

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、再生医療や創薬スクリーニングにおける細胞源として期待されている。しかし、分化心筋細胞は胎児型の特徴を有しているため、表現型のばらつきに繋がり、再生医療においては催不整脈作用、創薬スクリーニングにおいては心毒性を正確に評価することができない。そこで、成熟化を促進させる手法の開発が求められていた。成熟化を促進する方法に関しては様々報告されているが、いずれも成人ヒト心筋組織とは程遠い。その要因として、多くの研究者が単独アプローチのみで成熟化の問題を解決しようと試みていること、心筋細胞の成熟化における至適な細胞外代謝環境が明らかでないこと等が挙げられる。

【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, *Cell Metab.* 2016, *Circ. Res.* 2017, *Stem Cell Rep.* 2017, *Sci. Rep.* 2019, *iScience* 2020)。

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 μm 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、申請者がこれまで確立してきた手法により、ヒト iPS 細胞から高純度心室筋細胞を作製した (Tohyama, et al. *Cell Stem Cell* 2013, *Cell Metab.* 2016, *Stem Cell Rep.* 2017, *iScience* 2020)。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 α 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、ヒト iPS 細胞から高純度心室筋細胞に線維芽細胞を混ぜること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 *Nat Mater* 2013) を用いたマイクロファイバ状心筋組織の作製にも成功している (unpublished)。また、培養条件により組織化の安定性が異なることを確認した。

【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. Tanosaki S*, **Tohyama S (Lead Contact)** †, Fujita J†, Someya S, Hishiki T, Matsuura T, Nakanishi H, Nakanishi-Ohto T, Akiyama T, Morita Y, Kishino Y, Okada M, Tani H, Soma Y, Nakajima K, Kanazawa H, Sugimoto M, Ko M, Suematsu M, Fukuda K. (2020) Fatty acid synthesis is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *iScience* 23: 101535, 2020.
2. 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
3. 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
4. **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.
5. **Tohyama S*†** & Fukuda K†. (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.

6. **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
7. **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.
8. **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 microfibrils exhibit tissue morphologies and functions. *Nature Materials* 12(6):584–90.