

1. 研究のねらい

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できると考えられた。

2. 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、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变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⁶⁾。

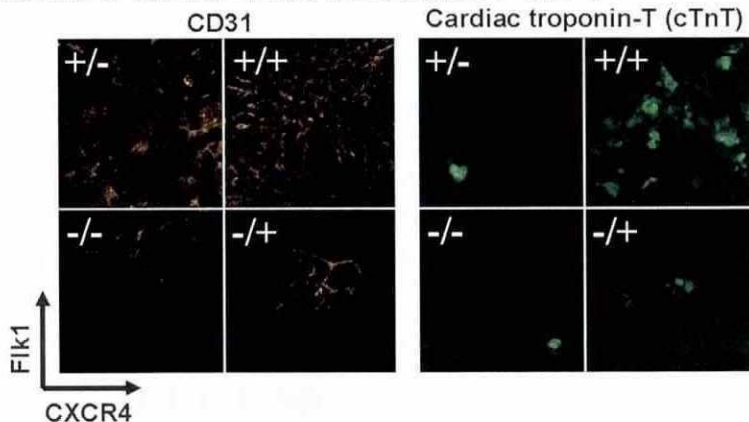


図 1: 心筋前駆細胞分画の同定
Flk1 陽性細胞を OP9 細胞上で培養 2 日後に Flk1 及び CXCR4 発現により 4 分画に分け、OP9 上で再培養すると、CD31 陽性内皮細胞は、Flk1 陽性分画から出現するのに対し、心筋トロポニン陽性細胞は Flk1 陽性/CXCR4 陽性分画に著しく濃縮されて出現する。

2) 動脈・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³⁾。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 angiopoietin1 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⁴⁾。

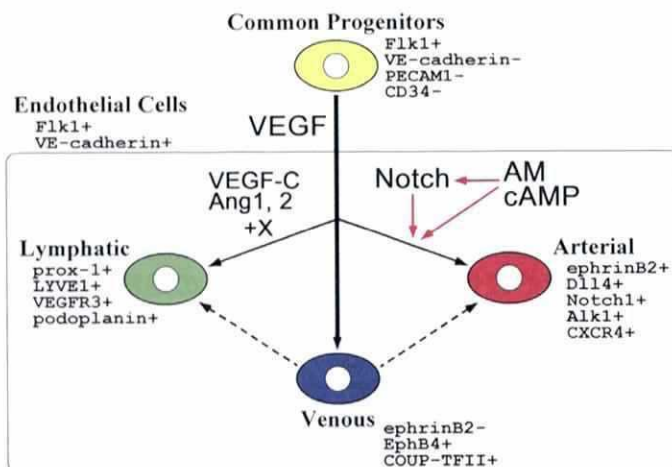


図2: Flk1 陽性細胞からの動脈・静脈・リンパ管内皮細胞分化

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

我々は、ES 細胞の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。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²⁾。

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。

3. 今後の展開

1) 新しい心筋再生治療法の開発

我々は最近、心筋前駆細胞を高効率(従来の約 10 倍)に誘導する方法を見出している。同分化法と誘導心筋前駆細胞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。

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。

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。

これらの研究により、ES 細胞研究をもとにした包括的心血管細胞分化機構の解析を行い、心血管再生を中心とした臨床応用を目指す。

4. 研究成果リスト

原著論文

1. Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, Kubo H, Ikai I. Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate the in vitro maturation of hepatic progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *in press*
2. 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.
3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Hisatsune H, Matsumura K, Ogawa M, Uemura A, Kondo N, Yamashita JK, Katsuda H, Nishikawa S, Chiba T, Nishikawa SI. A high level of endothelial cell–specific gene expression by a combination of 5' flanking region and 5' half of the first intron of VE–cadherin gene. *Blood*, 105: 4657–4663, 2005.
8. 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.
9. 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.
10. Saito T, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Tanaka T, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Tojo K, Tajima N, Hosoya T, Nakao K. Angiotensin II suppresses growth arrest specific homeobox (*Gax*) expression via redox–sensitive mitogen–activated protein kinase (MAPK). *Regul Pept*, 127: 159–167, 2005.
11. Tanaka T, Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Nakao K. Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator–activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration. *Eur J Pharmacol*, 508: 255–265, 2005.
12. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Maruyama T, Arai H, Oida H, Yurugi–Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S. Roles of thromboxane A2 and prostacyclin in development of atherosclerosis in apoE–deficient mice. *J Clin Invest* 114: 784–794, 2004.
13. 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.

総説

14. Watabe T, Yamashita JK, Mishima K, Miyazono K. TGF–beta signaling in embryonic stem cell–derived endothelial cells. *Methods Mol Biol*, 330: 341–51, 2006.
15. Yamashita JK. Differentiation and diversification of vascular cells from ES cells. *Int J Hematol* 80: 1–6, 2004.
16. 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 York, Tokyo. 2004.
17. 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 York, Tokyo. 2004.

(他和文総説 17 件)

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. 第4回日韓血管生物学シンポジウム (invited). 2006.12.13.東京
 2. Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. XIVth International Vascular Biology Meeting (invited). 2006.6.8. Noordwijkerhout, Netherlands.
 3. Yamashita JK. Mechanisms of vascular diversification: An approach from constructive developmental biology using ES cells. 第39回日本発生生物学会ワークショップ”Frontiers in Vascular and Lymphatic Development.” (invited) 2006.5.31. 広島.
 4. Yamashita JK. Human ES cell research in Japan. The 2nd Franco-Japanese Bioethics Workshop. “Approaching bioethical issues in their cultural context” (invited). 2005.12.19. Osaka.
 5. Yamashita J.: Signaling for vascular cell differentiation and diversification. International Satellite Symposium, 77th Annual Meeting for the Japanese Endocrine Society (invited). 2004. 6. 27. Kyoto.
- (他口頭発表 25 件)

特許出願: 国内 4 件、外国 1 件