

2017年5月30日  
AMEDシンポジウム2017  
東京国際フォーラム

## AMED成果報告⑥

# ヒトiPS細胞技術を活用した薬理試験法の 開発と国際標準化

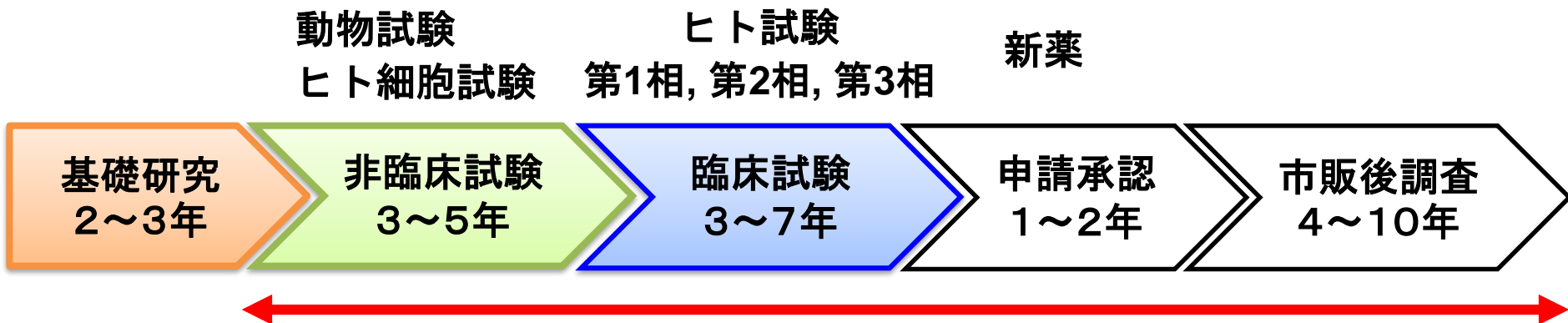
国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
薬理部  
諫田泰成

本発表は、厚生労働省の公式な見解ではありません。  
また、本研究において開示すべき利益相反はありません。

# 本日の内容

1. 創薬とレギュラトリーサイエンス
2. ヒトiPS細胞を用いた心臓安全性薬理試験法の開発と国際標準化
3. ヒトiPS細胞由来神経・肝臓細胞に関する評価系の開発
4. まとめと今後の展望

# 創薬におけるレギュラトリーサイエンス



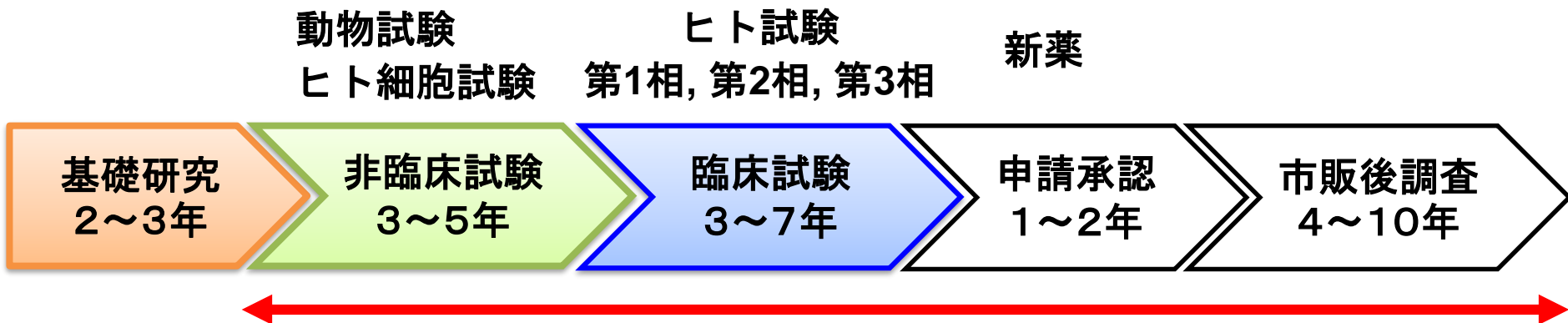
## レギュラトリーサイエンス

「医薬品等の品質・有効性・安全性を科学的知見に基づき適正かつ迅速に予測・評価・判断することに関する科学」

1987年に国立医薬品食品衛生研究所・内山充名誉所長が提唱された

健康・医療戦略推進法にも明記された(第13条第2項)。

# 創薬におけるレギュラトリーサイエンス



## ◆非臨床試験をどのように評価するか？

例) 新規評価法の確立

## ◆ヒトの安全性をどのように評価するか？

例) First-in-Humanの投与量設定

例) 副作用バイオマーカーの開発

## ◆市販後の安全性をどう担保するか？

例) 副作用報告システムの整備と利活用

# 創薬におけるレギュラトリーサイエンス

動物試験

ヒト細胞試験

ヒト試験

第1相, 第2相, 第3相

新薬

基礎研究  
2~3年

非臨床試験  
3~5年

臨床試験  
3~7年

申請承認  
1~2年

市販後調査  
4~10年



特に、新薬の開発動向をふまえ、必要となる評価法の開発と国際標準化を先導的に実施

⇒新薬開発の促進、承認審査の迅速化などに貢献

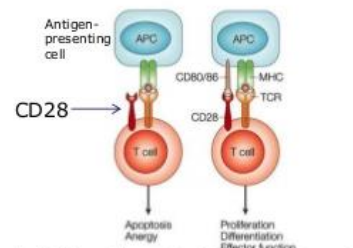


健康長寿社会の形成に貢献

# 創薬プロセスの変革の必要性

## The TGN1412 (CD28-superMAB) disaster

- Monoclonal CD28 agonistic antibody (T cell co-activator) developed as a drug for leukemia and rheumatoid arthritis
- First-in-man study in London 2006 led to catastrophic systemic multi-organ failure in six young male volunteers
- Animal studies (macaques, mice and rats) showed no adverse effects at 500x the dose used in the human phase I study



News.bbc.co.uk

## New Details Emerge About Clinical Trial Tragedy In France

Pharmaceuticals: As drug candidate's identity is confirmed, questions still remain about what went wrong

By Sarah Everts

[+Enlarge]

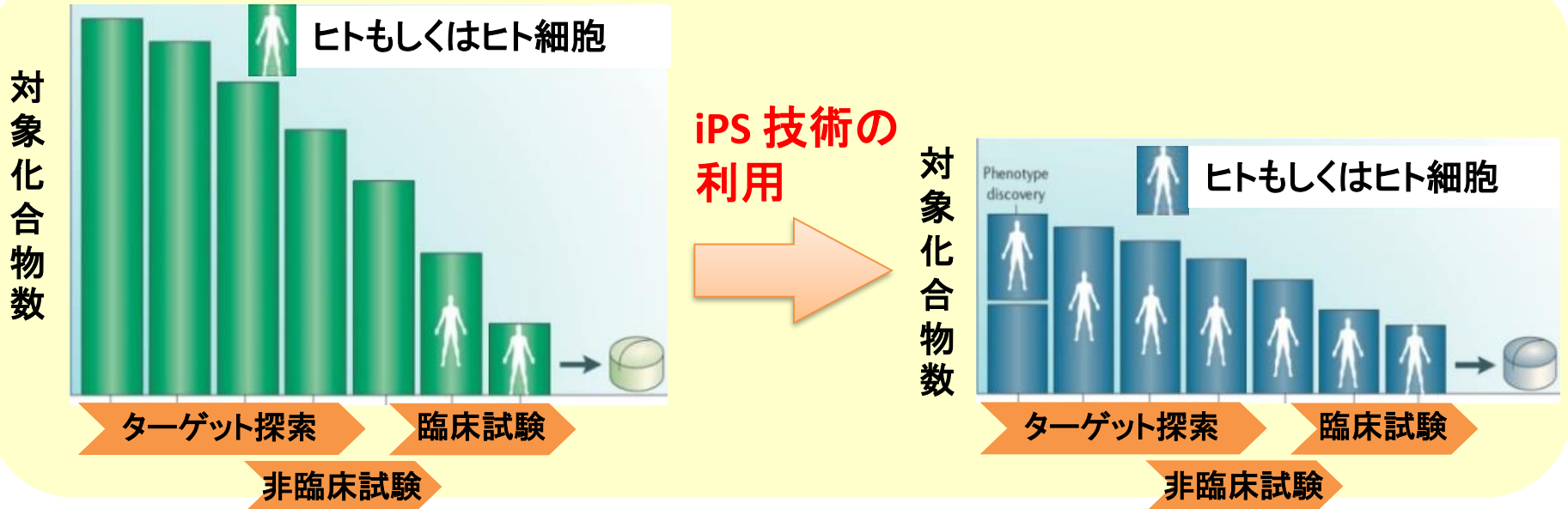


- 第1相臨床試験においてヒト特異的な重篤な有害事象が発生。
- 新たな医薬品は予期せぬ重篤な副作用が発生する可能性。
- 臨床試験において有効性が認められず中止に至る例も多い。



ヒトにおける予測性がさらに高い試験法を開発する必要がある

# 創薬プロセスへのiPS細胞技術の利用



Nat Rev Drug Discov 10, 915 (2011) 一部改

ヒトiPS細胞技術を利用する評価法は、「**ヒト試験系**」であるため、

- 予測性向上により、臨床試験の削減や被験者の安全性確保につながる。
- in vitroでメカニズムに基づく検証が可能となる。
- 医薬品の承認審査の迅速化にも貢献。

# ヒトiPS細胞を用いた薬理試験法を実現するために

標準細胞の開発

両輪

試験法の開発

出発材料

iPS細胞樹立

バンク化

試験系の再現性・信頼性等を確保できるように、適切な評価指標を選定



元となる細胞

iPS細胞

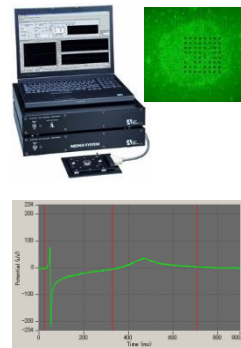
マスターセルバンク

分化誘導法の最適化

ワーキングセルバンク(継代数と品質チェック)

分化細胞

試験法の確立とシステム化



APD

Concentration

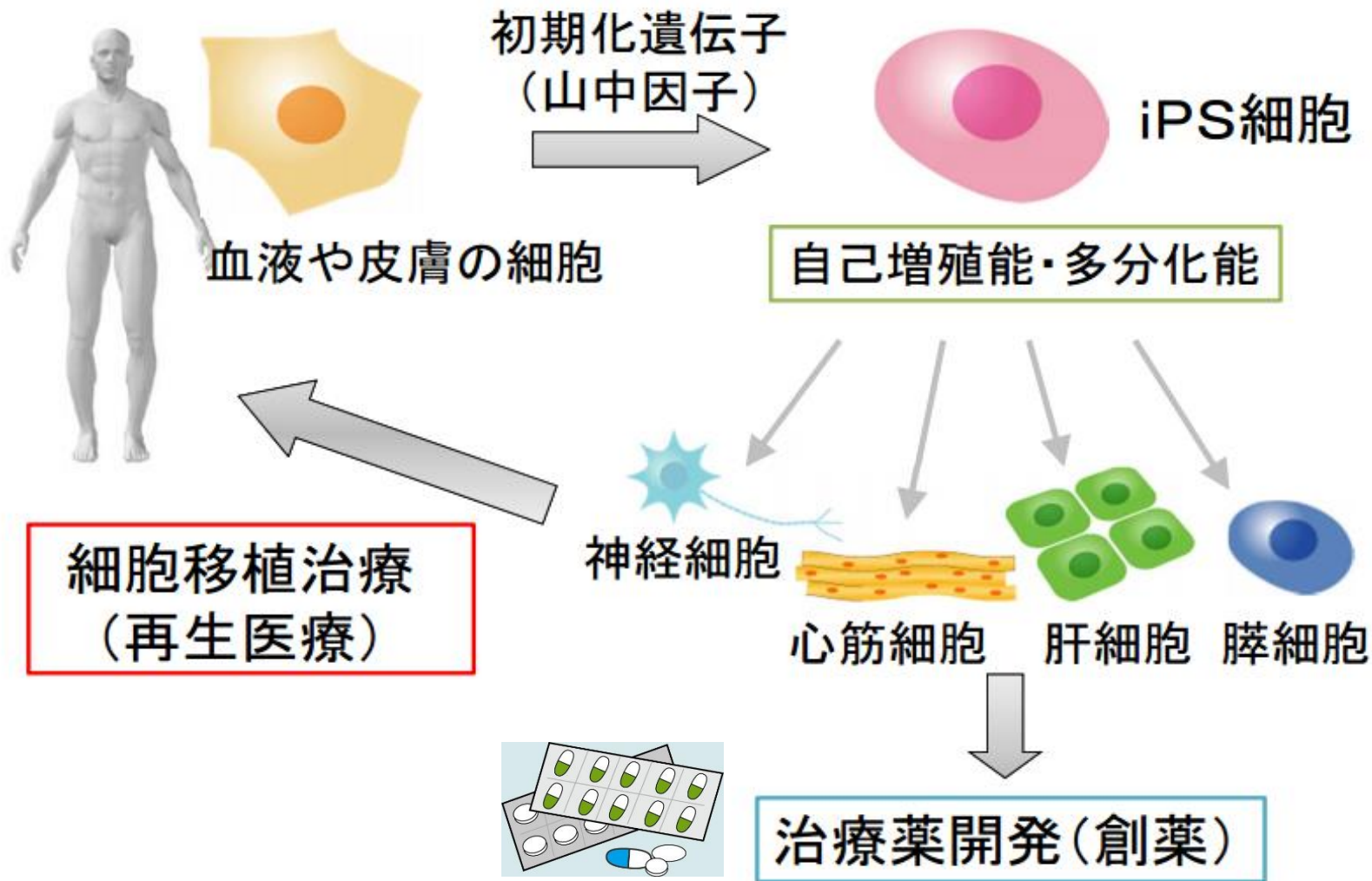
目的に適ったiPS細胞および分化細胞の整備

=目的とする分化細胞の製造工程をSOP化して、品質管理する。

薬の作用



# 求められる品質は再生医療と創薬で異なる



# 創薬におけるヒトiPS細胞由来分化細胞の規格化の問題

## 1. 分化細胞は多様性が大きい

- 元となるヒトiPS細胞株の違い
- 分化誘導法による違い
- 分化細胞は高度な精製が困難（例：心室筋、神経）

## 2. 分化細胞の性質は培養環境に依存

- 分化誘導後の培養条件の違い（例：基材）
- 基本的な培養技術が一般的な細胞株とは異なる（例：輸送・有効期間）
- 培養により均一性が低下する可能性がある（例：長期培養）
- 分化の状態が変わる可能性がある（例：長期培養）



- ✓ 従来の培養細胞製品とは異なる品質評価を設定。
- ✓ 分化細胞は変化するため、細胞からだけでなく薬理評価からも分化細胞の規格化を考える必要。

# ヒトiPS細胞の品質管理 (Good Cell Culture Practice)

## <基本的な考え方>

1. 出発材料、中間製品の品質管理
2. 製造工程のトレーサビリティの検証(一定性の維持管理)
3. 分化細胞の規格・試験法の設定(目的に応じて)



