の青字)の発現は、これも1を超えることはなく、静脈に優位に存在するというわけではないことも判明した。ただし、動脈マーカーよりは1に近く、動脈よりは静脈に多いことが判明した。一方で動脈でも静脈でもない内皮細胞としてリンパ管の可能性について検討した。その結果、LYVE1 陽性のリンパ管内皮細胞には SP 細胞分画が存在せず、リンパ管には内皮幹細胞様細胞は存在しないと考えられた(図①-7)。よって、血管であれば、動脈、静脈そして毛細血管においてこの SP 細胞は存在することが判明した。

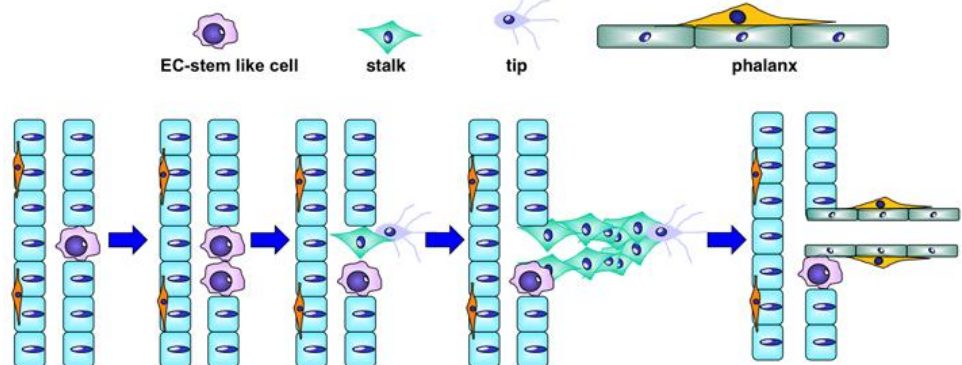


図①-6



図①-7

以上の結果から、血管新生が生じる場合、特に大きな組織損傷のような場合は、血管内皮細胞中にわずかに存在する血管内皮幹細胞のような細胞が、休眠から細胞周期を回復し、旺盛に前駆細胞を産生して、大量の血管内皮細胞に分化して、新規血管を形成する可能性が示唆さ



図①-8

れた(図①-8)

血管新生が生じるのは組織の損傷だけではなく、炎症や、あるいは生活習慣病等でも生じる。このような血管新生が生じる際にも内皮幹細胞が関与しているかどうかを解析する為に、たとえば網膜症や脈絡膜で生じる加齢黄斑変性症など眼科領域での血管新生について検討した(図①-9)。

まず、脈絡膜における血管内皮細胞(CD31 陽性 CD45陰性細胞)について、ヘキスト展開を行うと、下肢よりはやや多く、2.8%の細胞が SP 細胞であることが判明した(図①-10)。

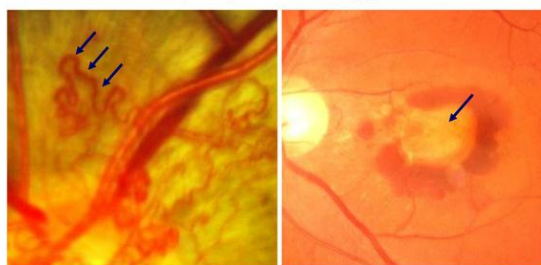
次に、網膜と脳における血管内皮細胞を観察した。脳では脳血流関門(BBB)が、網膜ではBRBが発達してこれら組織では内皮細胞に薬剤排出ポンプ発現が高いことが知られている。それを反映するように、これらの組織においてはSP細胞が30%前後存在し、単に薬剤排出ポンプの発現が高い内皮細胞か幹細胞かの区別がつかないことが判明した(図①-11)

続いて、脈絡膜や、網膜そして脳内に存在する内皮 SP 細胞について、これらが下肢の血管内皮 SP 細胞と同様にコロニー形成能を有するかどうかを検討した。その結果、脈絡膜ではMP細胞に比べ優位にSP細胞がコロニーを形成する細胞であることが判明した(図①-12)。また、網膜や脳内の内皮 SP 細胞を培養したところ、脈絡膜ほどの頻度ではないが、やはりSP細胞内にコロニー形成能を有する細胞が存在することが判明した(図①-12)。

そこで、この内皮 SP 細胞が、眼科領域での病態形成に関係するかどうかを解析する為に、脈絡膜にレーザーを照射して、血管新生を強制的に誘導する加齢黄斑変性症モデルを用いて、SP細胞の増殖を観察した。その結果、内皮 SP 細胞はレーザーの照射により増加してくる細胞であり、病態形成に

Pathological angiogenesis

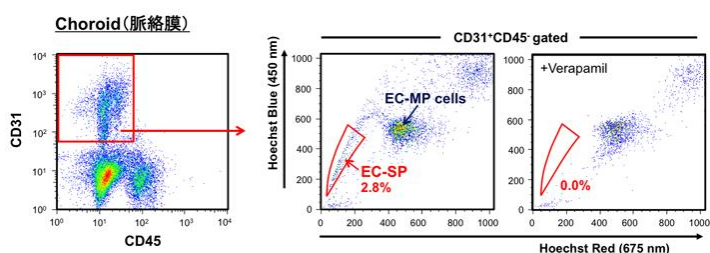
Diabetic retinopathy AMD (age-related macular degeneration)



