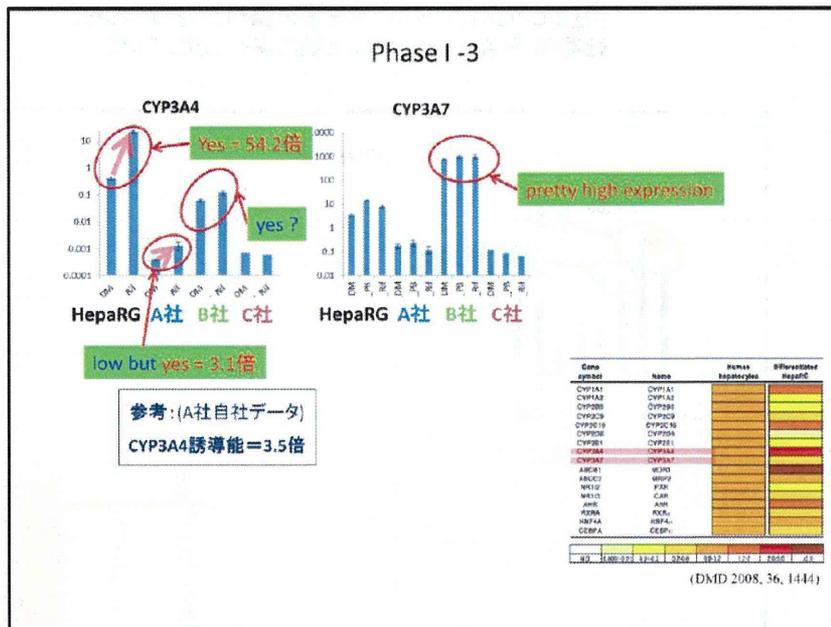
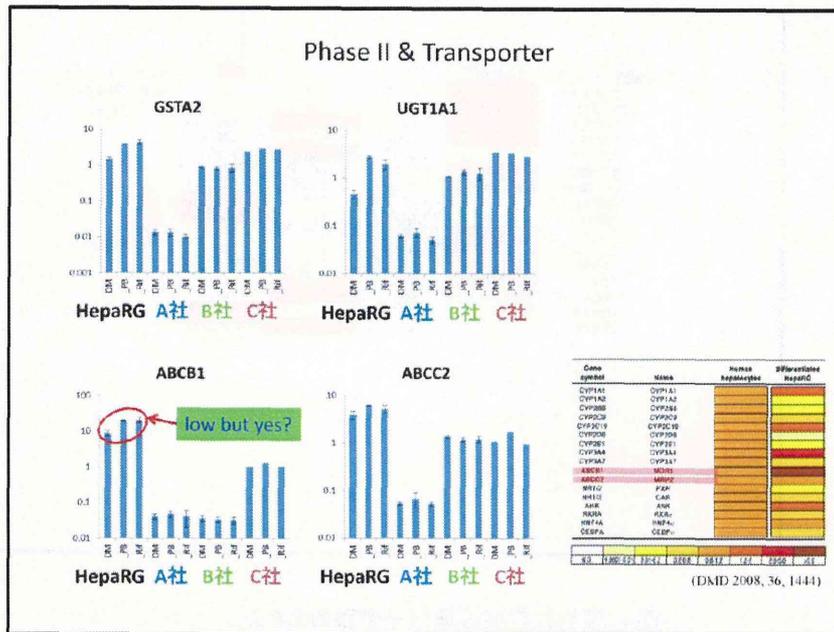


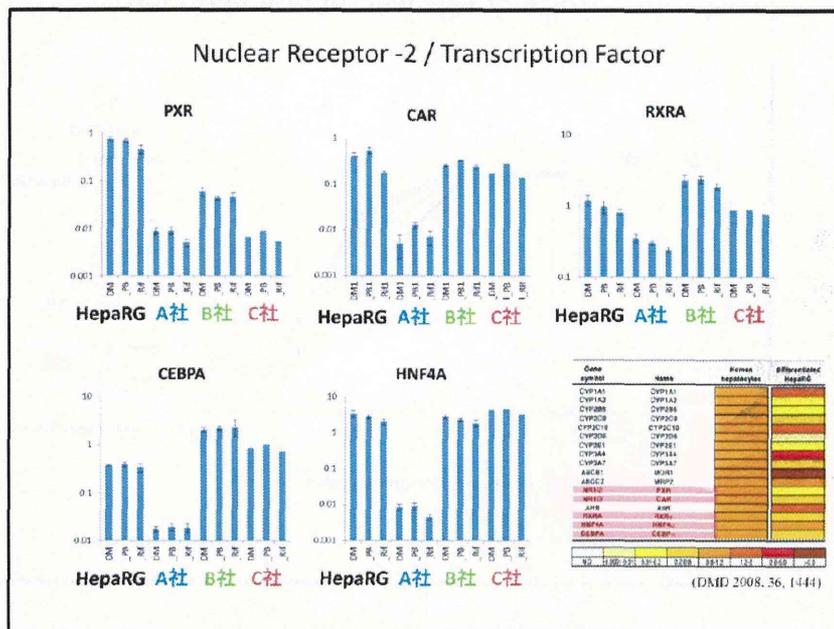
(C) CYP関連遺伝子
B社でCYP2C9とCYP2C19の比較的高い発現が認められた。また、C社でCYP2C19の比較的高い発現が認められた。



