

200808003β

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業）

ヒトES細胞を用いた
安全な人工血液の開発に関する研究

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 湯尾 明

平成21（2009）年 4月

目 次

I. 総合研究報告

ヒトES細胞を用いた安全な人工血液の開発に関する研究
湯尾 明

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告

ヒトES細胞を用いた安全な人工血液の開発に関する研究

湯尾 明

総合研究報告書

ヒトES細胞を用いた安全な人工血液の開発に関する研究

研究代表者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所血液疾患研究部長

研究要旨 病原体混入がないクリーンな環境で安定して血液細胞成分を生成する技術を開発していくことは極めて重要である。そこで、本研究では動物由来成分を少しでも排除するために、（特に初年度は）サルES細胞も併用しつつ、（次年度、3年度は）ヒトES細胞からの無フィーダー環境を駆使した血液細胞生成を試みた。我々の分化培養系は、前半の細胞凝集塊形成（sphere形成）の浮遊培養と、後半の平面単層培養（接着培養）の2段階から成り立っており、全体を通じて無フィーダー培養である。第1段階のsphere形成浮遊培養は6種類の増殖因子・サイトカイン（IGF-II, VEGF, SCF, Flt3-L, TPO, G-CSF）存在下に3日間行われ、その後、ゼラチンコート培養皿の上にて同じ6種類のサイトカイン存在下で第2段階の接着平面培養に移行した。接着したsphereからは2週間程度で嚢状構造物（sac-like structure）が形成され、構造物の内部に球状細胞（血液細胞）が充満した。産生された血液細胞は、CD45陽性、CD34わずかに陽性、CD11b、CD33陽性の比較的成熟した骨髄系（食細胞系）の血液細胞で、そのうち、形態（ライトギムザ染色）、細胞組織化学染色（ミエロペルオキシダーゼ染色、好中球アルカリフォスファターゼ染色）、表面抗原（CD66b、CD16b、GPI-80）などから30-50%が好中球と考えられた。これらの好中球は、in vitroでは遊走能、貪食能、活性酸素産生能を示し、in vivoでも遊走能を発揮した。このような成熟好中球が効率よく産生できるES細胞の分化誘導システムは、霊長類では世界初であり、顕著な成果が得られたと言える。さらに、最終年度においては、ヒトiPS細胞からも同様の無フィーダー2段階分化誘導システムを駆使して、嚢状構造体を介した血液細胞の産生が誘導できた。今後は、サルES細胞の分化誘導系（前半の長期胚様体形成による2段階無フィーダー培養法）で実現しているhemogenic endotheliumを介する成体型造血幹細胞に近い造血をヒトの系において実現してゆく計画である。

A. 研究目的

血液成分の輸注は現代医療において不可欠であるが善意のボランティアに供給を依存しているため供給量に限りがあり、また、感染症の媒体となる危険をかかえている。従って、病原体混入がないクリーンな環境で安定して血液細胞成分を生成する技術を開発していくことは極めて重要である。

骨髄の造血幹細胞から血液細胞成分を増幅する試みは長年研究されてきたが、造血幹細胞は体外では十分に増幅しないことも確認された。一方、ES細胞は無限増殖能と多能性分化能を持つために再生医療における優れた材料として近年注目されている。即ち、ヒトES細胞から安定して試験管内で血液細胞成分を作成するこ

とが可能になれば輸血医療・移植医療において革命的な進歩がもたらされる。とりわけ、寿命が短いために現行の輸血療法では効果が乏しい「顆粒球」に関してはその恩恵は大きい。尚、ヒトを含めた霊長類ES細胞はマウスES細胞とかなり異なる性質を持つので、医療応用を目指す研究は霊長類ES細胞においてなされる必要がある。さらには既存の霊長類ES細胞の培養技術ではマウスフィーダー細胞の混入が避けられず新しい培養技術の確立が要求されている。

これらのことを踏まえて、本研究ではヒトES細胞から無血清無フィーダー環境において未分化維持と血液細胞生成を試みる。特に、白血球産生のための培養条件の決定を目指すとともに、ヒトES細胞の未分化維持と血液細胞への分化を制御する分子を網羅的な手法も駆使して

見出すことにより、一層効率的な分化システムの構築を目指す。当該研究における成果は、免疫抑制剤投与方法の地道な工夫、組織適合抗原の発現制御技術、間葉系幹細胞を用いた免疫不適合緩和技術、そして、ヒト iPS 細胞やヒトクローン胚由来 E S 細胞を用いた培養技術、などと組み合わせること、常時万人に血液細胞成分を安全に供給するシステムが確立されることとなる。

B. 研究方法

1. 細胞など研究材料

マウス胎児線維芽細胞 (murine embryonic fibroblasts, MEF) はマイトマイシン C (MMC) 処理または X 線照射によって増殖を停止させて未分化維持用のフィーダー細胞として用いた。カニクイザル E S 細胞 (CMK-6)、ヒト E S 細胞 (KhES-1, KhES-2, KhES-3)、ヒト iPS 細胞 (201B6, 201B7, 253G1) は、MMC 処理 MEF 上で 20%KSR 存在下に無血清培養により継代した。継代は週 2 回、コラゲナーゼ処理にて行い、細胞密度を 2-4 倍に希釈した。OP9 細胞は、20%牛胎児血清存在下で継代培養した。

未分化維持における無血清培養は 20%KSR (knockout serum replacement) を用いて行った。培養開始当初はマウス胎児線維芽細胞と共培養し、その後マトリゲルコート培養皿において noggin、FGF2 を添加して無フィーダー培養を行った。最終的には noggin、FGF2 を添加せずに培養した。未分化状態の評価は、細胞形態、SSEA4、Oct4、Nanog により行った。

2. 分化誘導プロトコール

未分化ヒト E S 細胞、ヒト iPS 細胞をコラゲナーゼ処理により MEF の混入を避けて回収した後に、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine コート低接着培養皿にて 3 日間スフェア (sphere) 形成させた。分化培養液には、15%牛胎児血清の他に、6 種類のサイトカイン・増殖因子 (insulin-like growth factor II (IGF-II), vascular endothelial growth factor (VEGF), stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (Flt3-L), thrombopoietin (TPO), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)) を添加した。その後、スフェアはゼラチンコート培養皿での平面培養に移行した。サイトカイン・増殖因子は同様の 6 種類である。平面培養後、2 週間以内に数石状の細胞が増殖して、ス

フェアが着地した箇所に囊状構造物が形成され、その中に球状の細胞が充満した。

一部の実験においては、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を、上記の 6 種類のサイトカイン・増殖因子 (IGF-II, VEGF, SCF, Flt3-L, TPO, G-CSF) 存在下で、フィーダー細胞 (マウスストローマ細胞 OP9) と共培養して、好中球の分化誘導を行った。

サル E S 細胞の場合は、無フィーダー、無血清、無サイトカインにて長期間未分化維持継代した物を用いた。胚様体形成は、Bhatia のグループの手法をもとにした。すなわち、bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) 4、SCF、Flt3-L、interleukin 3 (IL-3)、interleukin 6 (IL-6)、G-CSF 存在下で 15 日間培養した。その後、形成された胚様体をほぐさずにゼラチンコート培養皿にて平面培養を行った。ヒト E S 細胞の分化誘導実験に一部も、この手法によった。

3. コロニーアッセー

造血コロニーアッセーは、市販のキット (Methocult TM GF H4535) を用いて、メチルセルロース中にて造血因子のカクテル存在下 (SCF、IL-3、IL-6、GM-CSF、G-CSF、erythropoietin) で行い、2 週間後のコロニー形成を倒立顕微鏡にて観察した。

4. RT-PCR

市販のキット (RNeasy Mini Kit) により RNA 抽出後に c DNA を作成して行った。各種のグロビン遺伝子 (α 、 ζ 、 ϵ 、 γ グロビン) の同定を行った。

5. 形態学的組織化学的観察方法

生細胞は、培養皿や培養フラスコのまま倒立顕微鏡により形態観察した。浮遊状態の血液細胞はスライドガラス表面にサイトスピン固定した後に、ライトギムザ染色、ミエロペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ染色、好中球アルカリフォスファターゼ染色を行い、正立顕微鏡により観察した。

6. フローサイトメトリー

細胞膜表面抗原の同定は、細胞を PBS 中で 30 分間 1 次抗体と反応させた後に FACSCalibur を用いて解析した。解析した抗原は、CD34、CD45、CD11b、CD33、CD66、CD16、GPI-80 である。

7. 遊走能

遊走能は、24穴プレートに設置したケモカキセルを用いて測定した。遊走因子は、菌体成分由来走化性ペプチド formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)、ケモカイン interleukin 8 (IL-8)を用いた。

