

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に関する調査

担当責任者 諫田 泰成  
国立医薬品食品衛生研究所  
薬理部 第二室 室長

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（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、分化誘導した iPS 心筋および市販の分化心筋に関する品質評価を行った。その結果、iPS 心筋は電気生理学的に未熟であることを明らかにした。そこで、成熟化させる方法の開発に取り組み、キーとなる遺伝子を見いだした。今後は、成熟化技術を基に細胞間差を克服できるような手法の開発を行う。

業務分担者：黒川洵子（東京医科歯科大学）

業務分担者：李敏（東京医科歯科大学）

業務分担者：安東朋子（東京医科歯科大学）

業務分担者：林英里奈（東京医科歯科大学）

**A. 研究目的**

本分担研究の目的は、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。

そのためには心室筋型ヒト心筋細胞と iPS 由来心筋細胞の電気生理学的な性質に違いがあり、iPS 心筋は未

熟であることを明らかにしてきた。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、ヒト iPS 分化心筋細胞を利用して成熟化を誘導する技術が重要である。

そこで今回この目的を達成するために、我々は内向き整流  $K^+$ 電流 ( $I_{K1}$ ) に対する  $K^+$ チャネル Kir2.1 をコードする遺伝子の KCNJ2 に着目して移管検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) iPS 細胞

iPS 細胞 (201B7 株) は理研バンクより入手した。フィーダー存在下でリプロセル培地に bFGF を加えて培養した。

### 2) 分化心筋細胞

市販の分化心筋細胞の中で、Cellular Dynamics International (CDI) 社の iCell 心筋細胞を用いた。

### 3) パッチクランプ

細胞内外に生理学的溶液を用いて、穿孔パッチクランプ法 (アンホテリシン B) の電流固定モードにより、単一細胞の活動電位を計測した。詳細は項目 1 と同じ。

## C. 研究結果

iPS 細胞から胚様体 (EB : Embryoid body) を形成させ、得られた iPS 心筋には、結節型、心房筋型、心室筋型の活動電位特性を示す細胞が混在し、活動電位の幅に大き

なばらつきが認められること、静止膜電位が浅いことを見いだした (図 1)。次に元の株によるのか検討するために、市販されている iPS 心筋を調査した (表 1)。その結果、CDI 社の iCell 心筋が広く流通していたことから市販のモデルとして選定し、電気生理学的な特性を評価した。その結果、201B7 株由来の iPS 心筋と同様に静止膜電位が浅いことを明らかにした。図 3 にヒト心筋と比較してした結果を示す。成人ヒト心筋細胞は発生の過程で自動能力を失い、刺激伝導系から電気刺激を受け取って活動電位を形成することから、iPS 心筋細胞は幼若な胎生初期の心筋細胞に近い性質を持つことが考えられた。

そこで、内向き整流  $K^+$ 電流 ( $I_{K1}$ ) に対する  $K^+$ チャネル Kir2.1 をコードする遺伝子 KCNJ2 に着目した。アデノウイルスを用いて iCell 心筋に導入したところ、静止膜電位が深くなり、電気生理学的に成熟することが示唆された (項目 1 および図 4)。さらに、選択的 hERG 阻害剤である E-4031 の添加により、APD50 が濃度依存的に延長した (図 4)。

## D. 考察

本研究により、iPS 心筋をより成体組織に近づけるような成熟化技術を開発した。

最近、胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来心筋細胞は、Kir2.1 チャネル遺伝子の導入により、強い  $Ba^{2+}$  感受性  $I_{K1}$  電流が発生し、自律拍動性を失い静

