

iPS細胞由来ニューロンの薬理学的プロファイリング

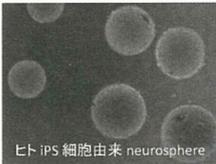
佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第一室長

倫理的問題を解決したヒト幹細胞として、iPS細胞研究の裾野が爆発的に広がってきた。神経系分野においては、再生医療への応用はもとより、*in vitro* の安全性評価系に、これまでほとんど使用することができなかったヒト神経細胞標本の適用を可能にすることから、ヒト予測性の向上、創薬の高速化・高効率化を実現し、創薬過程に大きな変革をもたらすことが期待されている。しかし、iPS細胞の基となった細胞種やiPS化プロトコル、さらには神経細胞を分化誘導するプロトコルが非常に多岐にわたることが平成22年度厚生労働省科学研究補助金医薬品・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」調査研究により明らかとなった。

iPS細胞を目的臓器の細胞に分化させるためには、iPS細胞から胚様体を作り、胚様体から目的臓器幹細胞からなる幹細胞塊を作り、これを分化誘導培地内で接着培養する必要がある。神経系はその他の臓器と異なり、幹細胞塊 (neurosphere) の状態で増殖、凍結、融解が可能という大きなメリットがある。そこで、各研究機関が保有しているヒトiPS細胞由来neurosphereの供与をうけ、neurosphereから分化誘導した神経細胞の性質、生理的特徴について薬理学的プロファイリングを継続中である。ヒトiPS細胞由来neurosphere (大阪医療センター樹立fibloblast由来osaka株、京都大学山中研樹立fibloblast由来201B7株、253G1株) を、single cellにて播種し、分化誘導し、細胞分化マーカー・シナプス機能成熟マーカー発現、ならびに細胞内Ca²⁺変動測定法を用いて機能的な受容体発現、神経回路形成について比較検討を行った。本シンポジウムでは、これらの比較検討結果について報告し、ヒトiPS細胞由来神経細胞の安全性評価系構築の方向性、実現性について議論を深めたい。

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

iPS細胞由来ニューロンの薬理的プロファイリング

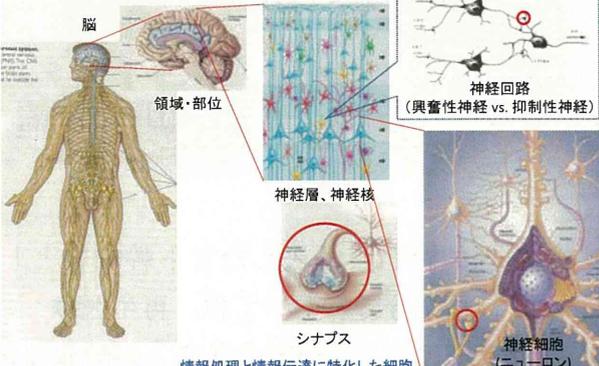


ヒト iPS 細胞由来 neurosphere

国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室
佐藤 薫

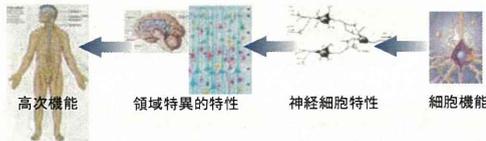
平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

中枢神経の基本単位 = 神経細胞 (ニューロン)



脳
領域・部位
神経層、神経核
シナプス
神経回路 (興奮性神経 vs. 抑制性神経)
神経細胞 (ニューロン)
情報処理と情報伝達に特化した細胞

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225



高次機能 ← 領域特異的特性 ← 神経細胞特性 ← 細胞機能

ヒト iPS 細胞由来神経 × ? ? ?

種差の壁

- ヒトへの外挿が困難
- dose 設定が困難
- 動物愛護の精神に沿わない、等

| 動物 | 高次機能 | 領域特異的特性 | 神経細胞特性 | 細胞機能 |
|----------|------|---------|--------|------|
| In vitro | × | △ | △ | △ |
| In vivo | △ | △ | × | × |

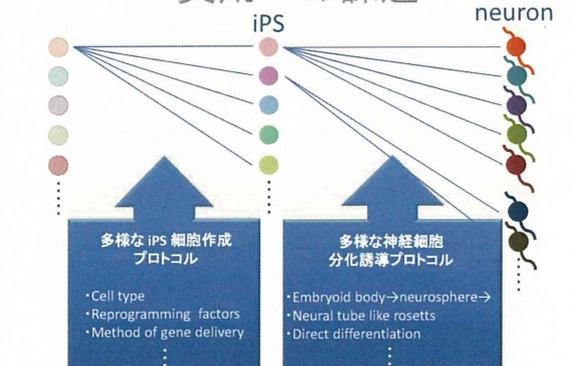
平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

安全性試験におけるヒト iPS 細胞由来神経細胞への期待

- ◆これまでほとんど使用することができなかったヒト神経細胞標本の安全性試験への適用が可能になる。 →ヒト予測性の向上?
- ◆ *In vitro* 試験系として iPS 細胞の早期実用への期待が高い。

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

実用への課題



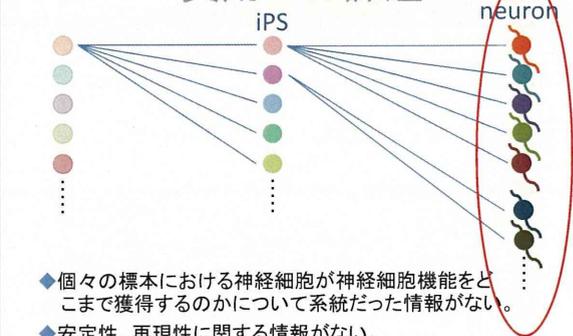
多様な iPS 細胞作成プロトコル
 ・ Cell type
 ・ Reprogramming factors
 ・ Method of gene delivery
 …

多様な神経細胞分化誘導プロトコル
 ・ Embryoid body → neurosphere →
 ・ Neural tube like rosetts
 ・ Direct differentiation
 …

iPS → neuron

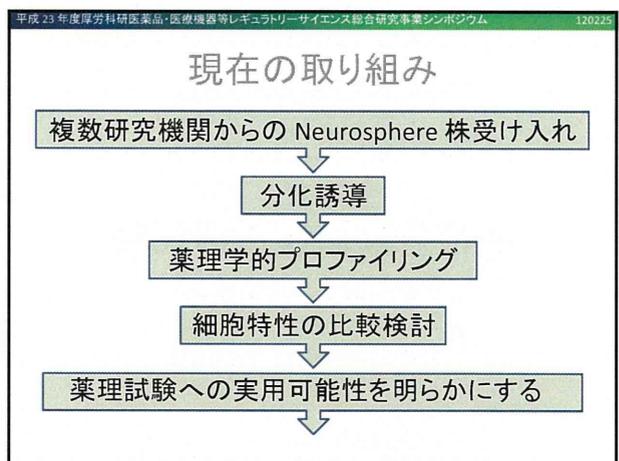
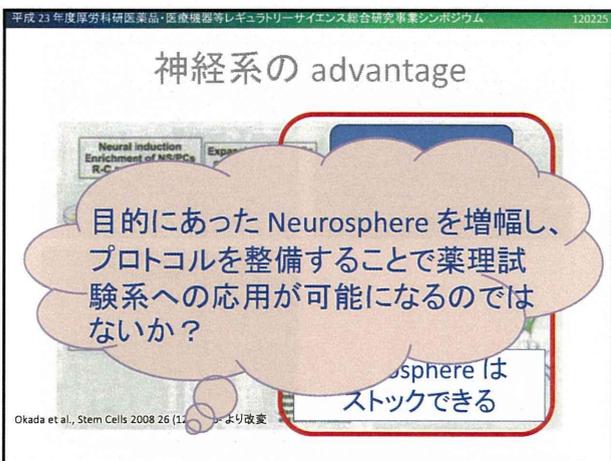
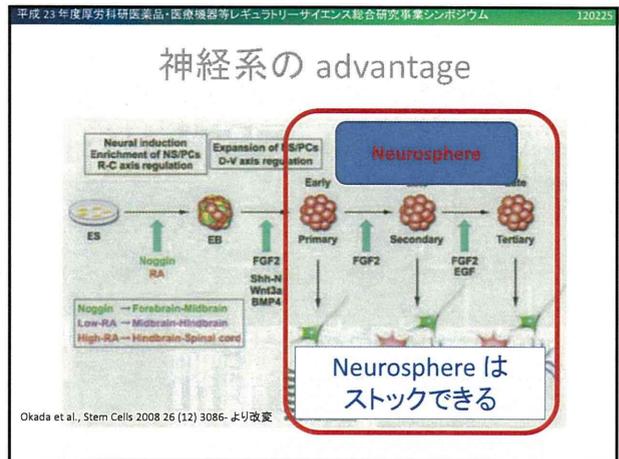
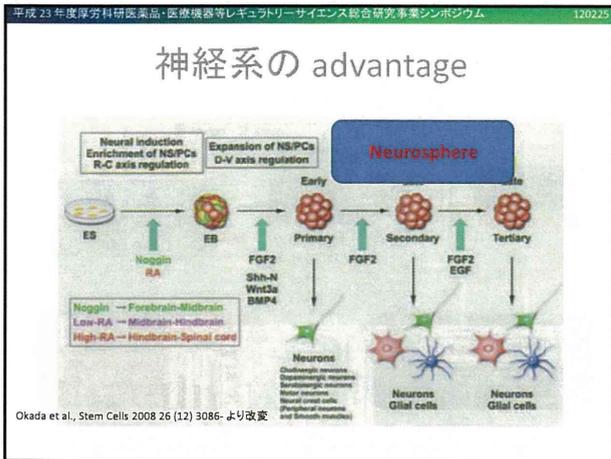
平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

