

令和元年6月12日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10626

研究課題名（和文）疾患iPS細胞由来三次元バイオマテリアル心臓組織を用いた心筋症治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of cardiomyopathy-specific iPS cell-derived 3-dimensional biomaterial-based cardiac tissues suitable for drug discovery

研究代表者

升本 英利（Masumoto, Hidetoshi）

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

研究者番号：70645754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：疾患再現モデル作製のための細胞準備として、拡張型心筋症患者等から樹立したiPS細胞を用いた、心筋細胞などの心臓を構成する細胞への分化誘導の方法を確立した。また詳細な病態再現を行うための三次元組織を作製・解析したところ、イオンチャネル関連遺伝子発現等の未成熟性が明らかとなった。新規薬剤開発に適した成熟化三次元人工心臓組織を構成するために、電気刺激による成熟化トレーニング培養による成熟化を試み、成熟心筋組織に関連する構造蛋白などのmRNA発現上昇を確認した。これらの結果から、新規薬剤開発に使用しうる疾患iPS細胞由来三次元バイオマテリアル人工心臓組織の開発における基礎研究基盤が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦においては、今後心不全患者の増加が予想されている一方で、心臓移植や植込み型人工心臓は未だ十分な供給がなされない状況がある。本研究成果は、心不全患者に対する創薬研究における、iPS細胞を用いた新たな技術基盤を与えるものであり、ヘルスケアおよび医療経済に対し貢献しうるものである。また、心筋症患者iPS細胞由来成熟化人工心臓組織は、疾患の病態をin vitroで再現しうるものであり、疾患進行に関してこれまで動物実験などで得られなかった新たな学術的発見をもたらすのに貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：First, we have established a protocol for cardiac cell differentiation from cardiomyopathy-specific iPS cells which is essential for the cell preparation of cardiomyopathy-specific iPS cell-derived 3-dimensional biomaterial-based cardiac tissues. Next, we constructed various types of 3-dimensional cardiac tissues and analysed them which resulted in immature tissue property and function including ion channel expression. We loaded the tissues with electrical stimulation training culture which promoted the tissue maturation which was confirmed by the expression level of mRNAs relating to tissue maturation. Here, we established a technological basis for the development of cardiomyopathy-specific iPS cell-derived 3-dimensional biomaterial-based cardiac tissues suitable for drug discovery.

研究分野：再生医学

キーワード：心臓再生医療 iPS細胞 バイオエンジニアリング

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。代表的な拡張型心筋症は多因子性の難病特定疾患である。末期拡張型心筋症への根本的な治療法は心臓移植しかなく、現に我が国の心臓移植適応例の90%以上が拡張型心筋症（あるいは拡張相肥大型心筋症）で占められている。しかしドナー不足は極めて深刻で、我が国での移植待機期間は約3年（2014年末現在）と極めて長期であり、しかも実際に移植が行われるのは適応例中ごく一部である。我が国の現状を鑑みると、移植以外の有効な治療法を確立することは急務と考えられる。

補助人工心臓は、本来移植待機患者に対して移植までのbridge（橋渡し）として開発されてきた（Bridge to transplantation）。しかし実際には深刻なドナー不足のため現実的なオプションとは言えない。現状に即した治療としての人工心臓からの離脱（Bridge to recovery）が新たな治療戦略として考えられるが、現在補助人工心臓からの離脱率は4-24%と低く、これを改善するための試みが求められる。また末期不全心への外科手術による左室部分切除・形成術（Batista手術・SAVE手術など）も行われてきたが、5年生存率は約45%と、薬物療法と比較し著明な改善は見られず、予後不良である。

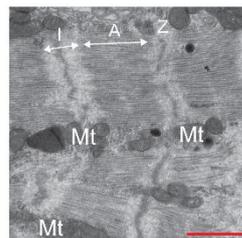
我々はこれまで、これらの補助人工心臓や外科手術の治療成績を改善すべく研究を行ってきた。この中で我々は虚血性心筋症ラット左室形成モデルを用いて、左室形成術後の再拡大・心不全再発に至る機序を抑制するために、レニン・アンギオテンシン系を抑制する薬剤(Nomoto, *Circulation* 2002)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(Tsuneyoshi, *Circulation* 2004)等の併用が著効することを示してきた。また、補助人工心臓をシミュレートしたラット異所性心移植実験を通じて、補助人工心臓装着時の容量負荷の除かれた(Unloaded)心臓においては、長期補助に伴い心筋萎縮に伴う心収縮能自体の低下をきたすこと(Oriyanhan, *J Heart Lung Transplant* 2007)、 β 2作動薬投与により心筋萎縮は抑制できないものの β 受容体感受性の回復・心筋アポトーシス進行の抑制を認めること(Tsuneyoshi, *Circulation* 2005)、拡張型心筋症ラット心における長期補助循環は心収縮能および β 受容体感受性を保つ一方で心筋線維化に伴う心筋硬化を促進すること(Muranaka, *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010)、などを示してきた。さらに最近、拡張型心筋症ラットモデルを用いて、肝細胞増殖因子の徐放投与が線維化およびアポトーシスを抑制することを示した(Nakano, *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2014)。これらの知見は、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可能性を示しているが、なお標準治療として広く普及し得るには不十分である現状も同時に示している。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。

