

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26713028

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から安定的に成熟した心室筋細胞を得る基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of a System to Obtain Mature Ventricular Cardiomyocytes from Human Induced Pluripotent Stem cells

研究代表者

内藤 篤彦(Naito, Atsuhiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10588891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞は心臓に対する再生医療や心臓病に対する治療薬を開発するためのツールとして期待されている。従来の技術ではiPS細胞から安定して高品質の心筋細胞を作成するには非常にコストがかかり、iPS細胞から作成した心筋細胞には複数の異なる性質を示す心筋細胞が混在しているなどの問題点があった。本研究で開発した培養液およびプロトコルを利用することでiPS細胞から心筋細胞を生産するためのコストを1/20以下にし、一定の品質を示す心筋細胞のみを精製することが可能になり、ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞を利用した再生医療や治療薬開発の研究が推進されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human iPS-derived cardiomyocytes are expected to be useful in cell therapy and drug discovery for heart diseases. In the present study, we developed a novel culture medium and a protocol that enables to cut the cost for cardiomyocyte production to 1/25. We also developed a fluorescence-based, non-genetic method for purifying only ventricular cardiomyocytes.

研究分野：循環器内科

キーワード：細胞・組織 iPS細胞 循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

心疾患は日本における死因の第2位であり、年間約20万人が心疾患のために亡くなっている。高齢者では心疾患による死亡が他の年代と比べて多くなっており、超高齢化社会を迎える日本において心疾患の新しい治療法を開発することは非常に重要な課題である。

2007年にわが国の高橋、山中らによって報告された人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、胚性多能性幹細胞(ES細胞)と同様、体内のあらゆる細胞に分化させることが可能であり、研究に利用する際の倫理的制約も少ないことから、様々な分野の医学研究への貢献が期待されている。

現在、ヒトiPS細胞を用いた様々な心疾患研究が行われているが、目的別に大きく3つに分けることができる。すなわち、心筋梗塞などの心筋細胞が失われる病態に対して、iPS細胞から作成した心筋細胞を補充することで治療効果を期待する「再生医療研究」、心筋症などの患者からiPS細胞(疾患特異的iPS細胞)を樹立し、そこから作成した心筋細胞の異常を解析することで病態解明を行う「疾患モデリング研究」、正常iPS細胞や疾患特異的iPS細胞から作成した心筋細胞を創薬初期段階におけるスクリーニングや毒性試験に用いる「創薬研究」である。

ヒトiPS細胞から心筋細胞を分化誘導する技術、分化誘導した細胞から心筋細胞を精製する技術が数多く報告され、それら技術を用いた探索的な研究が行われてきたが、iPS細胞由来心筋細胞を利用した「再生医療」「疾患モデリング」「創薬」研究に共通する重要な課題として、「iPS細胞由来心筋細胞の幼弱さとheterogeneity」が挙げられる。

iPS細胞から分化誘導した結果得られる心筋細胞には成熟した心室筋型の細胞だけでなく、幼弱なペースメーカー型や心房筋型の特性を示す細胞が混在している。幼弱でheterogeneityが強い細胞を再生医療に応用すると重篤な不整脈を誘発する可能性が非常に高い。また、心疾患の多くは「心室筋型」心筋細胞の異常で発症すると考えられ、幼弱でheterogeneityが強い細胞を用いても適切な疾患モデリング研究や臨床応用を目指した創薬研究を行うことができない可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の4つである。

- (1) 安定的にiPS細胞から心筋細胞を分化誘導する系の構築
- (2) iPS細胞由来心筋細胞から成熟した心室筋のみを精製する技術の確立
- (3) iPS細胞由来心筋細胞を成熟化・心室筋化させる化合物の同定
- (4) 正常iPS細胞由来「心室筋」を用いた心筋細胞機能測定技術の開発

3. 研究の方法

(1) 安定的にiPS細胞から心筋細胞を分化誘導する系の構築

健康ボランティアからのiPS細胞樹立

心臓病の既往歴および家族歴を認めない健康ボランティアに対してインフォームドコンセントを実施した後で心電図検査を行い、異常を認めないことを確認した。iPS細胞はCiRAで公開されているプロトコルに則ってフィーダー細胞上で樹立した。要約すると、末梢血から単核球を単離し、サイトカインカクテルで培養した後に、初期化因子をプラスミドベクターで導入し、2~3週間後に出現したiPS細胞クローンから形態の良好なクローンを選択した。それぞれのクローンについて未分化マーカー(Tra-1-60, Nanog, Oct3/4)の発現を免疫染色およびRT-PCRで確認し、未分化性の確認を行った。

