

ず、シナプス前部のマーカーのシナプシン I 染色像には変化は認められなかった(図 2b)。また、スパインの数や形態にも大きな変化は認められなかった(図 2c)。

次に、NMDA 受容体活性の時間変化の評価を、生きた細胞を用いて、SDR で評価することができるかどうかを検討した。図 3 に示すように、100  $\mu$ M グルタメート 50 秒後投与による NMDA 受容体活性化の直後からドレブリン SDR は急激な減少を示し、洗浄によりグルタメート濃度が下がるにつれて、SDR も徐々にコントロールレベルまで回復した。

次に、セロトニン受容体活性化により起こるドレブリンの局在変化を SDR で評価できるかどうかを検討した。セロトニン IIA 受容体の特異的アゴニストとしては、( $\pm$ )-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI) 1  $\mu$ M を用いた。図 4 に示すように、投与後 15 分後では有意に減少を示した(control, n = 90; DOI, n = 100; P<0.01)。

#### ドパミン D1 受容体活性の評価法におけるドレブリンマーカーの重要性の検討

今回は昨年度のセロトニン受容体の実験データと比較するために、クラスター数の測定により評価を行った。D1 アンタゴニスト(A68930) 1  $\mu$ M を投与後のドレブリンクラスター数とシナプシン I クラスター数を測定した。図 5 に示すように、D1 アンタゴニスト投与後 5 分では、ドレブリンクラスター数には有意な減少は認められなかった。投与後 15 分では、わずかに減少傾向が認められたが、有意差は検出できなかった。投与後 15 分後では、シナプシン I クラスター数に既に有意な減少が認められ、ドレブリンクラスター数の減少はシナプス数の変

化が起きているための二次的変化である可能性が示唆された。

#### ES 細胞の発達評価への応用

佐藤薫分担研究者の協力を得て、ES 細胞を神経細胞に分化させ、誘導後 12 日目と 29 日目において、ドレブリンおよびシナプシン I の発現状態を観察した。誘導後 12 日目では、ドレブリンの発現が確認された。ドレブリンは細胞体周囲および成長中のニューライトに分布しており、初代培養神経細胞の観察結果と一致していた(図 6A)。誘導後 29 日目においても、ドレブリンの斑状/点状の染色像が多数観察され、初代培養神経細胞の観察結果と一致していた(図 6B)。

#### D. 考察

昨年度の研究により、ドレブリンの集積度はシナプス後部一般の分化レベルの評価に用いることが可能であることがわかった。しかしながら、クラスター数を測定する評価方法では、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞では、ドレブリンの集積度の絶対量が異なるため、シナプス後部の分化レベルの評価は興奮性神経細胞と抑制性神経細胞ではそれぞれの評価基準を別個に決定する必要があることが判明した。

そこで、本年度は、ドレブリン集積度をスパイン基部の樹状突起シャフトに対するスパイン頭部のドレブリンの量比(SDR)で測定したところ、ドレブリンの集積度のより定量的な測定が可能となった。

また、NMDA 型グルタメート受容体活性化により SDR が 1 以下となること、とセロトニン受容体活性化による SDR の減少は有意であるが、1 以下にはならないことがわかったので、ドレブリン SDR の変化量を評

価することにより、NMDA型グルタメート受容体活性とセロトニン受容体活性を区別して、推定することが可能である事が示唆された。

一方、ドパミン D1 受容体活性はドレブリンを指標として検出することはできないことが示唆された。このことは、NMDA 型グルタメート受容体活性化あるいはセロトニン受容体活性化がドパミン D1 受容体活性化とともに起こったときに、NMDA 型グルタメート受容体活性あるいはセロトニン受容体活性を選択的に抽出して評価できる可能性を示している。この可能性を検証するためには、今後のさらなる研究が必要であるが、種々の受容体の活性レベルの特異的評価を行うために、ドレブリン集積度 (SDR) が応用できると考えられ、中枢神経細胞を用いた *in vitro* の安全性薬理試験の開発の可能性が示唆された。

最後に、ドレブリン集積度により ES 細胞から分化した神経細胞の分化度を評価できるかを、検討したところ、初代培養神経細胞と同様に、ドレブリン集積度を応用して、ES 細胞の分化度を評価することができることが示唆された。このことは iPS 細胞から分化させた神経細胞の分化／成熟度をドレブリンの集積度により評価できることを示唆している。

## E. 結論

我々は、シナプスの分化レベルの評価系およびシナプス後部受容体活性の評価系として、ドレブリン集積度の定量的測定法 (SDR 測定法) を用いることにより、従来の方法とは全く異なる簡便な免疫染色による評価系の可能性を示すことができた。この評価系は、*in vitro* 系を用いた新たな薬物スクリーニング方の開発に有用であり、

ES 細胞から分化誘導した神経細胞の分化レベルの評価にも使えることが示唆された。今後ヒト由来神経細胞の終末分化である機能的シナプス結合の形成のマーカーとして利用した試験法の開発が期待できる。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Tanaka K, Sato K, Yoshida T, Fukuda T, Hanamura K, Kojima N, Shirao T, Yanagawa T, and Watanabe H. "Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication." *Muscle and Nerve*, 44:968-977 (2011)
2. Kobayashi-Yamazaki C, Shirao T, Sasagawa Y, Maruyama Y, Akita H, Saji M, and Sekino Y. "Lesions of the supramammillary nucleus decrease self-grooming behavior of rats placed in an open field" *The Kitakanto Medical Journal* 61:287-292 (2011)
3. Han W, Takamatsu Y, Yamamoto H, Kasai S, Endo S, Shirao T, Kojima N, Ikeda K. "Inhibitory role of inducible cAMP early repressor (ICER) in methamphetamine-induced locomotor sensitization" *PLoS ONE* 6: e21637 (2011)
4. Okamoto T, Endo S, Shirao T, and Nagao S. "Role of Cerebellar Cortical Protein Synthesis in Transfer of Memory Trace of

