201132068A

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23年度総括研究報告書

研究代表者　　関野　祐子

平成24（2012）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．ヒト由来幹細胞の神経分化に関する調査研究

佐藤　　薫……………… 17

3．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……………… 29

4．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……………… 35

5．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……………… 47

6．ヒト由来幹細胞の心筋分化に関する調査研究

諫田　泰成……………… 53

7．ヒト由来幹細胞の肝実質細胞分化に関する調査研究

石田　誠一……………… 61

Ⅲ．公開シンポジウム「ヒトiPS細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」

1．抄録

2．シンポジウム発表内容

Ⅰ. 総　括　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研究事業）

総括研究報告書

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

（H23-医薬-指定-019）

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：

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 細胞から分化した標本には、動物実験では検出できないヒト特異的副作用の予測、臨床試験実施の迅速化の実現が期待されている。ヒト iPS 細胞を用いた薬理試験法を確立するためには、iPS 細胞株、株の継代数、分化誘導法、分化後の培養日数などについて一定の基準を設定して標準化しなくては、試験データの再現性は保証されないことを昨年の調査結果として報告した。

心筋分化について二つの iPS 株の分化指向性について比較を行ったところ、株によりかなり違いがあることが明らかとなった（諫田）。また分化誘導法については、ダイレクトリプログラミング法の登場などに代表されるように、さらに多様化が進んでいることが明らかとなった（佐藤）。肝実質細胞分化に関する研究の現状調査によると、標準的に利用できる分化細胞はまだ入手が困難である（石田）。現状のままでは、ヒト iPS 細胞を用いた標準的な薬理試験法が自然発生的に登場することは期待できない。

現在の安全性薬理試験は医薬品のカリウムチャネルへの作用を重視しているが、催不整脈の予測性を高めるためには、ナトリウムチャネルへの作用を検証する必要があり、この試験法に分化心筋細胞を利用することが期待されている（杉山）。ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた試験法を確立するには、まず中枢神経系のインビトロ試験法の開発が必要である。昨年度提案された軸索輸送を指標にする実験系を本年度は海馬培養神経細胞への応用を行った（五嶋）。加えて、シナプス後部機能の分化レベルを決定するバイオマーカーとしてドレブリンの定量的解析法が開発され、その薬物への反応性を確認した（白尾）。

ヒト iPS 細胞の安全性薬理試験への応用可能性は、これまで海外で流通していた Cellular Dynamics International (CDI) 社のヒト iPS 由来心筋が平成 23 年 6 月に、ヒト iPS 由来神経細胞が平成 24 年 3 月に国内販売されたことで、大いに進展した（関野）。今後、標準的な分化細胞を用いた実験プロトコルを整備することが薬理試験法の確立にとって重要な鍵となる。

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　肝実質細胞　ガイドライン

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)ヒト由来幹細胞の神経分化に関する調査研究（佐藤薫）
(3)中枢神経軸索輸送機能よる安全性薬理評価系の構築（五嶋良郎）
(4)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）
(5)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）
(6)ヒト由来幹細胞の心筋分化に関する調査研究（諫田泰成）
(7)ヒト由来幹細胞の肝実質細胞分化に関する調査研究（石田誠一）

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、中枢神経細胞、肝実質細胞の実用化にむけて、安全性薬理試験の標本としての利用は可能であるかについて、産学官の専門家からの情報収集や実験により科学的に検討することにある。また、インビトロ試験法が安全性と毒性の評価系として確立していない中枢神経系に関しては、利用可能性のあるインビトロ実験系を提案する。

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 年度に指定研究として採択されたが、本年度も新たに指定研究として採択された。

本年は昨年と同様に、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の現在の動向を踏まえて産学官の専門家らと協議し、薬理試験への応用のために必要な条件を検討した。

本年度の研究成果としては、「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」と題したシンポジウムを開催し、研究班の研究活動に関する広報を行うことを目的とした。