心筋症患者から樹立した人工多能性幹細胞(iPS細胞)から分化誘導した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氣的活動異常を示す疾患で現在進行している(Yazawa, *Nature* 2011)。ここで問題となるのはこの単一心筋細胞を用いたスクリーニング法が心筋症に対する創薬系として機能しうるかどうかである。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。

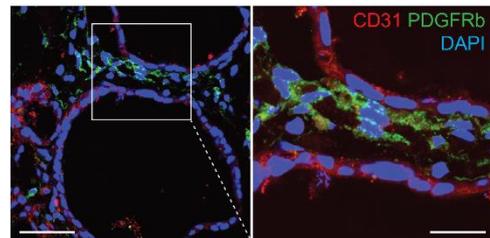
研究代表者の升本は以前より多能性幹細胞(ES/iPS細胞)から系統的に分化誘導した心筋細胞・血管内皮細胞・血管壁細胞を温度感受性培養皿を用いた細胞シート技術により再構成した、自己拍動性のマウスES細胞由来心臓組織シートを開発しており(Masumoto, *Stem Cells* 2012)、最近ヒトiPS細胞を用いた心臓組織シートを作製することにも成功した(Masumoto, *Sci Rep* 2014)。我々は組織構築をさらに洗練すべく、米国Louisville大学Cardiovascular Innovation InstituteのKellerとの共同研究を行い、バイオマテリアルを用いたヒトiPS細胞由来三次元心臓組織を作製することに成功した(図1)(Masumoto, *AHA abstract oral* 2015)。この三次元心臓組織は14日間のin vitroの培養において整列心筋サルコメア構造および血管構造を形成し、高度に組織化することが確認されている(図2・3)。この三次元心臓組織に対してさまざまなプログラム電気刺激を与えることにより、組織の収縮力および剛度、また刺激に対する追従能力の程度などの心筋組織としてのプロパティを総合的に評価する系を、我々はすでに確立している。



(図1) 三次元バイオマテリアル心臓組織



(図2) 整列心筋サルコメア (透過型電子顕微鏡)



(図3) 三次元心筋組織内に形成された血管構造 (CD31: 血管内皮細胞、PDGFRb: 血管壁細胞)

2. 研究の目的

我々は本研究において、このヒト iPS 細胞由来三次元心臓組織を既存の心筋症患者由来 iPS 細胞を用いて作製し、入手可能な各種化合物ライブラリを用いた網羅的なスクリーニングにより、補助循環からの離脱あるいは左室形成術後心不全の予防が可能となるような、心収縮力回復・各受容体機能異常・不整脈抑制あるいは線維化・アポトーシス抑制等の効果を持つ化合物をピックアップし、新薬の開発に向けた基礎研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 心筋症患者 iPS 細胞からの三次元バイオマテリアル心臓組織の作製

- ① 理化学研究所セルバンク等から拡張型心筋症患者由来の iPS 細胞を入手し、我々の有している単層高密度培養法をもとにした心臓構成細胞効率的分化誘導法 (Masumoto, *Sci Rep* 2014) により、心筋細胞と同時に血管内皮細胞・壁細胞を誘導する。
- ② これらの誘導された心臓構成細胞群を Flexcell 社 Tissue Train System あるいは類似の培養システム上に、コラーゲン I およびマトリゲルとともに播種し、14 日間培養にて、自己拍動性三次元心臓組織を得る。
- ③ 免疫染色を用いて、三次元心臓組織が正常・整な一方向性心筋配列を有していることを確認する。フローサイトメトリーにて細胞組成を確認する。
- ④ 拡張型心筋症患者以外に、肥大型心筋症・右室不整脈源性心筋症など入手可能な非虚血心筋症に関しても三次元心臓組織の作製を行う。

