



平成25年度国立医薬品食品衛生研究所シンポジウム

# ヒトiPS細胞の安全性試験法への応用

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
薬理部  
関野 祐子

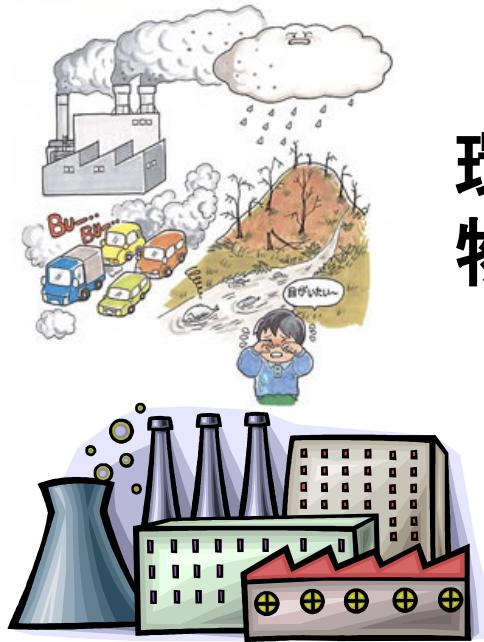
# 本日の内容

1. 医薬品の安全性評価
2. ヒトiPS細胞からヒト心筋細胞を作る
3. ヒト心筋細胞を用いた心毒性評価

# 1. 医薬品の安全性評価

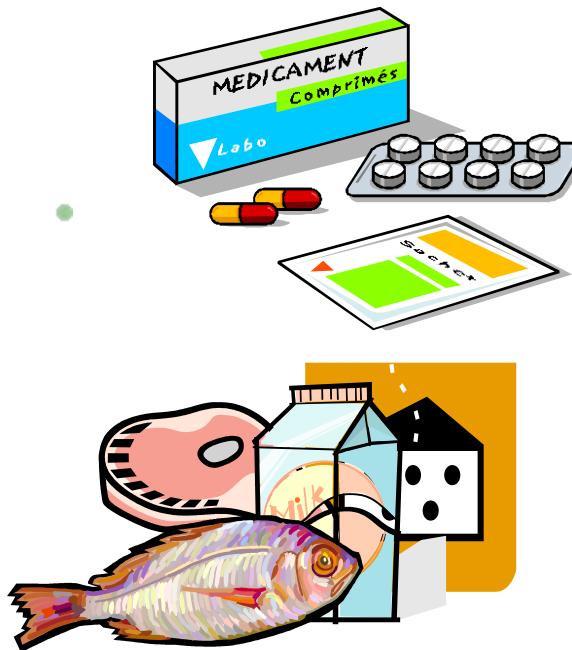
# 暮らしのなかの化学物質

## 環境中の化学物質



環境  
物質

## 人体が摂取する化学物質



医薬品

化粧品

サプリメント

食品添加物

医薬品の安全性評価

# 新医薬品開発の流れ

創薬研究

非臨床試験  
(動物試験)

臨床試験  
(ヒトを対象)

