

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드로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

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