

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12623

研究課題名（和文）ヒト多能性幹細胞に由来する心臓オルガノイド作製のための基盤技術開発

研究課題名（英文）Development of basic technology for the production of cardiac organoids derived from human pluripotent stem cells

研究代表者

白吉 安昭（SHIRAYOSHI, Yasuaki）

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：90249946

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞を用いて、各種心筋マーカー遺伝子座に蛍光タンパク質をノックインすることによって、各種サブタイプ心筋（2種類の心臓前駆細胞、洞結節ペースメーカー、心房筋/心室筋細胞）を可視化・選別採取できる細胞株の樹立に成功した。さらに、これらの細胞株を用いて、新規マーカーの導入とAIによる画像解析を用いた洞結節ペースメーカー様細胞の選別採取法の改良、心外膜の分化誘導系の確立、心臓前駆細胞の分取と細胞系譜の解明などの成果をあげることができた。このように、オルガノイド形成に必要な4種のサブタイプ心筋のうち、ペースメーカー細胞、心房筋/心室筋細胞の3種類のサブタイプ心筋の分取が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞を用いることによって、再現性を持って大量に調整するのが難しかったヒト心筋細胞の選別採取が可能となった。これらの選別細胞を用いることによって、心臓前駆細胞の発生運命、その制御機構の解析、成体心筋細胞の電気生理学的特性解析など、ヒト心臓（心筋細胞）を対象とした新たな生理機能、器官形成研究が可能となることが期待される。また、心臓オルガノイドや各サブタイプ心筋の製品化を通じて、例えば、新薬や化粧品などの人体への影響を試す毒性試験、薬効試験などへの応用が考えられ、サブタイプ心筋の選別採取法の開発は、病因・病態に応じた適切な創薬・病態解明・心疾患に対する再生医療につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Using human iPS cells, we succeeded in establishing cell lines that can visualise and selectively collect various subtypes of cardiomyocytes (two types of cardiac progenitor cells, sinus node pacemaker and atrial/ventricular cardiomyocytes) by knocking in fluorescent proteins at various cardiomyocyte marker loci. Furthermore, using these cell lines, we were able to (i) improve the selection and collection of sinus node pacemaker-like cells by introducing novel markers and using AI-based image analysis, (ii) establish a differentiation induction system for the epicardium, and (iii) sort cardiac progenitor cells and clarify their cell lineage. Thus, it was possible to sort three of the four subtypes of myocardium required for organoid formation: pacemaker cells and atrial/ventricular myocytes.

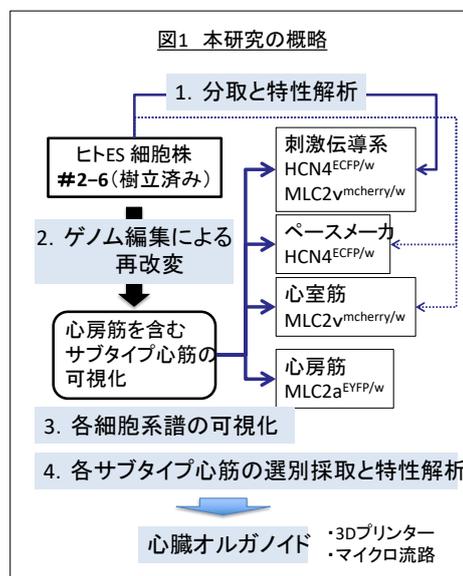
研究分野：発生生物学

キーワード：ヒトiPS細胞 心筋細胞 蛍光タンパク質 ペースメーカー細胞 心外膜 心臓前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

生体心臓の主要な構成要素は、2つのカテゴリーに属する4種のサブタイプ心筋、すなわち血流ポンプとしての作業心筋「心房筋と心室筋」と、その拍動制御に関わる特殊心筋「電気刺激を生成する洞結節ペースメーカー細胞と、それを作業心筋に伝達する刺激伝導系細胞」である (図 1)。これらのサブタイプ心筋は、2種類の心臓領域に存在する前駆細胞から派生する。

