

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0168

研究課題名（和文）Heart-on-chipによる心筋梗塞時不整脈のメカニズム解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of arrhythmia in myocardial infarction in an organ-on-a-chip

研究代表者

高橋 賢（Takahashi, Ken）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・研究准教授

研究者番号：50432258

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000円

渡航期間： 14ヶ月

研究成果の概要（和文）：当初1年間であった予定を4か月延長し、米ハーバード大Wyss InstituteのDonald E. Ingber教授の研究室で臓器チップorgan-on-a-chipを用いて虚血再灌流障害の研究を行い、臓器チップ研究の技術習得と、国際的研究ネットワーク形成とを行った。帰国後、この臓器チップ上でヒト線維芽細胞およびヒト血管内皮細胞との共培養下でヒトiPS細胞を心筋細胞に分化させる、ヒト心臓チップの開発に成功した。さらにCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集により、ヒトiPS細胞のTRPM4チャネルのノックアウトに成功した。これにより、心筋梗塞発症におけるこのチャネルの関与を調べる道が開けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器チップ技術を利用したヒト臓器モデルの開発と、それを利用した疾患モデルの開発に大きな成果が得られた。その結果、これまで実験動物に頼らざるを得なかった医学研究をより正確かつ効率的に行うことが可能になると期待される。

さらに、本国際共同研究の実施により、米ハーバード大やスイスETH Zurichなど、世界有数の研究機関の研究者とのネットワークが形成された。このネットワークは、国際学術誌Micromachinesのthematic issueの共同刊行や国際学会での招待講演の実施などの形で、既に本国際共同研究の枠組みを超えて学問領域の発展に貢献しつつある。

研究成果の概要（英文）：The original one-year schedule was extended by four months, and research on ischemia-reperfusion injury was conducted using the organ-on-a-chip in the laboratory of Professor Donald E. Ingber of the Wyss Institute at Harvard University. I acquired techniques for organ-on-a-chip research and formed an international research network. After returning to Japan, my research team succeeded in developing a human heart-on-a-chip using human iPS-derived cardiomyocytes under co-culture with human fibroblasts and human vascular endothelial cells. Furthermore, we succeeded in knocking out TRPM4 channels in human iPS cells by genome editing using CRISPR/Cas9. This paved the way for investigating the involvement of this channel in the development of myocardial infarction.

研究分野：臓器チップ、生体医工学、循環器生理学

キーワード：臓器チップ 心筋梗塞 脳梗塞 TRPM4 iPS細胞 CRISPR/Cas9 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞を引き起こす虚血性心疾患は、世界人口の死因の1位を占めるものの、その予防・治療にはまだ改善の余地がある。研究代表者・高橋は、イオンチャンネル TRPM4 が心筋梗塞の病態に関与していることを発見した[1, 2]。この病態をさらに明らかにするためには、ハイスループットの評価系を開発する必要がある。米ハーバード大の Wyss Institute は、臓器チップ organ-on-a-chip を用いたハイスループット実験系の開発の先駆者であり、この分野で世界を牽引している。本海外共同研究により、研究の進展はもちろん、今後の国際共同研究の飛躍的な促進が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1. 臓器チップの技術を習得し、ヒト心臓チップ heart-on-a-chip を開発して虚血再灌流障害のモデルを確立すること、および 2. 虚血再灌流を模擬した条件下で、ヒト心筋細胞の収縮状態および活動電位伝播に対し TRPM4 チャンネルの活動が及ぼす影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

