

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16587

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来心筋組織の機能と成熟度の解析 ～臨床応用に向けて～

研究課題名(英文) Analysis of function and maturity of human iPS cell-derived myocardial tissue for clinical application

研究代表者

小前 兵衛 (Hyo, KOMAE)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50788883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から分化させた心筋細胞を細胞シートの状態にして、動物の生体内に移植することで、ヒトiPS心筋組織を生体内で培養した。まず、麻酔や手術侵襲などが心筋組織に及ぼす影響を排除するために、動物が覚醒した状態でもヒトiPS心筋組織の表面電位を連続して計測できるシステムを開発した。このシステムを用いてヒトiPS心筋組織の電気的活動を経時的に記録した。その結果、培養期間が長くなるヒトiPS心筋組織の表面電位波形が安定することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓の再生医療分野では、ヒトiPS細胞から作製した心筋組織も用いて心筋収縮力や血液循環を補助することが期待されている。しかし作製されたものは心筋組織として未熟であるため、成熟させる必要がある。細胞レベルではなく作製した心筋組織の成熟の報告は少なく、客観的な成熟段階の評価は難しい。つまり作成した心筋組織の成熟度を標準化できず、今の状態では臨床に応用しづらい状況となる。今回見出されたヒトiPS心筋組織の表面電位の安定化は、客観的な評価の指標につながる成熟過程の一段階である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A cell sheets were prepared from cardiomyocytes differentiated from human iPS cells and transplanted on the subcutaneous tissues of animals. And we successfully cultured human iPS myocardial tissue in vivo. First, in order to eliminate the effects of anesthesia and surgical invasion on myocardial tissue, we developed a system that can continuously measure the surface potential of human iPS myocardial tissue even when the animal is awake. Electrical activities of human iPS myocardial tissue were recorded over time with this system. Results were that the surface potential waveform of myocardial tissue became stable as the culture period became longer.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心筋成熟 iPS細胞 細胞シート 心筋組織 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療の研究は iPS 細胞を代表とする幹細胞研究と組織工学技術が両輪となり急速に進んでいる。2014 年、日本で加齢性黄斑変性症患者に自家 iPS 細胞から分化誘導させて作成した網膜色素上皮細胞シートが移植された。これはヒト iPS 細胞を用いた世界初の臨床試験である。網膜以外でも多くの iPS 細胞由来の細胞・組織が臨床応用に向けて研究されており心筋分野も例外ではない。大動物実験モデルでは細胞シート工学を用いて作製した iPS 心筋組織を梗塞心筋に移植すれば心機能が回復すると報告されており (Circulation 2013)、日本では iPS 心筋組織による治療方法を臨床に持ち込もうとしている。しかし、その場合、用いる iPS 心筋組織は安全性・機能性の観点から十分に成熟したものであることが求められる。

ヒト iPS 細胞から心筋細胞に分化・誘導する技術は確立され(以下、分化誘導された細胞を iPS 心筋細胞、ヒト iPS 細胞から構築された心筋組織を iPS 心筋組織と呼ぶ)。さらに組織工学の手法の一つである細胞シート工学を用いることで iPS 心筋細胞を細胞シートとして 2 次元的な心筋様組織として扱うことが可能になった。東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究施設(以下 TWIns)のグループは、バイオリアクターと呼ばれる自動灌流装置を用いて iPS 心筋細胞シートを積層化して厚い、拍動する心筋組織を作製している (Nat Commun 2013, Sci Rep 2013)。また、申請者は TWIns 内の東京女子医科大学・先端生命医科学研究所(TWMU ABMES)と連携しラットの皮下に iPS 心筋細胞シートを移植することで in vivo 下で機能的な、異所性に移植できる iPS 心筋組織を構築したこと、構築した iPS 心筋組織が 1 年以上生着することを報告した (Komae H. et.al; J Tissue Eng Regen Med 2015)。また、分化したばかりの iPS 心筋細胞は実際のヒト心筋細胞と比べるとまだ成熟段階にあり、経過とともに成熟することが他研究でも同様の報告がなされている (Circulation Journal 2013)。しかしながら iPS 心筋細胞、そして特に iPS 心筋細胞から作成される iPS 心筋組織は成熟のメカニズムがほとんど解明されていない。そのため iPS 心筋組織の成熟段階の指標がなく、成熟度の客観的評価が困難である点が大きな問題である。

## 2. 研究の目的

本研究では iPS 心筋組織の機能的・構造的・分子学的なデータを解析することで iPS 心筋組織の成熟段階の客観的指標を構築し、iPS 心筋組織の臨床応用の基盤を確立することを目指す。

iPS 心筋細胞については、細胞内構造物の評価がされていたり、残存する未分化細胞を評価する目的で遺伝子やタンパクの発現が解析されたりと、成熟に関する報告は多くある。その一方で iPS 心筋組織の成熟に関する報告は少ない。心筋組織は電気伝導に従って一律に収縮することで力学的な拍出力を生み出すことが機能であり機能的な成熟の評価は重要となる。心筋組織の機能を裏打ちするのは心筋組織に固有の構造物であり、さらには心筋組織内の心筋細胞内、又は心筋細胞間に発現する様々なタンパクや遺伝子である。心筋組織の機能が成熟するに従って、心筋組織固有の構造物や発現する遺伝子やタンパクが変化していくことが予想される。

