

基礎技術の脈管病治療への応用 - ヒトES細胞

伊藤 裕

要 旨：無限の増殖性とほとんどすべての臓器細胞へ分化し得る全能性を有するES細胞は、再生医療において魅力的なマテリアルである。われわれは、マウスES細胞から血管を構成する内皮細胞と壁細胞（ペリサイトおよび血管平滑筋細胞）の双方に分化する“血管前駆細胞”（vascular progenitor cells: VPC）を同定した。VPCはVEGF受容体の一つであるFlk-1陽性細胞であったが、適切に初期内皮細胞と壁細胞に分化させた後、生体に移植するとホストの循環と吻合を有する血管を形成する。さらにヒトES細胞のVPCの分化動態はマウスとは異なり、ES細胞の臨床応用にはヒトES細胞を用いた研究が必須であると思われる。ヒトES細胞由来VPCは体外で大量増幅可能であり、VPC由来の内皮細胞および壁細胞の移植により、虚血、損傷部での血管再生が可能であり、血流増加治療効果が得られる。一方、ヒトES細胞由来VPCを用いた*in vitro*でのヒト血管発生分化系は、新たな血管再生薬剤の探索にも応用できると考えられる。（J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 125-129）

Key words: ES cells, vascular progenitor cells (VPC), VEGF, PDGF

自らの臓器を自らつくる医学、すなわち、再生医学は、組織の構築破壊を伴った臓器不全に対する新規の根治治療として注目され、現在、発生学の進歩による幹細胞／前駆細胞の発見により、研究が爆発的に進んでいる。しかしながら、体細胞由来前駆細胞は、その純化および性状の正確な把握が困難であり、臨床応用には、AIDSやC型肝炎ウイルスに関する知識のないままに行われた輸血治療の例からも慎重であるべきである。さらに、体内に存在する前駆細胞の数はきわめて少なく、移植治療に耐え得る十分な細胞数の確保も困難である。われわれは、血管再生医療に用いる前駆細胞として胚性幹細胞（embryonic stem cell: ES細胞）に注目している。ES細胞は受精卵の発生過程におけるblastocystと呼ばれる時期に、将来、胎児になるinner cell massより取り出した細胞であり、無限の増殖能と、われわれの体を構成する250種類以上の臓器細胞に分化し得る全能性を有している。ES細胞は、EvansとKaufmanが1974年に奇形癌から多分化能を有する細胞を分離し、その後1981年にマウス胚から同様の性格を有する細胞を樹立したことに端を発し、すでに20年以上が経

過している。われわれは、2000年に、マウスのES細胞から血管を構成する内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方に分化し得る前駆細胞 - われわれが血管前駆細胞（vascular progenitor cells: VPC）と命名した細胞を同定純化した。VPCは、血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF）の受容体の一つである、Flk-1陽性細胞であった。すなわち、コラーゲンIV上で、VEGF、および血小板由来成長因子（platelet derived growth factor: PDGF）存在下で培養を行うと、それぞれ内皮細胞、壁細胞（ペリサイト、血管平滑筋細胞）がおもに分化し、コラーゲンゲル内三次元培養により、内皮細胞のチューブ構造と、壁細胞の裏打ちを有する毛細血管構造を作ることができる（Fig. 1）。またVEGF産生の豊富なラット神経膠腫細胞を皮下に移植し腫瘍血管新生を促すモデルにおいて、VPCより初期内皮細胞および壁細胞に分化させた細胞を皮下に移植することにより、生体において血管を形成させることができ、移植局所の血流が増加する（Fig. 2）。現在までに、マウスES細胞を生体に移植し、組織を構築し得た実験例はわれわれの血管以外には、脾臓のランゲルハンス島しかない。

