

研究課題別評価

1 研究課題名:

新規試験管内誘導システムによる分化再生研究

2 研究者氏名:

山下 潤

3 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することができると考えられた。

4 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。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。(原著論文4: Yamashita et al, **FASEB J**, 2005)。

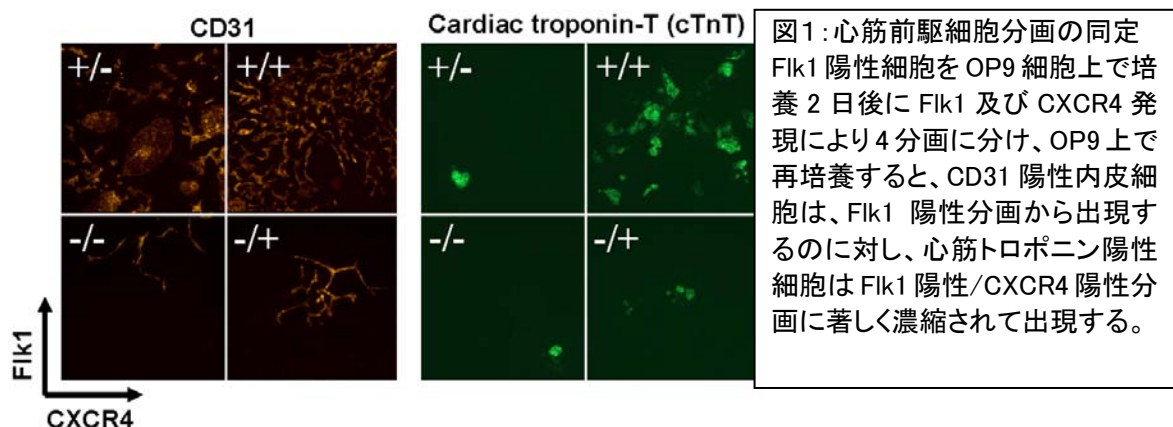


図1: 心筋前駆細胞分画の同定
Flk1 陽性細胞を OP9 細胞上で培養 2 日後に Flk1 及び CXCR4 発現により 4 分画に分け、OP9 上で再培養すると、CD31 陽性内皮細胞は、Flk1 陽性分画から出現するのに対し、心筋トロポニン陽性細胞は Flk1 陽性/CXCR4 陽性分画に著しく濃縮されて出現する。

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。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。(原著論文 2: Yurugi-Kobayashi et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006)。また、Flk1 陽性細胞を OP9 ストロ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。(原著論文 3: Kono et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006)。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。

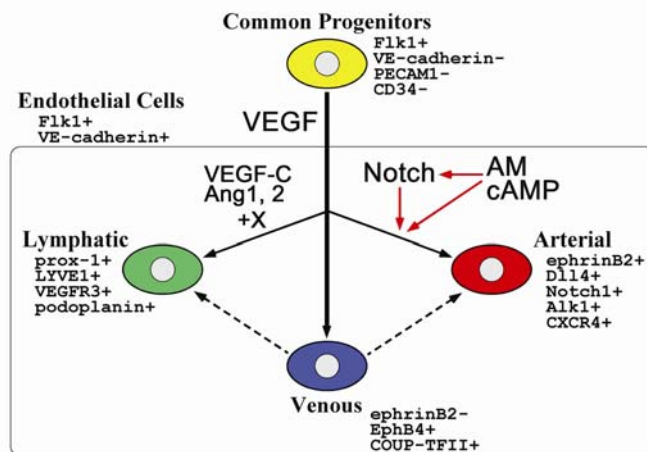


図2: Flk1 陽性細胞からの動静脈リンパ管内皮細胞分化

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 由来未知因子的作用により 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(原著論文 1: Hiraoka-Kanie et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006)。

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。

5 自己評価:

1) 達成できたこと

- 研究開始当初に我々が構築していた ES 細胞の血管分化系を研究期間内にさらに発展させ、1)心筋細胞に関しても同様に 2 次元培養下に単一細胞レベルで分化過程の解析が可能なシステムを構築したこと、および同システムを用いて新たな心筋前駆細胞を同定できたこと(原著論文4)、2)動静脈リンパ管内皮分化機構に関して研究を進め、最終的に 3 種類すべての内皮細胞の分化誘導に成功したこと(原著論文2, 3)。1)に関しては、2006 年になり Embryo 及び ES 細胞由来の Flk1 陽性前駆細胞が内皮・心筋・血管平滑筋細胞に分化するという研究が相次いで報告され(Kattman SJ, *Dev Cell*; Moretti A, *Cell*)、同論文が引用されている。また、2)に関しては、ES 細胞からのリンパ管内皮細胞誘導は、2006 年に我々を含め 3 ヶ所から報告されたが、動脈内皮に関しては他に報告がなく動脈静脈リンパ管の 3 者すべての誘導に成功したのは我々のみである。同研究により、2006 年国際血管生物学会で招請講演を行うとともに *Trends cardiovascular Medicine* 誌に総説を執筆した。このようにこれらの研究は、国際的にも高い評価を受けている。
- 心血管分化遺伝子プロファイル作製: 1) 2)で樹立した心筋及び動静脈リンパ管分化過程を含む心血管分化における遺伝子プロファイルを Affymetrix の Genechip を用いて行い、理化

