

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03660

研究課題名（和文）ヒト心筋スフェロイド/オルガノイドを用いた心不全の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of heart failure with human cardiac spheroid/organoid

研究代表者

藤田 淳（FUJITA, Jun）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤）

研究者番号：10306706

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞由来心筋細胞から成熟化した高品質な人工心筋組織の作製に成功した。適切な薬物反応を確認し、次世代心不全治療薬開発のためのプラットフォームを確立した。また、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて高品質な心筋スフェロイドを作製し、移植された心筋スフェロイドが分化直後よりも成熟化することを確認するとともにそのプロセスを明らかにした。また、心筋スフェロイドがVEGFを産生し、心不全状態の心臓に移植された心筋スフェロイドが血管新生を促進することで生着し、成熟化することを確認した。これらの結果より心不全による病的環境変化における移植心筋組織の状態が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではin vitroにおいて成熟化した高品質な人工心筋組織を作製することで詳細な心不全の病態解析および薬物開発を可能にした。また、in vivoで移植された心筋組織が生着、成熟化する機序が明らかになった。本研究によって得られた人工心筋組織の基盤技術は国際的にもトップクラスである。これらの成果によりヒトiPS細胞由来の人工心筋組織を用いた心不全の病態解析および創薬、心筋スフェロイドを用いた心不全治療は飛躍的に進歩すると考えられる。次世代の創薬開発に果たす役割は大きく国内外の循環器領域におけるインパクトは極めて大きい。

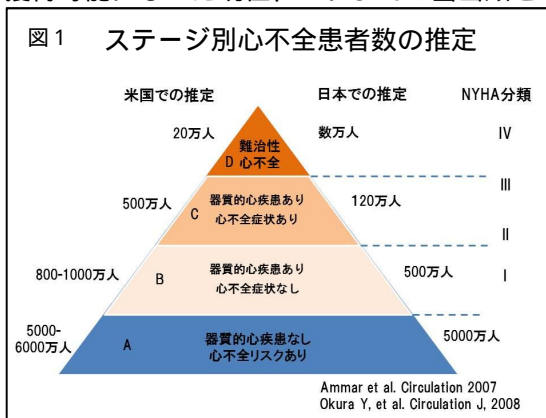
研究成果の概要（英文）：The matured and high-quality artificial myocardial tissues are successfully produced with human iPS cell-derived cardiomyocytes. The appropriate drug response is confirmed, and a platform for the development of next-generation therapeutic agents is established for heart failure. In addition, high-quality cardiac spheroids are generated with human iPS cell-derived cardiomyocytes. It is revealed that cardiac spheroids become mature after transplantation, and the process of maturation is clarified. It is also confirmed that cardiac spheroids produce VEGF. The transplanted cardiac spheroids promote angiogenesis, and they are engrafted and matured in the failing hearts. These results elucidate the state of the transplanted cardiac tissue in the heart failure.

研究分野：循環器内科

キーワード：ヒトiPS細胞 心筋スフェロイド 人工心筋組織 Engineered Heart Tissue

1. 研究開始当初の背景

重症心不全は予後不良の疾患であり、有症状の心不全患者数は、図1のように2015年の120万人が2030年には130万人に達すると推計されている。また、米国における心不全患者は死因の1位を占めており、その数は約500万人といわれている。これまでの心不全治療薬はステージCの重症心不全患者にはある程度有効であるが、ステージDの難治性心不全では心室補助装置を経て心臓移植が必要となり、末期癌患者よりも予後不良である。しかし、根治療法である心臓移植は全世界で年間約5500例程度しか行われず、日本においては100例にも満たない。末期の重症心不全への移行を予防し、重症心不全を根治するために各ステージにおける新薬の開発が急務である。これまでの *in vitro* における研究では、ラット新生仔の心筋細胞を用いた解析が行われてきた。しかしこの方法では多くの非心筋細胞が混入してしまうことが最大の問題点であり長期培養すると増殖性の非心筋細胞が多勢をしめ解析が困難になってしまう。さらに、ラット新生仔の心筋細胞では組織構築が難しいこと、ヒト細胞でないこと等の解析の限界があった。ヒト ES/iPS 細胞から *in vitro* でヒト心筋細胞が獲得可能になった現在、これまでの齧歯類を中心



