

公開

複製禁止

「研究用モデル細胞PJ」
第1回事後評価分科会説明資料
資料5-2-2(公開)

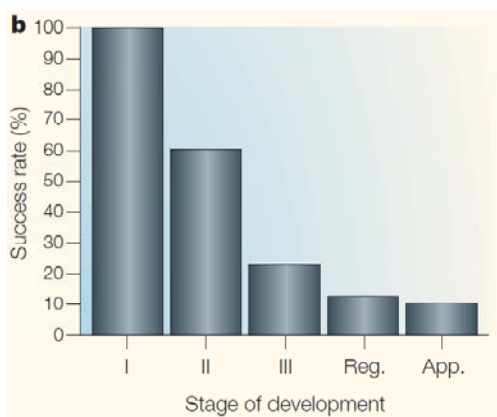
「研究用モデル細胞の創製技術開発プロジェクト」 第1回 事後評価分科会説明資料

議題4.2 プロジェクトの概要説明 (公開) 「研究開発成果」及び「実用化の見通し」

平成22年6月8日(火)

臨床試験中での新薬候補のドロップアウト

臨床試験フェーズI以降の成功率



Kola and Landis, Nature Review Drug Discovery 2004

臨床試験後期でのドロップアウト

↓
膨大な開発費の損失
薬価の上昇

ドロップアウト理由

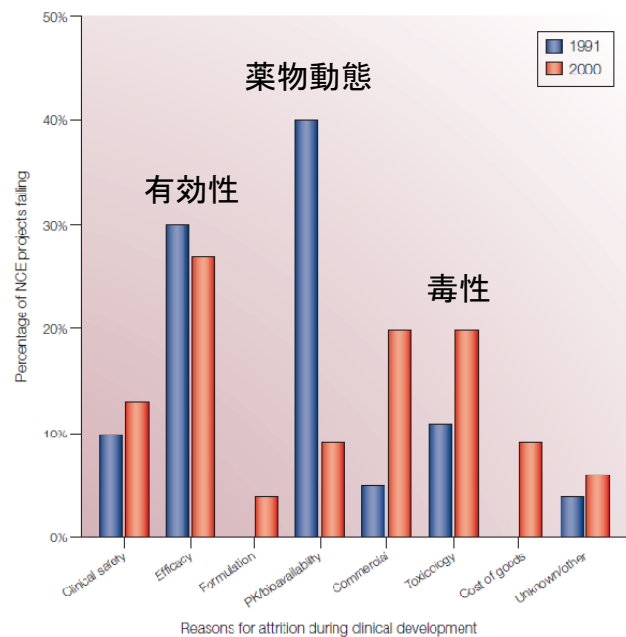
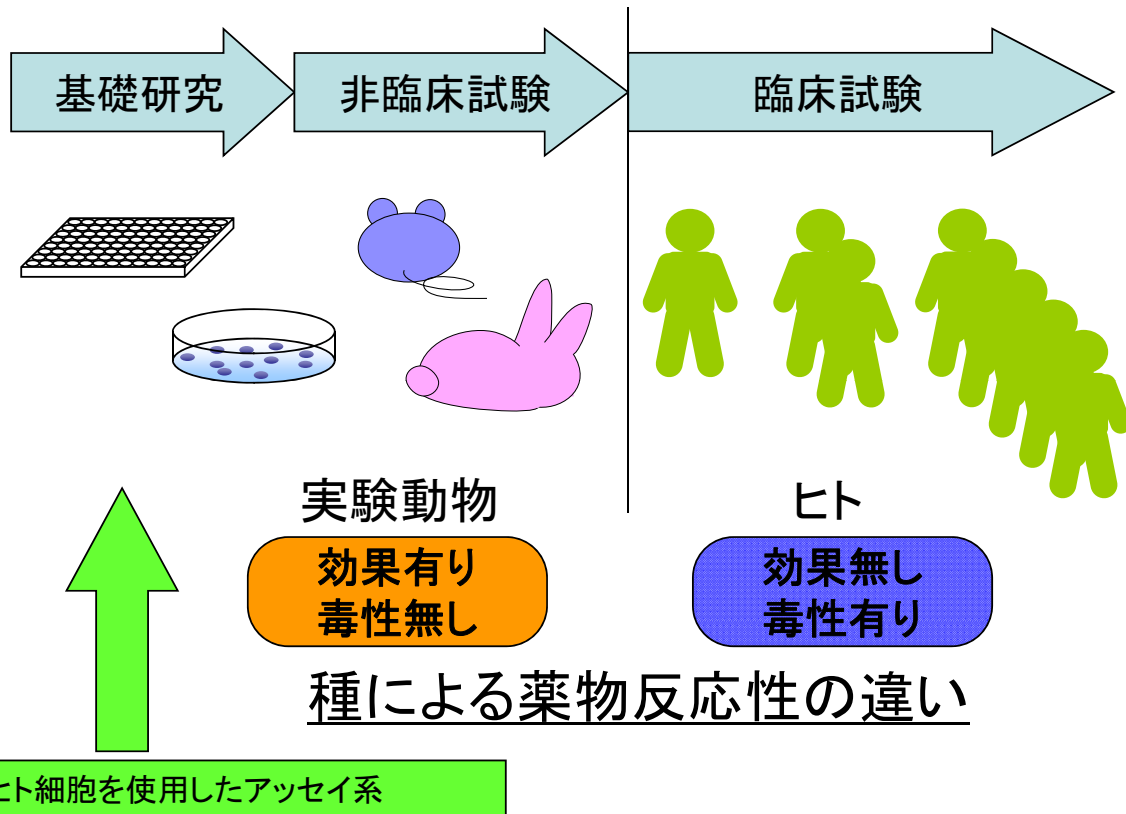


Figure 1 | **Reasons for attrition.** A survey of pharmaceutical companies comparing reasons for attrition between 1991 and 2000, expressed as a percentage of all drug projects stopped during clinical development, reveals a large reduction in losses to pharmacokinetic (PK) failures. NCE, new chemical entity.

Frank and Hargreaves, Nature Review Drug Discovery 2003

臨床試験中での新薬候補のドロップアウト



多能性幹細胞株の特性

- (1) 長期間の細胞増殖を、正常な性質を保持したまま無制限に維持できる細胞株である
- (2) 組織・臓器を構成するほぼ全ての種類の細胞に分化できる多能性をもっている

ヒト多能性細胞株の重要性

- (1) 細胞治療に用いるために必要な機能をもつ細胞を供給できる可能性
- (2) 組織工学による人工組織・臓器作製のための多種類細胞材料の供給可能性
- (3) 基礎研究や創薬研究に必要な多種類ヒト細胞: **品質管理して大量供給可能**

多能性幹細胞株がもつ優れた特質 「重大な特性変化なしの無限増殖能」

- 速い細胞増殖を長期間(無制限に)維持できるとともに、多分化能などの性質が保持されることによって:
- 多様な遺伝子改変を加えることが可能(目的に応じて細胞の特性を加工・改善することができる)
- 同一特性をもつ細胞集団(加工・選別した細胞株のサブラインなど、凍結保存も可能)について、細胞機能や安全性などを十分に検証したのち使用することができる
- 一定の特性と品質をもつ多種類の細胞を大量に供給することができる(大量生産が可能)