実用への課題



iPS → neuron

- ◆ 個々の標本における神経細胞が神経細胞機能をどこまで獲得するのかについて系統だった情報が無い。
- ◆ 安定性、再現性に関する情報が無い。



平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

| | 高次機能 | 領域特異的特性 | 神経細胞特性 ・機能タンパク質発現 ・シナプス形成 ・スパイン様形態 ・興奮性神経 ・抑制性神経 | 細胞機能 ・機能タンパク質発現 |
|---------------|------|---------|---|--------------------|
| ヒト iPS 細胞由来神経 | × | ? | ? | ? |

種差の壁

- ・ヒトへの外挿が困難
- ・dose 設定が困難
- ・動物愛護の精神に沿わない 等

| 動物 | 高次機能 | 領域特異的特性 | 神経細胞特性 | 細胞機能 |
|----------|------|---------|--------|------|
| In vitro | × | △ | △ | △ |
| In vivo | △ | △ | × | × |

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

これまでに検討したヒト iPS 細胞由来 neurosphere 株

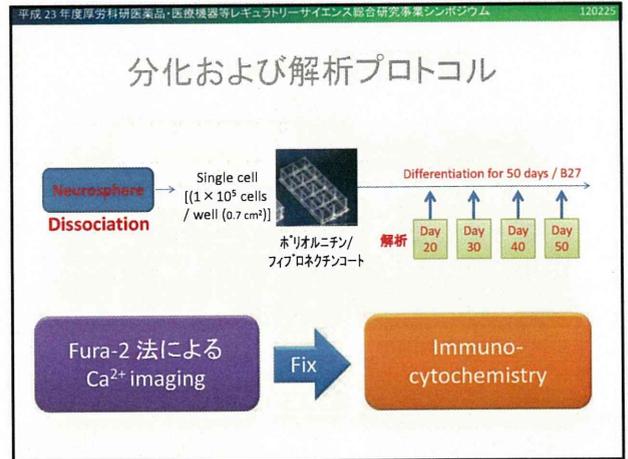
ヒト iPS 細胞由来 neurosphere

1. Osaka (大阪医療センターよりご供与)
2. ヒト iPS 201B7 由来
3. ヒト iPS 253G1 由来

(慶応大学よりご供与)

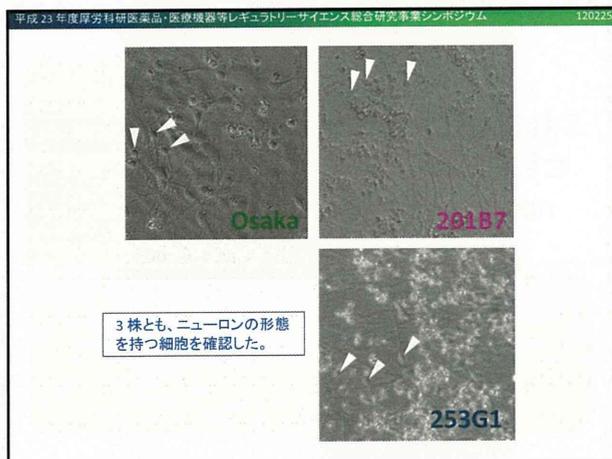
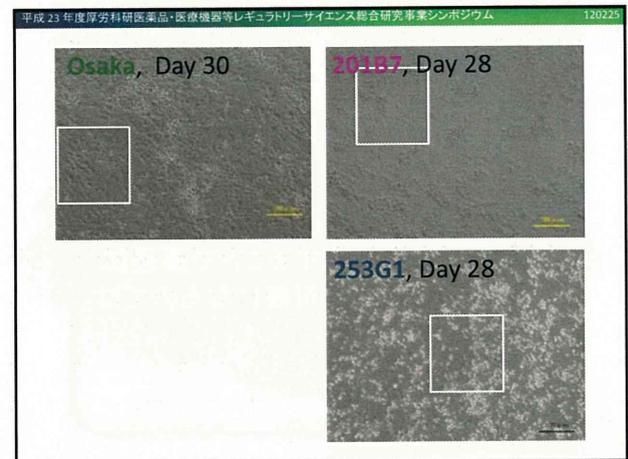
平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

| クローン名 | 導入遺伝子 | 由来 | 引用文献 |
|--------------|-------------------------------------|-----------------|--|
| Osaka | Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc (すべてヒト由来) | ヒト成人線維芽細胞 (HDF) | 大阪医療センター 投稿準備中 |
| 201B7 | Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc (すべてヒト由来) | ヒト成人線維芽細胞 (HDF) | Takahashi K et al. Cell. 2007 |
| 253G1 | Oct3/4, Klf4, Sox2 (すべてヒト由来) | ヒト成人線維芽細胞 (HDF) | Nakagawa M, Koyanagi M et al. Nat. Biotech. 2007 |



平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

位相差顕微鏡像の比較



平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

Ca²⁺ イメージングによる比較

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

Fura2 Ca²⁺ イメージング法-1

Fura2

- ・R. Y. Tsien らにより開発された蛍光プローブ。
- ・1 μmol/l 付近までの Ca²⁺ 濃度を計測可能。
- ・Ca²⁺ 結合により励起波長のピークが顕著にブルーシフト (362 nm→335 nm) する。
- ・335 nm 付近—Ca²⁺ 濃度の上昇に伴い蛍光強度が増大する。
- ・370~380 nm 付近—Ca²⁺ 濃度の上昇に伴い蛍光強度が減少する。

340 nm と 380 nm の二波長で励起し、蛍光強度の ratio をとると Ca²⁺ 濃度と対応づけられる。

図. Fura2のカルシウムイオン濃度変化に対する励起波長変化

AMエステル体は脂溶性が高いため細胞膜を通過することができ、細胞内のエステラーゼで加水分解されると、細胞外に漏れ出しにくい構造となるため細胞内 Ca²⁺ 濃度測定に適している。

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

Fura2 Ca²⁺ イメージング法-2

Aquacosmos ratio imaging system
励起波長を自動的に切り替えて蛍光強度を測定し ratio を算出するシステム

<手順>
細胞に Fura2-AM をロード
→各種薬物への反応性を検討

Fura-2 がロードされ、蛍光を発する細胞

- ・一回の実験で N=50-100 の細胞を検討できる。
- ・プロトコルが簡便。
- ・一度に多種の薬物について検討可能。

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

Fura2 Ca²⁺ イメージング法-3

薬理的検討に用いた薬物とその解釈

| 薬物 | 説明 | 反応時の解釈 |
|---------------------|-------------------------------------|---|
| picrotoxin | GABA (A) 受容体アンタゴニスト (IC50: 243 nM) | GABA (A) 受容体が発現している。 ・抑制性神経が分化し、興奮性神経とシナプスを作っている。 ・興奮性神経のシナプス形成も起こっている。 |
| NMDA | NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニスト | ・興奮毒性に特に関与の深い NMDA 受容体が発現している。 |
| Glutamate | イオンチャンネル型および代謝型グルタミン酸受容体アゴニスト | ・イオンチャンネル型もしくは代謝型グルタミン酸受容体が発現している。 |
| ATP | イオンチャンネル型および代謝型 P2 受容体アゴニスト | ・イオンチャンネル型もしくは代謝型 P2 受容体が発現している。 |
| High K ⁺ | 細胞外 K ⁺ 濃度を上げる | ・電位依存性 Ca ²⁺ チャンネルが発現している。 |
| ionomycin | Ca ²⁺ イオンの透過性を増加させる脂溶性分子 | ・細胞の生死について最後に確認。 |

