

## 論文の内容の要旨

論文題目 **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**

氏名 朝日 結実子

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、その心毒性のうち、致死性不整脈（主に Torsades de Pointes: TdP）が全体の約 3 割を占める。そのため、TdP の発生を予測し回避することが、新薬開発において極めて重要な課題である。TdP の発生前には、ヒト心電図で QT 間隔延長が認められ、QT 間隔延長の主機序は心筋細胞膜に発現している hERG (human ether-a-go-go-related gene) カリウムチャンネル電流 ( $I_{Kr}$ ) の阻害である。そこで、新薬開発のための非臨床試験に、hERG チャンネル強制発現細胞を用いた  $I_{Kr}$  試験と実験動物を用いた心電図 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)。しかしながら、心筋細胞の活動電位を構成するイオンチャンネルの阻害バランスやチャンネルの種差によって TdP リスクが異なることや、さらに hERG 直接阻害作用がなくても hERG チャンネル蛋白発現を阻害する薬剤があることが明らかとなった。つまり、TdP は hERG チャンネル阻害と QT 間隔の評価だけでは予測できないことを意味している。そのために、現在ガイドラインの見直しが求められている。

近年、ヒト幹細胞由来心筋細胞の利用が可能となり、試験間の種差の問題の解決が期待されている。中でも、多点電極アレー (multi-electrode array : MEA) を用いて測定するヒト幹細胞由来心筋細胞の細胞外電位持続時間 (field potential duration: FPD) がヒト心電図の QT 間隔に相当することから、FPD 延長作用を指標としたスクリーニング法の有用性が精力的に検証されてきた。しかし、その他の TdP 誘発因子や薬剤の長期曝露時の TdP リスク予測の可能性については、十分に検討されていない。

そこで本研究では、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 MEA アッセイ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 や興奮伝導とそれらのゆらぎを指標に、マルチイオンチャンネル阻害剤の TdP リスク予測性を検証した。次に、長期曝露によりイオンチャン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。

### **hESC-CM を用いた MEA ラインモデルによる興奮伝導時間(CT)と FPD、CT のゆらぎ解析**

本実験においては、MEA の電極上でライン状に配した hESC-CM に対して、薬剤を各濃度 10 分間隔で、低濃度から高濃度へと累積投与し、各濃度の最後 50 拍分を解析した。次に、FPD を自発拍動数で補正した cFPD と、1 拍ごとの cFPD のゆらぎの指標である  $STV_{cFPD}$  (short-term variability: STV)、興奮伝導時間 (conduction time: CT) とそのゆらぎ ( $STV_{CT}$ ) の 4 つの指標を解析し、この実験モデルの TdP リスク予測性を検討した。臨床データから、E-4031 (選択的 hERG 阻害剤)、マルチチャンネル阻

害剤のアステミゾール、フレカイニド、テルフェナジンは TdP リスク陽性 (TdP(+))、リドカイン (Nav1.5 阻害剤)、ベラパミル (Cav1.2 および hERG 阻害剤) は TdP リスク陰性 (TdP(-)) である。

本評価系において、ヒト QT 間隔と相関する指標である cFPD については既報と同様に、E-4031 で延長作用、ベラパミルとリドカインでは短縮作用を示した。一方、マルチチャネル阻害剤のうちアステミゾールは cFPD 延長作用を示したが、フレカイニドおよびテルフェナジンは hERG 阻害作用を有するにも関わらず cFPD 短縮作用を示した。フレカイニド、テルフェナジンによる cFPD 短縮作用の理由としては、 $I_{Kr}$  に対して逆向きの電流を形成する Cav1.2 チャネルの  $IC_{50}$  値が hERG  $IC_{50}$  値に近いため、hERG 阻害作用が相殺されたと考えられる。STV<sub>cFPD</sub> については、cFPD 延長作用を示した E-4031 およびアステミゾールの他、リドカインとテルフェナジンによっても増大した。本検討における cFPD と STV<sub>cFPD</sub> による薬剤の TdP リスク分類では、TdP 発生報告と異なり、リドカインは TdP(+) となる。

