

重症心不全に対する iPS 臨床応用へ向けた未分化細胞除去技術の新規開発

増田茂夫

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科

【研究の背景】

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	PluriSln #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: PluriSln, pluripotent cell-specific inhibitor; SSEA5, stage-specific embryonic antigen-5.

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

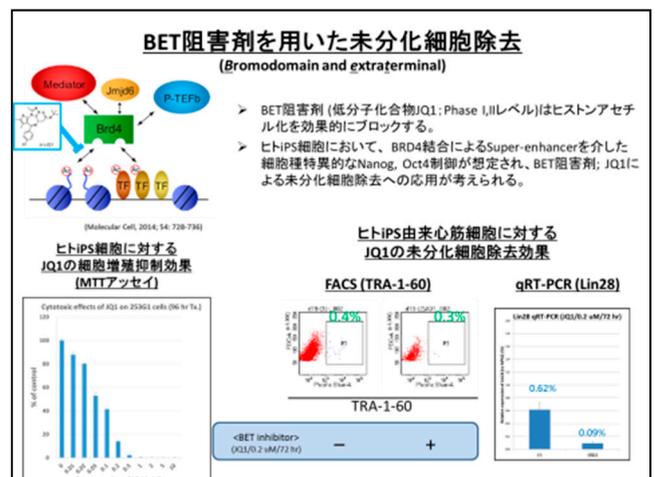
【目的】

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 阻害剤などを用いた除去法を検討した。

【方法と結果】

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, 96hr 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)



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。

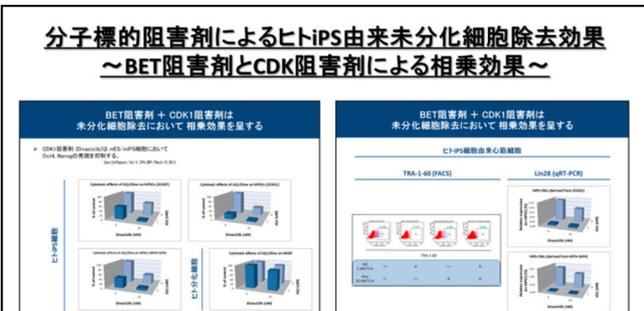
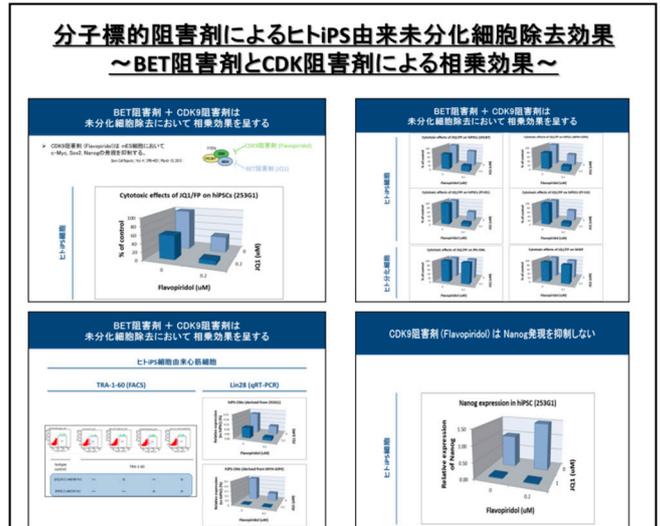
以上、BET 阻害剤 JQ1 により、iPS 細胞由来の残存未分化細胞を効率的に除去できることが判明した。

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) と共に相乗効果を呈することを見出した。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呈した (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。



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) と共に相乗効果を呈することを見出した。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呈した (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。

【考 察】

残存未分化細胞を除去して造腫瘍性を回避する観点から、複数の分子標的阻害剤を併用する利点が示唆された。

単剤と比較し、低用量の併用で相乗効果が得られることから、side effect の軽減につながると期待される。

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。

Epigenetic therapy by BET inhibitors

● Pre-clinical studies

BET inhibitor	Relevant BET protein target	Disease type	Disease subtype	Mouse model	EMC
JQ1	BRD4	Cancer	pancreatic cancer	pancreatic cancer xenograft	2017106
JQ1	BRD4	Cancer	acute myeloid leukemia	acute myeloid leukemia	2143037
JQ1	BRD4	Cancer	acute myeloid leukemia	acute myeloid leukemia	2143038
JQ1	BRD4	Cancer	multiple myeloma	multiple myeloma	2143039
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143040
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143041
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143042
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143043
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143044
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143045
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143046
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143047
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143048
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143049
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143050
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143051
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143052
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143053
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143054
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143055
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143056
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143057
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143058
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143059
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143060
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143061
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143062
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143063
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143064
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143065
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143066
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143067
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143068
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143069
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143070
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143071
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143072
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143073
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143074
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143075
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143076
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143077
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143078
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143079
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143080
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143081
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143082
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143083
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143084
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143085
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143086
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143087
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143088
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143089
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143090
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143091
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143092
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143093
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143094
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143095
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143096
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143097
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143098
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143099
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143100
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143101
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143102
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143103
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143104
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143105
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143106
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143107
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143108
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143109
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143110
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143111
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143112
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143113
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143114
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143115
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143116
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143117
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143118
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143119
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143120
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143121
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143122
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143123
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143124
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143125
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143126
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143127
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143128
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143129
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143130
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143131
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143132
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143133
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143134
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143135
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143136
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143137
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143138
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143139
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143140
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143141
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143142
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143143
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143144
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143145
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143146
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143147
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143148
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143149
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143150
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143151
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143152
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143153
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143154
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143155
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143156
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143157
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143158
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143159
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143160
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143161
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143162
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143163
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143164
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143165
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143166
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143167
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143168
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143169
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143170
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143171
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143172
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143173
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143174
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143175
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143176
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143177
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143178
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143179
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143180
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143181
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143182
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143183
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143184
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143185
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143186
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143187
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143188
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143189
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143190
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143191
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143192
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143193
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143194
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143195
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143196
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143197
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143198
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143199
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143200
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143201
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143202
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143203
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143204
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143205
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143206
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143207
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143208
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143209
JQ1	BRD4	Cancer	prostate	prostate	2143210

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究では、iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導する系において、未分化細胞除去を施行したが、理論的には他のあらゆる細胞種を対象とした iPS 臨床で応用可能と考えられる。すなわち iPS 心筋固有の事象に留まらず、極めて臨床的応用範囲の広い発展性・貢献度を有すると思われる。

●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

【参考・引用文献】

- 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**. 24(3-4): 287-300, 2018.
- 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, Kashiya 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, Kashiya 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.