

博士論文

ヒト ES 細胞由来心筋細胞を用いた
新規医薬品心毒性予測システムの開発と検証

朝日 結実子

本研究は以下の 2 報の原著論文に基づいて作成され、東京大学に提出されたものである。

1. Asahi Y., Hamada T., Hattori A., Matsuura K., Odaka M., Nomura F., Kaneko T., Abe Y., Takasuna K., Sanbusho K., and Yasuda K. On-chip spatiotemporal electrophysiological analysis of human stem cell derived cardiomyocytes enables quantitative assessment of proarrhythmia in drug development. *Sci Rep.* **8**, 14536, 2018.

The final publication is available at

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-32921-1>.

doi: 10.1038/s41598-018-32921-1.

2. Asahi Y., Nomura F., Abe Y., Doi M., Sakakura T., Takasuna K., and Yasuda K. Electrophysiological evaluation of pentamidine and 17-AAG in human stem cell-derived cardiomyocytes for safety assessment. *Eur J Pharmacol.* **842**, 221-230, 2019.

The final publication is available at

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299918306319?via%3Dihub>.

doi: 10.1016/j.ejphar.2018.10.046.

目次

| | |
|--------------------|----|
| 略語..... | 4 |
| 第一章 序論..... | 5 |
| 1-1 本研究の目的の概要..... | 5 |
| 1-2 本研究の背景..... | 5 |
| 第二章..... | 10 |
| 2-1 目的..... | 11 |
| 2-2 方法..... | 12 |
| 2-3 結果..... | 15 |
| 2-4 考察..... | 17 |
| 第三章..... | 21 |
| 3-1 目的..... | 22 |
| 3-2 方法..... | 23 |
| 3-3 結果..... | 26 |
| 3-4 考察..... | 28 |
| 第四章 総括..... | 32 |
| 図表..... | 33 |
| 参考文献..... | 45 |
| 謝辞..... | 52 |

略語

| | |
|----------|--|
| 17-AAG | 17-allylamino-17-desmethoxygeldanamycin |
| APD | action potential duration |
| Cav1.2 | calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C (CACNA1C alias) |
| cFPD | corrected field potential duration |
| CiPA | the Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay |
| CSAHi | Consortium for Safety Assessment using Human iPS cells |
| CT | conduction time |
| EAD | early after repolarization |
| ES | embryonic stem |
| ETPC | effective therapeutic plasma concentration |
| FPD | field potential duration |
| HEK | human embryonic kidney |
| hERG | human ether-a-go-go-related gene |
| hERG-CHO | hERG-overexpressing Chinese hamster ovary cell |
| Hsp90 | heat shock protein 90kDa |
| ICH | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use |
| iPS | induced-pluripotent stem |
| ISI | inter-spike interval |
| JiCSA | Japan iPS Cardiac Safety Assessment |
| MEA | multi-electrode array |
| Nav1.5 | sodium voltage-gated channel alpha subunit 5 (SCN5A alias) |
| S.D. | Standard deviation |
| S.E.M. | Standard error of the mean |
| STV | short-term variability |
| TA | triggered activity |
| TdP | Torsades de Pointes |
| VF | ventricular fibrillation |
| VT | ventricular tachycardia |

第一章 序論

1-1 本研究の目的の概要

新薬開発の中止要因となる主たる有害事象は心毒性であり、その中の約 3 割を薬剤誘発性の致死性不整脈が占める。その中でも多型性心室頻拍 (Torsades de Pointes: TdP) は心臓突然死につながる重篤な有害事象であり、このリスクを回避することが新薬開発において最も重要な課題である。TdP の発生前には心電図上で QT 間隔延長が観察され、QT 間隔延長は心筋細胞活動電位の再分極過程を司る hERG (human ether-a-go-go-related gene) チャネルの阻害により発生することが明らかとなっている。そこで、新薬開発のための非臨床試験に、hERG 強制発現細胞を用いた hERG カリウムチャネル電流 (I_{Kr}) 阻害作用を調べる試験、実験動物 (主にイヌ、サル) を用いた心電図 QT 間隔評価試験を新たに加えることが医薬品国際調和会議 (ICH) で定められた (ICH ガイドライン S7B)。しかし、このガイドラインの施行から 15 年が経ち多くの薬剤の試験データが蓄積したことから、hERG チャネル阻害作用があるがヒト心電図 QT 延長がない薬剤や、hERG チャネル阻害作用がないが QT 延長あるいは TdP が起こる薬剤があることが指摘された。つまり、TdP は単に hERG チャネル阻害と QT 間隔を調べるだけでは予測できないことを示している。これらの原因として、心筋細胞に発現する hERG チャネルとその他のイオンチャネルへの薬剤の作用で電流変化が起こらない場合があることや、イオンチャネルが膜に組み込まれるトラフィックの過程が阻害された結果として長期曝露時にのみ hERG チャネル電流が低下すること、実験動物を使う非臨床試験と臨床試験の種差の問題などが示唆されている。

近年、ヒト幹細胞から心筋細胞が作製できるようになったことから、ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いることで試験結果の種差の問題を解決しようとする動きがある。実際に、ヒト幹細胞由来心筋細胞からは、細胞外電位記録からヒト心電図 QT 間隔とよく相関する指標が計測できることが明らかとなってきた。

そこで本研究では、臨床での医薬品の致死性不整脈リスクを従来以上に正確に予測するための *in vitro* 評価系として、ヒト ES 細胞由来心筋細胞 (hESC-CM) を用いた多電極アレイ (multi-electrode array: MEA) の新たな応用可能性を検証した。まず、MEA 上に細胞をライン状に配した MEA ラインモデルを作製し、FPD および興奮伝導とそのゆらぎを指標として、マルチイオンチャネル阻害剤の TdP リスク予測確度が改善できるか検証した。次に、長期曝露によりイオンチャネルの発現に影響を及ぼす薬剤を用いて、hESC-CM の MEA アッセイにおいて薬剤を長期曝露することで、TdP リスクを予測できるか検証した。

1-2 本研究の背景

致死的不整脈リスクに関する現行の非臨床試験ガイドライン

新薬の臨床試験において、開発が中止されるケースのうち安全性懸念が原因となる割合は、

phase I および phase II の各ステージでは全体の約 25%と報告されている (Waring *et al.*, 2015)。また、安全性懸念のうち生命にとって最も危険なものは心毒性であり、心毒性の内訳としては致死性不整脈が約 30%を占めている (Lavery, *et al.*, 2011)。

薬剤誘発性の致死性不整脈には、TdP の他に、心室細動 (ventricular fibrillation: VF) ならびに持続性心室頻拍 (ventricular tachycardia: VT) などがあるが、これらのうち TdP には心電図の QT 間隔延長が前兆として現れる場合が多い (Cubeddu, 2003) ことから、QT 間隔延長をサロゲートマーカーとして TdP リスク予測を行うこととなった。また Brown らは、TdP を誘発した薬剤の薬理作用を詳細に調べ、QT 間隔延長の主たる機序は心筋細胞膜に発現している hERG チャンネルのカリウム電流の阻害であることを示した (Brown, 2004)。このように、hERG チャンネル阻害による QT 間隔の延長する薬剤をいち早く除外することで、医薬品による TdP の発生を回避できると考えられた。

そこで 2005 年に、International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) で日米欧共通の国際ガイドラインとして、非臨床試験安全性 (safety) ガイドライン S7 に、「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 S7B として追加された (<https://www.pmda.go.jp/files/000156281.pdf>)。表 1 に示すように、S7B では、hERG チャンネル強制発現細胞などを用いた *in vitro* での I_{Kr} 阻害試験とイヌ・サル等の非げっ歯類を用いた *in vivo* での心電図 QT 評価試験が必須試験として制定された。一方、臨床試験においては新たに「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」として、E14 が制定された (<https://www.pmda.go.jp/files/000156160.pdf>)。現在 ICH の会議においては、現行の ICH S7B と E14 の見直しが図られている。これらは共に心臓機能に対する安全性評価であるので、ICH S7B/E14 としてまとめて取り扱われている。米国 FDA は現在国際的なコンソーシアムを作り、現行の ICH S7B/E14 を全面的に見直す形の新しい催不整脈リスク予測パラダイムを提案しようとしている (Colatsky, *et al.*, 2016)。その中には、ヒト iPS 由来心筋細胞を利用した新たな試験法の導入も議論されている。

致死性不整脈リスクの予測性向上の必要性

ICH S7B/E14が施行される以前に上市された医薬品の中には、 I_{Kr} 阻害やQT延長作用を持つものが知られている (Ponti, *et al.*, 2002; 7 Giorgi, *et al.*, 2010; Gintant, 2011)。ベラパミル、アミオダロン、モキシフロキサシンがその例となる。現行のICH S7B/E14に従うと、これらの薬剤は I_{Kr} 阻害試験や心電図QT評価で陽性判定され上市されないことになってしまうが、これらは現在も使用されている。ベラパミルはhERGチャンネルとCav1.2チャンネルの阻害作用を有し、アミオダロンやモキシフロキサシンはhERGチャンネル、Cav1.2チャンネルとNav1.5チャンネルの阻害作用を有する (Kramer, *et al.*, 2013)。いずれの薬剤も本来の主薬理作用ではないhERGチャンネル阻害作用を有するが、ベラパミルではQT延長やTdP発

生の報告はなく、アミオダロンやモキシフロキサシンはQT延長作用を示すもののTdPリスクは少なく、各々の適応症で有用な薬剤として処方されている。一方で、 I_{Kr} 阻害やQT延長作用をもたなくてもTdP発生が報告された医薬品もある。レボフロキサシンとテルフェナジンがその例である。レボフロキサシンにおいては、非臨床研究では I_{Kr} や心電図QT 間隔への影響が小さい(Furuhama, 2007)にも関わらず、感染症患者においてQT 間隔延長やTdPの発生が報告されている(Samaha, 1999; Paltoo, *et al.*, 2001; Gandhi *et al.*, 2003)。また、既にTdPリスクのため市場から撤退したテルフェナジンは、hERGチャネル以外にCav1.2チャネルとNav1.5チャネル阻害作用を有し、非臨床研究でaction potential duration (APD)あるいはQT間隔延長作用を検出し難いため(Hondeghem, *et al.*, 2011)、現行の評価のみではTdPリスク陰性と判断され上市される可能性がある。このように、ヒトでTdPリスクのある化合物が、現行の評価フローでは偽陰性と判定され上市されてきた事例もある。

これらの事例から、とくに複数イオンチャネルへの阻害作用を有する薬剤の催不整脈リスクをhERGチャネル阻害作用とQT間隔延長の組み合わせのみで判断することは難しく、現行の非臨床評価では有望な化合物の開発機会の喪失を招いている可能性(偽陽性)、ならびに催不整脈リスクのある化合物を見逃している可能性(偽陰性)が指摘されている。そのため、現行のhERG阻害、QT間隔延長の指標よりも精度高くヒトでの催不整脈リスクを予測できる指標が求められ、それを評価するための新しい実験系の提案が待たれている。

hERG チャネル阻害、QT 延長が関与しない致死性不整脈の要因

複数イオンチャネル阻害作用を有する薬剤の催不整脈リスク予測が難しいのは、心筋細胞の活動電位が、hERGチャネル以外の複数のイオンチャネルで形成される電流で構成されるためである。Nav1.5チャネルの開口により心筋細胞が脱分極し、次いでCav1.2チャネルの開口により膜電位が維持され、再分極においてhERGチャネルと逆向きの電流を発生させる。すなわち、Nav1.5やCav1.2チャネルの阻害はhERGチャネル阻害と相殺的に働く(Kramer, *et al.*, 2013)。また、臨床所見および実験動物を用いた検討から、心筋細胞の興奮伝導の障害(Levine, *et al.*, 1989; Osadchii, 2014; Wagner, *et al.*, 2015)、脱分極あるいは再分極の1拍ごとのゆらぎ/不安定性の増大(Hinterseer, *et al.*, 2010; John, *et al.*, 2012; Varkevisser, *et al.*, 2012; Wagner, *et al.*, 2015; Stams, *et al.*, 2016)が、催不整脈リスクに影響を及ぼす可能性が示唆されている。それに加えて、イオンチャネルには種差があるため、動物/動物標本を用いた評価では必ずしも正確な催不整脈リスクの予測ができない(Nalos, *et al.*, 2011)。

さらに、近年、hERGチャネルの急性直接阻害作用を有さず、長期曝露において初めてTdP活性を有する化合物群が見出されてきた(de Git, *et al.*, 2013; Cubeddu, 2016)。これらの化合物の催不整脈リスクは、薬剤の急性曝露における I_{Kr} 阻害やQT間隔延長検出にフォーカスしている現行のスクリーニングでは適切に評価出来ない。長期曝露によってTdP活性を示す化合物の多くは、hERGチャネルの直接阻害作用は弱く、hERGチャネルの細

胞膜への移行、発現あるいは代謝・分解、すなわち hERG チャンネルトラフィックの阻害作用を有することが知られている (Nogawa and Kawai, 2014)。たとえば、ニューモシスチス肺炎の治療薬であるペンタミジンは、臨床において TdP の発生事例が複数報告されているが (Girgis, *et al.*, 1997; Jha, 1983; Wharton, *et al.*, 1987; Bibler, *et al.*, 1988)、急性曝露によって評価される hERG チャンネルへの直接阻害作用を有さない薬剤である。

従って、ヒトの心筋細胞を用いて適切な評価指標や薬剤曝露時間を設定することにより、興奮伝導の障害、興奮伝導や QT 間隔の 1 拍ごとのゆらぎ、イオンチャンネルトラフィック阻害作用について、種差の課題も払拭した評価が可能となると考えられる。

ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた催不整脈リスク予測評価

近年の幹細胞技術の進展から、ヒト胚性幹細胞または induced-pluripotent stem (iPS) 細胞から心筋細胞が分化誘導できるようになり (Norström, *et al.*, 2006; Synnergren, *et al.*, 2008 and 2011; Sartipy and Björquist, 2011)、*in vitro* 心毒性評価系への応用に向けて検証が行われてきた。代表的な取り組みとして、ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた MEA における細胞外電位から計測される心筋細胞の脱分極から再分極までの持続時間 (field potential duration: FPD) が、心電図 QT 間隔とよく相関することが検証されてきた (Harris, *et al.*, 2013; Nozaki, *et al.*, 2014; Clements, *et al.*, 2015; Yamamoto *et al.*, 2016; Kitaguchi, *et al.*, 2016; Kanda, *et al.*, 2018)。これらの研究では、マルチイオンチャンネル阻害剤を中心に検討されており、FPD の延長や EAD (early after depolarization) と呼ばれる波形の発生を指標とした実験系である。しかし、その他の TdP リスク因子である QT 間隔や興奮伝導のゆらぎ、あるいは薬剤の長期曝露による TdP リスク予測の可能性については、未だ十分に検討されていない。

本研究で目指すこと

本論文の第二章では、ヒト ES 細胞由来心筋細胞 (hESC-CM) を用いた MEA における、臨床での TdP リスクの有無が明らかな各種イオンチャンネル阻害作用を有する複数の化合物の TdP リスク予測性を検証した。電気生理学的パラメーターとして、ヒト心電図 QT 間隔の指標である FPD およびそのゆらぎ: STV (STV_{FPD})、興奮伝導時間の指標として MEA の電極間の conduction time (CT) およびそのゆらぎ: STV (STV_{CT}) を評価し、TdP リスク予測における MEA の有用性を検証した (Asahi, *et al.*, 2018)。

第三章では、臨床において長時間曝露下で TdP リスクを有するペンタミジンと TdP リスクの低い 17-AAG を用いて、化合物の 5 分間曝露時と 24 時間曝露時の hERG チャンネル強制発現株における hERG チャンネルの機能および発現評価を行い、両化合物の hERG チャンネルへの作用様式を検証した。次に、両化合物について、hESC-CM の FPD を指標とし、TdP リスク予測における MEA の有用性を検証した (Asahi, *et al.*, 2019)。

本論文は、マルチイオンチャンネル阻害作用を有する薬剤や長期曝露によりイオンチャネ

ル発現に影響を及ぼす薬剤の TdP リスク評価における、ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた MEA アッセイの応用可能性を示すものである。

