

# 二次元ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの収縮運動における陽性階段現象の表出法の確立

中瀬古(泉)寛子<sup>1\*</sup> 千葉浩輝<sup>1</sup> 佐塚文乃<sup>2</sup> 後藤 愛<sup>1</sup>  
 布井啓雄<sup>1</sup> 神林隆一<sup>1</sup> 松本明郎<sup>3</sup> 武井義則<sup>1</sup>  
 諫田泰成<sup>2</sup> 内藤篤彦<sup>4</sup> 杉山 篤<sup>1,3</sup>

ヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞(ヒト iPS 細胞由来心筋細胞)の単純二次元細胞シートを多電極プローブ上に作成し、電気ペーシング下で電気生理学的指標を連続記録した状態で薬物を曝露すると、催不整脈リスクおよび抗不整脈作用を検出できる。また同細胞シートの電気刺激位置を工夫すると、生理的な陽性階段現象、すなわち「正の収縮速度 - 頻度関係」を表出でき、薬物による収縮弛緩運動の変化の評価系としても利用可能である。同細胞シートの収縮速度を十分に引き出すには、プローブに接着した細胞シート中央部が辺縁部へ引き寄せられるという物理的条件を考慮し、中央付近の最大弛緩領域に電気刺激位置を設定することで、興奮伝導、収縮および弛緩運動の開始地点と伝播方向を一致させることが重要である。この発見は心臓再同期療法への応用も期待できる。

(心電図, 2023 ; 43 : 5-18)

## I. はじめに

ヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞(ヒト iPS 細胞由来心筋細胞)は、再生医療の分野では、虚血性心筋症で変性あるいは欠落した心筋細胞や心筋組織を補う細胞源として注目され、その移植の効果を検討する臨床試験が行われている<sup>1)</sup>。一方、医薬品開発時の非臨床試験においては、薬物性 QT 延長症候群の誘発リスクの検出系の一つとして利用され<sup>2)</sup>、現在、薬物による心筋の収縮機能障害(以下、本稿で

**Keywords**

- ヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞
- 興奮収縮連関
- 収縮弛緩運動
- 正の収縮速度 - 頻度関係
- 心臓再同期療法

1 東邦大学医学部薬理学講座

(〒143-8540 東京都大田区大森西5-21-16)

2 国立医薬品食品衛生研究所薬理部

3 東邦大学医学部加齢薬理学講座

4 東邦大学医学部生理学講座細胞生理学分野

\*は責任者を示す

*Development of a Methodology for Showing a Positive Staircase of Contraction in Conventional Two-Dimensional Cell Sheets of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes*

*Hiroko Izumi-Nakaseko, Koki Chiba, Ayano Satsuka, Ai Goto, Yoshio Nunoi, Ryuichi Kambayashi, Akio Matsumoto, Yoshinori Takei, Yasunari Kanda, Atsuhiko T. Naito, Atsushi Sugiyama*

2022年5月2日 原稿受領 / 2022年8月29日 掲載承認

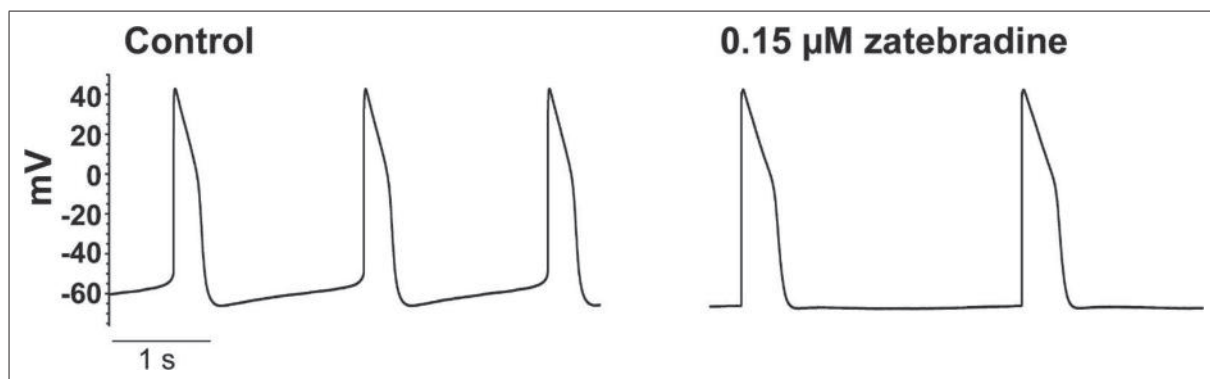


図1 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの活動電位波形

HCN 遮断薬 zatebradine 処理前 (Control) および後 (0.15  $\mu$ M zatebradine) の波形を示し、処理前の波形では緩徐脱分極相が観察される。それぞれの波形は1つの細胞シート内の異なる2つの細胞から記録した。

[文献6より Fig. 2を許諾転載]

は収縮毒性という用語を使用する)の評価系としても開発が進められている。また、患者由来の疾患 iPS 細胞由来心筋細胞が作成され、疾患の治療方法を開発するためのモデル細胞として利用が進んでいる<sup>3)</sup>。

一般に、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は組織工学的手法を加えずに単層二次元培養すると、その性質が胎児型心筋細胞に近いことが報告され<sup>4)</sup>、上記の応用において、その未熟性が問題視されることも多い。しかし、その未熟性を加味した上で利用すれば、様々な情報を得ることができる。本総説では、まずヒト iPS 細胞由来心筋細胞の二次元細胞シートの電気生理学的特徴を紹介し、薬物の催不整脈リスクや抗不整脈作用の評価系として、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞でどのような解析ができるかを紹介する。次に同細胞シートの収縮弛緩運動の特徴について紹介した上で、局所的電気刺激方法を活用することによって、今まで不可能であった二次元細胞シートでの陽性階段現象、すなわち「正の収縮速度-頻度関係」の表出に成功した例を紹介する。最後に心臓再同期療法と左室弛緩能との関連に着目した研究を紹介し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートで得られた結果から一考察加えたい。

## II. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの電気生理学的性質

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は現在、心房筋型、心室筋型などに作り分けることが可能になってきている。今回は主に心室筋型が多いとされる iCell<sup>®</sup> cardiomyocytes (FUJIFILM Cellular Dynamics 社製)で得られた知見を中心に電気生理学的性質を紹介する。

まず、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の特徴として、自動能の存在が挙げられる。その理由として、内向き整流性 K チャンネル Kir2.1 ( $I_{K1}$ ) の発現が生体心室筋に比較して低く静止膜電位が浅いこと、HCN4 電流が存在することが挙げられる。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を分散培養すると、静止膜電位と活動電位持続時間はばらつくが<sup>5)</sup>、細胞シートにするとかなり均一となり、静止膜電位は  $-70$  mV ほどで、緩徐脱分極相をもつ Purkinje 線維型活動電位波形を示すことが報告されている (図1)<sup>6)</sup>。この自動能は、HCN チャンネル遮断 (図1)<sup>6)</sup>に加え、Na チャンネル遮断や K チャンネル遮断によっても抑制される<sup>7), 8)</sup>。一方、Ca チャンネル遮断はかえって活動電位持続時間を短縮し、有効不応期を短縮させることにより、自動能を促進する<sup>7)</sup>。この自動能は心筋細胞を定期的に興奮

収縮させることにより、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の維持に貢献し、電気刺激なしに、例えば薬物の長期曝露の実験などを可能にしている。

次に、多電極プローブで測定した細胞外電位持続時間 (field potential duration : FPD) をもとにヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの再分極時間に着目すると、電気刺激 1 Hz 下では 350~550 ms<sup>6)~9)</sup> と幅広い値を取り、培養期間の延長によって細胞外電位持続時間は延長する<sup>9)</sup>。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの再分極時間はヒト心室筋細胞の活動電位持続時間 200~300 ms<sup>10)</sup> より長い、その原因として Kir2.1 の低発現による再分極電流の減少が考えられている<sup>6)</sup>。また、細胞外電位持続時間の補正式は、 $\text{corrected FPD} = \text{FPD} / \text{RR}^{0.22} [\text{RR 周期長 (sec)}]$  となり、補正係数の 0.2193 は Fridericia ( $a = 0.33$ ) や Bazett ( $a = 0.5$ ) より小さく、頻度依存性短縮率がヒト生体心より小さいことが示されている (図 2)<sup>6)</sup>。原因としては、遅延整流性 K 電流の遅い成分を担うイオンチャネル KCNQ1 の修飾サブユニットである KCNE1 の低発現が示され、KCNQ1 電流の電位依存性活性化速度の増加と電流密度の低下により、頻度依存性の KCNQ1 電流増幅が減弱し、その結果、再分極時間の短縮が減弱したと考えられている<sup>6)</sup>。以上のように、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は少なくとも 2 種類の K チャネルの電流量とキネティクスの変化によって再分極電流が減少している細胞である。しかし、薬物による K チャネル電流の抑制を介した細胞外電位持続時間の延長および早期後脱分極の誘発を安定して検出することが可能であり<sup>11)</sup>、薬物性 QT 延長症候群の誘発リスクの検出系の一つとして、利用されている<sup>2)</sup>。

