

新しい ES 細胞分化システムを用いた細胞分化におけるゲノム機能の系統的解析

●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、胚性幹 (ES) 細胞を用いた心血管分化研究を行ってきた。すなわち、ES 細胞から Flk1 陽性の中胚葉レベルの細胞を分化誘導し、そこから血管を分化誘導する新しい分化誘導系を開発した (Nature, 2000)。さらに同システムを用いて新しい心筋前駆細胞の同定 (FASEB J, 2005) とペースメーカー機能の解析 (Stem Cells, 2007) 及び動脈脈リンパ管内皮細胞の系統的誘導に成功した (2 x Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006)。これらの成果により、広汎な心血管系細胞の分化多様化過程を培養下に再現することが可能な新しい系統的細胞分化発生システムが構築された。さらに ES 細胞における新しい遺伝子機能解析系も構築した (Biochem Biophys Res Commun, 2006)。現在心血管細胞分化過程における遺伝子プロファイルを作製している。またヒト ES 細胞の心筋及び血管細胞分化に成功した。本研究は、同 ES 細胞心血管分化系をモデルとして細胞分化をゲノムレベルで解析し理解することを目的とする。研究期間内においては、1) 心血管分化多様化過程における遺伝子プロファイル作製。2) 分化段階特異的遺伝子の機能解析。3) ヒト ES 細胞における実験システム構築。4) 恣意的遺伝子操作による細胞形質と遺伝子発現パターン変化の相関解析。5) メチル化 DNA の網羅的解析。これら 5 項目の研究により、ヒトを含めた細胞分化におけるゲノム機能とその意義を包括的に明らかにする。

<2008 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。現在では、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することの出来る ES 細胞対応の shRNA 発現システムを構築している。

2008 年度は、昨年度までに構築した動脈脈リンパ管及び心筋分化誘導システムを用いて、

- 1) DNA チップを用いた心血管細胞分化特異的遺伝子群の網羅的同定: 未分化 ES 細胞から心血管細胞に至る様々な分化段階の細胞を誘導・純化し Affymetrix 社の Genechip を用いて遺伝子プロファイルを作製し、それぞれの細胞群特異的発現を示す遺伝子群を網羅的に同定する。
- 2) 誘導性 shRNA 発現 ES 細胞を用いた候補遺伝子の機能解析: ES 細胞対応 shRNA 発現システムを用い候補遺伝子の機能解析を行う。誘導性 cDNA 過剰発現の効果も合わせて検討する。

3) ヒト ES 細胞を用いた心血管分化システムの構築: ヒト ES 細胞の心血管分化系をマウス同様の詳細な解析が可能なモデルへと発展させ、種々の細胞群を用いた DNA チップ解析を行う。

4) 恣意的遺伝子操作による細胞形質と遺伝子発現パターン変化の相関解析: 同定した遺伝子を発現操作しながら分化誘導し、遺伝子プロファイルと細胞形質を相互参照し解析する。種々の遺伝子に関して同様の解析を繰り返し、特定の形質発現に必要な遺伝子群の重要度をスコア化する。

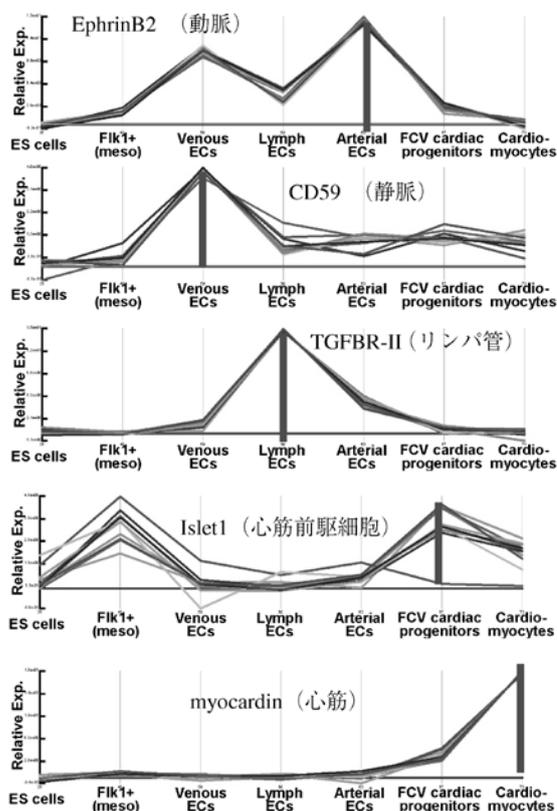
5) iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究: 1) - 4) の研究をマウス及びヒト iPS 細胞にも拡張し新しい心血管分化解析システムを構築する。

