

201034084A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への  
応用可能性のための調査研究

平成22年度総括研究報告書

研究代表者 関野 祐子

平成23（2011）年 5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究

関野 祐子…………… 1

## II. 分担研究報告

1. ヒト由来幹細胞を用いた安全性薬理試験の必要性に関する調査研究

関野 祐子…………… 13

2. ヒト由来幹心筋の安全性薬理実験のプロトコール提案

杉山 篤 …………… 17

3. ヒト由来幹細胞の心筋分化に関する調査研究

諫田 泰成…………… 21

4. ヒト由来幹細胞の神経分化に関する調査研究

佐藤 薫…………… 27

5. 中枢神経軸索輸送機能による安全性薬理評価系の構築

五嶋 良郎…………… 35

6. 中枢神経シナプス機能の *in vitro* 分化レベル評価系の構築

白尾 智明…………… 39

# I. 総括研究報告

## 総括研究報告書

### ーヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究ー

（H22-医薬-指定—035）

研究代表者 関野祐子

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験センター・薬理部 部長

#### 研究要旨：

ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性を検討するために、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）から分化誘導された心筋細胞や中枢神経細胞を使った薬理実験が現在どこまで可能になっているのか、その現状について情報を収集し、また下記研究項目について研究を実施した。ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用には、動物実験では検出できない副作用の予測、動物実験数の削減、臨床試験実施の迅速化などへの期待がある。現在、製薬関連会社の内数社で、ヒトiPS由来心筋細胞の利用が開始されていたが、中枢神経細胞の利用は検討されていなかった。現行の試験法との関係で心筋細胞への関心の高さがうかがわれた。ヒト由来幹細胞を新医薬品開発に利用するにはまず、標本の品質を多角的に評価して比較し、試験結果の再現性を検証する研究が必要である。ヒト由来幹細胞から得られる標本の品質に影響を与える要因として、iPS細胞株、iPS細胞の継代数、分化誘導法、分化後の培養日数などがある。これらの条件が異なると、分化誘導される細胞の種類や、特性、さらに化学物質に対する応答性が研究室間で大きくばらつくことが予想される。品質評価のためのバイオマーカーの選択や標本の活動や活性を定量的に評価する指標を明確にして、実験プロトコルを整備していく必要がある。

品質の安定性が評価された標本が大量かつ安価に供給されるシステムが整備されれば、ヒト由来幹細胞を用いた試験法の施設間バリデーション研究が可能となり、将来的に非臨床試験ガイドラインとして国際的に受け入れられる可能性がある。ガイドライン化までのロードマップを想定したうえで研究開発を行うことが、ヒトiPS細胞の産業実用化への道を促進するだろう。

#### 分担研究項目一覧：

- （1）ヒト由来幹細胞を用いた安全性薬理試験の必要性に関する調査研究（関野祐子）
- （2）ヒト由来幹心筋の安全性薬理実験のプロトコル提案（杉山篤）
- （3）ヒト由来幹細胞の心筋分化に関する調査研究（諫田泰成）
- （4）ヒト由来幹細胞の神経分化に関する調査研究（佐藤薫）
- （5）中枢神経軸索輸送機能による安全性薬理評価系の構築（五嶋良郎）
- （6）中枢神経シナプス機能の*in vitro*分化レベル評価系の構築（白尾智明）

キーワード：ヒトiPS細胞 安全性薬理試験 心筋細胞 神経細胞 ガイドライン

## A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト由来幹細胞から分化誘導された心筋細胞や中枢神経細胞を用いた薬理実験が安全性薬理試験として応用可能であるかについて、産学官の専門家からの情報収集と、また実験の実施により科学的に検討することにある。

幹細胞研究の成果を創薬分野に応用するためには、幹細胞から分化誘導した細胞が現行の非臨床 *in vitro* 試験に置き換えることができるのか、また動物実験を代替できるような試験法が開発可能なのか、動物実験では検出できない副作用の予測につながるか、臨床試験のタイミングをなどについて科学的に検証しなくてはならない。本研究はヒト由来 iPS 細胞の産業応用に関する国内外の関心の高まりを受けて、平成 22 年 10 月に指定研究として採択された。本研究では特に、ヒト由来 iPS 細胞から分化誘導された心筋細胞や中枢神経細胞を使った薬理実験がどこまで可能になっているのかについて情報を収集し、安全性薬理試験ガイドライン（医薬審発第 902 号；平成 13 年 6 月 21 日）に則った試験法を開発するために必要な細胞標本の品質や供給の問題に関して産学官の専門家らと協議する。

## B. 研究方法

### 情報収集による検討

ヒト由来幹細胞を用いた薬理実験を行っている企業からの情報収集は、主に班会議の開催、ワークショップの開催、関連学会への参加などにより行った。本調査研究での情報収集に協力した企業は、製薬会社 4 社、日本製薬工業協会、受託試験会社の Ion Chat Research<sup>株</sup>と他 1 社、生理機能計測器会社のアルファメッドサイエンティ

