ES 細胞を用いた *in vitro* 血管分化系

—分化制御研究の新たな視点—

山 下 潤*

review article

INFLAMMATION AND REGENERATION

In vitro vascular development system—A new aspect of developmental research using ES cells

Recently, we established a novel *in vitro* differentiation system of embryonic stem (ES) cells that reproduces vascular cell differentiation and vascular formation process. Flk 1, one of the vascular endothelial growth factor receptors (VEGF-R 2), is the earliest differentiation marker for vascular system and also a marker for mesoderm. We induced Flk 1-expressing (Flk 1+) cells from undifferentiated ES cells and purified Flk 1+ cells by flowcytometry. Purified Flk 1+ cells give rise to both of vascular cell types, endothelial cells and mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) by the stimulation with VEGF and PDGF-BB, respectively, and form blood vessel structures both *in vitro* and *in vivo*. These results indicate that Flk 1+ cells act as common progenitors for vascular cells and suffice to form complete vessels. This system not only provides potentials to develop novel vascular regeneration therapies, but also enables us to dissect the molecular mechanisms of vascular development from a new aspect, such as global gene expression analysis during cell differentiation and *in vitro* functional assay of genes for vascular development. Our novel methodological approach should offer new possibilities to ES cell research.

Rec. 8/29/2002, pp 509~517

Jun Yamashita*

key words : embryonic stem cells, progenitor cells, Flk1, differentiation, blood vessel

最近の再生医学のブームは、1997年のクローン羊・ドリーの誕生と1998年のヒトES細胞(embryonic stem cells)が樹立されたことにより、体細胞クローンES細胞を用いて自分自身の体の細胞をつくることのできる可能性が示されたことと、1992年に成体内では増殖しないと考えられていた神経において、神経細胞をつくり出す神経幹細胞が存在することが報告されたことに引きつづき、成体のあちらこちらにさまざまな種類の幹細胞が存在し(体性幹細胞)、成体においても損傷修復時などの組織構築に寄与していることがつ

ぎつぎと報告され、体性幹細胞の新たな可能性が出てきたことにより急速な広がりをみせている。このように再生医学は、幹細胞生物学の発展を不可欠な要素とした背景を持っている。そして幹細胞生物学の二つの大きな研究ターゲットが、すなわちES細胞と体性幹細胞である。

ES細胞は、初期胚(胚盤胞)内に存在する未分化幹細胞である内細胞塊(inner cell mass)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いわゆる“万能”幹細胞と考えられている。ES細胞の全能性(pluripotency)は、ES細胞を胚盤胞に注入して得られたキメラマウスを交配することにより、ES細胞由来の動物個体をつくることのできることで、*in*

* Department of Molecular Genetics, Kyoto University Graduate School of Medicine 京都大学大学院医学研究科分子遺伝学教室

図 1

A：血管の発生過程(Risau W, 1997²⁾より改変)

B：血島(blood island)からの血球・血管の分化

胎仔卵黄囊においては、中胚葉由来の間葉細胞が集簇して血島(blood island)とよばれるクラスターを形成する。血島の内側の細胞は血球に、外側の細胞は内皮細胞に分化すると考えられている。(Gilbert SF, 2000¹⁷⁾より改変)

vivo において証明されている。この全能性を *in vitro* において引き出し、分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試みがさまざまな臓器、細胞をターゲットに行われている。神経細胞、心筋細胞をはじめとして、血球細胞、内皮細胞、軟骨細胞、色素細胞等の細胞が *in vitro* において ES 細胞から誘導できることが明らかになっている。

最近筆者らは、ES 細胞を用いて *in vitro* において中胚葉、さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)を選択的に分化誘導し、最終的に血管としての高次構造を *in vitro* および *in vivo* において構築すること、いわば血管の発生過程を再現することに成功した¹⁾。本稿では、筆者らの知見を中心に ES 細胞研究の再生医学における可能性について概説する。

