

細菌学・ウイルス学

C型肝炎ウイルス研究の新知見

—肝脂質代謝とのかわり
Modification of lipid metabolism as well as lipid transfer system by HCV infection

脂防摂取の過多により、肝炎患者が惹起される頻度が高くなる。脂防摂取過多に加えて炎症を伴う場合、あるいはインスリン抵抗性が加わってみられる肝組織変化にNASH (non-alcohol steato-hepatitis) と診断されるものが存在するが、NASHは肝炎増悪の要因と考えられる。

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎を引き起こし、さらに肝硬変、肝臓の発症をもたらす。世界的には約1億7千万人、わが国では約200万人がHCVに感染していると推定されている。C型肝炎肝炎患者の15~20%が重篤な肝臓の癌性になると推定される。わが国では肝臓患者の約8割は

HCV陽性である。HCV感染者の多くに肝脂質代謝の変化がみられる。それらのなかにはインスリン抵抗性を示す患者も多い。これまでにHCV感染と肝脂質代謝変化との間に何らかの関連が示唆されていた。事実、HCV蛋白質のなかには脂質代謝活性を高める働きをもつものがある。また、HCV感染者の血液内に存在するウイルス粒子はリポ蛋白質と会合していることが示されていた。しかし、これらのウイルス蛋白質による脂質代謝活性促進やリポ蛋白質とウイルス粒子との会合のウイルス学的な意義、および疾患との関連については不明な点が多い。近年、培養細胞を用いた

HCV感染増殖系が樹立され、その意義についてもだいに解明されつつある。

培養細胞で効率よく感染増殖する系を用いた脂質代謝活性化の解析

慢性肝炎患者から単離されたHCVゲノムがヒト肝臓由来の培養細胞で効率よく増殖することが見出された¹⁾。この系は限られたHCVゲノムと限られた培養細胞(HuH7)でのみ効率よく感染増殖するものであるが、HCVの生活環を解析する優れた系のひとつである。HuH7細胞にHCVゲノムを導入すると、ウイルスゲノム複製の際に、細胞内の脂肪滴が増加することが明らかになった(図1)。脂肪滴周辺にウイルス蛋白質が会合していること、会合できない変異HCVゲノムからは感染性粒子が産生されないことから、この脂肪滴を利用してウイルス粒子の形態形成が行われると考えられる²⁾。

HCVはリポ蛋白質の合成あるいは細胞外輸送経路を利用して増える

肝細胞は脂質を合成し、それをリポ蛋白質として細胞外に放出する。リポ蛋白質は血流を通して他の組織細胞に吸収される。肝細胞でつくられるリポ蛋白質であるVLDL(very low density lipoprotein)合成に関与する酵素(microsomal triglyceride transfer protein: MTP)を阻害すると、ウイルス粒子の細胞外への放出も阻害される。また、培養上清中のウイルス粒子の浮遊密度の解析から、粒子には脂質に富む成分が含まれていると考えられる。つまりウイルス粒子は、リポ蛋白質合成とその輸送系を使って細胞の外に放出される。

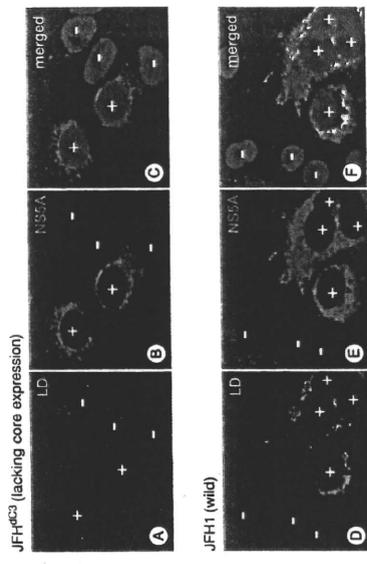


図1 HCV複製細胞における脂肪滴の産生
野生型のHCVを感染させた培養細胞(JFH1(Wild))において、HCVゲノムが複製している細胞(十で示した)では脂肪滴の量が増えている。一方、コア蛋白質を欠くHCVを感染させた細胞(JFH1^{cs})では、ゲノムが複製している細胞(A,Bの十)の細胞、Bの赤い色は複製の結果ウイルス蛋白質が産生されていることを示す)でも脂肪滴の量は増えている。すなわち、脂肪滴はコア蛋白質依存的に増加している。写真はレーザー共焦点顕微鏡観察で、LDは脂肪滴の染色(A,D)、NSSAはウイルス蛋白質(NSSA)の産生を、NSSAの染色で示したものの(B,E)。CはAとB、FはDとEを重ね合わせた。CとFの青色は核を示す。

リポ蛋白質構成蛋白質のなかのアポリポ蛋白質E (Apo-E)がウイルスの感染性に重要である

Apo-E が産生されない細胞に HCV を感染させた場合でも、細胞内でウイルスゲノムの複製は正常に行われる。また、ウイルス粒子の産生は 50% に減少する程度で、粒子産生に大きな影響はない。しかし、ウイルスの感染性は極端に低下する。Apo-E の発現を戻した細胞では、元のとおり感染性粒子の産生が回復する。培養上清のウイルス粒子には Apo-E が含まれて存在する。Apo-E 特異的な抗体で Apo-E と含有しているウイルスを除き、残りのウイルスを調べると感染性はみられない。つまり HCV の感染性には、Apo-E との含有が必要である。

Apo-E 受容体が HCV の感染に重要である

リポ蛋白質の受容体は数種存在する。そのなかで肝細胞に発現している受容体は LDLR、SR-B1、LRPs など数種類存在する。これらのリガンドは Apo-B、Apo-E である。LDLR および SR-B1 が HCV の受容体のひとつとして機能していることが知られている。どちらの受容体が重要なのかについては結論がつかっていない。しかし、LDLR あるいは SR-B1 を別々に発現抑制させた細胞に対する感染実験から、両方の受容体が HCV の感染初期に機能していると考えられる。

Apo-E アイソフォームにより HCV 感染性は異なる

Apo-E にはアイソフォーム (Apo-E2, E3, E4) が存在する。Apo-E3 が正常型で、8割以上のヒトは Apo-E3(ヘテロも含めて)をもっている。Apo-E2 および Apo-E4 をもつ個体では、それぞ

れ脂質代謝異常部、神経疾患との関連が示されている。異なる Apo-E アイソフォームを発現する細胞から産生される HCV の感染性を調べると、Apo-E2 と含有しているウイルス粒子の感染性が著しく低い。Apo-E2 は LDLR との親和性が Apo-E3, E4 に比べ低いことが知られているので、Apo-E2/ HCV の低い感染性は LDLR との親和性が低いためである可能性が考えられる。

おわりに

HCV が複製増殖する過程で宿主細胞の脂質代謝および輸送系が、ここに紹介したように種々の形で変化していることが明らかになりつつある。脂肪摂取過多によ

る脂肪肝とは異なり、HCV による積極的な脂質代謝の修飾が感染細胞内の脂質量を変化させ、さらには脂質成分の細胞外への輸送にも影響を与えているかもしれない。このような状態のなかで、ウイルス感染により引き起こされる炎症が加わり、NASH 様症状が現れるものと考えられる。したがって、HCV 感染者に対して脂質代謝を制御する方法は、抗 HCV のひとつの方法になる。

1) Wakita, T. et al.: *Nat. Med.*, 11: 791-796, 2005.
2) Miyanari, Y. et al.: *Nat. Cell Biol.*, 9: 1089-1097, 2007.

下道野邦忠/Kunitada Shimomoto
千葉工業大学附属総合研究所

循環器内科学 ホルミシス応答による心筋保護 Cardioprotection by hormesis

われわれは心理的重圧、精神的動揺、過度の肉体的負担など、さまざまなストレスに囲まれて生活している。過度なストレスは病気の原因となる。慢性ストレスは動脈硬化を進め、そこへ急性ストレスが加わるとプラークの破綻から心筋梗塞を引き起こし、突然死の原因となる。反対に過度なストレスは健康を増進することが知られている。たとえば、過度なカロリー制限や運動は冠動脈疾患、高血圧、糖尿病、癌の発症を抑制し、加齢に伴う認知機能低下を遅延させる効果をもつ。このようにストレスに対する生体の用量反応関係(dose-response)は二方向性で、ストレスが軽度である場合は生存に有利に働くため化させて健康を増進する方向に作用するのに対して、ストレスが過度になると早期老化や臓器障害の原因となる。このような二方向性の用量反応関係のことを「ホ

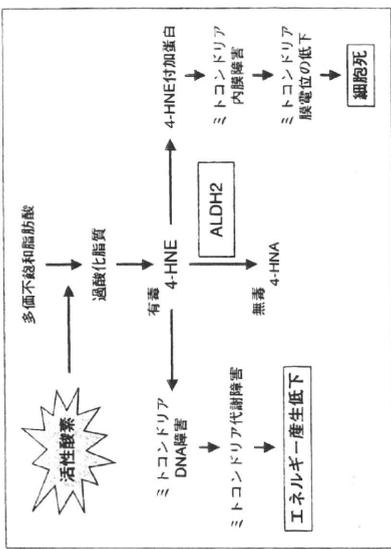


図1 アルデヒドによる障害機序

アルデヒド分解酵素 ALDH2をめぐる最近の話題

アルデヒドの無毒化にはいくつもの代謝経路があるが、aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) はアルデヒドをカルボン酸へ酸化することによって無毒化する酵素である。ヒトゲノム上に 19 個の ALDH 遺伝子が存在するが、なかでも ALDH2 は飲酒時に肝でアセトアルデヒドを酢酸に分解する酵素として有名である。しかし、ALDH2 は二日酔い防止のためだけに体内に存在している酵素ではない。ALDH2 は活性酸素の主要な産生場所であるミトコンドリア内に局在し、その本来の機能は脂質過酸化反応の結果生成される 4-HNE などのアルデヒドを無毒化する重要な抗酸化ストレス酵素である。

最近 ischemic preconditioning の分子機序に関して、新しい知見が報告された。Ischemic preconditioning に関する報告は 1986 年の Elizabeth Murphy らの研究によって最初であり、その後の解析によって PKCε の活性化が鍵を握ることが明らかにされた。しかし、PKCε のリン酸化標的蛋白質は、

これまで同定されていないかった。Daria Mochly-Rosen らは、PKCε がミトコンドリアに移動して ALDH2 をリン酸化して活性化することを報告した。さらに、ALDH2 を活性化する低分子量化合物として Alda-1 を探索・発見し、Alda-1 の虚血再灌流障害による心筋障害を 40% も減少できることを報告した³⁾。

ALDH2 には遺伝子多型が存在する。アミノ酸がひとつだけ置換された不活性変異体 ALDH2*2 は優性抑制性に作用するが、四量体のなかにひとつでも ALDH2*2 が含まれると酵素活性は消失する。したがって、ALDH2*2 をヘテロでもつ人(日本人の約 40%)は ALDH2*2 のホモのヒト)と比べると、ALDH2 の酵素活性は 1/16 まで低下している。ALDH2*2 のホモのヒト(日本人の約 10%)は、もちろん ALDH2 の酵素活性はない。ALDH2 がミトコンドリアに局在する重要な抗酸化ストレス酵素であることを考慮すると、ALDH2*2 の遺伝子多型が単にお酒が飲めるか、飲めないかを規定するだけでなく、避妊性 Alzheimer 病や心筋梗塞、ある種の癌、糖尿病の発症にも関与しているとする疫学研究の結果も説明できる。

ストレス応答性ホルミシスは、ミトコンドリアに膜持続性にアルデヒドに曝露されつつある状態でも樹立される

ミトコンドリア ALDH2 活性の低下が生体にとどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、ALDH2*2 を過剰発現させたマウスを作製した⁴⁾。興味深いことに

