

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293297

研究課題名(和文) 心筋症患者iPS細胞由来心臓組織シートを用いた重症心不全治療創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery for the treatment of severe heart failure

研究代表者

恒吉 裕史 (Tsuneyosi, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：40645412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：心筋症患者iPS細胞の樹立に際して、心筋症患者の術中の心筋組織を採取し、その特性を調べて病態パターンを認識する計画とし、1例の標本採取を行った。iPS細胞由来心筋組織シートについては、心臓組織構成細胞である心筋細胞・壁細胞を個別に分化誘導し、混合比率を厳密にコントロールしたシートを作成した。化合物スクリーニング法については、多電極細胞外電位測定システム上で、細胞外電位測定を測定した。薬物応答性評価の一つとして心毒性評価に着目し、薬剤性QT延長作用を引き起こすE4031を用い、細胞外電位波形にてQT(FPD)延長作用を再現した。また特徴的なリエントリー型不整脈現象も二次元的に視覚的に観察できた。

研究成果の概要(英文)：With regards to the establishment of cardiomyopathy patient's iPS cells, we planned to collect the myocardial tissue intraoperatively in order to recognize the characteristics of pathology. And we carried out sampling in one case. With regards to iPS cell-derived cardiac tissue sheet, we differentiated cardiomyocytes and mural cells individually and made the sheets by mixing them in strict ratio. With regards to method of drug screening, we measured extracellular electrical potentials on the multi-electrode device. We focused on the assessment of cardio toxicity and used the E4031 that caused drug-induced QT prolongation. We reproduced QT (FPD: field potential duration) prolongation and characteristic re-entry type arrhythmia visually.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：心筋疾患外科学 iPS細胞 創薬スクリーニング 心筋症

## 1. 研究開始当初の背景

心筋症は多くが進行性の治療困難な疾患であり、重篤な心不全を来しうる。補助人工心臓および左室形成術に対して薬剤治療を併用することが心臓移植にかわる集学的治療戦略として有効であるという結果を示す基礎研究は数多く発表されているが、なお標準治療として広く普及し得るには不十分である。我々はこのような不全心に対する補助治療としての効果を発揮する薬剤を新たに開発することが、この状況を打破する鍵となりうると考えた。

iPS細胞由来心筋細胞を用いた薬剤スクリーニングは特にQT延長症候群・Timothy症候群など心筋細胞自体の電気的活動異常を示す疾患で現在進行しているが、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たため、我々は、心筋細胞に加え、血管内皮細胞・血管壁細胞など多様な心筋構成細胞を再構築した組織状構造を用いたスクリーニングが、より高感度系として必須であると考えた。

## 2. 研究の目的

心筋症を背景とした末期心不全に対する心臓移植の代替治療として、左室補助装置・外科的左室形成術等との併用により大きな効果を得るための薬剤を開発するために、心筋症患者由来iPS細胞を樹立し、そこから分化誘導し作製した心臓組織シートを用いた薬剤スクリーニングを行うことにより、不全心に対する収縮力・アドレナリン受容体感受性等を回復しうる新規薬剤開発に結びつける。さらに心筋症による末期心不全に対するより効果的な集学的治療のための基礎研究として、心筋症および左室補助・左室形成モデル動物への投与実験を行うことで、早期臨床応用を目指すことが目的である。

## 3. 研究の方法

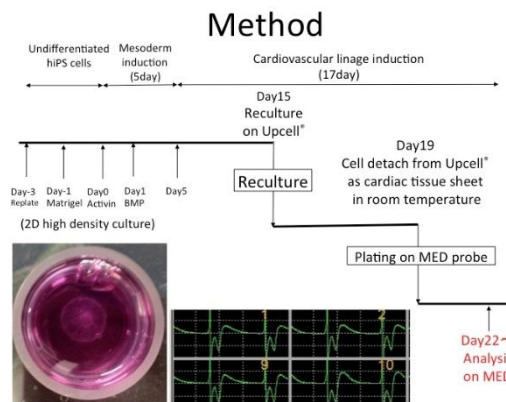
### 心筋症患者 iPS 細胞の樹立

京都大学医学部附属病院 iPS 細胞臨床開発部の正式な手続きに則り、心筋症患者の術中の皮膚生検により皮膚線維芽細胞を得る計画とした。その際に心筋組織を同時に採取し、その特性を調べて典型的な病態パターンを認識する計画とし、「心臓血管手術施行患者からの切除標本を用いた心血管系細胞および組織の特性解析研究」の研究計画書を作成した。

