

# 「次世代合成生物基盤」プロジェクト

プロジェクトリーダー 相澤 康則

## 【基本構想】

本プロジェクトでは、独自の iPS 細胞ゲノム構築技術群や大規模ゲノム改変技術を活用し、創薬分野での革新的イノベーションを生み出すプラットフォーム技術の開発と、高付加価値な疾患モデル細胞リソースの構築を推進しています。具体的には、現代人の健康寿命を脅かすがん領域において、膨大な変異遺伝子発現 iPS 細胞コレクションと細胞評価自動化システム、独自のバーコード識別解析系を融合させ、遺伝的背景のノイズなしに病態化メカニズムを深く理解できる環境を整備しています。さらに、公的規制研究機関との連携によるゲノム品質評価基準の策定や、国内外のトップ研究機関との共同研究を通じた神経変性・脳神経系疾患、糖尿病等の病態解明、宿主細胞内で長鎖 DNA の合成から高効率回収までを完結させる革新的なゲノム構築技術の開発を担っています。これらの研究リソースを最大限活用し、がん治療や再生医療の基盤となり得る国内外の研究機関や企業との連携を助け、神奈川県における創薬研究開発支援の拠点形成に資することを目指しています。

## 1. 2025 年度の研究目的

前年度までに構築した技術基盤や各種ライブラリーなどの独自創薬研究リソースを実用的な病態検証および応用展開のフェーズへと移行させ、国内外における共同研究の本格化を見据え、各研究項目について以下のように目標を設定して研究を実施した。

### 研究項目 A：がんモデル iPS 細胞ライブラリーの開発とその活用

がんは複数の遺伝子変異の蓄積によって進行する「遺伝子の病気」であり、臨床現場における抗がん剤抵抗性の獲得や腫瘍の再拡大は、これら複数変異の相乗効果が深く関与している。当グループでは、これまで培ってきたヒトゲノム構築技術を活用し、がん臓器で高頻度にみられる 290 種類のがん遺伝子を変異型として人工的に発現誘導できるヒト iPS 細胞の実験系（プラズミドライブラリーおよび細胞株）を前年度までに開発してきた。2025 年度は、この独自の創薬研究技術基盤を活用するため、以下の 3 つの具体的な目標を設定した。

**変異遺伝子発現 iPS 細胞を活用した遺伝性腫瘍症候群に対する創薬基盤研究** 遺伝性腫瘍症候群における若年がん化の遺伝子メカニズムを理解することは、効果的な予防法や新薬開発の基盤として重要である。しかし、従来の患者由来 iPS 細胞を用いたアプローチでは、個々人の遺伝的背景に由来するノイズが大きく、特定の遺伝子変異が腫瘍形成へ及ぼす直接的な影響を正確に見極めることが困難であった。本年度は、当グループが保有する発現誘導型がんモデル iPS 細胞が健常者由来であることの優位性を活かし、同症候群の原因とされる遺伝子変異による幹細胞分化抵抗性を検証することとした。

**遺伝子変異による抗がん剤抵抗性の評価研究** がん治療

における最大の障壁である抗がん剤抵抗性と遺伝子変異の間の因果関係データを網羅的に取得するため、前年度までに構築した変異体発現 iPS 細胞群と多種類の抗がん剤を組み合わせた大規模な細胞機能解析（生存・死滅プロファイリング）の開始を計画した。本年度は、この膨大な組み合わせ評価をハイスループット化するため、細胞自動評価システムの運用に加えて、同一ウェル内で多種類の変異発現細胞を同時に培養・解析できる DNA バーコードシステムの導入を目標とした。

**iPS 細胞のゲノム品質評価基準の開発** 当グループの開発してきた変異遺伝子発現誘導系は、がん発症の理解のみならず、再生細胞医療製品の安全性・ゲノム品質評価基準を策定する上でも有用である。本年度は、国立医薬品食品衛生研究所（国衛研）とのAMED共同研究プロジェクトのもとで薬剤誘導後の細胞評価系を共同で推し進めるため、まずは評価用細胞株の提供を進めることとした。並行して、実際の細胞培養下において自然発生しやすい特定の変異を網羅的に選定し、これらをあらかじめゲノム内へ導入した新規の品質評価用 iPS 細胞ライブラリーを構築することを目指した。

### 研究項目 B：各種疾患モデル iPS 細胞の応用性検証

1細胞あたり2コピー存在する遺伝子のうち、一方のアリルのみに効率よく変異を導入するアリル特異的ゲノム改変技術（asUKiS）は、本事業で既に確立済みである<sup>1</sup>。asUKiS 法は、一方のアリルの変異のみで発症する様々な顕性疾患（神経変性疾患など）を模倣する iPS 細胞の作成において高い汎用性と優位性をもつ。2025 年度は、asUKiS 法を基盤に、国内外のトップ研究機関との多角的な共同研究を本格化させ、技術の応用性を広く実証することを目的とした。

**研究項目 C：ゲノム構築による感染症対策技術の開発**

本研究開始当初に計画していたウイルスゲノムの合成法開発は研究リソースの集中と選択のために一時中断しているが、ウイルスゲノム合成以外にも多くの用途に活用できるゲノム構築基盤技術の開発は続けている。

国際的にも多くの研究室が使っている長鎖DNA合成法では、酵母と大腸菌といった2種類の宿主細胞を使うが、そのために長鎖DNAの回収率が大きく低下する課題があった。2025年度は、単一の細菌宿主内で長鎖DNAの相同組換えによる「合成」から「直接かつ大量の回収」までをシームレスに完結できる、枯草菌を宿主とした新規の形質転換アプローチの確立を目指した。

## 2. 2025 年度の研究成果

2025年度は国内外の研究機関との共同研究を本格化させると共に、グループ内では具体的な病態解明や創薬スクリーニング、ゲノム品質評価基準の策定において研究を強力に推進した。研究成果の詳細は、倉澤氏や赤瀬氏からの報告に譲り、ここではその特筆すべき内容だけを述べる。**研究項目A：がんモデルiPS細胞ライブラリーの開発とその活用**

2024年度は薬剤による発現誘導型プロモーターを用いて、がん臓器で高頻度にみられる290種類のがん遺伝子を安定発現するプラズミドライブラリーを完成させると共に、それらプラズミドをゲノム導入したiPS細胞株を樹立した。2025年度は、これら研究リソースを活用し、以下の3つの研究を本格的に展開した。

