

201451016A

厚生労働科学研究委託費

医薬品等規制調和・評価研究事業

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株を成人心筋に橋渡しする
ためのインシリコツールの開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 黒川 洵子

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の医薬品等規制調和・評価研究委託事業による委託業務として、国立法人東京医科歯科大学が実施した平成26年度「ヒトiPS細胞由来心筋細胞株を成人心筋に橋渡しするためのインシリコツールの開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株を成人心筋に橋渡しするためのインシリコツールの開発

----- 1

黒川 洵子（東京医科歯科大学難治疾患研究所）
（資料）表1、第1回班会議議事録

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. ヒト iPS 由来心筋の成熟化技術を利用した心毒性予測のためのインシリコツールの開発

----- 8

黒川 洵子（東京医科歯科大学難治疾患研究所）
（資料）図1-5、表1

2. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株ごとのマーカー遺伝子の比較定量解析法の開発

----- 19

古谷 和春（大阪大学大学院医学系研究科）
（資料）資料1、表1、図1-4

3. プロテオミクスを用いたヒトiPS細胞由来心筋の細胞株間差の調査

----- 36

永森 収志（大阪大学大学院医学系研究科）
（資料）図1-3、表1-3

4. インシリコヒトiPS細胞由来心筋細胞モデルの基盤構築

----- 46

芦原 貴司（滋賀医科大学医学部）
（資料）表1、図1-3

5. ヒト iPS 由来心筋の成熟化技術を利用した心毒性予測に関する調査

----- 54

諫田 泰成 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)
(資料) 図1-4

III. 学会等発表実績 ----- 64

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 100

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）

総括研究報告書

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株を成人心筋に橋渡しするためのインシリコツールの開発

業務主任者 黒川 洵子

国立大学法人 東京医科歯科大学

難治疾患研究所 生体情報薬理学分野 准教授

本委託研究は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株を利用して、*in silico*（以下、インシリコ）でヒト心筋細胞のシミュレーションを行う技術を実現し、さらに成人心筋の生体シミュレーションへ橋渡しする技術の実現を目指し、医薬品の副作用による致死性不整脈の発生リスクの予測を可能とすることを目的とする。本研究計画の全期間を通じて、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の質の向上が遅れているところを、インシリコモデルを用いて補正する技術を開発することにより、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株を利用した心毒性評価の実用化に貢献することを目指す。

本年度は、インシリコ iPS 細胞由来心筋細胞モデルを作成するためのヒト iPS 細胞由来心筋細胞株ごとの心筋マーカーの比較定量解析法の開発および次年度以降にヒト iPS 細胞由来心筋培養シートへ展開するための基盤構築の研究を行い、以下の結果を得た。

- (1) 幹細胞由来分化心筋を成熟化する技術の特許が国際公開された。
- (2) 分化細胞の維持およびサンプル回収法について、実験プロトコルを統一した。遺伝子発現比較のための心筋マーカー遺伝子と標準遺伝子を選定して、市販ヒト iPS 由来心筋細胞株を用いた相対的比較解析法の系を確立した。
- (3) マウス培養心筋細胞、未分化 iPS 細胞とヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、膜タンパク質比較定量解析のための網羅的質量分析法を確立し、心筋マーカー安定発現株培養細胞を用いて、定量解析に必要なペプチド情報を取得した
- (4) 本研究で用いるインシリコモデルとして、O'Hara-Rudy dynamic (ORD)モデルを選定した。
- (5) 多電極アレイ細胞外電位の計測系およびヒト iPS 細胞成熟化技術を導入する実験系を確立した。成熟化した細胞で、選択的 hERG 阻害剤の作用を解析した。

業務担当責任者

古谷和春 (大阪大学・助教)

永森收志 (大阪大学・准教授)

芦原貴司 (滋賀医科大学・講師)

諫田泰成 (国立医薬品食品衛生研究所・室長)

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒトiPS由来心筋の成熟化技術を利用した心毒性予測のためのインシリコツールを開発することである。ヒトiPS細胞由来心筋細胞株を利用して、ヒト心筋細胞のシミュレーションを行う技術を開発し、医薬品の副作用による致死性不整脈の発生リスクの予測性向上に貢献することを目的とする。

本研究計画の全期間を通じて、インシリコモデルを用いて、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の細胞特性のばらつきを補正する技術を開発し、ヒトiPS細胞由来心筋細胞株を利用した心毒性評価の実用化の実現を加速することを目指す。

