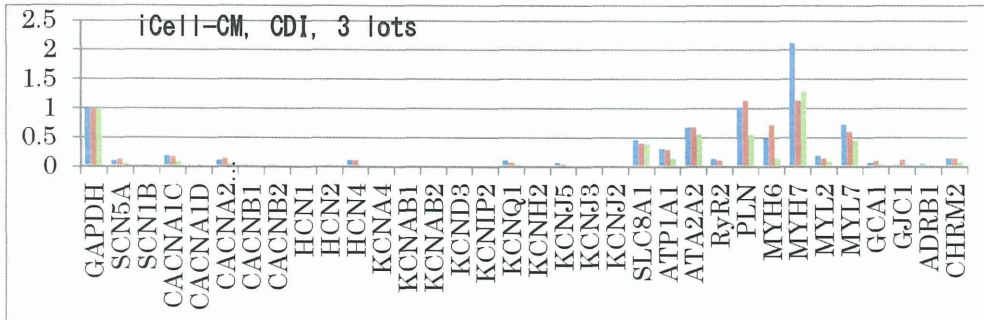


iCell-CM (CDI) ■ ロット 1、■ ロット 2、■ ロット 3



Cor.4U (Axiogenesis) ■ 細胞株 1、■ 細胞株 2

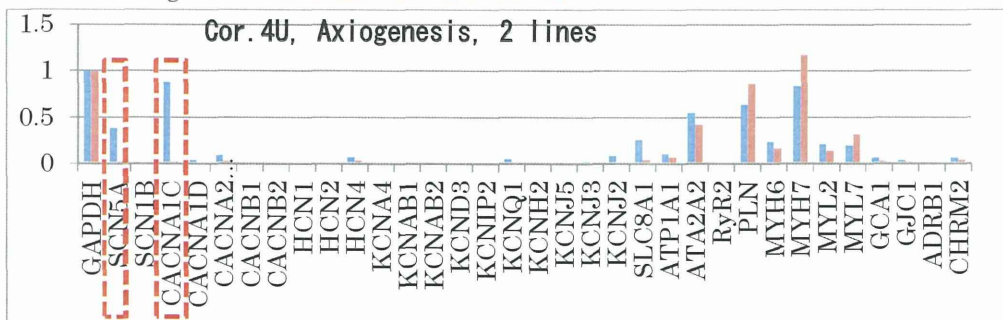


図 4 : 心筋マーカー遺伝子発現の比較定量解析の予備試験。

すべて同じ実験プロトコルで実験を行った。iCell-CM についてはロット間差、Cor.4U については株間差を示している。

平成 26 年度分担研究報告

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

業務主任者 永森 收志

国立大学法人 大阪大学

大学院医学系研究科 生体システム薬理学 准教授

本業務項目は、網羅的定量質量分析法を用いて、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株の電氣的性質を規定している膜イオン輸送に関わるタンパク質発現の細胞株間差を定量化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、プロテオミクス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、心筋マーカーの比較定量解析を行うための予備検討として、マウス培養心筋細胞 HL-1 細胞、未分化 iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて網羅的質量分析を行った。その結果、HL-1 細胞で 18,921 個のペプチドと 2,871 種のタンパク質を、未分化 iPS 細胞において 29,961 個のペプチドと 3,905 種のタンパク質を同定した。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞では 2,213 種類のタンパク質と 15,786 個のペプチドが同定できた。さらに、心筋マーカーであるイオンチャネルを安定発現させた CHO 細胞を用いて、比較定量解析に必要なペプチド情報の取得を進めた。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株ごとの心筋マーカーを定量解析し、in silico（インシリコ）でヒト心筋細胞のシミュレーションするための基盤データを取得することである。網羅的定量質量分析法を用いて、複数のヒト iPS 心筋細胞

株に対して心筋マーカーの比較定量解析を行うことで、細胞特性のばらつきを明らかにする。さらに主要なヒト心筋マーカーに対する絶対定量を行うことで、ヒト心筋マーカーの絶対的な分子数を取得し、シミュレーションの精度・信頼性の向上を目指す。

## B. 研究方法

心筋マーカーとなる膜タンパク質の比較定量解析系の構築を目指し、質量分析計を用いた膜タンパク質の網羅的解析系の確立を試みた。マウス培養心筋細胞 HL-1 細胞、ヒト未分化 iPS 細胞または iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、細胞膜に富んだ粗膜画分を調製した。更に細胞膜を濃縮する為に膜画分を尿素で洗浄し、sodium deoxycholate (SDC) で膜タンパク質を可溶化した。可溶化した膜タンパク質は TCEP を用いて還元し、iodoacetamide (IAA) を用いてアルキル化した後、0.1 M Triethylammonium bicarbonate (TEAB, pH 8.5) 条件下でトリプシンによるペプチド化を行った。Phase-Transfer Surfactant (PTS) 法を用いて SDC の除去を行った後、同定数向上を目的として、微量サンプルでもサンプルロスが少ないチップ型の逆相カラム (Stage-Tip-SDB) を用いて、高 pH 条件で簡易分画を行った。得られたペプチドに対して、質量分析計 Thermo Q Exactive (ベンチチップ型四重極 Orbitrap) にナノ LC Michrom Bioresources Advance UHPLC を接続した nano LC-MS/MS システムを用いてショットガンプロテオーム解析を行った。分析メソッドは 100 分間の直線グラジエント (5% から 40% アセトニトリル) を使用し、分析カラムは日京テクノス社製の C18 キャピラリーカラムを使用し

