

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号： 14301

研究種目： 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間： 2018～2020

課題番号： 18KK0461

研究課題名（和文）ヒト心臓由来脱細胞化マトリックスを用いた高度な三次元HCMモデルの構築

研究課題名（英文）Creation of an advanced HCM tissue model using human decellularized native extracellular matrix

研究代表者

三木 健嗣（Miki, Kenji）

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号： 10772759

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 18ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPS細胞から高純度の心筋細胞、心外膜細胞及び心内膜細胞を得る分化法を確立し、それらを脱細胞化した心臓組織に充填して培養したところ、肉眼で拍動する心臓組織が得られ、更にその心筋細胞は二次元培養した心筋細胞よりもサルコメア及びミトコンドリアの成熟を確認できた。更に、3Dバイオプリンター及びハイドロゲルを用いてperfusion可能な3層構造を持つ心筋組織の構築に成功し、この組織は1ヶ月培養を続けても組織の中心部がネクローシスを起こすことはなかった。この組織の心筋細胞においても、二次元培養した心筋細胞よりもサルコメア及びミトコンドリアの成熟を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱細胞化マトリックスを用いることにより、血管網が存在する拍動する心臓組織の構築に成功し、この研究は今後の心臓としてのポンプ機能をより詳細に解析できることになり、将来的な臓器創生・移植/創薬への応用・病態解明などに貢献できると考えている。3Dプリンターを用いた灌流可能な心筋組織に関しては、より長期間組織内の細胞を生存させることが可能となり、特に創薬や薬剤試験などへの応用が期待できる。これら高度な三次元心臓モデルを構築することで、臓器創出やPrecision Medicineの実現は医学分野の発展だけでなく、工学、情報科学分野の発展、更に医療費の抑制といった医療経済にも貢献しうる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, I established differentiation methods to obtain highly pure human iPSC-derived cardiomyocytes, epicardial cells and endocardial cells. I injected and perfused them in a decellularized heart tissue and cultured them, and obtained beating heart tissues by naked eyes. Furthermore, I also showed that cardiomyocytes in the decellularized heart had more mature sarcomeres and mitochondria than cardiomyocytes in two-dimensional culture. In addition, I succeeded in constructing a three-layered heart tissue that can be perfused using a 3D bioprinter and hydrogel. This tissue did not undergo necrosis in the center of the tissue even after one month of culture. In the cardiomyocytes of this tissue, sarcomere and mitochondria maturation was also confirmed to be better than that of cardiomyocytes cultured in two-dimensional culture.

研究分野： 幹細胞生物学

キーワード： 脱細胞化マトリックス 3Dプリンター ヒトiPS細胞 心筋細胞 心外膜細胞 心内膜細胞

1. 研究開始当初の背景

in vitro で作製するヒト iPS 細胞由来の心筋細胞は未成熟な初期の胎児型心筋細胞であり、病態モデルとして成人の表現型が現れないという問題があること、また、二次元のディッシュ上での表現型が in vivo での表現型とは遺伝子発現や電気生理学的機能、代謝機能といった様々な面において大きく異なることが知られている。

採択されていた若手研究において、作製した複数の isogenic な HCM 変異 iPS 細胞株のうち、MYH7 遺伝子の一つの変異(R719Q)に関しては plate 上での心筋肥大を確認することができたが、MYBPC3 遺伝子の二つの変異(R502W, E542Q)に関しては plate 上で心筋肥大は確認できなかった(図1)。この二つの変異に関しては複数の家系で報告があり、MYBPC3 上の変異としては最も頻度が高く、マウスモデルでも確認されている変異ではあるが、臨床的には MYH7-R719Q の変異に比して重症度が軽度である(発症も遅い)ことが報告されている。これらのことより、in vitro で MYBPC3 変異の HCM モデルを構築するには iPS 細胞由来心筋細胞の更なる成熟化を促進し、より成人に近い細胞/組織にすることが HCM の表現型を呈するために必須だと考えた。

