

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

「ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の
分化誘導と移植医療応用に関する研究」

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山下 潤

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	1
ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究		
山下 潤		
II. 分担研究報告	6
1. ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究		
池田 義		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	8
IV. 研究成果の刊行物・別刷	10

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

総括研究報告書

ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究

研究代表者 山下 潤

研究要旨

2007年京都大学山中伸弥教授らにより樹立されたヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、胚性幹細胞(ES細胞)と同等の万能の幹細胞と考えられ、再生医療への応用が期待されている。本研究は、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、ヒト iPS 細胞の心臓細胞分化誘導法・純化法、純化細胞の移植法の開発と移植細胞に関する安全性の検討を行うものである。

平成20年度においては、マウス iPS 細胞からの心血管分化誘導法の開発、マウス ES 細胞からの新しい高効率心筋および心筋前駆細胞誘導法の開発、と誘導細胞のラット心筋梗塞モデルへの移植、さらにヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導を行った。

分担研究者

池田 義(京都大学医学部心臓血管外科学 准教授)

研究協力者

山中伸弥(京都大学再生医科学研究所教授、京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター センター長)

A. 研究目的

2007年京都大学再生医科学研究所山中伸弥教授らにより樹立された成人皮膚細胞由来の幹細胞であるヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)

(Takahashi, Cell, 2007)は、胚性幹細胞(ES細胞)と同等の分化能を有する万能の幹細胞と考えられ、再生医療を中心とする臨床応用が大いに期待されている。iPS細胞はES細胞とほぼ同様の性質を有する細胞であり、再生医療応用にはヒトES細胞と同様に、1) 目的細胞の分化誘導・純化・移植法、2) 奇形腫形成を防ぐ方法、に加えて、3) がん形成性をはじめとする iPS 細胞そのものの安全性の検討が必要である。

研究代表者はこれまでES細胞を用いた心血管分化再生研究を行ってきた。すなわち、ES細胞から心血管細胞の

新しい分化誘導法を開発した(Nature, 2000; FASEB J, 2005)。サルおよびヒト ES 細胞の心血管分化研究も行っている(Circulation, 2003; Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007)。

本研究は、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、1) ヒト iPS 細胞の心臓細胞(心筋および心筋前駆細胞)分化誘導法、2) 誘導細胞純化法、3) 純化細胞の移植法の開発、及び移植細胞の4) 奇形腫形成、5) がん形成等に関する安全性の検討、の5項目の研究を行う。ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、ヒト iPS 細胞の心臓細胞(心筋および心筋前駆細胞)分化誘導法、誘導細胞純化法、純化細胞の移植法の開発、及び移植細胞の奇形腫形成、がん形成等に関する安全性の検討に関する研究を行う。

B. 研究方法

①マウス iPS 細胞からの心血管細胞分化誘導法の開発

研究代表者らは、未分化マウス ES 細胞から中胚葉マーカー Flk1 を発現する細胞を分化誘導・純化し、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として種々の心血管系細胞を分化誘導するシステムを構築している(Nature, 2000; FASEB J, 2005 ほか)。同システムをマウス iPS 細胞に適用し、マウ

ス iPS 細胞からの系統的心血管細胞誘導システムの構築を行った。

②マウス ES 細胞からの新しい高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞分化誘導法の開発

研究代表者は、マウス ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することにより、2次元培養下・単一細胞から心筋細胞を分化誘導できる新しい ES 細胞心筋分化系を構築し、高い心筋分化能を有する新しい心筋前駆細胞(FCV 細胞)の同定に成功している(FASEB J, 2005)。研究代表者及び分担研究者は、この分化系を用いて効率的な心筋分化を誘導する物質・増殖因子等の探索をおこなった。③心筋前駆細胞及び心筋細胞のラット心筋梗塞モデルへの移植実験