た。タンパク質配列解析は、解析ソフトウェア Thermo Proteome Discoverer 1.4 をプラットフォームとしたデータベース検索アルゴリズム Matrix Science Mascot 2.4 を用いて行った。解析の対象とするタンパク質配列は UniProt データベース (<http://www.uniprot.org>) に登録されている配列を用いた。得られた解析データは信頼性を高める為に、偽陽性ヒット率 False Discovery Rate (FDR) <1% となるように Proteome Discoverer でフィルタリングを行い、最終的な解析結果とした。

質量分析計を用いた高精度の比較定量解析には、標的プロテオミクス法の利用が必要となる。現在、標的プロテオミクス法にはプレカリーサーイオン測定法である Selected Ion Monitoring (SIM) 法、あるいはプロダクトイオン測定法である Parallel Reaction Monitoring (PRM) 法などが利用されているが、いずれの方法も測定の際には標的となるペプチドの質量 ( $m/z$ ) 情報が必須である。マウス培養心筋細胞、ヒト未分化 iPS 細胞または iPS 細胞由来心筋細胞サンプルでは検出できなかった心筋マーカー膜タンパク質については、既に確立した心筋マーカー安定発現細胞株を用いて網羅的解析を行い、比較定量解析に必要な目的分子由来のペプチドの質量情報の取得を試みた。

### C. 研究結果

HEK293 細胞などの他の細胞で既に確立している質量分析計による網羅的解析系を用いて、マウス培養心筋細胞への応用を検討した。100 分間の直線グラジエントを含む 120 分間の LC-MS 測定で得られた目的サンプルのマスペクトルは、他の細胞サンプルのマスペクトルと比較しても同等以上のシグナル強度であった。また、Stage-Tip-SDB によって 4 分画されたサンプルは、それぞれの画分で同程度のシグナル強度であり、ほぼ均等に分布していることから、分画条件に問題ない事を確認した (図 1)。データ解析の結果、マウス培養心筋細胞で 2,871 種類のタンパク質と 18,921 個のペプチドが同定できた (表 1)。得られた同定数は HEK 293 細胞などの他の培養細胞由来のサンプルと比べても十分な数であり、膜タンパク質の網羅的解析系のマウス培養心筋細胞への適用が可能と判断できた。続いて、比較的サンプル量の確保が容易な未分化 iPS 細胞に対する、網羅的解析系の適用を検討した (図 2)。再現性確認の為、分析を 3 回行ったところ、平均で 3,423 種類のタンパク質と 23,331 個のペプチドが同定でき、3 回の分析を合わせると、3,905 種類のタンパク質と 29,961 個のペプチドが同定された (表 1)。ヒト iPS 細胞でも膜タンパク質の網羅的解析系の適用が問題ないことから、ヒ

ト iPS 細胞由来心筋細胞での検討を行った (図 3)。その結果、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞では 2,213 種類のタンパク質と 15,786 個のペプチドが同定できた (表 1)。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞での質量分析計を用いた膜タンパク質の網羅的解析系が確立できた。

ヒト未分化 iPS 細胞または iPS 細胞由来心筋細胞で同定されたタンパク質の中には、心筋マーカーとなる膜タンパク質も含まれていた (表 2)。しかしながら、前述の膜タンパク質網羅的解析系では検出できなかった、もしくは定量解析に用いるために十分なペプチド情報を取得できなかった心筋マーカーも存在していた。そこで、取得したペプチド情報が不足している複数の重要分子を中心に、東京医科歯科大学で調製した心筋マーカー安定発現細胞株や強制発現細胞を用いて、確立した方法に則り質量分析解析を行った。その結果、全ての心筋マーカー安定発現株から、強制発現させた対象分子 (SCN5A、CACNA1C、KCNQ1、KCNH2、KCND3、KCNIP2) が検出でき、定量解析に必要な心筋マーカー膜タンパク質由来のペプチドの質量情報が取得できた (表 3)。

### D. 考察

他の培養細胞や動物臓器を対象として行った分析同様のペプチド及びタンパク質の同定数が得られ

たことから、分担研究者らが開発してきた膜タンパク質の網羅的定量質量分析法は、マウス培養心筋細胞、未分化iPS細胞やヒトiPS細胞由来心筋細胞のサンプルに、適応可能であると考えられた。しかしながら、一般的な培養細胞を解析する際に必要な細胞数をヒトiPS細胞由来心筋細胞で取得することは容易でないため、今後使用する細胞数の削減が可能なサンプル調製方法の開発が求められる。

