

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と多電極アレイ
システムを用いた薬剤誘発性 QT 間隔延長
および催不整脈リスク予測評価法の検討

2017 年

北口 隆

目次

第 1 章 背景および目的.....	5
第 2 章 実験方法.....	10
2-1. 使用薬物	10
2-2. 細胞の調製	10
2-3. 細胞外電位測定	11
2-4. 培地中タンパク結合率測定	12
2-5. データ解析	12
第 3 章 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせによる評価法の確立と一般化可能 性の検討	13
3-1. 序論	13
3-2. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の薬剤適用前値の施設間・ロット間差比較	13
3-3. 薬剤反応性 (FPDc ₁₀) の施設間・ロット間差比較.....	15
3-4. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせによる薬剤評価結果と、既存の非臨 床アッセイやヒト血漿中濃度との比較	16
3-5. 小括	18
第 4 章 MEA システムの機器間差比較およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞の構造的特徴付け	22
4-1. 序論	22
4-2. FPDc ₁₀ および不整脈様波形惹起濃度の MEA 機器間差比較	22
4-3. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の構造的特徴付け	25
4-4. 小括	26

第 5 章 包括的な QT 間隔延長および催不整脈リスク評価法に向けた検討	27
5-1. 序論	27
5-2. 心筋イオンチャネルや受容体調節薬に対する影響	28
5-3. 既存の非臨床評価系で擬陰性となる薬剤の評価	31
5-4. マルチイオンチャネル作用薬の評価	33
5-5. 小括	36
第 6 章 総括	37
参考文献	39
主論文目録	44
謝辞	45
審査委員	46

略語表

APD	活動電位持続時間
APD ₉₀	90%活動電位持続時間
APD ₉₀ EC ₁₀	90%活動電位持続時間の 10%延長濃度
CIOMS	国際医科学協議会
CiPA	Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay
CSAHi	ヒト iPS 細胞応用安全性評価コンソーシアム
CSRC	Cardiac Safety Research Consortium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EAD	早期後脱分極
ES 細胞	胚性幹細胞
ETPC	ヒト有効血漿中濃度
FDA	Food and Drug Administration
FPD	field potential duration
FPDc	Fridericia の補正式による補正 field potential duration
FPDc ₁₀	FPDc 10%延長濃度
f _u	非結合型の薬物の割合
hC _{max}	ヒトにおける最高血漿中濃度
hC _{QT}	ヒトにおける QT 間隔延長時の血漿中濃度
hC _{TdP}	ヒトにおける TdP 発症時の血漿中濃度
hERG	human <i>ether-à-go-go-related gene</i>
HESI	Health and Environmental Sciences Institute
I _{CaL}	L 型 Ca ²⁺ チャネル電流
I _{CaT}	T 型 Ca ²⁺ チャネル電流
ICH	国際医薬品規制調和会議
I _f	過分極活性化陽イオン電流
I _K	遅延整流 K ⁺ チャネル電流
I _{KACH}	アセチルコリン活性化 K ⁺ チャネル電流
I _{KATP}	ATP 感受性 K ⁺ チャネル電流
I _{Kr}	急速活性化遅延整流 K ⁺ チャネル電流
I _{Ks}	緩徐活性化遅延整流 K ⁺ チャネル電流
I _{Kur}	超急速活性化遅延整流 K ⁺ チャネル電流

I_{K1}	内向き整流 K^+ チャネル電流
I_{Na}	Na^+ チャネル電流
I_{NCX}	Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体を介する電流
iPS 細胞	人工多能性幹細胞
I_{to}	一過性外向き電流
LC-MS/MS	液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計
$MC_{EAD/TA}$	不整脈様波形検出の最小濃度
MEA	多電極アレイ
TA	triggered activity
TdP	Torsade de Pointes

第1章 背景および目的

医薬品の開発において、心血管系の安全性評価は重要な課題である。特に、1980年代後半から90年代前半に、欧米では抗アレルギー薬のTerfenadineによる致死性不整脈（Torsade de Pointes, TdP）が報告され、これを発端に、2000年代前半にかけて心電図QT間隔延長およびTdP発生リスクを理由とした安全性上の懸念により非循環器系医薬品の市販後撤退が相次いだ。国際医科学協議会（CIOMS）の報告書によると、1990年から2004年にかけて安全上の理由でグローバル市場から撤退した34種の医薬品のうち、少なくとも9種の医薬品がQT間隔延長に伴うTdP発生リスクをその撤退理由としており、市販後撤退理由の大きな割合を占めている（CIOMS、2005）。

TdPは心電図のQRS波が基線を軸として周期的にねじれるように変化する多形性の心室性頻拍であり、TdPが生じた場合、失神や、心室細動に移行し突然死へとつながる危険な不整脈である。TdPは心電図QT間隔の延長に伴う早期後脱分極（EAD）やTriggered activity（TA）のような心室筋の再分極過程における異常な脱分極が引き金となり発生すると考えられており、心電図QT間隔はK⁺チャネル阻害による外向きイオン電流の遮断やNa⁺チャネルやCa²⁺チャネル活性化による内向きイオン電流の活性化により延長することが知られている。特に、心室筋の再分極過程において大きな役割を果たすK⁺チャネルであるhuman ether-à-go-go-related gene (hERG)チャネル阻害作用やQT間隔延長とTdPのリスクには一定の相関性があることから、これらはTdP発生リスク予測のサロゲートマーカーとして用いられている（Redfernら、2003）。

このような考えに基づき、2005年に国際医薬品規制調和会議（ICH）により、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）および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）が採択され、すべての新有効成分含有医薬品でQT間隔延長作用や催不整脈作用に対する非臨床および臨床評価が行われることとなった（ICH

S7B、2005; ICH E14、2005)。両ガイドラインが施行されて以降、TdP 発生リスクが原因で市場から撤退した薬剤はなく、患者の安全確保および製薬企業の市販後撤退リスク低減の両面で大きな成果を上げていると考えられている。ICH S7B ガイドラインでは hERG チャネルの阻害作用と、覚醒下動物を用いた心電図測定による QT 間隔延長評価、また、動物の摘出組織やモデル動物による種々のフォローアップ試験や臨床試験成績による統合的リスク評価が求められており、製薬企業では開発中止リスクを避けるため、創薬早期段階から少量の化合物で実施可能なパッチクランプ法による hERG チャネル阻害試験により化合物のスクリーニングを行っている。このようなスクリーニング戦略により、hERG チャネル阻害作用のある化合物は十分な追加検討をされる前に速やかに開発候補から除外され、現在開発が進められている医薬品候補化合物で強い hERG チャネル阻害作用を有する薬剤は少ない。

しかしながら、心室筋の活動電位には hERG チャネル以外のイオンチャネルも関与しており、hERG チャネル阻害作用を有するにも関わらず QT 間隔を延長させない薬剤や、QT 間隔を延長しても TdP 発生リスクの低い薬剤も知られている。そのため、hERG チャネル阻害作用のみの評価では有用な医薬品となりうる候補化合物を開発初期に除外してしまう可能性があり、QT 間隔延長や催不整脈リスクに対する影響を初期からより正確に評価する必要性が指摘されている (Sager ら、2014)。特に、創薬早期段階から少量の化合物で hERG チャネル阻害以外の作用も含めた包括的な評価が可能な試験系に対する製薬企業のニーズは高く、 $\text{Na}_v1.5$ 電位依存性 Na^+ チャネルや、 $\text{Ca}_v1.2$ 電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害作用の確認、あるいは、モルモット、ウサギ、イヌといった実験動物から単離された組織や器官を用いた心筋活動電位や心電図の測定により、催不整脈リスク予測精度を高める試みがなされている (Takasuna ら、2009 ; Lu ら、2013 ; Kramer ら、2013 ; Morissette ら、2013)。しかし、複数のイオンチャネルの評価は試験数が多くなり、また各試験結果の組み合わせによる総合的な考察が必要である。単離組織あるいは器官の利用は実験手技の熟練を要し、比較的スループットが低く、加えて、実験条件（動物種の選択、麻酔の種類、組織の由来、測定機器等）の相違により、施設間で異なる評価結果につながる可能性があり、また、実験動

物倫理面の課題や、さらには種差の考慮といった課題もある。例えば、モルモット摘出乳頭筋を用いた微小電極法による活動電位持続時間（APD）の測定はバリデートされたモデルで、フォローアップ試験としての有用性は ICH S7B で確立されている (Yamazaki ら、2005)。しかし、本評価法は臨床における QT 間隔延長の予測において、ある程度の擬陰性結果を生じることも知られている。したがって、薬剤誘発性 QT 間隔延長および TdP 発生リスクを予測するため、臨床予測性の高い、包括的な評価が可能な *in vitro* 試験系が必要とされている。

近年、ヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞の大規模な生産がなされるようになり、製薬企業にとって新規の *in vitro* 心毒性評価法を開発できる環境が整ってきた。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は I_{Na} , I_{CaL} , I_f , I_{to} , I_{Kl} , I_{Kr} , I_{Ks} に関するイオンチャネルの発現が確認されており (Ma ら、2011)、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた評価系はヒトにおける総合的な心筋細胞の電気生理学的影響を評価することが期待されている。

2013 年 7 月に Food and Drug Administration (FDA) 本部で開催された Cardiac Safety Research Consortium (CSRC)/ Health and Environmental Sciences Institute (HESI) Thinktank Meeting において ICH E14 ガイドラインの廃止と S7B ガイドラインの改訂が提案された (Sager ら、2014)。*In vitro* 試験を中心とした非臨床試験を利用した、催不整脈リスク評価に関する Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) Initiative の活動は、心筋イオンチャネルの評価、イオンチャネルデータを用いた *in silico* 心室筋モデルによる予測ならびに *in vitro* でのヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞を用いた催不整脈作用の確認というパラダイムシフトを提案する取り組みで、現在 FDA、CSRC、HESI に加え Safety Pharmacology Society、European Medicines Agency、Health Canada、国立医薬品食品衛生研究所、医薬品医療機器総合機構といった規制当局も含めた活動となっている。

このような取り組みが進む中、2013 年 12 月に日本製薬工業協会を母体としたヒト iPS 細胞応用安全性評価コンソーシアム (CSAHi) がヒト iPS 細胞由来分化心筋、肝臓および神経細胞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、将来的展望も含め実用に向け世の中に提言することを目的として設立された。CSAHi

心筋チームの目標はヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞に対する薬剤の反応について、多電極アレイ (MEA) 法により細胞外電位を、パッチクランプ法により細胞内活動電位を、Impedance 法や Motion field imaging 法により細胞の収縮による電気抵抗変化や形態変化を、Ca transient 法により細胞内 Ca^{2+} 動態を、High content analysis 法により細胞毒性をそれぞれ評価し、これらの手法単独あるいは組み合わせにより QT 間隔延長、催不整脈作用、収縮機能異常および器質的な心毒性を包括的に予測するための評価戦略を提案することである。

これらの試験系のうち MEA は細胞外のイオン電流の変化に伴う電位変化を測定する装置で、古典的なパッチクランプ法や活動電位測定法とは異なり、細胞に対し非侵襲的で安定した記録が可能であり、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を含む心筋組織を用いた薬理試験の報告が多くなされている (Stett ら、2003 ; Asai ら、2010 ; Nakamura ら、2014)。心筋細胞の細胞外電位波形から得られる第一の鋭いピークは活動電位波形における脱分極相の立ち上がりに、第二の緩やかなピークは活動電位波形における再分極相後期に一致し、両ピークの間隔として定義される Field potential duration (FPD) は、心筋細胞の再分極持続時間に相關することが示唆されており、FPD は正常な状態では 50% 活動電位持続時間 (APD_{50}) に一致し、薬剤による活動電位持続時間延長作用検出時には 90% 活動電位持続時間 (APD_{90}) と一致することが報告されている (Asakura ら、2015)。また、異所性の脱分極波形や、EAD あるいは TA のような不整脈様波形も観察できる。

本研究では第一の検討として、市販のヒト iPS 細胞由来心筋細胞である iCell 心筋細胞と MEA として汎用されている MED64 システムの組み合わせによる評価系を構築し、共通プロトコールのもと、10 施設で薬剤の適用前値や 7 種の共通化合物に対する薬剤反応の施設間再現性や心筋細胞ロット間の再現性を確認することで、本評価系の一般化の可能性について検討した。

第二の検討として、他の MEA 機器との化合物評価結果を比較し、また、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の構造的特徴を電子顕微鏡により観察することで、本評価系の実験上の留意点や課題を明らかにすることとした。

第三の検討として、様々なイオンチャネルや受容体調節薬、既存の *in vitro* 評価系で擬陰

性となる薬剤、さらにはマルチイオンチャネル作用薬に対する影響を評価し、また臨床成績との比較を行うことで、包括的な QT 間隔延長および催不整脈リスク予測評価系としての有用性を評価した。

最後に、これらの検討結果をもとに本評価系の利用による創薬の効率化を提案する。

第2章 実験方法

2-1. 使用薬物

E-4031、Verapamil、Aspirin および Barium chloride (BaCl_2) dihydrate は Wako より、Terfenadine、Chromanol 293B、Flecainide、Moxifloxacin、Mibepradil dihydrochloride、Ouabain octahydrate、Bepridil hydrochloride、Pimozide、Cisapride monohydrate、Alfuzosin hydrochloride、Ranolazine dihydrochloride、Amiodarone hydrochloride、Fluoxetine hydrochloride、Tolterodine L-tartrate および GBR 12909 (Vanoxerine) dihydrochloride は Sigma-Aldrich より、(±)-Bay K8644、ZD7288、Quinidine および Thioridazine は Abcam (San Francisco、CA、USA) より、NS1643 および Levromakalim は Santa Cruz Biotechnology (Dallas、TX、USA) より DL-isoproterenol は Nacalai Tesque (京都) より購入した。

