

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒトES細胞由来心筋細胞の表面マーカー探索および
大量培養・純化システムの構築

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 日高 京子

平成20 (2008) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

ヒトES細胞由来心筋細胞の表面マーカー探索および大量培養・
純化システムの構築

日高京子-----1

II. 分担研究報告

DNAマイクロアレイによる心筋発現遺伝子の網羅的解析

森崎隆幸-----6

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----9

IV. 研究成果の刊行物・別刷

-----10

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

ヒト ES 細胞由来心筋細胞の表面マーカー探索および
大量培養・純化システムの構築

主任研究者 日高京子 国立循環器病センター研究所 室長

研究要旨

ES 細胞は高い増殖能と多能性を持ち、すでに基礎研究の分野で利用がはじまっている。さらに最近、多能性細胞 (iPS 細胞) がヒト体細胞からも誘導可能であることが示され、再生医療における新しい時代が始まろうとしている。ES 細胞や ES 細胞に限りなく性質の近い iPS 細胞を目的の細胞に分化させて利用していくための基盤研究を推進することは、新しい治療法や新薬の開発といった点から非常に重要であると考えられる。ES 細胞は胚様体の形成などを経て、自動拍動する心筋を比較的容易に生ずるが、胚様体の中には心筋以外の細胞も同時に生じている。したがって細胞移植のソースとして ES 細胞由来細胞を利用するためには、分化させた細胞集団から不要な細胞や未分化な細胞を除き、心筋のみ、あるいは心筋に分化する前駆細胞のみを単離する必要がある。しかしながら心筋細胞には効率的単離を容易にする細胞表面マーカーがほとんど知られていない。また、心筋細胞は分化してまもなく増殖能力を失うため、心筋細胞を大量に得るためには大量分化誘導の系の開発が必要である。本研究では ES 細胞から誘導した心筋細胞を単離・評価するためのマーカーの探索、およびこれを利用した効率的かつ大量化へむけての単離システムの確立をめざすものである。本研究ではまず (1) マウス ES 細胞を用いて心筋への効率的分化誘導法の開発と、この系を利用した網羅的発現遺伝子の探索を行い、さらに候補分子の発現特異性についてマウス胚を用いた発現解析を行った。この結果、候補マーカー分子が心筋および心筋前駆細胞で発現していることが示唆され、心筋細胞・前駆細胞を分離するマーカーとして、有用である可能性が示唆された。つぎに、(2) 胚様体に生じる心筋以外の細胞を同定することも、ネガティブセレクションと組み合わせた単離法の開発に有用であると考え、心筋以外で発現する遺伝子の発現特異性についてマウス胚を用いて調べた。この結果、心筋の他に心内膜細胞等が胚様体に生じていることが示唆された。さらに、(3) 胚様体の大量形成による ES 細胞の大量分化誘導について、従来のハンギングドロップ法よりも高効率な EB 形成チップ法やオートメーション化が可能な 384 プレート法について検討し、従来法よりも省スペースでかつ省労力で胚様体形成が可能であることを確認した。

分担研究者

国立循環器病センター研究所

森崎隆幸

A. 研究目的

本研究は ES 細胞より大量にかつ効率よく心筋細胞を得るために、心筋およびその前駆細胞で発現するマーカーを探索し、大量かつ効率的な分化誘導系とともに純度の高い単離法を開発することを目的とする。ES 細胞はさまざまな細胞に分化するが、再生医療の細胞ソースとして利用するためにはここから目的の細胞を取り出す必要がある。これまでにヒト ES 細胞から大量に心筋分化誘導を行い、ラット心筋梗塞モデルに移植した実験が報告されている (Laflamme et al. Nat Biotechnol. 25:1015-1024, 2007) が、この報告に用いられている移植細胞の数は 10^7 のオーダーであり、実用化に向けてはこれを上回る数の細胞を得る必要がある。また、この報告を含め、ほとんどの報告では密度勾配を利用した標的細胞の濃縮が行われており、安全性という観点からも、特異的表面マーカーの同定は有用な材料になると考えられる。そこで本研究では (1) 高効率分化条件の検討と発現遺伝子の解析によるマーカー候補遺伝子の同定、(2) より効率的な単離を可能にするための胚様体に存在する心筋以外の細胞種の同定、(3) 胚様体大量形成法の確立を目的とし、以下の実験を行った。

B. 研究方法

本年度における研究はすべてマウス ES 細胞を用いて行った。ES 細胞より胚様体

を形成させ、①10%血清を含む通常条件、②一時的に培養液の血清を除去する心筋分化促進条件、③レチノイン酸を加えた心筋分化抑制条件にて胚様体を培養し、これらのサンプルから RNA を調製し DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子を網羅的に解析した。心筋の分化誘導に伴い特異的に発現する遺伝子についてマウス胚の Whole mount in situ hybridization を行い、発現部位を解析した。また、マウス胚心臓を取り出し、酵素処理で解離後 CD31 陽性・陰性細胞にセルソーターで分離し、それぞれのフラクションの定量的 RT-PCR 法を行うことよって、心筋で発現するものと心内膜で発現するものとを区別した。胚様体形成については従来のハンギングドロップ法に加えて、「EB 形成チップ」と呼ばれるマイクロウェルを用いた方法、および 384V 底プレートと自動分注機を組み合わせた「384 法」を検討し、それぞれから得られる心筋細胞の割合をフローサイトメトリーにより、また発現遺伝子のレベルを定量的 RT-PCR 法により測定した。

C. 研究成果

I. 血清除去条件による高効率心筋分化誘導と網羅的発現遺伝子の探索。われわれはマウス ES 細胞を用いて、一時的な血清除去が高効率に心筋を誘導することを見出した。そこでこの条件で発現が上昇する遺伝子について、DNA マイクロアレイを用いた網羅的発現遺伝子の探索を行った。「心筋分化促進条件」で発現の上昇する遺伝子の中には Nkx2-5, Gata4/5/6, Mef2c, Myocd などをはじめとする心筋

特異的転写因子、および収縮タンパク質等の構造タンパク質をコードする遺伝子が含まれていた。発現部位が明らかでない未知の遺伝子についてマウス胚における発現部位を調べたところ、そのほとんどが心臓領域に発現し、マイクロアレイによる遺伝子抽出法が心筋特異的遺伝子を絞り込む上で有用であることが示唆された。増殖因子受容体を含む既知の細胞表面マーカーのほとんどは、発現が通常条件に比べて「心筋分化促進条件」で減少する傾向にあったが、少数ながら発現が増加する表面マーカー遺伝子が見いだされ、この中の一つを「マーカーX」と名づけた。マーカーXの遺伝子発現をマウス胚で調べたところ、心臓原基として知られる cardiac crescent に発現が始まり、原始心筒においても発現が持続していた。また、このマーカーに対する抗体を用いて胚様体をX陽性およびX陰性の分画に分離したところ、X陽性の分画からのみ自動拍動する心筋細胞が生じた。

11. 胚様体における心筋以外の細胞～心内膜細胞の同定。われわれがマイクロアレイで見出した遺伝子の中には心臓領域では発現するものの「心筋分化促進条件」で必ずしも発現が上昇しない遺伝子も存在した。これらの遺伝子が心臓のどの細胞種で発現するかを同定するために、マウス胚心臓を CD31 陽性と陰性の集団に分離し、それぞれの発現遺伝子を RT-PCR にて解析した結果、これらが CD31 陽性の心内膜と考えられるフラクションに発現していることが明らかになった。転写因子 *Nfatc1* は卵黄嚢由来の

