

マーカーの発現、受容体結合、電気刺激による収縮活性、電気生理学的特性変化等を検出することにより明らかにすることができる。上記hERG電流阻害活性を検出するには、本発明の心筋モデル細胞のQT間隔延長作用を評価すればよく、かかるQT間隔延長作用評価法としては、被検物質との接触により、活動電位持続時間(APD)や、MEAシステムにおけるフィールドポテンシャル持続時間(FPD)の延長を測定する方法を挙げることができる。FPDの測定によると、Naチャンネルでのイオン流入による、脱分極の大きなピークを始点とし、カリウムチャンネルによる再分極のピーク(2ndピーク)を終点として計測される値をもとに、被検物質によるQT延長作用を評価することができる。

[0051] 上記本発明のスクリーニング方法は、創薬のスクリーニングに有用である。かかる創薬スクリーニングによると、被検物質の細胞機能への影響、マーカーの発現、受容体結合、電気刺激による収縮活性、電気生理学的特性変化の解析などにより、副作用のない薬剤としての有効性を評価することができる。影響が観察される場合、被検物質の濃度を力価測定し、致死量及び半有効量を決定することができる。

[0052] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例 1

[0053] 1. hiPS細胞の培養

hiPS細胞株(201B7, 253G1)は、Basic fibroblast growth factor(10ng/ml)(bFGF; R&D Systems)を加えた霊長類ES細胞培養液(ReproCell)中で、1mg/mlのmitomycin C solution(Nacal Tesque)で処理されたSNL76/7(European Collection of Cell Culture)の支持細胞層上に播種し、培養を行った。継代時は、hiPS細胞コロニーを酵素処理により単一細胞化し、支持細胞でコーティングされた培養ディッシュに撒き、継代培養を行った。

2. 心筋細胞への分化誘導

心筋細胞への分化誘導は過去の報告 (PLoS ONE 6(8):e23657, 2011) を、若干改変した手法で行った。共培養した支持細胞を除くために、iPS細胞はmTeSR1培養液 (Stem cell technologies) 中のmatrigel (Invitrogen) 基底膜マトリックス上で数世代継代し、分化誘導の前日に、1:60希釈にしたmatrigelで細胞を覆った。心筋細胞への分化誘導するため、mTeSR1培養液を100ng/mlのActivin A (R&D Systems) を加えたB27加RPMI1640培養液 (RPMI/B27) に換えて24時間培養し、続いてbonemorphogenetic protein 4 (10ng/ml, R&D Systems) とbFGF (10ng/ml) を加えて4日間培養した。5日目に、培養液をRPMI/B27/Dkk1 (100ng/ml, R&D Systems) に換えた後、7日目にはRPMI/B27に換え、2-3日ごとに培養液の交換を行った。9日目には自律拍動する細胞が観察された。

3. 分化済み心筋細胞の前培養

分化済みのhiPS細胞由来心筋細胞として市販されている、iCell-cardiomyocytes (iCell-CMs) (Cellular Dynamics International; CDI, Madison, WI, USA) を、iPS Academia Japan Inc.社 (Kyoto, Japan) より購入した。iCell-CMsについて、製造元 (CDI) より提供されている方法に従い解凍し、アデノウイルスに感染させるまでの4日間、前培養を行った。ヒトES細胞由来心筋細胞の胚様体は、Collectis社 (Sweden) より購入し、酵素処理により単一細胞化した後、製造元 (Collectis) より提供されている方法に従いアデノウイルスに感染させるまでの4日間、前培養を行った。

4. KCNJ2発現プラスミドベクターの作製

KCNJ2-EGFP融合タンパク質の遺伝子をコードする、プラスミドのpENTR-KCNJ2-EGFPについて、cagcttgccgtctctcatgg (KCNJ2 reverse) [配列番号3]、gtccccaacactcccctttg (KCNJ2 forward) [配列番号4]、cgtctccgtccagctcgaccag (EGFP reverse) [配列番号5]、gaccacatgaagcagcagcagc (EGFP forward) [配列番号6]、の

4 プライマーにより全長の翻訳領域の配列を決定した。全長翻訳領域配列は、制限酵素の S a l I と N o t I で切断され、T4 DNA ligase (Takara) のライゲーションにより、pENTR1Aベクター (Invitrogen) へ配列を挿入した。LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) のLR反応により、エントリークローンである p E N T R 1 A - K C N J 2 - E G F P を介した、p A d / C M V / V 5 - D E S T (Invitrogen) へのターゲット遺伝子組み換えを行った。得られた発現クローンの p A d - K C N J 2 - E G F P を増幅させ、純正プラスミドDNAを精製した。HEK 293A細胞へ形質導入する前に、左右両端の逆方向反復配列 (I T R 又はパ lindローム配列) を、Lipofectamine (登録商標) 2000 Reagent (Invitrogen) に曝露させた。アデノウイルス発現クローンを増幅するHEK 293A細胞は、定常的にE1タンパクを発現しており、HEK細胞及びiCell-CMsへの遺伝子導入用に回収して用いた。

