

ES細胞を用いた新しい構成的発生生物学による分化におけるゲノム機能の網羅的解析

●山下潤

京都大学再生医科学研究所

<研究の目的と進め方>

我々は、ES細胞（胚性幹細胞）を用いて血管および心臓の分化研究を行い、心血管分化過程を細胞レベルで経時的系統的に解析できる新しい分化システムを構築した(Nature, 2000; FASEB J, 2005)。本研究は、ヒトを含めた哺乳動物の発生及び細胞分化過程を構成的に再現し、その過程におけるゲノム機能のダイナミズムを細胞レベルで解析・提示できる新たな研究基盤の構築を目的とする。研究期間内においては、1) 我々の新しいES細胞分化系を用いた心血管細胞分化過程における細胞レベルでの遺伝子プロファイルの作製、2) 心血管分化における機能遺伝子の網羅的同定、3) 同機能遺伝子群による構成的細胞分化の再現を行う。また、4) 分化過程におけるゲノム構造変遷の可視化と5) 同定遺伝子発現制御機構の解析により、個々の細胞分化におけるゲノム機能の経時的系統的解析を試みる。さらには6) ヒトES細胞を用いた構成的ヒト発生学の構築を試みる。正常発生から何かを壊すことによりその意義を検討する遺伝子改変動物研究に対し、本研究は、細胞そのものを作り出すことによる構成的な(constructive)発生生物学である。モデル生物とは異なるモードの新たなゲノム解析のソースを提供し解析できることにより、ゲノム機能の複眼的理解をもたらすことができる。

<2007年度の研究の当初計画>

我々は従来よりES細胞を用いた心血管分化再生研究を進めてきている。我々の構築した分化システムでは、Flk1陽性前駆細胞から、心血管系細胞の分化・多様化過程を系統的構成的に再現することが可能である。遺伝子発現解析に関しては、種々の分化段階のES細胞由来細胞群を用いて、ES細胞分化過程における遺伝子プロファイル作りを行っている(チップ: Affymetrix; 解析ソフト: eXintegrator, CDB, 理研及び Genespring, Silicon genetics 社)。同定遺伝子の機能解析に関しては、ES細胞において任意の分化段階においてshRNAを発現し、標的遺伝子の発現を阻害できるES細胞対応の遺伝子解析システムを構築している。すなわち、

- 1) 動静脈内皮細胞の分化誘導と純化：研究代表者らのES細胞心血管分化系を用いて、動静脈内皮細胞を分化誘導し純化することに成功した。すなわち、アドレノメデュリン及びサイクリックAMPが分化途上の内皮細胞においてNotchシグナルを活性化すること、VEGF, Notch, サイクリックAMPの3者が動脈内皮細胞誘導に独立して必要であること、及びこれら3者によりFLk1陽性前駆細胞から動脈内皮細胞を構成的に誘導できることを示した。
- 2) リンパ管内皮細胞の分化誘導と純化：Flk1陽性細胞をマウスストロマ細胞株OP9細胞上で培養するとリンパ管マーカーprox1陽性のリンパ管内皮細胞が誘導された。これらの成果により、動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれ系統的構成的に分化誘導し、分化過程における遺伝子プロファイル作製と動静脈リンパ管分化機構の解析が可能となった。
- 3) 誘導性shRNA発現ES細胞による遺伝子機能解析系の構築：

テトラサイクリン誘導性shRNA発現ES細胞を構築した。同システムを用いて、ES細胞分化系を用いて分化における遺伝子機能を分化ステージ特異的に解析することが可能になった。