## t4 workshop report\*

### Good Cell Culture Practice for Stem Cells and Stem-Cell-Derived Models

*David Pamies<sup>1</sup>, Anna Bal-Price<sup>2</sup>, Anton Simeonov<sup>3</sup>, Danilo Tagle<sup>3</sup>, Dave Allen<sup>4</sup>, David Gerhold<sup>3</sup>, Dezhong Yin<sup>5</sup>, Francesca Pistollato<sup>2</sup>, Takashi Imutsuka<sup>6</sup>, Kristie Sullivan<sup>7</sup>, Glyn Stacey<sup>8</sup>, Harry Salem<sup>9</sup>, Marcel Leist<sup>10</sup>, Mardas Daneshian<sup>10</sup>, Mohan C. Vemuri<sup>11</sup>, Richard McFarland<sup>12</sup>, Sandra Coecke<sup>2</sup>, Suzanne C. Fitzpatrick<sup>12</sup>, Uma Lakshmipathy<sup>11</sup>, Amanda Mack<sup>13</sup>, Wen Bo Wang<sup>13</sup>, Daiju Yamazaki<sup>14</sup>, Yuko Sekino<sup>14</sup>, Yasunari Kanda<sup>14</sup>, Lena Smirnova<sup>1</sup> and Thomas Hartung<sup>1,10</sup>* (ALTEX, 2017)

iPS細胞を用いた試験法の再現性・信頼性の確保に向けて留意すべき点を、「ヒトiPS細胞のGCCP」として日米EUの国際チームでまとめた。

# 研究戦略

## ◆ 評価法の開発・標準化

- 再現性を左右する種々の要因を調べ、医薬品の安全性評価法に使う分化細胞の細胞特性を規格化する。
- いち早く**安全性薬理に適した実験方法**を選び、次世代評価法プロトコルを開発する。
- 多施設において**多くの化合物データを収集**して、偽陽性・偽陰性の程度を検証する。
- 化合物データと**臨床データを照合**して、**リスク予測性を評価**する。

## ◆ 国際協調

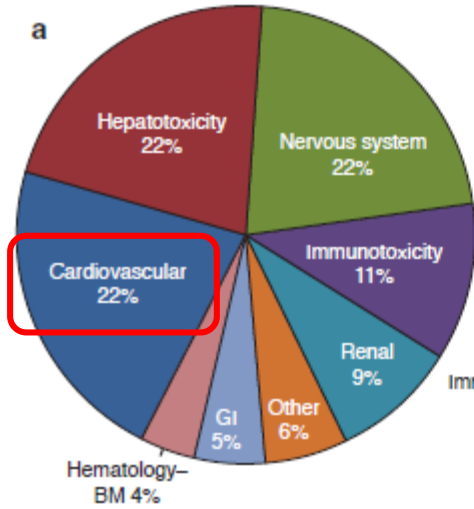
- 実験プロトコルを利用した論文を発表し、海外での利用を促進する。
- **海外のメンバーと実験プロトコルと化合物を共有**して、**プレバリデーション**する。
- 国際検証実験チームを結成して、国際標準化を達成する。

例) NPO法人あるいは国際学会で 国際チームを結成する  
(脱ガラパゴス)

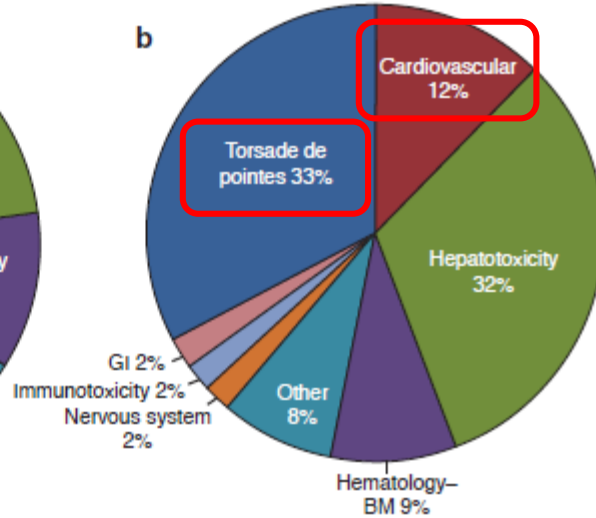


# 医薬品による心毒性

## 医薬品による有害作用



## 医薬品の市場撤退理由



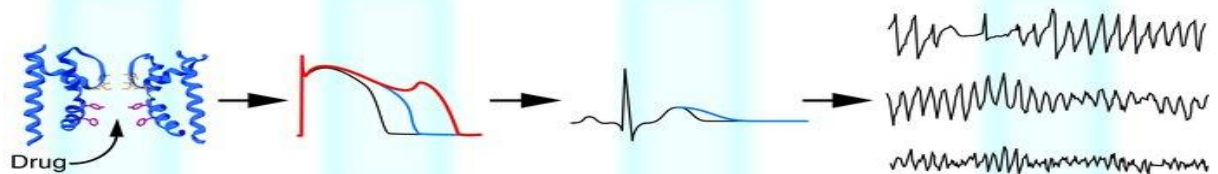
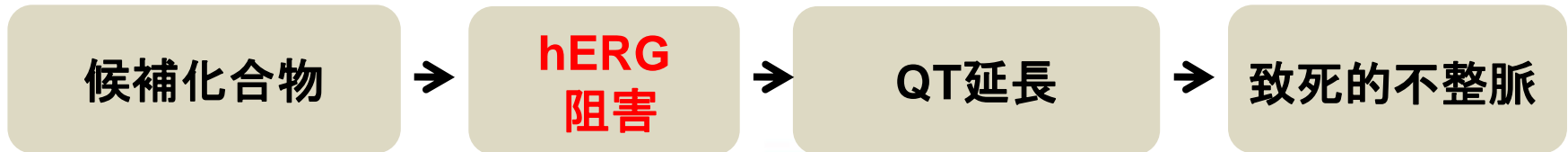
Clinical pharmacology & Therapeutics (2011)

## 心毒性のため市場撤退した非循環系作用薬

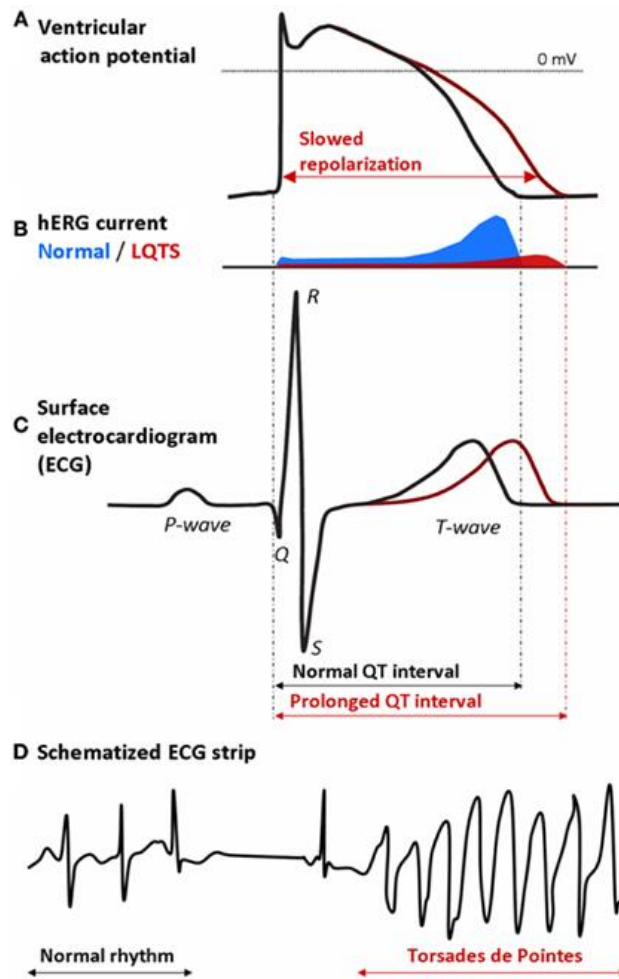
- Terodili 1991年 泌尿器
- Terfenadine 1998年 抗ヒスタミン剤
- Sertindole 1998年 抗精神病薬
- Astemizole 1999年 抗ヒスタミン剤
- Grepafloxacin 1999年 抗生物質
- Cisapride 2000年 消化管
- Droperidol 2001年 抗精神病薬
- Levacetylmethadol 2001年 鎮痛薬

など

## ICH S7B ガイドライン(hERG試験法)



# hERG試験の課題およびiPS心筋細胞の利点



(CiPA のHPより)

## 現状の課題

- ・QT延長作用のある薬剤が必ずTdPを誘発するわけではない
- ・hERGチャンネル阻害試験の偽陽性が多い

より正確に薬剤の催不整脈作用を予測できる試験系が望まれている。  
(マルチイオンチャンネルなど)

ヒトiPS細胞由来心筋細胞の利用が有用である。

# 産官学のオールジャパン体制 (JiCSA)

ICH  
ガイドライン  
S7B 改訂

国立医薬品食品  
衛生研究所 (NIHS)

iPSコンソーシアムCSAHi  
(製薬企業, CRO, 協賛企業)

厚生労働省  
(MHLW) /  
PMDA

AMED研究費



日本安全性薬理  
研究会 (JSPS)

大学・企業の  
アドバイザー

JiCSA: Japan iPS Cardiac Safety Assessment



CiPA Initiative (USA)

HESI / FDA / CSRC / PHARMA / Academia  
/EMA/Health Canada/Japan NIHS & PMDA

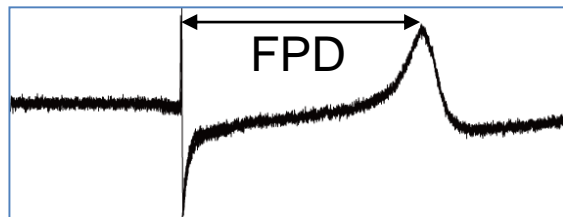
CiPA: Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay

HESI: Health and Environmental Science Institute

# 多点電極システムによる薬理評価

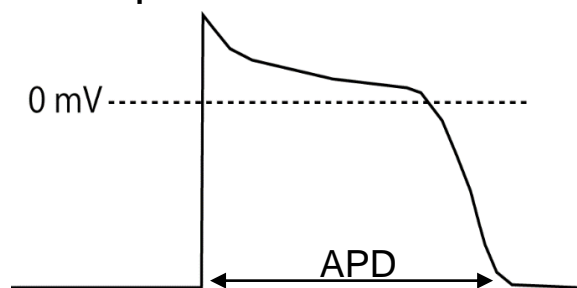
細胞外電位

Field potential



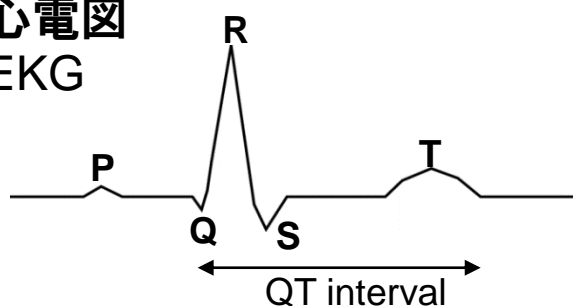
活動電位

Action potential



心電図

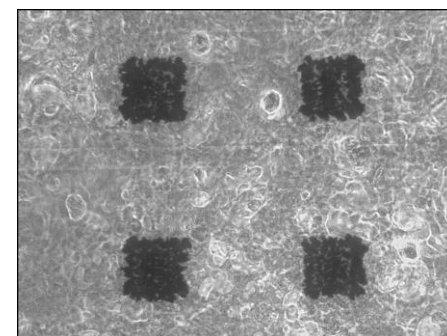
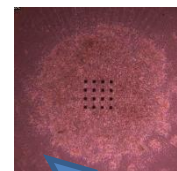
EKG



MEAシステム

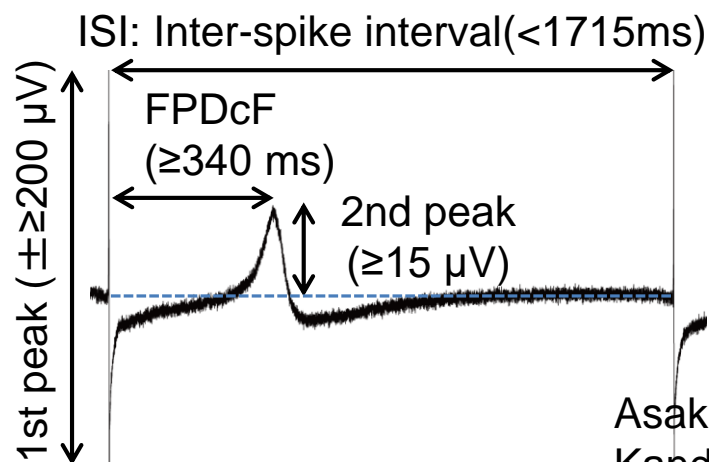


ヒトiPS心筋シート



個々の細胞の活動電位のばらつきを補正するため、心筋シートを採用

採用波形の基準

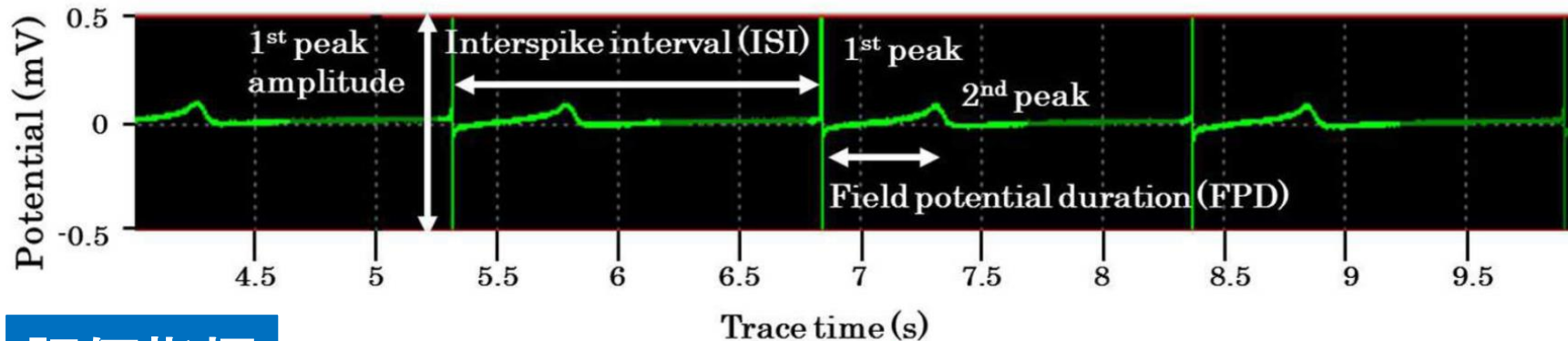


Asakura et al, *JPTM*, 2015  
Kanda et al, *JPTM*, 2016



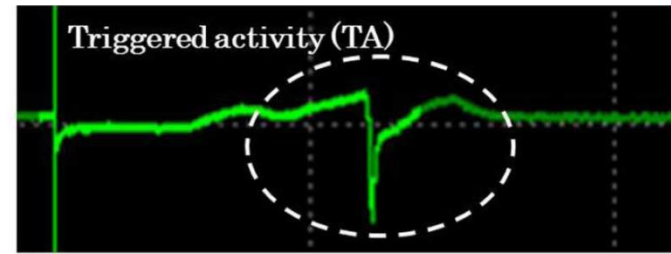
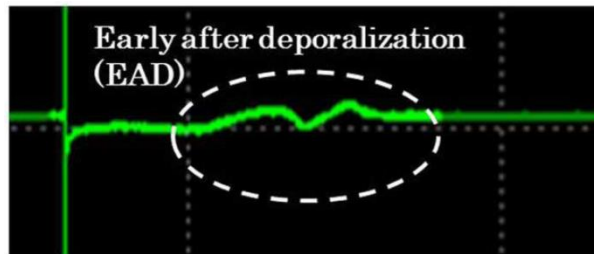
# 多点電極システムによる評価指標の決定