CD31 陽性血管内皮細胞には発現せず、心内膜特異的であることがわかり、胚様体においても発現していることが明らかとなった。以上のことから胚様体では心内膜細胞が心筋細胞とともに誘導されていることが示唆された。

111. EB 形成チップ等を用いた胚様体大量形成法の検討。ES 細胞は胚様体と呼ばれる細胞塊の形成により比較的効率よく自動拍動する心筋細胞を生ずるが、胚様体を形成させる従来法としては①ハンギングドロップ法、②細胞懸濁法などがある。前者はスペースと労力がかかり、後者は解離状態に感受性の高いヒト ES 細胞では不向きであると考えられる。そこで大量に胚様体を形成させるため、平方センチあたり 1000 個のマイクロウェルを持つチップを用いた「EB 形成チップ法」および 384V 底プレートと自動分注機を組み合わせた「384 法」による胚様体形成を行い、心筋への分化を評価したところ、EB 形成チップ法も 384 法もハンギングドロップ法に比べて遜色なく心筋細胞を生ずることが明らかとなった。

(倫理面への配慮)

今年度における本研究においてヒト ES 細胞は使用しなかった。尚、ヒト ES 細胞使用については研究機関内の倫理委員会の承認が得られ、文部科学省での確認の後、使用開始できる見込みである。遺伝子組換え実験は研究機関の委員会の承認を得て行われた。動物の取扱いについても研究機関の委員会の承認を得て行われ、また、動物愛護に配慮して実験を行った。

D. 考察

1. 血清除去条件による高効率心筋分化誘導と網羅的発現遺伝子の探索。細胞分化条件についてはこれまでの条件検討より培養液から血清を除去する培養法によって約 20%の心筋細胞を得ることができているが、最近、アクチビンと BMP の添加により 30%以上の心筋を誘導できたという報告がなされた (Laflamme et al 2007)。来年度はこの誘導法との比較を含めてより効率的な誘導法の探索を行いたい。一方、網羅的遺伝子探索によって、少数ながら心筋分化促進条件で発現が上昇する遺伝子候補を抽出することができ、「マーカー X」を同定することができた。このマーカー X 遺伝子の発現はマウス胚心臓原基に発現が認められ、マーカー X に対する抗体を用いて、胚様体をセルソーターによって分離したところ、X 陽性の分画からのみ心筋細胞を生ずることがわかった。このことはマーカー X が心筋およびその前駆細胞で発現し、これらを分離するために有用なマーカーであることを示している。現在、心筋転写遺伝子 Nkx2-5 遺伝子座に EGFP をノックインした ES 細胞株を利用し、マーカーの細胞特異性についてさらに詳細に解析を進めている。

1.1. 胚様体における心筋以外の細胞～心内膜細胞の同定。胚様体の中で心筋以外にどのような細胞が生じているかを同定することは有効なネガティブセレクションにつながり、効率的な単離法の開発につながる。今回の遺伝子発現解析研究によって、胚様体には心筋細胞のほかに

心内膜細胞も生じていることがわかった。心内膜細胞は表面マーカー CD31 で標識されることから、CD31 をネガティブセレクションマーカーの一つとして考えることができる。

1.1.1. EB 形成チップ等を用いた胚様体大量形成法の検討。384 法はオートメーション化に適しており、設備があれば大量化が可能である。EB 形成チップは 1 平方センチの中に 1000 個の EB を形成させることができ、胚様体形成を省スペースで簡便に行うことができることが確認できた。

E. 結論

本研究では (1) 血清除去による心筋への効率的分化誘導と、この系を利用した網羅的発現遺伝子の探索により候補分子マーカー X を同定することができた。マウス胚を用いた発現解析により、マーカー X 遺伝子が心筋および心筋前駆細胞で発現していることが示唆され、心筋細胞・前駆細胞を分離するマーカーとして、有用である可能性が示唆された。(2) 胚様体に生じる心筋以外の細胞を同定することは、ネガティブセレクションと組み合わせた単離法の開発に有用であり、今回、心筋の他に CD31 で標識される心内膜細胞等が胚様体に生じていることが示唆された。(3) 胚様体の大量形成について、EB 形成チップ法や 384 プレート法により、従来法よりも省スペースでかつ少ない労力で心筋細胞を含む胚様体形成が可能であることを確認した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terami H, Hidaka K, Shirai M, Narumiya H, Kuroyanagi T, Arai Y, Aburatani H, Morisaki T. Efficient capture of cardiogenesis-associated genes expressed in ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 355(1):47-53. 2007
- 2) Narumiya H, Hidaka K, Shirai M, Terami H, Aburatani H, Morisaki T. Endocardiogenesis in embryoid bodies: novel markers identified by gene expression profiling. *Biochem Biophys Res Commun.* 357(4):896-902. 2007
- 3) Kim HS, Cho JW, Hidaka K, Morisaki T. Activation of MEK·ERK by heregulin·beta1 promotes the development of cardiomyocytes derived from ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(3):732-8. 2007

2. 学会発表

- 1) 日高京子、白井学、成宮博理、森崎隆幸 胚様体の網羅的遺伝子発現解析による心内膜発現遺伝子の同定 第6回日本再生医療学会 2007年3月
- 2) 日高京子、森崎隆幸 ES細胞から心筋への分化誘導における網羅的遺伝子発現解析—形なき胚様体から見えてきたもの— 第11回 Molecular

Cardiovascular Conference 2007年9月(キロロ)

- 3) 水田栄之助、白井学、日高京子、孫春蘭、須川涼、井上修、重政千秋、久留一郎、森崎隆幸 心臓発生期におけるT型Ca²⁺チャンネル遺伝子Cav3.1, Cav3.2発現パターンの解析 第11回 Molecular Cardiovascular Conference 2007年9月(キロロ)
- 4) 宮本章子、日高京子、白井学、金谷信彦、森崎隆幸 心筋分化に伴いES細胞で発現するRNA結合タンパク質CACHE65の発現解析 第30回日本分子生物学会 2007年12月(横浜)
- 5) 須川涼、日高京子、白井学、森崎隆幸 心筋分化に伴いES細胞で発現する転写因子CACHE67の発現解析 第30回日本分子生物学会 平成19年12月(横浜)
- 6) 孫春蘭、森崎裕子、日高京子、宮本章子、森崎隆幸 ES細胞でのFbn1遺伝子を標的とするshRNAによる発現抑制の評価 第30回日本分子生物学会 平成19年12月(横浜)
- 7) 本多賢彦、日高京子、森崎隆幸 心筋再生医療に向けたEB大量形成法の検討 第7回日本再生医療学会 2008年3月(名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

DNA マイクロアレイによる心筋発現遺伝子の網羅的解析

分担研究者 森崎隆幸 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨

無限増殖能と多能性を有する ES 細胞は自動拍動する心筋細胞を生ずることから、心筋に対する細胞移植のリソースとして注目されるが、心筋細胞の効率的な単離に必要な細胞表面マーカーがほとんど知られず、十分な増殖能を有する心筋前駆細胞の分離法は未だ知られていない。また、心筋細胞の分化過程においては分化誘導の鍵となるマスターゲーンは知られておらず、ES 細胞から心筋細胞のみを誘導することは現時点では容易ではないと考えられる。そこで、これまでの研究で明らかにした血清除去処理による心筋分化誘導促進条件を比較検討し、さらに、血清除去による心筋分化促進にともない発現が変化する遺伝子群を明らかにするために、DNA マイクロアレイ解析を行い、種々の条件（時間経過、培養条件）により変化する遺伝子発現を解析ツールソフトウェア (eXintegrator System) を用いて網羅的発現遺伝子の探索を行った。表面マーカーと考えられる候補分子については心筋および心筋前駆細胞での特異性を *in vitro* での確認のほか *in silico* でも検討し、マーカーとしての有用性についてさらに解析を進めている。遺伝子発現制御に関わると考えられる遺伝子については ES 細胞その他の細胞分化誘導システムにおいて、siRNA を利用したノックダウンによる機能解析を行っている。

