

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

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

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 黒川 洵子

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の医薬品等規制調和・評価研究委託事業による委託業務として、国立法人東京医科歯科大学が実施した平成26年度「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」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I . 委託業務成果報告（総括）

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

----- 1

黒川 洵子（東京医科歯科大学難治疾患研究所）
（資料）表1、第1回班会議議事録

II . 委託業務成果報告（業務項目）

1. 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

----- 8

黒川 洵子（東京医科歯科大学難治疾患研究所）
（資料）図1-5、表1

2. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株ごとのマーカー遺伝子の比較定量解析法の開発

----- 19

古谷 和春（大阪大学大学院医学系研究科）
（資料）資料1、表1、図1-4

3. プロテオミクスを用いたヒトiPS細胞由来心筋の細胞株間差の調査

----- 36

永森 収志（大阪大学大学院医学系研究科）
（資料）図1-3、表1-3

4. インシリコヒトiPS細胞由来心筋細胞モデルの基盤構築

----- 46

芦原 貴司（滋賀医科大学医学部）
（資料）表1、図1-3

5. 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

----- 54

諫田 泰成 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)
(資料) 図1-4

III . 学会等発表実績

----- 64

IV . 研究成果の刊行物・別刷

----- 100

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ー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、市販の心筋マーカー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。

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 NaH₂PO₄/ 5.4 mM KCl/ 1.8 mM CaCl₂/ 0.53 mM MgCl₂/ 5.5 mM glucose/ 5 mM HEPES. (pH 7.4)

細胞内液：110 mM aspartic acid, 30 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 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_{K1} 電流測定：

細胞外液：NT

細胞内液：amphotericin B なし
0.2 mM BaCl₂ 感受性成分を算出。

I_f 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。

BaCl₂ による I_{K1} 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_{K1} 電流成分の増加であることを見出した。増加した I_{K1} 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_f 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_f 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_f 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_f 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⁺ 電流と L 型 Ca²⁺ 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_f 電流ではなく、I_{K1} 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

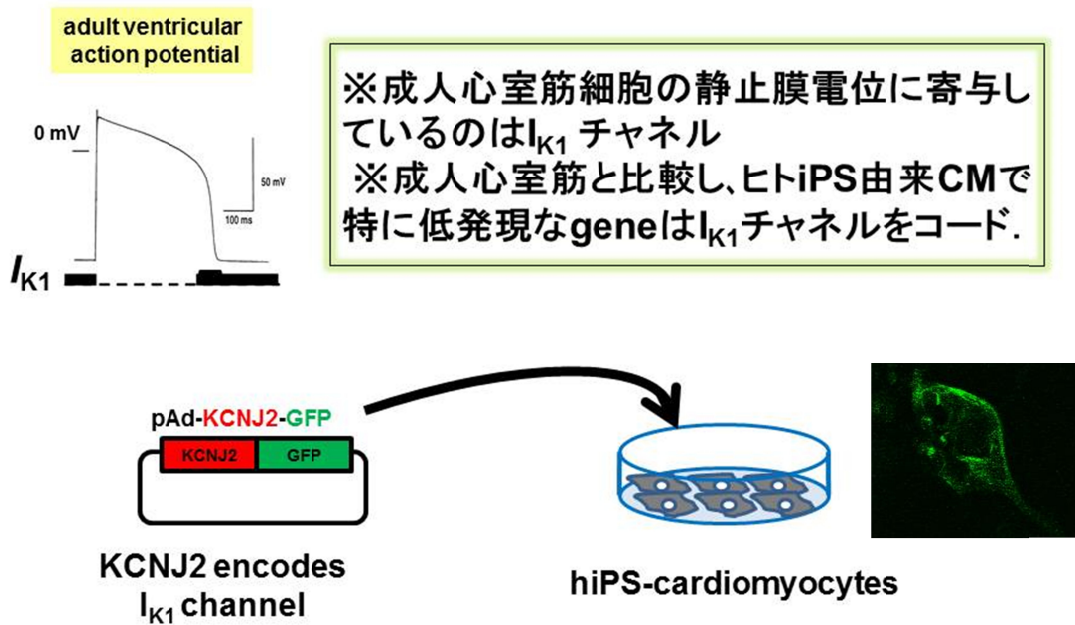
1. Hayakawa, T., Kunihiro, T., Ando, T., Kobayashi, S., Matsui, E., Yada, H., Kanda, Y., Kurokawa, J., Furukawa, T. (2014) Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: correlation and complementarity with extracellular electrophysiology. *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)。

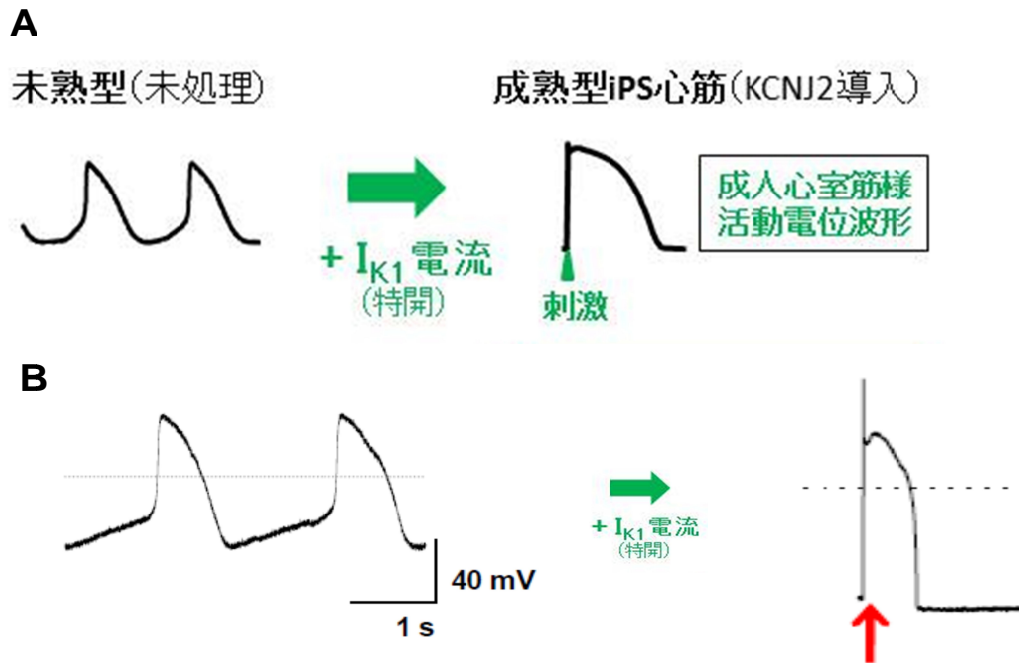


図 2 : ヒト幹細胞由来分化心筋細胞を成熟化する技術 .

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 .

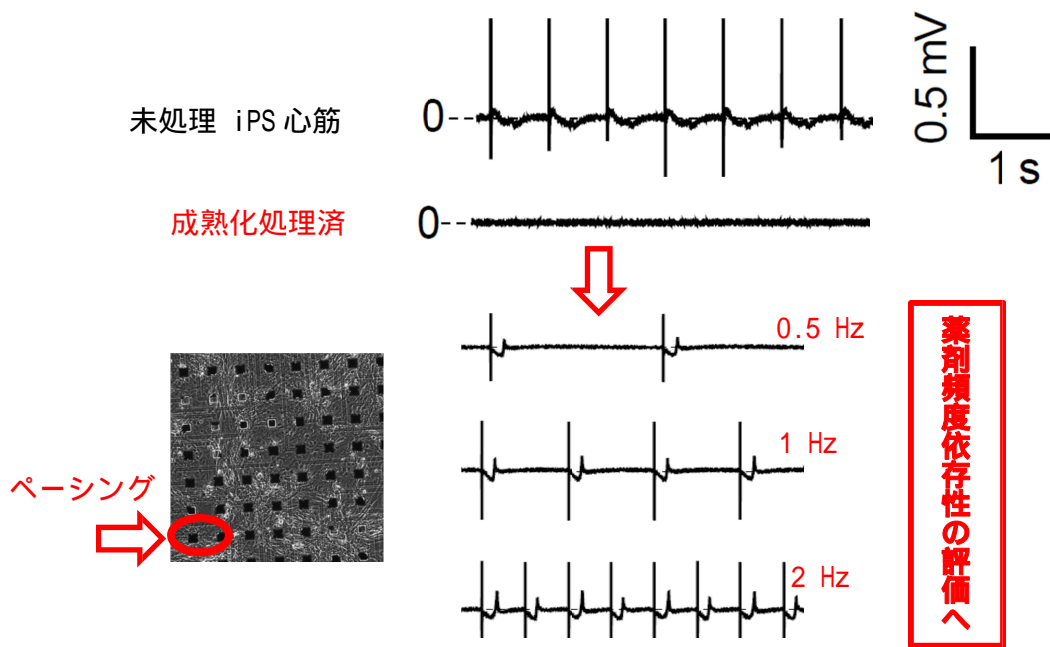


図3：心毒性の頻度依存性を評価する実験系。

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。

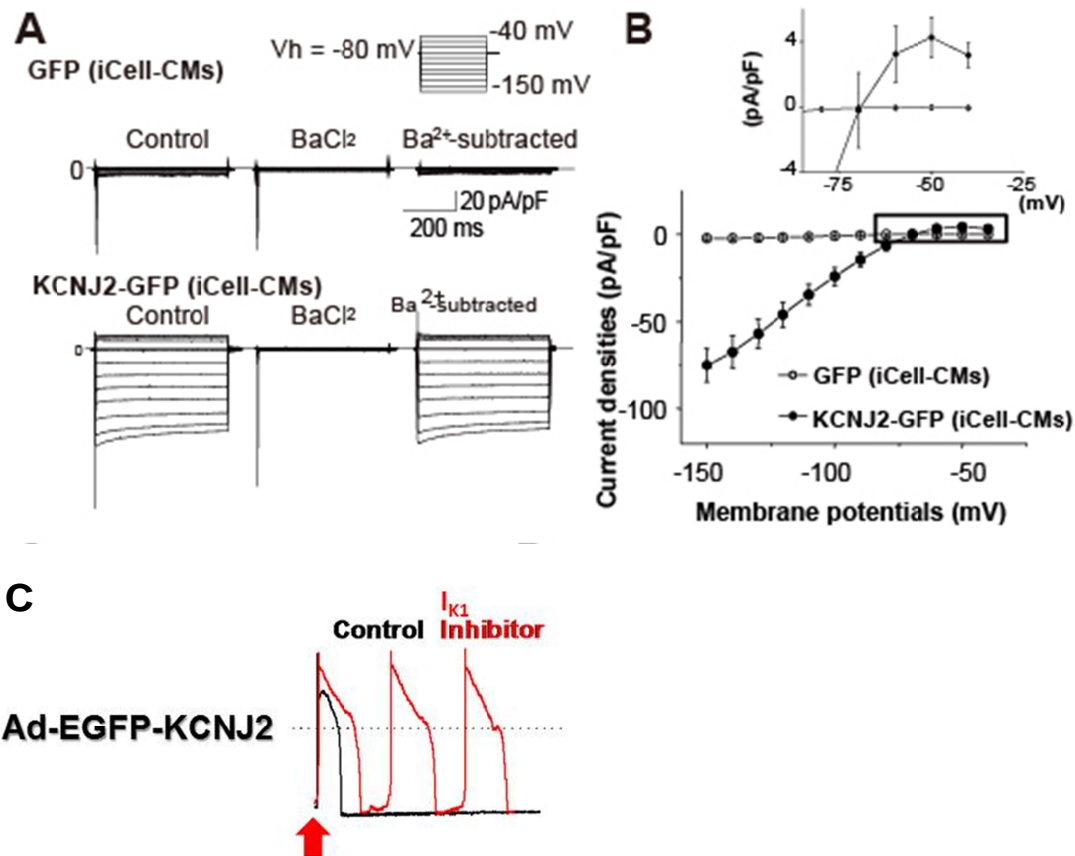


図 4 : KCNJ2 を強制発現したヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (iCell-CM) の電氣的性質 .

