

201006002A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

「ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の
分化誘導と移植医療応用に関する研究」
平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山下 潤

平成23 (2011) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告	1
ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究		
山下 潤		
II. 分担研究報告	7
1. ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究		
池田 義		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	13

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

総括研究報告書

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

研究代表者 山下 潤

研究要旨

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

平成 22 年度においては、マウス ES 細胞において開発した新しい高効率心筋および心筋前駆細胞誘導法をマウス及びヒト iPS 細胞に応用し、同細胞からの効率的な心筋細胞分化誘導法の開発と、誘導心筋細胞 (マウス) のラット心筋梗塞モデルへの移植、特に新しい細胞シートを用いた移植法の検討を行った。

分担研究者

池田 義 (京都大学医学部心臓血管外科学 准教授)

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

研究協力者

山中伸弥 (京都大学 iPS 細胞研究所 所長)

A. 研究目的

2007年京都大学再生医科学研究所山中伸弥教授らにより樹立された成人皮膚細胞由来の幹細胞であるヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)(Takahashi, Cell, 2007)は、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同等の分化能を有

研究代表者はこれまで ES 細胞を用いた心血管分化再生研究を行ってきた。すなわち、ES 細胞から心血管細胞の新しい分化誘導法を開発した(Nature, 2000; FASEB J, 2005)。サルおよびヒ

ト ES 細胞の心血管分化研究も行っている(**Circulation**, 2003; **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2007)。

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

B. 研究方法

①マウス iPS 細胞からの効率的な心血管細胞分化誘導法の開発

研究代表者らは、未分化マウス ES 細胞から中胚葉マーカー Flk1 を発現する細胞を分化誘導・純化し、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として種々の心血管系細胞を分化誘導するシステムを構築している(**Nature**, 2000; **FASEB J**, 2005 ほか)。心筋細胞系列に関しては、マウス ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することにより、2次元培

養下・単一細胞から心筋細胞を分化誘導できる。また高い心筋分化能を有する新しい心筋前駆細胞(FCV 細胞)の同定に成功している(**FASEB J**, 2005)。この分化系を用いて効率的な心筋分化を誘導する物質・増殖因子等の探索をおこない、免疫抑制剤サイクロスポリン A を Flk1 陽性細胞に添加すると心筋細胞及び FCV 心筋前駆細胞を特異的に増加させた(約 20 倍)。ES 細胞由来心筋前駆細胞を特異的に増加させる初めての方法として **Biochem Biophys Res Commun** 誌に報告する(Yan, 2009)とともに国際特許出願を行った(PCT/JP2008/066033)。

同システムをマウス iPS 細胞に適用し、マウス iPS 細胞からの効率的な心筋細胞及び心筋前駆細胞の分化誘導を行った。

②ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導とサイクロスポリン A による誘導の効率化

2003年Mummery C.らはマウス胎仔由来内胚葉様ストローマ細胞 END2細胞をヒトES細胞と共培養することにより、心筋細胞を誘導できることを報告している(**Circulation**, 2003)。END2細胞をMummery氏より供与を受け、ヒトiPS細胞からの心筋分化誘導を行った。また同方法にサイクロスポリンAの成果を導入し、ヒト心筋細胞分化誘導の効率化を試みた。

③細胞シート技術を用いた心筋細胞シート移植

研究代表者は、東京女子医科大学岡野光夫教授・清水達也准教授らとの共同研究を約8年前より開始しており、温度応答性培養皿を用いた細胞シート技術のES細胞への導入を進めてきた。②により潤沢に心筋細胞が得られるようになり、本研究が急速に進展した。マウスES細胞から誘導した心筋細胞を温度応答性培養皿上で培養後、心筋細胞シートとして回収する。心筋細胞シートをラット心筋梗塞モデルの梗塞巣上に貼付し、心機能や梗塞巣の変化を解析した(分担研究者・池田ら)。

C. 研究結果

①マウス iPS 細胞からの効率的な心血管細胞分化誘導法の開発

昨年度までに研究代表者らは、マウスES細胞において用いた方法をマウスiPS細胞に適用し、マウスiPS細胞から種々の心血管細胞を分化誘導することに成功している(Narazaki, *Circulation*, 2008. 本論文は、2008年 *Circulation* 誌掲載全論文中から基礎科学部門第1位 Best Paper Award を受賞し高く評価された。) 同分化系にサイクロスポリン法を導入し効率的な心筋細胞及び心筋前駆細胞の誘導を行った。マウスiPS細胞由来Flk1