そこで、iPS 心筋組織の電気生理や力学などの機能的解析・iPS 心筋組織の構造的解析・iPS 心筋組織に発現する分子学的解析を同時に行ったデータを蓄積し、変化の過程を解析して総合的に iPS 心筋組織の成熟段階を明らかにする必要があると考えた。心筋組織の成熟段階の基準ができれば、成熟を客観的に評価できるため、安定した iPS 心筋組織の作成が可能になる。また、培養条件を変えることなどで iPS 心筋組織の成熟を促成する因子が明らかになれば、臨床で用いる iPS 心筋組織の作成・準備にかかる時間と費用の節約につながる。

### 3．研究の方法

#### 1．In vivo での iPS 心筋組織の作製と力学的・電気生理学的機能測定

無胸腺ラットの皮下に iPS 心筋細胞シートを移植すれば in vivo での iPS 心筋組織培養となる(J Tissue Eng Regen Med 2015)。このように作成した iPS 心筋組織の機能計測を行う。力学的機能測定が適切な行えるセンサーは現在探索中であるが、電気生理学的機能は染谷研究室のナノメッシュセンサーを用いて行う。機能測定は定期的に行う。単純に張力や電位変化のみの解析だけでなく収縮・弛緩時の加速度や電位の伝播形式や伝播速度など幅広いデータを解析する。移植後 2 週間、1 か月を目安にデータ測定時点で iPS 心筋組織をサンプリングする。明らかに計測データに変化を認めた場合は予定した時点以外でもサンプリングする。長期培養することで iPS 心筋組織の成熟が進む可能性もあるため数例は 1 か月以上培養して計測し、適宜サンプリングを行う。

#### 2．In vitro での iPS 心筋組織の作製と力学的・電気生理学的機能測定

In vitro での iPS 心筋組織の培養を TWMU ABMES 協力のもとで行い、力学的・電気生理学的計測を行う。In vivo での培養と同様に培養経過 2 週間、1 か月を目安に in vitro で培養された iPS 心筋組織をサンプリングする。

収集したデータを解析し成熟度の指標を見出す。必要ならばサンプリングを追加する。次いで培養条件を変えて成熟度に変化が出るか検討し、iPS 心筋組織の成熟を促進する因子を見出す。

#### 3．iPS 心筋組織の成熟度の構造的・分子学的・遺伝子的評価

サンプリングした iPS 心筋組織は電子顕微鏡を用いて心筋組織に特異的な構造物の数や密度・形態を解析する。例えば力学的機能に関連すると考えられる筋原線維の最小構成単位であるサルコメアの構造や配向性、電位伝播に関連すると考えられるギャップジャンクションの数や密度などを評価する。

また、分子学的にはイオンチャンネルやミオシンなどのタンパクや遺伝子の発現が未熟な心筋細胞と成熟した心筋細胞で差があるかを計測し、分子学的にも成熟を解析する。他に未熟心筋・成熟心筋で発現の異なる遺伝子や分子があれば解析項目に加える。

#### 4．iPS 心筋組織の成熟度の指標の確立

In vitro, in vivo 下で測定した力学的・電気生理学的データとサンプリングした iPS 心筋組織の構造的・分子学的・遺伝子的データを比較対照して相関を見出す。その上で、力学的・電気生理学的データからの成熟度の指標を確立する。そうできれば力学的・電気生理学的データ測定でリアルタイムに iPS 心筋組織の成

熟度評価を行え、評価を簡便化できる。

## 5. iPS 心筋組織の種々の条件下での培養と成熟を促進する因子の解析

iPS 心筋組織に外部から力学的ストレッチを加える・拍動数よりも早い電気刺激を加えてペーシングを行う・成熟を促進する可能性のある成長因子を投与する・iPS 心筋細胞シート積層数を増やすなど培養条件を変える。比較対照して成熟を促進する因子を解析する。また、成熟を促進する可能性のある条件・因子を外部から意図的に加えて実際に iPS 心筋組織が成熟するかの検証も行う。

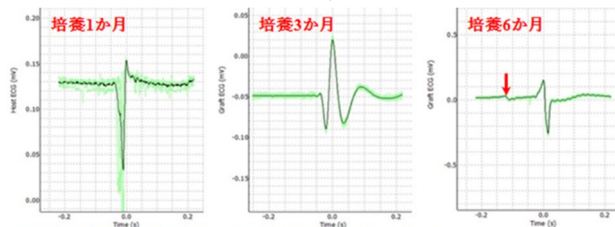
申請者の所属は東京大学医学部附属病院心臓外科であるが TWMU ABMES 研究生としての籍も有している。基本的な設備は所属機関内に揃っているが、TWIns で実験を行うことや技術的アドバイスを求めることが可能である。

