

皮膚基礎研究クラスターフォーラム、
2018年7月12日、東京

幹細胞を活用した 動物実験代替法の動向



小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所

本発表は、個人的な見解であり、必ずしも
OECDや国立衛研の公式見解ではありません。
また、発表に利益相反はありません。

JaCVAM（日本動物実験代替法評価センター） の歴史

2005年11月 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 新規試験法評価室内
に臨時の組織が設立

2011年4月 設置規則の策定

JaCVAMの目的

1. 国際的な協力の下、日本で開発された方法をOECDのガイドラインとする。
2. バリデーションや第三者評価を通じて評価された代替法について、行政的受入れの適否及びその適用可能な範囲を明確にし、公表する。



JaCVAM運営委員会

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

毒性部

病理部

動物管理室

薬理部

変異遺伝部

安全性予
測評価部

厚生労働省

国立感染症研究所

PMDA

ICATM (International Cooperation of Alternative Test Methods)

ICATM is a voluntary international cooperation of national organizations: Canada, the European Union, Japan, South Korea, and the United States.



試験法の利用手順



JaCVAMの担当分野

OECD GD34より

JaCVAMが成立に寄与した日本発の OECD TGまたはGD(2018)

- ✓ Skin sensitization assay, LLNA : DA, TG 442A (2010)
- ✓ Skin sensitization assay, LLNA : BrdU-ELISA , TG 442B (2010)
- ✓ *In vivo* comet assay TG 489 (2014)
- ✓ **Skin irritation assay with LabCyte EPI-MODEL 24, TG 439 (2013)**
- ✓ Performance-based Test Guideline for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen receptor agonists and antagonist, Revised TG 455 (2015)
- ✓ Short time exposure (STE) assay for eye irritation testing, TG490 (2015)
- ✓ Bhas 42 cell transformation assay (February, 2016) Guidance document
- ✓ h-CLAT assay for skin sensitization testing, TG442E (September, 2016)
- ✓ Stable transfected transcriptional activation (STTA) assay for androgen disruptor screening (AR-Ecoscreen), TG458 (September, 2016)
- ✓ IL-8 Luc assay for skin sensitization testing, TG442E (September, 2017)
- ✓ **Eye irritation test with LabCyte CORNEA-MODEL, TG 492 (July, 2018)**

我が国発の試験法を国際標準化

創薬スクリーニングへの関与

- ARCH-Tox プロジェクトリーダー(2011-2015年度)
- AI-SHIPSサブプロジェクトリーダー(2017年度-)
- AMED医薬品等規制調和・評価研究事業「医薬品等の安全

再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業

◆再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発

| | 所属 | 役職 | 氏名 |
|-------|----------------|------------|-------|
| PS・PO | 京都大学 iPS 細胞研究所 | 副所長／特定拠点教授 | 中畑 龍俊 |



PS・PO
中畑 龍俊

◆再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発

| | 所属 | 役職 | 氏名 |
|----|-------------------------|------------|-------|
| PS | 京都大学 iPS 細胞研究所 | 副所長／特定拠点教授 | 中畑 龍俊 |
| PO | 産業技術総合研究所 | グループ長 | 金森 敏幸 |
| PO | 東北大学病院臨床研究推進センター 情報政策部門 | 部門長 | 白戸 崇 |



PS
中畑 龍俊



PO
金森 敏幸



PO
白戸 崇

◆再生医療技術を応用した創薬支援基盤技術の開発

| | 所属 | 役職 | 氏名 |
|----|--|-----|-------|
| PS | 国立成育医療研究センター 研究所 | 副所長 | 梅澤 明弘 |
| PO | 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 安全性予測評価部第二室 | 室長 | 小島 肇 |



PS
梅澤 明弘



PO
小島 肇

薬ができるまで



医薬品は有効性と安全性をいろいろな方法で確認して作られます

非臨床試験の目指す方向

技術革新

AI

ES, iPS細胞の管理

3次元培養,

Organoid,

**Microphysiological
system**

In vivo

In silico,
in vitro
& in vivo

in silico &
Advanced
in vitro

種差と
個体差への考慮

ES, iPS細胞を用いた試験法の現状

- 薬理試験法としての開発が望まれている段階であり、ほとんどの試験が行政的に目的で、安全性薬理や安全性試験に使われる段階にはない。
- 創薬スクリーニングに利用して頂き、データが公開されていることを期待したい。

本発表の内容

- ESTおよびHand1-Luc EST
- ヒトES/iPS細胞を用いた新しい簡易毒性試験
- ヒトiPS細胞を用いた医薬品の国際標準化に関する研究
- 再生医療技術を応用した創薬基盤技術の開発
- AI-SHIPS
- GIVIMP

The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity *in vitro*

[Andrea E M Seiler¹](#) & [Horst Spielmann²](#)

Nature Protocols volume 6, pages 961–978 (2011)

In the embryonic stem cell test (EST), differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs) is used as a model to assess embryotoxicity *in vitro*. The test was successfully validated by the European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) and models fundamental mechanisms in embryotoxicity, such as cytotoxicity and differentiation.

In this protocol, we describe the ECVAM-validated method, in which the morphological assessment of contracting cardiomyocytes is used as an endpoint for differentiation, and the molecular-based FACS-EST method, in which highly predictive protein markers specific for developing **heart tissue** were selected. With these methods, the embryotoxic potency of a compound can be assessed *in vitro* within 10 or 7 d, respectively.

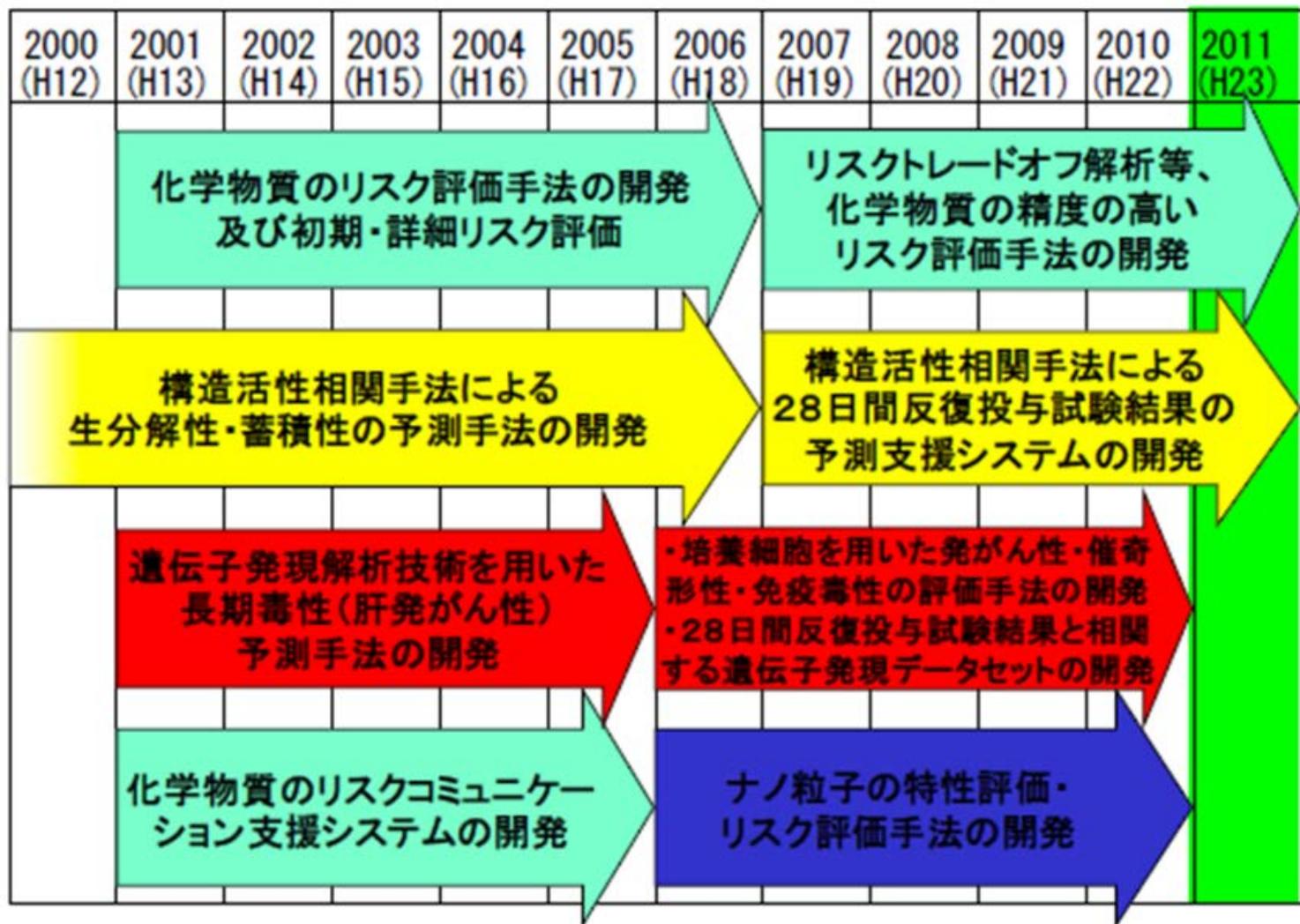
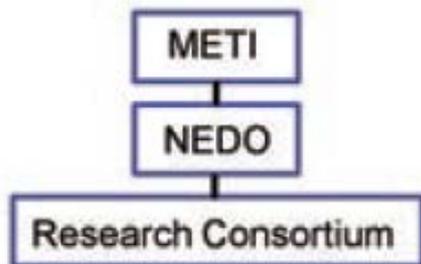
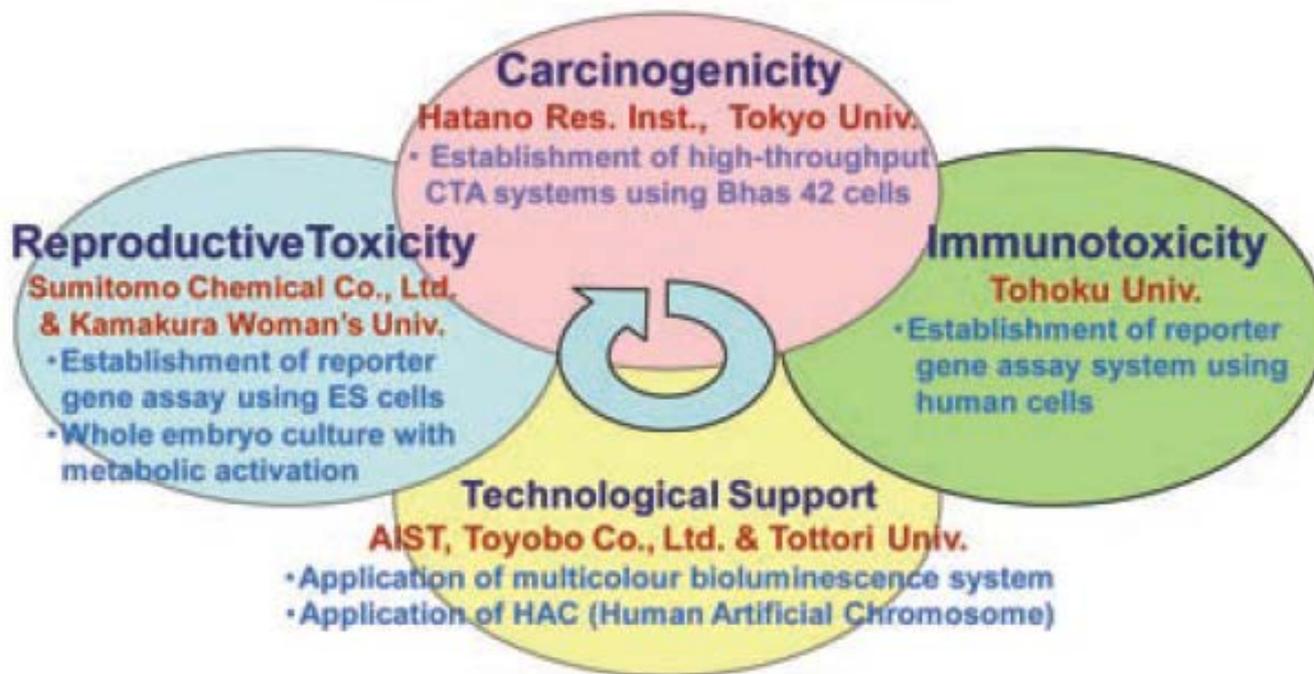


図1. 経済産業省における化学物質管理に関する研究開発



Project Leader: Dr. N. Tanaka
 Chief for Carcinogenicity: Dr. K. Sasaki
 Chief for Immunotoxicity: Dr. S. Aiba
 Chief for Repro. Toxicity: Dr. K. Saito
 Chief for Technological Support: Dr. Y. Ohmiya

Research Consortium

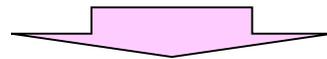


In vitro methods for reproductive toxicity

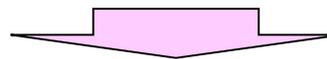
More than 30 different culture systems have been proposed

- 1) Tests on non-vertebrate species (*Hydra*, *Drosophila* etc.)
- 2) Tests on lower vertebrate embryo or embryonic aggregates (fish, birds etc.)
- 3) Tests on whole mammalian embryos
- 4) Tests on micromass cultures from mammalian embryos
- 5) Tests on embryonic stem cells (ES cells)**
- 6) Tests on other mammalian cell lines (neuroblastoma cells, teratocarcinoma cells etc.)