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 BaCl₂ 処置後 (I_{K1} 電流選択的阻害) BaCl₂ 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 BaCl₂) 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 ± 0.6	-64.8 ± 9.2	約 - 40
-50 mV	0.06 ± 0.07	4.0 ± 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。

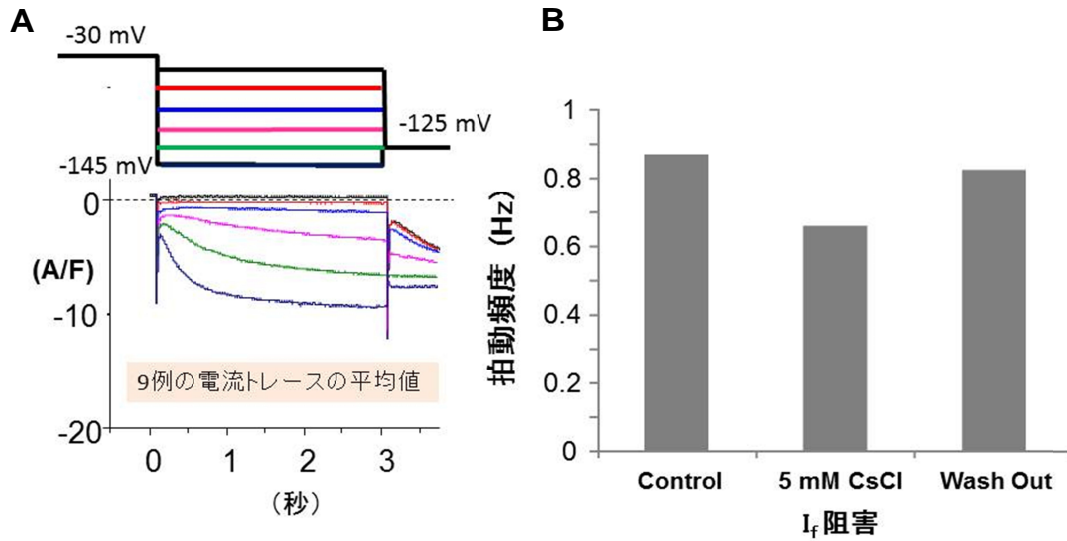


図5：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に発現している I_f チャンネル電流の解析。

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_f 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_f 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_f 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_f 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。

平成 26 年度業務担当報告

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株ごとのマーカー遺伝子の比較定量解析法の開発

担当責任者 古谷 和春
国立大学法人大阪大学
大学院医学系研究科 薬理学教室 助教

本業務項目は、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するための定量的データを取得することを目的とする。本研究計画の全期間を通じて、インシリコモデル技術に導入することに特化した実験系を構築する。

本年度は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の心筋マーカー遺伝子発現における株間差のばらつきを比較定量解析するために、定量性リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現解析を行った。解析用の遺伝子は、インシリコモデルを参照しながら選定し、それぞれの分子のプライマーを設計した。市販されているヒト iPS 細胞由来心筋分化細胞を用いて実験プロトコルの検証を行い、マーカー遺伝子発現の比較定量法を確立した。このプロトコルを用いて、2つの細胞株を用いて比較定量の予備試験結果を得た。

業務分担者：黒川洵子（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）

A. 研究目的

本研究の目的は、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するための定量的データを取得することを目的とする。本研究計画の全期間を通じて、インシリコモデル技術に導入することに特化

した実験系の構築を目指す。

ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞（ヒト iPS 心筋）を医薬品の副作用による催不整脈作用の評価に用いることが、国際的に検討されている。ヒト iPS 心筋は、現在用いられている非心筋細胞を用いた評価法より、イオンチャネルの特性やその制御因子の発現と言った面で有利であると期待されている。しかし、その実験的裏付けは十分されておらず、細胞の分化、成熟技術にも課題が残されている。ヒト iPS 心筋を用いた医薬品の催不整脈作用の評価に理

論的な裏付けを与え、ヒト iPS 心筋と臨床試験の結果の橋渡しを行なうためにも、インシリコ技術をヒト iPS 技術に融合したインシリコツールを開発することが極めて重要である。

ヒト iPS 心筋の電気生理学的特性および薬物への応答性の理解は十分進んでいない。これまでに報告されているデータをパラメーターとしてヒト成人心室筋モデルに導入しても、ヒト iPS 細胞の特性を再現出来てはいない。ヒト iPS 細胞の特性は、膜上にあるイオンチャンネルやトランスポーターといったイオン輸送体、それを制御する受容体やシグナル伝達蛋白質、さらにはそれらの細胞膜上での局在や選択的相互作用を総合的に反映するものであるため、目的（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）に特化した実験データの取得が必要である。そのためには、細胞の分化、成熟技術、薬物評価法の開発を行っている研究者と連携し、組織で当該研究を実施することが求められる。

ヒト iPS 心筋の活動電位に関する数理モデルは、未完成であっても、シミュレーション研究は現在理解できていないことをどのように仮定すればよいか、理論的に無理の無い範囲が示唆される可能性がある。インシリコモデルを用いたシミュレーション研究の結果を参照しながら、解析用の心筋マーカーを選定することで、研究方法を最適化させる。未熟なヒト iPS 心筋で観察される株間のばらつきを指標に、ヒト

iPS 心筋の特性を規定するパラメータの定量的データを取得することが有効であると考えられる。

そこで本研究では、以下の研究により、株間差を補正し、ヒト iPS 細胞と臨床の結果化を橋渡しするインシリコツールにパラメータを導入することに特化した実験系の構築を目指す。

定量性リアルタイム PCR 法および電気生理学的実験によるヒト iPS 心筋細胞株ごとの心筋マーカーの比較定量データリストの構築

インシリコ iPS 細胞由来心筋細胞モデルを用いた株間差補正のためのインシリコツール開発のサポートとその妥当性の実験的検証

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の培養実験プロトコルは、CDI社マニュアルを参考に作成した（資料1）。2014年8月14日に、東京医科歯科大学で実施し、研究分担：古谷と技術を共有した。

定量性リアルタイムPCRはSYBR Green 法を用いた。プライマーは、文献およびPrimer3を参考にして設計した（表1）。非特異的なプライマー二量体等が検出されていないことを確認するために、コントロールのサンプルを用いて、融解曲線解析およびPCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った。

今回の実験では、多くの分子の解析を行うので、通常の実験で用いている96ウェルプレート（StepOne

Plus or ABI7300, life technologies) だけではなく、384ウェルプレートも用いることとした(ABI7900)。384ウェルでは、ウェルごとの容量が少なくなることから、安定した計測が出来るかどうか実験者が確認する必要があると考え、マウス心室筋から調整したtotal RNAサンプルを用いてGAPDHの発現を調べた。

定量性PCRの標準遺伝子は、各サンプル間で変動しないことが望ましい。そこで、外因性刺激を与えた場合の発現変動を解析したDNAマイクロアレイデータからGAPDHの発現変動について調べた(図2, 3)。

CDI社のiCell-cardiomyocyte (CM)の3ロット およびAxiogenesis社のCor.4Uの2株のヒトiPS細胞由来心筋細胞からRNAを抽出し、41遺伝子の発現をリアルタイムPCRで解析した(図4)。

C. 研究結果

研究総括の報告書にまとめられた心筋マーカー40遺伝子リストに従い、定量性リアルタイムPCRのプライマーを設計し(表1)、その反応性及び特異性を評価した。表1のリストのうち、CACNA1H, KCNIP1, KCNE1については、アガロース電気泳動で非特異的バンドが検出され融解曲線解析のピークにも異常があった。また、ヒトiPS由来心筋細胞におけるKCNA5, KCNE2, ADRA1A, ADRB2遺伝子の発現は不検出であった。

本年は、GAPDH遺伝子発現の解析

を通して、機械をおよび標準遺伝子の検証を終了し(図1-3)、実験プロトコルを決定した。そのプロトコルに従い、予備実験として、CDI社とAxiogenesis社から市販されている細胞の遺伝子発現を比較した。CDI社の3ロットはMYH6(心房型)とMYH7(心室型)の比に少しばらつきはあったものの、心筋イオンチャネルの発現比に大きなばらつきは見られなかった。一方、Axiogenesis社の2株では、MYH6やMYH7の発現比はさほど大きくないにも関わらず、NaチャネルとL型Caチャネルのサブユニットの遺伝子発現は細胞株1で特徴的に多いことが示された。

D. 考察

心筋マーカー遺伝子発現の比較定量のために作成した心筋マーカー40遺伝子のプライマーのうち、33遺伝子については現プロトコルにて使用可能であることを示した。この33遺伝子には、ヒトiPS由来心筋の電気生理的機能および心筋再分極に影響が大きいと考えられる分子はほとんど含まれるが、CACNA1H, KCNIP1, KCNE1については再検討が必要である。KCNA5, KCNE2, ADRA1A, ADRB2遺伝子については、RNAの増量や他のヒトサンプルでは検出できたため、ヒトiPS由来心筋では低発現であることが示唆された。今後は、ヒトiPS由来心筋の電気生理的機能および心筋再分極に影響が大きいと考えられるCACNA1HとKCNE1, KCNIP1を中心にプライマ

一の再設計を行う。しかし、永森らによる質量分析解析において、膜タンパク発現の比較定量が可能になった場合には、タンパク発現データを採用し、遺伝子発現解析の結果を待たずに機能解析を行うこととする。

CDI 社と Axiogenesis 社から市販されている細胞の遺伝子発現を比較したところ、CDI 社 iCell-CM のロット間差よりも Axiogenesis 社 Cor.4U の細胞株間差のばらつきの方が大きいという傾向が見られたが、例数が少ないため今後は例数および細胞の種類を増やす必要がある。Cor.4U は株が異なるから、Na チャネルと L 型 Ca^{2+} チャネルのポア（孔）をもつ サブユニットの遺伝子発現が大きくなばらついたことから、脱分極の立ち上がりとプラトー相に影響があるかどうか興味深い。今後は、この 2 遺伝子については、標本ごとに検量線を作成し定量解析を行う。また、それぞれのソースの細胞株ごとに 3 例を目指して、諫田らが調査した現在入手可能なヒト iPS 由来心筋細胞のリストを基に順次解析していく。

E. 結論

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞培養および遺伝子発現解析に関する共通プロトコルを作成した。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。Na⁺チャネルと L 型 Ca^{2+} チャネルのポアをコード

する遺伝子（SCN5A, CACNA1C）の発現に大きな株間差が見られることを見出した。

G. 研究発表

論文

1. 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、Japan. J. Electrophysiol. 心電図 34:326-329.

