

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 7 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K12801

研究課題名（和文）創薬用複合型心筋組織電学機能評価システムの開発

研究課題名（英文）Cardiac electrophysiology evaluation system for improved drug assessment

研究代表者

李 俊君 (LI, JUNJUN)

大阪大学・大学院工学研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：10723786

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）：本研究では、新規デバイスにより24ウェルプレート内で安定したトラベリング波の再現に成功し、14日以上維持されました。波でペースングされたiPSC由来心筋細胞の成熟は、免疫染色、電気生理記録、RNAシーケンス、TEM、OCR、ウエスタンブロット、動態解析で確認されました。トルサード・ド・ポワント（TdP）リスクの異なる薬剤を用いた評価では、低リスク薬（ベラパミル、ラノラジン）で不整脈が少なく、高・中リスク薬（キニジン、ピモジド）で増加し、安全性評価への有用性が示されました。成果としてPCT特許1件を出願し、論文4報を発表、学会での口頭発表1件が第21回外国人留学生若手研究者賞を受賞しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、FDAはモノクローナル抗体などの医薬品に対する動物実験の義務を段階的に廃止する方針を示しました。iPSC由来の心臓オルガノイドは動物実験の代替として期待され、薬剤毒性評価の新しいプラットフォームとなります。しかし、iPSC由来心筋細胞の未成熟性が薬剤応答の精度を制限する課題があります。我々のシステムは心筋細胞の成熟を促進し、より正確な薬剤応答を実現しました。これにより、PMDAによる偽陽性薬剤候補の誤却下を減らし、創薬の効率向上とコスト削減に貢献します。また、動物実験削減という倫理的課題にも応え、持続可能な医療社会の実現に寄与する技術です。

研究成果の概要（英文）：In this study, stable traveling waves were successfully and efficiently reproduced in a 24-well plate using a newly designed device and were stably maintained for over 14 days. The maturation of iPSC-derived cardiomyocytes paced by the waves was confirmed through immunostaining, electrophysiological recording, RNA sequencing, TEM, OCR, western blotting, and motion analysis. Drug responses were evaluated using compounds with varying levels of Torsades de Pointes (TdP) risk: low-risk drugs (verapamil, ranolazine) showed low arrhythmia rates, while high- and intermediate-risk drugs (quinidine, pimoziide) increased arrhythmia incidence, demonstrating the system's utility in drug safety assessment. As outcomes, one PCT patent was filed, four papers were published, and one oral presentation was given at a conference. This presentation received the 21st Young Investigator's Award for International Students.

研究分野：Tissue engineering; Regenerative medicine;

キーワード：iPSC Cardiomyocytes Drug assessment Tissue engineering

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞が確立されて以来、再生医療への応用が強く期待されており、近年ではその臨床応用が加速しています。再生医療にとどまらず、iPS細胞は創薬、特に心毒性試験における応用も期待されています。従来の動物由来細胞を用いた試験ではヒトとの関連性が乏しく、正確な薬剤評価が困難です。そのため、成人ヒト心筋細胞に類似した心筋細胞を安定的かつ大規模に製造する技術、および薬剤応答を評価できるハイスループットスクリーニングシステムの構築が急務となっています。近年、分化誘導技術の進展により、iPS細胞由来心筋細胞の純度やコスト効率は改善されてきました。これらの細胞は自発的に拍動し、主要な心筋マーカーを発現していますが、遺伝子発現解析の結果から、依然として初期胎児段階に留まっていることが明らかとなっています。

近年では、幹細胞の性質を制御するための工学的アプローチが注目されており、特に *in vivo* 環境を模倣するマイクロ・ナノテクノロジーの活用が進んでいます。申請者は、細胞の成熟促進を目的とし、外部からの刺激を加えることなく、自発的にトラベリングウェーブ(伝播波)を誘導するリング状構造体を用いた新たな方法を開発しました(Li et al., Communications Biology, 2020、平成29~31年度若手B)。しかしながら、波動誘導の不安定性や、高い代謝需要による栄養供給不足といった課題が残されており、薬剤評価デバイスとしての実用性を制限しています。本研究では、成熟度の高い心筋細胞を安定かつ大規模に製造できるプロセスを確立し、心毒性試験および創薬への実用化を目指します。

