

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790757

研究課題名（和文） 多能性幹細胞由来血管前駆細胞の骨髓移植による戦略的血管再生療法の開発

研究課題名（英文） Development of new vascular regenerative therapy by replacement of bone marrow cells with pluripotent stem cell-derived vascular progenitor cells.

研究代表者 山原 研一（YAMAHARA KENICHI）

独立行政法人国立循環器病研究センター・再生医療部・室長

研究者番号：50450888

研究成果の概要（和文）：骨髓由来血管前駆細胞の代替としての、ES細胞由来血管前駆細胞の血管再生細胞ソースとしての有用性に関し検討を行った。我々の方法で誘導されたES細胞由来血管平滑筋細胞はその分化が不十分であり、マイクロRNA(miRNA)-145導入により、より分化した平滑筋細胞となった。また、我々のES細胞由来血管平滑筋細胞は、継代初期は抗老化性を示すものの、比較的早期の継代で細胞老化を起こすことが明らかとなり、ES細胞を用いた血管再生療法の確立には、より至適な血管前駆細胞誘導法の樹立が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We examined the therapeutic potential of ES cell-derived vascular progenitor cells as the alternative of bone marrow-derived vascular progenitor cells. Although human ES cell-derived vascular smooth muscle cells (VSMCs) obtained by our original method were at a rather immature state of differentiation, induction of miR-145 resulted in fully differentiated VSMCs. We also found that human ES-derived VSMCs at early passage possessed high proliferation and migration property, which might be a suitable cell source for vascular regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：

キーワード：ES 細胞、マイクロ RNA(miRNA)、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、血管前駆細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、動脈硬化に基づく脳梗塞や虚血性心疾患、下肢動脈閉塞症等の虚血性疾患に対し、従来の内科・外科的治療に加え血管再生療法が臨床応用されつつある。特に末梢血において血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell:EPC)が発見されて以降、その細胞移植による虚血改善効果が報告されている(*Circulation*. 108(18):2212-8 2003)。EPCは骨髄から動員され血中に存在し、虚血部位における血管形成に関与していると考えられている。最近では、血中における骨髄由来平滑筋細胞の存在とその動脈硬化病変への動員も指摘されており、骨髄由来血管構成(内皮・平滑筋)前駆細胞の血管再生および血管再構築における意義が注目されている。喫煙や糖尿病、加齢と共に血中 EPC は減少する(*N Engl J Med*. 348:593-600 2003)、あるいは、若齢マウス由来骨髄の移植は高齢マウス由来骨髄の移植と比較すると動脈硬化発症が抑制される(*Circulation*. 108:457-63 2003)という報告は、動脈硬化リスクファクターの増加と共に骨髄由来血管構成前駆細胞の機能・数が低下することを示唆している。また、動脈硬化疾患患者由来の血管構成前駆細胞を用いた細胞移植は、細胞の質的・量的問題により虚血改善効果に限界があると想像される。

我々はこれまで、血管構成細胞の発生分化に着目し、その過程を容易に再構築可能なES細胞を用いた研究を行ってきた。まず、マウスES細胞から2型VEGF受容体

(VEGFR-2)陽性中胚葉細胞を誘導させ、更に、血管内皮細胞及び壁細胞(平滑筋および周皮細胞)に分化しうる血管前駆細胞(vascular progenitor cell:VPC)の単離同定に成功した(*Nature*. 408:92-6 2000)。その後、霊長類(カニクイザル)ES細胞からのVPC同定にも成功し(*Circulation*. 107:2085-8 2003)、更に最近、我が国最初に研究認可を受けたヒトES細胞を用い、ヒトVPCの分化誘導および同定に成功した(*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27:2127-34 2007)。そこで、ヒトVPCを用いた新たな血管再生療法の確立を目指し、ヒトVPC由来血管構成細胞の虚血性疾患モデルへの移植実験を行った(*PLoS ONE*. 3(2):e1666 2008)。即ち、マウス下肢虚血モデルにおいてヒトVPC由来血管内皮および壁細胞を経動脈的に移植したところ、これら細胞はホストの血管内皮および壁細胞と共に再生血管を構築し、有意な血流改善を認めた。この効果はヒト末梢血・臍帯血由来EPCと比較し、より効果的且つ持続的であった。この結果は、ヒトES細胞由来VPCを用いた新しい血管再生療法の可能性を示したものである。