2-2. 細胞の調製

全ての実験において、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞として iCell 心筋細胞 (CDI、Madison、USA) を用いた。E-4031、Moxifloxacin、Flecainide、Terfenadine、Chromanol 293B、Verapamil および Aspirin の評価には全施設共通のロット (Lot 1091313) を用いるとともに、うち 2 施設では心筋細胞ロット間差評価のため異なるロット (Lot 1033176 および 1093227) も用いた。その他の化合物の評価には Lot 1091313 あるいは Lot 1036687 を用いた。

iCell 心筋細胞を plating medium (CDI) を用いて解凍し、0.1%ゼラチンでコーティングした 6 well プレートに 1 wellあたり約 2×10^6 cells となるよう播種し、37°C、5%あるいは 7% CO₂ インキュベーター中で培養した。播種 2 日後より maintenance medium (CDI) に交換した。播種 7 または 14 日後に 0.25% トリプシン-EDTA あるいは TrypLE Select (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) により細胞を剥がした。50 µg/mL の Fibronectin 2 µL (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) で MEA プローブ (MED-P515A、アルファメッドサイエンティフィック、大阪) 中心の電極部分をコートしたのち、1 プローブあたり 3×10^4 cells/2 µL となるように電極部分

に細胞を播種した。CO₂ インキュベーター中で 1 時間以上インキュベートし、細胞接着後 1 mL あるいは 2 mL の maintenance medium を追加し培養した。maintenance medium は半量あるいは全量を 2 から 3 日ごとに交換した。MEA プローブの播種後 5 から 10 日間培養した細胞を、細胞外電位測定に用いた。

2-3. 細胞外電位測定

細胞外電位測定は maintenance medium 中で行い、測定ごとに新しい MEA プローブを用いることとし、測定当日に 2 mL の新鮮な maintenance medium と交換し、30 分間以上 CO₂ インキュベーター内で平衡化した。その後、37°C に温度を調整し、O₂:CO₂:N₂ = 20%:5%:75% あるいは O₂:CO₂ = 95%:5% のガスを通気した MED64 システム（アルファメッドサイエンティフィック）に、MEA プローブを設置した。

細胞外電位は、E-4031、Moxifloxacin、Flecainide、Terfenadine、Chromanol 293B、Verapamil および Aspirin の評価には 1-1000 Hz のベッセルフィルターを通して、他の化合物の評価には Asakura らの報告を参考に 0.1-10000 Hz のベッセルフィルターを通して記録した (Asakura ら、2015)。波形の安定性と一定性を担保するため、MEA プローブ設置後 20 分間以上静置した。その後、2 μL の媒体 (DMSO、Wako、大阪) を MEA プローブに添加し、細胞外電位を 10 分間記録した。続いて、予め DMSO で調製した薬剤を低濃度から 10 分間隔で 2 μL ずつ累積適用し、細胞外電位を記録した。予備検討結果を基に濃度反応関係が得られるよう E-4031、Moxifloxacin、Flecainide、Terfenadine、Chromanol 293B、Verapamil および Aspirin の評価には最大 4 濃度、他の化合物の評価には 4~5 濃度を設定し、薬剤の最高濃度は 100 μM を上限とした。

各濃度において記録した 64 電極の細胞外電位データのうち最も波形が明瞭な電極を選び、10 分間の測定の最後 30 拍を抽出し、Asakura らの報告と同様に FPD、拍動数を Mobius (アルファメッドサイエンティフィック) で自動解析し、FPD は Nakamura らの報告を参考に、Fridericia の式により補正した ($FPD_c = FPD / \text{拍動間隔}^{1/3}$) (Nakamura ら、2014)。また、EAD あるいは TA、拍動停止や波形平滑化といった波形変化の有無は目視で確認し、波形変化が

みられた濃度のデータは解析から除外した。なお、今回の研究では、細胞外電位波形における脱分極波のピーク高さや上昇速度は、脱分極ピークの高さや方向が不安定であったため評価しなかった。

2-4. 培地中タンパク結合率測定

Maintenance medium 中の非結合型の薬物の割合 (f_u) は、別途、リン酸緩衝液 (pH 7.4) に対する平衡透析法により求めた。透析装置は HTD96b (HTDialysis LLC, Gales Ferry, CT, USA) を用い、培地中の各薬物の終濃度は細胞外電位測定時の濃度に合わせた。カットオフ 10 kDa の透析膜を用い、37°C、4 時間緩和な攪拌下で透析を行った後、培地側のサンプルに等量の緩衝液を、緩衝液側のサンプルに等量の培地をそれぞれ加え、内部標準物質を含む有機溶媒により除タンパクした上清を LC-MS/MS で測定した。 f_u は薬物と内部標準物質のピーク面積比を培地側と緩衝液側で比較して求めた。ヒト血漿あるいは血清タンパク結合率は既報より引用した。

2-5. データ解析

各濃度における FPD、拍動数および FPDC の絶対値は Nakamura らの報告を参考に薬剤適用前値 (0.1% DMSO 適用時) に対する変化率に変換した (Nakamura ら、2014)。FPDC を 10%以上延長させたサンプルに対しては FPDC 10%延長濃度 (FPDC₁₀) を GraphPad Prism ver.5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用い、ロジスティック回帰分析により求め、平均した。濃度-反応関係が見られなかった場合、最高濃度のデータは FPDC₁₀ 算出の解析から除外した。

第3章 ヒトiPS細胞由来心筋細胞とMEAの組み合わせによる評価 法の確立と一般化可能性の検討

3-1. 序論

近年、ヒトiPS/ES細胞由来心筋細胞の大規模な生産がなされるようになり、製薬企業にとって新規の *in vitro* 心毒性評価法を開発できる環境が整ってきた。これまでにヒトiPS/ES細胞由来心筋細胞を用いた心毒性アッセイは多くの報告がなされているが、細胞の由来、評価機器、実験施設、実験プロトコールといった試験条件が異なり化合物評価結果の相違もみられる。均一で再現性のある評価系が医薬品の安全性評価には求められることから、評価系の構築のみならず施設間で均一な評価結果を得ることは重要である。

そこでまず本章では市販のヒトiPS細胞由来心筋細胞であるiCell心筋細胞と、MEAとして汎用されているMED64システムを組み合わせた評価系を構築するため、共通のプロトコールのもと、10施設で薬剤適用前値および7種の共通化合物に対する薬剤反応性を比較した。また、異なるロットのiCell心筋細胞を用いて同様の評価を行いロット間の再現性も確認し、本試験系の一般化の可能性を評価した。

3-2. ヒトiPS細胞由来心筋細胞の薬剤適用前値の施設間・ロット間差比較

共通のロットを用いたiCell心筋細胞の拍動数、FPD、FPDcの薬剤適用前値（0.1% DMSO適用時）の絶対値を施設ごとにFig. 1およびTable 1に示した。全施設の拍動数、FPDおよびFPDcの平均値はそれぞれ、59 beats/min、390 msおよび384であった。また各施設の拍動数、FPD、FPDcの中央値はそれぞれ51-64 beats/min、342-462 msおよび350-423であり、最もばらつきが大きかった施設のFPD、拍動数およびFPDcの最小値および最大値は、それぞれ48-74 beats/min（LabE）、343-492 ms（LabB）および346-468（Lab E）であり、拍動数、FPD、FPDcいずれのパラメータも10施設の施設間のばらつきは施設内のばらつきと同程度であると考えられた。また、異なる2ロットのiCell心筋細胞を用いた際の拍動数、FPDお

より FPDc を Table 1 に示した。Lot #2 および Lot #3 の FPD と FPDc の範囲は Lot #1 と同程度であった。Lot #1 の全施設の平均拍動数 (59 beats/min) に比べ、Lot #2 および Lot #3 の拍動数の中央値はそれぞれ 51 および 45 beats/min であり、若干低値であったが、同一施設内の比較では同程度であった。FPD、拍動数および FPDc の薬剤適用前値は施設間や心筋細胞のロット間である程度のばらつきがみられたものの、一定の範囲内に収まり、またその結果は同システムを用いた既報とも同程度であった (Nakamura ら、2014 : Yamamoto ら、2016)。

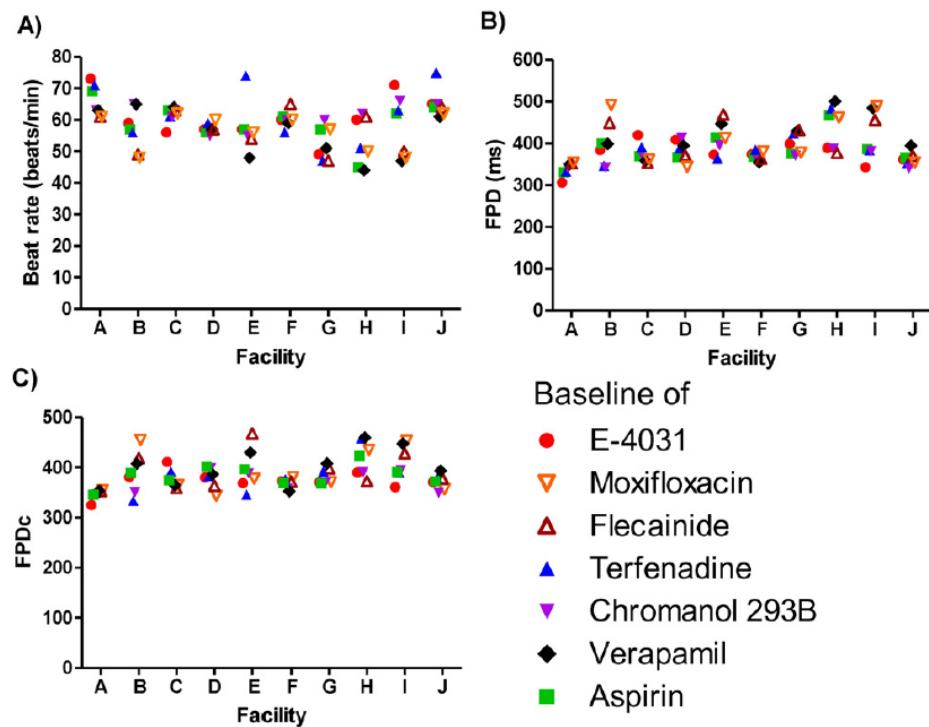


Fig. 1. Comparison of baseline beat rate, FPD, and FPDc values in iCell cardiomyocytes using MED probes at multiple facilities. A) Beat rate, B) FPD, and C) FPDc were recorded using the MED64 MEA system in the presence of 0.1% DMSO with pretreatment of the designated drugs at each facility ($n=3-11$ for each drug). These data are from 10 facilities and are plotted according to the designated drug.

Table 1. Comparison of baseline beat rate, FPD and FPDc values in iCell cardiomyocytes using MED probes at multiple facilities. A) Beat rate, B) FPD, and C) FPDc were recorded using the MED64 MEA system in the presence of 0.1% DMSO with pretreatment of the designated drugs at each facility.

Facility	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Lab J	Mean	Lab D	Lab G
Lot #	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3
Beat rate	63	57	62	57	56	60	51	51	62	64	59	51	45
(beats/min)	[61-73]	[48-65]	[56-64]	[55-60]	[48-74]	[56-65]	[47-60]	[44-62]	[47-71]	[61-75]	[50-54]	[41-47]	
FPD	342	399	364	388	413	368	399	462	386	362	390	446	426
(ms)	[306-354]	[343-492]	[353-420]	[344-413]	[364-469]	[355-385]	[371-432]	[377-501]	[343-489]	[341-395]	[434-456]	[385-443]	
FPDc	350	389	365	383	389	372	371	423	395	373	384	421	388
	[325-355]	[334-455]	[359-411]	[344-402]	[346-468]	[353-381]	[368-408]	[373-460]	[361-454]	[350-394]	[415-435]	[350-400]	

Each value represents the median value in each facility. Values in the brackets represent the minimum and maximum in each facility. iCell cardiomyocytes Lots #1; 1091313, #2; 1033176 and #3; 1093227.