8. 貪食能

貪食能は、FMLP 存在下でのザイモザンの貪食により定量した。細胞はライトギムザ染色し、正立顕微鏡により貪食を観察した。

9. NBT 還元能

NBT 還元能は、FMLP 存在下での活性を測定した。細胞浮遊液をマツナミスライドグラスに滴下させ、formazan blue-black deposits 陽性細胞を正立顕微鏡下で観察した。

10. ケミルミネッセンス

ルミノール結合粒子の貪食による蛍光発色を蛍光分光光度計により定量した。

11. 空気嚢炎モデルによる in vivo 遊走能の測定

ヒトES細胞由来好中球のNOGマウスへの移植実験と、空気嚢炎の組み合わせで実験を行った。マウス皮下に空気嚢を作成して3日後に、 2×10^6 の細胞を経静脈的に移植し、空気嚢内に起炎剤としてザイモザンを注入した。16時間後に、空気嚢に集積してくる好中球を回収して、フローサイトメトリーによりヒトES好中球を同定した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体は使用しないし、臨床研究もない。また、動物実験を行う計画はない。さらに、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、研究はいっさい含まれない。

ヒトES細胞研究を開始するための国立国際医療センターにおける生命倫理に対する取り組み

1. 主任研究者による使用計画書とその概要の作成
2. 機関内倫理委員会(「ヒトES細胞研究倫理審査委員会」)の人選と確定
3. 当機関としての倫理規定、倫理委員会運営規定などの作成
4. 生命倫理に関する勉強会、講演会の開催と参加

5. 主任研究者が提出した使用計画に対する機関内倫理審査委員会の審査

第1回:平成17年4月18日

第2回:平成17年5月30日

第3回:平成17年8月2日

6. 使用計画書一式、機関内倫理委員会審査経過を文部科学省に提出

7. 文部科学省特定胚及びヒトES細胞研究専門委員会にて当機関の使用計画が審査され承認。(平成17年9月30日)

最終的には、平成17年11月9日に当機関長宛に文部科学大臣の確認の文書(17諸文科振第734号)が送付され、ヒトES細胞使用が認められた。

その後、研究者の追加・削除と研究業績の変更、使用期間と使用の方法の変更、使用機関の基準に関する説明の変更についても平成18年11月24日に文部科学大臣の確認(18諸文科振第743号)を得た。

さらにその後、文部科学省指針の改定に伴う変更と使用の方法の変更についても平成19年12月18日に文部科学大臣の確認(19国文科振第26号)を得た。

さらにその後、研究者の追加・削除について機関内倫理委員会と機関長の了承を得て、平成20年3月1日に文部科学省に届け出た。

C. 研究結果

1. 霊長類ES細胞の無血清・無フィーダー・無サイトカイン環境での未分化維持培養

サルES細胞を用いて、noggin、FGF2を添加して無血清・無フィーダー培養を行ったところ、40継代以上の未分化維持培養が可能であった。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。次に、サルES細胞を用いて、無血清・無フィーダー・無サイトカイン培養を行ったところ、noggin、FGF2等の増殖因子やサイトカインを全く添加せずに、40継代以上の未分化維持培養が可能であった。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。奇形腫形成も確認した。

次に、ヒトES細胞を用いて、noggin、FGF2を添加して無血清・無フィーダー培養を行ったところ、KhES-1株では、10継代以上の未分化維持培養が可能であった。最後に、ヒトES細胞を用いた無血清・無フィーダー・無サイトカイン培養を試み、noggin、FGF2等の増殖因子やサイトカインを全く添加せずに、KhES-1、KhES-3の2株において25継代以

上の未分化維持培養が可能であった。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。奇形腫形成も確認した。ただし、KhES-2株はこの様な条件においては長期の安定した継代は困難であった。

2. 霊長類 ES 細胞からの無フィーダー血液細胞分化誘導 (Bhatia のグループの手法を改変して後半に平面培養を取り入れた手法)

サル ES 細胞を 15 日間の胚様体形成に引き続き、平面培養を行うと、フラスコの底に接着した胚様体は次第に平坦となり周囲に広がり、約 2 週間後には胚様体が存在した中心付近から囊状の構造物が出現した。その囊状構造物の中には球状の細胞が充満していた。その後の継代により、培養系には不定形の付着細胞と球状の浮遊細胞が混在する状態となった。球状の浮遊細胞は CD45 陽性 (90%以上) であり血液細胞と考えられた。この血液細胞のライトギムザ染色形態は、半数以上が未分化な芽球の形態で、10-40% が成熟好中球の形態を示した。これらの好中球は、ミエロペルオキシダーゼ染色、ナフトール ASD クロロアセテート染色、好中球アルカリフォスファターゼ染色が陽性であり、成熟好中球と考えられた。また、貪食能、活性酸素産生能、遊走能も、いずれも陽性で、十分な機能を有する好中球と考えられた。この様な、未分化血球と成熟好中球の共存する培養系は 100 日間以上維持することが出来た。また、凍結融解後も、同様な状態を保つことが出来た。

次に、ヒト ES 細胞を同様の方法で分化誘導した。サル ES 細胞の時とほぼ同様の経過 (胚様体形成、胚様体接着拡散、囊状構造物) を経て、血液細胞が産生された。球状細胞の 100% 近くが CD45 陽性の血液細胞で、しかも、CD33、CD11b 陽性の骨髓系細胞であった。これらの細胞のうちで CD16b 陽性の好中球は 2 割程度であった。ライトギムザ染色においても約 1-2 割の好中球が観察され、ミエロペルオキシダーゼ染色、ナフトール ASD クロロアセテート染色、好中球アルカリフォスファターゼ染色が陽性であり、成熟好中球と考えられた。

3. 2 段階からなる独自のヒト ES 細胞由来血液細胞分化誘導法

分化誘導実験は、当初は 3 株のうちで、KhES-3 株にて詳細に行ったので、先ずその結果を示す。

我々の分化培養系は、前半の細胞凝集塊形成

(sphere 形成) の浮遊培養と、後半の平面単層培養 (接着培養) の 2 段階から成り立っており、全体を通じて、フィーダー細胞との co-culture は一切含まれておらず、無フィーダー培養である。第 1 段階の sphere 形成は、6 種類の増殖因子・サイトカイン (20 ng/ml IGF-II, 20 ng/ml VEGF, 100 ng/ml SCF, 100 ng/ml Flt3-L, 50 ng/ml TPO, 100 ng/ml G-CSF) 存在下に 3 日間行われた。

その後、ゼラチンコート培養皿の上にて、第 2 段階の接着平面培養に移行した。接着した sphere は当初は次第に平坦になって行くが、活発な細胞増殖に伴って円盤状の細胞層が形成された。その後、接着部位の中心付近 (sphere の接着部位付近) で再度隆起、重層化してきて、12-14 日程度で囊状の構造物が形成された。この囊状構造物はカニクイザル ES 細胞からの造血細胞分化過程でも観察されており、我々はこれを囊状構造物 (a sac-like structure; SLS) と命名した。球状細胞は SLS 内に充満し、次第に SLS 外側の円盤状細胞層の上にも載積するようになった。培地交換の際にはまず SLS 壁面をマイクロピペットやステムセルナイフで切開して球状細胞を上清中に放出させ、上清を回収して遠心後に沈殿した球状細胞をフレッシュな分化培地に懸濁させるようにして行った。切開した SLS 壁は一晩で塞がり 2-3 日後には再び球状細胞が充満していった。このような球状細胞は、以下の記述するように高率に好中球に分化したが、マクロファージや赤芽球 (胎児型、成人型) にも分化しうる多能性の造血前駆細胞であることが、コロニーアッセイ、グロビン遺伝子発現解析 (RT-PCR) から明らかとなった。

4. ヒト ES 細胞から分化誘導されたヒト血液細胞の解析

SLS 壁の切開、培養上清の遠心、球状細胞の回収、培地交換、という手順を繰り返しながら合計 30-40 日の培養を行なった。最終的に回収された球状細胞の細胞表面抗原 (特に血液細胞抗原) のフローサイトメトリー解析を詳細に行った。この時期が球状細胞の増殖の最盛期であった。球状細胞の殆ど全てが血液細胞抗原である CD45 を発現していた。一方、造血幹細胞抗原である CD34 は、10% 以内に止まり、球状細胞は血液細胞であるが、比較的成熟した血球であることが示された。さらに、球状細胞の 90% 以上が、骨髓系細胞インテグリン系接着分子である CD11b 抗原陽性であり、同