胎生期における血管および血球細胞の発生は、共通の前駆細胞であるVEGFR-2陽性中胚葉細胞由来血球血管芽細胞(hemangioblast)から始まると考えられている。血球血管芽細胞はその後、VEGFR-2陰性の造血幹細胞およびVEGFR-2陽性の血管芽細胞(angioblast)に分化するが、我々のVPCはこの血管芽細胞とほぼ同義であり、

発生学的に骨髄に存在する造血幹細胞あるいは EPC などの骨髄由来血管構成前駆細胞に非常に近い細胞と考えられる。

これらの結果および事実を踏まえ、我々は、ES あるいは iPS といった多能性幹細胞由来 VPC は機能不全に陥った骨髄由来血管構成前駆細胞に置き換わりうるのではという仮説に至り、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

加齢、リスクファクター等により機能低下に至った骨髄由来血管構成前駆細胞の代替としての、多能性幹細胞由来 VPC の血管再生細胞ソースとしての有用性に関し検討を行った。

## 3. 研究の方法

①多能性幹細胞由来中胚葉細胞から血管構成細胞に至る発生系統的遺伝子およびマイクロ RNA (miRNA) 発現プロファイル解析

慶應義塾大学腎臓内分泌代謝内科との共同研究により、ヒト ES 細胞から血管内皮や平滑筋細胞といった血管構成細胞に至る各分化段階由来の細胞において、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子およびマイクロ RNA (miRNA) 発現プロファイリングを構築した。ヒト ES 細胞から血管内皮や平滑筋細胞までの各分化段階の細胞は、我々が樹立した方法に従い、未分化ヒト ES 細胞 (KhES1) から分化誘導を行った。

②多能性幹細胞由来血管前駆細胞の効率的血管構成細胞分化誘導法の確立

①の解析から、miR-145 が ES 細胞からの血管平滑筋細胞誘導に有用な因子である可能性が示唆されたことから、その詳細な検討を行った。即ち、ヒト ES 細胞由来平滑筋細胞に miR-145 の前駆体である pre-miR-145 を導入した場合の平滑筋分化

を、各種血管平滑筋マーカー (calponin, caldesmon, SM-MHC) 発現、細胞増殖性 (MTT アッセイ)、細胞収縮性 (カルバコール) により評価した。

③多能性幹細胞由来血管前駆細胞の細胞寿命・老化に関する研究

既に我々は GFP トランスジェニックマウスの骨髄由来 CD34 陽性 EPC を別の野生型マウスに移植したところ、その骨髄での生着と末梢血への移行、更には虚血組織における GFP 陽性 EPC の存在を確認している。そこで、多能性幹細胞由来 VPC を骨髄に移植を行ったが、生着性に乏しかった (unpublished data)。そこで、多能性幹細胞由来血管前駆細胞の細胞寿命・老化に関し、検討を行った。ヒト ES 細胞から血管平滑筋細胞 (ES-SMC) を分化誘導した。継代初期 (3 経代)、中期 (5 経代)、後期 (7 経代) における ES-SMC に関し、MTT 試験により細胞増殖を、SA- $\beta$ -gal 染色により細胞老化を、p53, p21, p16 を含む各種老化関連因子発現をウェスタンブロット法により検討した。更に、SMC の細胞老化を促進させるアンジオテンシン II (AII, 1 $\mu$ M) を各継代の ES-SMC に添加し、各実験系においてその変化を検討した。

## 4. 研究成果

①多能性幹細胞由来中胚葉細胞から血管構成細胞に至る発生系統的遺伝子およびマイクロ RNA (miRNA) 発現プロファイル解析

プロファイリングには、成人由来各種血管細胞のデータを加えて、相互比較検討を行った。その結果、最近血管平滑筋細胞の分化誘導に重要な miRNA として注目されている miR-145 が、ヒト ES 細胞由来血管内皮および平滑筋細胞の分化誘導過程において、特徴的な発現変化を示すことを見いだした。即ち、ヒト ES 細胞由来平滑筋細胞系では著

