

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ティフィック社) 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設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

ヒト iPS 細胞由来神経細胞機能を評価する標準プロトコル

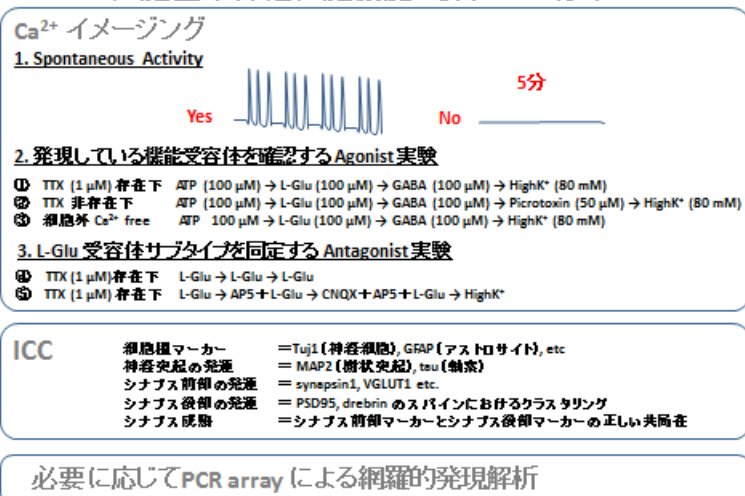


Fig.1. ヒトiPS細胞由来神経細胞のシナプス成熟度を評価するカルシウムイメージング法のプロトコル

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、エーザイ、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プし廃棄した。

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、被験物質の中枢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

実験をおこなった。シナプス形成に伴う神経細胞の形態変化やシナプス機能マーカータンパク質発現と局在に関する科学的知見は、すでにげっ歯類の脳の初代培養神経細胞において明らかになっていることから、げっ歯類の初代培養神経細胞を対照実験としている。対照実験については、協力研究者である群馬大学神経薬理学教室の協力を得て、シナプス機能マーカー発現の観察に関する標準プロトコル作成を開始した。本年度は、シナプス機能マーカータンパク質の免疫組織化学染色と、グルタミン酸受容体とATP受容体刺激により上昇する細胞内カルシウム濃度を測定することにより、iPS細胞由来神経細胞標本のシナプス機能の成熟度を比較検討した。iPS細胞株や、細胞の培養密度や、接着因子を変えることにより培養条件を整えた。実験データの再現性については、同じiPS細胞株から分化した神経細胞においては確認することができた。

ATPとグルタミン酸 (L-Glu) を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、P2受容体、グルタミン酸受容体のシナプス後部における機能的な発現を比較検討した。

201B7由来神経細胞は分化誘導30日目にATPにのみ反応する細胞が現れ、40日目でATPに加え、L-GluおよびHighK⁺に反応する細胞が現れた (Fig.2)。しかし、40日目までNMDAやpicrotoxinに反応を示す細胞はあらわれなかった。また、40日間の実験中、個々の細胞の個々のリガンドに対する反応強度は非常に多様であった。253G1由来神経細胞は分化誘導10日目でL-GluおよびhighK⁺にのみ反応し、40日目までその他のリガンド

(ATP, NMDA, Picrotoxin) に反応する細胞は現れなかった。(Fig.3: 30日目の典型的反応トレースを示す)。253G1由来神経細胞の反応強度はほぼ全ての細胞が非常に類似しており、201B7とは対照的であった。以上のようにシナプス後部の機能的な受容体発現において両株は全く異なる特性を持つことが明らかとなった。

40日目の免疫組織化学的検討では、ポストシナプスマーカーであるPSD95の発現パターンを比較検討した。201B7由来神経細胞では発現が樹状突起のシャフト部分に分散し、シグナル強度も非常に弱かった。一方253G1由来神経細胞ではPSD95がクラスター状に集積し、樹状突起上にクラスターが突出する、樹状突起スパインと思われるタンパク局在を示した (Fig.4)。そこで、253G1由来神経細胞についてsynapsin 1とPSD95の二重染色を行ったところ、synapsin 1のシグナルがPSD95のクラスター上に分布している様子が観察された (Fig.5)。このようにシナプス成熟マーカーの発現パターンにおいても201B7由来神経細胞と253G1由来神経細胞とは大きく異なることが明らかとなった。

