

合して次世代の心毒性技術を開発するために、ヒト iPS 分化心筋細胞を利用して成熟化を誘導する技術が重要である。

そこで今回この目的を達成するために、我々は内向き整流 K⁺電流 (I_{K1}) に対する K⁺チャネル Kir2.1 をコードする遺伝子の KCNJ2 に着目して移管検討を行った。

B. 研究方法

1) iPS 細胞

iPS 細胞 (201B7 株) は理研バンクより入手した。フィーダー存在下でリプロセル培地に bFGF を加えて培養した。

2) 分化心筋細胞

市販の分化心筋細胞の中で、Cellular Dynamics International (CDI) 社の iCell 心筋細胞を用いた。

3) パッチクランプ

細胞内外に生理学的溶液を用いて、穿孔パッチクランプ法 (アンホテリシン B) の電流固定モードにより、単一細胞の活動電位を計測した。詳細は項目 1 と同じ。

C. 研究結果

iPS 細胞から胚様体 (EB : Embryoid body) を形成させ、得られた iPS 心筋には、結節型、心房筋型、心室筋型の活動電位特性を示す細胞が混在し、活動電位の幅に大きなばらつきが認められること、静止膜電位が浅いことを見いだした (図

1)。次に元の株によるのか検討するために、市販されている iPS 心筋を調査した (表 1)。その結果、CDI 社の iCell 心筋が広く流通していたことから市販のモデルとして選定し、電気生理学的な特性を評価した。その結果、201B7 株由来の iPS 心筋と同様に静止膜電位が浅いことを明らかにした。図 3 にヒト心筋と比較してした結果を示す。成人ヒト心筋細胞は発生の過程で自動能力を失い、刺激伝導系から電気刺激を受け取って活動電位を形成することから、iPS 心筋細胞は幼若な胎生初期の心筋細胞に近い性質を持つことが考えられた。

そこで、内向き整流 K⁺電流 (I_{K1}) に対する K⁺チャネル Kir2.1 をコードする遺伝子 KCNJ2 に着目した。アデノウイルスを用いて iCell 心筋に導入したところ、静止膜電位が深くなり、電気生理学的に成熟することが示唆された (項目 1 および図 4)。さらに、選択的 hERG 阻害剤である E-4031 の添加により、APD50 が濃度依存的に延長した (図 4)。

D. 考察

本研究により、iPS 心筋をより成体組織に近づけるような成熟化技術を開発した。

最近、胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来心筋細胞は、Kir2.1 チャネル遺伝子の導入により、強い Ba²⁺感受性 IK1 電流が発生し、自律拍動性を失い静止状態に変化することが示された (Lieu DK, et al., Circ Arrhythm

Electrophysiol. 6:191-201(2013))。しかしながら、ヒト iPS 心筋細胞とヒト ES 心筋細胞では、APD50 に、約 1.37 倍の開きがあることから (iPS 由来 : $382 \pm 38\text{ms}$, $n=36$ 、ES 由来 : $278 \pm 28\text{ms}$, $n=64$) [Lopez-Redondo F, Kurokawa J, et al., Human ES- and iPS-derived cardiomyocytes. A comparative electrophysiological study. 57th Biophysical Society Annual Meeting, Philadelphia, Biophys J, 104, 298a. (Feb 3-6, 2013)], 両者における電気生理学的性質の差が示唆される。また、iPS 心筋細胞において、Kir2.1 チャネルを強発現させる系が検討されたという報告はなく、医薬品の催不整脈作用の評価に対する検証もなされていない。本研究で開発した成熟化した細胞では、E-4031 の作用に濃度依存性が見られたことから (図 4)、より定量性が高い作用解析が可能となると期待できる。

現在、JiCSA で iPS 細胞の医薬品の催不整脈作用の評価を進めているが、iPS 細胞の株間差の問題が起きる可能性がある。上記の成熟した iPS 細胞によりさらに予測性が向上するのか興味深い。

E. 結論

多電極アレイ細胞外電位の計測系およびヒト iPS 細胞成熟化技術を導入する実験系を確立した。成熟化した細胞で、選択的 hERG 阻害剤の作用を解析した。

G. 研究発表

論文

1. Hayakawa, T., Kunihiro, T., Ando, T., Kobayashi, S., Matsui, E., Yada, H., Kanda, Y., Kurokawa, J., Furukawa, T. (2014) Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: correlation and complementarity with extracellular electrophysiology. J. Mol. Cell. Cardiol, 77:178-191
2. 諫田泰成、ヒト iPS 細胞を用いた成熟心筋細胞の開発、心電図, 34, 306-309 (2014).
3. 澤田光平、松尾純子、長田智治、吉田善紀、白尾智明、佐藤薫、諫田泰成、関野祐子：霧島会議 Stem Cell Safety Pharmacology Working Group まとめ—ヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞を用いた催不整脈作用検出とその課題—、心電図 34:306-9 (2014).
4. 芦原貴司、黒川洵子、諫田泰成、原口 亮、稲田 慎、中沢一雄、堀江 稔：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの不整脈研究への応用可能性：in silico 不整脈学の観点から。生体医工学 2014:52(3) in press.