さらに、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートに臨床電気生理学的検査に準じたプログラム刺激を加えると、イオンチャネル遮断薬における頻度依存性や逆頻度依存性を測定でき、Na チャネル遮断作用による伝導遅延の検出 (図 3 : ペプリジル, アミオダロン)<sup>7), 8)</sup> や、使用依存性の有無や解離速度の大きさを間接的に評価できる。マルチチャネル遮断薬において

は、再分極時間における K チャネル遮断と Ca チャネル遮断のバランス、有効不応期の延長における K チャネル遮断と Na チャネル遮断の寄与度も知ることができる (図 4)<sup>8)</sup>。したがって、既存の抗不整脈薬との比較において、ある薬物が総合的に催不整脈的か抗不整脈的かをおおよそ判別することも可能である<sup>8), 12)</sup>。

### Ⅲ. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の収縮運動の特徴

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の収縮弛緩運動は単一細胞、二次元細胞シート、三次元組織、embryoid body において、ビデオ画像の解析、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態、張力の測定などを用いて研究されている。ヒトの正常心では左室収縮力において「正の力-頻度関係」が観察されるが、不全心は「負の力-頻度関係 (陰性階段現象)」を示す。一方、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は配向性のない一層の細胞シート状態で培養すると、「負の力-頻度関係」を示すことが報告されている<sup>13)</sup>。そこで、この細胞に生理的な「正の力-頻度関係」を表出させ、収縮力の評価系として利用するため、多くの研究者は心筋細胞としての成熟化に向けて努力を行ってきた。そのため、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞とハイドロゲル溶液<sup>14)</sup>、ヒト iPS 由来心筋細胞と心室の線維芽細胞とコラーゲン/マトリゲル/フィブリンゲル<sup>15)</sup>、あるいはヒト iPS 細胞由来心筋細胞と collagen I/マウス基底膜とを混和して<sup>16)</sup>、組織工学的手法で三次元組織が構築された。さらに、この三次元組織の両端を支柱に固定し、定頻度の電気刺激または一定の静止張力を加え、一軸性の張力がかかる条件下で培養すると、筋節の整列、筋細胞の肥大や成熟化が促進し、「正の力-頻度関係」を表出できることが報告された<sup>14)~16)</sup>。しかしながら、これらの標本作成は手順が多く、必要な細胞数は 10 万~100 万個と多く、電気生理学的指標を同時に測ることは難しい。そこで、すでに薬物の心筋における電気薬理学的作用の検出系として利用されている、3 万個の細胞からな

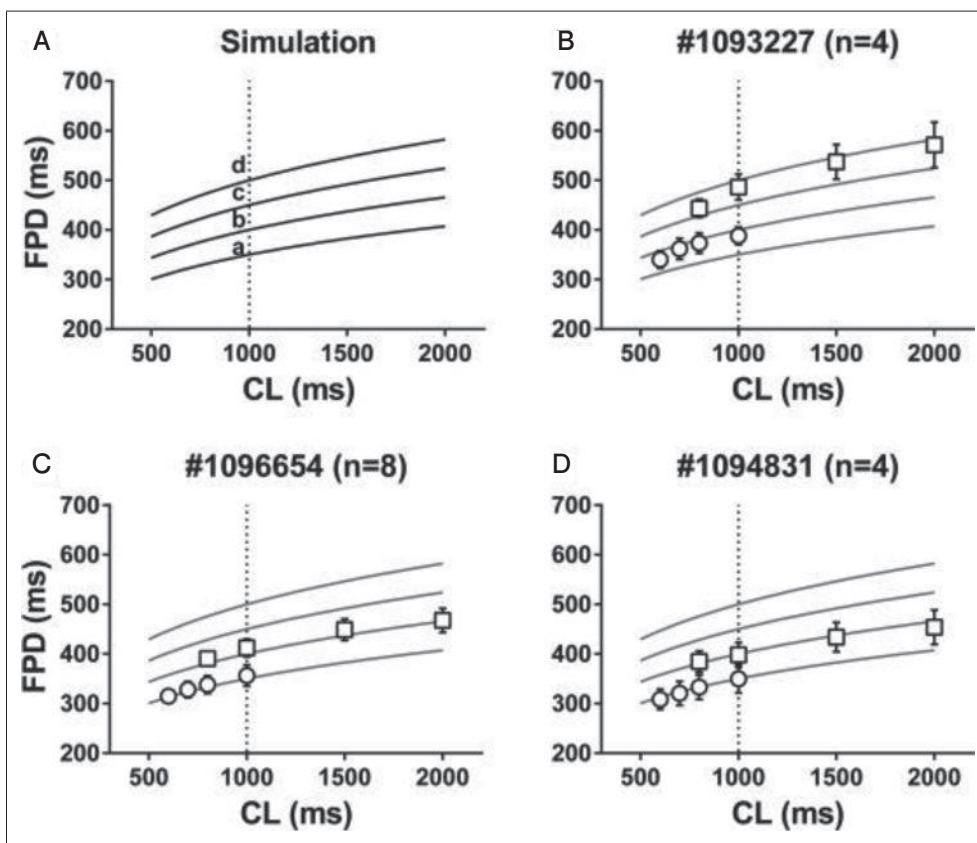


図2 電気刺激周期長(CL)と細胞外電位持続時間(FPD)の関係を示す理論曲線  
 非線形方程式： $FPD = FPD_{1000\text{ms}}(CL/1000)^a$ に従って描かれた曲線を示す。補正係数 $a$ には3ロットの  
 平均値0.2193を使用した。A： $FPD_{1000\text{ms}}$ の値をそれぞれ350(a)、400(b)、450(c)、500(d)  
 msとしたときの曲線を示す。B、C、D：個々のロットで作成した細胞シートで得られたFPDの  
 値と理論曲線との重ね書きを示す。ほとんどのFPDデータが理論曲線に沿って分布している。

○：zatebradine処理前，□：zatebradine処理後

[文献6より Fig. 5を許諾転載]

る配向のない二次元ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートで収縮に関する測定方法を確立できれば、薬物の催不整脈リスクと収縮毒性を同時に評価でき、かつ標本を小さくできると考え、次の項目で紹介する研究を行った。

#### IV. ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートにおける「正の収縮速度-頻度関係」の表出

ヒトiPS細胞由来心筋細胞は配向性のない二次元細胞シートにすると、「負の力-頻度関係」が示され<sup>13)</sup>、その原因としては筋節に配向性が見られないことや $Ca^{2+}$ ハンドリングが未熟であるた

めと考えられてきた<sup>17)</sup>。一般的には「負の力-頻度関係」はヒト不全心筋<sup>18)</sup>やげっ歯類<sup>19)</sup>の心室筋において観察され、前者では筋小胞体への $Ca^{2+}$ イオン取り込み量が減少していることが原因として報告されている。言い換えれば、「正の力-頻度関係」の表出には、興奮頻度依存性に筋小胞体への $Ca^{2+}$ イオン取り込み量を増加させることが必要であると考えられる。そこでわれわれは、局所的電気ペーシングを用いて、二次元ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの収縮および弛緩の運動方向を制御し、さらに酸素分圧を増加させることによりATP産生を促し、筋小胞体 $Ca^{2+}$ -ATPaseであるSERCA2a活性を増加さ