医薬品の副作用による致死性不整脈を予防するためには、薬事承認に向けて催不整脈作用を評価することが極めて重要であり、日米欧医薬品規制調和国際会議 (ICH) が心毒性評価法のガイドラインを発出している。

しかし、現評価法はヒトへの予測性が充分とは言えず、高い開発コスト等も問題であるため、1, 2年以内のICH

ガイドライン見直しに向けて、FDAを中心とした国際的共同検討の組織 (CiPA: Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay) で検討が始まっている。CiPAでは、生体シミュレーションの導入を検討する専門グループも立ち上がっており、業務主任者・黒川と業務担当者・古谷が、平成26年厚生労働科学研究費補助金 (代表: 関野祐子) の分担研究で情報収集を行った。この調査研究から、CiPAのインシリコワーキンググループは、ヒトチャネル発現系のデータを基にしたインシリコモデル導入を目指していることが明らかとなった。CiPAが推進するマルチチャネルデータを基にしたインシリコ解析によって、hERGアッセイと比較し、毒性予測の精確性が向上すると期待できる。しかしながら、CiPAの計画では非心筋細胞におけるデータに基づいているため、心筋チャネル制御因子や他のイオンチャネルの特性を反映することは、将来的にもありえないという限界がある。一方、本研究では、心筋細胞を利用しているため、将来的には心筋特有のシグナルにも拡張することが可能である。

一方、心毒性評価の *in vitro* 実験系として、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた細胞シート (以下、ヒトiPS由来心筋シート) に注目が集まり、産官学共同で急ピッチに進められている。CiPAでは、ヒトiPS由来心筋シートを用いた毒性評価を検討する専門グループも立ち上がっており、業務担当者・諫田がコアメンバーとして参加し

ている。さらに、今年度は厚労科研費補助金によるiPS細胞の実用化事業がJiCSA (Japan iPS Cardiac Safety Assessment)が設立され、日本の動きも活発化している。本研究班の班員も参加して情報を共有しており、国内全体の動きに合わせた開発を行うことが可能である。

このような全体の流れの中で、インシリコ技術は、ヒトiPS心筋と臨床試験の結果を橋渡しするツールとして有用である。そこで、本研究では、iPS細胞分化心筋の株間のばらつきに注目し、新しい心毒性評価の技術を開発する。未熟なヒトiPS分化心筋細胞の特性は細胞株間でばらつくため、薬物反応の結果もばらつく可能性が指摘されている。しかし、精確な毒性予測のためには、どのiPS細胞株を用いたとしても、同じ結論が導き出されるべきである。そこで、本研究で開発する技術を用いて、細胞特性のばらつきを補正すれば、利用可能な細胞株の規準が明確化して国内産iPS細胞の利用拡大につながると期待できる。

そこで、本研究では、今年度に国際特許が公開された独自の成熟化技術を導入し、以下の研究計画により、インシリコツールの開発を行う。

- ①ヒトiPS由来心筋細胞の心筋マーカーのリストの構築
- ②インシリコiPS由来心筋細胞モデルを用いた株間差補正法の開発
- ③心筋細胞シートを用いた薬効作用解析を評価する系の開発

B. 研究方法

本研究は、業務主任者黒川、業務担

当者・古谷、永森、芦原、諫田の計5名で遂行した。当該年度は、主にヒトiPS細胞由来心筋細胞に発現している心筋マーカー（遺伝子及び膜タンパク）の定量解析法の開発、インシリコツールの開発する為の基盤とするヒト心筋モデルの選定、iPS由来心筋細胞シートを成熟化するための技術開発を試みた。平成27年1月26日に第1回班会議を行った（議事録添付）。

業務主任者・黒川、業務担当者・古谷、永森、芦原、諫田の計5名とも、今年度分の倫理関係・利益相反について審査済みであり、来年度以降についても遅滞なく申請する予定である。

C. 研究結果

1. 幹細胞由来分化心筋を成熟化する技術の開発

本特許技術の開発は、業務主任者・黒川と業務担当者・諫田によって遂行された。ペースメーカー能に I_{K1} チャンネルが重要であることを同定した。

2. ヒトiPS細胞由来分化心筋細胞の心筋マーカー遺伝子発現における株間差解析のための基礎的検討

ヒト心筋インシリコモデルを参考にして、比較定量解析のための分子のリストを作成した（表1）。心筋マーカー発現解析に先立ち、東京医科歯科大学にて細胞の取り扱いに関する講習会を行い、実験プロトコルの詳細および手技について直接確認し合った。iPS細胞を取り扱う実験プロトコルをwet実験のグループ（業務主任者・黒川、業務担当者・古谷、諫田）で統一した。遺伝子発現比較のための標準遺

