

ヒト iPS 細胞技術を用いた医薬品の新たな評価法の開発

ー 研究開発の最先端と今後の展開 ー

Development of drug safety assessment using human iPS cell technology

- Introduction of cutting-edge research and its future prospects -

開催趣旨:

ヒト iPS 細胞は多分化能を有することから、今まで入手困難であった様々な臓器細胞の供給資源となっている。iPS 細胞から分化誘導されたヒト臓器細胞は再生医療だけでなく、創薬研究にも用いられ始めている。しかしながら、細胞の未成熟性などから成人ヒト臓器細胞との乖離があり応用への妨げとなってきた。そのような中、培養方法を工夫することなどにより、ヒト iPS 細胞分化細胞を用いた *in vitro* アッセイ系の高機能化が図られている。本シンポジウムでは、創薬における重要な臓器、肝臓、心臓、中枢神経に焦点を当て、研究開発の最先端にいる研究者から現在の状況について報告いただき、今後の展望について議論したい。

モデレーター: 石田 誠一 Seiichi Ishida
国立医薬品食品衛生研究所
National Institute of Health Sciences
佐藤 薫 Kaoru Sato
国立医薬品食品衛生研究所
National Institute of Health Sciences
山崎 大樹 Daiju Yamazaki
国立医薬品食品衛生研究所
National Institute of Health Sciences

1. 3次元培養によるヒト iPS 細胞由来肝細胞の高機能化

Functionalization of human iPS cell-derived hepatocytes by three-dimensional culture

小島 伸彦 Nobuhiko Kojima
横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科
Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University

ヒト iPS 細胞由来肝細胞はいくつかの企業から市販が行われているが、その代謝機能は実際の肝細胞と比べるとまだまだ低い。スフェロイドによる 3 次元培養は、プライマリ細胞や肝がん細胞株での肝臓機能を維持あるいは高める手法としてよく知られている。しかし、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は相対的に接着力・凝集力が低く、一般的な方法ではスフェロイドを安定形成することが難しい。本研究では、我々が開発した「メチルセルロース培地によって細胞を強制的に凝集させる技術」を利用することで、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を効率よくスフェロイドにできるかどうかを確認すること、またスフェロイド培養が CYP3A4、CYP1A2、CYP2B6 の発現量に及ぼす影響を調査することを目的とした。ヒト iPS 細胞由来肝細胞として ReproHepato を使用し、2000 個の細胞からなるスフェロイドの形成を試みたところ、ハンギングドロップや U 底プレートでは凝集しなかったが、メチルセルロース培地を用いることでスフェロイドを形成できた。次に CYP3A4 遺伝子などの発現を調べるために、スフェロイドをメチルセルロース培地中で 2 日間、その後通常の培地と低接着処理プレートを用いてさらに 4 日間あるいは 12 日間培養した。併せて 6 日間培養したあとでは、CYP3A4、CYP1A2、CYP2B6 の発現量はコントロールの平面培養とほとんど変わらなかった。一方、14 日間培養することで、代謝酵素遺伝子の発現は数百倍まで向上した。経時的な観測からは、培養 6 日目以降から CYP3A4 の発現量が増加すること、またそれと相反するように α -フェトプロテインの発現量が低下することがわかった。講演ではさらなる機能化に向けた課題についても紹介したい。

2. ヒト iPS 心筋細胞を用いた三次元心筋組織の作製と収縮評価系の構築

Development of human iPS cell-derived engineered heart tissue and contractility assessment

山崎 大樹 Daiju Yamazaki

国立医薬品食品衛生研究所

National Institute of Health Sciences

心臓に対する医薬品の安全性を評価するため、hERG チャンネル発現細胞を用いた阻害作用評価ならびに大動物の心電図評価が、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドラインを基に非臨床試験において実施されている (S7B)。臨床試験の Through QT 試験 (E14) も合わせて実施され、ガイドライン施行後に致死性不整脈の発生により市場から撤退した医薬品はなくなった。しかしながら、hERG チャンネルの阻害が必ずしも催不整脈と結びつかないこと、実験動物とヒトで化合物に対する反応性が異なる可能性があるなどの理由から、これまでよりも正確に催不整脈リスクを予測できる試験系が望まれている。このような背景の中、日本および海外からヒト iPS 心筋細胞を用いた医薬品による催不整脈リスク予測法の提案がなされ、多施設間検証も実施されて ICH S7B ガイドライン改定を視野に入れた議論が開始された。