3-2. ヒトiPS細胞由来心筋細胞の品質評価に関する研究

ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて医薬品の催不整脈作用を高感度で検出する実験法を提案した。本年我々は、技術的に平易である多点電極による細胞外電位記録法を選択した。また、電極への標本の接着性が高く、細胞間に形成されるギャップ結合により電気活動が均質化し、薬剤の浸透性が均一である、という理由で、細胞シ

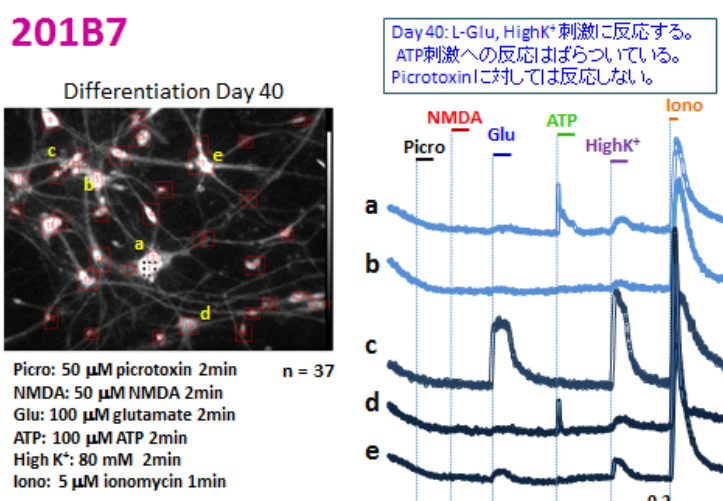
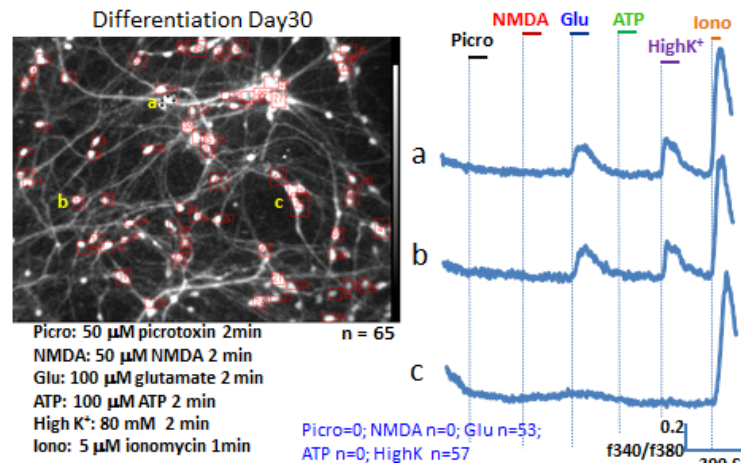


Fig.2. 分化誘導40日目の201B7由来神経細胞のCa²⁺応答

201B7由来神経細胞の薬物 (ATPならびにグルタミン酸; L-Glu) に対するカルシウムの細胞内増加は、分化誘導30日以降に観察された。左はfura-2 AMをとりこんだ201B7由来神経細胞の典型的蛍光染色像である。右は典型的な細胞内Ca²⁺応答トレースを示す。分化誘導40日後にはATPに加え、L-GluおよびHighK⁺に反応する細胞が現れた。NMDAやpicrotoxinに反応を示す細胞はあらわれなかった。

253G1

Fig.3. 分化誘導30日目の253G1由来神経細胞のCa²⁺応答

左はfura-2 AMをとりこんだ253G1由来神経細胞の典型的蛍光染色像。右は典型的な細胞内Ca²⁺応答のトレースを示す。L-GluおよびHighK⁺にのみ反応を示し、ATPに対する応答は観察されなかった。この反応は分化誘導10日目からあらわれ、40日目まで変化がなかった。ATP、NMDAやpicrotoxinに反応を示す細胞はあらわれなかった。