学会発表

1. 古谷和春：医薬品のインシリコ催不整脈リスク評価における現状と課題. 第41回日本毒性学会学術集会（2014, 7, 神戸）
2. Kazuharu Furutani, Kunichika Tsumoto, I-Shan Chen and Yoshihisa Kurachi : Effects of Class III Anti-Arrhythmic Agents with hERG Channel Block and Facilitation on Cardiac Action Potential: a Simulation Study. 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (2014, 7, Capetown, South Africa)
3. 古谷 和春 : CiPA が提案しようとする薬物催不整脈リスク予測のパラダイム.CBI学会 2014年大会（2014, 10, 船堀）

資料1：実験プロトコル

iPS細胞由来心筋細胞 実験プロトコル (2014年7月14日採用)

CDI社プロトコルを参考に、黒川の研究室で採用しているプロトコルである。

2014年8月14日に、東京医科歯科大学で実施し、研究分担：古谷と技術を共有した。

iPS細胞由来心筋細胞 (CDI社、iCell cardiomyocyte) の到着、保管
準備するもの：液体窒素保存タンク

細胞の取り扱い

iCell心筋細胞は、1 mLクライオバイアルに入ったシングルセルの凍結細胞懸濁液として供給されている。受領後速やかに凍結バイアルをクライオボックスごと液体窒素保管容器へ移す。凍結バイアルを液体窒素保管容器へ移す際、室温に暴露することを出来るだけ避ける。液体窒素保管容器内では気相で保管する。

細胞用培地の取り扱い

心筋細胞用解凍用培地 (CDI社、iCell心筋細胞用解凍用培地 iCell Cardiomyocytes Plating Medium) と維持用培地 (CDI社、iCell心筋細胞用維持用培地 iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium) は凍結した状態で提供されている。受領後、凍結培地を-20 冷凍庫で保管する。凍結後は4 で保管する。この状態で2週間まで保存できる。

iPS細胞由来心筋細胞の解凍の準備

解凍用培養の準備

iPS細胞の解凍に使用する培地 (CDI社、iCell心筋細胞用解凍用培地 iCell Cardiomyocytes Plating Medium) は実験日の前日に4 冷蔵庫に移し、一晩かけて解凍する。細胞の解答前に、解凍用培地を冷凍庫から取り出し、室温で2~4時間静置しておく。

プレートおよびカバースリップのゼラチンコート

iPS細胞由来心筋細胞を生着させるため細胞培養に用いるディッシュを0.1%ゼラチンでコーティングする。実験の目的に合わせて、6ウェルプレート、12ウェルプレート、24ウェルプレートを選択して用いる。12ウェルプレートには15 mmカバースリップを入れておく。オートクレーブ滅菌した0.1%ゼラチン溶液 (SIGMA-Aldrich社、タイプA、粉末、細胞培養用) を培養プレートに添加する。37 インキュベータで1時間以上整地する。使用する直前にゼラチン溶液を吸引除去する。

iPS細胞由来心筋細胞の解凍
準備するもの

- ・ 解凍用培地（準備に関しては で説明）
 - ・ 血球計算版
 - ・ ピペット
 - ・ ピペッターP1000、P20
 - ・ 50 mL 遠沈管
 - ・ トリパンプルー
 - ・ ストップウォッチ
 - ・ コーティング済みのデッシュ（準備に関しては で説明）
- * ベンチ内で必要な物をあらかじめ準備し、培地は蓋を軽くあけておく。
培地の使用量目安は、1バイアルで1.5本程度。

標準実験プロトコル

iPS細胞由来心筋細胞の解凍

1. 液体窒素保管容器から iCell 心筋細胞凍結バイアルを取り出す。
2. 37 に温めておいたウォーターバスで4分間加温する。このとき、フローターラックを使用し、バイアルが揺れないように固定する。バイアルのキャップ部分まで絶対に沈めない。
3. 4分後、バイアルを出して綺麗に拭き、エタノールで消毒したのち、安全キャビネット内に移す。
4. iCell 心筋細胞懸濁液を P1000 マイクロピペットを用いて 50 mL の遠沈管の底にゆっくりと移す。
5. 培地 1 mL で、空のバイアルをリンスし、4 と同じチューブにゆっくり移す。
ピペットの先は液につけないようにして、1 滴ずつ(4~5 秒で 1 滴)滴下し、2 分以上かけて行う。1 滴滴下してはチューブをゆっくり揺らすようにする。
6. さらに 1 mL の培地で 5 と同様に空のバイアルをリンスし、P1000 マイクロピペットを用いてゆっくり 1 分間かけて 50 mL 遠心管に滴下する。
7. さらに 7 mL の培地を、10 mL ピペッターでとって、1 分間かけて滴下する。
8. 蓋をして 2~3 回やさしく転倒混和する。*絶対ピペッティングしない。
1 バイアルで総量 10 mL になる。

細胞数算出

1. 計算盤と、染色液のトリパンプルーを準備する。
2. PCR チューブにトリパンプルーを 10 μ L 入れる。
3. 再度細胞懸濁液を転倒混和させてから、10 μ L とって 2 のチューブに入れる。
4. 細胞をカウントして播種する細胞数に調整する。

iPS細胞由来心筋細胞の維持培養

1. iPS細胞の維持に使用する培地（CDI社、iCell心筋細胞用維持用培地 iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium）は実験日の前日に4℃冷蔵庫に移し、一晩かけて解凍する。
2. 使用直前に維持用培地を37℃に温める。
3. 細胞播種後48時間後、解凍用培地を吸引除去し、適量の維持用培地で2回培地交換をおこなうことで非接着細胞や残骸を洗浄する。
4. 播種後は一日おきに培地交換を行なう。37℃、7%CO₂条件下で培養する。

iPS細胞由来心筋を用いた定量PCR実験

標準実験プロトコル

RNAの抽出

QIAGEN RNeasy Micro kit RNA (cat#74004) を使用して、RNAを抽出する。

操作の途中でDNase I処理を行い、DNAを除く。

1. 350 μLのRLTバッファーを各ウェルに加えホモゲナイズする。
2. 等倍量の70%エタノールを各可溶化液（サンプル）に加え、マイクロピペットで良く混和する。
3. サンプルを沈殿物とともに2 mLの回収（コレクション）チューブに装着したRNeasy MinEluteスピнкаラムに移す。チューブのフタを締め、8,000 g以上で15秒遠心する。通過画分は捨てる。
4. 350 μLのRW1バッファーをRNeasy MinEluteスピнкаラムにいれる。チューブのフタを締め、8,000 g以上で15秒間遠心する。通過画分は捨てる。
5. 10 μLのDNaseI stock溶液を70 μLのRDDバッファーに加え、転倒混和する。この80 μLのDNaseIインキュベーションMixをRNeasy MinEluteスピнкаラムの膜に直接滴下する。その後、室温で、15分間静置する。15分後、350 μLのRW1バッファーをRNeasy MinEluteスピнкаラムにいれる。チューブのフタを締め、8,000 g以上で15秒間遠心する。通過画分ごと回収チューブを捨てる。
6. 新しい12 mLの回収チューブにRNeasy MinEluteスピнкаラムを装着する。500 μLのRPEバッファーをRNeasy MinEluteスピнкаラムにいれる。チューブのフタを締め、8,000 g以上で15秒間遠心する。通過画分は捨てる。
7. 500 μLの80%エタノールをRNeasy MinEluteスピнкаラムにいれる。チューブのフタを締め、8,000 g以上で2分間遠心する。通過画分ごと回収チューブを捨てる。
8. 新しい12 mLの回収チューブにRNeasy MinEluteスピнкаラムを装着する。チューブのフタは開けた状態で出来るだけ高速で5分間遠心し、スピнкаラムの膜を乾燥させる。通過画分ごと回収チューブを捨てる。

9. 新しい1.5 mLの回収チューブにRNeasy MinEluteスピncラムを装着する。14 μ Lの RNase-free WaterをRNeasy MinEluteスピncラムの膜に直接滴下する。チューブのフタを締め、出来るだけ高速で1分間遠心し、RNAを溶出する。

*参考： 24well plate に播種したiCell (1x10⁵ cells/well) 2 well分からRNAを抽出した際にとれたRNA量は700 ng~1000ngだった。

cDNAの作成

RT-PCRによりcDNAを合成する。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems #4368814)を使用する。以下の通り、反応をおこなう。

反応液

RNA	20 ng~2000 ng	
10x buffer		2.0 ul
25x dNTPs		0.8 ul
10x Randum Primer		2.0 ul
Multiscribe RTase		1.0 ul
MillQ*	(MillQ + RNA)	14.2 ul)
	total	20 ul

*MillQ はオートクレーブしたものを使用する。

RT Program

サーマルサイクラーを使用して行う。

cDNAの希釈

cDNA は適宜希釈して定量 PCR に使用する。希釈する際は PCR 用のチューブを使って行う。RT-PCR 時の元の RNA 量が多い場合は 20 倍希釈、200ng RNA を使って RT した場合には 10 倍希釈している。

10 倍希釈例)

元の cDNA	10 μ L
Milli Q	90 μ L
Total	100 μ L

Standard (標準サンプル)

標準サンプルとして使う cDNA を以下のように希釈して、その仮の濃度から 試料の濃度を推定するために用いる。可能ならば、濃度既知の標準サンプルがあると目的の

試料の濃度を知ることができる。

標準サンプルの希釈 (例)

希釈系列	cDNA		MillQ
1/4	元 cDNA	10 μ L	30 μ L
1/20	1/4	10 μ L	40 μ L
1/100	1/20	10 μ L	40 μ L
1/500	1/100	10 μ L	40 μ L

測定サンプルの調整

定量 PCR は Triplicate で実施する。Triplicate で実施する場合、3.3well 分の pre-mix を作成する。

	<u>x1</u>	<u>x3.3</u>
2x SYBR	10 μ L	33.0 μ L
MillQ	8 μ L	26.4 μ L
Primer* (F&R mix μ M each)	1 μ L	3.3 μ L
<u>dil-cDNA</u>	1 μ L	3.3 μ L
	20 μ L	66.0 μ L

以上を 1 well ごとに 20 μ L ずつ分注し、測定する。

Standard cDNA は、同じ細胞を希釈して使用する。Housekeeping gene として GAPDH、Channel 関連の指標遺伝子に SCN5A、Channel 以外の指標には MYH6 を用いる。

定量PCR

準備

- リアルタイム PCR 装置 (ABI7300 もしくは ABI7900)
- 試薬: Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) #4367654 5 mL
- 目的の遺伝子用 Primer: forward and reverse 5 μ M each (pre-mix 下記のように希釈)
- 内部コントロール遺伝子用 primer: forward and reverse 5 μ M each
 > (GAPDH など) (pre-mix 下記のように希釈)
- MilliQ 水 (オートクレーブしたものを使用)

反応液

定量 PCR は Triplicate で実施する。Triplicate で実施する場合、3.3well 分の pre-mix を作成する。

	<u>x1</u>	<u>x3.3</u>
2x SYBR	10 μ L	33.0 μ L
MillQ	8 μ L	26.4 μ L
Primer* (F&R mix μ M each)	1 μ L	3.3 μ L
<u>dil-cDNA</u>	1 μ L	3.3 μ L
	20 μ L	66.0 μ L

RT Program

	50	2 min	
変性	95	10 min	
PCR	95	15 sec	40 サイクル
	60	1 min	
Dissociation curve	95	15 sec	
	60	30 sec	
	95	15 sec	

PCR 反応終了後、データを取り込み、解析を行う。

表 1 - 1 : 心筋マーカー34 遺伝子発現解析用のプライマーのリスト 1 .