伝子を選定して、市販ヒト iPS 由来心筋細胞株を用いた相対的比較解析法の系を確立した。

3. ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞の心筋マーカー膜タンパク質発現における株間差の検討（業務担当・永森）

マウス培養心筋細胞またはヒト未分化 iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、膜タンパク質の比較定量解析のための網羅的質量分析法を確立し、心筋マーカー安定発現株培養細胞を用いて、比較定量解析に必要なペプチド情報を取得した。

4. ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞のインシリコモデルの作成の基盤となる成人心室筋モデルの選定（業務担当・芦原）

本研究で用いるインシリコモデルとして、O'Hara-Rudy dynamic (ORD)モデルを選定した。市販ヒト iPS 由来心筋細胞株の1種から得られた実験データおよび既報の情報から、暫定的にシミュレーションを行い、単一細胞モデルにおいて、ペースメーカー機能をモデル化する事に成功した。

5. ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞シートを用いた典型的QT延長薬の作用解析に向けた基礎的検討

多電極アレイによる細胞外電位の計測系を業務主任者・黒川も新たに立ち上げた。ヒト iPS 細胞成熟化技術を実施した細胞にて、選択的 hERG 阻害剤である E-4031 の作用を解析した。

D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞の細胞株間における細胞特性のばらつきを補正するインシリコ技術の開発を目指す。

本研究の特色として、独自の幹細胞由来分化心筋を成熟化する技術を利用する。本年は、本技術が国際特許公開され (WO2014/192312A1)、学会等でも発表した。インシリコモデル構築のためには、ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞の電気的性質を数学的に記述することが必要であるので、まず心筋マーカー遺伝子発現の株間差を解析するための基礎的検討を行った。実験プロトコルを統一し、CDI 社製 iCell-CM と Axiogenesis 社製 Cor.4U を用いて、遺伝子発現の比較定量解析を開始した。本年は、iCell-CM のロット間でのばらつきは比較的小さいが、Cor.4U の発現プロファイルには明確な株間差が見られることを見出した。今後は、国産を含む複数の株を用いて、株間差の比較定量を行い、細胞特性のばらつきを定量化していく。今後は、重要度が高い分子については、パッチクランプによる機能解析を施し、インシリコモデルとの相互検証を行う。

膜タンパク質発現における株間差を検討するために、質量分析計を用いた実験系の確立に向けた基礎的検討を行った。本年は、業務担当者・永森が他細胞で確立している技術を用いて、心筋細胞もしくはヒト iPS 細胞における膜タンパク質の網羅的解析の実験系を構築した。ヒト iPS 由来心筋細胞での予備的検討も開始した。さらに、当初の予定を早め、来年度以降の

絶対定量解析に向けた基礎的検討として、ペプチド情報の取得を開始した。今後は、細胞株間で膜タンパク質量が大きくばらつく分子を同定し、細胞株ごとの絶対定量を行い、インシリコモデルに導入していく。

インシリコ技術の開発に関しては、本研究で開発する基盤となる成人心室筋モデルとして ORd モデルを選定した。本年は、実験データを参考にして、ORd モデルに改変を加えたところ、単一細胞におけるペースメーカー能の再現に成功した。今後は、さらに定量性が高い実験データを順次導入し、モデルの精度を向上する。ウェット実験と同時に、インシリコモデルも二次元に展開して、心筋シートを用いた心毒性評価系との相関を検証しながら、細胞株間のばらつきのシミュレーションを行う。最終年度までに、ばらつきの評価法（インシリコツール）を、ホームページ・論文を通して公表することを目指す。

ヒト iPS 細胞由来心筋シートを用いた心毒性評価法との連携を目指し、本年度は、単一細胞レベルでの薬剤作用を検討した。まず、市販 iPS 由来心筋細胞を用いて hERG 阻害剤である