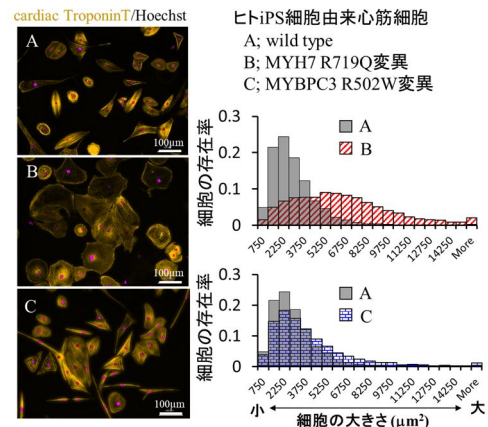


図1. HCM変異の種類による細胞肥大傾向の差異

2. 研究の目的

脱細胞化マトリックスを用いた高度な三次元心筋モデルの構築

図1に示すように、2D 培養では HCM の表現型が確認できない変異があることから、様々な変異に共通する HCM 発症の機序を解明するためにも、これまでにない病態モデルの構築が必要となる。本研究ではまずラット心臓の native な三次元脱細胞化マトリックス¹とヒト iPS 細胞由来の心臓構成成分の複数の細胞種を用いて実際の心臓組織に類似する三次元組織を構築し、心筋細胞の更なる成熟化を促進することで生体内の心臓を模倣した高度な心筋モデルの作製を目指した(図2)。加えて、ヒトの心室筋組織は心外膜層、心筋層、心内膜層の3層構造から成っているため、3D バイオプリンター及びハイドロゲルを用いてこのような組織を構築することを試みた。

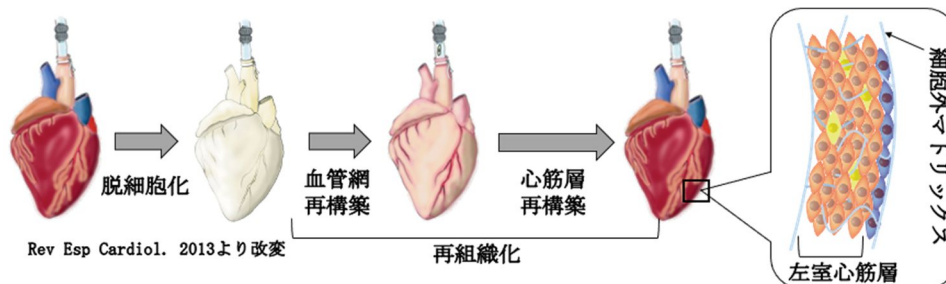


図2. 脱細胞化マトリックスを用いた三次元心筋組織の構築

3. 研究の方法

- (1) ヒト iPS 細胞から心筋細胞、心外膜細胞、心内膜細胞への分化誘導の検討
単層分化誘導法をベースに各種細胞種への分化誘導法の最適化を行った。
- (2) ヒト iPS 細胞由来各種細胞の脱細胞化マトリックス内への充填
ラット心臓を脱細胞化し、各種細胞を充填する方法の検討を行った。
- (3) 3D バイオプリンター及びハイドロゲルを用いた灌流可能な心筋組織の構築
コラーゲンやファイブリノーゲンを用いて、3D プリンターによる層状組織の構築を試みた。

4. 研究成果

- (1) ヒト iPS 細胞から心筋細胞、心外膜細胞、心内膜細胞への分化誘導の検討
心筋細胞

ヒト iPS 細胞をマトリゲルをコートしたプレートへ播種し、3-4 日間ヒト iPS 細胞用培地で培養した。細胞が well の 90%以上を占める段階まで増殖した時点で、RPMI+B27 minus insulin 培地に CHIR99021 を添加した培地へ交換し 2 日間培養(day 0-2)。その後、細胞を RPMI 培地で

wash し、RPMI+B27 minus insulin 培地に IWP-2 を添加した培地に交換して 2 日間培養した (day 2-4)。その後は RPMI+B27 minus insulin 培地で 4 日間培養し (day 4-8, day 6 に培地交換)、8 日目以降は RPMI+B27 with insulin 培地で培養した (2 日毎に培地交換)。その結果、day 10 の時点で 80% 以上の cTNT 陽性の心筋細胞を得ることができた。

心外膜細胞

day 2 までは上記と同様。day 2 の時点で RPMI+B27 minus insulin で 1 日培養。day 3 に RPMI+B27 minus insulin 培地に VEGF, Retinoic acid 及び BMP4 を加えた培地で 4 日間培養した (day 5 に培地交換)。day 7 の時点で 90% 以上の WT1 陽性細胞が得られ、敷石状の心外膜細胞が得られた。この分化方法に関しては、私も共著者として 2021 年に Nature communications へ採択された²。

心内膜細胞

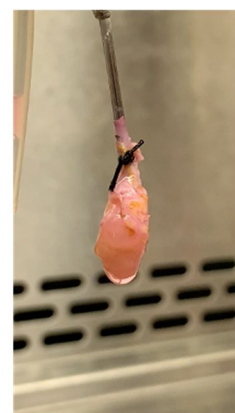
この分化誘導法に関しては、現在論文執筆中のため添加因子の詳細は記載できないが、day 7 の時点で 30-40% の CD31 陽性細胞が得られ、それらは心内膜細胞特異的なマーカーである NFATC1 陽性の細胞であった。これらは MACS による精製を行うことで、90% 以上の純度に純化することができた。