(2) 化合物スクリーニング

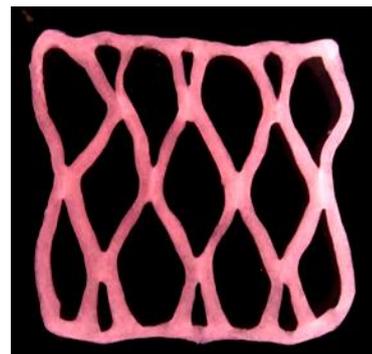
- ① アドレナリン受容体機能測定：化合物投与前後にて、アドレナリン受容体作動薬および遮断薬 (α 作動薬：ノルアドレナリン、 β 作動薬：イソプロテレノール、 β 遮断薬：プロプラノロール) を灌流投与し、拍動数・活動電位によりその反応性を測定する。
- ② カルシウム受容体機能測定：化合物投与前後にて、カルシウム細胞内濃度勾配により蛍光を発する色素 (Fluo8 など) を indicator とし、In cell analyzer にて蛍光強度を測定し差を評価する。
- ③ 線維化評価：化合物投与後細胞培養を継続する。1 週後に組織を回収、固定する。マッソン・トリクローム染色により線維化領域を評価し、コントロール (薬剤未投与) と比較して有意にそれを減らしている化合物をピックアップする。
- ④ アポトーシス評価：⑤と同様に 1 週後回収した組織より mRNA を回収する。また培養上清を回収する。遺伝子発現および培養上清タンパク量定量により、アポトーシス抑制・幹細胞誘導等の効果が知られている因子に関してコントロールと比較し有意に数値変動しているものをピックアップする。

4. 研究成果

健常ヒト iPS 細胞を用いて、円柱状の三次元バイオマテリアル人工心臓組織を作製し、その機能評価を行った。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に血管内皮細胞および血管壁細胞を含んだ三次元バイオマテリアル人工心臓組織は、多種類の血管細胞を含まないものに比べて、高い刺激追従性および組織応力を示し、組織学的には高い心筋細胞配向性およびサルコメア構造の成熟を認めた。ラット亜急性期心筋梗塞モデルへの移植において、心機能回復効果を認めた。これらの結果により、薬剤スクリーニング試験に耐えうる構造および機能を有した三次元バイオマテリアル人工心臓組織をヒト iPS 細胞から作製する基盤技術を確立することができた。この成果を論文として発表した (Masumoto, *Sci Rep* 2016)。

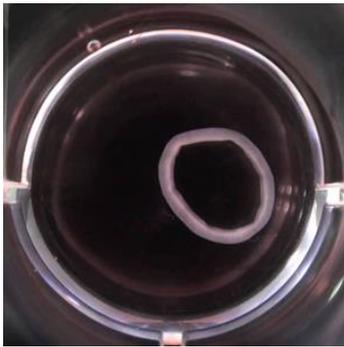
さらに、より詳細に病態再現を行うための多様な形態の三次元組織を作製するための予備的実験として、メッシュ状の人工組織作製を行った (図 4)。組織の形態により細胞の生存・収縮力・配向性に差異が出ることを示し、メッシュ状のものはより高い組織機能を持つことを示した。この成果についても論文として発表した (Nakane, *Sci Rep* 2017)。また、よりヒトの左心室の形状に近い形の人工組織として、ドーナツ状の人工組織作製に取り組んだ。サークル状の組織鋳型を使用することにより、自己拍動性のドーナツ型人工組織を作成し、その組織学および動態的特性につき検討を行った (図 5)。

また、疾患再現モデル作製のための細胞準備として、拡張型心筋症 iPS 細胞を入手し、その安定した培養維持

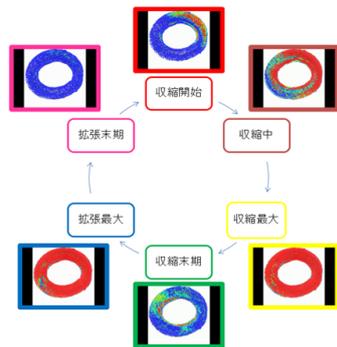


(図 4) メッシュ状三次元バイオマテリアル人工心臓組織

の方法を確立することができた (図6)。さらに、右室原性不整脈性心筋症患者から樹立した iPS 細胞を用いた、心筋細胞など、心臓を構成する細胞への分化誘導の方法を確立した。これにより、心筋症 iPS 細胞を用いた三次元バイオマテリアル人工心臓組織作製にとっての基盤的な技術を三次元組織作製技術とともに確立することが出来た。

