

平成 23 年 11 月 10 日  
筑波大学

## 循環器前駆細胞において Flk1 遺伝子が誘導される

### 分子機構を解明

発表者	筑波大学大学院	人間総合科学研究科	講師	依馬 正次
	筑波大学大学院	人間総合科学研究科		石飛 博之
	筑波大学大学院	人間総合科学研究科	教授	高橋 智

このたび、筑波大学大学院・人間総合科学研究科の研究グループ（研究代表者、依馬正次）は血管内皮増殖因子(VEGF: vascular endothelial growth factor)の受容体である Flk1 遺伝子の新規エンハンサーを同定し、その機能を明らかにしました。

Flk1 は、VEGF 受容体の 1 つであり、血管内皮細胞の分化過程における最初期のマーカーとして知られています。また、胚性幹細胞を分化させた時に出現する Flk1 陽性細胞は血球・血管内皮・平滑筋・心筋細胞へ分化すると、複数のグループから報告されていることから、Flk1 陽性細胞は心血管系疾患の移植細胞源として期待されています。実際に、再生医療研究において注目を浴びる iPS 細胞を循環器組織へ分化誘導させる際にも Flk1 陽性細胞が用いられています。しかし、このような多分化性中胚葉細胞の機能発現に必要な Flk1 の発現制御機構は不明な点が多く、どのような転写因子によって Flk1 が活性化されるのか殆ど分かっていませんでした。

本研究成果の重要性は以下の 3 点にまとめられます。

- ① Flk1 の最初期の発現を再現することができるエンハンサーを同定し Distal Multipotent Mesoderm Enhancer (DMME) と名付けました。DMME を用いたトランスジェニックマウス、ES 細胞を作製し、分化誘導を行ったところ、血球・血管内皮・平滑筋・心筋細胞の産生が認められた。
- ② DMME を欠損したマウスでは、Flk1 の初期の発現が低下した。同じく ES 細胞においては血球・血管内皮細胞の前駆細胞であるヘマンジオブラストの産生能が顕著に低下した。
- ③ DMME に結合する複数の転写因子を同定した。実験結果から、Flk1 の最初期の発現はこれらの因子が協調して働く必要性が示唆された。

なお、これらの研究成果は英国の国際誌、ディベロップメント (*Development*) に掲載される予定です。

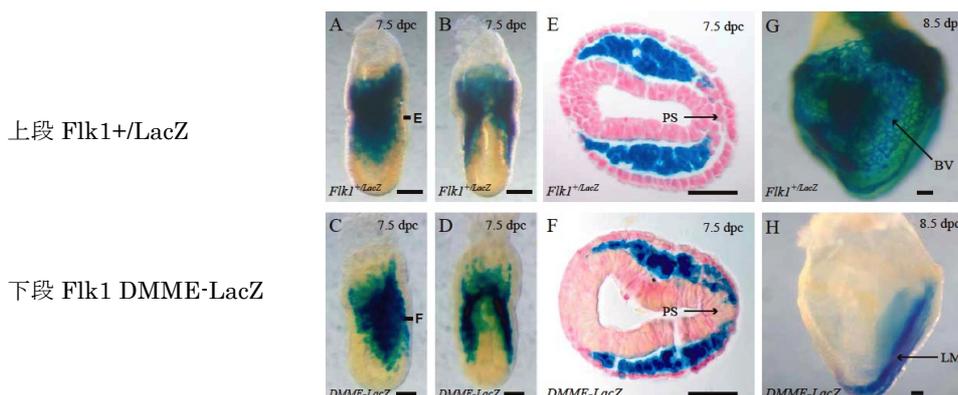
## <研究の背景>

マウス胚や胚性幹 (ES) 細胞由来の Flk1 (VEGF-R2)陽性細胞は、血球・血管内皮・平滑筋・心筋・その他の中胚葉細胞に分化し得る多分化性中胚葉細胞であることが明らかにされつつ有り、将来の心血管系疾患の移植細胞として期待されています。近年、ヒト ES 細胞由来の Flk1 陽性細胞から血管内皮・血管平滑筋・心筋細胞への分化誘導が報告され、再生医療研究において、より一層注目を浴びる遺伝子となりました。しかしながら、このような多分化性中胚葉細胞での Flk1 の発現に必要な転写調節領域は全く不明であるため、どのような外的因子 (分泌性因子) により、どのような転写制御因子が活性化され、Flk1 遺伝子の転写を制御するのかよく解っていませんでした。試験管内 ES 分化系を用いた先行研究により、Wnt、Bmp、Fgf などの液性因子を添加すると Flk1 陽性細胞の生成が誘導されることが報告されています。しかし、Flk1 遺伝子が直接、これらの分泌因子の下流で作用する転写因子によって活性化されるのか、分化が促進された二次的結果として、Flk1 の発現が上昇したのか不明です。このため、それぞれの液性因子と多能性中胚葉細胞における Flk1 の転写制御の関連性は明らかとなっておらず、Flk1 陽性細胞の起源、および分化プロセスについては未知な部分が多く残されています。Flk1 遺伝子の分化制御機構を明らかにすることは、再生医学において、効率よく目的の細胞へ分化誘導を可能にすることに繋がりことから重要な課題であると考えられます。そこで、我々は Flk1 のエンハンサーを単離し、その機能を明らかにすることを目的として実験を進めました。

