

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

心筋組織再生のための集約的研究

(H17-再生-007)

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 19 (2007) 年 3 月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
心筋組織再生のための集約的研究-----	1
小室 一成	
II. 分担研究報告書	
1. 心筋幹細胞の分化誘導と不全心への移植に関する研究-----	4
永井 敏雄	
2. 心筋分化誘導因子の単離精製に関する研究-----	6
南野 徹	
3. 間葉系細胞の心筋分化誘導と不全心への移植に関する研究-----	7
梅澤 明弘	
4. 移植組織の血管新生についての研究-----	9
望月 直樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	14

心筋組織再生のための集約的研究

総括研究者 小室一成 千葉大学大学院医学研究院循環病病態医科学 教授

**研究要旨** 骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子の解明を目的とした本研究において、我々は、心筋易誘導ヒト幹細胞株の発現遺伝子解析から新たな心筋分化誘導因子を同定し、OP9細胞から分泌される心筋分化誘導因子の機能について解析した。また、心筋SP細胞のin vivoにおける遊走、分化能を明らかにした。さらに、血管内皮細胞からの情報伝達が心機能維持に重要であることを明らかにした。

(主任研究者)

小室 一成 千葉大学大学院医学研究院  
循環病態医科学教授

(分担研究者)

永井 敏雄 千葉大学医学部附属病院  
循環器内科講師

南野 徹 千葉大学医学部附属病院  
循環器内科助手

梅澤 明弘 国立成育医療センター  
生殖医療研究部・生殖病理学

望月 直樹 国立循環器病センター研究所  
循環器形態部

## A. 研究目的

心不全・心筋梗塞の新しい治療法として再生治療が注目されている。現在、骨格筋芽細胞、骨髄細胞、内皮前駆細胞による細胞移植が臨床試験中であるが、臨床的に十分な数の心筋細胞と血管の両者を再生する方法は確立されていない。本研究では骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子を単離精製し、非侵襲的な心血管分化誘導療法の確立を目的とする。

## B. 研究方法

### 間葉系幹細胞

ヒト幹細胞in vitro心筋誘導率アッセイシステムを用いて心筋易誘導細胞を同定し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析から心筋誘導因子を類推した。候補となった心筋誘導因子の分化誘導能をP19CL6細胞を用いて解析した。

### OP9培養上清中に存在する心筋細胞分化誘導因子の機能の解明

X因子の心筋細胞分化における役割を明らかにするために、P19CL6細胞でX因子をノックダウンし、その表現型を解析した。

### 血管新生

第一イントロンまで含んだVE-cadherinプロモーター領域依存性にCreを発現するマウスを作製した。このマウスとloxP配列を有してCre依存性にEGFPを発現するマウスを交配することによりVE-cadherinのプロモーター活性化を可視化することを試みた。ErbBの下流で機能するアダプター分子Gabファミリー分子を心臓で特異的に欠損させたマウスを作製した。

### 心臓SP細胞

GFP陽性新生仔ラットの心臓より単離した心臓SPおよび非SP細胞をそれぞれ、心筋凍結障害モデルおよび正常ラットの尾静脈から移植した。移植後1、4、12週後に心臓、肝臓、脾臓、骨格筋、肺臓、骨髄組織についてGFP陽性細胞の有無、GFP陽性細胞の組織特異的マーカー蛋白の発現について免疫組織学的手法により評価した。また、凍結障害および健常心についても同様の検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞の培養に関しては、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認)。また、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針(未定稿)」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮し研究を行った。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。

実験動物を用いる研究については、千葉大学、国立循環器病センターおよび国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号2003-002,2005-003)。特に、動物愛

護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

## C. 研究結果

### 間葉系幹細胞

心筋易誘導細胞に発現している抗原を同定した。また、マイクロアレイ解析の結果より類推できた心筋誘導因子を、P19CL6細胞に作用させたところ心筋転写因子、収縮蛋白の遺伝子の発現が上昇した。この心筋誘導因子はBMPアンタゴニストであった。OP9培養上清中に存在する心筋細胞分化誘導因子の機能の解明

P19CL6細胞においてX因子を2種類の異なるsiRNAを用いてノックダウンした。野生型P19CL6ではDMSO刺激で心筋細胞へと分化するのに対して、X因子をノックダウンしたP19CL6細胞においてはDMSO刺激によっても心筋細胞への分化がおこらなくなった。

### 血管新生

作製したイントロンが存在するマウス(VE-cadherin(intro(+)-Cre)は生後までEGFPが血管で発現した。その後EGFPの発現がどのようになるか、現在成長による変化を観察中である。心臓でGab1, Gab2が欠損しているマウス(Gab1/2DKO)は心臓の著明な拡大と心内膜の繊維化(エラスチンの蓄積とコラーゲンの蓄積)を認め、生後から心機能低下を示した。心臓内の異常な血管数の増加があり、心内膜の異常とあわせ考えると、内皮機能の低下が示唆された。

### 心臓SP細胞

移植されたGFP陽性心臓SP細胞は、心臓、肝臓、脾臓、骨格筋、肺臓、骨髄組織に分布し、肝臓および骨格筋では、albuminおよびdesminを発現した単核のGFP陽性心臓SP細胞が認められ、それぞれ肝細胞および骨格筋細胞に分化したと考えられた。傷害心筋では健常心筋に比較して多くのGFP陽性心臓SP細胞が認められ、移植された心臓SP細胞の多くは凍結傷害部と健常部の境界領域に選択的に遊走し、移植4週間後には心筋troponin T, von Willebrand factor, calponinまたはvimentin陽性かつGFP陽性細胞が認められた。

## D. 考察

今年度の研究より、X因子が心筋分化誘導に必須の分泌蛋白であることが明らかになった。野生型P19CL6細胞とX因子をノックダウンしたP19CL6細胞における細胞内シグナル伝達系を比較することよりX因子が心筋細胞誘導をおこす

メカニズムについて現在検討中である。また、同様な検討をin vivoで行なうためにアフリカツメガエルの実験系を用いた検討も進めている。

我々の開発したヒト幹細胞in vitro心筋誘導率アッセイシステムを用いて、幹細胞の心筋誘導率改善因子の同定が可能となった。また、心筋分化に必要な液性因子のみならず、物理刺激、至適培養条件、培地の無血清化がその細胞分化・発現遺伝子にどのような影響を与え、また、マーカーとなる細胞表面タンパクについても数種類同定できた。これらの基盤的研究より得られた成果について、臨床応用を検討していくことが可能となった。

心臓の収縮機能、生存機能維持にはErbBファミリー分子が重要であり、特に心筋ではそのリガンドとしてニューレグリンの重要性が本研究によって明らかになった。興味深いことにニューレグリンは、血管内皮細胞、心内膜から分泌されることが明らかにされており、血管から心筋の生存に不可欠な因子が放出されていることになる。したがって、心臓の再生を促す細胞治療を行うにあたっては血管新生の促進は絶えず考慮に入れておく必要があることが示された。

VE-cadherinプロモーターの活性化の可視化マウスは血管新生部位において、どのような細胞がVE-cadherinを発現するかを同定するのに不可欠な手段となる。心筋の再生には”心筋になる細胞”とともに”血管になる細胞”による細胞治療が重要であり、心筋の再生だけで血管の再生を伴うようになるか、今後明らかにすることが必要であると考えられた。今後、心筋と血管系が再生時にどのような相互作用を基に収縮力がありかつ正常の組織構築となった心筋を形成できるかを今後もあきらかにしていきたい。

心臓SP細胞はin vivo、in vitroにおいて心筋細胞や他の心筋構成細胞に分化することが可能な組織幹細胞であることが明らかになった。経静脈的に移植された心臓SP細胞が長期にわたり、各臓器、特に心臓に生着する点は心臓SP細胞の高いホーミングおよび遊走能力を示唆する。また、障害心筋においてホーミングおよび遊走が促進される点は、障害心筋から発せられるシグナルが存在することを示唆する。内在性の心臓Sca-1および心臓SP細胞はともにオキシトシンを作用させることにより心筋細胞に分化した。現在のところ、in vivoにおいて心筋幹細胞を心筋細胞に分化させる因子については不明であるが、今後、遊走因子とともにこのような分化誘導因子が解明されることにより、内在性心筋幹細胞の能力を活用した心筋再生が可能となると考える。

## E. 結論

OP9細胞から心筋分化促進因子として単離されたX因子は心筋細胞分化に必須の分泌蛋白であることが明らかになった。

心筋分化にBMPアンタゴニストとして知られている心筋誘導因子が関与している可能性が示唆された。

血管内皮、心内膜より分泌されるニューレグリンは心筋細胞の生存維持に重要であることが明らかになった。

心臓SP細胞はin vivoにおいて心筋細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞といった心筋組織構成細胞に分化可能な心筋組織幹細胞であり、心筋障害に呼応してホーミング、遊走、分化した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19812-19817, 2006.
- Cao Y, Kamioka Y, Yokoi N, Kobayashi T, Hino O, Onodera M, Mochizuki N, Nakae J. Interaction of FoxO1 and TSC2 induces insulin resistance through activation of mTOR/p70S6K pathway. *J Biol Chem* 281: 40242-40251, 2006.
- Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, Mochizuki N. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J* 25: 2889-2897, 2006.
- Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells* 24(10):2270-8. 2006.
- Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A. Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL)cells and colony-forming units in spleen(CFU-S)following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J Cellular Physiology* 208:188-194. 2006.
- Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z,

Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology* 147(9):4104-11. 2006.

- Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito A.T, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, and Komuro I. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 176:329-341, 2007.
- Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG. Receptor activator of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B ligand (RANKL) increases vascular permeability; Impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood* 109:1495-1502, 2007.
- Yoshizaki H, Mochizuki N, Gotoh Y, Matsuda M. Akt-PDK1 Complex Mediates EGF-induced Membrane Protrusion through Ral Activation. *Mol Biol Cell* 18,119-128, 2007.
- Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res* 313:698-706, 2007.
- Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow Stromal cells and mesenchymal stemcells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007.
- Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol Biol Cell*, in press.2007.
- Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem.* in press.2007.

### 2. 学会発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

心筋幹細胞の分化誘導と不全心への移植に関する研究

分担研究者 永井敏雄 千葉大学医学部附属病院循環器内科 講師

**研究要旨** 近年、成体の心筋にも心筋へ分化しうる幹/前駆細胞が存在することが報告されている。我々はマウス心筋Sca-1陽性細胞が心筋幹前駆細胞を含む分画であることを報告したが、Sca-1はマウスに特異的な抗原である。そこで、色素排泄能を指標とした幹細胞分画であるside population(SP)細胞に着目し、心筋SP細胞の単離、分化誘導因子の探索、in vivoにおける役割について検討した。

### A. 研究目的

近年、成体の心筋にも心筋幹/前駆細胞が存在することが報告されているが、その分化のメカニズム、in vivoでの動態は明らかではない。また、細胞移植療法に加えて、このような心筋幹細胞を心筋へ分化する因子を解明することは、移植療法の効率を高めるためにも重要である。本研究における分担研究者の目的は、ヒトからも採取可能な幹細胞分画である心筋side population細胞を単離し、分化誘導因子の探索、in vivoにおける役割について解明することである。本研究は細胞移植を基盤とした心筋再生療法の開発につながり、国民の福利厚生に寄与するものと考えられる。

### B. 研究方法

#### 心臓SP細胞の単離および心筋障害モデルの作成

GFP陽性新生仔ラット心臓より酵素消化法により細胞を単離し、ヘキスト33342により染色した後にfluorescent cell sortingを行い色素染色性の低いSP細胞と非SP細胞を分取した。成体ラット心筋障害モデルは、液体窒素で冷却したアルミニウム棒による凍結障害モデルを用いた。心臓SPおよび非SP細胞をそれぞれ、心筋凍結障害モデルおよび正常ラットの尾静脈から移植した。

#### 心臓SP細胞のホーミング、遊走および分化能力の評価

GFP陽性心臓SP細胞を移植後1、4、12週後に心臓、肝臓、脾臓、骨格筋、肺臓、骨髄組織についてGFP陽性細胞の有無、GFP陽性細胞の組織特異的マーカー蛋白の発現について免疫組織学的手法により評価した。また、凍結障害および健全心についても同様の検討を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、千葉大学、国立循環器病センターおよび国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管

理を行った。

### C. 研究結果

移植されたGFP陽性心臓SP細胞は、健全ラットおよび凍結障害心筋モデルともに、心臓、肝臓、脾臓、骨格筋、肺臓、骨髄組織に分布したが、心臓へホーミングしたSP細胞は1週から4週間の間に増加し、移植12週後においても生着していた。ドナーラットの肝臓および骨格筋では、albuminおよびdesminを発現した単核のGFP陽性心臓SP細胞が認められ、それぞれ肝細胞および骨格筋細胞に分化したと考えられた。健全ラットの心臓では心筋troponin T, von Willebrand factor, calponinまたはvimentin陽性かつGFP陽性細胞は認められなかった。一方、傷害心筋では健全心筋に比較して多くのGFP陽性心臓SP細胞が認められ、移植された心臓SP細胞の多くは凍結傷害部と健全部の境界領域に選択的に遊走し、移植4週間後には心筋troponin T, von Willebrand factor, calponinまたはvimentin陽性かつGFP陽性細胞が認められ、移植された心筋SP細胞は心筋細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞に生着・分化したと考えられた。

### D. 考察

心臓SP細胞はin vivo、in vitroにおいて心筋細胞や他の心筋構成細胞に分化することが可能な組織幹細胞であることが明らかになった。経静脈的に移植された心臓SP細胞が長期にわたり、各臓器、特に心臓に生着する点は心臓SP細胞の高いホーミングおよび遊走能力を示唆する。また、障害心筋においてホーミングおよび遊走が促進される点は、障害心筋から発せられるシグナルが存在することを示唆する。内在性の心臓Sca-1および心臓SP細胞はともにオキシトシンを作用させることにより心筋細胞に分化した。現在のところ、in vivoにおいて心筋幹細胞を心筋細胞に分化させる因子については不明であるが、今後、遊走因子とともにこのような分化誘導因子が解明されることにより、内在性心筋幹細胞の能力を活用し

た心筋再生が可能となると考える。

#### E. 結論

心臓SP細胞はin vivoにおいて心筋細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞といった心筋組織構成細胞に分化可能な心筋組織幹細胞であり、心筋障害に呼応してホーミング、遊走、分化した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, Komuro I. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol.* 2007 ;176(3):329-41.

#### 2. 学会発表

4<sup>th</sup> ISSCR Annual meeting (Jun 29-July 1 2006  
Tronto Canada)

Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes.

Toshio Nagai, Tomomi Oyama, Hiroshi Wada, Atsuhiko Naito, Katsuhisa Matsuura, Hiroshi Wada, Koji Iwanaga, Issei Komuro

第4回 幹細胞シンポジウム(平成18年5月19-20日,  
東京)

心臓SP細胞の分化と遊走能のin vitro,in vitroにおける検討

小山知美、永井敏雄、松浦勝久、和田浩、岩永孝治、小室一成

第27回日本炎症・再生医学会 ワークショップ  
(平成18年7月11-12日 東京)

心筋幹/前駆細胞による心筋再生

永井敏雄、松浦勝久、岩永孝治、小山知美、内藤篤彦、高橋聖尚、三上陽子、康田典鷹、小室一成

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## 研究要旨

細胞移植を基盤とした心筋再生療法を確立するためには、分化多能性をもつ細胞を心筋細胞へ効率よく分化誘導させる技術の開発が必須である。昨年度分担研究者らは OP9 細胞由来の心筋分化誘導因子（X 因子）を単離した。本年度の研究により X 因子が心筋細胞分化に必須の分泌蛋白であることが明らかになった。

### A. 研究目的

近年、心筋細胞へ分化しうる幹細胞を用いた心筋再生治療が注目されているが、臨床的に十分な数の心筋細胞を分化誘導する方法は確立されていない。本研究における分担研究者の目的は、分化多能性をもつ細胞を心筋細胞に分化誘導する因子の単離同定である。本研究は細胞移植を基盤とした心筋再生療法の開発につながり、国民の福利厚生に寄与するものと考えられる。

### B. 研究方法

昨年度分担研究者らは OP9 細胞由来の心筋分化誘導因子（X 因子）を単離した。本年度は X 因子の心筋細胞分化における役割を明らかにするために P19CL6 細胞で X 因子をノックダウンし、その表現型を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は培養細胞を用いたものであり、特に倫理面での問題はないと考える。

### C. 研究結果

P19CL6 細胞において X 因子を 2 種類の異なる siRNA を用いてノックダウンした。野生型 P19CL6 では DMSO 刺激で心筋細胞へと分化するのに対して、X 因子をノックダウンした P19CL6 細胞においては DMSO 刺激によっても心筋細胞への分化がおこらなくなった。

