

くと考えられる。

iPS細胞の樹立によって、成体組織からES細胞様の多能性幹細胞を得ることができるようになったことにより、ヒトES細胞樹立における倫理的問題や移植における免疫の問題とそれに絡むヒトクローン胚の問題も回避され、これらの細胞の再生医療応用におけるハードルは一気に低くなると考えられる。しかし、未分化細胞による奇形腫形成という従来からES細胞に認められている問題は残っていることに加え、iPS細胞誘導時の導入遺伝子の再発現やゲノムへの遺伝子導入等による腫瘍形成の可能性等iPS細胞特有の新しい問題もあり、iPS細胞そのものの改良や分化誘導・純化法等さまざまな技術開発が今後必要である。iPS細胞の出現は、これまでのES細胞研究に数多くの新たな可能性を与えた。極端な熱狂や批判に走ることなく、冷静にかつ良識と叡知を持ってiPS細胞の今後に対応していくことが必要と考えられる。iPS細胞研究が健全に成長することにより、分化再生機構の基礎研究から、再生治療法の開発や創薬とその産業化に至るまで、ES細胞研究が持っていたポテンシャルがさまざまな形で臨床応用へ向けて花開き、人々の幸福に貢献していくことを期待する。

#### 参考・引用文献

---

- 1) K. Takahashi et al. : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, pp.663-676(2006).
- 2) K. Takahashi et al. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, pp.861-872(2007).
- 3) M. Nakagawa et al. : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, *Nat. Biotechnol.*, **26**, pp.101-106(2008).
- 4) J. Yamashita et al. : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors, *Nature*, **408**, pp.92-96(2000).
- 5) J. K. Yamashita et al. : Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction, *FASEB J.*, **19**, pp.1534-1536(2005).
- 6) D. J. Garry et al. : A common progenitor at the heart of development, *Cell*, **127**, pp.1101-1104(2006).
- 7) T. Yurugi-Kobayashi et al. : Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, pp.1977-1984(2006).
- 8) T. Kono et al. : Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, pp.2070-2076(2006).
- 9) J. K. Yamashita : Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors, *Trends Cardiovasc. Med.*, **17**, pp.59-63(2007).
- 10) J. K. Yamashita : Differentiation and diversification of vascular cells from embryonic

- stem cells, *Int. J. Hematol.*, **80**, pp.1-6(2004).
- 11) T. Yurugi-Kobayashi et al. : Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage, *Blood*, **101**, pp.2675-2678(2003).
  - 12) M. Sone et al. : Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells, *Circulation*, **107**, pp.2085-2088(2003).
  - 13) M. Sone et al. : Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, pp.2127-2134(2007).
  - 14) K. Yamahara et al. : Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells, *PLoS One*, **3**, p.e1666(2008).
  - 15) G. Narazaki et al. : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells, *Circulation*, **118**, pp.498-506(2008).
  - 16) Y. Nakao et al. : Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells, *Bioorg Med Chem Lett.*, **18**, pp.2982-2984(2008).

## 1. iPS細胞と心血管再生

京都大学再生医科学研究所幹細胞分化制御研究領域准教授 山下 潤

key words embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, regeneration, differentiation

### 動 向

ES細胞（胚性幹細胞 embryonic stem cells）は、マウスやヒトの早期胚（胚盤胞 blastocyst）の段階において、将来胎仔を形成する内細胞塊 inner cell mass とよばれる部位を取り出して樹立した細胞株であり、体中全ての種類の細胞に分化することのできるいわゆる万能の幹細胞と考えられている。マウスES細胞の樹立は1981年であり、マウスES細胞から拍動心筋細胞が誘導されることは1985年には報告されているが、ES細胞の医学・生物学における大きな貢献は、再生医学ではなくノックアウトマウスなどの様々な遺伝子改変マウスの樹立を可能にしたことであった。実際マウスES細胞を樹立したMartin Evans博士は、2007年のノーベル医学生理学賞をノックアウトマウスの開発を行った研究者らと共同受賞している。1990年代後半から、神経幹細胞の発見など成体の中に存在する体性幹細胞/組織幹細胞に関する研究とともにES細胞を含めた幹細胞の再生医学応用に関する研究が急速に盛んになってきた。1998年末のヒトES細胞樹立により、幹細胞の再生医療応用はさらに現実味を帯びて語られるようになってきた。しかし、ヒトES細胞においては、①技術・安全面の問題、特に未分化ES細胞があやまって移植されると奇形腫を形成する

可能性がある、ということに加えて、②倫理面の問題、すなわち i) ヒトES細胞の樹立の際にヒト受精卵を壊す必要がある、ii) 免疫による拒絶を受けないES細胞を樹立するためにヒト体細胞クローン胚（成体細胞の核を除核未受精卵に核移植したクローン胚）を作る必要が考えられる、ということが実際の応用への大きな障壁になっていた。こうした状況を背景に生まれてきた新しい幹細胞がiPS細胞（人工多能性幹細胞 induced pluripotent stem cells）である。

iPS細胞は、線維芽細胞など分化した細胞に特定の遺伝子群（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-mycなど）を導入することにより、ES細胞様の万能の幹細胞の性質をもたせることに成功した細胞であり、形態、遺伝子発現パターンに加えて、分化能力やiPS細胞をもとに最終的にiPS細胞由来のマウス個体を作製できることなど、ES細胞としての大きな特性を満たしている。最初のiPS細胞は2006年京都大学の山中らによって報告された<sup>1)</sup>。2007年には山中ら及びThomsonら<sup>2,3)</sup>、その後さらに多くの他のグループによりヒトiPS細胞の樹立が報告された。ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞において認められた倫理的問題、上記の②-i), ii)を一気に回避できる画期的発明であり、「iPS細胞を用いてすぐにも再生医療が実現できるので

はないか」というようなある種の熱狂を生み出した。しかし、iPS細胞には依然として上記①の奇形腫の問題は存在しているし、iPS細胞特有の「遺伝子導入による細胞変異・がん化の問題」など新たな問題もあり、今後地道に解決すべき課題は多い。これら iPS細胞を巡る可能性と問題点について、循環器領域との関連を中心に概説する。

### A. iPS細胞からの心血管細胞分化

筆者らはこれまでマウス及びヒトES細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究を行ってきた。すなわち、マウス未分化ES細胞からVEGF（血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor）の受容体の一つであり、血管内皮・血球の前駆細胞や中胚葉細胞のマーカーでもあるFlk1（2型VEGF受容体 VEGF receptor-2）を発現する細胞を誘導し、Flk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞、血管壁細胞、血球細胞、心筋細胞といった循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功している<sup>4,5)</sup>。この新しい分化誘導システムを用いて、ES細胞由来の

心筋前駆細胞の同定<sup>5)</sup> や動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれES細胞から誘導すること<sup>6,7)</sup> にも成功している。ヒトES細胞からの血管細胞の誘導や虚血モデルへの移植実験などにも関与している<sup>8,9)</sup>（京都大学内分泌代謝内科との共同研究）。このマウスES細胞の系統的心血管細胞分化システムをマウスiPS細胞に導入し、筆者らはいち早くiPS細胞からのこれら心血管細胞の分化誘導に成功した<sup>10)</sup>。すなわち、未分化マウスiPS細胞をLIF (leukemia inhibitory factor) 非存在下に培養することによりFlk1陽性細胞が誘導された。Flk1陽性細胞をVEGF及び血清存在下に培養することにより主に静脈を中心とする内皮細胞及び壁細胞が（図1）、VEGFに加えてcAMPシグナルを刺激することにより動脈内皮細胞が（図2）、OP9ストローマ細胞上で培養することにより血球、リンパ管内皮細胞（図3）、心筋細胞が（図4）、それぞれ誘導された。マウスiPS細胞からのFlk1陽性細胞、（動静脈リンパ管）内皮細胞、壁細胞の分化様式、分化効率等はほとんどマウスES細胞と変わりがなかった。心筋分化に関しては、多少分化効率が低い傾向が認められたが、ES細胞

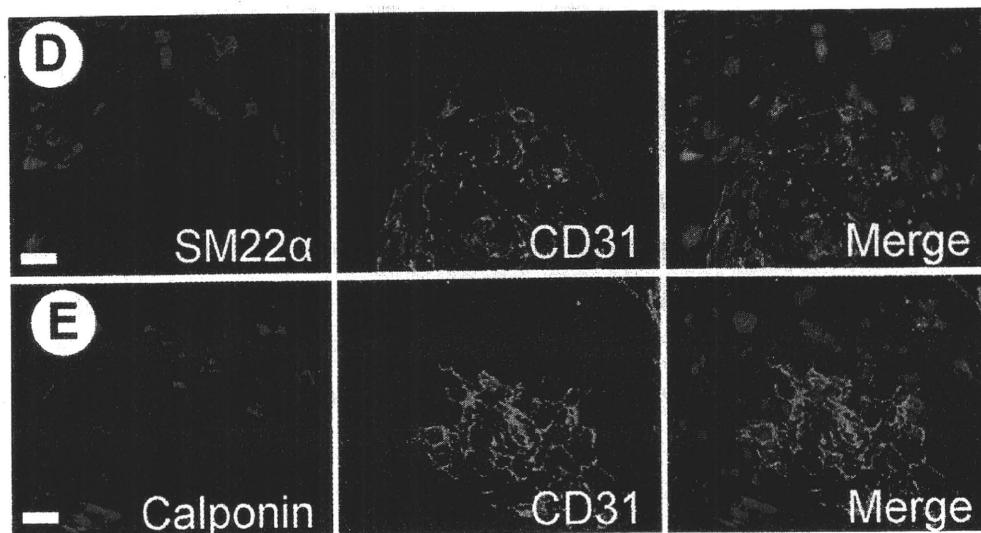


図1 マウスiPS細胞からの血管内皮・壁細胞分化（文献10より改変）  
マウスiPS細胞由来Flk1陽性細胞をVEGF及び血清存在下で培養することにより、CD31陽性内皮細胞（緑）とSM22αまたはカルボニン陽性壁細胞（赤）が選択的に誘導される。



