

201406029A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

疾患特異的 iPS 細胞を用いた
創薬スクリーニングシステムの開発

平成 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 澤 芳樹

平成 27(2015)年 5 月

目次

I. 総括研究報告

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

大阪大学大学院医学系研究科 澤 芳樹 1

II. 分担研究報告

1. 大阪大学大学院医学系研究科 宮川 繁 7

2. 大阪大学大学院医学系研究科 高島 成二 11

3. 大阪大学大学院医学系研究科 坂田 泰史、李 鍾國 14

4. 大阪大学大学院医学系研究科 石井 優 16

5. 大阪大学大学院工学研究科 明石 満、松崎 典弥 18

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 20

IV. 研究成果の別刷

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

研究代表者 大阪大学大学院医学系研究科 澤 芳樹

研究要旨

健常者由来、疾患得的 iPS 細胞から心筋組織を作成し、薬剤スクリーニングにより創薬開発の効率化、安全性の向上に資する基盤構築を目的とする。今年度は、新規疾患特異的 iPS 細胞の樹立、疾患の遺伝的背景の解析、iPS 由来心筋細胞の成熟度と機能、組織構築における細胞比率の検討、三次元組織における薬剤応答の評価、毛細血管を含む三次元組織体の構築、および高い時空間分解能での in vivo イメージングを可能にする二光子レーザー顕微鏡システムの開発を行った。

研究分担者

宮川繁 大阪大学医学系研究科 特任准教授(常勤)
高島成二 大阪大学医学系研究科 教授
坂田泰史 大阪大学医学系研究科 教授
石井優 大阪大学医学系研究科 教授
李鍾國 大阪大学医学系研究科 寄附講座准教授
明石満 大阪大学工学研究科 教授
松崎典弥 大阪大学工学研究科 助教

A. 研究目的

本研究では、健常者由来、疾患特異的 iPS 細胞から作製した心筋組織を用いたスクリーニングにより、創薬開発の効率化、安全性の向上に資する基盤構築を目的とする。また、疾患特異的 iPS 細胞を用い、既承認薬剤が効能を有する適応可能疾患のスクリーニングにより、薬剤に新たな価値を与えるドラッグリポジショニングを行う基盤の構築を行う。

本課題では、下記の課題を遂行した。

- 1) 希少難治性遺伝性疾患患者遺伝子の Exome 解析心
- 2) 細胞の形態的、機能的精度の検証
- 3) 心筋細胞の純度とシートの形態的機能的評価

- 4) 三次元組織評価と薬剤応答性
- 5) 毛細血管を持つ三次元組織体の構築
- 6) in vivo イメージング系の構築

B. 研究方法

- 1) 希少難治性遺伝性疾患患者遺伝子の Exome 解析

孤発例を含めた心疾患患者約 100 名の Exome 解析により原因遺伝子の解析を行った。その中で疾患 iPS 細胞を樹立することにより表現型を含めた解析が今後可能と思われた遺伝子変異について機能解析をすすめた。

- 2) 細胞の形態的、機能的精度の検証

iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導後、心筋細胞純度が 25~90%となるように調整して、心筋細胞と非心筋細胞を共培養した。心房形、心室形の各マーカーの染色を行った。細胞内カルシウム動態と細胞膜電位で細胞の機能特性を評価した。

- 3) 心筋細胞純度の異なる細胞シートの作成

iPS 由来心筋細胞を心筋細胞マーカーである CD172 の発現をもとに磁気ビーズを用いた

MACS により分離し、心筋細胞純度 25、50、70、90%の細胞シートを作製、各純度間の比較を行った。

細胞外マトリックス産生能は RT-PCR で測定した。サイトカイン産生は、培養上清を採取し、Bio-Plex により測定した。

電気生理学的特性は、多電極アレイ MED システムを用いて測定した。

4) 三次元組織の構築

ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞表面に交互積層法 (Nishiguchi A., Adv Mater. 2011) により、フィブロネクチンとゼラチン薄膜をコートし、細胞を積層化し、三次元心筋組織を作製した。薬剤応答性は心筋組織に影響を与える既知の薬剤を投与し、代謝生存率、細胞外電位、カルシウムイメージング、細胞運動により評価した。

5) 毛細血管を持つ三次元組織の構築

ヒト iPS 由来心筋細胞を 0.2 mg/ml のフィブロネクチン/50 mM トリス緩衝液と 0.2 mg/ml のゼラチン/50 mM トリス緩衝液に各 1 分間ずつ浸漬し、合計で 9 回交互浸漬を行った。得られた 1x10⁶ 個の細胞をセルカルチャーインサートへ播種し、所定時間培養した。得られた組織体の拍動数を位相差顕微鏡よりカウントした。また、購入した心臓線維芽細胞や心臓微小血管内皮細胞を、その割合を変えて混合した後の拍動や血管網形成を評価した。

6) in vivo イメージングのデータ取得と解析

生体心筋組織内を多光子励起顕微鏡で経時的に観察し、生きた細胞の挙動を可視化する。得られたイメージング画像データは、画像解析ソフトウェアを用いて定量化を行い、統計学的に評価する。

C. 研究結果

1) 希少難治性遺伝性疾患患者遺伝子の Exome

解析

心疾患家系において今まで報告のなかった特異的変異を同定した。機能解析実験の結果、この変異が当該遺伝子の機能を上げることが明らかになったため疾患 iPS 細胞樹立によりその機能を下げた薬剤のスクリーニングに使用できることが示唆された。心筋症家系においても原因と思われる未知の遺伝子変異を同定した。

また分化誘導した心筋細胞のエネルギー代謝を定量化する新たなアッセイ法の開発にも成功した。

2) 細胞の形態的、機能的精度の検証

播種時の心筋細胞純度に比例して心室形細胞の割合が増加する傾向が認められた。また播種時の心筋細胞純度の割合により Ca イメージングおよび膜電位感受性色素で測定された興奮特性が異なることが示された。

