新規試験管内誘導システムによる分化再生研究

山下　潤

研究のねらい

細胞分化は、幹細胞や前駆細胞などが細胞間相互作用、液性因子、細胞外マトリックスなど外界からの様々な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安定させるという基本的生命現象の一つと考えられる。ES 細胞（胚性幹細胞）は体中すべての種類の細胞に分化することができる「万能」の幹細胞と考えられている。我々は ES 細胞を用いて、共通の前駆細胞（Flk1 陽性細胞）から血管（血管内皮、血管壁細胞、血球細胞）および心筋細胞を系統的に分化誘導する新しい試験管内心血管分化系を構築した。この分化系は2次元培養下で単一細胞から分化誘導可能なシステムであり、個々の細胞に注目して分化過程を検討することができる。本研究は、細胞分化過程の解析が可能である同分化系の特性を活かし、トランスクリプトーム解析をはじめとする様々な Omics 解析と、RNAi などによる遺伝子機能解析実験を組み合わせることにより、試験管内だけで細胞分化の全体像を包括的に解析する新しい分化研究法を開発し、新しい再生医学を開拓することを目的とした。本研究は、遺伝子改変動物を中心とした従来の研究とは異なり、構成的に細胞を作り出すことにより分化機構を理解しようとする新しいアプローチにより、新たな分化再生機構の発見・解明をもたらすことが期待される。また、他の細胞・組織の分化再生研究やヒト ES 細胞を用いた研究への応用・展開が可能であり、遺伝子改変動物モデルが作れないヒト研究において不可欠な新しい分化再生研究基盤を創出することができると考えられた。

研究成果

1）新しい心筋分化過程解析系の構築

我々はES細胞由来Flk1 陽性中胚葉細胞をマウスOP9 ストローマ細胞上で培養することにより、2 次元培養下に拍動心筋細胞を誘導できることを見出していたが、同システムを用いて単一細胞からも心筋細胞が誘導できることを明らかにするとともに、中胚葉(Flk1 陽性細胞)から心筋細胞に至る中間段階において特異的に心筋分化能を有する心筋前駆細胞の同定を行い、未分化ES細胞→中胚葉細胞→心筋前駆細胞→心筋細胞という心筋分化の経時的変化を培養下に再現し、その過程を解析できる実験システムを構築した。Flk1 陽性細

胞をOP9 細胞上で培養すると、培養 4,5 日目から拍動心筋細胞が認められる。心筋分化の前段階である培養 2 日目に細胞を単離し、FACSを用いて種々の細胞分画を分取・再培養し、特異的に心筋細胞が出現する細胞分画を探索した。その結果、Flk1 陽性CXCR4 陽性 vascular endothelial cadherin (VE-cad)陰性の細胞分画(FCV細胞)が他の約20倍の心筋分化能を有することを見出した（図 1）。FCV細胞の単一細胞培養により、約 80%のコロニーに心筋細胞が認められ、FCV細胞は高い心筋分化特異性を有することが単一細胞レベルで明らかとなった。早期マウス胎仔(8.5dpc)においてもFCV細胞分画は高い心筋分化能を有した。Flk1 陽性細胞からの心筋及び心筋前駆細胞分化において、BMP阻害物質のnoggin及びwnt3aが抑制的に、wnt阻害物質Dkk1 が促進的に作用することも明らかにした[5]。