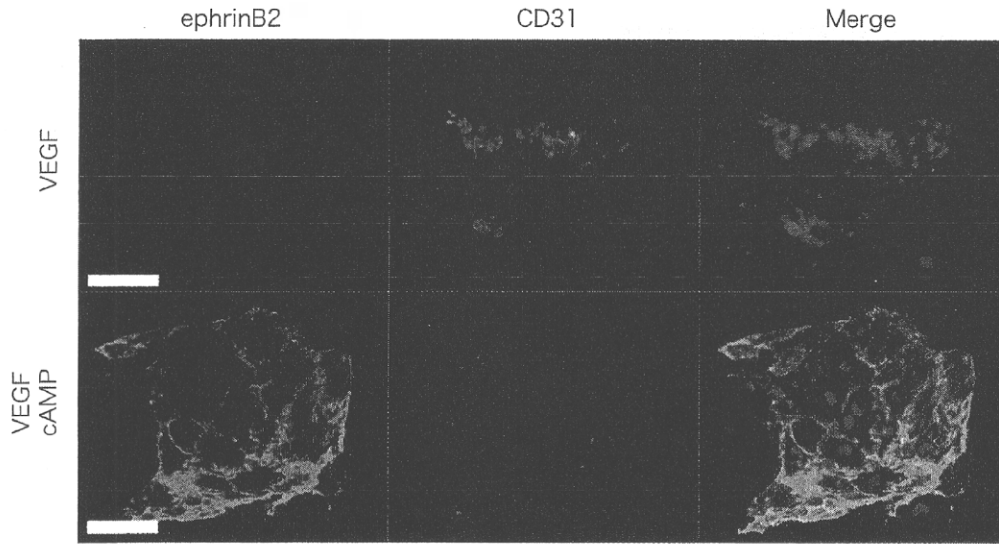


図2 マウスiPS細胞からの動静脈内皮細胞分化 (文献10より改変)

Flk1 陽性細胞を VEGF 及び血清存在下で培養した場合, その大部分が CD31 陽性 / ephrinB2 陰性の静脈内皮細胞となる (上段). VEGF に加え 8bromo-cAMP を投与し cAMP シグナルを活性化すると CD31 陽性 / ephrinB2 陽性動脈内皮細胞が出現する (下段).

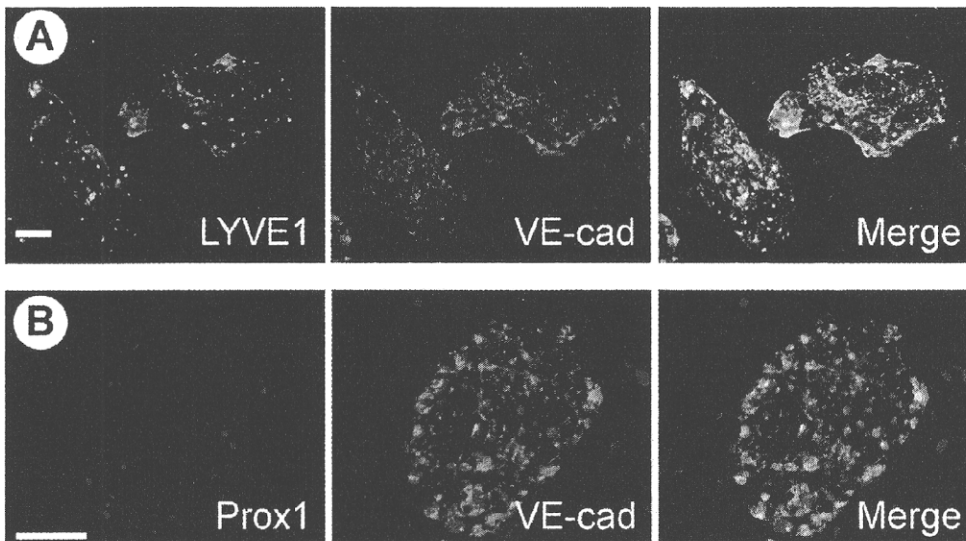


図3 マウスiPS細胞からのリンパ管内皮細胞分化 (文献10より改変)

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, LYVE1 陽性 (A) または prox1 陽性 (B) かつ VE-カドヘリン陽性のリンパ管が誘導される.

において通常認められる細胞株間の差異の範囲内のものであった. このように, マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞はほぼ完全に同等な心血管分化能と分化動態を示し, マウス ES 細胞と同様に系統的に心血管細胞を分化誘導することが可能であ

た (図5). ただし, マウス iPS 細胞を樹立する際に外来性に導入された遺伝子群の発現が長期分化培養中に再上昇したようにみえる例が観察された. 明らかにがん化したような細胞や未分化になった細胞が出現することはなかったが, ES 細

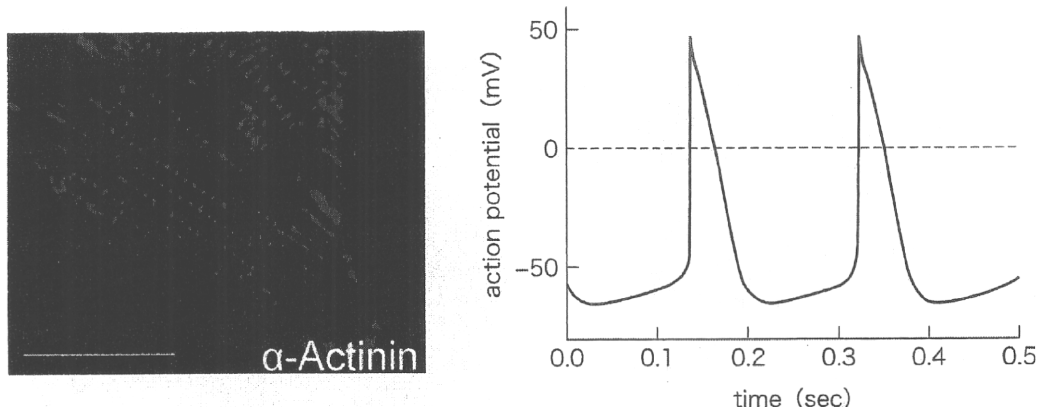


図4 マウスiPS細胞からの心筋細胞分化 (文献10より改変)

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、拍動心筋細胞が出現する。拍動細胞はsarcomere構造を示し(左: 赤; アクチニン染色)、ペースメーカー細胞様の活動電位を示す(右)。

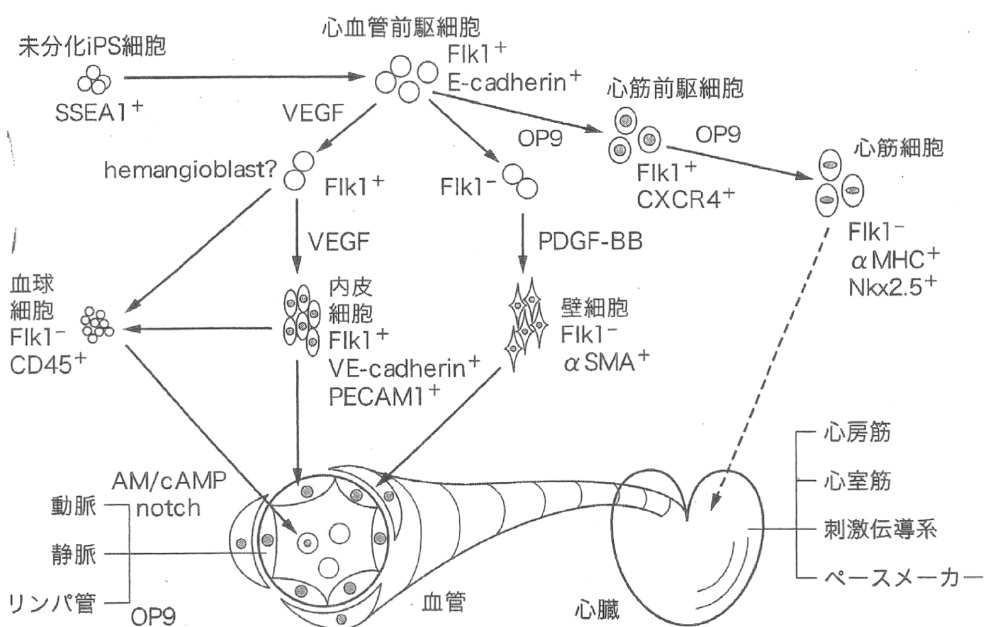


図5 マウスiPS細胞からの系統的心血管細胞分化 (文献10より改変)

マウスiPS細胞から誘導したFlk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、心血管系の構成細胞である血管内皮、壁細胞、心筋細胞、さらには動静脈リンパ管内皮細胞や種々の心筋細胞を系統的に分化誘導することができる。

胞とは異なりiPS細胞独特の問題である導入遺伝子の影響については慎重に対応する必要があると考えられた。他にマウスiPS細胞からの心血管細胞分化に関しては筆者らと同時期に、心筋細胞を誘導したとの報告<sup>11)</sup>と筆者らに類似した分化システムを用いた報告<sup>12)</sup>のそれぞれ1報があるの

