

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18H03517  
研究課題名(和文)細胞ホーミング特性に着目した心筋の自己組織化機構解明とバイオ人工心臓構築への応用  
研究課題名(英文)Elucidation of self-organization of myocardium focusing on cell homing and its application for bio-artificial heart engineering  
研究代表者  
李 鍾國 (LEE, Jong-Kook)  
大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)  
研究者番号：60303608  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体臓器に匹敵する機能・形態を有する三次元バイオ人工心臓の創出に利用可能な技術開発を行った：

#1. 界面活性剤と糖脂質物質を用いた新規脱細胞化技術を開発した；#2. ヒトiPS細胞由来心筋細胞の成熟化・自己組織化を促進する方法を報告した；#3. ストレスファイバー(アクチン)とYAPシグナルの関係を調べた。その結果、YAPシグナルが自己組織化においても重要な役割を果たしていることが示唆された；#4. 臓器様三次元心筋組織に利用可能な三次元心臓イメージング技術を組織透明化(CUBIC-2)を応用して確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓全体がびまん性広範囲に障害を受け、重篤な機能不全に陥っている心筋症のような病態に対しては、ドナーからの臓器移植を含む治療が行われているが、臓器そのものを再生し、移植する方法の開発が期待されている。近年、脱細胞化細胞外マトリックスを用いて立体臓器を構築する方法が一定の効果を示し、注目が集まるようになったが、生体臓器に匹敵するバイオ人工心臓を構築するには様々な課題を解決する必要があり、細胞が本来あるべき場所に生着し、生着、成長する、自己組織化を理解することが不可欠である。本課題により、三次元心筋組織構築に有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We have approached the development of new technologies that can be used to create a three-dimensional bioartificial heart with functions and morphology comparable to living organs:

# 1. We have developed a new decellularization technology using surfactants and glycolipid substances; # 2. We reported a method for promoting maturation and self-organization of human iPS cell-derived cardiomyocytes; # 3. We investigated the relationship between stress fibers (actin) and YAP signals. The result suggests that YAP signals also play an important role in self-organization; # 4. We have established a three-dimensional cardiac imaging technique that can be used for organ-like three-dimensional myocardial tissue by applying the tissue-clearing technique (CIBIC-2).

研究分野：再生医学、生体医工学、循環器内科学

キーワード：自己組織化 脱細胞化 iPS細胞由来心筋細胞 三次元心筋組織構築 ストレスファイバー YAPシグナル Duchenne型筋ジストロフィー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、胚盤胞補完などの技術により、培養皿や動物の体内で、生体と類似した構造を持つオルガノイドや臓器を再生する技術開発が進められているが、心臓のような大型臓器については、そのサイズや臓器再生にかかる時間等の制約のため、組織や器官の基質を鋳型として用い *in vitro* で立体臓器を構築する方法も行われている。

本課題研究代表者(李)らは、ラット脱細胞化細胞外マトリックスに心臓構成細胞を播種し、生体心とほぼ同様のサイズ・形態を有し、自己拍動を示す臓器様三次元心筋組織の構築に成功し、報告した (Yasui et al. *Biomaterials* 2014)。しかしながら、得られた臓器様三次元組織の微小構造や機能は、生体心のそれらとはかけ離れたものであった。そのため、生体に匹敵する臓器を構築する新規技術開発が必要と考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究においては、細胞の Homing, Adhesion, Maturation を始めとする細胞の自己組織化に関連する特性に着目し、生体臓器に匹敵する機能・形態を有する三次元バイオ人工心臓の創出に利用可能な技術開発を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

1) 心臓脱細胞化: 新生仔ラット心臓を、界面活性剤および糖脂質物質を含む溶液に含浸・振盪を行い、残存細胞、DNA、細胞外マトリックス (collagen 等) の形態について評価を行うとともに、新生仔ラット由来心臓構成細胞を播種し、再細胞化心臓の自動能の有無を調べた。

2) デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 患者から樹立された iPS 細胞を用い、ディストロフィンとアクチンストレスファイバーおよびの YAP の関係を、調べた。

3) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPS-CM) を配向性あり・なしスキャフォールド (SF) 上で培養し、成熟化に及ぼす効果を調べた。

4) ラット新生仔上頸神経節由来交感神経細胞と hiPS-CM を共培養し、機能・形態に及ぼす効果を調べた。

5) 当グループがこれまでに報告した組織透明化技術 (Yokoyama et al. *PLoS One* 2017) を応用し、心臓における神経・血管の 3 次元イメージング技術を確立し、健常心・病態心における交感神経分布定量評価に応用した。

