

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350520

研究課題名(和文)簡易動物実験データを用いた薬物誘発性不整脈予測のための薬物作用推定システム

研究課題名(英文)Arrhythmogenic Drug Evaluation System by Simplified Animal Experiments

研究代表者

天野 晃 (Amano, Akira)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：60252491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心筋細胞の電気生理モデルの工学的応用として、創薬コストを押し上げる要因の一つであり、重要性が高い薬物による催不整脈性を解析するツールを、細胞モデルのパラメータ最適化を用いて実現した。このシステムでは、麻酔下開胸モルモットを用いて吸引電極による活動電位波形の計測を行う。薬物投与前後の活動電位波形を最適に再現する細胞モデルのイオンチャネル透過係数を求め、透過係数の変化により、薬物によるイオンチャネル阻害を予測する。実際の実験により IKr, IKs, ICaL については、ある程度の精度で阻害率を予測可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed a tool to evaluate arrhythmogenic effect of drugs which is one of the most problem in drug discovery, by using cardiac cell model parameter optimization. In the system, the cardiac action potential is first measured by open chest guinea pig suction electrode. Then the action potential shape is reproduced with cardiac cell model by optimizing the ion channel permeability parameters. Finally, the changes in the ion channel permeability is used to estimate drug effect to the ion channels. From the experimental results, the drug inhibition to the ion channels of IKr, IKs and ICaL could be estimated by certain extent.

研究分野：生体機能シミュレーション

キーワード：薬物誘発性不整脈 活動電位波形 心筋細胞モデル イオンチャネル HERG

1. 研究開始当初の背景

生命科学分野の研究の進展により蓄積された膨大な量の知見を用いて、システムとしての生体を理解する目的で、個々の知見を定量モデルとして統合する研究が重要視されるようになり、フィジオーム研究と呼ばれる分野を形成するに至っている。

定量モデルの構築としては、特に心筋細胞や心臓に関する領域では大きな成果を挙げており、詳細な細胞モデルが、心室筋、心房筋、ペースメーカー細胞等で構築されており、動物実験の再現性もかなり高くなっている。

その一方で、生命科学分野では、投入した研究予算に対し、具体的な実用化に結び付く成果が少なく、定量モデルの構築に関しても、有益な応用テーマが模索されてきている。そのようなテーマの一つとして、フィジオーム研究の初期の頃から、薬物による副作用の予測をモデルを用いて行うことが検討されてきた。

現在、創薬プロセスにかかるコストは増大しており、開発初期の段階で効率的に候補物質のスクリーニングができるシステムへの期待は大きい。特に、現在の創薬プロセスでは、心臓に対する催不整脈性の検査で開発プロセスから落ちる物質が非常に多い。催不整脈性は、心筋細胞における hERG チャンネル (IKr チャンネル) の阻害が原因とされており、効率よく hERG ブロックを予測できるシステム、あるいは、hERG ブロックを起こすにも関わらず不整脈性は低くなる可能性等を予測できるシステムに対する期待が大きい。

このような研究として、ヨーロッパ VPH (Virtual Physiological Human) プロジェクトにおいて、2008 年より preDiCT プロジェクトが開始され、細胞モデルを用いた催不整脈性予測システムの構築が試みられた。しかしながら、このプロジェクトでは、hERG チャンネルのみを対象としたパラメータ推定を行ったことから、最終的にあまり良い結果が得られず 2011 年にプロジェクトが終了となっている。

2. 研究の目的

このシステムの特徴の一つは、生体への影響を、in vivo に近い状態で評価するため、単離細胞ではなく、摘出した心臓を用いて、薬物かん流下で吸引電極を用いた計測を行っている点である。評価関数の改良等により、特に hERG チャンネルに関しては、かなり高い推定精度が得られるようになってきている [高木, 天野, 生体医工学シンポ, 2013]。しかしながら、吸引電極法で計測される活動電位波形は、単離細胞の波形とやや異なることから、特に hERG 以外のチャンネルの推定精度が低いという問題があった。この点を改良するため、本提案では、複数の細胞モデルを用いた組織レベルのモデルを用いた吸引電極波形の生成を行い、薬物作用推定精度の向上を目指す。また、現在までの実験データの解析

結果から、単一刺激頻度による計測データを用いただけでは、パラメータ推定に 2 自由度の不定性が残ることが示唆されている。そこで、本研究では、刺激頻度の異なる実験データを用いて、不定性が解消できる可能性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 実験データの収集