承認申請

候補化合物  
探索

毒性試験  
薬理試験  
安全性薬理試験

第I相、第II相、  
第III相試験

審査

発売



人体への安全性を  
動物で予測、ヒトへ  
の投与量を決定

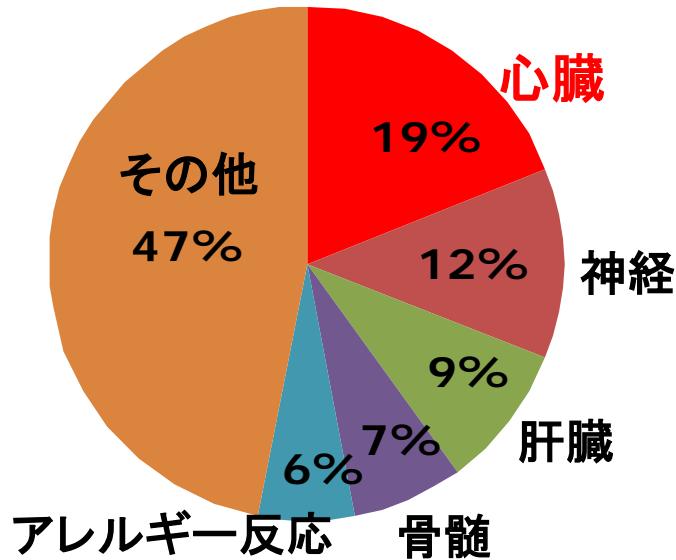


人体への安全性評価

研究開発費 ~1000億円、期間 10年～15年、確率

$\frac{1}{22,000}$

# 医薬品の販売中止理由

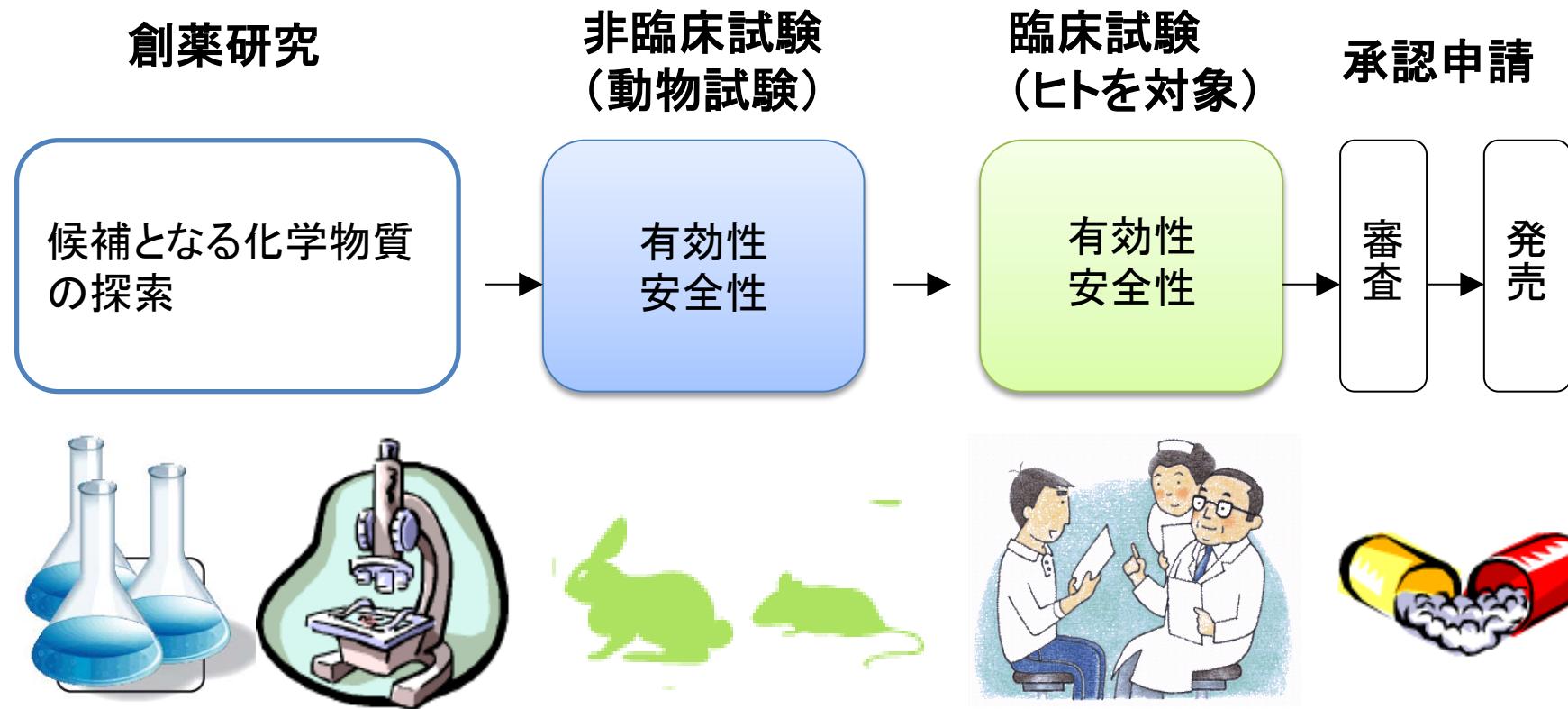


非循環器病薬ではないが、心毒性のために市場撤退した医薬品の例

心毒性の発生が最も高い

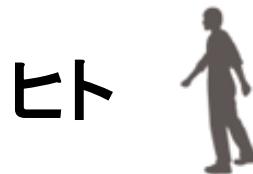
- Terodilane 1991年 泌尿器
- Terfenadine 1998年 抗ヒスタミン剤
- Sertindole 1998年 抗精神病薬
- Astemizole 1999年 抗ヒスタミン剤
- Grepafloxacin 1999年 抗生物質
- Cisapride 2000年 消化管
- Droperidol 2001年 抗精神病薬
- Levacetylmethadol 2001年 鎮痛薬

# 新薬開発における安全性評価の問題



- ・動物とヒトの種差の問題
- ・現在の安全性の評価手法の限界
- ・個人差

# 動物実験でヒトの心毒性が評価できない理由 心筋細胞活動電位の種差



ヒト

60-100回

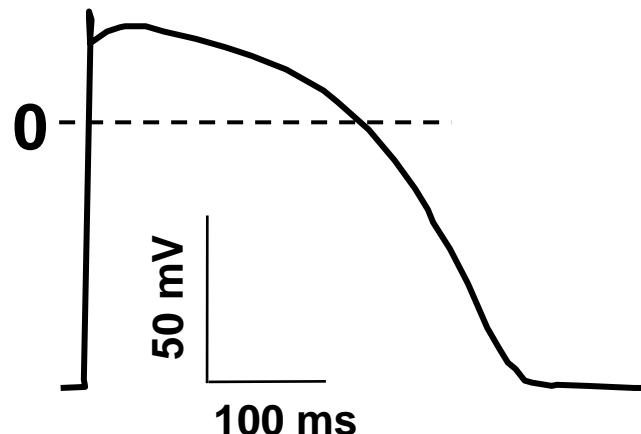


マウス

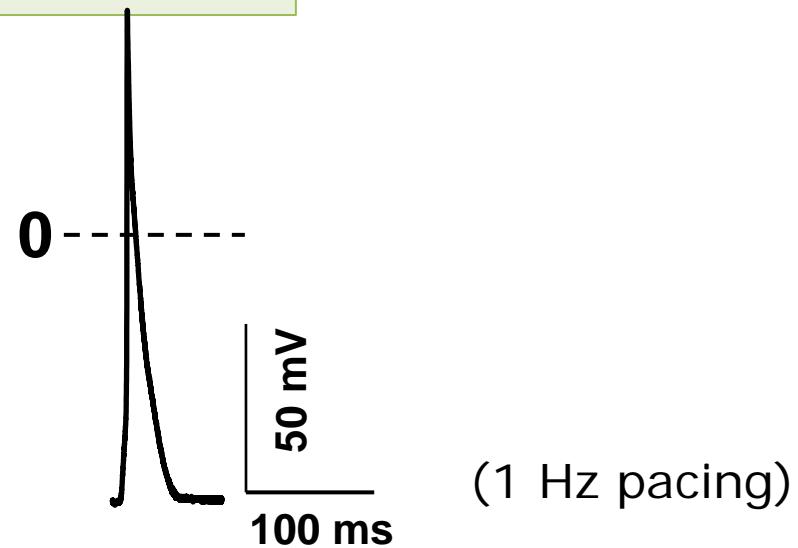
400-600回

電気活動

プラトー相あり



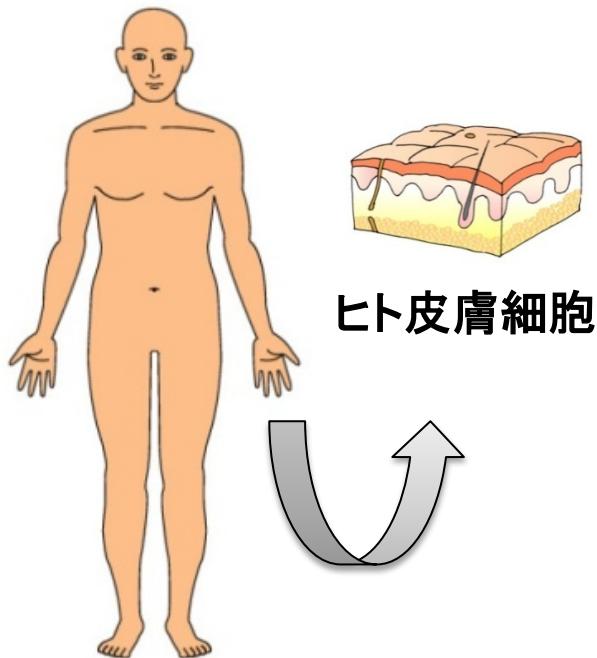
プラトー相なし



(東医歯大/黒川先生より)

## 2. ヒトiPS細胞から心筋細胞を作る

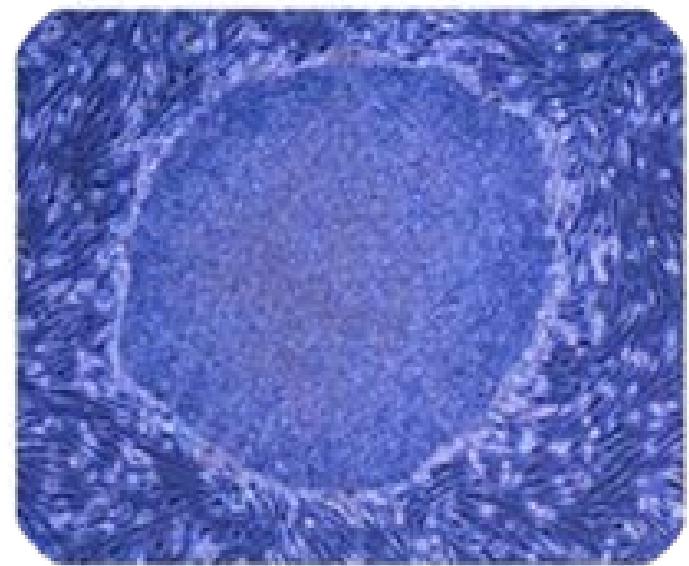
# iPS細胞(人工多能性幹細胞)