- Cerebellum-Dependent Motor Learning” *J. Neurosci.* 31: 8958-8966 (2011)
5. Kambe T, Motoi Y, Inoue R, Kojima N, Tada N, Kimura T, Sahara N, Yamashita S, Mizoroki T, Takashima A, Shimada K, Ishiguro K, Mizuma H, Onoe H, Mizuno Y, Hattori N "Differential regional distribution of phosphorylated tau and synapse loss in the nucleus accumbens in tauopathy model mice." *Neurobiol Dis.*42:404-414.. (2011)
  6. Okamoto T, Shirao T, Shutoh F, Suzuki T, Nagao S. "Post-training cerebellar cortical activity plays an important role for consolidation of memory of cerebellum-dependent motor learning." *Neurosci Lett.* 504: 53-56. (2011)
  7. Mancini A, Sirabella D, Zhang W, Yamazaki H, Shirao T and Krauss RS "Regulation of myoblast fusion by the actin-binding factor drebrin" *Skeletal Muscle* 1-36 (2011)
- 学会発表
1. Shirao T, Hanamura K, "Regulatory mechanism of drebrin localization at dendritic spines." *Emerging Concepts of Neuronal Cytoskeleton*, (invited), Santa Cruz, Chile, April 24-27, 2011.
  2. Suzuki Y, M. Hino, K. Shirai, Y. Yoshida, T. Mizui, K. Hanamura, T. Shirao, T. Nakano. "X ray Irradiation Induces Acute Depolymerization of Axonal and Dendritic Microfilaments in Cultured Neuron", 53rd Annual Meeting of American Society for Radiation Oncology, Miami, Florida, October 2-6, 2011.
  3. Shirao, T., Hanamura, K., Yasuda, H., Kajita, Y., Kamata, Y., Sekino, Y., Kojima, N. "Regulatory role of drebrin in hippocampus-dependent learning." 23rd ISN Biennial Meeting, Athens, Greece, August 28 - September 1, 2011.
  4. Fujieda, T., Shirao, T., Sekino, Y. "Voltage-sensitive dye imaging of GABA<sub>B</sub> receptors mediated responses in the lateral nucleus of the mice amygdala." 23rd ISN Biennial Meeting, Athens, Greece, August 28 - September 1, 2011.
  5. Shirao T. "Activity-dependent accumulation of F-actin associated with drebrin A facilitates spine formation." *The Synapse-From physiology to pathology*, (invited), Stresa, Italy, September 4-7, 2011.
  6. Suzuki Y, Hino M, Shirai K, Yoshida Y, Mizui T, Hanamura K, Shirao T, Nakano T. "X ray Irradiation Induces Acute Depolymerization of Axonal and Dendritic Microfilaments in Cultured Neuron." ADTRO's 53rd

- Annual Meeting, Maiami Beach, FL, Oct. 2-6, 2011.
7. Shirao T. "Radiosensitivity of newly-generated neurons in the adult brain" First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. Maebashi, Japan, January 29, 2011.
  8. 山崎博幸、白尾智明「新規ドレブリン結合タンパク質の同定とその機能解析」 First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. Maebashi, Japan, January 29, 2011.
  9. Roppongi RT, Hanamura K, Shirao T. "Inhibitory effect of 5-HT<sub>2A</sub> receptor activity on drebrin accumulation in dendritic spines" First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. Maebashi, Japan, January 29, 2011.
  10. 鎌田洋輔、花村健次、山崎博幸、白尾智明「スパイン内のアイソフォーム特異的なドレブリン動態のアクチン細胞骨格による制御機構」 First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. Maebashi, Japan, January 29, 2011.
  11. Fujieda T. "Analysis of neuronal activity in the lateral amygdala of mice slice preparation using voltage-sensitive dye imaging." First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. Maebashi, Japan, January 29, 2011.
  12. 石塚 佑太、花村健次、児島 伸彦、白尾智明、武井延之「X線照射による脳における mTOR シグナル及びタンパク質合成の変化」 First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. Maebashi, Japan, January 29, 2011.
  13. Kojima N, Hanamura K, Shirao T. "Acute effect of X-irradiation on conditioned fear memory" First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. Maebashi, Japan, January 29, 2011.
  14. 梶田裕貴、白尾智明「ドレブリンノックアウトマウスを用いた海馬成体新生ニューロンの解析」神経組織の成長・再生・移植研究会 第 26 回学術集会 2011 年 6 月 25 日
  15. 白尾智明「成体脳における新生神経細胞の発達過程と放射線感受性の関連について」第 20 回日本定位放射線治療学会(教育講演)、名古屋、2011 年 7 月 29 日
  16. 梶田裕貴、児島伸彦、白尾智明「Newly-generated neurons are decreased in the adult hippocampus of drebrin-null mutant mice」第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011 年 9 月 14 日～17 日
  17. 児島伸彦、水井利幸、関野祐子、白尾智明「Myosin II ATPase

- activity is involved in drebrin translocation in dendritic spines」第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011年 9 月 14 日～17 日
18. 山崎博幸、児島伸彦、白尾智明「Drebrin-binding protein Spikar facilitates filopodia formation in immature stage of neuronal development」第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011年 9 月 14 日～17 日
  19. 藤枝智美、白尾智明、三輪秀樹、関野祐子「Modulation of neuronal circuits by GABA<sub>B</sub> receptor activity in the mouse lateral amygdala」第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011年 9 月 14 日～17 日
  20. 永雄総一、岡本武人、遠藤章吾、白尾智明、鈴木寿紀「Different effects of transcription and translation inhibition on transfer of memory trace of cerebellum-dependent motor learning」第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011年 9 月 14 日～17 日
  21. Shirao T. “FRAP and time-lapse imaging analyses at dendritic spines of hippocampal neuronal culture” in Symposium「Optical imaging techniques linking different levels of neural information processing in the brain」第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011年 9 月 14 日～17 日
  22. 田邊和也、山崎博幸、浅田明子、斉藤太郎、白尾智明、久永眞一「Cdk5 に依存した Drebrin のリン酸化」第 54 回日本神経化学学会大会、加賀、2011年 9 月 26 日～28 日
  23. Shirao T. “Activity-dependent accumulation change of drebrin-bound actinfilaments in dendritic spines” in Symposium “Neurobiology and pathophysiology of the spine diseases” 第 54 回日本神経化学学会大会、加賀、2011年 9 月 26 日～28 日
  24. 梶田裕貴、三輪美樹、児島伸彦、中村克樹、白尾智明「マーモセット脳におけるドレブリンの免疫組織化学的解析」第 58 回北関東医学会総会、前橋、2011年 9 月 29 日～30 日
  25. 藤枝智美、白尾智明、三輪秀樹、関野祐子「マウス扁桃体外側核の GABA 受容体応答の可塑性に関する研究」第 58 回北関東医学会総会、前橋、2011年 9 月 29 日～30 日
  26. Shirao T, Yamazaki H, Kojima N, Sekino Y. “Myosin-II-dependent translocation of drebrin at the early phase of synaptic plasticity” 第 85 回日本薬理学会年会(英語口頭発表 15 日)、京都、2012年 3 月 14 日～16 日
  27. 藤枝智美、白尾智明、三輪秀樹、関野祐子「膜電位感受性色素を用いたマウス扁桃体外側核内シナプス可塑性の解析」第 89 回日本生理学会(発表 29 日)、松本、2012年 3 月 29 日～31 日
- G. 知的所有権の取得状況  
なし