学会発表

国内学会

1. 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 由来心筋を用いた新規心毒性評価法の開発、生理研研究会 (2014,9,岡崎)
2. 諫田泰成、関野祐子、古川哲史、黒川洵子：Role of substrate rigidity on function in human iPS cell-derived cardiomyocytes、第 87 回日本生化学会 (2014,10,京都)
 3. 黒川洵子、芦原貴司、諫田泰成：Evaluation of drug-induced QT-prolongation in human iPS-derived cardiomyocytes、第 87 回日本生化学会 (2014,10,京都)
 4. 諫田泰成、関野祐子：in vitro cardiac safety testing using iPS cells、第 5 回 DIA cardiac safety workshop (2014,10,東京)
 5. 藤塚美紀、中井雄治、諫田泰成、永森收志、金井好克、古川哲史、黒川洵子：Effects of substrate elasticity on gene expression profiles of human iPS-derived cardiomyocytes、CBI 学会 2014 年大会、(2014,10,東京)
 6. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞を用いた新たな安全性薬理試験の開発、日本実験動物代替法学会第 27 回大会 (2014,12,横浜)
 7. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験の開発、東京理科大学トランスレーショナルリサーチセンター第 1 回公開セミナー (2015,1,千葉)
 10. 松尾純子、宮本憲優、小島敦子、諫田泰成、澤田光平、有村由貴子、鈴木晶子、吉福智子、関野祐子：薬物の心筋再分極過程に対する作用：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートでの評価、第 88 回日本薬理学会 (2015,3,名古屋)
 11. 黒川洵子、芦原貴司、諫田泰成、古川哲史：膜輸送体を標的としたヒト iPS 細胞由来心筋の創薬応用、第 88 回日本薬理学会 (2015,3,名古屋)
 8. 黒川洵子、林英里奈、芦原貴司、諫田泰成、関野祐子、古川哲史：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた QT 延長薬剤の頻度依存性の解析、第 92 回日本生理学会大会 (2015,3,神戸)
 9. 黒川洵子、藤塚美紀、林英里奈、芦原貴司、諫田泰成、関野祐子、古川哲史：Effects of hydrogel culture substrate on contractile properties and gene expression profiles of human iPS cell-derived cardiomyocytes. 第 135 回日本薬学会 (2015,3,神戸)
- 国際学会
1. 黒川洵子、岡田純一、林英里奈、芦原貴司、吉永貴志、杉浦清了、李敏、諫田泰成、関野祐子、古川哲史：A novel approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. 58th Annual Meeting of the

Biophysical Society (2015, 2、米
国ボルチモア)

著書

1. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞を用いた
心毒性試験の現状と課題、谷本学
校毒性質問箱 16: p91-94 (2014).

H. 知的所有権の取得状況

1. 黒川洵子, 古川哲史, 諫田泰成,
関野祐子：正常な内向きのカリウ
ム電流特性を有する iPS 細胞由来
心筋モデル細胞 (特開：
WO2014/192312A1、公開日：
2014/12/4

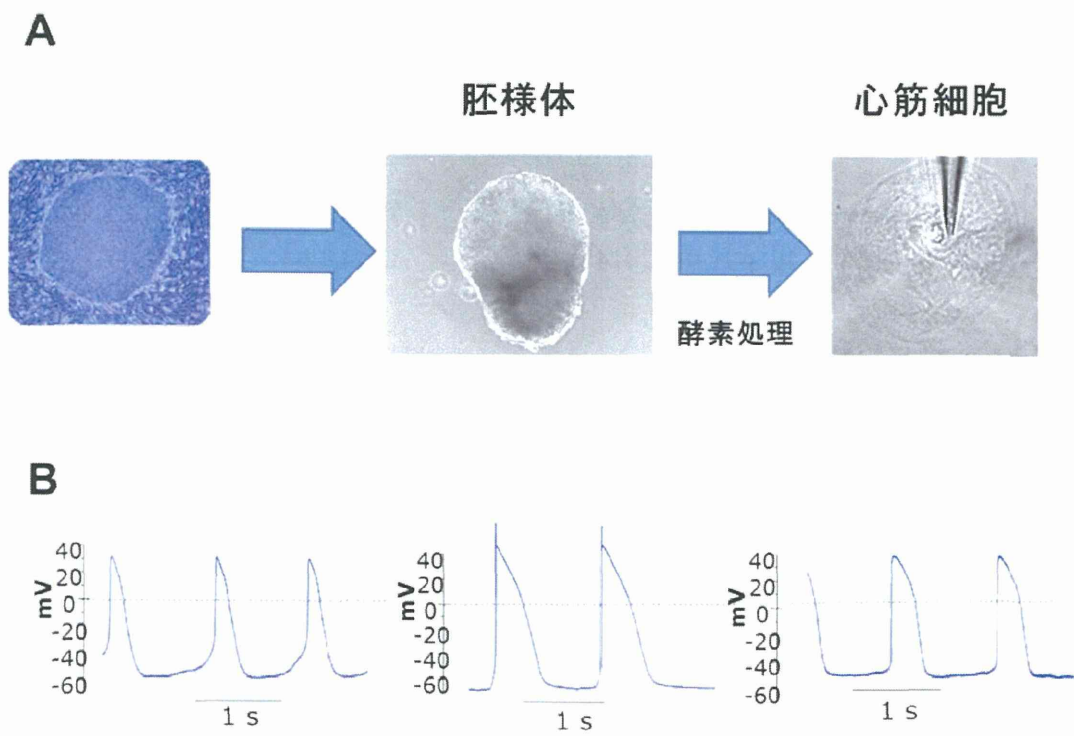


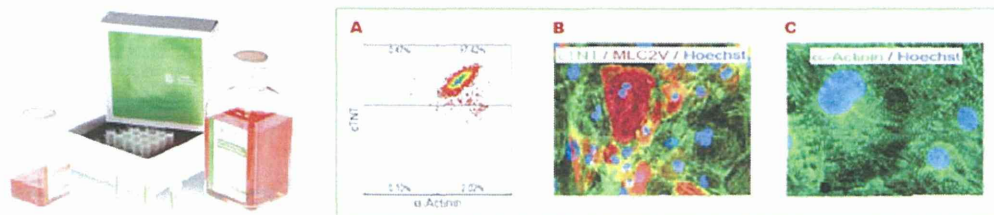
図1 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学特性
 現在市販されていて薬理実験に利用可能な主なヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞を示す

分化心筋細胞	販売会社
iPS cell-derived cardiomyocytes, iCell Cardiomyote	Cellular Dynamics International (CDI)
Cor.4U Human iPS Cell-Derived Cardiomyocytes	Axiogenesis
Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes	GE Healthcare
Stem cell derived cardiomyocyte product, hiPS-CMC	Cellectis/Takarabio
ReproCardio	Reprocell

