

「iPS細胞を用いた臨床応用における癌化予防 ～分子標的療法の開発～」  
 大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科 増田 茂夫

1 研究の背景と目的

Bromodomain and extraterminal (BET)タンパクファミリーはBRD2, BRD3, BRD4, BRDTからなり、RNA polymerase IIによる転写制御に深く関わっている。Bromodomainを介してヒストンテイルのアセチル化リジン残基を認識し(=Epigenetic reader)、アセチル化クロマチンへ転写制御複合体をリクルートする。低分子化合物JQ1のようなBET阻害剤は癌や炎症における治療的役割が認められている(Nature. 2010; 468: 1067-73) (Cell. 2011; 146: 904-17)。特に、BRD4は幾つかの癌腫で c-Myc, NK-κB, Nanogの発現を制御するといわれ、これはSuper-enhancerへのBRD4結合による。Cell contextにより異なるが、ヒトiPS細胞においても Super-enhancerを介したJQ1によるNanog, Oct4制御が想定され、未分化細胞除去への応用が考えられる。

これまでヒトiPS細胞由来の未分化細胞(=奇形腫形成能を有する細胞)を除去する方法は幾つか報告されてきた(筆者原図<Nature Rev Cardiol, 2014>)。しかし、臨床応用するに際して臨床グレードの薬剤であるか、有効性は充分であるか、大量の細胞を現実的に処理可能であるか、などクリアすべき課題が山積していた。

Reference	Chemical or antibody	Mode of action	Drug
Lee et al. <sup>4</sup>	Chemical inhibitor	Survivin inhibition	QC; YM155
Ben-David et al. <sup>6</sup>	Chemical inhibitor	Oleate synthesis inhibition	PluriSin #1
Vazquez-Martin et al. <sup>9</sup>	Chemical inhibitor	AMP-activated protein kinase activation	Metformin
Tang et al. <sup>11</sup>	Antibody	SSEA-5 purging	Anti-SSEA-5 monoclonal antibody
Richards et al. <sup>12</sup>	Chemical	Endoplasmic reticulum stress	JC011

Abbreviations: PluriSin, pluripotent cell-specific inhibitor; SSEA-5, stage-specific embryonic antigen-5.

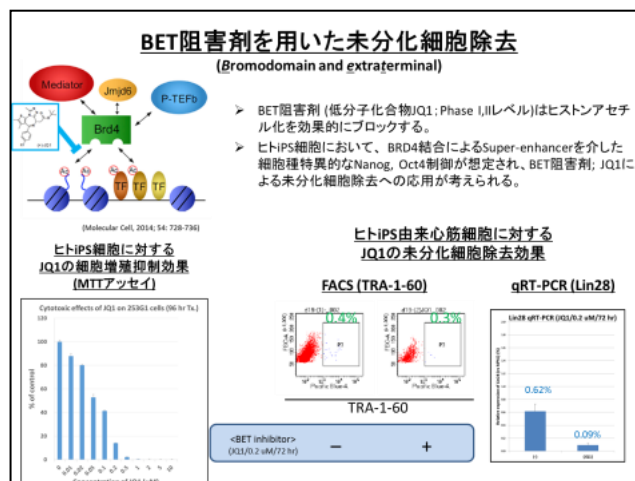
●Table (筆者原図 <Nature Rev Cardiol, 2014>)

本研究ではiPS細胞由来の未分化細胞を除去することを目的として、分子標的薬剤であるBET阻害剤を用いた除去法を検討した。

2 研究方法・研究内容

今回、我々のスクリーニングの結果、ヒトiPS細胞の増殖を特異的に抑制することが判明した。すなわち、ヒトiPS細胞(253G1細胞)をBET阻害剤であるJQ1で処理したところ、1 uM, 96 hrでほぼ完全にiPS細胞が死滅することが観察された。この傾向は他のヒトiPS細胞株でも同様に確認された。

次に、ヒトiPS細胞由来の心筋細胞を対象に、JQ1処理によってin vitroで残存未分化細胞が除去可能か否かを調べた。まず未分化マーカーTRA-1-60をFACSで解析した結果、未処理群では陽性率0.4%に対し、JQ1処理群では同0.3%であった。さらに未分化マーカーLin28の発現を定量した結果(ヒトiPS細胞を100%として)、未処理群では0.62%に対し、JQ1処理群で



は同0.09%まで低下した。

JQ1による遺伝子発現の変化を調べる目的で、iPS細胞を対象にJQ1処理前後の多能性関連マーカーを定量したところ、Nanog, Oct4発現が(JQ1濃度依存性、時間依存性に)減弱していることも確認された。すなわち、少なくともヒトiPS細胞においてはJQ1はNanog阻害剤、Oct4阻害剤として機能することが示唆された。

なお、JQ1処理によって、iPS細胞由来心筋細胞の拍動や心筋マーカー(cTnT)に変化を来しておらず、大きなadverse effectsをもたらすことは無かった。

以上、BET阻害剤JQ1により、iPS細胞由来の残存未分化細胞を効率的に除去できることが判明した。

これまでiPS細胞由来の未分化細胞を除去する方法として、分子標的薬剤であるBET阻害剤や抗CD30抗体結合薬剤を用いた手法を各々開発してきたが、次に、これらを組み合わせることで相加・相乗効果が得られるか否かを検討した。