3) 心筋細胞の純度とシートの形態的機能的評価

3-1) 力学的安定性と細胞外マトリックス

心筋細胞純度が 25、50、70%の場合には安定した細胞シートが形成されたのに対し、心筋細胞純度 90%の場合には細胞シートが形成されなかった。

心筋細胞純度 90%の場合にはコラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスの発現が低かった。心筋組織における主要な細胞外マトリックスの一つであるラミニンは心筋細胞純度 70%の場合に最も発現が高かった (図 1)。

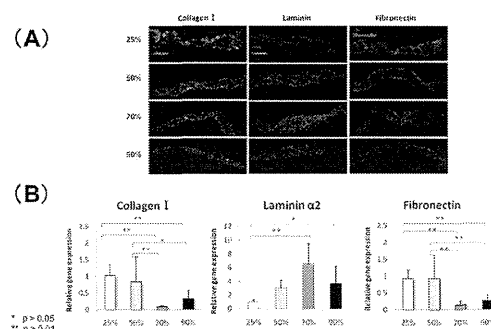


図1. 細胞外マトリックスの発現と心筋細胞純度 (A)免疫組織化学 (B)RT-PCRによる定量

3-2) 電気生理学的評価

多電極アレイシステムを用いて細胞外電位を測定したところ、心筋細胞純度に相関して電位伝播速度(Propagation velocity)が速くなった。また、Variation of inter-spike interval が減少し、拍動の規則性が高くなることが示された。一方、拍動数(Spontaneous beating rate)には有意な差は認められなかった(図2)。

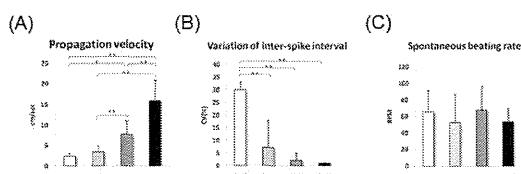


図2. 電気生理学的特性の評価
(A)Propagation velocity, (B)Variation of inter-spike interval, (C)Spontaneous beating rate

3-3) 免疫組織化学的評価

蛍光免疫染色により収縮タンパクの発現を評価したところ、心筋純度に相関して心室タイプの蛋白である MLC2v の割合が増加し、未成熟なタイプの心筋の割合が低下していた(図3)。

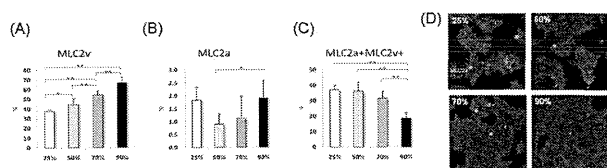


図3. 心筋収縮タンパクの発現
(A)MLC2v陽性細胞, (B)MLC2a陽性細胞, (C)MLC2aとMLC2v共陽性の細胞
(D)蛍光免疫染色像

3-4) サイトカイン産生能

培養上清中のサイトカイン測定においては、血管新生に関わるサイトカインである VEGF、幹細胞

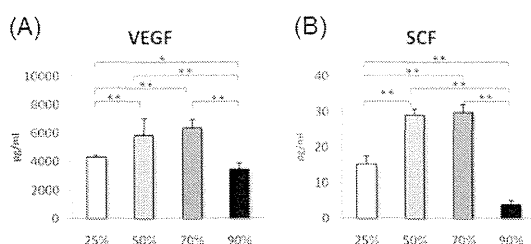


図4. サイトカイン産生能への影響
(A)VEGF, (B)SCF

胞の誘導に関わるサイトカイン SCF の発現は心筋純度 50、70% の場合に最も産生量が高かった(図4)。

4) 三次元組織評価と薬剤応答性

顕微鏡観察において、組織体全体に同期拍動を認め、免疫組織染色により Connexin43 の発現も確認されたことから、電気的接合を有する事が示唆された。また拍動の動画解析により、播種細胞数の増加に伴う収縮速度、収縮-弛緩距離の増加が認められ、収縮力の増加が示唆された。

抗腫瘍性抗生物質 Doxorubicin 添加により添加濃度依存的な細胞障害活性の上昇・生存率の低下傾向を示し、Field Potential Duration(FPD)の延長傾向を認めた。

一方、HERG K チャンネルブロッカー添加により、カルシウムトランジェントのピーク数の減少、およびピーク間隔の増加、立ち上がり時間の延長傾向を示した。

β ブロッカー添加によって、カルシウムトランジェントのピーク数の増加、およびピーク間隔の減少傾向を示した。

5) 毛細血管を持つ三次元組織体の構築

フィブロネクチンとゼラチンの交互積層法を改良した LbL ナノ薄膜形成法を考案し、細胞のダメージが少ない 1~10 層の三次元組織体を形成することができた。また、より緻密で同期拍動を示す心筋組織体を構築するため、心臓線維芽細胞を混合した三次元組織構築法を考案した。様々な割合を検討した結果、25~50% の心臓線維芽細胞を混合することで、最も高い同期拍動と緻密な組織体が見出された。

心臓血管内皮細胞の混合比に依存した毛細血管構造を作成することができ、繊維芽細胞から産出される血管増殖因子 (VEGF-A) が毛細血管構成に重要であることを見出した。

6) in vivo イメージングシステムの開発

本年度は、二光子励起レーザー顕微鏡、麻酔器、保温装置などの既存のイメージング設備備品に加えて、循環動態管理のための心電図や持続点滴装置を新たに導入するとともに、心臓を固定するための新規固定用デバイスの開発を行った。次年度以降、生体心筋組織内をリアルタイムで可視化し細胞動態を解析することが可能になると考えられる。

