

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04048

研究課題名(和文) 不整脈を操り再現する新しい次世代3D組織モデルによる致死性不整脈の病態解析

研究課題名(英文) Exploration of novel in vitro lethal arrhythmia models with 3D tissues from human iPS 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) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：不整脈は、突然死の原因にもなり年間数万人がなくなっていると考えられます。そうした致死性の不整脈は、遺伝性の異常、心筋梗塞や心筋症などの心臓病、薬の副作用等がおもな原因ですが、実際に不整脈が起こる過程を細胞や組織を使って再現することはできませんでした。研究代表者らは最近、ヒトiPS細胞から心臓を作っている細胞群を誘導し、最小限の3D構造を作ることにより、TdPと呼ばれる致死性不整脈を再現することに成功しました。本課題では、さらに様々な致死性不整脈の再現を試み、心室細動に類似の状態を再現することに成功しました。病態の解明や治療法の開発、薬剤安全性試験などへの応用が期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの不整脈を培養下に再現し、病態を解析したり治療法を探索したりする方法はこれまでありませんでした。また薬剤安全性試験においても細胞を使って危険性を推測するにとどまっていた。本研究は、心筋細胞だけでなく、複数種類の心臓の細胞を誘導し、さらにそれを3次元組織に作り上げることにより、実際の不整脈において起こっている病態生理に近い状態を作り出したものであり、世界初のTdPモデルさらには世界初の心室細動モデルとなる研究で、その学術的意義は大変に大きい。また突然死に至る致死性不整脈に対して種々の解析が可能となり将来の治療応用等社会的意義も非常に大きいと考えられます。

研究成果の概要(英文)：Lethal arrhythmias often lead to sudden death. To date, it has been impossible to reproduce the occurrence of these arrhythmias in vitro. Recently, we have succeeded in reproducing a lethal arrhythmia called Torsade de Pointes (TdP) using human iPS cell-derived cardiac tissue sheets (Nat Commun, 2017). That is considered to be the first in vitro model of TdP. In this study, we further tried to reproduce other lethal arrhythmias, including ventricular fibrillation (VF). We examined various additional conditions to our TdP model, and now we are finding a condition to induce VF-like phenomena in vitro. These findings would be extensively applied to pathogenesis analysis of VF, drug discovery, drug safety tests, and so on.

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：ヒトiPS細胞 病態モデル病 病態解析 不整脈 3次元組織

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

【背景1】 ヒトの不整脈を細胞・組織レベルで再現して病態を解析することは不可能だった。

- ・ヒトの生体モデルは倫理的にも不可能。生体モデルは動物モデルに限られるが、薬剤反応性や心臓のサイズ・構造の違い等により動物モデルはヒトの病態を必ずしも反映しなかった。
- ・ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞：QT延長現象など一部の電気生理学的特性は再現できたが、不整脈に相当する現象は再現できなかった（ごく一過性の異常波形のみ）。
- ・ヒト心臓に関するコンピューターシミュレーションも行われているが、あくまでシミュレーションであり、実際の生理病態生理をどれだけ反映しているかは不明であった。

【背景2】 研究代表者らは、ヒトiPS細胞から心筋細胞及び非心筋細胞（間質細胞）を誘導し、細胞シート技術を用いて細胞5-6層からなる3D心臓組織を構築した。同3D心臓組織を用いることにより、致死性不整脈の一つであるTorsade de Pointes (TdP)様不整脈の再現に世界で初めて成功した(Kawatou, Nat Commun, 2017)。

### 2. 研究の目的

TdP再現で得られた種々のノウハウをもとに様々な新しい不整脈の病態モデルを作製し、致死性不整脈の発生機構を新たな視点・方法で解析・理解することにより、新規治療法の開拓に結びつけることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 心室細動(VF)など新たな致死性不整脈再現in vitroモデルの開発

<臨床像とin vitroモデルの相違点>

臨床においては、TdPはしばしばVFを誘発し心停止から死に至る。しかしこれまで、研究代表者らのTdP発生モデルにおいては、VFへの移行は認められず、消失するか、しばしば心室頻拍(VT)様の定常的な頻拍に移行して安定する。すなわちin vitroモデルでは、TdPは安定的な回旋中心を探して移動(ミアンダリング)し、安定的中心となり得るアトラクターに到達してVT様の定常的な頻拍に移行するか、3D心臓組織の外縁に至って消失する、の2つの運命をたどると考えられる。

したがって、臨床において認められる生理的病態生理的環境を可能な限りin vitroで再現することにより、現在のin vitroモデルにおいて欠けている要素を補い、in vitroにおいてVFを発生させることを試みる。以下の様な条件の付加を検討する。

