

Title	ヒトiPS細胞由来心臓オルガノイドの構築と移植法の開発
Sub Title	Development of generation and transplantation methods for human iPS cell-derived cardiac organoids
Author	山崎, 真敬(Yamazaki, Masataka) 福田, 恵一(Fukuda, Keiichi) 高橋, 辰郎(Takahashi, Tatsuo) 志水, 秀行(Shimizu, Hideyuki) 湯浅, 慎介(Yuasa, Shinsuke) 遠山, 周吾(Tohyama, Shugo)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	現在、重症慢性心不全の根治療法は心臓移植のみであり、代替治療として心筋細胞移植などの再生医療が注目されている。 iPS細胞の出現により再生心筋細胞の細胞源は確保され、残されている最も大きな課題は最適な細胞移植法の開発である。心臓への長期の生着と機能の回復を実現するためには、ヒト心臓に近い微小心臓組織を構築し移植する必要がある。 我々は、新たに開発したパターンニングプレートを用いることにより、サイズの均一性があり、心臓を構成する多くの細胞種を含む微小心臓組織を高効率に作製することに成功した。またマウス心臓への移植実験を行い、心筋細胞のみで作成した心筋球と比較して生着に差がないことを確認した。 Currently, heart transplantation is the only curative treatment for severe chronic heart failure, and regenerative therapies such as cardiomyocyte transplantation are gaining attention as alternative treatments. With the advent of iPS cells, a reliable source of regenerative cardiomyocytes has been secured, and the most significant remaining challenge is the development of an optimal cell transplantation method.To achieve long-term engraftment and functional recovery in the heart, it is necessary to construct and transplant microcardiac tissues that closely resemble the human heart. We have successfully established a highly efficient method for generating microcardiac tissues with uniform size and composed of multiple cardiac cell types using a newly developed patterning plate.Furthermore, transplantation experiments into mouse hearts demonstrated no significant difference in engraftment compared to cardiomyocyte spheres composed solely of cardiomyocytes.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2022～2024 課題番号：22K08925 研究分野：Regenerative medicine
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K08925seika

令和 7 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K08925

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来心臓オルガノイドの構築と移植法の開発

研究課題名（英文）Development of Generation and Transplantation Methods for Human iPS Cell-Derived Cardiac Organoids

研究代表者

山崎 真敬 (YAMAZAKI, Masataka)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：40338075

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：現在、重症慢性心不全の根治療法は心臓移植のみであり、代替治療として心筋細胞移植などの再生医療が注目されている。

iPS細胞の出現により再生心筋細胞の細胞源は確保され、残されている最も大きな課題は最適な細胞移植法の開発である。心臓への長期の生着と機能の回復を実現するためには、ヒト心臓に近い微小心臓組織を構築し移植する必要がある。

我々は、新たに開発したパターンニングプレートを用いることにより、サイズの均一性があり、心臓を構成する多くの細胞種を含む微小心臓組織を高効率に作製することに成功した。またマウス心臓への移植実験を行い、心筋細胞のみで作成した心筋球と比較して生着に差がないことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の作成した微小心臓組織（オルガノイド）は心臓の構成細胞のうち多数を含んでおり、心臓の特徴をより再現していると考えられ、心臓への移植のみでなく、薬物動態や創薬、先天性心疾患の原因解明の研究の分野での活用が期待できる。

また、このようなオルガノイド技術が普及すれば、動物実験の代替手段として利用することで、犠牲となる動物の数を減らすことも期待できる。

研究成果の概要（英文）：Currently, heart transplantation is the only curative treatment for severe chronic heart failure, and regenerative therapies such as cardiomyocyte transplantation are gaining attention as alternative treatments.

With the advent of iPS cells, a reliable source of regenerative cardiomyocytes has been secured, and the most significant remaining challenge is the development of an optimal cell transplantation method. To achieve long-term engraftment and functional recovery in the heart, it is necessary to construct and transplant microcardiac tissues that closely resemble the human heart.

We have successfully established a highly efficient method for generating microcardiac tissues with uniform size and composed of multiple cardiac cell types using a newly developed patterning plate. Furthermore, transplantation experiments into mouse hearts demonstrated no significant difference in engraftment compared to cardiomyocyte spheres composed solely of cardiomyocytes.

