

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08861

研究課題名（和文）iPS細胞による心機能評価デバイスを用いた心毒性検出による創薬安全性に関する研究

研究課題名（英文）Development of a cardiotoxicity evaluation system using a Heart-on-a-Chip Microdevice with aligned fiber device.

研究代表者

村田 梢（Murata, Kozue）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：80884329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はヒト心臓の生理機能を評価できる高感度評価系の開発を目的とした。ヒトiPS細胞を心血管系細胞に分化させ作成した血管化マイクロ心臓組織を使用し、心機能評価に特化したハートオンチップマイクロデバイス（HMD）を開発した。さらに、幹細胞デバイス研究所（SCAD）との共同研究により、スループットと安定性を向上させたSCAD-HMDを開発した。SCAD-HMDは代表的な循環作動薬に対する薬理学的反応を示すだけでなく、抗がん剤トラスツズマブがドキシソルビシンと併用されると心筋機能障害を引き起こすという臨床事象を再現することができた。すなわち、ヒト心臓に対する薬物毒性を安定的に評価できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したSCAD-HMDは高感度にヒト心臓に対する心毒性を評価することができる。本研究によって従来型よりもより安定した操作性を獲得しただけでなく、ヒト心臓組織への長期的な影響を検証できるようになった。これは継続的な薬剤投与によって初めて顕在化する心毒性を検出できることを意味し、創薬研究において有用な研究ツールとなることが期待される。将来的にはSCAD-HMDを個々の患者由来iPS細胞から作製し、特定の薬剤への反応を評価することにより、患者への投与に先立って心毒性の有無を判定することができ、抗がん剤などの投与に伴う心臓関連合併症を回避することが可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cardiovascular cells differentiated from human iPS cells are expected to be useful for evaluating cardiac pharmacology and toxicity. The aim of this study was to develop a highly sensitive bioassay system that can evaluate the physiological function of the human heart. We differentiated human iPS cells into cardiovascular cells and generated vascularized microtissues with vascular network structures. We developed a heart-on-a-chip microdevice (HMD) specialized for evaluating cardiac function. Furthermore, through a collaborative study with the Stem Cell & Device Laboratory (SCAD), we improved throughput and stability of our system. SCAD-HMD not only exhibited pharmacological responses to representative circulatory stimulants, but also reproduced clinical events, demonstrating that the anticancer drug trastuzumab causes myocardial dysfunction when combined with doxorubicin. This study demonstrated that SCAD-HMD can stably evaluate the toxicity of drugs on the human heart.

研究分野：医科学

キーワード：iPS細胞 心臓 オルガノイド 組織 心毒性 HMD Organ-on-a-chip

1. 研究開始当初の背景

CIOMS pharmacogenetics(2015)によると、新規医薬品として上市された医薬品のうち安全上の理由から市場撤退したものは1990年から2004年の間だけで34種類にもものぼる。これらの医薬品はシャーレ上の実験や実験動物における安全性が確認されていたものばかりである。市場撤退の主な原因は、逆流性食道炎治療薬のシサプリド(2000年撤退)における心臓障害など、薬剤による循環器関連合併症であるとされる。ヒト心臓のポンプ機能に対する心毒性の評価をシャーレ上で安定して行えるシステムはこれまで存在せず、また動物とヒトの薬剤に対する反応性の違いから、動物実験による心毒性評価も不十分であったことが、これらの薬剤におけるヒトへの心毒性が十分に上市前に予測されなかった大きな要因だと考えられる。