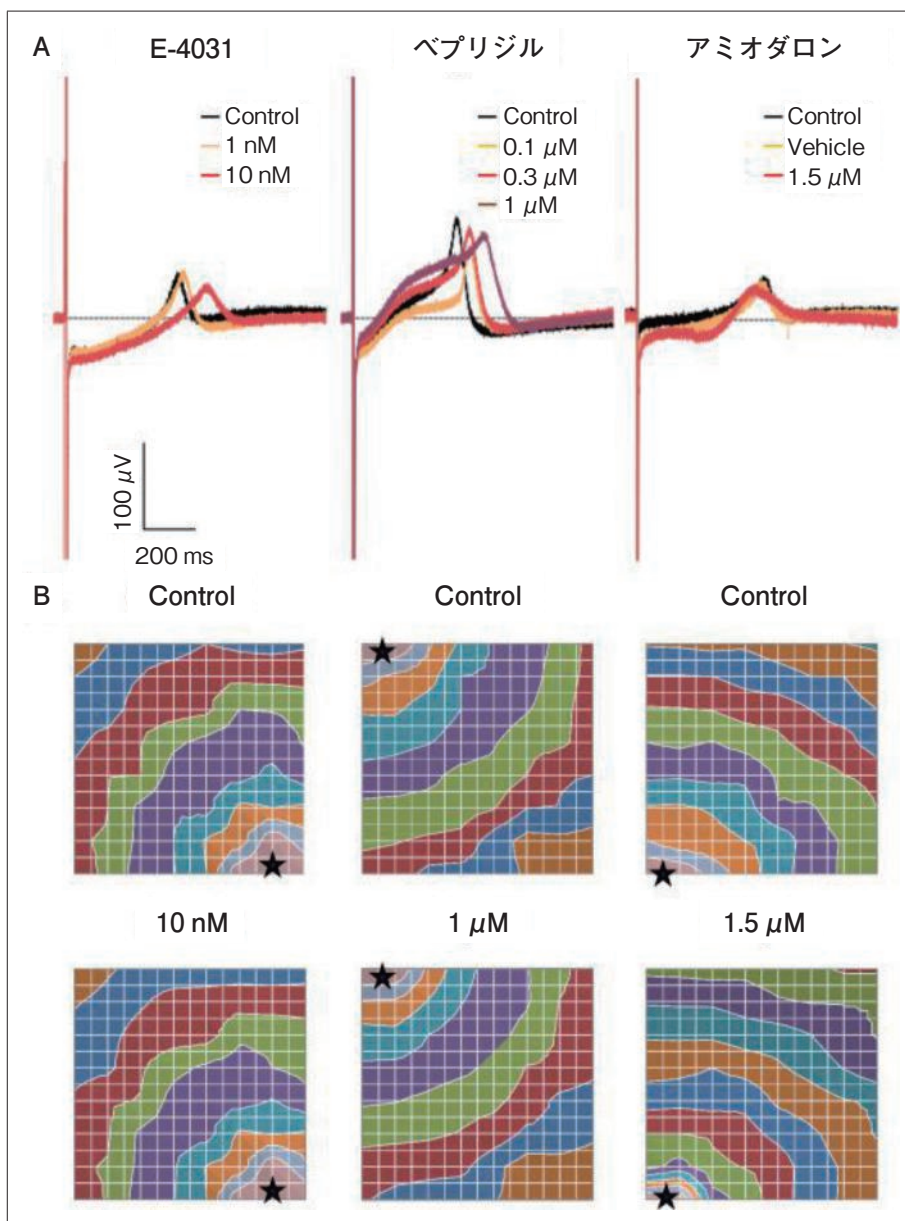


図3 1000 msの周期長で電気刺激しているときのヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの代表的な細胞外電位波形と興奮伝播図

左から hERG Kチャンネル選択的遮断薬 E-4031, ベプリジルおよびアミオダロンの曝露前後の結果を示す。A: 連続15回の電気刺激の最後の刺激時の細胞外電位波形の代表例を示す。B: 薬物処理前(Control, 上段)と薬物曝露後(下段)の代表的な興奮伝播図を示す。各図の星印は電気刺激を行った位置を示す。等高線は1.05×1.05 mm四方における15発目の電気刺激による興奮伝播の時間経過を示し、その間隔は1 msである。E-4031(10 nM)曝露では伝導遅延が観察されないが、アミオダロン曝露後の興奮伝播図(1.5  $\mu$ M)では、電気刺激部位近辺での著しい伝導遅延が観察された。ベプリジルでも弱い伝導遅延が電気刺激部位近辺で観察された。

[文献8より Fig. 1を許諾転載]

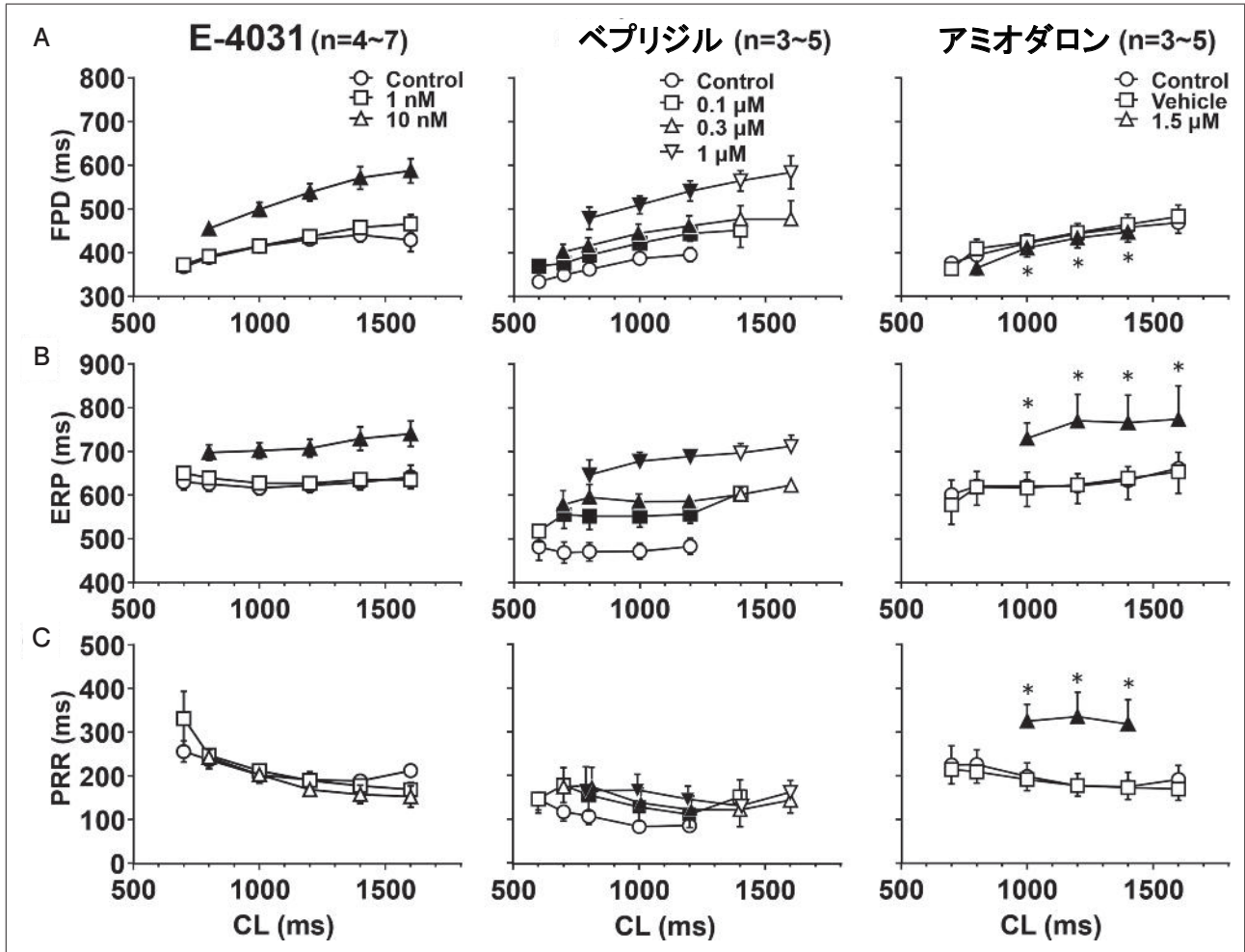


図4 電気刺激の周期長(CL)と細胞外電位(FPD)(A), 有効不応期(ERP)(B)および再分極後不応期(PRR)(C)との関係に対するE-4031(左), ベプリジル(中)およびアミオダロン(右)の作用

