

令和元年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19676

研究課題名(和文)幹細胞を用いた3次元組織構築による新世代in vitro組織・臓器モデルの開発

研究課題名(英文)Next generation in vitro tissue/organ models with 3D tissue from stem cells

研究代表者

山下 潤(Yamashita, Jun)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50335288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：1) ヒトiPS細胞由来心臓組織シート(hiPS-CTS)を用いたリエントリー型不整脈発生モデル：心臓細胞(心筋細胞+壁細胞)をヒトiPS細胞から誘導しミニ3D構造の心臓組織を作製した。QT延長誘導薬剤E4031投与によりリエントリーによる心室頻拍様不整脈が観測された。
2) hiPS-CTSを用いた致死性不整脈Torsade de Points(TdP)再現モデル：hiPS-CTSへのE4031投与により、TdPに類似した細胞外電位波形と回旋中心のさまよい現象が認められた。世界初のTdPを再現するin vitroモデルを示したものであり、Nature Communication誌に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TdPなどの致死性不整脈は、種々の疾患や薬剤の副作用に認められ重篤な結果をもたらす。しかしこれらを培養下に再現し、病態の検討を行えるin vitroモデルは存在しなかった。本研究は、ヒトiPS細胞由来の複数種の心臓の細胞を用いて3D構造を形成することにより、世界で初めてTdPの発生をin vitroで再現することに成功したものであり、今後の病態研究、創薬、安全性試験などに多大な貢献をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：1) In vitro reentry type arrhythmia model with human iPS cell-derived cardiac tissue sheets (hiPS-CTS): We generated mini-3D cardiac structure with human iPS cell-derived cardiac cells (cardiomyocytes and mesenchymal cells). Addition of E4031 induced QT prolongation as well as occurrence of ventricular tachycardia-like reentry arrhythmia.
2) Torsade de Pointes (TdP) model with hiPS-CTS: Addition of E4031 to hiPS-CTS induced TdP-like arrhythmia with polymorphic extracellular field potential and meandering of the center of reentry. This is the first in vitro TdP model, reported in Nature Communications.

研究分野：幹細胞生物学、循環器内科学、再生医学

キーワード：疾患モデル 細胞・組織 循環器・高血圧 iPS細胞 不整脈

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生理・病態生理を解析することは医学生物学的意義が非常に大きいですが、実際にはヒトを用いた研究にはおもに倫理的理由から大きく制約がかかっている。乗り越えることは不能と思われるその制約を回避し、ヒトにおける研究をより進め、知見を深めていくためには、生体のヒトを用いない研究手法且つ動物実験ではなくヒトの細胞・組織を用いる研究方法を開発していく以外にない。しかし現状では、ヒトサンプルから得られたわずかな細胞製品などを用いた細胞培養実験が行われている場合がほとんどであり、実際のヒトの生理病態生理を再現しうる実験系はまだないと言って差し支えない。ヒト iPS 細胞の技術は、患者の皮膚や血液の細胞から iPS 細胞を樹立し、そこから種々の標的細胞を誘導して解析に供することを可能とした点で画期的である。実際世界各地で種々の疾患、細胞を標的として疾患 iPS 細胞研究が進められている。しかし、現時点では標的の細胞を誘導し、細胞レベルでの解析を行うモデルが報告されている状況であり、培養細胞レベルでは再現し得ない生理的病態生理的現象は解析不能なままであった。

2. 研究の目的

本研究は、こうしたヒト研究における限界を打破し、「ヒト生体における生理・病態生理をできる限り再現できる新しい培養下(in vitro)実験系を開発し、種々の病態解明、治療法開拓、薬剤安全性試験などに新たな可能性を拓く」ことを目的とした。まずは研究代表者がこれまで培ってきた多能性幹細胞を用いた心血管系分化再生と3次元組織構築に関するノウハウを駆使して、心臓における以下の現象の再現モデルの構築を行った。研究期間内には以下の4項目の研究を行うことを目標とした(うち1)2)について完遂した)。

- 1) ヒト iPS 細胞由来心臓組織シート (hiPS-CTS) によるリエントリー型不整脈発生モデル
- 2) hiPS-CTS を用いた致死性不整脈 Torsade de Points 再現モデル
- 3) hiPS-CTS を用いた心室細動誘発モデル
- 4) hiPS-CTS 多重積層心臓組織を用いた心収縮力解析モデル(薬剤性心不全モデル)

3. 研究の方法

下記細胞材料と解析システムを用いた。

[細胞材料]

- ・ ヒト iPS 細胞から誘導した種々の心臓細胞 (心筋細胞、内皮細胞、血管壁細胞等)
- ・ 心臓細胞から構成される5 - 6細胞層からなるミニ3D組織である心臓組織シート
- ・ ゼラチンハイドロゲル微粒子 (GHM) を用いた多重積層化心臓組織

