

200908014A

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）

安全なヒトiPS細胞を用いた
テラーメイド血液細胞の作成に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 湯尾 明

平成22（2010）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

安全なヒトiPS細胞を用いた
テラーメイド血液細胞の作成に関する研究
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 . 総括研究報告

安全なヒト i P S 細胞を用いた
テラーメイド血液細胞の作成に関する研究

湯尾 明

総括研究報告書

安全なヒト i P S 細胞を用いた テラーメイド血液細胞の作成に関する研究

研究代表者 湯尾 明 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部長

研究要旨 本研究では動物由来成分を少しでも排除するために、ヒト i P S 細胞から無フィーダー環境において血液細胞生成を試みた。我々の分化培養系は、前半の sphere 形成浮遊培養と、後半の平面接着培養の 2 段階から成り立っており、全体を通じて無フィーダーである。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、好中球とマクロファージを多く含んでいた。しかしながら、細胞株によってはマクロファージのみの造血で、今後の改善が必要と考えられた。その方策の 1 つとして、センダイウイルスベクターを駆使してのヒト i P S 細胞の樹立が開始され、有望な結果が出つつある。本年度は、さらに、予備的な検討として、上記の我々独自の分化誘導法のみではヒト i P S 細胞での研究の推進が困難と考えて、ヒト E S 細胞による異なる分化誘導法を 2 種類試みて有望な成果を得たので、次年度においてはヒト i P S 細胞に応用して研究を進める予定である。

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、E S 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 E S 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好中球や体外での増幅が困難な造血幹細胞に関してはその恩恵は大きい。また、赤血球などの他の血球も、日本赤十字社の事業負担が大きいことを考慮すれば、ヒト E S 細胞からの産生が展開されれば、その意義は大きい。以上のような観点から、我々はヒト E S 細胞を用いて、無

血清無フィーダー環境における未分化維持と血液細胞生成を試み、顕著な成果を上げてきた。特に、好中球の分化誘導系は、著名な国際学術誌に公表され世界的な反響を呼んだ (Saeki K et al., Stem Cells 27:59-67, 2009、国際特許：出願番号 PCT/JP2007/71811)。

一方、近年の細胞初期化技術の進歩により、体細胞を受精卵の状態に戻して、E S 細胞のような万能細胞を作成する手法が相次いで報告され、ヒト多能性幹細胞（ヒト i P S 細胞）の作成も内外で活発に行われる時代となった。しかしながら、ヒト E S 細胞と同様にヒト i P S 細胞も多能性を有するとはいいながら、あるいは、多能性を有するが上に、特定方向への制御された効率の高い分化誘導は困難である。また、ヒト i P S 細胞は、ヒト E S 細胞のような生命倫理問題は伴わないが、ウイルスベクターによって体細胞を強引に初期化することの危険性がつきまとうことは否定できない。

本研究においては、我々がヒト E S 細胞において開発した独自の血液細胞分化誘導技術をさらに洗練させてヒト i P S 細胞に適応して血液細胞産生を達成することが主な目標である。その際、医療への応用が主目的であるので、当然のことながら、マウスフィーダー細胞や牛胎児

血清などの動物由来成分を出来るだけ排除することが研究目標である。また、現在のヒト iPS 細胞はレトロウイルスベクターによって樹立されたためにベクター由来遺伝子がゲノムに組み込まれている物が殆どであり、このような危険性排除することも重要な研究目標である。以上のような研究目的に従って初年度の研究を行ったので、その成果を報告する。

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。ヒトES細胞 (KhES-3) は京都大学再生医科学研究所から供与を受けた。ヒト iPS 細胞は、京都大学 iPS 細胞研究所 (201B7、253G1) および独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 (#25) より供与を受けた。ヒトES細胞 (KhES-3)、ヒト iPS 細胞 (201B7、253G1、#25) 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。

2. 分化誘導プロトコール

サイトカイン、増殖因子は、分化誘導系によって、文献などを参考に一部異なる組み合わせを用いた。

① 当研究室独自の手法による場合は、未分化ヒトES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数日間スフェア形成させた。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、すなわち、20 ng/ml IGF-II (insulin-like growth factor II)、20 ng/ml VEGF (vascular endothelial growth factor)、100 ng/ml SCF (stem cell factor)、100 ng/ml FL (Flt-3 ligand)、50 ng/ml TPO (thrombopoietin)、100 ng/ml G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) を添加した。

② Bhatia らの手法による場合は、回収した未分化ヒトES細胞、ヒト iPS 細胞を poly(2-hydroxyethyl methacrylate) コート低接着

6cm ディッシュにて数日間数日間スフェア形成させた。分化培養液には、20%牛胎児血清の他に、7 種類のサイトカイン・増殖因子、すなわち、20 ng/ml VEGF (vascular endothelial growth factor)、50 ng/ml BMP-4 (bone morphogenic protein 4)、300 ng/ml SCF (stem cell factor)、300 ng/ml FL (Flt-3 ligand)、10 ng/ml IL-3 (interleukin 3)、10 ng/ml IL-6 (interleukin 6)、3 U/ml EPO (erythropoietin) を添加した。

③ Elefanty らの手法による場合は、回収した未分化ヒトES細胞、ヒト iPS 細胞を無血清培地に浮遊して低接着 96 穴プレートにおいて比重遠心してスフェアを形成させた。分化培養液には以下の 9 種類のサイトカイン・増殖因子、すなわち、5 ng/ml IGF-II (insulin-like growth factor II)、5 ng/ml VEGF (vascular endothelial growth factor)、10 ng/ml BMP-4 (bone morphogenic protein 4)、20 ng/ml SCF (stem cell factor)、5 ng/ml FL (Flt-3 ligand)、5 ng/ml IL-3 (interleukin 3)、5 ng/ml IL-6 (interleukin 6)、5 ng/ml TPO (thrombopoietin)、5 U/ml EPO (erythropoietin) を添加した。

④ 上記の①②③いずれの場合も、分化誘導培養の後半において、スフェアを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・増殖因子はスフェア形成期間と同様である。

3. コロニーアッセイ

造血コロニーアッセイは、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 cDNA を作成して行った。各種のグロビン遺伝子 (α 、 β 、 γ グロビン)、過食脂肪細胞マーカー PRDM16、インターフェロンの同定を行った。

5. 免疫染色

グロビン蛋白 (α グロビン、 β グロビン) の免疫染色は、細胞をアセトン・メタノール固定した後に、1 次抗体と反応させ、アレクサ標識 2 次抗体と反応させて、蛍光顕微鏡により観察した。

6. 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、エステラーゼ染色、を行い、正立顕微鏡により観察した。

7. 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、CD16b、CD66 である。

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. センダイウイルスベクターによるヒト i P S 細胞の樹立

初期化 4 因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-myc) を組み込んだセンダイウイルスベクターは、ディナベック株式会社より供与された。初期化に供するヒト細胞は、新生児皮膚由来の線維芽細胞 (BJ、ATCC) を用いた。初期化の手法は、既報の手法 (Proc Jpn Acad Ser B 85:348-362, 2009) を元にディナベック社の推薦する手法 (特許などに関連する為に詳細は省略) によった。

(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 E S 細胞研究を開始するための生命倫理に対する取り組み

平成 17 年 11 月 9 日に、ヒト E S 細胞の使用計画の文部科学大臣の確認を初めて受けた (17 諸文科振第 734 号)。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を得た (18 諸文科振第 743 号)。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を受けた (19 国文科振第 26 号)。さらにその後、