(Food Chem. Toxicol., 2002, 40, 193)

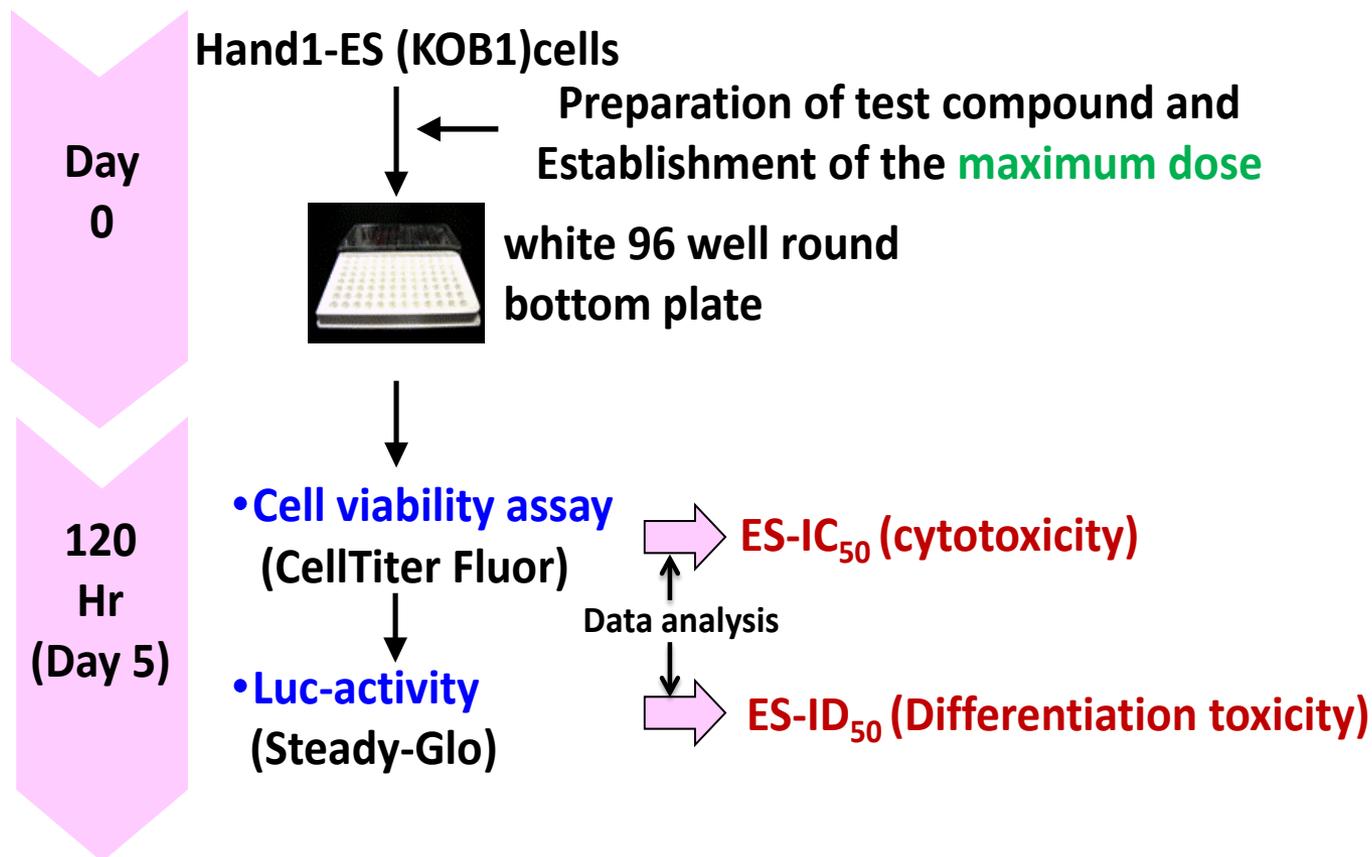


No tests gain regulatory acceptance and use.



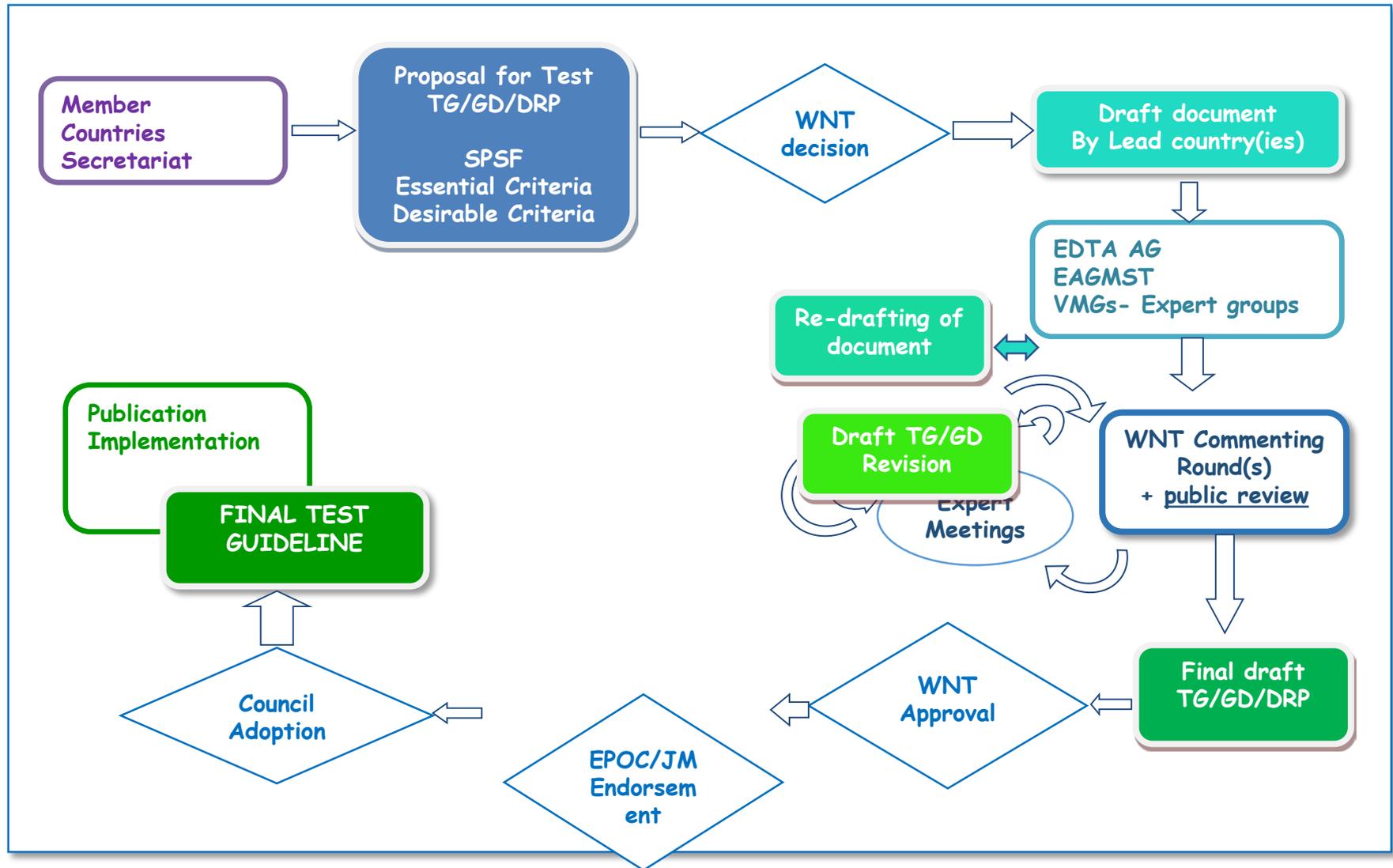
The research on alternative methods for detection of embryotoxicity is very challenging!

Hand1 gene related pathways



Hand1-Luc EST is an easy and inexpensive protocol

テストガイドライン開発のプロセス



OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME

Standard Project Submission Form

If you require further information please contact the OECD Secretariat
Return completed forms to Anne Gourmelon and Camilla Francis

PROJECT TITLE

Feasibility study to develop a OECD TG Hand1-Luc EST (Embryonic Stem Cell Test): In vitro assay detecting disruption to differentiation of rodent embryonic stem cells into cardiomyocytes using the Hand1 gene.

SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)

Japan

DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT

February, 2017

Test Guidelines Programme

DRAFT UPDATED WORK PLAN OF THE TEST GUIDELINES PROGRAMME

30th Meeting of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme

| | |
|--|---------------|
| Project 4.123: Review and feasibility of an Embryonic Stem Cell Test: In vitro assay detecting disruption to differentiation of rodent embryonic stem cells into cardiomyocytes using the Hand1 gene | |
| Lead: Inclusion in work plan: Project status and milestones: | Japan 2017 |
| <ul style="list-style-type: none">• 1st step: Detailed Review Paper of available methods and evaluation of utility and application;• 2nd step: feasibility study of the development of a Test Guideline (timelines are not provided yet). | |
| Subsidiary body of the JM | WNT |
| Expert group | |

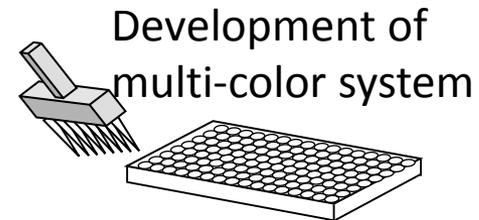
Goal of ARCH-Tox



Tox-in Vitro

Cell Culture system

- Speedily
- Low cost
- High specificity
- High-throughput



Screening

More another testings:
carcinogenicity,
Long reputed
dose testing, etc.

Tox-Omics

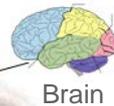
New Biomarker

Hepatotoxicity



Liver

Neurotoxicity



Brain

Nephrotoxicity



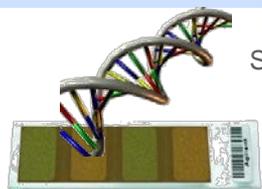
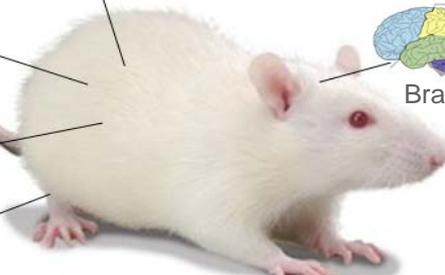
Kidney



Spleen



Bone Marrow



Gene expression analysis

Prediction system

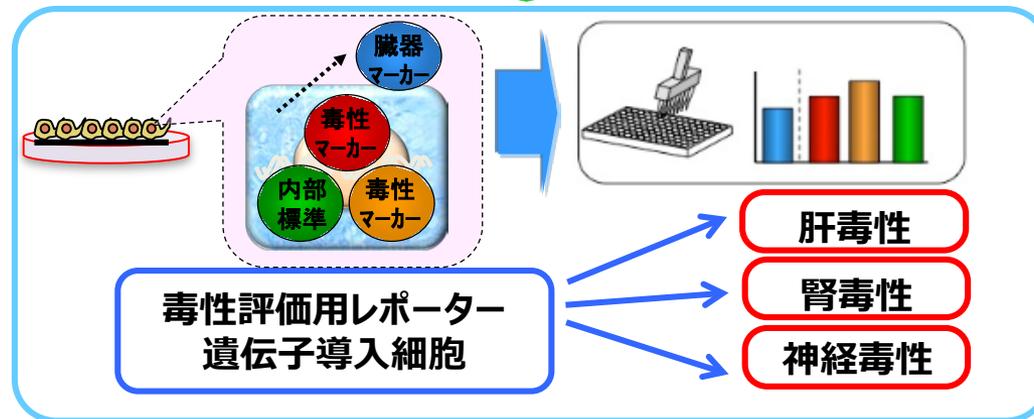
Our project has received funding from the METI in Japan.

