

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 年度分担研究報告

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学的評価

研究分担者： 関野 祐子（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長）

研究要旨：

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた医薬品による催不整脈作用を検出する標準プロトコルを用いて、市販の iCell 心筋細胞を用いて多施設間において評価を行った。その結果、陽性対照物質として IKr 阻害剤 E-4031 を用いて QT 延長および EAD/TA を評価できることを明らかにした。今後は、他のヒト iPS 細胞株由来の分化心筋細胞と比較することにより分化心筋細胞を用いた薬理試験の再現性をさらに検証する予定である。

キーワード：ヒト iPS 細胞 TdP QT 延長 EAD TA

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた薬理試験の再現性を多施設間で検証し、ガイドランス作成のための基盤整備を行うことである。

分化心筋細胞を用いた医薬品評価法開発には、多くの製薬関連企業が期待している。しかしながら、分化誘導条件、分化状態、標本の状態、薬理実験方法などが標準化されておらず、結果の比較検討は難しく、評価手法の標準化の遅れが大きな障害となっている。

そこで、実験結果の多施設間での再現性を高めるために薬理試験法の構築が求められている。医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化のために分化心筋細胞を利用して、標準プロトコルを用いて多施設間におけるバリデーションが重要である。今回この目的を達

成するために、iCell 心筋細胞をモデル細胞としてバリデーションを行った。

B. 研究方法

1) 分化心筋細胞

分化心筋細胞として、Cellular Dynamics International (CDI) 社の iCell 心筋細胞（ロット番号：1089404）を用いた。

2) 多点電極システムによる細胞外電位の測定

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。各被験物質は蓄積的に添加し、10 分間記録し、最後の 1 分間の結果を解析した。催不整脈作用の指標として、QT 間隔に相当する Field Potential Duration (FPD) および

EAD/TA の発生率を解析した。

C. 研究結果

分化心筋細胞を薬理実験に利用するためには、品質がそろった心筋細胞が大量に必要であるため、我々はすでに市販のヒト iPS/ES 細胞由来の分化心筋細胞の調査を行い、比較的多くの製薬企業が iCell を購入していることが分かったため、今回のバリデーション研究には、iCell をモデル細胞として用いて検討を行った。

iCell の品質評価のためには、実験プロトコルを統一化して、施設内および施設間における実験結果を比較検討する必要がある。昨年までに、研究班においてプロトコルの検討を行い、標準プロトコルを整備している(図2)。このプロトコルのもと、エーザイ(E)、国立衛研(N)、東邦大学(T)の3施設でバリデーションを行った。陽性対象物質として hERG 阻害剤 E-4031 を用いた。その結果、図3に示すように、3施設(E, N, T)すべてにおいて E-4031 の添加により、濃度依存的に FPD の延長が認められた。延長の程度は 10nM 処理により 10~20%であった。

さらに、E-4031 による EAD/TA の発生も観察された。図 4A に 100nM の E-4031 によって誘発された早期後脱分極 EAD および Triggered activity (TA) の波形を示す。EAD/TA の発生率に関して3施設で比較した結果、発生する濃度は 10~30nM と施設間の差が認められたが、100nM においては3施設ともすべての MED プローブにおいて EAD/TA の発生率が認められた。

D. 考察

本研究において、ヒト iPS 細胞由来の

分化心筋細胞が医薬品による催不整脈作用を検出できるのか検討を行った。その結果、分化心筋、評価機器、評価方法などをすべてそろえることにより、一定の再現性が確保できることが示唆された。さらに、EAD/TA の発生率を指標とすることにより、QT 延長とは異なる催不整脈作用を評価できることが明らかになった。

分化心筋細胞は、元の iPS 細胞株や分化誘導法、培養期間などによって性質が異なることが考えられており、ラボ間で比較検討が難しい状況であった。今回、市販の心筋で同一ロットという条件下ではあるが、3施設で同じ細胞を用いて共通のプロトコルのもとで薬理試験を実施することにより、再現性を検証することが可能になった。今後は、元の iPS 細胞株や分化誘導法を比較検討することにより、分化心筋細胞の再現性・信頼性がより明らかになると期待される。

さらに、特筆すべきことは、EAD/TA の発生率を指標とすることにより、QT 延長とは異なる催不整脈作用を評価できることである。分化心筋細胞は各イオンチャンネルを発現しているため案の地チャンネルによる評価が可能とされているが、本研究においてその利点を3施設で検証することに成功した。今後、EAD や TA の判断基準を設定することにより、新規の試験法に発展することが期待される。