陽性細胞をOP9細胞上で培養する際に1-3ug/mLのサイクロスポリンAを添加することにより、誘導される心筋細胞量が約10倍増加した。また心筋細胞分化過程の中間段階において、Flk1陽性/CXCR4陽性/血管内皮カドヘリン陰性の細胞群(FCV細胞)が心筋前駆細胞であることを示してきたが(Yamashita, *FASEB J*, 2005)、マウスiPS細胞においても同細胞が存在し、さらにサイクロスポリンA投与によりFCV細胞が約数倍増加し、全体の約30%あまりをFCV細胞に分化誘導することが可能となった。

②ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導とサイクロスポリン A による誘導の効率化

ヒトiPS細胞をマウス内胚葉系ストローマ細胞END2上で培養することにより、拍動心筋細胞を誘導することに成功した。未分化ヒトiPS細胞をEND2細胞上で培養すると培養後約10日目あたりから拍動心筋細胞が出現した。心筋細胞出現の時間及び効率性はヒトES細胞とほぼ同様であった。

この成果にサイクロスポリンA法を導入し、ヒトiPS細胞からの効率的な心筋細胞誘導を試みた。未分化ヒトiPS細胞をEND2細胞上で培養し、中胚葉段階と考えられる分化8日目にサイクロスポリンAを投与したところ、拍動細胞コロニー総数及び拍動コ

ロニー出現率が約4倍あまりに増加した。サイクロスポリンAにより誘導された細胞は、同期したCa取り込みや心筋型活動電位を示し、サルコメア構造、筋線維や豊富なミトコンドリア、グリコーゲン顆粒など心筋としての機能的構造的特徴を備えていた。また薬剤投与に反応して、拍動数の増減及びQT延長現象も確認され、機能的ヒト心筋のモデル細胞としての特質を備えていた。このようにヒトiPS細胞からの機能心筋細胞を誘導する基盤技術の開発に成功した。

③細胞シート技術を用いた心筋細胞シート移植

積層化したマウスES細胞由来心筋細胞シートをラット心筋梗塞モデルに移植した。心筋細胞シートを貼付した群では、2週後、4週後のいずれにおいても左室収縮率の有意な改善が認められた。組織学的検討では細胞シート貼付群で、梗塞部の繊維化領域の有意な縮小が認められた。また、生着した心筋細胞の周囲を中心に、新生血管の著明な増加を認めた。移植後4週目では生着細胞はごく少数であり、移植による心機能回復はサイトカインを介したパラクライン効果によるものが主であると考えられた。定量性RT-PCR解析により、細胞シートにおいて血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)な

どの発現亢進が認められ、これらの因子による血管新生促進効果が、結果的に心機能回復につながっているものと考えられた。

D. 考察

2008年研究代表者らが世界に先駆けて成功したマウスiPS細胞からの心筋など循環器系細胞の系統的分化誘導法と2009年に見出したサイクロスポリンAによる新しい心筋分化誘導促進作用を組み合わせ、マウスiPS細胞からの心筋細胞及び心筋前駆細胞の効率的分化誘導を初めて可能にした。また、END2細胞を用いたヒトES細胞心筋分化誘導法をヒトiPS細胞に導入し、ヒト心筋細胞の誘導に成功するとともに、サイクロスポリンA法を導入し、ヒトiPS細胞においてもサイクロスポリンA法が有効であることを示した。誘導されたヒト心筋細胞は機能的形態的に心筋としての特性を満たし、ヒト心筋モデル細胞樹立のための基本的技術基盤の確立に成功した。これらの結果は論文として発表(Fujiwara, **PLoS One**, 2011)するとともに特許申請を行っている。

細胞移植に関しては、サイクロスポリンA法により心筋分化誘導効率が向上したことにより飛躍的に研究が進展した。系統的に心血管細胞が誘導可能な研究代表者のマウスES細胞分