ヒト多能性幹細胞株の 創薬研究における重要性

創薬研究に必要な多種類ヒト組織細胞の大量供給

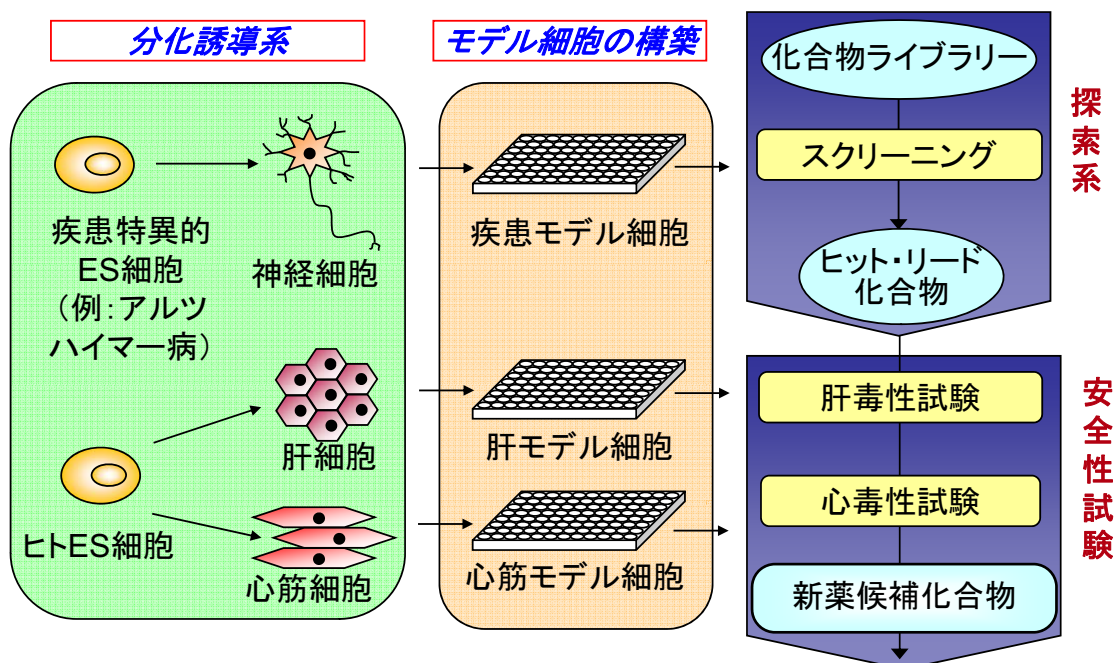
- ・均一な特性(ゲノム)をもつヒト細胞
- ・外来遺伝子ベクターを組み込んだヒト細胞
- ・内在遺伝子を改変したヒト細胞(疾患モデルヒト細胞)
- ・各種細胞内活性を検出するレポーター遺伝子導入ヒト細胞

- ・各種ヒトモデル細胞への薬物効果と生理活性のアッセイ系
- ・ヒト細胞(肝細胞や心筋細胞)を使った安全性試験

- ・各種神経細胞、心筋、網膜細胞、皮膚、軟骨、脂肪細胞
- ・肝細胞、膵島細胞

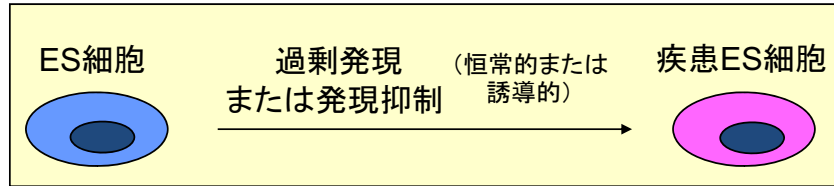
創薬研究のためのヒトES細胞由来のモデル細胞作成 (2005~2009年)

- ・ **探索系** (疾患モデル細胞を用いたハイスループットスクリーニング)
- ・ **安全性試験** (肝モデル細胞、心筋モデル細胞を用いた試験)



ヒトES細胞由来の疾患モデル細胞

・既存ヒトES細胞の遺伝子改変



- ・ **同じ遺伝的背景**をもった健康な細胞と疾患細胞の**比較が可能**である
- ・ 発現誘導型プロモーターシステム(Tet-On、Tet-Offなど)を用いた**疾患原因遺伝子の発現制御が可能**である
- ・ **特定の遺伝子座**に遺伝子を挿入することが可能である
- ・ **疾患発症を早める**ことが出来る可能性がある

ヒト多能性幹細胞株の遺伝子改変による疾患モデル細胞と患者由来iPS細胞株による疾患モデル細胞の利点比較

既存ヒトES(またはiPS)細胞株の遺伝子改変

有利な点

- ・ 同じ遺伝的背景をもった細胞株で病因遺伝子保有と健常型遺伝子保有細胞の厳密な比較対照が可能
- ・ 発現誘導型プロモーターを用いた病因遺伝子の発現制御が可能 → 病因遺伝子発現の影響を厳密な時間軸で解析可能
- ・ 異常蛋白質などの過剰発現により疾患関連異常の発症を早めることが出来る可能性

不利な点

- ・ 病因遺伝子が不明または多数遺伝子関与の場合にはモデル作成が困難

患者の体細胞由来iPS細胞株の作成

利点

- ・ 病因遺伝子が不明または多数遺伝子関与の場合にも患者のゲノムをもつ細胞株樹立が可能 → 疾患モデルとして使える可能性

不利な点

- ・ 患者と健常者からのiPS細胞株は異なる遺伝的背景をもつ → 厳密な比較対照が困難
- ・ **不完全な再プログラム化(初期化)によるエピジェネティクスの異常が細胞表現型の解析を乱す可能性**
- ・ 慢性疾患や加齢疾患などでは実験可能期間内に細胞の異常発生が確認できない可能性

マネジメント

中辻PLをはじめ本プロジェクト参加者が全体の進捗状況を常に共有し、
タイミング良く、適切な方向性および指示を出す

1. リーダー会 幹細胞創薬研究所 毎月1回 開催
参加者：中辻PLおよび幹細胞創薬研究所のGL
目的：研究の方向性、および、進捗の確認
2. 京大-幹細胞創薬研究所合同会 毎月1回 開催
目的：京大および幹細胞創薬研究所各グループの研究経過報告・情報交換、討論 京大との情報・技術交換
3. 研究方向の新たな検討のための臨時会議
目的：特に必要な研究方向の検討、例えば、肝細胞分化誘導研究と評価系研究との連携体制強化を目的に開催
4. NEDO全体会議
目的：NEDOプロジェクト全体の進捗管理、とりまとめ
5. 研究開発委員会

研究用モデル細胞の創製技術開発(連携を密にした共同研究を展開)

ヒトES細胞の加工技術開発

- ・ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御(京大、幹細胞創薬研の共同研究)
- ・ヒトES細胞の相同組換え技術開発(京大、幹細胞創薬研の共同研究)
- ・ウイルスベクターを用いた高効率遺伝子導入と相同組換え(埼玉医大、京大、幹細胞創薬研、熊本大の共同研究)

ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発

- ・神経幹細胞・神経前駆細胞 及び運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研、京大、埼玉医大の共同研究)
- ・心筋細胞への分化誘導法と安全性薬理試験への応用(幹細胞創薬研、京大の共同研究)
- ・高効率な肝細胞への分化誘導法の確立と成熟肝細胞誘導法の開発(京大、熊本大、東大、埼玉医大、幹細胞創薬研の共同研究)

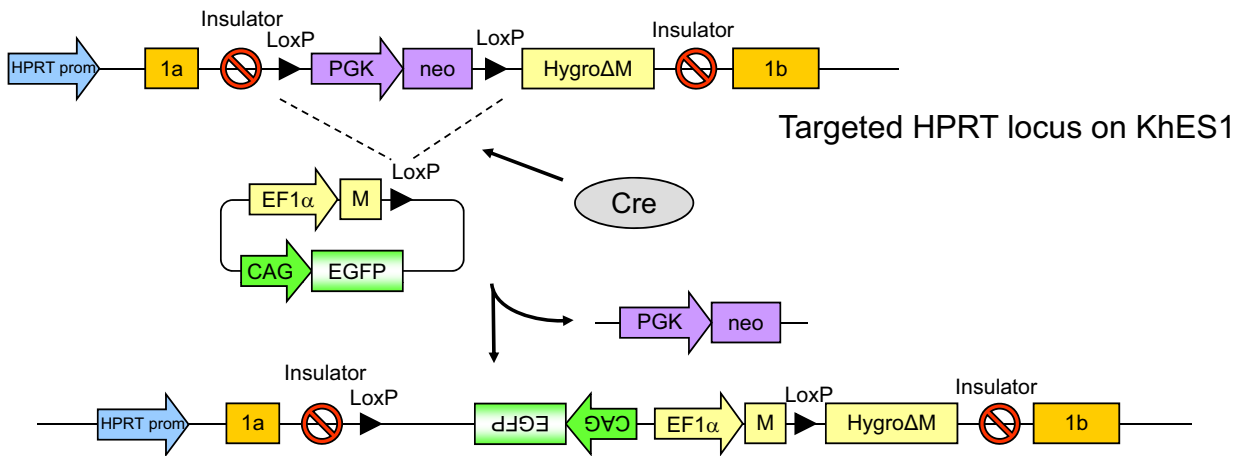
ECM成分や人工基底膜による細胞制御技術開発

- ・ヒトES細胞の組換えECM単一分子コーティングによる未分化維持培養功(京大、阪大の共同研究)
- ・人工基底膜等による分化誘導系の開発(阪大、環境研、熊本大、幹細胞創薬研の共同研究)