研究分担者は、ラット陳旧性心筋梗塞モデルを用いて骨髓細胞由来細胞の移植実験を行い、細胞移植の心臓機能回復における効果を明らかにしてきた(Circulation, 2005)。②において効率的に誘導・純化して潤沢に調製することが可能となった心筋細胞及び心筋前駆細胞をこのラット心筋梗塞モデルに適用し、マウス ES 細胞由来心臓細胞の細胞移植を行った。

④ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導

研究代表者らはすでに心血管分化に関するヒト ES 細胞の使用研究の認

可を受け、ヒト ES 細胞からの心筋細胞誘導に成功している。同手法をヒト iPS 細胞に適用し、ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導を試みた。

C. 研究結果

①マウス iPS 細胞を LIF (leukemia inhibitory factor)非存在下に 4 型コラーゲン上で培養すると、培養約 4-4.5 日後に Flk1 陽性中胚葉細胞が得られた。FACS にて純化した Flk1 陽性細胞を VEGF (vascular endothelial growth factor; 血管内皮増殖因子)存在下に培養すると CD31 陽性内皮細胞と平滑筋 α アクチン陽性血管壁細胞が選択的に誘導された。VEGF に加えて 8bromo-cAMP を添加し cAMP シグナルを活性化すると ephrinB2 陽性動脈内皮細胞が誘導された。Flk1 陽性細胞を OP9 細胞上で培養すると prox1 陽性リンパ管内皮細胞が誘導された。また Flk1 陽性細胞の OP9 との共培養により、拍動心筋細胞が誘導された。誘導効率・時間などほぼすべての分化特性はマウス ES 細胞と同等と考えられた。マウス iPS 細胞からの種々の心血管細胞分化誘導法を開発した。これらの結果を **Circulation** 誌に報告した(Narazaki, 2008)。

②純化 Flk1 陽性細胞を OP9 上で培養する際に、免疫抑制剤サイクロスポリ

ン A を添加すると心筋細胞の著しい増加を認めた (約 10-20 倍)。サイクロスポリン A は、Flk1 陽性中胚葉細胞に特異的に作用し、FCV 心筋前駆細胞を特異的に増加させた (約 20 倍)。誘導・純化された FCV 細胞は移植後ラット心臓内においても生着し心筋に分化した。ES 細胞由来心筋前駆細胞を特異的に増加させる初めての方法として **Biochem Biophys Res Commun** 誌に報告する(Yan, 2009)とともに国際特許出願を行った (PCT/JP2008/066033)。

③②で誘導された心筋及び心筋前駆細胞を用いて、心筋梗塞モデルラットに needle injection により 0.4×10^6 および 1.0×10^6 細胞移植を行った。心筋細胞移植においては組織学的に少量の生着細胞を認めるのみであった。前駆細胞移植を行った個体の病理組織学的評価は現在進行中である。心筋に分化した細胞を認めることはすでに確認している。

④ヒト iPS 細胞をマウス内胚葉系支持細胞 END2 上で培養することにより、拍動心筋細胞を誘導することに成功している。誘導された細胞は、同期した Ca 取り込みや心筋型活動電位を示し、筋繊維や豊富なミトコンドリア、グリコーゲン顆粒など心筋としての機能的構造的特徴を備えていた。

D. 考察

マウス iPS 細胞からの心筋など循環器系細胞の分化誘導は、2008 年に研究代表者らのものを含めて計 3 報が報告されたのが最初である。中でも研究代表者らの業績は 2008 年国際幹細胞学会において唯一口頭発表演題に選出され、立ち見も出る盛況の中発表され注目を集めた。また、2008 年に *Circulation* 誌に掲載されたすべての論文の中から、Basic Science 部門第 1 位の **Best Paper Award** を受賞するなど非常に高い評価を得ている。本研究課題推進における基盤をなす重要な技術開発に世界に先駆けて成功したと考えられる。サイクロスポリン A による心筋前駆細胞特異的分化促進効果は、心筋前駆細胞を大量に調製し、心筋前駆細胞移植治療という新しい可能性を開く重要な成果である。同業績により筆頭著者の Yan は 2008 年日本循環器学会において留学生 YIA を受賞した。マウス及びヒト iPS 細胞への応用展開が期待される。細胞移植に関しては、従来行ってきた *needle injection* による組織への局所注入では移植した幹細胞の生着率が低いことが推察される。*Needle injection* に代わる移植法として、最近では細胞シートを用いた方法が主流となりつつあり、本実験においても、分化誘導した幹細胞を温度感受性培養皿を用い