D. 考察

ヒト疾患で見いだされた変異はすでにヒトで病因となっていることが明らかであるため、その変異をもつ iPS 細胞は疾患モデルとして病態解析に非常に有用であるばかりでなく、創薬スクリーニングに使用することも可能である。

細胞の播種・培養条件により、心筋細胞の成熟度が組織学的、機能的に変化することが示された。

一方、iPS 細胞由来組織の作成心筋細胞の純度が 70%前後の組織体が、力学的に安定であり、かつ電気伝導性、サイトカイン産生能等において、実際の心筋組織に類似することが判明した。

3 次元組織体においては、既報通り Doxorubicin による細胞毒性、K チャネルブロッカーによる QT 延長傾向、および β ブロッカーに対する心筋刺激作用が再現され、薬剤応答が評価できたと考えている。

E. 結論

iPS 細胞樹立により疾患モデルになりうる可能性のある複数の心疾患原因遺伝子を同定した。

心筋細胞純度の違いが細胞シートの組織構造、機能に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、心筋細胞純度 70%の場合に、シート構造、電気生理学的機能、液性因子の産生に優れており、非心筋細胞がこのような機能に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

また、毛細血管構造を有する三次元ヒト iPS 由来心筋組織体の構築に世界で初めて成功した。今後は、構成細胞比の違いによる in vivo における細胞シート機能の比較を行い、心筋細胞シート純度の規格値の設定を進めていく必要がある。

また、開発中の生体多光子励起イメージング技術を用いて、今後、創薬候補化合物の薬物動態の解析や、薬物の有効性および安全性の評価を行うことが可能になると期待される。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto YI, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2015; 112(5):1553-8.
- 2) Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, Kato H, Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlm5. *Nat Commun*. 2015;6: 6137.
- 3) Yasui H, Lee JK, Yoshida A, Yokoyama T, Nakanishi H, Miwa K, Naito AT, Oka T, Akazawa H, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Biomaterials*. 2014;35(27):7839-50.
- 4) Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiya N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One*. 2014 Oct 30;9(10):e111064. doi:

10.1371/journal.pone.0111064. eCollection 2014.

- 5) A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. Akashi, Harvesting Functional 3D-Engineered Tissues by Dynamic Wettability Control at Nano-Interfaces, *Adv. Healthcare Mater.*, accepted 2014;Feb. 10
- 6) A. Nishiguchi, M. Matsusaki, Y. Asano, H. Shimoda, M. Akashi, Effects of Angiogenic Factors and 3D-Microenvironments on Vascularization within Sandwich Culture, *Biomaterials* 2014;35, 4739-4748.
- 7) Nishikawa K, Iwamoto Y, Ishii M. Development of an in vitro culture method for stepwise differentiation of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells into mature osteoclasts. *J Bone Miner Metab*, 32(3): 331-336, 2014

2. 学会発表

- (1) LeeJ, Yasui H, Yokoyama T, Nakanishi H, Yoshida A, Miwa K, NakaiJ, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Electrical properties of threedimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. Gordon Research Conference: Cardiac Arrhythmia Mechanisms ,Italy(Lucca) 2015.3.22-27
- (2) 松崎典弥・天野雄斗・西口昭広・宮川 繁・澤 芳樹・明石 満、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞表面への ECM ナノ薄膜形成による三次元心筋組織体の構築、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015.3.21
- (3) 武田真季、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、増田茂夫、李鐘國、今西悠基子、伊東絵望子、原田明希摩、小田紀子、天野雄斗、松崎典弥、明石満、澤芳樹. ヒト iPS 細胞由来三次元心筋組織を用いた薬剤毒性評価法の検討. 第 14 回日本再生医療学会、横浜、2015.3.21 ポスターセッション

- (4) 伊勢岡弘子、宮川繁、福嶋五月、増田茂夫、齋藤充弘、伊東絵望子、石川烈、澤芳樹. iPS 細胞由来心筋細胞シートにおける最適な心筋細胞純度の検討. 第 14 回日本再生医療学会総会. 2015.3.19-21 横浜
- (5) Iseoka, H, Miyagawa S, Fukushima S, Masuda S, Oda N, Saito A, Ito E, Ishikawa T, Lee J-K, Sawa Y. Development of Functional Tissue-engineered Artificial Cardiac Construct using Human Induced Pluripotent Stem Cells; Optimizing the Cell Components to Mimic Cardiac Tissue. AHA (American Heart Association) Scientific Sessions, 2014.11.17. Chicago (USA)
- (6) 天野雄斗・西口昭広・松崎典弥・宮川 繁・澤 芳樹・明石 満、フィルターLbL 法による毛細血管網を有するヒト iPS 細胞由来三次元心筋組織体の構築、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会、千葉、2014.11.17

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

①出願番号：特願 2014-230100

発明の名称：心筋細胞シート

発明者：伊勢岡弘子、澤芳樹、宮川繁、福嶋五月

出願人：テルモ株式会社、大阪大学

②出願番号：特願 2014-097104 (国内優先)、PCT/JP2014/72029

発明者：明石 満・松崎典弥・澤 芳樹・宮川 繁

発明の名称：薬剤候補化合物のスクリーニングに用いる心筋組織チップの製造方法

出願人：国立大学法人大阪大学

2. 実用新案登録 なし

3. その他

新聞報道

「血管網持つ心筋組織 iPS 細胞などから作製」,

2015 年 3 月 22 日, 日本経済新聞 38 面

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

研究分担者

大阪大学大学院医学系研究科 宮川 繁

研究要旨

iPS 細胞由来心筋細胞を用いた三次元組織体に薬効・毒性が報告されている既知薬剤を投与し、生存率、LDH 活性、アポトーシス等に着目した形態学的変化の観察、細胞外活動電位測定、カルシウムイメージング等の測定により、組織体の薬剤応答性を評価した。心毒性を有する薬剤を三次元組織体に投与したところ、濃度依存的に LDH の上昇、QT 延長に対応する応答がみられ、薬効・毒性の評価が可能であることが示された。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞は、薬剤のヒトに対する有効性・安全性を動物モデルを使用せず、迅速かつ low cost で予測することが可能であり、新薬開発の効率向上やリスク低減につながると期待されている。しかし、分化誘導した心筋細胞はヒト成人心筋細胞に比べて未熟であり、薬剤応答を評価するうえでの問題点であるといわれている。