研究分野：Regenerative medicine

キーワード：心臓オルガノイド ヒト多能性幹細胞 心筋細胞

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オルガノイドとは試験管の中で幹細胞から作るミニチュアの臓器とされ、幹細胞のもつ自己複製能と分化能を利用して自己組織化させることによる 3 次元的な組織様構造の総称である。ES 細胞や iPS 細胞のような多能性幹細胞(PSC)または成体組織幹細胞から作成され、解剖学的・機能的に生体内の器官に近い特徴を有し、正常組織由来のオルガノイドや疾患組織由来のオルガノイドの構築も可能である。主要な臓器の多くでオルガノイドが報告されているが、心臓においては細胞種の豊富さ、構造の複雑さからその開発はなかなか進んでこなかった。心臓領域ではヒト PS 細胞由来の心筋細胞(hPSC-CM)の誘導法が開発されて以降、薬剤応答の評価、心毒性試験、疾患モデリングに応用すべく、hPSC-CM を利用した様々な研究が行われてきた。近年では、生体工学的アプローチを用いた人工心臓組織(EHT)や心筋細胞を球状に凝集させた心筋スフェロイド(CS)などの 3D 心臓組織が創薬や移植分野での有用なツールとして確立されている。一方で、これらは左右の心房・心室形成や弁の形成、心腔構造と拍出能などの心臓に特徴的な組織、構造を再現できておらず、ヒトの心形成や心臓疾患のモデルとしては限界がある。自然発生を模倣した狭義の心臓オルガノイド(CO)の開発が進んできている。

2. 研究の目的

慢性心不全の予後は悪性腫瘍と同等に悪く、重症慢性心不全の根治療法は心臓移植のみである。心臓移植にかわる治療として再生医療が注目されているが、克服すべき課題も多い。iPS 細胞の出現により再生心筋細胞の細胞源は確保され、現在残されている最も大きな課題は、最適な細胞移植法の開発である。レシピエントの心臓への長期の生着と機能の回復を実現するためには、ヒト心臓に近い微小心臓組織を構築し移植する必要があると考えられている。hPSC-CM、心臓線維芽細胞および血管内皮細胞を用いてヒト CO を再構築することでヒト微小心臓組織の構築が可能となり、重症慢性心不全へのヒト iPS 細胞を用いた次世代の再生医療を促進させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)心臓オルガノイドの作成および解析

iPS 細胞から hPSC-CM への分化プロトコルを元に CO 分化プロトコルを作成、作成した CO について細胞形態解析、モーションベクター(MV)による拍動解析、PCR による RNA 解析、蛍光免疫染色による細胞種および形態解析をおこなった。

(2)移植実験

CO の機能的評価を行うため、免疫不全(NOG)マウスの心臓への移植実験を行った。比較するコントロールとしては心筋細胞のみで作られた CS を NOG マウスに移植することとした。

4. 研究成果

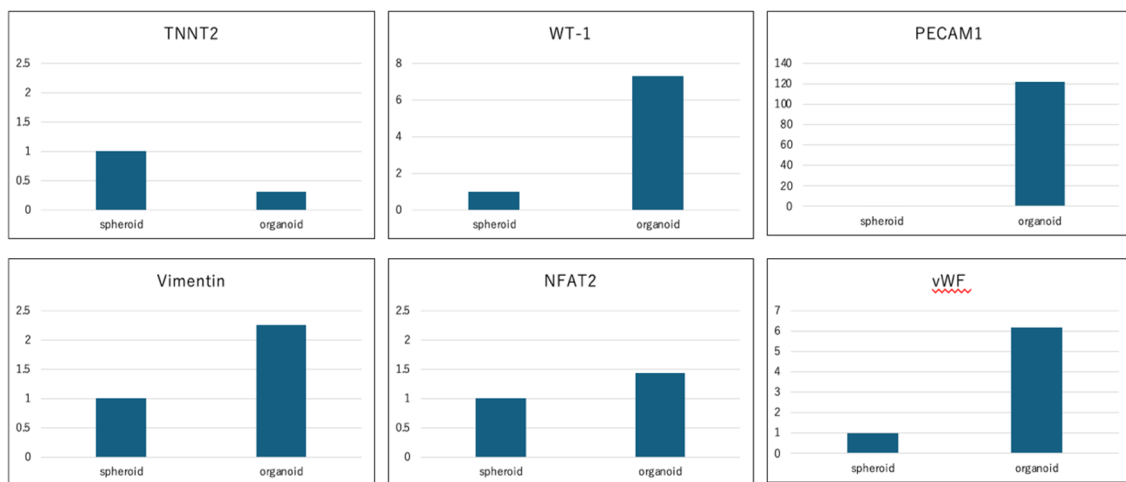
(1)心臓オルガノイド作成プロトコルの確立

心臓オルガノイドを作成するにあたり、プロトコル作成を行った。

まず最初のプロトコルでは分化開始 4 日前より iPS 細胞の維持に用いるフィーダーフリーの AS103C 培地に ROCK 阻害剤として Y27632 を添加したものへ iPS 細胞を播種。4 日後に

