

iPS細胞由来心筋成熟促進技術の開発及び創薬への応用



医療と技術

劉 莉*

Department of Design for Tissue Regeneration
Osaka University Graduate School of Medicine

Key Words : iPS-derived cardiomyocyte, Micro/Nano device,
Maturation, Drug screening

1. はじめに

ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞は再生医療や薬剤スクリーニング、そして心疾患モデルの確立への応用に期待されている。最近、我々の研究機関において、ヒト iPS 細胞由来心筋シートを用いた虚血性心筋症患者に対する移植が医師主導型治験で施行された。一方、iPS 細胞由来心筋細胞を用いた創薬スクリーニング分野への応用については、未解決の問題がある。それは iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導法が確立され、高純度で、安全性の高い心筋細胞製品が提供されているが、既存の心筋細胞の分化誘導法で得られた心筋細胞はまだ未熟であるため、創薬への応用に十分な機能を有していないということだ。そのために、人体に近い心筋細胞の成熟度を促進させる技術の開発が急務とされている。

近年、異分野融合の研究は非常に注目されており、特に工学的な手法により多能性幹細胞の多能性能の維持や、分化誘導効率に制御する報告が多く知られている。我々の研究グループはマイクロ・ナノテクノロジーを利用し、生体内の細胞の構造と微小環境を模倣することで、幹細胞及び幹細胞由来の細胞をコントロールし、高機能性細胞または組織を構築した上で、再生医療及び薬剤への応用が期待できる(1-5)。本稿では、これまで我々の工学手法を駆使した心筋組織の構築及び機能性・成熟度を向上させ

た技術を紹介し、今後心毒性評価、薬剤スクリーニングへの応用について概説する。

2. 3次元・配向性構造による心筋細胞成熟過程の促進法

近年、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の分化誘導法の樹立に成功し、心筋細胞の純度とコスト問題も解決しているが、得られた心筋細胞の成熟度は成人の心筋細胞と比べて低い。その原因として、従来の心筋培養法は平面培養皿の中で行うため、得られた心筋細胞は配列組織構造を持たず、2次元・ランダムな構造を有することにある。そのため、心筋としての収縮力や、電気生理学機能など、機能がまだ低い(図1)。代表的な心筋細胞のマーカーを発現しているにも関わらず、網羅的に遺伝子解析した結果、正常な成人心筋細胞の遺伝子発現レベルと比較し、まだ胎児レベルの心筋に近い状態である。中でも、代表的な心筋マーカーであるβ-MHC 遺伝子の発現量は成人心筋細胞の10%以下である。

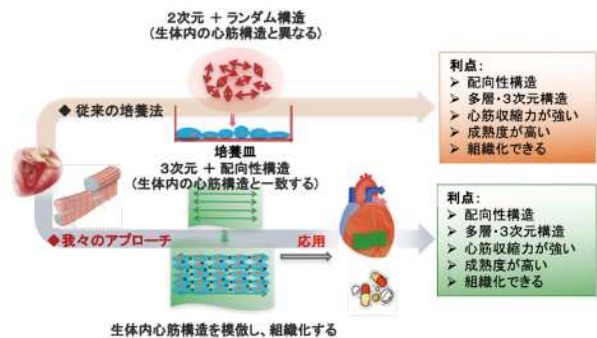
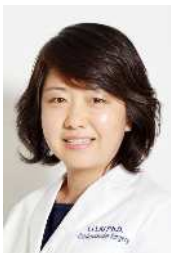


図1: 3次元・配向性心筋組織構築法の開発

生体内において、心筋細胞は3次元・配向性構造を有することで知られている。そこで心筋細胞の機能を向上させるため、我々は生体内の微小環境を模倣することに着目し、安全性と配向性構造を有した



* Li LIU

1973年8月生まれ
徳島大学大学院 医学研究科 生理学専攻 博士課程 (2000~2004年)
現在、大阪大学医学系研究科 心臓血管外科 組織再生デザイン学共同研究室 特任准教授(常勤) 医学博士 専門/生理学
TEL : 06-6105-6113
E-mail : li-liu@surgl.med.osaka-u.ac.jp

ナノファイバーを心筋細胞の足場材料として開発した(図1)。安全性の高い生体分解性素材である乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)は、既にFDAに認められ、臨床現場でよく使用されている材料である。この材料を用いて、ファイバーの太さ、密度、配向性などの条件を検討し、心筋細胞に最適化したナノファイバーの作製法を開発した。このナノファイバーの上にヒトiPS細胞由来心筋細胞を播種すると、心筋細胞はナノファイバーの表面に接着し、さらにファイバーの方向に沿って配列することが確認された。細胞が自発的に組織を形成し、最終的に20層以上で200 μm の厚みを持つ多層化した心筋組織が構築された(6)。これに対して、配向性がなくランダムファイバーで構築した3次元心筋組織(RNF)、そして従来の培養皿(2D)で培養した心筋細胞と比べて、配向性ナノファイバー(ANF)で構築した心筋組織の遺伝子発現は明らかに向上され、特に成人型的心筋細胞マーカーである β -MHCの発