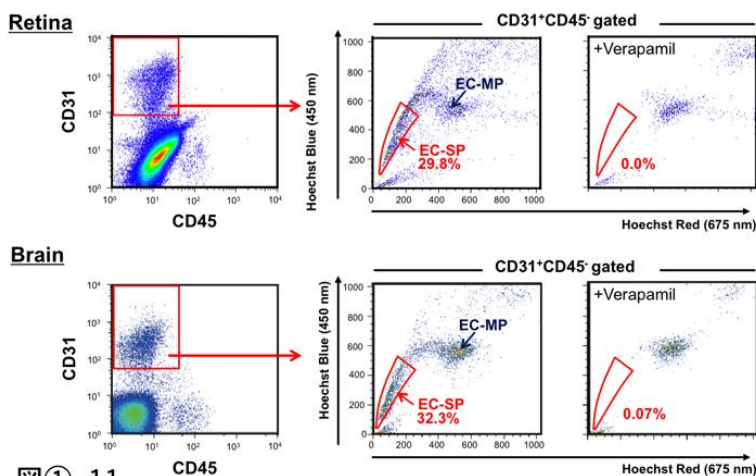
retina

choroid

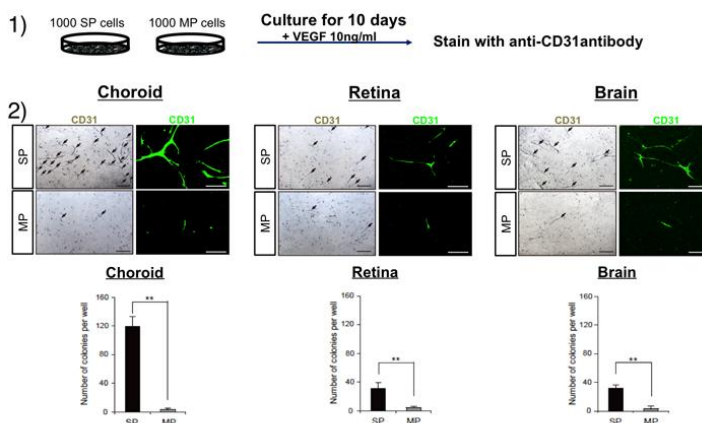
図①-9



図①-10



図①-11



図①-12

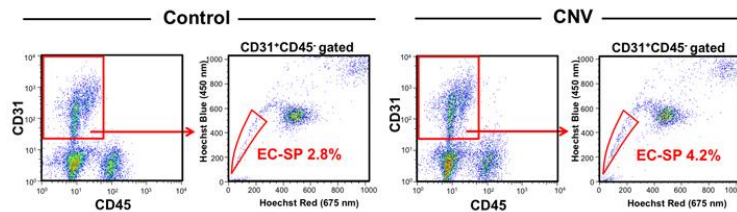
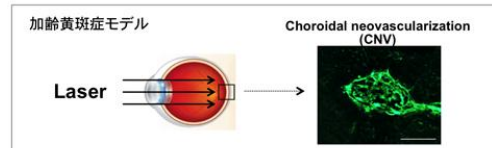
おける血管新生においても内皮 SP 細胞がその過程に関与することが示唆された(図①-13)。

以上の結果より、既存の血管内の血管内皮細胞には組織再生や病態形成の際に、血管形成において内皮細胞の旺盛な産生に関与する血管内皮幹細胞様の細胞が存在していることが示唆されてきた。このような細胞が、生体内において、臓器特異的な血管形成や、血管新生の際に表現型の異なる血管内皮細胞に分化する多分化能を有するのではないかと考えられるが(図①-14)、下肢の血管を用いた解析では、いわゆる幹細胞性といわれる、1)2次移植が可能であること、2)単一細胞による組織再構築が可能、3)分化における階層性を有する、等が未だ示すことができなかった。また、当研究では、内皮細胞から内皮幹細胞が分化誘導されてくる可能性(図①-15)を解析することを課題にしてきたことから、MP 細胞から SP 細胞が発生したという、分化方向の表現では不十分であり、一定分子の発現を示すことで、表現型の変化を追跡することが必要とされた。

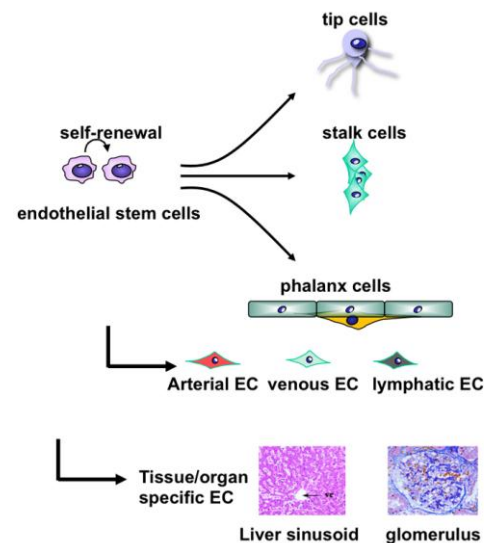
以上のことから、本研究では、以降他の臓器の血管形成をモデルとして、内皮幹細胞が関与し、この内皮幹細胞の幹細胞性を、血管形成の長期維持の観点、細胞移植による内皮幹細胞の自己複製、などの観点で研究を遂行した(未発表のためデータは公開せず)。

その結果、内皮 SP 細胞は2次移植可能な内皮細胞であり、一個の細胞でも血管を再構築し、自ら自己複製して長期に血管形成に寄与することが判明した。また SP 細胞と MP 細胞に発現している分子の相違から、内皮幹細胞表面マーカーが同定された(図①-16)。このマーカーを用いて、成体では内皮幹細胞から、内皮前駆細胞を介して、内皮細胞が分化することを証明し得た。また、このマーカー解析を用いて、胎児期に内皮細胞に分化決定した細胞から、内皮幹細胞の脱分化が誘導されることも証明された。この脱分化誘導の機構に、臓器に存在する特定の細胞と

内皮細胞の相互作用が関係することが明らかになった(図①-17)。そして、この内皮幹細胞の Lineage tracing を行う為に、そしてこの内皮幹細胞に細胞死を誘導して、内皮幹細胞の機能を解析する為に、内皮幹細胞に特異的に発現する遺伝子のプロモーター活性を用いて、遺伝子改変マウスを作成中に、本 CREST 研究期間が終了した。内皮幹細胞の存在を示唆する報告は上記公



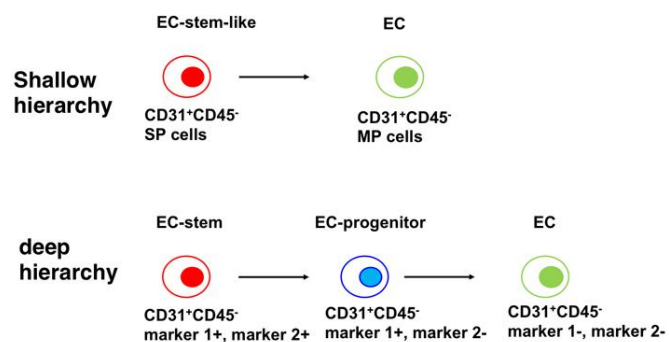
図①-13



図①-14

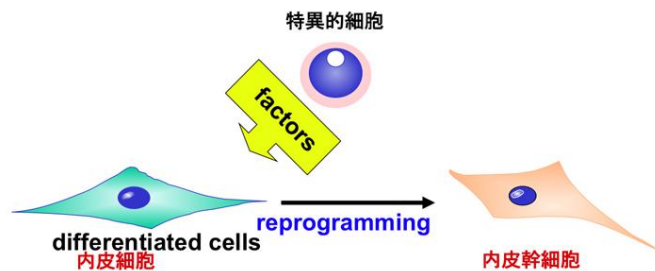


図①-15



図①-16

開した部分のみの2報(下肢と眼球)に終わったため論文成果としては不十分であった。今後、種々の臓器を用いた内皮幹細胞の幹細胞性、脱分化の誘導、内皮幹細胞の生理的意義については、遺伝子改変マウスの表現型とともに論文化する。期間内では紆余曲折があり、ストレートに研究が遂行しなかった点があるが、



図①-17

「既存の血管に血管内皮幹細胞が存在する」そして「内皮幹細胞は脱分化により誘導される可能性がある」という、新たな真実に迫ることができたと考えている。

3. 2 体細胞初期化効率改善を目的とした DNA 複製因子 GINS の発現とその制御 (大阪大学 高倉グループ)

