The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒトiPS 細胞由来心筋細胞を用いた新規催不整脈作用評価系の開発と有用性の検証
Author(s)	野﨑, 裕美子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69245
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた新規

催不整脈作用評価系の開発と有用性の検証

2017 年

野﨑 裕美子

目次

緒言 1

本論 3

第 1 章　プロトコールの検証と確立

第一節　序論 3

第二節　実験方法 4

第三節　結果 11

第四節　考察 21

第 2 章　参照薬を用いた評価系の検証

第一節　序論 25

第二節　実験方法 25

第三節　結果 26

第四節　考察 44

総括 52

引用文献 54

謝辞 60

本論文中には、以下の略語を使用した。

CSAHi: Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells

CiPA: Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay

MEA: Multi-electrode array

hiPS-CMs: human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes

FPD: Field potential duration

TdP: Torsade de Pointes

EAD: Early after depolarization

TA: Triggered activity

緒言

新薬開発の妨げとなる第一因は安全性（毒性）上の理由であり、心毒性により開発中止もしくは市場撤退に至った薬剤は Phase III までで開発中止になった薬剤の 22%、上市後では市場撤退した薬剤の 45%と報告されている（Watkins PB, 2011)。中でも、薬剤により誘発される不整脈の一つである Torsade de Pointes (TdP）は、その重篤性から新薬開発において最も重要視される心毒性である。TdP は、心室細動や心突然死を引き起こす致死性の多型性心室頻拍であり、先行して認められる心電図波形上の QT 延長が薬剤による催不整脈作用の指標として用いられてきた。これは、心室の再分極が遅延し心電図における QT 間隔が延長すると、TdP などの心室性の頻拍性不整脈の発生リスクが増加することが知られているためである。

このTdPを回避するための心毒性リスク評価の基盤として、2009年に日米EU医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: ICH）での合意に基づき、ICH S7Bガイドライン「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価」が制定された（http://www.pmda.go.jp/files/000156281.pdf）。さらに同年、不整脈の発生し易さと関連した、薬物による心室の再分極遅延の可能性を評価するための臨床試験のデザイン、実施、解析、解釈に関するICH E14ガイドライン「非抗不整脈薬におけるQT/QTc間隔の延長と催不整脈作用の潜在的可能性に関する臨床的評価」が制定され、臨床評価では、心血管系の有害事象とともにQT/QTc間隔に及ぼす作用を調査するべきである、と示された（http://www.pmda.go.jp/files/000156281.pdf）。

本ガイドラインの制定により、非臨床試験において求められる*in vitro* hERG (human ether-a-go-go-related gene) アッセイ、*in vivo* QT測定、およびフォローアップ試験の結果からQT延長ポテンシャルを評価し、さらに臨床試験において厳格なQT延長作用評価を実施することで、少なく

ともQT延長ポテンシャルを示す化合物が臨床試験に移行してからドロップアウトする可能性は非常に低くなった。一方で、QT延長作用が必ずしも催不整脈作用につながるとは限らず、QT間隔の延長はあくまで一つの予測因子でしかないため、薬効に優れた新薬であるにもかかわらず、前述の評価において偽陽性となり、上市される前にドロップアウトしてしまう可能性も否定できない。

現在、この状況を打開しうる新たな研究プラットホームとして最も期待されているのが、「ヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞を用いた心毒性評価システム」である。2017 年末以降に予定されている安全性薬理試験ガイドラインの改定に向け（Colatsky T, et al., 2016)、製薬協主催「ヒト iPS 細胞応用安全性評価コンソーシアム(CSAHi)」を母体として、製薬会社各社がヒト iPS 細胞由来心筋細胞(human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes; hiPS-CMs)を用いた各種安全性評価技術について、新規医薬品開発への応用可能性を実験的に検証し、将来的展望も含めた実用化に向けて世の中に提言するための活動に取り組んでいる（http://csahi.org/en/）。

本研究では、数ある評価技術のうち、細胞の細胞外電位を非侵襲的に測定できる Multi Channel Systems（MCS）社製多電極アレイシステムに着目し、hiPS-CMs を用いた QT 延長および催不整脈作用評価系の最適化プロトコールの構築、および評価系の有用性について検証することを目的とした。そのために、まず実験条件の最適化を行い、さらに、最適化したプロトコールを用いて、施設間差および細胞のロット間差に関する検討を実施した。また、多彩な薬理作用を有する 38 種の薬剤を陽性/陰性対照薬およびモデル化合物として用いて、有用性の検討を実施した。

加えて、実験に使用した細胞の遺伝子解析により、培養期間に伴う細胞性状の変化についても考察し、既存の *in vitro* および *in vivo* 評価系との比較、ヒトへの外挿性の観点から、催不整脈作用に対する当該評価系の有用性について報告する。

本論

第一章 プロトコールの検証と確立

第一節 序論

現在、非臨床試験における心毒性評価は、*in vitro* の hERG アッセイとイヌもしくはサルなどを用いた *in vivo* 心電図測定により QT 延長作用を検出することが世界標準となっている。

hERGとは、心筋活動電位の再分極を担うKイオンチャネルKv11.1をコードする遺伝子であり、本チャネルの阻害作用がQT延長に深く関与していることは既知の事実である（Redfern WS, et al., 2003)。hERG アッセイは本遺伝子を安定発現株として強制発現させ、マニュアルもしくはオートパッチクランプシステムでK電流に対する阻害作用を測定する。しかしながら、数多く存在する心筋イオンチャネルのうちKイオンチャネルのみに対する作用を評価する系であり、心筋活動電位に関与するその他のイオンチャネルに対する作用評価は出来ていない。また、モルモット心筋細胞を用いた活動電位測定やイヌもしくはサルを用いたテレメトリー法等による心電図評価で検出されるQT延長作用と、ヒトでのQT延長／催不整脈作用には必ずしも相関しないケースが存在し、その一要因として発現する各種心筋イオンチャネルの種差が指摘されている（Morissette P, et al., 2013;Varro A, et al., 2000)。

近年、新薬開発におけるこの新たな課題を打開しうる解決策として、「ヒトiPS/ES細胞由来心筋細胞(hiPS/ES-CMs)を用いた心毒性評価システム」が注目を浴びるようになった（Sager PT, et al., 2014)。ヒト由来の心筋細胞を用いて、薬剤の心筋イオンチャネルに対する影響を総合的に評価することで、創薬初期の段階でヒトの心毒性ポテンシャルを予測することが可能となると考えられている。そこで、非侵襲的に細胞外電位を測定できるMulti Channel Systems（MCS）社製多電極アレイシステム（Multi-electrode array system:以下、MEAシステム）に着目し、創薬初期段階においてグローバルスタンダードとなる*in vitro* QT延長および催不整脈作用スクリーニング評価の確立に着手した。

本章では、まず本評価系の標準プロトコールを策定するため、実験条件の最適化（播種細胞数、解析周波数、温度、通気条件等の検討）を行った。さらに、細胞のロット間差および本評価系の施設間

差に対する影響を検証する目的で、CSAHiに参画している企業5施設において、MEAシステムを用い、本研究で作成した標準プロトコールに従って陽性/陰性対照薬7剤の影響を検証した。また、5施設のうち3施設より回収した細胞のRNAサンプルを用いて細胞性状解析も合わせて実施し、用いられた細胞の各種遺伝子発現の施設間差についても検証した。

第二節 実験方法

(1) 陽性/陰性対照薬および媒体

本検討では、臨床においてQT延長もしくは催不整脈作用を示すことが報告されている化合物を含む以下の7化合物を陽性/陰性対照薬として用いた（表1）。媒体はジメチルスルホキシド(DMSO)とし、それぞれの化合物は、添加濃度の1000倍濃度液となるようにDMSOで溶解した。

表1 陽性/陰性対照薬（7化合物）

参照薬	メーカー名
陽性対照薬	
E-4031	和光純薬もしくはEnzo Life Sciences
テルフェナジン	Sigma-Aldrich
モキシフロキサシン	Fluka
フレカイニド	Sigma-Aldrich
クロマノール293B	Sigma-AldrichもしくはR&D systems
陰性対照薬	
アスピリン	和光純薬もしくはEnzo Life Sciences
ベラパミル	和光純薬もしくはSigma-Aldrich

(2) 細胞培養およびMEAプローブ記録電極上への細胞播種

各施設（5施設）において、市販のヒトiPS細胞由来心筋細胞（iCell® cardiomyocyte；以下、iCell心筋細胞、Cellular Dynamics International (CDI))を、CDI社より提供されるプロトコール（https://cellulardynamics.com/assets/CDI_iCellCardiomyocytes_UG.pdf）を基にコーティング剤の要否やその容量およびコーティング時間、播種細胞数、培養期間等の培養に関わる各条件を最適化し、それに従って培養した（以下、標準プロトコール）。本評価で用いた標準プロトコールの概要を表2に示す。

表2 標準プロトコールの概要

	前培養	MEA プローブ上での培養
コーティング	0.1 % ゼラチン	50 μg/mL フィブロネクチン溶液, 2 μL/well
培養条件	5%CO_2, 37°C	5%CO_2, 37°C
培地	iCell Cardiomyocytes Plating Medium(48 時間), iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium (5 日間)	iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium
細胞密度	2×10^6 細胞/well	1.5×10^4~3.0×10^4 細胞/2 μL/well
培養容器	1well もしくは 6 well plate	1 well (60MEA100/10iR-Ti) もしくは 6 well MEA dish (60MEA200/30iR-Ti)
培養期間	7 日間	7-10 日間
	細胞外電位（Field potential; FP）測定	
記録前	測定環境の安定化のため、20 分間チャンバーに静置	
測定環境	5%CO_2+20%O_2+N_2, 37°C	
培地	iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium	
媒体	0.1% DMSO (終濃度: 0.5%まで)	

適用方法	漸増適用
記録時間	10 分間
データ解析対象	各濃度適用 10 分後の最終 30 拍
評価項目	FPDc (corrected field potential duration)、 $FPDc_{10}$、 拍動数、 不整脈様波形の発現率

細胞は37℃で4分間融解し、解凍用培地(Plating Medium, CDI)にて懸濁した。前培養として、細胞懸濁液は、0.1%ゼラチンコートした1ウェルもしくは6ウェルプレートに、1ウェルあたり2×10^6細胞(Plating Medium 2～3 mL中に含有)となるように播種した。インキュベーター(5% CO_2、37℃)内で48時間インキュベート後、死細胞もしくは非接着細胞をリン酸緩衝液(PBS(-))で除去し、培地を維持用培地（Maintenance Medium, CDI)に交換した。その後5日間培養し、Maintenance Mediumは2もしくは3日おきに交換した。起眠7日後に細胞を回収し、フィブロネクチンコートしたMEAプローブ（200/30iR-Tiもしくは6well MEA200/30iR-Ti-tcr、図1b)の電極上に1.5×10^4～3.0×10^4 cells/2 μLの細胞懸濁液を滴下した。インキュベーターで1～3時間静置した後、Maintenance Mediumを添加し、7～10日間培養した。培地交換は2もしくは3日おきに実施した。

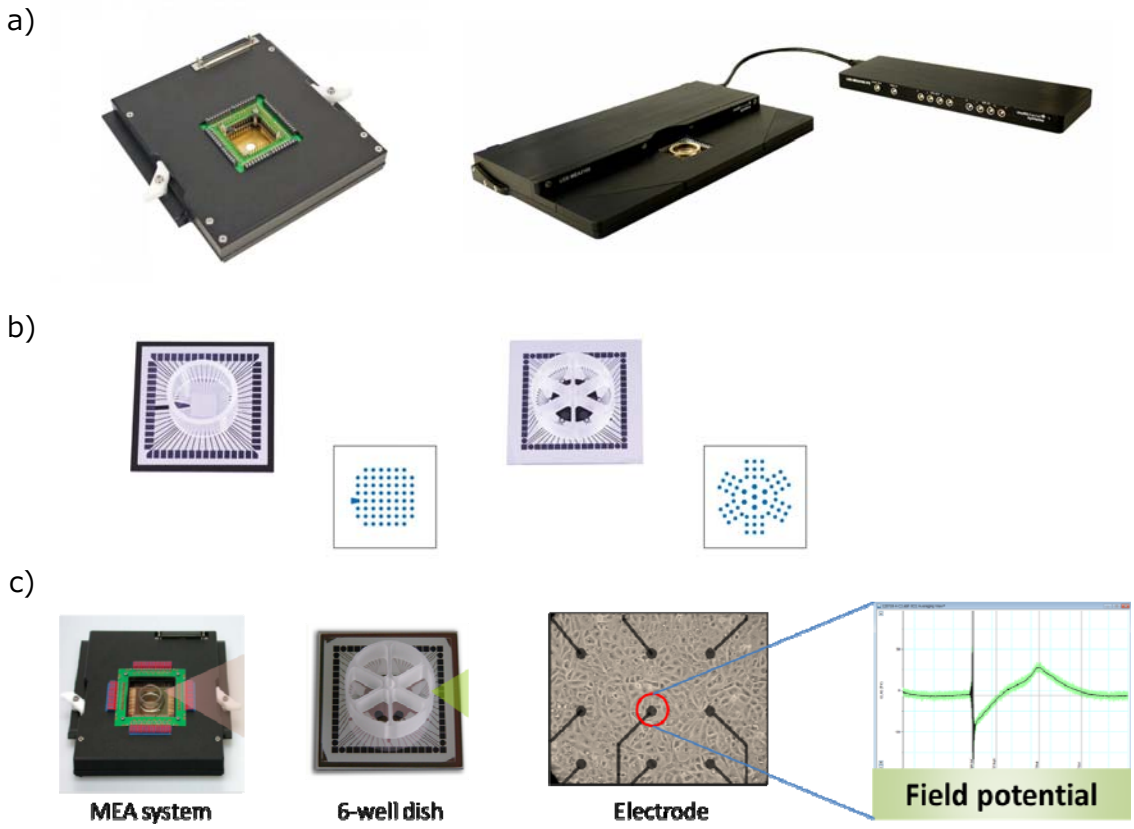


図 1　多電極細胞外電位記録システム（MEA システム：Multi-electrode array system）
a) MEA60(左)および MEA2100 システム(右)、b) MEA プローブ：1-well(左)および 6-well (右)
c) 微小電極上に播種された iCell 心筋細胞の FP 測定概念図。各電極から波形が検出されるため、1 ウェルにつき 1 電極を選択して、データ解析に使用した。

(3) 細胞外電位測定（MEA assay)

データ取得システムは、MCS社製のMEA60もしくは2100システム（図1a）を使用し、FP波形を各施設において同一のプロトコールで取得した。MEAプローブをMEAチャンバー(5% CO_2/20% O_2/N_2ガス通気、37℃)に設置し、細胞外電位を記録した。Second low-pass filterを3000～3500 Hzに設定し、ハイパスフィルターを1 Hzで解析した。20分間の安定化後、各ウェルにDMSO（終濃度0.1%）を添加し、ピペッティングにて穏やかに撹拌した。化合物は低濃度から10分間隔で累積的に適用し、累積適用によるDMSO濃度は、最大0.5%までとした(n=4-9)。波形解析は、LabChart®(AD

instruments)を使用し、電気ノイズを除去するため、1 Hzのフィルターを用いた。細胞外電位持続時間(Field potential duration: FPD)およびスパイク波形間間隔(Inter-spike interval: ISI)は、それぞれ第一の鋭敏なスパイクの開始時点からそれに続く陽性のピーク波形の頂点までの時間、および2つの鋭敏なスパイク間の時間と定義した(図2a)。FPDは、媒体もしくは陽性/陰性対照薬において各濃度添加後10分間測定し、最後の30拍分の波形を解析対象とした。FPDは、Fridericiaの補正式を用いてISIで補正した(FPDc= FPD/ISI$^{1/3}$)。拍動数およびFPDcのベース値は中央値、最小値および最大値で示した。拍動数およびFPDcの変化率は、各測定前値からの変化率を以下の式に従って算出した。

拍動数もしくはFPDc変化率(%) = [各濃度適用時の実測値 ― 測定前値] /[測定前値]

10% FPDc 延長濃度(FPDc$_{10}$)は、GraphPad Prism (GraphPad Software)を用いたロジスティック解析により算出した。不整脈様波形の発現率(早期後脱分極, EAD : Early after depolarization、および撃発活動, TA: Triggered activity)および拍動停止(Arrest)の発現率を算出した(図2b)。なお、不整脈様波形および拍動停止が認められたサンプルは、次濃度の解析対象から除外した。

