

## ES細胞を用いた血管分化再生研究

山下 潤

**要 旨：**胚性幹細胞 (ES細胞) は、再生医療への応用のみならず分化の基礎研究においても、不可欠な重要な役割を有する。筆者らは血管構成細胞 (内皮細胞および壁細胞) の分化および血管構造の形成過程を再現できる新しいES細胞分化系を開発した。この分化系を用いることにより、これまでになかった包括的な血管発生機構の解析が可能となるとともに、血管再生治療への応用が期待される。血管の分化再生研究におけるES細胞の意義を考察する。

( J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 265-271 )

Key words: embryonic stem cells, vascular regeneration, artery, vein, lymphatic vessels

### はじめに

この数年、急速な隆盛をみせる再生医学は、神経、心筋など成体内では増えることができないとされてきた細胞をはじめ、皮膚、骨、軟骨、角膜、網膜、膵β細胞、肝細胞などから、さらには腎臓や肺など非常に複雑な高次構造をとる臓器も含めて、ありとあらゆる臓器、組織をターゲットに研究が進められるようになってきた。ES細胞 (胚性幹細胞: embryonic stem cells) は、初期胚 (胚盤塊) に存在する未分化幹細胞である内細胞塊を培養して樹立された細胞株であり、体中の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。未分化性と分化能を維持したまま無尽蔵に増殖することができるES細胞は、再生医療への応用ということがその大きな使命であり研究ターゲットとされているが、日本ではまだヒトES細胞の臨床応用は認められていない。世界的にもES細胞由来細胞をヒトに用いた治療の報告はない。また、最近の体性幹細胞 (成体内に存在する幹細胞) 研究は、細胞移植に至るハードルが倫理面、安全面等でES細胞よりも低いと、再生医療応用において注目されている。にもかかわらず、ヒトを含めたES細胞研究は国内および世界的広がりをみせている。実際、“human embry-

京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター  
幹細胞分化制御研究領域

onic stem cells”にヒットする文献数は、1998年のヒトES細胞樹立の報告から年々ほぼ倍増し、2004年は100数十、2005年は約200であり (somatic 体性 またはadult 成体 幹細胞もほぼ同数)、ES細胞研究の持つポテンシャルの高さを示している。本稿では、ES細胞研究、特に血管分野の現況と問題点、将来における可能性等について概説する。

### ES細胞研究

ES細胞研究は、再生医療応用を中心とした臨床面と分化再生に関する基礎研究の両面を併せ持つ。基礎研究としては、細胞分化機構の分子生物学的および細胞生物学的解析、すなわち細胞の分化過程を培養下で再現し、そのメカニズムを分子レベル、細胞レベル、およびエピジェネティクスを含めた遺伝子レベルで明らかにすること、および、細胞の未分化性維持機構や分化した細胞が再び多分化能を獲得する「初期化」機構の解析、が大きな柱となると考えられる。その他にも細胞融合や核移植などに関連したさまざまな生命現象の解析が可能と考えられ、生命科学の基礎研究において大きな意義を有する。一方、臨床面としては当然のことながら、誘導細胞を用いた再生医療応用、が期待される。これには、造血幹細胞移植のようなある種の幹細胞、血管再生治療にみられるような前駆細胞群、パー

2006年6月2日受理

キンソン病治療におけるドーパミン産生細胞など分化成熟した細胞等、さまざまなレベルの細胞が細胞治療の材料として考えられる。また最近では比較的未分化な細胞を胎生期に移植することによる先天性疾患の治療の可能性なども生まれている。その他、細胞分化機構に関する基礎研究をもとにした新たな遺伝子治療、創薬、細胞初期化による新たな治療用細胞ソースの開拓、薬品の効果や毒性等のスクリーニングへの応用など、ES細胞の直接的な移植への応用以外にもES細胞研究の臨床面に果たせる貢献は非常に大きい。

