

創薬プロセスに応用されるインビトロ細胞アッセイ法

石田 誠一

創薬プロセスにおけるインビトロ細胞アッセイの利用には、大きく二つの場面がある。対象疾患に効果のある化合物を探索する場合（薬効探索）と開発していく化合物のヒトへの安全性を担保する場合（安全性評価）である。古くからの言い回しではないが、“毒にも薬にもならない”では患者の疾患は治せない。薬になるか、ならないかの判断にインビトロ細胞アッセイを用いるのが薬効探索であり、薬効だけ追及しようとする手綱を締めて毒にならない投与法を定めるのが安全性評価と言えよう。その際、毒性学の父と言われるパラケルススの言葉にもあるように、“すべての化合物は毒であり、毒性を示すか示さないかは服用量が主たる要因の一つである”というのが、長く考えられてきた毒性発現の基本であった。“薬の飲みすぎは毒”，というのは昔から当たり前であった。しかしながら、多くの医薬品が生み出された結果、必ずしも飲みすぎだけが薬の毒性発現もしくは副作用発現の原因ではないというのは、医薬品が魔術や錬金術から抜け出して化学に基づき開発されるようになった現代の我々が学んだことの一つである。少ない服用量でも長期に飲み続けることで副作用が出る、1種類の薬の服用では大丈夫だったのが、2種類、3種類と併用薬が増えることで副作用が惹起される、さらには、多くの人では大丈夫な服用量なのに特定の人には重篤な副作用が発現するなど、単純な用量-作用/毒性曲線だけでは想定できない事例が多く報告されるようになってきている。このような事例は、患者に危険をもたらすのはもちろんであるが、医薬品開発を断念することにもつながることであり、創薬プロセスのリスクとなっている。

薬効の評価は開発者の責任のもと選択されるものであるが、安全性の担保は医薬品開発全体に掛かることである。本稿では筆者がかかわっているインビトロ細胞アッセイの安全性評価研究を中心に、創薬への応用の可能性と問題点について筆者の個人的な見解をまとめてみたい。

創薬プロセスとインビトロ細胞アッセイ

一つの新薬が患者のもとに届けられるまでの行程は、対象とする疾患の治療に効果があると考えられるターゲットの探索・スクリーニングに始まり、非臨床でのさまざまな試験による新薬候補の絞り込みを経て、初めて

ヒトに投与される、いわゆる“First in Human”から始まる臨床試験に合格することにより申請に至る(図1)。報告にもよるが、全行程は15年以上の年月と1000億円を超える開発費がかかる非常に長く険しい道りである。しかも、新しい医薬品を作り出すためにはより治療が困難な疾患が対象となる一方、患者に対する安全性の要求も高まってきているため、医薬品の開発コストは増加の一途をたどっている。たとえばScannellらの報告では、10億ドルの開発費当たり1970年前後では10程度の新薬が承認されていたのが、1990年代後半には1個程度になり、最近では1個を切るようになってきている¹⁾。この創薬プロセスを規定するのが、医薬品規制調和国際会議(ICH)のM4Q「品質に関する文書の作成要領に関するガイドライン:CTD(Common Technical Document)ガイドライン」である。しかしながら、CTDが規定するのは薬効や安全性評価に関していえば承認申請に必要な非臨床試験と臨床試験での試験成績の取り扱いであり、インビトロ細胞アッセイが多用される探索段階でのアッセイには規定がないのが現状である。

ますます重要になるインビトロ細胞アッセイ

より良い(薬効が高く、安全な)新薬を患者により早く、そしてより手に入れやすく提供するためには、この創薬プロセスをいかに短くし、新薬探索の成功確率を上げるか、が重要である。そのためには、新規医薬品候補の薬



試験(調査)	試験内容	
物理化学的性状等試験	品質の保証	
非臨床試験	毒性試験	急性・慢性毒性、発がん性
	薬効薬理試験	作用機序、用法・容量の基礎的検討
	一般薬理試験	安全性薬理学的検討
	薬物動態試験	体内動態の検討
臨床試験	第I相試験	少数の健康成人での安全性の確認
	第II相試験	選択された患者での有効性・安全性、用法・容量の確認
	第III相試験	対象患者を広げ、有効性・安全性を対象薬と比較、有用性を調べる
市販後調査	開発段階では不明の臨床効果・副作用の調査	
	市販後臨床試験	開発段階の臨床試験の不足を補う臨床試験

