

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670126

研究課題名(和文) MVP法を用いたin vitro心毒性アッセイシステムの開発と応用

研究課題名(英文) In vitro cardiotoxicity assay system using MVP technology

研究代表者

古川 哲史 (Furukawa, Tetsushi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80251552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬物の心毒性は、創薬の開発中止・市販薬のリコールの重要な原因となっており、そのアッセイ系、特に開発早期段階のin vitroアッセイ系の確立は製薬業界から大きな期待が寄せられている。今回、多電極アレイ(MEA)システムとソニー株式会社が開発した動くベクトル(MVP)法を用いて、心筋細胞の電気活動と収縮能を同時にアッセイするシステムを構築した。ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて、陽性・陰性変力作用をもつ既存薬の作用を高精度にアッセイできることを確認した。最近抗がん剤の心毒性が問題となっているが、同心毒性をin vitroでアッセイすることができた。

研究成果の概要(英文)：Cardiotoxicity of drugs is the main cause of drop out from the pipeline and recall from the market. Thus, the development of assay system, especially in vitro assay system in the early stage of drug development, has been strongly required from pharmaceutical companies. Here, we used multi-electrode array (MEA) system and motion vector prediction (MVP) system developed by the Sony corporation to establish the system to simultaneously assay electrical activity and contractility in cardiomyocytes. We confirmed in human iPS-derived cardiomyocytes that drugs known to possess positive and negative inotropic effects could be reliably assayed. Recently, the cardiotoxicity of anti-cancer drugs has been strongly concerned. We successfully assayed cardiotoxicity of anticancer drugs.

研究分野：循環薬理

キーワード：心毒性 動きベクトル

1. 研究開始当初の背景

薬物開発段階がある程度進んだ後に、in vivo アッセイあるいは臨床試験の段階で副作用が発見されることは製薬業界にとっては大きな痛手である。そこで、創薬のできるだけ早い段階、すなわち in vitro アッセイ段階で薬物副作用抽出の精度を向上させることが望まれる。

副作用の中でも、心毒性は肝毒性と並んで市販薬のリコール・開発中の薬物のラインからの撤退の要因として大きな割合を占める。心毒性では、電気的副作用(QT 延長性不整脈など)は有名であり、その in vitro アッセイ系の開発は精力的に行われている。一方、力学的副作用のアッセイはいまだに in vitro でロウスループットなアッセイ系であるマグヌスを用いた張力測定が用いられている。このような現状を踏まえて、今世界中で in vitro ハイスループットアッセイ系を構築する様々な試みが行われている。

2. 研究の目的

ソニー株式会社が開発した、共同で臨床応用を実用化を目指している MVP(motion vector prediction)法を用いて、ヒト iPS 由来心筋細胞の力学的特性の評価が可能であるか否か検討すること、可能と判断された場合これを用いて薬物の心毒性評価システムを構築しその動作確認を行うこと、の2点を目的とする。

3. 研究の方法

MVP 法では心筋細胞の収縮・弛緩速度を求めることができるが、これが心筋細胞の発生張力の変化を反映するか否かはまだ確認されていない。そこで、一定の剛性を持つゲル上に心筋細胞を培養し、心筋細胞収縮がゲルに与える発生張力を算出し、収縮速度と発生張力の相関関係の有無を検討する。発生張力は、Engler ら (J. Cell. Sci. 2008;121:3794-3802)の traction force measurement 法を応用して行う。心筋細胞を培養する足場となるゲルを作成するときに蛍光ビーズを混入させ、心筋細胞の収縮に伴う蛍光ビーズの移動距離とゲル剛性からフーリエ変換を用いて発生張力を算出し、同時測定する MVP 法による収縮速度との相関を調べる(図 3 左)。図 3 右にはパイロット実験で求めた力場マップを示す。Positive inotrope であるイソプロテレノール、

negative inotrope であるベラパミル・BDM を投与し、収縮速度・発生張力を同時に測定し、収縮速度から発生張力を求めるアルゴリズムを作成する。

開発段階で、MVP 法の測定は MEA 法で QT 延長評価に用いられているものと同じ約 10^7 kPa のディッシュ上で行った。ところが、生体内では心筋細胞は一定の剛性のある細胞外基質の足場上に存在することから、従来のディッシュ上での測定の妥当性に懸念がもたれる。