2. 研究の目的

純化精製したヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞で構築した心筋組織を基盤として *in vitro*、*in vivo* における心不全時の心筋組織への病態応答を解析し、その分子機序を解明する。すなわち、低酸素状態、酸化ストレス、クライオインジャリー等による心筋障害(擬似心筋梗塞)に対する心筋組織における生理活性物質(血管増殖因子や肥大因子等)の産生、代謝変化(メタボローム、フラックスアナライザーを用いた解糖系、酸化的リン酸化、脂肪酸代謝等の解析)等を解析する。また、スフェロイドをマウス、ラット等に移植することによって *in vivo* における血管内皮細胞や線維芽細胞と心筋細胞がどのように組織構築しストレス応答するのか、移植されたヒト心筋組織に対しどのような免疫反応が起きるのかを明らかにする。組織構築されたヒト心筋細胞の遺伝子とエピジェネティクス、代謝、ミトコンドリア機能を解析することにより重症心不全の分子機序を解明し、新規心不全治療薬を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)人工心筋組織を用いた *in vitro* における心不全の病態解析

心筋スフェロイドを用いた人工心筋組織の作製および機能解析

ヒト ES/iPS 細胞から心筋細胞へと多層スタックプレートを用いた二次元培養法で分化誘導し、効率的にヒト iPS 細胞由来心筋細胞を大量培養する。大量培養した心筋細胞を無グルコース、無グルタミン、乳酸添加培地によって純化精製する。純化心筋細胞から特殊なマイクロウェルプレートを用いて心筋スフェロイドを形成させる。スフェロイドの培養上清から産生された生理活性物質をマイクロアレイと Multiplex Assay によって解析し、スフェロイドがどのような生理活性物質を産生するのかを検討する。本解析によって各細胞が産生する心筋細胞の肥大を促進するエンドセリンや、VEGF、アンジオテンシン等の発現を確認することによって、心筋スフェロイドのオートクライン、パラクライン機能を検証する。

一方、球形の心筋組織では一方向性に張力をかけることは困難なため心筋組織の成熟化には限界があり、*in vitro* の解析には帯状の心筋組織が有用と考えられる。そこで Engineered Heart Tissue (EHT) やマイクロパターンングによって作製した帯状の心筋組織を用いてストレスや薬物に対する反応を確認する。

マイクロパターンングを用いた人工心筋組織の作製および機能解析

特殊加工によりマイクロパターンングを行なった培養皿に純化心筋細胞を播種し、人工心筋組織を作製する。アクチニンによる免疫染色による組織構築を評価し、ストレスや各種薬物に対する反応を確認する。

Engineered Heart Tissue (EHT)を用いた人工心筋組織の機能解析

心筋組織の成熟化において心筋伸展による機械刺激が果たす役割は大きい。球形のオルガノイドでは心筋組織への機械刺激は困難なため、両端を動かすことで心筋組織を伸展させ機械刺激を負荷することが可能な Engineered Heart Tissue (EHT) を作製する。純化心筋細胞、線維芽細胞、マトリックスによって作製した心筋組織で EHT を作製し、心筋組織の拍動速度や組織構築

がどのように変化するのかを確認する。

(2)心筋スフェロイドを用いた in vivo ストレス応答の解析

我々の研究室ではヒト心筋スフェロイドが免疫不全マウスに長期生着することを確認している。心筋スフェロイドを移植した免疫不全マウスやラット等の心臓組織を解析しヒト心筋組織がレシピエント由来の血管と組織構築することを確認する。また、心筋梗塞後に移植して数ヶ月した心筋組織がどのように成熟化しているのかをサルコメアの構造やミトコンドリアの状態とトロポニン、アクチニン、TOM20 の免疫染色等で確認する。これまで in vivo で移植された心筋細胞が成熟することは報告されているが、その機序はあきらかではない。本研究により移植された心筋組織が in vivo でどのような代謝変化を起こし成熟化するのかを確認する。さらに、心筋梗塞後の心不全によるストレス下での移植心筋組織のストレス応答の解析を行う。

4. 研究成果

(1)人工心筋組織を用いた in vitro における心不全の病態解析

心筋スフェロイドを用いた人工心筋組織の作製および機能解析

ヒト iPS 細胞を用いた人工心臓組織の解析には大量の心筋細胞を必要とする。心筋細胞は増殖能が非常に低いため、分化誘導前にヒト iPS 細胞を大量培養する必要がある。これまで我々が開発した多層スタックプレートを用いた 2 次元大量培養法により iPS 細胞の大量培養が可能となった。しかし、ヒト iPS 細胞の培養には高価なマトリックスが必要となるため本研究推進のためには大量生産にかかるコストの削減が大きなボトルネックであった。そのため、UV/ozon により特殊加工した培養皿を用いることでマトリックスの量を大幅に減少させ、研究を促進することが可能になった (Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2020 Jun;111:110788. doi: 10.1016; 図 2)。

