

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10211

研究課題名(和文) iPS心筋の臨床応用へ向けた造腫瘍性回避技術の新規開発

研究課題名(英文) Eliminating residual undifferentiated cells from iPSC-CMs for safer clinical application of iPSCs

研究代表者

増田 茂夫 (Masuda, Shigeo)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：10396749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞を利用した再生医療の実現に際し、安全性担保、特に腫瘍形成回避が必要条件となる。本研究ではiPS細胞由来未分化細胞除去を目的とした。まずヒトiPS細胞を対象にEpigenetic修飾薬であるBET阻害剤(JQ1)を添加したところ、同剤が強力なNanog阻害剤として作用することを確認した。次にヒトiPS由来心筋細胞をin vitroで同Nanog阻害剤処理したところ、残存未分化細胞が効率的に除去された。さらにCDK阻害剤(CDK9 or CDK1阻害剤)がBET阻害剤と共に相乗効果を呈することを見出した。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。

研究成果の概要(英文)：Clinical application of iPSC-derived cardiomyocytes (iPS-CMs) is considered to be one of the most promising approach to regenerative treatment for severe heart failure. However, its success would largely depend on safety, including prevention of tumor formation (Masuda S, et al. Nature Rev Cardiol. 2014;11:553-4). Here, we demonstrate that BET protein bromodomain antagonist is efficacious in removing residual undifferentiated cells in vitro. In this context, it was revealed that BET protein antagonist functions as a Nanog inhibitor within human iPSC cells. Furthermore, co-treatment with BET protein antagonist and CDK inhibitors (CDK9 or CDK1 inhibitor) synergistically eliminated residual undifferentiated cells among human iPSC-CMs. These findings imply that combination treatment in vitro with these drugs contributes to molecular-targeted treatment on “human iPSC cells”.

研究分野：再生医療

キーワード：ヒトiPS細胞 造腫瘍性 未分化細胞除去 分子標的治療薬

### 1. 研究開始当初の背景

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- 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。

**Table 1 | Novel strategies for selective elimination of teratoma**

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>)

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。

### 2. 研究の目的

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 阻害剤及び CDK 阻害剤を用いた除去法を検討した。

### 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞 (253G1 細胞) を対象に *in vitro* で BET 阻害剤 (JQ1) にて 96 hr 処理し、増殖抑制効果を MTT アッセイで検証した。同様の細胞と阻害剤 (24 hr 処理) を用いて、多能性関連遺伝子 (Nanog, Oct4) の発現変化を qRT-PCR にて測定し、濃度・時間依存性を検証した。次にヒト iPS 細胞由来心筋細胞を対象に *in vitro* で BET 阻害剤 (JQ1) にて処理し、残存未分化細胞の陽性率を FACS (指標マーカー: TRA-1-60) 及び qRT-PCR (指標マーカー: Lin28) で測定した。さらにヒト iPS 細胞由来

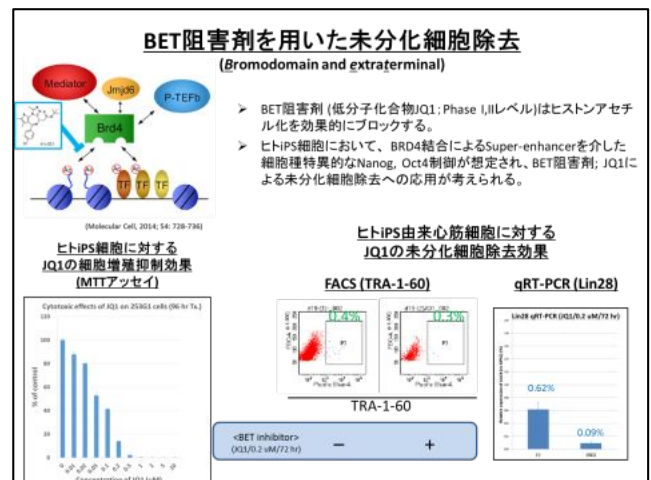
心筋細胞を対象に *in vitro* で BET 阻害剤 (JQ1) にて処理し、拍動や心筋マーカー (cTnT) に影響がないか否かを検証した。

