



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	胚性幹細胞を用いた血管形成メカニズムの解明
Author(s)	田村-辻, 潔美; 田村, 正人
Citation	北海道歯学雑誌, 37(2), 173-176
Issue Date	2017-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/65513">https://hdl.handle.net/2115/65513</a>
Type	journal article
File Information	37-02_10_tamura-tsuji.pdf



## 最新の歯学

## 胚性幹細胞を用いた血管形成メカニズムの解明

## Vascular development from embryonic stem cells

北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 口腔分子生化学教室

田村-辻 潔美 田村 正人

## はじめに

血管形成は、血管内皮細胞が増殖・分化し、出芽・伸長・分岐・管腔形成といった複雑な形態変化を経て進行する。その後、血管内皮細胞の外側を血管壁細胞が取り囲むことで成熟した血管となる。

胚性幹細胞（ES細胞）は、浮遊培養を行うと細胞が集合して胚様体と呼ばれる細胞凝集塊を形成する。この胚様体の中では、血管内皮細胞を含めた様々な種類の細胞分化や細胞間相互作用が起こる。そのため細胞・組織レベルでの発生過程のモデルとして解析されている<sup>1, 2)</sup>。OP9細胞は、マクロファージ刺激因子（M-CSF）に遺伝子異常を持つ骨大理石病マウス（op/opマウス）の新生仔の頭蓋冠から樹立されたストローマ細胞株であり、高い造血支持能を持つ<sup>3)</sup>。このOP9細胞をフィーダー細胞としてES細胞と共培養することで、血液細胞だけでなく血管細胞（血管内皮細胞、血管壁細胞）への効率的な分化誘導を行うことができる。また、タイプIVコラーゲンをコートしたプレートを用いることで、ES細胞から血管・血液細胞への無フィーダー培養系による分化誘導が可能である<sup>4)</sup>。本稿では、血管細胞の増殖・分化と血管形成プロセスについて、ES細胞を用いた研究を中心に紹介する。

## 血管・血液細胞の細胞系譜

血管内皮細胞増殖因子（VEGF）は、血管内皮細胞の増殖をはじめとして、多くの血管形成プロセスの調節に関与する因子である。中胚葉および血管前駆細胞はVEGFの受容体の一つVEGFR2（KDR/Flk1）を発現している。VEGFの結合によって、VEGFR2のダイマー形成、自己リン酸化が起こり、その下流のシグナル伝達経路が活性化し、細胞増殖・分化等が促進される。マウスES細胞の分化誘導によって、VEGFR2陽性の血管前駆細胞が出現する。細胞系譜の追跡によって、この血管前駆細胞から、CD31・VE-cadherin陽性の血管内皮細胞と $\alpha$ SMA・desmin陽性の血管壁細胞が分化することが明らかになっている<sup>4)</sup>。血管前駆細胞からの血管内皮細胞の分化は、VEGFの投与によって増加する。一方、上皮細胞、間葉系

細胞等の増殖や遊走に関与する因子である血小板由来増殖因子PDGF-BBの投与は、血管前駆細胞からの血管壁細胞への分化を促進する<sup>4)</sup>。またヒトES細胞の分化誘導によって、血管細胞分化の初期にTGF $\beta$ 1シグナルを阻害すると、血管内皮細胞の出現割合が増大することが報告されている<sup>5)</sup>。TGF $\beta$ 1は、Smad3とストレス応答性の転写因子ATF3を介して、細胞分化や増殖停止の阻害に働く転写因子であるId1を抑制している<sup>6)</sup>。そのためTGF $\beta$ 1シグナルの阻害によってId1が活性化することで、血管内皮細胞の増殖能が維持されることが考えられる。