本システムは、実用的なシステムとなることを目指しており、データの収集は、再現性を確保できるよう外注によるデータ計測を行っている。システムの精度を確認するためには、ある程度のデータ量が必要であり、複数のデータ取得を行う。同様の薬物作用予測システムに関する研究 (preDiCT プロジェクト [Mirams, Card. Res., 2011]) では、刺激頻度の異なる 2 種類の実験データを用いて IKr の阻害率を予測しており、本研究でも、この知見を生かし、2 種類の刺激頻度データを取得する。具体的には、対象とするイオンチャンネルの選択的阻害剤の 1 種類、あるいは 2 種類の混合液を用いて、単一および複数のイオンチャンネル阻害時の吸引電極波形データを収集する。また、収集するデータとして、新たに刺激頻度が異なる 2 種類のデータを取得する。

(2) 組織モデルの構築

従来のシステムでは、吸引電極による計測波形 (Exp) と、シミュレーションによって生成される波形 (Sim) とは、心筋細胞活動電位の第 0 相および、1 相がかなり異なる。細胞モデルは、単離細胞を対象として構築されているが、単離細胞と組織の状態で計測した波形とは異なることが知られており、この差によって、活動電位長の評価に問題が生じたり、第 1 相の評価が難しいなどの問題が生じている。そこで、本研究では、シミュレーションによって生成される波形を組織モデルの波形に変更する。具体的には、複数の細胞を用いた心筋細胞ケーブルモデルを構築し、流入流出電流が、組織の中の細胞に近い状態を実現し、その波形を用いる。

(3) 2 刺激頻度データを用いた阻害率推定

活動電位波形は刺激後の経過時間により、電流成分が変化する。複数の刺激頻度データを用いることにより、経過時間に対して電流成分の異なる波形が得られるので、前記のチャンネル電流の不定性を解消できる可能性が高い。具体的には、平成 26 年度に行う解析によって、どの程度の刺激頻度差が必要かを検討し、不定性が解消できる評価関数を設計する。この方法の一つとして、現在既に評価関数として検討している方法として、活動電位波形全体の形状の類似性を評価するだけでなく、前半と後半に分割して評価し、最悪値を全体の評価値とする方法、さらに、この際に時間軸の微小な差異を補正することで、時間に敏感な急激な電流変化に対応する方法等を適宜導入する。

(4) 最適点含有領域を用いた予測結果の改善

評価関数の最適化等を行っても、パラメータ空間の解析結果によっては、どうしても解消できない不定性が残る可能性がある。この場合、イオンチャネルに対する薬物作用を一意に決定することは難しいが、薬物作用をいくつかの可能性に限定できる可能性は残る。薬物作用を一意に決定できない場合についても、特に、催不整脈性に関与する IKr チャネルに関しては、現在までの解析結果では、一定精度で阻害の有無を予測できる可能性が高い。そこで、予測精度改善の手法の一つとして、モデルを用いた解析結果から、予測された薬物作用を示す可能性のある薬物作用のパターンを逆問題としてデータベース化し、結果的に得られるイオンチャネルの阻害率の可能な解を列挙することで、あり得る薬物効果とあり得ない薬物効果を解析する。

4. 研究成果

(1) 実験データの収集

実験では、8 週齢、400~500 [g] の雌性 Hartley 系モルモットを日本エルエスシー株式会社から購入し、実験に使用した。モルモットにペントバルビタールナトリウム 50 [mg/kg]、ヘパリンナトリウム 800 [単位/kg] を腹腔内投与することで麻酔を行った後、気管にカテーテルを挿入し、人工呼吸器を用いて呼吸を制御した。その後、開胸し、露出した左心室心外膜表面に吸引電極を押し当て計測を行った。その際、右心房にペースング電極を当て、200 [ms] の間隔でペースングを行った。吸引電極は外径約 4 [mm] の三方チューブコネクタを使用し、作成した。側方端には吸引装置に繋がるチューブを差し込み、80 [mmHg] の吸引圧を加えた。上方端からは 0.5 [mm] の銀線を通し、計測端子に接続している。下方端には組織に接する部分(先端)に向かって細くなるように加工したポリエチレンチューブを接続した。下図は吸引電極法を用いて麻酔下のモルモットから計測した、代表的な心筋細胞活動電位波形である。振幅は 50~60 [mV] 程度であり、Patch Clamp 法や微小電極法で計測される活動電位波形の振幅よりも小さい。また、第 0 相の脱分極はなだらかであり、第 1 相の急峻なピークが観察されない。そして、拍動している心臓に吸引電極を押し当てた場合に再分極相終盤に現れる、緩やかな再分極が確認されている。また、吸引電極では、第 0 相付近において 1 [mV] 以下のゆっくりとした電位の変化が起こることがあると言われている。これは dip や step と名付けられ、dip は心電図の Q 波が、step は心電図の R 波が観測されるタイミングと同時に観測される。右上図の活動電位波形からも第 0 相の前には dip と考えられる膜電位の減少と、step と考えられる膜電位の緩やかな上昇が確認できる。

