OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes
Author(s)	田中, 智文
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59741
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【131】

氏名	田中智文（たなかともふみ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　２５５６２　号
学位授与年月日	平成24年４月20日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学位論文名	In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes （ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた心毒性評価システムの開発）
論文審査委員	（主査） 教授　宮崎　純一 （副査） 教授　金井　好克　　教授　楽木　宏実

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

薬剤による副作用の1つに、心電図におけるQT間隔を延長させる、いわゆるQT延長に伴う心室性不整脈がある。心電図のQT 間隔は心室の脱分極および再分極の持続時間として計測されるが、再分極の遅延によりQT延長が起こると、心室性頻拍型の致死性の高い不整脈、Torsades de Pointes (TdP) の誘発に繋がることが知られている。そのため、新薬候補化合物の研究・開発においてQT延長作用の有無を確認することは特に重要であり、当該作用の有無が候補化合物の開発の遅延や中断の主因となるだけではなく、最悪の場合、上市後の回収・撤退をもたらすこともある。

この様な新薬候補化合物のQT延長作用の評価には、一般にマウスやラット、更にはイヌやサル等の実験動物が用いられるが、特に創薬初期段階では全ての化合物の*in vivo*試験を実施することはコストならびに研究効率の面で現実的ではなく、また、ヒトと実験動物との種差の問題もあるため、その前段階としてhERG試験と呼ばれる*in vitro*解析系が頻用されている。本法の有効性・有用性は高く評価されており、広く創薬の場で認知されている心毒性評価系としては、ほぼ唯一の*in vitro*試験系である。しかしながら、本系で陽性と判定される化合物は約7割にも上り、偽陽性を検出する可能性が否定できない。

そこで近年注目されているのが、ヒト誘導多能性幹（Induced pluripotent stem：iPS）細胞から分化誘導した心筋細胞を用いた評価系の構築である。我々はヒトiPS細胞がhERG試験系や*in vivo* QT延長試験系を代替しうる材料となりえるかを確認するために、ヒトiPS細胞の心筋分化誘導系の構築とヒトiPS細胞を用いた薬物の心毒性予測計測系の構築を目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

我々が確立してきたES細胞の心筋分化誘導法ならびに精製法をヒトiPS細胞に適用し、自立拍動能を有する心筋細胞の細胞塊を作製した。当該心筋細胞塊（以下、h-iPS心筋塊）では、未分化細胞のマーカー遺伝子であるOct3/4等の発現は認められず、心筋細胞特異的な転写因子であるNkx2.5や心筋細胞特有のミオシン重鎖やミオシン軽鎖などの遺伝子や蛋白の強い発現が確認された。また、Na^+チャネルのαサブユニット遺伝子であるSCN5A、L型Ca^{2+}チャネルのαサブユニット遺伝子である$Ca_V1.2$、そしてK^+チャネル遺伝子であるKCNH2（hERG）は、未分化状態のヒトiPS細胞では発現が見られず、h-iPS心筋塊で明確な発現が確認できた。

このh-iPS心筋塊を、on-chip多電極（Multi-Electrodes Array：MEA）計測システムを用いて細胞外電位の測定を行った。I_{Kr}選択的阻害剤であるE4031を添加すると、濃度依存的にK^+のピーク（再分極相）の傾斜が緩やかになるとともに減少し、細胞外電位持続時間（Field Potential Duration：FPD）（Na^+の流入による（－）ピークとK^+の流出に伴う（＋）ピークの間隔）の延長が確認された。E4031を培地から除去すると、FPDがE4031添加前と同程度まで戻ることが確認できた。また、Ca^{2+}チャネル阻害剤であるベラパミルの添加実験でも濃度依存的なFPDの短縮が見られ、やはり薬剤を除去することにより添加前と同程度までFPDの回復が認められた。Na^+チャネル阻害剤であるキニジンの添加の場合、拍動数の変化を伴わずに濃度依存的なNa^+チャネルの脱分極の強さ（活動電位の振幅）の低下がみられ、薬剤除去により元の状態に回復した。

続いて、心拍数変化に対する効果を調べるため、アドレナリン作動薬の1種、イソプロテレノールの影響を検討したところ、本剤の添加により、濃度依存的な心拍頻度の増強効果を確認できた。

〔総　括(Conclusion)〕

ヒトiPS細胞から作製した心筋細胞は自立拍動能を有し、各種心筋関連タンパクおよび機能的なチャネルタンパクが発現していることを確認した。

また当該細胞を用いた細胞外電位計測により、QT延長だけでなく、拍動数の変化、複数イオンチャネルへの影響を確認でき、本系が心毒性試験や創薬スクリーニング系として有用であることが示された。

論文審査の結果の要旨

創薬における候補化合物の心毒性評価系としては、動物実験によるin vivo QT延長作用の評価が行われるが、ヒトと実験動物との種差の問題もあるため、その前段階として培養細胞を用いたhERG試験と呼ばれるin vitro解析系が頻用されている。しかし本系で陽性と判定される化合物は7割にも上り、偽陽性を検出する可能性が否定できない。

田中智文君は、ヒト誘導多能性幹（induced pluripotent stem：iPS）細胞から心筋細胞への分化誘導法を確立し、その心筋細胞を用いた薬物の心毒性予測計測系を構築した。当該細胞を用いた細胞外電位計測により、QT延長だけでなく、拍動数の変化、複数イオンチャネルへの影響など、ヒト代替実験動物モデルよりも正確な関連生理学反応を予見でき、本系が心毒性試験や創薬スクリーニング系として有用であることを明らかにした。

以上により、本論文は博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。