血液細胞は造血幹細胞から分化するが、この造血幹細胞は、胎児期の造血性内皮細胞から出現する。筆者らは、マウスES細胞由来のVE-cadherin陽性の血管内皮細胞の一部に、CD41とCXCR4を同時に発現している細胞が存在しており、このVE-cadherin・CD41・CXCR4陽性細胞が、血管内皮細胞と血液細胞の両方に分化できる能力（二分化能）を持つ造血性内皮細胞であることを突き止めた<sup>7)</sup>。CXCR4はケモカインCXCL12の受容体であり、CXCL12がCXCR4に結合し、その下流シグナルが働くことで、血管内皮細胞への成熟が抑制され、造血性内皮細胞の二分化能が保存されることが考えられる。以上のように、ES細胞の分化誘導系を用いた解析によって、細胞系譜の追跡、細胞運命の決定メカニズムの解明が行われている<sup>8)</sup>。

## 血管内皮細胞の分化調節

Mef2は、血管の発達に重要な転写因子ファミリーの一つであり、Mef2cの欠損は胎生初期において血管形成の異常を引き起こす<sup>9)</sup>。De Valらは、Mef2c遺伝子から44bpの血管内皮細胞に特異的なエンハンサー（F10-44）を同定した<sup>10, 11)</sup>。F10-44は、フォークヘッド転写因子であるFoxc2とEtsファミリーに属する転写因子Etv2が結合するサイト“FOX:ETSモチーフ”を持ち、このFOX:ETSモチーフは、Mef2cの他にも、VEGFR2、Tie2、Tall1、Notch4、VE-cadherin等の血管内皮細胞の分化に関係する複数の遺伝子に存在する。そのため、フォークヘッドとEtsの2つの転写因子は、FOX:ETSモチーフを介して、血管内皮細胞に特異的な遺伝子群の発現を協調的に制御していると

考えられる。筆者らは、マウスES細胞を用いた細胞系譜の追跡によって、F10-44エンハンサーがVEGFR2陽性の血管前駆細胞で活性化していることを報告している<sup>12)</sup>。その後、分化したVE-cadherin陽性の血管内皮細胞では、血管前駆細胞の時期から継続してF10-44の活性化が見られるが<sup>12)</sup>、一方、同じく血管前駆細胞から分化した $\alpha$ SMA陽性の血管壁細胞ではF10-44の活性は消失している（未発表データ）。これらの知見は、F10-44の活性化が血管内皮細胞系譜に特異的であることを示している。しかし血管前駆細胞と血管内皮細胞の各分化段階において、同じ転写因子が作用するのか、また、血管壁細胞分化への切り替えはどのように決定されるのかは今後の課題である。

### 血管内皮細胞の形態調節

OP9細胞は低濃度のVEGFを産生している。OP9細胞と共培養したマウスES細胞由来の血管内皮細胞は、低濃度VEGFの刺激によって増殖・分化し、円形のコロニーを形成する<sup>13)</sup>。野生型の血管内皮細胞コロニーは、高濃度VEGFの外因性投与によって、円形から血管様の伸張形態に変化する。一方、フォークヘッド転写因子Foxo1を欠損したES細胞由来の血管内皮細胞は、高濃度のVEGFを投与しても伸張形態を示さない<sup>14, 15)</sup>。

VEGFR2陽性の血管前駆細胞を凝集させ、タイプIコラーゲンに3次元的に包埋し、高濃度VEGFの存在下で培養すると、血管内皮細胞はコラーゲンゲル内で血管様チューブ構造を形成し、その後、血管壁細胞によって被覆される<sup>4)</sup>。しかしFoxo1欠損型では、血管内皮細胞は太くて短い異常な構造を形成し、血管壁細胞による被覆も見られないことを、筆者らは明らかにしている<sup>12, 16)</sup>。Foxo1の欠損は、マウスにおいて心血管系の形成異常を示し胎生致死を引き起こすことが報告されている<sup>14)</sup>。Foxo1欠損ES細胞の血管内皮細胞への分化能とコロニー形成能は野生型と同程度であり、また血管壁細胞にも異常は見られない。そのため、Foxo1欠損マウスの表現系には、血管内皮細胞の伸張機能の異常が関与していると考えられる。