[解析系]

- ・ 多電極アレイ (MEA: multiple electrode array) を用いた細胞外電位 (EFP) 測定
- ・ セルモーション解析システムを用いた2次元細胞動態解析

[研究項目]

1) hiPS-CTS を用いたリエントリー型不整脈発生モデル

研究代表者は、ヒト iPS 細胞から心臓を構成する細胞 (心筋細胞、内皮細胞、壁細胞等) を誘導し、温度感受性培養皿 (東京女子医大) を用いた細胞シート作製技術を用いて、それら細胞を含む hiPS-CTS の作製に成功している。ヒト心臓組織シートは約5 - 6層の細胞層からなるミニ3D構造を取っており、ラット及びブタ心筋梗塞モデルへの移植により、明確な心機能改善効果を示す (Sci Rep, 2014)。この複数細胞からなるミニ3D構造を持つ心臓組織が、より生体の心臓に近い反応を示しうる可能性を検討した。

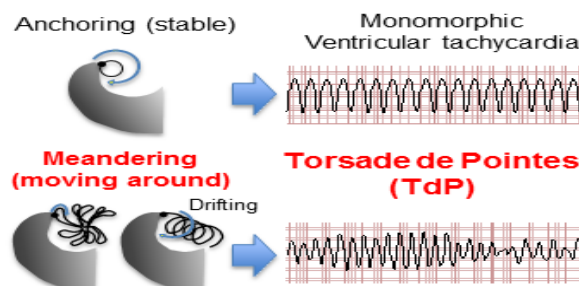
[細胞外電位—細胞動態同時測定によるリエントリー型不整脈発生の評価]

- ・ MEA が底面に配された培養皿において hiPSC-CTS を培養する。(細胞外電位の測定)
- ・ セルモーション解析システム (Sony Motion Vector) 同時観察 (2次元細胞動態解析)

上記を Sony Motion Vector に設置の培養チャンパー内で行いながら、QT 延長誘導薬剤である Ikr ブロッカー-E4031 を投与し、QT 延長作用により誘発される薬剤性不整脈の発生及びリエントリーの発生を観測した。

2) hiPS-CTS を用いた致死性不整脈 Torsade de Points (TdP) 再現モデル

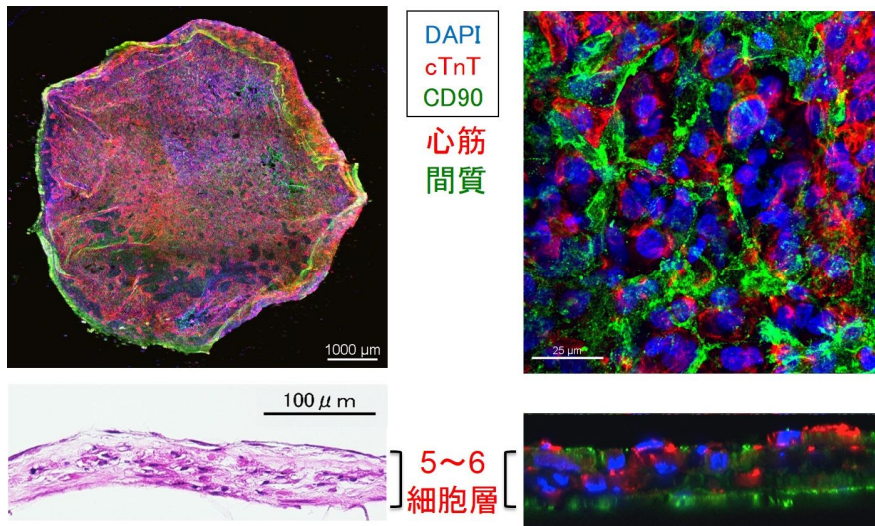
TdP は、心電図上で多形性の心室頻脈波形 (下図右) を示す。また2次元細胞動態としては、回旋中心が移動する Meandering (ミアンダリング) 現象 (下図左) が認められるはずである。hiPS-CTS にてこのような特徴を有する不整脈を誘発することを試みた。成功すれば、世界初の TdP モデルとなる。