てシート化したものを今後の実験に用いる方針である。ヒト iPS 細胞からの心筋細胞の誘導とその機能確認にすでに成功している。サイクロスポリン法などとの併用により分化誘導効率の向上を試みる。

E. 結論

iPS 細胞からの心筋分化誘導法、その促進方法、細胞移植法等、本研究課題推進において必要とされる iPS 細胞心筋分化技術に関して基盤となる成果を着実にあげることができたと考えられる。今後ヒト iPS 細胞からの効率的分化誘導・純化法や細胞移植法の改善等、同細胞の臨床応用に向けた研究への展開が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK*. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 115-120, 2009
2. Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK*. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 118: 498-506, 2008 <*Circulation* 2008, **Best Paper Award** in Basic

Science>

3. Yamashita JK. A linkage in the developmental pathway of vascular and hematopoietic cells. In Tanaka K, Davie EW. **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008**. Part 5, p363-p373. Springer, Tokyo, 2008
4. Nakao Y*, Narazaki G, Hoshino T, Maeda S, Yoshida M, Maejima H, Yamashita JK*. Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. **Bioorg Med Chem Lett**, 18: 2982-2984, 2008
5. Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Nakao K. Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. **PLoS One**, 3: e1666, 2008.
6. Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita JK, Nishi E, Tsukita S, Furuse M. Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. **Exp Cell Res**, 314:939-49, 2008.
7. Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor {beta}. **J Appl Physiol**, 104: 766-772, 2008

<和文総説>

1. 山下 潤. 「ES 細胞および iPS 細胞からの血管細胞分化」再生医療 8: 28-33, 2009. 日本再生医療学会雑誌
2. 山下 潤. 「ES 細胞、iPS 細胞を用いた血管再生医療技術」幹細胞の分化誘導と応用 - ES 細胞・iPS 細胞・体性幹細胞研究最前線 - 第 3 章 p253-261, 2009. NTS.
3. 山下 潤. 「iPS 細胞と心血管再生」Annual Review 循環器 2009. p1-p9, 2009. 中外医学社
4. 山下 潤. 「iPS 細胞を用いた血管再生」CLINICIAN 「再生医療を考える」56: 61-74, 2008. エーザイ株式会社
5. 山下 潤. 「血管再生」総合臨床 58: 72-78, 2008. 永井書店
6. 山下 潤. 「ES 細胞による血管の分化再生」遺伝子医学 MOOK 別冊 「進み続ける細胞移植治療の実際」田畑泰彦編, p107-p111, 2008. メディカルドゥ社

2. 特許

1. 名称: Efficient production and use of highly cardiogenic progenitors and cardiomyocytes from embryonic and induced pluripotent stem cells
出願番号: PCT/JP2008/066033
発明者: 山下潤、顔培実
出願日: 2008 年 8 月 29 日

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

分担研究報告書

ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究

研究分担者 池田 義

研究要旨 ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生療法の確立を目的とし、幹細胞からの分化誘導した心筋細胞、心筋前駆細胞を用いて、in vivo における細胞移植法の開発と移植後のがんや奇形腫形成性など安全性の検討を行う。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、ヒト iPS 細胞の心臓細胞 (心筋および心筋前駆細胞) 分化誘導法、誘導細胞純化法、純化細胞の移植法の開発、及び移植細胞の奇形腫形成、がん形成等に関する安全性の検討に関する研究を行う。

