

重症心不全に対するiPS細胞由来心筋細胞移植 (iPS細胞の癌化予防を目指して)

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科
特任准教授 増田 茂夫

はじめに

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- 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。

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	PluriSIn #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: PluriSIn, pluripotent cell-specific inhibitor; SSEA-5, stage-specific embryonic antigen-5.

●表 (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。

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 μ M, 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。

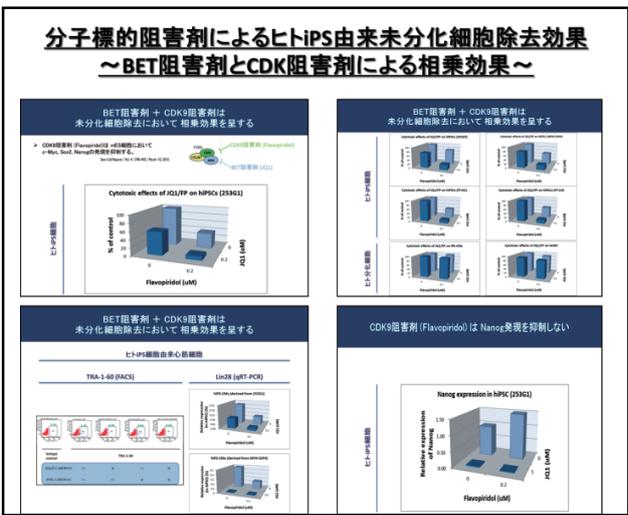
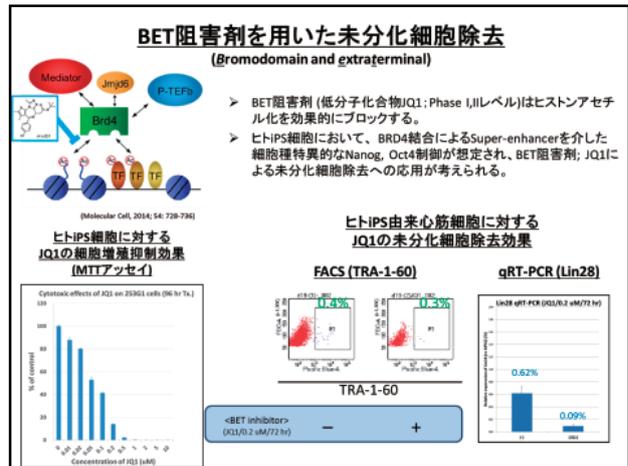
以上、BET阻害剤JQ1により、iPS細胞由来の残存未分化細胞を効率的に除去できることが判明した。

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



本研究で使用された分子標的阻害剤は種々の癌でPhase II試験施行中であり、今後、“ヒトiPS細胞”を対象とした分子標的治療薬としての可能性が示唆された。

文 献

1. Iseoka H, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Masuda S, Yajima S, Ito E, Sougawa N, Takeda M, Harada A, Lee JK, Sawa Y. Pivotal role of non-cardiomyocytes in electromechanical and therapeutic potential of induced pluripotent stem cell-derived engineered cardiac tissue. **Tissue Eng Part A**. in press.
2. 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.
3. Masuda S, Miyagawa S, Nakamura T, Khurram MA, Sawa Y. Brentuximab vedotin for CD30-positive tumours. **Lancet Oncol**. 17 (9) : e371, 2016.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Masuda S, Miyagawa S, Sougawa N, Sawa Y. CD30-targeting immunoconjugates and bystander effects. **Nature Rev Clin Oncol**. 12 (4) : 245, 2015.
8. 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.
9. 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, Surralles 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.
10. 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、福寫五月、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、福寫五月、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。（右上図）

2. 平成29年4月24日掲載、日本経済新聞、「がん化の恐れある細胞 iPS細胞から除去 阪大など技術開発」（右下図）



●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