血管の出芽において、VEGFR2の活性は、先端に位置する細胞（先端細胞/Tip cell）では高く、それに続く細胞（茎細胞/Stalk cell）では低下している。マウスES細胞を用いた3次元培養系において、血管内皮細胞に特異的な脱リン酸化酵素であるVE-PTPを欠損した血管内皮細胞は、VEGFR2の活性化が亢進し、細胞極性の異常が見られ、また内腔構造を形成しないことが報告されている<sup>17)</sup>。VE-PTPは茎細胞において、VEGFによるVEGFR2の活性化に拮抗して、アンジオポエチン受容体Tie2を介したVEGFR2の脱リン酸化を行うことで、細胞極性の維持と血管内腔の形成に関与していると考えられる。

### 血管形成の誘導

近年、損傷を受けた組織・臓器の回復のための再生医療への関心が高まっており、強力な血管新生誘導因子としてVEGFの血管再生への応用が試みられている<sup>18, 19)</sup>。しかし、高濃度のVEGFの投与は血管透過性を亢進させるため、浮腫等の副作用が問題となっている<sup>20, 21)</sup>。またVEGFを過剰発現した筋芽細胞の移植実験から、局所的な高濃度VEGFは血管腫を誘導する可能性が指摘されている<sup>22)</sup>。

筆者らは、マウスES細胞を用いた血管形成モデルによって、PI3K/Aktシグナル、またはmTORC1シグナルを阻害することで、低濃度VEGF環境でも血管伸張を誘導できること報告している<sup>23)</sup>。PI3K/AktシグナルはFoxo1の核外移行を促進することで、その転写活性を抑制する。血管伸張の調節においてもPI3K/Aktで制御されるFoxo1依存的な調節経路が働くと考えられる。Foxo1欠損型の血管内皮細胞は、高濃度VEGFに対する伸張応答を失っている。しかし、mTORC1シグナルを阻害することで、Foxo1欠損型の伸張機能を回復することができる。mTORC1は、アクチンのリモデリングを調節するmTORC2を抑制している。そのためmTORC1シグナルを阻害することでmTORC2の活性が亢進し、Foxo1非依存的かつmTORC2依存的に血管伸張が誘導されると考えられる。これら2つの血管伸張の調節メカニズムの発見は、高濃度VEGFの副作用を回避して血管形成を誘導する新たな治療方法の開発につながるかと期待される。

### おわりに

最近、ラット心筋梗塞モデルにおいて、ヒトiPS細胞から分化された心筋細胞、血管内皮細胞、血管壁細胞の3種を組み合わせた細胞シートの移植によって、心臓の収縮機能が回復することが報告された<sup>24)</sup>。長期間の生着が見られた移植部位では、宿主由来の血管新生が観察されており、組織再生の成功には既存の組織と新しい組織を結ぶ血管ネットワークの形成が必要不可欠であると考えられる。再生医療が現実のものとなってきている現在、組織再生の過程における血管形成コントロールの重要性は益々大きくなっている。血管形成の基礎的理解と、血管再生への応用のためにさらなる研究が望まれる。

### 参考文献

- 1) Wang R, Clark R, Bautch VL : Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels : an in vitro model of blood vessel development, *Development* 114 : 303-316, 1992.
- 2) Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E : Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells

