

令和元年5月19日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04684

研究課題名（和文）薬物誘発性不整脈に関する機能解析および発症予測へ向けた統合的評価法の構築

研究課題名（英文）Multidisciplinary approach to cardiac arrhythmogenesis assessment during drug discovery

研究代表者

黒川 洵子（Kurokawa, Junko）

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：40396982

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPS細胞とコンピューターシミュレーションを統合し、心毒性を正確に評価することを目的として行った。

初年度から3年間をかけて、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の特性について、単細胞機能解析を中心とした実験により定量的に解析した。その結果、内向き整流性カリウムチャネル電流が成体心室筋と比べ著しく低く、このことが分化心筋の静止膜電位および自動能に大きく寄与していることを発現系モデルおよびインシリコモデルで実証した。分化心筋細胞の拍動を解析したところ、収縮関連分子の発現パターンによって収縮能および薬物反応の違いが見られた。拍動解析により、より適切な細胞を選別することが可能になると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、突然死に代表される重篤な医薬品副作用の予防を長期的目標としている。今回の成果は、ヒトiPS細胞とコンピューターシミュレーションを統合することにより、評価結果のばらつきを生じさせる分子をあぶり出し、薬物による不整脈発生機構のメカニズムにつながる点が学術的に意義深い。開発中の新薬が心臓に異常をもたらす心毒性は、上市後の創薬開発失敗の約3割を占める。大きな要因として、心筋はヒト培養細胞がなかったため、非臨床試験におけるリスク予測が困難であったことが挙げられる。今回、ヒトiPS細胞とシミュレーションを統合することで、非臨床安全性私見のリスク予測性が向上することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we integrated technologies using human iPS cells and computer simulations, and aimed to accurately evaluate cardiotoxicity.

The characteristics of human iPS cell-derived cardiomyocytes were quantitatively analyzed by experiments centered on single cell function analysis over the four years. As a result, it was demonstrated by expression system models and in silico models that the inward-rectifying potassium channel current is significantly lower than adult ventricular muscle, which greatly contributes to the resting membrane potential and automaticity of differentiated myocardium. Analysis of the beating video imaging of differentiated cardiomyocytes revealed differences in contractility and drug response depending on the expression pattern of contraction-related molecules. It can be expected that the cell motion analysis makes it possible to select more appropriate cells to evaluate certain drugs.

研究分野：薬理学

キーワード：薬理学 イオンチャネル 不整脈 心不全 iPS細胞 シミュレーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者はこれまでチャンネル病(不整脈)による再分極異常と関連した分子機構についての研究を行ってきており、本研究ではその研究内容を発展させ、心毒性試験の予測性向上を出口とした新たな展開を狙った。

(2) 研究開始当初は、臨床で散見される心毒性を非臨床段階で精確には予測できていなかった。その主因として、種差、hERG以外のマルチチャンネル及びシグナル調節の影響が挙げられていた。種差を解決するにはヒトiPS細胞が利用可能であり、マルチチャンネルやシグナル調節など多因子が関与する複雑系の解析を可能にするには計算科学的アプローチが大きな威力を発揮することから、ヒトiPS細胞の応用とインシリコ心臓モデルが「次世代の評価法」として注目を集めていた。しかし、ヒトiPS細胞由来分化心筋は未熟な生理学的特性を示すため、実験データを成人心室筋モデルに導入して互いに検証し合うことができない。従って、これらのアプローチは統合されずに、別個に進められていた。

### 2. 研究の目的

(1) 突然死に代表される重篤な医薬品副作用の予防を長期目標とし、ヒトiPS細胞とコンピュータシミュレーションを統合したアプローチにより、心毒性を予測する新たな方法を構築することを研究目的とした。

(2) ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞は未熟な生理学的性質を示すので、成人心筋の毒性を直接的には評価できない。本研究では、ヒトiPS細胞に関する独自の成熟化技術を導入することにより、wetとdryを統合した成人心室筋評価系を構築する。従来の薬物急性作用解析、今回新たに行う慢性作用解析及び不整脈トリガー因子の解析の結果を計算科学でマルチスケールに統合して、種々の生理的及び病理的状态における不整脈評価を可能とし、個人差を反映する系の基盤を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトiPS細胞由来心筋細胞インシリコモデル(viPS-CM)を開発し、viPS-CMを用いた催不整脈モデルを構築した。市販ヒトiPS細胞由来心筋細胞において、活動電位形成に関わるイオンチャンネルトランスポーターの発現・機能を定量的に解析した。その結果をヒト心室筋モデルに導入して、iPS由来心筋に特徴的なモデルへと変化させた。

