

201328040A

## 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

平成25年度総括研究報告書

研究代表者 関野 祐子

平成26（2014）年 5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

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	
関野 祐子	1

## II. 分担研究報告

1. ヒト神経幹細胞由来神経細胞等の薬理学的プロファイルに関する研究	
佐藤 薫	18
2. ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞の品質評価	
諫田 泰成	33
3. ヒト幹細胞由来肝実質細胞の有害反応評価試験への適応基準作成	
石田 誠一	43
4. 種々のヒト iPS 細胞から誘導された心筋の遺伝子プロファイル	
吉田 善紀	62
5. ヒト iPS 細胞からの心筋細胞誘導とシート化に関する研究	
山下 潤	66

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....70

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

.....71

## V. 公開シンポジウム 抄録・シンポジウム発表内容

1. 平成 26 年 1 月 10 日開催 2014 in 霧島(霧島会議)	
第 1 回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング	140
2. 平成 26 年 2 月 13 日開催	
「ヒト iPS 細胞創薬プロセスへの応用」	
～国際情勢を見据えた新規試験法開発を目指して～	146

# 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事業）  
総括研究報告(平成 25 年度)

「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」

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：

ヒト人工多能性幹(iPS)細胞から誘導された分化細胞を新薬開発の非臨床試験段階で用いることには、動物実験の種差の問題を克服する、医薬品の有害反応から患者を守る、医薬品候補化合物のヒット確率を高める、などの様々な研究成果が期待されている。本研究では、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞、神経細胞、肝臓細胞を用いて、医薬品のヒト特異的な有害反応を検出する安全性薬理実験系を構築し、再現性の良い簡便な実験プロトコルを開発・標準化して、新しい安全薬理試験法の公定化のために多施設間バリデーションを行う。また、新規薬理試験法で利用出来る日本発のヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を開発することも、我々の研究班の重点課題となった。現在入手可能な各種分化細胞を用いて、前年度に決定した薬理試験プロトコルを用いて細胞機能の指標を比較する薬理実験を行った。まず、同一ロットで同一手法による実験データの再現性を確認し、次にロット、由来 iPS 細胞株、分化誘導法、細胞の製造元などの違いを検討した。その結果、同一箇所で製造された同一ロットの分化細胞を用いれば、実験データの再現性が高いことが分かった。しかし、同一分化手法を用いても、由来する iPS 細胞株の違いで分化細胞のフェノタイプは大きく異なる可能性が、神経幹塊から神経細胞を分化した研究から示唆された。また、分化肝細胞においては徐々に酵素活性が認められる細胞市販品が登場してきたという事実から、研究分野全体として分化誘導法の開発が進んでいることが窺われた。さらに、新たに薬理試験用に開発された分化心筋細胞について、我々が採用した実験プロトコルを適用するため、細胞標本の最適化を開始した。

レギュラトリーの側面からみると、平成 25 年 7 月に米国で ICH E14 の廃止と ICHS7B の改訂の議論が開始されたことが、本研究に大きな拍車をかけることとなった。S7B 改訂の科学的根拠を提出するため米国に Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay (CiPA)という日米欧規制機関による国際研究チームが結成された。我々は CiPA 活動の 5つのワーキングチームのうち Cardiomyocytes ワーキングチームに対して実験プロトコルの提案を行った。さらに京都大学 CiRA の山下潤教授に研究班への参加をお願いした。このように、平成 25 年度夏から急激に激化した、試験法の国際開発競争に対応し、日本の技術のグローバル化と日本の分化細胞を海外に展開するため研究体制を強化する必要がある。

キーワード：iPS細胞、神経細胞、心筋細胞、肝実質細胞、シナプス、QT延長、酵素活性、多施設間バリデーション

## 総括研究班

### 協力研究者一覧（順不同、敬称略、所属略称）

杉山篤（東邦大学）、中村裕二（東邦大学）、安東賢太郎（東邦大学）、白尾智明（群馬大学）、山崎博幸（群馬大学）、大原由紀（群馬大学）、小島正巳（産業総合研究所）、水井利幸（産業総合研究所）、五嶋良郎（横浜市立大学）、福島弘之（京都大学）、川東正英（京都大学）、澤田光平（エーザイ）、宮本憲優（エーザイ）、松尾純子（東邦大学、新日本科学、国立医薬品食品衛生研究所）、入江智彦（国立医薬品食品衛生研究所）

### オブザーバー一覧（順不同、敬称略、所属略称）

光岡俊成（厚生労働省）、田保充康（中外製薬）、葛西智恵子（アステラス製薬）、千葉克芳（第一三共）、山本恵司（武田薬品工業）、早乙女秀雄（iPSアカデミアジャパン）、酒井明（iPSアカデミアジャパン）、長田智治（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）

### 分担研究一覧

- (1) ヒト神経幹細胞由来神経細胞等の薬理的プロファイルに関する研究（佐藤薫）
- (2) ヒトiPS細胞由来の心筋細胞の品質評価（諫田泰成）
- (3) ヒト幹細胞由来肝実質細胞の有害反応評価試験への適応基準作成（石田誠一）
- (4) 種々のヒトiPS細胞から誘導された心筋の遺伝子プロファイル（吉田善紀）
- (5) ヒトiPS細胞からの評価法用心筋細胞の開発研究（山下潤）