第二章

hESC-CM を用いた MEA ラインモデルにおける
興奮伝導時間 (CT) と FPD、CT のゆらぎ解析

2-1 目的

臨床における薬剤誘発性の致死性不整脈リスクを精度高く予測するには、現行の hERG 阻害/QT 間隔延長以外の新しい評価指標とその実験系が必要とされている。第一章 2.本研究の背景で述べたように、心筋細胞の活動電位は hERG チャンネルに加えて他の複数のイオンチャンネルによって構成される。たとえば、Nav1.5 チャンネルは心筋細胞間の脱分極をもたらし、Cav1.2 チャンネルは脱分極により活性化し、hERG チャンネルと逆向きの電流を発生させる。またこれらの興奮は隣接する心筋細胞にギャップジャンクションを介して伝播する。そして、hERG カリウムチャンネル電流 (I_{Kr}) 以外の複数の電位依存性カリウムチャンネルによる電流 (例: I_{Ks} 、 I_{K1} 、 I_{to} など) と共に、活動電位の再分極を担っている。複数のイオンチャンネルに影響を与える薬剤は、心筋細胞の脱分極と再分極に対して時間的・空間的に影響を与えるため、心筋細胞ネットワークにおける QT 間隔や興奮伝導に加えて、それらの 1 拍ごとのゆらぎを測定することで、マルチイオンチャンネル阻害剤の総合的な影響を評価することが重要だと考えられる。実際、マルチイオンチャンネル阻害作用を有する薬剤では、hERG 阻害作用の強度が、QT 間隔延長作用のみならず、TdP リスクと一致しない。また、イオンチャンネルには種差があることから、ヒト心筋細胞のイオンチャンネルを発現する細胞での再分極過程や興奮伝導の指標を評価できる系が求められている。

ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた再分極過程のゆらぎの評価としては、1 拍ごとの活動電位持続時間 (APD) から Poincaré plot を用いて算出した short-term variability (STV) の有用性が示唆されている (Nalos, *et al.*, 2012)。しかし、APD の測定では測定のための微小電極を細胞に刺入する必要があるため、薬剤長期曝露の評価に適さず、スループットも低い。また、興奮伝導の評価に関しては、ヒト iPS 由来心筋細胞を平面的に配置した 2D シートモデルにより評価が可能とされている (Izumi-Nakaseko, *et al.*, 2017)。しかし、2D シートモデルでは測定中にペースメーカー細胞が移動しさまざまな方向から興奮伝導が生じる場合の対応が難しい。

そこで我々は、まず興奮伝導を一方向性に評価するモデルとして、ヒト ES 細胞由来心筋細胞 (hESC-CM) を電極上に一列に配した MEA ラインモデルを構築し (Kaneko, *et al.*, 2014)、臨床での TdP リスクの有無が明らかな複数のマルチイオンチャンネル阻害化合物の評価を実施した (Asahi, *et al.*, 2018)。MEA ラインモデルにおいて、ヒト心電図 QT 間隔に相当する FPD および FPD の 1 拍ごとのゆらぎ (STV_{FPD})、伝導時間 (CT) およびそのゆらぎ (STV_{CT}) を測定し、それらの指標を用いて TdP リスクを正確に予測することができるか、検証した (Asahi, *et al.*, 2018)。

2-2 方法

評価化合物

E-4031 (選択的 hERG 阻害薬)、アステミゾール、フレカイニドおよびテルフェナジン (マルチチャンネル遮断剤)、リドカイン (ナトリウムチャンネル遮断剤) およびベラパミル (カルシウムチャンネル遮断剤) の各種イオンチャンネル阻害作用を有する 6 つの化合物を選択し、実験に適用した。溶媒対照はジメチルスルホキシド (DMSO) とした。E-4031 は第一三共株式会社 (Tokyo, Japan) で自社合成し、その他の化合物は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。各化合物を DMSO により評価濃度の 1000 倍の濃度に溶解し、原液とした。各化合物の最高濃度は、溶解度を考慮して、ETPC の 30-100 倍に設定した。

MEA 心筋細胞ラインチップの作成

MEA チップ (MED-P530A; Alpha-MED Scientific Co. Ltd., Osaka, Japan) の表面を以下のように調製した。まず、コラーゲンコーティングのため、チップ表面に I-C 型コラーゲン (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) と 1 mM 希塩酸溶液を 1:9 で混合したコラーゲン溶液をチップに 0.5-1 mL 添加し、37°C で一晩静置した。翌日、チップのコラーゲン溶液を除去し、クリーンベンチ内に 15 分置きチップ表面を乾燥させた後、PBS で 2 回洗浄し、PBS でチップを満たした。次に、アガロースコーティングのため、チップから PBS を除去し、電子レンジで加熱融解した 2.25% アガロースを 80 μ L ほどチップ中央にすばやく滴下し、スピコーター (MIKASA, Tokyo, Japan) によりチップを 3000 rpm で 20 秒間遠心した。次いで、MEA チップを位相差顕微鏡 (IX-71; Olympus, Tokyo, Japan) で観察下、1480 nm の赤外線レーザーを照射し、チップ中央の多電極 (8 \times 8 電極) の平行線に沿ってアガロース層を融解した。赤外線レーザーの出力は、基板上 : 0.32-0.45 W, 回路上 : 0.15-0.16 W, 電極上 : 0.06-0.08 W に調節した。これらの操作により、アガロース層を選択的に除去し、コラーゲン層を露出させた (図 2A)。1 プローブにつき、1 列目、4 列目、7 列目を露出した。

細胞培養

ヒト胚性幹細胞由来心筋細胞クラスター (hESC-CMC; hESC-CMCTM002) を、Collectis (Gothenburg, Sweden) から購入し、20% FBS、1 mM GlutaMax、100 U/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸および 0.1 mM β -メルカプトエタノール (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) を維持培地として培養に用いた。維持培地は 1 日おきに 1 回交換した。解凍 5 日目に、hESC-CMC のクラスター塊を単一細胞に分離するために、DNase を含む 0.25% トリプシン-EDTA (Invitrogen) 中 37°C で 2~3 分間処理後、数回すばやくピペッティングし、速やかに 5 倍量の維持培地を停止溶液として添加した。細胞懸濁液を 2~3 分間 200 $\times g$ で遠心分離した。上清を除去後、残ったペレットに維持培地を加えてピペッティングした。得られた細胞懸濁液を、 1×10^5 cells/2 mL 培地/MEA チップとなるよう

に MEA チップの電極から作成した 8 電極のライン電極に播種した。実験開始の 30 分以上前に、加温した新鮮な維持培地にて培地交換した。

FPD の記録

hESC-CM をライン状に播種した MEA 心筋ラインチップを FP 測定装置にセットし、37°C、5% CO₂ の加湿細胞培養インキュベーターに入れた。FPD 記録は、2 kHz のローパスフィルタおよび 1 Hz のハイパスフィルタ、10 kHz のサンプリング速度で実施し、シグナル増幅器により 100~50,000 倍の範囲で増幅した。シグナルは、Igor Pro 6.0

(WaveMetrics, Inc., USA) および FlexPro 7.0 (Weisang GmbH, Germany) により解析した。

薬剤曝露

FP 記録において、心筋細胞の脱分極—再分極を示すピークが明確で、0.6~1.1 Hz の拍動周波数を示す、細胞ラインを選抜した。MEA チップを FP 測定装置のホルダーに入れ、5 分後に薬液投与前の対照 FP 波形を 10 分間記録した。続いて、薬物を培地に低濃度から 10 分間隔で段階的に添加した (図 2B)。

最後に、薬剤含有培地を 3 回洗浄した後、新鮮な培地と交換した。10 分間記録された FP 波形データから抽出された最後の 50 拍を、各濃度での拍動率、FPD (最初の脱分極ピークから広範な再分極ピークまでの時間) および CT (ライン状の隣り合う電極間の最初のピークについて、電極間を伝わる時間差) 測定のために使用した (図 2C 下段)。最高濃度は各薬剤の臨床での有効血中濃度の約 10 倍とした。

データ解析および統計解析

FPD は、脱分極を示す鋭波成分の第 1 ピークから、主にカリウムイオンチャネルによって引き起こされる再分極による広波成分の第 2 ピークまでの時間的間隔と定義した (図 2C 上段)。スパイク間隔と FPD のプロットの傾きの比較に基づく Bazzett または Fridericia の式により、心筋細胞の拍動速度に基づいた補正 FPD (cFPD) を用いた (図 3)。Poincaré plot における同一線に垂直な点の平均距離として定義される cFPD あるいは CT のゆらぎを計算した ($STV = \Sigma |D_{n+1} - D_n| / (n \times \sqrt{2})$ 、ここで D_n は第 n 拍動の FPD および CT を表す)。いずれのデータも、STV は各濃度の薬剤曝露の最後から 50 拍分のデータである。

各薬剤の TdP リスクを評価するために、各薬剤の cFPD と STV_{cFPD} 、CT および STV_{CT} 、 STV_{cFPD} と STV_{CT} について、各指標の平均値を 2 次元プロットした。Microsoft Office Excel 2013 Solver により、直線の傾き及び切片は、陰性あるいは陽性の各薬剤データのうち、直線に最も近い点と直線との距離が最大になるように算出した。

すべての値は mean±S.E.M.で示す。各時点における溶媒対照に対する薬剤群の作用の判定には、Dunnett の多重比較検定を用い、 $P<0.05$ を統計学的に有意とした。

2-3 結果

MEA ラインモデルのセットアップ

MEA ラインモデルにおける hESC-CM の FPD および CT に対する作用を評価するために、約 1000 個の hESC-CM を MEA チップのアガロースを含まない領域に播種し、インキュベートした (図 2C)。FPD 記録波形の代表例に示されるように、本実験における hESC-CM の波形は、心室筋タイプの活動電位の微分波形と類似していた (図 1B)。

まず、FPD の補正式として、ヒト心電図 QT 間隔の補正において最も代表的な Bazzet および Fridericia の式を用いた。Vehicle control (DMSO) の全データについて、inter-spike interval (ISI) と FPD あるいは補正 FPD (cFPD) を scatter plot した (図 3A-C)。FPD は ISI の増加と共に延長するが (図 3A、直線の傾き: 0.1345)、cFPD では傾きがゼロに近づくことがわかる (図 3B, C)。本研究では、vehicle control の全てのデータをプロットし、2つの補正式のうち、傾きがよりゼロに近い Bazzet の補正式 (直線の傾き: -0.0128) を採用し、cFPD データ解析を実施した。Vehicle control (DMSO) を含めた各薬剤の適応において、薬剤適応前 (Control、図 2B) の値に対する相対値を平均した。Vehicle control では、いずれの時点においても cFPD は Control 値の $\pm 10\%$ (0.9~1.1)、その他の指標 (STV_{cFPD}、CT、STV_{CT}) は $\pm 20\%$ (0.8~1.2) の範囲の変動を示した (図 4A, 5A)。

cFPD および STV_{cFPD} に対する効果

まず、陽性対照として選択的 hERG 阻害剤である E-4031 の作用を検証した。E-4031 は 0.1 μM で 30% (n=13、P<0.05 vs. DMSO、図 4B、青色線)、1 μM で 47% (n=12、P<0.05) の cFPD 延長作用を示した。一方、電位依存性 Ca²⁺チャネル (Cav1.2) 阻害作用と同等の濃度で hERG 阻害作用を有する Cav1.2 阻害剤ベラパミルは、10 μM で 26.6% の cFPD 短縮作用を示した (n=3、P<0.05 vs. DMSO、図 4C-1、青色線)。cFPD の STV (STV_{cFPD}) は、1 μM の E-4031 により 2 倍以上に増加したが (図 4B、赤色線)、10 μM のベラパミルでは有意な変化は認められなかった (図 4C-1、赤色線)。

次に、Nav1.5 阻害剤であるリドカイン、マルチイオンチャネル阻害作用を有するフレカイニド、アステミゾールおよびテルフェナジンによる作用を検証した。リドカインの Nav1.5 IC₅₀ は 42~108 μM であり、cFPD は 10-100 μM で -18% 短縮した (n=4、P<0.05 vs. DMSO、図 4C-2、青色線)。フレカイニドは hERG IC₅₀: 1.8 μM に対して Nav1.5 あるいは Cav1.2 阻害作用が 10 倍以上乖離 (Nav1.5 IC₅₀: 34 μM 、Cav1.2 IC₅₀: 56 μM) を示す薬剤であり、10 μM までは cFPD に作用を示さず、100 μM で -14% の cFPD を短縮した (n=3、P<0.05 vs DMSO、図 4D-1、青色線)。アステミゾールは hERG IC₅₀: 6.2 μM に対して Nav1.5 あるいは Cav1.2 阻害作用が 100 倍以上乖離する薬剤であり、1 μM で cFPD を 43.7% 延長した (n=3、P<0.05、図 4D-2)。一方、テルフェナジンは hERG IC₅₀: 55 μM に対して数倍程度の差で Cav1.2 阻害作用を有するが (Cav1.2 IC₅₀: 200)、10 または 100 μM で cFPD 短縮作用を示した (-26%、P<0.05 vs DMSO、n=4 (10 μM)、または -78%、n=2 (100 μM)、図 4D-3、青色線)。STV_{cFPD} は、1 μM および 10 μM のリドカインで 345% および 143% の

増加 ($P < 0.05$ vs DMSO、図 4C-1、赤色線)、10-100 μM のフレカイニドによって約 50% 増加し (図 4D-1、赤色線)、1 μM のアステミゾールで 122% 増加 ($P < 0.05$ vs DMSO、図 4D-2)、100 μM のテルフェナジンで 243% 増加した (図 4D-3)。

CT および STV_{CT} に対する効果

MEA ラインモデルにおいて、隣り合う 2 つの電極間の興奮伝導時間 CT とその STV (STV_{CT}) を評価した。

まず、hERG 阻害剤 E-4031、あるいは Cav1.2 および hERG 阻害剤ベラパミルでは、いずれの濃度でも CT に有意な変化は認められず (図 5B および C、青色線)、vehicle control の結果 (図 5A) と類似していた。一方、1 μM の E-4031 (図 5B の赤色線) では STV_{CT} が 336% 増加し ($n = 13$, $P < 0.05$ vs DMSO、図 5B、赤色線)、1 μM のベラパミルでは 103% の増加傾向を示した (図 5C-1、赤色線)。

次に、興奮伝導速度を低下させる作用の強いフレカイニド (クラス Ic) と弱いリドカイン (クラス Ib) の 2 種類の Na チャネルブロッカーを検証した。フレカイニドは 10 μM で 64% の CT 増加傾向を示し ($n = 4$, $P = 0.66$ 、図 5D-3、青色線)、リドカインは 100 μM でわずかに CT 増加傾向を示した (22.1%, $n = 4$, $P = 0.99$ 、図 5C-2、青色線)。Nav1.5 の IC_{50} はそれぞれ 34 μM および 42-108 μM であることから、両薬剤の CT 増加を示した濃度は I_{Na} 低下作用を示しうる濃度であった。 STV_{CT} は、10 μM のフレカイニドによって増加傾向を示した (287%, $P = 0.76$ 、図 5D-1、赤色線)。一方、リドカインでも 100 μM まで最大で 134% の増大を認めたが、有意な増加ではなかった (図 5C-2、赤色線)。

さらに、1 μM のアステミゾールで CT が 126% 増加し ($n = 3$, $P < 0.05$ 、図 5D-2、青色線)、3 μM のテルフェナジンでは CT が 189% 増加した ($n = 4$, $P < 0.05$ 、図 5D-3、青色線)。アステミゾールとテルフェナジンの Nav1.5 IC_{50} はそれぞれ 2.2 と 4.4 μM であり (表 2)、両薬剤ともに 50% の I_{Na} 阻害が予測される濃度で CT の増加を示した。 STV_{CT} はアステミゾール 0.1 と 1 μM (それぞれ 483% と 196%, $P = 0.16$ または $P = 0.92$ 、図 5D-2)、テルフェナジンの 1 μM (228%, $P = 0.12$ 、図 5D-3) 以上の高濃度で増加傾向を示した。

TdP リスク評価

hESC-CM を用いた MEA アッセイに使用した全ての薬物について、再分極過程 (cFPD および STV_{cFPD}) および脱分極過程 (CT、 STV_{CT}) のパラメーターに加えて、その他のパラメーター (ISI、beat rate、自律拍動停止 : arrest) への作用を、表 2 にまとめた。各薬剤の最高濃度における cFPD および STV_{cFPD} プロットでは、TdP(-) のリドカインおよびベラパミルと TdP(+) の E-4031、アステミゾール、テルフェナジン、およびフレカイニドを識別できなかった (図 6A)。一方、CT と STV_{CT} 、または STV_{cFPD} と STV_{CT} のプロットでは、TdP(-) と TdP(+) の薬剤群を明確に区別することができた (図 6B および C の赤い破線)。