3-3. 薬剤反応性 ($FPDc_{10}$) の施設間・ロット間差比較

同一ロットの iCell 心筋細胞を用いた 7 種の薬剤による FPDc の変化率および波形変化の有無を Fig. 2 に、各施設の FPDc 10%延長濃度 ($FPDc_{10}$) を Table 2 に示した。E-4031、Moxifloxacin、Flecainide、Terfenadine および Chromanol 293B はいずれの施設においても FPDc を延長し、各薬剤の $FPDc_{10}$ の施設間差は 1.8~5.8 倍であった。なお、Terfenadine を評価した 1 施設ではデータポイント数不足により $FPDc_{10}$ を算出できなかったが、FPDc は 0.1 μM で 10.9% 延長し、他施設の $FPDc_{10}$ の平均値 (0.13 μM) と同様の値であり、薬剤の反応に明確な差はみられなかった。また、全ての施設で Verapamil は FPDc を短縮し、Aspirin は FPDc に影響を与えたなかった。

異なる 2 ロットの iCell 心筋細胞を用いて 7 種の薬剤の FPDc に対する影響を評価した結果を Fig. 3 に示した。E-4031、Moxifloxacin、Flecainide、Verapamil および Aspirin の薬剤反応性にロット間で明確な差はみられなかった。Terfenadine の $FPDc_{10}$ は Lot #1 と Lot #2 で差がみられた (Lab D : Lot #1 で 0.27 μM , Lot #2 で 0.04 μM)。しかし、Lab D は Terfenadine の評価時に 0.3 μM の濃度を評価していなかった一方で、他の施設では Terfenadine が 0.3 μM で最も強い反応を示し、1 μM では抑制傾向であったため、Terfenadine の $FPDc_{10}$ のロット間差は Lab D の評価濃度選択に起因する可能性が推察された。なお、0.1 μM における FPDc の変化率は Lot #1 で 8.8%、Lot #2 で 14.2% であり、 $FPDc_{10}$ の乖離に比べその差は小さかつた。したがって、適切な濃度設定により Terfenadine でみられたロット間の $FPDc_{10}$ のばらつきは改善する可能性があると考えられた。Chromanol 293B の $FPDc_{10}$ は Lot #1 に比べて Lot #3 において若干低値であったが、 $FPDc_{10}$ を同施設内で比較した結果、Lot #1 で 6.6 μM 、Lot #3

で $2.8 \mu\text{M}$ とその値に明確な差はみられず、FPDc₁₀ の施設間およびロット間のばらつきは明確ではなかった。波形異常を惹起する最小濃度を施設間で比較した結果、E-4031、Moxifloxacin、Terfenadine における施設間差は少なくとも 3 倍、Flecainide で少なくとも 10 倍であり、別ロットの心筋細胞でも同様の結果であった。しかし、最高濃度設定が各試験施設で異なるため、波形異常を惹起する最小濃度の施設間差やロット間差の評価は今回の検討では不十分であると考えられた。

3-4. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせによる薬剤評価結果と、既存の非臨床アッセイやヒト血漿中濃度との比較

各薬剤の FPDc₁₀ および不整脈様波形を惹起する最小濃度 (MC_{EAD/TA}) について、hERG チャネルの 50% 阻害濃度 (hERG IC₅₀) やモルモット乳頭筋 APD アッセイの 90% 活動電位持続時間の 10% 延長濃度 (gpAPD₉₀ EC₁₀)、イヌあるいはサルテレメトリ試験の QTc 間隔 10% 延長時血漿中濃度 (dQTc EC₁₀ あるいは mQTc EC₁₀) といった既存の非臨床評価系における評価指標と比較を行い、また、ヒト有効血漿中濃度 (ETPC) や QT 間隔延長時あるいは TdP 報告時の血漿/血清中濃度 (hC_{QT} あるいは hC_{TdP}) と比較を行った結果を Table 3 に示した。

E-4031 および Moxifloxacin は hERG チャネル阻害作用を持ち、種々の非臨床評価系での再分極遅延作用および QT 間隔延長作用が確認されている。E-4031 は臨床試験段階で催不整脈リスクにより開発が中止された薬剤であり、Moxifloxacin は臨床投与量において QT 間隔を軽度に延長し、ICH E14 ガイドラインにおける、臨床の QT 間隔評価試験である thorough QT 試験の陽性対照薬として用いられている薬剤である。本試験系において E-4031 および Moxifloxacin は FPDc を濃度依存的に延長し、不整脈様波形を既存の非臨床評価系や臨床データと同程度の濃度で惹起した (Omata ら、2005)。

Flecainide はクラス Ic に属する抗不整脈薬で、hERG チャネルと Na⁺チャネルの阻害作用を有する。Flecainide は FPDc を濃度依存的に延長し、不整脈様波形を惹起したが、その濃度は ETPC より低い値であった。Flecainide はテレメトリ試験や臨床使用において QT 間隔延長を引き起こさないが、ウサギ心室筋ウェッジ標本やランゲンドルフ灌流心を用いた評

価系において不応期の延長や催不整脈作用を生じると報告されている (Sällström ら、2014；Liu ら、2012)。*In vitro*、*ex vivo* あるいは *in vivo* 試験間の結果の不一致の理由は不明であるが、本評価系による抗不整脈薬の催不整脈リスクの評価には慎重な解釈が必要であると考えられた。

Terfenadine は TdP 発生リスクにより市販後撤退した薬剤で、強い hERG チャネル阻害作用を有するものの、その QT 間隔延長および催不整脈リスク予測の結果は評価系の間で一致しない。例えばその心室再分極遅延作用は hERG チャネル阻害試験およびテレメトリ試験で検出されるが、モルモット乳頭筋 APD アッセイでは検出されない (Harris ら、2013；Omata ら、2005)。本研究において Terfenadine により FPDc 延長 (6.6 nM) を hERG IC₅₀ や dQTc EC₁₀ あるいは mQTc EC₁₀ と同等の濃度で検出したが、その濃度はいずれの試験系も ETPC (0.10-0.29 nM) より高い濃度であった。Terfenadine は CYP3A4 により、心毒性リスクの低い活性代謝物である Fexofenadine に代謝されるが、Terfenadine の血漿中濃度は CYP3A4 阻害剤との併用や、肝機能障害のある患者において顕著に上昇することが知られている。過去の報告では Terfenadine と強い CYP3A4 阻害作用を有する Ketoconazole と同時に投与した際に TdP を発症し、その時の血清中 Terfenadine 濃度は 3.6 nM に到達したことから (Monahan ら、1990)、本試験系において Terfenadine は臨床で TdP を発症させた濃度に近い濃度で FPDc を延長させたと考えられ、本評価系は Terfenadine の QT 間隔延長リスクをモルモット乳頭筋 APD アッセイより適切に評価可能であると考えられた。

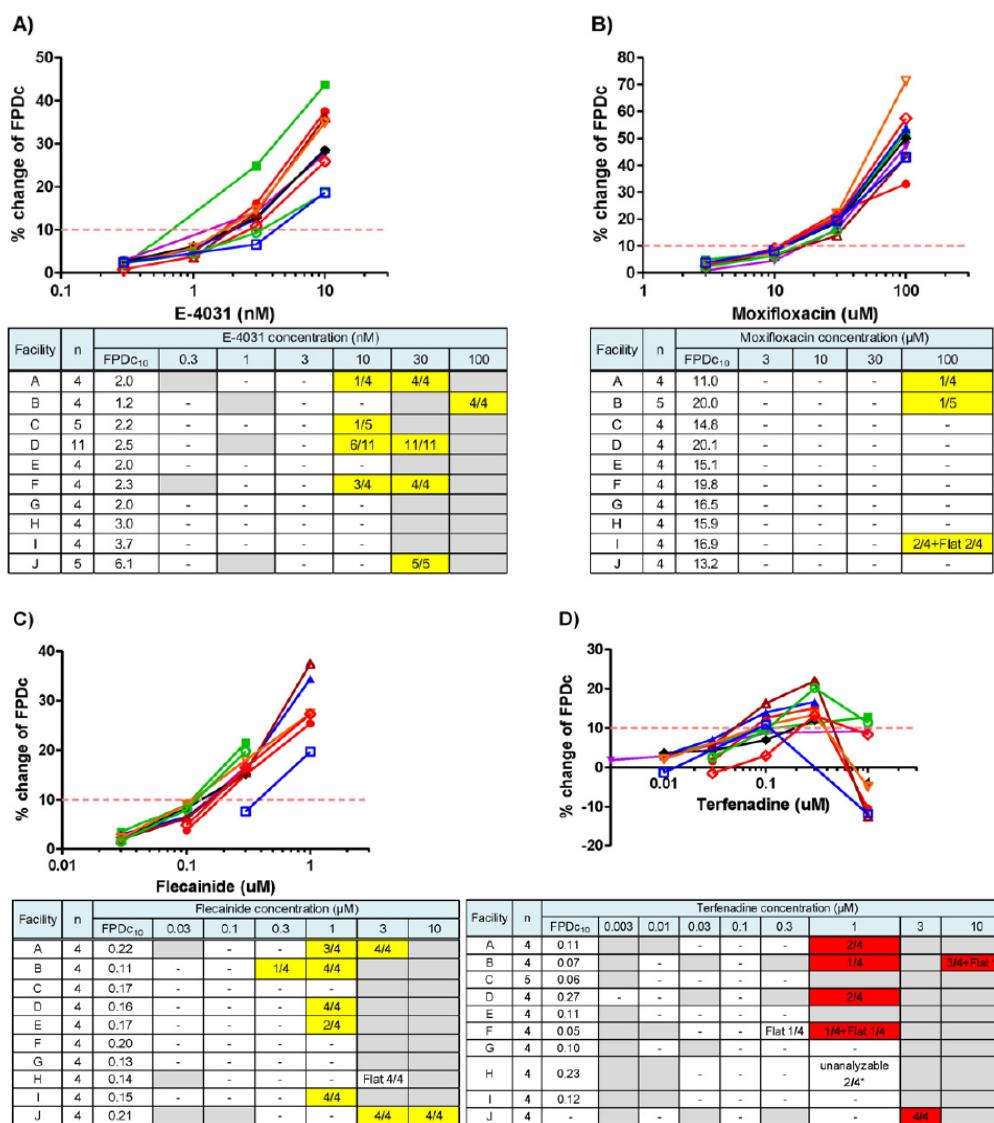
Chromanol 293B は I_{Ks} 阻害剤で、FPDc を延長し、その影響は高濃度で頭打ちとなった。この結果はヒト ES 細胞由来心筋細胞を用いた I_{Ks} 阻害剤の JNJ303 や JNJ282 を評価した既報と一致していた (Clements ら、2014)。FPDc₁₀ は I_{Ks} IC₅₀ と同等であったことから、Chromanol 293B による FPDc 延長は I_{Ks} 阻害を介した作用であると考えられた。

Verapamil は hERG チャネル阻害作用を有するが、Ca²⁺チャネル阻害作用も併せ持ち、Redfern らによるとその TdP 発生リスクは低く分類される薬剤である (Redfern ら、2003；Kramer ら、2013)。Verapamil は濃度依存的に FPDc を短縮し、Ca²⁺チャネル阻害が hERG チャネル阻害による再分極遅延作用を抑制したと考えられた。以上の結果から本評価系によ

り得られた化合物評価結果は臨床成績を適切に反映した結果であると考えられた。

3-5. 小括

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせによる評価系を構築し、FPDc の変化および不整脈様波形の検出を指標として、薬剤誘発性 QT 間隔延長や催不整脈リスクを評価可能な試験系であると考えられた。本試験系は施設間で薬剤適用前値および薬剤反応性のいづれも施設間差や細胞のロット間差が小さく、医薬品の安全性評価手法として一般化可能な評価系であると考えられた。



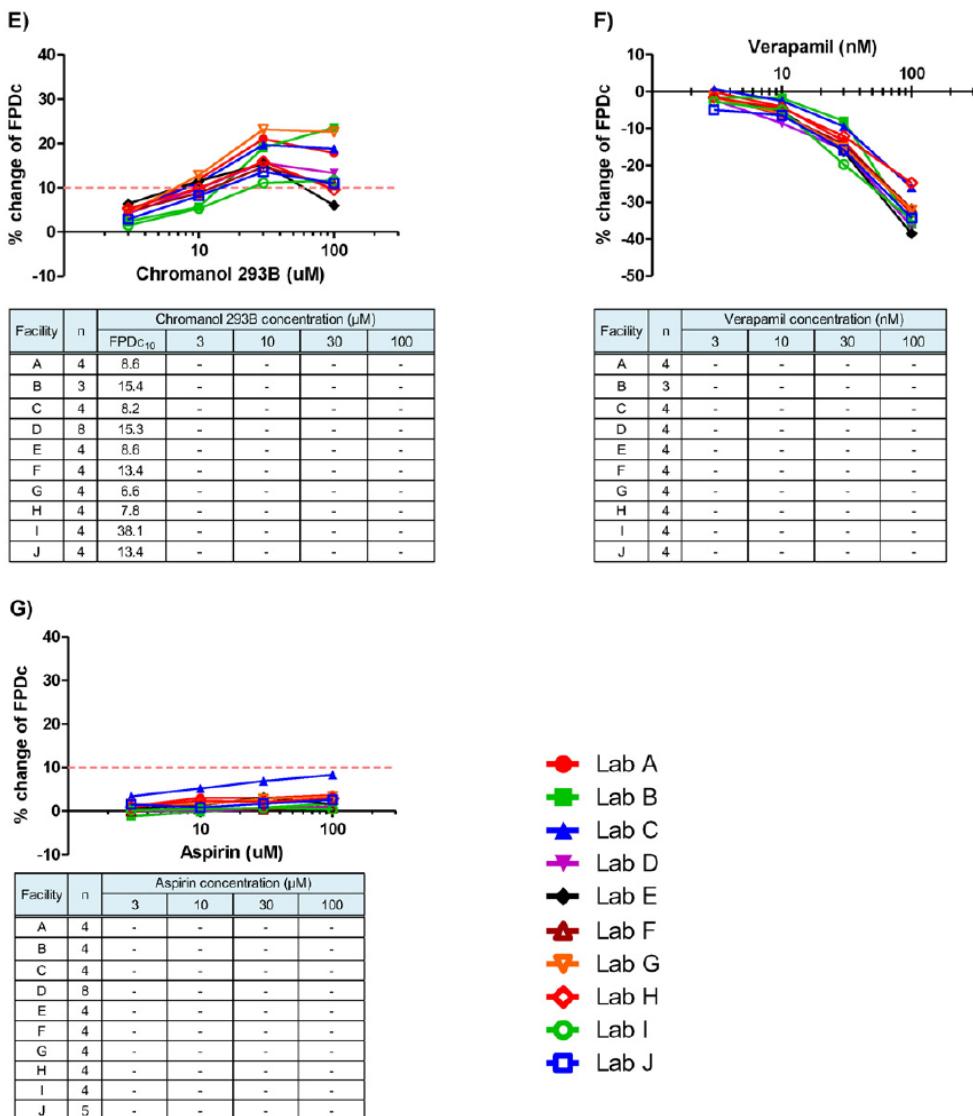


Fig. 2. Comparison of drug-induced effects on FPDc and FP waveforms in each testing facility. Percent change in FPDc induced by A) E-4031, B) moxifloxacin, C) flecainide, D) terfenadine, E) chromanol 293B, F) verapamil, and G) aspirin in 10 facilities. The concentration inducing 10% FPDc prolongation (FPD c_{10}) at each facility and incidence of abnormal FP waveforms for each concentration of the tested compound for each facility are shown. Yellow-filled boxes represent the incidence of EAD or TA-like waveforms in the tested samples; red-filled boxes represent the incidence of beating arrest in the tested samples. When field potentials were not obtained because of flattened unclear second peaks, they are indicated as 'Flat.' '-' indicates that no abnormal waveform was observed. Gray-filled boxes indicate 'not tested'. *: FP were unstable, and second peaks could not be analyzed because of deformed waveforms, and no EAD or TA-like waveform was detected for 1 μM terfenadine in Lab H.