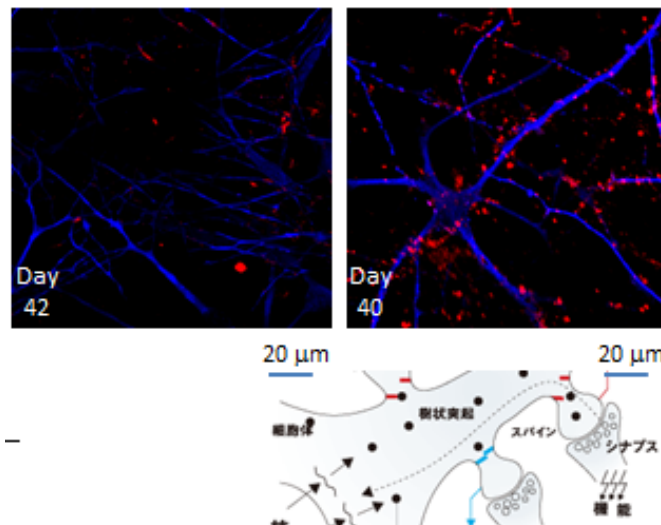
201B7
MAP2/PSD95253G1
MAP2/PSD95

Fig.4. 分化誘導40日目の201B7および253G1由来神経細胞のMAP2, PSD95二重染色像

左は201B7由来神経細胞、右は253G1由来神経細胞。201B7由来神経細胞ではPSD95の発現が樹状突起のシャフト部分に分散し、シグナルも非常に弱かった。一方253 G1由来神経細胞ではPSD95がクラスター状に集積していた。

ートを実験標本として採用した。今回使用した多点電極システムをFig.6に示す。細胞外電位 (Field potential; FP) は細胞内で記録される活動電位の微分波形に一致し、心電図によって得られる信号と同様の変化を記録する事ができる⁴⁾。従って、Fig.6に示すように、ナトリウムによるピークから活動電位再分極時に観察されるカリウムのピークまでの時間であるFPDは、心電図におけるQT間隔に相当する。このシステムを用いて、FPD

および拍動数の評価を行った。

製薬関連企業の中でもっとも多くの研究発表があり先行的に研究を行っているエーザイ (グローバルCV評価研究部) で採用している実験プロトコルを参考に標準プロトコルを作成した。

現在市販されているヒトiPS / ES細胞由来心筋細胞には、4種類ある (Table 2)。大量に入手可能な心筋細胞としては2種類の市販品があるが、同一iPS細胞株か

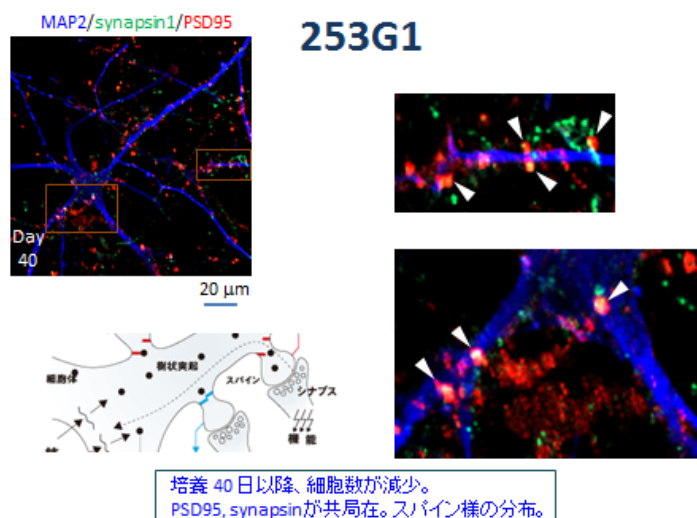


Fig.5. 分化誘導40日目の253G1由来神経細胞のMAP2, synapsin1, PSD95, 三重染色像

左はx40蛍光顕微鏡像である。右はそのインセットの拡大図である。synapsin1のシグナルがPSD95のクラスター上に分布している様子が観察された。シナプス前部とシナプス後部が会合していることが示唆された。

