

平成23年5月28日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790721

研究課題名(和文)

ヒト ES・iPS 細胞を用いた血管分化・老化・再生機構の解明と血管再生療法への応用

研究課題名(英文)

Investigation of human vascular development and aging using human ES/iPS cells

研究代表者

曽根 正勝 (SONE MASAKATSU)

京都大学 医学研究科 助教

研究者番号：40437207

研究成果の概要(和文)：

ヒト iPS 細胞からの血管構成細胞の分化誘導と単離に成功した。さらに、無フィーダー・無血清のより高効率なヒト ES/iPS 血管内皮細胞分化誘導系を確立した。また、ヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞と成人の血管内皮細胞の遺伝子発現を比較検討しデータベースを構築した。ヒト ES/iPS 細胞由来の幼弱な血管内皮細胞と成人の血管内皮細胞とで発現が異なる因子の 1 つに老化関連遺伝子 Sirt1 が挙げられることを見出し、その発現の違いが両者の内皮細胞機能の差異に寄与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：

We succeeded in inducing iPS cells to differentiate into vascular endothelial cells (ECs) and mural cells (MCs), which we were able to isolate. We also established a feeder- and serum-free method that enables us to more efficiently induce ECs. Human ES-derived ECs (ESECs) and iPS-derived ECs (iPSECs) had a greater potential for wound re-endothelialization and tube formation than human adult ECs (HAECs) in vitro. Next we carried out a gene expression analysis of these three types of ECs using gene chip technology. The expression level of Sirt1, an aging-related gene that encodes a NAD-dependent histone deacetylase, was higher in ESECs/iPSECs than in HAECs. When Sirt1 activity was knocked down by siRNA or inhibited by a specific Sirt1 antagonist, the aforementioned differences in the cellular functionality were abolished, which suggests that differences in Sirt1 activity contribute to the observed differences in the cellular functionality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管、再生、ES、iPS、分化、老化

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、霊長類であるサル ES 細胞から血管前駆細胞の分化・同定に成功し、霊長類 ES 細胞では血管分化過程においてマウスとの間に違いがあることを見出した (Circulation. 2003 ;107(16):2085-8.)。また、その知見を応用し、ヒト ES 細胞から血管前駆細胞を経て発生初期段階の血管構成細胞、すなわち血管内皮細胞および壁細胞 (平滑筋細胞) へと至る分化過程を解明し、それらの細胞を *in vitro* で増殖することにも成功している (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Jul;29(7):1100-3.)。さらに、適切な分化段階を選んでマウス下肢虚血モデル等へ経動脈的に移植すると、これらの細胞が宿主の血管に取り込まれ血流を回復させるという結果を得ている (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Oct;27(10):2127-34., PLoS ONE. 2008 Feb 27;3(2):e1666., J Transl Med. 2008 Sep 30;6(1):54.)。しかし、ヒト成人の大動脈や皮膚微小血管などの培養血管内皮細胞を移植に用いたところ同様の効果を得ることが出来ず、ヒト ES 由来の発生初期段階の血管細胞と、ヒト成人の老化した細胞との間には、健康な血管を維持・再生する細胞材料としての機能的な差異がある可能性が考えられる。一方、最近、山中らが、ヒト成人の細胞にいくつかの遺伝子を導入し、ES 細胞と同等の多分化能を持つ iPS 細胞の確立に成功している。しかし、iPS 細胞の由来は成体の線維芽細胞等であり、核そのものは老化した成体由来のものであることから、そこから分化誘導された血管構成細胞はその再生能や老化度の点でヒト ES 細胞由来の血管構成細胞と同等かどうか、成体の血管構成細胞と比較してどういう位置づけにあるか等の検討を要すると考えられる。