心筋細胞への分化誘導

心筋細胞への分化誘導はKellerらの方法(Yang et al. Nature 2008)を参考に行った。要約するとiPS細胞をコロニー状に剥離した後にStemPro34(Invitrogen)培地で浮遊培養を行うことで胚様体を形成し、bFGF, Activin-A, BMP4, Dkk-1, VEGFなどのサイトカインを含むStemPro34培地に順次交換していくことで拍動する心筋細胞を得た。

Kellerらの方法の問題点(培養液のロット間差および価格)を克服するための心筋細胞分化誘導系を確立するため、代表研究者が2006年に報告したWntシグナルの活性化および抑制を組み合わせる手法(Naito et al. PNAS 2006)を利用した。様々なWntシグナルを活性化する作用を有する化合物およびWntシグナルを抑制する作用を有する化合物を利用して心筋細胞を効率良く分化誘導できる条件を検索した。

(2) iPS細胞由来心筋細胞から成熟した心室筋のみを精製する技術の確立

蛍光プローブの作成

ミリポア社の受託サービスを利用して心室筋特異的に発現している複数の遺伝子に対する蛍光プローブを作成した。心室筋特異的に発現している遺伝子は過去のマイクロアレイデータより抽出した(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser?acc=GDS3625>)。

細胞ソーティング

FACS AriaIIIを利用してiPS細胞由来細胞を蛍光強度でソーティングした。

電気生理学的解析

ソーティングした細胞の電気生理学的解析は薬物安全性試験センターの受託サービスを利用した。

(3) iPS細胞由来心筋細胞を成熟化・心室筋化させる化合物の同定

化合物スクリーニング系の構築

iPS細胞由来心筋細胞を CellCarrier-96

(PerkinElmer)に播種し、化合物を作用させた後に心筋筋で優位に発現している MLC2a、心室筋で優位に発現している MLC2v に対する抗体で免疫染色し Operetta (PerkinElmer)を用いてハイコンテンツ解析を行った。化合物は Sigma 社のライブラリー化合物を利用した。

(4) 正常 iPS 細胞由来「心室筋」を用いた心筋細胞機能測定技術の開発
カルシウムイメージング
iPS 細胞由来心筋細胞を 96 穴プレートに播種し、カルシウムインディケータ(Cal520)で染色した後に蛍光イメージングを行った。

4. 研究成果

(1) 安定的に iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導する系の構築

研究代表者は 2006 年、マウス ES 細胞から心筋細胞を分化誘導する際、胚様体形成後一定期間 Wnt シグナルを活性化させた後に Wnt シグナルを抑制することで高効率に心筋細胞を分化誘導できることを報告している。

そこで Wnt シグナルを活性化させる作用を有する化合物として Glycogen synthase kinase 阻害剤である BIO および CHIR99021、Axin と b-catenin の結合を阻害する作用をもつ Wnt Agonist II、メカニズムが明らかでない Wnt Agonist を、Wnt シグナルを抑制させる作用を有する化合物として Axin タンパクを安定化させる IWR1、Porcupine 阻害剤である IWP2、Tankyrase 阻害剤である XAV939、Dvl タンパクの PDZ ドメインに結合して Wnt シグナルを阻害する Dvl-PDZ domain inhibitor、CBP inhibitor である ICG001 を利用したところ、Wnt シグナルを活性化させる作用を有する化合物としては CHIR99021 のみが細胞に対する毒性を示すことなく心筋細胞を分化誘導することが可能であること、Wnt シグナルを阻害する作用を有する化合物としては IWP2 が最も効率よく心筋細胞を分化誘導できること、がそれぞれ明らかになった(図 1 および図 2)。