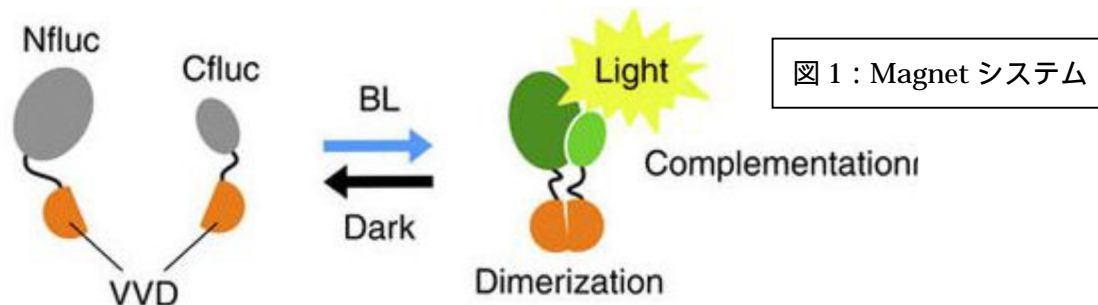
- ・低酸素・電解質異常・心筋細胞成熟度・組織厚、組織不均一性増大・心筋興奮性増大 等

#### 2) 心筋梗塞モデルなど新しい病態モデルの開発(オプトジェネティクスの応用)

心筋梗塞後や心筋症に伴う線維化亢進状態において、TdPなどの致死性不整脈の頻度が上昇することはよく知られている。3D心臓組織において、心筋梗塞様の傷害や線維化亢進状態を再現し、心筋梗塞や心筋症の新しい病態モデルを作製する。

<モデル作製戦略 オプトジェネティクスの応用によるパターンニング >

オプトジェネティクスは当初、光受容体であるロドプシンの構造を利用し、光に反応して分子の反応を引き起こすシステムとして開発された。薬剤投与などが不要で試料に直接コンタクトすることなく光により反応の惹起が可能であること、また、光の波長や光があたる領域の調整により反応の制御が簡便に可能であることなどより、in vitro 3D組織において、種々の細胞反応を恣意的に制御する上で最適のシステムである。分担研究者・佐藤は、オプトジェネティクスの新たな技術開発を精力的に進め、光に反応して2分子が会合するシステム (Magnet system (図1): Moritoshi Sato, *Nat Commun*, 2015) の開発からMagnet systemを



応用した様々な遺伝子発現制御システムを次々に開発・報告し(*Nat Biotechnol*, 2015; *Nat Cell Biol*, 2016; *Nat Methods*, 2017)、現在では種々の遺伝子発現の制御を光によって行うことが可能となっている。本研究ではこれら最先端オプトジェネティクスの手法を用いてモデル構築を試みる。

### 3) 上記モデルを用いた新しい病態解析と治療法開発

#### <新しい病態解析方法の開発>

上記1) 2) において構築した新規病態再現モデルを用いて、VF発生機構を解析する。

薬剤誘発性：Ikr電流阻害剤E4031投与によるTdP誘発はすでに成功している。同薬剤投与によるVFの発生を検討する。

ペーシング下における誘発：一定の拍動数条件であるペーシング下にE4031を投与してTdPを誘導することにも成功している。より安定で再現性の高いモデルとなる。

細胞外電位と細胞動態：多電極アレイによる細胞外電位測定とモーションベクターによる細胞動態の可視化により、VF発生過程を直視下に明らかにする。

#### <新規診断・治療法の開発>

- ・ 致死性不整脈発生に至る組織特性・構造パターンの解析：上記1) - 3) の解析よりTdPやVfなど致死性不整脈を発生しやすい組織の特性や構造パターンを抽出する。
- ・ 新規治療標的分子の探索：1) - 3) の解析を継続し、新規治療標的を開拓する。

## 4. 研究成果

### 1) 心室細動 (VF) など新たな致死性不整脈再現in vitroモデルの開発

ミニ 3D 心臓組織モデルにおいて、研究計画に述べた様な種々の条件を付加して VF の誘導を試みた。当初これらの条件の付加において VF の誘導は困難であった。

心筋成熟度に関して、新たに高純度高効率の心室筋分化誘導法を開発し報告した (*Fukushima, PLoS One*, 2021)。同分化法で誘導した心筋細胞は、長期間にわたり高純度での維持培養が可能である。それにより、電気生理学的・形態的構造的成熟化が誘導される (図 2)。長期培養心筋細