E. 結論

市販のヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を用いて多施設バリデーションを行い、どの施設においても E-4031 の薬理作用を検出できることを明らかにした。

また、EAD/TA の発生率を指標とすることにより、QT 延長とは異なる催不整脈作用を評価できることが明らかになった。

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

国内学会

1. 関野祐子: ヒト iPS 由来分化細胞の非臨床試験法への応用: 試験法の標準化の重要性について、日本製薬医学会 (2013,7,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. 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)
4. 関野祐子: Cardiovascular Safety Pharmacology Studies - Japan's Future Directions -, 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)

5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 関野祐子: 第 87 回日本薬理学会、ヒト iPS 細胞研究の現状と医薬品開発への応用 (2014,3,仙台)

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.

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」

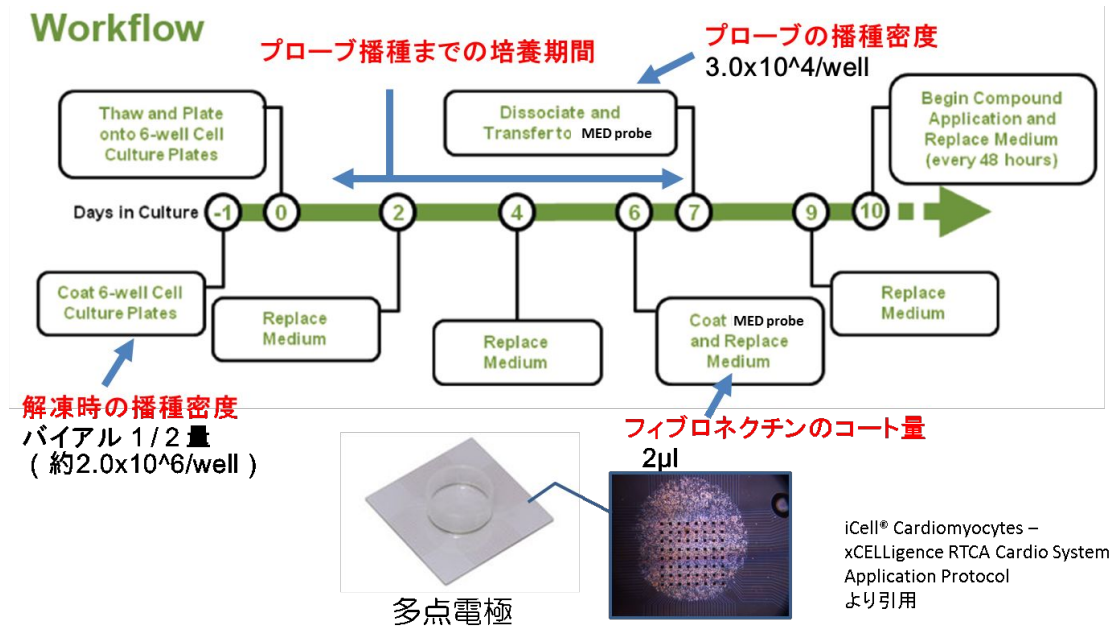


図 1 研究班で使用した標準プロトコル

iCell 心筋細胞を用いて、解凍時の播種密度、プローブの播種密度、ファイブロネクチンのコート量などに関して最適化を行った。

(「平成 24 年度 ヒト iPS 分化細胞を利用した医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化」より引用)