### D. 考察

今年度の研究により X 因子が心筋分化誘導に必須の分泌蛋白であることが明らかになった。野生型 P19CL6 細胞と X 因子をノックダウンした P19CL6 細胞における細胞内シグナル伝達系を比較することより X 因子が心筋細胞誘導をおこすメカニズムについて現在検討中である。また、同様な検討を *in vivo* で行なうためにアフリカツメガエルの実験系を用いた検討も進めている。

### E. 結論

OP9 細胞から心筋分化促進因子として単離された X 因子は心筋細胞分化に必須の分泌蛋白であることが明らかになった。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし



## 間葉系細胞の心筋分化誘導と不全心への移植

分担研究者 梅澤明弘 国立成育医療センター研究所・部長

### 研究要旨

成体内のさまざまな臓器由来の間葉系幹細胞株を確立し、細胞寿命の延長に関わる遺伝子を導入して細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討した。また、骨髄間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を網羅的に分析し、高い心筋分化効率を有するヒト幹細胞株にのみ強発現している遺伝子をマイクロアレイ法により同定した。マイクロアレイ解析の結果より類推できた心筋誘導因子の心筋分化誘導能を P19CL6 細胞を用いることにより検証したところ、心筋分化を誘導する活性が明らかになった。その基盤的研究より得られた成果について臨床応用への可能性を探った。

### A. 研究目的

間葉系幹細胞が心筋へ分化可能な事が知られているが、その分化誘導因子は未だ同定されていない。我々の開発したヒト幹細胞 *in vitro* 心筋誘導率アッセイシステム（特許PCT/JP2006/301043）を用い、間葉系細胞培養時の条件や *ex vivo* での薬剤投与による心筋誘導率の変化を観察することにより、幹細胞の心筋誘導因子の同定を試みた。また、心筋分化に必要な液性因子のみならず、物理刺激、至適培養条件、培地の無血清化がその細胞分化・発現遺伝子にどのような影響を与え、また、マーカーとなる細胞表面タンパク等も合わせて検討を行った。

### B. 研究方法

#### 心筋易誘導細胞の同定

心筋易誘導細胞に発現している抗原に対する抗体を用いて、心筋易誘導細胞の免疫染色を行った。また、雑多な幹細胞の集団である骨髄および胎盤間葉系幹細胞初代培養を酵素反応により単離し、FACSにより抗原陽性細胞が抽出できるか否かを検討した。

#### 無血清培養システムの導入：

心筋誘導因子の同定を行う際に、培養液中に含まれる血清が結果の評価を曖昧なものとする可能性を排除するため、無血清培地を用いた *in vitro* 誘導率アッセイを試みた。

#### 心筋誘導因子の同定と分化誘導能の検討

マイクロアレイ解析の結果より類推できた心筋誘導因子を、P19CL6 細胞に処理することにより、心筋分化誘導能を検討する。心筋誘導率は、誘導率が低い場合は目視によって確認可能であるが、誘導率が 20%以上となると目視で正確に評価する事が困難となる。そのため、共培養 1 週間後に単離し、心筋特異的な Cardiac Troponin-I を用いて免疫染色を行い、GFP 陽性のヒト細胞中の Troponin-I 陽性細胞率を心

筋誘導率として評価を行った。

#### （倫理面への配慮）

当研究所においては、ヒト細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認）。また、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、最新の社会的な影響を十分に考慮し研究を行った。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 2003-002、2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

### C. 研究結果

#### 心筋易誘導細胞の同定

心筋易誘導細胞に発現している抗原を同定した。FACS による検討は、対象抗原がトリプシン処理で消滅している可能性もあり、明瞭な分画は得られていない。今後は酵素反応なしで細胞を剥離する事が出来る温度感受性培養皿や、低濃度の Collagenase、papain などを利用した細胞単離方法を実践し、抗原性を確保したまま、単離条件設定を目指す。

### 無血清培養システムの導入：

我々は心筋代謝を考慮した独自の無血清培地の開発に成功しており、本培地により無血清でありながら、血清が存在しているときと同程度か、さらに強い心筋誘導を確認した。今後は無血清培地を用いたインビトロ誘導率アッセイシステムの有効性に関する基礎研究を行い、その科学的な根拠をもとに、徐々に本研究の完全な無血清化を視野に入れる。

### 心筋誘導因子の同定と分化誘導能の検討

マイクロアレイ解析の結果より類推できた心筋誘導因子を、P19CL6細胞に処理することにより、心筋分化誘導能を検討した。これらの細胞をRT-PCRで各遺伝子の発現量を確認した。その結果心筋特異的な転写因子(Mef2c, Csx/Nkx2.5, GATA4, Hand2)やタンパク質(MyLC-2a, MyLC-2v, b-MyHC, ANP, BNP)の発現量が有意に増加した。同定した心筋誘導因子はBMPアンタゴニストであり、発生時の四肢形成にSonic hedgehogやBMP、FGFらと相互作用している事が報告されており、骨格筋の分化にも関与している事も報告されている。

### D. 考察

我々の開発したヒト幹細胞 *in vitro* 心筋誘導率アッセイシステム(特許PCT/JP2006/301043)を用いて、間葉系細胞培養時の条件や *ex vivo* での薬剤投与による心筋誘導率の変化を観察することにより、幹細胞の心筋誘導率改善因子の同定が可能となった。また、心筋分化に必要な液性因子のみならず、物理刺激、至適培養条件、培地の無血清化がその細胞分化・発現遺伝子にどのような影響を与え、また、マーカーとなる細胞表面タンパクについても数種類同定できた。これらの基盤的研究より、得られた成果について臨床応用を検討していくことが可能となった。

### E. 結論

我々はGene chipの解析を行う事で心筋分化にBMPアンタゴニストとして知られている心筋誘導因子が関与している可能性を示唆する事ができた。同定した心筋誘導因子を用いた心筋分化誘導実験を胎児性癌細胞(mEC)細胞であるP19CL6を用いてその検討を行った。DMSOと一緒にグレムリンを添加することでDMSO単独の添加よりも高い心筋分化誘導に成功した。同定した分子が、心筋形成(促進)因子であることを明らかにした。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and **Umezawa A** Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol. Biol. Cell*, in press. 2007
2. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, **Umezawa A**. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem.* in press. 2007
3. Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, **Umezawa A**. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res.* 313:698-706, 2007
4. **Umezawa A**, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007
5. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, **Umezawa A**, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells.* 24(10):2270-8. 2006
6. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yoroazu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and **Umezawa A** Increased mobilization of c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>(KSL) cells and colony-forming units in spleen(CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J. Cellular Physiology* 208:188-194. 2006
7. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, **Umezawa A**, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology.* 147(9):4104-11. 2006

#### 2. 学会発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

移植組織の血管新生についての研究

分担研究者 国立循環器病センター研究所循環器形態部 部長 望月直樹

研究要旨 心臓再生には心筋細胞の再生とともに血管新生の誘導が不可欠である。本研究では心筋細胞と毛細血管の内皮細胞間の相互調節を研究することで心臓の再生を促進するメカニズムを探る。

**A. 研究目的**

心臓の再生には心筋細胞への酸素、グルコース、脂肪酸などのエネルギーの供給のために血管が不可欠である。このため、毛細血管の生長が心筋細胞の再生には不可欠であると考えられる。現在、虚血性心疾患による心不全を治療するには細胞治療の確立が急務であり、このためのより効率のよい治療法の確立が期待されている。本研究では心筋と血管内皮細胞の相互作用を理解するとともに、新生血管となる生体内細胞を同定することで心臓における再生血管の構築を促進させる細胞を導入する治療法の開発を計画する。

**B. 研究方法**

血管構築細胞同定のための新生血管モニターリングマウスの作製：新たなVascular endothelial cadherin (VE-cadherin)プロモーター活性によりGFPを発現するマウスの作製

昨年度の研究ではVE-cadherinのプロモーター領域が上流2000 baseまでとCreリコンビナーゼを発現するマウス(VE-cadherin(-2.0)-Cre)を作製した。本年は第一イントロンまで含んだプロモーター領域依存性にCreを発現するマウスを作製した。このマウスとloxP配列を有してCre依存性にEGFPを発現するマウスを交配することによりVE-cadherinのプロモーター活性化を可視化することを試みた。

血管新生では既存の血管からの分岐や増殖が主であり血管内皮細胞前駆細胞もいくらかの貢献があると考えられるがいずれにしても血管のあらたな構築には血管内皮細胞間接着がおこりこの部位で発現するVE-cadherinの転写の活性化がおこるのでそれをモニターできると予想した。