胞の電子顕微鏡による微細構造解析において、もっとも成熟化した心筋細胞の所見の一つである T 管様構造の形成を認めた (図 3)。また電気生理学的にも成体の心室筋に近づいた速い脱分極と長い活動電位持続時間を有する細胞が誘導された (図 4)。これら長期培養心筋細胞を用いた VF 誘導実験では、そのみで VF を誘導することには至らなかったが、本誘導法は、より成熟度の高い心室筋細胞を誘導・調製し、種々の in vitro モデルの開発・検証を行うための重要な基盤技術と考えられる。

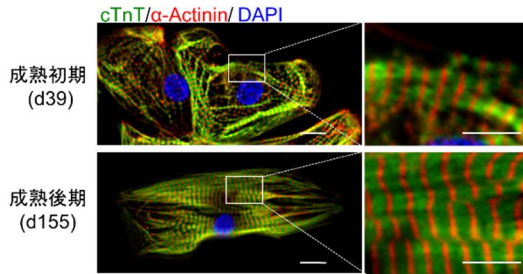


図 2 : 心筋の形態・サルコメア構造の成熟化  
長期培養によって、心筋細胞の長軸方向への伸展と方向性を持ったサルコメア構造 (赤縞) が形成される。

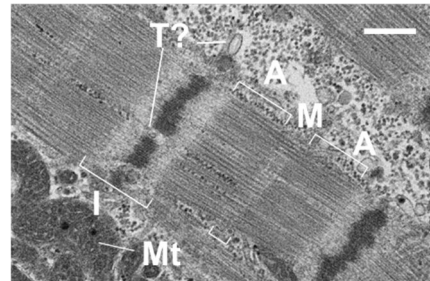


図 3 : 電顕的微細構造の成熟化  
I, A, M 帯などの構造に加え、T 管様構造を認める。(213 日め)

最終的に、種々の条件を検討した結果、VF 様の多形性細胞外電位波形と、モーションベクターによる細胞動態観察における興奮回旋中心の「分裂」、という VF の特徴を再現する不整脈の誘導に成功している。

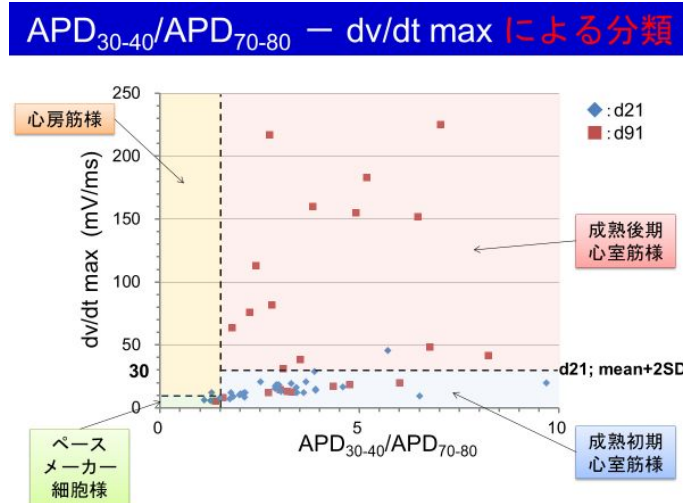


図 4 : 電気生理的成熟化  
21 日め心筋細胞 (青菱) に比し、91 日め (赤四角) では、脱分極時間 (APD30-40/APD70-80) が長く、脱分極速度 (dv/dt max) が速い、成熟心筋細胞に近づくものが増えている。

## 2) 心筋梗塞モデルなど新しい病態モデルの開発 (オプトジェネティクスの応用)

オプトジェネティクスを応用した in vitro モデル開発のため、分担者・佐藤らの Magnet システムに種々の標的分子を組み込んだ新しいプラスミドの構築、及び同遺伝子を導入した多能性幹細胞の樹立を行った。複数遺伝子を同時に安定して発現可能な系の構築に難渋したが、最終的に光照射による標的分子発現誘導が可能な多能性幹細胞株の構築に成功した。同細胞の病態モデルへの応用を進めている。

## 3) 上記モデルを用いた新しい病態解析と治療法開発

1) において見出した VF 誘導条件において、 の検討を行い、VF 様の細胞外電位波形と分裂

する興奮回旋中心の同時記録に成功した(図5)。興奮回旋中心の分裂は、VFを定義する上での最重要項目と考えられ、同現象を確認したin vitro VFモデルはいまだ報告はなく、世界初のin vitro VFモデルである可能性がある。