B. 研究方法

情報収集による検討

班会議の開催、関連学会への参加等により、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情報収集を行った。本年度の調査研究での情報収集に協力した企業は、製薬会社 4 社、受託試験会社 2 社、生理機能計測機器会社アルファメッドサイエンティフィック㈱、さらに、ヒト iPS 細胞分化細胞の国内販売を行っている iPS アカデミアジャパン社であった。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。

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）

ヒト iPS 細胞を利用した試験法の開発に対して、創薬の現場は何を期待しているのか、ヒト iPS 細胞の実用化に必要なこ

とはなにか、などについてその現状と課題に関して、ワークショップ、班会議、研究室訪問などを企画し、情報収集を行った。また、これまでの研究成果をシンポジウムを開催して発表した。

(2)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)

Human iPS cell (hiPSCs), neuron, differentiation をキーワードとして 2007 年以降の文献を PubMed 検索し文献を収集し、hiPSCs からの神経細胞分化誘導に関する文献調査を行った。

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

軸索輸送の障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、運動ニューロン病、統合失調症のような神経変性疾患の病因の一因として注目されている。本研究において、軸索輸送定量化の意義と他の解析法の比較を行なった。また、ニワトリ後根神経節細胞において確立した本アッセイ系を、海馬神経細胞へ適用した。さらに iPS 細胞における機能評価ならびに薬効評価系としての可能性と課題を議論した。

(4)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)

アルツハイマー病等の神経難病では、神経細胞死によりこの神経回路網の機能異常が惹起される結果であると考えられてきたが、最近では、神経回路網の接点であるシナプスの機能異常が着目されている。本年度は、昨年報告したバンカー法を用いたシナプス分化の評価法を改良し、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を同じ基準により評価できる定量性の高い評価法の開発を試みた。種々の受容体機能活性変化により惹起されるシナプス機能分化の遅延及び促進をどの程度定量的に評価できるかを解析し、中枢神経細胞を用いた *in vitro* の安全性薬理試験が開発可能であるかを検討した。

(5)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)

心血管系に直接の作用がなくても、薬物が中枢神経系、自律神経系あるいは内分泌系に作用し、それらの器官の変化を通じて心血管系に悪影響をおよぼすことがある。薬物が引き起こす機能的な心毒性としてQT延長以外では、変力作用、変時作用および変伝導作用が挙げられる。まず対応すべき課題としてNa^+チャネル抑制作用を取り上げ、その位置づけ、発生機序、in vitroおよびin vivoモデルでの評価および回避のための戦略を調査研究した。

(6)ヒト由来幹細胞の心筋分化に関する調査研究(研究分担者:諫田泰成)

平成 19 年 11 月に我が国で樹立されたヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と異なり倫理面の問題がなくヒト細胞標本を作成できることから、医薬品の QT 延長評価への応用が期待される。特に、Na^+, Ca^{2+}, K^+チャネルのすべてを発現しているような分化心筋細胞を使用することにより、hERG 試験より QT 延長の予測性が高くなると期待される。しかしながら、使用する iPS 細胞株、心筋分化誘導のプロトコール、分化心筋の品質評価、薬理試験の手法などが整備されておらず、実用化への

課題となっている。

今回、公的バンクから入手可能な 2 種類のヒト iPS 細胞株を用いて心筋細胞への分化プロトコールを比較検討した。さらに、安全性薬理試験に向けた問題点も合わせて調査を行った。

(7)ヒト由来幹細胞の肝実質細胞分化に関する調査研究(研究分担者:石田誠一)

iPS 細胞が開発され、胚性幹細胞とほぼ同等のヒト幹細胞の入手と研究が格段と容易になり、iPS 細胞を出発材料とする肝細胞の分化誘導研究が加速された。本研究では、この iPS 細胞に由来する肝細胞の研究開発を取り巻く現状を調査し、品質管理に関する懸念、分化誘導肝細胞を用いるリスクとベネフィット、細胞の評価指標としてゲノム DNA のメチル化の可能性について情報を収集した。