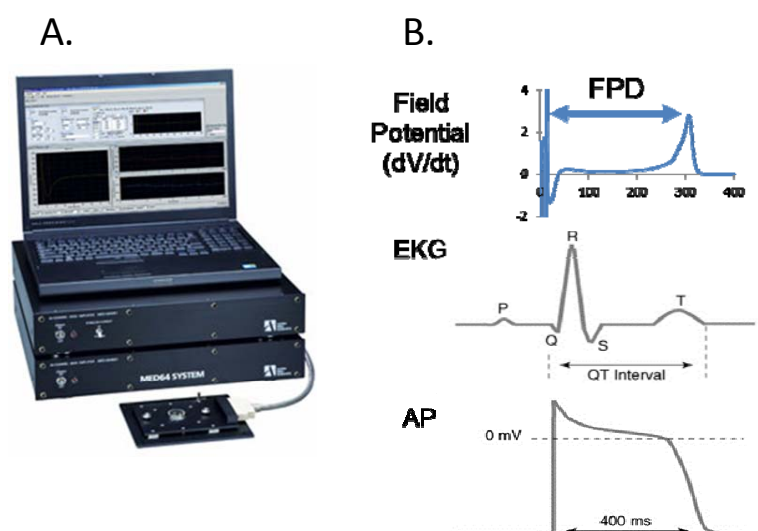


Fig.6. 多点電極システムによるFPDの測定

(A) 今回、多点電極システムとして、MED64 システム（アルファメッドサイエンティフィック株式会社）を用いた。

(B) 多点電極システムにおけるField Potential の長さ (FPD) はQT間隔に相当する。

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、かつ細胞シートの作成に適している細胞 (iCELL, CDI社) を用いて実験プロトコルの最適化を行った。その結果、データの再現性を得るためには、計測温度や分化心筋細胞の播種密度が非常に重要な条件であることがわかった。さらに、予備的薬理実験で使用したiCELLでは、陽性対照物質としてIKr阻害剤E-4031やIKs阻害剤クロマノールがともにQT延長を誘発することがわかった (Fig.7)。東邦大学、エーザイ、国衛研で心筋に関するサブ研究グループを作成し、プロトコル最適化のための擦り合わせ作業を行った

ところ、iCELLの薬理的性状はどの研究施設でも観察された。実験プロトコルは技術的に平易であり、今後複数の研究施設間で分化心筋細胞の薬理特性を比較する上で有用であると判断された。NEDO研究に参加している三菱化学メディエンスも我々が提案する標準プロトコルを導入する方針を固めた。また、安全性薬理研究会を通じて研究協力施設を募ったところ、東邦大学を中心として、医薬品開発業務受託機関にも標準プロトコルを導入して行くこととなった。また、製薬協への情報提供を行った結果、製薬協でタスクフォースがたちあがった。

3-3. ヒト幹細胞由来肝実質細胞を用いた試験法の確

Table2. 市販されているヒトiPS/ES細胞由来心筋細胞

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。このうち細胞シートを形成することができる形状で冷凍保存可能なCDI社のiCellを、実験プロトコルを整備するために利用した。実験プロトコルが整備された後に、京都大学で作製された分化心筋細胞について検討する予定である。

分化心筋細胞	販売会社
iPS cell-derived cardiomyocytes, iCell Cardiomyote	Cellular Dynamics International (CDI)
Stem cell derived cardiomyocyte product, hES-CMC	Collectis
Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes	GE Healthcare
ReproCardio	Reprocell

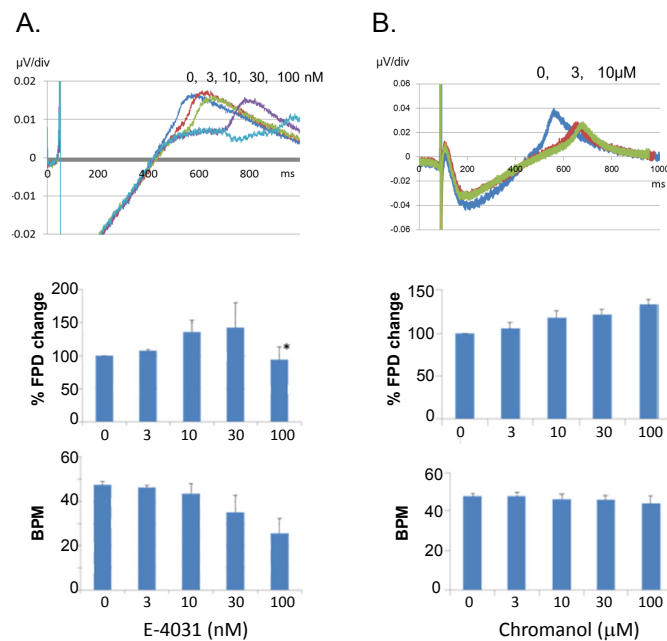


Fig.7. iCellシートのfield potential duration (FPD) と心拍数 (Beat per minute: BPM) に対するE-4031とクロマノールの影響

- (A) E-4031各濃度に対するFPD延長の典型例 (上段), E-4031によるFPDの延長とBPM減少 (n=4, *n=3) (下段)
 (B) クロマノール各濃度に対するFPD延長の典型例 (上段), E-4031によるFPDの延長とBPM減少 (n=3)

立

iPS細胞由来肝細胞を利用して医薬品の有害反応を評価する際の項目として、細胞毒性、ミトコンドリア膜電位、細胞膜透過性、活性酸素、酸化ストレスを採択した。現在入手可能なヒトiPS細胞由来肝実質細胞（1種類3ロット）を用いて、発現が期待される酵素活性を測定した。ヒト幹細胞由来肝実質細胞では酵素活性が不十分な標本が多く見受けられた。