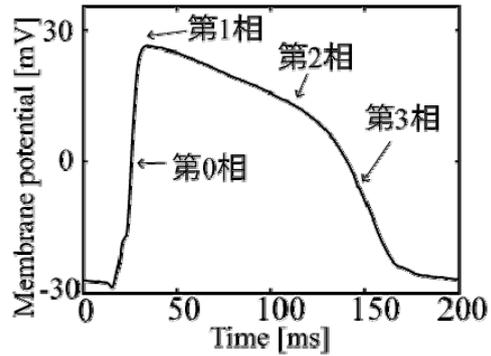


図1 計測吸引電極活動電位波形

(2) 組織モデルの構築

吸引電極を用いた計測は、拍動している心臓の心外膜表面に電極を設置することを想定している為、隣り合う細胞の影響を受けていると考えた。その為、作成したモルモット心筋細胞モデルを用いて下図のように一次元配列モデルを作成した。今回は 200 個の細胞を連結させ、1 番目の細胞に電気刺激を与えている。

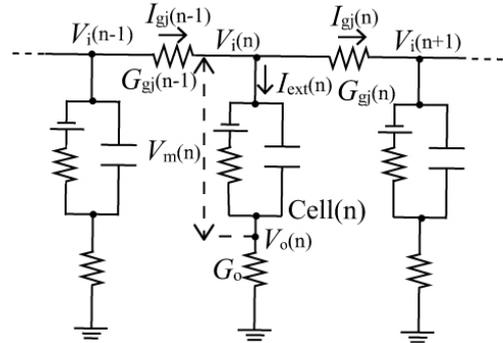


図2 吸引電極モデル

このような組織を想定すると、活動電位波形は、細胞外へ流出する電流の影響を受け変化する。ここでは、流出電流量を見積もる方法として、活動電位波形の振幅と傾きを用いる手法を検討した。その結果、傾きを振幅で除した値を用いることで、流出電流量を一定の精度で推定できることが確認できた。

(3) 活動電位波形を用いた阻害率推定

ここでは、5 つのイオンチャネルを対象として、活動電位波形を事前に生成したデータベースを用いて高速に類似波形探索を行うことでイオンチャネルの阻害率を予測した。入力波形に対して、探索された類似波形を下図に示す。この結果からわかるように、第 0 相に関しては、組織モデルの項で説明したように、計測系の影響を受けるため、必ずしも類似度が高くないが、それ以降の形状は、かなり正確に再現されていることがわかる。

実際には、このようにして得られた類似波形は一つに決定することが難しいので、類似度が高い波形を集合として得ることとし、その中に含まれるイオンチャネル阻害率の分布を用いて、薬物作用を推定するという手法を用いている。

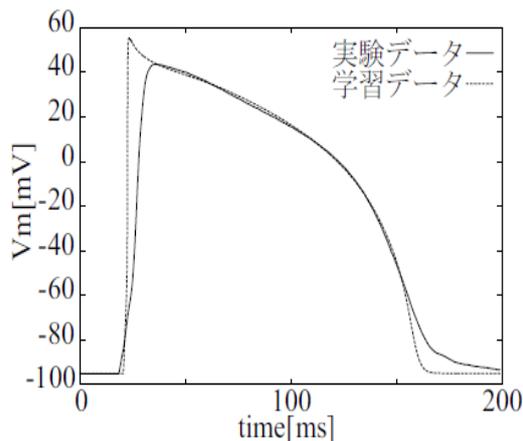


図3 計測波形と生成された最適波形

(4)最適点含有領域を用いた予測結果の改善
上記のように、最適波形を集合として得ることで、薬物作用によるイオンチャネル透過率の可能性がある分布の変動を見ることにより、比較的安定にチャネル阻害率を予測可能であることが確認できた。下図は、IK1 阻害薬を投与した場合の IK1 チャネル阻害の予測結果である。この場合、約 50%の阻害が予測される結果となった。