表 1 ヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞

安全性薬理実験に利用可能な市販のヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞のリスト。

A



B

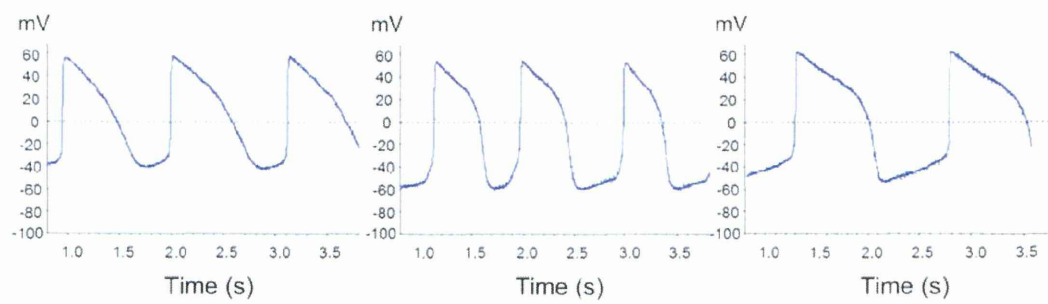


図 2 iCell 心筋の活動電位

A) iCell 心筋は 97%以上の細胞が心筋マーカー陽性である

B) 代表的な活動電位波形の例。

心室型ヒト心筋細胞と hiPS由来心筋細胞の特徴の違い

心室型ヒト心筋細胞	hiPS由来心筋細胞
・洞房結節(ペースメーカー)からの刺激無しでは 拍動しない	・無刺激にて 自律拍動
・最大拡張期電位(MDP) : -80mV ~	・最大拡張期電位(MDP) : $-40\sim-50\text{mV}$

図3 心室筋型ヒト心筋細胞と iPS 由来分化心筋の比較

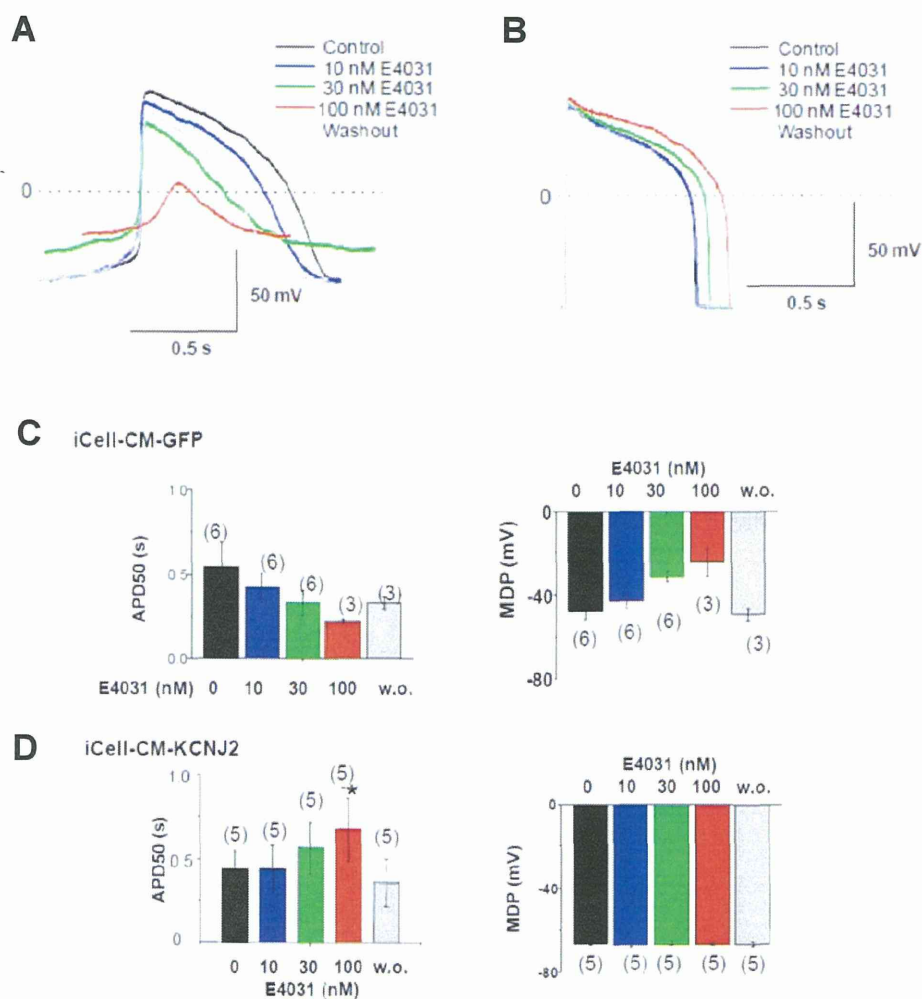


図4 KCNJ2遺伝子導入による薬理作用の変化

A) GFP(EGFP)のみを導入したiCell心筋細胞の典型的な活動電位とhERG阻害剤(E-4031)10, 30, 100 nMと段階的に添加したときの変化。

B) KCNJ2遺伝子(EGFP-KCNJ2)を導入したiCell心筋細胞の代表的な活動電位とhERG阻害剤(E-4031)10, 30, 100 nMと段階的に添加したときの変化。自動能を失ったためペーシングにより測定した。バー：縦軸50mV, 横軸0.5秒。

C) GFP(EGFP)のみを導入したiCell心筋細胞におけるE-4031の作用。APD50—活動電位時速時間。MDP—最大弛緩期電位。カラムの色は、A)の波形に対応している。

D) KCNJ2遺伝子(EGFP-KCNJ2)を導入したiCell心筋細胞におけるE-4031の作用。カラムの色は、B)の波形に対応している。

III. 学会等発表実績

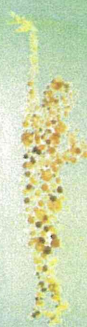
CBI学会2014年大会

Chem-Bio Informatics Society (CBI) Annual Meeting 2014



「iPS, ion channel, *in silico*が拓く、新しい創薬パラダイム」

"iPS cells, ion channels, *in silico* technologies: Leading to a New Drug Discovery Paradigm"



日時:2014年 10月28日(火)ー30日(木)

会場:タワーホール船堀(東京都江戸川区船堀4-1-1)



情報計算化学生物学会(CBI学会)

Chem-Bio Informatics Society (CBI) Annual Meeting 2014

**"iPS cells, ion channels, *in silico* technologies:
Leading to a New Drug Discovery Paradigm"**

Dates : October 28 (Tue) - 30 (Thu), 2014

Venue : Tower Hall Funabori (4-1-1 Funabori, Edogawa-ku, Tokyo)

Conference Chairperson: Kohei Sawada (Eisai Co., Ltd.)