・**変異遺伝子発現iPS細胞を活用した遺伝性腫瘍症候群に対する創薬基盤研究** 特定の遺伝性腫瘍症候群では、若年期に高い頻度で各種の腫瘍（副腎皮質がん、乳がん、中枢神経系腫瘍、骨肉腫、軟部肉腫など）を発症することが知られている。その原因遺伝子として特定のガン抑制遺伝子変異が関与しているとされている。個々の変異の影響や、他遺伝子変異との相乗効果を理解する上で、患者由来iPS細胞を用いた従来研究では遺伝的背景のノイズから検証が困難であった。本年度、当グループが作製した健常者由来iPS細胞をベースとする変異型遺伝子発現iPS細胞を用いて、同症候群における特定の腫瘍形成（骨芽細胞のがん化など）メカニズムの解明に着手した。外部研究機関との連携（殿町・羽田地域内連携）のもと、iPS細胞から骨芽細胞への分化プロトコルを導入および最適化を進めている。現在、がん抑制遺伝子の変異型を発現するiPS細胞株を用いた分化実験を開始しており、次年度中の解析完了と早期の論文投稿を目指す。

**遺伝子変異による抗がん剤抵抗性の評価研究** がんモデルiPS細胞コレクションの機能解析の一環として、抗がん剤抵抗性を誘発する遺伝子変異の探索研究を開始した。同一ゲノム背景を持つ20種類の変異体発現iPS細胞に対し、入手した13種類の抗がん剤（承認済：8種、開発中：5種）を作用させ、細胞生存・死滅プロファイリングの検証を進めている。本評価のハイスループット化にあたり、自動細胞解析システムの活用に加え、変異発現プラズミドへ独自の「DNAバーコード配列」を導入した。これにより、多種類

の変異発現細胞を同一ウェル内で混合培養（One-pot解析）し、抗がん剤処理後に生存した細胞のバーコード領域を解析することで、抵抗性を示す変異株を網羅的に同定することが可能となった。さらに本年度は、第三世代シーケンサーを用いたバーコード識別用のバイオインフォマティクス解析系も確立した。本システムを用いて特定の抗がん剤に対する抵抗性スクリーニングを試行した結果、特定の抗がん剤に対して4種類のTP53遺伝子変異が有意な抵抗性を示すことを見出した。

**iPS細胞のゲノム品質評価基準の開発** 国立医薬品食品衛生研究所（再生・細胞医療製品部：国衛研）とのAMED共同研究プロジェクトのもと、iPS細胞培養過程で自然発生する遺伝子変異の影響評価を進めた。国衛研における薬剤誘導後の細胞評価系確立に向け、昨年度作製したTP53変異体を単独発現するiPS細胞株（20株）を提供した。並行して、自然発生頻度が高い特定の変異体上位15種（がん関連変異3種、機能不明変異12種）を選定し、これらをLanding Padへ導入した新規iPS細胞ライブラリーの構築も完了した。現在、薬剤による発現誘導の確認実験を行っており、確認され次第、国衛研へサンプルを提供して品質評価基準の策定を推進する。

## 研究項目B：各種疾患モデルiPS細胞の応用性検証

当グループが確立したアリル特異的ゲノム改変技術（asUKiS）を基盤に、国内外の研究機関との多角的な共同研究を展開し、大規模ゲノム改変技術の有用性を実証した。**神経変性・脳神経系疾患モデルを用いた共同研究** 国内大学との共同研究である、ハンチントン病（HD）モデルiPS細胞を用いた創薬研究については、現在共同研究先にて論文発表に必要な最終データの収集が進んでいる。また、新規の共同研究提案に基づき、特定の脳神経系疾患（てんかん性脳症等）のモデルiPS細胞の作製を完了して共同研究先への送付を終えた。さらに、特殊なゲノム高次構造形成が関与する疾患のモデルiPS細胞株についても、現在作製を進めており、26年度夏の送付を予定している。

**国際共同研究の展開** 米国大学との間で、当グループの大規模ゲノム改変技術を活用した国際共同研究を開始した。マウスゲノム上に多数存在する特定の受容体遺伝子群を対象とし、最も多くの遺伝子が含まれる上位8箇所のクラスターをマウスES細胞内で段階的に欠損させる。本年度は、これら8クラスターをそれぞれ単独で欠損したES細胞クローンの作製、増幅、および凍結保存を完了した。次年度はこれらの細胞を同大学へ提供し、個体マウスの作製および脳神経系への影響評価（遺伝子発現に関する仮説検証）を開始するとともに、多重欠損細胞の作製へと進める。

**その他の新規共同研究の展開** 次年度より国内の医療機関・大学との共同研究を開始する。糖尿病におけるインスリン分泌不全メカニズムを解明するため、特定の受容体遺伝子を欠損したマウス細胞を当グループで構築し、先方が機能評価を行う。

当グループの大規模ゲノム改変技術の優位性が国内外で広く認知されつつあり、共同研究ネットワークは確実に

拡大している。今後も積極的な情報発信を継続し、インパクトの高い研究成果創出を目指す。

#### 研究項目C：ゲノム構築による感染症対策技術の開発

従来の長鎖DNA合成技術において広く用いられてきた出芽酵母によるギャップリペア修飾法（GRC法）では、出芽酵母内連結したDNAの回収効率が極めて低く、増幅のために大腸菌への再導入（形質転換）を要する多段階プロセスが大きなボトルネックであった。本年度、当グループはこれらの制限を打破すべく、単一の細菌宿主内で長鎖DNAの「合成」と「直接かつ大量の回収」をシームレスに行うことができる、枯草菌を宿主とした新規GRCシステムを確立した。枯草菌の天然の形質転換機構では導入時にDNA末端が消失しやすいという課題に対し、プロトプラスト形質転換法を導入・最適化することでこれを回避した。さらに、ゲノム上の内因性*recA*プロモーターをキシロース誘導型プロモーターへと置換した特殊な評価株を構築した。細胞増殖期に一時的にRecAを発現誘導させることで、ゲノムの安定性を損なうことなく、相同組換え効率を劇的に向上させるプロトコルを完成させた。

本システムの実証として、ヒトゲノム領域由来の断片を含む最大 26.5 kb に及ぶ巨大プラスミドの単一ステップ合成にも成功し、標準的なキットを用いてクリーンかつ大量に DNA を直接回収できる優位性を実証した（図1）<sup>2</sup>。本技術は、物理的切断に極めて脆い長鎖ウイルスゲノム等の直接調製プロセスを大幅に効率化するものであり、合成ゲノミクス分野における汎用性の高い基盤技術である。

#### 参考文献：

- (1) Kurasawa H, Matsuura Y, Yamane R, Ohno T, Aizawa Y. *Genes Genet Syst*, 100, 10.1266/ggs.25-00016 (2025).
- (2) Kaneko S, Nakahama M, Hashimoto H, Aizawa Y. *Journal of Biotechnology*, 415, 130-134 (2026).

