

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19499

研究課題名（和文）動きベクトル解析によるヒトiPS細胞由来心筋細胞の部位特異的性質の非侵襲的識別

研究課題名（英文）Noninvasive analysis of contractile function of human iPS-derived cardiomyocytes

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、動きベクトル解析を用いてヒトiPS細胞由来心筋細胞の部位特異的性質を非侵襲的識別することを試みた。その結果、ヒトiPS細胞から分化誘導して作成した心筋細胞には性質にはばらつきがあり、心房筋マーカーと心室筋マーカーに対する抗体免疫染色により識別した細胞ごとに機能を解析した結果（市販株）、心房型の収縮・弛緩速度は心室型よりも早いことを見出した。この結果は、マウス心房細胞と心室細胞で見られる違いと同じ傾向であり、異なるクラスの心血管治療薬の反応性にも違いについて計算科学的に示した。以上より、非侵襲的に薬物の作用を評価できる実験系の構築を達成したといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果はヒトiPS細胞由来心筋細胞同株の細胞間における機能的ばらつきを定量的に評価できるようにしたことであり、基礎および応用研究に汎用されるヒトiPS細胞由来分化細胞の品質評価法を確立した点は学術的に意義が高い。

そして、ヒトiPS細胞を用いることで、これまで問題となっていた実験動物とヒトの違いから生じる非臨床試験と臨床でのギャップを埋め、不整脈や心不全などの重篤な副作用（心毒性）を新薬開発の非臨床段階で忌避する技術に应用できることが社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to non-invasively identify the tissue-specific properties of human iPS cell-derived cardiomyocytes using motion vector analysis. We demonstrated that commercially available human iPS cell-derived cardiomyocytes have diverse properties by examining the contractile functions of cells that have been dyed by antibody immunostaining against an atrial muscle marker and a ventricular muscle marker. It was found that the contraction speed and relaxation speed of atrial-type was faster than those of ventricular-type. This result was in the same tendency as the difference observed in mouse atrial myocytes and ventricular myocytes, and there was a difference in the reactivity among different class of cardiovascular reagents. From the above, we have developed a novel experimental system that can non-invasively evaluate the drug actions.

研究分野：薬理学

キーワード：心毒性 ヒトiPS細胞 品質評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬剤安全性前臨床試験における心毒性評価の現状

医薬品により心室の電氣的回復が延長すると心電図上の QT 時間が延長 (QT 延長) し、ときに致死性不整脈 (TdP) が生じる。よって、創薬安全性試験では、主な薬物標的である hERG チャネル阻害の in vitro アッセイおよびイヌ心電図 in vivo 測定によって、全ての内服薬の QT 延長が評価される。しかし、QT 延長作用のある薬剤が必ずしも TdP を誘発するわけではないため、多くの偽陽性を生んでおり、試験系のさらなる改善が望まれている ()。

この問題解決のため、ヒト iPS 細胞もしくはシミュレーション (計算科学) を用いて、薬剤の催不整脈性を評価する取り組みが国際的に産官学共同で推進されている。心筋細胞は非分裂細胞なので iPS 細胞技術により初めてヒト心筋アッセイが可能となる。その結果、心筋イオンチャネルへの薬物作用と不整脈リスクの相関についての学術的理解が飛躍的に進んだ ()。

一方、抗がん剤の長期投与が誘発することがある心不全も重篤な副作用として良く知られている。しかしながら、抗がん剤を必要とする患者のリスクと心不全毒性に対する非臨床での試験系は存在しない。そこで、現在、ヒト iPS 細胞を利用して新たに心不全毒性を非臨床で評価しようとする動きが出ている ()。

(2) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心毒性評価系について

ヒト iPS 細胞を心筋に分化誘導させて作製した細胞は、その元となった個人のゲノムを持つ。従って、先天性疾患の基質となり得る変異がある場合、ときにその標的組織に分化誘導させた細胞では、疾患の表現型を示すことがある ()。シグナル特性は未熟で細胞株ごとにばらつくため、この iPS 心筋の性質のばらつきが薬剤の作用や副作用を評価する際に問題となる可能性がある ()。これまで、研究代表者は薬剤の再不整脈性の評価に I_{K1} 電流の機能が大切であることを示してきたが ()、収縮機能についての解析はなかった。そこで、研究代表者が東京医科歯科大学および SONY と共同で開発したヒト iPS 由来心筋細胞の動きベクトルを解析する手法 () を利用して、薬物の心不全毒性を非侵襲的に評価する手法の開発を提案した。