止状態に変化することが示された (Lieu DK, et al., Circ Arrhythm Electrophysiol. 6:191-201(2013) )。しかしながら、ヒト iPS 心筋細胞とヒト ES 心筋細胞では、APD50 に、約 1.37 倍の開きがあることから(iPS 由来 :  $382 \pm 38\text{ms}$  , n=36、ES 由来 :  $278 \pm 28\text{ms}$  , n=64 ) [ Lopez-Redondo F, Kurokawa J, et al., Human ES- and iPS-derived cardiomyocytes. A comparative electrophysiological study. 57th Biophysical Society Annual Meeting, Philadelphia, Biophys J, 104, 298a. (Feb 3-6, 2013) ] 両者における電気生理学的性質の差が示唆される。また、iPS 心筋細胞において、Kir2.1 チャンネルを強発現させる系が検討されたという報告はなく、医薬品の催不整脈作用の評価に対する検証もなされていない。本研究で開発した成熟化した細胞では、E-4031 の作用に濃度依存性が見られたことから (図 4 ) より定量性が高い作用解析が可能となると期待できる。

現在、JiCSA で iPS 細胞の医薬品の催不整脈作用の評価を進めているが、iPS 細胞の株間差の問題が起きる可能性がある。上記の成熟した iPS 細胞によりさらに予測性が向上するのか興味深い。

## E. 結論

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。

## 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. **諫田泰成**、ヒト iPS 細胞を用いた成熟心筋細胞の開発、心電図, 34, 306-309 (2014).
3. 澤田光平、松尾純子、長田智治、吉田善紀、白尾智明、佐藤薫、**諫田泰成**、関野祐子：霧島会議 Stem Cell Safety Pharmacology Working Group まとめ - ヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞を用いた催不整脈作用検出とその課題 -、心電図 34:306-9 (2014).
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. 諫田泰成、関野祐子：in vitro cardiac safety testing using iPS cells、第 5 回 DIA cardiac safety workshop（2014,10,東京）
5. 藤塚美紀、中井雄治、諫田泰成、永森収志、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）
6. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞を用いた新たな安全性薬理試験の開発、日本実験動物代替法学会第 27 回大会（2014,12,横浜）
7. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験の開発、東京理科大学トランスレーショナルリサーチセンター第 1 回公開セミナー

（2015,1,千葉）

1. 松尾純子、宮本憲優、小島敦子、諫田泰成、澤田光平、有村由貴子、鈴木晶子、吉福智子、関野祐子：薬物の心筋再分極過程に対する作用：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートでの評価、第 88 回日本薬理学会（2015,3,名古屋）
2. 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)

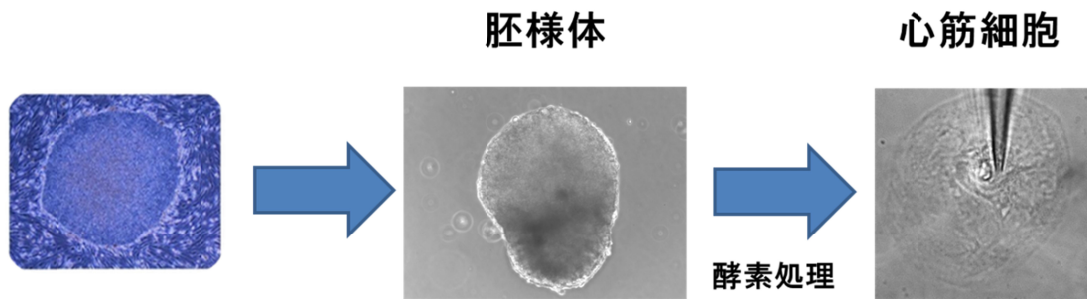
#### **著書**

1. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞を用いた  
心毒性試験の現状と課題、谷本学  
校毒性質問箱 16: p91-94 (2014).