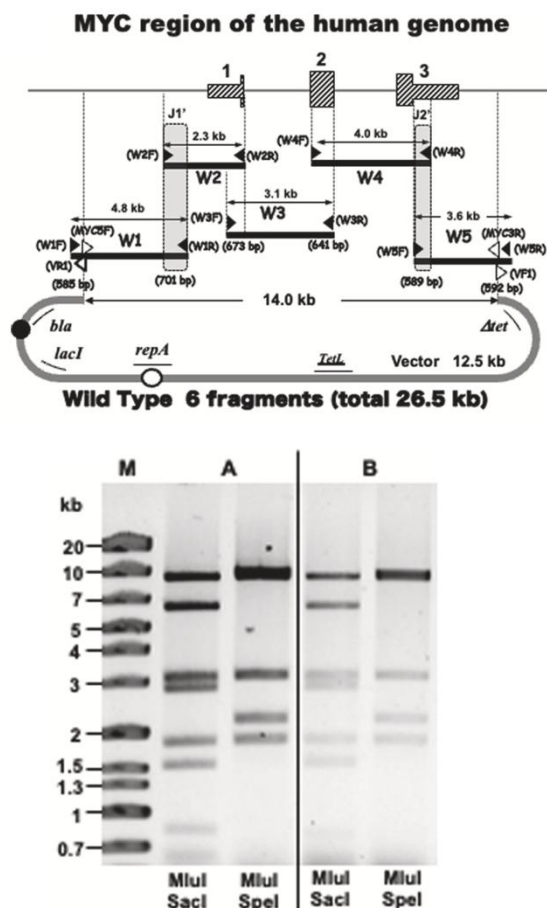


図1 ギャップリペア修飾法によるヒト MYC 遺伝子部位のゲノム断片連結。上段：DNA断片再構築を示す模式図。MYC 遺伝子領域をカバーする5つのDNA断片（W1-5）を、pGETS109由来のプラスミドと相同組換えによって連結させる。下段：得られた2種類のプラスミド（AおよびB）に対する制限酵素切断評価。期待する長さのDNA断片が検出されている。

# がんモデル iPS 細胞ライブラリの構築

「次世代合成生物基盤」プロジェクト

倉澤 光

## 1. はじめに

### (1-1) 背景

がんは、細胞が複数の遺伝子変異を段階的に獲得することで発症・進行する多段階悪性化疾患である。がん関連遺伝子のうち、変異によって細胞増殖、生存、浸潤・転移などを直接的に駆動するものは「ドライバー遺伝子」と呼ばれる。臨床においては、同一の原発臓器由来のがんであっても、保持するドライバー遺伝子の種類やその組み合わせの多様性（多様な共起変異）によって、腫瘍の生物学的特性や治療応答性が大きく異なる。したがって、がんの本質的な理解および精密医療（プレシジョン・メディシン）の確立に向けては、個々のドライバー遺伝子変異が細胞表現型に与える単独の影響のみならず、複数変異が共存した際の相互作用（相乗効果や排他性）を体系的に検証することが不可欠である。

近年、次世代シーケンサー（NGS）技術の飛躍的発展と The Cancer Genome Atlas (TCGA)<sup>1</sup>などの国際的な大規模がんゲノムプロジェクトにより、がん種ごとの変異プロファイルや高頻度な共起・排他関係が網羅的にカタログ化されてきた。これらゲノム解析から得られる情報は静的な「変異の有無」の記述に留まり、各変異が細胞のシグナル伝達や形質転換に果たす動的な機能的意義を直接的に証明するものではない。特に、患者由来のがん組織や既存のがん細胞株は、すでに無数の背景変異や染色体不安定性を抱えているため、特定の変異がもつ影響や、変異間の相乗効果を個別に切り分けて精密に解析することは極めて困難である。

この課題を克服するアプローチのひとつとして我々は、同一の遺伝的背景（アイソジェニックな背景）を持つ健康者由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）へ、変異したガンドライバー遺伝子を導入し、その表現型変化を直接比較する実験系を構築してきた。本プロジェクトでは、我々が培ってきた高度なゲノム編集技術を駆使し、「がんモデル iPS 細胞ライブラリ」の構築を推進している。本ライブラリは、単一の親 iPS 細胞株を出発材料として、そのゲノムの同一遺伝子座にガンドライバー遺伝子発現カセットを単独、または多重に組み合わせて組み込んだアイソジェニックな細胞株コレクションである。さらに、培地への薬剤添加によって任意のタイミングでガンドライバー遺伝子の発現を誘導できるシステムを組み込んでいる。これにより、遺伝的背景のばらつきやサイレンシングの影響を排除した同一条件下において、変異単独の機能、および複数変異間の相互作用を定量的かつ体系的に評価可能な基盤の創出を目指している。

### (1-2) 令和7年度末までの成果

#### (1-2-1) ドライバー遺伝子の選定とライブラリ構築

がんモデル iPS 細胞ライブラリで発現させるガンドライバー遺伝子の選別から本プロジェクトは始まった。先行研究<sup>2</sup>で同定された299種類のガンドライバー遺伝子を出発点とし、主要ながん種において特に高頻度に変異が認められる11種類のコアドライバー遺伝子を選定した。さらに、米国国立がん研究所（NCI）が公開するデータベース（Genomic Data Commons Data Portal）を詳細に解析し、これら11遺伝子においてがん特異的に頻発している合計290種類の変異遺伝子を対象とすることとした。

その後、これらすべての変異ガンドライバー遺伝子の発現プラズミドを設計及び構築した（表1）。現在、PIK3CA（83 変異体）、KRAS（36 変異体）をはじめとする全290種類の変異体プラスミドがすべて利用可能な状態に整備されている。

| 遺伝子名          | 作製した変異体数 |
|---------------|----------|
| <i>PIK3CA</i> | 83       |
| <i>KRAS</i>   | 36       |
| <i>FBXW7</i>  | 36       |
| <i>NRAS</i>   | 21       |
| <i>HRAS</i>   | 14       |
| <i>IDH1</i>   | 6        |
| <i>NFE2L2</i> | 22       |
| <i>BRAF</i>   | 24       |
| <i>ERBB2</i>  | 14       |
| <i>AKT1</i>   | 4        |
| <i>PIK3R1</i> | 30       |

**表1 全290種類のドライバー遺伝子ライブラリ。**米国国立がん研究所が公開している、がん組織における遺伝子変異のデータベース（Genomic Data Commons Data Portal）を解析し、高頻度で観察される変異体を作製した。