化誘導法と温度感受性培養皿による細胞シート技術を組み合わせ、心筋細胞シートを作製し、ラット心筋梗塞モデルへの移植を行い、明らかな新機能の改善をもたらすことに成功している。さらにその分子・細胞機構の解析を行い、細胞シート由来の種々の液性因子と血管新生誘導が重要な役割を果たしていることを見出している。今後②の成果等を応用してヒト iPS 細胞に研究を展開し、ヒト細胞シートによる細胞移植治療の開発を目指す。

E. 結論

iPS 細胞からの心筋分化誘導法、その促進方法、細胞移植法等、本研究課題推進において必要とされるヒト iPS 細胞心筋分化技術に関して基盤となる成果を着実にあげることができたと考えられる。さらに心筋シート移植法の進展により当初の予想以上の成果が認められており、今後これらの成果を複合的にヒト iPS 細胞へ応用することにより、同細胞の臨床応用に向けた展開が開けることが大いに期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK*.

Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A.

PLoS One, 6: e16734, 2011

2. Yamamizu K, Yamashita JK*.

Roles of cyclic adenosine monophosphate signaling in endothelial cell differentiation and arterial-venous specification during vascular development.

Circ J, 75: 253-260, 2011 (Review)

3. Yamashita JK.

ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration.

Exp Cell Res, 316: 2555-2559, 2010 (Review)

4. Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, Mitani K, Yamashita JK*.

Convergence of Notch and β -catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors.

J Cell Biol, 189: 325-338, 2010

5. Suzuki H, Shibata R, Kito T, Ishii M, Li P, Yoshikai T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Yamashita JK, Murohara T, Isobe K.

Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells.

BMC Cell Biol, 11: 72, 2010

6. Matsuda M, Yamashita JK, Tsukita S, Furuse M.
abLIM3 is a novel component of adherens junctions with actin-binding activity.
Eur J Cell Biol, 89: 807-816, 2010

<和文総説>

1. 山下 潤. 「iPS細胞を用いた心筋再生」心臓「iPS細胞の循環器疾患への応用」企画：山下 潤. 43: 3-9, 2011
2. 山水康平、山下 潤. 「血管発生のメカニズム：内皮細胞の分化と動脈形成」細胞工学「血管新生を制御する」29: 1075-1081, 2010
3. 山下 潤. 「iPS細胞の発見が心血管再生医学研究に与えるインパクト」Cardiac Practice 特集「心血管系の再生医学」21: 17-22, 2010
4. 山下 潤. 「血管内皮細胞の発生・分化—血管多様性研究のプロローグ」実験医学増刊「血管研究と血管治療」28: 28-35, 2010. 羊土社
5. 山下 潤. 「iPS細胞の展望」Cardiovascular Frontier 別冊「特集再生医療」1: 111-117, 2010

6. 山下 潤. 「心不全に対する iPS 細胞の臨床応用」医学の歩み「心不全 —研究と臨床の最前線—」232: 559-605, 2010. 医歯薬出版

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 名称：新規環状デシペプチドおよびその用途
国際出願番号：61/334,961
発明者：中尾洋一、勝俣良祐、山下 潤
出願人：早稲田大学、京都大学
出願日：2010年5月14日
2. 名称：Efficient and specific expansion of highly cardiogenic progenitors and cardiomyocytes from embryonic and induced pluripotent stem cells
PCT 国際出願
出願番号：PCT/JP2008/066033
発明者：顔培実、山下 潤
権利者：国立大学法人京都大学
出願日：2008年8月29日
出願公開
公開番号：W02009/118928
公開日：2009年10月1日

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

分担研究報告書

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

研究分担者 池田 義

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

A. 研究目的

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

本年度は、昨年度までに認めた細胞シート移植による心機能回復のメカニズムの解析を重点的に研究した。

B. 研究方法

iPS 細胞由来心筋細胞移植の前段階として、より心筋分化効率が高いマウス EMG7 細胞 (α MHC-EGFP transgenic EB5) を用いて研究を行った。既に発表した方法により、マウス ES 細胞から心筋細胞等への分化誘導を行い (Yamashita J et al. Nature 408: 92-6, 2000, Yamashita JK et al.