じく骨髄系細胞に特異的な抗原 CD33 も 90% 以上が陽性であったので、血液細胞の大部分が骨髄系（食細胞系）の血液細胞で有ることが示された。

以上のように、産生された血液細胞は骨髄系血液細胞であったが、どのような血球成分が含まれるかライトギムザ染色による形態観察を行った。その結果、約 30% が多型核好中球、約 30% がマクロファージ、その他の約 40% が未分化な骨髄系細胞であると考えられた。このような形態像に一致して、80-90% の細胞がミエロペルオキシダーゼ染色陽性で、30-50% が好中球アルカリフォスファターゼ染色陽性であった。

さらに、球状血液細胞中の好中球含有率を評価するために、好中球特異的な抗原のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、好中球特異的とされる CD66b、CD16b、GPI-80 抗原は、概ね、20-70% 陽性であった。従って、上記の形態像や細胞組織酵素染色なども総合的に鑑みて、30-50% が好中球と考えた。

5. ヒト ES 細胞から分化誘導されたヒト好中球の機能解析

まず、好中球機能の中で炎症反応の最初に発揮される最も重要な成熟機能である遊走能に関して、菌体成分由来走化性ペプチド

formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) とケモカイン interleukin 8 (IL-8) を遊走因子として検討した。その結果、いずれに因子に対しても遊走能を示した。FMLP に対してはより強い遊走能を示し、IL-8 に対してはより好中球特異的な遊走を示した。すなわち、IL-8 に対して遊走した血球は、主に分節核好中球から成り立ち、好中球アルカリフォスファターゼ陽性であった。

IL-8 に対して遊走した好中球を回収して、これを、準純化ヒト ES 細胞由来ヒト好中球と考えて、様々の成熟好中球機能の解析を行った。その結果、ザイモザン貪食能、活性酸素産生能 (NBT 還元能) はいずれも陽性であり、蛍光粒子貪食による活性酸素産生も陽性であった。以上より、ヒト ES 細胞から分化誘導したヒト好中球は、成熟機能を十分に備えた機能細胞であることが明らかとなった。

我々の分化誘導法においては、SLS 内に球状細胞が徐々に充満していくが、この状態を放置したまま培地交換を行なうと SLS 内の球状細胞はマクロファージ主体になる。この理由は不明であるが、元来 ES 細胞はマクロファ-

ージを産生しやすい性質を持つものであることに加えて、産生されたマクロファージが造血前駆細胞を貪食する可能性も推測される。我々は SLS が充満したら壁面を切開して球状細胞を上清中に放出して充満状態の持続を避けるとマクロファージの優勢化が遅延されることに気づき、これを実行した。これにより分化誘導開始後約 40 日までは顆粒球優位状態を保持しながら血球産生を行なうことが可能になった。

6. ヒト ES 細胞由来ヒト好中球の遊走能の in vivo 解析

我々は以前より空気嚢炎を駆使した生体内での (in vivo の) 遊走能の測定系を有し、しかも、ヒト造血幹細胞を移植した NOG マウスにおいて生着したヒト血液細胞がマウス体内で好中球に分化して空気嚢炎症巣に遊走することを確認してきた。本研究においてもこのような独自の系を駆使して、ヒト ES 細胞由来ヒト好中球の遊走能の in vivo 解析を遂行した。その結果、ヒト CD66 抗原陽性のヒト ES 細胞由来のヒト好中球が、炎症巣にわずかながらも (1% 未満) 遊走していることが確認できた。対照として用いられたヒト造血肝細胞由来ヒト好中球においても、空気嚢に有した好中球は 1% 未満であったので、この数値は有意であると考えられた。

7. KhES-1 株、KhES-2 株を用いた血液細胞分化誘導

KhES-1 株、KhES-2 株を用いて、上記と同様の分化誘導を行ったが、血液細胞分化は困難であった。KhES-1 株ではわずかに血球分化が認められたが効率は極めて低く、KhES-2 株では、全く血球分化しなかった。ただし、KhES-2 株に関しては、無血清 (KSR20%) 条件下で分化誘導を行ったところ、接着平面培養に移行した後は、嚢状構造物は出現しないまま、紡錘形の接着細胞とともに球状細胞が大量に増殖し始めた。これらの球状浮遊細胞は、CD45、CD11b、CD33 は陽性になるものの CD66b、CD16b は陰性で、形態上も WG 染色でアズール顆粒が偏って染色され、非定形的な分化と考えられた。

8. ヒト iPS 細胞を用いた血液細胞分化誘導

京都大学・山中伸弥教授の樹立したヒト iPS 細胞を用いて造血細胞分化を行なったが、試した 2 株 (201B7、253G1) のどちらでも SLS の形成が確認された。有効株数を比較す

るならば、ヒトES細胞（3株中1株）よりヒトiPS細胞（2株中2株）の方が成功率は高かった。ただし、ヒトES細胞（KhES-3）では全てのsphereから円盤状細胞層が形成され、その過半数でSLSが形成されたのに対して、ヒトiPS細胞で円盤状細胞層の形成を認めたのは一部（ <3 割）のsphereであった。我々の印象では、ES細胞では株の選択が、iPS細胞ではsphereの選択が、効率良い分化誘導のための鍵になると思われる。なおiPS細胞ではSLS壁切開後の球状細胞の再生産は認められなかった。

9. サルES細胞による血球産生から示唆される今後の研究展開

サルES細胞を15日間の胚様体形成に引き続き、平面培養を行うという分化誘導法（2. 霊長類ES細胞からの無フィーダー血液細胞分化誘導（Bhatiaのグループの手法を改良して後半に平面培養を取り入れた手法））によって、以下のような成体型2次造血に近づく成果を得た。

すなわち、近年の著しい研究の進歩によって、発生過程においてはhemogenic endothelium（CD34陽性、VE-cadherin陽性）から最初の造血幹細胞（CD34陽性、CD45陽性）が派生することが明らかとなっている。サルES細胞を上記の手法により無フィーダー培養したところ、CD34^{high}CD45^{middle}VE-cadherin^{high}細胞（接着細胞）が作製された。これらの細胞は活発に増幅しながら大量に浮遊細胞（CD34^{high}CD45^{middle}VE-cadherin^{middle}）を産生し続けた。ES細胞からの造血幹細胞がこのような時期を経るとすれば、成体型の造血幹細胞に近い表現型を得ることに成功したことになり、今後の進展が期待される。

D. 考察

好中球は細菌や真菌からの感染防御に極めて重要である。好中球減少症の患者が難治性感染症に罹患し、G-CSF、抗生物質、抗真菌剤、外科的処置等の治療に反応しない場合に顆粒球輸血が考慮される。ヒト白血球型抗原適合性顆粒球輸血の有効性は実証されているが、治療効果を得る充分量の顆粒球を常に確保することは難しく、顆粒球採取時に使用されるG-CSF、副腎皮質ステロイド、赤血球沈降促進剤等のリスクも問題となる。我々は現行の顆粒球輸血療法に対する補助手段の提供を目的に、ヒトES

細胞からの高純度好中球分化誘導法を開発すべく検討を行なった。

我々の行った分化培養によって、ヒトES細胞から極めて高効率に血液細胞が分化誘導できた。また、その中での好中球の比率も高く、霊長類ではこれまでに報告がない。世界的に見てもこれほど高効率での分化誘導は例が無く、極めて優れた技術開発に成功したと言っても過言ではない。

他の研究グループで達成できなかった高純度の血液分化誘導が我々の研究室で可能であった理由として、以下の点が推測される。我々の分化誘導系は前半の細胞凝集塊形成浮遊培養と後半の接着平面単層培養の2段階システムからなる分化誘導系であることである。血液細胞分化誘導などの中胚葉分化法においては、このような2段階培養は殆ど試みられておらず、我々の系の独自性が良好な結果につながった可能性が考えられる。

ヒトES細胞からはフィーダー細胞を用いた共培養法、および無フィーダー培養法により多系統の成熟血球の産生が報告されているが、好中球産生に関する報告はまだなかった。またマウスES細胞で報告されていた好中球産生法はマウスフィーダー細胞を用いた共培養系であった。我々は臨床応用の観点から異種動物細胞を用いない無フィーダー培養法での好中球分化誘導について検討を重ねた。そして浮遊培養とそれに続く接着培養の2段階からなる培養法により、高効率な血液細胞の産生、並びに成熟機能をもつ好中球の産生に成功した。この2段階培養法はサイトカインの種類を変えることで純粋に血管内皮細胞を作製することも可能であり、血球・血管内皮細胞の分化誘導に極めて有効な手法と考えられる。

sphereや胚様体などの細胞凝集塊の形成プロセスは無フィーダー分化誘導法の要となっているが、細胞凝集塊をsingle cellレベルに分散してセルソーターや磁気ビーズを用いて特定細胞集団を選別する操作がとられることが多い。我々の方法はsphereをそのまま接着培養をすることに特徴があり、セルソーティングが不要であるという技術的メリット（簡便化と低コスト化）に加えて、接着培養により細胞凝集塊が平面化するために形態観察が容易になること、細胞分化に重要である細胞間相互作用を破壊せずに培養ができること、などの利点がある。