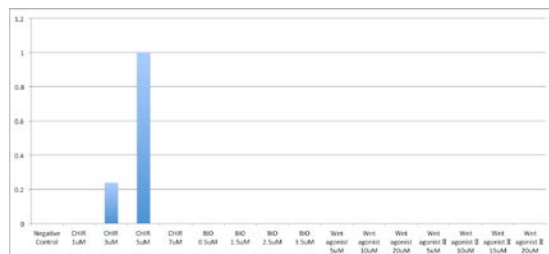


図 1. Wnt シグナルを活性化する化合物の検討。CHIR99021 を 5uM で添加することで最も効率よく分化誘導することができる。

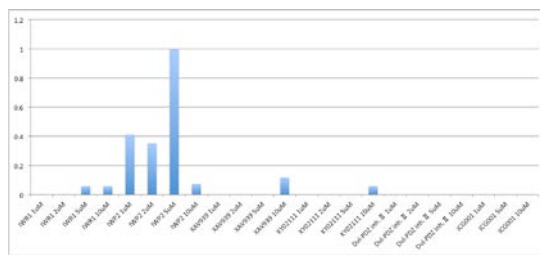


図 2. Wnt シグナルを抑制する化合物の検討。IWP2 を 5uM で添加することで最も効率よく分化誘導することができる。

CHIR99021 および IWP2 を利用して iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導するために最適な培養液を作成するため StemPro34 をコントロールとしていくつかの試作品を作成し、心筋細胞への分化誘導効率を検討したところ、その中の一つが StemPro34 よりも効率よく心筋細胞へと分化誘導することができることが明らかになった(図 3)。

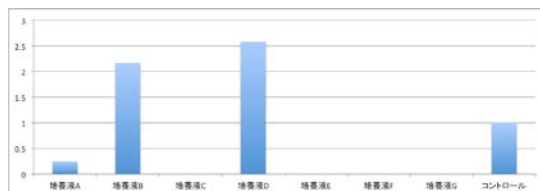


図 3. 培養液の検討。培養液 D を利用することで StemPro34 (コントロール) よりも効率よく心筋細胞を分化誘導することができる。

本研究で開発した安価に安定して大量の心筋細胞を生産するための培養液およびプロトコルについては特許を出願し、国内の試薬メーカーに製造・販売ライセンスを供与した。

(2) iPS 細胞由来心筋細胞から成熟した心室筋のみを精製する技術の確立

心室筋で高発現している遺伝子に対する蛍光プローブを作成し、心房筋・心室筋が混在した状態にある心筋細胞に取り込ませた後にシアボウソーティングを行ったところ、蛍光を強く発している細胞に MLC2v で染色され MLC2a で染色されない心室筋細胞が濃縮されていることが明らかになった(図 4)。ソーティングされた細胞について電気生理学的解析を行ったところ、蛍光を強く発している細胞には心室型の活動電位をもつ細胞が 92%の割合で含まれている一方、蛍光が認められない細胞には 33%しか含まれていなかった。これらの結果は、生細胞を標識可能な蛍光プローブを利用することで心室筋細胞が選択的に濃縮可能であることを示している。

本研究で開発した心室筋を精製する技術

および精製した心筋細胞を利用した薬剤スクリーニング系については特許を出願し、国内の試薬メーカーおよび製薬企業に実施許諾ライセンスを供与した。

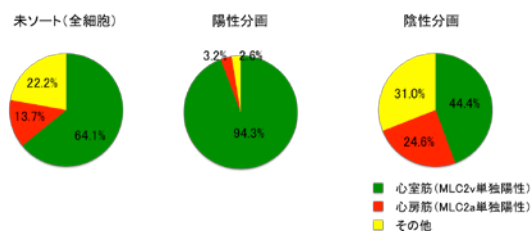


図 4. FACS 後の細胞を心室筋で高発現する MLC2v および心房筋で高発現する MLC2a で染色した。蛍光プローブを取り込んだ細胞に心室筋が濃縮されていることが明らかになった。

(3) iPS 細胞由来心筋細胞を成熟化・心室筋化させる化合物の同定

Sigma 社から市販されている化合物ライブラリーの中から心室でより特異的に発現する MLC2v を発現し、心房筋でより特異的に発現する MLC2a を発現しない心室筋細胞を増加させるような化合物をスクリーニングしたところ、複数の化合物がヒットした。うち一つはエピゲノムを変化させる化合物であり、逆の作用を有する酵素に対する阻害剤は心房筋を増加させる作用を有していたため、現在もメカニズムの解明を進めている。

(4) 正常 iPS 細胞由来「心室筋」を用いた心筋細胞機能測定技術の開発

健康者 iPS 細胞から本研究の成果を利用して作成した心筋細胞について、カルシウムイメージングをおこなったところ、市販されている細胞と比べても S/N 比の良好な心筋細胞が得られていること、カテコラミン刺激に対して拍動数が増加するなどの正常な薬理反応を示すこと、が確認された (図 5)。

