

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06652

研究課題名(和文) 多能生幹細胞を用いた心肺連携オルガノイド作製技術の開発

研究課題名(英文) Development of heart-lung organoid generation technology using pluripotent stem cells

研究代表者

李 知英 (Lee, Jiyoung)

東京医科歯科大学・統合研究機構・非常勤講師

研究者番号：20402860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎児の心臓で発現するBMP10を添加することで形態変化の精度が高いヒトES細胞由来心臓オルガノイドを作製し、心臓オルガノイドの多様な心筋細胞のマーカー、Naイオンチャンネルタンパク質とCaイオンチャンネルタンパク質の発現とともにNa電流とCa電流の存在を示した。また、PORCN阻害剤(C59)と脂肪酸は心臓オルガノイドの心筋細胞をより成熟させることに有効であった。ヒト多能性幹細胞からの心肺連携オルガノイド作製技術についてROCK阻害剤が肺オルガノイド作製に重要であることを示した。一方で、心臓オルガノイドの内部構造評価のために肉柱形成の定量的画像解析法の構築を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作製されたヒト心臓オルガノイドは心筋細胞マーカーの発現、NaとCaイオンチャンネルタンパク質を持つだけでなく、NaとCa電流が確認され、各電流のパターンは生体の心臓に極めて似ていることが明らかとなった。その他にもHERGやIK1チャンネルの発現が確認されたことからヒトES由来心臓オルガノイドは心臓の電気生理学的性質を総合的に再構築したものであると考えられる。これらの心臓オルガノイドと評価系を用いることで、将来的に薬剤毒性評価やdrug screeningに有効に活用できると考えられる。また、肺オルガノイドにおいても薬剤毒性評価系などの構築ができると予想されるため、医療への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated human ESCs-derived heart organoids with high morphological similarity of in vivo heart, by adding BMP10 expressed in the fetal heart. The human heart organoids expressed cardiomyocyte markers, and the integral proteins of gap junctions and ion channels. Also, Na and Ca currents were detected in human heart organoids by patch clamp analysis. Moreover, a PORCN inhibitor (C59) and fatty acids were effective in the maturation of cardiomyocytes in human heart organoids. For the quantitative analysis of trabeculation in heart organoids, we developed a method using imaging analysis with a machine learning model after tissue clearing. The evaluation system of human heart organoids will be a useful tool for cardiac safety assessment of newly developed drugs. For the generation of heart-lung organoids from human pluripotent stem cells, we found that ROCK inhibitor plays an important role for the development of lung by interfering with the function of FGF signals.

研究分野：細胞生物学

キーワード：心臓オルガノイド 多能性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から、マウス ES 細胞を用いて必要最低限な細胞外シグナルと細胞外環境下で細胞の自己組織化を引き起こすことによって心臓オルガノイド作製が可能になった。これらの心臓オルガノイドは、単なる収縮作用を示す細胞塊ではなく、形態的には2心房2心室構造をもち、組織学的にも心筋細胞、内皮細胞、平滑筋細胞を持つ心臓の高次構造と機能性まで兼備した生体心臓を上手く再現するものであった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、心臓オルガノイド作製先行技術を基に、統合的な連携オルガノイド作製技術開発の一環として、自己組織化シグナル経路解明により、ヒト多能性幹細胞からより *in vivo* の心臓と肺に近い心肺複合オルガノイドを *in vitro* で作製する方法を確立かつ改良し、ヒトの心肺系発生を試験管内で再現するとともに、有効なオルガノイド性質評価系を検討することである。具体的には、心臓特異的遺伝子をノックアウトしたマウス ES 細胞から心臓オルガノイドの作製、心肺発生に重要な自己組織化シグナル経路の探索によるヒト多能性幹細胞由来の心肺オルガノイド作製を検討した。加えて、ヒト多能性幹細胞由来心肺オルガノイドの評価系構築のために、組織学解析、微細構造解析、patch clamp 法によるイオン電流測定を行う電気生理学的解析、心筋収縮と弛緩を定量できる筋収縮解析を検討した。一方で、より詳細な心臓オルガノイドの内部構造の評価のために、肉柱形成の定量的画像解析法の構築の検討を行なった。