上記と同様の実験を、BET 阻害剤 + CDK9 阻害剤、及び BET 阻害剤 + CDK1 阻害剤、のそれぞれの組み合わせで施行し、相加・相乗効果が得られるか否かを検証した。

### 4. 研究成果

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  $\mu$ 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。

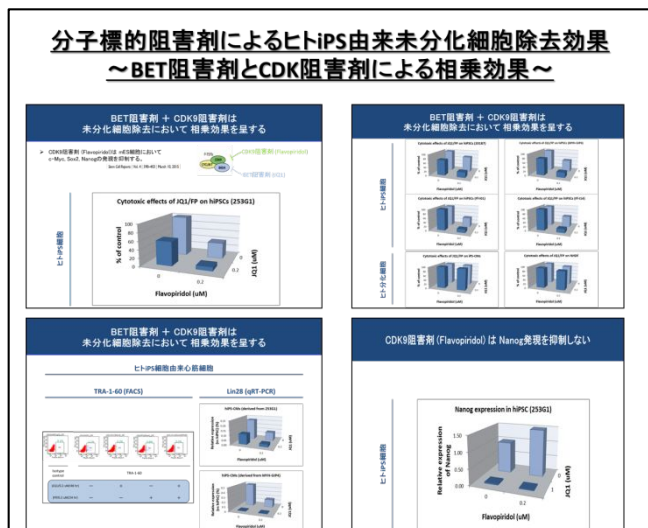


JQ1 による遺伝子発現の変化を調べる目的で、iPS 細胞を対象に JQ1 処理前後の多能性関連マーカーを定量したところ、Nanog, Oct4 発現が (JQ1 濃度依存性、時間依存性に) 減弱していることも確認された。すなわち、少なくともヒト iPS 細胞においては JQ1 は Nanog 阻害剤、Oct4 阻害剤として機能することが示唆された。

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 をもたずことは無かった。

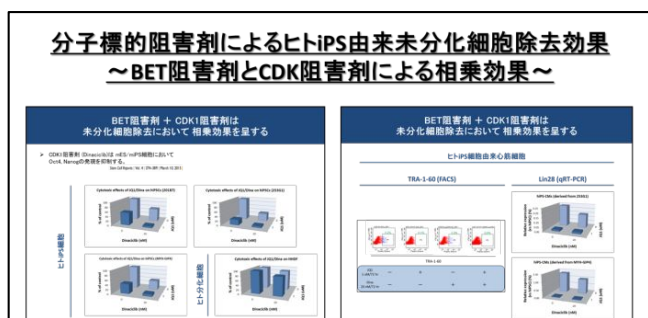
以上、BET 阻害剤 JQ1 により、iPS 細胞由来の残存未分化細胞を効率的に除去できることが判明した。

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。



以上の結果からの考察として、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。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計9件)

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. 査読有  
doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0535.
2. Masuda S. Atherosclerosis: Caused by Mutated Old Blood Cells. [Editorial] *Ann Cardiol Cardiovasc Med*. 1(1): 1002, 2017. 査読有  
[http://remedypublications.com/annals-of-cardiology-and-cardiovascular-medicine/articles/pdfs\\_folder/accm-v1-id1002.pdf](http://remedypublications.com/annals-of-cardiology-and-cardiovascular-medicine/articles/pdfs_folder/accm-v1-id1002.pdf)
3. Masuda S, Miyagawa S, Sawa Y. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med*. 376(18): e38, 2017. 査読有  
doi: 10.1056/NEJMc1703361.
4. Masuda S, Miyagawa S, Nakamura T, Khurram MA, Sawa Y. Brentuximab vedotin for CD30-positive tumours. *Lancet Oncol*. 17(9): e371, 2016. 査読有  
doi: 10.1016/S1470-2045(16)30404-1.
5. Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Nakamura T, Khurram MA, Ishikawa T, Saito A, Sawa Y. Expandable progenitors from induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cardiol*. 13(10): 574, 2016. 査読有  
doi: 10.1038/nrcardio.2016.129.
6. 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. 査読有  
DOI : 10.2174/1566523216666160119094143
7. 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. 査読有  
doi: 10.1038/srep19464.
8. 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. 査読有  
doi: 10.1007/s13238-015-0170-4.

9. Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Sougawa N, Okimoto K, Saito A, Sawa Y. CD30-targeting immunoconjugates and bystander effects. *Nat Rev Clin Oncol*. 12(4): 245, 2015. 査読有  
doi: 10.1038/nrclinonc.2014.159-c1.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Masuda S, Novel PROTAC-induced BET Protein Degradation is Potent in Ex Vivo Purging of Tumorigenic Cells from iPSC-derived Cardiomyocytes. 第 82 回 日本循環器学会学術総会, 2018 年.
2. Masuda S, Novel Factors that Evaluate Safety in iPSC-derived Cardiomyocytes Contaminated with Tumorigenic Cells. 第 82 回 日本循環器学会学術総会, 2018 年.
3. Masuda S, Eliminating Residual Undifferentiated Cells from iPSC-derived Cardiomyocytes by Heat Shock Protein 90 Inhibitors in Collaboration with Proteasome Inhibitor. 第 82 回 日本循環器学会学術総会, 2018 年.
4. Masuda S, Eliminating Residual Undifferentiated Cells from Human iPS-derived Products by Heat Shock Protein 90 Inhibitors. 15th International Society for Stem Cell Research: Annual Meeting, 2017.
5. Masuda S, Novel Candidate Markers for Evaluating Safety in iPSC-derived Cardiomyocytes Contaminated with Tumorigenic Cells. American Heart Association Scientific Sessions, 2017.
6. 増田 茂夫, Heat shock protein 90 (HSP90)阻害剤を用いたヒト iPS 由来未分化細胞除去の可能性, 第 16 回 日本再生医療学会総会, 2017 年.
7. Masuda S, BET Protein Antagonist is Potent in Eliminating Residual Undifferentiated Cells from Human iPS-derived Cardiomyocytes in Synergy with CDK Inhibitors. 第 81 回 日本循環器学会学術集会, 2017 年.
8. 増田 茂夫, 分子標的阻害剤によるヒト iPS 由来未分化細胞除去効果 ~Nanog 阻害剤と CDK 阻害剤による相乗効果~, 第 15 回 日本再生医療学会総会, 2016 年.
9. Masuda S, BET Protein Antagonist is Potent in Eliminating Residual

Undifferentiated Cells from Human iPS-derived Cardiomyocytes in Synergy with CDK Inhibitors. 14th International Society for Stem Cell Research: Annual Meeting, 2016.

10. 増田 茂夫, iPS 臨床におけるドラッグ・リポジショニングによる未分化細胞除去法の開発, 第 14 回 日本再生医療学会総会, 2015 年.
11. Masuda S, Drug Re-positioning Enables Elimination of Undifferentiated Cells in Clinical Application of iPS Cells. 第 79 回 日本循環器学会学術集会, 2015 年.
12. Masuda S, DRUG RE-POSITIONING ENABLES ELIMINATION OF UNDIFFERENTIATED CELLS IN CLINICAL APPLICATION OF IPS CELLS. 13th International Society for Stem Cell Research: Annual Meeting, 2015.
13. 増田 茂夫, 教育セッション(5) 幹細胞を用いた心不全科学「iPS 細胞の腫瘍原性」, 第 19 回 日本心不全学会総会, 2015 年.

〔図書〕(計 4 件)

1. Masuda S, Ex vivo Purging of Residual iPS Cells for Safer Clinical Application. (Chapter 6) (pp.117-126) In: *Advances in Medicine and Biology* (Volume 108), Leon V. Berhardt, ed., Nova Publishers, 2016 Aug 17.
2. 増田茂夫、宮川繁、澤芳樹 新規 PROTAC テクノロジーによるタンパク質のケミカルノックダウン 日本再生医療学会雑誌 Vol.17, No.1; 77, 2018.
3. 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.
4. 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.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

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  
発明者: 増田茂夫、寒川延子、福嶋五月、宮川繁、澤芳樹  
権利者: 国立大学法人大阪大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-226682  
出願年月日: 2014.11.7  
国内外の別: 国内

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

増田 茂夫 (MASUDA, Shigeo)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：10396749