

iPS 臨床における造腫瘍性回避技術の新規開発

大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科

増田 茂夫

1. はじめに・研究目的

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- κ B, 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。

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。

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

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

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

2. 方法 および 3. 結果

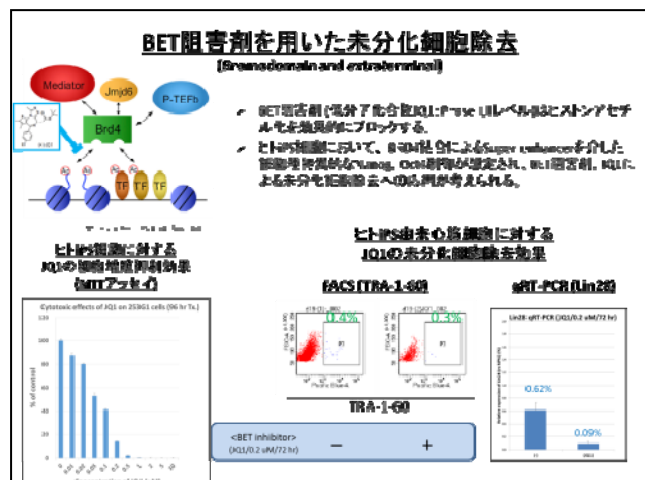
今回、我々のスクリーニングの結果、ヒトiPS細胞の増殖を特異的に抑制することが判明した。すなわち、ヒトiPS細胞(253G1細胞)をBET阻害剤であるJQ1で処理したところ、1 uM, 96 hrでほぼ完全にiPS細胞が死滅することが観察された。この傾向は他のヒトiPS細胞株でも同様に確認された。

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

5. 発表論文、その他

1. Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Nakamura T, Khurram MA, Ishikawa T, Saito A, Sawa Y. Expandable progenitors from induced pluripotent stem cells. **Nature Rev Cardiol.** 13(10): 574, 2016.
2. Masuda S, Miyagawa S, Nakamura T, Khurram MA, Sawa Y. Brentuximab vedotin for CD30-positive tumours. **Lancet Oncol.** 17(9): e371, 2016.
3. Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Kawamura T, Mochizuki-Oda N, Masuda S, Sawa Y. Building a new treatment for heart failure-Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cells into the Heart. **Curr Gene Ther.** 16(1): 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.

●和文総説

1. 増田茂夫, 澤芳樹 ES/iPS 臨床に向けた未分化細胞除去技術の最前線 医学のあゆみ Vol. 251, Nos. 12, 13; 1147-1148, 2014.
2. 増田茂夫, 宮川繁, 澤芳樹 iPS 臨床応用における未分化細胞除去技術 日本再生医療学会雑誌 Vol. 13, No. 4; 449, 2014.

●特許出願

1. International Application No. PCT/ JP2015/081408
Filed on November 6, 2015
Applicant: OSAKA UNIVERSITY
1. 発明の名称: 未分化細胞が除去された分化誘導細胞集団の製造方法
出願人: 国立大学法人大阪大学
出願番号: 特願 2016-150458 (出願日: 2016. 7. 29)
発明者: 増田茂夫, 福嶋五月, 宮川繁, 澤芳樹
2. 発明の名称: 未分化細胞が除去された分化誘導細胞集団、その利用及びその製造方法
出願人: 国立大学法人大阪大学
出願番号: 特願 2014-226682 (出願日: 2014. 11. 7)
発明者: 増田茂夫, 寒川延子, 福嶋五月, 宮川繁, 澤芳樹

●新聞記事

1. 平成 27 年 3 月 31 日掲載、日本経済新聞、「再生医療—普及への道 < 中 >」
→ヒト iPS 細胞由来 心筋細胞移植をより安全に施行するため、がん化する可能性のある細胞を薬剤で選別する方法を開発した。(右図)

6. 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

