

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05067

研究課題名（和文）代謝制御によるヒトiPS細胞由来心筋細胞におけるタイプ別選別法の確立と応用

研究課題名（英文）Production of Subtype Specific Cardiomyocytes from Human iPSCs Based on Metabolism

研究代表者

遠山 周吾 (TOHYAMA, Shugo)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任講師

研究者番号：90528192

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、代謝制御によるタイプ別心筋作製法を確立し、細胞移植治療や創薬へ応用することである。本研究では、（1）培養液の組成を工夫することにより、ヒトiPS細胞における増殖を促進する条件を見出すことに成功した。また、（2）ヒトiPS細胞由来のタイプ別心筋細胞の高効率分化誘導法を確立した。さらに、（3）タイプ別心筋細胞においてマルチオミクス解析を行うことにより代謝プロファイルを評価した。本研究成果により、今後の再生医療および創薬を大きく推進することが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、代謝プロファイルを基盤にヒトiPS細胞の増殖能をコントロールするだけでなく、高純度心室筋細胞と非心室筋細胞を作り分ける技術を開発することで、表現型のばらつきを解消する点である。表現型のばらつきを解消することで、安全かつ有効な再生医療の実現化および創薬への応用が期待できるため、社会的意義も極めて高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop an efficient method to produce subtype specific cardiomyocytes from human iPSCs via metabolic regulation for regenerative medicine and drug discovery. In this project, we identified optimal culture conditions for human iPSCs expansion (1). In addition, we also developed an efficient method to produce subtype specific cardiomyocytes from human iPSCs (2). Moreover, we evaluated metabolic profiles in subtype specific cardiomyocytes via multi-omics (3). These findings will eventually promote the clinical applications of regenerative medicine and drug discovery.

研究分野：再生医学

キーワード：ヒトiPS細胞 代謝 心筋細胞 移植 創薬

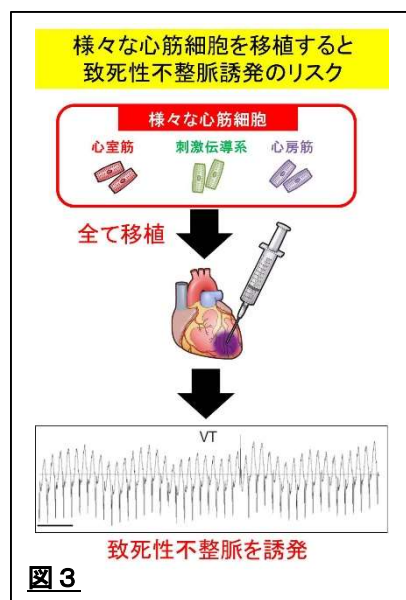
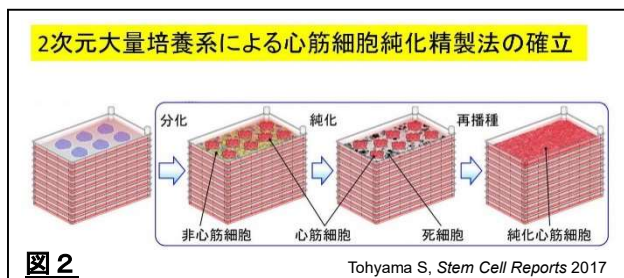
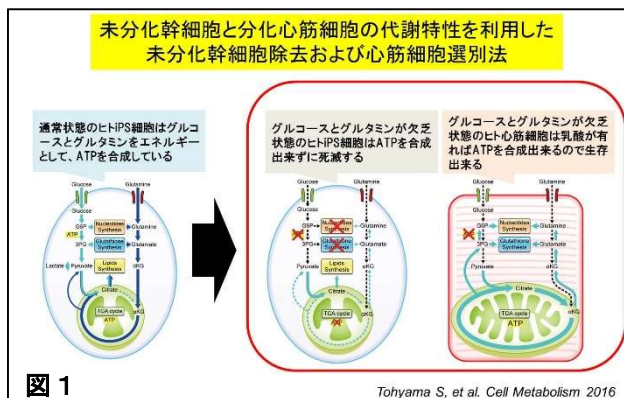
1. 研究開始当初の背景

