

平成 26 年度業務担当報告

インシリコヒトiPS細胞由来心筋細胞モデルの基盤構築

担当責任者 芦原 貴司
国立大学法人 滋賀医科大学
医学部 呼吸循環器内科 講師

本業務項目は、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の向上を目指し、in silico（インシリコ）でヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気活動を再現し、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を開発する。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、本委託研究で使用するヒト in silico（インシリコ）心筋モデルを選定するための調査及び実データを導入したシミュレーションを行い、ヒト心室筋モデルとして広く使用されている O'Hara-Rudy dynamic (ORd) モデルを選定した。

業務分担者：
江那かおり（滋賀医科大学）

A. 研究目的

本分担研究の目的は、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に、数理計算科学によるシミュレーションを利用したインシリコツールを開発することである。

生命現象を初めて数学的に記述したのは、Hodgkin 博士と Huxley 博

士による 1952 年に発表された 5 論文であるとされる。1960 年代初頭には、心臓の電気活動のシミュレーションが初めて発表された。その後、1991 年に Neher と Sakmann がノーベル賞をとったパッチクランプ法により、精度が高い実験データが多く集まったこともあり、心臓電気活動のインシリコモデル開発は大きく発展した。歴史ある分野であるが故に、数多くのモデルが開発された（表 1）。

シミュレーションを用いた数理計

算科学的技術を創薬における科学的アプローチの俎上に乗せるためには以下の項目が求められている。

より一般化した条件でも同じ答えが得られる。

臨床や動物実験から得られた経験則と矛盾しない。

客観的事実に基づき、理路整然と説明している。

再現性が高く、追試できる。

この基準は、心毒性評価に応用する際にも当てはまり、本研究でも常に留意していく。

心筋細胞モデルは非常に複雑化しており、パラメーターの改変をしても数学的に発散してしまい、同じ値を返さないことが良くある。これでは追試ができなくなる。従って、いくつかの良く使用されるモデルを基に改変を加えて、自分が検討したい項目に特化したインシリコモデルを作成するのがよい。また、モデルの系譜によって、パラメーターや微分方程式も異なるため、基盤となるモデルの選定は非常に重要である。

本年は、ヒト iPS 分化心筋細胞から得られた実験データを導入することにより、現実と矛盾のない適正な活動電位変化を記述することができるモデルを選定することに集中した。

B. 研究方法

成人心室筋細胞インシリコモデルとして、Priebe-Beuckelmann (PB)モデル (Circ. Res., 1998: 82:1206-1223) と O'Hara-Rudy dynamic (ORd) モデ

ル (PLoS Comput. Biol., 2011: 7(5): e1002061) を検証した。I_f や I_{K1} チャネル電流測定の実験データを基に、インシリコモデルのパラメーターを改変して、ペースメーカー能が見られるかどうか調べた。

オリジナルの ORd モデルには、I_f チャネル電流は含まれていなかったため、今回新たに、下記の I_f の数式をモデルに組み込んだ。

$$I_f = 0.07 \cdot (V_m - 0.3833 \cdot E_{Na} - 0.6167 \cdot E_K) \cdot y$$
$$y_{\infty} = 1 / (1 + \exp((V_m - 100) / 15))$$
$$\tau_y = 7000 / (\exp(-2.9 - 0.04 \cdot V_m) + \exp(3.6 + 0.11 \cdot V_m))$$

V_m (mV) : 膜電位、E_{Na} (mV) : I_f の Na⁺逆転電位、E_K (mV) : I_f の K⁺逆転電位、y_∞ : y ゲートの定常値、τ_y : y ゲートの時定数を示す。