## <研究内容>

これまでに Flk1 の第 1 イントロン中にエンハンサー活性を有する領域(1<sup>st</sup> intronic enhancer)が存在することが報告されています。しかし、その活性は非常に弱く、過去に我々はこのゲノム領域を欠損させたマウスにおいて Flk1 の発現低下は認められなかったことを報告しています。そのため他の Flk1 エンハンサーが存在することが予想されてきました。Flk1 の転写制御機構メカニズムを明らかにすることは、ES 細胞由来の Flk1 陽性細胞を循環器系細胞へと効率的に分化させる方法の確立へ繋がります。まず、Flk1 遺伝子とその上下 150kb のゲノム配列をヒトとマウスで比較し、保存されている 4 つの領域を特定しました。このうちエンハンサー#4(DMME)はトランスジェニックマウス解析によりマウス胚における最初期の Flk1 の発現を再現できる領域であることを発見しました (図 1)。

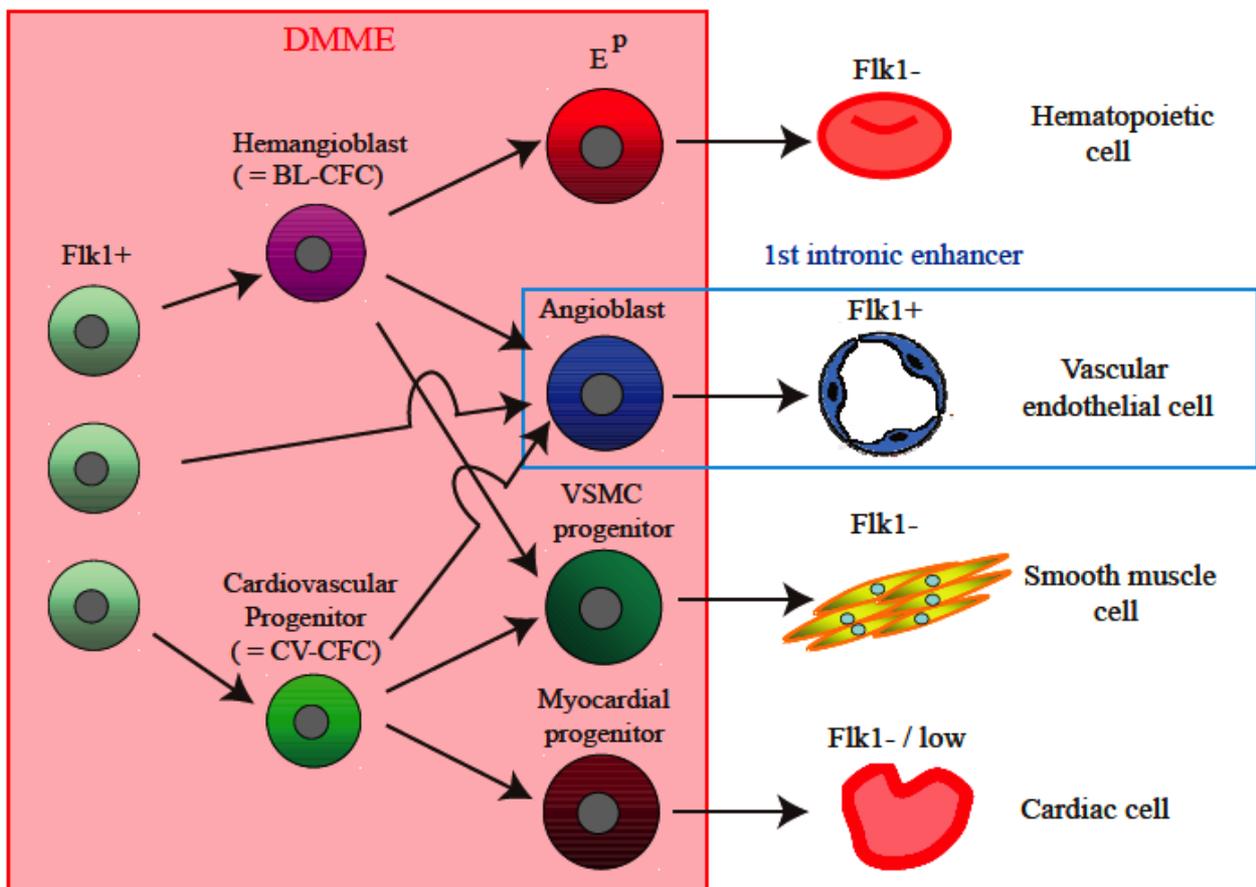
図 1 Flk1+/LacZ と Flk1 DMME-LacZ マウス胚の発現比較