#### (1-2-2) 薬剤誘導式 Landing pad 細胞株の作製

ヒト細胞内でガンドライバー遺伝子変異体の機能を正確に評価するには、各変異体をゲノム上の同一位置へ高効率に導入し、発現タイミングと量を厳密に制御できる実験系が必要である。そこで我々は、Clontech社のTet-Onシステムを利用し、ドキシサイクリン（Dox）により発現制御可能な薬剤応答型プラットフォームを構築した。

具体的には、まずiPS細胞のセーフハーバー遺伝子座へ、CRISPRゲノム編集により外来遺伝子の受け皿となる

任意の遺伝子座

野生型株

Landing padカセットのノックイン

promoter

インテグラーゼ作用配列

pA

LP株

Bxb1インテグラーゼによる組換え

Dox応答転写因子

Dox\_p

ドライバー遺伝子

Dox誘導型プラスミド:

- ・インテグラーゼ作用配列
- ・Dox応答転写因子のコード配列
- ・Dox応答プロモーター・ドライバ遺伝子

プラスミドの挿入

Dox誘導型iPS細胞

promoter

Dox応答転写因子

Dox\_p

ドメイン遺伝子

pA

転写・翻訳

Doxと結合

標的変換

## 2. 実験と結果

令和6年度末までに開発した「がんドライバー遺伝子ライブラリ」および「Dox依存的にがんドライバー遺伝子を発現誘導するプラットフォーム細胞株」を実際に運用するにあたり、まず本発現システムの基本性能を評価した。具体的には、赤色蛍光タンパク質（RFP）をレポーターとして用いて、従来型のDox応答プロモーター（Dox<sub>p</sub>）カセットにおけるDox応答性の定量的な検証を行った。

多数のドライバー遺伝子変異の機能を正確に比較評価するためには、Dox 添加に応じて、可能な限り均一かつ再現性よく目的遺伝子の発現を誘導できるシステムが求められる。したがって、RFP レポーター実験で観察された「Dox 非応答細胞の存在」は、本プラットフォームをがん変異機能評価系として高精度化させるうえで、最優先で解決すべき課題と考えられた。

この非応答性・不均一性が生じる原因として、Tet-Onシステム自体の活性だけでなく、発現カセットが置かれたゲノム上の局所的な環境（位置効果）が影響している可能性が想定された。具体的には、挿入部位周辺の局所的なクロマチン状態の閉鎖化、近傍のゲノム領域に存在する内因性プロモーターとの干渉、あるいは外来発現カセットに対する細胞固有のサイレンシング傾向などが原因となり、一部の細胞でDox\_pの転写活性化能が十分に発揮されていない可能性が考えられた。

この課題を解決するため、我々は「インスレーター配列」の導入を試みた。インスレーター配列とは、遺伝子発現カセットの周囲に配置することで、近傍のゲノム配列やクロマチン状態からの構造的・転写的な影響を遮断する、いわば「仕切り（境界エレメント）」の役割を果たすDNA配列である。そこで、Dox<sub>p</sub>からRFPコード配列までを含む発現カセットの両側にインスレーター配列を挿入した「改良型カセット（改良型Dox誘導式プラスミド）」を新たに設計・作製し、その効果を検証した（図3）。なお、本研究で用いたインスレーター配列の具体的な種類や詳細については、知的財産および今後の発表の兼ね合いから、本報告書での記載は控える。



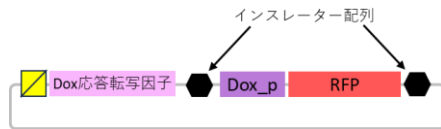


図3 改良型 Dox 誘導式プラスミドの構造。Dox\_p から RFP コード配列までを含む発現カセットの両側に、「仕切り」としての機能を有するインスレーター配列（黒色・六角形）を導入している。

### 改良型カセットによるDox応答性の改善効果

作製した改良型薬剤誘導プラスミドをLanding pad細胞株に導入し、同様にDox添加によるRFP発現誘導率をフローサイトメトリーにより評価した（図4）。その結果、Dox添加後にRFP陽性となる細胞の割合は88.78%にまで大幅に向上した。従来型カセットで大きな課題となっていたDox非応答細胞の割合は、約50.20%から約11.05%へと大きく低減した。すなわち、発現カセットの両側をインスレーター配列で保護することにより、Dox添加にตอบสนองして均一に発現誘導される細胞が劇的に増加し、応答性のばらつきが大幅に改善されることが実証された。

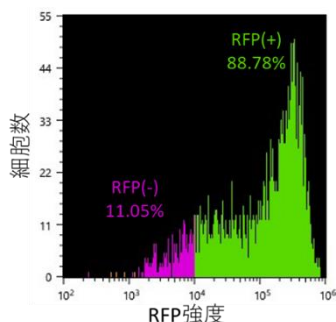


図4 インスレーター導入による RFP 発現誘導率の改善。従来型 Dox\_p カセットで認められた Dox 非応答細胞を低減するため、インスレーター配列を導入した改良型カセットを作製し、RFP レポーターを用いて Dox 応答性を評価した。フローサイトメトリーにより取得した RFP シグナル強度をヒストグラムとして示している。RFP シグナル値 10<sup>4</sup>を閾値とした場合、Dox 添加後に RFP 陽性となる細胞は 88.78%であった（緑色）。一方、非応答細胞は 11.05%まで低減した（マゼンタ色）。従来型カセットでは非応答細胞が約 50%存在していたことから、改良型カセットでは Dox 応答性が大きく改善したことが示された。

この結果は、従来型カセットで見られた非応答性の少なくとも一部において、発現カセット周辺のゲノム環境やエピジェネティックなクロマチン状態が不均一性に直接関与していたという仮説を強く支持するものである。したがって、がんドライバー遺伝子の精密な機能比較評価を達成するための薬剤誘導式発現系においては、プロモーターや転写因子の選定だけでなく、発現カセット全体の配列構成（周辺環境からの保護設計）もまた、誘導発現の安定性と均一性を左右する極めて重要な要素であることが明らかとなった。

### 3. 総括および今後の予定

がんドライバー遺伝子ライブラリ、薬剤誘導式Landing pad細胞株、ならびにDox応答性を大幅に改善した改良型発現カセットを整備した。これにより、本研究の目的である「変異単独の影響および複数変異間の相互作用を、位置効果によるノイズを排除して精緻に評価する」ための実験基盤が整った。