Table 2. FPD c_{10} for FPD-prolonging drugs at each testing facility.

Drug	Lab	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Mean \pm S.D.	D	G
	Lot #	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3
E-4031	(nM)	2.0	1.2	2.2	2.5	2.0	2.3	2.0	3.0	3.7	6.1	2.7 \pm 1.4	2.7	2.6
Moxifloxacin	(μM)	11.0	20.0	14.8	20.1	15.1	19.8	16.5	15.9	16.9	13.2	16.3 \pm 3.0	18.5	17.9
Flecainide	(μM)	0.22	0.11	0.17	0.16	0.17	0.20	0.13	0.14	0.15	0.21	0.17 \pm 0.04	0.16	0.24
Terfenadine	(μM)	0.11	0.07	0.06	0.27	0.11	0.05	0.10	0.23	0.12	N.C.	0.13 \pm 0.08	0.04	0.25
Chromanol 293B	(μM)	8.6	15.4	8.2	15.3	8.6	13.4	6.6	7.8	38.1	13.4	13.5 \pm 9.2	19.1	2.8

Abbreviations: FPDc; field potential duration corrected by Fridericia's formula, FPD c_{10} ; concentration inducing 10% FPDc prolongation, N.C.; not calculated. iCell cardiomyocytes Lots #1; 1091313, #2; 1033176, and #3; 1093227.

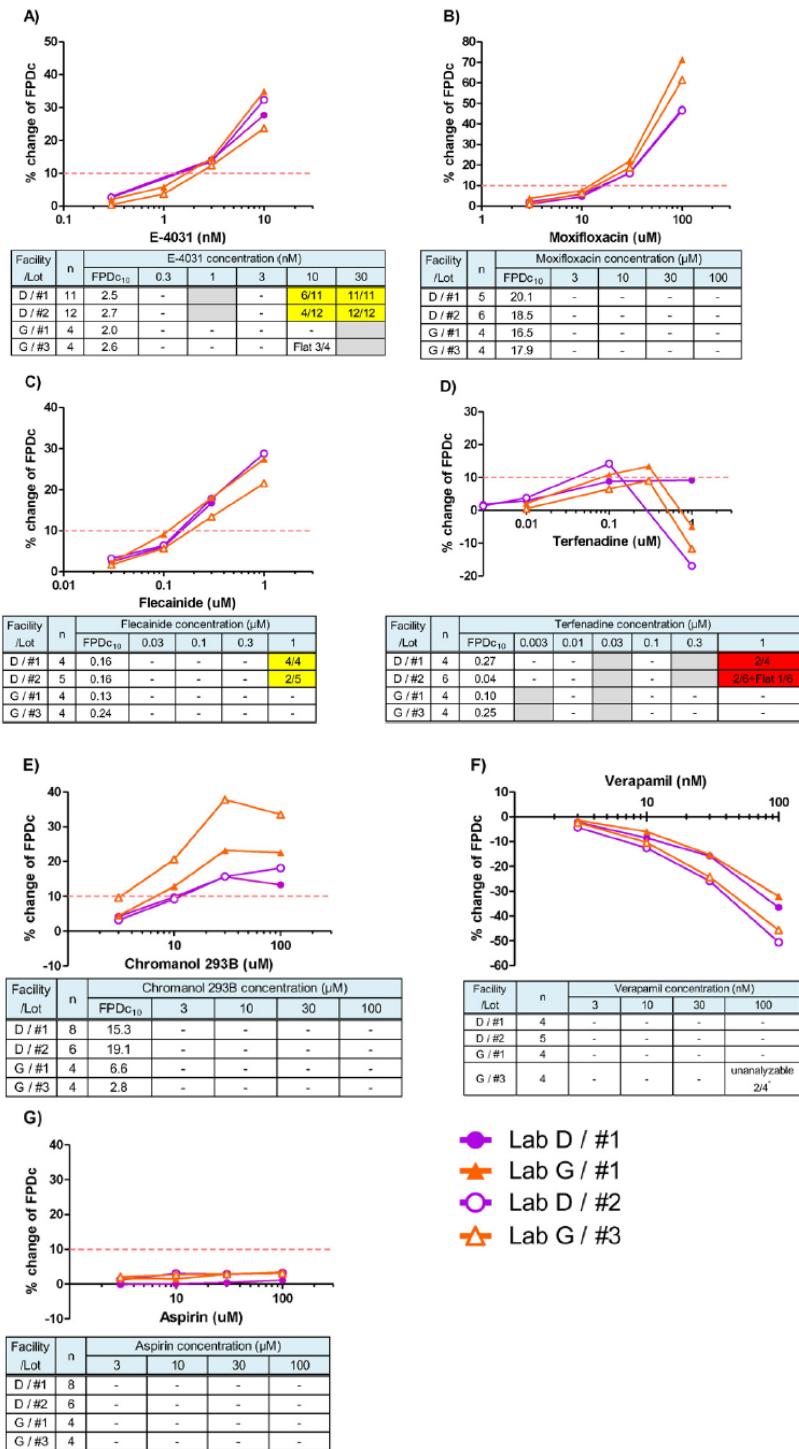


Fig. 3. Reproducibility of drug-induced effects on FPDc and FP waveforms of iCell cardiomyocytes in 2 facilities. Percent change in FPDc induced by A) E-4031, B) moxifloxacin, C) flecainide, D) terfenadine, E) chromanol 293B, F) verapamil, and G) aspirin from 2 independent laboratory experiments. The incidence of abnormal FP waveforms is also shown in the table for each concentration of the tested compound in each experiment. Yellow-filled boxes represent the incidence of EAD or TA-like waveforms in tested samples. Red-filled boxes represent the incidences of beating arrest in the tested samples. When field potentials were not obtained because of flattened, unclear second peaks, they are shown as 'Flat'. '-' indicates that no abnormal waveform was observed. Gray-filled boxes indicate 'not tested'. *: Second peaks were unstable because of excessive increases in beat rate and could not be analyzed for 100 nM verapamil in lot number 3 in Lab G.

Table 3. Comparison of multi-electrode array in combination with human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (MEA with hiPSC-CMs) outcomes with the existing information relating to drugs.

Drug	System	Ion channel			GP papillary APD ₉₀ EC ₁₀	Dog telemetry QTc EC ₁₀	Monkey telemetry QTc EC ₁₀	Human plasma/serum concentration		TdP risk category		MEA with hiPSC-CMs	
		Endpoint	hERG IC ₅₀	Ca _v 1.2 IC ₅₀	Na _v 1.5 IC ₅₀			ETPC	hC _{QT} or hC _{TdP}	Redfern	CredibleMeds	FPDc ₁₀	MC _{EAD/TA}
E-4031	Total (nM)	-	-	-	-	19.2	3.1	3.5	12-27	-	-	2.7	10
	f _u	-	-	-	-	0.31	-	7	-	-	-	0.81	-
	Free (nM)	5-20	-	-	7	6	-	1.1	3.7-8.4	-	-	2.2	-
Moxifloxacin	Total (μM)	-	-	-	-	20.4 (12% prolongation)	-	8.2-15.3	-	-	1	16.3	100
	f _u	42-86	173	1112	-	0.71	-	-	-	-	-	0.79	-
	Free (μM)	-	-	-	-	14.5	-	4.5-11.0	-	-	-	12.9	-
Flecainide	Total (μM)	-	-	-	-	No effect >5.2	-	0.96-1.9	-	3	1	0.17	1
	f _u	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.78	-
	Free (μM)	1.0-3.9	27.1	4.1-6.2	5.6	-	-	0.38-0.75	-	-	-	0.13	-
Terfenadine	Total (nM)	-	-	-	-	120	7.6	3.3-9.7	91-121	2	1	125	>1000
	f _u	-	-	-	-	0.02	-	-	0.03	-	-	0.053	-
	Free (nM)	20-200	200-930	1300-2000	>20,000	2.4	-	0.10-0.29	2.7-3.6	-	-	6.6	-
Chromanol 293B	Total (μM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.5	>100
	f _u	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.88	-
	Free (μM)	224-622	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.9	-
Verapamil	I _{Ks} IC ₅₀	1.8-10.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total (nM)	-	-	-	-	No effect >15 mg/kg	No effect	250-810	-	5	-	Shortening	>100
	Free (nM)	100-800	52-200	6600-32,500	46,000	-	-	25-81	-	-	-	-	-
Aspirin	Total (μM)	-	-	-	-	-	No effect	2.5-122	-	-	-	No effect	>100
	Free (μM)	>10,000	-	-	>10,000	-	-	5.0-62.3	-	-	-	-	-

Abbreviations: hERG; human *ether-à-go-go-related gene*, Ca_v1.2; voltage-gated Ca²⁺-channel, Na_v1.5; voltage-gated Na⁺ channel, GP; guinea pig, APD; action potential duration, ETPC; effective therapeutic plasma concentration, hC_{QT/TdP}; plasma concentration reported to induce QT prolongation or TdP in humans, TdP; torsade de pointes, CredibleMeds; CredibleMedsWorldwide, FPDc; field potential duration corrected by Fridericia's formula, FPDc₁₀; concentration inducing 10% FPDc prolongation, MC_{EAD/TA}; minimum concentration inducing early after depolarization and/or triggered activity-like waveforms, f_u; unbound fraction in human plasma or iCell maintenance medium.

TdP risk categories by Redfern are as follows: 1, repolarization-prolonging anti-arrhythmics; 2, drugs that have been withdrawn or suspended from the market in at least one major regulatory territory due to an unacceptable risk of TdP for the condition being treated; 3, drugs that have a measurable incidence of TdP in humans, or for which numerous case reports exist in the published literature; 4, drugs for which there have been isolated reports of TdP in humans; 5, drugs for which there have been no published reports of TdP in humans.

TdP risk categories by CredibleMeds are as follows. 1, drugs with known TdP risk; 2, drugs with possible TdP risk; 3, drugs with conditional TdP risk; 4, drugs to be avoided by congenital Long QT.

第4章 MEA システムの機器間差比較およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞の構造的特徴付け

4-1. 序論

第3章において、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせによる評価系を構築し、また本評価系が一般化可能であることを示した。本章では、本邦で汎用されている MEA システムである MED64 (1 well タイプ、アルファメッドサイエンティフィック) と、欧米で主に用いられている MEA システムである MEA60/2100 (1 well/6 well タイプ、MultiChannel Systems、Germany) および Maestro (12 well/48 well タイプ、Axion Biosystems、USA) の 3 種の MEA システムそれぞれで得られた共通化合物の評価結果を比較し、機種間差を評価するとともに実験実施上の留意点を明らかにすることとした。

また、第3章の検討では本評価系による QT 間隔延長や催不整脈リスクの臨床予測性が示唆された一方で、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は活動電位の第4相に関わる I_{K1} が少なく、ペースメーカー電流 (I_f) が強いという未成熟な心筋細胞の特徴を有し、それに起因する静止膜電位の浅さや自発拍動能といった電気生理学的な不安定性が指摘されており、化合物評価への影響が懸念されている (Hartman ら、2016)。そこで、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を電子顕微鏡により観察し、その構造的特徴を確認し、本評価系の課題を抽出することとした。

4-2. FPDc₁₀ および不整脈様波形惹起濃度の MEA 機器間差比較

3 種の MEA システム (MED64、MEA60/2100 および Maestro) について、E-4031、Moxifloxacin、Flecainide、Terfenadine および Chromanol 293B に対する各機器の FPDc₁₀ を比較した結果を Fig. 4 に示した。各化合物の FPDc₁₀ の機種間差は 1.4 から 4.9 倍であった。なお、FPDc₁₀ と

別途求めた hERG IC₅₀ の比を化合物ごとに比較した結果、Amiodarone では 0.7 倍、Quinidine では 47.1 倍となり、hERG 阻害以外の作用（他のイオンチャネル調節作用等）によってその比が変化した可能性が推察された。

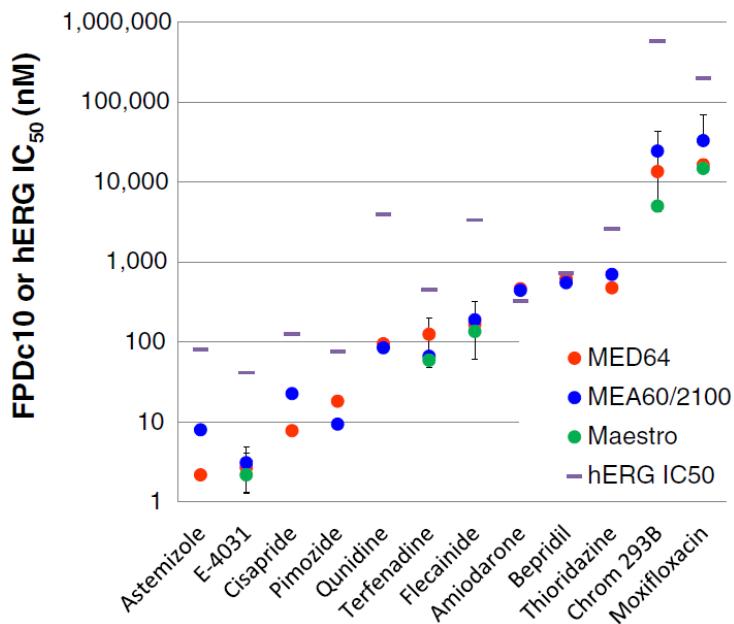


Fig. 4. FPDc₁₀ in MEAs of MED64, MEA60/2100, and Maestro and hERG IC₅₀.