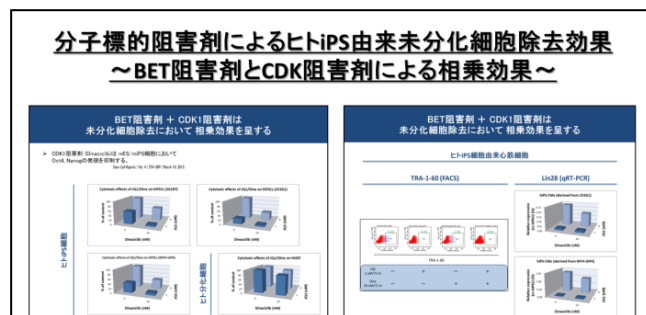
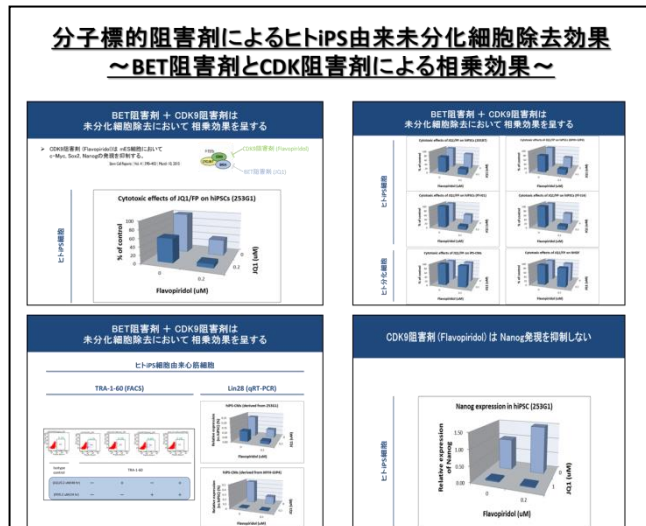
ヒトiPS細胞由来心筋細胞を対象に、未処理群、1剤処理群、2剤処理群をそれぞれ用意し、残存未分化細胞をTRA-1-60によるFACS解析で評価した。その結果、TRA-1-60陽性率が未処理群では0.3%に対し、2剤処理群では(検出限界として知られる)0.1%まで低下することが判明した。

以上より、より高い安全性を目指した未分化細胞除去法として、分子標的薬剤を用いた新規手法を組み合わせる dual therapeutic methodが奏功する可能性が示唆された。

次に、さらに未分化細胞除去効果に関し、より深い効果を目指して分子標的阻害剤のスクリーニングを行った結果、CDK阻害剤(CDK9 or CDK1阻害剤)がBET阻害剤(Nanog阻害剤)と共に相乗効果を示すことを見出した。

具体的には、転写complex P-TEFb を形成するBRD4とCDK9を同時に阻害したところ、未分化細胞除去において相乗効果を示した(BET阻害剤+CDK9阻害剤)。

しかし、CDK9阻害剤(Flavopiridol)は、ヒトiPS細胞において多能性関連遺伝子(Nanog, Oct4, c-Myc)の発現を抑制しなかった。同様に BET阻害剤+CDK1阻害剤でも未分化細胞除去に関して相乗効果を確認した。





- 5-13, 2016.
4. Kawamura A, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Kashiyama N, Ito E, Watabe T, Masuda S, Toda K, Hatazawa J, Morii E, Sawa Y. Teratocarcinomas Arising from Allogeneic Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Tissue Constructs Provoked Host Immune Rejection in Mice. **Sci Rep.** 6: 19464, 2016.
  5. Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Sougawa N, Okimoto K, Tada C, Saito A, Sawa Y. Eliminating residual iPS cells for safety in clinical application. **Protein Cell.** 6(7): 469-471, 2015.
  6. Masuda S, Miyagawa S, Sougawa N, Sawa Y. CD30-targeting immunoconjugates and bystander effects. **Nature Rev Clin Oncol.** 12(4): 245, 2015.
  7. Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Kashiyama N, Saito A, Sawa Y. Regulating ES or Induced Pluripotent Stem Cells by Innate Lymphoid Cells. **Transplantation.** 98(5): e38-e39, 2014.
  8. Liu GH, Suzuki K, Li M, Qu J, Montserrat N, Tarantino C, Gu Y, Yi F, Xu X, Zhang W, Ruiz S, Plongthongkum N, Zhang K, Masuda S, Nivet E, Tsunekawa Y, Soligalla RD, Goebel A, Aizawa E, Kim NY, Kim J, Dubova I, Li Y, Ren R, Benner C, del Sol A, Bueren J, Trujillo JP, Surrallés J, Cappelli E, Dufour C, Esteban CR, Izpisua Belmonte JC. Modelling Fanconi Anemia pathogenesis and therapeutics using integration-free patient-derived iPSCs. **Nature Communications.** 5: 4330, 2014.
  9. Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Sougawa N, Ito E, Takeda M, Saito A, Sawa Y. Emerging innovation towards safety in the clinical application of ESCs and iPSCs. **Nature Rev Cardiol.** 11(9): 553-554, 2014.

●謝辞

下記の先生方にはこの場を借りて深謝致します。

- ・京都大学 CiRA : 山中 伸弥 先生、吉田 善紀 先生
- ・東京女子医大 : 清水 達也 先生、松浦 勝久 先生
- ・国立医薬品食品衛生研究所 : 佐藤 陽治 先生
- ・大阪大学 : 紀ノ岡 正博 先生