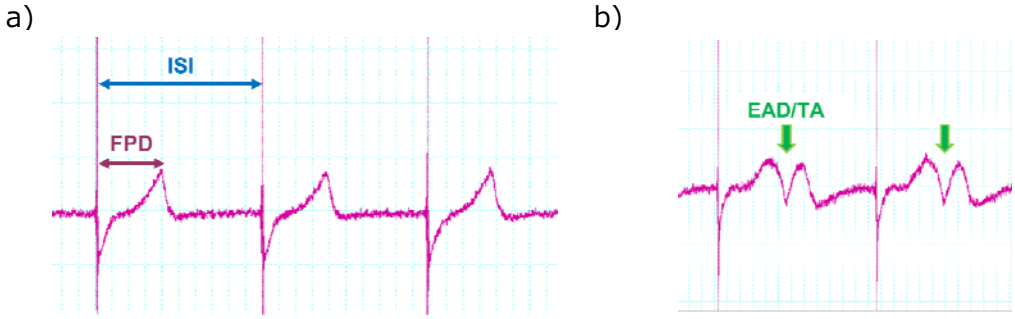


図 2　測定パラメータおよび細胞外電位波形の代表例
a) FPD: Field Potential Duration; 鋭敏なスパイク間の時間、ISI: Inter-Spike Interval;第一の鋭敏なスパイクの開始時点からそれに続く陽性のピーク波形間の時間、b) 不整脈様波形の代表例(EAD もしくは TA)

(4) 細胞密度（細胞播種数）による影響

細胞密度による形態学的影響を検討するため、1ウェルあたり0.75×10^4、1.5×10^4 もしくは 3.0×10^4 細胞を播種し、顕微鏡下で観察した。また、細胞密度による薬剤応答性への影響を検討するため、1ウェルあたり1.5×10^4 もしくは3.0×10^4 細胞で播種した時の、アスピリン、E-4031およびテルフェナジンの各評価パラメータへの影響を検討した。細胞は、同一Lot（Lot No. 1033176）を用いた。

(5) 施設間差および細胞ロット間差

施設間差（施設間によるデータのばらつき）を検討するため、施設A～Eの5施設において、同一ロット（Lot No. 1091313）の細胞を用いて表1に示した陽性/陰性対照薬7剤による各評価パラメータへの影響を検討した。また、細胞ロット間差（細胞のロットの違いによるデータのばらつき）を検討するため、代表施設2施設（施設AおよびE）において各2ロットずつ、計4ロットの細胞（Lot No. 1091313、1033176、1093227および1094831）を用いて陽性/陰性対照薬7剤のうち3剤（アスピリン、E-4031、テルフェナジン）の各評価パラメータへの影響を検討した。

(6) 統計解析

FPDcおよび$FPDc_{10}$は、平均値±SDで表記した。全施設間差は、Stat Preclinicaにより分散分析(ANOVA)を実施し、統計学的有意差を$p<0.05$および$p<0.01$で示した。ただし、以下の場合、$FPDc_{10}$の算出および統計学的解析からは除外した：1) いずれの濃度においても10%以上のFPDc延長もしくは短縮が認められず、不整脈様波形もしくは拍動停止のみが認められた場合、2) 10%以上のFPDc延長もしくは短縮が認められず、不整脈様波形も認められない場合、3) 全濃度で10%以上のFPDc延長もしくは短縮が認められた場合。

(7) 細胞性状解析

起眠後1日（Day 1）の細胞を1施設より2サンプル、およびFP測定直前（Day 13, 14, 15）の細胞を各施設3もしくは4サンプル回収し、回収した合計11サンプルのiCell心筋細胞から、それぞれRNAを抽出した。Total RNAは、miRNeasy Kitを用いて精製した。Total RNAの精製量は、吸光度測定により算出し、十分な品質を確保するため自動化ゲル電気泳動での測定によりRNA強度7以上のサンプルを使用した。

DNAマイクロアレイ分析のため、単離したhiPS-CMsのcRNAをシアニンでラベルし、Low Input Amp Labeling KitおよびExpression Kit (Agilent Technologies)により、添付されたプロトコールに従ってフラグメント化した。SurePrint G3 Human Gene Expression v2 Microarray (8 × 60 K; Agilent Technologies)にハイブリダイゼーション後、Agilent scannerを用いてスキャンした。アレイクオリティは、Control featureを用いて評価した(One-Color Spike Mix Kit, Agilent Technologies)。

Feature Extraction softwareより抽出されたテキストファイルをGeneSpring GX software(ver 12.0; Agilent Technologies)にインポートし、細胞性状解析のデータ解析に使用した。バックグラウンドはノーマライゼーション前に除去した。マイクロアレイデータセットは、GeneSpring GXでノーマライズされたシグナルを解析対照群（コントロール群）における系統差の階層的クラスタリングのため、対数的に変換した。3施設における単一強度の相関係数は、JMP 5.5 (SAS Institute, Cary, NC)により算出した。マイクロアレイデータは、GeneSpring GX softwareを用いて統計解析し、結果は4つの独立した値の平均値として示した。各施設においてDay1およびDay 14-15で特異的に発現した遺伝子は、Welch's test ($p<0.05$)を用いたカットオフ値を4倍以上とし、特異的な遺伝子群の機能的解析については、培養期間にしたがって、GO (Gene Ontology) 解析により実施した。PCA(主要成分解析)は、GeneSpring GXを用いて実施した。

第三節 結果

(1) 細胞密度による影響

顕微鏡下での形態学的観察において、0 .75×10^4 細胞/ウェル、1.5×10^4 細胞/ウェルおよび 3.0×10^4 細胞/ウェル（図 3a、b および c）を比較すると、0.75×10^4 細胞/ウェルでは、他の細胞密度に比して細胞肥大が認められたのに対し、1.5×10^4 細胞/ウェルおよび 3.0×10^4 細胞/ウェルでは、細胞のサイズに有意な差は認められなかった。従って、0.75×10^4 細胞/ウェルの培養条件では、細胞形態の変化を伴うことから、細胞性状にも何らかの影響を受けている可能性があると考え、以降の実験は、1.5×10^4 細胞/ウェルおよび 3.0×10^4 細胞/ウェルの条件下で行った。

1.5×10^4 および 3.0×10^4 細胞/ウェルで播種した細胞の FPDc 値ならびに拍動数は同等であった(それぞれ、FPDc: 426-433 msec および 430-432 msec、ならびに拍動数: 51-53 beats per minutes (bpm)および 52 bpm)。両細胞密度条件下において、アスピリンは 100 μM まで FPDc および拍動数に影響せず、E-4031 およびテルフェナジンも拍動数には影響を及ぼさなかった。一方、FPDc に対しては E-4031 は濃度依存的に延長し、テルフェナジンも 30 nM まで濃度依存的な延長を示したが、最高濃度の 100 nM ではその作用はプラトーに達した（図 3d）。また両細胞密度において、E-4031 およびテルフェナジン各濃度における FPDc 変化率は同程度であり、$FPDc_{10}$ の値に統計学的有意差は認められなかった。

以上のことから、本標準プロトコールでは、細胞密度として 1.5~3.0×10^4 細胞/ウェルを採用することとした。

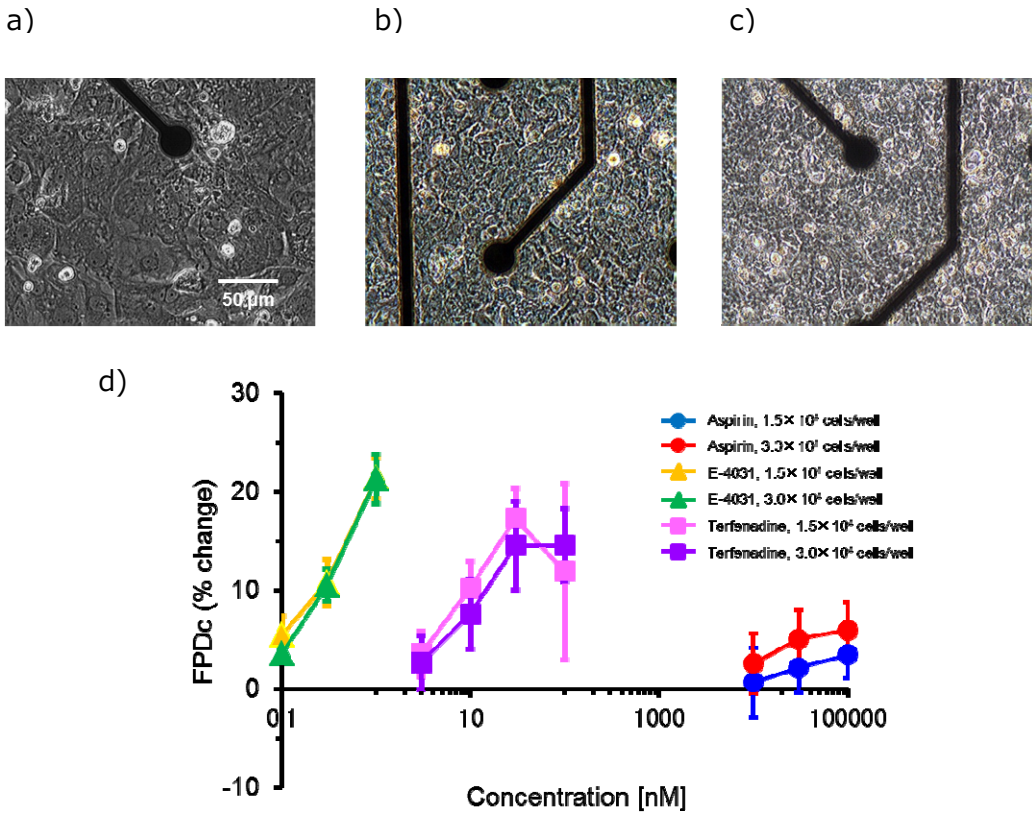


図 3 細胞密度の違いによる影響

a) 0.75×10^4 細胞/ウェル、b) 1.5×10^4 細胞/ウェル、c) 3.0×10^4 細胞/ウェルで播種した細胞の顕微鏡下における細胞形態

d) 各細胞密度における陽性/陰性対照薬の FPDc に対する影響

FPDc は、細胞密度毎に、平均値±SD で示した。

(2) 施設間差による影響

i) 測定前値 (0.1%DMSO)

Lab B において、わずかな拍動数の高値と FPDc の低値が認められたが、それ以外の 4 施設においては、拍動数および FPDc は同等であった(表 3)。さらに、Lab B を除く各施設の拍動数および FPDc の中央値は、それぞれ 51-58 bpm、392-429 msec の範囲内であった。

表3　FPDcおよび拍動数のベース値（0.1% DMSO適用条件下）

	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E
n	32	45	39	30	32
FPDc	424 [397-447]	370 [357-410]	429 [404-451]	400 [374-430]	392 [371-431]
拍動数（bpm）	58 [55-65]	76 [49-81]	54 [49-61]	51 [50-55]	58 [52-62]

＊欄内は各施設における中央値を、[]内は各施設における最小値–最大値を示す。

ii) 陽性/陰性対照薬を用いた評価

陽性/陰性対照薬として、アスピリン、E-4031、テルフェナジン、モキシフロキサシン、フレカイニド、クロマノール 293B およびベラパミルを使用し、FPDc、拍動数、EAD もしくは TA、および Arrest の発現率を 5 施設において評価した（表 4 および図 4）。

アスピリン

アスピリンは、Lab B を除く全ての施設において、100 μM まで拍動数および FPDc に影響を及ぼさず、不整脈様波形(EAD もしくは TA)を引き起こさなかった。アスピリンの各パラメータへの影響に施設間差は認められなかった。

E-4031

選択的 I_{Kr} 阻害薬である E-4031 は、FPDc を濃度依存的に延長した。$FPDc_{10}$ は 0.68-5.06 nM であり、有意な施設間差が認められた。Lab A および B において、拍動数の低下が認められた。不整脈様波形に関しては、全施設において 3-30 nM で EAD もしくは TA を発現し、Lab A においてのみ 5 例中 1 例で Arrest が認められた。

フレカイニドおよびモキシフロキサシン

フレカイニドおよびモキシフロキサシンはマルチチャネル阻害薬である。両化合物は全施設において濃度依存的に FPDc を延長し、各施設における $FPDc_{10}$ は、それぞれ 0.03-0.39 nM および 4.71-96.0 μM であった。フレカイニドは、FPDc に対する定性的な差は認められなかったものの、$FPDc_{10}$ に有意な施

設間差が認められた。またフレカイニドでは、Lab B、C で、モキシフロキサシンでは Lab A、B、D、E において拍動数の低下が認められた。

フレカイニドは、全施設において 0.3-1μM で EAD もしくは TA を誘発したが、Lab A において 3 μM で認められた不整脈様波形は全例で Arrest を伴っていた。モキシフロキサシンは 30-300 μM において EAD もしくは TA を誘発したが、同濃度で Arrest は認められなかった。

クロマノール 293B

I_{Ks} 阻害薬であるクロマノール 293B は FPDc を延長し（$FPDc_{10}$＝11.2-56.8 μM）、有意な施設間差が認められた。LabB および C において、拍動数のわずかな増加が認められ、それぞれ 6 例中 3 例および 4 例中 2 例で Arrest が認められた。しかしながら、いずれの施設においてもクロマノール 293B は 100 μM まで EAD もしくは TA を誘発しなかった。

ベラパミル

ベラパミルは、I_{Kr} 阻害作用を有する Ca チャネル阻害薬であり、いずれの施設においても 30 および 100 nM において FPDc を濃度依存的に短縮したが、EAD もしくは TA および Arrest はいずれの濃度においても発現しなかった。一方、拍動数は全施設において濃度依存的に増加した。ベラパミルの各パラメータへの影響に施設間差は認められなかった。

テルフェナジン

テルフェナジンは、強い I_{Kr} 阻害作用を有するマルチチャネル阻害薬である。FPDc を延長し、$FPDc_{10}$ は 13.79-169.5 nM を示し、有意な施設間差が認められた。他の I_{Kr} 阻害薬とは異なり、テルフェナジンは全施設において拍動数に影響は認められなかったものの、Lab A、C および E において EAD もしくは TA が 30-300 nM で、Lab A および D において Arrest がそれぞれ 100 および 300 nM で認められた。

全ての陽性/陰性対照薬の結果から、5 施設における $FPDc_{10}$ のばらつきは 3.9-20 倍であり、EAD もしくは TA を引き起こす最小濃度($MC_{EAD/TA}$)のばらつきはおおよそ 10 倍であった。

表 4 陽性/陰性対照薬の拍動数（Beat rate; BR）、FPDc および不整脈様波形発現率における施設間差

	Concentration	Lab A			Lab B			Lab C			Lab D			Lab E			*p*
		BR (%)	FPDc (%)	EAD or TA	BR (%)	FPDc (%)	EAD or TA	BR (%)	FPDc (%)	EAD or TA	BR (%)	FPDc (%)	EAD or TA	BR (%)	FPDc (%)	EAD or TA	
Aspirin	3	-0.7	0.6	-	10.5	-1.5	-	-0.9	2.1	-	1.0	-0.3	-				
(μM)	10	0.0	1.1	-	15.8	-2.2	-	-0.8	2.5	-	1.8	-0.3	-	-1.7	2.0	-	
	30	3.4	-5.0	-	18.9	-2.9	-	-0.4	3.1	-	4.7	-0.0	-	-3.0	4.1	-	
	100	3.1	-2.5	-	19.6	-3.6	-	0.4	3.1	-	5.1	0.7	-	-2.5	4.1	-	
	$FPDc_{10}$		NC			NC			NC			NC			NC		NC
E-4031	0.1		NT			NT			NT			NT		-1.0	2.4	-	
(nM)	0.3		NT			NT			NT		1.6	3.2	-	-1.7	5.7	-	
	1.0	0.5	3.3	-	3.6	5.5	-	0.6	7.3	-	1.2	6.7	-	-5.4	13.5	-	
	3.0	-1.7	8.5	-	7.2	7.8	-	3.0	7.2	2/5	-0.2	14.7	-	-	-	4/4	
	10.0	-12.4	17.7	-	-0.6	20.9	2/6	-0.5	11.2	-	-	-	4/4		NT		
	30.0	-29.4	17.5	2/5 arrrest 1/5	-11.0	25.4	3/4	-	-	3/3		NT			NT		
	$FPDc_{10}$		4.16±1.58			3.59			5.06±2.33			1.73±0.53			0.681±0.161		<0.01
Flecainide	0.01		NT			NT			NT			NT		-0.9	4.7	-	
(μM)	0.03		NT		3.6	1.5	-	3.4	3.0	-	1.0	2.2	-	-2.3	10.8	-	
	0.10	-0.5	2.7	-	2.4	6.5	-	5.7	7.4	-	-0.2	7.6	-	-9.1	21.8	-	
	0.30	-3.9	9.8	-	-1.4	14.5	1/6	-1.6	8.2	-	-4.2	15.5	-	-	-	4/4	
	1.00	-7.5	18.2	2/5	-14.4	27.7	4/5	-13.6	12.8	4/6	-	-	4/4		NT		
	3.00	-	-	arrrest 3/3		NT			NT			NT			NT		
	$FPDc_{10}$		0.389±0.268			0.192±0.047			0.181±0.168			0.161±0.034			0.0280±0.0089		<0.05
Moxifloxacin	1		NT			NT			NT			NT		0.5	3.1	-	
(μM)	3		NT		4.9	1.6	-		NT			NT		-0.7	7.5	-	
	10	0.1	2.4	-	6.5	3.0	-	0.4	6.1	-	-1.2	6.1	-	-5.8	17.5	-	
	30	2.4	5.6	-	-0.1	15.7	-	2.9	14.6	1/6	-4.6	15.4	-	-23.7	41.0	3/4	
	100	-4.4	15.7	-	-24.9	56.9	1/6	-9.7	35.9	1/5	-17.5	36.6	2/4		NT		
	300	-14.5	33.6	1/5		NT		-	-	4/4	-	-	Unclear T 2/2		NT		
	$FPDc_{10}$		96.0±116.6			24.0±8.1			22.5±9.3			18.1±3.5			4.71±1.03		NS
Chromanol 293B	1		NT			NT			NT			NT		-0.4	2.3	-	
(μM)	3	0.1	3.5	-	7.1	2.3	-	-4.6	4.3	-	0.9	3.5	-	-0.2	5.0	-	
	10	2.4	3.9	-	10.2	6.7	-	-3.9	8.3	-	2.2	8.9	-	1.6	9.9	-	
	30	3.1	7.2	-	11.9	12.0	-	0.4	12.4	-	3.3	15.4	-	1.9	18.1	-	
	100	3.0	13.5	-	12.3	14.9	arrrest 3/6	10.4	10.8	arrrest 2/4	9.3	17.9	-		NT		
	$FPDc_{10}$		56.8±42.2			26.9±15.1			12.3			15.6±6.0			11.2±5.7		<0.05
Verapamil	1		NT			NT			NT			NT		8.2	-4.4	-	
(nM)	3	12.4	-7.3	-	19.7	-8.6	-	7.9	-3.6	-	6.2	-2.3	-	14.9	-6.9	-	
	10	30.7	-14.3	-	38.8	-14.9	-	23.8	-11.3	-	18.0	-8.7	-	43.5	-20.0	-	
	30	67.7	-34.2	-	69.3	-27.4	-	57.8	-22.7	-	38.3	-18.0	-	76.8	-36.3	-	
	100	108.4	-53.2	-	110.6	-47.5	-	99.4	-42.7	-	70.4	-30.3	-		NT		
	$FPDc_{10}$		7.13±1.42			6.86±2.92			16.25±13.15			14.61±5.52			4.13±1.75		NS
Terfenadine	3	-1.3	2.1	-		NT			NT			NT		-0.3	2.4	-	
(nM)	10	-2.4	9.3	-	0.1	1.3	-	-2.8	4.5	-	1.6	1.2	-	-3.3	8.8	-	
	30	-6.7	10.0	1/4	-0.6	3.1	-	-1.3	7.2	-	4.3	5.2	-	-5.4	17.1	-	
	100	-	-	arrrest 3/3	-1.4	7.6	-	-5.8	13.6	-	4.1	9.3	-	-6.8	6.8	2/5	
	300		NT		-2.5	14.2	-	-8.9	11.0	1/5	1.2	16.5	arrrest 1/6		NT		
	$FPDc_{10}$		13.8±10.5			170±81			38.3±7.2			95.7±47.6			14.2±2.3		<0.01