2-4 考察

臨床における薬剤誘発性致死性不整脈の要因となる、QT 間隔の 1 拍ごとのゆらぎ、興奮伝導の変動とそのゆらぎについて、ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた評価はこれまでほとんど行われていなかった。検証にあたり、我々は、興奮伝導を一方向性に評価しうるヒト ES 細胞由来心筋細胞 (hESC-CM) を電極上に一列に配した MEA ラインモデルを構築し (Kaneko, *et al.*, 2014)、マルチチャネルイオン阻害作用を有する複数の薬剤を用いて、ヒト心電図 QT 間隔に相当する細胞外電位持続時間 (FPD)、興奮伝導時間 (CT)、それらの 1 拍ごとのゆらぎ (STV_{FPD} 、 STV_{CT}) を同時に評価した (Asahi, *et al.*, 2018)。

QT 間隔とゆらぎ : $cFPD$ と STV_{cFPD}

MEA ラインモデルにおいて、hERG 選択的阻害剤 E-4031 は、hERG IC_{50} (約 91 nM) に近い濃度で濃度依存的な $cFPD$ 延長作用を示した (図 4B)。この結果は、ヒト ES 細胞由来心筋細胞を用いたクラスターモデル (Braam, *et al.*, 2010) あるいは 2D シートモデル

(Yamazaki, *et al.*, 2012) での評価と同様の結果であった。また、Cav1.2 と hERG の IC_{50} が同等の Cav1.2 遮断薬であるベラパミルは、既報と同様に (Braam, *et al.*, 2010; Yamazaki, *et al.*, 2012)、 $cFPD$ 短縮作用を示した (図 4C-1)。Nav1.5 阻害作用を有するリドカインは APD 短縮作用のあるクラス Ib の薬剤であり、MEA ラインモデルにおいても $cFPD$ 短縮作用を示した (図 4C-2)。

マルチイオンチャネル阻害作用を有するアステミゾールは、hERG IC_{50} の約 100 倍高濃度で $cFPD$ 延長作用を示したが (図 4D-2)、フレカイニドは最大濃度 100 μ M (hERG IC_{50} の約 300 倍) でも $cFPD$ 延長作用を示さなかった (図 4D-1)。テルフェナジンについては、本検討ではいずれの濃度でも FPD 延長作用を示さず、hERG IC_{50} の約 180 倍以上で $cFPD$ の短縮作用を示した (図 4D-3)。hERG 阻害作用に対して Cav1.2 阻害作用は相殺的に働くことが知られている (Kramer, *et al.*, 2013)。フレカイニドおよびテルフェナジンの Cav1.2 IC_{50} は hERG IC_{50} の約 4 倍であることから、本評価系において両薬剤が $cFPD$ 延長作用を示さなかった理由の 1 つとして、Cav1.2 阻害による hERG 阻害作用の相殺が考えられる。

FDA から報告されている市販後調査によると、抗アレルギー薬であるテルフェナジンは 439 例の VT、VF、TdP を含めた致死的不整脈や心停止を引き起こした薬剤である

(Hondegheem, *et al.*, 2011)。しかし、テルフェナジンはヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた MEA アッセイにおいて、ベル型反応も含めると FPD 延長作用を示す報告 (Kitaguchi, *et al.*, 2016; Nozaki, *et al.*, 2016) に対して、FPD 短縮作用を示すという報告 (Stams, *et al.*, 2016) もされている。本研究の MEA ラインモデルにおいては、テルフェナジンによる FPD 延長作用は認められず、FPD 延長作用を検出することが難しい薬剤であることが確認された。

STV_{cFPD} は、TdP リスクのある E-4031、テルフェナジン、アステミゾールで増加し、TdP リスクのないベラパミルでは増加が見られなかった (図 4B, C-1, D-2, D-3)。一方、TdP リスクがないとされるリドカインでは高濃度域で増加した (図 4C-2)。リドカインは最高濃度

(100 μM) と同等の 42-108 μM で Nav1.5 チャンネル阻害作用を有する薬剤であり (Penniman *et al.*, 2010)、各細胞で Nav1.5 チャンネル阻害作用のかかる濃度で $\text{STV}_{\text{CT}}/\text{FPD}$ 増加を示した。

興奮伝導とゆらぎ : CT と STV_{CT}

CT と STV_{CT} の評価にあたり、本評価系において、フレカイニド (クラス Ic のナトリウムチャンネル遮断薬) は Nav1.5 の IC_{50} ならびに ETPC と同程度の濃度で CT および STV_{CT} の増加傾向を示した (図 5D-1)。一方、リドカイン (クラス Ib のナトリウムチャンネル遮断薬) は、ETPC の約 10 倍の濃度でもフレカイニドと比べて CT および STV_{CT} の増加はわずかであった (図 5C-2)。TdP の発生が報告されているナトリウムチャンネル遮断薬は、クラス Ia (キノジンなど) およびクラス Ic (フレカイニドなど) であり、興奮伝導を遅延させる (Morganroth and Goin, 1991; Almroth, *et al.*, 2011)。一方、クラス Ib の薬剤 (リドカイン、メキシレチンなど) は、催不整脈リスクの低い抗不整脈薬として使用されており

(Woosley, *et al.*, 2001; Wyman, *et al.*, 2004)、Nav1.5 チャンネル不活性化状態からの回復が早いため、興奮伝導速度に対する作用がないあるいは弱いとされている (Heath *et al.*, 2011; Osadchii, 2014)。本評価系で用いた 2 種のナトリウムチャンネル遮断薬フレカイニド、リドカインの CT 増加の有無は、これらのヒトにおける興奮伝導に対する遅延作用の有無を反映する結果であった。

その他に Nav1.5 阻害作用を有するマルチイオンチャンネル阻害剤について、テルフェナジン、アステミゾールでは、それぞれの Nav1.5 IC_{50} 付近で CT が増加した (図 5D-2, 3)。Nav1.5 阻害作用を有し、興奮伝導速度の遅延作用の報告されている全ての薬剤において、Nav1.5 の IC_{50} 付近で CT 増加を示した。この結果については、ヒト iPS 由来心筋細胞を用いた検討結果と一致するものである (Izumi-Nakaseko, *et al.*, 2017)。

STV_{CT} については、TdP リスクのある 4 薬剤全てで増加した。E-4031 で SVT_{CT} が増加した理由としては、hERG 阻害作用により再分極が遅延し、静止膜電位からの戻りが遅くなったことにより、不活性化された Na チャンネルの活性化への戻りが遅れ、FPD のバラつきに応じて脱分極のバラつきも生じた可能性が考えられる。一方、CT への影響の少ないリドカインにおいては、 STV_{CT} の変動もわずかであった (図 5C-2)。

催不整脈リスク予測に関する国内外の取り組みと複数パラメーター評価の有用性

臨床での催不整脈リスクを予測するために、国際的にさまざまな検証が進んでいる。たとえば、CiPA では、心筋細胞の各イオンチャンネルへの影響を *in vitro* 評価し、その結果を *in silico* で心筋細胞活動電位に再構築した結果を、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた MEA アッセイで得られる FPD で確認するという、統合的評価方法の確立を目指した検討が進行中である (Sager, *et al.*, 2014; Fermini, *et al.*, 2016)。日本でも Japan iPS Cardiac Safety Assessment (JiCSA) において、CiPA と共同で 3 種 (低・中・高) の催不整脈リ

スクの異なる 28 化合物を用いた国際共同検証が実施され、致死性不整脈リスクを高精度に予測できる可能性が示唆された (Blinova, *et al.*, 2017 and 2018)。また、日本製薬工業協会のコンソーシアムである Consortium for Safety Assessment using Human iPS cells (CSAHi) では、MEA アッセイでの FPD 評価のみならず、Impeadance、Ca²⁺ transient あるいは motion field imaging など QT リスクに加えて、心筋収縮評価も可能となる種々のプラットフォーム構築に着手し、多角的心毒性評価の有用性を示唆している (Takasuna, *et al.*, 2017)。その他にも、TdP 発生報告のある 60 化合物を用いて、FPD 延長作用や EAD 発生と薬物の臨床有効血中濃度とのマージンを組み合わせることで、高い感度と特異度で TdP リスク強弱を分類できるという報告もある (Ando, *et al.*, 2017)。また、Sirenko らの報告では、Ca²⁺ flux を用いた心拍数と波形解析により、臨床での最大有効血中濃度に対する心拍数 IC₅₀ の比を算出することで、TdP リスク有無を判別できるとしている (Sirenko, *et al.*, 2013)。さらに、2D シートモデルにおいて電極間の興奮伝導を視覚化し、リエントリーなどの興奮伝導異常を検出する試みもある (Kadota, *et al.*, 2012)。新薬の開発においては、このように多角的な評価指標を設定することで、主薬理作用以外の未知の作用による毒性メカニズムを知ることが、薬剤の潜在的な安全性リスクの把握につながることを期待されている。

本研究における MEA ライン実験では、STV_{CT}のみで TdP リスクを判定できる可能性が示唆されたが、さらに STV_{CT}に加えて CT あるいは STV_{cFPD}を組み合わせることで、リスク陰性と陽性の化合物の区分がより明確になった (図 6B, C)。陰性・陽性化合物の差が明確でアッセイウィンドウが広い評価系は、開発初期の多検体のスクリーニングに適しており、複数パラメーターのプロットは有用であると考えられる。また、今回の検討から、MEA ラインモデルにおける CT が興奮伝導の指標として有用である可能性も示唆された。例えば、心臓を標的臓器とする薬剤のスクリーニング時に、化合物の興奮伝導への作用ポテンシャルを評価することは、化合物の取捨選択に有用となる可能性がある。

本研究の課題、今後の展望

本研究は、TdP リスクに関して、4 つのマルチイオンチャネル阻害剤を含めた、2 つの陰性化合物と 4 つの陽性化合物の検証にとどまっている。しかし、本 MEA ラインモデルを非臨床研究でのスクリーニングに用いるには、イオンチャネル阻害剤のみならず、変時・変力作用を有する薬剤の催不整脈リスク検出ができるか更なる検証をする必要がある。特に、より安定的にデータ取得できるように、ペーシング下で測定したり、化合物曝露時間を最適化したりすることで、取得データのバラつきを抑えることが重要である。今後、これらの検証を行い、ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた MEA アッセイにおいて、興奮伝導のゆらぎを含めた複数パラメーターを指標とした、現行のスクリーニングと比べて臨床での催不整脈リスクの予測精度の高い評価系が構築されることが期待される。

第三章

hESC-CM を用いた MEA クラスタモデルにおける 化合物長期曝露による TdP リスク評価

3-1 目的

心筋細胞の電気生理学的特性は、細胞膜上に機能的に発現するイオンチャネルとトランスポーター、細胞内 Ca^{2+} ハンドリング蛋白によって主に形成される。それらの遺伝子の発現レベルは、転写・翻訳、翻訳後修飾などの様々な過程で調節されている (Delisle *et al.*, 2004; Wang, 2010; Rosati and McKinnon, 2014)。近年、市販薬や開発候補品の中に、イオンチャネルへの直接阻害作用を有さず、細胞内に発現したイオンチャネルが細胞膜に組み込まれるまでの輸送、分解 (トラフィッキング) へ作用を示す薬剤群の存在が報告されてきた (de Git, *et al.*, 2013; Cubeddu, 2016)。これらの薬剤は、hERG チャネル直接阻害作用を有しておらず、現行の薬剤急性曝露による評価においては、その催不整脈リスクを検出できない。

hERG チャネルトラフィッキング阻害作用を有する薬剤としては、ペンタミジンがよく知られており (Cordes *et al.*, 2005; Varkevisser *et al.*, 2013)、最大で約 20% の感染症患者において TdP を引き起こすことが報告されている (Eisenhauer *et al.*, 1994)。また、ゲルダナマイシンを代表とする Hsp90 阻害剤は、hERG トラフィッキング過程でシヤペロン蛋白として働く Hsp90 の機能を阻害することで hERG チャネル分解を促進するため (Dennis *et al.*, 2007; Ficker *et al.*, 2003)、臨床における TdP リスクが懸念されてきた薬剤群である。しかしながら、ゲルダナマイシン誘導体の Hsp90 阻害剤である 17-AAG については、臨床試験において無症候性で一過性の第 II 度房室ブロックが 2 例報告されているのみで (Neckers, Workman, 2012; Solit *et al.*, 2007)、TdP の発生はこれまで報告されていない。このような事例から、hERG チャネルトラフィッキング阻害作用を有する薬剤の中でも、臨床での TdP リスクの程度は大きく異なることがわかってきた。しかし、臨床での TdP リスク強度の異なるトラフィッキング阻害剤について、ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた検討はこれまで報告されていない。

本章では、臨床での TdP リスクを有するペンタミジンと TdP リスクが低いと推察される 17-AAG を用いて、化合物の 5 分間曝露時と 24 時間曝露時の hERG チャネル強制発現株における hERG チャネル電流および蛋白発現を評価し、両化合物の hERG チャネルへの作用様式を検証した。次に、両化合物について、hESC-CM の FPD を指標とした、催不整脈リスク予測における MEA アッセイの有用性を検証した (Asahi *et al.*, 2019)。

3-2 方法

評価化合物

ペンタミジンはSigma-Aldrichから入手し、17-AAGは和光純薬株式会社(Osaka, Japan, hERG-CHOを用いたアッセイ用)から購入、あるいは第一三共株式会社で合成した(MEAアッセイ用)。ストック溶液として、各試験化合物を試験濃度の1000倍の濃度でDMSOに溶解した。5分間曝露時のpopulation patch clampシステムでは、ストック溶液をさらに外部溶液で最終試験濃度の3倍に希釈し、急性適用した。長期曝露時のpopulation patch clampシステムあるいはWestern blottingにおいては、保存溶液を1/1000希釈で培養フラスコに直接投与した。FPD記録では、ストック原液を試験濃度の100倍の濃度となるように維持培地で希釈した。臨床での最高血漿中濃度と比べて5倍以上高い30 μM をペンタミジンの最高濃度とし、細胞系でのHsp90 IC₅₀ (<1 μM)の3倍以上高い3 μM を17-AAGの最高濃度とした(ペンタミジン100 μM あるいは17-AAG10 μM では細胞毒性によりデータ取得不可であったため)。

細胞培養

テトラサイクリン誘導性にhERGチャネル蛋白質を強制発現したチャイニーズハムスター卵巣細胞(hERG-CHO; ChanTest Corporation, Cleveland, OH, USA。現在、Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, MA, USAから入手可能)を10% Tet System Approved Fetal Bovine Serum (FBS; HyClone Laboratories, Inc., South Logan, UT, USA)、50 units/mL ペニシリンおよび50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)含有のHam's F-12 Nutrient Mix培地で培養した。hERGチャネル発現のために、これらの細胞を、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のdoxycycline hyclate (Sigma-Aldrich)と共に、2% FBSを含むHam's F-12 mediumで、5% CO₂、37°Cで19時間以上インキュベートした。

ヒト胚性幹細胞由来心筋細胞クラスター(hESC-CM; hESC-CMCTM002)は、Cellartisから購入した。hESC-CMを、20% FBS、1 mM GlutaMAX、100 U/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、1%非必須アミノ酸、および0.1 mM β -mercaptoethanol(いずれもInvitrogenから購入)を含有するDMEMで培養し、5% CO₂中37°Cでインキュベートした。

hERGカリウムチャネル電流(I_{Kr})の測定

Planner base population patch clampシステムであるSyncroPatch® 384PE (Nanion Technologies GmbH, Munich, Germany)を用いて、I_{Kr}を測定した。hERG-CHOをHank's balanced salt solutionで洗浄し、次いで10% Accutase (Sigma-Aldrich Co. LLC)により解離させ、次いで2% FBS含有Ham's F-12を添加し、その後、それらをSyncroPatch® 384PEのテフロンリザーバーに移した。外部溶液の組成は、140 mM NaCl、4 mM KCl、

