

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02558

研究課題名(和文) 循環器疾患におけるiPS細胞由来心筋細胞を用いた再生創薬に関する研究

研究課題名(英文) Study of drug discovery using cardiomyocytes derived from iPS cells in cardiovascular diseases

研究代表者

澤 芳樹 (Sawa, Yoshiki)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00243220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて、三次元心筋組織を作製し、心毒性評価を目的とした安全性検証モデルを作製した。従来、薬剤スクリーニングで用いられている単層培養した心筋細胞と比較し、特に収縮に作用する薬剤において三次元心筋組織は感度が高いことが示唆され、in vitro安全性検証モデルとして有用であることが示唆された。

さらに、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて、心臓線維化モデルを作製した。本モデルは線維化刺激、抑制刺激に対して生体と類似した応答性を示しており、抗線維化薬のスクリーニングシステムとして利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In vitro drug screening model is a critical step in drug discovery for clinical use. We developed the three-dimensional cardiac tissues using cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells for evaluating cardiotoxicity. The three-dimensional cardiac tissues exhibited cardiotoxicity induced by the known drugs. This model have great potential for in vitro drug screening with possible superiority to two-dimensional cardiomyocytes, suggesting that three-dimensional cardiac tissues may play crucial roles for drug repositioning or development in new cardiovascular agents.

In addition, we developed the cardiac fibrosis model using cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. The cardiac fibrosis model showed great responses to fibrosis stimulus similar to human, indicating its usefulness for drug screening system for drug anti fibrotic drugs.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞 創薬スクリーニング iPS由来心筋細胞 三次元組織 心毒性評価 心臓線維化モデル

1. 研究開始当初の背景

循環器領域において、高齢化、虚血性心疾患の増加にともない、今後心不全患者数の増大及びそれに伴う治療費の増加が予想され、既に高額化した医療費の高騰にさらに拍車をかけるものと思われる。重症心不全に対する現在の最終的な治療法は、補助人工心臓や心臓移植などの置換型治療であり、その有用性が報告されてきたが、耐久性や合併症、ドナー不足、高額な医療費等に問題があり、普遍的治療とは言い難いのが現状である。

このような状況のなか、薬剤による治療は汎用性が高く、病気の進行の抑制に加え、予防にも多大な効果を発揮することが可能であり、心不全の様々なメカニズムに作用する多様な新規薬剤を開発することは、心不全治療において重要な役割を果たすと考えられる。

しかし、薬剤の開発には多額の費用と開発期間がかかること、動物とヒトで効果が異なること等が問題であり、この問題点を解決しなければ、心不全に対する新規薬剤の開発は困難であると思われる。

また、EU では動物を用いる薬剤開発を禁止する途上にあり、非臨床試験は *in vitro* 試験にて代用される方向にある。そのなかで我が国の誇る iPS 細胞関連技術は、国際標準に展開せうる基盤技術である。我が国が創薬能力を有する国であり続けるために、iPS 細胞を用いた創薬基盤の構築・運用は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

iPS 細胞から作製した心筋組織を用いたスクリーニング方法の開発により、創薬開発の効率化、安全性の向上に資する基盤構築を目的とする。

3. 研究の方法

1) iPS 細胞樹立、心筋細胞への分化誘導、心筋細胞の精製

体細胞から iPS 細胞を作製し、未分化能・心筋分化能の確認を行う。また、健常者由来の iPS 細胞を用いて、心筋細胞への高効率な分化誘導方法の検討を行う。

2) 薬剤スクリーニング用心筋組織の作成と薬剤応答評価システムの開発

作製した iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、安全性検証モデル、心臓線維化モデルの心筋組織を作製する。モデルの最適化、従来の薬剤スクリーニング方法との比較を行う。作製した心筋組織を用いて、薬剤応答を評価するシステムの開発を行う。

