

[0007] しかしながら、h i P S由来心筋細胞の特性を精査すると、以下のような性質を示すことから、ヒト心筋モデル細胞としての使用には理想的とはいえない。すなわち、h i P S細胞から胚様体（E B : Embryoid body）を形成させ [図2]、得られたh i P S由来心筋細胞には、結節型、心房筋型、心室筋型の活動電位特性を示す細胞が混在し [図3]、活動電位の幅に大きなばらつきが認められ [図4 A]、内向き整流K<sup>+</sup>電流（I<sub>K1</sub>）が微弱であり [図4 C]、静止膜電位にほとんど影響せず [図4 B]、臨床濃度のh E R Gチャネル阻害薬E 4 0 3 1により自律拍動が停止する [図5] ため、スクリーニングに用いた場合、正確な判定に支障をきたす恐れがある。

[0008] また、h i P S由来心筋細胞は、自律拍動性が特徴のひとつであるが [図3, 4]、哺乳類発生の過程における胎生初期の心筋細胞では、一つひとつの細胞が自律的に活動電位を形成するものの、胎生後期においては自律性が消滅することから、成人ヒト心筋細胞は、刺激伝導系から電気刺激を受け取り活動電位を形成する、受動的な細胞であるはずと考えられる。従って、h i P S細胞由来心筋細胞は、[図3, 4] に示すような自律的な活動電位を発している点で、非常に幼若な、胎生初期の心筋細胞に近い性質を持つことを意味し、この様な細胞を成人の心筋モデル細胞として使用するには適さない。

[0009] Q T間隔延長作用を有する、h E R Gチャネル阻害薬のE 4 0 3 1を用いて、心室筋型h i P S由来心筋細胞の、活動電位に対するE 4 0 3 1作用を測定すると、低濃度（1 0, 3 0 nM）の曝露の場合は、[図5 A] に示すような自動的活動電位の発生頻度の低下を呈するが、E 4 0 3 1濃度を徐々に高めながら曝露濃度を1 0 0 nMまで上げると、静止膜電位が浅くなり、すなわち、静止膜電位値が0に近づき、h i P S由来心筋細胞は、脱分極の不能により活動電位の停止に陥る [図5 B]。E 4 0 3 1洗浄により活動電位が復活するので、これは測定ダメージによる活動電位発生力の消失ではなく、1 0 0 nMのE 4 0 3 1で活動電位が停止したことを示す [図5 B]。生体への使用では、同濃度のE 4 0 3 1投与により心停止を引き起こさない

ことが、臨床的に確認されていることから、in vitro電気生理試験における、h i P S由来心筋細胞に対するE 4 0 3 1の作用濃度が、ヒト生体内心筋細胞に対する実際の作用濃度と異なることを意味している。また、E 4 0 3 1が本来持つ、Q T間隔延長作用の検出も困難である [図5 B]。

[0010] 従って、成人の心筋細胞とh i P S由来心筋細胞との間では、i) 成人の心室心筋細胞では、洞房結節（ペースメーカー）からの刺激無しでは拍動しないのに対して、h i P S由来心筋細胞は自律拍動する点、ii) 最大拡張期電位（M D P）が成人の心室心筋細胞では約 $-80\text{ mV}$ であるのに対して、h i P S由来心筋細胞では $-40\sim-50\text{ mV}$ である点、iii) h E R G / K<sup>+</sup>チャンネルブロックにより、成人の心室心筋細胞は活動電位の再分極相が延長、すなわち心室筋活動電位持続時間（A P D : Q T間隔）が延長するのに対して、h i P S由来心筋細胞では、脱分極の不能により活動電位の停止を引き起こす点、において大きく異なっている [図6]。

[0011] 既報では、心毒性スクリーニング用モデル細胞として、h E R Gチャンネルを遺伝子導入した例が挙げられるが [特許文献1, 2]、h E R G遺伝子を発現させる対象が、非ヒト哺乳動物由来のチャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞である点で、上述した従来のモデル細胞に共通する問題点を有する。また、ヒト胚幹細胞由来機能性心筋細胞も、心毒性スクリーニング用モデル細胞として発表されているが [特許文献3]、イオンチャンネルに関する遺伝子改変はなく、物理的に収縮している細胞を対象としている点で、本発明とは異なる。

[0012] また、受託試験サービスとして商業的に提供されている「ヒトi P S由来心筋による心筋毒性試験」（Q T e m p o ; 登録商標, 株式会社リプロセル） [非特許文献4] では、i) ヒトi P S由来心筋細胞塊（胚様体）そのものを試験に使用している、ii) 心筋細胞が自律拍動しており幼若である、iii) 試験に使用されるヒトi P S由来心筋細胞は、結節、心房、心室の全ての型が混在していることから、本発明の細胞と異なり、心毒性を予想する上で、本発明に比べ外挿性に劣ると予想される。

[0013] 最新の報告によると、胚性幹細胞（ES細胞）由来心筋細胞は、Kir2.1チャンネル遺伝子の導入により、強いBa<sup>2+</sup>感受性IK1電流が発生し、自律拍動性を失い静止状態に変化することが示されている〔非特許文献5〕。しかしながら、ヒトiPS由来心筋細胞とヒトES由来心筋細胞では、50%再分極時の活動電位持続時間（APD50）に、約1.37倍の開きがあることから（iPS由来：382±38ms，n=36、ES由来：278±28ms，n=64）〔Lopez-Redondo F, Kurokawa J, et al., Human ES- and iPS-derived cardiomyocytes. A comparative electrophysiological study. 57th Biophysical Society Annual Meeting, Philadelphia, Biophys J, 104, 298a. (Feb 3-6, 2013)〕、両者における電気生理学的性質の差が示唆されており、かつ、iPS由来心筋細胞において、Kir2.1チャンネルを強発現させる系が検討されたという報告は未だ例がない。

[0014] 臨床で経験される、hERGチャンネル阻害による心電図QT延長とは、すなわち心室心筋の活動電位持続時間（APD）が延長することに他ならない。従来技術には、hERGチャンネル阻害によるQT延長作用の検出に用いるモデル細胞として、単純にhERGチャンネルを発現させた非ヒト由来細胞株の作出例のみ存在した〔特許文献1，2〕。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0015] 特許文献1：WO2005/047500

特許文献2：特開2007-167068号公報

特許文献3：特表2005-533518号公報

#### 非特許文献

[0016] 非特許文献1：Yap YG, et al., Heart. 2003 Nov;89(11):1363-72.