2 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、10 mM HEPES、および 5 mM Glucose (NaOH により pH 7.4 に調製) とした。内部溶液は 120 mM KF、20 mM KCl、10 mM NaCl、5 mM EGTA、および 10 mM HEPES、(KOH により pH 7.2 に調製) とした。hERG-CHO の I_{Kr} は、電圧パルスプロトコル：保持電位を-80 mV とし、2 秒間の脱分極パルス (+40 mV)、その後の 2 秒間の再分極パルス (-30 mV) における、脱分極パルスで記録された tail current のピーク値を測定した。急性曝露および慢性曝露の I_{Kr} に対する割合(%)は、次式を用いて計算した。

5 分間曝露時：

$$\text{阻害率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{3-sweep average current value of post-compound current}}{\text{3-sweep average current value of pre-compound current}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ of hERG current} = 100 - \text{阻害率 (\%)}$$

24 時間曝露時：

$$\% \text{ of hERG current} = \left(\frac{\text{current of cells applied with compound}}{\text{current of cells applied with vehicle}} \right) \times 100$$

Western blotting

Western blotting のために、CHO 細胞または hERG-CHO の溶解物を Laemmli 試料緩衝液(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)に溶解し、0.5% β-メルカプトエタノールと共に 70°C で 10 分間インキュベートし、次いで、5%~20%ポリアクリルアミド勾配ゲル(DRC Co., Ltd., Tokyo, Japan)に適用し、その後、それらを PVDF 膜(Bio-Rad)上に移した。膜を StartingBlock™ T20 (PBS)ブロッキング緩衝液(型番 37539; Thermo Fisher Scientific Inc.)で 30 分間ブロッキングし、次いで、一次抗体として anti-rabbit human C-terminus Kv11.1 抗体(型番 APC-062; Alomone Labs, Jerusalem, Israel)および anti-mouse β アクチン抗体(型番 A1978; Sigma-Aldrich)で一晩インキュベートし、続いて二次抗体として Alexa Fluor 680-conjugated anti-rabbit IgG (型番 A21109; Thermo Fisher Scientific Inc.)および IRDye800 donkey anti-mouse IgG (型番 926-32212; LI-COR, Lincoln, NE, USA)でインキュベートし、シグナルを ODYSSEY Infrared Imaging System (LI-COR)を用いて検出した。

MEA チップの調製

MEA チップは Alpha-MED Science Co., Ltd.から購入、あるいは安田研究室で設計された電極パターンに基づいて Photo Precision Co., Ltd. (Tokyo, Japan) により製造した (Nomura *et al.*, 2011)。MEA チップを I-C 型コラーゲン (Nitta Gelatin) でコーティングした。維持培地を充填した MEA チップ上に hESC-CM を置き、5% CO₂ 中 37°C で 2~3 時間インキュベート後、電極上のクラスターの付着を観察した 5% CO₂ 中 37°C にて、培地の量の半分を 2~3 日毎に交換した。

FPD 記録

FPD の定義は第二章と同様に設定した。長期薬物曝露のプロトコールを図 10A に示す。簡潔には、アッセイの 2 から 3 時間前に、MEA チップ中の培地を 2 mL の新鮮な培地に変更した。MEA チップをチップホルダーに取り付け、FP を 10 分間記録して対照条件を示した。コントロール条件の測定後、100 倍濃度の薬剤含有溶液 20 μ L または溶媒対照ピペットでセルチップに穏やかに加えた。薬物添加の 5 分後および 2、4、8 および 24 時間後に、FP を 10 分間記録した。

FP の記録は、安田研究室が開発した MEA システム (Suzuki *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2009) により、サンプリングレート 10 kHz、ローパスフィルタ 2 kHz、ハイパスフィルタ 1 Hz の設定で行った。得られたデータをまず CellAD 2.0 (Ditect Co., Ltd., Tokyo, Japan) で処理し、次いで FlexPro.7.0 で鋭波成分 (第 1 ピーク) と広波成分 (第 2 ピーク) を分析した。OriginPro 8.0J (Lightstone Inc., Tokyo, Japan) を用いて、薬物濃度反応曲線の統計解析およびフィッティングを行った。

データ解析および統計解析

すべての値は mean \pm S.D. で表す。有意性は $P < 0.05$ に設定した。hESC-CM を用いた実験では、時間と薬物の効果を評価するために 2 元要因分析を実施し、薬物の効果または時間と薬物の相互作用に有意性が認められた場合、パラメトリック Dunnett 検定を実施し、各時点での薬物効果の有意差を判定した。

3-3 結果

ペンタミジンおよび 17-AAG の I_{Kr} への影響

hERG チャンネルのトラフィックを阻害することが知られているニューモシスチス治療薬であるペンタミジンでは、5 分間曝露により 30 μM まで I_{Kr} は影響を受けなかった (図 7A)。一方、ペンタミジンの 24 時間曝露では、3 μM から濃度依存的に I_{Kr} が低下し (58.0% \pm 4.2%, $P < 0.01$; 図 7C)、最大で 30 μM において 10.5% \pm 1.0% ($P < 0.05$; 図 7C) まで低下した。

Hsp90 阻害剤である 17-AAG の 5 分間曝露では、1 μM まで I_{Kr} に影響を認めず (図 7B)、3 μM で I_{Kr} がわずかに低下した (81.0 \pm 2.0%, $P < 0.05$, 図 7B)。17-AAG の 24 時間曝露では、0.3 μM 以上で濃度依存的に I_{Kr} の有意な低下が認められた (図 7D)。17-AAG の 24 時間曝露における I_{Kr} は、0.3 μM 、1 μM または 3 μM でそれぞれ 58.1% \pm 4.8% ($P < 0.05$)、26.8% \pm 2.6% ($P < 0.05$) または 21.8% \pm 3.9% ($P < 0.05$) に低下した (図 7D)。

ペンタミジンおよび 17-AAG の hERG チャンネル蛋白発現への影響

ペンタミジンの 5 分間曝露では、グリコシル化を受けた成熟型 hERG 蛋白 (155 kDa 付近のバンド) ならびに未成熟型 hERG 蛋白 (135 kDa 付近のバンド) の発現量に、変化は見られなかった (図 8A)。一方、ペンタミジンの 24 時間曝露では、成熟型 hERG 蛋白の発現量は減少したが (10 μM で 31.7% \pm 5.5%, $P < 0.05$ 、30 μM で 18.9% \pm 0.7%, $P < 0.05$; 図 8B)、未成熟型 hERG 蛋白の発現量は増加した (10 μM で 138.4% \pm 10.3%, $P < 0.05$ 、30 μM で 126.8% \pm 6.4%, $P < 0.05$; 図 8B)。これらの結果から、ペンタミジンは hERG チャンネル蛋白の成熟を阻害すると考えられた (図 8A、B)。

17-AAG の 5 分間曝露では、成熟型 hERG 蛋白の発現量に変化はなく (図 8A)、24 時間曝露では、1 および 3 μM で成熟型 hERG 蛋白発現量を減少させた (それぞれ 13.9% \pm 0.9%, $P < 0.05$ および 10.3% \pm 1.2%, $P < 0.05$; 図 8B)。また、ペンタミジンとは異なり、未成熟型 hERG 蛋白発現量が、1 あるいは 3 μM での 17-AAG の 5 分間曝露によりわずかに減少し (81.3% \pm 4.2%, $P < 0.05$ および 71.1% \pm 3.3%, $P < 0.05$; 図 8A)、24 時間曝露によりさらに減少した (61.8% \pm 6.2%, $P < 0.05$ および 50.7% \pm 7.5%, $P < 0.05$; 図 8B)。

hESC-CM における FPD に対する作用

次に我々は、ペンタミジンまたは 17-AAG を用いて、MEA によるヒト ES 細胞由来心筋細胞 (hESC-CM) の FPD への影響を、5 分から 24 時間曝露まで経時的に評価した。自律拍動する hESC-CM における FPD は、それらの拍動数によって著しく影響を受ける。そこで、Fredericia の補正式と Bazett の補正式を比較し (図 9E, F)、傾きがよりゼロに近い Bazett の補正式 (傾き : 0.034) を用いて FPD を補正した。

Bazett 式で補正した FPD (cFPD) は、10 μM のペンタミジン曝露後 8 および 24 時間に延長した (それぞれ $17\% \pm 7\%$ および $101\% \pm 59\%$: 図 10B)。30 μM のペンタミジンは 4 時間以降 cFPD を延長した (4 および 8 時間で $19\% \pm 8\%$ および $87\% \pm 18\%$: 図 10B)。
hESC-CM の cFPD に対する別の機序によるトラフィック障害薬の効果をさらに調べるために、ペンタミジンと同様に hERG-CHO において遅延型 (24 時間曝露時) I_{Kr} 障害を示した 17-AAG を調べた。予想に反して、17-AAG は cFPD を延長せず、2~24 時間曝露中にむしろ短縮作用を示した (24 時間でピーク、1 μM と 3 μM でそれぞれ $24\% \pm 8.5\%$ と $29\% \pm 8.9\%$: 図 10C)。

3-4 考察

本研究は、(1) hERG-CHO を用いた電気生理学および生化学的アッセイにより、hERG トラフィック阻害作用を有するペンタミジンおよび 17-AAG について、hERG チャンネルへの作用様式を検証すること、および(2) hESC-CM を用いた MEA アッセイにおける FPD の評価が、ペンタミジンおよび 17-AAG の臨床における遅発性 TdP リスクの有無を判別できるか検証することを目的とした。

ペンタミジンの作用に関する考察

ペンタミジンの臨床における最高血漿中濃度は、4 mg/kg の単回静脈内注射後 1 時間以内に、最大約 1.8 μM (総濃度：フリー体濃度として 0.54 μM) とされている (Conte, *et al.*, 1986)。また、ペンタミジンの治療開始当日から数日後に QT 延長および TdP を引き起こす事例が報告されている (Bibler, *et al.*, 1988; Girgis, *et al.*, 1997; Jha, 1983; Kroll, *et al.*, 2002; Wharton, *et al.*, 1987)。

ペンタミジンの急性曝露では、hERG 強制発現 human embryonic kidney 細胞 (hERG-HEK 細胞) を用いた I_{Kr} 評価において、臨床血漿中薬物濃度の約 5~20 倍の 10 μM まで I_{Kr} に影響を及ぼさず (Cordes, *et al.*, 2005; Kuryshev, *et al.*, 2005)、hERG チャンネルの直接阻害作用を示さない。また、hESC-CM クラスターにおける MEA アッセイでも、10 μM まで FPD 延長作用を示さない (Hihara, *et al.*, 2014)。一方、ペンタミジンの 24 時間曝露時においては、濃度依存的に I_{Kr} が減少すること (IC_{50} : 5.1 μM) が報告されている (Kuryshev, *et al.*, 2005)。これらの *in vitro* におけるペンタミジンの I_{Kr} 阻害作用発現時間は、臨床所見とも一致している。

一方、ペンタミジンの長期曝露時 (10 μM での 24 から 48 時間曝露) は、hERG-HEK 細胞において hERG チャンネル蛋白の小胞体からの輸送が阻害され、hERG チャンネル蛋白のグリコシル化/成熟 hERG チャンネル蛋白発現が低下することが知られている (Dennis, *et al.*, 2012; Varkevisser, *et al.*, 2013)。そのため、ペンタミジンの hERG チャンネルへの作用機序は、hERG チャンネルトラフィック阻害作用と考えられている。

我々の hERG-CHO 細胞を用いた検討においても、ペンタミジンの 5 分間曝露時では 30 μM まで I_{Kr} に変化が認められず (図 7C)、24 時間曝露では、濃度依存的に I_{Kr} が低下すること (IC_{50} : 5 – 8 μM 、図 7D)、成熟 hERG チャンネル蛋白発現量の低下が確認された (図 8B)。また、hESC-CM を用いた MEA アッセイでは、曝露時間を延長することで明らかな cFPD 延長作用 (図 10D) が見られた。

17-AAG の作用に関する考察

ゲルダナマイシンのアナログである 17-AAG は、Hsp90 阻害薬である。ゲルダナマイシンは、Hsp90 シャペロン蛋白と hERG の複合体形成を阻害することで、hERG チャンネルのフォワードトラフィックを阻害することが知られており (Ficker, *et al.*, 2003)、QT 間

隔延長およびTdPリスクにつながる事が懸念されている (Dennis, *et al.*, 2007; Neckers and Workman, 2012)。

我々の hERG-CHO における検討でも、17-AAG の 24 時間曝露により、ゲルダナマイシンやペンタミジンと同様に、成熟あるいは未成熟 hERG チャネル蛋白の発現レベルの低下 (図 8B) ならびに、 I_{Kr} の減少が観察された。一方、hESC-CM を用いた MEA アッセイでは、17-AAG は 24 時間曝露までの経時的 cFPD 評価において、cFPD 延長作用を示さず、むしろ短縮作用を示した (図 10E)。これまで 17-AAG の臨床試験においては、無症候性の第 II 度の房室ブロックが 2 症例報告されているが QTc 延長作用や TdP の報告はない (Neckers and Workman, 2012; Solit, *et al.*, 2007)。そのため、hESC-CM において 17-AAG が cFPD 延長を示さなかった結果は、17-AAG が臨床試験において TdP リスクが低いことと一致している。すなわち、今回の hESC-CM を用いた MEA アッセイにおける両薬剤の hESC-CM の cFPD 延長作用の有無は、臨床的背景における TdP リスクの有無と相関する結果であった。

両薬剤の hERG チャネルへの作用機序

ペンタミジンと 17-AAG が成熟 hERG チャネル蛋白の発現を低下させる詳細な機序は、現在完全には解明されていない。ペンタミジンは Hsp70 および Hsp90 のシャペロン機能を阻害しないことが示されているため (Dennis, *et al.*, 2012)、17-AAG の主薬理作用 (Hsp90 阻害作用) は有さない。一方、アステミゾールやドフェチリドのような薬理的シャペロンは、ペンタミジンによって引き起こされるトラフフィキング阻害をキャンセルすることが知られており、ペンタミジンが薬理的シャペロンとして hERG チャネルに結合することによって hERG チャネルの成熟を阻害する可能性が示唆されている (Dennis, *et al.*, 2012; Varkevisser, *et al.*, 2013)。これまで、Hsp70、Hsp90、あるいはカルネキシンなどのシャペロン蛋白と hERG チャネル蛋白との相互作用が、hERG チャネルのグリコシル化に関与していることが示唆されている (Ficker, *et al.*, 2003; Gong, *et al.*, 2006)。実際に、Hsp90 阻害剤のゲルダナマイシンは、未成熟 hERG チャネル蛋白と Hsp90 との複合体形成を阻害し、hERG チャネル蛋白のユビキチン化を促進することによって、未成熟 hERG チャネルの分解を促進する (Ficker, *et al.*, 2003; Nogawa and Kawai, 2014)。

今回の hERG-CHO 細胞を用いた 5 分間曝露時の hERG 蛋白発現評価において、17-AAG は未成熟 hERG 蛋白発現量をわずかに低下させたが、成熟 hERG 蛋白発現量は低下させなかった。一方、Hsp90 阻害作用を有さないペンタミジンは、5 分間曝露では未成熟、成熟 hERG いずれの蛋白発現量にも影響を及ぼさなかった (図 8A)。細胞における hERG チャネル蛋白の半減期が約 17~18 時間 (Chen *et al.*, 2010) であることを考慮すると、17-AAG の 5 分間曝露で未成熟 hERG チャネル蛋白発現量のみが低下した現象は、17-AAG が hERG チャネル蛋白産生を抑制あるいは成熟 hERG チャネル蛋白の分解を促進したのではなく、未成熟 hERG チャネル蛋白の分解を促進した結果である可能性が示唆される。しかし、

Hsp90 阻害作用を有するゲルダナマイシンの 24 時間曝露では、hERG-HEK 細胞における未成熟 hERG-Flag 蛋白の発現量をわずかに増加させることが報告されており (Iwai *et al.*, 2013)、hERG-CHO における 17-AAG の 24 時間曝露時の我々の所見とは逆の結果である。この理由として、内在性 hERG 蛋白と Flag 標識 hERG 蛋白に対する Hsp90 阻害剤の結合・作用の違い、あるいは使用した細胞種の違い、または 17-AAG とゲルダナマイシンの off-target 作用の違いなどが影響を及ぼした可能性が考えられる。なお、未成熟 hERG チャネル蛋白に対するペンタミジンと 17-AAG の作用の違いからは、hESC-CM における cFPD 延長の有無を説明することはできない。両化合物やゲルダナマイシンとの作用の違いを理解するためには、17-AAG による hERG トラフィック阻害の正確な機序を解明することが重要である。

