

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のためのインシリコツールの開発

担当責任者 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

本分担研究は、iPS 由来心筋の成熟化技術を利用して、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株のデータを導入したインシリコモデルによる実験結果を臨床データへ橋渡しすることを目的とする。本研究計画の全期間を通じて、インシリコモデルで行った薬剤の催不整脈性の結果を成人心筋の結果へ変換するためのパラメーターを実験的に取得する。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気的性質は未熟型であるが、インシリコで成熟型に変換して、より臨床に即した心毒性評価が実現化できることが期待される。

本年度は、本研究で使用する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。そこで、本研究のために、ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を用いて、パッチクランプ法により、インシリコモデルに導入可能な実験データを取得し、インシリコモデルに導入するパラメーターを算出した。

**A. 研究目的**

本分担研究の目的は、iPS由来心筋の成熟化技術を利用して、ヒトiPS細胞由来心筋細胞株のデータを導入したインシリコモデルによる実験結果を臨床データへ橋渡しすることである。

心毒性評価の*in vitro*実験系としては、ヒトiPS細胞由来心筋の利用に注目が集まっている。毒性評価系としては、個々の細胞のばらつきが平均化さ

れる細胞シートが有利であり、実際、国内外で、ヒトiPS細胞由来分化心筋細胞を応用する動きが活発化している。

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ことが求められている。そこで、本研究では、インシリコ技術とヒトiPS技術を融合して次世代の心毒性技術を開発するために、iPS細胞分化心筋の株間のばらつきに注目した。未熟なヒトiPS分化心

筋細胞の細胞特性は細胞株間でばらつくとされており、薬物反応の結果に差がある可能性が指摘されている。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、同じ結論が得られることが望ましい。どの細胞株も利用可能とすることにより、国産iPS細胞の利用拡大につなげたい。

## B. 研究方法

この全体の流れの中で、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(図1)をインシリコモデルに橋渡しする技術を構築する。そのためには、まず生命現象(ここでは細胞内外の起電的イオン輸送)を数式で記述する必要があり、そのために単一細胞におけるパッチクランプデータを取得する。今年度は幹細胞由来市販ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を標本として、幹細胞由来心筋の未熟的な性質を表すための基礎データを取得した。取得したデータは、項目4 芦原のモデル構築に利用した。

細胞の調製：項目2の古谷と同じ実験プロトコルにより、細胞を解凍し再播種時にパッチクランプ用のディッシュに撒いた。グラスボトムディッシュ(イワキ, 日本: 35 mm 径)のガラス部分(10 mm 径)をラミニン(Sigma)でコートし、細胞再播種直前に PBS で洗浄した。

パッチクランプ実験：本年は、CDI社の iCell-CM を用いた。活動電位は穿孔パッチクランプ法(37 °C), 膜電流はホールセルパッチクランプ法(室温)

により、マニュアルモードで測定した。パッチクランプの増幅器は、Molecular Devices 社(CA, USA)の Axopatch200B を用いて、Degidata1440 でデジタル化した(サンプリング 2-5 kHz)。解析には、pClamp9.2 および 10.3 ソフトウェアを用いた。使用した溶液は以下の通りである。

### 活動電位測定：

細胞外液 (normal Tyrode; NT): 135 mM NaCl/ 0.33 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 5.4 mM KCl/ 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>/ 0.53 mM MgCl<sub>2</sub>/ 5.5 mM glucose/ 5 mM HEPES. (pH 7.4)

細胞内液：110 mM aspartic acid, 30 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM adenosine-5'-triphosphate magnesium salt, 5 mM creatine phosphate disodium salt, 5 mM HEPES, 10 mM EGTA. (pH 7.25) + 0.3-0.6 µg/ml amphotericin B を直前に添加。