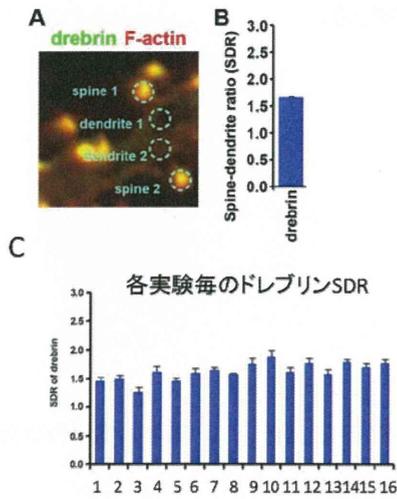


図 1 ドレブリンの初代培養海馬神経細胞におけるスパイン-樹状突起幹比 (SDR)。A. ドレブリンと F-アクチンの二重染色像。Spine1 の円内のドレブリンの平均輝度を dendrite1 の円内のドレブリン平均輝度で割った値が Spine1 の SDR である。B. 16 回の異なる海馬神経細胞初代培養を行い、170 個の細胞の SDR を平均したもの。C. 16 回の培養毎の SDR。

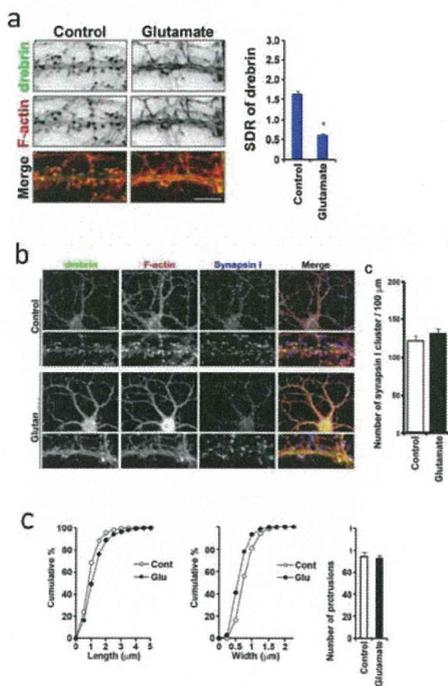


図 2 a. グルタミン酸投与によるドレブリン SDR が 1 以下に減少した。\*  $p < 0.01$ . Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ 。b. グルタミン酸投与により、シナプシン I クラスタ数は変化しない。c. グルタミン酸投与により、スパインの数および形態は変化しない。

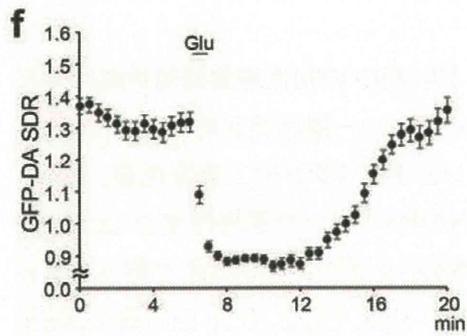


図 3 グルタミン酸投与後のドレブリンSDR変化の時間経過。

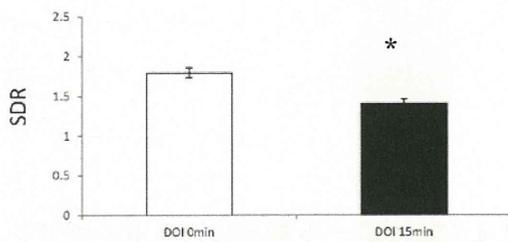


図 4 DOI投与によるドレブリンSDRの有意な減少。\*  $p < 0.01$

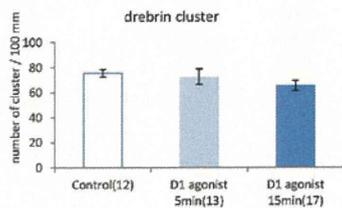
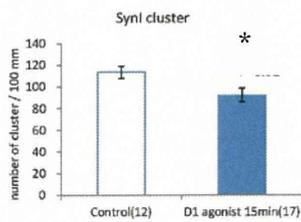


図 5 上段はドパミンD1受容体のアンタゴニストA68930投与によるドレブリンクラスター数の変化。下段はシナプシン I クラスター数 (\*  $p < 0.05$ )