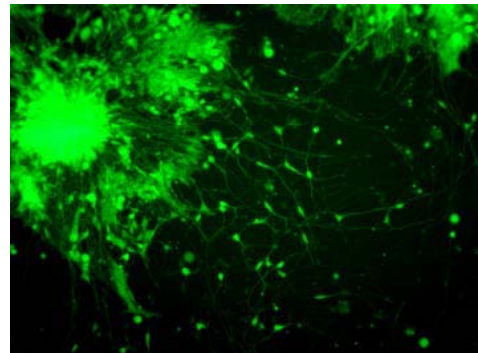
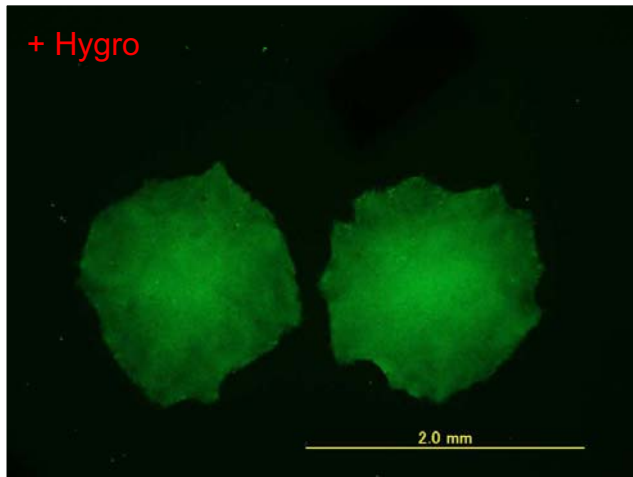
研究用モデル細胞の構築技術の開発

- ・神経変性疾患原因遺伝子組込みによる疾患モデル細胞作成(幹細胞創薬研、京大の共同研究)
- ・脳血液関門モデル構築と神経血管系細胞調製技術(幹細胞創薬研、京大、環境研の共同研究)
- ・ハイスループットスクリーニング(HTS)技術構築(京大、幹細胞創薬研の共同研究)

HPRT site-specific integration



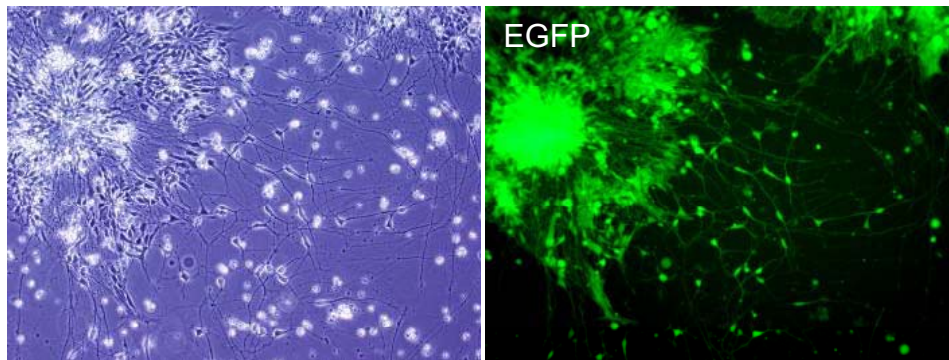
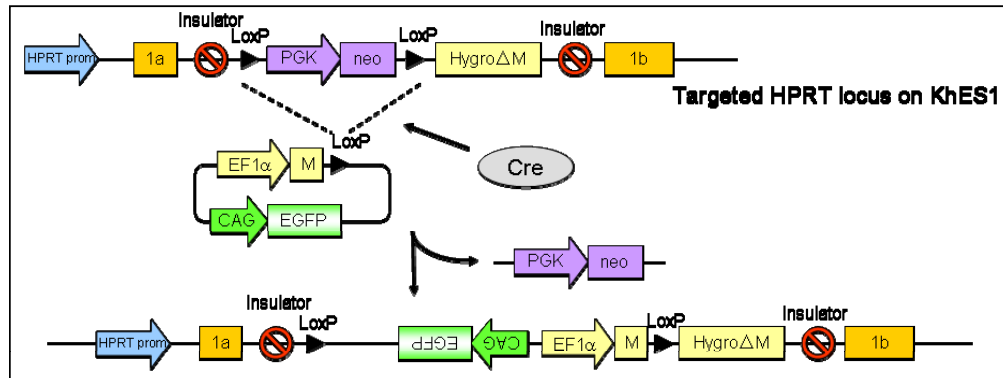
Cre-mediated recombination with a plasmid carrying the desired transgene and EF1 α promoter with an ATG codon results in the rescue of hygromycin resistance.



Hygro ^r	GFP ⁺	Efficiency (%)
186	186	100

We established the HPRT site-specific integration with high efficiency, indicating that this system can circumvent the silencing problem of transgenes

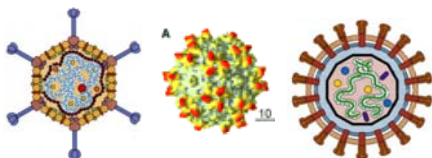
Cre/loxP mediated site-specific gene integration



Sakurai et al. Nucleic Acids Research (2010)

ウイルスベクターを用いた高効率な遺伝子導入

(埼玉医科大学)



1. ウイルスベクターの特徴

- ・ 病原性を除去し増殖ができない変異ウイルス（殻）を利用
- ・ ウイルス感染の巧妙な仕組みを利用した高い効率
- ・ 細胞種や細胞数に影響を受けにくいので広範な応用が可能