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

Osaka

Day 20: ATP刺激のみ反応が認められた。

Differentiation Day 20

Picro: 50 μM picrotoxin 8 min n = 30
NMDA: 50 μM NMDA 1 min
ATP: 100 μM ATP 1 min
High K⁺: 80 mM 1 min
Iono: 5 μM ionomycin 30 s

Picro n=0; Glu n=0; NMDA n=1; ATP(c-e) n=14; HighK n=0

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

Osaka

Day 30: 抑制性、興奮性回路が確認できた。

Differentiation Day 30

Picro: 50 μM picrotoxin 3 min n = 66
Glu: 100 μM glutamate 2 min
NMDA: 50 μM NMDA 2 min
ATP: 100 μM ATP 2 min
High K⁺: 80 mM 2 min
Iono: 5 μM ionomycin 1 min

Picro(b-e) n=37; Glu(d,e) n=13; NMDA n=1; ATP(a-e) n=66; HighK (a-e) n=66

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

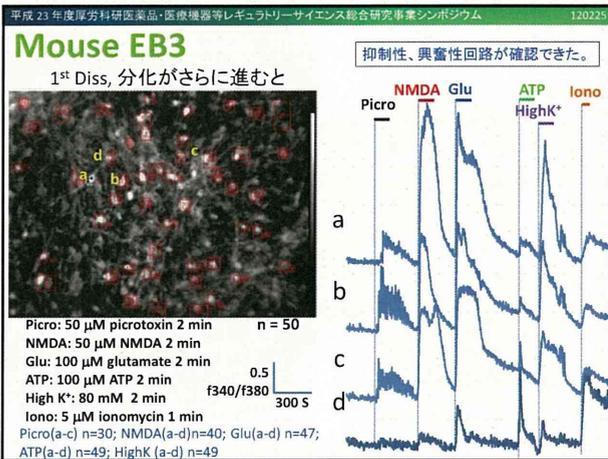
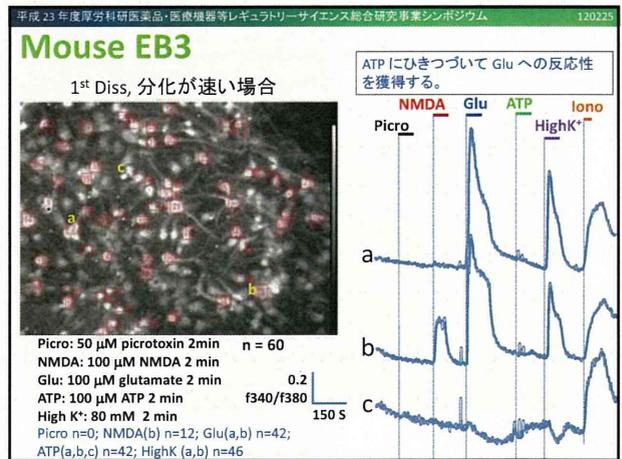
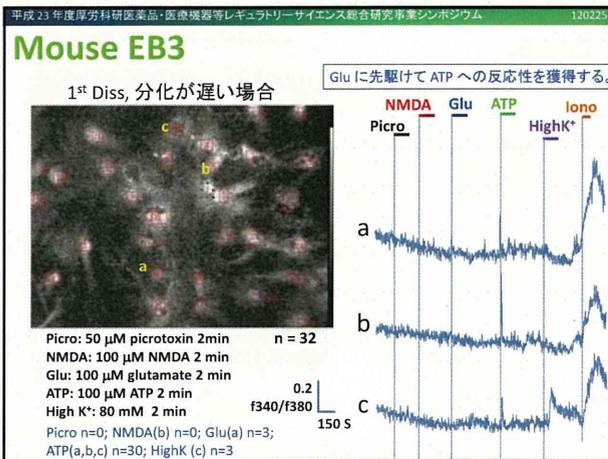
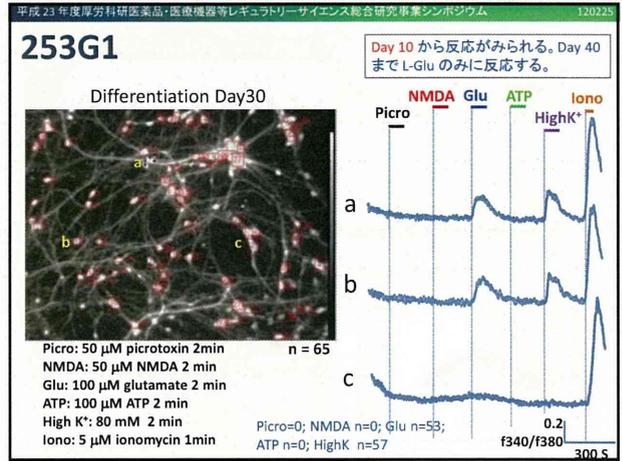
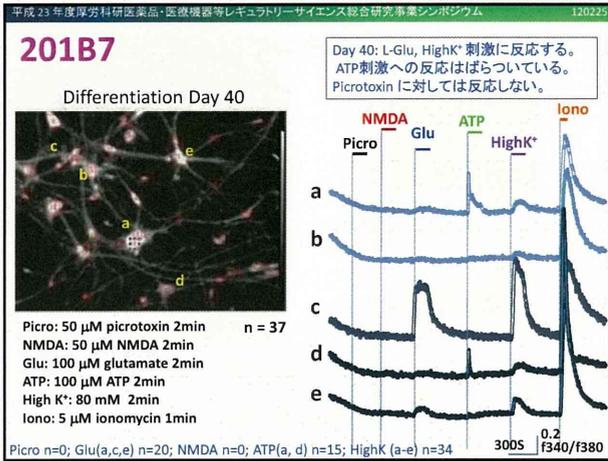
201B7

Day 30: ATPの応答が確認できた。

Differentiation Day 30

Picro: 50 μM picrotoxin 2 min n = 53
NMDA: 50 μM NMDA 2 min
Glu: 100 μM glutamate 2 min
ATP: 100 μM ATP 2 min
High K⁺: 80 mM 2 min
Iono: 5 μM ionomycin 1 min

Picro n=0; Glu n=0; NMDA n=0; ATP(a-c) n=35; HighK (d) n=5



平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

免疫組織化学的検討

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

Synaptogenesis

軸索とdendritic filopodia との接触→接触の安定化→成熟
 成熟したシナプスはプレシナプスに神経伝達物質を放出するための機構 (SNARE 蛋白質- synapsin1 など) とポストシナプスに受容体と scaffolding proteins (PSD95 など) が配置される。

樹状突起マーカーとして MAP2, プレシナプスマーカーとして synapsin 1, ポストシナプスマーカーとして PSD95 で染色し、シナプスの成熟度を検討した。

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

ポストシナプスの成熟は株間で大きく異なる

Osaka
MAP2/PSD95

Day 31

201B7
MAP2/PSD95

Day 42

253G1
MAP2/PSD95

Day 40

MAP2: 樹状突起マーカー
 PSD95: ポストシナプスマーカー

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

Osaka

Day 31

20 μm

10 μm

培養 40 日で細胞がはがれ出す。
 PSD95は dendrite 内に分散している。
 まれにスパイン様の染色像が見られた。

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

201B7

Day 42

20 μm

培養 50 日で細胞が剥がれ出す。
 PSD95 の発現は低い。
 Synapsin との共発現も確認できなかった。

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

253G1

Day 40

20 μm

培養 40 日以降、細胞数が減少。
 PSD95, synapsin1 が共局在。スパイン様の分布。

平成 23 年度厚労科研医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 120225

| | Osaka | 201B7 | 253G1 |
|--------------------------|--|--|---|
| 最大分化誘導日数 | 40日以降、細胞が剥がれた。 | 50日以降、細胞が剥がれた。 | 40日以降、細胞数減少。 |
| Neurosphere の取り扱い易さ | 増殖が悪い。 | 接着しやすく回収率が悪い。 | 増殖がよい。 |
| 反応性のばらつき | 同じ dish 内でもばらつきがある | 同じ dish 内でもばらつきがある | 安定 |
| Ca ²⁺ imaging | Day 20: ATP Day 30: ATP, glutamate, picrotoxin | Day 30: ATP Day 40: ATP, glutamate, picrotoxin | Day 10~: glutamate × ATP 応答強度: no change 応答率: increase |
| ICC | Day 20: Tuj1, GFAP Day 30: MAP2, PSD95-clustering | Day 20: Tuj1, GFAP Day 40: MAP2, PSD95, synapsin1 | Day 10: Tuj1/Vglut2 Day 20~: Nestin/GFAP, MAP2, PSD95, synapsin1 |