3) ドラッグリポジショニングの可能性のある薬剤の選定

各製薬会社に打診し、ドラッグリポジショニングの可能性のある薬剤の有無を問い合わせ、ドラッグリポジショニングの可能性を有

する薬剤のリストを作成する。

4. 研究成果

1) iPS 細胞樹立、心筋細胞への分化誘導、心筋細胞の精製

iPS 細胞拠点事業内で習得した分化誘導法をもとに、健常ヒト iPS 細胞から高効率に心筋細胞を作製することに成功した。また、既知原因遺伝子変異を有する患者から血液を採取し、センダイウイルスベクターにより初期化因子を導入し、疾患特異的 iPS 細胞を作製した。作製した疾患特異的 iPS 細胞において、健常ヒト iPS 細胞と同等の未分化マーカーの発現を確認した。

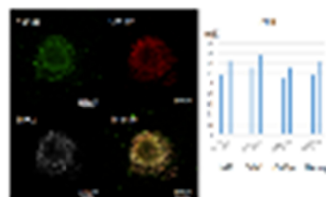


図1. 疾患特異的 iPS 細胞の未分化マーカーの発現

同細胞を用いて心筋分化誘導方法の検討を行ったところ、得られた心筋細胞はトロポニン陽性率が 60%以上であり、心筋特異的マーカーを発現することを確認した。

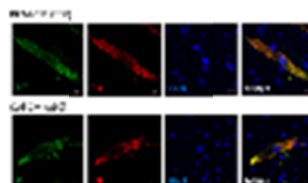


図2. 疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞の心筋特異的マーカーの発現

2) 薬剤スクリーニング用心筋組織の作製と薬剤応答評価システムの開発

2-1. 安全性検証モデルの作製と評価

健常ヒト iPS 細胞から分化させた心筋細胞を用いて、フィルターLbL 法により三次元心筋組織体 (3D-hiPSC-CT) を作製した。三次元心筋組織体の組織学的評価を行ったところ、心筋特異的構造タンパク・細胞外マトリクスタンパク (ECM) の発現が確認され (図3)、組織全体の拍動がみとめられた。

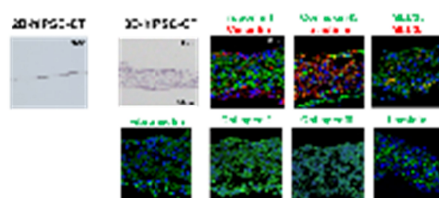


図3. 三次元心筋組織体の心筋特異的構造タンパク・ECM の発現

同組織に心筋細胞に対する薬理作用が明

らかであり、かつ作用機序が異なる薬剤を用いて薬剤応答性、さらに化合物スクリーニングの評価項目について検討した。細胞毒性を有する Doxorubicin を三次元心筋組織に 24 時間添加したところ、Doxorubicin 濃度依存的な細胞障害活性 (LDH Release) の上昇、生存率の低下をみとめた (図 4)。次に、従来の薬剤スクリーニング方法である単層培養した心筋細胞 (2D-hiPSC-CT) との比較を行った。単層培養した心筋細胞は、三次元心筋組織と比べ低濃度で細胞障害性がみとめられ、三次元心筋組織は薬剤耐性がある可能性が示唆された。

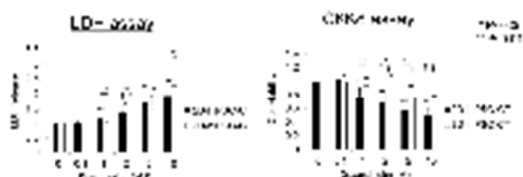


図 4 . Doxorubicin 添加後の三次元心筋組織の細胞障害性・生存率の変化

次に、HERG K チャンネルブロッカーである E-4031 を三次元心筋組織に添加したところ、濃度依存的にカルシウムピーク数、Up-stroke slope、Down-stroke slope の低下、PWD90 (Peak Width Duration 90%) の増加を示した。単層培養した心筋細胞と比較して、三次元心筋組織は薬剤添加による各パラメーターの変化率が有意に大きい傾向を示した。また薬剤添加 60 分後にはより顕著にみとめられ、応答が長く持続することが確認された (図 5)。収縮特性解析においても、同様に、濃度依存的な拍動数、収縮、弛緩速度の低下を示した (図 6)。