Otsuji らは三次元的に培養を行うことにより心筋細胞の maturation が促進し、ヒト成人心筋細胞と同様の薬剤反応性を示すことを示唆している。そこで、Matsusaki らが開発した、細胞の種類・配置が制御可能な三次元組織構築法を用いて、生体組織に類似した三次元構造をヒト iPS 細胞由来心筋細胞で作製し、同組織が薬剤応答評価に適応可能であるかの検討を行った。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞表面に交互積層法 (Nishiguchi A., Adv Mater., 2011) を

用いて、およそ 6 nm のフィブロネクチン (FN) とゼラチン (G) 薄膜をコートし、 2.9×10^5 個/cm² を 1 層として積層化し、三次元心筋組織を作製した(図 1)。

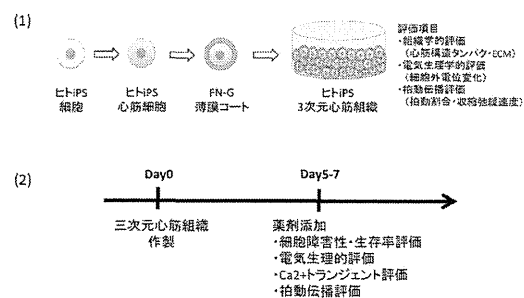


図1. 方法 (1)三次元心筋組織の作製。ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞表面に交互積層法を用いて、およそ6nmのフィブロネクチン(FN)とゼラチン(G)薄膜をコートし、 2.9×10^5 個/cm²を1層として積層化し、三次元心筋組織を作製した。(2)薬剤応答評価方法の検討。心筋細胞への薬理作用が既知の薬剤(Doxorubicin, E-4031, Isoproterenol)を用いて三次元心筋組織の薬剤応答評価を行った。

次に、心筋細胞に対する薬効が明らかな薬剤 (Doxorubicin, E-4031, Isoproterenol) を用いて、作製した三次元組織体の薬剤応答について評価を行った。心筋毒性の指標として細胞障害性、生存率、薬剤による QT 延長の指標として細胞外電位、

細胞内カルシウムトランジェント、拍動伝播を評価した。

QT 延長の評価方法は以下の様に行った。
心筋細胞の収縮は、心筋細胞に活動電位が発生し、 Ca^{2+} が細胞内に流入することにより起こる。薬剤による QT 延長を予測するため、活動電位・細胞内カルシウム動態・収縮の各時点での薬剤応答について評価した。

心電図に占める QT 時間の指標として、細胞外電位では Field Potential Duration(FPD)、カルシウムトランジェントでは PWD90、拍動評価では収縮-弛緩時間を用いた(図 2)。

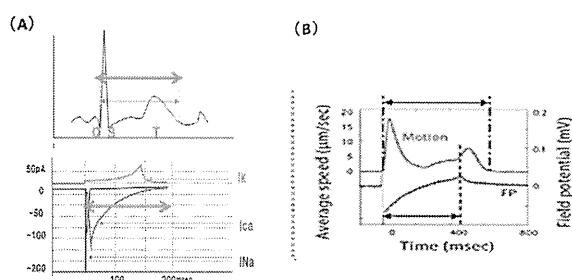


図2. QT延長評価。心電図に占めるQT時間の指標として、(A)細胞外電位ではField Potential Duration(FPD)、カルシウムトランジェントではPWD90を用いた。QTを規定するIcaがカルシウムトランジェントに反映される。(B)拍動評価では収縮-弛緩時間を用いた。

C. 研究結果

作製した三次元心筋組織の組織学的評価を行った。HE 染色により、播種細胞数に応じて積層厚が増加し、 20×10^5 個/ 0.33 cm^2 で播種したところ約 $100 \mu\text{m}$ の積層化が観察された。免疫組織染色により、同組織は心筋構造タンパクおよび細胞外マトリックスタンパクの発現を認め、心筋組織体として機能していることが示唆された(図 3)。

顕微鏡観察において、組織体全体に同期拍動を認め、免疫組織染色により Connexin43 の発現も確認されたことから、電気的接合を有する事が示唆された。また拍動の動画解析により、播種細胞数の増加に伴う収縮速度、収縮-弛緩距離の増加が認められ、収縮力の増加が示唆された(図 4)。

