

## 審査の結果の要旨

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 3 割を占める致死性不整脈（主に Torsades de Pointes: TdP）の発生を予測して回避することが、新薬開発においては極めて重要である。TdP の発生前にはヒト心電図 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、新薬開発の非臨床試験には 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 間隔評価試験が定められている (ICH ガイドライン S7B)。しかし近年、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が明らかとなり、現在ガイドラインの見直しが求められている。

ヒト幹細胞由来心筋細胞の細胞外電位を多点電極アレー (MEA) で記録し、ヒト心電図の QT 間隔に相当する field potential duration (FPD) を計測し、FPD 延長作用を指標とする評価法が精力的に検証されている。しかし、その他の TdP 誘発因子や薬剤の長期曝露時の TdP リスク予測については、十分に検討されていない。本研究課題では、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。

博士論文の第 2 章では、MEA 上に心筋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て発表した論文をまとめている。さらに第 3 章には、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論文をまとめている。

### 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

博士論文の第 2 章においては、MEA の電極上に hESC-CM をライン状に配して、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 つの指標を解析して TdP リスク予測性を検討している。臨床データから、TdP リスク陽性 (TdP(+)) の薬剤として、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、TdP リスク陰性 (TdP(-)) としてリドカイン (Nav1.5 阻害剤)、ベラパミル (Cav1.2 および hERG 阻害剤) を用いて、これら 4 つの指標で TdP リスク予測を行った。興奮伝導の指標による TdP リスク予測の可能性を検証している。

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、マルチチャン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。本検討における cFPD と  $STV_{cFPD}$  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。一方  $STV_{CT}$  は、ベラパミルとリドカインでは変動せず、E-4031 およびマルチチャンネル阻害剤で増大したことから、 $STV_{CT}$  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  $STV_{CT}$ 、あるいは  $STV_{CT}$  と  $STV_{cFPD}$  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、 $STV_{cFPD}$  あるいは  $STV_{CT}$  の指標によって陽性と判定できた。

本論文は複数の 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した初めての報告である。この研究成果は、*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

博士論文の第3章においては、2種類の実験を行っている。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トラフィック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トラフィック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トラフィック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(+)となる可能性があると考えられる。一方、hESC-CMを使うと長期曝露時にもcFPD延長は見られずTdP(-)と予想され、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、筆者がこれまでに行ってきた「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を期待される。

よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。