不整脈様波形を惹起する最小濃度を 3 種の機器間で比較した結果を Table 4 に示した。E-4031、Flecainide、Moxifloxacin および Chromanol 293B では明確な機器間差はみられなかったが、Terfenadineにおいて MEA60/2100 のみで不整脈様波形がみられた。その正確な原因は不明であるが、iCell 心筋細胞と Maestro の組み合わせにより Terfenadine の催不整脈作用を検出したという報告もあるため、機器の差のみに起因する可能性は低いと考えられた (Gilchrist ら、2015 ; Qu ら、2015)。また、Terfenadine の催不整脈作用は短期曝露では検出することが難しいことが指摘されており、ヒト iPS 細胞心筋細胞において、Terfenadine は 12 時間以上の長時間曝露によりその催不整脈作用が検出されるという報告がある (Guo ら、2011)。しかし、今回の 3 種の MEA システムの実験プロトコールはいずれも各濃度 10 分程度の短期曝露であり、曝露時間の差による可能性も低いと考えられた。細胞外電位波形取得時の条件であるベッセルフィルターの設定の違いにより、Terfenadine 適用後の細胞外電

位波形に差がみられ、1 Hz ではフィルターの影響により再分極ピークの位置のずれや二峰性の再分極ピークを取りうることが報告されている (Asakura ら、2015)。したがって、以降の実験ではベッセルフィルターの条件を 1 Hz から 0.1 Hz に統一することとした。また、第 3 章において同一機器 (MED64) 内の不整脈発現濃度の施設間差評価時にも述べたように、各施設の最高濃度設定が異なり、不整脈発現濃度に関する施設間差評価が不十分であることも原因の一つと考えられた。各薬剤の不整脈様波形は MED64 では $FPDc_{10}$ の 2.1 から 14.0 倍の濃度で検出され、MEA60/2100 では 0.6 から 10.7 倍の濃度で検出された。したがって、不整脈様波形を確認するための試験濃度は、評価薬剤の沈殿、拍動停止および細胞毒性等がみられない限り、少なくとも $FPDc_{10}$ の 15 倍程度まで設定する必要があると考えられた。

以上の結果から不整脈様波形の検出濃度には機器間差が一部の薬剤でみられ、その正確な原因は不明であるが、様々な種類の化合物の不整脈活性を見過ごさないよう、ベッセルフィルター条件、化合物の特性に応じた曝露時間や最高濃度の設定等の考慮をする必要があると考えられた。

Table 4. MC_{EAD/TA} at each test-site.

Drug	MED64 (10^a)	MEA60/2100 (5)	Maestro (1)
E-4031 (nM)	10 (4 ^b)	3 (2)	10 (1)
	30 (1)	10 (2)	
	100 (1)	30 (1)	
	>10 ^c (4)		
Flecainide (μM)	0.3 (1)	0.3 (2)	1 (1)
	1 (4)	1 (3)	
	3 (1)		
	>1 or >3 (4)		
Terfenadine (nM)	>300 (2)	30 (1)	>300 (1)
	>1000 (6)	100 (1)	
	>3000 (1)	300 (1)	
	>10,000 (1)	>300 (2)	
Moxifloxacin (μM)	100 (3)	30 (2)	>100 (1)
	>100 (7)	100 (2)	
		300 (1)	
Chromanol 293B (μM)	>100 (10)	>30 (1)	>100 (1)
		>100 (4)	

MED64, MEA60/2100, and Maestro: Multi-Electrode Array Systems: AlphaMED Scientific, Multichannel Systems, and Axion BioSystems, a: Numbers of test-sites tested. b: Numbers of test-sites detected EAD/TA. c: No EAD/TA detected even at maximum concentration tested at each test-site.

ベッセルハイパスフィルター条件を 0.1 Hz に変更し、MED64 と MEA60/2100 で 6 化合物 (Astemizole、Cisapride、Pimozide、Quinidine、Thioridazine および Bepridil) を追加評価した結果を Fig. 5 に示した。FPDc₁₀ の機器間差はいずれの化合物も 3 倍以内となり、5 化合物 (Astemizole、Cisapride、Pimozide、Quinidine および Thioridazine) の不整脈様波形惹起濃度も Astemizole (10 倍以内) を除き、3 倍以内の差であった。また、Bepridil は MED64 では 3 μM で不整脈様波形がみられ、MEA60/2100 では 1 μM まで評価し不整脈様波形はみられなかつたが、最高濃度設定の差によると考えられた。また、マルチイオンチャネル作用を有する Amiodarone は両 MEA で不整脈様波形はみられなかつた。これらの結果から、本評価系は MEA の機種に関わらず QT 間隔延長リスクおよび催不整脈リスクを適切に検出できることが示唆された。

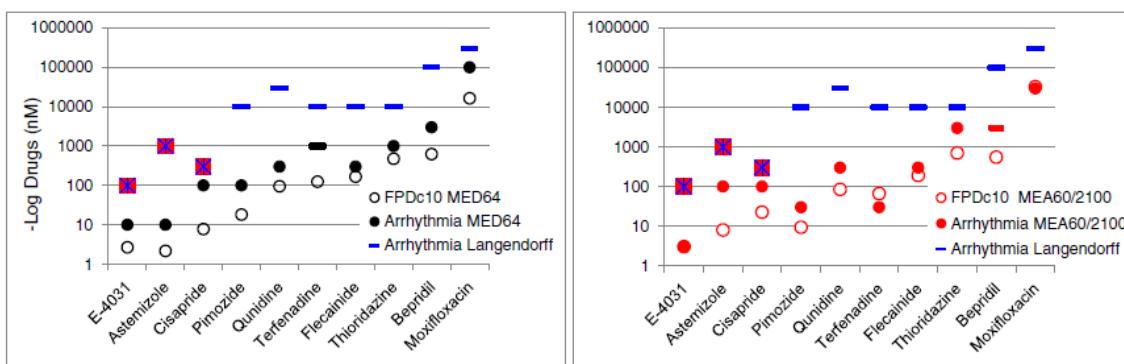


Fig. 5. Relationships between FPDc₁₀ and concentrations at which arrhythmia occurred in MED64 or MEA60/2100 systems, or rabbit Langendorff models. -: No arrhythmia in rabbit Langendorff models, except for E-4031, astemizole, and cisapride. In MEA systems, arrhythmia did not appear in terfenadine (MED64) or bepridil (MEA60/2100) groups.

4-3. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の構造的特徴付け

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞およびウサギの心室筋を電子顕微鏡で観察した結果を Fig. 6 に示した。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の細胞シートは成熟したウサギの心室筋と比較して心筋線維の方向の整列性を欠き、T 管が未発達であり、構造的に未熟であることが明らかとなつた。こうした構造的未熟性は興奮伝播速度の遅延や収縮力の弱さ、あるいは興奮伝播の不均一性によるリエントリー性不整脈の生じやすさにつながる懸念がある。既に報告されている静止膜電位の浅さといった機能的な未熟性と併せて考えると、これらのヒト iPS 細胞由

来心筋細胞やヒトES細胞由来心筋細胞の未成熟なプロファイルは薬物への反応性にバイアスをかけ、薬剤開発のGo/No-go判断に影響を与える懸念があると考えられた。したがって、心毒性スクリーニング評価系として十分な信頼性を担保するため、様々な種類の化合物を評価し、本評価系による臨床予測性を確認する必要があると考えられた。

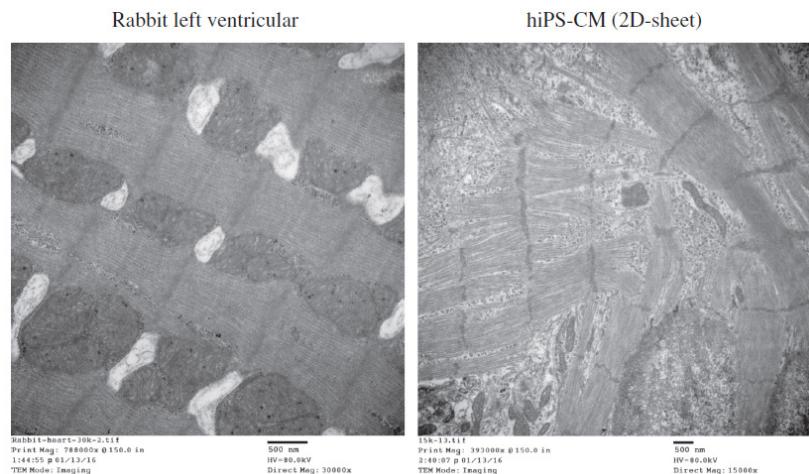


Fig. 6. Histological evaluation of rabbit left ventricular muscle and two-dimensional cultured hiPSC derived-cardiomyocytes using transmission electron microscopy. hiPSC derived-cardiomyocytes show poor T-tubule organization and less cardiac fiber alignment oriented in the same direction as compared with adult Rabbit ventricle.

4-4. 小括

本章において、ヒトiPS細胞由来心筋細胞とMEAシステムの組み合わせによる評価系は、MEAの機種を問わずFPDcの変化によりQT間隔延長リスクを予測する可能性を示した。しかし一方で、不整脈様波形惹起濃度には一部の化合物で機器間差がみられ、ベッセルフィルター条件、最高濃度設定、曝露時間といった実験上の留意点が必要であると考えられた。また、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の構造的未熟性が明らかとなり、評価薬剤への反応性にバイアスを与える懸念が示唆され、本評価系の有用性を示すためにはさらに多くの薬剤を評価する必要があると考えられた。

第 5 章 包括的な QT 間隔延長および催不整脈リスク評価法に向けた 検討

5-1. 序論

第 4 章において、MEA の機器間差を評価し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせによる実験実施上の留意点を示した。また、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の未熟性から、創薬初期段階におけるヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせによる安全性評価試験系としての有用性を示すためにはさらに多くの化合物評価の必要があると考えられた。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は I_{Na} , I_{CaL} , I_f , I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks} に関するイオンチャネルの発現が確認されており (Ma ら、2011)、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた評価系はヒトにおける総合的な心筋細胞の電気生理学的活性を評価することが期待されている。しかし、これらの細胞に発現している心筋イオンチャネルや受容体に対する薬理学的反応は十分に確立されていない。そこで本研究では心筋に発現する様々なイオンチャネルや受容体調節薬の反応を評価し、本評価系が総合的な電気生理学的影響を予測する試験系として適切か確認することとした。

また、モルモット乳頭筋 APD アッセイは hERG 以外のイオンチャネルに対する作用を包括的に評価することが可能な、確立された試験系であるが、この評価系は化合物評価時にある程度の擬陰性結果を生じることも指摘されている (Omata ら、2005)。そこで、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせによる評価系で、モルモット乳頭筋 APD アッセイで擬陰性となる 6 種の薬剤を評価するとともに臨床成績との比較を行い、本評価系の検出感度を確認した。

最後に、hERG チャネル阻害に加えて Na^+ チャネルや Ca^{2+} チャネル等、他のイオンチャネルに対する調節作用を有する 6 種の薬剤を本試験系で評価し、本評価系が QT 間隔延長およ

び催不整脈リスクを包括的に予測する評価系として適切かどうか確認することとした。

5-2. 心筋イオンチャネルや受容体調節薬に対する影響

代表的な心筋イオンチャネルや受容体調節薬によるヒト iPS 細胞由来心筋細胞の拍動数、FPD、FPDc の薬剤適用前値からの変化率および波形異常の有無を Table 5 および Fig. 7 に示した。

Bay K8644 は I_{CaL} 活性化剤で、モルモット摘出心臓を用いたアッセイにおいて APD 延長作用が報告されており (Barandi ら、2010)、本評価系において FPD および FPDc の延長がみられた。Mibepradil は I_{CaT} および I_{CaL} 阻害剤であり、モルモット心室筋やヒト心房筋において APD 短縮作用が報告されており (Bénardeau ら、2000 ; Martin ら、2000)、本評価系において $1 \mu\text{M}$ より FPD および FPDc の短縮がみられた。第 3 章の検討において Ca^{2+} チャネル阻害および hERG チャネル阻害作用を有する Verapamil が FPD および FPDc を短縮させることが確認されており、 Ca^{2+} 電流調節薬に対する反応を適切に検出したと考えられた。

NS1643 は I_{Kr} 活性化剤であり、モルモットランゲンドルフ灌流心やウサギ左心室ウェッジ標本において APD 短縮作用が報告されており (Lu ら、2008 ; Lu ら、2013)、本評価系において FPD の短縮がみられた。なお、FPDc には影響がみられなかつたが、 $30 \mu\text{M}$ で FPD の短縮とともに拍動数の顕著な増加 (80.8%) がみられており、Fridericia の補正による FPD の補正が不十分であった可能性が推察された。 I_{KATP} 活性化剤である Levromakalim は、ウサギランゲンドルフ灌流心で APD を短縮することが報告されており (Lu ら、2008)、本評価系において FPD および FPDc の短縮がみられた。Ouabain は Na^+/K^+ -ATPase 阻害剤で、QT 間隔短縮が報告されており (Guo ら、2011)、本評価系において FPD および FPDc の短縮がみられた。Ouabain は Na^+/K^+ -ATPase 阻害により細胞内 Na^+ 濃度を増加させ、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger を阻害した結果、細胞内 Ca^{2+} の増加に伴う遅延整流性 K^+ 電流の活性化を引き起こし、FPD を短縮したと推察された。第 3 章の検討において、 I_{Kr} 阻害剤である E-4031