× 共局在

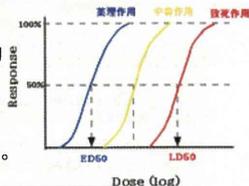
Outcomes

複数の neurosphere 株についてプロトコルを統一して解析することにより、それぞれの neurosphere の特性が明らかとなった。

- ・Osaka 株は抑制性神経回路および興奮性神経回路の形成に至っている可能性が示された。
- ・201B7 株はグルタミン酸受容体の発現には至るが、シナプス成熟は起こらなかった。
- ・253G1 株は分化 10 日目においてグルタミン酸反応性を獲得した。しかし、ATP への反応性は獲得しなかった。また、抑制性神経は現れなかった。しかし、シナプス成熟が進んでいることが確認された。

総括および展望

- ◆カルシウムイメージングを用いた薬理学的検討と免疫組織化学的検討の組み合わせは、神経機能獲得を判断するための有力なツールであることが明らかとなった。
- ◆以上のような検討を推進し、それぞれの neurosphere 株の薬理学的プロファイリングデータを集積し、個々の neurosphere について *in vitro* 薬理試験への実用範囲を明確化していく必要がある。そのためには発現受容体の網羅的プロファイリングも必要である。
- ◆ヒト iPS 細胞由来神経細胞は薬物の安全域における種差の確認など、ヒト特異的な有害反応の予測性向上のために、補足的薬理試験として活用できる可能性がある。



特別講演 ヒト心筋細胞を用いた臨床心毒性の予測

澤田 光平 エーザイ株式会社 グローバルCV評価研究部長

新薬を開発する上で不整脈、心不全、心筋虚血などの心毒性は直接生命にかかわることから、それらのリスクを軽減することが探索研究初期の段階から強く求められている。分子レベルの検討はヒトDNA由来のタンパク発現細胞を用いて実施されるようになったが、生理的機能を有したヒト細胞や組織は入手が困難であり、現在も主に動物由来の細胞を用いて安全性の評価が行われている。しかし、最近になりヒトES/iPS由来の心筋細胞が入手できるようになり、分子からin vivo実験への橋渡し、更に臨床におけるヒト心毒性予測へ利用できる期待が一段と高くなってきた。われわれは購入可能なヒトES/iPS由来心筋を用いて、心毒性評価への応用可能性に関し検討を開始した。

まず手始めとして、QT延長リスク評価系の構築を試みた。心筋細胞としてはCellartis社から入手したヒトES由来心筋細胞塊を用い、MED64システムによって細胞外電位、field potential duration (FPD)を記録した。心筋塊の大きさ、拍動数、電気生理的指標など種々のパラメータを用いて同じような心筋塊を選んでも、hERGチャネルブロッカーに対しFPDの延長作用は心筋塊ごとに大きく異なり、条件としては不十分であった。

In vivo、特にヒトの場合と同じようなQT延長作用を示す心筋塊を選ぶことが重要であるとの考えから、薬理学的反応性を選択の条件に追加した。心筋塊の選択にはpotencyおよびwashoutし易さからcisaprideをhERGチャネルブロッカーとして用いた。

このようにして選ばれた心筋塊はhERGのみでなく、Iks、CaあるいはNaチャネルブロッカーなどに対しても確実に反応し、複数のチャネルに作用する薬物も信頼性をもって評価できることが明らかとなった (Toxicology in Vitro, 26,335, 2012)。探索化合物のQT延長リスク評価にも応用を開始したが、in vivoの実験結果とよい相関を示した。また、由来の異なったヒト心筋細胞でも同じような戦略が取れるか確かめるために、iPS由来心筋であるiCellを用いた検討も進めており、その結果も併せて紹介したい。

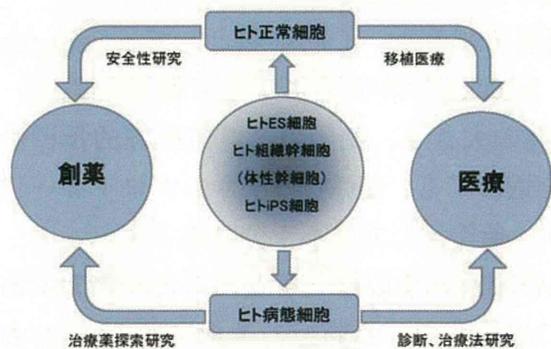
ヒト心筋細胞を用いた臨床心毒性予測

澤田光平
Global CV Assessment
Biopharmaceutical Assessments CFU
Eisai Product Creation Systems
Feb. 25, 2012

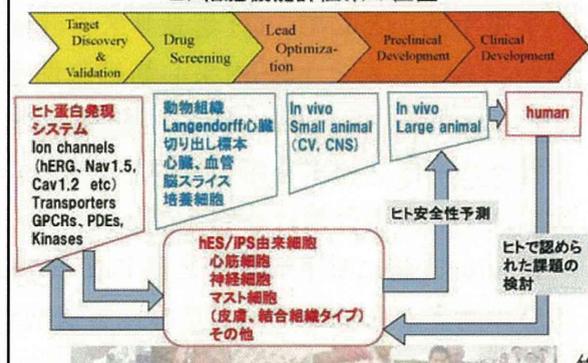
内容

1. 安全性薬理試験におけるヒト細胞の利用
2. Cellartis hES-CMCを用いたFPD評価系
3. CDI iCellにおける催不整脈作用評価

安全性薬理試験におけるヒト細胞の利用



創薬プロセスにおける安全性薬理評価 ヒト細胞機能評価系の位置

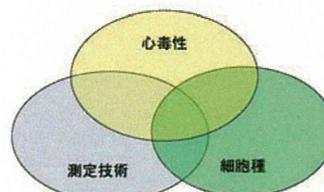


hES/iPS由来細胞を用いたヒト安全性予測

| | |
|---------------|---|
| 心筋細胞：心毒性評価 | QT間隔延長&短縮、不整脈誘発 心筋伝導抑制、心収縮性抑制&増強 心拍数上昇&低下 心筋細胞障害 |
| 神経細胞：神経毒性 | 痙攣誘発 依存性 神経可塑性（認知機能） 神経障害 |
| マスト細胞：ヒスタミン遊離 | アレルギー症状 infusion reaction |

心毒性評価への応用

- どのような毒性を評価するか
- どのような測定システムを用いるか
- どのようなヒト心筋細胞を用いるか



心毒性評価への応用

どのような毒性を評価するか

- QT間隔 短縮/延長: APD測定、FPD測定
- 心筋伝導抑制: Vmax 測定、伝導速度測定
- 不整脈誘発: EAD、DAD、automaticity、instability
- 心筋収縮性 抑制/増強: 動き解析、Ca transient
- 心拍数 上昇/低下: automaticity
- 心筋障害: 電気生理的指標 or 動きの異常検出、
生化学的マーカー測定

APD: action potential duration, FPD: field potential duration
EAD: early after depolarization DAD: delayed after depolarization

心毒性評価への応用

どのような技術を用いるか

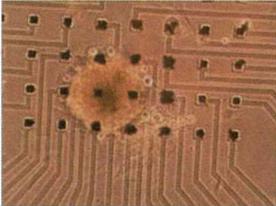
- APD, Vmax: 微小電極法、patch clamp法
- FPD測定、伝導速度測定: multi-electrode array (MEA)
- EAD、DAD、automaticity、instability測定:
微小電極法、patch clamp法、MEA、
xCELLigenceシステム
- 心筋収縮性: 画像解析(動き解析)、xCELLigenceシステム
Ca transient、etc

どのような状態の心筋細胞を用いるか

Single cell
Sheet (monolayer)
Cluster (clamp)