## A. 研究目的

動物実験では予測できない有害反応には、致死的な薬剤性不整脈、認知・情動・記憶などの高次脳機能障害、薬物性肝障害などがある。

人工多能性幹(iPS)細胞から誘導された分化細胞を新薬開発の非臨床試験段階で用いることには、動物実験との種差の問題を克服したヒト特異的有害反応評価系の構築が期待されている。本研究では、ヒトiPS細胞由来の分化細胞を非臨床試験の標本として用いる際に注意すべき医薬品薬理実験指針を含むガイドランスを作成するため、実験法の開発と標準化を行う。

本研究課題に先行する平成22、23年度の調査研究において、我々は、ヒトiPS細胞由来の分化細胞は、誘導条件、培養条件などの違いにより異なる薬理学的特性を示すため、結果の比較は難しいことを示した。評価手法の標準化の遅れが、iPS細胞を用いた医薬品評価法開発の大きな障害となっている。そこで、安定した特性を持つ分化細胞の供給が必須であり、同一の実験プロトコルによる実験結果の再現性を検証する必要性を提言した。心筋細胞の場合、同一iPS細胞株から誘導され組織細胞マーカータンパク質発現により規格化された分化細胞が数種類入手可能となった。そこ

で昨年度は、これらを利用してヒト特異的有害反応評価系の評価指標を決定するための予備的薬理実験を行い、実験プロトコルの標準化に取りかかった。

これまでに、ヒト iPS 細胞由来の神経細胞、心筋細胞、肝臓細胞を薬理実験に応用するために標本が満たすべき基準等を検討し、ヒト iPS 細胞分化細胞を用いた非臨床試験法を開発するためには、まずヒト有害反応の検出を可能とする評価指標を明確にする必要がある。神経細胞の場合にはシナプス形成とその機能成熟、心筋細胞の場合には集合活動電位記録と QT 間隔、肝実質細胞の場合には薬物代謝酵素活性などを評価指標とすることとした。

さらに、多施設間で実験データの再現性が確認できるよう、規制側から評価法の標準化に関する方向性を示してきた。また、近年世界的に制限されつつある動物実験に代わる評価法を推進する。本年度は、同一 iPS 細胞株から誘導され組織細胞マーカータンパク質発現により規格化された分化細胞などが数種類入手可能になっているので、これらを用いて、最も妥当と思われる予備的薬理実験を行い、医薬品評価法を標準化する作業に着手する。また、共同研究者から供与を受けた細胞に関しても組織細胞マーカータンパク質の発現などを調べて、標準化のための指標を決定した。

再現性の良い、簡便な実験プロトコルを開発・標準化して施設内・施設間バリデーションを行い、試験法の公定化を目指す。特に、平成 25 年度は、現在入手可能な各種分化細胞について、前年度に決定した評価指標を解析するための薬理実験を行い、同一ロットで同一手法に

よる実験データの比較を行い、分化細胞の機能評価を行った。

## B. 研究方法

### B-1. 総括研究

- 班会議を開催し、研究の方向性を打ち合わせし、国際動向などの情報を共有する。
- バリデーションスタディーの企画立案を行う。
- 公開シンポジウムを企画し開催する。学会のシンポジウム、一般演題で、研究成果の発表を行う。
- 論文の作成を行う。他の研究機関に対する技術導入を行う。
- 国際会議での情報発信を行う。

### B-2. 分担研究

#### ヒト iPS 細胞由来神経細胞等の薬理的プロファイルに関する研究 (佐藤薫)

- ヒト iPS 細胞由来神経細胞培養  
京都大学が樹立した 201B7 および 253G1 ヒト iPS 細胞株を用いて慶応大学が樹立した neurosphere, 201B7-EB と 253G1-EB(岡野研)、201B7 から大阪医療センターが樹立した neurosphere , Osaka-EB, 201B7-Dorsp (金村研)から神経細胞を分化誘導して実験に用いた。その他、すでに神経細胞に分化している、iNeuron (CDI 社)、Repro-DA (リプロセルセル社)を培養し、実験を行った。
- ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本のカルシウムイメージング

それぞれに適した分化誘導条件で 10-40 日間培養後、機能的受容体の発現をアゴニスト投与による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を fura2-AM カルシウムイメージング法を用いて AQUACOSMOS / RATIO システムで可視化、定量し比較

検討した。

### ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞の品質評価に関する研究 (諫田泰成)

#### ● 細胞シートの作成法の標準化

京都大学 CiRA で作成された分化心筋細胞を用いた。培地は B27 培地あるいは alpha MEM 培地を用いた。

#### ● 細胞外電位記録

MEA システムとして MED64 (アルファメッドサイエンティフィック社)を用いた。各被験物質は蓄積的に添加し、10 分間記録し、最後の 1 分間の結果を解析した。催不整脈作用の指標として、QT 間隔に相当する Field Potential Duration (FPD)および EAD/TA の発生率を解析した。

#### ● 波形解析法の標準化

波形は、FlexPro8 (Weisang (GmbH)) を使用して解析した。具体的には、データを CSV 形式変換し、FlexPro ソフトウェアに読み取らせ、波形データを可視化した。得られた波形から所定のピークを認識させ、認識ずれや認識漏れがないかを確認し、必要に応じて修正した。ピークを認識した情報と共にエクセル(マイクロソフト)に転送し、FPD などの各値を算出した。さらに、Fredericia 式により補正した。

### ヒト幹細胞由来肝実質細胞の有害反応評価試験への適応基準作成研究(石田誠一)

本年度は、リプロセル社、CDI 社、Collectis 社より iPSC 由来肝細胞を入手し、薬物代謝関連遺伝子の活性発現と遺伝子発現を検討した。誘導に関しては、ガイドラインに従い CYP1A2、CYP2B6、