A



B

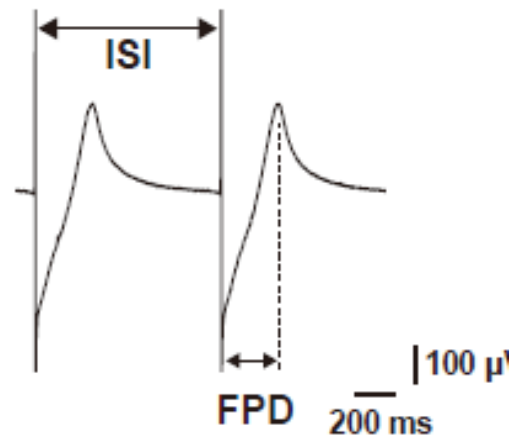


図2 多点電極システムによる FPD の測定

(A) 今回、多点電極システムとして、MED64 システム（アルファメッドサイエンティフィック株式会社）を用いた。

(B) 多点電極システムにおける典型的な波形。FPD は図に示すようにピーク間を用いた。

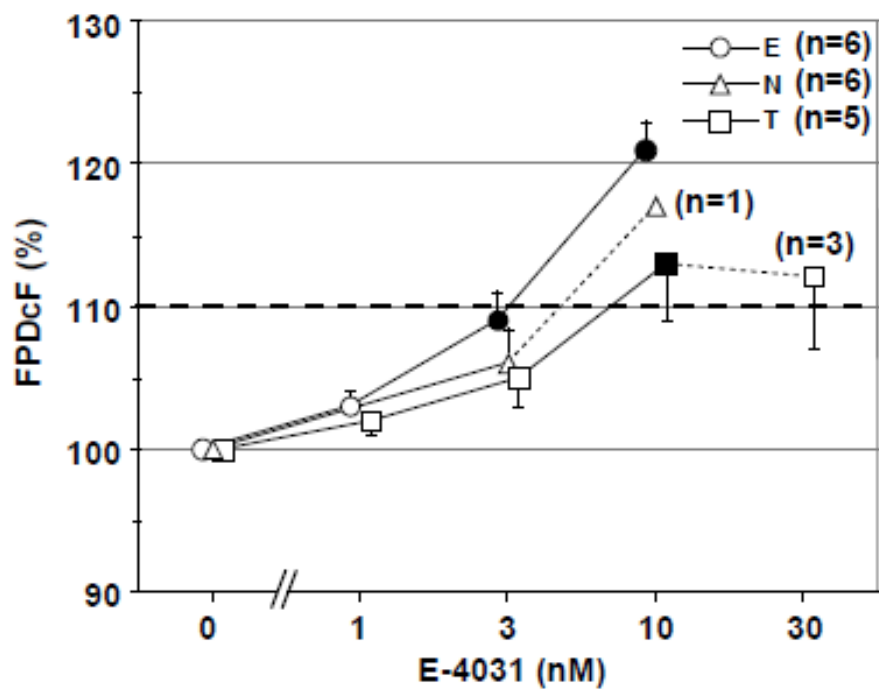
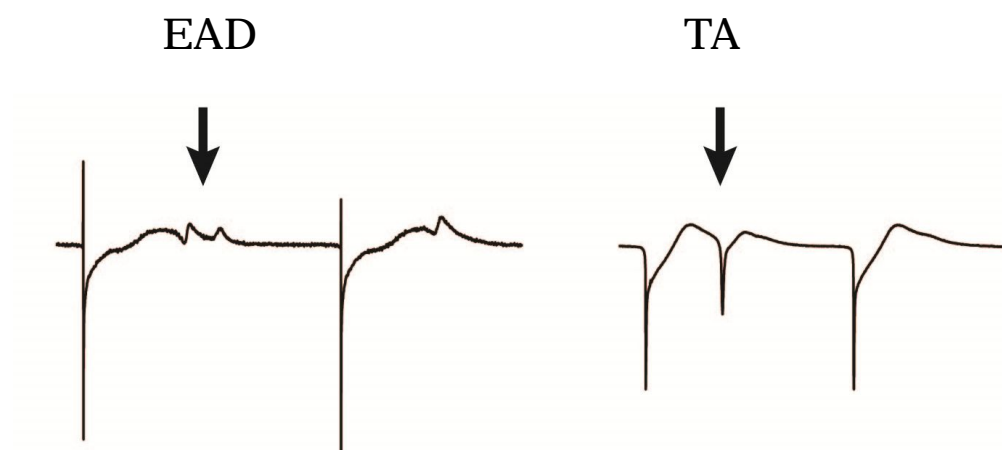


図3 E-4031 による FPD 延長

3施設 (E, N, T) すべてにおいて E-4031 の添加により、濃度依存的に FPD の延長が認められた。延長の程度は 10nM 処理により 10~20%であった。

(Nakamura et al., in press)

A



B

Concentration (nM)	Facility			All
	E	N	T	
0	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/5)	0% (0/17)
1	0% (0/6)	NT	0% (0/5)	0% (0/11)
3	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/5)	0% (0/17)
10	0% (0/6)	83% (5/6)	0% (0/5)	29% (5/17)
30	100% (6/6)	100% (6/6)	40% (2/5)	82% (14/17)
100	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (5/5)	100% (17/17)

NT: Not tested

図4 E-4031 による EAD/TA の発生

(A) 100nM の E-4031 によって誘発された早期後脱分極 EAD および Triggered activity (TA)

(B) EAD/TA の発生率に関する多施設におけるバリデーションを行い、100nM ではすべての施設ですべての MED プローブにおいて EAD/TA の発生が認められた。

(Nakamura et al., in press)