研究者の追加・削除について平成 20 年 3 月 1 日、10 月 27 日に文部科学省に届け出た。さらにその後、使用の期間の変更、ヒト E S 細胞株の変更について平成 21 年 7 月 13 日に文部科学大臣の確認を得た (21 諸文科振第 6491 号)。

C. 研究結果

1. ヒト i P S 細胞からの血球分化への応用を確実にするためのヒト E S 細胞からの血液細胞の分化誘導に関わる更なる検討

我々は、ヒト E S 細胞から独自の手法を用いて好中球の効率的な分化誘導を行うことに成功した (Saeki K et al., Stem Cells 27:59-67, 2009、国際特許：出願番号 PCT/JP2007/71811)。一方、サル E S 細胞から、Bhatia らの手法の変法により高効率の造血前駆細胞を得ることに成功したが、いまだにヒト E S 細胞では成功していない。さらに、Elefanty らは造血前駆細胞や赤芽球を高効率に誘導する手法を報告しており、しかも、この手法は無血清培養である (我々独自の手法や Bhatia の手法は牛胎児血清を使用している)。以上より、本年度研究においては、ヒト i P S 細胞での研究の確実な推進のために、ヒト E S 細胞での分化誘導実験を従来とは異なる手法も含めて検討した。また、我々独自の手法は無フィーダー培養であるが、動物由来成分排除をさらに推し進めるために、無血清培養を本年度の課題とした。

本年度検討した手法は、①独自の手法による再現性の十分な確認、②サル E S 細胞において一時期成功した Bhatia らの手法の変法による造血前駆細胞の誘導、③好中球のみではなく赤芽球や前駆細胞にも有効な新たな手法の導入 (Elefanty らの手法)、の 3 つの手法である。

①我々独自の手法 (Stem Cells 27:59-67,2009) による検討

ヒト i P S 細胞へ安定的に応用するために、我々独自の既報の手法によるヒト E S 細胞からの血球分化を、KhES-3 株を使用して検討した。サイトカインカクテル (6 種類のサイトカイン・増殖因子 (IGF-II, VEGF, SCF, Flt3-L, TPO, G-CSF)) を含む分化培地を用いて低吸着培養皿上で 3 日間浮遊培養を行い、形成された大小不同の sphere をまとめてゼラチンコート皿で培養した。接着後に sphere は平板化し、活発な細胞増殖に伴って円盤状の細胞層が形成された。しばらくすると円盤状細胞層中心付近

(sphere の接着部位付近) が重層化し、1 2 日前後で球状細胞を包含する囊状の構造物 (囊状構造物 (a sac-like structure; SLS)) が形成された。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、好中球に分化したが、マクロファージ分化多数を占める時もあり、必ずしもなんて胃的に好中球のみを産生できるとは限らず、また、未分化造血細胞の観察期間が長いとは言えなかった。すなわち、この手法のみに頼ることの危険性が想定された。

② Bhatia らの手法の変法による検討

上記の場合と同様に、ヒト E S 細胞からの血球分化を KhES-3 株を使用して検討した。高濃度の SCF、Flt3-L を含む培養条件において Bhatia らの手法 (約 2 週間) より短期間 (5 日程度) の sphere 形成を行い、その後、平面接着培養を行った。その結果、囊状構造物は形成されずに球状浮遊細胞が持続的に産生され、手法の有効性が示唆された。囊状構造とは異なり、蜘蛛の巣状の構造物が形成され、造血が進行した。再生された球状細胞のライトギムザ染色像では、未分化血球が主体を占める時期が認められ、コロニーアッセイでは、顆粒球、単球マクロファージ、赤芽球コロニーが全て認められ、造血前駆細胞の存在が示唆された。また、グロビン遺伝子発現解析においては、 α グロビン、 γ グロビンの他に β グロビン遺伝子発現も認められ、我々の既報より成体造血に近いことが示された。

③ Elefanty らの手法の変法による検討

上記の場合と同様に、ヒト E S 細胞からの血球分化を KhES-3 株を使用して検討した。回収した未分化ヒト E S 細胞を血清培地に浮遊して低接着 96 穴プレートにおいて比重遠心してスフェアを形成させた。約 10 日間の sphere 形成の後に、6 穴ゼラチンコート皿条において接着培養を開始した。sphere は比較的固まったまま分化して、肉眼でも赤いことが確認できるような赤芽球分化が認められた。 α グロビン、 β グロビンの免疫染色が陽性で、成体型造血が蛋白レベルで確認された。

我々のヒト E S 細胞からの血球分化誘導においては、上記の①②③いずれの系においても球状の血球増殖分化を支える接着細胞 (ヒト E S 細胞由来の支持細胞・ストローマ細胞の可能性有り) が必ず観察されるが、Elefanty らの手法の変法においては、その様な接着細胞における新たな発見があった。すなわち、注意深い観察により、ストローマ細胞の中に脂肪的を含有する脂肪細胞が存在し、褐色脂肪細胞マーカーである PRDM16 遺伝子発現が陽性であった。

2. 京都大学より供給されたヒト iPS 細胞を用いた血液細胞分化誘導

京都大学山中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。用いた手法は、我々独自の手法 (Stem Cells 27:59-67,2009) である。また、201B7 株は、初期化 4 因子導入株で、253G1 株は、c-Myc 以外の初期化 3 因子を導入して樹立された株である。ただし、ヒト E S 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。

201B7 では、マクロファージのみが誘導されたのに対して、253G1 株においては、マクロファージのみならず、一過性ではある未分化造血前駆細胞も観察された。また、253G1 株においては、マクロファージの血球貪食像が観察された。一方、コロニーアッセイにおいては、253G1 株においては、ヒト E S 細胞

(KhES-3) と同様に顆粒球コロニーを形成したが、201B7 株においてはコロニーに形成は全く認められなかった。以上より、201B7 株においては、血球分化そのものが低下しており、253G1 株においては、一端は産生された血球がマクロファージによって貪食されている可能性が示唆された。

3. 国立成育医療センターより供給されたヒト iPS 細胞を用いた血液細胞分化誘導

国立成育医療センター研究所梅澤部長の樹立したヒト iPS 細胞を用いて、我々独自の手法 (Stem Cells 27:59-67,2009) により、造血細胞分化を行なったが、試した 1 株 (#25、初期化 4 因子導入株) で SLS の形成が確認された。SLS 切開による血球回収後は、速やかに切り口がふさがり血球産生が再開される。回収され

た細胞は、ライトギムザ染色では成熟好中球も含まれ、エステラーゼ2重染色においても顆粒球系細胞の存在が明確に確認された。さらに、コロニーアッセイにおいても顆粒球系細胞の存在が確認された。このような顆粒球系細胞は、CD45陽性の血球で貪食能を有していたが、CD34、CD16、CD66bの陽性率は高くなく、さらなる分化系の改善が必要と考えられた。

4. ゲノムにウイルスベクターが取り込まれない安全なヒトiPS細胞の作成の試み

初期化4因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-myc) を組み込んだセンダイウイルスベクターを用いて、ヒト線維芽細胞 (BJ) のiPSを試みた。培養細胞にベクター添加後、一定の期間の後には、用いたヒト線維芽細胞とは全く異なる細胞形態を有する (ヒトES細胞と極めて類似した細胞形態を有する) 細胞のコロニーが数多く観察され、そのうちのいくつかは増殖を開始している。次年度に向けての新たなヒトiPS細胞作成の段階に入ることができた。