本研究では(1) SLD5 および PSF1 発現の可視化による体細胞の潜在的幹細胞化および幹細胞化獲得能の解析、(2) 幹細胞化の効率改善にむけた細胞調整法の確立を目標として以下のように研究を遂行した。

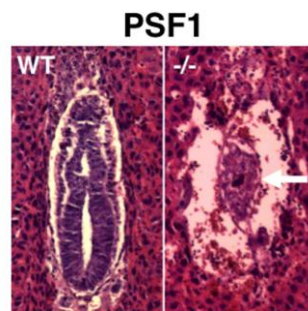
【目的】

従来の研究成果により、DNA 複製および染色体均等分配に関わることを示してきた GINS 複合体構成 4 分子(SLD5, PSF1, 2, 3)の中でも、SLD5, PSF1 が、急速な幹細胞の増殖に非常に重要な役割を果たすことを明確にしてきた。PSF1 や SLD5 の発現制御は、持続的に細胞増殖を誘導する上で有用である。iPS 細胞化が試験管内で誘導される際に、p53 欠損など細胞増殖がリプログラミングに必要とされるように、生体内で成熟した細胞が幹細胞化する際にも、PSF1 や SLD5 の発現が誘導されて、増殖活性を再度持ち得た細胞が、幹細胞化するのではないかと考えられる。そこで、本研究項目では、PSF1 の発現制御機構を明らかにして、PSF1 発現誘導によるリプログラミング化効率の改善をめざす。

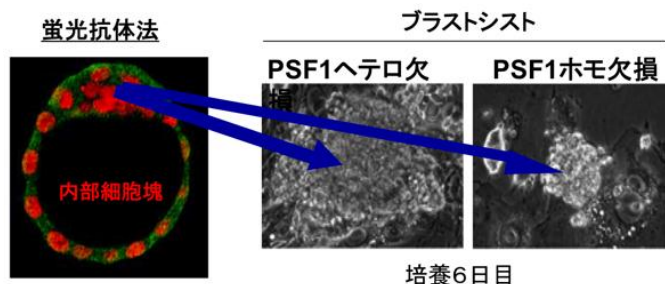
【研究実施内容】

PSF1 は酵母を用いた研究により、PSF2, PSF3, SLD5 という4つの分子で環状の複合体(GINS 複合体)を形成し、ポリメラーゼ動員因子である CDC45 と会合して、DNA 複製開始点(origin)においてヘリカーゼ活性を有する MCM などと複合体を形成して DNA 複製フォークの形成に必須の役割を有することが解明されてきた分子である。我々は自己複製活性の高い胎児期の造血幹細胞と、成体骨髄の休眠期の造血幹細胞に発現する遺伝子を比較して、胎児期の造血幹細胞で発現の亢進する遺伝子についてマイクロアレイやサブトラクション法を用いて遺伝子の網羅的スクリーニングを行なった。

その結果、種々の遺伝子が単離されたが、前述した PSF1 の発現が胎児期の幹細胞で発現が亢進していることが判明した。既報によると、PSF1 と複合体を形成することが酵母で報告されている SLD5 はヒト ES 細胞で発現の高いことが判明しており、そこで休眠期の体細胞から増殖期の体細胞に細胞活性を変化させる候補遺伝子として、PSF1 や SLD5 を選択した。



図②-1

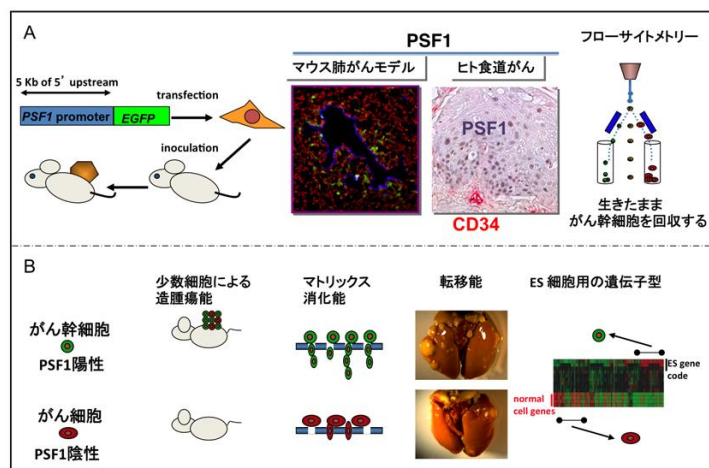


図②-2

酵母では PSF1 が PSF2, PSF3, SLD5 とヘテロ複合体を形成して GINS を形成して DNA 複製因子として機能するが、ほ乳類での機能は未知であった。そこで PSF1 のノックアウトマウスを作製して解析すると、PSF1 ノックアウトマウスは胎生6日目頃に致死となることが判明した。その表現型を解析すると、胎生 6.5 日目の野生型マウス胎児で観察されるような全能性幹細胞である epiblast による egg cylinder 構造が破綻していることが判明した(図②-1)。組織所見からは、内部細胞塊を構成する未分化幹細胞の増殖が抑制されていることが予想されたため、胎生 4 日目の受精卵を試験管内で培養し、内部細胞塊の細胞増殖についての検討を行ったところ、PSF1 ノックアウトマウス由来の内部細胞塊の細胞は増殖が抑制されていることが判明した(図②-2)。よって、PSF1 はほ乳類細胞においても、epiblast のような未分化多能性幹細胞の細胞増殖にかかわることが判明した。成体で細胞の恒常的に増殖している臓器細胞は骨髄の造血幹細胞～前駆細胞である。そこで、PSF1 のヘテロ欠損成体マウスを用いて、骨髄造血を解析すると、定常状態では特に野生型マウスとの相違は観察されなかった。しかし、5-FU(半致死量)を投与して細胞周期にはいつている造血幹細胞に細胞死を誘導し、休眠期の造血幹細胞のみが残存するようにした場合、野生型マウスの場合、7日までに造血幹細胞の急速な増殖が誘導されて、骨髄は回復した。しかし、PSF1 ヘテロマウスの場合は造血幹細胞が細胞周期にはいつらず造血幹細胞の増殖が生じず、マウスは致死となった。つまり、PSF1 は急速な造血幹細胞の増殖に必須の分子であることが判明した。

次に、がん幹細胞のように自己複製活性が高い細胞では PSF1 の遺伝子発現が亢進しており、PSF1 のプロモーター活性が高く維持されていることが予想された。PSF1 プロモーター領域 5Kb を単離し、EGFP と連結させたレポーター遺伝子を作製してがん細胞に発現させ、マウスにこの細胞を移植して腫瘍組織を形成させると、ほとんどのがん細胞は EGFP 陰性であったが、一部のがん細胞で血管内皮細胞近傍に位置する細胞に GFP が陽性となることが判明した。この局在はヒトのがん組織で CD34 陽性の血管近傍に PSF1 蛋白陽性のがん細胞が集合している所見と非常に類似している。

