# 日本医療研究開発機構　　創薬基盤推進研究事業
# 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名： IVIVE とヒト細胞資源の活用による安全性評価技術のヒト予測性向上
Improving human predictability of safety assessment technologies by utilizing IVIVE and human cell resources

研究開発実施期間：令和 4 年 4 月 15 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者　氏名：山崎　大樹
Daiju Yamazaki

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：
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・室長
National Institute of Health Sciences・Center for Biological Safety and Research, Division of Pharmacology・Section Chief

## II 研究開発の概要

<u>研究開発の成果およびその意義等</u>

本研究では、安全性評価が不可欠で、かつ、ヒト iPS 分化細胞等のヒト細胞資源活用の研究が進む心臓、肝臓、中枢神経系の 3 臓器を標的とする。臓器特異的な課題解決のため、以下の通り臓器ごとに戦略を立て IVIVE とヒト細胞資源を活用して医薬品創出に資する安全性評価技術の開発を行い、高度化・汎用化することを目的とした。

【心臓】

抗ガン剤等による心毒性評価は、多くの製薬会社において主に動物の摘出心臓ランゲンドルフによって調べられているが、慢性毒性の検出は困難でありヒト外挿性も不明である。そこで、代表的な被験薬を用いて生体での心臓に対する影響を検出できるモルモット心エコー（*in vivo* データ）と複数の *in vitro* 心収縮評価系との相関性検証を行うことを目的とした。その後、抗ガン剤等を用いて検証し、*in vitro* 評価技術を高度化するために、培地や培養基材等に改良を加えることにより相関性の高い評価系へと発展させることを実施した。

*In vivo* データ取得では、代表的な陽性変力作用を示す被験薬として β アドレナリン受容体であるドブタミンおよび心筋ミオシン活性化薬であるオメカムティブメカルビル（OM）を選択し、3 濃度についてモルモット心エコー計測を行った。モルモット心エコー計測により、25 のパラメーターについてデータを取得した。*In vitro* 評価法データ取得では、モルモット心エコー計測で用いたドブタミンおよび OM を用いて *in vitro* 評価系である三次元心筋組織を用いて収縮評価を行い、画像解析ソフト SI8000 による解析により 18 パラメーターに関してデータを取得した。最後に、*in vivo* データ取得および *n vitro* 評価法データ取得で得られた、各パラメーターセット同士の相関性検証を行うため、それぞれのパラメーターセットに対して全パラメーターの変動係数の平均値で評価した。ドブタミンについて、*in vivo* データにおいては投与前を基準に生値の差分値を使用する場合が最も検体間のバラツキが小さく、*in vitro* データにおいては投与前を基準に%値の差分値を使用

する場合が最も検体間のバラツキが小さかった。その後、標準化[(解析値－系列の平均値)／系列の標準偏差]によるスケーリング処理を行い、*in vivo* の 25 パラメーターと *in vitro* の 18 パラメーターを合わせた計 43 パラメーターについて、3 濃度を 1 系列としてクラスター分析を行った。3 濃度にわたるドブタミン投与による反応性が類似したパラメーター群を抽出したところ、主に 12 個のクラスターが形成され、そのうち 5 個のクラスターで *in vivo*、*in vitro* 両方のパラメーターが含まれた。日本毛織(株)では、コラーゲン繊維にヒト iPS 細胞由来心筋細胞を播種し三次元構造体を作製することでダイナミックな収縮変化を検出できる系(Genocel)を有しており、本 *in vitro* 評価系でもモルモット心エコー計測とのパラメーターの相関性を検証した。2 種類の *in vitro* 評価系データと *in vivo* データとの相関性検証結果を比較すると、Ao Sinus、IVRT、Tei index および Fractional shortening が 2 種類の *in vitro* 評価系データに対する相関性の高い *in vivo* パラメーターとして見出された。*in vitro* パラメーターは同一ではないものの、比較的類似したものを表すパラメーターであった。

以上より、*in vitro*収縮評価系のパラメーターを用いて、*in vivo*心エコーの現象を予測できる段階に近づきつつある。本方法により動物実験を用いなくても*in vivo*の予測が可能となり、実験動物の削減や医薬品開発期間の短縮、開発費の削減に資することが期待される。

