

京都大学教育研究振興財団助成事業
成果報告書

2024年 3月 20日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会長 藤 洋 作 様

所属部局 iPS細胞研究所

職 名 特定研究員

氏 名 藤原 侑哉

助成の種類	令和5年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	アントラサイクリン系薬剤高感受性のiPS細胞由来心臓組織モデルの構築と 病態解明			
上記以外で助成金 を充当した 研究内容	なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)【文献報告】 Fujiwara, Y., et al. (2023). Stem Cell Reports 18(11): 2108-2122. 【学会報告】Y. Fujiwara, ISSCR2023 Annual Meeting June 2023, (Oral), Yuya Fujiwara, 第23回日本再生医療学会, March 2024, (Oral)			
成果の概要	別紙に記載			
会計報告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品費	952,040円	
		図書費	9,900円	
		郵便・宅配便料	960円	
国内旅費	37,100円			
当財団の助成に ついて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)			

成果の概要/藤原 侑哉

研究背景

ヒト由来 iPS 細胞から分化させた心筋細胞 (hiPSC-CMs) はこれまで困難であったヒト心筋細胞の *in vitro* での評価を可能とし、幅広く用いられている。

しかし、hiPSC-CMs を用いた 2 次元のプラットフォームでは 3 次元の複雑な構造や心筋細胞と非心筋細胞との相互作用などは再現できないことが問題となり、繊維化等の非心筋細胞を含めた高度な病態再現が困難であった。そのため、心筋細胞と非心筋細胞から構成される人工心臓組織 (ECT) は *in vitro* で複雑な心臓組織を模倣する platform であり、生体に近い *in vitro* の創薬基盤として期待されている。一方で、疾患モデルの再現性や、デバイスへの化合物の収着、組織としての未熟さに課題があった。本研究では、(1) 肥大型心筋症をモデルとし、遺伝性疾患の重症度を正確に再現するモデルを構築し、(2) 化合物の吸着を抑えたデバイスの開発を行い、(3) 生着因子に着目した ECT の成熟化法の開発を行なった。

(1) 肥大型心筋症モデルの開発

肥大型心筋症は心筋細胞の肥大をともなう心疾患であり、サルコメア構成遺伝子の変異が原因の一つであることがわかっているが、その詳細な発症メカニズムはわかっていない。そのため、ECT を用いた HCM モデルの構築とメカニズム解析が期待されている。一方で、ECT を用いた肥大型心筋症モデルは患者数の少ない重症度の高い変異による HCM モデルしか確立されておらず、患者数が多い非重症度の変異による HCM モデルは存在しない。また HCM 患者で見られる繊維化などの非心筋の病態変化までは模倣できていないことが課題であった。

肥大型心筋症はサルコメア構成遺伝子の変異により引き起こされる疾患であるため、サルコメアの成熟化を促すことで、これらの問題を解決できるのではないかと考えた。

これまで、申請者らは ERR gamma 作動薬 (T112) が hiPSC-CMs の成熟化を促すことを明らかにした。そのため、T112 を用いて ECT の成熟化法の確立を行なったところ、T112 は hiPSC-CMs のみならず ECT の成熟化を促すことが明らかになった。また、既存の成熟化法である伸張培養と併用することで、相加的にサルコメア構造の成熟化やミトコンドリア量の増加といった ECT の成熟度を促進することに成功した (図 1 A-C)。重症度の高い変異 (MYH7 R719Q) と非重症度の変異 (MYBPC3 G115*) をそれぞれ導入した iPS 細胞を作成し、ECT を作製したところ、成熟化により、MYH7 R719Q では筋原繊維の錯綜配列、細胞の肥大、過収縮、拡張障害、解糖系の更新、繊維化といった多様な表現系がされた。一方で MYBPC3 G115* では心筋細胞の肥大や拡張障害、繊維化といった限られた表現系のみが再現され、臨床上の重症度に相関した表現系の差が確認された (図 1 D)。また未熟な ECT では両変異による繊維化や MYH7 R719Q による筋原繊維の

錯綜配列、MYBPC3 G115* による細胞の肥大は確認されなかった。このことから、ECT の成熟化が疾患表現系の再現に重要な要素であり、T112 と伸張培養を組み合わせた成熟化法は非心筋細胞の変化も含めた臨床の重症度を再現する HCM モデルの構築に有用であることを明らかにした。本件研究は学会報告し、Best Poster presentation に選ばれた。また論文報告も行った (Fujiwara et al., *Stem Cell Reports* 2023)。

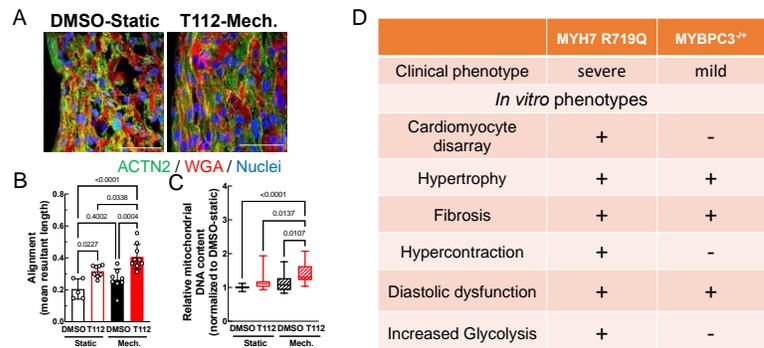


図1 肥大型心筋症モデルの開発

- コントロール (DMSO-static) と T112 と伸張培養 (T112+Mech.) の刺激を与えた ECT の切片画像
- T112 と伸張培養が相加的にサルコメア配列を向上させた
- T112 と伸張培養によりミトコンドリア量が増加した。
- 成熟化 ECT により再現された肥大型心筋症の表現系の要約