DMME は Flk1 の発現だけでなく、機能も再現する事ができるかを検討する為に DMME トランスジェニックマウスより Flk1 陽性細胞を単離し、分化誘導実験を行いました。その結果、DMME によって再現される Flk1 陽性細胞は血球、血管内皮、平滑筋、心筋細胞へ分化誘導する事に成功しました。ES 細胞に DMME を導入したトランスジェニック ES 細胞を用いて実験を行った場合も同様の結果が得られました。

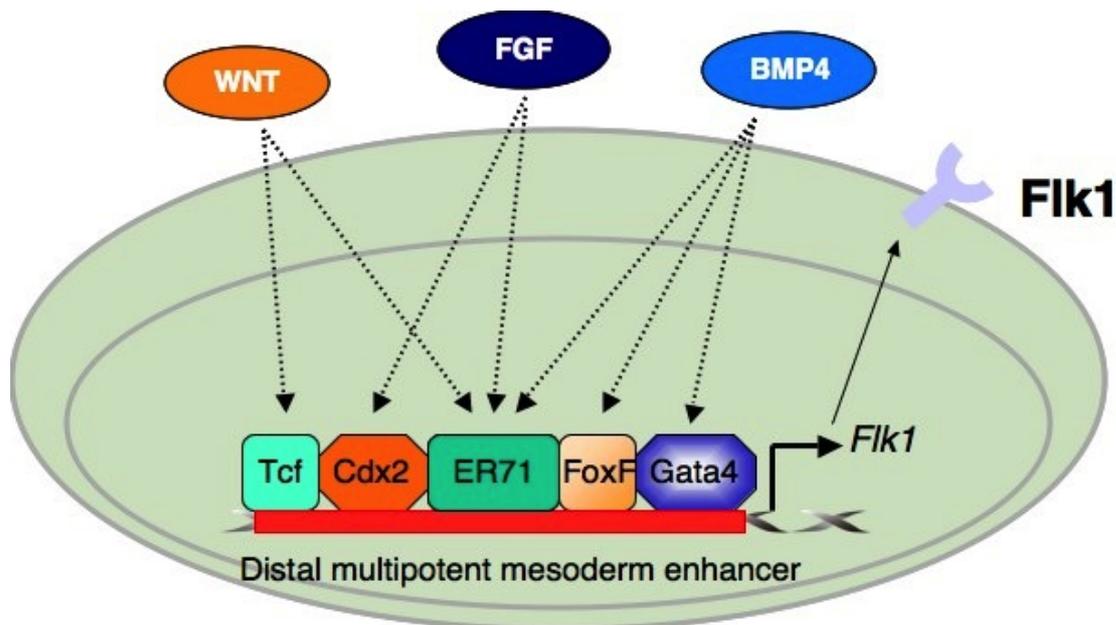
一方で、DMME を欠損させたマウスでは、最初期の Flk1 の発現が有意に低下しました。また、血球・血管内皮細胞共通の前駆細胞であるヘマンジオブラストの産生が顕著に低下しました。これらの実験から、DMME は最初期の Flk1 の機能も再現する事ができるエンハンサーであることがわかりました(図 2)。今後は、循環器組織の再生研究に貢献するために、DMME を iPS 細胞に導入し、Flk1 陽性細胞の誘導効率を上げる等の検討を行う予定です。

図 2 DMME によって標識される Flk1 の発現



DMME 領域の配列分析、各種実験を行ったところ、複数の転写因子の結合が認められました。転写因子が一因子でも結合すること、Flk1 の発現が再現できなかったことから、最初期の Flk1 の発現にはこれらの転写因子が協調して働いている事が考えられます(図3)。しかし、これらの因子が各細胞へ分化する際、どのような組み合わせで分化を決定しているのかということは今後の検討課題であると考えています。