両薬剤の hERG チャネル以外の作用機序

上述した長時間曝露時の薬剤反応性 (cFPD 延長) の違いを説明する hERG チャネル以外の要因として、他のイオンチャネルに対する影響についても考慮すべきである。とくに、Nav1.5 または Cav1.2 の活性化型変異は、いずれも先天性 QT 延長症候群の原因遺伝子として知られており (Amin, *et al.*, 2010; Betzenhauser, *et al.*, 2015)、それらのイオンチャネルの阻害が QT/FPD 延長作用を相殺しうることが示唆されている (Kramer, *et al.*, 2013)。ペンタミジンの急性曝露では、モルモット単離心筋細胞 (Cordes, *et al.*, 2005) あるいは Nav1.5 強制発現 HEK293 細胞 (Kuryshev, *et al.*, 2005) において、Nav1.5 電流を 10 μM まで、あるいは Cav1.2 電流を $\leq 300 \mu\text{M}$ まで阻害しない、すなわち Nav1.5 または Cav1.2 への直接阻害作用を示さないことが報告されている。しかし、Nav1.5 または Cav1.2 に対するペンタミジンと 17-AAG の長期曝露による作用に関する報告はない。

そこで、我々は Nav1.5 あるいは Cav1.2 を過剰発現する HEK293 細胞を用いて、両薬剤の 24 時間曝露による Nav1.5、Cav1.2 電流への影響を予備的に検討したが、むしろペンタミジンが 30 μM で両チャネル電流に対して約 50% の阻害作用を示し、17-AAG では影響が認められなかった (Asahi, *et al.*, 2019)。現時点で、主要なイオンチャネル強制発現細胞における電流評価の結果によっても、両薬剤の hESC-CM における cFPD 延長作用有無の違いを説明することはできていない。

本研究の限界、今後の課題

結論として、我々の検討から、ペンタミジンと 17-AAG の両薬剤が hERG 強制発現細胞において hERG トラフィック阻害作用を示す一方で、hESC-CM においてはペンタミジンのみが TdP リスク (cFPD 延長) 陽性という臨床結果を反映した結果を示した。しかしながら、ペンタミジンと異なり 17-AAG が hESC-CM において cFPD 延長作用を示さない理由は解明できなかった。17-AAG はペンタミジンとは異なり、Nav1.5、Cav1.2 以外のイオンチャネル/トランスポーターの発現あるいは活性に影響を及ぼすことにより、細胞膜

における正味の電流/イオン電流平衡に影響しない可能性が考えられる。今後、より網羅的な心筋細胞膜上のチャネル/トランスポーターの発現/活性解析によって、17-AAG の作用機序が解明されることが期待される。また、ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた MEA アッセイにおいて、複数のトラフィック障害剤の FPD 評価を進めることにより、薬剤長期曝露時のトラフィック障害に関連する催不整脈リスクの判定に対する、本評価系の有用性に関するさらなる知見が積まれることが期待される。

第四章 総括

第二章のマルチイオンチャネル阻害剤を用いたヒト ES 細胞由来心筋細胞の MEA ライン実験では、興奮伝導とそのゆらぎ、あるいは FPD のゆらぎを組み合わせることにより、従来の FPD 単独評価では陽性の判定が難しいとされるテルフェナジンをはじめ、各薬剤の TdP 作用を高い精度で予測できる可能性が示された。さらに、第三章の MEA クラスタモデルによる薬剤長期曝露の実験では、hERG チャネルトラフィック阻害作用を有するが TdP リスクの異なるペンタミジンと 17-AAG について、そのリスクを正しく予測できる可能性が示唆された。これらの 2 薬剤の TdP リスクは、現行の薬剤急性曝露時の hERG チャネル阻害/QT 間隔延長を指標とした評価では、正確に判別できない。これら一連の検証を通して、ヒト ES 細胞由来心筋細胞を用いて、適切な実験モデルおよび薬剤曝露時間を設定し、電気生理学的パラメーターを解析することにより、従来の試験法では判別できなかった薬剤の臨床での TdP リスク有無を正確に評価できる可能性が示された。

これらの結果から、本評価系では、ヒトの心筋イオンチャネルへの作用の総合的な評価に加えて、QT 間隔延長のみならず興奮伝導の異常を含めた催不整脈作用の評価、長期曝露時の催不整脈作用の評価が可能であると考えられる。そのため、本評価系を非臨床試験の心毒性評価に追加することにより、hERG チャネル阻害/QT 間隔延長作用を指標とした現行の ICH ガイドライン S7B の課題を解決すること、ならびに ICH ガイドライン E14 のヒト心電図 QT/QTc 評価の代替となりうることが期待される。

図表

| | 試験内容 | 評価項目（代表例） |
|----------------|--------------------------------------|----------------------------|
| S7B ガイ ドライン | <i>in vitro</i> I _{Kr} 試験 | hERG 強制発現細胞を用いた電流測定 |
| | <i>in vivo</i> QT 試験 | 主にイヌ・サルを用いた心電図 QT 間隔測定 |
| | フォローアップ試験 | 摘出心臓（心筋）標本や麻酔動物における心室再分極測定 |
| E14 ガイ ドライン | ヒト QT/QTc 試験 (thorough QT/QTc 試験) | 臨床試験における心電図 QT/QTc 測定 |

表 1. ICH ガイドライン S7B、E14 においてそれぞれ実施される試験と代表的な評価項目

In vitro I_{Kr} 測定では、hERG チャンネル強制発現細胞を用いて hERG カリウムチャンネル電流 (I_{Kr}) が評価される。*In vivo* QT 測定では、実験動物を用いた心電図 QT 間隔が評価される。非臨床試験間でデータが一致しない場合や臨床試験と非臨床試験の結果が異なる場合に、両者の矛盾の原因を理解するために、データの再評価や非臨床フォローアップ試験を行うことができる。ヒト QT/QTc 測定では、ヒト心電図 QT/QTc 間隔が評価される。表は独立行政法人医薬品医療機器総合機構の ICH ガイドライン S7B (<https://www.pmda.go.jp/files/000156281.pdf>) および E14 (<https://www.pmda.go.jp/files/000156160.pdf>) を参考に作成。

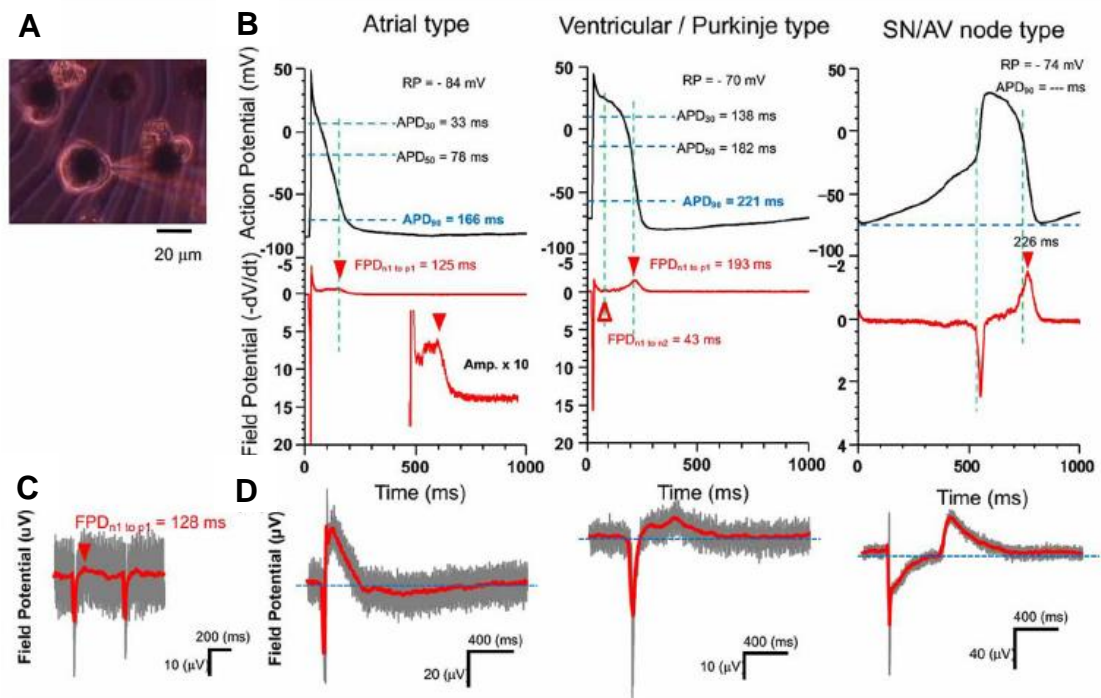


図 1. 単離心筋細胞(ヒト ES 細胞由来)における field potential (FP)および action potential (AP)の相関関係

(A) Multi-electrode array (MEA)チップ上でパッチクランプ電極を刺入されている細胞の一例。10 μm の細胞外電極により field potential (FP)を記録し、パッチクランプ法により Action Potential (AP)を記録している。

(B) 3 種の単離心筋細胞 (左：心室筋、中央：心室筋、右：洞結節) の AP 波形の代表例および各 AP 波形の微分波形(-dV/dt)。

(C) MEA の電極における単離心筋細胞の FP 波形。

(D) 実測 FP 波形のさまざまな例。左からそれぞれ、(B)の微分波形と類似した波形を示す。

(Asahi *et al.*, 2018, Sci Rep の Fig. 2 から改変)

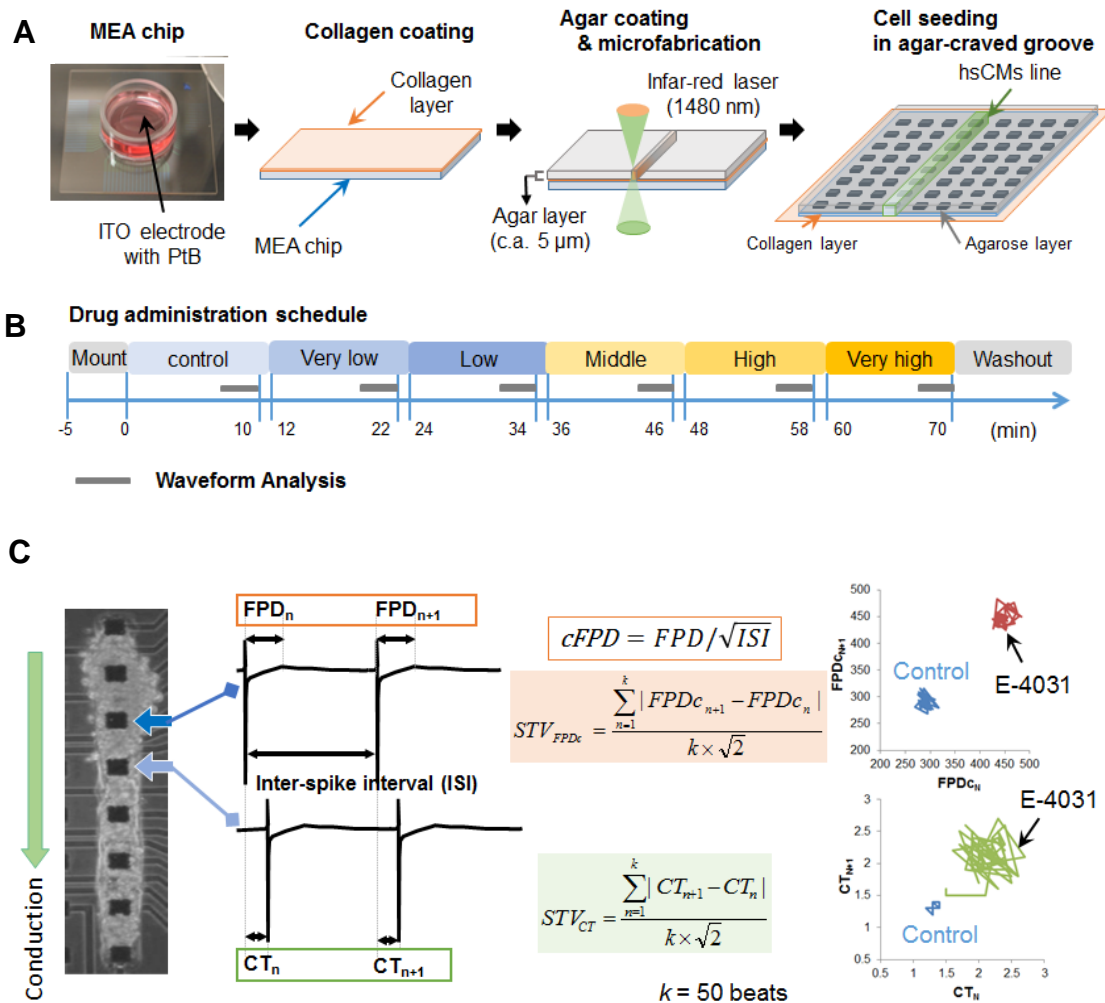


図 2. 実験概要および実験方法を示す模式図

(A) MEA ラインモデルの構築方法。

(B) 投薬と解析に関する実験スケジュール。

(C) MEA ラインモデルでの記録波形と各パラメーターの算出方法。cFPD (corrected FPD): FPD を Bazzet 補正式により補正したもの。CT (conduction time): MEA 上の電極間のメインピーク (Na⁺の内向き電流により形成) の電極間の時間差。STV (short-term variability): 1 拍ごとのバラつきの大きさを示す。右のグラフは、vehicle control および 1 μM E-4031 曝露時の、上: cFPD、下: CT の Poincaré プロットの代表的な例。

(図は Asahi *et al.*, 2018, Sci Rep の Fig. 2 を改変)

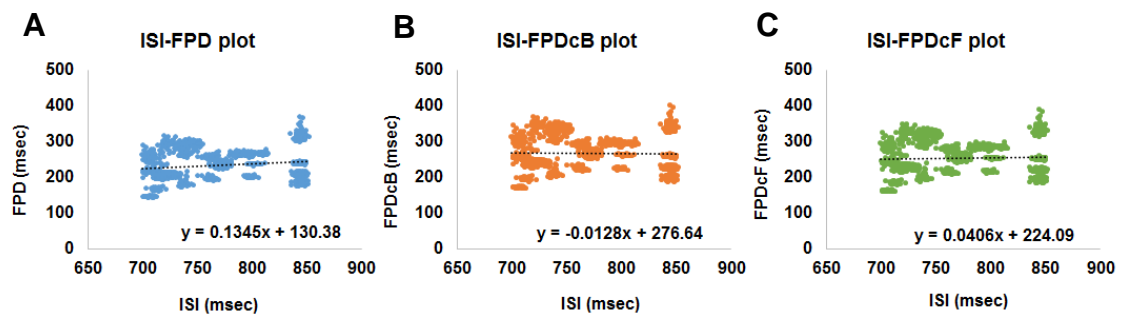


図 3. FPD あるいは補正 FPD (cFPD) と inter-spike interval (ISI) の相関関係

(A) ISI と FPD の scatter プロット。

(B) ISI と Bazzet の補正式による cFPD (FPDcB) の scatter プロット。

(C) ISI と Fridericia の補正式による cFPD (FPDcF) の scatter プロット。

(A)~(C)は Vehicle コントロール (n=9) の全てのデータをプロットした。Bazzet および Fridericia の各補正式は、それぞれ $FPD/(ISI \text{ sec})^{1/2}$ 、 $FPD/(ISI \text{ sec})^{1/3}$ である。Bazzet の補正式において、直線の傾きが最も 0 に近いこと、すなわち、拍動間の時間間隔による FPD への影響が補正されていることがわかる。

(図は Asahi *et al.*, 2018, Sci Rep の Fig. 3 を改変)