フィック<sup>株</sup>、ブレインビジョン<sup>株</sup>と他 1 社である。また、スーパー特区「ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築」プロジェクトに参加している分担研究者（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部）からヒト iPS 細胞を用いた薬理実験データの再現性を担保するのに必要な実験条件に関して情報収集を行った。さらに、ヒト iPS の再生医療応用に関する最先端研究を行っている、慶応大学・医学部・循環器内科福田恵一教授、慶応大学・医学部・生理学岡野栄之教授の研究室を訪問し、ヒト iPS 細胞由来心筋と中枢神経細胞に関する研究について情報提供、技術提供などの研究協力を依頼した。

### 分担研究による検討

(1) ヒト由来幹細胞を用いた安全性薬理試験の必要性に関する調査研究（研究分担者：関野祐子）

創薬の現場ではヒト iPS 細胞を利用した試験法の開発に何を期待しているのか、新薬開発のどの段階で、またどのような目的でヒト iPS 細胞の実用化を図っているのか、などについてその現状と課題について、ワークショップ、班会議、研究室訪問などを通じて収集した情報をまとめ、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と中枢神経細胞を利用した安全性薬理試験の確立のためのロードマップを考察する。

(2) ヒト由来幹心筋の安全性薬理実験のプロトコール提案（研究分担者：杉山篤）

国内外におけるヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニングシステムの開発状況に関する情報を収集し、それらの長所と短所を解析し、実用化に向けてのシステム作製の方向性を検討する。

(3) ヒト由来幹細胞の心筋分化に関する

#### る調査研究（研究分担者：諫田泰成）

マウス胚性幹細胞（ES 細胞）を培養し、心筋分化誘導を行った。また、ヒト iPS 細胞を培養し、未分化マーカーの発現により未分化状態を確認し、ついで心筋分化誘導を行なった。心筋分化誘導により得られた拍動する胚様体（EB; embryoid body）の拍動数を計測した。さらに、拍動 EB の細胞外電位を多点電極システムにより計測し、マウス ES 細胞由来心筋とヒト iPS 細胞由来心筋との性状の比較を行い、安定した品質の標本に求められる条件を考察する。

#### （4）ヒト由来幹細胞の神経分化に関する調査研究（研究分担者：佐藤薫）

iPS細胞の分化誘導法や均質性について、文献調査を行った。また、ヒトiPS細胞由来神経幹塊（neurosphere）から神経細胞、グリア細胞を分化誘導し、マーカータンパク質の発現を免疫細胞化学的手法により確認する。また、長期培養した場合に神経回路を形成するかについて、成熟シナプス機能タンパク質の発現を免疫細胞化学的手法により確認し、実験動物の中枢神経細胞を用いた *in vitro* 実験プロトコールの実施が可能であるかを検討する。

#### （5）中枢神経軸索輸送機能による安全性薬理評価系の構築（研究分担者：五嶋良郎）

軸索輸送に対する医薬品の作用を定量的に解析する実験系として、胎生7日目のニワトリ胚から後根神経節（dorsal root ganglion DRG）を分散培養し、DRG軸索内を輸送される粒子を蛍光色素CM-Dilにより標識し、粒子の軸索内動態を定量的に計測するシステムを開発した。神経障害の副作用で知られる抗腫瘍薬が軸索輸送に

もたらす効果を調べ、移動粒子の数および速度を比較する評価系としての有用性を検討する。

#### （6）中枢神経シナプス機能の *in vitro* 分化レベル評価系の構築（研究分担者：白尾智明）

胎生16日のマウス脳の海馬を取り出し、バンカー法による海馬初代分散培養を行い、神経細胞の成熟を形態的に観察するとともに、シナプス機能成熟マーカータンパク発現を免疫細胞化学的に調べ、シナプス成熟度を定量的に解析する実験系を開発した。樹状突起スパインへのドレブリンの集積度を指標として、グルタミン酸、セロトニンの作用を免疫細胞化学的手法により定量的に解析することが可能かを検討する。

#### 倫理面への配慮

動物の取り扱いは、各研究機関の動物実験指針に基づき実施した。研究計画実施のすべてに必要な実験計画について、各研究者の所属機関内の動物実験委員会の承認を得ている。本研究に必要な倫理委員会承認は、「ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築と創薬研究」については平成 21 年 12 月 25 日に、「樹立済ヒト神経幹細胞および分化細胞を用いた *in vitro* 毒性評価系の構築」については平成 22 年 12 月 16 日に、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会より受けている。ヒト細胞の個人情報とは二重匿名化を行った上で提供されており、国立医薬品食品衛生研究所には個人情報はない。

#### C. 研究結果

本項では主に班会議、ワークショップ、学会

参加、研究室訪問などにより得られた情報を総括する。

本調査研究に対して情報提供をした製薬会社4社、試験受託会社2社のうち、少なくとも製薬会社3社と受託試験会社の1社は本研究開始時期にすでにヒトiPS細胞由来心筋を用いた薬理実験を開始していた。しかし、ヒトiPS細胞由来中枢神経細胞を用いた薬理実験は開始されていなかった。そこで、心臓に対する安全性薬理試験への応用に関する情報収集が中心となった。