(2) 不整脈リスク因子の解析として、薬剤作用に対する交感神経系刺激と性ホルモンの影響を調べた。これまでの研究代表者の研究結果から、L型カルシウムチャンネル、遅延整流性カリウムチャンネル2種(IKrチャンネルとIKsチャンネル)の機能および発現を解析した。

(3) 薬物の慢性毒性による催不整脈性と心リモデリングへの影響、特に抗がん剤の心毒性を調べた。拍動心筋培養細胞を用いて、拍動の力学的機能を非侵襲的かつ経時的に測定し、約2週間の培養を行った。

(4) ヒト心筋での影響を調べるために、性ホルモンや薬物の影響について、インシリコモデルと心筋細胞の結果を統合して評価した。また、催不整脈効果のある薬物の影響も検討した。

### 4. 研究成果

本研究では、ヒトiPS細胞とコンピュータシミュレーションを用いた2つの技術を統合させ、心毒性を正確に評価することを目的として行った。

初年度から4年間をかけて、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の特性について、単細胞機能解析を中心とした実験により定量的に解析した。そしてその結果を基に、インシリコモデルを用いて、活動電位や薬物反応の特徴について解析した。その研究成果を下記に列挙する。

#### (1) ヒトiPS細胞由来心筋細胞インシリコモデル(viPS-CM)の開発

市販ヒトiPS細胞由来心筋細胞の異なる4株において、イオンチャンネルトランスポーターの遺伝子発現を定量性RT-PCR法により比較検討したところ、すべての株においてIK1チャンネルをコードするKCNJ2が少なく、IfチャンネルをコードするHCN4の発現が高いという結果となった。viPS-CMの作成のため、Ifチャンネルを方程式で表し実験で得られた測定値を導入し、電流波形を正しく記述できた(図1)。そこで、ヒト心室筋細胞モデルであるO'Hara-Rudyモデルを基に、図1のようにIfチャンネルの方程式を導入したりIK1チャンネル電流密度を10%にするな

ど、測定した機能からモデルを改変した様々な改変をしたところ、 $I_{K1}$  チャンネル電流密度を 10% にしたときに静止膜電位が浅くなり自動能が発生するという結果となった。以上より、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の自動能形成に  $I_{K1}$  チャンネル電流成分が最も寄与していることが示唆された（雑誌論文 2）。

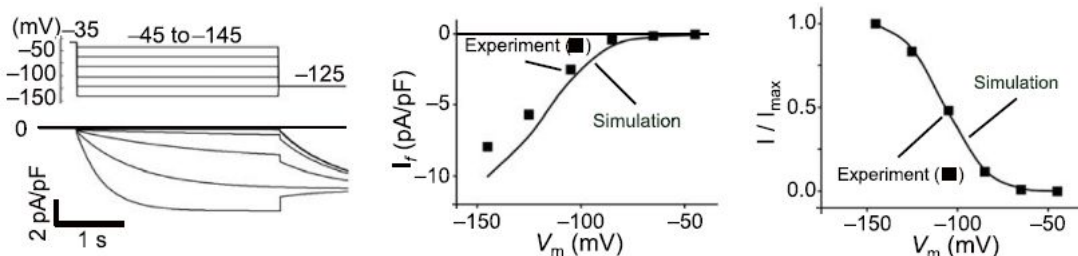


図 1.  $I_f$  チャンネル電流のシミュレーション（雑誌論文 2 より；Open access）

### （ 2 ） 内向き整流性カリウム ( $I_{K1}$ ) チャンネル強制発現による電気的性質の成熟化

（ 1 ）にて開発された viPS-CM において、細胞の自律拍動能に  $I_{K1}$  チャンネル電流が電流が成体心室筋と比べ著しく低く、このことが分化心筋の静止膜電位および自動能が大きく寄与していることが示唆された。そこで、 $I_{K1}$  チャンネル強制発現系モデルを用いて、モデルを実証したところ、刺激応答型の活動電位を計測することができた（図 2）。さらに、この強制発現細胞にてペーシング刺激により活動電位を発火させ、典型的 hERG (ヒト  $I_{Kr}$  チャンネル) 阻害薬 E-4031 (10-100 nM) を細胞外から添加したところ、濃度依存的に活動電位幅が延長した（図 2）。未処理のヒト iPS 細胞由来心筋細胞では、100 nM の E-4031 を添加すると 100% の細胞にて活動電位発生が阻害されたことから、 $I_{K1}$  チャンネルの発現量は薬物応答を正確に評価する際にも重要であることが示された。

