

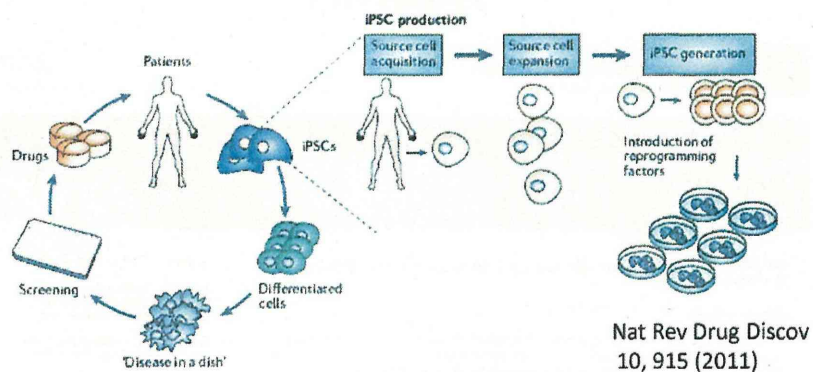
ヒトiPS細胞の創薬応用の展望

- ✓ 新しい創薬ターゲットの探索
- ✓ 種差の壁を乗り越えた非臨床試験法の開発
- ✓ 非臨床段階でのヒト有効性／安全性評価の実現
(臨床試験の効率化)



創薬プロセスの“パラダイムシフト”

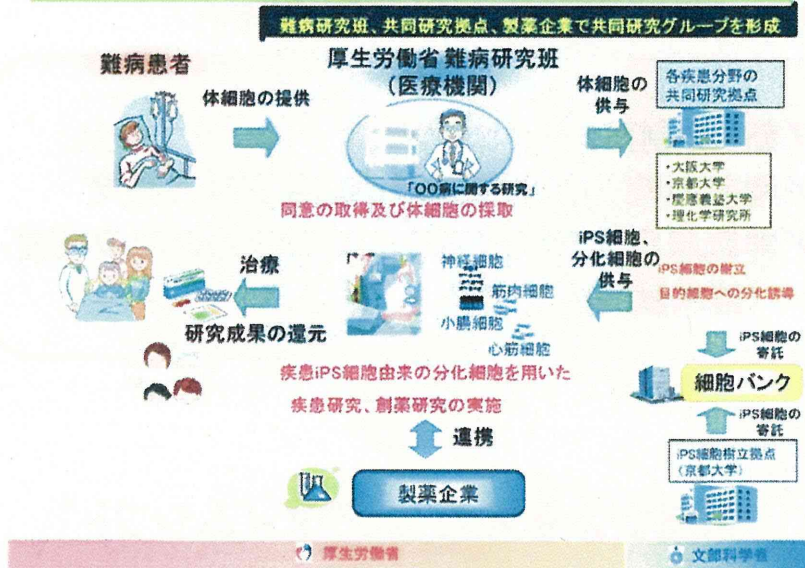
新たなパラダイムを実現するためには



- 薬理試験に用いる健常人および疾患iPS細胞由来の分化細胞の大量かつ安定な供給システムを確立する。
- 個体差と疾患の区別を明確にする。
- 再現性が可能なシステムを構築する。
- 分化細胞を利用した評価が妥当であることを科学的に証明する。

新しい創薬ターゲットの探索

疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究



米国NIH

NIH National Institutes of Health
Turning Discovery Into Health

Search
For Employees Staff Directory En Español

Health Information Grants & Funding News & Events Research & Training Institutes at NIH About NIH

NIH Home > Research & Training

ACCELERATING MEDICINES PARTNERSHIP (AMP)

Accelerating Medicines Partnership

Alzheimer's disease
Type 2 diabetes
Rheumatoid arthritis and lupus

Accelerating Medicines Partnership

Private-friendly version (url:ge + 2014)

The Accelerating Medicines Partnership (AMP) is a bold new venture between the NIH, 10 biopharmaceutical companies and several non-profit organizations to transform the current model for developing new diagnostics and treatments by jointly identifying and validating promising biological targets of disease. The ultimate goal is to increase the number of new diagnostics and therapies for patients and reduce the time and cost of developing them.