Tox-in vitro研究開発の目標

本研究では、**石油精製化学物質等**の動物試験を**培養細胞**を用いた***in vitro*試験法**で補完できる有害性スクリーニングシステムを開発

〔目標〕毒性評価用レポーター遺伝子を導入した細胞を用いて、
効率的に有害性を評価できる新たな試験法を開発する

化学物質の毒性スクリーニング





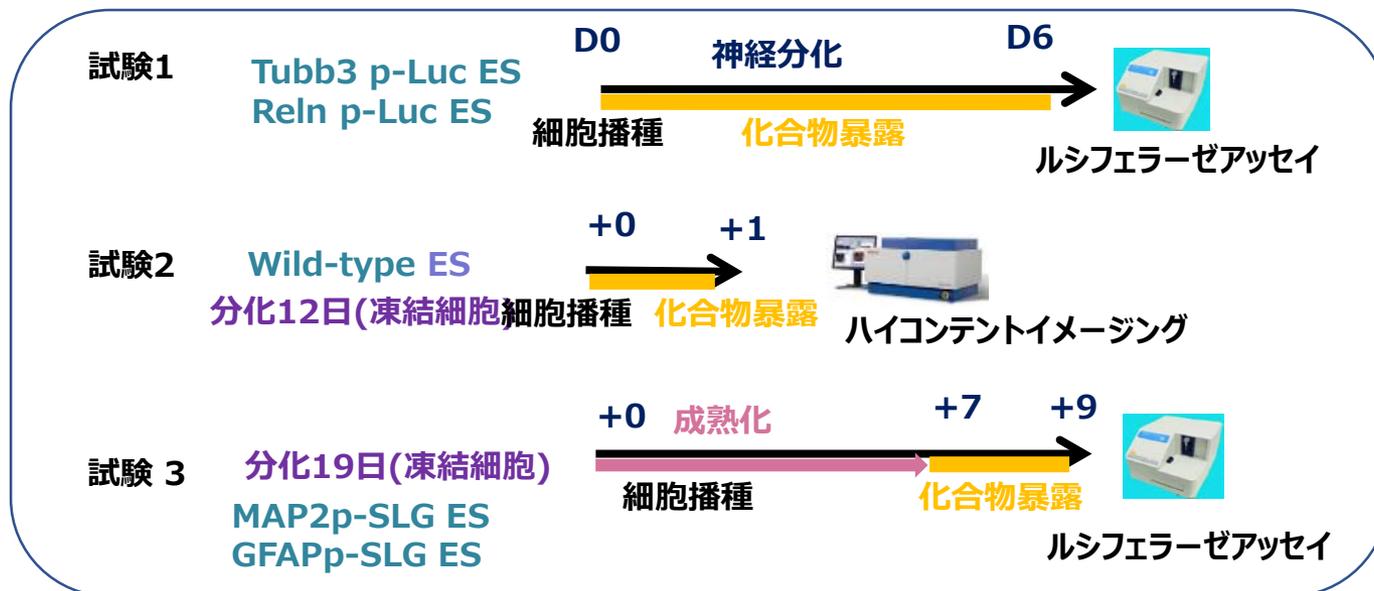
プロトコル作成・公表

3種類の試験プロトコルを作成・公表

試験1: Tubb3-ES/ReIn-ES細胞を利用した神経分化アッセイ プロトコル

試験2: マウス ES細胞由来神経細胞を利用した神経突起伸展アッセイ プロトコル

試験3: MAP2-ESおよびGFAP-ES細胞を利用した簡便な神経毒性アッセイ プロトコル



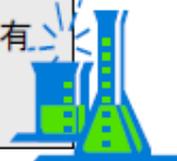
ポイント: 短期間で3試験同時に実施できるプロトコルを作成

ヒトiPS細胞を用いた新規in vitro毒性評価系の構築

特区の必要性

背景

- 日本の化学物質(薬剤等)の分子毒性解析技術は世界トップクラス
- 世界最大規模(8億件)のトキシコゲノミクス(毒性と遺伝子発現)のデータベース所有
- 「iPS細胞活用毒性評価技術」は総合科学技術会議から革新的技術の位置づけ(平成20年5月「革新的技術戦略」)



本複合体がiPS細胞の創薬応用で世界をリード



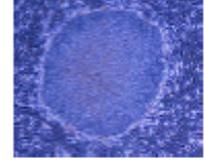
課題

- 動物実験によるスクリーニングでは「種差の壁」の限界を超えられない
- 評価系構築には様々な要素技術の融合が不可欠(細胞品質管理技術、分化誘導技術、毒性評価技術等)
- ヒトiPS細胞の創薬応用分野は世界との競争が激しく研究のスピードアップが不可欠
- 評価系を構築できても新薬承認審査基準に結びつかなければ新薬開発につながらない

スーパー特区による

- 様々な要素技術を融合させた新規評価系構築の研究と
- 規制当局との並行協議による評価系の審査基準への反映(先端技術と審査との乖離の解消)が不可欠

事業の概要



iPS細胞はあらゆる細胞に分化でき倫理上の問題点も少ないため
新規in vitro 毒性評価系開発のための最適な細胞ソース！

ヒト臍帯血細胞、胎盤組織由来細胞、
月経血由来細胞等を材料にした
ヒトiPS細胞コレクションの作成
(性別、年齢、細胞種、遺伝子背景等バリエーション)

ヒトiPS細胞の培養法の確立、
および品質評価法の開発と標準化
(グローバルスタンダードな
ヒトES細胞の標準値との比較)

京都大学
シェフィールド大学(英)
等と連携

目的細胞(肝臓、心筋、神経等)
への高効率分化誘導

世界最大規模(8億件)のトキシゲミクス
(毒性と遺伝子発現)のデータベース活用

ヒトiPS細胞を用いた新規in vitro毒性評価系の開発
各細胞毎に多種の毒性等を一度にスクリーニングできるハイスループットシステム



薬事法上の新薬承認審査基準に反映させる毒性試験ガイドライン案作成(従来基準を置き換える)
世界の医薬開発国が参加するICHのグローバル・スタンダードへ貢献

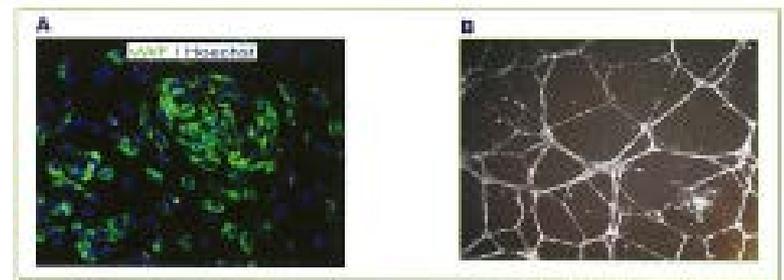
iPS細胞の「創薬応用」に関する
唯一のプロジェクト

iPS細胞の再生医療等への応用と比較し
創薬応用(毒性評価系構築)は
より早期の実用化が期待される

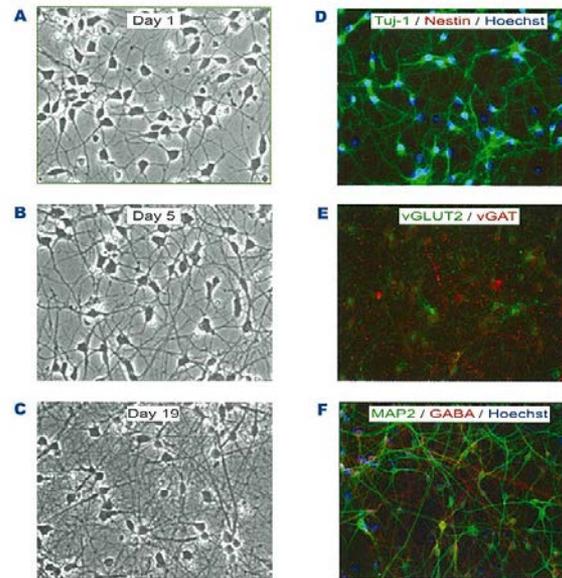
iCell® Cardiomyocytes



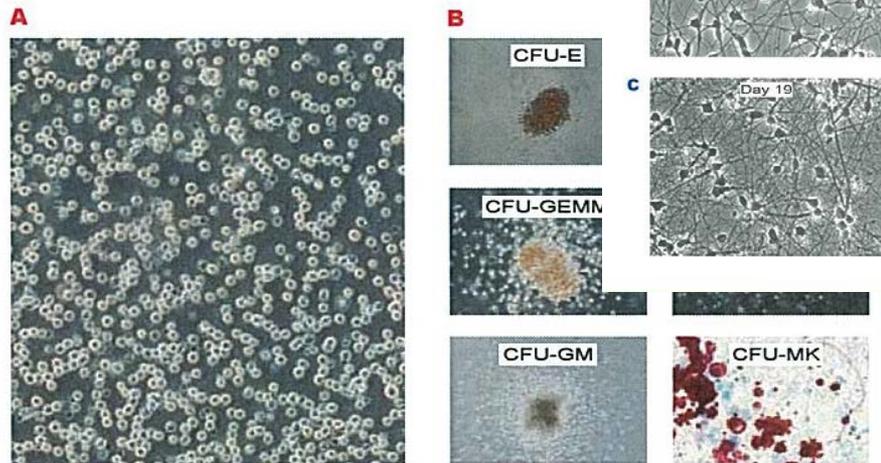
iCell® Endothelial Cells



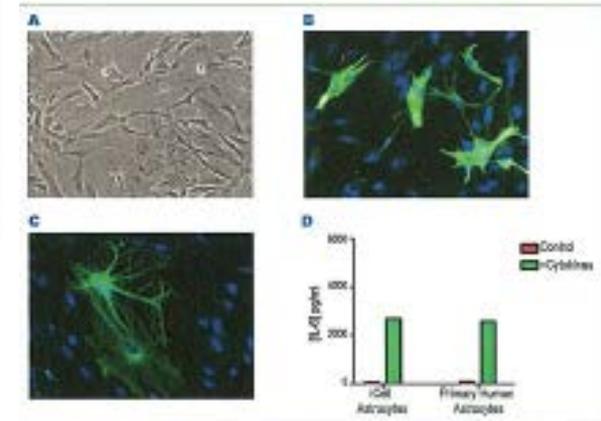
iCell® Neurons



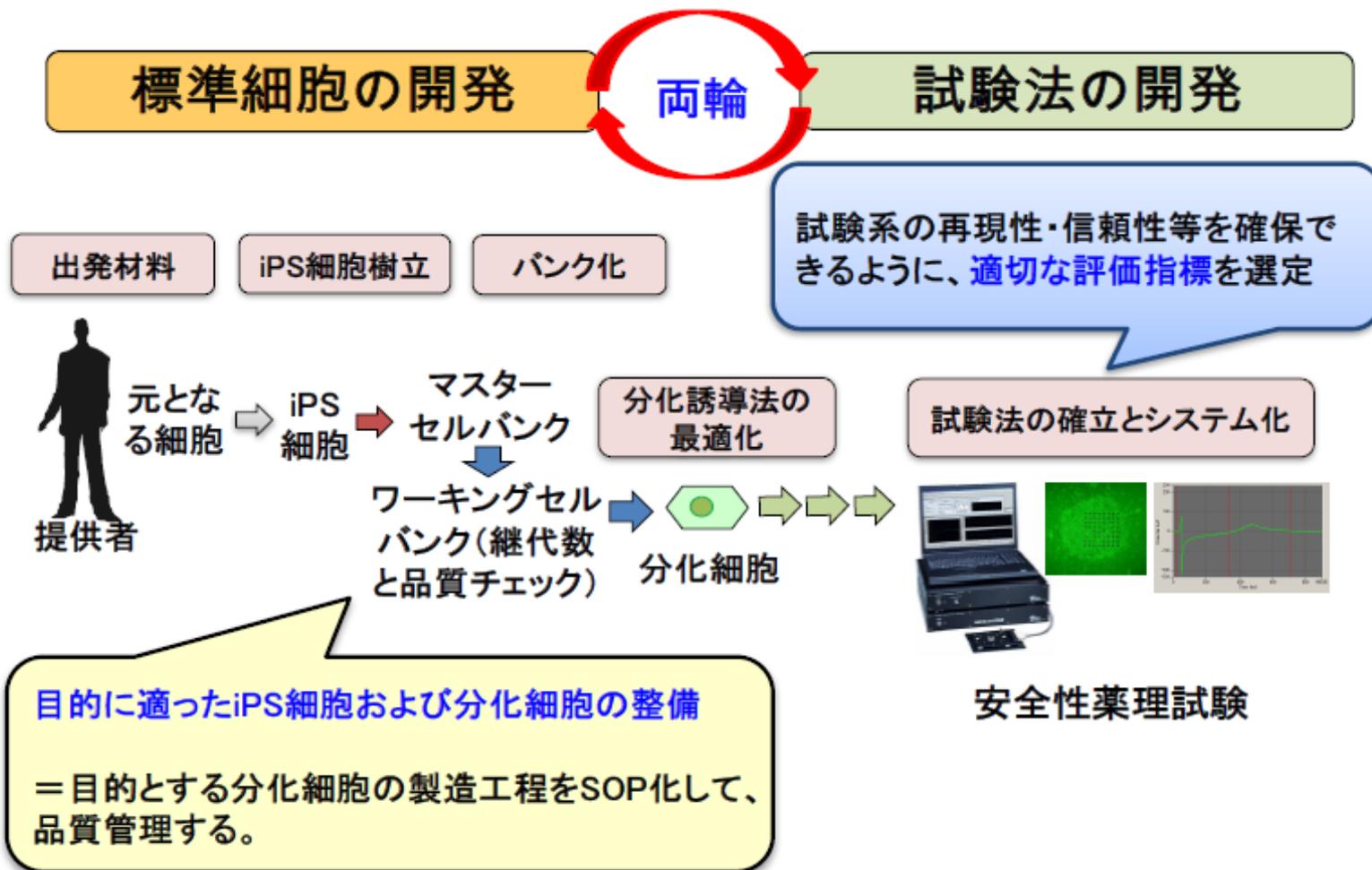
iCell® Hematopoietic Progenitor Cells



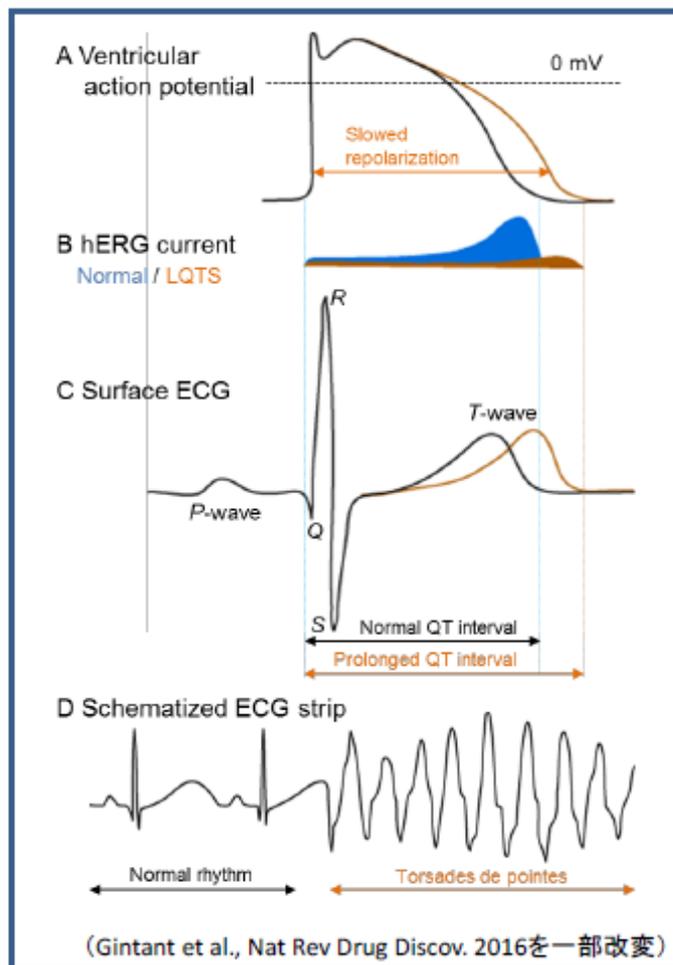
iCell® Astrocytes



ヒトiPS細胞を用いた薬理試験法を実現するために



hERG試験の問題点およびiPS心筋細胞の利点



現状の問題点

- ・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。
(ヒト、複数のイオンチャネルなど)

ヒトiPS細胞由来心筋細胞の利用が有用である。

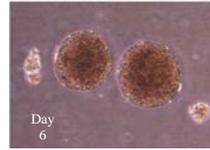
Pharmacological and toxicological tests using human iPS cells

Neurons

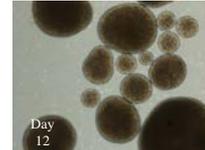
hiPSC clones



253G1



201B7



Neurospheres

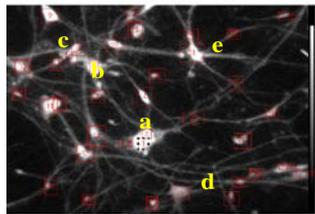


Differentiation

Pharmacological profilings of functional receptors

Establishment of human neuronal model from hiPSCs !

