

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293056

研究課題名(和文) 成熟したiPS由来心筋細胞の樹立と創薬・医療への応用

研究課題名(英文) Development of mature cardiomyocytes from human iPS cells

研究代表者

諫田 泰成 (Kanda, Yasunari)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号：70510387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品による心毒性は医薬品の市場撤退の主要な要因である。ヒトiPS細胞由来心筋細胞は、新たな心毒性評価法のツールとして期待される。本研究において、iPS心筋の最大拡張期電位が-50mV程度と浅く伝播速度も正常ヒト心筋の40%程度であったことから、iPS心筋は未成熟であることが示唆された。次に、パソコンによりiPS心筋のシミュレーションを行ったところ、iPS心筋は最大拡張期電位に関わるIK1チャネルの機能が低いと考えられた。実際、iPS心筋にIK1チャネル遺伝子を導入した結果、電気生理学的に成熟化が誘導された。以上の結果から、IK1による成熟化は医薬品の心毒性評価に応用できることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced cardiac arrhythmias have been a major reason for drug withdrawal at late stage of clinical trials. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPS-CMs) are expected to be applicable to cardiac drug safety testing as research tools. In the present study, our patch-clamp recordings and imaging with voltage-sensitive dye revealed that iPS-CMs exhibited relatively depolarized maximum diastolic potential and lower conduction velocity, suggesting an immature differentiation state of the iPS-CMs. We next established our mathematical simulation in iPS-CMs and found that low expression of the inward-rectifier potassium (IK1) channel is a determinant of spontaneous activity. We also found that transduction of KCNJ2, which encodes the IK1 channel, induced electrophysiological maturation of iPS-CMs. Thus, our novel approach would provide new insights into the evaluation of drug-induced cardiac toxicities in iPS-CMs.

研究分野：薬理学、幹細胞生物学、

キーワード：iPS細胞 心筋細胞 成熟化 インシリコ イオンチャネル 安全性薬理

1. 研究開始当初の背景

(1) 2007年のヒトiPS細胞の樹立を機に、今までに入手が困難だったヒト心筋細胞を用いたin vitro試験法が可能となり、医薬品候補物質の安全性薬理試験への応用に対する関心が急速に高まっている。特に、動悸、失神及び不整脈として現れる医薬品の重篤な副作用であるトルサード・ド・ポアント(TdP)は、抗不整脈薬をはじめとして、非循環器系作用薬である抗腫瘍剤、抗生物質、抗精神病薬など医薬品投与時に起こり得る副作用であるため、創薬の過程において、QT間隔延長作用及び催不整脈性をもつ医薬品候補物質を評価する必要がある。

(2) 2013年に米国はFDAを中心とする国際コンソーシアムCiPA(Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay)、2014年に日本でコンソーシアムJiCSA(Japan iPS cardiac safety assessment)が結成され、国際的にも機運が高まった。JiCSA/CiPAではhERGチャネル阻害による再分極遅延のみに着目した現行の試験法(ICH S7Bガイドライン)を改良し、新たな催不整脈性リスク評価を目指しており、多点電極システム(Multielectrode array; MEA)に加えて膜電位感受性色素(Voltage-sensitive dye; VSD)を用いたイメージング技術を用いた検証が開始された。

(3) 一方、ヒトiPS細胞由来心筋細胞は自動能を有しており、電気生理学的に未成熟な心筋細胞と考えられる。形態も単離した心筋細胞とは大きく異なり、サルコメア構造も不規則である。創薬応用において、医薬品の反応性がヒト成体組織とヒトiPS細胞由来心筋細胞で差が認められる可能性が指摘されていること、再生医療応用においては左室駆出率の改善が不十分で心機能回復が十分に得られていないことから、ヒトiPS細胞の実用化にはまだ多くの課題が残されている。これらの問題の一部は成熟した心機能を獲得した分化心筋細胞の開発により解決できる可能性が考えられるが、現在までに成熟化を誘導する因子は明らかにされてこなかった。

(4) そこで本研究では、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の成熟化因子を探索し、その詳細なメカニズムを解明する。さらに、成熟心筋の創薬応用の可能性を検討する。これにより、ヒト心臓組織に対する作用をどこまでヒトiPS細胞由来心筋細胞で予測できるのか検証する。