初期化

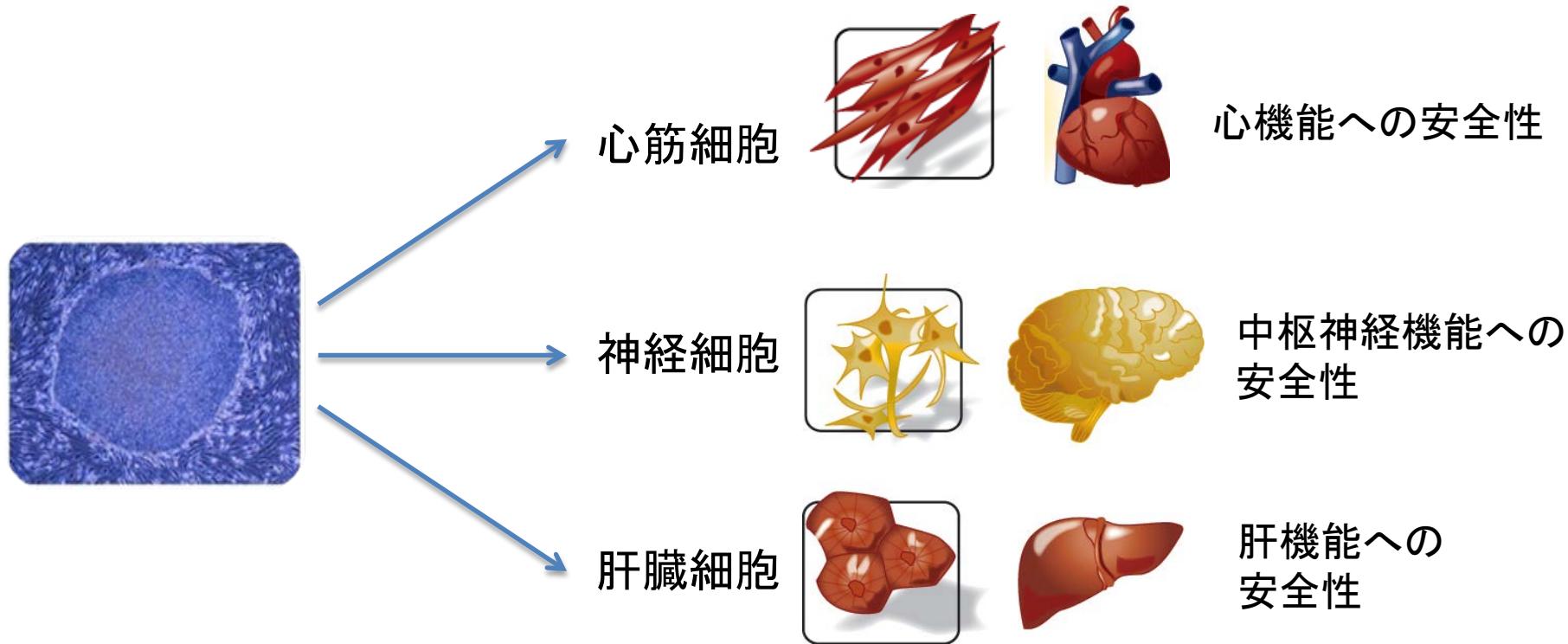
4つの遺伝子

Oct3/4  
Sox2  
Klf4  
c-Myc



ヒトiPS細胞  
(2007年に京大で樹立された株)

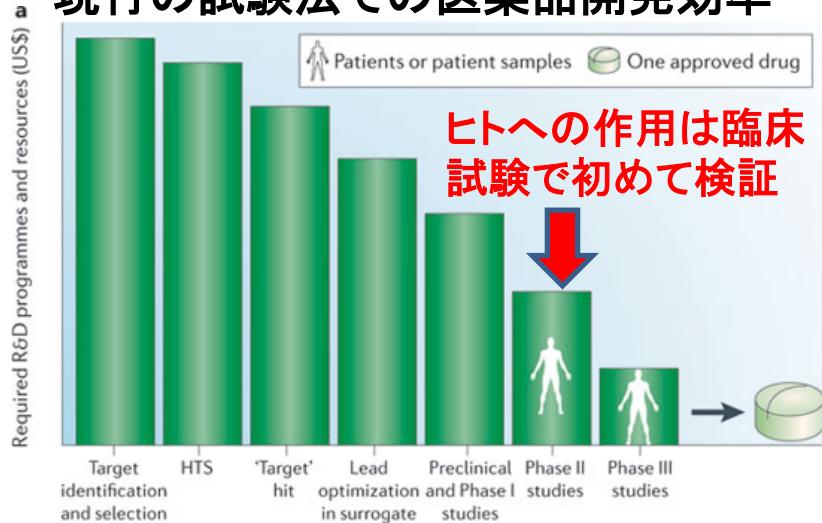
# iPS細胞から分化誘導した組織細胞と 新しい安全性薬理試験法の開発



iPS細胞は体を構成するすべての細胞に分化誘導することが可能！  
国衛研・薬理部では、入手できる分化細胞を使って薬理実験を行っている。  
薬物に対する細胞の応答性に再現性があるか、研究施設間で実験結果を比較して、検証する。

# ヒトiPS細胞を利用した新しい医薬品開発ストラテジー

## 現行の試験法での医薬品開発効率



ヒトへの作用は臨床試験で初めて検証

## ヒト細胞試験法での医薬品開発効率



ヒトへの作用は探索段階から考慮される。

## 予想される創薬ストラテジーの変革

- 探索スクリーニング
  - ・標的分子スクリーニング(構造活性相関)から標的病態スクリーニングへの変換
  - ・ヒト細胞を使うハイスクレーブットスクリーニング
- 非臨床試験
  - ・in vitro 臨床試験
  - ・毒性／安全性試験の変革

# 心筋細胞をどの段階で利用するか？

創薬研究

候補となる化学物質  
の探索

非臨床試験  
(動物試験)

有効性試験  
安全性試験

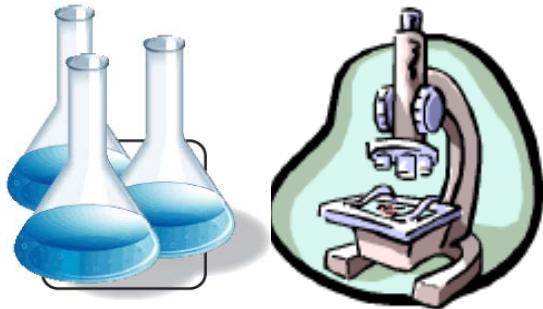
臨床試験  
(ヒトを対象)