ヒトでは、生体からの心筋調整が不可能なことから、その生理機能、発生 (器官形成) 過程などを研究できる唯一の実験系は、ヒト多能性幹細胞を用いた心筋分化誘導系である。実際、分化誘導心筋には、4種のサブタイプ心筋の少なくとも一部が含まれ、ヒト心臓の生理機能や発生過程を探る上で有力な研究資材となり得る (Bao et al, Toxi Lett 2019; Birket et al, Nat. Biotech. 2015)。しかし、そこに含まれているサブタイプ心筋の構成比率は一定せず、生体の心臓が持つ解剖学的組織構造は失われ、各心筋がランダムに混在している。これら4種のサブタイプ心筋は、機能・遺伝子発現は異なっている。しかし、形態的にはよく似ていて、個別に分取するのは難しい。なお、研究開始当初、心臓のサブタイプ心筋を選択的分取する試みは、ようやく実現段階に入りつつあった (Zhang et al, Cell Stem Cell 2019)。



オルガノイドは、解剖学的・機能的に生体内に存在する器官に近い特徴を示すことから、様々なヒト生命現象に迫ることが可能となる (Sasai et al, Nature 2013)。また、新薬や化粧品などの人体への影響を試す毒性試験の有力な資材でもある。オルガノイドの作製方法として、①各素材細胞を配列することによる組立方法 (3D プリンター、脱細胞化、細胞シートなど) と、②前駆 (幹) 細胞が持つ自己組織化と呼ばれる半自律的なプロセスによる器官形成の 2 通りが知られている (Lancaster et al, Science 2014)。研究開始当初、様々な臓器で作製されていたが、心臓については、後者に関する報告は無かった。また、前者に関しても、4種の心筋からなるオルガノイドは作製されていなかった。

2. 研究の目的

心臓は、2つの心臓領域に存在する前駆細胞から派生し、洞結節ペースメーカー細胞などの刺激伝導系細胞、心房・心室筋、そして心外膜などの非心筋細胞から構成されている。生体の心臓に構造も機能も近い「オルガノイド」の作製には、これら4種の心筋が必要で、現状のオルガノイド (Noor et al, Adv.Sci.2019) は、拍動制御機構など機能的に不十分と考えられる。各種サブタイプ心筋を選別採取できれば、細胞のアイデンティティを特定したうえで機能を解析することができ、解剖学知見に基づいて配置することによって秩序だった「心臓オルガノイド」を再構成することができると考えられる。

そこで、本研究では、これらの心臓を構成するサブタイプ心筋や前駆細胞を選択できる実験系を構築し、分取した細胞で特性解析を進めると共に、それらを組み合わせることによって、ヒト心臓オルガノイドの構築を目指した (図 1)。また、本研究のオルガノイド作製は、サブタイプ心筋の選別採取とその組立によるアプローチに属するが、前駆細胞を選別採取することができれば、器官形成過程の再現を目指した培養条件の検討などが可能となり、自己組織化による作製方法の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

心臓前駆細胞と、4種類のサブタイプ心筋細胞（刺激伝導系細胞、ペースメーカ細胞、心室筋、心房筋）を、3種の蛍光タンパク質を用いて、個別に選別採取できるシステムの開発を目指した。具体的には、各サブタイプ心筋に特異的なマーカー遺伝子の発現を、蛍光タンパク質で可視化できるヒト iPS 細胞株を樹立した後、心筋へと分化誘導し、蛍光タンパク質の発現を指標としてセルソーターによって各種陽性細胞を分取し、各種サブタイプ心筋を選別採取した。

選別マーカーとして、まず、HCN4 イオンチャネルを用いた（Morikawa et al 2010）。HCN4 イオンチャネルは、心臓発生初期には、1次心臓領域（First Heart Field）の前駆細胞に、成体の心臓では、洞結節ペースメーカおよび刺激伝導系に特異的に発現する。また、本研究では、より精密な選別採取と詳細な発生運命や細胞特性の解析を目的に、HCN4 とさらに別の心筋マーカー遺伝子の発現を同時にモニター（可視化）できるヒト iPS 細胞株の樹立を目指した。HCN4 と組み合わせたサブタイプ心筋マーカーは、Islet1 転写因子（2次心臓領域マーカー）、Mlc2a ミオシン軽鎖（心房筋マーカー）、Shox2 転写因子（洞結節ペースメーカマーカー）、Mlc2v（心室筋マーカー：Yamauchi et al, BBRC 2017）である。

具体的には、まず、BAC ベクターを用いたセミノックイン法により、緑色蛍光タンパク質 EGFP を HCN4 遺伝子座にノックインしたヒト iPS 細胞株を樹立した。これら樹立した細胞に対して、他の心筋マーカー遺伝子座に、赤色蛍光タンパク質 mCherry を CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集法によりノックインし、二重改変ヒト iPS 細胞株を複数樹立することに成功した。