動物実験の限界を超えるための、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心毒性評価の試みは、これまで米国食品医薬品局 (FDA) を中心に組織された国際コンソーシアム CiPA や、Japan iPS Cardiac Safety Assessment (JiCSA) などにより取り組まれてきている。一方、心筋層は心筋細胞を中心とした血管網および支持細胞の有機的集合体による組織として収縮力を発現している。したがってシャーレ上での心臓再現モデルの作製においては、心筋細胞に加え血管内皮細胞など多様な心筋構成細胞による組織構造の再構築が望ましいと考えられる。我々はこの課題に応えるため、これまで種々のヒト iPS 細胞からの多様な心臓構成細胞(心筋細胞・血管内皮細胞・血管壁細胞など)への分化誘導系について研究し、報告してきた (Takeda, *Cell Reports* 2018 / Kawatou, *Nature Communications* 2017 / Masumoto, *Scientific Reports* 2014 など)。また、分化誘導した多様な心臓構成細胞をヒトの臓器機能を模した立体構造に為すため、温度感受性培養皿を用いた細胞シート技術 (Masumoto, *Stem Cells* 2012 / Masumoto, *Scientific Reports* 2014)、その多層積層化技術 (Matsuo, *Scientific Reports* 2015) あるいはコラーゲンなどのバイオマテリアルを用いた立体化技術 (Masumoto & Nakane, *Scientific Reports* 2016) を研究開発してきた。これらの技術融合によるヒト iPS 細胞由来三次元心臓組織に対し、心毒性が知られている各種薬剤によるTdP型の致死性不整脈のシャーレ上での再現を世界で初めて示した (Kawatou, *Nature Communications* 2017)。

この細胞シートを基盤とする、心臓の機能を模倣する人工ヒト心臓組織は、新規化合物の心毒性をシャーレ上で知るために有用であると考えられるが、そのためには微細な人工心臓組織のポンプ機能を高感度に検出するシステムが必要である。このために我々は最近、この人工組織と、分担研究者の理化学研究所・田中らが開発してきた微細加工技術によるPDMS スピンコート法により作製したマイクロ流体チップ

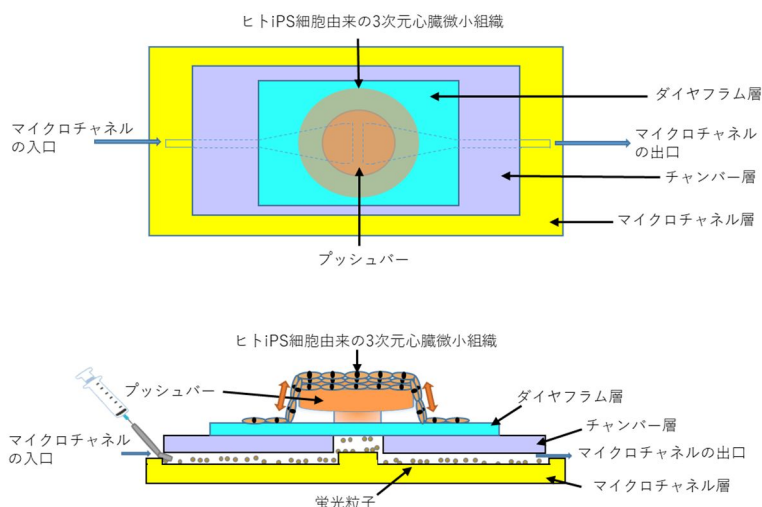


図1 HMDの構造

ブ (Tanaka, Lab on a Chip 2006 など) を融合させたハートオンチップ型マイクロデバイス(HMD)を開発した。これは、人工心臓組織の小さな脈動を拍動機能に変換するための高感度システムである(Abulaiti, Murata, Tanaka, Masumoto et al. Scientific Reports, In press) (図1)。本研究の核心をなす、ヒト iPS 細胞を使った高感度な心毒性評価による創薬安全性研究として、HMD システムを利用できるのではないかと、「問い」に答えることが本研究の趣旨である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が独自に開発した HMD の安定性を高め、より精度と感度の高い新規医薬品の心毒性評価方法を確立させることである。健常ヒト iPS 細胞を用いて作製した心臓組織はまさにヒトの心臓組織をシャーレ上で再現したもので、これを用いた心毒性評価系は、これまで動物実験やヒト iPS 細胞由来単一心筋細胞では検出できなかったヒト心臓に対する心毒性を検出できる可能性が高い。このような新しい技術基盤を用いた精度の高い心毒性評価方法が確立することで、医薬品の開発費用の抑制だけでなく、上市前にいち早くヒト心臓に対する心毒性を示す医薬品を検出することができ、新規医薬品の市場撤退リスクの軽減および副作用に苦しむ患者発生リスクを軽減しうることが期待される。

