

サブテーマ名：新規血管構成細胞分化誘導因子を用いた血管再生療法の開発

小テーマ名：血管分化誘導候補遺伝子の機能解析

テーマリーダー：(財)先端医療振興財団、客員研究員、伊藤 裕

研究従事者：(財)先端医療振興財団、客員研究員、山下 潤

(財)先端医療振興財団、特別研究員、岡田 光浩

● 研究の概要

新規血管構成細胞分化誘導因子を用いた血管再生療法の開発

1. フェーズ I

(1) 研究の目標

ES 細胞由来血管前駆細胞からの血管構成細胞分化誘導因子の網羅的探索と移植可能な血管前駆細胞の同定純化：ES 細胞より、FACS セルソーターを用い、血管前駆細胞である Flk-1 陽性細胞をソーティングし、VEGF 等の増殖因子添加により、内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方を分化誘導する。更に、血管前駆細胞と、血管前駆細胞より分化誘導させた、種々の分化段階にある内皮細胞と血管平滑筋細胞の遺伝子発現パターンを、cDNA マイクロアレイを用いて比較する事により、それぞれの細胞の分化誘導に必須な遺伝子を網羅的に探索する。また、田辺製薬(株)を中心に、霊長類 ES 細胞あるいは体細胞(骨髓血等)を用いて、血管前駆細胞の同定を行い、それら細胞の純化と血管構成細胞への分化培養を行った。

(2) 実施内容

ES 細胞による血管再生の臨床応用を目指し、カニクイザル由来 ES 細胞を用いて霊長類における“血管前駆細胞”の検討を行った。サル ES 細胞では、マウスと異なり未分化な状態ですでに Flk-1 を発現していたが、この細胞は血管細胞には分化しなかった。この細胞を、マウス頭蓋冠由来フィーダー細胞と共培養し分化誘導すると、一度 Flk-1 陽性分画が消失したのち、全体の約 8% に Flk-1 陽性細胞が出現し、この細胞群(Flk-1 陽性、VE カドヘリン陰性)はコラーゲン IV 上で VEGF、血清刺激を行なうことで内皮細胞(EC)および血管平滑筋細胞(VSMC)に分化した。したがって、分化誘導後の Flk-1 陽性 VE カドヘリン陰性細胞は霊長類の血管前駆細胞であることが明らかとなった。こうした血管前駆細胞の誘導条件および細胞分離手法確立の成功により、機能細胞分化過程における網羅的遺伝子発現データの取得が可能となり、「ES 細胞を用いた機能細胞分化決定モデル」として、基盤技術開発のための実験(研究)モデルとした。

血管細胞誘導条件に従い、分化する細胞集団を細胞表面マーカーにより染色後、各細胞分画を FACS セルソーターにより細胞分離を行った。分離した各分画由来の RNA を分離精製し、DNA Chip 実験に供した。DNA Chip は、Human Genome U133 series (GeneChip : Affymetrix 社)を用いた。

DNA Chip 用に精製した Total RNA を用いて、逆転写酵素による First strand cDNA、second strand cDNA 合成反応を行った。さらに 2 本鎖 cDNA を鋳型に試験管内 cRNA 合成反応後、cRNA Fragmentation による GeneChip 用サンプル調整を行った。各調整済み核酸サンプルは、ハイブリカクテルとして DNA

Chip カートリッジ内に注入し、プレハイブリダイゼーションに続き、ハイブリダイゼーション (45°C 60 回転/分 16 時間) を行った。ハイブリダイゼーション後 各カートリッジを Fluidics station にセットし、指定の protocol (洗浄、染色) による処理を行い、最後にスキャナーによる DNA Chip 表面の蛍光度測定を行った。

生データは、4 種類の拡張子を持つ File 形式 (Experimental File, Dat File, Cel File, Chip File) に保存され、各サンプルデータをデータベース化し、The eXintegrator system を用いたデータ解析を行った。サル ES 細胞由来血管前駆細胞を用いて、霊長類の血管発生分化に関するマイクロアレイデータの蓄積を予定した。