以上 5 項目の研究を行い、心血管細胞分化過程におけるゲノム機能の包括的理解を目指す。

<2008 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

2005 年 2006 年の新しい心筋前駆細胞 (FCV 細胞) の同定と動脈脈リンパ管内皮細胞の分化誘導の成果を加えて心血管分化多様化過程における遺伝子プロファイルを作製した (下図)。



下に特異的発現を示す遺伝子の例を示す。

2) タモキシフェン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞システムの構築

2006年に我々は、テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞を構築し、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できることを示した(Hiraoka-Kanie, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006)。また、テトラサイクリン誘導性(tet-OFF) cDNA 発現システムも ES 細胞において構築していたが、今回新たに、shRNA によるノックダウンと cDNA 発現の両方を独立して行うことが可能な新しいノックダウンレスキューシステムを構築するため、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た。ES 細胞分化途上においてタモキシフェン誘導性に中胚葉マーカー Flk1 遺伝子に対する shRNA を発現させることにより、Flk1 陽性中胚葉の誘導を阻害することに成功している。

3) 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)。下肢虚血動物モデルへの移植実験においても効果が得られている(Yamahara, *PLoS One*, 2008)。

4) 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 細胞に対して、我々が構築してきたマウス ES 細胞分化システムを導入し、マウス ES 細胞と同様に系統的な心血管分化誘導に成功した(Narazaki, *Circulation*, 2008)。マウス ES 細胞において誘導された動脈リンパ管内皮細胞、心筋前駆細胞をはじめ、これまで誘導可能であった心血管細胞が全て誘導可能となった。同システムを構築することにより、iPS 細胞を新たな解析材料とした心血管分化再生に関するゲノム研究への展開を可能にした。

5) 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。すでに自己拍動する機能的な心筋細胞の誘導に成功している。

<国内外での成果の位置づけ>

- 1) 動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) 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。
- 3) 任意の遺伝子の shRNA によるノックダウンと同遺伝子 cDNA 発現のレスキューが可能な ES 細胞システムは未だ報告はない。
- 4) マウス iPS 細胞を用いた心血管細胞分化に関する報告はまだ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。

- 5) ヒト iPS 細胞を用いた分化実験ははまだ報告はない。
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。現在、マウス ROSA26 領域に FRT 配列を導入し Flp-in recombinase システムにより、ROSA locus に遺伝子を導入するシステムを構築している。
- 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) iPS 細胞に関して心血管分化における遺伝子プロファイルを作製し、マウス ES 細胞と比較検討する。現在生殖細胞系列コンピテント iPS 細胞、肝臓由来 iPS 細胞、胃由来 iPS 細胞、プラスミドによる iPS 細胞など種々の iPS 細胞を用いて分化誘導と遺伝子プロファイル作りを進めている。
- 2) 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)。
- 3) 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
 1. 0901132005 Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamana S, Yamashita JK*. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 118: 498-506, 2008
 2. 0901132011 Nakao Y*, Narazaki G, Hoshino T, Maeda S, Yoshida M, Maejima H, Yamashita JK*. Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 18: 2982-2984, 2008
 3. 0901132016 Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Nakao K. Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cell-derived endothelial and mural cells. *PLoS One*, 3: e1666, 2008
 4. 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 [beta]. *J Appl Physiol*, 104: 766-772, 2008

(研究室ホームページ)

URL: <http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/es02/main-j.htm>