グレーのカラムは、不検出もしくはプライマー2 量体や非特異バンドが見られたため、再検討を予定している。

Gene	上段: Sense primers, 下段: Antisense primers	Tm (°)	Size (bp)
SCN5A	TTACGCACCTTCCGAGTCCTCC	64	150
	GATGAGGGCAAAGACGCTGAGG	63.5	
SCN1B	GGCAGAGATGATTTACTGCTACAAGA	60.9	88
	GTGATGGCCAGGTATTCC	57.6	
CACNA1C	AAGGCTACCTGGATTGGATCAC	60	136
	GCCACGTTTTTCGGTGTTGAC	60	
CACNA1D	GGGCAATGGGACCTCATAAATAA	58.5	141
	TTACCTGGTTGCGAGTGCATTA	60	
CACNA2D1	AGTGGATGGCCTGTGAAAAC	58.4	178
	ACAAGTCCCAGTTCCAATGC	58.4	
CACNB1	CTGGCTAAGCGCTCAGTTCT	60.1	253
	GGGACTTGATGAGCCTTTGA	57.5	
CACNB2	CCACAACCACAGAGACGAGA	59.3	241
	AACACAAAAGGGCAAAACTC	55.2	
CACNA1H	ACCGTGTTCCAGATCCTGAC	59	127
	TGAAGAGCACATAGTTGCCG	58	
HCN1	GGACGTCGTACTIONGCCAGTGTT	62.6	64
	TGTCCACGGAAAGTGAGTAAAGAC	60.7	
HCN2	GAGCGTGGACAACTTCAACGA	59.4	61
	AAGGCGAGCCGCATCAT	57	
HCN4	ACGCCAAGGCACCTGAAAC	61	115
	TGGATGGGAAGGAGGATGAA	57.7	
KCNA4	TGGCGGCTACAGTTCAGTC	59.7	571
	ATCATTCAACAACCCACCAT	55	
KCNA5	ACTTGCGGAGGTCCCTTTAT	58.7	201
	GGAGGGAGGAAAGGAGTGAA	58.3	
KCNA1B	AGGCTGCAGCTCGAGTATGT	61.3	197
	ACCGGTGGGATCATATTGAA	56.3	

表 1 - 2 : 心筋マーカー34 遺伝子発現解析用のプライマーのリスト 2 .

グレーのカラムは再検討予定。

Gene	上段: Sense primers, 下段: Antisense primers	Tm (°)	Size (bp)
KCNA2	TGGGCAATAAACCTACAGC	57.9	195
	CAGCGACTTGGGAGATCATT	57.7	
KCND3	GGCAGTTCGAATGCATACCT	58.3	211
	TGATGGTGGAGGTTTCGTACA	58.4	
KCNE1	AGATGCAAGCTTGGGTTTCGTG	61.5	184/32
	CTCGATAAAGGACCTGCAGC	58.4	
KCNE2	ACTTTGTGGCTGGTTTGTCC	58.9	247
	ATGGTCACCACACCATCCTT	58.9	
KCNE3	CGCCTGAACCGAGTAGAAGA	59.2	71
	TGAAGCATGTCGGTGATGAG	58	
KCNE4	GGCTCTCTCGGCATCTCAGA	61.1	79/107
	TCAGATAATGCCTTCCTCCAATG	58.3	
KCNE5	CAGAACAGCCTGGCTTTGGA	60.5	99
	TCCAGCGTCTGTGTGAAATTG	59.1	
KCNH2	TCAACTGCGAGATACCAACATG	58.7	128
	CTGGCTGCTCCGTGTCCTT	62.3	
KCNJ5	AGCGCTACATGGAGAAGAGC	59.9	118
	AAGTTGAAGCGCCACTTGAG	59	
KCNJ3	CTCTCGGACCTCTTCACCAC	59.5	80
	GCCACGGTGTAGGTGAGAAT	59.8	
KCNJ2	TGTCACGGATGAATGCCCAA	60	184
	CAAACACAGCTTGCCGTCTC	60	
SLC8A1	TGTGCATCTCAGCAATGTCA	57.8	191
	TGATGCCAATGCTCTCACTC	58	
ATP1A1	GGCTGTCATCTTCCTCATTGG	58.7	62
	CGGTGGCCAGCAAACC	58.5	
ATP2A2	ACCCACATTCGAGTTGGAAG	57.8	138
	CAGTGGGTTGTCATGAGTGG	58.5	

表 1 - 3 : 心筋マーカー34 遺伝子発現解析用のプライマーのリスト 3 .

グレーのカラムは再検討予定。

Gene	上段: Sense primers, 下段: Antisense primers	T _m (°)	Size (bp)
RYR2	ACAGCATGGCCCTTTACAAC	58.7	265
	TTGGCTTTCTCTTTGGCTGT	57.9	
PLN	ACAGCTGCCAAGGCTACCTA	60.9	191
	GCTTTTGACGTGCTTGTTGA	57.8	
MYH6	CGCATGAAGAAGAACATGGA	56.1	248
	CGCAGCAGGTTCTTTTTGTCT	59.7	
MYH7	GGCAAGACAGTGACCGTGAAG	58.2	133
	CGTAGCGATCCTTGAGGTTGTA	57.9	
MYL2	GGTGCTGAAGGCTGATTACGTT	59.2	382
	TATTGGAACATGGCCTCTGGAT	61.2	
MYL7	AAGGTGAGTGTCCCAGAGG	58.2	377
	ACAGAGTTTATTGAGGTGCC	57.9	
GJA1	TACCATGCGACCAGTGGTGCGCT	68.8	293
	GAATTCTGGTTATCATCGGGGAA	58.3	
GJC1	CTCCCCCTGGCTATAACATT	56.3	232
	TGAGGGTTGTTTTGGTGACT	57.2	
ADRA1 A	ATCATCTCCATCGACCGCTACA	61.1	343
	TCACTTGCTCCGAGTCCGACTT	63.6	
ADRB1	CAGGTGAACTCGAAGCCCAC	61	101
	CTCCCATCCCTTCCCAAAC	59	
ADRB2	GCAAAGGGACGAGGTGTGG	61	114
	AGACGCTCGAACTTGGCAAT	60	
CHRM 2	CTCCAGCCATTCTCTTCTGG	57.7	211
	GCAACAGGCTCCTTCTTGTC	59	
GAPD H	GAGCCACATCGCTCAGACAC	61	150
	CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG	57.2	

GAPDH	template, mouse E6												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	17.38944	16.65757	17.96838	17.64475	17.41124	17.26345	17.65019	17.80836	16.83348	17.60857	17.54392	17.75317	17.88619
B	17.63425	17.91765	17.31954	17.69317	17.21334	17.24133	17.1966	16.70913	17.40989	16.90626	17.27176	17.12235	16.73552
C	17.56341	16.37825	16.99868	17.37204	16.74458	17.12092	16.99397	16.78695	17.223	17.34065	17.51979	17.06911	17.40822
D	16.73855	17.45645	15.48583	17.00678	16.93808	17.1871	17.46832	16.90244	17.14027	17.44596	17.34148	16.69724	16.95991
E	17.6596	17.42343	17.2631	16.78724	17.25938	17.21538	17.44288	17.0032	17.57017	17.32865	17.13888	17.47067	17.27183
F	17.29454	16.53581	17.39819	17.85456	15.70063	16.92605	17.35236	16.82679	17.40796	17.51705	15.53922	14.05367	16.35884
G	17.29826	16.77511	17.56629	13.62892	17.15272	17.92383	17.38328	16.86689	17.37669	16.84294	17.44155	17.23053	16.8908
H	17.52545	15.25462	16.83601	16.93286	17.27617	15.82357	16.9703	17.26514	16.86637	17.3578	17.48214	16.79935	16.91862
I	16.81874	17.15011	20.35057	14.11728	16.8778	17.32934	17.29207	17.03087	16.97376	16.44789	16.85548	16.78726	17.50595
J	16.69328	17.49182	17.41748	17.29985	17.29954	16.51901	17.37655	14.74048	17.07992	16.69572	16.96448	17.6671	17.20347
K	17.1525	15.69819	16.61518	17.30116	17.03097	17.23217	15.98879	17.1871	16.73511	16.77104	13.68412	17.44225	16.73348
L	16.82236	17.30028	17.21765	16.74621	17.17039	17.38627	17.01887	17.33009	13.99329	16.86064	17.71146	16.77177	17.46131
M	17.20908	17.37028	17.66676	16.86461	17.62129	21.04802	16.93485	17.27505	17.29435	16.95136	14.95753	16.67181	16.38012
N	16.47949	17.26284	17.37733	16.91753	17.32451	16.00745	15.20185	14.31733	15.10212	14.94328	15.17176	16.6142	21.13669
O	16.91581	17.49099	17.14999	17.00835	16.67972	17.35696	17.28242	17.19279	17.43218	16.24807	16.92032	17.45014	14.57167
P	17.7067	17.68158	16.31224	17.62479	17.64542	16.28071	15.07301	17.25649	16.99801	16.37208	15.68221	16.76011	16.41501
Average	17.18134	16.99031	17.30895	16.80001	17.08414	17.24135	16.91414	16.78119	16.83979	16.85237	16.57663	16.89754	17.11485

	CT値	
Average	GAPDH	
<20%	<13.6	
10-20%	13.6-15.3	
0-10%	15.3-17	
0-10%	17-18.7	
10-20%	18.7-20.4	
20%<	20.4<	

図 1：解析に用いるリアルタイム PCR 機の検証。

384 ウェルのうち解析に用いるウェル間における実験データのばらつきを検証した。C57/BL6J マウス心室筋組織から調整した total RNA を用いて、RT-PCR を行った。本実験におけるリアルタイム PCR のシステムは、ABI7900 機を用いた。ウェルごとの Ct 値の結果（208 ウェル）を記載しており、発現強度に応じてカラー表示（下段図）をした。