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

情報収集による検討

現行の安全性薬理試験では、hERG チャ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ストラテジーによるが、安全性薬理試験として臨床試験の移行に先立ち行うことは ICHS7B に定められている。ヒト iPS 由来心筋細胞をこの試験に用いることは現時点では可能ではないが、将来的な可能性に期待がよせられている。現在、ヒト iPS 由来心筋細胞マニュアルパッチクランプや細胞外記録法で電流解析を行っている。しかし、ハイスループットシステムに応用することはいまだ困難である。hERG 試験は現在オートパッチによりハイスループット化されているため、化合物探索の段階で利用して、開発後期に hERG 陽性で脱落する危険性を回避している。そこで、マルチチャネルの作用を調べることのできるヒト iPS 由来心筋細胞をオートパッチシステムで利用が可能かどうかは実用化にむけて大きな課題である。オートパッチ機器の販売会社が、iPS 細胞の応用に関するシンポジウムを開催した。いくつかの製薬企業がヒト iPS 由来心筋細胞を hERG 試験で用いている細胞に置き換えられるかという試みを開始して

いる。

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。

ヒトiPS細胞の安全性薬理試験への応用可能性は、これまで海外で流通していたCellular Dynamics Inter- national (CDI) 社のヒトiPS由来心筋が平成23年6月に、ヒトiPS由来神経細胞が平成24年3月に国内販売されたことで、大いに進展した。

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)

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。もっとも関心の高いものは心機能に対する安全性の評価への応用である。

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)。

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。しかし、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。おそらく、hERG試験で陽性でも、その他薬理作用のベネフィットが大きいと考えられる医薬品候補物質についてのフォローアップとして用いることが最も現実的である。しかし、コストの問題をどう考えるかである。実用化のためには現状では標本の獲得に多額の費用を要するため、導入についてはあまり積極的ではない。

さらに、ヒトiPS分化心筋を薬理試験に用いるためには満たすべき条件がある。心筋に発現する機能タンパク質が複数(チャネルと筋線維)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が問題である。また、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。

これらのことを考慮すると、分化心筋細胞の品質として再現性を求められる条件は、たとえば、発現するチャネル(ナトリウムチャネル、カリウムチャネル、カルシウムチャネル)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つきまとう。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。

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。これまで海外で流通していたCellular Dynamics International (CDI) 社のヒトiPS由来心筋が平成23年6月に、ヒトiPS由来神経細胞が平成24年3月に国内販売された。そのため、多点電極上にモノレイヤーで培養するプロトコールを、国内の研究機関で確認することが出来るようになった。今後標本の有用性を複数の研究機関で比較検討することが望まれる。

(2)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）

人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells, iPSCs)から神経幹細胞塊（neurosphere）を介さずに神経細胞に分化誘導する手法（ダイレクトディフェレンシエーション法）に関する報告が増えてきていること、この手法を用いて分化誘導された神経細胞の株間比較が行われ出しているが十分な報告例がないこと、iPSC化せずに体細胞から直接神経細胞を分化誘導するダイレクトリプログラミング法が新しい技術として出てきていること、を明らかとした。分化誘導法の多様化が促進している。

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

ラット海馬培養神経細胞にニワトリDRGと同様に DiI染色を試みたところ、細胞毒性が生じ、観察可能な細胞がほとんど得られなかったため、海馬神経細胞へのDiI染色法の適用は困難であると判断した。そこで、DiI染色で標識される粒子は、主にリソソームであることにヒントを得て、リソソームマーカーであるLAMP-1を標的とした軸索輸送観察を試みた。その結果、EGFP-LAMP-1を過剰発現させた海馬培養神経細胞において、軸索内で一定の輝度を示す移動粒子を観察することができた。また、培養4日後と7日目後の比較を行ったところ、7日後の方が、単位時間あたりにより多くの粒子が観察できる傾向が示された。すでに確立した軸索輸送自動解析系が、他の細胞系に応用しうる事が明らかとなった。本実験系は、iPS細胞を利用した病態の解明、神経毒性試験、薬物スクリーニングに有用である。

(4)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）

機能タンパクのスパイン部位への集積度の定量的評価のために、スパイン／樹状突起幹比（spine-dendrite ratio: SDR)を測定した。まず樹状突起スパイン形態のアウトラインを作成し、樹状突起スパイン頭部の免疫染色濃度とスパインの付け根の樹状突起シャフトの当該蛋白の免疫染色濃度を測定した上で、その量比