実際、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の網羅的解析ではマウス培養心筋細胞やヒトiPS細胞を解析した場合と比べてタンパク質同定数が少ないが、これは準備できたヒトiPS細胞由来心筋細胞の膜画分が微量であったためと推測される。そのため、網羅的解析での検出を目指した心筋マーカの一部が検出不可能であった。しかしながら、今後は本年度の解析によって収集したペプチド情報を利用することで、より高感度な測定である標的プロテオミクス法の適応が可能になり、本年度行った網羅的解析では検出できなかった心筋マーカタンパク質を定量することが可能になると考えられる。

## E. 結論

マウス培養心筋細胞、未分化iPS細胞さらにヒトiPS細胞由来心筋細胞の質量分析に成功したことで、次年度に計画している複数のヒトiPS心筋細胞株に対しての心筋マーカ比較定量解析が可能になった。さらに、心筋マーカ膜タンパク質由来のペプチドの質量情報が得られたことから、これらのマーカタンパク質の絶対定量系の構築も実現可能になった。

## G. 研究発表

### 論文

特になし

### 学会発表

1. 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)

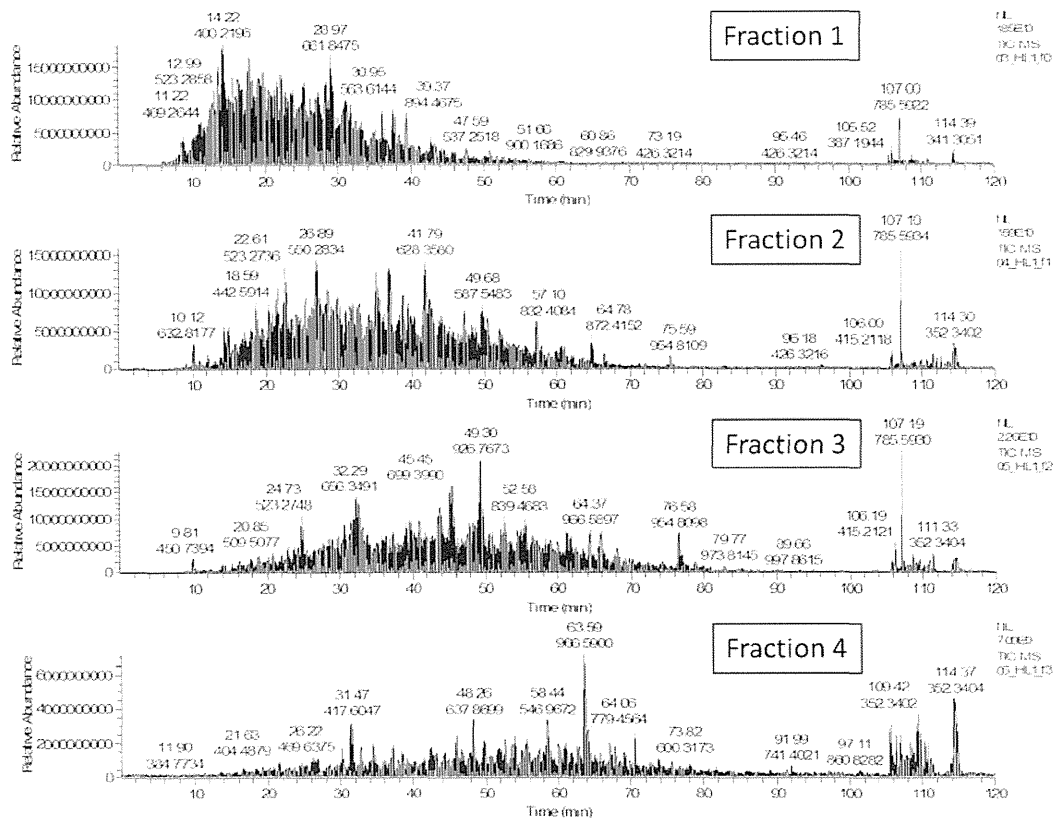


図 1 : マウス培養心筋細胞サンプルのマスペクトル。

マウス培養心筋細胞の膜画分は膜濃縮後、還元・アルキル化され、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルはStage-Tip-SDBで4分画 (Fraction 1-4) した後、LC-MS/MS解析を行った。測定時間は120分間、分析メソッドには100分間の直線グラジエント (5%から40%アセトニトリル) を使用した。分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。スペクトルは保持時間に対するシグナル強度を相対値で示し、スペクトル上のラベルは保持時間 (上段) と  $m/z$  (下段) を表す。