A. 研究目的

本研究は ES 細胞からの心筋細胞の分離が効率良く行えるよう、ES 細胞の心筋細胞への分化過程で発現する遺伝子を網羅的に探索し、単離法を開発するための候補選別にむけての情報を得ることを目的とする。ES 細胞は無限増殖能と多分化能を合わせ持ち、胚様体形成を通して自律拍動を示す心筋細胞へと分化し、再生医療の細胞ソースとして注目されるが、こ

れを利用するためには目的の細胞をできるだけ多く分化させ、ここから取り出す必要がある。そこで、効率の良い分化誘導の鍵となる遺伝子発現制御因子とともに、細胞選別のマーカー候補分子の同定にむけた発現遺伝子の網羅的な解析を行った。

B. 研究方法

本年度はマウス ES 細胞の心筋分化条件

を比較検討し、分化過程での遺伝子発現を検討した。ES細胞より胚様体を形成させて培養を行うと自律拍動する心筋細胞が出現するが、10%血清を含む通常の培養条件に比して、一時的に培養液の血清を除去すると心筋分化が促進し、他方、レチノイン酸を加えた条件で培養すると心筋分化が抑制されることがこれまでの研究で明らかになった。そこで、これらの異なる条件によりES細胞より形成させた胚様体を培養し、細胞よりRNAを調製し、DNAマイクロアレイを用いて発現する遺伝子転写産物 mRNA を網羅的に解析した。遺伝子発現パターンから心筋の分化誘導との関係する遺伝子を選別するにあたっては、理化学研究所で開発されたソフトウェアツール (eXintegrator System) を用いた。選別抽出された遺伝子を CACHE (Cardiogenesis Associated genes from CHip assay of EBs) と名づけ、再度定量的 RT-PCR 法により、ES細胞由来の分化過程にある細胞での転写発現を確認するとともに、Web上のデータベースを利用して既知の遺伝子発現情報、遺伝子機能情報と比較検討し、マーカー分子としての有用性を *in silico* の観点からも検討した。また、遺伝子発現制御に関わる候補分子については siRNA を利用して、分化誘導における機能解析を行った。

C. 研究成果

これまでにマウス ES細胞で我々が見いだした、一時的な血清除去が高効率の心筋誘導をもたらす知見をもとに、この条件での発現が上昇する遺伝子の抽出選別を行うため、種々の培養条件や時期での

心筋分化を自律拍動を指標に比較し、時期特異的に血清除去を行うことでの心筋分化促進とレチノイン酸添加による心筋分化抑制を確認した。次に、これらの種々の培養条件下での分化過程の異なる時期での遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に探索した。探索ソフトウェア eXintegrator System を用いることで、血清除去により「心筋分化促進条件」で分化時期に応じて発現の上昇する遺伝子を簡便に選別抽出することができ、実際、選別された遺伝子の中に Nkx2-5, Gata4/5/6, Mef2c, Myocd などの心筋特異的転写因子や収縮タンパク質等の特異的構造タンパク質をコードする遺伝子が含まれていた。選別された遺伝子は、RT-PCR 法によりマイクロアレイで発現が心筋分化促進条件に呼応していることを再確認し、これまで心筋分化との関係が明らかでない未知の遺伝子を分化関連候補遺伝子あるいは分化マーカー候補遺伝子とした。分化関連候補遺伝子の中には転写あるいは転写後に遺伝子発現を制御すると考えられる遺伝子もあり、心筋分化誘導の効率的化への応用が期待される候補として注目している。

D. 考察

心筋分化誘導については、我々が検討した特定時期に培養液から血清を除去する培養法以外に、最近、アクチビンと BMP の添加により効率よく心筋分化が見られるとの報告があり、今後は別の因子の添加を含め、種々の条件を比較してさらに効率的な誘導法の探索を行う必要があると考えられる。また、DNA マイクロアレ

イと探索ソフトウェアを用いた網羅的遺伝子探索により、細胞分別や純化に有用なマーカー遺伝子候補の抽出にむけての基礎情報を獲得することができた。今後、これらの候補遺伝子情報により分別される細胞について詳細な解析を進めていく必要があると考える。

E. 結論

本研究では血清除去による心筋への効率的分化誘導と、この系を利用した網羅的発現遺伝子の探索が心筋分化に関係する候補遺伝子、マーカー遺伝子候補の選別につながる有用な情報獲得につながることを確認した。今後、心筋細胞・前駆細胞を分離するマーカーの候補について詳細な検討を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terami H, Hidaka K, Shirai M, Narumiya H, Kuroyanagi T, Arai Y, Aburatani H, Morisaki T. Efficient capture of cardiogenesis-associated genes expressed in ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 355(1):47-53. 2007
- 2) Kim HS, Cho JW, Hidaka K, Morisaki T. Activation of MEK-ERK by heregulin-beta1 promotes the development of cardiomyocytes derived from ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(3):732-8. 2007

2. 学会発表

- 1) 日高京子、白井学、成宮博理、森崎隆幸 胚様体の網羅的遺伝子発現解析による心内膜発現遺伝子の同定 第6回日本再生医療学会 2007年3月
- 2) 日高京子、森崎隆幸 ES細胞から心筋への分化誘導における網羅的遺伝子発現解析—形なき胚様体から見えてきたもの— 第11回 Molecular Cardiovascular Conference 2007年9月(キロロ)
- 3) 水田栄之助、白井学、日高京子、孫春蘭、須川涼、井上修、重政千秋、久留一郎、森崎隆幸 心臓発生期におけるT型Ca²⁺チャンネル遺伝子Cav3.1, Cav3.2発現パターンの解析 第11回 Molecular Cardiovascular Conference 2007年9月(キロロ)
- 4) 宮本章子、日高京子、白井学、金谷信彦、森崎隆幸 心筋分化に伴いES細胞で発現するRNA結合タンパク質CACHE65の発現解析 第30回日本分子生物学会 2007年12月(横浜)
- 5) 須川涼、日高京子、白井学、森崎隆幸 心筋分化に伴いES細胞で発現する転写因子CACHE67の発現解析 第30回日本分子生物学会 平成19年12月(横浜)
- 6) 孫春蘭、森崎裕子、日高京子、宮本章子、森崎隆幸 ES細胞でのFbn1遺伝子を標的とするshRNAによる発現抑制の評価 第30回日本分子生物学会 平成19年12月(横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
森崎隆幸	「生命倫理と人権に関する世界宣言」成立の経緯と今後の課題	奥田純一郎	普遍性と多様性	上智大学出版	東京	2007	26-34

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Terami H, Hidaka K, Shirai M, Narumiya H, Kuroyanagi T, Arai Y, Aburatani H, Morisaki T.	Efficient capture of cardiogenesis-associated genes expressed in ES cells.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	355 巻 1 号	47-53	2007
Narumiya H, Hidaka K, Shirai M, Terami H, Aburatani H, Morisaki T.	Endocardiogenesis in embryoid bodies: Novel markers identified by gene expression profiling.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	357 巻 4 号	896-902	2007
Kim HS, Cho JW, Hidaka K, Morisaki T.	Activation of MEK-ERK by heregulin-beta1 promotes the development of cardiomyocytes derived from ES cells.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	361 巻 3 号	732-738	2007
森崎隆幸 日高京子	ES細胞の臨床応用：心血管系の再生医療実現に向けて	循環器病研究の進歩	28 巻 1 号	2-9	2007
森崎隆幸 日高京子	ES細胞から心筋をつくる	Heart View	11 巻 13 号	55-61	2007
森崎隆幸 日高京子	ES細胞による心臓再生の可能性と課題	呼吸と循環	55 巻 7 号	715-720	2007