有効性  
安全性

承認申請

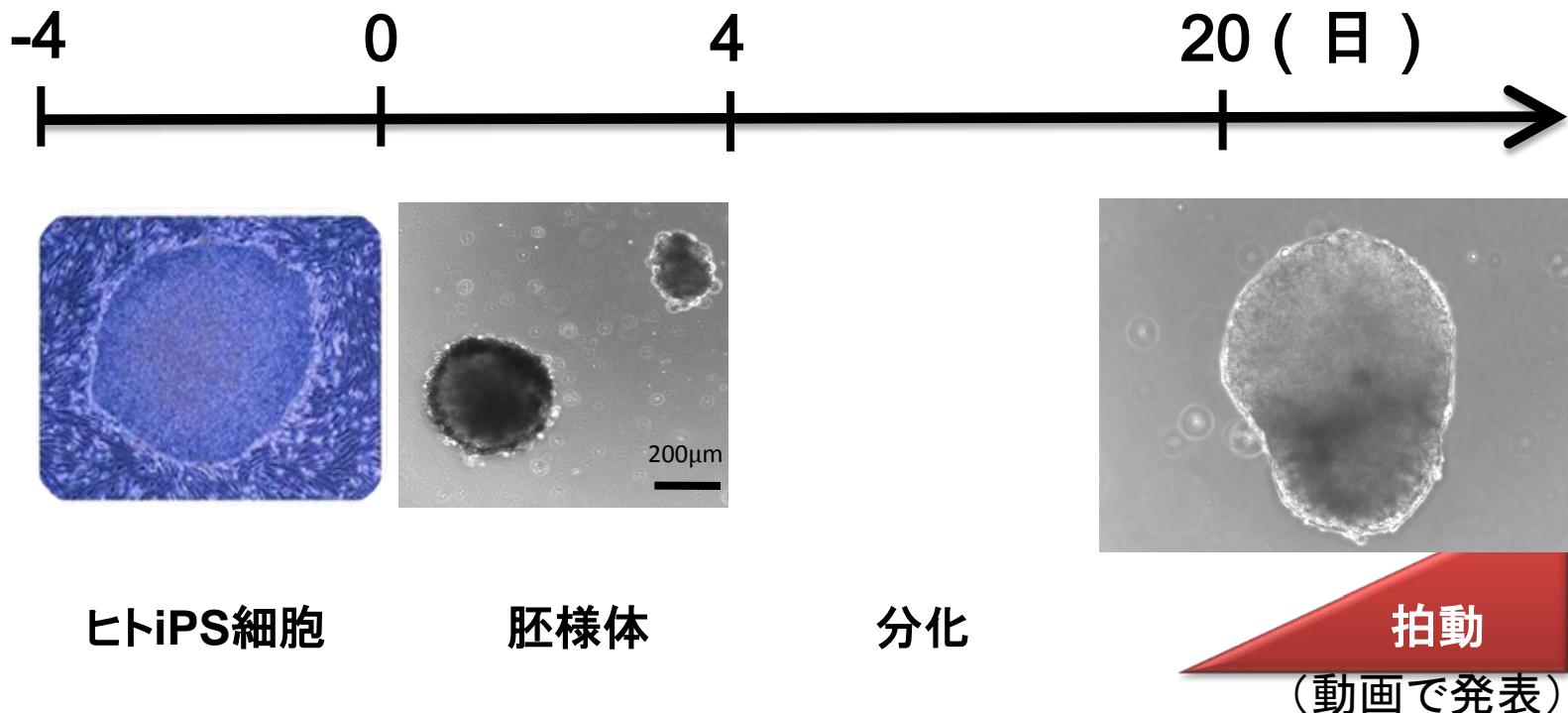
審査

発売



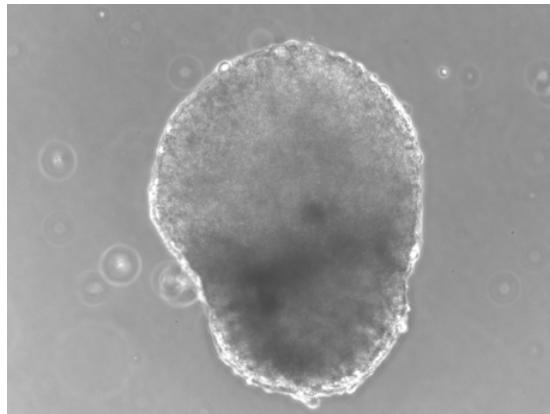
動物実験の代わりにヒトiPS細胞由来心筋細胞を利用することは可能か？

# ヒトiPS細胞(201B7株)から心筋細胞の作製



# 心筋細胞の活動電位のバラエティー

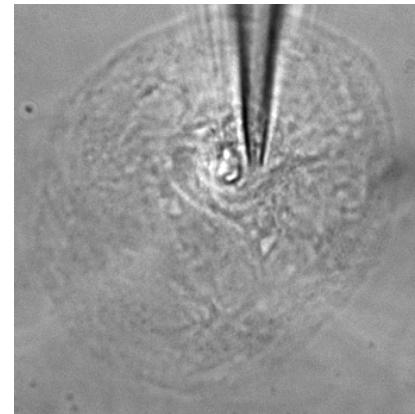
拍動する心筋塊



1 mm ぐらい

酵素処理で  
ばらばらに  
する

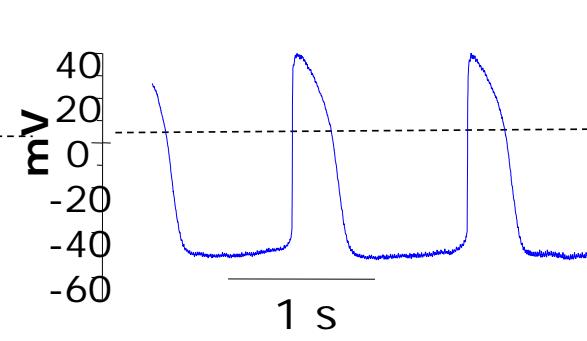
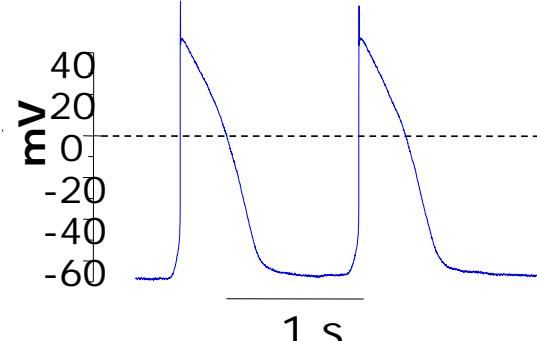
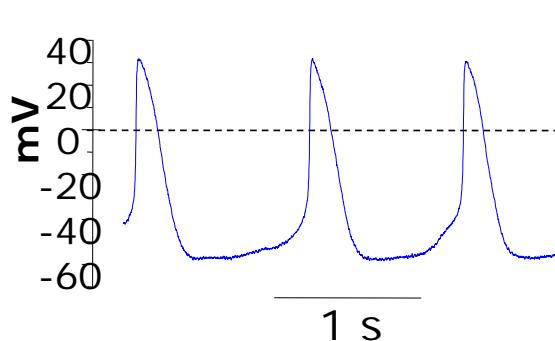
拍動する心筋細胞