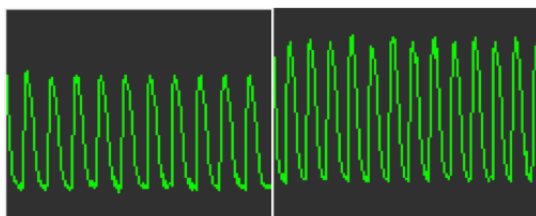


図 5. 正常 iPS 細胞由来心筋細胞のカルシウムイメージング。左とくらベイソプロテレノールを添加した右では拍動数と振幅が大きくなっている。

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 14 件)

英文論文

1. Hashimoto A, Naito AT, Lee JK, Kitazume-Taneike R, Ito M, Yamaguchi T, Nakata R, Sumida T, Okada K, Nakagawa A, Higo T, Kuramoto Y, Sakai T, Tominaga K, Okinaga T, Kogaki S, Ozono K, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Morita H, Umezawa A, Komuro I. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Patients With Duchenne Muscular Dystrophy and Their Induction to Cardiomyocytes. *Int Heart J.* 2016;57(1):112-7. doi: 10.1536/ihj.15-376. 査読有り
2. Yano M, Akazawa H, Oka T, Yabumoto C, Kudo-Sakamoto Y, Kamo T, Shimizu Y, Yagi H, Naito AT, Lee JK, Suzuki J, Sakata Y, Komuro I. Monocyte-derived extracellular Nampt-dependent biosynthesis of NAD(+) protects the heart against pressure overload. *Sci Rep.* 2015 Nov 2;5:15857. doi: 10.1038/srep15857.
3. Yabumoto C, Akazawa H, Yamamoto R, Yano M, Kudo-Sakamoto Y, Sumida T, Kamo T, Yagi H, Shimizu Y, Saga-Kamo A, Naito AT, Oka T, Lee JK, Suzuki J, Sakata Y, Uejima E, Komuro I. Angiotensin II receptor blockade promotes repair of skeletal muscle through down-regulation of aging-promoting C1q expression. *Sci Rep.* 2015 Sep 25;5:14453. doi: 10.1038/srep14453. 査読有り
4. Yamagami K, Oka T, Wang Q, Ishizu T, Lee JK, Miwa K, Akazawa H, Naito AT, Sakata Y, Komuro I. Pirfenidone exhibits cardioprotective effects by regulating myocardial fibrosis and vascular permeability in pressure-overloaded hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015 Aug 1;309(3):H512-22. doi: 10.1152/ajpheart.00137.2015. 査読有り
5. Okada K, Naito AT, Higo T, Nakagawa A, Shibamoto M, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Sumida T, Nomura S, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Morimoto S, Sakata Y, Shiojima I, Komuro I. Wnt/ β -Catenin Signaling Contributes to Skeletal Myopathy in Heart Failure via Direct Interaction With