ヒト iPS 細胞から心筋細胞へと二次元培養法で分化誘導後に純化精製し、特殊なマイクロウェルプレートを用いて心筋スフェロイドを形成させ研究を行った。培養上清中に含まれるヒト iPS 細胞由来の心筋細胞と心筋スフェロイドから産生されたサイトカインをマイクロアレイと Millipore の Multiplex Assay によって網羅的に解析した。その結果、純化心筋細胞および心筋スフェロイドから VEGF 等の血管新生を促進するサイトカインが産生されていることが確認された (JACC Basic Transl Sci. 2021 Feb 19;6(3):239-254. doi: 10.1016

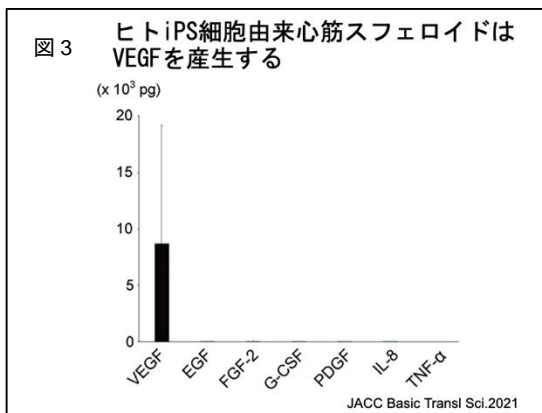
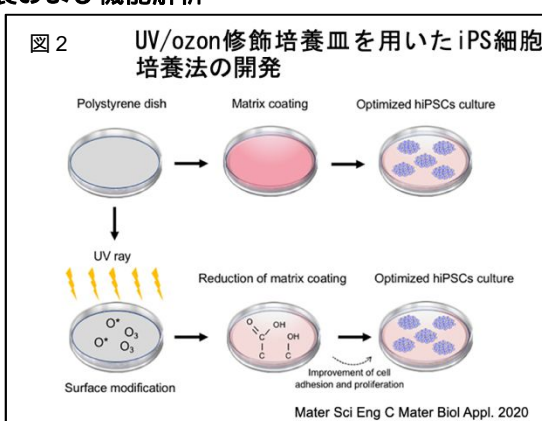


図 3)。この結果より、移植されたヒト iPS 細胞由来の心筋組織がレシピエントの心臓で血管新生を強く誘導する可能性が示唆された。

一方、球形のスフェロイドは心筋組織としての成熟化に必要な機械刺激を負荷することが困難であることが明らかになった。心筋組織の成熟化において心筋組織の伸展による機械刺激が果たす役割は大きい。そこで、心不全の詳細な病態解明には方向性をもった張力を負荷することが可能な Engineered Heart Tissue (EHT) やマイクロパターンングを用いた人工心筋組織の作製が必須と考えられ、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて EHT とマイクロパターンングにより心筋組織の形成が可能であることを確認した。

マイクロパターンングを用いた人工心筋組織の作製および機能解析

特殊加工技術によりマイクロパターンングを行なった培養皿に純化心筋細胞を播種し、人工組織を作製した。アクチニンによる免疫染色により人工心筋組織の組織構築が確認された。イソプロテレノールやアセチルコリン等の薬剤を添加することで心筋収縮速度と収縮力の変化を確認し、薬物評価のプラットフォームになりうることを確認された。