そこで PSF1 プロモーター活性の高いがん細胞と低いがん細胞をフローサイトメリーで回収してその表現型を解析した(図②-3A)。その結果、PSF1 プロモーター活性の高いがん細胞は少数細胞での造腫瘍能を有し、マトリックス溶解能の高い浸潤能の高い細胞であり、静脈注射するといった臓器に転移巣を形成した(図②-3B)。また遺伝子型も ES 細胞と類似していることから、PSF1 プロモーター活性の高さによりがん幹細胞様細胞を同定できることが判明した。



図②-3

よって PSF1 のプロモーターを制御することにより、体細胞の細胞増殖を高め、iPS 細胞化へのリプログラミングを効率よく行なえる技術が開発できる可能性が示唆された。そこで、本研究項目では、1)PSF1 のプロモーターがどのように活性制御を受けるのかをエピジェノミク観点で解析し、体細胞の急速な増殖を誘導する理論的枠組みを形成する。2)酵母では PSF1 の結合因子として機能する SLD5 のノックアウトマウスを作製して、PSF1 と同じ表現型となるかを確認する。同じ表現型であれば、SLD5 プロモーターを可視化してリプログラミング現象に細胞増殖が与える影響を観察する。3)体細胞において PSF1 のプロモーター活性が高くなるような条件を見いだすため、PSF1 プロモーター制御下に EGFP を発現するトランスジェニックマウスを作製し、PSF1 プロモーターの個体での制御機構を観察する。

【研究の方法と研究成果】

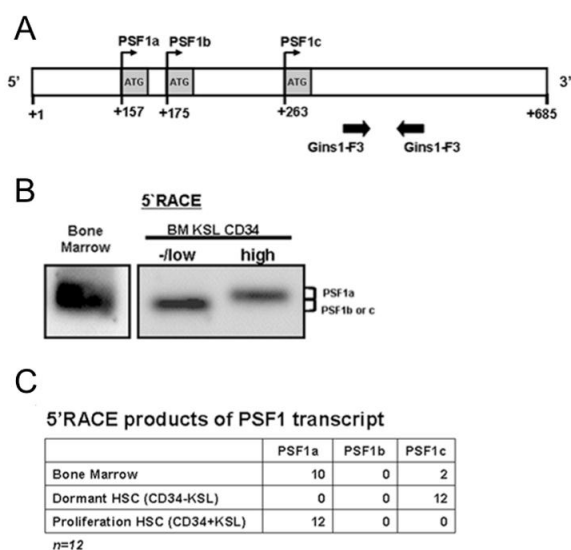
1) PSF1 の発現制御解析結果

精巢を用いた解析において、精子幹細胞においては PSF1 蛋白の発現は観察されても、それより分化した精子細胞においては mRNA の発現は観察されるが、PSF1 蛋白の発現は観察されない。PSF1 は異なる3つの転写開始点から mRNA が産生され、最も長い PSF1a とそれより短い PSF1b、c が観察され(図②-4A)、精子幹細胞では PSF1a の産生が優位であり、それより分化した精子細胞では PSF1b,c が優位に発現していた。このことから分裂活性の高い精子幹細胞に発現する PSF1a は蛋白として安定して DNA 複製因子として機能し、PSF1b,c は産生されてもすぐに分解されるために、蛋白として機能せず分裂の抑制に機能するのではないかと考えられた。

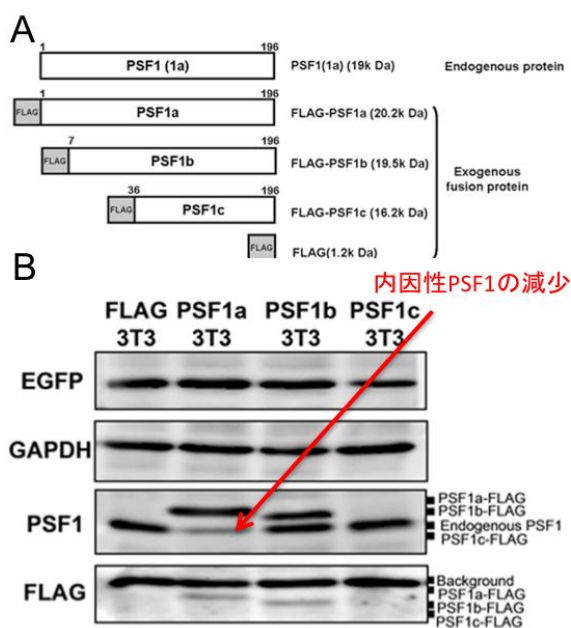
胎児期の造血幹細胞においては PSF1 の発現はきわめて亢進しているが、成体骨髄の造血幹細胞においても mRNA の発現が全くないわけではない。精子幹細胞は盛んに分裂していることから、成体骨髄の造血幹細胞でも、分裂期のものでは PSF1a が発現していることが予想された。そこで、5' RACE 法を用いて、CD34 陰性の休眠期に入っていることの多い造血幹細胞と、CD34 陽性の増殖期の造血幹細胞において PSF1 の発現を比較すると、分裂期の造血幹細胞においては PSF1a が優位に発現し、休眠期では PSF1c が優位に発現していることが判明した(図②-4B、C)。つまり、体細胞でも、細胞分裂活性は有していても DNA 複製が生じないように無効な PSF1 を産生させて、細胞周期が止められた状態になっているのではないかと考えられた。そこで、異なる PSF1 の産生を誘導するメカニズムを解析すれば、細胞の増殖活性に変化を与えられるのではないかと考え、休眠期と増殖期の PSF1 の発現誘導に関する解析を行った。

異なる3つの PSF1 を産生できる PSF1a, b, c 遺伝子をクローニングして FLAG エピトープを融合して、内在性の PSF1 と区別できるようにして、これらの遺伝子を NIH3T3 細胞に導入した(図②-5A,B)。

その結果 PSF1a b は蛋白として発現させることが可能であったが、予想通り、PSF1c はすぐさま変性を受け蛋白として観察することができなかった。ここで興味深いことに、PSF1 として DNA 複製にかかわる PSF1a を過剰に発現させた場合、内在性の PSF1 の発現が抑制されることが判明した(図②-5B)。予備的な実験で PSF1a を過剰に発現させた場合、細胞死が誘導されることが判明していたことから、PSF1、PSF2、PSF3、SLD5 の発現量のバランスが DNA 複製因子 GINS 複合体形成においては重要であることが予想されていた。つまり、人工的に PSF1a を過剰に発現しても生存してきた細胞においては、PSF1、PSF2、PSF3、SLD5 の発現量のバランスを保つために、内