非特許文献2：橋本宗弘「ICH-S7Bドラフトガイドライン」（2003）日薬理誌，(121):377-383.

非特許文献3：古川哲史ほか，「ヒトiPS細胞由来心筋細胞の電気生理学」（2011）JPN. J. ELECTROCARDIOLOGY Vol. 31 No. 3, 325-328.

非特許文献4：浅井康行「ヒト多能性幹細胞由来拍動心筋細胞を用いた創薬試験系」（2011）心臓 Vol.43, No.1:p14-p19

非特許文献5：Lieu DK, et al., Circ Arrhythm Electrophysiol. 2013 Feb; 6(1):191-201. Epub 2013 Feb 7.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0017] 本発明の課題は、薬剤研究開発におけるQT間隔延長作用及び催不整脈性を検出する評価系に用いる評価細胞とその樹立方法、及びそれを用いた被検物質のスクリーニング方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0018] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行う過程において、内向き整流K<sup>+</sup>電流（IK1）に対するK<sup>+</sup>チャンネルKir2.1をコードする遺伝子の、KCNJ2に着目した。アデノウイルスを用いてhiPS由来心筋細胞にKir2.1チャンネルを発現させることで、強い内向き整流K<sup>+</sup>電流（IK1）が発生し、hiPS由来心筋細胞がもつ自律拍動の特性が失われ、電気刺激依存的に活動電位が発生するという知見を得た。またエピソーマル型ベクターを用いて遺伝子導入することもできる。また、最大拡張期電位（MDP）が、KCNJ2遺伝子発現により約-50mVから-70mVへシフトし、成熟したヒト心室筋型心筋細胞の性質に近い、電気生理学的特性を示すことを見出した。更に、hiPS由来心筋細胞では、hERG阻害によりMDPが浅くなり短縮することがあった活動電位持続時間が、KCNJ2発現細胞ではhERG阻害による活動電位持続時間の延長を呈し、すなわち、hERG阻害によるQT間隔延長のin vitroでの再現に成功した。本発明はこれらの知見に基づき完成するに至ったものである。

[0019] すなわち、本発明は、

[1] 人工多能性幹細胞（iPS細胞）に由来し、心臓トロポニンT（TnT）、コネキシン43（Cx43）、又は $\alpha$ -アクチニン（ $\alpha$ -actinin）のうち少なくとも1つの細胞内因性遺伝子を発現し、かつ、導入され

たKCNJ2遺伝子によりKir2.1チャネルを発現する心筋モデル細胞に関する。

[0020] また本発明は、

[2] 自発的な周期的収縮活性を有さないことを特徴とする上記[1]に記載の心筋モデル細胞、

[3] 生理的細胞内外液を使用した条件において、電気刺激を与えたときの最大拡張期電位が、 $-85 \sim -65$  mVであることを特徴とする上記[1]又は[2]に記載の心筋モデル細胞、

[4] Kir2.1チャネルの発現が、ウイルスベクターに導入されたKCNJ2遺伝子の発現であることを特徴とする上記[1]～[3]のいずれかに記載の心筋モデル細胞、

[5] 人工多能性幹細胞(iPS細胞)がヒト由来であることを特徴とする上記[1]～[4]のいずれかに記載の心筋モデル細胞に関する。

[0021] さらに本発明は、

[6] 以下の(a)～(e)の工程を備えたことを特徴とする心筋モデル細胞の作製方法であって、

1) 人工多能性幹細胞(iPS細胞)から心筋細胞又は心筋前駆細胞に分化させる工程(a)；

2) 工程(a)により得られた心筋細胞又は心筋前駆細胞を含む胚様体若しくはコロニーを、単一細胞に分離する工程(b)；

3) KCNJ2遺伝子を組み込み、Kir2.1チャネルを発現可能なベクターを調製する工程(c)；

4) 工程(b)により分離した細胞を、分離直後から1時間以内に、工程(c)で調製したウイルスベクターに感染させる工程(d)；

5) 心臓トロポニンT(TnT)、コネクシン43(Cx43)、又は $\alpha$ -アクチニン( $\alpha$ -actinin)のうち少なくとも1つの細胞内因性遺伝子を発現し、かつ、Kir2.1チャネルを発現する細胞を選択する工程(e)を含む方法、

〔7〕ベクターがアデノウイルスベクターであることを特徴とする上記〔6〕に記載の方法、

〔8〕ベクターがエピソーマル型ベクターであることを特徴とする上記〔6〕に記載の方法、

〔9〕以下の（A）～（C）の工程を備えたことを特徴とする心筋細胞に対して毒性作用及び／又は変調作用を有する物質のスクリーニング方法であって、

1) 上記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の心筋モデル細胞と被検物質とを接触させる工程（A）；