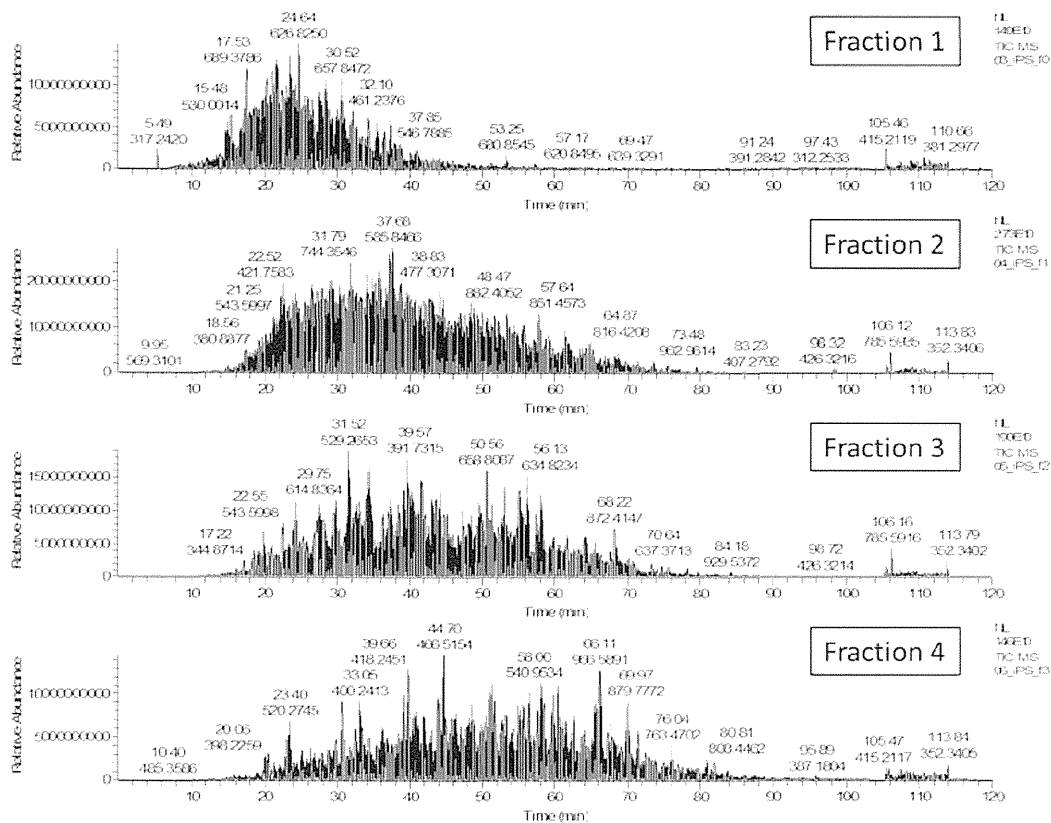


図 2 : ヒト未分化 iPS 細胞サンプルのマススペクトル。

ヒト未分化iPS細胞の膜画分は膜濃縮後、還元・アルキル化され、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルはStage-Tip-SDBで4分画 (Fraction 1-4) した後、LC-MS/MS解析を行った。測定時間は120分間、分析メソッドには100分間の直線グラジエント (5%から40%アセトニトリル) を使用した。分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。スペクトルは保持時間に対するシグナル強度を相対値で示し、スペクトル上のラベルは保持時間 (上段) と  $m/z$  (下段) を表す。