【肝臓】

医薬品の胆汁排泄評価は、予測性の高いヒト肝細胞を用いた評価系が存在しないことから、ベシクルトランスポーターアッセイや動物実験に頼っている。この現状を打開するために、ヒト予測性の高い in vitro 評価系の確立が求められている。本研究では、ヒトと相関性の高い胆汁排泄評価系の構築を目的とし、以下の研究を実施した。①文献調査により尿中排泄、胆汁排泄に関するヒト動態データを収集した。②ヒト凍結肝細胞において効率よく毛細胆管が形成される条件で胆汁排泄のデータを取得した。③取得した胆汁排泄データとヒトにおけるデータとの相関性を検証した。④in vitro における胆汁排泄データを①で得たヒトデータとの外挿性を高めるために培養条件を検討した。

文献調査を行い、11 化合物のヒト胆汁排泄クリアランスを取得した。これらの化合物から、胆汁排泄クリアランスのバラエティ性(低、中、高クリアランスの化合物)やLC-MS/MS におけるピークの分離を考慮し、Olmesartan、Valsartan、Pitavastatin、Pravastatin、Rosuvastatin の基質セットを胆汁排泄評価に用いる被験薬として選定した。これまでに Horiuchi らが見出した効率的に毛細胆管が形成される培養条件でヒト凍結肝細胞を用いた胆汁排泄評価を行い、胆汁排泄クリアランスを算出した。この評価で得られた胆汁排泄クリアランスをヒトのデータと比較した結果、胆汁排泄クリアランスが初代ヒト凍結細胞を使用した Abe らの既報 (Drug Metab Dispos. 2009;37(3):447-52.) より 2 倍以上改善されていることが明らかになった。これらの成果は Archives of Toxicology や The Journal of Toxicological Sciences にて発表し、一般に公開した。ヒト凍結肝細胞を用いた胆汁排泄評価系の更なる高度化を目指して、培養条件の改良を試みた。胆汁排泄試験の条件検討において、細胞に重層したマトリゲルが培地と細胞間における基質の移行を妨げていることが示唆された。そこで、マトリゲルを用いずに毛細胆管を形成する培養条件を検討した。マトリゲルを使用しない 23 種類の培養条件で毛細胆管の形成を観察した結果、効率よく毛細胆管を形成する培養条件を見出し、この条件で胆汁排泄試験を実施した。本研究で得られた成果は、ヒト肝細胞を用いた胆汁排泄評価系の普及を促進し、医薬品開発の課題となっている実験動物や開発費用の削減の解決につながる可能性がある。

【中枢神経系】

中枢神経系の有害事象予測には、影響を受けた脳領域情報が重要であるが、この点を検討する評価系は確立されていない。そこで、非侵襲的な *in vivo* イメージング系の確立を試み、IVIVE に取り組んだ。小動物用 MRI (ASPECT) を用いて痙攣誘発薬物適用動物の全脳画像取得を試みた。既報により痙攣誘発が報告されている条件であるペンチレンテトラゾールもしくは 4-AP を 6-7 週齢 Wistar 雄性ラットに i.p. 単回投与した。30 分間、行動観察を行った。ペンチレンテトラゾール 60 mg/kg 適用後 30 分後まで痙攣が持続し、適用 1,2 日目までミオ

クローヌスは継続した。4-AP 適用後 30 分後まで持続的に増悪する痙攣が現れた。1,2 日後ではほとんど痙攣用行動は消失した。痙攣動物はイソフルラン麻酔を行い撮像した。MRI では T2 強調画像において特徴的な画像が得られた。PTZ 適用動物においては、行動観察直後一過的に、腹側尾側の海馬周辺にシグナル増強を捉えた。回復期間の 1 日目、2 日目にはほぼコントロールと同程度に戻った。4-AP 適用動物においては腹側尾側の海馬周辺にシグナル増強を捉えたが、シグナルは回復期間 2 日目まで持続した。