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iPS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。なお、このような感染防御における意義は、培養法の開発のみでは実証できず、日和見感染症モデルマウスなどのin vivoの系での実証 (ヒトiPS由来血球投与マウスの優位の生存延長など) が重要であると考えられるが、次年度は、東京医大微生物学教室とも共同研究で、このような有効性を明らかにする計画である。

血液学分野 (もしくは輸血医療分野、造血細胞移植分野) における課題は、造血幹細胞が増殖しがたく、多くの造血幹細胞を得ることが困難であるということである。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等の系で示されているが、ヒトES/iPS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。

ヒトiPS細胞は、ドナーと同じHLAを有しておりドナーに移植しても拒絶されないという大きな利点を有しており、再生医療、移植医療の切り札として大きく期待されている。しかしながら、一方においては、ヒトES細胞と同様に未分化細胞が残存したら、移植材料としては危険であり、分化の制御という共通のハードルを有している。さらに、ウイルスベクターを駆使した体細胞の強制的初期化ということで、ヒトES細胞のような本来的に受精卵と近い細胞とは異なる危険性もはらんでおり、今後の課題が大きい。レトロウイルスベクターを用いることによる染色体ゲノムへのウイルス断片の組み込み危険性は、本計画での研究手法であるセンダイウイルスベクターの使用によって克服されるであろう。その後は、強制初期化細胞そのものの限界、元になる体細胞の種類や何らかの工夫による改善、分化誘導方法の改善による安全性の向上、など、取り組むべき重要な課題は多く残っており、我々も引き続き挑戦したい。

E. 結論

本研究では、異種動物成分の混入を回避する培養法の開発のために、ヒトiPS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接着培養で、我々がヒトES細胞の系において開発した手法である (国際特許PCT/JP2007/71811)。敷石状の細胞の増殖、中心部での嚢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、好中球とマクロファージを多く含んでいた。しかしながら、細胞株によってはマクロファージのみの造血で、今後の改善が必要と考えられた。その方策の1つとして、センダイウイルスベクターを駆使してのヒトiPS細胞の樹立が開始され、有望な結果が出つつある。本年度は、さらに、予備的な検討として、上記の我々独自の分化誘導法のみではヒトiPS細胞での研究の推進が困難と考えて、ヒトES細胞による異なる分化誘導法を2種類試みて有望な成果を得たの

で、次年度においてはヒト i P S 細胞に応用して研究を進める予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakahara M, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, Yuo A, Saeki K: High efficiency production of subculturable vascular endothelial cells from feeder-free human embryonic stem cells without cell-sorting technique. Cloning Stem Cells 11:509-522, 2009.
2. 佐伯久美子、湯尾 明：ヒト E S 細胞からの造血細胞への分化－好中球産生を中心として－。医学のあゆみ 229:704-710, 2009.

2. 学会発表

1. Saeki K, Yogiashi Y, Nakamura N, Matsuyama S, Sato C, Gokoh M, Takahashi K, Yamanaka S, Yuo A: A feeder-free hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells: towards a provision of rejection-free neutrophils for granulocyte transfusion therapy. 7th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, July 2009, Barcelona, Spain.
2. 佐伯久美子、中村直子、安田和基、湯尾 明：ヒト血管内皮細胞の高ブドウ糖負荷時の ROS 産生源（ミトコンドリア電子伝達系 vs NADPH oxidase）の多様性に関する解析。第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、横浜。
3. 佐藤千香子、五香麻衣子、過足芳子、松山さと子、安田和基、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾 明：ヒト胚性幹細胞由来血管内皮細胞および末梢血単球由来血管内皮細胞による血管平滑筋細胞の増殖抑制。第 9 回日本再生医療学会総会、2010 年 3 月、広島。
4. 五香麻衣子、佐藤千香子、過足芳子、松山さと子、高橋和利、山中伸弥、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾 明：ヒト E S / i P S 細胞由来血管内皮細胞における継代培養に伴う老化誘発の機序解析。第 9 回日本再生医療学会総会、2010 年 3 月、

広島。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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
Nakahara M, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, <u>Yuo A</u> , Saeki K	igh efficiency production of subculturable vascular endothelial cells from feeder-free human embryonic stem cells without cell-sorting technique.	Cloning Stem Cells	11	509-522	2009

Ⅲ. 研究成果の刊行物・ 別刷

High-Efficiency Production of Subculturable Vascular Endothelial Cells from Feeder-Free Human Embryonic Stem Cells Without Cell-Sorting Technique

Masako Nakahara,¹ Naoko Nakamura,¹ Satoko Matsuyama,¹ Yoshiko Yogiashi,¹
Kazuki Yasuda,² Yasushi Kondo,³ Akira Yuo,¹ and Kumiko Saeki¹

Abstract

We previously reported a feeder-free culture method for pure production of subculturable vascular endothelial cells (VECs) from cynomolgus monkey embryonic stem cells (cmESCs) without as using cell-sorting technique. By this method, canonical vascular endothelial (VE)-cadherin/platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1)-positive VECs (c-VECs) and atypical VE-cadherin/PECAM1-negative VECs (a-VECs) were generated without a contamination by pericytes, lymphatic endothelial cells, or immature ES cells. More recently, we established a unique culture technique to maintain human ESCs (hESCs) under a feeder-free and recombinant cytokine-free condition. Combining these two systems, we have successfully generated pure VECs from two lines of hESCs, khES-1 and khES-3, under a completely feeder-free condition. Our method is very simple: spheres generated from hESCs by floating culture using differentiation media supplemented with vascular endothelial growth factor, bone morphogenetic protein 4, stem cell factor, FMS-related tyrosine kinase-3 ligand, and interleukin 3 (IL3) and IL6 were cultured on gelatin-coated plates. Cell passage was performed by an ordinary enzymatic treatment. The hESC-derived differentiated cells demonstrated cord-forming activities and acetylated low-density lipoprotein-uptaking capacities. Moreover, they exclusively expressed von Willebrand factor and endothelial nitric oxide synthase. Flow cytometric analyses indicate that khES-3 generated both c-VECs and a-VECs as in the case of cmESCs. By contrast, khES-1 produced only a-VECs, which nonetheless demonstrated effective recruitment into neovascularity *in vivo*. Interestingly, a-VECs turned to express PECAM1 after transplantation into immunodeficient mice. The hESC-derived VECs were subculturable at least up to 10 passages without functional depression. Our method does not require a presorting processes to enrich progenitor fractions such as CD34-positive or kinase insert domain receptor (KDR)-positive cells, providing the most efficient and easiest technique for VEC production from hESCs.

Introduction

HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS (hESCs) are becoming increasingly important tools for regenerative medicine because the problem of immunological hurdle has begun to move toward resolution via establishments of cloned primate ES cells (Byrne et al., 2007) and cloned human blastocysts (French et al., 2008), as well as a technical innovation to generate homozygous hES cells (Revazova et al., 2008). At the same time, the order-made regenerative medicine has got grip

of reality by an establishment of human induced pluripotent stem (iPS) cells (Meissner et al., 2007; Nakagawa et al., 2008; Okita et al., 2008; Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007), especially after the success of generating murine iPS cells by plasmid-based transient transfection system (Okita et al., 2008). By those remarkable progresses, it has become ever more important to improve differentiation protocols for realization of ES-based and/or iPS-based regenerative medicine: differentiation techniques should have highest efficiency, which is ideally a hundred percents, and the largest

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

²Department of Metabolic Disorder, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan.

³Advanced Medical Research Laboratories, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Osaka, Japan.

feasibility, which needs only basic culture tools, besides being free from xenogenic materials.