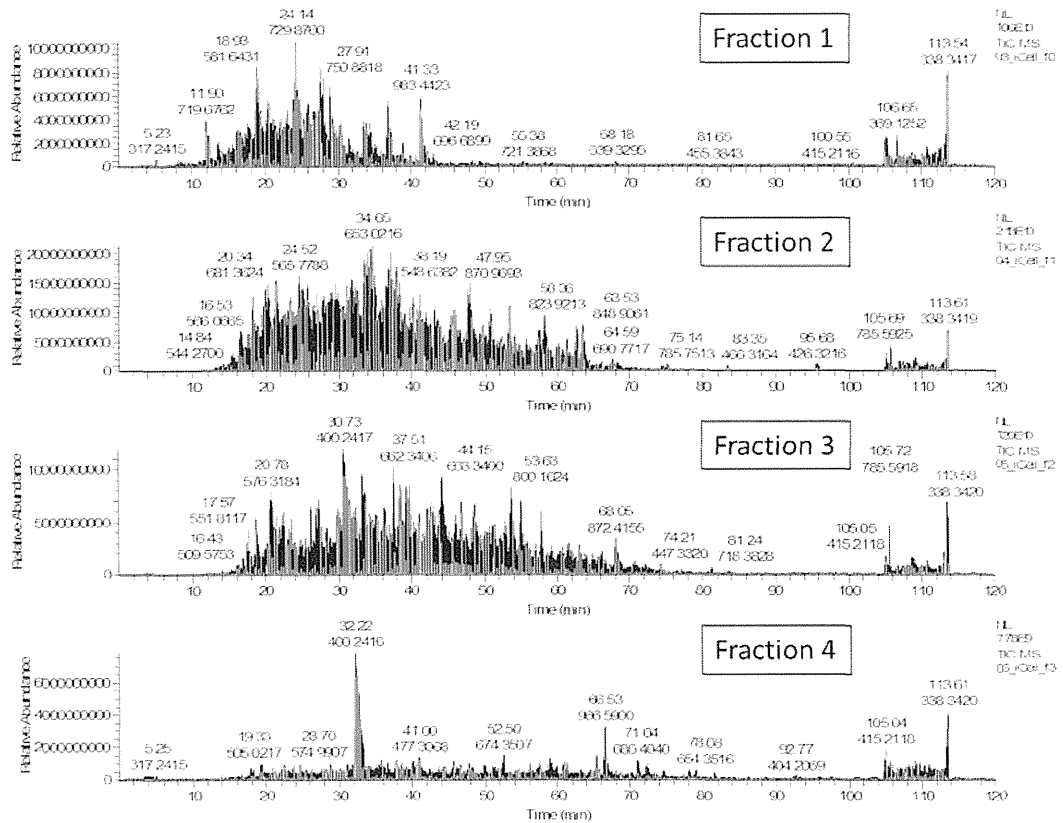


図3：ヒトiPS細胞由来心筋細胞サンプルのマススペクトル。

ヒトiPS細胞由来心筋細胞の膜成分は膜濃縮後、還元・アルキル化され、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルはStage-Tip-SDBで4分画 (Fraction 1-4) した後、LC-MS/MS解析を行った。測定時間は120分間、分析メソッドには100分間の直線グラジエント (5%から40%アセトニトリル) を使用した。分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。スペクトルは保持時間に対するシグナル強度を相対値で示し、スペクトル上のラベルは保持時間 (上段) と  $m/z$  (下段) を表す。



表 1 : 膜画分サンプルの LC-MS/MS による網羅的解析.

膜画分サンプル		同定タンパク質数	同定ペプチド数
マウス培養心筋		2,871	18,921
	Replicate 1	3,516	24,693
	Replicate 2	3,421	22,920
ヒト未分化 iPS 細胞	Replicate 3	3,333	22,381
	平均	3,423	23,331
	合計	3,905	29,961
ヒト iPS 細胞由来心筋		2,213	15,786

表2 : LC-MS/MS による網羅的解析で同定された心筋マーカーの比較.

Gene Symbol	Protein Name	同定ペプチド数	
		未分化 iPS	iPS 細胞由来心筋
SCN5A	Nav 1.5 $\alpha$ subunit		1
SCN1B	Nav 1.5 $\beta$ -1 subunit		
CACNA1C	Cav 1.2 $\alpha$ -1C subunit		
CACNA1D	Cav 1.2 $\alpha$ -1D subunit		
CACNA2D1	Cav 1.2 $\alpha$ -2/ $\delta$ -1 subunit	3	17
CACNB1	Cav 1.2 $\beta$ -1 subunit		
CACNB2	Cav 1.2 $\beta$ -2 subunit		
CACNA1H	Cav 3.2 $\alpha$ -H subunit		
HCN1	Pacemaker channel		
HCN2	Pacemaker channel		
HCN4	Pacemaker channel		2
KCNA4	Kv 1.4 $\alpha$ subunit		
KCNA5	Kv 1.5 $\alpha$ subunit		
KCNAB1	Kv 1.5 $\beta$ -1 subunit		
KCNAB2	Kv 1.5 $\beta$ -2 subunit		
KCND3	Kv 4.3		
KCNIP1	Kv channel-interacting protein		
KCNIP2	Kv channel-interacting protein		
KCNQ1	Kv 7.1 (KvLQT1)		
KCNE1	minK		
KCNE2	MiPR1		
KCNH2	Kv 11.1 (KvLQT2,hERG)		
KCNJ5	GIRK4 IKACH channel		
KCNJ3	GIRK1 IKACH channel		
KCNJ2	Kir 2.1		
SLC8A1	NCX 1.1		24
ATP1A1	NaK ATPase $\alpha$ 1	47	30
ATP2A2	SERCA 2A	33	55
RYR2	Ryanodine receptor		33
PLN	phospholamban		3

表 3 : 心筋マーカー安定発現株の LC-MS/MS による網羅的解析.

Gene Symbol	Protein Name	同定ペプチド数						
		未分化 iPS	iPS 細胞 由来心筋	安定発現株				CACNA1C
				KCNQ1 +SLC8A1	SCN5A	KCNH2	KCND3 +KChIP2	
SCN5A	Nav 1.5 $\alpha$ subunit		1		42			
CACNA1C	Cav 1.2 $\alpha$ -1C subunit							62
KCNQ1	Kv 7.1 (KvLQT1)			21				
KCNH2	Kv 11.1 (KvLQT2,hERG)					41		
SLC8A1	NCX1.1		24	17				
KCND3	Kv 4.3						11	
KCNIP2	Kv channel- interacting protein						3	

平成 26 年度業務担当報告

インシリコヒトiPS細胞由来心筋細胞モデルの基盤構築

担当責任者 芦原 貴司  
国立大学法人 滋賀医科大学  
医学部 呼吸循環器内科 講師

本業務項目は、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の向上を目指し、in silico（インシリコ）でヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気活動を再現し、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を開発する。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、本委託研究で使用するヒト in silico（インシリコ）心筋モデルを選定するための調査及び実データを導入したシミュレーションを行い、ヒト心室筋モデルとして広く使用されている O'Hara-Rudy dynamic (ORd) モデルを選定した。

業務分担者：  
江那かおり（滋賀医科大学）

A. 研究目的

本分担研究の目的は、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に、数理計算科学によるシミュレーションを利用したインシリコツールを開発することである。

