

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21H03808
研究課題名（和文）交感神経クロストークによる自己組織化能を用いた心オルガノイド・バイオ人工心臓創出
研究課題名（英文）Creation of cardiac organoids and bio-artificial hearts using self-organization ability through sympathetic nerve crosstalk
研究代表者
李 鍾國（LEE, JONG-KOOK）
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授（常勤）
研究者番号：60303608
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,900,000円

研究成果の概要（和文）：再細胞化三次元心筋組織では、生体に匹敵する心作動薬への薬理的反応が見られた。ラット交感神経細胞の存在下で、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の自己組織化と成熟化が促進される現象を *in vitro* 実験系で再確認した。ヒトiPS細胞由来心筋細胞におけるストレスファイバー（アクチン）と細胞増殖・遊走に関連するYAPシグナルの関係を調べ、学術誌に報告した。ヒトiPS細胞由来心筋細胞（心房筋・心室筋）の機能特性評価技術を確立し、創薬プラットフォーム構築のための基盤技術開発を行い、学術誌に報告した。ヒトiPS心筋と交感神経の共培養系では、ニコチン添加後の自己拍動レートの増加は、共培養系でより顕著であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題においては、研究代表者らが見出した「交感神経との共培養がiPS心筋の自己組織化と成熟化を促進する」現象を再確認し、iPS心筋を用いた三次元心筋組織の構築と機能・形態評価を行い、「臓器間クロストーク」の影響を調べた。

本研究は、生体模倣系に基づく創薬プラットフォームを含む社会実装に向けたアプローチに有用な知見をもたらした。1.創薬・再生治療に利用可能な三次元心筋組織を構築するためには、臓器間クロストーク（交感神経-心筋）による心筋の自己組織化と成熟性促進が有用であることを明らかにした。2.交感神経支配を有する三次元心筋組織を構築した。

研究成果の概要（英文）：In the recellularized 3D cardiac tissue, pharmacological responses to cardiostimulatory agents comparable to those *in vivo* were observed. The presence of rat sympathetic nerve cells promoted the self-organization and maturation of human iPS-derived cardiomyocytes, as reconfirmed in an *in vitro* system. We investigated the relationship between stress fibers (actin) and YAP signaling, related to cell proliferation and migration, in human iPS-derived cardiomyocytes and reported our findings. We established techniques for evaluating the functional characteristics of human iPS-derived atrial and ventricular myocytes, developed foundational technologies for a drug discovery platform, and reported these findings. In the co-culture system of human iPS cardiomyocytes and sympathetic nerves, the increase in spontaneous beating rate after nicotine addition was more pronounced.

研究分野：再生医学、組織工学、心臓電気生理学

キーワード：三次元心筋組織構築 交感神経 臓器間クロストーク iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、胚盤胞補完などの技術により、培養皿や動物の体内で、生体と類似した構造を持つオルガノイドや臓器を再生する技術開発が進められているが、心臓のような大型臓器については、そのサイズや臓器再生にかかる時間的制約が障壁となっている。この問題を解決するため、研究代表者(李)らは、脱細胞化細胞外マトリックスを用いた臓器様三次元心筋組織の構築に成功し、学術誌に報告した(Yasui, Lee et al. 2014, Biomaterials)。しかしながら、得られた三次元組織の微小構造や機能は、生体心とはかけ離れたものであった。これらの多くは、iPS心筋が有する「未成熟性」・「非生理的特性」に起因すると考えられ、その原因として「臓器間クロストークの欠如」が考えられている。一方、研究代表者らは、これまでの研究で、交感神経との共培養がiPS心筋の自己組織化と成熟化を促進する現象を観察しており、臓器間クロストーク(交感神経-心筋)が自己組織化を促進する可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は「臓器間クロストークにより、生体臓器に匹敵する生理機能特性を有する三次元バイオ人工心臓および心臓オルガノイドを創出すること」である。この目標を達成するために、「交感神経細胞との共培養がiPS心筋の自己組織化・成熟化を促進する効果」のメカニズムを解明するとともに、三次元心筋組織構築を行い、心臓再生治療および創薬に利用可能な基盤技術の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 成獣および新生仔ラットから摘出した心臓に、界面活性剤 Sodium Dodecyl Sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム: SDS)あるいは他の試薬を含む溶液を以下の または の方法で作用させ、大動脈カニューレーションを用いて灌流、試薬への含浸・振盪処理(ではカニューレーションは行わない)により脱細胞処理を行い、終了後に組織固定を行い、細胞外マトリックス蛋白のcollagen (type1, 3)、laminin, fibronectinなどの免疫染色実験を行い、形態評価を行った。また、多電極アレイ上に静置した脱細胞化心臓組織にヒトiPS心筋細胞を播種して3次元再細胞化心筋組織を作成し、Field potential 波形および心筋興奮伝播速度などの心筋興奮特性の解析を行い、生理機能評価実験を行った。