Currently, the methods for vascular endothelial cell (VEC) differentiation of primate ESCs suffer from low differentiation efficiencies (<10%) (Levenberg et al., 2002; Sone et al., 2003, 2007; Wang et al., 2007) and/or difficulties in *in vitro* expansion (Sone et al., 2007; Sone et al., 2003; et al., 2007; Wang et al., 2007). Moreover, they exclusively require cell-sorting processes to enrich the progenitor populations such as platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1) (Levenberg et al., 2002), kinase insert domain receptor (KDR)-positive (Sone et al., 2003, 2007), or CD34-positive (Wang et al., 2007) cells. However, the requirement of cell-sorting processes is disadvantageous in view of technical feasibility. There was one study reporting pure production of subculturable VECs from rhesus monkey ESCs without using a cell-sorting technique (Kaufman et al., 2004). However, these VECs completely lacked the expressions of vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) and PECAM1, the major markers of VECs, although they demonstrated the mature functions *in vitro* and *in vivo*. Whether their results can be reproduced in the differentiation of hESCs and whether this uncommon type of VECs, which lacked the message expressions of VE-cadherin and PECAM1 (Kaufman et al., 2004), can justly be recognized as VECs remains undetermined. In addition, all the protocols utilize murine feeder cells for the maintenance culture of hESCs (Levenberg et al., 2002; Sone et al., 2003, 2007; Wang et al., 2007), which is quite unfavorable in view of quality control aiming for clinical application.

Recently, we established a feeder-free culture method for pure production of VECs from cynomolgus monkey ESCs (cmESCs) without progenitor-enriching processes (Saeki et al., 2008). By this method, we could generate VE-cadherin/PECAM1-positive VECs at the efficiency of around 30%. Interestingly, the residual VE-cadherin/PECAM1-negative populations clearly demonstrated the mature functions of VECs: they showed cord-forming activities and acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL)-uptaking capacities in addition to von Willebrand factor (vWF) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expressions. Moreover, they were negative for monocytic markers including CD14, CD68, and CD45, indicating that the VE-cadherin/PECAM1-negative cells are distinct populations from monocytic VEC progenitors. Although they did not express CD34 or KDR/vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF-R2), the expression levels of Tie-2 and VEGF-R1 were similar to those of VE-cadherin/PECAM1-positive VECs. Finally, no contamination by pericytes or immature hESCs was observed (Saeki et al., 2008). Based on those findings, we named the VE-cadherin/PECAM1-negative populations generated from cmESCs by our method as "atypical VECs," which are VE-cadherin⁻/PECAM1⁻/CD14⁻/Tie-2⁺/vWF⁺/eNOS⁺/cord-formation⁺/Ac-LDL-uptaking⁺. As we already showed in our report, the key of our success lies in the usage of multiple hematopoietic cytokines in addition to the VEC growth factors (Saeki et al., 2008). Interestingly, no other protocols ever showed the benefit of the usage of hematopoietic cytokines, although hematopoiesis and angiogenesis are intimately associated.

Because our method is superior to other methods in a comprehensive view of efficiency, quality, and feasibility, we

planned to examine its applicability to hESCs. In the case of cmESCs, however, the maintenance culture was performed using mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Saeki et al., 2008), which is unfavorable in view of clinical application. Recently, we established a feeder-free and recombinant cytokine-free culture method for the maintenance of hESCs (Nakahara et al., 2009). By combining these two methods, we have succeeded in generating pure VECs, which consists of canonical VECs and atypical VECs, from hESCs under a completely xenogenic cell-free condition without using cell-sorting techniques. Our system provides the nearer way to the clinical application of hES-based or human iPS-based regenerative medicine for vascular disorders than any other methods. In addition, it offers an excellent tool for basic researches on human vascular endothelial biology via an elimination of murine cells throughout the culture process.

Materials and Methods

Cells and reagents

The two lines of hESC (Suemori et al., 2006), khES-1 and khES-3, were cultured by our novel feeder-free and recombinant cytokine-free method (Nakahara et al., 2009). Briefly, cells were subcultured Matrigel™ Basement Membrane Matrix, phenol-Red free (Cat 356237, BD Biosciences, San Jose, CA)-coated culture dishes using DMEM/F12 medium (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) supplemented with 20% Knockout Serum Replacement (KSR™) (Invitrogen Corp.), 1% nonessential amino acids solution (Invitrogen Corp.), 1 mM Sodium Pyruvate Solution (Invitrogen Corp.), 2 mM L-glutamine (Invitrogen Corp.), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 10 U/mL of penicillin (Invitrogen Corp.), and 10 mg/mL of streptomycin (Invitrogen Corp.) without using recombinant cytokines. hESCs were maintained as a crop of colonies of similar sizes with diameters between 200 and 1,000 μm at the densities less than eight colonies per 1 cm². The ES cells were passed every 4 days. For detachment from the culture dish, cells were treated with a minimum volume of dissociation liquid including 0.25% trypsin (Invitrogen Corp.), 1 mg/mL collagenase IV (WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), 20% KSR™, 1 mM CaCl₂ at 37°C for 5 to 15 min. Cells were gently collected without performing pipetting to avoid cell damage. They were seeded at split ratios of 1:2~1:4 on newly Matrigel™ Matrix-coated dishes, avoiding fusion between colonies. Culture medium was changed every day. Pooled normal human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), normal human aortic endothelial cells (HAEC), normal human mesenchymal stem cells (hMSC), normal human aortic smooth muscle cells (AOSMC), and normal human dermal lymphatic microvascular endothelial cells (HMVEC-dLy) were purchased from Lonza Group Ltd., (Basel, Switzerland). The pooled normal human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC) and normal human glomerular vascular endothelial cells (HGVEC) were purchased from Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd. (Osaka, Japan). All the cells were maintained using media recommended by the manufacturers. Murine stromal OP9 cells were maintained with α-MEM medium (Invitrogen Corp.) supplemented with 20% heat-inactivated FBS (PAA Laboratories GmbH), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co.), 1 mM L-glutamine

(Invitrogen Corp.), 10 U/mL of penicillin (Invitrogen Corp.), and 10 μ g/mL of streptomycin (Invitrogen Corp.).

Differentiation procedures

hESCs were detached from culture plates by using the dissociation liquid for 15 min at 37°C. The mildly dissociated ESC clumps were subjected to floating cultures in Hydro cell[®] (CellSeed Inc., Tokyo, Japan) to form spheres using the differentiation medium consisting of Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Sigma Chemical Co.) supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), 0.1 mM β -mercaptoethanol, 3 mM L-glutamine, 10 U/mL penicillin, 20 ng/mL vascular endothelial growth factor (VEGFA), 20 ng/mL bone morphogenetic protein 4 (BMP4), 20 ng/mL stem cell factor (SCF), 10 ng/mL FMS-related tyrosine kinase-3 ligand (Flt3-L), 20 ng/mL Interleukin 3 (IL3), and 10 ng/mL IL6. After incubation for 3 days at 37°C under a 100% humidified condition in a 5% CO₂ gas incubator, spheres were subjected to adherent culture using 100 \times 20 mm 0.1% porcine type A gelatin (Sigma Chemical Co.)-coated dishes in the differentiation medium described above. Media were changed twice a week. For passage, cells were harvested by treatment with 0.25% trypsin and 1 mM EDTA and replated at split ratios of 1:2 on new gelatin-coated dishes. In some experiments, spheres were cultured on 40 Gy-irradiated OP9 feeder layers for control.