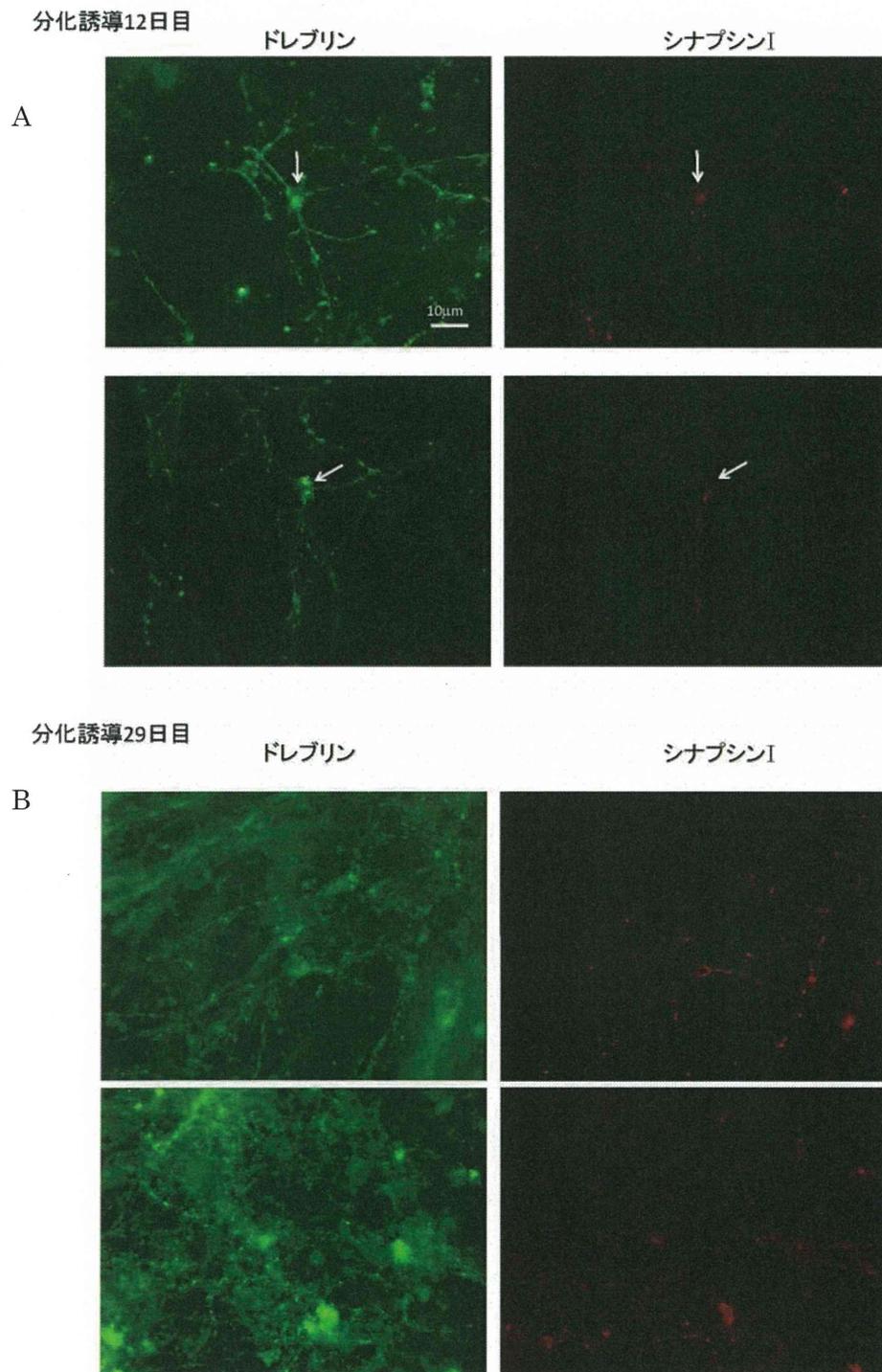


図 6 A:分化誘導後 12 日目の ES 細胞。左カラムはドレブリン染色 (緑)、右カラムはシナプシン I 染色。矢印の細胞が神経細胞に分解していることがわかる。B:分化誘導後 29 日目の ES 細胞。ドレブリンクラスター (小さな斑点) が多数形成され、シナプスが形成されていることがわかる。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」  
平成 23 年度分担研究報告

ーポスト QT として Na<sup>+</sup>チャネル抑制作用ー  
ヒト由来幹心筋の安全性薬理実験のプロトコールの提案

研究分担者:杉山 篤 (東邦大学 教授)

研究要旨:

薬物が引き起こす機能的な心毒性として QT 延長以外では、変力作用、変時作用および変伝導作用が挙げられる。本年度は、ポスト QT としてまず対応すべき課題として Na<sup>+</sup>チャネル抑制作用を取り上げ、その位置づけ、発生機序、in vitro および in vivo モデルでの評価および回避のための戦略を調査研究した。In vitro 試験ではヒト Na<sup>+</sup>チャネル発現細胞の I<sub>Na</sub> 電流あるいはモルモット乳頭筋の活動電位の最大立ち上がり速度を指標に推定し、in vivo 試験では心電図の QRS 幅やヒス束心電図の HV 間隔を指標に評価が可能である。臨床試験においても心電図の QRS 幅から Na<sup>+</sup>チャネルに対する作用を推定できる。安全域推定のためのフォローアップ試験としては、薬物性心臓非同期収縮を高感度に検出できる心不全モデルの開発が必要であろう。iPS 由来心筋細胞を用いて候補化合物の Na<sup>+</sup>チャネルに対する作用を評価することが可能になれば、現在利用されている in vitro 試験の代用が可能になるばかりでなく、臨床試験に必要なボランティア数も減らせる可能性がある。

キーワード:ポスト QT Na<sup>+</sup>チャネル抑制作用 ICH S7B ヒト幹細胞由来心筋細胞

A. 研究目的

薬物性心毒性は、薬物により心臓ひいては循環器系全体に引き起こされる病態を意味し、3 つの特徴を有する。①循環器系は各種の調節機能で支えられているので、薬物により細胞レベルで異常が生じたとしても多少の異常は代償され、心臓の機能異常としては表現されにくい。②循環器系の変化を通じて他の器官、特に肺や腎などに続発的な影響をおよぼすことがある。③逆に心血管系に直接の作用がなくても、薬物が中枢神経系、自律神経系あるいは内分泌系に作用し、それらの器官の変化

を通じて心血管系に悪影響をおよぼすことがある。薬物が引き起こす機能的な心毒性として QT 延長以外では、変力作用、変時作用および変伝導作用が挙げられる。

B. 研究方法

本年度は、ポスト QT としてまず対応すべき課題として Na<sup>+</sup>チャネル抑制作用を取り上げ、その位置づけ、発生機序、in vitro および in vivo モデルでの評価および回避のための戦略を調査研究した。以下の内容が新規候補化合物を評価する際の一助になれば幸いである。

## C. 研究結果

### Na<sup>+</sup>チャンネル抑制に由来する心筋作用の特徴

Verapamil や diltiazem のように心筋選択性を有する Ca 拮抗薬は心収縮力を低下させるが、同時にその作用は心筋酸素需要も減少させ<sup>1)</sup>、慢性安定狭心症の治療においてβ遮断薬と同等の有効性を持つとされている。ところが同じように陰性変力作用を有する Na<sup>+</sup>チャンネル抑制薬がそのような目的で用いられることはない。むしろ CAST (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial) や他の臨床研究で明らかになったように、Na<sup>+</sup>チャンネル抑制薬の使用はむしろ死亡率を増加させることが判明している<sup>2)</sup>。Ca 拮抗薬と Na<sup>+</sup>チャンネル抑制薬の電気薬理学的差異は、心室内伝導抑制作用の有無である。心室内伝導遅延が心不全患者のリスク因子であることは心臓再同期療法 (Cardiac Resynchronization Therapy: CRT) の有用性からも広く認められているところである<sup>3)</sup>。要するに種々の薬物が陰性変力作用を起こし得るが、Na<sup>+</sup>チャンネル抑制薬のように心室内伝導遅延を伴う場合が特に危険と考えられる。