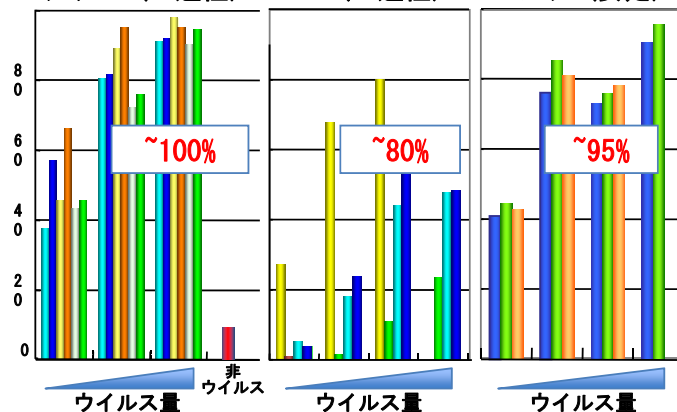
2. これまでに達成した成果

アデノ（一過性）

AAV（一過性）

レンチ（安定）

アデノ（相同組換え）



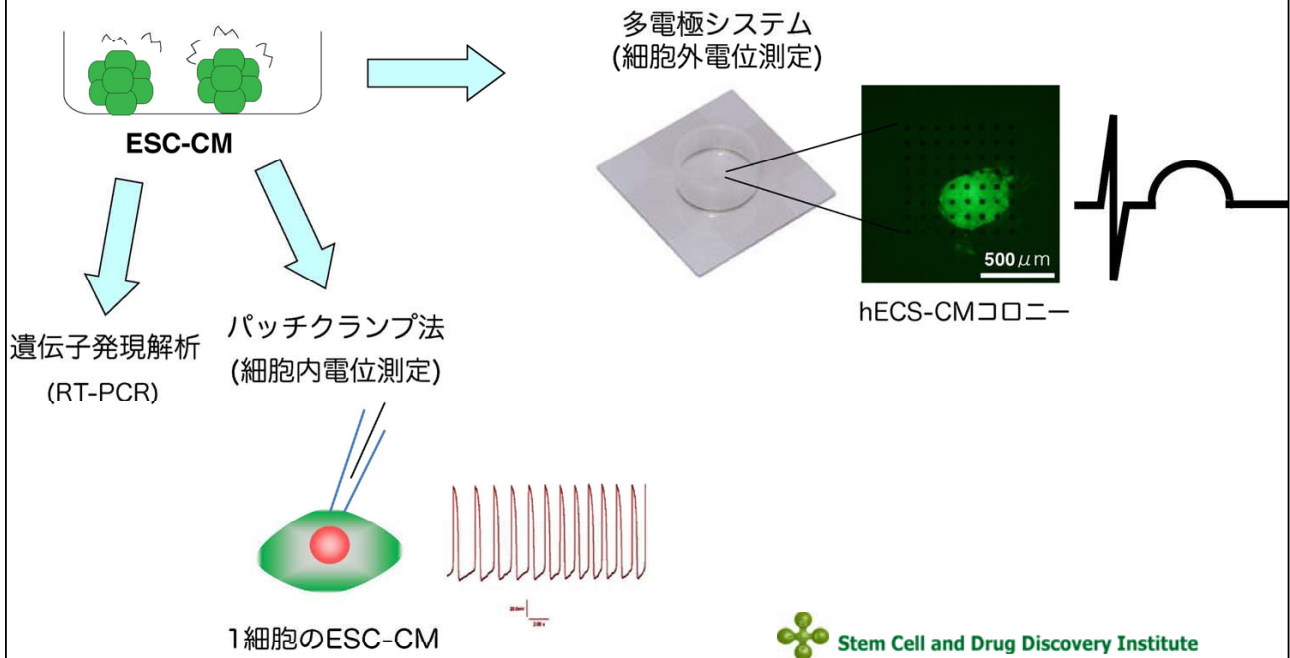
細胞株	ベクター	相同組換え頻度
HPRT	アデノ	3-14% (7-45%)
	非ウイルス	0-0.6% (0-1%)
その他4遺伝子座	アデノ	13-55% (40-81%)
肝細胞特異的	アデノ	29-56% (83-90%)
運動神経特異的	アデノ	7% (57%)
	非ウイルス	0%

()はnegative selection後

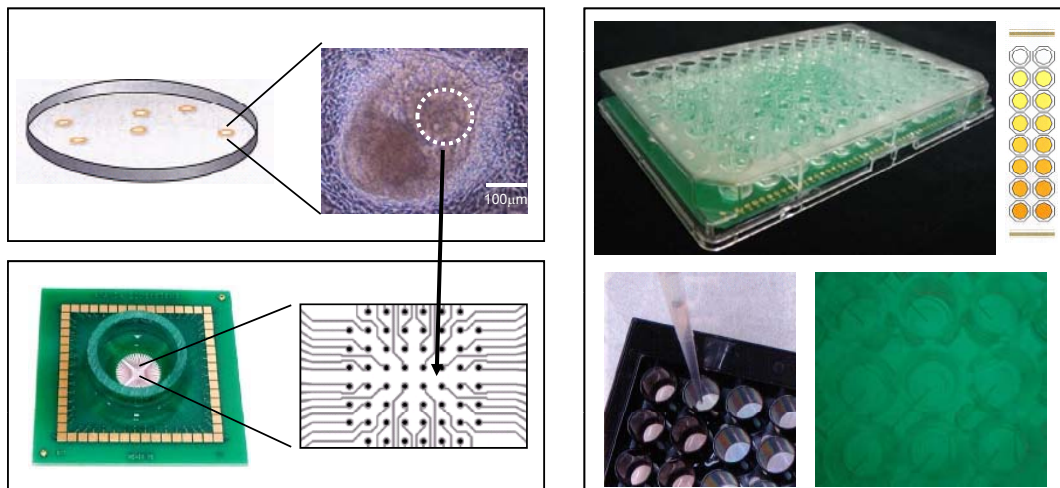
3. 産業化への道筋

- ・ siRNAや遺伝子発現誘導法への利用
- ・ ~100%のES細胞への遺伝子発現・分化誘導による機能細胞の量産
- ・ ハイスループット化による網羅的な遺伝子ノックアウトES細胞ライブラリーの創製

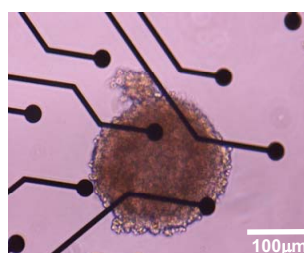
2. hESC-CMsの機能評価法 およびQT延長評価法の確立



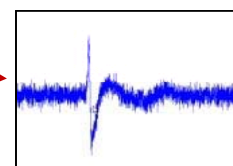
Simple procedure of QT interval assay using ESC-derived CMs



Recording field of
micro electrode arrays
(MEA) (Multi Channel
Systems, Reutlingen,
Germany)

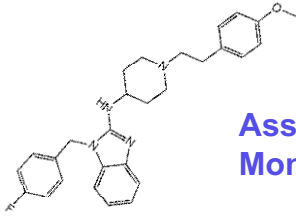


Multiwell MEAs or 96 well plates
by ReproCELL, Tokyo, Japan with
integrated reference and
recording electrodes can be used
for higher throughput screening



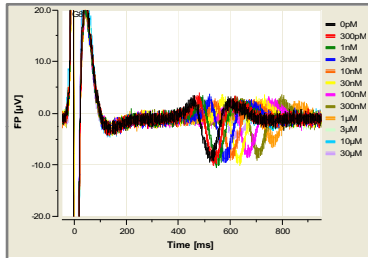
ReproCELL

A

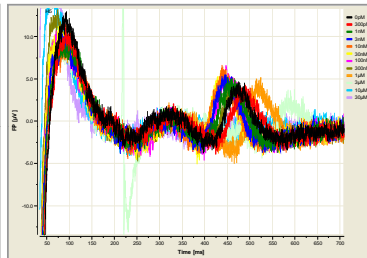


Assay data using cardiomyocytes derived from
Monkey ESCs, Human ESCs and Human iPSCs

B



C



D

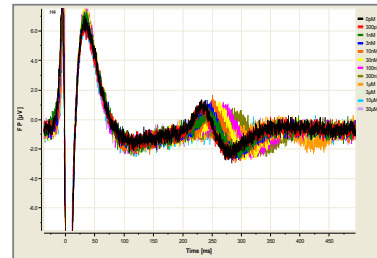


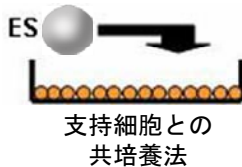
Fig. 7. Assay results for Astemizole, a potent histamine H1-receptor antagonist, which was withdrawn from the market due to QT prolongation,.

A: Structure of Astemizole

B, C, D: Overlay of waveforms recorded with control (compound solvent) and in the presence of each concentration of Astemizole on monkey ES(B), human ES(C), or human iPSC (D) cell-derived cardiomyocytes.

Although detailed waveform shapes for each cell differ, a common analysis method can be applied since the waveform from each cell contains the same ion components. Upon treatment with Astemizole, a prolonged $\text{Na}^+\text{-K}^+$ interval indicates this compound's potential toxicity to heart.