今後は、この均一かつ高精度な発現誘導プラットフォームを用いて各ドライバー遺伝子の発現を誘導し、細胞増殖能、生存・アポトーシス抵抗性、薬剤応答性、ならびに未分化性の維持や分化運命制御（分化指向性）への影響を中心に評価する予定である。さらに、必要に応じて足場非依存的増殖能や浸潤・遊走能など、細胞のがん化・悪性化に直結する表現型（フェノタイプ）についても多角的に検討する。

加えて、RT-qPCRやRNA-seq等によるハイスループットな遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析）を組み合わせることで、各ドライバー遺伝子変異がどのような分子シグナル経路を介して細胞状態を変化・悪性化させるのかを分子レベルで明らかにする予定である。

これらの実験により、がんにおける各変異の動的な機能的意義を体系的に解き明かし、将来的には、ゲノム変異情報に基づくがんの病理理解の深化、および個々の症例に最適化された精密医療（プレジジョン・メディシン）の基盤構築に貢献することを目指す。

### 【参考文献】

1. Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, *Nat. Genet.* 45, 1113–1120 (2013).
2. Bailey, M. *et al.*, *Cell* 173, 371–385.e18 (2018).
3. Gossen, M. & Bujard, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 5547–5551 (1992)

# iPS 細胞ライブラリを用いた抗がん剤耐性評価系の構築

「次世代合成生物基盤」プロジェクト  
赤瀬 太地

## 1. はじめに

がん治療において大きな課題の一つは、抗がん剤耐性の獲得である。治療開始時には高い治療効果を示す薬剤であっても、治療の継続に伴い耐性を獲得したがん細胞が選択的に生存・増殖することで薬剤効が低下し、最終的には再発や転移につながるものが少なくない。このような薬剤耐性は、化学療法のみならず分子標的薬や免疫療法においても重要な課題となっており、がん治療成績を制限する主要因の一つとして認識されている。これらの耐性獲得には、がん細胞が保有する遺伝子変異とそれらに起因するシグナル伝達経路の変化が深く関与していることが知られている<sup>1</sup>。しかし、実際に個々の変異がどの程度薬剤耐性に寄与するのかについては、依然として十分な実験的検証が行われておらず、多くの変異についてはその機能的意義が未解明のままである。

近年、次世代シーケンサーの発展により、多数のがん患者についてゲノム変異情報が蓄積されてきた<sup>2</sup>。その結果、がん組織において、どの遺伝子にどのような変異が存在するかは網羅的に把握できるようになった一方で、それぞれの変異が細胞機能に与える影響や薬剤耐性との因果関係については十分に解明されていない。今後も継続的な蓄積が見込まれる膨大なゲノム変異情報を医学・創薬へ活用するためには、変異情報の収集だけでなく、その生物学的機能や薬剤応答への影響を体系的かつ高効率に評価できる実験基盤の整備が不可欠である。

我々はこれまでに、ドキシサイクリン誘導型発現システムを利用し、がん関連変異を同一の遺伝的背景を有するヒト iPS 細胞で比較評価できる実験プラットフォームを構築してきた。本プラットフォームでは、ドキシサイクリン誘導型発現システム（Tet-On システム、Clontech 社）を用いることで、細胞株の樹立過程では変異遺伝子を発現させず、ドキシサイクリン添加後にのみ目的の変異体を誘導発現させることができる。このため、細胞株樹立時に変異体発現に伴う選択圧を回避できることから、変異導入以外の要因による影響を最小限に抑え、同一の遺伝的背景を維持した状態で各変異体の機能を比較評価することが可能となる。これまでに 11 種類の原がん・がん抑制遺伝子において、合計 299 種類のがん関連遺伝子変異体を整備し、本プラットフォームを用いた機能解析基盤を構築している。

本年度は、ヒトがんで最も高頻度に変異が認められるがん抑制遺伝子 *TP53* をモデル遺伝子として、本プラットフォームを用いた *TP53* 変異体発現 iPS 細胞ライブラリを構築し、抗がん剤に対する薬剤感受性・耐性を網羅的

に評価した。以下に、2025 年度に実施した研究成果のうち公開可能な内容について報告する。

## 2. 実験と結果

### (1) *TP53* 変異体発現 iPS 細胞ライブラリの構築

前年度までに構築した 20 種類の *TP53* 変異体発現 iPS 細胞株に加え、比較対照として野生型 *TP53* 発現 iPS 細胞株および空ベクター導入 iPS 細胞株（mock）を用い、計 22 種類の iPS 細胞株を等量ずつ混合して *TP53* 変異体発現 iPS 細胞ライブラリを作製した（表 1）。

| #  | Gene        | Genomic position (hg38) | がんドライバー変異 | タンパク質上の変異 |
|----|-------------|-------------------------|-----------|-----------|
| 1  | <i>TP53</i> | chr17:7675088           | C>T       | R175H     |
| 2  | <i>TP53</i> | chr17:7674220           | C>T       | R248Q     |
| 3  | <i>TP53</i> | chr17:7673803           | G>A       | R273C     |
| 4  | <i>TP53</i> | chr17:7673802           | C>T       | R273H     |
| 5  | <i>TP53</i> | chr17:7674221           | G>A       | R248W     |
| 6  | <i>TP53</i> | chr17:7673776           | G>A       | R282W     |
| 7  | <i>TP53</i> | chr17:7674894           | G>A       | R213*     |
| 8  | <i>TP53</i> | chr17:7674872           | T>C       | Y220C     |
| 9  | <i>TP53</i> | chr17:7674945           | G>A       | R196*     |
| 10 | <i>TP53</i> | chr17:7674230           | C>T       | G245S     |
| 11 | <i>TP53</i> | chr17:7675076           | T>C       | H179R     |
| 12 | <i>TP53</i> | chr17:7670685           | G>A       | R342*     |
| 13 | <i>TP53</i> | chr17:7673704           | G>A       | R306*     |
| 14 | <i>TP53</i> | chr17:7674953           | T>C       | H193R     |
| 15 | <i>TP53</i> | chr17:7675143           | C>A       | V157F     |
| 16 | <i>TP53</i> | chr17:7675124           | T>C       | Y163C     |
| 17 | <i>TP53</i> | chr17:7674947           | A>G       | I195T     |
| 18 | <i>TP53</i> | chr17:7673802           | C>A       | R273L     |
| 19 | <i>TP53</i> | chr17:7674957           | G>A       | Q192*     |
| 20 | <i>TP53</i> | chr17:7674216           | C>A       | R249S     |

表 1 前年度までに構築した 20 種類の *TP53* 変異体リスト。米国国立がんセンター（NCI）が公開しているがん臓器における遺伝子変異のデータベース（Genomic Data Commons Data Portal）を解析し、*TP53* 遺伝子にて高頻度で報告されている上位 20 種類の変異を抽出した。