図②-4



図②-5

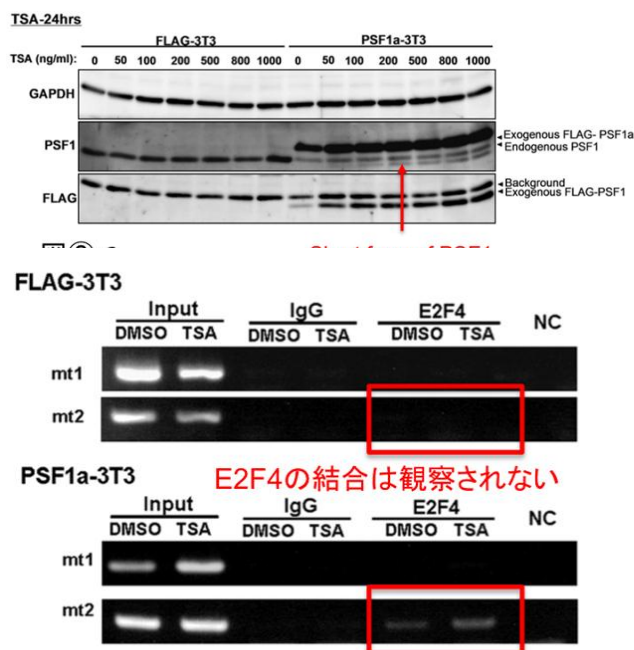
在性の PSF1 の転写を抑制していることが示唆された。終末分化した体細胞では PSF1 遺伝子そのものの発現が抑制された状態であるので、PSF1 のプロモーター活性も抑制されている状態である。そこで、この PSF1a 過剰発現 NIH3T3 細胞を用いれば、休眠期の PSF1 の発現制御機構を解明することができると考えられた。

PSF1a 過剰発現 NIH3T3 細胞 (PSF1a-NIH3T3 細胞) において、PSF1 のプロモーター活性が抑制されただけでは PSF1b,c といった短い PSF1 は産生されていないが、この細胞のエピゲノムを変化させて、それが誘導できないかどうかを検討した。PSF1a-NIH3T3 細胞に対して、5アザシチジンを投与したが、PSF1b,c の発現は観察されず、短い PSF1 の発現には DNA メチル化は関わらないと考えられた。しかし、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA (HDACi) で細胞を処理すると、濃度既存的に短い PSF1 の産生が誘導されてくることが判明した (図②-6)。

次に PSF1 の転写が PSF1 プロモーター領域のどこで制御を受けているのかを解析するため、PSF1 の1番目のエキソンから上流5キロベースを解析し、+22~+30bp では PSF1 のプロモーターがサイレンシングを受け、+4448~+4441bp の領域が PSF1 プロモーター活性の亢進に必須であることが判明した。+22~+30bp の領域には、細胞周期のネガティブな制御因子である E2F4 の結合モチーフを有することから、この領域に E2F4 が結合すると、PSF1 の発現を抑制して細胞を休眠状態に誘導できる準備ができるのではないかと考えられる。そこで、E2F4 の抗体を用いて ChIP 解析を行なったところ、確かに PSF1a-NIH3T3 細胞に対して TSA 処理を行なうと、E2F4 が PSF1 プロモーター領域に結合してくることが判明した (図②-7)。

以上から、造血幹細胞などの体細胞の幹細胞が休眠状態になる際には、ヒストンアセチル化が誘導され、PSF1 のショートフォームを形成させることで、GINS の形成を抑制し、細胞分裂を抑制しているのではないかと考えられた。

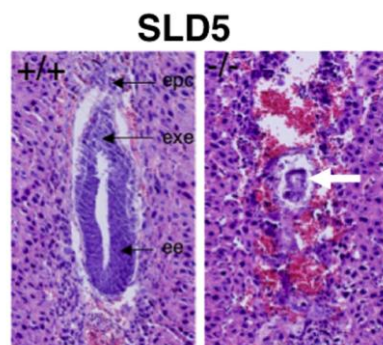
体細胞を用いて細胞をリプログラミングさせる際に、このようなエピジェノミク変化を制御して、幹細胞化した細胞の増殖を誘導させることに応用できる可能性があると考えられた。



図②-7 E2F4の結合はTSAで強くなる

2)SLD5 ノックアウトマウスの作製およびその解析

酵母では PSF1 と結合して GINS 複合体の一員として機能する SLD5 に関しても、ほ乳類でも細胞増殖に重要であるのかどうかを解析し、細胞のリプログラミング過程に必要な、体細胞の細胞増殖誘導の分子標的として用いることができるかどうかを解析するために、SLD5 遺伝子の欠損 (KO) マウスを作製した。その結果、SLD5 KO マウスは PSF1 KO マウスと同様に胎生 6.5 日目までに致死となっていることが判明した。その表現型も PSF1 KO マウスと同様で、全能性幹細胞である epiblast の増殖が抑制されていた (図②-8、Mohri et al. PLoS One 2013)。PSF1 ヘテロ欠損マウスを用いた解析においては、5FU をマウスに半致死量投与すると、野生型マウスでは、一旦造血幹細胞数が激減しても、7日目ころには急速に細胞数が回復したが、PSF1 ヘテロ欠損マウスでは造血幹細胞の急速な増殖ができず致死となった。つまり、PSF1 は成体において急速な増殖に必須な分子であると考えてきた。しかし、同様に SLD5



図②-8

ヘテロ欠損マウスに 5FU を上記実験と同量を投与しても、造血幹細胞の回復は野生型マウスと同様に生じた。このことから、SLD5 においては急速な幹細胞性増殖には必須ではない可能性が考えられた。よって、SLD5 は、細胞のリプログラミング過程に必要な、体細胞の細胞増殖誘導の分子標的として用いるには不適と考え、PSF1 発現の可視化による体細胞の潜在的幹細胞化および幹細胞化獲得能の解析に向かって解析することにした（以下（3）の実験内容へ続く）。

3) PSF1 プロモーターEGFPトランスジェニックマウスの作製と細胞増殖活性の可視化

結果は発表前につき非公開

3.3 GINS 抑制因子による iPS 細胞の細胞死誘導（大阪大学 高倉グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

【目的】

本研究項目では、再生医療に用いられつつある、iPS 細胞を用いた再生医療の実現において、懸念材料となっている iPS 細胞混入によるがん化に対応するため、iPS 細胞そのものを、そしてがん化した iPS 細胞由来がん幹細胞に細胞死を誘導しうる物質（薬剤）の開発を目的として研究を実施した。