再分極後不応期(post-repolarization refractoriness: PRR)は  $PRR = ERP - FPD$  で計算される。hERG Kチャンネル選択的遮断薬E-4031では逆頻度依存的なFPD延長が観察される。マルチチャンネル遮断薬のベプリジルではFPDが延長したので、Caチャンネル遮断 < Kチャンネル遮断、同じくマルチチャンネル遮断薬のアミオダロンではFPDが短縮したので、Caチャンネル遮断 > Kチャンネル遮断である。E-4031のデータより、Kチャンネル遮断によるFPD延長のみがERP延長に寄与するとき、PRRは延長しないことを示す。一方、アミオダロンではFPD延長なしに、ERPおよびPRRが延長するのでNaチャンネル遮断のみに依存するERP延長である。ベプリジルはFPD、ERPおよびPRRが延長するのでKチャンネル遮断とNaチャンネル遮断双方がERP延長に寄与している。黒塗りのシンボルはそれぞれ同じ周期長におけるControl値からの有意な変化を示す。\* $p < 0.05$ : 個々の周期長における溶媒値からの有意な変化を示す。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。

[文献8より Fig. 2を許諾転載]

せ、筋小胞体への $Ca^{2+}$ イオン取込みを促進させれば、「正の収縮速度-頻度関係」が得られるという仮説(図5)をたて、研究を行った<sup>9)</sup>。方法として、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を30,000細胞/2 $\mu$ L滴下して、約2mm<sup>2</sup>ほどの二次元細胞シートを多電極

プローブ上に作成し、約1週間培養した。細胞シートの同期的収縮が安定したところで、多電極システムMED64-Basic(アルファメッドサイエンティフィック社製)とライブセルイメージングシステムSI8000(ソニー社製)を組合せ、自発興奮下と電気刺

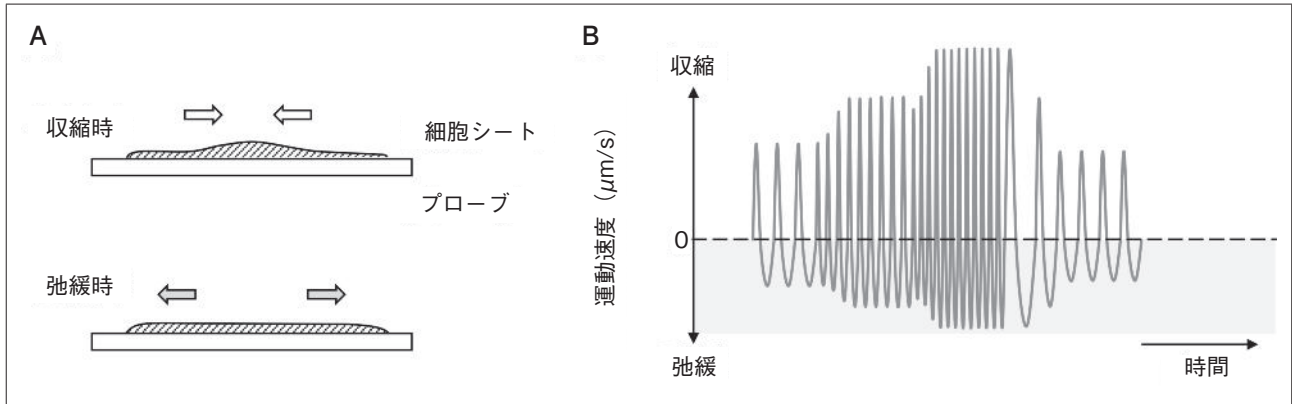


図5 ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの収縮運動速度における陽性階段現象の概念図

- A: ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートがプラスチック素材の多電極プローブ上に接着している条件では、心筋細胞の収縮速度(白矢印)と弛緩速度(灰色矢印)は細胞の変形速度として観測される。
- B: 収縮速度変化をプラスに、弛緩速度変化をマイナスに表示している。等尺性収縮運動において、収縮頻度上昇に対して収縮力が増加すれば、収縮速度のピークである最大収縮速度が増加すると考えられ、陽性階段現象として観測される(著者作成)。

激下で細胞外電位波形と細胞運動を記録し、その興奮伝導特性および細胞運動速度の解析を行った(図6)。その結果、自発興奮下では興奮伝導と、収縮弛緩運動の開始地点および伝播方向が一致しないことが明らかになった(図7)。特に、弛緩運動は細胞シートの中央付近から縁へ向かって同心円状に広がった。この現象はプラスチックでできた多電極プローブ上に円状に細胞密度の高い細胞シートを形成した結果、張り付きの強い縁に向かって引っ張られやすいという物理的な特性によると考えられた。そこで、弛緩運動が最も強い中央付近とそれ以外の隅の2カ所を選んで、電極への電流の注入により電気ペーシングし、比較を行った(図7)。その結果、電気刺激の位置によって収縮弛緩運動の方向性が変化することが確認され(図8)、最大弛緩領域(maximal relaxation region: MRR)を電気刺激すると、興奮伝導および収縮弛緩運動の開始地点が一致し(図7)、「正の収縮速度-頻度関係」が得られ、その増加度は+39%/Hz(心拍数が60 bpm増加すると収縮速度が39%増加)であった(図9)。この増加度はヒト心室条片標本で報告された「正の力-頻度関係」の増加度+26%/Hz(心拍数が60 bpm増加すると収縮力が

26%増加)<sup>18)</sup>やヒト生体心の洞結節自動能の上昇による左室内圧最大立ち上がり速度の増加度+35.4%/Hz(心拍数が60 bpm増加すると立ち上がり速度が35.4%増加)<sup>20)</sup>に匹敵すると考えられた。最大弛緩領域の周辺(Edge)を電気刺激した場合には、増加度が+26%/Hzであり、若干の減少が認められた(図9)。局所的電気刺激は、どの位置でも興奮伝導と収縮運動の開始地点をほぼ一致させたが、最大弛緩領域の周辺を電気刺激すると収縮運動と弛緩運動との開始地点にずれが生じるため、収縮運動の効率性が下がったと考えられる。一方、自発興奮時の収縮開始地点は細胞シートの中央付近に点在することから(図7B, Spontaneous, パネルa)、弛緩張力のかかりやすい部位では筋小胞体のCa<sup>2+</sup>含有量が高いのではないかと推察された。この観察は細胞の伸張がprotein kinase G1aを活性化し、phospholambanのリン酸化を介してSERCA2a活性を増強するという知見<sup>21)</sup>で説明できると考えられた。

次に、液体培地の平衡化に用いる混合ガスに95% Air+5% CO<sub>2</sub>または95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>を用いて酸素分圧を約5倍変化させた。その結果、高い酸素分圧下では、より大きな「正の収縮速度-頻度関係」が認