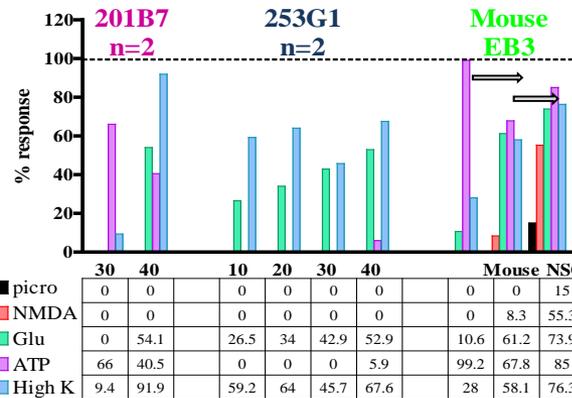
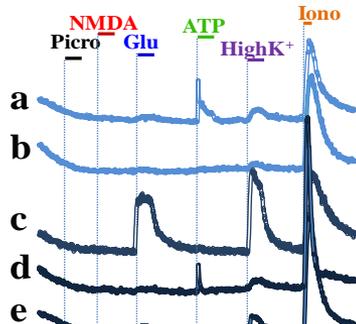
Differentiation Day 40



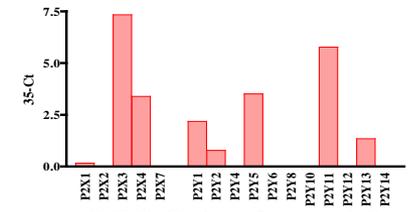
n = 37

Picro: 50 μ M picrotoxin 2min
 NMDA: 50 μ M NMDA 2min
 Glu: 100 μ M glutamate 2min
 ATP: 100 μ M ATP 2min
 High K⁺: 80 mM 2min
 Iono: 5 μ M ionomycin 1min

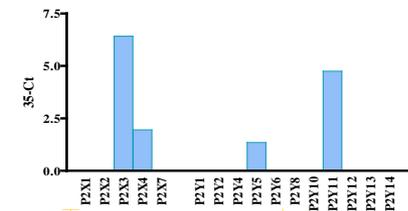
Picro n=0; Glu(a,c,e) n=20; NMDA n=0; ATP(a, d) n=15; HighK⁺ (a-e) n=34



201B7, Day 10



253G1, Day 10



Taqman array plate

Imaging of Ca²⁺ responses

医薬品のヒトにおける癌誘発リスクを予測するヒト iPS細胞由来神経細胞を用いた *in vitro* 安全性薬理評価法開発に関する研究

J76

創薬

新薬開発において、癌は重症化による副作用であり、新薬の癌誘発リスクを開発められています。これまで、非臨床段階ですることは非常に困難でしたが、ヒト iPS 細胞問題を解決したヒト神経細胞の入手が可能とヒト iPS 細胞由来神経細胞で癌誘発薬物の用を鑑認することに成功しました。そこで、薬品のヒトにおける癌誘発リスクを予測するヒトを用いた *in vitro* 安全性薬理評価法]の開発私たちの確立した評価法について国内・国際として提案し、皆様に使っていただけるよう引

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長

佐藤 薫



ヒト iPS細胞由来肝細胞を用いた医薬品の肝毒性を予測・評価する*in vitro*試験法の開発研究

J75

創薬

新規医薬品の開発コストの増加などにより、医薬品の開発効率の向上が求められている一方で、いまだに開発中止もしくは市場撤退の原因として肝障害が問題となる事例が報告されています。そのような中で、非臨床試験段階での肝障害リスクの早期把握のために、予測性の高い *in vitro* 肝障害予測評価系の開発が望まれています。

従来はヒト凍結肝細胞や動物実験による評価法が利用されてきましたが、再現性、供給量やヒトへの外挿性が必ずしも高くないなどの問題点を孕んでいました。そのような中、様々な臓器細胞に分化誘導可能なヒト iPS 細胞由来肝細胞 (hiPSC-hep) に期待が寄せられています。

本研究課題では、産官学が協力し、参画する各グループが今までに得た知見をもとに、hiPSC-hep を用いる利点が期待され薬物性肝障害予測に重要な 1. 反復投

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第三室長

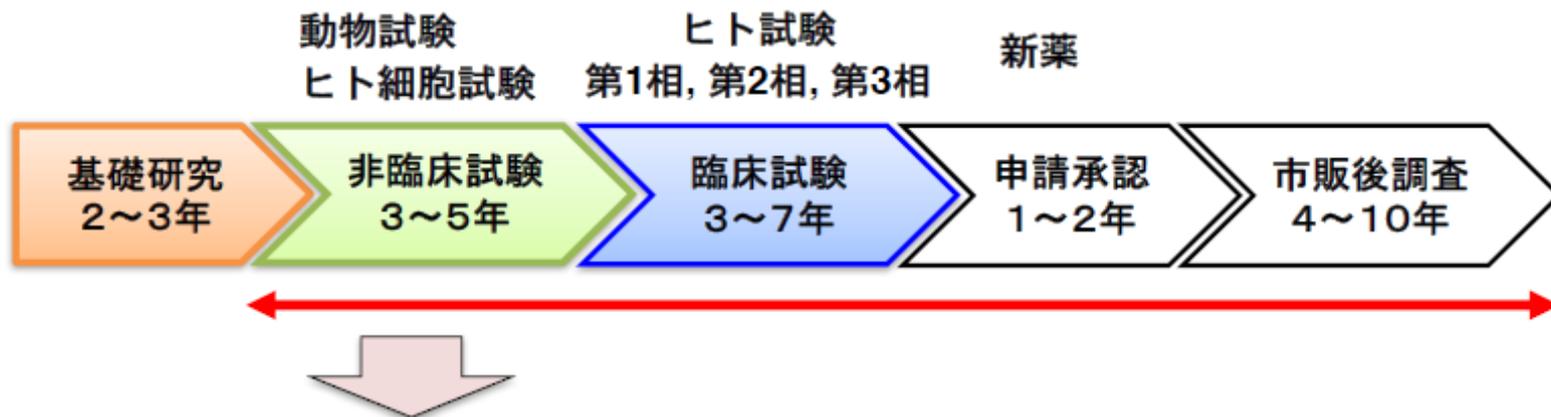
石田 誠一



与肝細胞障害性試験、2. CYP 誘導試験、3. 胆汁排泄阻害試験、4. 脂肪肝誘導性試験の *in vitro* 試験系の開発を進めて参ります。

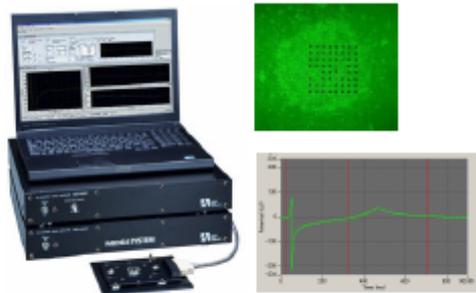


まとめ



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)



お知らせ

ホーム > お知らせ > 拡大コンソーシアム説明会

「幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化」拡大コンソーシアム説明会

日時：2017年10月27日（金）13:05-17:30（受付開始 12:30）

場所：京都大学iPS細胞研究所 1階棟1階議室

内容：化合物動物実験禁止の流れからヒト細胞を用いた代替リスク試験法の必要性が高まっています。2009年より国の補助を得て、未分化ヒトES細胞の遺伝子発現量を用いた毒性予測が神経毒、遺伝的・非遺伝的発がん毒で95～100%に達しました。未分化細胞のための試験期間は数日のみで行うことができ、応答反応が出る化合物については効率iPS細胞を用いた有効な代替リスク試験法になる可能性を秘めています。

本コンソーシアムでは、層官字が連携し、日本人からの「未分化幹細胞」及び「品質が安定な分化細胞」を用いて化合物の反応データベースを構築し、今後の企業や研究の現場でヒト細胞への化合物リスク試験において評価情報の基盤を構築することを目指します。

尚、本コンソーシアムの会費は当商は無料とします。ご興味ある皆様はぜひこの機会に本説明会にご参加下さい。

プログラム：

13:05-13:10 挨拶：藤岡 航（京大ORA）

13:10-13:30 コンソーシアム開催趣意説明：鈴木 隆（協和キリン）

13:30-14:00 新しいヒトES細胞を用いた化合物反応データベースとiPS細胞による毒性試験システムの概要：藤岡 航（京大ORA）

14:00-14:30 製薬企業での毒性試験の現状と期待：鈴木 基治（エーザイ）

14:30-15:00 化学企業での毒性試験の現状と期待：竹内 和由（日産化学）

【15:00-15:15 休憩（ドリンクを用意しています）】

15:15-15:45 iPS細胞とNGSを用いた毒性解析の実態：山根 操子・高原 一徳（京大CIRA）

15:45-16:15 食品企業での毒性試験の現状と期待：坂 紀佐子（サントリー）

16:15-16:45 「特別講演」データベースに用いる化合物リストについて：曾根 典子（国立環境研）

—Symposium Review—

ヒト ES 細胞を用いた高精度の化合物毒性予測システムの構築

山根順子,^{*,a,b} 油谷幸代,^c 今西 哲,^b 赤沼宏美,^d 永野麗子,^d
加藤 毅,^e 曾根秀子,^d 大迫誠一郎,^b 藤渕 航^{a,c}

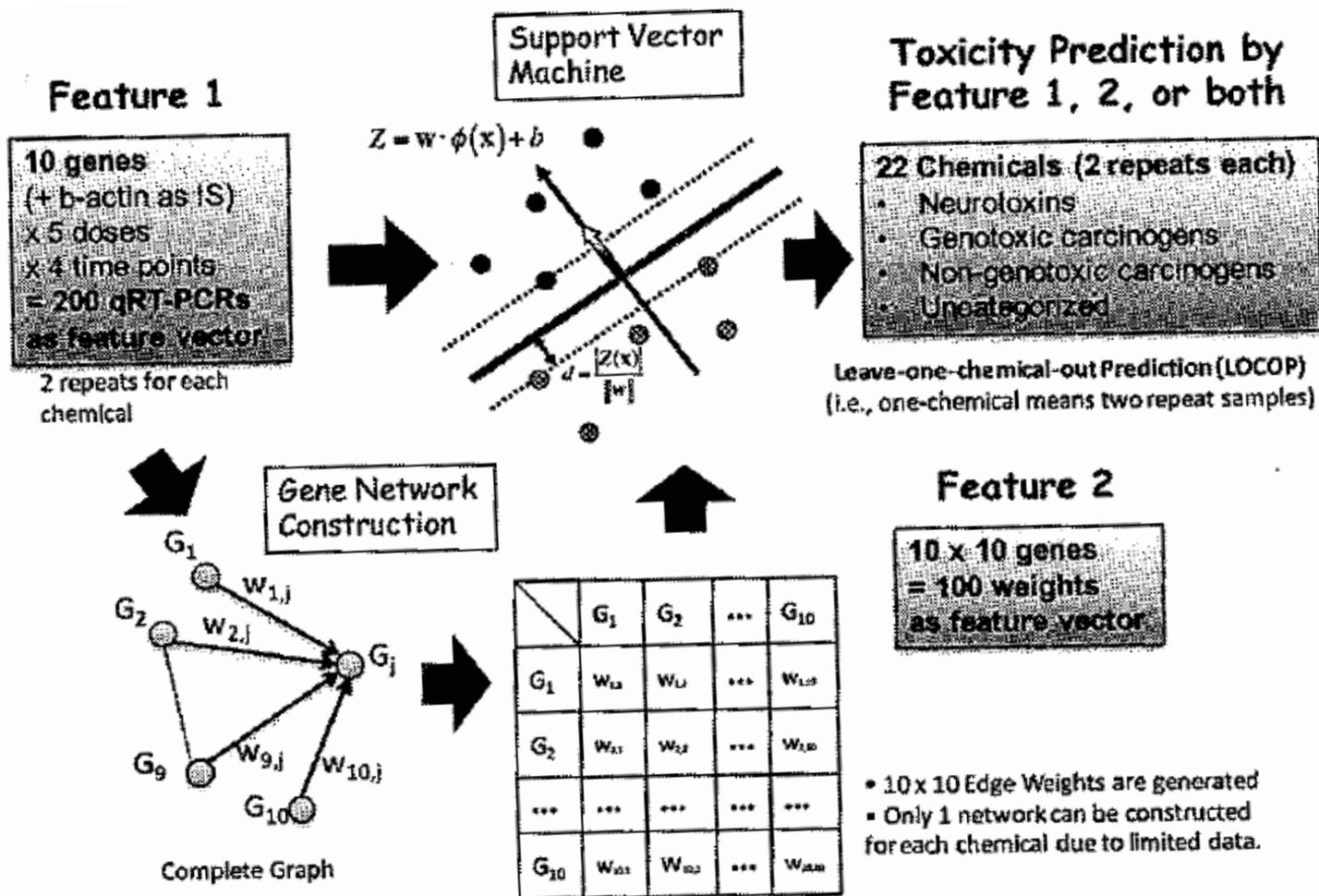
Construction of a High-precision Chemical Prediction System Using Human ESCs

Junko Yamane,^{*,a,b} Sachiyo Aburatani,^c Satoshi Imanishi,^b Hiromi Akanuma,^d Reiko Nagano,^d
Tsuyoshi Kato,^e Hideko Sone,^d Seiichiroh Ohsako,^b and Wataru Fujibuchi^{a,c}

^aKyoto University; 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan; ^bThe University of Tokyo; 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; ^cNational Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST); 2-4-7 Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064, Japan; ^dNational Institute for Environmental Studies (NIES); 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan; and ^eGunma University; 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan.

