

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。

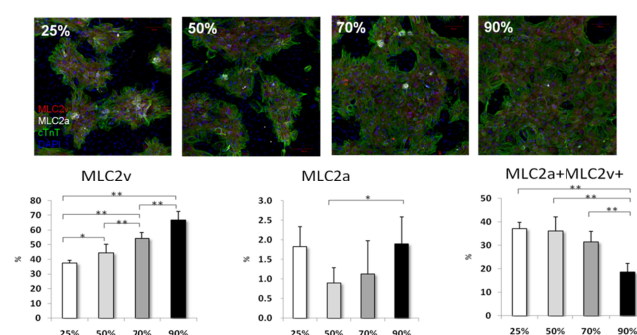


図1 High contents imaging system による画像とその定量評価

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。

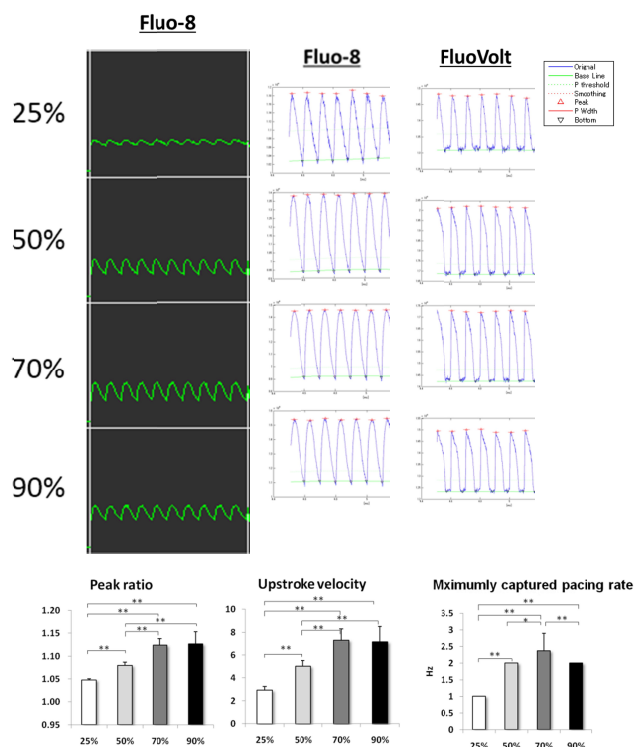


図2 High throughput screening system により取得した心筋細胞純度の割合における細胞内カルシウム動態と細胞膜電位特性

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, 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.

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* 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