5. 心筋細胞へのアデノウイルスを介した遺伝子導入

前培養した幹細胞由来心筋細胞を、分散・分離溶液のアキュターゼを用いた酵素処理により単一細胞化し、lamimin/poly-D/L-lysineコーティングされたガラスボトムディッシュに撒いた。心筋細胞をアデノウイルスに感染させるために、100MOIの濃度のpAd-EGFP又はpAd-KCNJ2-EGFPに、24時間曝露させた。感染開始から48時間後の感染率(心筋細胞におけるGFPシグナル陽性率)は、60~100%(平均約80%)であった。アデノウイルス感染心筋細胞は、10%FBS、1mM GlutaM AX (Invitrogen)、0.1mM non essential amino acid (Sigma)、0.1mM 2-mercapto ethanol (Sigma) 加Knockout DMEM (Invitrogen) 下にて培養を行った。培養細胞は、アデノウイルスによる遺伝子導入完了後30日の間は、培養により維持が可能であり、以下の解析には全て導入から30日までの感染細胞を用いて実施した。膜電流及び活動電位測定は、全てGFP陽性細胞を用いて行った。同様に、HEK 293細胞への遺伝子導入用として、HEK 293細胞をDulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) で培養

し、100MOI (Multiplicity Of Infection) の濃度の pAd-E GFP
又は pAd-KCNJ2-E GFP に感染させた。KCNJ2 遺伝子の発現
から48時間後、GFP陽性細胞における膜電流を測定した。

6. 免疫細胞染色及び画像解析

解析に用いた細胞は、全て laminin/poly-D/L-lysine コーティングされたガラスボトムディッシュ又はチャンバー上に培養し、免疫細胞染色には、氷冷した100%エタノールに5~15分置いて固定・浸透化させた。また、GFP画像解析には、4%パラホルムアルデヒドの後、0.1% Triton-Xに浸透化させて用いた。引き続いて、phosphate-buffered saline (PBS) にて洗浄し、免疫細胞染色には、5% fetal bovine serum/PBSにて30分間ブロッキングを行い、1次抗体との反応を4℃にて一晩行った後、Alexa 488又はAlexa 647にて標識された2次抗体イムノグロブリンGとの反応を、室温にて2時間行った。1次抗体はAlexa 488又はAlexa 647標識2次抗体でラベルされ、余分な抗体はPBSにて洗浄した。画像解析に用いた全細胞は、PBSを取り除いた後、ガラスボトムディッシュ又はスライドガラス上で、VECTASHIELD mounting medium (Vector, Burlingame, USA) にて封入を行った。細胞の観察には、Zeiss LSM510共焦点レーザー倒立型顕微鏡を使用し、励起光と蛍光の波長をそれぞれEx; 488nm, Em; 505~520nmとEx; 635nm, Em; 650~670nmに設定した100倍油浸対物レンズを用いるか、又は、Olympus IX-71倒立型蛍光顕微鏡を使用し、キセノンランプを(励起光: 492±9nm、吸収フィルタ: 530±18nm)に設定した、40倍油浸対物レンズを用いて行った。共焦点顕微鏡画像は、リニアレンジの蛍光強度/ピクセルを用いた光電子増倍管ゲインの自動調整により最適化され、16回の取り込み画像を平均化したものを採用した。

7. 心筋細胞の収縮性解析

分化誘導された心筋細胞とそのクラスターの収縮活性の観察には、ビデオカメラ (Hitachi) 又は顕微鏡 (IX-71) を使用した。収縮率は、10-sビデオカメライメージ若しくは、1分間の目視観察により、収縮回数を計数して

算出した。クラスターについては、GFP陽性細胞を3以上含むものを、収縮性解析に使用した。hiPS細胞から心筋細胞への分化誘導率を割り出すために、自律拍動する細胞数は、顕微鏡の1視野あたりの細胞総数で標準化した。IK1内向き整流K⁺電流を阻害するために、0.2 mMのBa²⁺をバスへ投与した。静止状態のKCNJ2-GFP細胞クラスターには、電気刺激装置(8EN-7203, NIHON KOHDEN, Tokyo, Japan)を用いた10 ms、50 V/cm、1 Hzの均一な電場による、長期的電位刺激を与えた。

8. 電場電位解析

hiPS細胞由来及びES細胞由来の心筋細胞における、自発的並びに誘発的な電場電位を計測するために、MED64 multi-electrode array system (Alpha MED Science, Osaka, Japan)を使用した。細胞は、MEDプローブに直接入れて培養し、非侵襲性平面微小電極を用いて自発的又は電気刺激誘発性の電場電位を調べた。電気刺激は、MEDプローブ上の、2つの隣接する電極から誘起させた。

9. 運動ベクトル解析

自律拍動する心筋細胞の運動ベクトルは、[Ghanbari, M. The cross-search algorithm for motion estimation. IEEE Transactions on communications 38, 950-953 (1990)] 及び [Hayakawa, T. et al. Noninvasive evaluation of contractile behavior of cardiomyocyte monolayers based on motion vector analysis. Tissue engineering. Part C, Methods 18, 21-32 (2012)] に記載の、ブロックマッチング・アルゴリズムを用いた解析により算出した。

10. パッチクランプ

活動電位と膜電流は、Axopatch 200Bパッチクランプ増幅器 (Molecular Devices, CA, USA) を用いた穿孔パッチ立体構成のパッチクランプ法により記録した。電信情報は、5 kHzのローパスフィルター設定を用いて2~5 kHzで検出した。pCLAMP software (version10.02, Axon) は、voltage-pulseプロトコール作成や、データの取得及び解析に使用した。阻害剤などは