(Received October 11, 2017)

Toxicity prediction based on stem cells and tissue derived from stem cells plays a very important role in the fields of biomedicine and pharmacology. Here we report on qRT-PCR data obtained by exposing 20 compounds to human embryonic stem (ES) cells. The data are intended to improve toxicity prediction, per category, of various compounds through the use of support vector machines, and by applying gene networks. The accuracy of our system was 97.5–100% in three toxicity categories: neurotoxins (NTs), genotoxic carcinogens (GCs), and non-genotoxic carcinogens (NGCs). We predicted that two uncategorized compounds (bisphenol-A and permethrin) should be classified as follows: bisphenol-A as a non-genotoxic carcinogen, and permethrin as a neurotoxin. These predictions are supported by recent reports, and as such constitute a good outcome. Our results include two important features: 1) The accuracy of prediction was higher when machine learning was carried out using gene networks and activity, rather than the normal quantitative structure-activity relationship (QSAR); and 2) By using undifferentiated ES cells, the late effect of chemical substances was predicted. From these results, we succeeded in constructing a highly effective and highly accurate system to predict the toxicity of compounds using stem cells.



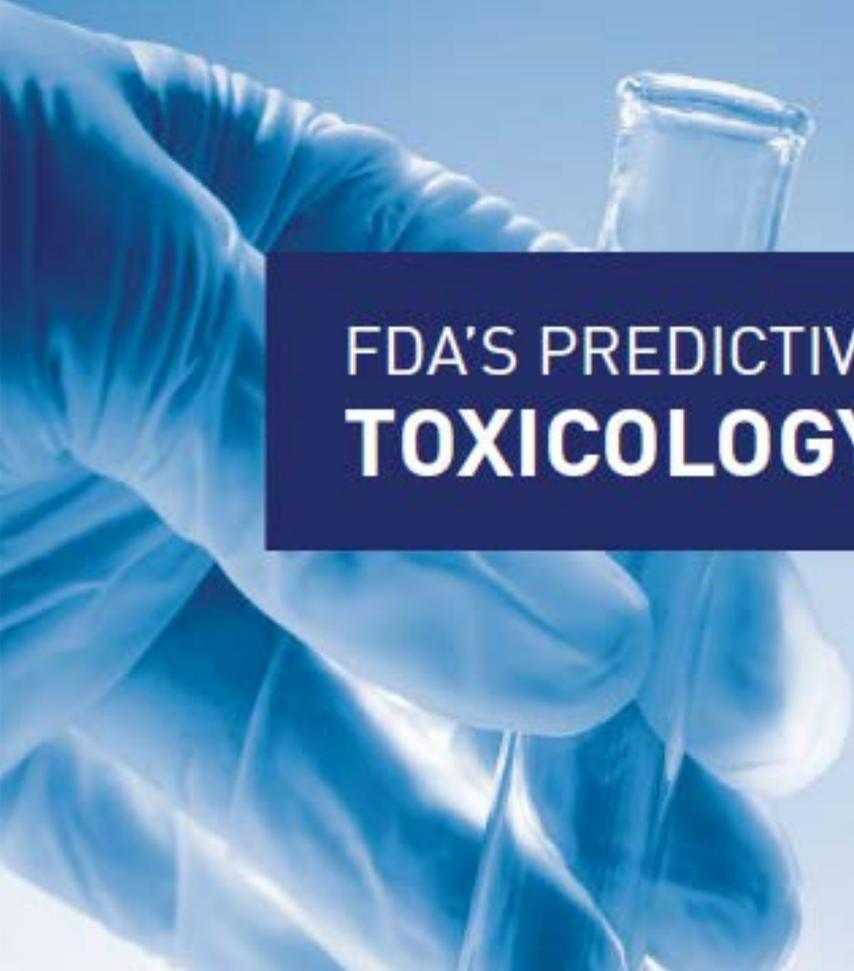
Nucleic Acids Research, 2016, Vol. 44, No.12 5515-5528 doi: 10.1093/nar/gkw450 より抜粋

図1 データ生成から SVM 予測へのプロセスの概略図

Figure1 Schematic view of processes from data generation to SVM prediction



**U.S. FOOD & DRUG
ADMINISTRATION**

A close-up photograph of a hand wearing a white nitrile glove, holding a clear glass test tube. The background is a soft, out-of-focus blue. The entire image is overlaid with a semi-transparent blue filter.

FDA'S PREDICTIVE **TOXICOLOGY ROADMAP**

Promising New Technologies in Predictive Toxicology

New approaches are being explored in many scientific disciplines that may be relevant to toxicology. These methods span the technical spectrum, from computational methods and simple and complex in vitro systems to innovative animal models, such as humanized animals or genetically altered organisms, and many others. This roadmap cannot catalog or prioritize these vast and dynamic fields of research. However, many of these approaches might be able to address some of the needs and gaps identified, although it is not possible to predict which ones will be most successful. Each approach requires evaluation for its usefulness within a context of use-specific manner as discussed above.

Over the years, FDA has been a critical participant in developing and adopting new technologies. The experience gained from these efforts continues to inform activities, including international activities, around a number of toxicology-related areas.

Microphysiological systems like tissues or organs on a chip

FDA participates in the Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA)¹ and National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS)² programs, and it is initiating internal research programs with such systems. FDA's Center for Food Safety and Nutrition has entered into a Cooperative Research and Development Agreement to bring organs on a chip technology into FDA laboratories.

Alternative test methods for reproductive toxicity testing

FDA's Center for Drug Evaluation and Research is working through the International Conference on Harmonisation (ICH) to consider the regulatory use of alternative test methods for reproductive toxicity testing, as outlined in the Step 2 draft guidance ICH S5(R3) available at www.ich.org.

Promising New Technologies in Predictive Toxicology

Computational toxicology

FDA's research programs contribute to updating existing and developing new quantitative structure–activity relationship (QSAR) programs and to devising new computational approaches.

In vitro alternatives

FDA participates in the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), which is evaluating non-animal methods for assessing a variety of endpoints.

Quantitative risk assessment (QRA) addressing the complex chemical mixtures of tobacco products

FDA's Center for Tobacco Products conducted a two-day workshop on risk assessment and has been providing feedback to industry on QRAs submitted with product applications.

Read across methodology

This methodology uses data from a data-rich substance for a data-poor substance that is considered similar enough to use the same data as a basis for assessing safety. FDA participates in an ICCVAM Work Group on this area.

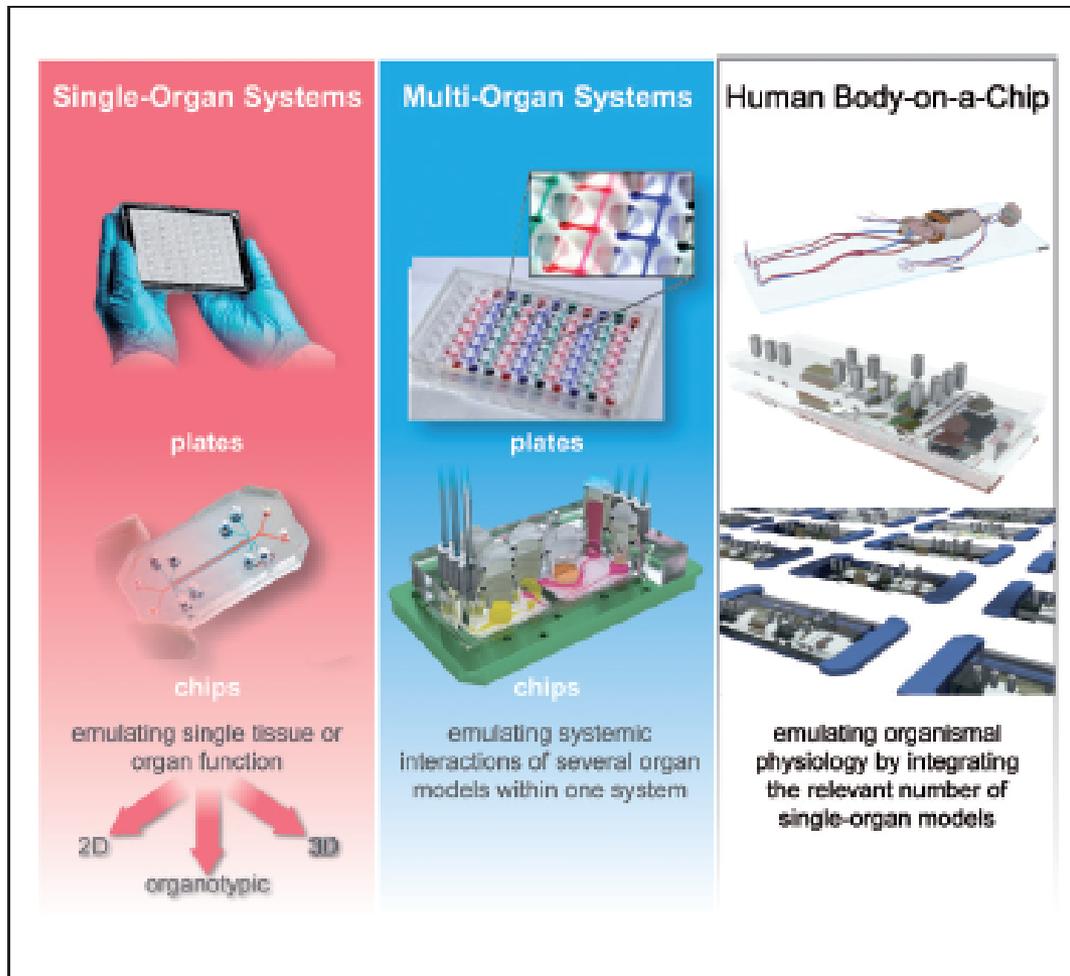
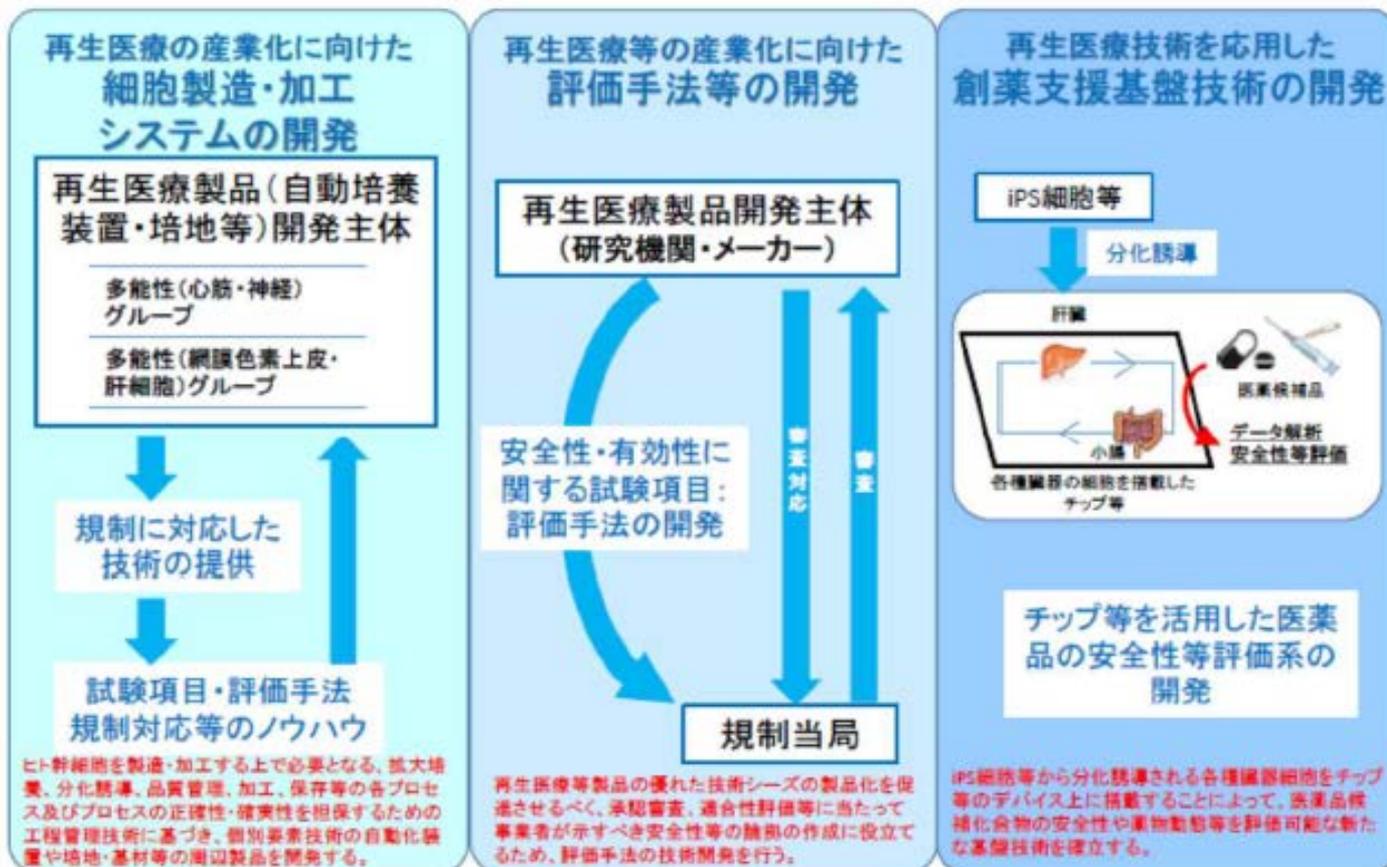