みである(2008年7月末現在)。

## B. ヒトiPS細胞からの分化

筆者らはヒトiPS細胞の心血管細胞分化にも取り組んでいる。ヒトES細胞の維持培養条件に準

じた環境で誘導・樹立されたヒトiPS細胞は、その維持及び分化誘導においてもヒトES細胞に類似した動態を示した。心筋細胞分化に関しては、ヒトiPS細胞樹立の論文内において拍動細胞が誘導可能であったことはすでに報告されているが、その効率や機能的解析については明らかになっていない。筆者らは、ヒトES細胞において報告されている心筋分化誘導法<sup>13)</sup>に準じて培養することにより、自己拍動する心筋細胞コロニーの誘導にすでに成功している。心筋に特徴的なsarcomereの形成や自己拍動に同調したCa<sup>2+</sup>の取り込みなど形態的機能的特性も確認している(未発表)。現在のところヒトiPS細胞からの特定の細胞の分化誘導に関しては、心血管以外も含めてまだ報告はない。

マウスES細胞とマウスiPS細胞、ヒトES細胞とヒトiPS細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有していると考えられる。今後のiPS細胞研究においては、マウス及びヒトES細胞研究がその土台となり、また常に比較対象のスタンダードとなると考えられる。iPS細胞の出現によって、ES細胞研究は衰退するどころかさらにその重要性を増すものと考えられる。

## C. iPS細胞研究の循環器領域における意義

ES細胞、iPS細胞研究の循環器領域における意義はやはり心血管再生治療への応用が中心的に期待されると考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築という新しいアプローチができることによる病態解明や創薬治療応用などさまざまな形で臨床面への貢献が可能である。

### 1. 誘導細胞の細胞移植応用

ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞に存在した倫理

面的問題、及び患者特異的iPS細胞を樹立できることにより移植免疫の問題も回避できるため、細胞移植による再生医療応用が期待されている。循環器領域においても、心筋再生による心筋梗塞や心筋症その他の心不全治療、血管再生による虚血性疾患の治療、生物学的ペースメーカーによる洞不全症候群等の治療などが細胞治療ターゲットとして想定される。しかし、ヒトiPS細胞を用いたこれら細胞治療の実現に至るまでには数多くの乗り越えるべきハードルが残っている。

#### a. 効率的な心血管分化誘導法及び純化法の開発

ヒトの心筋梗塞においては10<sup>9</sup>個オーダーに至る心筋細胞が死ぬともいわれている。そのレベルの細胞数を用意することが可能な効率的誘導法を開発する必要がある。現在までで最も効率が良いと考えられるヒトES細胞からの心筋分化誘導法において、ヒトES細胞1個から心筋細胞3個と報告されている<sup>14)</sup>。また、ヒトiPS細胞はヒトES細胞と同様に奇形腫を形成するので、未分化ヒトiPS細胞を厳密に除去できる細胞純化法が必要である。

#### b. 移植用細胞の開発

最終的にヒトに対して細胞を移植するためには、単に細胞を誘導して純化するというだけでは不十分で、GMP基準の医薬品と同様な品質管理の元に移植用細胞を用意できるようにする必要がある。もともになるiPS細胞から血清やフィーダー細胞なしで一貫して培養して、分化誘導・純化が行えるようにする必要があり、a. からb.の間には実は大きな隔りがある。

#### c. 細胞移植法の開発

a. b. を経て用意された細胞をヒトに移植する際に、いかなる細胞群をどのような方法をもって移植すれば有効かつ安全であるかを、サルなどの大型動物を含めたスタディで評価する必要がある。

#### d. ヒトにおける評価

a. ~ c. を経てようやくヒトへの応用が可能となると考えられる。実験的医療としての患者への細胞移植例や有効例などは比較的早く数年単位で報告されるかも知れない。しかし、1つの細胞治療法が安全性と有効性の確認を経て一般的に使用される治療法として確立されるまでには通常の薬剤と同等以上の多大な労力と時間を要する可能性がある。

### 2. 患者特異的モデル細胞

患者自身から細胞を採取し患者特異的なiPS細胞を樹立できるというiPS細胞にしかない特性は、移植免疫を回避した細胞治療ということだけでなく、全く新しい形で病態の解明や創薬への応用が可能である<sup>15,16)</sup>。

#### a. 病態解明

心筋症、QT延長症候群、洞不全症候群等心臓を構成する細胞そのものに起因すると考えられる疾患が中心となると思われるが、患者自身の細胞からiPS細胞を樹立し、そこから該当すると考えられる細胞を分化誘導し種々のモデル細胞を構築できることは、病態解明に全く新しい手段を提供する。すなわち、これまではごく少量の生検サンプルの解析に限局されていたものが、個々の症例から生きた細胞を潤沢に得られることにより、標的細胞の遺伝子解析、機能解析や薬剤の効果判定などを実際の症例に関して繰り返し行うことが可能となる。原因遺伝子不明の症例においてもモデル細胞が構築できるので、モデル細胞を用いた原因遺伝子探索も可能となる。このように病態解明に向けたアプローチの方法は飛躍的に増大すると考えられる。

#### b. 創薬応用

iPS細胞の創薬応用には大きく、新規薬剤の探索と薬剤安全性試験への応用の2つが考えられる。疾患モデル細胞を用いて、同細胞の異常を改

善する新規薬剤や疾患特異的に作用する薬剤などの探索が可能となる。また培養下における分化モデルを用いることにより、心筋分化促進物質などの新たな生理活性物質の探索も可能となる。筆者らは、マウスiPS細胞を用いて3次元培養下における血管構造形成モデルを構築し、新規海洋生物由来HDAC（ヒストン脱アセチル化酵素）阻害物質azumamideの血管形成抑制作用を示すことに成功した<sup>17)</sup>。同モデルを用いた血管形成抑制または促進物質の探索が可能と考えられる。さらにこうしたシステムを患者特異的iPS細胞を用いて構築することにより、疾患特異的作用物質の探索などにも展開可能と考えられる。

受精卵を用意することが必要であるヒトES細胞と比べて、iPS細胞は数多くの細胞株を樹立しやすくiPS細胞バンクが構築しやすい。そこから細胞を誘導して並べることにより、種々のヒトモデル細胞パネルのようなものを構築することができる。こうしたヒトモデル細胞パネルは、薬剤の安全性試験に応用可能と考えられる。たとえば、千人分や1万人分などの心筋細胞や肝細胞を並べたパネルを用いて薬剤の細胞毒性をスクリーニングすることにより、まれに発生する心毒性や肝障害などを事前に検出できるかも知れない。さらには障害を起こす細胞を解析し原因を明らかにすることにより、副作用を起こすヒトを事前に特定し投薬を避ける「テーラーメイド医療」に貢献しうる可能性もある。

### 3. その他動物モデルへの応用

循環器病関係のモデル動物には、マウスモデルばかりでなくマウス以外の動物種のものも数多くある（高血圧自然発症ラット、糖尿病モデルラット、心筋症ハムスター等）。これらモデル動物からのiPS細胞の樹立が可能となれば、モデル動物と同動物由来細胞を用いたin vitro実験を相互対応させながら新しい病態の解析を行うことなどが

可能となると考えられる。

## D. iPS細胞研究の今後の展望

iPS細胞に関する研究は今後、iPS化（初期化）機構そのものに関するもの、iPS細胞を利用したもの、iPS化という現象を利用したものなど多岐にわたって進められると思われる。

### 1. iPS細胞の改良

現在、3～4個の遺伝子をレトロウイルスを用いて導入することによりiPS細胞は誘導されているが、細胞治療に用いることができるレベルのiPS細胞を樹立するためには、誘導法、誘導効率などの改良が必要である。

#### a. c-mycトランスジーンなしiPS細胞

iPS細胞誘導に用いた4因子の一つであるc-mycはがん遺伝子の一つであり、実際mycありiPS細胞由来のマウス個体では高率にがんが発生した。その後mycを除いた3因子でもiPS細胞誘導が可能となったが、mycなしiPS細胞由来マウス個体ではがんの発生がほとんど認められなくなった<sup>18)</sup>。

#### b. レトロウイルスなしiPS細胞

現在iPS細胞誘導にはレトロウイルスによる遺伝子導入が行われている。レトロウイルスにより導入された遺伝子はゲノム上のどこかに組み込まれることになるので、導入遺伝子が組み込まれた場所によっては、がん化を含む種々の細胞の変異をもたらす可能性がある。レトロウイルスを用いずゲノムをintactに保ったままの遺伝子導入の方がより安全なiPS細胞を樹立できると考えられる。

#### c. トランスジーンなしiPS細胞

レトロウイルスを用いない場合でも、遺伝子操作をした細胞はヒトへの移植応用は慎重に行われるべきと考えられる。遺伝子操作を行わず、タン

パクを作用させたり低分子化合物を用いてiPS細胞を誘導しようとする試みが盛んに行われている。しかし、低分子化合物の多くが催がん性を有していることは古くから知られている。誘導に成功しても誘導された細胞のiPS細胞としての機能及び安全性は厳密に評価される必要がある。

#### d. 誘導効率の改善

患者特異的iPS細胞バンクの構築など将来的には多数の安定したiPS細胞株を樹立できることが必要となる。そのために現在数%以下であるiPS細胞誘導効率をあげて、様々なヒトや組織からiPS細胞を樹立可能にしておく必要がある。

#### e. 培養方法の改善

ヒトへの細胞移植応用に用いるiPS細胞の場合、血清やフィーダー細胞を用いずに樹立し、GMP基準を満たすレベルのiPS細胞を用意する必要がある。

## 2. iPS化（リプログラミング）機構の解析

3個または4個の特定の遺伝子を導入することにより、線維芽細胞などからiPS細胞が誘導されるという事実は明らかとなったが、その分子メカニズムは全く不明である。遺伝子を導入された細胞のうち、iPS細胞化するのはいったいどの細胞で、iPS細胞化される細胞の条件は何か？、導入遺伝子の発現量やその組み合わせはどのように影響するのか？、実際導入遺伝子がどのように働いてiPS細胞化させているのか？、等々解決すべき問題は尽きない。