4. 考察

4-1. ヒトiPS細胞由来分化細胞を用いた薬理試験法開発 (総括班)

4-1-1. 薬理作用の評価指標の選定について

ヒトiPS細胞から種々の臓器細胞を分化する実験技術はめまぐるしい進歩をみせており、神経細胞、心筋細胞、肝実質細胞への分化方法の改良がおこなわれている。どのような細胞が実用に最適であるかを知るためには、同一プロトコルと同一の薬物を用いて薬理実験を行い、分化細胞がどのぐらい目的とする細胞の特性を有しているか比較検討する必要がある。しかし、現時点ではそのような標準的な実験プロトコルは確立しておらず、使用する薬物も様々であり、現状のままでは分化細胞が

利用可能であるかを確認する方法がなかった。我々の研究は、標準的プロトコルで同一薬物を用いたデータを収集することを最終ゴールとするために計画されている。

ヒトiPS細胞分化細胞を用いて非臨床試験法を開発するためには、何を調べたいのかを明かにして、それを調べるだけの機能が発現しているか確認する必要がある。そのためには、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て、実験プロトコルの開発に着手した。

我々は、分化神経細胞、分化心筋細胞、分化肝実質細胞を予備的薬理実験に用いるために十分な量を入手するルートを平成24年度に確立していたことから、本年度の研究開始日には、すぐに予備的薬理実験に着手した。どの分化細胞にしても、製造ロットの違いにより、細胞の状態が異なることが確認できたが、どのぐらいの幅で変動しているのかを今後確認していく必要がある。

現時点においては、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、細胞密度などの培養条件を整えることで薬理実験の結果に再現性があることが確認された。

4-1-2. 実験プロトコルの標準化について

評価指標を決定したあとは、その指標を評価するための実験プロトコルを標準化する。同じ方法で多施設での実験結果を比較することにより、実験結果の再現性に関わるさまざまな要因が明らかとなった。

4-2. ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた試験法の確立

神経細胞の場合には、ATP、グルタミン酸、高カリウム液、ピクロトキシンを投与し、これらの刺激による細胞内カルシウム濃度変化を指標として、分化誘導後の培養日数と応答性の変化を調べ、シナプス後部の受容体機能の発現をしらべる実験をおこなった。シナプス後部の機能的な受容体発現において両株は全く異なる特性を持つことが明らかとなった。また、免疫組織化学を行い、シナプス後部マーカータンパク質であるPSD95と、シナプス前部のマーカータンパク質であるsynapsin Iの局在を解析した。これも、細胞株により分布が異なることが明らかとなった。

iPS株間での違いはあるものの、同一株であれば、再現性は得られるのであれば、試験法としての確立が可能である。ただし、今回の株間での相違が大元のiPS細胞

株間の違いに由来するものか、Neurosphere間の違いに由来するものかの判定はできておらず、現段階では、長期培養を擁することや安定した薬理学的特性が得られにくいため、Neurosphere から各研究施設で神経細胞を分化誘導する試験系を確立することは困難であると判断された。

4-3. ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた試験法の確立

複数のES/iPS細胞株における心筋分化能の評価を行い、細胞株における分化指向性の違いがあることが明らかになった。iPS細胞からの安定した高効率な大量培養系の開発が必須である。今後さらに心臓組織により近い遺伝子発現プロファイルを示す心筋細胞の作製を目指すことが重要であると考えられた。

プロトコルの標準化のたたき台となる実験方法として、標本は細胞シートを用いること、測定系には多点電極システムによる細胞外電位記録を採用した。プロトコルの標準化には、技術的な容易さも重要なファクターである。細胞内電位記録は技術習得が難しいことから、細胞外電位記録を採用した。また、個々の細胞の電気特性をそろえるためにある密度で心筋細胞培養するとギャップジャンクションを形成して、電気的特性が平均化されることから、細胞シートからの細胞外電位記録を行うこととした。そのためには、品質がそろった心筋細胞が大量に必要であるため、我々はまず市販のヒトiPS細胞あるいはES細胞由来の分化心筋細胞の調査を行った。iCell心筋が国内外でもっとも流通しており、これらを用いた薬理実験が多く行われていたので、この細胞を用いてプロトコルの整備を行った。その結果、陽性対照物質によるQT延長を確認でき、多施設間でデータを比較できる標準的試験プロトコルを開発することに成功した。