### ES細胞分化研究

マウスES細胞は1981年に樹立され、85年にはDoetschmanらにより心筋細胞等が分化することが報告されている。しかしこれまで、マウスES細胞の生命科学における最大の貢献はノックアウトマウスの作製を可能にしたことであり、分化再生研究への応用が盛んになったのは、1990年代後半になってからである。

1998年末、マウスから17年の時間を経て、ヒトES細胞樹立の報告がなされた<sup>1)</sup>。これは、その前年の成体体細胞由来クローン羊ドリーの報告と合わせ、クローン人間や遺伝子改変人間の作製が技術的には可能であることを示唆し、大きな衝撃を与えたが、それは同時に、これまで困難であったヒトの発生や細胞分化の研究や、細胞や臓器そのものを作り出す新しい再生医療の可能性を開くという大きな意義を有している。現在、ヒトES細胞分化研究は、イスラエルをはじめ、アメリカ、オーストラリア、カナダ、韓国、ロシア、イランなどからの報告がある。日本においては、2006年3月31日現在、2002年4月の京都大学をはじめとして、計35件の使用計画がすでに文部科学省の承認を得ている ([http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/main.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/main.htm)) が、日本からのヒトES細胞分化研究の論文はいまだ発表されていない。(追記: 2006年6月、理化学研究所よりヒトES細胞からの神経分化の報告\*がなされた。)