本ライブラリでは、ドキシサイクリンの添加により、それぞれの細胞が異なる *TP53* 変異体を誘導発現する。また、各細胞株には固有の DNA バーコードがあらかじめ導入されているため、混合培養後も各細胞株の存在比率を定量的に解析することができる（図 1）。この特徴を利用することで、22 種類の細胞株を単一の培養系で同時に評価できるため、個別培養で生じる実験条件のばらつきを抑制するとともに、時間・資源の両面でコストを大幅に削減できる。DNA バーコードを指標として薬剤処理前後における各細胞株の存在比率を定量的に比較することで、各 *TP53* 変異体の薬剤感受性および耐性を効率的かつ網羅的に解析することが可能となる（図 2）。



図1 ドキシサイクリン誘導型がん変異体発現システム。本システムでは、ドキシサイクリン誘導型プロモーターを用いることで、がん関連遺伝子変異体を誘導発現させることができる。各変異体には固有の DNA バーコードが1種類ずつ対応しており、黒色矢印で示したプライマーを用いて DNA バーコード領域を PCR 増幅することができる。

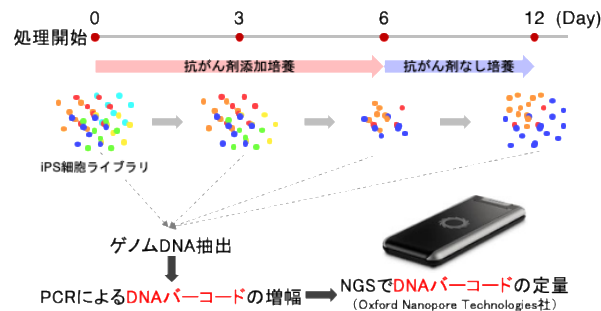


図2 iPS 細胞ライブラリを用いた細胞毒性タイムコース試験概略。あらかじめ混合して作製した *TP53* 変異体発現 iPS 細胞ライブラリに対して抗がん剤処理を行い、経時的に細胞を回収する。各時点で回収した細胞からゲノム DNA を抽出し、各細胞株に固有の DNA バーコードを PCR によって増幅する。得られた PCR 産物には、ライブラリを構成する各細胞株由来の DNA バーコードが混在しており、それぞれのバーコード量は対応する細胞数を反映する。そのため、PCR 産物を次世代シーケンサーで解析し、各 DNA バーコードのリード数を定量することで、ライブラリ中における各細胞株の存在比率を算出することができる。これにより、抗がん剤処理前後における各 *TP53* 変異体を有する細胞の増減を網羅的に評価することが可能となる。

## (2) 抗がん剤の有効濃度の検討

本評価系に適用する薬剤および処理条件を決定するため、臨床で使用されている抗がん剤および開発段階にあるシーズ化合物を含む計 13 種類の薬剤を選定した。これらは作用機序の異なる複数の薬剤群から選択した。ライブラリ解析では、薬剤が十分な選択圧として機能しつつ、一部の細胞が生存可能な処理条件を設定することが重要であることから、まず各薬剤について複数段階の希釈系列を用いた細胞毒性評価を実施し、有効濃度の探索を行った。

その結果、13 種類のうち 8 種類の薬剤において明確な細胞毒性が認められ、濃度依存的な細胞生存率の低下を確認した (図 3)。一方、残る 5 種類の薬剤については、本評価条件では顕著な細胞毒性は認められなかった。これらの結果を踏まえ、十分な選択圧が得られた 8 種類の薬剤について、本スクリーニング系に適用可能な処理条件を決定し、以降のライブラリ解析に用いた。

## (3) 抗がん剤 A を用いた細胞毒性タイムコース試験

*TP53* 遺伝子は、DNA 損傷応答の中心的な役割を担う代表的ながん抑制遺伝子であり、細胞周期停止、DNA 修

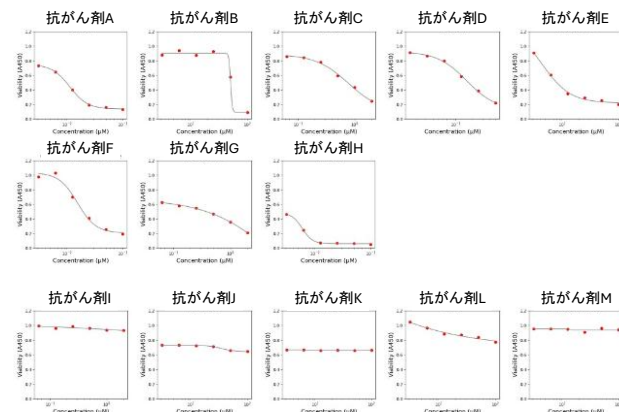


図3 抗がん剤の細胞毒性評価試験。*TP53* 変異体発現 iPS 細胞ライブラリを用いて、抗がん剤 A～M の細胞毒性を CCK-8 アッセイにより評価した。各薬剤について希釈系列を作製し、細胞生存率を測定することで、ライブラリ解析に適用する薬剤処理条件を検討した。その結果、抗がん剤 A～H では明確な細胞毒性が認められた一方、抗がん剤 I～M では本評価条件において顕著な細胞毒性は認められなかった。

復およびアポトーシス誘導などの多様な生物学的機能を制御している。そのため、*TP53* の変異は DNA 損傷を介して作用する抗がん剤に対する感受性や耐性に大きく影響することが知られている<sup>3</sup>。そこで、本研究では DNA 損傷を誘導し、標準治療薬として広く用いられている抗がん剤 A を用いて、*TP53* 変異体発現 iPS 細胞ライブラリの薬剤応答を経時的に解析する細胞毒性タイムコース試験を実施した。

本試験では、臨床における抗がん剤治療を模倣することを目的として、約 1 クールの治療スケジュールを参考に薬剤処理日数を設定した。*TP53* 変異体発現 iPS 細胞ライブラリに対して 6 日間連続で抗がん剤 A を曝露したところ、多数の細胞が薬剤作用によって死滅した一方、一部の細胞は薬剤存在下でも生存が認められた。薬剤処理期間中の細胞集団の変化を解析するため、薬剤処理開始 3 日後および 6 日後に細胞を回収した。さらに、6 日間の薬剤処理終了後は薬剤を含まない通常培地へ交換し、生存細胞を回復培養することで、後続の分子解析に十分な細胞数を確保した。