AMP will begin with three to five year pilot projects in three disease areas:

- Alzheimer's disease
- type 2 diabetes
- autoimmune disorders of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (lupus)

Related Information

News: NIH, industry and non-profits join forces to speed validation of disease targets, February 4, 2014

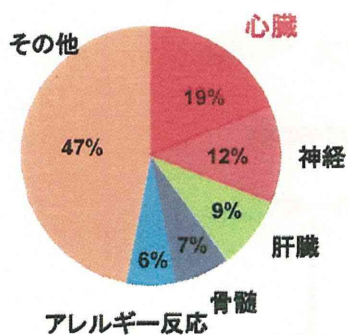
Director's Blog: Introducing AMP: the Accelerating Medicines Partnership

Audio: Listen to the AMP press conference

Multimedia

Statement by the President

市場から撤退した医薬品

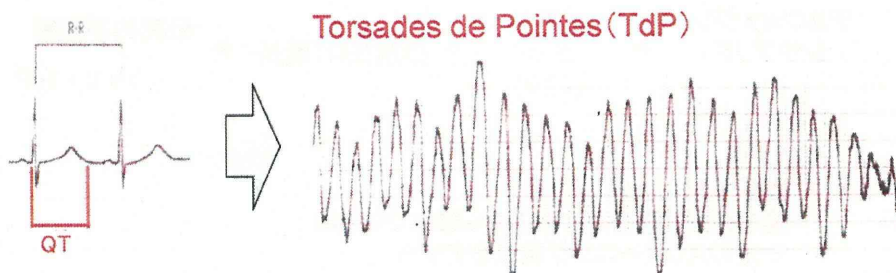


心毒性のため市場から撤退した医薬品

- Terodiline 1991年 泌尿器
- Terfenadine 1998年 抗ヒスタミン剤
- Sertindole 1998年 抗精神病薬
- Astemizole 1999年 抗ヒスタミン剤
- Grepafloxacin 1999年 抗生物質
- Cisapride 2000年 消化管
- Droperidol 2001年 抗精神病薬
- Levacetylmethadol 2001年 鎮痛薬

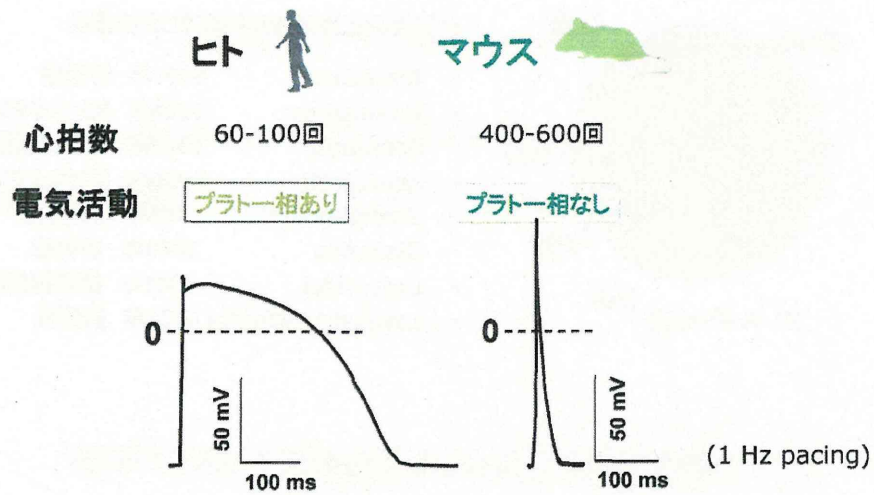
非心臓作用薬による心毒性の発生リスクが問題

薬剤性不整脈

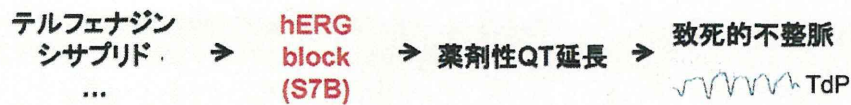


- 多形性心室頻拍の一種。
- 発生頻度は非常に低いですが、心室細動に移行し突然死に至ることがある。
- 心電図でQT間隔延長を伴う。
- リスク要因として、電解質異常、徐脈、期外収縮など。

動物実験でヒトの心毒性が評価できない理由 — 心筋細胞活動電位の種差 —



hERG試験 (S7B ガイドライン)



利点

- 簡便で低コスト
- 基本的な技術を有する人なら誰にでも可能
- 一定のスクリーニング精度を有する

欠点

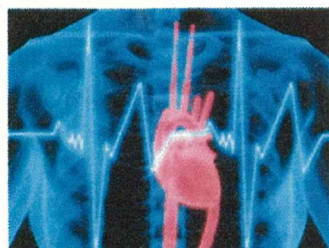
- 偽陽性が多い
- hERG以外のメカニズムによる不整脈が拾えない
- TdP≠QT



ヒト分化心筋細胞はマルチチャネルを発現しているため
総合的に催不整脈作用を予測できる可能性！

心毒性評価法を巡る海外の動向

NEWS & ANALYSIS

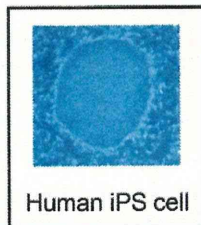


Revolution dawning in cardiotoxicity testing

Breaks old techniques and brings precision medicine into the process of testing the heart's tolerance of medications.