2. 研究の目的

本課題研究では、新薬開発で問題となっている抗がん剤の心筋収縮抑制を評価することを将来目標とし、ヒト iPS 細胞を利用して、心房筋と心室筋を識別できる高精度さと慢性作用の解析を可能とする非侵襲性を兼ね備えた新規の実験系を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

技術的な課題 (下記 2 点) を克服するため、オリジナルの動きベクトル解析法を基にして段階的に新システムを構築した。

(1) 課題 1 : 長時間測定のための実験環境の整備 :

心筋細胞の収縮力をモニターするシステムは、現在、2 種類ある。心筋細胞の収縮の動画から動きベクトルを算出する方法と特殊な接地面に培養してインピーダンスを測定する方法である。研究代表者は、ソニーが技術基盤を開発した前者のシステムを採用している ()。同システムの大きな利点の一つに、非侵襲であることが挙げられるので、慢性毒性の解析に必須となる細胞環境の最適化に有利となる。培地交換の方法は薬 10 日間の安定的な計測を基準とした。

(2) 課題 2 : 分化心筋細胞の細胞ごとのばらつきの評価 :

心房と心室の性質を非侵襲的に識別するシステムを構築した。まずマウス心臓を標本として、心房・心室それぞれの拍動に特徴的な動きベクトル値を解析した。シングルセルの解析を行うために、ガラス電極法およびシングルセルソーター法を検証した。市販ヒト iPS 由来心筋細胞 (タカラバイオ) 等を用いて、心房・心室マーカーで認識する細胞の動きベクトルを測定し、マウス心臓との違いを比較解析した。また、MLC2a と MLC2v 以外のマーカーがあるかどうかについて、マイクロアレイ解析の結果を基に文献調査を行った。

(3) 本システムを用いた薬理学的解析 :

マウス心筋細胞の実験では、動きベクトル解析のパラメーターと心筋収縮の機能との関連を明らかにするために各種チャネル阻害剤を用いて解析した。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を使った実験では、臨床で心不全を引き起こす薬物の作用を解析した。アドリアマイシン心筋症 (ドキ

ソルピシン累積投与)はROSを介したDNA障害やアポトーシスとの関連が示唆され、ヒトiPS細胞で個人差が示されることも報告されたことを受けて、デクサラドキサンの保護効果などを調べた。

4. 研究成果

(1) 培地交換の方法について、初心者・熟練者による違いや細胞の密度や培養ディッシュのコーティング剤などの培養条件を変えて検証した。その結果、熟練者によって毎日半量ずつの培地を交換する方法によって、動きベクトル解析による全てのパラメーターの変動が10%以内に安定した条件で12日間の測定に成功した。条件としては、ピペッティングによる細胞への圧負荷および作業中の温度変化の2点が心筋細胞の収縮機能に大きな影響を与えることを見出し、今後の細胞の品質管理にとって重要な知見が得られた。

(2) マウスから摘出した心臓から単離した心房筋細胞と心室筋細胞の収縮特性の違いを詳細に解析した結果、心室筋細胞に比べて心房筋細胞の方が、「短時間で速く」収縮・弛緩を行うことが示された。収縮弛緩の持続時間については、過去の報告でもあったように活動電位持続時間が心房筋細胞の方が短いことと良く一致している。この違いは、成体マウスと新生児マウス(生後1日)のいずれにおいても保存されていた。次に、ヒトiPS細胞由来心筋細胞については、心房筋マーカーとしてMLC2a、心室筋マーカーとしてMLC2vの発現のいずれかが優位であるものをそれぞれ心房型および心室型として解析した。その結果、心室型細胞に比べて心房型細胞の方が、「短時間で速く」収縮・弛緩を行うことが示された。この傾向は、マウス心臓で見られた傾向と同様であり、種を超えて保存されている性質であるという新たな知見が得られた。なお、定量PCRによる遺伝子発現解析(論文発表)およびマイクロアレイ解析の結果を基に文献調査を行ったところ、MLC2aとMLC2vが最も心房筋と心室筋の違いを示すマーカーとして適切であることが分かった。以上より、動きベクトル解析により、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の性質のばらつきを検出するという研究計画の目的は達成された。