2) 電気生理学的試験手法を用いて、被検物質に起因する心筋細胞に対する毒性作用及び／又は変調作用を検出する工程（B）；

3) 工程（B）の検出結果に基づき、被検物質の心筋細胞に対する毒性作用及び／又は変調作用の有無を判定する工程（C）；を含む方法、

〔10〕工程（B）における毒性作用及び／又は変調作用が、hERG電流阻害活性であることを特徴とする上記〔9〕に記載の方法に関する。

### 発明の効果

[0022] 本発明により、hiPS由来心筋細胞の問題点であった、自律拍動性すなわち未成熟さが解消され、成人ヒト心室心筋レベルに最大拡張期電位が深く、かつ、成人ヒト心室心筋細胞と同様のhERG阻害薬に対するQT間隔延長作用を示す、心筋モデル細胞が提供される。すなわち、心毒性のある薬剤の選別、及び、臨床試験に用いる用量の設定といった、創薬に必須のin vitroスクリーニングにおいて、本発明のモデル細胞を用いることで、外挿性の高いスクリーニング結果が期待できる。

### 図面の簡単な説明

[0023] [図1]ヒト心臓の活動電位と各K<sup>+</sup>チャネルを示す図である。

[図2]胚様体に分化した201B7株hiPS細胞の形態及び表現型を示す図である。心筋細胞に分化したhiPS細胞の、光学顕微鏡像。胚様体形成法による心筋への分化誘導を、hiPS細胞株（201B7）を用いて実施し

た。A：胚様体形成。典型的なh i P S細胞コロニーから、h i P S細胞が胚様体へ分化する様子を示す。スケールバー；300  $\mu$ m B：心臓系マーカー(AAN； $\alpha$ -actinin, TnT；troponinT)を発現する、分化したh i P S細胞の免疫染色像。スケールバー；20  $\mu$ m C：心臓系マーカー( $\alpha$ -actinin, Cx43；Connexin43)を発現する、分化したh i P S細胞の免疫染色像。

[図3]胚様体形成法によるh i P S由来心筋細胞が示す、活動電位の多様性を示す図である。結節型：静止膜電位が浅く、著明な拡張期脱分極がみられる。心房筋型：静止膜電位が深く、拡張期脱分極がわずかで、活動電位幅の短い活動電位。心室筋型：静止膜電位が深く、拡張期脱分極がわずかで、活動電位幅の長い活動電位を示す。

[図4]心筋細胞に分化したh i P S細胞の、電気生理学的特徴を示す図である。A：自律拍動するh i P S由来心筋細胞 ( $n = 26$ ) の50%再分極時の活動電位持続時間 (APD50) と周期長 (Cycle Length) をプロットした図を示す。(破線：線形近似値) B：0.2 mMのBaCl<sub>2</sub> (IK1内向き整流K<sup>+</sup>電流を阻害) 及び140 mMのKCl (高カリウム；ポジティブコントロール) 下での、h i P S由来心筋細胞の最大拡張期電位 (MDP) を、パッチクランプ法により求めた ( $n = 6$ )。高カリウム下では最大拡張期電位を減少させるが、BaCl<sub>2</sub>下では変化しない。\*  $P < 0.05$  (コントロール値との間に有意差あり。) C：パッチクランプ法によって記録された、IK1内向き整流K<sup>+</sup>チャンネル電流の電流電圧曲線 (左： $n = 6$ ) と、代表的電流密度トレース (右)。右：0.2 mMのBaCl<sub>2</sub>が、内向き電流を阻害している。グレー；コントロール 黒；BaCl<sub>2</sub> Vh (保持電位) = -80 mV

[図5]h i P S由来心筋細胞の活動電位に対する、抗hERG阻害剤 (E4031) の効果を示す図である。A：低濃度のE4031曝露では、自動的活動電位の発生頻度の低下を呈す。B：E4031濃度を徐々に高めながら曝露濃度を100 nMまで上げると、静止膜電位は浅くなり、脱分極の不能に

より活動電位の停止に陥る。

[図6]心室筋型ヒト心筋細胞とh i P S由来心筋細胞の特徴の違いを示す図である。

[図7]エピソーマル型ベクターを使用した遺伝子導入による成熟化心筋の作成の概略図である。

[図8]KCNJ2を過剰発現したiCell-CMシートから計測したFPDの頻度依存性を示す図である。

[図9]KCNJ2を過剰発現したiCell-CMシートから高頻度刺激により計測したFP波形に対するQT延長薬の影響を示す図である。

[図10]アデノウイルスを介したh i P S由来心筋細胞への、KCNJ2遺伝子導入の概要を示す図である。

[図11]アデノウイルスを使った、h i P S細胞への遺伝子導入法の検討結果1を示す図である。胚様体へ分化する3日前から24時間、h i P S細胞に5000MOIのGreen Fluorescent Protein (GFP)をコードするアデノウイルスベクター(pAd-GFP)を感染させ、遺伝子導入の成否をGFPの発現により確認した。図は、胚様体形成1日前の、感染細胞コロニーの微分干渉顕微鏡像(上)と蛍光顕微鏡像(下)である。一部の細胞にしかGFPの発現が確認できず、遺伝子導入効率は大変低い結果となった。

[図12]アデノウイルスを使った、h i P S細胞への遺伝子導入法の検討結果2を示す図である。h i P S細胞が胚様体へ分化した直後に、トリプシン処理により細胞を単一細胞化したのち8日目の細胞に、ウイルスを24時間感染させた。遺伝子導入の成否をGFPの発現により確認した。図は、胚様体形成から10日目の、感染したh i P S細胞の微分干渉顕微鏡像(上)と蛍光顕微鏡像(下)である。