Efficient capture of cardiogenesis-associated genes expressed in ES cells

Hiromi Terami^a, Kyoko Hidaka^a, Manabu Shirai^a, Hiromichi Narumiya^a,
Takuo Kuroyanagi^{a,c}, Yuji Arai^a, Hiroyuki Aburatani^b, Takayuki Morisaki^{a,c,*}

^a Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

^b Genome Science Division, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

^c Department of Molecular Pathophysiology, Osaka University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka, Japan

Received 27 December 2006

Available online 30 January 2007

Abstract

Cardiogenesis can be induced *in vitro* in ES cells, though it is difficult to distinguish cardiac-specific genes, since embryoid bodies simultaneously differentiate into multiple lineages. In the present study, transient serum removal during culture greatly enhanced cardiogenesis, and reduced generation of endothelial and hematopoietic cells. Using DNA microarray analysis of 24 differentiated sample cultures including cardiogenesis-enhanced cells, we successfully selected genes up-regulated in embryoid bodies that had undergone cardiogenic differentiation. Besides contractile protein genes, cardiac transcriptional regulatory genes, such as *Nkx2-5*, *Gata4/5*, *Mef2c*, and *Myocd*, were primary constituents of the first 100 genes chosen as cardiogenesis-associated genes. Further, whole mount *in situ* hybridization analysis of 13 genes containing non-characterized ones confirmed that most of them were specifically expressed in the heart region of mouse embryos from E9.5–10.5. Based on our results, we consider that the present profiling method may be useful to identify novel genes important for cardiac development.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Embryonic stem cells; Embryoid body; Cardiogenesis; Differentiation; Development; Mesoderm; Microarray; Gene expression

ES cells are differentiated into the three embryonic germ layers through the formation of three-dimensional structures called embryoid bodies (EBs) [1]. Cardiogenesis is easily detected by spontaneous contraction of EBs and has been suggested to mimic that which occurs in embryos. Among the different types of cardiac lineage cells, atrial, ventricular, and conduction system cell types differentiate as EBs, which has been demonstrated by gene expression pattern, immunological, electrophysiological, and pharmacological analyses [2]. Although ES cells are considered as a promising source of seed cells for tissue engineering, and many factors and molecules have been reported to enhance cardiogenesis *in vitro*, it is still difficult to completely con-

trol the direction of differentiation, partially because of the clonal differences in differentiation potential of different ES cell lines. Thus, it is important to elucidate the mechanism by which cardiomyocytes are generated during embryogenesis.

Cardiac development is controlled by an evolutionarily conserved network of transcription factors, including *Nkx2-5*, *Gata4/5/6*, *Mef2c*, and *Hand2*, which connects signaling pathways with genes for muscle growth, patterning, and contractility [3,4]. Mutations in components of the cardiac gene network cause congenital heart disease, the most common human birth defect. Among them, the homeodomain-containing transcription factor *Nkx2-5*, a vertebrate homolog of the *Drosophila* homeobox gene *tinman*, is one of the earliest markers of the mesoderm. Expression of *Nkx2-5* is first detected in cardiogenic mesoderm tissue termed the cardiac crescent and then maintained in cardiomyocytes throughout heart development [5,6]. In a

* Corresponding author. Address: Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan. Fax: +81 6 6872 5597.

E-mail address: morisaki@ri.ncvc.go.jp (T. Morisaki).

previous study, knock-in of EGFP in one of the *Nkx2-5* loci successfully identified and isolated cardiomyocytes derived from ES cells [7].

Recent high-throughput analyses using DNA microarray methods have uncovered the profiles of genes expressed during EB differentiation, demonstrating that mesoderm induction precedes cardiogenesis. However, it has been difficult to distinguish cardiomyocyte-specific genes from others in these kinds of studies [8], since multiple cell lineages differentiate simultaneously following mesoderm induction. These types of cells include other mesoderm derivatives, such as hematopoietic and endothelial cells, as well as endoderm derivatives. Notably, these cells are generated in a spatially related manner in embryos [9]. On the other hand, use of purified cells that are committed to cardiomyocytes for gene expression profiling may make it difficult to identify genes transiently expressed during the process of differentiation.

In the present study, we found that transient serum removal greatly enhanced cardiogenesis in EBs, which resulted in EB populations composed of up to 30% cardiomyocytes, instead of decreased populations of hematopoietic and endothelial cells. Those findings prompted us to also analyze cardiomyocyte-rich EBs using microarray analysis. In addition to use of the cardiomyocyte-rich EBs, the multiple culture conditions utilized enabled us to efficiently select genes expressed in the early stages of cardiogenesis, including most of the well-characterized cardiac-specific transcription factor genes that are relevant for heart development. We also identified novel genes that are specifically expressed in the embryonic heart. The resultant microarray database should enable identification of genes potentially important for cardiomyocytes as well as cardiac function.

Materials and methods

ES cell culture and differentiation. The mouse ES cell line ht7 and its derivative hcgp7 (*Nkx2-5* EGFP knock-in ES cells) were cultured without feeder cells, and then differentiated as described previously [7,10]. For serum removal, floating EBs were collected once into a 50-ml test tube and transferred to a bacterial Petri dish filled with serum-free medium on day 4 (d4). To determine the time window of effect of serum removal, serum was removed on d3. To determine beating EBs, floating EBs were transferred onto gelatin-coated dishes on d6 and cultured further for 4 days to observe spontaneous contraction.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted from ES cell-derived cells using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and then reverse-transcribed to cDNA with SuperScript III (Invitrogen). PCR was performed with a QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Chatsworth, CA) using a real-time thermal cycler (7700 Sequence Detector Systems, Applied Biosystems, Foster City, CA). To ensure the fidelity of the mRNA extraction and reverse transcription processes, all samples were subjected to PCR amplification using Rodent GAPDH Control Reagent (Applied Biosystems), with the data normalized with respect to those values. The primers used, described in detail previously [7].

DNA microarray analysis. To obtain samples for DNA microarray analyses, 3 independent differentiation experiments were performed under 3 different differentiation conditions. (1) Normal condition: floating EBs were cultured in the presence of 10% fetal calf serum. (2) Cardiogenesis-

enhanced condition: serum was removed on d4 and total RNA extracted on d7. (3) Cardiogenesis-inhibited condition: floating EBs were treated with 10^{-7} M retinoic acid from d3 to d7. More than 5 μ g of total RNA was isolated from each EB sample using an RNeasy kit (QIAGEN). As a negative control, a fibroblast cell line established from an embryonic heart was also included. Each fluorescent labeled cDNA pool was hybridized on an Affymetrix Mouse Expression Chip (Mouse Expression Set 430) and acquired data regarding gene expression were visualized using eXintegrator software (<http://www.cdb.riken.go.jp/scb/documentation/>). Similarities to the specified profiles were calculated as the mean of the Euclidean distance to the set of probe pair profiles for each probe set.

Whole-mount *in situ* hybridization. Complementary DNA fragments of cardiogenesis-associated genes (see Supplemental Table 1) were generated by PCR amplification using total cDNA from d8 EBs as the template, with specific primers (primer sequences are available upon request). Hybridization was performed using mouse embryos under standard conditions with an automated *in situ* hybridization system (Genemaster ISH-W, Aloka Co., Ltd., Tokyo) [11]. No signals were observed with the sense probes (data not shown).