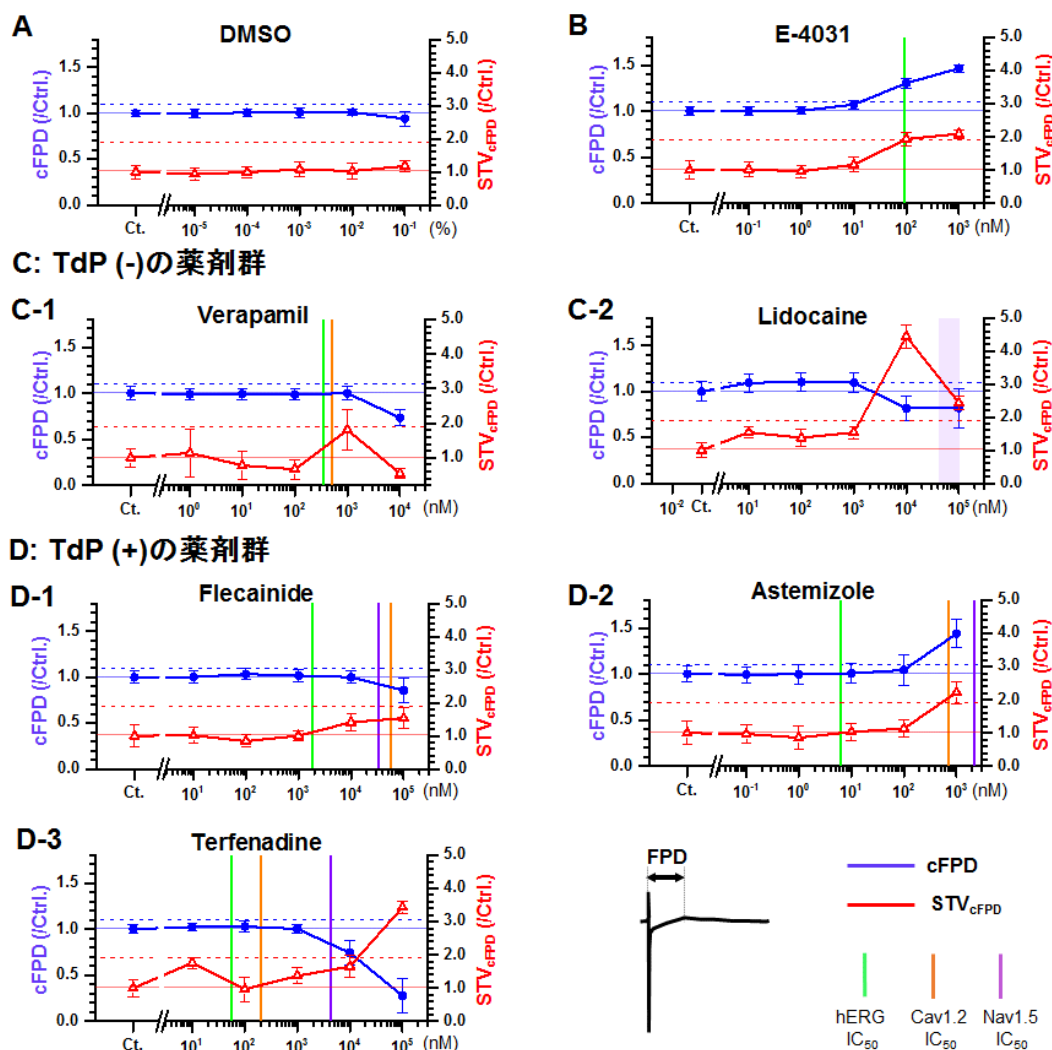


図 4. MEA ラインモデルを用いた、FPD 及び STV_{cFPD} に対する各薬剤の作用の評価

Bazett の補正式を用いて FPD を拍動間隔 (ISI) によって補正した cFPD (青線) と cFPD の一拍ごとのゆらぎ (STV_{cFPD}, 赤線) について、薬剤曝露前のコントロール値を対照として示す (mean ± S.E.M.)。薬剤は DMSO (A)、E-4031 (B)、ベラパミル (C-1)、リドカイン (C-2)、フレカイニド (D-1)、アステミゾール (D-2)、テルフェナジン (D-3)。10 % cFPD 延長(cFPD >1.1)および 90% STV_{cFPD} 増加(STV_{cFPD} >1.9)の基準をそれぞれ青色または赤破線で示す((設定根拠: 先行研究 (Kaneko, *et al.*, 2014) で用いたテルフェナジンが vehicle コントロールに対して有意な変化を示した際の変動率))。縦線は、各薬剤の単一チャネル発現細胞における hERG IC₅₀ (緑線)、Cav1.2 IC₅₀ (橙線)、Nav1.5 IC₅₀ (紫線/紫枠)の値を示す。E-4031 やアステミゾールの様に hERG チャネルを単独阻害する濃度域を持つ薬剤群では、STV_{cFPD} の増加を伴う FPD の延長がみられたが、hERG チャネルと Ca チャネル阻害作用を近似の濃度域で併有する薬剤では、STV_{cFPD} の増加を伴う FPD の短縮がみられた。(図は Asahi *et al.*, 2018, Sci Rep の Fig. 4 を改変)

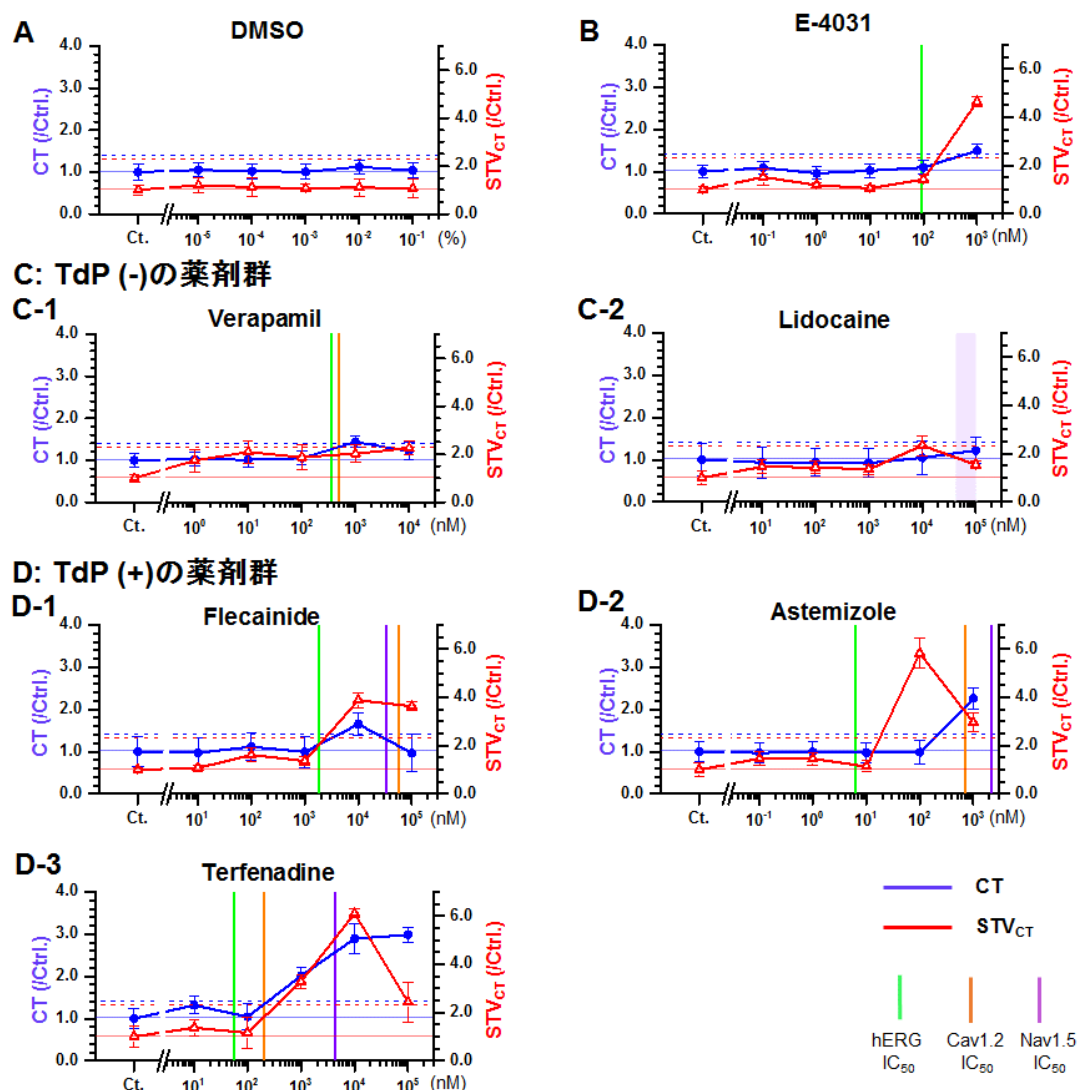
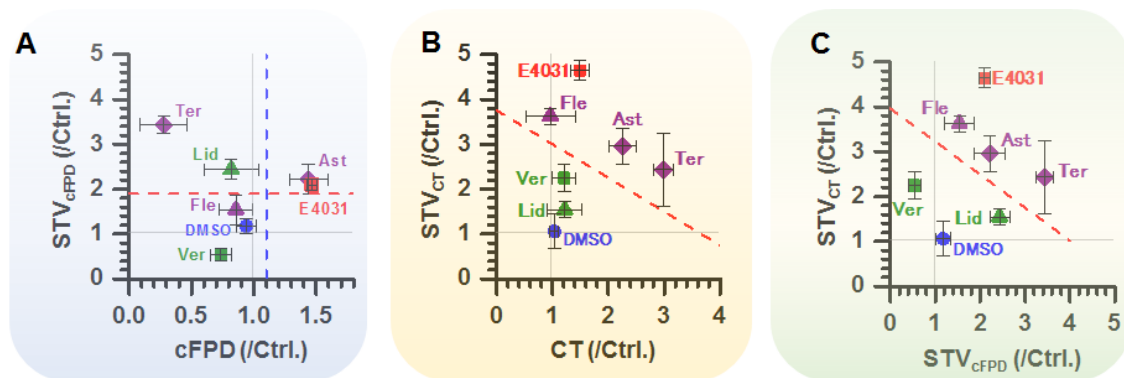


図 5. MEA ラインモデルを用いた興奮伝導 (CT 及び STV_{CT}) に対する各薬剤の作用の評価
 CT (青線) と CT の一拍ごとのゆらぎ (STV_{CT} , 赤線) について、薬剤曝露前のコントロール値を対照として示す (mean \pm S.E.M.)。薬剤は DMSO (A)、E-4031 (B)、ベラパミル (C-1)、リドカイン (C-2)、フレカイニド (D-1)、アステミゾール (D-2)、テルフェナジン (D-3)。40% CT 上昇率 ($CT > 1.4$) と 130% STV_{CT} 上昇率 ($STV_{CT} > 2.3$) をそれぞれ青または赤破線で示す (設定根拠: 先行研究 (Kaneko, *et al.*, 2014) で用いたテルフェナジンが vehicle コントロールに対して有意な変化を示した際の変動率)。縦線は、各薬剤の hERG IC_{50} (緑線)、Cav1.2 IC_{50} (オレンジ線)、Nav1.5 IC_{50} (紫線/紫棒) を示す。CT は Nav1.5 チャンネル阻害作用を有する薬剤群で Nav1.5 IC_{50} の濃度付近で増大した。また、 STV_{CT} は Nav1.5 チャンネル抑制作用を有する薬剤群だけでなく、E-4031 による hERG チャンネル阻害剤によっても増大した。

(図は Asahi *et al.*, 2018, Sci Rep の Fig. 5 を改変)



【TdPリスク(+)]

E-4031 (hERG blocker)
Astemizole (multi-channel blocker)
Flecainide (multi-channel blocker)
Terfenadine (multi-channel blocker)

【TdPリスク(-)]

Verapamil (hERG and Cav1.2 blocker)
Lidocaine (Nav1.5 blocker)

図 6. MEA ラインモデルにおける cFPD、CT、それらのゆらぎの間の相関関係、各薬剤の最高濃度における値のプロット

(A) cFPD と STV_{cFPD} のプロット。

(B) CT と STV_{CT} のプロット。

(C) STV_{cFPD} と STV_{CT} プロット。

Ast: アステミゾール、Fle: フレカイニド、Lid: リドカイン、Ter: テルフェナジン、Ver: ベラパミル。(B)および(C)のグラフ中の直線の傾き及び切片は、陰性あるいは陽性の各薬剤データのうち、直線に最も近い点と直線との距離が最大になるように算出した。cFPD、STV_{cFPD}、CT それぞれ単独パラメーターでは偽陽性あるいは偽陰性の判定となる薬剤がある。一方、STV_{CT} では全ての薬剤について TdP リスクを判定可能である。CT と STV_{CT} (B)、あるいは STV_{cFPD} と STV_{CT}(C)を組み合わせることで、より明確に TdP リスクを判定することが可能である。(図は Asahi *et al.*, 2018, Sci Rep の Fig. 6 を改変)

| Drug | Concentration (nM) | n | cFPD (ms) | STV _{cFPD} (ms) | CT (ms) | STV _{CT} (ms) | ISI (s) | Arrest | ETPC (unbound) (nM) ^{ref. 21, 70} | IC ₅₀ (nM) ^{ref. 47} |
|-------------|--------------------|----|-----------|--------------------------|------------|------------------------|-------------|--------|--|--|
| DMSO | Ctrl. | 9 | 288 ± 28 | 50 ± 31 | 1.2 ± 0.7 | 0.57 ± 0.33 | 0.76 ± 0.04 | | | |
| | 0.10% | 9 | -0.51% | -6.70% | 4.90% | 20% | -3.50% | | | |
| | 0.20% | 9 | 0.77% | -1.20% | 2.20% | 12% | -4.80% | | n.d. | n.d. |
| | 0.30% | 9 | 0.75% | 7.70% | 0.38% | 7.50% | -5.10% | | (n.d.) | |
| | 0.40% | 9 | 1.10% | 2.30% | 12% | 11% | -5.20% | | | |
| | 0.50% | 9 | -6.00% | 18% | 3.70% | 6.20% | -7.50% | | | |
| Astemizole | Ctrl. | 5 | 250 ± 47 | 38 ± 30 | 1.4 ± 0.7 | 0.62 ± 0.41 | 0.75 ± 0.06 | | | |
| | 0.1 | 5 | -0.71% | -2.80% | -3.30% | 46% | -1.90% | | | |
| | 1 | 5 | 0.24% | -14% | -0.99% | 46% | -5.40% | | 5.5-7.9 | hERG: 6.3 |
| | 10 | 5 | 0.69% | 3.50% | -3.00% | 13% | -5.90% | | (0.2-0.26) | Nav1.5: 2,200 |
| | 100 | 5 | 4.40% | 14% | -1.40% | 483% | -5.30% | | | Cav1.2: 700 |
| | 1000 | 3 | 44% | 122% | 126% | 196% | 3.10% | 2/5 | | |
| E-4031 | Ctrl. | 13 | 266 ± 41 | 58 ± 59 | 1.6 ± 0.9 | 0.49 ± 0.21 | 0.79 ± 0.11 | | | |
| | 0.1 | 13 | 0.52% | 2.90% | 8.90% | 52% | -2.50% | | | |
| | 1 | 13 | 0.69% | -3.60% | -4.30% | 19% | -3.70% | | 3.5 | hERG: 91 |
| | 10 | 13 | 7.10% | 17% | 2.10% | 5.70% | -4.20% | | (1.09) | Nav1.5: >1,000 |
| | 100 | 13 | 30% | 94% | 10% | 43% | -4.70% | | | Cav1.2: n.d. |
| | 1000 | 12 | 47% | 110% | 49% | 3364% | -5.10% | 1/13 | | |
| Flecainide | Ctrl. | 4 | 223 ± 30 | 31 ± 22 | 0.7 ± 0.5 | 0.37 ± 0.08 | 1.03 ± 0.10 | | | |
| | 10 | 4 | 0.13% | 1.4% | -3.20% | 7.00% | -2.50% | | | hERG: 1,800 |
| | 100 | 4 | 3.40% | -16% | 12% | 61% | -3.70% | | 483-2,413 ^{ref. 72} | Nav1.5: 34,000 |
| | 1000 | 4 | 1.80% | 0.32% | -0.65% | 36% | -4.20% | | | Cav1.2: 56,000 |
| | 10000 | 4 | 0.11% | 41% | 65% | 288% | -4.70% | | | |
| | 100000 | 3 | -14% | 54% | -3.60% | 263% | -5.10% | 1/4 | | |
| Lidocaine | Ctrl. | 4 | 250 ± 54 | 24 ± 11 | 1.0 ± 0.77 | 0.73 ± 0.38 | 1.03 ± 0.17 | | | |
| | 10 | 4 | 9.50% | 54% | -6.4% | 46% | -3.40% | | 5,970-25,603 ^{ref. 73} | hERG: n.d. |
| | 100 | 4 | 10% | 38% | -6.00% | 43% | -4.20% | | | Nav1.5: 42,000- |
| | 1000 | 4 | 9.70% | 54% | -7.40% | 35% | -2.60% | | (1,804-7,732 ^{ref. 74}) | 108,000 ^{ref. D} |
| | 10000 | 4 | -18% | 345% | 4.70% | 134% | 128% | | | Cav1.2: n.d. |
| | 100000 | 4 | -18% | 143% | 22% | 54% | 160% | | | |
| Terfenadine | Ctrl. | 7 | 273 ± 34 | 58 ± 41 | 1.7 ± 1.1 | 1.3 ± 1.5 | 0.80 ± 0.12 | | | |
| | 10 | 7 | 2.30% | 76% | 32% | 37% | -4.00% | | | |
| | 100 | 7 | 2.80% | -3.40% | 4.00% | 16% | -2.00% | | 3.3-9.7 | hERG: 55 |
| | 1000 | 7 | 0.25% | 37% | 101% | 228% | 3.10% | | (0.1-0.29) | Nav1.5: 4,400 |
| | 10000 | 4 | -26% | 65% | 189% | 511% | 122% | 3/7 | | Cav1.2: 200 |
| | 100000 | 2 | -73% | 243% | 198% | 143% | 744% | 2/4 | | |
| Verapamil | Ctrl. | 4 | 251 ± 37 | 29 ± 16 | 0.9 ± 0.3 | 0.36 ± 0.11 | 0.91 ± 0.12 | | | |
| | 1 | 4 | -1.10% | 14% | 2.40% | 73% | -0.97% | | | hERG: 350 |
| | 10 | 4 | -0.74% | -22% | 0.86% | 109% | -3.40% | | 250-810 | Nav1.5: 66,800 |
| | 100 | 4 | -1.50% | -33% | 4.80% | 87% | -4.30% | | (25-81) | Cav1.2: 500 |
| | 1000 | 4 | 0.10% | 81% | 43% | 103% | -16% | | | |
| | 10000 | 3 | -27% | -47% | 21% | 125% | -21% | 1/4 | | |