### 陰性変力作用および心室内伝導遅延の発生機序

Na<sup>+</sup>チャンネル抑制薬は細胞質内の Na<sup>+</sup>濃度を減少させる。細胞質内の Na<sup>+</sup>濃度減少は Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換系の駆動力を増加させ、心筋細胞から細胞外空隙への Ca<sup>2+</sup>の排出が増加して、細胞質内 Ca<sup>2+</sup>が減少する。これにより Ca<sup>2+</sup> ATPase によって筋小胞体に運ばれる Ca<sup>2+</sup>が減少し、収縮の間に利用できる総 Ca<sup>2+</sup>量が減少する。この結果陰性変力作用が発生する。一方、

Na<sup>+</sup>チャンネル抑制薬は活動電位第 0 相の立ち上がり速度を抑えることによって心筋興奮の伝導速度を減少する。心室内の電気興奮は Na<sup>+</sup>チャンネル電流で伝搬するので、Na<sup>+</sup>チャンネル抑制薬投与時に心室内伝導遅延が発生する。

### 陰性変力作用と心室内伝導遅延の同時評価

Na<sup>+</sup>チャンネルの抑制に起因する陰性変力作用と心室内伝導遅延は同一濃度・用量で同時に誘発される変化であることが以下の *in vitro* および *in vivo* 試験で示されている。したがって心室内伝導遅延を Na<sup>+</sup>チャンネル抑制に起因する陰性変力作用のサロゲートマーカーとして利用できるかもしれない。

#### In vitro 試験

薬物の心室筋収縮力と心室内伝導時間に対する作用の同時評価に関しては、イヌ摘出血液灌流心筋標本を用いた筆者らの報告がある<sup>4)</sup>。選択的 Na<sup>+</sup>チャンネル抑制薬である tetrodotoxin (TTX) を栄養冠動脈内に投与すると陰性変力作用と心室内伝導遅延が同じ用量域で発生した。I 群抗不整脈薬の procainamide や mexiletine でも結果は同様であった<sup>4)</sup>。一方、Ca<sup>2+</sup>拮抗薬の verapamil は収縮力を抑制する用量においても心室内伝導時間にはまったく影響がなかった。

#### In vivo 試験

ハロセン麻酔犬モデルを用いて I 群抗不整脈薬の disopyramide, mexiletine および verapamil による陰性変力作用と心室内伝導遅延の同時評価を行った筆者らの報告がある<sup>5,6)</sup>。Disopyramide と mexiletine は陰性変力作用と心室内伝導遅延を同じ用量で示したのに対して、

verapamil は心室収縮力の抑制だけを示し、in vitro 試験の結果に一致していた。

#### D. 考察

##### 薬物性 Na<sup>+</sup>チャネル抑制に起因する心毒性を回避するための戦略

薬物性 QT 延長症候群発生回避のための基本戦略を応用することにより、開発候補化合物が Na<sup>+</sup>チャネル抑制作用を有することに起因する心血管リスクを in vitro および in vivo 試験で推測することが可能かもしれない(図 1)<sup>7,8)</sup>。In vitro 試験ではヒト Na<sup>+</sup>チャネル発現細胞の I<sub>Na</sub> 電流あるいはモルモット乳頭筋の活動電位の最大立ち上がり速度を指標に推定し、in vivo 試験では心電図の QRS 幅やヒス束心電図の HV 間隔を指標に評価が可能である。臨床試験においても心電図の QRS 幅から Na<sup>+</sup>チャネルに対する作用を推定できる。安全域推定のためのフォローアップ試験としては、薬物性心臓非同期収縮を高感度に検出できる心不全モデルの開発が必要であろう。iPS 由来心筋細胞を用いて候補化合物の Na<sup>+</sup>チャネルに対する作用を評価することが可能になれば、現在利用されている in vitro 試験の代用が可能になるばかりでなく、臨床試験に必要なボランティア数も減らせる可能性がある。

#### E. 結論

Na<sup>+</sup>チャネル抑制作用を有する非循環器用薬による薬物性心臓非同期収縮といった機能的心毒性は、臨床の現場で既に発生しているのかもしれない。このような病態の回避のために、iPS 由来心筋細胞を用いた評価・予知システムの構築が望まれる。

#### 用語解説

\*Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) : Encainide または flecainide の投与を受けた患者のほうがプラセボ群に比べて、不整脈あるいはあらゆる原因による死亡あるいは心停止の割合が多いことを証明した臨床研究。

\*Cardiac Resynchronization Therapy (CRT) : 重症の心不全で左右の心室が収縮するタイミングにずれが生じ、血液を効率よく送り出せない状態になったとき、ペースメーカーによって左心室と右心室に同時に電気刺激を加え、心室の動きを正常に戻す治療法。

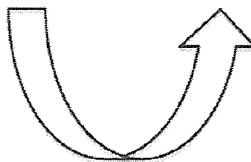
#### 参考文献

1. Lindenberg BS, et al. Efficacy and safety of incremental doses of diltiazem for the treatment of angina. J Am Coll Cardiol 1983; 2: 1129-1133.
2. Echt DS, et al. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. N Engl J Med 1991; 324: 781-788.
3. Cleland JG, et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. N Engl J Med 2005; 352: 1539-1549.
4. Sugiyama A, et al. Utilization of isolated, blood-perfused canine papillary muscle preparation as a model to assess efficacy and adversity of class I antiarrhythmic drugs. Jpn J

- Pharmacol 1994; 66: 303-316.
5. Yoshida H, et al. Effects of disopyramide and mexiletine on the terminal repolarization process of the in situ heart, assessed using the halothane-anesthetized, in vivo canine model. *Circ J* 2002; 66: 857-862.
  6. Shiina H, et al. Comparison of the electropharmacological effects of verapamil and propranolol in the halothane-anesthetized in vivo canine model under monophasic action potential monitoring. *Jpn Circ J* 2000; 64: 777-782.
  7. 杉山 篤. 薬物性心毒性:基礎の立場よりポスト QT を考える. *心電図* 2012; 32: 19-23.
  8. Sugiyama A. Sensitive and reliable proarrhythmia in vivo animal models for predicting drug-induced torsades de pointes in patients with remodelled hearts. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 1528-1537.
- F. 研究発表  
論文発表
1. 杉山 篤. 薬物性心毒性:基礎の立場よりポスト QT を考える. *心電図* 32: 19-23, 2012.
- 学会発表
1. 杉山 篤:ポスト QT を考える:Na<sup>+</sup>および Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害作用の基礎, 第 3 回日本安全性薬理研究会学術年会, 東京(2012. 2).
- G. 知的所有権の取得状況  
なし