B. 研究方法

iPS 細胞由来心筋細胞移植の前段階として、より心筋分化効率が高いマウス EMG7 細胞 (α MHC-EGFP transgenic EB5) を用いて心筋細胞および心筋前駆細胞への分化誘導を行い (Yamashita J et al. Nature 408: 92-6, 2000, Yamashita JK et al. FASEB J. 19: 1534-6, 2005)、左前下行枝結紮により心筋梗塞を誘導した無胸腺ラット (F344/N Jcl-rnu/rnu) モデルに対して細胞移植を行い、移植

後 4 週目に生理学的心機能評価、病理組織学的評価を行った。

さらに、移植細胞の生着効率の増加を目的として、ヒト ES 細胞等での生着効率上昇効果が報告されている Y-27632 (ROCK inhibitor) を併用して同様の実験を行った。

C. 研究結果

われわれの心筋あるいは内皮分化誘導法 (direct differentiation) は、未分化幹細胞から中胚葉に分化した Flk1 陽性細胞を抽出し、その後の分化段階で発現する表面マーカーを免疫抗体法により蛍光標識して必要とする細胞群を抽出するものであり、心筋細胞 25~33%、前駆細胞 25~40% と高水準の誘導効率を得ることができた。

これらの細胞を用いて、心筋梗塞モデルラットに needle injection により

0.4×10⁶ および 1.0×10⁶ 細胞移植を行った。4 週後心臓超音波および心臓カテーテル検査では心筋細胞移植群、Y-27632 処理心筋細胞群ともコントロール群と比較して明らかな心機能の改善は認めなかった。組織学的評価においても少量の生着細胞を認めるのみで、心筋細胞群と Y-27632 処理心筋細胞群で生着率に差はなかった。前駆細胞移植を行った個体の病理組織学的評価は現在進行中である。

D. 考察

最近報告されてきているように、従来行ってきた *needle injection* による組織への局所注入では移植した幹細胞の生着率が低く、明らかな心機能の改善や組織学的な心筋再生を得ることは困難であることが推察される。*Needle injection* に代わる移植法として、最近では細胞シートを用いた方法が主流となりつつあり、本実験においても、分化誘導した幹細胞を温度感受性培養皿を用いてシート化したものを今後の実験に用いる方針である。

E. 結論

従来行ってきた心筋への局所注入法では、移植した幹細胞の十分な正着が得られないことが明らかになった。今後は、シート化した心筋分化幹細胞を用いて、心筋梗塞モデルに対する細

胞移植効果を検討する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yan P, et al. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 379 (2009) 115-120.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 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
<u>Yamashita JK</u>	A linkage in the developmental pathway of vascular and hematopoietic cells.	Tanaka K, Davie EW	Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008	Springer	Tokyo	2008	363-373
山下 潤	ES細胞、iPS細胞を用いた血管再生医療技術	中辻憲夫	幹細胞の分化誘導と応用 - ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線 -	NTS	東京	2008	253-261
山下 潤	iPS細胞と心血管再生	山口徹、高本眞一、中澤誠、小室一成	Annual Review 循環器2009	中外医学社	東京	2008	1-9
山下 潤	ES細胞による血管の分化再生	田畑泰彦	遺伝子医学MOOK別冊「進み続ける細胞移植治療の実際」	メディカルドゥ社	東京	2008	107-111

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
Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, <u>Yamashita JK</u>	Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells.	Biochem Biophys Res Commun	379	115-120	2009
Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, <u>Yamashita JK</u>	Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells.	Circulation	118	498-506	2008
Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, Maeda S, Yoshida M, Maejima H, <u>Yamashita JK</u>	Evaluation of anti-angiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse iPS cells.	Bioorg Med Chem Lett	18	2982-2984	2008

Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Nakao K	Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells.	PLoS One	3	E1666	2008
Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita JK, Nishi E, Tsukita S, Furuse M	Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization- based expression cloning.	Exp Cell Res	314	939-949	2008
Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J	Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor {beta}.	J Appl Physiol	104	766-772	2008
山下 潤	ES細胞およびiPS細胞からの血管細胞分化	再生医療	8	28-33	2008
山下 潤	iPS細胞を用いた血管再生	Clinician「再生医療を考える」	56	61-74	2008
山下 潤	血管再生	総合臨床	58	72-78	2008