Clusters(2D, 3D) or single cells

Cellartis hES-CMC → Isolation and culture → Single and monolayer cardiomyocytes



MED64 probe

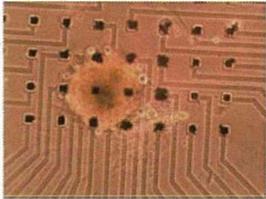


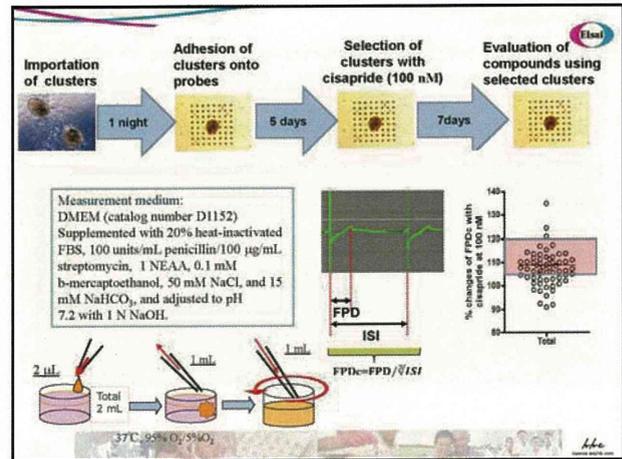
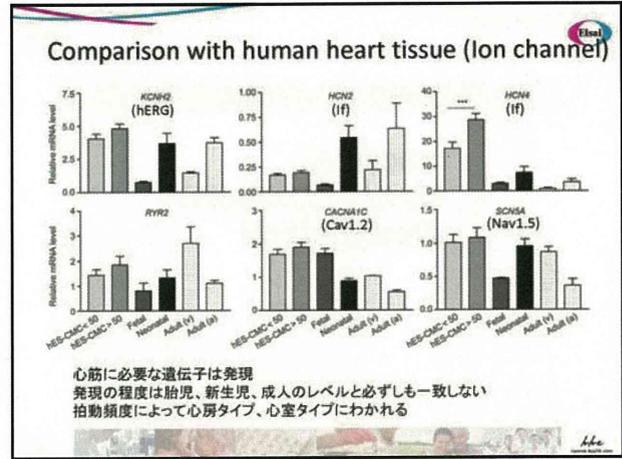
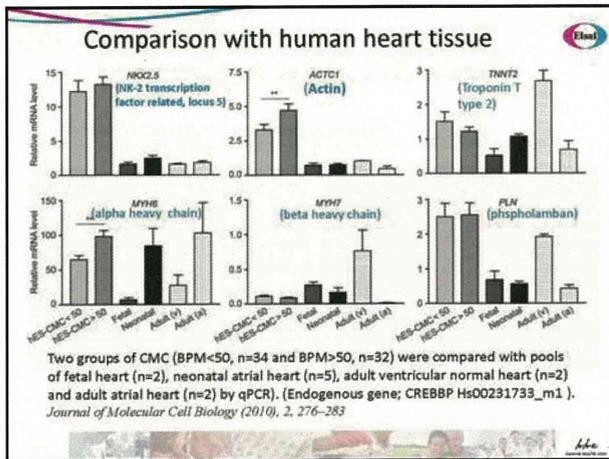
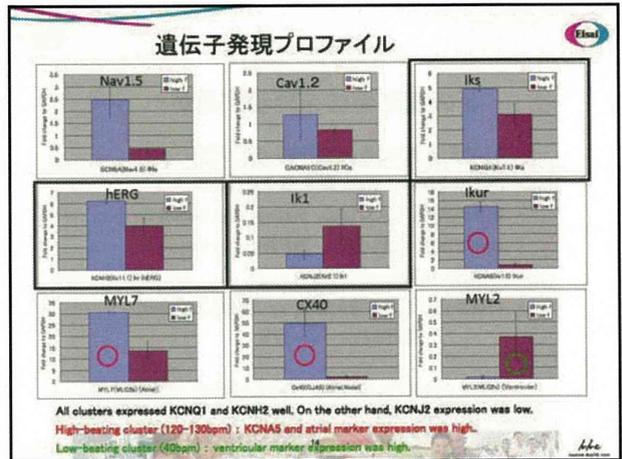
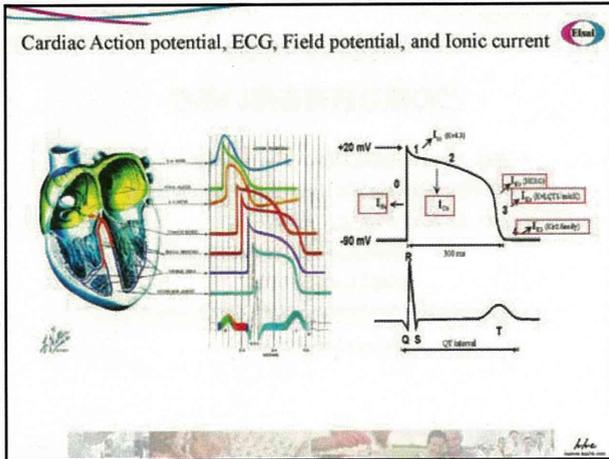
cover glass

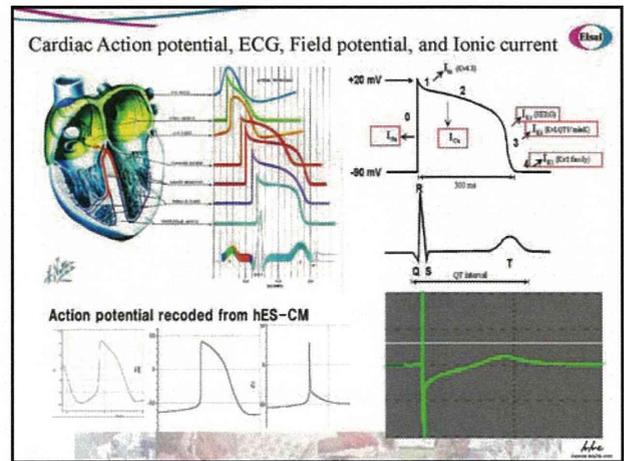
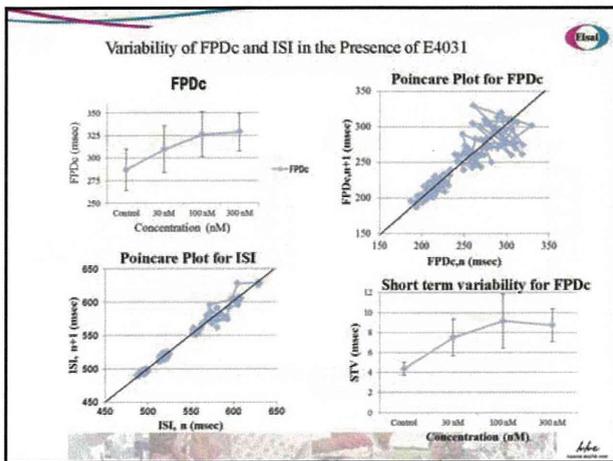
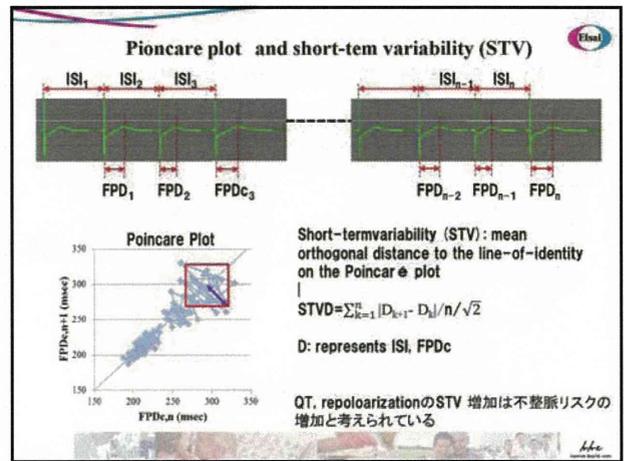
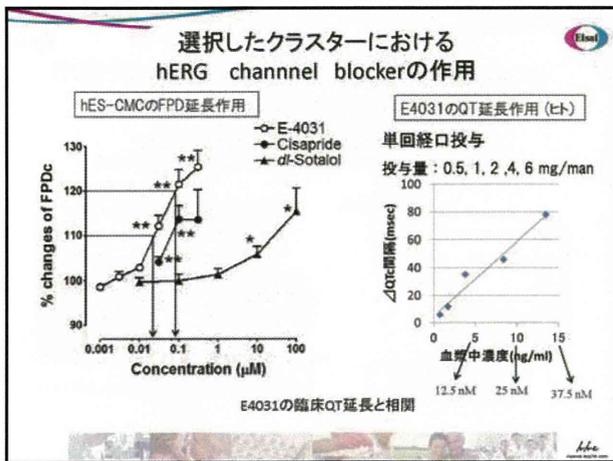
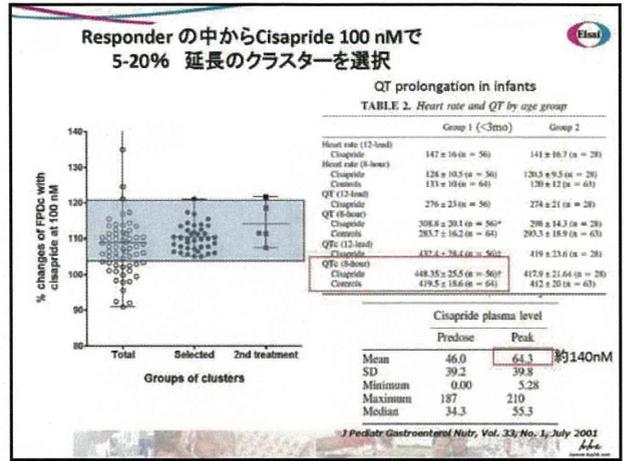
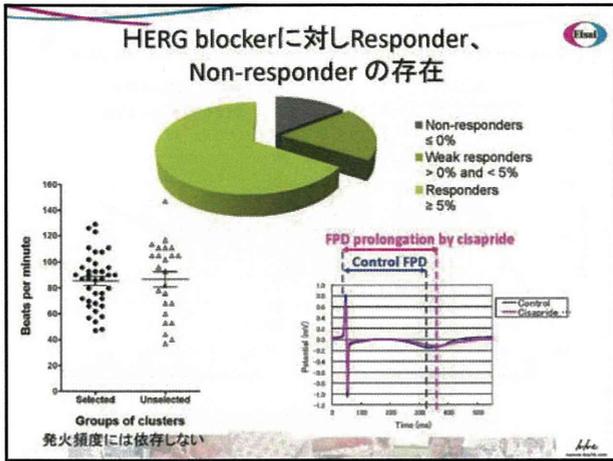
Commercially available human cardiomyocytes derived from stem cells

