

の始点は、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として同定される一方で、FPDの終点は、ピークもピークの終わりもはっきりしないばかりか、研究者により測り方の見解が異なるため、データ解析を困難にしている。図24に示すように、MEAシステム (Microelectrode Array/マルチ電極アレイ) による細胞外電位の測定結果では、GFPのみを発現するコントロール細胞では、FPDのピーク及びピークの終点が明瞭では無いが (A上段)、KCNJ2遺伝子を導入された細胞では、カルシウムチャンネルによる再分極が急峻になるため、顕著な2ndピークが出現し (A下段)、はじめのピークと2ndピーク間をFPDとすれば、解析誤差を回避することができる。現行では、A上段に示す様なFPD1やFPD2を測定に用いており、従って、ひとつの測定結果に対して異なる結論が導かれる [FPD1の方法で計測している例: Tanaka T, et al. BBRC 2009;385:497-502. FPD2の方法で計測している例: Matsa E et al., Eur Heart J 2011;32:952-962]。また、GFPのみを発現するコントロール細胞では、10nMのE4031作用に対して、心拍が落ち、FPD1、FPD2共に延長を呈するものの、ピーク及びピークが基線に戻るポイントの決定が困難であるのに対し (B)、KCNJ2遺伝子導入細胞では、同濃度のE4031作用下でも、FPDの2ndピークが顕著である (C)。(B)の様な、現行で用いられている細胞では、FPD延長の程度が各々の拍によって異なり、正確な判定に影響を及ぼすが、KCNJ2遺伝子を導入した細胞を用いれば、薬物による再分極の影響を正確に読み取ることができる。更に、KCNJ2導入細胞の顕著な2ndピークの特徴を生かせば、比較的単純なプログラムでピーク検出ができるため、ハイスループットスクリーニングといった高精度高効率解析システムが、現実的に開発可能となる。

産業上の利用可能性

[0075] 本発明によると、in vitroにおいて評価の困難であった、被検物質に起因する活動電位持続時間の延長作用を、高い精度で検出することが可能となり、外挿性の高い解析結果が期待できることから、スクリーニング用モデル細

胞として、創薬技術への応用に有用である。

請求の範囲

- [請求項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 α -アクチニン（ α -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。
- [請求項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請求項1に記載の心筋モデル細胞。
- [請求項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請求項1又は2に記載の心筋モデル細胞。
- [請求項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請求項1～3のいずれかに記載の心筋モデル細胞。
- [請求項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請求項1～4のいずれかに記載の心筋モデル細胞。
- [請求項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。
- 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）、コネキシン43（Cx43）、又は α -アクチニン（ α -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)

[請求項7] 前記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請求項6に記載の作製方法。

[請求項8] 前記ベクターがエピソード型ベクターであることを特徴とする請求項6に記載の作製方法。

[請求項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。

1) 請求項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)；

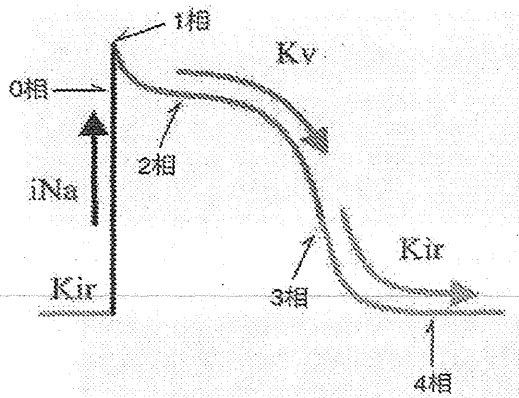
2) 電気生理学的試験手法を用いて、被検物質に起因する心筋細胞に対する毒性作用及び／又は変調作用を検出する工程(B)；

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)；

[請求項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請求項9に記載の方法。

【図1】

心臓の活動電位

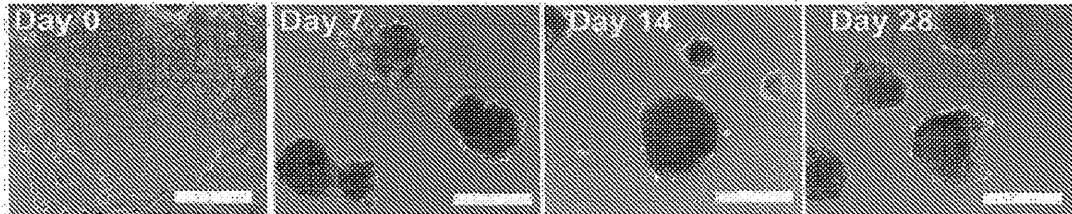
I_{K1}内向き整流K⁺電流の電気生理学的特徴

- 静止膜電位の維持
- 活動電位最終局面での静止膜電位への再分極化

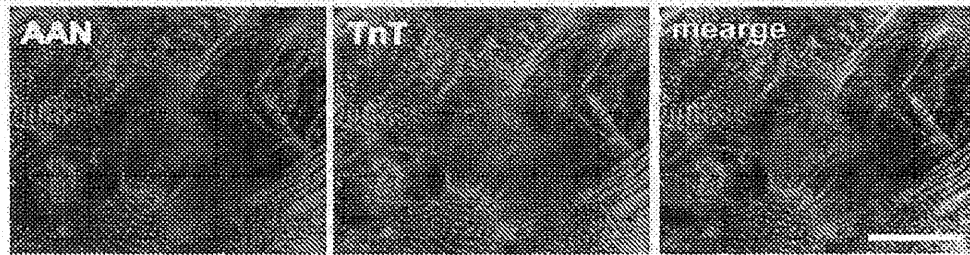
[図2]