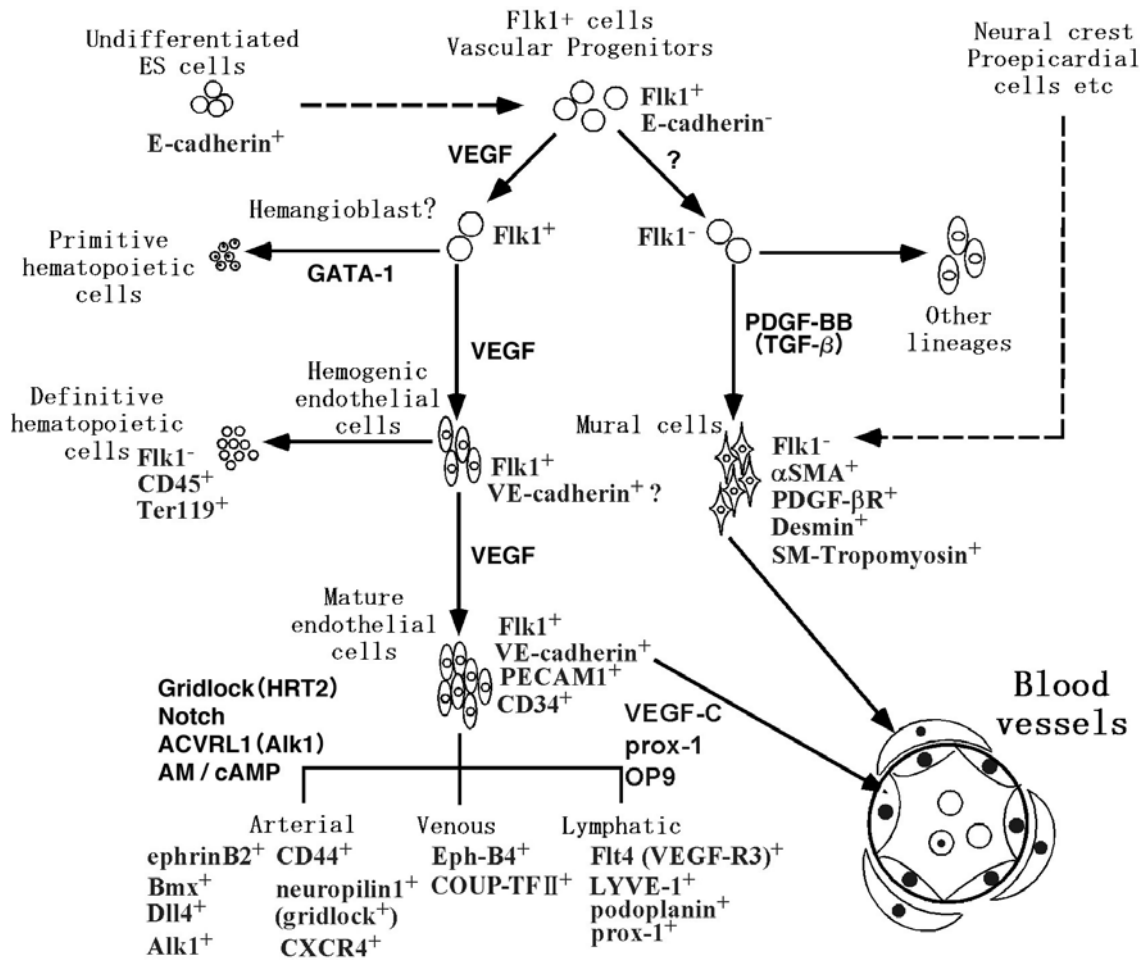
### ES細胞からの血管細胞の分化と再生

#### (1) 血管細胞の分化多様化

血管の内腔を1層に覆い血管腔を形成している血管内皮細胞と、血管内皮による管腔を外側から取り巻き、収縮弛緩や血管構造の維持に寄与している血管壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)の2種類の細

胞は血管を構成する主要な細胞である。これら血管構成細胞は、胚様体を用いて分化誘導できることが以前より報告されている。未分化ES細胞は、フィーダー細胞やLIF(leukemia inhibitory factor)などの非存在下で浮遊培養することにより、ES細胞が寄り集まった球形の胚様体(embryoid body)と呼ばれる構造を形成する。胚様体内では、さまざまな細胞間の相互作用が文字通り擬似胎仔のように働き、さまざまな細胞が分化誘導されてくる。胚様体法を用いてES細胞を分化誘導することにより、血管前駆細胞および中胚葉のマーカであるFlk1[2型VEGF(vascular endothelial growth factor: 血管内皮増殖因子)受容体]陽性の細胞、さらには内皮細胞のマーカであるCD31、Tie2、VE(vascular endothelial)-カドヘリン陽性細胞が順次出現し、内皮細胞の段階的分化と網状に張り巡らされた原始的な血管構造の形成が起こることが観察されている<sup>2)</sup>。また、レチノイン酸とdibutyl-cyclic AMPを添加することにより、胚様体中に血管平滑筋細胞が誘導されることも報告されている<sup>3)</sup>。筆者らは、胚様体を用いない新しいES細胞分化誘導法により、ES細胞由来Flk1陽性細胞が血管細胞の共通の前駆細胞であり、Flk1陽性細胞から内皮細胞および壁細胞の双方が選択的に分化するとともに、毛細血管様の高次構造を培養下に形成できることを示した<sup>4)</sup>。Flk1陽性の血管前駆細胞は、VEGFの刺激により内皮細胞に、おもにPDGF(platelet-derived growth factor: 血小板由来増殖因子)-BBにより壁細胞に分化すると考えられる(Fig. 1)。また、血流による物理的刺激であるshearストレスや拍動性進展刺激がFlk1陽性細胞からの内皮細胞分化や壁細胞分化を誘導することも明らかにしている<sup>5,6)</sup>。

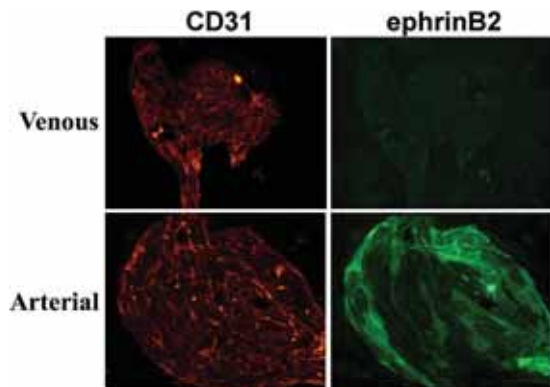
最近、動脈、静脈、リンパ管それぞれの内皮細胞に特異的に発現している分子が数々報告され、内皮細胞の多様性に分子の根拠が与えられるようになってきた<sup>7)</sup>。それにより、生体内の位置情報がない培養細胞においても、動静脈リンパ管分化が解析できるようになった。ES細胞を用いては、3型VEGF受容体の過剰発現によるリンパ管内皮様細胞の誘導の報告<sup>8)</sup>や胚様体内にリンパ管内皮が誘導されたという報告がなされたが、その他動静脈リンパ管内皮細胞の分化誘導や単離、分化メカニズムに関する報告はない。筆者らは最近、Flk1陽性細胞からの血管分化系を用い、ephrinB2陽性(動脈)内皮、ephrinB2陰性(静脈)内皮、およびprox-1陽性