としてSDRを決定した。スパイン形態のアウトラインの作成は、遺伝子導入によりGFPを発現させた細胞を用いることができる場合は、GFP蛍光像あるいはF-アクチン染色像を用いて形態のアウトラインを作成した。アウトラインを確定したのち、スパイン部とスパインの付け根の受容突起幹に、0.26 μm^2の円を描き、その内部の蛍光強度の平均を算出し、その比をSDRとした。各細胞の第一分岐から第二分岐間の樹状突起幹50 μm ~100 μmに存在するスパインに関してドレブリンSDRを測定し、それを平均したものをその細胞におけるドレブリンSDRとした。通常の培養状態では、ドレブリンSDRは1.65 ± 0.03であった。この値からドレブリンがスパインに集積傾向があることを示している。ドレブリンの集積度が定量的に測定できることがわかった。ドレブリンSDRはシナプス後部の分化レベルの評価に用いることが可能であることがわかった。さらに、ドレブリンSDRを用いるとグルタミン酸ばかりでなく、セロトニン、ドパミンの薬理作用を調べることができることを確認した。これらのアゴニスト以外にも種々の受容体の活性レベルの特異的評価に、ドレブリンSDRが利用可能であると考えられ、中枢神経細胞を用いた *in vitro* の安全性薬理試験の開発の可能性が示唆された。

(5)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)

薬物性QT延長症候群発生回避のための基本戦略を応用することにより、開発候補化合物がNa^+チャネル抑制作用を有することに起因する心血管リスクをin vitroおよびin vivo試験で推測することが可能であることが示唆された。In vitro試験ではヒトNa^+チャネル発現細胞のI_{Na}電流あるいはモルモット乳頭筋の活動電位の最大立ち上がり速度を指標に推定し、in vivo試験では心電図のQRS幅やヒス束心電図のHV間隔を指標に評価が可能である。臨床試験においても心電図のQRS幅からNa^+チャネルに対する作用を推定できる。

(6)ヒト由来幹細胞の心筋分化に関する調査研究(研究分担者:諫田泰成)

公的バンクより培養可能なヒトiPS細胞株として201B7とTicの2種類を選んで、本研究に用いた。Oct3/4などの未分化マーカーの発現により、両細胞株とも未分化状態であることを確認した。次に、心筋分化能の比較を行った。心筋への分化誘導は拍動EBを介する方法と介さない方法の2通りのプロトコールを検証した。心筋細胞への分化能は株間で差があることが明らかになり、適切な株を選択する必要があることが示唆された。

安全性薬理試験の解析方法について調査した。大きく分けて個々の心筋を用いる方法(パッチクランプ法)とクラスターによる解析方法の2通りあり、目的に応じて手法を選択する必要がある。

実際にヒトiPS細胞を用いて非臨床におけるQT延長の予測性が向上するのかに関しては、QT延長を示す薬剤を共通で用いて多施設間で検証するなどにより、試験法の簡便さと信頼性を検証することが必要と考えられる。

(7)ヒト由来幹細胞の肝実質細胞分化に関する調査研究(研究分担者:石田誠一)

平成 24 年 3 月において、iPS 細胞より分化誘導された肝細胞の市場への供給は、米国の Cellular Dynamics Inter- national (CDI) 社と本邦の株式会社リプロセルがそれぞれ平成 24 年前半をメドに準備を進めていた。CDI 社の詳細は未定であった。リプロセル社は凍結バイアルでの提供を予定している。iPS 細胞はリプロセル社で樹立したものを用い、大阪大学 水口らの方法に準拠し肝細胞へと分化誘導している。分化誘導法を調整することで、CYP3A4 活性の高いタイプの細胞、CYP1A2 活性の高いタイプの細胞などを提供する。