100分の1 mmぐらい

パッチクランプ法によ  
る個々の心筋細胞か  
ら活動電位を記録する。

201B7株から心筋細胞を分化誘導した。拍動する心筋塊  
から単離した心筋細胞の活動電位を記録した。

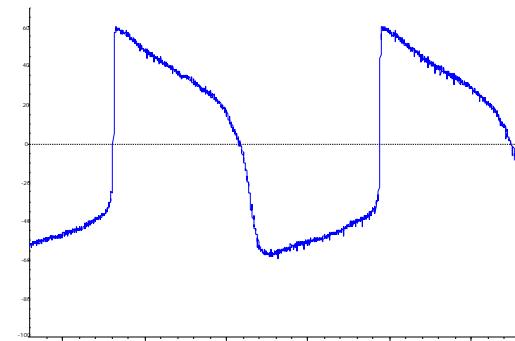
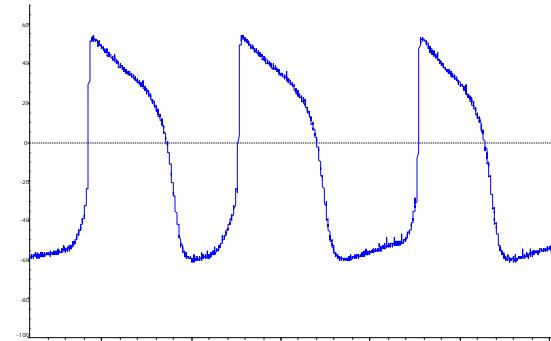
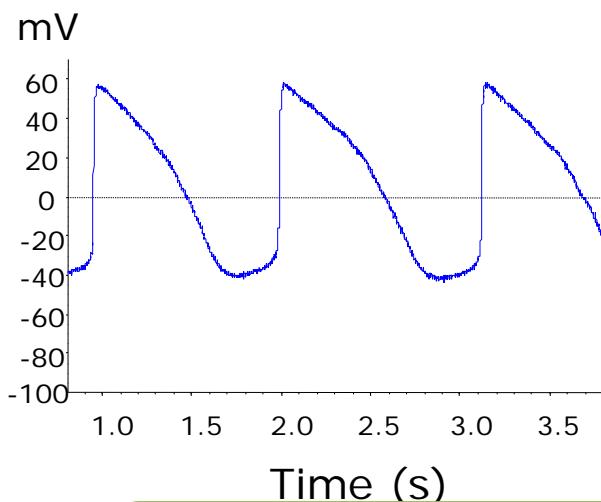
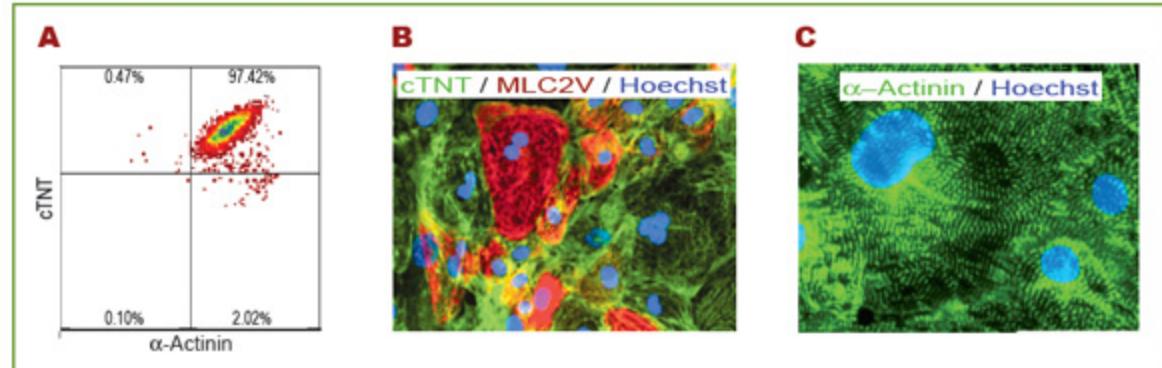


活動電位の形は様々である。

電気生理実験研究協力  
東京医科歯科大学 黒川洵子博士

# 市販されているヒトiPS細胞由来心筋細胞の活動電位を記録した。

CDI社

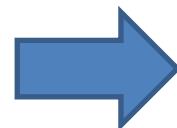


電気生理実験研究協力  
東京医科歯科大学 黒川洵子博士

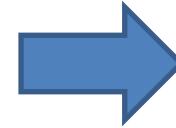
個々の心筋細胞から記録した電気活動は、市販の分化細胞でもそれぞれ個性的であった！

心筋シートを作成すると、個々の心筋細胞がギヤップジャンクションにより電気的につながる。

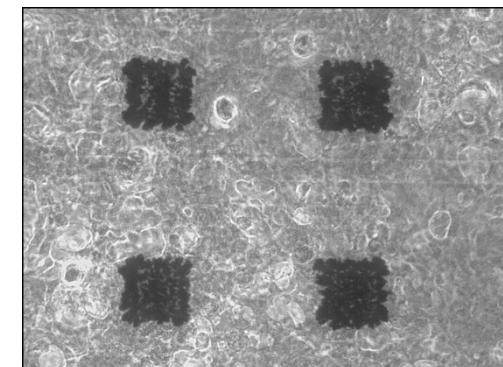
分化心筋細胞



多点電極システム（MED64）  
の電極プローブディッシュに心  
筋細胞を撒く



多点電極（■）の上の  
心筋細胞シート



3万個の心筋を2μl  
の溶液に調製

細胞同士が接着して一枚の  
シートのように拍動する。

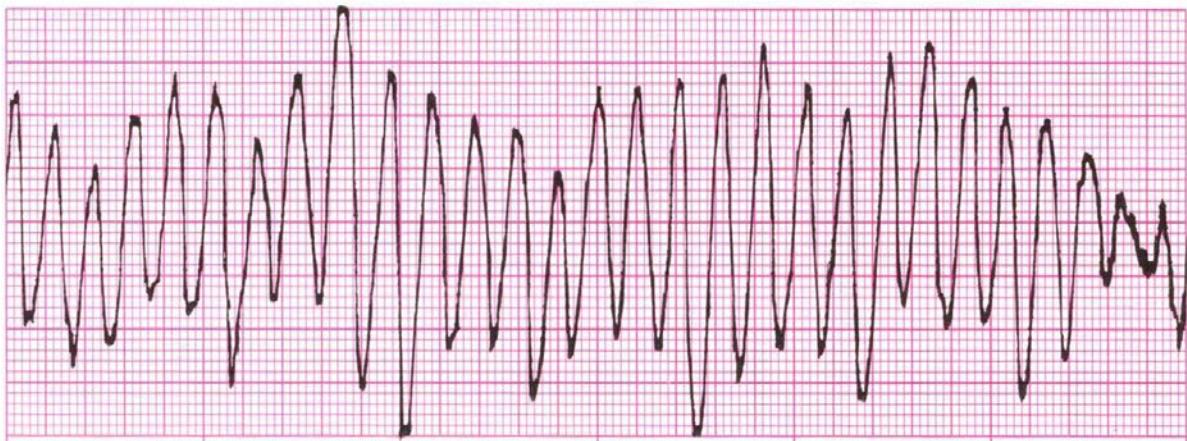
シートにすれば比較的均一な拍動が観察される

### 3. ヒト心筋細胞を用いた心毒性評価

# 医薬品が原因の重篤な不整脈

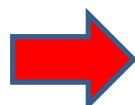


Torsades de Pointes (TdP)