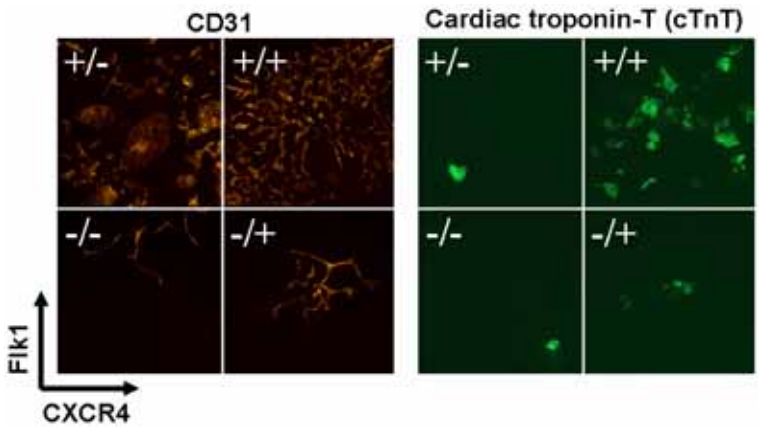

図1：心筋前駆細胞分画の同定
Flk1 陽性細胞を OP9 細胞上で培養 2 日後に Flk1 及び CXCR4 発現により 4 分画に分け、OP9 上で再培養すると、CD31 陽性内皮細胞は、Flk1 陽性分画から出現するのに対し、心筋トロポニン陽性細胞は Flk1 陽性/CXCR4 陽性分画に著しく濃縮されて出現する。

2）動静脈リンパ管内皮細胞の分化誘導

我々は、Flk1 陽性細胞をIV型コラーゲン上で血清及びVEGF (vascular endothelial growth factor)存在下に培養すると、血管内皮細胞及び血管壁細胞が選択的に誘導されることを明らかにしてきたが(Yamashita et al, **Nature**, 2000)、さらに血管の分化多様化機構の解析を進め、動脈・静脈・リンパ管の 3 種類の内皮細胞をそれぞれ誘導することに成功した（図 2）。従来どおりFlk1 陽性細胞を血清及びVEGF存在下に培養した場合は、約 90%以上の誘導内皮細胞が動脈内皮細胞マーカーephrinB2 陰性の静脈内皮細胞となった。VEGFに加えてcyclic AMP analogueの 8bromo-cAMPまたはcAMPを上昇させる液性因子の一つ、アドレノメデュリン(AM)を添加すると、ephrinB2 陽性の動脈内皮細胞が著しく増加した。cAMP経路の活性化により、内皮細胞特異的にNotch経路が活性化された。Notchの下流分子であるRBP-J欠損ES細胞を用いてNotch経路の活性化を阻害すると動脈内皮細胞分化は認められなくなった。しかし、Notch1 細胞内ドメインの強制発現によるNotch経路の活性化のみでは動脈内皮細胞は誘導されず、動脈内皮分化には、VEGF, Notch, cAMPの 3 者が必要であることが明らかとなった。本研究は、動脈内皮細胞分化誘導に初めて成功するとともに動脈内皮分化の新

しい分子機構を示したものである[2)]。また、Flk1 陽性細胞をOP9 ストローマ細胞上で培養するとリンパ管内皮マーカーprox1 陽性のリンパ管内皮細胞が誘導された。OP9 ストローマ上におけるリンパ管内皮誘導は、リンパ管誘導因子VEGF-C及びangiopoietin1 を阻害することによりほぼ完全に消失したが、VEGF-C及びangiopoietinのみではリンパ管内皮細胞は誘導されなかった。一方、OP9 ストローマ細胞の培養上清の添加においてはリンパ管内皮細胞の出現を認めたため、OP9 ストローマ細胞培養上清中にリンパ管内皮誘導活性が存在することが示唆された[3)]。ES細胞からのリンパ管内皮分化誘導は 2006 年に同報告を含め 3 報が初めて報告された。

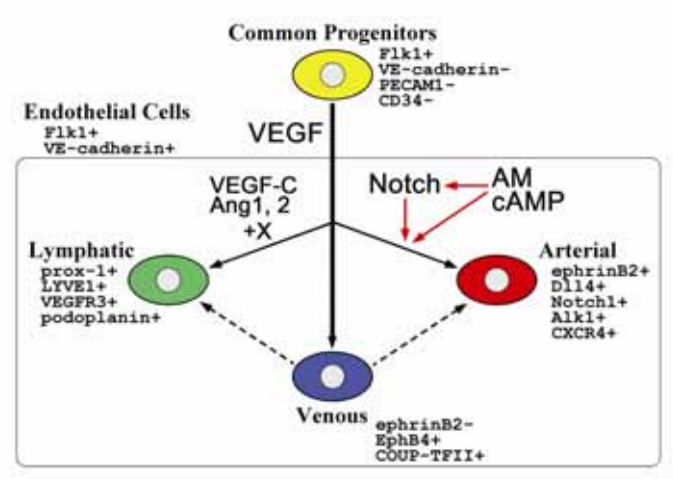

図 2：Flk1 陽性細胞からの動静脈リンパ管内皮細胞分化
Flk1 陽性細胞は、血清及び VEGF 存在下に VE-カドヘリン陽性の内皮細胞に分化する。その際、Notch に加えて cyclic AMP や AM（アドレノメデュリン）が存在すると ephrinB2 陽性動脈内皮細胞が分化する。一方、OP9 細胞上で培養すると OP9 由来未知因子の作用により prox1 陽性リンパ管内皮細胞が分化する。