### 4. 研究成果

1) 新規脱細胞化技術と 3 次元形態評価技術の開発: 糖脂質物質を用いることにより、細胞外マトリックスの大きさや形態などに影響を与えずに脱細胞化を遂行しうることを見出した。本成果は、特許出願をおこなうとともに、2020 年日本再生医療学会学術集会で発表した。さらに、脱細胞化工程において光干渉断層イメージング装置により解析を用い、3 次元組織である脱細胞化技術の効果を評価する新規技術を開発し報告した。(李鍾國、「脱細胞化組織の作製法と医療・バイオ応用」岸田晶夫・山岡哲二・干場隆志編、2019 年)

2) 細胞の増殖・遊走関連因子 YAP 活性とストレスファイバーアクチンとの関連: ディストロフ

インが欠損している DMD 患者から樹立された hiPS-CM を用い、ディストロフィンがアンカリングするストレスファイバー(アクチン)の機能性を調べた。また、アクチン機能を評価するため、アクチンダイナミクスをライブセルイメージングで解析するプラットフォーム構築を行った。その結果、DMD-iPS 心筋においては、アクチン蛋白の重合阻害、増殖マーカーの低下とともに YAP 関連遺伝子発現の低下が見られ、細胞の増殖・遊走関連因子の YAP シグナルがストレスファイバーの影響を受けることが示され、組織構築における新規標的分子となる可能性が示唆された。本成果は 2019 年心筋症研究会で発表するとともに(安武秀記: Young Investigator's Award セッション優秀賞) 国際学術誌で報告した(Yasutake et al. *Sci Rep* 2021)。

3) 他律的組織化が、hiPS-CM の成熟化に及ぼす効果: 有配向性スキャフォールド (SF) 上で hiPS-CM を培養すると、無配向性 SF あるいは SF なしの条件と比べ、電気生理特性や遺伝子発現パターンなどの成熟化促進が観察された。有配向性 SF による成熟化パラメータの一部は、hiPS-CM を剥離して再播種した後も維持された。本成果は原著論文として報告した(Li J et al. *Front Cell Dev Biol.* 2021)。

また、生体の解剖学的構造を持ちたスキャフォールドで心房タイプに分化させた hiPS-CM を培養すると、心房性不整脈様の興奮伝播異常がみられた。(Nakanishi et al. *Front Physiol* 2019)

4) 交感神経細胞との共培養による自己組織化: ラット交感神経細胞 (rSN) と共培養すると、hiPS-CM の自己組織化と成熟化が促進されることを見出した。一方、rSN 培養上清を用いた hiPS-CM 単培養系では、hiPS-CM の成熟化が見られたが、自己組織化は見られなかった。本成果は、2020 年 第 85 回日本循環器学会学術集会 Young Investigator's Award (International Student Section) で発表した (Li Jun et al. 最優秀賞受賞、論文投稿準備中)。

5) 三次元心臓のイメージング法の構築: 組織透明化技術 (CUBIC-2) を用い、成獣マウス心臓における交感神経および血管の 3 次元分布を観察する技術を用い、たこつぼ症候群マウスモデルにおける交感神経線維の評価を行った。その結果、たこつぼ症候群マウスにおいて、交感神経線維が病態ステージによりダイナミックに変化することが明らかとなった。本技術は、3 次元構築された心筋組織の品質評価に利用可能な技術と考えられた。本成果は国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2020) で発表した (Masuyama et al. YIA session 優秀賞、論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakanishi H, Lee JK, Miwa K, Masuyama K, Yasutake H, Li J, Tomoyama S, Honda Y, Deguchi J, Tsujimoto S, Hidaka K, Miyagawa S, Sawa Y, Komuro I, Sakata Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Geometrical Patterning and Constituent Cell Heterogeneity Facilitate Electrical Conduction Disturbances in a Human Induced Pluripotent Stem Cell-Based Platform: An In vitro Disease Model of Atrial Arrhythmias	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2019.00818	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 Yoshida A, Lee JK, Tomoyama S, Miwa K, Shirakawa K, Hamanaka S, Yamaguchi T, Nakauchi H, Miyagawa S, Sawa Y, Komuro I, Sakata Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 In vitro platform of allogeneic stem cell-derived cardiomyocyte transplantation for cardiac conduction defects.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Europace	6. 最初と最後の頁 1553-1560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/europace/eux379	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 -