肝細胞の成熟度を規定する分子マーカーとして、ゲノム DNA のメチル化を用いることが出来ないかに関して、文献調査を行った。分化誘導した肝細胞間で、肝細胞としての生物活性とゲノム DNA メチル化を比較した論文はまだ報告例がなかった。しかしながら、幹細胞から肝細胞への分化誘導過程におけるゲノム DNA メチル化の変化を解析した報告例が見いだされた。Kim らは、ヒト ES 細胞を肝細胞へと分化誘導し、その過程で幹細胞、胚体内胚葉、肝細胞の各段階においてメチル化により発現が調節されていると考えられる遺伝子群を網羅的解析により抽出した。多くの遺伝子でメチル化の変化が観察され、それらの遺伝子を用いることで、細胞分化の方向性を規定する因子の解析が可能であるとする結果が報告された。

D. 考察

ヒト iPS 細胞を安全性薬理試験に応用して実用化するには、分化誘導した細胞の標準化が必須である。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。

心筋分化について二つの iPS 株間に分化指向性について比較を行ったところ、株によりかなり違いがあることが明らかとなった（諫田）。また、分化誘導法については、ダイレクトリプログラミング法の登場などに代表されるように、さらに多様化が進んでいることが明らかとなった（佐藤）。肝実質細胞分化に関する研究の現状調査によると、標準的に利用できる分化細胞はまだ入手が困難である（石田）。現状では、薬理反応の再現性の高い分化細胞が大量に安価に入手できる状態が最も期待されるところである。

現在の安全性薬理試験は医薬品のカリウムチャネルへの作用を重視しているが、催不整脈の予測性を高めるためには、ナトリウムチャネルへの作用を検証する必要があり、この試験法に分化心筋細胞を利用することが期待されている（杉山）。

また、医薬品の中枢神経系への作用を検証する試験法として軸索輸送を指標にする実験系が提案されていたが、本年度は海馬神経細胞に応用し、その有用性が確認された（五嶋）。さらに、シナプス後部機能の分化レベルを決定するバイオマーカーとしてドレブリンの定量的解析法が開発され、その有用性が確認された（白

尾）。

質の高い分化細胞が供給され、早期に施設間比較によりデータの再現性を確認することが望まれる。

E. 結論

現状では、ヒト iPS 細胞を用いた標準的な薬理試験法が自然発生的に登場することは期待できない。しかし、これまで海外で流通していた CDI 社のヒト iPS 由来心筋細胞、ヒト iPS 由来神経細胞が本年度に国内販売されたことで、これらの細胞を使用して標準的実験プロトコルを提案できる可能性が生じた。

もちろん、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できず、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いまだたっていない。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ことについては、昨年と同様である。

F. 研究発表

論文発表

1. Sato, K., Kuriwaki, J., Takahashi, K., Saito, Y., Oka, J., Otani, Y., Sha, Y., Nakazawa, K., Sekino, Y., Ohwada, T. Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without Interaction with estrogen receptors. ACS Chem Neurosci 3, 105-113 (C.A.), (2012)
2. Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S., Koizumi, S., Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. Cell Mol Neurobiol (in press)
3. Takata, F., Dohgu, S., Yamauchi, A., Matsumoto, J., Machida, T., Fujishita, K., Shibata, K., Shinozaki, Y., Sato, K., Kataoka, Y., Koizumi, S., In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related barrier properties. Plos ONE (in press)
4. Goshima Y, Hida T, Gotoh T. Computational analysis of axonal transport: A novel assessment of neurotoxicity, neuronal development and functions. Int J Mol Sci, 13(3), 3414-3430 (2012).
5. Tanaka K, Sato K, Yoshida T, Fukuda T, Hanamura K, Kojima N, Shirao T, Yanagawa T, and Watanabe H. “Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication.” Muscle and Nerve, 44:968-977 (2011)
6. Kobayashi-Yamazaki C, Shirao T, Sasagawa Y, Maruyama Y, Akita H, Saji M, and Sekino Y. “Lesions of the supramammillary nucleus decrease self-grooming behavior of rats placed in an open field” The Kitakanto Medical Jorunal 61 : 287-292 (2011)
7. Han W, Takamatsu Y, Yamamoto H, Kasai S, Endo S, Shirao T, Kojima N, Ikeda K. “Inhibitory role of inducible cAMP early repressor (ICER) in methamphetamine-induced locomotor sensitization” PLoS ONE 6: e21637 (2011)
8. Okamoto T, Endo S, Shirao T, and