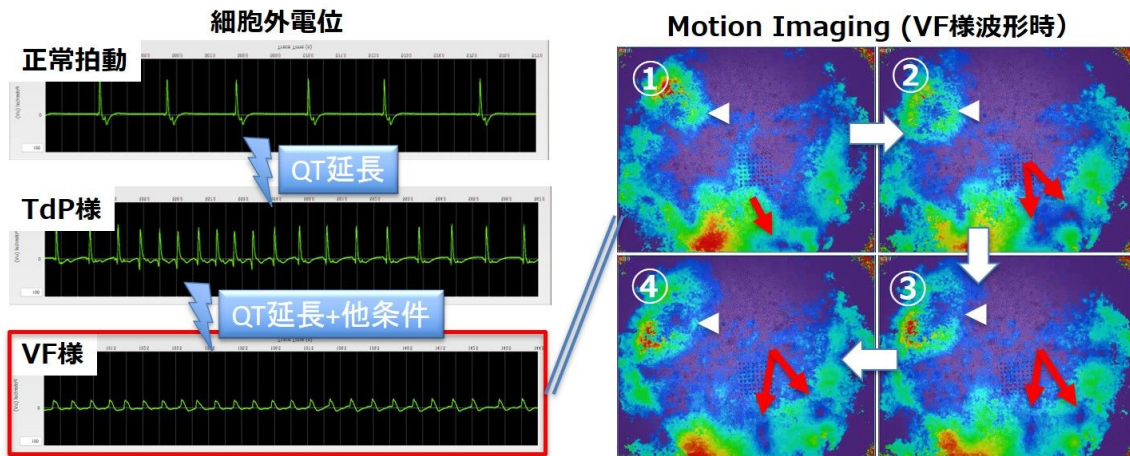


図5：In vitroにおけるVFの発生

(左)細胞外電位。VFに類似した細胞外電位波形を認める。(右)モーションベクターによる3D心臓組織における細胞動態。複数の興奮回旋中心(矢頭・赤矢印)が存在し、赤矢印の回旋中心は2つに分裂する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukushima H, Yoshioka M, Kawatou M, Lopez-Davila V, Takeda M, Kanda Y, Sekino Y, Yoshida Y, Yamashita JK	4. 巻 15
2. 論文標題 Specific induction and long-term maintenance of high purity ventricular cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0241287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0241287	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 Karagiannis Peter, Takahashi Kazutoshi, Saito Megumu, Yoshida Yoshinori, Okita Keisuke, Watanabe Akira, Inoue Haruhisa, Yamashita Jun K., Todani Masaya, Nakagawa Masato, Osawa Mitsujiro, Yashiro Yoshimi, Yamanaka Shinya, Osafune Kenji	4. 巻 99
2. 論文標題 Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reviews	6. 最初と最後の頁 79 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/physrev.00039.2017	査読の有無 無
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15件（うち招待講演 12件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山下 潤
2. 発表標題 Stem cells meet tissue engineering -幹細胞生物学と組織工学による3D組織構築-
3. 学会等名 第19回再生医療学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 潤
2. 発表標題 細胞から組織へ -多能性幹細胞由来心臓組織の作製とその治療応用-
3. 学会等名 第19回再生医療学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 潤
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心臓組織を用いた心臓再生及び病態モデル
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下潤
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来ミニ3D心臓組織を用いた心疾患モデル
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下潤
2. 発表標題 再生医療及び疾患モデルにおける血管の役割
3. 学会等名 血管生物医学会新規研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下潤
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心血管細胞多層体 による心臓再生治療の試み
3. 学会等名 日本心不全学会・シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下潤
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた分化再生研究 - Stem cells meet chemical biology -
3. 学会等名 早稲田大学先進理工学部講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下潤
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた心血管分化再生研究
3. 学会等名 Kyushu Vascular Biology & Medicine（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下潤
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心臓組織を用いた 心臓再生及び病態モデル
3. 学会等名 第19回山梨再生・移植研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下潤
2. 発表標題 iPS細胞を用いた心臓再生戦略における血管の役割
3. 学会等名 CVMW心血管代謝週間 日本血管生物医学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 山下潤
2. 発表標題 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-
3. 学会等名 第79回循環器診療セミナー in 西宮 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下潤
2. 発表標題 CTS (cardiac tissue sheet)-Stacks for Cell therapy & Drug discovery
3. 学会等名 Global BI Stem Cell Meeting 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川東正英, 山下潤
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第22回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (CVEM2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川東正英, 山下潤
2. 発表標題 Torsade de Pointes arrhythmia model in vitro with 3D human iPS cell-engineered heart tissue
3. 学会等名 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 iPS細胞研究所 増殖分化機構研究部門 山下研究室 研究概要  
[https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/yamashita\\_summary.html](https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/yamashita_summary.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	佐藤 守俊  (Sato Moritoshi)  (00323501)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授    (12601)	

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