3 次元組織体に Doxorubicin を添加し、24 時間培養したところ、Doxorubicin 濃度依存的な細胞障

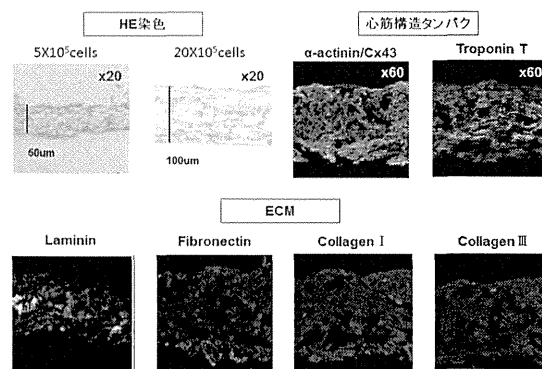


図3. 作製した三次元心筋組織の組織学的評価。HE染色、心筋構造タンパク、細胞外マトリックス(ECM)の免疫染色を行った。

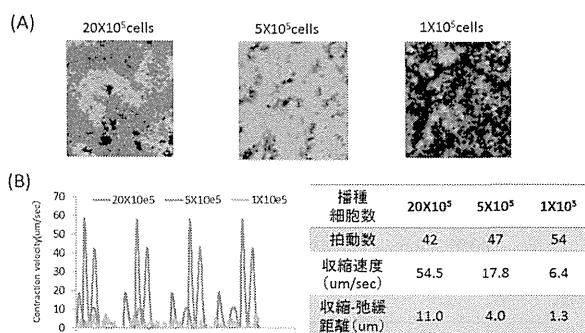


図4. 三次元組織の拍動伝播評価
(A)細胞の動き(拍動)の大きさと方向(ベクトル)を検出し、単位フレーム時間の動きの速度(収縮速度or弛緩速度)を算出した。(A)収縮もしくは弛緩速度をヒートマップで表したものの赤くなるほど速度が速いことを示している。(B)各細胞数で播種した際の、平均収縮-弛緩速度(一つ目の山は収縮、二つ目の山は弛緩)。

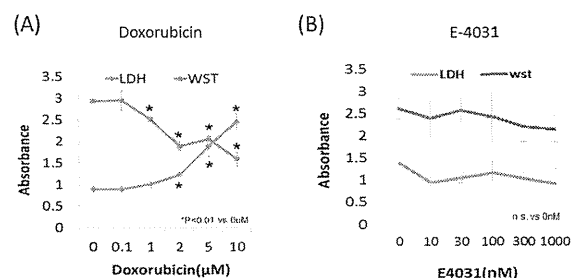


図5 細胞障害活性(LDH assay)と生存率(WST assay)による三次元組織の薬剤応答評価
(A) Doxorubicin濃度依存性。(B) E4031濃度依存性

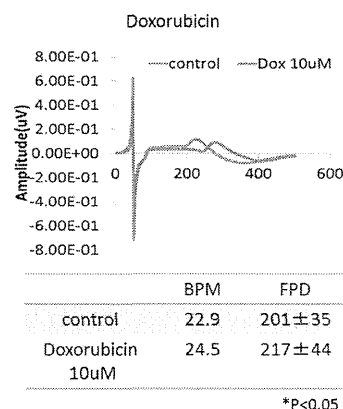


図6. 三次元組織の薬剤応答評価
Doxorubicin10 μM を投与し、細胞外電位への影響を評価した。

害活性の上昇・生存率の低下傾向を示し、2 μ M 以上で有意な差を認めた(図5)。

一方、HERG K チャンネルブロッカーである E-4031 添加培養において、細胞障害活性・生存率における有意な差は認めなかった。

明らかな細胞障害をみとめた Doxorubicin10 μ M を添加し細胞外電位を測定したところ、Field Potential Duration(FPD)の延長傾向を認めた(図6)。

E-4031 添加培養において、カルシウムトランジェントのピーク数の減少、およびピーク間隔の増加、PWD90(立ち上がり時間)の増加傾向を示し、100nM 以上で有意な差を認めた(図7)。

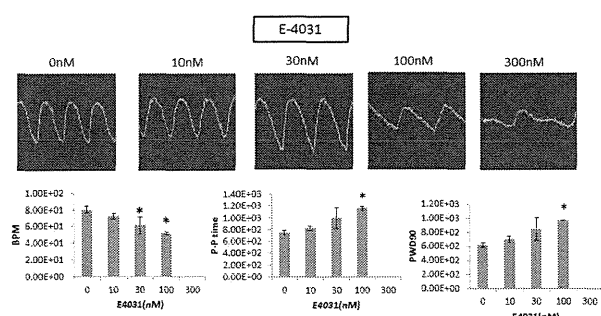


図7. E-4031投与下でのCa²⁺トランジェント評価 (細胞内Ca濃度変化) BPM: Ca²⁺トランジェントピーク数、P-P time:ピーク間隔、PWD90:立ち上がり時間

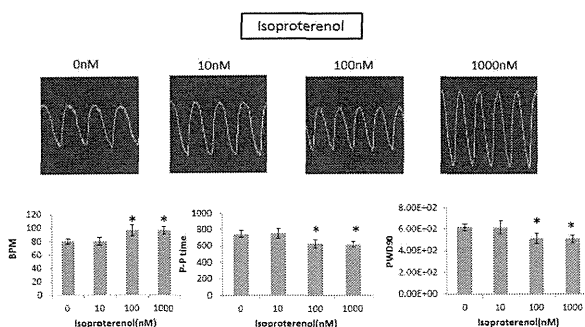


図8. Isoproterenol投与下でのCa²⁺トランジェント評価 (細胞内Ca濃度変化) BPM: Ca²⁺トランジェントピーク数、P-P time:ピーク間隔、PWD90:立ち上がり時間

β 刺激剤である Isoproterenol 添加培養において、カルシウムトランジェントのピーク数の増加、およびピーク間隔の減少傾向を示し、100nM 以上で有意な差を認めた(図8)。

D. 考察

Doxorubicin については、濃度依存的な細胞障害活性が認められ、また細胞障害活性を示す濃度において、細胞外電位で Field Potential Duration(FPD)の延長傾向を認め、毒性が平行であることが示された。

一方、E-4031・Isoproterenol については、さらに濃度依存性のデータを取得中である。

拍動に対する薬剤応答性を評価するには、拍動伝播(収縮、弛緩時の細胞運動)の定量的評価が有効であり、現在データ取得を行っている。

E. 結論

作製した3次元組織体において、既報通り Doxorubicin による細胞毒性、E-4031 による QT 延長傾向、および Isoproterenol に対する心筋刺激作用が再現され、薬剤応答が評価できたと考えている。

今後、3次元組織体を薬剤応答評価に最適化するため、細胞数(積層数)や構成細胞割合など条件が異なる組織体を作製し、検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiya N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.