Morphological examinations

Viable cells were directly observed under an inverted phase contrast light microscope (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Cord formation assays

Matrigel[™] Basement Membrane Matrix, phenol-Red free (Cat 356237, 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 \times 10⁴ cells per well were seeded in differentiation medium described above. Cell morphologies were observed after overnight culture under an inverted light microscope (Olympus Optical Co. Ltd).

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

Cells were transferred in four-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, DiI complex (DiI Ac-LDL) (Invitrogen Corp.) for 4 h. After washing the cells by HBSS for three times, nuclei were counterstained using 10 nM of Hoechst 33342 (Sigma Chemical Co.). After washing the cells, samples were observed under the fluorescence microscope (Olympus Optical Co. Ltd).

Flow cytometry

Cells were collected by 0.2% EDTA treatment and, after a wash in phosphate-buffered saline (PBS), 1 \times 10⁶ cells were reacted with first antibodies on ice for 30 min. The expression

level of each protein was analyzed using a FACSCalibur[™] (BD Biosciences). The antibodies used were a mouse monoclonal antihuman VE-cadherin (clone TEA1/31)-phycoerythrin (PE) antibody (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), a mouse monoclonal antihuman Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM1)-FITC antibody (clone WM59) (BD Biosciences), antihuman Tie-2- allophycocyanin (APC) antibody (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), antihuman VEGF receptor 1 (VEGF R2)-PE antibody (R&D Systems Inc.), antihuman VEGF receptor 2 (VEGF R2)-PE antibody (R&D Systems Inc.), VEGF receptor 3 (VEGF R3)-PE antibody (R&D Systems Inc.), antihuman CD34-PE (clone 356) antibody (BD Biosciences), antihuman CD14-PE (clone M5E2) antibody (BD Biosciences), antihuman CD45-PE antibody (clone TÛ116) (BD Biosciences), or an antihuman SSEA-4-phycoerythrin monoclonal antibody (clone MC813-70, R&D Systems Inc.). After antibody-staining procedures, cells were stained with TO-PRO3 fluorescent dye (Invitrogen Corp.) for 10 minutes. During analysis, dead cells were gated out as the FL4-higher fraction. For analysis on Oct-4 expression, cells were fixed and permeabilized by FIX & PERM[®] reagents (Invitrogen Corp.) according to manufacturer's guidance and stained by an antihuman Oct-3/4-phycoerythrin monoclonal antibody (clone #240408, R&D Systems Inc.).

Immunostaining

The cells were fixed on slide glasses by using a cytospin apparatus (Cytospin 2) along with further fixation with acetone/methanol solution (1:3). The immunostaining procedure was performed as described elsewhere (Saeki et al., 2009) with first antibody reactions using a mouse monoclonal antihuman Oct-3/4 antibody (C-10, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), a rabbit polyclonal antihuman Nanog antibody (ReproCELL Inc., Tokyo, Japan), a rabbit antihuman N-cadherin antibody (H-63) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), a mouse monoclonal antihuman vascular smooth muscle actin (SMA) (clone 1A4) (Sigma Chemical Co.), a mouse monoclonal antihuman platelet-derived growth factor (PDGF) Receptor β (clone 28) (BD Biosciences), a rabbit polyclonal antihuman eNOS antibody (H-159) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), or a goat polyclonal antihuman vWF antibody (C-20) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), followed by second antibody reactions using Alexa Fluor[®] 488 chicken antimouse IgG (H+L), Alexa Fluor[®] 568 goat antirabbit IgG (H+L) or Alexa Fluor[®] 594 chicken antigoat IgG (H+L) (Invitrogen Corp.). Nuclear counterstaining was performed using 300 nM of 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI).

Western blotting

Western blotting was performed as previously described (Saeki et al., 2009) using a mouse monoclonal antihuman calponin 1 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.), a mouse monoclonal antihuman Oct-4 (C-10) antibody, a rabbit polyclonal antihuman β -tubulin (H-235) antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.), a rabbit antihuman lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE-1) antibody (AngioBio Co., Del Mar, CA), a rabbit antihuman prospero-related homeobox 1 (Prox-1) antibody (AngioBio Co.), or a rabbit antihuman Nanog antibody (ReproCELL Inc.). The second antibody reaction was performed using a horseradish

peroxidase-conjugated antirabbit or antimouse 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).

Matrigel plug assays

The assays were performed as reported by others (Kaufman et al., 2004). Briefly, 3×10^6 of hES-derived differentiated cells were suspended in 10 μ L of differentiation medium supplemented with 150 ng/mL of fibroblast growth factor (FGF)-2, mixed with 500 μ L of Matrigel™ Basement Membrane Matrix, phenol-Red free (Cat 356237, BD Biosciences) and transplanted subcutaneously into severe combined immunodeficiency (SCID) mice. For control, 10 μ L of differentiation medium supplemented with 150 ng/mL of fibroblast growth factor (FGF)-2 was mixed with 500 μ L of Matrigel™ Matrix (BD Biosciences) and transplanted in the same way. After 3 weeks, 0.2 mL of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (500,000 average molecular size; Sigma Chemical Co.) solution (100 mg was suspended in 5 mL of PBS) was injected to mice from tail veins. After a few minutes, mice were sacrificed and the blocks were fixed by 10% formaldehyde and paraffin embedded. The 4- μ m sliced specimen were directly observed under fluorescent microscopy to determine the presence of FITC-dextran-packed lumens in the pugs. They were then subjected to immunostaining studies using a rabbit polyclonal antihuman PECAM1 antibody (H-300) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), which does not recognize murine vascular endothelial cells as we showed in Figure 4C, or mouse monoclonal anti-HLA-A, B, C antibody (BD Biosciences).

Adipocyte differentiation

Confluent cultures of hMSCs and hES-derived cells in six-well plates were subjected to adipocyte differentiation as follows. First, cells were cultured with hMSC Differentiation BulletKit-Adipogenic (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD) for 3 days. Then, medium was changed to MSCGM BulletKit (Lonza Walkersville, Inc.). After overnight culture, medium was replaced by hMSC Differentiation BulletKit-Adipogenic. Then, the cells were cultured for 3 days, when medium was changed to MSCGM BulletKit. After another overnight culture, cells were fixed and subjected to oil red O staining at day 8 of the differentiation culture.

Oil red O staining

Cells were washed with PBS twice and fixed by 10% formalin solution for 10 min at room temperature. After washing with PBS twice, cells were incubated in 60% isopropanol solution for 1 min. Then, cells were stained by Oil Red O Stain Original Solution (Muto Pure Chemicals Co. Ltd, Tokyo, Japan) for 20 min at room temperature. After rinsing with 60% isopropanol solution and with PBS, cells were directly observed under phase contrast microscopy.

Karyotype analyses

The metaphase hESCs were collected after 16-h incubation of hESCs with 0.06 μ g/mL of colcemid. ES cells were treated by hypotonic buffer and fixed by methanol/acetic acid (3:1). Chromosomal analyses with Giemsa band (G-band) staining

were performed by SRL, Inc. (Tokyo Japan) by a standard method.

Results

Pure production of canonical VECs and atypical VECs from hESCs

We recently established a feeder-free culture method for pure production of subculturable VECs from cynomolgus monkey embryonic stem cells (cmESCs) that were maintained on murine feeder layers. To further advance this technique toward clinical application, we tried VEC differentiation of hESCs that were maintained by our novel feeder-free, recombinant cytokine-free culture method (Nakahara et al., 2009).