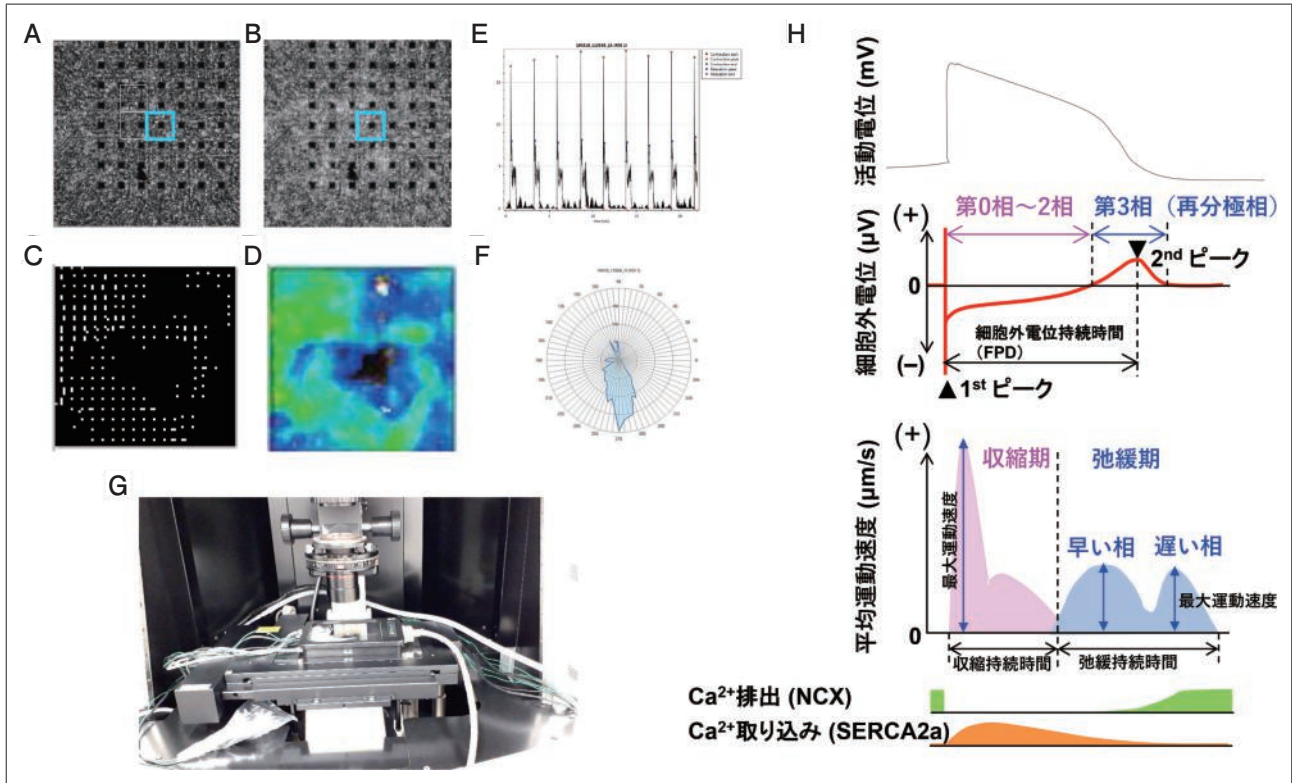


図6 細胞外電位と細胞運動速度の取得方法

64電極プローブ上に作成したヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの位相差顕微鏡写真に動きベクトルを重ね書きした(A, B)。弛緩期(A)と最大収縮速度時(B)。 (B)中のROI(青四角,  $200 \times 200 \mu m^2$ )の拡大図でベクトル表示のみを(C)に示し, 運動速度のカラー表示を(D)に示す。このROIで22秒間に計測された自発活動における運動速度変化を(E)に, 運動方向のヒストグラム(5度毎のベクトルの数)を(F)に示す。測定装置の図(G)。ライブセルイメージングシステムSI8000(ソニー社製)内の位相差顕微鏡のステージ上にインキュベーターを設置し, その中に細胞シートを形成させた64多電極プローブ(アルファメッドサイエンティフィック社製)を固定した。プローブは $37^{\circ}C$ に保温し, 加温した混合ガスで培地を平衡化し, 実験を行った(G)。ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの心周期における活動電位波形, 電極から取得される細胞外電位, 平均運動速度の時間経過を示した概略図(H)。細胞外電位は細胞の活動電位による電場電位変化と, 電極表面と細胞膜間での小空間における心筋細胞のイオンチャネルを介したイオン濃度の変化とを反映する。運動速度の変化は収縮期(ピンク)と弛緩期(青)に分かれる。 $Na^+/Ca^{2+}$ 交換体(NCX)による $Ca^{2+}$ イオン排出とSERCA2aによる $Ca^{2+}$ イオン取り込み活性の時間経過を示す(著者作成)。

められた<sup>9)</sup>。

以上より, われわれはこの小さなヒトiPS細胞由来心筋細胞シートを物理的特性に基づいて, 興奮伝導の開始地点と収縮弛緩運動の方向を電気刺激位置で最適化すると, 「正の収縮速度-頻度関係」を生体心同様に再現することが可能なことを示した。さらに, 酸素分圧の上昇は「正の収縮速度-頻度関係」を促進することを見出した。これらの工夫により, ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートは薬物による収縮毒性の検出にも応用可能であることが示された。

## V. 心臓再同期療法(CRT)について

われわれは心臓の二次元細胞モデルでもある, ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートから得られた知見をもとに, 心臓再同期療法における刺激位置について一考察を加えてみたい。心臓再同期療法は心不全に対する標準的な治療の一つで, その原理は伝導障害の是正, すなわち同期不全の是正である。再同期療法はレスポナーにおいては心機能を改善するが, 一部の患者では反応しないことが問題となってお



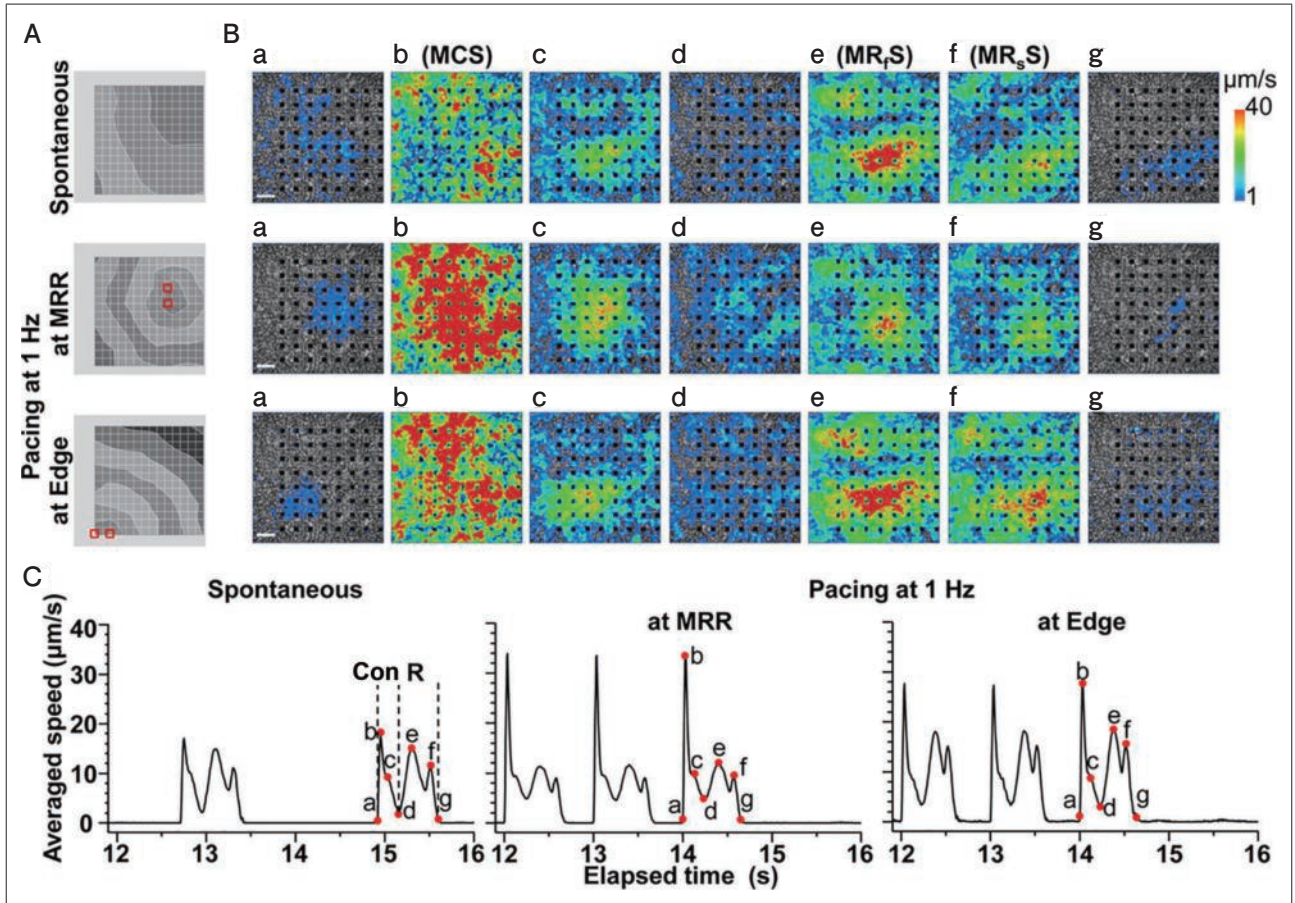


図7 ヒト iPSC 細胞由来心筋細胞シートにおける自発興奮収縮時、最大弛緩領域付近 (maximal relaxation region : MRR) の刺激時および周辺領域 (Edge) 刺激時の興奮伝播図と収縮弛緩運動の運動速度

A : 興奮伝播図. 赤四角は電気刺激に用いた電極の位置を示す. 等高線の間隔は 1 ms.

B : 細胞運動速度をカラー表示によって可視化し, a ~ d は収縮期, d ~ g は弛緩期を示す. パネル a のスケールバーは 200  $\mu\text{m}$  を示す.

