

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業  
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) iPS細胞を用いたサブタイプ別心筋組織構築による心疾患研究  
(英語) Cardiac research using subtype-specific myocardial tissue derived from induced pluripotent stem cell

研究開発実施期間: 令和2年8月25日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 吉田 善紀  
(英語) Yoshinori Yoshida

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 京都大学 iPS細胞研究所増殖分化機構研究部門 准教授  
(英語) Department of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Associate Professor

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：2 ページ以上

本研究開発においてはサブタイプ特異的な iPS 細胞由来心筋細胞およびその組織を用いて心室筋の疾患(カテコラミン誘発性多形性心室頻拍と不整脈原性右室心筋症)、心房筋疾患(若年性心房細動)、洞結節疾患(洞不全症候群)を対象疾患として病態モデルの構築を行うことを目的として研究を行った。

サブタイプごとの心筋細胞の作製については、サブタイプごとの心筋選択的作製法および細胞選別法の確立を行い、心室筋細胞・心房筋細胞・洞結節細胞を選択的に作製する方法および、抗体を用いて心房筋と心室筋を選別する方法の開発を行った。

化合物による心筋細胞の成熟誘導法の開発のため TNNI1/TNNI3 レポーター iPS 細胞を用いて TNNI3 の発現を上昇させる化合物のスクリーニングを行い、ERR $\gamma$  賦活薬と SKP2 阻害薬が TNNI3 の発現を上昇させることを明らかにした。ERR $\gamma$  化合物の処理により活動電位波形における活動電位振幅や最大立ち上がり速度の上昇が認められた。またミトコンドリア機能評価において ATP 産生能の有意な増大が認められ、さらに電子顕微鏡

においてはサルコメア構造の成熟化と T 管構造の形成が認められるなど、心筋細胞の成熟が促進されていることが確認された (Miki et al. *Nat. Commun.* 2021、図 1)。さらに同成熟誘導法を用いて立体組織での組織レベルでの成熟誘導法の開発を行っている (Fujiwara et al. リバイス中)。

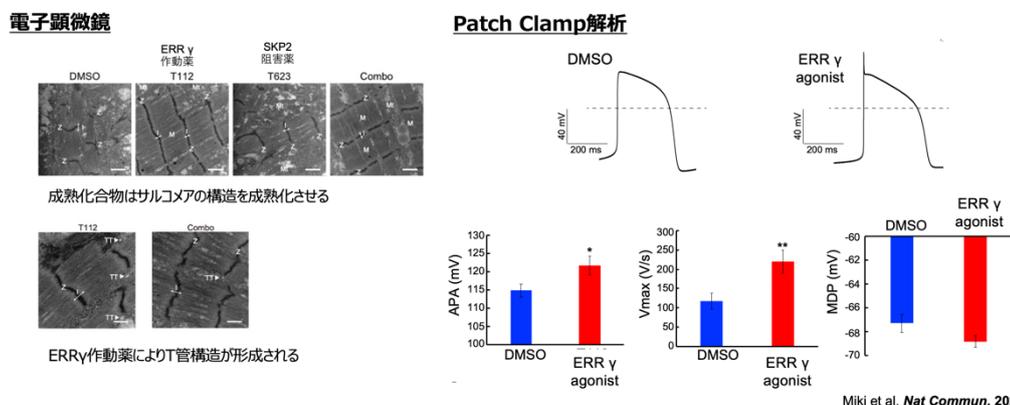


図1. 化合物処理による心筋細胞の成熟化

サルコメア構造成熟化・T管形成など微細構造レベルでの成熟化を確認した。またERR $\gamma$ 作動薬により電気生理学的特性・ミトコンドリア機能の活性化が認められた

心筋細胞を選別する方法として、細胞種により特定の miRNA の発現量が異なることを利用して miRNA 応答性合成 mRNA を用いて細胞を選別するシステムである miRNA-switch 法を報告したが (Miki et al. *Cell Stem Cell* 2015)、同方法はフローサイトメトリーセルソーティングで細胞を選別するため、大量の細胞を調整するためには不適であった。そこで、miRNA-switch 法と磁気ビーズを用いた MACS ソーティングを組み合わせることで大量の細胞を短時間で選別する技術の開発を行った。miRNA-switch 法で非心筋細胞においてのみ CD4 細胞外ドメインを出現させ、MACS により CD4 発現細胞のみを捕捉することにより心筋細胞を短時間でソートすることが可能となった。同技術により  $1 \times 10^8$  個の心筋細胞を 15 分程度の処理により選別純化することが可能となった。また miRNA-switch 法とサブタイプ特異的心筋細胞誘導法を組み合わせることにより心室筋・心房筋・洞結節細胞