2. 研究の目的

本研究では、自発的な循環トラベリングウェーブを利用して未成熟な心筋細胞の成熟を加速させ、最終的に成人心筋細胞に近い性質を持つ心筋細胞を作製することを目指します。これにより、心毒性評価や創薬への応用が可能となります。さらに、薬剤スクリーニングへの応用を念頭に、トラベリングウェーブを自発的に誘導できるデバイスとマルチウェル型多電極システムを統合したハイスループットスクリーニングシステムの開発を計画しています(図1)。

目的1: 自発的な循環トラベリングウェーブを安定的かつ高効率で誘導する最適条件を明らかに

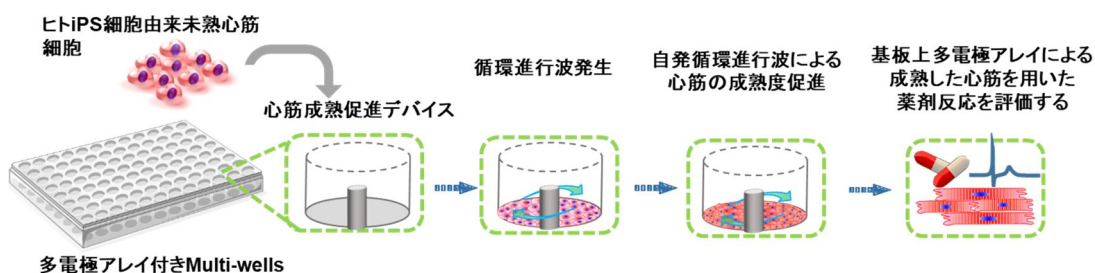


図1 自発的な進行波を伴う心筋リング組織の形成とその薬物反応評価への応用。

し、その条件下で得られた心筋細胞の成熟度を評価します。成人心筋細胞と比較し、さらなる成熟促進法を検討します。

目的2: 自発的トラベリングウェーブ誘導が可能なデバイスを備えたマルチウェルシステムを構築します。

目的3: 構築されたマルチウェル多電極システム上で成熟心筋細胞を用い、薬剤評価を実施します。

3. 研究の方法

本研究では、成熟心筋組織形成のためのプラットフォームを構築し、それを用いた薬剤評価を実施します。具体的には、以下のステップを進めます：

- (1) **トラベリングウェーブ誘導条件の最適化。**未成熟な心筋細胞において、トラベリングウェーブが安定的に自発誘導される条件を最適化します。分化純度、培養環境、デバイスパラメータを検討し、得られた細胞の成熟度を、遺伝子・タンパク質発現、超構造解析、収縮能、電気的特性、ミトコンドリア活性、低酸素耐性など多角的に評価し、成人心筋細胞との比較を行います。
- (2) **ハイスループット24ウェルシステムの開発。**自発的トラベリングウェーブ誘導が可能なデバイスを統合した24ウェルの高スループット評価プラットフォームを開発します。このシステムは、複数のウェルにおいて安定的な波動誘導を実現し、薬剤評価における再現性と拡張性を確保します。
- (3) **薬剤評価の実施。**上述のプラットフォーム上で得られた成熟心筋細胞を用いて、TdP (torsades de pointes) リスクの異なる複数の薬剤に対する薬理応答評価を実施します。トラベリングウェーブによる成熟処理の有無により、iPSC 由来心筋細胞の薬剤感受性の違いを検証します。具体的には、QT 間隔の変化や不整脈発生頻度を指標として評価を行います。



24ウェルプレート内の心筋細胞成熟トレーニグ装置

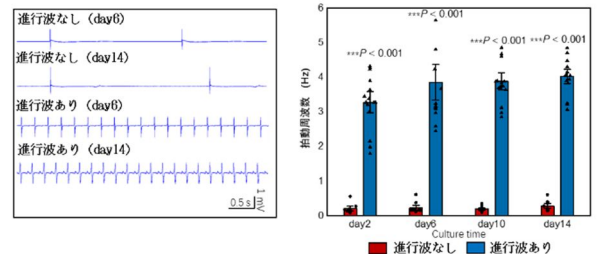


図2 閉ループ経路内の心筋細胞を、トラベリングウェーブが高速でペースングしました。

4. 研究成果

本研究計画における目標の大部分は達成され、以下の通り具体的な成果が得られました：

- (1) 本研究では、新たに設計したリング状構造を備えたデバイスにより、24ウェルプレート内で自発的な循環型トラベリングウェーブの再現に成功しました。誘導された波動は、特別な外部刺激を必要とせずに自然に発生し、14日以上にわたって安定的に維持されることが確認されました（図2）。これにより、培養中の心筋細胞に長期間にわたり持続的な刺激を与えることが可能となり、従来の成熟化手法と比較して、大きな技術的進展を示しました。