3. 研究の方法

- (1) **HMD システム改良・デバイス装着システム**：マイクロデバイスは測定の安定性および頑健性を向上させる必要がある。本研究では、特に、心臓組織シートを安定してデバイス本体へ装着できるシステムを開発する。具体的には、現システムでは心臓組織シートを直接デバイス上へ接着させているが、SCAD-MT™(SCAD社)などの細胞接着性ファイバー技術を改良し、心臓細胞シートが簡易にそして安定してデバイス上に移動・装着できるように改良する。この過程の評価においても HMD システムの原理を使用して行う。
- (2) **市場撤退医薬品の心毒性検出実験**：HMD の安定性が向上した段階で、市場撤退した医薬品への薬物応答を検討することで、心毒性を安定して検出できるかを評価する。また、同時にモーションベクターによる画像からの定量化でも拍動を評価し、HMD がより高感度、高精度で心毒性を検出できることを実証する。
- (3) **抗悪性腫瘍剤の使用による心毒性の検証**：Cardiac oncology とよばれ、抗がん薬による循環器系合併症の発症機序を解明する研究分野が近年着目されている。HMD を使用し、心毒性を示すことが知られている抗がん剤投与時の心機能低下を HMD システムで検出できるかを検討する。

4. 研究成果

我々は、ヒト iPS 細胞から CM および血管内皮細胞を含む心血管系細胞を分化誘導し動的培養トレーニングを加えることにより、血管網様構造を有する血管化マイクロ心臓組織(VCM)を作製した。この VCM と、微細加工技術により作製したマイクロ流路を有するマイクロ流体チップを組み合わせることにより、心臓機能評価に特化したオーガンオンチップであるハートオンチップ型マイクロデバイス(HMD)を開発した。さらに幹細胞&デバイス研究所(SCAD)との共同研究による配向性ファイバーデバイスの応用により、HMD のスループット性・試験安定性の向上を達成し、より長期の心毒性を評価しうる改良型 HMD を開発すること

に成功した(SCAD-HMD)。図 2 に示す SCAD-HMD はマイクロ流路内の粒子の変位量をモニターすることで VCM の脈動を可視化し、拍出流量・圧および力などの生理学的パラメータを定量化することができる。SCAD-HMD は Frame 状の組織の移動が簡単に行えることから、操作性、スループット性の向上だけでなく、組織の長期培養を可能にした。これは、継続的な薬物の投与によって初めて心毒性が顕在化するような試薬の評価も可能になったことを意味する。

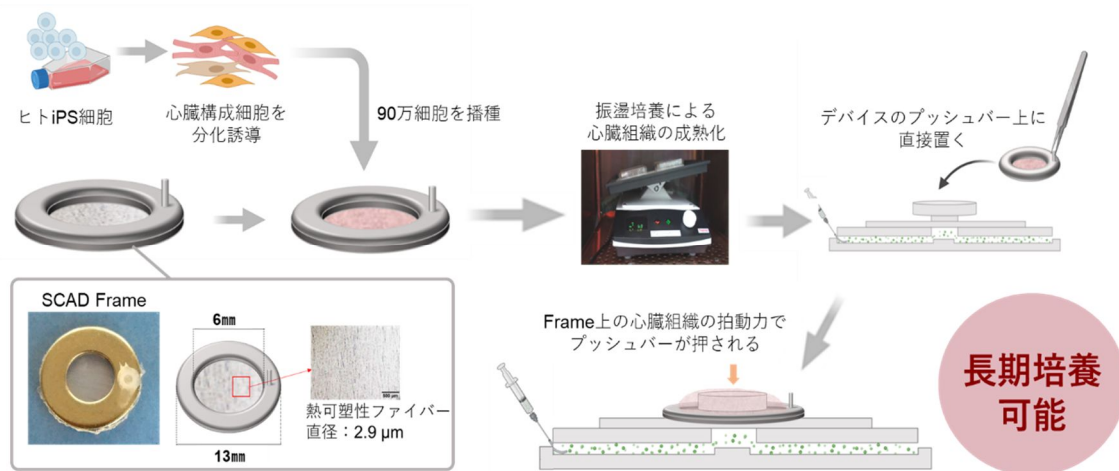


図 2 HMD-SCAD の概要

本研究によって、SCAD-HMD が代表的な循環作動薬に対する薬理反応を示だけですが分かった。また心毒性が既知である抗悪性腫瘍剤のドキソルビシンを投与した場合にみられる濃度依存的な拍動力の低下を高感度に検出することができることが明らかとなった。