NATURE REVIEWS
DRUG DISCOVERY
12, 565 (2013)

新たなアプローチ



Human iPS cell



In silico

◆2013年7月23日にFDA/HESI/CSRCの Workshopが開催され、新たな心毒性評価法に関して国際的議論が始まる。

◆S7B改訂、E14廃止を視野に入れた動き

国内の動向(霧島会議)



薬物性QT延長検出から催不整脈作用評価へ

第1回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング 2014 in 霧島(霧島会議)

開催趣旨

新しい心臓安全性評価を提唱するための議論の場として、第1回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング2014 in 霧島(霧島会議)を開催いたします。本会議では、PhRMAのTopic Leaderとして、ICH E14ガイドライン作成において中心的役割を果たされ、現在、CSRC, Scientific Oversight CommitteeのChairとしてご活躍されているPhilip T. Sager先生をスペシャルアドバイザーとして招聘し、心臓安全性に関する米国の最新情報をご教示頂く予定です。また、ワーキンググループメンバーとして、非臨床試験、臨床試験において心臓安全性評価に携わっておられる産官学、それぞれの第一人者の方々にご参加頂き、過渡期にあるCardiac Safety Paradigmの現状、数年後に予想されるNew Paradigm作成において、日本の存在意義を示すために、何をすべきか議論して頂きます。霧島でお会いしましょう。

開催日時・場所

日時 2014年1月11日(土)13:30~1月12日(日)15:00
場所 霧島いわさきホテル(鹿児島県霧島市牧園町高千穂3958)メイフルルーム

Comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay (CIPA)

Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: A meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium

Philip T. Sager, MD, EACC, FAHA,^a Gary Gintant, PhD,^b J. Rick Turner, PhD,^c Syril Pettit, MEM,^d and Norman Stockbridge, MD, PhD^e Palo Alto, CA; North Chicago, IL; Durham, NC; Washington, DC; and White Oak, MD

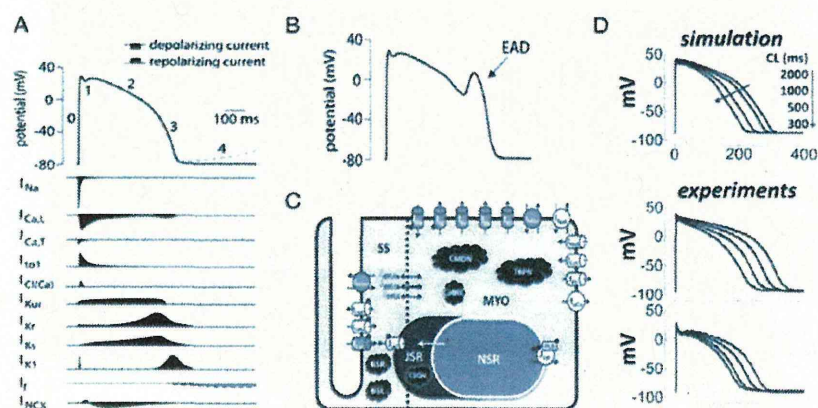
Am Heart J 12:565 (2014)

Goal:

Develop a new paradigm for cardiac safety evaluation of new drugs that utilizes high throughput methods and provides a more comprehensive assessment of direct proarrhythmic potential by:

- ✓ evaluating effects on multiple cardiac ionic currents beyond hERG
- ✓ provide a more accurate assessment of potential effects on human cardiac electrophysiology
- ✓ focus on TdP proarrhythmia rather than QT prolongation

CIPA の Work Stream



Am Heart J 12:565 (2014)

イオンチャネル、心筋、インシリコ、規制などの各チームにおける議論をもとに、催不整脈作用の統合的理解を目指す。

CIPA のWork Stream

In Silico – model design, execution, feedback and vetting;
Tom Colatsky (Thomas.Colatsky@fda.hhs.gov)

Ion Channel – channel selection, protocol development,
novel data generation to test model; Cyril Petit
(Spettit@hesiglobal.org)

Stem Cell Myocyte – protocols, platforms and validation;
Gary Gintant (Gary.Gintant@abbvie.com)

Regulatory – model design and validation compound
selection, arrhythmia metrics, ECG assessment; Philip
Sager (Psager@Stanford.edu)

Steering Team – Coordination and integration

CIPA Administrator:

Jennifer Pierson: jpierson@hesiglobal.org

FDA Lead: Norman Stockbridge: Norman.Stockbridge@fda.hhs.gov

本日のお話

- 創薬プロセスにおけるヒトiPS細胞の応用
 - 国内外の動向
- ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた安全性薬理試験法の開発
 - 標準化の意義
 - 試験法としての科学的根拠(バリデーション)
- 今後の展望
 - ガイドラインに向けて