- 1) Wyss Institute にて臓器チップの運用法を習得する。
- 2) ヒト細胞を用いた心臓チップの作成法を確立する。ヒト細胞は、iPS 由来心筋細胞、歯肉線維芽細胞、および臍帯静脈血管内皮細胞を用いる。(ヒトの心臓は約半分が線維芽細胞から成る。研究代表者は、iPS 細胞と採取が容易な歯肉線維芽細胞との共培養により心筋組織を得る方法を確立した[3].)
- 3) 分化心筋の収縮記録と活動電位記録、および溶液灌流試験を心臓チップ上で行う。
- 4) 心臓チップ上で、分化心筋に虚血再灌流条件の負荷を行う。虚血再灌流模擬条件として、主要な活性酸素種である過酸化水素の投与、および低酸素/再酸素化処置を行う。
- 5) 虚血再灌流障害への TRPM4 チャンネルの関与を明らかにするため、CRISPR を用いて TRPM4 チャンネルをノックアウトしたヒト iPS 細胞株の作成を行う。
- 6) 今後の国際共同研究を強化するため、世界の優秀な研究者らとのネットワーク形成を行う。

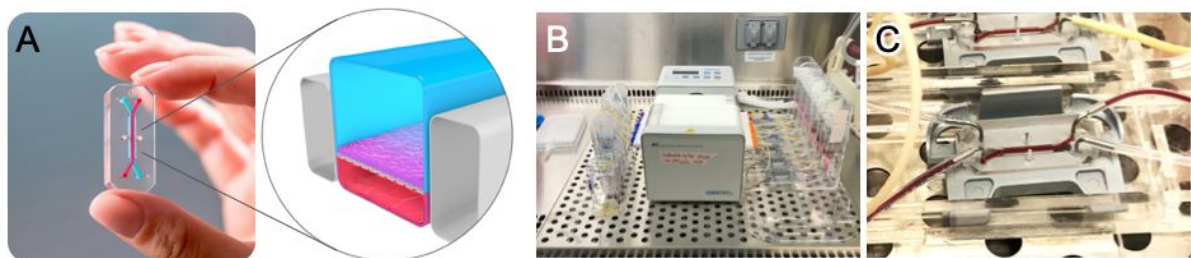


図 1. 臓器チップを用いた臓器モデル. A. シリコン樹脂製の 2 チャンネルチップ。Top チャンネル・bottom チャンネルで培養する細胞種を変えることで様々な臓器のモデルが作成でき、ライブイメージングも可能。B. ペリスタポンプによる血液の灌流。C. bottom チャンネルへの全血血液灌流。

4. 研究成果

当初 1 年間であった予定を 4 か月延長し、米ハーバード大 Wyss Institute の Donald E. Ingber 教授の研究室で臓器チップを用いて虚血再灌流障害の研究を行い、臓器チップ研究の技術習得と、国際的研究ネットワーク形成とを行った。帰国後、この臓器チップ上で線維芽細胞および血管内皮細胞との共培養下でヒト iPS 細胞を心筋細胞に分化

させる、ヒト心臓チップの開発に成功した。この成果は、CBI 学会のシンポジウムで発表された[4]ほか、日本生体医工学会[5]および International Conference of Microfluidics, Nanofluidics and Lab-on-a-Chip (中国・深圳) [6]で発表予定である。

これに加え、臓器チップ上で心筋細胞の収縮量を定量的に測定する方法を開発した他、細胞内カルシウムイオン濃度および活性酸素をリアルタイムで観察する方法を確立した。この成果により、ヒトの臓器を模擬した臓器チップを用いて、薬物の効果検証や病態モデルの開発により疾患の研究を行う道が開かれた。

さらに、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、ヒト iPS 細胞において一過性受容器電位チャネルの一種である TRPM4 チャネルの発現抑制に成功した。両アレル変異による TRPM4 チャネルのロックアウトは、このチャネルが心筋梗塞や脳梗塞などの一因である虚血再灌流障害を増悪するという研究代表者の仮説を検証する上で、極めて重要なステップである。この成果に先立ち、ラット心筋細胞株 H9c2 において TRPM4 チャネルのロックアウト株の作成に成功した。この成果は、2 編の研究論文として出版された[7, 8]。

虚血再灌流障害のモデル確立に関しては、3 つの成果があった。すなわち、ヒト iPS 由来心筋細胞を低栄養・低酸素環境に曝露して細胞傷害を誘発し、その程度を定量評価する方法の確立。臓器チップの灌流系で過酸化水素を投与し、細胞内活性酸素をリアルタイム観察する方法の確立。および、ヒト血液を灌流した臓器チップを低酸素状態に曝露して組織傷害を誘発し、その程度を定量評価する方法の確立である。