4. 研究成果

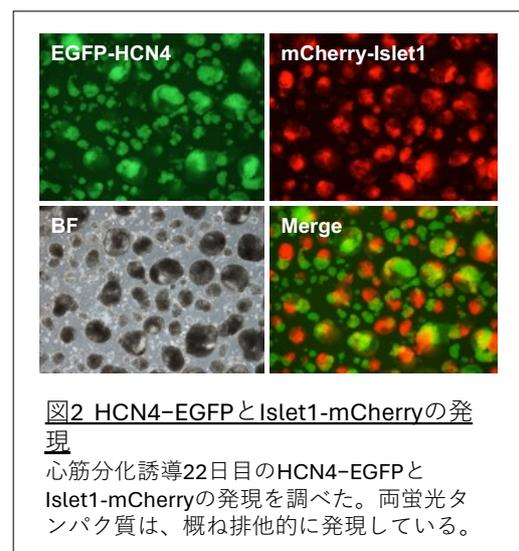
刺激伝導系細胞の選別採取を目指して、minK 遺伝子の可視化を試みたがうまくいかなかった。このため、心臓を構成するすべてのサブタイプ心筋の選別採取には成功しなかった。また、ペースメーカ細胞の選別採取法についても、特異的マーカーである HCN4 単独では、十分には精製できないこと、さらに、2種類の前駆細胞を選択的に分取できることが判明した。そこで、本研究では、サブタイプ心筋の採取法の改善、および前駆細胞の分取とその後の自己組織化過程の解析を中心に進めた。

(1) HCN4-EGFP/Islet1-mCherry 二重改変ヒト iPS 細胞株

FHF（First Heart Field：1次心臓領域）前駆細胞のマーカー遺伝子である HCN4 の発現を緑色蛍光タンパク質（EGFP）で、SHF（Second Heart Field：2次心臓領域）前駆細胞の特異的マーカー遺伝子である Islet1 の発現を赤色蛍光タンパク質（mCherry）で同時に可視化できる新規細胞株を樹立した（重永他、第45回日本分子生物学会）。

分化誘導後22日目に、セルソーターで分画すると、3つの異なる細胞集団（EGFP、mCherry、そして共陽性細胞）が同定された（図2）。それぞれの画分において、どのようなマーカーが発現しているかを RT-PCR で調べた（図3）。①EGFP 陽性画分は HCN4 と TBX5 のような他の FHF マーカーを発現し、②mCherry 画分は SHF マーカー Islet1 と TBX1 を発現し、③共陽性細胞は FHF と SHF の両方のマーカーを発現していた（図3）。

このように、FHF と SHF の前駆細胞が、HCN4 と Islet1 によってそれぞれ排他的に可視化され、EGFP と mCherry を用いて、選択的に分取できることが明らかとなった。なお、共陽



性細胞の素性は現時点では不明である。

(2) HCN4-EGFP/Mlc2a-mCherry 二重改変ヒト iPS 細胞株

Mlc2a もまた心臓発生初期には、FHF 前駆細胞のマーカ―として、その後、心房筋マーカ―として発現する。しかし、FHF マーカ―としては HCN4 と発現する時期および領域が少し異なっている。そこで、HCN4-EGFP ヒト iPS 細胞株の

Mlc2a 遺伝子座に、mCherry をノックインした二重改変ヒト iPS 細胞株を樹立した(谷本他、第 44 回日本分子生物学会)。

分化誘導後 31 日目に、心筋細胞凝集塊を接着させ、さらに 10 日間培養すると、線維芽細胞様細胞と敷石様の上皮様細胞の少なくとも 2 種類の細胞が観察された。上皮様細胞では、EGFP 蛍光は観察されなかった。EGFP 陽性細胞と EGFP/mCherry 共陽性細胞の存在は、誘導後 10 日頃から観察でき、誘導後 14~21 日目から EGFP 陽性細胞の割合は徐々に減少した。一方、共陽性細胞の割合は徐々に増加した。

細胞選別直後、EGFP 陽性細胞と共陽性細胞は心臓マーカ―と FHF マーカ―を共に発現していたが、培養 2 週間後、EGFP 陽性細胞では心筋マーカ―と FHF マーカ―の発現が減少し、代わりに心外膜マーカ―が発現した(図 4、5)。一方、共陽性細胞では心筋マーカ―と FHF マーカ―の発現が持続し、心外膜マーカ―は発現しなかった。このように、初期の HCN4 陽性細胞は、少なくとも 2 つの発生経路を取ることがわかった。1 つは、やがて HCN4 発現を失う細胞集団で、一部から心外膜様細胞が生ずる。残りは、Mlc2a との共陽性細胞となり、拍動する心筋細胞へと分化する。