ヒトiPS由来心筋細胞を用いた細胞移植治療および創薬スクリーニングの臨床応用を実現化する上で障害となる最初の大きな課題は、①心筋細胞以外の細胞が多く含まれてしまうこと、および、②大量の純化心筋細胞の作製法がないことであった。申請者はこれらの課題を同時に克服するために、代謝制御により腫瘍形成の原因となる未分化幹細胞を除去し、心筋細胞のみを大量に選別できないか試みた。未分化幹細胞と分化心筋細胞における代謝プロファイルを詳細に解析した結果、未分化幹細胞はグルコースおよびグルタミンに依存したエネルギー代謝機構を有している一方で、分化心筋細胞はグルコースおよびグルタミンの代わりに乳酸をエネルギー源にできることを明らかにした。それらの性質を利用することにより、腫瘍形成の原因となる残存未分化幹細胞を完全に除去し、心筋細胞のみを純化精製する世界初の技術を開発することで克服することに成功した (Tohyama S, Cell Stem Cell 2013, Cell Metab 2016 ; 図1)。また②の課題に対しては、2次元大量培養系による純化精製心筋細胞作製法を確立することにより解決が可能となった (Tohyama S, Stem Cell Reports 2017 ; 図2)。

しかしさらなる解析の結果、分化心筋細胞は様々なタイプの心筋細胞を含むヘテロな集団であることがわかった。様々なタイプの心筋細胞は、致死性不整脈の誘発や移植後あるいは創薬における表現型のばらつきを引き起こすことが予想される (図3)。申請者はこれらの課題に対する解決策として、高純度タイプ別心筋細胞の作製を目指した。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞は再生医療あるいは創薬においては魅力的な細胞ソースであるが、分化誘導した心筋細胞は均質な集団ではなく、心房筋、心室筋、刺激伝導系等さまざまなタイプの心筋細胞が含まれたヘテロな集団であることが知られている。心筋細胞におけるばらつきは、細胞移植時の致死性不整脈の誘発や有効性（改善効果）のばらつき、あるいは創薬スクリーニングにおける再現性の低下に影響するため、分化心筋細胞におけるタイプ別作製法の開発が求められている。心筋細胞におけるタイプ別選別法のアプローチとして低コストかつ臨床応用に直結する“代謝制御”による手法を確立し、細胞移植治療や創薬へ応用することを目的として研究を行った。



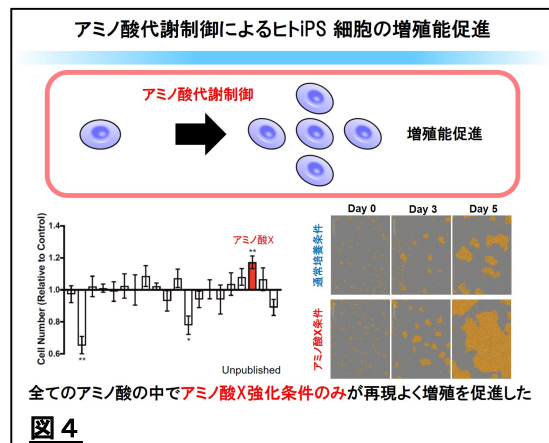
3. 研究の方法

本研究における基盤技術は、我々が構築してきたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の純化精製技術および大量作製技術である (Tohyama S, Cell Stem Cell 2013, Cell Metabolism 2016, Stem Cell Reports 2017)。本研究では、培養液の組成を工夫することにより、これらの基盤技術における最適化を図ると同時に、ヒト iPS 細胞由来のタイプ別心筋細胞の高効率分化誘導法の確立を試みた。また、タイプ別心筋細胞を効率よく三次元化する手法の確立、およびタイプ別心筋細胞における収縮機能解析を行った。さらに、心室筋細胞と非心室筋細胞においてマルチオミクス解析により代謝プロファイルを評価した。