従来からsphere形成は高指向性分化誘導のために有利とされてきたが、それは目的系列の細胞だけでなくフィーダーとなる細胞種も同時

に産生されるためと推測される。発生過程では分化細胞とフィーダー細胞（またはストローマ細胞）とが密接な関係をもって発生するが、sphere という3次元構造に起因する位置依存的シグナルが発生類似の環境を提供するのかもしれない。

現在の我々の課題は、1) 長期の好中球産生法の開発、2) ヒトES細胞の分化挙動に関する株間差への対応、3) 産生された好中球の臨床使用における有用性の検証、である。1) については、胎児造血で見られるような「自己増幅能のある造血幹細胞」の作製が必要になるかもしれない。HOXB4 遺伝子導入が造血幹/前駆細胞の作製に有効であることがマウスES細胞で示されているが、ヒトES細胞に関しては臨床応用を可能とするような成果はまだ報告されていない。HOXB4 に加えて Runx1 など造血幹細胞の発生に重要な転写因子群をセットで導入することが有効なのかもしれない。2) については、当面はヒトES細胞株の数を増やすことで対応するのが近道であると思われる。しかし網羅的解析などを通じて分化指向性を決定づけているファクターが同定できれば分化誘導操作の幅が広がるかもしれない。3) については、我々の解析はヒトES細胞由来好中球の *in vivo* での遊走能を免疫不全マウスへの移植実験で確認したにとどまっているが、将来的には多剤耐性菌への感染防御能についても評価できるようにしたい。

生体内での機能性好中球の評価システムは極めて重要である。我々の研究グループは従来より通常のマウスで試みられていた *in vivo* 炎症モデルの1種である空気嚢炎モデルを、移植実験で有用な NOG マウスにおいて成功させた。さらに、NOG マウスにヒト造血幹細胞を移植して生着させて、そこからマウス体内で分化してくるヒト好中球を、空気嚢炎内で検出することにも成功して、血液系移植後の機能性好中球産生評価システムに使用できることを証明した。今回、このシステムを駆使してヒトES細胞由来のヒト好中球がマウス体内で遊走能を発揮することを示した。今後は、ヒトES細胞からヒト造血幹細胞を作成して、その体内分化能を検証することにも応用可能であると考えられる。

今回の検討においては、ヒトES細胞株のうちの1株において成果が得られた。他の株における工夫を凝らして、無血清培養も含めた展開が期待される。また、今回は好中球の分化に成功したが、成体型の造血幹細胞の誘導を目指したい。hemogenic endothelium (CD34 陽性、

VE-cadherin 陽性) から最初に派生する造血幹細胞 (CD34 陽性、CD45 陽性) の産生誘導に向けて、HOXB4、Runx1 など造血幹細胞の発生に重要な転写因子群をセットで導入することも視野に入れて研究を展開する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究では、異種動物由来の成分の混入を回避する培養法の開発のために、主にヒトES細胞を用いて、無フィーダー分化誘導系による血液細胞の産生を試みた。培養法の基本は、前半の sphere 形成浮遊培養と後半の平面培養であった。敷石状の細胞の増殖、中心部での囊状構造物の形成を経て、血液細胞が産生された。産生された血液細胞は比較的分化した骨髄系の細胞で、好中球を多く含んでいた。これらの好中球は、*in vitro* でも *in vivo* でも十分な機能を発揮出来る成熟好中球であった。このような成熟好中球が効率よく産生できるES細胞の分化誘導システムは、霊長類では世界初であり、顕著な成果が得られたと言える。また、研究は最終年度においてヒトiPS細胞にも展開して、臨床応用へ向けて着実に進展した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saeki K, Yogiashi Y, Nakahara M, Nakamura N, Matsuyama S, Koyanagi A, Yagita H, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from primate embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 217:261-280, 2008.
2. Nakahara M, Matsuyama S, Saeki K, Nakamura N, Saeki K, Yogiashi Y, Yoneda A, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: A feeder-free hematopoietic differentiation system with generation of functional neutrophils from feeder and cytokine-free primate embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 10:341-354, 2008.
3. Saeki K, Saeki K, Nakahara M, Matsuyama S, Nakamura N, Yogiashi Y, Yoneda A,

Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:59-67, 2009.

4. Nakahara M, Saeki K, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, Yuo A: Human embryonic stem cells with maintenance under a feeder-free and recombinant cytokine-free condition. *Cloning Stem Cells* 11:5-18, 2009.
2. 学会発表
 1. 中原正子、松山さと子、過足芳子、中村直子、佐伯晃一、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類（サル・ヒト）ES細胞からの無フィーダー培養による造血細胞・血管内皮細胞分化。日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋。
 2. 佐伯晃一、米田麻子、中原正子、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類ES細胞から分化誘導した好中球の機能解析。日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋。
 3. 中原正子、佐伯久美子、松山さと子、佐伯晃一、中村直子、過足芳子、近藤 靖、末盛博文、中辻憲夫、湯尾 明：カンクイザルおよびヒトES細胞からの無フィーダー培養による造血細胞。第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。
 4. 中村直子、過足芳子、佐伯久美子、中原正子、佐伯晃一、松山さと子、湯尾 明：カンクイザルES細胞からの無フィーダー培養条件下における継代培養可能な血管内皮細胞への分化誘導。第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。
 5. 佐伯晃一、米田麻子、中原正子、末盛博文、中辻憲夫、佐伯久美子、湯尾 明：ヒトES細胞から分化誘導した好中球の機能解析。第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。
 6. 中原正子、過足芳子、佐伯晃一、中村直子、松山さと子、米田麻子、佐伯久美子、湯尾 明：サル・ヒトES細胞からの無フィーダー培養による高効率な血管内皮細胞分化法の開発。第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会・合同総

会、2007年10月、横浜。

7. 中原正子、過足芳子、佐伯久美子、佐伯晃一、中村直子、松山さと子、米田麻子、小柳 真、近藤 靖、末盛博文、中辻憲夫、湯尾 明：霊長類（サル、ヒト）ES細胞からの無フィーダー培養による高効率な血管内皮細胞分化誘導法の開発—各サイトカインの役割の検討及びin vivoでの機能評価—。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会、2007年12月、横浜。
8. 中村直子、過足芳子、中原正子、佐伯久美子、小柳 真、松山さと子、小柳明美、八木田秀雄、湯尾 明：霊長類胚性幹（ES）細胞からの高効率な血管内皮細胞分化。第7回日本再生医療学会総会、2008年3月、名古屋。
9. Saeki K, Nakahara M, Yogiashi Y, Nakamura N, Matsuyama S, Koyanagi A, Yagita H, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from monkey and human embryonic stem cells. 6th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2008, Philadelphia, PA, USA.
10. Saeki K, Nakahara M, Yogiashi Y, Nakamura N, Matsuyama S, Koyanagi A, Yagita H, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from monkey and human embryonic stem cells. The 23rd Naito Conference: Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [III], November 2008, Kanagawa, Japan.
11. 中村直子、佐伯久美子、佐伯晃一、安田和基、湯尾 明：高ブドウ糖によるヒト血管内皮細胞における活性酸素産生の機序—臓器特異的メカニズムの同定。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・合同大会、2008年12月、神戸。
12. 五香麻衣子、佐藤千香子、過足芳子、中村直子、松山さと子、近藤 靖、山中伸弥、高橋和利、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類胚性幹細胞およびヒトiPS細胞に由来する血管内皮細胞でのストレス依存性老化の機序。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・

合同大会、2008年12月、神戸。

13. 中村直子、佐伯久美子、松山さと子、高橋和利、山中伸弥、湯尾 明：カニクイザルES細胞およびヒトiPS細胞からの無血清・無フィーダー培養による肝細胞分化。第8回日本再生医療学会総会、2009年3月、東京。
14. 佐藤千香子、五香麻衣子、過足芳子、松山さと子、小柳 真、高橋和利、山中伸弥、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類胚性幹細胞由来血管内皮細胞による血管平滑筋細胞の増殖制御機構。第8回日本再生医療学会総会、2009年3月、東京。
15. 五香麻衣子、佐藤千香子、過足芳子、松山さと子、小柳 真、高橋和利、山中伸弥、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類（ヒト、サル）胚性幹細胞およびヒトiPS細胞に由来する血管内皮細胞の老化機序。第8回日本再生医療学会総会、2009年3月、東京。