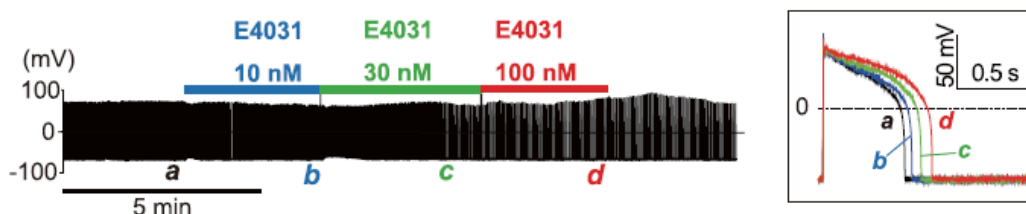


図 2. KCNJ2 強制発現ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞における活動電位測定の典型例  
ペーシングによる活動電位測定中に hERG 阻害薬 E-4031 を添加（雑誌論文 2 より）。

### （ 3 ） ヒト iPS 由来分化心筋の力学的機能に対する抗がん剤の影響

ヒト iPS 由来分化心筋細胞シートが自律拍動するビデオ動画を培養条件下にて非侵襲的に測定し長期に計測するために、研究代表者らが 2014 年に発表した動きベクトル法を導入した。条件を最適化したところ、収縮弛緩速度について 2 週間で 10% 以内の変化率で計測することに成功した。この結果を受けて、抗がん剤ドキソルビシン、エルロチニブを 8 日間添加したときの機能変化を計測した（論文投稿準備中）。さらに、収縮関連分子の発現パターンによって収縮能および薬物反応の違いが見られた（特許出願中）。拍動解析により、より適切な細胞を選別することが可能になると期待できる。

### （ 4 ） 不整脈発生に対する性ホルモンの影響

多くの不整脈には、発症に性差が見られる。中でも、心室性不整脈である QT 延長症候群は hERG チャンネル抑制を中心としたチャンネルブロッカーによって発症し、女性で発症する割合が高い。発症性差については、臨床研究から性ホルモンの関与が示唆されてきており、

これまで研究代表者らは性ホルモン受容体非ゲノムシグナルを介したイオンチャネルの制御やエストロゲンによる HERG チャンネルの直接阻害が関連すると提唱してきた。我々以外にも、性ホルモン受容体ゲノム調節によるギャップ結合や  $I_{to}$  チャンネルの機能変化が報告されてきた。これらの報告されてきたシグナルの性差は、心室筋細胞モデルへ反映させてきた。今回はこのモデルを用いて、交感神経系刺激が急に興奮するタイミングで、発症する心室性不整脈に、エストロゲンによる HERG 阻害が関与する可能性を見いだした。さらに、ドッキングシミュレーションにより、エストロゲンが hERG チャンネルに結合することも示した、本研究は、米国・カナダ・日本との国際共同研究として、*Journal of Physiology* に発表した（雑誌論文 3）。

さらに、心臓の 3 次元モデルを用いて、薬剤による心電図変化をスーパーコンピュータにより計算させ詳細な波形変化をリスト化した（雑誌論文 1、9）。このリストは、新たな組み合わせのマルチチャンネルブロッカーの催不整脈性を予測する際に活用されることを期待している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 30 件中 10 件)