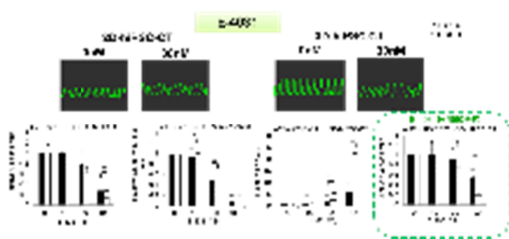


図 5 . E-4031 添加後の三次元心筋組織の細胞内カルシウム動態の変化

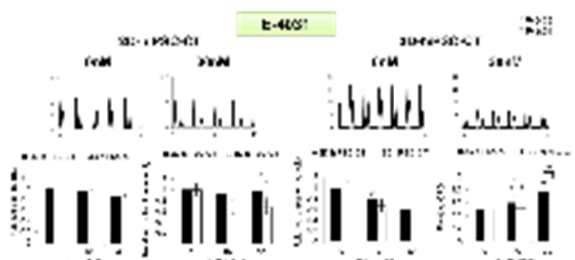


図 6 . E-4031 添加後の三次元心筋組織の収縮特性の変化

刺激剤である Isoproterenol を三次元心筋組織に添加したところ、濃度依存的にカルシウムピーク数、Up-stroke slope、Down-stroke slope の増加を示した。単層培養した心筋細胞と比較して、三次元心筋組織は薬剤添加による各パラメーターの変化率が有意に大きい傾向を示した (図 7)。また収縮特性解析においても、同様に、拍動数、収縮、弛緩速度の増加を示した (図 8)。

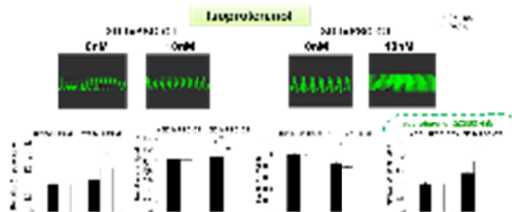


図 7 . Isoproterenol 添加後の三次元心筋組織の細胞内カルシウム動態の変化

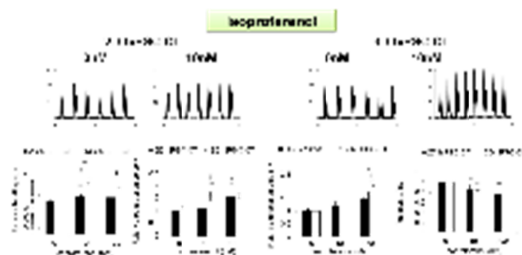


図 8 . Isoproterenol 添加後の三次元心筋組織の収縮特性の変化

以上の結果から、三次元心筋組織は単層培養した心筋細胞と比較して、薬剤応答の感度が異なり、特に収縮に作用する薬剤において三次元心筋組織の方が感度が高いことが示唆された。さらに、三次元心筋組織でみられた薬剤応答変化は、生体内の薬剤応答と類似しており、in vitro 安全性検証モデルとして有用であることが示唆された。

さらに、作製した三次元心筋組織の均一化と薬剤応答評価に最適な三次元心筋組織の作製を目的とし、三次元心筋組織を構成する細胞割合を統一する方法を検討した。生体の心臓は主に心筋細胞と線維芽細胞で構成されている。そこで、健常ヒト iPS 細胞から心筋分化誘導した細胞と市販の心臓線維芽細胞 (NH) と血管内皮細胞 (HM) を混合することにより、細胞混合モデルの三次元心筋組織を作製した。