#### 心筋細胞：安全性薬理コアバッテリー試験への応用

ヒトiPS細胞由来心筋の安全性薬理試験への応用可能性についての関心の高さは、現行の安全性薬理コアバッテリーの代替となる可能性があるからである。現在、薬物の再分極遅延とQT間隔延長リスクを評価する非臨床試験の実施が、ICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）S7Bガイドラインとして制定されている（平成21年10月23日厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知 薬食審査発1023第4号）。具体的にはGood laboratory practice (GLP) 適用下で実施される*in vitro* I<sub>Kr</sub>測定と*in vivo* QT測定である。これらの試験のうち、主に*in vitro* I<sub>Kr</sub>測定への応用が議論された。

心室再分極遅延（QT延長）や致死性心室不整脈（torsades de pointes; TdP）の発生が原因で市場より撤退した医薬品のほとんど全てがhERG（human ether-a-go-go-related gene）電流阻害作用を持つことから、安全性薬理試験としてhERG電流阻害試験が重視される。ある製薬会社では、hERGチャンネルを安定発現する培養細胞を用いたハイスループットシステムで、探索段階の第一次スクリーニングで開発候補化合物を選択し、GLP適用下の前臨床

試験での安全性薬理コアバッテリーではマニュアルによる電流解析（パッチクランプによる評価）を行っている。hERG試験を新薬開発のどこからどのように行うかは企業ごとの戦略によるが、現状で入手できるヒトiPS由来心筋細胞ではマニュアルパッチクランプや細胞外記録法での電流解析を行えているが、ハイスループットシステムに応用することは困難であろう。

また、現行のhERG試験では偽陽性が高いため、薬理作用が強力な新薬候補であれば、hERG試験で陽性であってもフォローアップ試験による総合リスク評価で安全性を確認している。そこで、もしヒトiPS由来心筋細胞を利用することで擬陽性が少なくなるとすれば、試験法を置き換えるメリットは大きい。

いずれにせよ、ヒトiPS由来心筋細胞が現行のhERG試験に置き換えられるかどうかは、安定してhERGチャンネルを発現する標本が得られるかどうかにかかっている。

#### 心筋細胞：安全性薬理フォローアップ試験への応用

ガイドラインのなかでフォローアップ試験として位置づけられている「摘出心筋標本において活動電位パラメーターを測定する心室再分極測定法」への応用についても議論された。活動電位持続時間（action potential duration; APD）を測定してQT間隔延長リスクを評価し、再分極に影響を与えるイオン電流を複合的に評価する方法である。単一心筋細胞を用いた場合には、APDとイオン電流の双方への影響を評価できる。活動電位の長さや電流成分により3種類の細胞（結節、心房筋、心室筋）に分けてそれぞれ薬物の作用を確認することが可能なので、薬物の作用メカニズムの同定が容易である。しかし、実験には技術的

な熟練と時間を要する。そこで組織標本から活動電位を細胞外記録する方法 (field potential 記録) がとられる場合がある。組織標本を用いると、心臓全体への薬物の作用が *in vivo* に近い形で検出できる。心筋組織は多細胞で構築されているが、同期して活動するので、安定した活動電位が記録されれば、細胞外電位記録であっても電流成分を時間的に分けてナトリウム電流成分、カルシウム電流成分、カリウム電流成分をそれぞれ解析することが可能である。

ヒト iPS を心筋に分化させる場合、EB の拍動により心筋への分化を評価する。得られる拍動 EB は多細胞で構成されているので、拍動 EB そのものを APD 測定に応用できる可能性がある。

分担研究者である杉山の報告によると、ヒト幹細胞由来心筋細胞の活動電位あるいは field potential を指標にした安全性薬理試験への応用研究が国内外の複数の研究機関で進められているという。我が国では、慶応大学福田研究室から、分化誘導した心筋塊の field potential 記録により、薬物性再分極遅延が評価できることが報告された (Tanaka T. et al. *Biochem Biophys Res Com.* 2009; 385: 497-502)。また、本調査研究の分担研究者・諫田は、ヒト iPS 細胞 201B7 株から独自に分化誘導した拍動 EB を用いて細胞外電位測定を行っており、拍動 EB からの細胞外記録法による評価には期待がもたれる。ただし、拍動 EB の大きさや拍動数がまちまちであることが指摘されている。したがって現状では、EB を分化して得られる拍動 EB そのものを利用する実験では再現性の高い結果を得るのは難しいと思われる。

ヒト iPS 細胞由来心筋の特性と品質の評価

hERG チャンネルの発現系細胞を用いる

hERG 試験においても、多くの株が淘汰されて、現在は安定した発現細胞株が利用されている。これと同様に、ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋の品質を評価し、薬理実験として再現性のあるデータが保障される細胞だけを利用するようになることが望ましい。しかし、心筋に発現する機能タンパク質が複数 (チャンネルと筋線維) であるために、一定の条件を満たす細胞を再現性良く得られるかどうかの懸念が強い。分化誘導された心筋は発生初期の胎児型である可能性が高くヒト成人の心臓への薬理作用を反映しないのではないかという懸念もある。細胞の品質として再現性を求められる条件は、たとえば、発現するチャンネル (ナトリウムチャンネル、カリウムチャンネル、カルシウムチャンネル) の割合が安定することであろう。また、継代数や分化後の培養日数による細胞特性の変化が品質に与える影響の有無は検証されなければならない。分化後の長期にわたる培養では脱分化が問題となるとも言われる。さらに、DNA メチル化の違いがもたらす影響、元となる iPS 株には個体差がどう反映するか、疾患モデル細胞の実現は可能か等、ヒト iPS 細胞由来細胞には、まだまだ多くの問題が積みまとう。安全性薬理試験への応用と国際的に調和されるガイドライン化を念頭において標本開発を行うためには、産学官の壁を越えて情報を共有していき、標本の最適化を急ぐことが重要であると思われる。