By adding a minor modification to the original protocol, we successfully induced VEC differentiation of two lines of hESCs, khES-1 and khES-3. First, we generated spheres from hESCs by a simple floating culture using the differentiation medium supplemented with hematopoietic cytokines (Fig. 1A). Then, hESC-derived spheres were cultured on gelatin-coated plates. As in the case of cmESCs (Saeki et al., 2008), cobblestone-shaped cells spread from the detached spheres (data not shown) and we transferred them massively onto new gelatin-coated plates after enzymatic treatments. Cells were actively proliferated and reached confluence (Fig. 1B). Compared to the case of cmESC (Saeki et al., 2008), hESC-derived cells were rather morphologically heterogeneous. However, this is also the case with the primary culture of human vascular endothelial cells: some areas of HUVEC showed compact cobblestone appearance consisting of smaller cells, whereas other areas showed rather loose images consisting of larger cells (Fig. 1B, right). Although there is a quantitative difference: khES-1-derived cells mainly consisted of larger loose-contacted cells; khES-3-derived cells consisted of smaller compact cells and larger loose-contacted cells; HUVEC consisted of mainly smaller compact cells, it can be said that there was no morphologically crucial differences among the three types of cells.

To evaluate the performance of VEC differentiation, we examined the cell surface expressions of VE-cadherin and PECAM1 by flow cytometry. As in the case of cmESCs, about 20% of the khES-3-derived cells was VE-cadherin/PECAM1-positive, whereas all the khES-1-derived cells were VE-cadherin/PECAM1-negative (Fig. 1C). Concerning khES-3 line, percentages of VE-cadherin/PECAM1-positive populations did not decrease but rather increased during the course of subculture by unknown reasons (Fig. 1C, right). On the other hand, khES-1 cells scarcely produce VE-cadherin/PECAM1-positive populations even in the presence of OP9 feeder layers (Fig. 1D).

We next examined the possibility that the khES-1-derived cells as well as the khES-3-derived VE-cadherin/PECAM1-negative-populations were a-VECs. As shown in Figure 2A and B, both of the khES-1-derived cells and khES-3-derived cells showed cord-forming activities and uniform Ac-LDL-uptaking capacities. They exclusively expressed vWF and eNOS (Fig. 2B). We found no significant differences in N-cadherin protein expressions between the khES-1-derived and khES-3-derived cells. Despite the absence of VE-cadherin protein expression in khES-1-derived cells as demonstrated by flow cytometry (Fig. 1C), VE-cadherin message expres-

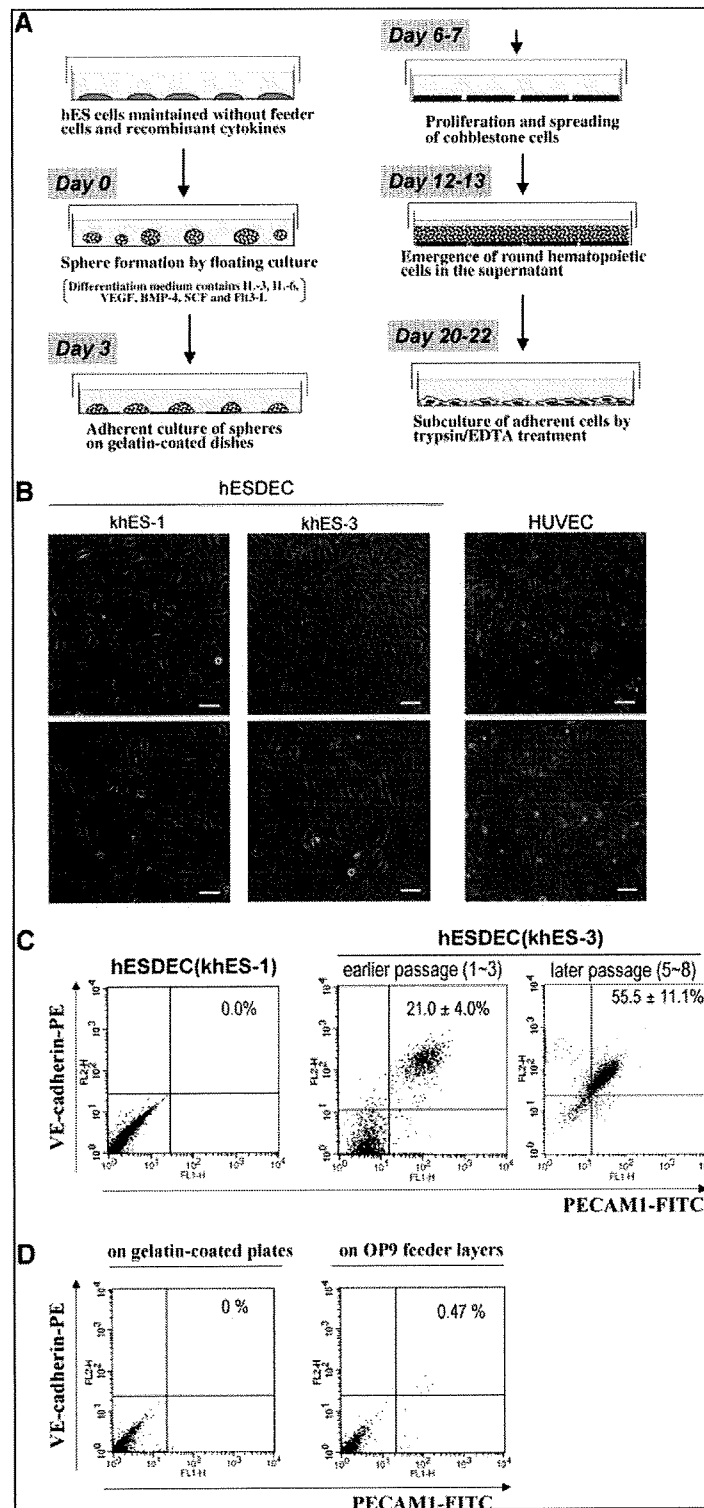


FIG. 1. The VEC differentiation of khES-1 and khES-3. **(A)** A schema of differentiation process. Spheres, which were generated by a floating culture, were cultured on gelatin-coated plates using differentiation media containing six kinds of cytokines. Cobblestone cells were subcultured using the same differentiation media. **(B)** Phase contrast microscopy of hES-derived cells (hESDEC). Cell morphologies at confluent states of khES-1-derived cells (left) and those of khES-3-derived cells (middle), and HUVEC (right) were shown. Scale bar indicates 100 μ m. **(C)** Flow cytometry. The khES-1-derived cells (left) and khES-3-derived cells (right) were subjected to FACS analyses using anti-VE-cadherin-PE and anti-PECAM1-FITC antibodies. **(D)** Effect of OP9 feeder layers. khES-1 cells were subjected to VEC differentiation on gelatin-coated plates (left) or on murine OP9 feeder layers (right), and the expressions of VE-cadherin and PECAM1 were assessed by flow cytometry.

