

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
「ヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞を用いた薬剤性不整脈評価の薬事申請利用
における妥当性の検討」
平成 25 年度総括・分担研究報告

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心筋シートの作製
および遺伝子発現による評価

研究代表者： 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：

ヒト iPS 細胞心筋細胞を用いて医薬品による催不整脈作用を薬事申請に用いるために、市販の分化心筋細胞を用いて必要な品質評価を行った。その結果、 アドレナリン受容体の反応性が市販の分化心筋細胞によって異なることを明らかにした。分化心筋細胞の品質として、自律拍動および拍動数では情報では不十分であり、薬剤評価に必要な分化心筋細胞の特性を評価できた。今後、薬理試験の使用可能な細胞を選択するための基準になることが考えられる。

キーワード：ヒト iPS 細胞 多点電極 アドレナリン受容体

A. 研究目的

本研究の目的は、国内で入手可能なヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて予備検討を行い、薬事申請に向けて医薬品によるヒト特異的有害反応を検出できる細胞の品質基準を確立することである。

不整脈の中でも、トルサード・ド・ポアント (TdP) とよばれる重篤な不整脈は極めて重要である。TdP は心室細動に移行して突然死に至ることがまれに起こることから、医薬品を開発する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 チャンネルに結合し再分極過程におけるカリウム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 試験法)。しかしながら、偽陽性が多いなどの問題点がある。

カリウムに加えて、カルシウムやナトリウムの電流成分に対する作用を総合的に評価することができれば、医薬品による催不整脈作用の予測性が高まると考えられる。そこで、カリウム、カルシウム、ナトリウムのすべてのイオンチャネルを兼ね備えたヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を利用することにより、医薬品による催不整脈作用を高感度で検出できることが期待されている。しかしな

がら、そもそも分化心筋細胞の品質を市販の分化心筋細胞間で比較されてこなかった。

そこで本研究では、この目的を達成するために、市販の分化心筋細胞を2つ選んで品質評価の基準設定を試みた。具体的には、分化心筋細胞においてアドレナリン受容体刺激を行い、受容体の下流シグナルと拍動数などを比較検討した。

B. 研究方法

1) 分化心筋細胞

市販の2種類の分化心筋細胞を用いた。

2) 多点電極システム

MEAシステムとしてMED64(アルファメッドサイエンティフィック社)を用いて、分化心筋細胞の電気活動を記録した。各被験物質について3~4濃度を選択して、実験記録開始後5又は10分間の間隔で低濃度から高濃度へと被験物質を投与し、最後の1分間の結果を記録した。QT間隔に相当する指標として、細胞外電位のField Potential Duration (FPD)を算出した。また、拍動数BPM (Beat per Minute)も解析した。

3) PKA活性

FRETイメージングシステムによりPKA活性の解析をした(東京医科歯科大学・難治研の黒川洵子准教授との共同研究)。

C. 研究結果

市販の分化心筋細胞が広く流通しているが、薬理実験に利用するためには品質を検証する必要がある。そこで、我々はまず市販のヒトiPS細胞あるいはES細胞由来の分化心筋細胞の調査を行った(表1)。その中で、

2種類の分化心筋細胞をモデルとして比較検討を行った。個々の分化心筋細胞を

アドレナリン受容体作動薬イソプレテノロール(30 nM)で刺激したところ、A社の分化心筋細胞は速やかに拍動が早くなったのに対して、B社は全く影響が認められなかった。そこで、A社の分化心筋細胞を高密度見培養して心筋シートを作製し、現在CiPAでプロトコルの整備が進められている多点電極システムを用いて解析した。30nMのイソプレテノロールによってBPMの増加やISIの減少が認められた(図1A)。さらに、アドレナリン受容体の下流としてGs/cAMP/PKAシグナルが重要であることから、イソプレテノール刺激により活性化されているのか検討した。その結果、拍動数などの反応と同様に、A社の心筋は活性化が認められたが、B社の心筋はあまり影響が認められなかった(図1B)。従って、不整脈発生に重要である交感神経刺激応答に明確な株間差が存在することが示唆された。心筋細胞としての特性を考える上では、アドレナリン受容体を介する薬理作用は重要であると考えられる。