## 細胞外電位の波形



## 評価指標

EAD: **E**arly **A**fter **D**epolarization TA: **T**riggered **A**ctivity



Yamamoto et al, *PLoS ONE*, 2016

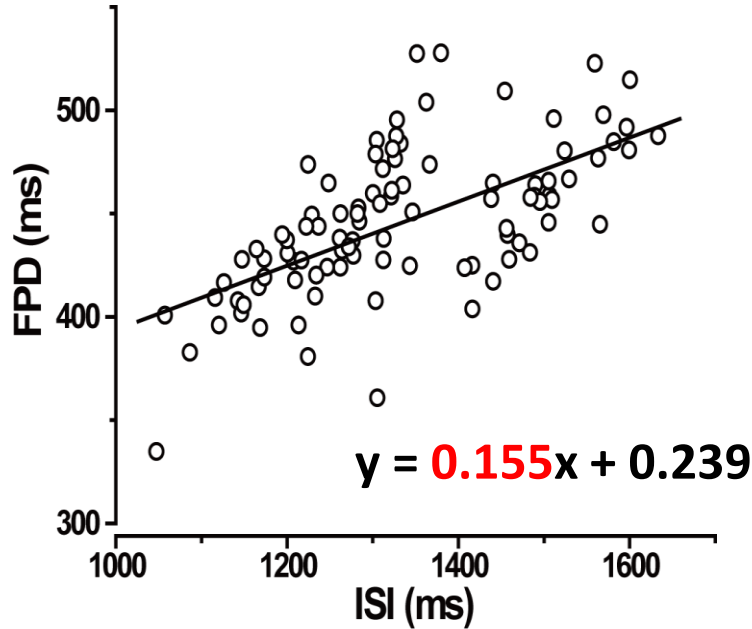
iPS心筋でTdP発生の原因の一つであるEAD/TAを評価できることを見出した。  
従来のhERG試験では評価できないことから新たな試験法が期待される

# 臨床における心電図とiPS心筋の比較

	心電図	iPS心筋(MEA評価)
hERG阻害による再分極遅延	QT/QTc 延長	FPD 延長
QT間隔の補正	QTcf, QTcb, Framingham など	FPDcf
拍動の不安定性 (Beat-to-beat Variability of QT)	QT間隔のSTV (short term variability) 増加	FPDのSTV増加
Early afterdepolarization (EAD)	T波などの変化	FP波形の変化
QT-RRの関係	QT-RRの正の相関	?
頻度依存性	hERG阻害による逆頻度依存性	?
リスク評価	カテゴリ解析による評価	?

臨床データとの比較を念頭に置いて、多施設間で評価する項目を選択

# ヒト iPS 心筋細胞はヒト心電図データを反映する



ISI: 拍動間隔(心電図におけるRR間隔)、  
FPD: 心電図におけるQT間隔

(Yamamoto et al, *PLoS ONE*, 2016)

$$QT_{LC} = QT + 0.154 (1-RR)$$

Framingham Heart Study

心疾患リスク因子の解明を  
目的とした大規模住民研究  
(n=5018)

Sagie A., et al. *AJC* 70; 797-801  
(1992).

多施設によって得られたヒトiPS心筋のFPD-ISIの関係は、ヒト心臓におけるQT-RR関係に類似していた。

## ヒトiPS由来の心筋細胞 薬の毒性評価に有用

国立医薬品  
食品衛生研

国立医薬品食品衛生研を事前に調べる研究に、確認した。細胞の拍動や  
研究所の関野祐子薬理部長 ヒトiPS細胞から作っ 薬剤に対する反応など  
らは新薬候補物質の毒性 た心臓の細胞が有用だと が、約5000人の心電

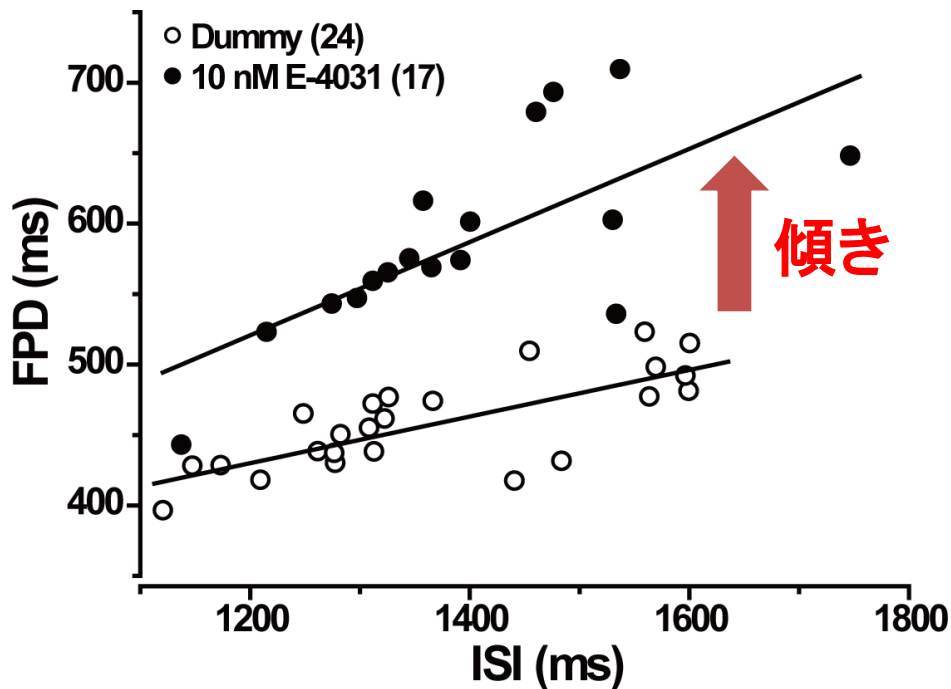
図から得られた特性と  
ほぼ一致した。新薬開  
発の効率化やコスト低  
減などに役立つ成果で、  
米オンライン科学誌プロ  
スワンに7日掲載され  
る。  
新薬候補は人に投与し  
た際に致死性の不整脈な  
が、創薬の成功率も  
減る。創薬の成功率も  
得られたデータとほぼ一

を起さないか、事前  
に詳しく調べる必要があ  
る。現在は動物実験など  
で調べている物質の毒性  
をiPS細胞を使ってよ  
り正確に確認できれば、  
臨床試験などに進んでか  
ら開発を中止するケース  
結果、米国で心電図から

研究チームはヒトiP  
S細胞から心筋細胞を作  
り、拍動や電気的な活動  
、薬剤を振りかけた際の変  
化などを観察した。その

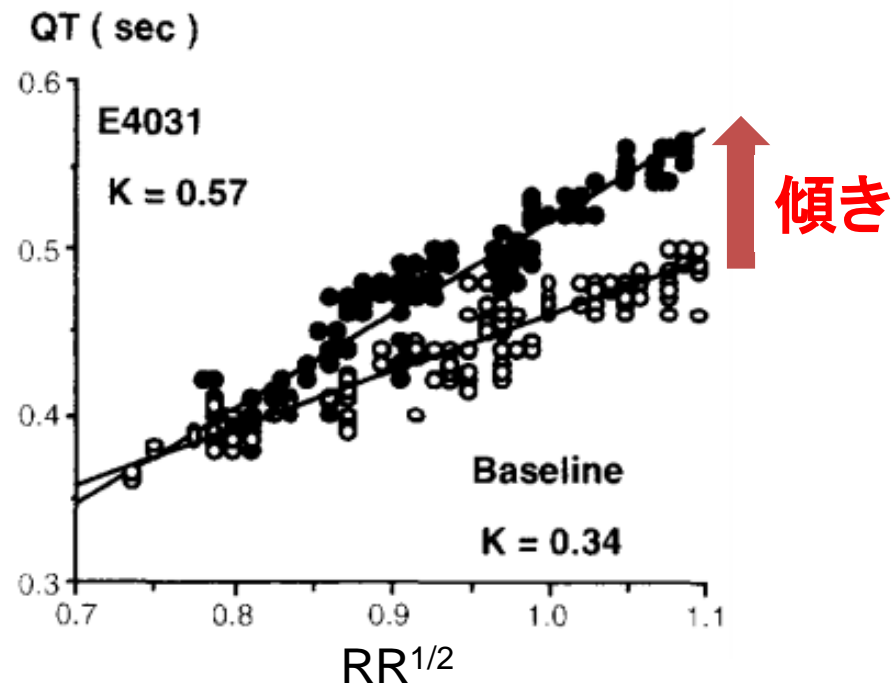
# 心拍/QT間隔の相関に対するhERG阻害剤E-4031の影響

## iPS心筋のデータ



Yamamoto et al, *PLoS ONE*, 2016

## ヒト心筋のデータ



*JACC* 27:84-9 (1996).

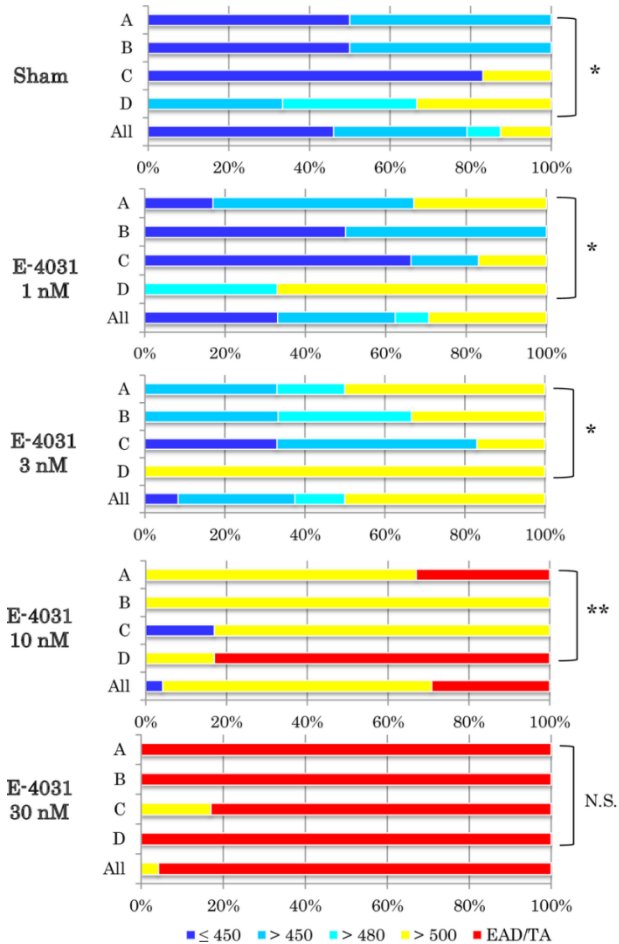
**Cisaprideにおいても同様の結果が得られた。**



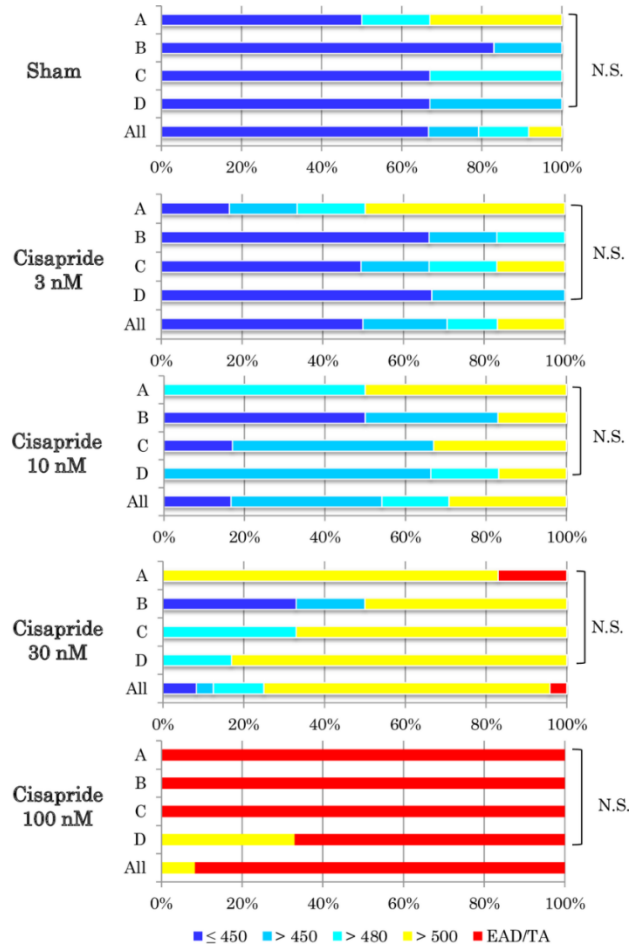
ヒトiPS心筋はヒト心臓に似た薬理作用を示すことから、薬理評価への応用が可能であることが示唆された。

# 多施設間データを用いたカテゴリー解析

## E-4031



## Cisapride



### FPDの値



FPDの値が500msecを超えるとEADの発生頻度が増大

# 大規模検証試験（60化合物の評価）

Ajmaline	Diphenhydramine	Levocetirizine	Quinine sulfate
Amiodarone	Disopyramide	Loratadine	Ranolazine
Amitriptyline	Dofetilide	Metoprolol	Risperidone
Aspirin	Dolasetron	Mexiletine	Sematilide
Astemizole	Domperidone	Mibefradil	Sertindole
Bepridil	Dronedarone	Moxifloxacin	Sparfloxacin
Chlorpheniramine	Droperidol	Nifedipine	Tamoxifen
Chlorpromazine	E-4031	Nilotinib	Terfenadine
Chromanol 293B	Erythromycin IV	Nitrendipine	Terodiline
Cilostazole	Famotidine	Ondansetron	Thioridazine
Cisapride	Flecainide	Paliperidone	Tolterodine
Clarithromycin	Gatifloxacin	Pimozide	Vandetanib
Clozapine	Haloperidol	Prenylamine	Verapamil
D,L-sotalol	Ibutilide	Procainamide	Ziprasidone
Diltiazem	JNJ303	Quinidine	DMSO

