

200911006A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 日高 京子

平成22 (2010) 年 3月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 日高 京子

平成22 (2010) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

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

日高京子-----1

II. 分担研究報告

両能性心筋前駆細胞の同定と解析

森崎隆幸-----7

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----11

IV. 研究成果の刊行物・別刷

-----13

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

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

主任研究者 日高京子 国立循環器病センター研究所 室長

研究要旨

ES 細胞および iPS 細胞（人工多能性幹細胞）はともに高い増殖能と多能性を持ち、分化メカニズムの解明といった基礎研究の細胞ソース、薬効・毒性試験の細胞ソース、究極的には細胞移植のソースとしての役割が期待されている。心臓は再生能力の低い臓器であり、心筋細胞の入手は極めて困難であることから、ES 細胞・iPS 細胞から分化誘導させた心筋細胞が大いに期待されている。心筋細胞にはこれまで効率的単離を容易にする細胞表面マーカーがほとんど知られておらず、遺伝子操作によりマーカーを導入することによってのみ単離が可能であった。そこでわれわれは、マウス ES 細胞の心筋分化誘導系の網羅的発現遺伝子解析より表面マーカーの候補としてプリオンタンパク質（PrP）を見出した。本年度は（1）PrP の胚様体およびマウス胚での発現特異性を詳細に調べ、（2）PrP によって精製した細胞分画の解析を進めたところ、PrP はミオシン重鎖（MyHC）陽性細胞出現時にこれらの細胞で発現しており、自動拍動開始直後の胚様体から単離した PrP 陽性細胞は MyHC を発現するが心筋トロポニン I（cTnI）を発現しない未熟な心筋細胞集団であること、培養後に cTnI を発現する成熟した心筋細胞へと効率良く（>90%）分化することを見出した。マウス胚では PrP は心臓原基に発現しており、PrP でソートした分画は心筋マーカーを特異的に発現していることがわかった。また、（3）ヒト由来心筋細胞の発現特異性について、自動拍動するヒト iPS 細胞由来胚様体を用いて mRNA レベルでの発現確認を行った。以上のことから、PrP が特異的表面マーカーとして多能性幹細胞由来の心筋細胞の大量調製に有用であることが十分に期待できることがわかった。

分担研究者

国立循環器病センター研究所
森崎隆幸

A. 研究目的

本研究は ES 細胞、および ES 細胞と同様の多能性を有する iPS 細胞より大量に効率よく心筋細胞を得るために、心筋および心筋前駆細胞で発現するマーカーを探

索し、簡便かつスケールアップ可能な単離法を開発することを目的とする。ES細胞はさまざまな細胞に分化するが、再生医療、薬効・毒性試験の細胞ソース等、その実用化に向けては(1)目的細胞への選択的分化誘導法の確立、(2)目的細胞の選別・純化法の確立、(3)大量化へ向けたシステムの効率化などが基本となる。(1)については心筋分化メカニズムの解明とそこから得られる知見の活用、(3)については胚様体作成法と培養法や分離法の開発と改良が基盤となり、初年度および次年度において報告してきた。本年度は(2)の選別・純化のための表面マーカーについての総括を行う。尚、(1)の分化メカニズム解明に有用な前駆細胞同定については分担研究者・森崎の項で総括する。心筋細胞を選別するには、これまでは主として、細胞の比重の違いを利用する方法、選択可能なマーカー遺伝子の導入による方法(遺伝子改変を利用した方法)が用いられてきた。前者は簡便であるが純度の上で問題があり、後者はより確実ながらも安全性、コスト、時間の上で問題があった。細胞表面に特異的に発現するタンパク質(細胞表面マーカー)がわかれば、それに対する抗体を用いて、抗体に付加した標識物を利用して簡便にかつ短時間で細胞の分離が可能である。実際に血球系細胞においてはそのようなマーカーが数多く同定されており、マーカーの発現違いによる細胞の性質の違いが明らかとなっているほか、希少な血球幹細胞の分離にも役立っている。しかしながら心筋細胞にはそのような表面マーカーがほとんど知られていな

い。心血管系共通の前駆細胞を認識するといわれる血管内皮増殖因子受容体2(Flk1)、あるいは中胚葉マーカーの一つである血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFR α)は分化した心筋細胞では発現がほとんどなくなることから、心筋マーカーとしては使いづらい面もある。われわれはこれまでに胚様体の網羅的発現遺伝子解析を行い、膜タンパク質であるプリオンタンパク質(PrP)が心筋細胞に特異的に発現していることを見出した。今年度は(1)PrPの胚様体およびマウス胚における特異性を詳細に調べ、(2)PrPを指標として分離した細胞の性質を詳細に調べた。また、最後に(3)ヒト由来心筋細胞におけるPrPマーカーの発現を検討した。

B. 研究方法

マウス ES細胞は胚様体形成を経て分化誘導させた。胚様体形成後は大量の培地(10%血清)に胚様体を浮遊させ、さらに4-5日培養させることにより自動拍動する胚様体を得た。胚様体は抗原がプロテアーゼ感受性であるため、コラーゼナーゼII型(Sigma社)とそれに続く細胞分離バッファー(Invitrogen社)処理によって分離させた。PrP抗体はSPI-BIO社から購入したマウスモノクローナル抗体を蛍光色素の一つAPCで標識して用いた。磁気ビーズによる単離は抗APC抗体とAutoMACS自動細胞分離装置(ミルテニー社)を用いて行った。この他に蛍光を利用したセルソーター(FACS Aria、BD社)による分離も行った。細胞の内外を抗体染色する場合は、

まず生細胞を PrP 抗体で染色した後、細胞を固定し細胞膜に穴を空け、ミオシン重鎖等の細胞内を認識する抗体を反応させた。陽性細胞の割合はフローサイトメトリー (FACS Canto, BD 社) にて評価した。マウス胚における発現は whole mount in situ hybridization および免疫染色により行ったほか、マウス胚の細胞を Collagenase 等で解離させ、フローサイトメトリーで評価した。また、マーカーでソートした細胞分画より RNA を抽出し、RT-PCR により発現特異性を確認した。ヒト iPS 由来の胚様体 (自動拍動を確認したもの) はニプロより購入して検討した。

C. 研究成果

I. PrP の胚様体およびマウス胚における発現特異性。分化誘導後の各時期の胚様体を分散させ細胞表面を PrP 抗体で染めてフローサイトメトリーで解析したところ、分化誘導後 5 日目(d5)に発現が開始することがわかった。胚様体は d7 で自動拍動を開始するので PrP の発現はこれに先んじて始まることがわかった。次にミオシン重鎖(MyHC)を認識する抗体を用いて細胞内を染色すると、MyHC 陽性細胞は d6 に出現し、出現時すべて PrP 陽性であることがわかった。以上のことから PrP タンパク質は分化した後の心筋細胞の表面で発現することがわかった。一方、マウス胚において PrP は体節形成直前、Cardiac crescent として知られる心臓原基および原始心筒において発現が観察された。PrP でソートした細胞を RT-PCR により解析すると心筋特異的遺伝子が