Organizing Chairperson: Takatoshi Kawai (Eisai Co., Ltd.)

CBI 学会 2014 年大会

**「iPS, ion channel, *in silico* が拓く、
新しい創薬パラダイム」**

日時 : 2014 年 10 月 28 日 (火) - 30 日 (木)

会場 : タワーホール船堀 (東京都江戸川区船堀 4-1-1)

CBI 学会 2014 年大会大会長 : 澤田光平 (エーザイ株式会社)

CBI 学会 2014 年大会実行委員長 : 河合隆利 (エーザイ株式会社)

Chem-Bio Informatics Society (CBI) Annual Meeting 2014 Secretariat

CBI 学会 2014 年大会事務局

日時： 2014 年 10 月 29 日 14:00-15:30

場所： 407

フォーカストセッション

in silico 不整脈予測における CiPA の考え方、および日本の取り組み

Moving toward *in silico* arrhythmic assessment: The paradigm of CiPA and efforts in Japan

開催趣旨:

昨年7月のCSRC-HESI-FDA会議において薬物の心臓安全性評価に関わるICH E14廃止とS7Bの改訂に関する提案が発表されたことを受けて、評価のエンドポイントをQT延長作用から催不整脈作用に変更するとともに、新たな非臨床試験法としてCiPA (Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay) の議論が始まった。現在、ヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞を用いた *in vitro* 評価と、複数のヒトイオンチャネルへの反応性から不整脈リスクを予測する *in silico* 評価を組み合わせる提案がなされ、新たな方法論構築等に関する検討・議論が活発に行われている。CiPA *in silico* WG の考え方と日本発の提案に向けた取り組みという観点で、現状と課題を今一度整理し、共有化しておく必要があると判断し、本フォーカストセッションを企画する。

モデレーター： 黒川 洵子 Junko Kurokawa

東京医科歯科大学 Tokyo Medical and Dental University

CiPA が提案しようとする薬物催不整脈リスク予測のパラダイム

古谷 和春 Kazuharu Furutani

大阪大学大学院医学系研究科 Osaka University Graduate School of Medicine

創薬候補物質の催不整脈リスク予測に関して、CiPA (Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay) に関する共同議論の場が開かれている。この会議は、hERG channel に留まらない multi ion channel assay を創薬早期に非臨床試験として実施し、得られたデータを *in silico* において評価することによって、現在臨床試験で実施されている Thorough QT テストに変わる、催不整脈作用をエンドポイントとする新しいリスク評価法の提案を目指している。CiPA が提案しようとする新しい心臓安全性薬理のパラダイムを紹介し、現在の課題について議論したい。

ICaL inactivation が非線形に起こる

Mirans JPTM xxx (2014)

*濃度はまだ予測して2020年05, Multichannel
予測性 88% 82% 1% 1% モデルは ADD
細胞外 [Ca²⁺]_o ↓ 10% 延長 2倍*

心筋細胞活動電位モデルと安全性評価

朝倉 圭一 Keiichi Asakura

日本新薬株式会社 Nippon Shinyaku Co., LTD.

創薬における *in silico* 活用は、これまでも化合物の構造活性相関などに活用されているが、創薬現場における活用についてはまだまだ発展途上にある。今回は創薬早期におけるヒト心筋細胞活動電位モデルの活用について紹介し、心毒性安全性評価への *in silico* 評価の可能性について議論したい。

パーチャル iPS 細胞由来心筋細胞への飽くなき挑戦

芦原 貴司 Takashi Ashihara

滋賀医科大学循環器内科・不整脈センター Shiga University of Medical Science

*ICaL / NCX accelerator
IKr, IKs, KI trigger*

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の安全性薬理評価や遺伝性不整脈治療への応用が期待されているが、その電気生理学的特性がオリジナルの心筋細胞と同じとは限らない。コンピュータモデル (*in silico*) によるパーチャル iPS 細胞由来心筋細胞 (viPSC-CM) がもたらす可能性と、今後の研究の方向性について概説する

UT-Heart を用いた薬剤の心毒性評価

岡田 純一 Jun-ichi Okada

東京大学大学院新領域創成科学研究科 The University of Tokyo Graduate School of Frontier Sciences

UT-Heart は心筋細胞の電気的興奮から心収縮までを統合し心電図も再現できる世界で唯一のマルチスケール・マルチフィジックス心臓シミュレータであり、薬剤の心毒性評価に関する共同研究をエーザイ・東京医科歯科大と進めている。今回はその研究の現状を報告する事により、*in silico* 心毒性評価の近い将来における実現可能性を示すと共に、その際実験において求めるべきデータが何であるかを議論したい。

フォーカストセッション

FPDで、
あポイント
あはunpの
PS-CMの
重質の1857
決める
どうか?

CiPAが提案しようとする 薬物催不整脈リスク予測のパラダイム



古谷 和春

大阪大学大学院医学系研究科

Presenter has no conflict of interest which should be disclosed in this presentations

背景①：hERGチャネル

不整脈誘発を理由にした医薬品の市場からの撤退

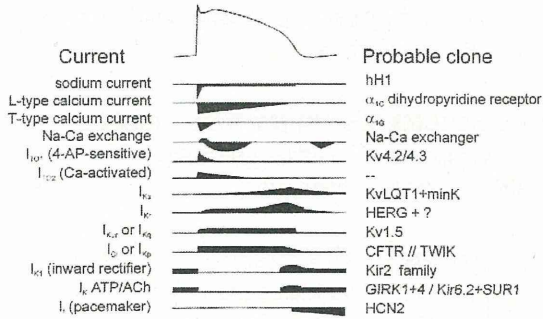
- | | |
|--|---|
| 抗不整脈薬
encainide (EnKaid), 1991 | 抗ヒスタミン薬
astemizole (Hismanal), 1999 (1999) |
| 鎮痙薬
terodiline (Micturin), 1991 | 抗菌薬
grepafloxacin (Raxar), 1999 |
| 抗ヒスタミン薬
terfenadine (Seldane), 1998 (2000) | 消化管運動改善薬
cisapride (Propulsid), 2000 (2000) |
| 抗精神病薬
sertindole (Serdolect, Serlect), 1998 | オピオイド依存症
lavomethadyl acetate (OrLAAM), 2003 |

I_{Kr}電流、hERGチャネル阻害 (hERGはLQT2の原因遺伝子)

医薬品の開発、安全な使用の大きな問題

Ionic and molecular basis of the cardiac action potential.

