

2023年6月20日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

心臓から抽出したコラーゲンを用いて試験管内でヒト人工心筋組織を作製 —創薬や疾患モデル作製に有用な成熟した人工心筋組織が利用可能に—

慶應義塾大学医学部内科学教室（循環器）の遠山周吾専任講師および小林英司客員教授、医学部・医学研究科心臓病未来治療学共同研究講座の谷英典特任助教らの研究グループは、株式会社ニッピとの共同研究により、ブタの心臓から抽出したコラーゲンを用いることにより、成熟したヒト人工心筋組織を作製することに成功しました。

ヒト人工多能性幹（iPS）細胞（注1）は、理論的に体を構成する全ての細胞種へと分化できる多能性を持つことから心筋細胞への分化が可能です。そのため、従来リソースが限られる心筋細胞を大量に作製したり、遺伝性などの患者の特性を有する心筋細胞を培養皿上で作製したりすることで疾患の研究や創薬研究に応用することが期待されています。しかし、培養皿上で作製したヒト iPS 細胞由来の心筋細胞は胎児期相当の未熟な細胞であり、こうした研究に用いる上での細胞の成熟化の再現性が不十分であることは大きな課題になっています。

今回、共同研究グループは、細胞外基質（注2）の中でも最も重要な構成成分である線維性コラーゲンの臓器ごとの違いに着目しました。その結果、ヒト人工心筋組織を作製するにあたってブタの6臓器から抽出した各コラーゲン（心臓、脾臓、腎臓、肝臓、肺、皮膚）を添加した場合に、心臓コラーゲンを用いたヒト人工心筋組織が最も形状が安定し、構造的にも機能的にも成熟化が進むことを確認しました。その違いが生まれる原因としてコラーゲンの組成の違いがあり、I型以外に、III型及びV型コラーゲンの含有率が高いことが、常に収縮弛緩を継続するヒト心筋組織の形状の維持にも組織の成熟化にも重要であることを見出しました。この研究成果は、今後創薬や疾患モデルの研究においてより有用な成果を生むことが期待できるとともに、臓器特異的な細胞外基質がその臓器を構成する細胞の成熟に関わるという新たな知見を生み出したものと考えます。

本研究成果は2023年5月29日（米国東部時間）に、国際学術誌 *Biomaterials* に掲載されました。

1. 研究の背景

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は複数種のイオンチャンネル（注3）を発現するため、従来の動物細胞を用いた前臨床試験では十分に心毒性（心臓に悪影響を及ぼす毒性）評価ができずに偽陽性になっていた薬物についても正確に評価できる可能性を秘めています。また、ヒトの生体内の心筋細胞を生検などで採取してくる必要がなく心筋細胞の利用が可能となることから、創薬や疾患解明への応用が大きく期待されています。一方、既存の二次元培養系におけるヒト iPS 細胞由来心筋細胞には依然として非心筋細胞や異なるタイプの心筋細胞の混入、ロット間のばらつき、胎児期相当の未熟な細胞であるといった課題が残っています。本研究グループはこうした課題を克服すべく、Engineered Heart Tissue（EHT）という三次元に配列化した人工心筋組織作製法に、独自の大量心筋作製法や臓器由来の細胞外基質を

組み合わせることで、成熟度の高いヒト iPS 細胞由来人工心筋組織を作製し、新たな創薬研究での活用や、心毒性評価ツールの確立を目的としました。組織作製においては細胞外基質が組織の成熟化を促進することが報告されていますが、その機序は明らかではなく、適正な細胞外基質の添加条件は未だ明らかではありません。本研究グループはこれまでに臓器特異的線維芽細胞が存在し、それが分泌する臓器特異的細胞外基質が組織前駆細胞の分化・成熟を促し臓器発生に関わるという仮説を立て（図 1）、本研究において細胞外基質の中でも最も重要な構成成分である線維性コラーゲンに着目し、ブタの臓器由来のコラーゲンを用いて、比較検討を行いました。その結果、既存の報告よりも成熟度の高いヒト人工心筋組織作製法を開発するとともに、細胞外基質としてのコラーゲンの重要性、心臓由来コラーゲンの特異性を示しました。

