

Fig. 4. Effect of naloxone (A and B), nor-Binaltorphimine (C), and BD-1047 (D) on (-)- or (+)-PTZ-induced inhibition of [³H]NE uptake. A and B After preincubation with or without the nonselective opioid receptor antagonist naloxone (NLX, 1 or 10 μM) for 20 min, cells were incubated for 12 min with [³H]NE in the presence (black column) or absence (white column) of (-)-PTZ (A) or (+)-PTZ (B) (30 μM) and naloxone (NLX). C and D After preincubation with or without the κ-opioid receptor antagonist nor-Binaltorphimine (nor-BNI, 1 or 10 μM) (C) or the σ-receptor antagonist BD-1047 (1 or 10 μM) (D) for 20 min, cells were incubated for 12 min with [³H]NE in the presence (black column) or absence (white column) of (-)-PTZ (C) or (+)-PTZ (D) (30 μM) and each antagonist. The desipramine-sensitive [³H]NE uptake by the cells was measured. Data are means ± S.E.M. of three separate experiments carried out in triplicate and expressed as % of the control. *P < 0.05, compared with each 0 μM PTZ.

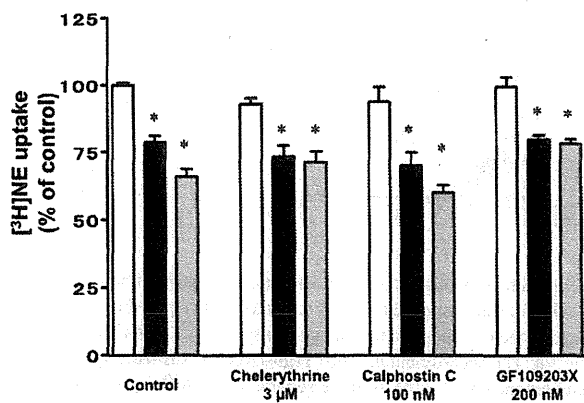


Fig. 5. Effect of various inhibitors of protein kinase C on PTZ-induced inhibition of [³H]NE uptake. The cells were pretreated for 20 min with or without various inhibitors of protein kinase C and then incubated for 12 min with [³H]NE in the presence (black column or gray column) or absence (white column) of (-)-PTZ (black column) or (+)-PTZ (gray column) (30 μM) and various inhibitors of protein kinase C. The desipramine-sensitive [³H]NE uptake by the cells were measured. Data are means ± S.E.M. of three separate experiments carried out in triplicate and expressed as % of the control. *P < 0.05, compared with each 0 μM PTZ.

(IC₅₀ = 54.6 μM). As much as 80% – 90% of NE released from presynaptic terminals is believed to be physiologically taken up again by the presynaptic neurons, thereby terminating neurotransmission (12). Therefore, even a slight inhibition of NET activity induced by PTZ may enhance noradrenergic neurotransmission.

Down-regulation of NET function by PTZ

To study the site(s) of action of PTZ on NET, we examined the effects of PTZ on kinetic parameters for [³H]NE uptake by the cells. The Eadie-Hofstee analysis of [³H]NE uptake revealed that PTZ induces a decrease in the V_{max} of [³H]NE uptake without any change in the K_m. These results suggest that PTZ inhibits the NET function by interacting with a site or sites other than the recognition site for NE. To investigate the possible involvement of opioid receptors, we used naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist; nor-Binaltorphimine, a selective κ-opioid receptor antagonist; and BD-1047, a selective σ-receptor antagonist. None of these opioid and σ-receptor antagonists reversed the suppression of [³H]NE uptake induced by (-)- and (+)-PTZ, suggesting that these effects are independent of opioid and σ receptors.

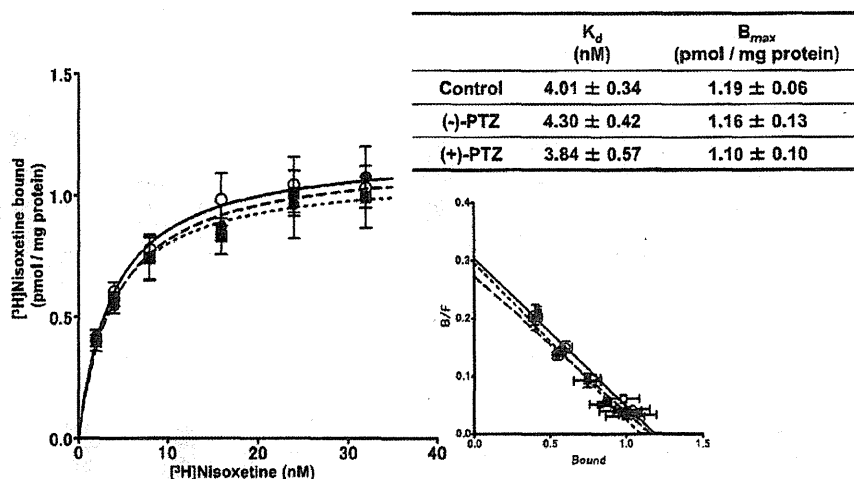


Fig. 6. Effects of (-) or (+)-PTZ on specific binding of [³H]nisoxetine to plasma membranes of bovine adrenal medulla and its Scatchard plot analysis. Plasma membranes isolated from bovine adrenal medulla were incubated at 4°C for 2 h with (closed circles or closed squares) or without (open circles) (-)-PTZ (closed circles) or (+)-PTZ (closed squares) (30 μM) in the presence of increasing concentrations (2–32 nM) of [³H]nisoxetine. The specific binding of [³H]nisoxetine was measured. Right inset: Scatchard plot analysis data of [³H]nisoxetine binding. Data are means ± S.E.M. of three separate experiments carried out in duplicate. B, bound (pmol / mg protein); B/F, bound/free (pmol / mg protein per nM).

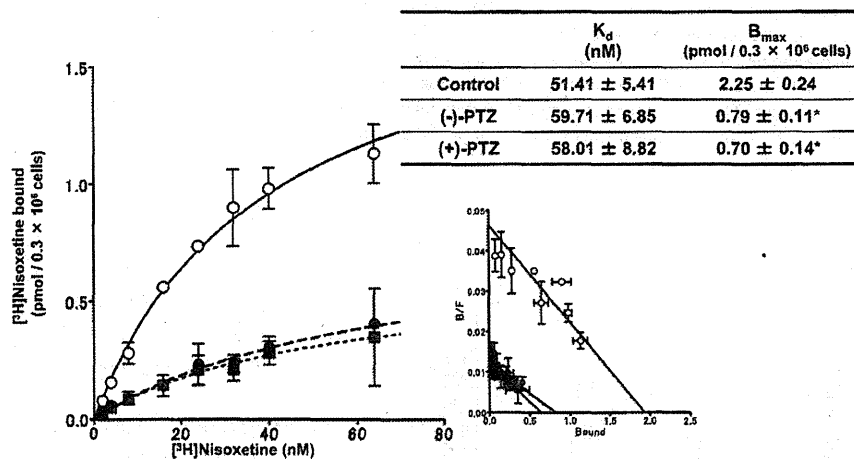


Fig. 7. Effects of (-) or (+)-PTZ on specific binding of [³H]nisoxetine to intact SK-N-SH cells and its Scatchard plot analysis. After preincubation with (closed circles or closed squares) or without (open circles) (-)-PTZ (closed circles) or (+)-PTZ (closed squares) at 30 μM, SK-N-SH cells (0.3×10^6 cells) were incubated in the presence of increasing concentrations (2–64 nM) of [³H]nisoxetine with or without (-) or (+)-PTZ (30 μM) at 4°C for 2 h. The specific binding of [³H]nisoxetine was measured. Right inset: Scatchard plot analysis data of [³H]nisoxetine binding. Data are means ± S.E.M. of three separate experiments carried out in duplicate. B, bound (pmol / 0.3×10^6 cells); B/F, bound/free (pmol / 0.3×10^6 cells per nM). * $P < 0.05$, compared with the control.