京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

2005年3月7日受理

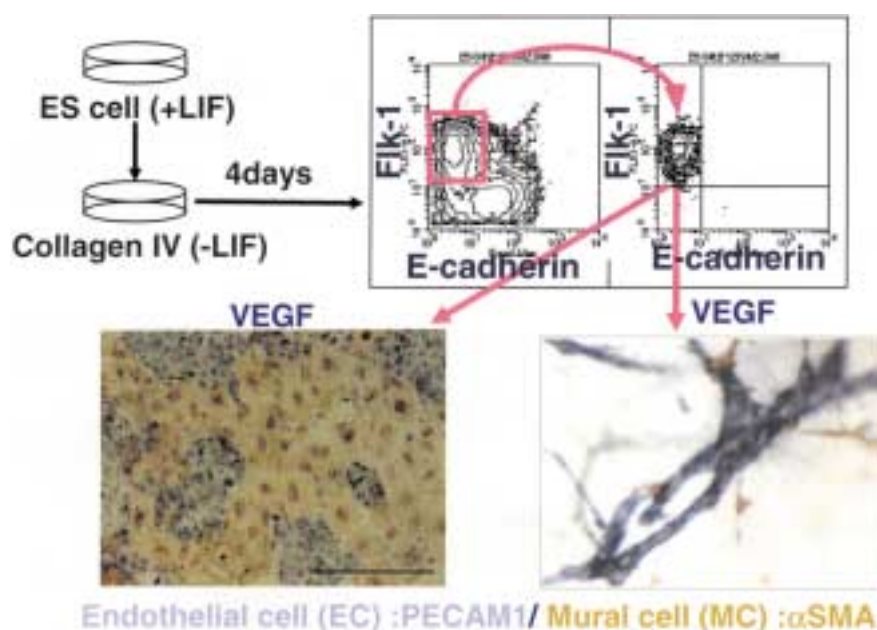


Figure 1 Induction of Flk-1-positive cells from mouse ES cells and *in vitro* differentiation into vascular cells and their organization into blood vessels.

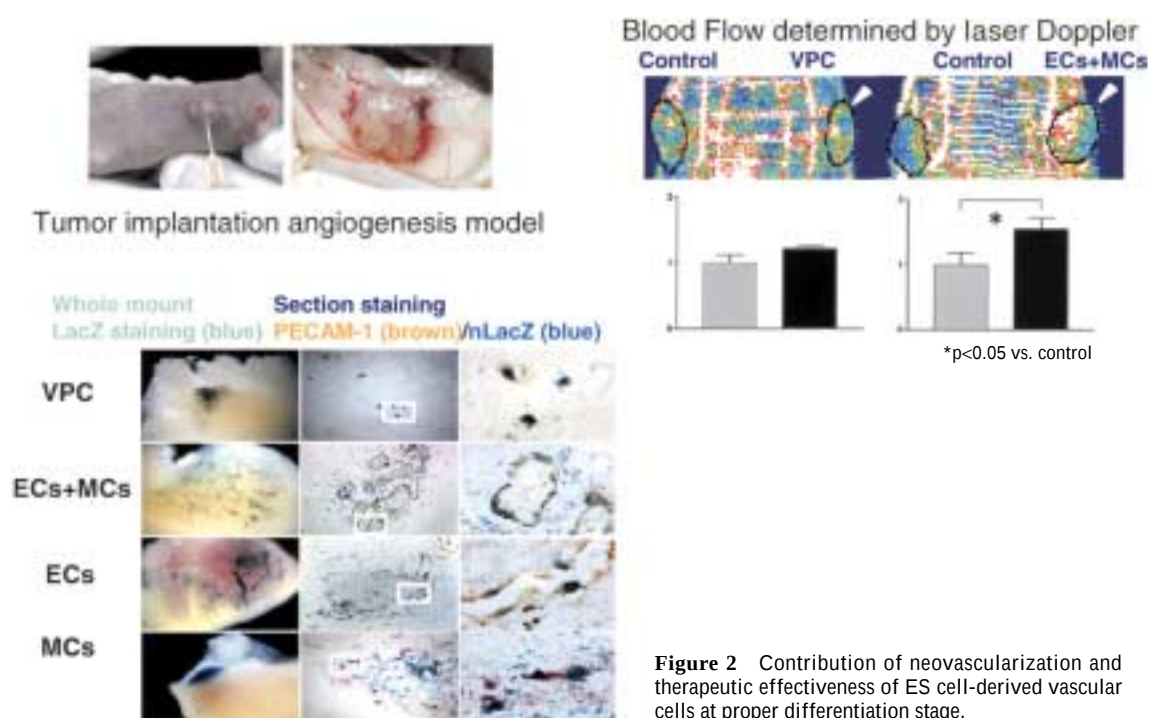


Figure 2 Contribution of neovascularization and therapeutic effectiveness of ES cell-derived vascular cells at proper differentiation stage.