肝細胞への高効率分化誘導法の開発に成功（熊本大学）



特徴

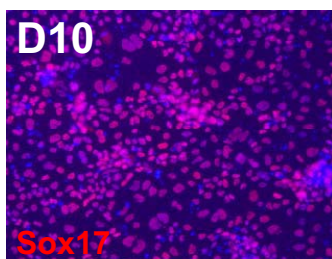
- ・分化支持細胞（細胞株）を誘導源とする
- ・scale up が簡単である

これまでの成果

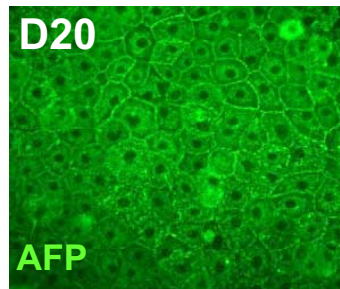
- ヒトES細胞から肝前駆細胞 (AFP陽性90%) の高効率分化誘導に成功した。
- 成熟肝細胞まで分化する技術も確立した (Alb陽性細胞>20%)

図 ヒトES細胞から内胚葉、肝前駆細胞、肝細胞の順番で分化誘導された

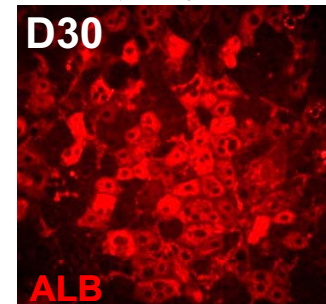
内胚葉



肝前駆細胞



成熟肝細胞

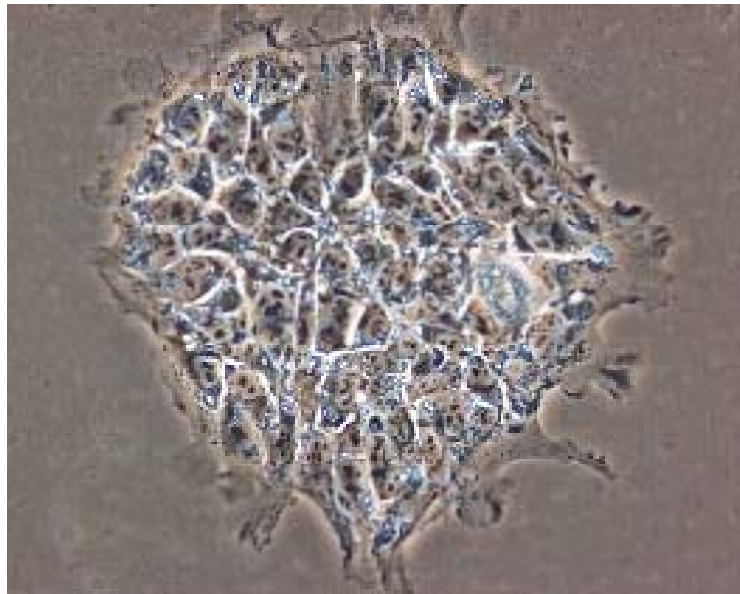


- グリコーゲン蓄積、薬物代謝酵素、抱合系酵素、トランスポーターの発現、薬物によるCyp3A4の誘導。ヒト初代培養肝細胞と同等なアルブミン分泌能が確認された。

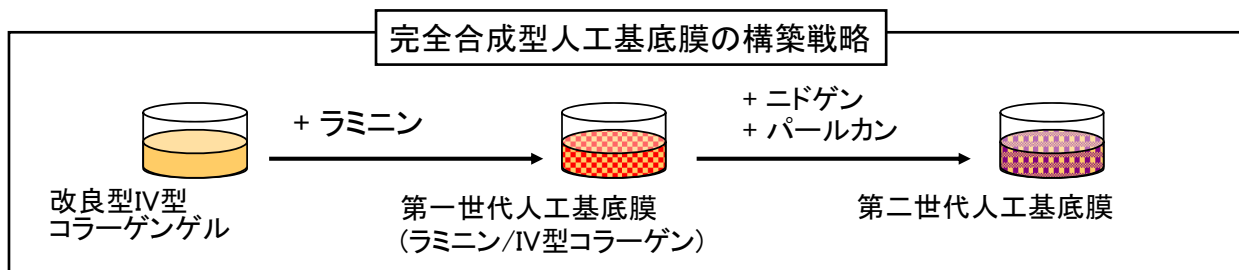
多能性幹細胞の応用に必要な培養法の確立

- 無血清培地から完全合成培地へ
 - ・すでに血清添加しない培地で樹立・増殖維持されている
 - ・動物蛋白質などを含まない完全合成培地の開発が進んでいる。
- フィーダー細胞
 - ・すでにヒト細胞を用いた樹立と増殖維持が成功している
 - ・フィーダー細胞を使わない培養維持方法の開発は進行中であるが、マトリゲル(マウスがん細胞株由来ECM)使用など問題点残る

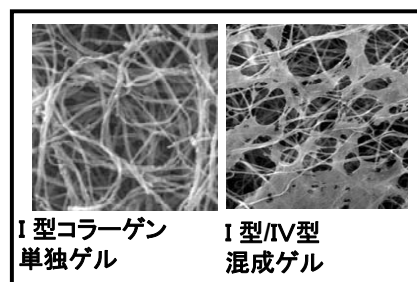
Human ES cell colony cultured without feeder cells
フィーダー細胞なしで培養されたヒトES細胞コロニー



分子組成をカスタマイズした完全合成型人工基底膜の構築技術を開発 (大阪大学・日本皮革研究所)

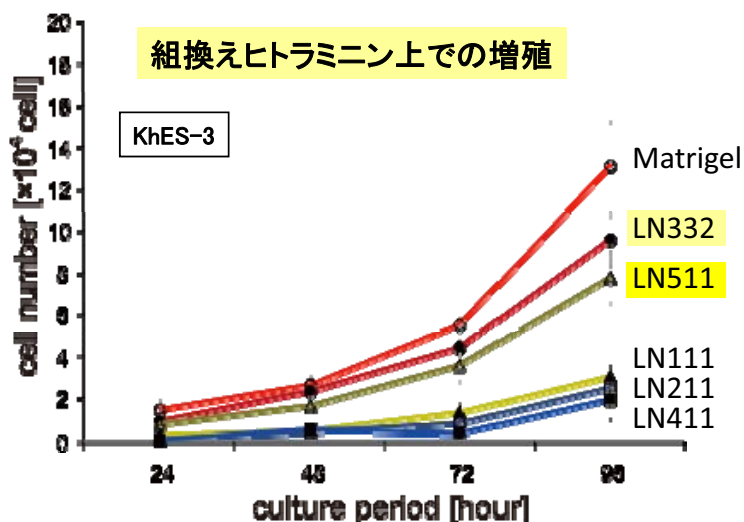


- 主要基底膜構成分子の高発現・安定供給系の確立
 - ✓ 全ラミニンアイソフォーム、パールカン、ニドゲンの組換え蛋白質の発現系を構築
 - ✓ ゲル化能を保持したIV型コラーゲンの安定供給系を確立
- IV型コラーゲンゲルの脆弱性を克服した改良型コラーゲンゲルの開発に成功
 - ✓ I型コラーゲンの安定性とIV型コラーゲンの生物活性を併せ持つ混成コラーゲンゲルの開発
 - * 特許出願:「I型-IV型コラーゲン混成ゲル」(特願2009-235348)
- I型/IV型混成ゲルにラミニン、ニドゲン、パールカンを組み込んだ“第二世代人工基底膜”の構築に成功



世界初の完全合成型人工基底膜！

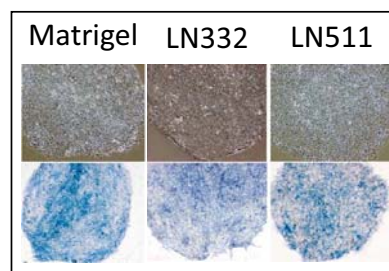
組換えラミニンを利用したヒトES細胞のフィーダーフリー培養に成功 (大阪大学と京都大学の共同研究)



(Miyazaki et al., Biochem Biophys Res Commun, 2008)