(2) 心臓交感神経特性の3D機能評価のため、カテコラミン負荷により作成したストレス誘発性心筋症マウスのランゲンドルフ灌流心に電位感受性色素をロードし、心表面の活動電位を記録し、ニコチン添加時の活動電位変化を観察した。本研究成果の一部は、心電学関連春季大会(2022年4月オンラインで開催)にて発表した。

(3) ヒトiPS細胞由来心筋細胞とラット由来交感神経細胞の共培養を行い、神経支配を有するヒトiPS心筋の生理特性を評価した。

4. 研究成果

[1]. ラット心の脱細胞化マトリックスにヒトiPS細胞由来心筋細胞を播種し、再細胞化三次元心筋組織を構築した。再細胞化組織の自己拍動を、実体顕微鏡を用いて観察するとともに、多電極アレイにより細胞外電位を記録し、カリウムチャネルブロッカー(E-4031)添加時の効果を調べたところ、明らかなField Potential Durationの延長が観察された。

[2]. 組織透明化技術と心臓の三次元イメージングにより、心臓に分布する交感神経の可視化技術を確立した。この手法により、マウス健常心およびカテコラミン負荷心臓における交感神経の3次元分布の可視化が可能となり、3次元組織構築時のgeometrical patterningなどの評価が可能となった(論文投稿準備中)。

[3]. ラット交感神経細胞の存在下で、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の自己組織化と成熟化が促進される現象をin vitro実験系で再確認した。

[4]. ヒトiPS細胞由来心筋細胞におけるストレスファイバー(アクチン)と細胞増殖・遊走に関連するYAPシグナルの関係を調べ、原著論文として学術誌に報告した(Yasutake et al. Sci Rep,

2021)。

[5]. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (心房筋・心室筋) の機能特性評価技術を確立し、三次元心筋の評価を行うための基盤技術開発を行い、学術誌に報告した (Li J, Lee JK et al. *Methods in Molecular Biology*. 2021; Honda et al. *Front Pharmacol* 2021; Yuasa et al. *Front Cell Dev Biol* 2022)。

[6]. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と交感神経細胞の共培養を行い、作成した培養プラットフォームに、ニコチンをはじめとする薬剤を添加して自己拍動など機能特性の変化を解析し、創薬プラットフォームとしての社会実装の可能性を検証した。その結果、ニコチン添加後の自己拍動レートの増加は、共培養系においてより顕著であった。

考察

本研究は、心臓再生技術における重要な課題である「臓器間クロストークの欠如」に対して、交感神経と心筋細胞の共培養を通じて解決を図るものであり、研究成果は多岐にわたる。

交感神経と心筋細胞の共培養による心筋成熟化促進

研究成果[1]および[3]は、ラット心の脱細胞化マトリックスにヒト iPS 細胞由来心筋細胞を播種し、再細胞化三次元心筋組織を構築したものである。特に、交感神経細胞の存在がヒト iPS 心筋細胞の自己組織化と成熟化を促進する現象を *in vitro* 実験系で再確認できたことは、本研究の核心を示すものである。これは、臓器間クロストークが心筋成熟化において不可欠であることを強く示唆しており、将来的には臨床応用への道筋を示す重要な知見である。

三次元イメージング技術の確立と評価

研究成果[2]の組織透明化技術と心臓の三次元イメージング技術の確立は、心臓に分布する交感神経の可視化を可能にし、三次元組織構築時の *geometrical patterning* などの評価に新たな視点を提供する。これにより、心筋組織の再生過程における交感神経の役割をより詳細に理解することができ、再生医療における最適な組織構築法の開発に寄与することが期待される。