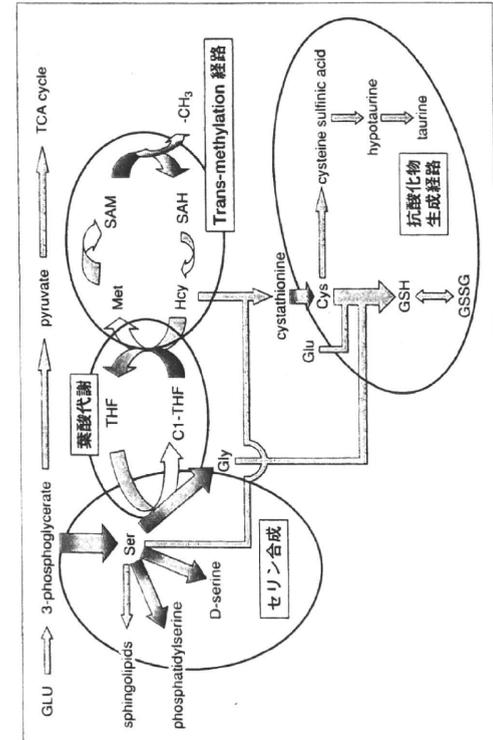


図2 ALDH2*2過剰発現マウスで充満したおもな代謝経路

臓器によって表現型は大きく異なる。脳においてALDH2*2を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、加齢に伴って海馬の錐体細胞が変性・脱落している。記憶力の低下などヒトのAlzheimer病類似の表現型を呈し、寿命も短かった。一方で心臓に過剰発現させたトランスジェニックマウスは、加齢とともに心不全を呈することなく、虚血再灌流障害に対してはむしろ耐性を示した。心筋細胞のミトコンドリアにはアルデヒドが蓄積し、電子顕微鏡下の観察ではミトコンドリア内に電子密度の高い蓄積物を認め、ミトコンドリアクリスタの構造が障害されていた。この一見矛盾する現象は、ミトコンドリアが持続的にアルデヒドストレスによって感傷された結果、ホルミシス効果が発揮されつづけていることによる説明できると考えた。

その分子機序を検討した結果、catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase などの主要な抗酸化ストレス酵素の発現量

すことによって(好氣的解糖)心筋取縮に必要なエネルギーをまかなっていることが示唆された。さらに、グルコースは解糖系でピルビン酸まで代謝されるだけでなく、中間代謝産物からペントースリン酸経路やアミノ酸セリルン、さらにはグルタチオン合成経路へも代謝されるように変化していた。ペントースリン酸経路を介して合成されるNADPHは、酸化型のGSSGを還元型GSHに戻して再利用するのに使われ、還元型GSH濃度を高く維持するため、一般買っていると考えられた。

従来の preconditioning による心筋保護は、細胞死を制御するミトコンドリアのMPTPの開口を抑制することによって達成される。しかし、このトランスジェニックマウスでは、酸化ストレスが蓄積したミトコンドリアから核に向けてシグナル(ミトコンドリア・レトログレード・シグナリング)が伝達され、細胞内代謝経路を再構築させることによりホルミシス効果を発現させていた。ミトコ

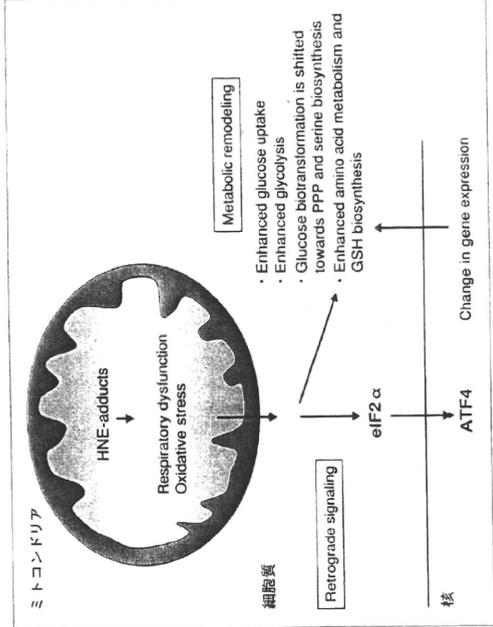


図3 ミトコンドリア・レトログレード・シグナリングと心筋代謝リモデリング

ア・レトログレード・シグナリングが、心筋の抗加齢あるいは病態下における心筋細胞保護に実際に関与しているのかどうかは興味深い⁹⁾。加齢に伴ってROSの産生は高まり、ミトコンドリアDNAや蛋白、脂質などの高分子の酸化ダメージは進行する。それに伴って産生されるアルデヒドによるホルミシス効果が発現されれば、臓器の恒常性は永久的に保たれることとなる。しかし高齢者では、虚血再灌流障害に対する抵抗力が低下している。それに伴って高齢者では、eIF2αリン酸化シグナルを介するミトコンドリア・レトログレード・シグナリングの反応性が低下している可能性がある。ラットにおいては、eIF2αリン酸化レベルが加齢した組織で低下していることが報告されている。ストレス応答が加齢によって減弱する機序の解明は、老化の機序を解明するうえでこれからの重要な研究

テーマになると考えられる。

1) Conklin, D. et al.: Aldehyde metabolism in the cardiovascular system. *Mol. Biosci.*, 3: 136-150, 2007.

2) Zhang, Y. et al.: 4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2010. (in press)

3) Chen, C. H. et al.: Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*, 321: 1493-1495, 2008.

4) Endo, J. et al.: Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. *Circ. Res.*, 105: 1118-1127, 2009.

5) Sano, M. and Fukuda, K.: Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis. *Circ. Res.*, 103: 1191-1193, 2008.

佐野元昭 / Morooki Sano
慶應義塾大学医学部循環器内科

1. 心筋疾患

話題の心筋症

4) ミトコンドリア異常と心筋病変

佐野元昭¹⁾ 木村謙介¹⁾
小平真幸¹⁾ 影山智己²⁾

ア DNA 比率は細胞ごと、臓器ごとに、あるいは同じ母親から生まれた子供の間でもかなり異なってくる。細胞全体として変異ミトコンドリア DNA の割合がある一定以上を超えるとミトコンドリア呼吸機能障害が出現する (閾値効果 threshold effect)。したがって例え同じ変異ミトコンドリア DNA をもっていても臨床症状は多彩で予測不能である。

例えばロイシン t-RNA 上にある 3243A → G 点変異 [A3243G (RRNLeu)] は MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episode) の患者にみつかると代表的なミトコンドリア DNA 点変異だが、実は糖尿病患者の全体の約 1% に A3243G (RRNLeu) がみつかると、日本には 890 万人の糖尿病患者がいるといわれているので該当する患者は数万人の規模になる。これらの患者では母系に糖尿病の家族歴、難聴を伴う、合併症として神経障害もつ頻度が高いなどの特徴がある。神経障害を合併しても糖尿病患者では A3243G (RRNLeu) がみつかると頻度は実に 4% にまで増加する。つまり同じ A3243G (RRNLeu) をもっている人もある人はミトコンドリア脳筋症を発症し、またある人は糖尿病患者としてメタボリックシンドロームの患者に紛れて治療を受けている。

II. ミトコンドリア異常と心筋病変

ミトコンドリア病はその症状によって病型が分類される。

- ・ CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia)
- ・ MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)
- ・ MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fiber)
- MELAS と MERRF の患者からはミトコンドリア

I. ミトコンドリア病総論

ミトコンドリアは細胞内小器官の一つでありその主要な働きはエネルギー (adenosine 5'-triphosphate: ATP) 産生である。核 DNA とは別にミトコンドリアは独自の DNA をもつ。細胞あたり 100~2,000 個のミトコンドリアがあり、ミトコンドリア内に数個のミトコンドリア DNA がある。エネルギー産生に直接関わる電子伝達系酵素は 100 個以上あるが、ミトコンドリア DNA に書き込まれている遺伝子からつくられるのは蛋白質が 13 種類 (電子伝達系の複合体 I, III, IV, V のサブユニット)、これら 13 種類の蛋白質の翻訳過程に使われる転移 RNA (t-RNA) が 22 種類、リボソーム RNA が 2 種類の合計 37 種だけで、これ以外は全て核 DNA にコードされている。

ミトコンドリアでのエネルギー産生の過程で、電子伝達系から活性酸素が発生するため、ミトコンドリア DNA は核の DNA と比べて変異を起こしやす。ミトコンドリア DNA の質的異常には欠失・重複変異、点変異が存在する。変異をもつミトコンドリア DNA と正常ミトコンドリア DNA は混在している (heteroplasm)。受精の際には母親由来の正常ミトコンドリア DNA と変異ミトコンドリア DNA の極一部がランダムに娘細胞に受け継がれるため (genetic bottleneck) 同じ母親から生まれた子供の中でも変異ミトコンドリア DNA と正常ミトコンドリア DNA 比率は様々である (母親より変異ミトコンドリア DNA % が高まる可能性もある)。さらに、その後の発生・分化の過程における細胞分裂でミトコンドリアはランダムに娘細胞に分配されていくため (mitotic segregation)、変異ミトコンドリア DNA と正常ミトコンドリア

¹⁾慶應義塾大学医学部循環器内科
²⁾さいたま市立病院循環器内科

図3 ミトコンドリア遺伝子 (rRNA-Lys) ダイレクトシーケンシング解析結果

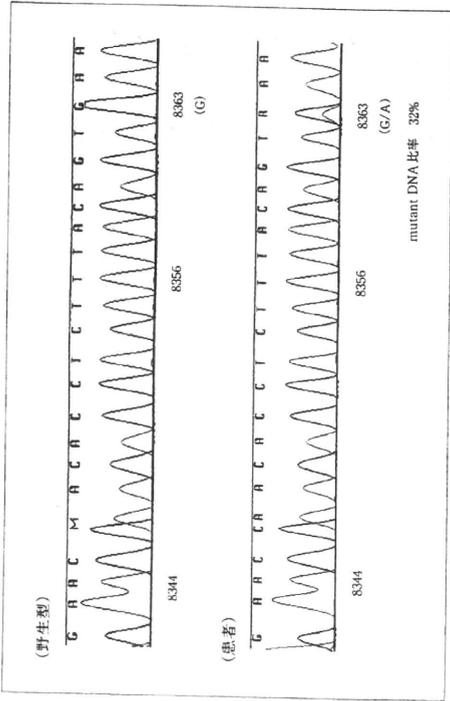


表1 過去に報告された G8363A 変異を認める家系と本症例との臨床像の比較

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	本症例
心筋症	●	●	●		●	●			●	●
痺痺	●	●				●	●			●
外眼筋麻痺	●	●					●	●		
脂肪腫		●				●	●			●
ミオクローヌスてんかん			●		●	●	●	●		
小脳失調	●	●	●	●	●	●	●			
筋症状	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
末梢神経障害	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
認知・運動遅行	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
自閉症										
腎障害										●

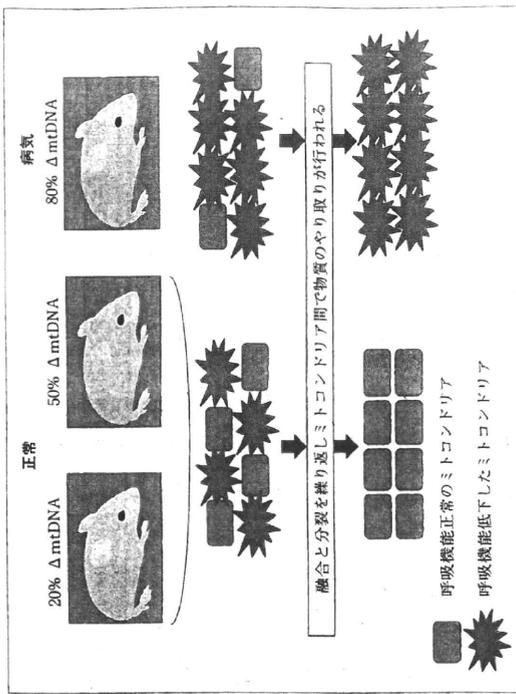
・耳鼻科：左高首節感音性難聴。
 ・眼科：網膜等に異常所見なし。
 ・心筋生検：光顕像では心筋層内に高度の線維化，およびまばらに残存する心筋細胞の肥大を認める(図2c)。電顕像では一部にミトコンドリアの数の増加を認め，類結晶状封入体も認める(図2d)。
 ・ミトコンドリア DNA 遺伝子検査(血液細胞)：リジン tRNA 内の G8363A 変異を検出(図3)。
 慢性心不全，慢性腎不全，筋力低下で加療中に遺伝子診断によってミトコンドリア心筋症 G8363A と診断された。