これらの成果は、1 件の特許出願、4 編の研究論文、2 編の総説論文と 12 件の学会発表（うち招待講演 3 件、国際学会 3 件）を生んだ。

本国際共同研究の実施により、米ハーバード大やスイス ETH Zürich など、世界有数の研究機関の研究者とのネットワークが形成された。このネットワークは、国際学術誌 *Micromachines* の thematic issue の共同刊行や国際学会での招待講演の実施などの形で、既に本国際共同研究の枠組みを超えて学問領域の発展に貢献しつつある。

今後は、開発した心臓チップを用いて虚血再灌流障害の条件下における TRPM4 チャネルの関与を明らかにし、心筋梗塞発症のメカニズムを明らかにする。さらに、同様のメカニズムで起こると考えられる脳梗塞や、腎移植後の腎臓障害についても、脳チップ、腎臓チップを開発することにより TRPM4 チャネルの関与の有無を明らかにしていく。

さらに臓器チップの研究を進めることにより、他大学・研究機関の研究者との共同研究を積極的に進め、医学の発展に貢献していきたい。

#: equal contribution, *: corresponding author

1. Wang J[#], **Takahashi K[#]*, Piao H, Qu P, Naruse K. 9-Phenanthrol, a TRPM4 inhibitor, protects isolated rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 2013 Jul 25;8(7):e70587. doi: 10.1371/journal.pone.0070587. PMID: 23936231; PMCID: PMC3723883.**
2. Piao H[#], **Takahashi K[#]*, Yamaguchi Y, Wang C, Liu K, Naruse K. Transient receptor potential melastatin-4 is involved in hypoxia-reoxygenation injury in the cardiomyocytes. *PLoS One*. 2015 Apr 2;10(4):e0121703. doi: 10.1371/journal.pone.0121703. PMID: 25836769; PMCID: PMC4383534.**
3. Matsuda Y, **Takahashi K[#]*, Kamioka H, Naruse K. Human gingival fibroblast feeder cells promote maturation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Sep 10;503(3):1798-1804. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.116. Epub 2018 Jul 27. PMID: 30060947.**
4. **高橋 賢**. ヒト臓器チップを用いた臓器機能評価. CBI学会2020年大会. 2020年10月27日 (online). 情報計算化学生物学会 (シンポジウム)
5. **高橋 賢**. Development of a model of human heart using organ-on-a-chip. 第60回日本生体医工学会大会. 2021年6月16日 (online).
6. **Takahashi K**. Development of heart-on-a-chip using endothelial cells, fibroblasts, and iPS-derived cardiomyocytes. The 3rd International Conference of Microfluidics, Nanofluidics and Lab-on-a-Chip. July

2021 (Shenzhen) (online) (invited)

7. Wang C, Chen J, Wang M, Naruse K, **Takahashi K***. Role of the TRPM4 channel in mitochondrial function, calcium release, and ROS generation in oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 (accepted)
8. Wang C, Maeda M, Chen J, Wang M, Naruse K, **Takahashi K***. Production of TRPM4 knockout cell line using rat cardiomyocyte H9c2. *MethodsX*. 2021 (accepted). doi: 10.1016/j.mex.2021.101404. Epub 2021 May