RPMI+B27(インスリンなし)に培地交換、24 時間は中胚葉への分化を誘導するため GSK β 阻害剤の CHIR99021 および中胚葉分化の促進および心筋細胞分化を強化するため BMP4 を添加。さらに 3 日目に Wnt 阻害剤の IWR-1 を加え心筋分化を開始。心房筋への分化を行う場合にはこのタイミングでレチノイン酸を添加。7 日目以降は成熟培地の MEM α + 成熟を促進するための FBS(ウシ胎児血清)+エネルギー源としてピルビン酸に培地を変更し培養を継続。4 週間程度培養したのち回収した。このプロトコルで作成された CO は拍動解析にて問題なく拍動が確認され、さらに心房筋へ分化を試みた CO の方で明らかに拍動数が多かった。一方で、蛍光免疫染色で心外膜細胞(WT1 陽性)、線維芽細胞(Vimentin 陽性)、ペースメーカー細胞(SHOX2 陽性)が確認された一方血管内皮細胞(CD31 陽性)や心内膜細胞(NFAT2 陽性)は確認できなかった。

そこで血管内皮細胞を含む CO を作成するため、プロトコルを改変した。試行錯誤の結果、3 日目から 7 日目まで血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を加えることとした。結果、PCR および蛍光



免疫染色にて CO に血管内皮細胞が含まれていることが確認された。

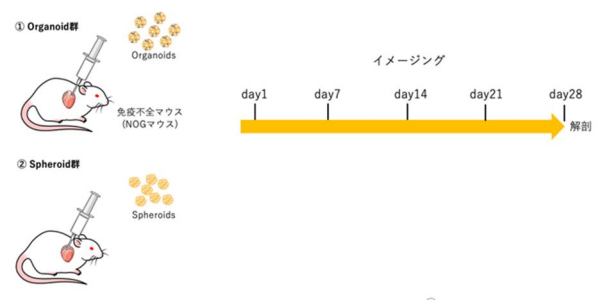
図 1:PCR による RNA 測定結果(左:心筋スフェロイド、右:心臓オルガノイド)

(2)心臓オルガノイドの移植

AkaLuc 導入 G1 ヒト iPS 細胞を CO または CS に分化誘導し、NOG マウスの心臓に移植。day1,7,14,21,28 に in vivo イメージング装置を用いて観察した。観察は 4.96mM の AkaLumine 100 μ L を腹腔内投与し、10 分後に NEWTON で撮影(露光時間 1 分)することで行った。day28 のイメージング後に解剖し、心臓切片を作製し蛍光免疫染色で評価した。

生着に関しては主にイメージングにて評価を行った。CO と CS では有意差は見られなかったものの day28 の時点ではやや CO の方が優っていた。今後 n 数を増やすことでより傾向が見られるか確認する必要がある。

また心臓切片の蛍光免疫染色ではグラフト内に血管内皮細胞、心外膜細胞、線維芽細胞を認めた。また NFAT2 陽性細胞も確認され、今まで確認できなかった心内膜細胞も CO 内に認めることが示唆された。



(3)今後の展望

CO を含む 3D 心臓組織は近年大きな進歩を遂げており、ヒトの心発生と心血管系疾患のいくつかの重要な側面を捉えることを可能にした。今後もこうした様々な心臓モデルは心疾患研究、薬剤の有効性や毒性試験などへの適応が拡大していくことが期待でき、研究目的に応じて適切なモデルを選択する必要がある。一方で、再現性の低さ、限られた脈管形成、心臓の本質的特徴の欠落などの限界は、臨床応用への普及を妨げている。

現時点で我々の CO はすでに報告されている CO と比較し、均一性の面で優れていると考えている。また、CO を心臓へ移植した報告は限られており、心臓再生医療分野に新しい知見を加えるものと考えられる。

今後は主にプロトコルの詳細の細かい部分の調整(播種細胞数、コーティングの濃度など)を行い、理想的な細胞比率の CO を目指し、1 度の培養で回収できる数を増やすべき最適なプロトコルを目指している。さらに作成した CO を用いて疾患モデルや薬剤応答まで確認できれば、今後様々な分野で心臓モデルとして利用可能となるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Soma Y, Tani H, Morita-Umei Y, Kishino Y, Fukuda K, Tohyama S*	4. 巻 187
2. 論文標題 Pluripotent stem cell-based cardiac regenerative therapy for heart failure	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol	6. 最初と最後の頁 90–100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2023.12.001	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 Moriwaki T, Tani H, Haga K, Morita-Umei Y, Soma Y, Umei T, Sekine O, Takatsuna K, Kishino Y, Kanazawa H, Fujita J, Fukuda K, Tohyama S*, Ieda M	4. 巻 3
2. 論文標題 Scalable production of homogeneous cardiac organoids derived from human pluripotent stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmeth.2023.100666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurashina Y, Fukuda K, Itai S, Akizuki S, Sato R, Masuda A, Tani H, Fujita J, Fukuda K, Tohyama S*, Onoe H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Hydrogel-sheathed hiPSC-derived heart microtissue enables anchor-free contractile force measurement	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 e2301831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/advs.202301831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sekine O, Kanaami S, Masumoto K, Aihara Y, Morita-Umei Y, Tani H, Soma Y, Umei T, Haga K, Moriwaki T, Kawai Y, Ohno M, Kishino Y, Kanazawa H, Fukuda K, Ieda M, Tohyama S*	4. 巻 18
2. 論文標題 Seamless and Non-Destructive Monitoring of Extracellular MicroRNAs during Cardiac Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1925-1939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2023.08.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