### iPS 細胞由来心筋組織シート作成

単層高密度培養法をもとにした我々の心筋細胞効率的分化誘導法(Uosaki, 2011)を応用した手法により誘導された心筋構成細胞群を温度 PLoS One 感受性培養皿上に播種し、自己拍動性心臓組織シートを得ている。(Masumoto, Sci Rep 2014)今回、同手法によって作成されたシートでの、シートの性状・電気的特徴などの検討を行った。

また今回シートの作成法をより発展させ、組成の均一化した薬剤スクリーニングに適する心筋組織シートの作成を行った。具体的には、心臓組織構成細胞である、心筋細胞・内皮細胞・壁細胞を個別に分化誘導し、それらを混合したシートを作成した。特に心筋細胞と壁細胞において、その混合比率を厳密にコントロールしたシートを作成し、シートの性状・電気的特徴などを検討した(図1)。



(図1) iPS細胞由来心臓組織シートの作製および細胞外電位測定

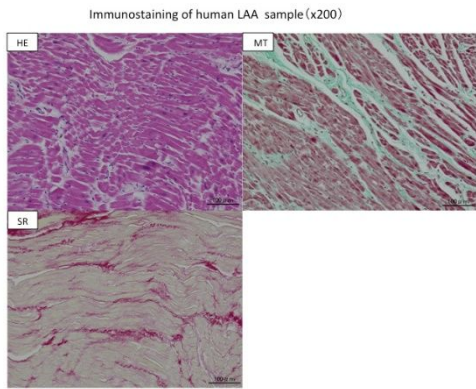
### 化合物スクリーニング

多電極細胞外電位測定システム上に心臓組織シートを乗せ、細胞外電位測定を測定し、その波形の特徴を解析した。シート全体で同期した自発拍動の記録だけではなく、その薬物応答性評価の一つとして、創薬を考慮する際に重要な心毒性評価に着目し、検討を行った。

## 4. 研究成果

### 心筋症患者 iPS 細胞の樹立

京都大学医学部附属病院「医の倫理委員会」の承認を得た後に、1例の標本採取を行うことができた(図2)。



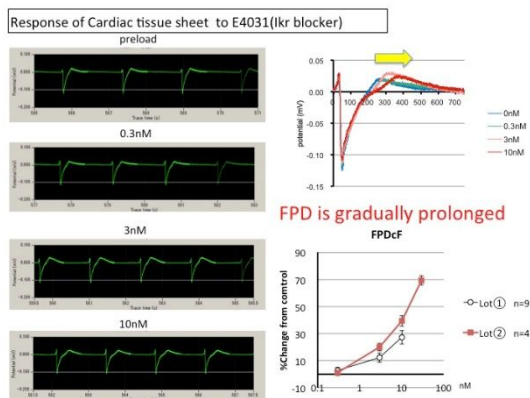
(図2) 心筋症患者から得られた心臓組織標本の病理所見

### iPS細胞由来心筋組織シート作成

心筋細胞と血管壁細胞の組成により、E4031等の薬剤投与に対して不整脈が起こる頻度に違いがあることを見出した。具体的には、心筋細胞の純度が100%近いシートにおいては不整脈はほぼ誘発されなかったが、心筋：壁細胞が1:1となる細胞シートにおいては不整脈がほぼ必発となった。