4. 研究成果

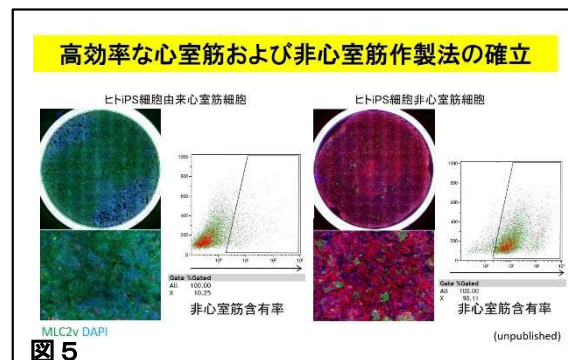
(1) ヒト iPS 細胞を効率的に増殖させる手法の確立

移植や創薬研究に用いる心筋細胞を大量に作製するにはその素となるヒト iPS 細胞を効率よく増やす必要がある。しかしながら、現在の未分化維持培養液は最適な条件になっていない。そこで、ヒト iPS 細胞における代謝機構を元に様々なアミノ酸の添加実験を行った。その結果、特定のアミノ酸 X のみが濃度依存的にヒト iPS 細胞における増殖を再現よく増殖させることがわかった (図 4)。継続培養した際の累積細胞数は約 2 か月間でアミノ酸 X 強化により約 20 倍得られることを確認した (論文投稿中, 2019-)。



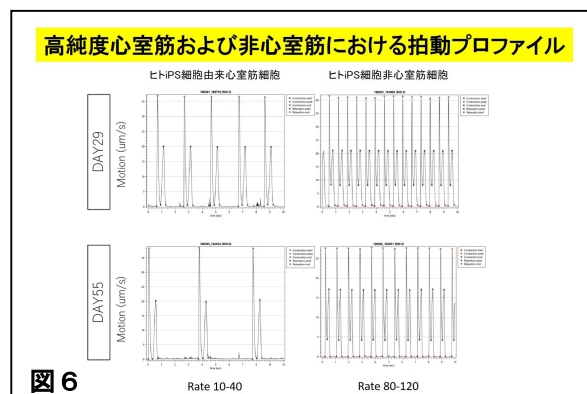
(2) タイプ別心筋細胞の高効率な分化誘導法の確立

(1) において作製した培養液を用いてヒト iPS 細胞を効率よく増殖させた後、分化誘導プロトコルを試行錯誤することにより、心室筋細胞および他の心筋細胞の高効率な分化誘導法を開発した (図 5、論文準備中)。



(3) タイプ別心筋細胞における生理学的解析

(2) において作製した心室筋細胞および他の心筋細胞における生理学的なプロファイルを motion vector imaging 解析により評価した。高純度心室筋細胞は心拍数が 10-40 回/分であったのに対し、非心室筋細胞は 80-120 回/分と有意に拍動レートが高いことがわかった (図 6)。



(4) タイプ別心筋細胞におけるスフェロイド作製

(3) において作製した心室筋細胞および他の心筋細胞を用いて効率よくスフェロイドを作製する手法を確立した (図 7、J Heart Lung Transplant 2019)。さらにスフェロイドを作製する際の

培養液についても最適化を行い、効率を高めることに成功した (unpublished)。

(5) タイプ別心筋細胞におけるオミクス解析

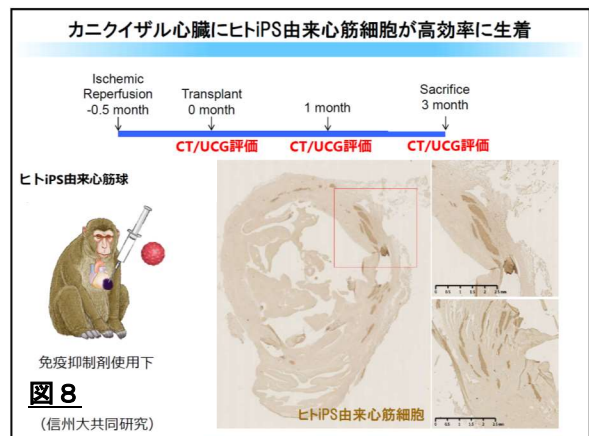
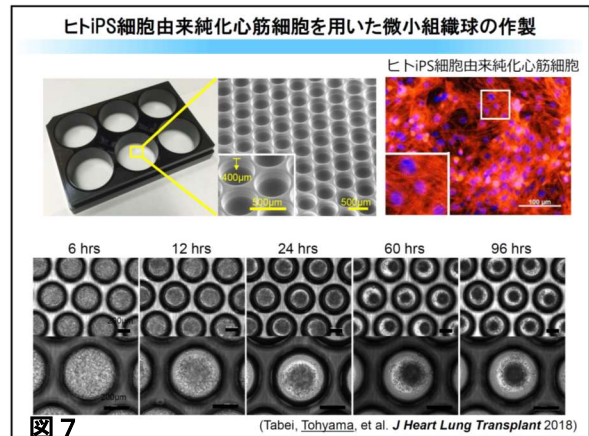
(3) において作製した心室筋細胞および他の心筋細胞を用いてメタボローム解析、プロテオーム解析、トランスクリプトーム解析を用いた統合解析を行い、代謝プロファイルを明らかにした (論文準備中)。