2. 研究の目的

ヒトiPS/ES細胞由来心筋細胞は、ヒト成体心臓組織の心筋細胞と比べて電気生理学的に未成熟であるため、創薬などの実用化の課題となっている。

そこで本研究では、以下の検討を行う。

(1) 成熟化因子を検討し、そのメカニズムを解明する。

(2) ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて、ヒト心臓に対する医薬品の作用をin vitroで予

測できるのか明らかにする。また、成熟化の影響も併せて検討する。

本研究により、臓器に近い成熟化させた心筋により、創薬応用の実現に貢献できると期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒトiPS細胞由来心筋細胞

京都大学で樹立された201B7株(理研バンクより購入)を用いて、胚様体(EB)法あるいは接着法(Uosaki H et al, PLoS One. 2011;6(8):e23657)による分化誘導を行った。また市販のiCell心筋細胞(CDI社)を使用した。

(2) 成熟心筋細胞の作製

KCNJ2チャネル遺伝子は、アデノウイルス法によりヒトiPS細胞由来心筋細胞に遺伝子導入した。

(3) MEAシステムによる機能評価

MEAシステムはMED64(アルファメッドサイエンティフィック社)を用いた。High pass filterは0.1Hz、Low pass filterは1kHzを用いた。細胞を播種したMEAデータは37°C、5% CO₂、95% O₂ガスを通気した条件で記録した。波形に加えて、拍動間隔を示すInter-spike interval (ISI)およびQT間隔に相当するFP持続時間(FPD)を解析した。

(4) VSDを用いた光学測定による機能評価

倒立型マクロ蛍光顕微鏡(ブレインビジョン社)、光学測定系として対物/集光レンズLEICA PLAN APO 2X、500-540nmバンドパスフィルター、560nmダイクロイックミラー、580nm蛍光用ロングパスフィルターを用いた。画像の取得は、超高速CMOSイメージングシステムMiCAM ULTIMA(ブレインビジョン社)を使用した。VSDはDi-8-ANEPPS(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用いた。VSDで標識したヒトiPS心筋細胞シートの伝播速度を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒトiPS細胞由来心筋細胞の電気生理学的な特性

201B7株は、EB形成法および接着培養法を用いて拍動する細胞を作製し、パッチクランプ法により品質評価を行った。その結果、図1Aに示すように、ヒトiPS/ES細胞由来心筋細胞は浅い最大拡張期電位MDPを有することが示唆された。

別の細胞株由来である市販のiCell心筋も同様であったことから(図1B)、もとの細胞や分化誘導法にかかわらず、ヒトiPS細胞由来心筋細胞は未成熟な特性を有することが示唆された。

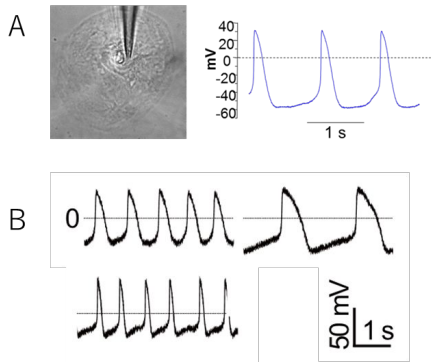


図1 パッチクランプ法によるヒト iPS 細胞由来心筋細胞の品質評価
A: 201B7 株由来心筋、B: iCell 心筋

(2) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の伝播速度の解析

VSD を用いた光学測定の結果から、ヒト iPS 心筋細胞シート内のペースメーカー細胞から活動電位が生じ、10ms 程度で直径約 2mm のヒト iPS 心筋細胞シートに伝播し、数百ミリ秒程持続することが分かった。今回の VSD イメージングデータから、ヒト iPS 心筋細胞の興奮伝播速度は約 20cm/s であった。

ヒト心室筋細胞の伝播速度は 50 cm/s と報告されており (J Physiol. 2007;578:315-26)、ヒト iPS 心筋細胞はヒト心室筋細胞よりも伝播速度が少し遅く、電気生理学的な特性と同様に、未成熟であると考えられる。

(3) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞のインシリコモデルの構築

iCell 心筋細胞のデータをもとにして、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞のインシリコモデルを構築した。