PLoSOne.2014Oct30;9(10):e111064.doi:10.1371/journal.pone.0111064. eCollection 2014.

2. 学会発表

武田真季、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、増田茂夫、李鐘國、今西悠基子、伊東絵望子、原田

明希摩、小田紀子、天野雄斗、松崎典弥、明石
満、澤芳樹. ヒト iPS 細胞由来三次元心筋組織
を用いた薬剤毒性評価法の検討. 第 14 回日本再
生医療学会、横浜、2015.3.21 ポスターセシ
ョン

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

研究分担者

大阪大学大学院医学系研究科 高島 成二

研究要旨

疾患特異的 iPS 細胞を作成し創薬スクリーニングとして使用するためには、疾患の原因となる遺伝背景が解明されていなければならない。本研究においては、心血管疾患を有する患者の原因遺伝子を解明しさらにその機能解析を行い、病態モデルとなりうる多彩な iPS 細胞を樹立することを目的とする。そこで、希少難治性遺伝性疾患患者遺伝子の Exome 解析を行い原因遺伝子の同定に成功した。

A. 研究目的

疾患モデルとなる iPS 細胞樹立のためには遺伝子情報の解析は非常に重要である。近年、高速シーケンサーの進歩により、疾患家系から多くの検体を得られなくても、効率よく原因遺伝子を同定することが可能となった。本研究では疾患モデルとなりうる iPS 細胞樹立を目的として、心疾患患者の原因遺伝子解明を行った。また心筋に分化誘導した iPS 細胞のエネルギー代謝系をアッセイする新たな評価系を確立することも目的とした。

B. 研究方法

孤発例を含めた心疾患患者約 100 名の Exome 解析を行い原因遺伝子の解析を行った。その中で疾患 iPS 細胞を樹立することにより表現型を含めた解析が今後可能と思われた遺伝子変異について機能解析をすすめた。さらに細胞内のエネルギー状態を定量化する技術の開発を行った。

（倫理面への配慮）

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重にお

こなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護：診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者をおいて情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置：心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的に必要に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理

者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて：提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

4) 動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行なって実験をおこなう。

C. 研究結果

心疾患家系において今まで報告のなかった特異的変異を同定した。さらにその変異の機能を解析するため細胞を用いた機能解析実験を行った。結果、この変異が当該遺伝子の機能を上げることが明らかになったため疾患 iPS 細胞樹立によりその機能を下げる薬剤のスクリーニングに使用できることが示唆された。今後アッセイ系を変えて本変異の機能をさらに明らかにしていく。また心筋症家系においても原因と思われる遺伝子変異を同定した。全く未知の機能を持ったタンパク質であり、疾患 iPS 細胞樹立によりその変異の機能解析を行い、心筋症発症との関連が解明されることが期待された。また分化誘導した心筋細胞のエネルギー代謝を定量化する新たなアッセイ法の開発にも成

功した。

D. 考察

ヒトで見いだされた変異の機能解析をラットやマウスの細胞等を使って行うことは困難なことが多い。しかし、ヒト疾患で見いだされた変異についてはすでにヒトで病因となっていることが明らかであるため、その変異をもつ iPS 細胞を樹立することができれば疾患モデルとして病態解析に非常に有用であるばかりでなく、創薬スクリーニングに使用することも可能である。今後も、こういった iPS 細胞樹立により疾患解析が進むであろう変異の同定と機能解析を進めていく。

E. 結論

iPS 細胞樹立により疾患モデルになりうる可能性のある複数の心疾患原因遺伝子を同定した。また新たなエネルギー代謝アッセイ系も構築した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto YI, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(5):1553-8. (2015)

② Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, Kato H, Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5. *Nat Commun*. 6: 6137. (2015)

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新登録 該当なし
3. その他 特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

研究分担者

大阪大学大学院医学系研究科 坂田泰史、李鍾國

研究要旨

iPS 細胞由来心筋細胞を用いた創薬スクリーニングを行うにあたり、同細胞の品質管理が必要になる。本研究では、細胞の特性を詳細にデータ化することを目的とし、High contents imaging system と High throughput screening system を用いて形態的、機能的精度を検証した。iPS 細胞由来心筋細胞の純度を変えて培養を行った場合、成熟度を示すサブタイプマーカーの割合と興奮特性が異なることが観察された。化合物の薬効・安全性を解析できるシステムの開発に応用できることが示唆された。

A. 研究目的

iPS 細胞由来心筋細胞の品質管理を行うためのスクリーニングシステムを構築する。

B. 研究方法

iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導後、心筋細胞純度が 25～90% となるように調整して、心筋細胞と非心筋細胞を共培養した。培養後の細胞に対し myosin light chain (MLC2a:心房形:分化初期マーカー、MLC2v:心室形:分化後期マーカー)の免疫染色を行い、各陽性細胞の割合を High contents imaging system を用いて調べた。さらに各条件の培養における機能特性（細胞内カルシウム動態と細胞膜電位特性）を調べるために、Fluo-8 (Ca 感受性蛍光色素を検出)および FluoVolt(膜電位感受性蛍光色素)をローディングしたサンプルを High throughput screening system 上で観察した。