NET is regulated by a number of intracellular signaling pathways. One common pathway is phosphorylation by several protein kinases such as cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C (15, 28). Activation of protein kinase C is reported to down-regulate the function of NET in SK-N-SH cells (29) or transfected COS-7

cells (30). In the present study, inhibitors of protein kinase C (calphostin C, chelerythrine, and GF109203X), cAMP-dependent protein kinase (H-89), and phosphoinositide 3-kinase (wortmannin) had little effect on PTZ-induced inhibition of [³H]NE uptake, suggesting that these protein kinases are not involved in the PTZ-

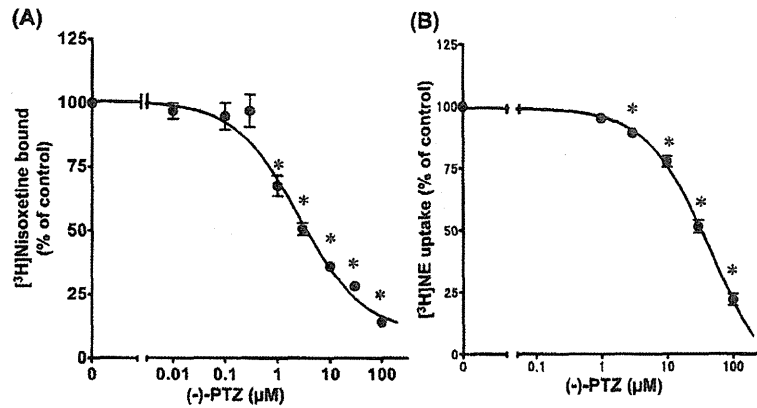


Fig. 8. Effect of various concentrations of (-)-PTZ on [³H]nisoxetine specific binding (A) and [³H]NE uptake (B) by SK-N-SH cells. A) After preincubation with various concentrations of (-)-PTZ for 30 min, the cells were incubated in [³H]nisoxetine at 4°C for 2 h. The specific binding of [³H]nisoxetine (20 nM) was measured. Data are means ± S.E.M. of three separate experiments carried out in duplicate and expressed as % of the control. The values of the control (0 µM PTZ) were 0.52 ± 0.01 pmol / 0.3 × 10⁶ cells. B) After preincubation with various concentrations of (-)-PTZ for 20 min, cells were incubated in the presence of [³H]NE (100 nM) with various concentrations of (-)-PTZ for 12 min. The desipramine-sensitive [³H]NE uptake by the cells was measured. Data were expressed as a percentage of the control (0.45 ± 0.04 pmol / 10⁶ cells per min). *P < 0.05, compared with 0 µM PTZ.

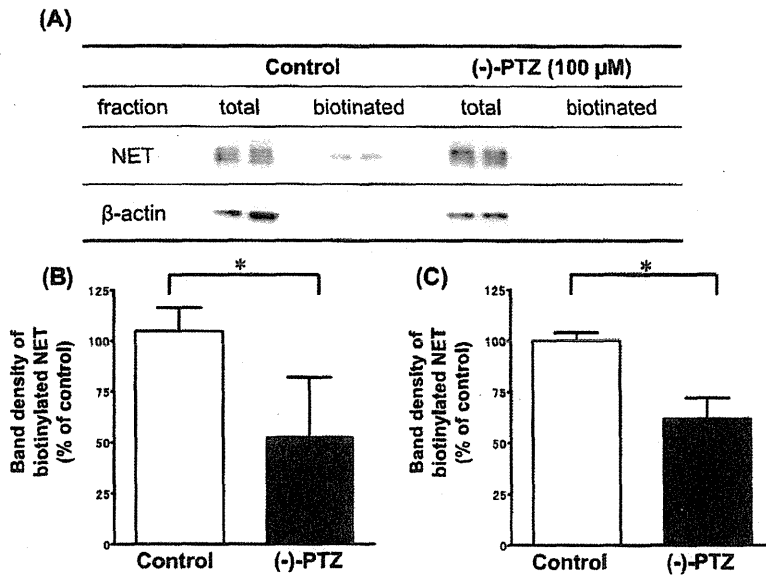


Fig. 9. Effect of (-)-PTZ on cell surface expression of NET proteins in SK-N-SH cells. SK-N-SH cells were pretreated with (black column) or without (white column) (-)-PTZ (100 µM) for 30 min and then biotinylated with sulfo-NHS-biotin. A) Aliquots of total and nonbiotinylated fractions were loaded, whereas the entire eluate from streptavidin beads was loaded as the biotinylated sample and blots were probed with NET antibody as described. B, C) Data are means ± S.E.M. of three separate experiments and are expressed as % of the control NET band [the ratio of the density of biotinylated NET fraction (54 kDa) to that of total NET] (B) and as % of the control (the ratio of the density of biotinylated NET fraction to that of β-actin) (C). *P < 0.05, compared with the control.

induced down-regulation of NET function.

Treatment of cells with PTZ for 30 min caused a suppression in the specific binding of [³H]nisoxetine to intact SK-N-SH cells, although PTZ did not directly inhibit the specific binding of [³H]nisoxetine to plasma membranes isolated from bovine adrenal medulla. Scatchard plot analysis showed that PTZ significantly decreased the B_{max} with little change in the K_d in SK-N-SH cells. These findings suggest that treatment of cells with PTZ inhibits the specific binding of [³H]nisoxetine

by reducing the binding sites of [³H]nisoxetine on NET. Indeed, in the present study, we observed the decrease in membrane surface expression of NET proteins after treatment with PTZ. At present, however, the intracellular mechanism of PTZ-induced down-regulation of NET remains to be clarified. This is probably due to a reduction of the membrane trafficking of NET to the plasma membrane or an increase in its degradation or endocytosis by the lysosomal degradation system. The latter possibility may partially be excluded by the sub-

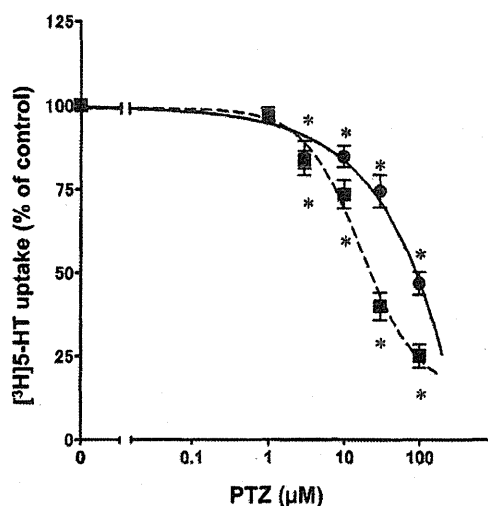


Fig. 10. Effects of (-)- and (+)-PTZ on [^3H]5-HT uptake by rat SERT cDNA transfected COS-7 cells. After transfection with cDNA rSERT for 24–48 h, COS-7 cells (1×10^6 /well) were preincubated at 37°C for 20 min in KRH buffer in the presence or absence of various concentrations of (-) (closed circles)- or (+) (closed squares)-PTZ. The cells were further incubated with [^3H]5-HT (50 nM, 0.1 μCi) at 37°C for 12 min in the presence or absence of (-)- or (+)-PTZ. Data are means \pm S.E.M. of three separate experiments carried out in triplicate and expressed as % of the control (0.43 ± 0.01 pmol/10⁶ cells per min). * $P < 0.05$, compared with 0 μM each PTZ.

sequent finding that bafilomycin A1, a lysosomal inhibitor, did not reverse the inhibition of [^3H]NE uptake induced by PTZ (data not shown). Further study will be required to determine the mechanism by which PTZ down-regulates NET function.

The pharmacological significance of PTZ-induced down-regulation of NET

After intramuscular administration of 40 or 80 mg of PTZ, mean peaks of PTZ plasma concentration at 15 min were 102 and 227 ng/ml (0.318 and 0.707 μM), respectively (31). In the present study, the [^3H]NE uptake in adrenal medullary cells was significantly inhibited by PTZ at 3.0–100 μM , and the specific binding of [^3H]nisoxetine and [^3H]NE uptake of intact SK-N-SH cells were significantly inhibited by PTZ at 1–100 μM and 3.0–100 μM , respectively. Taken together, the present findings and previous data suggest that near-clinical concentrations of PTZ partly suppress the NET function of cultured bovine adrenal medullary cells.