## 3. iPS細胞の医療応用

iPS細胞化のプロセスやメカニズムの解析とは全く独立して、iPS細胞として樹立させたものを出発点とし、これを様々な形で利用する方法の開発もiPS細胞研究の大きな柱である。上で述べた心血管細胞をはじめ、神経細胞、膵β細胞等々様々な臓器・組織がiPS細胞を用いた再生医学研究

のターゲットとなる。

#### 4. その他

「いったん分化した細胞を簡便にリプログラミングしてもとに戻すことができる」という新しい技術は、様々な研究に新しいストラテジーを提供する。リプログラミングそのものに関する研究はもちろんのこと、分化/脱分化におけるエピジェネティクス研究やがん化メカニズムの解析などiPS細胞研究が新しい展開をもたらすと考えられる研究領域は数多く存在する。

#### むすび

哺乳類の成体の細胞がリプログラミングされて未分化なものに戻りうることはクローン羊ドリーによってすでに示されていたが、その後10年を経て報告されたヒトiPS細胞樹立の報告がそれを上回る反響をもって迎えられたのは、iPS細胞のもつ応用範囲の広さのせいであろう。「世界中どこでも施行可能な簡単な方法で成人由来の分化細胞から未分化幹細胞を誘導できる」ということが将来的に科学や社会に及ぼす影響は計り知れない。そこには当然功罪両面が生まれてくることになる。それはすべて科学者と社会が自ら責任を負うものである。極端な熱狂や批判に走ることなく冷静にかつ良識と叡知をもってiPS細胞の今後に対応していくことが必要と考えられる。

#### 文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-72.
- 3) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318: 1917-20.
- 4) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. 2000; 408: 92-6.
- 5) Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, et al. Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J*. 2005; 19: 1534-6.
- 6) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, et al. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 1977-84.
- 7) Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al. Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 2070-6.
- 8) Sone M, Itoh H, Yamahara K, et al. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 2127-34.
- 9) Yamahara K, Sone M, Itoh H, et al. Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS One*. 2008; 3: e1666.
- 10) Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008; 118: 498-506.
- 11) Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, et al. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008; 118: 507-17.
- 12) Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, et al. Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells*. 2008; 26: 1537-46.
- 13) Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*. 2003; 107: 2733-40.
- 14) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al.

- Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* 2007; 25: 1015-24.
- 15) Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007; 1: 39-49.
- 16) Nishikawa SI, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008. Epub ahead of print.
- 17) Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, et al. Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008; 18: 2982-4.
- 18) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008; 26: 101-6.

### 3. 胚性幹細胞

#### 1) ES 細胞による血管の分化再生

山下 潤

胚性幹細胞 (ES 細胞) は, 再生医療への応用のみならず分化の基礎研究においても不可欠な重要な役割を有する。われわれは血管構成細胞 (内皮細胞および壁細胞) の分化および血管構造の形成過程を再現できる新しい ES 細胞分化系を開発した。この分化系を用いることにより, これまでにない包括的な血管発生機構の解析が可能となるとともに, 血管再生治療への応用が期待される。血管の分化再生研究における ES 細胞の意義を考察する。

#### はじめに

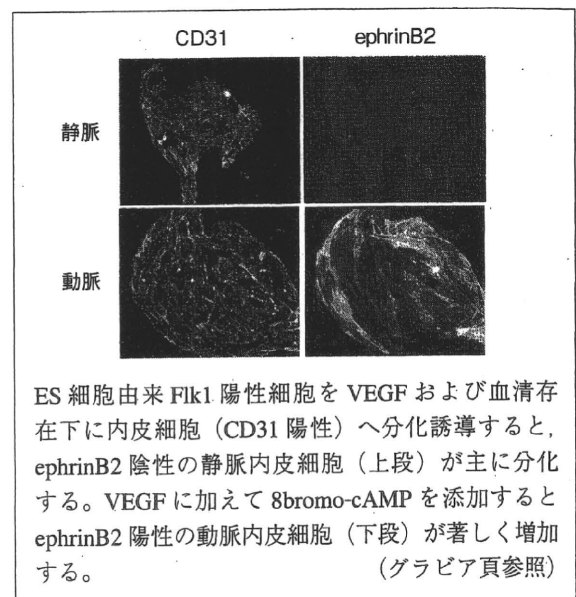
未分化性と分化能を維持したまま無尽蔵に増殖することができる ES 細胞 (胚性幹細胞: embryonic stem cells) は, 再生医療への応用ということがその大きな使命であり研究ターゲットとされているが, 日本ではまだヒト ES 細胞の臨床応用は認められていない。世界的にも ES 細胞由来細胞をヒトに用いた治療の報告はない。また, 最近の体性幹細胞 (成体内に存在する幹細胞) 研究は, 細胞移植に至るハードルが倫理面・安全面などで ES 細胞よりも低いため, 再生医療応用において注目されている。にもかかわらず, ヒトを含めた ES 細胞研究は国内および世界的広がりを見せている。本稿では, ES 細胞研究, 特に血管分野の現況と問題点, 将来における可能性などについて概説する。

#### I. ES 細胞からの血管細胞の分化多様化

筆者らは ES 細胞由来 2 型血管内皮増殖因子受容体 (Flk1) 陽性細胞が, 血管を構成する細胞である血管内皮細胞と血管壁細胞 (血管平滑筋細胞およびペリサイト) の共通の前駆細胞であり, Flk1 陽性細胞から内皮細胞および壁細胞の双方

が分化誘導でき, 毛細血管様の高次構造を培養下に形成できることを示した<sup>1)</sup>。Flk1 陽性の血管前駆細胞は, VEGF の刺激により内皮細胞に, また主に PDGF-BB (血小板由来増殖因子) の刺激により壁細胞に分化すると考えられる。また, 血流による物理的刺激である shear ストレスや拍動性進展刺激が Flk1 陽性細胞からの内皮細胞分化や壁細胞分化を誘導することも明らかにしている<sup>2)-4)</sup>。

図1 ES 細胞からの動静脈内皮分化



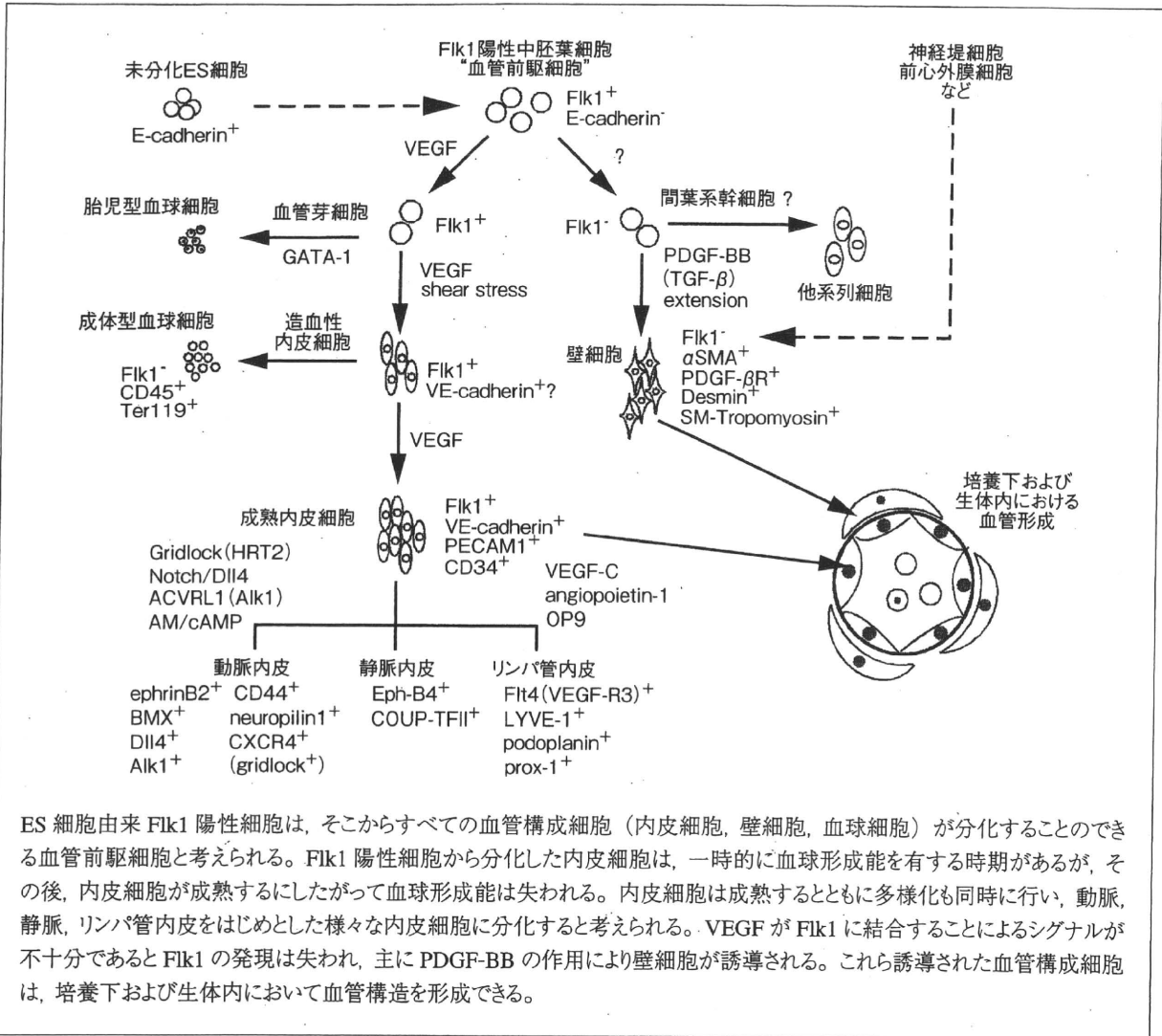
ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下に内皮細胞 (CD31 陽性) へ分化誘導すると, eprhnB2 陰性の静脈内皮細胞 (上段) が主に分化する。VEGF に加えて 8bromo-cAMP を添加すると eprhnB2 陽性の動脈内皮細胞 (下段) が著しく増加する。  
(グラビア頁参照)