ヒト組換えラミニンを利用したヒトES細胞のフィーダーフリー培養の世界初の成功例！

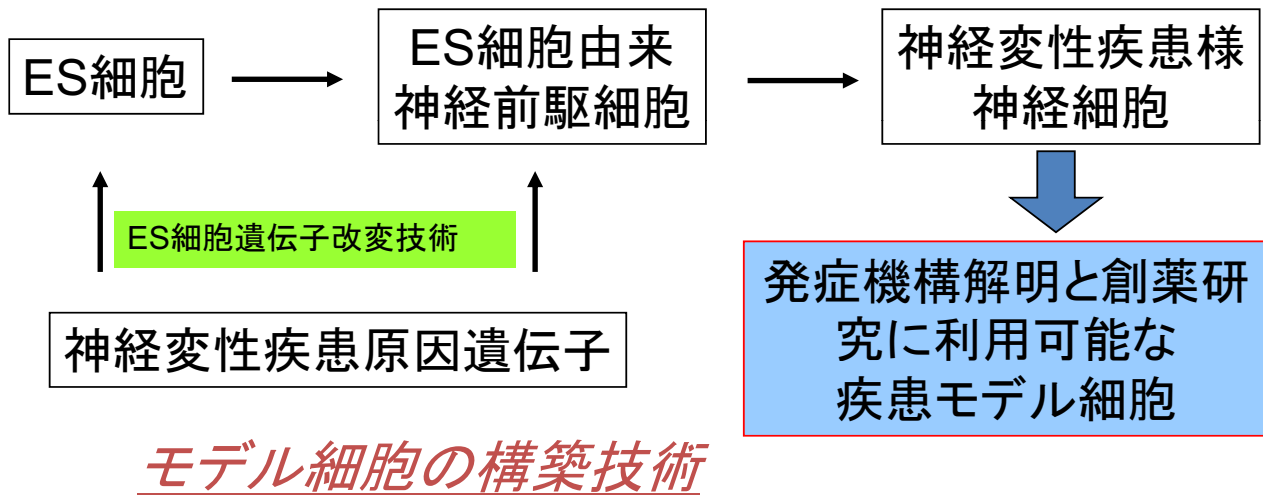
- 組換えラミニン-511および-332をコートした基質上で、ヒトES細胞は未分化性を維持したまま増殖する。
- ラミニン-511および-332は、どちらもインテグリン $\alpha6\beta1$ と強く結合。
- ヒトES細胞はインテグリン $\alpha6\beta1$ を強く発現している。



アルカリフォスファターゼ
活性染色

ヒトES細胞から 神経変性疾患モデル細胞の創製

神経分化誘導技術

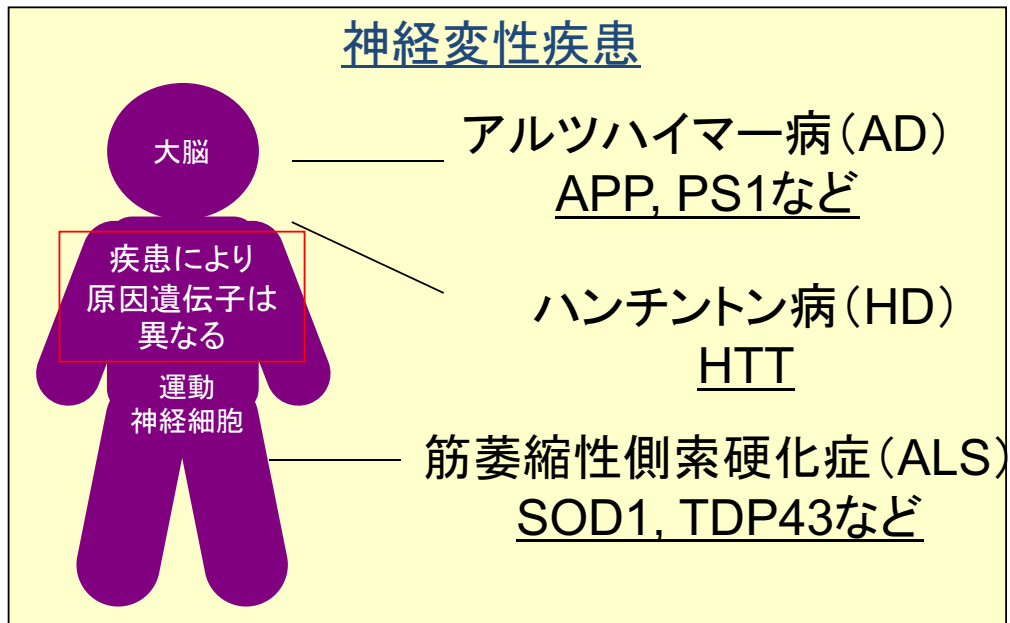


神経変性疾患モデル細胞の創製



Stem Cell and Drug Discovery Institute

神経変性疾患

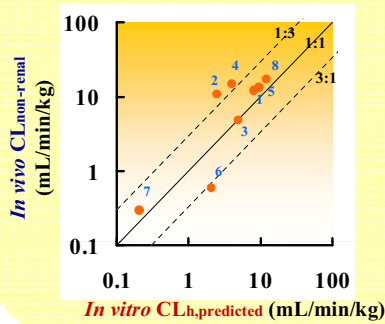


目的とする神経変性疾患の原因遺伝子の**変異型遺伝子**を発見するヒトES細胞 (**疾患ES細胞**) の作成と分化誘導

ES細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立 (東大院・薬／杉山雄一)

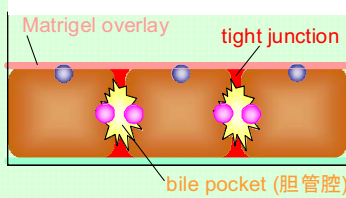
1. ヒト肝細胞を用いた薬物動態の評価・予測系の確立

遊離肝細胞を用いた肝取り込みクリアランスの予測



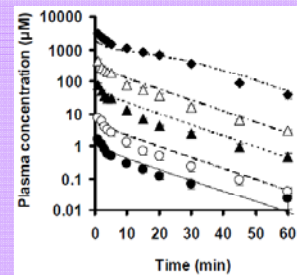
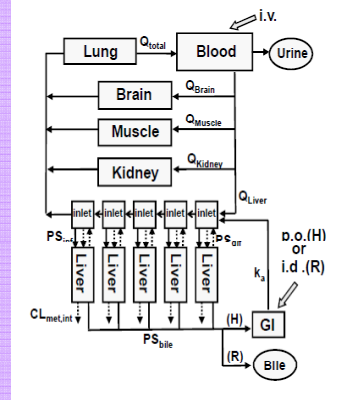
In vivo肝クリアランスをin vitro実験から良好に予測

サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁排泄クリアランスの予測



胆汁排泄トランスポーターの寄与率・機能の定量的予測につなげる

In vitroデータに基づくin vivo薬物動態の予測モデルの構築

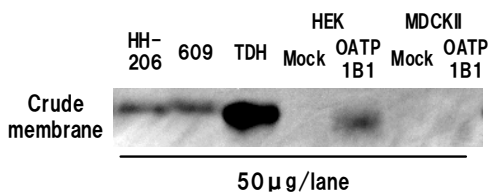


統合

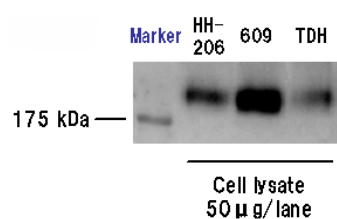
ES細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立 (東大院・薬／杉山雄一)

2. ヒトES細胞由来肝細胞における薬物動態関連遺伝子の発現の評価法の標準化

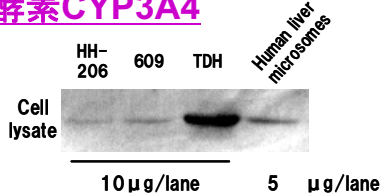
取り込みトランスポーター-OATP1B1



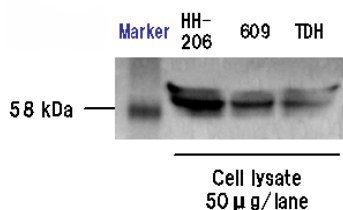
排出トランスポーター-MRP2



代謝酵素CYP3A4

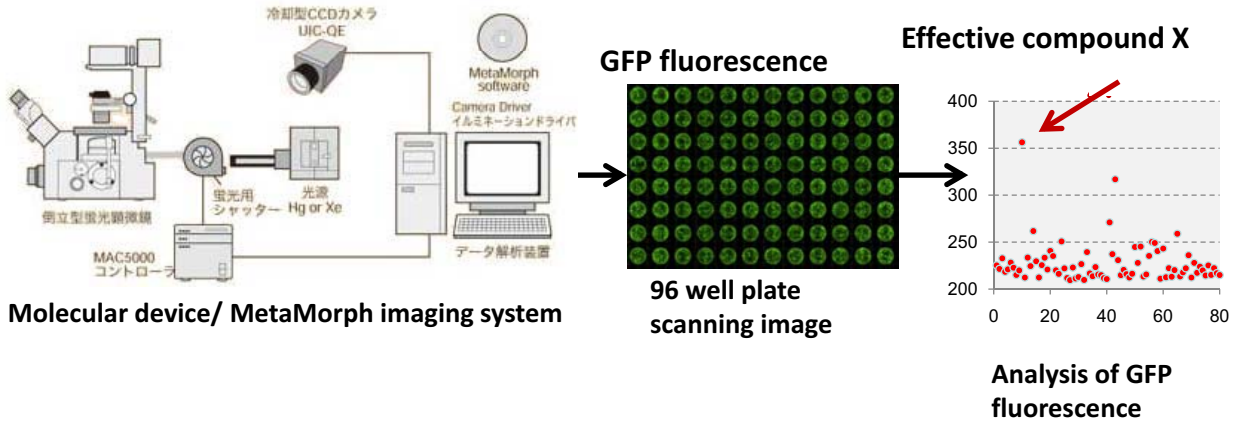


代謝酵素CYP2C9



複数ロットのヒト凍結肝細胞サンプルでの薬物動態関連遺伝子のmRNA, 蛋白発現量を基準に、ES細胞由来肝細胞の創薬利用への可能性を定量的に評価可能とした。

Screening system with a reporter GFP gene for cardiomyocyte differentiation, and detection of effective chemical compounds