CYP3A4 を中心に検討した。また、アセトアミノフェンに対する毒性発現を CYP 酵素活性阻害剤の非存在 / 存在下で検討した。

### 種々のヒト iPS 細胞から誘導された心筋の遺伝子プロファイル研究 (吉田善紀)

ヒト ES/iPS 細胞を胚様体形成法にて分化誘導する従来の分化誘導法に改良を加えた。この改良法を用いて複数のヒト iPS 細胞株において心筋分化効率を評価する。また多点電極システム、カルシウムイメージング、パッチクランプ検査などの電気生理学的検査を用いて、既知の心毒性物質に対して異常が誘発されるかを確認することにより、有害反応評価系に使用できる品質を有しているかを確認する。

### ヒト iPS 細胞からの心筋細胞誘導とシート化に関する研究 (山下潤)

ヒト iPS 細胞からの心筋及び血管系細胞の効率的分化誘導法と温度感受性培養皿を用いた心血管細胞のシート化技術を用いて、高純度心筋細胞の効率的誘導・精製と同細胞の供給及び同細胞を用いた心筋機能評価系の構築、さらにはシート化した細胞の新しい in vitro 安全性試験モデルへの応用の可能性を検討する。具体的には、ヒト iPS 細胞から誘導した種々の細胞群(心筋細胞・内皮細胞・血管壁細胞)を単離したもの及びシート化したものを調製し、評価法用に用いるための最適な細胞条件の検討を開始する。本年度中に 5 回、種々の細胞材料を研究代表者に供給し、最適な細胞形態・輸送条件や必要とされる細胞特性

を検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。慶應大学よりヒト iPS 細胞由来 neurosphere 等を受け入れるため、慶應大学と MTA を取り交わした。Neurosphere に関しては、分化済み細胞塊であるため、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会より平成 23 年 1 月 31 日に倫理審査非該当と判定された。ストックバイアルは施錠可能な国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室にて有人監視のもと液体窒素中保管している。実験に使用した細胞は実験終了後全てオートクレープし廃棄した。

## C. 研究結果

### C-1. 総括班による研究成果

#### 班会議の開催

第 1 回班会議を平成 25 年 8 月 26 日に東邦大学にて開催して、総括班の進捗状況として、関野が参加した平成 25 年 7 月 23 日 CSRC-HESI-FDA 会議の報告行い、ICH E-14 S7B に関する日本の対応について考える臨床一非臨床合同会議を 1 月 10 日～12 日霧島にて行うことをアナウンスした。また、平成 26 年 2 月 13 日に研究成果シンポジウムを行うことをアナウンスした。第 2 回班会議を平成 26 年 1 月 10 日に霧島にて開催し、25 年度の研究の進捗の確認と予算の追加配分ならびに班の構成員の追加に関する報告、26 年度の研究体制について打ち合わせをおこなった。論文作成については、心筋グループ(東邦大学、エーザイ、国衛研、三菱化学メディ

エンス)により東邦大学に集合して作製した。

#### 霧島会議と公開シンポジウムの開催

平成 26 年 1 月 10-12 日に、霧島会議を開催した。平成 26 年 2 月 13 日に研究成果の公開シンポジウム「ヒト iPS 細胞の創薬プロセスへの応用～国際情勢を見据えた新規試験法開発を目指して～」(公開シンポジウムの項、抄録ならびに発表内容を参照)を東京大学にて開催した。

#### 研究発表

北米神経科学学会、日本薬理学会、日本生理学会にて研究発表を行った。

#### 招待講演

研究代表者・関野は、日本製薬医学会 2013 年年次大会で「ヒト iPS 由来分化細胞の非臨床試験法への応用：試験法の標準化の重要性について」(平成 25 年 7 月 19 日)、平成 25 年度国立医薬品食品衛生研究所公開シンポジウムで「ヒト iPS 細胞の安全性試験法への応用」(平成 25 年 7 月 26 日)、第 8 回レギュラトリーサイエンス学会シンポジウム～再生医療の早期実現に向けて～で「レギュラトリーサイエンスからみた創薬応用への課題」(平成 25 年 9 月 24 日)の講演を行った。第 87 回日本薬理学会年会(仙台、平成 26 年 3 月 19-21 日)で、日本薬理学会・日本毒性学会合同シンポジウム「iPS 細胞研究の現状と医薬品開発への応用」において、シンポジストとして「ヒト iPS 細胞由来分化細胞を用いた薬理試験法の開発と公定化」について講演した。また、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)を副会長として企画し担当し、オープニングと

Cardiovascular Safety Pharmacology Studies - Japan's Future Directions - の講演をした。

## C-2. 分担研究による研究成果

### ヒト iPS 細胞由来神経細胞等の薬理学的プロファイルに関する研究 (佐藤 薫)

ヒト iPS 細胞由来神経細胞によるヒト特異的有害反応評価を実現するために、神経細胞のシナプス後部に発現する受容体機能を調べる実験プロトコルを確立した。昨年度より、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞塊 (201B7 および 253G1 由来: 慶応大学より供与)、さらにヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞 (iCell Neuron; CDI Ltd., USA) を用いて、神経細胞標本を作成した。シナプス機能の分化状態を検討するプロトコルとして、ATP とグルタミン酸 (L-glutamate: L-Glu) を細胞外に投与した際の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化をイメージング解析して、機能的な P2 受容体、グルタミン酸受容体の発現を調べた。また、シナプス前部タンパク質とシナプス後部タンパク質を免疫組織染色してシナプス形成とシナプス機能成熟について検討した。201B7 由来神経細胞は分化誘導 30 日目に ATP で、40 日目で L-Glu で細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇する細胞が見出された。この順番はげっ歯類の神経幹細胞から分化誘導した神経細胞でも観察された。しかし、免疫組織化学的観察では、共局在は観察されなかった。253G1 由来神経細胞は分化誘導 10 日目で L-Glu にのみ反応しその後 ATP への反応は現れなかった。しかし、免疫組織化学的にはシナプス形成が確認できた。ヒト iPS 細胞由来神経