胚様体に分化した201B7株hiPS細胞の形態及び表現型

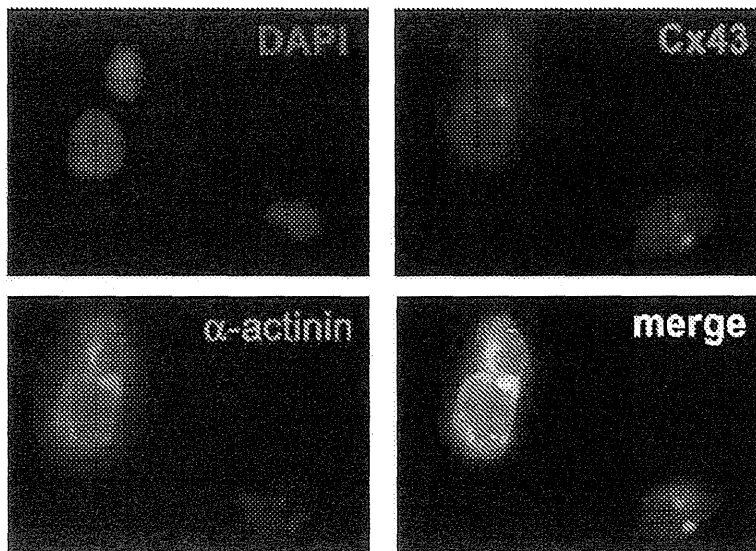
A



B

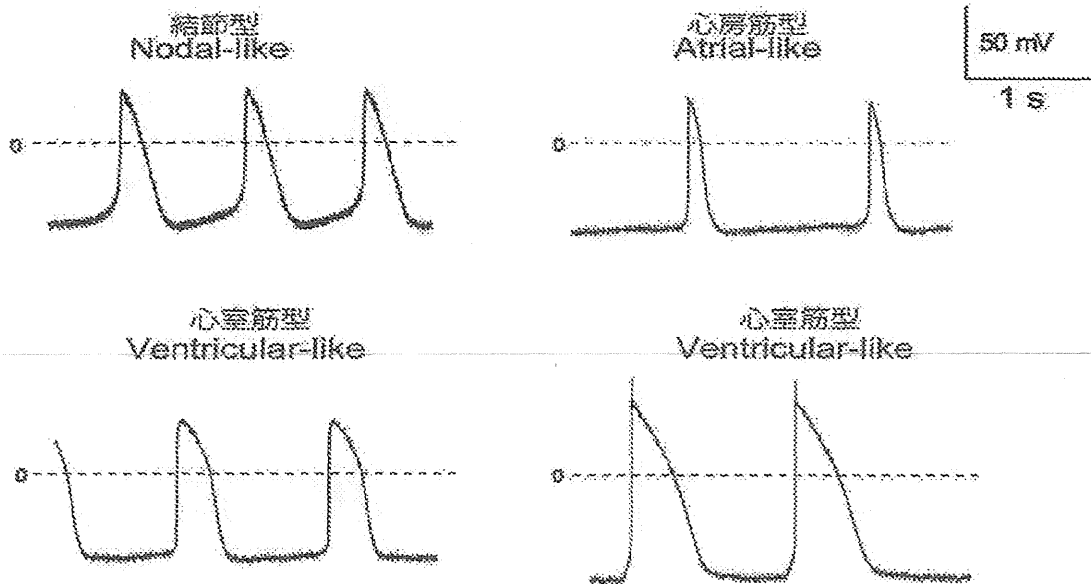


C



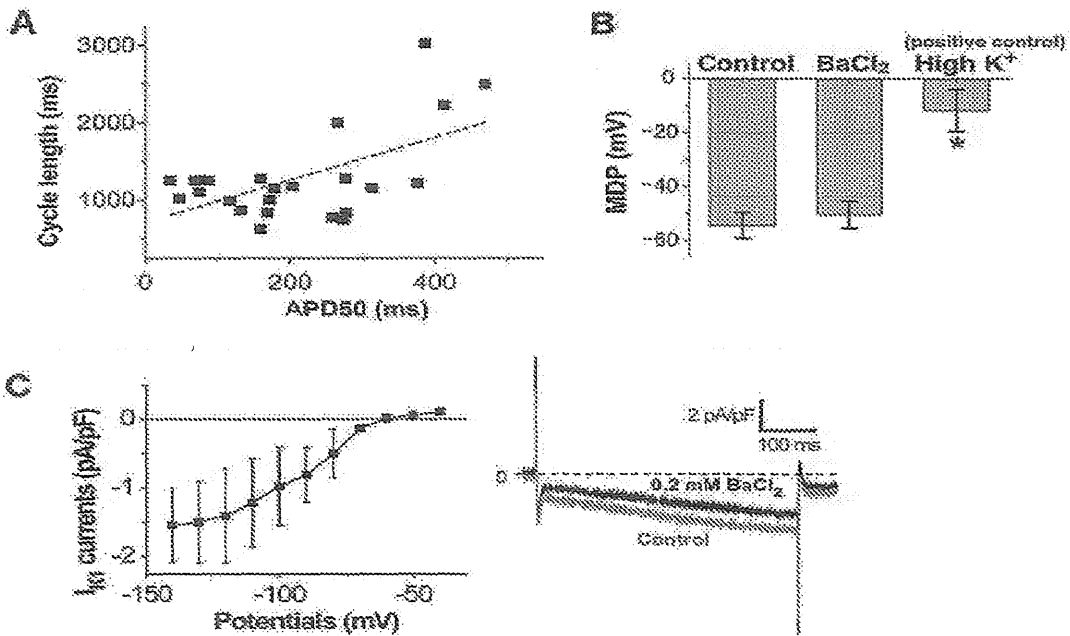
[図3]

胚様体形成法によるhiPS由来心筋細胞が示す活動電位の多様性



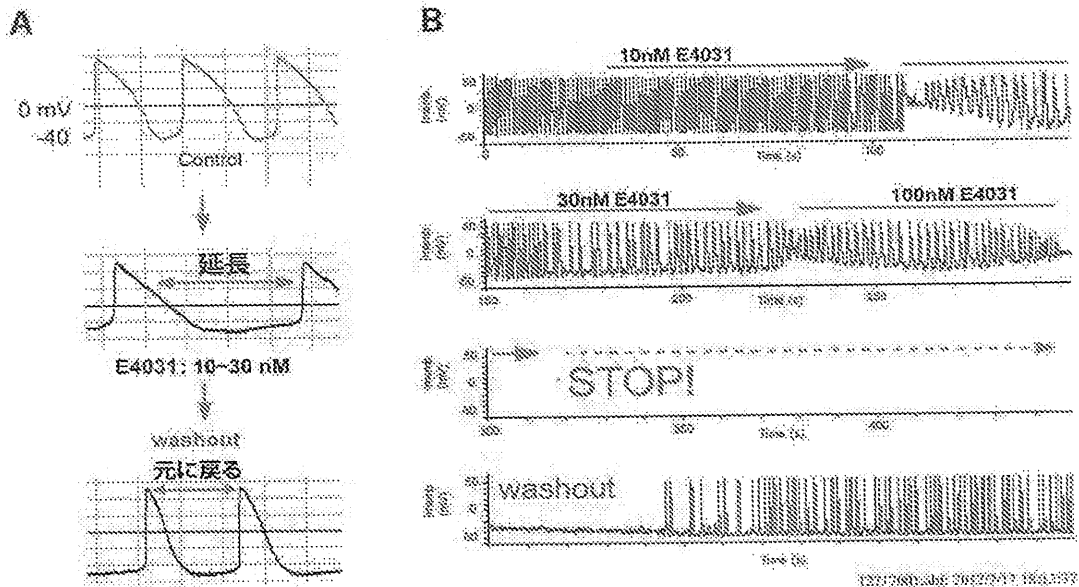
[図4]

心筋細胞に分化したhiPS細胞の電気生理学的特性



[図5]

hiPS由来心筋細胞活動電位に対する
E4031(抗 hERG 阻害剤/QT間隔延長剤)の効果



[図6]