## 3. 研究の方法

(1) 心臓特異的遺伝子をノックアウトしたマウス ES 細胞から心臓オルガノイド作製：心臓発生に重要な Tbx5 と Is11 遺伝子を CRISPR 法でノックアウトしたマウス ES 細胞を樹立した。Tbx5 KO-ES 細胞と Is11 KO-ES 細胞を用いて心臓オルガノイド作製を行なった。

(2) マウス ES 由来心臓オルガノイド作製技術を基盤にヒト ES 細胞由来心臓オルガノイド作製：FGF4 シグナルだけではなくマウス胎児の心臓で発現する BMP10 を添加して心臓オルガノイドの作製を行なった。細胞外基質としては Laminin/Entactin 複合体を用いて心臓オルガノイドの培養を行なった。

(3) ヒト ES 由来心臓オルガノイドにおける電気生理学的解析：心臓オルガノイドから collagenase を使用して心筋細胞を単利した後、patch clamp 解析によって Na 電流と Ca 電流を測定した。

(4) ヒト ES 由来心臓オルガノイドを用いた特性評価

組織学的解析：BMP10 を添加して作製されたヒト ES 由来心臓オルガノイドを用いて、Mlc2a, Mlc2v などの心筋細胞のマーカー、Cx43, Cx40 などの Gap Junction タンパク質、Na, Ca, HERG, IK1 チャネルタンパク質の発現を調べるために蛍光免疫染色を実施した。

HERG trafficking inhibition assay：心筋細胞の中の HERG trafficking を阻害する薬剤であるペンタミジンを用いて、ヒト ES 心臓オルガノイドの HERG trafficking inhibition assay を実施した。

高速カメラによる心筋収縮解析：高速カメラによってヒト ES 由来心臓オルガノイドの心筋収縮の動きを記録して、画像を MuscleMotion プログラムで解析して、生体心臓で見られる収縮と弛緩の確認を行なった。

心臓オルガノイドの心筋細胞成熟度向上とその評価：心筋細胞の成熟度を上げるために、Wnt シグナルを抑制する小分子阻害剤である PORCN 阻害剤 (C59) と脂肪酸を心臓オルガノイド培養液に加えることによりその効果を試した。作製された心臓オルガノイドの評価のために心筋細胞マーカーである Mlc2a と Mlc2v の発現を蛍光免疫染色法により調べた。

(5) 肺および心肺オルガノイド作製条件検討及び評価：肺および心肺オルガノイド作製のために、ROCK 阻害剤の効果を試した。ヒト多能性幹細胞由来オルガノイドとマウス ES 細胞由来オルガノイド作製時に FGF4 に加えて ROCK 阻害剤を添加することによって肺への分化を誘導した。作製された肺オルガノイドを用いて肺特異的転写因子と気管上皮マーカーの発現を調査するために蛍光免疫染色を実施した。また、肺オルガノイドを構成する細胞の肺胞細胞特異的の微細構造を解析するために透過電子顕微鏡 (TEM) によって観察及び画像を取得した。

(6) 心臓オルガノイドの評価のための肉柱形成の定量的画像解析法の構築：胎生 11.5 日マウス心臓を組織透明化し、波長 633 nm の励起光に由来する自家蛍光で画像化したものを Image J (Fiji) の Trainable Weka Segmentation (TWS: 機械学習による分節化) で肉柱を認識させ、その周長の複雑さを肉柱形成の指標として定量を行なった。肉柱の証明のために、cardiac Troponin T (心筋細胞マーカー) と CD31 (血管内皮細胞マーカー) で蛍光免疫染色を実施した。

## 4. 研究成果

(1) 心臓特異的遺伝子をノックアウトしたマウス ES 細胞から心臓オルガノイド作製  
先行研究で開発された多能性幹細胞由来心臓オルガノイド作製技術については、心臓特異的遺

伝子をノックアウトしたマウス ES 細胞から心臓オルガノイドは正常な心筋形成ができないことを実証する研究を追加で行うことにより、マウス ES 細胞由来構造的・機能的な心臓オルガノイド作製法を確立した。心臓発生に重要な遺伝子 *Tbx5* と *Isl1* を CRISPR 法で KO した ES 細胞から作った EB でオルガノイドを形成してみると、図 1 の様に培養 9 日目の chamber formation 効率が著しく低下することが明らかとなった（図 1）。これらの結果から心疾患心臓オルガノイド樹立可能であることが示されたので、心臓オルガノイド作製技術は心疾患関連遺伝子探索や心疾患メカニズム解明に有効であると考えられる。