前駆細胞は、培養 1 日目より L-Glu にのみ反応しその後 ATP へは反応しなかった。市販の iCell Neuron に関しては研究協力者の白尾グループが、シナプス機能成熟マーカーであるドレブリンの発現と神経細胞形態を調べた。興奮性シナプス部位である樹状突起スパインが形成されず、ドレブリンの細胞内分布は成熟パターンとならなかった。

### ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞の品質評価に関する研究 (諫田泰成)

播種する iCell 心筋細胞の密度を検討したところ、密度によって拍動数などに影響が認められたため、iCell 心筋細胞の播種密度の最適化を行った。この条件下で、心電図の QT 間隔に相当する Field potential duration (FPD) を計測した結果、FPD には温度感受性が認められ、 $37 \pm 1^\circ C$  で測定する必要があることを明らかにした。このように、播種密度と温度をコントロールすることにより、再現性の高い心筋モノレイヤーを作製し FPD を解析できることを明らかにした。次に、陽性対照物質および陰性対照物質を用いて、心筋モノレイヤーの FPD に対する影響を検討した。陽性対照物質である hERG 阻害剤-4031 の添加より濃度依存的に FPD の延長が認められたが、陰性対照物質であるアスピリンはほとんど FPD に影響を与えなかった。

### ヒト幹細胞由来肝実質細胞の有害反応評価試験への適応基準作成研究 (石田誠一)

A 社細胞では、CYP3A4 において、

発現は低いものの、活性並びに遺伝子発現の双方で、リファンピシンによる誘導が認められた。CYPP2B6も遺伝子発現レベルでは誘導がみられる可能性がある。B社細胞では、非常に高いCYP3A4活性が認められた。また、リファンピシンによる誘導も遺伝子発現レベルでは確認できた。さらにCYP1Aの誘導が認められた。C社細胞では、低いながらもCYP3A4の遺伝子発現が認められた。

アセトアミノフェンによる毒性発現は、各社とも同じ程度の応答性を示した。CYP阻害剤の効果は認められなかった。

#### 種々のヒト iPS 細胞から誘導された心筋の遺伝子プロファイル研究 (吉田善紀)

新しく開発した胚様体形成法による分化誘導法(改良法)を用いることにより複数のヒト ES/iPS 細胞株において80-90%の高効率でトロポニンT陽性心筋細胞が得られることを確認した。また本分化誘導系を心筋大量培養系に適応可能なように誘導法の最適化・改良を進めている。得られた分化心筋細胞の遺伝子発現はヒトの心臓組織の遺伝子発現プロファイルに近いものであった。また本分化誘導系で誘導された心筋細胞の性質を評価するためE4031(IKr阻害薬)およびchromanol 293B(IKs阻害薬)による効果を評価した。多点電極システムによる細胞外電位測定法によりそれぞれの薬剤によって用量依存性にフィールド電位間隔が延長することを確認した。

#### ヒト iPS 細胞からの心筋細胞誘導とシート化に関する研究 (山下潤)

高純度純化心筋細胞(純度>95%)を培養皿に接着した状態で輸送し、解析に用いることにより、QT延長及びEADを確認することができることを確認した。また同時に分担者のもとでも同様の解析を行い、種々の薬剤でQT延長及びEADを確認した。

### D. 考察

#### D-1. ヒト iPS 細胞由来分化細胞を用いた薬理試験法開発

平成24年度に設定した評価指標と標準化したプロトコルを用いて、各種分化細胞で実験を行ったところ、同一iPS細胞株から同一分化条件で誘導され、組織マーカータンパク質発現により規格化された分化細胞であれば、施設内外で再現性の高いデータを取得できることが示唆された。

#### 神経細胞

ヒト iPS 細胞から神経系への誘導法開発が進むにつれ、NMDA受容体の発現効率が上昇してきている、という傾向をみることができた。これは、神経細胞特異的な有害反応である興奮毒性の評価が可能になったことを示している。しかし、我々のこれまでの実験ではシナプス形成の指標である自発発火の観察には至っていない。今後、さらに高次の中樞機能への影響評価を達成するためには、シナプス形成を促進する因子(グリア細胞との相互作用など)の探索、デバイス開発などを急ぐ必要がある。

#### 心筋細胞

市販のヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を用いて多施設バリデーションを行い、どの施設においてもE-4031の薬理作用を検出できることを明らかにし

た。また、EAD/TA の発生率を指標とすることにより、QT 延長とは異なる催不整脈作用を評価できることが明らかになった。また、吉田ら、山下らが作製した心筋細胞において、ともに E-4031 ならびにクロマノールによる QT 延長を確認する標本が得られることを確認した。今後薬理実験用に安定した薬理作用を発現するには、薬理試験用細胞調整のための SOP を作製する必要があるものの、日本で開発された分化心筋細胞を国際市場に展開することへの期待は大きい。