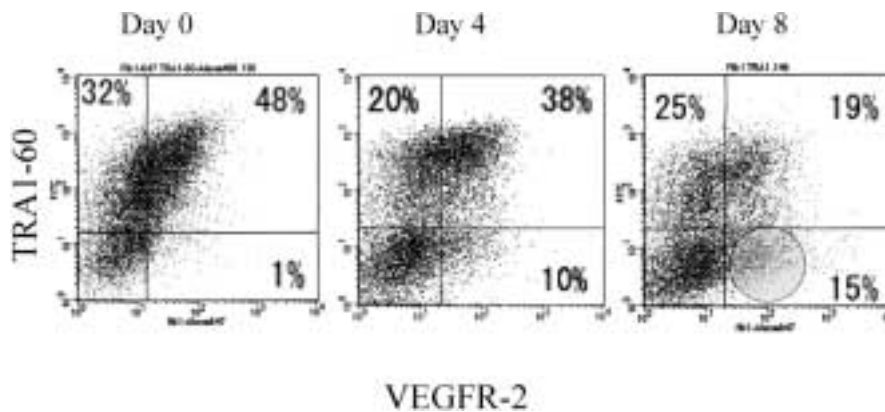


Figure 3 Time course of VEGFR-2 and TRA-1 expressions of human ES cells during differentiation.

われわれは、さらにES細胞の医療応用をめざして、霊長類であるカニクイザルES細胞を用いて、VPCの性状を検討したところ、サルES細胞では、マウスと異なり、未分化な段階ですでにその半数の細胞がFlk-1陽性であった。この未分化Flk-1陽性細胞からは血管構成細胞は分化しなかった。そこで、このサルES細胞を、マウス頭蓋冠線維芽細胞であるフィーダー細胞のOP9と共培養したところ、Flk-1発現はいったん消滅し、再び出現した。このFlk-1陽性細胞は未分化マーカーのアルカリフォスファターゼ陰性であり、この細胞群を単離し、VEGF存在下に培養したところ、PECAM-1、VEカドヘリン、eNOS陽性の内皮細胞および α 平滑筋アクチン(α SMA)、カルボニン陽性の血管平滑筋細胞の双方が分化誘導でき、サルVPCと考えられた。このように、マウスVPCと霊長類VPCはその分化動態が異なることが示された。したがって、ES細胞の再生医療への応用には、ぜひとも霊長類由来ES細胞を用いた研究が必須であることが明らかとなった。

日本では、2001年にヒトES細胞の樹立およびその使用に関するガイドラインが策定された。これを受け、われわれは、海外で樹立されたヒトES細胞の使用計画を京都大学医学部の倫理委員会に申請し、2002年の4月に文部科学省から正式許可を得て、7月からヒトES細胞を用いた研究を京都大学で開始した。さらに、2004年になり、京都大学再生医科学研究所にて国内初のヒトES細胞が樹立された。われわれはこのヒトES細胞の研究許可も得ることができ、現在、米国のウイスコンシン大学の樹立株も含め、3種類の異なった施設で樹立されたヒトES細胞を用いた研究を行っている。

酵素法を用いたヒトES細胞の未分化培養系を確立し、複数のヒトES細胞を用いてその分化動態について慎重に検討を行っている。

未分化ヒトES細胞は、フィーダー細胞MEF(mouse embryonic fibroblast)の中で、比較的コンパクトなコロニーを形成し、アルカリフォスファターゼ、SSEA-4、TRA-1陽性を示したが、サル同様に多くの細胞がFlk-1陽性であった。そこで、OP-9との共培養による分化誘導法を用いて、その分化動態を検討したところ、共培養開始8日から、TRA-1陰性、Flk-1陽性の細胞群が出現した(Fig.3)。この細胞は、Flk-1+/TRA-1-/VEカドヘリン-/PDGF受容体+であり、VEGFおよびPDGF-BB存在下でそれぞれ、内皮細胞(PECAM-1、VEカドヘリン、CD34、内皮型一酸化窒素合成酵素陽性)および血管平滑筋細胞(α SMA、カルボニン陽性)の双方に分化し、したがって、この細胞群がヒトVPCであると考えられた。

さらに、われわれは、この同定したヒトES細胞由来VPCの体外大量増幅および生体への移植による血管再生が可能であるかを検討した。ヌードマウスの皮膚にパンチ生検針にて、潰瘍を形成し、その治癒過程に対するヒトES細胞移植の治療効果を検討した。ヒトES細胞由来VPCそのものの皮下移植においては、移植群と対照群間に潰瘍治癒において差を認めなかった。しかしながら、ヒトVPCより分化させた発生初期内皮細胞(Flk-1+/TRA-1-/VEカドヘリン+)は、継代可能であり、6継代により100倍に細胞数は増幅された。しかもその30%の細胞は、もとの発生初期の内皮細胞の性質(CD34+/PECAM-1+/VEカドヘリン+)を維持していた。