## 海外事情

海外の学会で得られた情報によると、欧米の研究者の間では、多点電極システム上に幹細胞由来心筋細胞を単層 (モノレイヤー) で培養した標本で薬理評価を行う方法が主流となりつつあるという。心筋塊では、



塊と電極の位置関係によって波形が変わることが問題であるが、単層の培養標本では安定した電流成分が記録されているようだ。また、塊から記録をとる場合には、刺激をして収縮反応を誘発できないが、モノレイヤー標本では多点電極の一部の電極を使って電気刺激をして収縮活動を誘発できるメリットが大きい。分化した細胞をモノレイヤーで電極上に培養するプロトコールは入手できていないため、我々は未だ追試を行っていない。現状では海外から購入できる標本に期待がよせられている。海外では、Cellular Dynamics International (CDI)社のヒト iPS 由来心筋が多く利用されているとのことだ。日本ではリプロセル社が分化した心筋細胞を供給する体制を整えているという。これらに関しても、しかるべき機関で標本の比較検討が詳細になされることが望まれる。

#### 中枢神経系に対する安全性評価への応用

新薬開発において、被験物質の中枢神経系に及ぼす作用は適切に評価するべきとされているが、運動量、行動変化、協調性、感覚／運動反射反応および体温について評価するべきとされている。これらの評価項目を見たおと、*in vitro* で評価すべき項目はなく、中枢神経系への安全性は動物の *in vivo* 実験で評価している。しかしながら、薬理作用メカニズムを明らかにしたり、副作用の有無の予測には *in vitro* 実験は有用である。ただし、*in vitro* で形成した神経回路をつかっ、シナプス機能障害が検出された場合に、その障害が動物の行動観察でどのような表現系をとるのか、その対応関係を明確にする必要がある。ヒト iPS 由来神経細胞を中枢神経系の安全性薬理試験に応用するためには膨大な基礎データが

必要であり、実際に応用するまでには長い道のりがあるだろう。しかし、安全性薬理試験以外の応用には様々な期待があるようだ。たとえば、中枢神経と末梢神経への分化過程への影響を調べたり、脳の本質である神経回路の形成過程に対して薬物の安全性を評価することなどである。また、ヒトでしか効果を確認することができない抗体医薬品の安全性評価に利用することが考えられる。

#### D. 考察

実験動物を用いた安全性試験では予測できなかった心臓に対する作用により市場より撤退したいくつかの薬物がどれも  $I_{Kr}$  の阻害作用を持つことが明らかになったことで、ICH S7B ガイドライン制定に至り、hERG 試験は今や開発候補化合物選定を大きく支配する試験法となっている。最近、hERG 電流以外の機序による催不整脈作用が報告されてきており、QT 間隔延長のみで医薬品を評価するストラテジーを問題視する考えもある。しかし、製造販売承認のためには hERG 試験を避けておれないため、「ヒト iPS 細胞由来心筋を用いた試験導入するとさらにコストと時間がかかるようになるのであれば、導入には積極的になれない」という製薬関連企業側の事情もある。少なくとも、現行の hERG 試験に取って代わらなければ、メリットは少ない。ただ、問題は QT 延長がすべて重篤な不整脈に至るわけではなく、hERG 試験で陽性になっても、*in vivo* QT 試験では陰性ということもある。また、hERG 試験が陰性でも、他のチャンネルに作用して QT 延長を引き起こす可能性もあり、結局は種々のフォローアップ試験をして安全性を評価しているのが、現状である。ヒト iPS

細胞由来心筋を用いると hERG チャネル以外のマルチチャネルアッセイが可能になり、かつ初期のハイスループットスクリーニングで用いることができるようになるれば、安全性評価にかかる時間短縮とコスト削減につながる可能性がある。

本調査研究では、ヒト iPS 細胞由来標本を中心に情報収集を行ったが、ヒト iPS 細胞の分化誘導法の改良に多くの研究者が躍起となっている現在の研究現場の状態では、まだ標準となる標本を確定していくのは難しいだろうとの印象を持った。iPS 株によっては、心筋への分化しやすさに違いがあることが示唆されている。分化しやすさの違いは、初期化の過程において多能性の獲得に株毎に違いがあることを反映していると考えられている。その意味ではヒト ES 細胞から誘導する方が、安定した性質の心筋誘導が見られるかもしれない。この可能性の真偽は、実際に比較検討しなければならないが、これに関する情報は得られていない。ES 細胞ではなく iPS 細胞を利用するメリットは、当該疾患患者の細胞から作成できるので、疾患モデルを作れる可能性が高いことにある。そのことを考慮すれば、iPS 細胞で実験系を構築していく方が効率的であろう。