図1. 創薬クリティカルパスとICH CTDが定める非臨床・臨床試験

効や安全性をいかに早期に評価するか、すなわち開発を進めるか中止するかをより早い時期に的確に判断できるかが一つのカギとなっている。たとえば、非臨床試験から、第I～III相臨床試験の各段階では第II相臨床試験（選択された限定数の患者を対象に有効性・安全性および用法・用量を確認する試験）で脱落する医薬品候補が多いことが過去の事例からわかっている²⁾。患者での薬効の欠如や安全性の問題をより早い段階で予想し開発の方向性の判断ができれば、このような脱落を回避できるはずである。この解決策の一つとして、探索段階での化合物の絞り込みを適切に判断する評価手法であるインビトロ細胞アッセイの重要度が増してきている。

さらに医療の現場に目を移すと、臨床試験だけでは評価しきれない医薬品の服用状況がある。一つは小児や高齢者といった、脆弱集団への投与での安全性予測の問題、また一つは、高齢者化が進展するに伴い患者一人が抱え込む疾患の数が増加し、複数の医薬品を併用すること（ポリファーマシー）が常態化している問題である。

脆弱集団の臨床試験は、被験者の選択や安全性で問題を伴い、実施が容易ではない。ポリファーマシーに関しても、過去の知見に基づく薬物-薬物相互作用の注意喚起をするための薬物動態試験などは実施されるものの、2剤の併用予測がせいぜいであり、実際の患者が処方されるような多くの医薬品の組合せすべての安全性を保障する試験を実施することは不可能である。脆弱集団に由来する培養細胞を用いた試験もしくは脆弱集団を模した培養系が構築できることや、ディッシュの中であれば複数の薬剤のばく露が可能であるという、インビトロ細胞アッセイの利点を活かしていくことが今後は重要と考える。

インビトロ細胞アッセイの潮流

このようにインビトロ細胞アッセイの重要性が増してきているが、ICHのCTDに組み込まれている例は、遺伝毒性試験（S2）や心室再分極遅延（QT間隔延長）評価（S7B）などに限られている。これは、インビトロ細胞アッセイではヒト予測性が十分に担保されてこなかったのが主因の一つと考えられる。しかし、その点を解決すべく、近年は細胞培養技術の進展に伴い、さまざまな培養系が提案されてきている。本特集でも、松永らのiPS細胞などからの機能性細胞の分化誘導、篠原らの組織工学や竹澤の組織構築による肝組織再構築、また、金森らのorgan(s)-on-a-chipが取り上げられている。これらの最新のインビトロ細胞アッセイ技術の詳細は各論文に譲り、ここでは、オルガノイド培養と腸内細菌叢に簡

単に触れてみたい。

オルガノイドとは、LancasterとKnoblichにより提唱されている最近の定義では、“多能性幹細胞または単離された臓器前駆細胞に由来し、自己組織化によりインビトロの臓器と類似した構造を形成する複数の機能性分化細胞を含む器官様組織”と理解されている³⁾。すでに、本邦でも阿久津らが微細加工技術を応用した培養器の上で細胞の自己組織化能を活用することで比較的単純な培養系で腸管を模したオルガノイドの創生に成功した例⁴⁾などの報告がある。阿久津らによる腸管オルガノイドは蠕動様運動を自律的に行い、栄養成分や医薬品のような低分子を吸収・分泌する能力を兼ね備えていた。このような、云わば“ミニ腸”ともいうべき細胞塊を用いることで、生体内の腸管での医薬品の吸収や代謝を模倣した評価がインビトロでできることが期待される。さらに、オルガノイドのインビトロ細胞アッセイ系としての能力も魅力的であるが、ミニ腸様の構造を維持しつつ長期培養が可能なることから、オルガノイド内に臓器幹細胞を有していることが考えられ、臓器前駆細胞の供給源としても興味深い。iPS細胞からの分化誘導では初代培養並みの機能を維持した細胞の供給が未だに難しい肝臓の実質細胞のような細胞もオルガノイドを経ることで新たな供給法の道が開けるかもしれない⁵⁾。Huchらは、そのようなオルガノイドに分化誘導できる肝前駆細胞を肝臓の胆管細胞から単離し、長期間安定して培養維持できることを示した⁶⁾。阿久津らの“ミニ腸”に匹敵するような“ミニ肝臓”もしくは“ミニ肝小葉”を構築することで、幹細胞からの分化誘導で苦戦している肝細胞供給源になることが期待される。