Several lines of evidence have shown that the descending inhibitory system consists of noradrenergic and/or serotonergic neurons (32, 33). A recent study reported a potential use of 5-HT₇ receptor agonists as adjuvants of opioid analgesia because spinal activation

of 5-HT₇ receptors has a role in the expression of opiate-induced analgesia through activation of descending inhibition (34). Furthermore, the antinociceptive effects of some clinical drugs, such as tricyclic antidepressants, are partially explained by enhanced noradrenergic or serotonergic neurotransmission induced by suppression of the NET or SERT in the descending inhibitory system in the brain and spinal cord (35). Indeed, in the present study, PTZ inhibited not only NET function but also SERT function, suggesting a preferential inhibition by PTZ of monoamine transporter functions. Furthermore, several anesthetics such as ketamine and propofol also inhibited the NET function (36, 37). Taken together with these results, it is intriguing to propose that PTZ induces antinociceptive effects via the down-regulation of NET and/or SERT in addition to the activation of opioid receptors.

Readers assessing the significance of the present findings should bear in mind the limitations of this study. First, the cellular mechanism by which PTZ induces the down-regulation of NET function has not been elucidated. Further investigations, including those on NET membrane trafficking and internalization or degradation, are needed to clarify its molecular mechanism after exposure to PTZ. Second, although cultured bovine adrenal medullary cells or SK-N-SH cells are a good *in vitro* model system of noradrenergic neurons, *in vivo* animal studies of PTZ are required to establish the involvement of NET down-regulation by PTZ in its antinociceptive effect.

In conclusion, the present findings suggest that near-clinical concentrations of PTZ induce the down-regulation of NET via suppression of cell surface expression of NET proteins. This may add a new antinociceptive aspect of PTZ to our pharmacological understanding of analgesics.

Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. Norio Sakai (University of Hiroshima) and Prof. Naoaki Saito (University of Kobe) for providing the rSERT cDNA used in this study. This research was supported, in part, by Grants-in-Aid (23617035, 23590159, 23617036, and 24890286) for Scientific Research (C) from the Japan Society for the Promotion of Science.

References

- 1 Gutstein HB, Akil H. Opioid analgesics. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman-Gilman A, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 569–619.
- 2 McQuay HJ. Pharmacological treatment of neuralgic and neuropathic pain. *Cancer Surv.* 1988;7:141–159.

- 3 Sharav Y, Singer E, Schmidt E, Dionne RA, Dubner R. The analgesic effect of amitriptyline on chronic facial pain. *Pain*. 1987;31:199-209.
- 4 Magni G. The use of antidepressants in the treatment of chronic pain. A review of the current evidence. *Drugs*. 1991;42:730-748.
- 5 Max MB, Lynch SA, Muir J, Shoaf SE, Smoller B, Dubner R. Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 1992;326:1250-1256.
- 6 Larson AA, Takemori AE. Effect of fluoxetine hydrochloride (Lilly 110140), a specific inhibitor of serotonin uptake, on morphine analgesia and the development of tolerance. *Life Sci*. 1977;21:1807-1811.
- 7 Malseed RT, Goldstein FJ. Enhancement of morphine analgesia by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology*. 1979;18:827-829.
- 8 Ossipov MH, Malseed RT, Goldstein FJ. Augmentation of central and peripheral morphine analgesia by desipramine. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1982;259:222-229.
- 9 Ossipov MH, Harris S, Lloyd P, Messineo E. An isobolographic analysis of the antinociceptive effect of systemically and intrathecally administered combinations of clonidine and opiates. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;255:1107-1116.
- 10 Bergman SA, Wynn RL, Alvarez L, Asher K, Thut PD. Imipramine-fentanyl antinociception in a rabbit tooth pulp model. *Life Sci*. 1991;49:1279-1288.
- 11 Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG. Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature*. 1991;350:350-354.
- 12 Amara SG, Kuhar MJ. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci*. 1993;16:73-93.
- 13 Bönisch H, Brüss M. The noradrenaline transporter of the neuronal plasma membrane. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;733:193-202.
- 14 Baker EL, Blakely RD. Norepinephrine and serotonin transporters. In: Bloom FE, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology*. 4th ed. New York: Raven Press; 1995. p. 321-333.
- 15 Zahniser NR, Doolen S. Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacol Ther*. 2001;92:21-55.
- 16 Michael-Hepp J, Blum B, Bönisch H. Characterization of the [³H]-desipramine binding site of the bovine adrenomedullary plasma membrane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1992;346:203-207.
- 17 Ceña V, García AG, Montiel C, Sánchez-García P. Uptake of [³H]-nicotine and [³H]-noradrenaline by cultured chromaffin cells. *Br J Pharmacol*. 1984;81:119-123.
- 18 Lingen B, Brüss M, Bönisch H. Cloning and expression of the bovine sodium- and chloride-dependent noradrenaline transporter. *FEBS Lett*. 1994;342:235-238.
- 19 Sagata K, Minami K, Yanagihara N, Shiraishi M, Toyohira Y, Ueno S, et al. Tramadol inhibits norepinephrine transporter function at desipramine-binding sites in cultured bovine adrenal medullary cells. *Anesth Analg*. 2002;94:901-906.
- 20 Hara K, Yanagihara N, Minami K, Ueno S, Toyohira Y, Sata T, et al. Ketamine interacts with the noradrenaline transporter at a site partly overlapping the desipramine binding site. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1998;358:328-333.
- 21 Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;260:275-285.
- 22 Driessen B, Reimann W. Interaction of the central analgesic, tramadol, with the uptake and release of 5-hydroxytryptamine in the rat brain in vitro. *Br J Pharmacol*. 1992;105:147-151.
- 23 Kinouchi K, Maeda S, Saito K, Inoki R, Fukumitsu K, Yoshiya I. Effects of d- and l-pentazocine on the release and uptake of norepinephrine in rat brain cortex. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1989;63:201-213.
- 24 Yanagihara N, Oishi Y, Yamamoto H, Tsutsui M, Kondoh J, Sugiura T, et al. Phosphorylation of chromogranin A and catecholamine secretion stimulated by elevation of intracellular Ca²⁺ in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Biol Chem*. 1996;271:17463-17468.
- 25 Toyohira Y, Yanagihara N, Minami K, Ueno S, Uezono Y, Tachikawa E, et al. Down-regulation of the noradrenaline transporter by interferon- α in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Neurochem*. 1998;70:1441-1447.
- 26 Kippenberger AG, Palmer DJ, Comer AM, Lipski J, Burton LD, Christie DL. Localization of the noradrenaline transporter in rat adrenal medulla and PC12 cells: evidence for its association with secretory granules in PC12 cells. *J Neurochem*. 1999;73:1024-1032.
- 27 Morikawa O, Sakai N, Obara H, Saito N. Effects of interferon- α , interferon- γ and cAMP on the transcriptional regulation of the serotonin transporter. *Eur J Pharmacol*. 1998;349:317-324.
- 28 Mandela P, Ordway GA. The norepinephrine transporter and its regulation. *J Neurochem*. 2006;97:310-333.
- 29 Apparsundaram S, Galli A, DeFelice LJ, Hartzell HC, Blakely RD. Acute regulation of norepinephrine transport: I. protein kinase C-linked muscarinic receptors influence transport capacity and transporter density in SK-N-SH cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287:733-743.
- 30 Bönisch H, Hammermann R, Brüss M. Role of protein kinase C and second messengers in regulation of the norepinephrine transporter. *Adv Pharmacol*. 1998;42:183-186.
- 31 Yeh SY, Todd GD, Johnson RE, Gorodetzky CW, Lange WR. The pharmacokinetics of pentazocine and tripeleminamine. *Clin Pharmacol Ther*. 1986;39:669-676.
- 32 Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol*. 2006;80:53-83.
- 33 Fields HL, Basbaum AI. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Textbook of Pain*. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999. p. 309-329.
- 34 Brenchat A, Ejarque M, Zamanillo D, Vela JM, Romero L. Potentiation of morphine analgesia by adjuvant activation of 5-HT₇ receptors. *J Pharmacol Sci*. 2011;116:388-391.
- 35 Monks R, Merskey H. Psychotropic drugs. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Textbook of pain*. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999. p. 1155-1186.
- 36 Hara K, Yanagihara N, Minami K, Hirano H, Sata T, Shigematsu A, et al. Dual effects of intravenous anesthetics on the function of norepinephrine transporters. *Anesthesiology*. 2000;93:1329-1335.
- 37 Minami K, Yanagihara N, Segawa K, Tsutsui M, Shigematsu A, Izumi F. Inhibitory effects of propofol on catecholamine secretion and uptake in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1996;353:572-578.