4-4. ヒトiPS細胞由来肝実質細胞を用いた試験法の確立

分化肝実質細胞を実用化するためには、薬物代謝酵素の活性が十分に得られていることが必須となる。現時点で我々が入手して予備的な計測実験を行ったところ、安定した酵素活性を確認することができなかった。実験毎に分化誘導しているため、再現性の確認が難しい。まず分化細胞の供給の問題を克服しない限り試験法としてプロトコルを整備することが難しい。

4-5. 成果の今後の活用

本研究で得られた成果は、主催したシンポジウムや、日本毒性学会、米国Health and Environmental Science Instituteでのワークショップ、また各分野の国内学会・

国際学会での研究発表により、関連業界の研究者に情報提供した。特に日本安全性薬理研究会では、研究会幹事を通じて関連企業に対して試験技術導入に関する希望を募った。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。また、平成25年度から開始され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』の研究アドバイスをやっていく予定である。また、当該タスクフォースでは、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る計画である。このコンソーシアムに関しても研究アドバイスをを行う。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」に対して、我々が標準化した分化心筋用の実験プロトコルを提供するなど協力的な体制を構築する。今後行われる複数の被験物質の選択などに関するアドバイスをを行う。

5. 結論

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。分担研究において、現在入手可能な数種類のヒトiPS細胞由来心筋細胞、神経細胞、肝臓細胞を用いて予備的な薬理実験を行い、各分化細胞が獲得している細胞機能を評価した。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て実験プロトコルの整備にとりかかった。

ヒトiPS細胞由来神経細胞標本のシナプス機能成熟はもととなるiPS細胞株やNeurosphere株によって特徴が異なる可能が示唆された。また、ヒトES/iPS細胞株により組織細胞への分化指向性が異なることが心筋細胞への分化指向性を比較する研究から明らかとなった。iPS細胞株間の分化指向性の違いが、分化細胞の薬理学的特質の株間の差につながるかどうかは不明であるが、ヒトiPS細胞由来の分化細胞を用いた薬理試験法開発においては、少なくとも元となるiPS細胞株の違いに十分に留意する必要がある。

同一ヒトiPS細胞から同一条件で分化誘導されて同一の組織マーカータンパク質の発現などで規格化された心

筋細胞を用いた実験結果と、同一の神経細胞塊から分化誘導した神経細胞を用いた実験結果からは、分化細胞をなんらかの条件により規格化すれば、薬理学的特性はある程度の変動内に収まり、再現性の高い薬理試験結果が得られる可能性が示唆された。

肝細胞については、医薬品の有害反応を評価する際の項目として、細胞毒性、ミトコンドリア膜電位、細胞膜透過性、活性酸素、酸化ストレスは、acetaminophenの濃度依存的な変化をしめすことから、評価指標として有用である。入手可能なiPS細胞由来肝細胞をモデルとして、細胞機能の評価に着手した結果、現時点で提供されるiPS細胞由来肝細胞では十分に酵素活性が得られない場合が多く観察された。現時点では、肝細胞は実験毎に分化誘導して供給している状態であるため、実験結果の再現性にしての同一施設内または多施設間比較を可能にする分化細胞の供給の問題を解決する必要がある。

本研究では、ヒトiPS細胞由来神経細胞標本を用いてシナプス機能への有害反応評価を実現するため、標本が満たすべき基準およびそれを確認するための標準プロトコルを定め、実験の再現性を確認した。今後は、同一のプロトコルを多施設間で実施して同一の薬物への反応性の比較を行う必要がある。現在入手可能な複数の分化細胞以外にも利用可能な細胞が今後開発されることが予想され、標準プロトコルで複数の化合物に対するデータを収集して比較する作業が必須となる。そして、実験結果を収集し比較するための、研究プラットフォームを確立する必要がある。

引用文献

- 1) Nori, S. Okada, Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., Toyama, Y., Yamanaka, S., Nakamura, M. and Okano, H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4, 16825-30 (2011)
- 2) Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Tsuda, M., Oh-sawa, K., Kohsaka, S. and Inoue, K. *J Neurochem.*, 78, 1339-49 (2001)
- 3) http://www.cellulardynamics.com/products/lit/CDI_iCell_Cardiomyocytes_DS-CM130102.pdf
- 4) Kamp, T.J. and January, C.T. *Drug Discovery Today: Disease Mechanism* 1,45-51 (2004)