- Forkhead Box O. *Circ Heart Fail.* 2015 Jul;8(4):799-808. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001958. 査読有り
6. Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat Commun.* 2015 Feb 26;6:6241. doi: 10.1038/ncomms7241. 査読有り
 7. Takahashi T, Nagai T, Kanda M, Liu ML, Kondo N, Naito AT, Ogura T, Nakaya H, Lee JK, Komuro I, Kobayashi Y. Regeneration of the Cardiac Conduction System by Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Circ J.* 2015;79(12):2703-12. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0400. 査読有り
 8. Liu ML, Nagai T, Tokunaga M, Iwanaga K, Matsuura K, Takahashi T, Kanda M, Kondo N, Naito AT, Komuro I, Kobayashi Y. Anti-inflammatory peptides from cardiac progenitors ameliorate dysfunction after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc.* 2014 Dec 2;3(6):e001101. doi: 10.1161/JAHA.114.001101. 査読有り
 9. Yasui H, Lee JK, Yoshida A, Yokoyama T, Nakanishi H, Miwa K, Naito AT, Oka T, Akazawa H, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Biomaterials.* 2014 Sep;35(27):7839-50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.080. 査読有り
 10. Kudo-Sakamoto Y, Akazawa H, Ito K, Takano J, Yano M, Yabumoto C, Naito AT, Oka T, Lee JK, Sakata Y, Suzuki J, Saido TC, Komuro I. Calpain-dependent cleavage of N-cadherin is involved in the progression of post-myocardial infarction remodeling. *J Biol Chem.* 2014 Jul 11;289(28):19408-19. doi: 10.1074/jbc.M114.567206. 査読有り
 11. 伊藤正道、内藤篤彦、小室一成、iPS細胞を用いた難治性心臓疾患の治療戦略、炎症と免疫、2016、24:72-76、査読無し
 12. 伊藤正道、内藤篤彦、小室一成、iPS細胞を用いた遺伝性心筋疾患の病態解明と治療法開発、日本臨牀増刊号「再生医療」、2015、73:411-415、査読無し
 13. 伊藤正道、内藤篤彦、小室一成 疾患特異的 iPS の臨床 2.循環器疾患における現況、*Surgery Frontier*、2015、22:141-145、査読無し
 14. 伊藤正道、内藤篤彦、小室一成、iPS細胞を用いた拡張型心筋症の病態解析、最新医学、2015、70:107-112、査読無し
- [学会発表] (計14件)
- 国内学会**
1. Atsuhiko Naito: Drug Discovery using hiPS-derived Cardiomyocytes、第80回日本循環器学会学術集会 (2016, 3, 仙台国際センター (宮城県・仙台市))
 2. 内藤篤彦: iPS細胞由来心筋細胞の創薬への応用、口頭、内藤篤彦、第19回日本心不全学会学術集会 (2015, 10, グランフロント大阪 (大阪府・大阪市))
 3. 内藤篤彦: 幹細胞由来心筋細胞の医学研究への応用、口頭、内藤篤彦、第5回レギュラトリーサイエンス学会学術集会、(2015, 9, 一橋大学一橋講堂 (東京都・千代田区))
 4. 内藤篤彦: ヒト iPS 細胞の創薬への応用、第79回日本循環器学会学術集会 (2015,4,大阪国際会議場 (大阪府・大阪市))
 5. 内藤篤彦: Wnt シグナルと心臓の生老病死、脳心血管抗加齢研究会 2014 (2014, 12, 梅田スカイビル (大阪府・大阪市))
 6. 内藤篤彦: Wnt シグナルと心臓の生老病死、第66回日本皮膚科学会西部支部学術集会 (2014, 11, アルファあなぶきホール (香川県・高松市))
 7. 岡田佳築、内藤篤彦、塩島一朗、坂田泰史、小室一成: Wnt/ β -catenin Signaling Promotes Heart Failure-Induced Skeletal Myopathy through Direct Interaction with FoxO.、第18回日本心不全学会学術集会 (2014, 10, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市))
 8. 内藤篤彦: Drug Discovery Against Heart Failure using Human iPS cells.、第18回日本心不全学会学術集会 (2014, 10, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市))
 9. 内藤篤彦: iPS細胞を用いた循環器疾患に対する創薬、For the Better Forum 2014 (2014, 9, 虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都・港区))
 10. Akito Nakagawa, Atsuhiko Naito, Tomokazu Sumida, Seitaro Nomura, Masato Shibamoto, Tomoaki Higo, Katsuki Okada, and Issei Komuro: Activation of canonical Wnt signaling

- in arterial endothelial cell induces cardiac dysfunction. The 18th International Vascular Biology Meeting (2014, 4, 都メッセ (京都府・京都市))
11. Tomoaki Higo, Atsuhiko Naito, Yasushi Sakata, and Issei Komuro: Pathogenic role of DNA single strand break accumulation in heart failure. Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions (2014, 7, Las Vegas, USA)
 12. Yuki Kuramoto, Masamichi Ito, and Atsuhiko Naito: Non-genetic method for purification of ventricular cells from human iPS-derived cardiomyocytes. Safety Pharmacology Society Annual Meeting (2014, 10, Washington DC, USA)
 13. Masamichi Ito, Yuki Kuramoto, and Atsuhiko Naito: Scalable, reproducible, and economical method for producing cardiomyocytes from human iPS cells. Safety Pharmacology Society Annual Meeting (2014, 10, Washington DC, USA)
 14. Masamichi Ito, Ryoko Takizawa, Natsumi Igarashi, Megumi Naito, Issei Komuro, and Atsuhiko Naito: Scalable, reproducible, and economical method for producing cardiomyocytes from human iPS cells. American Heart Association Scientific Sessions 2014 (2014, 11, Chicago, USA)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称：心筋細胞の製造方法、心室型心筋細胞及びその製造方法、並びにスクリーニング方法

発明者：内藤篤彦、小室一成

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/78784

出願年月日：2014年10月9日

国内外の別：PCT

名称：多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導する方法、並びに該方法に好適な培地添加剤、分化誘導調節剤、培地、培地作製用キット、及び多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導するためのキット

発明者：内藤篤彦

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/74947

出願年月日：2014年9月2日

国内外の別：PCT

〔その他〕

ホームページ等

<http://ips-heart.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

内藤 篤彦 (NAITO, Atsuhiko)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10588891