Nagao S. “Role of Cerebellar Cortical Protein Synthesis in Transfer of Memory Trace of Cerebellum-Dependent Motor Learning” J. Neurosci. 31: 8958-8966 (2011)
9. Kambe T, Motoi Y, Inoue R, Kojima N, Tada N, Kimura T, Sahara N, Yamashita S, Mizoroki T, Takashima A, Shimada K, Ishiguro K, Mizuma H, Onoe H, Mizuno Y, Hattori N "Differential regional distribution of phosphorylated tau and synapse loss in the nucleus accumbens in tauopathy model mice." Neurobiol Dis.42:404-414.. (2011)
10. Okamoto T, Shirao T, Shutoh F, Suzuki T, Nagao S. “Post-training cerebellar cortical activity plays an important role for consolidation of memory of cerebellum-dependent motor learning.” Neurosci Lett. 504: 53-56. (2011)
11. Mancini A, Sirabella D, Zhang W, Yamazaki H, Shirao T and Krauss RS “Regulation of myoblast fusion by the actin-binding factor drebrin” Skeletal Muscle 1-36 (2011)
12. 佐藤 薫、グリア型グルタミン酸トランスポーター、日薬理誌 138:127, 2011
13. 杉山 篤. 薬物性心毒性：基礎の立場よりポスト QT を考える. 心電図 32: 19-23, 2012.

学会発表
各分担者の項目を参照

G. 知的所有権の取得状況
なし

平成23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」

第１回班会議議事

日時　：平成23年12月21日（水）17時30分〜20時
場所　：八重洲倶楽部・第一会議室
出席者：白尾智明（群馬大学）、杉山篤（東邦大学）、五嶋良郎（横浜市立大学）、
中西真人（産業技術総合研究所）、光岡俊成（厚生労働省）、山本恵司（武田薬品）、田保充康（中外製薬）、千葉克芳（第一三共）、安東賢太郎（三菱化学メディエンス）、
慈幸秀保（アルファメッドサイエンティフィック）、関野祐子、石田誠一、佐藤薫、諫田泰成、入江智彦（以上、国立衛研）

以上順不同、敬称略

議題　：
１．最新の研究の進捗状況の報告
発表
研究代表者の関野より研究進捗状況の報告を行った
分担研究者より各自の研究の進捗報告があった。
　石田誠一：「幹細胞由来肝実質細胞開発をめぐる現状報告］
　佐藤　薫：「ヒト由来幹細胞の神経分化に関する調査研究」
　諫田泰成：「ヒトiPS細胞の心筋への分化誘導とその品質評価」
　白尾智明：「最近の興味ある話題」
話題提供　：中西真人　産業技術総合研究所
２．平成23年2月25日開催　シンポジウムに関して
　検討事項
　１）シンポジウムのメインテーマについて
　２）演者の検討
　　すでに講演の依頼をした先生
　　澤田先生（エーザイ）
　　吉田先生（京都大iPS研）
　　酒井先生（アカデミアジャパン）
　　豊島先生（アドバイザー）
　その他の演者の先生の検討
　３）開会／閉会の挨拶
３．今後の研究の方向性の検討
４．その他

以上

平成23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」

第２回班会議議事

日　　時　：平成24年2月25日（土）11時00分〜12時45分
場　　所　：長井記念館　１階　会議室Ａ
出 席 者　：【班員ならびにオブザーバー】
白尾智明（群馬大学）、杉山篤（東邦大学）、中西真人（産業技術総合研究所）、光岡俊成（厚生労働省）、田保充康（中外製薬）、千葉克芳（第一三共）、安東賢太郎（三菱化学メディエンス）、葛西千恵子（アステラス製薬）、慈幸秀保（アルファメッドサイエンティフィック）、関野祐子、石田誠一、佐藤薫、諫田泰成、入江智彦（以上、国立衛研）