V. ミトコンドリア DNA 変異と疾患

ミトコンドリア DNA 変異の蓄積によるミトコンドリア電子伝達系の機能異常が疾病発症との間に因果関係があるのだろうか？ この疑問に対して筑波大学の林純一先生らは変異ミトコンドリア DNA (全ゲノム NA4696) と野生型ミトコンドリア DNA を heteroplasmy でもつミトコンドリア遺伝子疾患病態マウス (Mito-Mice) を作製して答えを出した。ΔmtDNA4696 が 80% を超えた Mito-Mice において電子伝達系の呼吸活性が低下し，これに伴い低体重と高乳酸血症，聴力障害，腎不全，心臓の伝導障害 (Wenckebach 型)，雄性不妊症，空間記憶の障害などの異常が観察された。

ミトコンドリアは酸化ストレス環境にあり，核の DNA と比べてミトコンドリア DNA には変異が入りやすい。これに対してミトコンドリアは融合と分裂を繰り返して，ミトコンドリアの膜，ミトコンドリア DNA，およびその遺伝子産物を補い合うことで，酸化ストレス障害によってグロマーバルなミトコンドリア機能が低下しないように代償機転を働かせていると考えられる。その証拠にミトコンドリア DNA 変異 A4269G (tRNAIle) と A3243G (tRNALeu) を homoplasmity にもつ細胞はそれぞれ単一細胞では呼吸活性は認められないが，この2つの異なるミトコンドリア DNA 変異をもつ細胞の融合細胞をつくるとミトコン

図4 閾値効果の分子機序 (文献5より改変)



ドリア DNA やその遺伝子産物を交換し合うことによって結果的にミトコンドリア呼吸機能は回復していることが実験的に証明された。
 Mito-Mice においても ΔmtDNA4696 が 75% までは細胞全体としてのミトコンドリア呼吸機能は野生型マウスのミトコンドリアと同程度に維持されるが，ΔmtDNA4696 が 75% を超えるとミトコンドリア呼吸機能が低下し始め，80% を超えるとミトコンドリア呼吸機能が消失して様々な臓器機能障害を呈してくる(図4)。この Mito-Mice の解析結果から，ミトコンドリア DNA 変異をもつ患者において変異型 mtDNA があるレベル以上に蓄積しない限り発症しない閾値効果 threshold effect の分子機序が推察される。

おわりに

ミトコンドリア病の臨床像は，変異ミトコンドリア DNA の相対量，変異ミトコンドリア DNA の組織分布，酸化的代謝障害に対する組織の脆弱性によって規定される。変異ミトコンドリア DNA をもついても，多くの場合閾値効果によって無症状で経過していると考えられる。変異ミトコンドリア DNA の相対量が閾値以下であっても，加齢とともに代償不全を起こし

トコンドリア病を発症する、あるいは細胞死に対する感受性が亢進して後天的な疾病の病態を修飾している可能性が示唆される。ミトコンドリアはエネルギー代謝、細胞死の制御、Caホメオオスタシス維持など多彩な作用をもつオルガネラである。最近になってようやくその機能解析に分子生物学的手法が導入され、細胞生物学的あるいは臨床学的な見地からの疑問点が明らかにされつつある。しかし、依然として不明な点が多く、ミトコンドリア病に対する有効な治療法の開発のためにもさらなる基礎研究の発展が望まれる。

文 献

1) ミトコンドリアとミトコンドリア病. 日本臨牀

2002, 60 (増刊)

- 2) 瀬名秀明, 末田成男: ミトコンドリアと生きる, 角川書店, 東京, 2000
- 3) Momiyama, Y., Suzuki, Y., Ohsuzu, F. et al.: Maternally transmitted susceptibility to non-insulin-dependent diabetes mellitus and left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 1999, 33 : 1372-1378
- 4) Kerr, D.S.: Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: a review of clinical trials over the past decade. *Mol Genet Metab* 2010, 99 : 246-255
- 5) Nakada, K., Sato, A., Hayashi, J.: Mitochondrial functional complementation in mitochondrial DNA-based diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009, 41 : 1907-1913



心不全と腎臓病

佐野元昭, 福田恵一
慶應義塾大学 循環器内科

心不全の治療は症状の改善だけでなく、再入院の予防や予後の改善をめざしたものでなくてはならない。わずかな血清クレアチニン値上昇が心不全患者の予後に悪影響を及ぼすことから、つねに心腎連関を考慮した心不全治療が求められるようになってきている。

Key words

cardiorenal syndrome (心腎症候群), AKI (急性腎障害), 腎交感神経アブレーション, カルペリチド, トルバブタム

はじめに

高齢化や生活習慣病にもとづく動脈硬化性疾患の増加に加え、これらハイリスクの患者にも積極的に治療介入(外科手術, カテーテルインターベンションを含む)をおこなうようになった結果、入院患者が急性腎障害を発症する頻度が高まってきた。このような流れのなか、今から10年ほど前より、おもに集中治療の現場でそれまではほとんど問題視されなかった0.3 mg/dl程度のわずかな血清クレアチニン値上昇でさえも患者の予後を悪化させることが報告され、より早期あるいは軽症の段階からリスクととらえて積極的に診断・治療介入する機運が盛り上がってきた。急激に腎機能障害をきたす病態は、急性腎障害(acute kidney injury: AKI)と定義され、血清クレアチニン値と尿量によって病期基準が設定された(表①)¹⁾。この病期基準の妥当性はその後の多くの臨床研究によって検証されてきている。

心不全に伴う腎機能障害の頻度

急性心不全(acute decompensated heart failure: ADHF)の患者で腎機能が低下している症例や入院中に腎機能が悪化する症例は日常臨床においてよく遭遇する。AD-

HERE 研究によると急性心不全入院患者のうち入院時の血清クレアチニン・クリアランス(CCr)が正常(≥ 90 ml/min/1.72 m²)であった症例はわずか9%にすぎず、軽度低下(CCr 60~89 ml/min/1.72 m²)であった症例は27%、中等度低下(CCr 30~59 ml/min/1.72 m²)であった症例は43%、高度低下(CCr 15~29 ml/min/1.72 m²)であった症例は13%、腎不全(CCr<15 ml/min/1.72 m²)であった症例は7%であった。また、入院中に腎機能が悪化する症例を30%程度に認めた²⁾。

心不全に伴う腎機能障害の意義

腎障害は短期、長期予後不良を示唆する最も重要な独立した危険因子の1つである。腎障害は左室駆出率やNYHA機能分類よりも強力な予後不良を示唆する危険因子である。ADHERE研究では予後(院内死亡)予測因子としてBUN ≥ 43 mg/dl, Cr ≥ 2.75 mg/dl, SBP<115 mmHgが最も精度が高いと報告している。BUN ≥ 43 mg/dl, Cr ≥ 2.75 mg/dl, SBP<115 mmHgが最も高リスク群であり院内死亡率は21.94%, BUN<43 mg/dl, Cr<2.75 mg/dl, SBP ≥ 115 mmHgが低リスク群であり院内死亡率は2.14%であった³⁾。

血清クレアチニン値がベースラインで高値の症例だけ

表① AKIの病期分類

	糸球体濾過率	尿量
1	血清 Cr が 0.3 mg/dl あるいは 1.5 倍以上に上昇	尿量 0.5 ml/kg/hr 以下が 6 時間
2	血清 Cr が 2 倍以上に上昇	尿量 0.5 ml/kg/hr 以下が 12 時間
3	血清 Cr が 3 倍以上に上昇	尿量 0.3 ml/kg/hr 以下が 24 時間、または無尿が 12 時間

(Lassnigg A *et al*, 2004¹⁾より引用)

表② 心腎連関—Ronco の分類—

分類	別名	原因
Type 1	急性心腎症候群	急性に心機能低下→腎機能低下
Type 2	慢性心腎症候群	慢性に心機能低下→腎機能低下
Type 3	急性腎心症候群	急性に腎機能低下→心機能低下
Type 4	慢性腎心症候群	慢性に腎機能低下→心機能低下
Type 5	2 次性心腎症候群	全身性疾患の 1 症状として腎・心が障害

(Ronco C *et al*, 2008²⁾より引用)

でなく、おそらく最も重要なのは入院中のわずかな血清クレアチニン値の上昇が入院期間の遷延化、高い再入院率、高い死亡率と相関する事実である。GottliebらはADHFで入院した患者の47%において入院後最初の3日間で腎機能低下を認めたと報告している⁴⁾。もともと慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) が存在していればAKIの発症のリスクはさらに高くなり重症化する。もともと腎機能が正常であっても入院中のAKI発症は予後不良の予測因子となる。0.3 mg/dl程度のわずかな血清クレアチニン値上昇が予後に悪影響を及ぼす循環器領域の疾患は心不全だけでなく、ACSによる入院患者、cardiothoracic surgery後の患者にもあてはまる。特記すべきことは入院中の一過性のAKIであっても長期生存率に悪影響を与える事実である⁵⁾⁶⁾。また、cardiothoracic surgeryのなかではCABGやaortic surgeryにおいてはAKIの発症の有無が予後不良因子となるのとは対照的に弁膜症の手術例ではAKIの発症の有無が予後に影響を及ぼさなかった。

Cardiorenal syndrome

Cardiorenal syndrome は、National Heart, Lung, and

Blood Instituteによって“A state in which therapy to relieve heart failure symptoms is limited by further worsening renal function”と定義されている (NHLBI Working Group, 2009)。Roncoらは心腎連関を5つに分類した。Type Iは心機能が急速に低下することによって腎障害をきたす場合、Type IIは慢性に心機能が低下することによって腎障害をきたす場合とした。Type IIIは腎機能が急速に低下することによって心機能が低下する場合、Type IVは腎機能が慢性に低下した結果、心機能が低下する場合とした。Type Vは糖尿病、膠原病、敗血症のような全身疾患による障害が心臓と腎臓に同時に起こる場合とした。そしてType I、Type IIをあわせてcardiorenal syndrome (心腎症候群)、Type III、Type IVをあわせてrenocardiac syndrome (腎心症候群)とよぶべきであると提唱している (表②)⁷⁾。

Cardiorenal syndrome を考慮した心不全治療

心不全の治療は症状の改善だけでなく、再入院の予防や予後の改善をめざしたものでなくてはならない。わずかな血清クレアチニン値上昇が心不全患者の予後に悪影響を及ぼすことからつねに心腎連関を考慮した心不全治

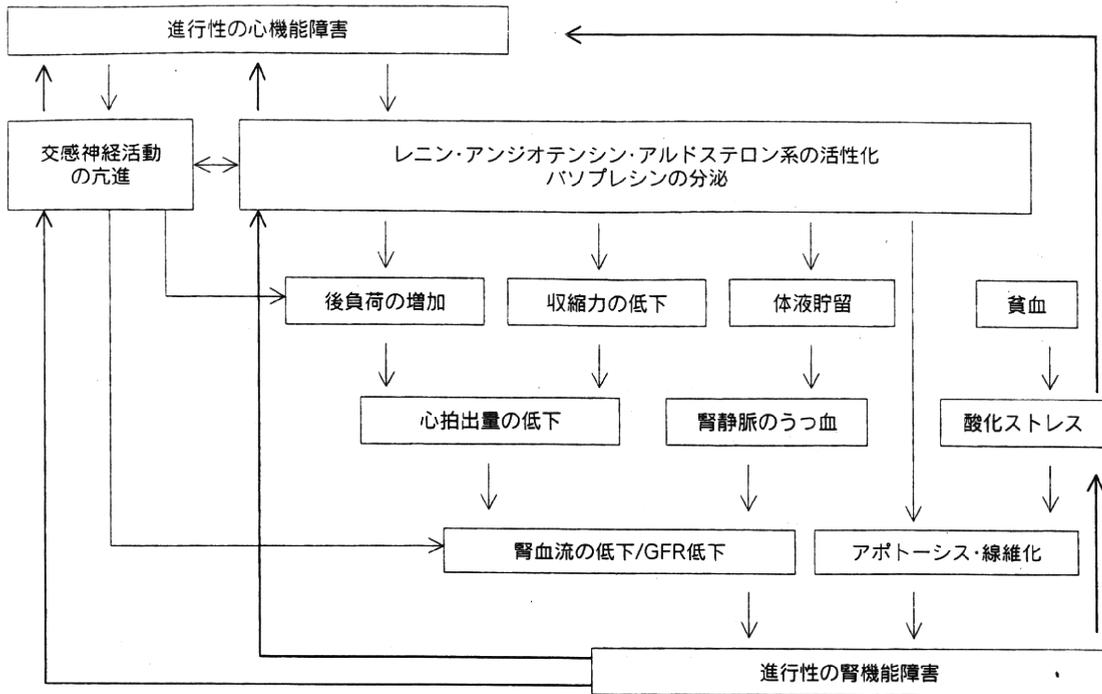


図1 Cardiorenal syndrome の発症機序 (Bock JS et al, 2010⁸⁾より引用)