C. 研究結果

播種時の心筋細胞純度に比例して MLC2v 陽性の割合が増加し、その結果 MLC2a/MLC2v 陽性細胞の割合が低下する傾向が認められた。

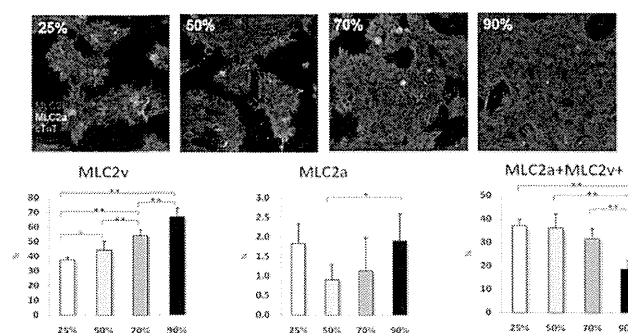


図1 High contents imaging system による画像とその定量評価

さらに各条件の培養における機能特性（細胞内カルシウム動態と細胞膜電位特性）を調べるために、Fluo-8 (Ca 感受性蛍光色素を検出)および FluoVolt(膜電位感受性蛍光色素)をローディングしたサンプルを High throughput screening

system 上で観察した結果、播種時の心筋細胞純度の割合により興奮特性が異なることが示された。

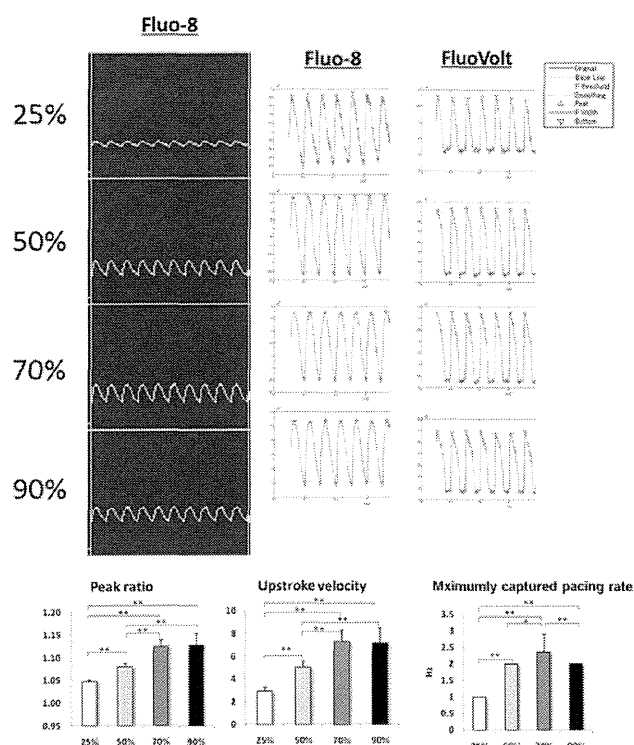


図2 High throughput screening systemにより取得した心筋細胞純度の割合における細胞内カルシウム動態と細胞膜電位特性

D. 考察

High contents imaging system と High throughput screening system を用いることにより各条件の培養における成熟の割合と興奮特性を詳細に示すことができた。適正な培養方法や純度を検証することが可能となった。

E. 結論

本研究の方法で iPS 細胞由来心筋細胞の特性を評価することが可能であり、化合物の薬効・安全性の解析を目的とした創薬スクリーニングシステムの開発に応用できることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasui H, Lee JK, Yoshida A, Yokoyama T, Nakanishi H, Miwa K, Naito AT, Oka T, Akazawa H, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Biomaterials*. 2014;35(27):7839-50.
- 2) Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiyama N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One*. 2014 Oct 30;9(10):e111064. doi: 10.1371/journal.pone.0111064. eCollection 2014.

2. 学会発表

- 1) Lee J, Yasui H, Yokoyama T, Nakanishi H, Yoshida A, Miwa K, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Electrical properties of three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Gordon Research Conference: Cardiac Arrhythmia Mechanisms* 2015 年 3 月 22 日-27 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

研究分担者

大阪大学大学院医学系研究科 石井 優

研究要旨

iPS 細胞を医療現場に応用するためには、iPS 細胞から機能分化させた細胞・組織が実際に生体内で如何に生着し機能を果たしているかを細胞レベルで評価することが必要不可欠である。本研究では、生組織で高い時空間分解能をもつ光イメージング系を駆使して、“生きた”個体内での iPS 細胞由来心筋組織・心筋細胞の“生きた”動態をリアルタイムで観察する新規の *in vivo* イメージング系を構築する。さらに、確立したイメージング技術を新たな薬剤スクリーニングシステムとして活用することにより、創薬候補化合物の薬物動態の解析や、薬物の有効性および安全性の評価を行う。

A. 研究目的

近年の再生医療研究は長足の進歩を遂げており、様々な臓器・組織の再生医療において最先端の研究がなされ、臨床現場を革新させつつある。特に、心筋再生の分野においては、ヒト体細胞から iPS 細胞を樹立し、心筋細胞へ分化誘導させ、心筋組織を作製することが可能となってきた。しかしながら、移植した iPS 細胞由来の細胞・組織が実際に生体内で如何に生着し機能を果たしているかを、細胞レベルで評価する方法論に乏しかった。

本研究では、生きた細胞現象を 1 細胞レベルでかつ速い時間経過で解析することのできる生体多光子励起イメージング技術を応用し、生体内での iPS 細胞由来の心筋細胞の動態・心筋組織の再生をリアルタイムで観察する新規の *in vivo* イメージングシステムを確立する。心筋は、その解剖学的位置や臓器の可動性のために、生体での観察には困難が伴うことが予想される。そこで本研究では、まずマウス・ラットなど動物モデルを用いた