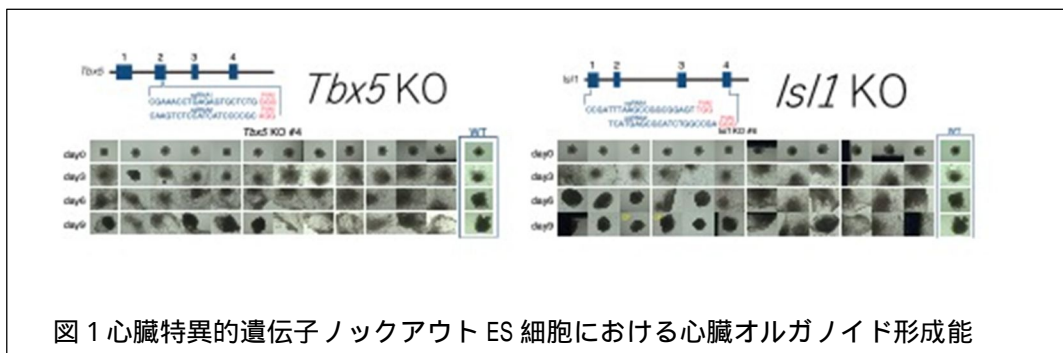


図 1 心臓特異的の遺伝子ノックアウト ES 細胞における心臓オルガノイド形成能

### (2) ヒト ES 細胞由来心臓オルガノイド作製

FGF4 シグナルだけではなくマウス胎児の心臓で発現する BMP10 を添加することで形態変化の精度が高い心臓オルガノイドを作製できた（図 2、右）。これらの心臓オルガノイドは胎児型心臓に形が類似して、蛍光免疫染色によって *Mlc2a*, *Mlc2v* などの心筋細胞のマーカーを発現し、*Cx43*, *Cx40* などの Gap Junction タンパク質、*Na*, *Ca*, *HERG*, *IK1* チャネルタンパク質も発現していることが明らかとなった。

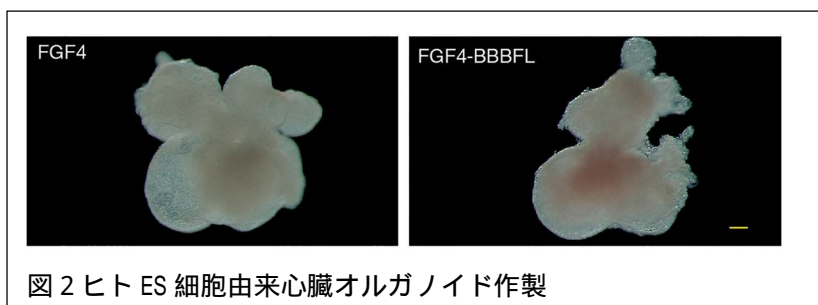


図 2 ヒト ES 細胞由来心臓オルガノイド作製

### (3) ヒト ES 由来心臓オルガノイドにおける電気生理学的解析

ヒト ES 由来心臓オルガノイドの電気生理学的性質を調査するために patch clamp 解析を行なった結果、ヒト ES 由来心臓オルガノイドの中で *Na* 電流と *Ca* 電流が確認され、各電流のパターンはナイーブな心臓に極めて似ていることが明らかとなった（図 3）。特に *Na* 電流は Tetrodotoxin (TTX) によって不活性化されることも確認された。

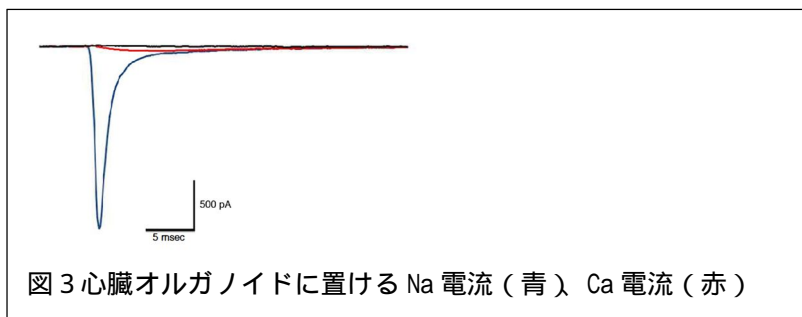


図 3 心臓オルガノイドに置ける *Na* 電流（青）、*Ca* 電流（赤）

### (4) ヒト ES 由来心臓オルガノイドを用いた特性評価

組織学的解析：心臓で発現する各種マーカータンパク質の抗体を用いた蛍光免疫染色を実施した結果、ヒト心臓オルガノイドにおいて *Mlc2a*, *Mlc2v* などの心筋細胞のマーカーを発現していることが明らかとなり、*Cx43*, *Cx40* などの Gap Junction タンパク質や *Na*, *Ca*, *HERG*, *IK1* チャネルタンパク質が発現することも確認できた（図 4）。