赤字: 循環系作用薬、黒字: 非循環系作用薬

TdPリスクの異なる60化合物を選択し、大規模検証試験を実施した。

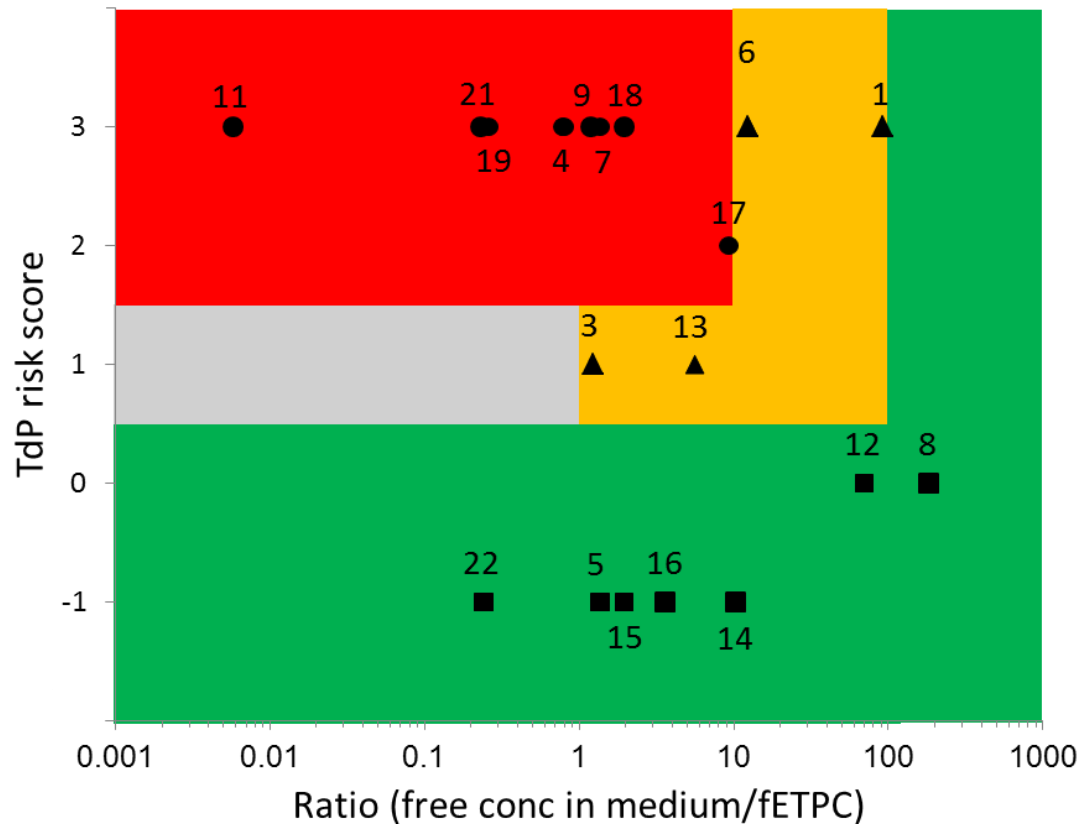
# TdPリスクのスコアリング方法を検討

## FPDcFの延長とEADの発生

Score	-1	0	1	2	3
FPDc change	<-10%	No change	$\geq 10\%$ , <30%*	$\geq 30\%^*$	-
EAD	-	-	-	-	+

Compound	Concentration ( $\mu\text{M}$ )						Score
	1	3	10	30	100	-	
Aspirin	1	3	10	30	100	-	0
Astemizole	0.0001	0.0003	0.001	0.003 (14%)	0.01 (26%)	0.03 [EAD 5/6]	3
Cisapride	0.003	0.01	0.03 (13%)	0.1 [EAD 6/6]	-	-	3
Diphenhydramine	0.1	0.3	1 (12%)	3 (21%)	10 (109%)	-	1
Dofetilide	0.0001	0.0003	0.001 (21%)	0.003 [EAD 6/6]	-	-	3
Moxifloxacin	3	10	30 (16%)	100 (46%)	300 (2nd peak flat)	-	2
Nifedipine	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1 (-33%)	-	-1
Verapamil	0.01	0.03	0.1 (-33%)	0.3 (-52%)	1 (-67%)	-	-1

# 2D マップによるTdPリスクカテゴリー化 〈循環作用薬〉



## High risk

4. D,L-sotalol
7. Dofetilide
9. E-4031
11. Ibutilide
17. Prenylamine
18. Procainamide
19. Quinidine
21. Sematilide

## Intermediate risk

1. Ajmaline
3. Bepridil
6. Disopyramide
13. Mexiletine

## Low risk

5. Diltiazem
8. Dronedarone
12. Metoprolol
14. Mibefradil
15. Nifedipine
16. Nitrendipine
22. Verapamil

## Arrest

### CV related drugs

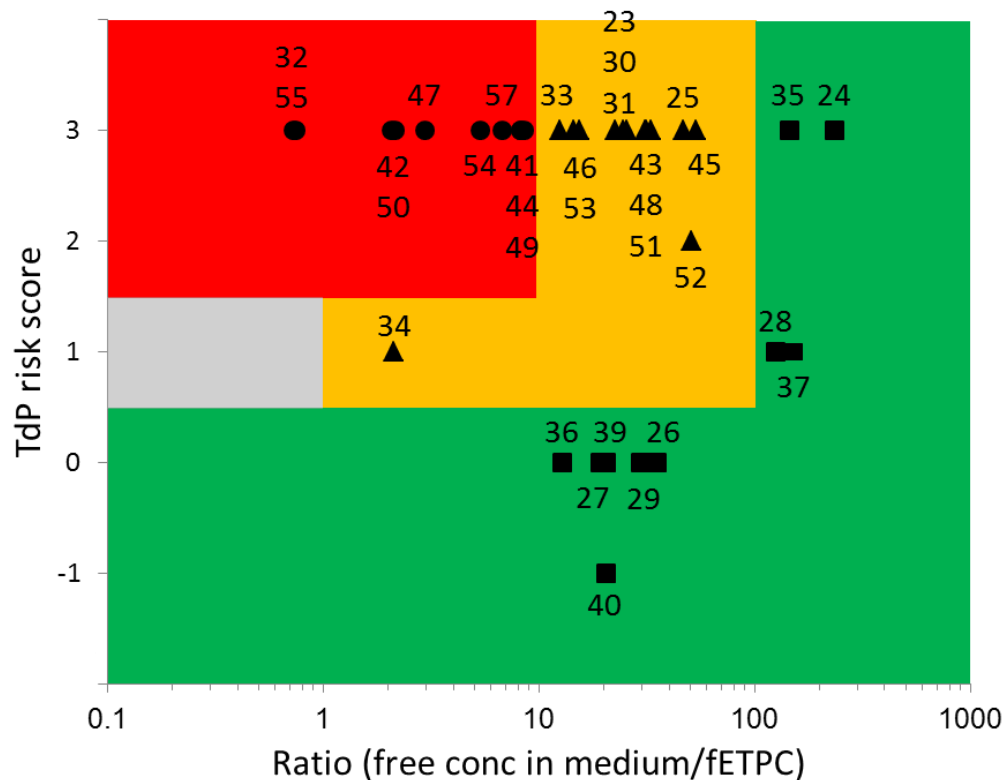
2. Amiodarone
10. Flecainide
20. Ranolazine

### Non-CV drugs

38. Amitriptylin
56. Tamoxifen



# 2D マップによるTdPリスクカテゴリー化 〈非循環作用薬〉



## High risk

- 32. Domperidone
- 41. Droperidol
- 42. Haloperidol
- 44. Pimozide
- 47. Thioridazine
- 49. Clarithromycin
- 50. Erythromycin
- 54. Quinine sulfate
- 55. Nilotinib
- 57. Vandetanib

## Low risk

- 24. Chlorpheniramine
- 26. Levocetirizine
- 27. Loratadine
- 28. Terfenadine
- 29. Famotidine
- 35. Tolterodine
- 36. Aspirin
- 37. Cilostazole
- 39. Chlorpromazine
- 40. Clozapine

## Intermediate risk

- 23. Astemizol
- 25. Diphenhydramine
- 30. Cisapride
- 31. Dolasetrone
- 33. Ondansetrone
- 34. Terodiline
- 43. Paliperidone
- 45. Risperidone
- 46. Sertindole
- 48. Ziprasidone
- 51. Gatifloxacin
- 52. Moxifloxacin
- 53. Sparfloxacin

# TdPの公的データベース



A Trusted Partner Providing  
Reliable Information On Medicines

FOR EVERYONE

FOR HEALTHCARE PROVIDERS

FOR RESEARCH SCIENTISTS

Check regularly for updates to the QT Drugs List!

CredibleMeds > QTDrugs Lists (registration required)

Print Share RSS Donate

## Select Medicines of Interest







### AVAILABLE TDP RISK CATEGORIES

You can select multiple categories.

-  Known Risk of TdP [more info](#)
-  Possible Risk of TdP [more info](#)
-  Conditional Risk of TdP [more info](#)
-  Drugs to Avoid in Congenital Long QT [more info](#)



### SELECTED TDP RISK CATEGORIES

-  Known Risk of TdP [Remove](#) 
-  Possible Risk of TdP [Remove](#) 
-  Conditional Risk of TdP [Remove](#) 

# 臨床データとの比較による試験法の評価

	CredibleMeds Known risk of TdP+	others	
High Risk	True Positive	False Positive	
Low Risk	False Negative	True Negative	
	感度 TP/(TP+FN)	特異度 TN/(TN+FP)	精確性 (TP+TN)/Total

	CredibleMeds Known risk of TdP+	others	
High Risk	17	2	
Low Risk	4	13	Ando et al., JPTM (2017)
	81%	87%	83%

臨床データベースと照合することにより、ヒトでの予測性を検証



既存のhERG試験法よりも高いTdPリスク予測性を示した。

**新薬候補の安全性  
iPS細胞で評価**  
国立衛生研など

国立医薬品食品衛生研究所やエーザイ、小野薬品工業などは、人間のiPS細胞から作った心筋細胞を使うことで、新薬の候補となる物質の安全性を正確に評価できることを確かめた。60種類の既存の化学物質で試し、80%以上が臨床試験（治療）の結果と一致した。

現在の手法よりも精度が高く、新薬開発の効率化に役立つとみている。新薬候補は人に投与したときに、致死性の不整脈などを起こさないか、事前に調べる必要がある。新たな安全性評価法として普及を目指す。

iPS細胞から作った心筋細胞に様々な濃度の化学物質をふりかけ、電気信号などの変化を観察した。心臓への悪影響を点数で評価した。19種類を高くリスク、17種類を低リスクと判定し、治療結果と比べたところ、精度は80%を上回った。

現在は心筋細胞とは別の人の細胞を使って評価しているが、精度は70%程度にとどまるといふ。

(日本経済新聞 平成29年1月23日)

# 米国コンソーシアムCiPAとの国際協調

The objective of the CIPA initiative is to facilitate the adoption of a new paradigm for assessment of clinical potential of TdP that is not measured exclusively by potency of hERG block and not at all by QT prolongation. The new CIPA paradigm will be driven by a suite of mechanistically based in vitro assays coupled to in silico reconstructions of cellular cardiac electrophysiologic activity, with verification of completeness through comparison of predicted and observed responses in human-derived cardiac myocytes. It is envisioned that the CIPA initiative will ultimately require the modification or replacement of the existing ICH S7a/b guidelines and elimination of E14 guidelines, although progress can be made in the short term under the existing regulatory construct. [Read more about the proposal.](#)

## CIPA Partners:

US FDA, HESI, CSRC, SPS, EMA, Health Canada, Japan NIHS, PMDA



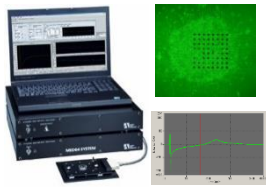
日本から実験プロトコルを提案して、共通の化合物とMEAプロトコルのもと検証試験を実施することにより、国際標準化を推進した。

# ヒトiPS心筋細胞を用いた薬理試験法の開発 — 多施設間バリデーションと国際協調 —

産官学オールジャパン体制で、ヒトiPS心筋細胞シートで細胞外電位を多点電極システム (MEA) により記録する方法を標準化した。さらに、FDAを中心とする国際コンソーシアム (CiPA) とプロトコルおよび薬剤データを共有して、国際的な検証が可能となった。

## MEAプロトコルの標準化

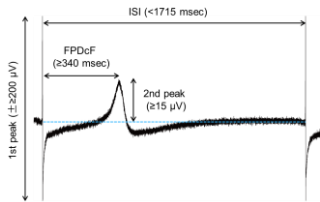
### MEAプロトコルの作製



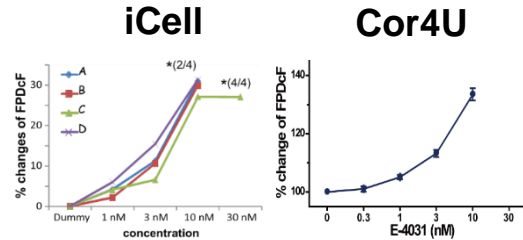
JPS Common protocol for MEA (MED, MCS) experiment	
Cell and well preparation before plating on MEA probe - cell supplier recommendation	
Continuation of recording on probe and culture: Recommendation: 2000-2500 cells/well, 3-4 days	
Conditions of MEA recording: 36-37 °C, adjust the temperature by measuring a substance (see above) the electrical probe filled with media. Calibration should be checked at least once and recorded at least once every month.	
Measurement: Baseline stability: monitoring for ca. 30 min Compound addition: cumulative, 10-20 min for each conc. High conc: 10 nM, Low conc: 0.1 nM	
Analysis: Field potential signal, EFL, Field potential duration, EAP via E-4031, Action potential signal	
Consent for EFL, Fluorescence, Heart, Cytosine, Individual	

心筋シートを利用

### 波形基準の設定



### 株間差の検証



(Kanda, et al. *JPTM*, 2016)  
(諫田ら、RS学会誌、2016)

## 国内の大規模検証試験

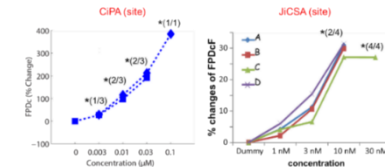
- ヒト iPS 心筋細胞とヒト心電図データの比較
  - 臨床データとの比較による試験法の評価
- (*JPTM*, 2015; *PLoS ONE*, 2016; *JPTM*, 2017)