細胞混合モデルは心筋細胞のみの組織体と比較し、線維芽細胞の含有割合依存的に、イオンチャネル関連の遺伝子発現が低く、ECM 関連遺伝子やギャップ結合関連の遺伝子の発現が高いことが確認された。

拍動動画解析より、細胞混合モデルは、心筋細胞のみの組織体と比較し、高い収縮特性を示した。E-4031 を添加したところ、両モデ

ルにおいて、濃度依存的な薬剤応答が確認されたが、細胞混合モデルは心筋細胞のみの組織体と比較し、低濃度より反応がみとめられた。以上のことより、心筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞から構成された三次元心筋組織体は優れた構造的・機能的特性および薬物に対する感受性を示し、新しい創薬スクリーニングツールになりうることを示唆した。

2-2. 心臓線維化モデルの作製と評価

健常ヒト iPS 細胞から分化させた心筋細胞、線維芽細胞からなる心筋組織体を用いて心臓線維化モデルの構築を検討した。作製した心筋組織体に線維化刺激として TGF- β を添加し、collagen、Fibronectin などの細胞外マトリックス (ECM) の産生を評価したところ、これらの ECM の産生亢進が認められた (図 9)。

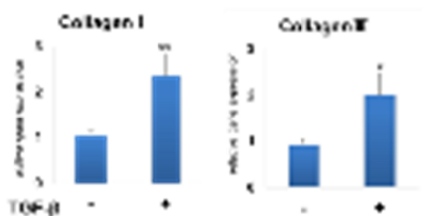


図 9. TGF 刺激による ECM の産生変化

また、心筋組織としての機能評価として、細胞の動きを数値化して収縮、弛緩の評価を行ったところ、収縮・弛緩速度、収縮・弛緩力に相当するパラメータの低下が認められた。さらに、心筋組織に含まれる心筋細胞純度による応答性の違いを評価したところ、純度 50~70% の場合に TGF- β への応答性が高く、80% では応答性が低下する傾向が認められた (図 10)。

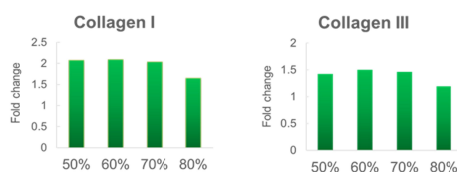


図 10. 心筋細胞純度の違いによる線維化刺激への応答性の違い

線維化刺激に加えて抗線維化作用をもつことが知られている因子を添加したところ、TGF- β 刺激による ECM 産生増加の抑制、収縮・弛緩速度の低下の抑制が認められた。線維化刺激、抑制刺激時の細胞内シグナル伝達を解析したところ、これまで線維化への関連の報告のある SMAD シグナルが変化していることが確認できた。このように、本モデル系は線維化刺激、抑制刺激に対して生体と類似した応答性を示しており、抗線維化薬のスクリーニングシステムとして利用できる可能性が示唆された。

3) ドラッグリポジショニングの可能性のある薬剤の選定

各製薬会社の協力を得て、これまでの知見を基に、ドラッグリポジショニング候補薬剤の選定を行いリストを作成した。

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 6 件)

Takeda M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Ito E, Harada A, Matsuura R, Iseoka H, Sougawa N, Mochizuki-Oda N, Matsusaki M, Akashi M, Sawa Y. Development of In Vitro Drug-Induced Cardiotoxicity Assay by Using Three-Dimensional Cardiac Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2018 Jan;24(1):56-67.

DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0247.

Lee YB, Lee JY, Byun H, Ahmad T, Akashi M, Matsusaki M, Shin H. One-step delivery of a functional multi-layered cell sheet using a thermally expandable hydrogel with controlled presentation of cell adhesive proteins. *Biofabrication*. 2018 Jan 10;10(2):025001.

DOI: 10.1088/1758-5090/aa9d43.