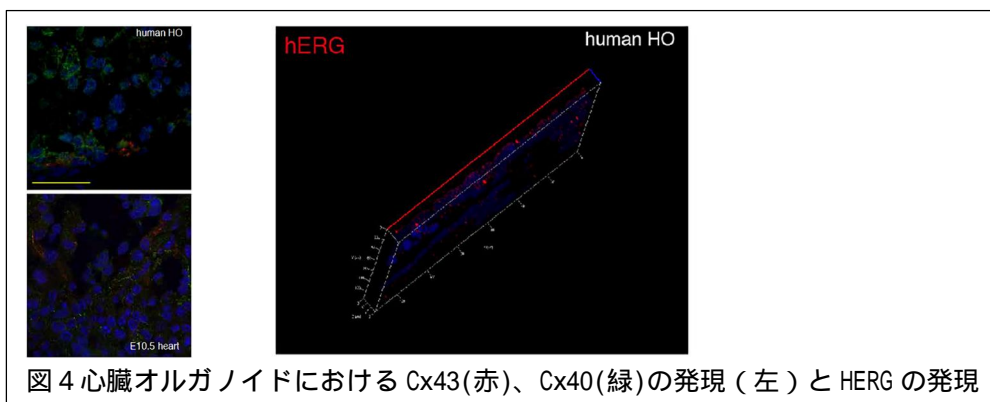


図4 心臓オルガノイドにおける Cx43(赤)、Cx40(緑)の発現 (左) と hERG の発現

HERG trafficking inhibition assay: 薬剤毒性評価や drug screening などの心臓オルガノイドの技術的応用については、ヒト心臓オルガノイドを用いて HERG trafficking inhibition assay を行い、ペンタミジンによる HERG trafficking 阻害が確認できた。

高速カメラによる心筋収縮解析: 高速カメラを用いてヒト ES 由来心臓オルガノイドの心筋収縮の動きを記録し、その画像データを MuscleMotion プログラムで解析した結果、心臓オルガノイドにおいて生体心臓で見られる収縮と弛緩が確認された。この心臓オルガノイドの評価システムも薬剤毒性評価や drug screening に有効であると考えられる。

心臓オルガノイドの心筋細胞成熟度向上とその評価: 心臓オルガノイドの心筋細胞をより成熟させるために Wnt シグナルを抑制する小分子阻害剤である PORCN 阻害剤 (C59) と脂肪酸の効果を試した所、Mlc2v の発現上昇及び肉柱形成が確認できたので (図5) より成熟した心筋細胞を持つ心臓オルガノイドが作製できたと考えられる。

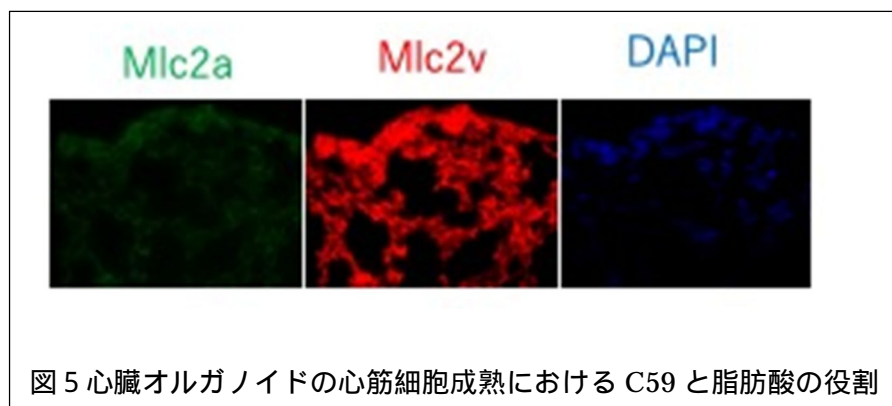


図5 心臓オルガノイドの心筋細胞成熟における C59 と脂肪酸の役割

#### (5) 肺および心肺オルガノイド作製条件検討及び評価

肺および心肺オルガノイド作製条件検討に用いた ROCK 阻害剤はヒト多能性幹細胞由来オルガノイドにおいて心臓だけではなく肺発生も促進することと組織学的解析により肺オルガノイドは気管上皮マーカーである ECAD と CK8 を発現することを確認した(図6)。また、肺オルガノイドにおいて電子顕微鏡による微細構造解析により肺特異的の構造である一型肺胞細胞、二型肺胞細胞及びラメラ体の存在が確認できた。