- (2) トラベリングウェーブによってペースングされた心筋細胞の成熟度については、免疫染色（cTnT、 α -Actinin）、透過型電子顕微鏡（TEM）

によるサルコメリック構造の観察、酸素消費率（OCR）測定によるミトコンドリア機能解析、ウェスタンブロットによる成熟関連タンパク質の発現評価、さらにはモーション解析を用いた収縮運動パターンの定量解析など、多角的かつ網羅的な評価を実施しました（図3）。これらの結果から、細胞は構造的・代謝的・機能的にいずれの面においても成熟が促進されていることが明らかとなりました。

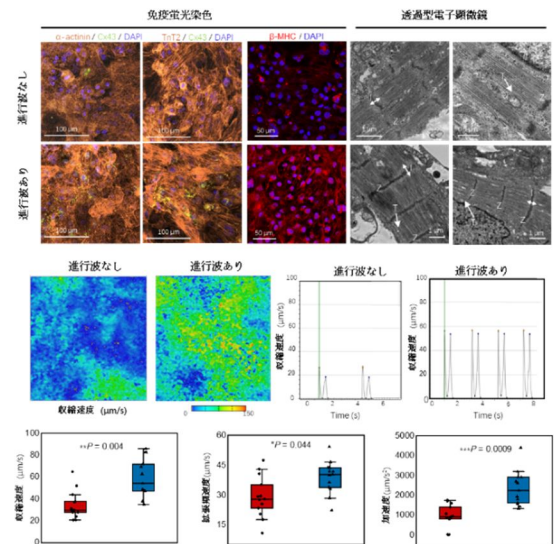


図3 トラベリングウェーブペースングの後、心筋細胞は成熟が促進されました。

(3) さらに、得られた成熟心筋細胞を用いて、**torsades de pointes (TdP)** 発症リスクの異なる複数の薬剤（低リスク：ベラパミル、ラノラジン；中リスク：ピモジド；高リスク：キニジン）に対する薬理応答評価を行いました。低リスク薬剤に対しては、成熟心筋細胞では不整脈の発生率が低いことが確認されました（図4）。一方で、中/高リスク薬剤を投与した場合には不整脈の発生率が有意に増加し、本プラットフォームが薬剤誘発性心毒性を的確に検出し得る感度と信頼性を有することが示されました。これにより、開発したデバイスおよび評価系が、より臨床的意義の高い **in vitro** 心毒性評価ツールとして有望であることが示唆されました。

(4) 研究成果として、当該技術に関連する特許を1件出願し、査読付き論文を4報発表しました。さらに、国内の学会において成果発表を行い、第87回日本循環器学会学術集会にて、「第21回外国人留学生ヤング・インベスティゲーター賞 (Young Investigator's Award for International Students)」を受賞するなど、高い評価を受けました。本研究で確立した技術は、今後の創薬スクリーニングや心疾患モデル構築において応用が期待されており、さらなる展開を目指しています。