### 化合物スクリーニング

臨床にて薬剤性QT延長作用を引き起こすE4031を用いた薬剤負荷試験を行い、細胞外電位波形にてQT(FPD)延長作用を再現できることを確認した。またこの薬剤負荷により、QT(FPD)延長のみでなく、特徴的な不整脈現象を観察することができ、臨床的に重要な不整脈のin vitro病態再現モデルとして、病態解明および創薬研究において有用な結果を得ることができた(図3)。



(図3) IKrチャンネルブロッカーE4031による脱分極時間延長測定

### 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 3 件)

1. Kamitani T, Masumoto H, Kotani H, Ikeda T, Hyon SH, Sakata R. Prevention of retrosternal adhesion by novel biocompatible glue derived from food additives. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013;146:1232-8.

2. Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, Fukushima H, Marui A, Katayama S, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK. Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. Sci Rep. 2014;4:6716.

3. Matsuo T, Masumoto H, Tajima S, Ikuno T, Katayama S, Minakata K, Ikeda T, Yamamizu K, Tabata Y, Sakata R, Yamashita JK. Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells. Sci Rep. 2015;5:16842.

[学会発表](計 21 件)

1. Masumoto H, Sakata R, Yamashita JK et al. The transplantation of human iPS cell-derived cardiac cell sheets to rat myocardial infarction model ameliorates cardiac dysfunction through neovascularization. The 21<sup>st</sup> Annual Meeting of The Asian Society of Cardiovascular and Thoracic Surgery (ASCVTS 2013) (Kobe, Japan) 2013.4.4.-4.7.

2. Masumoto H, Sakata R, Yamashita JK et al. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-engineered tissue sheets with defined cardiovascular cell populations for infarct rat hearts. International Society for Stem Cell Research 11<sup>th</sup> annual meeting. (Boston, USA) 2013.6.12.-6.15.

3. 升本英利、南方謙二、丸井晃、池田義、清水達也、岡野光夫、山下潤、坂田隆造。再生医学研究が変える外科の近未来細胞シート技術を用いた多能性幹細胞による心筋再生研究 機能的再生から組織再生へ 第113回日本外科学会定期学術集会(福岡) 2013.4.11-13.

4. Matsuo T, Sakata R, Yamashita JK et al. An efficient piling up of pluripotent stem cell-derived cardiac tissue-like sheets that robustly promotes cell engraftment and ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction. European Society of Cardiology Congress (Amsterdam, Netherlands) 2013.8.31-9.4.