臨床の現場において HER2 陽性乳がんの治療薬としてトラスツズマブが使用されている。トラスツズマブはアントラサイクリン系抗がん剤として知られているドキソルビシンと併用されることが多いが、2剤の同時添加は心毒性を発揮することが知られている。一般的な臨床現場では、ドキソルビシンの投与後にトラスツズマブを添加するという時間的ラグを設けることによって心毒性の顕在化を避けている。本研究で開発した SCAD-HMD がこの現象を再現できるかを評価したとこと、トラスツズマブとドキソルビシンの同時添加時が最も心毒性の顕在化が早かった。一方でトラスツズマブの単独使用では濃度依存的な心毒性は検出されなかった(図3)。

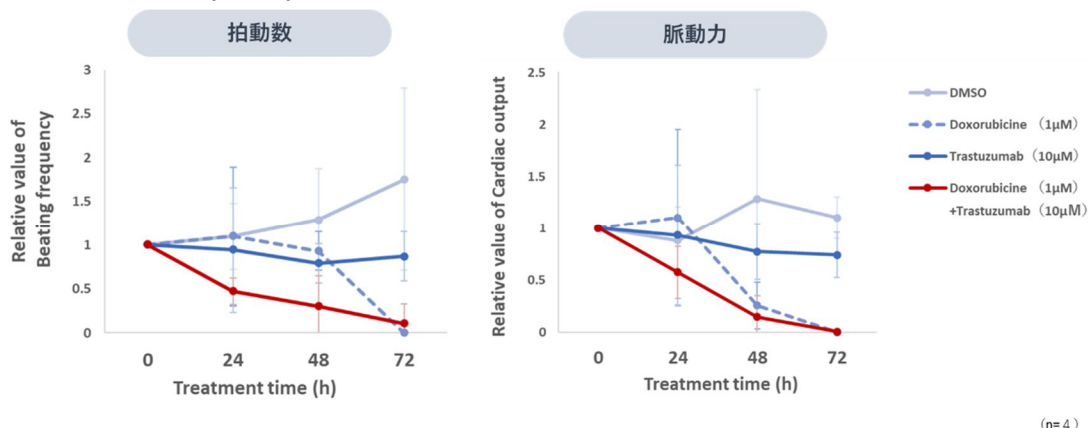


図 3 トラスツズマブとドキソルビシンの心毒性評価

これらの結果から、SCAD-HMD はヒト心臓で起こっている心作動薬の作用を in Vitro で再現することができることが分かった。トラスツズマブとドキソルビシンの併用時の臨

床レジメンなどは実際の患者投与によって得られたデータをもとに確立されている。すなわち、SCAD-HMD のようなヒト心臓への作用をあらかじめ検出できる系を使用することにより、患者投与前に適切な使用量、使用レジメンを確立することが可能になる。本研究によって、薬剤事象を未然に防ぐという意味で HMD-SCAD が有用であることが示唆された。

将来的には SCAD-HMD を個々の患者由来 iPS 細胞から作製し、特定の薬剤への反応を評価することにより、患者への投与に先立って心毒性の有無を判定することができ、抗がん剤などの投与に伴う心臓関連合併症を回避することが可能になると期待される。現在、我々はこのデバイスを用いた「個別化心毒性評価系」の確立に向けて、産学連携による研究開発を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murata Kozue, Masumoto Hidetoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Systems for the Functional Evaluation of Human Heart Tissues Derived from Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/stmcls/sxac022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村田 梢、アブラティ モシャ、長垣 良和、加藤 謙介、升本 英利
2. 発表標題 配向性ファイバーデバイスを用いた改良型ハートオンチップ型マイクロデバイスによる心毒性評価系の開発
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kozue Murata, Mosha Abulaiti, Yoshikazu Nagakaki, Kensuke Kato, Hidetoshi Masumoto
2. 発表標題 Development of a cardiotoxicity evaluation system using a Heart-on-a-Chip Microdevice with aligned fiber device
3. 学会等名 ESC 2024 欧州心臓学会（国際学会）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 陽 (Tanaka Yo) (40532271)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	2022年離職

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	升本 英利 (Masumoto Hidetoshi) (70645754)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究セン ター・上級研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関