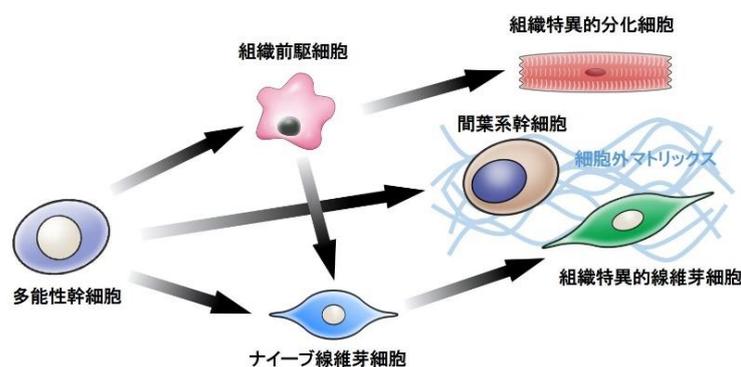


図 1

臓器、組織特異的なコラーゲン、線維芽細胞の概要図を記載しました。

2. 研究の成果

(1) 心臓由来コラーゲンを用いたヒト人工心筋組織は安定した組織の形状維持と強い収縮力を示した人工心筋組織は 2 つのピラー間で収縮弛緩する微小な心臓の組織であり、シリコンモールド内でヒト iPS 細胞由来心筋細胞とマトリゲル、フィブリノゲン、トロンビン、コラーゲン等の細胞外基質を混和培養して作製します（図 2 A）。この実験系ではライブセルイメージングシステムにより人工心筋組織の収縮力を測定することができます。一般的に、臓器再生に用いるコラーゲンは、皮膚由来のものや、純化した I 型コラーゲンが用いられますが、本研究グループは本研究でブタの様々な臓器（心臓、腎臓、脾臓、肝臓、肺、皮膚）からコラーゲンを抽出し、これらを組み合わせたものを用い 3 次元心筋組織化の適正条件を検討しました。その結果、心臓由来のコラーゲンを用いたヒト心筋組織が他臓器のコラーゲンを用いた場合よりも組織の形状は長期間維持されることがわかりました（図 2 B）。また、経時的に収縮力を比較したところ、心臓由来コラーゲンを用いたヒト心筋組織は他臓器由来コラーゲンを用いたヒト心筋組織より強い収縮力を示しました。

こうしたコラーゲンの違いの機序に迫るべくコラーゲンの線維形成能を比較したところ、心臓、腎臓、脾臓のコラーゲンは肝臓、肺、皮膚のコラーゲンと比較して線維形成アッセイで濁度が低く、細い線維を形成していることがわかりました（注 4）。さらにこのような違いが生まれる原因としてはコラーゲンの組成の違いが重要であることがわかり、心臓、特にその中でも左心室に含まれるコラーゲンは他臓器と比較して明らかに III 型、V 型コラーゲンの比率が（I 型コラーゲンと比較して）多いことがわかりました（図 2 C）。