血管の発生過程

血管の発生は、中胚葉細胞から hemangioblast または angioblast とよばれる前駆細胞が分化することによりはじまると考えられている。この前駆細胞はたがいに融合し原始血管叢を形成する。この過程が vasculogenesis とよばれている。特に卵黄囊においては、hemangioblast が血島(blood island)を形成したのち、辺縁部の細胞は内皮細胞に分化し、中心部の細胞は血球細胞に分化すると推定されている(図 1 B)。

その後、既存血管の内皮細胞が血管新生刺激に反応して新たな管腔形成を行い(angiogenesis)、階層性を持った大小血管からなる vascular tree の形成(リモデリング)、基底膜の形成、壁細胞による内皮細胞周囲の裏打ち構造の形成(血管成熟)により新生血管が完成される²⁾(図 1 A)。

血管内皮細胞の起源と分化

通常の発生過程において、血管内皮細胞は、卵黄囊の胚体外中胚葉(extraembryonic mesoderm)、胚体領域の内臓中胚葉(splanchnopleuric mesoderm)や沿軸中胚葉(paraaxial mesoderm)

から発生することが知られている。ニワトリ、ウズラのキメラ胚による検討では、背側大動脈腹側の内皮や内臓の内皮細胞は内臓中胚葉から、脳や顔面、体壁・肢・腎臓の血管、体節間動脈、背側大動脈背側の内皮は沿軸中胚葉に由来するといわれている³⁾。

血管内皮細胞における前駆細胞(progenitor cell)や幹細胞(stem cell)の検索は、embryo のほかにも ES 細胞、マウスやヒトの成体(末梢血・骨髓・臍帯血等)を用いて行われている。ニワトリ胚由来 Flk 1 陽性細胞⁴⁾や、マウス 7.5 日胚から単離したトロポモデュリン発現コロニーが内皮細胞に分化すること⁵⁾などが報告されている。浅原らは、ヒト末梢血中の CD 34 陽性細胞または Flk 1 陽性細胞群中に内皮細胞へ分化しうる細胞が存在することや⁶⁾、マウス骨髓中にも同様の細胞が存在し血管新生に貢献することを示し、成体内においても内皮前駆細胞と考えられる細胞群が存在することを明らかにしている。

また最近では、成体の骨格筋における幹細胞と考えられていたサテライト細胞が内皮細胞のマーカーである VE カドヘリンを発現していること⁷⁾や、骨髓中の造血幹細胞の一群と考えられていた SP(side population)細胞からも内皮細胞が分化できること⁸⁾、移植した c-kit 陽性造血幹細胞が血管内皮細胞ばかりでなく平滑筋細胞および心筋細胞に貢献しうること⁹⁾などが示され、血管内皮細胞の起源と分化様式はかなり多様であると考えられるようになってきた。

Flk 1 は、VEGF 受容体(VEGF-R 2)であること、他の内皮マーカーである flt-1(VEGF-R 1)、Tie-2、VE-カドヘリン(vascular endothelial cadherin)などより早期から発現が認められ側板中胚葉に発現してから内皮細胞に局限していくこと¹⁰⁾、ノックアウトマウスでは血島(blood island)の形成不全により、血球・内皮がともに分化しないこと¹¹⁾などが示され、内皮細胞の分化過程における最も早期のマーカーと考えられている。Flk 1 陽性細胞は、VE-カドヘリン、PECAM 1、CD 34 などの内皮細胞マーカーを順次発現しながら¹²⁾動静脈分化などの多様化も同時に行い、しだいに成

図2 マウス発生早期における血管細胞マーカーの発現と血管発生過程

熟した細胞に向かうと考えられる(図2)。

壁細胞(血管平滑筋細胞・ペリサイト)の起源

血管を構成するもう一つの主要な細胞成分である壁細胞については、その起源や分化の機構はあまり明らかにはなっていない。ニワトリとウズラのキメラを用いた検討などにより、大動脈起始部から頭部の血管平滑筋細胞は神経堤(neural crest)由来であることが示されている¹³⁾。また、冠動脈の血管平滑筋細胞は、心外膜と共通の前駆細胞(proepicardial cells)から分化することが報告されている¹⁴⁾。