Fig. 3: Types of MPS used for emulation of human biology *in vitro*

Mark U., et al, ALTEX、 33(3)272-321 (2016)

再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業





再生医療実現拠点ネットワークプログラム (疾患特異的iPS細胞の利活用促進・難病加速プログラム)

研究拠点 1

| 研究開発課題名 | 研究開発代表者 | | |
|--|----------------------------|---------|--------|
| | 所属 | 役職 | 氏名 |
| 神経疾患特異的iPS細胞を活用した病態解明と新規治療法の創出を目指した研究 | 慶應義塾大学医学部 | 医学部長／教授 | 岡野 栄之 |
| 疾患iPS細胞を活用した難治性血液・免疫疾患の病態解明と治療法開発 | 京都大学iPS細胞研究所 | 准教授 | 齋藤 潤 |
| 筋疾患に対する治療薬の創出を目指した研究 | 京都大学iPS細胞研究所 | 准教授 | 櫻井 英俊 |
| 難治性骨軟骨疾患に対する革新的iPS創薬技術の開発と応用 | 京都大学ウイルス・再生医科学研究所／iPS細胞研究所 | 教授／副所長 | 戸口田 淳也 |
| ヒトiPS細胞を用いた呼吸器難病の病態機序の解明と新規創薬基盤の確立 | 京都大学大学院医学研究科 | 教授 | 平井 豊博 |
| 難治性心筋症疾患特異的iPS細胞を用いた集学的創薬スクリーニングシステムの開発と実践 | 大阪大学大学院医学系研究科 | 特任教授 | 宮川 繁 |

創薬のスクリーニング系の確立



難治性心筋症疾患特異的 iPS細胞を用いた 集学的創薬スクリーニングシステムの開発と実践



宮川 繁

大阪大学 大学院医学系研究科 先進幹細胞治療学共同研究講座 特任教授

E8

特異性心筋症が重症化する。iPS細胞由来のその知見に基づいた疾患モデルを構築し、新薬の開発に貢献。大阪大学で蓄積した知見を駆使し、より集学的な創薬スクリーニングシステムと人工知能を用いた創薬解析に基づいた

ヒト iPS細胞を用いた呼吸器難病の病態機序の 解明と新規創薬基盤の確立



平井 豊博

京都大学 大学院医学研究科 呼吸器内科学 教授

E7

呼吸器疾患ともあるが、創薬が困難な臓器である肺を強く受ける形も大規模な創薬スクリーニングが難しい。ヒト iPS細胞を用いた創薬スクリーニングシステムと人工知能を用いた創薬解析に基づいた

疾患特異的 iPS細胞をもちいた 小児難治性疾患の統合的理解と創薬開発



北島 康司

大阪大学 医学部附属病院 総合周産期母子医療センター 講師

E9

小児の難病が成人と大きく異なるところは、その体の成長・発育とともに形成され、しかもさまざまな臓器に現れる点にあります。それら多様な症状を併せても、疾患の全貌は見えてきません。これまで私ダウングル症候群に高頻度で発症する造血異常のメカニズムを明らかにするとともに、神経細胞が受けるストレスについて新たな知見を得ました。

本拠点では、複数の分化系列を時間軸に沿ってできる iPS 細胞の特徴を十分に生かし、小児難病とくにダウングル症候群の合併症をさまざまな角度からとらえることで、その病態を統合的に理解することを目指し白血病などさらに重篤な造血異常をもたらす遺伝子変異を特定できる系を確立するとともに、細胞培養系とマウス脳への移植系をもちいて、ダウングル症の小児期に発症する神経発達障害、および成人期の認知障害の病態を

iPS細胞由来心筋細胞を活用した 遺伝性拡張型心筋症の病態解明と治療薬開発



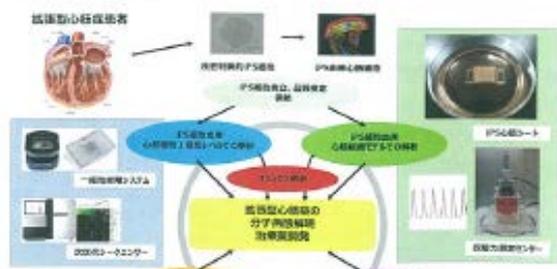
小室 一成

東京大学 大学院医学系研究科 教授

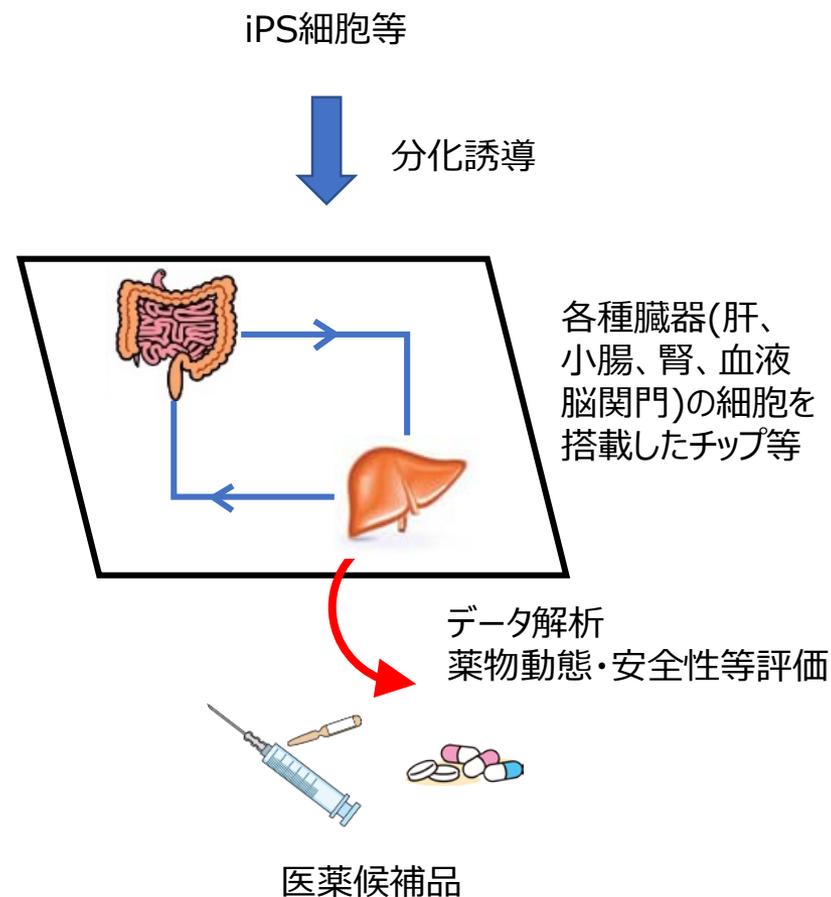
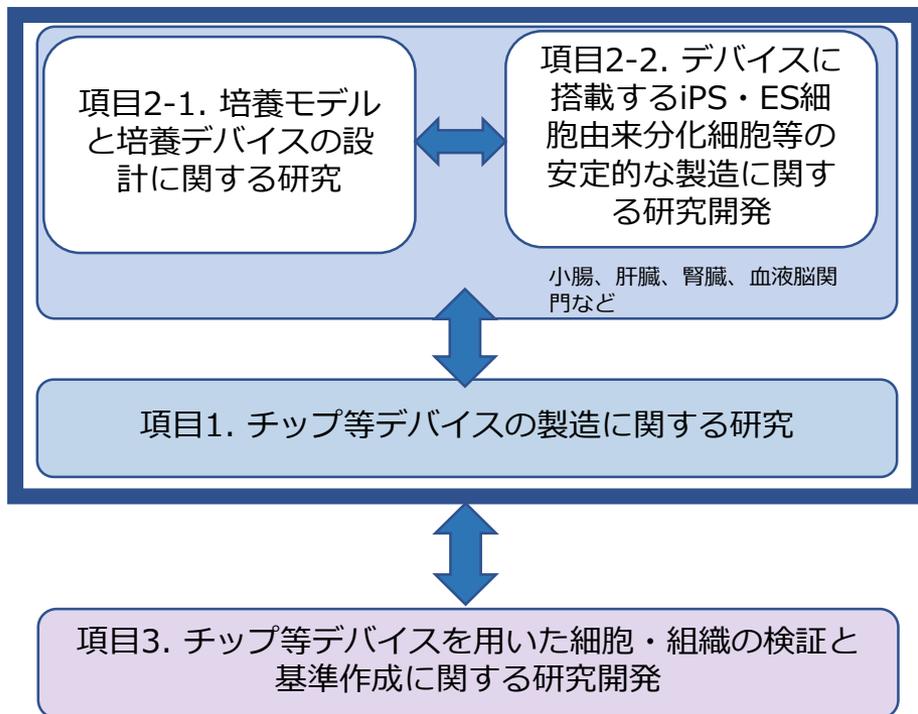
E10

特異性拡張型心筋症は難治性の心不全や不整脈を来す予後不良の疾患で、病態の解明や治療法の開発はまだ進んでいません。私はこれまで、複数の心疾患の患者さんから iPS 細胞を作成し、心筋分化誘導して解析する研究を行ってきました。その結果、心疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞は、患者さんの心臓で生じる異常の一部を再現していることが明らかになりました。私たちは既に、心筋細胞の遺伝子発現の変化やエピゲノム変化を1細胞ごとのレベルで解析する「1細胞トランスクリプトーム解析」、また iPS 細胞から心筋細胞シートやチューブを作成して張力や内圧変化を測定する「三次元心筋組織モデル構築」

術を用いて解析することで、拡張型心筋症発症過程に共通する病態を明らかにし、治療薬開発につなげることを目標としています。



再生医療技術を活用した創薬支援基盤技術の開発



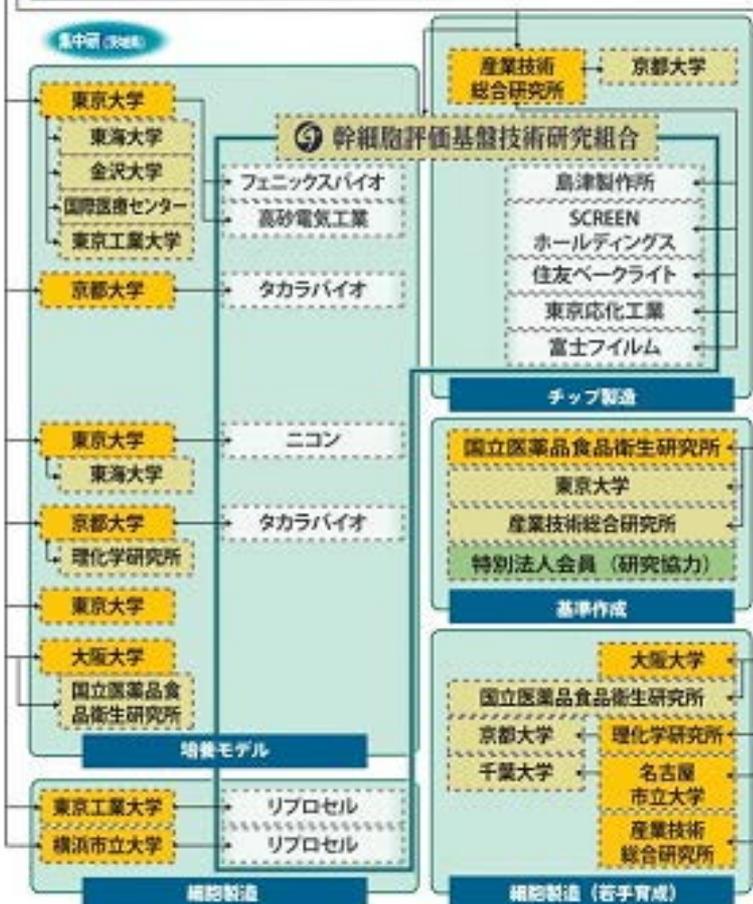
AMEDプロジェクトの実施体制

代表機関 / 知財合意書 / 共同研究契約書

AMED

細胞製造システム事業 PS: 中畑 龍俊 (京都大学教授)