療が求められるようになってきている (図1)⁸⁾。

心臓と腎臓は互いに協調しながら循環血液量や血管のトーン (末梢血管抵抗) を増減して血圧や各臓器への血流量を精巧に調節している。正常心では心房圧が上昇すると圧受容体を介して非浸透圧性の vasopressin の分泌、交感神経中枢から末梢臓器への遠心性インパルス、循環血液中のレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) は抑制され、心房からの natriuretic peptide の分泌が亢進して腎臓からの水やナトリウムの排泄は促進される。心不全の患者では有効循環血液量の低下から圧受容体を介するこの negative feedback 機構がはずれて浮腫、肺うっ血、低ナトリウム血症をきたす。

ADHF によって腎血流量が低下すると腎臓から交感神経中枢への求心性インパルスが増加して交感神経中枢を興奮させる結果、腎臓を含む末梢の交感神経活動が亢進し腎臓内のレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の活性化、酸化ストレスの増強、サイトカイン・ケモカイン、生理活性脂質などの過剰かつ持続的な産生亢進が起こり腎臓に組織学的リモデリングを伴う不可逆的な障害を引き起こす。

1) 腎血流量の低下

腎血流量 (腎灌流圧) の低下は2つの機序で起こると考えられている。1つ目は誰もが考える心拍出量の低下に伴う腎血流量の低下である。しかし、433人のADHFの患者にSwan-Ganzカテーテルを挿入して血行動態をモニターしながら治療したESCAPE研究では心係数の低下と腎機能障害のあいだに相関はみられず、心係数の改善は必ずしも腎機能の改善には結びつかなかった⁹⁾。経静脈的強心薬であるミルリノンは心拍出量を増やして腎血流量を増やす作用があるが、OPTIME-CHF研究ではADHFの治療に短期間ミルリノンを使用しても入院期間の短縮効果、死亡率や再入院率の改善効果は認められなかった^{10,11)}。ミルリノンを使用して血行動態をより早期に安定化させることができれば退院前までにACE阻害薬の用量を十分量まで上げることが可能であると想定されたが、実際には入院早期に短期間ミルリノンを使用してもACE阻害薬の増量には結びつかなかった。ACE阻害薬の増量の可否は血圧と腎機能障害の程度に依存していると考えられ、この結果は短期間ミルリノンを使用して心拍出量を上げてやっても腎保護には結びつかな

かった可能性を示唆する。

2つ目は中心静脈圧の上昇である。基盤に腎機能障害をもつ心不全患者あるいは入院中に AKI を発症した心不全患者の中心静脈圧は有意に高いことが報告されている¹²⁾。ESCAPE 研究でも心係数や pulmonary capillary wedge pressure は腎機能障害の程度と相関はみられなかったが、唯一右房圧が腎機能障害と相関することが報告された¹³⁾。腎静脈圧を上昇させると尿量が減少し腎血流が低下することは古くから動物実験で確認されている。また、中等度以上の三尖弁逆流のある患者は逆流の重症度と腎機能障害の程度に相関がみられるとの報告もある¹⁴⁾。

2) 交感神経系の過剰な活性化

心拍出量の低下にせよ腎静脈圧の上昇にせよ腎血流量が低下すると腎臓から交感神経中枢への求心性インパルスが増加して交感神経中枢を興奮させる。その結果、全身への遠心性交感神経系活動が亢進し、腎臓では β_1 受容体を介したレニンの分泌、 α_1 受容体を介した尿細管でのナトリウム再吸収亢進、腎動脈の収縮をきたす。CKD の患者では虚血、アンジオテンシン II (A II)、酸化ストレスなどの情報が求心性腎神経を介して交感神経中枢を興奮させその結果全身への遠心性交感神経系活動が亢進している¹⁵⁾。このように求心性腎神経からのインパルスは交感神経中枢の活動性を制御する重要なシグナルとなっている。

昨今、難治性高血圧に対する腎交感神経 ablation 治療の有効性が報告された。腎交感神経 ablation 後に認められる降圧効果に伴って予想どおり腎臓での norepinephrine (NE) の spill over (交感神経活動を直接反映する指標である) やレニン活性が抑制されていた。ところが、全身の NE の spill over も低下していたことから腎交感神経 ablation によって求心性と遠心性の腎神経が両方とも障害され、その結果、交感神経中枢の興奮を介する遠心性交感神経活動の活性化が抑制されたことを示している。興味深いことに腎交感神経 ablation 治療を受けた難治性高血圧患者の 24% において 20% 以上の GFR の改善を認めた。腎神経の ablation が急性および慢性の腎障害に対して保護的にはたらくという報告は動物実験

でも確認されている¹⁶⁾¹⁷⁾。心不全患者を対象に腎交感神経 ablation 治療はおこなわれていないが、以上の結果は cardiorenal syndrome を考慮した心不全治療において交感神経遮断薬は中心的な役割を担う方向性を示している。

慢性心不全において MERIT-HF¹⁸⁾、U. S. Carvediol HF study¹⁹⁾、COPERNICUS²⁰⁾、わが国の MUCHA²¹⁾ など数多くのランダム化比較試験で β 遮断薬の有用性が示されている。腎機能障害を有する心不全患者に β 遮断薬の投与が慎重になるのは心拍出量が減ると腎血流量がさらに低下するのではないかと懸念があるためだと思われる。しかし、実際には β 遮断薬が原因で腎機能が低下する経験は少なく、前述したように心拍出量の低下と腎機能低下の程度には必ずしも相関関係を認めないようである。過度な降圧にさえ注意すれば心保護および腎保護の両方の面から入院後できるだけ早期から β 遮断薬の投与を開始すべきであると考えられる。

3) レニン・アンジオテンシン系 (RAS)

腎血流量 (腎灌流圧) が低下すると juxtaglomerular cell (傍糸球体細胞) からのレニンの分泌が引き金となり循環血液中の RAS が活性化される。一方で、腎臓内の RAS の活性化は NAD(P)H oxidase を介した活性酸素の産生、免疫の過剰反応、病的な線維化をきたし非可逆的な腎障害を引き起こす。ACE 阻害薬や ARB には糖尿病性腎症の進行を抑制する効果がある。心不全患者において ACE 阻害薬や ARB が心臓リモデリング抑制効果を介さず腎保護作用があるか否かは明らかでない。また AKI を合併した ADHF 患者に対して入院早期から ACE 阻害薬や ARB を投与すべきか否かも定かではない。

しかし、慢性心不全患者の予後を ACE 阻害薬や ARB が改善させることは疑いの余地はない事実である。わずかな血清クレアチニン値上昇が心不全患者の予後に悪影響を及ぼすことが広く知られるようになり、輸出細動脈を開いて糸球体内圧を低下させる結果、機能的に GFR を低下させる ACE 阻害薬や ARB の投与開始や増量にためらう事例も多く経験される。しかし、両側腎動脈狭窄症など ACE 阻害薬や ARB 投与が禁忌となる症例以外は、過度な利尿薬の投与を控えて血管内脱水に傾かせない努力を払いながら ACE 阻害薬や ARB は退院時まで

には導入し可能なかぎり増量を試みる努力が必要である。

4) 体液貯留

ADHFは左室充満圧上昇に伴う肺水腫による症状が前景にたつ。肺水腫には体液が心肺に分布する central volume shift によるものと心腎連関によって全身に体液が貯留する volume retention による2つの機序がある。前者は vascular failure とよばれる左室拡張障害と血管抵抗増大に起因する肺水腫で NIPPV と血管拡張薬が治療の中心で利尿薬を必要とすることは少ない。後者は慢性的な水分貯留に対して利尿薬が治療の中心として用いられる。

a. フロセミド

フロセミドは心不全治療に必須だが、フロセミドの使用によって腎機能が改善するケースも反対に悪化するケースも経験する。腎静脈のうっ血がとれて腎機能が改善するのかもしれない。一方で、RAASをはじめとする神経体液性因子の活性化、過度な利尿による腎灌流圧の低下、血圧低下によって腎機能が低下することもある。フロセミドの使用量が血清クレアチニン値上昇や生存率の低下と相関すると報告された²²⁾が、この理由は高用量のフロセミドを使用せざるを得ない心不全患者は重症であったことを反映しているのかもしれない。フロセミドを投与すると RAAS が活性化され組織の線維化が進行する。ラットの動脈縮窄による心臓圧負荷モデルにおいてフロセミド投与群において血液中アルドステロン濃度が高くより早期に代償破綻(心不全)を起こすことが報告されている。また、フロセミドは腎臓の尿細管における 11β -hydroxy-steroid dehydrogenase-2 の活性を抑制して、glucocorticoid が mineralocorticoid receptor を活性化するようになることが報告されている²³⁾。フロセミドは体液貯留をきたす心不全治療において中心的役割を果たすが、フロセミドの使用量は最低限度にとどめる努力を払うべきである。いうまでもなく間質から血管内に水分が戻ってくるスピードを上回るスピードで利尿をつけるのは控えるべきである。

b. Mineralocorticoid receptor 遮断薬

ACE 阻害薬や ARB を投与して RAS を遮断しても aldosterone の濃度が再上昇する aldosterone breakthrough

現象が観察される。われわれは、食塩感受性ラットに高食塩を負荷すると血漿中のレニン活性や AII 濃度が低く抑えられているにもかかわらず心不全期に入ると血液中 aldosterone 濃度が不釣り合いに上昇してくる現象を観察している。Aldosterone は食塩が存在するときにはじめて臓器障害性に作用する。Aldosterone 受容体である mineralocorticoid receptor が aldosterone 非依存性に活性化される現象も報告されている²⁴⁾。

RALES, EMPHASIS-HF のランダム化比較試験(RCT)で mineralocorticoid receptor 遮断薬の投与は β 遮断薬や ACE 阻害薬, ARB が投与されている NYHA II 度以上の左室機能の低下した慢性心不全患者の予後をさらに改善することが実証された²⁵⁾²⁶⁾。臨床的に mineralocorticoid receptor 遮断薬の有効性は確認できたが、どこに作用してどのように心臓にはたらくているのかについてはいまだ説明されていない。腎臓尿細管からのナトリウムの再吸収を阻害していることが根本的に重要なのか、心臓や血管、腎臓の非上皮系細胞の mineralocorticoid receptor を遮断することにもとづく細胞死抑制、抗炎症・抗線維化効果が臓器保護に関与しているのかまったく不明である。ADHF に対する mineralocorticoid receptor 遮断薬の投与が cardiorenal syndrome を予防する効果や予後を改善する効果があるか否かに関しては RCT では実証されていないが、高カリウム血症に注意しながら早期から使用する価値は十分にある。

c. Natriuretic peptide

Natriuretic peptide はわが国ではカルペリチド (ANP 製剤)、米国では nesiritide (BNP 製剤) が使用されている。2010 年 AHA の late-breaking clinical trials で ADHF 患者に対する nesiritide の効果を検討した RCT, ASCEND-HF が発表された。その結果、nesiritide には以前のメタアナリシス²⁷⁾で報告されたような腎機能を悪化させる負の作用はなかったものの、心不全症状、再入院率、死亡に関しては従来治療群とくらべて改善効果を認めなかった。一方では、血圧を低下させない低用量の nesiritide は腎機能を改善させるとの報告もあり²⁸⁾、更なる ASCEND-HF 研究が必要である。

