

平成 21 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790649  
 研究課題名（和文） ヒト ES 細胞からの骨格筋細胞の分化誘導とその内分泌臓器としての分化過程の解明 に関する研究  
 研究課題名（英文）  
 研究代表者  
 曽根 正勝 (SONE MASAKATSU)  
 京都大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：40437207

## 研究成果の概要：

申請者は、これまでにヒト ES 細胞から誘導された Flk1 陽性細胞より平滑筋細胞を分化誘導することに成功している。また、共同研究者らは、同じく Flk1 陽性細胞より心筋細胞の分化誘導に成功している。そこで、本研究では、同じ Flk1 陽性細胞から骨格筋細胞の分化誘導を試み、Flk1 陽性細胞が 3 種の筋肉すべてに分化する能力を持つか検討を行ったが、一般的な骨格筋分化条件では成熟した骨格筋細胞へは分化しなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

以前、我々の研究室では、マウス ES 細胞から誘導された VEGF 受容体の一つである Flk1 陽性細胞が、血管内皮細胞と平滑筋細胞のいずれにも分化する能力を持つ細胞群であることを明らかにした(Nature 408:92-6, 2000)。さらに我々は、ヒトでの臨床応用を目指し、まず霊長類 ES 細胞としてサル ES 細胞の検討を行い、霊長類 ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞がその分化動態においてマウスと異なること

を明らかにし、霊長類 ES 細胞から血管内皮細胞・平滑筋細胞の分化誘導に成功した(Circulation. 107(16):2085-8, 2003)。そのノウハウをもとに、日本で最初に 2002 年文部科学省より正式承認を得てヒト ES 細胞の研究を開始し、ヒト ES 細胞の大量未分化維持培養系を確立し、最近ヒト ES 細胞における血管前駆細胞の分化過程の解析と血管内皮細胞および平滑筋細胞の分化誘導に成功した(特願2004-184138号、特願2005-06683号)。すなわち、未分化マーカーTRA-1 陰性、

Flk1 陽性、PDGF 受容体陽性分画からヒトの血管内皮細胞および平滑筋細胞を分化誘導できることを明らかにし、さらに *in vitro* にてそれらのヒト ES 細胞由来血管構成細胞を大量に増幅することにも成功した。そして、それらの細胞を用い免疫不全マウスにて移植実験を行い、ヒト ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞が生体においてヒト血管を構築し、更に皮膚潰瘍モデルにおいて移植により潰瘍早期治癒が認められることを明らかにした。また、下肢虚血モデルにおいても同様に下肢虚血部分の血流の改善と移植細胞による血管の形成を認め、中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルにおいても移植局所の虚血脳血流量が改善し、脱落神経機能の回復が認められることを見出した。また、下肢虚血モデルにおいて各血管構成細胞の移植効果を検討したところ、血管内皮細胞 (EC) 単独の移植より血管内皮細胞 (EC) + 平滑筋細胞 (MC) の両方の移植の方がより成熟した血管が形成され血流回復効果が高くより長期的な効果が認められた。

このように、これまで我々は ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞からの血管内皮細胞・平滑筋細胞の分化誘導およびそのヒトでの再生医療への応用の研究を行ってきた。一方、最近、共同研究者の山下らが、同じマウス ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞からフィーダー細胞との共培養下で平滑筋細胞のみならず心筋細胞も分化誘導され得ることを報告している (FASEB J. 19:1534-6, 2005)。さらに、他のグループの遺伝子改変マウスを用いた研究にて、Flk1 陽性の細胞に Cre リコンビナーゼが発現される遺伝子改変マウスと Cre リコンビナーゼにより LacZ が発現する遺伝子改変マウスを掛け合わせるにより骨格筋および心筋に広く LacZ が発現したという報告があり (genetics 35:153-9, 2003)、骨格筋および心筋細胞がその発生分化の過程で Flk1 陽性の時期を経ることが示唆されている。また、マウス胎児由来 Flk1 陽性細胞から骨格筋を分化誘導したという報告もある (Experimental Cell Research 301: 232-41, 2004)。これらの結果から、ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞は、平滑筋・心筋のみならず骨格筋にも分化する能力を有していることが推測される。

## 2. 研究の目的

近年、各種臓器の分化・再生に関する研究が進み、再生医療に対する期待は日に日に高まってきている。なかでも、生体のあらゆる細胞・臓器に分化する能力を有する胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた研究は、発生・分化機構の解明や再生医療における大きな柱の一

つである。一方、骨格筋細胞は糖・脂質代謝を担う重要な代謝臓器であり、またインスリンなど各種ホルモンの受容体を持つホルモン標的臓器であると同時にマスキリンなど生理活性物質を分泌する内分泌器官であることが近年明らかになってきており、脂肪細胞と同様に内分泌代謝臓器としての働きが注目されてきている。

我々は ES 細胞から 3 種類の筋細胞のうちすでに 2 種類 (平滑筋細胞と心筋細胞) の分化誘導に成功しており、残る一つである骨格筋細胞についても背景で述べたように発生分化の過程で *embryo* では Flk1 陽性細胞を経ることが示唆されている。そこで、本研究では、ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞から骨格筋細胞の分化誘導を試み、Flk1 陽性細胞が 3 種の筋肉すべてに分化する能力を持つか検討を行った。