[図13]KCNJ2の発現は、h i P S細胞由来心筋細胞の自律収縮を停止させる結果を示す図である。A:h i P S由来心筋細胞(iPS253G1)に、GFPタンパク発現遺伝子のみを導入した、ネガティブコントロール細胞クラスターの共焦点レーザー顕微鏡像を示す。GFPを発現する細胞クラ



スターが、不明瞭な横紋構造を形成しており（破線部）、これは、心筋への分化が未成熟であることを示す。（AAN： $\alpha$ -アクチニン） B：hiPS由来心筋細胞（iPS253G1）に、GFP融合KCNJ2遺伝子を導入したクラスター（右）の共焦点レーザー顕微鏡像を示す。GFP及びKCNJ2遺伝子導入の成否は、細胞基質及び細胞膜上のGFPシグナル（緑）により判定される。過剰発現するKCNJ2（緑）が、 $\alpha$ -アクチニン（赤、KCNJ2；右下図中の白線内）の発現を促進している。KCNJ2を発現する細胞は、明瞭な横紋を形成しており、すなわち成熟した筋節構造が構築されていることを意味する。スケールバー； $20\mu\text{m}$  C：各幹細胞由来の心筋細胞が示す自律収縮能。（201B7, 253G1；hiPS細胞株由来心筋細胞、iCell-CMs；市販hiPS細胞由来心筋細胞株、hES-CMs；ES細胞由来心筋細胞）KCNJ2を発現させた各幹細胞由来の心筋細胞は、全て自律収縮能を失うが、BaCl<sub>2</sub>への曝露により自律収縮能を回復する。 D：GFPのみ（左）及びKCNJ2（右）を導入した、iCell心筋細胞シートのGFP蛍光シグナル（各上段）と、それぞれの微分干渉顕微鏡像（各下段）。スケールバー； $100\mu\text{m}$

[図14]KCNJ2発現及び非発現iCell心筋細胞の細胞外電位記録を示す図である。A：GFPのみ（上段）及びKCNJ2（中段）を導入したiCell心筋細胞シートの、非電気刺激における細胞外電位記録を示す。KCNJ2を発現していないiCell心筋細胞が、周期的な自律性の電気発火を示すのに対し（上段）、KCNJ2を発現させると静止状態を呈する（中段）。細胞外液中へのBaCl<sub>2</sub>（0.5mM）投与により内向き整流K<sup>+</sup>電流（IK1）を阻害すると、細胞外電場電位における自律性の興奮状態が惹起され、自律性の電気発火が開始する（下段）。破線：0シグナルレベルを示す。スケールバー；縦軸1mV 横軸1秒 B, C：KCNJ2を導入したiCell心筋細胞シートの、異なる周波数（0.5、1、2Hz）に応じた細胞外電位記録（B）と運動ベクトル（C）。スケールバー；縦軸1mV 横軸1秒 D：異なる周波数における運動ベクトルの波形。収縮の立ち上が

りを揃えて重ね書きしたところ、収縮-弛緩時間が周波数依存的に変化した ( $0.5 \text{ Hz} > 1 \text{ Hz} > 2 \text{ Hz}$ ) (左図)。収縮-弛緩時間の周波数依存性。それぞれの標本ごと (点線) と平均値 (灰色・実線) のフィッティング直線。周波数が上がるほど収縮-弛緩時間が短縮した (右図)。この実験から、 $I_{Ks}$  チャネルの寄与を調べることができる。

[図15] ヒト  $iPS$  細胞由来心筋細胞上に過剰発現させた  $KCNJ2$  遺伝子による  $K_{ir}2.1$  チャネル ( $I_{K1}$  電流) の機能性を示す図である。A: GFPのみ (上段) 及び  $KCNJ2$  (下段) を導入した  $iCell$  心筋細胞における、パッチクランプ法電位固定モード (ボルテージクランプモード) により記録された、代表的な  $I_{K1}$  電流トレースを示す。細胞に挿入された細い針状電極により、0.5秒間のコマンドパルス、保持電位  $-80 \text{ mV}$ 、 $-40 \text{ mV}$  から  $-150 \text{ mV}$  まで、 $10 \text{ mV}$  刻みで与えてイオン電流を誘発させ、その電流密度 ( $\text{pA}/\text{pF}$ ) トレースを重ねて表示した。総  $I_{K1}$  電流は、細胞外液に  $\text{BaCl}_2$  ( $0.2 \text{ mM}$ ) を投入した記録から (中央)、 $\text{Ba}^{2+}$  無しの記録 (左) を差し引いた、 $\text{Ba}^{2+}$  イオン感受性の電流 (右) として示される。スケールバー; 縦軸  $20 \text{ pA}/\text{pF}$  横軸  $200 \text{ ミリ秒}$  B: GFPのみ (白抜き) 及び  $KCNJ2$  導入細胞 (黒) (各  $n=9$ ) の  $I_{K1}$  電流における瞬時電流電圧相関曲線を示す。C: B 枠線内の拡大図。  $I_{K1}$  電流の外向き電流成分を示す。

[図16]  $KCNJ2$  遺伝子を過剰発現するヒト  $iPS$  由来心筋細胞の性質を示す図である。A, B: GFPのみ (A)、及び  $KCNJ2$  遺伝子 (B) を発現する  $iCell$  心筋細胞における、パッチクランプ法電流固定モードによる代表的活動電位トレース記録。  $KCNJ2$  遺伝子導入  $iCell$  心筋細胞においては、活動電位を発生させるために、細胞内通電 (B; 灰色楔形) を要した。スケールバー; 縦軸  $50 \text{ mV}$  横軸  $1 \text{ 秒}$  C~F: 活動電位の各パラメータ解析結果。\*  $P < 0.05$  (GFP群との比較) C: 最大拡張期電位 (MDP) 白抜き; GFP群 ( $n=30$ ) 灰色;  $KCNJ2$  群 ( $n=36$ ) D: APD50 (50%再分極時の活動電位持続時間) 白抜き; GF