**Figure 1** Differentiation of vascular cells from Flk1<sup>+</sup> vascular progenitor cells. Flk1<sup>+</sup> cells are common progenitor cells for vascular cells and hematopoietic cells. GATA-1<sup>+</sup> cells can give rise to primitive erythrocytes (and others). Flk1<sup>+</sup> cells differentiate and are matured to endothelial cells by VEGF. VE-cadherin/Flk1 promoter-driven GFP<sup>+</sup> cells are hemogenic endothelial cells. Endothelial cells are simultaneously diversified into specified endothelial cells, arterial, venous, and lymphatic endothelial cells. Flk1<sup>+</sup> cells give rise to endothelial cells and mural cells. In the absence of VEGF, Flk1<sup>+</sup> cells lose Flk1 expression and differentiate into mural cells mainly by PDGF-B signaling. Induced vascular cells can form vascular structures both *in vitro* and *in vivo*.

(リンパ管)内皮細胞と考えられる細胞の誘導と純化にそれぞれ成功した<sup>9, 10</sup>)。すなわち, Flk1陽性細胞を VEGFおよび血清存在下に内皮細胞に誘導するとほとんど(90~95%以上)の内皮細胞が ephrinB2陰性の静脈内皮細胞となる。VEGFに加えて, cAMPアナログである 8 bromo-cAMP または細胞内 cAMP を上昇させる液性因子の1つであるアドレノメデュリン(AM)を加え cAMP 経路を活性化することにより, 内皮細胞において Notch シグナルの活性化が誘導され, ephrinB2陽性の動脈内皮細胞が誘導されることを明らかにした( Fig. 2 )<sup>9</sup>)。ま

た一方, Flk1陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養して内皮細胞を誘導したところ, prox-1陽性リンパ管内皮細胞が出現した。この OP9 によるリンパ管誘導作用は, VEGF-C および angiopoietin の作用をブロックすることによりほぼ完全に阻害された<sup>10</sup>)。これらの結果により, ES細胞を用いて, 動脈, 静脈, リンパ管内皮細胞のすべてを系統的に分化誘導することが可能になるとともに, その新たな分化メカニズムが明らかになった。現在, それぞれの分化誘導因子や分化機構のさらなる検討を行っている(投稿中)。

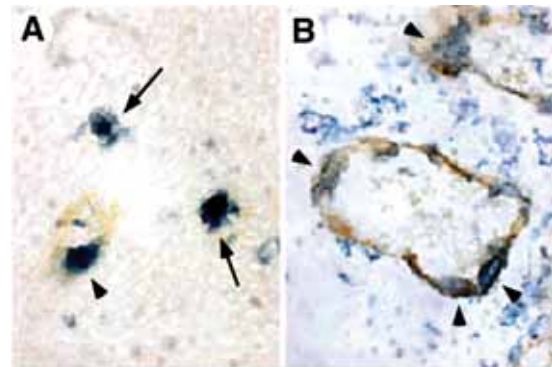


**Figure 2** Arterial and venous endothelial cell differentiation from ES cells. When ES cell-derived Flk1<sup>+</sup> cells are cultured in arterial conditions (VEGF and 8 bromo-cAMP), substantial induction of ephrinB2<sup>+</sup> arterial endothelial cells is observed. In venous conditions (VEGF alone), most of endothelial cells (> 90%) become ephrinB2<sup>-</sup> venous endothelial cells.