#### **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

**A**



**B**

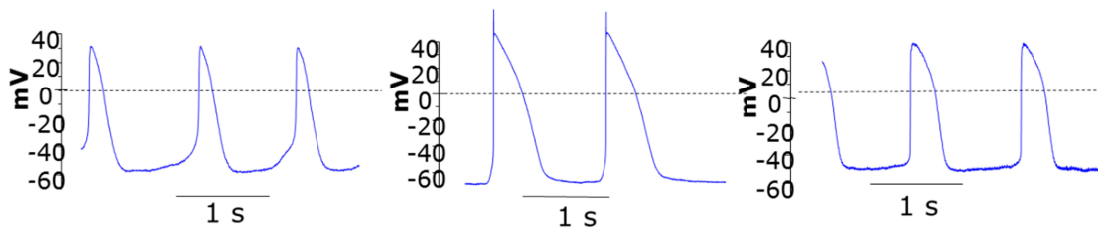


図1 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学特性

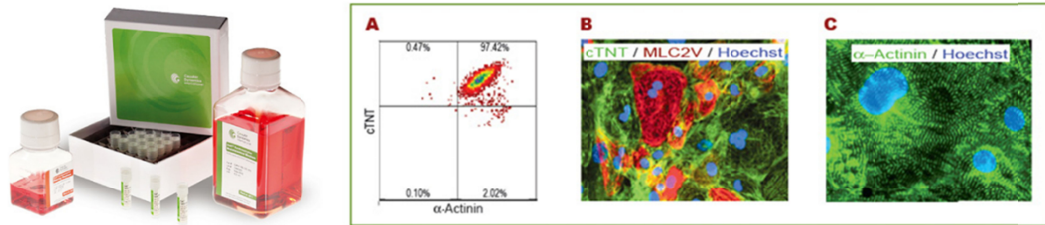
現在市販されていて薬理実験に利用可能な主なヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞を示す

分化心筋細胞	販売会社
iPS cell-derived cardiomyocytes, iCell Cardiomyote  Cor.4U Human iPS Cell-Derived Cardiomyocytes Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes  Stem cell derived cardiomyocyte product, hiPS-CMC	Cellular Dynamics International (CDI)  Axiogenesis  GE Healthcare  Celectis/Takarabio
ReproCardio	Reprocell

表1 ヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞

安全性薬理実験に利用可能な市販のヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞のリスト。

**A**



**B**

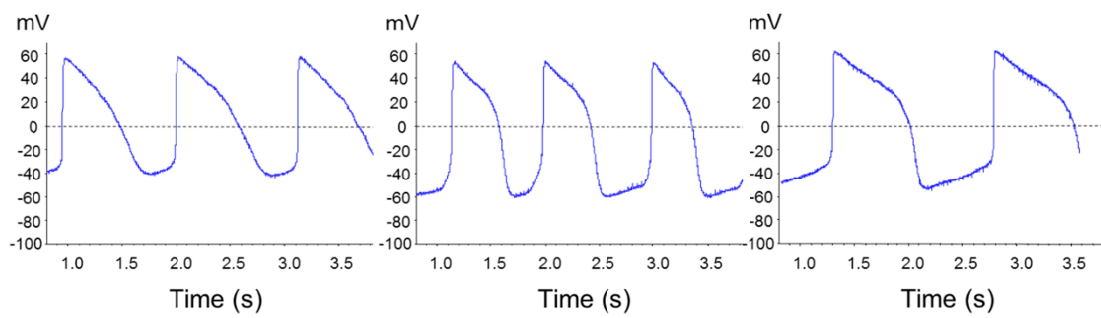


図2 iCell 心筋の活動電位

A) iCell 心筋は 97% 以上の細胞が心筋マーカー陽性である

B) 代表的な活動電位波形の例。



## 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 :  $-80\text{mV}$  ~  
(MDP)

### hiPS由来心筋細胞

•無刺激にて自律拍動

•最大拡張期電位 :  $-40 \sim -50\text{mV}$   
(MDP)