、バス溶液へ迅速灌流システムを用いて投与した。hiPS由来心筋細胞又はiCell心筋細胞（幹細胞由来心筋細胞）を用いた全ての解析は、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ の環境下で実施した。また、同様にHEK293細胞においても、ホールセル・パッチクランプ技術によるIK1電流の測定を実施した。細胞外液は、 132 mM NaCl 、 2 mM CaCl_2 、 10 mM HEPES 、 4.8 mM KCl 、 1.2 mM MgCl_2 、 5 mM Glucose (NaOHでpH 7.4に調製)、細胞内液は、 $110\text{ mM K-Aspartate}$ 、 5 mM ATP-K2 、 1 mM EGTA 、 10 mM HEPES 、 1 mM CaCl_2 、 1 mM MgCl_2 (KOHでpH 7.3に調製)の組成で調製した。IK1電流と電流電圧曲線は、hiPS由来心筋細胞・HEK293細胞共に同一の電圧プロトコールで測定した。 -100 mV の電気刺激により誘発されたIK1電流は、全細胞破裂パッチクランプ (Whole-cell ruptured patch-clamp) 法により、直列抵抗が $3\sim 5\text{ M}\Omega$ の状態では細胞膜が破裂した後から測定を開始し、IK1電流の振幅が安定するまで ($\sim 2\sim 3$ 分間) 測定を続けた。その後、電流電圧曲線の解析を行った。

1.1. パッチクランプ法による解析

幹細胞由来心筋細胞の解析には、細胞をlaminin/poly-D/L-lysineコーティングされたディッシュに撒いたものを、倒立型顕微鏡 (IX-71, Olympus) のステージに設置し、培養液をTyrode's solution ($135\text{ mM NaCl}/0.33\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4/5.4\text{ mM KCl}/1.8\text{ mM CaCl}_2/0.53\text{ mM MgCl}_2/5.5\text{ mM Glucose}/5\text{ mM HEPES}$, pH 7.4) に置き換えた。組成が $110\text{ mM aspartic acid}$ 、 30 mM KCl 、 1 mM CaCl_2 、 $5\text{ mM adenosine-5' -triphosphate magnesium salt}$ 、 $5\text{ mM creatine phosphate disodium salt}$ 、 5 mM HEPES 、 10 mM EGTA (pH 7.25)の細胞内液で満たされた場合の、微小電極の尖端抵抗は $1.5\sim 4\text{ M}\Omega$ であった。パッチ穿孔 ($10\sim 20\text{ M}\Omega$ 、直列抵抗)を得るために、amphotericin B ($0.3\sim 0.6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$; Nacalai)を細胞内液に投与した。パッチピペット内の前面を細胞内液に浸して満たし、背面

を amphotericin B を添加した細胞内液で満たした。h i P S 細胞由来心筋細胞 (201B7)、i C e l l 心筋細胞及びヒト E S 細胞由来心筋細胞の細胞膜静電容量はそれぞれ、 $49.8 \pm 8.1 \text{ pF}$ ($n=19$)、 $46.2 \pm 2.7 \text{ pF}$ ($n=74$)、 $43.7 \pm 4.8 \text{ pF}$ ($n=13$) であった。

12. パッチクランプ法の測定条件

幹細胞由来心筋細胞の活動電位及び静止膜電位は、電流固定法を用いて記録した。パッチクランプに使用した細胞の評価基準は、結果の項目に記す。自律拍動性心筋細胞の活動電位は、電気刺激無しに記録した。特に別途記載のない限り、静止状態の心筋細胞については、持続時間が $0.2 \sim 3.1 \text{ ms}$ の脱分極電流刺激で、かつ、電流強度が閾上であり (活動電位を誘発する最低値の 120%)、周波数が 1 Hz の電流を流すことで、活動電位を誘発させた。I K 1 (K i r 2. 1) 電流の電流電圧曲線を得るために、 0.5 秒間のコマンドパルスで 0.1 Hz の周波数内で、 -40 mV から -150 mV まで 10 mV 刻みで刺激した。I K 1 電流成分は、 0.2 mM の BaCl_2 を添加した細胞外液下で差し引かれたトレースにより同定される、 Ba^{2+} 差分電流として示される。電流電圧の相関曲線は、コマンドパルスの電圧に対する Ba^{2+} 差分電流のピーク振幅を求めることで得られる。

13. 薬剤・化合物

選択的 I k r 阻害薬の E 4 0 3 1 は、エーザイ株式会社 (Japan) から提供されたものを使用した。他の全ての化合物は、医薬品グレードのものを使用し、一般的な流通経路により入手した。 200 mM BaCl_2 (水溶液)、 1 M CsCl (水溶液)、 10 mM E 4 0 3 1 (水溶液) のストック溶液は、パッチクランプの細胞外液中に用時、最終濃度に調製して使用した。E 4 0 3 1 のストック溶液については、使用する日と同日に調製した。

14. RNA抽出及び、定量的real-time PCR

i P S 細胞 (201B7) 又は i C e l l 心筋細胞からの全 RNA 抽出には、RNeasy kit (Qiagen) を使用した。相補的 DNA は、プライマーとしてランダムヘキサマー (Applied Biosystems) を用いた逆転写により作製した。

定量的real-time PCRは、ABI7300 cyclerを用いて実施した。KCNJ2プライマー (sense primer; 5' -TGTCACGGATGAATGCCCAA-3' 配列番号7, antisense primer; 5' -CAAACACAGCTTGCCGTCTC-3' 配列番号8) によるKCNJ2発現の解析には、SYBR greenを使用した。これらの解析は、製造者によって推奨されるプロトコールに沿って実施した。SYBR greenを使用した場合、PCR産物は、常時、解離曲線解析ソフトウェア (Applied Biosystems) により確認作業を行った。転写量は、 $\Delta\Delta CT$ 法を用いて比較を行った。ハウスキーパー遺伝子のコントロールとして、GAPDHを用い、プライマーは (sense primer; 5' -GAGCCACATCGCTCAGACAC-3' 配列番号9, antisense primer; 5' -CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG-3' 配列番号10) を使用した。