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

QT間隔延長を誘発する化合物はTdPを誘発する危険性が高い。



QT間隔への作用を評価することで、心機能への安全性を評価する。

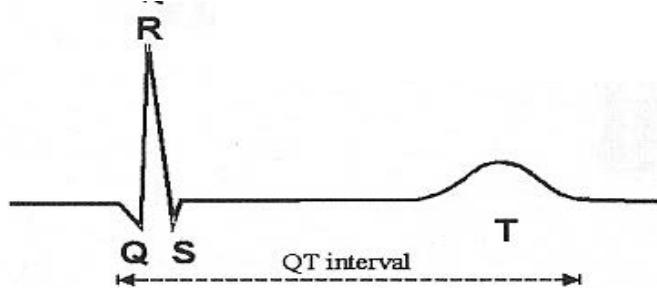
# 心電図におけるQT間隔延長のイオン電流メカニズム

心筋細胞の1拍動に関する細胞内電位変化と関連するイオン電流

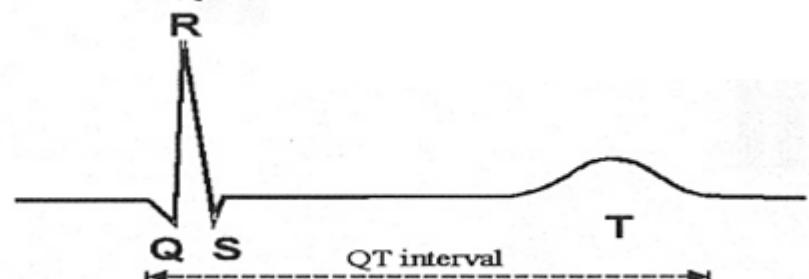


心電図(細胞外電位測定)波形

T波は心筋細胞の再分極過程で発生する



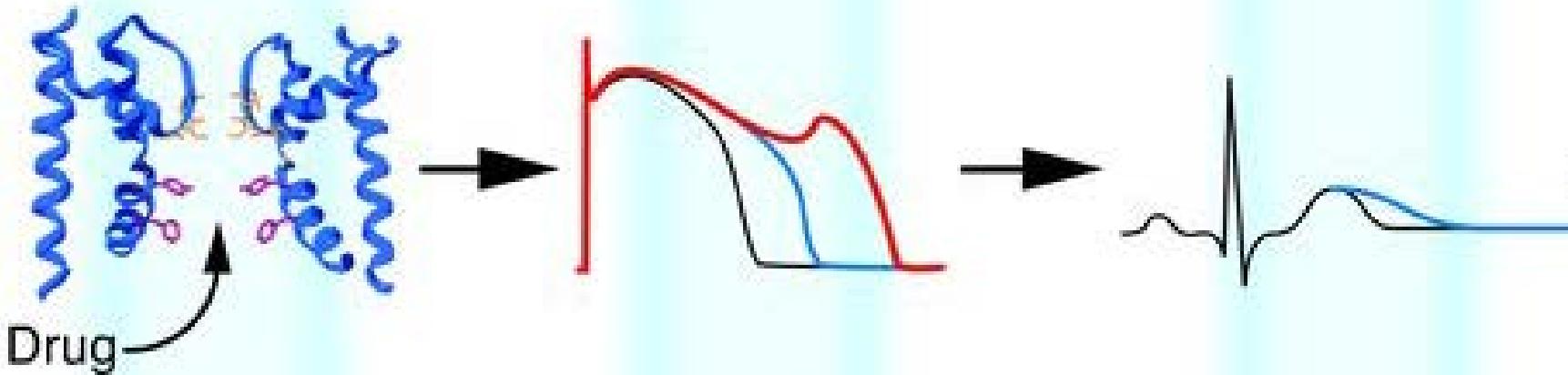
Kチャネルが阻害されると再分極過程が遅れるので心電図ではQT間隔延長する。



# 医薬品によるQT延長リスク評価

医薬品がKチャネル  
を阻害

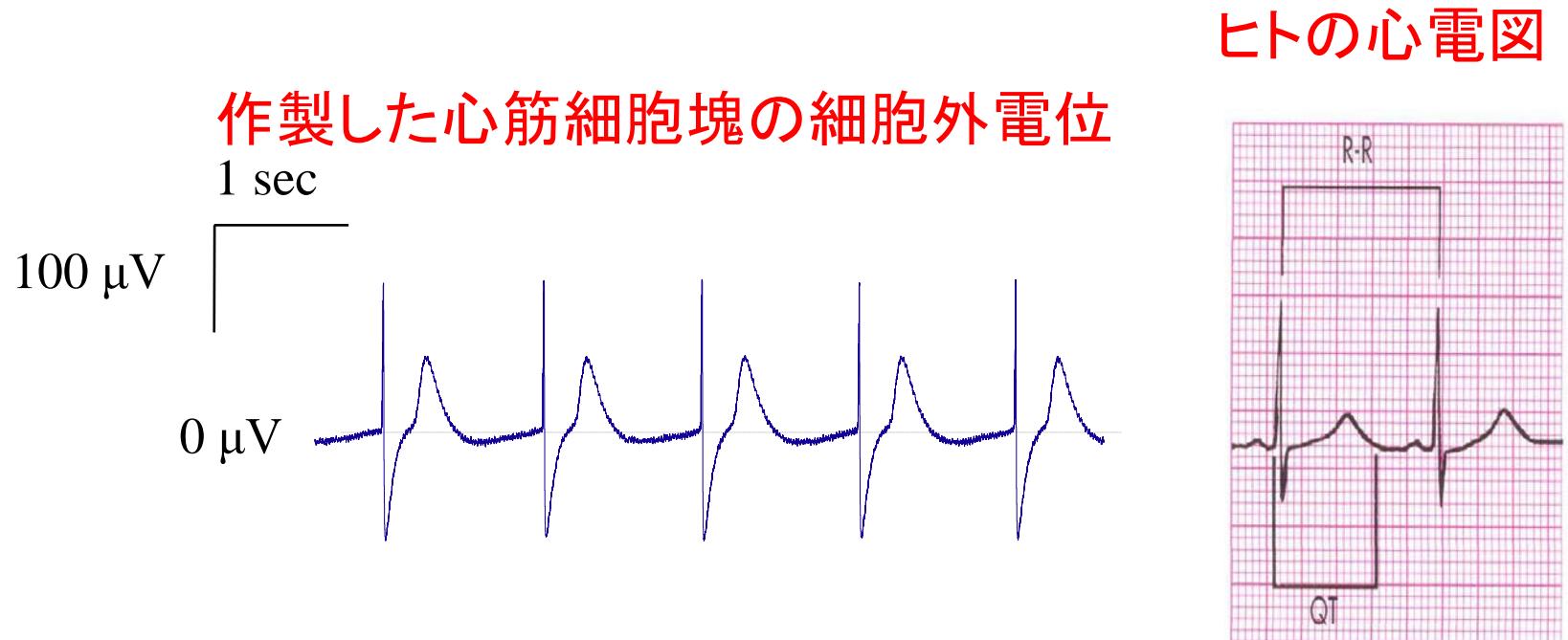
QT Prolongation  
Early after depolarization (EAD)



非臨床試験: *In Vitro*  $I_{Kr}$  測定  
hERGチャネル試験法  
医薬品がhERGチャネルに影響を及ぼさないかを、hERGチャネルタンパク質発現する細胞で確認する試験法