心筋の発生に重要なErbB受容体の下流で機能する分子Gabファミリー分子のノックアウトマウスの作製による心筋-内皮細胞間シグナルの理解

心筋細胞の機能維持にはErbBファミリーチロシンキナーゼ受容体のシグナルが重要であることが示されている。心筋再生にもErbBファミリー受容体のシグナルは不可欠であると予想してErbBの下流で機能するアダプター分子Gabファミリー分子を心臓で特異的に欠損させたマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、千葉大学、国立循環器病センターおよび国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

**C. 研究結果**

VE-cadherin-intron(+)-Creマウスの作製

昨年度作製したVE-cadherin(-2.0)-Creマウスは生後10日間でEGFPの発現が消失したが、心筋梗塞を作製すると心臓ならびに骨髄でGFP陽性細胞が陽性となった。今年度作製したイントロンが存在するマウス(VE-cadherin(intro(+)-Cre)も生後までEGFPが血管で発現していることは確認できた。その後EGFPの発現がどのようになるか現在までのところ不明である(現在成長による変化を観察中である)。

Gabファミリー分子の心臓特異的欠損では血管の形成異常と心内膜の形成異常を伴う

心臓で発現していることを確認したGabファミリー分子Gab1 Gab2をノックアウト(KO)するために以下のマウスを作製した。まずGab1のconventional KOは胎生致死になるために心臓で特異的にGab1をKOさせた(Myosin heavy chain-CプロモーターCreマウスとloxP-Gab1マウスの交配により得たConditional Gab1 KO-Gab1CKO)。さらにGab2のconventional KO(生存可能 Gab2KO)を交配することで心臓でGab1, Gab2が欠損しているマウス(Gab1/2 DKO)を作製した。

DKOマウスは生後から心機能低下を示した。さらに心臓の著明な拡大と心内膜の繊維化(エラスチンの蓄積とコラーゲンの蓄積)を認めた。DKOマウスと他の Gab1CKO, Gab2KO, 野生型の生存曲線を比較するとDKOのみ死亡率が高かった。

心臓内の異常な血管数の増加があり、心内膜の異常とあわせ考えると、内皮機能の低下が示唆された。ErbBシグナルのリガンドであるニューレ

グリンの反応がGabDKOで低下していたことから、ニューレグリン(内皮から分泌される)の情報伝達の異常が考えられた。

#### D. 考察

心臓の収縮機能、生存機能維持にはErbBファミリー分子が重要であり、特に心筋ではそのリガンドとしてニューレグリンの重要性が本研究によって明らかになった。興味深いことにニューレグリンは、血管内皮細胞、心内膜から分泌されることが明らかにされており、血管から心筋の生存に不可欠な因子が放出されていることになる。したがって、心臓の再生を促す細胞治療を行うにあたって血管新生の促進は絶えず考慮にいれておく必要があることが示された。

VE-cadherinプロモーターの活性化の可視化マウスを作製することで、昨年度のマウス(VE-cadherin(-2.0)-Creとの比較が可能になると考えている。VE-cadherinが発現されたことを反映するマウスは血管新生部位のどのような細胞がVE-cadherinを発現するのかを同定するのに不可欠な手段となる。既存の血管でのVE-cadherinの発現が亢進すれば、既存の血管からの分岐や、増殖が重要であると結論できる。

心筋の再生において、“心筋になる細胞”とともに“血管になる細胞”による細胞治療の必要性は重要な課題であり、心筋の再生だけで血管の再生を伴うようになるか、今後明らかにすることが必要であると考えられた。

Cell誌に発表されたIsl1(+)細胞が心筋にも、血管内皮細胞・血管平滑筋細胞にもなりうるという事実は心臓の再生を考えると非常に魅力的な細胞となりうる。心筋と血管系が再生時にどのような相互作用を基に収縮力がありかつ正常の組織構築となった心筋を形成できるかを今後もあきらかにしていきたい。

#### E. 結論

心臓の発達と機能維持には血管内皮細胞あるいは心内膜から分泌されるニューレグリンを介したシグナルが重要である。つまり内皮細胞の成長が心臓の機能維持に重要であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

- ① Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG. Receptor activator of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B ligand (RANKL) increases vascular permeability; Impaired permeability and angiogenesis in

eNOS-deficient mice. **Blood** 109:1495-1502, 2007

- ② Yoshizaki H, Mochizuki N, Gotoh Y, Matsuda M. Akt-PDK1 Complex Mediates EGF-induced Membrane Protrusion through Ral Activation. **Mol Biol Cell** 18,119-128, 2007
- ③ Cao Y, Kamioka Y, Yokoi N, Kobayashi T, Hino O, Onodera M, Mochizuki N, Nakae J. Interaction of FoxO1 and TSC2 induces insulin resistance through activation of mTOR/p70S6K pathway. **J. Biol. Chem.** 281: 40242-40251, 2006
- ④ Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, Mochizuki N. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. **EMBO J.** 25: 2889-2897, 2006

#### 2. 学会発表

特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, <u>Komuro I.</u>	Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis.	Proc Natl Acad Sci USA	103	19812-19817	2006
Cao Y, Kamioka Y, Yokoi N, Kobayashi T, Hino O, Onodera M, <u>Mochizuki N,</u> Nakae J.	Interaction of FoxO1 and TSC2 induces insulin resistance through activation of mTOR/p70S6K pathway.	J Biol Chem	281	40242-40251	2006
Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, <u>Mochizuki N.</u>	Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms.	EMBO J	25	2889-28972	2006
Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, <u>Umezawa A,</u> Young MJ	A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells.	Stem Cells	24	2270-2278	2006
Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and <u>Umezawa A</u>	Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL) cells and colony-forming units in spleen(CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossificaion.	J Cellular Physiology	208	188-194	2006
Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, <u>Umezawa A,</u> Miyamoto K	Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells.	Endocrinology	147	4104-4111	2006

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito A.T, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, and <u>Komuro I</u>	Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo.	J Cell Biol	176	329-341	2007
Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, <u>Mochizuki N</u> , Kim YM, Oh GT, Kwon YG.	Receptor activator of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B ligand (RANKL) increases vascular permeability; Impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice.	Blood	109	1495-1502	2007
Yoshizaki H, <u>Mochizuki N</u> , Gotoh Y, Matsuda M.	Akt-PDK1 Complex Mediates EGF-induced Membrane Protrusion through Ral Activation.	Mol Biol Cell	18	119-128	2007
Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, <u>Umezawa A</u> .	Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells.	Exp Cell Res	313	698-706	2007
<u>Umezawa A</u> , Toyoda M	Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells.	Inflammation and Regeneration	27	28-36	2007
Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and <u>Umezawa A</u>	Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells.	Mol Biol Cell			in press

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, <u>Umezawa A.</u>	Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts.	J Cell Biochem			in press
塩島一朗、 小室一成	特集 発生学からみた循環器疾患の病態と治療 「心臓発生の分子機構」	循環器科	60	395-400	2006

# Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis

Atsuhiko T. Naito\*, Ichiro Shiojima\*, Hiroshi Akazawa\*, Kyoko Hidaka†, Takayuki Morisaki†, Akira Kikuchi‡, and Issei Komuro\*<sup>5</sup>

\*Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan; †Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan; and ‡Department of Biochemistry, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan

Edited by Eric N. Olson, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, and approved October 23, 2006 (received for review July 10, 2006)

Although Wingless (Wg)/Wnt signaling has been implicated in heart development of multiple organisms, conflicting results have been reported regarding the role of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in cardiac myogenesis: Wg/armadillo signaling promotes heart development in *Drosophila*, whereas activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits heart formation in avians and amphibians. Using an *in vitro* system of mouse ES cell differentiation into cardiomyocytes, we show here that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling exhibits developmental stage-specific, biphasic, and antagonistic effects on cardiomyogenesis and hematopoiesis/vasculogenesis. Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the early phase during embryoid body (EB) formation enhances ES cell differentiation into cardiomyocytes while suppressing the differentiation into hematopoietic and vascular cell lineages. In contrast, activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the late phase after EB formation inhibits cardiomyocyte differentiation and enhances the expression of hematopoietic/vascular marker genes through suppression of bone morphogenetic protein signaling. Thus, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling exhibits biphasic and antagonistic effects on cardiomyogenesis and hematopoiesis/vasculogenesis, depending on the stage of development.

cardiogenesis

Wnt genes encode secreted glycoproteins that play important roles in embryonic development, adult tissue homeostasis, and carcinogenesis (1, 2). During early embryogenesis, Wnt signaling is required for primitive streak formation and mesoderm induction (3, 4). Subsequently, Wnt signals regulate the patterning of anterior-posterior body plan: Wnt signaling is required for trunk/tail development and specification of posterior mesodermal fates, and Wnt inhibition in anterior ectoderm is required for head formation (3, 4). Regarding the role of Wnt signaling in heart formation and cardiomyocyte differentiation, there have been several contradictory reports, depending on the model organisms used. In avians and amphibians, the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway inhibits cardiac development, and expression of Wnt inhibitors in the tissue adjacent to cardiac mesoderm is required for cardiogenesis (5–7). In contrast, the Wingless (Wg)/armadillo pathway (which corresponds to the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in vertebrates) promotes heart formation in *Drosophila* (8, 9), and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling induces cardiomyocyte differentiation in a mouse embryonal carcinoma cell line P19CL6 (10, 11). Thus, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits cardiogenesis in chick and *Xenopus*, whereas it enhances cardiogenesis in flies and in a mouse teratocarcinoma cell line.