FPDc および BR: 適用前値からの変化率±SD、EAD or TA: 不整脈様波形（拍動停止もしくは Unclear T も含む）の発生率[発生数/ウェル数]、$FPDc_{10}$: 平均濃度±SD でそれぞれ示す。

$p<0.05$、$p<0.01$: $FPDc_{10}$ の施設間における統計学的有意差を示す。（n=4-9）

NT: 測定せず、-: 検出できず、NC: 算出できず、NS: 有意差なし

Unclear T: 波形変形による不明瞭な T 波

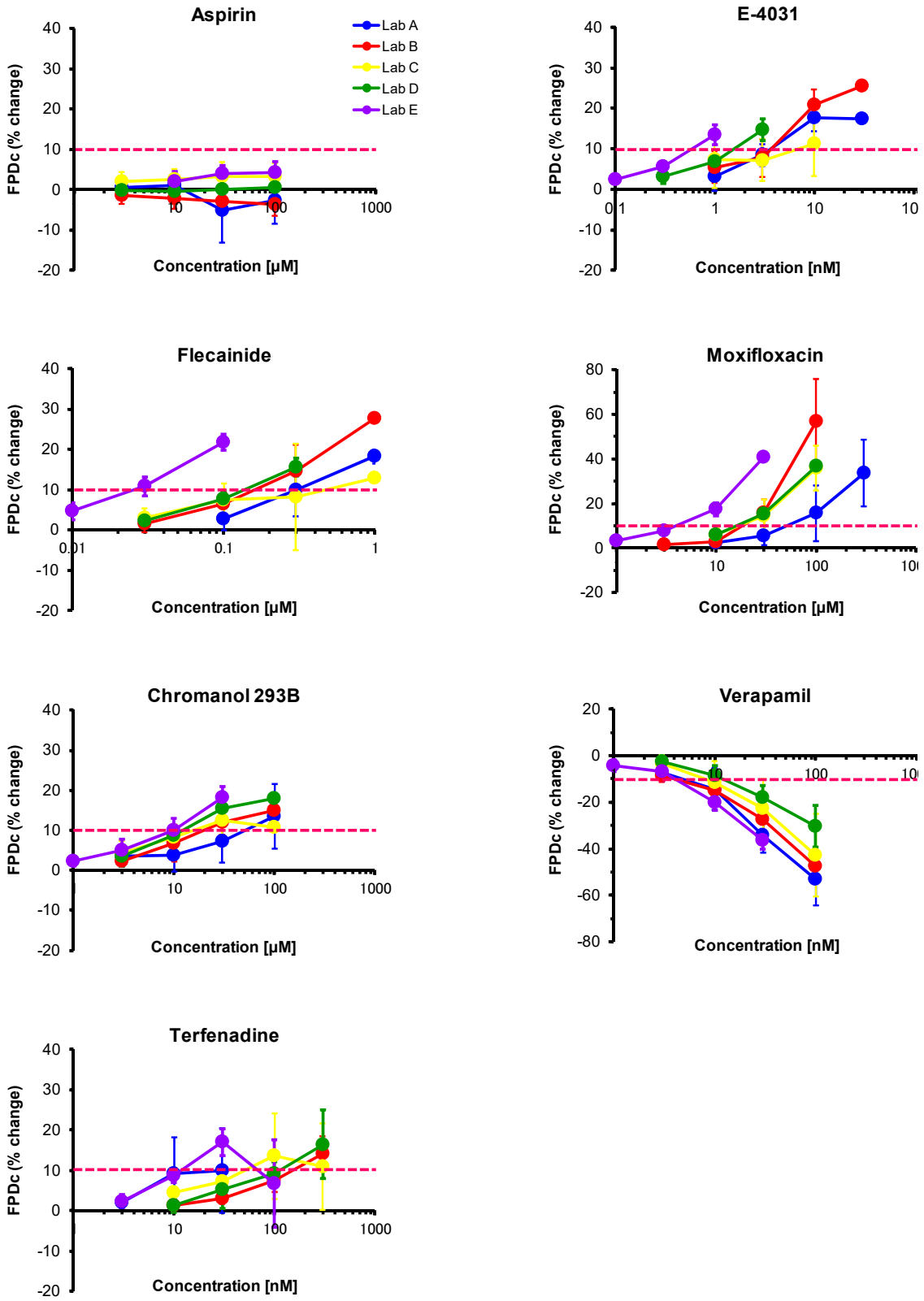


図 4 陽性/陰性対照薬 7 剤の FPDc 変化率に対する施設間差（n=4-9）

FPDc は、適用前値からの変化率±SD で示す。赤い点線（----）は $FPDc_{10}$ を示す（FPDc 短縮を示すベラパミルを除く）。

(3) 細胞のロット間差による影響

本論文では、統計学的有意差に関係なく、当該化合物の FPDc や拍動数に対する作用の有無を検出できた場合を「定性的」とし、さらに統計的有意差をもって作用が検出できた場合を「定量的」と定義した。(2)の結果より、定性的な施設間差は認められなかったため、細胞のロット間差に関する検討を任意に選出した 2 施設（Lab A および E）において実施した。両施設において、それぞれ異なる 2 種類のロットを使用し、データを表 5 に示した。

Lab A においては、Lot No. 1093227 および 1094831 を用いて FPDc および拍動数に対する影響を比較した。$FPDc_{10}$ のロット間のばらつきは、E-4031 で 1.7 倍、テルフェナジンで 3.7 倍であり、統計学的有意差は認められなかった。E-4031 は両ロットにおいて、10 および 30 nM で EAD もしくは TA を発現したが、テルフェナジンにおいては 300 nM まで発現しなかった。なお、E-4031 は、Lot No. 1093227 を用いた検討において、5 例中 3 例で 10%以上の FPDc の延長を伴わない不整脈様波形(EAD もしくは TA)が発現したことから、$FPDc_{10}$ 平均値のみの表示（標準偏差なし）とした。

Lab E においては、Lot.No. 1091313 および 1033176 を用いて、同様に評価した。3 剤の陽性/陰性対照薬において、両ロットにおける FPDc および拍動数への影響は同等であった。E-4031 およびテルフェナジンの $FPDc_{10}$ のロット間のばらつきはそれぞれ 2.3 倍および 1.1 倍であり、E-4031 のみ統計学的有意差が認められた。E-4031 は両ロットで 3 nM で EAD もしくは TA を誘発したが、一方でテルフェナジンは、Lot.No. 1091313 では 100 nM で EAD もしくは TA を誘発したのに対し、もう一方のロットでは 100 nM まで発現しなかった。

上記の結果より、FPDc、拍動数および EAD もしくは TA の発現率にロット間差は認められず、E-4031 の $FPDc_{10}$ のロット間のばらつきについても、統計学的な有意差はあるものの、定性的な差異なく作用を検出可能であることから、*in vitro* スクリーニング系として許容される範囲の変動であった。

表 5 ロット間差による FPDc および不整脈様波形（EAD or TA）発現頻度への影響

	Concentration	Lab A					Lab E				
		#1093227		#1094831		*p*	#1091313		#1033176		*p*
		FPDc (%)	EAD or TA	FPDc (%)	EAD or TA		FPDc (%)	EAD or TA	FPDc (%)	EAD or TA	
Aspirin (μM)	3	-0.16±4.69	–	1.77±1.18	–		NT		NT		
	10	-0..99±3.44	–	2.64±1.68	–		2.03±2.52	–	1.22±2.64	–	
	30	1.45±3.62	–	2.44±2.23	–		4.08±1.92	–	3.55±2.07	–	
	100	1.91±4.46	–	1.52±1.81	–		4.14±2.72	–	4.62±2.25	–	
	$FPDc_{10}$	NC		NC		NC	NC		NC		NC
E-4031 (nM)	0.1	NT		NT			2.36±0.71	–	4.75±1.58	–	
	0.3	NT		NT			5.71±0.89	–	10.01±1.82	–	
	1	4.23±1.76	–	3.83±3.37	–		13.46±2.49	–	17.30±6.09	–	
	3	6.32±2.26	–	12.27±6.96	–		–	4/4	–	8/8	
	10	10.07±2.18	1/5	15.64	4/6		NT		NT		
	30	22.42	2/4	28.55	1/2		NT		NT		
	$FPDc_{10}$			3.59±2.59		NC	0.66±0.16		0.30±0.07		<0.01
Terfenadine (nM)	3	NT		NT			2.44±1.52	–	3.56±2.34	–	
	10	3.40±2.67	–	5.25±3.55	–		8.82±1.70	–	10.26±3.00	–	
	30	5.28±2.61	–	8.44±3.49	–		17.07±3.37	–	18.78±6.77	–	
	100	7.46±3.78	–	11.79±2.75	–		6.84±10.83	2/5	3.67±8.28	–	
	300	12.04±2.69	–	14.86±6.79	–		NT		NT		
	$FPDc_{10}$	160.33±99.20		43.45±29.33		NS	14.17±2.33		12.63±6.07		NS

FPDc: 適用前値からの変化率±SD、EAD or TA: 不整脈様波形もしくは拍動停止の発生率[発生数/ウェル数]、$FPDc_{10}$: 平均濃度±SD でそれぞれ示す。

$p<0.01$: $FPDc_{10}$ の施設間における統計学的有意差を示す。（n=4-9）

NT: 測定せず、-: 検出できず、NC: 算出できず、NS: 有意差なし

(4) 細胞性状解析-培養期間が遺伝子発現に与える影響-

培養期間が遺伝子発現プロファイルに与える影響について検討する前に、3 施設において採取した遺伝子発現プロファイルデータに科学的同等性があることを確認した。

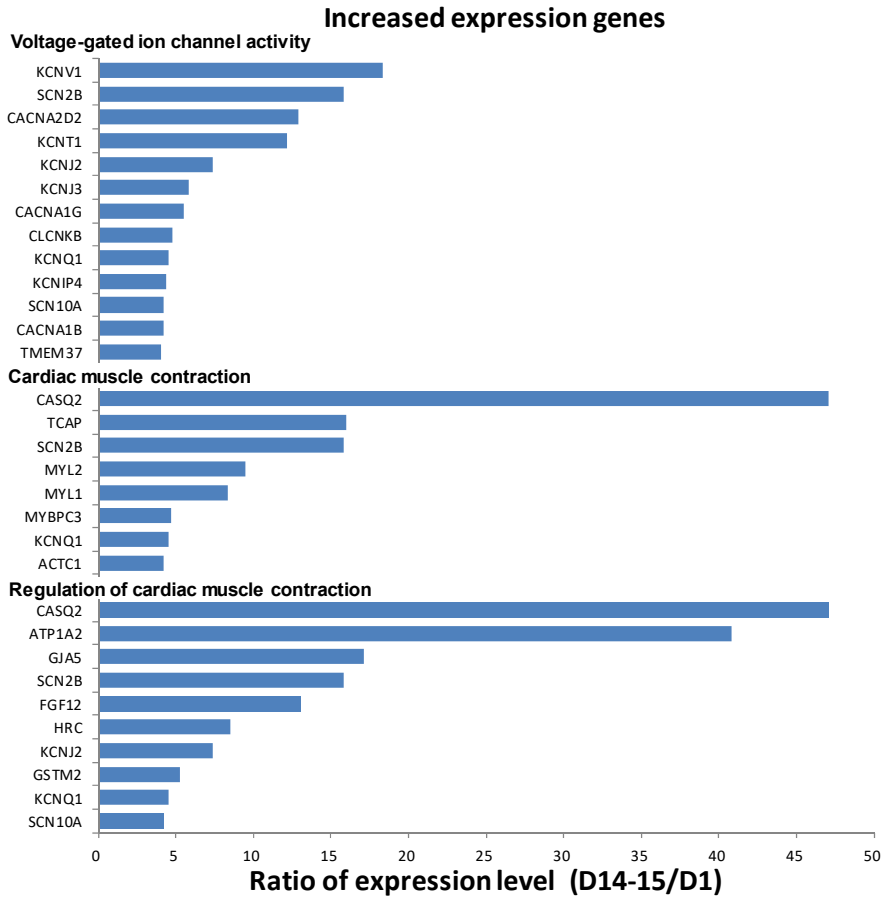
3 施設より採取した遺伝子サンプルは、起眠直後と MEA 測定開始時の遺伝子発現の比較を行うため、それぞれ起眠後 1 日（Day 1）および 13 日、14 日もしくは 15 日（Day 13-15）に採取した。各施設で採取した同日サンプル間において、相関係数は 0.95 以上[0.962 - 0.998]であり、それぞれ高い相関性を示した。また、これらの 3 施設は散布図において施設同士が高い決定係数[0.942-0.984]を示し、各施設間においても高い相関性を示した。従って、各サンプルから取得された遺伝子発現を調べるためのデータセットが、引き続き実施する培養期間に基づく一連の遺伝子プロファイル解析に有用であることが確認された。

培養期間に伴う遺伝子発現変化について検証するため、Day 1 および Day 14-15 サンプルを用いて遺伝子オントロジー解析（GO 解析）を実施した。電位依存性イオンチャネル活性、心筋収縮、およ

び心筋収縮調節に関与する遺伝子群のうち、Day 1 に比較して Day 14-15 で 4 倍以上増加したものは、それぞれの遺伝子群において 13 遺伝子、8 遺伝子および 10 遺伝子あり、4 分の 1 に減少したものは、7 遺伝子、1 遺伝子および 3 遺伝子あった(図 5a、b)。電位依存性イオンチャネル活性に関わる遺伝子群で最も増加したのは、KCNV1（K チャネル、ファミリー5）で 18 倍となった。同遺伝子群で SCN2B、CACNA2D2 および KCNT1 は、12～16 倍増加した。また、Day 14-15 で統計学的に有意に増加したのは I_{K1} に関与する KCNJ2、I_{Ks} に関与する KCNQ1、および Nav1.8 に関与する SCN10A であった。

心筋収縮およびその調節に関わる遺伝子群では、CASQ2（カルセクエストリン 2）が最も増加し、Day 14-15 の培養期間中に 47 倍に増加した。心筋収縮の調節に関わる遺伝子群については、ATP1A2（Na^+-K^+ ATPase α2 ポリペプチド）が 41 倍まで増加したが、一方で RGS2（G-タンパクシグナル 2 の調節因子）は 10 分の 1 以下に減少した。I_{Ks} 電流に関与する遺伝子については、KCNQ1 とは異なり、KCNE1L および KCNE1-様遺伝子が 5 分の 1 に減少した。

a)



b)