一方で、医薬品により引き起こされる心毒性には、催不整脈の他に心収縮障害や高血圧、虚血などがあり、これらの *in vitro* 心毒性評価系については十分な議論がなされていない。スニチニブやトラスツマブなど分子標的型抗がん剤の出現によりがん患者の死亡率は減少したが、抗がん剤を原因とする心毒性の発症が顕在化してきた。このことから、近年ヒト iPS 心筋細胞を用いた *in vitro* 評価系により抗がん剤の心毒性を検出・評価する試みが行われている。心収縮障害は多くの種類の抗がん剤により引き起こされ、心不全へと発展し得る重大な副作用である。我々は抗がん剤による心収縮障害を検出するためヒト iPS 心筋細胞を用いて三次元心筋組織を作製し、その収縮画像を定量化する評価系の構築を試みた。三次元心筋組織を作製し、3 週間程度培養すると遺伝子レベルで成熟化が亢進することが明らかとなった。また、 α アドレナリン受容体刺激薬であるイソプロテレノールにより拍動数および収縮力が濃度依存的に増強したことから、ヒト心筋と同様の反応性であることを確認した。

本講演では、三次元心筋組織の収縮評価を含めた抗がん剤による心毒性評価系の現状と今後の展開について議論したい。

3. 非臨床試験におけるヒト iPS 細胞由来神経細胞の新たな可能性

—iNCENS プロジェクト、CSAHi、および HESI NeuTox 協力研究より

New potential of human induced pluripotent stem cell-derived neurons in the non-clinical study

—the report from iNCENS project in collaboration with CSAHi and HESI NeuTox

高橋 華奈子 Kanako Takahashi

佐藤 薫 Kaoru Sato

国立医薬品食品衛生研究所

National Institute of Health Sciences

我々はこれまで、創薬課程の早期に痙攣誘発有害反応を検出する *in vitro* 薬理評価系をヒト iPS 細胞由来神経細胞 (human induced pluripotent stem cell-derived neurons: hiPSC-neurons) を用いて構築する努力を続けてきた (iPS Non-clinical Experiments for Nervous System (iNCENS) project)。国際コンソーシアム Health and Environmental Science Institute (HESI) の Translational Biomarkers of Neurotoxicity (NeuTox) Micro-Electrode Array (MEA) Subteam, The NeuTox Committee、および、国内製薬企業によるヒト iPS 細胞応用安全性コンソーシアム Consortium for Safety Assessment using iPS Cells, Japan (CSAHi) との協力研究を通して、hiPSC-neuron によって構成されるヒト神経回路を *on dish* で再現することに成功した。この標本では、痙攣誘発薬物の検出、さらには抗痙攣薬の薬理的検討も可能である。

さらに最近では、hiPSC-neuron と標本中の glia 細胞との間に機能的な相互作用があることも確認した。例えば、生体脳グリア細胞でシナプス機能に寄与している機能タンパク質が hiPSC-neuron 標本中のグリア細胞にも発現し、健全な神経回路伝達に重要な機能を発揮していた。このような一連のグリア細胞機能タンパク質は、より多様な神経侵襲、神経病理的变化に関わっている。従って、hiPSC-neuron によって構築された *in vitro* 薬理評価系の予測範囲が予想以上に広いことが期待される。我々の結果はヒト中枢神経系細胞を基盤とした新しいミドルスルーブット、あるいは、ハイスルーブットスクリーニング系を hiPSC-neuron 標本を用いて構築し、非臨床試験に応用できる可能性を示している。