心室型ヒト心筋細胞と
hiPS由来心筋細胞の特徴の違い

心室型ヒト心筋細胞

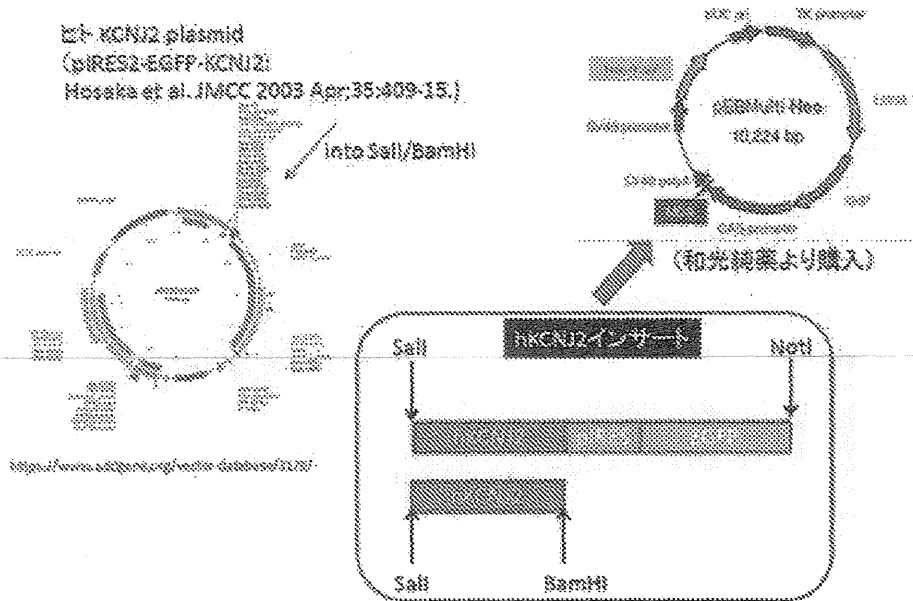
- ・洞房結節(ペースメーカー)からの刺激無しでは拍動しない
- ・最大拡張期電位 (MDP) : $-80\text{mV} \sim$
- ・hERG/K⁺チャンネルブロック
→ 心室筋活動電位持続時間 (APD:QT間隔)が延長

hiPS由来心筋細胞

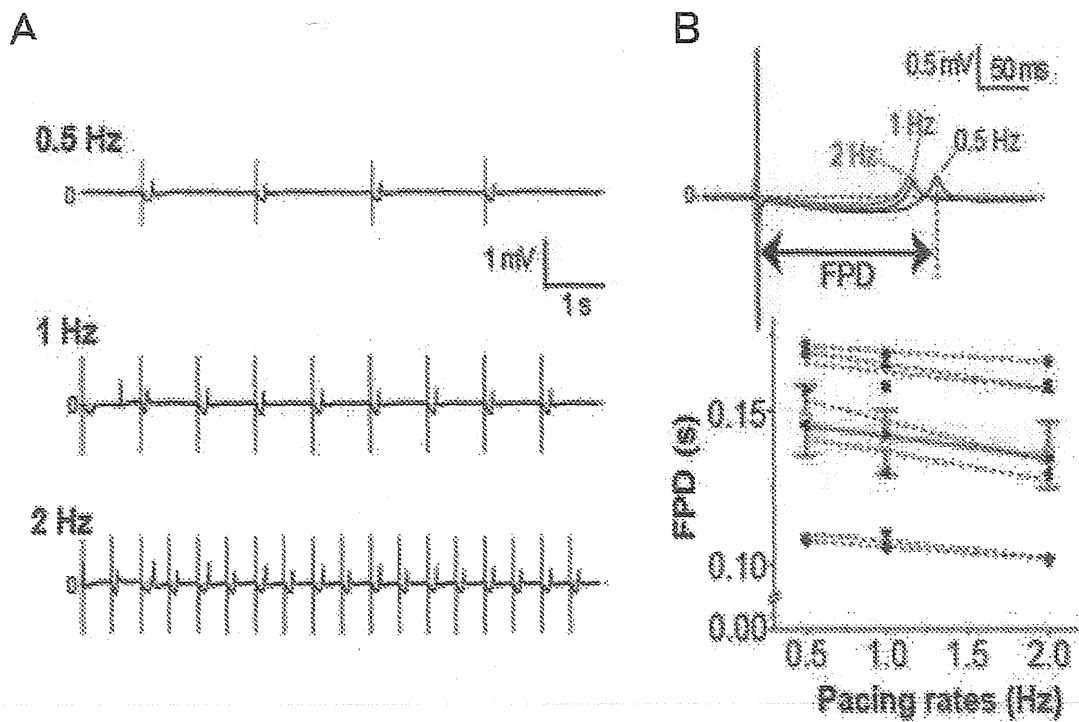
- ・無刺激にて自律拍動
- ・最大拡張期電位 (MDP) : $-40 \sim -50\text{mV}$
- ・hERG/K⁺チャンネルブロック
→ 脱分極の不能により活動電位の停止

[図7]

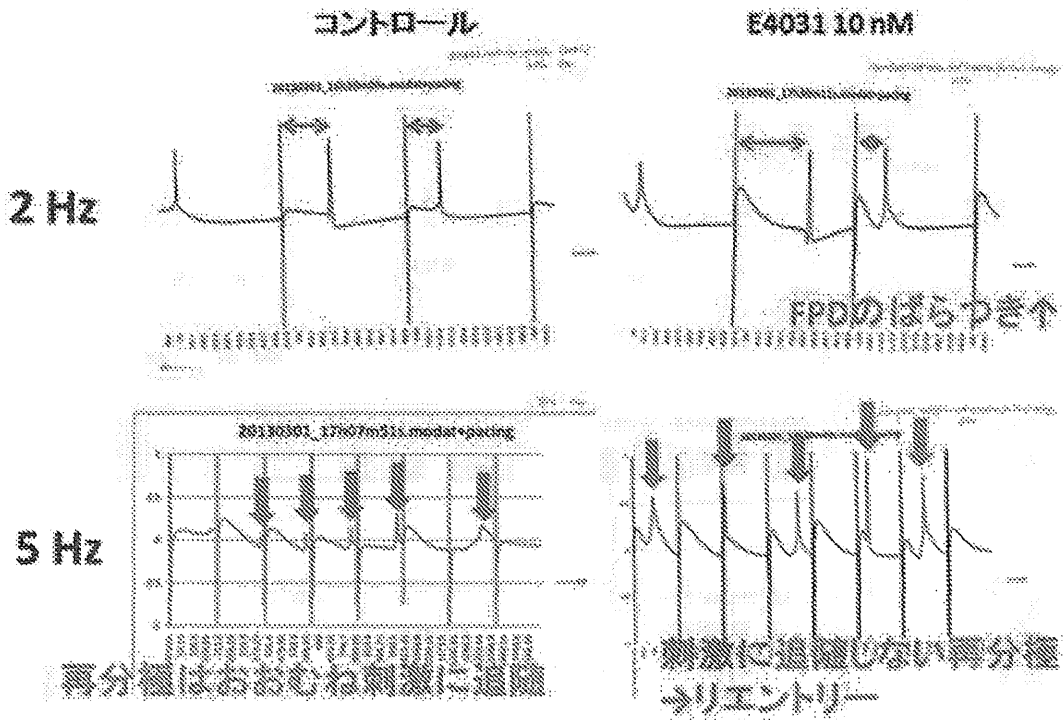
エピソーマル型ベクターを使用した遺伝子導入による成熟化心筋の作成(コンストラクト作成)