薬剤応答性評価と創薬プラットフォームの可能性

研究成果[6]で行われたヒト iPS 細胞由来心筋細胞と交感神経細胞の共培養系におけるニコチン添加後の自己拍動レートの変化解析は、薬剤応答性評価の新たな可能性を示すものである。この共培養プラットフォームは、心臓オルガノイドを用いた創薬試験において有用であり、心疾患治療薬の開発に向けた前臨床試験の効率化および精度向上に貢献する。

心筋細胞の機能特性評価技術の確立

研究成果[5]で確立されたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の機能特性評価技術は、三次元心筋の評価を行うための基盤技術として極めて重要である。これにより、再生医療や創薬の分野で用いる心筋細胞の品質を厳密に評価できるようになり、実用化に向けた一步を踏み出すことができたといえる。

今後の課題と展望

本研究では多くの重要な知見が得られたが、さらなる研究が必要である。特に、ヒト iPS 心筋細胞の完全な成熟化には、他の臓器間クロストーク (例: 血管系や免疫系) も含めた複合的な要因の解明が求められる。また、*in vivo* における長期的な機能維持や免疫応答の評価も今後の課題である。

結論として、本研究は心臓再生医療における新たなアプローチを提供し、将来的な臨床応用に向けた基盤技術を確立する上で重要な一步となった。今後は、これらの知見を基にさらなる研究を進め、心臓再生治療および創薬における実用化を目指していくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6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 Kondo T, Higo S, Shiba M, Kohama Y, Kameda S, Tabata T, Inoue H, Okuno S, Ogawa S, Nakamura S, Takeda M, Ito E, Li J, Liu L, Kuramoto Y, Lee JK, Takashima S, Miyagawa S, Sawa Y, Hikoso S, Sakata Y	4. 巻 15
2. 論文標題 Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Model for TNNT2 160E-Induced Cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 429-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCGEN.121.003522	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 李鍾國	4. 巻 42
2. 論文標題 臨床と基礎の世界を巡るトランスレーショナル研究～日本の基礎研究の現状と不整脈領域の再生医療～	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 心電図 (日本不整脈心電学会誌)	6. 最初と最後の頁 165-169
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 Yasutake H, Lee JK, Hashimoto A, Masuyama K, Li J, Kuramoto Y, Higo S, Hikoso S, Hidaka K, Naito AT, Miyagawa S, Sawa Y, Komuro I, Sakata Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Decreased YAP activity reduces proliferative ability in human induced pluripotent stem cell of duchenne muscular dystrophy derived cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89603-8	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 Masuyama K, Higo T, Lee JK, Matsuura R, Jones I, Bakal C, Higo S, Morimoto S, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Homogeneous 2D and 3D Alignment of Cardiomyocyte in Dilated Cardiomyopathy Revealed by Intravital Heart Imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94100-z	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 Li J, Lee JK	4. 巻 2320
2. 論文標題 Protocol for Morphological and Functional Phenotype Analysis of hiPS-Derived Cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol/ Pluripotent Stem-Cell Derived Cardiomyocytes	6. 最初と最後の頁 91-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1484-6_10	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 Honda Y, Li J, Hino A, Tsujimoto S, Lee JK	4. 巻 12
2. 論文標題 High-throughput drug screening system based on human induced pluripotent stem cell-derived atrial myocytes ~ A novel platform to detect cardiac toxicity for atrial arrhythmias	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 680618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.680618	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 Yuasa S, Yazawa M, Lee JK.	4. 巻 9
2. 論文標題 Editorial: Induced Pluripotent Stem Cell-Based Disease Modeling and Drug Discovery: Can We Recapitulate Cardiovascular Disease on a Culture Dish?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 831304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.831304	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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 李 鍾國
2. 発表標題 不整脈領域の心筋再生医療：iPS心筋を用いた創薬とバイオペースメーカー
3. 学会等名 第68回日本不整脈心電学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李鍾國
2. 発表標題 ヒトiPS心房筋を用いた創薬プラットフォームの構築
3. 学会等名 心電学関連春季大会2021 (招待講演)
4. 発表年 2021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
研究分担者	坂田 泰史 (Sakata Yasushi) (00397671)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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