(D) CYP3A関連遺伝子
B社でCYP3A4遺伝子の高い発現が認められた。CYP3A4遺伝子の発現誘導がA社、B社で認められた。B社ではCYP3A7(胎児型のCYP3A)の発現が非常に高かった。



(E) 第II相薬物代謝酵素、トランスポーター
A社を除き、全体的に比較的高い発現が認められた。



(F) 薬物代謝遺伝子の発現調節因子
A社を除き、全体的に比較的高い発現が認められた。

Summary of Experiments (PXR/CAR)

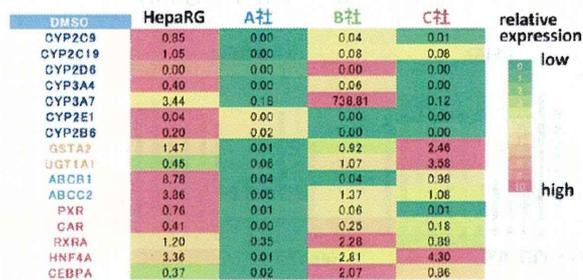


図4 薬物代謝関連遺伝子発現のまとめ
 主として核内転写因子PXR/CARに関連する遺伝子の発現データをまとめて、ヒートマップにて示した。各遺伝子のうち、発現が高かった細胞がより赤く、低かった細胞がより緑で示されている。各セル中の数字は、遺伝子発現量を示す。

Toxicity Test with Acetaminophen

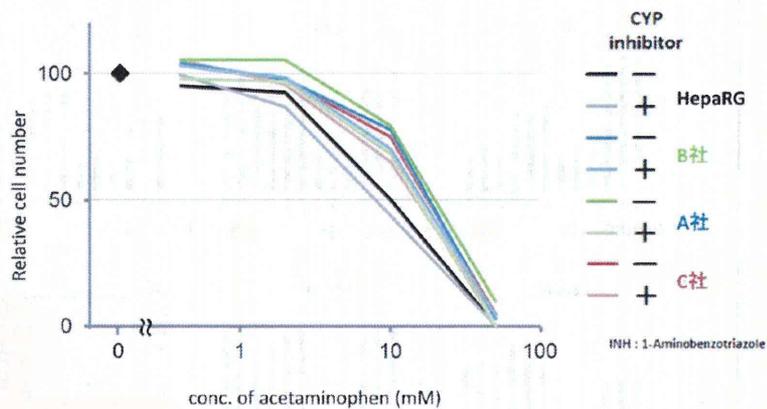


図5 アセトアミノフェン暴露による毒性発現
 各細胞を図に示したアセトアミノフェンで2日間処理したのち、相対的細胞数をCellTiter Glo assayキットで算出した。予め細胞をCYP阻害剤 1-aminobenzotriazoleで処理した群と未処理の群の結果を併せて示す。