P群 (n=29) 灰色; KCNJ2群 (n=43) E:  $dV/dt_{max}$ :  
 0相の最大立ち上がり速度 (立ち上がり速度; 大きいほど心室筋型に近い)  
 白抜き; GFP群 (n=26) 灰色; KCNJ2群 (n=9) F: プラ  
 トー相を反映する値、 $APD_{40-30}/APD_{80-70}$ 率 ( $\leq 1.5$ では心房筋様  
 、 $> 1.5$ では心室筋様の活動電位とみなされる) 白抜き; GFP群 (n  
 =84) 灰色; KCNJ2群 (n=52)

[図17] KCNJ2発現ヒトiPS細胞由来心筋細胞の活動電位に対するBaCl<sub>2</sub>  
 の影響を示す図である。A: KCNJ2遺伝子発現iCell心筋細胞  
 における、パッチクランプ法電流固定モードの記録による、代表的な活動電  
 位トレースを3例示す。コントロール細胞外液 (灰色) 0.2mMBaCl  
 2加細胞外液 (黒) IK1内向き整流K<sup>+</sup>電流を阻害するBa<sup>2+</sup>イオンの  
 投入により、通電無しで、自発的な活動電位が誘発された。B: 最大拡張  
 期電位 (MDP) 灰色; コントロール (n=9) 濃灰色; 0.2mMBa  
 Cl<sub>2</sub>加 (n=9) C: APD50 (50%再分極時の活動電位持続時間)  
 灰色; コントロール (n=9) 濃灰色; 0.2mMBaCl<sub>2</sub>加 (n=9)

D:  $dV/dt_{max}$ : 0相の最大立ち上がり速度 (立ち上がり速度; 大きい  
 ほど心室筋型に近い) 灰色; コントロール (n=9) 濃灰色; 0.2mM  
 BaCl<sub>2</sub>加 (n=9) E: プラト一期 $APD_{40-30}/APD_{80-70}$ 率 ( $\leq 1$   
 .5では心房筋様、 $> 1.5$ では心室筋様の活動電位とみなされる) 灰色;  
 コントロール (n=9) 濃灰色; 0.2mMBaCl<sub>2</sub>加 (n=9)

[図18] KCNJ2発現ヒトiPS由来心筋細胞に対するhERG阻害剤 (E4  
 031) の効果を示す図である。A~C: GFPのみ (A, B) を発現、ま  
 たはKCNJ2遺伝子 (C) を発現するiCell心筋細胞におけるE403  
 1の影響を示した、パッチクランプ法電流固定モードによる、代表的活動電  
 位トレース記録。AはE4031によって自発的な活動電位持続時間が短縮  
 した典型例を示し、BはE4031によって自発的な活動電位持続時間が延  
 長後に停止した典型例を示す。Cは0.2Hzの細胞内通電により発生した  
 活動電位を示す。A~C全て、E4031曝露の時間軸にあわせて圧縮され

たトレースにて示される。図中に挿入された、一活動電位波長の重ね合わせトレースは、a～dの時点（薬物投与前とそれぞれの濃度のE4031投与3分後）におけるトレースを抜き出したものである。D, E: E4031 (10, 30, 100 nM) 投与による活動電位変化の概要。GFPのみを発現するiCell心筋細胞の記録 (n=6)。KCNJ2遺伝子を発現するiCell心筋細胞の記録 (n=3)。洗浄によりE4031の影響を除くと、D, E共に、ある程度の数値の回復が見られた。

[図19]KCNJ2の発現により、HEK293細胞（ヒト胎児由来腎臓細胞）が、内向き整流性K<sup>+</sup>イオン電流を発生することを示す、パッチクランプの記録を示す図である。A: アデノウイルス発現クローンを示す図である。上: コントロール（GFPのみを発現） 下: KCNJ2発現クローン（GFPとの連結蛋白を発現させている。） B: パッチクランプ法によって記録された、IK1内向き整流K<sup>+</sup>チャネル電流の電流電圧曲線 (n=5)。保持電位-80 mVから、0.5秒間のコマンドパルス、-40 mVから-150 mVまで10 mV刻みで12回与えた場合の、電流密度 (pA/pF) トレースの、電位依存的変化を示した図である。C: Bの電流密度トレースを、重ねて表示した図である。内向き整流K<sup>+</sup>チャネル遺伝子のKCNJ2を発現させたHEK細胞においては、Ba<sup>2+</sup>感受性の内向き整流性を示す電流が発生した。

[図20] iPS由来心筋細胞におけるI(f)チャネルの機能的発現を示す図である。A: iPS由来心筋細胞(201B7)における、I(f)チャネル電流トレースの代表例を示す。コマンドパルス、-140 mVから-40 mVまで、20 mV刻みで6回与えた場合の、電流密度 (pA/pF) トレースの電位依存的変化を示した図である。電流密度トレースを重ねて表示した図(左)、及び、塩化セシウムへの曝露の有無によるトレースの変化(右)を示す。スケール: 2 pA/pF, 1 s。 B: 上記トレースにおける、電流電圧曲線図 (n=13) C: 等時活性化曲線 (n=9)  $V_{1/2} = -2$  mV  $V_k = 10.7$  を示す。 D: 5 mMの塩化セシウムによる、自律拍動頻