C : 自発興奮収縮時(左), MRR 電気刺激時(中), Edge 電気刺激時(右)の平均運動速度の代表的な経時変化. この波形はパネル B で示された観察領域全体  $1,365 \times 1,365 \mu\text{m}^2$  で取得された. 電気刺激 15 発のうち最後の 3 発における細胞運動速度を示している(中および右). 収縮期(Con)と弛緩期(R)におけるパネル B とパネル C の a ~ g は一致している. 電気刺激によって最大収縮速度の増加が観察された. b は最大収縮速度(maximum contraction speed : MCS), e は早い弛緩相の最大弛緩速度(maximum fast-relaxation speed :  $\text{MR}_f\text{S}$ ), f は遅い弛緩相の最大弛緩速度(maximum slow-relaxation speed :  $\text{MR}_s\text{S}$ )を示す.

[文献 9 Fig. 2 より許諾引用改変]

り, レスポンダーとノンレスポンダーとの違いに焦点を当てた研究が行われている. 今回の細胞シートの研究では, 最大弛緩領域付近を電気刺激し, 弛緩運動に興奮伝導と収縮運動を連動・同期させることによって「正の収縮速度-頻度関係」の回復につなげた. ここでは, まず本研究で得られた知見に関連する臨床研究を 3 編紹介し, 弛緩機能と電極刺激部位

との連関を考察する. 慢性的な右室心尖部ペーシングを行っている患者で駆出率を維持できた群と悪化させた群との比較を行った研究では, QRS 幅は左室の駆出率と負に相関し, 左室拡張末期径に正に相関し, 平均 E' 速度は負に相関することが報告された. 特にペーシング時 QRS 幅は独立して平均 E' 速度に関連することから, ペーシング時 QRS 幅は弛緩機

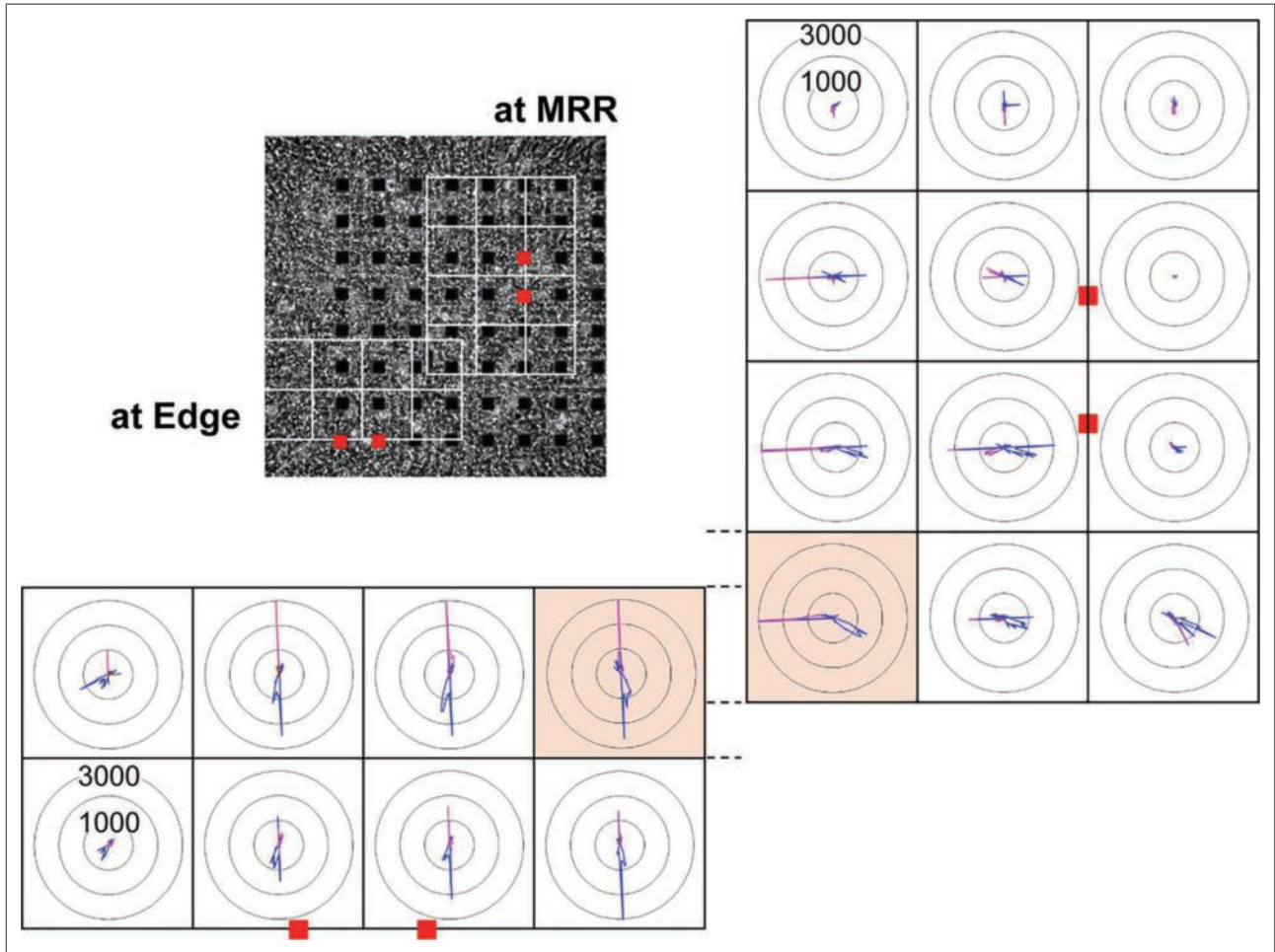


図8 電気刺激位置によるヒト iPSC 細胞由来心筋細胞シートの運動ベクトルの方向の変化

各  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  の ROI (白四角) から取得した、代表的な動きベクトルのヒストグラムを示す。図7と同じヒト iPSC 細胞由来心筋細胞シートを、95%  $\text{O}_2 + 5\%$   $\text{CO}_2$  の混合ガス下で、最大弛緩領域付近 (at MRR) でペーシングした場合 (右) または周辺領域 (at Edge) をペーシングした場合 (下) を示す。細胞シートの位相差画像上の赤四角はペーシング電極の位置を示す (左上パネル)。各パネルは、収縮期 (ピンク) と弛緩期 (青) に検出された動きベクトルの  $360^\circ$  分布を示す。収縮期と弛緩期の動きベクトルは、連続電気ペーシング 15 発のうち最後の 9 発のデータから抽出し、 $25^\circ$  ごとに並べた。ヒストグラム中の 1000 と 3000 は任意の方向の動きベクトルの総数を示す。明るいオレンジ色でハイライトされたヒストグラムは、MRR と Edge でペーシングしたときにはほぼ同じ領域から取得された。電気刺激位置によって両者の動きベクトルの方向は全く異なることが示されている。

[文献9より Fig. 3を許諾転載]

能にも関連していることが報告されている<sup>22)</sup>。またリード植込み直後の  $\text{LVdP/dt}_{\text{min}}$  の増加および Weiss method で算出される弛緩機能を表す  $\tau$  値の減少が、レスポンドではノンレスポンドと比較して有意に大きく、特に  $\tau$  値の変化はレスポンドの予測において特異度が高いことが報告されている<sup>23)</sup>。さらに、拡張型心筋症で完全左脚ブロックの患者におけ

る再同期療法においては、左室刺激電極が収縮遅延領域かつ弛緩遅延領域に設置された場合は 94.4% がレスポンドであったが、収縮遅延領域のみでは 70%、弛緩遅延領域のみでは 60.9% がレスポンドであった<sup>24)</sup>。これらの報告は収縮同期不全と弛緩同期不全の双方の改善が心臓再同期療法の成功に重要であることを示している (図 10)。われわれの細胞