#### key words

ES 細胞, 血管再生, 動静脈分化, リンパ管分化, 細胞移植, ヒト ES 細胞



図2 Fik1 陽性細胞からの血管構成細胞の分化



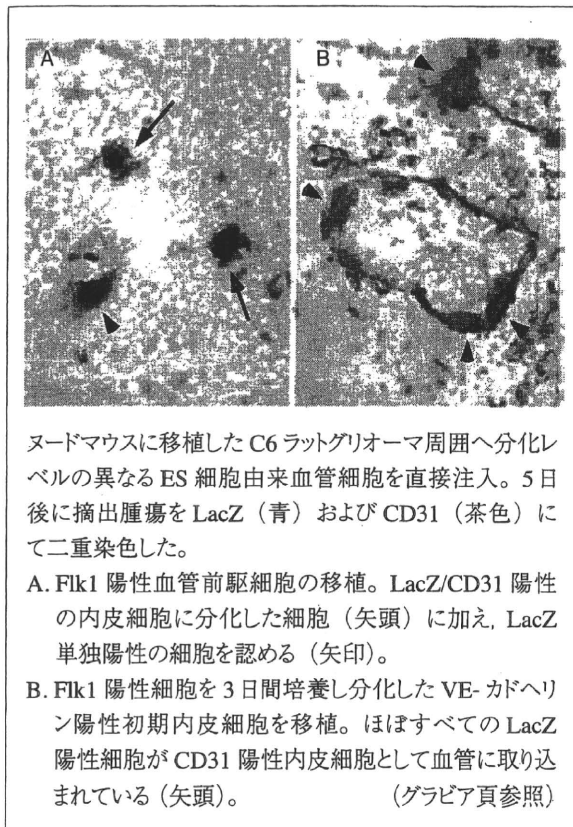
ES 細胞由来 Fik1 陽性細胞は、そこからすべての血管構成細胞（内皮細胞、壁細胞、血球細胞）が分化することのできる血管前駆細胞と考えられる。Fik1 陽性細胞から分化した内皮細胞は、一時的に血球形成能を有する時期があるが、その後、内皮細胞が成熟するにしたがって血球形成能は失われる。内皮細胞は成熟するとともに多様化も同時に行い、動脈、静脈、リンパ管内皮をはじめとした様々な内皮細胞に分化すると考えられる。VEGF が Fik1 に結合することによるシグナルが不十分であると Fik1 の発現は失われ、主に PDGF-BB の作用により壁細胞が誘導される。これら誘導された血管構成細胞は、培養下および生体内において血管構造を形成できる。

最近、動脈、静脈、リンパ管それぞれの内皮細胞特異的に発現している分子が数々報告され、内皮細胞の多様性に分子的根拠が与えられるようになってきた。筆者らは最近、Fik1 陽性細胞からの血管分化系を用い、ephrinB2 陽性（動脈）内皮、ephrinB2 陰性（静脈）内皮、および prox-1 陽性（リンパ管）内皮細胞と考えられる細胞の誘導と純化にそれぞれ成功した<sup>5)6)</sup>。すなわち、VEGFR2 陽性細胞を VEGF および血清存在下に内皮細胞に誘導すると、ほとんど (> 90 ~ 95%) の内皮細胞が ephrinB2 陰性の静脈内皮細胞となる。VEGF に加えて、cAMP アナログである 8bromo-cAMP または細胞内 cAMP を上昇させる液性因子の1つであるアドレノメデュリン

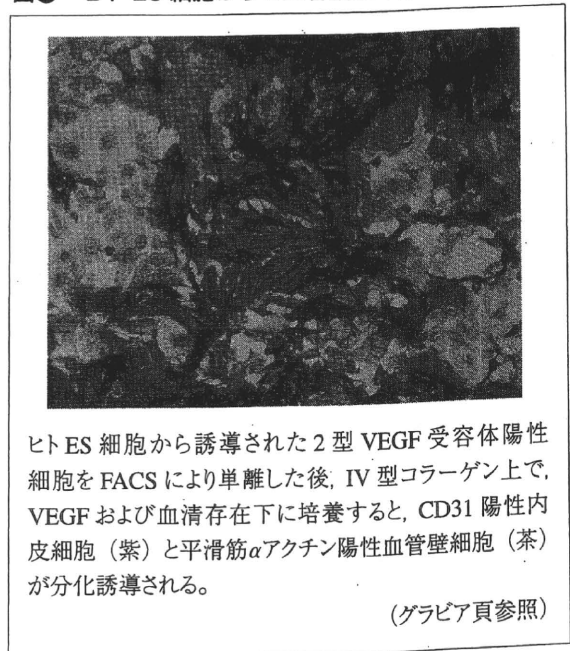
(AM) を加え cAMP 経路を活性化することにより、内皮細胞において Notch シグナルの活性化が誘導され、ephrinB2 陽性の動脈内皮細胞が誘導される (図1)。また一方、Fik1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養して内皮細胞を誘導したところ、prox-1 陽性リンパ管内皮細胞が出現した。この OP9 によるリンパ管誘導作用は、VEGF-C および angiopoietin の作用をブロックすることによりほぼ完全に阻害された。これらの結果により、ES 細胞を用いて、動脈、静脈、リンパ管内皮細胞のすべてを系統的に分化誘導することが可能になるとともにその新たな分化メカニズムが明らかになった<sup>7)8)</sup>。

以上の結果をまとめると ES 細胞からの血管細

図③ ES 細胞由来血管細胞の分化ステージによる血管新生への寄与の仕方の違い (文献 8 より改変)



図④ ヒト ES 細胞からの血管細胞の分化誘導



胞分化は図②のようになる。こうした新たなアプローチで血管分化多様化機構を解析することにより, 動脈特異的血管新生やリンパ管特異的の新生抑制による抗癌治療などの開発も期待される。さらに詳細に臓器特異的な血管の多様性を解析し理解することは, 血管を介した臓器機能や病態の理解とそれに基づく様々な新しい治療戦略の開拓に結びつくと考えられる。

## II. ES 細胞による血管再生

筆者らは ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞が生体内においても血管細胞に分化し, 血管再生に寄与しうるかを検討するため, 純化 Flk1 陽性細胞のニワトリ胎仔への移植実験を行った。心腔内注入により経管的に移植された Flk1 陽性細胞は, 内皮細胞および壁細胞に分化するとともにニワトリ胎仔発生に伴って形成された新生血管に寄与した<sup>1)</sup>。われわれはさらに, ES 細胞由来細胞の血管再生治療応用における可能性を検討するため, ES 細胞

胞由来血管細胞の成体に対する移植効果を検討した<sup>9)</sup>。すなわち, ES 細胞由来血管細胞をヌードマウスに移植した腫瘍周囲に注入し, 移植細胞の新生血管への寄与を検討したところ, ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞は, 内皮細胞および壁細胞として新生血管へ寄与した。

次に, 成体への移植に適切な細胞の分化段階を検討するため, 分化段階の異なる血管細胞, すなわちソート直後の Flk1 陽性血管前駆細胞と, Flk1 陽性細胞をさらに 3 日間培養して初期内皮細胞に分化した細胞 (VE- カドヘリン陽性) の移植を比較した。Flk1 陽性細胞を移植した群では, 血管内皮細胞として寄与しているものの他に, それ以外の細胞として組織内に存在するものが多数 (約 60%) 認められた。一方, 初期内皮を移植した群では, ほとんどすべての細胞 (95%以上) が内皮細胞として血管に寄与していた (図③)。また, Flk1 陽性細胞移植群では, 細胞移植した腫瘍における血流増加は認められなかったが, 分化させた血管細胞を移植した群では有意な血流増加が認められた。

これらの結果より, ES 細胞由来血管細胞の移植により, 血管新生促進効果が認められるが, 成体における血管新生をターゲットとした細胞移植

においては、血管前駆細胞のレベルの細胞よりも、やや血管に分化した初期内皮細胞のステージがより有効かつ特異的であると考えられた。このように、ES細胞由来細胞の移植においては、むやみに未分化細胞を移植すればよいわけではなく、ドナー細胞の分化段階とレシピエント側の状況を合わせた至適な分化段階の細胞を選択する必要があると考えられた。これらの知見は骨髄などの体性細胞の移植時においても考慮に入れる必要があると考えられる。

血管再生治療においては、倫理面・安全面・技術面でハードルが低い骨髄細胞や末梢血、G-CSFなどの薬剤を用いた血管新生治療が先行して行われ、優れた効果を上げている。心筋や神経と異なり、既存の組織からの新生が可能な血管においては、細胞による純粋な再生は必ずしも必要ではなく、ES細胞治療がこれらの治療を凌駕して有用であるという知見は今のところない。しかし将来にわたっては、直接的な細胞移植治療のみならず様々な血管再生治療のターゲットとなる新たなシーズを生み出し、血管特異的血管新生なども含め、さらに治療法を精緻に改善向上させていくうえでES細胞の血管再生研究における意義は大きいと考えられる。

### Ⅲ. ヒトES細胞からの血管分化再生

ヒトES細胞を用いた血管細胞分化としては、胚様体を用いてCD31やVE-カドヘリン陽性内皮細胞の誘導と、フローサイトメトリーを用いての純化・再培養、培養下および免疫不全マウスに移植したゲル内における血管構造の形成が報告されている。京都大学のグループは、マウスES細胞と同様にサルES細胞においても2型VEGF受容体陽性細胞からの内皮細胞・壁細胞の分化<sup>10)</sup>、