元となる幹細胞が iPS 細胞であろうが ES 細胞であろうが、分化誘導した細胞の細胞生物学的な特徴づけや、薬理学的な特徴づけを行い、複数の分化細胞を比較検証し、実験に使用する細胞の標準化を行うことが必要であろう。現段階で海外や国内で供給されている細胞に関する正確な情報の入手と比較検討を特定の機関が行うことが必要ではないだろうか。

電気生理学的な評価法については、パ

ッチクランプ法、細胞外電位記録以外に画像による評価法や細胞とデバイスの接着のインピーダンスを計測する方法もある。最終的にどのデバイスで何を指標にして評価するかは、試験機関毎の選択となるであろう。しかしながら、電気生理学的な特性を比較する必要があるため、どのようなデバイスを用いるにせよマニュアルパッチ法と同時並行してその電気生理学的特性を評価していかなければならない。

分化誘導後の標本の状態も、評価に影響する。単一細胞を用いるか、細胞塊を用いるか、モノレイヤー培養を用いるか、も重要な要素となる。もしも、細胞塊を利用するのであれば、塊を構成している心筋の種類が安定していないと細胞外記録波形の解析が困難となる。また、薬物の浸透性を安定に行うためにも、形や大きさを揃えるような工夫を施さなければならない。

スクリーニングなどの早い段階で利用したい場合、たくさんの種類の化合物の様々な濃度での反応を調べるためには、ハイスループット化を計らなければならないが、少なくとも現状では、ハイスループット化は難しい。電気生理学的特性の裏付けがきちんととれた段階で、画像による評価を導入すると、一度に多くの細胞の記録が得られるので、ハイスループット性は上がることが期待される。

以上は技術的に克服すべき事柄であるが、薬理学的な特性について検証すべき最も重要な点は、幹細胞由来心筋細胞の反応が、ヒト心筋における薬理反応と類似しているかについての評価である。

## E. 結論

ヒト iPS 細胞由来心筋では、医薬品の心筋に対する作用を統合的に評価することができることが期待されており、現行の hERG 試験の偽陽性率を下げることであれば、それは医薬品開発にとっては大きなメリットとなる。また、動物実験では検出不可能なヒト特有の有害事象を検出できる可能性も期待される。ただし、ヒト iPS 由来心筋が、一体どのような特質を示すのかについてはまだ十分には解析されていない。

安定した品質の標本を得るためには、たとえば心筋細胞の場合、心筋細胞に分化しやすい iPS 株を選定し標準化されたプロトコールにしたがって分化誘導し、得られた分化心筋の中から拍動数などの条件を満たす細胞を選択することにより、品質をそろえることが可能であると思われる。中枢神経細胞については、神経幹細胞塊 (neurosphere) が増殖・保存が可能であるため、分化能の安定している neurosphere が供給されることで均質な神経細胞標本を再現性良く得られる可能性がある。標本の供給システムが国内で整備されることが望ましいが、現在は海外に遅れをとっている印象がある。分化細胞が何であれ、標本の品質を評価するためのバイオマーカーの選択や心筋や神経細胞の活動を計測し定量的に評価する指標を明確にする必要がある。

hERG 試験をどのような段階で行うかと同様に、ヒト iPS 細胞由来心筋をどのように利用するかについては、各企業の判断に任せるべきことであろう。

現時点では、ヒト iPS 由来心筋細胞を QT 間隔延長の潜在的可能性に関する非臨床的評価にすぐに利用することは出来ず、また動物実験を代替できるような試

験法を開発できる見通しはたっていない。今後ヒト由来幹細胞を薬事申請に利用可能な試験法の開発につなげていくためには、未分化 iPS 細胞の維持管理にかかる膨大なコスト、iPS 株ごとに最適化されている分化誘導プロトコールの標準化、安定した標本作製に必要な技術者の確保、薬理試験項目の選定、薬効の計測システムの選定、ハイスループット化のための技術開発等の種々の問題点を総合的に解決していく必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Goshima Y, Usui H, Shiozawa T, Hida T, Kuraoka S, Takeshita S, Yamashita N, Ichikawa Y, Kamiya Y, Gotoh T, Gotoh T.

Computational analysis of the effects of antineoplastic agents on axonal transport. *J. Pharmacol. Sci.*, 114(2),168-179 (2010).

Kojima N, Hanamura K, Yamazaki H, Ikeda T, Itohara S, Shirao T.

Genetic disruption of the alternative splicing of drebrin gene impairs context-dependent fear learning in adulthood. *Neuroscience* 165: 138-150 (2010)

### 2. 学会発表等

Sugiyama A.

New proarrhythmic model for drug-induced QT-prolongation, KoNECT-KITARO Joint Symposium, Lee Kun-Hee Auditorium, Seoul National University Cancer Research

Institute, Seoul, Korea (2011. 2).