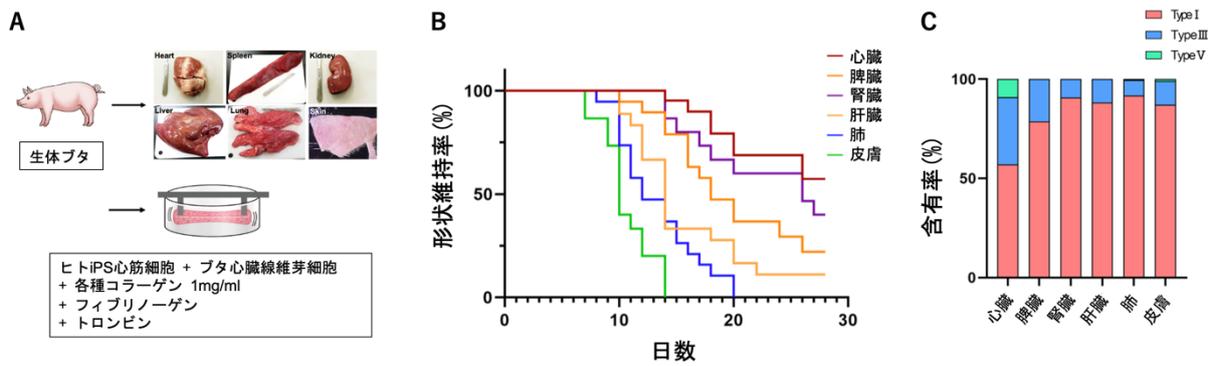


図 2

- A. 人工心筋組織作製の概要図を記載しました。
- B. 臓器別コラーゲンの違いによる人工心筋組織の形状維持率の経時的な違いを確認しました。
- C. 線維性コラーゲン（I型、III型、V型コラーゲン）の比率の臓器ごとの違いを確認しました。心臓が最も多くのIII型、V型コラーゲンを含有しています。

(2) 心臓由来コラーゲンは皮膚由来コラーゲンより構造的、機能的に成熟化を促進した次に、コラーゲンの組成分布や今回の線維形成能が離れており、一般に最も再生医療の場で用いられることが多い皮膚由来コラーゲンと心臓由来コラーゲンをを用いたヒト心筋組織の成熟度の評価をコラーゲンを含まない非含有のヒト心筋組織と比較して行いました。まずはqRT-PCR（注5）の遺伝子解析において、心臓由来コラーゲンをを用いたヒト心筋組織（心臓コラーゲン心筋組織）では心筋関連やチャネル関連などの成熟に関連する遺伝子の発現が上昇することを確認しました（図3A）。さらに網羅的遺伝子発現解析では、こうした成熟化の促進が機械的刺激に伴う経路や各種イオンチャネル関連、心臓発達に関わる経路の変化も伴っていることがわかりました。

また、電子顕微鏡で心筋筋節の構造を比較すると、心臓コラーゲン心筋組織でははっきりとしたZ線、A帯、I帯、H帯の形成を伴う横紋構造の成熟化を認め、細かい筋原線維のレベルで成熟が促されていることがわかりました（図3B）。フラックスアナライザー（注6）を用いた細胞代謝機能解析では、心臓コラーゲン心筋組織においてミトコンドリア呼吸機能が高いことがわかりました。こうした結果から心臓由来コラーゲンは皮膚由来コラーゲンよりも構造的、機能的に成熟化を促進することが示唆されました。