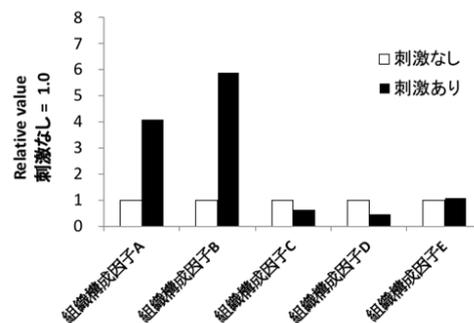


(図5) ドーナツ状三次元バイオマテリアル人工心臓組織およびその心周期における動態的特性



(図6) 拡張型心筋症患者由来 iPS 細胞 (Coriell 社) から分化誘導した心臓構成細胞群

一方で、様々な形態の三次元組織を作製し、その組織学的・動態的および生化学的特性を解析したところ、人工組織の未成熟性による不均一な収縮特性およびイオンチャネル関連遺伝子発現等の未成熟性が明らかとなり、新規薬剤開発に適した三次元人工心臓組織を構成するために、さらに組織の成熟化を推進する必要性が示されたため、これまで他グループより複数報告されている電気刺激による成熟化トレーニング培養による成熟化を試み、成熟心筋組織に関連する構造蛋白などの mRNA 発現上昇を確認した (図7)。これらの結果から、新規薬剤開発に使用しうる疾患 iPS 細胞由来三次元バイオマテリアル人工心臓組織の開発における基礎研究基盤が示された。



(図2) 心臓組織構成因子発現量の変化

(図7) 電気刺激による複数の組織構成因子の mRNA 発現上昇 (定量 PCR 法)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Dwenger M, Kowalski WJ, Ye F, Yuan F, Tinney JP, Setozaki S, Nakane T, Masumoto H, Campbell P, Guido W, Keller BB. Chronic optical pacing conditioning of h-iPSC engineered cardiac tissues. *J Tissue Eng.* 2019;10:2041731419841748. 査読有
2. Masumoto H, Yamashita JK. Human iPS cell-engineered three-dimensional cardiac tissues perfused by capillary networks between host and graft. *Inflamm Regen.* 2018;38:26. 査読有
3. Ishigami M, Masumoto H, Ikuno T, Aoki T, Kawatou M, Minakata K, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK, Minatoya K. Human iPS cell-derived cardiac tissue sheets for functional restoration of infarcted porcine hearts. *PLoS One.* 2018;13:e0201650. 査読有
4. Kawatou M, Masumoto H, Fukushima H, Morinaga G, Sakata R, Ashihara T, Yamashita JK. Modelling Torsade de Pointes arrhythmias in vitro in 3D human iPS cell-engineered heart tissue. *Nat Commun.* 2017;8:1078. 査読有
5. Kowalski WJ, Yuan F, Nakane T, Masumoto H, Dwenger M, Ye F, Tinney JP, Keller BB. Quantification of Cardiomyocyte Alignment from Three-Dimensional (3D) Confocal Microscopy of Engineered Tissue. *Microsc Microanal.* 2017;23:826-842. 査読有
6. Nakane T, Masumoto H, Tinney JP, Yuan F, Kowalski WJ, Ye F, LeBlanc AJ, Sakata R, Yamashita JK, Keller BB. Impact of Cell Composition and Geometry on Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Engineered Cardiac Tissue. *Sci Rep.* 2017;7:45641. 査読有
7. Masumoto H, Yamashita JK. Untiring steps toward the maturation of human stem cell-engineered heart tissue. *Ann Transl Med.* 2017;5:87. 査読有