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Wang C, Chen J, Wang M, Naruse K, Takahashi K	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of the TRPM4 channel in mitochondrial function, calcium release, and ROS generation in oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang C, Maeda M, Chen J, Wang M, Naruse K, Takahashi K	4. 巻 -
2. 論文標題 Production of TRPM4 knockout cell line using rat cardiomyocyte H9c2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mex.2021.101404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Liang Yin, Wang Mengxue, Wang Chen, Liu Yun, Naruse Keiji, Takahashi Ken	4. 巻 22
2. 論文標題 The Mechanisms of the Development of Atherosclerosis in Prediabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4108 ~ 4108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22084108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wang Mengxue, Liu Yun, Liang Yin, Naruse Keiji, Takahashi Ken	4. 巻 8
2. 論文標題 Systematic Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Oxidative Stress-Related Conditions?Diabetes Mellitus, Cardiovascular Diseases, and Ischemia?Reperfusion Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2021.649785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Liu Yun, Liang Yin, Wang Mengxue, Wang Chen, Wei Heng, Naruse Keiji, Takahashi Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Model of Ischemic Heart Disease and Video-Based Comparison of Cardiomyocyte Contraction Using hiPSC-Derived Cardiomyocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/61104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wei Heng, Wang Chen, Guo Rui, Takahashi Ken, Naruse Keiji	4. 巻 520
2. 論文標題 Development of a model of ischemic heart disease using cardiomyocytes differentiated from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 600 ~ 605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang C, Naruse K, Takahashi K	4. 巻 7(6)
2. 論文標題 Role of the TRPM4 Channel in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells7060062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda Y, Takahashi K, Kamioka H, Naruse K	4. 巻 503(3)
2. 論文標題 Human gingival fibroblast feeder cells promote maturation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1798-1804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.07.116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 高橋 賢
2. 発表標題 Development of a model of human heart using organ-on-a-chip
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahashi K
2. 発表標題 Development of heart-on-a-chip using endothelial cells, fibroblasts, and iPS-derived cardiomyocytes
3. 学会等名 The 3rd International Conference of Microfluidics, Nanofluidics and Lab-on-a-Chip (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 賢, 王 夢雪, 劉 雲, 梁 茵, 王 晨, 成瀬 恵治
2. 発表標題 Development of microfluidic cell culture system in preparation for human organ on a chip
3. 学会等名 第59回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 賢
2. 発表標題 ヒト臓器チップを用いた臓器機能評価
3. 学会等名 CBI学会2020年大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wang Mengxue, Yun Liu, Kenji Naruse, Ken Takahashi
2. 発表標題 Establishing an artificial heart model on a chip by using cardiomyocytes
3. 学会等名 The 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Liu Yun, Mengxue Wang, Kenji Naruse, Ken Takahashi
2. 発表標題 Optimization of the cardiac differentiation of human pluripotent stem cells
3. 学会等名 The 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yin Liang, Mengxue Wang, Keiji Naruse, Ken Takahashi
2. 発表標題 Kidney-on-a-chip model using human renal proximal tubular epithelial cells and human umbilical vein endothelial cells
3. 学会等名 The 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahashi K
2. 発表標題 Ischemia-reperfusion injury
3. 学会等名 2019 International Conference for Leading and Young Medical Scientists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang C, Naruse K, Takahashi K
2. 発表標題 Roles of the TRPM4 channel in mitochondrial function, ROS generation, and calcium release in myocardial ischemia-reperfusion injury
3. 学会等名 2019 International Conference for Leading and Young Medical Scientists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang C, Chen J, Naruse K, Takahashi K
2. 発表標題 Roles of the TRPM4 channel in mitochondrial function, ROS generation, and calcium release in myocardial ischemia-reperfusion injury
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wei H, Wang C, Takahashi K, Naruse K
2. 発表標題 Cellular model of ischemic heart disease using human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tada C, Takahashi K, Naruse K
2. 発表標題 Effect of dimensional factor of cell culture on cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang C, Wei H, Naruse K, Takahashi K
2. 発表標題 TRPM4 channel is involved in cellular damage caused by simulated ischemia-reperfusion injury: study of human iPSC-derived cardiomyocytes
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi K
2. 発表標題 Mechanobiology and its application to medical problem solving
3. 学会等名 2019 International Conference on Biology and Medical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 心筋細胞の作製方法	発明者 高橋賢、出射明美、 成瀬恵治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、OP01467	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

KEN TAKAHASHI website https://ken-takahashi.net/category/research/
--

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Harvard University			
米国	Harvard University			