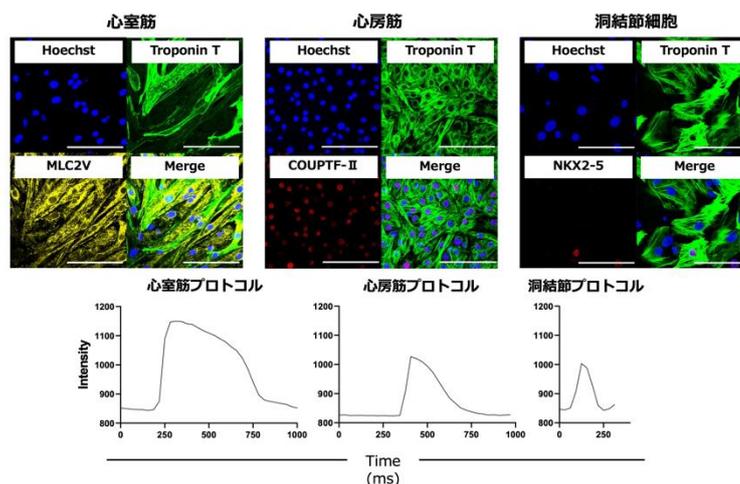


図2. 選択的分化誘導法とmiRNA-switch法を組み合わせることにより心室筋・心房筋・洞結節細胞を高純度で作製・精製することに成功

それぞれのサブタイプ心筋細胞のマーカー遺伝子の発現(上)と活動電位(下)を確認

をそれぞれ高純度で選別することが可能となった(Tsujisaka et al. *Stem Cell Reports* 2022、図2)

また心筋細胞のサブタイプ分化において重要な働きをする転写因子 HAND1, HAND2 のレポーターiPS細胞を用いて、心筋細胞の分化成熟過程における HAND1, HAND2 の発現ダイナミクスの解析を行い、HAND1/2 と LEF1 が相互に抑制しあい細胞増殖を制御していること、増殖活性の高い心室筋細胞は HAND1 陽性心筋細胞であり CD151 がそのマーカーとなることを明らかにした(Okubo et al. *Stem Cell Reports* 2021)。

また、心臓を構成している多くの非心筋細胞のソースとなる心外膜細胞の効率良い作製法を開発し、遺伝子発現プロファイリングから CDH18 が心外膜特異的なマーカー

となることを発見した。さらに CDH18 をノックダウンすることにより心外膜細胞は平滑筋細胞への分化を示し、CDH18 は心外膜細胞の維持・分化を制御していることが明らかになった(Junghof et al. *NPJ Regen Med* 2022、図3)。

また、心筋細胞、心外膜細胞、心臓線維芽細胞など多系統の細胞から構成される心臓オルガノイドを用いて、心筋組織の線維化を再現し、薬剤の効果を評価することが可能であることを明らかにした(Tian et al. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022)。

疾患研究についてはカルモジュリン2(CALM2)-E46K 変異を持つカテコラミン誘発性多形性心室頻拍患者由来 iPS 細胞を用いて病態モデルの構築を行った。カテコラミン誘発性多形性心室頻拍は筋小胞体から異常 Ca リークが生じ、早期/遅延後脱分極を生じ心室頻拍を引き起こす疾患であるが、CALM2-E46K 変異を有する iPS 細胞由来心筋細胞は高頻度に異常脱分極を示し、筋小胞体 Ca リークの上昇や Ca 貯蔵量の低下が認められた。E46K-CaM はリアノジン受容体への結合能が亢進していることを明らかにした。これらのことから、変異カルモジュリンがリアノジン受容体にドミナント機序で作用し、重度な催不整脈を生じることを示した(Gao et al. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2023、図5)。