C. 研究結果

インシリコヒト心室筋細胞モデルであるPBモデルおよびORdモデルを基に、iPS細胞由来心筋細胞様の自動能がある活動電位波形を再現することに成功した(図2, 3)。いずれのモデルにおいても、I_{K1}チャネルコンダクタンスの減少がペースメーカー機能の発生に大きく影響していた。一方で、I_fチャネルコンダクタンスはあまり影響しておらず、ウェット実験の結果と良く一致していた。パラメーター可変に関する拡張性に優れ、活動電位波形がより現実の細胞の結果と類似していたため、ORdモデル

(図3)を基盤として、モデルを構築することに決定した。

D. 考察

ヒトiPS細胞由来心筋細胞様活動電位波形において、 I_f チャネル電流成分の影響はほとんどないが、 I_{K1} チャネル電流成分が大きく影響し、薬剤による反応にも影響することが示唆された。今後は、今年度のシミュレーション結果を基にして、次年度に作成することを予定している多細胞モデルの作成法の検討を行う。

E. 結論

今後は、ORdモデルを基盤として、ヒトiPS由来心筋モデルを構築することに決定した。

G. 研究発表論文

1. 芦原貴司 : TECH PLUS: In silico心室筋モデルにより検討したiPS細胞由来心筋細胞シートの応用可能性 . 不整脈 +PLUS 2014;8:12-13.
2. 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 : 霧島会議の総括および今後の展望 : コンピュータ(in silico)安全性薬理学ワーキンググループ報告 : 医薬品安全性評価における in silico アプローチの可能性について考える . 心電図 2014;34(3):326-329.

3. 芦原貴司 : ICH S7Bに関する今後の展望 : 新しいパラダイムの主な方向 : In silicoによる心臓安全性薬理評価 . 心電図 2014;34(3):291-296.
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

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. 芦原貴司 : フォーカストセッション「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」: バーチャルiPS細胞由来心筋細胞への飽くなき挑戦 . CBI学会2014年大会(情報計算化学生物学会)(2014,10,東京)
3. 芦原貴司 : Session 1: Integrated Cardiac Safety: Scientific Update: Potential applications of heart simulation to the safety pharmacology study in the future. 5th DIA Cardiac Safety Workshop in Japan, (2014,10,東京)
4. 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)
5. 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)
 6. 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)
 7. 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)

主な心筋細胞モデル

Myocardial Cell Model

- 神経モデル Neural Model
 - FitzHugh-Nagumo (1961): AERP only
 - Modified FitzHugh-Nagumo (1993): +RERP
- プルキンエ細胞(線維) Purkinje Cell (Fiber)
 - Noble (1962)
 - McAllister, Noble and Tsien (1975)
 - DiFrancesco and Noble (1985): Mammalian
 - Aslanidi, et al. (2009): Canine
- 洞結節 Sinus Node
 - Yanagihara, et al. (1980): Rabbit
 - Noble and Noble (1984): Rabbit
 - Demir, et al. (1994): Mammalian
 - Zhang, et al. (2000): Rabbit
 - Chandler, et al. (2009): Human
- 心房筋 Atrium
 - Hilgemann and Noble (1987): Rabbit
 - Nygren, et al. (1998): Human
 - Courtemanche, et al. (1998): Human
 - Ramirez, et al. (2000): Canine
- 肺静脈 Pulmonary Vein
 - Seol CA, et al. (2007): Rabbit
- 心室筋 Ventricle
 - Beeler and Reuter (1977): Mammalian
 - Luo and Rudy (1991, 1994): Mammalian
 - Demir, et al. (1996): Canine
 - Priebe and Beuckelmann (1998): Human
 - Winslow, et al. (1999): Canine
 - Faber and Rudy (2000): Guinea Pig
 - Bernus, et al. (2002): Human
 - Ten Tusscher, et al. (2003, 2006): Human
 - Matsuoka, et al. (2003, 2004): Guinea Pig
 - Iyer, Mazhari, and Winslow (2004): Human
 - Mahajan A, et al. (2008): Rabbit
 - Hund and Rudy (2004, 2009): Canine
 - Grandi, et al (2010): Human
 - O' Hara and Rudy (2011): Human
 - Asakura, et al. (2014): Human
- 電気刺激用 For electrical stimulation
 - Drouhard and Roberge (1982): Modified Beeler and Reuter → BR-DR model
 - Ashihara, et al. (2001): Modified Luo and Rudy → LR-A model
 - Ashihara and Trayanova (2004): Modified Faber and Rudy → aLRd model