TWMU ABMES から iPS 心筋細胞や計測技術の提供を受ける。また、iPS 心筋組織の電気生理学的解析は研究協力機関である染谷研で開発されたナノメッシュセンサーの技術を用いる。定期的に研究代表者が TWIns に行き、研究の進捗状況や方針につきディスカッションを行う。また、染谷研は同じ東京大学構内にあるため、申請者は必要な時に直接連絡を取ることができる。また、TWIns と染谷研は共同研究関係にある。申請者と研究協力機関の TWIns と染谷研究所の 3 者はいつでも互いに連絡を取り合える環境となっている。

## 4. 研究成果

当初の計画では、iPS 心筋組織の作成と力学的・電気生理学的機能測定  
iPS 心筋組織の成熟度の構造的・分子学的・遺伝子的評価  
iPS 心筋組織の成熟度の指標の確立  
iPS 心筋組織の種々の条件下での培養と成熟を促進する因子の解析  
を行う予定であったが、予想外の興味深い結果が出たこともあり、同テーマで前年度申請を行い、引き続き同じテーマでの研究を続行している。

結果としては *in vivo* 培養下の iPS 心筋組織の表面電位を培養 1 カ月後と 3 カ月後で測定し比較したところ、移植 3 カ月後の電位波形がより一定していた。さらに長期間培養された iPS 心筋組織の電位波形は、さらに一定であり、iPS 心筋組織が時間経過で電気生理学的に成熟していくことが示唆された。また、長期培養された iPS 心筋組織では、興味深いことに成熟した心臓のようにペースメーカー部位の存在を示唆する電位波形が出現した(右下図)。電位波形の安定とペースメーカー部位の出現が電気生理学的な成熟段階の指標となる可能性があり、日本再生医療学会総会などで発表を行った。



緑線(細線)：解析期間の全測定波形の重ね合わせ  
黒線(太線)：全測定波形の平均  
赤矢印：ペーシング部位の形成を示唆する波形

また、*in vivo* 培養下での iPS 心筋組織の機能測定は、通常は麻酔薬を用いて実験動物を鎮静させた条件下で測定するが、多くの麻酔薬は心機能に対して抑制的に作用することが多い。さらに手術侵襲の影響もあるため、*in vivo* 培養下の心筋組織の本来の機能を測定できていない可能性がある。

そこで、ナノメッシュセンサーを体内に埋め込み、導線を動物の皮下を通して

頂部から体外に導出して測定器と接続した。ラットの頭部に金属リードを接続し、シーベル(回転軸)によって無拘束下で自由行動の状態を作り出すことができる広空間円筒型の専用アニマルケージ内で飼育することで覚醒後も連続的に電位を測定するシステムを構築した。その結果、麻酔覚醒後2日間にわたり連続して安定した電位測定を行うことに成功し、この結果を論文形式で発表した(Heart and vessels. 2021 June; Continuous measurement of surface electrical potentials from transplanted cardiomyocyte tissue derived from human-induced pluripotent stem cells under physiological conditions in vivo)。

培養期間は3カ月で主に評価・解析する予定だったが、上述の測定電位波形の安定化の再現性の確認が必要と判断し、培養期間を6か月に延長する方針とした。また、施行数を増やしての表面電位波形の再現性の確認と、サンプリングしたiPS心筋組織の分子学的・遺伝子学的解析を行う必要があるため、前年度応募を行い引き続き同じテーマで研究を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroshi Goto, Hyoue Komae, Hidekazu Sekine, Jun Homma, Sunghoon Lee, Tomoyuki Yokota, Katsuhisa Matsuura, Takao Someya, Minoru Ono, Tatsuya Shimizu	4. 巻 36(6)
2. 論文標題 Continuous measurement of surface electrical potentials from transplanted cardiomyocyte tissue derived from human-induced pluripotent stem cells under physiological conditions in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 899-909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-021-01824-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小前兵衛
2. 発表標題 ヒトiPS心筋様組織の成熟による電位波形の経時的変化
3. 学会等名 第1回細胞シートイノベーションフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小前兵衛
2. 発表標題 ヒトiPS心筋様組織の成熟による電位波形の経時的変化
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小前兵衛
2. 発表標題 Maturation Stage of the Human iPS Myocardial Tissue
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小前 兵衛
2. 発表標題 生理的な条件下で連続測定したヒト iPS 由来心筋組織の電位の解析
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清水 達也  (Shimizu Tatsuya)	東京女子医科大学・先端生命医科学研究所・教授  (32653)	
研究協力者	染谷 隆夫  (Someya Takao)	東京大学・工学系研究科電気系工学専攻・教授  (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------