Immunohistochemistry and determination of apoptotic cells. The EBs were cryo-sectioned at 8 μ m, then cardiomyocytes and apoptotic cells were detected using fluorescence microscopy. The sections were fixed in 1% paraformaldehyde, followed by cell permeabilization with 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium citrate (pH 7.4). After washing in PBS, the sections were incubated with a TUNEL reaction mixture (In Situ Cell Death Detection Kit TMR red, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and the anti-sarcomeric myosin antibody MF20 (Developmental Studies Hybridoma Bank). MF20 was visualized with anti-mouse IgG-Alexa488 (Invitrogen). Thereafter, the cells were observed under a BX51 microscope (Olympus Corporation, Tokyo) and photographed using a DP70 digital camera (Olympus Corporation).

Flow cytometry and cell sorting. For determination of endothelial/hematopoietic/myocardial cells in the EBs, *Nkx2-5*/EGFP ES cell-derived EBs were dissociated into single cells using trypsin/EDTA. The cells were incubated with the antibody against phycoerythrin (PE)-conjugated CD31 or CD45 (eBioscience, San Diego, CA). Stained cells were analyzed using a FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA) with CellQuest software (BD Biosciences). For determination of myosin heavy chain-expressing cells by flow cytometry, dissociated cells were fixed and permeabilized using FIX & PERM Cell Permeabilization Reagent (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). The cells were then washed and incubated in staining buffer containing MF20, following incubation with anti-mouse IgG-Alexa488.

Results

Effects of serum removal on differentiation of embryoid bodies

Using an *Nkx2-5*/EGFP ES cell line, we recently reported that *Wnt11* can facilitate cardiac differentiation of ES cells [10]. In the course of our studies, we discovered that transient serum removal increased the population of *Nkx2-5*/EGFP cells in EBs (Fig. 1A and B). To confirm that finding, we monitored cardiac differentiation by counting the number of spontaneously beating EBs. When serum was removed from d4, most of the EBs started to beat by d7, earlier than control EBs (Fig. 1C). Consistent with those results, transcripts of the cardiac transcription factor genes *Gata4*, *Mef2C*, *Nkx2-5*, as well as the structural protein genes, *Myl2* and *Myl7*, were enhanced after serum-free treatment (Fig. 1D). That enhancement is likely to be stage-specific, as no beating EBs were observed and the levels of cardiac marker genes were decreased when serum was

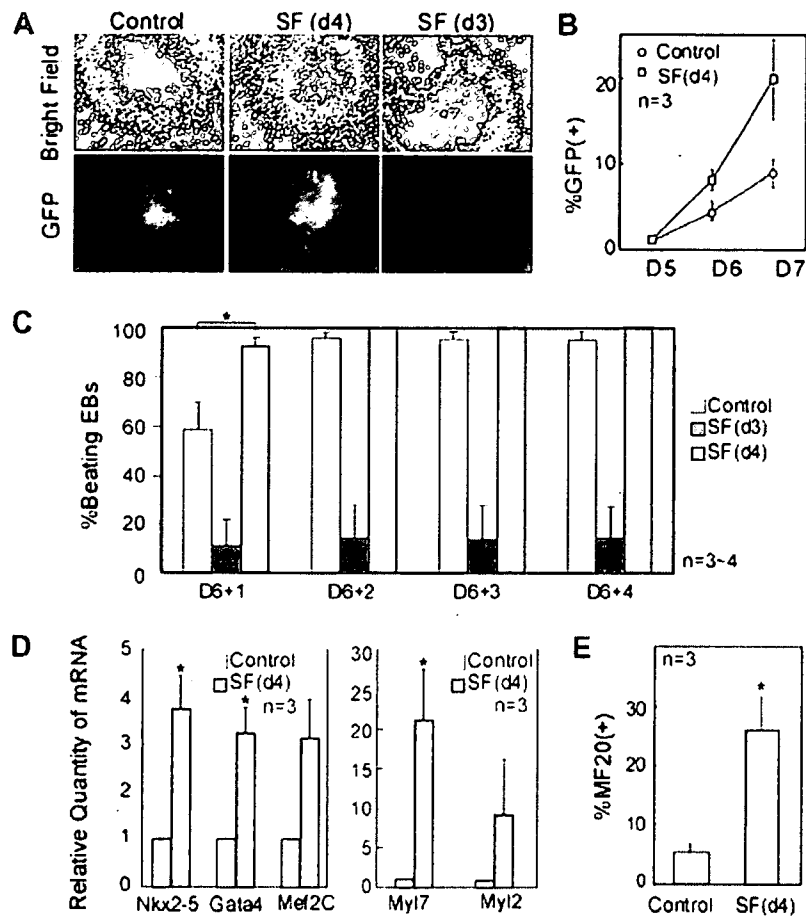


Fig. 1. Transient serum removal enhances cardiac differentiation of ES cells. (A) GFP fluorescence of Nkx2-5/EGFP ES cell-derived EBs differentiated after transient serum removal. Serum was removed at d4 or at d3. EBs were attached on gelatin-coated plates at d6 and further cultured for 2 days. (B) Quantification of Nkx2-5/EGFP-positive cell in EBs. Trypsin-dissociated cells were analyzed by flow cytometry. (C) The number of spontaneously beating EBs after transient serum removal. EBs were transferred to a 24-well gelatin-coated dish on d6 and the numbers of beating EBs were counted daily (mean \pm SE, $*P < 0.05$). (D) Quantification of mRNA level of cardiac transcription factor genes total RNA was extracted from EBs and real time RT-PCR analysis was performed (mean \pm SE, $*P < 0.05$). (E) Quantification of MyHC-positive cells in EBs. Trypsin-dissociated cells were fixed, permeabilized, and stained with MF20 and anti-mouse IgG conjugated with Alexa488. MF20-positive cells were analyzed by flow cytometry (mean \pm SE, $*P < 0.05$).

removed from d3. On the other hand, *Nes*, a marker of neural differentiation, was up-regulated in that condition (data not shown), consistent with the observation that ES cells differentiated into neuroectoderm tissue in the absence of serum [12]. To further quantify the number of cardiomyocytes that had differentiated from EBs, we analyzed EBs by flow cytometry. The population of sarcomeric myosin heavy chain-positive (MF20⁺) cells in serum-free treated EBs was considerably higher than that in control EBs (Fig. 1E). Immunohistochemical analyses of frozen sections revealed that the MF20⁺ area was much larger in serum-free treated EBs as compared to control EBs (Fig. 2A).

EBs usually develop apoptotic cells under a normal serum-containing culture condition, which may contribute to cavity formation [13]. On the other hand, serum removal is generally believed to cause cell death in cultured cells. In the present experiments, serum removal did not increase

the number of apoptotic cells, shown as TUNEL positive cells (Fig. 2A). Overall, the number of cells incubated without serum was about half that in the control EB cultures (Fig. 2B), while the number of cells with hematopoietic (CD45⁺) or endothelial cell (CD31⁺) lineage was much lower with the serum-free condition (Fig. 2C), and we could not detect dying cells or apoptotic cells of CD45⁺ or CD31⁺ lineage (data not shown). Thus, the fate of EBs appeared to change from a hematopoietic/endothelial lineage to a cardiac lineage, perhaps through selective differentiation of the cells.