興財団

出願番号：特願2008-280148

出願日：平成20年10月31日

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法
発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

出願人：国立国際医療センター、田辺製薬株式会社

出願番号：特願2006-303929

出願日：平成18年11月 9日

発明の名称：霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法
発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

出願人：国立国際医療センター、田辺三菱製薬株式会社

出願番号：PCT/JP2007/71811

出願日：平成19年11月 9日

発明の名称：血管平滑筋細胞増殖を抑制する血管狭窄部挿入用基材

発明者：佐伯久美子、湯尾 明、安田和基、佐藤千香子、五香麻衣子

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振

Ⅱ. 研究成果の刊行に 関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	頁	出版年
Saeki K, Yogiashi Y, Nakahara M, Nakamura N, Matsuyama S, Koyanagi A, Yagita H, Koyanagi M, Kondo Y, <u>Yuo A</u>	Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from primate embryonic stem cells.	J Cell Physiol	217	261-280	2008
Nakahara M, Matsuyama S, Saeki K, Nakamura N, Saeki K, Yogiashi Y, Yoneda A, Koyanagi M, Kondo Y, <u>Yuo A</u>	A feeder-free hematopoietic differentiation system with generation of functional neutrophils from feeder and cytokine-free primate embryonic stem cells.	Cloning Stem Cells	10	341-354	2008
Saeki K, Saeki K, Nakahara M, Matsuyama S, Nakamura N, Yogiashi Y, Yoneda A, Koyanagi M, Kondo Y, <u>Yuo A</u>	A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells.	Stem Cells	27	59-67	2009
Nakahara M, Saeki K, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, <u>Yuo A</u>	Human embryonic stem cells with maintenance under a feeder-free and recombinant cytokine-free condition.	Cloning Stem Cells	11	5-18	2009

Ⅲ. 研究成果の刊行物・ 別刷

Highly Efficient and Feeder-Free Production of Subculturable Vascular Endothelial Cells From Primate Embryonic Stem Cells

KUMIKO SAEKI,¹ YOSHIKO YOGIASHI,¹ MASAKO NAKAHARA,¹ NAOKO NAKAMURA,¹ SATOKO MATSUYAMA,¹ AKEMI KOYANAGI,² HIDEO YAGITA,² MAKOTO KOYANAGI,¹ YASUSHI KONDO,³ AND AKIRA YUO^{1*}

¹Department of Hematology, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

²Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

³Regenerative Medicine Group, Advanced Medical Research Laboratory, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Osaka, Japan

The vascular endothelial cell (VEC) differentiation from primate embryonic stem (ES) cells has critical problems: low differentiation efficiencies (<2%) and/or subculture incapability. We report a novel feeder-free culture method for high efficiency production of subculturable VECs from cynomolgus monkey ES cells. Spheres, which were generated from ES cells in the presence of cytokine cocktail, were cultured on gelatin-coated plates. Cobblestone-shaped cells spread out after a few days, which were followed by an emergence of a sac-like structure containing hematopoietic cells. All adherent cells including sac walls cells and surrounding cobblestone cells expressed vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) at intercellular junctions. Subculture of these cells resulted in a generation of homogeneous spindle-shaped population bearing cord-forming activities and a uniform acetylated low density lipoprotein-uptaking capacity with von Willbrand factor and endothelial nitric oxide synthetase expressions. They were freeze-thaw-tolerable and subculturable up to eight passages. Co-existence of pericytes or immature ES cells was ruled out. When introduced in a collagen sponge plug implanted intraperitoneally in mice, ES-derived cells recruited into neovascularity. Although percentages of surface VE-cadherin-positive population varied from 20% to 80% as assessed by flow cytometry, the surface VE-cadherin-negative population showed intracellular VE-cadherin expression and mature functions, as we call it as atypical VECs. When sorted, the surface VE-cadherin-positive population expanded as almost pure (>90%) VE-cadherin/PECAM-1-positive VECs by 160-fold after five passages. Thus, our system provides pure production of functional, subculturable and freeze-thaw-tolerable VECs, including atypical VECs, from primate ES cells.

J. Cell. Physiol. 217: 261–280, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Embryonic stem (ES) cells are a valuable resource in regenerative medicine because of their high capacity to differentiate into a broad range of cell types. It has been revealed that primate ES cells have characteristics distinct from those of murine ES cells. For example, leukemia inhibitory factor is ineffective for maintaining the immaturity of human ES cells (Sato et al., 2004). The gene expression patterns also differ between primate and murine ES cells. For example, undifferentiated primate ES cells express kinase insert domain receptor (KDR, Flk-1, a type 2 receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF-R2)) although undifferentiated murine ES cells do not (Sone et al., 2003; Vodyanik et al., 2005). KDR is known as an excellent marker for sorting the vascular endothelial precursor population in murine ES differentiation system (Yamashita et al., 2000). However, the presence of KDR in undifferentiated primate ES cells limits a direct application of the murine system to the primate one (Sone et al., 2003). Eventually, by contrast to the highly efficient production (>90%) of vascular endothelial cells from murine ES cells (Hirashima et al., 1999), that from primate ES cells is significantly low; the efficiency of the production of vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)-positive (Sone et al., 2003, 2007) or platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-positive (Levenberg et al., 2002) cell are not higher than two percents. Although the human ES cell study is essential for clinical application, basic researches using monkey ES cells still has great importance because they provide good pre-plantational models that must be performed in the pre-clinical study (Takagi et al., 2005). Moreover, the use of monkey ES cells avoids ethical issues and thus the

biotechnological manipulation of them, including gene transfer, can immediately be applied, which will contribute to understand human ES cells.

Currently, there are three major methods for the *in vitro* differentiation of ES cells into specific lineages. One is co-culturing ES cells with stromal cells as their feeders (Hirashima et al., 1999; Sone et al., 2003, 2007). Feeder cells have large capacities to promote directed differentiation and to support viability of differentiated cells. Nevertheless, contamination of the final product by feeder cells is inevitable, and thus, an especially strict cell-sorting technique is required for purification of the final products. Concerning vascular endothelial differentiation of primate ES cells, however, the efficiency of cell surface VE-cadherin-positive cell production is considerably low (<2%) even when murine OP9 feeder cells were used (Sone et al., 2003, 2007). Besides, massive

Contract grant sponsor: The Japan Health Sciences Foundation; Contract grant number: KH61061.

*Correspondence to: Akira Yuo, Department of Hematology, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan.
E-mail: yuoakira@ri.imcj.go.jp

Received 22 December 2007; Accepted 23 April 2008

DOI: 10.1002/jcp.21502

contamination of pericytes reportedly occurs in this system. Pericytes are important players for angiogenesis, and thus, the co-generation of pericytes might be beneficial in some aspects. However, domination of pericytes after passages considerably hinders the pure expansion of vascular endothelial cells even after sorting of VE-cadherin-positive cells (Sone et al., 2007). The second method is a feeder-free culture via a generation of embryoid bodies (EBs) or spheres (Levenberg et al., 2002). It is beneficial that it can exclude the risk of contamination of xenogenic materials. Yet, directions of differentiation in EBs or spheres are principally random and cannot easily be focused on a specific lineage. As a result, fairly large volumes of starting ES cells are required to obtain sufficient amounts of differentiated cells. Additionally, these two methods described above share a common disadvantage; they do not provide a clear microscopic field for observation and manipulation due to co-existing feeder cells or the compact three-dimensional structures of EBs or spheres. The third method is a simple adherent culture of ES cells. There have been two reports concerning this method. One is the continual culture of rhesus monkey ES (rmES) cells on mouse embryonic fibroblasts (MEFs) using a vascular endothelial cell-specific culture medium of EGM[®]-2 MV BulletKit (Kaufman et al., 2004). This system provided a good microscopic field and effectively produced the subculturable vascular endothelial cells. However, these cells are not the conventional or canonical vascular endothelial cells, but rather, seem to be "atypical" vascular endothelial cells in that neither the expression of VE-cadherin, a vascular endothelial cell-specific and pan-vascular endothelial marker, nor PECAM-1, a mature vascular endothelial cell marker, was detected by flow cytometry. Nonetheless, they have mature endothelial functions including *in vitro* cord-forming and acetylated low density lipoprotein (Ac-LDL)-uptaking activities and *in vivo* neovascularization activity along with expressions of von Willbrand factor (vWF) and endothelial nitric oxide synthetase (eNOS). The other one is an adherent culture of human ES-derived CD34-positive cells, which were spontaneously generated by overgrown ES cells on MEFs in the presence of serum, in EGM[®]-2 MV BulletKit (Wang et al., 2007). This system requires the enrichment of CD34-positive cells (<10%) by cell sorter before subsequent culture in EGM[®]-2 MV BulletKit. Although this system provides VE-cadherin-positive functional vascular endothelial cells, they are not subculturable. Thus, the most urgent task for the vascular endothelial differentiation from primate ES cells is to establish a method for "feeder-free" and "high efficiency" production of cell surface "VE-cadherin-positive" and "subculturable" vascular endothelial cells.