また、上記の ES 細胞からの血管前駆細胞の分化実験系の検討から、フィーダー細胞には、血管細胞の分化を誘導する、従来から知られている VEGF など以外の因子が発現している可能性が示唆されたので、構築したマウス ES 細胞の血管分化のアレイデータと各種フィーダー細胞での遺伝子発現パターンを対比解析し、新規血管構成細胞分化誘導因子の絞り込みとその解析を行った。

フィーダー細胞うち、OP9 細胞株の遺伝子発現プロファイリングデータ解析から、40 種類の遺伝子情報をピックアップし、マウス胎仔を使って *in vivo* 発現解析 (Whole-mount *in situ*) を行った。解析対象 40 個のうち、機能未知遺伝子を含む、25 種類の遺伝子が発生過程のマウスを使った *in vivo* 実験から、血管形成部位での発現が確認された。

また、そのうち 9 種類の遺伝子は、微小血管だけではなく、心・血管部位にも発現していることが判明した。

実際にマウス胎仔発生時において各候補遺伝子が血管細胞に発現するか、またはどのような発現パターンを示すのかについて検証した結果、mKIAA 遺伝子群を新規候補遺伝子として見出した。

これら以外の幾つかの特徴的な発現パターンを示すデータが得られた。発現部位は必ずしも血管特異的ではないものもあり、同一分子が時空間的にその機能を変化させて成体機能を司っていることが示唆された。

(3) 成 果

- ・サル ES 細胞由来血管前駆細胞の同定
- ・マウス ES 細胞分化誘導系の構築と DNA マイクロアレイ技術の確立
- ・ES 細胞由来血管細胞分化ステージ別遺伝子発現データの取得とデータベース化

2. フェーズ II

(1) 研究の目標

新規血管構成細胞分化誘導因子による血管再生誘導の検証と移植可能な血管前駆細胞の体外大量培養：フェーズ I にて同定した新規血管構成細胞分化誘導因子について、ES 細胞あるいは分化各段階の血管細胞へそれらの遺伝子を導入し、血管分化誘導活性を検証する。その成果に基づき、それら因子を用いた遺伝子治療等の可能性を検討する。

更にフェーズ I にて得られた、移植可能な血管前駆細胞を、血液幹細胞のセルプロセッシングシステム開発チームと連携して、同定した血管構成細胞分化誘導因子を用いて体外での大量分化培養を試みる。

(2) 実施内容

これまでのマウスES細胞およびサルES細胞で蓄積した実験ノウハウを活かして、ES細胞による血管再生医療実現化へのステップアップとしてヒト由来ES細胞における血管構成細胞分化誘導条件の確立と細胞表面分子マーカーを用いた細胞分離を行った。

ヒトES細胞を用いて、血管構成細胞（ECおよびVSMC）の分化誘導を試み、さらにECおよびVSMCへの分化に伴う、細胞表面マーカー発現の変化を検討した。サルES細胞同様、ヒトES細胞においても、未分化な状態においてすでにFlk-1の発現が認められ、さらに、サルとは異なり、フィーダー細胞での分化培養においてもFlk-1の発現は持続していたが、フィーダー細胞での分化培養後、未分化マーカーTRA-1陰性分画が徐々に出現した。この細胞分画は、Flt-1、PDGFR α 、 β 陽性であったが、内皮先駆細胞で陽性であるCD34、VEカドヘリンは陰性であった。この細胞群よりそれぞれVEGFおよびPDGF-BBによりECおよびVSMCを誘導することができた。この細胞群の生体移植は、その生着効率は悪く血管形成は認められなかったが、この細胞群より分化させたFlk-1、CD34、VEカドヘリン陽性の発生初期の内皮細胞は、その分化段階を維持したままパッセージを繰り返しても、2オーダーレベルで増幅でき、さらにこの細胞の生体移植では血管形成に伴う有効な血流増加が認められた。さらに、ヒトES細胞から上記のように分化誘導した発生初期のECおよびVSMCの2種類の細胞の混合移植は、それぞれ、毛細血管密度の増加および血管の安定性ならびにその内径の維持に寄与することにより、より有効な血管再生を実現できることも明らかになった。