FASEB J. 19: 1534-6, 2005)、温度感受性培養皿上で培養して心筋細胞シートを作製した。作製した心筋細胞シートを in vitro で積層化し、左前下行枝結紮により心筋梗塞を誘導した無胸腺ラット (F344/N Jcl-rnu/rnu) モデルに対して、梗塞部に貼付することで細胞移植を行った。移植後 2 週および 4 週目に心臓超音波および心臓カテーテル検査による生理学的心機能評価、病理組織学的評価を行った。

C. 研究結果

心筋細胞シートを貼付した群では、2 週後、4 週後のいずれにおいても心臓超音波検査によって左室収縮率の有意な改善が認められた。同様に心臓カテーテル検査によっても、左心室の収縮能の指標である E_{max} が有意に上昇することが明らかとなった。

組織学的検討ではシリウスレッド

染色による線維化部位の計測を行い、細胞シート貼付群で、梗塞部の繊維化領域の有意な縮小が認められた。また、生着した心筋細胞の周囲を中心に、新生血管の著明な増加を認めた。

また、移植後1週目の段階で梗塞巣に移植されたマウス心筋細胞の生着が確認されたが、4週目では生着細胞は認められるもののごく少数であり、移植による心機能回復はサイトカインを介したパラクライン効果によるものが主であると考えられた。

定量性 RT-PCR 法による細胞シートの遺伝子発現パターン解析により、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)などの発現亢進が認められ、これらの因子による血管新生促進効果が、結果的に心機能回復につながっているものと考えられた。

D. 考察

マウス ES 細胞から分化誘導させた心筋細胞等からなる細胞シートを製作した。このシートを用いてラット心筋梗塞モデルに対して、細胞移植を行い、*in vivo* で心機能改善効果が認められることを明らかにした。さらにそのメカニズム解析の結果、各種サイトカインを介した血管新生効果が心機能改善に大きく寄与しているものと考えられた。

E. 結論

幹細胞から分化誘導させた心筋細胞を用いて、ラット心筋梗塞モデルに対して細胞シート移植を行い、虚血部位の血管新生に伴う心機能の改善、左室リモデリングの抑制を得ることができた。

F. 研究発表

1. Takeda T, Shimamoto T, Marui A, Saito N, Uehara K, Minakata K, Miwa S, Nakajima N, Ikeda T, Hyon SH, Sakata R. Topical application of a biodegradable disc with amiodarone for atrial fibrillation. *Ann Thorac Surg*. 2011;91(3):734-9.
2. Bir SC, Esaki J, Marui A, Sakaguchi H, Kevil CG, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y, Sakata R. Therapeutic Treatment with Sustained-Release Platelet-Rich Plasma Restores Blood Perfusion by Augmenting Ischemia-Induced Angiogenesis and Arteriogenesis in Diabetic Mice. *J Vasc Res*. 2010;48(3):195-205.
3. Yanagi S, Matsumura K, Marui A, Morishima M, Hyon SH, Ikeda T, Sakata R. Oral pretreatment with a green tea polyphenol for cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in an isolated

rat heart model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;141(2):511-7.

4. Muranaka H, Marui A, Tsukashita M, Wang J, Nakano J, Ikeda T, Sakata R. Prolonged mechanical unloading preserves myocardial contractility but impairs relaxation in rat heart of dilated cardiomyopathy accompanied by myocardial stiffness and apoptosis. *J*

Thorac Cardiovasc Surg. 2010;140(4):916-22.

5. Morishima M, Marui A, Yanagi S, Nomura T, Nakajima N, Hyon SH, Ikeda T, Sakata R. Sustained release of vancomycin from a new biodegradable glue to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* graft infection. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010;11(1):52-5.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, <u>Yamashita JK</u>	Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A.	PLoS One	6	E16734	2011
Yamamizu K, <u>Yamashita JK</u>	Roles of cyclic adenosine monophosphate signaling in endothelial cell differentiation and arterial-venous specification during vascular development.	Circ J	75	253-260	2011
<u>Yamashita JK</u>	ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration.	Exp Cell Res	316	2555-2559	2010
Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, Mitani K, <u>Yamashita JK</u>	Convergence of Notch and β -catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors.	J Cell Biol	189	325-338	2010
Suzuki H, Shibata R, Kito T, Ishii M, Li P, Yoshikai T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, <u>Yamashita JK</u> , Murohara T, Isobe K.	Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells.	BMC Cell Biol	11	72	2010
<u>Matsuda M, Yamashita JK, Tsukita S, Furuse M.</u>	abLIM3 is a novel component of adherens junctions with actin-binding activity.	Eur J Cell Biol	89	807-816	2010