人体模倣システム事業 PS: 梅澤 明弘 (国立成育医療研究センター副所長)
PO: 小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所 所長)

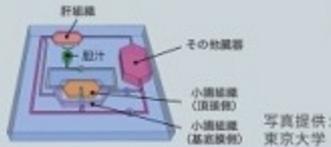


人体模倣システム事業

製薬企業等ユーザーニーズを最大限に活かしたデバイスや培養技術の構築を行い、チップ等デバイスを用いた細胞・組織評価系の実用化を目指す。

幹細胞評価基盤技術研究組合下で、集中研での一体研究/知財管理

培養モデルと培養デバイスの設計に関する研究開発



培養
モデル

チップ
製造

細胞
製造

チップ等デバイスの製造技術に関する研究開発



写真提供:
産業技術総合研究所

iPS・ES細胞由来分化細胞等の安定的な製造に関する研究開発



iPS
細胞

写真提供 京都大学iPS細胞研究所



小腸、肝臓、腎臓、血液脳関門など

基準
作成

チップ等デバイスを用いた細胞・組織の検証と基準作成に関する研究開発

データ解析
薬物動態・安全性等の評価

多施設での
バリデーション

統一プロトコル

薬物動態・安全性を正確に予測

幹細胞を用いた創薬への活用を加速

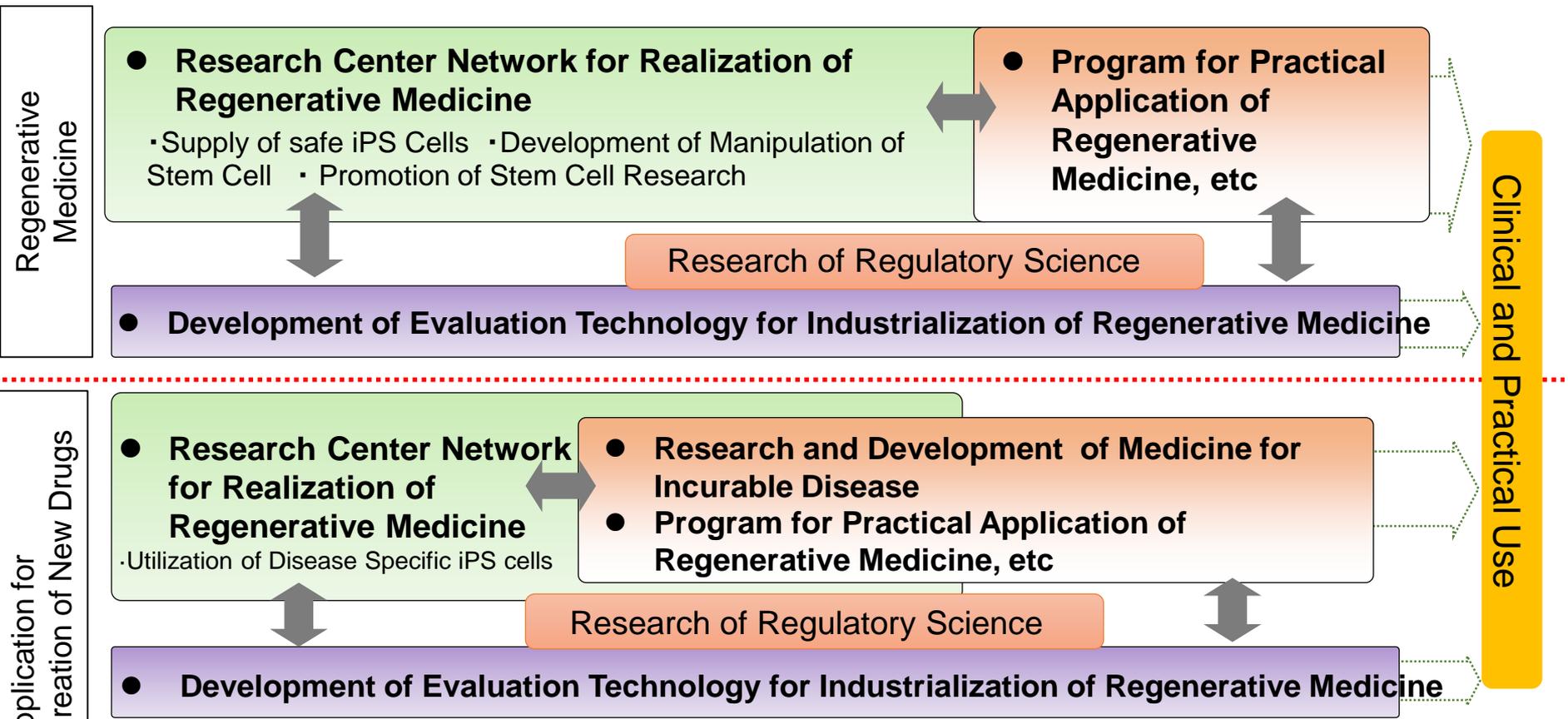
ユーザーニーズ
フィードバック



製薬企業

※AMED原図を加工

Japan Regenerative Medicine Project



■ : MEXT. ■ : MHLW、■ : METI

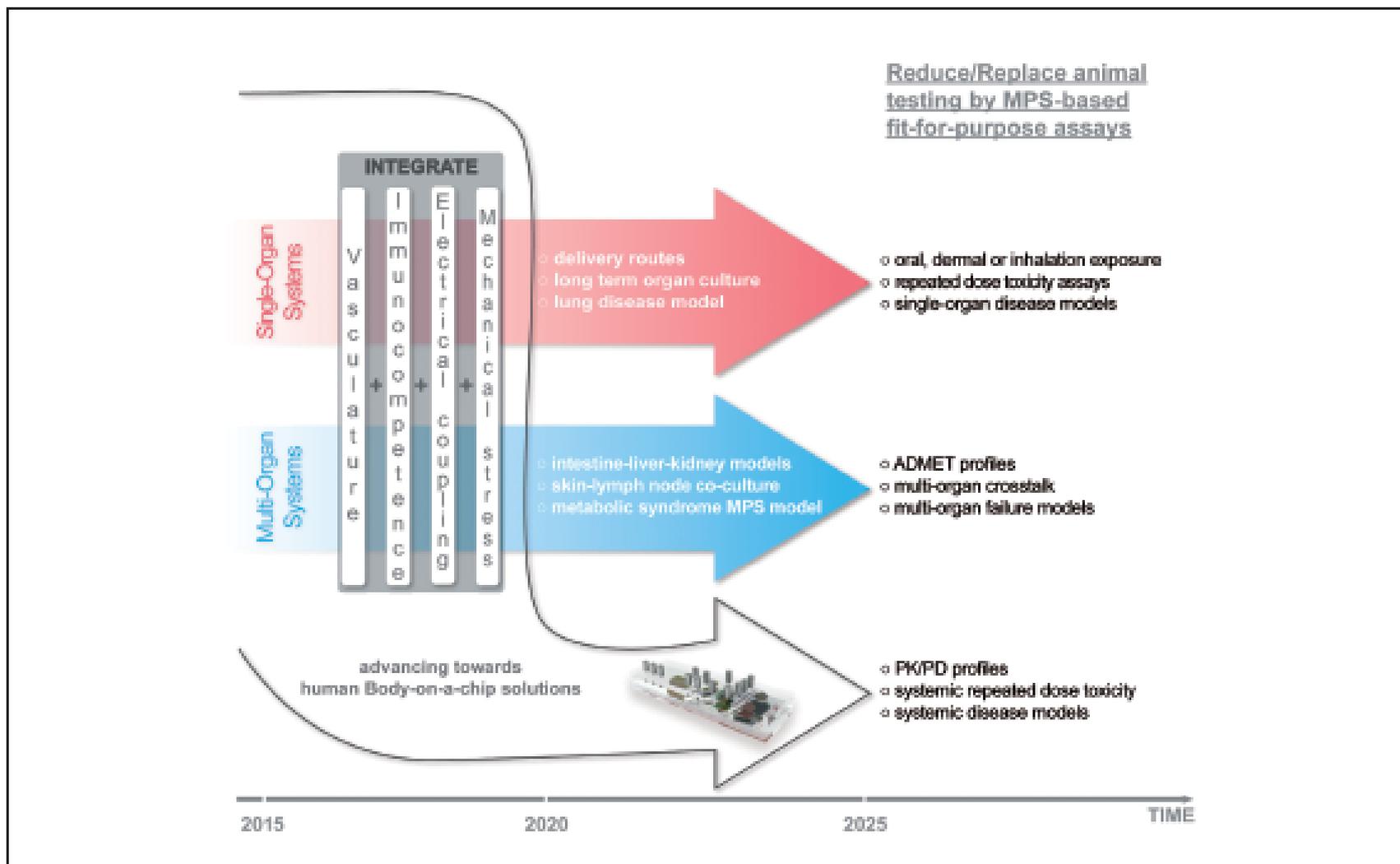


Fig. 18: Next MPS developments meeting industrial needs

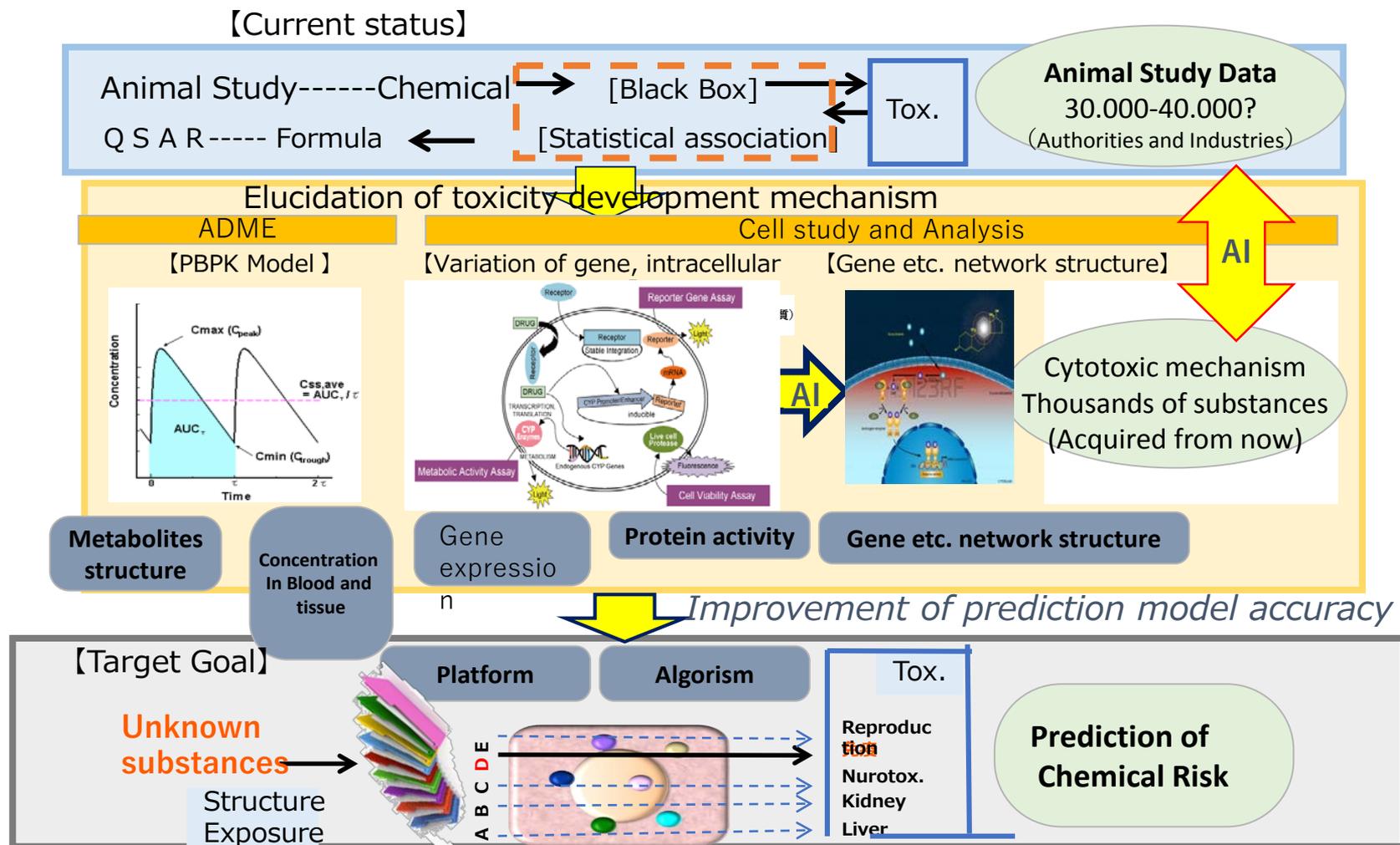
経済産業省プロジェクト

“毒性関連ビッグデータを用いた人工知能による
次世代型安全性予測手法の開発”