- through successive maturation steps, *Blood* 88 : 3424-3431, 1996.
- 3) Kodama H, Nose M, Niida S, Nishikawa S, Nishikawa S : Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells, *Experimental hematology* 22 : 979-984, 1994.
  - 4) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors, *Nature* 408 : 92-96, 2000.
  - 5) James D, Nam HS, Seandel M, Nolan D, Janovitz T, Tomishima M, Studer L, Lee G, Lyden D, Benezra R, Zaninovic N, Rosenwaks Z, Rabbany SY, Rafii S : Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent, *Nature biotechnology* 28 : 161-166, 2010.
  - 6) Kang Y, Chen CR, Massague J : A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells, *Mol Cell* 11 : 915-926, 2003.
  - 7) Tanzir A, Tsuji-Tamura K, Ogawa M : CXCR4 signaling negatively modulates the bipotential state of hemogenic endothelial cells derived from embryonic stem cells by attenuating the endothelial potential, *Stem cells* : 2016 (in press).
  - 8) Tan KS, Tamura K, Lai MI, Veerakumarasivam A, Nakanishi Y, Ogawa M, Sugiyama D : Molecular pathways governing development of vascular endothelial cells from ES/iPS cells, *Stem Cell Rev* 9 : 586-598, 2013.
  - 9) Lin Q, Lu J, Yanagisawa H, Webb R, Lyons GE, Richardson JA, Olson EN : Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development, *Development* 125 : 4565-4574, 1998.
  - 10) De Val S, Anderson JP, Heidt AB, Khiem D, Xu SM, Black BL : Mef2c is activated directly by Ets transcription factors through an evolutionarily conserved endothelial cell-specific enhancer, *Developmental biology* 275 : 424-434, 2004.
  - 11) De Val S, Chi NC, Meadows SM, Minovitsky S, Anderson JP, Harris IS, Ehlers ML, Agarwal P, Visel A, Xu SM, Pennacchio LA, Dubchak I, Krieg PA, Stainier DY, Black BL : Combinatorial regulation of endothelial gene expression by ets and forkhead transcription factors, *Cell* 135 : 1053-1064, 2008.
  - 12) Tsuji-Tamura K, Sakamoto H, Ogawa M : ES Cell Differentiation as a Model to Study Cell Biological Regulation of Vascular Development, in : C.S. Atwood (Ed.) *Embryonic Stem Cells : The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis*, InTech 2011, pp. 581-606.
  - 13) Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S, Matsuyoshi N, Nishikawa S : Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis, *Blood* 93 : 1253-1263, 1999.
  - 14) Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, Motoyama N, Mori N : Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice, *J Biol Chem* 279 : 34741-34749, 2004.
  - 15) Matsukawa M, Sakamoto H, Kawasuji M, Furuyama T, Ogawa M : Different roles of Foxo1 and Foxo3 in the control of endothelial cell morphology, *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 14 : 1167-1181, 2009.
  - 16) Park SH, Sakamoto H, Tsuji-Tamura K, Furuyama T, Ogawa M : Foxo1 is essential for in vitro vascular formation from embryonic stem cells, *Biochemical and biophysical research communications* 390 : 861-866, 2009.
  - 17) Hayashi M, Majumdar A, Li X, Adler J, Sun Z, Vertuani S, Hellberg C, Mellberg S, Koch S, Dimberg A, Koh GY, Dejana E, Belting HG, Affolter M, Thurston G, Holmgren L, Vestweber D, Claesson-Welsh L : VE-PTP regulates VEGFR2 activity in stalk cells to establish endothelial cell polarity and lumen formation, *Nat Commun* 4 : 1672, 2013.
  - 18) Jabbarzadeh E, Starnes T, Khan YM, Jiang T, Wirtel AJ, Deng M, Lv Q, Nair LS, Doty SB, Laurencin CT : Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 : 11099-11104, 2008.
  - 19) Chung JC, Shum-Tim D : Neovascularization in tissue engineering, *Cells* 1 : 1246-1260, 2012.
  - 20) Rissanen TT, Korpisalo P, Markkanen JE, Liimatainen T, Orden MR, Kholova I, de Goede A, Heikura T, Grohn OH, Yla-Herttuala S : Blood flow remodels growing vasculature during vascular endothelial growth factor gene therapy and determines between capillary arterialization and sprouting angiogenesis, *Circulation* 112 : 3937-3946, 2005.

- 21) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF : Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science* 219 : 983-985, 1983.
- 22) Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM : Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis, *J Clin Invest* 113 : 516-527, 2004.
- 23) Tsuji-Tamura K, Ogawa M : Inhibition of the PI3K/Akt and mTORC1 signaling pathways promotes the elongation of vascular endothelial cells, *J Cell Sci* 129 : 1165-1178, 2016.
- 24) Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, Fukushima H, Marui A, Katayama S, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK : Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration, *Sci Rep* 4 : 6716, 2014.