Cardiac ion currents and cloned subunits



Snyders D J Cardiovasc Res 1999;42:377-390

Cardiovascular Research

The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)



Welcome to the ICH official website
 The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) is unique in bringing together the regulatory authorities and pharmaceutical industry of Europe, Japan and the U.S. to develop standards and guidelines based on drug registration. Since its inception in 1990, ICH has achieved through its harmonized collaboration, to improve the regulatory global focus of drug development, to bring the benefits of innovative pharmaceuticals to better patient care, to ensure the highest quality standards and to assure greater harmonization to ensure that safe, effective and high quality medicines are developed and regulated in the most responsible manner. Download the ICH website & supplementary publications.

<http://www.ich.org/>



日米EU医薬品規制調和国際会議

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

http://www.pmda.go.jp/ich/ich_index.html

ICHとは...

ICHとは、International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米EU医薬品規制調和国際会議)の略称。日本・米国・EUそれぞれの医薬品規制当局と産業界代表で構成され、他にオブザーバーとして3組織が参加している。

ICHの目的は、各地域の規制当局 (日本では厚生労働省) による新薬承認審査の基準を国際的に統一し、医薬品の特徴を模倣するための非臨床試験・臨床試験の実施方法やルール、提出書類のフォーマットなどを標準化することにより、製薬企業による各種試験の不必要な繰り返しを防止して医薬品開発・承認申請の非効率を減らし、結果としてよりよい医薬品をより早く患者のもとへ届けること。

ICHでは、各地域の専門家により、医薬品の承認に際して必要な品質・有効性・安全性にかかわるデータ収集などについてガイドライン (科学的・倫理的に適切と考えられる指針) を作成し、公表している。

ガイドラインがICHで合意 (調和) に至ると、そのガイドラインを適用した医薬品開発や臨床試験、医薬品申請が各地域で可能となるよう、各国が法的な整備も含めた必要な措置を取る。日本では、ICHで合意されたガイドラインは厚生労働省医薬食品局から通知される。

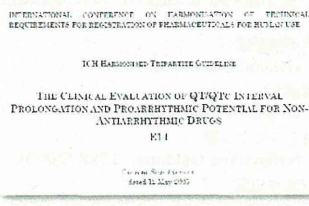
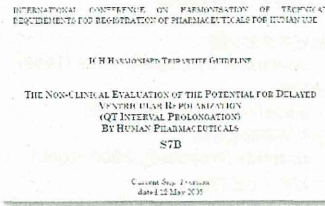


ICH 日米EUガイドライン最新状況

国	品質 Quality	安全性 Safety	有効性 Efficacy	製剤学/多剤併用 Multi-compatibility
日本	Q1A (2003) 新薬の品質試験に関する国際的なガイドライン	Q1B (2003) 新薬の安定性試験に関する国際的なガイドライン	Q1C (2003) 新薬の生体利用度試験に関する国際的なガイドライン	Q1D (2003) 新薬の製剤学に関する国際的なガイドライン
EU	Q1A (2003) 新薬の品質試験に関する国際的なガイドライン	Q1B (2003) 新薬の安定性試験に関する国際的なガイドライン	Q1C (2003) 新薬の生体利用度試験に関する国際的なガイドライン	Q1D (2003) 新薬の製剤学に関する国際的なガイドライン
米国	Q1A (2003) 新薬の品質試験に関する国際的なガイドライン	Q1B (2003) 新薬の安定性試験に関する国際的なガイドライン	Q1C (2003) 新薬の生体利用度試験に関する国際的なガイドライン	Q1D (2003) 新薬の製剤学に関する国際的なガイドライン
オブザーバー	Q1A (2003) 新薬の品質試験に関する国際的なガイドライン	Q1B (2003) 新薬の安定性試験に関する国際的なガイドライン	Q1C (2003) 新薬の生体利用度試験に関する国際的なガイドライン	Q1D (2003) 新薬の製剤学に関する国際的なガイドライン

背景②：ICHガイドライン S7B、E14

2005 ICH Step4合意



2008 欧米で発出

2009 日本で発出

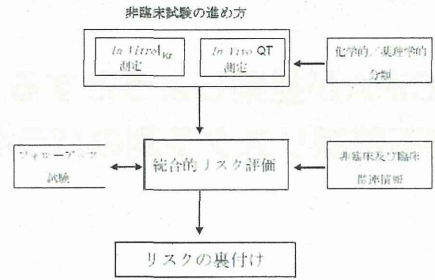
「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価」（薬食審査発1023第4号）2009（H21）/10/23

「非抗不整脈薬におけるQT/QTc間隔の延長と催不整脈作用の潜在的可能性に関する臨床的評価」（薬食審査発1023第1号）2009（H21）/10/23

S7Bのパラダイム

2.3 非臨床試験の進め方

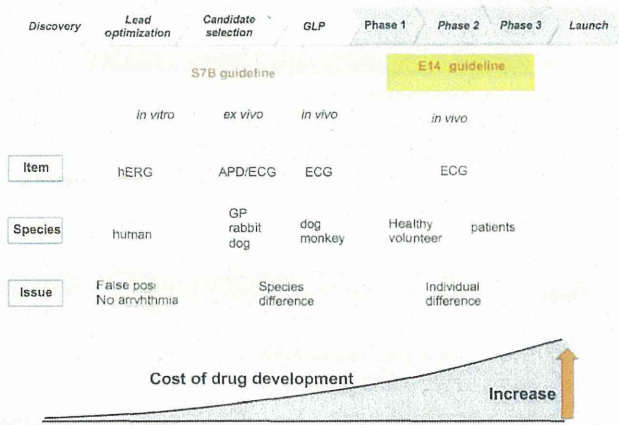
以下のパラダイムでは、薬物的な現在入手可能な情報に基づき、化学的・薬理的な特徴とQT間隔延長のリスクを評価するための、統合的な非臨床試験の進め方に示されている。図は試験を進める上で必要な要素を示しており、特定の試験順序試験の進め方は示されていない。