Microarray analysis of genes expressed in embryoid bodies

Using serum-free treated cardiomyocyte-rich EBs, we profiled the genes expressed during cardiac differentiation of EBs with DNA microarray analysis. EBs became differentiated using a standard protocol with 10% serum, a cardio-

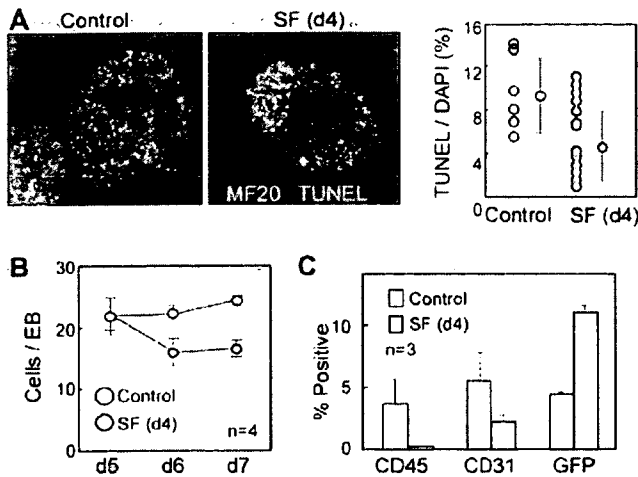


Fig. 2. Transient serum removal changes the fate of EBs by reducing generation of endothelial/hematopoietic cells. (A) Apoptosis of EBs after culturing in serum-free medium. Frozen sections of EBs were analyzed for TUNEL-positive cells, and the frequency of TUNEL-positive cells was calculated. (B) Number of cells in EBs after culturing in serum-free medium. (C) Endothelial/hematopoietic cell lineage analysis of EBs. Trypsin-dissociated *Nkx2-5*/EGFP ES cell-derived EBs on d7 were stained with PE-conjugated CD45 or CD31. Quantification of CD45, CD31, and GFP positive cells was performed by flow cytometry.

genesis-enhancing protocol with transient serum removal, and a cardiogenesis-inhibiting protocol with retinoic acid [7,14]. Using 24 of the EB samples (18 time course samples from d3 to d8, and 3 each of cardiogenesis enhanced and repressed samples from d7), along with a fibroblast sample as a negative control, total RNA was extracted, cDNA was labeled and hybridized on a DNA chip, and eXintegrator software was utilized to visualize the expression patterns (Fig. 3A) [15]. Cardiac-specific genes exhibited a similar pattern, as shown in Fig. 3, including the transcription factors *Nkx2-5*, *Myocd*, *Smyd1*, *Gata4*, *Gata5*, *Hand2*, and *Smardc3*, as well as contractile protein genes such as *Myl4*, *Myl7*, *Tnni1*, *Tnni3*, and *Tpm1*. In contrast, endothelial/hematopoietic genes (*Tall1*, *Kdr*, and *Hbb-bh1*) and a smooth muscle gene (*Tagln*) exhibited distinct patterns, with a decreased expression in the serum-free condition. Endoderm-related genes (*Sox17*, *Hhex*, *Krt1-19*, and *Afp*) were also expressed, but not in the serum-free condition. Nascent mesoderm and mesoendoderm-related genes (*Mixl1*, *T*) were induced transiently on d3 and d4, then declined before cardiac differentiation began. The derivatives of neuroectoderm-related genes (*NeuroD3*, *Pax6*) were not differentiated efficiently in our default condition with serum, unless retinoic acid was added to the EBs. Thus, our profiling data were demonstrated to distinguish cardiac cell lineages from others in differentiating EBs.

Expression of cardiogenesis-associated genes in mouse embryos

The eXintegrator software package allows the user to compare different samples in the database on the basis

of the given probe sets. Using that software, we chose 130 probe sets with the greatest similarity to *Actc1*. After eliminating probe sets without a single Gene ID and those with the suffix “_s_at” or “_x_at”, 100 genes were remaining (Supplemental Table 1). This extraction method may not cover all of the cardiogenesis-associated genes, since we were unable to set a threshold. However, the selected genes included many transcriptional regulatory factors that were related to cardiac morphogenesis and differentiation (*Nkx2-5*, *Mef2c*, *Myocd*, *Gata4*, *Gata5*, *Hand2*, *Smyd1*, *Foxc1*, *Lbh*, *Smardc3*, *Csrp2*, *Csrp3*, and *Hdac5*), suggesting that we were able to successfully select genes expressed in the early stages of cardiogenesis with this method. Next, we selected 13 genes containing non-characterized ones and analyzed them for their expression in embryos using whole-mount *in situ* hybridization. Remarkably, nearly all of those genes including *Rcsd1* were found to be preferentially expressed in the heart region of E9.5–E10.5 mouse embryos (Fig. 4 and Supplemental Fig. 1). Further, *Ppp1r14c*, *Fbxo32*, and *Klhdc8b* were expressed in the heart in a regional manner, suggesting their region-specific functions. Cardiac-specific expression of these genes was also confirmed with quantitative RT-PCR analysis of the heart and other regions dissected from E8.5 and E9.5 embryos (data not shown).

Discussion

An EB system is useful to study cardiac differentiation during the early stages of heart development, which is considered to be a difficult period for defining progenitor cells in embryos. However, EBs simultaneously generate multiple cell lineages in addition to cardiomyocytes. Under the differentiation conditions used in the present study, mesodermal cells (cardiomyocytes, endothelial cells, and hematopoietic cells) and endodermal cells were preferentially differentiated as compared to neural cells. On the other hand, neuroectodermal cells were preferentially induced by retinoic acid treatment. While our default condition caused nearly 100% of the EBs to start beating by d8 or d9, we found that transient serum removal further enhanced cardiogenesis, partially by reducing the populations of other cell lineages such as endothelial/hematopoietic cells. Similar phenomena have been observed in other mouse ES cell lines as well as in human ES cells [16,17]. Thus, transient serum removal is thought to trigger a conserved pathway to induce cardiogenesis in EBs. Since it has been reported that ES cells can be committed toward a cardiac lineage by TGF β superfamily [18–20], it is important to determine how much level the serum contains TGF β , its related factors, and inhibitory factors.

We used cardiomyocyte-rich EBs to identify cardiogenesis-associated genes, though the mechanism by which serum removal treatment enhanced cardiogenesis remains to be elucidated. By combining different culture conditions and time courses, we classified the genes expressed