*in vitro* 実験として、ラット大脳皮質神経細胞初代培養系に対して PTZ、4-AP を適用し、microelectrode array (MEA) 記録を行った。MEA で取得可能な 12 パラメーターについて主成分分析 (PCA) したところ、陰性化合物である Acetaminophen と溶媒コントロール DMSO の間に有意差が認められず、各痙攣陽性化合物が有意に分離できた。PTZ, 4-AP 間でも有意差が認められたことから、作用機序の検討に適していることが明らかとなった。

研究協力者　鈴木郁朗東北工大教授より、PTZ, 4-AP について、*in vivo* ラットに 痙攣誘発する CSF 内薬物濃度について情報が提供された。*in vivo* ラットに 痙攣誘発する CSF 内薬物濃度は PTZ: 706 microM; 4-AP: 5.14 microM であった。今回、i.p.投与で痙攣を誘発した最低濃度は PTZ: 60 mg/kg(=434 microM/kg), 4-AP: (5 mg/kg=53 microM/kg)であった。両薬物の痙攣誘発 i.p.適用濃度と CSF 内濃度に 100 倍以上の差があることを考えると、BBB 透過性の相違を考慮する必要があることが示された。

以上の検討により、*in vivo* MRI イメージングにより脳影響領域の特定、*in vitro* MEA により作用メカニズムが検討できることが示された。また、IVIVE 検討には BBB 透過性の検討が欠かせないことが示された。

This research focuses on three critical organs for safety evaluation—the heart, liver, and central nervous system—for which the use of human cell resources, particularly human induced pluripotent stem (iPS) cell-derived differentiated cells, is rapidly advancing. To address organ-specific challenges, targeted strategies were developed that leverage *in vitro-in vivo* extrapolation (IVIVE) and human cell resources. The ultimate goal is to establish sophisticated, generalizable safety assessment technologies that can support and accelerate drug development.

【Heart】

Cardiotoxicity assessment, especially concerning anti-cancer agents and other pharmaceuticals, has traditionally relied on animal models such as Langendorff-perfused hearts. However, these models often struggle to detect chronic toxicity and present limited relevance to human physiology. To address this, the study aimed to validate the correlation between *in vivo* cardiac function data—specifically, echocardiography results from guinea pigs—and multiple *in vitro* cardiac contraction evaluation systems. These systems are designed to detect functional effects of drugs on the heart. Using representative test compounds, the study further validated and refined the *in vitro* evaluation techniques by optimizing conditions such as culture media and substrates. These improvements were intended to enhance the correlation with in vivo data, ultimately transforming the *in vitro* systems into reliable tools for cardiotoxicity assessment.

【Liver】

The biliary excretion of drugs has been evaluated using vesicle transporter assays and animal tests, because of the lack of a highly predictive in vitro evaluation system using human hepatocytes. Therefore, we aimed to establish an in vitro evaluation system for biliary excretion with a high correlation to human data. We searched the literature for the biliary clearance human data of drugs and selected olmesartan, valsartan, pitavastatin, pravastatin, and rosuvastatin as test drugs to evaluate biliary excretion in vitro. Biliary excretion was evaluated in culture conditions that efficiently form bile canaliculi, as previously discovered by us, and biliary clearance was calculated. Biliary clearance in vitro was compared with that in humans. The results demonstrated that biliary clearance was closer than that reported by Abe (Drug Metab Dispos. 2009;37(3):447-52) previously. For the further improvement of the evaluation system, we examined a culture condition without Matrigel, which inhibits the excretion of substrates from hepatocytes to medium. Consequently, a culture condition that efficiently forms bile canaliculi without Matrigel was found and adopted for the evaluation of biliary excretion ability.

【Central Nervous System (CNS)】

For the prediction of the CNS adverse effects (AEs), especially of seizure provocation, it is important to identify the brain regions affected by the drugs. However, little evaluation systems are available for that. In this study, we established in vivo MRI imaging evaluation system for rodents and enabled to identify the affected brain regions using seizure-inducing drugs. We also clarified that in vitro MEA evaluation system is suitable for investigating the mechanisms underlying the AEs. Furthermore, it was also suggested that the blood brain barrier permeability of each drug is indispensable to complete the CNS IVIVE.