心毒性には、不整脈発生につながる電気現象に対する副作用と心不全につながる力学現象に対する副作用の両者がある。電気現象に対する副作用は、MEA 法による細胞外電位記録により行われており、これと MVP 法を組み合わせることにより電気現象と力学現象を同時に記録することが可能となる。

MEA・MVP 同時アッセイシステムの動作確認を行うために、電気現象・収縮力に対する作用が既知の薬物数種類の作用を検討する：

positive inotrope - イソプロテレノール、ジギタリス、シロスタゾール
電気現象に影響する negative inotrope - ベラパミル、ジソピラミド

電気現象に影響しない negative inotrope - BDM、フレカイニド、カルベジロール

同システムの動作確認が取れたところで、薬物の評価に入る。まずは、市販の抗不整脈すべてで MVP 法で収縮・弛緩速度に対する作用を検討し、これらの収縮・弛緩速度に対する作用のリスト化を行う。

次に、同システムをスクリーニングに用いるために多ウェルディッシュで MVP 法の測定を行う。パイロット実験で、すでに 384 ウェルまで測定可能なことが確認されている(図 4)。そこで、化合物スクリーニングへの応用性を評価するために、東京医科歯科大学の化合物ライブラリーからランダムに 1000 化合物を選び、384 ウェルを用いたシステムでスクリーニングを行う。この中から、positive inotrope あるいは negative inotrope の候補が同定された場合は、

同システムを用いたスクリーニングの妥当性を検討するために、これらの化合物の心収縮能に対する作用を従来の方法、細胞内 Ca^{2+} イメージング・ビデオカメラによる edge detection・in vivo での心エコー法・in vivo でのミラーカテーテルによる心内圧測定法、を用いて心臓収縮力に対する作用を検討し、MVP 法による評価との相関性を検討する。

4. 研究成果

蛍光ビーズを封入した 12 kPa および 50kPa のアクリルアミドゲル上で、位相差顕微鏡による動きベクトルと蛍光顕微鏡による traction force の相関を検討した。図 1(A)に典型的な実験データ、図 1(B)に両者の相関関係を示す。動きベクトルと traction force は直線状の関係にあり、動きベクトルにより心筋細胞にかかる力学的力をアッセイできることが確認された。

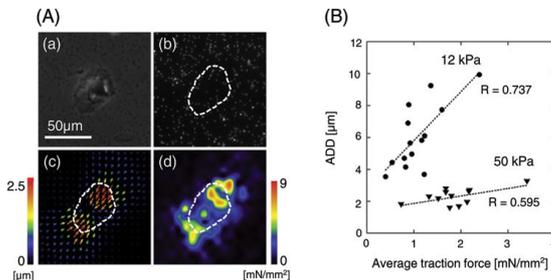


図 1. 動きベクトルと traction force の相関関係

MEA と MVP 同時アッセイシステムを構築した。図 2 に MEA と MVP の同期記録の典型的なトレースを示す。

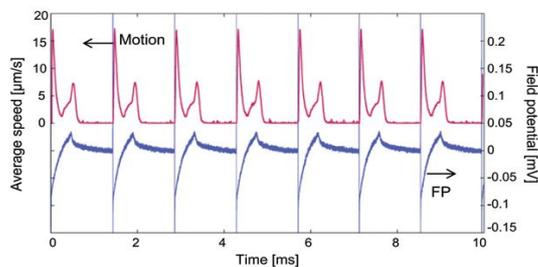


図 2. MEA と MVP の同時記録

これを使って、Na チャネルブロッカー (TTX)、K チャネルブロッカー (E4031)、Ca チャネルブロッカー (verapamil)、および isoproterenol の作用を検討した。図 3、4 に陽性変力作用を示すことが知られ