図3 DMME による Flk1 遺伝子の発現制御機構



### <まとめと今後の展望>

今回の研究結果をまとめると以下ようになります。Flk1 の新規エンハンサーを同定し、DMME と名付けました。DMME は Flk1 の最初期の発現、機能を再現することができます。今後は DMME が標識する細胞が分化していく時に、どのような遺伝子群に制御されているか、Flk1 陽性細胞の分化制御機構の基盤を構築しようと考えています(図4)。現在、将来の再生医学を目指し、iPS 細胞による研究が盛んに行われています。現在、iPS 細胞の課題の一つに効率よく目的の細胞へ分化させることが挙げられます。原因として、iPS 細胞が細胞株毎に分化能力にバラツキがあること、細胞分化の方向性を決定する遺伝子をはっきりわかっていないことが考えられます。今後、DMME の研究をさらに発展させ再生医療に貢献する上で以下の2つの課題に取り組んでいきたいと思ひます。

#### 課題1 iPS 細胞に DMME を導入した iPS 細胞を樹立

DMME は最初期の Flk1 陽性細胞を再現する事ができるため、DMME を導入する事で未分化な Flk1 陽性細胞が高効率で得られると考えます。

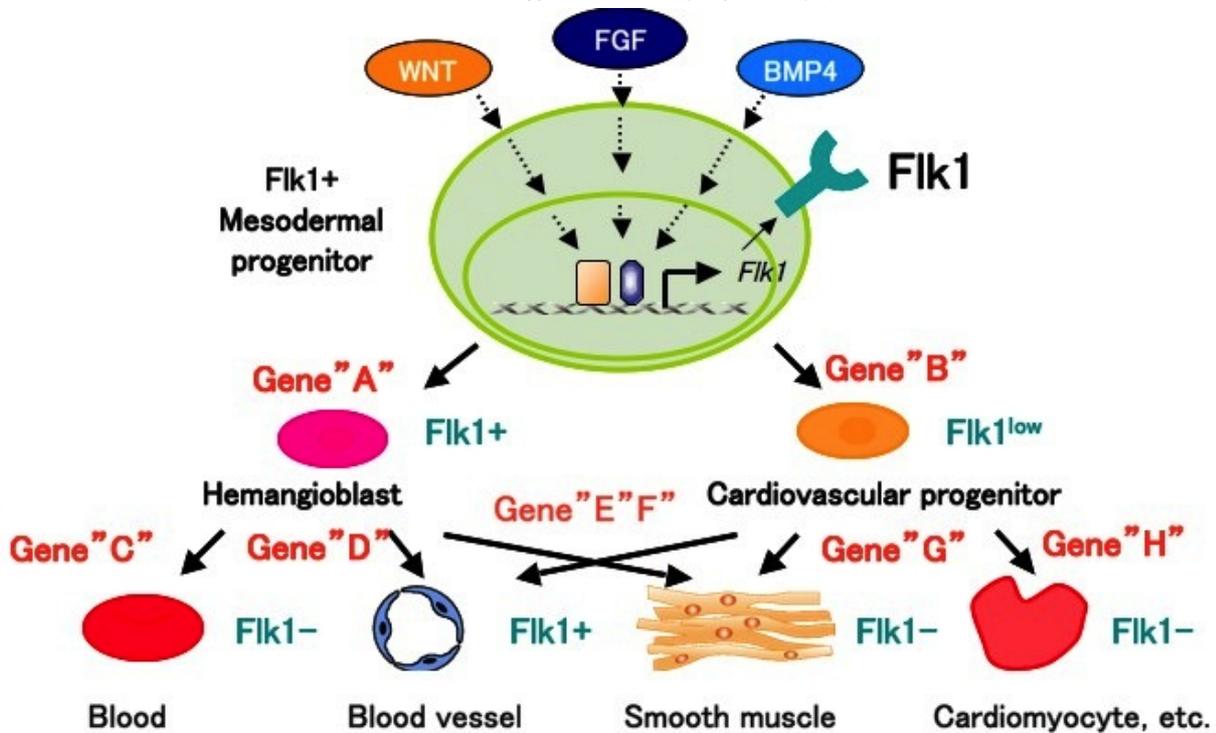
#### 課題2 分化の方向性を決める遺伝子の探索

DMME にはこれまでに5つの転写因子が結合することがわかっている。Flk1 陽性細胞が血球・血管内皮・平滑筋・心筋細胞へと分化していく際これらの遺伝子の組み合わせで分化が決定されている事が考えられる。

以上、創出された情報を活用することによって、循環器障害の発症機構の解明や新しい治療法の開発に繋がる成果を挙げることができると考えています。

本研究の一部は、JST 戦略的創造研究推進事業さきがけの研究課題「Klfファミリーによる幹細胞機能制御の分子機構」(研究代表者:依馬正次)の一環として行われました。

図 4 Flk1 陽性細胞の分化制御機構



本研究についての問い合わせ先

代表者： 依馬 正次  
 電話： 029-853-6963  
 E-mail： masaema@md.tsukuba.ac.jp