ヒトiPS細胞由来心筋細胞の問題

1. 分化細胞毎の多様性が大きい

- 元となるヒトiPS細胞株の違い
- 分化誘導法による違い
- 分化細胞は高度な精製が困難（例：心室筋）

2. 分化細胞の性質は培養環境に依存する

- 分化誘導後の培養条件の違い（例：培地、基材、培養期間）
- 基本的な培養技術が一般的な細胞株とは異なる（例：輸送・有効期間）
- 培養により均一性が低下する可能性がある（例：長期培養）
- 分化の状態が変わる可能性がある（例：長期培養）



分化心筋細胞は絶えず変化する細胞集団である！

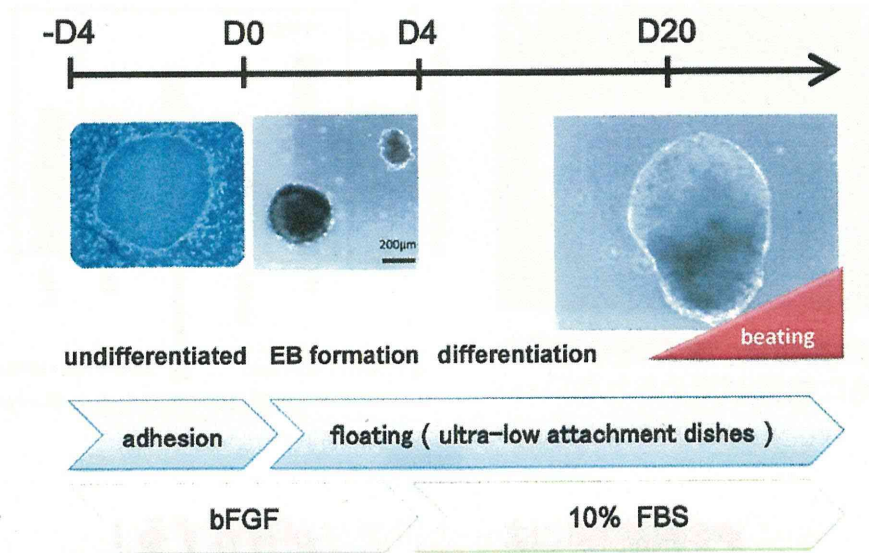
- ✓ 分化細胞の特性解析が重要。
- ✓ 従来の培養細胞製品とは異なる品質管理が必要

ヒトiPS細胞株

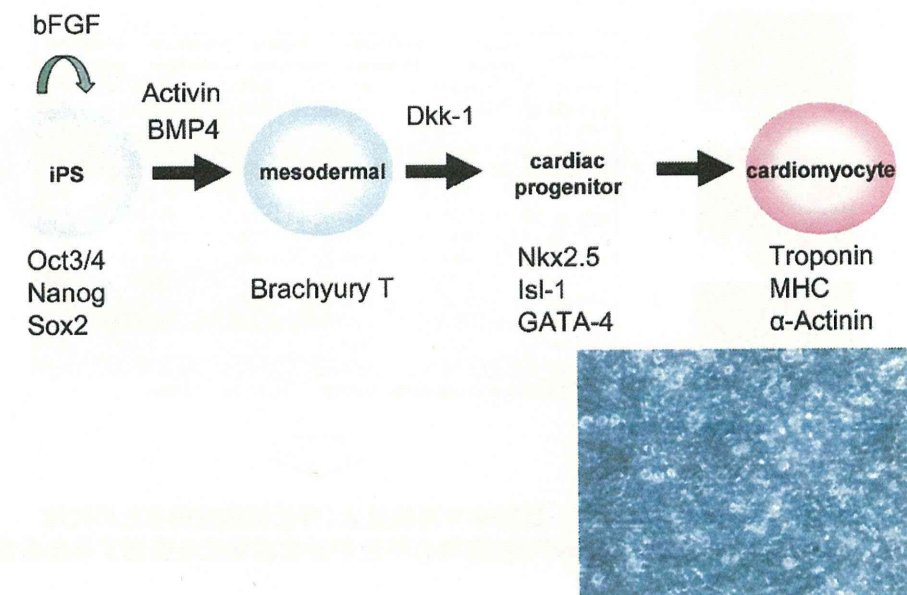
iPS株	起源細胞	初期化因子	遺伝子導入	入手
201B7	dermal fibroblast	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス	理研セルバンク
253G1	dermal fibroblast	Oct3/4, Sox2, Klf4	レトロウイルス	理研セルバンク
Tic	lung fibroblast	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス	JCRB細胞バンク (#JCRB1331)