表 2. 各薬剤の MEA ラインモデルにおける cFPD、STV_{cFPD}、CT、STV_{CT}、ISI、arrest のまとめ

ETPC: 臨床における有効血漿中濃度、IC₅₀: 各イオンチャネル (hERG、Nav1.5、Cav1.2) に対する薬剤によるイオンチャネル電流 50%阻害値。

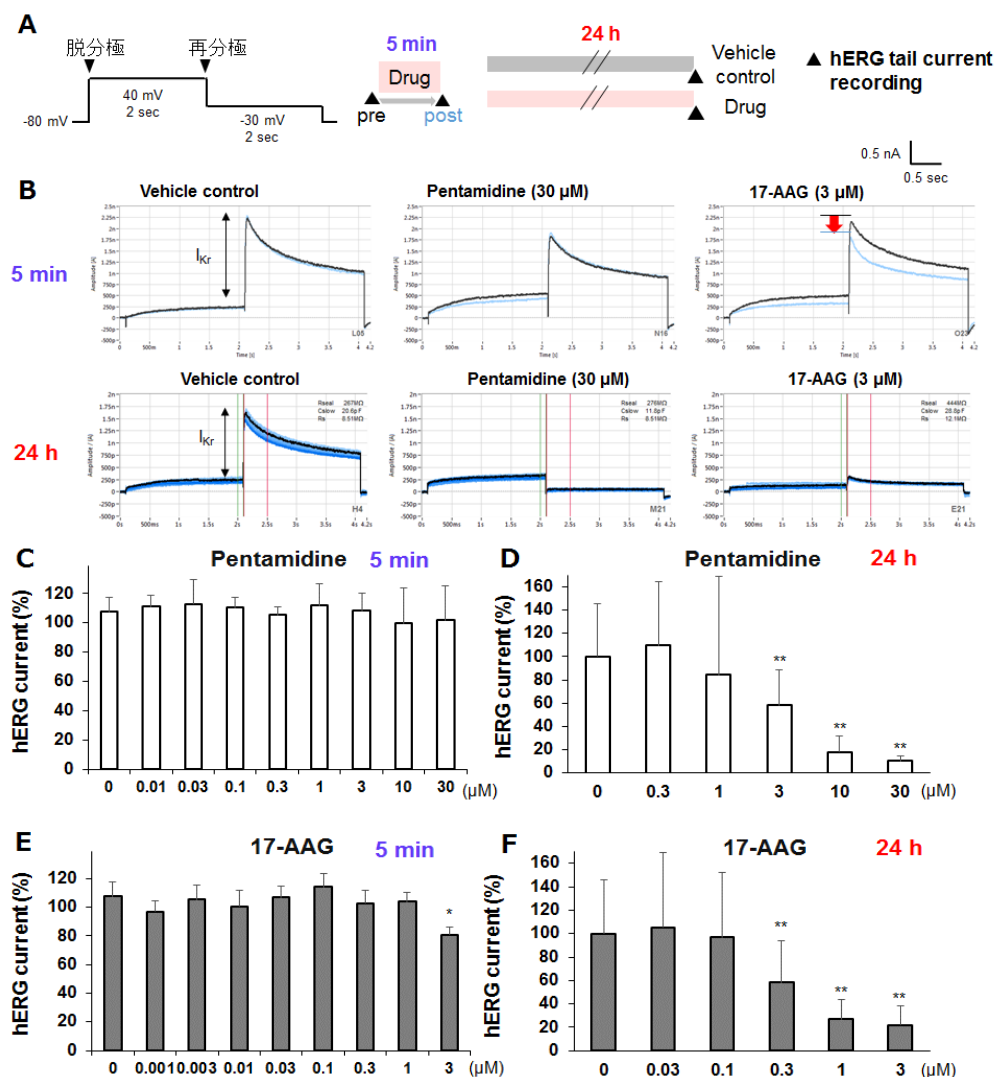


図 7. hERG チャンネル強制発現 CHO 細胞 (hERG-CHO) に対する薬剤 5 分間または 24 時間曝露による hERG カリウムチャンネル電流 (I_{Kr}) 評価

(A) population patch clamp 法における電位プロトコールおよび I_{Kr} 測定スケジュール。

(B) 代表的な I_{Kr} 波形。5 分間曝露では薬剤曝露前 (黒線)、薬剤処理後 (青線)、24 時間曝露では複数回記録される電流を重ねて表示している。

(C) 5 分間曝露前の電流値に対するペンタミジン曝露後の電流の相対値。

(D) 24 時間曝露後の vehicle control の電流値に対するペンタミジンの電流の相対値。

(E) 5 分間曝露前の電流値に対する 17-AAG の曝露後の電流の相対値。

(F) 24 時間曝露後の vehicle control の電流値に対する 17-AAG の電流の相対値

mean + S.D., %. n=59 (vehicle control)、n=5–12 (薬剤 5 分間曝露時) n=17–60 (薬剤 24 時間曝露時)。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ vs control。

(図は Asahi *et al.*, 2019, *Eur J Pharmacol* の Fig. 1 を改変)

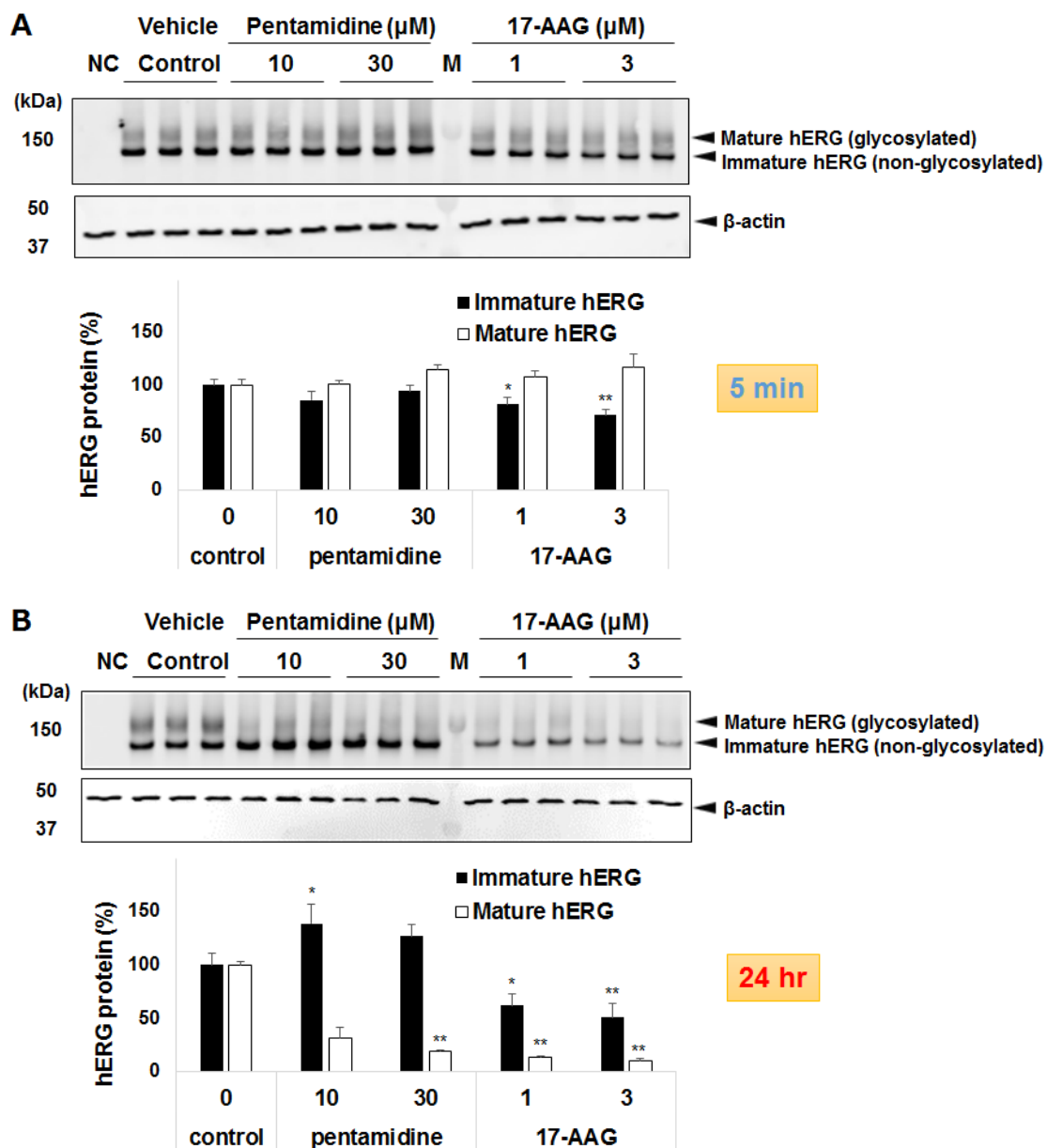


図 8. hERG チャンネル強制発現 CHO 細胞における Western blotting による hERG チャンネル蛋白発現評価

(A) 5 分間曝露後の vehicle control の電流値に対するペンタミジンおよび 17-AAG の電流の相対値。

(B) 24 時間曝露後の vehicle control の電流値に対するペンタミジンおよび 17-AAG の電流の相対値。

NC レーンには CHO 親株を泳動した。135 kDa 付近の immature hERG および 155 kDa 付近の mature hERG について、各時点の vehicle control に対する発現量 (mean + S.D., %, n=3) を示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control。

(図は Asahi *et al.*, 2019, *Eur J Pharmacol* の Fig. 2 を改変)

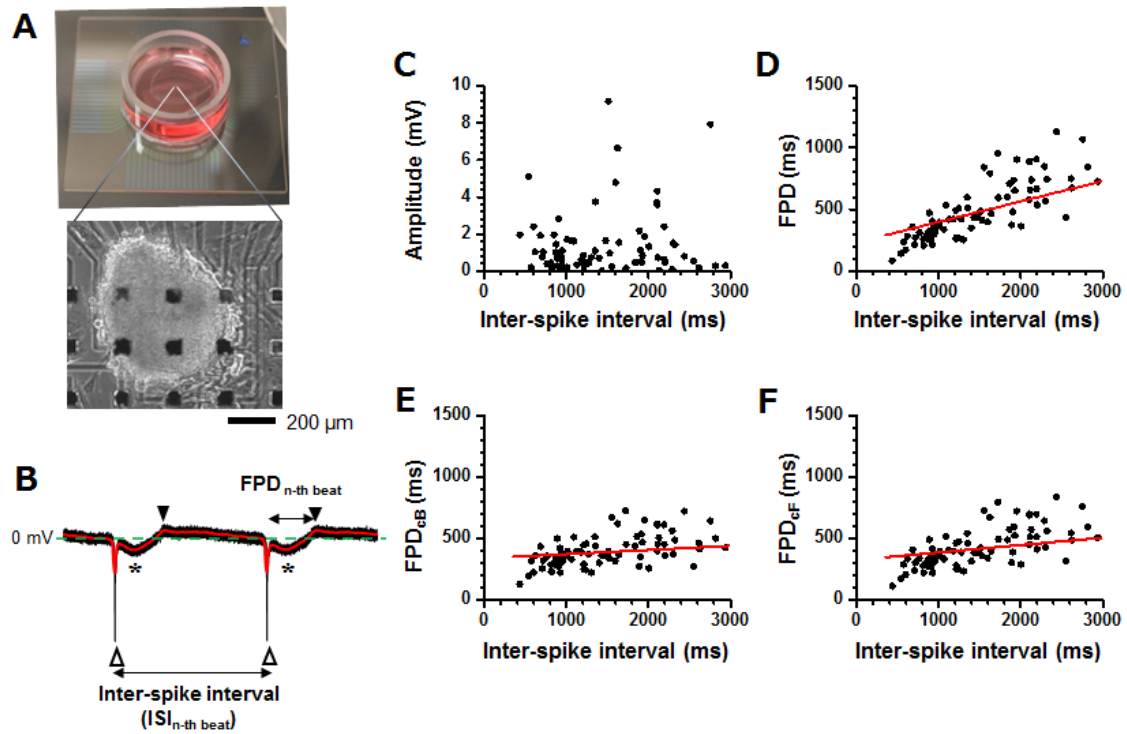


図 9. MEA における hESC-CM の電気生理学的解析

- (A) MEA チップ上の hESC-CM のフェーズコントラストでの鏡検像。Bar: 200 μm 。
 (B) hESC-CM の MEA による細胞外電位の代表的波形。白矢印で示す脱分極ピークと黒矢印で示す再分極ピークの間隔が FPD (field potential duration)。Inter-spike interval (ISI) は隣接する 2 つのチャンネル間の脱分極ピークの時間差、field potential duration (FPD) は同一チャンネル中の脱分極ピークから再分極ピークまでの時間差で定義される。
 (C) 脱分極ピーク振幅と ISI の相関関係。
 (D) FPD (ms) と ISI (ms) の相関関係。
 (E) Bazett (FPD_{cB}) と ISI の相関関係。
 (F) Friderica の補正式による補正 FPD (FPD_{cF}) と ISI の相関関係。
 (D)、(E)、(F) のそれぞれのデータから得られる直線 (赤線) の傾きは、それぞれ 0.17 ($R^2 = 0.727$), 0.034 ($R^2 = 0.201$), and 0.060 ($R^2 = 0.378$) であり、(E) の Bazett の補正式により、最も補正がなされることがわかる。

(図は Asahi *et al.*, 2019, *Eur J Pharmacol* の Fig. 3 を改変)