山下 潤	iPS細胞を用いた心筋再生	心臓	43	3-9	2011
山水康平、山下 潤	血管発生のメカニズム：内皮細胞の分化と動静脈形成	細胞工学	29	1075-1081	2010
山下 潤	iPS細胞の発見が心血管再生医学研究に与えるインパクト	Cardiac Practice	21	17-22	2010
山下 潤	血管内皮細胞の発生・分化－血管多様性研究のプロローグ	実験医学増刊「血管研究と血管治療」	28	28-35	2010
山下 潤	iPS細胞の展望	Cardiovascular Frontier別冊「特集再生医療」	1	111-117	2010
山下 潤	心不全に対するiPS細胞の臨床応用	医学の歩み「心不全－研究と臨床の最前線－」	232	559-605	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Induction and Enhancement of Cardiac Cell Differentiation from Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells with Cyclosporin-A

Masataka Fujiwara^{1,2}, Peishi Yan^{1,3†}, Tomomi G. Otsuji^{4,5}, Genta Narazaki^{1,6}, Hideki Uosaki^{1,6}, Hiroyuki Fukushima^{1,6}, Koichiro Kuwahara², Masaki Harada², Hiroyuki Matsuda⁷, Satoshi Matsuoka⁷, Keisuke Okita⁸, Kazutoshi Takahashi⁸, Masato Nakagawa⁸, Tadashi Ikeda³, Ryuzo Sakata³, Christine L. Mummery⁹, Norio Nakatsuji^{10,11}, Shinya Yamanaka^{8,12}, Kazuwa Nakao², Jun K. Yamashita^{1,6*}

1 Laboratory of Stem Cell Differentiation, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan, **2** Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan, **3** Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan, **4** Stem Cell and Drug Discovery Institute, Kyoto Research Park, Kyoto, Japan, **5** Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan, **6** Department of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application (CIRA), Kyoto University, Kyoto, Japan, **7** Department of Physiology and Biophysics, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan, **8** Department of Reprogramming Science, Center for iPS Cell Research and Application (CIRA), Kyoto University, Kyoto, Japan, **9** Department of Anatomy and Embryology, Leiden University Medical Centre, Leiden, the Netherlands, **10** Department of Development and Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan, **11** Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, Kyoto, Japan, **12** Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, California, United States of America

Abstract

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are novel stem cells derived from adult mouse and human tissues by reprogramming. Elucidation of mechanisms and exploration of efficient methods for their differentiation to functional cardiomyocytes are essential for developing cardiac cell models and future regenerative therapies. We previously established a novel mouse embryonic stem cell (ESC) and iPSC differentiation system in which cardiovascular cells can be systematically induced from Flk1⁺ common progenitor cells, and identified highly cardiogenic progenitors as Flk1⁺/CXCR4⁺/VE-cadherin⁻ (FCV) cells. We have also reported that cyclosporin-A (CSA) drastically increases FCV progenitor and cardiomyocyte induction from mouse ESCs. Here, we combined these technologies and extended them to mouse and human iPSCs. Co-culture of purified mouse iPSC-derived Flk1⁺ cells with OP9 stroma cells induced cardiomyocyte differentiation whilst addition of CSA to Flk1⁺ cells dramatically increased both cardiomyocyte and FCV progenitor cell differentiation. Spontaneously beating colonies were obtained from human iPSCs by co-culture with END-2 visceral endoderm-like cells. Appearance of beating colonies from human iPSCs was increased approximately 4.3 times by addition of CSA at mesoderm stage. CSA-expanded human iPSC-derived cardiomyocytes showed various cardiac marker expressions, synchronized calcium transients, cardiomyocyte-like action potentials, pharmacological reactions, and ultra-structural features as cardiomyocytes. These results provide a technological basis to obtain functional cardiomyocytes from iPSCs.