D. 考察

本研究により、市販の分化心筋細胞を使用する際に、注意すべき点としてアドレナリン受容体の反応性の重要性を明らかにした。さらに、その反応性としてPKA活性を示した。

分化心筋細胞はどこまでヒトの成体に近いのか議論されるところであるが、交感神経系の活性化が認められるのは最低限でも検討すべき項目であると考えられる。当初は遺伝子発現による品質評価を検討したが、それよりも受容体の機能およびその下流シグナルをもとに

評価するのが妥当であると思われる。すでに再分極過程に重要な役割を果たすカリウムチャンネルIkr, Iksが両方とも機能的であることを明らかにしているが、それだけでは不十分である可能性もあり、さらなる検討が必要である。

今後、より多くの分化心筋細胞を用いてアドレナリン受容体の機能を比較することにより、分化心筋の性質の差を説明できる可能性が考えられる。

E. 結論

本研究において、市販のiPS細胞由来分化心筋細胞を2種類用いて、アドレナリン受容体による心拍亢進が重要であることを明らかにした。

F. 研究発表論文

1. Nakamura Y., Matsuo J., Miyamoto N., Ojima A., Ando K., Kanda Y., Sawada K., Sugiyama A., Sekino Y. Assessment of Testing Methods for Drug-Induced Repolarization Delay and Arrhythmias in an iPS-Derived Cardiomyocyte Sheet: Multi-site Validation Study. *Journal of Pharmacological Sciences* (in press).

学会発表

1. 諫田泰成: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性薬理試験の開発、第40回日本毒性学会シンポジウム(2013,6,東京)
2. 黒川洵子、李敏、諫田泰成、関野祐子、古川哲史: ヒト iPS 由来心筋を

用いた心臓毒性評価系の構築、第30回心電学会(2013,11,青森)

3. 諫田泰成: ヒト iPS 細胞由来分化細胞の標準化と創薬への応用細胞アッセイ研究会、(2013,11,東京)
4. 黒川洵子、李敏、諫田泰成、芦原貴司、関野祐子、古川哲史: ヒト iPS 由来心筋を用いた薬剤誘発性不整脈の研究、生理研研究会(2013,11,岡崎)
5. 黒川洵子、諫田泰成、古川哲史: iPS 心筋を用いた心機能評価、第23回日本循環薬理学会(2013,12,福岡)
6. 諫田泰成: Development of an in vitro cardiac safety testing using human iPS-cell derived mature cardiomyocytes、第1回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング2014 in 霧島(2014,1,霧島)
7. 諫田泰成: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性評価法の現状と今後の展望、厚生労働省公開シンポジウム(2014,2,東京)
8. 高橋和也、早川智広、國弘威、辰田寛和、松居恵理子、矢田博昭、諫田泰成、黒川洵子、古川哲史: イメージングによる培養心筋細胞の拍動伝播評価、第5回日本安全性薬理研究会(2014,2,東京)
9. 中村裕二、松尾純子、宮本憲優、小島敦子、安東賢太郎、諫田泰成、澤田光平、杉山篤、関野祐子: Assessment of testing methods of the drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS-derived cardiomyocytes sheet: Multi-site validation study、第5回日本安全性薬理研究会(2014,2,

東京)

10. 諫田泰成: ヒューマンサイエンス振興財団 開発振興/規制基準合同委員会、ヒト iPS 細胞を用いた心毒性評価の現状と課題(2014,2,東京)
11. 李敏、諫田泰成、芦原貴司、笹野哲郎、関野祐子、古川哲史、黒川洵子: ヒト iPS 由来心筋を用いた薬物誘発性 QT 延長に対する新規 in vitro 評価系、第 87 回日本薬理学会(2014,3,仙台)
12. 藤塚美紀、黒川洵子、烏野初萌、中井雄二、永森収志、金井好克、諫田泰成、松居恵理子、古川哲史: ヒト iPS 由来心筋細胞の収縮に対する基質硬度の影響、第 87 回日本薬理学会(2014,3,仙台)
13. 中村裕二、松尾純子、宮本憲優、小島敦子、安東賢太郎、諫田泰成、澤田光平、杉山篤、関野祐子: iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた薬物性再分極遅延評価法の分析: 多施設間バリデーション、第 87 回日本薬理学会(2014,3,仙台)
14. 諫田泰成: 第 87 回日本薬理学会、ヒト iPS 細胞由来の成熟心筋細胞の開発 実用化に向けて(2014,3,仙台) 諫田泰成、ヒト iPS 細胞の心毒性試験への応用、第 133 回日本薬学会シンポジウム(2013.3,東京)

国際学会

1. Li Min, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. Functional optimization of commercially available human

induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iCell-CMs) for evaluation of drug-induced QT prolongation. The 2nd HD physiology international symposium on multi-level systems biology. Tokyo, Japan 2013.06.28.