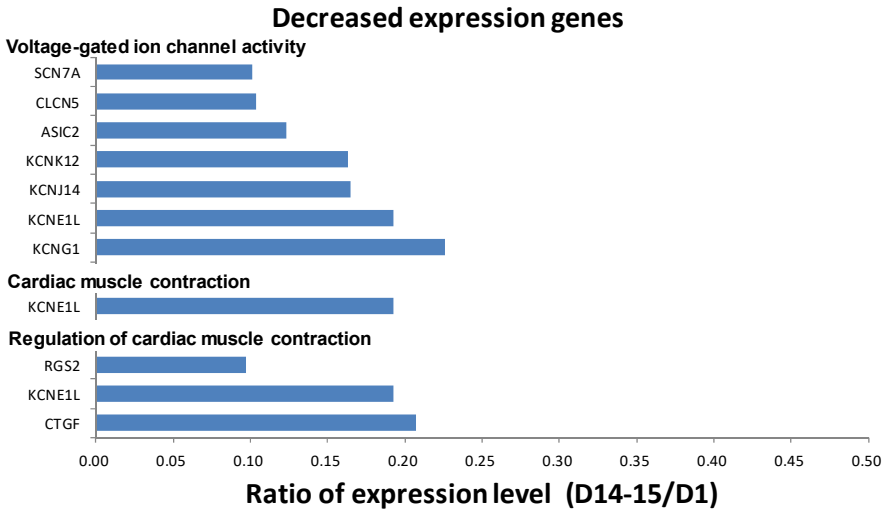


図 5　GO 解析による Day 1 および Day 14-15 の細胞サンプル間の遺伝子発現の比較
電位依存性イオンチャネル活性、心筋収縮および心筋収縮関連遺伝子群において、培養期間により a) 4 倍以上増加した遺伝子および b) 4 分の 1 以下に減少した遺伝子（計 50,599 遺伝子中）

第四節 考察

本検討では、CDI 社から提供されている iCell 心筋細胞を用いた MEA アッセイのプロトコールを一部改変して、細胞生存率、細胞の播種密度、培養期間、プローブのコーティング、FP 記録中のガス濃度や温度コントロール、さらにはデータ解析の条件に至るまで、詳細な条件を厳格に設定し、標準プロトコールを作成した。まず、標準プロトコールで定めた細胞密度（1.5×10^4 もしくは 3.0×10^4 細胞/ウェル）では、細胞のサイズに影響が無く、薬剤適用前の拍動数や FPDc、および薬剤応答に差異が認められなかった。さらに、陽性/陰性対照薬 7 剤に対する薬剤応答は臨床での催不整脈作用をよく反映しており、定性的な施設間差は無く、細胞によるロット間差も示さなかった。また、各施設で評価に使用した細胞が、非常に類似した遺伝子パターンを示した。これらの結果から、本研究で最適化した標準プロトコールに沿った MEA アッセイは、施設間差やロット間差のない安定した評価が可能であり、薬剤の催不整脈作用検出に有用であることが示唆された。

(1) iCell 心筋細胞を用いた MEA アッセイのプロトコール標準化

プロトコールにおいて注意すべきポイントは多数あるが、特に本標準プロトコールでは、以下の 5 つのポイントを特徴としており、施設間差をなくす上で、特に徹底する必要があると考えている；

1) 未接着細胞の除去：MEA 測定時のプローブ上の細胞生存率は、本評価系薬剤応答性に大きく影響するため、細胞起眠後 2 日目に死細胞や未接着細胞を丁寧に除去した。

2) 培養期間：CDI 社のプロトコールによると、iCell 心筋細胞は、起眠後 6～7 日間の前培養期間を必要とするが、本研究では、MEA プローブ上に播種してからさらに 7～10 日間以上培養した。

3) プローブのコーティング処理：iCell 心筋細胞を非コート処理プローブに播種すると、細胞生着率が著しく低下したため（data not shown）、MEA プローブ電極上のフィブロネクチン処理は必須とした。（起眠用の培養ディッシュとコーティング方法が異なる。）

4) 平衡期間：iCell 心筋細胞の拍動数および FP を安定させるためには、測定開始前の平衡期間が重要である。

5) FPD の補正式：FP 波形における最初の鋭敏なスパイクとその後のなだらかな陽性ピーク波形（図 2a）は、それぞれ iCell 心筋細胞の脱分極と再分極によるものであり、FPD および ISI は、心電図における QT 間隔と RR interval に相当すると考えられる。したがって、QT 間隔を RR interval で補正して QTc として算出するように、FPD も ISI で補正すべきであると考えた。本報告では、FPDc は Fridericia の式に従って算出したが、Bazett の式を用いても結果に影響がないことを確認した（data not shown）。しかしながら、FPDc を正確に評価するためには、hiPS-CMs を用いた *in vitro* 評価に見合った適切な補正式を用いるべきかもしれない。

(2) 陽性/陰性対照薬による評価パラメータへの影響

アスピリンは、不整脈に関する報告はなく、臨床での QT 延長にも関連していないため（Clements M, et al., 2014)、陰性対照薬として使用した。E-4031 は代表的な選択的 I_{Kr} 阻害薬であり、クロマノール 293B およびフレカイニドはそれぞれ臨床で QT 延長症候群もしくは QT 延長を伴う TdP に関連する

ことが知られている（Clements M, et al., 2014;Redfern WS, et al., 2003;Volders PG, et al., 2003)。これらの化合物は、本評価系において、臨床における QT 延長や催不整脈ポテンシャルを反映した結果を示した。アスピリンは、高濃度まで全パラメータに影響を及ぼさなかったことから、本評価系は薬剤適用後も安定したパラメータ測定が可能であることが示された。E-4031 およびフレカイニドは、他の hiPS-CMs を用いた報告と一致して（Guo L, et al., 2011;Mehta A, et al., 2013)、低濃度から顕著な FPDc 延長と不整脈様波形の発現が検出された。クロマノール 293B も、濃度依存的な FPDc 延長を示し、I_{Ks} 阻害薬の臨床における QT 延長作用ポテンシャルを十分に評価できることを示唆している。モキシフロキサシンは、臨床で QT 延長を示すことが知られているが（Demolis JL, et al., 2000)、TdP に対するポテンシャルは低いことから、ICH が提唱する Thorough QT study における陽性対照薬として用いられている。本検討では、高濃度で FPDc 延長および不整脈様波形を示したが、不整脈様波形が認められたのは 30～300 μM 適用時であり、これは臨床の有効血漿中非結合型濃度よりも約 6～60 倍高曝露で認められたものであった。

ベラパミルは、臨床において心拍数の低下を示すことが知られている一方で、iCell 心筋細胞においては FPDc を短縮し、拍動数を増加させた。本研究に一致して、他の hiPS-CMs を用いた研究においても活動電位持続時間（Action Potential Duration; APD）短縮に伴う拍動数の増加が認められ (Harris K, et al., 2013)、ヒト ES 細胞(hES)においても同様に拍動数の増加が報告されている (Clements M, et al., 2014)。このようにベラパミルが、臨床的には心拍数の低下を示すにも関わらず、本評価系では拍動数が増加した原因として、臨床的には洞房結節における刺激生成速度を抑制することで、拍動数を減少させるが（Stark G, et al., 1988)、iCell 心筋細胞は結節様細胞の性質を有していないことが考えられる。事実、本研究においても既報（Guo L, et al., 2011)においても hiPS-CMs は、結節様細胞ではなく、胎児性心筋細胞によく似た遺伝子発現パターンを示している。

テルフェナジンの催不整脈作用を検出できたことは、本評価系の有用性を特に強く支持する。同剤は、既存の *in vitro* および *in vivo* 非臨床試験では催不整脈作用を検出することが非常に困難であるが、本研究ではほぼ全ての施設において、FPDc を延長し、EAD もしくは TA を誘発した。2 施設においては

ベル型の FPDc-濃度曲線を示したが、hES 細胞を用いた検討においても、テルフェナジンは同様にベル型の FPDc-濃度曲線を示している (Clements M, et al., 2014)。しかしながら、朝倉らの報告によると、テルフェナジンは 0.1 Hz ハイパスフィルターでは濃度依存的な FPDc 延長を示すのに対し、1 Hz ハイパスフィルターではベル型の濃度曲線を示した (Asakura K, et al., 2015)。FP の第二ピークの遅発性電流成分がハイパスフィルターの影響を受けやすいことから、1 Hz ハイパスフィルター条件下での第二ピークのゆがみが、不整脈様波形に影響してベル型の反応を示す可能性が考えられる。

(3) 施設間差およびロット間差による影響

新規評価系を確立する際には、施設間差や細胞のロット間差なく一貫した結果が得られる必要があり、新薬開発における科学的観点および規制当局の観点から大変重要なポイントである。

本評価において、E-4031、フレカイニド、クロマノール 293B およびテルフェナジンは、$FPDc_{10}$ に対して有意な施設間差を示したが、$MC_{EAD/TA}$ の施設間差は全ての化合物でおよそ 10 倍以内であり、全ての陽性/陰性対照薬による FPDc 延長および不整脈様波形発現に定性的な施設間差は認められなかった。さらに、iCell 心筋細胞のロット間における本質的な差異は認められず、iCell 心筋細胞が新規開発化合物の QT 延長リスクや催不整脈作用リスクを評価するのに適切かつ均質な細胞であることを示した。

MEA アッセイが世界的ガイドラインに組み込むべき *in vitro* 評価システムとして許容範囲であるかどうかについては議論の最中であり、定量的な催不整脈作用検出に関して改善の余地はあるものの、簡便に使用できる *in vitro* 評価系として定性的な催不整脈作用の検出は可能であり、少なくとも、本検討で構築した標準プロトコールはグローバルスタンダードの基本骨格となりうると考えられる。

第二章 モデル化合物を用いた評価系の検証

第一節 序論

2009 年に制定された ICH S7B および ICH E14 ガイドラインにより、QT 延長ポテンシャルを持つ化合物がヒトに投与される可能性は回避されてきたが、一方で有望な薬理作用を示す化合物をドロップアウトに追い込んでしまう可能性も否定できない。そこで近年、これらガイドラインの改定が計画されており、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた MEA アッセイ、さらに心筋に発現する各イオンチャネルの電流への影響とそのデータを用いた *in silico* 評価を用いることで、*in vivo* さらにはヒトでの催不整脈作用を予測することが世界的注目を集めている。

MEA アッセイを新規医薬品の安全性評価に用いるためには、本評価系がどのような特徴を持つ化合物の評価が可能であるのかを見極めておく必要がある。第一章では、MEA アッセイが化合物の QT 延長作用の検出のみならず、催不整脈作用評価に有用であることを示した。本章では MEA アッセイを用いて、臨床で心臓に様々な薬理作用を示す化合物の FPDc、拍動数や不整脈様波形に及ぼす影響について検討した。さらに、本評価系と現行の *in vitro* および *in vivo* 心毒性評価系、さらに臨床データとの相関性について考察したため、本章にて報告する。

第二節 実験方法

(1) モデル化合物および媒体

第一章で使用した陽性/陰性対照薬 7 化合物に加え、第二章では心筋イオンチャネルや自律神経系およびその他を介して、心臓へ影響を及ぼすメカニズムを有する 31 化合物のモデル化合物を使用した。心筋イオンチャネルへの作用を有する化合物は、ドンペリドン、NS-1643、ミベフラジル、ラノラジン、アルフゾシン、メキシレチン、シサプリド、アステミゾール、ピモジド、クロルプロマジン、クロザピン、dl-ソタロール、アジミリド、ベプリジル、アミオダロン（Sigma-Aldrich）、Bay K 8644、ZD7288、レブクロマカリム（Abcam）、チオリダジン（MP biomedicals）、キニジン（和光純薬）、ドフェチリド、

クリゾチニブ（Tocris Bioscience）、イブチリド、ロラタジン（東京化成）、スニチニブ（Cayman Chemicals）である。自律神経系に作用を有する化合物として、プロプラノロール（Sigma-Aldrich）、イソプロテレノール（LKT Laboratories）、カルバコール（東京化成工業）を、その他のメカニズムを有するものとして、ウアバイン、グリチルリチン酸（和光純薬）、ブレビスタチン（Tronto Research Chemicals）を用いた。化合物は、それぞれ DMSO 中に適用液の 1000 倍濃度となるように溶解した。

(2) 細胞培養および記録電極上への細胞播種

「第一章　第二節(2) 細胞培養および記録電極上への細胞播種」と同じ手順で実施した。

(3) 細胞外電位測定（MEA assay)

「第一章　第二節(3) 細胞外電位測定（MEA assay)」と同じ手順で実施したが、朝倉らの報告よりハイパスフィルターが不整脈様波形に与えうる影響を考慮して、ハイパスフィルターを0.1 Hzに設定して解析した（Asakura K, et al., 2015)。

(4) 統計解析

「第一章　第二節(6) 統計解析」と同様にデータの統計解析を実施した。

第三節 結果

第一項　iCell 心筋細胞を用いたモデル化合物の FP に及ぼす影響（表 6)

iCell 心筋細胞を用いたモデル化合物の各評価パラメータに及ぼす影響について、表 6 に示した。

(1) hERG チャネル阻害薬および活性化薬（図 6）

hERG チャネル阻害薬（ドンペリドンおよび E-4031）および hERG チャネル活性化薬（NS-1643）

の作用を比較したところ、想定された通り、両薬剤は拍動数および FPDc に対して相反する作用を示し、hERG チャネル阻害薬では拍動数の減少および FPDc の延長が認められたのに対し、hERG チャネル活性化薬では拍動数の増加および FPDc の短縮が認められた。ドンペリドンの $FPDc_{10}$ は 27.33 nM であった。NS-1643 は、モルモットの単離心室筋細胞において APD 短縮を誘発することが報告されており (Hansen RS, et al., 2006)、これは FPDc 短縮を示した本 MEA アッセイの結果に一致する。

ドンペリドンは、300 nM において 4 例中 3 例で EAD もしくは TA を誘発したが、NS-1643 は、100 μM において 5 例中 2 例で Arrest を、1 例で不明瞭な T 波（陽性のピーク波形の乱れ）を誘発したことから、E-4031 を含む hERG チャネル阻害薬は EAD に関連しているが、hERG チャネル活性化薬は Arrest や不明瞭な T 波に関連していることが示唆された。近年では、QT 延長だけでなく、QT 短縮も心臓における電気的異常の重要な一因子であり、高い確率で突然死を招くと言われている (Lu HR, et al., 2008;Takasuna K, et al., 2009)。また、QT 短縮症候群は TdP を引き起こすのではなく、心室細動（Ventricular fibrillation）を起こすことが報告されている (Lu HR, et al., 2008)。このことから、本アッセイで認められた FPDc 短縮を伴う Arrest は、ヒトでの QT 短縮を伴う心室細動に相関することを示唆しており、本アッセイが薬物の心臓への作用メカニズムを解明し、ヒトの QT 短縮を予測するのにも有用である可能性が示された。hiPS-CMs を用いた MEA アッセイは、hERG チャネル阻害薬のみならず、hERG チャネル活性化薬の作用を検出できることが示された。

(2) hERG チャネル阻害作用を有する Late Na 電流阻害薬および活性化薬（図 6）

ラノラジンは、治療濃度域の低濃度側では Late Na 電流および hERG チャネルを同等に阻害し、高濃度側では hERG チャネルよりも Late Na 電流を強く阻害することが知られている (Chaitman BR, 2006)。本アッセイにおいてラノラジンは、FPDc を延長し、$FPDc_{10}$ は 3.63 μM であったが、10 μM の高濃度まで不整脈様波形を発現しなかった。慢性狭心症患者においても QTc 延長は認められるが、不整脈は報告されていないことから (Chaitman BR, 2006)、本アッセイの評価結果は、臨床データと一致している。しかしながら、hERG 阻害作用の IC_{50} が 8.3 μM であることを考慮すると、さらに高濃度で

の催不整脈作用評価が必要かもしれない。

クラス Ib の抗不整脈薬であるメキシレチンは、主に心室性不整脈の治療に用いられる。ラノラジンと同様に hERG 阻害作用を有する Late Na 電流の阻害薬であり（Gualdani R, et al., 2015)、立ち上がり速度の増加および APD の短縮を示す。有効血漿中濃度域では、選択的に Late Na 電流を阻害することが知られており（Wang DW, et al., 1997)、このメキシレチンの有する特徴が、ヒトの QT 延長を改善すると考えられる。一方で、hiPS-CMs を用いた MEA アッセイでは、濃度依存的な FPDc 延長（$FPDc_{10}$＝6.77 μM）、拍動数減少および 30 μM において４例中３例で Arrest が認められた。*in vivo* の結果と本検討結果の相違の原因に関しては不明であるが、Guo らの報告によると、hiPS-CMs では、SCN5A にコードされる Nav1.5 チャネルが、成人の心筋細胞よりも胎児性心筋細胞に類似して発現量が低いため、本結果に影響を与えている可能性がある（Guo L, et al., 2011)。メキシレチンのような特徴を示す化合物の電気生理学的プロファイルをさらに明らかにするためには、QT 延長が認められる患者由来の hiPS-CMs を用いた検討や前処置によってあらかじめ FPDc 延長が認められている細胞での検討が必要かもしれない。

