

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 重篤副作用患者由来 iPS 細胞バンクの構築に向けたフィージビリティ研究
(英語) Feasibility study for the construction of patient-derived iPS cell bank
of serious adverse drug reactions

研究開発実施期間: 令和4年8月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 中村 亮介
(英語) Ryosuke Nakamura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・客員研究員
(英語) Visiting researcher, Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health
Sciences

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文: 薬品の使用による重篤な副作用は、患者やその家族の生命・生活・人生に重大な影響を及ぼしうる。その発現は患者の遺伝的背景に依存することが多く、開発段階でこれを予測することは極めて難しい。厚生労働省では、「予測・予防型」の安全対策の必要性を掲げ、平成18年度より「重篤副作用疾患別対応マニュアル」の整備等の施策を進めている。国立医薬品食品衛生研究所（国衛研）では、予測・予防型安全対策の実施に呼応して、医薬安全対策課長通知（薬生安発 0728 第3号）等の支援を受け、全国の重篤副作用の患者登録を進めており、4副作用1千例以上の症例を登録し、患者血液から採取したゲノムDNAを元にバイオマーカー探索を進めている。同定されたマーカー候補には薬物代謝酵素の遺伝子多型等も含まれるが、その多くはヒト白血球抗原（HLA）であり、このことは、発症機序への免疫系の関与を示唆している。一方で、山中らによるiPS細胞の発見は、医薬品安全性研究にも革命をもたらし、例えばヒトiPS細胞由来心筋を用いた医薬品の心毒性評価法が近年開発され、国際標準化に向けた研究が着々と進んでいる。しかし、患者の遺伝子多型やHLA型、免疫細胞の抗原特異性等が重要な役割を果たすと考

えられる重篤副作用は、健常人由来 iPS 細胞株では再現できないことが予想されるため、重篤副作用患者由来 iPS 細胞株の樹立へのニーズは高い。

このような背景の下、本研究では、PMDA への報告数が多い重篤副作用として知られる薬物性肝障害 (DILI) の患者を複数例登録、末梢血単核球 (PBMC) を採取し、これらの患者由来 iPS 細胞を複数株樹立し、これを肝細胞に分化させ、肝障害評価系に用いる中で、その留意点をまとめることを目標とした。具体的には、臨床試料登録機関として東海大学医学部を中心に据え、インフォームドコンセントを経て登録された患者より全血を採取、これを京都大学に輸送し、PBMC を分離して凍結後、iPS 細胞への分化を行い、さらにこれを国衛研に輸送して肝細胞への分化を誘導し、評価系の作出に用いるという研究体制を構築した。なお、インフォームドコンセントは、AMED「疾患特異的 iPS 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム」で用いられるものを雛形とし、患者の自由意志に基づき、海外での使用や企業による商用利用を可能とする形で同意を取得した。上記研究の研究倫理承認を受けるまでの間は、各機関において評価系の開発や市販 iPS 細胞株を用いた条件検討などを実施した。

まず最初の困難は、研究倫理承認の取得であった。当初は 1 年ほどの期間で全機関における承認が取得できるものと見込んでいたが、関係機関のあいだで東海大学における一括審査が最適であるという共通認識が得られるまでに想定以上の時間を要した。その後、研究開発代表者の人事異動等の当初想定していなかった事態も生じたことから、すべての倫理承認が得られ、実際に患者のリクルートを始めるまでに 1 年半以上を要した。

研究倫理承認が得られるまでの間、各研究機関において、試験系の開発や最適化が検討された。京都大学では、凍結保存された PBMC から iPS 細胞を誘導する方法の最適化に取り組んだ。具体的には、エピソーマルベクターを用いて 6 因子(①OCT3/4, ②SOX2, ③KLF4, ④L-MYC, ⑤LIN28, ⑥shRNA for TP53)を electroporation により細胞に導入するプロトコルにおいて、iPS 細胞樹立効率を高めるために、凍結した細胞を融解し前培養ののちに iPS 細胞の樹立を行う前培養法の有効性を検証した。国衛研においては、市販 iPS 細胞株を用いて肝細胞への分化プロトコルを実証し、患者由来 iPS 細胞を用いた肝細胞分化プロトコルの最適化を行った。具体的には、胚体内胚葉から肝芽細胞への分化のステップの間に後方前腸への分化のステップを挟んだプロトコルを検討した。さらに、遺伝子発現パターンと内胚葉分化指向性を評価した。また、P450 を導入したヒト培養肝がん細胞株と市販 PBMC の共培養により誘導されるアロ反応性免疫応答の DILI 誘発性の薬剤 (アモジアキン) による増悪を、RNAseq により解析した。これにより、被疑薬と P450 の代謝活性依存的に転写が誘導される 244 種の応答遺伝子のセットを同定した。

研究倫理承認の遅延に伴い、DILI 患者のリクルートは開始が遅れたが、予定通り DILI の診断基準を満たす 2 例の患者を登録することができた。いずれも肝細胞障害型で、被疑薬はモサプリドおよびグラゾプレビルであった。これらの症例とは別に、将来 iPS 細胞へ分化させることを許諾された症例を 3 例登録した。被疑薬は、レゴラフェニブ、ビカルタミド、テルビナフィンであった。いずれの検体も、東海大学医学部付属病院にて全血を EDTA 採血管に採取後、冷温保存で京都大学に輸送した。