2.3.1 In vitro Ig 測定

hERG の測定では、天然のヒト hERG に近い hERG 遺伝子発現レベルの hERG 細胞を用いて、hERG 阻害現象などを示す。hERG 阻害の評価は、hERG 阻害試験（S7B 第 3 章）

医薬品開発（心臓安全性評価）におけるS7BとE14の位置付け



中外製薬株式会社 田保 充康 先生 提供

背景③：現状と課題

S7B, E14の成果

S7B, E14以降不整脈を理由にした医薬品の市場からの撤退はなし
不整脈発生の報告件数も減

ただし、hERG試験陽性/催不整脈性なし、の偽陽性

不整脈誘発の報告がない医薬品もhERGを阻害
新規医薬品開発をより困難なものに

前臨床試験のガイドライン S7B

hERG阻害は不整脈発生を予測しない
hERG is not predictive, premature, unwarranted

背景④：E14の廃止とS7Bの改定

CSRC/HESI/FDA WORKSHOP AT THE FDA WHITE OAK FACILITY JULY 23, 2013
RECHANNELLING THE CURRENT CARDIAC RISK PARADIGM:
ARRHYTHMIA RISK ASSESSMENT DURING DRUG DEVELOPMENT
WITHOUT THE THOROUGH QT STUDY

Agenda: Drug-induced proarrhythmia is a major safety issue in pharmaceutical development that markedly impacts drug discovery and development. The current approach identifies many drugs as being "positive" despite having no demonstrable proarrhythmic risk. This results in adverse labeling for some compounds and can inhibit the development of new clinical entities due to concern of possible QT signals and the subsequent complexities of the clinical development pathway.

This workshop will examine and discuss a new paradigm, focusing on a comprehensive assessment of ion channel effects to determine actual proarrhythmic risk. This new approach has the real potential to obviate the need for clinical Thorough QT Studies, making CV risk assessment more efficient.

Session 1: Paradigm Shift: New Approach to Assessing TdP Risk without the Thorough QT Study

Session 2: Proposed Assay Schema

Session 3: Implications and Next Steps

Audience/Panel Discussion

FDA担当者からの提案

July 2015 Abandon ICH E14
July 2016 Revise ICH S7B



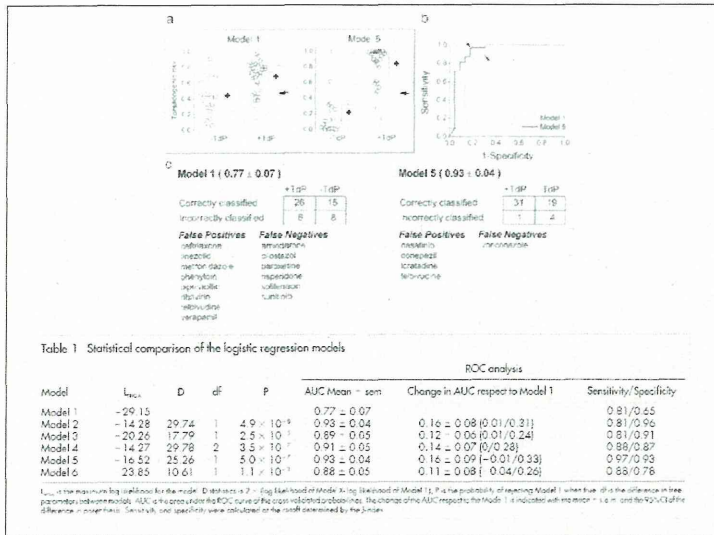
FDAが纏めたdocument（2013年6・7月ごろ）

『新規医薬品の催不整脈危険性に関する包括的非臨床試験の必要性和実現性』

Need for and feasibility of a comprehensive non-clinical assay for the pro-arrhythmic potential of new drugs

D. Abernathy¹, A.M. Brown², T. Cahalan³, C. Carrozzini⁴, E. DiMatteo⁵, G. F. J. Gagnier⁶, E. L. Gagnier⁷, J. Krawiec⁸, N. Krunic⁹, D. L. Loman¹⁰, B. Maitz¹¹, S. P. M. P. Maitz¹², N. Strohbridge¹³, D. Strauss¹⁴, N. Thomas¹⁵, J. Z. Zhang¹⁶

¹Food and Drug Administration; ²ChanTest; ³Certara; ⁴AbbVie; ⁵University of Wisconsin; ⁶Eli Lilly; ⁷St. Paul's Hospital; ⁸SimCyp; ⁹Independent Consultant; ¹⁰GE



Comprehensive *In Vitro* ProArrhythmia Assay (CiPA)

What It Is: Proposal to be developed by numerous stakeholders (Regulators, Pharma, Academics, CRO's)

- An evolving initiative with evolving workflows in need of wide participation and input of multiple parties
- A proposal that needs to be qualified

What It is Not: Predetermined or predefined regulatory schema with undue influence of vendors

- An approach that will render useless various approaches for internal decision-making (e.g., binding studies, *in-vivo* studies, other useful alternatives)

Comprehensive *In Vitro* ProArrhythmia Assay (CiPA)

What It Will Do:

- Standardize *in vitro* assays used to characterize drug effects, standardize *in silico* models, establish best practices for stem-cell derived cardiomyocyte models (comparable to "acceptable" TQT studies evolved)
- Provide proarrhythmic ranking based on calibration/validation efforts with agree-upon standards
- Likely lead to revision of S7B, E-14 guidelines, more sophisticated ECG modeling of drug effects in future

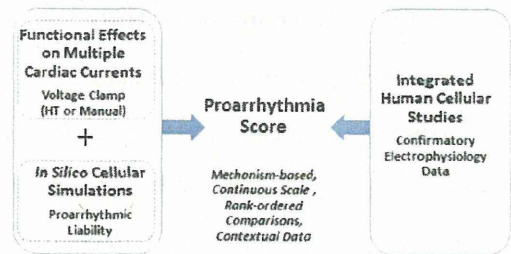
What It Will Not Do:

- Maintain regulatory status-quo for an imperfect surrogate marker of proarrhythmia
- Replace biological studies with fully integrated systems

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

Philip T. Sager, MD, FACC, FAHA,* Gary Glantz, PhD,† J. Rick Turner, PhD,† Sybil Periti, MEM,† and Norman Stockbridge, MD, PhD,† *Philo-Alto, CA; North-Chicago, IL; Durham, NC; Washington, DC; and White Oak, MD*

Comprehensive *In Vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA)

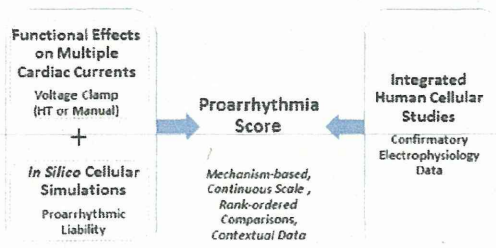


Schematic of the elements of the CiPA. Abbreviations: HT, high throughput; Manual, manual patch voltage clamp.