## FDA等によるCiPAと連携



- CiPA 運営委員として参加
- 電話 & 対面会議によりプロトコル・予備データの共有や国際検証の議論に貢献

E-4031

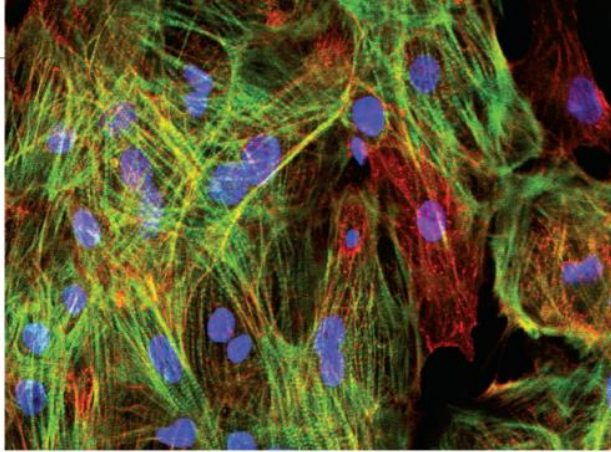


国際協調



国際検証試験に発展

# 国際検証試験



DRUG DEVELOPMENT

## *A painstaking overhaul for cardiac safety testing*

New methods may better predict arrhythmia risk in vitro

The CiPA initiative, a partnership between FDA and several agencies and consortia, including Health Canada, the European Medicines Agency, and Japan's National Institute of Health Sciences, is an attempt to do just that. One group within CiPA is investigating seven channels (including *hERG*) known to regulate heart rhythm to find which combination of channel-blocking tests might best predict safety. A second team is refining a computer

Servick K. **Science** 353:976-7 (2016)

## 国際検証試験のコアチーム

Site	Platform 1	Platform 2	Cell type 1	Cell Type 2
BMS	Axion	MCS	CDI icell <sup>2</sup>	Axiogenesis Cor.4U
Janssen-JNJ	Axion	MCS	CDI icell <sup>2</sup>	Axiogenesis Cor.4U
Merck	Acea		CDI icell <sup>2</sup>	Axiogenesis Cor.4U
Clyde	VSO		CDI icell <sup>2</sup>	Axiogenesis Cor.4U
Q-state	VSO		CDI icell <sup>2</sup>	Axiogenesis Cor.4U
Vala	VSO		CDI icell <sup>2</sup>	Axiogenesis Cor.4U
<b>JiCSA*</b>	AlphaMed	Axion	CDI icell <sup>2</sup>	Axiogenesis Cor.4U
NCI	Blinded compound preparation and shipment			

Table 1. Core Team study sites

- コード化したCiPA/JiCSA共通の28化合物を用いて、CiPA Stem Cell Myocyteグループの国際検証試験に参加。
- 2017年4月に対面会議を行い、引き続きデータを解析中。

# ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた 試験法に関して考慮すべきポイント

## ヒトiPS細胞由来心筋細胞の大規模データ

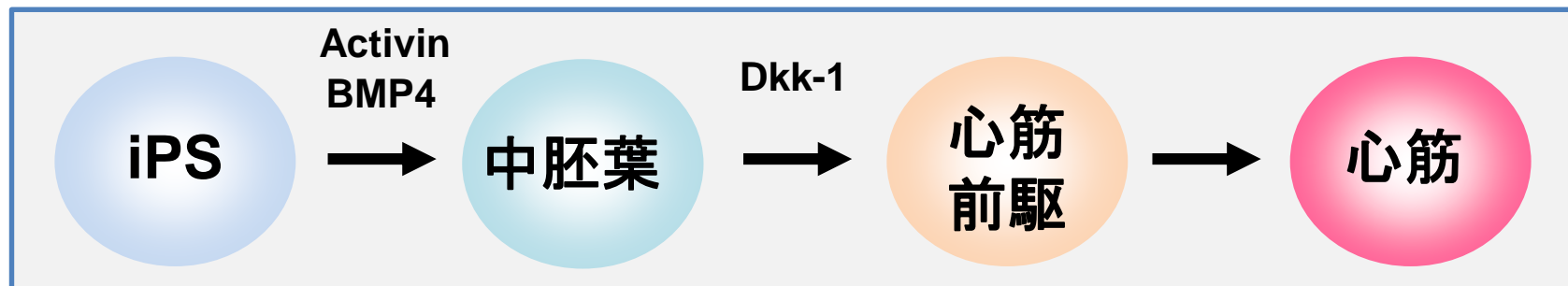


○ヒトiPS細胞由来心筋細胞の未成熟性は？

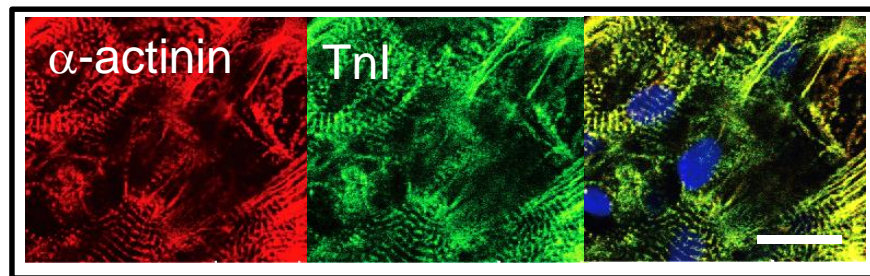
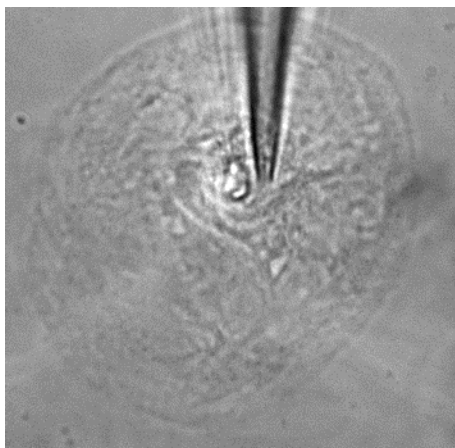
○メカニズムベースに薬理作用を理解あるいは臨床を  
予測するためには？

○抗癌剤など革新的医薬品による心毒性評価は？

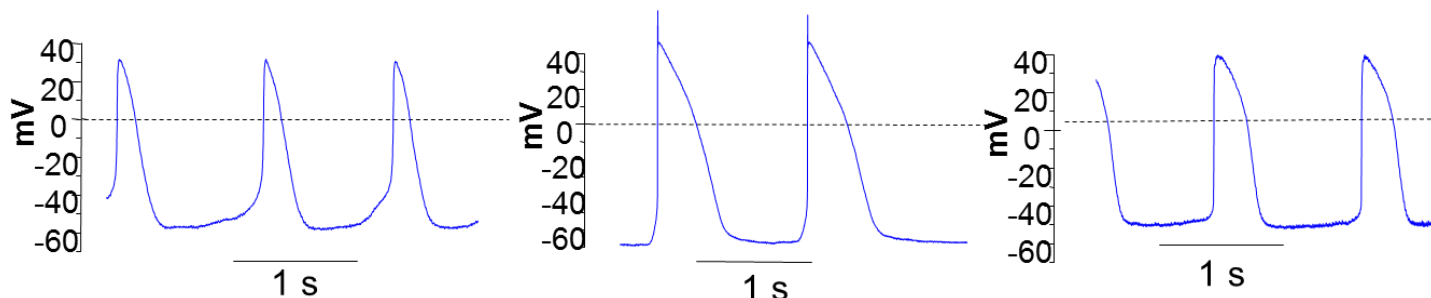
# iPS心筋細胞の電気生理学的特性



## パッチクランプによる解析



京大樹立  
201B7株

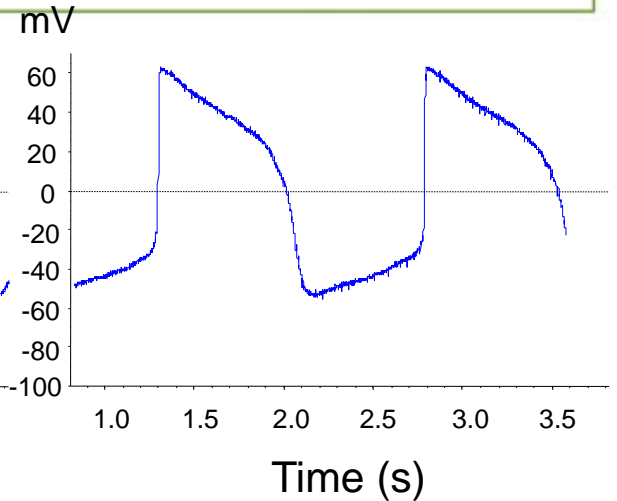
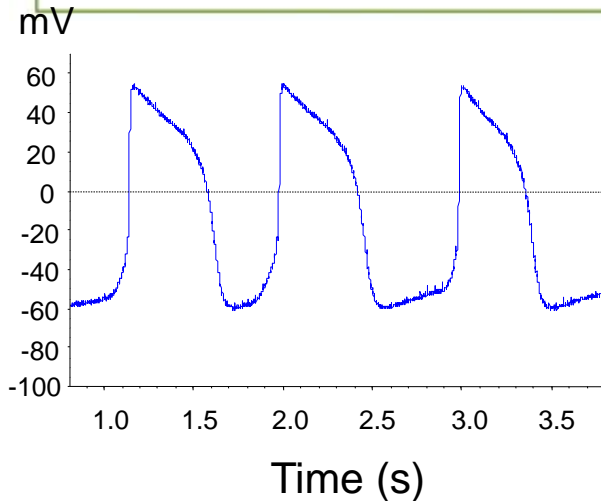
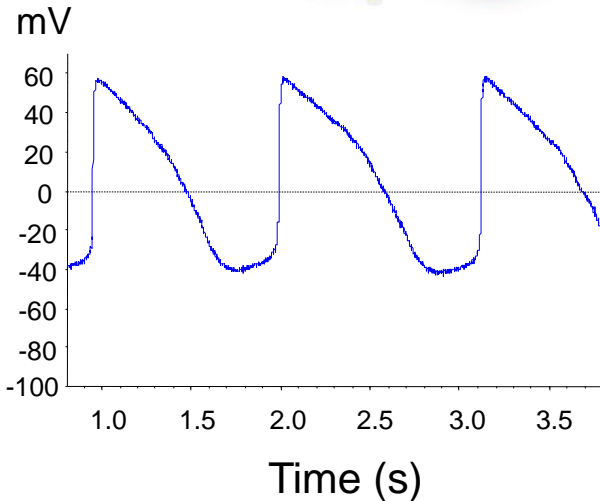
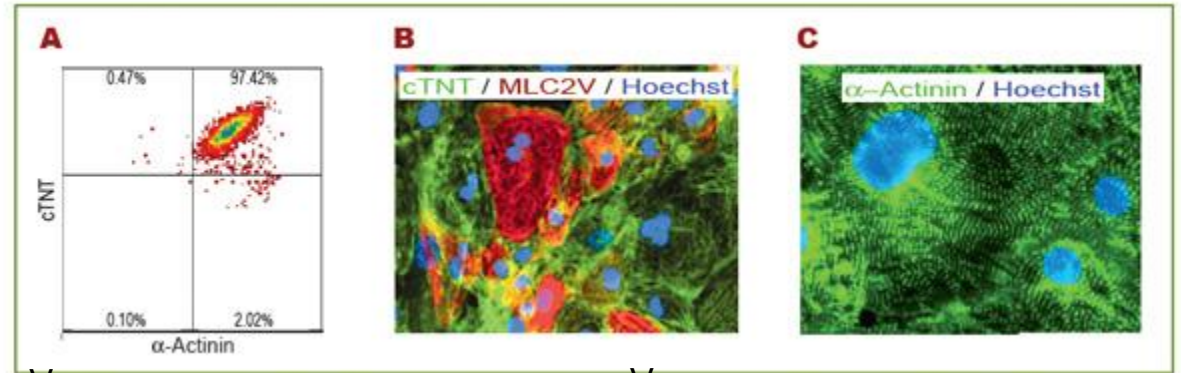


(静岡県立大学・黒川先生との共同研究)



# iCell心筋細胞の活動電位

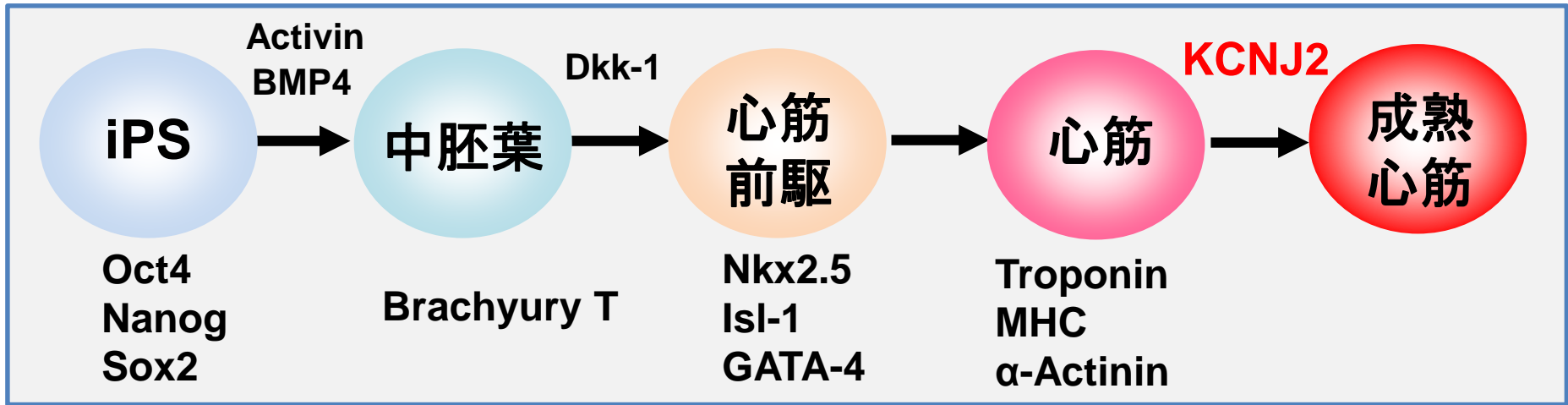
CDI



(静岡県立大学・黒川先生との共同研究)