To further explore the role of Wnt signaling during cardiac myogenesis, we used mouse ES cells as a model system for cardiomyocyte differentiation in mammals (12). We show here that activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the early phase during embryoid body (EB) formation enhances ES cell differentiation into cardiomyocytes while suppressing hematopoietic and vascular cell marker gene expression. In contrast, activation of Wnt/ $\beta$ -

catenin pathway in the late phase inhibits cardiomyocyte differentiation and enhances the expression of hematopoietic/vascular marker genes through the suppression of bone morphogenetic protein (BMP) signaling. Furthermore, initial enhancement followed by inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling results in a marked increase in the efficiency of ES cell differentiation into cardiomyocytes. Thus, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling exhibits developmental stage-specific, biphasic, and antagonistic effects on cardiogenesis and hematopoiesis/vasculogenesis, and appropriate modulation of Wnt signaling enables highly efficient cardiomyocyte differentiation of ES cells.

## Results

**Wnt Signaling Positively Regulates Cardiomyogenesis During Early Stage of ES Cell Differentiation.** To induce ES cell differentiation into cardiomyocytes, EBs were formed by the hanging-drop method. Hanging-drop culture was started at day 0, and EBs were transferred to adhesion culture on day 3 (Fig. 1A). Under this experimental condition, spontaneous contraction was observed as small contracting foci in  $\approx 80\%$  of EBs at day 8 (Fig. 1B). To investigate the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cardiomyocyte differentiation, we first analyzed the expression of Wnt ligands that activates Wnt/ $\beta$ -catenin pathway such as *Wnt1*, *Wnt3a*, and *Wnt8a*. During ES cell differentiation, *Wnt1* was expressed after day 4, *Wnt3a* on days 2 and 3, and *Wnt8a* from days 1 to 4 (Fig. 1C). Expression of early mesodermal markers (*Brachyury T*, *Gooseoid*) was detected from day 2, and cardiac lineage markers (*Cx/Nkx-2.5*, *Tbx-5*) were detectable from day 3 (Fig. 1C). Thus, initial commitment from immature mesodermal cells to a cardiac lineage occurs between days 2 and 3, when *Wnt3a* and *Wnt8a* genes are expressed. Next, we blocked Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during this early stage of cardiomyocyte differentiation by extracellular Wnt inhibitors, Dickkopf-1 (Dkk-1; 500 ng/ml) and Frizzled-8/Fc chimeric protein (Fz8/Fc) (200 ng/ml), either alone or in combination. At these concentrations, Wnt3a (100 ng/ml)-induced activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in ht7 ES cells was completely suppressed as judged by a T cell factor-dependent reporter gene assay and the status of nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin [supporting information (SI) Fig. 6]. When ES cells were treated with Dkk-1 in hanging

Author contributions: A.T.N., I.S., and I.K. designed research; A.T.N. performed research; H.A., K.H., T.M., and A.K. contributed new reagents/analytic tools; A.T.N. analyzed data; and A.T.N., I.S., and I.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS direct submission.

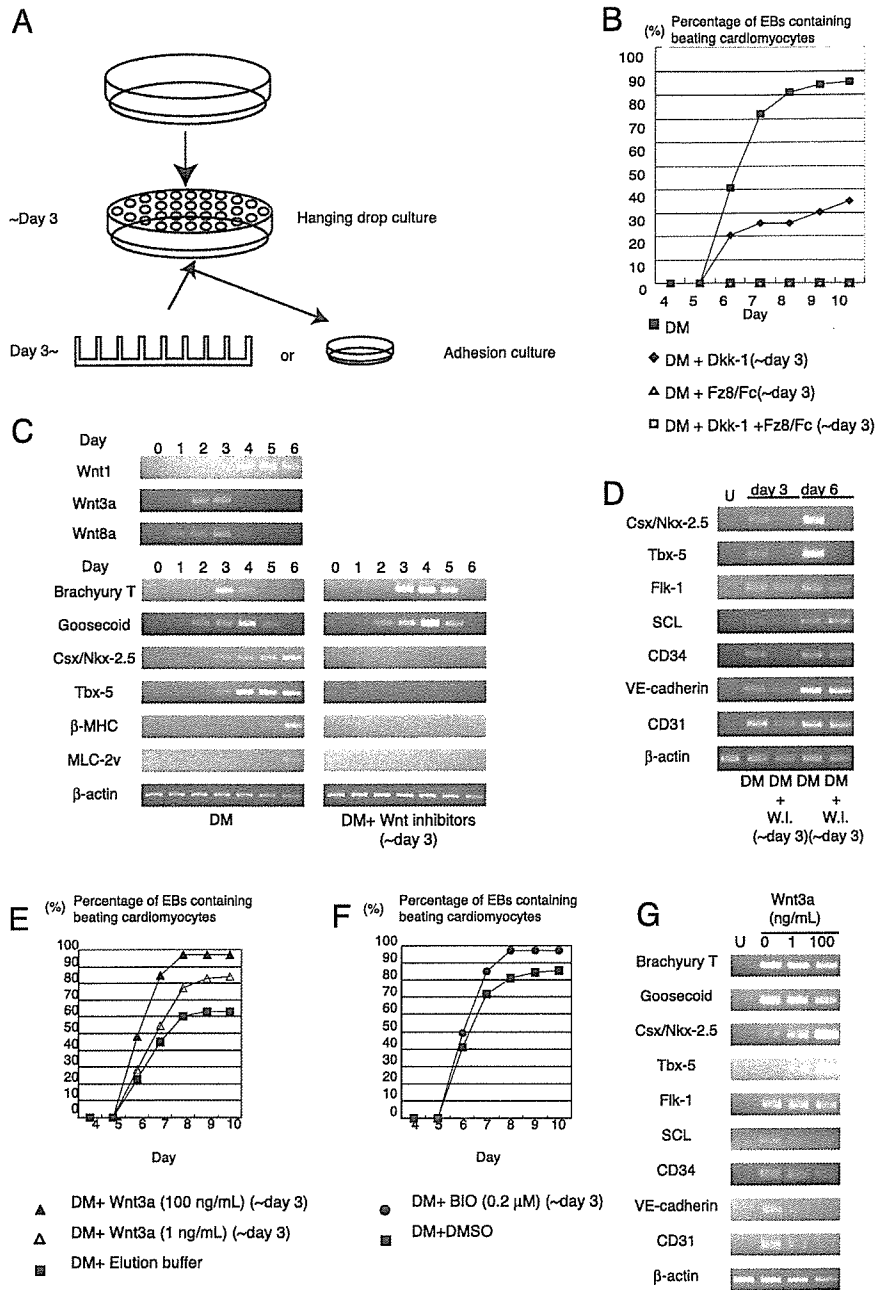
Abbreviations: BMP, bone morphogenetic protein; cTnT, cardiac troponin T; Dkk-1, Dickkopf-1; EB, embryoid body; Fz8/Fc, Frizzled-8/Fc chimeric protein; Wg, Wingless; DM, differentiation medium.

<sup>5</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: komuro-tky@umin.ac.jp.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0605768103/DC1](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0605768103/DC1).