1. 事業内容と目標

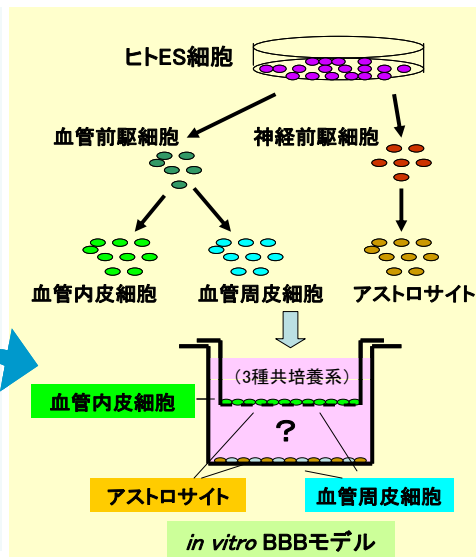
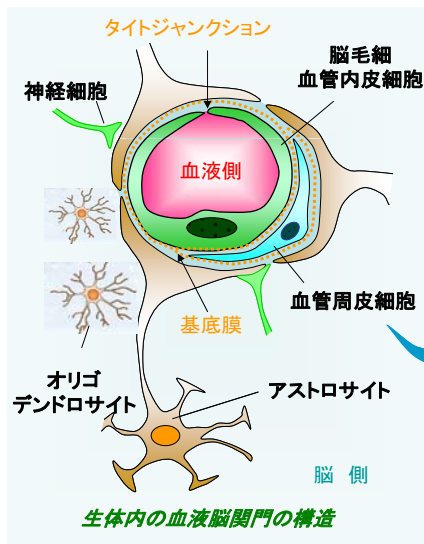
BBBモデル創製

① ヒトES細胞から血管系・神経系細胞の分化誘導技術
および量産調製技術の確立

分化誘導技術

モデル細胞創製

② 血液脳関門(BBB)モデルの創製



モデル化の基本形態



論文、学会発表、特許、報道

平成17年6月～平成22年3月

論文	学会発表	特許	報道
193	332	24	45

最終目標への達成度

目標達成度

1. ヒトES細胞の加工技術開発・・・・・・・・・・・・・・ 〇大きく達成

TetON/OFF発現誘導系確立、2A配列による複数遺伝子産物の同時発現系確立、HPRT部位への置換力セット相同組込みによる外来遺伝子安定発現系確立、その活用拡がる

①遺伝子導入技術と発現制御技術の開発 ②相同組換え技術の開発 ③RNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

2. ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発・・・・・・・・・・・・・・ 〇大きく達成

組換えヒト蛋白コーティングによる未分化維持増殖系確立、各種神経細胞への高効率分化誘導系確立、心筋分化成熟化と有効低分子化合物のケミカルスクリーニング成功

①神経系細胞への分化誘導制御技術の開発 ②心筋細胞への分化誘導制御技術の開発 ③肝細胞への分化誘導制御技術の開発 ④人工基底膜や擬似マトリックスによる分化制御評価

3. 研究用モデル細胞の構築技術開発・・・・・・・・・・・・・・ 〇大きく達成

アルツハイマー病/ハンチントン病/ALSモデル細胞作成に成功、心筋毒性アッセイ系の確立

①神経変性疾患モデル細胞の創製 ②血液脳関門 (BBB) モデルの創製 ③ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立 ④オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬支援技術の研究開発

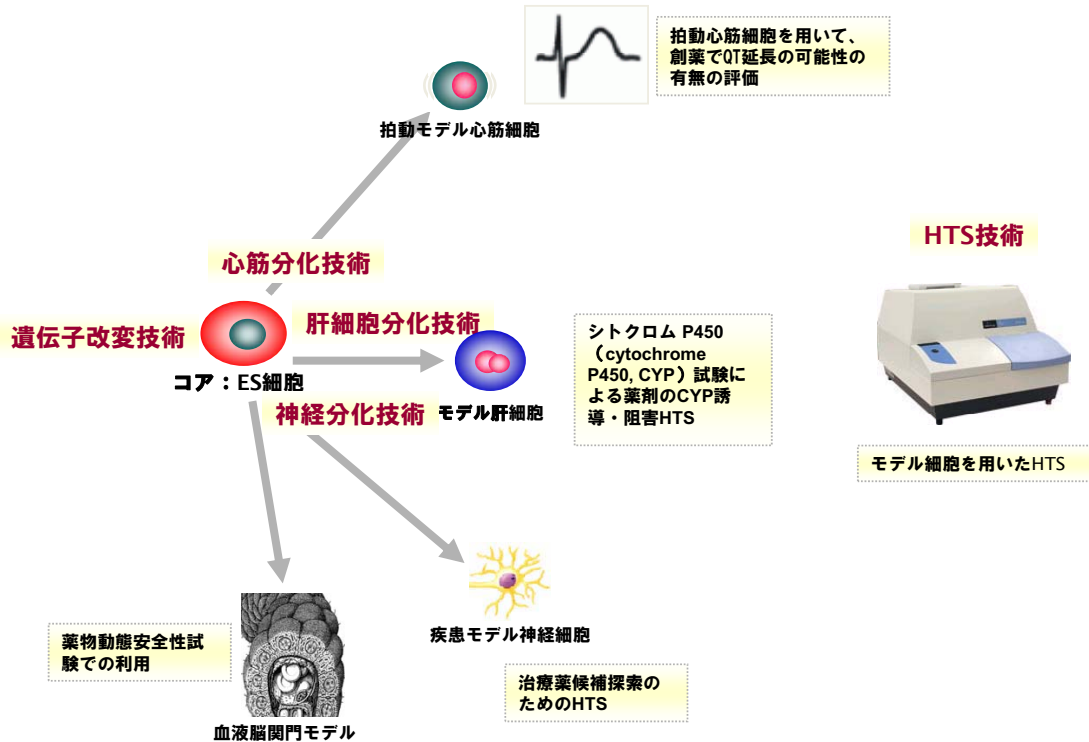
4. 開発技術の産業化・実用化・・・・・・・・・・・・・・ 〇大きく達成

心筋毒性試験の実用化開始、モデル細胞による事業化の計画

①分化心筋細胞をもちいたQT延長試験実用化 ②神経変性疾患などモデル細胞による事業化計画

開発技術の創薬応用

ES細胞をコアに遺伝子改変技術、機能細胞分化技術およびそれらを用いたスクリーニング技術を含む世界でも類を見ない包括的な技術開発の成果をあげつつある。包括的な技術開発展開により、実用化も近い。