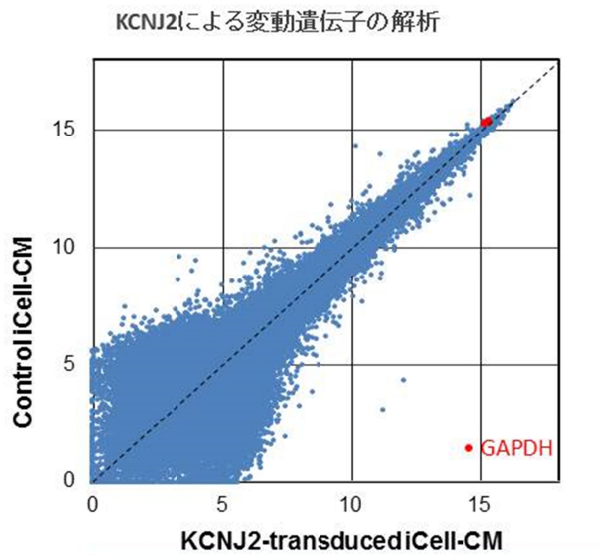


図 2 : 標準遺伝子 GAPDH の検証 1 (DNA microarray 解析)

市販ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株 (iCell-CM, CDI 社) に、成熟化遺伝子 KCNJ2 を導入した際の変動遺伝子をプロットした (Y 軸: コントロールの発現レベル, X 軸: KCNJ2 導入後の発現レベル)。DNA マイクロアレイのプラットフォームは、Affymetrix 社の Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を使用した。GAPDH の位置を赤で示した。

ソフトゲル培養による変動遺伝子の解析

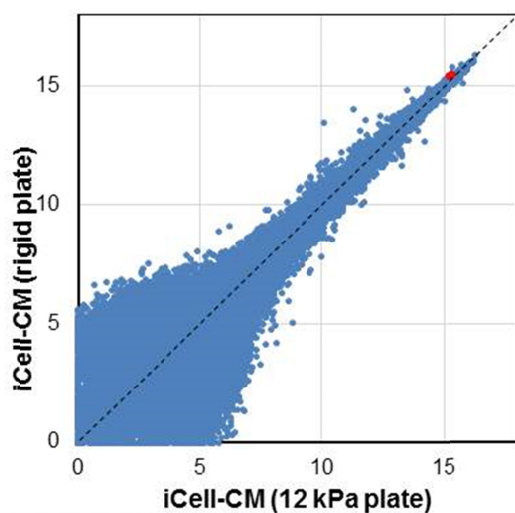
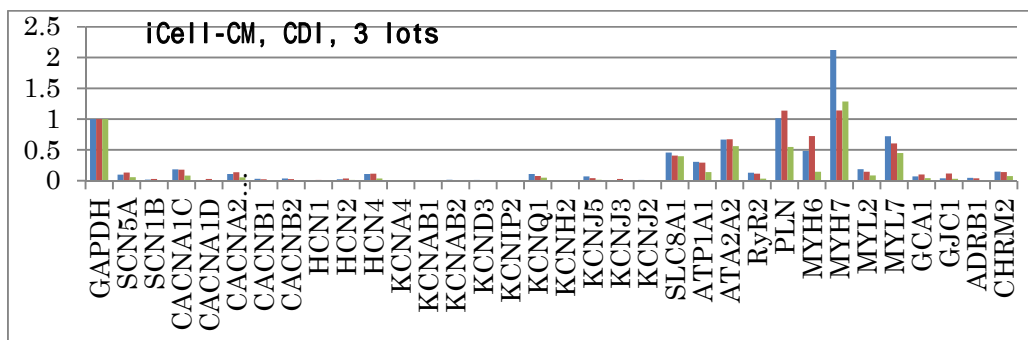


図 3 : 標準遺伝子 GAPDH の検証 2 (DNA microarray 解析)

市販ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株 (iCell-CM, CDI 社) に、ソフトゲル基質上での培養した際の変動遺伝子をプロットした (Y 軸: 通常のプラスチックディッシュ上で培養したときの発現レベル, X 軸: ソフトゲル基質上での培養したときの発現レベル)。DNA マイクロアレイのプラットフォームは、東レ社の 3D-Gene 全遺伝子型 DNA チップを使用して、mRNA 発現を解析した。GAPDH の位置を赤で示した。

iCell-CM (CDI) ロット 1、 ロット 2、 ロット 3



Cor.4U (Axiogenesis) 細胞株 1、 細胞株 2

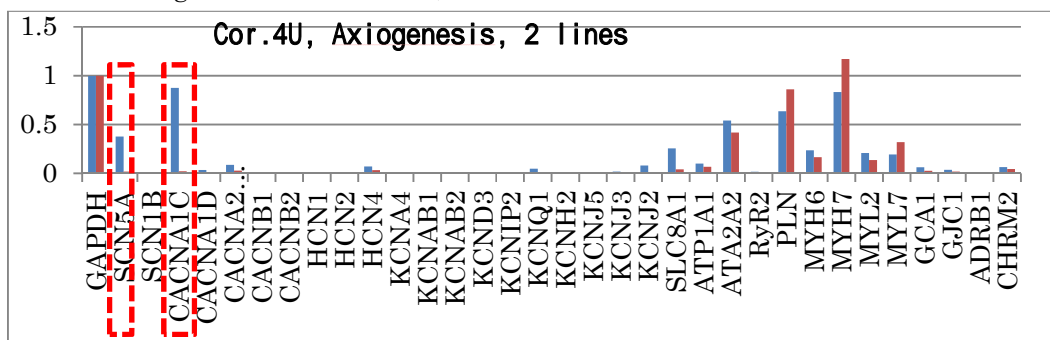


図 4：心筋マーカー遺伝子発現の比較定量解析の予備試験。

すべて同じ実験プロトコルで実験を行った。iCell-CM についてはロット間差、Cor.4U については株間差を示している。

平成 26 年度分担研究報告

プロテオミクスを用いたヒト iPS 細胞由来心筋の細胞株間差の調査

業務主任者 永森 收志

国立大学法人 大阪大学

大学院医学系研究科 生体システム薬理学 准教授

本業務項目は、網羅的定量質量分析法を用いて、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株の電気的性質を規定している膜イオン輸送に関わるタンパク質発現の細胞株間差を定量化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、プロテオミクス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、心筋マーカーの比較定量解析を行うための予備検討として、マウス培養心筋細胞 HL-1 細胞、未分化 iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて網羅的質量分析を行った。その結果、HL-1 細胞で 18,921 個のペプチドと 2,871 種のタンパク質を、未分化 iPS 細胞において 29,961 個のペプチドと 3,905 種のタンパク質を同定した。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞では 2,213 種類のタンパク質と 15,786 個のペプチドが同定できた。さらに、心筋マーカーであるイオンチャネルを安定発現させた CHO 細胞を用いて、比較定量解析に必要なペプチド情報の取得を進めた。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株ごとの心筋マーカーを定量解析し、in silico (インシリコ) でヒト心筋細胞のシミュレーションするための基盤データを取得することである。網羅的定量質量分析法を用いて、複数のヒト iPS 心筋細胞

株に対して心筋マーカーの比較定量解析を行うことで、細胞特性のばらつきを明らかにする。さらに主要なヒト心筋マーカーに対する絶対定量を行うことで、ヒト心筋マーカーの絶対的な分子数を取得し、シミュレーションの精度・信頼性の向上を目指す。

B. 研究方法

心筋マーカーとなる膜タンパク質の比較定量解析系の構築を目指し、質量分析計を用いた膜タンパク質の網羅的解析系の確立を試みた。マウス培養心筋細胞 HL-1 細胞、ヒト未分化 iPS 細胞または iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、細胞膜に富んだ粗膜画分を調製した。更に細胞膜を濃縮する為に膜画分を尿素で洗浄し、sodium deoxycholate (SDC) で膜タンパク質を可溶化した。可溶化した膜タンパク質は TCEP を用いて還元し、iodoacetamide (IAA) を用いてアルキル化した後、0.1 M Triethylammonium bicarbonate (TEAB, pH 8.5) 条件下でトリプシンによるペプチド化を行った。Phase-Transfer Surfactant (PTS) 法を用いて SDC の除去を行った後、同定数向上を目的として、微量サンプルでもサンプルロスの少ないチップ型の逆相カラム (Stage-Tip-SDB) を用いて、高 pH 条件で簡易分画を行った。得られたペプチドに対して、質量分析計 Thermo Q Exactive (ベンチップ型四重極 Orbitrap) に ナノ LC Michrom Bioresources Advance UHPLC を接続した nano LC-MS/MS システムを用いてショットガンプロテオーム解析を行った。分析メソッドは 100 分間の直線グラジエント (5% から 40% アセトニトリル) を使用し、分析カラムは日京テクノス社製の C18 キャピラリーカラムを使用し

た。タンパク質配列解析は、解析ソフトウェア Thermo Proteome Discoverer 1.4 をプラットフォームとしたデータベース検索アルゴリズム Matrix Science Mascot 2.4 を用いて行った。解析の対象とするタンパク質配列は UniProt データベース (<http://www.uniprot.org>) に登録されている配列を用いた。得られた解析データは信頼性を高める為、偽陽性ヒット率 False Discovery Rate (FDR) <1% となるように Proteome Discoverer でフィルタリングを行い、最終的な解析結果とした。

質量分析計を用いた高精度の比較定量解析には、標的プロテオミクス法の利用が必要となる。現在、標的プロテオミクス法にはプレカーサーイオン測定法である Selected Ion Monitoring (SIM) 法、あるいはプロダクトイオン測定法である Parallel Reaction Monitoring (PRM) 法などが利用されているが、いずれの方法も測定の際には標的となるペプチドの質量 (m/z) 情報が必須である。マウス培養心筋細胞、ヒト未分化 iPS 細胞または iPS 細胞由来心筋細胞サンプルでは検出できなかった心筋マーカー膜タンパク質については、既に確立した心筋マーカー安定発現細胞株を用いて網羅的解析を行い、比較定量解析に必要な目的分子由来のペプチドの質量情報の取得を試みた。

C. 研究結果

HEK293 細胞などの他の細胞で既に確立している質量分析計による網羅的解析系を用いて、マウス培養心筋細胞への応用を検討した。100 分間の直線グラジエントを含む 120 分間の LC-MS 測定で得られた目的サンプルのマスペクトルは、他の細胞サンプルのマスペクトルと比較しても同等以上のシグナル強度であった。また、Stage-Tip-SDB によって 4 分画されたサンプルは、それぞれの画分で同程度のシグナル強度であり、ほぼ均等に分布していることから、分画条件に問題ない事を確認した(図 1)。データ解析の結果、マウス培養心筋細胞で 2,871 種類のタンパク質と 18,921 個のペプチドが同定できた(表 1)。得られた同定数は HEK 293 細胞などの他の培養細胞由来のサンプルと比べても十分な数であり、膜タンパク質の網羅的解析系のマウス培養心筋細胞への適用が可能と判断できた。続いて、比較的サンプル量の確保が容易な未分化 iPS 細胞に対する、網羅的解析系の適用を検討した(図 2)。再現性確認の為、分析を 3 回行ったところ、平均で 3,423 種類のタンパク質と 23,331 個のペプチドが同定でき、3 回の分析を合わせると、3,905 種類のタンパク質と 29,961 個のペプチドが同定された(表 1)。ヒト iPS 細胞でも膜タンパク質の網羅的解析系の適用が問題ないことから、ヒ