一方、残りの70%の細胞は α SMA、カルボニン陽性の血管平滑筋細胞に分化していた。このヒトVPCより得られた発生初期の内皮細胞および血管平滑筋細胞を上記の潰瘍モデルに混合移植したところ、有意に潰瘍の治癒の促進が認められた(潰瘍面積の有意な縮小と肉芽部分の減少)。組織学的検討により、移植したヒトES細胞由来血管構成細胞は、それぞれ潰瘍部の新生血管に取り込まれ、再生血管の形成に寄与していることが確認された。以上より、ヒトES細胞由来VPCより適切な分化段階まで分化誘導した血管構成細胞移植による血管再生医療の可能性が示唆された。

ES細胞の移植治療への応用には、腫瘍形成の問題が大きい。われわれのこれまでの移植実験の経験からは、未分化な細胞の移植(たとえばVPCそのもの)では、移植細胞が生体において適切に分化し目的とする臓器を構築することは困難であり、さらに奇形腫形成の危険性が確かに存在する。しかしながら*ex vivo*である程度、目的細胞へ分化させた後、移植することで臓器再生が可能であり、かつ腫瘍形成の可能性は低くなると思われる。

われわれは、さらに、虚血性疾患に対するヒトES細胞由来VPCの移植治療応用を検討した。6~10週齢、雄のKSNヌードあるいは129SVマウスを用い、右大腿静脈結紮後1匹当たり 1×10^6 個のVPC由来細胞を動脈内投与し、その後、右大腿動静脈を切除した。VPC由来細胞は、上述したヒトVPCより分化させた発生初期内皮細胞(FIk-1+/TRA-1-/VEカドヘリン+)を増幅し得られた発生初期内皮細胞および血管平滑筋細胞の混合細胞群である。対照群として、ヒト末梢血から採取した内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells: EPC)を用いた。EPCは、ヒト単核球分画で接着培養し得た細胞群であり、PECAM-1陽性、アセチルLDL取り込みを認めた。結紮後42日まで継続的に、下肢の血流をレーザードップラーにて計測し、適時屠殺し、虚血側下肢筋のwhole mountでのLacZ染色を行った後、凍結切片を作成し、PECAM-1および α SMAによる免疫染色を行った。その結果、VPC由来細胞移植群では移植後28日において生食コントロール群およびEPC移植群に比べ有意な血流の増加を認め、42日、さらに血流は増加した。EPC移植群は生食投与群に比べ軽度の血流上昇を認めたがその効果は一過性であった。移植ヒトES細胞の再生血管形成への寄与を免疫組織学的に検討した。すな

わち、経門脈的に血管内皮に特異的に結合するレクチンを投与し、血流のある血管内皮を標識した後の虚血側下肢筋を蛍光顕微鏡により検討した。その結果、ヒト特異的PECAM-1、レクチン両者陽性部位を多数認め、移植された細胞が血管内皮細胞として再生血管のネットワーク構築に寄与していることが明らかとなった。また、蛍光色素DiIにてヒトES細胞由来細胞を標識し、 α SMAと二重染色したところ、DiI、 α SMA両者陽性部位を血管に認め、移植された細胞が内皮細胞のみならず血管平滑筋細胞としても再生血管の形成に寄与していることが示された。

ES細胞の再生医学への応用が脚光を浴びるようになったのは、1998年にヒトES細胞が樹立されたことによる。この年、初めて、人工授精の際の余剰卵を使ってES細胞が、さらに、墮胎胎児を使ってES細胞と同様の性質を有する胚性生殖細胞(embryonic germ cell: EG細胞)が作られた。EG細胞は、始原生殖細胞(primordial germ cell: PG細胞)を白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor: LIF)、線維芽細胞成長因子(fibroblast growth factor: FGF)-2、幹細胞増殖因子(stem cell factor: SCF)で培養することで、ES細胞に似た性質を有する細胞としてとられたものである。ヒトES細胞の臨床応用には免疫的拒絶反応が問題となるが、この問題の解決として、自己の体細胞から核を取り出し、これを別の個体の未受精卵から除核し、その中に核移植することにより、自己の遺伝子情報をもつES細胞、つまり“マイES細胞”を作ること技術的に可能となってきた。この手法がクローン技術であるが、2004年、韓国のグループにより、体性細胞核移植(somatic cell nuclear transfer: SCNT)でのヒトES細胞の作成の報告がなされた。ただし、現在この方法の成功率は数%であり、患者個人についてのテーラーメイド医療型のES細胞作りはかなり困難であると思われる。しかしながら、今後、いくつかのブレイクスルー研究が行われるなかで、ヒトES細胞の臨床応用は近い将来可能である。また、短期的には、免疫原性の比較的低いヒトES細胞が樹立されれば、免疫抑制剤を投与した形での臨床応用も考えられる。