### **肝臓細胞**

昨年度の比較検討に比べ、iPSC 由来肝細胞の機能発現が高くなっていると考えられた。特に薬物代謝において、最も主要な CYP3A4 に関して、比較的高い発現と誘導が認められる例があり、来年度は引き続き、再現性、ロット間差を検討し、また、新たな製品に関して知見を得ていくことが重要である。また、遺伝子発現のパターンが会社ごとに異なる結果が得られていた。データを増やし、薬物代謝関連遺伝子の発現と関連性の高い遺伝子の探索を進めることで、薬物代謝活性の高い分化誘導肝細胞を判断するバイオマーカーを見出す可能性が示唆された。

### **D-2. 成果の今後の活用**

本標準化された試験プロトコルの公定化には、多施設が参加するバリデーション研究が必須であるので、同一プロトコルで薬理試験を行うことのできる研究施設を増やす必要がある。現在、複数の関連企業から技術導入の希望があり、研修などによる技術移植を予定している。日本製薬工業協会 医薬品評価委員

会 基礎研究部会タスクフォース 5 (TF-5) 『ヒト iPS 細胞応用安全性評価』が平成 25 年度から開始され、研究アドバイスをを行っている。また、当該タスクフォースが、心筋、神経、肝臓を対象とした医薬品の安全性評価にヒト iPS 細胞由来分化細胞が利用出来るかどうかを検討する目的で平成 25 年度秋にコンソーシアムを立ち上げた。さらに、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発プロジェクト」では、我々の用いた分化心筋用の実験プロトコルを用いて、複数薬物でのプレバリデーションが行われた。今後さらに被験物質と参加研究施設を増やして行く予定である。

### **E. 結論**

分化神経細胞のシナプス機能を調べるためには、生きた細胞で受容体機能を生理学的に調べる方法と、シナプス構成タンパク発現とその分布を免疫組織染色法で調べる方法を組み合わせる必要がある。また、ヒト iPS 細胞由来分化神経細胞の特性は、分化誘導前の状態に依存することが示唆された。

心筋モノレイヤーを MEA で解析するプロトコルにより、簡便に医薬品による催不整脈作用を検出できることが示唆された。今後は多施設間で同一実験を行い、実験プロトコルを標準化して、心筋細胞のロット間比較や複数の薬物によるバリデーションを行う。

また iPSC 由来肝細胞の機能発現は、昨年度の比較検討に比べ高くなった。特に薬物代謝において、最も主要な

CYP3A4 に関して、比較的高い発現と誘導が認められる例があり、来年度再現性等の検討が必要と考える。

レギュラトリーの側面からみると、平成 25 年 7 月に米国で ICH E14 の廃止と ICHS7B の改訂の議論が開始されたことが、本研究に大きな拍車をかけることとなった。S7B 改訂の科学的根拠を提出するため米国に Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) という日米欧規制機関による国際研究チームが結成された。我々は CiPA 活動の 5 つのワーキングチームのうち Cardiomyocytes ワーキングチームに対して実験プロトコルの提案を行った。

平成 25 年度夏から急激に激化した試験法の国際開発競争に対応し、日本の技術のグローバル化と日本の分化細胞を海外に展開するための研究体制を強化する必要がある。

## F. 研究発表

### 原著論文及び総説

1. Mizui T., Sekino Y., Yamazaki Y., Ishizuka H., Takahashi H., Kojima N., Kojima M., Shirao T. (2014) Myosin II ATPase activity mediates the long-term potentiation-induced exodus of stable F-actin bound by drebrin A from dendritic spines. PLOS ONE. 9(1) e8536722 . doi: 10.1371/journal.pone.0085367. eCollection 2014.
2. Yamazaki H., Kojima N., Kato K., Hirose H., Iwasaki T., Mizui T., Takahashi H., Hanamura K., Roppongi R.T., Koibuchi N., Sekino Y., Mori N., Shirao T. (2014) Spikar, a novel drebrin-binding protein, regulates the formation and stabilization of dendritic spines. J Neurochem 128(4): 507-22
3. Irie T., Matsuzaki Y., Sekino Y., Hirai H. (2014) Kv3.3 channels harboring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells. J Physiol 592(Pt1) 34: 229-47
4. Ishikawa M, Shiota J, Ishibashi Y, Hakamata T, Shoji S, Fukuchi M, Tsuda M, Shirao T, Sekino Y, Ohtsuka T, Baraban JM, Tabuchi A. (2013) Identification, expression and characterization of rat isoforms of the serum response factor (SRF) coactivator MKL1. FEBS Open Bio. 7(3): 387-93.
5. Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E., Sekino, Y. and Sato, K. (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. J Neurosci 34(5): 2231-2243.
6. Takahashi, K., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K., Nakazawa, K., Sekino, Y. and Sato, K. (2013) Niflumic acid activates additional currents of the human glial L-glutamate transporter EAAT1