他の壁細胞は、中胚葉由来の未分化間葉細胞から発生すると考えられているが、その正確な起源は不明である。また最近では、内皮細胞と同様に血管平滑筋細胞も、骨髓細胞¹⁵⁾や造血幹細胞に由来する⁹⁾との報告もなされてきている。

ES細胞を用いた血管構成細胞の分化誘導モデル

1. 2次元培養血管構成細胞分化モデル

ES細胞を用いた発生分化モデルとしては、従来浮遊培養によってつくられるcystic embryoid body (CEB: 胚様体)が広く用いられてきた。胚様体においてES細胞はおたがいに接着・集合しながら自発的に分化・増殖する。胚様体内に自律拍

動する心筋細胞が出現することは古くから観察されているし、細胞塊の内部には索状に張り巡らされた内皮細胞や血管平滑筋細胞が誘導されることが示されている。

胚様体の系は簡便に *in vitro* において細胞の分化誘導ができるため、さまざまな種類の細胞の分化誘導に頻用されている。しかし、① 胚様体内には常に目的細胞以外の複数種の細胞が混在し、そのなかから特定の細胞やシグナルを取り出して解析することが不可能である、② 3次元立体的構造をとっていることにより、顕微鏡下に個々の細胞の挙動や分化過程を観察することができない、③ 特に細胞1個からの分化誘導などsingle cellレベルでの分化誘導や解析は不可能である、④ 胚様体内の細胞はしばしば強固に接着し、目的細胞を取り出すことが困難になる、などの欠点があった。

フローサイトメトリーは、血液学、免疫学の基礎分野を中心に発展してきた技術であるが、表面抗原やGFPなどの標識蛋白を用いて種々の細胞群のなかから目的の細胞をよりわけ純化して集めることができる。そこで筆者らは、フィーダー細胞や胚様体の介在しない新しいES細胞の2次元培養分化誘導系とフローサイトメトリーの手法を組み合わせ、血管発生過程を検討できる新しいES細胞の*in vitro*分化誘導系を開発した^{12,16)}。

マウスES細胞は、LIF(leukemia inhibitory factor)の存在下にfeeder細胞なしでも未分化状態が維持される。このES細胞をLIFを加えない

図3 ES細胞を用いた *in vitro* 血管発生分化誘導系

LIF (leukemia inhibitory factor) 存在下に維持された未分化ES細胞をLIF非存在下に4型コラーゲン上で培養すると、培養4日後にFlk1陽性/E-カドヘリン(未分化ES細胞マーカー)陰性の細胞群が誘導されてくる。このFlk1陽性細胞をフローサイトメトリーにより高純度(95%以上)で純化・再培養し、Flk1陽性細胞からの血管構成細胞の分化を検討した。

条件でIV型コラーゲン上で培養しすると分化が誘導され、4日後にはFlk1陽性細胞が出現する。このES由来Flk1陽性細胞を抗Flk1抗体を用いたフローサイトメトリーにより純化(ソーティング)・再培養し血管構成細胞への分化を検討した(図3)。

Flk1は側板中胚葉のマーカーの一つと考えられるが、筆者らのES細胞由来のFlk1陽性細胞は、ソーティング直後には他の内皮マーカーの発現は陰性であり、側板中胚葉と同等の分化段階の細胞群と考えられた。このFlk1陽性細胞をVEGFおよび血清存在下にIV型コラーゲン上で培養すると、種々の内皮細胞マーカー(VE-カドヘリン、PECAM1、CD34、エンドグリリン、アセチルLDL取り込み)陽性の内皮細胞のシート状構造とともに、その周囲に平滑筋 α アクチン陽性の細胞が多数認められた(図4a~c)。