**ヒト  
試験**

Test	I <sub>Na</sub>	Multi-channel	PK	QRS-ST	VF
Human	SCN	IPS由来心筋細胞	P1	T-ECG	



**動物  
実験**

Animal	In Vitro I <sub>Na</sub> Assay (V <sub>max</sub> )		In Vivo ECG Assay		Asynchrony Model
Test	I <sub>Na</sub>	Multi-channel	PK	ECG	CHF

図1 薬物性 Na<sup>+</sup>チャンネル抑制回避のための戦略。

SCN テストは Na<sup>+</sup>チャンネルへの薬物の作用を評価するだけであるが、ヒト幹細胞由来心筋細胞から得られる field potential や活動電位は種々のチャンネルに対する作用を評価することができる。QRS: 心室内伝導が抑制される場合に延長する。SCN: sodium channel; I<sub>Na</sub>: Na<sup>+</sup>電流; PK: pharmacokinetics; T-ECG: thorough ECG test; CHF: congestive heart failure

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」  
平成 23 年度分担研究報告

ーヒト由来幹細胞の心筋分化に関する調査研究ー

研究分担者: 諫田 泰成 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部 第二室長)

研究要旨:

平成 19 年 11 月に我が国で樹立されたヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と異なり倫理面の問題がなくヒト細胞標本を作成できることから、医薬品の QT 延長評価への応用が期待される。特に、Na, Ca, K チャネルのすべてを発現しているような分化心筋細胞を使用することにより、hERG 試験より QT 延長の予測性が高くなると期待される。しかしながら、使用する iPS 細胞株、心筋分化誘導のプロトコール、分化心筋の品質評価、薬理試験の手法などが整備されておらず、実用化への課題となっている。

本研究では、公的な細胞バンクより 2 種類のヒト iPS 細胞株を入手し、株間における心筋分化能の比較を行った。心筋分化誘導法は、胚様体(embryoid body; EB)形成法と EB を介さない方法の 2 通り検証した。その結果、201B7 株は EB 作成に関係なく拍動が観察されたのに対して、Tic 株は両方の方法によっても拍動が認められなかった。従って、ヒト iPS 細胞には株によって心筋への分化指向性が存在することが示唆された。医薬品候補化合物が心筋細胞に及ぼす薬理作用を評価する試験に向けて、適切なヒト iPS 細胞株を選択する必要があることが考えられる。さらに、医薬品による QT 延長評価できる試験系を構築するためには何が課題となるのか調査を行った。品質評価の基準として、イオンチャネルの機能が一定の範囲内におさまること、同一の薬物に対して同一の薬理作用を示すことがあげられる。また、薬理試験として、個々の心筋を用いるパッチクランプとクラスター法を比較し、使い勝手などが異なることが考えられた。均質で安定供給可能な心筋細胞が得られる場合にはこのような点に留意して、多施設において偽陽性や偽陰性を含めた種々の薬剤の薬理作用を検討し、試験系の簡便さや信頼性を検証する必要がある。

キーワード: ヒト iPS 細胞 分化指向性 TdP QT 延長

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いた安全性薬理試験に向けた課題を検証することである。

医薬品候補化合物の開発中止原因として「毒性の判明」が占める割合は約 20% 程度あり、創薬の初期段階で簡便・確実に

毒性をスクリーニングできれば、後期段階での開発中止の低減、新薬開発コストの低減、新薬開発期間の短縮、近年世界的に実施が制限される傾向にある動物実験に代わる評価法の確立といった成果が実現できると考えられる。

毒性の中でも、トルサード・ド・ポアント

(TdP)とよばれる重篤な不整脈は重要である。TdP は心室細動に移行して突然死に至ることがあり、医薬品開発の上で問題となっている。現在の TdP のサロゲートマーカーは心電図における QT 間隔の延長である。QT 延長を起こす薬剤の多くは hERG チャネルに結合し遅延整流 K 電流の速い成分を抑制することによって心筋細胞の活動電位持続時間を延長させる。そこで、*in vitro* 試験として、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) に hERG を導入した発現系を用いて、カリウム電流に対する阻害効果が検討されてきた (hERG 試験)。しかしながら、偽陽性や偽陰性を示す薬剤があり、より予測性の高い評価系が求められている。

平成 19 年 11 月に我が国で樹立されたヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と異なり倫理面の問題がなくヒト細胞標本を作成できることから、医薬品の QT 延長評価への応用が期待される。特に、Na, Ca, K チャネルのすべてを発現しているような分化心筋細胞を使用することにより、hERG 試験より QT 延長の予測性が高くなると期待される。しかしながら、使用する iPS 細胞株、心筋分化誘導のプロトコール、分化心筋の品質評価、薬理試験の手法などが整備されておらず、実用化への課題となっている。

今回、公的バンクから入手可能な 2 種類のヒト iPS 細胞株を用いて心筋細胞への分化プロトコールを比較検討した。さらに、安全性薬理試験に向けた問題点も合わせて調査を行った。

## B. 研究方法

### ヒト iPS 細胞の培養

201B7 株は理研バイオリソースセンターより、Tic 株は JCRB 細胞バンクよりそれぞれ

購入した。常法に従い、SNL 細胞をフィーダーとして維持、培養した。必要に応じて、マトリゲル (Sigma) でコートしたディッシュ上で TeSR 培地 (Stem Cell Technologies) で培養することによりフィーダーレス化を行った。

### 未分化状態の解析

ヒト iPS 細胞の未分化状態は、Oct3/4 および Nanog に対する抗体で免疫染色して確認した。

### ヒト iPS 細胞の EB 形成による心筋分化誘導

ヒト iPS 細胞のコロニーをスクレーパーではがすことにより小さな塊を作成し、iPS 細胞用培地を用いて 4 日間浮遊培養して EB を作成した。さらに 3~4 週間、分化培地 (20%FBS を含む  $\alpha$ MEM) で浮遊培養を行い、拍動する EB を得た。