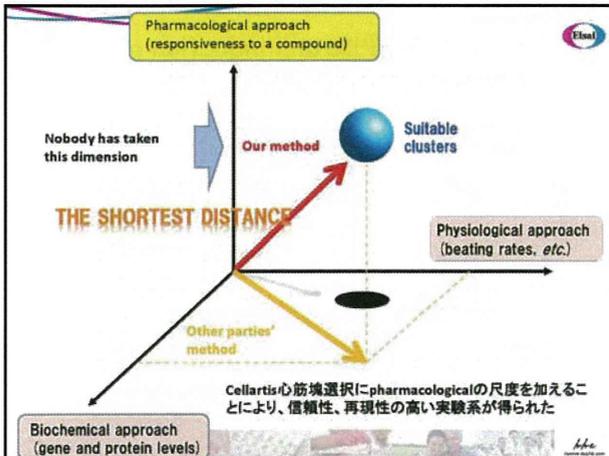
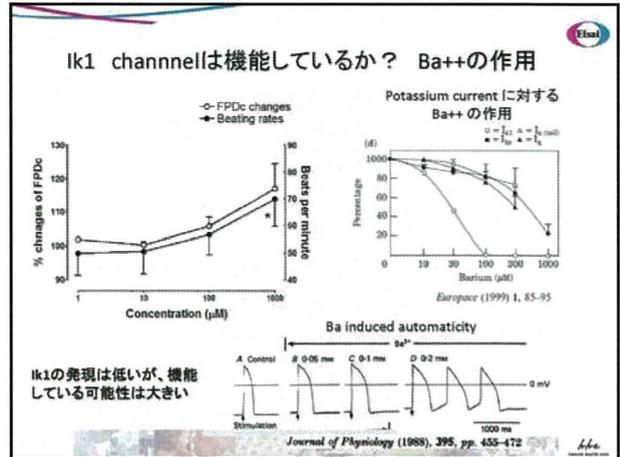
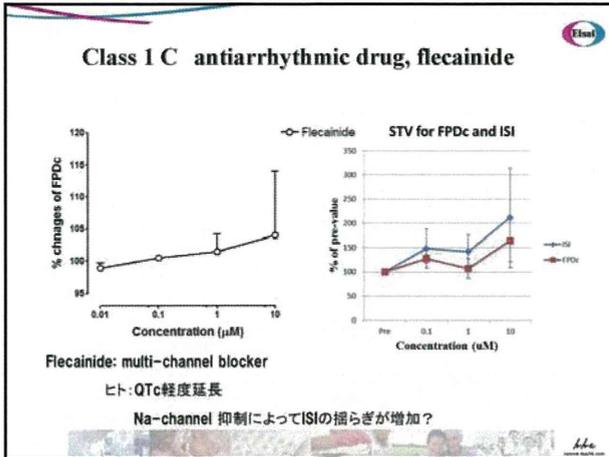
| Product | Source | Shipping format | Company |
|--------------------------------------|--------|---|--|
| Cytiva™ Cardiomyocytes | hESC | Frozen cardiomyocytes (a mixture of ventricular, atrial, and nodal subtypes), single cells and thin layers | GE Healthcare Biosciences, PA, USA |
| hES-CMC™ 2D Cardiomyocyte Monolayers | hESC | Ready-to-use beating cardiomyocyte monolayers in a 96-well plate format | Cellartis AB, Sweden |
| hES-CMC™ 002 Cardiomyocyte Clusters | hESC | Ready-to-use beating cardiomyocyte clusters in a 3D tissue-like format | Cellartis AB, Sweden |
| iCell™ Cardiomyocytes | hiPSC | Frozen cardiomyocytes (a mixture of ventricular, atrial and nodal subtypes), single cells and thin layers | Cellular Dynamics International, WI, USA |
| ReproCardio 2 | hiPSC | Frozen cardiomyocytes (a mixture of ventricular, atrial and nodal subtypes), single cells, thin layers or cell clumps | Reprocell Inc., Yokohama Kanagawa, Japan |