PrP 陽性細胞に発現していることが確認できた。以上のことから胚においても PrP は初期の心筋細胞に発現していることがわかった。

II. PrP を指標として分離した細胞の性質の検討。胚様体を PrP によってソートした後、再度細胞塊を形成して自動拍動する細胞が生ずるかどうかを検討したところ、PrP 陽性分画から自動拍動する細胞が出現したのに対して、PrP 陰性分画からは出現しなかった。ソートした細胞をマトリゲル中で 1 週間培養すると、PrP 陰性分画からは視認できる大きなコロニー (未分化細胞に由来すると考えられる) が生じたのに対し、PrP 陽性分画からは生じなかった。これらの結果は PrP によるソートにより心筋と非心筋が確実に分離できることを示している。PrP 陽性細胞を長期培養すると、最初は心筋特異的なマーカー心筋トロポニン I (cTnI)を発現していなかったが、1 週間の培養により cTnI を 90%以上発現するようになった。また、これらの細胞の約半数は心室筋特異的なマーカーミオシン軽鎖 2v (Mlc2v) を発現しており、一方で心房筋に特有の薬剤感受性 (カルバミルコリン感受性) を示したことから、PrP 陽性細胞より分化した細胞集団は心室筋と心房筋の両種の細胞を含んでいることが示唆された。

III. ヒト由来心筋細胞における PrP マーカーの発現の検討。ヒト iPS 細胞由来の自動拍動する胚様体 (少なくとも分化後 3 週間経過) をニプロより購入した。入手可能な胚様体の数が限られていたため、RT-PCR に

よる発現の確認を行ったところ、PrP mRNA のヒト由来細胞における発現が確認できた。ヒト ES 細胞については心筋への分化誘導条件を引き続き検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト ES 細胞使用については研究機関内の倫理委員会の承認が得られ、文部科学省での確認の後、使用を開始した。遺伝子組換え実験は研究機関の委員会の承認を得て行われた。動物の取扱いについても研究機関の委員会の承認を得て行われ、また、動物愛護に配慮して実験を行った。

D. 考察

I. PrP の心筋細胞における発現特異性。胚様体においてあるタンパク質の発現特異性を調べるにはいくつかの方法があるが、胚様体は種々の細胞の集合体であるため、RT-PCR やウエスタンブロットといったバルクでの解析では正確な情報が得られない。一方、免疫染色法では分化途上の細胞で、シグナルの弱いものを判断することが難しい。今回われわれは、PrP でまず細胞外を染色し、細胞を固定し膜に穴をあけ、細胞の中を染色し、これをフローサイトメトリーで解析するという手法をとった。この方法は非常に手間がかかるが、得られる情報は多く、PrP ができたての心筋細胞に発現しているというクリアカットな結果を得ることができた。これと並行して PrP でのソーティングにより自動拍動する心筋分画とそうでない非心筋分画を確実に分離できるということがわかった。これは PrP の心筋特異的発現をさらに支持するものである。生物個体における PrP の発現は脳を中心に解析されてきており、マウス初期

胚では詳細には解析されてこなかった。今回の解析で PrP が心臓原基で発現していることが明らかとなり、胚様体での発現特異性を裏付ける結果となった。以上のことは PrP を心筋マーカーとして用いるための、重要な知見となると考えられる。

II. PrP を指標として分離した心筋細胞について。心筋細胞には心房筋・心室筋のほか刺激伝導系の細胞がある。今回の解析では Mlc2v を発現する心室筋、カルバミルコリン感受性の心房筋の両方が PrP 陽性分画から生じることが明らかとなった。しかしながらペースメーカー特異的な Hcn4 タンパク質を発現する細胞はほとんど生じていなかった。これは単に現培養条件下で Hcn4 陽性細胞がうまく生じなかったのか、PrP 陽性細胞の分化できる系譜にペースメーカー細胞が含まれていなかったのか、現段階では不明である。PrP 陽性細胞の可塑性や分化能力を検討するためにさらなる解析が必要であると考えられる。

III. ヒト由来心筋細胞における PrP マーカーの発現の検討。ヒト由来細胞についてはフローサイトメトリーで解析できるほど十分な数の心筋細胞を得られていない。しかしながら PrP は種を超えて高く保存されており、その生理的役割の多くは不明ながら、発現特異性も保存されていると予想できる。今後は PrP がヒト細胞で利用できるマーカーとなるかどうか、さらなる確認実験が必要である。

E. 結論

本年度ではマウス ES 細胞とマウス胚を

用いて PrP の発現特異性についての検討、PrP でソートした細胞の性質についての検討を行った。これらの検討より、PrP がこれまであまり知られていなかった心筋細胞の特異的 surface marker として、有力であることが明らかとなった。昨年度までに報告したように、surface marker は磁気ビーズを用いて大量かつ簡便に調製することが可能であり、PrP は多能性細胞由来の心筋細胞を扱う上で強力な武器となりうる。今後はヒト細胞における発現特異性のさらなる検討、PrP 陽性細胞の生体内での機能評価等が必要になると考えられる。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hidaka K, Shirai M, Lee JK, Wakayama T, Kodama I, Schneider MD, Morisaki T. The cellular prion protein identifies bipotential cardiomyogenic progenitors. *Circ Res.* 106: 111-119, 2010.
- 2) Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh YS, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S, Fukuda K. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods.* 7: 61-66, 2010.
- 3) Miyamoto S, Hidaka K, Jin D, Morisaki T. RNA-binding proteins Rbm38 and Rbm24 regulate myogenic differentiation via p21-dependent and -independent regulatory pathways. *Genes Cells.* 14: 1241-1252, 2009.
- 4) 森崎隆幸、日高京子 ES 細胞 循環器科 66: 461-465, 2009.

2. 学会発表

- 1) Hidaka K, Nitta T, Sugawa R, Shirai M, Takahama Y, Morisaki T. Generation of the third pharyngeal pouch-related cells from mouse embryonic stem cells Kyoto T Cell Conference 平成 21 年 6 月
- 2) 日高京子、白井学、若山貴成、本多賢彦、森崎隆幸 surface marker による心筋前駆細胞の単離と解析 第 13 回 Molecular Cardiovascular Conference 平成 21 年 9 月
- 3) 日高京子、白井学、森崎隆幸 Isolation and characterization of cardiomyocytes and their progenitors using surface markers 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月
- 4) 白井学、日高京子、森崎隆幸 Expression analysis of the LIM homeodomain transcription factor, Isl1 in the cardiac field of early mouse embryos 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月
- 5) 本多賢彦、日高京子、須川涼、森崎隆幸 Vgll2, a transcription

- cofactor that is involved in the determination of skeletal muscle fiber type 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月
- 6) 金東浩、日高京子、宮本章子、森崎隆幸 RNA binding motif protein-24 promotes myogenic differentiation by regulating myogenin expression 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月
- 7) Hidaka K, Morisaki T. Purification of ES cell-derived cardiomyocytes using cell surface markers 第 7 回心血管幹細胞研究会 平成 22 年 1 月
- 8) 日高京子、白井学、若山貴成、李鍾國、児玉逸雄、森崎隆幸 プリオンタンパク質を表面マーカーとして用いた心筋前駆細胞の分離と解析 第 9 回日本再生医療学会 平成 22 年 3 月
- を含む)
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

