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が見出された。

さらに、毛細血管構造を有する三次元心筋組織体を得るため、心臓血管内皮細胞を混合した。血管内皮細胞による毛細血管構造は、心臓線維芽細胞の割合に依存することを見出し、その理由の一つとして、繊維芽細胞から産出される血管増殖因子 (VEGF-A) が重要であることを見出した。

D . 考察

ヒト iPS 由来心筋細胞に最適なナノ薄膜コーティング方法として、フィルターLbL 法を新たに考案した。これにより、心筋細胞にダメージを与えることなくコーティングすることを可能とした。現在は、他の細胞と同様に FN-G のナノ薄膜を用いているが、ナノ薄膜についても最適化を図る必要がある。生体内の心筋細胞は、その周辺が基底膜に覆われている。基底膜の主成分は、ラミニンやIV型コラーゲン等であるため、今後、ラミニン等によるナノ薄膜形成を検討し、創薬スクリーニングに最適な三次元心筋組織体の構築に取り組む。

E . 結論

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。本手法は特許出願し、現在論文に投稿中である。また、予備検討の段階であるが、抗がん剤投与による心毒性評価を行った結果、二次元の時と比較して薬剤抵抗性が発現すること、また、毛細血管への影響が大きく現れることを見出した。今後、創薬スクリーニングへの応用を目指して更に検討を進める予定である。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. Akashi,

Harvesting Functional 3D-Engineered Tissues by Dynamic Wettability Control at Nano-Interfaces, *Adv. Healthcare Mater.*, accepted (Feb. 10, 2014).

2. A. Nishiguchi, M. Matsusaki, Y. Asano, H. Shimoda, M. Akashi, Effects of Angiogenic Factors and 3D-Microenvironments on Vascularization within Sandwich Culture, *Biomaterials* **35**, 4739-4748 (2014).

2 . 学会発表

1. 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、船堀、千葉、2014年11月17日
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、神奈川、2015年3月21日

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 2014-097104 (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

1. 「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