わが国では volume retention が前景にたつ ADHF の

治療に腎保護効果も期待して超急性期から血圧に対する影響を配慮して低用量 (0.0125 mg/kg/min) のカルベリチドが使用されるケースが多い。慶應義塾大学病院循環器内科でも過去3年間ADHF入院患者の2/3においてカルベリチドが使用されていた。カルベリチドは適度な血管拡張作用があり、過度な利尿は起こさないという点でADHFのオートマティックな治療薬として使いやすいことを反映しているのかもしれない。

Cochrane libraryからも低用量カルベリチドがAKIの予防に有効であるという解析結果が報告されている²⁹⁾。

カルベリチドには動物実験レベルではRASに対する拮抗作用、交感神経抑制作用、サイトカインストーム抑制作用が報告されている。J-WIND研究では心筋梗塞後の急性期に3日間カルベリチドを投与すると梗塞サイズ縮小効果があるという結果が報告されている³⁰⁾。より大規模なPROTECT試験³¹⁾でカルベリチドのADHF治療における有効性を証明することが必要である。

d. Vasopressin 受容体拮抗薬

Vasopressinには浸透圧依存性と非依存性の分泌調節機構がある。浸透圧非依存性の分泌機構が心不全の病態に関与している。生理的な条件下では圧受容体を介したnegative feedback機構で下垂体後葉からのvasopressinの分泌は持続性に抑制されている。心不全患者では有効循環血流量の低下から圧受容体を介するvasopressinのtonicな分泌抑制がはずれて、血漿浸透圧とは不釣り合いに過度のvasopressin分泌を起こしている。Vasopressinは血管や腎臓メサンギウム細胞に発現しているV_{1a}受容体を介して血管収縮作用や細胞増殖作用を発揮し、集合尿管に発現しているV₂受容体を介して水分の再吸収を促進するようにはたらく。VasopressinがV₂受容体に作用するとセカンドメッセンジャーcyclic AMP濃度が上昇を介してaquaporin 2が小胞体から管腔側に移動して水の再吸収を促進する。わが国でも2010年末にV₂受容体遮断薬トルバプタンが認可された。トルバプタンは心不全患者に対して水利尿を促進させ低ナトリウム血症を是正する効果が期待される。EVEREST研究ではトルバプタンの追加投与をおこなっても心不全入院患者に腎機能の改善効果も含めてアドバンテージを示すことはできなかった³²⁾。しかし、トルバプタンはこ

れまでの利尿薬とは作用機序の異なる新しい利尿薬として利尿薬抵抗例や重篤な低ナトリウム血症を合併した症例などにおいて心不全治療の新たな治療選択枝となると期待される。

おわりに

わずかな血清クレアチニン値上昇が心不全患者の予後に悪影響を及ぼすことが広く知られるようになりvolume retentionを伴うADHFの治療はつねに心腎連関を意識しておこなわれるようになってきた。残念ながらADHFの治療薬でRCTによって予後の改善が証明された治療薬はこれまで存在しない。この理由としてADHFの超急性期にRCTを企画することのむずかしさやADHFの病態の不均一性、ADHFを発症する患者の多様性などが考えられる。現時点では心腎連関の病態生理を十分に理解したうえで個々の患者ごとにテーラーメイド医療をおこなっていくことがADHFの患者の予後を改善するうえで重要といえる。

文 献

- 1) Lassnigg A *et al* : Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery : a prospective cohort study. *J Am Soc Nephrol* 15 : 1597-1605, 2004
- 2) Heywood JT *et al* : High prevalence of renal dysfunction and its impact on outcome in 118,465 patients hospitalized with acute decompensated heart failure : a report from the ADHERE database. *J Card Fail* 13 : 422-430, 2007
- 3) Fonarow GC *et al* : Risk stratification for in-hospital mortality in acutely decompensated heart failure : classification and regression tree analysis. *JAMA* 293 : 572-580, 2005
- 4) Gottlieb SS *et al* : The prognostic importance of different definitions of worsening renal function in congestive heart failure. *J Card Fail* 8 : 136-141, 2002
- 5) Goldberg A *et al* : The impact of transient and persistent acute kidney injury on long-term outcomes after acute myocardial infarction. *Kidney Int* 76 : 900-906, 2009
- 6) Hobson CE *et al* : Acute kidney injury is associated with increased long-term mortality after cardiothoracic surgery. *Circulation* 119 : 2444-2453, 2009
- 7) Ronco C *et al* : Cardiorenal syndrome : refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. *Intensive Care Med* 34 :

- 957-962, 2008
- 8) Bock JS *et al* : Cardiorenal syndrome : new perspectives. *Circulation* 121 : 2592-2600, 2010
 - 9) Nohria A *et al* : Cardiorenal interactions : insights from the ESCAPE trial. *J Am Coll Cardiol* 51 : 1268-1274, 2008
 - 10) Cuffe MS *et al* : Short-term intravenous milrinone for acute exacerbation of chronic heart failure : a randomized controlled trial. *JAMA* 287 : 1541-1547, 2002
 - 11) Klein L *et al* : Admission or changes in renal function during hospitalization for worsening heart failure predict postdischarge survival : results from the Outcomes of a Prospective Trial of Intravenous Milrinone for Exacerbations of Chronic Heart Failure (OPTIME-CHF). *Circ Heart Fail* 1 : 25-33, 2008
 - 12) Damman K *et al* : Increased central venous pressure is associated with impaired renal function and mortality in a broad spectrum of patients with cardiovascular disease. *Am Coll Cardiol* 53 : 582-588, 2009
 - 13) Nohria A *et al* : Cardiorenal interactions : insights from the ESCAPE trial. *J Am Coll Cardiol* 51 : 1268-1274, 2008
 - 14) Maeder MT *et al* : Tricuspid regurgitation contributes to renal dysfunction in patients with heart failure. *J Card Fail* 14 : 824-830, 2008
 - 15) Klein IH *et al* : Sympathetic nerve activity is inappropriately increased in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 14 : 3239-3244, 2003
 - 16) Ye S *et al* : Renal injury caused by intrarenal injection of phenol increases afferent and efferent renal sympathetic nerve activity. *Am J Hypertens* 15 : 717-724, 2002
 - 17) Campese VM *et al* : Renal afferent denervation prevents the progression of renal disease in the renal ablation model of chronic renal failure in the rat. *Am J Kidney Dis* 26 : 861-865, 1995
 - 18) Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure : Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 353 : 2001-2007, 1999
 - 19) Packer M *et al* : The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U. S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 334 : 1349-1355, 1996
 - 20) Packer M *et al* : Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 344 : 1651-1658, 2001
 - 21) Hori M *et al* : Low-dose carvedilol improves left ventricular function and reduces cardiovascular hospitalization in Japanese patients with chronic heart failure : the Multicenter Carvedilol Heart Failure Dose Assessment (MUCHA) trial. *Am Heart J* 147 : 324-330, 2004
 - 22) Eshahian S *et al* : Relation of loop diuretic dose to mortality in advanced heart failure. *Am Cardiol* 97 : 1759-1764, 2006
 - 23) Palermo M *et al* : Furosemide and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity, in man. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110 : 272-276, 2002
 - 24) Shibata S *et al* : Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase : implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med* 14 : 1370-1376, 2008
 - 25) Pitt B *et al* : The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341 : 709-717, 1999
 - 26) Zannad F *et al* : Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 364 : 11-21, 2011
 - 27) Wang DJ *et al* : Nesiritide does not improve renal function in patients with chronic heart failure and worsening serum creatinine. *Circulation* 110 : 1620-1625, 2004
 - 28) Riter HG *et al* : Nonhypotensive low-dose nesiritide has differential renal effects compared with standard-dose nesiritide in patients with acute decompensated heart failure and renal dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 47 : 2334-2335, 2006
 - 29) Nigwekar SU *et al* : Atrial natriuretic peptide for preventing and treating acute kidney injury. *Cochrane Database Syst Rev* 7 : CD006028, 2009
 - 30) Kitakaze M *et al* : Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND) : two randomised trials. *Lancet* 370 : 1483-1493, 2007
 - 31) Hata N *et al* : Effects of carperitide on the long-term prognosis of patients with acute decompensated chronic heart failure : the PROTECT multicenter randomized controlled study. *Circ J* 72 : 1787-1793, 2008
 - 32) Konstam MA *et al* : Effects of oral tolvaptan in patients hospitalized for worsening heart failure : the EVEREST Outcome Trial. *JAMA* 297 : 1319-1331, 2007

Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes

Fumiyuki Hattori^{1,2}, Hao Chen^{1,3}, Hiromi Yamashita¹, Shugo Tohyama^{1,3}, Yu-suke Satoh^{1,4}, Shinsuke Yuasa¹, Weizhen Li¹, Hiroyuki Yamakawa^{1,3}, Tomofumi Tanaka^{1,2}, Takeshi Onitsuka^{1,3}, Kenichiro Shimoji^{1,3}, Yohei Ohno^{1,3}, Toru Egashira^{1,3}, Ruri Kaneda¹, Mitsushige Murata^{1,3}, Kyoko Hidaka⁵, Takayuki Morisaki⁵, Erika Sasaki⁶, Takeshi Suzuki⁴, Motoaki Sano¹, Shinji Makino¹, Shinzo Oikawa² & Keiichi Fukuda¹

Several applications of pluripotent stem cell (PSC)-derived cardiomyocytes require elimination of undifferentiated cells. A major limitation for cardiomyocyte purification is the lack of easy and specific cell marking techniques. We found that a fluorescent dye that labels mitochondria, tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate, could be used to selectively mark embryonic and neonatal rat cardiomyocytes, as well as mouse, marmoset and human PSC-derived cardiomyocytes, and that the cells could subsequently be enriched (>99% purity) by fluorescence-activated cell sorting. Purified cardiomyocytes transplanted into testes did not induce teratoma formation. Moreover, aggregate formation of PSC-derived cardiomyocytes through homophilic cell-cell adhesion improved their survival in the immunodeficient mouse heart. Our approaches will aid in the future success of using PSC-derived cardiomyocytes for basic and clinical applications.

Human embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) could prove to be an unlimited source of cardiomyocytes. Several studies have achieved directed differentiation of mouse, monkey and human ESCs into cardiomyocytes^{1–3} but with variable efficiency. Some protocols describe up to 60% differentiation efficiency, but none achieve >99% of cells differentiating into cardiomyocytes without the use of genetic selection methods⁴. Transplantation of undifferentiated ESCs results in the formation of teratomas⁵. Thus, it is necessary to purify ESC-derived cardiomyocytes before transplantation.

ESC lines with various combinations of cardiomyocyte-specific reporters can be used to obtain highly pure ESC-derived cardiomyocytes^{4,6–10}, but this requires genetic modification of the cells. Also, discontinuous Percoll density gradient centrifugation could be used to enrich for mouse and human ESC-derived cardiomyocytes, but the purity of the cardiomyocytes in these preparations is relatively low^{11,12}. Here we show that cardiomyocytes in early mouse embryos or those differentiated from pluripotent

stem cells (PSCs) have high mitochondrial content and can be purified without the need for genetic modification, using fluorescent dyes that label mitochondria.

RESULTS

Characterization of mitochondrial dyes

In primary cultures of neonatal rat heart cells stained with MitoTracker Red (Invitrogen) the fluorescence intensity of cardiomyocytes was much higher compared to that of nonmyocytes (Fig. 1a). MitoTracker Red and tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM) specifically accumulated in both the subsarcomeric mitochondria, located around the nucleus and in the intermyofibrillar mitochondria (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1). To confirm specific mitochondrial staining of MitoTracker dyes, we stained neonatal rat cardiomyocytes with MitoTracker Red and JC-1 (a mitochondrial voltage-sensitive dye; Supplementary Fig. 2).

Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis of cells dissociated from neonatal heart revealed three main populations (Fig. 1b). We sorted the populations with the highest (designated as fraction 1), the middle (fraction 2) and the lowest (fraction 3) fluorescence intensity and cultured them separately. All the cells in fraction 1 showed rhythmic beating and were immunostained with an antibody to α -actinin (Fig. 1c), indicating they were cardiomyocytes. We identified very few cardiomyocytes in fraction 2 (Fig. 1c). Fraction 3 consisted of red blood cells and dead cells. We confirmed the neonatal rat cardiomyocyte content in fraction 1 by immunofluorescence staining for α -actinin to be $99.4 \pm 0.6\%$ (Fig. 1d), and the yield was approximately 5×10^5 cells from a single heart.

Next, we compared the efficacy of various mitochondrial dyes for separating the neonatal rat cardiomyocyte population from the nonmyocytes and found that TMRM was the most effective (Fig. 1e,f). We then evaluated the washout efficiencies of the dyes and found that TMRM disappeared completely within 24 h, whereas

¹Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan. ²Asubio Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan.

³Division of Cardiology, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan. ⁴Division of Basic Biological Sciences, Faculty of Pharmacy, Keio University, Tokyo, Japan. ⁵Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan. ⁶Laboratory of Applied Developmental Biology, Marmoset Research Department, Central Institute for Experimental Animals, Kanagawa, Japan. Correspondence should be addressed to K.F. (kfukuda@sc.itc.keio.ac.jp).

RECEIVED 10 AUGUST; ACCEPTED 15 OCTOBER; PUBLISHED ONLINE 29 NOVEMBER 2009; DOI:10.1038/NMETH.1403

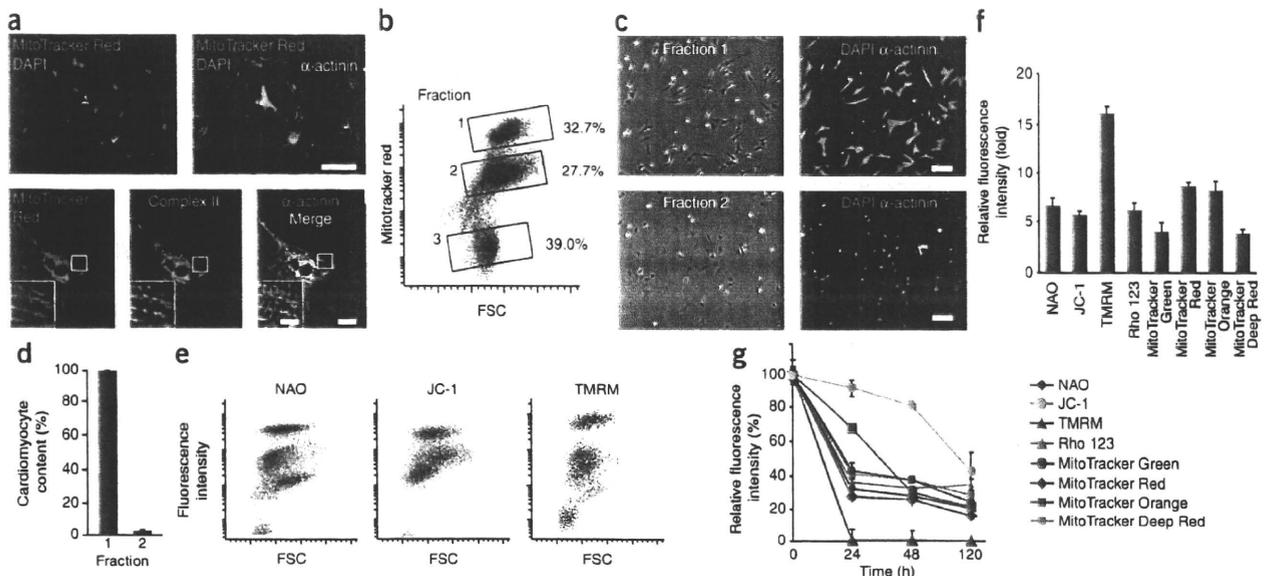


Figure 1 | Mitochondrial dyes for cardiomyocyte purification. (a) Fluorescence images of neonatal rat cardiomyocytes prestained with MitoTracker Red and immunostained for α -actinin (top) or prestained with MitoTracker Red and immunostained for mitochondrial electron transfer chain complex II (complex II) and α -actinin (bottom). DAPI, nuclear stain. Scale bars, 100 μ m (top); 20 μ m (bottom); and 10 μ m (bottom inset). (b) FACS analysis of neonatal rat heart-derived cells stained with MitoTracker Red. The sorted cells were divided into fractions 1–3 (boxed). FSC, forward scatter. (c) Immunofluorescence staining for α -actinin of cells from fractions 1 and 2. Blue, DAPI staining. Scale bars, 100 μ m. (d) Cardiomyocyte content in fractions 1 and 2. Data are shown as mean \pm s.d. ($n = 3$). (e) Representative FACS plots of dissociated cells from neonatal rat heart stained with mitochondrial dyes. (f) Relative fluorescence intensity of the indicated mitochondrial dyes in fractions 1 versus 2. Data are shown as mean \pm s.d. ($n = 3$). (g) Washout of the indicated mitochondrial dyes from neonatal rat cardiomyocytes. Data are shown as mean \pm s.d. ($n = 3$).

other dyes remained for at least 5 d (Fig. 1g and Supplementary Fig. 3a). TMRM and JC-1 at 100 nM did not affect cell viability using 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, whereas other dyes affected viability differently (Supplementary Fig. 3b). Based on these results, we selected TMRM for subsequent experiments.

Purification of cardiomyocytes from heart and whole embryos

To investigate the mitochondrial content of cardiomyocytes at different developmental stages, we performed FACS analysis of rat hearts at embryonic day 11.5 (E11.5) to postnatal day 8 (P8); the hearts had been dissociated and labeled with TMRM (Fig. 2a). The mean ratio of TMRM fluorescence in fraction 1 to fraction 2 gradually increased with increasing embryonic stage and rapidly after birth (Fig. 2b). FACS analysis followed by immunofluorescence staining confirmed over 99% cardiomyocyte purity at all stages (Fig. 2c,d).

We then stained live embryos (E11.5 and E12.5) with TMRM. The heart showed markedly stronger fluorescence compared with other tissues (Fig. 2e and Supplementary Video 1). Intraplacental injection of MitoTracker Red also resulted in the strongest accumulation of fluorescence in the heart via embryonic circulation. However, other tissues had much weaker fluorescence (Supplementary Fig. 4).

To assess why there was strong TMRM fluorescence in the embryonic heart, we compared expression levels of complex I–V of the 36 kDa mitochondrial outer membrane protein porin (also known as the voltage-dependent anion channel) and of heat shock protein 70 between cardiac and various noncardiac tissues in rat E12.5 embryos; we detected markedly stronger expression in the myocardium (Supplementary Fig. 5). Furthermore, immunostaining of the fetal heart area for α -actinin, manganese superoxide

dismutase (MnSOD) and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) (markers of cardiomyocytes, mitochondria and the endothelium, respectively), revealed that MnSOD immunostaining overlapped that for α -actinin but not for PECAM (Fig. 2f). Taken together, the accumulation of fluorescent dyes that label mitochondria may reflect high mitochondria abundance in the heart.

Next, we treated dissociated cells obtained from E11.5 to E13.5 whole rat embryos with TMRM and analyzed them on a FACS (Fig. 2g). Some cells in this preparation were autofluorescent, which was due to the presence of lipopigments and flavins¹³. To obtain only TMRM-fluorescent cells and eliminate contamination by autofluorescent cells, we adopted pseudo-two-dimensional separation (Fig. 2g and Online Methods). We isolated populations with the highest TMRM-fluorescence from dispersed cells of E11.5, E12.5 and E13.5 whole rat embryos. The sorted cells from E11.5 embryos were immunostained for α -actinin (purity 99%, $n = 3$ embryos; yield, $\sim 5 \times 10^3$ cells per embryo). We obtained similar results with E12.5 and E13.5 embryos. At these embryonic stages (E11.5–E13.5), the embryos contain skeletal myoblasts only and not mature myotubes. We found that mature skeletal myotubes, which could not pass through the FACS, could be marked with TMRM, whereas skeletal myoblasts, which do pass through the FACS, were not marked by TMRM (Supplementary Fig. 6).

Purification of PSC-derived cardiomyocytes

We first observed cardiomyocytes differentiated from mouse ESCs on day 7 of differentiation; the cells had marked TMRM accumulation. After TMRM staining, we fixed the cells and immunostained them for Nkx2.5 and α -actinin (Fig. 3a). The Nkx2.5- and α -actinin-positive areas and TMRM-positive area in the mouse

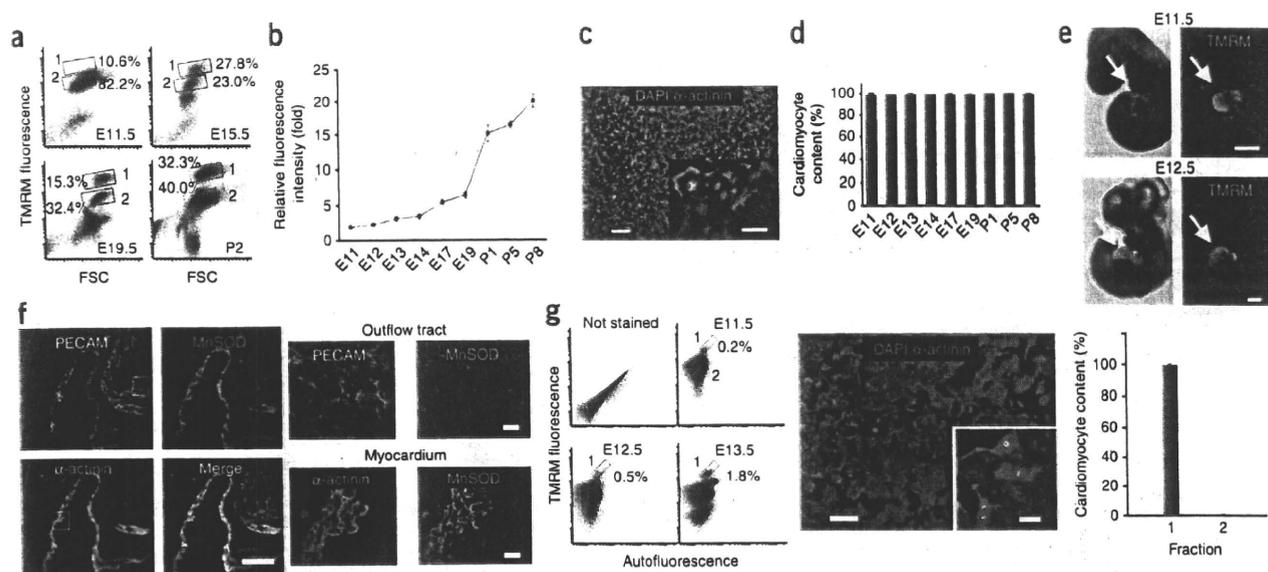


Figure 2 | Purification of cardiomyocytes from embryonic heart and whole embryo. (a) Representative FACS analysis of TMRM-stained rat embryonic heart cells at the indicated ages. Fractions 1 and 2 were typical gates for cardiomyocytes and noncardiomyocytes, respectively. (b) Relative fluorescence intensity of fraction 1 versus fraction 2 in the developing rat heart. Data are shown as mean \pm s.d. ($n = 3$). (c) Immunofluorescence staining for α -actinin in the fraction 1 gated cells from E11.5 rat heart. (d) Cardiomyocyte content of the fraction 1-gated cells obtained from E11.5–P8 rat hearts. Data are shown as mean \pm s.d. ($n = 3$). (e) Bright field (left) and fluorescence (right) images of whole rat embryos of indicated ages. (f) Immunofluorescence staining of rat E11.5 embryo for the indicated markers, PECAM, α -actinin and MnSOD. Images show pericardiac area (left four) and magnification of the boxed areas is shown on the right. (g) FACS analysis (left) of dissociated cells from whole embryos in the absence (not stained) or presence of TMRM at the indicated stages. Boxes indicate fractions 1 and 2; percentages of fraction 1 cells are shown. Immunofluorescence staining (middle) for α -actinin in the cells obtained from fraction 1 of E11.5 embryos. Cardiomyocyte content of fractions 1 and 2 at E11.5 is shown (right). Data are shown as mean \pm s.d. ($n = 3$). Scale bars, 100 μ m (c,g,e); 200 μ m (f left); and 20 μ m (c inset, f right, g inset).