各時点で回収した細胞からゲノム DNA を抽出し、DNA バーコード領域を PCR によって増幅した後、次世代シーケンサーを用いて各 *TP53* 変異体由来 DNA バーコードの存在比率を定量した。その結果、抗がん剤処理中の各タイムポイントにおける *TP53* 変異体の存在比率を比較することが可能となった。

解析の結果、野生型 *TP53* 発現細胞および mock 細胞に加え、多くの *TP53* 変異体発現細胞では、薬剤処理の進行に伴って存在比率が大きく低下し、抗がん剤に対して高い感受性を示した (図 4)。一方で、特定の *TP53* 変異体 (変異 X、Y および Z) は薬剤処理後に存在比率が顕著に増加し、薬剤存在下において選択的に生存・増殖し



ていることが確認された。この結果は、これらの *TP53* 変異が抗がん剤 A に対する耐性の獲得に寄与している可能性を示唆するものである。

以上の結果から、本ライブラリ解析系は、単一の培養系において多数の *TP53* 変異体の薬剤応答を同時に評価し、薬剤処理過程における耐性変異の動態を経時的に捉えることができることを示した。さらに、*TP53* 変異の種類によって薬剤応答性が大きく異なることが明らかとなり、本プラットフォームが変異依存的な抗がん剤耐性を高効率に探索・評価できる有用な実験基盤であることが示された。

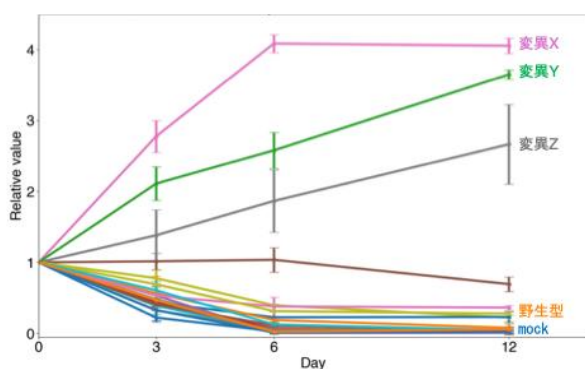


図4 *TP53* 変異体発現 iPS 細胞ライブラリを用いた抗がん剤 A の細胞毒性タイムコース試験結果。抗がん剤処理前に検出された各 DNA バーコード由来のリード数を 1 として正規化し、各時点における相対量を示した。22 種類の細胞株のうち、*TP53* 変異 X、変異 Y および変異 Z を発現する細胞で相対量の増加が認められ、これらの変異を有する細胞が抗がん剤 A 存在下で優先的に生存することが示唆された。

#### (4) 抗がん剤 A 耐性変異体候補の個別検証

細胞毒性タイムコース試験によって耐性変異体候補として同定された *TP53* 変異体について、それぞれ個別に樹立した細胞株を用いて抗がん剤耐性試験を実施した。その結果、ライブラリ解析で耐性候補として抽出された変異体のうち、変異 Z を除く、変異 X と Y で個別培養系においても抗がん剤 A 耐性を示し、スクリーニング結果を再現することができた (図 5)。以上の結果から、ライブラリ解析によって抽出された耐性候補変異を個別の実験系でも再現できることが確認され、本プラットフォームが変異依存的な薬剤耐性を高効率に評価する実験系として有用であることが示された。

### 3. 考察及び今後の展望

本研究では、*TP53* 変異体発現 iPS 細胞ライブラリを用いることで、薬剤処理に伴う各変異体の存在比率を経時的に解析し、抗がん剤耐性候補変異を効率的に抽出することができた。従来のように変異体ごとに個別評価を行うことなく、多数の変異体を同一遺伝的背景下、かつ同一条件下で網羅的に比較できることから、本評価系は変異依存的な薬剤応答を解析するための有用なスクリーニ

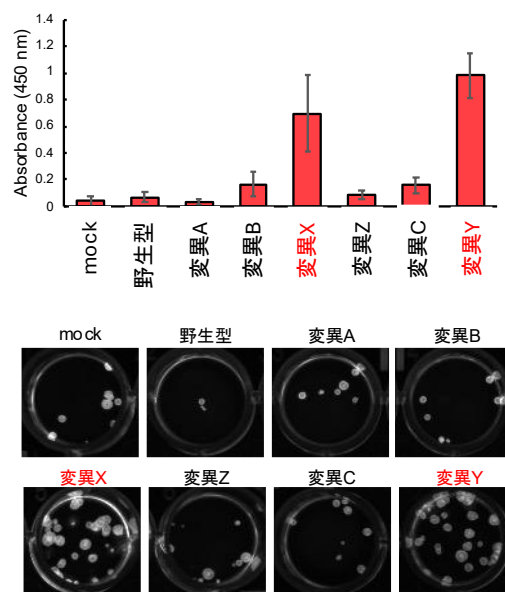


図5 *TP53* 変異体発現 iPS 細胞株を用いた抗がん剤 A に対する耐性評価。混合前の各細胞株に対して抗がん剤 A を処理し、生存率を CCK-8 アッセイ (上) およびコロニー形成アッセイ (下) により評価した。ライブラリ解析で候補として抽出された変異 X および変異 Y では、いずれの評価系においても対照細胞 (mock と野生型) と比較して高い生存率を示し、抗がん剤耐性が確認された。一方、変異 Z では明確な耐性は認められず、ライブラリ解析の結果を個別評価では再現できなかった。

ング手法であるといえる。

一方、ライブラリ解析で耐性候補として抽出された *TP53* 変異体のうち、一部は個別培養系でも同様の耐性傾向を示したものの、全ての候補変異が再現されたわけではなかった。このことから、本評価系は耐性候補変異を効率的に抽出する一次スクリーニングとして有用である一方、候補変異の機能をより正確に評価するためには個別検証を組み合わせることが重要であると考えられる。今後は、ライブラリの設計や薬剤処理条件、データ解析手法のさらなる改良を進めることで、本プラットフォームの感度および再現性の向上を図りたい。

現在、抗がん剤処理後に生存した細胞を単離し、遺伝子発現解析や分子生物学的解析を通じて、各 *TP53* 変異がどのような分子機構を介して薬剤耐性を獲得するのかを詳細に解析している。耐性獲得に関与するシグナル伝達経路や転写制御機構を明らかにすることで、新たな治療標的の同定につながることを期待される。

さらに、本評価系を他の DNA 損傷誘導型抗がん剤や分子標的薬へ展開するとともに、*TP53* 遺伝子以外の主要ながん関連遺伝子についても同様の変異ライブラリを構築し、薬剤応答との関連を体系的に評価する予定である。これにより、多数のがん関連変異について薬剤感受性を包括的に評価できる基盤を構築したいと考えている。