3）誘導性 short hair-pin RNA (shRNA)発現による分化ステージ特異的遺伝子機能阻害システムの構築

これまでの遺伝子改変モデルを含む種々の研究により、分化ステージや発生段階、細胞種の違い等、遺伝子が発現される背景によって同じ遺伝子が異なった役割を果たすことが知られてきている。またES細胞においても、ES細胞分化諸段階からの遺伝子発現変化は、ES細胞の樹立や増殖を含めた様々な影響を及ぼし、分化過程における特異的遺伝子機能を反映しない可能性が考えられる。そこで我々は、分化ステージ特異的に遺伝子機能を解析するため、テトラサイクリン誘導性にshRNAを発現し、ES細胞分化過程において恣意的に遺伝子発現を制御できるES細胞分化系の構築を行った。テトラサイクリン誘導性発現制御遺伝子tetR-tTS遺伝子ベクターと、テトラサイクリンオペレーター配列を挿入したtRNA及びU6 プロモーターを用いたshRNA発現ベクターをES細胞に導入し(Tet-ONシステム)、テトラサイクリン誘導性shRNA発現株を構築した。ES細胞分化初期からのテトラサイクリン添加によるFlk1 遺伝子発現阻害により、Flk1 陽性中胚葉細胞の分化は著しく抑制された。また、ES細胞分化誘導 2 日目からのshRNA発現により中胚葉におけるFlk1 遺伝子発現抑制を試み

たところ、VE-cad陽性内皮細胞の分化が阻害された。一方、VE-cad遺伝子に対するshRNAを発現させた場合には、内皮細胞分化は影響を受けなかったが、誘導内皮細胞におけるVE-cad発現が有意に低下した。このように分化ステージ特異的遺伝子発現阻害により、ターゲット遺伝子の発現抑制とともにターゲット遺伝子の関与する細胞分化も制御できることが明らかとなった[1)]。

4）心血管分化過程における遺伝子プロファイルの作製

我々が開発した1）－2）の分化系を用いて、未分化 ES 細胞、Flk1 陽性細胞、動脈･静脈･リンパ管内皮細胞、心筋前駆細胞、心筋細胞の各分画を分化誘導･純化し、RNA を抽出してDNA チップ解析(Affymetrix)を行い、心血管分化過程における遺伝子発現プロファイルを作製した。それぞれの分画に特異的に発現する遺伝子各 100-200 個を同定している。データマイニングには eXintegrator システム（理化学研究所発生再生医学総合研究センター）をおもに使用した。

5）ヒト ES 細胞からの心血管分化

ヒト ES 細胞使用計画「ヒト ES 細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」が文部科学省の承認を受け（平成 17 年 3 月）、ヒト ES 細胞を用いた心血管分化研究を開始した。すでにヒト ES 細胞からの 2 型 VEGF 受容体（マウス Flk1）の誘導と純化、内皮細胞分化、心筋細胞分化に成功している。

今後の展開

1）新しい心筋再生治療法の開発

上記心筋前駆細胞の効率的誘導法と純化による新しい心筋前駆細胞移植治療の可能性を探索するとともに、我々が見出している心筋前駆細胞誘導物質の投与または遺伝子導入、さらには細胞移植と遺伝子治療を複合させた高効率心筋再生治療の開拓を試みる。それにより、心筋症や慢性期心筋梗塞等、血流改善によっては心機能の回復が望めず、真の心筋再生が必要な病態にも対応可能な新しい心筋再生治療法を開発する。