- in a substrate-dependent manner. *Biol Pharm Bull* 36(12): 1996-2004.
7. Oguchi-Katayama, A., Monma, A., Sekino, Y., Moriguchi, T. and Sato, K. (2013) Comparative gene expression analysis of the amygdalae of juvenile rats exposed to valproic acid at prenatal and postnatal stages. *J Toxicol Sci* 38(3): 381-402.
  8. Kinoshita, M., Nasu-Tada, K., Fujishita, K., Sato, K. and Koizumi, S. (2013) Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of Tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). *Cell Mol Neurobiol* 33 (1): 47-58.
  9. 関野祐子、佐藤薫、諫田泰成、石田誠一 (2013) 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、国立医薬品食品衛生研究所報告. 131: 25-34.
  10. 諫田泰成 (2013) ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導法、日本薬理学雑誌、141: 32-36.
  11. Sekino, Y., Sato K., Kanda, Y. and Ishida, S. (2013) Developing and standardizing experimental protocols using human iPS-derived cells to predict adverse drug reactions in pre-clinical safety studies. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*. 131: 25-34.
  12. Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T. (2013) Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. *Circ J*. 77(5): 1307-14.
  13. Miki K, Yoshida Y, Yamanaka S. (2013) Making steady progress on direct cardiac reprogramming toward clinical application. *Circ Res*. 113(1): 13-5.
  14. Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, Yamanaka S. (2014) A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 4: 3594. doi: 10.1038/srep03594.
  15. Uosaki, H., Magadum, A., Seo, K., Fukushima, H., Takeuchi, A., Nakagawa, Y., Moyes, K.W., Narazaki, G., Kuwahara, K., Laflamme, M., Matsuoka, S., Nakatsuji, N., Nakao, K., Kwon, C., Kass, D.A., Engel, F.B., Yamashita, J.K. (2013) Identification of chemicals inducing cardiomyocyte proliferation in developmental stage-specific manner with

pluripotent stem cells. *Circ Cardiovasc Genet.* 6: 624-633

### 学会発表

(国内)

1. 関野 祐子、白尾 智明：iPS細胞由来分化細胞の生理機能を確認するための実験プロトコール作成の試み、第6回上肢の神経機能回復セミナー（2013.6, 秋田）
2. 関野 祐子：ヒト iPS 由来分化細胞の非臨床試験法への応用：試験法の標準化の重要性について、日本製薬医学会 2013 年度年次大会（2013.7, 東京）
3. 関野 祐子：ヒト iPS 細胞の安全性試験法への応用 平成 25 年度国立医薬品食品衛生研究所シンポジウム（2013.7, 東京）
4. 関野 祐子：レギュラトリーサイエンスからみた創薬応用への課題第8回レギュラトリーサイエンス学会シンポジウム～再生医療の早期実現に向けて～（2013.10, 東京）
5. 関野 祐子：Cardiovascular safety pharmacology Studies - Japan's future directions - 第1回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング（2014.1, 霧島, 鹿児島）
6. 関野 祐子：ヒト iPS 細胞由来分化細胞を用いた薬理試験法の開発と公定化、第87回日本薬理学会年会（2014.3, 仙台）
7. 佐藤 薫、関野祐子：化学物質が生後初期神経・グリア新生に及ぼす影響を簡便に検討するための in vitro 評価系の開発、日本薬学会 第 134 年会（2014, 3, 熊本）
8. 高橋華奈子、最上(重本)由香里、大津香苗、岡田洋平、岡野栄之、関野祐子、佐藤 薫：ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本を用いた神経毒性評価系の構築、日本薬学会 第 134 年会（2014, 3, 熊本）
9. 片山敦子、門馬彰彦、秋友孝文、虞末 愛、星 裕姫乃、守口 徹、関野祐子、佐藤 薫：胎生期および新生期の化学物質暴露の情緒社会性への影響を予測する、遺伝子発現解析に基づく新規評価手法の開発、日本薬学会 第 134 年会（2014, 3, 熊本）
10. 最上(重本)由香里、干川 和枝、関野 祐子、佐藤 薫：ミクログリアによる血液脳関門の機能制御機構の解明、日本薬学会 第 134 年会（2014, 3, 熊本）
11. 笠原由香、三浦真理恵、最上(重本)由香里、関野祐子、佐藤 薫、鈴木岳之：抗うつ薬と P2X4 受容体の相互作用の比較検討、日本薬学会 第 134 年会（2014, 3, 熊本）
12. 佐藤 薫：ミクログリアの病理的新機能と生理的新機能一極性からみた神経疾患治療の可能性、第 87 回日本薬理学会年会シンポジウム「ニューロン・グリア連関から紐解く神経疾患」（2014, 3, 仙台）
13. 大原由貴、山崎博幸、大津真生、佐藤 薫、関野祐子、白尾智明：ヒト iPS 細胞由来神経細胞の発達に関する研究、第 91 回 日本生理学会大会（2014, 3, 鹿児島）
14. 佐藤 薫：ヒト iPS 細胞由来神経細胞に期待すること、4 社共催：ヒト iPS 細胞由来神経ワークショップ

- プ (講演) (2014, 3, 横浜)
15. 佐藤 薫: hiPSC-ニューロンで神経特異的有害反応は予測可能か、公開シンポジウム ヒト iPS 細胞の創薬プロセスへの応用～国際情勢を見据えた新規試験法開発を目指して～ (2014, 2, 東京)
  16. Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y. and Sato K.: An attempt to establish the neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons, the 7<sup>th</sup> Takeda science foundation symposium on pharmasciences 'iPS Cells in drug discovery and development' (2014, 1, 大阪)
  17. 佐藤 薫、高橋 華奈子、重本一最上 由香里、大津 香苗、岡田 洋平、岡野 栄之、関野 祐子: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた神経毒性評価系確立の試み、第 22 回日本バイオイメーキング学会 (2013, 9, 東京)
  18. Sato, K., Fujimori, K., Takaki, J., Suzuki, T. and Sekino, Y.: P2X4 receptor-mediated acceleration of microglial activation is important for the L-glutamate release from activated microglia in the early stage of inflammation , Neuro2013 (2013, 6, 京都)
  19. Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Miura, M., Sekino, Y. and Sato, K.: Development of in vitro blood-brain barrier model reflecting the function of neurovascular unit, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
  20. Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y. and Sato, K.: The function of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 is enhanced by docosahexanoic acid, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
  21. Ohtsu, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Okada, Y., Okano, H., Sato, K. and Sekino, Y.: An Attempt to develop a neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons vulnerable to excitotoxicity, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
  22. Hoshikawa, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohno, Y., Goldman, J.E., Sekino, Y. and Sato, K.: Activated microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis via inflammatory cytokines, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
  23. Katayama, A., Monma, A., Akitomo, K., Hirotsue, M., Hoshi, Y., Moriguchi, T., Sekino, Y. and Sato, K.: Search for genetic markers for the risk of the postnatal exposure to chemical compounds in emotion and social behavior after maturation, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
  24. 関野祐子、大原由香、佐藤 薫、高橋華奈子、山崎博幸、白尾智明: iPS 細胞由来分化細胞の生理機能を確