生命現象を初めて数学的に記述し

たのは、Hodgkin 博士と Huxley 博士による 1952 年に発表された 5 論文であるとされる。1960 年代初頭には、心臓の電気活動のシミュレーションが初めて発表された。その後、1991 年に Neher と Sakmann がノーベル賞をとったパッチクランプ法により、精度が高い実験データが多く集まったこともあり、心臓電気活動のインシリコモデル開発は大きく発展した。歴史ある分野であるが故に、数多くのモデ

ルが開発された (表 1)。

シミュレーションを用いた数理計算科学的技術を創薬における科学的アプローチの俎上に乗せるためには以下の項目が求められている。

①より一般化した条件でも同じ答えが得られる。

②臨床や動物実験から得られた経験則と矛盾しない。

③客観的事実に基づき、理路整然と説明している。

④再現性が高く、追試できる。

この基準は、心毒性評価に応用する際にも当てはまり、本研究でも常に留意していく。

心筋細胞モデルは非常に複雑化しており、パラメーターの改変をしても数学的に発散してしまい、同じ値を返さないことが良くある。これでは追試ができなくなる。従って、いくつかの良く使用されるモデルを基に改変を加えて、自分が検討したい項目に特化したインシリコモデルを作成するのがよい。また、モデルの系譜によって、パラメーターや微分方程式も異なるため、基盤となるモデルの選定は非常に重要である。

本年は、ヒト iPS 分化心筋細胞から得られた実験データを導入することにより、現実と矛盾のない適正な活動電位変化を記述することができるモデルを選定することに集中した。

## B. 研究方法

成人心室筋細胞インシリコモデルとして、Priebe-Beuckelmann (PB)モデル

(Circ. Res., 1998: 82:1206-1223) と O'Hara-Rudy dynamic (ORd) モデル (PLoS Comput. Biol., 2011: 7(5): e1002061) を検証した。I<sub>f</sub> や I<sub>K1</sub> チャネル電流測定の実験データを基に、インシリコモデルのパラメーターを改変して、ペースメーカー能が見られるかどうか調べた。

オリジナルの ORd モデルには、I<sub>f</sub> チャネル電流は含まれていなかったため、今回新たに、下記の I<sub>f</sub> の数式をモデルに組み込んだ。

$$I_f = 0.07 \cdot (V_m - 0.3833 \cdot E_{Na} - 0.6167 \cdot E_K) \cdot y$$

$$y_{\infty} = 1 / (1 + \exp((V_m - 100) / 15))$$

$$\tau_y = 7000 / (\exp(-2.9 - 0.04 \cdot V_m) + \exp(3.6 + 0.11 \cdot V_m))$$

V<sub>m</sub> (mV) : 膜電位、E<sub>Na</sub> (mV) : I<sub>f</sub> の Na<sup>+</sup>逆転電位、E<sub>K</sub> (mV) : I<sub>f</sub> の K<sup>+</sup>逆転電位、y<sub>∞</sub> : y ゲートの定常値、τ<sub>y</sub> : y ゲートの時定数を示す。

## C. 研究結果

インシリコヒト心室筋細胞モデルであるPBモデルおよびORdモデルを基に、iPS細胞由来心筋細胞様の自動能がある活動電位波形を再現することに成功した (図2, 3)。いずれのモデルにおいても、I<sub>K1</sub>チャネルコンダクタンスの減少がペースメーカー機能の発生に大きく影響していた。一方で、I<sub>f</sub>チャネルコンダクタンスはあまり影響しておらず、ウェット実験の結果と良く一致していた。パラメーター可変に関する拡張性に優れ、

活動電位波形がより現実の細胞の結果と類似していたため、ORdモデル(図3)を基盤として、モデルを構築することに決定した。

#### D. 考察

ヒトiPS細胞由来心筋細胞様活動電位波形において、 $I_f$ チャネル電流成分の影響はほとんどないが、 $I_{K1}$ チャネル電流成分が大きく影響し、薬剤による反応にも影響することが示唆された。今後は、今年度のシミュレーション結果を基にして、次年度に作成することを予定している多細胞モデルの作成法の検討を行う。

#### E. 結論

今後は、ORdモデルを基盤として、ヒトiPS由来心筋モデルを構築することに決定した。

#### G. 研究発表

##### 論文

1. 芦原貴司: TECH PLUS: In silico心室筋モデルにより検討したiPS細胞由来心筋細胞シートの応用可能性. 不整脈+PLUS 2014;8:12-13.
2. 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: 霧島会議の総括および今後の展望: コンピュータ(in silico)安全性薬理学ワーキンググループ報告: 医薬品安全性評価における in silico アプローチの可能性について

考える. 心電図 2014;34(3):326-329.