### I<sub>K1</sub> 電流測定：

細胞外液：NT

細胞内液：amphotericin B なし  
0.2 mM BaCl<sub>2</sub> 感受性成分を算出。

### I<sub>f</sub> 電流測定：

細胞外液：NT

細胞内液：amphotericin B なし  
5 mM CsCl 感受性成分を算出。

## C. 研究結果

公開された特許内容の開発は、主に業務主任者・黒川と業務担当者・諫田によって遂行された。以下に、公開さ

れた特許の内容を簡単に説明する。

幹細胞由来分化心筋細胞に発現している内向き整流性カリウムチャネルの発現が低いことに注目し、本チャネルのサブユニットをコードする遺伝子(KCNJ2)を導入することにより、電気的特性を成熟化する技術を開発し、国際特許を公開した(図1)。ヒトiPS細胞由来心筋細胞にKCNJ2を過剰発現することにより、静止膜電位が深くなり自動能を失い、外部刺激を与えるとプラトー相がある心室筋様の活動電位が発生した(図2)。本成熟化技術によって得られたヒトiPS細胞由来心筋細胞はペーシングが可能であり、頻度依存性がある薬剤を評価する系が構築できた(図3)。

パッチクランプの電位固定モードにより $I_{K1}$ 電流を測定したところ、ヒトiPS細胞由来心筋細胞での発現レベルは非常に低いことが確認できた(図4)。KCNJ2の過剰発現によりタンパク発現は大きく増大し、ウェスタンブロットによる解析では、モルモット心室筋の約50倍のタンパク量であることを示した。一方、興味深いことに、パッチクランプ解析では、モルモット心室筋と同程度の機能発現であった(表1)。0.2 mM  $BaCl_2$ を処理して $I_{K1}$ 電流を阻害すると、自動能が発生した(図4)。さらに、ヒトiPS細胞由来拍動心筋細胞に5 mM  $CsCl$ を添加して $I_f$ チャネルを選択的に阻害しても、自律拍動は消失せず、拍動頻度が20%程度減少しただけであった(図5)。なお、成熟化処理の有無に関わらず、幼若心筋に特徴的に発現している $I_f$ 電流の成分が計測された(図5)。

#### D. 考察

本研究では、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)、学会等においても本技術に関する研究結果を発表した。本技術は、ヒトES細胞由来、胚葉体による分化誘導、化学的誘導など種々の幹細胞由来心筋細胞にも応用可能であった。今後は、この成熟型ヒト心筋細胞を成人心筋電気活動の実験モデルとして、インシリコツールの開発に応用する。

本年は、主として、成熟化技術の基礎的理解のために、 $I_{K1}$ 電流および $I_f$ 電流を計測し、それぞれのイオンチャネル電流が自動能に与える影響を調べた。今回、驚いたことに、KCNJ2遺伝子導入により $I_{K1}$ チャネルを強制発現させた場合にも、機能的には他のほ乳類心室筋と同レベルまでしか発現しなかった。この結果から、 $I_{K1}$ 電流量を一定にコントロールする仕組みが心筋細胞自体に存在することが示唆され、一つの可能性として、膜タンパクのトラフフィッキングによる制御が考えられる。実は、図1の共焦点画像からも膜以外にも細胞内にドット状にGFPシグナルが観察された。従って、他のグループによる従来研究のように、mRNA量の測定のみから得られた発現比は、現実の細胞特性を反映しない危険性がある。我々は、膜タンパク質を定量する永森らのプロテオミクスを取り入れることにより、より精確な実験データを取得することを可能にしている。

BaCl<sub>2</sub> による I<sub>K1</sub> 電流阻害によって自動能が復活したことから、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の自動能消失の直接的原因は KCNJ2 遺伝子導入により増加した I<sub>K1</sub> 電流成分の増加であることを見出した。増加した I<sub>K1</sub> 成分の電流量はほ乳類心室筋のレベルと同程度であり、本細胞モデルは、さほど実細胞からかけ離れているわけではないと考えられる。