Engineered Heart Tissue (EHT) を用いた人工心筋組織の機能解析

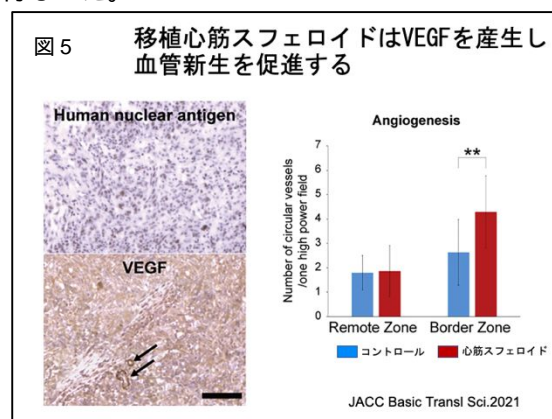
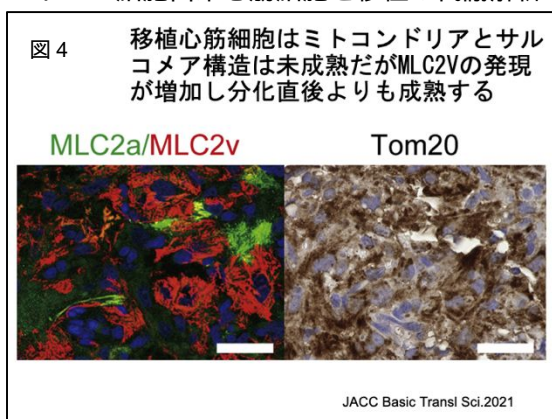
iPS 細胞由来純化心筋細胞にマトリックスを混合することによって EHT を作製し、トロポニン染色により組織構築を確認した。心筋の伸展による機械刺激の負荷下で EHT を長期培養することによって心筋組織の拍動速度や組織構築がどのように変化するのかを経時的に確認した。イソプロテレノール添加により EHT の収縮速度および収縮力が増加することから良好な薬物反応を確認した。また、構成成分の割合を変えることによって収縮力や耐久性の変化、遺伝子発現の変化を確認した。

(2)心筋スフェロイドを用いた in vivo ストレス応答の解析

我々は免疫不全マウスに移植した心筋組織がレシピエントの心臓に長期に生着することを確認していたが、どのような機序で生着し、かつ長期生存することができるのかは不明であった。

そこで心筋スフェロイドを移植した免疫不全マウス(NOG マウス)の心臓組織切片を解析し、移植された心筋スフェロイドがレシピエントの心臓から血管新生により組織構築され、血液供給を受けて長期生着することを心筋細胞、血管内皮細胞、抗ヒト核抗体の免疫染色によって確認した。

また心不全における移植心筋スフェロイドの機能解析を行なった。クライオインジャリーにより心筋梗塞を作製し、ヒト iPS 細胞由来の心筋スフェロイドを移植した移植2ヶ月後の免疫不全ラット(XSCID rat)の心臓組織切片を用いて移植心筋細胞が移植後2ヶ月経過した時点でどのように生体に適応しているのかを評価した。サルコメアの構造やミトコンドリアの状態をトロポニン、アクチニン、MLC2A、MLC2V、TOM20の免疫染色によって確認した。移植心筋細胞はミトコンドリアやサルコメアの構造は未成熟であるものの、MLC2AよりもMLC2Vの発現が多く分化直後よりも明らかに成熟化していることが確認された。これらの結果から、心不全状態の心臓においても移植後2ヶ月時点の心筋細胞は分化直後よりも成熟していることが明らかになったが、成人の心筋細胞と比較して依然として未成熟であることが確認された(図4)。in vitroの研究で純化精製心筋細胞によって形成したスフェロイドはVEGF等の血管新生を促進するサイトカインを産生していることが確認されたが、in vivoでの評価を行うため心筋スフェロイドを移植した心不全ブタの組織切片を用いて実験を行なった。移植された心筋スフェロイドは移植後の組織でもVEGFを産生し血管新生を促進することが確認された(JACC Basic Transl Sci.2021 Feb 19;6(3):239-254. doi: 10.1016 図5)。本研究によりこれまで解析が困難であったヒト iPS 細胞由来心筋スフェロイドのin vivoにおける動態、機能が明らかになった。また、NOG マウスにヒト iPS 細胞由来心筋細胞を移植し代謝解析を行なった。