ト iPS 細胞由来心筋細胞での検討を行った(図 3)。その結果、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞では 2,213 種類のタンパク質と 15,786 個のペプチドが同定できた(表 1)。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞での質量分析計を用いた膜タンパク質の網羅的解析系が確立できた。

ヒト未分化 iPS 細胞または iPS 細胞由来心筋細胞で同定されたタンパク質の中には、心筋マーカーとなる膜タンパク質も含まれていた(表 2)。しかしながら、前述の膜タンパク質網羅的解析系では検出できなかった、もしくは定量解析に用いるために十分なペプチド情報を取得できなかった心筋マーカーも存在していた。そこで、取得したペプチド情報が不足している複数の重要分子を中心に、東京医科歯科大学で調製した心筋マーカー安定発現細胞株や強制発現細胞を用いて、確立した方法に則り質量分析解析を行った。その結果、全ての心筋マーカー安定発現株から、強制発現させた対象分子(SCN5A、CACNA1C、KCNQ1、KCNH2、KCND3、KCNIP2)が検出でき、定量解析に必要な心筋マーカー膜タンパク質由来のペプチドの質量情報が取得できた(表 3)。

D. 考察

他の培養細胞や動物臓器を対象として行った分析同様のペプチド及びタンパク質の同定数が得られ

たことから、分担研究者らが開発してきた膜タンパク質の網羅的定量質量分析法は、マウス培養心筋細胞、未分化iPS細胞やヒトiPS細胞由来心筋細胞のサンプルに、適応可能であると考えられた。しかしながら、一般的な培養細胞を解析する際に必要な細胞数をヒト iPS 細胞由来心筋細胞で取得することは容易でないため、今後使用する細胞数の削減が可能なサンプル調製方法の開発が求められる。

実際、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の網羅的解析ではマウス培養心筋細胞やヒト iPS 細胞を解析した場合と比べてタンパク質同定数が少ないが、これは準備できたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の膜画分が微量であったためと推測される。そのため、網羅的解析での検出を目指した心筋マーカーの一部が検出不可能であった。しかしながら、今後は本年度の解析によって収集したペプチド情報を利用することで、より高感度な測定である標的プロテオミクス法の適応が可能になり、本年度行った網羅的解析では検出できなかった心筋マーカータンパク質を定量することが可能になると考えられる。

E. 結論

マウス培養心筋細胞、未分化 iPS 細胞さらにヒト iPS 細胞由来心筋細胞の質量分析に成功したことで、次年度に計画している複数のヒト iPS 心筋細胞株に対しての心筋マーカー比較定量解析が可能になった。さらに、心筋マーカー膜タンパク質由来のペプチドの質量情報が得られたことから、これらのマーカータンパク質の絶対定量系の構築も実現可能になった。

G. 研究発表論文

特になし

学会発表

1. 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)

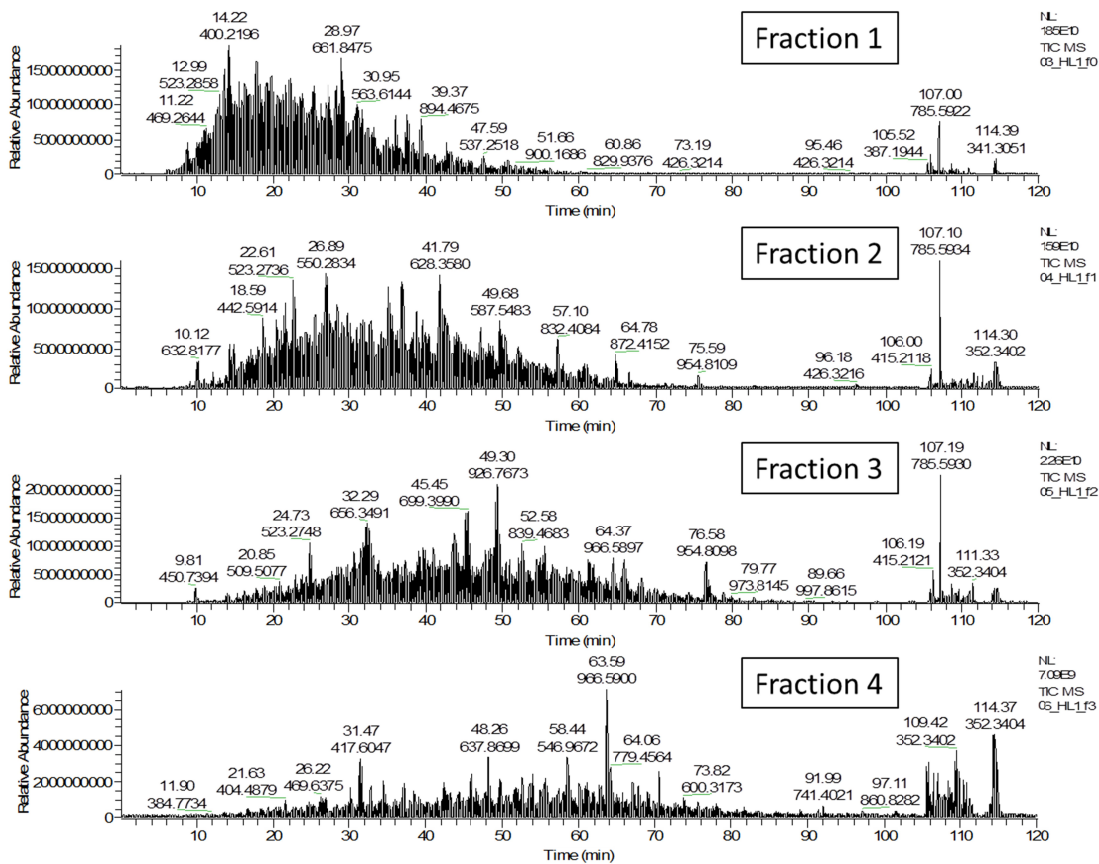


図 1 : マウス培養心筋細胞サンプルのマススペクトル .

マウス培養心筋細胞の膜画分は膜濃縮後、還元・アルキル化され、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルはStage-Tip-SDBで4分画 (Fraction 1 - 4) した後、LC-MS/MS解析を行った。測定時間は120分間、分析メソッドには100分間の直線グラジエント (5%から40%アセトニトリル) を使用した。分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。スペクトルは保持時間に対するシグナル強度を相対値で示し、スペクトル上のラベルは保持時間 (上段) と m/z (下段) を表す。

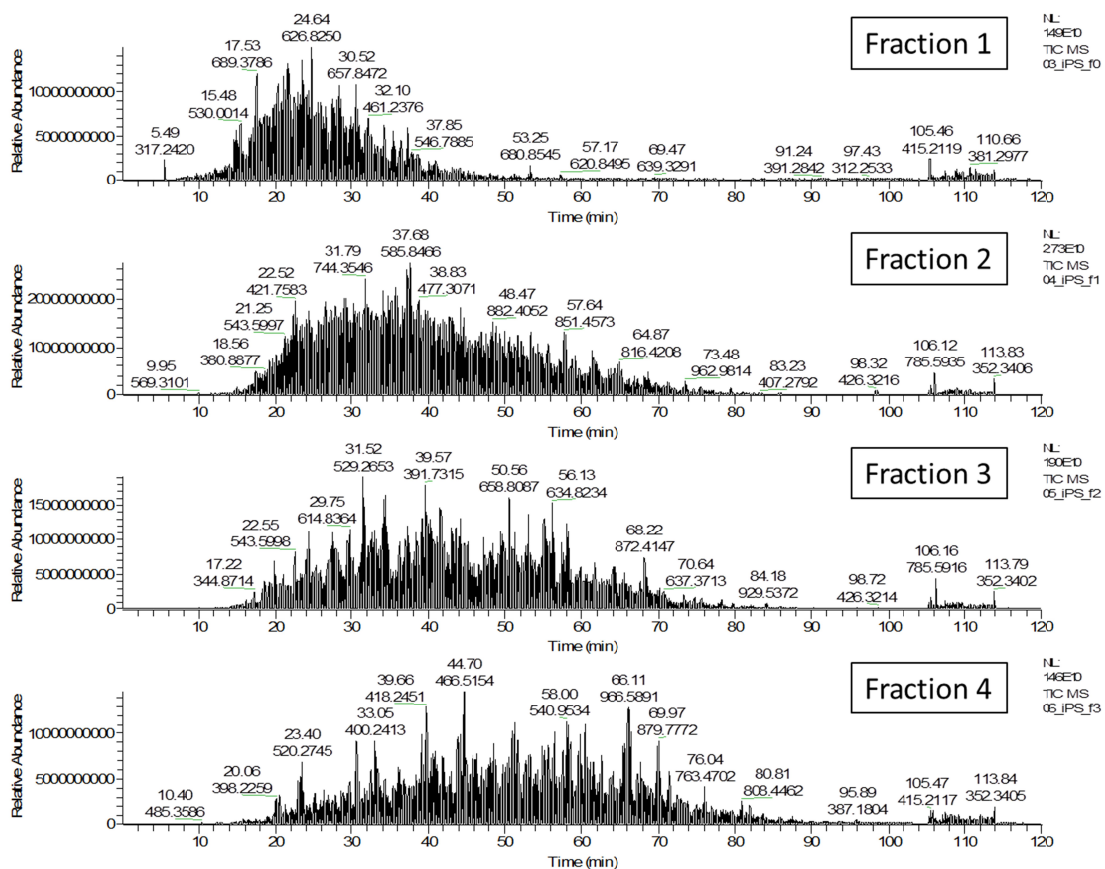


図 2 : ヒト未分化 iPS 細胞サンプルのマススペクトル .