成果の概要/藤原 侑哉

(2) 化合物の吸着を抑えたデバイスの開発

PDMSは生体適合性の高さ、加工のしやすさ、可塑性といった特徴を有することから ECT や organ-on chip のデバイス作製によく用いられる素材である。一方で、化合物が PDMS に吸着することが欠点であり、これにより化合物評価を正確に評価できないことが ECT を創薬基盤として用いるための、解決すべき問題であった。

そこでシリコンゴム素材よりも化合物の低吸着性が期待できるプラスチック素材に着目し、化合物の吸着能力を評価したところ、PDMS と比べてポリスチレンフィルム (P.S. film) では Rhodamine B の吸着を抑えられることがわかった (図 2. A)。そのため、P.S. film を用いた ECT デバイスを作製した。またこれまでの収縮力測定は特殊な測定機材を必要とし、スループット性も低いことから、本デバイスでは心筋組織を固定する 2 本のピラーが収縮力に合わせて可逆的に動くことで、その移動距離から簡便に収縮力を測定することが可能とした (図 2. B)。本デバイスを用いて ECT を作製したところ、抗がん剤であるドキソルビシンの濃度に依存して心毒性による収縮力の低下が検出できたことから (図 2. C)、正確な化合物評価が可能となるとともに簡便に収縮力を測定ができるデバイスを開発することに成功し、特許出願した (特願 2023-064450)。

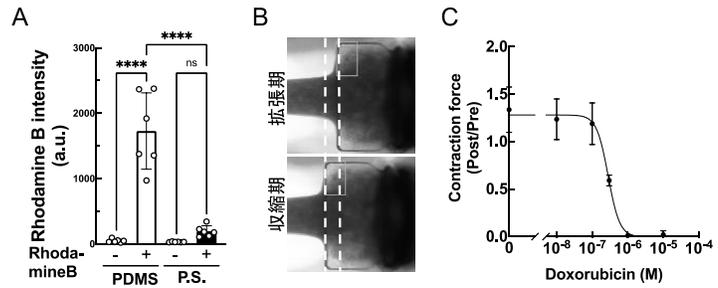


図2 化合物の吸着を抑えた収縮力測定デバイスの開発

A. PDMSと低吸着素材 (P.S. film) へのRhodamine Bの吸着量
B. 収縮によりデバイスが変形して移動(点線)している様子
C. 心毒性を引き起こすDoxorubicinの収縮力に対する容量反応曲線

(3) 生着因子に着目した ECT の成熟化法の開発

これまで、ECT の成熟化が疾患表現系を再現するのに重要であることを示してきた。一方で、ECT は生体の心臓組織と比較して細胞密度が低く、実際の生体を模倣した platform としては課題があった。

そのため、心筋細胞のみならず、心臓組織としての成熟化を促進するために、生着能力の高い細胞を作製することで、より組織化した ECT が作製できるのではないかと考え、生着分子の探索を行なった。生着能力を評価する細胞接着アッセイを構築し、生着能力の高い心筋作製法を明らかにするために、異なる分化方法である EB 法と monolayer 法で分化させた hiPSC-CMs の生着能力を評価したところ、EB 法で作製した hiPSC-CMs が高い生着能力を有することが明らかとなった。また RNA-seq により EB 法で分化した hiPSC-CMs で発現が高い接着分子を同定し、その過剰発現細胞及びノックダウン細胞を用いて接着能力を評価したところ、NCAM1 が hiPSC-CMs の生着能力を規定する分子の一つであることを明らかにした (図 3. A)。また NCAM1 を発現した ECT を作製したところ、サルコメアの配向性の向上が認められ、細胞の密度が増加した組織を作製することができたことから NCAM1 が ECT の組織成熟化を促す分子であることを明らかにした (図 3. B)。本成果は国際学会で発表し、Travel award と Merit abstract award を受賞した。

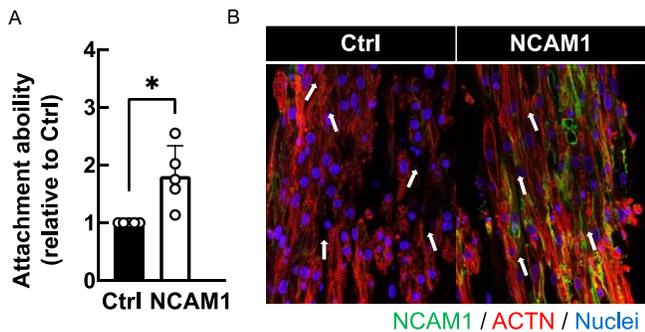


図3 生着因子による心筋細胞組織成熟化法の開発

A. NCAM1の過剰発現により接着作用が増加した。
B. NCAM1の過剰発現によりサルコメア配向性が向上した。(矢印)