ている isoproterenol と陰性変力作用を示すことが知られている verapamil の実験結果の図をそれぞれ示す。上にカルシウムトランジェント、下に MEA・MVP 同時記録の結果を示すが、isoproterenol によるカルシウムトランジェントの増加と動きベクトルの速度の増加、verapamil によるカルシウムトランジェントの減少と動きベクトルの速度の減少が示された。これにより、MVP 法により薬物の陽性変力作用・陰性変力作用を高精度にアッセイできることが確認された。

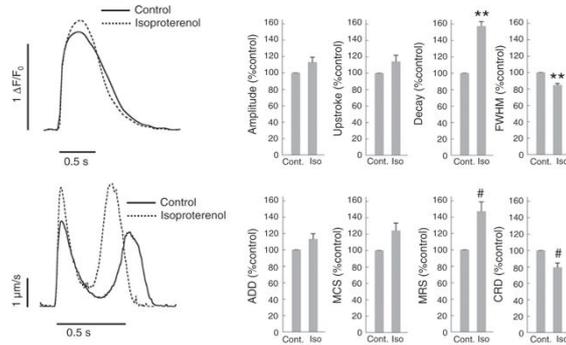


図 3. Isoproterenol による陽性変力作用
上：カルシウムトランジェント、
下：MEA・MVP 同時記録

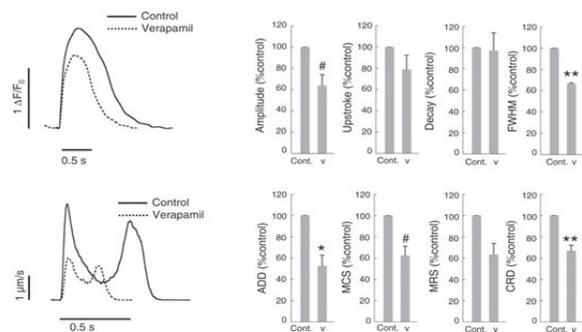


図 4. Verapamil による陰性変力作用
上：カルシウムトランジェント
下：MEA・MVP 同時記録

近年製薬業界では抗がん剤の開発が積極的に行われており、今後も増加することが予測されている。効果的な抗がん剤の開発が期待される一方で、臨床では有害事象の報告が多いことも課題となっている。一般的に臨床では抗がん剤は長期または反復投与という方法がとられており、そのため安全性・毒性試験項目にもなっており、創薬プロセスの早期段階で精度よく評価できる手法が求められている。

そこで重篤な有害事象報告のある抗がん剤について、臨床における心毒性リス

クを MVP 法により検出可能であるかを検証し、従来技術との比較を行った。今回はヒト iPS 細胞由来心筋細胞に対しドキシソルピシン、スニチニブおよびエルロチニブの毒性評価を行った。濃度は臨床で採用される用量（血中濃度）を参考とし、低濃度～高濃度の薬剤に細胞を短期（～20 分）・高濃度のみ長期（～20 時間）間曝露し、動きベクトル解析により、拍動数や振幅などあらゆる項目において評価した。

この結果、ドキシソルピシンに対して、iPS 細胞由来心筋細胞は短長期ともに影響を受けた(表 1)。スニチニブについて、hiPS-CM は収縮弛緩速度ともに影響を受け(表 1)、またその効果は長期的にみられた。ドキシソルピシンとは異なり、拍動リズムはある程度維持していた。一方、特に重篤な心障害報告のなかったエルロチニブに関しては、今回の検証では短期毒性はみられず、本手法では臨床結果と同等の結果が得られたと考えた(表 1)。ただし、長期の高濃度曝露においては拍動数に若干影響がみられ(Fig.3b)、今後も要観察であると考えられた。これら結果を他手法と比較した(表 1)。今回の 3 種抗がん剤について臨床結果に近い現象が再現された。また本手法の特徴である長期観測が可能であることが十分に活かされ、長期曝露による慢性的な影響を検討できたと考える。ただし、スニチニブについては、重篤な QT 延長が報告されており、今回の結果では明確に再現できなかったことは残課題であると考えた。