ヒト未分化iPS細胞の膜画分は膜濃縮後、還元・アルキル化され、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルはStage-Tip-SDBで4分画 (Fraction 1 - 4) した後、LC-MS/MS解析を行った。測定時間は120分間、分析メソッドには100分間の直線グラジエント (5%から40%アセトニトリル) を使用した。分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。スペクトルは保持時間に対するシグナル強度を相対値で示し、スペクトル上のラベルは保持時間 (上段) と m/z (下段) を表す。

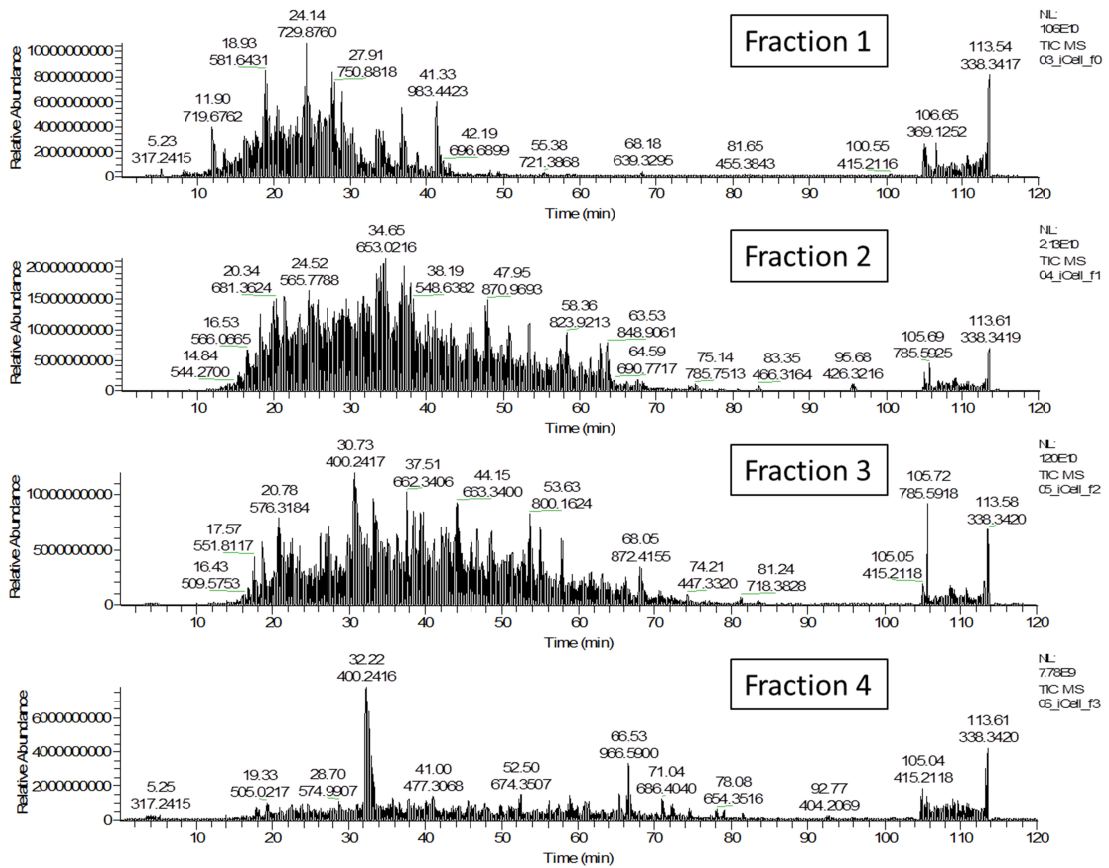


図3：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞サンプルのマススペクトル。

ヒトiPS細胞由来心筋細胞の膜画分は膜濃縮後、還元・アルキル化され、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルはStage-Tip-SDBで4分画 (Fraction 1 - 4) した後、LC-MS/MS解析を行った。測定時間は120分間、分析メソッドには100分間の直線グラジエント (5%から40%アセトニトリル) を使用した。分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。スペクトルは保持時間に対するシグナル強度を相対値で示し、スペクトル上のラベルは保持時間 (上段) と m/z (下段) を表す。

表 1 : 膜画分サンプルの LC-MS/MS による網羅的解析 .

膜画分サンプル		同定タンパク質数	同定ペプチド数
マウス培養心筋		2,871	18,921
	Replicate 1	3,516	24,693
	Replicate 2	3,421	22,920
ヒト未分化 iPS 細胞	Replicate 3	3,333	22,381
	平均	3,423	23,331
	合計	3,905	29,961
ヒト iPS 細胞由来心筋		2,213	15,786

表2：LC-MS/MSによる網羅的解析で同定された心筋マーカーの比較。

Gene Symbol	Protein Name	同定ペプチド数	
		未分化 iPS	iPS 細胞由来心筋
SCN5A	Nav 1.5 α subunit		1
SCN1B	Nav 1.5 β -1 subunit		
CACNA1C	Cav 1.2 α -1C subunit		
CACNA1D	Cav 1.2 α -1D subunit		
CACNA2D1	Cav 1.2 α -2/ β -1 subunit	3	17
CACNB1	Cav 1.2 β -1 subunit		
CACNB2	Cav 1.2 β -2 subunit		
CACNA1H	Cav 3.2 α -H subunit		
HCN1	Pacemaker channel		
HCN2	Pacemaker channel		
HCN4	Pacemaker channel		2
KCNA4	Kv 1.4 α subunit		
KCNA5	Kv 1.5 α subunit		
KCNAB1	Kv 1.5 β -1 subunit		
KCNAB2	Kv 1.5 β -2 subunit		
KCND3	Kv 4.3		
KCNIP1	Kv channel-interacting protein		
KCNIP2	Kv channel-interacting protein		
KCNQ1	Kv 7.1 (KvLQT1)		
KCNE1	minK		
KCNE2	MiPR1		
KCNH2	Kv 11.1 (KvLQT2,hERG)		
KCNJ5	GIRK4 IKACH channel		
KCNJ3	GIRK1 IKACH channel		
KCNJ2	Kir 2.1		
SLC8A1	NCX 1.1		24
ATP1A1	NaK ATPase α 1	47	30
ATP2A2	SERCA 2A	33	55
RYR2	Ryanodine receptor		33
PLN	phospholamban		3

表3：心筋マーカー安定発現株のLC-MS/MSによる網羅的解析。

Gene Symbol	Protein Name	同定ペプチド数						
		未分化 iPS	iPS 細胞 由来心筋	安定発現株				
				KCNQ1 +SLC8A1	SCN5A	KCNH2	KCND3 +KChIP2	CACNA1C
SCN5A	Nav 1.5 α subunit		1		42			
CACNA1C	Cav 1.2 α -1C subunit							62
KCNQ1	Kv 7.1 (KvLQT1)			21				
KCNH2	Kv 11.1 (KvLQT2,hERG)					41		
SLC8A1	NCX1.1		24	17				
KCND3	Kv 4.3						11	
KCNIP2	Kv channel- interacting protein						3	

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

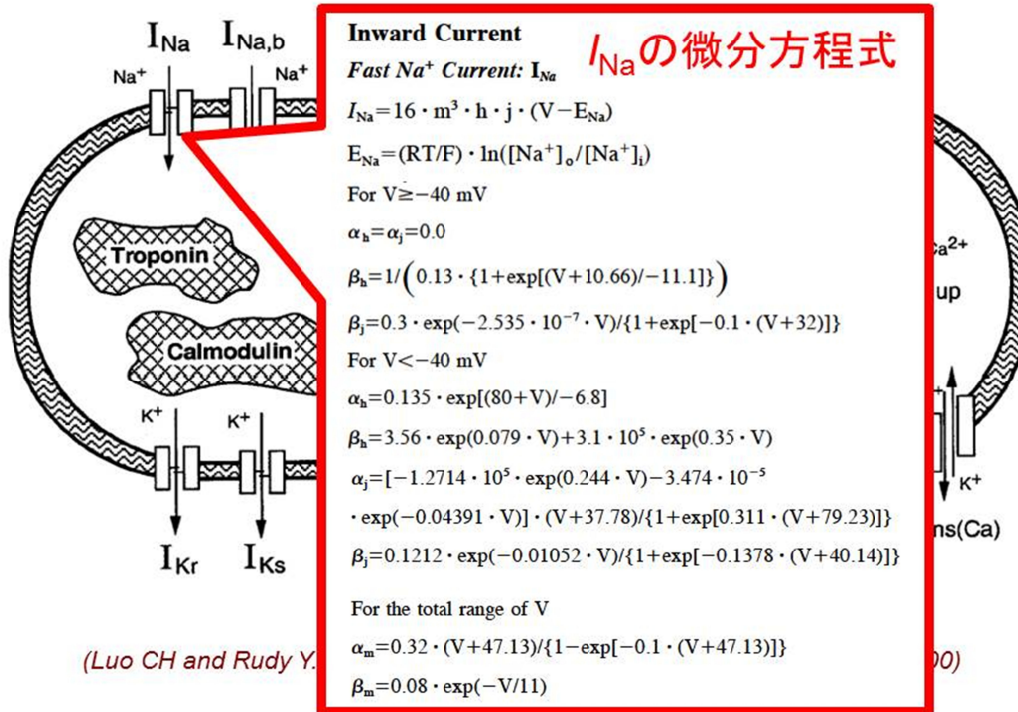
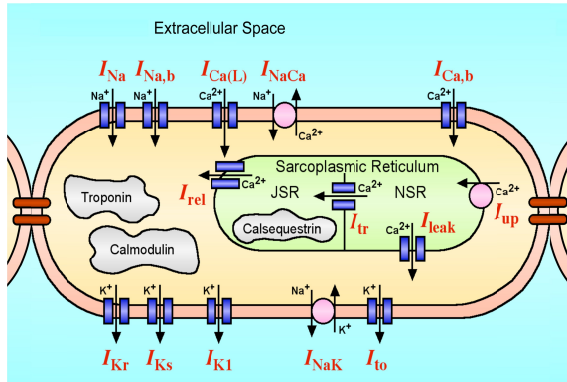


図 1 : 心筋ナトリウムチャンネルを記述する微分方程式 .

A**B**

ヒト心室筋細胞モデル

iPSC-CM モデル

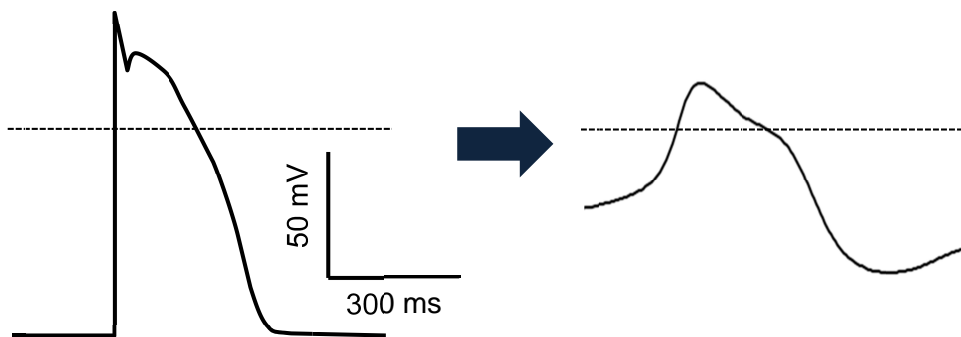
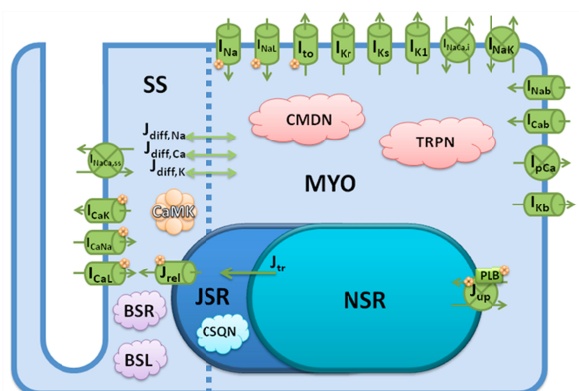


図 2 : Priebe-Beuckelmann (PB) モデルによる活動電位シミュレーション。

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

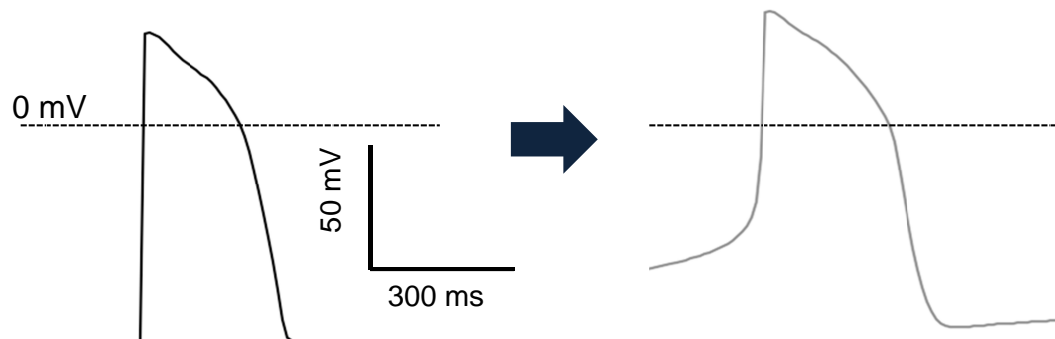


図 3 : O'Hara-Rudy dynamic (ORd) モデルによる活動電位シミュレーション .