Here we report a novel method for highly efficient production of functional, subculturable, freeze-thaw-tolerable and cell-surface-VE-cadherin-positive vascular endothelial cells from cynomolgus monkey ES (cmES) cells in feeder-free culture system. Furthermore, it does not require a step to enrich the progenitor fractions, such as CD34-positive and/or KDR-positive fractions, by cell sorter. To our knowledge, this is the highest efficiency system for the production of vascular endothelial cells. Indeed, our system provides almost two pure populations: the cell surface VE-cadherin-positive canonical vascular endothelial cells and cell surface VE-cadherin-negative "atypical" vascular endothelial cells. The characterization and significance of these atypical vascular endothelial cells is referred and discussed in this report.

Materials and Methods

Cells and reagents

Murine embryonic fibroblasts (MEFs), which had been treated with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing mitomycin C (MMC) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) for 3 h,

were seeded on the dishes coated with 0.1% gelatin. The cmES cells (CMK-6) (Suemori et al., 2001) were maintained on MMC-treated MEF-coated dishes in DMEM/F12 medium (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) supplemented with 20% Knockout[™] Serum Replacement (KSR[™], Invitrogen Corp.), 1% Non-essential amino acids solution (Invitrogen Corp.), 1 mM Sodium Pyruvate Solution (Invitrogen Corp.), 2 mM L-glutamine (Invitrogen Corp.), 10 U/ml penicillin (Invitrogen Corp.) and 10 µg/ml streptomycin (Invitrogen Corp.). ES cells were passed twice a week by collagenase treatment and seeded at split ratios of 1:2 to 1:4 on new MEF-coated dishes. Human aortic endothelial cells (HAEC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were purchased from Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland), and maintained on gelatin-coated dishes using EGM[®]-2 BulletKit (Lonza Group Ltd.). Normal Human Aortic Smooth Muscle cells (AOSMC) were purchased from Lonza Group Ltd. and maintained on gelatin-coated dishes using SmGM[®]-2 BulletKit[®] (Lonza Group Ltd.). The human leukemic UT-7 and HL-60 cells were cultured RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co.) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

Differentiation procedure

ES colonies were collected by collagenase treatment without a contamination of MEFs and further disaggregated by trypsinization. Cell aggregates were generated by a hanging drop culture, where 3,000 cmES cells were incubated in a 30 µl drop of differentiation medium (DM) consisting of Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Sigma Chemical Co.) supplemented with 15% heat-inactivated FBS (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co.), 3 mM L-glutamine (Invitrogen Corp.), 10 U/ml penicillin (Invitrogen Corp.), 20 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF; Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ), 20 ng/ml bone morphogenic protein 4 (BMP-4; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), 20 ng/ml stem cell factor (SCF; Pepro Tech Inc.), 10 ng/ml Flt3 ligand (Flt3-L; Pepro Tech Inc.), 20 ng/ml interleukin 3 (IL-3; Pepro Tech Inc.) and 10 ng/ml interleukin 6 (IL-6; Pepro Tech Inc.). After incubating the drops for 3 days at 37°C under a 100% humidified condition in a 5% CO₂ gas incubator, cell aggregates generated from 72 hanging drops were subjected to adherent culture on a 100 mm × 20 mm gelatin-coated dishes using differentiation medium described. Media were changed twice a week. After about 2 weeks, a VE-cadherin-positive sac-like structure filled with round cells along with surrounding VE-cadherin-positive cobblestone cells emerged. Before sacs were fully packed by inner round cells, sac walls were manually cut by using stem cell knife (Vitrolife AB, Kungsbacka, Sweden) under microscopic observation. After releasing the inner round cells into culture supernatant, total adherent cells including fragmented sac walls and surrounding cobblestone cells were massively transferred onto new gelatin-coated dishes via trypsin/EDTA treatment. These cells were subcultured by 1:3 dilution twice a week. In some experiments, EGM[®]-2 BulletKit (Lonza Group Ltd.) was used in place of the differentiation medium described above throughout the differential processes including hanging drop culture and subsequent adherent culture.

Morphological and cytochemical examinations

Viable cells were directly observed under an inverted phase contrast light microscope (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan), or alternatively, cells were fixed on slide glasses using a cytospin apparatus (Cytospin 2, SHANDON, Pittsburgh, PA), stained with Wright-Giemsa solution, myeloperoxidase staining kit or esterase staining kit (Muto Pure Chemical Co., Tokyo, Japan), and then observed under the light microscope (Olympus Optical Co. Ltd.).

Flow cytometric analyses and cell sorting

Cells were collected by 0.2% EDTA treatment and, after a wash in phosphate-buffered saline (PBS), 1×10^6 cells were reacted with first antibodies on ice for 30 min. The expression level of each protein was analyzed using a FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA). The antibodies used were a mouse monoclonal anti-human VE-cadherin (clone TEA1/31)-phycoerythrin (PE) antibody (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), a mouse monoclonal anti-human CD31 (PECAM-1)-fluorescein isothiocyanate (FITC) antibody (clone WM59) (BD Biosciences), a mouse monoclonal anti-human CD34 (clone 563)-PE antibody (BD Biosciences), a mouse monoclonal anti-human Tie-2 (clone 83715)-PE (R&D Systems Inc.), a mouse monoclonal anti-human VEGF-R1 (Flt-1) (clone 49560)-PE antibody (R&D Systems Inc.), a mouse monoclonal anti-human VEGF-R2 (KDR, Flk-1) (clone 89106)-PE antibody (R&D Systems Inc.), a mouse monoclonal anti-human VEGF-R3 (Flt-4) (clone 54733)-PE antibody (R&D Systems Inc.), a mouse monoclonal anti-human CD14 (clone M5E2)-PE antibody (BioLegend, San Diego, CA), a mouse monoclonal anti-human CD18 (clone 6.7)-FITC antibody (BD Biosciences), a mouse monoclonal anti-human CD11b (clone ICRF44)-PE antibody (BD Biosciences) and a mouse monoclonal anti-human CD45 (clone TŪ116)-PE antibody (BD Biosciences). As for the anti-VE-cadherin antibody reaction, secondary antibody reaction was performed using a goat anti-mouse IgG-PE (Calbiochem Co., La Jolla, CA). After antibody-staining procedures, cells were stained with TO-PRO3 fluorescent dye (Invitrogen Corp.) for 10 min. During analysis, dead cells were gated out as the FL4-higher fraction. The cell surface VE-cadherin-positive and VE-cadherin-negative fractions were sorted using as FACSAria™ (BD Biosciences) after cells were stained VE-cadherin (clone TEA1/31)-phycoerythrin (PE) antibody (Beckman Coulter Inc.).

Immunostaining

The cells were fixed on slide glasses with a cytospin apparatus (Cytospin 2) with further fixation with acetone/methanol solution (1:3). The immunostaining procedure was as described elsewhere (Saeki et al., 2003) with first antibody reactions using a mouse anti-human VE-cadherin antibody (clone55-7H1) (BD Biosciences), a rabbit anti-human N-cadherin antibody (H-63) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), a rabbit polyclonal anti-human Nanog antibody (ReproCELL Inc., Tokyo, Japan), a mouse monoclonal anti-human Actin, α smooth muscle (SMA) (clone IA4) (Sigma Chemical Co.), a mouse monoclonal anti-platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR- β) (clone 28) (BD Biosciences), a rabbit polyclonal anti-human eNOS antibody (H-159) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), a goat polyclonal anti-human vWF antibody (C-20) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) or a mouse monoclonal anti-CD68 antibody (Transgenic Inc., Kobe, Japan) followed by second antibody reactions using Alexa Fluor[®] 488 chicken anti-mouse IgG (H + L), Alexa Fluor[®] 568 goat anti-rabbit IgG (H + L) or Alexa Fluor[®] 594 chicken anti-goat IgG (H + L) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Cord formation assays

Matrigel (BD Biosciences) was loaded into the 24 multi-well dishes (95 μ l/well). After the dishes were incubated for 30 min at 37°C, 1×10^4 cells per well were seeded in 1 ml of EGM[®]-2 BulletKit supplemented with cytokines and growth factors according to the manufacturer's instructions (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD). Cell morphologies were observed after overnight culture under an inverted light microscope (Olympus Optical Co. Ltd.).