再生医療における臨床研究と製品開発

諫田 泰成

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室 室長

(株)技術情報協会

「再生心筋細胞を用いた安全性薬理評価系の開発」 抜刷

2013年9月発刊

第3節 再生心筋細胞を用いた安全性薬理評価系の開発

はじめに

ヒト iPS 細胞は、今まで入手が困難であったヒト細胞の作製が可能となるため、「再生医療」と「創薬」の実用化が期待されている（図1）。再生医療への注目度は非常に高く、ヒト iPS 細胞から作成した網膜色素上皮細胞を移植する臨床研究が2012年度に申請され、正式に承認された。創薬応用としては、医薬品の安全性や有効性の評価に対する利用が考えられ、創薬プロセスの早い段階で医薬品候補化合物の副作用などを予測できれば、臨床試験における予測性の向上や安全性確保、開発コスト削減などが期待される（図1）。

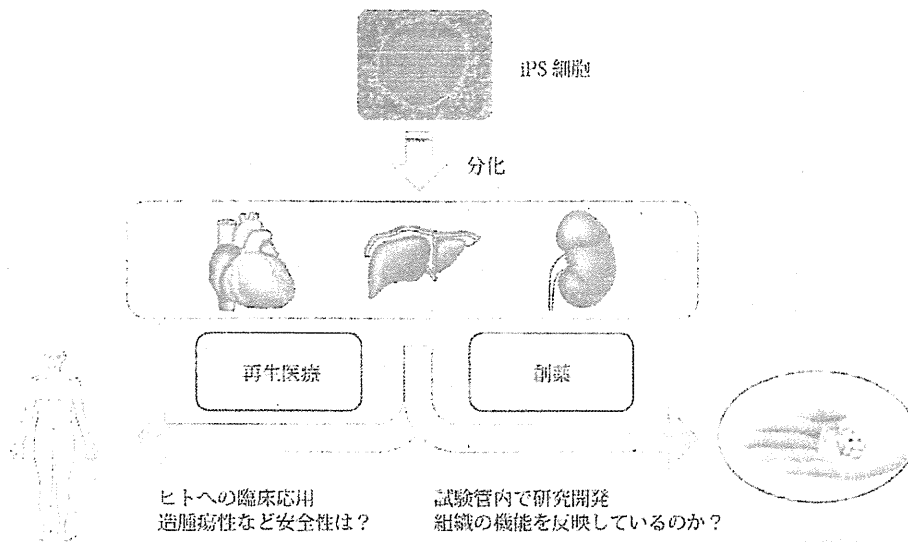


図1 ヒト iPS 細胞の医療応用への可能性

これらのヒト iPS 細胞の実用化に向けた課題として、ヒト未分化 iPS 細胞の品質、すなわち株間の差、継代数や研究室間の差などが明らかになり、国内外のプロジェクトにより標準化の作業が進められている¹⁾。しかし、ヒト iPS 細胞由来の分化細胞に関してはほとんど標準化が手付かずであり、分化誘導の標準プロトコールや分化細胞の品質評価、分化指向性などあまり明らかになっていない。

また、再生医療と創薬応用でそれぞれ克服すべき課題も明らかになってきている。再生医療においては、分化細胞の安全性の確保が必須であり、残存している未分化 iPS 細胞の検出など造腫瘍性の評価法の開発が進められている²⁾。分化心筋細胞に関しては、移植によって不整脈が誘発されないかなどの検証も必要である。創薬応用は、in vitro のアッセイ系で分化細胞を使用するため再生医療とは異なり安全面のハードルが低く分化製品に対するウイルス導入などの加工も可能であるが、元の臓器の性質を反映した成熟した細胞が必要と考えられる。

そこで本稿では、ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導技術ならびに分化心筋細胞の電気生理学的特性を概説し、将来的にヒト iPS 細胞の創薬応用実用化に向けて整備すべき課題について考察したい。

1. ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導法

1.1 EB 形成法

ヒト iPS 細胞から分化心筋細胞の一般的な作製法として、図2Aに示すような胚様体 (Embryoid body, EB) を形成させる方法が知られている。胚の発生過程を in vitro で模倣するためにマウス ES 細胞から擬似的な胚である EB を形成さ

せる方法が開発され、ヒト iPS 細胞にも応用されている。

マウス ES 細胞の場合には、未分化 ES 細胞をトリプシン処理により single cell にして、非接着コート処理済の 96 ウェルプレートなどを用いて EB を形成する。一方、ヒト iPS 細胞の場合には single cell にすると細胞死が起きるため、最初は小さな細胞塊を用いて EB を作成する必要がある。小さな細胞塊はヒト iPS 細胞のコロニーを CTK 溶液（トリプシン、コラーゲナーゼを含む分散液）などで処理した後ピペッティングすることによって作製し、低接着ディッシュに移す。すぐに 10% 血清を含む DMEM などの分化培地に変更すると細胞死が誘導されることがあるため、我々は basic fibroblast growth factor (bFGF) を含む未分化維持培地で数日間培養して EB を形成させてから、3 日ごとに半量を分化培地（10% 血清, 0.1mM 2-メルカプトエタノール, 非必須アミノ酸を添加した DMEM）に切り替えている。未分化維持に重要な bFGF の除去により分化スイッチが ON になり、外・中・内胚葉の三方向へ分化が誘導される。中胚葉を経由して心筋にも分化が誘導され、分化培地で EB の培養を続けると 2～3 週間後に拍動する EB が観察される。

EB 法の欠点は、三方向へ分化が誘導されるため、特定の細胞への分化効率が低いことである。EB の中でも心筋細胞は 10% 程度しか含まれていない。そこで、心筋分化効率を高くするために分化を亢進する液性因子が探索され、BMP-4, Wnt3a, G-CSF など様々な因子が報告されている²³⁾。もう一つの欠点は、EB のサイズが不均一で形状もばらばらであるため、EB 間の差が大きく拍動数などもバラつくことである。我々は EZ passage (Invitrogen #23181-010) を使用してコロニーを処理し、できる限り均一なサイズとなるように心掛けている。最近、V 字型ウェルの中で強制的に EB を形成させるプレートがいくつか報告されており、形やサイズのそろった EB 作成法の開発が期待される。

このように EB 形成を介する分化プロトコールは比較的簡便であり、特別な試薬を用いることなく血清を含む培地で分化誘導も可能であるが、問題点として、ヒト iPS 細胞には分化指向性が存在し、株間で心筋分化能に差が認められることがあげられる。公的な細胞バンクから入手可能な株の中で、201B7 株、253G1 株は心筋分化能が高いが、Tic 株 (JCRB1331) はほとんど拍動が認められないことから、ヒト iPS 細胞には分化の方向性を規定する特性（分化指向性）があると考えられる。Tic 株は肝臓への分化効率が低いと報告されており⁹⁾、心筋に対しては分化抵抗性を有する可能性がある。分化指向性に関するメカニズムや選別のマーカーなどは明らかになっていないので、今後の研究の進展が待たれる。目的に応じて最適なヒト iPS 細胞株を入手できるように、分化特性も含めた細胞バンクの整備が望まれる。また、そのような情報を共有するシステムも必要である。