最終的には、本グループで構築してきた変異体細胞ラ

イブラリおよび薬剤評価プラットフォームを発展させることで、多様ながん関連遺伝子変異の機能を網羅的かつ高効率に解析できる基盤技術を確立するとともに、ゲノム医療や個別化医療における変異機能評価への応用を目指す。さらに、蓄積されるゲノム変異情報の機能的解釈を加速し、創薬研究や新規治療法の開発に貢献することが期待される。

#### 【参考文献】

- 1.Holohan *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 13, 714-726 (2013)
- 2.The Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, *Nat. Genet.*, 45, 1113-1120 (2013)
- 3.Peuget *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 24, 192-215 (2024)

# 業績

## 【原著論文】

(投稿掲載)

1. Shinya Kaneko, Hiromi Fukushima, Misako Nakahama, Kenji Tsuge, Jun Ishii, Yasunori Aizawa, Mitsuhiro Itaya, Akihiko Kondo “Versatile methodology for efficient large-sized DNA delivery between microorganisms without in vitro purification.” *Journal of Molecular Biology*, 437(17):169289 (2025) [IF: 4.5]

## 【総説】

1. 橋本陽太、山崎翔太、金子真也、相澤康則 「ヒト uORF 由来タンパク質の細胞内安定性を決定する要因の探究」 生物工学会誌、2026 年 2 月 25 日掲載予定

## 【書籍】

1. 相澤康則「ゲノム構築による真核生物システムの理解とその応用」合成生物学ハンドブック（1 編 2 章）2025 年 12 月 1 日投稿予定

## 【口頭発表】

1. 相澤康則（招待講演）「Mega-engineering of human X chromosome」ニューヨーク大学システム遺伝学研究所内セミナー、2025 年 4 月 14 日、ニューヨーク大学
2. Shota Yamazaki, Yuta Matsuura, Yuriko Hori, Kazuki Yamamoto, Yasunori Aizawa（ポスター）「Systematic evaluation of genomic regions essential for cell proliferation under autotrophic or heterotrophic conditions in *Cupriavidus necator* H16」 Metabolic Engineering 16、2025 年 6 月 7 日、Tivoli Hotel and Congress Center (Copenhagen, Denmark)
3. 相澤康則（招待講演）「ゲノム構築への道」大学特別講義、2025 年 7 月 10 日、八王子高校
4. 金子真也、相澤康則（一般講演）「枯草菌を用いた Gap Repair Cloning 法の改良」2025 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2025 年 8 月 28 日、KKR 熱海ホテル
5. 相澤康則（招待講演）「ゲノムを書き換えて非コード領域の意味を知る」第 7 回転移因子研究会、2025 年 9 月 1 日、遺伝学研究所
6. 相澤康則（招待講演）「東京科学大学/GteX ゲノム構築拠点での研究活動」第 42 回日本植物バイオテクノロジー学会、2025 年 9 月 7 日、神戸大学
7. 赤瀬太地、倉澤光、山根里歩、川上恵利、橋本陽太、松浦優太、遠藤成将、堀川あゆみ、山崎翔太、金子真也、大野知幸、相澤康則（一般講演）「20Mb 領域の

- ミニマム化によるヒトゲノム配列機能性の理解へ」日本遺伝学会第 97 回大会、2025 年 9 月 10 日、神戸大学
8. 橋本陽太、赤瀬太地、相澤康則（一般講演）「ヒト上流 ORF にコードされるタンパク質の細胞内安定性を決定する要因の探索」日本遺伝学会第 97 回大会、2025 年 9 月 11 日、神戸大学
  9. 金子真也、相澤康則（一般講演）「枯草菌での Gap Repair Cloning 法の改良」日本遺伝学会第 97 回大会、2025 年 9 月 10 日、神戸大学
  10. 金子真也、相澤康則（一般講演）「枯草菌を用いた DNA 構築と他の宿主への導入法」第 4 回総合微生物学研究会、2025 年 9 月 16 日、ラフォーレクラブ修善寺
  11. 相澤康則（招待講演）「ゲノムを作る、ということ。」第 63 回 工大祭 2025（公開講義）、2025 年 11 月 2 日、東京科学大学大岡山キャンパス
  12. 相澤康則（招待講演）「ヒトゲノム・ライティング：高度なヒト iPS 細胞を用いた動物実験代替モデルを実現する基盤技術」日本動物実験代替法学会第 33 回大会、2025 年 11 月 3 日、パシフィコ横浜ノース
  13. 相澤康則（招待講演）「革新的基盤技術：ゲノム構築で iPS 細胞を自由に改変し社会実装へ導く！」RINK FESTIVAL 2026、2026 年 2 月 6 日、TIAT SKY HALL (Haneda Airport Terminal 3)
  14. 倉澤光、赤瀬太地、山崎翔太、遠藤成将、山根里歩、鈴木貴久、松浦優太、金子真也、相澤康則（ポスター）「ゲノム構築拠点形成の現状と計画」GteX バイオものづくり領域第 4 回領域全体会議、2026 年 3 月 3 日、神戸大学統合研究拠点コンベンションホール
  15. 金子真也、鈴木貴久、松浦優太、山本和輝、遠藤成将、相澤康則（ポスター）「枯草菌を用いた長鎖 DNA 構築法」GteX バイオものづくり領域第 4 回領域全体会議、2026 年 3 月 3 日、神戸大学統合研究拠点コンベンションホール
  16. 金子真也、鈴木貴久、松浦優太、山本和輝、遠藤成将、田中寛、相澤康則（ポスター）「藻類の人工核染色体の開発」GteX バイオものづくり領域第 4 回領域全体会議、2026 年 3 月 3 日、神戸大学統合研究拠点コンベンションホール
  17. 相澤康則（一般講演）「Engineering Hypoimmunogenic and Functionally Enhanced iPSC-Derived  $\beta$  Cells Using a High-Precision Genome Writing Platform: Geno-Writing™」Keystone Symposia on Molecular and Molecular Biology (Islet Biology and Diabetes)、2026 年 3 月 17 日、Beaver Run Conference Center (米国コロラド)
  18. 黒田拓也、松山さと子、草川森士、倉澤光、赤瀬太地、相澤康則、佐藤陽治、安田智（ポスター）「hiPS 細

胞の形質変化を指標にした遺伝的不安定性評価法の開発」第 25 回日本再生医療学会総会、2026 年 3 月 18 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場

- 19.相澤康則（招待講演）「ヒトゲノム大規模改変技術からの創薬への挑戦」日本薬学会第 146 年会、2026 年 3 月 27 日、関西大学千里山キャンパス