培養下における血管構造形成に成功している。さらに同グループは、2002年より日本最初のヒトES細胞分化研究を輸入ヒトES細胞を用いて開始し、ヒトES細胞においても血管構成細胞の分化誘導と*in vitro*における管腔構造形成、さらにはマウス血管新生モデルにおける新生血管への移植細胞の寄与と血流改善効果を認めている(図4)<sup>11)12)</sup>。ヒト細胞において血管分化再生機構が明らかになることにより、より治療応用に結びついた新たな知見が生まれることが期待される。

### おわりに

このように、血管の発生・分化・再生機構に関して様々な知見が蓄積されてきているが、いまだ血管再生治療が明らかに有用な形で臨床応用されたといえるレベルには至っていない。臓器を構成する細胞を誘導して移植する、あるいは前駆細胞を移植するというだけで臓器の再生が進むというほど単純ではないことがようやく学習されてきたというのが実情に近いであろう。今後は、細胞そのものの分化メカニズムの解析(細胞外シグナルから細胞内環境の変化と安定化の過程をエピジェネティックな視点も含めて解明する)に加えて、細胞間および細胞-細胞外マトリクス相互作用や臓器・組織間相互作用など臓器としての機能を果たしうる機能ユニットを形成するために必要な要素すべてに関して理解を深め、それらを生体内でできるだけ再構成することが重要であろう。有効に分化しうる幹・前駆細胞(seed: 種子)と、分化と機能発現を可能にする周囲環境(soil: 土壌)の双方を整えた治療(Seed & Soil Therapy)をめざすことにより、再生医療はより実効性が期待されるものに近づくと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Yamashita J, Itoh H, et al : Nature 408, 92-96, 2000.
- 2) Yamamoto K, Sokabe T, et al : Am J Physiol Heart Circ Physiol 288, H1915-1924, 2005.
- 3) Huang H, Nakayama Y, et al : J Artif Organ 8, 110-118, 2005.
- 4) Shimizu N, Yamamoto K, et al : J Appl Physiol, in press.
- 5) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, et al : Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 1977-1984, 2006.
- 6) Kono T, Kubo H, et al : Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 2070-2076, 2006.
- 7) Yamashita JK : Int J Hematol 80, 1-6, 2004.
- 8) Yamashita JK : Trends Cardiovasc Med 17, 59-63, 2007.

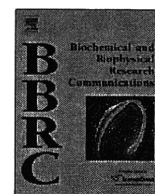
- 9) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, et al : Blood 101, 2675-2678, 2003.
- 10) Sone M, Itoh H, et al : Circulation 107, 2085-2088, 2003.
- 11) Sone M, Itoh H, et al : Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007.
- 12) Yamahara K, Sone M, et al : PLoS One, in press.

山下 潤		
1990年	京都大学医学部卒業	2007年 同准教授 (名称変更)
1998年	医学博士 (京都大学)	
2000年	同大学院医学研究科分子遺伝学助手	専門 幹細胞生物学、心血管発生・再生
2002年	同助教授	研究テーマ ES 細胞を用いた心血管分化再生機構の解析
2003年	京都大学再生医科学研究所幹細胞分化制御研究領域助教授 (独立)	



Contents lists available at ScienceDirect

# Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells

Peishi Yan<sup>a,b</sup>, Atsushi Nagasawa<sup>b</sup>, Hideki Uosaki<sup>a</sup>, Akihiro Sugimoto<sup>b</sup>, Kohei Yamamizu<sup>a</sup>, Mizue Teranishi<sup>a</sup>, Hiroyuki Matsuda<sup>c</sup>, Satoshi Matsuoka<sup>c</sup>, Tadashi Ikeda<sup>b</sup>, Masashi Komeda<sup>d</sup>, Ryuzo Sakata<sup>b</sup>, Jun K. Yamashita<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Stem Cell Differentiation, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>b</sup> Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>c</sup> Department of Physiology and Biophysics, Kyoto University Graduate School of Medicine, Yoshida-Konoe, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

<sup>d</sup> Nagoya Heart Center, Japan

<sup>e</sup> Center for iPS Cell Research and Application, Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, 53 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 November 2008

Available online 16 December 2008

#### Keywords:

Cyclosporin-A  
Cardiac progenitor  
Cardiomyocytes  
Differentiation  
Embryonic stem cells

### ABSTRACT

Though cardiac progenitor cells should be a suitable material for cardiac regeneration, efficient ways to induce cardiac progenitors from embryonic stem (ES) cells have not been established. Extending our systematic cardiovascular differentiation method of ES cells, here we show efficient and specific expansion of cardiomyocytes and highly cardiogenic progenitors from ES cells. An immunosuppressant, cyclosporin-A (CSA), showed a novel effect specifically acting on mesoderm cells to drastically increase cardiac progenitors as well as cardiomyocytes by 10–20 times. Approximately 200 cardiomyocytes could be induced from one mouse ES cell using this method. Expanded progenitors successfully integrated into scar tissue of infarcted heart as cardiomyocytes after cell transplantation to rat myocardial infarction model. CSA elicited specific induction of cardiac lineage from mesoderm in a novel mesoderm-specific, NFAT independent fashion. This simple but efficient differentiation technology would be extended to induce pluripotent stem (iPS) cells and broadly contribute to cardiac regeneration.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Embryonic stem (ES) cell research has been providing various possibilities and strategies for regenerative medicine. Establishment of adult tissue derived, ES cell-like, stem cells, induced pluripotent stem (iPS) cells, is now further facilitating research for clinical application of stem cells [1–4]. Various ES cell studies showed induction of cardiomyocytes from ES cells and their contribution to cardiac tissues after transplantation [5]. Nevertheless, cell transplantation strategies of purified cardiomyocytes have not been fully established, mainly due to the limited proliferative potential and engraftment efficacy of differentiated cardiomyocytes [6,7]. Cardiac progenitors which can proliferate and give rise to cardiomyocytes should be suitable material to achieve efficient cardiac regeneration [8,9]. Methods to efficiently and specifically expand and purify cardiac progenitor cells, however, have not been reported.

Previously, we established a novel ES cell differentiation system that can reproduce the early process of cardiovascular development *in vitro* [8,10]. Endothelial cells (ECs), pericytes and vascular smooth muscle cells [10], and cardiomyocytes [8] are systematically induced from common mesodermal precursor, Flk1 (also designated as vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2))-expressing cells. We also succeeded in identifying a cardiac progenitor population, FCV cells (Flk1<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>/vascular endothelial cadherin<sup>-</sup> cell population) among the progeny of Flk1<sup>+</sup> mesoderm cells [8]. Though FCV cells, which are only a small subset of Flk1<sup>+</sup> cell progeny, showed highly cardiac specific progenitor activity, efficient expanding method of FCV cells remain unknown.

To explore a novel cardiac regenerative therapy, we investigated methods to efficiently induce cardiac progenitor cells and cardiomyocytes with the use of our ES cell differentiation system. Here we show that addition of an immunosuppressant, cyclosporin-A (CSA), to Flk1<sup>+</sup> mesoderm cells potently and specifically expand FCV progenitor population as well as cardiomyocytes. Expanded FCV cardiac progenitors showed differentiation potentials to cardiomyocytes *in vivo* after cell transplantation to rat myocardial infarction model. Discovery of the novel role of CSA

\* Corresponding author. Address: Laboratory of Stem Cell Differentiation, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. Fax: +81 75 751 4824. E-mail address: [juny@frontier.kyoto-u.ac.jp](mailto:juny@frontier.kyoto-u.ac.jp) (J.K. Yamashita).



with mesoderm-specific cardiogenic activity would provide a clue to explore cardiac regeneration strategies.

## Materials and methods

**Antibodies.** Monoclonal antibodies (MoAbs) for murine E-cadherin (ECCD2), murine Flk1 (AVAS12) were prepared and labeled in our laboratory as described [8,10]. MoAb for cardiac troponin-T (cTnT) was purchased from NeoMarkers (Fremont, CA). Murine  $\alpha$ -actinin was from Sigma (St. Louis, Mo). Phycoerythrin (PE)-conjugated AVAS12 was from eBioscience (San Diego, CA). MoAbs for mouse CD31 and biotinylated-CXCR4 were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). Polyclonal rabbit antibody to GFP was from MBL (Nagoya, Japan).

**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  $\mu$ g/mL were made in differentiation medium (see below) at the time of use. FK506 (a gift from Astellas Pharma) was dissolved in DMSO at 10 mg/mL, dilution of 10 ng–1  $\mu$ g/mL were made in differentiation medium. 11R-VIVIT was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). PKH67 fluorescent dye was from Sigma.

**Mouse ES cell culture.** EMG7 mouse ES cells that carry mouse  $\alpha$ -myosin heavy chain (MHC) promoter-driven EGFP gene were used for this study [8]. OP9 stroma cells were maintained as described [11].

**Induction of cardiomyocyte differentiation.** Induction and sorting of Flk1<sup>+</sup> cells were performed as previously described [8,10]. Briefly, mouse ES cells were cultured in differentiation medium (alpha minimum essential medium (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum) on type IV collagen-coated dishes (BIOCOAT™, Becton–Dickinson) or mitomycin C-treated confluent OP9 cell sheets (MMC-OP9) for 96–108 h. FACS-purified Flk1<sup>+</sup> cells were then plated onto MMC-OP9 and cultured in differentiation medium to induce cardiac differentiation. Medium was replaced every 2 days. Induction of FCV cells was performed as described [8]. Purified FCV progenitor cells were again plated onto MMC-OP9 cells. MMC-OP9 cells were pre-stained with PKH67 fluorescent dye (Sigma) before plating.