Am Heart J. 2014 Mar;167(3):292-300. doi: 10.1016/j.ahj.2013.11.004

CiPAが提案しようとする 薬物催不整脈リスク予測のパラダイム

Comprehensive *In Vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA)



Schematic of the elements of the CiPA. Abbreviations: HT, high throughput; Manual, manual patch voltage clamp.

Am Heart J. 2014 Mar;167(3):292-300. doi: 10.1016/j.ahj.2013.11.004

CiPA Guiding Principles

The Comprehensive *In Vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) is an initiative that will evaluate proarrhythmic risk based on mechanistic electrophysiologic understanding of proarrhythmia with three primary components:

1. *In vitro* drug effects on multiple cardiac ion channels
2. *In silico* reconstruction of electrical effects
3. Confirmation using human stem-cell derived cardiomyocytes

The objective of the CiPA initiative is to engineer an assay for assessment of the proarrhythmic potential of new drugs that has improved specificity compared with the hERG assay plus Thorough QT study.

The CiPA initiative has a number of collaborators including, FDA, HESI, CSRC, SPS, Japan NIHS, Health Canada, EMA, PMDA, academicians, *in silico* modelers as well as industry partners from pharmaceutical and device companies.

CiPA initiative

Comprehensive *In Vitro* ProArrhythmia Assay Schema

Further Considerations DRAFT (Is-Is not-Theme)

Gary Gintant, AbbVie

For discussion of the Comprehensive *In Vitro* ProArrhythmia Assay Group.

Comprehensive *In Vitro* ProArrhythmia Assay (CiPA)

What It Is: Proposal to evaluate proarrhythmic risk based on mechanistic electrophysiologic understanding of proarrhythmia with two primary components

- I. *In vitro* drug effects, multiple cardiac channels
+
In silico reconstruction of electrical effects
- II. Confirmation using human stem-cell derived cardiomyocytes

What It Is Not: Approach that negates well-controlled preclinical *in vivo* ECG assessment in preclinical studies

Comprehensive *In Vitro* ProArrhythmia Assay (CiPA)

What It Will Do:

- Prevent early (often unwarranted) attrition due to early testing for hERG liabilities with updated technologies and knowledge of proarrhythmia
- Provide a more complete assessment of proarrhythmic risk (rather than surrogate QT prolongation alone)
- Replace TQT study (high sensitivity) for higher specificity, less "false positives" based on functional hERG studies
- Potentially "rescue" drugs mislabeled with risk warnings by small degrees of QT prolongation in TQT studies

What It Will Not Do:

- Not replace need for careful clinical assessment of electrophysiologic effects in phase 1 ECG safety studies

Comprehensive *In Vitro* ProArrhythmia Assay (CiPA)

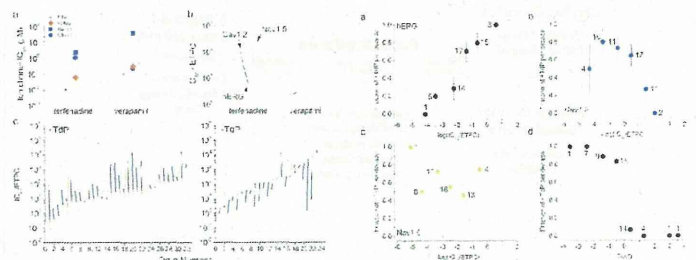
- What It Is:** Reflection of evolving practices by some Pharma for early *in vitro* detection of QT prolongation
- Regression techniques predict proarrhythmia from *in vitro* effects of 3 currents better than hERG assessment alone (Kramer et al, 2013)
 - *In silico* reconstructions show that hERG block may be mitigated by other (e.g. calcium) channel block (Mirams et al., 2011)
 - Recognition that hERG represents only one of multiple ion currents defining cardiac repolarization (surrogate marker of proarrhythmia)

What It Is Not: Novel approach never considered or employed by pharma, academics as part of exploratory/frontloading safety studies

MICE Models: Superior to the hERG Model in Predicting Torsade de Pointes

James Kramer^{1*}, Carlos A. Obajero-Paz^{1*}, Glenn Myatt², Yuri A. Koryshev², Andrew Bruning-Wright¹, Joseph S. Verducci¹ & Arthur M. Brown¹

¹Chionest Corporation, 14650 NeoParkway, Cleveland, OH 44128, ²Leadscope Inc., 1393 Dublin Rd., Columbus, Ohio 43215, *The Ohio State University, 4271 N. Corcoran Hall, 1958 Neil Ave., Columbus, OH 43210



hERG, Nav1.5, Cav1.2に着目

現在の議題 current issues

どのイオン電流がアッセイの対象になる？

I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} , I_{NaF} , I_{NaS} , I_{Ca}
(SPS2014でも紹介)

どのようなパラメーターを取得するのか？

電位依存性 voltage-dependence, 頻度依存性 rate dependence

阻害に関する速度論 block kinetics, などをデータとして取得

↓
voltage-clamp protocolの標準化
#high-throughput autpatch前提

どの活動電位モデルを用いるのか？

O'Hara-Rudy model? (or FDA model?)

統合的な評価をどのように行なうのか？

repolarization instability, EAD, reduced up stroke...