(6) 高純度心室筋細胞の移植

国内外における研究により、ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞を移植した際には心室頻拍が移植後 1 か月間、頻発することが報告されている。そこで、(3) において作製した心室筋細胞における不整脈作用を正確に評価するために、カニクイザル心筋梗塞モデルを作製し、細胞移植を行った (信州大柴研究室との共同研究)。ヒト iPS 細胞由来高純度微小心筋組織球をカニクイザル心筋梗塞モデルに移植し、免疫抑制剤 3 剤投与を継続したところ、1 か月間免疫拒絶なく生着することがわかった (図 8)。

一方で、持続性心室頻拍等の心室性不整脈に関しては 1 個体において数分程度発生したのみで、ほとんど発生しないことを確認した (論文準備中)。この結果は、これまでの論文報告の結果 (心室頻拍が頻発する) とは異なる結果であり、心室頻拍を抑制するためには心室筋細胞のみを移植することが重要であることが示唆された。

今後はこれらの解析結果を元に、さらに高精度な心室筋細胞および非心室筋細胞の作製法の確立を行っていく。これらの技術確立により、細胞移植においては致死性不整脈の危険の少ない安全かつ有効な治療に、創薬スクリーニングにおいては評価データの安定化に繋がると考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Kishino Y, Fujita J, Tohyama S, Okada M, Tanosaki S, Someya S, Fukuda K. | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Toward the realization of cardiac regenerative medicine using pluripotent stem cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration | 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） 10.1186/s41232-019-0110-4. | 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 Fujita J, Tohyama S, Kishino Y, Okada M, Morita Y. | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Genetic and Epigenetic Regulation of Cardiac Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells | 6. 最初と最後の頁 992-1002 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3027. | 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 Tabei R, Kawaguchi S, Kanazawa H, Tohyama S, Hirano A, Handa N, Hishikawa S, Teratani T, Kunita S, Fukuda J, Mugishima Y, Suzuki T, Nakajima K, Seki T, Kishino Y, Okada M, Yamazaki M, Okamoto K, Shimizu H, Kobayashi E, Tabata Y, Fujita J, Fukuda K | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 Development of a transplant injection device for optimal distribution and retention of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of heart and lung transplantation | 6. 最初と最後の頁 203-214 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.healun.2018.11.002. | 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 Okada M, Tada Y, Seki T, Tohyama S, Fujita J, Suzuki T, Shimomura M, Ofuji K, Kishino Y, Nakajima K, Tanosaki S, Someya S, Kanazawa H, Senju S, Nakatsura T, Fukuda K. | 4. 巻 511 |
| 2. 論文標題 Selective elimination of undifferentiated human pluripotent stem cells using pluripotent state-specific immunogenic antigen Glypican-3. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 711-717. |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.094. | 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 Tohyama S, Fujita J, Fujita C, Yamaguchi M, Kanaami S, Ohno R, Sakamoto K, Kodama M, Kurokawa J, Kanazawa H, Seki T, Kishino Y, Okada M, Nakajima K, Tanosaki S, Someya S, Hirano A, Kawaguchi S, Kobayashi E, Fukuda K | 4. 巻 9(5) |
| 2. 論文標題 Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Stem cell reports | 6. 最初と最後の頁 1406-1414 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.025. | 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 Tohyama S, Fukuda K | 4. 巻 120(10) |
| 2. 論文標題 Safe and Effective Cardiac Regenerative Therapy With Human-Induced Pluripotent Stem Cells: How Should We Prepare Pure Cardiac Myocytes? | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Circulation research | 6. 最初と最後の頁 1558-1560 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310328. | 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 該当する |