- 認するための実験プロトコール作成の試み、第6回上肢の神経機能回復セミナー（2013, 6, 秋田）
25. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性薬理試験の開発、第40回日本毒性学会シンポジウム（2013, 6, 東京）
  26. 黒川洵子、李敏、諫田泰成、関野祐子、古川哲史：ヒト iPS 由来心筋を用いた心臓毒性評価系の構築、第30回心電学会（2013, 11, 青森）
  27. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞由来分化細胞の標準化と創薬への応用細胞アッセイ研究会（2013, 11, 東京）
  28. 黒川洵子、李敏、諫田泰成、芦原貴司、関野祐子、古川哲史：ヒト iPS 由来心筋を用いた薬剤誘発性不整脈の研究、生理研研究会（2013, 11, 岡崎）
  29. 黒川洵子、諫田泰成、古川哲史：iPS 心筋を用いた心機能評価、第23回日本循環薬理学会（2013, 12, 福岡）
  30. 諫田泰成：Development of an in vitro cardiac safety testing using human iPS-cell derived mature cardiomyocytes、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（2014, 1, 霧島）
  31. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性評価法の現状と今後の展望、厚生労働省公開シンポジウム（2014, 2, 東京）
  32. 高橋和也、早川智広、國弘威、辰田寛和、松居恵理子、矢田博昭、諫田泰成、黒川洵子、古川哲史：イメージングによる培養心筋細胞の拍動伝播評価、第5回日本安全性薬理研究会（2014, 2, 東京）
  33. 中村裕二、松尾純子、宮本憲優、小島敦子、安東賢太郎、諫田泰成、澤田光平、杉山篤、関野祐子：Assessment of testing methods of the drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS-derived cardiomyocytes sheet: Multi-site validation study、第5回日本安全性薬理研究会（2014, 2, 東京）
  34. 諫田泰成：ヒューマンサイエンス振興財団—開発振興/規制基準合同委員会、ヒト iPS 細胞を用いた心毒性評価の現状と課題（2014, 2, 東京）
  35. 李敏、諫田泰成、芦原貴司、笹野哲郎、関野祐子、古川哲史、黒川洵子：ヒト iPS 由来心筋を用いた薬物誘発性 QT 延長に対する新規 in vitro 評価系、第87回日本薬理学会（2014, 3, 仙台）
  36. 藤塚美紀、黒川洵子、鳥野初萌、中井雄二、永森収志、金井好克、諫田泰成、松居恵理子、古川哲史：ヒト iPS 由来心筋細胞の収縮に対する基質硬度の影響、第87回日本薬理学会（2014, 3, 仙台）
  37. 中村裕二、松尾純子、宮本憲優、小島敦子、安東賢太郎、諫田泰成、澤田光平、杉山篤、関野祐子：iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた薬物性再分極遅延評価法の分析:多施設間バリデーション、第87回日本薬理学会（2014, 3, 仙台）
  38. 諫田泰成：第87回日本薬理学会、ヒト iPS 細胞由来の成熟心筋細胞の開発—実用化に向けて（2014, 3, 仙台）

39. Ayumi Oshikata, Seiichi Ishida, Toshiaki Takezawa: Development of A Culture Method Activating Hepatic Function of HepG2 Cells Utilizing A Collagen Vitrigel Membrane Chamber And Its Application To Assay System For Liver Metabolism And Toxicity, 日本組織培養学会 第 86 回大会 (2013, 5, つくば)
40. 石田誠一: 創薬安全性評価において iPS 細胞由来肝細胞に望まれる特性とは?、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013, 6, 千葉)
41. 石田誠一: iPS 細胞由来肝細胞を用いた薬物安全性評価の展望と課題、第 3 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2013, 9, 東京)
42. Seiichi Ishida, Takashi Kubo, Maki Hojyo, Yukie Kuroda, Su-Ryang Kim, Yuko Sekino: Simple Culture Method for the Preparation of Deactivated Hepatic Stellate Cells, 17th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (2013, 9, Osaka)
43. Takashi Kubo, Yukie Kuroda, Maki Hojyo, Su-Ryang Kim, Anne Corlu, Fabrice Morel, Yuko Sekino, and Seiichi Ishida: Establishment of Simple Culture Method for the Stable Maintenance of Hepatic Progenitor Cells, 日本薬物動態学会第 28 回年会 (2013, 10, 東京)
44. Seiichi Ishida, Su-Ryang Kim, Takashi Kubo, Yukie Kuroda, Maki Hojyo, Atsuko Miyajima, Taku Matsushita and Yuko Sekino: COMPARATIVE ANALYSIS OF HUMAN FETAL AND ADULT HEPATOCYTES BY METABOLOMICS AND TOXICITY TEST, 日本薬物動態学会第 28 回年会 (2013, 10, 東京)
45. 石田誠一: *in vitro* 試験と代替法をつなぐ 計算毒性学の立ち上げ、CBI 学会 2013 年回大会 (2013, 10, 東京)
46. 石田誠一: 創薬支援に有用なヒト肝 *in vitro/in silico* 代謝・輸送予測モデルの提案と薬物動態評価における実証、日本動物実験代替法学会第 26 回大会 (2013, 12, 京都)
47. 湯田浩太郎、石田誠一: hiPSC-肝細胞とインシリコのデータ融合による安全性予測/メカニズム解析に向けた考察、ヒト iPS 細胞の創薬プロセスへの応用 (2014, 2, 東京)
48. 石田誠一: *in vitro* 肝毒性評価系の計算毒性学への展開、日本薬学会第 134 年会 (2014, 3, 熊本)
49. 押方歩、石田誠一、竹澤俊明: コラーゲン美鳥膜チャンバーを利用した新しい肝代謝試験法の開発、日本薬学会第 134 年会 (2014, 3, 熊本)
50. 吉田善紀: 疾患 iPS 細胞を用いた心疾患研究 日本人類遺伝学会第 58 回大会シンポジウム 疾患特異的 iPS 細胞を用いた難病研究および再生医療 (2013, 11, 仙台)
51. 吉田善紀: iPS 細胞を用いた心疾患解析 日本再生医療学会総会シンポ