アルフゾシンは、選択的α1 受容体アンタゴニストであり、hERG チャネル阻害はむしろ弱いが、臨床においては、Na 電流を増強することにより QT 延長を引き起こすことが知られている（Liang P, et al., 2013)。MEA アッセイでは、濃度依存的に FPDc を延長し、$FPDc_{10}$ は 190.30 nM であった。この FPDc 延長は、Na 電流増加により引き起こされる脱分極遅延によって生じたものと考えられる。また、非臨床評価系においても、アルフゾシンは、ウサギ心筋プルキンエ線維の APD やウサギ単離心の QT 間隔を延長し（Lacerda AE, et al., 2008)、臨床で認められる QT 延長および MEA アッセイで認められた FPDc 延長に一致している。EAD もしくは TA が 1 μM で 5 例位中 3 例に認められたが、拍動数に対する影響は認められなかった。

(3) L 型 Ca チャネル阻害薬および活性化薬（図 6）

L 型 Ca チャネル阻害薬であるベラパミルは、第 1 章において濃度依存的に FPDc を短縮することを

示し、L 型 Ca チャネル活性化薬である Bay K 8644 は (January CT, et al., 1988)、本評価において濃度依存的に FPDc を延長することを示した (FPDc$_{10}$=0.63 nM)。また、ベラパミルおよび Bay K 8644 のどちらにおいても不整脈様波形も拍動停止も認められなかった。これらの結果は臨床データを反映しており、MEA アッセイが L 型 Ca チャネル阻害薬および活性化薬の催不整脈作用ポテンシャルを予測するのに有用であると考えられたが、一方で、拍動数に対する結果は薬理作用に一致せず、ベラパミルは拍動数を増加し (Nozaki Y, et al., 2016)、Bay K 8644 は拍動数に影響しなかった。hiPS-CMs における拍動数は、ヒトの心筋細胞とは異なり、結節様細胞で生じる細胞の拍動によってコントロールされないことが示唆された (Stark G, et al., 1988)。

(4) マルチイオンチャネル阻害薬

ミベフラジルは、T 型 Ca チャネル阻害薬として知られているが、L 型 Ca チャネル、hERG チャネル、KvLQT1 チャネル、および Na チャネル阻害作用を有し、ヒトの心拍数をわずかに減少させることが報告されている (Benardeau A, et al., 2000;Chouabe C, et al., 1998;McNulty MM, et al., 2006;SoRelle R, 1998)。MEA アッセイでは、FPDc を濃度依存的に短縮し、その結果、拍動数を増加させたが、これは hERG 阻害作用よりも強い Ca チャネル阻害作用によるものと考えられる。また、10 μM で 6 例中 4 例に認められた Arrest は、同濃度で認められた顕著な FPDc 短縮が大きく影響していると考えられる。ミベフラジルがヒトで TdP を誘発するという報告は少なく (Glaser S, et al., 2001)、MEA アッセイで認められる EAD もしくは TA および Arrest の原因は不明ではあるが、これらの波形の変化は、ヒトにおけるミベフラジルの催不整脈作用ポテンシャルを予測可能であるという新たな知見となりうる。

消化管運動促進薬および抗アレルギー薬として知られるシサプリドおよびアステミゾールは、それぞれ強い hERG 阻害作用と弱いもしくは中程度の Na および Ca チャネル阻害作用を有する (Kramer J, et al., 2013)。これらの化合物は、FPDc を延長し、FPDc$_{10}$ はそれぞれ 22.55 nM および 8.03 nM であった。両化合物は濃度依存的な拍動数の減少を示し、シサプリドは 100 nM 以上で、アステミゾール

は 100 nM で EAD もしくは TA を発現した。

チオリダジンとピモジドは、抗精神病薬であり、強い hERG 阻害作用と中程度もしくは強い Na および Ca チャネル阻害作用を有する (Kramer J, et al., 2013)。両化合物は、濃度依存的に FPDc を延長し、$FPDc_{10}$ はそれぞれ 701.18 nM もしくは 9.41 nM であった。チオリダジンは最高濃度の 3 μM まで拍動数に影響しなかったが、5 例中 1 例で EAD もしくは TA の発現が認められた。ピモジドは濃度依存的な拍動数の減少を示し、30 nM で 5 例中 1 例、100 nM で 4 例中 3 例に EAD もしくは TA の発現が認められた。

クロルプロマジンおよびクロザピンも抗精神病薬であり、hERG、Na および Ca チャネルを同等に阻害し (Kramer J, et al., 2013)、ヒトにおいて QT 延長および TdP を含む催不整脈作用を有することが知られている (Berling I, et al., 2015;Ochiai H, et al., 1990;Wenzel-Seifert K, et al., 2011)。クロルプロマジンは、FPDc および拍動数に 3 μM まで影響を及ぼさなかったが、3 μM で EAD もしくは TA が 6 例中 2 例に、10 μM では Arrest が全例に認められた。一方クロザピンは、濃度依存的な FPDc 短縮および拍動数増加を示したが、不整脈様波形は 1 μM まで認められなかった。クロザピンは同程度の Ca チャネル阻害作用および hERG チャネル阻害作用を有するものの、hiPS-CMs においては Ca チャネルに対する阻害作用が強く影響する可能性があるため、hERG チャネル阻害作用による FPDc 延長を減弱することで、催不整脈作用に対して抵抗性を示したのかもしれない。MEA アッセイにおける結果と臨床で起こる現象との矛盾を示すためには、さらなる検討が必要であると考えられた。

dl-ソタロールは、弱い hERG 阻害作用と Ca チャネル阻害作用を有する抗不整脈薬である。濃度依存的に FPDc を延長し、$FPDc_{10}$ は 1.02 μM であったが、拍動数に変化はなく、EAD もしくは TA も 3 μM まで認められなかった。

また、キニジン、ベプリジル、アミオダロンも、抗不整脈薬であり、中程度もしくは弱い Na および Ca チャネル阻害作用を有する hERG チャネル阻害薬として知られている (Kramer J, et al., 2013;Redfern WS, et al., 2003)。これらの化合物は、濃度依存的に FPDc を延長し、$FPDc_{10}$ はそれぞれ 84.92 nM、0.55 μM および 0.44 μM であった。ベプリジルは、3 μM において拍動数を減少したが、キニジンと

アミオダロンは、拍動数に影響を及ぼさなかった。また、キニジンは 300 および 1000 nM においてそれぞれ 4 例中 2 例および全例で EAD もしくは TA を発現したが、ベプリジルとアミオダロンは、最高濃度まで EAD もしくは TA を発現しなかった。

キニジンを除く dl-ソタロール、アミオダロン、ベプリジルは、臨床において不整脈発現の報告例がいくつかあるが、MEA アッセイにおいていずれの濃度でも不整脈様波形を示さず、*in vivo* 非臨床評価においても催不整脈作用は検出されていない (Omata T, et al., 2005;Van Opstal JM, et al., 2001;Yasuda M, et al., 2006)。しかしながら、dl-ソタロールが本検討の予備的検討において、3 μM で不整脈波形を発現していたことから、より高い濃度で催不整脈作用を検出することが出来る可能性がある。

アジミリドは、hERG および KvLQT1 チャネル阻害作用を有する抗不整脈薬である。濃度依存的な FPDc 延長を示し、$FPDc_{10}$ は 129.11 nM であった。また 30 nM 以上で拍動数減少を示し、EAD もしくは TA は、300 および 1000 nM においてそれぞれ 6 例中 3 例および 3 例中 2 例で認められた。

ドフェチリドとイブチリドもまた抗不整脈薬であり、強力な hERG チャネル阻害作用と弱い Na および Ca 阻害作用を有する (Kramer J, et al., 2013;Redfern WS, et al., 2003)。両化合物は、3 nM まで濃度依存的な FPDc 延長を示し、$FPDc_{10}$ はそれぞれ 0.30 nM および 0.35 nM であった。ドフェチリドは 3 nM で拍動数を減少させたが、イブチリドは最高濃度まで拍動数に影響を及ぼさなかった。EAD もしくは TA は、3 nM において、それぞれ 4 例中 1 例に認められた。

ロラタジンは、抗アレルギー薬であり、hERG チャネル阻害作用に加えて Ca および Na チャネル阻害作用を有する化合物である (Crumb WJ, Jr., 2000;Kramer J, et al., 2013)。ロラタジンは、濃度依存的に拍動数を増加させたが、FPDc には影響を及ぼさず、不整脈様波形も認められなかった。ヒトにおいて QT 延長および TdP を含む催不整脈作用を有することが知られているが (Poluzzi E, et al., 2015)、クロザピンと同様に同程度の Ca チャネル阻害作用および hERG チャネル阻害作用を有するため (Kramer J, et al., 2013)、hiPS-CMs においては催不整脈作用に対して抵抗性を示した可能性が考えられる。

クリゾチニブやスニチニブは、抗ガン薬であり、Ca や Na チャネル阻害作用を有する hERG チャネル阻害薬である（Doherty KR, et al., 2013)。クリゾチニブは、ヒトにおいて QT 延長および TdP が発現することが知られているが（Doherty KR, et al., 2013;Ou SH, et al., 2011)、MEA アッセイにおいては 3 μM で FPDc を短縮し、拍動数を減少させた。また、10 μM において、Arrest もしくは第 1 の鋭敏なスパイク波（陽性ピーク）の消失が 4 例中 3 例もしくは 1 例でそれぞれ認められた。一方、スニチニブは濃度依存的に FPDc を延長し、$FPDc_{10}$ は 0.67 μM であったが、拍動数に明らかな変化は認められなかった。3 μM および 10 μM において、EAD もしくは TA が 5 例中 2 例および全例に認められた。

(5) その他のイオンチャネル阻害薬

ZD7288は、洞房結節細胞においてHCNチャネルを阻害し、心拍数を減少させる（Wu X, et al., 2012)。HCNチャネルは、ヒト胚幹細胞由来心筋細胞（hESC-CMs）において、洞房結節細胞に匹敵する量のチャネルを発現し、hES-CMs の自動能に寄与しており、同 HCN チャネル阻害薬であるザテブラジンは、hES-CMs において APD_{90} を延長することが報告されている（Jonsson MK, et al., 2012)。hiPS-CMsを用いたMEAアッセイにおいては、ZD7288は拍動数の減少を伴った濃度依存的な FPDc 延長を示した（$FPDc_{10}$=29.94 nM）が、不整脈様波形は認められなかった。これらの結果は、HCN チャネルが hiPS-CMs にも十分に発現しており、拍動数の調節に重要な役割を担っていることを示唆している。

$I_{K,Ach}$ は、ATP 依存性 K チャネルであり、心室筋細胞の伸展により活性化され、ペースメーカー活性を抑制することが報告されている（Mangoni ME, et al., 2008)。レブクロマカリムは、ATP 感受性 K チャネル開口薬であり、膜の過分極を引き起こすことが知られている（Ohya Y, et al., 1996)。MEA アッセイにおいては 1 μM で FPDc を短縮し、これはウサギのプルキンエ線維、乳頭筋細胞で認められる APD 短縮や、ウサギの単離心で認められるQT短縮と一致する結果である（Lu HR, et al., 2008;Lu HR, et al., 2008)。また、レブクロマカリムは、ウサギ単離心で 87.5%に心室細動（Ventricular fibrillation; VF）が起こることが報告されているが（Lu HR, et al., 2008)、本アッセイでは拍動数を

減少し、1 μM および 3 μM において、それぞれ 6 例中 3 例および全例で Arrest を発現した。本検討の結果から、ATP 依存性 K チャネルが hiPS-CMs に発現しており、心臓の自動能に重要な役割を果たしていることが示された。

このように、MEA アッセイは、臨床において QT 延長だけでなく QT 短縮を示すような、様々なイオンチャネル阻害薬および活性化薬、さらには自動能に関与するチャネルへ作用する薬剤の催不整脈作用を検出するのに有用であることが示唆された。

(6) その他の薬理作用を有する化合物（図 6）

ウアバイン八水和物は、強心配糖体の一つであり、Na^+-K^+ ATPase を阻害し、その結果 Na^+-Ca^{2+}交換体を介して細胞内 Ca^{2+}を増加させる（Louie JC, et al., 2016)。本検討では 100 nM で FPDc を短縮したことから、細胞内 Ca^{2+}を増加させたことを示唆している。拍動数には影響を及ぼさなかったが、300 nM において 5 例中 1 例で拍動数停止が、残りの全例において不明瞭な T 波形が認められた。

イソプロテレノールは、β受容体刺激作用を有する気管支拡張薬である（Stratton JR, et al., 1992)。心筋イオンチャネルへの作用は報告されていないが、濃度依存的な拍動数増加および FPDc 短縮を示し、不整脈様波形はいずれの濃度においても認められなかった。βアドレナリン受容体は、I_f 電流を介して自動能を制御していると考えられ、βアドレナリン受容体の活性化は cAMP を介して I_f 電流（つまり HCN チャネル）を増強することが知られていることから（Mangoni ME, et al., 2008)、イソプロテレノールの拍動数の増加は、間接的な I_f 電流への影響によるものと考えられた。

プロプラノロールは抗不整脈薬であり、Na チャネル阻害作用を有するβ受容体阻害薬である（Wang DW, et al., 2010)。FPDc への顕著な影響は認められなかったが、イソプロテレノールとは対照的に、3 μM で拍動数の減少を示し、10 μM では 7 例全例で EAD もしくは TA および Arrest を誘発した。臨床では催不整脈作用を示さないが、MEA アッセイで認められた催不整脈様波形は、I_f 電流に対する間接的な抑制作用によるものと考えられる。βアゴニストおよびアンタゴニストの FPDc およびそれに続く不整

脈様波形に対する影響から、MEA アッセイがβアドレナリン受容体の自動能に対する間接的な作用を検出可能であることを示している。

カルバコールは、腸管運動促進薬であり、アセチルコリン受容体に結合して活性化するコリン作動薬である（Matucci R, et al., 2016)。グリチルリチン酸は甘草エキスであり、gap 結合阻害薬として知られており（Zhao D, et al., 2015)、ブレビスタチンは、ミオシン II ATPase 特異的阻害薬である（Wang HH, et al., 2008)。いずれの化合物も心筋イオンチャネルに対する作用はない。カルバコールは、臨床では副交感神経系に影響して徐脈を誘発することが知られており、本検討においては、拍動数を減少し、濃度依存的に FPDc を延長した（$FPDc_{10}$ は 116.93 nM）。従って、MEA アッセイはムスカリン作動性の化合物の影響も検出できることが示された。グリチルリチン酸も、濃度依存的に FPDc を延長し（$FPDc_{10}$=373.39 μM）、拍動数を減少したが、最高濃度まで不整脈様波形は認められなかった。一方、ブレビスタチンは、FPDc に明らかな作用は示さなかったものの、濃度依存的に拍動数を増加し、1000 μM で 7 例中 2 例に Arrest が認められた。

これらの結果より、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた MEA アッセイは、様々な心筋イオンチャネル、心筋受容体およびイオンチャネルポンプに作用を持つ化合物の催不整脈作用および QT 延長作用ポテンシャルを評価可能であることが示された。

表 6 モデル化合物の拍動数、FPDc および不整脈様波形発現率に及ぼす影響（n=4-10）

カテゴリー	薬物名	薬理作用メカニズム	イオンチャネル情報	濃度 (nM)	拍動数 (%)	FPDc (%)	$FPDc_{10}$ (nM)	不整脈様波形 (タイプおよび発現率)
hERG チャネル阻害薬および活性化薬	ドンペリドン (Domperidone)	消化管運動促進薬	hERG チャネル阻害	10	-3.13 ± 1.99	5.10 ± 1.43	27.33 ± 6.56	-
				30	-5.64 ± 1.95	10.84 ± 2.34		-
				100	-9.43 ± 5.17	24.51 ± 4.10		-
				300	-14.85	36.22		EAD or TA 3/4
	NS-1643	hERG チャネル活性化薬	hERG チャネル活性化	3 (μM)	1.92 ± 2.64	1.40 ± 1.06	-	-
				10	8.95 ± 11.50	0.76 ± 2.92		-
				30	17.23 ± 10.23	-3.03 ± 5.65		-
				100	20.25	-14.19		Arrest 2/5 Unclear T 1/5
late Na チャネル阻害薬および活性化薬	ラノラジン (Ranolazine)	狭心症治療薬	late Na 電流阻害および hERG チャネル阻害	0.3 (μM)	1.35 ± 0.65	1.41 ± 0.68	3.63 ± 0.96 (μM)	-
				1	1.95 ± 1.24	4.06 ± 1.47		-
				3	1.73 ± 2.65	9.40 ± 1.63		-
				10	-2.70 ± 2.03	19.47 ± 3.38		-
	メキシレチン (Mexiletine)	抗不整脈薬（クラス Ib）	late Na 電流阻害および hERG チャネル阻害	1 (μM)	-3.37 ± 3.31	2.61 ± 1.00	6.77 ± 1.66 (μM)	-
				3	-4.73 ± 4.91	6.02 ± 1.42		-

late Na チャネル阻害薬および活性化薬（続き）				10	-8.92 ± 2.78	11.73 ± 2.55		-
				30	-24.74	19.42		Arrest 3/4
	アルフゾシン (Alfuzosin)	前立腺肥大治療薬	late Na 電流活性化および hERG 電流阻害	30	3.02 ± 3.20	3.88 ± 1.02	190.31 ± 82.74	-
				100	3.91 ± 6.20	6.43 ± 2.35		-
				300	2.71 ± 5.79	14.07 ± 3.77		-
				1000	1.77	25.57		EAD or TA 3/5
Ca チャネル活性化薬	Bay K 8644	L-type Ca チャネルアゴニスト	Ca (L-type)チャネル活性化	0.1	4.24 ± 5.61	2.38 ± 1.46	0.63 ± 0.30	-
				0.3	4.44 ± 7.96	6.52 ± 1.95		-
				1	2.62 ± 8.95	15.17 ± 3.86		-
				3	-3.04 ± 10.48	29.10 ± 7.43		-
マルチチャネル阻害薬	ミベフラジル (Mibefradil)	狭心症治療薬	T-type Ca > L-type Ca ≥ hERG ≥ Na ≒ KvLQT1 チャネル阻害	0.3	3.13 ± 2.49	1.07 ± 1.50	-	-
				1	15.44 ± 8.65	-6.38 ± 7.47		-
				3	41.57 ± 9.39	-28.93 ± 16.33		-
				10	52.54	-59.89		Arrest 4/6
	シサプリド (Cisapride)	消化管運動促進薬	hERG >> Ca >> Na チャネル阻害	10	-5.45 ± 7.37	5.28 ± 7.27	22.55 ± 10.15	-
				30	-15.59 ± 8.26	25.12 ± 13.90		-
				100	-28.85 ± 22.21	33.19 ± 4.49		EAD or TA 4/7