2. 研究の目的

申請者らはこれまで、ヒト ES 細胞を用いた血管再生医療の確立を目指してきたが、ヒト ES 細胞の臨床応用には倫理面や免疫拒絶、腫瘍化の恐れなどの問題があり、臨床応用には多くのハードルがあった。iPS 細胞を用いれば、少なくとも倫理面や免疫拒絶の面の問題については解決が期待できる。そのことから、本研究において、ヒト iPS 細胞からの血管細胞材料の分化誘導し単離する手法の確立を目指した。一方、本研究の知見を用いた血管抗老化・再生薬剤の開発も将来的なもう一つの大きな目標である。我々の以前のマウス下肢虚血モデルを用いた実験では、ヒト ES 細胞由来の発生初期段階の血管内皮細胞を移植すると虚血部に生着し血管再生に寄与したが、成体

由来の血管内皮細胞を移植してもほとんど生着しなかったという結果を得ており、我々はその差がどこから生じるのかに興味を抱いている。申請者らは本研究においてその ES 由来の発生初期段階の血管細胞と成体の老化した血管細胞との再生能の差を規定する因子を突き止め、それらに介入することにより血管細胞の老化を防いだり再生能を高めたりする方法を見出すことを将来的な目標とした。

3. 研究の方法

ヒト成人線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの遺伝子を導入して作製された 201B6, 201B7、および c-Myc を除く 3 つの遺伝子を導入して作製された 253G1, 253G4 の 4 つの iPS セルライン (Cell. 2007 ;131(5):861-72.) を用いて、ヒト ES 細胞で我々がすでに確立している分化誘導法 (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; Oct;27(10):2127-34.) にて血管細胞の分化誘導を行った。さらに、無フィーダー・無血清でのヒト ES 細胞・iPS 細胞の血管分化誘導法の確立も試みた。そして、ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞、成人の血管内皮細胞の細胞機能の比較を行った。また、ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞と成人の血管内皮細胞との遺伝子発現の違いを DNA マイクロアレイにて網羅的に解析した。そして、それらの両者間で発現が異なる遺伝子群をピックアップし、その中から血管の老化に関わり両者の細胞機能の違いに寄与する因子を検索し、その働きを検討した。iPS 細胞由来血管構成細胞にても上記因子の発現を検討した。

4. 研究成果

iPS 細胞を OP9 フィーダー細胞との共培養にて 10 日間分化誘導を行うと、Flk1 陽性 TRA1-60 陰性細胞が出現した (図 1)。Flk1 陽性 TRA1-60 陰性細胞は VEcadherin 陽性細胞と陰性細胞に分けられ、Flk1 陽性 TRA1-60 陰性 VEcadherin 陽性細胞は、CD34, CD31, eNOS も陽性で、培養ディッシュ上にて内皮細胞特有の敷石状の形態およびマトリゲル上で管腔構造をとり、血管内皮細胞であると考えられた (図 2)。Flk1 陽性 TRA1-60 陰性 VEcadherin 陰性細胞は、カルポニン、平滑筋ミオシン重鎖も陽性で、血管平滑筋細胞であると考えられた (図 2)。それらヒト iPS 細胞からの血管細胞の分化過程はヒト ES 細胞とほぼ同等であった。また、ヒト iPS 細胞からの血管細胞の分化効率には B セルラインと G セルライン間で有意な差は認められなかった。さらに、我々は、上記のヒト ES・iPS 細胞分

化誘導法を改良し、フィーダー細胞・血清を用いずに、GSK3β阻害薬などの薬剤やStemPro-34などの無血清培地を用いて分化誘導する手法を確立し、血管内皮細胞分化誘導効率を上昇させることにも成功した(図3)。