このようにES細胞を用いて構成的系統的に血管細胞を分化誘導する新たなアプローチは、ノックアウトマウスなどでは困難であった血管の分化・多様化メカニズムの細胞レベル分子レベルでの解析を可能にする新たな手法と考えられる<sup>5)</sup>。また、動脈や静脈特異的血管新生やリンパ管特異的血管新生抑制による抗がん治療など、新たな治療戦略の開発につながることも期待される。

## (2) ES細胞による血管再生

筆者らはES細胞由来Flk1陽性細胞が生体内においても血管細胞に分化し、血管再生に寄与しうるかを検討するため、純化Flk1陽性細胞のニワトリ胎仔への移植実験を行った。心腔内注入により経管的に移植されたFlk1陽性細胞は、内皮細胞および壁細胞に分化するとともにニワトリ胎仔発生にともなって形成された新生血管に寄与した<sup>4)</sup>。筆者らはさらに、ES細胞由来細胞の血管再生治療応用における可能性を検討するため、ES細胞由来血管細胞の成体に対する移植効果を検討した<sup>11)</sup>。すなわち、ES細胞由来血管細胞をヌードマウスに移植した腫瘍周囲に注入し、移植細胞の新生血管への寄与を検討したところ、ES細胞由来Flk1陽性細胞は、内皮細胞および壁細胞として新生血管へ寄与し



**Figure 3** Differentiation stage-specific contribution of ES cell-derived vascular cells to *in vivo* angiogenesis. Transplantation of ES cell-derived vascular cells in different differentiation stages to pre-implanted C6 rat glioma cells in nude mice. Double staining for LacZ (ES cell-derived cells) and CD31 (brown), 5 days after the vascular cell transplantation. A: Transplantation of Flk1<sup>+</sup> cells. Both LacZ<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> cells (arrowhead) and LacZ<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> cells (arrows) are observed. B: Transplantation of early endothelial cells induced by 3-day culture of Flk1<sup>+</sup> cells. Almost all LacZ<sup>+</sup> cells contribute to blood vessels as CD31<sup>+</sup> endothelial cells do (arrowheads). Modified from reference 11.

た。次に、成体への移植に適切な細胞の分化段階を検討するため、分化段階の異なる血管細胞、すなわち、ソート直後のFlk1陽性血管前駆細胞と、Flk1陽性細胞をさらに3日間培養して初期内皮細胞に分化した細胞(VE-カドヘリン陽性)の移植を比較した。Flk1陽性細胞を移植した群では、血管内皮細胞として寄与しているもののほかに、それ以外の細胞として組織内に存在するものが多数(約60%)認められた。一方、初期内皮を移植した群では、ほとんどすべての細胞(95%以上)が内皮細胞として血管に寄与していた(Fig. 3)。また、Flk1陽性細胞移植群では、細胞移植した腫瘍における血流増加は認められなかったが、分化させた血管細胞を移植した群では、有意な血流増加が認められた。これらの結果より、ES細胞由来血管細胞の移植により、血管新生促進効果が認められるが、成体における血管新生をターゲットとした細胞移植においては、血管前駆細胞のレベルの細胞よりも、やや血管に分化した初期内皮細胞のステージがより有効かつ特異的であると考えられた。このように、ES細胞由来細胞の移植においては、むやみに未分化細胞を移植すればよいわけではなく、ドナー細胞の分化段階とレシビエント側の状況を合わせた至適な分化段階の細胞を選択する必要が