【研究実施内容】

iPS 細胞に由来するがんの成長を抑制する為には、移植後に残存する iPS 細胞が急速に増殖して奇形腫を形成する過程、あるいは iPS 細胞に由来するがん細胞の中でも、特に癌の悪性進展にかかわるがん幹細胞あるいは iPS 細胞そのものに細胞死を誘導することが必要である。がん幹細胞は ES 細胞と表現型が類似しており、自己複製の分子機序も類似していることが予想される。我々が、これまで未分化幹細胞に発現し、細胞増殖に必須の役割を果たすことを解明してきた DNA 複製因子である PSF1 や SLD5 も、がん幹細胞と内部細胞塊細胞（≒ES 細胞）において機能的であることから、PSF1、SLD5 を分子標的とした薬剤は、iPS 細胞やがん幹細胞の細胞増殖を抑制する治療薬として利用できると考えられ、本研究項目では、1) PSF1-SLD5 複合体形成を抑制する薬剤開発、2) PSF1 の発現抑制剤の開発を行った。

§4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件(すべて商業誌のため割愛)、国際(欧文)誌 40 件)

1. Kidoya H, Naito H, and Takakura N. Apelin induces enlarged and non-leaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood* 115: 3166-3174, 2010 (doi:10.1182/blood-2009-07-232306)
2. del Toro R, Prahst C, Mathivet T, Siegfried G, Kaminker JS, Larrivee B, Breant C, Duarte A, Takakura N, Fukamizu A, Penninger J, Eichmann A. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116: 4025-33, 2010 (doi:10.1182/blood-2010-02-270819)
3. Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab* 12: 483-95, 2010 (doi:10.1016/j.cmet.2010.09.015)
4. Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1451-5, 2011 (doi:10.1073/pnas.1011293108)
5. Shioyama W, Nakaoka Y, Higuchi K, Minami T, Taniyama Y, Nishida K, Kidoya H, Sonobe T, Naito H, Arita Y, Hashimoto T, Kuroda T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I. Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of Postnatal Angiogenesis After Ischemia via HGF/c-Met Signaling. *Circ Res* 108: 664-675, 2011 (doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.232223)
6. Nakahara I, Miyamoto M, Shibata T, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Mogushi K, Oda K, Ueno M, Takakura N, Mizushima H, Tanaka H, Ohta T. Up-regulation of PSF1 promotes the growth of breast cancer cells. *Genes Cells* 15: 1015-24, 2010 (doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01442.x).
7. Murakami A, Takasugi H, Ohnuma S, Koide Y, Sakurai A, Takeda S, Hasegawa T, Sasamori J, Konno T, Hayashi K, Watanabe Y, Mori K, Sato Y, Takahashi A, Mochizuki N, Takakura N. Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 77: 704-13, 2010 (doi:10.1124/mol.109.061481)
8. Nagahama Y, Ueno M, Haraguchi N, Mori M, Takakura N. PSF3 marks malignant colon cancer and has a role in cancer cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 392, 150-154, 2010 (doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.174)
9. Naito H, Kidoya H, Sakimoto S, Wakabayashi T, Takakura N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J* 31: 842-855, 2012 (doi:10.1038/emboj.2011.465)
10. Naito H, Takara K, Wakabayashi T, Kawahara H, Kidoya H, Takakura N. Changes in blood vessel maturation in the fibrous cap of the tumor rim. *Cancer Sci* 103: 433-438, 2012 (doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02157.x)
11. Kajiya K, Kidoya H, Sawane M, Matsumoto-Okazaki Y, Yamanishi H, Furuse M, Takakura N. Promotion of Lymphatic Integrity by Angiopoietin-1/Tie2 Signaling during Inflammation. *Am J Pathol* 180: 1273-1282, 2012 (doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.008)
12. Sawane M, Kidoya H, Muramatsu F, Takakura N, Kajiya K. Apelin attenuates UVB-induced edema and inflammation by promoting vessel function. *Am J Pathol* 179: 2691-2697, 2011 (doi:10.1016/j.ajpath.2011.08.024)

13. Yamakawa D, Kidoya H, Sakimoto S, Jia W, Takakura N. 2-Methoxycinnamaldehyde inhibits tumor angiogenesis by suppressing Tie2 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 415: 174-180, 2011 (doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.053)
14. Sakimoto S, Kidoya H, Kamei M, Naito N, Yamakawa, Sakaguchi H, Wakabayashi T, Nishida K, and Takakura N. An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization. *PLoS One* 8: e58096, 2013 (doi:10.1371/journal.pone.0058096)
15. Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature* 495:524-528, 2013 (doi:10.1038/nature11930)
16. Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Sakimoto S, Takakura N. microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin. *Oncogene* 32:414-421, 2013 (doi:10.1038/onc.2012.68)
17. Maruyama K, Fukasaka M, Vandenbon A, Saitoh T, Kawasaki T, Kondo T, Yokoyama KK, Kidoya H, Takakura N, Standley D, Takeuchi O, Akira S. The Transcription Factor Jdp2 Controls Bone Homeostasis and Antibacterial Immunity by Regulating Osteoclast and Neutrophil Differentiation. *Immunity* 37: 1024-1036, 2012 (doi:10.1016/j.immuni.2012.08.022)
18. Komada Y, Yamane T, Kadota D, Isono K, Takakura N, Hayashi S, Yamazaki H. Origins and properties of dental, thymic, and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells. *PLoS One* 7: e46436, 2012 (doi:10.1371/journal.pone.0046436)
19. Yoshioka K, Yoshida K, Cui H, Wakayama T, Takuwa N, Okamoto Y, Du W, Qi X, Asanuma K, Sugihara K, Aki S, Miyazawa H, Biswas K, Nagakura C, Ueno M, Iseki S, Schwartz RJ, Okamoto H, Sasaki T, Matsui O, Asano M, Adams RH, Takakura N, Takuwa Y. Endothelial PI3K-C2 α , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat Med* 18: 1560-1569, 2012 (doi:10.1038/nm.2928)
20. Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene* 31: 3254-3264, 2012 (doi:10.1038/onc.2011.489)
21. Sakimoto S, Kidoya H, Naito H, Kamei M, Sakaguchi H, Goda N, Fukamizu A, Nishida K, Takakura N. A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice. *Development* 139: 1327-1335, 2012 (doi:10.1242/dev.072330)
22. Kinugasa Y, Takakura N. Monoclonal Antibody Selectively Recognizing Murine But Not Human CD44. *Hybridoma* 31:262-266, 2012 (doi:10.1089/hyb.2012.0021)
23. Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 expressed on CAFs is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. *Stem Cells* 32; 145-156, 2014 (doi:10.1002/stem.1556)
24. Kyutoku M, Nakagami H, Koriyama H, Tomioka H, Nakagami F, Shimamura M, Kurinami H, Zhengda P, Jo DH, Kim JH, Takakura N, Morishita R. Development of novel DNA vaccine for VEGF in murine cancer model. *Sci Rep* 29; 3380, 2013 (doi:10.1038/srep03380)
25. Mohri T, Ueno M, Nagahama Y, Gong ZY, Asano M, Oshima H, Oshima M, Fujio Y, Takakura N. Requirement of SLD5 for Early Embryogenesis. *PLoS One* 8 e78961, 2013 (doi:10.1371/journal.pone.0078961)
26. Sato Y, Yashiro M, Takakura N. Heregulin Induces Resistance to Lapatinib-mediated Growth Inhibition of HER2-Amplified Cancer Cells. *Cancer Sci* 104:1618-1625, 2013 (doi:10.1111/cas.12290)
27. Wakabayashi T, Naito H, Takara K, Kidoya H, Sakimoto S, Oshima Y, Nishida K, Takakura N. Identification of vascular endothelial side population cells in the