3. 芦原貴司: ICH S7Bに関する今後の展望: 新しいパラダイムの主な方向: In silicoによる心臓安全性薬理評価. 心電図 2014;34(3):291-296.
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

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. 芦原貴司: フォーカストセッション「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»: バーチャルiPS細胞由来心筋細胞への飽くなき挑戦. CBI学会2014年大会(情報計算化学生物学会)(2014, 10, 東京)
3. 芦原貴司: Session 1: Integrated Cardiac Safety: Scientific Update: Potential applications of heart simulation to the safety pharmacology study in the future. 5th DIA Cardiac Safety Workshop in Japan, (2014, 10, 東京)

4. 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)
  5. 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)
  6. 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)
  7. 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)

## 主な心筋細胞モデル

Myocardial Cell Model

- 神経モデル Neural Model
  - **FitzHugh-Nagumo (1961): AERP only**
  - **Modified FitzHugh-Nagumo (1993): +RERP**
- プルキンエ細胞(線維) Purkinje Cell (Fiber)
  - Noble (1962)
  - McAllister, Noble and Tsien (1975)
  - DiFrancesco and Noble (1985): Mammalian
  - Aslanidi, et al (2009) Canine
- 洞結節 Sinus Node
  - **Yanagihara, et al. (1980): Rabbit**
  - Noble and Noble (1984): Rabbit
  - Demir, et al (1994): Mammalian
  - Zhang, et al (2000): Rabbit
  - Chandler, et al (2009) Human
- 心房筋 Atrium
  - Hilgemann and Noble (1987): Rabbit
  - Nygren, et al. (1998): Human
  - Courtemanche, et al (1998): Human
  - Ramirez, et al (2000): Canine
- 肺静脈 Pulmonary Vein
  - Seol CA, et al (2007) Rabbit
- 心室筋 Ventricle
  - Beeler and Reuter (1977): Mammalian
  - Luo and Rudy (1991, 1994): Mammalian
  - Demir, et al (1996): Canine
  - Priebe and Beuckelmann (1998): Human
  - Winslow, et al (1999): Canine
  - Faber and Rudy (2000): Guinea Pig
  - Bernus, et al (2002): Human
  - Ten Tusscher, et al (2003, 2006): Human
  - **Matsuoka, et al. (2003, 2004): Guinea Pig**
  - Iyer, Mazhari, and Winslow (2004): Human
  - Mahajan A, et al. (2008): Rabbit
  - Hund and Rudy (2004, 2009): Canine
  - Grandi, et al (2010) Human
  - O'Hara and Rudy (2011) Human
  - **Asakura, et al. (2014): Human**
- 電気刺激用 For electrical stimulation
  - Drouhard and Roberge (1982): Modified Beeler and Reuter → BR-DR model
  - **Ashihara, et al. (2001): Modified Luo and Rudy → LR-A model**
  - **Ashihara and Trayanova (2004): Modified Faber and Rudy → aLRd model**

表 1 : 主な心筋細胞モデル.

括弧内に発表された年を記載している。ヒト心筋モデルは赤字で表示している。国内研究者による研究は、オレンジのハイライト表示をしている。



## Luo-Rudy dynamic 2000 Model

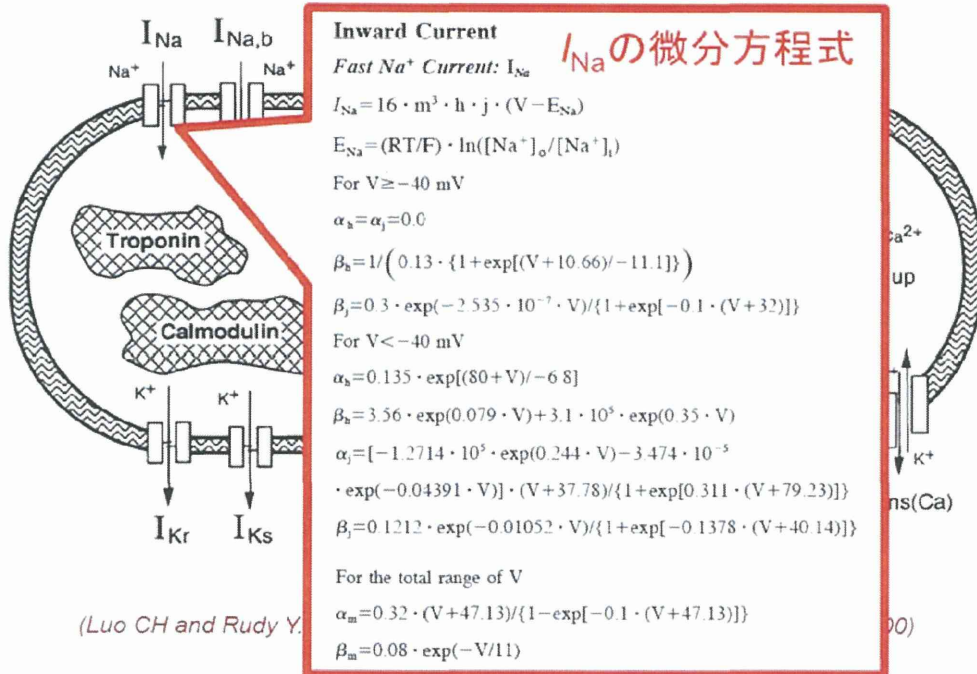
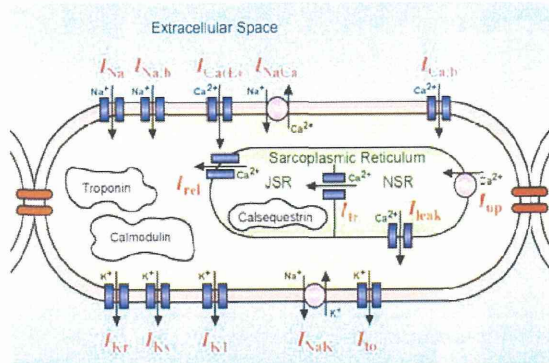