現量が高く、複数の心筋細胞の構造と関連する遺伝子の発現量も増加した；心筋細胞の電気信号を測定した結果、電気生理学的な機能性に優れていた。心筋細胞に影響を与える複数の薬剤テストの中、細胞表面のイオンチャンネルに作用してQT延長の心臓毒性を呈する試薬E-4031を濃度の増加を与えたところ、100 μM のE-4031の添加により、未熟な心筋細胞の場合は不整脈の誘発率が高いことに対して、成熟度が高い心筋組織の場合は薬剤の応答に非常に安定で、不整脈を起こさないことが判明した(図2)。

3. 自発性循環進行波による心筋細胞成熟過程の促進法

近年、物理的な方法(例えば、電気刺激、機械的な細胞トレーニング法など)による心筋細胞の成熟過程を促進する方法が報告されている(7-9)。これらの方法では細胞にダメージがかかり、長期的なトレーニングには適しておらず、また周辺の制御装置が複雑で操作しにくいなどの問題が挙げられている(図3)。

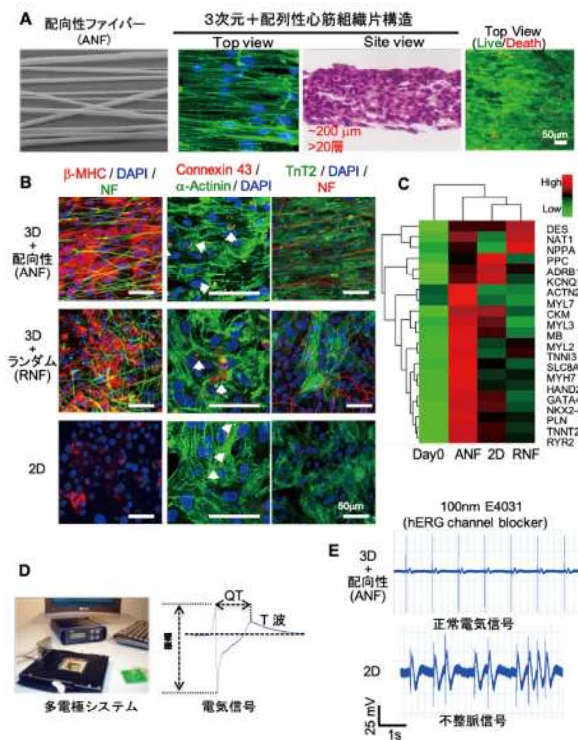


図2：3次元・配向性構造により心筋細胞の成熟過程を促進する。(A)配向性ファイバーを用いて、3次元かつ配向性構造を有する心筋組織の構築ができた。(B)成人心筋細胞特異成熟マーカー(β -MHC)の発現レベルが向上された。(C)心筋構造と成熟と関係する遺伝子の発現が上昇した。(D)多電極システムにより心筋特異電気信号を測定に使用する。(E)薬剤E-4031の添加により、未熟な心筋細胞において、不整脈が誘発された。

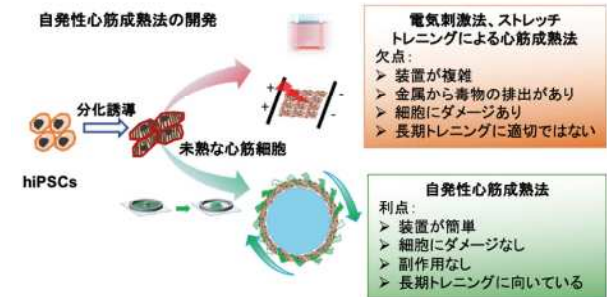


図3：自発性循環進行波による心筋成熟法の開発

外部から物理的な刺激を一切使用せず、自発的な心筋細胞の成熟加速法を開発するために、我々は工学的な手法を駆使したヒトiPS細胞由来心筋細胞の3次元構造を持つリングの作製に成功した(10-11)。興味深いことに、心筋リングの状態を維持することで、自発で活動電位の高速伝播現象が誘発されたことを見出した。我々はこの現象に『自発性循環進行波』という名前を付けた。デバイスの作製条件と細胞の培養条件を精密にコントロールすることによって、この現象を誘発する発生率と安定性を制御することが可能になる。最適化条件下で、70%以上のサンプルは循環進行波が自発で誘導され、さらにこの現象は3ヶ月以上も継続し、安定であることが確