図3 心室筋型ヒト心筋細胞と iPS 由来分化心筋の比較

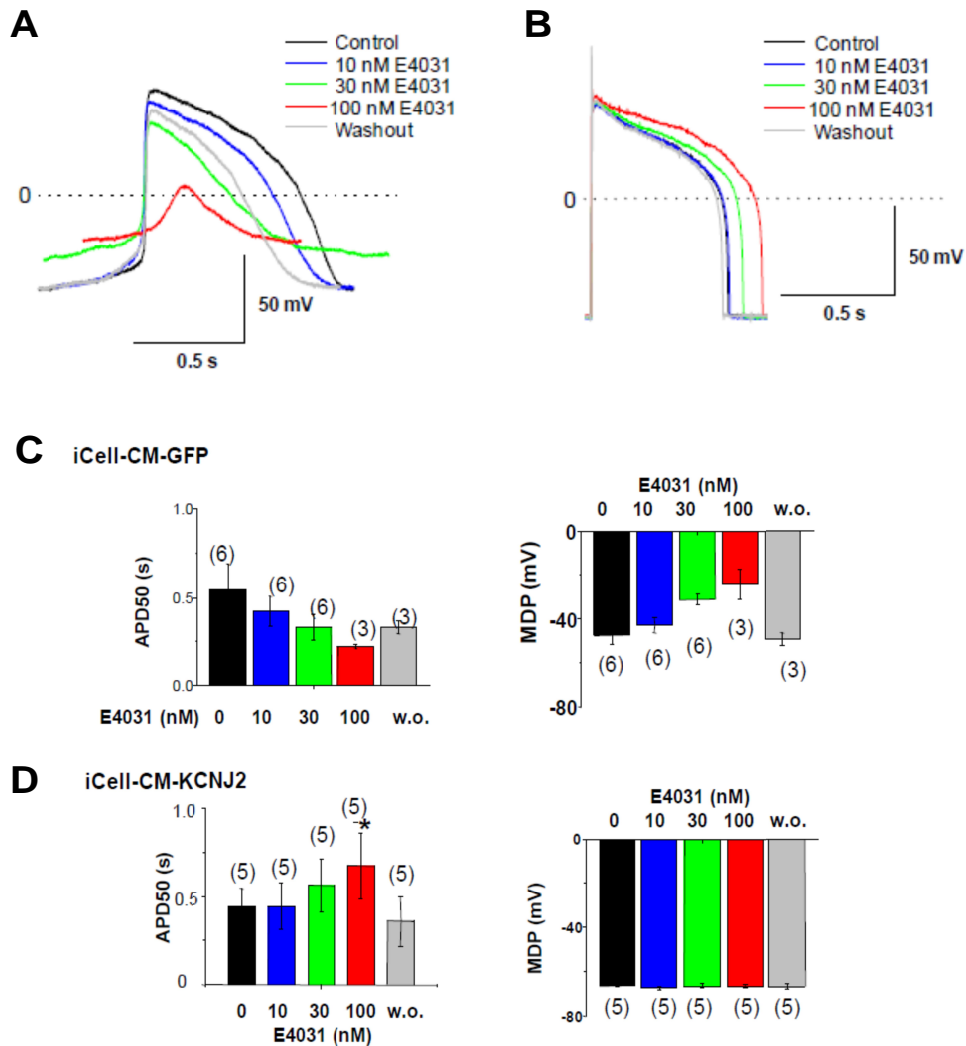


図4 KCNJ2遺伝子導入による薬理作用の変化

- A) GFP(EGFP)のみを導入したiCell心筋細胞の典型的な活動電位とhERG阻害剤(E-4031)10, 30, 100 nMと段階的に添加したときの変化。
- B) KCNJ2遺伝子(EGFP-KCNJ2)を導入したiCell心筋細胞の代表的な活動電位とhERG阻害剤(E-4031) 10, 30, 100 nMと段階的に添加したときの変化。自動能を失ったためペーシングにより測定した。バー：縦軸50mV, 横軸0.5秒。
- C) GFP(EGFP)のみを導入したiCell心筋細胞におけるE-4031の作用。APD50 活動電位時速時間。MDP 最大弛緩期電位。カラムの色は、A)の波形に対応している。
- D) KCNJ2遺伝子(EGFP-KCNJ2)を導入したiCell心筋細胞におけるE-4031の作用。カラムの色は、B)の波形に対応している。