度への影響を示す。(n=6)各群間において、有意差は認められなかった。

[図21]エピソーマル型ベクターによるKCNJ2遺伝子導入をGFP蛍光シグナルとして評価した結果を示す図である。

[図22]エピソーマル型ベクターによりKCNJ2遺伝子を導入した場合のヒトiPS心筋の機能変化を示す図である。

[図23]KCNJ2遺伝子を導入したhiPS由来心筋細胞による、QT間隔延長薬の評価法イメージを示す図である。

[図24]KCNJ2遺伝子を導入されたiPS由来心筋細胞がもつ、ハイスループットスクリーニング応用への利点を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0024] 本発明は、薬剤研究開発における被検物質の心筋細胞への影響を試験する際に有利に使用することができる心筋モデル細胞やその作製法に関し、本発明の心筋モデル細胞は、最大拡張期電位の深さ、hERGチャネル阻害による活動電位持続時間の延長傾向、及び自律拍動しない点において、成人心筋細胞が持つ電気生理学的特性と共通し、創薬スクリーニングに用いた場合、結果として得られる情報の質の向上が期待できる。

[0025] 本発明の心筋モデル細胞としては、人工多能性幹細胞(iPS細胞)に由来し、心臓トロポニンT(TnT)、コネクシン43(Cx43)、又は $\alpha$ -アクチニン( $\alpha$ -actinin)のうち少なくとも1つの細胞内因性遺伝子を発現し、かつ、導入されたKCNJ2遺伝子によりKir2.1チャネルを発現する細胞であれば特に制限されないが、自発的な周期的収縮活性を有さない細胞や、生理的細胞内外液を使用した条件において、電気刺激を与えたときの最大拡張期電位が、 $-85 \sim -65$  mVである細胞や、Kir2.1チャネルの発現が、ウイルスベクターに導入されたKCNJ2遺伝子の発現である細胞や、人工多能性幹細胞(iPS細胞)がヒト由来である細胞が好ましい。

[0026] また、本発明の心筋モデル細胞の作製方法としては、iPS細胞から心筋

細胞又は心筋前駆細胞に分化させる工程 (a) ; 工程 (a) により得られた心筋細胞又は心筋前駆細胞を含む胚様体若しくはコロニーを、単一細胞に分離する工程 (b) ; KCNJ2 遺伝子を組み込み、Kir2.1 チャネルを発現可能なウイルスベクターを調製する工程 (c) ; 工程 (b) により分離した細胞を、分離直後から1時間以内に、工程 (c) で調製したウイルスベクターに感染させる工程 (d) ; 心臓トロポニンT (TnT)、コネクシン43 (Cx43)、又は $\alpha$ -アクチニン ( $\alpha$ -actinin) のうち少なくとも1つの細胞内因性遺伝子を発現し、かつ、Kir2.1 チャネルを発現する細胞を選択する工程 (e) の各工程を備えた方法であれば特に制限されないが、上記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターであることが好ましい。かかる本発明の作製方法により、上記本発明の心筋モデル細胞を得ることができる。

[0027] 本発明の心筋モデル細胞は、内因性遺伝子から心筋細胞及び心筋前駆細胞の特異的マーカーである心臓トロポニンT (TnT)、コネクシン43 (Cx43)、及び $\alpha$ -アクチニン ( $\alpha$ -actinin) の内、少なくとも1つ、より好ましくは2つ、特に好ましくは3つ以上の細胞内因性遺伝子を発現するが、これらに加えて心臓トロポニンI (cTnI)、筋節ミオシン重鎖 (MHC)、ミオシン軽鎖 (MLC)、N-カドヘリン、 $\beta$ 1-アドレナリン受容体 ( $\beta$ 1-AR)、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANF)、ミオグロビン、クレアチンキナーゼMB (CK-MB)、GATA-4 (心筋転写因子)、NKX2.5 (心筋転写因子)、及びMEF-2ファミリー (心筋転写因子) から選ばれる1又は2種以上の特異的マーカーを発現する細胞が好ましい。

[0028] 本発明の心筋モデル細胞は、形態学的に明瞭な心筋細胞の特徴を有する。すなわち、免疫染色によって検出可能な、筋節構造に特有の横紋を有し [図13B]、紡錘形、円形、三角形、多角形などの形態を示し得る。

[0029] 上記iPS細胞としては、山中ら [Cell, 2007 Nov 30;131(5):861-72.] によって記載される方法で作製されたヒト人工多能性幹細胞の他、京都大学

から提供されているh i P S細胞株の2 0 1 B 7、2 5 3 G 1、並びに、Cellular Dynamics International, Inc. (C D I) 社から販売されている分化心筋細胞i C e l l の様に、樹立された細胞系統の形態でも提供される細胞を例示することができる。かかるi P S細胞として、初代コロニーから直接得られる細胞や、もしくは分化のためにすぐに使用可能な他の方法で作製されたi P S細胞も用いることができる。また、i P S細胞の由来としては、ヒトの他、アカゲザル、カニクイザルなどの非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ネコ、イヌなどの実験動物、家畜、ペットを好適に挙げるができる。

[0030] 本発明におけるK i r 2. 1チャンネルとしては、K C N J 2遺伝子にコードされた、心筋細胞における内向き整流K<sup>+</sup>チャンネルの構成タンパク質の一つであって、配列番号1 (UniProtKB Accession No. : P63252) で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質、又はこれら配列と95%以上の同一性を有する同効物を好適に挙げるができる。ここで同効物とは、細胞に発現させた場合、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質のK i r 2. 1活性を有するポリペプチドいい、上記K i r 2. 1活性とは、カリウムイオンチャンネルとして機能し、内向き整流性K<sup>+</sup>イオン電流を発生させる活性を意味する。また、上記実質的に同質の活性とは、その活性が性質的に、例えば電気生理学的あるいは薬理学的に、同質であることを示す。