(3) マウス新生児の収縮において、内向きのカルシウムチャンネルをコードする分子が心房筋特異的に関与していることを非選択的および選択的阻害薬で示した。心房と心室の収縮機能の違いを説明しうる知見として重要と思われる。ヒトiPS細胞由来心筋細胞の実験では、カルシウム拮抗薬およびアゴニストの作用を調べたところ、用量反応性に差が見られた。本結果は、心房型もしくは心室型の違いが薬物への反応性に影響を与える可能性を示すものであり、非臨床における評価医系として使用する際に注意を喚起するものである。また、抗がん剤の心毒性については、ドキシソルピシンとエルロチニブを使用した実験で、3日投与に比べて8日投与の方が心毒性ありとなしの差を明確に示すことが出来、論文として発表した。本結果は、心毒性評価において、長期投与の重要性を示唆するものである。また、デクサラドキサンおよびインスリンの保護効果が見られた。

<引用文献>

Kanda Y, Yamazaki D, Kurokawa J, Inutsuka T and Sekino Y (2016). 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.

諫田泰成, 芦原貴司, 黒川洵子 (2016) 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, 日薬理誌 147: 1-5.

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 β -subunit, SCN3B masks the disease phenotype of Brugada 2 syndrome. *Sci Rep*, **6**, 34198.

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.

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.