1. 著者名 Tani H, Kobayashi E, Yagi S, Tanaka K, Kameda-Haga K, Shibata S, Moritoki N, Takatsuna K, Moriwaki T, Sekine O, Umei T, Morita Y, Soma Y, Kishino Y, Kanazawa H, Fujita J, Hattori S, Fukuda K, Tohyama S*	4. 巻 299
2. 論文標題 Heart-derived collagen promotes maturation of engineered heart tissue.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 122174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2023.122174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 —

1. 著者名 Kawai Y, Tohyama S* (*Corresponding author), Arai K, Tamura T, Soma Y, Fukuda K, Shimizu H, Nakayama K, Kobayashi E.	4. 巻 8
2. 論文標題 Scaffold-Free Tubular Engineered Heart Tissue From Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Bio-3D Printing Technology in vivo.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cardiovasc Med.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2021.806215.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 —

1. 著者名 Umei T, Tohyama S* (*Corresponding author).	4. 巻 -
2. 論文標題 Metabolism in Human Pluripotent Stem Cells and Cardiomyocytes for Regenerative Therapy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Keio journal of medicine.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2302/kjm.2021-0015-IR.	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 Tani H, Tohyama S* (*Corresponding author).	4. 巻 10
2. 論文標題 Human engineered heart tissue models for disease modeling and drug discovery.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.855763.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 —

1. 著者名 Kameda K, Someya S, Fujita J, Fukuda K, Tohyama S* (*Corresponding author).	4. 巻 3
2. 論文標題 Protocol for enhanced proliferation of human pluripotent stem cells in tryptophan-fortified media.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protoc.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101341.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 —

1. 著者名 Tanosaki S, Akiyama T, Kanaami S, Fujita J, Ko SH M, Fukuda K, Tohyama* (*Corresponding author). S	4. 巻 8
2. 論文標題 Purification of cardiomyocytes and neurons derived from human pluripotent stem cells by inhibition of de novo fatty acid synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protoc.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 —

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 11件／うち国際学会 1件)

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 重症心不全に対するヒトiPS由来高純度心筋細胞移植:基礎から臨床へ
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shugo Tohyama
2. 発表標題 Metabolism-based production of cardiomyocytes from human PSCs for regenerative therapy
3. 学会等名 Cardiovascular Bioengineering 2023 (NIH) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 重症心不全に対する心筋再生治療法の開発
3. 学会等名 第9回日本心筋症研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 重症心不全に対する心筋再生治療法の開発
3. 学会等名 第31回日本医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた心臓再生医療の最前線 ～心臓移植に頼らない世の中への挑戦～
3. 学会等名 東京医科歯科大学主催 TMDU Innovation Park BBセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 代謝機構に基づくヒトiPS由来心筋細胞の製造と再生医療への応用
3. 学会等名 浜松医科大学先端医学シンポジウム 「再生医学の進歩と再生医療の未来」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 代謝機構に基づく心筋再生治療法の開発
3. 学会等名 SAMURAI研究会 2nd（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた心筋再生治療法の確立
3. 学会等名 第52回日本心臓血管外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 代謝制御に基づくヒトiPS細胞由来心筋細胞の作製と再生医療への応用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 代謝機構を基盤としたヒトiPS細胞由来心筋細胞の製造と再生医療への応用
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 多能性幹細胞の代謝機構に基づく心筋製造と再生医療への応用
3. 学会等名 JKiC主催 慶應義塾大学医学部研究紹介セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 谷 英典, 遠山周吾	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 230
3. 書名 実験医学増刊	

〔産業財産権〕

〔その他〕

藤田医科大学東京 先端医療研究センター 遠山研究室 ホームページ https://adv-cardiac-rege.med.fujita-hu.ac.jp/

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	福田 恵一 (Fukuda Keiichi) (20199227)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤） (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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	高橋 辰郎 (Takahashi Tatsuo) (40383822)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	
研究 分担者	志水 秀行 (Shimizu Hideyuki) (50226247)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	
研究 分担者	湯浅 慎介 (Yuasa Shinsuke) (90398628)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究 分担者	遠山 周吾 (Tohyama Shugo) (90528192)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

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