もとの株に関わらず、未成熟な電気生理学特性を示す

# KCNJ2遺伝子によるiPS心筋細胞の成熟化



pAd-GFP



pAd-KCNJ2-GFP

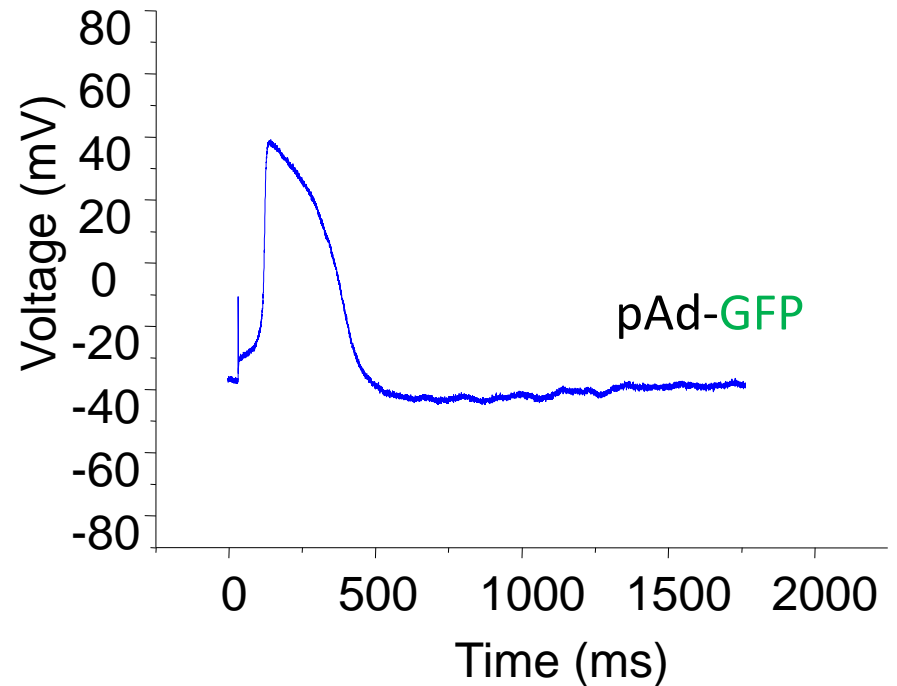
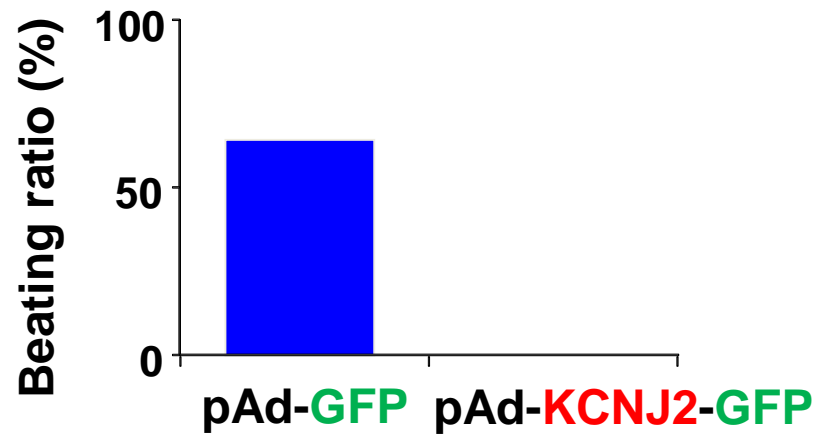


# 活動電位に対するKCNJ2遺伝子の影響

pAd-GFP



pAd-KCNJ2-GFP

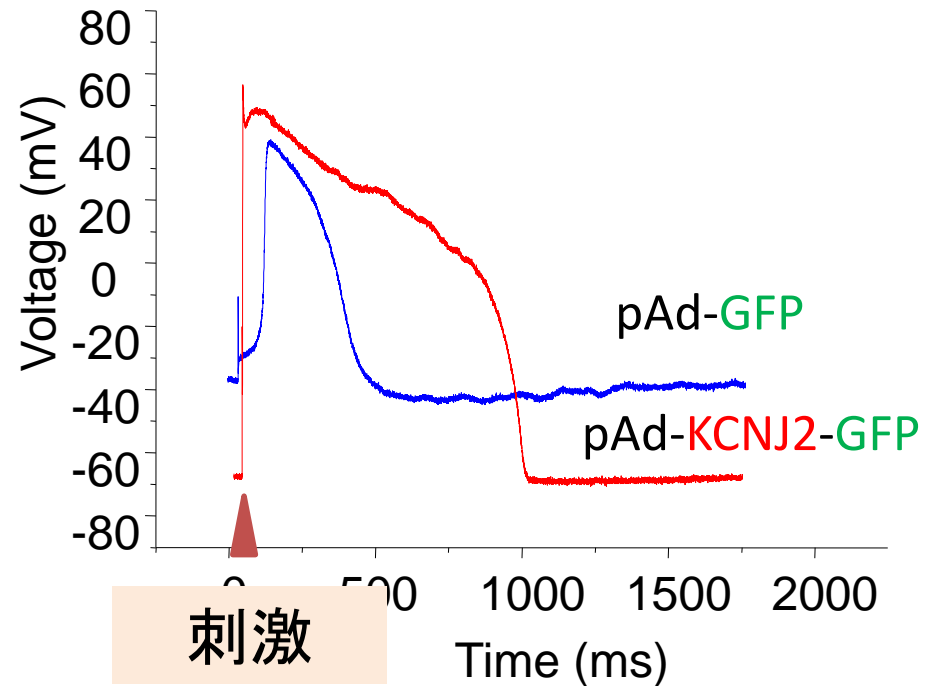
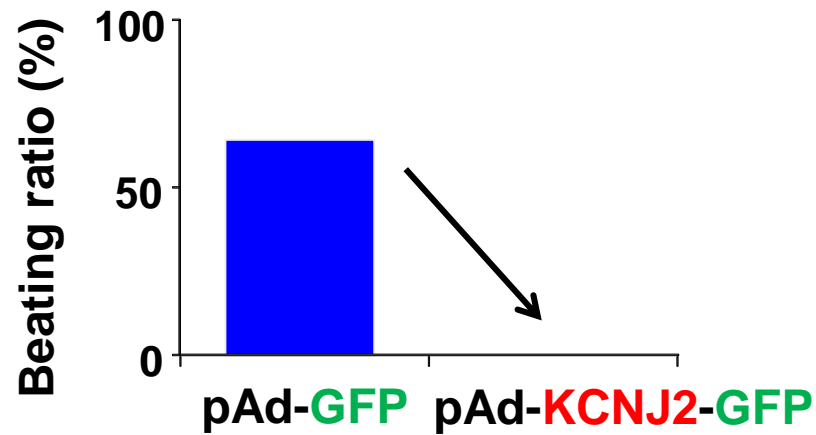


# 活動電位に対するKCNJ2遺伝子の影響

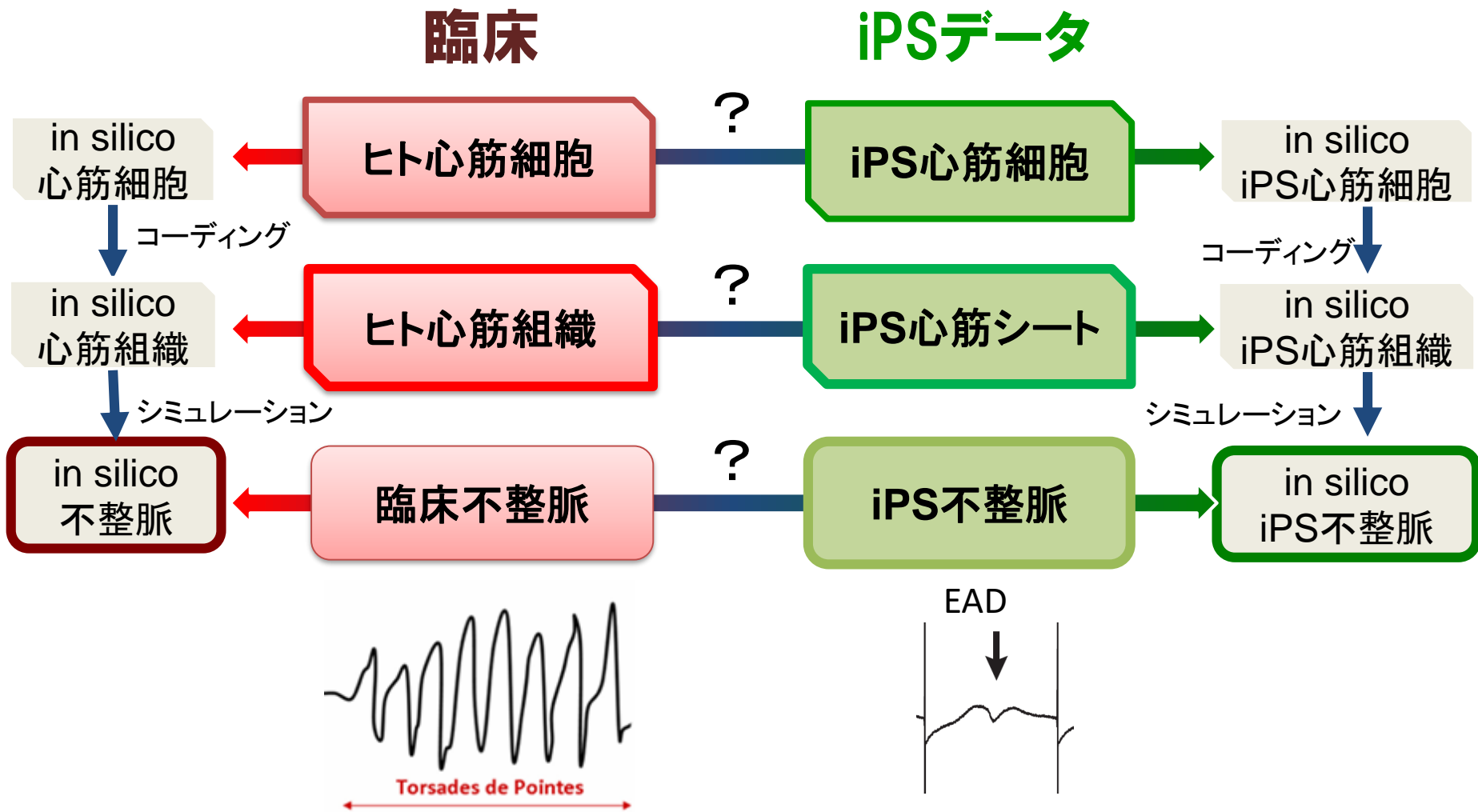
pAd-GFP



pAd-KCNJ2-GFP

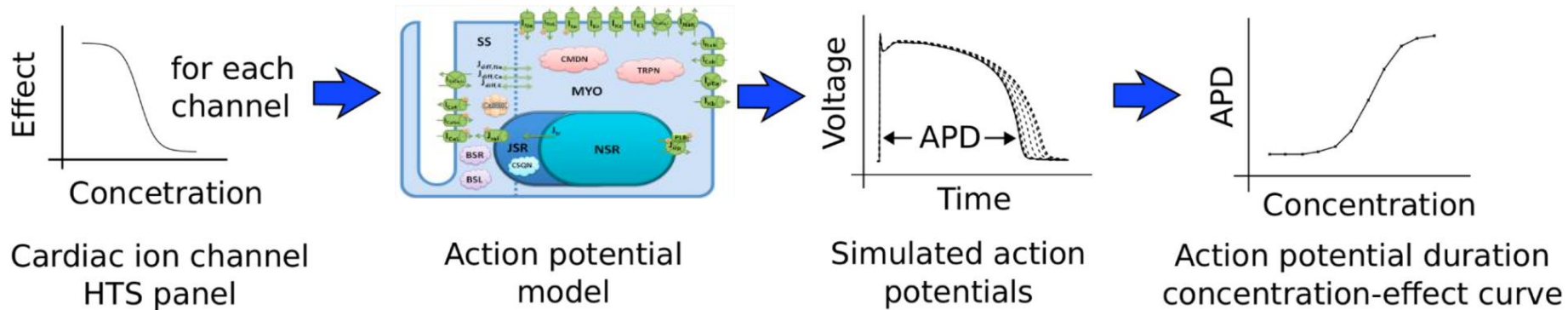


# *in silico*技術を用いた臨床不整脈への橋渡し



*in silico* iPS心筋細胞をもとに、心筋シートを用いた薬効評価のメカニズムを理解

# ヒト心室筋細胞のインシリコモデル



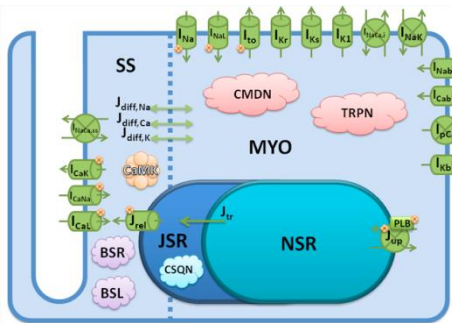
○hERG ( $I_{Kr}$ ),  
○Nav1.5 ( $I_{Na}$ ),  
○Cav1.2 ( $I_{Ca,L}$ ),  
○KCNQ1/KCNE1 ( $I_{Ks}$ ),  
○Kv4.3/KChIP2.2 ( $I_{to(fast)}$ )

O'Hara-Rudy  
(*PLoS CB* 2011)

ヒト心室筋細胞のモデルなので、そのままではiPS心筋の評価には使えない

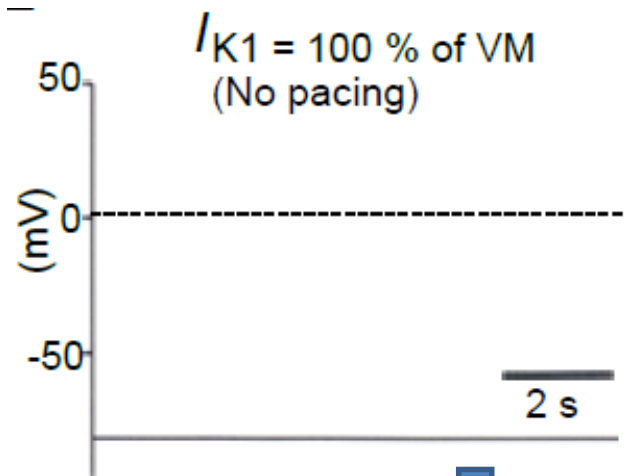
# インシリコモデルを利用した $I_{K1}$ 電流の役割

## 成人心室筋細胞モデル

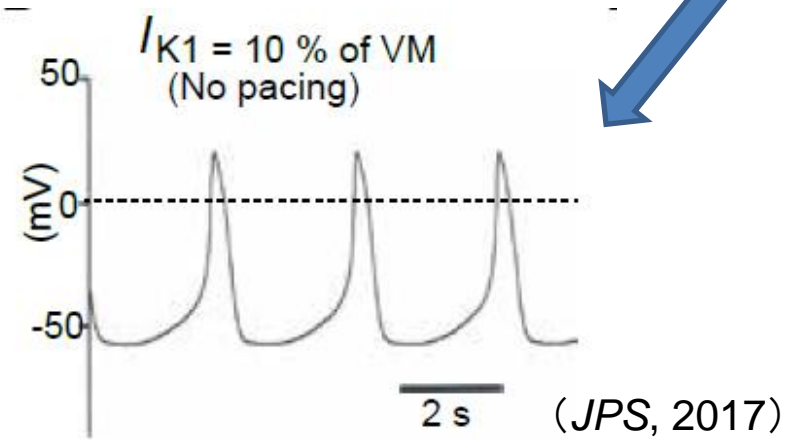


+ 未分化変換  
 ( $-I_{K1}$ 、 $-T$ 管局在、  
 $+I_{Ca,T}$ 、 $I_f$ )