医薬品の開発コストを引き上げる原因として、薬物性の肝障害による市場撤退が散見される。市販後、多くの患者が服用することで初めて見られる重篤所見であり、

- ・飲んだ量に関係なく副作用が出る
- ・ある特定の人にしか副作用が出ない

という事例が多いため、なかなか開発段階では予測できないのが現状である。以前より免疫系の関与が疑われてきたが、未だ検討が十分でないものとして、腸内細菌叢がある。腸内細菌叢は、文字通り、腸（主に大腸）に存在する細菌の集まりであり、近年は次世代シーケンサーによる腸内細菌由来ゲノムの解析が導入されたことで研究が急伸している。健康な状態では、摂取した栄養分を代謝する働きをしているが、腸管のバリア機能が破たんすると門脈から肝臓に流入することで肝炎の原因となると考えられている。抗生剤の服用などによる腸内細菌叢の変化や、ストレスや高脂肪食、医薬品の服用により腸

管バリアの機能は日々変動しており、日和見的に腸管バリアが低下した際の医薬品の服用が予期せぬ肝障害となることが考えられる⁷⁾。このような状況をインビトロの培養系で再現できるようになると、ごくまれに起こる重度の薬物性肝障害の発症機構解明につながると考えられる。しかしながら、腸内細菌叢の多くは嫌気性菌であり、宿主側（すなわちヒト）の細胞は好気的な状況が必要という相矛盾する培養環境を再現するのはチャレンジングであり、今後の課題である。

アッセイに用いる細胞に要求されること —NCI-60の教訓—

さて、インビトロ細胞アッセイに用いられる細胞に目を移すと、日本ではあまり注目されていないが、2016年に重要な方針転換が米国立癌研究所（NCI）で決定された⁸⁾。NCIでは1990年よりがん由来培養細胞60株（NCI-60）を用いて抗がん剤の毒性発現データを蓄積してきた。その化合物数は100,000を超え、膨大なデータベースとなっていた。しかしながら、たとえば“乳がん由来培養細胞6株で有効な化合物は乳がん治療に使えるはず”という作業仮説は必ずしも有効ではなかった⁸⁾。がん由来培養細胞株は不死化されているという実験室での培養に大変好ましい特徴を有する一方、そのために長期の継代がなされて、その間にオリジナルのがんの形質を失っていくことが起きていた。そこで、NCIは“patient-derived xenografts (PDX)”による評価にかじを切ったのである。このように、インビトロ細胞アッセイに用いられる細胞の形質をいかに維持するかは、そこから生み出されるデータの有効性を左右する重要な要素となっており、NCIの決断は良い教訓である。ちなみに、国内では井上らが患者がん組織からがん細胞を培養する新しい方法（CTOS: cancer tissue-originated spheroid法）を報告している。その方法によれば、がん組織の中のがん細胞をスフェロイド培養することで、もとの形質を失わずに安定して試験管の中で純粋培養することができるため、PDXに代わる国産技術として注目される⁹⁾。