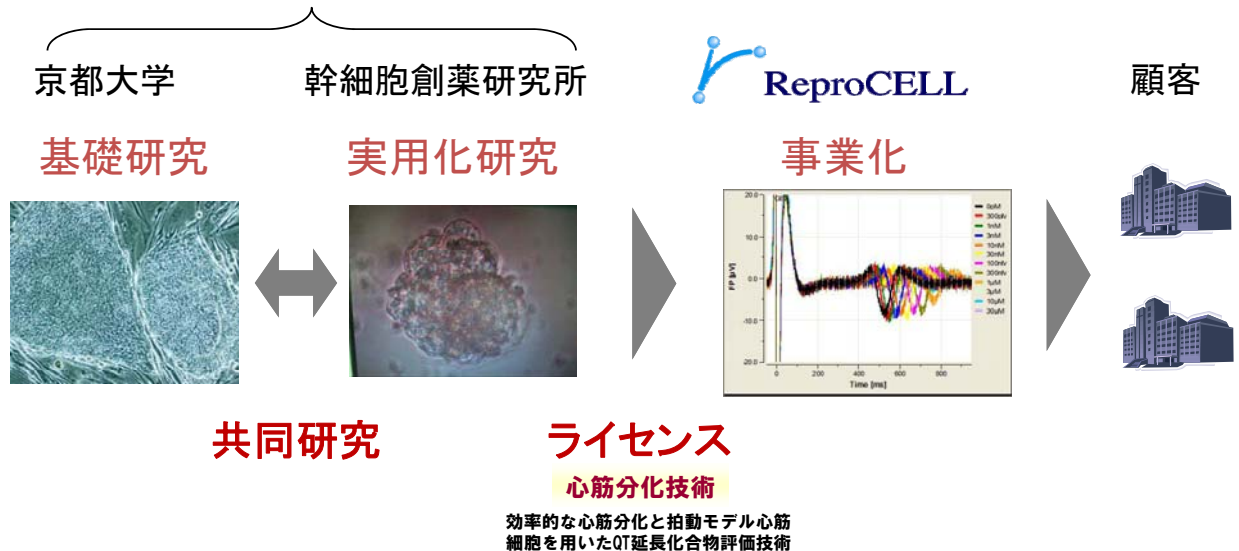


開発技術の産業化

創薬におけるQT延長に使用できる心筋分化技術に関しては平成19年6月に株式会社リプロセルにライセンス供与した。

リプロセル社では平成20年4月に**サルES細胞由来心筋細胞**、平成21年4月に**ヒトiPS細胞由来心筋細胞**の販売および受託試験事業を開始している。

NEDOプロジェクト



NEDOプロジェクトでのES細胞技術をiPS細胞へ適用・実用化

世界で最初にES/iPS細胞由来心筋細胞を使った心筋毒性アッセイ事業実用化開始の報道記事

REUTERS
LATEST NEWS U.S. SENATE BACKS PANEL TO PROBE FINANCIAL FRAUD

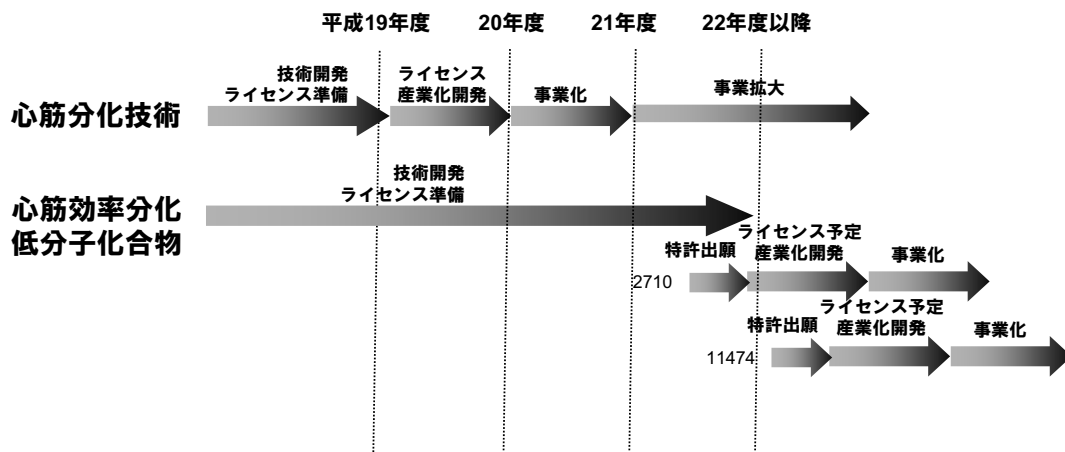
New Stem Cell Technology to Improve Drug Safety
Wed Apr 22, 2009 8:41am EDT
First Commercial Test Incorporating iPS Cells
ロイター電子版 (2009年4月22日)

Society for Biomolecular Science 15th Annual Conference (2009)
Best Poster

Stem Cells and Regenerative Medicine Europe (2009)
Best Poster

日本経済新聞 朝刊1面 (2009年2月27日) 日本経済新聞 朝刊9面 (2009年4月9日)

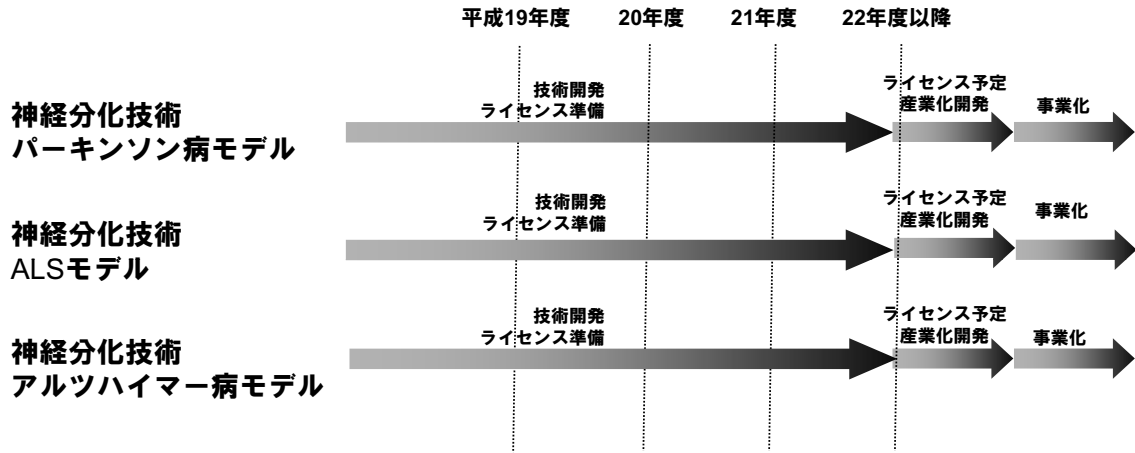
現在開発中の技術の事業化スケジュール(心筋)



本プロジェクトの具体的な事業化項目とスケジュールを以下に示す。

1. ES細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験 (QT延長) : 平成20年度事業化済み
2. ES細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験 (QT延長) を基盤にiPS細胞でも事業化 : 平成21年度事業化済み
3. HTSで見出した低分子2化合物の特許出願とこれらの化合物を用いた効率分化の事業化平成22年度

現在開発中の技術の事業化スケジュール（神経）



本プロジェクトの具体的な事業化項目とスケジュールを以下に示す。

1. 3種の神経疾患モデル細胞：平成22年度に事業化する

ヒトES細胞/iPS細胞技術の事業化の展開(予想)

事業領域	研究試薬・研究機器	有用物質産生	創薬基盤技術	再生医療・細胞治療
事業イメージ				
実現時期	・現在	・1～2年後 -	・現在～1年後 -	・5～10年後 -
市場規模	・数十～数百億円	・数十～数百億円	・数百～一千億円?	・数兆円?
ビジネスモデル	<ul style="list-style-type: none"> 試薬の提供 デバイス・機器の提供 細胞(研究用)の提供 	<ul style="list-style-type: none"> 試薬の提供 デバイス・機器の提供 医薬品の提供 	<ul style="list-style-type: none"> 試薬の提供 デバイス・機器の提供 細胞(事業用)の提供 創薬受託試験サービスの提供 	<ul style="list-style-type: none"> 試薬の提供 デバイス・機器の提供 細胞(医療用)の提供 細胞バンキング・サービスの提供
事業実施事例*	日本	 <small>Cell Science & Technology Institute</small>		
	海外	 		 <small>ADVANCED CELL TECHNOLOGY</small>

* 事例紹介であり、必ずしも網羅的ではない
出典: 企業公開情報: 筆者作成