2）生物学的ペースメーカーによるペースメーカー再生治療法の開発

ES 細胞からの心筋ペースメーカー細胞の分化誘導と純化、さらには組織工学等との組み合わせによる移植可能な生物学的ペースメーカーを構築する。同ペースメーカーの移植による新しいペースメーカー再生治療法の開発を行う。

3）心血管分化における機能遺伝子の探索

心血管分化過程における遺伝子発現プロファイル及び誘導性 shRNA 発現システムを用いて、心血管分化における機能遺伝子の網羅的検索を続行する。同定遺伝子の誘導性発現によるレスキュー実験やマウスなど動物モデルにおける検証を行い、新しい心血管分化遺伝子の同定を行う。それにより、新たな心血管再生治療に応用可能なシーズの開拓を行う。

4）ヒト ES 細胞を用いた心血管分化機構解析システムの構築

ヒト ES 細胞においてもマウス ES 細胞と同様の分化過程の解析が可能な分化誘導システム及び遺伝子機能解析システムを構築する。それにより、移植細胞応用が可能な細胞材料及び各種薬剤試験等が可能なモデルヒト心血管細胞の開発、ヒトにおける心血管分化遺伝子探索等を行い、創薬、遺伝子治療なども含めた新たな再生医療の可能性を検討する。

5）動脈内皮細胞分化機構の解析

現在動脈内皮細胞分化に関与する cAMP, Notch シグナルの下流分子を探索している。動脈内皮分化を分子･細胞レベルで再構成することにより、動静脈分化の分子機構を構成的に理解し、虚血性疾患に対する動脈選択的再生など新しいモードの血管再生治療を開拓する。

6）リンパ管内皮誘導物質の探索

現在 OP9 由来リンパ管内皮誘導物質の探索を行っている。リンパ管分化の新しい分子機構を明らかにし、抗リンパ管新生などの新しい抗がん戦略の開発を行う。

研究成果リスト

（1）原著論文

1. Hiraoka-Kanie M, Miyagishi M, Yamashita JK. Differentiation stage-specific analysis of gene function with inducible short hair-pin RNA in differentiating embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 351: 669-674, 2006.
2. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 26: 1977-1984, 2006.
3. Kono T, Kubo H, Shimazu C, Ueda Y, Takahashi M, Yanagi K, Fujita N, Tsuruo T, Wada H, Yamashita JK. Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 26: 2070-2076, 2006.
4. Nakao Y, Yoshida S, Matsunaga S, Shindoh N, Terada Y, Nagai K, Yamashita JK, Ganesan A, Soest van RW, Fusetani N. Azumamides A–E: Histone Deacetylase Inhibitory Cyclic Tetrapeptides from the Marine Sponge Mycale izuensis. **Angew Chem Int Ed**, 45: 7553-7557, 2006.
5. Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, Shimazu C, Yan P, Yanagi K, Nakano A, Inoue E, Kita F, Nishikawa SI. Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a

novel single cell-based cardiomyocyte induction. **FASEB J**, 19: 1534-1536, 2005.

6. Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, Ohmura N, Matsushita A, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 288: H1915-1924, 2005.
7. Huang H, Nakayama Y, Qin K, Yamamoto K, Ando J, Yamashita J, Itoh H, Kanda K, Yaku H, Okamoto Y, Nemoto Y. Differentiation from embryonic stem cells to vascular wall cells under in vitro pulsatile flow loading. **J Artif Organ**, 8: 110-118, 2005.
8. Suzuki Y, Komi Y, Ashino H, Yamashita J, Inoue J, Yoshiki A, Eichmann A, Amanuma H, Kojima S. Retinoic acid controls blood vessel formation by modulating endothelial and mural cell interaction via suppression of TIE2 signaling in vascular progenitor cells. **Blood** 104: 166-169, 2004.