成体の心臓は、一番外側に心外膜によって囲まれており、外界から心臓を隔てる障壁となるのみならず、冠動脈が走るなど機能的にも重要な役割を果たしている。オルガノイドも心外膜で囲まれている必要があり、その点で、本研究により、心外膜で囲まれた心筋スフェロイドの作製に成功したことは、より成体心臓に近いオルガノイド形成法の開発につながるのではないかと期待している。

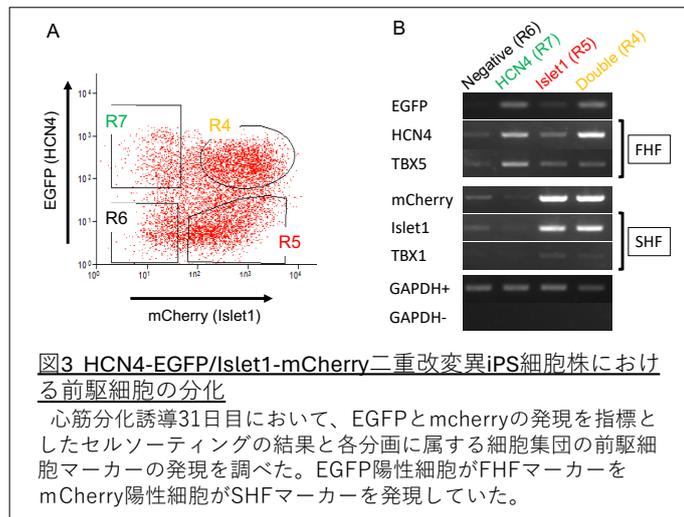


図3 HCN4-EGFP/Islet1-mCherry二重改変異iPS細胞株における前駆細胞の分化

心筋分化誘導31日目において、EGFPとmcherryの発現を指標としたセルソーティングの結果と各分画に属する細胞集団の前駆細胞マーカ―の発現を調べた。EGFP陽性細胞がFHFマーカ―をmCherry陽性細胞がSHFマーカ―を発現していた。

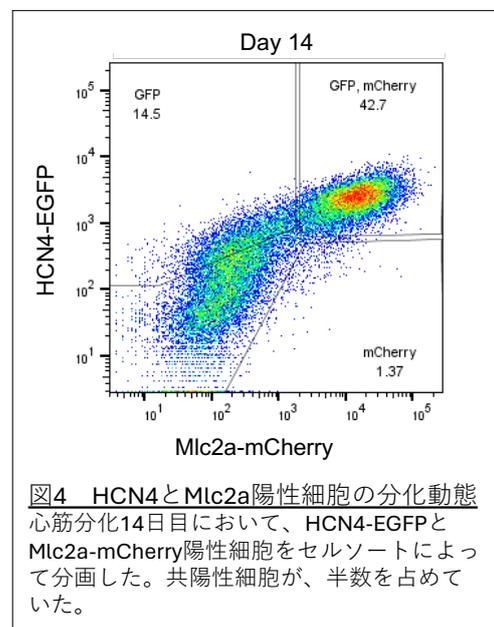


図4 HCN4とMlc2a陽性細胞の分化動態
心筋分化14日目において、HCN4-EGFPとMlc2a-mCherry陽性細胞をセルソートによって分画した。共陽性細胞が、半数を占めていた。

