

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08270

研究課題名(和文)新規化合物による高効率な多能性幹細胞-心筋分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of the efficient cardiac differentiation method of pluri-potent stem cells by using novel chemicals

研究代表者

南 一成 (Minami, Itsunari)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：40362537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：一般に細胞分化培養には成長因子等の組み換え蛋白質や血清成分など、高コストでコンタミリスクのある生体由来の高分子が大量に必要であるため、本研究ではそれらを使わない培養方法の開発を試みている。
ケミカルスクリーニングにより発見された、心筋細胞への分化を促進する新規化合物KY03-1を用いて、独自のiPS細胞の心筋分化誘導法を確立してきた。この心筋誘導法は低分子化合物とアミノ酸のみの培養条件で行われており、細胞分化を人工物のみで誘導した唯一の手法である。心筋細胞の純度が90%以上と安定して高い上に、培養液が低コストでコンタミリスクも低く、3次元浮遊培養系であるため、大量細胞培養にも適している。

研究成果の概要(英文)：We are considering ways to reduce the cost of current differentiation cultures, biological polymers and growth factors for the cardiomyocyte differentiation. Using a chemical screening, we discovered the compounds KY03-1, which efficiently induce the differentiation of iPS cells to cardiomyocytes. Our differentiation protocol only requires small compounds and amino acids in the culture. The purity of cardiomyocytes is high at more than 90%, and the production efficiencies of cells are remarkably stable. Furthermore, our method has low cost and low risk of virus contamination. It is compatible with a three-dimensional suspension culture system, making it suitable for large scale production of cardiomyocytes.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：低分子化合物 心筋分化誘導 多能性幹細胞 臨床応用

1. 研究開始当初の背景

心臓疾患は世界の死因1位であり、重症心不全患者においては心移植が唯一の治療法であるが、ドナー不足という問題を抱えている。心移植に代わる治療法として、幹細胞(iPS/ES細胞等)由来の心筋細胞移植が有望視されており早急な実現化が望まれている。しかしiPS細胞由来の心筋細胞を再生医療に応用するためには解決しなければならない大きな課題がある。効率性と安全性である。臨床を阻む根本的な原因として、このような蛋白質による細胞分化誘導法に問題がある。そのため、上記の全ての蛋白質をより強力かつ安定で低コストな化合物で代替した、蛋白質なし合成化合物成分のみ(protein-free, chemically defined)の完全化合物培地による幹細胞の効率的分化誘導法が必要となる。しかしながらこの試みには誰も成功しておらず、幹細胞分化には必ず数種類以上の蛋白質を大量に必要とするのが現状である。そして現在、必要な蛋白質の種類が世界で最も少ない、比較的安全な細胞分化誘導法は申請者が発見した新規化合物KY02111を用いた心筋分化誘導法(文献5)であるが、この化合物だけでは全ての蛋白質は代替できず、また効率性も十分ではない。

2. 研究の目的

スクリーニングした新規化合物を組み合わせて、世界初の完全化合物培地による心筋分化誘導法を確立する。国の安全基準とコスト問題をクリアし、臨床iPS-心筋移植を可能とすることを旨とする。

3. 研究の方法

ケミカルスクリーニングによる化合物探索・開発を行う。KY02111の合成展開による改良を行い、より強力な心筋分化能を持つ化合物を合成する。次に、心筋細胞数や心筋細胞率を増加させる化合物、血清蛋白質を代替する化合物といった別の新たな化合物を探索する。最後にこれらの化合物を用いて、蛋白質を使わずに安全なiPS-心筋細胞を低コストで大量生産する培養液を開発する。

4. 研究成果

心疾患は世界の死因一位であり、ヒト心筋細胞は創薬や再生医療において非常に需要が高いが、拍動する機能的な心筋細胞は分裂能が低いため初代培養による生産が難しく、工業的に大量生産可能な実用的細胞は現在、iPS細胞由来の心筋細胞のみである。しかし現時点のiPS-心筋細胞は非常に高価であり、また安全性や安定性が問題となっている。一般に細胞分化培養には組み換え蛋白質や血清成分など、生体由来の高分子が大量に必要であり、これが細胞の高コスト化やウイルス等のコンタミリスク、ロット差が生じる原因

となっている。本研究はこれらの生体高分子を全て、化学合成可能な低分子化合物に置き換えるために、京都大学化学研究所の約1万化合物のライブラリから、iPS細胞を心筋細胞に分化させる新規化合物KY02111、KY03-Iをハイスループットスクリーニングにより発見した(和光純薬社他から販売中)。そしてさらにEGFR阻害剤など幾つかの分化効果のある低分子を見出し、独自の新たなiPS-心筋誘導法を開発した(図1)。

