

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、ヒトチャン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ン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、心筋チャンネル制御因子や他のイオンチャン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ので、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。

ヒトiPS由来心筋細胞の心筋マーカーのリストの構築

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

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、インシリコツールを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-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-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 subunit |
| SCN1B | Nav 1.5 -1 subunit |
| CACNA1C | Cav1.2, -1C subunit |
| CACNA1D | Cav1.2, -1D subunit |
| CACNA2D1 | Cav1.2, -2/delta-1 subunit |
| CACNB1 | Cav1.2, -1 subunit |
| CACNB2 | Cav1.2, -2 subunit |
| CACNA1H | Cav 3.2, -H subunit |
| HCN1 | Pacemaker channel |
| HCN2 | Pacemaker channel |
| HCN4 | Pacemaker channel |
| KCNA4 | Kv1.4 subunit |
| KCNA5 | Kv 1.5 subunit |
| KCNAB1 | Kv 1.5 -1 subunit |
| KCNAB2 | Kv 1.5 -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 | -1A adrenoreceptor |
| ADRB1 | -1 adrenoreceptor |
| ADRB2 | -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。