明な miR-145 発現が認められるのに対し、同内皮細胞系では全くその発現を認めず、ヒト ES 細胞からの血管細胞誘導における miR-145 の重要性が示唆された。

#### ②多能性幹細胞由来血管前駆細胞の効率的血管構成細胞分化誘導法の確立

miR-145 は ES 細胞由来平滑筋細胞において、大動脈血管平滑筋細胞と同等の強い発現を認めた。各種平滑筋マーカー発現は、ES 由来平滑筋細胞において miR-145 導入によりその発現増強を認めた。また、同細胞における細胞増殖性は miR-145 導入により低下し、収縮性に関しては逆に亢進を認めた。逆に、ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞において、pre-miR-145 を過剰発現させても、内皮機能に変化はなかった。以上から、ES 細胞由来平滑筋細胞分化において、miR-145 はその誘導をより促進させる重要な因子であることが示された（投稿中）。

#### ③多能性幹細胞由来血管前駆細胞の細胞寿命・老化に関する研究

各種実験の結果、継代初期(3 継代)の ES 由来血管平滑筋細胞 (ES-SMC) は、MMT 試験により高い細胞増殖能を有し、SA- $\beta$ -gal 染色においても、AII 添加にかかわらず、その抗老化性は明らかであり、血管再生療法における細胞ソースとして有用であると思われた。しかしながら、予想に反し、中期(5 継代)および後期(7 継代)における ES-SMC は、細胞増殖性に乏しく、AII 添加あるなしに関わらず染色性が高く、継代早期に細胞老化を起こすことが明らかとなった。

これらの本研究で得られた知見から、血管再生療法に相応しい ES 細胞由来血管構成細胞分化誘導法の確立につなげていきたい。

#### 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] (計件)

- ① Ishikane S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Hayakawa K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol*. 査読有、2010 49(5):753-61
- ② Homma K, Sone M, Taura D, Yamahara K, Suzuki Y, Takahashi K, Sonoyama T, Inuzuka M, Fukunaga Y, Tamura N, Ito 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 212(1):42-7.
- ③ Bir SC, Esaki J, Marui A, Yamahara K, Tsubota H, Ikeda T, Sakata R. Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: characterization in-vitro and in the ischemic hind limb of the mouse. *J Vasc Surg*. 査読有、2009 50(4):870-879.e2.
- ④ Tokudome T, Kishimoto I, Yamahara K, Osaki T, Minamino N, Horio T, Sawai K, Kawano Y, Miyazato M, Sata M, Kohno M, Nakao K, Kangawa K. Impaired recovery of blood flow after hind-limb ischemia in mice lacking guanylyl cyclase-A, a receptor for atrial and brain natriuretic

peptides. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 査読有、2009 29(10):1516-21.

- ⑤ Yamahara K, Itoh H. Potential use of endothelial progenitor cells for regeneration of the vasculature. Ther Adv Cardiovasc Dis, 査読有、2009 3(1):17-27.
- ⑥ Yamahara K, Min KD, Tomoike H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Pathological role of angiostatin in heart failure: an endogenous inhibitor of mesenchymal stem-cell activation. Heart. 査読有、2009 95(4):283-9.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yamahara K, Nishi T, Homma K, Takesue S, Yamaguchi S, Sone M, Itoh H. Aging of human ES cell-derived vascular cells: analysis of early and late passage cells. XX World Congress of the International Society for Heart Research (ISHR), 2010 年 5 月
- ② 山原研一、iPS 細胞由来血管前駆細胞を用いた新規下肢動脈閉塞性疾患治療法の開発、第 50 回日本脈管学会 共催シンポジウム、2009 年 10 月

[図書] (計 1 件)

- ① 山原研一、曾根正勝、伊藤裕、真興出版、血管の再生 p52-64, 2008

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山原 研一 (YAMAHARA KENICHI)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・再生医療部・室長  
研究者番号：50450888

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

伊藤 裕 (ITOHI HIROSHI)  
慶應義塾大学・医学部腎臓内分泌代謝内科・教授  
研究者番号：40252457  
本間 康一郎 (HOMMA KOICHIRO)  
慶應義塾大学・医学部腎臓内分泌代謝内科・助教