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 5件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来の超高純度心筋組織球を用いた再生医療の現状と今後の展望 |
| 3. 学会等名 第67回日本心臓病学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 細胞内代謝機構に基づくヒトiPS細胞由来心筋作製と心臓再生医療への応用 |
| 3. 学会等名 第53回河口湖心臓討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来超高純度心室筋細胞の大量作製と心臓再生医療への応用 |
| 3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 細胞内代謝機構に基づくヒトiPS由来心筋細胞の大量作製とその応用 |
| 3. 学会等名 第30回日本医学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた心臓再生医療実現化に向けた取り組み |
| 3. 学会等名 第18回日本再生医療学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた創薬および再生医療の具現化における課題と対策 |
| 3. 学会等名 第6回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング2019合同公開シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞が拓く心臓再生医療の未来 |
| 3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 代謝制御によるヒトiPS細胞由来心筋細胞の大量作製とその応用 |
| 3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 Safe and Effective Cardiac Regenerative Medicine with Human iPSCs |
| 3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shugo Tohyama |
| 2. 発表標題 Development of a Massive Cardiac Spheroids Production and Transplantation System in Human Pluripotent Stem Cells |
| 3. 学会等名 the 16th annual scientific meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2018（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠山周吾 |
| 2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞における代謝機構の理解と心臓再生医療への応用 |
| 3. 学会等名 第43回日本微小循環学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shugo Tohyama |
| 2. 発表標題 Metabolic Selection System for Large Numbers of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes |
| 3. 学会等名 Weinstein 2018（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shugo Tohyama, Jun Fujita, Chihana Fujita, Sayaka Kanaami, Rei Ohno, Keiichi Fukuda |
| 2. 発表標題 Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human iPSCs and Differentiated Cardiomyocytes |
| 3. 学会等名 CiRA international symposium（国際学会） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shugo Tohyama, Jun Fujita, Chihana Fujita, Sayaka Kanaami, Rei Ohno, Keiichi Fukuda |
| 2. 発表標題 Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes |
| 3. 学会等名 The 15th annual scientific meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2017（国際学会） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shugo Tohyama |
| 2. 発表標題 Manipulation of Pluripotent Stem Cell Metabolism for Cardiac Regenerative Medicine |
| 3. 学会等名 The 47th Annual Scientific Meeting of the Taiwan Society of Cardiology (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 遠山 周吾 |
| 2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞における代謝制御と心臓再生医療への応用 |
| 3. 学会等名 第53回日本小児循環器学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠山周吾、荒井健一、川口新治、木村成卓、藤田淳、福田恵一、中山功一、小林英司 |
| 2. 発表標題 バイオ3Dプリンタを用いたヒトiPS細胞由来心筋組織構造体の作製 |
| 3. 学会等名 日本再生医療学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計5件

| | |
|------------------|-----------------|
| 1. 著者名 遠山周吾 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 日本心臓財団 | 5. 総ページ数 - |
| 3. 書名 心臓 | |

| | |
|---------------------|-----------------|
| 1. 著者名 森田唯加、遠山周吾 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 220 |
| 3. 書名 実験医学 | |

| | |
|---------------------|-----------------|
| 1. 著者名 遠山周吾、福田恵一 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 東京医学社 | 5. 総ページ数 368 |
| 3. 書名 腎と透析 | |

| | |
|--------------------|-----------------|
| 1. 著者名 谷英典、遠山周吾 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 184 |
| 3. 書名 循環器ジャーナル | |

| | |
|---------------------|-----------------|
| 1. 著者名 相馬雄輔、遠山周吾 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 202 |
| 3. 書名 循環器学と精密医療 | |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|