また、その手法で単離したヒトES由来血管内皮細胞と成人の大動脈内皮細胞の細胞機能を比較検討したところ、ヒトES・iPS由来血管内皮細胞は成人の大動脈血管内皮細胞に比べ、MTTアッセイにて細胞増殖能が高く、Wound Healing Assayにて内皮欠損の回復能が高く、マトリゲル上でのネットワーク形成能も高かった(図4)。次に両者の遺伝子発現をDNAマイクロアレイにて網羅的に比較し、ヒトES由来の幼弱な血管細胞と成人の血管細胞との遺伝子発現の違いについてのデータベースを構築した。両者で発現が異なる因子の1つに老化関連遺伝子Sirt1が挙げられた(図5)。Sirt1をsiRNAでノックダウンしたところ、Wound Healing Assayやマトリゲル上でのネットワーク形成能などにおける両者の機能面の差が消失した。Sirt1阻害剤であるSirtinolを加えても同様の結果であった。一方、上記の4つのヒトiPSセルライン由来血管内皮細胞についても同様の検討を行ったところ、ヒトiPS由来血管内皮細胞は細胞機能の面でも遺伝子発現の面でもヒトES由来の血管内皮細胞とほぼ同等であった。

以上の結果より、本研究では、

- (1)世界に先駆けヒトiPS細胞より血管内皮細胞・壁細胞を分化誘導し、さらに単離することに成功した。
- (2)ヒトiPS細胞からの無フィーダー・無血清の血管分化誘導法の確立に成功した。
- (3)ヒトES/iPS由来の血管内皮細胞と成人の血管内皮細胞の遺伝子発現についてDNAマイクロアレイでデータベースを構築した。
- (4)両者の遺伝子発現の違いと細胞機能の差異とをつなぐメカニズムの一端を明らかにした。

今後の展望として、

- (1)疾患特異的iPS細胞を用いた血管障害性疾患の病態解明におけるヒトiPS血管分化系として活用(図6)
- (2)既存の薬剤の血管分化・老化に対する影響の評価系
- (3)ヒトESからの血管分化・老化過程で重要な働きをしている分子群を明らかにし、それらに介入する新規の血管老化防止薬剤の開発等への応用が期待できる。

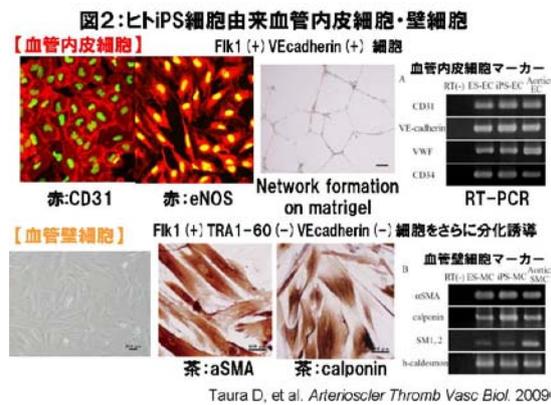
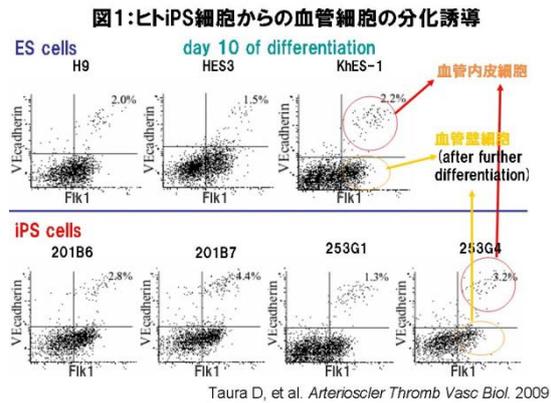


図3:血管分化誘導法の改良
従来法を改良し、フィーダー細胞・血清を用いない血管分化誘導法を確立した。

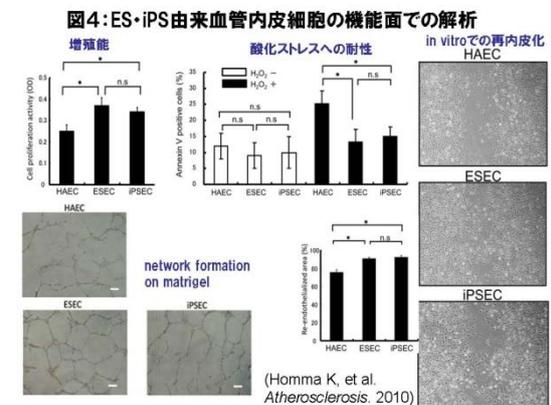
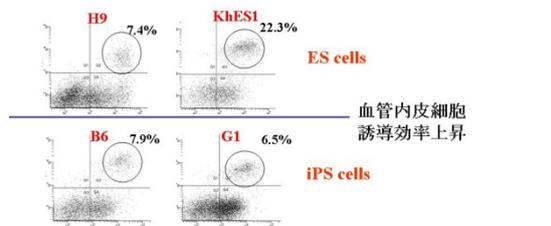