また、網羅的遺伝子発現プロファイリングデータベース化と遺伝子解析ツール（The eXintegrator system（データ解析ツール；<http://www.cdb.riken.go.jp/scb/>参照）を用いて、上記ヒトES細胞由来血管細胞遺伝子発現プロファイリングデータの取得と血管細胞分化誘導分子群の検討を行った。

(3) 成果

- ・霊長類ES細胞由来分化誘導系の確立
- ・ヒトES細胞由来血管細胞分化誘導系（試験管内）の確立
- ・ヒトES細胞由来血管細胞分化系譜（試験管内）情報と遺伝子発現情報のデータベース

3. 今後の展望

再生医学の基盤技術として創出したオリジナルデータベースを利用した血管細胞分化関連分子の機能解析とその応用としての新規血管再生療法確立の可能性を検討する。

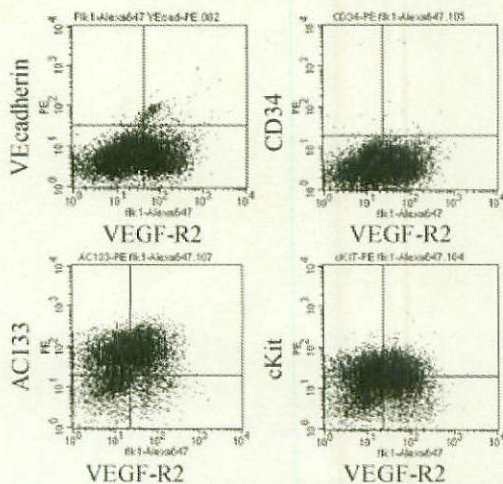


図1. 未分化ES細胞における血球・血管系幹細胞マーカーの発現

ヒトES細胞は、マウスES細胞とは異なり、未分化な状態でVEGF-R2、AC133、cKITの発現が認められる。

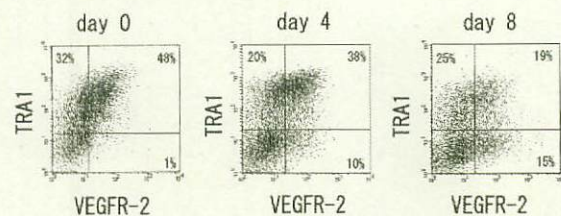


図2. ヒトES細胞からの血管内皮細胞の誘導
ヒトES細胞をOP9上で8日間分化誘導を行うとVEGF-R2+TRA1-の分画が約15%出現し、これらは血管前駆細胞としての働きを有していた。

図3. ヒト ES 細胞由来 VPC の血管系細胞への分化 (免疫組織化学的解析結果)

A-D: Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞の血管内皮細胞への分化

CD34 (A), VEcadherin (B), PECAM1 (C), eNOS (D)

E: Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞の再培養後の PECAM1 と α SMA の発現

F,G: Flk1⁺/TRA1⁻/VEcadherin⁻細胞の壁細胞への分化 α SMA (F), calponin (G).

H: PDGF-BB 刺激によるヒト ES 細胞由来 VPC の壁細胞への分化 (α SMA 発現)

I: VEGF 刺激によるヒト ES 細胞由来 VPC の内皮細胞分化 (PECAM1 と α SMA)