公的バンクからiPS細胞株を入手し、その分化能や特性の解析を行った

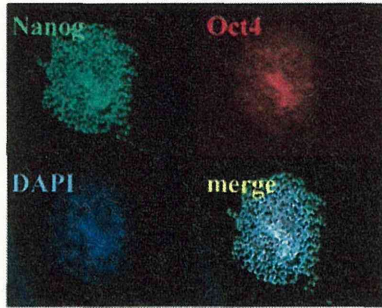
Cardiac differentiation (201B7)



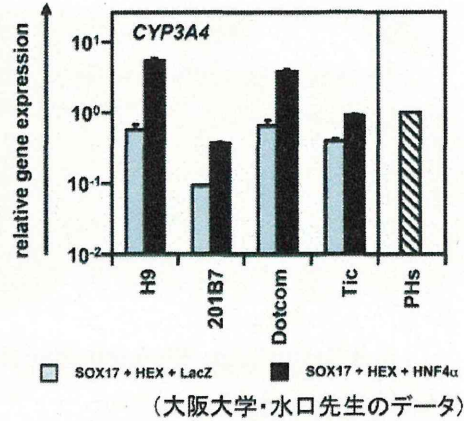
Direct differentiation (253G1)



Tic株の心筋分化能



EB形成法、定方向分化法ともにも拍動が認められない...



↓

iPS細胞株には**分化指向性**が存在する！

ヒトiPS細胞の株間比較



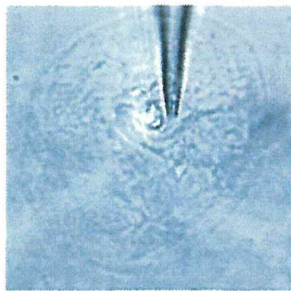
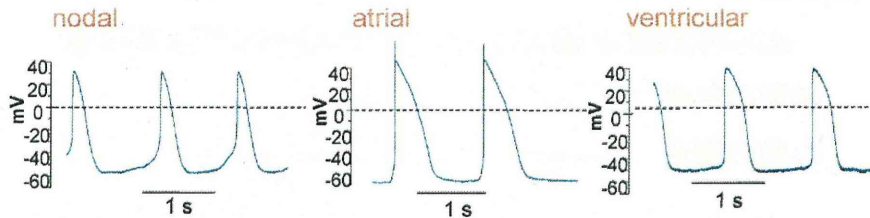
(Cell 144: 439, 2011)

Cell line	Neural lineage	Hematopoietic lineage	Ectoderm germ layer	Mesoderm germ layer	Endoderm germ layer
hiPS 11a	-0.69	0.18	-0.37	-0.23	0.83
hiPS 11b	-1.17	-0.23	-0.96	-1.03	0.47
hiPS 11c	-0.22	0.40	-0.03	-0.16	0.37
hiPS 15b	-0.48	-0.78	-0.63	-1.11	2.48
hiPS 17a	0.19	0.05	0.33	0.00	1.16
hiPS 17b	-0.07	-0.48	-0.02	-0.83	0.20
hiPS 18a	0.28	-0.52	0.31	-0.67	0.20
hiPS 18b	0.80	-0.72	0.84	-0.62	0.15
hiPS 18c	0.93	-0.65	1.05	-0.41	0.10
hiPS 20b	-0.37	-0.47	-0.30	-1.18	0.56
hiPS 27b	0.52	-0.50	0.68	-0.71	-0.42
hiPS 27e	-1.61	-1.04	-2.12	-1.82	3.77
hiPS 29d	-0.25	-0.04	0.00	-0.11	0.83
hiPS 29e	-0.99	-0.60	-1.15	-1.14	-1.08

Differentiation propensity: high (red), medium (white), low (blue)

高効率で再現性よく分化細胞を得るためにはヒトiPS細胞株の特性や分化誘導法を整備する必要性

Action potential of iPS-CMs (201B7)

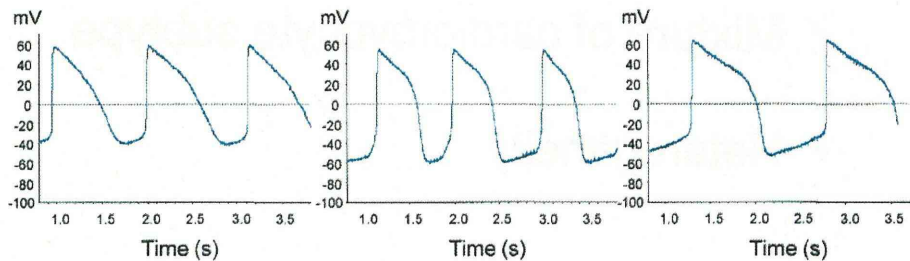
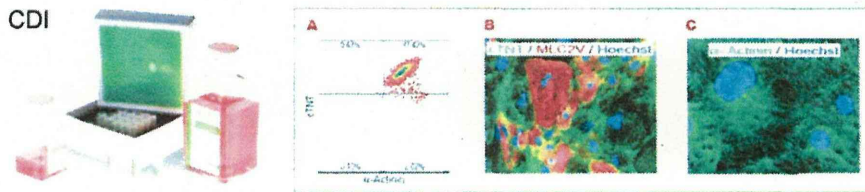