図5: ES・iPS由来血管内皮細胞でのSIRT1の発現

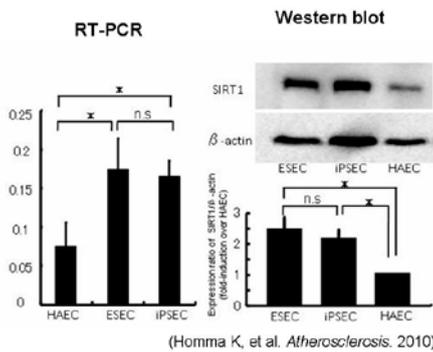
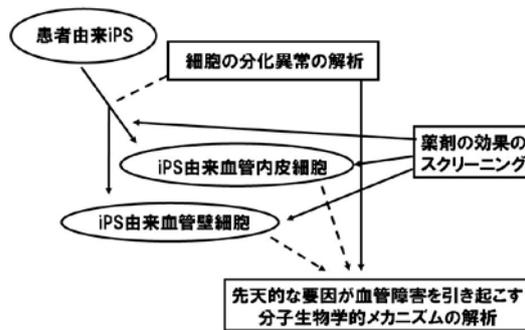


図6: 疾患特異的iPSを用いた病態解明への展開



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, Yamanaka S, Nakao K.

Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. (査読有) 2009 Jul;29(7):1100-3.

Homma K, Sone M, Taura D, Yamahara K, Suzuki Y, Takahashi K, Sonoyama T, Inuzuka M, Fukunaga Y, Tamura N, Itoh H, Yamanaka S, Nakao K.

Sirt1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS-derived vascular endothelial cells.

Atherosclerosis. (査読有) 2010 Sep; 212 (1):42-7.

Tatsumi R, Suzuki Y, Sumi T, Sone M, Suemori H, Nakatsuji N.

Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells.

Cell Transplant. (査読有) Dec 22. 2010 [Epub ahead of print]

[学会発表] (計5件)

曾根正勝、他

ヒト ES および iPS 細胞を用いたヒト血管保護・再生因子の探索

第 82 回日本内分泌学会学術総会 公募シンポジウム 1 前橋、日本 2009年4月23日

Masakatsu Sone, Kazuwa Nakao

Induction and Isolation of Vascular Cells from Human ES and iPS cells: as a research tool for vascular biology

5th SEOUL Conference on Cardiovascular Research

Seoul, Korea. October 31, 2009

曾根正勝、他

ヒト ES および iPS 細胞を用いたヒト血管分化・再生・老化機構の解明

第 9 回日本再生医療学会総会

広島、日本、3月18日、2010年

Masakatsu Sone, et al.

The characteristic and potential of human ES and iPS -derived vascular cells.

14th International Congress of Endocrinology

Kyoto, Japan, March 28, 2010

曾根正勝、他

ヒト iPS/ES からの血管構成細胞分化誘導・単離技術の確立と疾患 iPS 研究への応用

第 10 回日本再生医療学会総会

東京、日本、3月2日、2011年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾根 正勝 (SONE MASAKATSU)

京都大学 医学研究科 助教

研究者番号: 40437207

(2) 研究協力者

田浦 大輔 (TAURA DAISUKE)

日本学術振興会 特別研究員 (PD)

本間 康一郎 (HOMMA KOICHIRO)

京都大学 医学研究科 客員研究員

鈴木 豊 (SUZUKI YUTAKA)

NPO 法人幹細胞創薬研究所