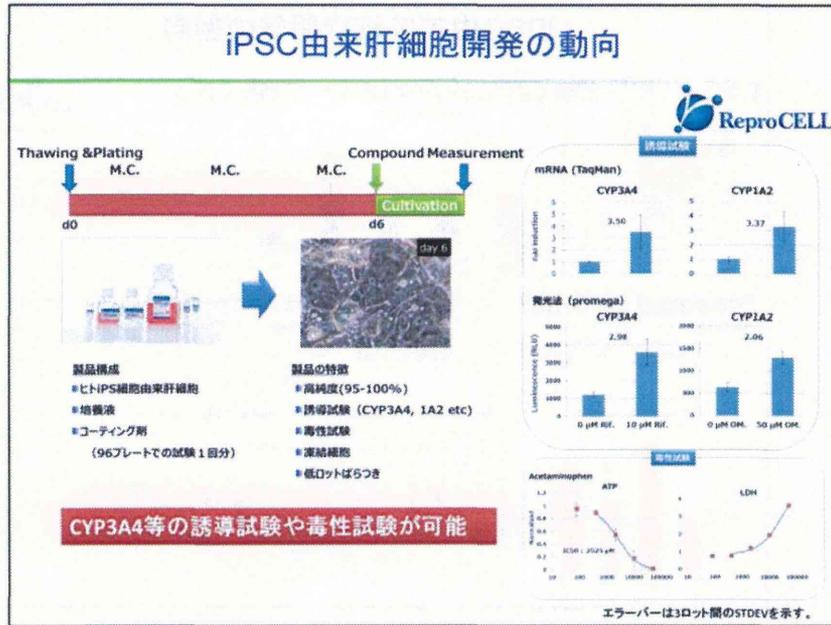


図6 iPSC由来肝細胞開発の動向
(A) リプロセル社



図6 iPSC由来肝細胞開発の動向
(B) CDI社

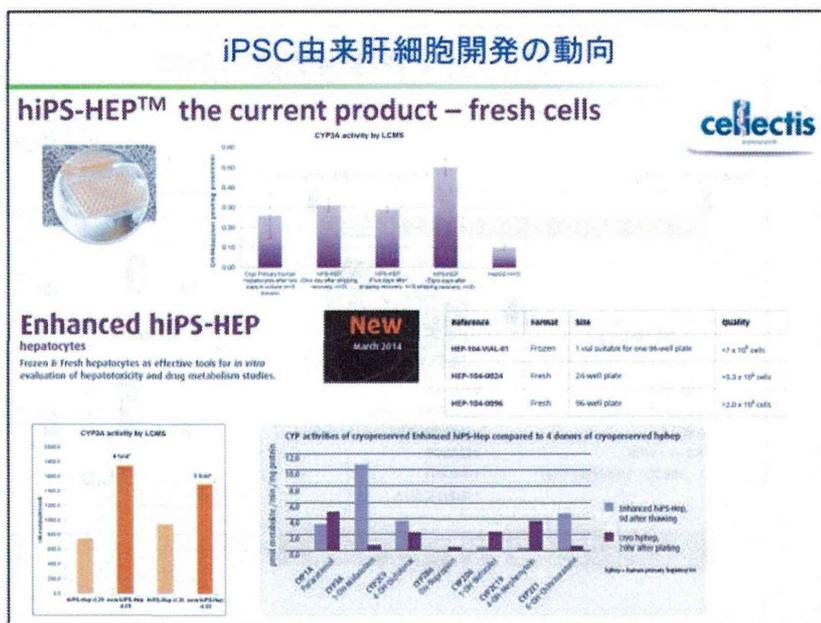


図6 iPSC由来肝細胞開発の動向
(C) Collectis社

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 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 年度分担研究報告

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

研究分担者： 吉田 善紀（京都大学 iPS 細胞研究所 講師）

研究要旨：

医薬品のヒト特異的有害反応評価系に使用できる心筋細胞を作製するためには、高効率に品質の安定した心筋細胞を誘導できる大量分化誘導系の開発が必要である。我々は心筋分化誘導系を改良し、複数のヒト ES/iPS 細胞株で効率よく安定して心筋分化誘導が可能な分化誘導系を開発した。また本誘導法で得られた誘導心筋細胞を用いてヒト特異的有害反応評価系を構築するための電気生理学的解析を進めている。多点電極システムによる細胞外電位測定系において選択的 IKr 阻害薬 (E4031) および選択的 IKs 阻害薬 (chromanol 293B) により用量依存的なフィールド電位間隔の延長が認められた。今後は iCell 等の他の心筋細胞と比較しつつヒト特異的有害反応評価系の構築を目指す。

キーワード：ヒト iPS 細胞 分化誘導 多点電極システム

A. 研究目的

本研究の目的は、医薬品のヒト特異的有害反応評価系に使用することが可能でかつ配布可能な iPS 細胞由来の心筋細胞を作製することである。

そのためにヒト iPS 細胞から高効率に心筋細胞を分化誘導できる誘導系の開発および、薬理試験に使用できるように品質が安定しており、かつラージスケールにも対応できる分化誘導系を開発する必要がある。今年度はこの目的を達成するために分化誘導法の改良と分化心筋の電気生理学的評価を行った。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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) による効果の評価した。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。

D. 考察

医薬品のヒト特異的有害反応評価系の構築のために使用可能な心筋細胞を作製するためには、高効率でかつ大量培養系に適応可能でかつ品質の安定した心筋細胞分化誘導系が必要不可欠である。我々は複数の細胞株で効率よく安定した心筋分化誘導法を開発した。そのため心筋細胞を用いた有害反応評価系の構築を効率よく進めることができるようになることが期待できる。今年度は安全性薬理試験において主要な検査となると思われる多点電極システムによる細胞外電位測定法の検討を中心に行った。E4031, chromanol 293B を用いて薬剤反応性を確認した。今後は他の薬剤についても解析を進めていく予定である。さらに市販の誘導心筋細胞(iCell)を対照としてヒト特異的有害反応評価系の構築のための解析を進める予定である。

E. 結論

複数の細胞株で効率よく心筋分化誘導できる分化誘導法を開発し、さらに大量

培養系への適応を進めている。この方法で作製した分化心筋細胞を用いて E4031 (IKr 阻害薬) および chromanol 293B (IKs 阻害薬) による心筋細胞の再分極遅延を確認した。今後他の薬剤も試しながらヒト特異的有害反応評価系の構築を目指す。

F. 研究発表

論文

1. 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.
2. Miki K, Yoshida Y, Yamanaka S. (2013) Making steady progress on direct cardiac reprogramming toward clinical application. *Circ Res.* Jun 21;113(1):13-5.
3. 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.* Jan 8;4:3594.