E-4031 の APD 延長について調べたところ、成熟化処理によって高濃度（毒性域）においても濃度依存的な反応を解析することができることを明らかにした。

今後は、iPS 細胞株間ごととの薬物反応のばらつきを定量化した実験データを提供することにより、インシリコモデル構築に貢献する。

E. 結論

ヒト iPS 細胞成熟化技術を利用して、ウェット実験の結果を臨床結果に参照するデータに橋渡しすることを可能とするために、成熟化技術を施したヒト iPS 由来心筋における薬理的評価系を構築した。インシリコ iPS 由来心筋モデルを作成するために、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株ごとの心筋マーカーの比較定量解析法を構築・整備した。さらに、本研究で使用するインシリコモデルを選定し、ヒト iPS 細胞由来心筋培養シートを用いた心毒性評価に関する情報を収集した。

F. 健康危険情報

特になし。

表1：ヒト iPS 細胞由来心筋株間比較解析のために選定した心筋マーカー34 遺伝子のリスト。

インシリコモデルに導入する際のウェット実験が可能となる分子群を中心に選定したため、市販の心筋マーカー遺伝子リスト等とは異なる。本リストには含めないが、心室タイプ vs. 心房タイプのばらつきを定性的に評価するために、MYH6, MYH7, MYL2, MYL7 の4 遺伝子もバックアップとしての解析対象とする。

Gene	Protein
SCN5A	Nav 1.5 α subunit
SCN1B	Nav 1.5 β -1 subunit
CACNA1C	Cav1.2, α -1C subunit
CACNA1D	Cav1.2, α -1D subunit
CACNA2D1	Cav1.2, α -2/delta-1 subunit
CACNB1	Cav1.2, β -1 subunit
CACNB2	Cav1.2, β -2 subunit
CACNA1H	Cav 3.2, α -H subunit
HCN1	Pacemaker channel
HCN2	Pacemaker channel
HCN4	Pacemaker channel
KCNA4	Kv1.4 α subunit
KCNA5	Kv 1.5 α subunit
KCNAB1	Kv 1.5 β -1 subunit
KCNAB2	Kv 1.5 β -2 subunit
KCND3	Kv 4.3
KCNIP2	Kv channel-interacting protein

KCNQ1	Kv 7.1 (KvLQT1)
KCNE1	minK
KCNE2	MiRP1
KCNH2	Kv 11.1 (KvLQT2, hERG)
KCNJ5	GIRK4 IKACH channel
KCNJ3	GIRK1 IKACH channel
KCNJ2	Kir 2.1
SLC8A1	Na/Ca exchanger
ATP1A1	NaK ATPase alpha 1
ATP2A2	SERCA 2A
RYR2	Ryanodine receptor
GJA1	Connexin 43, gap junction
GJC1	Connexin 45, gap junction
ADRA1A	α -1A adrenoreceptor
ADRB1	β -1 adrenoreceptor
ADRB2	β -2 adrenoreceptor
CHRM2	m2-acetylcholine receptor
GAPDH	コントロール (標準遺伝子)

厚労科研委託研究費 第一回 キックオフ班会議議事録
日時：平成27年1月26日（月） 12:30～16:00
場所：大阪大学吹田キャンパス医学部4階セミナー室（階段横）
出席者：芦原，諫田，黒川，永森，古谷

医薬品等規制調和・評価研究事業委託研究
課題名(課題番号)：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株を成人心筋に橋渡しするためのインシリコ
ツールの開発 (H26-医薬B-一般-016)

[配付資料]

資料1：H26 業務計画最終版および研究概要報告書
資料2：H27 研究計画書
資料3：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株について
資料4：ヒト心臓インシリコモデルについて
資料5：発現解析遺伝子・分子（案）
資料6：ウェットとドライの連携（案）

[議事]

1. 本委託研究の趣旨及び名称について
「黒川班」と呼ぶこととした。
2. 班員の自己紹介
これまでの研究および業務の背景と本事業との関連について、全員が自己紹介を行った。
3. 今年度業務計画および報告書について
資料1に従って、確認した。
4. 心毒性安全性評価試験の現状について
レギュラトリーサイエンスの観点から説明があった(諫田)。
5. 研究班内での連携の取り方について（インシリコモデルへの集約法）
ウェット実験担当者（黒川・古谷・永森・諫田）のデータを集約し、コンセンサスが得られた段階で、ドライ実験者（芦原）に情報を提供することとした。
6. 本委託研究の成果の発表方法について
学会および論文発表は積極的に行う。と同時に、HPによる情報発信も行う。
7. 次回以降の班会議のスケジュールおよび開催スタイルについて
2，3月の学会シーズンに情報交換を図り、新年度に再度集まることとした。
8. 次年度業務計画について
今年度中に次年度計画についても話し合うこととした。

[報告事項]