Cellartis hES-CMC™を用いたFPD評価系





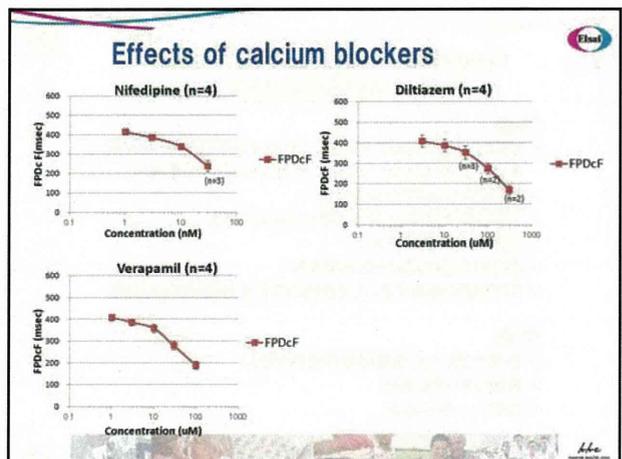
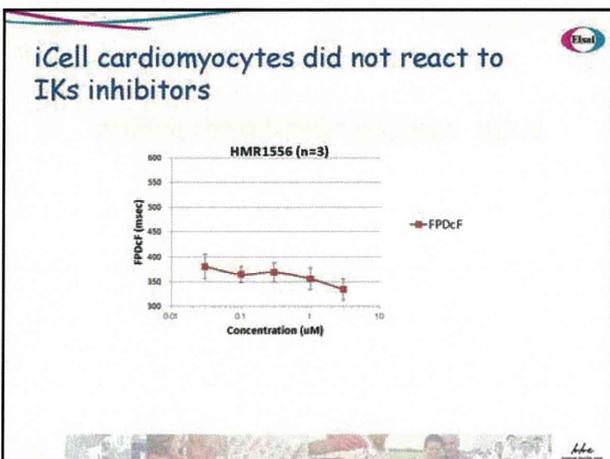
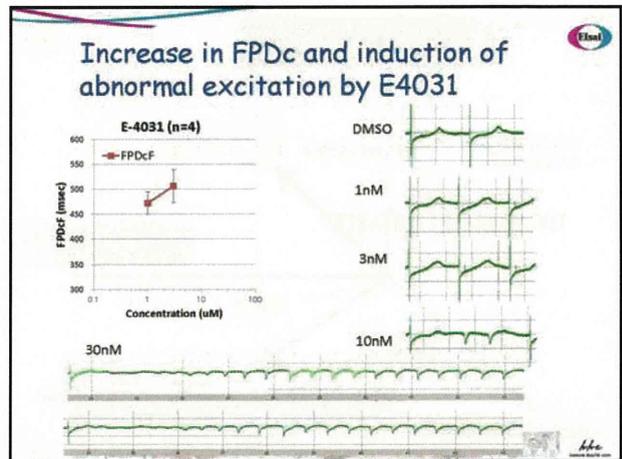
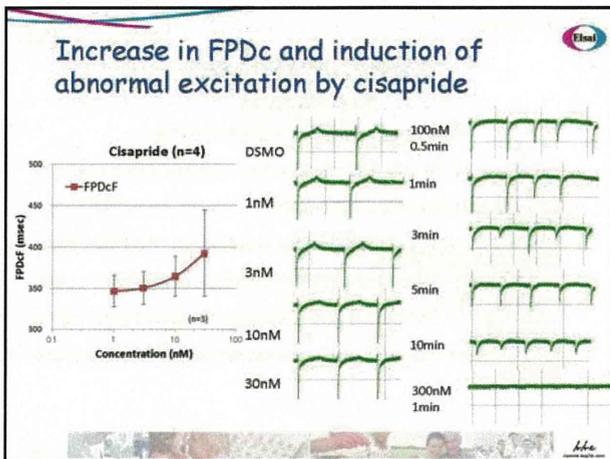
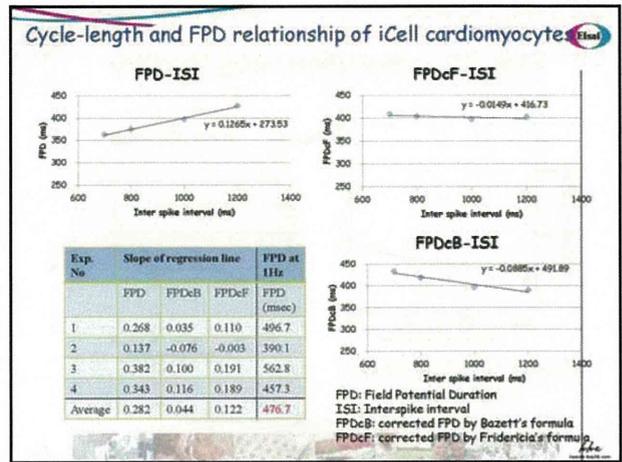
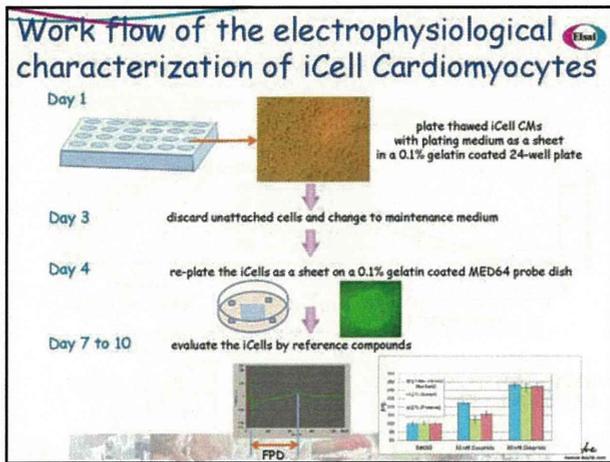


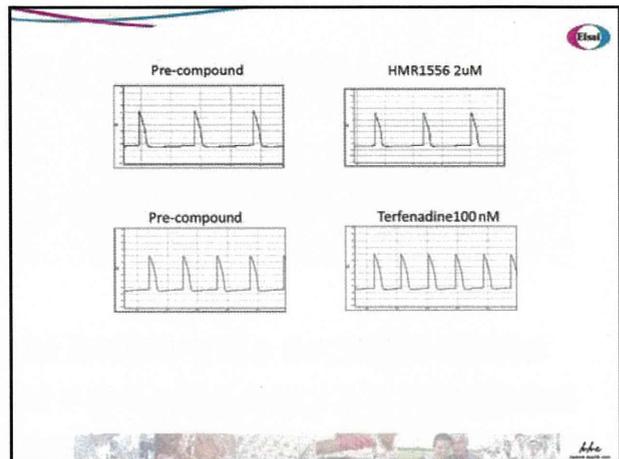
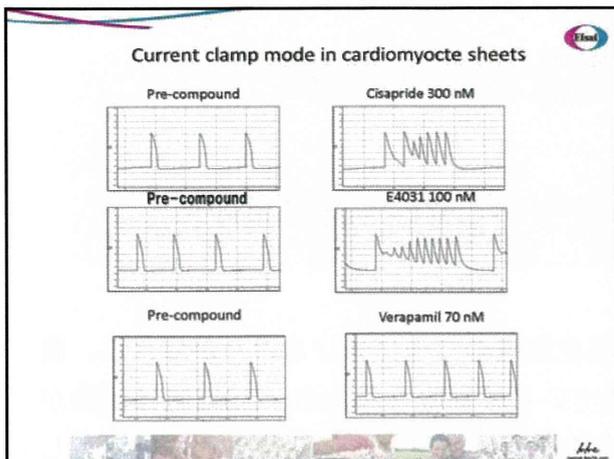


- ### 試験化合物を用いた検証
- Compound X,Y,Z
Moderate hERG & Nav1.5 inhibition
- 社内化合物X,Y,Zに関しhES-CMCの結果と麻酔犬における心電図変化の関係を調べた。
 - X,Y,Zは構造的に類似しており、いずれもhERGおよび心筋Na-channel抑制をuMレベルで示す。
 - XはhES-CMCで濃度依存的にFPDcを延長させ、麻酔犬においてもほぼ同じ血中濃度でQTc間隔の延長を示した。
 - 一方、Y,ZはhES-CMCでFPDcを濃度依存的に軽度短縮し、麻酔犬においてもQTcの短縮終点を示した。
 - これらの結果から、探索化合物のQTcリスクの評価にhES-CMCは用いることができると判断された。
 - 更に、他の社内テーマに応用した結果、かなりよいQTcリスクの予見性があることも示された。

- ### Cisapride の反応性に基づいた Cellartis心筋塊選択法まとめ
- 利点**
- hERG, IksおよびIcaチャネルなどに対する単独の作用のみならず、multi-channelに作用する化合物のQTリスクを検出
 - 例数は3~4例で十分な検出力
 - 1週間後でも初回と同じ反応性が維持できる
 - 実験間の変動が小さい
 - 長期の暴露実験にも対応できる
 - STV解析を追加することで薬物の特性を分類できる可能性
- 欠点**
- 使用に適した心筋塊の取得確率が低い
 - 実験コストがかさむ
 - 実験に人手が必要

3. CDI iCellにおける催不整脈作用評価





- ### iCell まとめ (初めて使用した感想)
- hERG channel blockerに対する感受性が非常に高い
 - hERG channel blockerの催不整脈作用(EAD誘発)作用捕まえやすい
 - Iks channel blockerに対してはむしろ反応性が低い
 - Ca-channel blockerに対してはCellartis心筋塊と同等の応答性
 - MEAシステムとの相性はそれほど悪くない

心毒性評価: 現在~未来

Present : Measurement of ECG-like signal, AP QT , arrhythmogenic risk assessment

Final goal:
Simultaneous assessment of QT, TdP risk, contractility, and chronic cardiac toxicity in the same cardiomyocytes
Safety assessment using cardiomyocytes derived from diseased heart

Short term goal: Chronic effects
Myocardial cell damage
Assessment of delayed effect on QT (hERG channel trafficking etc)

Evaluation contractility using matured cardiomyocytes

Assessment of cardiac conduction: 2D layers

Collaborators

| | |
|--------------|-------------|
| T. Taniguchi | T. Hihara |
| T. Yoshinaga | N. Kohmura |
| N. Miyamoto | K. Yamazaki |
| M. Uesugi | M. Ito |

幹細胞ビジネス戦略と世界の動向

酒井 明 iPSアカデミアジャパン株式会社 研究技術部長

幹細胞の利用は大きく分けて①創薬支援と②再生医療の二つに分けることができる。間葉系幹細胞のように既に人体への投与が行われている幹細胞もあるが、ES細胞は治験が開始され、iPS細胞は治験の計画が進行中で、今後急速に進展すると期待されている。しかし、ES細胞・iPS細胞の場合、再生医療に必要な安全性の確認には時間がかかる。そこで、幹細胞のビジネス化としては創薬支援を対象としたビジネスモデルが先行している。