IV. 研究成果の刊行物・別刷

A Linkage in the Developmental Pathway of Vascular and Hematopoietic Cells

JUN K. YAMASHITA

Summary. Blood vessels consist of at least three kinds of cell: endothelial cells lining the inside of the lumen to form tubes, mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) supporting the endothelial tubes, and blood cells flowing inside. Blood and vascular cells are closely related to each other in their anatomical locations, origins, and differentiation processes. In addition to a long history of histological analyses, recent progress in stem cell biology using various genetic animal models, especially in vivo cell tracing technologies, and in vitro stem cell differentiation systems are now succeeding in providing molecular and cellular bases of the relation between these two cell populations. Accumulating data suggest that their differentiation processes are more complicated than was previously expected. That is, multiple origins of progenitor cells, multiple pathways of differentiation, and multiple molecular functions regulating cell fates exist and complicatedly interact with each other to complete the functional circulation system with blood and vessels. This chapter summarizes recent advances in the developmental processes and the relation of blood and vascular cells, especially between blood and endothelial cells.

Key words. Hematopoiesis · Endothelial cells · Hemogenic endothelium · Progenitor cells · Stem cells

Introduction

Blood cells and endothelial cells (ECs) directly contact each other and form an essential functional unit to maintain the blood supply for the whole body. These two anatomically and functionally related cells are also closely related in their origin and differentiation process. In the yolk sac of mouse embryos, mesoderm-derived cells form cell aggregates called blood islands [1]. The central cells differentiate into blood cells, and peripheral cells of blood islands develop into ECs and fuse with each other to form the initial vascular network [2]. This phenomenon symbolizes the close association and relation between the blood and EC differentiation process. Nevertheless, the actual differentiation pathway and mechanisms of blood and ECs seem not to be so simple and straightforward. Recent progress of developmental, molecular, and stem cell biology is revealing various novel aspects of their differentiation processes. This chapter aims to review the relation between

blood and ECs in their differentiation and diversification process through recent advances.

Differentiation of Endothelial Cells

The origin of ECs is postulated to be mesoderm cells expressing Flk1 (also designated vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR2) [2]. Flk1⁺ cells in the periphery of blood islands and in the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region in the embryo proper differentiate into ECs mainly by vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and simultaneously form an endothelial tube network called the primary plexus. Such direct formation of vascular structures from progenitor cells is called vasculogenesis. Vasculogenesis is followed by angiogenesis, in which neovessels are formed from preexisting vessels, followed by vascular remodeling with migration and attachment of mural cells to the vascular wall; mature blood vessels are then gradually formed [2, 3]. Diversification into arterial and venous ECs and formation of arteries and veins occur almost simultaneously with the initiation of vascular development [4]. The existence of arterial- or venous-specific progenitors is suggested but still has not been fully demonstrated [5]. Lymphatic vessels sprout and develop from a specific subset of venous ECs [6] (see the Chapter by P. Carmeliet, this volume). The sequential processes of EC differentiation and diversification (i.e., induction of Flk1⁺ vascular progenitor cells, differentiation of ECs, and diversification into arterial, venous, and lymphatic ECs) are successfully reproduced in an embryonic stem (ES) cell differentiation system [7]. ES cell-derived Flk1⁺ cells give rise to ECs by VEGF stimulation and mural cells by platelet-derived growth factor (PDGF) stimulation [8]. Whereas venous ECs are induced from Flk1⁺ progenitors by VEGF treatment alone, arterial ECs are induced by the combinatory stimulation with VEGF and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [9]. Prox1⁺ lymphatic ECs are induced from Flk1⁺ progenitors by coculture with OP9 stroma cells [10] or long-term culture of embryoid bodies [11, 12].