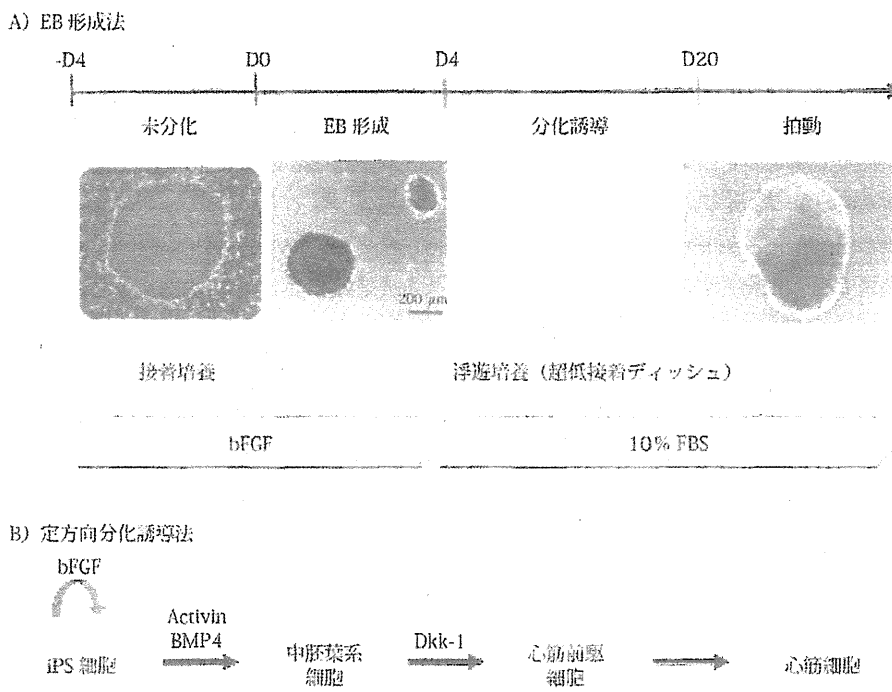


図 2 ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導法

1.2 定方向分化誘導法

定方向分化誘導法とは、液性因子などを用いて特定の方向へ分化を特徴付ける方法であり、心筋細胞の場合は、中胚葉⇒心筋前駆細胞⇒心筋細胞、と段階的に分化誘導を行うことを指す(図2B)。この際、各ステップで添加する液性因子は、心筋細胞の発生過程やES細胞由来分化細胞に発現している受容体などを元にして、液性因子のスクリーニングや最適化が行われている⁷⁾。

まず、ヒトiPS細胞をマトリゲルでコートしたディッシュに高密度で播種して、数回継代を行うことによりフィーダーをできる限り除去した後、Activinにより中胚葉や内胚葉の元となる原条へ分化誘導する。BMP-4の添加により中胚葉へ分化誘導がかかる。次に、Wnt antagonistであるDickkopf-1(Dkk-1)などにより心筋前駆細胞の方向へ分化を行い、最終的には心筋細胞の拍動が観察される。

EB形成法と比較すると、定方向分化誘導法は拍動までの期間が約1週間と顕著に短縮できる特徴がある。実際、酵素処理により分散しトロポニンで染色すると40%以上の細胞が心筋細胞であることから、分化効率も非常に高いことを確認している。また、接着したまま分化誘導を行うのでシートのような状態となり、ダイナミックな拍動が観察できる。欠点は、分化誘導のステップが増えてEB形成法よりも手間とコストがかかること、ヒトiPS細胞のコロニーの密度により分化効率が大きく異なることなどがあげられる。また、添加する因子は濃度に加えてタイミングも重要である。Wntシグナルは心筋分化の初期には促進的に作用し、後期では抑制的に作用することが知られており、タイミングが合わない場合には全く逆の作用をもたらすことが起こり得る。従って、液性因子を添加する時期・濃度・順序などに関して慎重に最適化する必要がある。

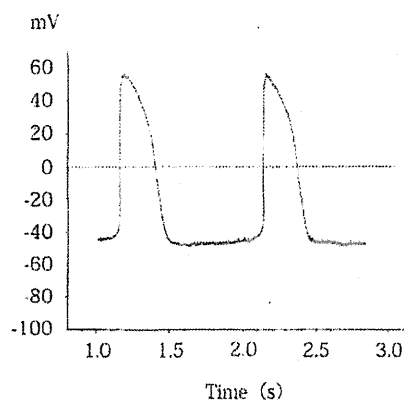
このように心筋細胞への分化プロトコールはEB法、定方向分化法ともに改良が加えられてきているが、分化心筋細胞における遺伝子発現やイオンチャネルの発現は幼若タイプである^{8,9)}。後述するように、分化心筋細胞は電気生理学的にも未成熟であるため、現在、我々は成熟させる分化誘導法を構築中である(投稿準備中)。再生医療においては細胞移植により心機能が回復するのが焦点となるので分化細胞の成熟度はあまり問題にならず、むしろ液性因子の産生が重要と言われているが、創薬応用の場合は成熟度が薬剤のスクリーニング効率に影響をあたえる可能性があり、今後の研究に進展が期待される。

2. 分化心筋細胞の電気生理学的な特性

一般的に細胞の特性の指標として遺伝子発現やマーカー分子の発現などがあげられるが、心筋細胞で最も重要なことは電気生理学的な特性である。筆者らは創薬応用に向けて、国内の公的な細胞バンクよりヒトiPS細胞株を入手して、分化心筋細胞の品質を検証している。

201B7株由来の拍動EBをピンセットで引っ張るかカッターで刻んだ後にトリプシン処理をするとsingle cellを単離でき、ラミニンでコートしたディッシュに再播種すると拍動する細胞が得られる。この単離拍動細胞を用いてマニュアルパッチクランプにより活動電位を測定したところ、結節、心房、心室型の各サブタイプが存在していることが明らかになった。しかし、心筋細胞の静止膜電位が通常は-90mV程度であるのに対して分化心筋細胞はいずれも-40mV程度と浅いことから、成熟が不十分である可能性が考えられる(図3A)。次に、米国Cellular Dynamics International社で販売されているヒトiPS細胞由来分化心筋細胞(iCell)をiPSアカデミアジャパン株式会社経由で入手し、同様に活動電位の測定を行った。その結果、やはり静止膜電位が浅かったことから(図3B)、元となるiPS細胞の株によるのではなく分化心筋細胞の共通の課題であることが示唆された。

A) 201B7 株由来心筋細胞



B) iCell 心筋細胞

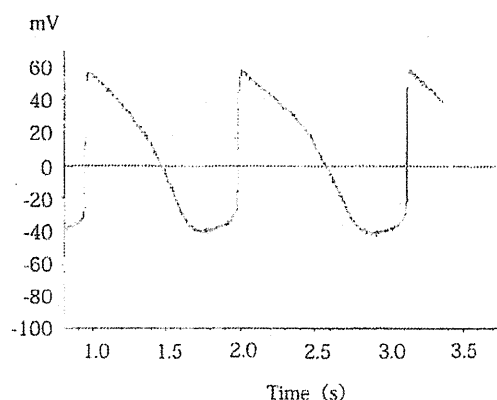


図3 分化心筋細胞の活動電位

このような分化心筋細胞を用いた薬理作用の評価においては、様々なヒト iPS 細胞株から種々の手法を用いて心筋へ分化誘導すると、心筋細胞のサブタイプの割合や成熟度が不均一となり、薬剤に対する反応性についてもばらつくことが予想される。同一の化合物に対して同様の薬理作用が観察できない限り、催不整脈の予測が困難であり、バラつきを抑える必要がある。そこで、我々は次に述べるように、心筋シートを用いた実験プロトコルを整備している。

3. 分化心筋細胞を用いた安全性薬理試験

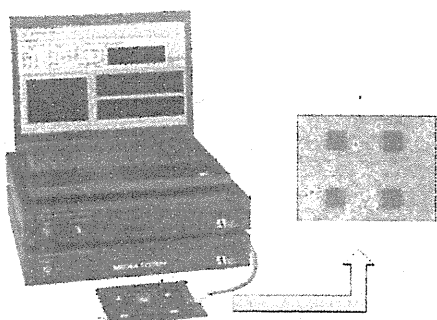
分化心筋細胞を用いた創薬応用の例として、薬剤性不整脈のリスク評価が考えられる。医薬品によって発生する副作用の中でもトルサード・ド・ポアント (TdP) とよばれる重篤な不整脈は重要で、発生頻度は極めて少ないもののまれに心室細動に移行し突然死に至る¹⁰⁾。TdP は QT 間隔 (心室の興奮から再分極までの時間) の延長を伴うことから、現在 TdP のリスクは、非臨床試験としてカリウムチャネル (IKr) を発現させた HEK293 細胞を用いてカリウム電流阻害作用を検討し (hERG 試験法)、次いで *in vivo* で動物の QT 延長作用を評価し、その後臨床において Thorough QT/QTc 試験により厳密にヒトの QT 間隔に対する作用を調べることで、一定の評価が可能である (図5)。しかしながら、hERG 試験法は疑陽性が多く、有用な化合物を化合物のスクリーニングのプロセスで除外してしまう可能性がある。ヒト iPS 細胞由来の分化心筋細胞は、カリウム (IKs/IKr) に加えて、カルシウム、ナトリウムなど複数のチャネルが発現しているため再分極電流への影響を総合的に評価できる利点があり、疑陽性が減少して予測性が向上することが期待される。今までは、心筋への分化誘導条件 (細胞株、分化誘導分化誘導法、日数、培養細胞密度など) が異なるばかりではなく、心筋細胞の電気生理学的機能の測定方法も異なっていたために、実験データを研究間で比較検討ができず、実験結果の再現性を確かめることが困難であった。そこで、我々は電気生理学的特性の解析法を比較検討し、不整脈検出プロトコルの標準化作業を行っている。