諫田 泰成

The 10th Biennial Meeting of the 第2  
回日本安全性薬理研究会若手研究者討論  
会、2011年2月18日、東京

佐藤 薫、James E Goldman, 関野 祐  
子

生後初期脳のリスクアセスメントシステムの  
構築、日本薬学会第132回年会(2011. 3,  
静岡市)

ワークショップ開催

関野祐子 世話人

「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応  
用可能性」平成23年1月22日～23日、  
甲府

講演者

中西真人「ヒトiPS細胞研究の現状と今後の  
展望」

白尾智明「神経細胞の分化評価系作成の  
可能性」

五嶋良郎「神経軸索輸送機能による安全性薬  
理評価系の構築の現状」

小泉修一「グリアを用いた創薬の試み」

佐藤 薫「ヒトiPS細胞からの神経細胞誘導  
の現状」

杉山 篤「ヒト由来幹心筋の安全性薬理実  
験の現状」

関野祐子 パネルディスカッション「iPS 由  
来心筋細胞を用いた安全性薬理試験に関  
する「現状と今後の課題」

G. 知的所有権の取得状況

なし

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金  
「医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業」  
ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究

会期：平成 23 年 1 月 22 日～23 日

会場：ホテル談露館 <http://www.danrokan.co.jp/index.html>

〒400-0031 山梨県甲府市丸の内 1-19-16 055-237-1331

プログラム

平成 23 年 1 月 22 日

12:00～13:00 班会議 I 「ワークショップの打ち合わせ」

ラウンドテーブル (13:00～16:50)

「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性」

13:00～13:10 関野祐子 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部長)

「開会の挨拶」

13:10～13:50 招待講演 1

中西真人 (産総研・幹細胞工学センター・副センター長)

「ヒト iPS 細胞研究の現状と今後の展望」

Part. 1 中枢神経系 *in vitro* 安全性試験系の開発

13:50～14:20 白尾智明 (群馬大学大学院医学系研究科・教授)

「神経細胞の分化評価系作成の可能性」

14:20～14:50 五嶋良郎 (横浜市立大学大学院医学研究科・教授)

「神経軸索輸送機能による安全性薬理評価系の構築の現状」

14:50～15:10 コーヒー・ブレイク

15:10～15:40 小泉修一 (山梨大学医学部薬理学講座・教授)

「グリアを用いた創薬の試み」

15:40～16:10 佐藤 薫 (国立医薬品食品衛生研究所・室長)

「ヒト iPS 細胞からの神経細胞誘導の現状」

Part. 2 心室再分極遅延に関する非臨床的評価への応用

16:10～16:40 杉山 篤 (東邦大学医学部薬理学・教授)

「ヒト由来幹心筋の安全性薬理実験の現状」

パネルディスカッション (16:40～18:20)

「iPS 由来心筋細胞を用いた安全性薬理試験に関する「現状と今後の課題」」

別添1

司会：関野祐子

パネリストによる現状と問題点提示（10～15分のトーク後に全体討論の予定

18:20～18:30 光岡俊成(厚生労働省審査管理課・国際医薬審査情報分析官)  
「閉会の挨拶」

平成23年1月23日

9:30～11:30 班会議 II 今後の予定及び報告書作成の打ち合わせ  
参加者：班員ならびに製薬企業の皆様

## Ⅱ. 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業）  
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」  
平成 22 年度分担研究報告

—ヒト由来幹細胞を用いた安全性薬理試験の必要性に関する調査研究—

研究分担者：関野祐子（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部長）

研究要旨：

オールジャパン体制でのヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）研究への取り組みの中、研究成果の出口としてヒト iPS 細胞の創薬応用に対する関心が高まっている。ヒト iPS 細胞を安全性薬理試験に応用するためには、創薬現場のニーズを知ることが重要である。ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞を使った安全性薬理実験の必要性について、現行の安全性薬理実験への応用と将来的に期待される評価系などの観点から、意見交換をおこなった。ヒト iPS 細胞から分化した標本には、動物実験では検出できない副作用の予測、動物実験数の削減、臨床試験実施の迅速化の実現が期待されている。将来的に、臓器の特性を安定して発現する、品質が管理された、安価な標本が大量に供給されるシステムが構築されれば、安全性薬理試験法としての導入が加速化する可能性はある。ヒト細胞を用いた安全性評価が非臨床試験段階で行われるようになり、ヒトに対する医薬品の安全性評価がより早い段階でより正確に行えるようになることには、大きな期待がよせられている。

キーワード：ヒト iPS 細胞 安全性薬理試験 心筋細胞 中枢神経細胞

A. 研究目的

幹細胞研究の成果を創薬分野に応用するためには、幹細胞から分化誘導した組織細胞が現行の非臨床 *in vitro* 試験に利用することができるのか、また動物実験を代替できるような試験法が開発可能なのか、臨床試験開始のタイミングを迅速化できるのか、などについて科学的に検証しなくてはならない。

創薬現場において、ヒト由来幹細胞、とくにヒト iPS 細胞の利用に対してどのようなニーズが考えられているのか。安全性薬理試験への応用を考える場合には、利用する細胞標本はどのような条件を満たしている必要があるのかなど