- choroidal vessels and their potential role in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54; 6686-6693, 2013 (doi:10.1167/iovs.13-12342)
28. Kawahara H, Naito H, Takara K, Wakabayashi T, Kidoya H, Takakura N. Tumor endothelial cell-specific drug delivery system using apelin-conjugated liposomes. *PLoS One* 8:e65499, 2013 (doi:10.1371/journal.pone.0065499)
 29. Yamakawa D, Kidoya H, Sakimoto S, Jia W, Naito H, Takakura N. Ligand-independent Tie2 dimers mediate kinase activity stimulated by high dose Angiopoietin-1. *J Biol Chem* 288; 12469-12477, 2013 (doi: 10.1074/jbc.M112.433979)
 30. Jia W, Kidoya H, Yamakawa D, Naito H, and Takakura N. Galectin-3 accelerates M2 macrophage infiltration and angiogenesis in tumors. *Am J Pathol* 182; 1821-1831, 2013 (doi:10.1016/j.ajpath.2013.01.017)
 31. Matsui T, Kinugasa Y, Tahara H, Kanakura Y, Takakura N. Possible role of mural cell covered mature blood vessels in inducing drug resistance in cancer-initiating cells. *Am J Pathol* 182; 1790-1799, 2013 (doi:10.1016/j.ajpath.2013.01.019)
 32. Sawane M, Kajiya K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F, Takakura N. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes* 62; 1970-1980, 2013 (doi:10.2337/db12-0604)
 33. Kidoya K, Naito H, Muramatsu F, Yamakawa D, Jia W, Ikawa M, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shirai M, Adams RH, Fukamizu A, Takakura N. APJ Regulates Parallel Juxtapositional Alignment of Arteries and Veins in the skin. *Dev Cell* inpress (doi:10.1016/j.devcel.2015.02.024)
 34. Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Otani K, Kishimoto I, Shintani Y, Inoue M, Kimura T, Sawabata N, Minami M, Nakagiri T, Funaki S, Takeuchi Y, Maeda H, Kidoya H, Kiyonari H, Shioi G, Arai Y, Hasegawa T, Takakura N, Hori M, Ohno Y, Miyazato M, Mochizuki N, Okumura M, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112:4086-91, 2015 (doi: 10.1073/pnas.1417273112)
 35. Arita Y, Nakaoka Y, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Kataoka-Hashimoto T, Ikeoka K, Yasui T, Masaki T, Yamamoto K, Higuchi K, Park JS, Shirai M, Nishiyama K, Yamagishi H, Otsu K, Kurihara H, Minami T, Yamauchi-Takahara K, Koh GY, Mochizuki N, Takakura N, Sakata Y, Yamashita JK, Komuro I. Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. *Nat Commun* 5: 4552, 2014 (doi:10.1038/ncomms5552)
 36. Yamamoto S, Yamazaki T, Komazaki S, Yamashita T, Osaki M, Matsubayashi M, Kidoya H, Takakura N, Yamazaki D, Kakizawa S. Contribution of calumenin to embryogenesis through participation in the endoplasmic reticulum-associated degradation activity. *Dev Biol* 393:33-43, 2014 (doi: 10.1016/j.ydbio. 2014. 06.024)
 37. Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, Pearson J, Chen YC, Saito A, Harada A, Shiozaki M, Iseoka H, Watabe T, Watabe H, Horitsugi G, Ishibashi M, Ikeda H, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Naito H, Umetani K, Shimizu T, Okano T, Kobayashi E, Daimon T, Ueno T, Kuratani T, Toda K, Takakura N, Hatazawa J, Shirai M, Sawa Y. Cell-sheet Therapy With Omentopexy Promotes Arteriogenesis and Improves Coronary Circulation Physiology in Failing Heart. *Mol Ther* 23: 374-386, 2015 (doi:10.1038/mt.2014.225)
 38. Tahara H, Naito H, Kise K, Wakabayashi T, Kamoi K, Okihara K, Yanagisawa A, Nakai Y, Nonomura N, Morii E, Miki T, Takakura N. Evaluation of PSF1 as a prognostic biomarker for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 18:56-62, 2015 (doi:10.1038/pcan.2014.46.)
 39. Gong Z-Y, Kidoya H, Mohri T, Han Y, Takakura N. DNA damage enhanced by the attenuation of SLD5 delays cell cycle restoration in normal cells but not in cancer cells. *PLoS One* 9:e110483, 2014 (doi:10.1371/journal.pone.0110483)

40. Ishikura K, Misu H, Kumazaki M, Takayama H, Matsuzawa-Nagata N, Tajima N, Chikamoto K, Lan F, Ando H, Ota T, Sakurai M, Takeshita Y, Kato K, Fujimura A, Miyamoto K, Saito Y, Kameo S, Okamoto Y, Takuwa Y, Takahashi K, Kidoya H, Takakura N, Kaneko S, Takamura T. Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. *Diabetologia* 57:1968-1976, 2014 (doi:10.1007/s00125-014-3306-9)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Takakura N. Role of intimate interactions between endothelial cells and the surrounding accessory cells in the maturation of blood vessels. *J Thromb Haemost* 9:144-150, 2011 (DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04275.x)
2. Takakura N. Guest editorial: mutual relationship between vascular biology and hematology. *Int J Hematol* 95: 117-118, 2012 (doi: 10.1007/s12185-012-1014-0)
3. Takakura N. Involvement of non-vascular stem cells in blood vessel formation. *Int J Hematol* 95: 138-142, 2012 (doi: 10.1007/s12185-012-1011-3)
4. Kidoya H, Takakura N. Biology of the apelin-APJ axis in vascular formation. *J Biochem* 152: 125-131, 2012 (DOI: 10.1093/jb/mvs071)
5. Takakura N. Formation and regulation of the cancer stem cell niche. *Cancer Sci* 103: 1177-1181, 2012 (DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02270.x)
6. Takakura N. Regulation of niche molecules for the maintenance of cardiac stem cells. *Circ J* 69-70, 2013 (DOI:10.1253/circj.CJ-13-1384)
7. Naito H & Takakura N. Vascular Resident Endothelial Side Population Cells, Angiogenesis and Vascularization (Springer)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

①招待講演 (国内会議 7 件、国際会議 8 件)