元のモデルとしては、広くヒト心室筋細胞のモデルとして利用されている O'Hara-Rudy モデルを使用した。膜キャパシタンスを 50 pF に、INaF INaL, Ito, IKr, IKs, IpCa, INaCa の最大コンダクタンス値をそれぞれ設定した。また、新たに O'Hara-Rudy モデル If を組み込み、ICaT も設定した。さらに、IK1 を 0.01908 mS/ μ F にすることにより、自動能を再現することに成功した。

以上の結果から、IK1 がもっとも iPS 細胞由来心筋細胞の未成熟性と関連していることが示唆された。

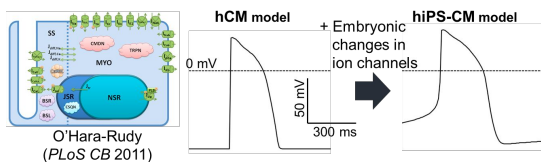


図2 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞のインシリコモデル

(4) KCNJ2 による電気生理学的な成熟化

インシリコの結果から、IK1 がヒト iPS 細胞由来心筋細胞に足りない因子であることが考えられたので、実際に wet の実験で検証を行った。調べた範囲では、iPS 細胞は遺伝子導入効率が低かったことから (data not shown) 図 3 のように分化させた心筋細胞に対して KCNJ2 遺伝子を導入するアプローチを選択した。

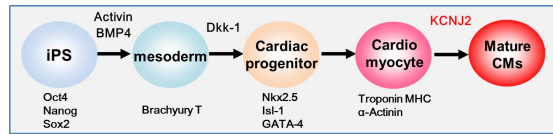


図3 ヒト iPS 細胞の分化誘導法

その結果、201B7 株由来心筋細胞、iCell 心筋細胞、ヒト ES 細胞由来心筋細胞のいずれも自動能が消失した。そこで、KCNJ2 の発現させた iCell 心筋細胞を用いてパッチクランプを行ったところ、図 4A に示すように、MDP が深くなった。さらに、図 4B に示すように、0 相の最大立ち上がり速度 dV/dt_{max} が大きくなったことから、電気生理学的に成熟化することが示唆された。

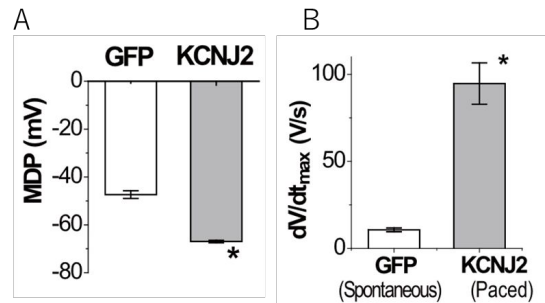


図4 iCell 心筋細胞に対する KCNJ2 発現の影響

(5) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の再分極予備力の評価

成熟心筋細胞を用いて、医薬品の作用を調べた。選択的な hERG 阻害剤である E-4031 により、容量依存的に FPD の延長が認められた。E-4031 に加えて IKs 阻害剤である Chromanol293 を添加したところ、さらに FPD 延長が認められた (図 5)。したがって、本モデル細胞を用いることにより、再分極予備力を評価できることが示唆された。

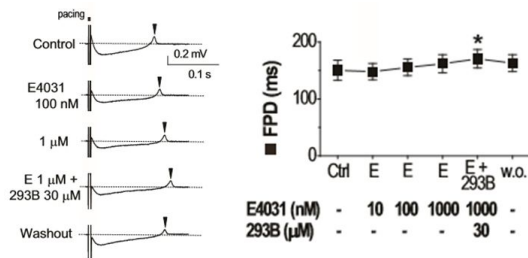


図5 再分極予備力の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

1. 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, 306-9 (2014).
2. 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** 34:302-5 (2014).
3. 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** 53: 100-5 (2015).
4. 諫田泰成, 芦原貴司, 黒川洵子: ヒト iPS 細胞から成熟した心筋細胞の開発と安全性評価への応用, **日本薬理学雑誌** 147: 334-8 (2016).
5. Kanda Y, Yamazaki D, Kurokawa J, Inutsuka T, Sekino Y. Points to consider for a validation study of iPS cell-derived cardiomyocytes using a multi-electrode array system, **J Pharmacol Toxicol Methods**. 81:196-200 (2016).
6. Pamies D, Bal-Price A, Simeonov A, Tagle D, Allen D, Gerhold D, Yin D, Pistollato F, Inutsuka T, Sullivan K, Stacey G, Salem H, Leist M, Daneshian M, Vemuri MC, McFarland R, Coecke S, Fitzpatrick SC, Lakshminpathy U, Mack A, Wang WB, Daiju Y, Sekino Y, Kanda Y, Smirnova L, Hartung T. Good Cell Culture Practice for stem cells and stem-cell-derived models. **ALTEX** 34: 95-132, (2017).
7. Ando H, Yoshinaga T, Yamamoto W, Asakura K, Uda T, Taniguchi T, Ojima A, Shinkyō R, Kikuchi K, Osada T, Hayashi S, Kasai C, Miyamoto N, Tashibu H, Yamazaki D, Sugiyama A, Kanda Y, Sawada K, Sekino Y. A new paradigm for drug-induced torsadogenic risk assessment using human iPS cell-derived cardiomyocytes. **J Pharmacol Toxicol Methods**. 84: 111-127