学会発表

1. 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. ISSCR 2013 (2013/6/12-15)
2. 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. ISSCR 2013 (2013/6/12-15)
 3. Shunuske Funakoshi, Takeru Makiyama, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida: A Disease Model of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. ISSCR 2013 (2013/6/12-15)
 4. 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 (2013.12.7-10)
 5. 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 , USA (2013. 11.16-19)
 6. 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 2013/11/23
 7. 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 2014/3/5
- G. 知的所有権の取得状況**
- 特許出願
1. 出願番号:特願 2013-102375 名称:効率的な心筋細胞の誘導方法 発明者:山中伸弥/吉田善紀/三木健嗣 権利者:国立大学法人京都大学 出願日:2013/5/14
 2. 出願番号:特願 2013-109385 名称:骨髄異形成症候群等の治療/予防薬のスクリーニング方法 発明者:山中伸弥/吉田善紀/蝶名林和久 権利者:国立大学法人京都大学 出願日:2013/5/23
 3. 出願番号:特願 2013-216817 名称:効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法 発明者:山中伸弥/吉田善紀/横田日高 権利者:国立大学法人京都大学 出願

日:2013/10/17

4. 出願番号:特願 2013-102375 名称:心筋細胞の選別方法 発明者:齊藤博英/吉田善紀/三木健嗣/遠藤慧/高橋誠弥
権利者:国立大学法人京都大学 出願日:2014/3/20

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 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 年度分担研究報告

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

研究分担者： 山下 潤（京都大学 iPS 細胞研究所 教授）

研究要旨：

分担者らはマウス ES 細胞からヒト ES 細胞さらに iPS 細胞に渡る長く豊富な心血管系細胞分化研究とその応用技術を蓄積している。本年度新たに分担研究者として参加し、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した。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した。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した。すでに少なくとも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ている。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。

キーワード：ヒト iPS 細胞 心筋細胞 QT 延長 催不整脈性

A. 研究目的

本研究は、一刻も早く iPS 細胞技術を使った新たな心筋安全性評価法開発を行うため、評価法用標準細胞候補として有力な分担者（山下潤）の再生医療用心筋細胞を評価法用に改良するための最適な細胞条件を探ることを目的とする。

ヒト iPS 細胞分化細胞を用いた被験物質の有効性・安全性試験には、薬物反応の種差の問題の克服と、ヒト特異的有害反応評価系の構築が期待されている。平成 24 年度からヒトの生命機能に関わ

る中枢神経系、心血管系、肝代謝系について、ヒト iPS 細胞分化細胞を用いた医薬品安全性評価法の開発を目的として開始した。それぞれの細胞の分化状態を示すマーカー発現と薬理学的反応の関係を検討しながら標準的試験法を整備し、ヒト iPS 細胞分化細胞の薬物応答性の再現性を多施設間で検証する。心筋細胞については、分化誘導条件、分化誘導日数、培養細胞密度、心筋活動の測定方法などを統一化して、3 施設で実験データを比較した結果、細胞の製造ロット間

で心筋細胞の特性に大きなバラつきがあることが判明した。平成 25 年 7 月末に FDA からの提案により、2 年後に心毒性に関する医薬品安全性評価法に関する臨床試験を廃止 (ICH-E14) すること、3 年後に非臨床試験の見直し (ICH-S7B) することについて、国際的議論が始まり、ヒト iPS 細胞技術を利用する臨床試験代替法は、開発過程の短縮や予測精度の向上が望めることから、欧米企業を中心に開発競争が始まっている。これまでの実験の情報や実現可能性を検討した結果、代替法利用のためには、QT 延長のみならず催不整脈作用を予測できる成熟心室筋型の評価法用標準細胞を開発することが必要であること、これまでの研究の成果を応用して新たな評価法が可能であり、医薬品安全性評価法の国際基準 (ICH ガイドライン) の見直し等の時間的制約も踏まえ、一刻も早く、iPS 細胞技術を使った新たな評価法開発への着手が必要と考えられた。

分担者はこれまで、ES 細胞及び iPS 細胞を用いた心血管分化再生に関する研究を行ってきた。マウス ES 細胞において Flk1(2 型血管内皮増殖因子受容体) 陽性の中胚葉レベルの細胞を共通の前駆細胞として、心血管細胞の分化機構を経時的系統的に検討できる新しい実験系を構築した(Nature, 2000)。特に心筋分化においては、高率に心筋細胞に分化する直近の心筋前駆細胞 (FCV 細胞) の同定に新たに成功し(FASEB J, 2005)、分化ステージ特異的な心筋分化機構の解析が可能となった。さらに iPS 細胞を用いた心血管細胞分化にもいち早く成功した(Circulation, 2008; 同誌基礎科学部門 Best Paper Award)。これらを基

盤として幹細胞の血管分化機構の解析 (Blood, 2009; J Cell Biol, 2010; Blood, 2011 (同誌表紙) ; Stem Cells, 2012a) や心筋シートを用いた細胞治療法の開発(Stem Cells, 2012b)などを行った。ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導・純化に関しても新規方法を開発し(PLoS One, 2011a, 2011b)、細胞治療応用へ向けた研究も精力的に進めている。これら iPS 細胞の心筋分化における幅広いノウハウを応用し、iPS 細胞技術を使った新たな心筋安全性評価法開発を行うため、本年度新たに分担研究者として参加し、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と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した。