や I_{Ks} 阻害剤である Chromanol 293B は FPD および FPDc を延長させることを確認しており、 I_{Kur} 、 I_{Kto} 、 I_{KACh} といった K^+ 電流調節薬に対する影響は今回評価しなかったものの、本評価系は K^+ 電流に対する影響を適切に検出可能であると考えられた。

Isoproterenol は非選択的アドレナリン β 受容体作動薬であり、ヒト ES 細胞由来心筋細胞を用いた Clements らの報告と同様、本評価系において拍動数を増加させた (Clements ら、2014)。ZD7288 は I_f 阻害剤であり (Marshall ら、1993)、本評価系において拍動数を低下させた。BaCl₂ は I_{Kl} 阻害剤であり、拍動数を増加させ、変時作用に関わる薬剤反応を適切に検出した。一方、拍動数は心筋の再分極過程に変化を与える薬剤 (K^+ 電流や Ca²⁺電流の調節薬) によっても変化していた。 K^+ 電流や Ca²⁺電流調節により拍動数への影響がみられた正確な機序は不明であるが、Guo ら、Harris らはヒト iPS 細胞由来心筋細胞において Verapamil や Nifedipine といった Ca²⁺チャネル阻害剤で同様に拍動数の増加がみられることを報告しており、その拍動数増加は、活動電位の短縮により自発的な拍動開始までの時間が短縮したためであると考察している (Guo ら、2011；Harris ら、2013)。

今回の評価により、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞が心筋の再分極や変時作用に影響を与えるイオンチャネルや受容体の調節薬に対し適切に反応することが示された。しかし、拍動数は K^+ 電流や Ca²⁺電流調節作用によっても影響を受けるため、拍動数への影響の解釈には注意が必要であると考えられた。それでもなお、今回得られたヒト iPS 細胞由来心筋細胞に対する様々な薬剤による反応に関する情報は、創薬段階における医薬品候補化合物の影響を予測するために有用な情報となると考えられた。

Table 5. Effects of various ion channel/receptor modulators on the indicated assay parameters.

Tested drugs	Name	Pharmacological activities	Expected effects	MEA with hiPSC-CMs			
				FPD (> 10%)	FPDc (> 10%)	Beat rate (> 10%)	Waveform changes
Bay K8644	I _{CaL} activator	QT prolongation	↑ 3 nM	↑ 3 nM	↓ 1000 nM	> 1000 nM	
Mibepradil	I _{CaT} and I _{CaL} inhibitor	QT shortening	↓ 1 μM	↓ 1 μM	↑ 1 μM	Arrest 3 μM	
NS1643	I _{Kr} activator	QT shortening	↓ 30 μM	> 30 μM	↑ 30 μM	> 30 μM	
Levcromakalim	I _{KATP} activator	QT shortening	↓ 1 μM	↓ 1 μM	↓ 1 μM	Arrest 3 μM	
Ouabain	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase inhibitor	QT shortening	↓ 0.1 μM	↓ 0.3 μM	> 1 μM	Arrest 0.3 μM	
Isoproterenol	β adrenergic agonist	Beat rate increase	↓ 3 nM	↓ 3 nM	↑ 3 nM	> 100 nM	
ZD7288	I _f inhibitor	Beat rate decrease	↑ 0.1 μM	> 1 μM	↓ 0.1 μM	> 1 μM	
BaCl ₂	I _{KI} inhibitor	Beat rate increase	↓ 100 μM	> 100 μM	↑ 30 μM	> 100 μM	

MEA, multi-electrode array; hiPSC-CMs, human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes; FPD, field potential duration; FPDc, FPD corrected by Fridericia's formula; I_{CaL}, L-type Ca²⁺ current; I_{CaT}, T-type Ca²⁺-current; I_f, funny current; I_{KATP}, ATP-sensitive inward rectifier K⁺-current; I_{Kr}, rapid component of the delayed-rectifier K⁺-current; I_{KI}, inward rectifier K⁺-current; ↑, increased; ↓, decreased.

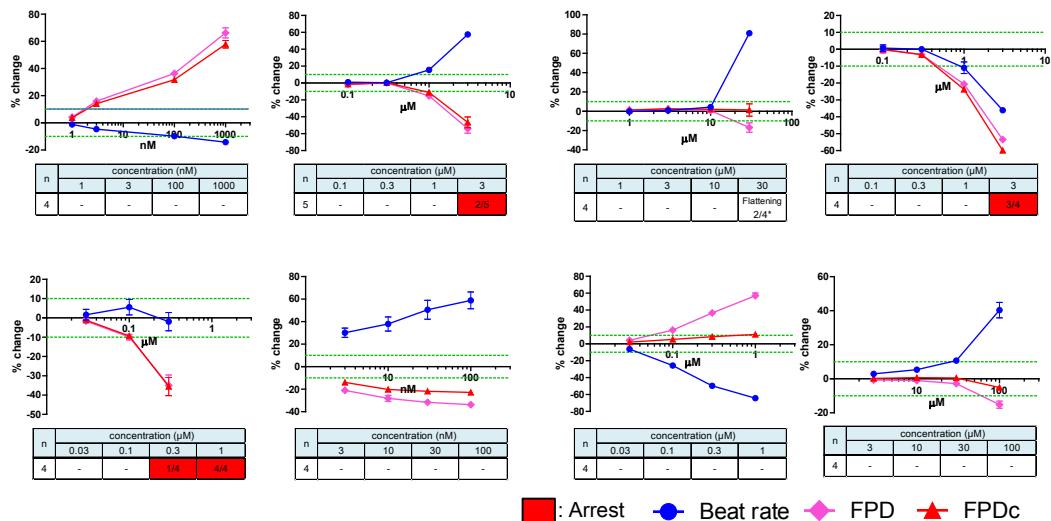


Fig. 7. Effects of ion channel/receptor modulators on field potential duration (FPD), FPD corrected by Fridericia's formula (FPDc), and beat rate. The mean ± standard error of the mean of the percentage changes in beat rate, FPD, and FPDc in the presence of the indicated drugs are shown ($n = 4-5$). The inset Tables indicate the incidence of abnormal FP waveforms at each concentration of the test compound. Red-filled boxes represent the incidence of beating arrest. '-' indicates that no abnormal waveform was observed. *NS1643 at 30000 nM induced 2nd peak flattening in 2 out of 4 samples and these samples were not analyzed.

5-3. 既存の非臨床評価系で擬陰性となる薬剤の評価

ヒトにおいて QT 間隔を延長し、催不整脈作用を有することが知られているものの、モルモット乳頭筋 APD アッセイではそのリスク検出が困難である 6 種の薬剤 (Quinidine、Cisapride、Thioridazine、Astemizole、Bepridil および Pimizide) に対する FPDc の変化率および細胞外電位波形変化を Fig. 8 に示し、各薬物の $FPDc_{10}$ や不整脈様波形検出の最小濃度 ($MC_{EAD/TA}$) をモルモット乳頭筋 APD アッセイ結果 ($APD_{90} EC_{10}$)、ヒトにおける最高血漿中濃度 (hC_{max})、QT 間隔延長時の血漿中濃度 (hC_{QT}) および TdP 発症時の血漿中濃度 (hC_{TdP}) と比較した結果を Table 6 に示した。全ての薬剤で FPDc の延長および不整脈様波形がみられ、いずれの薬剤もその $FPDc_{10}$ はモルモット乳頭筋 APD アッセイの $APD_{90} EC_{10}$ に比べ 100 倍以上低濃度であった。Quinidine の $FPDc_{10}$ は hC_{max} や hC_{QT} に比べ低いものの、QT 間隔はこれらの濃度域で顕著に延長することが報告されており、 $MC_{EAD/TA}$ は hC_{TdP} と同等であった。Cisapride、Astemizole および Pimozide の $FPDc_{10}$ および $MC_{EAD/TA}$ は hC_{max} 、 hC_{QT} や hC_{TdP} と同様の値であった。Bepridil の $FPDc_{10}$ は hC_{max} よりも低かったが、 $MC_{EAD/TA}$ は hC_{TdP} と同等であった。Thioridazine の free $FPDc_{10}$ は hC_{max} や hC_{QT} に比べ高い値であったが、Thioridazine のヒト血漿タンパク結合率は 99.81-99.87% と非常に高く、total 濃度の比較も行ったところ、 $FPDc_{10}$ は hC_{max} や hC_{QT} と同等であった。これらの薬剤において、 $FPDc_{10}$ と hC_{max} の曝露比は 0.020 から 1.5 倍の範囲、 $FPDc_{10}$ と hC_{QT} の曝露比は 0.12 から 14 倍の範囲、 $MC_{EAD/TA}$ と hC_{TdP} の曝露比は 0.38 から 3.6 倍の範囲であり、臨床血漿中濃度との関連が示された。

これらの結果からヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせは QT 間隔延長リスクおよび催不整脈リスクをモルモット乳頭筋 APD アッセイより感度良く検出し、さらに $FPDc_{10}$ や $MC_{EAD/TA}$ の値は hC_{max} 、 hC_{QT} 、 hC_{TdP} と相関する濃度であったことから、本評価系は既存の非臨床評価系に比べて臨床における QT 間隔延長および催不整脈リスクを適切な濃度で検出可能な評価系であると考えられた。

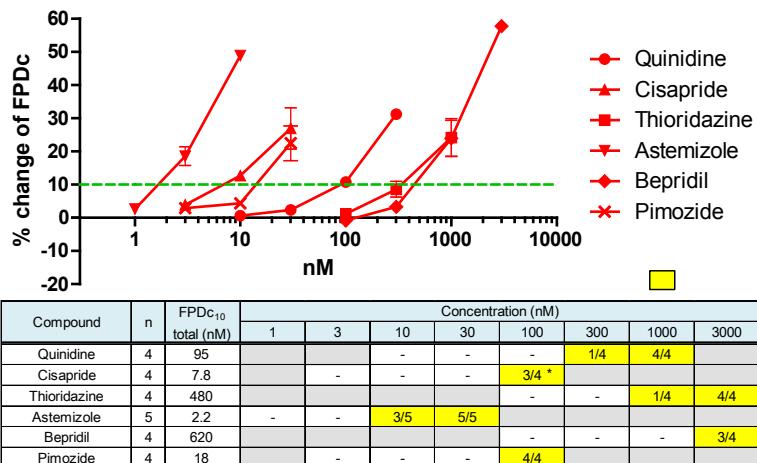


Fig. 8. The effects of drugs associated with a high to intermediate risk for torsade de pointes (TdP) on field potential duration corrected by Fridericia's formula (FPDc) and waveform abnormalities. The mean \pm standard error of the mean of the percentage change in FPDc in the presence of the indicated drugs are shown ($n = 4-5$). The concentration of each drug that induced 10% FPDc prolongation (FPDc₁₀) and the incidence of abnormal FP waveforms at each test concentration are indicated in the Table, where yellow-filled boxes show the incidence of early after depolarization (EAD) or triggered activity (TA)-like waveforms in the assay. '-' indicates that no abnormal waveform was observed. Gray-filled boxes indicate 'not tested'. *Cisapride at 100 nM induced 2nd peak flattening in 1 out of 4 samples and the sample was not analyzed.

Table 6. Comparison of multi-electrode array in combination with human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (MEA with hiPSC-CMs) outcomes with the existing information relating to drugs that are not detected with adequate sensitivity by guinea pig action potential duration (gpAPD) assays, but prolong the QT interval in humans and show high to intermediate torsade de pointes (TdP) risk.

Drugs	Unit	MEA with hiPSC-CMs			gpAPD*			Exposure in human*				Exposure multiple**			
		FPDc ₁₀ free [total]	MC _{EAD/TA} free [total]	APD ₉₀ EC ₁₀	hC _{max} free [total]	hC _{QT} free [total]	ΔhQTc	hC _{TdP} free [total]	FPDc ₁₀ /hC _{max}	FPDc ₁₀ /hC _{QT}	MC _{EAD/T} /hC _{TdP}				
Quinidine	nM	66 [95]	210 [300]	6800	920–3200 [6160–21580]	560–4900 [3700–32674]	78 ms	460–4900 [3082–32674]	0.02	0.12	0.45				
Cisapride	nM	2 [7.8]	25 [100]	200	2.6–4.9 [130–245]	2.2–6.0 [110–300]	25 ms	Not available	0.41	0.9	N.C.				
Thioridazine	nM	5 [480]	11 [1000]	7000	0.49–3.4 [378–1780]	0.36–4.3 [278–2267]	22 ms	2.9–14 [2267–7286]	1.5	14	3.6				
Astemizole	nM	0.12 [2.2]	0.53 [10]	>10000	0.20–0.26 [5.9–7.7]	Not available	170 ms ***	1.1–18 [35–545]	0.45	N.C.	0.46				
Bepridil	nM	1 [620]	4.8 [3000]	>100000	2.3–7.6 [1000–3300]	Not available	Not available	12–13 [5402–5784]	0.13	N.C.	0.38				
Pimozide	nM	0.19 [18]	1 [100]	>10000	0.090–0.54 [9–54]	0.095–0.13 [9.5–13.2]	17–24 ms	Not available	0.34	2	N.C.				

* Data on gpAPD and exposures in human were obtained from the references.

** To calculate the exposure multiple, the highest values of free hC_{max} and the lowest values of free hC_{QT} and hC_{TdP} were applied.