Differentiation of Hematopoietic Cells

Research into the differentiation pathway of blood cells (=hematopoietic cells, or HPCs) has a much longer and complicated history than that of ECs. Until recently, a model of the successive hematopoietic process (primitive and definitive hematopoiesis) has been largely accepted as a major pathway of hematopoietic development [13, 14]. That is, the first transient wave of hematopoiesis (primitive hematopoiesis), which generates primitive erythrocytes, occurs in the yolk sac at E7.0–7.5, but the primitive HPCs carrying the embryonic and fetal-type hemoglobins contribute only in the embryo, not in the adult. A second wave of hematopoiesis that generates the hematopoietic stem cells (HSCs) necessary throughout life (definitive hematopoiesis) originates in the embryo proper. Definitive HSCs arise from the AGM region, including the endothelium and surrounding mesenchyme of the dorsal aorta at E10.5; then the site of blood formation migrates to the fetal liver at E12.5 and finally to the bone marrow (Fig. 1a) [13, 15–17].

This model is currently being challenged and remodeled by various studies. In addition to the AGM region, HSCs appear in umbilical and vitelline arteries [18]. The placenta forms a large HSC pool around E11.5–12.5 through the rapid expansion of

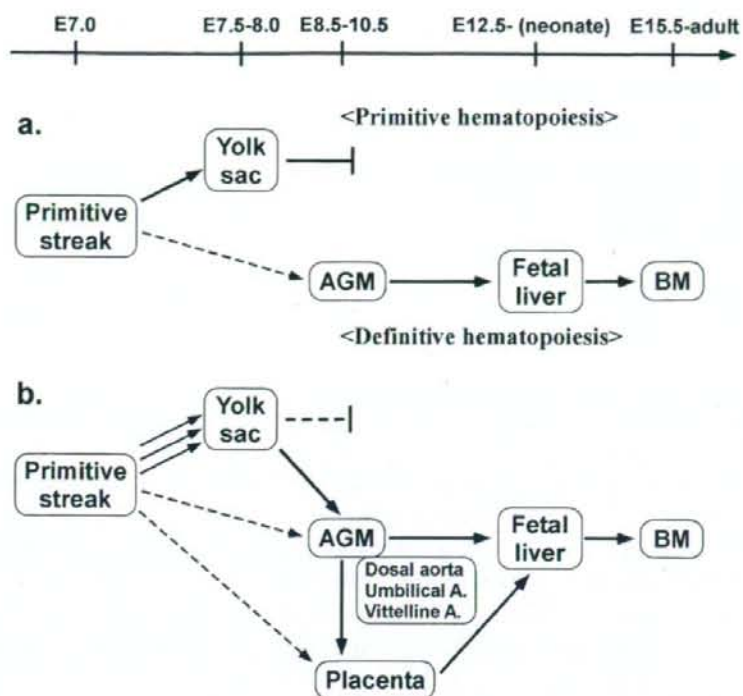


FIG. 1. Models of embryonic and adult hematopoiesis. **a** Conventional model. The first wave of hematopoiesis, called primitive hematopoiesis, occurs in the yolk sac at E7.0–7.5. Primitive hematopoietic cells (HPCs) carrying the embryonic and fetal-type hemoglobins are found only in the embryo, not in the adult. A second wave of hematopoiesis, called definitive hematopoiesis, occurs in the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and generates definitive HSCs that can contribute throughout life. Definitive HSCs colonize the fetal liver and finally the bone marrow (BM). **b** A multiorigin, multipathway model. The origin of yolk sac blood islands is polyclonal. Definitive HSCs in the AGM regions at least partly originate from yolk sac precursor cells. Major vessels in the embryo, dorsal aorta, umbilical artery, and vitelline artery as well as the placenta are another source of definitive HSCs