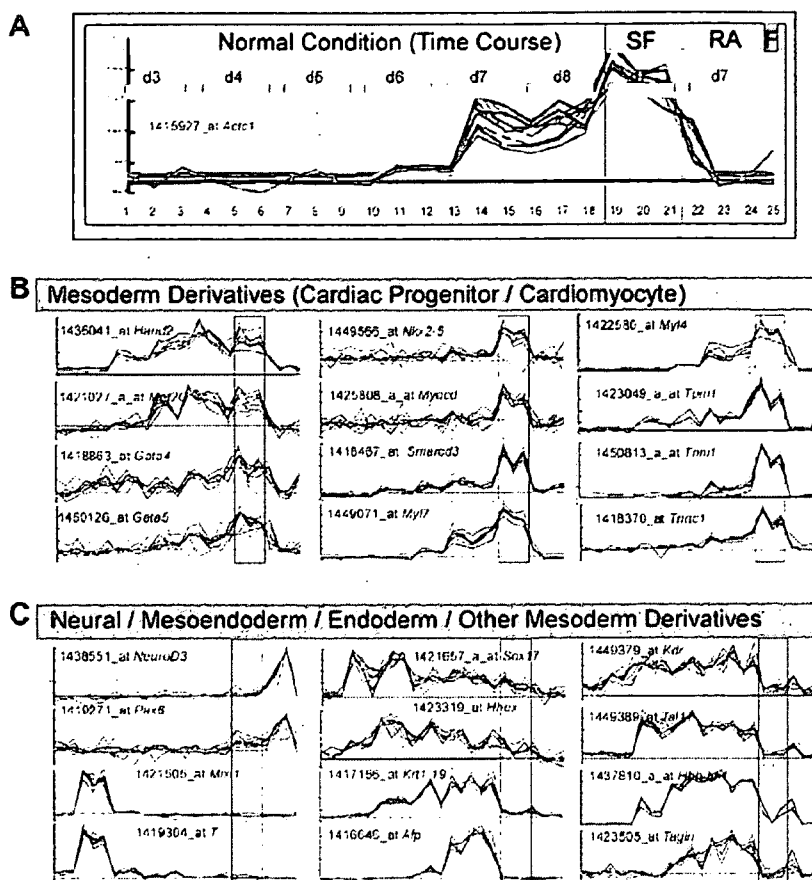


Fig. 3. Microarray analysis distinguishes cardiogenesis-associated genes from others in EBs. eXintegrator analysis of microarray data. (A) Representative eXintegrator analysis data of *Nkx2-5* are shown. Embryoid bodies were cultured in a normal condition with 10% fetal calf serum, a cardiogenesis-enhanced condition treated transiently with serum-free (SF) medium, or a cardiogenesis-inhibited condition treated with retinoic acid (RA). In the 3 independent differentiation experiments, EBs cultured in the normal condition were sampled on d3 (lanes 1–3), d4 (lanes 4–6), d5 (lanes 7–9), d6 (lanes 10–12), d7 (lanes 13–15), and d8 (lanes 16–18), while those cultured in the cardiogenesis enhanced condition (lanes 19–21) and in the cardiogenesis-inhibited condition (lanes 22–24) were sampled on d7. As a negative control, a fibroblast cell line (F) derived from an embryonic heart was also included (lane 25). (B) Cardiogenesis-associated genes. (C) Neuroectoderm, mesoendoderm, endoderm, and other mesoderm derivatives.



Fig. 4. Expression patterns of cardiogenesis-associated genes in mouse embryos. Whole-mount *in situ* hybridization revealed that the *Rcsd1*, one of the genes that exhibited an expression pattern similar to *Actc1*, was preferentially expressed in the mouse embryonic (E9.5) heart region. Expression in the heart region (heart and others) was also confirmed by real time RT-PCR of dissected embryos (data not shown).

in EBs. As reported previously, genes expressed in the primitive streak, such as *T* and *Mixl1*, were transiently expressed in EBs at 3 or 4 days after the induction of differentiation, followed by the expression of definitive endoderm and mesoderm derivatives [21]. While those genes were simultaneously induced, we found that only cardiomyogenesis-related genes were enhanced by transient serum removal. From the top 100 genes that showed a similar expression pattern to *Actc1*, 13 uncharacterized genes were found to be expressed specifically in the heart region. Thus, the present profiling method is considered useful to preferentially identify novel genes expressed in cardiomyocytes.

Among the top 100 cardiogenesis-associated genes, many known cardiac transcriptional regulators have been found, including *Nkx2-5*, *Mef2c*, *MyoD*, *Gata4*, *Gata5*, *Hand2*, *Smyd1*, *Foxc1*, *Lbh*, *Smarcd3*, *Csrp2*, *Csrp3*, and *Hdac5* [3,22–26]. Although similar results have been

reported, the methods used may not have recaptured genes expressed at the early stages of cardiac differentiation, since only a few cardiac transcription factor genes were extracted [27], which may have been due to the usage of different differentiation time points. Those 100 genes also include the signaling molecule genes *Wnt2*, *Mdk*, and *Pgf*. Interestingly, *Mdk* and *Pgf* may have a protective role against cardiac ischemia [28], and might be potentially important for cardiac development by functioning in an autocrine or a paracrine manner, though additional studies will be required. In addition, the 13 non-characterized genes found to be expressed in the embryonic heart in the present study include potential signal transduction factors, such as *Asb2*, *Diras2*, *Ppp1r14c*, *Sorbs2*, and *Fbxo32*. Since signaling pathways involved in cardiogenesis have not been well elucidated, it is important to analyze these genes *in vivo* as well as *in vitro* in future studies.

Acknowledgments

We express our thanks to Dr. Hitoshi Niwa for providing the ht7 ES cells, and Ms. Sachiko Suzuki and Ms. Shoko Miyamoto for assistance with the ES cell cultures. This work was supported in part by a grant from Promotion of Fundamental Studies in Health Science of the Organization for Pharmaceutical Safety and Research (OPSR) of Japan, by Research Grants for Cardiovascular Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and by Grants-in-Aid for Scientific Research from Japan Society for the Promotion of Science.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.109.

References

- [1] G. Keller, Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine, *Genes Dev.* 19 (2005) 1129–1155.
- [2] J. Hescheler, B.K. Fleischmann, S. Lentini, V.A. Maltsev, J. Rohwedel, A.M. Wobus, K. Addicks, Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis, *Cardiovasc. Res.* 36 (1997) 149–162.
- [3] T. Brand, Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis, *Dev. Biol.* 258 (2003) 1–19.
- [4] D. Srivastava, E.N. Olson, A genetic blueprint for cardiac development, *Nature* 407 (2000) 221–226.
- [5] I. Komuro, S. Izumo, *Csx*: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 8145–8149.
- [6] T.J. Lints, L.M. Parsons, L. Hartley, I. Lyons, R.P. Harvey, *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants, *Development* 119 (1993) 969.
- [7] K. Hidaka, J.K. Lee, H.S. Kim, C.H. Ihm, A. Iio, M. Ogawa, S. Nishikawa, I. Kodama, T. Morisaki, Chamber-specific differentiation of *Nkx2.5*-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells, *FASEB J.* 17 (2003) 740–742.
- [8] C.F. Peng, Y. Wei, J.M. Levsky, T.V. McDonald, G. Childs, R.N. Kitsis, Microarray analysis of global changes in gene expression during cardiac myocyte differentiation, *Physiol. Genomics* 9 (2002) 145–155.
- [9] K.K. Linask, J.W. Lash, Early heart development: dynamics of endocardial cell sorting suggests a common origin with cardiomyocytes, *Dev. Dyn.* 196 (1993) 62–69.
- [10] H. Terami, K. Hidaka, T. Katsumata, A. Iio, T. Morisaki, *Wnt11* facilitates embryonic stem cell differentiation to *Nkx2.5*-positive cardiomyocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 968–975.
- [11] C.A. Davis (Ed.), *Whole-Mount Immunohistochemistry*, 1993.
- [12] M.V. Wiles, B.M. Johansson, Embryonic stem cell development in a chemically defined medium, *Exp. Cell Res.* 247 (1999) 241–248.
- [13] H.S. Kim, K. Hidaka, T. Morisaki, Expression of ErbB receptors in ES cell-derived cardiomyocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 (2003) 241–246.
- [14] G. Bain, W.J. Ray, M. Yao, D.I. Gottlieb, Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223 (1996) 691–694.
- [15] H. Sakurai, T. Era, L.M. Jakt, M. Okada, S. Nakai, S. Nishikawa, S. Nishikawa, In vitro modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility, *Stem Cells* 24 (2006) 575–586.
- [16] A. Sachinidis, C. Gissel, D. Nierhoff, R. Hippler-Altenburg, H. Sauer, M. Wartenberg, J. Hescheler, Identification of platelet-derived growth factor-BB as cardiogenesis-inducing factor in mouse embryonic stem cells under serum-free conditions, *Cell Physiol. Biochem.* 13 (2003) 423–429.
- [17] R. Passier, D.W. Oostwaard, J. Snapper, J. Kloots, R.J. Hassink, E. Kuijk, B. Roelen, A.B. de la Riviere, C. Mummery, Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures, *Stem Cells* 23 (2005) 772–780.
- [18] D. Zeineddine, E. Papadimou, K. Chebli, M. Gineste, J. Liu, C. Grey, S. Thurig, A. Behfar, V.A. Wallace, I.S. Skerjanc, M. Puceat, Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development, *Dev. Cell* 11 (2006) 535–546.
- [19] A. Mery, E. Papadimou, D. Zeineddine, C. Menard, A. Behfar, L.V. Zingman, D.M. Hodgson, J.M. Raugier, G.C. Kane, C. Perez-Terzic, A. Terzic, M. Puceat, Commitment of embryonic stem cells toward a cardiac lineage: molecular mechanisms and evidence for a promising therapeutic approach for heart failure, *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 24 (2003) 269–274.
- [20] A. Behfar, L.V. Zingman, D.M. Hodgson, J.M. Raugier, G.C. Kane, A. Terzic, M. Puceat, Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart, *FASEB J.* 16 (2002) 1558–1566.
- [21] H.J. Fehling, G. Lacaud, A. Kubo, M. Kennedy, S. Robertson, G. Keller, V. Kouskoff, Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation, *Development* 130 (2003) 4217–4227.
- [22] P.D. Gottlieb, S.A. Pierce, R.J. Sims, H. Yamagishi, E.K. Weihe, J.V. Harriss, S.D. Maika, W.A. Kuziel, H.L. King, E.N. Olson, O. Nakagawa, D. Srivastava, *Bop* encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis, *Nat. Genet.* 31 (2002) 25–32.
- [23] H. Lickert, J.K. Takeuchi, I. Von Both, J.R. Walls, F. McAuliffe, S.L. Adamson, R.M. Henkelman, J.L. Wrana, J. Rossant, B.G. Bruneau, *Baf60c* is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development, *Nature* 432 (2004) 107–112.