この平滑筋 α アクチン陽性細胞は、他の壁細胞マーカー(分化型血管平滑筋 α アクチン、PDGF-

β 受容体、平滑筋トロポミオシン、デスミン)陽性であり、未分化間葉細胞から壁細胞の系列に分化した細胞群と考えられた。Flk1の無血清培養にて分化誘導因子を検索したところ、内皮細胞はVEGF添加により誘導された。壁細胞は無血清でも少数認められたが、PDGF-BBの作用により増加した(図4d~f)。

これらの結果より、VEGF存在下にはFlk1の発現が維持され内皮細胞への分化が認められるが、VEGFが存在せずFlk1にシグナルが入らないとFlk1の発現は失われ内皮細胞は分化しない。このFlk1が陰性化した細胞群がPDGF-BBの作用により壁細胞として増殖すると思われた。これらの結果はVEGFやFlk1、PDGF-B/ β 受容体のノックアウトマウスの結果とよく合致する。Flk1陽性細胞の単一細胞培養において、内皮細胞、壁細胞の混在したコロニーを認め、Flk1陽性細胞が真に内皮/壁細胞へのbipotencyを有していることが明らかとなった。

図 4 Flk 1 陽性細胞からの血管構成細胞の分化

いずれも再培養 3~4 日目, a~c: 血清および VEGF 50 ng/mL, a: PECAM 1(紫色)/平滑筋 α アクチン(茶色), 二重染色, 内皮細胞のシート状構造と周囲を取り巻くアクチン陽性細胞を認める, b: 内皮細胞における DiI-アセチル LDL の取り込み, c: 分化型血管平滑筋 α アクチン(CGA 7)陽性細胞, d~f: Flk 1 陽性細胞無血清培養, d: PDGF-BB 10 ng/mL 添加, 平滑筋 α アクチン陽性細胞の増生を認める, e: VEGF 50 ng/mL 添加, PECAM 1 陽性内皮細胞シートが出現, f: PDGF-BB, VEGF 同時投与, 内皮細胞, 壁細胞双方の増生を認める, (Yamashita J et al., 2000¹⁾より改変)

図 5 Flk 1 陽性細胞の *in vitro* 3 次元培養による血管構造の再構成

培養 9 日目, コラーゲンゲル凍結切片の共焦点顕微鏡による検討

- a: VE-カドヘリン(赤)/平滑筋 α アクチン(緑)二重染色, 毛細血管に類似した壁細胞による支持を伴った内皮細胞によるネットワーク構造を認める,
b: VE-カドヘリン(赤)/平滑筋 α アクチン(緑)/CD 45(白血球系)・Ter 119(赤血球系マーカー)(青), 三重染色, 内皮細胞による管腔構造と壁細胞の支持(矢印), さらに管腔内に血球細胞(矢頭)を認める,

図 6 Flk 1 陽性細胞からの血管構成細胞の発生分化機構

未分化 ES 細胞から分化誘導された Flk 1 陽性細胞は、血管をつくることのできる血管前駆細胞である。すなわち、VEGF 存在下に Flk 1 陽性細胞は内皮細胞（および血球細胞）に分化し、一方、PDGF-BB や血清によっては壁細胞が誘導される。これらの誘導された血管構成細胞は、3 次元培養下や *in vivo* の血管新生に寄与し、血管の高次構造を形成しうる。（Yamashita J et al., 2000¹³より改変）

以上の結果より、Flk 1 陽性細胞は、血管内皮細胞と壁細胞の両方に分化可能であり、血管を構成する細胞の前駆細胞、すなわち血管前駆細胞ともいべき細胞群であると考えられた。