個々の心筋細胞の場合は、パッチクランプで解析が可能である。一つ一つの細胞の活動電位の波形をもとに QT 間隔を評価するため、心筋細胞のサブタイプの情報も同時に得られる利点がある。さらに、QT 延長などに起こることが多い早期後脱分極も直接検出することができる。しかし、前述したように個々の波形にバラつきが認められること、スループット性が低く大規模なスクリーニングには向かないこと、侵襲があるので短時間の薬理作用に限定されてしまうことなどを考慮すると、現実的には薬理作用の検出には向かないと考えられる。

細胞塊の場合は、図4Aに示すような多点電極システムを用いて心電図の解析が可能である。電極を埋め込んだディッシュに細胞塊を接着させると、細胞外電位 (Field Potential; FP) が測定できる。FP は細胞内で記録される活動電位の微分波形に一致し、心電図によって得られる信号と同様の変化を記録する事ができる¹¹⁾。従って、ナトリウムによるピークから活動電位再分極時に観察されるカリウムのピークまでの時間である FPD は、心電図における QT 間隔に相当する。

FPD を用いる利点は、侵襲がないため医薬品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である。しかし、細胞塊ごとの FP の波形が一定の範囲内になるよう均一な塊の作製技術が必要不可欠である。さらに、EB が電極に接していなければシグナルが取得できない。もともと心筋細胞はガラスに張り付きにくい性質がある上に、拍動によってディッシュから剥がれたり接着場所が変わったりするので、ディッシュをコートする基材やデバイスの改善が求められる。我々が作製したヒト iPS 細胞由来の拍動 EB も市販のヒト ES 細胞由来細胞塊（スウェーデン Collectis 社）も細胞外電位の測定に手間と時間がかかり、スループット性も低く、現時点では薬理作用の検出にはまだまだ遠いと言わざるを得ない。

A) 多点電極システム



B) IKr 阻害剤 E-4031 による FPD の延長

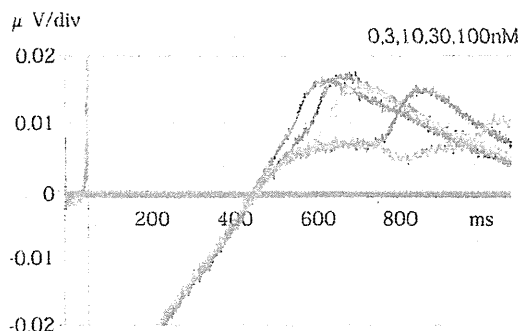


図4 心筋シートにおけるFPの解析

そこで、我々は心筋シートを用いて多点電極システムによる QT 延長評価系の開発に着手した。心筋シートは分化心筋細胞を密に播種することで容易に作成することができ同期した拍動が観察される。シート形成により EB 間や個々の心筋細胞などのバラつきが平均化されるため安定したデータが得られると期待される。また、シートは多点電極全体を覆うことになるので、FP のデータ取得も大幅に改善される。実際例として、陽性対照物質である IKr 阻害剤 E-4031 によって心筋シートの FPD 延長が検出できる (図 4B)。現在、産官学の枠組みで市販の分化心筋細胞を用いて、薬理作用の再現性、メーカーの相違、ロット間差など比較を行っており、不整脈検出プロトコルの標準化を行っている。

最終的に、分化心筋細胞を用いた試験法として確立するためには、検出感度、再現性、信頼性などを検証する必要がある。検出感度に関しては、今のところ、分化心筋細胞を用いた評価系は感受性が高いような結果が得られており、hERG 試験で落とされた医薬品候補化合物を拾えるようなフォローアップに使用できるのかは不明である。再現性や信頼性を明らかにするためには、特定のラボ内のデータのみでは評価できないので、施設内及び多施設間で多くの化合物を用いたバリデーションを行う必要がある。本当に分化心筋細胞を用いる試験系が hERG 試験よりも優位性があるのか？分化心筋細胞の試験法が手間やコストをかけるだけの価値があるのか？ヒトにおける予測性が向上するのか？臨床試験を代替しうるのか？などを明らかにしなければならない。

おわりに

ヒト iPS 細胞の分化誘導技術などの研究の進展により、ヒト iPS 細胞の実用化に向けた動きが盛んである。創薬応用の実用化に向けては、ヒト iPS 細胞の株間の差、分化細胞の規格、安全性薬理試験のプロトコル整備など再生医療とは異なる多くの課題が残されている。薬剤性不整脈のリスク評価に関しては、現行の hERG 試験法に対する優位性も重要なポイントである。これらの課題を克服することにより、創薬プロセスの効率が向上し、将来的には承認審査の迅速化が実現することが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴重なご助言とご指導を賜りました国立医薬品食品衛生研究所薬理部 関野祐子部長、東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理分野 古川哲史教授、黒川洵子准教授、エーザイ株式会社 澤田光平博士、宮本憲優博士、株式会社 Ion Chat Research 齋藤光義博士に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, Ziller M, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Gnirke A, Eggan K, Meissner A. *Cell* 144:439-452 (2011)
- 2) Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. *PLoS ONE* 7:e37342 (2012)
- 3) Takei S, Ichikawa H, Johkura K, Mogi A, No H, Yoshie S, Tomotsune D, Sasaki K. *Am J Physiol*. 296:H1793-H1803 (2009)
- 4) Tran TH, Wang X, Browne C, Zhang Y, Schinke M, Izumo S, Burcin M. *Stem Cells* 27:1869-1878 (2009)
- 5) Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, Ohno Y, Chen H, Egasgira T, Seki T, Yae K, Koshimizu U, Ogawa S, Fukuda K. *Cell Stem Cell* 6:227-237 (2010)
- 6) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furne MK, Mizuguchi H. *Mol Ther*. 19: 400-407 (2011)
- 7) Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK. *PLoS ONE*. 6:e16734 (2011)
- 8) Beqqali A, Kloots J, Ward-van Oostwaard D, Mummery C, Passier R. *Stem Cells*, 24:1956-1967 (2006)
- 9) Cao F, Wagner RA, Wilson KD, Xie X, Fu JD, Drukker M, Lee A, Li RA, Gambhir SS, Weissman IL, Robbins RC, Wu JC. *PLoS ONE*. 3:e3474 (2008)
- 10) Yap YG and Camm AJ. *Heart* 89:1363-1372 (2003)
- 11) Kamp TJ and January CT. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 1:45 (2004)

VI. 化学物質リスク事業・班会議資料

平成 25 年 8 月 23 日開催

平成 26 年 2 月 6～7 日開催

(in vivo 研究グループ)

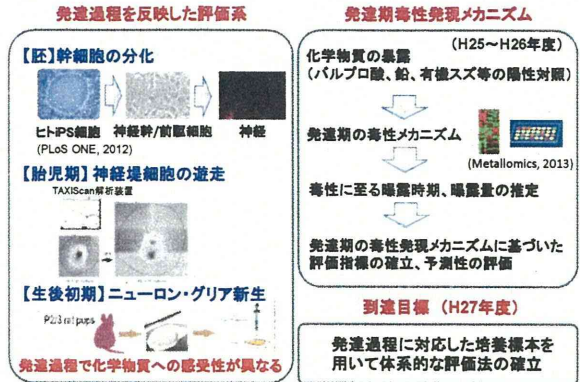


平成25年8月23日
 化学物質リスク事業・班会議(八重洲倶楽部)