図1：心筋ナトリウムチャンネルを記述する微分方程式。

A



B

ヒト心室筋細胞モデル

iPSC-CM モデル

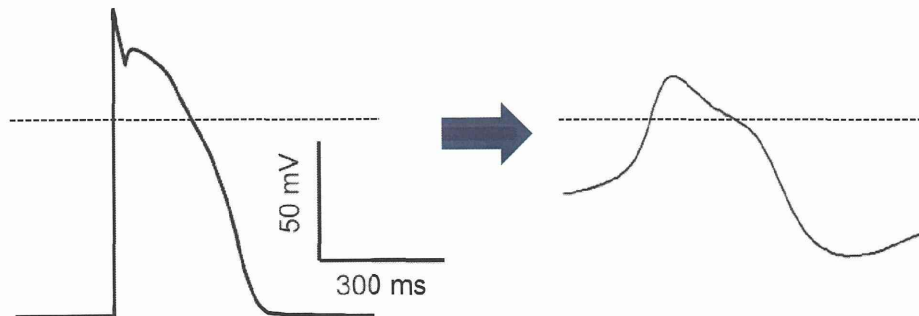
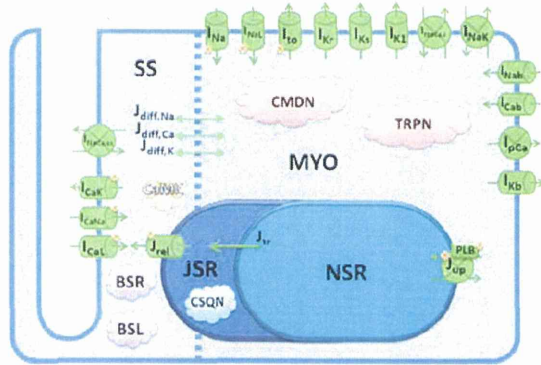


図 2 : Priebe-Beuckelmann (PB) モデルによる活動電位シミュレーション.

A. モデルの概略図。

B. ヒト iPSC-CM (iPS 細胞由来心筋細胞) シミュレーション : PB モデル (左) を基に、 $I_{K1}$  電流の減少及び  $I_f$  電流追加等の改変を加えた (右)。

A



B

ヒト心室筋細胞モデル

iPSC-CM モデル

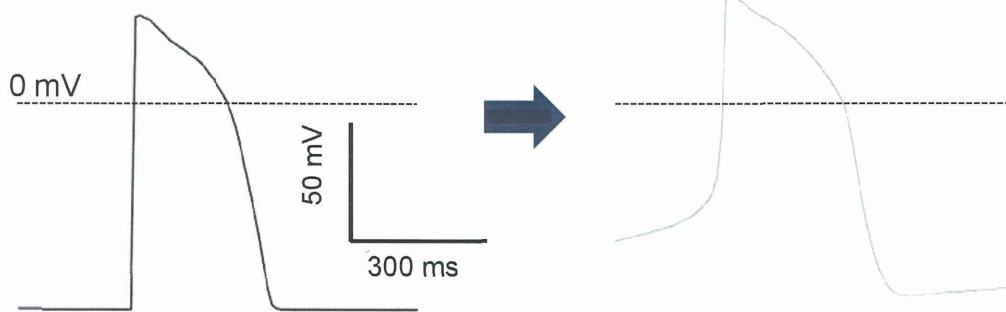


図 3 : O'Hara-Rudy dynamic (ORd) モデルによる活動電位シミュレーション.

A. モデルの概略図。

B. ヒト iPSC-CM (iPS 細胞由来心筋細胞) シミュレーション: ORd モデル (左) を基に、 $I_{K1}$  電流の減少及び  $I_f$  電流追加等の改変を加えた (右)。

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に関する調査

担当責任者 諫田 泰成  
国立医薬品食品衛生研究所  
薬理部 第二室 室長

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（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、分化誘導した iPS 心筋および市販の分化心筋に関する品質評価を行った。その結果、iPS 心筋は電気生理学的に未熟であることを明らかにした。そこで、成熟化させる方法の開発に取り組み、キーとなる遺伝子を見いだした。今後は、成熟化技術を基に細胞間差を克服できるような手法の開発を行う。

業務分担者：黒川洵子（東京医科歯科大学）

業務分担者：李敏（東京医科歯科大学）

業務分担者：安東朋子（東京医科歯科大学）

業務分担者：林英里奈（東京医科歯科大学）

A. 研究目的

本分担研究の目的は、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。

そのためには心室筋型ヒト心筋細胞と iPS 由来心筋細胞の電気生理学的な性質に違いがあり、iPS 心筋は未熟であることを明らかにしてきた。インシリコ技術とヒト iPS 技術を融