### ヒト iPS 細胞の EB を介さない心筋分化誘導

京都大学・山下研で開発されたプロトコールを少し改変して行った (Uosaki et al. Efficient and Scalable Purification of Cardiomyocytes from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells by VCAM1 Surface Expression. *PloS One* 6: e23657 (2011))。ヒト iPS 細胞を TeSR 培地でフィーダーレス化した後、Activin A を含む培地で 1 日間培養し、次に BMP4 と bFGF を含む培地で 4 日間培養し、さらに DKK1 を含む培地で 2 日間培養を行うことにより、分化を行った。

### C. 研究結果

我々はまず公的バンクより培養可能なヒト iPS 細胞株として 201B7 と Tic の 2 種類を選んで、本研究に用いた(図 1)。Oct3/4 などの未分化マーカーの発現により、両細胞株とも未分化状態を維持したまま培養していることを確認した(図 2, 3)。

次に、ヒト iPS 細胞株を用いて心筋分化能の比較を行った。心筋への分化誘導は拍動 EB を介する方法と介さない方法の 2 通りのプロトコールを検証した。まず、201B7 株に関しては、EB を介する場合には 20 日目に、EB を介さない方法では 10 日目に拍動が認められた。一方、Tic 株では EB を 3 ヶ月培養しても拍動は認められなかった。また、EB を介さない方法でも 30 日間追跡したが、拍動はまったく観察されなかった。従って、検討した範囲では Tis 株は心筋分化に抵抗性を示す可能性が示唆された。以上の結果から、心筋細胞への分化能は株間で差があることが明らかになり、適切な株を選択する必要があることが示唆された(図 4)。

次に、同一の薬物に対して同一の反応性を示すような分化心筋細胞が供給される場合、安全性薬理試験の解析方法について調査した。大きく分けて個々の心筋を用いる方法(パッチクランプ法)とクラスターによる解析方法の 2 通りあり、それぞれ利点、欠点が存在する(表 1)。目的に応じて手法を選択する必要があることが考えられる。

薬剤性 TdP の発生件数は非常に少なく、致死的な症例は有害作用の 1 万件に対して数件程度であり、また心臓作用薬と非心臓作用薬の両方に認められる(表 2)。しかし、シサプリドやテルフェナジンなどはすでに市場から撤退していることから分かるよ

うに、より適切に QT 延長を評価することが望まれる。実際にヒト iPS 細胞を用いて非臨床における QT 延長の予測性が向上するののかに関しては、QT 延長を示す薬剤を共通で用いて多施設間で検証するなどにより、試験法の簡便さと信頼性を検証することが必要と考えられる。

### D. 考察

本研究において、公的バンクより購入可能な 2 種類のヒト iPS 細胞株を比較検討し、ヒト iPS 細胞には心筋の分化指向性が存在することを明らかにした。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全薬理試験の大きな問題点として、どのヒト iPS 細胞株からどのように心筋を作成すればいいのかそのプロセスが明らかになっていないことがあげられる。現在までに多くのヒト iPS 細胞株やヒト ES 細胞株を用いて分化指向性は検証されているものの(Bock et al. Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. Cell 144: 439-452 (2011))、評価の指標は各胚葉であり心筋などの最終分化産物ではない。201B7 株と Tic 株に限らず、多くの細胞株を用いて最終分化産物を指標とした分化指向性の解明が期待される。

本研究で使用した 201B7 株と Tic 株において分化指向性の違いをもたらす分子メカニズムについては分かっていない。マウス ES 細胞に関しては、心筋への分化指向性のマーカーとして AW551984 遺伝子が指摘されていることから、ヒト iPS 細胞株においても同様のアプローチが有効であると考えられる(Yasuda et al. AW551984: a novel regulator of

cardiomyogenesis in pluripotent embryonic cells. *Biochem J.* 437: 345-355 (2011)). また、Tic 株の分化抵抗性に関しては、今回示した方法以外にも数種類の EB を介さない心筋分化誘導法が知られていることから (Burridge et al. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell.* 10:16-28 (2012))、どのプロトコールでも同様の結果が得られるのか検討した上で分化抵抗性を判断する必要がある。

分化抵抗性がなく心筋に分化誘導が可能な株を選んで、分化心筋細胞の品質を評価する必要がある。古川らの報告によれば、心筋分化誘導により HCN4 や hERG、などのイオンチャネルの発現が顕著に増加していることが示されている (古川哲史ほか、心電図, 31, 325-328 (2011))。さらに、Na<sup>+</sup>電流、Ca<sup>2+</sup>電流が記録されているものの、IKr および IKs はほとんど記録されていない。特に薬剤性 QT 延長に寄与する IKr の機能が弱いことから、更なる分化条件の検討は必要である。また、第 3 回安全性薬理学会において東京医科歯科大学・難治疾患研究所の黒川らにより、201B7 株由来の拍動 EB を用いた検討により、分化誘導日数が 30 日と 60 日で心筋細胞の性質が異なることが指摘された (図 5)。培養時間を長くすることにより成熟化が進む可能性が指摘されていて興味深い。最終的には心室筋細胞の割合やイオンチャネルの発現に加えて、同一の薬物に対して同一の薬理作用を示すのかなどを検討し、薬理試験に向けた分化細胞の規格化が必要であると思われる。

同一の薬物に対して同一の反応性を示

すような分化心筋細胞が供給される場合、安全性薬理試験の解析方法について考察したい。大きく分けて個々の心筋を用いる方法 (パッチクランプ法) とクラスターによる解析方法の 2 通りあり、それぞれ利点、欠点が存在する (表 1)。パッチクランプ法の利点として、個々の心筋細胞の活動電位を解析すれば、波形により心筋細胞のサブタイプの情報とともに QT 延長の評価が可能となる。多くの企業ですでに導入しているオートパッチを導入しているので、新たに機器を整備する必要がない。さらに QT 延長などに起こることが多い早期後脱分極 (EAD) も直接検出することができる。欠点として、スループット性が低くなること、短時間の薬理作用に限定されること、各心筋のサブタイプが含まれるのでどのように選別するのか、などがあげられる。