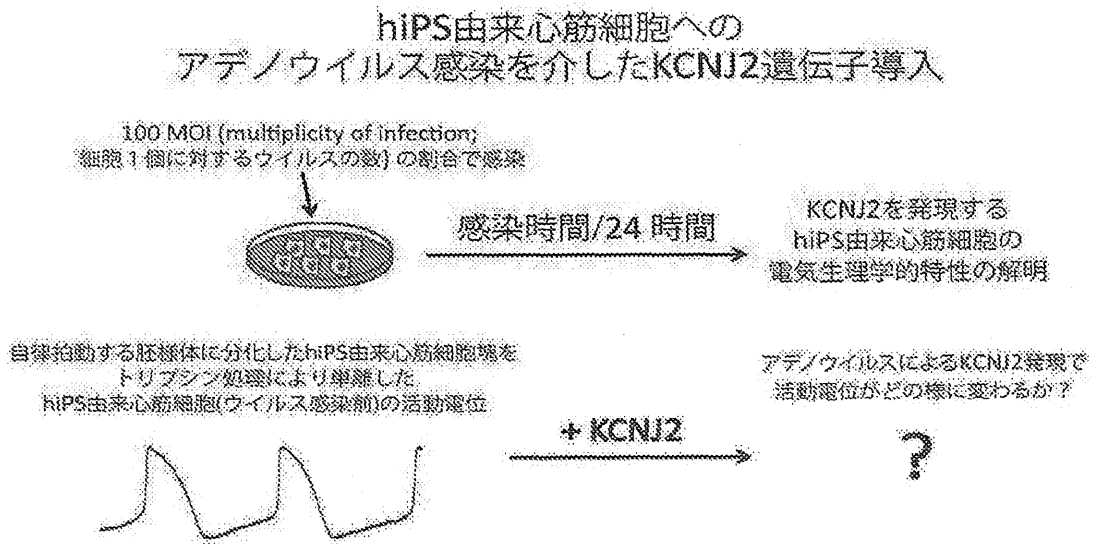
[図8]



[図9]



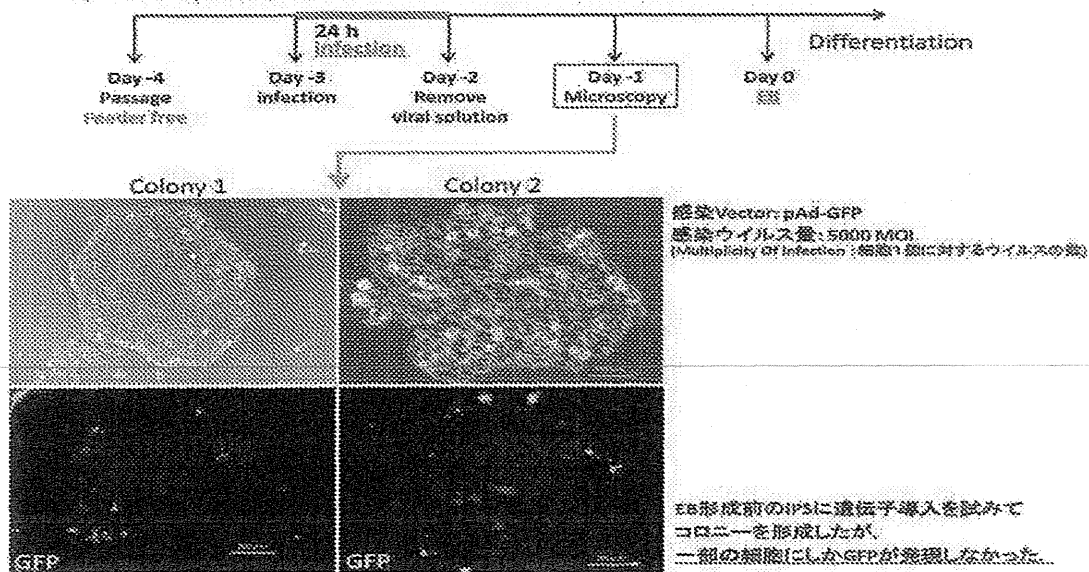
[図10]



[図11]

アデノウイルスを介した遺伝子導入法の検討 1

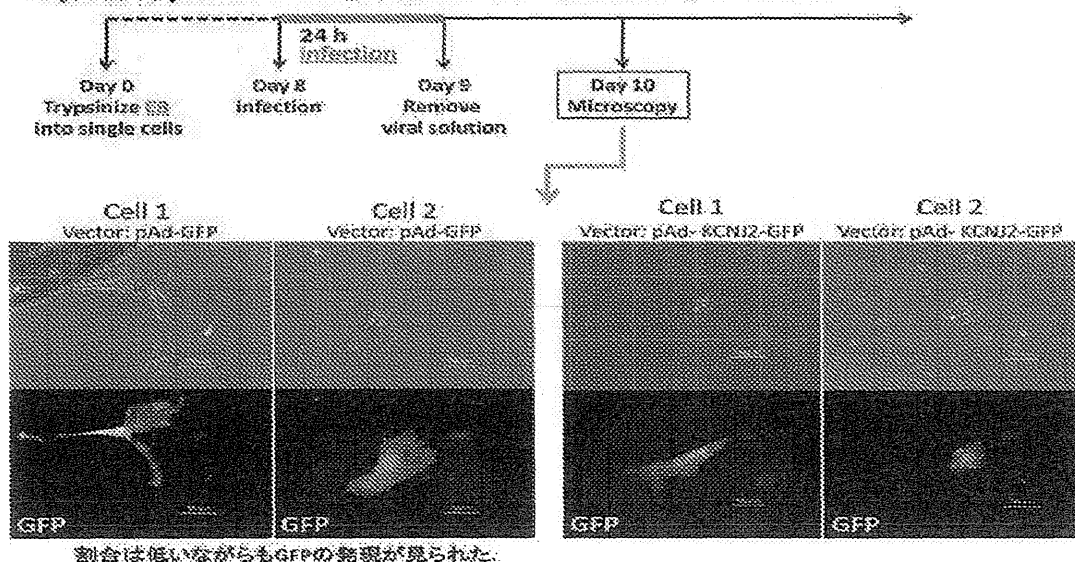
EB(胚様体)形成前のiPS cellにウイルスをinfection:



[図12]