1. Okada J#, Yoshinaga T, Kurokawa J, Washio T, Furukawa T, K Sawada, Sugiura S, Hisada T (2018) Arrhythmic hazard map for a 3D whole-ventricles model under multiple ion channel block. *Br J Pharmacol*, 175, 3435-3452.
2. Li M, Kanda Y, Ashihara T, Sasano T, Nakai Y, Kodama M, Hayashi E, Sekino Y, Furukawa T, Kurokawa J\*. (2017) Overexpression of KCNJ2 in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for the assessment of QT-prolonging drugs. *J Pharmacol Sci*, 134, 75-85.
3. Yang PC, Perissinotti L, López-Redondo F, Wang Y, DeMarco KR, Jeng MT, Vorobyov I, Harvey RD\*, Kurokawa J\*, Noskov S\*, Clancy CE\* (2017) A multiscale computational modeling approach predicts mechanisms of female sex risk in the setting of arousal-induced arrhythmias. *J Physiol (Lond.)*, 595, 4695-4723.
4. Okata S, Yuasa S\*, Suzuki T, Ito S, Makita N, Yoshida T, Lin M, Kurokawa J, Seki T, Egashira T, Aizawa Y, Kodaira M, Motoda C, Yozu G, Shimojima M, Hayashiji N, Hashimoto H, Kuroda Y, Tanaka A, Murata M, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Furukawa T, Fukuda K. (2016) Embryonic type  $Na^+$  1 channel  $\beta$ -subunit, SCN3B masks the disease phenotype of Brugada 2 syndrome. *Sci Rep*, 6, 34198.
5. López-Redondo F, Kurokawa J#, Nomura F, Kaneko T, Hamada T, Furukawa T, Yasuda K. (2016) A distribution analysis of action potential parameters obtained from patch-clamped human stem cell-derived cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci*, 131, 141-145.
6. Nagamori S, Wiriyasermkul P, Espino Guarch M, Okuyama H, Nakagomi S, Tadagaki K, Nishinaka Y, Bodoy S, Takafuji K, Okuda S, Kurokawa J, Ohgaki R, Nunes V, Palacín M, Kanai Y#. (2016) Novel cystine transporter in renal proximal tubule identified as a “missing partner” of cystinuria-related SLC3A1 (rBAT). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 113, 775-780.
7. Kurokawa J, Kodama M, Clancy CE and Furukawa T (2016). Sex hormonal regulation of cardiac ion channels in drug-induced QT syndromes. *Pharmacology & Therapeutics*, **168**: 23-28.
8. Saito Y, Nakamura K, Yoshida M, Sugiyama H, Ohe T, Kurokawa J, Furukawa T, Takano M, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Ito H. (2015) Enhancement of Spontaneous Activity by HCN4 overexpression in Mouse Embryonic Stem Cell-derived Cardiomyocytes - a Possible Biological Pacemaker. *PLoS ONE*, **10**, e0138193.
9. Okada J#, Yoshinaga T, Kurokawa J, Washio T, Furukawa T, Sawada K, Sugiura S, Hisada T. (2015) Screening system for drug-induced arrhythmogenic risk combining patch clamp and a

heart simulator. *Science Advances*, **1**, e1400142.

10. 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 (2015) 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**:100-105.

〔学会発表〕(計 81件中6件抜粋)

11. 黒川洵子 (2018.7.20) 心毒性の性差 . 日本毒性学会年会シンポジウム(日本薬理学会との共催)、口演、大阪グランキューブ
12. Kurokawa J, (2018.7.8) Ion channels in iPS-derived cardiomyocytes. WCP2018 KYOTO Satellite Symposia New Insights into Ion Channel Functions and Pharmacology. Invited. Higashi honganji, Kyoto.
13. 黒川洵子 (2018.5.26) . Electrophysiological maturation of human iPS-derived cardiomyocyte. 国際心血管薬物療法学会、シンポジウム、リッツカールトン京都
14. 黒川洵子 (2017.11.29-30) ヒト iPS 細胞技術と *in silico* 技術を用いた薬物誘発性不整脈の予測、構造活性相関シンポジウム、県南生涯学習センター土浦、招待講演.
15. Kurokawa J (2016.7.11-13) Regulation of cardiac ion channels by sex hormones. International and Interdisciplinary Symposium 2016 “Towards a New Era of Cardiovascular Research” 東京医科歯科大学、M&D タワー鈴木記念講堂
16. Kurokawa J (2015.9.22-23) Sex differences in cardiac channel regulations. The International Congress of Gender Medicine “Junior meets Senior”, Berlin, Germany. Invited lecture.

〔図書〕(計 2件)

17. 黒川洵子 (2016) 第3章5節 ヒト iPS 細胞を用いた医薬品の心毒性評価 . In: iPS 細胞の安全・高品質な作製技術、技術情報協会、東京.
18. 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 p33-40.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1件)

名称: 画像情報処理システム、細胞型ごとの情報の生成方法  
発明者: 黒川洵子、山口賢彦  
権利者: 静岡県立大学  
種類: 特許  
番号: 2017-147893  
出願年: 2017年  
国内外の別: 国内

〔その他〕

研究室ホームページ <http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/rinsho/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 芦原 貴司

ローマ字氏名: Takashi Ashihara

所属研究機関名: 滋賀医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8桁): 80396259

研究分担者氏名: 諫田 泰成

ローマ字氏名：Yasunari Kanda

所属研究機関名：国立医薬品食品衛生研究所

部局名：薬理部

職名：部長

研究者番号（8桁）：70510387

研究分担者氏名：児玉 昌美

ローマ字氏名：Masami Kodama

所属研究機関名：東京医科歯科大学（現所属：東京大学）

部局名：研究・産学連携推進機構（現所属：定量

職名：学振研究員

研究者番号（8桁）：30512248

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡田 純一

ローマ字氏名：Junichi Okada

研究協力者氏名：中井 雄治

ローマ字氏名：Yuji Nakai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。