Colony assays

Colony assays were performed using Methocult TM GF⁺H4535 (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canada) according to the

manufacturer's recommendations. In brief, 0.3 ml of cell suspension, which contained 10 cells, was mixed in 3 ml of methylcellulose solution consisting of 1% methylcellulose, 30% FBS, 1% bovine serum albumin, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 50 ng/ml SCF (Pepro Tech Inc.), 20 ng/ml IL-3 (Pepro Tech Inc.), 20 ng/ml IL-6 (Pepro Tech Inc.), 20 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Pepro Tech Inc.), 20 ng/ml granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF; Kirin Brewery Company, Ltd., Tokyo, Japan) and 3 U/ml erythropoietin (Kirin Brewery Company, Ltd.) in 3.5-cm culture dishes. After 2 weeks, the number of colonies was counted. The morphology of the colonies was observed under an inverted light microscope (Olympus Optical Co. Ltd.).

Western blotting

Western blotting was performed as described previously (Saeki et al., 2003) using a rabbit anti-human VE-cadherin antibody (C-19) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) or a mouse monoclonal anti-tubulin β (D-10) antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.). The second antibody reaction was performed using a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA). The final detection procedure was performed using ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England).

Uptake of acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL)

Cells were transferred in 4-well chamber slide system (Nalge Nunc International Corp., Naperville, IL). After overnight culture, cells were washed by Hank's balanced salt solution (HBSS) twice and incubated in serum-free medium containing 10 μ g/ml of low-density lipoprotein from human plasma, acetylated, Dil complex (Dil Ac-LDL) (Molecular Probes) for 4 h. After washing the cells by HBSS for three times, the cells were observed under the fluorescence microscope (Olympus Optical Co. Ltd.).

Polymerase chain reaction (PCR)

Genomic PCR. Genomic DNA was extracted from ES-derived vascular endothelial cells (EsDEC), HUVECs (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) or MEFs of the ICR strain (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan). 1×10^5 cells were lysed with a buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA and 0.1% SDS) supplemented with 75 μ g/ml Proteinase K (WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) for 8 h at 55°C. After phenol/chloroform extraction and isopropanol precipitation, dried pellets were solubilized by 100 μ l of water containing 50 ng/ml DNase-free RNase (Invitrogen Corp.) and incubated for 1 h at 37°C. The genomic DNA solution was kept at -80°C. PCR was performed using 2 μ l of the 50 \times diluted DNA template, SP-Taq (Hokkaido System Science Co., Ltd., Hokkaido Japan) and following primers. For detecting the murine ly.9.2 genomic fragment, a forward primer 5'-gtaattccccagctctgt-3' and a reverse primer 5'-atgccatgctctctctcc-3' were used (the product length is 433 bp). For detecting the primate CD34 genomic fragment, a forward primer 5'-CGACAGTCAAATTCACATCTACC-3' and a reverse primer 5'-GAGATGTTGCAAGGCTAGTGC-3' were used (the product length is 254 bp). The PCR procedure was carried out using a DNA Thermal Cycler PJ2000 (PerkinElmer Corp., Foster City, CA) with the following program: 95°C; 5 min, 94°C; 30 sec, 57°C; 30 sec, 72°C; 1 min at 27 cycles for murine ly.9.2 and at 34 cycles for primate CD34. The product was separated by agarose gel electrophoresis and the DNA was visualized by ethidium bromide staining. A 100 bp ladder marker 4 (Nippon Gene Co. Ltd., Tokyo, Japan) was used to evaluate the molecular weights of the PCR products.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). RNA was extracted from 5×10^5 cells with RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) and cDNA was synthesized by Superscript II Kit (Invitrogen Corp.) according to a manufacturer's protocol. The PCR procedure was carried out as described above using primate globin- ϵ primers; a forward primer 5'-TGCAATTTACTGCTGAGGAGA-3' and a reverse primer 5'-AAGGAAGCACTGAGTACTT-3', primate globin- ζ primers; a forward primer 5'-TTCCTCAGCCACCCGACAG-3' and a reverse

primer 5'-AGCAGGCACTGGGACAGGAG-3', primate VE-cadherin primers; a forward primer 5'-TGGGCTCAGACATCCACATA-3' and a reverse primer 5'-TCACAGTCTCCCTGGGAAT-3'. For internal control, primate β -actin primers were used: a forward primer 5'-gCaggAgATggCCACggCgCC-3' and a reverse primer 5'-TCTCCTTgCATCCTgTCggC-3'.

Collagen plug assay

About 10 blocks of dried honeycomb collagen sponge (Koken Co. Ltd., Tokyo, Japan) were mixed with 500 μ l of cmES-derived cells at passage number 4, which were suspended in differentiation medium at the density of 4×10^5 /ml, and were then cultured for 2 days *in vitro*. Then they were transplanted intraperitoneally into SCID mice. After 35 days, 0.2 ml of FITC-dextran (500,000 average molecular size, Sigma Chemical Co.) solution (100 mg FITC-dextran suspended in 5 ml PBS) was injected into mice from a tail vein. After several minutes, mice were sacrificed and the blocks were fixed by 10% formaldehyde and paraffin embedded. The 4 μ m sliced specimen were further subjected to immunostaining using a mouse monoclonal anti-human HLA-A, B, C antibody (BD Biosciences) or a rabbit polyclonal anti-PECAM-1 antibody (H-300) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), and also to histological examination using hematoxylin and eosin solutions.

Results

A sac-like structure with surrounding cobblestone cells as a parental organization for vascular endothelial cell generation

During our attempt to generate hematopoietic progenitor cells from cmES cells under feeder-free conditions, we found that the condition we had tried to optimize for hematopoietic differentiation was unexpectedly fitted for the production of vascular endothelial cells. Our differentiation medium was prepared by modifying the one reported in a case of hematopoietic differentiation of rmES cells by co-culture method (Li et al., 2001). In the presence of VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-L, IL-3, IL-6 and serum, we generated spheres from cmES cells (Fig. 1A,B, upper left). Then spheres were subjected to adherent culture on gelatin-coated dishes (Fig. 1A,B, upper middle and right). Time course observations revealed the differentiation processes as follows: spreading of cobblestone-shaped cells with leaving the center region rather amorphous in a few days (Fig. 1B, lower left); swelling of the center region at about 6 days (Fig. 1B, lower middle); ballooning out of the center region resulting in the formation of "a sac-like structure" filled with abundant round cells, some of which brimmed over the sac wall, around 12 days (Fig. 1B, lower right). At this time, the cobblestone cells were divided into two populations by their morphology. The cells located at proximal regions to the sac-like structure became densely packed, while the cells located at distal regions remained rather stretched (Fig. 1C). Although the early phased cobblestone cells (Fig. 1B, lower left) did not express VE-cadherin but expressed only N-cadherin at intercellular junctions (data not shown), VE-cadherin expression had become detectable in all adherent cells at the time when a sac-like structure was formed. As shown in Figure 1D, the late phased cobblestone cells, including proximal compact cells and distal extended cells, as well as sac wall cells expressed VE-cadherin at intercellular junctions. Thus, total adherent cells generated after the culture of ES-derived spheres on gelatin-coated dishes using our differentiation medium are regarded as vascular endothelial cell-committed populations although no special selection procedures were performed.

We also studied the characteristics of the non-adherent round cells, majority of which located within the sacs and minor portion of which resided around the sacs. They were collected from the culture supernatant after cutting the sac walls by micropipettes and releasing into the medium. The cytochemical

analysis including Wright-Giemsa, myeloperoxidase and esterase staining showed that the majority of the round cells were myeloblasts and macrophages (Fig. 1E). This finding was further supported by the results of colony assays of round cells, where generation of granulocyte/macrophage colonies consisting of promyelocytes, myelocytes, and segmented neutrophils were observed (Fig. 1F). Because sac-like structures resembled the morphology of blood islands in the yolk sac, we investigated the possible existence of primitive hematopoietic cells. The RT-PCR studies showed that the messages for embryonic hemoglobins, globin- ϵ and globin- ζ , were expressed at the sac stage (Fig. 1G, lane 2 (cmES-derived cells, p1)) and subsequent first-passage-stage (Fig. 1G, lane 3 (cmES-derived cells, p2)). Thus, non-adherent round cells consist of myeloblasts and macrophages along with a small portion of primitive erythroid cells.