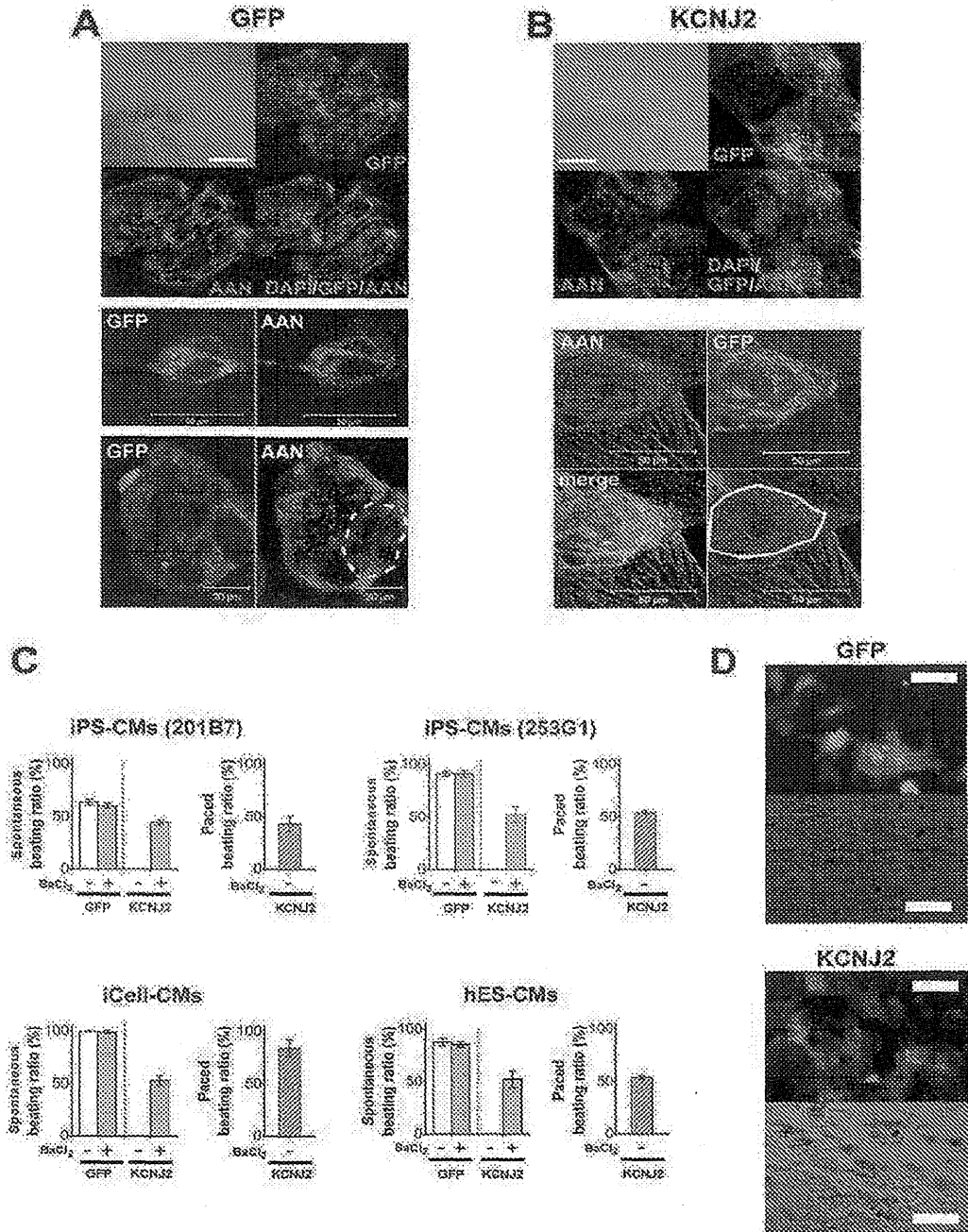
アデノウイルスを介した遺伝子導入法の検討 2

EB (胚様体)からiPS cellを単離した後にウイルスをinfection:



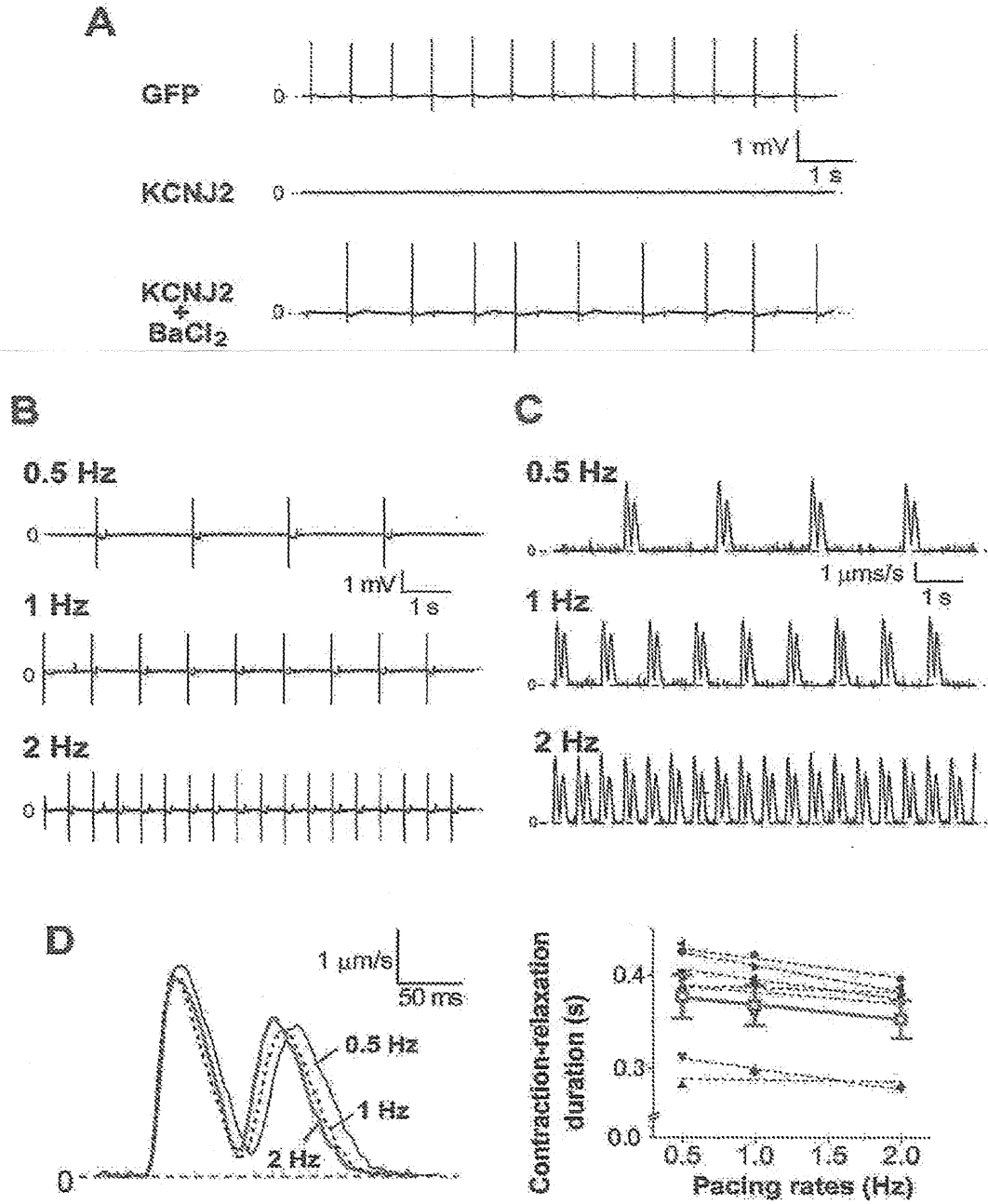
[図13]