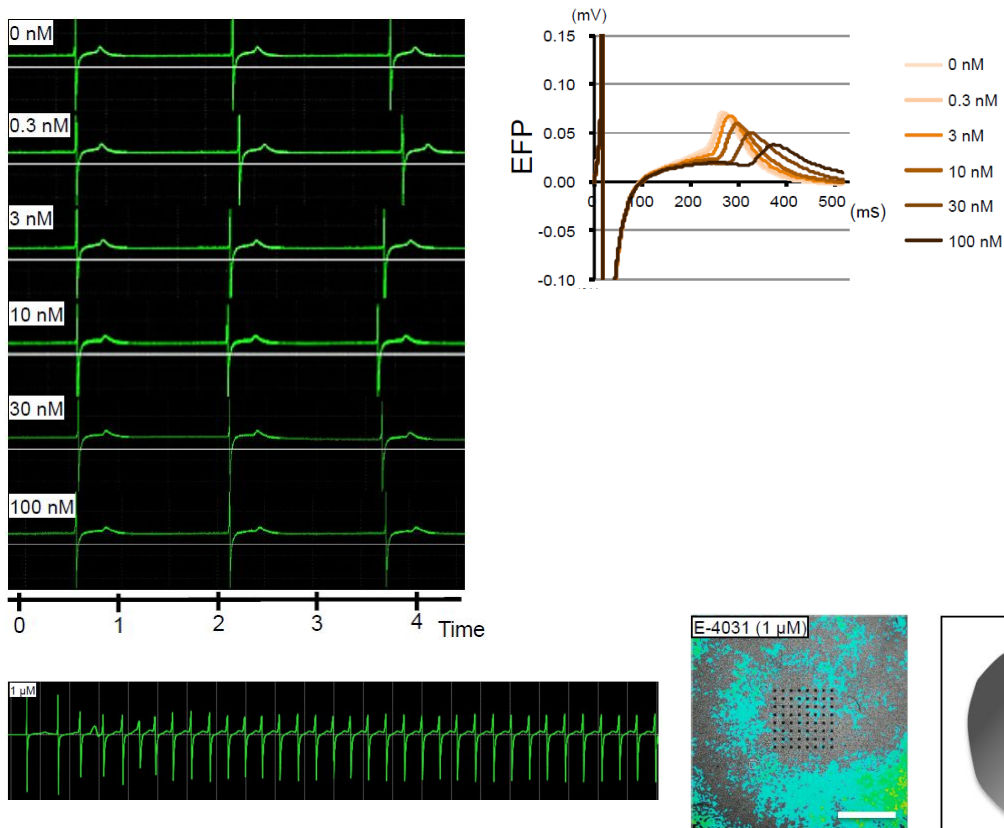
4. 研究成果

1) hiPS-CTS を用いたリエントリー型不整脈発生モデル

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と間質細胞の 2 種類の細胞からなる hiPS-CTS を作製した。hiPS-CTS は 5,6 層の細胞層からなる「複数細胞種によるミニ 3D 構造」であった(下図)。



hiPS-CTS に QT 延長を来す薬剤 E-4031 を添加したところ、細胞外電位において QT 延長に相当する細胞外電位時間 (FPD) の延長が認められた(下図)。



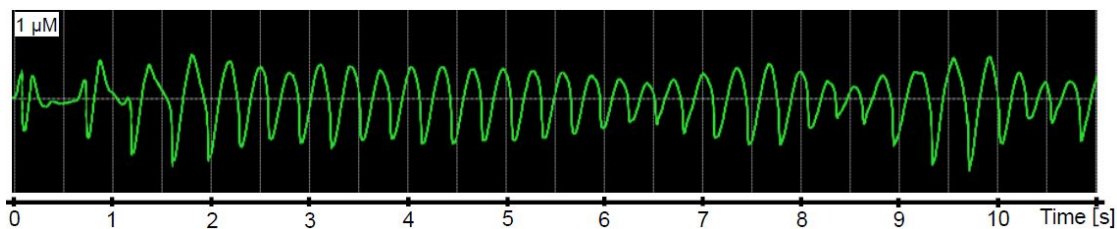
E-4031 投与により、心室頻拍様の細胞外電位波形の発生を認め(左上図)、同時に解析した 2 次元的細胞動態解析により、安定したリエントリー型の不整脈様現象が再現されていることが確認された(右上図)。

このように hiPS-CTS を作製して薬剤性に QT 延長効果を与えることにより、従来の細胞モデルでは認められなかったリエントリー型不整脈を in vitro において再現することに成功した。

