

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

中村裕二より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2678 号

学位申請者 : 中 村 裕 二

学位審査論文 : Assessment of testing methods for drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS cell-derived cardiomyocyte sheet: multi-site validation study

(iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた薬物性再分極遅延評価法の分析: 多施設間バリデーション)

著 者 : Yuji Nakamura, Junko Matsuo, Norimasa Miyamoto, Atsuko Ojima, Kentaro Ando, Yasunari Kanda, Kohei Sawada, Atsushi Sugiyama, Yuko Sekino

公 表 誌 : Journal of Pharmacological Sciences 124(4):494-501, 2014

論文内容の要旨 :

[序論] 新薬の開発における薬物の催不整脈性は大きな関心事である。日米欧の国際会議で ICH E14 および S7B ガイドラインが採択され、新薬が致死性不整脈を起こすリスクは格段に低下したが、催不整脈リスクが証明されないにもかかわらずガイドラインで陽性と判定される化合物もあり問題となっている。2013 年の国際会議では幹細胞を利用した評価系にも注目が集まったが、ヒトにおける催不整脈性を正確に予測するには多くの課題が残っている。我々はヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来心筋細胞シートモデルを用いたより簡便で信頼性の高いプロトコルを開発した。今回、開発した標準プロトコルの有用性と再現性の確認を目的として、同一ロットのヒト iPS 細胞由来心筋細胞で選択的 IKr 遮断薬である E-4031 の作用を産官学の 3 施設 (E, N, T) で評価した。

[方法] 0.1%ゼラチンコートした 6-well プレートに $1.3\text{--}2.6 \times 10^6$ cell/well で細胞を播種し 3.7 ± 1.4 日培養した。次いで細胞を回収し、多電極プローブ上に $30,000$ cell/ $2 \mu\text{L}$ で再播種後 5.2 ± 1.6 日培養して、得られた同期して自発拍動する心筋細胞シートを実験に用いた。測定前に培地交換した後 30 分以上安定化させ、95%O₂/5%CO₂ 雰囲気下 36-37°C で MED64 システムを用いて測定を行った。薬物投与前の記録を取得後、E-4031 1, 3, 10, 30, 100 nM

を累積的に投与し細胞外電位波形を記録した。各濃度の E-4031 投与後 10 分以上測定を行い、最後の 30 拍動を解析の対象とした。細胞外電位波形における拍動と拍動の間隔を inter-spike interval、最初の鋭い振れからピークのドームの頂点までの時間を Field potential duration (FPD)、細胞外電位波形のプラトー相に発生する振れを早期後脱分極、早期脱分極から発生した鋭い振れを激発活動と定義した。Inter-spike interval および Fridericia の式で補正した FPD (FPDcF) それぞれの 30 拍動の平均を測定値とし、E-4031 が上記指標に与える変化および早期後脱分極/激発活動の発生を解析した。

[結果] inter-spike interval: 実測値で比較したところ、施設 T と他の 2 施設との間に有意差を認めたが、E-4031 の投与による有意な変化は認めなかった。投与前値を基準にした % 変化で比較したところ、どの施設間にも有意な施設間差を認めなかったが、施設 N において E-4031 による inter-spike interval の有意な延長作用を認めた。

Field potential duration (FPD) : 実測値で比較したところ施設 N と他の 2 施設との間に有意差を認め、施設 E, T において E-4031 による有意な延長作用を認めた。投与前値を基準にした % 変化で比較したところ、どの施設間にも施設間差を認めず、施設 E, T において E-4031 による FPDcF の有意な延長作用を認めた。施設 N は FPDcF の延長傾向を認めたが統計的解析を行わなかった。早期後脱分極/激発活動: 施設 N では 10 nM 以上、施設 E, T では 30 nM 以上で早期後脱分極/激発活動の発生を認めた。カテゴリー解析: FPDcF が 500 ms 以上を示したのは、施設 N で 3 nM 以上、施設 E で 10 nM 以上であった。△FPDcF が 60 ms 以上を示したのは、施設 E, N で 3 nM 以上、施設 T で 10 nM 以上であった。