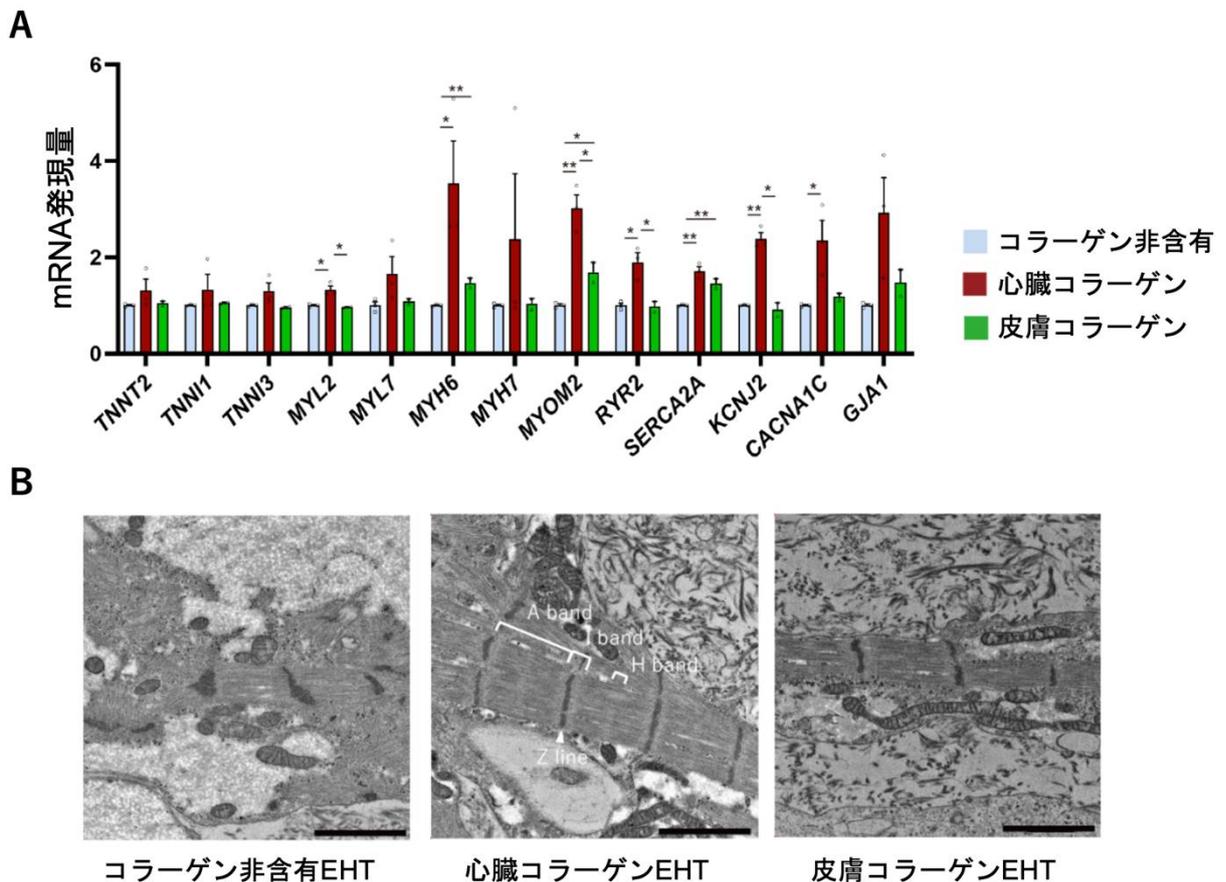


図 3

A. qRT-PCR で心臓コラーゲン心筋組織、皮膚コラーゲン心筋組織、コラーゲンを含まない心筋組織（コラーゲン非含有心筋組織）における心筋関連、チャネル関連の遺伝子発現の比較を行いました。心臓コラーゲン心筋組織でこれらの成熟に関連する遺伝子の発現が上昇することを確認しています。

B. 電子顕微鏡を用いて、心臓コラーゲン心筋組織、皮膚コラーゲン心筋組織、コラーゲン非含有心筋組織のサルコメア構造を比較しました。心臓コラーゲン心筋組織でははっきりとしたZ線、A帯、I帯、H帯などの形成を伴う横紋構造の成熟化を認めています。

(3) 組織の成熟化にはコラーゲン型の含有比率が重要であることを示した

さらに、コラーゲン型の違いに着目し心臓から抽出したコラーゲン全体を用いたヒト心筋組織を、純化した型別のコラーゲン（I型、III型、V型コラーゲン）のみを用いたヒト心筋組織と比較検討しました。収縮、拡張の計測では、収縮能を示唆する収縮距離がI型コラーゲンをを用いたヒト心筋組織で大きくなり、拡張能を示唆する拡張時間/収縮時間の比率がIII型コラーゲンをを用いたヒト心筋組織で小さくなることがわかりました（一般的に拡張時間/収縮時間の比率は小さいほど拡張能が良い）（図4A）。一方でqRT-PCRにおいて遺伝子発現を比較すると型別のコラーゲンをを用いたヒト心筋組織よりもコラーゲン全体を用いたヒト心筋組織での成熟が良い傾向が示されました（図4B）。これらの結果から、収縮に強いI型コラーゲンと拡張に強いIII型コラーゲンのバランスが成熟化には重要であることが示唆されました。

最後に、皮膚由来のI型、III型コラーゲンをを用いたヒト心筋組織と、これらを混ぜ合わせたヒト心筋組織、さらに心臓由来のIII型、V型コラーゲンを添加したコラーゲンをを用いたヒト心