について考察する。

B. 研究方法

創薬の現場ではヒト iPS 細胞を利用した試験法の開発に何を期待しているのか、新薬開発のどの段階で、またどのような目的でヒト iPS 細胞の実用化を図っているのか、などについてその現状と課題について、ワークショップ、班会議、研究室訪問などを通じて収集した情報をまとめる。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞の創薬応用への期待  
種差の問題の解決

実験動物を用いた試験結果をヒトに



外挿する際の種差の問題は、ヒト由来標本を医薬品の非臨床試験に用いることで解決出来る可能性がある。これまでも腫瘍細胞、不死化細胞、ヒト組織初代培養細胞が用いられてきた。しかし、腫瘍細胞や不死化細胞は大量供給ができるが由来組織の特質を喪失している欠点があり、一方初代培養細胞は得られる臓器細胞の種類と供給とに、限りがあった。そこで期待されたのが、未分化状態で増殖可能でかつ分化誘導により組織の特質を発現するヒト幹細胞を用いることであり、これらの問題が解決できる可能性である。ヒト幹細胞を非臨床試験に適用して、創薬に応用しようという動きは、世界的な動向である。

#### 産業化促進による国内創薬力の底上げへの期待

日本ではヒトの未受精卵や胚を使うヒト胚性幹細胞 (ES細胞) の利用には、倫理的問題でその研究開発には積極的ではなかったが、山中らがヒト皮膚細胞からiPS細胞を樹立したことにより、日本の科学技術政策が大きく変化した。現在ヒトiPS細胞には医療応用・産業応用による国内産業育成という大きな期待が寄せられている。iPS細胞研究プロジェクトの中でも創薬応用に関係する研究プロジェクトには、先端医療開発特区 (スーパー特区) に「ヒトiPS細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築」そして、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) に「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発事業」がある。文部科学省は主に再生医療への応用実現化を目指して大規模なiPS細胞等研究ネットワークを構築している。

このようなオールジャパン体制での

iPS細胞研究への取り組みの中、創薬応用に関して実現可能性が高いという期待が大きくなっている。ヒトiPS細胞から分化した標本がヒトの臓器組織細胞の特性を示せば、医薬品に対するヒトの安全性を検証する安全性薬理試験法としての応用が可能であろう。また産業応用による高い経済効果を得るためには、試験法プロトコールを日本で開発し、それをガイドラインとして提案してかつ日米EU医薬品規制調和国际会議などで国際的な賛同を得ることが求められる。

#### 創薬現場におけるニーズ

被験物質の心臓への作用に関しては Good laboratory practice (GLP) 適用下で実施される *in vitro* I<sub>Kr</sub> 測定と *in vivo* QT 測定が、安全性薬理コアバッテリー試験となる。これらの試験のうち、主に *in vitro* I<sub>Kr</sub> 測定 (hERG 電流測定) への応用のニーズを検討した。現状で入手できるヒト iPS 由来心筋細胞では hERG 電流特性が安定しているとは言えないため、hERG 試験に利用する可能性はない。しかしこの問題が改善されるならば、試験法を置き換えるメリットは大きい。ヒト iPS 由来心筋細胞が現行の hERG 試験に置き換えられるかどうかは、安定して hERG チャネルを発現する標本が得られるかどうかにかかっている。また、「摘出心筋標本において活動電位パラメーターを測定する心室再分極測定法」への応用についても議論した。活動電位持続時間 (action potential duration: APD) を測定して QT 間隔延長リスクを評価し、再分極に影響を与えるイオン電流を複合的に評価するには、ヒト iPS 由来心筋細胞が、結節型、心房筋型、心室筋

型の3種類に分化してそれぞれの特性を発現するかについての情報が必要であり、細胞生物学的なマーカーによる検証や、薬理学的な特質を調べる検証がなされるべきである。

創薬現場としては、疾患患者から得られたiPS細胞から作成した標本での化合物スクリーニングに期待が寄せられている。また、一般的な副作用予測や、疾患特異的な副作用の予測に有用であると考えられている。現状では、未分化のヒトiPS細胞の維持に膨大なコストと人手がかかることがネックとなっているが、その問題が解決すれば、いわゆる *in house* 実験としてスクリーニングに利用する企業は多くなるだろう。将来的に、各企業の開発した試験法を施設間バリデーションに持って行くことを想定し、*in house* 実験で使用する標本が規格化されていると、ガイドライン化の可能性が高くなるだろう。標本の規格化とは、ヒトiPS株の選定基準や分化誘導法の標準化、使用する標本の選定基準などが明確化されて、試験に使用する標本の品質を揃えていくことが推奨される。

#### ガイドライン化を巡る諸問題と解決策

ヒトiPS由来細胞を利用した安全性薬理試験法のプロトコールが確立されて、ガイドライン化されることへの期待は製薬企業では大きくないとの印象を受けた。非臨床試験や臨床試験の簡素化につながるの期待が持てないからである。