B. 研究方法

1. ヒト iPS 細胞由来心臓細胞シート作製
分担者らは、Laflamme らのヒト ES 細胞心筋分化誘導法 (Nat Biotech, 2007) を改良した 2 次元無血清培養による心筋分化誘導法 (Uosaki, PLoS One, 2011a) を開発したが、さらに内皮細胞及び血管壁細胞も同時に誘導できる新たなヒト iPS 細胞からの心臓細胞誘導法の開発を行った。同方法 (改良 Uosaki 法) により誘導した細胞を温度感受性培養皿に播種し、心筋細胞に加えて、内皮細胞・壁細胞を含む心臓細胞シートを作製した。
2. ヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞調製
分担者らは細胞表面マーカー VCAM1

が心筋特異的発現をしており、抗 VCAM1 抗体を用いて心筋細胞を純化できることを報告してきた (Uosaki, PLoS One, 2011)。同方法を用いて 95%以上の純度でヒト iPS 細胞由来純化心筋を調製できる。さらに心筋分化誘導の前段階で前駆細胞レベルの細胞を純化してから心筋細胞を誘導する新しい方法を開発している。

3. ヒト iPS 細胞由来心臓細胞の輸送法
多施設バリデーションを可能にするため、京都 (iPS 細胞研究所) - 東京 (国立医薬品食品衛生研究所 (国衛研)) 間の細胞輸送法を検討した。種々の方法で細胞を移送し、その後の細胞の状態、拍動、薬剤応答の安定性等を確認した。

4. ヒト iPS 細胞由来心臓細胞シートの細胞外電位 (フィールド電位) 測定

1. において作製した心臓細胞シートを MED64 多電極システムの上に移し、細胞外電位の測定を行った。

5. ヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞の細胞外電位測定

2. において調製した心筋細胞を研究代表者らにより構築された高密度 2 次元培養法に沿って MED64 上に播種し、細胞外電位の測定を行った。

6. 標準化に向けた最適細胞条件の検討
上記 1-5. の検討を通して、多施設バリデーション及び標準的試験法として最適な細胞条件を検討した。

細胞株は、京都大学山中研究室において樹立されたエピゾーマルベクターを用いた導入遺伝子の残存がない integration-free ヒト iPS 細胞株 836B3 をおもに使用した。(実験初段階において一部 201B6 株も使用。)

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞由来心臓細胞シート作製改良 Uosaki 法を用いることにより、心筋細胞約 72%、内皮細胞約 6%、壁細胞約 22% 含む心臓細胞シートを作製できる (Masumoto, submitted)。

2. ヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞調製 Uosaki 法にて誘導した心筋細胞を抗 VCAM1 抗体を用いて純化することにより、約 95-99% の純度で心筋細胞を得ることが可能であった。また前駆細胞で純化後心筋に誘導する方法でも 96-98% 純度の心筋細胞が得られた。得られた細胞は長期培養 (約 6 ヶ月) が可能であり、2 ヶ月の時点で 95-99% の純度が維持できていることを確認している。

3. ヒト iPS 細胞由来心臓細胞の輸送法

1. 2. で調製した細胞シート及び心筋細胞を、細胞懸濁液、培養皿接着状態、4°C、室温等種々の条件で輸送し、その後の細胞の状態を検討した。培養皿に接着した状態で、約 35°C にて運搬 (培養細胞運搬システム・セルポーター (コアフロント社)) した場合に、細胞の生着、拍動、薬剤反応性等が最も安定しており、輸送方法として最適と考えられた。

4. ヒト iPS 細胞由来心臓細胞シートの細胞外電位 (フィールド電位) 測定

12 ウェルディッシュ (約 100 万細胞) 及び 24 ウェルディッシュで作製した心臓細胞シートを MED64 上においた。シート全体で同調した収縮が観察され、ほぼすべての電極 (電極が老朽化して剥がれてしまったものなどを除く) において細胞外電位を計測可能であった。HERG チャネル阻害剤 E4031 投与により、QT 延長に相当する活動電位持続時間 (APD) の延長を確認することもできた。

5. ヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞の細

胞外電位測定
分化誘導後約 2 週間から 6 ヶ月まで、
種々の純化心筋細胞を用いて細胞外電
位測定を行った。E4031 による APD 延
長及び EAD はほぼ再現性よく確認され
た。IKs電流を阻害する Chromanol に
関しては、細胞の時期や培養条件によっ
てやや不定であったが、対照の 20%程
度の APD の延長が認められた。

6. 標準化に向けた最適細胞条件の検討
これらの検討の結果、①前駆細胞段階
で純化して心筋細胞へ誘導した細胞を、
②培養皿に接着した状態で、③35℃に
おいて搬送し、④(シート化せずに)高
密度 2 次元で培養した際に、最も安定し
た結果が得られると考えられた。

D. 考察

心臓細胞をシート化することにより、
MED64 上で全体が同調した細胞外
電位が得られたが、iPS 細胞研究所以
外でのシートの扱いが難しいこと、
MED64 上でシートの端が安定して
接着しにくいこと及びそれにより細
胞外電位の波形が影響を受けること
等により、細胞シートを現状のまま多
施設バリデーションに適用するのは
困難と考えられた。一方、純化心筋細
胞は高純度での維持が可能であり、国
衛研においても従来の iPS 細胞由来
心筋細胞製品と同様に扱ってほぼ同
等の結果が得られており、多施設バリ
デーションに移行可能な標準的評価
法に適していると考えられた。今後詳
細な条件決定を行い、標準プロトコ
ルの作成を行う。