J,K: ヒト ES 細胞由来 VPC の *in vitro* 3次元培養における血管構築の再構成

※ スケールは、すべて 50 μ m を示す

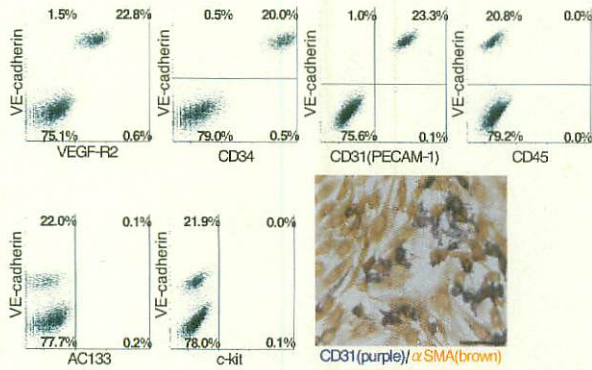
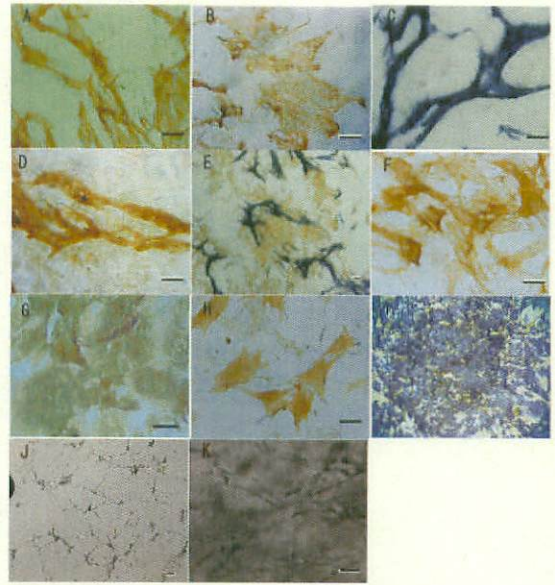


図4. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞より誘導した発生初期内皮細胞 (VPC-EC) の大量増幅培養後の細胞性状の解析

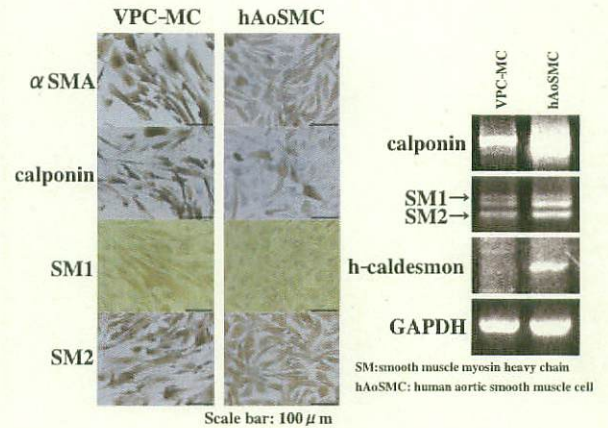


図5. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞より誘導した発生初期壁細胞 (ペリサイト、血管平滑筋細胞) (VPC-MC) の大量増幅培養後の細胞性状の解析

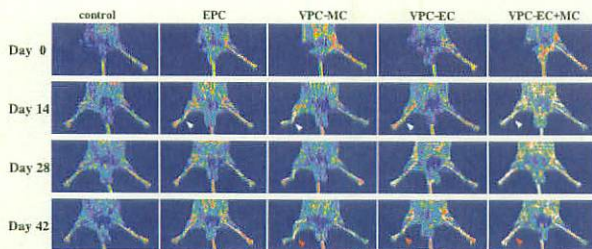
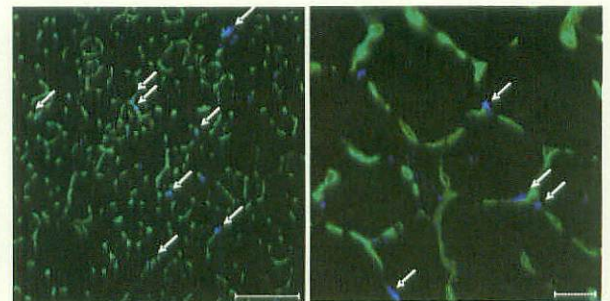


図6. ヒト ES 細胞由来血管細胞 (VPC-EC, VPC-MC) 移植によるマウス下肢虚血モデルにおける血流回復

EPC: ヒト末梢血由来内皮前駆細胞



Scale: 100 μ m Scale: 20 μ m
Blue: human CD31 Green: GSL1 isolectin B₄

図7. マウス下肢虚血モデル細胞移植における VPC-EC の新生血管への取り込み