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

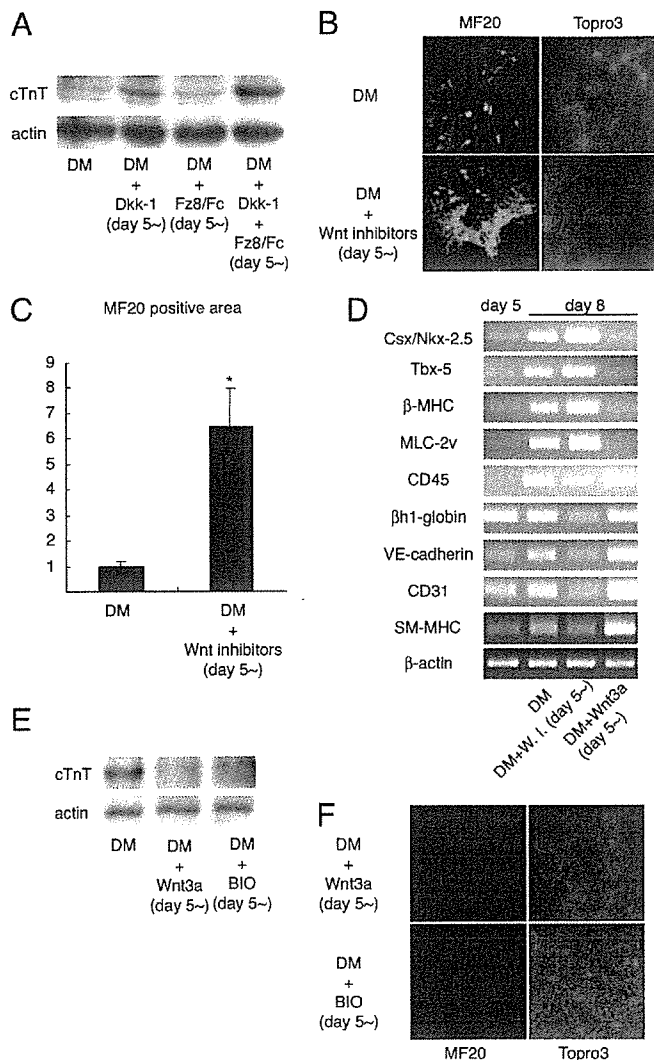




**Fig. 1.** Wnt/ $\beta$ -catenin signaling positively regulates cardiogenesis in the early stage of ES cell differentiation. (A) Protocol for cardiomyocyte differentiation of ES cells. (B) Number of EBs with beating foci. Wnt inhibitor treatment during EB formation suppressed differentiation into beating cardiomyocytes. (C) RT-PCR analysis of gene expression during differentiation of ES cells into cardiomyocytes. (D) Wnt inhibition blocked expression of cardiac markers and transiently down-regulated hematopoietic/vascular marker genes. Cells were cultured in the presence or absence of Wnt inhibitor during EB formation (until day 3). U, undifferentiated ES cells; W.I., Wnt inhibitors. (E) Number of EBs with beating foci. Wnt3a treatment during EB formation enhanced differentiation of ES cells into beating cardiomyocytes. (F) Number of EBs with beating foci. Treatment with BIO during EB formation enhanced differentiation of ES cells into beating cardiomyocytes. (G) RT-PCR analysis of cardiac, hematopoietic, and vascular cell lineage markers on day 3. U, undifferentiated ES cells.

drops from days 0 to 3, EBs were normally formed, but the number of EBs containing spontaneously beating foci was significantly suppressed (Fig. 1B). Moreover, when cells were treated with Fz8/Fc, or Dkk-1 plus Fz8/Fc, spontaneous contraction was never observed up to day 15 (Fig. 1B and data not shown). Although the precise reason for the differential effects of Dkk-1 vs. Fz8/Fc is not known, it may be due to slightly more efficient suppression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by Fz8/Fc than that by Dkk-1 (SI Fig. 6A). Alternatively,  $\beta$ -catenin-independent, noncanonical Wnt signaling that is blocked by Fz8/Fc but not by Dkk-1 may partially contribute to Wnt-mediated cardiogenesis at this stage. Expression of earliest

cardiac marker genes *Csx/Nkx-2.5* and *Tbx-5* was completely abolished by Wnt inhibitor treatment, whereas that of mesodermal marker genes *Brachyury* and *Goosecoid* was not affected by Wnt inhibition (Fig. 1C and D). Thus, it is presumed that the commitment of mesodermal cells into a cardiomyocyte lineage requires higher levels of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling than those required for specification of mesodermal cells. We also investigated whether differentiation into other mesoderm-derived cell lineages is affected by Wnt inhibition. Expression of early hematopoietic markers (*SCL* and *CD34*) and endothelial cell markers (*CD31* and *VE-cadherin*) was transiently down-regulated at day 3 but was not



**Fig. 2.** Wnt/ $\beta$ -catenin signaling negatively regulates cardiogenesis in the late stage of ES cell differentiation. (A) Western blot analysis for cTnT on day 10. EBs were cultured in DM or DM containing the indicated Wnt inhibitors from day 5. Wnt inhibitor treatment after day 5 increased cTnT expression. (B) MF20 and Topro staining on day 10. (Magnification:  $\times 100$ .) (C) Morphometry for the expression of sarcomeric MHC in each EB. \*,  $P < 0.01$  vs. control. (D) RT-PCR analysis of cardiac, hematopoietic, and vascular marker genes. EBs were cultured in DM or DM containing Wnt inhibitors (DM + W.I.) or Wnt3a protein (DM + Wnt3a) from day 5. W.I., Wnt inhibitors. (E) Western blot analysis for cTnT on day 10. EBs were cultured in DM or DM containing Wnt3a (DM + Wnt3a) or BIO (DM + BIO) from day 5. Wnt3a treatment in the late stage of ES cell differentiation blocks further differentiation into mature cardiomyocytes. (F) MF20 and Topro staining on day 10. (Magnification:  $\times 100$ .)

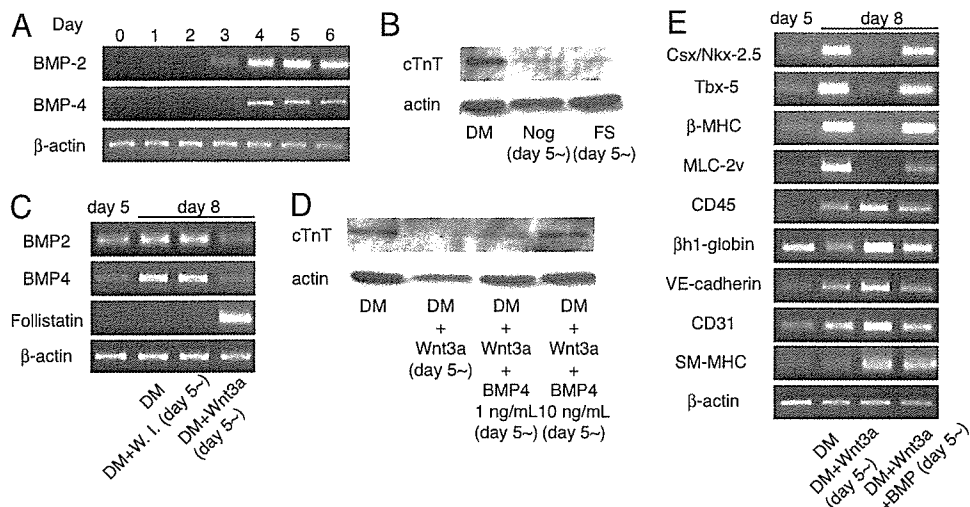
altered at day 6. Expression of *Flk-1*, a marker of hemangioblasts as well as other mesodermal progenitors (13), was not affected by Wnt inhibition (Fig. 1D). Thus, inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling transiently attenuates differentiation of ES cells into a hematopoietic or an endothelial cell lineage. Other mesoderm-derived cell markers such as *MyoD* (a marker of skeletal muscle) or *Runx2* (a marker of bone and cartilage) were not expressed at these time points (data not shown). Taken together, Wnt signaling in the early phase of ES cell differentiation is required for commitment of mesodermal cells into a cardiomyocyte lineage.