## 3. 研究の方法

マウス ES 細胞・ヒト ES 細胞は既報の方法にて維持培養を行った (Nature 408:92-6, 2000, Arterioscler Thromb Vasc Biol. Oct;27(10):2127-34, 2007)。マウス ES 細胞からの Flk1 陽性細胞の分化誘導はコラーゲン IV コートディッシュ上で 4 日間行い、ヒト ES 細胞からの Flk1 陽性細胞の分化誘導は OP9 フィーダー細胞との共培養下で 8 日間行った。Flk1 陽性細胞は FACS Aria を用いフローサイトメトリーにてソーティングした。遺伝子発現の解析は Reverse Transcriptase-PCR 法にて行った。免疫染色は DAKO EnVision System を用い既報の方法にて行った (Arterioscler Thromb Vasc Biol. Oct;27(10): 2127-34, 2007)。抗骨格筋ミオシン抗体には SIGMA-ALDRICH 社の M8421 (clone NOQ7.5.4D) を用いた。

## 4. 研究成果

平成 19 年度は、まずマウス ES 細胞を用い、Flk1 陽性細胞からの骨格筋の分化誘導を試みた。マウス ES 細胞を分離しコラーゲン IV コートディッシュ上で 10% 血清存在下で分化誘導を行うと、分化誘導 4 日目に Flk1 陽性細胞が約 10% 出現した。これらの Flk1 陽性細胞をフローサイトメトリーにてソーティングし、10% 血清下で分化誘導を行ったところ、これまでの検討と同様に平滑筋細胞が出現した。これら Flk1 陽性細胞を低血清条件下・2% 馬血清存在下などの既報にある骨格筋分化誘導条件下で分化誘導を試みたが、これらの条件下では Flk1 陽性細胞は十分に生育せず、骨格筋系細胞の出現は認めら

れなかった。そこで、筋衛星細胞のセルラインと考えられている C2C12 細胞の培養上清を用いて培養を行ったところ、Flk1 陽性細胞は良好に生育した。そこで、平成 20 年度は、その条件において、筋幹細胞マーカーである Pax7、骨格筋芽細胞で発現する MyoD、筋管細胞で発現する myogenin の遺伝子発現を RT-PCR 法にてソーティング後 20 日間観察したところ、Pax7 の発現は認められたが、MyoD、myogenin の有意な発現は認めなかった。また、明らかな多核の細胞や免疫染色にて骨格筋ミオシン陽性細胞も出現しなかった。次に、ヒト ES 細胞を用いて、OP9 フィーダー細胞との共培養下で分化誘導後 8-10 日目に出現する Flk1 陽性・未分化 ES マーカー TRA1-60 陰性細胞をソーティングし、ソーティング後 28 日目まで同様の検討を行ったが、MyoD、myogenin の有意な出現は認めなかった。低血清・PDGF-BB 添加条件下で細胞密度の低い状態で培養すると、多核の巨大な細胞が一部に出現したが、それらは紡錘形ではなく円形で、骨格筋ミオシンは発現しておらず、形態的に破骨細胞の出現が疑われた。これらの結果から、現段階ではマウスおよびヒト ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞からの骨格筋細胞の分化誘導には成功していない。

#### 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 8 件)

①Taura 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. 2009 May 7. [Epub ahead of print] (査読有)

②Taura D, Noguchi M, Sone M, Hosoda K, Mori E, Okada Y, Takahashi K, Homma K, Oyamada N, Inuzuka M, Sonoyama T, Ebihara K, Tamura N, Itoh H, Suemori H, Nakatsuji N, Okano H, Yamanaka S, Nakao K.

Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. FEBS Lett. 2009 Mar 18;583(6):1029-33. Epub 2009 Feb 27. (査読有)

③Sone M, Shibata H, Homma K, Tamura N, Akahira J, Hamada S, Yahata M, Fukui N, Itoh H, Sasano H, Nakao K.

Close examination of steroidogenesis disorders in a DOC- and progesterone-producing adrenocortical carcinoma.

Endocrine. 2009 Feb;35(1):25-33. Epub 2008 Nov 5. (査読有)

④Oyamada N, Itoh H, Sone M, Yamahara K, Miyashita K, Park K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K.

Transplantation of vascular cells derived from human embryonic stem cells contributes to vascular regeneration after stroke in mice.

J Transl Med. 2008 Sep 30;6:54. (査読有)

⑤Oyamada N, Sone M, Miyashita K, Park K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Itoh H, Nakao K.

The role of mineralocorticoid receptor expression in brain remodeling after cerebral ischemia.

Endocrinology. 2008 Aug;149(8):3764-77. Epub 2008 Apr 24. (査読有)

⑥Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K.

Augmentation of neovascularization [corrected] in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells.

PLoS ONE. 2008 Feb 27;3(2):e1666. (査読有)

⑦Park K, Itoh H, Yamahara K, Sone M, Miyashita K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K.

Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases.

Endocrinology. 2008 Feb;149(2):483-91. Epub 2007 Nov 8. (査読有)

⑧Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao TH, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa S, Nakao K.

Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Oct;27(10):2127-34. Epub 2007 Sep 13. (査読有)

〔学会発表〕 (計0件)

〔図書〕 (計1件)

曾根正勝, 中尾一和  
医歯薬出版株式会社  
医学のあゆみ, 2007, 220(2) : p171-174,

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

## 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) 研究分担者

### (3) 連携研究者