ヒト未分化細胞を用いた 発達毒性評価系の構築

国立医薬品食品衛生研究所
 薬理部第二室
 諫田 泰成

胎生・神経発達期の評価系



神経毒性評価の流れ



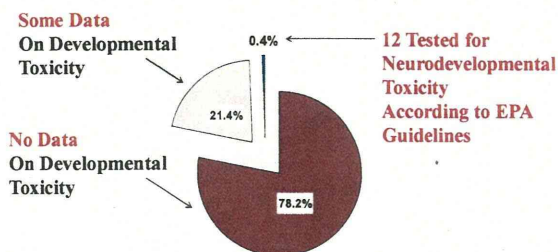
Most Chemicals Have Not Been Adequately Tested for Toxicity

- 80,000+ chemicals in commerce
- 2,863 produced or imported in quantities of 1 million pounds or more per year (High Production Volume; HPV)
- No basic toxicity information is publicly available for about half of HPV chemicals
- Information on developmental toxicity is publicly available for about 20% of HPV chemicals

EPA: Chemical Hazard Data Availability Study, 1998

Status of Developmental Toxicity Testing for the 2,863 Chemicals

Produced Above 1 million pounds/year



現在の発達毒性試験法の問題点

1. 時間・コストがかかりすぎる
2. 大規模なスクリーニングに向かない
3. ヒトと動物の「種差」の問題

現在の発達毒性試験法の問題点

1. 時間・コストがかかりすぎる
2. 大規模なスクリーニングに向かない
3. ヒトと動物の「種差」の問題



ヒトのモデル細胞を用いたin vitroアッセイ系により発達期の神経毒性を評価できないだろうか？

陽性対照物質：トリブチルスズ(TBT)

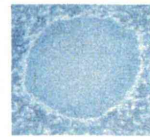
- ✓ 内分泌攪乱作用をもつ環境汚染物質。
- ✓ 低濃度の曝露により、神経系や免疫系など様々な細胞毒性を引き起こす。
- ✓ TBTを投与された妊娠ラットから生まれたF1は、行動異常を示す。
- ✓ ヒト発達期に対する影響ははまだ明らかではない。



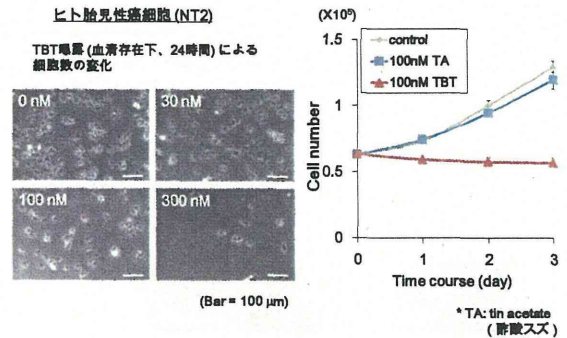
ヒト未分化細胞の「エネルギー代謝」に着目し、TBT曝露による毒性メカニズムを解析した。

ヒト未分化細胞のモデル

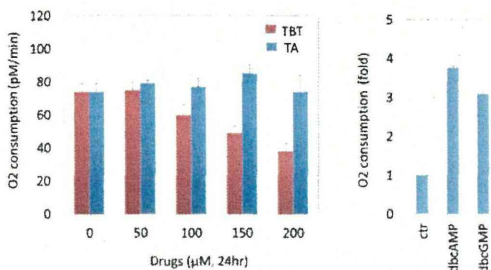
- ヒト胎児性癌細胞株NT2/D1
- ヒトiPS細胞由来の神経幹細胞



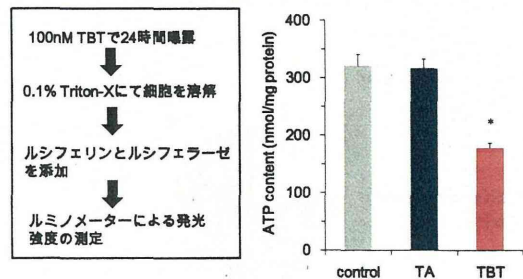
低濃度TBT曝露による増殖抑制



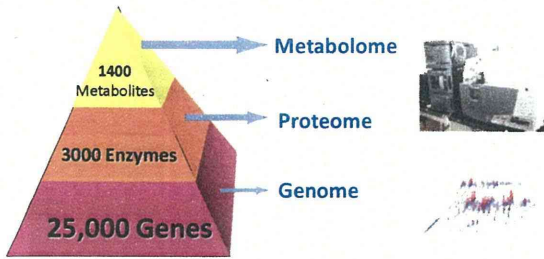
TBT曝露による酸素消費量の抑制



TBT曝露による細胞内ATP量の低下

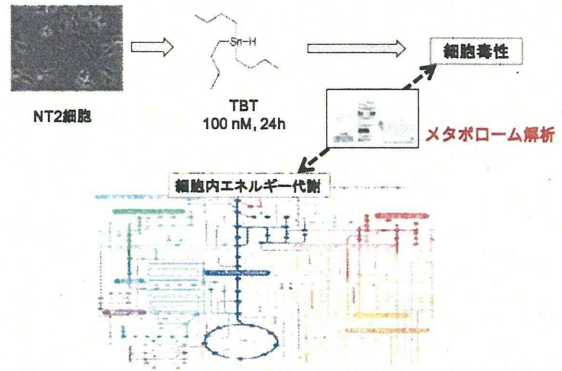


メタボローム解析

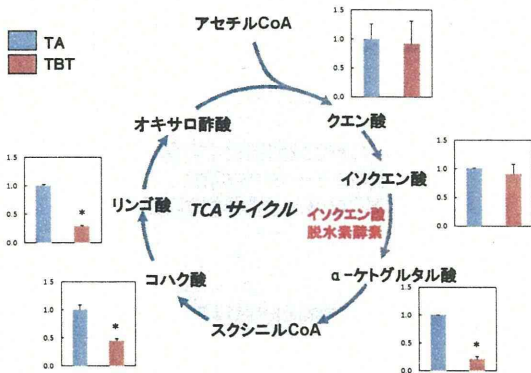


細胞全体の働きを理解するためには、ゲノム、プロテオームに加えて、アミノ酸など代謝物質の網羅的解析が有用。

メタボローム法を利用したTBT毒性解析

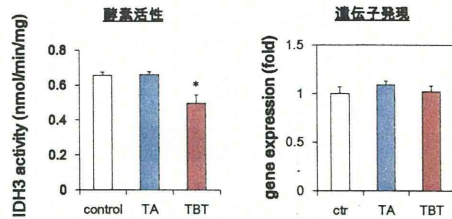


TCAサイクルに対するTBT曝露の影響



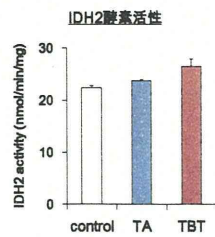
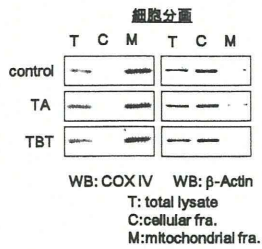
IDH3活性に対するTBT曝露の影響

| イソクエン酸脱水素酵素 | | | |
|-------------|---------|-------------------|-----|
| | 細胞内局在 | 補酵素 | 反応 |
| IDH1 | 細胞質 | NADP ⁺ | 可逆 |
| IDH2 | ミトコンドリア | NADP ⁺ | 可逆 |
| IDH3 | ミトコンドリア | NAD ⁺ | 不可逆 |



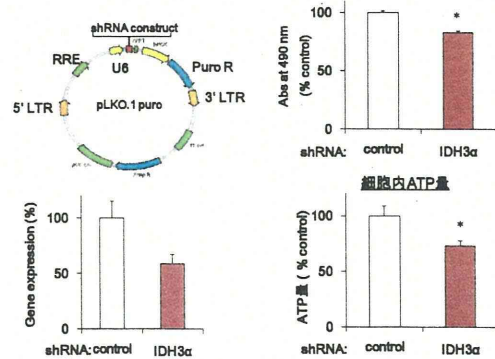
IDH2活性に対するTBT曝露の影響

| イソクエン酸脱水素酵素 | | | |
|-------------|---------|-------------------|-----|
| | 細胞内局在 | 補酵素 | 反応 |
| IDH1 | 細胞質 | NADP ⁺ | 可逆 |
| IDH2 | ミトコンドリア | NADP ⁺ | 可逆 |
| IDH3 | ミトコンドリア | NAD ⁺ | 不可逆 |