To further examine the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the commitment of mesodermal cells into cardiomyocytes, we treated ES cells with purified Wnt3a protein during the early stage of ES cell differentiation. When Wnt3a was added from days 0 to 3, the

relative number of beating EBs was increased in a dose-dependent manner (Fig. 1E). Slightly lower percentage of spontaneous beating in control EBs as compared with that shown in Fig. 1B is presumably due to the mild inhibitory effect of Wnt3a elution buffer on cardiomyocyte differentiation (Fig. 1B and E). This effect of Wnt3a to promote cardiogenesis was mimicked by the addition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitor BIO (0.2  $\mu$ M) from days 0 to 3, suggesting that  $\beta$ -catenin-dependent canonical Wnt signaling is responsible for this positive effect of Wnt3a on cardiomyocyte differentiation (Fig. 1F). We also examined the expression of cardiac, hematopoietic, and endothelial cell lineage markers in response to Wnt3a treatment at day 3. Addition of Wnt3a from days 0 to 3 dramatically increased the expression of *Csx/Nkx-2.5* and *Tbx-5*, whereas the expression of *SCL*, *CD34*, *VE-cadherin*, and *CD31* was decreased in a dose-dependent manner (Fig. 1G and SI Fig. 7). We also performed FACS analysis of hcgp7, a clonal derivative of ht7 ES cells in which GFP cDNA is knocked in at the *Csx/Nkx2.5* locus (14). In response to Wnt3a treatment, there was a significant increase in the number of cells in a cardiac lineage (GFP positive) as well as a significant decrease in the number of cells in a hematopoietic (CD34 positive) or an endothelial cell (CD31 positive) lineage at day 3 of differentiation (SI Table 1). Thus, increased level of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during EB formation further enhances differentiation into cardiomyocytes and simultaneously inhibits differentiation of ES cells into hematopoietic and endothelial cell lineages.

#### Wnt Signaling Negatively Regulates Cardiomyogenesis During the Late Stage of ES Cell Differentiation.

We next examined the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during later stage of cardiomyocyte differentiation, when cells are already committed to a cardiac lineage and start to express contractile protein genes. In our experimental condition, the expression of contractile protein genes such as  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) and myosin light chain 2v (*MLC-2v*) was first observed at around day 5 (Fig. 1C). Thus, Wnt inhibitor treatment was started at day 5, and late-stage cardiomyocyte differentiation was evaluated by Western blot analysis of cardiac troponin T (cTnT) on day 10. In contrast to the inhibitory effects of Wnt inhibitors on early-stage cardiomyocyte differentiation, late-stage cardiomyocyte differentiation was strongly promoted by Dkk-1 and only marginally by Fz8/Fc, and a combination of these two inhibitors synergistically enhanced this process (Fig. 2A). This effect is consistent with previous observations showing that Dkk-1 induces ectopic cardiogenesis in noncardiac mesoderm more efficiently than soluble frizzled receptor protein family of Wnt inhibitor such as Frzb (6). In addition, treatment with a combination of Wnt inhibitors (Dkk-1 plus Fz8/Fc) from day 5 increased the area of mature cardiomyocytes stained with MF20 (a monoclonal antibody against sarcomeric MHC) by 6-fold compared with control EBs on day 10 (Fig. 2B and C). RT-PCR analysis revealed that treatment with Wnt inhibitors increased the expression of mature cardiac marker genes while the expression levels of mature hematopoietic (*CD45* and  $\beta$ *h1-globin*) or endothelial cell markers were decreased (Fig. 2D and SI Fig. 8). *Smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC)* gene, a marker of smooth muscle cells, was expressed from day 5 during ES cell differentiation (data not shown), and its expression was also decreased by Wnt inhibitor treatment (Fig. 2D and SI Fig. 8). Next, we activated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by treating EBs with Wnt3a or BIO beginning from day 5 of differentiation. In contrast to the effects of Wnt activation on early-stage cardiomyocyte differentiation, activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling at this later stage completely suppressed the expression of cTnT (Fig. 2E) and abolished the appearance of spontaneously contracting EBs or MF20-positive cardiomyocytes on day 10 (Fig. 2F). The expression of cardiac marker genes was dramatically down-regulated, whereas that of hematopoietic, endothelial, or smooth muscle cell markers was up-regulated by Wnt3a treatment (Fig. 2D and SI Fig. 8). Collectively, these observations indicate that Wnt/



**Fig. 3.** Wnt inhibits cardiomyocyte differentiation in the late phase by suppressing BMP signaling. (A) RT-PCR analysis of BMP2/4 expression. (B) Western blot analysis for cTnT on day 10. EBs were cultured in DM or DM containing noggin (Nog) or follistatin (FS) from day 5. Inhibition of BMP signaling during the late phase suppresses cardiomyocyte differentiation. (C) RT-PCR analysis of BMP2/4 and Follistatin expression. EBs were cultured in DM or DM containing Wnt inhibitors (DM + Wnt inhibitors) or Wnt3a protein (DM + Wnt3a) from day 5. W.I., Wnt inhibitors. (D) Western blot analysis for cTnT on day 10. EBs were cultured in DM or DM containing Wnt3a (DM + Wnt3a) or Wnt3a plus BMP4 protein (DM + Wnt3a + BMP4) from day 5. Inhibition of cardiomyocyte differentiation by Wnt3a was rescued by BMP treatment. (E) RT-PCR analysis of cardiac, hematopoietic, and vascular marker genes. EBs were cultured in DM or DM containing Wnt3a (DM + Wnt3a) or Wnt3a plus BMP4 protein (DM + Wnt3a + BMP4) from day 5.

$\beta$ -catenin signaling, when activated after cells are committed to cardiomyocytes, negatively regulates cardiomyocyte differentiation, and that inhibition of Wnt signaling at this stage enhances cardiomyocyte differentiation.

#### Activation of Wnt Signaling During the Late Stage Attenuates Cardiomyocyte Differentiation by Suppressing BMP Signaling.

To further investigate the molecular mechanisms by which Wnt/ $\beta$ -catenin signaling shows such biphasic effects on cardiomyocyte differentiation, we investigated whether other signaling pathways that play an important role during cardiogenesis are affected by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. The BMP family of humoral factors positively regulate cardiogenesis in *Drosophila* (15), chick (16), *Xenopus* (17), mouse (18), and P19CL6 cells (19). Among the BMP family members, BMP2/4 are implicated in cardiogenesis (16) and are expressed predominantly during the late stage of ES cell differentiation into cardiomyocytes (Fig. 3A). Expression of BMP2/4 during this stage is indispensable for cardiomyocyte differentiation, because the addition of a BMP inhibitor such as noggin (100 ng/ml) or follistatin (100 ng/ml) during the later stage of ES cell differentiation decreased the expression of cTnT (Fig. 3B). Interestingly, activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during the late stage of ES cell differentiation suppressed the expression of BMP2/4 and induced the expression of follistatin (Fig. 3C), suggesting that the negative effect of Wnt signaling on cardiomyocyte differentiation in the late phase is mediated by inhibition of BMP pathway. To test this hypothesis, we treated EBs with a combination of Wnt3a and BMP4. Addition of BMP4 protein (1 and 10 ng/ml) rescued the Wnt3a-mediated inhibition of cardiomyocyte differentiation (Fig. 3D) and normalized the expression pattern of cardiac, hematopoietic, and vascular cell marker genes (Fig. 3E). In collection, these observations indicate that the antagonistic effects of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling on cardiogenesis and hematopoiesis/vasculogenesis in the late phase of ES cell differentiation are in part mediated by Wnt-induced inhibition of BMP signaling.

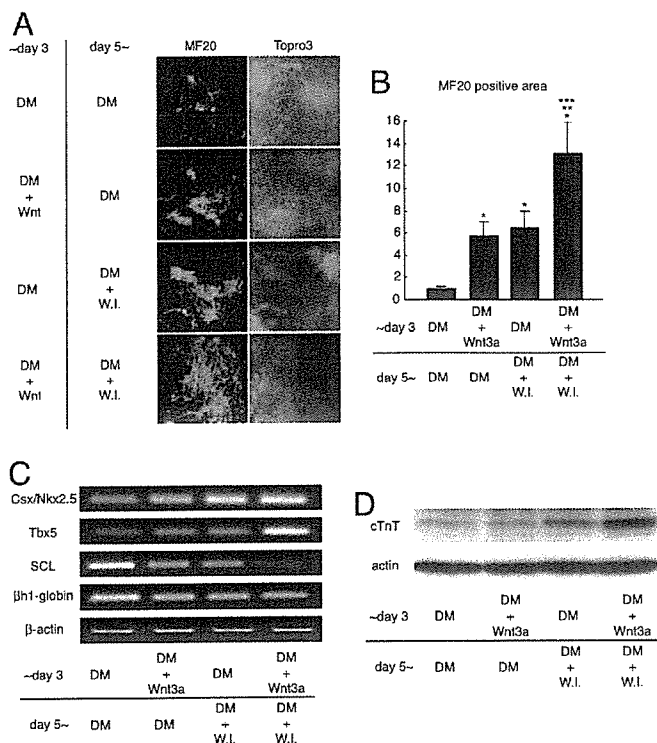
**Modulation of Wnt Signaling Enables Efficient Induction of Cardiomyocytes from ES Cells.** Finally, we tested the hypothesis that activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the early phase (from days