[考察] Inter-spike interval は 3 nM 以上で濃度依存的な延長傾向を示したが、より高濃度では早期後脱分極/激発活動が発生したために統計的解析は行わなかった。この濃度は心房性の頻脈性不整脈患者において心拍数変化を起こした濃度とよく一致し、ウサギ洞房結節細胞等の動物モデルで徐拍を生じた濃度より低濃度であった。早期後脱分極/激発活動を 10-30 nM 以上で認めたが、この濃度はヒト ES 細胞由来の心筋組織モデルにおける濃度ほぼ一致し、ウサギ Langendoff 灌流心等の動物モデルより低濃度であった。FPDcF の延長を 3-10 nM 以上で認めたが、この濃度は臨床において QT/QTc 延長を発生させた濃度にほぼ一致し、他の動物モデルや iPS 細胞を用いたモデルよりも低濃度であった。以上より、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた我々のプロトコールは E-4031 の陰性変時作用、催不整脈作用、再分極延長作用をヒトに近い感度で検出できると考えられた。Inter-spike interval および FPDcF の結果で観察された施設間差は投与前値を基準にした % 変化で比較することにより最小化することができた。我々が開発したヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたプロトコールは薬物誘発性再分極遅延および催不整脈性を予測する一助となるであろう。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2678 号	氏 名	中 村 裕 二
学位審査担当者	主 査	赤 坂 喜 清
	副 査	赤 羽 悟 美
	副 査	池 田 隆 徳
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	東 丸 貴 信
<p>学位審査論文の審査結果の要旨：</p> <p>新薬開発における薬物の催不整脈性は重要な問題であり、ヒトにおける催不整脈性を正確に予知する評価系の確立が早急な課題となっている。中村らは、現在の新薬開発における心筋の再分極延長作用評価の問題点を解決するものとしてヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた新しい評価プロトコールを作成し、その信頼性と再現性を検証するために産官学の 3 施設において選択的 IKr 遮断薬 E-4031 の作用を比較した。拍動数、再分極時間および早期後脱分極の発生に対する作用は施設間差を認めず、申請者らが作成したプロトコールの再現性を証明した。本研究の結果をすでに報告されている評価系の結果と比較し、申請者らが作成したプロトコールによる結果がヒトにおける結果と近いことから、プロトコールの信頼性を証明した。以上より、申請者らが作成した新規プロトコールが、今後のヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた心筋再分極延長作用評価のための標準作業手順となりうると結論付けた。</p> <p>平成 26 年 12 月 22 日（月）14：00～15：00 医学部 3 号館第 2 セミナー室において、赤羽教授、池田教授、盛田教授、赤坂の出席のもと審査が行われた。東丸教授は公務欠席のため書面審査を行った。まず FPDcF10%延長濃度が施設間 (T と E) で 3 倍異なる機序について質問があり、中村氏は iPS 細胞由来心筋細胞の懸濁液の滴下面積が微妙に異なり多電極上の細胞密度の違いが推察される原因の一つであると述べた。次にヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートを今回の評価対象として選定したデメリットが質問された。中村氏は市販の試験評価可能なヒト iPS 細胞由来心筋細胞が全世界で極少数に限定されている現状を述べ、本試験を広く普及させる際の供給面での問題点を返答した。また QT 延長効果で代表的な反応性を示す E-4031 を今回使用したが、E-4031 以外の薬剤の検討について質問があった。中村氏はこの薬剤以外の解析も着手していると返答し、その具体的な薬剤を数種言及した。さらに低濃度で FPDcF の延長検出可能な高感度な心筋細胞シートは偽陽性を誘導する可能性が指摘された。これに対して FPDcF 以外に新たな指標として EAD 発現性の詳細な検討が必要であり、今後 EAD も検索することで臨床的に重要な QT 延長による不整脈誘導を予知する評価系確立への展望を述べた。最後に inter-spike interval や FPDcF の実測値の施設間変異や両因子に対する重要なファクターについて質問がなされた。中村氏は前者の重要な要因として多電極上の心筋細胞密度を挙げ、また後者のファクターについては培養温度条件が極めてクリティカルであることを返答した。</p> <p>中村氏は全ての質疑に対して的確に返答し、上記のように研究の限界や今後の課題についても言及した。本研究は、今後のヒト幹細胞を利用した薬物の催不整脈予知の信頼性の高い日本独自の国際標準的プロトコール開発に寄与する重要な論文であると判定され、厳正なる審査の結果、学位授与に相当すると判断した。</p>		