- [24] D.F. Chang, N.S. Belaguli, D. Iyer, W.B. Roberts, S.P. Wu, X.R. Dong, J.G. Marx, M.S. Moore, M.C. Beckerle, M.W. Majesky, R.J. Schwartz, Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors, *Dev. Cell* 4 (2003) 107–118.
- [25] S. Seo, T. Kume, Forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for the morphogenesis of the cardiac outflow tract, *Dev. Biol.* 296 (2006) 421–436.
- [26] K.J. Briegel, H.S. Baldwin, J.A. Epstein, A.L. Joyner, Congenital heart disease reminiscent of partial trisomy 2p syndrome in mice transgenic for the transcription factor Lbh, *Development* 132 (2005) 3305–3316.
- [27] A. Beqqali, J. Kloots, D. Ward-van Oostwaard, C. Mummery, R. Passier, Genome-wide transcriptional profiling of human embryonic stem cells differentiating to cardiomyocytes, *Stem Cells* 24 (2006) 1956–1967.
- [28] M. Horiba, K. Kadomatsu, K. Yasui, J.K. Lee, H. Takenaka, A. Sumida, K. Kamiya, S. Chen, S. Sakuma, T. Muramatsu, I. Kodama, Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction, *Circulation* 114 (2006) 1713–1720.

Supplemental Table 1. Cardiogenesis associated genes found in EBs.

No	Gene name	Gene	Probe set ID	Note
1	actin, alpha, cardiac	Actc1	1415927_at	(1)
2	actinin alpha 2	Actn2	1448327_at	
3	adenylosuccinate synthetase like 1	Adssl1	1449383_at	
4	apolipoprotein B editing complex 2	Apobec2	1417889_at	(3)
5	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	Atp2a2	1416551_at, 1452363_a_at	(1)
6	SET and MYND domain containing 1	Smyd1	1450203_at	(1)
7	cysteine dioxygenase 1, cytosolic	Cdo1	1448842_at	
8	procollagen, type II, alpha 1	Col2a1	1450567_a_at	
9	cysteine and glycine-rich protein 2	Csrp2	1420731_a_at	
10	cysteine and glycine-rich protein 3	Csrp3	1460318_at	
11	desmin	Des	1426731_at	
12	enolase 3, beta muscle	Eno3	1417951_at	
13	G0/G1 switch gene 2	G0s2	1448700_at	
14	GATA binding protein 4	Gata4	1418863_at	(1)
15	GATA binding protein 5	Gata5	1450126_at	(1)
16	glutathione peroxidase 3	Gpx3	1449106_at	
17	heart and neural crest derivatives expressed transcript 2	Hand2	1422221_at, 1436041_at	(1)
18	histone deacetylase 5	Hdac5	1415743_at, 1415743_at	
19	inhibitor of DNA binding 2	Id2	1422537_a_at	
20	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	1421992_a_at	
21	LIM domain only 4	Lmo4	1420981_a_at	
22	midkine	Mdk	1416006_at	
23	myocyte enhancer factor 2C	Mef2c	1421027_a_at, 1424852_at, 1451506_at	(1)
24	forkhead box C1	Foxc1	1419485_at	
25	myosin binding protein C, cardiac	Mybpc3	1418551_at	
26	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha	Myh6	1417729_at, 1448826_at	
27	myosin, light polypeptide 4	Myl4	1422580_at	
28	myosin, light polypeptide 3	Myl3	1428266_at	
29	myosin, light polypeptide regulatory	Myl7	1449071_at	(1)

30	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	Myl2	1448394_at	
31	myomesin 1	Myom1	1420693_at	
32	nuclear factor, interleukin 3, regulated	Nfil3	1418932_at	
33	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)	Nkx2-5	1449566_at	(1)
34	neuronatin	Nnat	1423506_a_at	
35	placental growth factor	Pgf	1418471_at	
36	regulator of G-protein signaling 4	Rgs4	1416286_at	
37	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 2	Rps6ka2	1417542_at	
38	paired related homeobox 2	Prrx2	1432331_a_at	
39	transcription factor 21	Tcf21	1417447_at	
40	tropomodulin 1	Tmod1	1422754_at	
41	troponin C, cardiac/slow skeletal	Tnnc1	1418370_at	
42	troponin I, skeletal, slow 1	Tnni1	1450813_a_at	
43	troponin I, cardiac	Tnni3	1422536_at	(1)
44	troponin T2, cardiac	Tnnt2	1418726_a_at	
45	tropomyosin 1, alpha	Tpm1	1423049_a_at	
46	titin	Ttn	1427445_a_at	
47	wingless-related MMTV integration site 2	Wnt2	1449425_at	
48	blood vessel epicardial substance	Bves	1419003_at	
49	LIM domain binding 3	Ldb3	1433783_at	
50	estrogen-related receptor gamma	Esrrg	1455267_at	
51	integrin beta 1 binding protein 2	Itgb1bp2	1423238_at	
52	glycogenin	Gyg	1448429_at	
53	N-myc downstream regulated gene 2	Ndrp2	1448154_at	(3)
54	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein	Sh3bgr	1422644_at	
55	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	Acaa2	1428145_at, 1455061_a_at	
56	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	Ppp1r3c	1433691_at	
57	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 5	Rassf5	1422637_at	
58	phosphoglycerate mutase 2	Pgam2	1418373_at	
59	Ras-related associated with diabetes	Rrad	1422562_at	
60	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia	Pnkd	1418746_at	