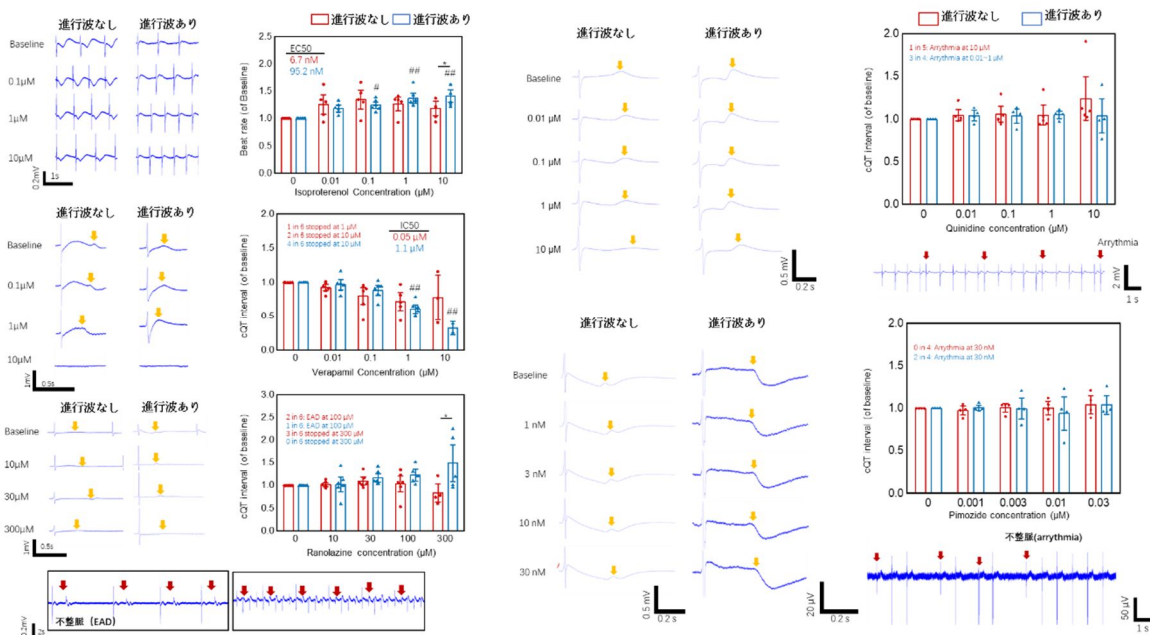


図4 進行波トレーニングの有無による、hiPSC由来クローズドループ型心筋組織の低（図の左部）高/中（図の右部）TdPリスク薬剤応答

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Li Junjun, Liu Li, Zhang Jingbo, Qu Xiang, Kawamura Takuji, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki	4. 巻 9
2. 論文標題 Engineered Tissue for Cardiac Regeneration: Current Status and Future Perspectives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 605 ~ 605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering9110605	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 -

1. 著者名 Zhang Jingbo, Qu Xiang, Li Junjun, Harada Akima, Hua Ying, Yoshida Noriko, Ishida Masako, Sawa Yoshiki, Liu Li, Miyagawa Shigeru	4. 巻 23
2. 論文標題 Tissue Sheet Engineered Using Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Diabetic Wound Healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12697 ~ 12697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232012697	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 -

1. 著者名 Li Junjun, Hua Ying, Liu Yuting, Qu Xiang, Zhang Jingbo, Ishida Masako, Yoshida Noriko, Tabata Akiko, Miyoshi Hayato, Shiba Mikio, Higo Shuichiro, Sougawa Nagako, Takeda Maki, Kawamura Takuji, Matsuura Ryohei, Okuzaki Daisuke, Toyofuku Toshihiko, Sawa Yoshiki, Liu Li, Miyagawa Shigeru	4. 巻 27
2. 論文標題 Human induced pluripotent stem cell-derived closed-loop cardiac tissue for drug assessment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108992 ~ 108992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.108992	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 -

1. 著者名 Li Junjun, Li Menglu, Nawa Yasunori, Liu Yuting, Bando Kazuki, Hua Ying, Sun Lifu, Fujita Satoshi, Sawa Yoshiki, Fujita Katsumasa, Liu Li	4. 巻 96
2. 論文標題 Label-Free Raman Spectroscopy for Assessing Purity and Maturation of hiPSC-Derived Cardiac Tissue	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 15765 ~ 15772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.4c03871	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ying Hua, Junjun Li, Xiang Qu, Jingbo Zhang, Masako Ishida, Noriko Yoshida, Hayato Miyoshi, Mikio Shiba ³ , Shuichiro Higo ^{4,5} , Nagako Sougawa ¹ , Maki Takeda ¹ , Takuji Kawamura ¹ , Ryohei Matsuura, Toshihiko Toyofuku, Yoshiki Sawa, Li Liu and Shigeru Miyagawa
2. 発表標題 Human iPSC-derived closed-loop cardiac tissue for improved drug assessment
3. 学会等名 The 87th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (JCS2023) (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Method for producing myocardial cell layer, myocardial cell layer, and use thereof	発明者 Li Liu, Junjun Li	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US20240277899A1	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	劉 莉 (Liu Li) (50380093)	大阪大学・工学研究科・特任教授 (14401)	

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
---------	---------