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.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakamoto K, Sakatoku K, Sugimoto S, Iwasaki N, Sano Y, Yamaguchi M, Kurokawa J	4. 巻 140
2. 論文標題 Continued exposure of anti-cancer drugs to human iPS cell-derived cardiomyocytes can unmask their cardiotoxic effects.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci,	6. 最初と最後の頁 345-349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kodama M, Furutani K, Kimura R, Ando T, Sakamoto K, Nagamori S, Ashihara T, Kurachi Y, Sekino Y, Furukawa T, Kanda Y, Kurokawa J	4. 巻 140
2. 論文標題 Systematic expression analysis of genes related to generation of action potentials in human iPS cell-derived cardiomyocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci,	6. 最初と最後の頁 325-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kernik DC, Morotti S, Wu HD, Garg P, Duff HJ, Kurokawa J, Jalife J, Wu JC, Grandi E, Clancy CE.	4. 巻 597
2. 論文標題 A computational model of induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes incorporating experimental variability from multiple data sources.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol (Lond.),	6. 最初と最後の頁 4533-4564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP277724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 黒川 洵子	4. 巻 34
2. 論文標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた薬物作用評価法の現状	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica,	6. 最初と最後の頁 80-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 山口賢彦、中川桃夏、鈴木結衣、佐野優介、白川健、間島慶、神谷之康、坂本多穂、諫田泰成、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来分化心筋細胞の収縮機能に対する統合的品質評価
3. 学会等名 第10回日本安全性薬理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎菜々美、坂本多穂、山口賢彦、行方衣由紀、田中光、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS由来心筋細胞内ナトリウム濃度に対する電気刺激の作用
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川洵子、坂本多穂
2. 発表標題 心毒性の性差
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎菜々美、坂本多穂、行方衣由紀、山口賢彦、西田基宏、諫田泰成、田中光、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS由来心筋細胞内ナトリウム濃度に対する電気刺激の作用
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川桃夏、鈴木結衣、佐野優介、山口賢彦、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞の薬理学的性質のばらつき
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gen Igarashi, Momoka Nakagawa, Masahiko Yamaguchi, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Evaluation of cardiotoxicity of doxorubicin on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte monolayers and single cells by using field motion imaging
3. 学会等名 The 24th Shizuoka forum on health and longevity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kevin R DeMarco, Pei-Chi Yang, Kazuharu Furutani, Branden Brown, John R Dawson, Sergei Y Noskov, Vladimie Yarov-Yarovoy, Jon T Sack, Junko Kurokawa, Heike Wulff, Colleen E Clancy, Igor Vorobyov
2. 発表標題 Assessment of molecular mechanisms of sex-dependent drug-induced arrhythmias.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Momoka Nakagawa, Yui Suzuki, Yusuke Sano, Masahiko Yamaguchi, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Noninvasive evaluation of cardiac types of iPS cell-derived cardiomyocytes using cell motion imaging
3. 学会等名 The 50th NIPS International symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた新規心毒性評価法の開発
3. 学会等名 産学官金連携マッチング会、静岡県立大学（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木結衣、佐野優介、児玉昌美、諫田泰成、山口賢彦、坂本多穂、古川哲史、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来分化心筋細胞の心筋型に特異的な収縮機能評価
3. 学会等名 第9回日本安全性薬理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒徳航平、岩崎菜々美、山口賢彦、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞の動きベクトル解析による抗がん薬心毒性の評価
3. 学会等名 第138回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木結衣、佐野優介、高橋健太郎、児玉昌美、諫田泰成、山口賢彦、早川智広、松居恵理子、古川哲史、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた新規薬効および毒性評価法の構築へのセルモーションイメージングの応用
3. 学会等名 第137年会日本薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川洵子、芦原貴司、古谷和春、永森収志、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞の電気生理学的成熟化に対する統合的アプローチ
3. 学会等名 日本生理学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurokawa J, Kodama M, Kanda Y, Ashihara T, Nagamori S, Suzuki Y, Sakatoku K, Iwasaki N, Sano Y, Sakamoto K
2. 発表標題 A multidisciplinary approach for pharmacological assessment using human iPS-derived cardiomyocytes.
3. 学会等名 WCP2018 KYOTO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川洵子、山口賢彦、坂本多穂
2. 発表標題 動きベクトル解析によるヒトiPS細胞由来心筋細胞のモーションイメージング
3. 学会等名 平成30年度生理研研究会「生体界面研究会」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木結衣、中川桃夏、佐野優介、山口賢彦、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 動きベクトル解析を用いたヒトiPS細胞由来心筋細胞の力学的機能に対する薬剤作用解析
3. 学会等名 第4回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川洵子、山口賢彦、坂本多穂
2. 発表標題 画像解析によるヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた薬剤評価
3. 学会等名 平成30年度生理研研究会「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohei Sakatoku, Nanami Iwasaki, Shintaro Sugimoto, Masahiko Yamaguchi, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Evaluation of semi-chronic cardiotoxicity of anticancer drugs on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte monolayers by using field motion imaging.
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma and Food (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yui Suzuki, Yusuke Sano, Momoka Nakagawa, Masami Kodama, Yasunari Kanda, Masahiko Yamaguchi, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Development of a novel functional assay to evaluate cardiac toxicity using human iPS cell-derived cardiomyocytes.
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma and Food (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohei Sakatoku, Nanami Iwasaki, Shintaro Sugimoto, Masahiko Yamaguchi, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Evaluation of semi-chronic cardiotoxicity of anticancer drugs on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte monolayers by using field motion imaging
3. 学会等名 The 23rd Shizuoka forum on health and longevity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野優介、鈴木結衣、山口賢彦、児玉昌美、古川哲史、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 フィールドモーションイメージングによるマウス心筋の力学的機能の解析
3. 学会等名 第28回日本循環薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川洵子、芦原貴司、古谷和春、永森收志、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞の電気生理学的成熟化に対する統合的アプローチ
3. 学会等名 日本生理学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた次世代心毒性評価へ向けた基礎研究.
3. 学会等名 SONY-CDIJ共催セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒川洵子
2. 発表標題 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,
3. 学会等名 構造活性相関シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kurokawa J
2. 発表標題 Localized signaling regulation of cardiac ion channels through progesterone receptor.
3. 学会等名 The 69th Korean Physiological Society Annual meeting, (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒川洵子、山口賢彦
2. 発表標題 ヒトiPS由来心筋細胞のセルモーションイメージング
3. 学会等名 平成29年度生理研研究会「生体界面研究会」
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-147893	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>静岡県立大学 薬学部 生体情報分子解析学分野 https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/rinsho/ 研究シーズ集 https://www.u-shizuoka-ken.ac.jp/media/seeds2019-2020_027.pdf 静岡県立大学教員データベース https://db.u-shizuoka-ken.ac.jp/show/prof687.html</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考