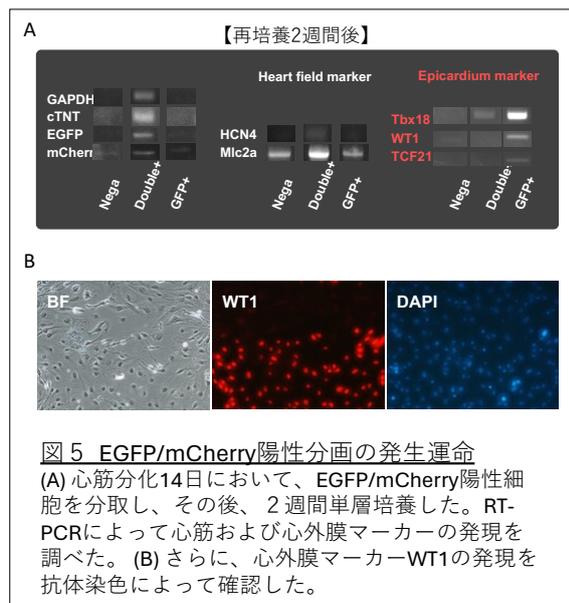


図5 EGFP/mCherry陽性分画の発生運命

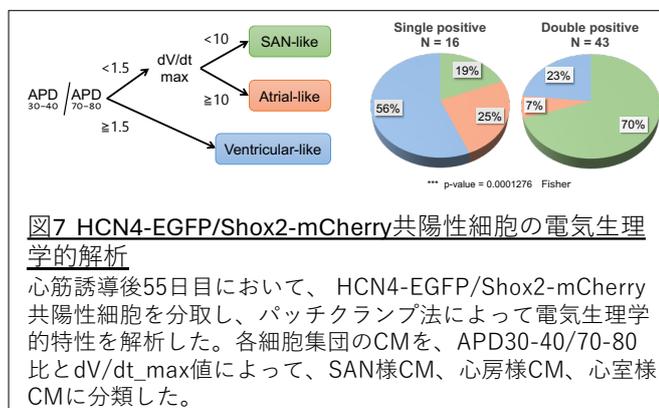
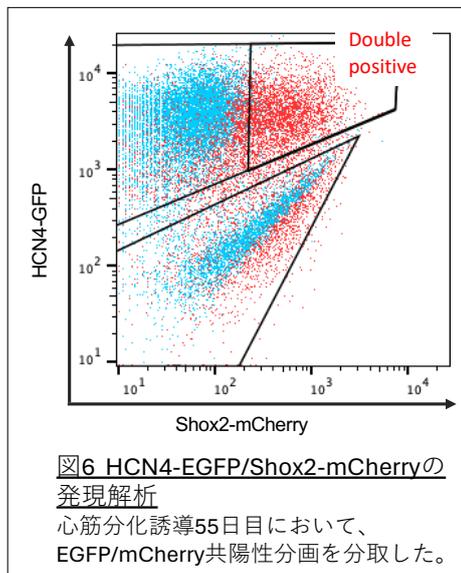
(A) 心筋分化14日目において、EGFP/mCherry陽性細胞を分取し、その後、2週間単層培養した。RT-PCRによって心筋および心外膜マーカ―の発現を調べた。(B) さらに、心外膜マーカ―WT1の発現を抗体染色によって確認した。

(3) HCN4-EGFP/Shox2-mCherry 二重改変ヒト iPS 細胞株

HCN4 の発現を緑色蛍光タンパク (EGFP) によって可視化できるヒト iPS 細胞株を心筋分化誘導し、HCN4 単独陽性細胞を分取すると、洞結節ペースメーカー様細胞、心房・心室筋様の電気生理学的特徴を示す細胞が混在していて、HCN4+単一陽性細胞の 19%だけが、洞結節ペースメーカー様電気生理学的特性を示した。このように HCN4 を単独でマーカーとして用いた場合には、ペースメーカー様細胞を十分には分取できないことがわかった。そこで、HCN4 に加えて、ペースメーカー細胞特異的転写因子 Shox2 を mCherry で同時に可視化できる二重改変ヒト iPS 細胞株を樹立した (Wakimizu et al, 2022)。

心筋分化誘導 40 日目前後に、Shox2-mCherry の発現が認められ、60 日目前後にその発現がピークを迎えることがわかった。やがて 70 日目前では、Shox2-mCherry の発現は減少し、わずかに HCN4-EGFP との共陽性細胞で見いだせるだけになった。

心臓分化誘導から 55 日目に、HCN4-GFP 単独陽性細胞と HCN4-GFP / Shox2-mCherry 共陽性細胞をセルソーターで分画した (図 6)。FACS で選別された Shox2-mCherry/HCN4-EGFP 二重陽性細胞をパッチクランプ法で解析したところ、洞房結節様細胞、心房筋様/心室筋様細胞の自発活動電位を示す細胞が含まれていることがわかった。さらに、APD30-40/70-80 比と dV/dt_max 値によって分類すると、約 70%の HCN4+/Shox2+細胞が、洞結節ペースメーカー様電気生理学的特性を示した (図 7)。続いて、mRNA を抽出し、RT-PCR により遺伝子発現解析を行った。Shox2、Isl1、Tbx3、Tbx18 などのペースメーカーマーカーは、HCN4-GFP 単独陽性細胞よりも HCN4-GFP / Shox2-mCherry 共陽性細胞で強く発現していて、ペースメーカー細胞が HCN4-GFP / Shox2-mCherry 共陽性細胞集団内に濃縮されていることが示唆された。