*** Data was obtained from the TdP report.

FPDc₁₀, concentration prolonging field potential duration by 10%; MC_{EAD/TA}, minimum concentration inducing early after depolarization and/or triggered activity-like waveforms; hC_{max}, maximum plasma concentration in humans; hC_{QT/TdP}, plasma concentration reported to induce QT prolongation or TdP in humans; ΔhQTc, the degree of QTc prolongation in human.

5-4. マルチイオンチャネル作用薬の評価

マルチイオンチャネル作用薬である 6 種類の薬剤 (Fluoxetine、Amiodarone、Tolterodine、Vanoxerine、Alfuzosin および Ranolazine) に対する FPDc の変化率および細胞外電位波形変化を Fig. 9 に示し、各薬物の $FPDc_{10}$ や $MC_{EAD/TA}$ をイオンチャネルの IC_{50} 、 hC_{max} および hC_{QT} と比較した結果を Table 7 に示した。

Fluoxetine は I_{Kr} 阻害に加え I_{Ca} 阻害作用を有し、TdP はほとんど報告されていない (Wenzel-Seifert ら、2011)。本評価系において Fluoxetine は 3 μM で FPDc を短縮し、不整脈様波形はみられなかった。Amiodarone はクラス III の抗不整脈薬に属し、 I_{Kr} 、 I_{Ks} 、 I_{Ca} および I_{Na} を阻害する。臨床において QT 間隔を延長させるが、その TdP 発症リスクは 0.7%程度と報告されている (Kodama ら、1996 および 2000)。今回の検討において、Amiodarone は臨床濃度付近で FPDc を 10%以上延長させたものの、その作用は高濃度で頭打ちとなり、不整脈様波形はみられなかった。

Tolterodine は I_{Kr} および I_{CaL} の阻害作用を有し、thorough QT 試験でわずかに QT 間隔を延長させることが報告されている (Kang ら、2004；Malhotra ら、2007)。今回の報告において Tolterodine は hC_{QT} に近い濃度で FPDc を延長し、高濃度において不整脈様波形を惹起した。Vanoxerine は hERG チャネル阻害に加え、 $Ca_v1.2$ および $Na_v1.5$ チャネル阻害作用を有し、Vanoxerine は Phase 2 臨床試験において顕著な QT 間隔延長をしたもの、重篤な心血管系イベントはみられなかったことから、本研究では TdP 発生リスクが低い薬剤と考え評価を行った (Obejero-Paz ら、2015；Søgaard ら、1990)。本評価系において Vanoxerine は FPDc を延長したが、一方で予想と異なり臨床試験用量における血漿中濃度近傍で不整脈様波形を惹起した。近年 Vanoxerine は器質的心疾患を有する患者に対する臨床試験において TdP を含む不整脈の発生が複数報告され開発が中止された (Piccini ら、2016) ため、本評価系により不整脈様波形を検出した結果と一致すると考えられた。

Alfuzosin は I_{Kr} 阻害作用に加え I_{NaL} 活性化作用を有し、thorough QT 試験で QT 間隔を軽度

に延長させることが報告されている (Lacerda ら、2008)。本評価系において Alfuzosin は FPDc を延長し、不整脈様波形を惹起したが、その濃度はいずれも hC_{max} と比較して 70 倍以上の高濃度であり、臨床成績と乖離していた。Ranolazine は I_{Kr} 阻害および I_{NaL} 阻害作用を有し、QT 間隔を非臨床試験および臨床試験で延長させるが、 I_{NaL} 阻害により I_{Na} 依存性の Ca^{2+} オーバーロードを減少させることでその TdP 発生リスクは低い薬剤と考えられている (Chaitman ら 2006 ; Darpo ら 2015)。今回の報告において、Ranolazine は hC_{max} に近い濃度で FPDc を延長し、不整脈様波形を惹起した。Alfuzosin および Ranolazine の評価結果から、心筋再分極および TdP 発生リスクに寄与する I_{NaL} 活性化および阻害作用が今回の実験条件では十分に評価されなかつた可能性が示唆された。その正確な原因は不明だが、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞あるいはヒト ES 細胞由来心筋細胞の未熟性が関連する可能性がある。Hartman らや Keung らはヒト iPS 細胞由来心筋細胞は I_{K1} が弱く、 I_f が強いという特徴を有し、静止膜電位が脱分極側に偏っていると報告している (Hartman ら、2016 ; Keung ら、2014)。また、Jonsson らはヒト ES 細胞由来心筋細胞において、 Na^+ チャネルの発現は確認されているものの、静止膜電位が脱分極側に偏っているため大部分のチャネルが不活性化状態にあり、ほとんど活性化されていないと報告している (Jonsson ら、2012)。これらの報告と一致して、Vaidyanathan らは I_{K1} を導入した iCell 心筋細胞において I_{NaF} および I_{NaL} が増加することを報告している (Vaidyanathan ら、2016)。

近年、Ando らにより iCell 心筋細胞と MED64 MEA システムの組み合わせにより 60 化合物を用いた催不整脈リスク予測のバリデーション試験結果が報告され、その臨床予測性が示された (Ando ら、2017)。本研究の結果は、試験系のもつ特徴を把握したうえで化合物を評価することで、Ando らの報告と同様、医薬品候補化合物の催不整脈リスク予測への応用は可能であると考えられた。

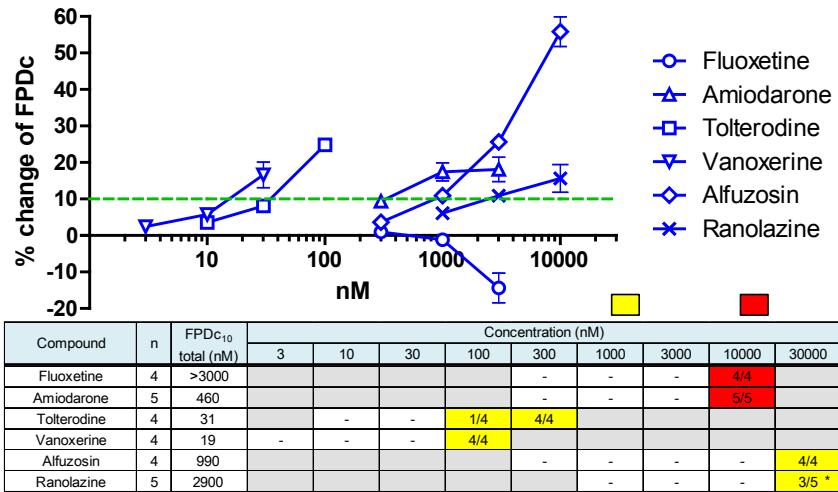


Fig. 9. The effect of drugs with multiple ion channel effects and a wide range of torsade de pointes (TdP) risks on field potential duration corrected by Fridericia's formula (FPDc) and waveform abnormalities. The mean \pm standard error of the mean of the percentage changes in FPDc in the presence of the indicated drugs are shown ($n = 4-5$). The concentration of each drug that induced 10% FPDc prolongation (FPDc₁₀) and the incidence of abnormal FP waveforms at each test concentration are indicated in the Table, where yellow-filled boxes show the incidence of early after depolarization (EAD) or triggered activity (TA)-like waveforms and red-filled boxes represent the incidence of beating arrest. N.C.: not calculated. ‘-’ indicates that no abnormal waveform was observed. Gray-filled boxes indicate ‘not tested’. * Ranolazine at 30000 nM induced 2nd peak flattening in 2 out of 5 samples and these samples were not analyzed.

Table 7. Comparison of multi-electrode array in combination with human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (MEA with hiPSC-CMs) outcomes with the existing information relating to drugs with multiple ion channel effects.

Drugs	Unit	MEA with hiPSC-CMs		Ion channel effects*		Exposure in human*			Exposure multiple**	
		FPDc ₁₀	MC _{EAD/TA}	IC ₅₀		hC _{max}	hC _{QT}	ΔhQTc	FPDc ₁₀	FPDc ₁₀
		free	free			free	free	/hC _{max}	/hC _{QT}	
Fluoxetine	nM	>1400 [>3000]	Arrest 4500 [10000]	hERG 700, Ca _v 1.2 5400, Na _v 1.5 >30000	8.7–29 [145–485]	Not available	Not available	>47	N.C.	
		<0.46 [460]	Arrest <10 [10000]	hERG 860, Ca _v 1.2 1900, Na _v 1.5 15900	<0.1–0.8 [775–3874]	Not available	Not available	<0.58	N.C.	
		1.1 [31]	3.6 [100]	hERG 17, Ca _v 1.2 143, Na _v 1.5 >1000	0.26–2.1 [7–58]	2.2 [58.4]	12 ms	0.53	0.52	
Vancoxerine	nM	0.21 [19]	1.1 [100]	hERG 9.3, Ca _v 1.2 16.2, I _{NaF} 34.6, I _{NaL} 85.2	<3.7–8.3 [366–831]	<3.7–8.3 [366–831]	32–61 ms	>0.026	>0.059	
		740 [990]	22000 [30000]	hERG 13900, Ca _v 1.2 >10000, I _{NaL} activation 300	5.6 [56]	10 [100]	8 ms	130	74	
Ranolazine	nM	1300 [2900]	13000 [30000]	hERG 11400, Ca _v 1.2 296000, Na _v 1.5 5000–21000	700–2100 [2000–6000]	1900 [5380]	13 ms	0.61	0.68	

* Data on ion channel effects and exposures in human were obtained from the references.

** To calculate the exposure multiple, the highest values of free hC_{max} and the lowest values of free hC_{QT} were applied.

FPDc₁₀, concentration prolonging field potential duration by 10%; MC_{EAD/TA}, minimum concentration inducing early after depolarization and/or triggered activity-like waveforms; hERG, human *ether-à-go-go-related gene*; Ca_v1.2, voltage-gated Ca²⁺-channel; Na_v1.5, voltage-gated Na⁺ channel; gpAPD, action potential duration in guinea pig papillary muscle; hC_{max}, maximum plasma concentration in humans; hC_{QT}, plasma concentration reported to induce QT prolongation in humans; ΔhQTc, the degree of QTc prolongation in human; N.C., not calculated.

5-5. 小括

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせにより、様々な化合物の評価を行った結果、拍動数の変化の解釈や、 I_{NaL} 調節作用薬の催不整脈リスクの予測には本評価系の特徴を把握し、適切な解釈をする必要があるものの、心筋に発現する様々なイオンチャネルに対する作用あるいは受容体の調節薬による影響を適切に検出し、薬剤による QT 間隔延長および催不整脈リスクを既存のモルモット乳頭筋 APD アッセイより感度良く、また臨床成績を適切に予測したため、QT 間隔延長あるいは催不整脈リスクを包括的に評価可能な試験系であると考えられた。

第6章 総括

本研究の成果として、以下の知見が得られた。

- ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と MEA の組み合わせによる評価系を構築し、FPDc の変化および不整脈様波形の検出を指標とすることで、薬剤による QT 間隔延長や催不整脈リスクを評価することができた。本評価系は薬剤適用前値および薬剤反応性のいずれも施設間差や細胞のロット間差が小さく、医薬品の安全性評価手法として一般化可能な評価系であると考えられた。
- 他の MEA 機器と薬剤反応性を比較した結果、不整脈様波形出現濃度に一部の薬剤で差がみられたものの、FPDc₁₀ に機器間差はみられなかった。実験の留意点（バンドパスフィルター、最高濃度設定、曝露時間）が明らかとなった。また、iPS 細胞由来心筋細胞は構造的に未成熟であることが明らかとなった。
- K⁺電流や Ca²⁺電流調節薬による拍動数変化、Late Na⁺電流調節作用を有する薬剤の不整脈リスク評価に注意が必要であるものの、本評価系は hERG チャネル以外の心筋イオンチャネルや受容体調節薬の作用を検出し、既存の *in vitro* 評価系で擬陰性となる薬剤やマルチイオンチャネル作用を有する薬剤の QT 間隔延長リスクや催不整脈リスクを適切に評価することができた。

以上の結果に加えて、少量の化合物で評価が可能で、実験動物を必要としない *in vitro* 試験系であることを考慮すると、本評価系は創薬初期段階から、正確かつ包括的な QT 間隔延長および催不整脈リスク評価を予測可能な、新たな心毒性評価系であり、従来行われていた hERG チャネル阻害試験および動物由来組織や器官を用いたマルチイオンチャネル評価に置き換えることで、hERG チャネル阻害試験のみで除外されてしまっていた有望な化合物を適切に評価でき、医薬品候補化合物評価の効率化につながり、ひいては心毒性評価のパ