E. 結論

心毒性安全性評価への応用が可能な

ヒト iPS 細胞由来心臓細胞の調製法
を見いだした。

F. 研究発表

論文

1. 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・研究会発表

1. 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)
2. Yamashita JK.: Differentiation
System of Cardiovascular Cells
from iPS Cells. 1st Think Tank
Meeting on Cardiac Safety 2014
in Kirishima. (2014, 1,
Kagoshima)
3. 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)

G. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
関野祐子、佐藤薫、 諫田泰成、石田誠一	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	2013
Mizui T., <u>Sekino Y.</u> , Yamazaki Y., Ishizuka H., Takahashi H., Kojima N., Kojima M., Shirao T.	Myosin II ATPase activity mediates the long-term potentiation-induced exodus of st able F-actin bound by drebrin A from dendritic spines.	PLOS ONE.	9(1)	e8536722	2014
Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E., <u>Sekino, Y.</u> and Sato, K.	Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone.	J Neurosci	34(5)	2231-2243	2014
Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T.	Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture.	Circ J.	77(5)	1307-14	2013
Miki K, Yoshida Y, Yamanaka S.	Making steady progress on direct cardiac reprogramming toward clinical application. Jun 21;	Circ Res.	113 (1)	13-5	2013
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.	A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells	Sci Rep	4	3594	2014
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.	Identification of chemicals inducing cardiomyocyte proliferation in developmental stage-specific manner with pluripotent stem cells.	Circ Cardiovasc Genet,	6	624-633	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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[#], 佐藤薫, 諫田泰成, 石田誠一

Developing and standardizing experimental protocols using human iPS-derived cells to predict adverse drug reactions in pre-clinical safety studies

Yuko Sekino[#], Kaoru Sato, Yasunari Kanda, Seiichi Ishida

In this study, we have standardized experimental protocols to evaluate the possibility of using cells differentiated from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) in the pre-clinical studies for the drug approval processes. Cells differentiated from hiPSC, especially cardiomyocytes, neurons and hepatocytes, are expected to be used as new pharmacological and toxicological assay tools. Current pre-clinical test methods have limitations for predicting clinical adverse drug reactions. This is because of the so-called 'problem of species difference'. Drug-induced arrhythmia, cognitive impairment and hepatotoxicity which can't be predicted in pre-clinical studies are major causes of the high rate attrition of new-drug candidates in clinical studies and of withdrawal of products from the market. The development of new pre-clinical test methods using cells differentiated from hiPSCs would resolve these problems, in addition to solving the issue of "the replacement, refinement and reduction (3Rs)" of animal experiments. From 2010 to 2011, we surveyed companies belonging to the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) and academic researchers about the usage of differentiated cells in their laboratories. We found that studies were performed using differentiated cells from different cell lines of hiPSC with laboratory-specific differentiation methods. The cells were cultured in various conditions and their activities were measured using different methods. This resulted in a variety of pharmacological responses of the cells. It is therefore impossible to compare reproducibility and ensure reliability of experiments using these cells. To utilize the cells in the drug approval processes, we need robust, standardized test methods to accurately reproduce these methods in all laboratories. We will then be able to compare and analyze the obtained results. Based on the survey, the Ministry of Health, Labor and Welfare funded our study. In our study, we standardize pharmacological methods among several laboratories, including our laboratory, to develop robust tests, using the same lot of cells, the same culture conditions, reference compounds, experimental protocols, and analysis methodology. In conclusion, to standardize robust test methods, we need a consistent supply of high-quality differentiated cells. Further, indexes to quantify the quality of the differentiated cells will be needed for their effective usage in the pre-clinical safety studies.

Keywords: human iPS cells, pre-clinical study, safety pharmacology, standardization

[#] To whom correspondence should be addressed:

Yuko Sekino; Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel/Fax: +81-3-3700-9692; E-mail: yukos@nihs.go.jp

1. はじめに

本研究は、厚生労働科学研究費の医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業の支援により、平成24年度から実施されている。本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) 由来の分化細胞 (心筋細胞, 神経細胞, 肝実質細胞) を用いた新規の薬理/毒性試験法の開発するだけでなく、複数の研究室間で試験法の標

準化を行い、結果の再現が保証される頑健な試験法を開発することである。さらに標準化された試験法を医薬品の承認申請に係る安全性薬理試験法の一つとして選択することについて、その科学的妥当性を検証する。

hiPSC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。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。これらにより、臨床試験段階での開発中止、さらに市場からの撤退などを余儀なくされており、その経済的損失は計り知れない。非臨床試験においてこれらの有害反応が予測できない原因は、実験動物とヒトとの種差にあると言われている。そこで、hiPSC由来分化細胞を非臨床試験への利用に関しては、種差の問題の克服が期待されているばかりでなく、動物実験の“the replacement, refinement and reduction (3Rs)”にも大きく貢献する。もしも実際にヒトの有害反応が予測できることが確認できれば、非臨床試験と臨床試験がシームレスとなる。また、患者由来のhiPSC由来分化細胞を用いることに関しても、探索ストラテジーの改革が期待されている。そのために、ほとんどの国内製薬関連企業がhiPSC由来分化細胞を用いた薬理/毒性試験の開発に高い関心を示している。

