

## 代謝制御と力学刺激による成熟化ヒト心筋組織の作製と創薬への応用

遠山周吾

慶應義塾大学医学部 循環器内科

### 【研究の背景】

ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞はあらゆる細胞に分化可能であり、再生医療や創薬スクリーニングへの応用が期待されている。しかし、ヒト iPS 細胞から作製した心筋細胞は様々な成熟段階の細胞から構成される不均一な集団であるため、創薬スクリーニングにおける表現型のばらつきが問題となっている。

### 【目 的】

本研究では、成熟化を促進させる手法として培養環境および 3 次元心筋組織における力学刺激に着目し、両者を組み合わせることによりヒト iPS 細胞由来の成熟心筋組織を作製し、創薬スクリーニングに応用することを目的として研究を行った。

### 【方 法】

#### 1. ヒト iPS 細胞由来心室筋細胞の作製

申請者がこれまでに構築してきた 2 次元大量培養系および純化精製技術によりヒト iPS 細胞から心室筋細胞 (心筋含有率 99%) を作製する (Tohyama, et al. Cell Stem Cell 2013, Tohyama, et al. Cell Metab. 2016, Tohyama, et al. Circ. Res. 2017, Tohyama, et al. Stem Cell Rep. 2017, Tohyama, et al. Sci. Rep. 2019)。

#### 2. ヒト iPS 細胞由来微小心筋組織球の作製

マイクロウェルプレート (Kuraray/Corning) を用いて直径 150  $\mu$ m 程度の微小心筋組織球 (1 つの組織球は約 1000 細胞から構成) を大量に作製する (Tabei, et al. J Heart Lung Transplant 2019)。

#### 3. ヒト iPS 細胞由来心筋ファイバの作製

慶應義塾大学工学部 尾上研究室との共同研究により、マイクロ流体デバイス技術 (Onoe, et al. Nat Mater 2013) を用いたマイクロファイバ状の心筋組織の作製を行う。

#### 4. ヒト iPS 細胞由来心筋組織構造体 (Engineered Heart Tissue) の作製

Echenhagen らの手法 (Weinberger, Circ Res 2017) を用いて、心筋組織構造体を作製し、免疫染色および QPCR により成熟度の評価を行う。

#### 5. 成熟化心筋組織における薬剤応答性評価

3 および 4 において作製された成熟した心筋組織に対してイソプロテレノール (ISP) を用いて薬剤応答性を評価し、未成熟な心筋組織における応答性の違いを明らかにし、その分子機構を探索する。

### 【結 果】

はじめに、ヒト iPS 細胞から高純度心室筋細胞を作製した。それらの心筋細胞を用いて、Kuraray/Corning 社のマイクロウェルプレートにより微小心筋組織球を作製した。さらに Echenhagen らの手法を活用し Engineered Heart Tissue (EHT) を作製することに成功した。トロポニン T や  $\alpha$  アクチニン抗体を用いて免疫染色を行った結果、微小心筋組織球はサルコメア構造の配

向性が認められなかったのに対して、EHT では配向性が認められた。また、QPCR を行ったところ、接着心筋細胞に対して、微小心筋組織球では MYL2 や Cx43 等の成熟化マーカーの上昇が認められなかった。一方で、EHT では、成熟化マーカーが顕著に上昇していることを確認した。さらに EHT に対して ISP を添加したところ、陽性変時作用、陽性変力作用が認められた。また、マイクロ流体デバイス技術(Onoe, et al. Nat Mater 2013)を用いたマイクロファイバ状心筋組織の作製にも成功している。

## 【考 察】

3次元組織は、2D に比べて成熟度が高くなることが知られているが、スフェロイドにおいては成熟度の促進が認められず、EHT においては 2D に比べて顕著な成熟度促進が認められた。成熟度の促進には力学的な刺激が重要であると考えられる。今後は成熟度を促進させる添加因子や培養条件を探索し、未熟心筋組織と成熟心筋組織における薬剤応答性の差異を明らかにする。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

ヒト成熟心筋組織の開発は、疾患メカニズムの解明や創薬スクリーニングにおいて最も重要な課題の 1 つである。本研究において創薬スクリーニングにおける標準的なヒト成熟心筋組織を構築できれば、薬剤による副作用を事前に予測することが可能となり、新薬開発において心毒性などによる脱落を防ぐことができるため極めて重要な研究であると考えている。

## 【参考・引用文献】

- 1) Terao Y\*, Kurashina Y\*, **Tohyama S\* (\*Co-first author)**, Fukuma Y, Fukuda K, Fujita J, Takemura K. (2019) An effective detachment system for human induced pluripotent stem cells cultured on multilayered cultivation substrates using resonance vibrations. *Scientific reports* 9(1) 15655
- 2) Tabei R, Kawaguchi S, Kanazawa H, **Tohyama S**, Hirano A, Handa N, Hishikawa S, Teratani T, Kunita S, Fukuda J, Mugishima Y, Suzuki T, Nakajima K, Seki T, Kishino Y, Okada M, Yamazaki M, Okamoto K, Shimizu H, Kobayashi E, Tabata Y, Fujita J, Fukuda K. (2019) Development of a transplant injection device for optimal distribution and retention of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Heart Lung Transplant* 38(2) 203-214
- 3) **Tohyama S**, Fujita J, Fujita C, Yamauchi M, Kanaami S, Ohno R, Sakamoto K, Kodama M, Kurokawa J, Kanazawa H, Seki T, Kishino Y, Okada M, Nakajima K, Tanosaki S, Someya S, Hirano A, Kawaguchi S, Kobayashi E, Fukuda K. (2017) Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports* 9,1406-1414.
- 4) **Tohyama S\*\*** & Fukuda K\*\* (\*\*Co-corresponding author). (2017) Safe and Effective Cardiac Regenerative Therapy with Human Induced Pluripotent Stem Cells. How Should We Prepare Pure Cardiac Myocytes? *Circulation Research* 120, 1558-1560.
- 5) **Tohyama S**, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K. (2016) Glutamine Oxidation is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metabolism* 12, 663-674. Cover of the issue
- 6) **Tohyama S**, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. (2013) Distinct Metabolic Flow Enable Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12, 127-137.
- 7) **Onoe H**, Okitsu T, Itou A, Kato-Negishi M, Gojo R, Kiriya D, Sato K, Miura S, Iwanaga S, Kuribayashi-Shigetomi K, Matsunaga YT, Shimoyama Y, Takeuchi S. (2013) Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions. *Nature Materials* 12(6):584-90.