2) hiPS-CTS を用いた致死性不整脈 Torsade de Points (TdP) 再現モデル

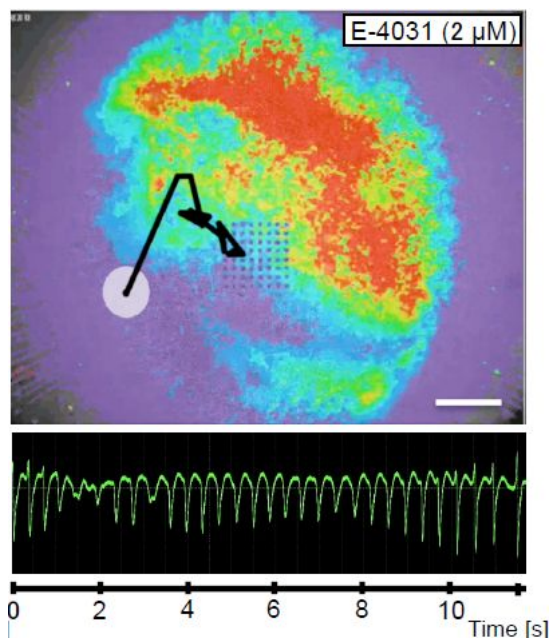
1) で示した安定した心室頻拍様不整脈のみならず、多形性の細胞外電位波形とさまよい型のリエントリーを示す TdP も再現できないか検討した。

その結果、下図に示すようなTdP様の細胞外電位波形も発生することが確認された。



さらに、TdP様の細胞外電位波形発生時に、リエントリー波形における回旋中心のさまよい減少を確認することにも成功した。(右図・黒線が回旋中心の移動)

これらの結果は、in vitroにおいてTdP様の不整脈の発生を細胞外電位波形及びリエントリー回旋中心の移動というTdPの特徴を明確に示した初めてのデータであり、世界で初めてTdPをin vitroにおいて再現するモデルを構築することに成功したものと考えられる。同成果は、2017年Nature Communication誌に報告された。(Kawatou, Nat Commun, 2017)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Kawatou M, Masumoto H, Fukushima H, Morinaga G, Sakata R, Ashihara T, *[Yamashita JK](#). Modelling Torsade de Pointes arrhythmias in vitro in 3D human iPS cell-engineered heart tissue. **Nat Commun**, 8(1):1078, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-01125-y.
2. Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, Yoshida Y, Okita K, Watanabe A, Inoue H, [Yamashita JK](#), Todani M, Nakagawa M, Osawa M, Yashiro Y, Yamanaka S, Osafune K. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. **Physiol Rev.**, 99(1):79-114, 2019. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2017>

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 組織工学を用いた多層化心筋組織の作製と治療応用、山下潤、日本炎症再生医学会/日本再生医療学会ジョイントシンポジウム(招待講演)、2017年
2. 多能性幹細胞を用いた新しい3次元的組織モデル、山下潤、日本炎症再生医学会シンポジウム(招待講演)、2017年
3. 多能性幹細胞を用いた心血管系の分化再生研究 - 新たな細胞・モデル・治療戦略の探索 -、山下潤、心血管代謝週間 CVMW2017・合同シンポジウム(招待講演)、2017年
4. Novel in Vitro Modeling of Lethal Arrhythmias with 3D Cardiac Structure Derived from Human iPS Cells、山下潤、Myocardial Ischemia Symposium in Korea 2018(招待講演)(国際学会)、2018年
5. Human iPS cell-engineered heart tissue to reproduce “Torsade de Pointes” arrhythmia in vitro、川東正英、山下潤、International Society for Stem Cell Research(ISSCR)(国際学会)、2017年

6. ヒト iPS 細胞由来の薬剤誘発性 Torsade de Pointes 再現 3 次元心臓組織モデル、川東正英、山下潤、第 38 回日本炎症・再生医学会、2017 年
7. Human iPS cell-derived cardiac tissue to reproduce “Torsade de Pointes”arrhythmia in vitro、川東正英、山下潤、ESC Congress2017 (国際学会)、2017 年
8. ヒト iPS 細胞由来の Torsade de Pointes 再現心臓組織モデル、川東正英、山下潤、Molecular Cardiovascular Metabolic Conference、2017 年
9. In vitro Torsade de Pointes arrhythmia model with 3D human iPS cell-engineered heart tissue、川東正英、山下潤、AHA American Heart Association 2017 (国際学会)、2017 年
10. iPS 細胞研究の循環器領域への応用-新しい病態モデル・細胞ソース・治療戦略-、山下潤、第 79 回循環器診療セミナー in 西宮 (招待講演)、2018 年
11. CTS (cardiac tissue sheet)-Stacks for Cell therapy & Drug discovery、山下潤、Global BI Stem Cell Meeting 2018 (招待講演) (国際学会)、2018 年
12. ヒト iPS 細胞由来の薬剤誘発性 Torsade de Pointes 再現心臓組織モデル、川東正英、山下潤、第 22 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会(CVEM2018)、2018 年
13. Torsade de Pointes arrhythmia model in vitro with 3D human iPS cell-engineered heart tissue、川東正英、山下潤、5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) World Congress (国際学会)、2018 年

〔その他〕

ホームページ等

http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/yamashita_summary.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：川東正英

ローマ字氏名：Masahide Kawatou

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。