(2017).

8. Yamamoto W, Asakura K, Ando H, Taniguchi T, Ojima A, Uda T, Osada T, Hayashi S, Kasai C, Miyamoto N, Tashibu H, Yoshinaga T, Yamazaki D, Sugiyama A, Kanda Y, Sawada K, Sekino Y. Electrophysiological Characteristics of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes for the Assessment of Drug-Induced Proarrhythmic Potential. **PLoS ONE**, 11: e0167348 (2016).
9. 諫田泰成, 芦原貴司, 黒川洵子: ヒト iPS 細胞から成熟した心筋細胞の開発と安全性評価への応用, **日本薬理学雑誌** 147: 334-8 (2016).
10. 井出吉紀, 山崎大樹, 諫田泰成, 関野祐子: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位イメージングの測定装置と実験プロトコルの開発, **国立医薬品食品衛生研究所報告** 134: 9-16 (2016).
11. 諫田泰成, 山崎大樹, 関野祐子: ヒト iPS 細胞を利用した心臓安全性評価の開発と国際標準化, **レギュラトリーサイエンス学会誌** 6: 367-74 (2016).
12. Izumi-Nakaseko H, Nakamura Y, Wada T, Ando K, Kanda Y, Sekino Y, Sugiyama A. **J Toxicol Sci**. 42: 183-192 (2017).
13. Li M, Kanda Y, Ashihara T, Sasano T, Nakai Y, Kodama M, Hayashi E, Sekino Y, Furukawa T, Kurokawa J. Overexpression of KCNJ2 in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for the assessment of QT-prolonging drugs (in press)

〔学会発表〕(計34件)