両能性心筋前駆細胞の同定と解析

分担研究者 森崎隆幸 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨

無限増殖能と多能性を有する ES 細胞・iPS 細胞は心筋に対する細胞移植や薬効・毒性試験の貴重なリソースとして注目されている。心筋細胞への効率的な分化誘導を行うためには心筋分化メカニズムの解明とそこから得られる知見が重要である。心筋細胞は血管内皮増殖因子受容体 2 (Flk1) を発現する心血管系共通の前駆細胞より生ずるとされているが、心筋細胞へと分化する細胞系譜についてはまだ十分に解析が進んでおらず、どのような中間段階を経て心筋へ分化するかは不明な部分が多い。発生生物学の知見より BMP やアクチビン等 TGFβファミリーのシグナル、Wnt ファミリーによるシグナルが細胞分化制御に重要であるということが明らかになってきたが、これらの因子は時間的・空間的にごく限られた様式で作用することから、複数の細胞種に分化する多能性幹細胞からの分化系では評価しにくい側面もある。われわれはこれまでに胚様体の網羅的発現遺伝子解析を行い、候補マーカーの一つであるプリオンタンパク質 (PrP) が心筋細胞特異的に発現していることを見出した。さらに、第二の表面マーカーとして血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFRα) を組み合わせると、ミオシン重鎖タンパク質を発現していない前駆細胞を同定できることがわかった。PrP/PDGFRα 二重陽性細胞 (PRa 細胞と命名) は細胞の再凝集によって効率的に心筋へ分化したが、平面培養では平滑筋へと選択的に分化した。また、PRa 細胞は Wnt シグナル依存的に増殖し、単一細胞から形成されたコロニーは平滑筋・心筋の両方を含んでいた。以上のことは PRa 細胞が両能性を有する細胞であることを強く示唆し、この細胞こそが心筋に分化する直前の前駆細胞の本体であることが明らかとなった。PRa 細胞への分化、PRa 細胞からの分化条件をさらに詳細に検討することは心筋分化メカニズムの理解に向けての一助となり、多能性幹細胞由来の心筋細胞の効率的生産と利用へ向けて有意義な知見となると期待できる。

A. 研究目的

本研究は ES 細胞からの心筋細胞の効

率的な分化・分離法を開発し、ヒト ES

細胞の心筋細胞への分化を促進すること

のできる条件を明らかにすることを目指して実施した。多能性細胞からの分化誘導は複数の細胞種を含む胚様体では難しい側面があり、多くの因子が限られたウインドウで作用することから中間段階の細胞の同定とその解析が大きな鍵となる。われわれはこれまでにマウス ES 細胞の分化過程で発現する遺伝子を網羅的に探索し、プリオンタンパク質 (PrP) が心筋細胞表面マーカーとして有力な候補であることを明らかにしてきた。しかしながら PrP によるソーティングで心筋・非心筋分画を分離するには自動拍動開始直後、あるいはその 1 日前の胚様体を用いる必要があり、自動拍動開始 2 日前 (d5) ではうまく分離できなかった。そこで本年度は第二のマーカーとして PDGFRa を併用することによって、さらに前の段階の前駆細胞の同定、その性状解析を行った。

B. 研究方法

本年度はマウス ES 細胞胚様体分化系を用いて解析を行った。ハンギングドロップ法などで得られた胚様体を Collagenase / Dissociation Buffer で分散させ、APC 標識した抗 PrP 抗体、PE 標識した抗 PDGFRa または抗 Flk1 抗体による染色をおこない、フローサイトメトリーによる解析およびセルソーティングを行った。ソーティングした細胞は低接着性のウェルにて培養し再凝集させるか、ゼラチンコートしたウェルで平面培養を行い、ミオシン重鎖 (MyHC) あるいは平滑筋アクチン (SMA) による免疫染色、RT-PCR による特異的マーカー遺伝子の発現解析により分化を観察・評価した。

単一細胞からの培養はメチルセルロースに低密度で播種し、コロニー形成後、ひとつひとつのコロニーをマルチウェルプレートに移して分化を観察した。

C. 研究成果

PrP・PDGFRa・Flk1 によるフローサイトメトリー解析により、自動拍動開始 2 日前 (d5) 胚様体では PrP 陽性細胞は PDGFRa 陽性あるいは陰性であり、Flk1 に関しては陰性あるいはごく低レベルでの発現が認められた。次に PrP/PDGFRa または PrP/Flk1 によるソーティングを行い、それぞれの分画を再凝集させ、心筋分化能を調べたところ、d5 では PrP・PDGFRa 二重陽性細胞 (PRa 細胞と命名) が最も高い頻度で自動拍動する細胞塊を生じることがわかった。この分画は初期の心筋マーカー (Nkx2.5, Tbx5, Isl1) を最も高く発現していた。d5・d5.5 胚様体由来 PRa 細胞は MyHC をまだ発現していなかったが、再凝集によって MyHC 陽性の心筋細胞を生じ、平面培養で平滑筋アクチン (SMA) 陽性の平滑筋細胞へ分化することがわかった。単一細胞からのコロニー解析を行ったところ、一つのコロニーに MyHC 陽性細胞と SMA 陽性細胞が混在することが明らかとなり、PRa 細胞が両能性を持つ細胞であることが示唆された。興味深いことに Wnt シグナルはコロニー形成を促進し、再凝集による心筋分化を遅らせることが明らかとなった。

D. 考察

PRa 細胞は Isl1 も発現しており、タンパ

ク質レベルでもこれを確認している。Isl1 は第二の心臓形成領域（第一の細胞が原始心筒を形成した後に付加される心筋細胞群）のマーカ―として知られるが、我々の解析では Isl1 は一次形成領域 (Cardiac crescent) にも一時的に発現し、心筋前駆細胞の一般的マーカ―であることが示唆された。今回同定した PRa 細胞は Isl1 陽性細胞の性質 (Wnt による増殖促進、分化抑制) と一部重複しており、心筋前駆細胞の性質が今回の解析でより一層明確になったと考えられた。PRa 細胞はソート直後に再凝集させると効率よく心筋へ分化したが、コロニー形成を経ると、すなわち一旦増殖させると、心筋への分化能力は必ずしも高くないことがわかった。今後は増殖させた PRa 細胞が確実に心筋へと分化するための条件・因子を探索し、再生医療への応用へ役立てたい。