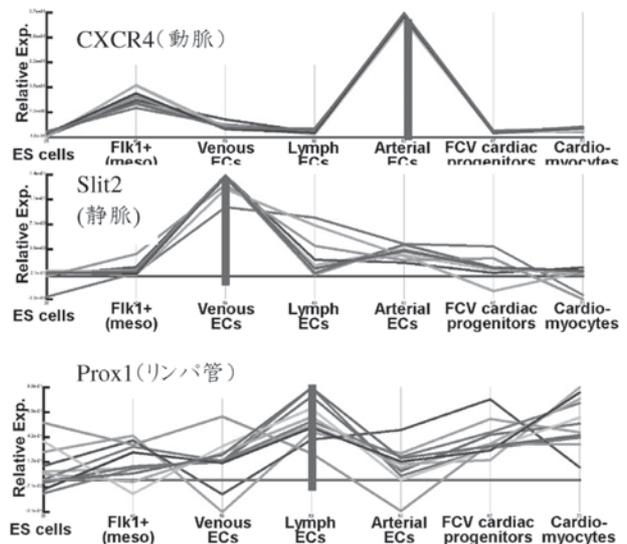
- 4) ES細胞を用いた心血管分化過程遺伝子プロファイルの作製：未分化ES細胞、Flk1+中胚葉細胞、動静脈リンパ管血管内皮細胞、心筋前駆細胞、心筋細胞を用いて遺伝子プロファイルを作製した。

2007年度は、昨年度までに構築した動静脈リンパ管及び心筋分化誘導システムを用いて、

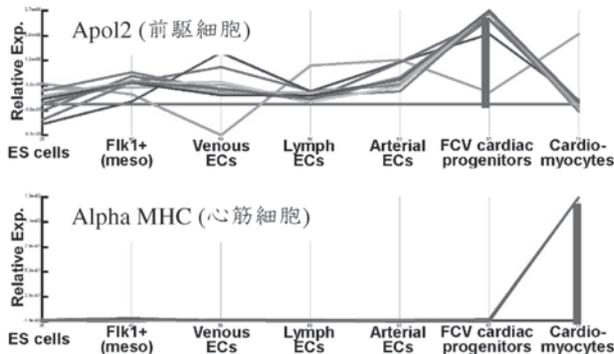
- 1) 心血管分化における遺伝子プロファイルの作製：既に構築した血管分化過程における遺伝子プロファイルに加えて、
 - i) 心筋分化過程における遺伝子発現プロファイル作製
 - ii) 心筋多様化過程における遺伝子発現プロファイル作製
 - iii) 動静脈分化における遺伝子発現プロファイル作製
 を行い心血管分化多様化遺伝子候補を網羅的に同定する。
- 2) 同定候補遺伝子からの機能遺伝子の同定
 - i) 誘導性shRNAを用いた遺伝子機能阻害実験
 - ii) 誘導性遺伝子発現による候補遺伝子過剰発現実験
 - iii) i) ii) による遺伝子発現抑制-レスキュー実験系の構築
- 3) 同定機能遺伝子による構成的心血管分化の再構築
- 4) DNAメチル化の網羅的解析 を当初計画とした。

<2007年度の成果>

- 1) 心血管分化過程における遺伝子プロファイル作製
 - i) 動静脈分化における遺伝子プロファイルの作製
 2006年我々はES細胞から動静脈リンパ管内皮のすべてを分化誘導することに世界で初めて成功した。誘導した動静脈リンパ管内皮細胞を純化し遺伝子発現プロファイルを作製した。eXintegrator(理研)を用いた解析により、数々の動静脈リンパ管内皮特異的遺伝子を同定した(下図に例示)。



- ii) 心筋分化における遺伝子プロファイルの作製
2005年に我々が同定した新しい心筋前駆細胞 (FCV 細胞) を加えて心筋分化過程における遺伝子プロファイルを作製し、心筋及び心筋前駆細胞特異的遺伝子群を同定した (下図)。