表 1：主な心筋細胞モデル。

括弧内に発表された年を記載している。ヒト心筋モデルは赤字で表示している。国内研究者による研究は、オレンジのハイライト表示をしている。

Luo-Rudy dynamic 2000 Model

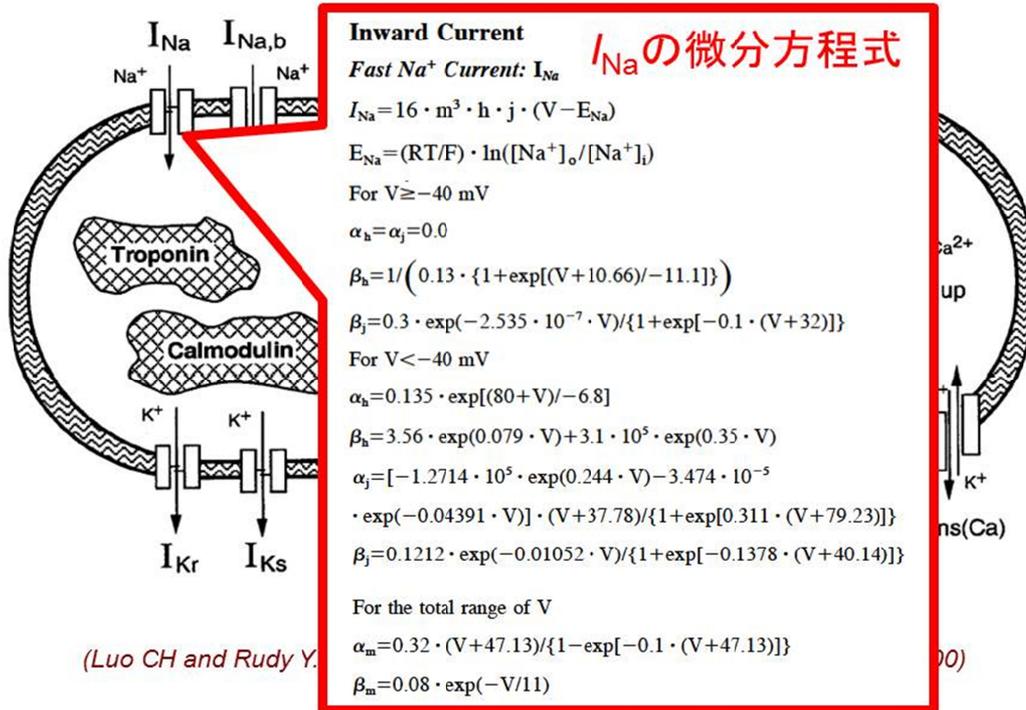
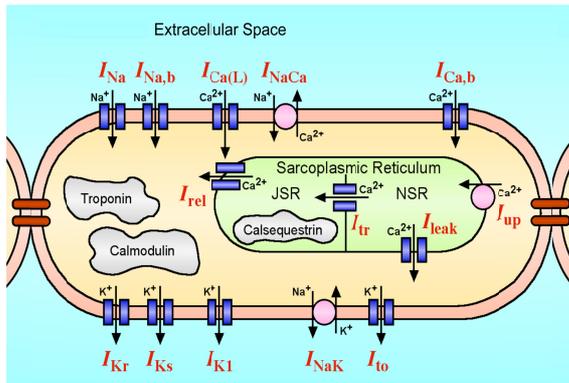


図 1 : 心筋ナトリウムチャンネルを記述する微分方程式 .

