

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Application of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発
(英語) Development of screening system for drug discovery using disease specific iPS cells.

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科 教授 澤 芳樹
所属 役職 氏名： (英語) Professor, Yoshiki Sawa,
Osaka University Graduate School of Medicine,

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

【和文抄録】

本研究は、健常者由来、および疾患特異的 iPS 細胞から作成した心筋組織を用いたスクリーニングにより、創薬開発の効率化、安全性の向上に資する基盤の構築を目的とする。創薬開発において心毒性は深刻な副作用であり、既存の系では動物モデルや細胞の電気生理学的解析が用いられているが、より効率的に評価できる *in vitro* のスクリーニング系の開発は重要である。本課題では正常 iPS 細胞由来心筋細胞、および、疾患特異的 iPS 細胞を用い、創薬スクリーニング系の構築を目指すとともに既承認薬剤が効能を有する適応可能疾患のスクリーニングにより、薬剤に新たな価値を与えるドラッグリポジショニングを行うための基盤の構築も目標としている。

当該年度は、以下の項目を遂行した。

1. 疾患特異的 iPS 細胞から心筋細胞の効率的誘導と特性解析、正常組織との比較
2. 正常 iPS 細胞組織から線維化モデルの作成
3. iPS 細胞樹立症例の候補となる遺伝性心筋症症例からの原因遺伝子変異同定
(3-1) 候補症例蓄積 (4 症例) および同症例に対するゲノム解析

- (3-2) 症例のゲノム解析から責任変異の同定
- (3-3) 変異機能解析と化合物スクリーニング
- 4. 体細胞の iPS 細胞化
- 5. 心筋細胞への分化誘導
- 6. 健常および疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞の機能特性および形態特性を解析
- 7. ドラッグリポジショニング対象薬剤 pirfeidon (特発性肺線維症治療薬) の健常 iPS 細胞由来心筋組織に対する効果をハイスループットスクリーニングシステムで検証
- 8. iPS 細胞由来心筋細胞の Ca トランジェントをモニターし、興奮特性を長期間観察する方法の構築
- 9. 細胞外基質解析用心筋組織の構築
- 10. 血管新生解析用心筋組織の構築
- 11. 効率良く心筋誘導を引き起こす特定因子を見出し、ヒト iPS 細胞を用いた分化研究においても証明した。
- 12. 心室筋誘導に必要な特定因子を同定。ヒト iPS 細胞分化系においても証明した。

【英文抄録】

The aim of this project is the development of in vitro screening system by using disease specific iPS cells to discover new drugs for treating cardiac disease. Cardiotoxicity is a severe side effect of drugs that induce structural and electrophysiological changes in cardiac muscle cells. Current methods for predicting cardiotoxicity are mainly based on combination studies of cell lines expressing ion channels and animal models. Human iPSC-derived cardiomyocytes are emerging as potentially more predictive alternatives, particularly for the early phases of preclinical research. We aimed to establish several lines of disease specific iPS cells from the patients with genetic cardiac disorder, induce cardiomyocytes (iPS-CM) and integrate them into two or three dimensional cell architecture, as well as analyzing their genetic background and identification of responsible gene(s). The artificial tissues constructed by iPS-CM will be useful to efficient drug screening or drug repurposing

Current year, we performed the following studies;

- 1. Efficient derivation of cardiomyocytes from disease specific iPS cells
- 2. Development of in vitro model system of cardiac fibrosis
- 3. Identification of causal gene mutation from hereditary cardiomyopathy patients as candidates of iPS cell establishment cases
 - (3-1) Genome analysis for the 4 cases
 - (3-2) Identification of responsible mutations
 - (3-3) Mutation function analysis and compound screening
- 4. Generation of iPS cells from somatic cells.
- 5. Differentiation of iPS cells into cardiomyocytes.
- 6. Functional and morphological analysis of the healthy or disease-specific iPS-CM
- 7. Evaluation of the efficacy of “Pirfenidone (drug for treating idiopathic pulmonary fibrosis)” on healthy iPS-CM, using a high-throughput screening system

8. Consutoraction of long-term imaging method of calcium transient in iPS-CM
9. Development of in vitro cardiomyocyte tissues for an extracellular matrix assay
10. Development of in vitro cardiomyocyte tissues for an angiogenesis assay
11. Generation of functional Cardiomyocyte induction from human iPSCs by the defined factors
12. Generation of functional Ventricular cardiomyocytes from human iPSCs by the cooperative function between transcription factors and ncRNA

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2 件、国際誌 15 件)