E. 結論

本研究ではこれまで十分に明らかにされてこなかった心筋前駆細胞の同定と解析を行った。PrP・PDGFRa 二重陽性細胞は表面マーカ―を利用して分離できる両能性の心筋・平滑筋前駆細胞であり、多能性幹細胞から心筋細胞へ分化する中間段階に位置するものと考えられた。中間段階への分化条件、中間段階からの分化条件の検討、それぞれの場面で機能する遺伝子や因子の解析を通して、分化メカニズムのさらなる理解につながることを期待でき、心筋細胞をより多く得るための重要な足がかりになると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hidaka K, Shirai M, Lee JK, Wakayama T, Kodama I, Schneider MD, Morisaki T. The cellular prion protein identifies bipotential cardiomyogenic progenitors. *Circ Res.* 106: 111-119, 2010.
- 2) Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh YS, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S, Fukuda K. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods.* 7: 61-66, 2010.
- 3) Shirai M, Imanaka-Yoshida K, Schneider MD, Schwartz RJ, Morisaki T: T-box 2, a mediator of Bmp-Smad signaling, induced hyaluronan synthase 2 and Tgfbeta2 expression and endocardial cushion formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18604-18609, 2009.
- 3) Miyamoto S, Hidaka K, Jin D, Morisaki T. RNA-binding proteins Rbm38 and Rbm24 regulate myogenic differentiation via p21-dependent and -independent regulatory pathways. *Genes Cells.* 14: 1241-1252, 2009.
- 4) 森崎隆幸、日高京子 ES 細胞 循環器科 66: 461-465, 2009.

2. 学会発表

- 1) Hidaka K, Nitta T, Sugawa R, Shirai M, Takahama Y, Morisaki T. Generation of the third pharyngeal pouch-related cells from mouse embryonic stem cells Kyoto T Cell Conference 平成 21 年 6 月
- 2) 日高京子、白井学、若山貴成、本多賢彦、森崎隆幸 表面マーカーによる心筋前駆細胞の単離と解析 第 13 回 Molecular Cardiovascular Conference 平成 21 年 9 月
- 3) 日高京子、白井学、森崎隆幸 Isolation and characterization of cardiomyocytes and their progenitors using surface markers 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月
- 4) 白井学、日高京子、森崎隆幸 Expression analysis of the LIM homeodomain transcription factor, Isl1 in the cardiac field of early mouse embryos 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月
- 5) 本多賢彦、日高京子、須川涼、森崎隆幸 Vgl12, a transcription cofactor that is involved in the determination of skeletal muscle fiber type 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月
- 6) 金東浩、日高京子、宮本章子、森崎隆幸 RNA binding motif protein-24 promotes myogenic differentiation by regulating myogenin expression 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月
- 7) Hidaka K, Morisaki T. Purification of ES cell-derived cardiomyocytes using cell surface markers 第 7 回 心血管幹細胞研究会 平成 22 年 1 月
- 8) 日高京子、白井学、若山貴成、李鍾國、児玉逸雄、森崎隆幸 プリオンタンパク質を表面マーカーとして用いた心筋前駆細胞の分離と解析 第 9 回日本再生医療学会 平成 22 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Hidaka K, Shirai M, Lee JK, Wakayama T, Kodama I, Schneider MD, Morisaki T.	The cellular prion protein identifies bipotential cardio-myogenic progenitors.	Circ Res	106 巻 1号	111-119	2010
Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Sato YS, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S, Fukuda K.	Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes.	Nat Methods	7巻 1号	61-66	2010
Shirai M, Imanaka-Yoshida K, Schneider MD, Schwartz RJ, Morisaki T	T-box 2, a mediator of Bmp-Smad signaling, induced hyaluronan synthase 2 and Tgfbeta2 expression and endocardial cushion formation.	Proc Natl Acad Sci USA	106 巻 44号	18604-1 8609	2009
Miyamoto S, Hidaka K, Jin D,	RNA-binding proteins Rbm38 and Rbm24 regulate myogenic	Genes Cells	14巻 11号	1241-12 52	2009

Morisaki T.	differentiation via p21-dependent and -independent regulatory pathways.				
森崎隆幸、 日高京子	ES 細胞	循環器科	66 卷 4 号	461-465	2009

The Cellular Prion Protein Identifies Bipotential Cardiomyogenic Progenitors

Kyoko Hidaka, Manabu Shirai, Jong-Kook Lee, Takanari Wakayama, Itsuo Kodama, Michael D. Schneider, Takayuki Morisaki

Rationale: The paucity of specific surface markers for cardiomyocytes and their progenitors has impeded the development of embryonic or pluripotent stem cell-based transplantation therapy. Identification of relevant surface markers may also enhance our understanding of the mechanisms underlying differentiation.

Objective: Here, we show that cellular prion protein (PrP) serves as an effective surface marker for isolating nascent cardiomyocytes as well as cardiomyogenic progenitors.

Methods and Results: Embryonic stem (or embryo-derived) cells were analyzed using flow cytometry to detect surface expression of PrP and intracellular myosin heavy chain (Myhc) proteins. Sorted cells were then analyzed for their differentiation potential.

Conclusions: PrP⁺ cells from beating embryoid bodies (EBs) frequently included nascent Myhc⁺ cardiomyocytes. Cultured PrP⁺ cells further differentiated, giving rise to cardiac troponin I⁺ definitive cardiomyocytes with either an atrial or a ventricular identity. These cells were electrophysiologically functional and able to survive in vivo after transplantation. Combining PrP with a second marker, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α , enabled us to identify an earlier cardiomyogenic population from prebeating EBs, the PrP⁺PDGFR α ⁺ (PRa) cells. The Myhc⁻ PRa cells expressed cardiac transcription factors, such as Nkx2.5, T-box transcription factor 5, and Isl1 (islet LIM homeobox 1), although they were not completely committed. In mouse embryos, PRa cells in cardiac crescent at the 1 to 2 somite stage were Myhc⁺, whereas they were Myhc⁻ at headfold stages. PRa cells clonally expanded in methylcellulose cultures. Furthermore, single Myhc⁻ PRa cell-derived colonies contained both cardiac and smooth muscle cells. Thus, PrP demarcates a population of bipotential cardiomyogenic progenitor cells that can differentiate into cardiac or smooth muscle cells. (*Circ Res* 2010;106:111-119.)

Key Words: cardiogenic precursor ■ differentiation ■ embryonic stem cells ■ surface marker regeneration

Heart, the first functional organ to develop in vertebrate embryos, contains cardiac, smooth muscle, and endothelial cells.¹⁻³ Cardiac transcription factors, such as Nkx2.5 (NK2 transcription factor related, locus 5) and T-box transcription factor (Tbx)5, are first expressed in cardiogenic mesoderm, which is located in the anterior lateral plate mesoderm.⁴ Subsequently, genes encoding cardiac-specific structural proteins are expressed in the cardiac crescent.⁴ The cardiac crescent then fuses at the ventral midline to form the linear heart tube, which develops into the chambered heart after looping. In the cardiac crescent, endothelial (or endocardial) markers, such as Flk1 (fetal liver kinase-1), do not markedly overlap with cardiomyogenic markers, suggesting that these 2 lineages have already segregated at this stage. Recent studies using embryonic stem (ES) cells have sug-

gested the presence of multipotential cardiovascular stem cells that can differentiate into cardiac, smooth muscle, and endothelial cells^{5,6}; these cells have been identified as Flk1⁺ and/or islet LIM homeobox 1 (Isl1)⁺.⁷ Intermediate cardiomyogenic progenitor cells may be bipotential, differentiating into both cardiac and smooth muscle cells.⁸ Because of the paucity of known specific surface markers, however, these intermediate progenitors have been difficult to characterize. Several studies using ES cells or embryonal carcinoma cells have suggested that temporally regulated Wnt signaling is important for the specification and differentiation of cardiomyocytes.⁹⁻¹² Progeny derived from ES cells, however, are a mixture of different cell types, and additional analysis is needed to define the immediate progenitors of cardiomyocytes more precisely.