iPS細胞由来心筋細胞の大量生産・組織化技術の開発と再生医療応用

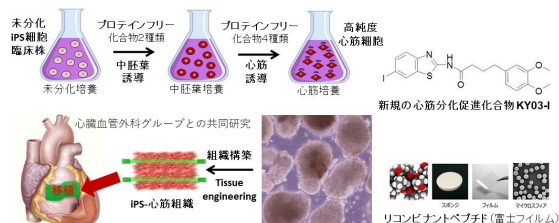


図1 新規化合物と心筋分化法・再生医療

この心筋誘導法は蛋白質やペプチド等の生体高分子を全く含まず、低分子とアミノ酸のみの環境条件で行われており、細胞分化を人工物のみで誘導した世界唯一の手法である。これによりコスト効率が非常によく、ウイルス等のコンタミリスクがなく、またロット差の影響を受けず安定してiPS-心筋細胞を生産することが可能となった。本技術による心筋細胞は心筋純度が90%以上と高く、臨床応用に適しており、臨床用のiPS細胞株からも高純度な心筋誘導が可能であることが明らかになった。また、臨床応用において課題となり得る発がん性があるとされるPKC活性剤のPMAをProstratinに代替することで、より臨床に適用しやすい方法を開発した。この手法を用いて大動物モデルを用いた前臨床試験を目指し、再生医療や創薬応用を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8件)

1. Li J[†], Minami I[†], Shiozaki M, Yua L, Shiba Y, Yajima S, Fukushima S, Morone N, Yoshioka M, Lia S, Qiao J, Lia X, Wanga L, Kotera H, Miyagawa S, Sawa Y, Nakatsuji N, Liu L, Chen Y. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Tissue-Like Constructs for Repairing of the Infarcted Myocardium. Stem Cell Reports. 2017 October 26 (†contributed equally)

2. Ogasawara T, Okano S, Ichimura H, Kadota S, Tanaka Y, Minami I, Uesugi M, Wada Y, Saito N, Okada K, Kuwahara K, and Shiba Y. Impact of extracellular matrix on engraftment and maturation of pluripotent

stem cell-derived cardiomyocytes in a rat myocardial infarct model. Scientific Reports. 2017 Aug 17;7(1):8630

3. Crombie DE, Curl CL, Raaijmakers AJ, Sivakumaran P, Kulkarni T, Wong RC, Minami I, Evans-Galea MV, Lim SY, Delbridge L, Corben LA, Dottori M, Nakatsuji N, Trounce IA, Hewitt AW, Delatycki MB, Pera MF, Pébay A. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes display electrophysiological abnormalities and calcium handling deficiency. Aging (Albany NY). 2017 May 30;9(5):1440-1452.

4. Zhu H, Scharnhorst KS, Stieg AZ, Gimzewski JK, Minami I, Nakatsuji N, Nakano H, Nakano A. Two dimensional electrophysiological characterization of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte system. Scientific Reports. 2017 Mar 7;7:43210.

5. Mao D, Ando S, Sato SI, Qin Y, Hirata N, Katsuda Y, Kawase E, Kuo TF, Minami I, Shiba Y, Ueda K, Nakatsuji N, Uesugi M. A Synthetic Hybrid Molecule for the Selective Removal of Human Pluripotent Stem Cells from Cell Mixtures. Angew Chem Int Ed Engl 56(7) · 1765-1770 · 2017

6. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. Nature. 2016 538(7625) · p388-391.

7. Li X, Yu L, Li J, Minami I, Nakajima M, Noda Y, Kotera H, Liu L, Chen Y. On chip purification of hiPSC-derived cardiomyocytes using a fishnet-like microstructure. Biofabrication 8;8(3):035017 · 2016 査読あり

8. Li J, Minami I, Yu L, Tsuji K, Nakajima M, Qiao J, Suzuki M, Shimono K, Nakatsuji N, Kotera H, Liu L, Chen Y. Extracellular Recordings of Patterned Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes on Aligned Fibers. Stem Cells Int. 2016;2016:2634013. doi: 10.1155/2016/2634013. Epub 2016 Jun 29.

〔学会発表〕(計 2件)

1、 第3回バイオメディカル研究所国際シ

ンポジウム「The clinical-grade production of human PSC-derived cardiac cells using by chemical materials」 南一成 2015年12月2日

2、 京都市ライフイノベーション創出支援センターシンポジウム「iPS細胞由来心筋細胞の応用研究」南一成 2016年11月2日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 2件)

名称: 低分子化合物を用いた多能性幹細胞の心筋分化誘導法

発明者: 南一成、中辻憲夫

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: WO 2015182765 A1

出願年月日: 2015/12/13

国内外の別: 国外

名称: 多能性幹細胞由来心筋細胞の凝集体の凍結方法

発明者: 南一成

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: WO2017159862A1

出願年月日: 2017/09/21

国内外の別: 国外

取得状況(計 1件)

名称: 多能性幹細胞の心筋分化を促進する化合物

発明者: 南一成、上杉志成、山田耕平、大塚慎也、中辻憲夫

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 6333830

取得年月日: 2018/05/11

国内外の別: 国内

〔その他〕

www.med.osaka-u.ac.jp/introduction/research/joint/design

<http://myoridge.co.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南一成 (Minami, Itsunari)

大阪大学 医学系研究科 組織・細胞設計学 共同研究講座

特任准教授(常勤)

研究者番号: 40362537

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

上杉 志成 (Uesugi, Motonari)

京都大学化学研究所 教授

研究者番号：10402926

(4)研究協力者

()