2. Yasunari Kanda, Li Min, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. Development of human iPS cell-derived mature cardiomyocytes for assessment of drug-induced QT prolongation. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. Osaka, 2014.1.
3. Li Min, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. A novel approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Biophysical Society 58th Annual Meeting, San Francisco, USA, 2014.02.15.

著書

1. 諫田泰成、再生心筋細胞を用いた安全性薬理評価系の開発、再生医療における臨床研究と製品開発、p572-576、技術情報協会(2013).

G. 知的所有権の取得状況

特許出願番号: 2013-116243

「正常な内向きのカリウム電流特性を有する iPS 細胞由来心筋モデル細胞」

分化心筋細胞	販売会社
iPS cell-derived cardiomyocytes, iCell Cardiomyote	Cellular Dynamics International (CDI)
Stem cell derived cardiomyocyte product, hES-CMC	Cellestis
Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes	GE Healthcare
Cor.4U iPSC derived human cardiomyocytes ReproCardio	Axiogenesis Reprocell

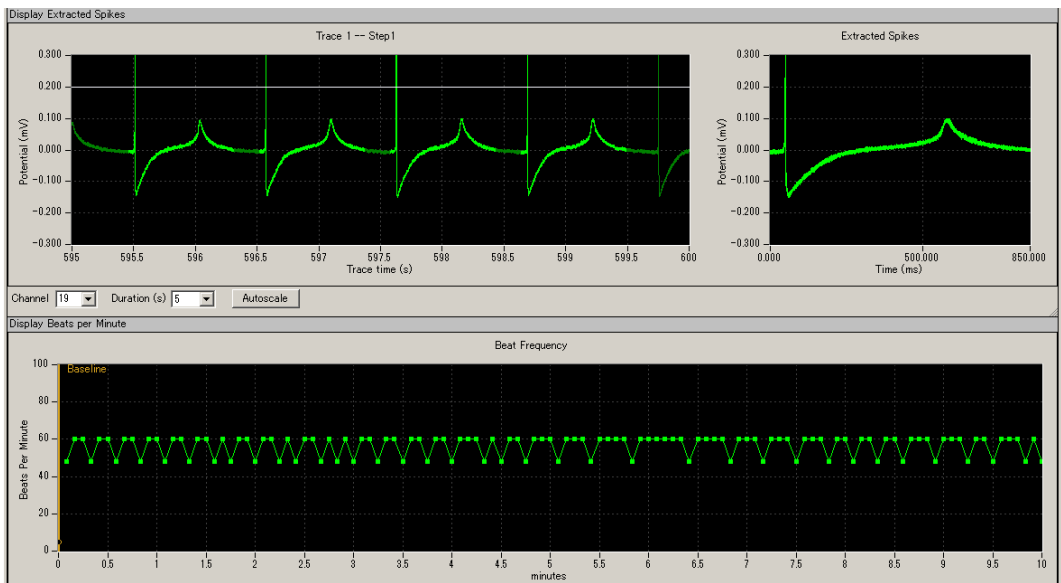
表1 ヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞

現在市販されていて薬理実験に利用可能な主なヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞を示す

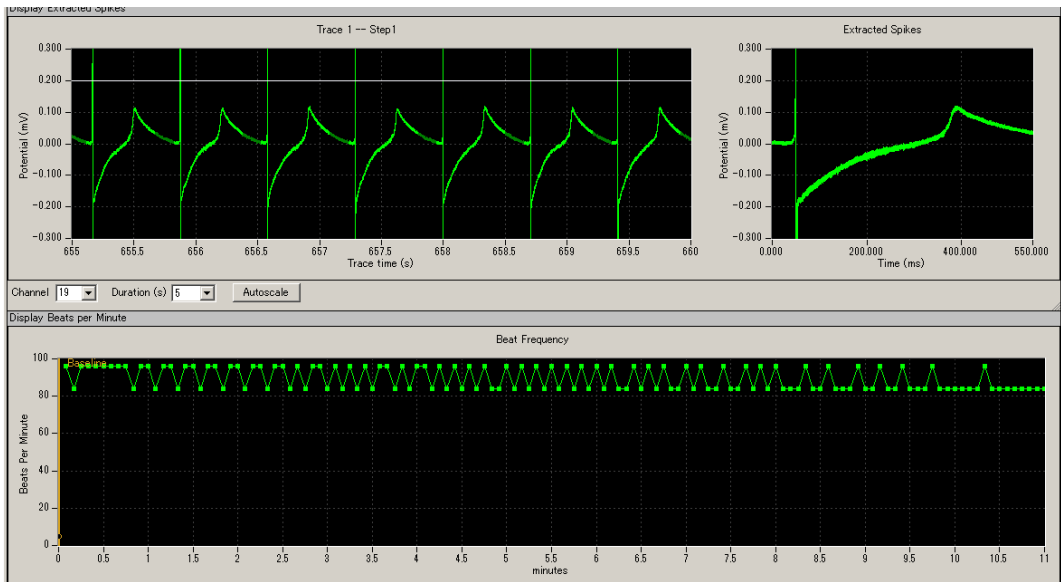
1

A.

control



ISO



B.

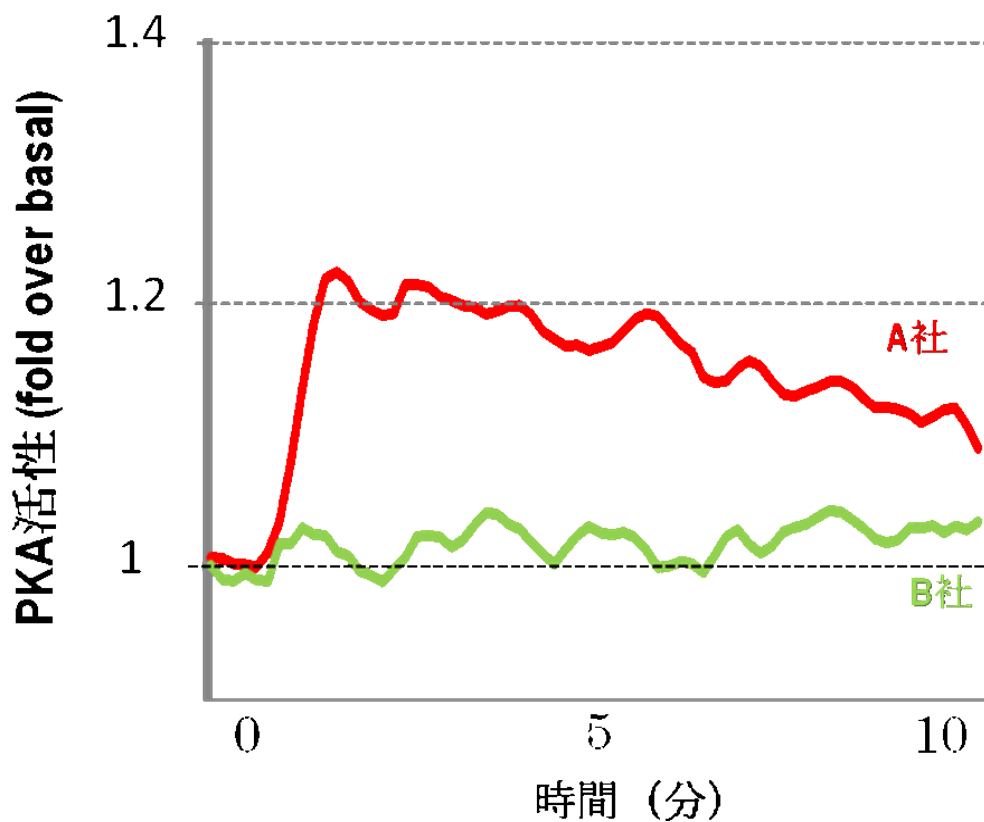


図1 分化心筋細胞の機能に対するイソプレテレノールの影響

A) A社の心筋細胞を30 nMのイソプレテレノール(ISO)で刺激を行い、多点電極システムMED64(アルファメッドサイエンティフィック株式会社)を用いてBPMやISIなどを測定した。

B) 分化心筋細胞をイソプレテレノール(30nM)で刺激を行い、FRETシステムによるPKA活性を測定した。A社の心筋はすみやかなPKAの活性化が認められたが、B社の心筋はあまり影響が認められなかった。

(データ提供; 東京医科歯科大学・難治研 黒川洵子准教授)