Citation: Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, et al. (2011) Induction and Enhancement of Cardiac Cell Differentiation from Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells with Cyclosporin-A. PLoS ONE 6(2): e16734. doi:10.1371/journal.pone.0016734

Editor: Felipe Prosper, Clinica Universidad de Navarra, Spain

Received: November 1, 2010; **Accepted:** December 24, 2010; **Published:** February 22, 2011

Copyright: © 2011 Fujiwara et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, the Ministry of Health, Labour and Welfare, the New Energy and Industrial Development Organization (NEDO) of Japan, the Project for Realization of Regenerative Medicine. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: juny@frontier.kyoto-u.ac.jp

† Current address: Cardiovascular Department, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian, China

Introduction

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are novel pluripotent stem cells generated from adult tissues by reprogramming originally with transduction of a few defined transcription factors, such as Oct4, Sox2, Klf4, and c-myc [1], [2]. Establishment of iPSC lines from adult human tissue is facilitating development of cell transplantation-based regenerative strategies and establishment of patient-derived cells as disease models. Efficient differentiation and dissecting the differentiation mechanisms of target cells would significantly contribute to elucidate the

pathophysiology of diseases and provide a platform for developing new therapeutic strategies for specific diseases through such as drug discovery [3], [4].

Cardiomyocytes are a major target of regenerative medicine. Although cardiomyocyte differentiation has been reported from various progenitor and adult cell sources (e.g. bone marrow, cardiac biopsies, adipose tissue, umbilical cord, mesenchymal cells, etc), overall, the efficiencies of functional cardiomyocyte appearance have been still variable (<1–5%) [5]. Pluripotent cells, embryonic stem cells (ESCs) and iPSCs have thus emerged as among the most promising stem cell sources for inducing

functional cardiomyocytes *in vitro*. Several induction and purification methods have been reported, starting with either mouse or human ESCs. These include stem cell aggregation in suspension and growth as embryoid bodies (EBs), co-culture with stroma cells, serum-free culture in differentiation medium, or hypoxic culture [6], [7], [8], [9], [10], [11]. Overall, the efficiency of cardiomyocyte differentiation in human ESCs [6] should be still lower than in mouse ESCs [8], [11]. In view of the similarities between iPSCs and ESCs, most cardiomyocyte induction methods from iPSCs are based on those tried and tested in ESCs. Several groups have thus reported cardiomyocyte formation from mouse iPSCs using either EBs or stroma cell co-culture [12], [13], [14]. Recently, several reports on cardiomyocyte induction from human iPSCs appeared with based on EB formation though the efficiencies are still varied [15], [16], [17], [18], [19]. Other new methods robust in human iPSCs remain to be explored and maybe of particular value for preparation of transplantation cell sources as well as dissecting the differentiation mechanisms and drug discovery.

Previously, we developed a novel ESC differentiation system that recapitulates early cardiovascular development *in vivo* [8], [20], [21]. Flk1 (also known as vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2) is the earliest differentiation marker for endothelial cells (ECs) and blood cells, and is a marker of lateral plate mesoderm [21], [22]. We induced Flk1⁺ cells from ESCs, purified them by fluorescence-activated cell sorting (FACS), and re-cultured the purified cells. We succeeded in inducing the major cardiovascular cell types from the common Flk1⁺ progenitor cells: vascular ECs, mural cells (pericytes and vascular smooth muscle cells) [20] and cardiomyocytes [8]. When purified Flk1⁺ cells were cultured on mouse bone marrow-derived stromal cells, OP9 cells, spontaneously beating cardiomyocytes as well as ECs can be induced within 3–4 days (Flk-d3-4) even from a single cell. We, thus, demonstrated that ESC-derived Flk1⁺ cells serve as cardiovascular progenitors [8], [20], [23], which was further supported with following several mouse and human studies [9], [24], [25], [26]. We also identified a Flk1⁺/CXCR4⁺/vascular endothelial cadherin⁻ (FCV) population as highly cardiogenic progenitor cells among the progeny of Flk1⁺ mesoderm cells at the single cell level [8]. That is, in an intermediate stage of ESC differentiation between Flk1⁺ mesoderm cells and cardiomyocytes (Flk-d2), purified FCV population could efficiently give rise to cardiomyocytes from a single cell. The cardiogenic potential of FCV cells was 15–20 times higher than that of other cell populations among the Flk1⁺ cell progeny. We further confirmed FCV cells can differentiate into cardiomyocytes *in vivo* through cell transplantation experiments [11]. FCV cells, which are detected just 1–2 days before the cardiomyocyte appearance, are so far the nearest upstream cardiac progenitors to cardiomyocytes. This system proved amenable to induce various cardiovascular cells systematically from ESCs, explore novel differentiation methods, and dissect the differentiation processes [23], [27], [28]. Indeed, we recently succeeded in demonstrating that an immunosuppressant, cyclosporin-A (CSA) showed a novel potent effect specifically on Flk1⁺ mesoderm cells to induce a dramatic increase in FCV cardiac progenitor cells and cardiomyocytes with the use of this ESC differentiation system [11]. That is, when CSA was added to Flk1⁺ cells co-cultured on OP9 cells, appearance of FCV progenitor cells and cardiomyocytes were increased by 10–20 times.