筋組織とで遺伝子発現の比較を行いました。その結果、皮膚のコラーゲンにおいてもコラーゲン組成を調整して心臓コラーゲンの比率に合わせてI型コラーゲンとIII型コラーゲンを添加することで成熟化が促進されることが確認できました（図4C）。心臓由来のIII型、V型コラーゲンの添加も成熟化を促進しました。一方で、コラーゲン比率を揃えても皮膚コラーゲンは心臓コラーゲンに及ばないことから、臓器ごとの特性も何らかの重要な役割を持つことが示唆されました。

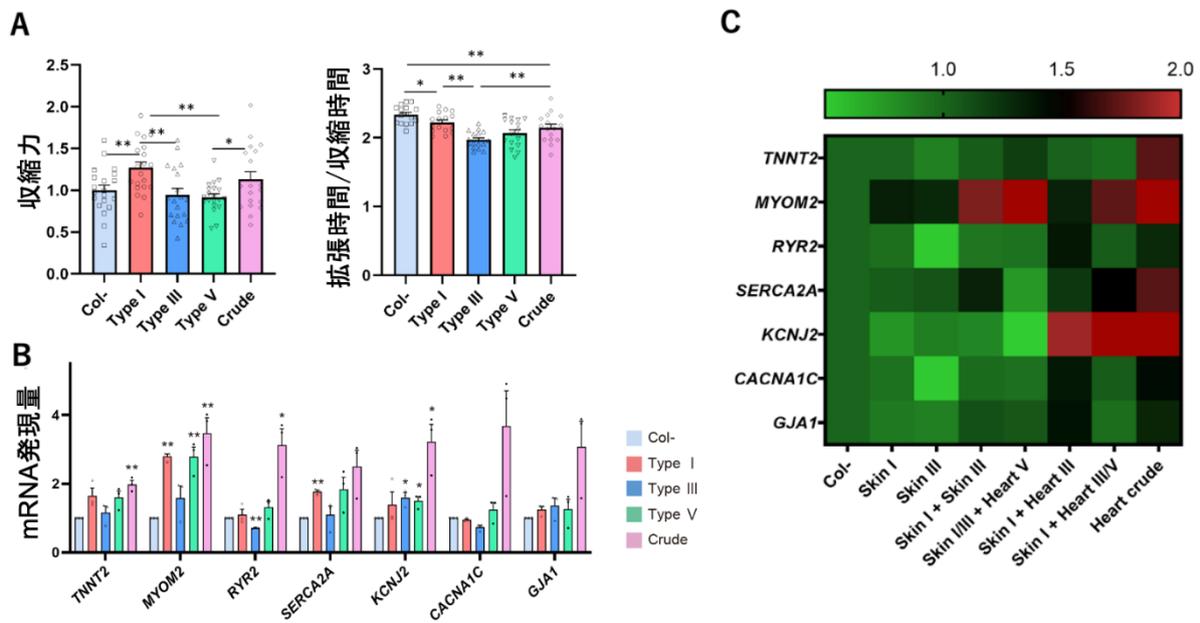


図4

- A. コラーゲン非含有ヒト心筋組織 (col-)、I型、III型、V型コラーゲンを用いたヒト心筋組織、心臓コラーゲン全体 (crude) を用いたヒト心筋組織において収縮力、拡張時間/収縮時間を測定しました。
- B. qRT-PCR でコラーゲン非含有ヒト心筋組織、I型、III型、V型コラーゲンを用いたヒト心筋組織、心臓コラーゲン全体を用いたヒト心筋組織において成熟に関連する遺伝子発現の比較を行いました。
- C. qRT-PCR でコラーゲン非含有ヒト心筋組織 (col-)、皮膚I型、皮膚III型コラーゲンを用いたヒト心筋組織、皮膚I型、皮膚III型コラーゲンを添加したヒト心筋組織、そこに心臓III型、V型コラーゲンを加えたヒト心筋組織、心臓コラーゲン全体 (crude) を用いたヒト心筋組織において成熟に関連する遺伝子発現の比較を行い、ヒートマップに表記しました。