一方、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞には、ペースメーカーチャンネルと呼ばれる I<sub>f</sub> チャンネルが機能的に発現していることを示した(図5)。I<sub>f</sub> チャンネルは幼若な心筋に特徴的に発現していることから、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞が幼若な性質を有するという過去の報告とも一致する。なお、I<sub>f</sub> 電流を 5 mM CsCl で完全に阻害しても自動能は消失しなかったことから、I<sub>f</sub> チャンネルは自動能の決定因子ではないことが示唆された。

今後は、他のイオンチャンネルも同様に解析し、モデル構築の実験データを取得する。次の機能解析の候補は Na<sup>+</sup> 電流と L 型 Ca<sup>2+</sup> 電流であり、古谷と共同して電気生理学的解析を行う。

## E. 結論

国際特許が公開されたヒト iPS 細胞を成熟化する技術について、単一細胞におけるデータを取得した。本年は、I<sub>f</sub> 電流ではなく、I<sub>K1</sub> 電流がヒト iPS 細胞由来心筋の自動能決定に大きく寄与していることを示し、電流密度などインシリコモデルに導入可能な実験データを得た。

## G. 研究発表

### 論文

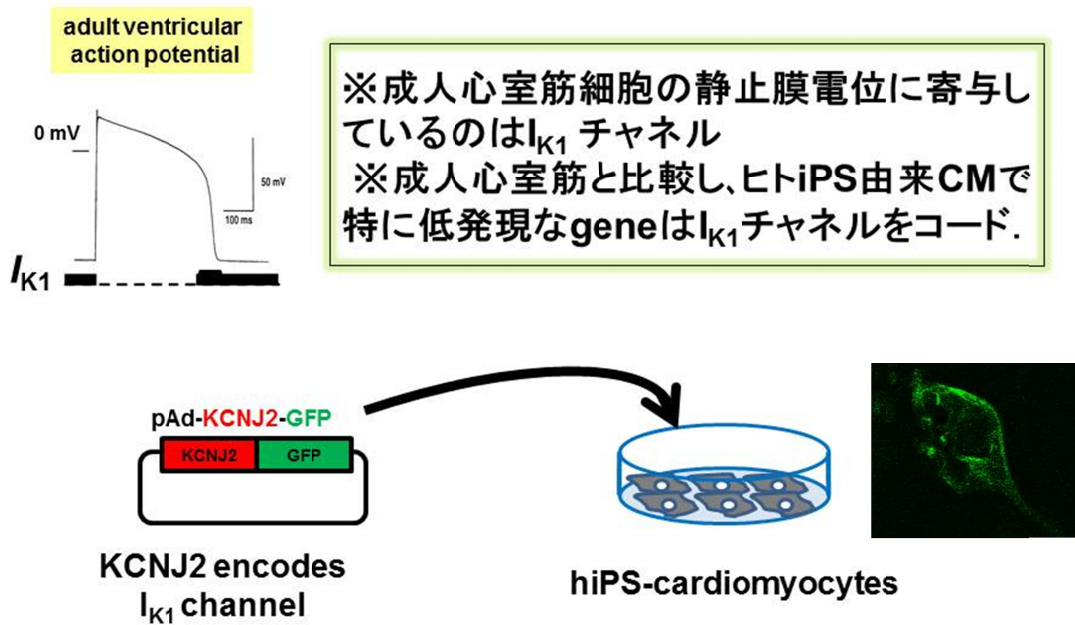
1. Hayakawa, T., Kunihiro, T., Ando, T., Kobayashi, S., Matsui, E., Yada, H., Kanda, Y., Kurokawa, J., Furukawa, T. (2014) Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: correlation and complementarity with extracellular electrophysiology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 77:178-191
2. 黒川洵子 (2014) *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、CBI 学会誌 4:7
3. 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(2014) 医薬品安全性評価におけるインシリコアプローチの可能性について考える、心電図 34:326-329.
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