[0031] かかるK i r 2. 1チャンネルのアミノ酸配列情報は、UniProt (<http://www.uniprot.org/>) 等のデータベース検索により、適宜入手することができ、IR K2\_HUMAN (UniProtKB Accession No. : P63252) として登録されたものを、具体的に例示することができる。また、K i r 2. 1チャンネルの塩基配列情報は、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 等のデータベース検索により、適宜入手することができ、GenBank Accession No. : NM\_000891.2 GI : 22095339として登録されたものを、具体的に例示することができる。

[0032] 本発明においてK C N J 2遺伝子とは、K i r 2. 1チャンネルをコードす

る塩基配列からなるポリヌクレオチドをいう。本発明のKCNJ2遺伝子は、配列番号2 (GenBank Accession No. : NM\_000891.2 GI : 22095339) で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド、又はこれら配列と95%以上の同一性を有する同効物を好適に挙げることができる。ここで同効物とは、配列番号2で表わされる塩基配列を有するポリヌクレオチドと実質的に同質のKir2.1活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドをいう。

[0033] 本発明の心筋モデル細胞の作製方法において用いられる、KCNJ2遺伝子を含むウイルスベクターとしては、上記KCNJ2遺伝子を宿主細胞内に保持し、該KCNJ2遺伝子にコードされるKir2.1チャネルを発現することができるウイルスベクターであれば特に制限されず、かかるウイルスベクターとしては、モロニー Maus 白血病ウイルスなどをベースにしたレトロウイルス、ヒト免疫不全1型ウイルス (HIV-1)などをベースにしたレンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)などを由来とするウイルスベクターが挙げられ、特に、サイトメガロウイルスプロモーターを含有するpAd/CMV/V5-DESTアデノウイルスベクターなどを好適に挙げることができる。

[0034] 例えば、アデノウイルスベクターにKCNJ2遺伝子を導入すると、導入遺伝子を好ましくは1ヶ月以上、より好ましくは2ヶ月以上、持続的かつ長期的にiPS由来心筋細胞上で発現させることができる。一般的に、アデノウイルスベクターは、導入遺伝子が染色体外でエピゾーマルに存在し自律複製することはないため、一過性の遺伝子発現を示し、よって細胞が分裂するごとに導入遺伝子の発現は弱まる。しかし、ヒト心筋細胞は、生後約1カ月で分裂能を喪失するという性質のため、アデノウイルスベクターによる導入遺伝子の長期発現が期待でき、本発明において遺伝子導入されたiPS由来心筋細胞においても、約2ヶ月のKCNJ2遺伝子発現を確認している。より長期的なKCNJ2遺伝子の発現には、非分裂細胞への感染力があり、かつ、導入遺伝子の一部で染色体への組み込みを期待できる、アデノ随伴ウイル



スペクター（AAV）を有利に使用することができる。

[0035] KCNJ2 遺伝子導入アデノウイルスベクターは、ヒト胎児由来腎臓細胞（HEK細胞）の様な非心筋細胞に対しても、 $Ba^{2+}$ 感受性の内向き整流 $K^+$ 電流を発生させることができ[図19]、HEK細胞の他に、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、アフリカミドリザル腎臓由来COS-7細胞、アフリカツメガエル卵母細胞なども $Ba^{2+}$ 感受性の内向き整流 $K^+$ 電流を発生させることができる。

[0036] 上記ウイルスベクターは、選択可能なマーカーを含んでもよく、選択可能なマーカーとして、具体的にはアンピシリン、ネオマイシン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、クロラムフェニコールなどの薬剤に対する耐性遺伝子のほか、GFP、EGFP（Enhanced Green Fluorescent Protein）などの蛍光タンパク質などを例示することができる。

[0037] KCNJ2 遺伝子導入アデノウイルスベクターの構築に用いることができる、組換えクローニング技術としては、TAクローニングや制限酵素を用いるクローニングのほかに、大腸菌におけるラムダファージの部位特異的組換えを利用した、GATEWAY（登録商標；Life Technologies, Carlsbad, CA USA）クローニングなどを好適に例示することができる。

[0038] KCNJ2 遺伝子の発現は、ウイルスベクターに組み込まれたGFP発現マーカーを蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡などで検鏡し、視覚的に確認することができる。他にも、市販又は定法により作製した抗KCNJ2抗体を用いたウェスタンブロット法、フローサイトメトリー法、免疫組織化学染色法、免疫蛍光染色法、ノーザンブロット法、RT-PCR法などにより定性・定量的に、KCNJ2 遺伝子発現を測定することができる。

[0039] 本発明における細胞内への遺伝子導入方法としては、KCNJ2 遺伝子を細胞内に導入する限り特に制限されず、KCNJ2 遺伝子を細胞内に導入する方法としては、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等を挙げることができ、Lipofectin Reagent（登録商標）、Lipof

ectamine (登録商標)、Lipofectamine (登録商標) 2000 Reagent (Invitrogen社製) や、SuperFect (登録商標) Transfection Reagent (キアゲン社製)、FuGENE (登録商標) HD Transfection Reagent (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)、FuGENE (登録商標) 6 Transfection Reagent (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) 等の市販のトランスフェクション試薬を用いる当技術分野で広く用いられている手法を挙げることができる。

[0040] 本発明におけるウイルスベクターに感染させる工程としては、iPS細胞から分化した心筋細胞及び心筋前駆細胞を含む胚様体若しくはコロニーを単一細胞に分離し、分離から12時間以内、より好ましくは6時間以内、特に好ましくは3時間以内、最も好ましくは1時間以内にウイルスベクターへの感染を開始させ、感染のインキュベーション時間としては、96時間、より好ましくは72時間、特に好ましくは48時間、最も好ましくは24時間のインキュベーション時間を例示することができる。