2 種のナトリウムチャネル遮断薬フレカイニド、リドカインの CT への効果については、興奮伝導遅延作用が報告されているフレカイニドでは CT が増加し、遅延作用が小さいリドカインの CT 増加はわずかであり、これまでの報告と矛盾のない結果であった。一方、E-4031 およびベラパミルでも hERG  $IC_{50}$  近傍で CT の増加を示した。STV<sub>CT</sub> については、ベラパミルとリドカインでは変動せず、E-4031 およびマルチチャネル阻害剤で増大したことから、STV<sub>CT</sub> の指標はこの 6 剤の TdP リスクを正しく評価した。さらに、CT と STV<sub>CT</sub>、あるいは STV<sub>CT</sub> と STV<sub>cFPD</sub> での 2 次元プロットでは、TdP (+) の 4 薬剤と TdP (-) の 2 薬剤とをより明確に判定できた。とくに、テルフェナジンは、従来の非臨床試験では TdP リスク予測が難しい薬剤であるが、STV<sub>cFPD</sub> あるいは STV<sub>CT</sub> の指標によって陽性と判定できた。

本検討は、複数の TdP リスク陽性・陰性化合物を用いて、興奮伝導の指標による TdP リスクの予測可能性を示唆した、初めての報告である。これらの研究成果は、*Scientific Reports* 2018 年 (Asahi, et al.) に発表した。

### hESC-CM における長時間曝露による TdP リスク予測評価

本課題においては、2 種類の実験を行った。まず、hERG チャネル強制発現 CHO 細胞 (hERG-CHO) を用い、TdP 活性の異なる 2 薬剤として、hERG トラフィッキング阻害作用の想定されるペンタミジン (TdP(+)) および 17-AAG (TdP(-)) を 5 分あるいは 24 時間曝露した。各時点で SyncroPatch® 384PE を用いた population patch clamp により  $I_{Kr}$  評価を、Western blotting により hERG 蛋白発現量を評価した。次に、MEA 上をコラーゲンコートし、hESC-CM をクラスター状で播種後、得られた波形から FPD を解析した。薬剤を各濃度で曝露し、5 分、2、4、8、24 時間後に cFPD を評価した。

hERG-CHO において、ペンタミジンの 5 分間曝露では、非グリコシル化 hERG (immature hERG) の発現は変化しなかったが、17-AAG ではわずかに減少した。一方、細胞膜移行に必要なグリコシル化された hERG (mature hERG) 発現は、両薬剤で変化しなかった。このとき、17-AAG ではわずかに  $I_{Kr}$  阻害作用を示したことから、17-AAG が軽微な hERG 直接阻害作用を有することが示唆された。24 時間曝露では、両薬剤とも顕著な mature hERG 発現低下ならびに  $I_{Kr}$  阻害作用を示し、hERG トラフィッキング阻害作用を有することがわかった。一方、immature hERG 発現については、ペンタミジンで増加し、17-AAG では減少したことから、両薬剤の hERG トラフィッキング阻害の作用機序が異なる可能性が示唆された。

hESC-CM を用いた cFPD 評価において、2 時間以上の曝露によりペンタミジンでは経時的かつ濃度依存的に cFPD が延長し、17-AAG では 5 分間曝露および 2 時間以上の長期曝露で cFPD が短縮した。各薬剤の cFPD 延長作用の有無は、TdP リスクの有無と一致していた。

17-AAG が 24 時間曝露時に hERG-CHO で顕著な  $I_{Kr}$  阻害作用を示したにも関わらず、hESC-CM において cFPD 短縮作用を示した点に食い違いが見られた。そこで、Nav1.5 あるいは Cav1.2 による相殺作用の可能性を検討したが、各チャネルの強制発現細胞系では電流阻害作用を示さず、現時点では cFPD 短縮作用の機序は解明できていない。

17-AAG は TdP 発生の報告はないが、hERG トラフィック阻害作用があるため hERG チャネル強制発現細胞系で薬剤を長期曝露すると TdP(+)となると考えられる。一方、hESC-CM を使うと長期曝露時にも cFPD 延長は見られず TdP(-)となるため、hESC-CM を利用したリスク評価の方が TdP リスク予測に適していると考えられる。

本研究は、hERG トラフィック阻害作用を有するが TdP リスク強度の異なる薬剤を用いて、hESC-CM を用いた FPD 評価により TdP リスクを予測できることを示した、初めての報告である。これらの研究成果は、*European Journal of Pharmacology* 2019 年 (Asahi, et al.) に発表した。

## まとめ

本論文は、筆者らがこれまでに行った「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」に関する研究をまとめたものである。本検証から、ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いて、適切な実験モデルと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で、従来の試験法では判別できなかった薬剤の TdP リスク有無を正確に評価できる可能性が示された。本評価系を非臨床の心毒性評価に追加することにより、hERG 直接阻害・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 評価の代替となりうることが期待される。