細胞の規格化

NCIの事例に限らず、筆者らも用いる細胞によりインビトロ細胞アッセイの結果が大きく変わるという経験をしている。

NCI-60にも含まれているが、ヒト前骨髄性白血病由来細胞株HL-60はレチノイン酸などにより顆粒球に最終分化するため、白血病治療薬のスクリーニング用細胞と

して汎用されてきた（図2A）。現在、HL-60細胞はJCRB細胞バンク（Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank）に3種の亜株が登録されており、細胞の同一性を識別するSTR（short tandem repeat）法によれば同一の細胞株と判定されている（図2B）。しかしながら、これらの3亜株を同一条件下で比較すると、レチノイン酸による分化誘導のED₅₀値が1桁以上異なることが分かった（図2C）¹⁰⁾。亜株間でこのような差が生じているのを承知せずに医薬品候補をスクリーニングしていると、たとえばHL-60(s)株を使用している製薬企業（もしくは研究室）では、非常に多くの化合物が有望な白血病治療薬として選別されてくるが、HL-60RG株を使ってしまうと、いくら化合物をスクリーニングしても一向に活性のあるシーズに行きあたらないという状況が生じ得る。

また、筆者らの研究室で行っているiPS細胞を分化誘導して作製された肝細胞様細胞（iPSC-hep）を評価する際に用いているヒト凍結肝細胞（cryo-hep）はベンダー間差が大きいことが、荒木らによる細胞に添付されるデータシートの解析結果より報告されている¹¹⁾。実際に、筆者らの研究室で2か所のベンダーから購入したcryo-hepも指標としている薬物代謝酵素の発現量が1桁以上異なっていた（図3、Horiuchiら、投稿準備中）。筆者らの目的は、cryo-hepを基準として、市販のiPSC-hepの活性が医薬品開発に用いるのに十分かを評価するものである。ベンダー1とベンダー2では肝細胞の出発材料である肝組織の由来が異なることや細胞の調製方法の違い

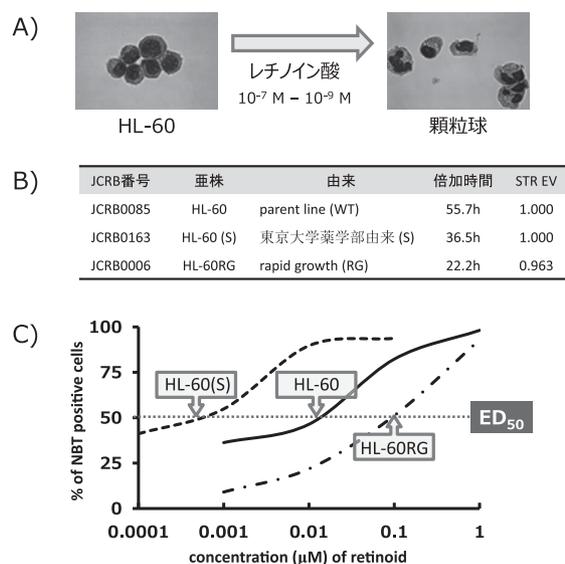


図2. HL-60細胞亜株とレチノイド応答性. A) HL-60: ヒト前骨髄球性白血病細胞由来細胞株, B) HL-60細胞の亜株, C) HL-60亜株間でのレチノイド応答性の差.

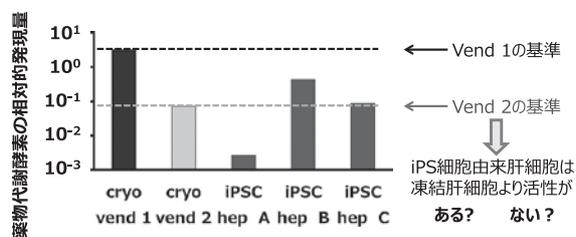


図3. 細胞の評価が用いる基準により異なる

が重なり、このような差異が生じてくると考えられる。しかしながら、cryo-hepでの活性値にこのような開きがあると、二つのベンダーのどちらを基準にするかでiPSC-hepの活性が十分量発現しているか、いないのか、の判断が分かれてしまう。