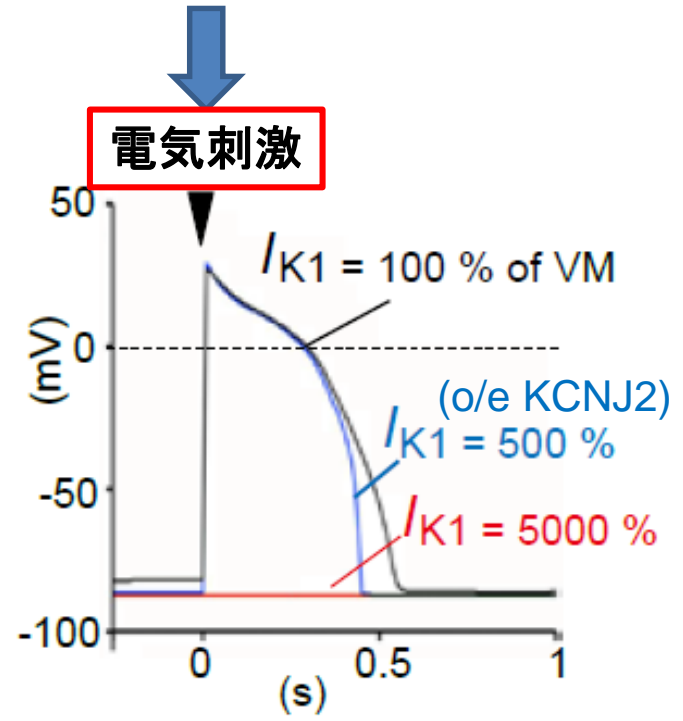
O'Hara-Rudy (PLoS CB 2011)



( $-I_{K1}$  機能)



電気刺激



静止膜電位が浅くなり自動能を獲得

(滋賀医大・芦原先生との共同研究)



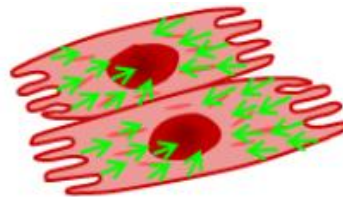
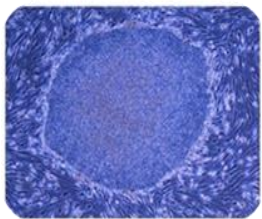


# 検討すべき課題

○長期暴露、蓄積性の問題

○抗がん剤などによる心筋収縮障害

	タイプⅠ (心筋障害)	タイプⅡ (心筋機能不全)
代表的薬剤	アントラサイクリン	トラスツズマブ
機序	フリーラジカル生成、酸化ストレス/障害	ErbB <sub>2</sub> シグナル阻害
心組織	超微細構造の異常(例:空胞、壊死)	超微細構造の異常なし
臨床経過/治療反応性	障害は持続的かつ不可逆的; 安定化することもあり	一般的に可逆的; 2~4ヵ月で回復する可能性が高い
用量の影響	蓄積性、用量相関性あり	用量相関性なし

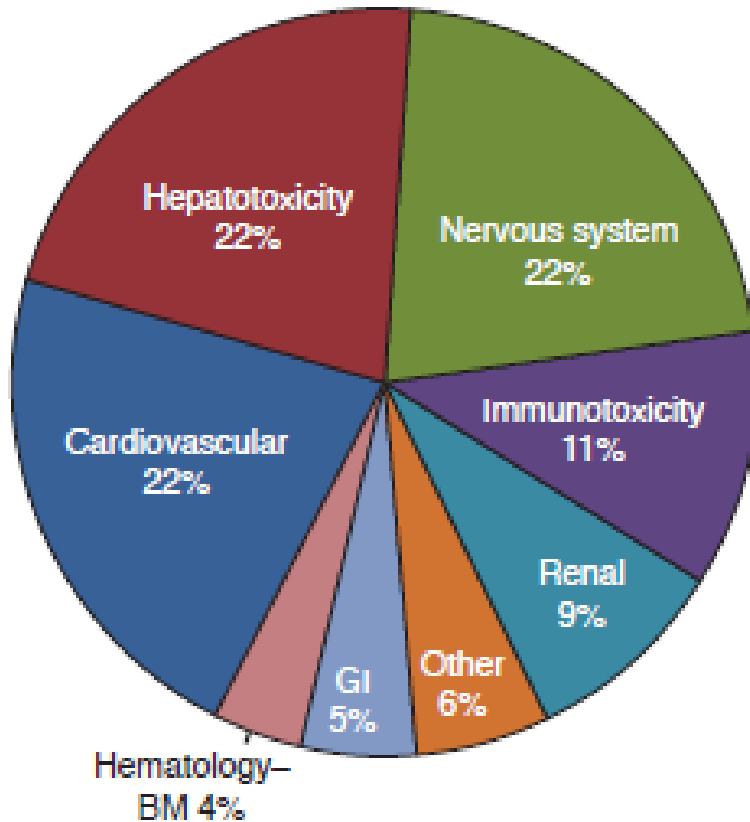


(Ewer et al. JCO, 2005より改変)

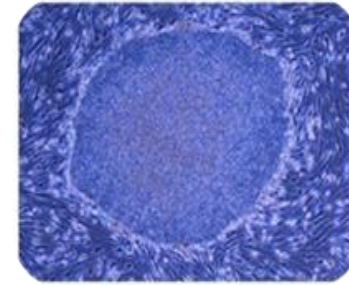
ヒト特異的な心筋収縮評価系に関してもFDAと議論を開始

# 神経、肝臓に関するヒトiPS細胞の応用可能性

## 医薬品による有害作用



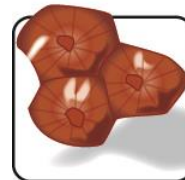
Clinical pharmacology & Therapeutics (2011)



心筋細胞



神経細胞



肝臓細胞

# 中枢神経系の安全性薬理試験

## コアバッテリーにおける中枢神経系の試験

一般行動観察

機能観察総合評価 (FOB)

### フォローアップ試験

自発運動能に及ぼす影響

運動協調性

痛覚感受性

痙攣誘発作用

睡眠誘発作用および睡眠剤との相互作用

学習行動に及ぼす作用

- (1) 迷路学習 (Maze learning)
- (2) 能動的回避学習 (Active avoidance learning)
- (3) 受動的回避学習 (Passive avoidance learning)
- (4) オペラント学習 (Operant learning)

## 薬物依存および薬物乱用の評価

薬物依存

薬物乱用

## 電気生理学的方法

自発脳波に対する作用

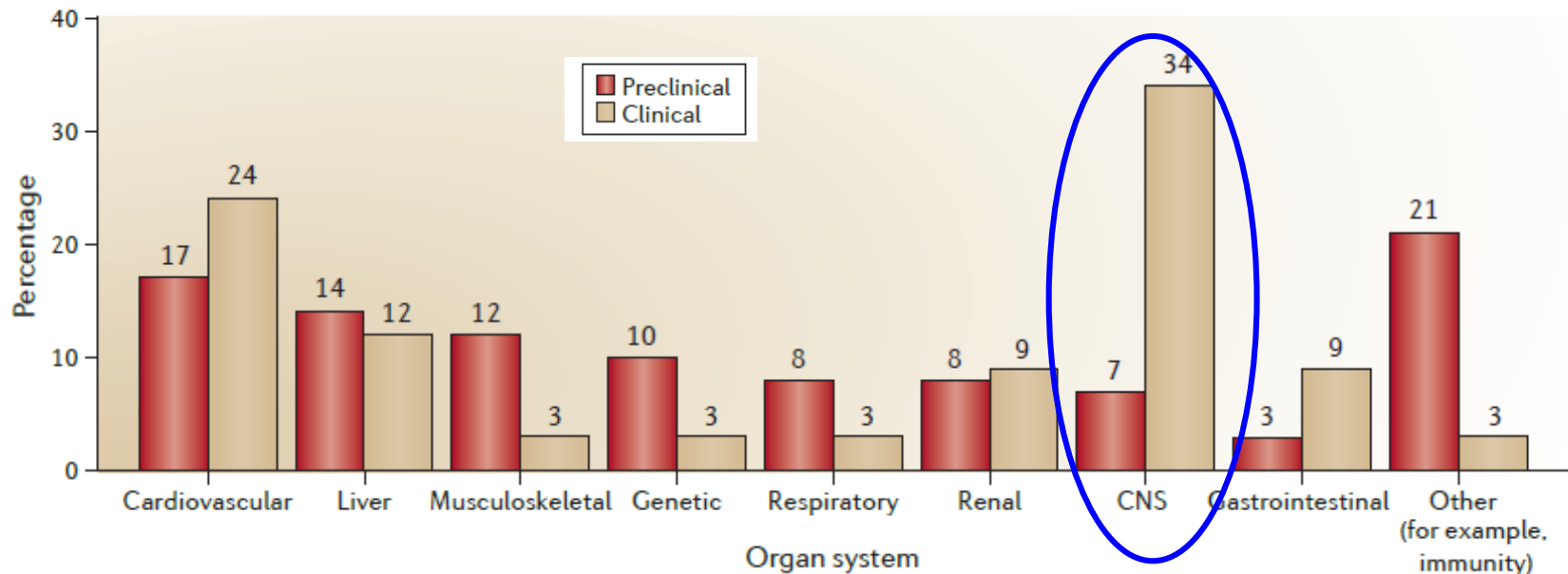
脳波覚醒反応

## 単離組織を用いる分析 (具体的な方法の記載はない)

げっ歯類の行動薬理試験  
に依存している。

# 医薬品候補化合物の中樞神経系への影響

a Organ systems involved in safety failures between 2005-2010



Nat. Rev. Drug Discov., Vol.13, p.419, 2014

○開発後期における中枢神経系副作用の発現は莫大な損失

○開発初期の非臨床段階で中枢神経系副作用を予測できれば、  
被験者の安全性確保などが実現。

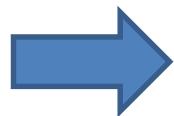


ヒト iPS 由来神経細胞により非臨床試験のヒト予測性向上が期待。

# ヒトiPS神経細胞による非臨床試験



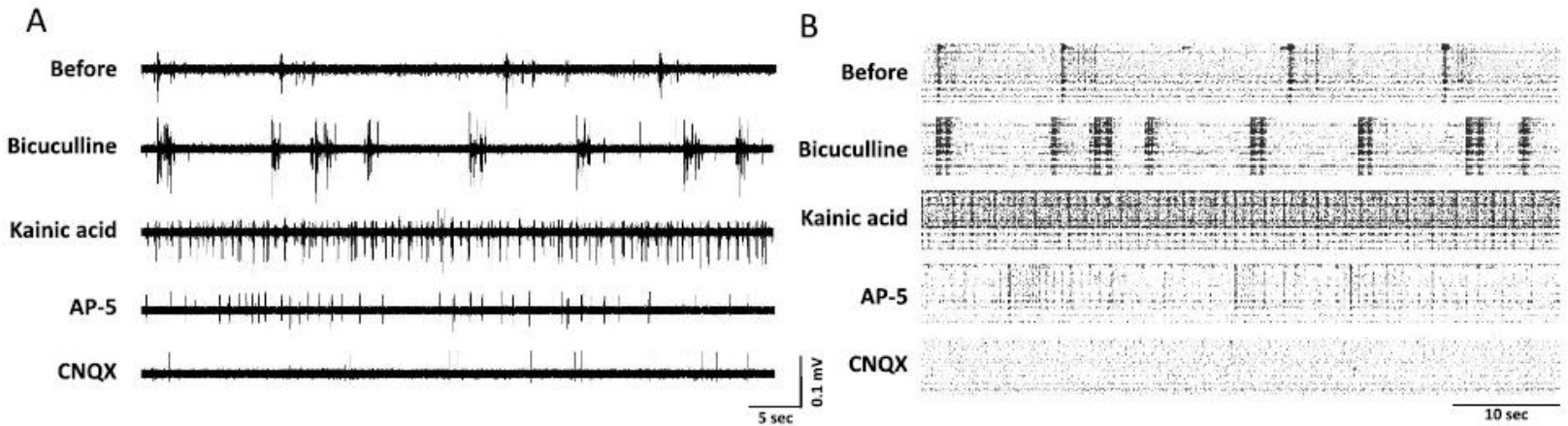
ヒトiPS細胞由来神経細胞により何を置き換えるのか？



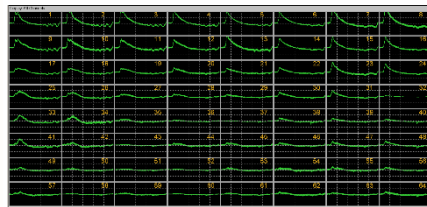
陽性対照物質を選定し、評価指標を探索する必要

# ヒトiPS神経の神経回路機能に基づく評価法

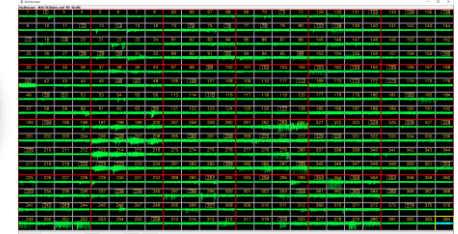
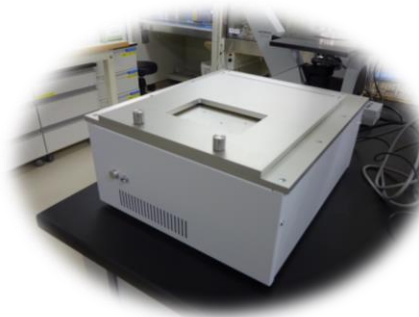
神経回路活動を反映する周期的バースト発火を  
MEAシステムにより記録する



(Odawara et al., 2016)



MEAシステム



- 神経異常活動に基づく副作用予測への実用→痙攣誘発リスクなど
- 標本調整プロトコル、MEA 記録プロトコル、データ解析プロトコルを整備

# 国際コンソーシアムNeuTox

NeuTox



**目的:**

行動、イメージング、形態および神経病理学的な指標の連携により、既知の神経毒性・発達神経物質の曝露によって生じる毒性の予測が可能なバイオマーカーの同定を目指す。

**リーダー:**

Merle Paule (FDA), David Calligaro (Eli Lilly), Ruth Roberts (AstraZeneca)

**参加機関:**

規制当局 : US EPA, FDA, NIOSH, **NIHS**

アカデミア : Columbia University, Duke Universityなど

企業 : Eli Lilly, AstraZeneca, Janssen, Genentech など

# NeuToxのMEAバリデーション

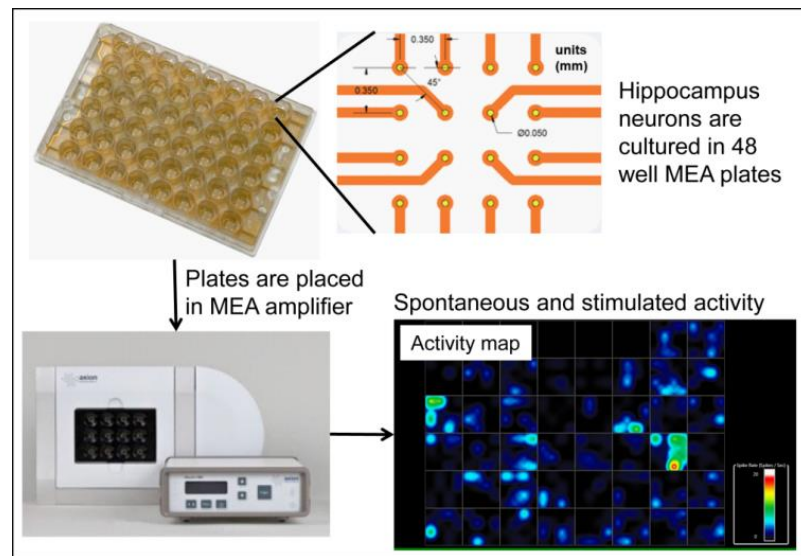
## <MEA Subteam>

- ・多点電極システムにおけるラット神経細胞やヒトiPSニューロンの違いを比較
- ・プロトコルの標準化とエンドポイントを議論。

施設名	参加の可否	プラットフォーム
Axion	Confirmed	MEA
BMS	Tentative	
NIHS	Confirmed	MEA
Eisai	Confirmed	MEA
Cyprotex	Confirmed	
EPA	Confirmed	
GSK	Confirmed	
Janssen	Tentative	