[0041] また、ウイルスベクターの感染に際しては、5000MOI、より好ましくは1000MOI、特に好ましくは500MOI、最も好ましくは100MOIの濃度で使用する。

[0042] 本発明における自発的な周期的収縮活性とは、細胞の周期的な電氣的活動により、細胞が自発的かつ規則正しく収縮と弛緩を繰り返す現象をいい、Kir2.1チャネルを発現していないiPS細胞由来の心筋細胞は、この自発的な周期的収縮活性を有している。これに対して、本発明の心筋モデル細胞は自発的な周期的収縮活性を有しておらず、自発的ではなく(電気刺激を受けた場合に)細胞が規則正しく収縮と弛緩を繰り返す。細胞の自発的な周期的収縮活性は、目視観察によって判定することができ、ビデオカメラ又は顕微鏡などを用いて計数した、1視野あたりの自律拍動細胞数を、1視野あたりの細胞総数で標準化した、自律拍動細胞数率を用いて評価することができる。

[0043] 本発明における活動電位とは、ナトリウムイオン及びカリウムイオンを主体とする電荷をもつイオンが、細胞内外の濃度差に従い、イオンチャンネルを

通じて受動的に拡散を起こすことにより生じる、一過性の電位変化をいう。また、本発明における膜電位とは、上記イオンの濃度差により、細胞の内外で生じている電位の差をいい、静止膜電位とは、細胞内外を移動するイオンの流出入電荷量が等しい状態における、安定した膜電位をいい、陰性の電位である。

[0044] 本発明における最大拡張期電位とは、陰性の静止膜電位が、刺激により陽性電位へと入れ替わる脱分極を経て、もとの静止膜電位へ戻る再分極の過程における陰性頂点にあたる電位をいう。本発明の心筋モデル細胞の最大拡張期電位は、ヒト心室筋型心筋細胞に代表される細胞における最大拡張期電位と同程度の $-85 \sim -65$  mVであることが好ましい。

[0045] 本発明において、正常な内向きのカリウム電流における内向きのカリウム電流とは、静止膜電位の維持、及び、活動電位最終局面での静止膜電位への再分極化を司る $I_{K1}$ 電流をいい、正常な内向きのカリウム電流特性とは、ヒト心筋細胞に代表される細胞が発生する $I_{K1}$ 電流強度に比して、同程度の $I_{K1}$ 電流強度を有する性質をいう。

[0046] 本発明における活動電位測定の実施には、本発明の心筋モデル細胞の作製方法における工程(d)のウイルス感染後3日以降、より好ましくは3日以降30日以内、最も好ましくは14日以降30日以内の期間、培養した細胞を使用し、測定用の細胞外液・細胞内液バッファーとしては、pH6~8のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどの、 $I_{K1}$ 電流に影響を与えないバッファーであれば特に制限されず、 $132$  mM NaCl,  $2$  mM  $CaCl_2$ ,  $10$  mM HEPES,  $4.8$  mM KCl,  $1.2$  mM  $MgCl_2$ ,  $5$  mM Glucoseの組成により調製されたバッファーを、NaOHによりpH7.4に調製した細胞外液や、 $110$  mM K-Aspartate,  $5$  mM ATP-K<sub>2</sub>,  $11$  mM EGTA,  $10$  mM HEPES,  $1$  mM  $CaCl_2$ ,  $1$  mM  $MgCl_2$ の組成により調製されたバッファーを、KOHによりpH7.3に調製した細胞内液を、好ましく挙げるができる。

[0047] 本発明における活動電位、静止膜電位、最大拡張期電位測定を記録するに

は、パッチクランプ法又は全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることができる。静止状態にある、本発明のKir2.1チャンネル発現細胞における活動電位は、種々の保持電位及び脱分極刺激（コマンドパルス）を細胞に与えることにより誘発することができる。これらの条件については、当業者であれば容易に設定することができ、一例としては、0.5秒間のコマンドパルスを0.1Hzの周波数内で、-40mVから-150mVまで10mV刻みで細胞に与えることにより、誘発することができる。IK1電流成分の特定には、0.2mMのBaCl<sub>2</sub>を添加した細胞外液下で観察されるトレースを、BaCl<sub>2</sub>添加前のトレースから差し引かれた差分により同定される、Ba<sup>2+</sup>差分電流の値を用いることができる。

[0048] 本発明の心筋細胞に対して毒性作用及び／又は変調作用を有する物質のスクリーニング方法としては、上記本発明の心筋モデル細胞と被検物質とを接触させる工程（A）；電気生理学的試験手法を用いて、被検物質に起因する心筋細胞に対する毒性作用及び／又は変調作用を検出する工程（B）；工程（B）の検出結果に基づき、被検物質の心筋細胞に対する毒性作用及び／又は変調作用の有無を判定する工程（C）；の各工程を備えた方法であれば特に制限されず、上記工程（B）における毒性作用及び／又は変調作用が、hERG電流阻害活性であることが好ましい。

[0049] 例えば、電気生理学的試験手法を用いて、被検物質に起因する心筋細胞に対する毒性作用や変調作用を検出する方法としては、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを含むパッチクランプ法、アイソトープ及び原始吸光分析によるイオンフラックス法、膜電位感受性色素法、イオン感受性蛍光色素法、多点平面電極システムを利用した細胞外電位測定法、MEA（Multielectrode Array）システムによる多電極記録法、FRET等の分子プローブを含む膜電位感受性色素を用いた活動電位測定法、膜電位イメージング法、イオン流束（Ion flux）解析法、放射性リガンド結合試験法などを好適に挙げるることができる。

[0050] 上記毒性作用や変調作用は、hERG電流阻害活性、細胞機能への影響、