実は、このような培養細胞に見られるばらつきは、新しい培養技術を導入する際の弊害にもなっていると考えられる。新しい培養器材が紹介されるとき、メーカー添付の資料では素晴らしい活性を示しているのに、いざ自身の研究室で使ってみるとカタログの値とは程遠い活性しか得られなかったということは、読者の中にも経験がある方もおられるのではないだろうか。カタログの値がチャンピオンデータだったというのでは言語道断だが、多くの場合、メーカーの開発段階で用いていた細胞ではそれなりの性能を示しており、その条件に基づきアプリケーションプロトコルが組まれてユーザーに提供されているのであろう。しかし、同じ細胞と称していても、たとえば先のHL-60細胞のような差異があれば、メーカーが期待していたような活性が不幸にしてユーザーのもとでは再現できない、ということが起こっても不思議ではない。このような状況が繰り返されていると、せっかく優秀な培養法が開発されたとしてもユーザーにおける適切な評価がなされないために普及の妨げになってしまう。たとえて言うなら、自動車の製造工程で、同じシャーシの車なのに、A工場とB工場では異なる性能のエンジンが搭載されてしまい、見た目は同じなのに、まったく異なる走りをする車が出荷されているようなものである。工業製品ではこのような状況はあり得ない。インビトロ細胞培養も高度な培養法が開発されるようになってきた。細胞(=エンジン)にとっても規格化の検討が望まれるところである。

おわりに

創薬プロセスの中でも共通基盤である安全性評価におけるインビトロ細胞アッセイの利用法について概説してきた。本総説の最初で、ICHのCTDに組み込まれてい

るインビトロ細胞アッセイは限られていると述べた。ヒトが服用する医薬品の安全性は、非臨床試験ではモデル動物に頼るのは必然かもしれない。しかし、動物実験には越えられない種の壁があり、ポリファーマシーなど服用されて初めて問題となる事例もあることから、ヒト型のインビトロ細胞アッセイが希求されている。本特集でも取り上げられている新規の培養法や細胞資源の登場により、この点が克服されるようになるのも近いと期待している。

一方で、そのような培養法や細胞資源が広く有効に活用されるためには、規格化が重要であることをHL-60細胞(図2)やcryo-hep(図3)の例で紹介した。インビトロ細胞培養法の開発が急速に進展する中で、細胞培養における問題点を解決することの重要性が認識されるようになり、複数の組織で“Good Cell Culture Practice (GCCP)”の議論がされてきている^{12,13)}。GCCPは細胞培養法の基本的な指針を提唱するものであるが、三次元培養やオルガノイド、さらに、organ(s)-on-a-chipのように細胞培養が複雑化、高度化する現状では、さらに一歩踏み込んで、そのような培養技術に実装する細胞の品質の規格化をいかに定めるかという議論が、このような先進的な培養方法の再現性や頑健性を保証するうえで今後必須になってくると考える。細胞と細胞が実装された培養系の品質管理を行うための評価指標の選定を進めていくことが、インビトロ細胞アッセイをインハウスでの利用からヒト予測への活用を高めていくうえで急務であろう。

文 献

- 1) Scannell, J. W. *et al.*: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 191 (2012).
- 2) Cook, D. *et al.*: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13**, 419 (2014).
- 3) Lancaster, M. A. and Knoblich, J. A.: *Science*, **345**, 1247 (2014).
- 4) Uchida, H. *et al.*: *JCI Insight*, **2**, e86492 (2017).
- 5) Takebe, T. *et al.*: *Nature*, **499**, 481 (2013).
- 6) Huch, M. *et al.*: *Cell*, **160**, 299 (2015).
- 7) 石田誠一: 創薬のひろば, **6**, 30 (2017).
- 8) Leoford, H.: *Nature*, **530**, 391 (2016).
- 9) Kondo, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 6235 (2011).
- 10) Ishida, S. *et al.*: How DNA microarray technology contributes to the retinoid evaluations. In “*Vitamin A: New Research*” (Ed. Loessing IT.) Nova Scientific Publishers, Inc., 71 (2007).
- 11) Araki, T. *et al.*: *Fundam. Toxicol. Sci.*, **3**, 89 (2016).
- 12) Good Cell Culture Practice: <http://caat.jhsph.edu/programs/GCCP/> (2017/5/25)
- 13) Pamies, D. *et al.*: *ALTEX*, **34**, 95 (2017).