続いて、京都大学において、受領した上記全血検体から PBMC を調製し、直ちに凍結保存した。なお、無凍結のまま PBMC を調製した場合と比較したところ、凍結なしの方が得られたコロニー数が若干多かった。これを元に、2 症例に由来する iPS 細胞株を合計 24 株 (1 症例目凍結あり 10 株、凍結なし 3 株、2 症例目凍結あり 1 株、凍結なし 10 株) を樹立した。これら iPS 細胞株の品質は、アルカリフォスファターゼ染色、FACS 解析 (TRA1-60, SSEA-4)、および qPCR 解析 (OCT4, NANOG) により評価し、いずれも遜色ないことを確認した。

これらの iPS 細胞株は、続いて国衛研薬理部に送られ、これまでに確立した三胚葉分化のプロトコル

を実施し、内胚葉・外胚葉への分化指向性を確認した。さらに、確立したプロトコルに基づき 30 日間かけて肝細胞分化を誘導し、肝細胞マーカーの発現上昇および未分化マーカーの発現減少、さらにアルブミンの分泌能により、肝細胞の品質評価を行った。その結果、凍結された患者 PBMC から樹立された iPS 細胞を用いても、品質の高い機能的な肝細胞が分化誘導できることが示された。

患者 iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝障害評価系の確立は、全体の計画遅延のため、研究期間内に実施することができなかった。しかし、得られた 2 例の iPS 細胞株を用いて、これらの HLA 型は同定することに成功した。このうち 1 例については、HLA クラス I (A, B, C) およびクラス II (DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1) のうち 4 アレルが部分一致する市販 PBMC を購入しており、共培養を実施する準備が整っている。

以上、本研究により、重篤副作用である DILI の患者由来 iPS 細胞を 2 例 11 株作成することができ、その一部は実際に肝細胞へと分化させ、機能評価に用いることができることを示した。本研究開始前の時点では、世界でも DILI 患者由来 iPS 細胞は 2 例のみが登録されていたことを考えると、意義ある成果と考える。さらに、実際に iPS 細胞は樹立していないものの、将来 iPS 細胞を作製することを前提として採血された患者の PBMC が 3 例存在する。これら 2 例の iPS 細胞株および合計 5 例の PBMC については、理研 BRC における登録を予定している。一部の検体については海外での使用や企業による商用利用が可能となっているため、これらの検体を用いた創薬研究が加速することが期待される。また、本研究の各ステップで見出された様々な留意点については、論文の形でまとめ、登録される患者試料の詳細な説明とともに発表する予定である。これら留意点は、今後の重篤副作用患者由来 iPS 細胞バンクを構築していく上で有用な情報となり、重篤副作用の機序解明とバイオマーカー開発を通じた予測法の確立による予測・予防型安全対策へ貢献できる他、他の重篤副作用への横展開や治療薬開発への貢献も想定される。これらは中長期的には我が国の医薬品開発環境の高度化による研究開発環境整備および国際標準化によるプレゼンス向上というインパクトにつながるであろう。

英文 : Severe adverse drug reactions (such as drug-induced liver injury, DILI) can have serious impacts on patients' lives and are often influenced by genetic factors, making them difficult to predict. Japan's Ministry of Health, Labour and Welfare has promoted prediction- and prevention-oriented active safety measures. In accordance with this policy, the National Institute of Health Sciences (NIHS) has advanced biomarker research, particularly focusing on HLA genes. Meanwhile, the advent of iPS cell technology has enabled the use of patient-derived cells for drug safety evaluation. However, reactions involving specific genetic or immunological factors may not be reproducible using iPS cells from healthy donors, highlighting the need for patient-derived iPS cells.

This study was conducted as a feasibility study to identify key considerations in generating iPS cells from patients with DILI, differentiating them into hepatocytes, and constructing an evaluation system. The research framework involved Tokai University for patient recruitment and blood sampling, Kyoto University for PBMC isolation and iPS cell induction, and NIHS for hepatic differentiation and functional evaluation. Informed consent was obtained using a template from an AMED program (The Acceleration Program for Intractable Diseases Research utilizing Disease-specific iPS cells), allowing for future commercial and international use.

Obtaining ethical approvals across institutions took more than 1.5 years—longer than anticipated. During this time, Kyoto University optimized protocols for inducing iPS cells from frozen PBMCs, including pre-culture methods after thawing. NIHS improved hepatic differentiation protocols by

incorporating intermediate steps through posterior foregut stages. The exacerbation of alloreactive immune responses, induced by co-culture of human hepatoma cells and commercial PBMCs upon exposure to a known DILI-inducing drug, was analyzed by RNAseq, leading to the identification of a set of 244 upregulated genes.

Two diagnosed DILI patients (suspected drugs: mosapride and grazoprevir) were enrolled, and a total of 24 iPS cell lines were established. The quality of these lines was confirmed through alkaline phosphatase staining, FACS (TRA1-60, SSEA-4), and qPCR (OCT4, NANOG). Hepatic differentiation at NIHS yielded functional hepatocytes with the capacity to secrete albumin and express appropriate markers, even when derived from frozen PBMCs.

Although the complete evaluation system could not be established within the study period, HLA typing was performed for the iPS cell lines, and co-culture experiments with partially HLA-matched commercial PBMCs were prepared. In addition, PBMCs from three more patients were collected for future iPS cell generation. In total, five patient samples are scheduled for registration with RIKEN BRC, with some approved for commercial and international use.

Considering that only two cases of DILI patient-derived iPS cells had been registered worldwide prior to the start of this study, the successful establishment and validation of these cells in this project represents a significant achievement. The findings and procedural insights will be published, contributing to future biobanking efforts, predictive biomarker discovery, and the development of preventive drug safety strategies. In the long term, this work is expected to enhance Japan's research infrastructure and international presence in pharmaceutical development.