2. 3 次元培養 *in vitro* 血管形成モデル

さらに筆者らは、この Flk 1 陽性血管前駆細胞を用いて、3 次元的血管構造の再構成を試みた。内皮/壁細胞の相互作用の機会を増やすため、Flk 1 陽性細胞の細胞塊を胚様体生成と同様の方法で形成させたあと、コラーゲングル内で 3 次元的に培養すると、PECAM 1 陽性内皮細胞による管腔形成とともに管腔周囲への平滑筋 α アクチン陽性のペリサイトの接着が認められ（図 5 a）、Flk 1 陽性細胞から、*in vivo* の血管と同様の構造を *in*

vitro において 3 次元的に再構成しうることが示された。また、形成された血管の内腔にはしばしば血球細胞も認められた（図 5 b）。

卵黄嚢においては、hemangioblast が血島を形成したあと、辺縁部の細胞は内皮細胞に分化し、中心部の細胞は血球細胞に分化すると推定されている（図 1 B）。筆者らの Flk 1 陽性細胞塊の 3 次元培養は、この血島からの血管発生過程を *in vitro* において再現している可能性がある。以上の結果を中心に、血管構成細胞の分化過程をまとめると図のようになると考えられる（図 6）。

ES 細胞を用いた血管分化研究の意義

ES 細胞は全能性の分化能から再生医療の切り

札ともいわれ、臨床応用が注目されているが、ES細胞からの血管分化系は基礎面・臨床面の両方において意義を有すると考えられる。臨床面においては、当然のことながら血管再生治療への応用の可能性がある。

筆者らは現在までに、ニワトリ胎仔への Flk 1 陽性細胞の細胞移植実験、さらには担癌ヌードマウスへの移植により、この細胞が成体を含めた *in vivo* の血管新生過程においても、内皮細胞および壁細胞として貢献しうることも見いだしている。(万木ら投稿中) また、京都大学(中尾、伊藤ら)はわが国最初のヒト ES 細胞を用いた分化研究を血管をターゲットに開始している。現時点では、ヒト ES 細胞の臨床への応用は認められていないが、ES 細胞研究は、虚血性疾患に対する血管再生細胞治療ということだけでなく、体性幹細胞を用いた治療や遺伝子治療などにもその知見は応用可能であるし、さまざまな生体材料と血管前駆細胞を組み合わせることにより、新たな人工血管作製の細胞材料としての応用なども期待される。

一方、基礎面としては、ES 細胞を用いて生体内の構造や位置情報がないところで恣意的にシグナルを操作し、*in vitro* で血管の分化発生過程を再現することにより、これまでにない新しい視点で血管新生メカニズムを解析できる可能性が開けたと考えられる。すなわち、2 次元培養下に血管構成細胞の分化誘導ができることにより、分化過程を single cell レベルでも検討することが可能になる。培養条件を変化させたときの分化や増殖の変化を定量性を持って評価することができるなど、新たな分化研究の可能性が広がる。また、平島らが報告しているように、この ES 細胞由来内皮細胞はマウスストローマ細胞上でシート状構造を形成する¹²⁾。さまざまな分子を GFP などでも可視化した ES 細胞を用いて、ストローマ細胞上の内皮細胞をタイムラプスビデオで撮影することにより、さまざまな条件下での内皮細胞の振る舞い、すなわち、細胞増殖、遊走、接着などをリアルタイムで検討することができる。これらのシステムにより、薬剤・試薬の内皮細胞に対する効果をさまざまな側面からスクリーニングしたり、細胞分

化の過程を *in vitro* で生化学的に解析するという試みも可能になるかもしれない。

筆者らの分化系では、共通の前駆細胞(Flk 1 陽性細胞)と 2 種類の異なる分化した細胞(内皮細胞と壁細胞)が潤沢に高純度でしかも経時的に得られることにより、それぞれの細胞の分化過程における遺伝子発現プロファイルを作製し、血管分化関連遺伝子群をピックアップすることができる。それぞれの細胞群から蛋白を精製すれば蛋白発現プロファイルも作製可能であろう。さらに、3 次元の血管形成の過程までを *in vitro* で再現できていることにより、培養下における血管構築異常を指標として、得られた遺伝子群の機能解析を *in vitro* で行うことができるかもしれない。