Original received January 29, 2009; resubmission received September 18, 2009; revised resubmission received October 30, 2009; accepted November 3, 2009. From the Department of Bioscience (K.H., M.S., T.W., T.M.), National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Japan; Department of Circulation (J.-K.L., I.K.), Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Japan; Department of Molecular Pathophysiology (T.W., T.M.), Osaka University Graduate School of Pharmaceutical Sciences Suita, Japan; and National Heart and Lung Institute (M.D.S.), Imperial College, London, United Kingdom.

Correspondence to Takayuki Morisaki, Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, -7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan. E-mail morisaki@ri.ncvc.go.jp

© 2010 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>—13—

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209478

Non-standard Abbreviations and Acronyms	
ANP	atrial natriuretic peptide
cTn	cardiac troponin
E	embryonic day
EB	embryoid body
ES	embryonic stem
Fik1	fetal liver kinase-1
GFP	green fluorescent protein
Isl1	islet LIM homeobox 1
MEC	methylcellulose
Myhc	myosin heavy chain
Mylc	myosin light chain
Nkx2.5	NK2 transcription factor related, locus 5
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PrP	prion protein
SMA	smooth muscle actin
SMMMyhc	smooth muscle myosin heavy chain
Tbx	T-box transcription factor

In addition to their utility in developmental studies, ES cells or induced pluripotent stem cells are a potential cellular source for cell transplantation therapy to treat damaged hearts. Several groups have shown that transplanted ES cell-derived cells can repair damaged heart tissue.^{13,14} In most of the previous studies, however, the transplanted cells were not purified cardiomyocytes, and including undifferentiated ES cells was often tumorigenic. To improve the efficacy of ES cell-derived cardiomyocytes, cardiomyocytes or committed progenitors should be isolated. Moreover, because functional engraftment requires a large number of cells, scalable and reproducible preparation methods should be developed. To date, few surface markers that can be used to isolate cardiomyocytes have been reported.¹⁵ This has hindered efforts to isolate pure cardiomyocytes.

During course of studies to identify cardiogenesis-associated genes in ES cells,^{16,17} we found that that *Prnp*, which encodes cellular prion protein (PrP), was expressed in cardiomyocyte-rich embryoid bodies (EBs). In this study, we

show that PrP can be used to separate the cardiomyogenic and noncardiomyogenic cellular fractions. Furthermore, we identified a bipotential, PrP⁺PDGFR α ⁺ cardiomyogenic population that was able to differentiate into either cardiac or smooth muscle cells depending on Wnt signaling and the culture conditions.

Methods

ht7 cells (derived from the CGR8 cell line; a kind gift from Dr H. Niwa, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan) and the derivative hcgp7 cell line (Nkx2.5 EGFP [enhanced green fluorescent protein] knock-in) were maintained and differentiated as described previously.¹ Briefly, we created hanging drops (500 cells/drop) of differentiation medium containing 10% fetal calf serum (FCS) and Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM). On day 2 of differentiation, medium was added to the plates and the cells were cultured as floating embryoid bodies (EBs). To differentiate EB3 ES cells (derived from the E14tg2a cell line; a kind gift from Dr Niwa), Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α MEM) was used as the basal medium instead of GMEM. Typically, ht7 and hcgp7 cells began to beat spontaneously on day 7, whereas EB3 cells began beating on day 6. The percentages of beating EBs were approximately 100% (ht7 and hcgp7 cells) and 80% (EB3 cells).

An expanded Methods section is available in the Online Data Supplement at <http://circres.ahajournals.org>.

Results

PrP Is Expressed in ES Cell-Derived Cardiomyocytes

To confirm that *Prnp* was expressed in EBs during cardiogenesis, we performed RT-PCR analysis. *Prnp* expression was upregulated by 7- to 8-fold before spontaneous beating began (Online Figure I, A). In beating EBs, the PrP⁺ area partially overlapped with the area containing sarcomeric tropomyosin protein-expressing cardiomyocytes (Online Figure I, B). Although the physiological functions of PrP are not yet known,¹⁸ PrP has been detected on the surface membranes of various cell types.¹⁹ To examine the specificity of PrP expression at the cellular level, we used flow cytometry to examine an ES cell line in which *EGFP* was knocked into the *Nkx2.5* locus (Nkx2.5^{GFP/+} ES cells)²⁰; all of the green fluorescent protein (GFP)⁺ cardiomyocytes expressed PrP on their surfaces on day 7 (Figure 1A). Although GFP has been used to isolate cardiomyocytes from beating EBs, we

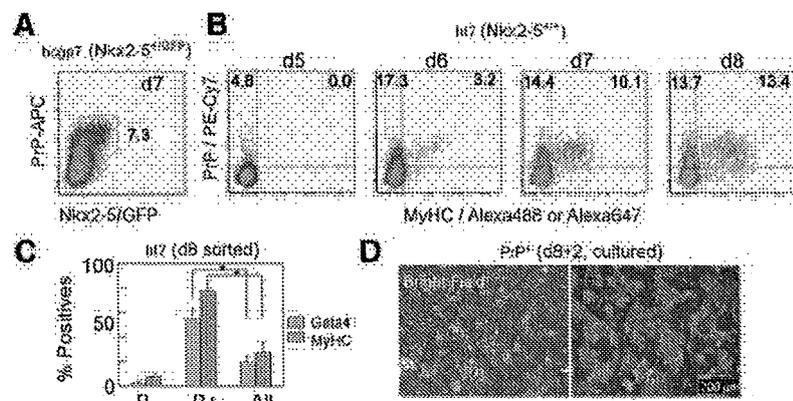


Figure 1. PrP is expressed in ES cell-derived cardiomyocytes. **A**, Flow cytometric analysis of PrP cell surface expression in Nkx2.5^{GFP/+} ES cells (hcgp7). On day 7 of differentiation, GFP⁺ cardiomyocytes were found in the PrP⁺ fraction. **B**, Flow cytometric analysis of cell surface PrP and intracellular sarcomeric Myhc in the parental cell line of hcgp7 cells (ht7). After staining the cells with an anti-PrP antibody, the cells were fixed, permeabilized, and stained with an anti-Myhc antibody. The earliest Myhc⁺ cells appeared on day 6 and were all PrP⁺. **C** and **D**, Cardiomyocyte samples were enriched from beating EBs using the anti-PrP antibody. Cells were analyzed for Myhc and GATA-binding protein 4 (Gata4) expression immediately after cell sorting (**C**) or after they had been cultured on gelatin-

coated plates for 2 days (**D**). Error bars represent the SEMs (n=3 independent samples for each group). **P*<0.05 from an unpaired Student *t* test.