本研究では心不全治療の薬物開発に必要な均一な品質を有する心筋細胞、心筋スフェロイドの大量生産に成功している。本基盤技術無くして心不全の病態解明、創薬は成り立たない。また、in vitroにおいて人工心筋組織に心筋伸展による機械刺激を負荷することにより心筋組織を成熟化させることで詳細な心不全の病態解析、薬物開発を可能にした。in vivoにおいては心不全動物に移植され長期生存した心筋スフェロイドが、分化直後よりも明らかに成熟すること、主にVEGFを産生すること、血管新生を増加させることによって生着を促進することを明らかにした。本研究によって得られた人工心筋組織の基盤技術は国際的にもトップクラスである。これらの成果によりヒト iPS 細胞由来の人工心筋組織を用いた心不全の病態解析および創薬、心筋スフェロイドを用いた心不全治療は飛躍的に進歩すると考えられる。次世代の創薬開発に果たす役割は大きく、国内外の循環器領域におけるインパクトは極めて大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawaguchi S, Soma Y, Nakajima K, Kanazawa H, Tohyama S, Tabei R, Hirano A, Handa N, Yamada Y, Okuda S, Hishikawa S, Teratani T, Kunita S, Kishino Y, Okada M, Tanosaki S, Someya S, Morita Y, Tani H, Kawai Y, Yamazaki M, Ito A, Shibata R, Murohara T, Tabata Y, Kobayashi E, Shimizu H, Fukuda K, and Fujita J.	4. 巻 6
2. 論文標題 Intramyocardial Transplantation of Human iPS Cell-Derived Cardiac Spheroids Improves Cardiac Function in Heart Failure Animals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 239-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2020.11.017	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 Fujita	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of Cardiac Regenerative Medicine Using Human iPS Cell-derived Cardiomyocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	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) 10.2302/kjm.2020-0009-IR	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 相馬雄輔, 藤田淳, 遠山周吾, 金澤英明, 福田恵一	4. 巻 24
2. 論文標題 臨床応用前夜となったiPS細胞による心臓再生医療の今後の展開	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovascular Anesthesia	6. 最初と最後の頁 3-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11478/jscva.2019-1-001	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 藤田淳, 福田恵一	4. 巻 8
2. 論文標題 iPS細胞を用いた心筋細胞療法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 先進医療NAVIGATOR	6. 最初と最後の頁 38-40
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 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 -

1. 著者名 Kasai Kohei, Tohyama Shugo, Suzuki Hayato, Tanosaki Sho, Fukuda Keiichi, Fujita Jun, Miyata Shogo	4. 巻 111
2. 論文標題 Cost-effective culture of human induced pluripotent stem cells using UV/ozone-modified culture plastics with reduction of cell-adhesive matrix coating	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 110788 ~ 110788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2020.110788	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 Kishino Yoshikazu, Fujita Jun, Tohyama Shugo, Okada Marina, Tanosaki Sho, Someya Shota, Fukuda Keiichi	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 遠山 周吾, 相馬 雄輔, 染谷 将太, 藤田 淳, 金澤 英明, 小林 英司, 福田 恵一	4. 巻 26
2. 論文標題 ヒトiPS細胞由来微小心筋組織球の大量作製と心臓再生医療への応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 48
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 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7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤田淳
2. 発表標題 Development of Cardiac Regenerative Therapy Using Cardiac Spheroids
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 藤田淳
2. 発表標題 iPS細胞を用いた再生心筋細胞移植による重症心不全治療法の確立
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田淳
2. 発表標題 再生医療は重症心不全患者を救えるか？
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tohyama S, Tanosaki S, SomaY, Someya S, Kanazawa H, Fujita J, Fukuda K
2. 発表標題 Cardiac Regenerative Therapy with Human Induced Pluripotent Stem Cells for Heart Failure
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 相馬雄輔, 中嶋一晶, 遠山周吾, 藤田淳, 岸野喜一, 岡田麻里奈, 田野崎翔, 染谷将太, 森田唯加, 谷英典, 金澤英明, 福田恵一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来微小心筋組織球を用いた細胞移植治療の安全性と有効性
3. 学会等名 日本循環制御医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬雄輔, 遠山周吾, 藤田淳, 中嶋一晶, 福田恵一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来微小心筋組織球を用いた細胞移植治療の安全性と有効性
3. 学会等名 iHFフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬雄輔, 遠山周吾, 藤田淳, 中嶋一晶, 岸野喜一, 岡田麻里奈, 田野崎翔, 染谷将太, 森田唯加, 谷英典, 金澤英明, 福田恵一
2. 発表標題 Large-scale production of purified human iPSC-derived cardiomyocytes for cardiac regenerative therapy
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Jun Fujita, Shugo Tohyama, Hideaki Kanazawa, Yoshikazu Kishino, Marina Okada, Sho Tanosaki, Shota Someya, and Keiichi Fukuda	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 14
3. 書名 Clinical Application of iPSC Derived Cardiomyocytes in Patients with Advanced Heart Failure. "Advanced Technologies in Cardiovascular Bioengineering"	

〔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
研究協力者	遠山 周吾 (TOHYAMA Shugo)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

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	金澤 英明 (KANAZAWA Hideaki)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

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