1. 高倉伸幸: 血管新生における血管成熟化の意義、第 63 回細胞生物学会、北海道、2011.6.29 (招待)
2. Takakura N: Molecular Analysis of Blood Vessel Maturation. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. July 26, 2011, Kyoto, Japan (invited)
3. Takakura N: Identification of endothelial stem cell population in the pre-existing blood vessels, The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting. Tokyo Japan, Dec 9, 2011 (invited)
4. Takakura N: Identification of endothelial stem like cells in preexisting blood vessels. 2012 Suzhou International Symposium on Basic and Translational Vascular Research. Suzhou University, Suzhou, China, May 4-6, 2012 (invited)
5. Takakura N: Requirement for endothelial stem-like cells and involvement of the Tie2-APJ axis for mature blood vessel formation 17th International Vascular Biology Meeting 2012, Wiesbaden, Germany, June 3, 2012 (invited)
6. 高倉伸幸: 血管病において血管成熟化が示す意義、第9回日本病理学会カンファレンス、山口、2012.8.3.
7. 高倉伸幸: 阪大発ベンチャー、ジーン・ステム株式会社の設立、文部科学省 iPS 細胞等研究ネットワーク第 3 回知財シンポジウム、東京フォーラム、2012.10.30.
8. Takakura N: Requirement for endothelial stem-like cells in mature blood vessel formation. "International Symposium 2012" *Neuro-vascular wiring*. Nara Prefectural New Public Hall. November 13, 2012 (invited)
9. Takakura N, Regulation of angiogenesis in vascular diseases, 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Maui, Hawaii, December 19, 2013
10. 高倉伸幸、内皮幹細胞による血管の形成と維持、第13回再生医療学会、国立京都国際会館、2014.3.4.

11. Takakura N, Requirement of endothelial stem cell population for the maintenance and reconstitution of blood vessels, 18TH IVBM 2014, *Kyoto, Japan, April 17, 2014*
12. Takakura N, Cancer stem cells and their vascular niche formation, Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting, *Seoul, Korea, May 16, 2014*
13. 高倉伸幸、血管形成と幹細胞制御、第38回日本リンパ学会総会、北里大学薬学部コンベンションホール、2014.6.20.
14. 高倉伸幸、がん幹細胞ニッチの形成と制御、第32回日本骨代謝学会、大阪国際会議場、2014.7.24.
15. 高倉伸幸、既存血管における血管内皮幹細胞システムの解明、第14回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜、2015.3.19

②口頭発表 (国内会議 1 件、国際会議 0 件)

1. 高倉伸幸、生理的細胞リプログラミング機構の解明とその応用、CREST/さがけ「iPS 細胞」領域 合同シンポジウム 2011、日本科学未来館(東京)、2010.1.14.

③ポスター発表 (国内会議 1 件、国際会議 0 件)

1. Han Y, Takakura N, Identification and Characterization of PSF1 transcription mechanism in stem cells, CREST/さがけ「iPS 細胞」領域 合同シンポジウム 2011、日本科学未来館(東京)、2010.1.14.

(4)受賞・報道等

①受賞

平成25年度大阪大学総長顕彰
平成26年度大阪大学総長顕彰

②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

2011 年 5 月 16 日 日本経済新聞 がん幹細胞の識別法の開発について
2013 年 12 月 15 日 朝日新聞 がん幹細胞の血管ニッチ
2014 年 12 月 23 日 日本経済新聞 血管構造の安定化に機能する物質発見

(5)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・ JST「再生医療実現拠点ネットワークプログラム」事業に採択され、現在実施中 課題名「再生医療における血管新生制御技術の開発」(H25～29)
- ・ ベンチャー企業と JST の「A-STEP」事業に採択され実施。課題名「がん幹細胞機能分子 GINS 複合体制御によるがん予防薬／がん幹細胞治療薬開発」(H24-25)

②社会還元的な展開活動

- ・ 既存の血管の中に内皮幹細胞が存在することを国際誌および国際血管生物医学会で発表し、本細胞を用いた血管再生の有用性を提言した。

§ 5 研究期間中の活動

(1) 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

2015 年 5 月 13 日に大阪大学微生物病研究所、融合棟谷口記念講堂で、血管形成に関わる研究について、日本血管生物医学会の春の特別シンポジウムを主催する。海外より2名の研究者、国内から11名を招聘する。

§ 6 最後に

<研究目標から見た到達度>

がん幹細胞が、がん細胞と造血幹細胞との相互作用により発生する現象の分子機序を明確にし、それをレッスンにして血管内皮細胞から内皮幹細胞へのリプログラミング機構を明らかにすることを大目標としていた。ただし、血管内皮幹細胞の表現型としての定義がCREST研究開始時にはできていなかったことで、内皮細胞から内皮幹細胞への分化が生じているのかどうかは不明瞭であった。そのために、多くの時間、研究費を内皮幹細胞の表現型解析に費やすことになったが、最終的にその表現型を明らかにできたこと、そして内皮幹細胞から内皮前駆細胞(と考えられる細胞)、内皮細胞への分化系譜を定義することができるようになり、この階層性の逆行が内皮幹細胞の発生に関わることが示唆できた。生体内で生じる内皮幹細胞化の現象につき、生体内に存在する体細胞と内皮細胞の何らかの相互作用が内皮幹細胞化に関わることまで明らかにすることができた。その分子機序までは明らかにできなかったが、その他に掲げた研究項目の達成度と合わせて、おおむね研究目標に到達できたと考えられる。

<得られた成果の自己評価>

内皮幹細胞様の細胞が既存血管に存在することを示した成果は論文として発表できたが、内皮幹細胞の表現型の定義、発生と分化を解析した結果がまだ論文化できていないことでなお一層の研究の邁進が必要と考えている。GINS複合体の中でもPSF1の発現制御の解明は論文投稿まで至り、PSF1のプロモーターによる増殖細胞の可視化についての成果も近く論文として報告できると考えているが、この可視化の方法を用いたiPS細胞化の効率改善の解析まで至らなかったのは残念である。

<今後の研究の展開>

内皮幹細胞の血管形成、維持についての重要性を明確にする。内皮幹細胞の発生メカニズムを明らかにする。以上の基礎医学的な解析とともに、内皮幹細胞を用いた血管再生の前臨床的研究を実施する。

<代表者としてのプロジェクト運営:チーム全体の研究遂行など>

研究室内の多くの研究者によって本研究が遂行された。運用上の問題はなかったが、当初予定した研究内容の変更などに追従してもらったスタッフおよび院生などの柔軟性に感謝する。

<CREST研究に参加した感想>

CRESTでは類似した研究を異なる手法で研究する複数の研究グループの研究の進捗を目の当たりにし、非常に研究に対して刺激を受けつつ5年半を過ごした。研究目標としてはやや困難かと思われた内容も、このように他の研究グループからの刺激を受けたこともあって、一つの形になりつつある。「内皮幹細胞」の同定を期に新しい血管形成の分子機序解明の潮流を創造していきたい。



2012年10月17日私の50才の誕生日に教室員が祝ってくれた写真です(全員が写っていないのですみません)。