Recently, we were able to systematically induce cardiovascular cells from mouse iPSCs in a way almost identical to that using mouse ESCs [12]. Here, we combined our technologies in ESCs and iPSCs and showed that FCV cardiac progenitors and

cardiomyocytes were efficiently expanded from mouse iPSCs by CSA treatment. Moreover, we extended the CSA method to human iPSCs and showed that CSA also successfully worked in human iPSC differentiation and efficiently enhanced the appearance of spontaneously beating cells. Human iPSC-derived cardiomyocytes showed expected molecular, structural and functional features of human cardiomyocytes. We, thus, succeeded in inducing and enhancing cardiac cell differentiation from both mouse and human iPSCs.

Methods

Antibodies

Monoclonal antibodies (MoAbs) for murine E-cadherin (ECCD2), murine Flk1 (AVAS12) were prepared and labeled in our laboratory as described previously [8], [21], [29]. MoAb for cardiac troponin-T (cTnT) (1:2000) was purchased from NeoMarkers (Fremont, CA). For staining human ESCs and iPSCs, another MoAb for cTnT (1:100) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). MoAbs for murine and human α -actinin (1:800) was from Sigma (St Louis, Mo). MoAb of phycoerythrin (PE)-conjugated AVAS12 was purchased from eBioscience (San Diego, CA). MoAbs for biotinylated-CXCR4 was purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). Anti-HCN4 (1:200) and anti-Cav3.2 (1:200) antibodies were from Chemicon (Temecula, CA). Anti-Kir2.1 (1:200) and anti-connexin 43 (1:200) antibodies were from Alomone (Israel) and Invitrogen (Carlsbad, CA), respectively.

Reagents

Cyclosporin-A (a gift from Novartis Pharma) was dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Nacalai Tesque, Kyoto Japan) at 30 mg/mL. Dilution of 1–3 μ g/mL were made in differentiation medium at the time of use. PKH67 fluorescent dye was purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Mouse iPSC culture

A germline-competent mouse iPSC line, 20D-17, carrying Nanog promoter-driven GFP/IRES/puromycin resistant gene (Nanog-iPS cells), was maintained as previously described [30]. Briefly, iPSCs were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 15% FCS, non-essential amino acids, 1 mmol/L sodium pyruvate, 5.5 mmol/L 2-mercaptoethanol, 50 units/mL penicillin and 50 mg/mL streptomycin on feeder layers of mitomycin-C-treated mouse embryonic fibroblast (MEF) cells carrying stably incorporated puromycin-resistance gene. OP9 stroma cells were maintained as described [21].

Induction of mouse cardiomyocyte differentiation

Induction of Flk1⁺ cells and sorting for Flk1⁺ cells were performed as previously described [8], [12], [20]. Briefly, mouse iPSCs were first plated on to gelatin-coated dishes and cultured for 30 min to eliminate attached feeder cells, then, non-adherent cells were collected and induced to differentiation. Mouse iPSCs were cultured at a density of 1–2.5 $\times 10^3$ cells/cm² in differentiation medium (DM)(alpha minimum essential medium (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum) on type IV collagen-coated dishes (Biocoat, Beckton Dickinson) or mitomycin C-treated confluent OP9 cell sheets (MMC-OP9) for 96–108 h. Cells were collected and selected by FACS to purify Flk1⁺ cells. Flk1⁺ cells were then plated on to MMC-OP9 at a density of 1–10 $\times 10^3$ cells/cm² and cultured in differentiation medium to induce cardiac differentiation. CSA (1–3 μ g/mL) was added to Flk1⁺ cells on OP9 cells. Medium was replaced every 2 days.