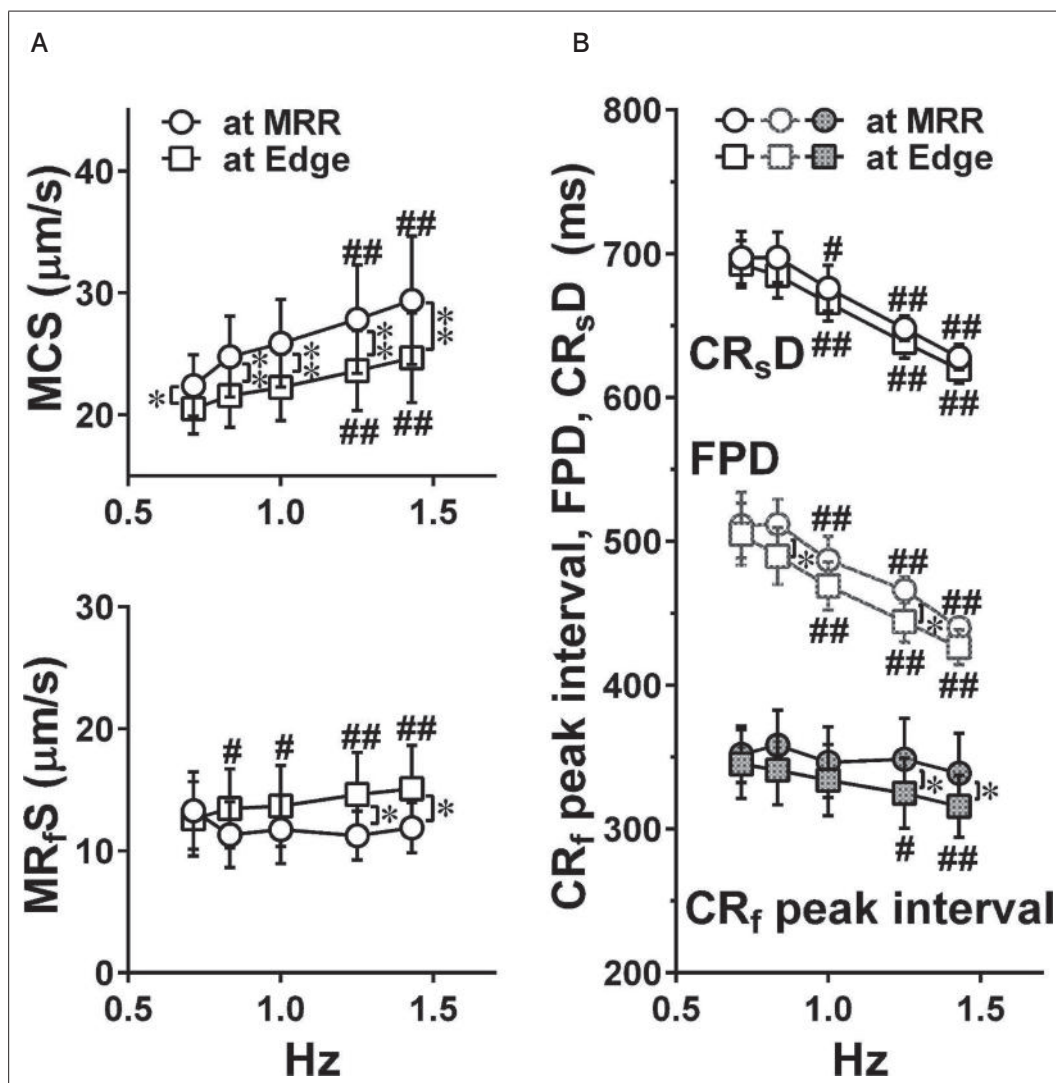


図9 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの収縮弛緩運動の運動速度、間隔および持続時間に対する電気ペーシングの位置と刺激頻度の影響

Aは、MRRおよびEdge電気刺激時の最大収縮速度(MCS, 上), 早い弛緩相の最大弛緩速度(MR<sub>f</sub>S, 下), Bは、収縮-弛緩持続時間(CR<sub>s</sub>D, 図7Cのa~gの区間), 細胞外電位持続時間(FPD)および収縮相ピーク-早い弛緩相ピーク間隔(CR<sub>f</sub> peak interval: 図7Cのb~eの間隔)を示す。心筋分化後44日目の細胞シートを用いて95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>の混合ガス下で実験を行った。動きベクトルは観察領域全体から取得した(図7B参照)。データは平均値±標準誤差(n=5)で表され、最小刺激頻度である0.7 Hzの値との有意差を #p<0.05および##p<0.01で示す。ペーシング位置の異なる値間の有意差を \*p<0.05および\*\*p<0.01で示す。電気ペーシングによって「正の運動速度-頻度関係」が認められる(A)。

[文献9より Fig. 5を許諾転載]

シートの研究では、最大弛緩領域付近で電気刺激をすることによって効率的に収縮速度の増加を引き出した。弛緩機能が保存された部位は筋小胞体機能が保持されていると推察されるので、弛緩遅延領域の

ペーシングは弛緩同期不全の改善だけでなく、収縮力増加に一役担っている可能性がある。



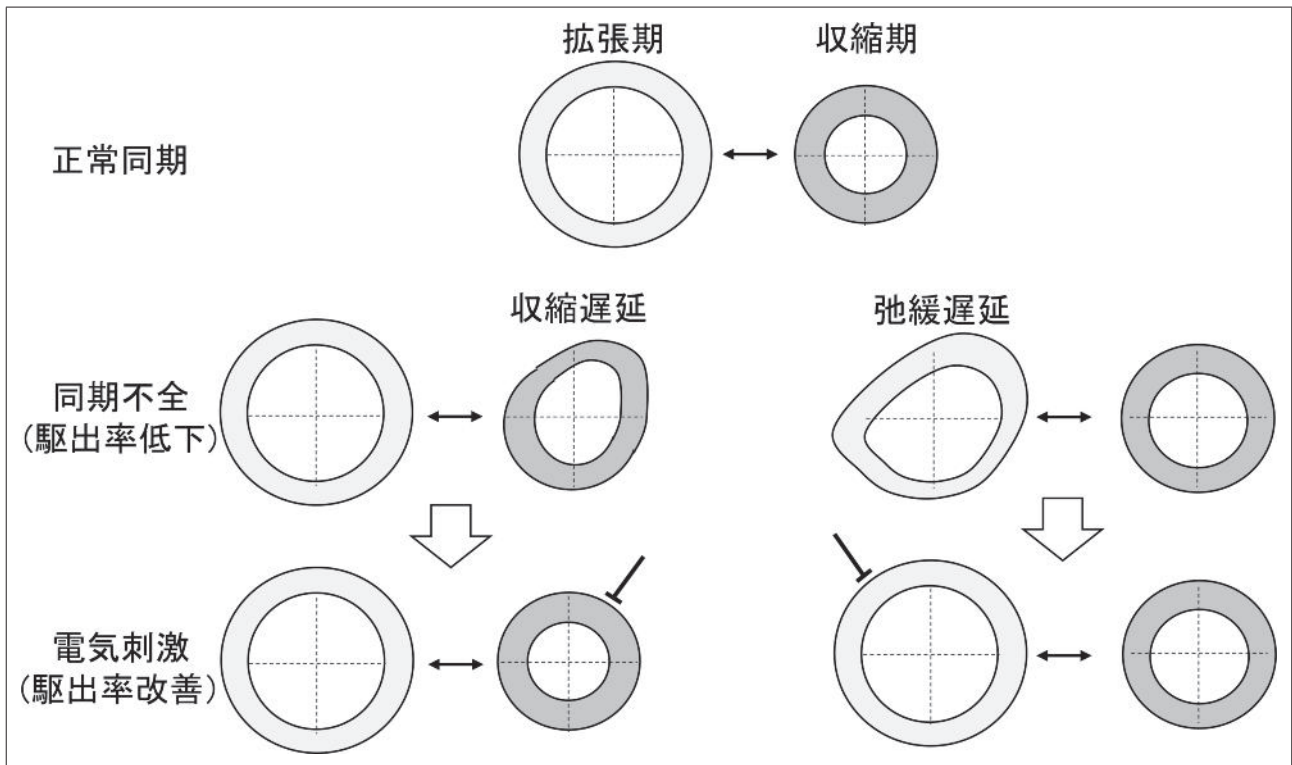


図10 CRTにおける電気刺激位置による収縮能および拡張能の改善効果

収縮遅延領域の電気刺激(左)と同様に拡張遅延領域の電気刺激(右)は心室のポンプ機能を改善する。拡張遅延領域は電気刺激で収縮開始を同期することによって、拡張開始が同期し、拡張能の改善に結びつく(著者作成)。

## VI. 結 語

多電極上に作製したヒト iPS 細胞由来心筋細胞の二次元細胞シートは薬物曝露による電気生理学的変化の評価に有用である。さらに、電気刺激の位置をコントロールすると、薬物曝露による収縮弛緩運動の変化を評価できることも示された。また、細胞シートの収縮速度を十分引き出すためには、細胞シートの物理的制限に基づいて、最大弛緩領域に電気刺激位置を決定し、興奮伝導、収縮および弛緩運動の開始地点と伝播方向を一致させることが有用であることが示された。心臓再同期療法において、弛緩機能や弛緩遅延も同時に改善するような位置に刺激電極が設置されると、レスポンドになる割合が高いという臨床報告もあわせると、今回の研究結果は心室の弛緩機能や弛緩順序に着目することの重要

性を示唆している。

## 付記

本稿は、第21回鈴木謙三記念医科学応用研究財団研究助成による日本不整脈心電学会論文賞を受賞した論文とその関連論文を総説にまとめたものである。

## 利益相反

本論文について、開示すべき利益相反事項はない。

## 受賞論文

Izumi-Nakaseko H, Chiba K, Hagiwara-Nagasawa M, Satsuka A, Goto A, Nunoi Y, Kambayashi R, Matsumoto A, Takei Y, Kanda Y, Naito AT, Sugiyama A : Optimizing the Direction and Order of the Motion Unveiled the Ability of Conventional

Monolayers of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes to Show Frequency-Dependent Enhancement of Contraction and Relaxation Motion. *Front Cell Dev Biol*, 2020 ; 8 : 542562.