#### 国内学会

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. 諫田泰成、関野祐子、古川哲史、黒川洵子：Role of substrate rigidity on function in human iPS cell-derived cardiomyocytes、第 87 回日本生化学会（2014,10,京都）
  3. 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）
  4. 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）
  5. 黒川洵子：幹細胞由来心筋細胞を用いた心臓薬理学研究の基礎から応用まで .第 6 回日本安全性薬理研究会（2015, 2, 東京）
  6. 林英里奈、藤塚美紀、古川哲史、黒川洵子：ペーシング可能なヒト iPS 細胞由来心筋標本を用いたドキシルピシンの薬理作用解析、第 88 回日本薬理学会（2015,3,名古屋）
  7. 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）
  8. 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）
  9. 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)
- 著書**
1. 黒川洵子（2015）iPS 細胞を用いた抗不整脈薬の心毒性評価 .In: 不整脈 2015 . 井上博（編）メディカルレビュー社、東京 in press. 分担執筆.
- H. 知的所有権の取得状況**
1. 黒川洵子、古川哲史、諫田泰成、関野祐子：正常な内向きのカリウム電流特性を有する iPS 細胞由来心筋モデル細胞（特開：WO2014/192312A1、公開日：2014/12/4）



(黒川, 諫田, 関野, 古川: WO2014/192312A1特開)

図 1 : 幹細胞由来分化心筋細胞を成熟化する技術 .

心室筋細胞の静止膜電位を安定化することに寄与している内向き整流性カリウムチャンネル ( $I_{K1}$  チャンネル) をコードする遺伝子 KCNJ2 をアデノウイルスベクターに導入した。マーカー遺伝子として GFP (EGFP) を用いることにより、KCNJ2 が発現している細胞を識別可能にしてある (共焦点画像)。

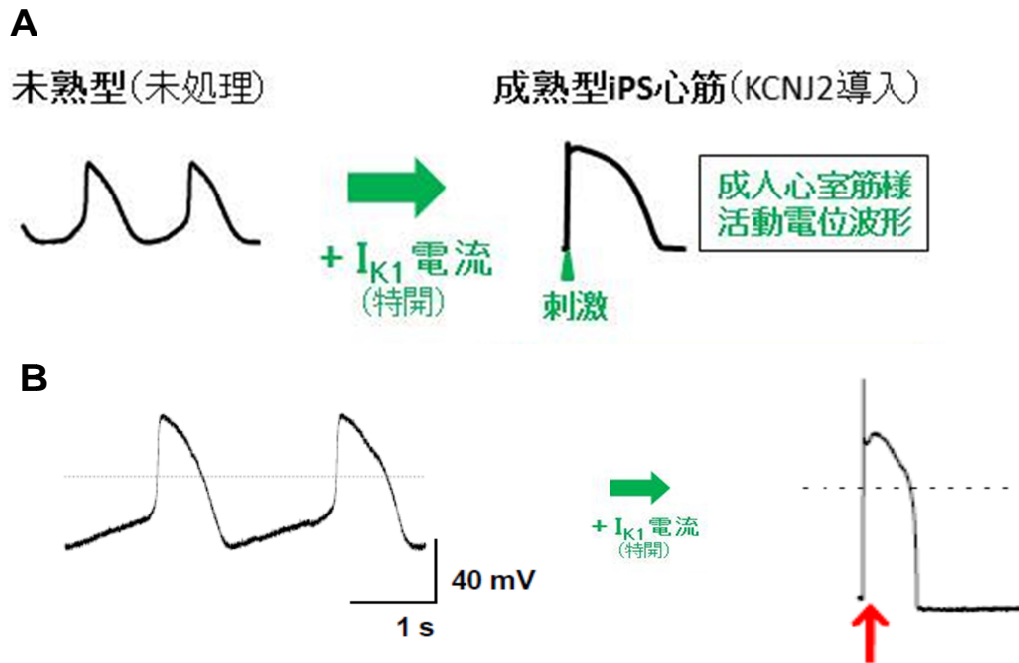


図 2 : ヒト幹細胞由来分化心筋細胞を成熟化する技術 .