(未確定)

## 多点電極(MEA)システム



MEAデータの解析法、評価指標、細胞、陽性対照物質などの選定が必要。



# 国際動向

化学物質の神経毒性評価系として、暴露時期に応じた評価系の議論が進行中。  
OECDガイダンス提案に向けて国際シンポジウムで議論

For Official Use

Organisation de Coopération et de Développement Économiques  
Organisation for Economic Co-operation and Development

ENVIRONMENT DIRECTORATE

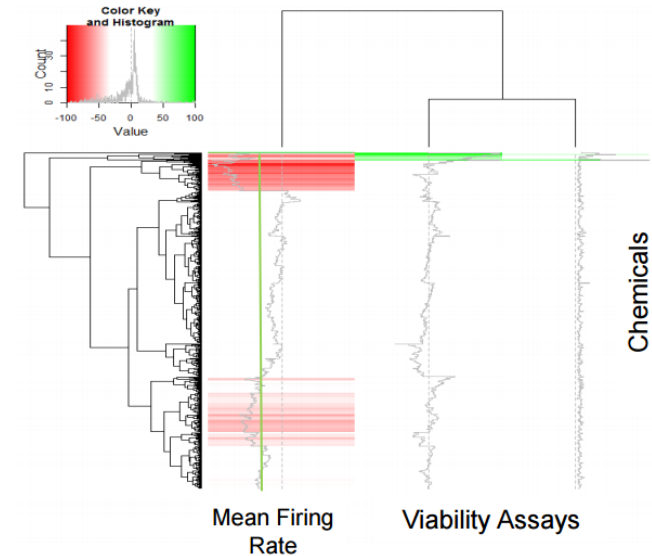
ENV/JM/WRPR(2016)87

06-Dec-2016

English - Or. English

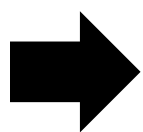
Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals,  
Pesticides and Biotechnology

REPORT OF THE OECD/EFSA WORKSHOP ON DEVELOPMENTAL NEUROTOXICITY (DNT):  
THE USE OF NON-ANIMAL TEST METHODS FOR REGULATORY PURPOSES



joint OECD/EFSA workshop on DNT  
18-19 October, 2016, in Brussels

Public release of data release via ToxCastDB in 2017  
from Dr. Tim Shafer (EPA)



化学物質の神経毒性評価に関するプロトコルが固まれば、  
医薬品の評価系にも展開できる。

# 非臨床試験における肝障害

- 安全性上の理由でグローバル市場から撤退した医薬品34種のうち14種(約4割)が重度肝障害が原因であった。
- 臨床試験が中止になる例も多い。

## 具体例)



EUROPEAN MEDICINES AGENCY  
SCIENCE MEDICINES HEALTH

Thelin (sitaxentan) to be withdrawn due to cases of unpredictable serious liver injury

Clinical trials are also to be stopped



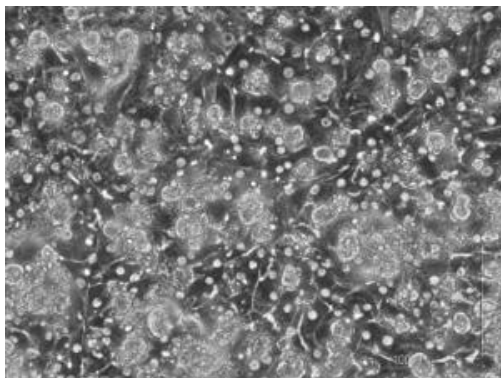
FDA: Pfizer Voluntarily Withdraws Cancer Treatment Mylotarg from U.S. Market



非臨床での重度肝障害リスクの把握が重要！

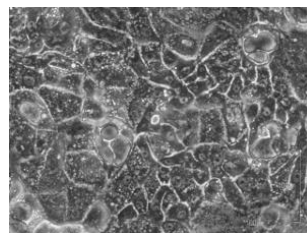
# ヒトiPS細胞由来肝臓細胞

ヒト肝臓細胞

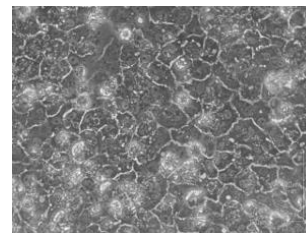


市販のiPS由来肝臓細胞

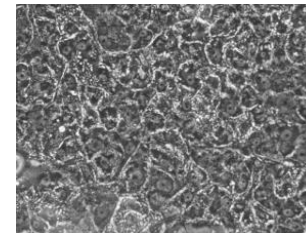
Vender A



Vender B



Vender C



○iPS細胞由来肝臓細胞は肝細胞様の形態を示す

○21個の薬物代謝関連遺伝子の発現を基に階層クラスタリング解析

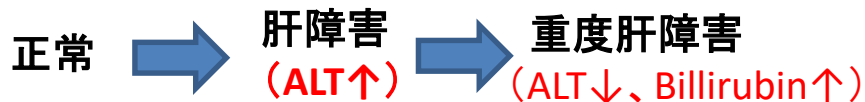
⇒ ヒトiPS細胞由来肝臓細胞における薬物代謝関連遺伝子の発現は、第Ⅱ相の酵素やトランスポーターなど一部の遺伝子の発現が高い。

# 重度肝障害と胆汁うっ滞

重度肝障害への進展予後はHy's Law（経験則）に基づいて診断されている

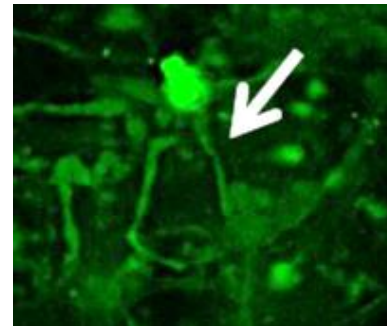
- Hy's Law:
- AST又はALTが基準値上限の3倍以上に増加。
  - 総ビリルビンが基準値上限の2倍以上に増加しALP増加を伴わない。
  - アミノトランスフェラーゼ及び総ビリルビンがともに増加する原因が他に認められない。
- ⇒ 致死率10-50%の**重度肝障害**へ (Dr. Zimmerman、1978年)

## 重度肝障害への進展スキーム



毛細胆管を有する成熟幹細胞が不足  
⇒胆汁うっ滞(黄疸)

## iPS肝臓における微小胆管形成



(Imagawa et al.,  
Sci Rep, 2017)

iPS肝臓細胞を用いた胆汁排泄能による  
in vitro肝障害評価系

# まとめ

動物試験

ヒト細胞試験

ヒト試験

第1相, 第2相, 第3相

新薬

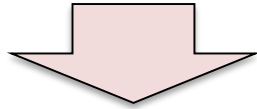
基礎研究  
2~3年

非臨床試験  
3~5年

臨床試験  
3~7年

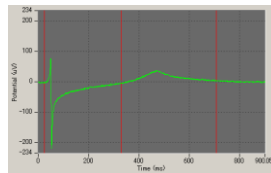
申請承認  
1~2年

市販後調査  
4~10年



## ヒトiPS細胞を用いた安全性評価法の開発と国際標準化

催不整脈リスク評価法



国際協調

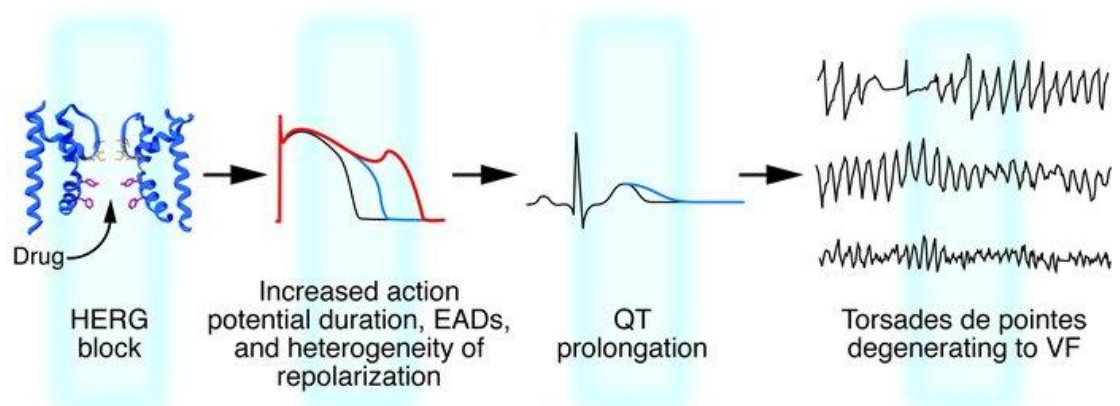


iPS細胞技術を応用した医薬品心毒性評価法の国際標準化への提言

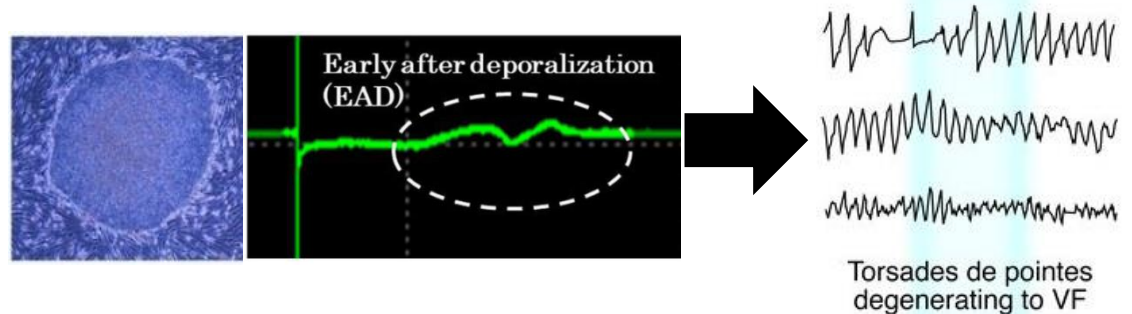
(健康・医療戦略、平成26年7月22日閣議決定)

# Beyond hERG assay

ICH S7B  
QT延長



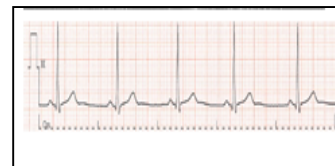
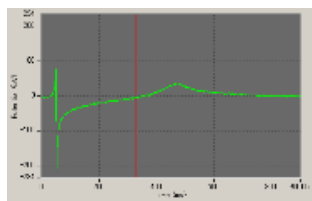
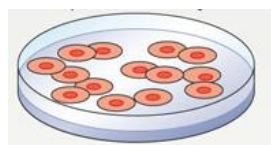
iPS/MEA  
TdPリスク評価



# 今後の展望

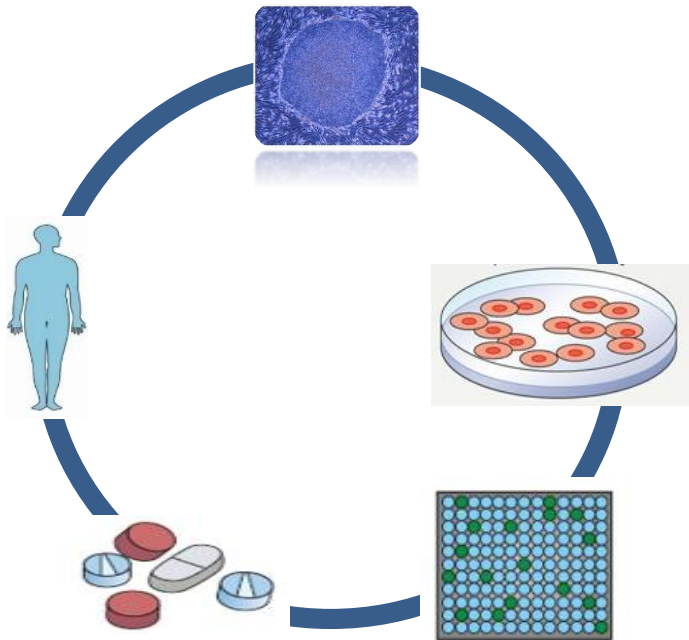


もともとの出発点。  
「iPS細胞由来心筋細胞により、tQT  
試験（臨床試験）が削減できるか？」



**’ディッシュ上での臨床試験’**

# 今後の展望



## ① ヒト臨床を反映した評価系の開発

健常人あるいは疾患iPS細胞由来の分化細胞に関して、個体差や疾患のフェノタイプを明確にする。

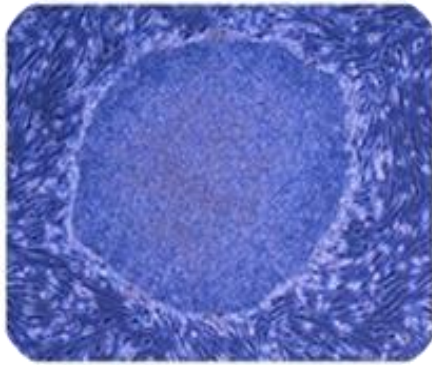
## ② 疾患における薬効評価系の開発

疾患メカニズムの解明、既存の病態モデルとの比較、患者の層別化。

- 臨床試験における薬効予測性の向上、臨床試験の効率化
- 医薬品の適正使用
- 性差や個人間差、民族間差の克服



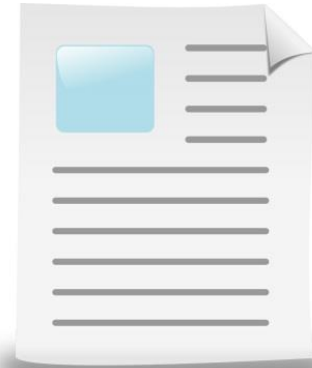
# イノベーションの実用化



iPS細胞



”橋渡し”



医薬品の  
承認審査

安全な薬を届けるために、科学的なデータを取得し、国際的なルールを作る。

# 謝辞

医薬品・医療機器

食 品

化学物質

その他

交通案内

HOME

安心できる毎日をおくるために…  
私たちは研究をしています。



これらの研究にかかわって下さった  
JiCSAや研究班の多くの先生方、関係者の皆様、  
AMEDのサポートに心から感謝申し上げます。

ご清聴、ありがとうございました。