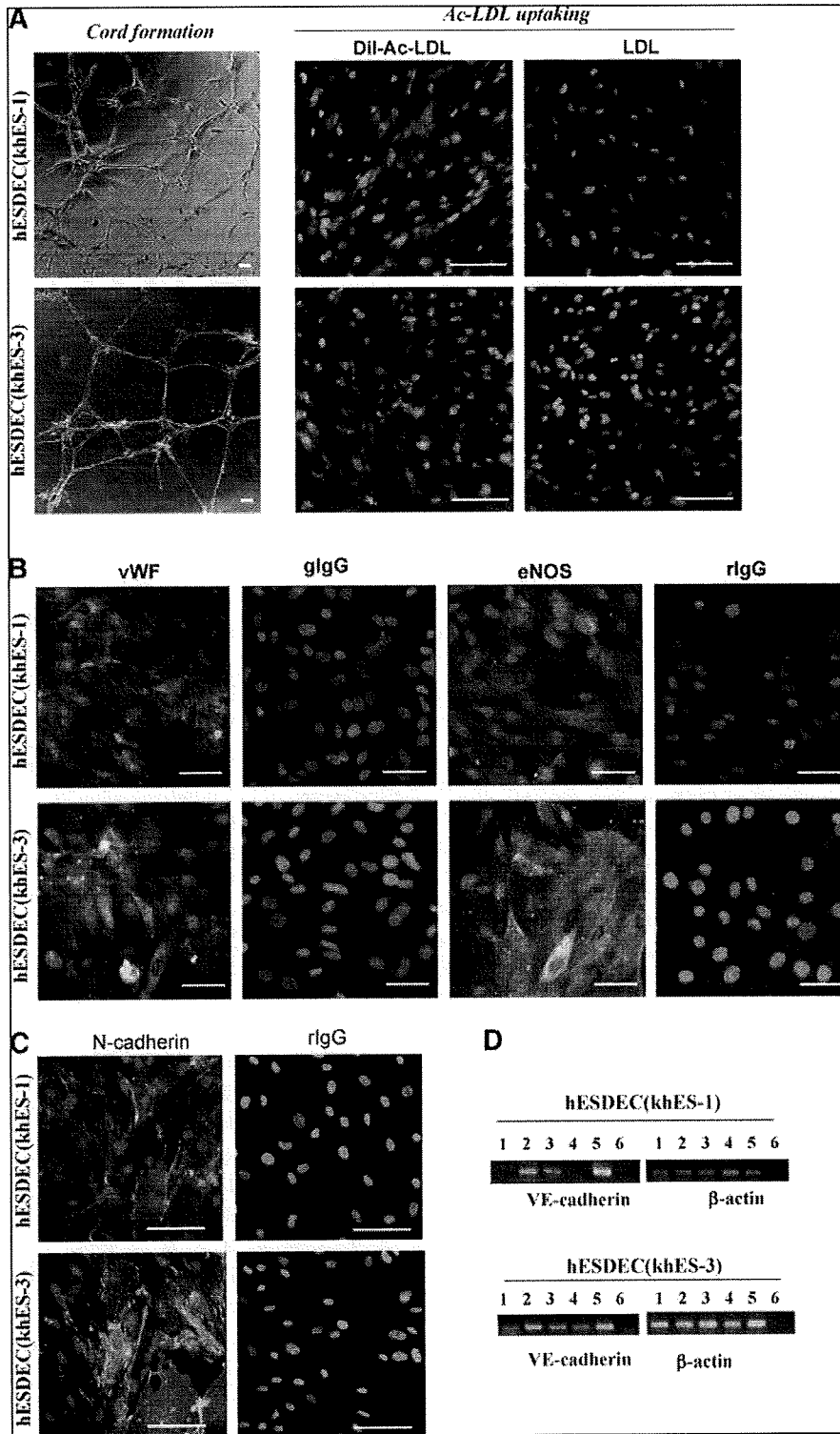


FIG. 2A-D. (see next page).