非臨床試験: *In Vivo* QT測定  
(イヌ・サルのテレメトリー)  
臨床試験: thorough QT試験

# ヒトiPS細胞から作製した心筋細胞塊の 細胞外電位記録



試験管の中で心臓の動きを再現できる！！



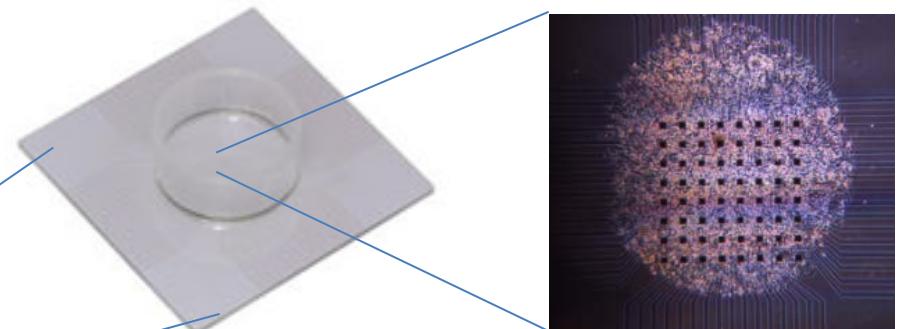
ヒトiPS細胞から作成した心筋細胞を用いて、心臓への薬物の効果を調べることができる。

# ヒトiPS細胞由来心筋細胞で形成した心筋シートの細胞外電位の測定

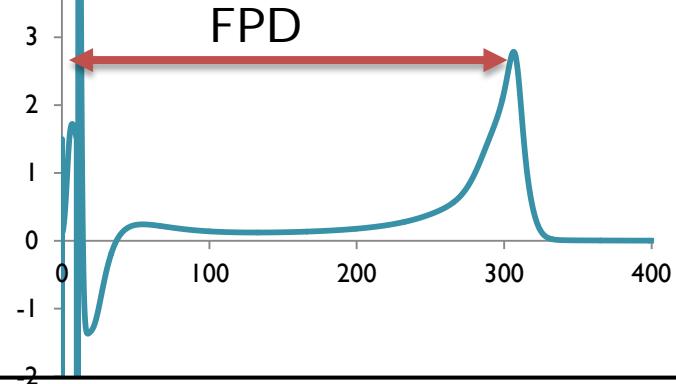


多点電極システム  
64電極の上に形成した心筋シートから細胞外電位を測定する。  
(アルファMED サイエンス社)

1拍動のフィールド電位間隔  
(Field Potential Duration: FPD)を、*In Vivo*心電図のQT間隔に対応した指標として評価する。