1. CiPA インシリコチームの現状報告（黒川）
資料を配付した。
2. CiPA ミーティング（2014年12月ワシントンDC）の参加報告（諫田）
資料を配付した。
3. 実験進捗報告
報告した。

II. 委託業務成果報告（業務項目）

平成 26 年度業務担当報告

ヒト iPS 由来心筋の成熟化技術を利用した心毒性予測のためのインシリコツールの開発

担当責任者 黒川 洵子

国立大学法人 東京医科歯科大学

難治疾患研究所 生体情報薬理学分野 准教授

本分担研究は、iPS 由来心筋の成熟化技術を利用して、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株のデータを導入したインシリコモデルによる実験結果を臨床データへ橋渡しすることを目的とする。本研究計画の全期間を通じて、インシリコモデルで行った薬剤の催不整脈性の結果を成人心筋の結果へ変換するためのパラメーターを実験的に取得する。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気的性質は未熟型であるが、インシリコで成熟型に変換して、より臨床に即した心毒性評価が実現化できることが期待される。

本年度は、本研究で使用する幹細胞由来分化心筋を成熟化する技術の特許が国際公開された。そこで、本研究のために、ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を用いて、パッチクランプ法により、インシリコモデルに導入可能な実験データを取得し、インシリコモデルに導入するパラメーターを算出した。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、iPS由来心筋の成熟化技術を利用して、ヒトiPS細胞由来心筋細胞株のデータを導入したインシリコモデルによる実験結果を臨床データへ橋渡しすることである。

心毒性評価の*in vitro*実験系としては、ヒトiPS細胞由来心筋の利用に注目が集まっている。毒性評価系としては、個々の細胞のばらつきが平均化さ

れる細胞シートが有利であり、実際、国内外で、ヒトiPS細胞由来分化心筋細胞を応用する動きが活発化している。

このような全体の流れの中で、インシリコ技術は、ヒトiPS心筋と臨床試験の結果を橋渡しすることが求められている。そこで、本研究では、インシリコ技術とヒトiPS技術を融合して次世代の心毒性技術を開発するために、iPS細胞分化心筋の株間のばらつきに注目した。未熟なヒトiPS分化心

筋細胞の細胞特性は細胞株間でばらつくとされており、薬物反応の結果に差がある可能性が指摘されている。精確な毒性予測のためには、どのiPS細胞株を用いたとしても、同じ結論が得られることが望ましい。どの細胞株も利用可能とすることにより、国産iPS細胞の利用拡大につなげたい。

B. 研究方法

この全体の流れの中で、本研究では、今年度に国際特許が公開された独自の成熟化技術(図1)をインシリコモデルに橋渡しする技術を構築する。そのためには、まず生命現象(ここでは細胞内外の起電的イオン輸送)を数式で記述する必要があり、そのために単一細胞におけるパッチクランプデータを取得する。今年度は幹細胞由来市販ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を標本として、幹細胞由来心筋の未熟的な性質を表すための基礎データを取得した。取得したデータは、項目4 芦原のモデル構築に利用した。

細胞の調製：項目2の古谷と同じ実験プロトコルにより、細胞を解凍し再播種時にパッチクランプ用のディッシュに撒いた。ガラスボトムディッシュ(イワキ、日本：35 mm 径)のガラス部分(10 mm 径)をラミニン(Sigma)でコートし、細胞再播種直前に PBS で洗浄した。

パッチクランプ実験：本年は、CDI社の iCell-CM を用いた。活動電位は穿孔パッチクランプ法(37°C)、膜電流はホールセルパッチクランプ法(室温)

により、マニュアルモードで測定した。パッチクランプの増幅器は、Molecular Devices 社(CA, USA)の Axopatch200B を用いて、Degiddata1440 でデジタル化した(サンプリング 2-5 kHz)。解析には、pClamp9.2 および 10.3 ソフトウェアを用いた。使用した溶液は以下の通りである。

活動電位測定：

細胞外液 (normal Tyrode; NT) : 135 mM NaCl/ 0.33 mM NaH₂PO₄/ 5.4 mM KCl/ 1.8 mM CaCl₂/ 0.53 mM MgCl₂/ 5.5 mM glucose/ 5 mM HEPES. (pH 7.4)

細胞内液 : 110 mM aspartic acid, 30 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM adenosine-5'-triphosphate magnesium salt, 5 mM creatine phosphate disodium salt, 5 mM HEPES, 10 mM EGTA. (pH 7.25) + 0.3-0.6 µg/ml amphotericin B を直前に添加。