A.概念図 . ヒト幹細胞由来心筋細胞は未熟型拍動心筋の電気生理学的性質を示している (図左) . ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に、心室筋に豊富に発現している内向き整流性カリウム ( $I_{K1}$ ) チャンネルをコードする遺伝子を導入すると、刺激に応じて成人心室筋様の活動電位がする (図右上) .

B. それぞれの条件における典型的活動電位波形 .

未熟型ネガティブコントロール (GFP 標識心筋 : 図左) : 自律的に発火した活動電位 . 成熟型 iPS 由来心筋 (KCNJ2 導入心筋 : 図右) : 刺激による活動電位を示す .

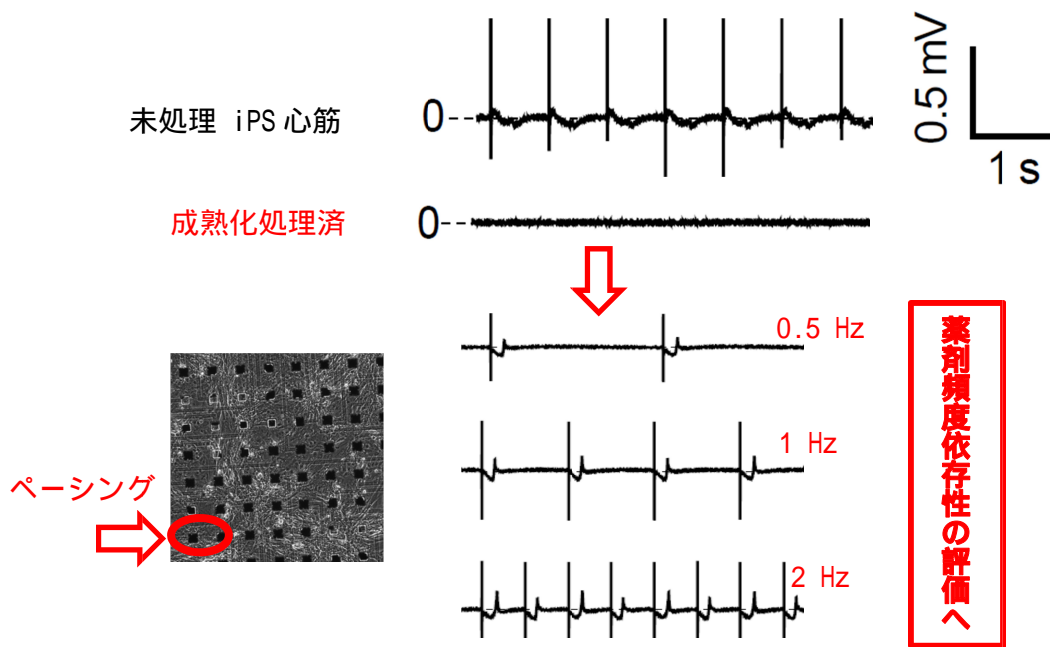


図3：心毒性の頻度依存性を評価する実験系。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートに対し成熟化処理を施すと、自律拍動能が消失し（上段）ペーシングによる心筋シート興奮を計測することが可能となった（下段）。従って、刺激頻度に応じた薬剤作用を解析することにより、不整脈発生に重要な指標である頻度依存性を評価することが可能となった。