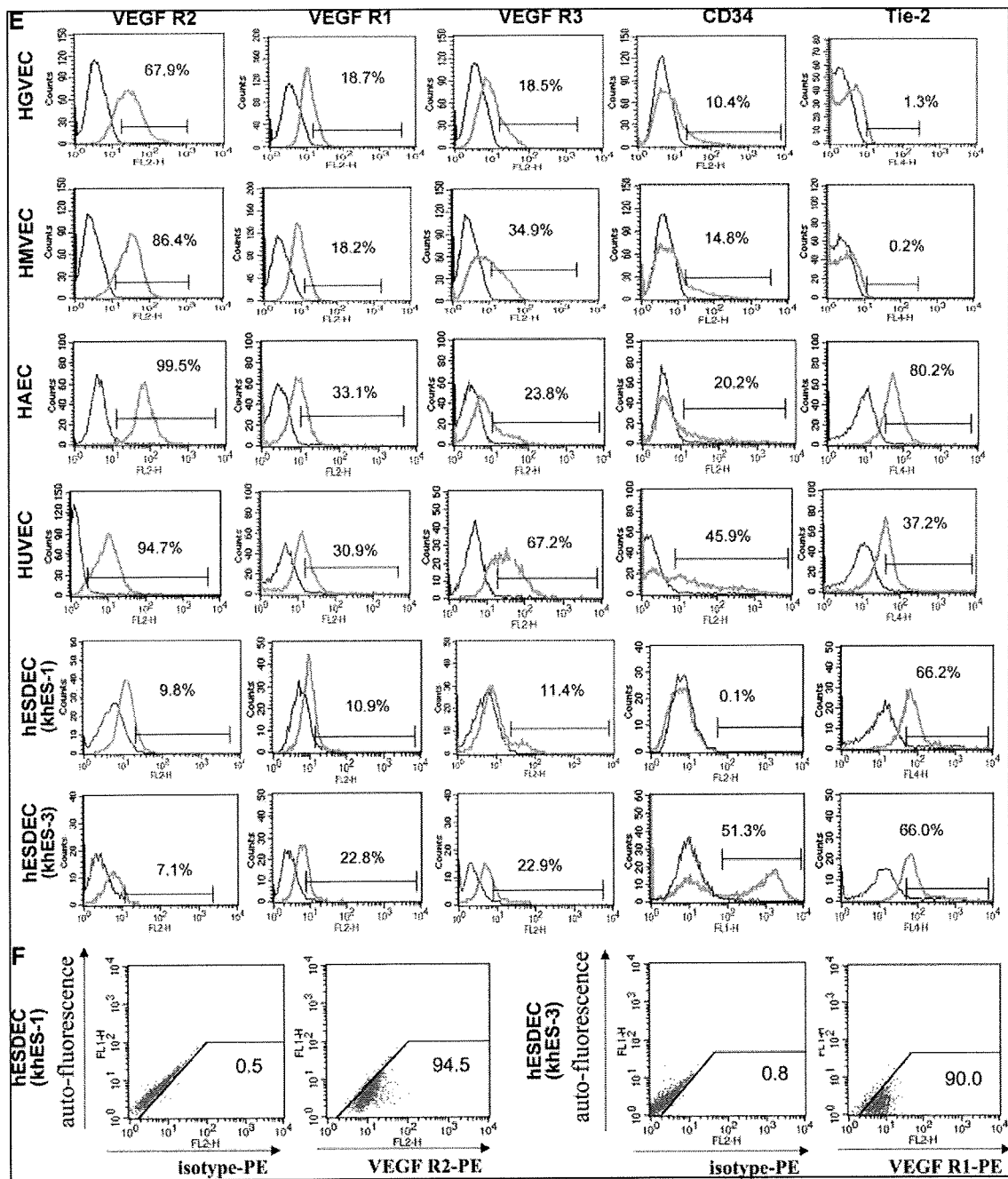


FIG. 2. Characterization of hESC-derived VECs. (A) Functional assays *in vitro*. khES-1-derived cells (upper) and khES-3-derived cells (lower) at passage 4 were subjected to cord formation assays (left panels) or Ac-LDL-uptaking assays (middle panels) as indicated. Right panels indicate the control studies using nonlabeled LDL. The nuclei were stained with DAPI. Scale bar indicates 100 μ m. (B) Expressions of vWF and eNOS. khES-1-derived cells (upper) and khES-3-derived cells (lower) at passage 4 were fixed and stained by an anti-vWF (left) and anti-eNOS (right) antibodies as indicated. Control studies using goat IgG (gIgG) and rabbit IgG (rIgG) were also shown. Scale bar indicates 50 μ m. (C) Expression of N-cadherin. khES-1-derived cells (upper) and khES-3-derived cells (lower) at passage 4 were fixed and stained by an anti-N-cadherin antibody. Control studies using rabbit IgG (rIgG) were shown in the right panels. (D) RT-PCR. khES-1-derived cells (upper) and khES-3-derived cells (lower) were subjected to RT-PCR studies for VE-cadherin. Lane 1; undifferentiated hESCs, lane 2; differentiated hESCs (at passage 0), lane 3; differentiated hESCs (at passage 3), lane 4; differentiated hESCs (at passage 6), lane 5; HUVEC, lane 6; water. (E) VEC marker expressions by histogram. The khES-1-derived and khES-3 derived cells were subjected to flow cytometric analyses to determine VEGF R2, VEGF R1, VEGF R3, CD34, and Tie-2 expressions in comparison with primary human VECs including HGVEC, HMVEC, HAEC, and HUVEC (black lines; isotype control IgG staining results, grey lines; primary antibody staining as indicated). (F) VEGF R2 expression in dot plots. The results of anti-VEGF R2 antibody in E were reanalyzed by dot plots using parameters of autofluorescence (vertical axes) and PE fluorescence (horizontal axes).

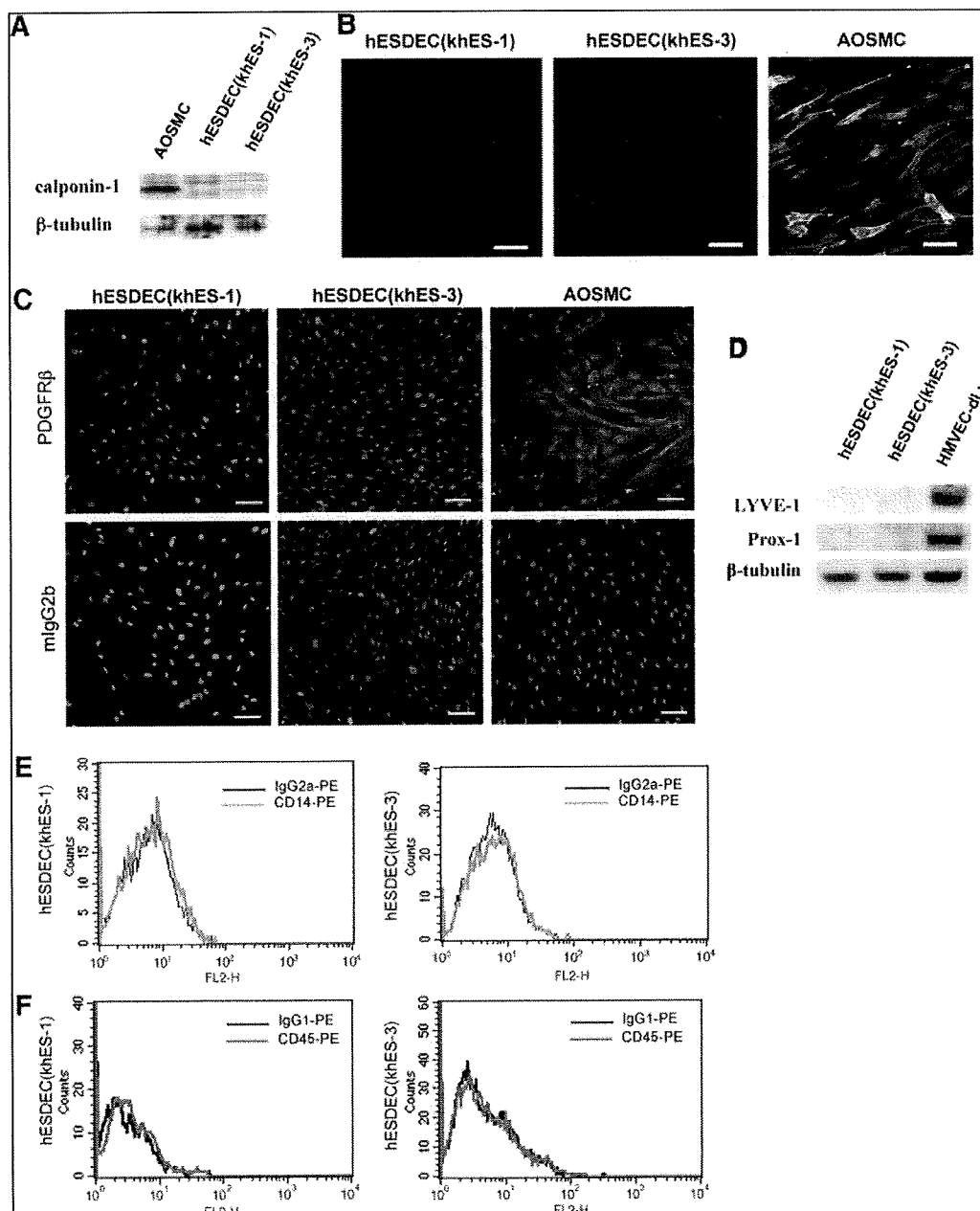


FIG. 3. Exclusion of contamination by other lineage cells. (A–C) Absence of pericytes. khES-1-derived cells and khES-3-derived cells and normal human aortic smooth muscle cells (AOSMC) are subjected to Western blotting studies using antihuman calponin antibody or antihuman β -tubulin antibody as indicated (A), immunostaining studies using antihuman SMA antibody (B), or immunostaining studies using PDGFR- β antibody or isotype IgG2b antibody as indicated (C). Scale bar indicates 100 μ m. (D) Absence of lymphatic endothelial cells. khES-1-derived cells, hES-3-derived cells, and normal human dermal lymphatic microvascular endothelial cells (HMVEC-dLy) were subjected to Western blotting using anti-LYVE-1, anti-Prox-1 or anti- β -tubulin antibodies as indicated. (E, F) Absence of monocytic cells. khES-1-derived cells and khES-3-derived cells were subjected to FACS analysis using anti-CD14-PE (E) or anti-CD45-PE (F) antibodies as indicated. (G) Absence of Naog and Oct-3/4. khES-1-derived cells, khES-3-derived cells, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and undifferentiated khES-3 cells were subjected to Western blotting using anti-Nanog, anti-Oct-4 and anti- β -tubulin antibodies as indicated. (H, I) Absence of SSEA-4. Undifferentiated hESCs and hESC-derived cells were subjected to flow cytometric analyses on SSEA-4 expressions as indicated. Results were shown in either histogram (H) or dot plots (I). (J) Adipocyte differentiation. The khES-1-derived cells, which were a-VECs, and hMSCs, were subjected to adipocyte differentiation. Phase contrast micrographs and oil O staining results were shown as indicated. Scale bar indicate 100 μ m. (K) Karyotyping. Chromosomal analyses with G-banding were performed using khES-1-derived cells and khES-3-derived cells. (L) Functional assays in vitro at later passages. khES-1-derived cells and khES-3-derived cells at passage 10 were subjected to cord formation assays (left panels) or Ac-LDL-uptaking assays (middle panels) as indicated. Right panels indicate the control studies using non-labeled LDL. The nuclei were stained with DAPI. Scale bar indicates 100 μ m.