I_{K1}電流測定：

細胞外液：NT

細胞内液：amphotericin B なし
0.2 mM BaCl₂ 感受性成分を算出。

I_f電流測定：

細胞外液：NT

細胞内液：amphotericin B なし
5 mM CsCl 感受性成分を算出。

C. 研究結果

公開された特許内容の開発は、主に業務主任者・黒川と業務担当者・諫田によって遂行された。以下に、公開さ

れた特許の内容を簡単に説明する。

幹細胞由来分化心筋細胞に発現している内向き整流性カリウムチャネルの発現が低いことに注目し、本チャネルの α サブユニットをコードする遺伝子(KCNJ2)を導入することにより、電気的特性を成熟化する技術を開発し、国際特許を公開した(図1)。ヒトiPS細胞由来心筋細胞にKCNJ2を過剰発現することにより、静止膜電位が深くなり自動能を失い、外部刺激を与えるとプラトー相がある心室筋様の活動電位が発生した(図2)。本成熟化技術によって得られたヒトiPS細胞由来心筋細胞はペーシングが可能であり、頻度依存性がある薬剤を評価する系が構築できた(図3)。

パッチクランプの電位固定モードにより I_{K1} 電流を測定したところ、ヒトiPS細胞由来心筋細胞での発現レベルは非常に低いことが確認できた(図4)。KCNJ2の過剰発現によりタンパク発現は大きく増大し、ウェスタンブロットによる解析では、モルモット心室筋の約50倍のタンパク量であることを示した。一方、興味深いことに、パッチクランプ解析では、モルモット心室筋と同程度の機能発現であった(表1)。0.2 mM $BaCl_2$ を処理して I_{K1} 電流を阻害すると、自動能が発生した(図4)。さらに、ヒトiPS細胞由来拍動心筋細胞に5 mM $CsCl$ を添加して I_f チャネルを選択的に阻害しても、自律拍動は消失せず、拍動頻度が20%程度減少しただけであった(図5)。なお、成熟化処理の有無に関わらず、幼若心筋に特徴的に発現している I_f 電流の成分が計測された(図5)。

D. 考察

本研究では、独自の幹細胞由来分化心筋を成熟化する技術を利用する。本年は、本技術が国際特許公開され(WO2014/192312A1)、学会等においても本技術に関する研究結果を発表した。本技術は、ヒトES細胞由来、胚葉体による分化誘導、化学的誘導など種々の幹細胞由来心筋細胞にも応用可能であった。今後は、この成熟型ヒト心筋細胞を成人心筋電気活動の実験モデルとして、インシリコツールの開発に応用する。

本年は、主として、成熟化技術の基礎的理解のために、 I_{K1} 電流および I_f 電流を計測し、それぞれのイオンチャネル電流が自動能に与える影響を調べた。今回、驚いたことに、KCNJ2遺伝子導入により I_{K1} チャネルを強制発現させた場合にでも、機能的には他のほ乳類心室筋と同レベルまでしか発現しなかった。この結果から、 I_{K1} 電流量を一定にコントロールする仕組みが心筋細胞自体に存在することが示唆され、一つの可能性として、膜タンパクのトラフィックによる制御が考えられる。実は、図1の共焦点画像からも膜以外にも細胞内にドット状にGFPシグナルが観察された。従って、他のグループによる従来研究のように、mRNA量の測定のみから得られた発現比は、現実の細胞特性を反映しない危険性がある。我々は、膜タンパク質を定量する永森らのプロテオミクスを取り入れることにより、より精確な実験データを取得することを可能にしている。

BaCl₂による I_{K1} 電流阻害によって自動能が復活したことから、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の自動能消失の直接的原因は KCNJ2 遺伝子導入により増加した I_{K1} 電流成分の増加であることを見出した。増加した I_{K1} 成分の電流量はほ乳類心室筋のレベルと同程度であり、本細胞モデルは、さほど実細胞からかけ離れているわけではないと考えられる。

一方、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞には、ペースメーカーチャンネルと呼ばれる I_f チャンネルが機能的に発現していることを示した (図5)。I_f チャンネルは幼若な心筋に特徴的に発現していることから、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞が幼若な性質を有するという過去の報告とも一致する。なお、I_f 電流を 5 mM CsCl で完全に阻害しても自動能は消失しなかったことから、I_f チャンネルは自動能の決定因子ではないことが示唆された。