(4) その他

- ①MLc2a/Mlc2v の共陽性細胞として、心房筋様細胞が優位に濃縮されるが、この心房筋様細胞を用いて、心房細動に関連する PPRX1 転写因子が、Kv1.5 などのイオンチャネルの発現制御に関わっていることを明らかにした (幸他、第 44 回日本分子生物学会)。
- ②AI による画像解析法によって、ペースメーカー様細胞が他のサブタイプ心筋細胞から形態学的に区別できることを明らかにすることができた (Wakimizu et al, 2023)。

展望

各種サブタイプ心筋のより正確な分取法の開発に成功した。今後、刺激伝導系細胞の分取法を確立すると共に、分取した細胞を用いて心臓オルガノイドの形成を試みる予定である。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wakimizu T, Naito J, Ishida M, Kurata Y, Tsuneto M, Shirayoshi Y, Hisatome I.	4. 巻 39
2. 論文標題 Deep learning-based identification of sinoatrial node-like pacemaker cells from SHOX2/HCN4 double-positive cells differentiated from human iPS cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J.Arhythm.	6. 最初と最後の頁 664-668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/joa3.12883	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 Wakimizu T, Morikawa K, Fukumura K, Yuki T, Adachi T, Kurata Y, Miake J, Hisatome I, Tsuneto M, Shirayoshi Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 SHOX2 refines the identification of human sinoatrial nodal cell population in the in vitro cardiac differentiation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 239-249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.07.012.	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kumi Morikawa, Takashi Adachi, Akari Imagawa, Masato Shigenaga, Takayuki Wakimizu, Ichiro Hisatome, Motokazu Tsuneto, Yasuaki Shirayoshi
2. 発表標題 Developmental fate and cellular characteristics exhibited by HCN4-positive cardiomyocytes derived from human iPS cells.
3. 学会等名 CARDIOVASCULAR BIOENGINEERING (CVBE) SYMPOSIUM 2023, Kyoto, Japan (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 重永雅人, 今川明梨, 谷本久実, 経遠智一, 白吉安昭
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた心臓前駆細胞の選択的分取法の開発と特性解析
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 脇水孝之、経遠智一、白吉安昭、久留一郎
2. 発表標題 HCN4/Shox2遺伝子標識によるヒトiPS細胞からの心臓洞結節ペースメーカー細胞の分取システムの構築
3. 学会等名 心電学関連春期大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重永雅人、今川明梨、経遠智一、久留一郎、白吉安昭
2. 発表標題 予定心臓領域特異的マーカー遺伝子の発現を可視化したIPS細胞株の樹立
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本久実、足立隆、経遠智一、久留一郎、白吉安昭
2. 発表標題 ヒトiPS細胞に由来するHCN4陽性心筋細胞のはっせい・分化能とその特性解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸哲夫、経遠智一、三明淳一郎、久留一郎、白吉安昭
2. 発表標題 心房細動関連遺伝子PRRX1のヒト心房筋様細胞における機能解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 脇水孝之、足立隆、林裕也、経遠智一、久留一郎、白吉安昭
2. 発表標題 ヒトiPS 細胞から心臓ペースメーカー細胞への全分化過程の検討
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 脇水孝之、足立隆、林裕也、経遠智一、白吉安昭、久留一郎
2. 発表標題 心臓洞結節ペースメーカー細胞の分取、解析のためのヒトiPS 細胞株の作製
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 脇水孝之、経遠智一、白吉安昭、久留一郎
2. 発表標題 HCN4/Shox2遺伝子標識によるヒトiPS細胞からの心臓洞結節ペースメーカー細胞の分取システムの構築
3. 学会等名 心電学関連春季大会2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

遺伝子再生医療学講座 再生医療学部部門
<https://www.med.tottori-u.ac.jp/regmed/518/1195.html>

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	経遠 智一 (TUNETO Tomokazu) (60730207)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	
研究分担者	森川 久未 (MORIKAWA Kumi) (90707217)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

	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	久留 一郎 (HISATOME Ichiro)		

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