- 2) 心筋ペースメーカー細胞分化機構の解析
ES細胞由来自己拍動心筋と拍動停止心筋細胞におけるイオンチャネルの発現及び機能を検討し、HCNチャネルとT型Caチャネルが心筋自動能の維持に必須であることを明らかにした (Yanagi, Stem Cells, 2007)。
- 3) タモキシフェン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞システムの構築
Cre-loxP システムとエストロゲン受容体-Cre 融合タンパクを用いたタモキシフェン誘導性 shRNA 発現系を ES 細胞に導入した新しい遺伝子機能阻害実験系を構築している。先のテトラサイクリン誘導性 shRNA 発現系より効果が強い予備的結果を得ている。
- 4) ヒト ES 細胞を用いた血管分化誘導システムの構築
ヒト ES 細胞を用いて、マウス ES 細胞と同様の系統的血管細胞分化システムを構築し、ヒト ES 細胞においても血管分化過程の細胞レベルでの解析が可能となった (Sone, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007)。
- 5) マウス人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた心血管分化誘導システムの構築
2006年に報告されたマウス iPS 細胞を用いて、ES 細胞と同様の心血管分化誘導システムを構築し、iPS 細胞を用いた分化再生研究を可能にした (投稿中)。
- 6) ヒト iPS 細胞を用いた心血管分化誘導
2007年に報告されたヒト iPS 細胞を用いた心血管細胞分化実験を開始している。

<国内外での成果の位置づけ>

- 1) 動静脈リンパ管内皮のすべてを ES 細胞から分化誘導することに成功しているのは研究代表者のグループのみであり、その遺伝子プロファイルの解析は本例以外に報告はない。多数の動静脈リンパ管内皮特異的遺伝子群をもとに、血管選択的血管再生や特異的血管リンパ管抑制によるがん治療など新しい臨床応用の可能性が生まれると考えられる。
ES 細胞由来心筋前駆細胞は、研究代表者らが 2005 年に初めて報告し、2006 年に Cell などに相次いで報告された。心筋前駆細胞を含めた心筋分化遺伝子プロファイルの報告はない。
- 2) ES 細胞由来心筋細胞のペースメーカーや心室筋などの多様化機構はほとんど明らかになっていない。特異的心筋細胞が誘導でき、その遺伝子プロファイルなどを通じて多様化機構が解析されれば新たな心筋再生法の開発につながると考えられる。

- 3) Cre-loxP システムによる shRNA 発現 ES 細胞の報告はすでにあるが、薬剤 (タモキシフェン) を用いて分化途上において誘導性に発現させるシステムの報告はない。
- 4) ヒト ES 細胞からの系統的分化誘導システムは、研究者らのマウスシステムを援用した同様のシステムが 2007 年に同様のものが Circ Res 誌に報告されている。
- 5) マウス iPS 細胞を用いた心血管細胞分化に関する報告はいまだなされていない。マウス ES 細胞において構築した方法により、完全にマウス iPS 細胞の分化が再現できる。
- 6) ヒト iPS 細胞を用いた分化実験はいまだ報告はない。従って、これらの成果はいずれも世界的にも先端的である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

- 1) 遺伝子発現抑制-レスキューシステムの構築: HPRT 遺伝子座への標的 cDNA 導入システムの構築に難渋した。新たなノックインベクターを再構築することにより、現在改善が認められている。
- 2) 心血管分化機能遺伝子の同定: 上記レスキューシステムの構築が遅れたため、候補遺伝子の機能解析が進まなかった。

<今後の課題>

- 1) 上記ノックダウン-レスキューシステムの構築に基づく分化機能遺伝子の同定: 効率的機能解析による網羅的同定を可能とする (50-100 以上の候補遺伝子の解析を目指す)。
- 2) ヒト ES 細胞および iPS 細胞への実験システムの展開: ヒト心血管細胞分化におけるゲノム機能の解析とその再生医療応用及びゲノム研究の社会還元を目指す。

<成果公表リスト>

- 1) 論文/プロシーディング
- 0801251841 Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor β . J Appl Physiol, 2008 Jan 10; [Epub ahead of print]
 - 0801251837 Yanagi K, Takano M, Narazaki G, Uosaki H, Hoshino T, Yamashita JK*. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and T-type calcium channels confer automaticity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Stem Cells, 25: 2712-2719, 2007.
 - 0801251827 Sone 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 SI, Nakao K. A pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 27: 2127-2134, 2007.
 - 0708071609 Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. Trends Cardiovasc Med, 17: 59-63, 2007. (研究室ホームページ)
URL: <http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/es02/main-j.htm>