15. データ解析・統計処理

全ての数値は、平均値±標準誤差で示す。pCLAMP software ver.9.2and10.3 (Molecular Dynamics) は、パッチクランプでのデータ取得及び解析に使用した。活動電位パラメータの解析には、Peak Analysis Module搭載のLabchart ver.7.2 (ADInstruments) を使用した。図表作成及び統計処理には、OriginPro9.0J (Microcal) 、Illustrator CS6.0 (Adobe) 、Instat program (GraphPad) を使用した。特に記載の無い場合、2群比較ではステューデントt検定を、多重比較では分散分析とBonferroni検定を行い、統計的有意差を求めた。P値<0.05を統計的有意差有りとした。

16. エピソーマル型ベクターを使用した遺伝子導入

続いて、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を試みた。

[0054] pIRES2-EGFP-KCNJ2 (Hosaka et al. JMCC 2003 35:409-15) からSalI/NotIもしくはSalI/BamHIで切りだしたヒトKCNJ2を含むインサートをそれぞれの制限酵素のセットでカットしたpEBMulti-Neoベクター (和光純薬) にサブクローニングした。図7に示すように、SalI/NotIで切りだしたインサートには、マーカーとしてEGFP蛋白が発現し、SalI/BamHIで切りだしたインサートはhKCNJ2クローンのみが含まれる。遺伝子導入の効果を調べる際には、EGFPを標識

して行った。

[0055] iCell-CM (CDI社)は、CDI社のプロトコルとNakamura et al. J Pharmacol Sci 124:494-501 (2014)に従い、凍結バイアルから解凍し、35 mmもしくは60 mmプラスチックディッシュ上で前培養を行った。培地を始め試薬類は全て細胞に同封されるキットのものを使用した。初回解凍後は、バイアル当たり6 cmディッシュ3枚の底面積を基準にして単層培養を行い、2-7日後の植え換えの際に測定系に応じた処理を施した。

[0056] 遺伝子をトランスフェクションする場合の細胞単離法について次に示す。

[0057] 細胞単離法 (再播種) ; 実験プロトコルは下記に示すものであった。

- ・ 37°Cに温めたPBS(-)で3回洗う。
- ・ 37°Cに温めた0.5 mL accutase (innovative cell technologies)を与え、CO₂インキュベーターで 37 °C 30分静置する。
- ・ 30-50 %の細胞が丸くなりディッシュの底から浮いていることを確認し、ディッシュをそっと傾けて混ぜると、9割の細胞を底から浮かせる。
- ・ 37°Cに温めた0.5 mL PBS(-)を加える。(accutaseには酵素反応停止は必要ないとされており、細胞を洗う意味でPBSを添加する。)
- ・ 遠心 200Xg 5分間(RT) (ラボのエッペン卓上遠心機では1500rpmぐらい) 後、上清を捨てる。遺伝子導入処理をせずに再播種したものをVehicleとした。

[0058] Neon(登録商標) Transfection system kit (Invitrogen)を利用したエレクトロポレーションによる手法は下記に示すものであった。

- ・ iPS細胞由来分化心筋細胞を準備する。ここでは、iCell-CM (CDI社)を用いた。
- ・ 解凍してラミニンコートしたガラスベースディッシュ (IWAKI 3971-035) に前培養したiCell-CM (CDI社) を前述の方法で単離する。
- ・ アクターゼで単離したiPS心筋細胞をPBSでwash後、遠心 (200Xg, 5分間)
- ・ プラスミド溶液を作成

Neon Transfection system kit 100 μ L (Invitrogen #MPK10025)

Buffer R:100 μ L Plasmid:1 μ g

- ・ Neon チューブにBuffer Eを3 mL入れてピペットステーションにセットする。
- ・ 細胞の遠心終了後、細胞の上清を100 μ L程度残してブルーチップで吸い取る。
- ・ イエローチップでしっかりと上清を取り除く。
- ・ プラスミド溶液に細胞を懸濁して、1.5 mLエッペンチューブ（蛋白非吸着タイプ）に移す。
- ・ Neon 100 μ L tipで細胞懸濁液を吸い上げ、泡を立てずに機器にセットする。
- ・ エレクトロポレーションを行う。

[0059] Voltage : 1650 V、Width : 10 ms、Pulse Number : 3（京大プロトコル）

- ・ 温めておいたガラスベースディッシュ（IWAKI 3971-035）にすばやく撒き、CO₂インキュベーターへ入れて、実験実施まで培養（2日後写真ビデオ撮影）。*細胞のプラスミド溶液への懸濁から播種までは1サンプルずつ行う。

[0060] Lipofectamin2000 (Invitrogen)を利用した手法は下記に示すものであった。即ち、ガラスボトムディッシュに再播種したiCell-CM(1枚ごとの細胞数10⁰-1000個)が定着したのを確認し(2日以上後)、リポフェクタミン2000 (Invitrogen)のプロトコルに従い、以下の順に遺伝子導入を行った。

- ・ 50 μ L Opti-mediumにcDNA 1 μ g を加え、5分間静置。
- ・ 50 μ L Opti-mediumにLipofectamine2000 2 μ Lを加え、5分間静置。
- ・ 上述のそれらの溶液を混合し、20分間静置(室温)。
- ・ 準備したiCell-CMに加え、CO₂インキュベーターで37℃で培養。
- ・ 24時間後に培地交換、さらに24時間後撮影(実験実施)。