iPS-CMs
Spontaneous beating
MDP; ~ -50 mV



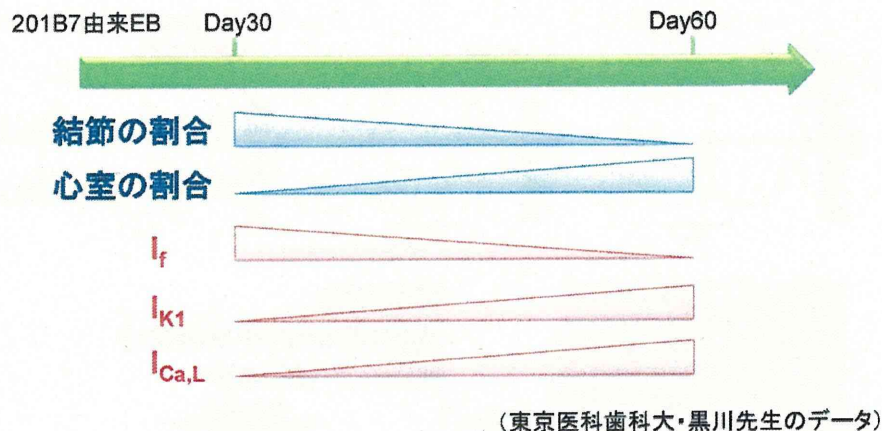
iPS-CMs exhibit immature electrical property.

Action potential of iPS-CMs (iCell)



Although iPS-derived CMs show variations among cell lines, their electrophysiological properties are immature.

ヒトiPS細胞由来分化細胞の特性変化



iPS細胞の分化は発生をin vitroで模倣しているため、常に変化している！

Limitation of iPS-CMs

- ✓ Immaturity
- ✓ Mixture of cardiomyocyte subtype
- ✓ Heterogeneity

ヒトiPS細胞由来分化細胞の“標準化”

自由に放置すれば、
多様化、複雑化、無秩序化する。



- 性能等の客観的な比較が不可能
- 技術の基礎的、共通的事項を統一できず、
真の技術的な発展が期待できない。



標準化の必要性

実験手法の標準化

- 分化心筋細胞を使った薬理試験結果の
再現性、バリエーションを把握できる
- 実験結果の信頼性を評価できる
 - 多施設で同じ薬物に対して同じ結果
が得られることを検証

ヒトiPS細胞由来心筋細胞

◆現在利用可能な市販心筋細胞

- iCell Cardiomyote (Cellular Dynamics International)
- ReproCardio (Reprocell)
- Cytiva Cardiomyocytes (hES cell-derived; GE Healthcare)
- hES-CMC (Collectis)
- Cor.4U CL cardiomyocytes (Axiogenesis)

◆実験標本のタイプ

- Single cell
- Sheet
- Cluster

実験プロトコルの標準化

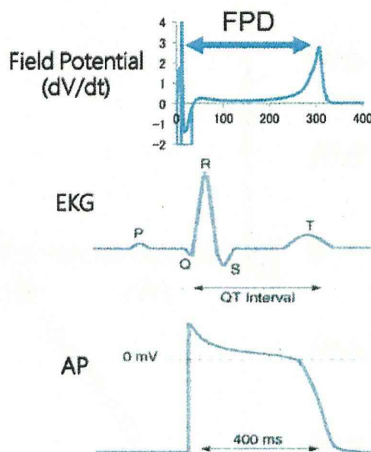
- <手順>
- 1.参加研究機関の選定
 - 2.実験標本の決定
 - 3.実験方法・計測方法の決定
 - 4.評価指標の決定
 - 5.被験薬の決定
 - 6.同一研究機関内での実験再現性
 - 7.データ解析法の統一化
 - 8.各参加研究機関におけるバリデーションの実施
 - 9.プロトコルの修正
 - 10.標準プロトコルの確立