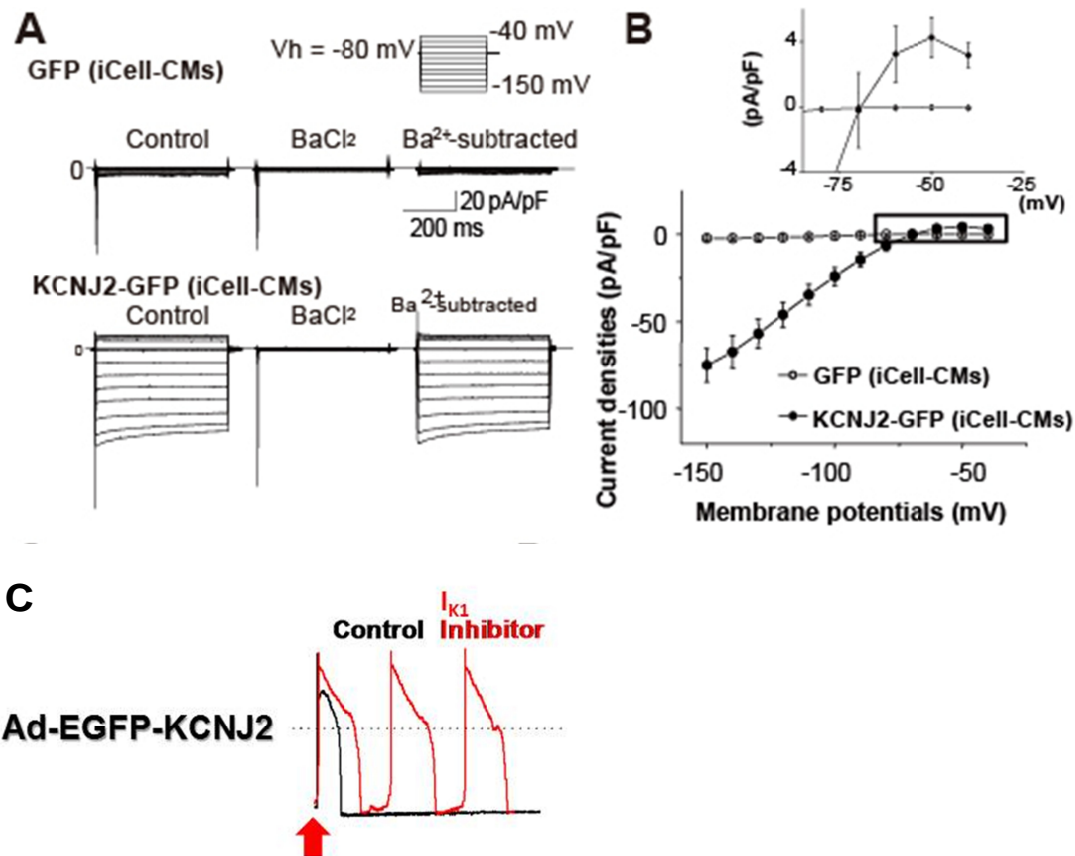


図 4 : KCNJ2 を強制発現したヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (iCell-CM) の電氣的性質 .

A.  $I_{K1}$  電流の典型波形 . 上段 : ネガティブコントロール (EGFP 発現) 下段 : KCNJ2 遺伝子導入 (KCNJ2-EGFP 発現) . 波形は右から , 薬剤なし (コントロール) 0.2 mM BaCl<sub>2</sub> 処置後 ( $I_{K1}$  電流選択的阻害) BaCl<sub>2</sub> によって阻害された成分 ( $I_{K1}$  電流成分) を示す . 従って , KCNJ2 遺伝子導入により , 典型的な内向き整流性を示す  $I_{K1}$  チャネル電流が機能的に発現した .

B. 電流電圧直線 . それぞれのテストパルスで計測されたピーク電流値をプロットした (N=9) . ○ : EGFP、● : KCNJ2 遺伝子導入 . 挿入図として、生理的な膜電位範囲

C. KCNJ2 を強制発現した iCell-CM の活動電位波形 . コントロール (阻害剤なし) では , 刺激 (赤い矢印) したときのみ活動電位が発生するが (トレース黒)  $I_{K1}$  選択的阻害剤 (0.2 mM BaCl<sub>2</sub>) では活動電位が自律的に発火した (トレース赤) .