すなわち、個々の細胞の分化だけでなく、細胞間相互作用による形態形成過程に関する解析という分化のつぎのステップに踏み込める可能性がある。それにより、これまでノックアウトマウスの表現型の解析に頼らざるをえなかった分化や高次構造形成過程に関与する遺伝子の機能解析を *in vitro* で簡便にスクリーニングできるようになる可能性がある。

このように ES 細胞を用いて系統的に目的の細胞を分化誘導することのできる系を構築することにより、ES 細胞による分化研究は大きな深まりをみせることができる。すなわち、胚様体を用いて“結果的に”ある細胞群が分化誘導された、ということだけでなく、分化のメカニズムの解析という“分化誘導のつぎ”の命題に答える方法論を提示することができる。そしてこの方法論は、血管分化にとどまらず、誘導されたあらゆる細胞群に対して適用可能であり、新たな細胞の分化誘導法が確立されるたびに即座にその細胞の分化機構の解析と連動して研究を進められることを意味する。

おわりに

このように、ES 細胞を用いることによりはじめてみえるようになると考えられることは数多くある。細胞の分化という現象を取り出して解析す

るうえで、ES細胞はやはり非常に強力なツールと考えられる。それは研究の基礎的部分である分子メカニズムから臓器再生という最終形まで、分化研究全般を幅広くカバーすることができる。臨床応用へのハードルが高いということで再生医学の分野からは時として疎んじられることのあるES細胞であるが、現在の体性幹細胞研究に多くみられる“どこそこからどれこれになる細胞が得られた”という形の論文ばかりが蓄積されても、分化や再生研究はあまり深みを増していくとは思えない。幹細胞や分化のシステムを細胞生物学や生化学のレベルにまでもってきて解析し、それぞれの現象に科学的根拠を与えていけるということが背景になれば、分化・再生の研究もすぐに頭打ちになってしまうであろう。

分化・再生研究を発展・成熟させるためには、ES細胞も体性幹細胞も、基礎的研究も臨床的応用も、すべて含んだ多角的多面的トライアルがなされることが大切であろうと思われる。そのなかで、ES細胞研究は確実に一つの重要な核となるであろう。

文 献

- 1) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M et al. : Nature 408 : 92-96, 2000.
- 2) Risau W : Nature 386 : 671-674, 1997.
- 3) Pardanaud L, Luton D, Prigent M et al. : Development 122 : 1363-1371, 1996.
- 4) Eichmann A, Corbel C, Nataf V et al. : Proc Natl Acad Sci USA 94 : 5141-5146, 1997.
- 5) Hatzopoulos AK, Folkman J, Vassilev E et al. : Development 125 : 1457-1468, 1998.
- 6) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. : Science 275 : 964-967, 1997.
- 7) De Angelis L, Berghella L, Coletta M et al. : J Cell Biol 147 : 869-877, 1999.
- 8) Jackson KA, Majka SM, Wang H et al. : J Clin Invest 107 : 1395-1402, 2001.
- 9) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. : Nature 401 : 701-705, 2001.
- 10) Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA et al. : Development 118 : 489-498, 1993.
- 11) Sharaby F, Rosant J, Yamaguchi TP et al. : Nature 376 : 62-66, 1995.
- 12) Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S et al. : Blood 93 : 1253-1263, 1999.
- 13) Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF : Development 128 : 1059-1068, 2001.
- 14) Mikawa T, Gourdie RG : Dev Biol 174 : 221-232, 1996.
- 15) Sata M, Saiura A, Kunisato A et al. : Nat Med 8 : 403-409, 2002.
- 16) Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M et al. : Development 125 : 1747-1757, 1998.
- 17) Gilbert SF : Lateral plate mesoderm and endoderm : in "Developmental Biology (6th)". SINAUER Associates, Sunderland, Massachusetts, 2000, p 482.