1. A. Ge, M. Matsusaki, L. Qiao, M. Akashi, S. Ye, Salt Effect on Surface Structures of Polyelectrolyte Multilayers (PEMs) Investigated by Vibrational Sum Frequency Generation (SFG) Spectroscopy, *Langmuir* 32, 3803-3810 (2016).
2. D. Hikimoto, A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. Akashi, High-Throughput Blood- and Lymph-Capillaries with Open-Ended Pores which allow the Transport of Drugs and Cells, *Adv. Healthcare Mater.* 5, 1969-1978 (2016).
3. Gribova, C.-Y. Liu, A. Nishiguchi, M. Matsusaki, T. Boudou, C. Picart, M. Akashi, Construction and Myogenic Differentiation of 3D Myoblast Tissues Fabricated by Fibronectin-Gelatin Nanofilm Coating, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474, 515-521 (2016).
4. Imai A, Kishita Y, Nakayama Y, Fujita S, Futatani T, Kohda M, Yatsuka Y, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Dried blood spots for newborn screening allows easy determination of a high heteroplasmy rate in severe infantile cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2016 Jun 29;221:446-449.
5. Imai A, Kohda M, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Lathrop M, Okazaki Y, Ott J. HDR: a statistical two-step approach successfully identifies disease genes in autosomal recessive families. *J Hum Genet.* 2016 Jun 30.
6. Nakagawa A, Naito AT, Sumida T, Nomura S, Shibamoto M, Higo T, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Oka T, Lee JK, Harada M, Ueda K, Shiojima I, Limbourg FP, Adams RH, Noda T, Sakata Y, Akazawa H, Komuro I. Activation of endothelial β -catenin signaling induces heart failure. *Scientific reports.* 2016, 6, 25009
7. Masumura Y, Higo S, Asano Y, Kato H, Yan Y, Ishino S, Tsukamoto O, Kioka H, Hayashi T, Shintani Y, Yamazaki S, Minamino T, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S, Sakata Y. Btg2 is a Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy through a Decrease in Cytosolic RNA. *Sci Rep.* 2016 Jun 27 6:28592. doi: 10.1038/srep28592.
8. Ishida H, Saba R, Kokkinopoulos I, Hashimoto M, Yamaguchi O, Nowotschin S, Shiraishi M, Ruchaya P, Miller D, Harmer S, Poliandri A, Kogaki S, Sakata Y, Dunkel L, Tinker A, Hadjantonakis AK, Sawa Y, Sasaki H, Ozono K, Suzuki K, Yashiro K. GFRA2 Identifies Cardiac Progenitors and Mediates Cardiomyocyte Differentiation in a RET-Independent Signaling Pathway. *Cell Rep.* 2016 Jul 5. pii: S2211-1247(16)30804-X

9. Ito S, Asakura M, Liao Y, Min KD, Takahashi A, Shindo K, Yamazaki S, Tsukamoto O, Asanuma H, Mogi M, Horiuchi M, Asano Y, Sanada S, Minamino T, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Identification of the Mtus1 Splice Variant as a Novel Inhibitory Factor Against Cardiac Hypertrophy. *J Am Heart Assoc.* 2016 Jul 6; 5(7). pii: e003521.
10. Okuda K, Fu HY, Matsuzaki T, Araki R, Tsuchida S, Thanikachalam PV, Fukuta T, Asai T, Yamato M, Sanada S, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Hanawa H, Hao H, Oku N, Takashima S, Kitakaze M, Sakata Y, Minamino T. Targeted Therapy for Acute Autoimmune Myocarditis with Nano-Sized Liposomal FK506 in Rats. *PLoS One.* 2016 Aug 8;11(8):e0160944.
11. K. Matsuura, I. Sugimoto, Y. Kuroda, K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, Development of Microfluidic Systems for Fabricating Cellular Multilayers, *Anal. Sci.*, 32, 1-6 (2016)
12. 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. *International Heart Journal.* 2016, 57, 1, 112-7
13. Takanari H, Miwa K, Fu X, Nakai J, Ito A, Ino K, Honda H, Tonomura W, Konishi S, Opthof T, van der Heyden MA, Kodama I, Lee JK. A New In Vitro Co-Culture Model Using Magnetic Force-Based Nanotechnology. *Journal of cellular physiology.* 2016, 231, 10, 2249-56
14. Ichibori Y, Mizote I, Maeda K, Onishi T, Ohtani T, Yamaguchi O, Torikai K, Kuratani T, Sawa Y, Nakatani S, Sakata Y. Clinical Outcomes and Bioprosthetic Valve Function After Transcatheter Aortic Valve Implantation Under Dual Antiplatelet Therapy vs. Aspirin Alone. *Circ J.* 2017 Feb 24;81(3):397-404
15. Sakamoto Y, Kioka H, Hashimoto R, Takeda S, Momose K, Ohtani T, Yamaguchi O, Wasa M, Nakatani S, Sakata Y. Cardiogenic shock caused by a left midventricular obstruction during refeeding in a patient with anorexia nervosa. *Nutrition.* 2017 Mar;35:148-150

<国内誌>

1. 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
2. 高島 成二 循環器疾患のゲノム医療 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 43(3): 134-137, 2017 ニューサイエンス社