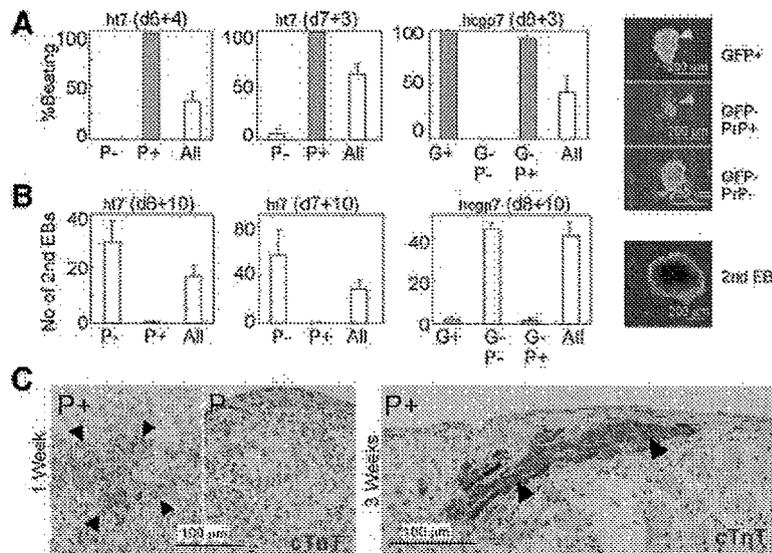


Figure 2. PrP specifically marks a cardiomyogenic population derived from ES cells. **A**, The cardiomyogenic potential of the PrP⁺ fraction of post- and prebeating EBs. Cells were sorted on day 6, 7, or 8 (beating began on day 7), reagggregated, and cultured in Matrigel for 3 to 4 days. Beating foci (denoted with yellow arrowheads) were found in all reagggregates of PrP⁺ cells. Error bars represent the standard error of the mean (n=3). **B**, Sorting using PrP depleted the undifferentiated cell population. Reagggregates of PrP⁺ or PrP⁻ cells were grown in Matrigel for 10 days. Clearly visible colonies (secondary EBs) were scored. Error bars represent the SEMs (n=3). **C**, Transplantation and survival of PrP⁺ cells in vivo. Reagggregates of PrP⁺ cells were transplanted under the kidney capsule. Arrowheads indicate cTnT⁺ cells.

found that GFP expression was not strong enough to allow us to capture all of the Nkx2.5⁺ cells (see next section). Therefore, we simultaneously detected the surface expression of PrP and intracellular sarcomeric proteins. On day 6 or 7, all of the sarcomeric myosin heavy chain (Myhc)⁺ cells that were derived from the Nkx2.5^{GFP/+} ES cell (Figure 1B) or Nkx2.5^{GFP/+} ES cell population (not shown) were PrP⁺, suggesting that the nascent cardiomyocytes were PrP⁺. Expression of PrP on Myhc⁺ cells gradually started to decrease on day 8. Immunofluorescence in cytospin samples (Figure 1C) and cultured cells (Figure 1D) further confirmed that PrP can be used to enrich the Myhc⁺ and GATA-binding protein 4 (Gata4)⁺ cell populations.

PrP Specifically Identifies a Cardiomyogenic Cell Population Derived From ES Cells

To determine whether PrP can be used to enrich not only differentiated cardiomyocytes but also cardiac progenitors, we used reaggregation assays to assess the cardiomyogenic activities of cells sorted from pre- or postbeating EBs. PrP⁺ cells sorted at day 6 (prebeating), day 7 (onset of beating), or day 8 (beating) generated beating reagggregates, whereas PrP⁻ cells did not (Figure 2A). In contrast, the PrP⁻ fraction gave rise to secondary EBs in Matrigel cultures, suggesting the presence of undifferentiated cells²¹ that were not produced from the PrP⁺ fraction (Figure 2B). We also found that GFP⁻PrP⁺ reagggregates derived from Nkx2.5^{GFP/+} ES cells had beating foci. Consistent with this result, the GFP⁻PrP⁺ cells expressed low levels of mRNA encoding Nkx2.5 and other cardiac transcription factors (Figure 3A). Thus, enriching the cardiomyogenic fraction using the cardiogenic marker PrP yielded better results than when enrichment was performed using Nkx2.5^{GFP/+} knock-in ES cells. Importantly, even without using genetically modified ES cells, we were able to purify the cardiogenic fraction before beating began.

To test whether PrP can be used to separate transplantable cells, we transplanted reagggregates from day 6 EBs under the kidney capsules of nude mice. Immunohistochemical analysis demonstrated that cardiac troponin (cTn)T⁺ cells were pres-

ent in the PrP⁺ cell grafts, but not in the PrP⁻ grafts (Figure 2C). Tumor formation was frequently observed in unsorted cell grafts (data not shown) but not in PrP⁺ grafts (41 transplanted aggregates). These results suggested that the PrP⁺ cell population was able to generate cardiomyocytes and survive in vivo for at least 3 weeks.

PrP⁺ Cells Differentiate From Primitive to Definitive Cardiomyocytes

Monolayer cultures of PrP⁺ cells sorted from day 7 or day 8 EBs started to beat within 24 hours. After 5 days of culture, approximately one third of the cells spontaneously beat (data not shown). Single-cell recordings of membrane potentials from 16 of 18 quiescent cells revealed action-potential profiles similar to those of working (atrial or ventricular) cardiomyocytes (Figure 3A). The rest of the cells displayed sinus nodal cell-like spontaneous beating activity. Pharmacological studies using multielectrode arrays indicated that the cultured PrP⁺ cells were responsive to isoproterenol and carbamylcholine, suggesting the presence of functional β adrenergic receptors and sinoatrial cardiomyocytes, respectively (Figure 3B). Immunofluorescence indicated that PrP⁺ cells differentiated into cTnI⁺ (a definitive marker of cardiomyocytes) cells. These were either myosin light chain 2v (Mylc2v)⁺ or Mylc2v⁻ (Figure 3C). A few atrial natriuretic peptide (ANP)⁺ cells were also detected.