0 to 3) followed by Wnt inhibition in the late phase (from day 5 and afterward) might further enhance cardiomyocyte differentiation of ES cells. Activation of Wnt signaling in the early phase or inhibition of Wnt signaling in the late phase each increased MF20-positive area  $\approx$ 6-fold (Fig. 4A and B). Wnt activation in the early phase followed by Wnt inhibition in the late phase further increased MF20-positive area per single EB up to 13-fold (Fig. 4A and B). This increase in MF20-positive area was associated with increased expression of *Csx/Nkx2.5* and *Tbx5* and decreased expression of *SCL* and  *$\beta$ h1-globin* (Fig. 4C; SI Fig. 9). Enhanced cardiomyocyte differentiation and diminished hematopoietic differentiation was also confirmed by Western blot analysis of cTnT expression and FACS analysis of hcg7 cells on day 10 of differentiation (Fig. 4D; SI Table 2). Thus, appropriate modulation of Wnt signaling enables highly efficient induction of ES cell differentiation into cardiomyocytes.

#### Discussion

Although previous studies have implicated Wg/Wnt signaling in cardiac development, there exist some controversies regarding the roles of Wg/Wnt in cardiogenesis. In *Drosophila*, elimination of Wg function for a short time period after gastrulation results in loss of heart formation, and overexpression of Dishevelled leads to increased number of heart precursor cells (8, 9). Likewise, Wnt/ $\beta$ -catenin signals are essential for *in vitro* cardiomyocyte differentiation of mouse P19CL6 cells, a teratocarcinoma-derived pluripotent cell line (10, 11). However, in chick embryos at stage 5–6, Wnt3 and Wnt8 are expressed in the posterior part of the embryo (primitive streak and adjacent ectodermal cells) and block cardiogenesis in this region (5). At stage 8–9, Wnt1 and Wnt3 are expressed in the neural tube, and this Wnt signal from neural tube blocks cardiogenesis in the anterior paraxial mesoderm (7). In *Xenopus* embryos, forced expression of Wnt ligands in dorsal mesoderm (which normally gives rise to the heart) inhibits cardiac marker gene expression (6). Taken together, the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway promotes cardiogenesis in *Drosophila* and mouse P19CL6 cells, whereas it blocks heart formation in chick and *Xenopus*.

Based on our present study, one possible explanation for this apparent discrepancy is that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling has biphasic



**Fig. 4.** Activation of Wnt signaling in the early stage followed by Wnt inhibition in the late stage leads to highly efficient differentiation of ES cells into cardiomyocytes. (A) MF20 and Topro3 staining on day 10. (Magnification:  $\times 100$ .) (B) Morphometry for the expression of sarcomeric MHC in each EB. \*,  $P < 0.05$  vs. "DM>DM" protocol. \*\*,  $P < 0.05$  vs. "DM + Wnt3a>DM" protocol. \*\*\*,  $P < 0.05$  vs. "DM>DM + Wnt inhibitor" protocol. (C) RT-PCR analysis of cardiac and hematopoietic markers. (D) Western blot analysis of cTnT expression on day 10.

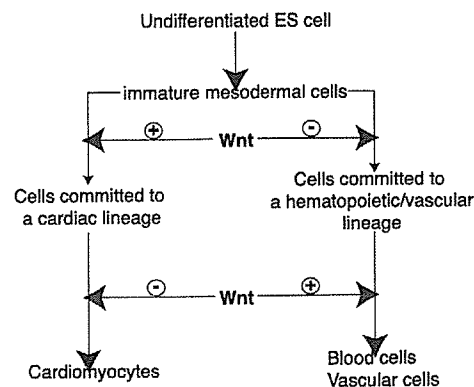
effects on cardiogenesis depending on the stage of differentiation. According to this model, Wnt signaling promotes commitment of mesodermal cells into a cardiac lineage in the early phase of cardiogenesis while it inhibits proliferation and/or maturation of committed cardiomyocytes in the late phase of cardiac development. In *Drosophila*, temporal requirement of Wg for heart formation is restricted to a short time period after gastrulation, which is much earlier than the time point when the expression of a *Csx/Nkx-2.5*-related gene *tinman* becomes restricted to dorsal cardiac mesoderm (8). During P19CL6 cell differentiation into cardiomyocytes, expression of *Wnt3a* and *Wnt8a* genes is observed earlier than that of early cardiac markers, and inhibition of Wnt signaling in the early stage results in the suppression of cardiac marker gene expression without affecting mesodermal marker gene expression (10, 11). These observations support the notion that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes commitment of mesodermal cells into a cardiomyocyte lineage. In chick and *Xenopus*, negative effects of Wnt signals on cardiogenesis are observed in precardiac mesoderm, where cells are supposed to be already committed to a cardiomyocyte lineage. In support of this hypothesis, it was reported that hemangioblast commitment is already initiated during gastrulation in the primitive streak (20). By analogy, the cell fate decision into a cardiac lineage may occur during gastrulation in the primitive streak, where a high concentration of local Wnt ligands promotes this process, and then committed cells migrate to heart forming region by gastrulation movements where they are exposed to Wnt inhibitors to form mature cardiomyocytes.

Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for primitive streak formation and mesoderm induction *in vivo* (3, 4) and the generation of ES cell-derived mesoderm *in vitro* (21). Thus, one might argue that the

positive effects of Wnts on cardiogenesis in the early stage of differentiation reflect the mesoderm-inducing activity of Wnt signaling. However, we favor the model in which additional Wnt activity is required to induce commitment of immature mesodermal cells into a cardiac lineage, because Wnt inhibitor treatment in the early phase (from days 0 to 3) did not attenuate the expression of mesodermal markers while completely abolishing early cardiac marker gene expression in our experimental condition. The discrepancy between the present work and a previous study (21) may be due to a difference in the ES cell differentiation protocol. Alternatively, the concentration of Wnt inhibitors used in our study might be subthreshold level to completely block mesodermal differentiation (Fig. 1C). During gastrulation, heart progenitor cells leave the primitive streak and move anterolaterally to reside at the anterior end of the mesoderm, making the heart the most anterior mesoderm-derived organ to develop in vertebrates. In this regard, the requirement of Wnt inhibitors for cardiogenesis in the later stage of ES cell differentiation may reflect the regulation of anterior-posterior body plan by Wnt signaling.

Another important point is that Wnt signal has antagonistic effects on cardiogenesis vs. hematopoiesis/vasculogenesis in both the early and late stages of differentiation. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling was initially proposed to increase hematopoietic stem cell (HSC) self-renewal and enhance their ability to reconstitute the hematopoietic system of lethally irradiated animals (2). On the other hand, constitutive activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hematopoietic system results in differentiation block of HSCs and widespread hematopoietic abnormalities (22, 23), together suggesting that fine-tuned control of Wnt signaling is required for HSC self renewal and differentiation. This notion is consistent with our observations that both activation and inhibition of Wnt signaling in the early phase of ES cell differentiation result in down-regulation of hematopoietic marker genes. Regarding the antagonistic effects of Wnt signaling on cardiogenesis and hematopoiesis in the late phase of ES cell differentiation, similar effects of Wnt signaling on cardiogenesis vs. hematopoiesis have been reported in chick and frog embryos: Wnt inhibition in posterior mesoderm (which normally gives rise to blood) leads to induction of cardiac markers and simultaneous inhibition of hematopoietic marker gene expression (5), and forced expression of Wnt ligands in precardiac mesoderm leads to inhibition of cardiogenesis and ectopic expression of hematopoietic markers (5, 6).

We have also shown that Wnt-induced inhibition of cardiogenesis and promotion of hematopoiesis/vasculogenesis in the late phase are in part mediated by Wnt-induced inhibition of BMP signaling. This notion is consistent with a recent report showing that inhibition



**Fig. 5.** Wnt signals exhibit developmental stage-specific, biphasic, and antagonistic effects on cardiogenesis and hematopoiesis. In the early stage of development, Wnt signals promote cardiogenesis and inhibit hematopoiesis, whereas in the late stage of development, Wnt signals inhibit cardiomyocyte differentiation and promote blood cell differentiation.