ヒト幹細胞から誘導される様々な細胞群は新規薬剤開発プロセスで利用が可能である。しかし、創薬企業が自ら幹細胞から分化細胞を誘導させることは誘導法の選択、効率、人的資源、経費等の観点からできれば避けて通りたいことである。そこで、幹細胞から分化誘導されたヒト細胞を購入して使用することが第一選択となってきている。創薬における安全性の問題としては、心臓に対する副作用（不整脈やQT延長）があり、この確認のためにヒト心筋細胞の利用が可能になりつつある。既にヒトES細胞やヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞が販売されており、創薬の安全性試験に利用されはじめている。最近世界的に使用されつつあるiPS細胞由来心筋細胞を販売している米国CDI社のビジネス戦略を分析することで、将来の幹細胞ビジネスの参考にしたい。

幹細胞ビジネスモデルを考える上でポイントとなるのは、強力なパテント（少なくとも実施権）を保有していること、人材、資金導入、商品の必要性などがある。関連して世界的に動物実験の規制が厳しくなっており、in vitroモデルとして幹細胞由来ヒト分化細胞の利用が増加している。このような状況下、日本が世界に伍して良いものを生み出してゆくために、研究面での産官学連携のみならず、規制分野や人材育成、投資環境、IPの有効利用など多くの分野での協力体制が欠かせないと思われる。

幹細胞ビジネス戦略と世界の動向

2012年2月25日

iPSアカデミアジャパン 酒井 明



Geron社がヒトES細胞由来神経前駆細胞の臨床試験から撤退するという話の中、今後の幹細胞ビジネスについて考えてみたい。

幹細胞の利用としては再生医療と創薬支援が考えられる。将来的には再生医療を目指すことになるが、道のりはまだ遠い。一方、創薬支援は実現可能な状況にきている。

今日は創薬支援における幹細胞のビジネス戦略と世界の動向についてお話したい。



創薬支援の現状



医薬スクリーニング系の開発状況

| 企業名 | 由来細胞 | 対象 | 用途 |
|---------------------------------|------------|------------|-------------------|
| Scottish Biomedical | ES細胞 | 神経細胞 | 化合物スクリーニング |
| California Stem Cell, Inc. | ES細胞 | 運動神経前駆細胞 | ALS薬物スクリーニング |
| ReNeuron Group Plc. | ES細胞 | 家族性パーキンソン病 | パーキンソン病治療薬スクリーニング |
| ReNeuron Group Plc. | ES細胞 | ハンチントン病 | ハンチントン病治療薬スクリーニング |
| Lomza Inc. | ES細胞 | 複数ある | スクリーニングツール開発 |
| VistanGen Therapeutics, Inc. | ES細胞 | 心筋・肝臓・膵臓細胞 | 糖尿病、神経変性疾患 |
| VistanGen Therapeutics, Inc. | ES細胞 | 幹島分化細胞 | 糖尿病薬スクリーニング |
| Cellular Dynamics International | ES細胞 | 心筋前駆細胞 | 毒性試験 |
| Cellular Dynamics International | iPS細胞 | 心筋細胞 | 安全性試験、創薬スクリーニング |
| ZenBio, Inc. | 胎前細胞由来の胚細胞 | 肝細胞 | 非アルコール性脂肪性肝疾患 |
| Novocell, Inc. | ES細胞 | 膵臓由来細胞 | 糖尿病スクリーニング |



毒性評価の開発状況

| 企業名 | 由来細胞 | 対象 | 用途 |
|---------------------------------|-------------|------------------------|---------------------------|
| International Stem Cell | 単気生細胞由来ES細胞 | 皮膚三次元組織モデル | 皮膚刺激性、皮膚刺激性、皮膚感受性遺伝毒性、光毒性 |
| ニコダーム リサーチ | 表皮 | 三次元再構築表皮モデル 角膜上皮モデル | 皮膚刺激性、皮膚腐食性 眼の刺激性予測モデル |
| International Stem Cell | 単気生細胞由来ES細胞 | 角膜細胞 | 毒性評価 |
| Cellular Dynamics International | iPS細胞 | 心筋細胞 | 心筋毒性 |
| VistanGen Therapeutics, Inc. | ES細胞 | 心筋・肝臓・膵臓細胞 | 糖尿病、神経変性疾患薬のスクリーニング、毒性評価 |
| Cellular Dynamics International | ES細胞 | 心筋前駆細胞 | 毒性試験 |
| Cellular Dynamics International | iPS細胞 | 心筋細胞 | 安全性試験、創薬スクリーニング |
| Cellular Dynamics International | iPS細胞 | 肝臓細胞 | 薬の副作用分析とデータベース構築 |
| 日立製作所 | 肝臓細胞 | 立体組織 | ADME、毒性試験 |



iPS細胞関連企業のビジネスモデル

| 企業名 | 分類 | 特徴 | 貢献 | 備考 | その他 |
|---------------------------------|-------|--------------|----------------------|--|----------------------|
| Pierian, Inc. | 自社創業 | 低分子薬開発 | 疾患iPS細胞利用 | パーキンソン病 新薬開発 神経変性疾患 ハンチントン病など | 大学との共同研究 |
| Fate Therapeutics Inc. | 自社創業 | 低分子薬開発 | 疾患iPS細胞利用 | がん、変性疾患など | 大学との共同研究 |
| Cellular Dynamics International | 創薬支援 | 細胞提供 | 分化細胞の提供 iPS細胞樹立 | 心筋細胞、内皮細胞、 神経細胞、肝細胞 | 創薬メーカー 創薬企業との共同研究 |
| リプロセル社 | 創薬支援 | 細胞提供 委託試験 | 分化細胞の提供 場地の提供 | 心筋細胞、神経細胞、肝細胞 OT延長試験委託 | 大学との共同研究 |
| ATOC | 細胞バンク | 細胞提供 | | 各種分化細胞、iPS細胞 疾患特異的iPS細胞 | 主に研究用 |
| その他 | 既存企業 | | 登録 研究 コンサルティング | 周辺製品及び関連サービス | |

ES細胞を取り扱っている企業(特にEU)の参入が目立つ Axiogenesis, Collectis等



米国CDI社の戦略分析

- 1: 自社製品の開発
- 2: 機器メーカーとの共同開発
- 3: 製薬会社との共同研究
- 4: 講習会、Webinar

幹細胞を取り巻く世界の動向



1: 自社製品の開発

CDI社 iCell® Cardiomyocytes



凍結心筋細胞
解凍培地
維持培地
マニュアル
特許実施権



2: 機器メーカーとの共同開発

各機器メーカーはハイスループットスクリーニングまで可能な解析器機の開発を行っていたが、大量に使用できる**均一**なヒト細胞の入手に問題を抱えていた。

機器メーカーは機器には強いが細胞の取り扱いに慣れていないので、共同研究が比較的簡単に進んだ。



ここに iCell Cardiomyocytes を提供し、機器開発と細胞販売ビジネスをカップルさせるというビジネスモデルを構築した。

その結果、メーカーの専門家による信頼性の高いデータを手に入れるようになった。

多くの解析法によるデータの蓄積はユーザーに安心感を与え、細胞の使用・購入を促進した。



共同開発機器メーカー

| メーカー名 | 使用機器 | 解析方法 | 特徴 |
|------------------------|---------------------|-----------|-----------|
| Roche Applied Sciences | xCELLigence | インピーダンス測定 | 不整脈解析 |
| Multichannel Systems | MEA | 細胞外電位 | QT |
| Molecular Devices | PatchExpress | チャンネル電位 | 自動パッチクランプ |
| Molecular Devices | FLJPR® Tetra System | Ca イメージング | HCl |
| Molecular Devices | ImageExpress | | HCl |
| Nanon | Patchfinder | チャンネル電位 | 自動パッチクランプ |



3: 製薬・試薬会社との共同研究

| | | | |
|--------------|-----------------|--------------|-----------|
| Lilly | | 酸素消費量 | ミトコンドリア機能 |
| Pfizer | Ion Optix | Ca Transient | |
| Promega | Caspase assay 等 | 細胞死定量 | 細胞毒性 |
| Roche Pharma | Gene Chip | 発現解析 | |
| GSK | 各種アッセイ | | |