To examine the cell types quantitatively, we performed flow cytometry with atria and ventricles from mouse embryos as reference samples (Online Figure 1, E). Among the atrial and ventricular cells from embryonic day (E)13.5 embryonic heart, 25% and 2% to 4% were ANP⁺, respectively. Myosin light chain 2a (Mylc2a) was detected in both the atrial and ventricular cells, although higher levels were observed in atrial cells. Thus, neither ANP nor Mylc2a can be used to distinguish atrial cells from ventricular cells. In contrast, all embryonic ventricular cells were Mylc2v⁺, whereas all atrial cells were Mylc2v⁻. Approximately 50% of cultured PrP⁺ cells were Mylc2v⁺, although the expression level varied between cells (Figure 3D). Consistent with the immunofluo-

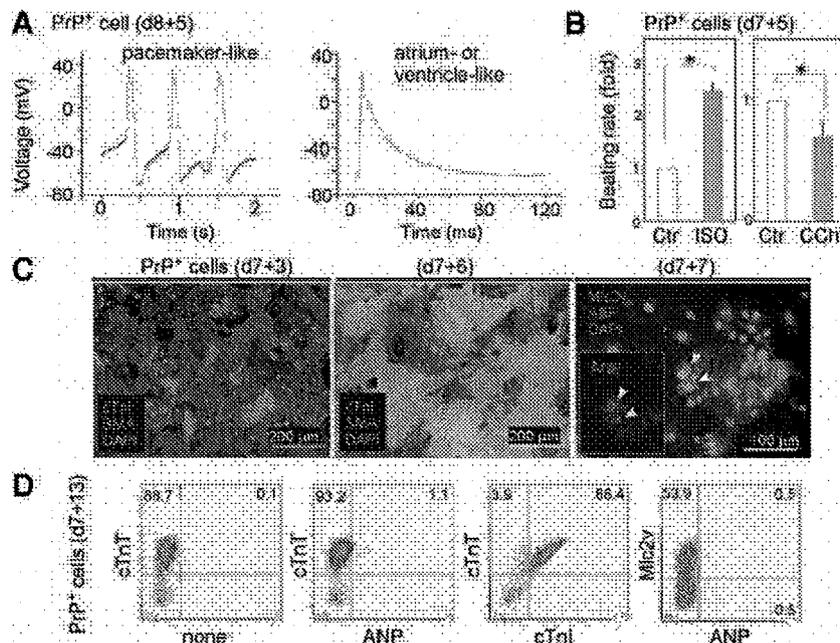


Figure 3. PrP⁺ cells differentiate into cTnI⁺ definitive cardiomyocytes with an atrial or a ventricular identity. **A**, Traces of the membrane potential recorded from a single PrP⁺ cell. PrP⁺ cells sorted on day 8 were cultured for 5 days. Approximately, one third of the cells spontaneously beat (data not shown). Sixteen of 18 quiescent cells exhibited a working myocardium-type (atrial or ventricle) action potential, whereas the rest exhibited a pacemaker-type action potential. Action potentials were elicited at 1 Hz. **B**, Pharmacological analysis of PrP⁺ cells. PrP⁺ cell aggregates were analyzed using multielectrode arrays and isoproterenol (ISO) (1 μ mol/L) or carbamylcholine (CCh) (10 μ mol/L). All aggregates were sensitive to CCh, suggesting that they contained atrial cells. Error bars represent the SE (n=9 independent samples for each group). **P*<0.05 from a paired *t* test. **C**, Immunofluorescence analysis for cTnI (a definitive cardiomyocyte marker), Mylc2v (a ventricle marker), and ANP (a chamber myocardium marker). PrP⁺ cells sorted on day 7 were cultured on gelatin-coated dishes for 1 week. The number of cTnI⁺ cells increased during the culture. Mylc2v⁺

cells were frequently observed, whereas the percentage of ANP⁺ cells was low (1% to 2%). Arrows indicate cells that are ANP⁺MLC2v⁺, a profile characteristic of left ventricular cardiomyocytes. **D**, Flow cytometric analysis of PrP⁺ cell cultures. Sorting on day 7 revealed that the cardiomyocytes were cTnI⁺ but not cTnI⁻ (data not shown). After culturing the cells for 13 days, 90% to 95% expressed both cTnI and cTnI, 50% to 60% expressed Mylc2v, and 1% expressed ANP. Control experiments using embryonic heart and PrP⁻ fractions are shown in Online Figure III.

rescence results, only 1% to 2% of the cells were ANP⁺. The PrP⁺ cell fraction initially contained cells expressing Myhc and cTnI but not cTnI (data not shown).^{20,22} Interestingly, after 10 to 13 days of culture, 90% of the cells differentiated into cTnI⁺ cardiomyocytes. Collectively, these results suggested that PrP⁺ cells differentiated from cTnI⁻ to cTnI⁺ cardiomyocytes with an atrial or a ventricular identity.

The PrP⁺PDGFR α ⁺ Population Contains Myhc⁻ Cardiomyogenic Progenitors

Although PrP expression was first detected at day 5, we were unable to enrich the cardiomyogenic population using this marker until day 6. To determine whether combination with other surface markers would allow better enrichment of the progenitor population at day 5, we examined Flk1, c-kit, and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α as secondary surface markers. Flk1 is a marker of cardiovascular progenitors: common progenitors for cardiac, smooth muscle, and endocardial cells.⁵ PrP⁺ cells expressed a very low level of Flk1 on day 5 and even less on day 6 (Online Figure IV, A), suggesting that PrP⁺ cells may have already diverged from the vascular lineage. c-kit, which is reported to be a cardiovascular stem cell marker in adult and embryonic heart,⁸ was not expressed on PrP⁺ cells. PDGFR α is widely expressed in mesoderm, including the cardiac lineage, although its expression is gradually downregulated in heart tube (elsewhere²³ and Online Figure VI). PrP expression was first observed on day 5 on PDGFR α ⁺ and PDGFR α ⁻ cells (Figure 4A). Molecular analysis indicated that the PrP⁺PDGFR α ⁺ cell fraction from day 5 EBs expressed cardiac marker genes,¹⁶

including *Nkx2.5*, *Tbx5*, and *Isl1*, whereas the PrP⁺PDGFR α ⁻ cell fraction did not (Figure 4B and 4C). Consistent with these data, only the PrP⁺PDGFR α ⁺ cell fraction gave rise to beating reaggregates (Online Figure IV, D). These results suggested that double-positive PrP⁺PDGFR α ⁺ cells, hereafter referred to as PRA cells, are the earliest known cardiomyogenic population.

PRA Cells Differentiate Into Cardiac Cells and Smooth Muscle Cells

To test the cardiomyogenic potential of PRA cells, we used PRA cells sorted from day 5.5 EBs, at which point Myhc was not expressed (data not shown), and directly differentiated the cells as 3D reaggregates (3D cultures) or as sparsely cultured 2D monolayers (2D cultures). The reaggregates developed into beating cardiomyocytes, whereas the monolayer cultures did not (Online Figure V, D). Reaggregate cultures expressed such cardiac-specific genes as *Myl7* (encoding Mylc2a), *Myh6* (encoding myosin heavy chain α), and *Tnni3* (encoding cTnI) (Figure 5A). In contrast, smooth muscle genes, including *Tagln* (encoding SM22 α), *Acta2* (encoding smooth muscle actin, SMA), and *Myh11* (encoding smooth muscle myosin heavy chain [SMMMyhc]), were expressed in the monolayer cultures. Interestingly, adding Wnt3a (wingless-related MMTV integration site 3A) to the reaggregates inhibited cardiac differentiation (Figure 3C). Wnt, however, did not increase the levels of smooth muscle markers, suggesting that it did not drive the progenitors to a smooth muscle fate. Immunostaining experiments revealed that aggregates expressed the cardiac muscle proteins Myhc and cTnI, whereas the