本研究に先行する平成22、23年度の調査研究において、日本製薬工業協会に所属する製薬関連企業と大学の中で、実際にhiPSC由来の分化細胞を用いた研究を行っている研究室から情報を収集した。その結果、それぞれの研究室で異なるhiPS株から分化誘導した細胞を使っていたり、分化誘導法が様々だったり、細胞機能の測定法や、反応を調べる薬物が異なっていたり、さらに解析の指標なども異なっていた。したがって、これらの情報からでは、hiPSCを用いた実験結果の再現性を評価することは不可能であった。さらに、hiPSC由来の分化細胞は、分化誘導後の培養条件の違いによっても、容易に異なる薬理学的特性を示すことも明らかとなった。そこで、我々はhiPSC由来の分化細胞を用いた頑健な薬理/毒性試験法を開発する手始めとして、まず同一の実験プロトコルを整備して、複数の研究室で同じ標本と同じ計測法を用いて、同一の化合物に対する反応を同一の指標により解析して、実験結果の再現性を検証することとした。

最近になってから、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、これらを利用して複数の研究室と情報交換をしながら、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。実験プロトコルの標準化に関しては、神経細胞に関しては、群馬大学、産業総合研究所、アカデミアジャパン、リプロセルが協力している。心筋細胞については、東邦大学、エーザイ、三菱化学メディエンス、アカデミアジャパンが協力している。また、肝臓細胞についてはリプロセルアカデミアジャパンの協力を得ている。一部においては、医薬品開発業務受託機関によるデータ収集も含まれている。

ヒト有害反応の検出を可能とする評価指標については、心筋細胞の場合には集合活動電位記録とQT間隔、神経細胞の場合にはシナプス形成とその機能成熟、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。以下に、hiPSC由来の神経細胞、心筋細胞、肝実質細胞を用いた試験法開発の進捗状況を報告する。

今後、入手可能な分化細胞が増えることが予想されることから、同一実験プロトコルによる実験結果を収集し比較するプラットフォームを確立する必要がある。特に心筋細胞を用いた試験法においては、臨床におけるthorough QT (tQT) 試験データとhiPSCを用いた試験データの相関関係を解析することが今後の重要な課題となるであろう。

2. 研究方法

総括研究班を設置し、研究全体を統括した。研究分担者とオブザーバーによる総括的会合を年に2回開催し、それぞれの研究の方向性を打ち合わせし、情報を共有した。まずは、たたき台となるプロトコルを提案し、施設間比較(バリデーションスタディー)の企画立案をおこない、実験プロトコルの標準化に着手した。実験プロトコルについて施設間の実験結果を比較検討することにより、異なる結果がある場合には、密な情報交換を行い、施設間での実験条件の差を是正して、プロトコルを標準化した。hiPSC由来の神経細胞、心筋細胞、肝臓細胞に関しては、それぞれに応じたプロトコルの標準化を行った。

2-1. ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた試験法の確立

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・岡野研で確立された神経幹細胞塊(neurosphere)¹⁾の供与をうけ、neurosphereからの神経細胞分化方法と長期培養方法の確立を行った。

解凍したneurosphereはbasic fibroblast growth factor (bFGF) 中で12日間浮遊培養をおこなった。TripLE Select (Invitrogen) によりsingle cellにし、 10^5 cells/500 μ l/wellの割合でポリオルニチン/フィブロネクチン

コートした8 well スライドチャンバー (Nunc) に播種し, B27 supplement (Gibco) を含む分化誘導培地に切り替え分化誘導培養を行った。上記分化誘導条件で 10-40 日間培養後, picrotoxin (50 μ M, 2 min), N-methyl-D-aspartate (NMDA) (50 μ M, 2 min), L-glutamate (L-Glu) (100 μ M, 2 min), adenosine- triphosphate (ATP) (100 μ M, 2 min), High K^+ (80 μ M, 2 min), Ionomycin (5 μ M, 1 min) によって生じた細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇をfura2-AMカルシウムイメージング法²⁾を用いてAQUACOS-MOS/RATIOシステムで可視化, 定量した (Fig.1)。次に, 上記分化誘導条件で40日間培養後, MAP2 (樹状突起マーカー), PSD95 (シナプス後部マーカー), synapsin I (シナプス前部マーカー) の発現を免疫組織化学的に検討した。

2-2. ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた試験法の確立

分化心筋細胞として, Cellular Dynamics International社の心筋細胞 (iCell³⁾; ロット番号: 1089404) を用いて, 細胞シートを作成し, 多点電極 (Multiple electrode array; MEA) システムにより, 細胞外電位記録を行った。