	Drug	Mechanism	Clinical risk*	In vivo*	Ex vivo*	MVP (in vitro)
アントラサイクリン系抗がん剤	Doxorubicin	Topoisomerase II inhibitor 15µM (50mg/m ²)	血液腫瘍 血中濃度 (500ng/ml) LD50	心筋障害 頻脈	イヌ ● (1~5mg/kg)	● (10~100 µg/mL (抽出 172µM)) ● (10~100 µM)
	Erlotinib	Tyrosine kinase inhibitor 958ng/mL = 2.23µM (150mg)	—	腫瘍性肺疾患 肝機能障害	イヌ — (<100mg/kg)	ウサギ (抽出 標本) — (0.1~30µM)
分子標的薬	Sunitinib	Tyrosine kinase inhibitor 33.4ng/mL = 0.27nM (50mg)	●	QT延長 (5.2%) 心毒性(肝臓) (0.3% Tdp含む)	カンニクザル ● (450mg/kg)	● (0.1~10 µM)

表 1. 抗がん剤の心毒性アッセイ - 既存法との比較

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 3 件)

- Okada J, Yoshinaga T, Kurokawa J, Washio T, Furukawa T, Sawada K, Sugiura S, Hisada T. Screening system for drug-induced arrhythmogenic risk combining a patch clamp and heart simulator. Sci. Advance 2015;1:e1400142. (査読有)
- Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Musumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. ET-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy iPS cell-derived cardiomyocytes. J. Amer. Heart Assoc. 2014;3:e001263. (査読有)
- Hayakawa T, Kunihiro T, Ando T, Kobayashi S, Matsui E, Yada H, Kanda Y, Kurokawa J, Furukawa T. Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 2014;77:178-191. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- .Kurokawa J, Okada J, Hayashi E, Ashihara T, Yoshinaga T, Sugiura S, Li M, Kanda Y, Sekino Y, Sawada K, Hisada T, Furukawa T. A multidisciplinary approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. 59th Biophysical Society Annual Meeting 2015.02.07 Baltimore
- Fujitsuka M, Nakai Y, Kanda Y, Nagamori S, Kanai Y, Furukawa T, Kurokawa J. Effects of substrate elasticity on gene expression profiles of human iPS-derived cardiomyocytes. CBI 学会 2014 年大会 2014.10.28 船堀(千葉)
- 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 回日本毒性学会学術年会 2014.07.02 神戸
- Kurokawa J, Kanda Y, Furukawa T.

- Cardio-toxicity screening system using human iPS-derived cardiomyocytes. The 9th International Symposium of the Institute Network 2014.06.19 大阪
5. 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. 日本薬理学会第 130 回関東部会 2014.06.05 東京
 6. Kurokawa J, Hayashi E, Ashihara T, Kanda Y, Sekino Y, Furukawa T. Analysis of rate-dependence of drug-induced QT-prolongation in human iPS-derived cardiomyocytes. 日本生理学会大会 2014.03.21 神戸(兵庫)
 7. Lopez-Redondo F, Kurokawa J, Nomura F, Kaneko T, Hamada T, Yasuda K, Furukawa T. Human ES- and iPS-derived cardiomyocytes. A comparative electrophysiological study. 57th Biophysical Society Annual Meeting, Philadelphia, February 4th, 2014.
 8. 黒川洵子, 李敏, 諫田泰成, 関野祐子, 古川哲史. ヒト iPS 由来心筋を用いた心毒性評価系の構築. 学術委員会指定トピックス「iPS 細胞の臨床応用—現状と展望」, 第 30 回日本心電学会学術集会、青森、2013 年 10 月 12 日
 9. Hayakawa T, Kunihiro T, Ando T, Unno H, Kobayashi S, Matsui E, Yada H, Kanda Y, Kurokawa J, Furukawa T. Contractile behaviors of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte monolayers evaluated with an image-based analysis using motion vector prediction technique: A comparison with extracellular electrophysiology. 13th annual meeting of Safety Pharmacology Society. Rotterdam, Netherlands, September 16th-19th, 2013.
 10. Min L, Kanda Y, Ashihara T, Sekino Y, Furukawa T, Kurokawa J. Functional optimization of commercially available human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for evaluation of drug-induced QT

prolongation. The 2ndHD Physiology International Symposium, Tokyo, June 29th, 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古川 哲史 Tetsushi FURUKAWA
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：80251552