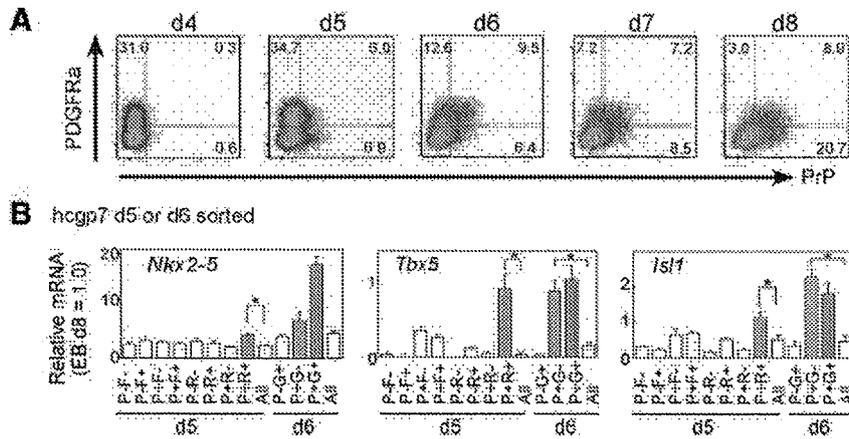


Figure 4. The PrP⁺PDGFR α ⁺ (P α) population contains bipotential cardiomyogenic progenitors that can differentiate into cardiomyocytes or smooth muscle cells. **A**, Flow cytometric analysis of EBs using PrP- and PDGFR α -specific antibodies. PrP⁺ cells detected on day 5 were PDGFR α ⁺ or PDGFR α ⁻. The expression profiles of PDGFR α and PrP overlapped on day 6 and then gradually receded as differentiation proceeded. **B**, RT-PCR analysis of hcgp7-derived cells sorted using PrP (P), PDGFR α (R), Flk1 (F), and GFP (G). PrP⁺ cells on day 5 were PDGFR α ⁺ or PDGFR α ⁻ and Flk1^{Low} (see Online Figure II). Compared with the unsorted fraction, Nkx2.5, Tbx5, and Isl1 were expressed at significantly higher levels in the P⁺R⁺ fraction (pink bars) and P⁺G⁺ fraction (green) on day 6. Error bars represent the SEM (n=3 independent samples for each group). *P<0.05 from an unpaired Student *t* test. Other marker genes are shown in Online Figure II.

monolayer cells expressed such smooth muscle proteins as SMA, SM22 α , and calponin (Figure 5B). SMM α Myhc, a very specific marker of smooth muscle cells,⁸ was also detected in the monolayer cells. These results suggested that the

P α cell fraction contained 2 different lineages and/or bipotential progenitors. To examine the latter possibility, we next cultured single cells isolated from days 5 to 5.5 EBs in methylcellulose (MEC). Typically, \approx 100 colonies

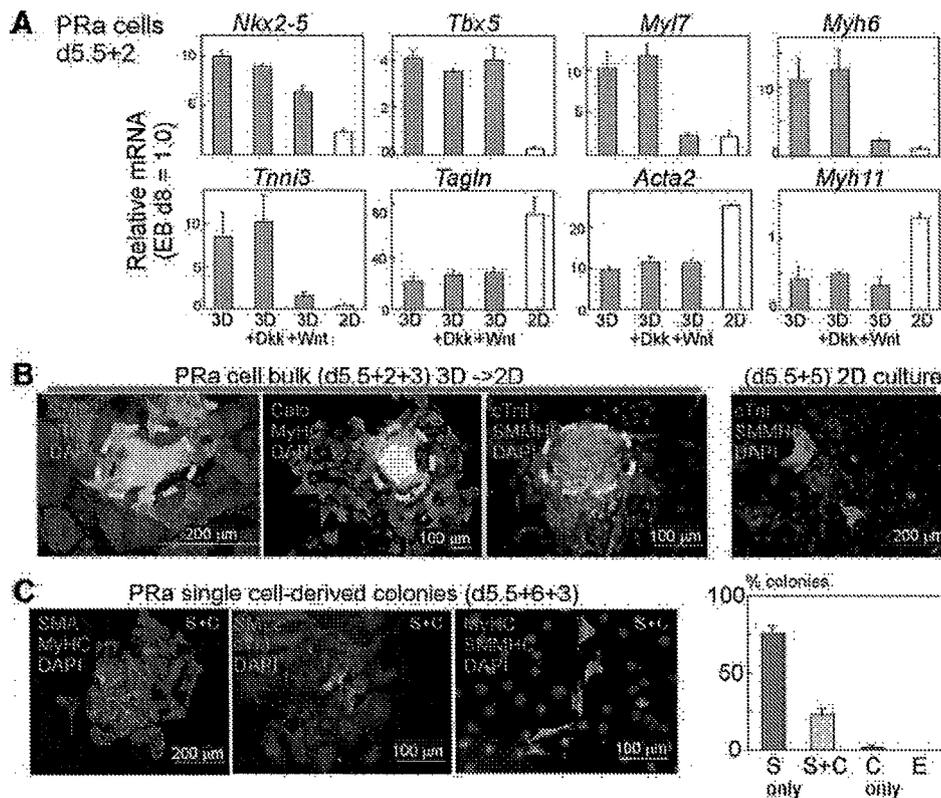


Figure 5. Developmental potential of P α cells. **A**, Differentiation of reaggregated cultures of P α cells. P α cells sorted on day 5.5, at which point the cells were still negative for Myhc (Online Fig V), were allowed to differentiate as reaggregates (3D) or sparse monolayers (2D) with or without Wnt or the Wnt inhibitor Dkk1 (dickkopf homolog 1). After 2 days of culture, cardiac (*Myh7*, *Myh6*, *Tnni3*) and smooth muscle (*Tagln*, *Acta2*, *Myh11*) markers were analyzed in RT-PCRs. Error bars represent the SEMs (n=3 independent samples for each group). **B**, Immunostaining of 3D or 2D cultures of P α cells for cardiac and smooth muscle marker proteins. P α cells sorted on day 5.5 were aggregated in an ultralow binding plate for 2 days and then transferred to a gelatin plate for 3 days (3D \rightarrow 2D) or were cultured on only a gelatin plate for 5 days (2D). Beating aggregates (marked with the dotted lines) strongly expressed the cardiac proteins Myhc and cTnI. Monolayer cells expressed a number of smooth muscle cell markers, including SMA, SM22, calponin, and SMM α Myhc. **C**, Expansion and differentiation of single P α cells. P α cells sorted on day 5.5 were expanded in MEC at clonal density for 6 days and colonies derived from single cells were transferred to gelatin-coated multiwell plates for immunostaining. Colonies composed of SMA⁺Myhc⁻ smooth muscle cells only (S only), SMA⁺Myhc⁻ smooth muscle cells and SMA⁺Myhc⁺ cardiac muscle cells (S+C), Myhc⁺SMA⁺ cardiac muscle cells only (C only), or platelet/endothelial cell adhesion molecule-positive endothelial cells (E) were counted. Error bars represent the SEMs (n=5 independent samples for each group).