COMPOUNDS SELECTED FOR CIPA PROARRHYTHMIA TESTING

Compounds Identified as High Risk for Manifesting Human TdP

- Azmilice
- Bepindil
- Dofetilide
- Ibutilide
- Quinidine
- Vandetanib
- Methadone
- D,L Sotalol

Compounds Identified as Intermediate Risk for Manifesting Human TdP

- Astemizole
- Chlorpromazine
- Clozapine
- Clarithromycin
- Clozapine
- Domperidone
- Droperidol
- Terfenadine
- Pimozide
- Risperidone
- Ondansetron

Compounds Identified as No or Very Low Risk for Manifesting Human TdP

- Diltiazem
- Lorazepam
- Metoprolol
- Mexiletine
- Nifedipine
- Nifedipine
- Nifedipine
- Ranolazine
- Tamoxifen
- Verapamil
- Flecainide

3. Confirmation using human stem-cell derived cardiomyocytes

ねらい

ヒトにとって有害な薬物の効果はヒト由来心筋で評価できるはず
臨床試験（高コスト）に入る前にヒトへの効果を予測したい

現在の課題

細胞株の標準化

実験手法

multi-electrode array
voltage-sensitive optical recording

↓
標準薬の効果がどのように検出されるか

July 2015 Abandon ICH E14

July 2016 Revise ICH S7B

日本における産官学連携によるこの問題への対応

霧島会議

催不整脈リスクの統合的評価について

イオンチャネルアッセイとin silico 催不整脈予測について（細胞レベル、組織、臓器レベル）

hiPS心筋のin vitro 心臓安全性試験への実用化について

現在実施されているTQT試験に代わる臨床試験について

日本の独自性

stem cell+in silico（この後の芦原先生）

stem cell (hiPS)-derived 心筋の電気生理学的性格付け、数理モデル

ion channel assay+whole heart model（この後の岡田先生）

J-iCSA (Japan Cardiac Safety Assessment)

CIPAに対する日本シンクタンク？、コンソーシアム？

まとめ

CIPA initiativeが提案しようとする薬物催不整脈リスク予測のパラダイム

Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay

催不整脈性をエンドポイントとするメカニズムに基づいた
薬物催不整脈リスク評価法

multiple cardiac ion channels, In silico reconstruction,
human stem-cell derived cardiomyocytes

方法論に関する議論と検証実験

薬物催不整脈リスクへの特異性が高い

hERG試験に対する優位性（false positiveを減らす）

謝辞

イーザイ株式会社 澤田 光平 東京医科歯科大学 黒川 洵子

霧島会議*in silico* WGメンバー

東京医科歯科大学 黒川 洵子 東京大学大学院 久田 俊明
滋賀医科大学 芦原 貴司 杉浦 清了
千葉大学大学院 中谷 晴昭 岡田 純一
中外製薬株式会社 田保 充康 エーザイ株式会社 吉永 貴志

大阪大学大学院 倉智 嘉久

倉智研究室のメンバー

CBI学会、安全性薬理研究会

厚労科研費 H24-医薬-指定-030 (代表: 関野 祐子)

厚労科研委託費 26401501 (代表: 黒川 洵子)

文科科研費 新学術領域研究「多階層生体機能学」22136002 (代表: 倉智 嘉久)

基盤研究24590319 (代表: 古谷 和春)

バーチャルiPS細胞由来 心筋細胞への飽くなき挑戦

芦原 貴司

滋賀医科大学 循環器内科・不整脈センター 学内講師

CBI学会2014年大会(情報計算化生物学会)
2014年10月29日(水) @タワーホール船橋

System Biology

遺伝子, 細胞, 組織, 臓器を繋いで生命をシステムとして理解

生命の複雑さゆえ
の階層構造は難解

新たな不整脈学?
計算論的創発
Cariani 1992

創発性
階層構造には
新たな特性が
加わる
(Emergence)

要素還元

臨床・動物
(病態)

細胞生物学

分子生物学

SCIENTIFIC AMERICAN

Virtual Ventricle: Computer Predicts Dangers of Arrhythmia Drugs Better than Animal Testing

Researchers developed a computer model of a human heart to study whether certain drugs will help treat an abnormal heartbeat, or cause serious side effects

Drugs useful in the long-term management of cardiac arrhythmia, which occurs when electrical impulses in the heart become irregular and put patients at risk of sudden death, have eluded researchers for decades. Despite best efforts, most of the medications developed to calm abnormally fast heartbeats, a type of arrhythmia known as tachyarrhythmia, have faltered. Several clinical trials, including the seminal 1986 Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST), even showed that the use of certain drugs designed to correct tachyarrhythmia—encainide and flecainide, in particular—actually increased the risk of death.

心臓の構造やイオンチャネルの構成がヒトとは異なるマウスやラット等の異種心臓を用いるより、ヒト心臓の構造的・機能的特徴を導入したモデルの方が正しいかも?

種差による薬剤応答の違い ヒトモデルシミュレーションが有用な訳

I_{Kr} block Experiments I_{Ks} block

Human Canine Guinea Pig Human Canine Guinea Pig

Simulations

Human Canine Guinea Pig Human Canine Guinea Pig

70% I_{Kr} block, 70% I_{Ks} block, 90% I_{Kr} block, 90% I_{Ks} block, 50% I_{Kr} block

O'Hara T, Rudy Y. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2012;302:H1023-H1030

前臨床試験 S7B
臨床試験 E14
市販

DEVELOPMENT STAGES: MOLECULE DISCOVERY, PRECLINICAL, CLINICAL, MANUFACTURING

KEY STEPS AND PROCESSES: Target, Commercial, Regulatory, Manufacturing

COMPOUND ALTERATION: 10,000 compounds, 250 compounds, 5 compounds, 1 compound

約800億円

Cardiac Safety Research Consortium
in silico Tuesday, 23 July 2013
7:30am - 6:00pm

2つの in silico 創薬

- in silico 探索(スクリーニング)
 - 化合物データベースから、疾患の標的タンパク質と結合親和性の高い化合物(創薬seed)をコンピュータで探索
 - 従来からの標的探索~リード最適化に相当
- in silico 安全性評価
 - 疾患の標的タンパク質に結合した後の反応をコンピュータシミュレーション
 - 前臨床~臨床試験Phase 1に相当
 - これが今回新たに取り入れられる in silico アプローチ