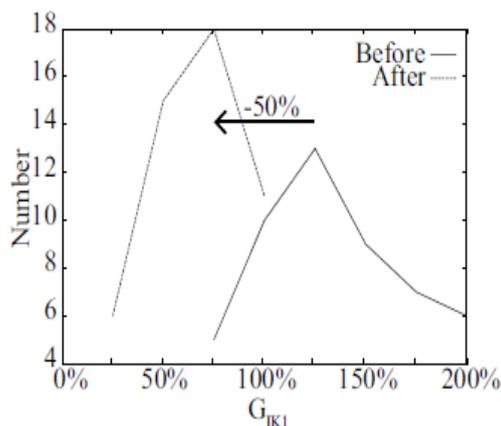


図4 イオンチャネル阻害率予測

(5)まとめ

提案手法には、未だ、評価結果が十分ではなく、どの程度の精度で薬物作用が推定できるかという点が明確ではないという問題があるが、一定の精度で薬物作用を予測可能であることは示すことができた。実用化のためには、より一層の改良が必要であるが、生体モデルを工学的に応用することで、従来の薬物作用推定とは基本的な考え方が異なる方法を提案できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Muangkram Y, Wajjwalku W, Amano A, Sukmak M. The novel primers for mammal species identification-based mitochondrial cytochrome b sequence:

implication for reserved wild animals in Thailand and endangered mammal species in Southeast Asia.

Mitochondrial DNA, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1080/24701394.2016.1238902> 査読有. pp.1-11

- ② Kosuke Taniguchi, Hiromasa Utaki, Daichi Yamamoto, Yukiko Himeno, Akira Amano. Mechanisms Underlying the Effects of Ventricular Activation Time on Hemodynamic Parameters: a Simulation Study. *Advanced Biomedical Engineering*, 5:94-104, 2016.

<http://doi.org/10.14326/abe.5.94> 査読有

- ③ Yuttamol Muangkram, Akira Amano, Worawidh Wajjwalku, Tanu Pinyopummintr, Nikorn Thongtip, Nongnid Kaolim, Manakorn Sukmak, Sumate Kamolnorrath, Boripat Siriaroonrat, Wanlaya Tipkantha, Umaporn Maikaew, Warisara Thomas, Kanda Polsrila, Kwanreaun Dongsaard, Saowaphang Sanannu, Anuwat Wattananorrasate. Genetic diversity of the captive Asian tapir population in Thailand, based on mitochondrial control region sequence data and the comparison of its nucleotide structure with Brazilian tapir. *MITOCHONDRIAL DNA*, 2016.

<http://dx.doi.org/10.3109/24701394.2016.1149828> 査読有 pp.1-5

- ④ Yukiko Himeno, Masayuki Ikebuchi, Akitoshi Maeda, Akinori Noma, Akira Amano. Mechanisms underlying the volume regulation of the interstitial fluid by capillaries: a simulation study. *Integrative Medicine Research*, Vol. 5, 1, pp. 11-21, 2016.

<http://doi.org/10.1016/j.imr.2015.12.006> 査読有

- ⑤ Hiromasa Utaki, Kosuke Taniguchi, Hiroya Konishi, Yukiko Himeno, Akira Amano. A Method for Determining Scale Parameters in a Hemodynamic model incorporating Cardiac Cellular Contraction model. *Advanced Biomedical Engineering*, 5:32-42, 2016.