マルチチャネル阻害薬(続き)				300	-	-		EAD or TA 3/3
	アステミゾール (Astemizole)	抗アレルギー薬	hERG >> Ca ≥ Na チャネル阻害	3	-2.38 ± 2.51	5.10 ± 1.50	8.03 ± 2.92	-
				10	-4.16 ± 2.61	13.80 ± 4.74		-
				30	-9.82 ± 4.91	33.06 ± 11.96		-
				100	-16.63	54.39		EAD or TA 8/10
	チオリダジン (Thioridazine)	抗精神病薬	hERG ≥ Na ≥ Ca チャネル阻害	100	2.16 ± 2.17	1.88 ± 1.67	701.18 ± 301.62	-
				300	3.06 ± 4.26	4.70 ± 4.00		-
				1000	-0.35 ± 5.22	14.89 ± 4.20		-
				3000	-2.13 ± 2.61	28.40 ± 7.72		EAD or TA 1/5
	ピモジド (Pimozide)	抗精神病薬	hERG > Ca ≥ Na チャネル阻害	3	-2.98 ± 2.47	4.66 ± 2.57	9.41 ± 5.28	-
				10	-8.26 ± 2.83	10.84 ± 4.72		-
				30	-12.44 ± 7.90	22.85 ± 1.77		EAD or TA 1/5
				100	-23.62 ± 2.81	37.96		EAD or TA 3/4
	クロルプロマジン (Chlorpromazine)	抗精神病薬	hERG ≒ Na ≒ Ca チャネル阻害	0.3	1.17 ± 1.50	2.40 ± 0.57	-	-
				1	3.45 ± 3.12	7.03 ± 3.18		-
				3	8.78 ± 2.71	3.57 ± 6.68		EAD or TA 2/6

マルチチャネル阻害薬(続き)				10	-	-		Arrest 4/4
	クロザピン (Clozapine)	抗精神病薬	hERG ≒ Ca ≥ Na チャネル阻害	30	2.96 ± 2.85	0.14 ± 1.65	-	-
				100	7.96 ± 8.42	-0.08 ± 3.66		-
				300	20.18 ± 8.74	-5.11 ± 3.77		-
				1000	38.65 ± 8.47	-17.12 ± 3.03		-
	dl-ソタロール (dl-Sotalol)	抗不整脈薬（クラス III）	hERG ≒ Ca >> Na チャネル阻害	100	0.27 ± 1.08	1.97 ± 1.33	1017.61 ± 546.74	-
				300	1.14 ± 2.14	3.99 ± 1.50		-
				1000	-0.35 ± 1.27	9.73 ± 2.87		-
				3000	-3.87 ± 2.66	24.36 ± 6.11		-
	アジミリド (Azimilide)	抗不整脈薬（クラス III）	hERG and KvLQT1 チャネル阻害	30	-12.14 ± 6.79	5.39 ± 3.83	129.11 ± 80.15	-
				100	-17.20 ± 8.70	13.26 ± 6.86		-
				300	-15.48 ± 8.97	15.71 ± 6.24		EAD or TA 3/6
				1000	-18.07	17.62		EAD or TA 2/3
	キニジン (Quinidine)	抗不整脈薬（クラス Ia）	hERG > Ca ≒ Na チャネル阻害	30	0.34 ± 2.51	4.29 ± 2.00	84.92 ± 37.31	-
				100	0.30 ± 4.79	11.94 ± 4.08		-
				300	-3.04	27.35		EAD or TA 2/4
				1000	-	-		EAD or TA 2/2

マルチチャネル阻害薬(続き)	ベプリジル (Bepridil)	抗不整脈薬（クラスIV）	hERG > Ca ≒ Na チャネル阻害	100	-0.42 ± 1.36	2.94 ± 1.15	552.80 ± 214.54	-
				300	-1.55 ± 2.29	6.95 ± 3.14		-
				1000	-5.20 ± 3.05	17.52 ± 6.51		-
				3000	-11.00 ± 5.42	37.11 ± 8.39		-
	アミオダロン (Amiodarone)	抗不整脈薬（クラスIII）	hERG ≒ Ca > Na チャネル阻害	100	1.01 ± 2.15	3.63 ± 1.69	444.28 ± 216.53	-
				300	1.54 ± 1.73	9.71 ± 3.60		-
				1000	0.70 ± 3.93	18.00 ± 8.69		-
				3000	-7.92 ± 11.56	18.91 ± 13.46		-
	ドフェチリド (Dofetilide)	抗不整脈薬（クラスIII）	hERG >> Ca > Na チャネル阻害	0.1	-1.36 ± 0.84	4.12 ± 0.58	0.3011 ± 0.0646	-
				0.3	-4.06 ± 2.61	10.92 ± 2.52		-
				1	-6.68 ± 2.93	26.50 ± 6.37		-
				3	-10.18 ± 5.28	47.59 ± 9.89		EAD or TA 1/4
	イブチリド (Ibutilide)	抗不整脈薬（クラスIII）	hERG >> Na ≒ Ca チャネル阻害	0.1	-0.28 ± 1.68	4.03 ± 1.00	0.3481 ± 0.0691	-
				0.3	-1.01 ± 0.99	8.94 ± 1.12		-
				1	-4.49 ± 2.29	22.23 ± 2.34		-
				3	-7.67 ± 7.59	44.59 ± 15.66		EAD or TA 1/4

マルチチャネル阻害薬(続き)	ロラタジン (Loratadine)	抗アレルギー薬	hERG ≒ Ca ≥ Na チャネル阻害	100	5.53 ± 1.31	0.32 ± 1.14	-	-
				300	9.08 ± 3.56	2.68 ± 1.56		-
				1000	18.97 ± 4.61	1.68 ± 2.18		-
				3000	30.81 ± 4.68	-3.51 ± 4.96		-
	クリゾチニブ (Crizotinib)	抗がん薬	hERG ≒ Ca ≒ Na チャネル阻害	0.3 (μM)	-3.54 ± 1.02	1.17 ± 1.03	-	-
				1	-9.69 ± 2.14	-0.51 ± 1.02		-
				3	-24.16 ± 2.18	-10.38 ± 2.17		-
				10	-	-		Arrest 3/4 1st peak disappearance 1/4
	スニチニブ (Sunitinib)	抗がん薬	hERG >> Na ≒ Ca チャネル阻害	0.3 (μM)	-1.18 ±1.64	6.22 ± 3.31	0.6688 ± 0.2143 (μM)	-
				1	-5.84 ± 8.49	14.31 ± 3.73		-
				3	-7.19 ± 12.78	24.16 ± 3.19		EAD or TA 2/5
				10	-	-		EAD or TA 3/3
その他のイオンチャネル阻害薬および開	ZD7288	HCN 阻害薬	HCN チャネル阻害	3	-4.50 ± 4.11	1.91 ± 1.10	29.94 ± 19.69	-
				10	-17.15 ± 7.26	6.56 ± 1.26		-
				30	-31.36 ± 6.57	12.09 ± 2.88		-

口薬				100	-42.21 ± 7.99	18.73 ± 4.65		-
	レブクロマカリム (Levcromakalim)	K_{ATP} チャネル開港薬	K_{ATP} チャネル活性化	100	-1.26 ± 1.24	-1.04 ± 4.97	-	-
				300	-3.92 ± 2.71	-6.46 ± 8.96		-
				1000	-18.68 ± 2.99	-30.21 ± 6.41		Arrest 3/6
				3000	-	-		Arrest 3/3
その他のメカニズムを有する化合物	ウアバイン (Oubain octahydrate)	強心配糖体	Na, K-ATPase 阻害	10	1.53 ± 1.50	-1.76 ± 2.92	-	-
				30	3.16 ± 2.44	-8.71 ± 6.73		-
				100	3.28 ± 5.05	-26.35 ± 9.57		-
				300	-	-		Arrest 1/5
								Unclear T 4/5
	イソプロテレノール (Isoproterenol)	気管支拡張薬	情報なし	3	19.22 ± 14.80	-7.50 ± 5.59	-	-
				10	25.45 ± 18.10	-9.31 ± 6.29		-
				30	34.79 ± 19.01	-12.40 ± 6.26		-
				100	53.21 ± 15.29	-20.27 ± 5.39		-
	プロプラノロール (Propranolol)	抗不整脈薬（クラス II）	Na > hERG チャネル阻害	0.3 (μM)	-0.98 ± 2.20	0.73 ± 1.58	-	-
				1	-5.02 ± 3.52	2.20 ± 1.03		-

その他のメカニズムを有する化合物（続き）				3	-15.76 ± 3.17	7.82 ± 2.82		-
				10	-	-		EAD or TA and arrest 4/7 EAD or TA 2/7 Arrest 1/7
	カルバコール (Carbacol)	消化管運動促進薬・緑内障治療薬	情報なし	10	-2.01 ± 1.52	2.35 ± 3.01	116.93 ± 134.97	-
				30	-10.66 ± 6.60	6.23 ± 9.39		-
				100	-20.92 ± 2.83	11.69 ± 11.17		-
				300	-32.30 ± 11.27	19.08 ± 12.35		-
	グリチルリチン酸 (Glycyrrhizic acid)	甘草エキス	情報なし	1 (μM)	-0.86 ± 2.16	3.62 ± 2.50	373.39 ± 417.65 (μM)	-
				3	-1.99 ± 3.09	5.78 ± 3.85		-
				10	-4.68 ± 3.12	9.27 ± 3.77		-
				30	-12.33 ± 4.75	13.69		-
	ブレビスタチン (Blebbistatin)	ミオシン II 特異的阻害薬	ギャップ結合阻害	30 (μM)	9.28 ± 2.44	-5.71 ± 2.12	-	-
				100	11.71 ± 2.44	-6.32 ± 1.90		-
				300	17.21 ± 3.18	-8.96 ± 2.56		-
				1000	20.36 ± 4.72	-9.91 ± 1.90		Arrest 2/7

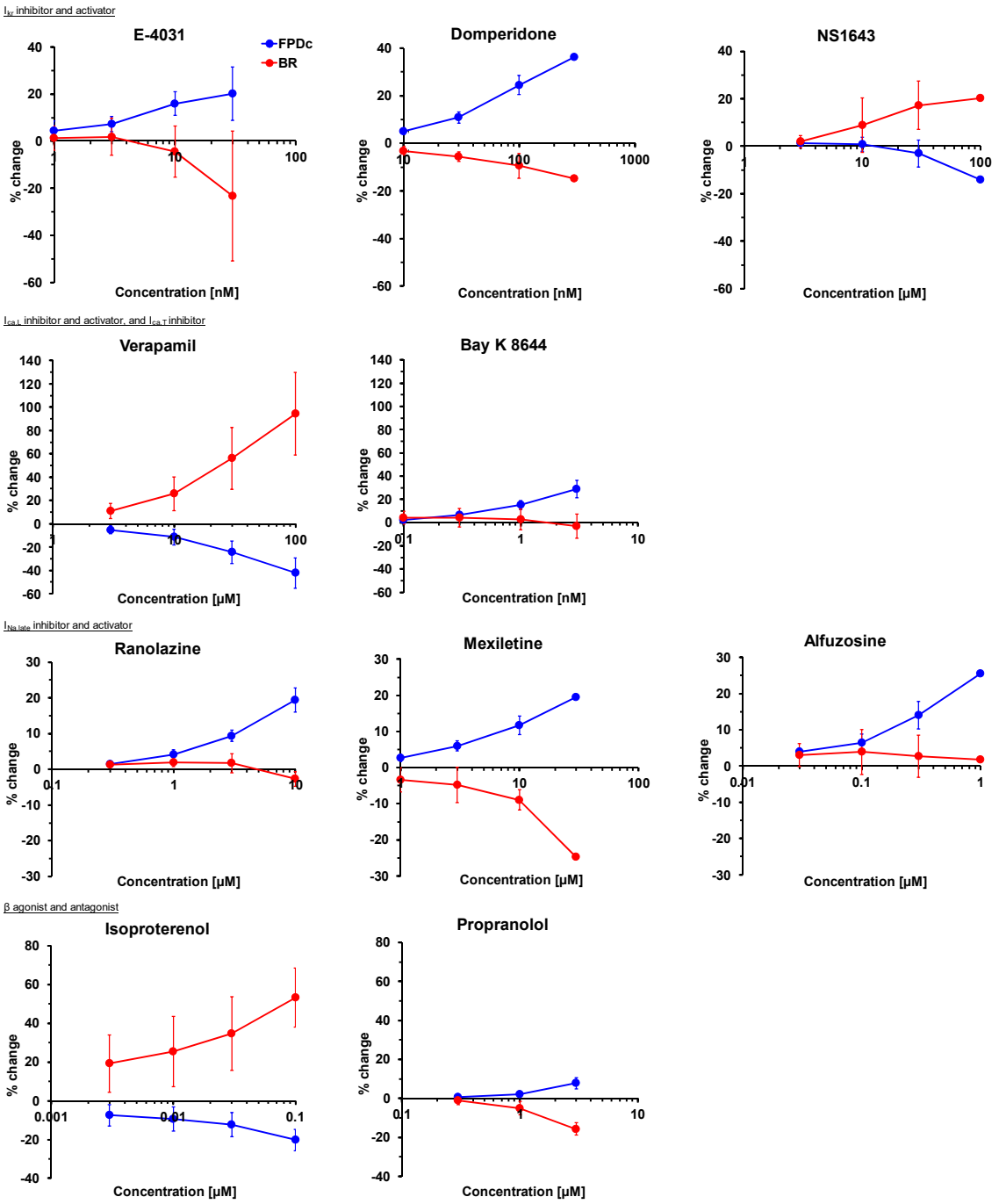


図 6　様々なイオンチャネル阻害薬および活性化薬の FPDc および拍動数に及ぼす影響

FPDc および拍動数は、適用前値からの変化率±SD で示す。（n=4-23）

第四節 考察

第一項 陽性/陰性対照薬およびモデル化合物による MEA アッセイの検証

第三節 結果および表 7 より、ドンペリドンやアルフゾシンのように、臨床で QT 延長および TdP を発現する化合物は、MEA アッセイにおいて FPDc 延長および EAD/TA を発現した。また、メキシレチンやクロマノール 293B のように、臨床で QT 延長を示すが、TdP は報告されていない化合物は、FPDc 延長を示し、Arrest のみを引き起こした。さらにミベフラジルは、顕著な FPDc 短縮により Arrest のみを引き起こしたと考えられるが、臨床でも TdP を発現した症例は数例のみである。Arrest と臨床で発現する不整脈との関連性については議論の余地があるが、Arrest のみを誘発する化合物は、TdP ポテンシャルが無いもしくは低いことが示唆された。

一方、例外の化合物も存在し、特にマルチチャネル阻害薬に多く認められた。クロルプロマジン、ロラタジン、クロザピンおよびクリゾチニブは、ヒトにおいて QT 延長および TdP を含む催不整脈作用を有することが知られているが (Berling I, et al., 2015;Bruggisser M, et al., 2009;Doherty KR, et al., 2013;Ochiai H, et al., 1990;Ou SH, et al., 2011;Poluzzi E, et al., 2015;Wenzel-Seifert K, et al., 2011)、MEA アッセイの結果は臨床に相関せず、クロザピンやロラタジンにおいては、不整脈様波形も発現しなかった。hiPS-CMs においては Ca チャネルに対する阻害作用が強く影響する可能性があるためと考えられるが、MEA アッセイにおける結果と臨床で起こる現象との矛盾を示すためには、さらなる検討が必要であると考えられた。さらに、dl-ソタロール、アミオダロン、ベプリジルは、MEA アッセイにおいて臨床の QTc 延長を反映した FPDc 延長が認められたものの、TdP を示唆する不整脈様波形を示さなかった。これらの化合物は、臨床において不整脈発現の報告例がいくつかあるが、*in vivo* 非臨床評価において催不整脈作用は検出されておらず、低い TdP ポテンシャルを有する化合物を検出するためには、より広い濃度範囲での検討が必要であることが示唆された。