基礎研究から着手する。動物モデルで確立した評価系をもとに、将来的にヒト生組織への臨床応用を目指す。

B. 研究方法

本年度は、生きた状態のマウスの心筋組織をリアルタイムで観察するライブイメージング系を確立する。具体的には、イソフルランにてマウスを麻酔後、気管挿管し人工呼吸管理を行う。胸部を剃毛し、皮膚および胸骨を切開後、心臓を露出させ、生体用ボンドで自作の固定用デバイスに固定する。生体心筋組織内の各種細胞核および血管内皮は、それぞれ Hoechst33342、isolectin GS-IB₄-Alexa Fluor 594 を静脈内投与することにより染色する。その後、生体心筋組織内を多光子励起顕微鏡で経時的に観察し、生きた細胞の挙動を可視化する。得られたイメージング画像データは、画像解析ソフトウェアを用いて定量化を行い、統計学的に評価する。

C. 研究結果

本年度は、二光子励起レーザー顕微鏡、麻酔器、保温装置などの既存のイメージング設備備品に加えて、循環動態管理のための心電図や持続点滴装置を新たに導入するとともに、心臓を固定するための新規固定用デバイスの開発を行った。次年度以降、生体心筋組織内をリアルタイムで可視化し細胞動態を解析することが可能になると考えられる。

D. 考察

これまで、吸入麻酔下で生きた状態の動物個体の臓器を手術的に露出して、多光子励起顕微鏡で観察することにより、様々な臓器内の生きた細胞動態の可視化に成功してきたが (Ishii et al, *Nature*, 2009; Kikuta et al, *J Clin Invest*, 2013)、生体心筋組織においても技術的に可視化が可能となりつつある。一方で、臓器の露出による組織の乾燥やマウスの体温低下、不十分な臓器の固定などが原因となって、*in vivo*で臓器を観察できる時間が限られているのが現状である。また、心筋組織の再生や血管新生の過程を経時的に解析するためには、生理的な環境を維持しながら長時間の観察が必要となる。今後、ウィンドウデバイスや吸引デバイスなどを活用しながら、さらに技術改良を加えることにより、より長時間生体組織の観察が可能な *in vivo* イメージングシステムを開発する予定である。

E. 結論

生体多光子励起イメージング技術を用いて、生きた状態の動物個体内での心筋組織を観察可能な *in vivo* イメージング系を開発中である。本イメージングシステムが確立できれば、今後、創薬候補化合物の薬物動態の解析や、薬物の有効性及び安全性の評価を行うことが可能になると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishikawa K, Iwamoto Y, Ishii M. Development of an in vitro culture method for stepwise differentiation of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells into mature osteoclasts. *J Bone Miner Metab*, 32(3): 331-336, 2014
2. 水野紘樹, 菊田順一, 石井優. ライブイメージング. 遺伝子医学 MOOK 別冊細胞の3次元組織化—その最先端技術と材料技術 再生医療とその支援分野 (細胞研究, 創薬研究) への応用と発展のために 354-358, 2014

2. 学会発表

1. 石井 優, 再生医療実現拠点ネットワークプログラム iPS 細胞分化・がん化の量子スイッチング 技術開発個別課題 *in vivo* Theranostics, 平成 26 年度 第 1 回 課題運営会議, 招待講演, 名古屋, 2014 年 8 月 5 日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

研究分担者

大阪大学大学院工学研究科 明石 満、松崎 典弥

研究要旨

iPS 細胞由来心筋細胞を用いて三次元組織構築を試みた。心筋細胞表面にフィブロネクチンとゼラチンのナノ薄膜を交互積層法により構築し、セルカルチャーインサートに播種・培養することで、およそ 3-4 日後に組織全体が拍動する三次元組織体を得られた。また、心臓線維芽細胞の導入を最適化することにより同期拍動が観察されただけでなく、心臓微小血管内皮細胞を併せて導入することで、毛細血管網様のネットワーク構造を構築することに成功した。得られた毛細血管構造を有する三次元心筋組織体は、創薬分野への応用が期待される。

A. 研究目的

iPS 細胞由来心筋細胞を用いて三次元組織構築を試みた。また、得られた組織体の薬剤応答性を評価した。

B. 研究方法

ヒト iPS 由来心筋細胞を 0.2 mg/ml のフィブロネクチン/50 mM トリス緩衝液と 0.2 mg/ml のゼラチン/50 mM トリス緩衝液に各 1 分間ずつ浸漬し、合計で 9 回交互浸漬を行った。得られた 1×10^6 個の細胞をセルカルチャーインサートへ播種し、所定時間培養した。得られた組織体の拍動数を位相差顕微鏡よりカウントした。また、購入した心臓線維芽細胞や心臓微小血管内皮細胞を、その割合を変えて混合した後の拍動や血管網形成を評価した。

C. 研究結果

細胞集積法を用い、ヒト正常 iPS 細胞由来心筋

細胞表面へおよそ 7 nm のフィブロネクチン (FN) -ゼラチン (G) の交互積層 (LbL) ナノ薄膜を形成することで、三次元組織化が可能であることを見出した。しかし、他の細胞と比較して、心筋細胞を用いた場合、ナノ薄膜形成後の細胞の回収率が極端に低く (40%以下)、複数回の遠心分離によりダメージを受けることが課題であった。そこで、心筋細胞に最適な、遠心分離を用いない新たな LbL ナノ薄膜形成法 (フィルターLbL 法) を考案した。これにより、ラット胎児由来心筋細胞やヒト iPS 由来心筋細胞でダメージを与えることなく、60~80%以上の回収率でコーティング細胞を得ることができた。本手法を用いることで、1~10 層の心筋組織体を構築できた。

また、より緻密で同期拍動を示す心筋組織体を構築するため、心臓線維芽細胞を混合した三次元組織構築法を考案した。様々な割合を検討した結果、25~50%の心臓線維芽細胞を混合することで、最も高い同期拍動と緻密な組織体を得られることを見出した。