ESC-derived cardiomyocytes were colocalized completely, although the intracellular localization of TMRM, *Nkx2.5* and α -actinin was clearly different. Notably, TMRM dissociated rapidly into the bulk solution compared with other dyes upon fixation (Supplementary Fig. 7), indicating that there is likely to be no effect of TMRM on subsequent immunohistochemical analysis.

We applied pseudo-two-dimensional FACS analysis to the embryoid body-derived cells (Fig. 3b). We first observed fraction 1 cells 7 d after embryoid body formation. Both the ratio of the mean TMRM fluorescence in fraction 1 (cardiomyocytes) to fraction 2 (noncardiomyocytes) and the percentage of cells in fraction 1 increased gradually until day 15 (Fig. 3c,d), suggesting that the best time for obtaining mouse ESC-derived cardiomyocytes was at day 15.

We sorted approximately 5×10^5 to 9×10^5 cells from day 15 embryoid bodies. The viability of the sorted cells was $99.1 \pm 1.5\%$, as confirmed by trypan blue staining (Supplementary Fig. 8). This high viability may be due to the fact that the cells were sorted based on TMRM accumulation (and thus contained active mitochondria). We cultured the sorted cells for 7 d to allow the cells to attach to the substrate and to elongate (Online Methods). Immunofluorescence staining for α -actinin and *Nkx2.5* in three independent experiments confirmed that these cells were high-purity cardiomyocytes ($99.5 \pm 0.3\%$; Fig. 3e). We obtained >99% pure ESC-derived cardiomyocytes from day 12–25 embryoid bodies (Fig. 3f). We also obtained highly pure cardiomyocytes from mouse iPSCs (Fig. 3g,h).

To investigate the possibility of isolating cardiac progenitor cells, we stained whole E7.5 and E7.75 embryos. We found that TMRM faintly, but distinctly, marked the cardiac crescent, which contains cardiomyogenic precursor cells, indicating a possible applicability

of our method to obtaining progenitor cells. Next, we carried out time-lapse fluorescence microscopy on attached mouse embryoid bodies stained with TMRM (Supplementary Fig. 9). We first observed TMRM-positive cells on day 6.5. Fluorescence in these cells increased gradually between days 6.5 and 7 and they started beating on day 7.0. In contrast, TMRM-negative cells did not beat during the experiments. We then performed FACS analysis on dissociated cells obtained from day 3–6.5 embryoid bodies and stained with TMRM. There were no cells in fraction 1. The higher TMRM-fluorescence cells in fraction 2 from day 3 and 4 embryoid bodies did not differentiate into cardiomyocytes, even after subsequent culture of attached cells for up to 8 d. In the case of day 6.5 embryoid bodies, some of the isolated cells differentiated into cardiomyocytes upon subsequent culture for 3 d. We also stained *Nkx2.5-GFP* knock-in mouse ESCs⁶, which we and others have used frequently to isolate cardiomyocytes. After embryoid body formation, we first observed GFP fluorescence on day 7, whereas we observed TMRM staining on day 6.5 (Supplementary Fig. 10). Our observations indicate that our method can be used to purify differentiated cardiomyocytes but not cardiac progenitor cells.

We differentiated common marmoset ESCs, human ESCs and human iPSCs into cardiomyocyte-containing embryoid bodies by conventional floating cell culture. We transferred the embryoid bodies into the cell-attachment dishes with 10 nM TMRM. Beating embryoid bodies had extremely high TMRM fluorescence compared with that of nonbeating embryoid bodies derived from marmoset and human ESCs (Fig. 4a). Then we dispersed embryoid body-derived cells, stained them with TMRM and analyzed them on a FACS (Fig. 4b). We fixed sorted human

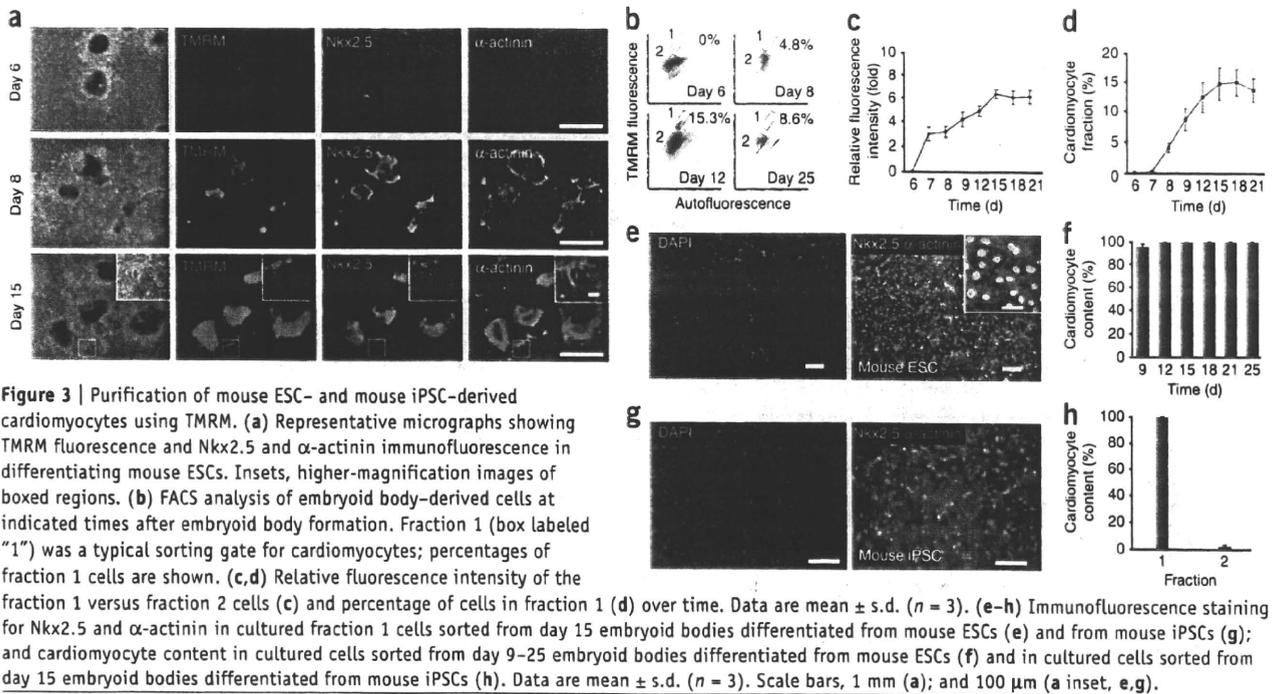


Figure 3 | Purification of mouse ESC- and mouse iPSC-derived cardiomyocytes using TMRM. (a) Representative micrographs showing TMRM fluorescence and Nkx2.5 and α -actinin immunofluorescence in differentiating mouse ESCs. Insets, higher-magnification images of boxed regions. (b) FACS analysis of embryoid body-derived cells at indicated times after embryoid body formation. Fraction 1 (box labeled "1") was a typical sorting gate for cardiomyocytes; percentages of fraction 1 cells are shown. (c,d) Relative fluorescence intensity of the fraction 1 versus fraction 2 cells (c) and percentage of cells in fraction 1 (d) over time. Data are mean \pm s.d. ($n = 3$). (e–h) Immunofluorescence staining for Nkx2.5 and α -actinin in cultured fraction 1 cells sorted from day 15 embryoid bodies differentiated from mouse ESCs (e) and from mouse iPSCs (g); and cardiomyocyte content in cultured cells sorted from day 9–25 embryoid bodies differentiated from mouse ESCs (f) and in cultured cells sorted from day 15 embryoid bodies differentiated from mouse iPSCs (h). Data are mean \pm s.d. ($n = 3$). Scale bars, 1 mm (a); and 100 μ m (a inset, e,g).

cells in fraction 1, immunostained them for Nkx2.5 and subjected them to a second FACS analysis. The results showed that over 99.9% of cells in fraction 1 were cardiomyocytes (Fig. 4c). Furthermore, we compared expression of cardiac and noncardiac genes in human ESC-derived cardiomyocytes isolated by our method and in unpurified cells from embryoid bodies using real-time PCR. We observed a marked increase in the expression of myocardial genes and a decrease in the expression of nonmyocardial genes in purified human ESC-derived cardiomyocytes (Supplementary Fig. 11).

We also cultured the sorted cells for 5 d and immunostained them for Nkx2.5 and α -actinin (Fig. 4d). Common marmoset ESC, human ESC and human iPSC fraction 1 comprised $99.0 \pm 1.0\%$, $99.0 \pm 0.9\%$ and $99.3 \pm 0.2\%$ cardiomyocytes, respectively; in contrast, fraction 2 had $2.3 \pm 0.6\%$, $2.5 \pm 0.2\%$ and $1.7 \pm 1.6\%$ cardiomyocytes, respectively (Fig. 4e). To estimate

the acquisition efficiency in the sorting experiments, we compared by FACS analysis the cardiomyocyte fraction obtained by TMRM with that obtained by immunofluorescence staining for α -actinin. The number of cardiomyocytes isolated by TMRM staining was 60–90% of the number defined by α -actinin staining (Supplementary Fig. 12). To rule out the possibility of skeletal muscle contamination in the sorted cardiomyocyte population, we extracted total mRNA from sorted cardiomyocytes and evaluated it for *myoD* expression using real-time PCR. We confirmed that there was no amplification of *myoD* (Supplementary Fig. 13).

No teratoma formation

We cultured the purified mouse ESC-derived cardiomyocytes and noncardiomyocytes for 7 d and found that although noncardiomyocytes formed piled-up colonies, in which some cells

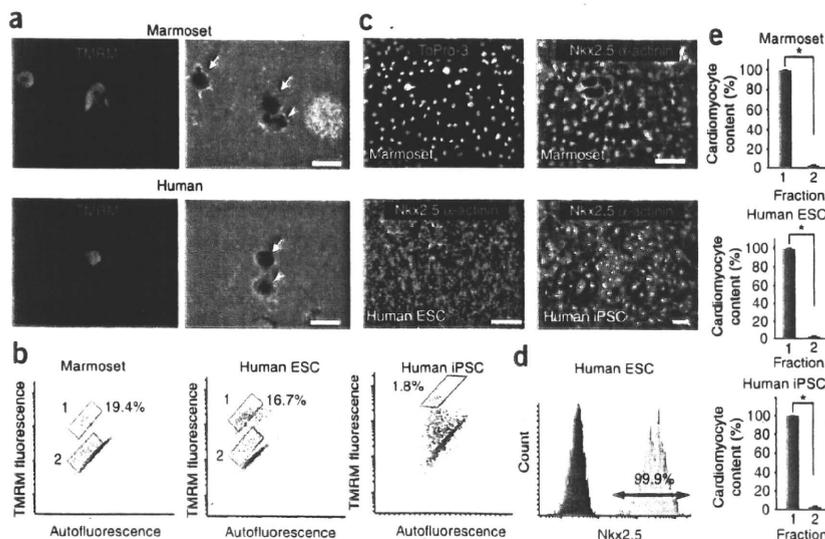


Figure 4 | Purification of PSC-derived cardiomyocytes in human and marmoset. (a) TMRM fluorescence (left) and phase contrast (right) images of marmoset and human embryoid bodies containing beating cardiomyocytes. Arrows, beating areas; arrowheads, nonbeating areas. (b) FACS separation of TMRM-stained cardiomyocytes derived from common marmoset ESCs, human ESCs and human iPSCs. Fractions 1 and 2 are boxed; percentages of fraction 1 cells are shown. (c) Immunofluorescence staining of fraction 1 cells for α -actinin and Nkx2.5. ToPro-3 represents nuclear staining. (d) Histogram showing immunodetection of Nkx2.5 (gray) and negative control (without first antibody; black) in sorted human ESC-derived fraction 1 cells. (e) The cardiomyocyte content of fractions 1 and 2 in common marmoset ESCs, human ESCs and human iPSCs. Data are mean \pm s.d. ($n = 3$). $*P < 0.01$ (Student *t*-test). Scale bars, 500 μ m (a); and 100 μ m (c).