上述のように、例外的な結果に関しては、今後も MEA アッセイのプロトコールについて検討および改善の余地はあると考えられるものの、MEA アッセイにおける FPDc および不整脈様波形の発現は、ヒト QT

および TdP 発現を確度高く予測可能であることが示唆された。

表 7　陽性/陰性対照薬およびモデル化合物による MEA アッセイ結果のまとめと hERG 阻害およびヒト QT/TdP 発現との比較

分類	薬剤名	hiPC-CMs		hERG 阻害作用	ヒト QT/TdP *括弧付は、動物 *in vivo* データ
		FPDc(%)	不整脈様波形		
hERG チャネル阻害薬および活性化薬	E-4031	↑	E, A	+	(+)
	Domperidone	↑	E	+	+
	NS1643	↓	A, O	—	(—)
late Na チャネル阻害薬および活性化薬	Ranolazine	↑	—	+	—
	Mexiletine	↑	A	+	+
	Alfuzosin	↑	E	+	+
Ca チャネル阻害薬および活性化薬	Verapamil	↓	—	+	—
	Bay K 8644	↑	—	—	—
マルチイオンチャネル阻害薬	Flcecainide	↑	E, A	+	+
	Moxifloxacin	↑	E, O	+	+
	Terfenadine	↑	E, A	+	+
	Mibefradil	↓	A	+	+
	Cisapride	↑	E	+	+
	Astemizole	↑	E	+	+
	Thioridazine	↑	E	+	+
	Pimozide	↑	E	+	+
	Chlorpromazine	→	E, A	+	+
	Clozapine	↓	—	+	+
	dl-Sotalol	↑	—	+	+
	Azimilide	↑	E	+	+
	Qunidine	↑	E	+	+
	Bepridil	↑	—	+	+
	Amiodarone	↑	—	+	+
	Dofetilide	↑	E	+	+
	Ibutilide	↑	E	+	+
	Loratadine	→	—	+	+
	Crizotinib	↓	A, O	+	+

	Sunitinib	↑	E	+	+
その他のイオンチャネル阻害薬もしくは開口薬	Chromanol 293B	↑	A	—	+
	ZD7288	↑	—	—	—
	Levocromakalim	↓	A	—	—
その他のメカニズムを有する化合物	Oubain octahydrate	↓	A, O	—	—
	Isoproterenol	↓	—	—	—
	Propranolol	→	E, A	+	—
	Carbacol	↑	—	—	—
	Glycyrrhizic acid	↑	—	—	—
	Blebbistatin	→	A	—	—
陰性対照薬	Aspirin	→	—	—	—

FPDc については、↑：延長、↓：短縮、→：変化なしを示す。
EAD/TA:E、Arrest:A、その他（Unclear T および 1st peak disappearance）：O を示す。
hERG 阻害作用およびヒトにおける QT 延長および TdP ポテンシャルについては、＋：ポテンシャルあり、－：ポテンシャルなしを示す。

第二項　MEA アッセイと既存他試験との比較

第一章で用いた陽性/陰性対照薬に加え、第二章で用いた 31 化合物のモデル化合物の MEA アッセイにおける $FPDc_{10}$ および $MC_{EAD/TA}$（EAD/TA 発現最小濃度）を、既存の心毒性評価に使用されている *in vitro* 評価系である hERG アッセイにおける IC_{50} およびモルモット心筋細胞を用いた APD アッセイにおける APD_{90} の EC_{10}（APD_{90} を 10%延長する場合の濃度）、また *in vivo* 評価系であるイヌもしくはサルを用いたテレメトリー試験における EC_{10}（10% QTc 延長時の非結合型血漿中濃度）と比較し（図 7）、既存評価系との相関性について考察した。また、MEA アッセイの結果を、臨床における QTc 延長や TdP 発現が認められた際の非結合型血漿中濃度と比較し、MEA アッセイのヒトにおける催不整脈作用予測性について考察した。

(1) hERG 試験との比較

MEA アッセイと hERG 試験における結果を比較するため、全 38 化合物のうち、入手可能であった 24

化合物の hERG IC_{50} の文献データを収集した。その結果、24 化合物のうち 18 化合物は、MEA アッセイで得られた $FPDc_{10}$ データと hERG IC_{50} の差異は 10 倍以内であった（図 7a）。残る 6 化合物のうち、$FPDc_{10}$ と hERG IC_{50} に 50 倍以上の差が認められたのは、dl-ソタロールとアルフゾシンであった。両化合物は、hERG 阻害作用は弱いものの、ともに臨床において TdP を発現することが知られていることから、MEA アッセイがより確度高く催不整脈作用ポテンシャルを検出できたと考えられる。図 7e に示すように、dl-ソタロールにおける $FPDc_{10}$ とヒトにおける QTc 延長作用に対する EC_{10} もしくは TdP 発現時の非結合型血漿中濃度は高い相関性を示した。ベラパミルは、hERG チャネルよりも Ca チャネルを強く阻害することが知られているが、ヒトで TdP を発現することはない。ベラパミルのような化合物の場合、hERG アッセイの IC_{50} でのみ評価すると、ヒトにおける QT 延長ポテンシャルを過大評価してしまう可能性があるが、MEA アッセイでは、FPDc に対して延長作用を示さず、ヒトでの QT 延長および TdP ポテンシャルに対して高い特異性を示した。これは、MEA アッセイが心筋イオンチャネルに対する包括的な評価が可能であることから、催不整脈作用に対して臨床予測精度の高い結果が得られることを示している。

さらに、hERG アッセイと MEA アッセイにおける予測度、感度、特異度について、Morissette らの報告と同様に算出した（表 8）（Morissette P, et al., 2013)。ヒトで催不整脈作用ポテンシャルのある（QT 延長および TdP を発現する）化合物が、hERG アッセイもしくは MEA アッセイで検出される割合を感度とし、ポテンシャルの無い化合物が、それぞれのアッセイで検出されない割合を特異度とすると、陽性/陰性対照薬およびモデル化合物として用いた 38 化合物に対し、hERG アッセイの感度は 96%であり、特異度は 77%であった。また、ヒトにおける催不整脈作用ポテンシャルと hERG アッセイもしくは MEA アッセイにおけるポテンシャル評価が一致した化合物の割合（予測度）は、89%であった。同様に MEA アッセイにおいて、感度は 80%、特異度は 62%であり、さらに予測度は 74%であった。hERG アッセイに対し、MEA アッセイの方が感度、特異度および予測度はやや低かったものの、大きな差は認められなかった。偽陽性を示した化合物、つまりヒトでは催不整脈作用ポテンシャルがないにもかかわらず、MEA アッセイで FPDc の延長が認められた 5 化合物は、全て不整脈様波形が認められていないことから、FPDc および不整脈様波形の有無の両方を加味することで、特異度および予測度の改善が期待できる。不整脈

様波形が催不整脈作用の有無の判断に重要であることが示唆された。

表 8 ヒトにおける QT 延長および TdP ポテンシャルに対する hERG アッセイおよび MEA アッセイの予測度、感度および特異度

		ヒトQT/TdP	
		−	+
hERG	−	10	1
	+	3	24
MEA (hiPC-CMs)	−	8	5
	+	5	20

	予測度(%)	感度(%)	特異度(%)
hERG	89	96	77
hiPS-CMs	74	80	62

＋：表 7 における↑もしくは＋。ポテンシャルあり。
—：表 7 における→および↓もしくは－。ポテンシャルなし。
左図の数字は、化合物数を示す。

(2) モルモット APD アッセイとの比較

MEA アッセイにおける $FPDc_{10}$ は、モルモット心筋細胞を用いた APD アッセイにおける EC_{10} と比較的高い相関性を示した（図 7b）。E-4031 およびモキシフロキサシンにおいて、$FPDc_{10}$ および $MC_{EAD/TA}$ は、モルモット心筋細胞における APD_{90} 延長と同等であった。しかしながら、モルモット APD アッセイでは、フレカイニド、アステミゾール、ピモジドおよびテルフェナジンのような化合物は、QT 延長ポテンシャルや催不整脈作用は検出できなかった（Omata T, et al., 2005)。これは、モルモット心筋細胞における hERG チャネル発現量の低さや I_{to} に関連するチャネルが発現していないことが一因と考えられる（Lu Z, et al., 2001)。これらの結果は、特にマルチイオンチャネル阻害薬の QT 延長ポテンシャルの検出において、MEA アッセイがモルモット APD アッセイよりも優れていることを強く示唆している。

(3) *in vivo* テレメトリー試験との比較

E-4031 およびシサプリドは、強力な hERG チャネル阻害薬である。覚醒サルおよびイヌを用いたテレメトリー試験における EC_{10} との比較において、MEA アッセイにおける両化合物の $FPDc_{10}$ は高い相関性を示し、その差異は 10 倍以内であった（図 7c、d）。一方、テルフェナジンは、イヌやサルを用いた *in vivo*

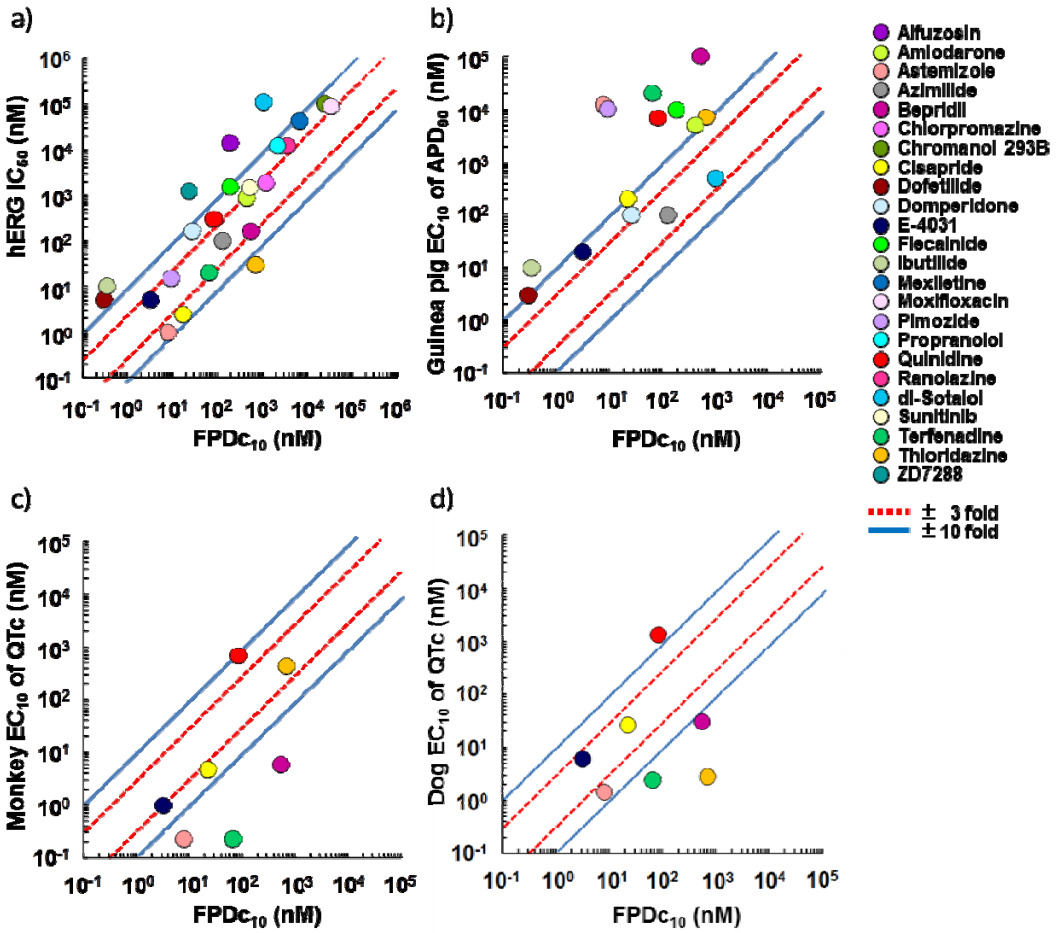
テレメトリー試験において、明らかなQT延長作用を示すものの、TdPや不整脈を誘発しない（Ando K, et al., 2005;Toyoshima S, et al., 2005)。また、フレカイニドは、イヌテレメトリー試験においてQT延長も不整脈も発現しないことが報告されている（Toyoshima S, et al., 2005)。それに比較して、MEAアッセイでは、テルフェナジンにおいて、$FPDc_{10}$が覚醒イヌのEC_{10}よりも高値を示したものの、不整脈様波形を発現し、フレカイニドにおいてもFPDc延長および不整脈様波形が検出された。心毒性を示す化合物のテレメトリー試験のデータは報告が少なく、*in vivo*と*in vitro*の決定的な比較評価は困難である。しかしながら、hiPS-CMsを用いたMEAアッセイは、少なくともQT延長に関してはテレメトリー試験と同等に、催不整脈性に関しては薬剤によってはテレメトリー試験以上に臨床における心毒性予測が可能であると考えられる。

(4) 臨床におけるQT延長およびTdPデータとの比較

MEAアッセイにおける$FPDc_{10}$および$MC_{EAD/TA}$は、臨床でQTc延長やTdP発現が認められた際の非結合型血漿中濃度と高い相関性を示したが（図 7e）、テルフェナジン、ピモジド、ベプリジルのようなマルチチャネル阻害薬や、アルフゾシンのようなhERG阻害作用を有するNaチャネル活性化薬は、ヒトでQTc延長やTdPを発現する非結合型血漿中濃度よりも、$FPDc_{10}$や$MC_{EAD/TA}$の方が高かった。ヒトiPS細胞由来心筋細胞は、ヒト胎児の心筋細胞に似た性質を示すが(Guo L, et al., 2011)、各心筋イオンチャネルの発現量がどの程度成人の心筋細胞と異なるのか、未だ明らかにされていない。Guoらの文献によると、ヒトiPS細胞由来心筋細胞では、成人の心筋細胞に対し、NaおよびhERGチャネルの発現量が明らかに低く、胎児の心筋細胞における発現量とほぼ同等であった。一方、Caチャネルの発現量は成人および胎児の心筋細胞と比較してほとんど差は認められなかった。したがって、NaチャネルやhERGチャネルに対する作用は成人の心筋細胞に比較して減弱する傾向があり、一方でCaチャネルに対する作用は成人の心筋細胞と同様に検出できるのではないかと推測されるが、これ以上の議論をするには、hiPS-CMsの各イオンチャネル発現量に関する情報が現状不足している。心筋イオンチャネルの発現量の差はMEAアッセイの結果に影響しうることから、新規開発化合物の評価をより確度高く行うため

に、細胞の生物学的性質に関して更なる解明と改善が必要であると考えられる。

以上のように、薬剤の QTc 延長や TdP リスクを予測するにあたり、MEA アッセイの有用性が示唆された。*in vivo* テレメトリー試験における EC_{10} や hERG アッセイの IC_{50}、APD アッセイにおける EC_{10} が化合物の催不整脈作用ポテンシャルを過大評価もしくは過小評価していることが知られており、本研究で示した MEA アッセイにおける $FPDc_{10}$ や $MC_{EAD/TA}$ は、それらに比較して高い感度と特異性を有する予測因子となる可能性が高い。このように MEA アッセイは、臨床との相関性の観点においても、既存の非臨床評価系に比較して優れていると考えられるが、本研究で使用しているヒト iPS 由来心筋細胞は幼若な心筋細胞としての性質を有しており、より成熟したヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いることにより、さらに有用性が改善するものと期待される。



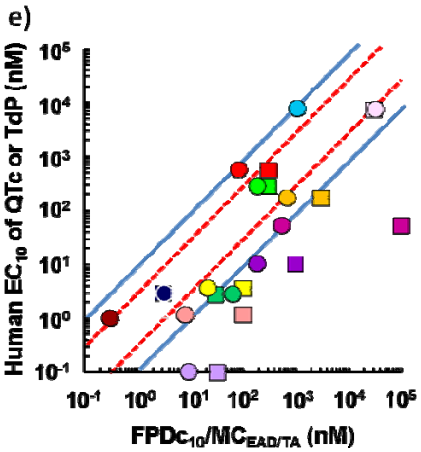


図 7　MEA アッセイと既存の *in vitro* および *in vivo* 評価系との比較

MEA アッセイにおける $FPDc_{10}$（○）および $MC_{EAD/TA}$（□）との比較；a）hERG アッセイにおける IC_{50}、b）モルモット APD_{90} に対する EC_{10}、c）サルテレメトリー試験における QTc 延長に対する EC_{10}、d）イヌテレメトリー試験における QTc 延長に対する EC_{10}、e）ヒト QTc 延長に対する EC_{10} もしくは TdP 発現時非結合型血漿中濃度

参考文献：(BoSmith RE, et al., 1993;Chaitman BR, 2006;Cheng HC, et al., 2009;Kramer J, et al., 2013;Krapf R, et al., 1985;Lacerda AE, et al., 2008;Morissette P, et al., 2013;Omata T, et al., 2005;Redfern WS, et al., 2003;Toyoshima S, et al., 2005)