Amano Y, Nishiguchi A, Matsusaki M, Iseoka H, Miyagawa S, Sawa Y, Seo M, Yamaguchi T, Akashi M. Development of vascularized iPSC derived 3D-cardiomyocyte tissues by filtration Layer-by-Layer technique and their application for pharmaceutical assays. *Acta Biomater*. 2016 Mar;33:110-21.

DOI: 10.1016/j.actbio.2016.01.033.

Liu CY, Matsusaki M, Akashi M. Three-Dimensional Tissue Models Constructed by Cells with Nanometer- or Micrometer-Sized Films on the Surfaces. *Chem Rec*. 2016 Apr;16(2):783-96.

DOI: 10.1002/tcr.201500272.

Gribova V, Liu CY, Nishiguchi A, Matsusaki M, Boudou T, Picart C, Akashi M. Construction and myogenic differentiation of 3D myoblast tissues fabricated by fibronectin-gelatin nanofilm coating. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jun 3;474(3):515-521.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.130.

Matsuura K, Sugimoto I, Kuroda Y, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M. Development of Microfluidic Systems for Fabricating Cellular Multilayers. Anal Sci. 2016;32(11):1171-1176.

HP:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/32/11/32_1171/article

〔学会発表〕(計 18 件)

Takeda M, Miyagawa S, Ito E, Harada A, Mochizuki-Oda N, Sawa Y. Building a New Drug Screening System for Evaluating Cardiotoxicity by Three-dimensional Micro Cardiac Tip Derived from Induced Pluripotent Stem cells. 第 82 回日本循環器学会 2018, 2018.

Iseoka H, Miyagawa S, Sawa Y. In vitro modeling of cardiac fibrosis for drug screening using simulated extracellular matrix in induced pluripotent stem cells-derived cardiac construct. 第 82 回日本循環器学会 2018, 2018.

武田真季 宮川繁 伊東絵望子 原田明希摩 小田-望月紀子 明石満 澤芳樹 創薬スクリーニングを目的としたヒト iPS 細胞由来 3 次元心筋組織の作製 第 17 回日本再生医療学会学術集会, 2018

松崎典弥 細胞外微小環境制御による 3 次元組織モデルの構築と薬剤評価への応用, 第 16 回日本再生医療学会総会シンポジウム, 2017

伊勢岡弘子, 宮川繁, 福嶋五月, 齋藤充弘, 増田茂夫, 伊東絵望子, 大橋文哉, 澤芳樹 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心臓繊維化モデルによる創薬スクリーニングシステムの開発, 第 16 回日本再生医療学会学術集会, 2017,

武田真季, 宮川繁, 福嶋五月, 齋藤充弘, 伊東絵望子, 原田明希摩, 松浦良平, 小田 望月紀子, 松崎典弥, 明石満, 澤芳樹 ヒト iPS 細胞由来 3 次元心筋組織を用いた創薬スクリーニングシステムの検討, 第 16 回日本再生医療学会学術集会, 2017

松崎典弥, 天野雄斗, 西口昭広, 宮川繁, 澤芳樹, 明石満 毛細血管構造を有するヒト iPS 細胞由来 3 次元組織体チップの創製と薬剤毒性試験への応用 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016

Takeda M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Ito E, Harada A, Matsuura R, Matunaga Y, Mochizuki-Oda N, Matsusaki M, Akashi M, Sawa Y Building a new drug screening system for evaluating drug response and toxicity by three dimensional cardiac constructs

derived from human induced pluripotent stem cells AHA (American Heart Association) Scientific Sessions 2016

〔図書〕(計 1 件)

松崎典弥, 明石満, 第 III 編 第 3 章 立体心筋組織体の創製, バイオ・医療への 3D プリンティング技術の開発最前線, シーエムシーリサーチ出版, 167-181, (2016). ISBN978-4-904482-32-2

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00243220

(2) 研究分担者

・松崎 典弥 (MATSUSAKI, Michiya)
大阪大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号: 00419467

・宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号: 70544237

・秦 広樹 (HATA, Hiroki)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80638198