同モデルは、疾患機序の解明だけでなく、薬効評価のモデルとしても有用であり、カルモジュリンノパチー症例に対する「個別化医療」に貢献できると考える。

催不整脈性右室心筋症については患者由来 iPS 細胞を用いて心臓オルガノイドを作製した。また RNA-seq

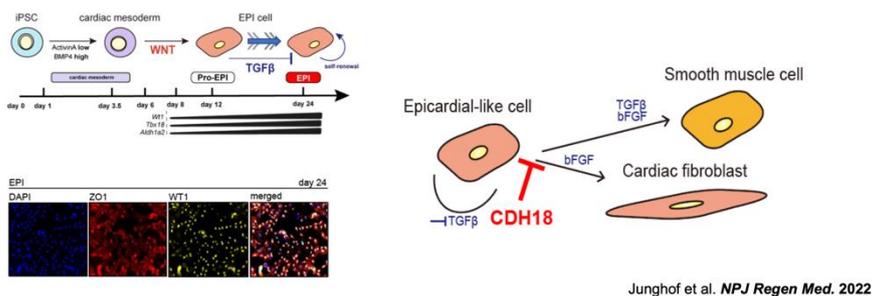


図3. iPS細胞からの心外膜細胞の作製と線維芽細胞・平滑筋細胞への分化  
安定して心外膜細胞を誘導するプロトコルを開発。CDH18が心外膜細胞の維持と線維芽細胞・平滑筋細胞への分化を制御している

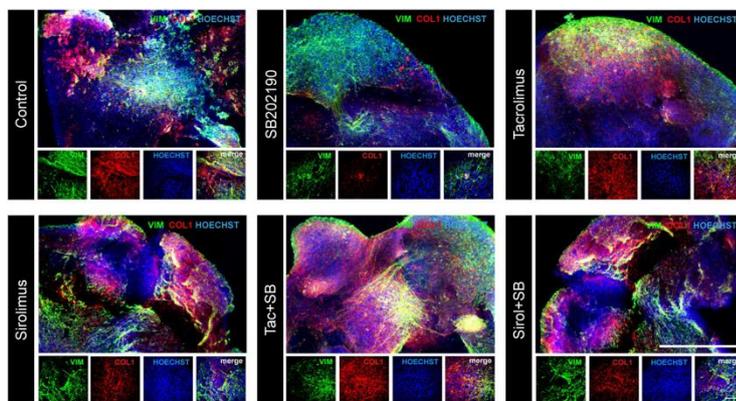
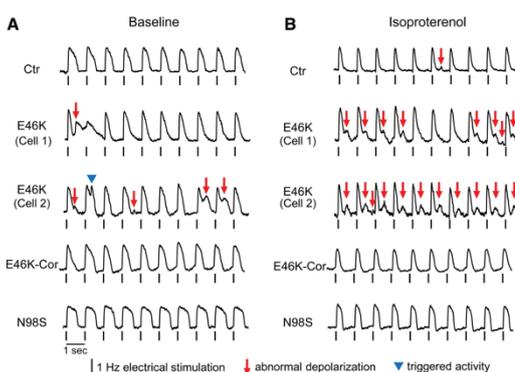
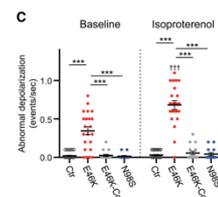


図4. 心臓オルガノイドによる薬剤応答を修飾している心筋細胞-間質細胞の相互作用のモデル化  
ヒト線維芽細胞単独の培養系ではSB202190とシロリムス単剤、シロリムス、タクロリムスとSB202190の併用で抗線維化作用が見られたが、心臓オルガノイドにおいてはSB202190単剤のみ抗線維化作用が確認された。心筋細胞-間質細胞の相互作用が薬剤応答を修飾していることを示唆している。

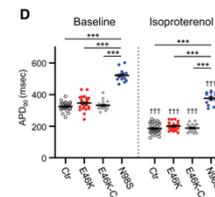
### 活動電位記録 (膜電位色素イメージング)



### Abnormal depolarizations



### AP duration



### 図5. CALM-関連CPVTモデル (CALM2-E46K)

E46K iPS分化心筋細胞は、高頻度に異常脱分極を示した。

による網羅的遺伝子発現解析を行い、ARVCにおける遺伝子発現プロファイルを解析し、催不整脈性右室心筋症の心筋組織の変化を制御するシグナルを同定した。

また心房筋については前述のように高効率で選択的に心房筋細胞を誘導する方法を用いて心房細動モデルの構築を行った。特定のシグナルの刺激により高効率で成熟心房筋細胞を誘導する方法を開発した (Koakutsu et al. リバイス中)。同方法により作製した心房筋細胞を用いて、興奮が旋回する心房細動モデルの構築を行った。

洞結節についても高効率で洞結節細胞を作製する方法を確立した。洞不全症候群の家系の解析を実施し、同家系における洞不全病態の発症に関わるメカニズムの解析を実施している。

英文

In this study, we used subtype-specific cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) and their tissues to construct pathological models for ventricular muscle diseases such as catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, atrial muscle diseases including juvenile atrial fibrillation, and sinus node diseases such as sick sinus syndrome.

