

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眼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)。

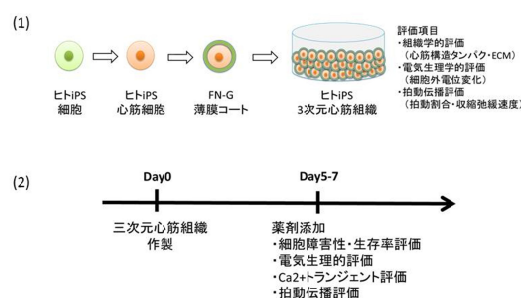


図1. 方法 (1)三次元心筋組織の作製。ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞表面に交互積層法を用いて、およそ6nmのフィブロネクチン(FN)とゼラチン(G)薄膜をコートし、 2.9×10^5 個/cm²を1層として積層化し、三次元心筋組織を作製した。(2)薬剤応答評価方法の検討。心筋細胞への薬理作用が既知の薬剤(Doxorubicin, E-4031, Isoproterenol)を用いて三次元心筋組織の薬剤応答評価を行った。

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おこる。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)。

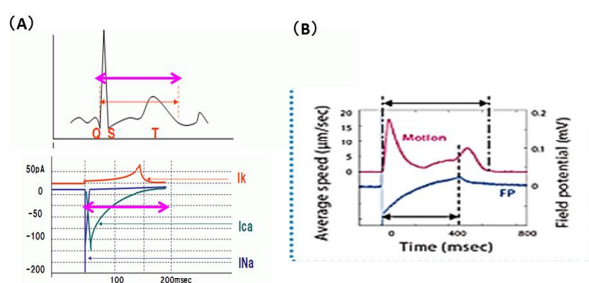


図2. QT延長評価. 心電図に占めるQT時間の指標として、(A)細胞外電位ではField Potential Duration(FPD)、カルシウムトランジェントではPWD90を用いた。QTを規定するIcaがカルシウムトランジェントに反映される。(B)拍動評価では収縮-弛緩時間を用いた。

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、電氣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

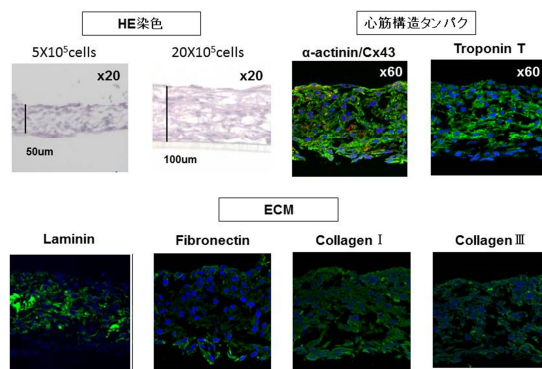


図3. 作製した三次元心筋組織の組織学的評価。HE染色、心筋構造タンパク、細胞外マトリックス(ECM)の免疫染色を行った。

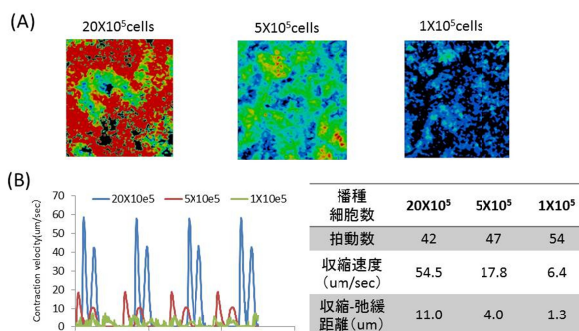


図4. 三次元組織の拍動伝播評価 (A)細胞の動き(拍動)の大きさと方向(ベクトル)を検出し、単位フレーム時間の動きの速度(収縮速度or弛緩速度)を算出した。(A)収縮もしくは弛緩速度をヒートマップで表したもの。赤くなるほど速度が速いことを示している。(B)各細胞数で播種した際の、平均収縮-弛緩速度(一つ目の山は収縮、二つ目の山は弛緩)。

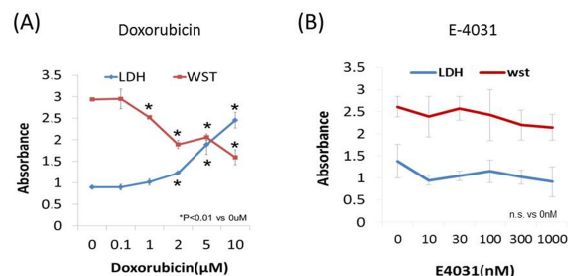


図5 細胞障害活性(LDH assay)と生存率(WST assay)による三次元組織の薬剤応答評価 (A)Doxorubicin濃度依存性。(B)E4031濃度依存性

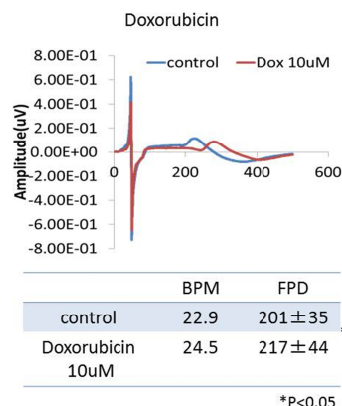


図6. 三次元組織の薬剤応答評価 Doxorubicin10μMを投与し、細胞外電位への影響を評価した。

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 Doxorubicin 10 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)。

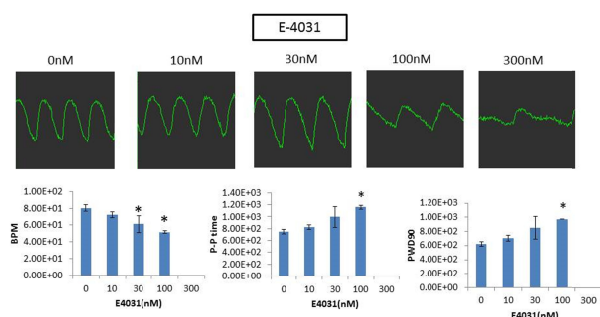


図7. E-4031投与下でのCa²⁺トランジェント評価 (細胞内Ca濃度変化) BPM: Ca²⁺トランジェントピーク数、P-P time:ピーク間隔、PWD90:立ち上がり時間

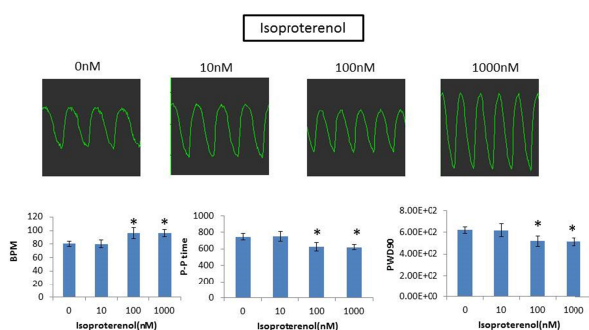


図8. Isoproterenol投与下でのCa²⁺トランジェント評価 (細胞内Ca濃度変化) BPM: Ca²⁺トランジェントピーク数、P-P time:ピーク間隔、PWD90:立ち上がり時間

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 ポスターセッション

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