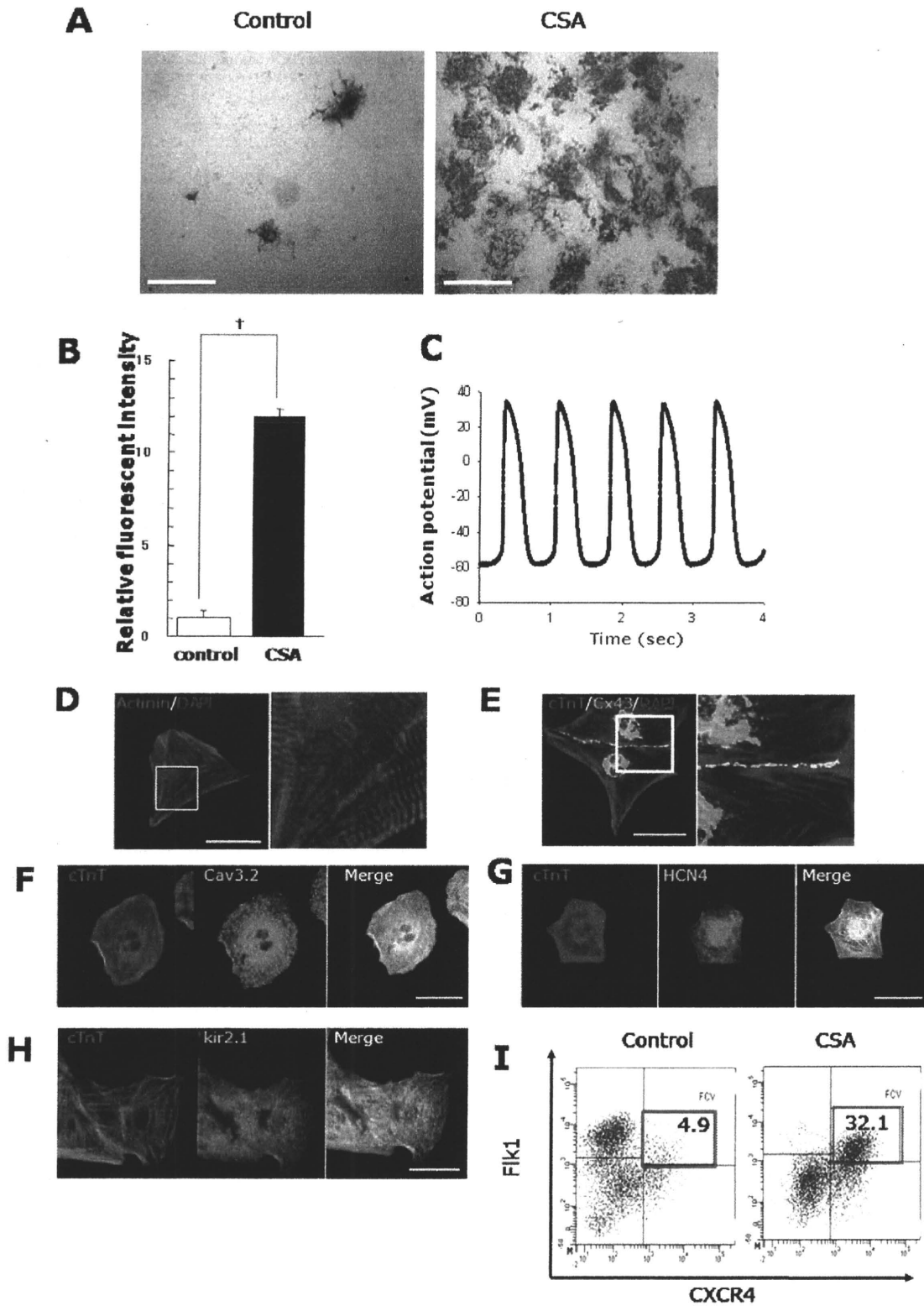


Figure 1. Cardiac cell expansion from mouse iPSC-derived Fik1⁺ mesoderm by CSA. **A.** Gross appearance of cardiomyocyte induction by CSA. Six days after the Fik1⁺ cell culture on OP9 cells (Flk-d6). cTnT staining (brown). Left panel: control. Right panel: CSA treatment. Scale bars = 400 μ m. **B.** Quantitative evaluation of cardiomyocyte induction by fluorescent intensity of cTnT staining. Relative fluorescent intensity is