**Flow cytometry and cell sorting.** FACS for differentiating ES cells was performed as described [8,10]. After 96–108 h of ES cell differentiation, cultured cells were harvested and stained with allophycocyanin (APC)-conjugated AVAS12 and FITC-conjugated ECCD2. Viable Flk1<sup>+</sup>/E-cadherin<sup>-</sup> cells, excluding propidium iodide (Sigma), were sorted by FACS Vantage (Becton–Dickinson). For FACS analysis of FCV progenitor cells, after 2 days differentiation of purified Flk1<sup>+</sup> cells on OP9 cells (Flk-d2), cells were harvested and stained with a combination of MoAbs of PE-conjugated AVAS12 and biotinylated CXCR4 followed by addition of streptavidin-conjugated APC. PKH-negative populations were analyzed as ES cell-derived cells. For cardiomyocytes, cells were harvested at Flk-d6. GFP<sup>+</sup> population was evaluated and sorted as differentiated cardiomyocytes.

**Immunohistochemistry.** Immunostaining for ECs and cardiomyocytes was performed as described [8]. Anti-mouse IgG antibody conjugated with horse radish peroxidase (HRP) (Invitrogen, Carlsbad, California) or anti-mouse, rat and Rabbit Ig Abs conjugated with Alexa 488 or 546 (Molecular Probes, Eugene, OR) were used for 2nd Abs. Nuclei were visualized with DAPI (Invitrogen). Preparation of rat heart sections was performed as previously described [12]. Double staining for cTnT and GFP was performed with mixture of anti-cTnT Ab labeled with Zenon Alexa Fluor 546 labeling kit (Molecular Probes) and anti-GFP Ab, followed by Alexa Fluor488-conjugated anti-Rabbit Ig Ab (Molecular Probes).

**Quantification of cardiomyocyte differentiation.** Cardiomyocyte differentiation was quantitatively evaluated by fluorescent intensity of cTnT staining using Alexa Fluor 546 as described [8].

**Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).** RT-PCR was performed as previously described [8]. Primers that were used are indicated in supplemental Table I online.

**Annexin-V FITC apoptosis assay.** Cells were harvested at Flk-d2 and stained for Flk1 and CXCR4. After addition of Annexin-V FITC (Invitrogen), cells were incubated for 15 min at room temperature in the dark and subjected to FACS analysis.

**EdU cell proliferation assay.** EdU solution (Invitrogen) (10  $\mu$ M) was added to the culture medium 2 h before sorting FCV cells by FACS. The sorted FCV cells were plated onto glass slides by Cytopspin (Thermo Shandon) (Waltham, MA), fixed by 4% PFA and EdU was detected by incubating with Click-iT™ reaction cocktail (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The numbers of EdU positive DAPI positive FCV cells were counted in 10 randomly selected fields.

**Analysis of induced endothelial and blood cells.** At Flk-d6, floating cells and attached cells were collected and stained with biotin-conjugated anti-CD45 Ab or anti-CD31 Ab (BD Pharmingen) followed by addition of streptavidin-APC.

**Model of heart failure.** Ligation of rat left coronary artery was performed as described [12] in accordance with the guidelines for Animal Experiments of Kyoto University, which conforms to the law of "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" in Japan.

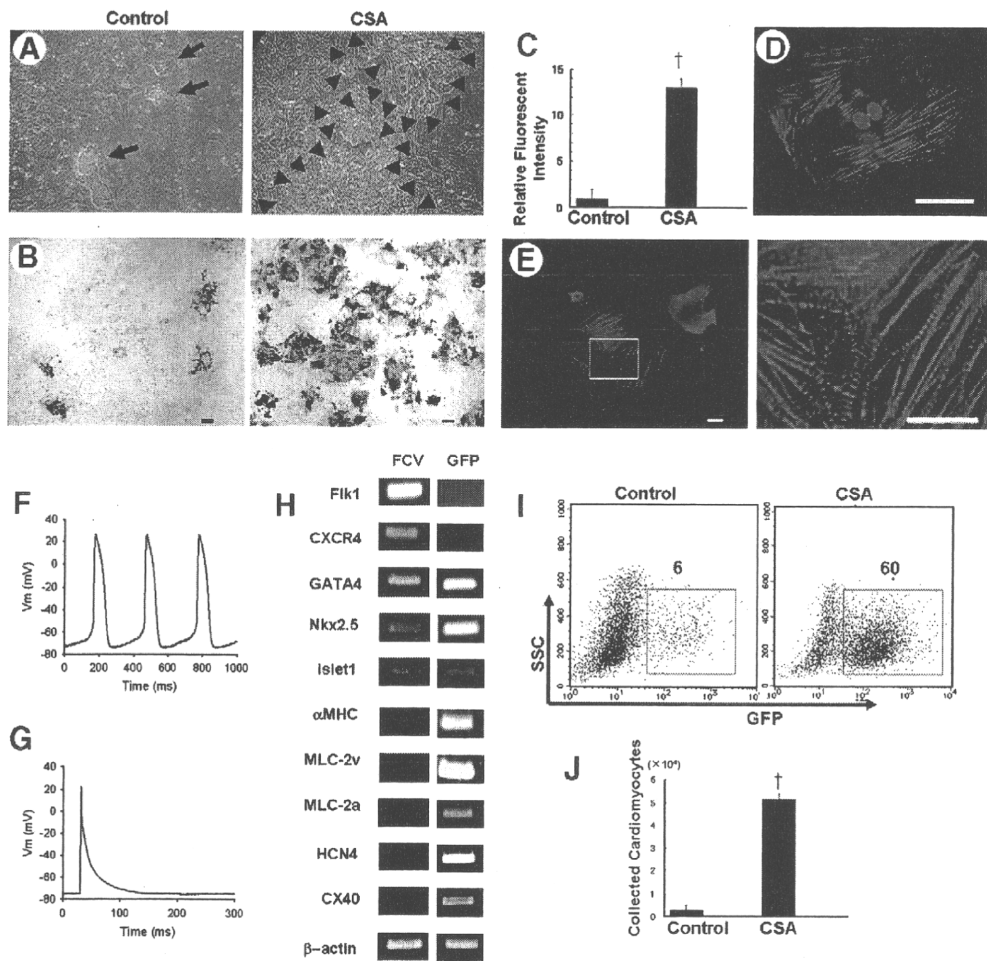
**ES cell transplantation.** Four weeks after ligation, nude rats with moderate-sized myocardial infarction (MI) (infarct size: 20–40%) were used for cell transplantation experiment. Through left thoracotomy, after putting mattress sutures with 6.0 polypropylene thread at injection points to prevent leakage, 100  $\mu$ L culture medium containing  $4 \times 10^5$  cells were subepicardially injected into the center of the scar using a 27-gauge needle. Bulging over the MI area was confirmed after injection [12].

**Electrophysiological studies.** Action potentials of FACS-purified GFP positive cardiomyocytes were recorded as previously described [13]. All experiments were performed at 36–37 °C.

**Statistical analysis.** Values are reported as means  $\pm$  SD. Comparisons among values were performed by ANOVA. At least three independent experiments were performed.  $p < 0.05$  was considered significant.

## Results

In our differentiation system, cells representing four different differentiation stages are sequentially induced, that is, undifferentiated ES cells, Flk1<sup>+</sup> mesoderm cells, FCV cardiac progenitor cells, and cardiomyocytes. When purified Flk1<sup>+</sup> cells are cultured on OP9 stroma cells, self-beating cardiomyocytes appear after 4 days of culture (Flk-d4) [8]. When we were performing transplantation experiments in which purified cardiomyocytes were injected into immune-competent mice treated with CSA to suppress immune rejection, we examined the direct effects of CSA on cardiomyocyte differentiation and survival in vitro in a control experiment. Surprisingly, addition of CSA (1–3  $\mu$ g/mL) to Flk1<sup>+</sup> cells showed a striking effect to increase beating cells at Flk-d6 (experiment 1 in supplemental figure 1 online) (Fig. 1A, and supplemental video 1 and 2 online). Addition of CSA induced approximately 13 times increase in cardiac troponin-T (cTnT)-positive cardiomyocyte appearance than control (Fig. 1B and C). CSA-induced cardiomyocytes showed distinct expression of cTnT (Fig. 1D), and sarcomere formation (Fig. 1E). Action potential in purified cardiomyocytes showed existence of cells with pacemaker potential (Fig. 1F), as well as ventricular type cells lacking pacemaker potential and