学研究所開発の解析ソフト eXintegrator (Sakurai, Stem Cells, 2006; Kobayashi, Cancer Res, 2006)を用いて、それぞれの細胞系列特異的遺伝子群を同定した。

- 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:本研究推進の中心的役割を果たす ES 細胞分化過程における遺伝子機能解析システムを構築することに成功した(原著論文1)。
- ヒト ES 細胞からの心血管細胞分化誘導: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得(心筋に関して国内 3 番目)、ヒト ES 細胞に研究を広げるとともに、マウス ES 細胞と類似の方法を用いて心血管細胞の誘導に成功した。
- 特許申請:我々の血管分化システムをもとに国内外合わせ 5 件の特許申請を行った。
- 共同研究関係の拡充:我々のマウス ES 細胞分化システムを用いて、国内6施設より合計 7 報の原著論文が発表されている。(Nakao Y, Angew Chem Int Ed, 2006; Yamamoto K, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005; Huang H, J Artif Organ, 2005; Suzuki K, Blood, 2004; Watabe T, J Cell Biol, 2003; Fujita M, J Am Chem Soc, 2003; Sone M, Circulation, 2003)。

2) 達成できなかったこと

- 心血管分化に関する新規遺伝子の同定:研究当初、ES 細胞における shRNA を用いた遺伝子機能解析システムを早期に構築し、遺伝子発現プロファイルからの候補遺伝子に関する機能解析を行い、心筋分化に関与する新規遺伝子を多数同定する計画であったが、同遺伝子機能解析システムの構築が思いのほか難渋し、最終的に新規の機能遺伝子の同定に至らなかった。現在、原著論文1に報告したシステムを用いて順次機能解析を行い、すでに数個の shRNA 発現において心筋分化抑制効果を認めている。また、新たに Cre-loxP システムを用いた誘導性 shRNA 発現システム及びテトラサイクリン誘導性 cDNA 発現レスキューシステムを構築し、更なる機能解析を行う研究基盤形成を進めている。これら機能解析システムを用いて今後新規機能遺伝子の同定を進める予定である。
- ヒト ES 細胞を用いた心血管分化・機能解析システムの構築:ヒト ES 細胞使用計画の承認のもと、ヒト ES 細胞の心血管分化研究を開始したが、特に心筋細胞に関しては、同使用計画において承認された国内樹立のヒト ES 細胞 khES1, 2, 3 からは効率的な心筋分化が認められず、他の細胞株の検討を必要とした。海外樹立株輸入申請及び新規大学院生、研究員の使用研究への登録にそれぞれ 8 ヶ月から 1 年を要し、その間ほとんど研究が進められなかった。ヒト ES 細胞使用研究承認システムの簡素化が強く望まれる。

以上研究当初の目標であった心血管分化に関与する新規遺伝子の網羅的同定を中心とする心血管分化機構の解析はあまり進展が見られなかったが、分化誘導システムの拡充と遺伝子機能解析システムの構築は達成され、ES 細胞を用いて分化機構を解析するための研究基盤は形成された。今後の研究の継続により、当初の目的が果たされることが期待される。

6 研究総括の見解:

ES 細胞由来 Flk1 陽性中胚葉細胞の種々の条件下での 2 次元培養で、心筋前駆細胞、心筋細胞への分化、また、動脈、静脈、リンパ管 3 種類の内皮細胞への誘導に成功し、これら分化の過程におけるタンパク質因子の動態を明らかにしたことは優れた成果と評価できる。これらの研究成果は、世界をリードし、あるいは互角に戦っている独自性の高いものであり、今後は得られた成果の人類への貢献を意識した再生研究への発展を期待する。

7 主な論文等:

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. 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.

他に論文 9 件(国際)、総説 21 件(国際 4 件、国内 17 件)、口頭発表 25 件(国際 11 件、国内 14 件)

特許出願: 国内4件、外国1件

受賞: なし

招待講演

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 (2006/12/13, 東京)
2. Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. XIVth International Vascular Biology Meeting. (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.” (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. (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 (2004/6/27, Kyoto)