HSCs [19–21]. In the dorsal aorta, a subset of endothelium [15, 16] (hemogenic ECs; discussed later) as well as surrounding mesenchymal cells [22, 23] are postulated to be the origins of definitive HSCs. Recently, Ueno et al. revealed that the origin of yolk sac blood islands *in vivo* is polyclonal, using a novel direct clonal progenitor analysis in the mouse embryo [24]. Samokhvalov et al. demonstrated that specifically labeled Runx1^+ yolk sac precursor cells can develop into fetal lymphatic progenitors and even into adult HSCs [25], clearly indicating that yolk sac hematopoiesis can contribute to the adult. These reports indicate that HSCs develop through multiple origins, locations, and trafficking processes (Fig. 1). In addition, these various hematopoietic organs, yolk sac, AGM, fetal liver, and bone marrow serve as different microenvironments for HSC maturation [17]. Yolk sac-derived HPCs could not reconstitute hematopoiesis in the adult when transplanted into irradiated mouse models [26], even though they have an intrinsic potential of becoming adult HSCs [25]. On the other hand, yolk sac-derived HPCs could give rise to definitive HSCs after being injected

into fetal liver [26], indicating that HSC niches in the embryo proper should serve as an appropriate microenvironment to achieve complete maturation of HSCs for engraftment and self-renewal activity.

Diversification of ECs and HPCs

From many decades ago, the close association of HPCs and ECs in their developmental process in the yolk sac led to the hypothesis that these cells originate from a common precursor, the hemangioblast [27]. Blast colony-forming cells (BL-CFCs), a putative hemangioblast that give rise to both HPCs and ECs, were first reported in differentiating embryonic stem cell culture in vitro [28]. BL-CFCs were enriched in the Flk1⁺/brachyury⁺ mesoderm population. Recently, the existence of hemangioblasts in the gastrulating embryo has been demonstrated. Huber et al. revealed that hemangioblast comprises a subpopulation of mesoderm co-expressing Flk1 and brachyury. Highest dual differentiation potential to HPCs and ECs were observed in the posterior primitive streak but not in yolk sac, indicating that the first commitment of mesodermal progenitors to the HPC and EC lineages begins in the posterior primitive streak before the cells migrate into the yolk sac, prior to the formation of the blood islands [29]. The early segregation of HPC and EC lineages is also indicated by the fact that individual Flk1⁺ precursors rarely contributed to both ECs and HPCs in blood islands by a direct clonal progenitor analysis in the mouse embryo [24] and that Runx1-marked yolk sac precursor cells can contribute to adult HSCs but not to ECs [25].

The next putative diverging point between ECs and HPCs is in the early ECs. During the early developmental stage of the dorsal aorta, attachment of HPC clusters to the EC layer is observed [30], inferring that HPCs including HSCs originate from a subset of ECs, termed hemogenic ECs, that possess the potential to give rise to HPCs. The hemogenic EC hypothesis is supported by several studies in addition to histological evidence. Embryonic as well as ES cell-derived vascular endothelial (VE) cadherin⁺ ECs give rise to HPCs including T and B cells in vitro [31, 32]. Acetylated low density lipoprotein (Ac-LDL)-labeled ECs in the embryo give rise to CD45⁺/Ac-LDL⁺ HPCs in situ in chick and mouse embryos [33, 34]. A diverging point of hemogenic and non-hemogenic ECs was demonstrated using a transgenic embryo and ES cell line carrying the Flk1 promoter/enhancer [Flk(p/e)]-driven GFP gene. VE-cadherin⁺ ECs first appeared as a GFP⁻ population, but subsequently all ECs became VE-cadherin⁺/GFP⁺. Only GFP⁻ ECs could give rise to definitive HPCs and were observed in hematopoietic cell clusters in the dorsal aorta, indicating that Flk(p/e)-GFP⁻ ECs represent hemogenic ECs [35]. α_4 Integrin⁺/VE-cadherin⁺ ECs, but not α_4 integrin⁻ ECs derived from mouse and primate ES cells, were reported to show hemogenic potential [36, 37]. VE-cadherin⁺/CD45⁺ cells at E9.5 of the mouse embryo, which give rise to definitive erythroid, myeloid, but not B lymphoid cells, may represent another intermediate cell type of hemogenic ECs [38]. These studies indicate that during the early developmental stage a subset of ECs show a differentiation window to give rise to HPCs. The hemogenic ECs should be at least one of the precursors for the definitive HSCs.