あると考えられた。これらの知見は骨髄等の体性細胞の移植時においても考慮に入れる必要があると考えられる。

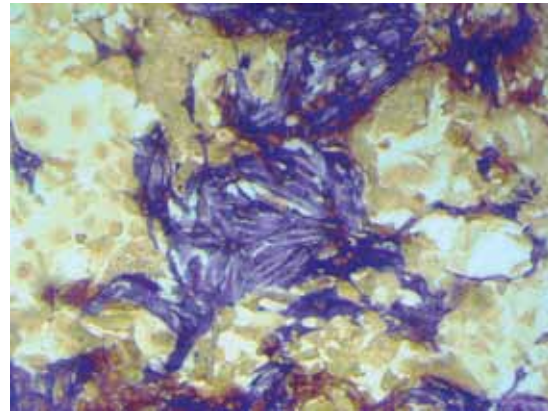
血管再生治療においては、倫理面・安全面・技術面でハードルが低い骨髄細胞や末梢血、G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) などの薬剤を用いた血管新生治療が先行して行われ、優れた効果を上げている。心筋や神経と異なり、既存の組織からの新生が可能な血管においては、細胞による純粋な再生は必ずしも必要ではなく、ES細胞治療がこれらの治療を凌駕して有用であるという知見は今のところない。しかし将来にわたっては、直接的な細胞移植治療のみならず、さまざまな血管再生治療のターゲットとなる新たなシーズを生み出し、血管特異的血管新生等も含めさらに治療法を精緻に改善向上させていくうえで、ES細胞の血管再生研究における意義は大きいと考えられる。

### (3) ヒトES細胞からの血管分化再生

ヒトES細胞を用いた血管細胞分化としては、胚様体を用いてCD31やVE-カドヘリン陽性内皮細胞の誘導と、フローサイトメトリーを用いての純化・再培養、培養下および免疫不全マウスに移植したゲル内における血管構造の形成が報告されている<sup>12)</sup>。京都大学のグループは、マウスES細胞と同様にサルES細胞においても2型VEGF受容体陽性細胞からの内皮細胞・壁細胞の分化<sup>13)</sup>、培養下における血管構造形成に成功している。さらに同グループは、2002年より日本最初のヒトES細胞分化研究を輸入ヒトES細胞を用いて開始し、ヒトES細胞においても血管構成細胞の分化誘導と*in vitro*における管腔構造形成、さらにはマウス血管新生モデルにおける新生血管への移植細胞の寄与と血流改善効果を認めている(Fig. 4)〔投稿中〕。ヒト細胞において血管分化再生機構が明らかになることにより、より治療応用に結びついた新たな知見が生まれることが期待される。

### ES細胞研究の可能性

ES細胞研究の再生医療に果たす役割としては、細胞治療応用、分化機構の解析をもとにした遺伝子治療の開発や創薬、再生医療の産業化、が大きな柱と考えられる。に関しては、現在ヒトES細胞のヒトへの臨床応用は認められておらず、倫理面・安全面を含



**Figure 4** Vascular cell differentiation from human ES cells. VEGF receptor-2<sup>+</sup> cells from human ES cells give rise to CD31<sup>+</sup> endothelial cells (purple) and  $\alpha$ -smooth muscle actin<sup>+</sup> mural cells (brown) with VEGF and serum on type IV collagen. Courtesy of Dr. Masakatsu Sone, Kyoto University Graduate School of Medicine.

めた厳密な検討を行い、その実現の可能性を地道に模索していく必要がある。これは、研究サイドのみの問題ではなく、社会全体との関わりの中で社会自体が決定していくことであり、人の叡智が試される場所である。自らの細胞の核を移植した体細胞クローン胚から樹立した自家ES細胞は、再生医療における有力な細胞材料の1つである。日本では2004年、総合科学技術会議生命倫理専門調査会により、難病治療などの基礎研究に限定してヒトクローン胚作製を容認する方針が打ち出された。ヒトクローン胚作製はその他、イギリス、韓国、ベルギー、フィンランド、オランダ、中国、インド、シンガポール、イタリア、スウェーデン、サウジアラビア、イスラエルなどで容認されている。賛否の議論は尽きないと思われるが、人の幸福につながる優れた研究のあり方が構築されていくことが期待される。ES細胞研究の意義は、直接的な細胞移植への応用だけではなく、分化機構の解析ができることにより再生医学へ大きな貢献を行うことができる。特に、マウスのように遺伝子改変動物モデルによる解析が不可能なヒト細胞の分化研究において、ヒトES細胞研究は不可欠と考えられる。ES細胞分化研究の与える知見は、新たな遺伝子ターゲットの発見や創薬など、再生医療開拓にさまざまな可能性を提示し続けるであろう。さらに、万人に移植可能なユニバーサル