心筋細胞の機能評価法

多点電極による細胞外電位記録

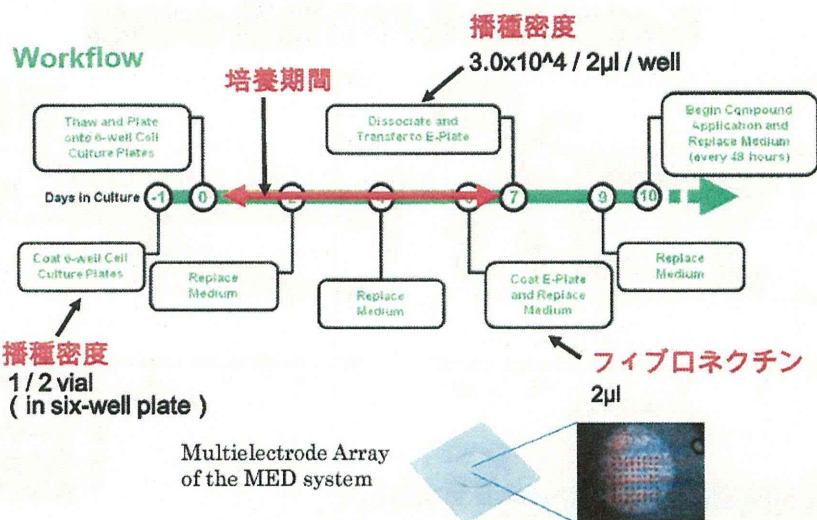


MED64 system
(Alpha MED Scientific Inc.)



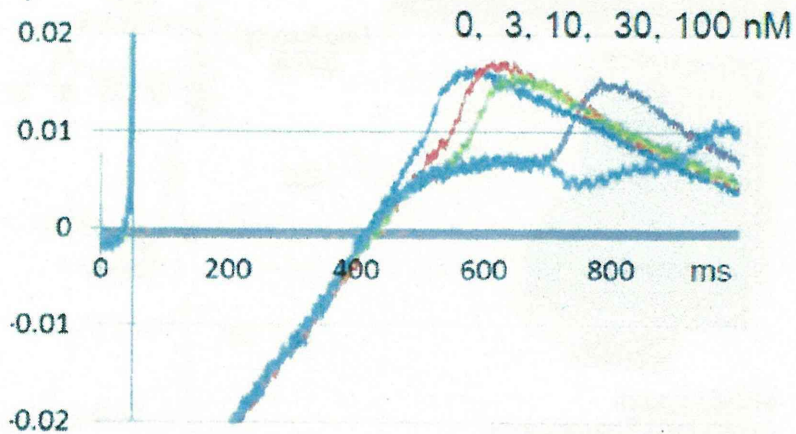
(Kamp & January, Drug
Discovery Today 1:45, 2004)

共通プロトコル

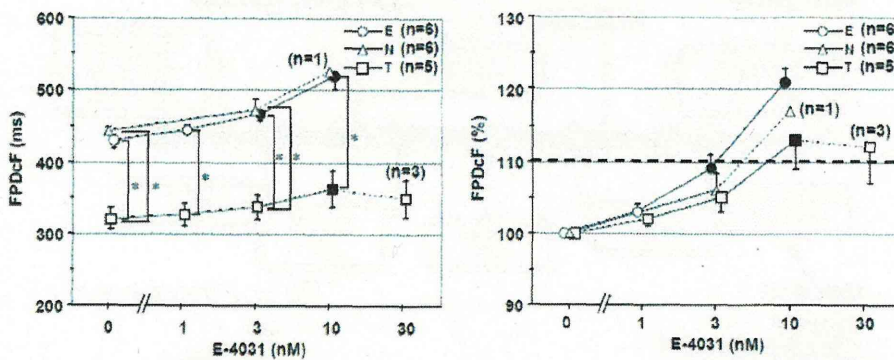


Modified protocol of Cardiomyocytes(iCell®)-xCELLigence RTCA
Cardio System Application Protocol

E-4031によるFPD延長



多施設間における E-4031によるFPD延長の検証

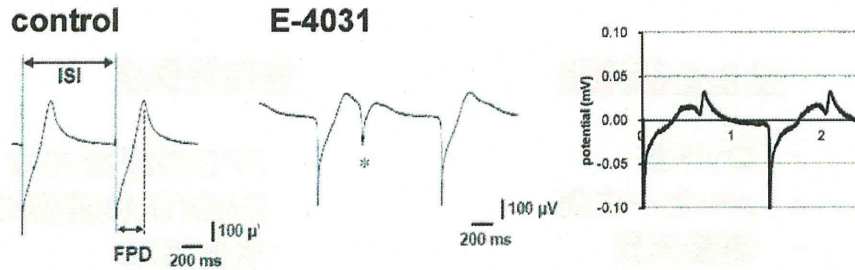


iCell心筋(#1089404)をモデルとして、
産官学でバリデーションを行った。

E: エーザイ
N: 国立衛研
T: 東邦大学

Nakamura Y., et al.
J Pharmacol Sci (in press)