Molecular Machinery of the Fate Determination

Gene knockout technology has largely contributed to uncover the molecular mechanisms in differentiation of ECs and HPCs. In vitro cell differentiation systems using

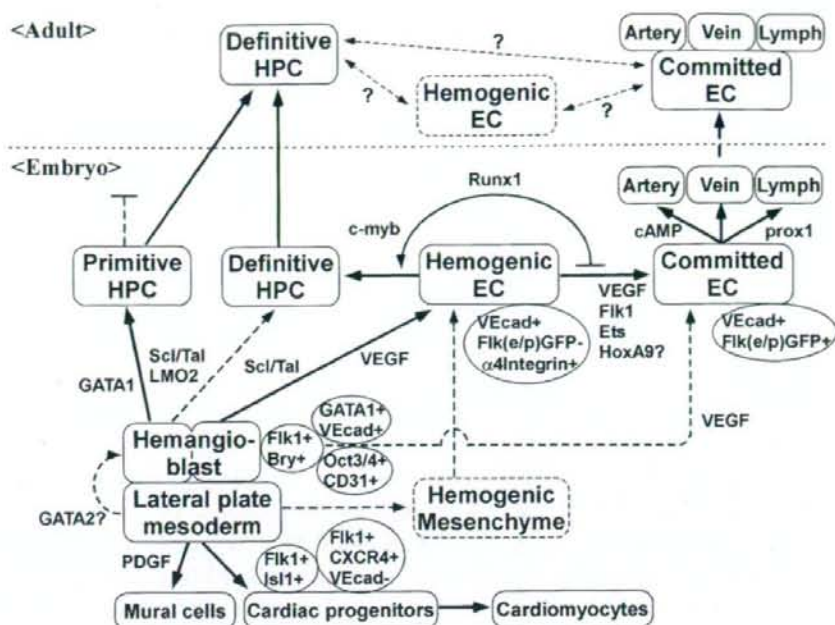


FIG. 2. Possible relation between ECs and HPCs during their differentiation. Cells constituting the circulation—ECs, HPCs, mural cells in the vascular wall, cardiomyocytes—mainly originate from lateral plate mesoderm. The putative relations, differentiation pathways, and regulatory mechanisms of these cells and their progenitors (hemangioblast and hemogenic ECs) are summarized. Cell populations are indicated in *rectangles*. Molecular markers are indicated in *ovals* attached to the corresponding cell populations. Issues not fully demonstrated are indicated by *dotted lines*

ES cells also play an important role in dissecting the molecular machinery for the cell differentiation and diversification process, especially at a single-cell level [39]. Various approaches using both *in vitro* and *in vivo* analyses have now demonstrated that many molecules are involved in the differentiation and diversification process of ECs and HPCs (Fig. 2).

Flk1/VEGFR2

Flk1 is one of the VEGF receptors (VEGFR2). As Flk1-deficient mice showed a defect in the development of ECs and HPCs [40], Flk1 is thought to be one of the earliest functional molecules for EC and HPC development and should mark their common progenitor, hemangioblasts. Flk1 is broadly expressed in lateral plate mesoderm and extraembryonic mesoderm [41, 42]. Flk1⁺ mesoderm cells are demonstrated to give rise to both ECs and HPCs [31]. Flk1⁺ cells also differentiate into mural cells in the vascular wall and cardiomyocytes [8, 43, 44]. During the differentiation, Flk1 expression is maintained only in ECs and disappears in mature HPCs, mural cells, and cardiomyocytes. Activation of Flk1 by VEGF is required to maintain Flk1 expression in Flk1⁺ mesoderm cells and drives their differentiation to EC lineage [8, 45]. Flk1 signaling through VEGF is the main inducer of ECs from their progenitors. Recently, phospholipase C- γ activation by VEGF through the autophosphorylation of tyrosine