[0061] 蛍光倒立顕微鏡 (Olympus IX-71, X40 油浸対物レンズ) にて、GFP蛍光を観察した (キセノンランプ、Ex; 492 \pm 9 nm, Em; 530 \pm 18 nm)。イメージ撮影と動画撮影は、冷却CCDカメラ (CoolSNAP HQ, Photometrics) で行い、M

etaMorphソフトウェア (Molecular Devices 社) でデータ処理および解析を行った。同条件 (解像度, シャッター時間等) で取得したGFP画像は全て同条件 (カラスケール, 閾値等) の処理を施した。

[0062] 平均動き量は、ビデオ動画からブロックマッチングアルゴリズム (前の画像から動いたベクトル値をブロックごとに計算する古典的手法) を応用したHayakawa T et al., Tissue Eng Part C Methods 18:21-32:2012 の方法に基づいて算出し、動画撮影中 (3秒間) の変化を解析した。

17. KCNJ2を過剰発現したiPS心筋シートにおける頻度依存性

iCell-CM (CDI社)は、CDI社のプロトコルとNakamura et al., J Pharmacol Sci 124:494-501 (2014)に従い、凍結バイアルから解凍し、35 mmもしくは60 mmプラスチックディッシュ上で前培養を行った。培地を始め試薬類は全て細胞に同封されるキットのものを使用した。初回解凍後は、バイアル当たり6 cmディッシュ3枚の底面積を基準にして単層培養を行い (前培養)、4日後にMEA用のチャンバー (マルチチャンネルシステム社) に細胞を撒き換えた。

[0063] マルチチャンネルシステム社のMEAシステムを用いて細胞外電位の記録を行った。

[0064] MEAマルチ電極アレーディッシュの中央にラミニン/poly-D-lysineをコートして、前培養してあったiCell-CMを撒き直す。MEAの電極上に心筋シートを作成するには工夫が必要であり、バイオリサーチセンター社では、電極アレイを中心としてプラスチックの筒を付属することが出来る。その筒に単離した細胞を注入して心筋シートを作成する事が出来た。KCNJ2を遺伝子導入するためのアデノウイルスは、MEAディッシュに撒き直す際に添加した。

[0065] 多電極シート (電極のレイアウト: 8 X 8) からの信号は、MEA1060 アンプで増幅し、フィールドポテンシャル (FP) の波形を得た。図8Bの波形に示すように、FPの立ち上がりから基線に戻るまでの時間をフィールドポテンシャル持続時間 (FPD) として、FPDの値を評価した。測定温度は全て37°Cで行った。測定時の細胞外液はiCell-CM Maintenance medium (CDI社) のままで行い、倒立顕微鏡に取り付けた卓上CO₂インキュベーター内にディッシュを静置した。

[0066] 刺激入力のための電極は、任意の隣り合う2チャンネルを選択した。それ以外の電極からはFPを計測し、再分極のピークが最も顕著に見られる波形を選択してFPDの値を算出した。FPD値の算出に使用したチャンネル（一電極に相当）以外に少なくとも3つのチャンネルで同じコントロールのFPD値が得られることも確認した。

[0067] データ取得・データ解析は全てマルチチャンネルシステム社のMEAシステムを使用した。CSVファイルからマイクロソフトのExcel上でデータを解析し、統計はGraphpad社のInstatプログラムを用いて、ANOVAもしくはnon-paired t-testで評価した。

18. 結果：hiPS細胞由来心筋細胞の特徴

hiPS細胞由来心筋細胞を得るために、iPS細胞クローンの201B7を胚様体へ分化させた[図2A]。心筋細胞への分化を証明するため、心筋のマーカである α -アクチニン(α -actinin)、コネクシン43(Cx43)、心臓トロポニンT(TnT)の免疫細胞染色を行い、発現を確認した[図2B,C]。電気生理学的な特徴として、パッチクランプ法による、hiPS細胞由来心筋細胞の活動電位記録から、多様な波形を示すことが明らかとなった。いくつかの活動電位波形は、結節型、心房筋型、心室筋型に類似した波形を示した[図3]。50%再分極時の活動電位持続時間(APD50)と周期長(Cycle Length)をプロットした図では、これまでの報告通り周期長が延びるに従い、APD50が増大する傾向が見られたとともに、APD50値のばらつきも示された[図4]。また、自発的な活動電位を発生していることから、hiPS細胞の分化段階は、幼若であることを示している。この様な、hiPS細胞由来心筋細胞の、成人心室筋細胞と明らかに異なる電気生理学的特徴は、薬剤の毒性を予測する実験系に使用した場合に問題となり得る。最大拡張期電位(MDP)は、成人心室筋細胞では約 -80 mV であるのに対して、hiPS細胞由来心筋細胞では約 -55 mV と陽性方向にシフトしている[図4B]。最大拡張期電位の大部分は K^+ イオン濃度に制御されており、すなわち本来ならば K^+ 電流が深く関係

しているが、内向き整流 K^+ 電流 (I_{K1}) を阻害する Ba^{2+} イオンへの曝露が最大拡張期電位に対して影響を及ぼさないことから [図4 B]、hiPS細胞由来心筋細胞においては、内向き整流 K^+ 電流 (I_{K1}) の関与が小さいことを示している。実際、hiPS細胞由来心筋細胞で記録された -150 mVにおける I_{K1} 電流密度 (pA/pF) は、非常に小さい ($-1.5 \pm 0.5 pA/pF$; [図4 C])。また、QT間隔延長を引き起こす、hERGチャネル阻害剤E4031の、hiPS由来心筋細胞活動電位における作用を確認すると、低濃度 ($10, 30 nM$) の曝露の場合は、心室筋活動電位持続時間が延長し、E4031の除去により回復する [図5 A]。一方、段階的にE4031濃度を上げ、 $100 nM$ まで上昇させた長時間曝露では、除去の後に脱分極不能となり、活動電位が停止する [図5 B]。臨床において $100 nM$ /E4031はQT延長が見られる濃度域であり、拍動が止まるという報告はない。これは、本結果のE4031作用濃度が、臨床における作用濃度と異なることを示し、hiPS細胞由来心筋細胞を安全性薬理試験に用いた場合、生体内での作用濃度を読み誤る恐れがある。以上、hiPS細胞由来心筋細胞と、心室筋型ヒト心筋細胞の特徴の違いを図6にまとめる。これらの結果が、 K^+ チャネル $Kir2.1$ をコードするヒト $KCNJ2$ 遺伝子を、hiPS細胞由来心筋細胞へ導入する動機づけとなった。