KCNJ2の発現は、幹細胞由来心筋細胞の自律収縮を停止させる



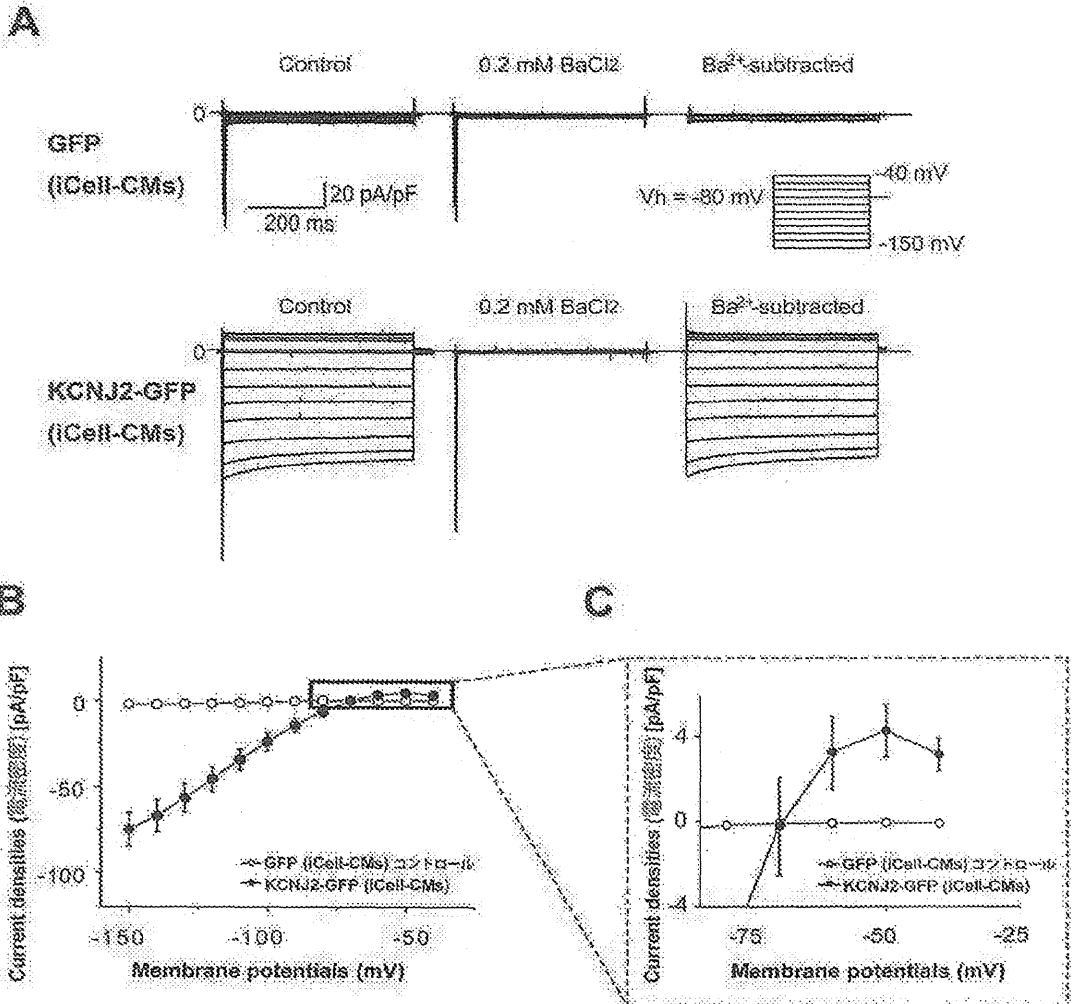
[図14]

KCNJ2発現及び非発現iCell心筋細胞の細胞外電位記録



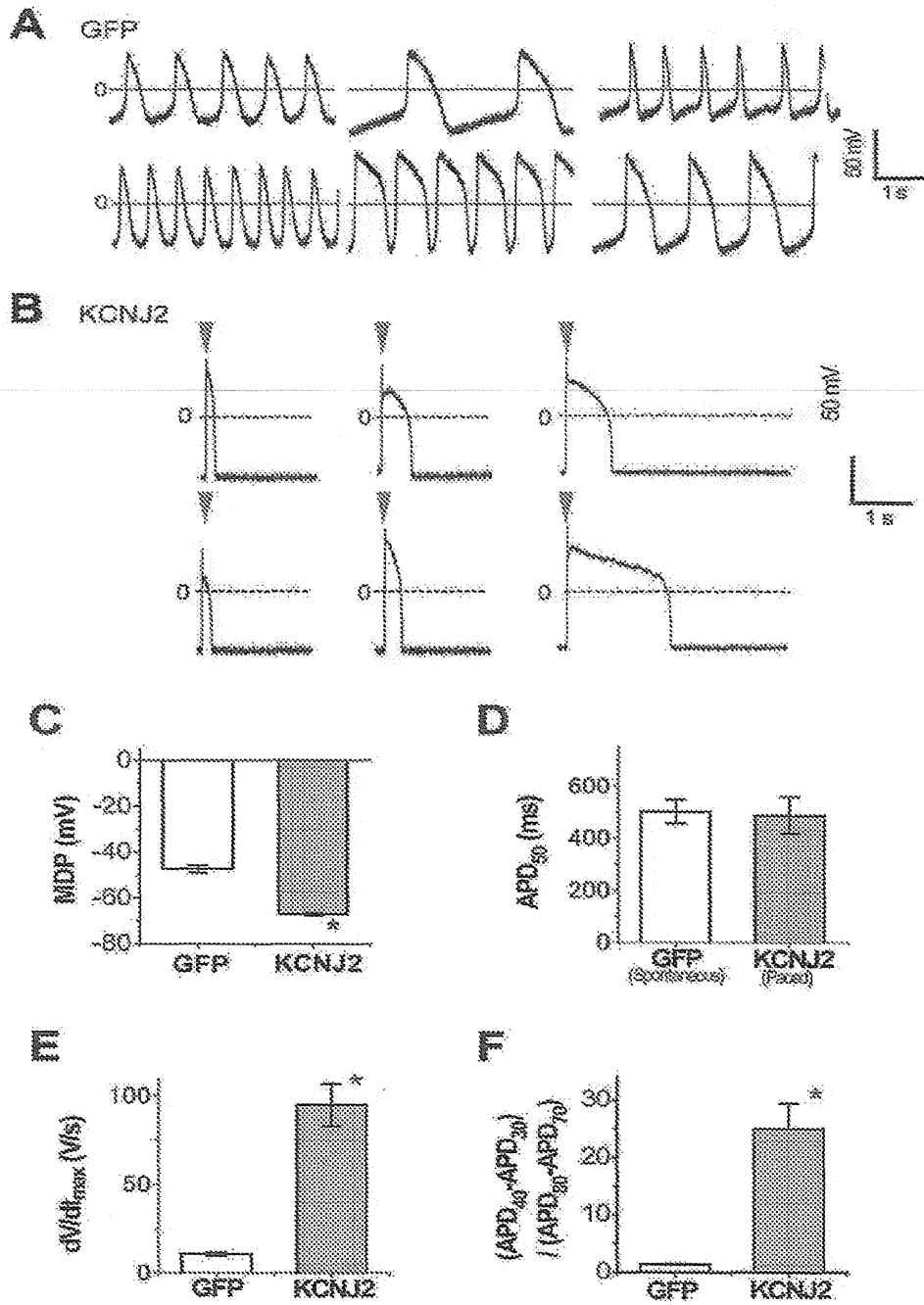
[図15]