一方、拍動 EB などのクラスターを用いて細胞外電位の変化による方法も考えられる。利点として、電気生理実験の未経験者でも比較的簡単に測定ができ、侵襲もないので医薬候補化合物の長時間曝露による薬理作用が調べられること、クラスター化によって個々の心筋のバラつきが抑えられる可能性があることなどがある。欠点として、クラスターの均一化の方法を開発する必要があることに加えて、EB が多点電極に接着しにくいのでデバイスやコート剤 (ファイブロネクチン等) の最適化などが考えられる。

トルサード・ド・ポアント (TdP) とよばれる多形性心室性頻拍は、発生頻度は極めて少ないものの心室細動に移行して突然死に至る症例が報告され、心臓作用薬、非心臓作用薬に関わらず認められている (表 2)。現在、TdP のサロゲートマーカーとして QT 延長を用いて、K チャネルのサブユ

ニット hERG を強制発現させたヒト胎児腎由来 HEK293 細胞を用いて評価されている。しかしながら、この hERG 試験法には偽陽性や偽陰性を示す薬剤が認められる。その原因の一つとしては、K チャネルのみの評価であることが考えられている。Na, Ca, K チャネルのすべてが発現、機能しているヒト iPS 細胞由来心筋細胞を使用すれば予測性の向上が期待される。

将来的にヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた試験法のガイドライン化を進めるためには、試験法の「簡便さ」と「信頼性」を検証することが重要となる。

簡便さに関しては、試験系の手間がかからず誰でもアクセスできることが必要である。未分化 iPS 細胞や分化細胞の供給（バンク化）、分化誘導の標準プロトコール作成、心筋細胞のアッセイ方法などの整備が含まれる。

一方、信頼性に関しては、多施設間比較による再現性や正確性のバリデーションが必要不可欠である。QT 延長を示すことが分かっている薬剤や hERG 試験で偽陽性などを示すような薬剤を共通で用いて、各施設間で同じように QT 延長作用が得られるのか定量的に検証を行う必要がある。以上述べてきたように、ヒト iPS 由来心筋細胞を用いて QT 延長を評価するためには、均一で成熟した心筋細胞の品質と再現性、正確性の高い薬理試験の信頼性が必要不可欠である。このような観点からヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた QT 延長の試験法の検証を進めることにより、S7B ガイドラインで用いられる hERG 試験の問題点が克服され、S7B を補完するようなガイドラインに発展することが期待される。

## E. 結論

本研究において、公的バンクのヒト iPS 細胞株を用いて心筋分化能の比較検討を行い、分化指向性があることを明らかにした。今後、元となる iPS 細胞の株間の差、分化誘導後アッセイに適切な時期の判断基準などの品質基準をどう設定するのか、同一の薬物に対して同一の薬理作用を示すのか、などの課題を検証する必要がある。

## F. 研究発表 学会発表

1. 李敏、黒川洵子、諫田泰成、関野祐子、古川哲史: Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. 第 124 回薬理学会関東部会(2011,6)
2. Li M., Kurokawa J., Kanda Y., Toyama S., Murata M., Sekino Y., Fukuda K., Furukawa T. Quantitative characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. The 1st HD physiology international symposium: Integrative multi-level systems biology for in silico cardiology and pharmacokinetics. Tokyo, Japan (2012,1,20)
3. 諫田泰成: 分化心筋細胞のクオリティコントロール、厚生労働省科学研究費公開シンポジウム ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ (2012,2,東京)

## G. 知的所有権の取得状況 なし

iPS株	起源細胞	初期化因子	遺伝子導入	入手
201B7	dermal fibroblast	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス	理研バイオリソース
Tic	lung fibroblast	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス	JCRB細胞バンク (#JCRB1331)

図1 今回用いたヒトiPS細胞株

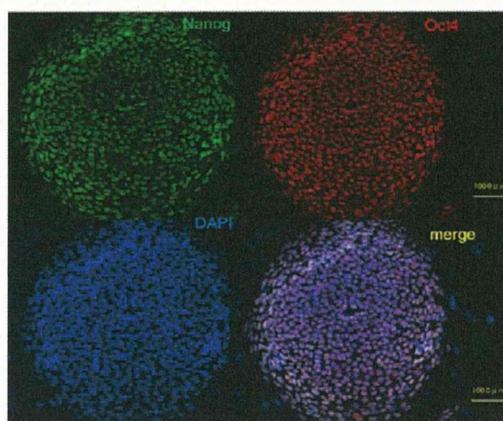


図2 201B7株における未分化マーカーの発現

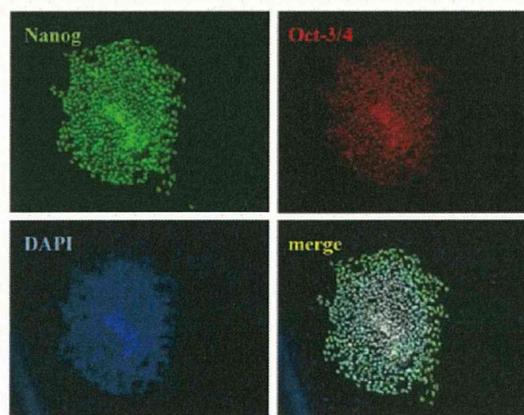


図3 Tic株における未分化マーカーの発現

心筋分化誘導	201B7	Tic
EB形成法	○	×
EBを介さない方法	○	×

図4 心筋分化能の比較

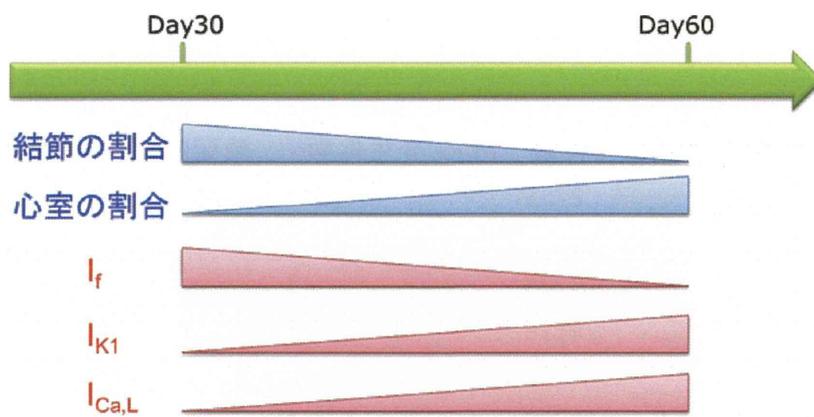


図5 EB由来心筋の品質に対する培養時間の影響