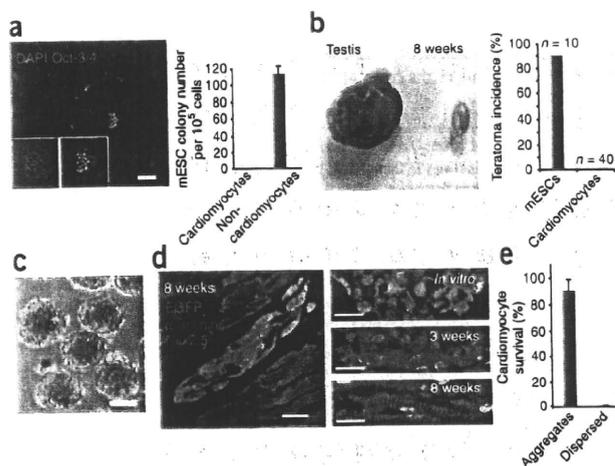


Figure 5 | Transplantation of purified mouse ESC-derived cardiomyocytes.

(a) Immunofluorescence staining for Oct3/4 (red) in the sorted cells from the noncardiac fraction (left), and numbers of mouse ESC-like colonies obtained from 10^5 sorted cells (right). Data are mean \pm s.d. ($n = 3$). (b) Transplantation of 250 undifferentiated mouse ESCs into testes resulted in teratoma formation (testis), whereas transplantation of 1.9×10^5 purified mouse ESC-derived cardiomyocytes did not (8 weeks). Incidence of teratoma formation was quantified (right). (c) Phase contrast image of mouse cardiomyocyte aggregates. (d) Immunofluorescence staining of engrafted mouse cardiomyocyte aggregates for α -actinin and Nkx2.5 8 weeks after transplantation (left); transplanted cells expressed EGFP. Mouse ESC-derived cardiomyocytes *in vitro* and 3 and 8 weeks after transplantation immunostained for Nkx2.5 and α -actinin (right). (e) Transplanted mouse ESC-derived cardiomyocyte survival. Data are shown as mean \pm s.d. ($n = 5$). Scale bars, 100 μ m (a,c); 5 mm (b); and 20 μ m (d).

were positive for Oct3/4, the cardiomyocytes did not (Fig. 5a). Further, we transplanted 1.9×10^5 aggregated mouse ESC-derived cardiomyocytes and 250 undifferentiated mouse ESCs as a control into the testes of immunocompromised nonobese diabetic–severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice. Two months later, 90% of the control mice developed teratomas (9 of 10 mice), but we did not detect teratomas in any of the mice transplanted with purified mouse ESC-derived cardiomyocytes (0 of 40 mice) (Fig. 5b). We tried to verify that there was no teratoma formation in the heart by directly injecting mouse ESC-derived cardiomyocytes (1×10^5) into the myocardium of five NOD-SCID mice immediately after sorting. Two months later, we found few (<1%) of the transplanted cardiomyocytes in the heart (data not shown).

To understand the mechanism underlying this cell loss, we injected purified and MitoTracker Red-labeled neonatal rat cardiomyocytes into the left ventricular free wall of *ex vivo*-perfused hearts. We found one-third to one-half of injected cells in the postperfusion solution, indicating that the neonatal rat cardiomyocytes were washed out within the first 10 min (Supplementary Fig. 14). Next, we compared the tissue adhesiveness of purified mouse ESC-derived cardiomyocytes and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) by counting cells in continuous sections of whole ventricles 24 h after injection into the left ventricular free walls. We found that less than 1% of the grafted ESC-derived cardiomyocytes had adhered to the host myocardium, compared with 50% of MEFs.

Transplantation of PSC-derived cardiomyocytes

From the above observations, we reasoned that loss of transplanted ESC-derived cardiomyocytes may be due to rapid washout and low adhesiveness of the cells. Because ESC-derived cardiomyocytes existed as homophilic cell aggregates (diameter, 100–500 μ m) in mouse, marmoset and human embryoid bodies (Supplementary Fig. 15), we suspected that re-aggregated purified ESC-derived cardiomyocytes may be more resistant to rapid washout. We generated cardiomyocyte aggregates by seeding 313–10,000 purified mouse ESC-derived cardiomyocytes onto nonadhesive 96-well plates. One day after seeding, the cells adhered to each other, aggregated and started synchronized beating; 5 d later, cardiomyocyte aggregates formed with diameters of 100–450 μ m (Fig. 5c, Supplementary Fig. 16 and Supplementary Video 2).

Propidium iodide staining revealed that a high proportion of re-aggregated mouse ESC-derived cardiomyocytes were viable ($98.8 \pm 0.2\%$ of seeded cells; Supplementary Fig. 16).

We transplanted mouse cardiomyocyte aggregates into the ventricular free walls of NOD-SCID mice and killed the mice at 3 and 8 weeks ($n = 5$ for both groups). We observed no teratoma formation in either group. Immunofluorescence staining revealed that cell aggregates positive for the tracers Nkx2.5 and α -actinin were located in the left ventricle (Fig. 5d). The number of cells that survived in the heart was greater than 90% (Fig. 5e). Furthermore, we repeated these experimental procedures using purified human ESC-derived cardiomyocytes (Supplementary Video 3). Two months after transplantation, we detected a large amount of human myocardial tissue in NOD-SCID mouse heart (Supplementary Fig. 17).

Finally, we investigated which autocrine factors are important for the survival of ESC-derived cardiomyocytes. Human cardiomyocyte aggregates remained viable under serum-free culture conditions; moreover, their diameters increased by approximately twofold by day 25. Supplementation of the cultures with physiological concentrations of basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor beta dimer (PDGF-BB) and endothelin-1 (ET-1) strongly enhanced the growth of the cardiomyocyte aggregates (Supplementary Fig. 18a and Supplementary Video 4). We confirmed expression of these growth factors and their receptors by real-time PCR (probe and primer sets are listed in Supplementary Table 1). We also confirmed that these growth factors were expressed in adult human and mouse hearts (Supplementary Fig. 18b). Autocrine stimulation with these growth factors may be one reason why grafted cardiomyocyte aggregates survived and grew in the host myocardium.

DISCUSSION

Our method for cardiomyocyte isolation has two advantages. First, it does not require genetic modification of the cells. Genetic modifications using nonviral or viral systems have several disadvantages: extrinsic genes may be silenced, the number of integration events in one cell is difficult to control, targeted integration is not straightforward, and line selection as well as verification of proper expression of extrinsic genes¹⁴ is time-consuming. Furthermore, genetic modification carries risks such as possible tumor formation^{15–17}. Second, our method is likely to be widely applicable. We demonstrated that it may be used to purify ESC-derived cardiomyocytes in four species, including human,

and that it is also applicable to mouse and human iPSCs. High abundance of cellular mitochondria is likely to be a common characteristic of cardiomyocytes irrespective of species. In contrast, most genetic modifications require species-specific constructs. Our simple purification strategy should facilitate basic studies using embryonic heart and stem cell-derived cardiomyocytes; furthermore, this strategy can also allow isolation of noncardiomyocytes, which may open up new approaches to studying developmental interactions.

The ESC-derived cardiomyocytes purified using our method did not induce teratoma formation in either the heart or testes. Although from the viewpoint of clinical safety, further studies using large animal models with a much larger number of ESC-derived cardiomyocytes will be required, we believe that our purification method may have considerable advantages over existing methods for eventual clinical translation as well.

Our results suggest that induction of mitochondrial biogenesis begins shortly before beating of cardiomyocytes. This indicates the tight relationship between cardiomyogenesis and mitochondrial biogenesis. A combination of our strategy and other marking techniques for cardiac progenitor cells may facilitate study in this field.

Unpurified fetal and neonatal rat cardiomyocytes and bone marrow mesenchymal and ESC-derived cardiomyocytes have been shown to survive in the recipient heart^{18–20}. In contrast, purified and dispersed cardiomyocytes differentiated from ESCs did not achieve a high survival rate⁵. Re-aggregation augmented the long-term survival of purified mouse and human ESC-derived cardiomyocytes. Our results indicate that ESC-derived cardiomyocytes might be highly anchorage-dependent, and that homophilic cell-to-cell adhesion and autocrine signaling may be important factors contributing to their survival.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturemethods/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Methods website.

ACKNOWLEDGMENTS

Human ESCs were a gift of N. Nakatsuji at the Department of Development and Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University. Human and mouse iPSCs were a gift of S. Yamanaka at the Center for iPS Cell Research and Application, Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University. Mouse ESCs were a gift of H. Niwa at the Laboratory of Pluripotent Cell Studies, RIKEN Center for Developmental Biology. This study was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan, and by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Science of the National Institute of Biomedical Innovation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.H. designed the whole study. F.H. performed most experiments and wrote the manuscript. H.C. participated in cell-sorting experiments and prepared cells. H. Yamashita participated in cell-sorting experiments, PCR experiments, immunofluorescent staining, animal experiments and preparing cells. S.T., Y.S., W.L., T.T., T.O., K.S., Y.O. and T.E. participated in cell preparations. H. Yamakawa and M.M. participated in heart perfusion experiments. K.H. and T.M. provided the *Nkx2.5 knock-in* ESCs. S.Y., M.M., R.K., M.S., S.M. and S.O. provided advice. E.S. provided cmESCs. T.S. supervised Y.S. K.F. provided advice, obtained the budget and supervised the project.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare competing financial interests: details accompany the full-text HTML version of the paper at <http://www.nature.com/naturemethods/>.

Published online at <http://www.nature.com/naturemethods/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>.

1. Yuasa, S. *et al.* Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 607–611 (2005).
2. Nemir, M., Croquelais, A., Pedrazzini, T. & Radtke, F. Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling. *Circ. Res.* **98**, 1471–1478 (2006).
3. Mummery, C. *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* **107**, 2733–2740 (2003).
4. Anderson, D. *et al.* Transgenic enrichment of cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Mol. Ther.* **15**, 2027–2036 (2007).
5. Kolossov, E. *et al.* Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J. Exp. Med.* **203**, 2315–2327 (2006).
6. Hidaka, K. *et al.* Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB J.* **17**, 740–742 (2003).
7. Fijnvandraat, A.C. *et al.* Cardiomyocytes purified from differentiated embryonic stem cells exhibit characteristics of early chamber myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 1461–1472 (2003).
8. Gassanov, N., Er, F., Zagidullin, N. & Hoppe, U.C. Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *FASEB J.* **18**, 1710–1712 (2004).
9. Huber, I. *et al.* Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *FASEB J.* **21**, 2551–2563 (2007).
10. Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y. & Field, L.J. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest.* **98**, 216–224 (1996).
11. Laflamme, M.A. *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1015–1024 (2007).
12. Xu, C., Police, S., Hassanipour, M. & Gold, J.D. Cardiac bodies: a novel culture method for enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **15**, 631–639 (2006).
13. Monici, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* **11**, 227–256 (2005).
14. Gropp, M. & Reubinoff, B. Lentiviral vector-mediated gene delivery into human embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* **420**, 64–81 (2006).
15. Tsukahara, T. *et al.* Murine leukemia virus vector integration favors promoter regions and regional hot spots in a human T-cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1099–1107 (2006).
16. Recchia, A. *et al.* Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1457–1462 (2006).
17. Woods, N.B. *et al.* Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* **101**, 1284–1289 (2003).
18. van Laake, L.W. *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Rev.* **1**, 9–24 (2007).
19. Reinecke, H., Zhang, M., Bartosek, T. & Murry, C.E. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* **100**, 193–202 (1999).
20. Hattam, N. *et al.* Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc. Res.* **65**, 334–344 (2005).