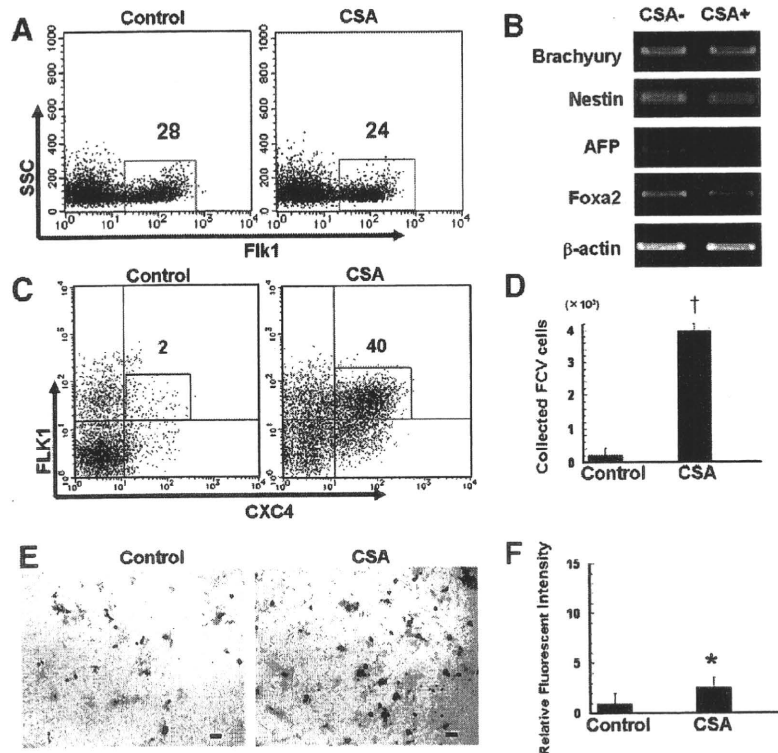


**Fig. 1.** Cardiomyocyte induction from Flk1<sup>+</sup> mesoderm by CSA (experiment 1). (A,B) Gross appearance of cardiomyocyte induction by CSA. Left panels: control. Right panels: CSA treatment. Scale bars = 100  $\mu$ m. (A) Appearance of beating colony. Arrows indicate beating colonies. Arrow heads surround large beating area (see supplemental video 1 and 2 online). (B) Cardiomyocyte stained with cTnT (brown). (C) Quantitative evaluation of cardiomyocyte induction by fluorescent intensity of cTnT staining. Relative fluorescent intensity is indicated ( $n = 9$ ,  $^{\dagger}p < 0.001$  vs control). (D,E) Appearance of isolated cardiomyocytes. (D) cTnT (red) and DAPI (blue) staining. Scale bar = 50  $\mu$ m. (E) Actinin (red) staining. Right panel shows higher magnification of boxed area. Apparent sarcomere structures are observed. Scale bar = 25  $\mu$ m. (F,G) Action potentials of induced cardiomyocytes. (F) Cell with pacemaker potential and spontaneous beating. (G) Quiescent ventricular type cell. (H) mRNA expressions in purified FCV progenitor cells and MHC promoter-driven GFP<sup>+</sup> cardiomyocytes induced by CSA. Left panel: control. Right panel: CSA treatment. X axis: GFP. Y axis: side scatter. All Flk1<sup>+</sup> cell-derived population was analyzed. Percentages of GFP<sup>+</sup> cardiomyocytes are indicated. (J) Yield of purified cardiomyocytes. Cell number of obtained GFP<sup>+</sup> cardiomyocytes from 10<sup>4</sup> Flk1<sup>+</sup> cells ( $n = 12$ ,  $^{\dagger}p < 0.001$  vs control).

self-beating (Fig. 1G). Purified CSA-induced cardiomyocytes showed expression of various cardiac marker mRNAs, such as GATA4, Nkx2.5, islet1, alpha-myosin heavy chain (MHC), myosin light chain (MLC) 2v, and 2a, a pacemaker marker, HCN4, and conduction system marker, Cx40 (Fig. 1H). These results indicate that functional cardiomyocytes were successfully induced and expanded by CSA treatment. At optimal conditions, approximately 60% of Flk1<sup>+</sup> cell-derived cells became cardiomyocytes, positive for MHC promoter-driven GFP (GFP<sup>+</sup>) (Fig. 1I). The CSA treatment resulted in approximately 17-fold increase in the yield of FACS-purified cardiomyocytes starting from the same number of Flk1<sup>+</sup> cells (CSA-treatment:  $5.0 \pm 0.35 \times 10^4$  cells/10<sup>4</sup> Flk1<sup>+</sup> cells vs. control:  $0.3 \pm 0.023 \times 10^4$  cells/10<sup>4</sup> Flk1<sup>+</sup> cells,  $n = 12$ ,  $^{\dagger}p < 0.001$ ) (Fig. 1J). As a result, approximately 200 cardiomyocytes could be obtained from one ES cell (Supplemental figure 2 online).

We further evaluated differentiation stage-specific effects of CSA. CSA did not have any influence on Flk1<sup>+</sup> mesoderm cell appearance from undifferentiated ES cells (Fig. 2A, experiment 2). No apparent difference in endoderm and ectoderm marker expression was induced by CSA treatment (Fig. 2B). Surprisingly, addition

of CSA to Flk1<sup>+</sup> cells specifically increased FCV population to approximately 10–20 times more than control (experiment 3) (Fig. 2C). The maximum percentage of FCV cells within total Flk1<sup>+</sup> cell-derived cells was increased up to 40% by CSA. The yield of purified FCV progenitor cells was increased approximately 22 times by CSA treatment (CSA-treatment:  $4.3 \pm 0.23 \times 10^3$  cells/10<sup>4</sup> Flk1<sup>+</sup> cells vs. control:  $0.2 \pm 0.001 \times 10^3$  cells/10<sup>4</sup> Flk1<sup>+</sup> cells,  $n = 12$ ,  $^{\dagger}p < 0.001$ ) (Fig. 2D). Purified CSA-induced FCV cells showed expression of various cardiac progenitor marker mRNAs, such as Flk1, CXCR4, GATA4, Nkx2.5, islet1, but not differentiated cardiomyocyte markers, such as MHC, MLC-2v and 2a (Fig. 1H). Comparable number of cardiomyocytes was induced from the same number of control FCV cells and CSA-expanded FCV cells (data not shown). These results indicate that CSA-expanded FCV cells retained their high cardiogenic potentials. When CSA was added to purified FCV cells (experiment 4), slight increase (approximately 2.6 times) in cardiomyocytes was observed (Fig. 2E and F). These results indicate that the novel potent cardiomyocyte inducing activity of CSA is restricted to the period after mesoderm formation, and acts principally between the mesoderm and cardiac pro-



**Fig. 2.** Differentiation stage-specific effect of CSA. (A,B) Effects of CSA on early differentiation from undifferentiated ES cells (experiment 2). Undifferentiated ES cells were cultured in the absence of LIF for 4 days (ES-d4). (A) Induction of Flk1<sup>+</sup> mesoderm cells. FACS analysis for Flk1 and side scatter (SSC) in the absence (control) or presence (CSA) of CSA. (B) mRNA expressions for mesoendoderm marker, brachyury, ectoderm marker, Nestin, and endoderm markers, AFP and Foxa2 at ES-d4. (C,D) Induction of FCV progenitor cells from Flk1<sup>+</sup> mesoderm (experiment 3). (C) FACS analysis for cardiac progenitor induction by CSA. X axis: Flk1. Y axis: CXCR4. Percentages of FCV cells (double positive population) are indicated. (D) Yield of purified cardiac progenitor cells. Cell number of obtained FCV progenitor cells from 10<sup>4</sup> Flk1<sup>+</sup> cells ( $n = 12$ ,  $^{\dagger}p < 0.001$  vs control). (E,F) Cardiomyocyte induction from purified FCV cells by CSA (experiment 4). Purified FCV cells were recultured on OP9 cells for 4 days. (E) Gross appearance of cardiomyocytes stained with cTnT (brown). Left panel: control. Right panel: CSA treatment. Scale bars = 400  $\mu$ m. (F) Quantitative evaluation of cardiomyocyte induction by fluorescent intensity of cTnT staining. Relative fluorescent intensity is indicated ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$  vs control).

genitor stages to induce specific and efficient expansion of the cardiac progenitor cells.

We further examined cellular and molecular mechanisms of CSA. EdU incorporation and annexin V expression in FCV cells were not affected by CSA treatment (Fig. 3A–C), indicating that the increase in FCV cells by CSA was not due to proliferation and/or survival of FCV cells. CSA treatment on Flk1<sup>+</sup> cells (Flk-d0-6; experiment 1) induced drastic increase in cardiomyocytes with reciprocal decrease in ECs or blood cells from Flk1<sup>+</sup> mesoderm cells (Fig. 3D and E). Even when CSA was added only in mesoderm stage (Flk-d0-2; experiment 5), similar effects were observed (Fig. 3F), suggesting that CSA should act on Flk1<sup>+</sup> cells and may shift the cell fate from ECs or blood cells to cardiomyocytes. Calcineurin inhibitors, CSA and FK506 exert their immunosuppressing effect through inhibition of nuclear factor of activated T-cells (NFAT) signaling [14]. Nevertheless, FK506 and a NFAT inhibitor, 11R-VIVIT, showed no significant effect on cardiomyocyte induction in our system (Fig. 3G), suggesting that the main cardiogenic effect of CSA should be NFAT independent. These results indicate that the potent cardiomyocyte inducing activity of CSA should be evoked through novel mechanisms to induce specific and efficient expansion of the cardiac progenitor cells with mesoderm-specific, NFAT-independent fashion. Future studies on precise mechanisms of CSA action should provide novel molecular understanding of cardiomyocyte differentiation and regeneration.

This efficient expansion of the rare FCV progenitors allowed us to confirm their cardiogenic potential *in vivo*. Finally, we examined *in vivo* cardiogenic potential of expanded FCV cells. We performed transplantation of CSA-expanded FCV cells to chronic myocardial

infarction model of rat. At 2 weeks after the injection, transplanted FCV cells were successfully differentiated into cardiomyocytes and integrated in the infarct heart to form GFP<sup>+</sup>/cTnT<sup>+</sup> donor cell-derived cardiomyocyte bundle in the scar tissue (Fig. 4A and B). This result indicates that CSA-expanded FCV cells can show highly cardiogenic potentials also *in vivo* after cell transplantation.

## Discussion

Here, we show a novel technology for the specific and efficient expansion of highly cardiogenic progenitors as well as cardiomyocytes from ES cells with a newly discovered mesoderm-specific effect of CSA. The immunosuppressive action of the calcineurin inhibitor CSA stems from the inhibition of NFAT signaling in T cells [14]. Through calcineurin-NFAT signaling, CSA is also involved in various cellular processes, such as cardiac valve formation [15], cardiac hypertrophy [16], and hair growth [17]. Though a weak inductive effect of CSA on cardiomyocytes in embryoid bodies was reported [18], the effect on cardiac progenitors and its molecular mechanism were unclear. Our novel sequential cardiomyocyte differentiation system should succeed in distinctively digging out the potent mesoderm-specific and novel NFAT-independent effect of CSA, which has been buried in the cell mixture of embryoid bodies. This novel culture system would be amenable to screen and discover novel cardiac regenerative drugs from small molecules using chemical biology strategies.

FCV cells, which are detected at 6–6.5 days after the differentiation of mouse ES cells and at 1–2 days before cardiomyocyte