ES細胞などのES細胞が開発されれば、それを用いてさまざまな移植用細胞を厳密に品質管理したうえで製品化することが可能となる。細胞移植による再生医療を実験的医療から日常診療レベルで実現するのはアンブレラ化された移植用細胞医薬かもしれない。規格化され均一化された細胞を心臓カテーテルの際に打ち込むだけならば、十分に日常診療として成立する。また、条件を揃えた厳密な効果判定も可能となり、細胞医薬の開発・製品化をもとにした再生医療の産業化も可能となると考えられる。

ES細胞の臨床応用にまつわる種々の問題を乗り越えるため、成体内の分化した細胞を初期化してES細胞などの多能性幹細胞にリプログラミングし、そこから種々の細胞を誘導することを可能にしようとする試みがなされている。実際、成体から取り出した体細胞からES細胞を作り出すことも不可能ではなくなる日もそう遠くなくさそうである。そうすれば、ヒトES細胞樹立における倫理的問題や移植における免疫の問題とそれに絡むヒトクローン胚の問題も回避され、ヒトES細胞の再生医療応用におけるハードルは一気に低くなると考えられる。そこまでに、さまざまな分化再生機構に関するノウハウを蓄積していることにより、ES細胞による再生医療はまた新たな展開をみせることになるだろう。分化再生機構の基礎研究から、再生医療の実現、産業化に至るまで大きな可能性を有するES細胞研究が、さまざまな形で人々の幸福に貢献していくことが期待される。

## 文 献

- 1) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al: Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282**: 1145–1147.
- 2) Vittel D, Prandini MH, Berthier R et al: Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*, 1996, **88**: 3424–3431.
- 3) Drab M, Haller H, Bychkov R et al: From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J*, 1997, **11**: 905–915.
- 4) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M et al: Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 2000, **408**: 92–96.
- 5) Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T et al: Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **288**: H1915–1924.
- 6) Huang H, Nakayama Y, Qin K et al: Differentiation from embryonic stem cells to vascular wall cells under in vitro pulsatile flow loading. *J Artif Organs*, 2005, **8**: 110–118.
- 7) Yamashita JK: Differentiation and diversification of vascular cells from embryonic stem cells. *Int J Hematol*, 2004, **80**: 1–6.
- 8) Suzuki H, Watabe T, Kato M et al: Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells. *Blood*, 2005, **105**: 2372–2379.
- 9) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T et al: Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, in press.
- 10) Kono T, Kubo H, Shimazu C et al: Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, in press.
- 11) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J et al: Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood*, 2003, **101**: 2675–2678.
- 12) Levenberg S, Golub JS, Amit M et al: Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 4391–4396.
- 13) Sone M, Itoh H, Yamashita J et al: Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation*, 2003, **107**: 2085–2088.
- \* Ueno M, Matsumura M, Watanabe K et al: Neural conversion of ES cells by an inductive activity on human amniotic membrane matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 9554–9559.

## Vascular Development and Regeneration Using Embryonic Stem Cells

Jun K Yamashita

Laboratory of Stem Cell Differentiation, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences,  
Kyoto University, Kyoto, Japan

---

**Key words:** embryonic stem cells, vascular regeneration, artery, vein, lymphatic vessels

Embryonic stem (ES) cells are potent materials for regenerative therapeutic approaches and developmental research. Recently, we developed a novel ES cell differentiation system, in which cardiovascular cells can be systematically and constructively induced from common progenitor cells. This constructive approach facilitates elucidation of the cellular and molecular mechanisms in vascular development. ES cell research for developmental biology would be indispensable for human species, considering experimental animal models are not available to them. ES cells should also contribute to regenerative medicine not only as a cellular source for transplantation but also for discovery of novel genes and drugs for regeneration.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 265–271)