8. Masumoto H, Yamashita JK. Human iPS Cell-Derived Cardiac Tissue Sheets: a Platform for Cardiac Regeneration. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2016;18:65. 査読有
9. Masumoto H, Nakane T, Tinney JP, Yuan F, Ye F, Kowalski WJ, Minakata K, Sakata R, Yamashita JK, Keller BB. The myocardial regenerative potential of three-dimensional engineered cardiac tissues composed of multiple human iPS cell-derived cardiovascular cell lineages. *Sci Rep*. 2016;6:29933. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. 升本英利. 同種 iPS 細胞を用いた心不全治療を目指して：これからの心不全治療における iPS 細胞を用いた再生医療の役割. 第 18 回再生医療学会総会(招待講演). 2019 年. 神戸市
2. Heima D, Masumoto H, Kawatou M, Osada H, Ikeda T, Tabata Y, Minatoya K, Yamashita J.K. Human iPS Cell-Derived Cardiac Tissue Transplantation to a Rat Unloaded Ischemic Heart Model Mimicking Left Ventricular Assist Device Implantation. AHA (American Heart Association) Scientific Sessions 2018 (国際学会). 2018 年. Chicago, USA
3. Kawatou M, Masumoto H, Ashihara T, Yamashita JK. Torsade de Pointes arrhythmia model in vitro with 3D human iPS cell-engineered heart tissue. 第 5 回国際組織工学・再生医療学会世界会議 (国際学会). 2018 年. 京都市
4. Masumoto H. Updates for Cardiovascular Regenerative Medicine Based on Biomaterials and Beyond. 第 5 回国際組織工学・再生医療学会世界会議 (招待講演) (国際学会). 2018 年. 京都市
5. 平間 大介, 升本英利, 川東 正英, 金光 ひでお, 山崎 和裕, 池田義, 湊谷 謙司. 左室補助装置下の虚血性心疾患におけるヒト iPS 細胞由来心臓組織移植の効果について：ラット異所性移植モデルを用いた検討. 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2018 年. 東京都
6. 升本英利, 中根 武一郎, 平尾 慎吾, 瀧本 真也, 李 子澎, 金光 ひでお, 植山 浩二, 山崎 和裕, 池田義, 田畑 泰彦, 山下 潤, 湊谷謙司. 心臓再生医療用のヒト iPS 細胞由来心血管系細胞多層体の開発. 第 118 回日本外科学会定期学術集会. 2018 年. 東京都
7. Masumoto H. Human iPS Cell-derived Cardiac Tissue (HiCT) for cardiac regenerative therapy. European Society for Cardiology Congress 2017 (国際学会). 2017 年. Barcelona, Spain
8. 升本英利, 中根 武一郎, 南方謙二, 池田義, 坂田 隆造, 湊谷 謙司, 山下 潤, Bradley B. Keller. ヒト iPS 細胞由来心臓構成細胞を用いた再生医療用の三次元人工心筋組織の開発. 第 117 回日本外科学会定期学術集会. 2017 年. 横浜市
9. 升本英利, 坂田 隆造, 湊谷 謙司. 多能性幹細胞由来バイオエンジニアリング心臓組織の外科的移植による心筋再生研究. 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2017 年. 東京都
10. Masumoto H. Generation of 3-dimensional cardiac tissue with human iPS cells and tissue engineering. The 9th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research (PPSSC) (招待講演) (国際学会). 2016 年. Taichung, Taiwan
11. Masumoto H, Yamamizu K, Ikuno T, Takakubo H, Minakata K, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K. A technology for cardiac regeneration using human iPS cell-derived cardiac tissue including multiple cardiovascular lineages. AHA American Heart Association 2016 (国際学会). 2016 年. New Orleans, USA
12. Masumoto H. Bioengineered cardiac cell sheets. AHA American Heart Association 2016 (招待講演) (国際学会). 2016 年. New Orleans, USA
13. Masumoto H, Nakane T, J.P. Tinney, F Yuan, W.J. Kowalski, Minakata K, Sakata R. Implantation of human iPS cell-derived engineered cardiac tissues including cardiomyocytes and multiple vascular lineages ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in a rat model. European Society of Cardiology (ESC) Congress 2016 (国際学会). 2016 年. Rome, Italy
14. Masumoto H, Nakane T, J.P. Tinney, F Yuan, F Ye, W.J. Kowalski, Minakata K, Sakata R, Yamashita J.K., B.B. Keller. Therapeutic potential of human iPS cell-derived engineered cardiac tissue including cardiomyocytes and multiple vascular lineages for myocardial infarction. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2016 (国際学会). 2016 年. San Francisco, USA
15. 升本英利, 中根 武一郎, 南方謙二, 池田義, 坂田 隆造. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞および血管構成細胞を含む三次元人工心筋組織による心筋再生についての検討. 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2016 年. 岡山市
16. 升本英利, 中根 武一郎, Joseph Tinney, 南方謙二, 坂田 隆造, 山下 潤, Bradley Keller. ヒト iPS 細胞由来心臓構成細胞を含む三次元人工心筋組織移植による心筋再生についての検討. 第 37 回日本炎症・再生医学会. 2016 年. 京都市

〔図書〕（計 1 件）

1. Nakane, T, Masumoto H. Stem Cells in Clinical Practice and Tissue Engineering. InTech, 2017, 総ページ数 334 (97-110 ページ)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：池田 義

ローマ字氏名：IKEDA TADASHI

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40281092

研究分担者氏名：南方 謙二

ローマ字氏名：MINAKATA KENJI

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：60539675

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。