1. 諫田泰成: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性評価法の現状と将来の展望, 第41回日本毒性学会シンポジウム, 神戸 (2014.07)
2. 黒川洵子, 古川哲史, 関野祐子, 諫田泰成: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた新規心毒性評価系, 第41回日本毒性学会, 神戸 (2014.07)
3. 李敏, 林英里奈, 諫田泰成, 関野祐子, 古川哲史, 黒川洵子: ペーシング可能なヒト iPS 細胞由来心筋標本の開発, 第130回日本薬理学会関東部会, 東京 (2014.07)
4. 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, 京都 (2014.10)
5. 諫田泰成, 関野祐子: 第5回 DIA cardiac safety workshop, In vitro cardiac safety testing using iPS cells, 東京 (2014.10)
6. 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回日本生化学会シンポジウム, 京都 (2014.11)
7. 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、東京(2014.11)
8. 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 回大会シンポジウム、横浜(2014.11)
 9. 諫田泰成: 安全性薬理試験へのヒト iPS 細胞由来神経細胞の応用—催不整脈評価は可能か?、第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム、東京(2014.12)
 10. 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、千葉(2015.01)
 11. Junko Kurokawa, Jun-ichi Okada, Erina Hayashi, Takashi Ashihara, Takashi Yoshinaga, Seiryu Sugiura, Li Min, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Kohei Sawada, Toshiaki Hisada, Tetsushi Furukawa. A novel approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. 59th Biophysics meeting, Baltimore, USA (2015.02).
 12. 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、名古屋(2015.03)
 13. 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 iPS 細胞由来心筋の創薬応用、第 88 回日本薬理学会、名古屋(2015.03)
 14. 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(2015.03)
 15. 黒川洵子、芦原貴司、諫田泰成、古川哲史. ペーシング可能なヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた QT 延長薬剤の作用解析. 第 10 回トランスポーター研究会年会、東京(2015.06)
 16. 黒川洵子、諫田泰成、芦原貴司、古川哲史: ヒトが創った心臓: iPS 細胞から大人の心筋細胞を創る秘蔵のレシピ公開、生体機能と創薬シンポジウム(2015.08)
 17. 諫田泰成: ヒト iPS 細胞由来の成熟心筋細胞の作製と標準化に向けた次世代評価法の開発、第 3 回霧島会議、東京(2016.02)
 18. 木村麗子、児玉昌美、古谷和春、諫田泰成、倉智嘉久、関野祐子、古川哲史、黒川洵子: ヒト iPS 細胞由来心筋の活動電位形成に関連する遺伝子の定量的発現解析におけるリファレンス遺伝子の選定、第 89 回日本薬理学会年会、神奈川(2016.03)
 19. 林英里奈、木村麗子、李敏、安東朋子、芦原貴司、関野祐子、古川哲史、諫田泰成、黒川洵子: 内向き整流性カリウムチャネルを過剰発現させたヒト iPS 由来心筋細胞を用いた薬理作用解析、第 89 回日本薬理学会年会、神奈川(2016.03)
 20. 諫田泰成: ヒト iPS 細胞技術を用いた次世代心臓安全性評価: JiCSA の取り組み、第 89 回日本薬理学会年会シンポジウム、東京(2016.03)
 21. 関野祐子、諫田泰成: ヒト iPS 心筋細胞を利用した催不整脈性リスク評価と ICHS7B 改訂に関する国際動向について、第 43 回日本毒性学会シンポジウム、金沢(2016.06)
 22. Yasunari Kanda and Yuko Sekino. Toward a proposal of the revised ICH S7B: Update of the activities of Japan iPS cardiac safety assessment (JiCSA) and CiPA. 5th Chinese Safety Pharmacology Society. (2016.05)
 23. Yasunari Kanda. Electrophysiology studies of iPS-derived cardiomyocytes as a surrogate of QT prolongation, Safety Pharmacology Society Annual Meeting Symposium, Vancouver, Canada (2016.09.)
 24. Junko Kurokawa, Yasunari Kanda, Masami Kodama, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa. Effects of anticancer drugs on contractile behaviors of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte monolayers evaluated with an image-based analysis using motion field imaging technique. Safety Pharmacology Society 16th Annual Meeting, Vancouver, Canada (2016.09).
 25. Daiju Yamazaki, Yoshinori Ide, Yasunari Kanda, Yuko Sekino. Drug-induced proarrhythmic testing methods using VSD and calcium indicator in FDSS/uCell, Safety Pharmacology Society 16th Annual Meeting, Vancouver, Canada (2016.09).
 26. Yoshinori Ide, Michinori Ichikawa, Mariko Kobayashi, Kenji Tsubokura, Daiju Yamazaki, Yasunari Kanda, Yuko Sekino. Cardiac safety assessment methods for human iPSC-derived cardiomyocytes: A voltage sensitive dye imaging with a high-speed CMOS sensor and a non-staining imaging with polarizers, Safety Pharmacology Society 16th Annual Meeting, Vancouver, Canada (2016.09).
 27. Junko Matsuo, Yukiko Arimura, Akiko Suzuki, Tomoko Yoshifuku, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Asako Uchiyama. Comparison of pharmacological responses to an IKr inhibitor between action potential

and field potential in human iPS cell-derived cardiomyocytes, Safety Pharmacology Society 16th Annual Meeting, Vancouver, Canada (2016.09).

など合計 34 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 諫田泰成、関野祐子：ヒト iPS 細胞を用いた新たな心臓安全性評価法の開発と国際標準化：JiCSA の取り組み、谷本学校毒性質問箱第 18 号 (2016).
2. 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第 16 号 (2014).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：正常な内向きカリウム電流特性を有する iPS 細胞由来心筋モデル細胞

発明者：黒川洵子、古川哲史、諫田泰成、関野祐子

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/2014/002888 号

出願年月日：平成 26 年 5 月 30 日

国内外の別： 外国

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.nihs.go.jp/phar/phar-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諫田 泰成 (KANDA, Yasunari)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号：70510387

(2) 研究分担者

大島 英揮 (Oshima, Hideki)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40378188

(3) 連携研究者

黒川 洵子 (Kurokawa, Junko)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：40396982