Hence, simple adherent culture of ES-derived spheres in the presence of hematopoietic cytokines resulted in generation of a unique construction: a sac-like structure and surrounding cobblestone cells that expressed VE-cadherin along with primitive and definitive hematopoietic cells localized within and around the sac.

Characterization of subcultured adherent cells

We next tried to expand the cell surface VE-cadherin-positive adherent cells by an ordinary subculture method. After cutting sac walls and releasing the inner hematopoietic cells into culture supernatant, residual adherent cell populations including sac wall-constituting cells and surrounding cobblestone cells were detached by trypsin/EDTA treatment and transferred massively onto new gelatin-coated dishes. During the cutting process of the sac walls, they were divided into small fragments but remained attached to dishes. After trypsin/EDTA treatment, the cells were dissociated almost into single cell and transferred to new gelatin-coated plates by 1:3 dilution. Cells actively proliferated and reached confluence in 3–4 days. They showed highly homogenous spindle-shaped morphology similar to HUVEC (Fig. 2A). Indeed, these cmES-derived cells showed cord-forming activities equivalent to HUVEC (Fig. 2B). Furthermore, all of the cells were positive for Ac-LDL-uptaking activities (Fig. 2C) with uniform expressions of eNOS and vWF (described in the following part of the manuscript and Fig. 4B, left parts).

To quantitatively evaluate the vascular endothelial differentiation, we determined the cell surface expression of VE-cadherin and PECAM-1 by flow cytometry. As shown in Figure 3A, limited populations were positive for VE-cadherin and PECAM-1 despite rather uniform expression of VE-cadherin before subculture (Fig. 1D). Although the reason for the reduction of VE-cadherin expression after subculture was not known, the expressions of VE-cadherin/PECAM-1 were well preserved during subsequent culture (Fig. 3B). The cells were subculturable up to eight passages, during which 2×10^5 cmES cells generated 7×10^9 of VE-cadherin/PECAM-1-positive vascular endothelial cells. Moreover, the cells were freeze-thaw-tolerable and re-cultured cells properly retained the VE-cadherin/PECAM-1 expressions (Fig. 3C). The average percents of VE-cadherin/PECAM-1-positive cells were $29.8 \pm 15.1\%$ ($n = 17$). The expressions of other surface markers for vascular endothelial cells were also examined. As shown in Figure 3D, the expression of VEGF-R1, a vascular endothelial cell-specific marker, was detected at a comparable level to HUVEC and HAEC. Tie-2 expression was also detected in cmES-derived cells although the expression levels were slightly lower than HUVEC and HAEC. On the other hand, CD34-positive populations were detected mainly in cmES-derived cells and HUVEC. Interestingly, the expression of

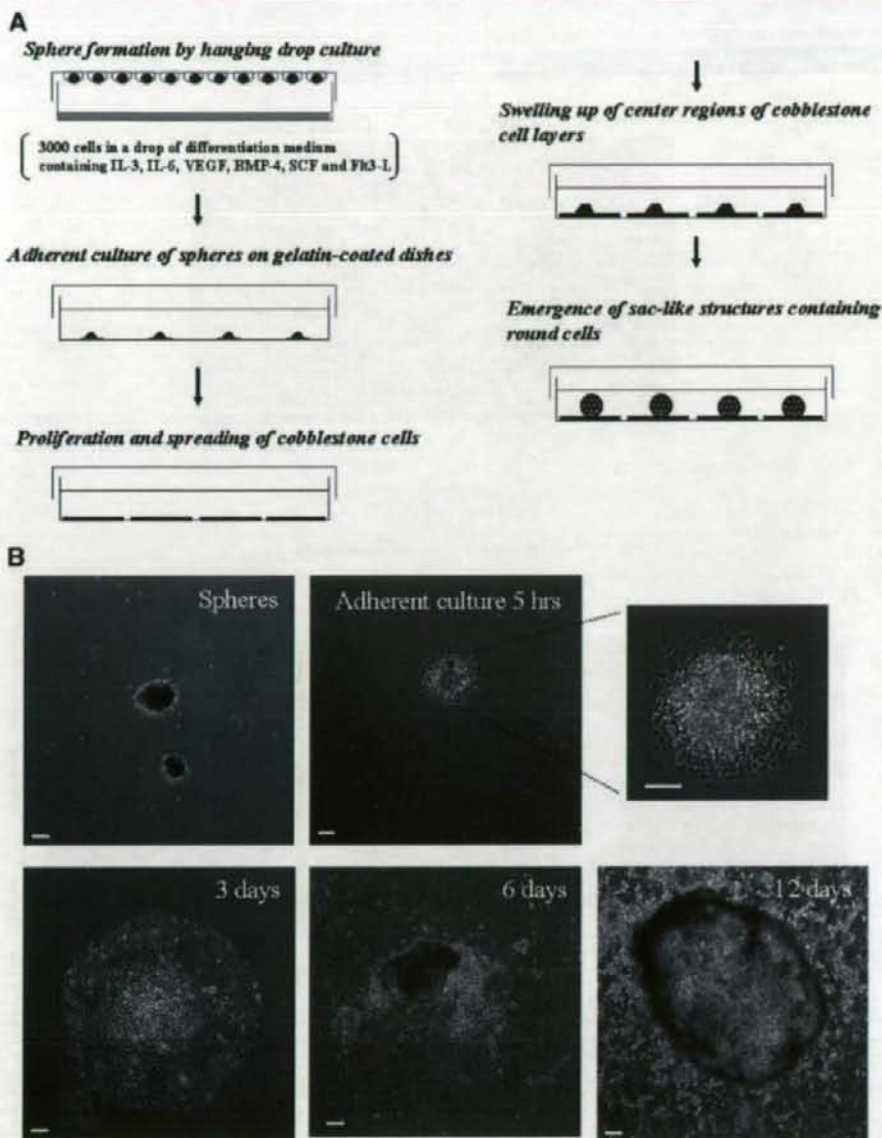


Fig. 1. Generation of a sac-like structure and cobblestone cells from feeder-free differentiation culture of cmES cells. The procedure for the production of a sac-like structure (A) and phase contrast microscopy (B). Spheres were generated by a hanging drop culture and subjected to subsequent adherent culture using gelatin-coated plates. Within a few days, spheres adhered on the plates became flattened and VE-cadherin-negative cobblestone cells spread out. At about 6 days, the center region began to swell up again. Around 12 days, the center regions ballooned out and sac-like structures were formed. Scale bars indicate 100 μm . C: The phase contrast microscopy of late phase cobblestone cells. Morphologies of proximal and distal cobblestone cells that surrounded a sac-like structure were shown. The scale bar indicates 100 μm . D: VE-cadherin expression in late phase cobblestone cells. Sac-like structure and surrounding cobblestone cells were stained with anti-VE-cadherin antibody. The scale bar indicates 50 μm . E: Morphological and cytochemical examinations of the round cells released from the sac-like structure. The Wright-Giemsa staining (WG) showed the presence of two types of the cells: the small cells with basophilic cytoplasm and high nucleus/cytoplasm ratio resembling myeloblasts and the large cells with abundant vacuolated cytoplasm resembling macrophages. The myeloperoxidase staining (MPO) showed that majority of the small cells were positive for myeloperoxidase. The esterase double staining (Esterase) showed the cells with blue granules (granulocyte lineage cells) and cells with brown granules (macrophage lineage cells). The scale bar indicates 100 μm . F: Hematopoietic colony assays. The round cells released from the sac-like structure were subjected to hematopoietic colony assays. The phase contrast microscopic observation (Phase) showed the presence of granulocyte/macrophage colonies. Wright-Giemsa staining (WG) of the cells from colonies showed the presence of myeloblasts (a black arrow), promyelocytes (a blue arrow) and polymorphonuclear granulocytes (a red arrow). The myeloperoxidase staining (MPO) showed the presence of a myeloperoxidase-rich smaller granulocyte population (a black arrow) and a myeloperoxidase-poor large macrophage population (a red arrow). Esterase double staining (Esterase) showed the presence of cells with blue granules (a black arrow) and cells with brown granules (a red arrow). The scale bar indicates 100 μm . G: RT-PCR. The presence of primitive hematopoietic cells was shown by the existence of messages for embryonic hemoglobins (globin- ϵ and globin- ζ) using primate-specific primers (pr-globin- ϵ , pr-globin- ζ , and pr- β -actin). "M" indicates 100 bp ladder marker. The subscript character of "p" of cmES-derived cells indicates the passage number. "H"; HJECV, "E"; undifferentiated cmES cells, "U"; hematopoietic UT-7 cells as positive control. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]