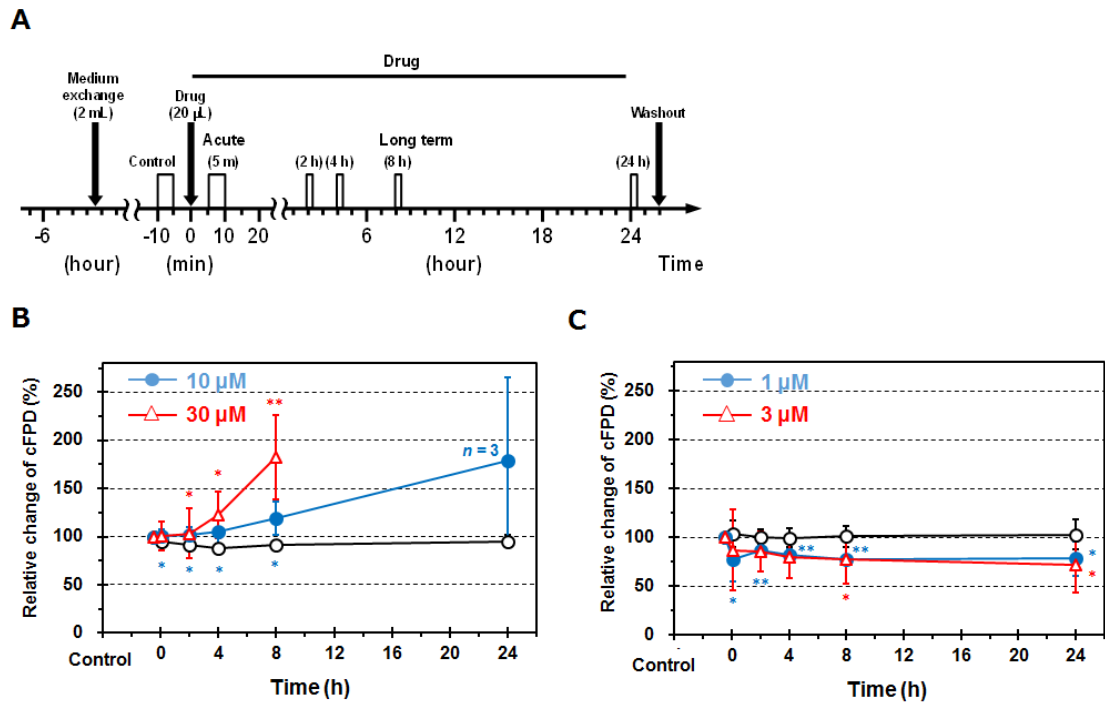


図 10. hESC-CM の MEA クラスターモデルにおける cFPD 評価

(A) 実験スケジュール。白ボックスで示す時点で細胞外電位を 5 分間記録した。

(B) Vehicle コントロールおよびペンタミジン (10, 30 μM) の経時的曝露 (5 分、2、4、8、24 時間) における、曝露前値に対する相対的な cFPD 値。

(C) Vehicle コントロールおよび 17-AAG (1, 3 μM) の経時的曝露 (5 分、2、4、8、24 時間) における、曝露前値に対する相対的な cFPD 値。

% pre-treatment control, mean ± S.D., n=6. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs time-matched control. ペンタミジン 30 μM の 24 時間曝露では、拍動停止のためデータなし。

(図は Asahi *et al.*, 2019, *Eur J Pharmacol* の Fig. 4, 5 を改変)

参考文献

- Almroth, *et al.*, 2011. The safety of flecainide treatment of atrial fibrillation: long-term incidence of sudden cardiac death and proarrhythmic events. *J. Intern. Medicine.* 270, 281–290.
- Amin, *et al.*, 2010. Cardiac sodium channelopathy, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 460, 223–237.
- Ando, *et al.*, 2017. A new paradigm for drug-induced torsadogenic risk assessment using human iPS cell-derived cardiomyocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 84, 111-127.
- Betzenhauser, *et al.*, 2015. Calcium channel mutations in cardiac arrhythmia syndromes. *Curr. Mol. Pharmacol.* 8, 133–142.
- Bibler, *et al.*, 1988. Recurrent ventricular tachycardia due to pentamidine-induced cardiotoxicity. *Chest.* 94, 1303–1306.
- Blinova, *et al.*, 2017. Comprehensive Translational Assessment of Human-Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes for Evaluating Drug-Induced Arrhythmias. *Toxicol. Sci.* 155, 234–247.
- Blinova, *et al.*, 2018. International multisite study of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug proarrhythmic potential assessment. *Cell Rep.* 24, 3582-3592.
- Braam, *et al.*, 2010. Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res.* 4, 107–116.
- Brown, 2004. Drugs, hERG and sudden death. *Cell Calcium.* 35, 543-7.
- Chen, *et al.*, 2010. Post-transcriptional control of human ether-a-go-go-related gene potassium channel protein by alpha-adrenergic receptor stimulation. *Mol. Pharmacol.* 78, 186–197.
- Clements, *et al.*, 2015. Bridging functional and structural cardiotoxicity assays using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for a more comprehensive risk assessment. *Toxicol. Sci.* 148, 241–260.
- Colatsky, *et al.*, 2016. The Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA)

- initiative - Update on progress. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 81, 15-20.
- Conte, *et al.*, 1986. Use of a specific and sensitive assay to determine pentamidine pharmacokinetics in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 154, 923–929.
- Cordes, *et al.*, 2005. Pentamidine reduces hERG expression to prolong the QT interval. *Br. J. Pharmacol.* 145, 15–23.
- Cubeddu, 2003. QT prolongation and fatal arrhythmias: a review of clinical implications and effects of drugs. *Am. J. Ther.* 10, 452–457.
- Cubeddu, 2016. Drug-induced inhibition and trafficking disruption of ion channels: pathogenesis of QT abnormalities and drug-induced fatal arrhythmias. *Curr. Cardiol. Rev.* 12, 141–154.
- de Git, *et al.*, 2013. Cardiac ion channel trafficking defects and drugs. *Pharmacol Ther.* 139, 24-31.
- Delisle, *et al.*, 2004. Biology of cardiac arrhythmias: ion channel protein trafficking. *Circ. Res.* 94, 1418–1428.
- Dennis, *et al.*, 2007. hERG channel trafficking: novel targets in drug-induced long QT syndrome. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1060–1063.
- Dennis, *et al.*, 2012. Molecular determinants of pentamidine-induced hERG trafficking inhibition. *Mol. Pharmacol.* 81, 198–209.
- Eisenhauer, *et al.*, 1994. Incidence of cardiac arrhythmias during intravenous pentamidine therapy in HIV-infected patients. *Chest.* 105, 389-95.
- Fermini, *et al.*, 2016. A new perspective in the field of cardiac safety testing through the comprehensive in vitro proarrhythmia assay paradigm. *J. Biomol. Screen.* 21, 1–11.
- Ficker, *et al.*, 2003. Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ. Res.* 92, e87–100.
- Furuhama, 2007. Toxicology assessment of fluoroquinolones: a case study. In Sietsema W K, Schwen R (ed.), *Nonclinical drug safety assessment: practical considerations for successful Registration.* FDA News. Falls Church, USA. 571-88.
- Gandhi, *et al.*, 2003. Fluconazole and levofloxacin induced torsades de pointes in an intensive care unit patient. *Am J Health Syst Pharm.* 60, 2479-83.

- Gintant, 2011. An evaluation of hERG current assay performance: Translating preclinical safety studies to clinical QT prolongation. *Pharmacol. Ther.* 129, 109–119.
- Giorgi, *et al.*, 2010. QT Interval Prolongation: Preclinical and Clinical Testing Arrhythmogenesis in Drugs and Regulatory Implications. *Curr. Drug Saf.* 5, 54–57.
- Girgis, *et al.*, 1997. A prospective study of the effect of I.V. pentamidine therapy on ventricular arrhythmias and QTc prolongation in HIV-infected patients. *Chest* 112, 646–653.
- Gong, *et al.*, 2006. Mechanisms of pharmacological rescue of trafficking-defective hERG mutant channels in human long QT syndrome. *J. Biol. Chem.* 281, 4069–4074.
- Harris, *et al.*, 2013. Comparison of Electrophysiological Data From Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes to Functional Preclinical Safety Assays. *Toxicol. Sci.* 134, 412–426.
- Heath, *et al.*, 2011. Translation of flecainide- and mexiletine-induced cardiac sodium channel inhibition and ventricular conduction slowing from nonclinical models to clinical. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 63, 258–268.
- Hinterseer, *et al.*, 2010. Usefulness of short-term variability of QT intervals as a predictor for electrical remodeling and proarrhythmia in patients with nonischemic heart failure. *The Am. J. Cardiol.* 106, 216–220.
- Hondeghem, *et al.*, 2011. Drug-induced QTC prolongation dangerously underestimates proarrhythmic potential: Lessons from terfenadine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57, 589–597.
- Iwai, *et al.*, 2013. Hsp90 prevents interaction between CHIP and HERG proteins to facilitate maturation of wild-type and mutant HERG proteins. *Cardiovasc. Res.* 100, 520–528.
- Izumi-Nakaseko, *et al.*, 2017. Characterization of human iPS cell-derived cardiomyocyte sheets as a model to detect drug-induced conduction disturbance. *The J. of Toxicol. Sci.* 42, 183–192.
- Jha, 1983. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 167–170.
- John, *et al.*, 2012. Ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *The Lancet.*

380, 1520–1529.

Kadota, *et al.*, 2012. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J.* 34 (15), 1147-1156.

Kanda, *et al.*, 2018. Development of torsadogenic risk assessment using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Japan iPS Cardiac Safety Assessment (JiCSA) update. *J Pharmacol Sci.* 138, 233-239.

Kaneko, *et al.*, 2014. On-chip in vitro cell-network pre-clinical cardiac toxicity using spatiotemporal human cardiomyocyte measurement on a chip. *Sci Rep.* 4, 4670.

Kim, *et al.*, 2019; Scaling and correlation properties of RR and QT intervals at the cellular level. *Sci Rep.* 9, 3651.

Kitaguchi, *et al.*, 2016. 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.

Kramer, *et al.*, 2013. MICE models: Superior to the HERG model in predicting torsade de pointes. *Sci Rep.* 3, 2100

Kuryshv, *et al.*, 2005. Pentamidine-induced long QT syndrome and block of hERG trafficking. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 316–323.

Lavery, *et al.*, 2011. How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines? *Br. J. Pharmacol.* 163, 675–693.

Levine, *et al.*, 1989. Mechanisms and risk factors for proarrhythmia with type Ia compared with Ic antiarrhythmic drug therapy. *Circulation.* 80:1063–1069.

Morganroth and Goin, 1991. Quinidine-related mortality in the short-to-medium-term treatment of ventricular arrhythmias. *A meta-analysis. Circ.* 84, 1977–83.

Nalos, *et al.*, 2011. Comparison of the hERG current blockers moxifloxacin, dofetilide and E-4031 in five screening models of pro-arrhythmia reveals lack of specificity of isolated cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.* 165, 467–478.

Nalos, *et al.*, 2012. Comparison of the IKr blockers moxifloxacin, dofetilide and E-4031 in five screening models of pro-arrhythmia reveals lack of specificity of isolated cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.* 165, 467–478.

- Neckers and Workman, 2012. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res.* 18, 64–76.
- Nogawa and Kawai, 2014. hERG trafficking inhibition in drug-induced lethal cardiac arrhythmia. *Eur. J. Pharmacol.* 741, 336–339.
- Nomura, *et al.*, 2011. On-chip constructive cell-network study (II): on-chip quasi-in vivo cardiac toxicity assay for ventricular tachycardia/fibrillation measurement using ring-shaped closed circuit microelectrode with lined-up cardiomyocyte cell network. *J. Nanobiotech.* 9, 39.
- Norström, *et al.*, 2006. Molecular and pharmacological properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Exp. Biol. Med.* 231, 1753–1762.
- Nozaki, *et al.*, 2014. Availability of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in assessment of drug potential for QT prolongation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278, 72–77
- Nozaki, *et al.*, 2016. 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-. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 77, 75-86.
- Osadchii, 2014. Effects of Na⁺ channel blockers on extrasystolic stimulation-evoked changes in ventricular conduction and repolarization. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 63, 240–251.
- Paltoo, *et al.*, 2001. Levofloxacin induced polymorphic ventricular tachycardia with normal QT interval. *PACE.* 24, 895-7.
- Penniman *et al.*, 2010. Assessing use-dependent inhibition of the cardiac Na current (INa) in the PatchXpress automated patch clamp. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 62(2): 10718.
- Ponti, *et al.*, 2002. Safety of non-antiarrhythmic drugs that prolong the QT interval or induce torsade de pointes: an overview. *Drug safety: an international journal of medical toxicology and drug experience.* 25, 263–286.
- Rosati and McKinnon, 2004. Regulation of ion channel expression. *Circ. Res.* 94, 874–883.
- Sager, *et al.*, 2014. Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: a meeting

report from the Cardiac Safety Research Consortium. *Am Heart J.* 167, 292-300.

Samaha, 1999. QTc interval prolongation and polymorphic ventricular tachycardia in association with levofloxacin. *Am J Med.* 107, 528-9.

Sartipy and Björquist, 2011. Human pluripotent stem cell-based models for cardiac and hepatic toxicity assessment. *Stem Cells.* 29, 744–748.

Sirenko, *et al.*, 2013. Multiparameter in vitro assessment of compound effects on cardiomyocyte physiology using iPSC cells. *J. Biomol. Screen.* 18, 39–53.

Skibsbjerg and Ravens, 2016. Mechanism of proarrhythmic effects of potassium channel blockers. *Card. Electrophysiol. Clin.* 8, 395–410.

Solit, *et al.*, 2007. Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 1775–1782.

Stams, *et al.*, 2016. Beat-to-Beat Variability in Preload Unmasks Latent Risk of Torsade de Pointes in Anesthetized Chronic Atrioventricular Block Dogs. *Circ. J.* 80, 1336–1345.

Suzuki, *et al.*, 2011. Stepwise pattern modification of neuronal network in photo-thermally-etched agarose architecture on multi-electrode array chip for individual-cell-based electrophysiological measurement. *Lab Chip.* 5, 241–247.

Synnergren, *et al.*, 2008. Molecular Signature of Cardiomyocyte Clusters Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 26, 1831–1840.

Takasuna *et al.*, 2017. Comprehensive in vitro cardiac safety assessment using human stem cell technology: Overview of CSAHi HEART initiative. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 83, 42–54.

Tanaka, *et al.*, 2009. In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 497–502.

Varkevisser, *et al.*, 2012. Beat-to-beat variability of repolarization as a new biomarker for proarrhythmia in vivo. *Heart Rhythm.* 9, 1718–1726.

Varkevisser, *et al.*, 2013. Structure-activity relationships of pentamidine-affected ion channel trafficking and dofetilide mediated rescue. *Br. J. Pharmacol.* 169, 1322–1334.

Wagner, *et al.*, 2015. Role of Sodium and Calcium Dysregulation in Tachyarrhythmias in Sudden Cardiac Death. *Circ. Res.* 116, 1956–1970.

- Wang, 2010. The role of microRNA in cardiac excitability. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 56, 460–470.
- Waring, *et al.*, 2015. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 475-486.
- Wharton, *et al.*, 1987. Torsade de pointes during administration of pentamidine isethionate. *Am. J. Med.* 83, 571–576.
- Woosley, *et al.*, 2001. Pharmacology, electrophysiology, and pharmacokinetics of mexiletine. *Am. Hear. J.* 107, 1058–1065.
- Wyman, *et al.*, 2004. Prevention of primary ventricular fibrillation in acute myocardial infarction with prophylactic lidocaine. *The Am. J. Cardiol.* 94, 545–551.
- Yamamoto, *et al.*, 2016. Electrophysiological characteristics of human iPSC-derived cardiomyocytes for the assessment of drug-induced proarrhythmic potential. *PLoS One.* 11(12): e0167348.
- Yamazaki, *et al.*, 2012. A novel method of selecting human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte clusters for assessment of potential to influence QT interval. *Toxicol in Vitro.* 26, 335–342.

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、早稲田大学先進理工学部 安田 賢二 教授、ならびに、東京大学大学院薬学系研究科 關野 祐子 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の推進にあたり、御尽力、御助言を賜りました法政大学生命科学部 金子 智行 教授、ならびに、野村 典正氏、浜田 智代氏、東京大学大学院薬学系研究科 澤田 光平 客員教授に深謝いたします。また、本研究の技術基盤の構築をいただくと共に研究遂行をご支援くださいました早稲田大学 重点領域研究機構、ならびに、**Waseda Bioscience Research Institute in Singapore (WABIOS)** の関係各位に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、直接のご指導を賜り、多くの知識や御助言をいただきました三分一所 厚司氏、Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社 高砂 浄氏、第一三共株式会社 阿部 泰之氏に心よりお礼申し上げます。また、細胞培養や電流測定にあたり、御協力を賜りました第一三共 RD ノバーレ株式会社 土居 正文氏、第一三共株式会社 坂倉 智子氏に深謝致します。

最後に、本研究の機会と御支援を与えてくださいました第一三共株式会社 高崎 渉 研究開発本部長、熊倉 誠一郎 研究統括部長、森 和彦 安全性研究所長、杉立 収寛 スペシャルティ第一研究所長、高石 巨澄 スペシャルティ第一研究所第一グループ長に深く感謝いたします。そして、私の研究を支えてくださいました第一三共株式会社 研究開発本部の関係各位、ならびに、博士号取得に対し理解し協力してくれた家族に心より感謝の意を表します。