ラダイムシフトに繋がると考えられた。

参考文献

- Ando, H., Yoshinaga, T., Yamamoto, W., Asakura, K., Uda, T., Taniguchi, T., Ojima, A., Shinkyo, R., Kikuchi, K., Osada, T., Hayashi, S., Kasai, C., Miyamoto, N., Tashibu, H., Yamazaki, D., Sugiyama, A., Kanda, Y., Sawada, K., and Sekino, Y. A new paradigm for drug-induced torsadogenic risk assessment using human iPS cell-derived cardiomyocytes. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **84**: 111-127 (2017)
- Asai, Y., Tada, M., Otsuji, T. G., and Nakatsuji, N. Combination of functional cardiomyocytes derived from human stem cells and a highly-efficient microelectrode array system: an ideal hybrid model assay for drug development. *Current Stem Cell Research & Therapy*, **5**: 227–232 (2010)
- Asakura, K., Hayashi, S., Ojima, A., Taniguchi, T., Miyamoto, N., Nakamori, C., Nagasawa, C., Kitamura, T., Osada, T., Honda, Y., Kasai, C., Ando, H., Kanda, Y., Sekino, Y. and Sawada, K. Improvement of acquisition and analysis methods in multi-electrode array experiments with iPS cell-derived cardiomyocytes. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **75**: 17–26 (2015)
- Bárándi, L., Virág, L., Jost, N., Horváth, Z., Koncz, I., Papp, R., Harmati, G., Horváth, B., Szentandrásy, N., Bányász, T., Magyar, J., Zaza, A., Varró, A., and Nánási, P. P. Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations. *Basic Research in Cardiology*, **105**: 315–323 (2010)
- Bénarreau, A., Weissenburger, J., Hondeghem, L., and Ertel, E. A. Effects of the T-type Ca^{2+} channel blocker mibepride on repolarization of guinea pig, rabbit, dog, monkey, and human cardiac tissue. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **292**: 561–575 (2000)
- Chaitman, B. R. Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. *Circulation*, **113**: 2462–2472 (2006)
- CIOMS. Pharmacogenetics: Towards Improving Treatment with Medicines, Geneva (2005)
- Clements, M., and Thomas, N. High-throughput multi-parameter profiling of electrophysiological drug effects in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes using multi-electrode arrays. *Toxicological Sciences*, **140**: 445–461 (2014)
- Darpo, B., Benson, C., Dota, C., Ferber, G., Garnett, C., Green, C. L., Jarugula, V., Johannessen, L., Keirns, J., Krudys, K., Liu, J., Ortemann-Renon, C., Riley, S., Sarapa, N., Smith, B., Stoltz, R. R., Zhou, M., and Stockbridge, N. Results from the IQ-CSRC prospective study support replacement of the thorough QT study by QT assessment in the early clinical phase. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **97**: 326–335 (2015)
- Gilchrist, K.H., Lewis, G.F., Gay, E.A., Sellgren, K.L., and Grego, S. High-throughput cardiac safety evaluation and multi-parameter arrhythmia profiling of cardiomyocytes using microelectrode

- arrays. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **288**: 249–257 (2015)
- Guo, L., Abrams, R.M., Babiarz, J.E., Cohen, J.D., Kameoka, S., Sanders, M.J., Chiao, E., and Kolaja, K. L. Estimating the Risk of Drug-Induced Proarrhythmia Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Toxicological Sciences*, **123**: 281–289 (2011)
- Harris, K., Aylott, M., Cui, Y., Louttit, J.B., McMahon, N.C., and Sridhar, A. Comparison of electrophysiological data from human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to functional preclinical safety assays. *Toxicological Sciences*, **134**: 412–426 (2013)
- Hartman, M. E., Dai, D. F., and Laflamme, M. A. Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **96**: 3–17 (2016)
- ICH. S7B: The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. (URL http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7B/Step4/S7B_Guideline.pdf). (2005a)
- ICH. E14: The clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-antiarrhythmic drugs. (URL http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E14/E14_Guideline.pdf). (2005b)
- Jonsson, M. K., Vos, M. A., Mirams, G.R., Duker, G., Sartipy, P., de Boer, T. P., and van Veen, T. A. Application of human stem cell-derived cardiomyocytes in safety pharmacology requires caution beyond hERG. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **52**: 998–1008 (2012)
- Kang, J., Chen, X. L., Wang, H., Ji, J., Reynolds, W., Lim, S., Hendrix, J., and Rampe, D. Cardiac ion channel effects of tolterodine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **308**: 935–940 (2004)
- Keung, W., Boheler, K. R., and Li, R. A. Developmental cues for the maturation of metabolic, electrophysiological and calcium handling properties of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Research and Therapy*, **5**: 17 (2014)
- Kodama, I., Kamiya, K., Honjo, H., and Toyama, J. Acute and chronic effects of amiodarone on mammalian ventricular cells. *Japanese Heart Journal*, **37**: 719–730 (1996)
- Kodama, I., Kamiya, K., and Toyama, J. Cellular electropharmacology of antiarrhythmic drugs with multiple molecular targets. *Japanese Journal of Electrophysiology*, **20**: 202–208 (2000)
- Kramer, J., Obejero-Paz, C.A., Myatt, G., Kuryshev, Y.A., Bruening-Wright, A., Verducci, J.S., and Brown, A.M. MICE models: Superior to the HERG model in predicting Torsade de Pointes. *Scientific Reports*, **3**: 2100 (2013)
- Lacerda, A. E., Kuryshev, Y. A., Chen, Y., Renganathan, M., Eng, H., Danthi, S. J., Kramer, J. W., Yang, T., and Brown, A. M. Alfuzosin delays cardiac repolarization by a novel mechanism. *The*

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **324:** 427–433 (2008)

- Liu, T., Traebert, M., Ju, H., Suter, W., Guo, D., Hoffmann, P., Kowey, P.R., and Yan, G.X. Differentiating electrophysiological effects and cardiac safety of drugs based on the electrocardiogram: A blinded validation. *Heart Rhythm*, **9:** 1706–1715 (2012)
- Lu, H. R., Vlaminckx, E., Hermans, A. N., Rohrbacher, J., Van Ammel, K., Towart, R., Pugsley, M., and Gallacher, D. J. Predicting drug-induced changes in QT interval and arrhythmias: QT-shortening drugs point to gaps in the ICHS7B Guidelines. *British Journal of Pharmacology*, **154:** 1427–1438 (2008)
- Lu, H. R., Yan, G. X., and Gallacher, D. J. A new biomarker—Index of cardiac electrophysiological balance (iCEB)-plays an important role in drug-induced cardiac arrhythmias: beyond QT-prolongation and Torsades de Pointes (TdPs). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **68:** 250–259 (2013)
- Ma, J., Guo, L., Fiene, S. J., Anson, B. D., Thomson, J.A., Kamp, T. J., Kolaja, K. L., Swanson, B. J., and January, C. T. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. **301:** H2006–2017 (2011)
- Malhotra, B. K., Glue, P., Sweeney, K., Anziano, R., Mancuso, J., and Wicker, P. Thorough QT study with recommended and supratherapeutic doses of tolterodine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **81:** 377–385 (2007)
- Marshall, P. W., Rouse, W., Briggs, I., Hargreaves, R. B., Mills, S. D., and McLoughlin, B. J. ICI D7288, a novel sinoatrial node modulator. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **21:** 902–906 (1993)
- Martin, R. L., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E., and Hanck, D. A. Mibepradil block of cloned T-type calcium channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **295:** 302–308 (2000)
- Monahan, B.P., Ferguson, C.L., Killeavy, E.S., Lloyd, B.K., Troy, J., and Cantilena, L.R., Jr. Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *The Journal of the American Medical Association*, **264:** 2788–2790 (1990)
- Morissette, P., Nishida, M., Trepakova, E., Imredy, J., Lagrutta, A., Chaves, A., Hoagland, K., Hoe, C.M., Zrada, M.M., Travis, J.J., Zingaro, G.J., Gerenser, P., Friedrichs, G., and Salata, J.J. The anesthetized guinea pig: an effective early cardiovascular derisking and lead optimization model. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **68:** 137–149 (2013)
- Nakamura, Y., Matsuo, J., Miyamoto, N., Ojima, A., Ando, K., Kanda, Y., Sawada, K., Sugiyama, A., and Sekino, Y. Assessment of testing methods for drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS cell-derived cardiomyocyte sheet: Multi-site validation study. *Journal of Pharmacological Sciences*, **124:** 494–501 (2014)

- Obejero-Paz, C.A., Bruening-Wright, A., Kramer, J., Hawryluk, P., Tatalovic, M., Dittrich, H. C., and Brown, A. M. Quantitative profiling of the effects of vanoxerine on human cardiac ion channels and its application to cardiac risk. *Scientific Reports*, **5**: 17623 (2015)
- Omata, T., Kasai, C., Hashimoto, M., Hombo, T., and 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*, **99**: 531–541 (2005)
- Piccini, J. P., Pritchett, E. L., Davison, B. A., Cotter, G., Wiener, L. E., Koch, G., Feld, G., Waldo, A., van Gelder, I. C., Camm, A. J., Kowey, P. R., Iwashita, J., and Dittrich, H. C. Randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the safety and efficacy of a single oral dose of vanoxerine for the conversion of subjects with recent onset atrial fibrillation or flutter to normal sinus rhythm: RESTORE SR. *Heart Rhythm*, **13**: 1777–1783 (2016)
- Qu, Y., and Vargas, H. M. Proarrhythmia Risk Assessment in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using the Maestro MEA Platform. *Toxicological Sciences*, **147**: 286–295 (2015)
- Redfern, W.S., Carlsson, L., Davis, A.S., Lynch, W.G., MacKenzie, I., Palethorpe, S., Siegl, P.K., Strang, I., Sullivan, A.T., Wallis, R., Camm, A.J., and Hammond, T.G. 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*, **58**: 32–45 (2003)
- Sager, P.T., Gintant, G., Turner, J.R., Pettit, S., and Stockbridge, N. Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: A meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium. *American Heart Journal*, **167**: 292–300 (2014)
- Sällström, J., Al-Saffar, A., and Pehrson, R. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of QRS-prolongation by flecainide: heart rate-dependent effects during sinus rhythm in conscious telemetered dogs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **69**: 24–29 (2014)
- Søgaard, U., Michalow, J., Butler, B., Lund Laursen, A., Ingersen, S. H., Skrumsager, B. K., and Rafaelsen, O. J. A tolerance study of single and multiple dosing of the selective dopamine uptake inhibitor GBR 12909 in healthy subjects. *International Clinical Psychopharmacology*, **5**: 237–251 (1990)
- Stett, A., Egert, U., Guenther, E., Hofmann, F., Meyer, T., Nisch, W., and Haemmerle, H. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **377**: 486–495 (2003)
- Takasuna, K., Chiba, K., and Manabe, S. Pre-clinical QT risk assessment in pharmaceutical companies — Issues of current QT risk assessment. *Biomolecules & Therapeutics*, **17**: 1–11 (2009)
- Vaidyanathan, R., Markandeya, Y. S., Kamp, T. J., Makielinski, J. C., January, C. T., and Eckhardt, L.

- L. I_{K1} -enhanced human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: an improved cardiomyocyte model to investigate inherited arrhythmia syndromes. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, **310**: H1611–1621 (2016)
- Wenzel-Seifert, K., Wittmann, M., and Haen, E. QTc prolongation by psychotropic drugs and the risk of Torsade de Pointes. *Deutsches Arzteblat International*, **108**: 687–693 (2011)
- Yamamoto, W., Asakura, K., Ando, H., Taniguchi, T., Ojima, A., Uda, T., Osada, T., Hayashi, S., Kasai, C., Miyamoto, N., Tashibu, H., Yoshinaga, T., Yamazaki, D., Sugiyama, A., Kanda, Y., Sawada, K., and Sekino, Y. Electrophysiological Characteristics of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes for the Assessment of Drug-Induced Proarrhythmic Potential. *PLoS One*, **11(12)**: e0167348 (2016)
- Yamazaki, R., Yamada, M., Kobayashi, K., Kitani, S., Shimada, C., Shimosato, T., Mori, T., Suganami, H., and Yamamoto, K. QT PRODACT: inter- and intra-facility variability of the action potential assay using isolated guinea-pig papillary muscles. *Journal of Pharmacological Science*, **99(5)**: 439-47 (2005)

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Kitaguchi, T., Moriyama, Y., Taniguchi, T., Ojima, A., Ando, H., Uda, T., Otabe, K., Oguchi, M., Shimizu, S., Saito, H., Morita, M., Toratani, A., Asayama, M., Yamamoto, W., Matsumoto, E., Saji, D., Ohnaka, H., Tanaka, K., Washio, I., and Miyamoto, N. CSAHi study: Evaluation of multi-electrode array in combination with human iPS cell-derived cardiomyocytes to predict drug-induced QT prolongation and arrhythmia-effects of 7 reference compounds at 10 facilities. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 78: 93-102 (2016)
2. Takasuna, K., Asakura, K., Araki, S., Ando, H., Kazusa, K., Kitaguchi, T., Kunimatsu, T., Suzuki, S., and Miyamoto, N. Comprehensive in vitro cardiac safety assessment using human stem cell technology: Overview of CSAHi HEART initiative. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 83: 42-54 (2017)
3. Kitaguchi, T., Moriyama, Y., Taniguchi, T., Maeda, S., Ando, H., Uda, T., Otabe, K., Oguchi, M., Shimizu, S., Saito, H., Toratani, A., Asayama, M., Yamamoto, W., Matsumoto, E., Saji, D., Ohnaka, H., and Miyamoto, N. CSAHi study: Detection of drug-induced ion channel/receptor responses, QT prolongation, and arrhythmia using multi-electrode arrays in combination with human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 85: 73-81 (2017)

謝辞

本研究の審査をしていただき、適切かつ有益な御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 小椋康光教授、伊藤晃成教授、高野博之教授、樋坂章博教授および山口直人教授に深く感謝申し上げます。

本研究の母体となりましたヒト iPS 細胞応用安全性評価コンソーシアムリーダー 宮本憲優博士、心筋チームリーダー 高砂淨博士および MED64 サブチームの皆様、また本評価系検討にあたり iCell 心筋細胞および MED64 システムの技術的サポートを賜りました iPS ポータル株式会社ならびにアルファメッドサイエンティフィック株式会社の皆様に深く感謝申し上げます。

持田製薬株式会社において本研究を遂行するにあたり、終始御鞭撻下さり、また、深い御理解を賜りました、創薬研究所 薬物動態安全性研究室室長 松本茂樹博士、安全性マネジャー 宮内慎博士に謹んで御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、御支援を賜りました創薬研究所 森山友太様をはじめ、安全性所属員の皆様に深く感謝申し上げます。

審査委員

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 博士（薬学） 小椋康光

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 博士（薬学） 伊藤晃成

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 博士（薬学） 樋坂章博

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 山口直人

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 医学博士 高野博之