A**B**

ヒト心室筋細胞モデル

iPSC-CM モデル

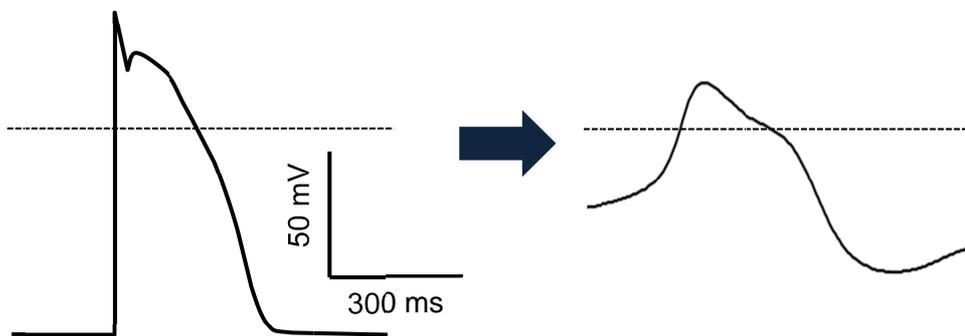
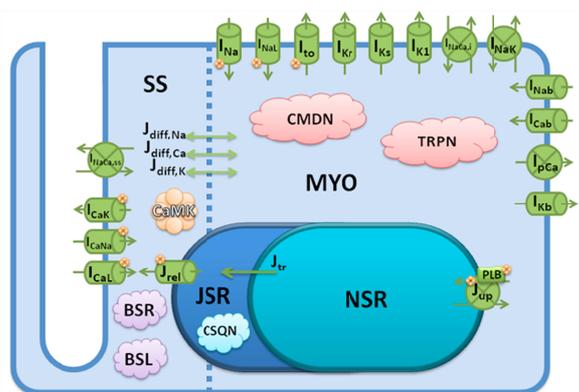


図 2 : Priebe-Beuckelmann (PB) モデルによる活動電位シミュレーション。

A. モデルの概略図。

B. ヒト iPSC-CM (iPS 細胞由来心筋細胞) シミュレーション : PB モデル (左) を基に、 I_{K1} 電流の減少及び I_f 電流追加等の改変を加えた (右)。

A



B

ヒト心室筋細胞モデル

iPSC-CM モデル

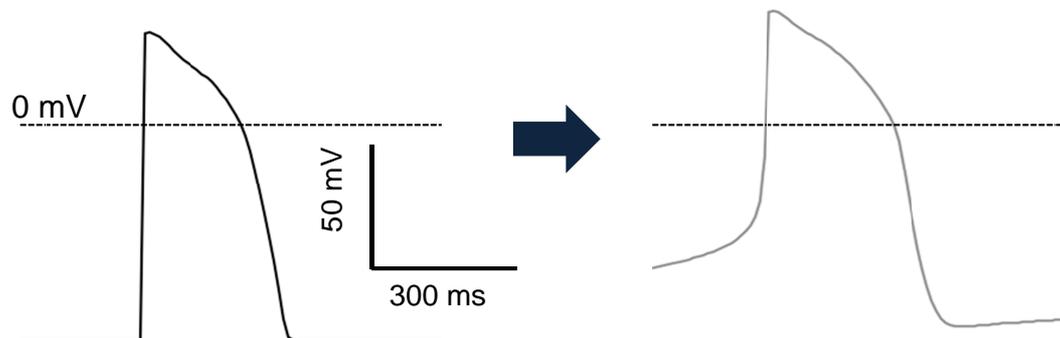


図 3 : O'Hara-Rudy dynamic (ORd) モデルによる活動電位シミュレーション .

A. モデルの概略図。

B. ヒト iPSC-CM (iPS 細胞由来心筋細胞) シミュレーション : ORd モデル (左) を基に、 I_{K1} 電流の減少及び I_f 電流追加等の改変を加えた (右)。