- ジウム 疾患特異的 iPS 細胞  
(2014, 3, 京都)
52. 山下 潤: 多能性幹細胞からの心血管細胞の誘導・純化・組織再構成、安全性評価研究会 2013 年 春セミナー (2013, 4, 大阪)
53. Yamashita JK.: Differentiation System of Cardiovascular Cells from iPS Cells. 1<sup>st</sup> Think Tank Meeting on Cardiac Safety 2014 in Kirishima. (2014, 1, Kagoshima)
54. 山下 潤: 多能性細胞由来心血管細胞の応用—再生医療と創薬—、製薬協コンソーシアム事務局会合 (2014, 2, 京都)
- 国際
55. Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Goldman, J.E. and Sekino, Y.: The role of microglia in neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. SfN2013 (2013, 11, San Diego, USA)
56. Ohara, Y., Yamazaki, H., Sato, K., Shirao, T. and Sekino, Y.: Morphological development and expression of synaptic proteins of human iPSC-derived neurons. SfN2013 (2013, 11, San Diego, USA)
57. Sato, K., Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T. and Sekino, Y.: L-Glutamate released from activated microglia down regulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. ISN-ASN 2013 (2013, 4, Cancun, Mexico)
58. Sato, K., Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T. and Sekino, Y.: L-Glutamate released from activated microglia down regulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation. ISN-ASN 2013 satellite meeting (2013, 4, Merida, Mexico)
59. Sekino, Y., Takahashi, K., Mogami-Shigemoto, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H. and Sato, K.: Calcium signalling of human iPS-derived neurons responding to ATP and L-glutamate stimulation. ISN-ASN 2013 (2013, 4, Cancun, Mexico)
60. Sekino, Y., Takahashi, K., Mogami-Shigemoto, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H. and Sato, K.: Calcium imaging of responses to ATP and L-glutamate stimulation of human iPS-derived neurons. ISN-ASN 2013 satellite meeting (2013, 4, Playa del Carmen, Mexico)
61. Li Min, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. Functional optimization of commercially available human induced pluripotent stem cell-derived

- cardiomyocytes (iCell-CMs) for evaluation of drug-induced QT prolongation. The 2nd HD physiology international symposium on multi-level systems biology. (2013.6. Tokyo, Japan)
62. Yasunari Kanda, Li Min, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. Development of human iPS cell-derived mature cardiomyocytes for assessment of drug-induced QT prolongation. The 7<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. (2014.1.Osaka, Japan)
63. Li Min, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. A novel approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Biophysical Society 58th Annual Meeting, (2014.2. San Francisco, USA)
64. Masatoshi Nishizawa, Kazuhisa Chonabayashi, Akiko Oishi, Ikue Takei, Misato Nishikawa, Akifumi Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, and Yoshinori Yoshida: Comparison of hematopoietic differentiation efficiency among many iPS cell lines. (2013.6. Boston, USA)
65. Kazuhisa Chonabayashi, Masahiro Kawahara, Akira Watanabe, Keisuke Okita, Masatoshi Nishizawa, Akifumi Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida: Search for pathogenesis of acquired myelodysplastic syndromes using reprogramming technology. (2013.6. Boston, USA)
66. Shunuske Funakoshi, Takeru Makiyama, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida: A Disease Model of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. (2013.6. Boston, USA)
67. Masatoshi Nishizawa, Yoshinori Yoshida, Kazuhisa Chonabayashi, Akiko Oishi, Ikue Takei, Misato Nishikawa, Yoko Morioka, Akifumi Takaori-Kondo, and Shinya Yamanaka: Comprehensive comparison of gene expression, genomic DNA methylation, and in vitro hematopoietic differentiation among many human iPS and ES cell lines. American Society of Hematology Annual meetings (2013.12 New Orleans, USA)
68. Shunsuke Funakoshi, Takeru Makiyama, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, and Yoshinori Yoshida : Cell Cycle Activation of Hypertrophic Cardiomyopathy : Insights From Research of Patient-Specific Induced

Pluripotent Stem Cells-Derived  
Cardiomyocytes, American Heart  
association's Scientific sessions  
(2013.11 Dallas, USA)