(2) ヒト iPS 細胞由来各種細胞の脱細胞化マトリックス内への充填

ラットより心臓を単離し、PBS で wash 後、cannula を aorta に挿入して専用 chamber に装着し、1% SDS により 24 時間灌流した。その後 1% Triton で 1 時間、滅菌水で 1 時間灌流後、PBS で 5 日間灌流することで脱細胞化マトリックスを作製した (図 3a)。その後、上記により作製したヒト iPS 細胞由来心筋細胞、心外膜細胞、心内膜細胞をそれぞれ perfusion ないし injection により細胞を充填した (図 3b)。この心臓組織は肉眼で拍動を確認でき、組織染色においても心筋細胞、心外膜由来細胞及び心内膜由来細胞が存在していることが確認できた。



(a) 脱細胞化した心臓組織



(b) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞等を用いて再細胞化した組織

図3. 脱細胞化マトリックスへのヒト iPS 細胞由来各種細胞の充填

また、再細胞化した組織を 3 週間培養し、組織に存在する心筋細胞を詳細に確認したところ、同じ期間二次元培養した心筋細胞よりも長いサルコメア長を有し、ミトコンドリア量も豊富に存在していることが確認された。これらより、複数種の細胞を脱細胞化マトリックス内で培養することで、心筋細胞の成熟度が亢進していることが確認できた。

(3) 3D バイオプリンター及びハイドロゲルを用いた灌流可能な心筋組織の構築

脱細胞化マトリックスと並行して、3D バイオプリンターを用いたスルーポット性の高い心筋組織構築も検討した。上記(1)の各種細胞種をコラーゲン及びファイブリノーゲンを混合した懸濁液を 3D プリンターを用いて播種し、更に perfusion 可能な組織にするため、特殊な材料を用いて組織内に培地を灌流できる通路を構築した。その材料に関しては現在論文執筆中のためここでは記載しない。perfusion 可能な組織にする理由としては、これまでの engineered heart tissue (EHT) と呼ばれる心筋組織は、組織が厚くなるとその中心部がネクロシスを起こし、組織の外周部分にのみしか細胞が生存できないという課題があった。そのため、培地を組織内部にも行き渡らせるためのルートを構築することで、組織内部の細胞も長期間生存できるのではないかと考え、perfusion 可能な組織の構築を試みた。その結果、図 4 のように 3 層から成る perfusion 可能な心筋組織の構築に成功し、このような組織を 1 ヶ月間培養を続けたところ、組織内部でも心筋組織が生存していることが確認できた。

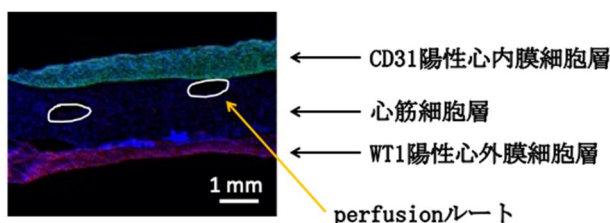


図4. 3Dプリンターを用いたperfusion可能な3層構造の心筋組織

更に、この組織内の心筋細胞を確認したところ、脱細胞化マトリックスの時と同様に、同じ期

間二次元培養した心筋細胞よりも長いサルコメア長を有し、ミトコンドリア量も豊富に存在していることが確認された。

本研究期間中、米国在住のため Covid-19 により 3 ヶ月以上の中断期間があったが、当初予定の脱細胞化マトリックス内への充填によるヒト iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化を確認でき、更に 3D プリンターにより新たな心筋組織の構築にも成功した。

<引用文献>

1. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI and Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nat Med. 2008 Feb;14(2):213-21.
2. Tan JJ, Guyette J, **Miki K**, Xiao L, Kaur G, Wu T, Zhu L, Hansen K, Ling KH Milan D and Ott HC. Human iPS-derived Pre-epicardial Cells Direct Cardiomyocyte Aggregation, Expansion and Organization In Vitro. Nature Communications. in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenji Miki, Kohei Deguchi, Misato Nakanishi-Koakutsu et al.	4. 巻 in press
2. 論文標題 ERR enhances cardiac maturation with T-tubule formation in human iPSC-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-021-23816-3	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 Jun Jie Tan, Jacques Guyette, Kenji Miki, Ling Xiao, Gurbani Kaur, Tong Wu, Liye Zhu, Katrina Hansen, King Hwa Ling, David Milan & Harald C. Ott	4. 巻 in press
2. 論文標題 Human iPSC-derived Pre-epicardial Cells Direct Cardiomyocyte Aggregation, Expansion and Organization In Vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Misato Koakutsu, Kenji Miki, Yuki Naka, Masako Sasaki, Stephanie C Napier, Tomoyuki Nishimoto and Yoshinori Yoshida
2. 発表標題 Differential expression levels of CD151 enable enrichment of atrial cardiomyocytes derived from human induced-pluripotent stem cell
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress（国際学会）
4. 発表年 2020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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	オット ハラルド (Ott Harald)	Massachusetts General Hospital・Department of Surgery・Associate Professor	

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	Massachusetts General Hospital			