

日本医療研究開発機構  
再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム  
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 細胞外代謝環境スクリーニング系による高機能化オルガノイドの作製とその応用  
(英語) Production of Highly Functional Organoids via Metabolism-Based Screening System for Regenerative Therapy and Drug Discovery

研究開発実施期間: 令和 4 年 7 月 25 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 遠山 周吾  
(英語) Shugo Tohyama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 藤田医科大学 医学部臨床再生医学講座 教授  
(英語) Department of Clinical Regenerative Medicine, Professor

## II 研究開発の概要

(日本語)

ヒト iPS 細胞由来の分化心筋細胞は胎児型の特徴を有している。その結果、再生医療においては催不整脈作用に、創薬研究においては表現型のばらつきに繋がる。培養環境は細胞の成熟化において重要な役割を担っているが、これまで培養環境のスクリーニング系が確立されておらず、至適条件の探索が困難であった。また、心臓オルガノイドを効率よく作製する手法が確立されていなかった。さらに、他領域においても同様の課題が存在している。上述の課題を克服するため、本研究では、多種類培養液を用いたスクリーニング系の構築（研究開発項目 1）、成熟ヒト心臓オルガノイドの作製と応用（研究開発項目 2）、さまざまな細胞への応用（研究開発項目 3）の 3 つの研究開発項目に対して研究を実施した。

研究開発項目 1 では、約 250 種類の培養液ライブラリの構築し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞への暴露を行い、多検体 RNA-seq を実施した。また、成熟したヒト iPS 細胞由来心筋細胞を作製するために長期培養し、トランスクリプトームの変化を経時的に解析した。その結果、従来の成熟評価マーカーでは成熟度評価には不十分であり、総合的に成熟度を評価するための手法を構築した（論文投稿準備中）。さらに、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を免疫不全マウスの心臓に移植し、成熟した心筋グラフト（*iScience* 2024 に報告）においても、上述の成熟評価法が適応可能かを検証したところ、in vivo における成熟度変化も評価できることが

わかった。また、本成熟評価法を用いることで、成熟促進培養条件候補を同定した (unpublished)。また、セリン合成阻害剤により、心筋分化誘導効率が安定化することを見出し、その分子機序を明らかにした (*iScience* 2025 に報告)。さらに、培養上清中の miRNA を評価することで、細胞の成熟度を評価する手法を開発することに成功した (*Stem Cell Reports* 2024 に報告)。

研究開発項目 2 では、ブタ由来のコラーゲンを用いて成熟したヒト iPS 細胞由来の心筋組織を作製することに成功し、そのメカニズムを明らかにした (*Biomaterials* 2023 に報告)。また、心房筋と心室筋を作り分け、多孔質のプレートに順に吸引させることで、真球度の高い均質な心臓オルガノイドを効率よく作製する手法を開発し、薬剤応答性を評価した (*Cell Reports Methods* 2023, *STAR Protocols* 2025 に報告)。さらに、ファイバー状心筋組織を作製し、電気刺激を加えることで成熟した心筋組織を作製することに成功した (*Advanced Science* 2023, *Adv Healthc Mater* 2024 に報告)。心筋オルガノイドを移植し、in vivo 環境でサルコメア構造だけでなく、イオンチャネルや T 管、代謝が成熟型にシフトすることを確認した (*iScience* 2024 に報告)。

研究開発項目 3 では、非心筋細胞としてヒト間葉系幹細胞を用いて、培養環境スクリーニングを実施した。培養上清中の分泌タンパクの解析により、高機能化培養条件を同定した (unpublished)。

今後は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化方法、増殖方法、成熟化評価方法、ヒト間葉系間質 (幹) 細胞の高機能化方法に関する成果を報告し、さらに多種類培養液を用いたスクリーニング系を用いたプロジェクトを進展させていくことを考えている。

(英語)

## Summary

Human iPSC-derived differentiated cardiomyocytes show fetal-type characteristics, which results in proarrhythmic effects in regenerative medicine and phenotypic variability in drug discovery research. The culture environment plays an important role in the maturation of the differentiated cells, including cardiomyocytes. However, screening systems for culture environments have not been established, leading to difficulty in finding the optimal culture conditions. In addition, a method for efficiently producing cardiac organoids has not been established. Furthermore, similar issues exist in other areas. To overcome the issues, three R&D items were conducted in this study.

In R&D item 1, an extracellular metabolic environment screening system was established. In addition, large-scale multi-sample RNA-seq analysis was performed, and an optimal culture environment that promotes maturation in human iPSC-derived cardiomyocytes was identified based on the large-scale multi-sample RNA-seq analysis data. In R&D item 2, we generated mature cardiac organoids derived from human iPSCs and elucidated the maturation mechanism. In R&D item 3, we screened extracellular metabolic environments using human mesenchymal stem cells as non-cardiomyocytes and identified conditions for functional enhancement.

## Highlights

- A metabolism-based screening system using multiple types of culture media was established.
- Large-scale multi-sample RNA-seq analysis was performed during the maturation process of human iPSC-derived cardiomyocytes.
- A multifaceted method for evaluating cardiomyocyte maturation was developed.
- Culture conditions that promote maturation or juvenilization of cardiomyocytes were identified.
- Mature cardiac tissues from human iPSCs were produced using pig heart collagen.

- The culture conditions that enhance the functionality of human mesenchymal stem cells were identified.

## Publications

1. Umei T, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, et al.  
Serine synthesis pathway regulates cardiac differentiation from human pluripotent stem cells  
*iScience* in press
2. Moriwaki T, Tani H, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**.  
Protocol for production of homogeneous iPSC spheroids and microtissues using the suction technique.  
*STAR Protocols* 2025;6(2):103891-103891
3. Soma Y, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, et al.  
Metabolic changes of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and teratomas after transplantation.  
*iScience* 2024;27(11):111234-111234
4. Masuda A, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, et al.  
Maturation of Human iPSC-Derived Cardiac Microfiber with Electrical Stimulation Device.  
*Advanced Healthcare Materials* 2024:e2303477.
5. Soma Y, **Tohyama S\*(\*Corresponding)** et al.  
Pluripotent stem cell-based cardiac regenerative therapy for heart failure.  
*J Mol Cell Cardiol* 2024;187:90-100.
6. Moriwaki T, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, et al.  
Scalable production of homogeneous cardiac organoids derived from human pluripotent stem cells.  
*Cell Reports Methods* 2023;3:100666.
7. Sekine O, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, et al.  
Seamless and Non-Destructive Monitoring of Extracellular MicroRNAs during Cardiac Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells  
*Stem Cell Reports*. 2023;18(10):1925-1939.
8. Tani H, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, et al.  
Heart-derived collagen promotes maturation of engineered heart tissue.  
*Biomaterials*. 2023;299:122174-122174.
9. Umei T, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, et al.  
Metabolism-based cardiomyocytes production for regenerative therapy.  
*J Mol Cell Cardiol*. 2023;176:11-20.