19. 結果：KCNJ2遺伝子の導入法の検討

hiPS細胞由来心筋細胞へ、アデノウイルスを介した $KCNJ2$ 遺伝子の導入を検討した [図10]。まず初めに、胚様体形成前のhiPS細胞にアデノウイルスを感染させたところ、感染ウイルス量が $5000 MOI$ 濃度で、ごく一部の細胞にのみ、感染を示すGFPの発現を認めた [図11]。次に、 $1 \sim 1000 MOI$ までの感染アデノウイルス量において濃度検討を行い、感染させるタイミングを、分化した胚様体の単一細胞化から8日後に設定して、導入効率を検討したところ、導入効率の向上が見られた [図12]。更なる感染条件検討の結果、遺伝子導入のプロトコールとして、胚様体からiPS細胞を単一細胞化した直後に、 $100 MOI$ の濃度でアデノウイ

ルス感染を開始し、24時間後にウイルスを除き、感染開始から3日目以降の細胞を実験に使用した。発現効率（GFP陽性率）は、約80%であった。

20. 結果：KCNJ2の発現は、hiPS細胞由来心筋細胞の自律収縮を停止させる

KCNJ2遺伝子を導入したhiPS細胞由来心筋細胞クラスターについて、免疫細胞染色により心筋細胞マーカーの α -アクチニン、及び遺伝子導入細胞を意味するGFPの発現を確認した〔図13 A, B〕。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では、横紋構造の不明瞭さから、心筋への分化の未成熟さが示されたが〔図13 A；右下図中の破線内〕、GFP融合KCNJ2遺伝子を導入したクラスターでは、過剰発現するKCNJ2（緑）が、 α -アクチニン（赤：AAN）の発現を促進し、明瞭な横紋、すなわち成熟した筋節構造の構築が確認できた〔図13 B；右下図中の白線内〕。KCNJ2遺伝子の導入は、GFPの蛍光シグナルにより確認された〔図13 D〕。また、201B7細胞株及び253G1細胞株由来の心筋細胞、並びに、iCell心筋細胞、ヒトES細胞由来心筋細胞の全てにおいて、KCNJ2遺伝子の導入により、心筋細胞クラスターの自律拍動性が消失するが、BaCl₂への曝露により自律収縮能を回復した〔図13 C〕。

21. 結果：KCNJ2発現及び非発現iCell心筋細胞の細胞外電位記録

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及び、ハイスピードビデオカメラが捉えた収縮する細胞の挙動について検討を行った〔図14〕。細胞外電場電位の記録には、高純度に精製されたiCell心筋細胞を用い、シート状心筋細胞の電気生理学的特徴を捉える手段として一般的な、MEAシステムを使用した。GFPのみ遺伝子導入された、アデノウイルス感染iCell心筋細胞シート（陰性コントロール）は、細胞外電場電位記録上で周期的な自律性の電気発火を呈した（ 0.95 ± 0.21

Hz, $n=5$) [図14 A上段]。一方、KCNJ2遺伝子を発現するiCell心筋細胞シートは、完全に静止状態を示した [図14 A中段]。細胞外液中へのBaCl₂ (0.5 mM) 投与により内向き整流K⁺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 [図14 A下段]。従って、自律拍動の抑制には、静止状態のiCell心筋細胞上に過剰発現するKCNJ2遺伝子、つまり、Kir2.1チャネル (IK1電流) の寄与が示唆された。また、KCNJ2を導入した静止状態のiCell心筋細胞シートは、周波数の変換による、電気刺激頻度の増減に依存した拍動性を示した [図14 B, C]。この電気刺激/周波数依存性の拍動は、運動ベクトル解析 (Motion vector analysis) により解析を行った。周波数を上げるにつれ、収縮-弛緩持続時間は短縮していったことから、遅延性の整流性K⁺電流の寄与が示唆された [図14 D]。

2.2. 結果：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Kir2.1チャネル (IK1電流) の機能性

Kir2.1チャネルは、KCNJ2遺伝子導入により機能的に過剰発現しており [図15]、GFPの発現は、KCNJ2タンパク発現の有無を確認するための指標として扱われる。Kir2.1チャネルの機能的発現を、パッチクランプ法による電流測定により確認した典型例のトレースを [図15 A] に示す。0.5秒間の電位パルス刺激 (コマンドパルス) を、保持電位-80 mV、-150 mVから-40 mVまで、10 mV刻みで与えた条件で得られたトレースを、重ね合わせた図を解析した結果、コントロールのiCell心筋細胞では、Kir2.1チャネル選択的阻害剤であるBaCl₂ (0.2 mM) により抑制される電流成分を差し引いた成分 (Ba²⁺-subtracted電流) がほとんど発生しないのに対し、KCNJ2遺伝子を導入したiCell心筋細胞では、Ba²⁺-subtracted電流、つまりIK1電流の発生が確認できた。刺激電位ごとの最大値をBa²⁺-subtractedトレースから得てプロットした、IK1電流成分を [図15 B] に示す。(GFPのみ；