今後は、他のイオンチャンネルも同様に解析し、モデル構築の実験データを取得する。次の機能解析の候補は Na⁺ 電流と L 型 Ca²⁺ 電流であり、古谷と共同して電気生理学的解析を行う。

E. 結論

国際特許が公開されたヒト iPS 細胞を成熟化する技術について、単一細胞におけるデータを取得した。本年は、I_f 電流ではなく、I_{K1} 電流がヒト iPS 細胞由来心筋の自動能決定に大きく寄与していることを示し、電流密度などインシリコモデルに導入可能な実験データを得た。

G. 研究発表

論文

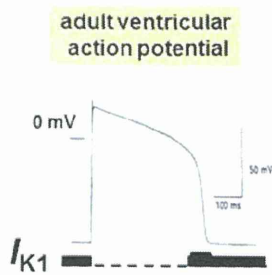
1. Hayakawa, T., Kunihiro, T., Ando, T., Kobayashi, S., Matsui, E., Yada, H., Kanda, Y., Kurokawa, J., Furukawa, T. (2014) Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: correlation and complementarity with extracellular electrophysiology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 77:178-191
2. 黒川洵子 (2014) *In silico* 不整脈予測における CiPA の考え方、および日本の取り組み、CBI 学会誌 4:7
3. 黒川洵子、古谷和春、中谷晴昭、芦原貴司、久田俊明、杉浦清了、岡田純一、田保充康、吉永貴志(2014) 医薬品安全性評価におけるインシリコアプローチの可能性について考える、心電図 34:326-329.
4. 芦原貴司、黒川洵子、諫田泰成、原口 亮、稲田 慎、中沢一雄、堀江稔：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの不整脈研究への応用可能性：in silico 不整脈学の観点から。生体医工学 2014;52(3) in press.

学会発表

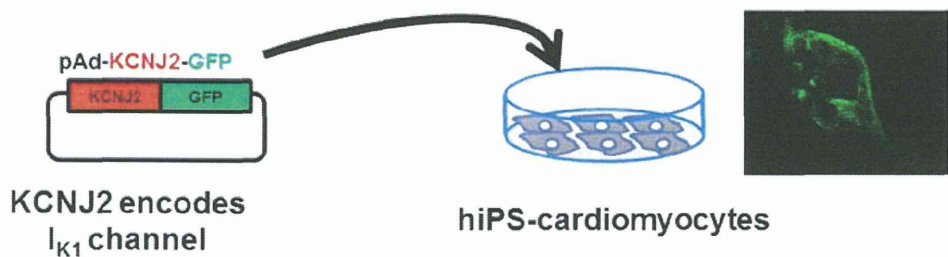
国内学会

1. 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 由来心筋を用いた新規心毒性評価法の開発、生理研研究会 (2014,9, 岡崎)

2. 諫田泰成、関野祐子、古川哲史、黒川洵子 : Role of substrate rigidity on function in human iPS cell-derived cardiomyocytes、第 87 回日本生化学会 (2014,10,京都)
 3. 黒川洵子、芦原貴司、諫田泰成 : Evaluation of drug-induced QT-prolongation in human iPS-derived cardiomyocytes、第 87 回日本生化学会 (2014,10,京都)
 4. 藤塚美紀、中井雄治、諫田泰成、永森收志、金井好克、古川哲史、黒川洵子 : Effects of substrate elasticity on gene expression profiles of human iPS-derived cardiomyocytes、CBI 学会 2014 年大会、(2014,10,東京)
 5. 黒川洵子 : 幹細胞由来心筋細胞を用いた心臓薬理学研究の基礎から応用まで。第 6 回日本安全性薬理研究会 (2015, 2, 東京)
 6. 林英里奈、藤塚美紀、古川哲史、黒川洵子 : ペーシング可能なヒト iPS 細胞由来心筋標本を用いたドキシソルビシンの薬理作用解析、第 88 回日本薬理学会 (2015,3,名古屋)
 7. 黒川洵子、芦原貴司、諫田泰成、古川哲史 : 膜輸送体を標的としたヒト iPS 細胞由来心筋の創薬応用、第 88 回日本薬理学会 (2015,3,名古屋)
 8. 黒川洵子、林英里奈、芦原貴司、諫田泰成、関野祐子、古川哲史 : ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた QT 延長薬剤の頻度依存性の解析、第 92 回日本生理学会大会 (2015,3,神戸)
 9. 黒川洵子、藤塚美紀、林英里奈、芦原貴司、諫田泰成、関野祐子、古川哲史 : Effects of hydrogel culture substrate on contractile properties and gene expression profiles of human iPS cell-derived cardiomyocytes. 第 135 回日本薬学会 (2015,3,神戸)
- 国際学会**
1. 黒川洵子、岡田純一、林英里奈、芦原貴司、吉永貴志、杉浦清了、李敏、諫田泰成、関野祐子、古川哲史 : A novel approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. 58th Annual Meeting of the Biophysical Society (2015, 2、米国ボルチモア)
- 著書**
1. 黒川洵子 (2015) iPS 細胞を用いた抗不整脈薬の心毒性評価. In: 不整脈 2015. 井上博 (編) メディカルレビュー社、東京 in press. 分担執筆.
- H. 知的所有権の取得状況**
1. 黒川洵子、古川哲史、諫田泰成、関野祐子 : 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 (特開 : WO2014/192312A1、公開日 : 2014/12/4)