ヒトES細胞の別の方向での臨床応用としては、*in vitro*でのヒト血管細胞の発生分化系を確立し、このシステムを使って、新規の血管再生遺伝子、あるいは血管再生薬剤の探索を実施することが挙げられる。われわれは、神戸市の先端医療センターとの共同研究で、

マウスES細胞由来VPCを用い、さまざまな程度に血管細胞に分化させた血管細胞よりmRNAを採取し、これをプローブとして遺伝子チップでのマイクロアレイ解析を行い、さらにその遺伝子発現パターンを独自に開発したソフトウェアを用いて血管発生分化にかかわると思われる遺伝子を抽出できるシステムを開発した。

このシステムを用いて、最近われわれは血管作動ペプチドであるアドレノメデュリン(adrenomedullin: AM)がES細胞からの内皮細胞の分化の強力な誘導因子であることを明らかにした。AMは褐色細胞腫から単離された52個のアミノ酸からなるペプチドであり、細胞内のcAMP濃度の上昇、Aキナーゼの活性化、また、PI3キナーゼ/Aktを活性化することで、強力な降圧作用、ナトリウム利尿作用など、循環動態制御にかかわる多彩な生理作用を発揮する。現在、すでに心不全患者、肺高血圧症患者に臨床応用され、治療的効果を有することも報告されている。われわれは、培養内皮細胞を用いて、AMが損傷内皮細胞の再生を、cAMP/AキナーゼおよびPI3キナーゼ/Aktを活性化し促進すること、さらに*in vivo*ゲルプラグアッセイを用いて、血管再生を促進することを明らかにした。AMのホモノックアウトマウスでは血管形成不全により胎生致死になることも報告されている。そこで、われわれのマウスES細胞由来VPCを用いた血管発生分化系によるデータベース

において、AMおよびその受容体複合体のひとつであるRAMP2の発現を検討したところ、ともに内皮細胞および血管平滑筋細胞の分化に伴いその発現が増加していた。とくにRAMP2の内皮細胞での発現の増加が著明であった。そこで、これらの知見をもとに、AMおよびその細胞内セカンドメッセンジャーであるcAMPのVPC分化における作用を検討したところ、ともにVEGFによるVPCから内皮細胞への分化を著明に促進し、AMが内皮細胞の分化誘導因子であることが明らかとなった。幹細胞/前駆細胞の移植による再生医療においては、移植細胞の体外大量増幅が必須であり、われわれの結果より、AMがES細胞由来VPCのセルプロセッシングにおいて有用な薬剤になり得ることが示唆された。

以上、ES細胞による血管再生医療へのトランスレーショナルアプローチは、ヒトES細胞を用いた血管前駆細胞が必須であり、いわゆる*in silico*のバイオインフォマテックスの遺伝子情報、移植細胞の*in vitro*での分化大量調整方法の確立、さらに、*in vivo*での高効率の移植法の開発が必要であり、その成果が生活習慣病血管合併症に生かされれば、虚血性心疾患、脳卒中の制圧、さらに寝たきりや痴呆などの解消による患者QOLの改善、また、膨張を続ける医療経済の改善につながると考えられる。

Application of Human ES Cells to Vascular Medicine

Hiroshi Itoh

Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

Key words: ES cells, vascular progenitor cells (VPC), VEGF, PDGF

The fact that ES (embryonic stem) cells possess the properties of self-renewal and pluripotency attracts many investigators' attention as a promising stem cell source for regenerative medicine. From mouse ES cells, we identified "vascular progenitor cells (VPC)", which can differentiate into both endothelial and mural cells (pericytes and vascular smooth muscle cells) to form blood vessel structure *in vitro*. VPC is Flk-1, one of VEGF receptors, -positive cells. The differentiation kinetics of VPC of monkey ES cells is different from that of mouse ES cells, suggesting the significance of researching applications of human ES cells to regenerative medicine. We initiated the first study using human ES cells in Japan, and recently have identified human VPC, which is TRA1- Flk1+ VEGFR2+ PDGFR+ cells. Human VPC, when transplanted subcutaneously or intra-arterially, are incorporated into neovessels and improve local blood flow. The results indicate that human ES cell-derived VPC hold the potential for vascular regeneration. *In vitro* human vascular cell differentiation system using VPC, combined with a microarray technique, is also useful for vascular development and regeneration in searching for novel genes and pharmaceuticals. (J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 125-129)