【シンポジウム準備委員会】
石田誠一〔会場責任者〕、入江智彦〔プロジェクター係〕、久保崇〔照明係〕、金秀良〔タイムキーパー係〕、奈木照子〔受付・マイク係〕、佐々木佐知子〔受付・マイク係〕（以上６名、国立衛研）、市川玲子〔会場副責任者〕、久保田由美子〔受付・マイク係〕、江波京子〔受付・マイク係〕（以上３名、健康と良い友だち社）、千葉克芳〔撮影係〕（第一三共）

以上順不同、敬称略

議　　題　：

1. シンポジウムに関して
　・シンポジウム準備委員会との打合せ
　会場責任者の健康と良い友だち社の市川様から各会場案内と当日の各受け持ちの確認作業を行った。
2. 平成23年度研究報告書について
　研究代表者の関野より挨拶と報告があった。
　班員及びオブザーバーの各先生より簡単な報告があった。
3. 研究費の概算報告
　研究代表者の関野から報告があった。
4. 平成24年度の指定研究について
　「ヒトiPS分化細胞を利用した医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化(指定研究)」
　24年度の研究計画について各分担研究者と打合せを行った。
5. その他

以上

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23年度分担研究報告

ー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ー

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:

安全性薬理試験では、生命に関わる機能として心血管系、中枢神経系、呼吸器系に対する作用をコアバッテリー試験として評価している。安全性薬理試験は、新医薬品候補薬を臨床試験に移行する上で非常に重要な位置づけとなる。とりわけ心機能への有害作用は突然死の可能性があり、創薬プロセスの中でも探索研究初期の段階でそのリスクを軽減することが重視されている。現在、ヒト型受容体やヒト型チャネルを発現した細胞が探索研究初期のハイスループットスクリーニングに用いられている。しかし、これらのヒト型タンパク質の発現細胞を利用した試験法ではヒトの生理機能への有害反応を十分には予測できない点が欠点であり、いまだ動物実験に頼らざるを得ない。このような背景の中、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、などについて情報をまとめた。その結果、ヒト由来幹細胞から分化した臓器細胞は、分子レベルの試験法と動物を用いた機能試験の中間に位置づけられると考えられている。特にヒトでの有害反応の予測に利用できる可能性への期待が大きい。これまで海外で流通していた分化心筋細胞と分化神経細胞が国内代理店から購入できるようになった。これらは高価であるものの、臓器の細胞機能特性を安定して発現しており、品質が管理されているので、このような分化細胞を用いて実験プロトコールを確立し、多施設間で試験結果を比較検討して、薬理試験法としての有用性を科学的に検証することができる。

キーワード:創薬プロセス　安全性薬理試験　ヒト細胞　ヒト安全性予測

A.　研究目的

安全性薬理試験は、新医薬品候補である被験薬を臨床試験に移行する上で、とりわけ重要な役割を担っている。安全性薬理試験では、コアバッテリー試験として被験薬の心血管系、中枢神経系、呼吸器系への影響を評価する。試験には現在動物モデルが使われており、ヒトに対する被験薬の有効性・安全性評価には限界がある。特に近年、抗体医薬品などの分子標的医薬品が登場し、化学薬品を対象とする安全性試験による評価の限界はさらに深刻な問題となるため、これまでにも増して被験薬のヒト特異的な反応を予測する試験法の開発が望まれている。例えば、ヒト型タンパク質を発現する遺伝子改変動物の利用、ヒト細胞やヒト型タンパク質の発現細胞を用いたインビトロ試験法などが開発されているが、ヒトの生理機能の有害反応を十分には予測できていない。

これらの背景の中、5 年前のヒト由来人工多能性幹細胞(iPS 細胞)作製技術の

開発は、医薬品の承認申請に必要とされる種々の試験系にヒト細胞を利用することを可能にした。大学でのヒト iPS 細胞の実用化研究に関しては、再生医療への応用に重きが置かれており、創薬応用研究はあまり盛んではない。しかし、創薬の現場では、ヒトでの有害反応の予測を高める試験系の開発に関する期待が大きい。

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、班会議、シンポジウム開催を通じて情報を収集した。

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解決のために、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に、制限がある。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、iPS細胞を契機に日本の科学技術政策が大きく変化した。