総括

本研究では、新薬開発における新たな心毒性安全性評価法の一つとして、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞（hiPS-CMs）を用いた微小多電極アレイ（MEA: Multi-electrode array）による細胞外電位記録法により、催不整脈作用および QT 延長作用の検出が可能かどうかについて検討を行い、以下の知見を得た。

1. hiPS-CMs を用いた MEA アッセイにおける評価パラメータに対し、電極上に播種する細胞密度（1.5×10^4 および 3.0×10^4 細胞/ウェル）による影響、施設間差および細胞のロット間差は認められず、同期間培養後の細胞において、施設間による各種遺伝子発現量の差も認められなかった。本報告で提案する標準プロトコール条件下では、本評価系は実験および測定環境による影響を受けにくいと考えられた。
2. 細胞を起眠後、2 週間以上培養後に細胞外電位測定に用いる細胞は、起眠直後の細胞に比較して電位依存性チャネル、心筋収縮およびその調節に関わる遺伝子群において遺伝子発現の変動が認められた。特に K^+、Na^+および Ca^{2+}チャネル、さらに心筋収縮に関わる Ca^{2+}濃度調節に関与する遺伝子が培養期間に従って顕著な増加を示したことより、hiPS-CMs が培養期間において細胞成熟の過程にあることが示唆された。
3. 本アッセイでは、細胞外電位、拍動数、および不整脈様波形の発現数を評価パラメータとすることで、心筋イオンチャネルや自律神経系およびその他の薬理作用を介して心臓へ影響を及ぼすメカニズムを有するモデル化合物の有する催不整脈作用および QT 延長作用を検出可能であることが示唆された。

新薬開発に必要とされる安全性評価系は、実験に用いられる試料が入手しやすいこと、いずれの施設においても容易に評価が可能であること、そして評価する施設に関わらず同様の結果が得られる安定した評価系であることが求められる。本報告では、*in vitro* における催不整脈作用評価として MEA アッセイが、1) 市販品として安定供給可能で、種差の懸念が無いヒト由来の心筋細胞を使用できること、2) 一回の測定で複数化合物の評価が可能であること、3) 少量の化合物量で評価が可能であること、

4) 心筋マルチチャネル阻害薬を含む様々な心筋への作用を有する化合物の評価が可能であること、そして 5) 既存評価系に比較して臨床予測確度の高いデータを提供できること、という利点を有することを示した。

近年中に改訂を予定されている ICH 7SB ガイドラインの評価法の一つとして、本 MEA アッセイが取り入れられることが期待される。

引用文献

Ando K, Hombo T, Kanno A, Ikeda H, Imaizumi M, Shimizu N, Sakamoto K, Kitani S, Yamamoto Y, Hizume S, et al: QT PRODACT: in vivo QT assay with a conscious monkey for assessment of the potential for drug-induced QT interval prolongation. Journal of pharmacological sciences 2005, 99:487-500.

Asakura K, Hayashi S, Ojima A, Taniguchi T, Miyamoto N, Nakamori C, Nagasawa C, Kitamura T, Osada T, Honda Y, et al: Improvement of acquisition and analysis methods in multi-electrode array experiments with iPS cell-derived cardiomyocytes. Journal of pharmacological and toxicological methods 2015.

Benardeau A, Weissenburger J, Hondeghem L,Ertel EA: Effects of the T-type Ca(2+) channel blocker mibefradil on repolarization of guinea pig, rabbit, dog, monkey, and human cardiac tissue. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 2000, 292:561-575.

Berling I,Isbister GK: Prolonged QT Risk Assessment in Antipsychotic Overdose Using the QT Nomogram. Annals of emergency medicine 2015, 66:154-164.

BoSmith RE, Briggs I,Sturgess NC: Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (If) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. British journal of pharmacology 1993, 110:343-349.

Bruggisser M, Ratz Bravo A,Bodmer M: [Medication associated long QT syndrome]. Praxis 2009, 98:1409-1415; quiz 1415.

Chaitman BR: Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. Circulation 2006, 113:2462-2472.

Cheng HC,Incardona J: Models of torsades de pointes: effects of FPL64176, DPI201106, dofetilide, and chromanol 293B in isolated rabbit and guinea pig hearts. Journal of pharmacological and toxicological methods 2009, 60:174-184.

Chouabe C, Drici MD, Romey G, Barhanin J,Lazdunski M: HERG and KvLQT1/IsK, the cardiac K+ channels involved in long QT syndromes, are targets for calcium channel blockers. Molecular pharmacology 1998, 54:695-703.

Clements M,Thomas N: High-throughput multi-parameter profiling of electrophysiological drug effects in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes using multi-electrode arrays. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 2014, 140:445-461.

Colatsky T, Fermini B, Gintant G, Pierson JB, Sager P, Sekino Y, Strauss DG,Stockbridge N: The Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative - Update on progress. Journal of pharmacological and toxicological methods 2016, 81:15-20.

Crumb WJ, Jr.: Loratadine blockade of K(+) channels in human heart: comparison with terfenadine under physiological conditions. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 2000, 292:261-264.

Demolis JL, Kubitza D, Tenneze L,Funck-Brentano C: Effect of a single oral dose of moxifloxacin (400 mg and 800 mg) on ventricular repolarization in healthy subjects. Clinical pharmacology and therapeutics 2000, 68:658-666.

Doherty KR, Wappel RL, Talbert DR, Trusk PB, Moran DM, Kramer JW, Brown AM, Shell SA,Bacus S: Multi-parameter in vitro toxicity testing of crizotinib, sunitinib, erlotinib, and nilotinib in human cardiomyocytes. Toxicology and applied pharmacology 2013, 272:245-255.

Glaser S, Steinbach M, Opitz C, Wruck U,Kleber FX: Torsades de pointes caused by Mibefradil. European journal of heart failure 2001, 3:627-630.

Gualdani R, Tadini-Buoninsegni F, Roselli M, Defrenza I, Contino M, Colabufo NA,Lentini G: Inhibition of hERG potassium channel by the antiarrhythmic agent mexiletine and its metabolite m-hydroxymexiletine. Pharmacology research & perspectives 2015, 3:e00160.

Guo L, Abrams RM, Babiarz JE, Cohen JD, Kameoka S, Sanders MJ, Chiao E,Kolaja KL: Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 2011, 123:281-289.

Guo L, Qian JY, Abrams R, Tang HM, Weiser T, Sanders MJ,Kolaja KL: The electrophysiological effects of cardiac glycosides in human iPSC-derived cardiomyocytes and in guinea pig isolated hearts. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 2011, 27:453-462.

Hansen RS, Diness TG, Christ T, Demnitz J, Ravens U, Olesen SP,Grunnet M: Activation of human ether-a-go-go-related gene potassium channels by the diphenylurea 1,3-bis-(2-hydroxy-5-trifluoromethyl-phenyl)-urea (NS1643). Molecular pharmacology 2006, 69:266-277.

Harris K, Aylott M, Cui Y, Louttit JB, McMahon NC,Sridhar A: Comparison of electrophysiological data from human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to functional preclinical safety assays. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 2013, 134:412-426.

January CT, Riddle JM,Salata JJ: A model for early afterdepolarizations: induction with the Ca2+ channel agonist Bay K 8644. Circulation research 1988, 62:563-571.

Jonsson MK, Vos MA, Mirams GR, Duker G, Sartipy P, de Boer TP,van Veen TA:

Application of human stem cell-derived cardiomyocytes in safety pharmacology requires caution beyond hERG. Journal of molecular and cellular cardiology 2012, 52:998-1008.

Kramer J, Obejero-Paz CA, Myatt G, Kuryshev YA, Bruening-Wright A, Verducci JS,Brown AM: MICE models: superior to the HERG model in predicting Torsade de Pointes. Scientific reports 2013, 3:2100.

Krapf R,Gertsch M: Torsade de pointes induced by sotalol despite therapeutic plasma sotalol concentrations. British medical journal (Clinical research ed) 1985, 290:1784-1785.

Lacerda AE, Kuryshev YA, Chen Y, Renganathan M, Eng H, Danthi SJ, Kramer JW, Yang T,Brown AM: Alfuzosin delays cardiac repolarization by a novel mechanism. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 2008, 324:427-433.

Liang P, Lan F, Lee AS, Gong T, Sanchez-Freire V, Wang Y, Diecke S, Sallam K, Knowles JW, Wang PJ, et al: Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. Circulation 2013, 127:1677-1691.

Louie JC, Fujii N, Meade RD,Kenny GP: The interactive contributions of Na /K -ATPase and nitric oxide synthase to sweating and cutaneous vasodilation during exercise in the heat. The Journal of physiology 2016.

Lu HR, Vlaminckx E,Gallacher DJ: Choice of cardiac tissue in vitro plays an important role in assessing the risk of drug-induced cardiac arrhythmias in human: beyond QT prolongation. Journal of pharmacological and toxicological methods 2008, 57:1-8.

Lu HR, Vlaminckx E, Hermans AN, Rohrbacher J, Van Ammel K, Towart R, Pugsley M,Gallacher DJ: Predicting drug-induced changes in QT interval and arrhythmias: QT-shortening drugs point to gaps in the ICHS7B Guidelines. British journal of pharmacology 2008, 154:1427-1438.

Lu Z, Kamiya K, Opthof T, Yasui K,Kodama I: Density and kinetics of I(Kr) and I(Ks) in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of I(Ks) blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit: implications for arrhythmogenesis in humans. Circulation 2001, 104:951-956.

Mangoni ME,Nargeot J: Genesis and regulation of the heart automaticity. Physiological reviews 2008, 88:919-982.

Matucci R, Nesi M, Martino MV, Bellucci C, Manetti D, Ciuti E, Mazzolari A, Dei S, Guandalini L, Teodori E, et al: Carbachol dimers as homobivalent modulators of muscarinic receptors. Biochemical pharmacology 2016.

McNulty MM, Kyle JW, Lipkind GM,Hanck DA: An inner pore residue (Asn406) in the Nav1.5 channel controls slow inactivation and enhances mibefradil block to T-type Ca2+ channel levels. Molecular pharmacology 2006, 70:1514-1523.

Mehta A, Chung Y, Sequiera GL, Wong P, Liew R,Shim W: Pharmacoelectrophysiology of viral-free induced pluripotent stem cell-derived human cardiomyocytes. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 2013, 131:458-469.

Morissette P, Nishida M, Trepakova E, Imredy J, Lagrutta A, Chaves A, Hoagland K, Hoe CM, Zrada MM, Travis JJ, et al: The anesthetized guinea pig: an effective early cardiovascular derisking and lead optimization model. Journal of pharmacological and toxicological methods 2013, 68:137-149.

Nozaki Y, Honda Y, Watanabe H, Saiki S, Koyabu K, Itoh T, Nagasawa C, Nakamori C, Nakayama C, Iwasaki H, et al: CSAHi study: Validation of multi-electrode array systems (MEA60/2100) for prediction of drug-induced proarrhythmia using human iPS cell-derived cardiomyocytes -assessment of inter-facility and cells lot-to-lot-variability. Regulatory toxicology and pharmacology : RTP 2016, 77:75-86.

Ochiai H, Kashiwagi M, Usui T, Oyama Y, Tokita Y,Ishikawa T: [Torsade de Pointes with T wave alternans in a patient receiving moderate dose of chlorpromazine: report of a case]. Kokyu to junkan Respiration & circulation 1990, 38:819-822.

Ohya Y, Setoguchi M, Fujii K, Nagao T, Abe I,Fujishima M: Impaired action of levcromakalim on ATP-sensitive K+ channels in mesenteric artery cells from spontaneously hypertensive rats. Hypertension 1996, 27:1234-1239.

Omata T, Kasai C, Hashimoto M, Hombo T,Yamamoto K: QT PRODACT: comparison of non-clinical studies for drug-induced delay in ventricular repolarization and their role in safety evaluation in humans. Journal of pharmacological sciences 2005, 99:531-541.

Ou SH, Azada M, Dy J,Stiber JA: Asymptomatic profound sinus bradycardia (heart rate </=45) in non-small cell lung cancer patients treated with crizotinib. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer 2011, 6:2135-2137.

Poluzzi E, Raschi E, Godman B, Koci A, Moretti U, Kalaba M, Wettermark B, Sturkenboom M,De Ponti F: Pro-arrhythmic potential of oral antihistamines (H1): combining adverse event reports with drug utilization data across Europe. PloS one 2015, 10:e0119551.

Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK,

Strang I, Sullivan AT, Wallis R, et al: Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. Cardiovascular research 2003, 58:32-45.

Sager PT, Gintant G, Turner JR, Pettit S,Stockbridge N: Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: a meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium. American heart journal 2014, 167:292-300.

SoRelle R: Withdrawal of Posicor from market. Circulation 1998, 98:831-832.

Stark G, Stark U,Tritthart HA: Modulation of cardiac impulse generation and conduction by nifedipine and verapamil analyzed by a refined surface ECG technique in Langendorff perfused guinea pig hearts. Basic research in cardiology 1988, 83:202-212.

Stratton JR, Cerqueira MD, Schwartz RS, Levy WC, Veith RC, Kahn SE,Abrass IB: Differences in cardiovascular responses to isoproterenol in relation to age and exercise training in healthy men. Circulation 1992, 86:504-512.

Takasuna K, Katsuyoshi Chiba,Manabe aS: Pre-clinical QT Risk Assessment in Pharmaceutical Companies - Issues of Current QT Risk Assessment -. Biomolecules & Therapeutics 2009, 17:1-11.

Toyoshima S, Kanno A, Kitayama T, Sekiya K, Nakai K, Haruna M, Mino T, Miyazaki H, Yano K,Yamamoto K: QT PRODACT: in vivo QT assay in the conscious dog for assessing the potential for QT interval prolongation by human pharmaceuticals. Journal of pharmacological sciences 2005, 99:459-471.

Van Opstal JM, Leunissen JD, Wellens HJ,Vos MA: Azimilide and dofetilide produce similar electrophysiological and proarrhythmic effects in a canine model of Torsade de Pointes arrhythmias. European journal of pharmacology 2001, 412:67-76.

Varro A, Balati B, Iost N, Takacs J, Virag L, Lathrop DA, Csaba L, Talosi L,Papp JG: The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. The Journal of physiology 2000, 523 Pt 1:67-81.

Volders PG, Stengl M, van Opstal JM, Gerlach U, Spatjens RL, Beekman JD, Sipido KR,Vos MA: Probing the contribution of IKs to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation. Circulation 2003, 107:2753-2760.

Wang DW, Mistry AM, Kahlig KM, Kearney JA, Xiang J,George AL, Jr.: Propranolol blocks cardiac and neuronal voltage-gated sodium channels. Frontiers in pharmacology 2010, 1:144.

Wang DW, Yazawa K, Makita N, George AL, Jr.,Bennett PB: Pharmacological targeting of long QT mutant sodium channels. The Journal of clinical investigation 1997,

99:1714-1720.

Wang HH, Tanaka H, Qin X, Zhao T, Ye LH, Okagaki T, Katayama T, Nakamura A, Ishikawa R, Thatcher SE, et al: Blebbistatin inhibits the chemotaxis of vascular smooth muscle cells by disrupting the myosin II-actin interaction. American journal of physiology Heart and circulatory physiology 2008, 294:H2060-2068.

Watkins PB: Drug safety sciences and the bottleneck in drug development. Clinical pharmacology and therapeutics 2011, 89:788-790.

Wenzel-Seifert K, Wittmann M,Haen E: QTc prolongation by psychotropic drugs and the risk of Torsade de Pointes. Deutsches Arzteblatt international 2011, 108:687-693.

Wu X, Liao L, Liu X, Luo F, Yang T,Li C: Is ZD7288 a selective blocker of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel currents? Channels (Austin, Tex) 2012, 6:438-442.

Yasuda M, Nakazato Y, Sasaki A, Kawano Y, Nakazato K, Tokano T,Daida H: Clinical evaluation of adverse effects during bepridil administration for atrial fibrillation and flutter. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society 2006, 70:662-666.

Zhao D, Liu Q, Ji Y, Wang G, He X, Tian W, Xu H, Lei T,Wang Y: Effect of 18beta-glycyrrhetinic acid on cerebral vasospasm caused by asymmetric dimethylarginine after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. Neurological research 2015, 37:476-483.

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授、藤尾　慈　先生に心より深くお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、直接のご指導を賜り、日常の様々な議論を通じて多くの知識や示唆をいただきました大日本住友製薬株式会社　研究本部　本田　弥生氏、辻本　伸治氏、国松　武史氏に深謝致します。

また、iCell 細胞の培養や MEA 測定にあたり、御協力、御討論を賜りました大日本住友製薬株式会社　研究本部　渡辺　仁氏、依田　智美氏に心よりお礼申し上げます。

最後に、MEA アッセイの実用化に向けた製薬協コンソーシアム　CSAHi　心臓チームの各社関係者の皆様の熱心な研究精神に敬意を表するとともに、本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援とご協力を頂きました大日本住友製薬株式会社　研究本部　前臨床研究所の皆様、そして博士号取得への理解を示し、日々サポートしてくれた家族に心から感謝致します。