1. 著者名 Li Jun, Lee Jong-Kook, Miwa Keiko, Kuramoto Yuki, Masuyama Kiyoshi, Yasutake Hideki, Tomoyama Satoki, Nakanishi Hiroyuki, Sakata Yasushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Scaffold-Mediated Developmental Effects on Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Are Preserved After External Support Removal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 591754-591754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.591754	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13件（うち招待講演 6件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 李鍾國
2. 発表標題 "Engineering of "physiologically-relevant" human cardiac tissues for arrhythmias study using iPS cell-derived cardiomyocytes."
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム(BCVR)（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 LEE Jong-Kook
2. 発表標題 Engineering of Biological Artificial Heart ~ Next Step for Cardiac Regeneration?
3. 学会等名 The 63rd Annual Scientific Meeting of The Korean Society of Cardiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李鍾國
2. 発表標題 教育講演：iPS心筋を用いた疾患解明・創薬研究の現状と展望
3. 学会等名 第40回日本臨床薬理学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松島 麻悠子, 龍見 宗樹, 野上 明日香, 竜 瑞之, 李 鍾国, 平田 善彦
2. 発表標題 糖脂質物質ソホロスリピッドを用いた再生医療基盤技術開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李俊、李鍾國、日野綾、藏本勇希、坂田泰史
2. 発表標題 Co-culture with Sympathetic Neurons Promotes the Self-organization of iPS Cell-derived Cardiac Tissues
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安武秀記、李 鍾國、藏本 勇希、肥後 修一郎、彦惣 俊吾、日高 京子、坂田 泰史
2. 発表標題 iPS細胞を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィーにおけるYAPの局在性の評価及び細胞密度による検証
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西浩之、李鍾國、小室一成、坂田泰史
2. 発表標題 Geometrical and Constituent Heterogeneity Jeopardizes the Electrical Conduction on Atrial-like Cardiomyocytes Monolayer Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells: an in vitro Structural and Electrophysiological Model Imitating the Junction of Pulmonary Vein and Left Atrium
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李鍾國
2. 発表標題 iPS細胞由来心筋組織を用いた循環器疾患モデルと創薬プラットフォームの構築～自己組織化と新規3次元イメージング技術を用いたフェノタイプ解析
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安武秀記、李鍾國、日高京子、坂田泰史
2. 発表標題 デュシェンヌ型筋ジストロフィー心筋症（DMD）の発症におけるYAPシグナルの関与
3. 学会等名 第5回 日本心筋症研究会 YIAセッション
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李鍾國
2. 発表標題 Disease Modeling for Atrial Arrhythmias Using Human iPS Cell ~ Lessons from Human Anatomy and Pathophysiology (Topics: Arrhythmia 4)
3. 学会等名 第84回 日本循環器学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李俊、李鍾國、藏本勇希、坂田泰史
2. 発表標題 Sympathetic Innervation Facilitated the Self-organization of iPS Cell-derived Cardiac Tissues
3. 学会等名 第84回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李鍾國
2. 発表標題 Sympathetic Innervation Promotes Self-Organization and Maturation of iPS cell-derived Cardiomyocytes: Implication for Organoids and Three-dimensional Bioartificial Hearts
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増山潔、李鍾國、坂田泰史
2. 発表標題 Transitional sympathetic dysinnervation underlie pathophysiological process of Takotsubo syndrome
3. 学会等名 CVMW 2020 37th ISHR
4. 発表年 2021年

## 〔図書〕 計2件

1. 著者名 李鍾國 分担執筆（岸田晶夫・山岡哲二・干場隆志編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 9
3. 書名 脱細胞化組織の作製法と医療・バイオ応用	

1. 著者名 増山潔、李鍾國	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学のあゆみ2020（医歯薬出版）	5. 総ページ数 5
3. 書名 たこつば症候群における分子メカニズム（明石嘉浩編：「たこつば症候群のすべて」）	

## 〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脱細胞化処理液及び洗浄組成物	発明者 李鍾國 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、110001427	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

## 〔取得〕 計0件

## 〔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 分 担 者	坂田 泰史  (SAKATA Yasushi)  (00397671)	大阪大学・医学系研究科・教授    (14401)	

	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	安武 秀記  (YASUTAKE Hideki)		

6. 研究組織（つづき）

	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	李 俊  (LI Jun)		
研究協力者	増山 潔  (MASUYAMA Kiyoshi)		
研究協力者	松島 麻悠子  (MATSUSHIMA Mayuko)		
研究協力者	小湊 智子  (KOMINATO Tomoko)		

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