現行の非臨床試験や、臨床試験の試験期間が短縮されコストダウンが見込まれるためには、何が必要であろうか。たとえば、ヒトiPS由来心筋細胞を用いた

*in vitro*試験法が、第1相臨床試験のthoroughQT試験の縮小につながるか、などについての十分に審議されなければならないだろう。ガイドライン化を想定した試験研究開発を行うには、その他にも、ヒトiPS由来細胞を用いた試験法は動物実験より副作用の予測性が高い、ヒト初回投与量決定に有用である、ヒトiPS由来組織細胞の応答性が実際のヒトでの薬効を反映している、有害反応のメカニズム研究に利用できる、などのメリットが科学的に証明される必要がある。ヒトiPS細胞から分化した細胞を用いた*in vitro*試験結果と、これまで承認審査申請に用いてきた試験結果との対応を確認する体系的な研究が必要である。

とりわけヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた試験研究開発については国際競争が大変に厳しい状況にある。すでに海外では、先天性QT延長症候群の患者iPS細胞から分化誘導された心筋細胞にQT延長の特性があることが報告された。この報告からわかるように、ヒトiPS細胞の創薬応用には、疾患モデル細胞の構築という期待も大きい。疾患モデル細胞の利用ということを考えれば、ヒトES細胞の利用よりもヒトiPS細胞の有用性が勝るといえる。

#### D. 考察

ヒトiPS細胞から分化した標本が理論通りヒトの臓器の特性を示すのであれば、動物実験では検出できない副作用の予測、動物実験数の削減、臨床試験実施の迅速化が実現し、医薬品に対するヒトの安全性を検証する安全性薬理試験法としてガイドライン化されるメリッ

トは大きい。

しかし現状では、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を QT 間隔延長の潜在的可能性に関する非臨床的評価にすぐに利用することは出来ず、また動物実験を代替できるような試験法を開発できる見通しはたっていない。今後ヒト由来幹細胞を薬事申請に利用可能な試験法の開発につなげていくためには、未分化 iPS 細胞の維持管理にかかる膨大なコスト、ヒト iPS 株ごとに最適化されている分化誘導プロトコルの標準化、安定した標本作製に必要な技術者の確保、薬理試験項目の選定、薬効の計測システムの選定、ハイスループット化のための技術開発等の種々の問題点を統合的に解決していく必要がある。まず目指すべきところは、品質の安定性が評価された標本が大量かつ安価に供給されるシステムが整

備されることである。それにより、ヒト由来幹細胞を用いた試験法の施設間バリデーション研究が可能となり、将来的に非臨床試験ガイドラインとして国際的に受け入れられる可能性がある。

#### **E. 結果**

ガイドライン化までのロードマップを想定したうえで研究開発を行うことが、ヒト iPS 細胞の産業実用化への道を促進するだろう。

#### **F. 研究発表等**

ワークショップ

「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性」を開催

平成 23 年 1 月 22 日～23 日、甲府

関野祐子 世話人

#### **G. 知的財産権の取得状況**

なし

厚生労働科学研究費補助金医薬品（医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業）  
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」  
平成 22 年度分担研究報告

－ヒト由来幹心筋の安全性薬理実験のプロトコールの提案－

研究分担者：杉山 篤（東邦大学 教授）

研究要旨：国内外におけるヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニングシステムの開発状況に関する情報を収集し、それらの長所と短所を解析し、実用化に向けての方向性を検討した。ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニングシステムを文献調査し、専門家を交えての班会議でそれらの有用性と課題を検討した。ヒト幹細胞由来心筋細胞の活動電位あるいは field potential を指標にした開発候補化合物の電気生理学的作用の評価に基づく安全性薬理試験への応用研究が国内外の複数の研究機関で進められている。薬物性再分極遅延はヒト幹細胞由来心筋細胞の field potential 持続時間あるいは活動電位持続時間の延長から推定することが可能である。しかしながら、ヒト幹細胞由来心筋細胞の反応は、ヒト心筋における薬理反応と定性的には類似するが、定量的評価を正確に実施するためには解決すべき課題がいくつかある。例えば、iPS 由来心筋細胞の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  といった代表的なイオンチャネル発現密度を native ヒト心筋あるいは不整脈を発生しやすい患者と同程度に調整する手法、徐拍に伴う生理的再分極遅延を薬物による再分極遅延から分離して評価するための拍動数の制御法、目的に応じた細胞型（たとえば心室筋様の活動電位波形を示す細胞）を選択的に作製する手法、活動電位持続時間は発達段階で変化するので評価のタイミングを推定する指標の開発、クローンごとに薬物反応性が均一であることを確認する指標（iPS 由来心筋細胞の規格化）等も必要である。

キーワード：薬物性 QT 延長症候群、torsades de pointes、ICH S7B、ヒト幹細胞由来心筋細胞

**A. 研究目的**

ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニングシステムは、患者における医薬品の有効性と副作用の予測精度が極めて高いと期待されている。このシステム開発が実現すれば動物実験数の大幅な削減と臨床試験の迅速化およびコストダウンが可能になる。本研究では、国内外におけるヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニングシステムの開発状況に関する情報を収集し、それらの長所と短所を解析し、

実用化に向けてのシステム作製の方向性を検討した。

**B. 研究方法**

ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた現行の薬物スクリーニングシステムの実用例を文献調査し、この分野の専門家を交えての班会議でそれらの有用性と課題を検討した。ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニングシステムが、どのような条件を満たせば薬物性致死