※成人心室筋細胞の静止膜電位に寄与しているのは I_{K1} チャンネル
 ※成人心室筋と比較し、ヒトiPS由来CMで特に低発現なgeneは I_{K1} チャンネルをコード.



(黒川, 諫田, 関野, 古川: WO2014/192312A1特開)

図 1 : 幹細胞由来分化心筋細胞を成熟化する技術.
 心室筋細胞の静止膜電位を安定化することに寄与している内向き整流性カリウムチャンネル (I_{K1} チャンネル) をコードする遺伝子 KCNJ2 をアデノウイルスベクターに導入した。マーカー遺伝子として GFP (EGFP) を用いることにより、KCNJ2 が発現している細胞を識別可能にしてある (共焦点画像)。

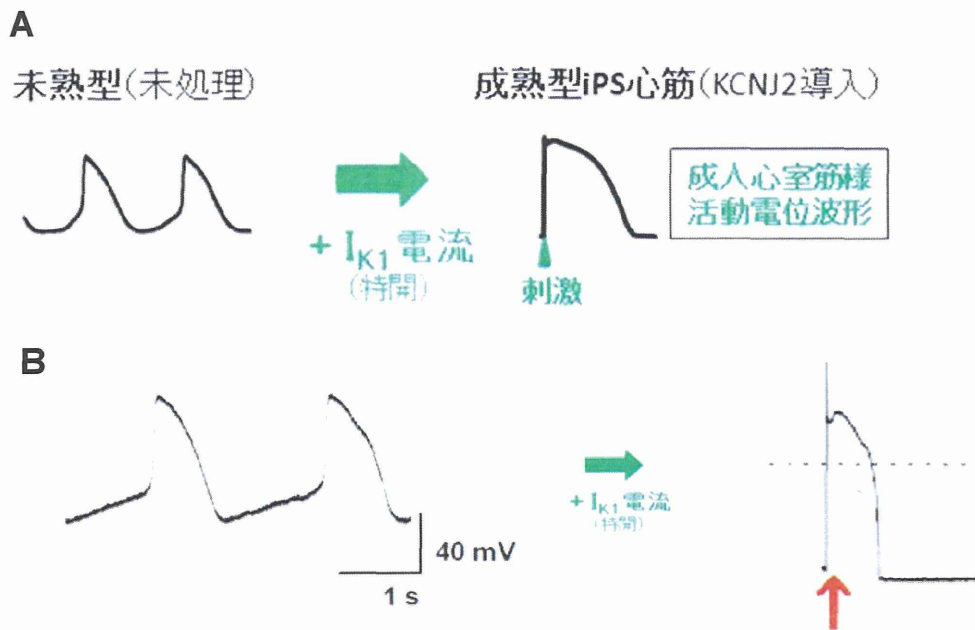


図2：ヒト幹細胞由来分化心筋細胞を成熟化する技術.

A.概念図. ヒト幹細胞由来心筋細胞は未熟型拍動心筋の電気生理学的性質を示している(図左)。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に、心室筋に豊富に発現している内向き整流性カリウム (I_{K1}) チャンネルをコードする遺伝子を導入すると、刺激に応じて成人心室筋様の活動電位がする(図右上)。

B. それぞれの条件における典型的活動電位波形.

未熟型ネガティブコントロール (GFP 標識心筋: 図左): 自律的に発火した活動電位。成熟型 iPS 由来心筋 (KCNJ2 導入心筋: 図右): 刺激による活動電位を示す。