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. エナジーメタボリズムとミトコンドリア病 (仮題)], 高島成二, 創薬・医療フォーラム (第 5 回 談話会)「酸化リン酸化を活性化するタンパク質の同定と創薬」2016/4/26, 国内
2. Ca 感受性蛍光プローブ蛋白発現による iPS 細胞由来心筋細胞興奮特性の長期観察技術 の開発, ポスター, 三輪佳子, 李鍾國, 安河内絢, 大倉正道, 中井淳一, 坂田泰史, 宮川繁, 澤芳樹, 第 37 回日本炎症・再生医学会, 京都勧業会館 みやこめっせ 京都 2016/6/12 国内

3. Electrical properties of stem-cell derived cardiac tissues experimental platforms for research and development, 口頭, Lee JK, De La Salle University, Manila. 2016/9/21, 国外
4. 【招待講演】 Fabrication of 3D-Engineered Tissues with Blood Capillaries and Their Biomedical Application, Michiya Matsusaki, ENGE2016, 2016/11/08, Korea 国外
5. Effectiveness of human iPS cell-derived cardiac 3D-tissue constructs with cardiomyocytes and endothelial cells, Oral, Yokoyama J, Miyagawa S, Fukushima S, Takamura Y, Shima Y, Akashi M, Toda K, Ueno T, Kuratani T, Sawa Y, American Heart Association Scientific Sessions, 2016/11/12, 国外
6. Building a new drug screening system for evaluating drug response and toxicity by three dimensional cardiac constructs derived from human induced pluripotent stem cells, Poster, 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, American Heart Association Scientific Sessions, 2016/11/12, 国外
7. In Vitro Model of Allogenic Cell Transplantation for Conduction Defects - Electrical Coupling Between Rat iPS Cell-Derived Cardiac Cells and Rat Native Cardiac. ポスター Yoshida A, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y, Komuro I, Sakata Y, New Orleans Ernest N Morial Convention Center. 2016/11/15 国外
8. Tissue Clearance Technique Enables to Investigate Three-Dimensional Distribution of Cardiac Sympathetic Nervous System. ポスター。Yokoyama T, Lee JK, Miwa K, Tomoyama S, Nakanishi H, Yoshida A, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. New Orleans Ernest N Morial Convention Center. 2016/11/15 国外
9. 「日本心不全学会ジョイントシンポジウム」 坂田泰史、日本人工臓器学会（鳥取/米子コンベンションセンター、2016年11月24日）口頭、国内
10. ATP代謝調節による新しい心疾患治療戦略, 高島成二, 21th Cardiovascular Metabolism and Aging Conference, 2016/12/2, 国内, 東京
11. Three-dimensional imaging of Transparent Hearts Revealed Abnormal Distribution Cardiac Sympathetic Nerves in Mice with Myocardial Infarction, 口頭, Yokoyama T, Lee JK, Miwa K, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I, 東京コンベンションホール, 2016/12/16, 国内
12. 左室拡張不全と心筋性状：心エコー、MRI、CT でどこまで迫れるか？ 坂田泰史、日本心血管画像動態学会（三重/ホテルグリーンパーク津、2017年1月21日）、口頭、国内
13. 【招待講演】医薬品アッセイへの応用を目指した3D培養の取り組み, 松崎典弥, 細胞アッセイ研究会シンポジウム, 2017/01/31, 国内
14. Three dimensional Architecture of the Cardiac Sympathetic Nervous System in Tissue-Cleared Hearts of Mice of after Myocardial Infarction, ポスター, Yokoyama T, Lee JK, Miwa K, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I, Gordon Research Conference, Ventura CA, USA 2017/2/8 国外
15. 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、ポスター、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、第16回日本再生医療学会 2017/3/7 国内
16. LBL法で作成したヒト iPS 由来 3D心筋構築組織のラット慢性心不全モデルへの移植, 口頭、横

- 山淳也、宮川繁、福嶋五月、原田明希摩、高村寧、島史明、明石満、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹、第16回日本再生医療学会 2017/3/7 国内
17. 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 ポスター、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、第16回日本再生医療学会 2017/3/7 国内
 18. 【招待講演】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、松崎典弥、第16回日本再生医療学会総会シンポジウム、2017/03/08、国内
 19. Allosteric Activation of Cytochrome C Oxidase by Small Ligands, 高島 成二, The 90th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society, 2017/3/16, 国内, 長崎
 20. ガイドライン解説1「心臓移植適応判定と必要な検査」坂田泰史、日本循環器学会（金沢/石川県音楽堂、2017年3月17日）、口頭、国内
 21. 「心筋病理細胞核クロマチンスコアを用いた重症心不全可塑性臨床診断指標の開発と実用化」坂田泰史、日本循環器学会（金沢/石川県音楽堂、2017年3月19日） Translational Research 振興事業最終報告会 口頭、国内
 22. 【招待講演】細胞集積技術による三次元組織の構築と応用、今後の課題、松崎典弥、第36回日本動物細胞工学会シンポジウム、2017/03/29、国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 身近になりつつある再生医療への期待と課題、松崎典弥、練馬ぶんかサイエンスカフェ、2017/03/19、国内。
2. からだをつくる？、松崎典弥、日本科学未来館サイエンティスト・クエスト、2017/03/04、国内。

(4) 特許出願