KCNJ2遺伝子を導入した hiPS細胞由来心筋細胞の細胞膜電流測定



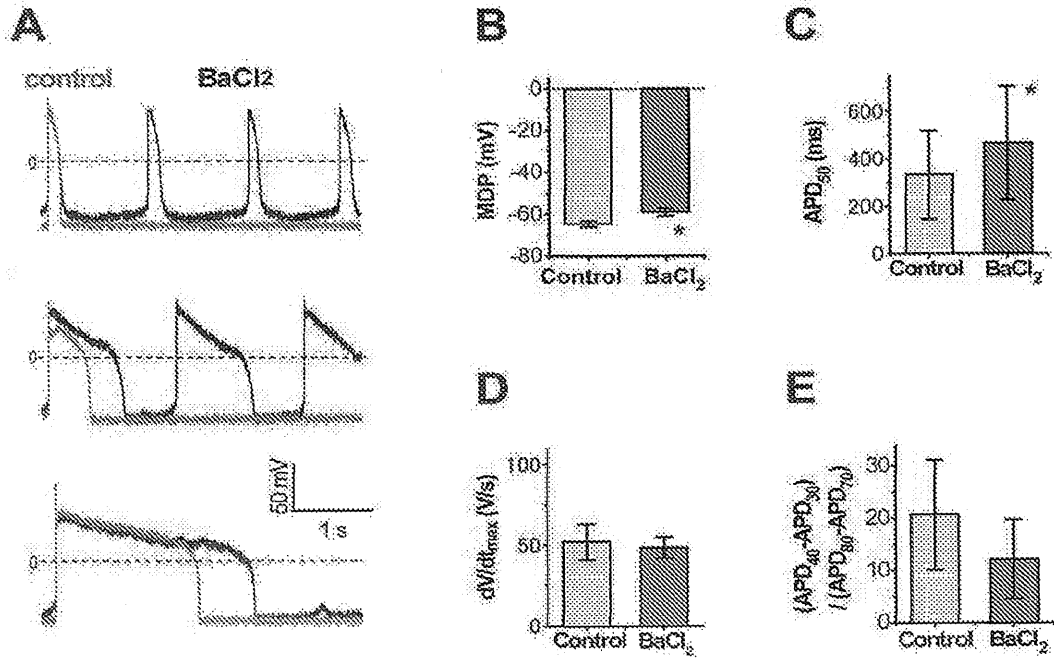
[図16]

KCNJ2遺伝子を過剰発現するヒトIPS由来心筋細胞の性質



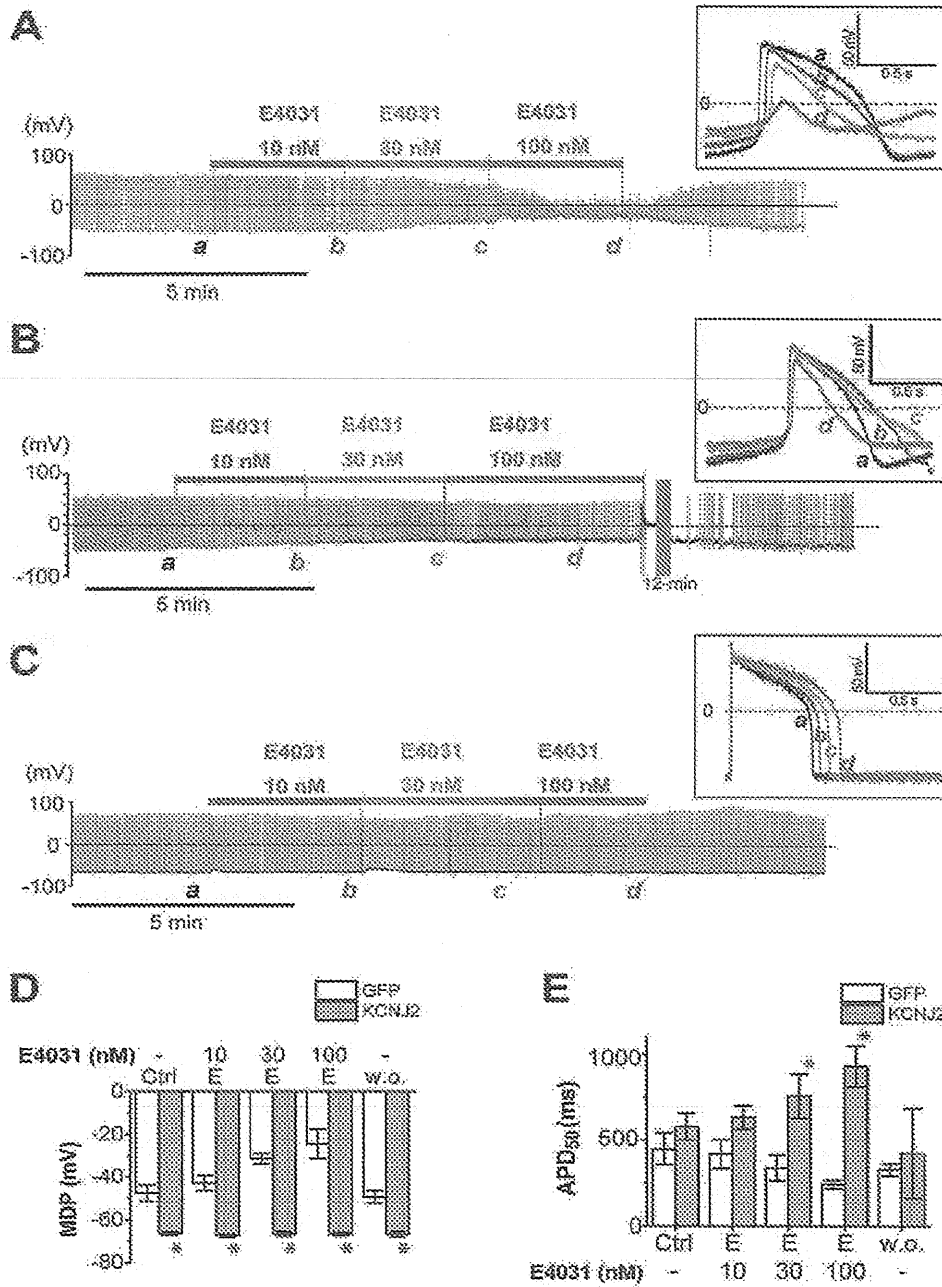
[図17]

KCNJ2発現ヒトiPS細胞由来心筋細胞の
活動電位に対するBaCl₂の影響



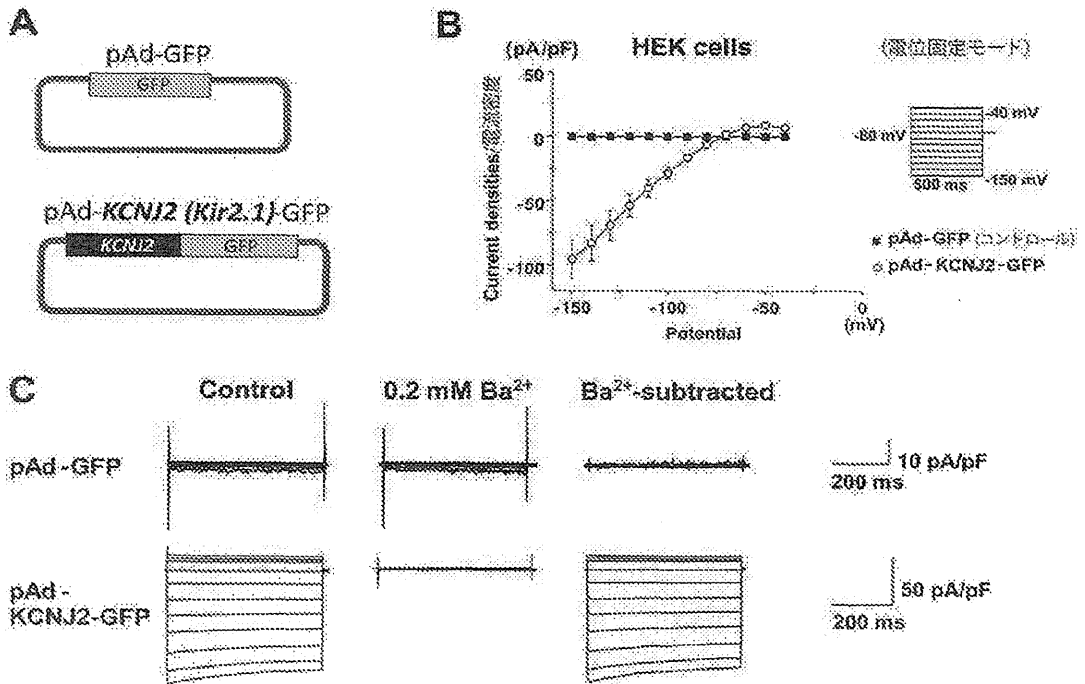
[図18]