E-4031によるEAD/TA様波形の発生

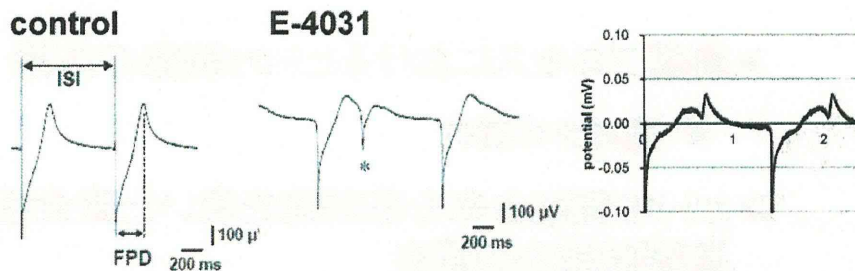


Concentration (nM)	Facility			All
	E	N	T	
0	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/5)	0% (0/17)
1	0% (0/6)	NT	0% (0/5)	0% (0/11)
3	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/5)	0% (0/17)
10	0% (0/6)	83% (5/6)	0% (0/5)	29% (5/17)
30	100% (6/6)	100% (6/6)	40% (2/5)	82% (14/17)
100	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (5/5)	100% (17/17)

NT: Not tested

Nakamura Y., et al. J Pharmacol Sci (in press)

E-4031によるEAD/TA様波形の発生



Concentration (nM)	Facility			All
	E	N	T	
0	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/5)	0% (0/17)
1	0% (0/6)	NT	0% (0/5)	0% (0/11)
3	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/5)	0% (0/17)

分化心筋細胞、標本タイプ、実験プロトコル等を揃える事により、
FPD延長やEAD/TA発生率に関して一定の評価が可能！

Nakamura Y., et al. J Pharmacol Sci (in press)

実験データの再現性に関わる要因

分化心筋細胞

- ロット差
 - メーカーの差
 - 培養日数
(測定するタイミングなど)
 - 培地
 - 実験環境(CO₂など)
 - 播種密度
- etc

機能評価法

- FPDの解析方法
 - EAD/TA様波形の
判定基準
 - チャネル間の差
- etc

本日のお話

➤創薬プロセスにおけるヒトiPS細胞の応用

- 国内外の動向

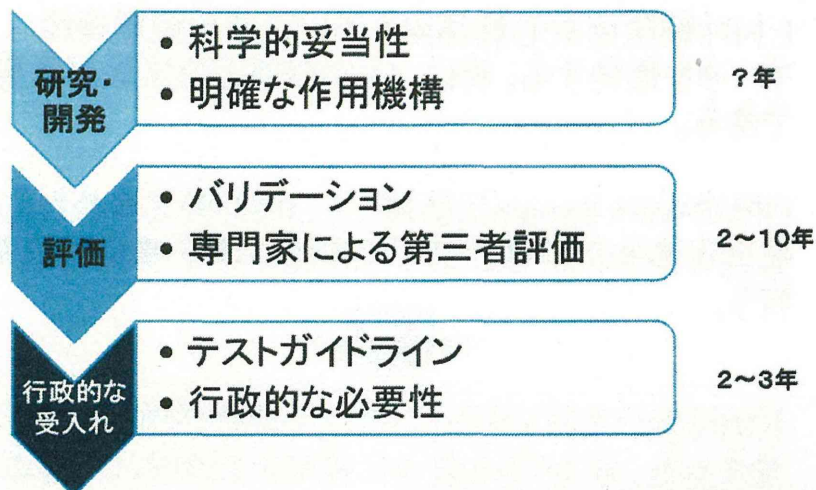
➤ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた安全性 薬理試験法の開発

- 標準化の意義
- 試験法としての科学的根拠(バリデーション)

➤今後の展望

- ガイドラインに向けて

試験法の行政的な受入れまでの経緯



ガイドラインを見据えて

- ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた薬理試験法のデータを取得する。特に、hERG試験との比較が重要である。
- CIPAのWork Streamに参加して、iPS心筋を含めた心毒性の総合的評価に関する情報収集や意見交換を行う。

ガイドラインを見据えて

- ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた薬理試験法のデータを取得する。特に、hERG試験との比較が重要である。
- CIPAのWork Streamに参加して、iPS心筋を含めた心毒性の総合的評価に関する情報収集や意見交換を行う。



ICHにおいてガイドライン改定の動きが出ることが考えられ、少なくとも我々は速やかに対応できるよう準備しておく必要がある。

実験データのプラットフォーム作り

試験法の改良

- **再現性**
培養密度、培養期間、計測実施温度
その他：ロット間差、iPS株間差
- **信頼性**
作用がわかっている陽性化合物により
感度と特異性を評価する。



多施設において心毒性データの共有化