<http://doi.org/10.14326/abe.5.32> 査読有

- ⑥ Florencio Rusty Punzalan, Yoshitoshi Kunieda, Akira Amano. Program Code Generator for Cardiac Electrophysiology Simulation with Automatic PDE Boundary Condition Handling. *PLoS ONE* 10(9): e0136821. doi:10.1371/journal.pone.0136821, 2015. 査読有

- ⑦ 天野 晃, プンザラン フローレンシオ ラステイ, 嶋吉 隆夫, 國枝 義敏 複雑な計算スキームを必要とする多階層生体機能モデルのシミュレーションシステム. 生体医工学, Vol. 53, No. 3, pp.115-122, 2015. 10.11239/jsmbe.53.115 査読有
- ⑧ 姫野友紀子, 天野晃, 野間昭典 心臓ペースメーカー細胞のイオン機序について. 循環器専門医, 23/1, 9-17, 南江堂, 2015/03. 査読有
- ⑨ Takao Shimayoshi, Chae Young Cha, Akira Amano. Quantitative Decomposition of Dynamics of Mathematical Cell Models: Method and Application to Ventricular Myocyte Models. PLoS ONE 10(6): e0124970. doi:10.1371/journal.pone.0124970, 2015. 査読有
- ⑩ Y. Himeno, K. Asakura, C. Y. Cha, H. Memida, T. Powell, A. Amano, A. Noma. A human ventricular myocyte model with refined representation of excitation-contraction coupling. Biophys. J., Vol. 109, 2, pp.415-427, 2015. 10.1016/j.bpj.2015.06.017 査読有
- ⑪ Yuki Hasegawa, Takao Shimayoshi, Akira Amano, Tetsuya Matsuda. Application of the Kalman Filter for Faster Strong Coupling of Cardiovascular Simulations. IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics, 99, 2015. 10.1109/JBHI.2015.2436212 査読有
- ⑫ Komori Y, Amano A, Maehara K, Jin L, Narazaki M, Matsuda T. A motion tracking method that applies a spread spectrum communication technique to tagging MR imaging. Magn Reson Med Sci., 14(1):25-34, 2015. 10.2463/mrms.2016-0116 査読有
- ⑬ K. Asakura, C. Cha, H. Yamaoka, Y. Horikawa, H. Memida, T. Powell, A. Amano, A. Noma EAD and DAD mechanisms analyzed by developing a new human ventricular cell model. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 116(1):11-24, 2014. 10.1016/j.pbiomolbio.2014.08.008. 査読有
- ⑭ 天野晃. 圧反射モデルを導入した循環動態モデル. 循環制御, 第 35 巻, 第 2 号, pp.84-88, 2014. 査読有
- ⑮ 細木ゆかり, 小池千恵子, 竹田有加里, 天野晃 杆体・錐体視細胞光応答機構初期過程モデルによる視物質一トランスデュースン間シグナル増幅現象の再現. 生体医工学, Vol. 52, No. 3, pp.145-155, 2014. 査読有
- ⑯ 長谷川雄基, 三島充晴, 嶋吉隆夫, 天野晃, 松田哲也. 貫壁性不均一性が心エネルギー効率に与える影響に関する理論的解析. 生体医工学, Vol. 52, No. 3, pp.129-135, 2014. 査読有
- [学会発表] (計 53 件)
- ① Taiki Tatara, Takeru Arita, Yoshitoshi Kunieda, Akira Amano Semi-automatic mapping of variables between biological function model and numerical calculation scheme Cardiac Physiome Workshop, 2016. 8. 25. ソウル (韓国)
- ② Yamamoto Natsuki, Matsumoto Tamami, Ujihara Mirei, Noma Akinori, Amano Akira The ionic mechanisms underlying the propagation of action potential and the extracellular potential changes analyzed in a one-dimensional cell array of human ventricular cell models Cardiac Physiome Workshop, 2016. 8. 24. ソウル (韓国)
- ③ 天野晃 循環系の統合的理解のための細胞・組織・臓器レベル生理学知見集約生体機能モデル 第 55 回生体医工学会大会, 2016. 4. 28, 富山国際会議場(富山県・富山市)
- ④ Maekawa Saki, Watanabe Risa, Himeno Yukiko, Noma Akinori, Amano Akira Measurement of cardiac action potential in anesthetized guinea pig for estimating drug action on ion channel conductance 日本生理学会大会, 2016. 3. 22, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- ⑤ 山本菜月, 氏原美玲, 野間昭典, 天野晃 ヒト心室筋細胞モデル一次元配列を用いた J 波の成因メカニズム解析 近畿生理談話会, 2015. 10. 24. 近畿大学(大阪府・東大阪市)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
天野 晃 (AMANO, Akira)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号: 60252491
- (2) 研究分担者
野間 昭典 (NOMA, Akinori)
立命館大学・生命科学部・非常勤講師
研究者番号: 00132738