$N=9$, KCNJ2; $n=9$)。Bの一(-80から-40mV)の拡大図を[図15C]に示す。

23. 結果：KCNJ2遺伝子を過剰発現するヒトiPS由来心筋細胞の性質

KCNJ2遺伝子が導入されたiCell心筋の単細胞を用いて、パッチクランプ法により活動電位を記録した。KCNJ2の遺伝子導入が、活動電位波形の形態的特徴を劇的に変化させることが示された[図16A, B]。[図15]の結果から予測されたように、KCNJ2遺伝子を発現するiCell心筋の単細胞は、静止状態であった[図16B]。また、KCNJ2遺伝子を発現するiCell心筋の単細胞に対し、細胞内通電を行うと、細胞膜電位の細胞内外の極性が入替わるオーバーシュートを引き起こし、心室筋型の活動電位を誘発する[図16B]。KCNJ2遺伝子導入により、最大拡張期電位(MDP)、 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)及び APD_{40-30}/APD_{80-70} 率(≤ 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)は、心室筋様に変化することが確認できた[図16C~F]。また、パッチクランプ法電流固定モードの記録により、KCNJ2遺伝子発現iCell心筋細胞における、代表的な活動電位トレースを解析すると、IK1内向き整流K⁺電流を阻害するBa²⁺イオンの投入により、初回電気刺激以降の通電無しで、自発的な活動電位が誘発され[図17A上段及び中段]、拡張期第4相に脱分極させる活動電位を自律的に発火させることが示された。KCNJ2遺伝子導入された心筋細胞において、内向き整流K⁺電流(IK1)を阻害するBa²⁺イオンへの曝露の有無による電気生理学的性質の変化をまとめたところ、Ba²⁺イオンへの曝露によりMDPは浅くなり[図17B]、また一方で、50%再分極時の活動電位持続時間(APD50)は延長を呈した[図17A下段, C]。

24. 結果：KCNJ2発現ヒトiPS由来心筋細胞に対するhERG阻害剤(E4031)の効果

選択的 I_{Kr} 阻害剤の E4031 は、KCNJ2 遺伝子発現の無い hiPSC 細胞由来心筋細胞において、拡張期電位を顕著に脱分極へと導いた [図 18 A, B]。GFP のみを発現するコントロール細胞では、低濃度 E4031 曝露により活動電位持続時間 (APD) が短縮 (A) する細胞と、延長 (B) する細胞の両ケースが確認された。KCNJ2 発現細胞の最大拡張期電位 (MDP) は、累積的な E4031 の投与に対して変化を示さず [図 18 C, D]、一方で、GFP のみを発現するコントロールの細胞においては、E4031 濃度上昇にしたがって、MDP が浅く推移した。また、活動電位持続時間 (APD) については、KCNJ2 発現細胞では、濃度依存的な延長を示した [図 18 C, E] のに対し、コントロール細胞においては、平均の値では濃度依存的な短縮を呈した ($n=6$) [図 18 E]。従って、GFP のみを発現するコントロールの細胞の、E4031 による活動電位持続時間延長 (APD) を立証することは困難であるが [図 18 A, B, D, E]、KCNJ2 遺伝子導入した静止状態の心筋細胞を用いた場合は、E4031 濃度依存的な、活動電位持続時間の延長を記録することが可能であることが示された [図 18 C, D, E]。

25. 結果：KCNJ2 遺伝子発現により、HEK 細胞は内向き整流性 K^+ イオン電流を発生する

心筋細胞の代わりに HEK 細胞を用いて、KCNJ2 遺伝子の導入を行い、内向き整流 K^+ チャネル電流 I_{K1} の電流電圧曲線 (B) 及び、重ね合わせた電流密度トレース (C) を精査したところ、コントロールベクターにより GFP のみを発現する HEK 細胞では、内向き整流 K^+ チャネル電流が発生しないのに対し、KCNJ2 遺伝子を導入した HEK 細胞では、 Ba^{2+} 感受性の強い内向き整流 K^+ チャネル電流が発生した [図 19 B, C]。

26. 結果：iPS 由来心筋細胞における $I(f)$ チャネルの機能的発現

心臓の洞房結節はペースメーカー電位を発生し、心臓における心拍リズムを決定している。洞房結節のペースメーカー細胞においては、特徴的な緩徐脱分極相が心拍数の調節に大きく寄与しており、この相を形成するペースメ

一カーチャンネルとして I (f) チャンネルが知られている。I (f) チャンネルは、主に洞房結節、房室結節とプルキンエ束の伝導系に局在しており、過分極電位で活性化することで、主として Na^+ が細胞内に流入する。iPS 由来心筋細胞において、I (f) チャンネル電流の発生、及び、塩化セシウムによる I (f) チャンネル電流の選択的抑制が観察された [図 20A~C]。I (f) チャンネルは

、自律神経ホルモンによる心拍数調節に重要な役割を果たすことが知られるが、iPS 由来心筋細胞にも発現していることが明らかとなった。しかしながら、選択的 I (f) チャンネル阻害剤である塩化セシウムによる自律拍動への影響には、各群に有意差は認められなかった [図 20D]。よって、iPS 由来心筋細胞には I (f) チャンネルが機能的に発現しているものの、自律拍動への影響は小さいことが示された。