刺激電位	未熟型 iCell-CM (GFP)	成熟型 iCell-CM (GFP-KCNJ2)	成体モルモット 心室筋細胞
	$I_{K1}$ 電流密度 (A/F)	$I_{K1}$ 電流密度 (A/F)	$I_{K1}$ 電流密度 (A/F)
-120 mV	$-1.8 \pm 0.6$	$-64.8 \pm 9.2$	約 - 40
-50 mV	$0.06 \pm 0.07$	$4.0 \pm 1.0$	約 3

表 1 : 心筋細胞における  $I_{K1}$  電流密度測定 .

ヒト iPS 由来心筋細胞 (iCell-CM, CDI) (GFP で標識したネガティブコントロールおよび KCNJ2 強制発現細胞, N=7-9) および参考値としてモルモット心室筋細胞のデータ (Yang DH et al. *J Physiol.* 2005;563:713-724 の figure から計測) を示す。

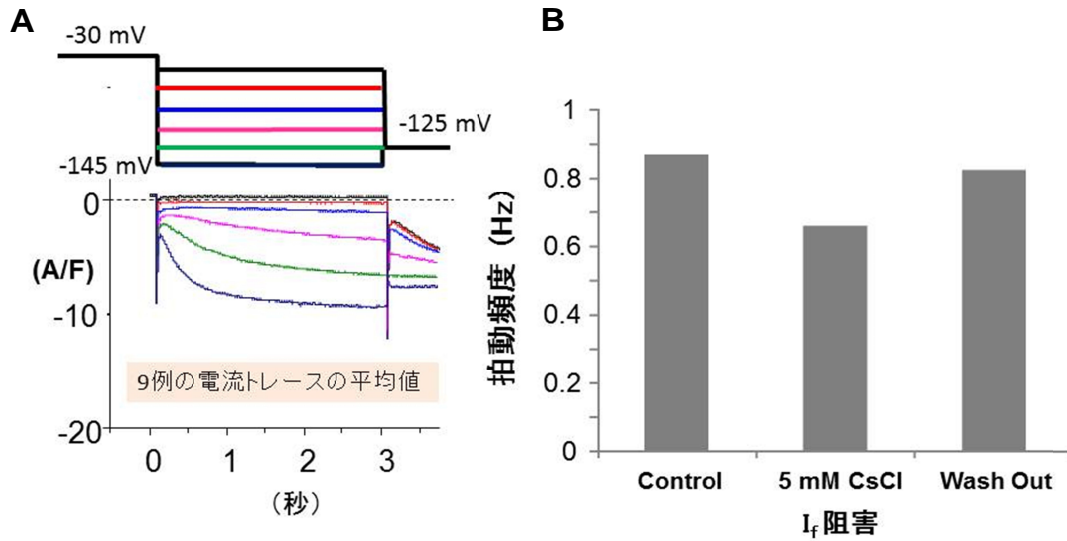


図5：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に発現している I<sub>f</sub> チャンネル電流の解析。

A. 過分極パルス ( - 145 ~ - 45 mV まで 20 mV おき ) により活性化した I<sub>f</sub> チャンネル電流トレース ( 9 例の平均値トレース ) . 上段：刺激パルス . 下段：刺激電位ごとに重ね描きした電流トレース。I<sub>f</sub> チャンネルに特徴的な遅い活性化キネティクスの内向きカチオン電流。

B. 自律拍動に対する I<sub>f</sub> チャンネル電流阻害の作用 . 細胞が拍動する様子のビデオ画像から拍動頻度を求めた。5 mM CsCl を細胞外に添加することにより、I<sub>f</sub> チャンネル電流を阻害したときの拍動頻度の変化を示した。