MEAシステムとしてMED64 (アルファメッドサイエントフィック社) を用いた。細胞解凍後のプレ培養の細胞密度と培養期間, 電極への細胞の播種の細胞密度と培養期間, 薬剤の投与方法及び波形解析については, 総括班での打ち合わせ及び担当研究施設での話合いの結果統

一化した共通プロトコル通りにおこない (Table 1), これをたたき台として, 相互の情報交換により, 実験プロトコルの標準化にむけて実験条件を整えた。薬理実験で使用した薬物は, 陽性対照物質としてIKr阻害剤E-4031とIKs阻害剤クロマノールを選択した。

2-3. ヒト幹細胞由来肝実質細胞を用いた試験法の確立

ヒト幹細胞由来肝実質細胞を用いた試験法の確立のために, 対照実験として, HepG2細胞を用いて, 実験データの再現性を確認した。HepG2細胞を播種後, acetaminophen (2.5 mM and/or 5 mM) または0.1 %DMSO (vehicle) 一定期間曝露後, 細胞毒性, ミトコンドリア膜電位/細胞膜透過性, 活性酸素, 酸化ストレスを測定した。市販iPS細胞由来肝細胞の肝細胞への分化の指標として, CYP1A2, CYP3A4 酵素活性, CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 の遺伝子誘導活性ならびにCYP1A2, CYP3A4酵素誘導活性を測定した。(倫理)

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



Fig.1. ヒトiPS細胞由来神経細胞のシナプス成熟度を評価するカルシウムイメージング法のプロトコル

シナプス機能への有害反応評価系の構築をめざすため, 各種グルタミン酸作動性受容体の機能的な発現を調べ, 十分なシナプス機能成熟段階に達しているかを見定めるための標準プロトコルで, 特にNMDA型グルタミン酸受容体の発現を確認することが重要なポイントとなる。

Table 1. 多施設間での実験結果比較のために作製した共通プロトコル

分化心筋細胞を多点電極上でシート状に培養して細胞外活動電位を記録する実験方法について、多施設間で実験結果を比較するために、解凍後のプレ培養の細胞密度と培養期間、多点電極への細胞播種の細胞密度と培養期間、などを取り決めて、多施設間（東邦大学、ユーザイ、三菱化学メディエンス、国衛研）で実験結果に関する密な情報交換を行い、薬理実験プロトコルの標準化をめざす。（平成25年3月5日現在）

大項目	内容	詳細①	詳細②
プレインキュベーション	6-wellプレートに播種	iCell 1バイアルあたり6mluプレートの2ウェルに等分に播種	細胞数はウェルごとの細胞密度を同じにするために半分にして撒く。 生存率はカウントして記録
	培地交換	死細胞除去が主目的	wash数は任意（2-3回）
		プレインキュベーション期間は任意（15日間まで可？）として記録	48時間は必要
計測	計測期間	適宜（基盤播種後2-7日間）として記録	CDIは5-7日間を推奨
	播種密度	30,000 cells/2 uL/プローブ	
	基盤	新品を使用したサンプルか、再利用基盤を使用したか記録	
	薬剤	① E-4031 ② Chromanol 293B	0, 1, 3, 10, 30, 100 (nM) 0, 1, 3, 10, 30 (uM)
	計測時間	10分間/濃度	
	適用用量	適宜（半量交換、薬液のみ）として記録	温度変化を抑えるため（詳細は適宜とするが）37度にpre-warmすることは共通に実施。
	データ取得	最後の30拍（前後は確認のうえ適切な波形を選択）	
解析	温度記録	データ取得時の培養液温を記録する。 インキュベーター内の測定か、キャップ法か記録	実際に記録する条件での液温を測定する。
	計測項目	FPDcF (Fredericia's correction) として算出	BPM, FPDも記録（添付） （表記例）○○nMの薬剤AでFPDcFが△△%延長
	波形データポイント	Peak to peak 波形の図を残す。	1st peakは起点、ネガ、ポジいずれも可 2nd peakはポジ優先（ネガも可）、単一ピークとして取得できれば可 微妙な異常が観察された場合は記録
	延長率（%）	vs before（非添加群）	
	異常波形の扱い	測定中に検出した場合、FPD値は算出しない。 異常のタイプを記録し、波形の図を残す。 記載例① 記載例②	EAD-like (+) : 2nd peak 前後に extra peak が出現する 頻脈-like (+) : 波形全体が変化する
	実験数 (n)	5, 6	実験数を記録する
	細胞ロット	#1202320	
期日	6月をメド		
留意事項	薬剤（候補）	Verapamil (Ca blocker), Pilsicainide (Na blocker)	今回の結果を踏まえて実施を検討

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ブし廃棄した。

3. 研究結果

3-1. ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた試験法の確立

認知や記憶・学習などのヒト脳高次機能基本単位であ

るシナプス機能に着目して、シナプス形成とその機能成熟を評価することで、被験物質の中樞神経系に対する有害反応を予測する試験系を確立することをめざしている。慶応大学より供与された神経幹細胞塊 (Neurosphere; 201B7と253G1由来) から神経細胞を分化誘導し約2ヶ月間培養することに成功した。また、すでに神経前駆細胞にまで分化している市販品についても同様の