5. 松尾武彦、坂田隆造ほか。多能性幹細胞

- 由来心臓組織シートの効果的積層化は移植細胞の生着効率を改善し心筋梗塞後の心機能低下を抑制する. 第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会 (仙台) 2013.10.16.-10.19.
6. Matsuo T, Sakata R, Yamashita JK et al. Efficiently Piled-Up Cardiac Tissue-Like Sheets With Pluripotent Stem Cell-Derived Cells Robustly Promotes Cell Engraftment and Ameliorates Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Sessions (Dallas, USA) 2013.11.16-20.
  7. Ikuno T, Satata R, Yamashita JK et al. High-purity and scalable endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture. 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting (Kyoto) 2014.4.14.-4.17.
  8. Ikuno T, Satata R, Yamashita JK et al. Scalable and highly efficient endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture for realization of regenerative medicine. International Society for Stem Cell Research (Vancouver, Canada) 2014.6.18.-6.21.
  9. Masumoto H, Ikuno T, Okita K, Marui A, Minakata K, Ikeda T, Satata R, Yamashita JK. Cell sheet transplantation to rat infarct heart using genomic integration-free human iPS cells generated with episomal plasmid vectors: a strategy for tumor-free cardiac cell therapy. International Society for Stem Cell Research (Vancouver, Canada) 2014.6.18.-6.21.
  10. Ikuno T, Satata R, Yamashita JK et al. Scalable and highly efficient endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture. European Society of Cardiology Congress (Barcelona) 2014.8.30.-9.3.
  11. 石上雅之助、坂田隆造ほか. ミニブタ心筋梗塞モデルへのヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植による心機能回復. 第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会. (福岡) 2014.9.30.-10.3.
  12. 幾野毅、坂田隆造ほか. 2 型血管内皮細胞増殖因子受容体陽性細胞の純化再培養によるヒト iPS 細胞からの血管内皮細胞分化誘導の効率化. 第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会. (福岡) 2014.9.30.-10.3.
  13. Ishigami M, Masumoto H, Aoki T, Takai F, Ikuno T, Marui A, Minakata K, Ikeda T, Yamashita JK, Sakata R. Transplantation of cardiac cell sheet including human iPS cell-derived cardiomyocytes and vascular cells to infarcted porcine heart restores impaired left ventricular global function and dyssynchrony. American Heart Association Scientific Sessions (Chicago, USA) 2014.11.15-19.
  14. 升本英利、松尾武彦、石上雅之助、幾野毅、丸井晃、南方謙二、池田義、坂田隆造. 多能性幹細胞による心筋再生研究の最前線. 第 45 回日本心臓血管外科学会学術総会 (京都) 2015.2.16.-2.18.
  15. 石上雅之助、坂田隆造ほか. ミニブタ心筋梗塞モデルへのヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植は心機能を回復する. 第 45 回日本心臓血管外科学会学術総会 (京都) 2015.2.16.-2.18.
  16. 幾野毅、坂田隆造ほか. 2 型 VEGF 受容体陽性細胞純化再培養によるヒト iPS 細胞からの効率的血管内皮細胞分化誘導. 第 45 回日本心臓血管外科学会学術総会 (京都) 2015.2.16.-2.18.
  17. Masumoto H, Nakane T, Tinney JP, Yuan F, Ye F, Kowalski WJ, Sakata R, Yamashita JK, Keller BB. Human iPS cell-derived 3D engineered cardiac tissue including cardiomyocytes and multiple vascular lineages for cardiac regeneration. American Heart Association Scientific Sessions (Orlando, USA) 2015.11.7-11.
  18. Aoki T, Sakata R, Yamashita JK et al. Transplantation of genomic integration-free human iPS cell-derived cardiac tissue sheets into porcine infarct hearts produced no lethal arrhythmia: A preclinical study for a safer human iPS cell therapy. American Heart Association Scientific Sessions (Orlando, USA) 2015.11.7-11.
  19. Masumoto H, Ishigami M, Aoki T, Takai F, Ikuno T, Kawatou M, Minakata K, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK. Cardiac tissue sheet including human iPS cell-derived cardiomyocytes and vascular cells restores impaired left ventricular systolic function of infarcted porcine hearts: a preclinical study. European Society of Cardiology Congress (London, UK) 2015.8.29.-9.2.
  20. Masumoto H, Nakane T, Tinney JP, Yuan F, Ye F, Kowalski WJ, Sakata R,

Yamashita JK, Keller BB. Development of engineered cardiac tissue with human iPS cell-derived cardiomyocytes and endothelial cells. International society of stem cell research (Stockholm, Sweden) 2015.6.24-27.

21. 幾野毅、坂田隆造、山下潤ほか. プタ心筋梗塞モデルを用いた iPS 細胞由来心臓組織シート移植による不整脈評価実験. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会. (京都) 2015.11.9.

〔図書〕(計 2 件)

1. Masumoto H, Yamashita JK. Pluripotent Stem Cells, ISBN 978-953-51-1192-4. InTech. 2013
2. 升本英利、坂田隆造. Annual Review 循環器：心筋再生医療の進歩. 中外医学社. 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kyoto-cvs.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

恒吉裕史 (TSUNEYOSHI HIROSHI)

京都大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：40645412

### (2) 研究分担者

坂田隆造 (SAKATA RYUZO)

京都大学・大学院医学研究科・名誉教授

研究者番号：20325781

### (3) 連携研究者

山下潤 (YAMASHITA JUN)

京都大学・iPS細胞研究所・教授  
研究者番号：50335288