認できた。さらに驚くべきことに、この循環進行波の刺激により心筋細胞が自発的に自分自身をトレーニングし、2週間の間で細胞の拍動数は高くなり、頻率が0.2Hzから4Hzまで上昇した。さらに、心筋の構造と成熟度に関係する遺伝子の発現を調べた結果、全体的に著しく向上され、特に成人型の心筋細胞マーカーである β -MHCの発現量は成人心筋と比較して、従来の10%以下から30%以上に高くなった。自発性循環進行波の刺激により、波の伝達方向に沿って、細胞は配向性構造を有することも確認できた。また、心筋細胞内部の構造をTEMで確認した結果、心筋のサルコメア構造がはっきり形成されている。サルコメアの間の距離は正常成人心筋細胞と近づいてくる(1.8 μ m)。さらに、心筋機能としたミトコンドリア呼吸運動や、リングの収縮力などを測定した結果、自発性循環進行波がない時と比べて、明らかに上昇したことを明確にした。引き続き、我々は自発性進行波ありとなしのサンプルを用いて、薬剤評価を行い、薬剤反応を比較した。その結果、配向性ファイバー心筋組織のデータと同様に、成熟度が高い心筋リングでは薬の反応に安定であるのに対し、自発性進行波がない未熟な心筋リングの場合は50~100nMのE-4031を投与することに、不整脈が頻発してしまった(図4)。

以上の結果により、配向性ナノファイバーのような足場や、デバイスなどの工学手法を用いて、3次元・配向性構造、及び自発性進行波を誘発するこ

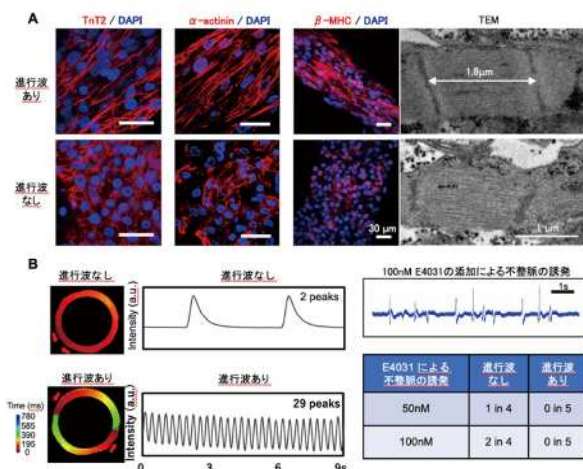


図4：(A) 自発性循環進行波の刺激により、心筋が配向性構造を有している。さらに成熟マーカーの発現が上昇された。(B) 自発性循環進行波により、心筋の拍動頻度が高くなる。薬剤E-4031の添加により、自発性循環進行波がない心筋において、頻繁に不整脈が誘発される。

とにより、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の成熟過程を促進する方法の樹立に成功した。これらの方法で作製した成熟度が高い心筋組織を使って、薬剤反応のテストを行うと、より安定で正確な薬剤評価を行うことができたため、適切であることが明らかになった(12)。

4. 高成熟心筋組織を用いた薬剤スクリーニング分野への応用

iPS細胞は再生医療で注目を集めている一方、創薬への応用の可能性にも期待され続けている。現在全ての領域の医薬品について心毒性心電図に関する非臨床実験の実施を求める指針がある。致死性不整脈誘発活性が懸念される薬物は、市場からの撤退や承認遅延、そして開発断念を余儀なくされた。また、“古薬新用”、つまり既に使われている薬や開発の途中で断念された候補物を別の病気に利用されることを期待している。薬の安全性を評価するための心毒性評価試験や、病態モデルを作製による病態解明と創薬スクリーニングなどにおいて、従来は動物由来の初代細胞、動物がよく使用されたが、ヒトの生体組織の細胞と機能の種差、ロット差など様々な問題を抱えており、正確に薬の反応を評価することは困難である。ヒトiPS細胞由来心筋細胞は薬物の毒性評価や動態評価への応用において産業界からの必要性が高いが、現在誘導された心筋細胞の成熟度は低く、心筋細胞の向きがバラバラで配向されておらず筋収縮力が弱い、頻繁な不整脈の発生、応用で安全性の保証ができないといった様々な欠点がある。我々は現在の化学の方法で制御しているiPS細胞由来心筋細胞をベースにして、さらに物理的な方法を融合した技術を革新し、生体の成人に近い心筋細胞を安定的かつ大量に提供できる技術開発に取り組