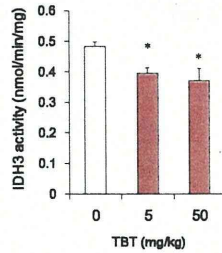
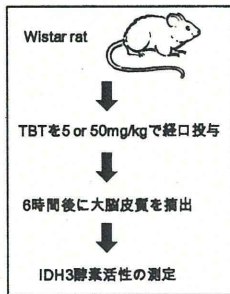


細胞増殖に対するIDH3αノックダウンの影響

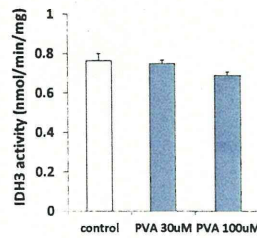
IDH3α (核酸サブユニット)のノックダウン



in vivoにおけるTBTの作用



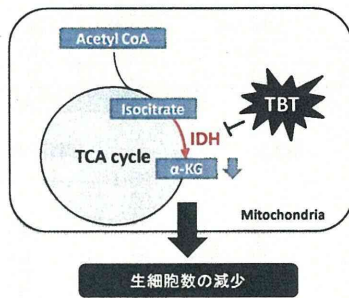
他の化学物質の影響は？



バルプロ酸処理によってもIDH3の活性が抑制される傾向であった。

IDH3を含めたエネルギー産生は高感度で毒性を検出できる可能性が考えられる。

結論



本研究において、メタボロームの手法を応用することにより、トリブチルスズの新たな毒性メカニズムを明らかにした。

今後の予定

メタボロームによるTBTの新たな毒性作用

1. 神経への分化過程に対する影響
2. より簡便なマーカーの探索
3. 有機スズ以外の化学物質の適用

発達神経毒性の新規評価法の構築

平成25年8月23日

厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

個体の成長期における毒性メカニズムに基づく
新規in vitro発達神経毒性評価法に関する研究
(H25-化学-一般-002)

第1回 班会議

神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

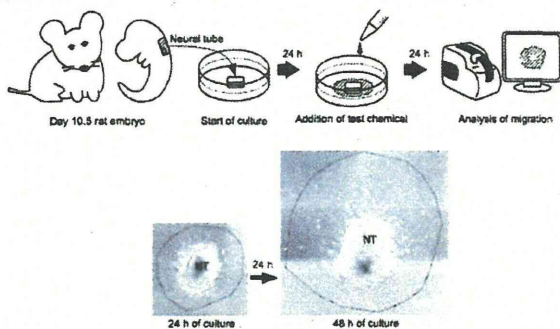
国立医薬品食品衛生研究所
薬理部 第四室
宇佐見 誠

神経堤細胞の機能解析による 評価法の開発

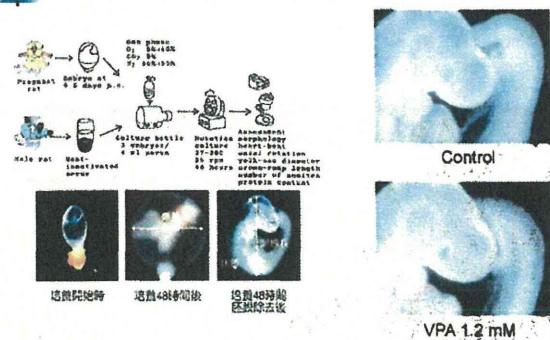
- 形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いる。



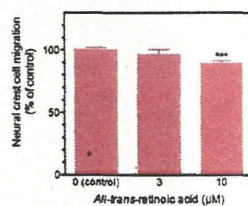
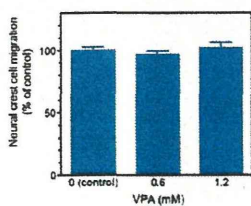
神経堤細胞遊走実験法



ラット培養胚に及ぼす バルプロ酸(VPA)の影響



ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす バルプロ酸(VPA)の影響



今後の計画

- 培養実験法の改良
 - 解析のための細胞収率の改善
- siRNAを用いた毒性発現メカニズム解析法の確立
 - オフターゲット効果の低減
- ハイコンテンツアナリシスの応用
 - マルチパラメータによる同時解析
 - 細胞形態・生存率など

オリゴデンドロサイト新生に対する VPA の作用

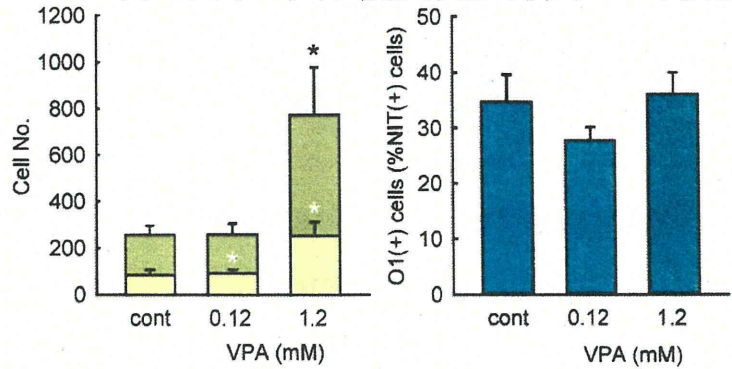
Cont



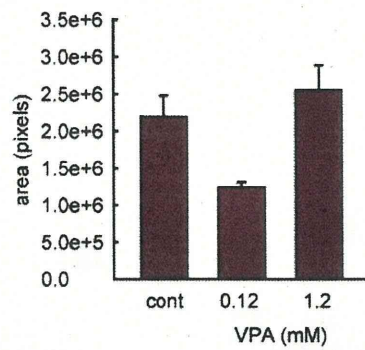
VPA 1.2 mM



オリゴデンドロサイト増殖・分化に対する VPA の作用



オリゴデンドロサイト前駆細胞遊走に対する VPA の作用

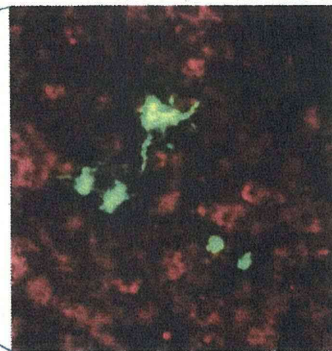


*p<0.05, **p<0.01 vs. control, N=6, Tukey's test following ANOVA



オリゴデンドロサイト新生に対する VPA の作用

Cont



VPA 1.2 mM



オリゴデンドロサイト新生—VPA

Neurodegener. Dis., 2013 Aug 16. [Epub ahead of print]

Valproic Acid Attenuates Disease Symptoms and Increases Endogenous Myelin Repair by Recruiting Neural Stem Cells and Oligodendrocyte Progenitors in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Pazhoohan S, Salarian L, Asghari AA, Salimi M, Kiani S, Mani AR, Javan M.

Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

EAE モデルで VPA によるオリゴデンドロサイト新生の促進が観察されていた

Neuroscience, 2012 Sep 18;220:313-21. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.012. Epub 2012 Jun 13

Valproic acid increases white matter repair and neurogenesis after stroke.

Liu XS, Chopp M, Kassis H, Jia LF, Hozeska-Solgot A, Zhang RL, Chen C, Cui YS, Zhang ZG.

Department of Neurology, Henry Ford Health System, Detroit, MI 48202, USA. xslu@neuro.hfh.edu

虚血 モデルでも VPA によりオリゴデンドロサイト新生(神経新生も)の促進が観察されていた

Nat Neurosci, 2008 Sep;11(9):1024-34. doi: 10.1038/nn.2172.

Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency.

Shen S, Sandoval J, Swiss VA, Li J, Dupree J, Franklin RJ, Casaccia-Bonnel P.

Department of Neuroscience and Cell Biology, Robert Wood Johnson Medical School, 675 Hoes Lane, Piscataway, New Jersey 08854, USA.

VPA によるオリゴデンドロサイト新生は年齢依存的—若い脳では epigenetic control がききやすいが成熟すると効果が弱くなる。