To produce cardiomyocytes of each subtype, we established methods for selective production and cell sorting of each cardiac subtype. We developed methods for the selective production of ventricular, atrial, and sinus node myocytes and for sorting atrial and ventricular myocytes using antibodies.

To develop a method for inducing cardiomyocyte maturation using compounds, we screened compounds that upregulate TNNI3 expression. We used TNNI1/TNNI3 reporter iPSCs and found that ERR $\gamma$  activators and SKP2 inhibitors upregulate TNNI3 expression. Using these compounds, we developed a method to induce the maturation of cardiomyocytes using ERR $\gamma$  agonists (Miki et al. *Nat. Commun.* 2021). Furthermore, we are developing a method to induce maturation at the tissue level in three-dimensional tissues using the same maturation induction method (Fujiwara et al. under revision).

As a method for sorting cardiomyocytes, we previously reported the miRNA-switch method, which is a system for sorting cells using miRNA-responsive synthetic mRNAs based on the different expression levels of specific miRNAs in different cell types (Miki et al. *Cell Stem Cell* 2015). However, this method utilizes flow cytometry cell sorting, which is unsuitable for preparing large numbers of cells. Therefore, we developed a technique to quickly sort large numbers of cells by combining the miRNA-switch method with MACS sorting. Using this technology, it is possible to sort and purify  $1 \times 10^8$  cardiomyocytes in approximately 15 minutes. The combination of the miRNA-switch method and the subtype-specific cardiomyocyte induction method enables the sorting of ventricular, atrial, and sinus node myocytes with high purity, respectively (Tsujisaka et al. *Stem Cell Reports* 2022).

Using HAND1/HAND2 reporter iPSCs, we discovered a mutual repression between HAND1/2 and LEF1, which regulates cell proliferation. We also found that HAND1-positive myocytes exhibit high proliferative activity, and CD151 is a marker for these myocytes (Okubo et al., *Stem Cell Reports* 2021).

Additionally, we developed an efficient method for generating epicardial cells responsible for giving rise to various types of non-cardiomyocytes in the heart. Through gene expression profiling, we identified CDH18 as an epicardial-specific marker. Knockdown of CDH18 led to the differentiation of epicardial cells into smooth muscle cells, demonstrating its role in regulating epicardial cell maintenance and differentiation (Junghof et al. *NPJ Regen Med* 2022). Furthermore, we demonstrated the potential of cardiac organoids, consisting of multiple lineages, including cardiomyocytes, epicardial cells, and cardiac fibroblasts, for modeling cardiac tissue fibrosis and evaluating drug effects (Tian et al. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022).

A pathological model was created using iPS cells derived from a patient with catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia harboring the CALM2-E46K mutation. This disease leads to abnormal calcium leakage from the sarcoplasmic reticulum, resulting in early/delayed afterdepolarization and ventricular tachycardia. iPS cell-derived cardiomyocytes with the CALM2-E46K mutation frequently exhibit abnormal depolarization, increased sarcoplasmic reticulum calcium leak, and decreased calcium stores. The E46K-CaM mutation enhances the binding capacity to ryanodine receptors, suggesting that mutant calmodulin exerts a dominant effect on ryanodine receptors, leading to severe arrhythmias (Gao et al. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2023). This model helps elucidate disease mechanisms and enables the evaluation of drug efficacy, potentially contributing to personalized medicine for patients with calmodulinopathies. For arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, we generated cardiac organoids using patient-derived iPSCs. Additionally, we conducted comprehensive gene expression analysis through RNA-seq to examine gene expression profiles in ARVC, identifying signaling pathways involved in myocardial tissue changes in patients with this condition.

In the case of atrial muscle, we established a model for atrial fibrillation using a highly efficient and selective method of inducing atrial myocytes, as described earlier. We developed a stimulation-based method to achieve high-efficiency maturation of atrial myocytes. With atrial myocytes produced using this method, we constructed an atrial fibrillation model that exhibits excitation swings.

Furthermore, we established a highly efficient method for producing sinus nodal cells. Currently, we are analyzing the lineage of the sinus node syndrome in a specific family and investigating the underlying mechanisms contributing to the pathogenesis of sinus node pathology within this family.