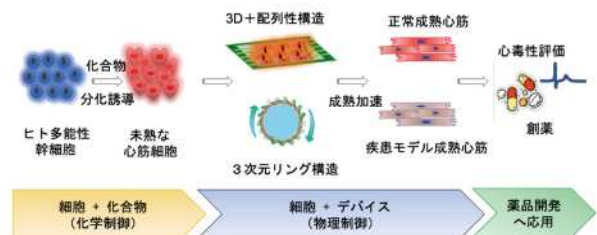


図5：化学・物理の制御により、ヒトiPS細胞由来した正常及び疾患モデル心筋細胞の成熟過程を促進して、成人と近い心筋組織を用いて薬剤応答への応用を目指す。

んでいる。最終的に、高成熟・高機能した組織レベルでの薬効と安全性をより高い精度で予測する基盤技術の開発を目指す。創薬技術向上のための評価系が確立出来れば、心筋組織を用いた開発候補薬の有効性や安全性の評価が可能になる。今後候補薬の開発効率の向上やリスクを低減する技術の開発が期待される。

参考文献

1. Nanofibrous gelatin substrates for long-term expansion of human pluripotent stem cells. Li Liu, Momoko Yoshioka, Minako Nakajima, Arata Ogasawara, Jun Liu, Kouichi Hasegawa, Sisi Li, Jianli Zou, Norio Nakatsuji, Ken-ichiro Kamei*, Yong Chen* *Biomaterial* 35; 6259-6267 (2014).
2. Culture Substrate Made of Elastomeric Micro-Tripod Arrays for Long-Term Expansion of Human Pluripotent Stem Cells. Li, J., Zhang, F., Yu, L., Fujimoto, N., Yoshioka, M., Li, X., Shi, J., Kotera, H., Liu, L*, Chen, Y*, *Journal of Materials Chemistry B*. 5; 236-244 (2017).
3. Nano-on-micro fibrous extracellular matrices for scalable expansion of human ES/iPS cells. Li Liu, Ken-ichiro Kamei, Momoko Yoshioka, Minako Nakajima, Junjun Li, Nanae Fujimoto, Shiho Terada, Yumie Tokunaga, Yoshie Koyama, Hideki Sato, Koichi Hasegawa, Norio Nakatsuji, Yong Chen*, *Biomaterial* 124; 47-54 (2017).
4. Effective motor neuron differentiation of hiPSCs on a patch made of crosslinked monolayer gelatin nanofibers Yadong Tang, Li Liu, Junjun Li, Leqian Yu, Francesco Paolo Ullo Severino, Li Wang, Jian Shi, Xiaolong Tu, Vincent Torre, Yong Chen*, *Journal of Materials Chemistry B* 4; 3305-3312 (2016).
5. Induction and Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Cardiomyocytes on a Compartmented Monolayer of Gelatin Nanofibers. Tang, Y., Liu, L. Li, J., Yu, L., Wang, L., Shi, J., Chen, Y. *, *Nanoscale* 8; 14530-14540 (2016).
6. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Tissue-Like Constructs for Repairing of the Infarcted Myocardium. Li, J., Minami, I., Shiozaki, M., Yu, L., Yajima, S., Miyagawa, S., Shiba, Y., Morone, N., Fukushima, S., Yoshioka, M., Li, S., Qiao, J., Li, X., Wang, L., Kotera, H., Nakatsuji, N., Sawa, Y. *, Chen, Y.*, Liu, L.*, *Stem Cell Reports*. 9(5) 1546-1559 (2017).
7. Electrical stimulation promotes maturation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Chan, Y., Ting, S., Lee, Y , Ng, K., Zhang, J., Chen, Z., Siu, C., Oh, S., Tse, H. *, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 6; 989-999. (2013).
8. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. Ronaldson-Bouchard, K., Ma, S., Yeager, K., Chen, T., Song, L., Sirabella, D., Morikawa, K., Teles, D., Yazawa, M., Vunjak-Novakovic, G. *, *Nature*, 556; 239-243 (2018).
9. Electro-mechanical conditioning of human iPSC-derived cardiomyocytes for translational research. Kroll, K., Chabria, M., Wang, K., Hausermann, F., Schuler, F., Polonchuk, L. *, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 130; 212-222 (2017).
10. Circulatin re-entrant waves promote maturation of hiPSC-derived cardiomyocytes in self-organized tissue ring, Junjun Li, Lu Zhang, Leqian Yu, Itsunari Minami, Shigeru Miyagawa, Marcel Horning, Ji Dong, Jing Qiao, Xiang Qu, Ying Hua, Nanae Dujimoto, Yuji Shiba, Yang Zhao, Fuchou Tang, Yong Chen, Yoshiki Sawa*, Chao Tang*, Li Liu*, *Communications Biology*, 3(1); 122 (2020).
11. Analysis of Circulating Waves in Tissue Rings Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells, Lu Zhang, Junjun Li, Li Liu*, Chao Tang*, *Scientific Reports*, 10; 2984 (2020).
12. hiPSC-Derived Cardiac Tissue for Disease Modeling and Drug Discovery, Junjun Li, Ying Hua, Shigeru Miyagawa, Jingbo Zhang, Lingjun Li, Li Liu*, Yoshiki Sawa*, *International Journal of Molecular Sciences* 21; 8893 (2020).