KCNJ2発現hiPS由来心筋細胞に対するhERG阻害剤(E4031)の効果



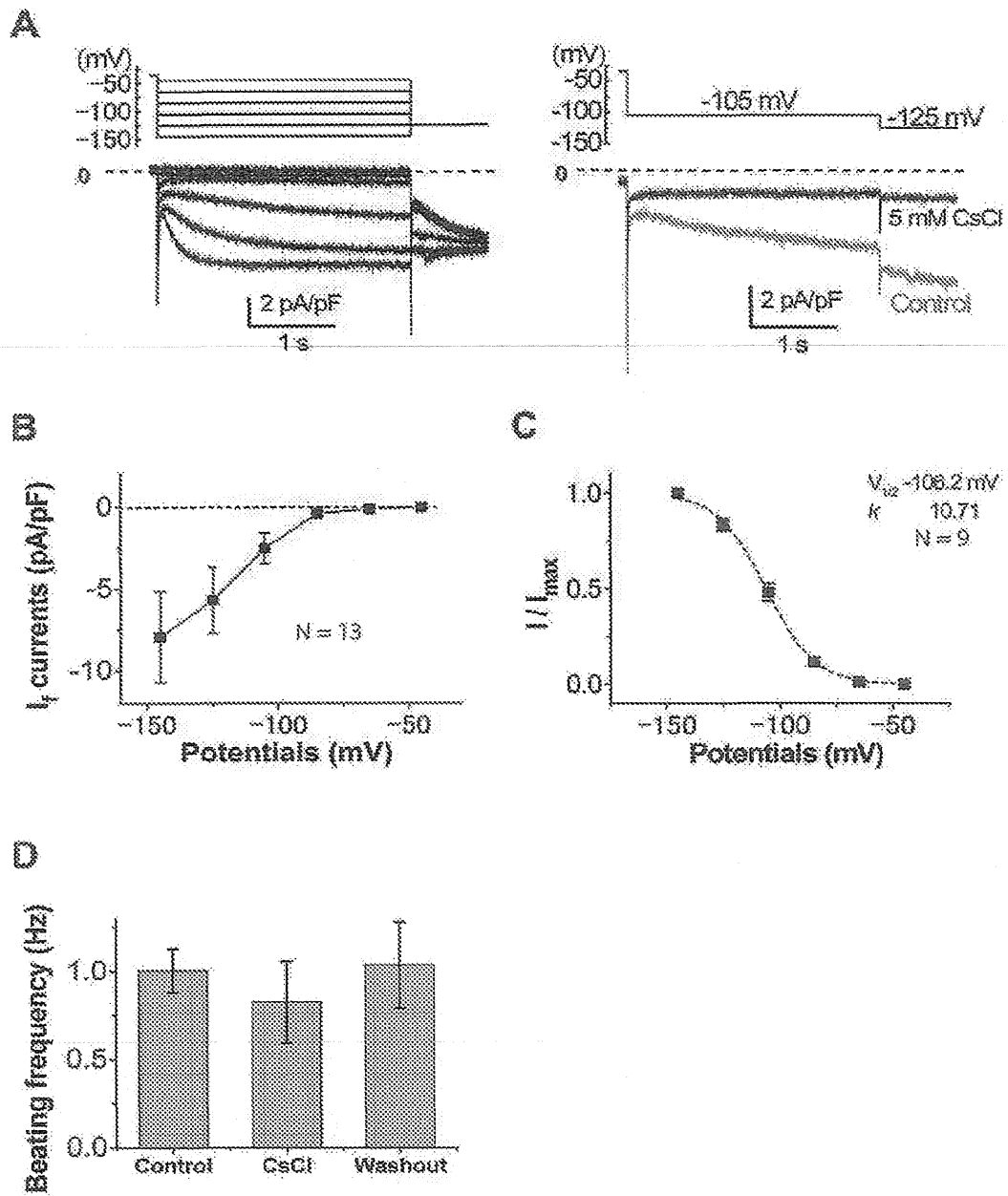
[図19]

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



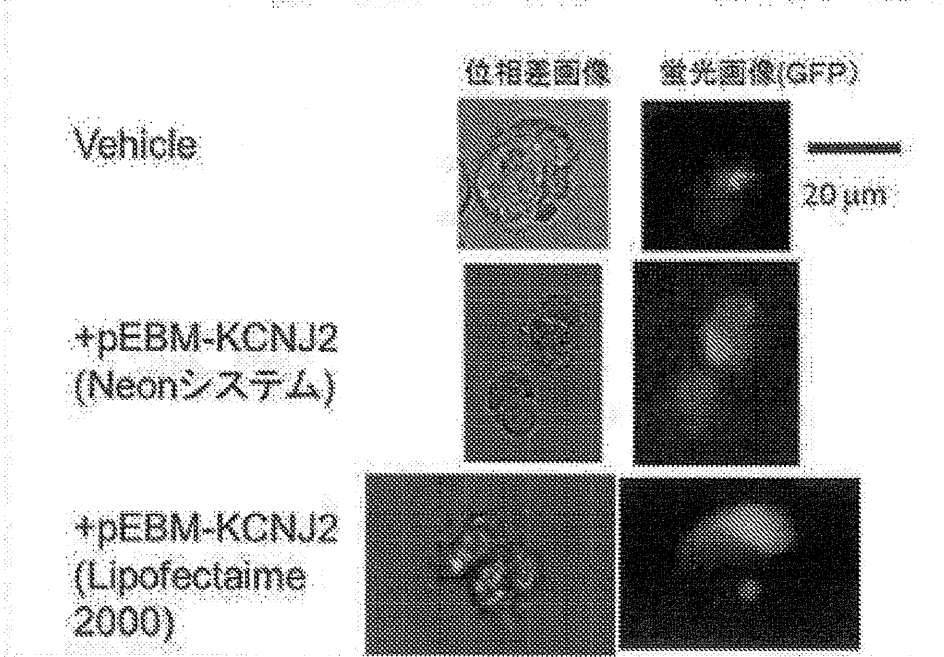
[図20]

IPS由来心筋細胞におけるI(f)チャネルの機能的発現



[図21]

エピソード型ベクターによるKCNJ2遺伝子導入



[図22]

エピソード型ベクターによるKCNJ2遺伝子導入によるヒトiPS心筋細胞の平均動き量の変化