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)。

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)

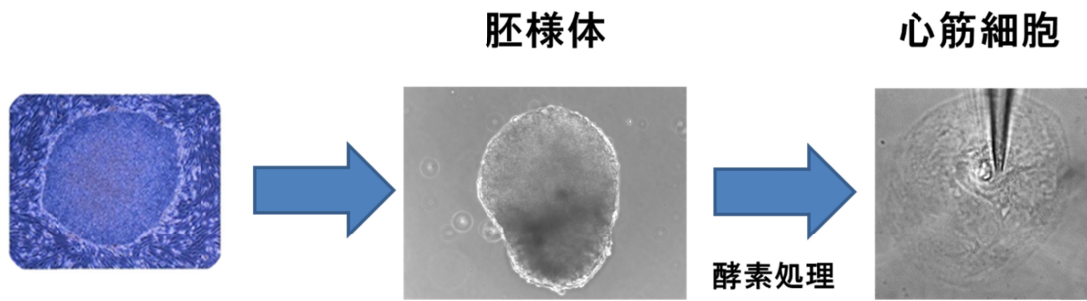
著書

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

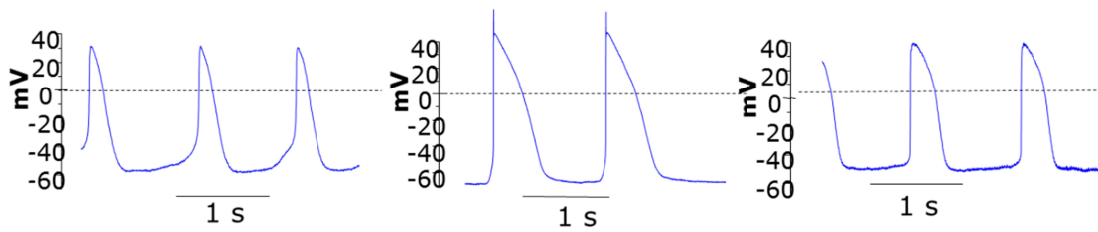


図1 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学特性

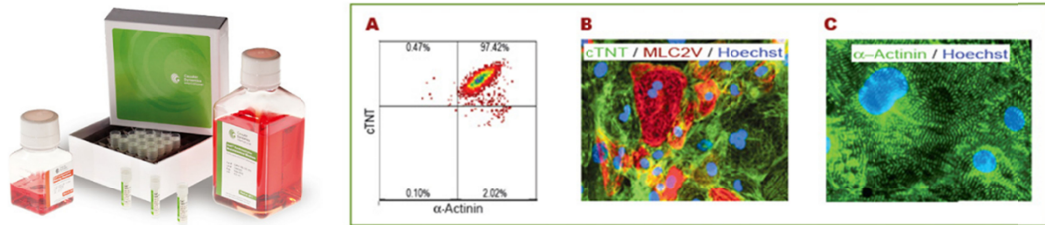
現在市販されていて薬理実験に利用可能な主なヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞を示す

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

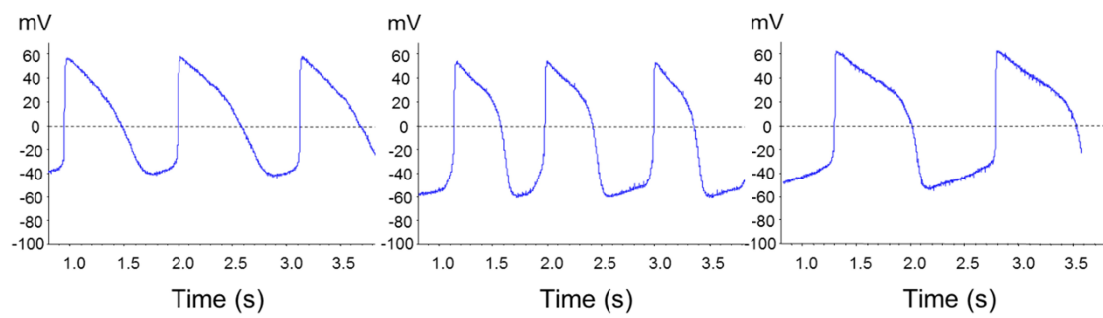


図2 iCell 心筋の活動電位

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 : -80mV ~
(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

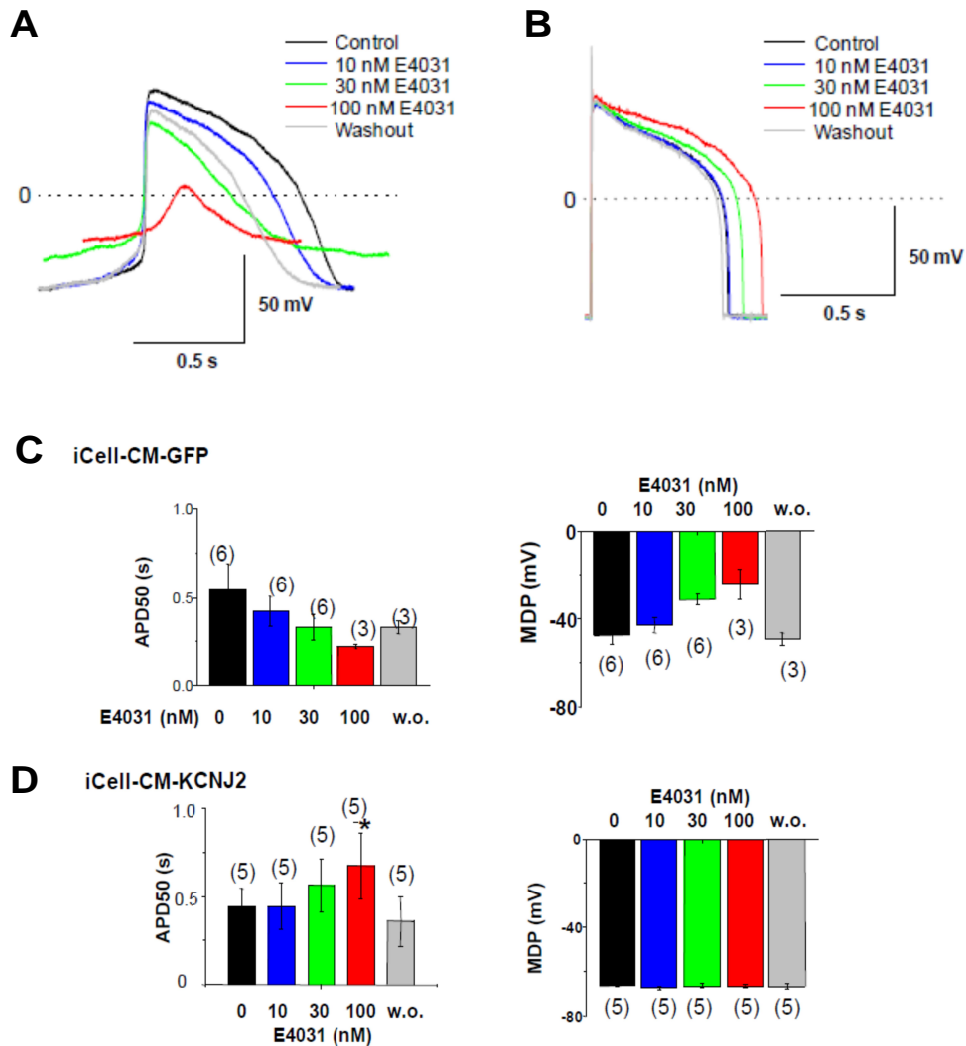


図4 KCNJ2遺伝子導入による薬理作用の変化

- 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。

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「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」
 機関名 東京医科歯科大学 黒川 洵子

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
ヒト iPS 由来心筋を用いた新規心毒性評価法の開発、口頭	黒川洵子	生理研研究会	2014 年 9 月	国内
Effects of substrate elasticity on gene expression profiles of human iPS-derived cardiomyocytes.、ポスター	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	CBI 学会 2014 年大会	2014 年 10 月	国内
Role of substrate rigidity on function in human iPS cell-derived cardiomyocytes	諫田泰成、関野祐子、古川哲史、黒川洵子	第 87 回日本生化学会	2014 年 10 月	国内
Evaluation of drug-induced QT-prolongation in human iPS-derived cardiomyocytes、口頭	黒川洵子	第 87 回日本生化学会	2014 年 10 月	国内
A multidisciplinary approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.、ポスター	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, 久田俊明, 古川哲史	59th Biophysical Society Annual Meeting	2015 年 2 月	国外
幹細胞由来心筋細胞を用いた心臓薬理学研究の基礎か	黒川洵子	第 6 回日本安全性薬理研究会	2015 年 2 月	国内

ら応用まで、口頭				
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ソルピシンの薬理作用解析、ポスター	林英里奈, 藤塚美紀, 古川哲史, 黒川洵子	第 88 回日本薬理学会大会	2015 年 3 月	国内
膜輸送体を標的とした iPS 細胞由来心筋の創薬応用、口頭	黒川洵子, 芦原貴司, 諫田泰成, 古川哲史	第 88 回日本薬理学会大会	2015 年 3 月	国内
Analysis of rate-dependence of drug-induced QT-prolongation in human iPS-derived cardiomyocytes., ポスター	黒川洵子, 林英里奈, 芦原貴司, 諫田泰成, 関野祐子, 古川哲史	第 92 回日本生理学会大会	2015 年 3 月	国内
Effects of hydrogel culture substrate on contractile properties and gene expression profiles of human iPS cell-derived cardiomyocytes., ポスター	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	日本薬学会第 135 年会	2015 年 3 月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: correlation and complementarity with extracellular electrophysiology.	早川智宏, 國弘威, 安東朋子, Kobayashi S, 松居恵理子, Yada H, 諫田泰成, 黒川洵子, 古川哲史	J Mol Cell Cardiol, 77, 178-191	2014 年 12 月	国外

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	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	心電図 34:326-329	2014年8月	国内
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	黒川洵子	CBI 学会誌 4:7	2014年10月	国内
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。	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	生 体 医 工 学 2014;52(3) in press	2014年12月	国内

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式は excel 形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。