27. 結果：エピソーマル型ベクター遺伝子導入

エピソーマル型ベクターによる KCNJ2 遺伝子の導入に成功した。図 21 は、遺伝子導入を GFP 蛍光シグナルとして評価した結果をまとめた図である。まず、Neon システムによる遺伝子導入についてであるが、図中の GFP 蛍光画像において、vehicle は spot 的な自家蛍光のみを示したのに対し (図の上段)、Neon システムによる処理を施した細胞ではタンパク発現を示す細胞全体の蛍光シグナルを観察することが出来た (図の中段; 生存した細胞のほぼ 90%)。この処理により、半分以上の細胞が死滅した (浮かんだ) ことから、細胞障害は中程度以上であった。

[0068] 次に、Lipofectamine2000 を用いた遺伝子導入についてであるが、図の最下段に示すように細胞クラスターの一部の細胞で強い蛍光シグナルを観察することが出来た。図の最下段の GFP 蛍光画像では、上部の細胞には遺伝子導入されているが、下部の細胞は自家蛍光のみであり、遺伝子が導入されなかったことを示している。全体としては、10% 以下の導入効率であったが、細胞障害は弱く、死滅した細胞もクラスターの縁に少し観察されるのみであった。

[0069] アデノウイルスベクターを用いて KCNJ2 を遺伝子導入したときと同様に、KC

NJ2遺伝子導入により、拍動心筋の動きが停止した。

[0070] 図22は、図21のうち、vehicle(上段)とLipofectamine2000(下段)のビデオ画像(3秒間)から算出した平均動きベクトル量の時間変化を示している。図に示すように、KCNJ2-EGFPの遺伝子導入により、細胞の動きが完全に停止した。一方で、vehicle細胞は拍動しており、動きベクトルの活発な変化が見られた。以上の実験結果は、エピソーマル型ベクターによるKCNJ2-EGFP遺伝子導入によっても、本発明の機能変化をもたらすことが可能であることを示した。

28. 結果：KCNJ2を過剰発現したiPS心筋シートから計測したFPDの頻度依存性の検討

図8にKCNJ2を過剰発現したiCell-CMシートから計測したFPD(フィールドポテンシャル持続時間)の頻度依存性を示す。刺激頻度は0.5 Hzから2 Hzである。図8Aには、FP波形の典型例を示す。図8B上段には、異なる頻度(0.5, 1, 2 Hz)によるFP波形を重ね合わせた図を示している(一つの心筋シート標本から得られたデータ)。図8B下段には、7例から得られたFPD値の頻度依存性の結果をまとめている。黒いシンボルは個々のシートの値であり、異なる頻度の値を点線で結び、頻度依存性を示している。白抜きシンボルで平均値を示しており、頻度(Hz)の値が増えるほどFPDが減るという逆相関が見られた。この結果は、QT間隔や活動電位持続時間に見られる頻度依存性(逆頻度依存とも言う)を良く反映する結果であり、当該発明による処理を行う事ではじめて観察することに成功した。

[0071] 心電図のQT間隔、ランゲンドルフ心臓標本のQT間隔もしくはMAP、心筋細胞標本の活動電位幅(APD)には頻度依存性があることがよく知られており、その性質は不整脈発生において重要であることが知られている(Viswanathan PC et al., Circulation 99:2466-2474:1999)。自律拍動をする未処理のiPS心筋(平均拍動能 約1 Hz)には低頻度刺激(0.5 Hzなど)を入力することは不可能であるため、刺激頻度依存性を評価することは出来ないので、当該発明による処理をiPS心筋に施したところ、刺激頻度0.5 Hzから5 Hzまでの刺激印

加に追隨して心筋シートを拍動させることに成功した。2Hz以上に刺激頻度を上げていくとビートごとのFPDが安定しない現象が見られ、5Hzまでの刺激印加に対してはおおむね追隨するという結果が得られた。

[0072] 代表的QT延長薬剤であるE4031存在下で同様の実験を行ったところ、2 HzではビートごとのFPDの不安定性が上がり、5Hz刺激には全く追隨せず、スパイラルリエントリーを示唆するFP波形が観察された。よって、10 nM E4031において、催不整脈性を示す2つのパラメーター；ビートごとのFPD値のばらつきおよび高頻度における刺激不追隨性、が顕著に上がることが示された。

[0073] 即ち、図9は、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E4031の影響を示す図である。刺激頻度2 Hz(上段)および5 Hz(下段)の結果を示す。左側にはコントロール(薬物投与前)、右側にはE4031 (10 nM 5分間添加) 存在下のFP波形を示す。

[0074] まず2 Hzの結果であるが、コントロールでは刺激後の再分極ピークまでのFPD値は150-200 msの範囲内でのばらつきであったが、E4031添加後には150-350 msとFPD値ばらつきの程度が広がった。5Hzの結果では、コントロールの時には図中の矢印は刺激から、大体180 ms後に再分極が見られることが多かった(7回中5回)。一方で、E4031添加後には刺激後一定の時間に再分極することではなく、ランダムに再分極のピークが見られたことから(下段右：矢印参照)リエントリーが発生している特徴を示すFP波形が得られた。

29. まとめ：図23に示すように、hiPS由来心筋細胞は、自律拍動する幼若な細胞であり、E4031によるhERGチャネル阻害が、最大拡張期電位(MDP)を低下させるため、活動電位持続時間(APD)の延長を安定的に計測することができない。一方、KCNJ2遺伝子を導入することで成熟化したhiPS由来心筋細胞は、活動電位の発火が電気刺激依存的になり、かつ、E4031によるhERGチャネル阻害が、活動電位持続時間(QT間隔)を延長させており、より臨床への外挿性に優れた心筋モデル細胞であると言える。一般にQT延長薬の薬物評価の解析では、フィールドポテンシャル持続時間(FPD)という指標が良く用いられているが、FPD