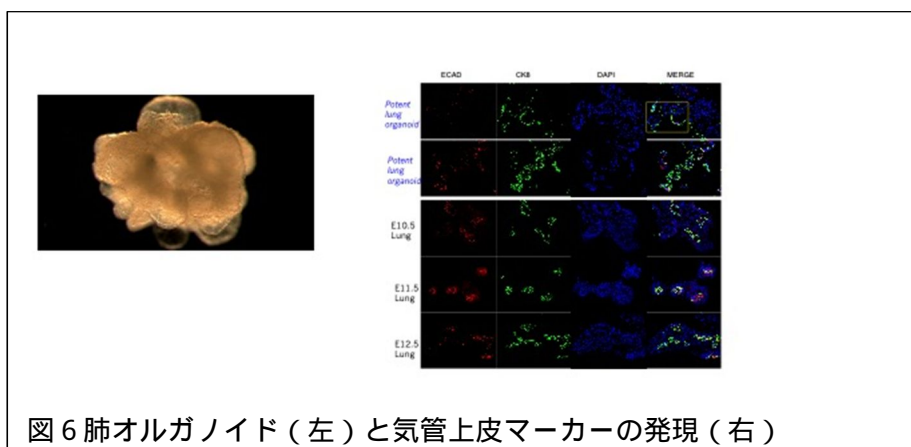


図6 肺オルガノイド (左) と気管上皮マーカーの発現 (右)

#### (6) 心臓オルガノイドの評価のための肉柱形成の定量的画像解析法の構築

心臓オルガノイドの肉柱形成の重要性からマウス心臓オルガノイドにおける肉柱形成の定量的画像解析法の構築を行なった。組織透明化したサンプルを波長 633 nm の励起光に由来する自家蛍光で画像化したものを Image J (Fiji) の Trainable Weka Segmentation (TWS: 機械学習による分節化) で肉柱を認識させ、周長の複雑さを定量した。cardiac Troponin T (心筋細胞マーカー) と CD31 (血管内皮細胞マーカー) で蛍光免疫染色により、これら定量的画像解析法は肉柱の定量的解析に有効であることが示唆された。したがって、この方法を用いてヒト多能性幹細胞由来心臓オルガノイドの肉柱形成について定量的解析が可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lee Jiyoung, Sutani Akito, Kaneko Rin, Takeuchi Jun, Sasano Tetsuo, Kohda Takashi, Ihara Kensuke, Takahashi Kentaro, Yamazoe Masahiro, Morio Tomohiro, Furukawa Tetsushi, Ishino Fumitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 In vitro generation of functional murine heart organoids via FGF4 and extracellular matrix	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4283: 1, 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18031-5	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 李 知英
2. 発表標題 心臓再生医療研究の基盤技術としての多能性幹細胞由来心臓オルガノイド作製法
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 知英
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞からの心臓オルガノイド形成
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李 知英
2. 発表標題 心臓オルガノイド作製及びその利用
3. 学会等名 心電学関連春季大会2022：基礎医学と心電学（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jiyoung Lee, Akito Sutani, Rin Kaneko, Tetsuo Sasano, Kensuke Ihara, Jun Takeuchi, Tetsushi Furukawa, Fumitoshi Ishino.
2. 発表標題 In vitro generation of heart organoids with functional capacity.
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 李 知英
2. 発表標題 生体心臓発生を模倣するマウスES細胞由来心臓オルガノイド作製 Generation of mouse heart organoids mimic in vivo heart development.
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 知英、酢谷明人、金子 凜、笹野哲郎、井原健介、幸田 尚、竹内純、古川哲史、石野史敏
2. 発表標題 Generation of functional heart organoids from mouse embryonic stem cells. マウスES細胞を用いた機能的な心臓オルガノイドの作製
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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