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が、創薬応用研究は盛んではない。

iPS細胞研究プロジェクトの中で創薬応用に関係する研究プロジェクトは、先端医療開発特区(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」そして、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発事業」であり、成果が期待される。

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_{Kr} 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、*in vitro* I_{Kr} 測定(hERG 電流測定)への応用のニーズを検討した。昨年度の段階で入手できたヒト iPS 由来心筋細胞では hERG 電流特性が安定していなかったため、hERG 試験としてヒト iPS 分化細胞が利用される可能性はないと思われたが、本年度になってから海外に流通していた分化心筋が入手できるようになったために、ヒト iPS 由来心筋細胞が現行の hERG 試験に置き換えられる可能性を検証することが可能となった。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ると考えられていた。しかし、分化心筋細胞をシート状に培養することで、この問題は克服できると期待されている。分化心筋細胞がシートを形成する際に、細胞同士がギャップジャンクションを形成するからである。シート毎の APD のバラつきも少なく、安定した拍動が得られることが明らかとなり、心筋に発現する複数のチャネルへの影響を、複合的に捉えることができるメリットがある。標本の医薬品に対する反応性を、従来の試験法による結果と詳細に比較検討していくことで、安全性薬理試験法への応用が可能であろう。

その他

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たが、論文発表された疾患iPS細胞が一般では利用できず、スクリーニング系の開発は進んでいない。

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点については、解決のめどがたっていない。

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れば、ヒトiPS細胞から分化した細胞の利用価値は高い。

D. 考察

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。もっとも関心の高いものは心機能に対する安全性の評価への応用である。

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）

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。しかし、現行の hERG 試験では偽陽性率が高いため、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偽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。おそらく、hERG 試験で陽性でも、その他薬理作用のベネフィットが大きいと考えられる医薬品候補物質についてのフォローアップとして用いることが最も現実的である。しかし、コストとのバランスをどう考えるかである。実用化のためには現状では標本の獲得に多額の費用を要するため、導入についてはあまり積極的ではない。さらに、ヒト iPS 分化心筋を薬理試験に用いるためには満たすべき条件がある。心筋に発現する機能タンパク質が複数（チャネルと筋線維）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が問題である。また、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。これらのことを考慮すると、分化心筋細胞の品質として再現性を求められる条件は、たとえば、発現するチャネル(ナトリウムチャネル、カリウムチャネル、カルシウムチャネル)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、まだまだ多くの解決しなくてはならない課題がある。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。

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。これまで海外で流通していた Cellular Dynamics International (CDI) 社のヒト iPS 由来心筋が平成 23 年 6 月に、ヒト iPS 由来神経細胞が平成 24 年 3 月に国内販売された。そのため、多点電極上にモノレイヤーで培養するプロトコールを、国内の研究機関で確認することが出来るようになった。今後標本の有用性を複数の研究機関で比較検討することが望まれる。

ヒト iPS 細胞から分化誘導したヒト細胞を用いて医薬品の特性を解析し、安全性薬理試験における有用性を確認するためには、標本や実験プロトコールの標準化に関する研究を レギュラトリーサイエンスとして戦略的に推進して、関連情報の共有化を行い、多施設間で実験データの再現性を確認できる環境をいち早く整備することが必須である。実用化のためのロードマップの最初のゴールは、多くの試験施設で同じ細胞特性を示す分化細胞を利用することである。そのためには、分化細胞の配給システムを構築し、多施設間で試験結果をバリデーションできる試験プロトコール整備を行う必要がある。

E. 結果

ヒト iPS 細胞から分化した細胞を用いたインビトロ試験結果と、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。つまり、陽性対照、陰性対照の医薬品の作用を同一プロトコールにより複数施設で比較することにより、偽陽性率を確認し、薬理試験法としての有用性を科学的に検証していくこととなる。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。

F. 研究発表等

公開シンポジウム
「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」を開催
約 150 人、2012 年 2 月 25 日、東京
本報告書の項目 III を参照のこと

G. 知的財産権の取得状況

なし