（2）その他の成果

著作物

1. Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. **Trends Cardiovasc Med**, *in press*
2. Yamashita JK. Differentiation and diversification of vascular cells from ES cells. **Int J Hematol** 80: 1-6, 2004.
3. Yamashita J. Cardiovascular cell differentiation from ES cells. In: Mori H, Matsuda H. **Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches.** Chapter 2. p67-p80. Springer-Verlag GmbH, Berlin, New Yolk, Tokyo. 2004.
4. Yamashita J, Nishikawa SI. Embryonic stem cell-derived endothelial cells. In: Augustin H. Springer Lab Manual. **Methods in Endothelial Cell Biology** Chapter 4. p33-p45. Springer-Verlag GmbH, Berlin, New Yolk, Tokyo. 2004.
5. 山下 潤.「ヒトES細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」医学のあゆみ「ヒトES 細胞研究のネクストステージ」220: 175-180, 2007. 医歯薬出版
6. 山下 潤.「ES細胞と血管再生」生体の科学・特集血管壁, 57: 590-592, 2006. 医学書院
7. 山下 潤.「血管内皮細胞分化多様化のメカニズム」実験医学増刊「急速進展する血管研究」宮園浩平、佐藤靖史編, p25-p32, 2006. 羊土社
8. 山下 潤.「血管とリンパ管の発生」癌と血管新生の分子生物学、渋谷正史編, p15-p26, 2006. 南山堂
9. 山下 潤.「ES細胞を用いた血管分化再生研究」脈管学, 46: 265-271, 2006.
10. 山下 潤.「胚性幹細胞からの血管分化と再生」循環器科, 60: 59-65, 2006.
11. 山下 潤.「血管発生のメカニズム」人工臓器・再生医療の最先端、許俊鋭・斎藤明・赤池敏宏 編, p144-p149, 2005. 先端医療技術研究所
12. 山下 潤.「血管の発生と分化メカニズム -血管構成細胞分化多様化の視点から-」実験医学, 23: 2425-2430, 2005. 羊土社
13. 山下 潤.「ES細胞を用いた心血管細胞分化誘導と心血管再生」再生医療, 4: 47-53, 2005. 日本再生医療学会
14. 山下 潤.「血管の発生と分化」治療学, 39: 9-14, 2005. ライフサイエンス出版
15. 山下 潤.「ES細胞に関する研究の進歩」循環器専門医, 13: 10-16, 2005. 日本循環器学会
16. 山下 潤.「血管系の発生とその制御」Molecular Medicine, 42: 618-626, 2005. 中山書店
17. 山下 潤.「ES細胞を用いた血管新生」血管医学, 5: 25-32, 2004. メディカルレビュー社
18. 山下 潤.「血管壁の構造と発生」血管不全フロンティア、野出孝一編, 35p-44p, 2004. メディカルレビュー社

19. 山下　潤. 「nicheにおける未分化性の維持」遺伝子医学MOOK「再生医療へのブレイクスルー」田畑泰彦編, 94p-99p, 2004. メディカルドゥ社
20. 山下　潤. 「ヒトES細胞分化誘導と移植への応用」細胞工学, 23: 1264-1267, 2004. 秀潤社
21. 山下　潤. 「ES細胞を用いた血管再生の今後の展開」わかる実験医学シリーズ「血管研究がわかる」高倉伸幸編, 123p-128p, 2004. 羊土社
22. 山下　潤. 「再生医療と血管分化制御機構」分子血管病, 5: 36-43, 2004. 先端医学社
23. 山下　潤. 「ES細胞を用いた血管形成」メディカル・サイエンス・ダイジェスト, 30: 12-15, 2004. ニューサイエンス社

学会発表

1. Yurugi-Kobayashi T, Shroeder T, Nagasawa T, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK.: Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells. (Invited) 第4回日韓血管生物学シンポジウム (2006/12/13)
2. Yamashita JK.: Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. (Invited) XIVth International Vascular Biology Meeting. (2006/6/8)
3. Yamashita JK: Mechanisms of vascular diversification: An approach from constructive developmental biology using ES cells. (Organizer) 第 39 回日本発生生物学会ワークショップ (2006/5/31)
4. Yamashita JK: Human ES cell research in Japan. (Invited) The 2nd Franco-Japanese Bioethics Workshop. (2005/12/19)
5. Yamashita J.: Signaling for vascular cell differentiation and diversification. (Invited) Signaling for vascular cell differentiation and diversification. (Invited) International Satellite Symposium, 77th Annual Meeting for the Japanese Endocrine Society (2004/6/27)

特許出願
研究期間累積件数：国内4件、外国1件