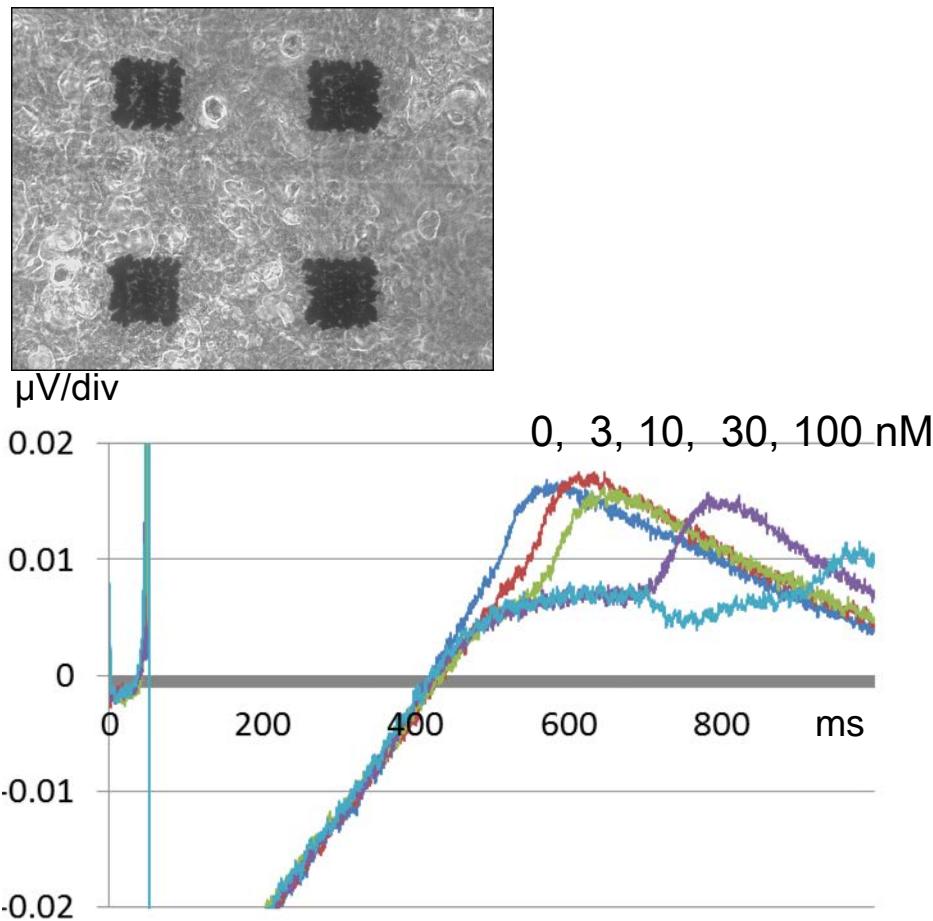


心筋シートから記録した1拍動の細胞外電位

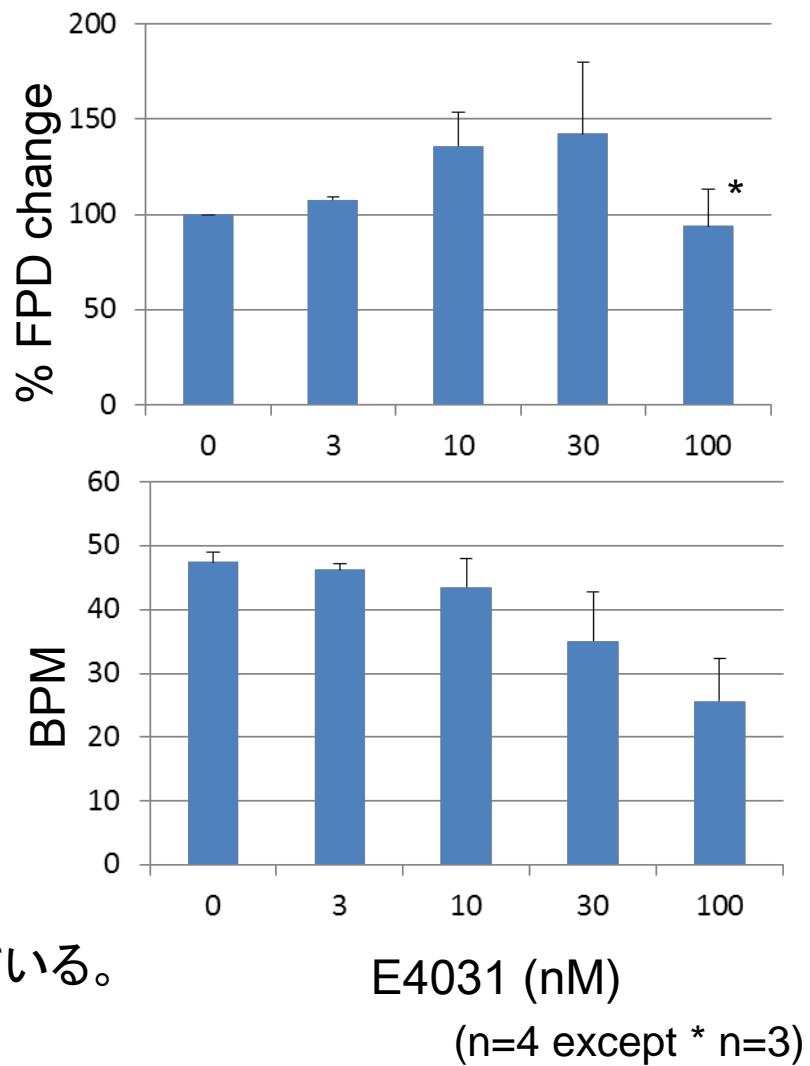


心筋細胞塊に比べた長所：電極全体を覆うようにシートが形成されているので、解析可能な波形の数が多い。電極との接触性の再現性が高い。薬液の浸透が容易。

# hERGチャネルを阻害する化合物(E-4031)の心筋細胞シートの細胞外電位への影響



FPDの延長が見られた。=QT延長作用を示している。



# ヒトiPS細胞由来分化細胞を用いた実験 試験データのプラットホーム作り

試験法の標準化にむけた実験プロトコルの改良

- **再現性**

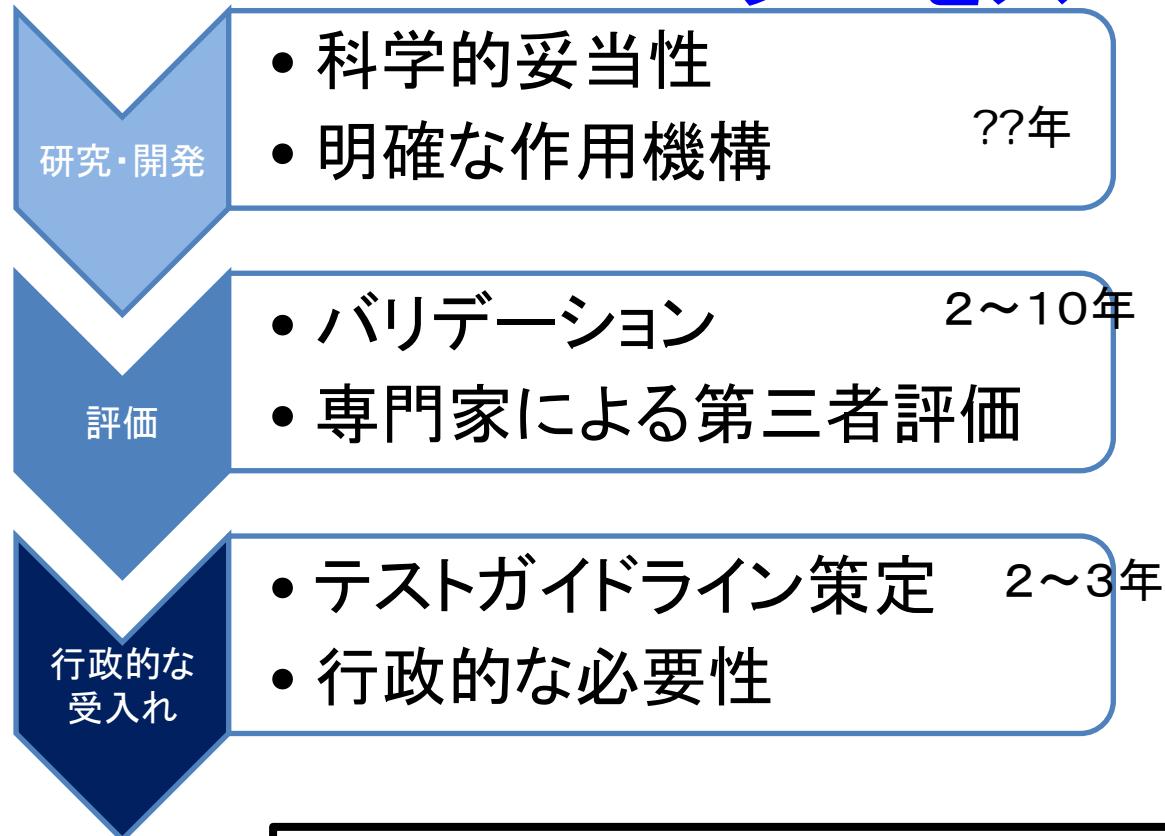
培養密度、培養期間、計測実施温度  
その他：ロット間差、iPS株間差

- **信頼性**

作用がわかっている陽性化合物により  
感度と特異性を評価する。

多施設において同一実験プロトコルで、同一の化合物の効果を測定して、多施設間でデータを比較検討して、再現性と信頼性を検証する。

# 新規試験法の行政的な受入れのためのプロセス



バリデーションとは: 試験法の頑健性を示すために、陽性・陰性化合物についてどの研究施設でも同じ結果がでることを検証(バリデーション)しなくてはならない。

**Point:** 行政的な受け入れを見据えた研究計画を立てる。多施設で実験プロトコルを整備するなどして、将来的な多施設間バリデーションに備えて試験法を開発することにより、開発が迅速化する。



# ヒトiPS細胞由来分化細胞をもちいた試験法と 動物実験の3Rs

3Rs (Russel and Burch 1959)とは

- **Replacement**

動物を用いない方法に置き換える

(例) *In Vitro* エンドトキシン試験法

- **Reduction**

動物の使用数の削減

(例) 固定用量による単回投与試験

- **Refinement**

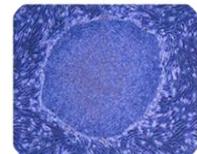
実験方法改良による実験動物の苦痛の削減



# ヒトiPS細胞を用いた 安全性評価系の実現に向けて

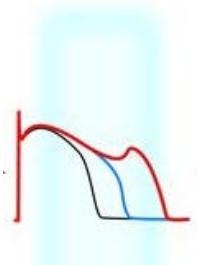
## ✓ 分化心筋細胞の供給体制

高品質な心筋細胞を安定供給すること



## ✓ 分化心筋細胞を用いた安全性評価の整備

共通の評価方法(実験プロトコル)を整備して  
陽性または陰性化合物のデータを比較。



- 現行の非臨床試験の代替となるか？
- 早期にヒトにおける薬効・安全性を評価できるか？



医薬品の迅速な承認審査



# まとめ

- ・ヒトiPS細胞由来の心筋細胞を用いて、ヒトの心電図様細胞外電位記録を行った。
- ・誰でもできるような試験方法になるようにプロトコルを整備して、試験法を標準化することにより試験データの再現性、信頼性を高める。
- ・今後、多くの医薬品を用いて実験データを多施設で比較検討を行い、ヒトiPS細胞由来分化細胞を用いて医薬品の安全性が評価できるのか検討する。