3. 今後の展開

本研究の成果により、ブタ心臓から抽出したコラーゲンの添加がヒト人工心筋組織の構造的、機能的な成熟化を促進することが明らかになりました。さらにはこうした成熟化の機序にはコラーゲンの線維としての特性や、コラーゲン型の含有比率が重要な役割を持つことが明らかになりました。また今回の発見は、これまで開発してきた他の成熟化の手法や薬物添加との併用も可能であり、成熟化したヒト iPS 細胞由来心筋組織として創薬や疾患モデルの研究に応用されることが期待されます。さらに、こうした組織・臓器の分化・成熟に関する知見は、今後他臓器の分化・成熟誘導、臓器作製研究への応用も期待されます。

4. 特記事項

本研究は、主に下記機関より資金的支援を受け実施されました。
国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）再生医療実現拠点ネットワークプログラム「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」
神奈川県立産業技術総合研究所（KISTEC） 戦略的研究シーズ育成事業「徐脈性不整脈の革新的細胞移植治療開発」
日本学術振興会科研費（JP20H03768, JP20H05744, JP19H03660）
日本心臓財団研究奨励（助成者：谷英典）

5. 論文

英文タイトル：Heart-derived collagen promotes maturation of engineered heart tissue

タイトル和訳：心臓由来のコラーゲンが人工心臓組織の成熟を促す

著者名：谷 英典、小林 英司、八木 志乃海、田中 啓友、亀田/芳賀 康太郎、芝田 晋介、
盛一 伸子、高綱 馨、森脇 大順、関根 乙矢、梅井 智彦、森田 唯加、相馬 雄輔
岸野 喜一、金澤 英明、藤田 淳、服部 俊治、福田 恵一、遠山 周吾

掲載誌： *Biomaterials*, 2023 (e-pub online)

DOI： 10.1016/j.biomaterials.2023.122174

【用語解説】

- (注1) ヒト人工多能性幹細胞（ヒトiPS細胞：human induced pluripotent stem cell）：
体細胞に特定因子を導入することにより樹立される、胚性幹細胞（ES細胞）に類似した多能性幹細胞。多能性を持つことから心筋細胞への分化が可能であり、リソースが限られる心筋細胞を大量に作製して創薬研究に応用したり、遺伝性などの患者の特性を有する心筋細胞を培養皿上で作製することで疾患の研究に応用することが期待される。
- (注2) 細胞外基質：生体において細胞以外に存在する不溶性の高分子の構造体である。組織の支持体となるだけでなく、細胞外環境の情報を伝えることで細胞の増殖や分化を制御する。コラーゲンは代表的な細胞外基質の一つで、全身の臓器に存在する。
- (注3) イオンチャネル：細胞膜に存在するナトリウム (Na) やカリウム (K)、カルシウム (Ca) 等の特定のイオンを通すタンパク質。
- (注4) 線維形成アッセイ：生理条件下に加温することで、フリーのコラーゲンが核を形成して分子間の架橋を作り線維を形成する様子を比較する。一般的に核形成にかかる時間が短いコラーゲンでは多くの核が形成され、その結果、細い線維となり、濁度も小さくなる。
- (注5) qRT-PCR：リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して核酸の定量を行う方法であり、遺伝子特異的な転写産物の存在量を測定することによって、様々な遺伝子の発現の増減を定量化することが可能になる。
- (注6) フラックスアナライザー：細胞の主要なエネルギー代謝経路である解糖系やミトコンドリアによる好気呼吸の状態を、細胞に対して無侵襲に経時的に解析する手法である。心筋組織の成熟と細胞内小器官であるミトコンドリアの機能成熟は密接に関係していることが知られている。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部内科学教室（循環器） 専任講師

遠山 周吾 （とおやま しゅうご）

TEL:03-5363-3446 FAX 03-5356-3875

E-mail: shugotohyama@keio.jp

【本リリースの配信元】

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課：山崎・飯塚・奈良

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL : 03-5363-3611 FAX : 03-5363-3612 E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp

<https://www.med.keio.ac.jp>