### 〔文 献〕

- 1) Jackson AO, Rahman GA, Yin K, et al. : Enhancing matured stem-cardiac cell generation and transplantation : A novel strategy for heart failure therapy. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021 ; 14 : 556-572
- 2) Strauss DG, Wu WW, Li Z, et al. : Translational models and tools to reduce clinical trials and improve regulatory decision making for QTc and proarrhythmia risk (ICH E14/S7B Updates). *Clin Pharmacol Ther*, 2021 ; 109 : 319-333
- 3) Funakoshi S, Yoshida Y : Recent progress of iPSC technology in cardiac diseases. *Arch Toxicol*, 2021 ; 95 : 3633-3650
- 4) Yang X, Pabon L, Murry CE : Engineering adolescence : maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res*, 2014 ; 114(3) : 511-523
- 5) Ma J, Guo L, Fiene SJ, et al. : High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes : electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011 ; 301 : H2006-H2017
- 6) Izumi-Nakaseko H, Kanda Y, Nakamura Y, et al. : Development of correction formula for field potential duration of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes sheets. *J Pharmacol Sci*, 2017 ; 135 : 44-50
- 7) Izumi-Nakaseko H, Nakamura Y, Wada T, et al. : Characterization of human iPSC cell-derived cardiomyocyte sheets as a model to detect drug-induced conduction disturbance. *J Toxicol Sci*, 2017 ; 42 : 183-192
- 8) Izumi-Nakaseko H, Hagiwara-Nagasawa M, Naito AT, et al. : Application of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes sheets with microelectrode array system to estimate antiarrhythmic properties of multi-ion channel blockers. *J Pharmacol Sci*, 2018 ; 137 : 372-378
- 9) Izumi-Nakaseko H, Chiba K, Hagiwara-Nagasawa M, et al. : Optimizing the direction and order of the motion unveiled the ability of conventional monolayers of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to show frequency-dependent enhancement of contraction and relaxation motion. *Front Cell Dev Biol*, 2020 ; 8 : 542562
- 10) Fozzard HA, Arnsdorf MF : *Cardiac electrophysiology. The Heart and Cardiovascular System : Scientific Foundations.* (eds. Fozzard HA, Haber E, Katz AM, et al.) , 2nd ed. Raven Press, New York, 1992 ; 99e110
- 11) Nakamura Y, Matsuo J, Miyamoto N, et al. : Assessment of testing methods for drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPSC cell-derived cardiomyocyte sheet : multi-site validation study. *J Pharmacol Sci*, 2014 ; 124 : 494-501
- 12) Izumi-Nakaseko H, Fujiyoshi M, Hagiwara-Nagasawa M, et al. : Dasatinib can impair left ventricular mechanical function but may lack proarrhythmic effect : A proposal of non-clinical guidance for predicting clinical cardiovascular adverse events of tyrosine kinase inhibitors. *Cardiovasc Toxicol*, 2020 ; 20 : 58-70
- 13) Sasaki D, Matsuura K, Seta H, et al. : Contractile force measurement of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheet-tissue. *PLoS One*, 2018 ; 13 : e0198026
- 14) Ronaldson-Bouchard K, Yeager K, Teles D, et al. : Engineering of human cardiac muscle electromechanically matured to an adult-like phenotype. *Nat Protoc*, 2019 ; 14 : 2781-2817
- 15) Feric NT, Pallotta I, Singh R, et al. : Engineered cardiac tissues generated in the Biowire™ II : A platform for human-based drug discovery. *Toxicol Sci*, 2019 ; 172 : 89-97
- 16) Ruan JL, Tulloch NL, Razumova MV, et al. : Mechanical stress conditioning and electrical stimulation promote contractility and force maturation of induced pluripotent stem cell-derived human cardiac tissue. *Circulation*, 2016 ; 134 : 1557-1567
- 17) Yang X, Pabon L, Murry CE : Engineering adolescence : maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res*, 2014 ; 114 : 511-523
- 18) Pieske B, Maier LS, Bers DM, et al. : Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*, 1999 ; 85 : 38-46
- 19) Maier LS, Bers DM, Pieske B : Differences in Ca<sup>2+</sup>-handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2000 ; 32 : 2249-2258
- 20) Feldman MD, Alderman JD, Aroesty JM, et al. : Depression of systolic and diastolic myocardial reserve during atrial pacing tachycardia in patients with

- dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 1988 ; 82 : 1661-1669
- 21) Scotcher J, Prysyzhna O, Boguslavskiy A, et al. : Disulfide-activated protein kinase G *Ia* regulates cardiac diastolic relaxation and fine-tunes the Frank-Starling response. *Nat Commun*, 2016 ; 7 : 13187
- 22) Kim D : Relationship between paced QRS duration and myocardial relaxation of the left ventricle in patients with chronic right ventricular apical pacing. *J Electrocardiol*. 2021 ; 66 : 54-61.
- 23) Kato H, Shimano M, Sumi T, et al. : Acute improvement of left ventricular relaxation as a predictor of volume reduction after cardiac resynchronization therapy : a pilot study assessing the value of left ventricular hemodynamic parameter. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2014 ; 37 : 1544-1552
- 24) Wang C, Shi J, Ge J, et al. : Left ventricular systolic and diastolic dyssynchrony to improve cardiac resynchronization therapy response in heart failure patients with dilated cardiomyopathy. *J Nucl Cardiol*, 2021 ; 28 : 1023-1036

## Development of a Methodology for Showing a Positive Staircase of Contraction in Conventional Two-Dimensional Cell Sheets of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes

Hiroko Izumi-Nakaseko<sup>1</sup>, Koki Chiba<sup>1</sup>, Ayano Satsuka<sup>2</sup>, Ai Goto<sup>1</sup>, Yoshio Nunoi<sup>1</sup>, Ryuichi Kambayashi<sup>1</sup>, Akio Matsumoto<sup>3</sup>, Yoshinori Takei<sup>1</sup>, Yasunari Kanda<sup>2</sup>, Atsuhiko T. Naito<sup>4</sup>, Atsushi Sugiyama<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Toho University

<sup>2</sup>Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences

<sup>3</sup>Department of Aging Pharmacology, Faculty of Medicine, Toho University

<sup>4</sup>Department of Physiology, Division of Cell Physiology, Graduate School of Medicine, Toho University

A conventional two-dimensional cell sheet of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes lying on microelectrode array probes has been employed to estimate their excitation-conduction properties. By applying local electric stimuli on the cell sheet, the proarrhythmic and antiarrhythmic profiles of a drug can be systematically evaluated. Drug-induced changes in contraction-relaxation motion can also be evaluated using the cell sheet. Namely, a physiological property called “positive contraction velocity-frequency relationship” can be developed in the cell sheet by initiating the excitation, contraction, and relaxation in the same area. In order to fully elicit the contractile motion of the cell sheet, it is essential to set the stimulation sites around the maximum relaxation region to overcome its physical limitation due to lying on the plastic probe ; i.e., the center of the cell sheet is stretched toward its peripheral area. This finding may suggest that cardiac resynchronization therapy can be further improved by adopting the currently described new concept of cardiac pacing with monitoring of ventricular motion.

**Keywords** : Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, Excitation-contraction relationship, Contraction-relaxation motion, Positive contraction velocity-frequency relationship, Cardiac resynchronization therapy