*AI-based
Substances
Hazardous
Integrated
Prediction
System project*

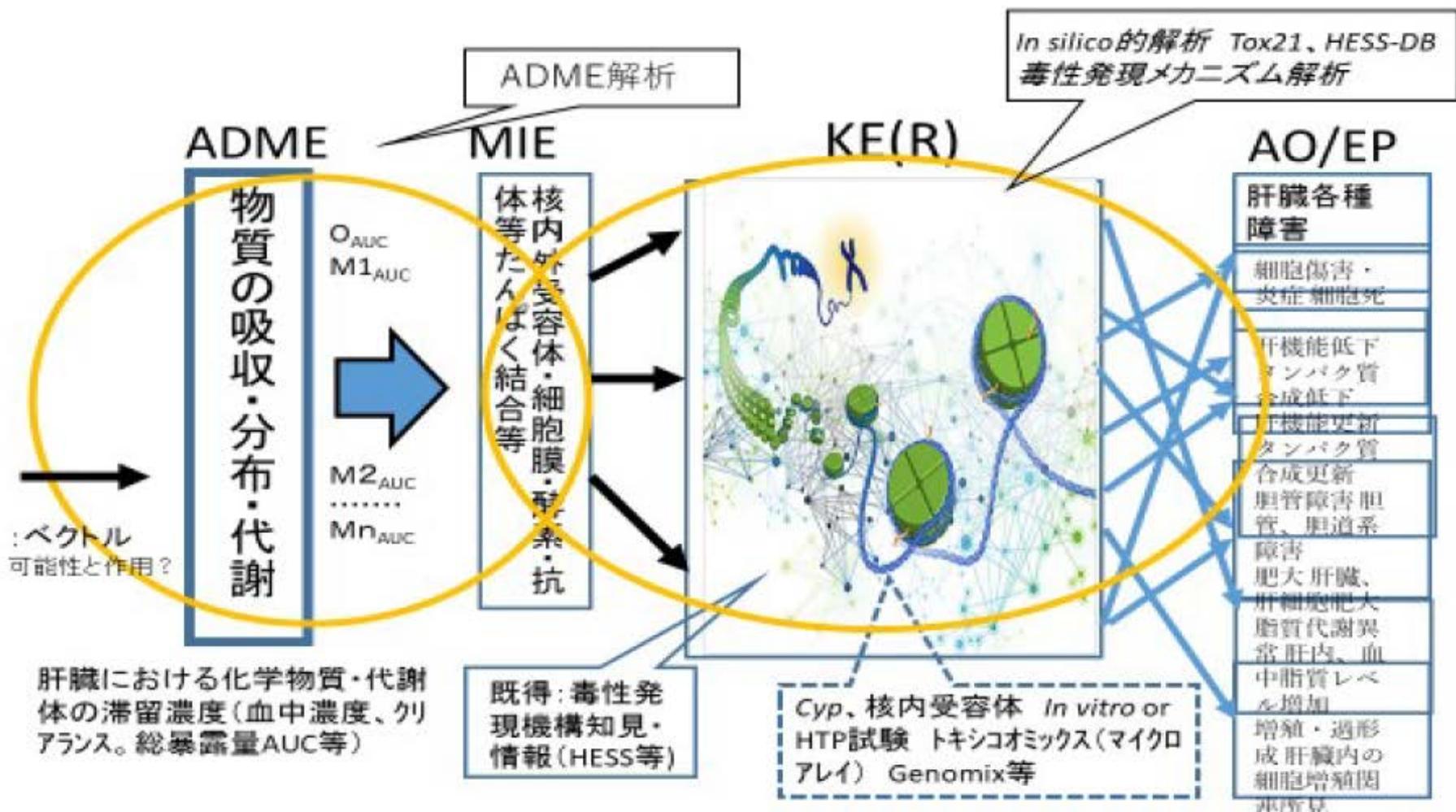


Basic concept for Development of AI based next generation Chemical Safety prediction system using related Big data



AI-SHIPS開発機基本方針とスケジュール（案）

| 期間 | システム構築目標 | 具体的なアクション | |
|-----------------------------------|--|--|------------------|
| 1st STEP 2017-2018 (19) 年度 |  肝臓毒性予測プロトタイプシステム構築 | <ol style="list-style-type: none"> 基本的な予測モデル（肝臓毒性）の構築 ・構造、物性から肝臓毒性予測までの入力記述子（実験データ等含む）の選択（ADME情報や作用機作情報等）と適正情報処理システム（アルゴリズム等）の開発、構築 毒性メカニズム解明 ・シグナル伝達系、タンパク、核内受容体、細胞内複雑系毒性発現情報取得 | |
| 2nd STEP 2019 (20) - 2021年度 |  血液毒性、腎臓毒性等予測プロトタイプシステム構築 ・肝臓毒性予測システムの精緻化 ・肝臓、血液および腎臓毒性統合システムの構築 | <ol style="list-style-type: none"> 血液毒性、腎臓毒性への応用展開 ・血液毒性、腎臓毒性作用機差情報の取得必要に応じ、実験データ取得。 国際機関、企業取得情報の入力および上記、複雑系毒性情報の入力による全体毒性予測システムの精緻化 | 企業等外部データ入力（組織構築） |
| PJ終了後 2022年度以後 |  上記予測システムの精緻化、アップディング、利用 | 新規情報の入力、メンテナンス 規制への利用展開（既存化学物質評価等） | 管理組織 |



1
2 **Draft GUIDANCE DOCUMENT ON GOOD *IN VITRO* METHOD PRACTICES (GIVIMP)**
3 **FOR THE DEVELOPMENT AND IMPLEMENTATION OF *IN VITRO* METHODS FOR**
4 **REGULATORY USE IN HUMAN SAFETY ASSESSMENT**

5
6 **FOREWORD**
7

8 A guidance document on Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the development and
9 implementation of *in vitro* methods for regulatory use in human safety assessment was
10 identified as a high priority requirement by the OECD. The aim of this guidance document is
11 to reduce the uncertainties in cell and tissue-based *in vitro* method derived predictions by
12 applying all necessary good scientific, technical and quality practices from *in vitro* method
13 development to *in vitro* method implementation for regulatory use. This guidance document
14 also applies to *in vitro* methods already accepted by the OECD.

Guidance on Good Cell Culture Practice

A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice

Sandra Coecke,¹ Michael Balls,² Gerard Bowe,¹ John Davis,³ Gerhard Gstraunthaler,⁴ Thomas Hartung,¹ Robert Hay,⁵ Otto-Wilhelm Merten,⁶ Anna Price,¹ Leonard Schechtman,⁷ Glyn Stacey⁸ and William Stokes⁹

¹ECVAM, Institute for Health & Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre, Ispra (VA), Italy; ²FRAME, Nottingham, UK; ³Research and Development Department, Bio-Products Laboratory, Elstree, Herts., UK; ⁴Department of Physiology, Innsbruck Medical University, 6010 Innsbruck, Austria; ⁵ATCC, Manassas, VA, USA; ⁶Généthon, Evry, France; ⁷National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA; ⁸Division of Cell Biology and UK Stem Cell Bank, National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, Potters Bar, Herts., UK; ⁹National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods Environmental Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, USA

t⁴ workshop report*

Good Cell Culture Practice for stem cells and stem-cell-derived models

David Pamies¹, Anna Bal-Price², Anton Simeonov³, Danilo Tagle³, Dave Allen⁴, David Gerhold³, Dezhong Yin⁵, Francesca Pistollato², Takashi Imutsuka⁶, Kristie Sullivan⁷, Glyn Stacey⁸, Harry Salem⁹, Marcel Leist¹⁰, Mardas Daneshian¹⁰, Mohan C. Vemuri¹¹, Richard McFarland¹², Sandra Coecke², Suzanne C. Fitzpatrick¹², Uma Lakshmi¹¹, Amanda Mack¹³, Wen Bo Wang¹³, Daiju Yamazaki¹⁴, Yuko Sekino¹⁴, Yasunari Kanda¹⁴, Lena Smirnova¹ and Thomas Hartung^{1,10}

¹Center for Alternative to Animal Testing, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA; ²European Commission, Joint Research Centre, Ispra, VA, Italy; ³National Center for Advancing Translational Sciences – National Institutes of Health, Rockville, MD, USA; ⁴Integrated Laboratory Systems, Inc., Contractor supporting the NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), Morrisville, NC, USA; ⁵ATCC Cell Systems American Type Culture Collection, Gaithersburg, MD, USA; ⁶Pharmacological Evaluation Institute of Japan (PEIJ), Tokyo, Japan; ⁷Physicians Committee for Responsible Medicine, Washington, DC, USA; ⁸National Institute for Biological Standardization and Control, South Mimms, Hertfordshire, UK; ⁹US Army Edgewood Chemical Biological Center, Aberdeen Proving Ground, MD, USA; ¹⁰Center for Alternatives to Animal Testing-Europe, University of Konstanz, Konstanz, Germany; ¹¹Cell biology solutions, Thermo Fisher Scientific, Frederick, MD, USA; ¹²Center for Food Safety and Applied Nutrition/FDA, College Park, MD, USA; ¹³Cellular Dynamics International, Madison, WI, USA; ¹⁴Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

「細胞培養における基本原則」の提案

諫田 泰成¹⁾、中村 和昭²⁾、山崎 大樹¹⁾、片岡 健³⁾、青井 貴之⁴⁾、中川 誠人⁵⁾、藤井 万紀子⁶⁾、阿久津英憲⁷⁾、末盛 博文⁸⁾、浅香 勲⁹⁾、中村 幸夫¹⁰⁾、小島 肇¹¹⁾、関野 祐子¹⁾、古江-楠田 美保¹²⁾

1) 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

2) 国立成育医療研究センター研究所薬剤治療研究部

3) 岡山理科大学理学部臨床生命科学科

4) 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科先端医療学分野 医学研究科内科系講座 iPS 細胞応用医学分野

5) 京都大学 iPS 細胞研究所未来生命科学開拓部門

6) 広島大学大学院医歯薬保健学研究科統合健康科学部門

7) 国立成育医療研究センター研究所生殖医療研究部

8) 京都大学ウイルス・再生医科学研究所胚性幹細胞分野

9) 京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門

10) 理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室

11) 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安全性予測評価部

12) 国立医薬基盤健康栄養研究所ヒト幹細胞応用開発室

細胞培養の基本原則

近年、細胞培養に関連する技術の急速な開発に伴い、創薬研究、再生医療への応用など、細胞培養が貢献する分野が拡大している。欧米では細胞培養の再現性、信頼性、的確性を確保するうえで、細胞培養の基本概念を研究者・実験者間で共有することの重大性が認識され、Good Cell Culture Practice (GCCP) を作成することにより、細胞培養技術を一定の水準に維持する努力がなされている。我が国の研究者・実験者においても、細胞培養における基本概念を共有すべきと考え、「細胞培養における基本原則」案を作成した。本基本原則案は、培養細胞の脆弱性、入手先の信頼性と使用方法の妥当性、汚染防止、適切な管理と記録、作業者の安全と環境への配慮、の5条項から構成されている。この基本原則の概念が細胞培養を行うすべての研究者・実験者により共有され、日本の細胞培養技術が上進し、細胞培養技術を用いた研究の信頼性が向上することを期待する。

基本原則

- 第一条：培養細胞は生体の一部に由来すること
を認識すること
- 第二条：入手先の信頼性、使用方法の妥当性を
確認すること
- 第三条：培養細胞への汚染を防止すること
- 第四条：培養細胞の管理・取扱い記録を適切に
行うこと
- 第五条：培養作業者の健康と安全、周囲環境へ
の配慮を行うこと

多能性幹細胞培養の留意点

近年、ヒト胚性幹（ES）細胞やヒト人工多能性幹（iPS）細胞等のヒト多能性幹細胞は、基礎研究のみならず、創薬研究、再生医療への応用など、広い分野でその利用が期待されている。それに伴い、培養資材の供給など研究環境が整備され、ヒト多能性幹細胞の培養が容易に実施可能となり、利用者が増加している。研究者・作業員間において、技術とその背景となる基本概念の共有と、研究結果の再現性の担保が課題である。ヒト多能性幹細胞は従来利用されてきた体性細胞とは異なる点が多く、培養経験者であっても留意すべき点が多い。そこで、ヒト多能性幹細胞を有用に活用されることを期待し、「多能性幹細胞培養の留意点」案を作成した。本留意点・案は、ヒト多能性幹細胞の使用開始にあたり確認すべき内容を、7項目（法令・指針と同意・MTA、多能性幹細胞の多様性、培養資材、解凍作業、培地交換と継代作業、凍結操作、培養管理）にまとめた。この留意点の概念が多能性幹細胞の細胞培養を行う研究者・作業員により共有され、日本の細胞培養技術が上進し、多能性幹細胞を用いた研究の信頼性が向上することを期待する。

まとめ

現在、創薬開発において、*in vitro*試験に求められるものは、種差や個体差の壁を越えた創薬開発である。この壁を越えるための、ヒトiPS細胞や患者やボランティア由来の組織から得られた初代培養細胞の利用が重視されている。ただし、求められる培養レベルが上がっており、二次元培養から三次元あるいは細胞プリント、オルガノイド、organ-on-a-chipなどより高度なものが利用されるようになってきた。同時にそれを支える細胞の品質確保に務めねばならない状況になっている。



About JaCVAM



Update on JaCVAM



Academic activities



Submission of Alternative
Methods to JaCVAM



International Cooperation

御静聴ありがとうございました

Policy and Mission: JaCVAM's policy and mission is to promote the 3Rs in animal experiments for the evaluation of chemical substance safety in Japan and establish guidelines for new alternative experimental methods through international collaboration.

the 3Rs in animal experiments—Reduction (of animal use)

Refinement (to lessen pain or distress and to enhance animal well-being)

Replacement (of an animal test with one that uses non-animal systems or phylo-genetically lower species)

(OECD GD34)

News

☞【NEW】news texts dummy texts news texts dummy texts
news texts dummy texts(2009.7.16)

☞news texts dummy texts news texts (2009.7.3)

☞news texts dummy texts news texts dummy texts news
texts dummy texts (2009.7.3)

Contents

☞About JaCVAM

Message from JaCVAM / Policy and Mission of JaCVAM /

Organization of JaCVAM / Glossary /

Proposal for Engagement Rules

☞JaCVAM Activities