

PRESS RELEASE

2026 年 9 月 17 日

理化学研究所
産業技術総合研究所
九州大学

細胞治療をより安全にする仕組み

ー新たな「細胞停止スイッチ」で二重の安全装置を目指すー

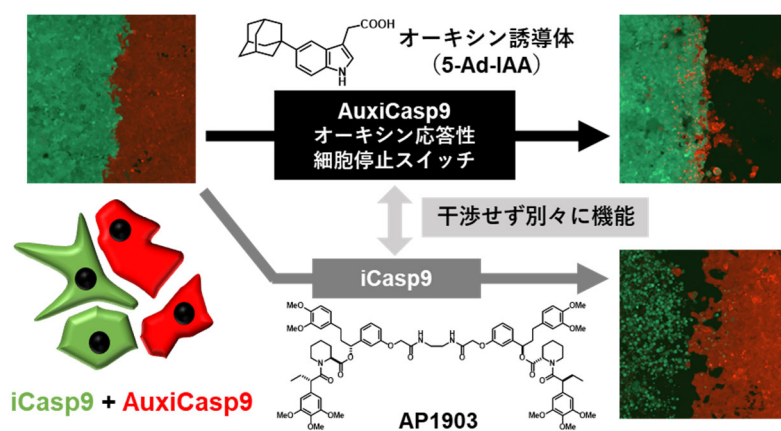
概要

理化学研究所（理研）環境資源科学研究センター触媒・融合研究グループの閼 闔（どど）孝介専任研究員、吉本哲特別研究員、産業技術総合研究所バイオものづくり研究センター植物機能制御研究チームの菅野茂夫研究チーム付、九州大学大学院工学研究院機械工学部門の山西陽子教授、佐久間臣耶准教授の共同研究グループは、疾患治療のために遺伝子を改変した細胞（改変細胞）にプログラム細胞死^[1]のアポトーシス^[2]を誘導することで改変細胞の働きを停止させるスイッチとして働くタンパク質「AuxiCasp9」を開発しました。

本研究成果は、近年臨床応用が進む細胞治療において、副作用が起きたときに、複数の停止スイッチを併用して改変細胞を停止させる、より安全なシステムの開発に貢献すると期待されます。

今回、共同研究グループは、植物ホルモンの一つオーキシシン（Auxin）^[3]の誘導体进行处理することでアポトーシスの実行因子カスパーゼ（Caspase）^[4]9 を人工的に活性化させ、アポトーシスを誘導するスイッチ AuxiCasp9 の開発に成功しました。さらに既に臨床試験が検討されている停止スイッチである iCasp9（inducible Caspase 9）とも比較を行い、二つの停止スイッチがお互いに干渉せず別々に機能することを明らかにしました。

本研究は、科学雑誌『ACS Synthetic Biology』オンライン版（9 月 8 日付）に掲載されました。



新たな停止スイッチ AuxiCasp9 と既存スイッチ iCasp9 の比較

背景

近年、患者から採取した細胞を改変して、疾患治療に用いる医療が急速に発展しています。中でもがん細胞を特異的に認識できる人工受容体を発現させた免疫細胞のT細胞（CAR-T細胞）にがんを攻撃させる治療は、広く用いられる治療法となっており、特に血液がんの有効です。

このような治療においては、改変細胞による副作用が体内で現れた場合に備え、細胞の働きを止めて改変細胞を除去する仕組みが安全装置として期待されます。中でもiCasp9（inducible caspase 9）は臨床試験にも展開されている人工システムであり^{注1）}、導入した改変細胞に薬物処理でプログラム細胞死の代表例であるアポトーシスを誘導し、生体に悪影響を及ぼさずに除去することができます。iCasp9はFK506結合タンパク質（FKBP）とカスパーゼ9が融合したもので、FKBPに結合する化合物を二つつないだAP1903という薬剤でカスパーゼ9同士を近づけて、相互作用させることで活性化させ、アポトーシスを誘導する仕組みが知られています（図1A）。

同様の仕組みを利用して、「ラパマイシン（Rapamycin）」という薬剤で2量体化されるタンパク質FKBPおよびFRBとカスパーゼ9を融合させたRapaCasp9（Rapamycin-activated Caspase 9）もiCasp9に続く細胞死誘導システムとして開発されています（図1B）^{注2）}。しかしながら、ラパマイシンは本来免疫抑制剤として使われる薬剤であり、その薬理作用が副作用の原因となることが問題となっていました。

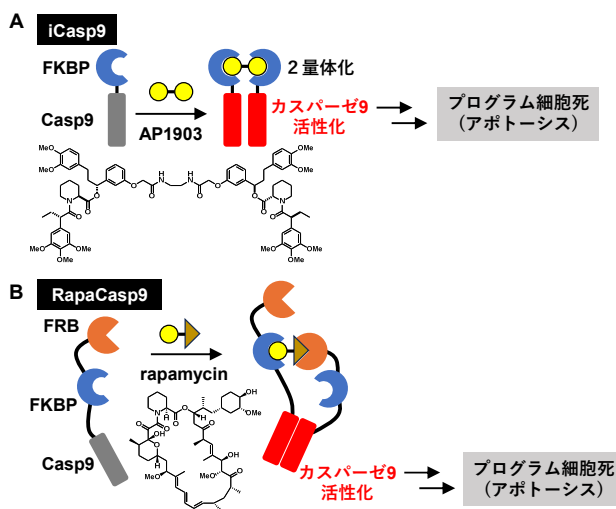


図1 既存の細胞停止スイッチの活性化機構

- A. iCasp9による細胞死誘導。iCasp9はFK506結合タンパク質（FKBP）とカスパーゼ9から成る。薬剤AP1903は二つのiCasp9のFKBPに同時に結合することで、カスパーゼ9同士の2量体化・活性化を誘導し、これがアポトーシスにつながる。
- B. RapaCasp9による細胞死誘導。RapaCasp9はタンパク質FKBPおよびFRBとカスパーゼ9から成る。ラパマイシン（Rapamycin）はFRBおよびFKBPの間に結合することでRapaCasp9同士を近づけてカスパーゼ9の2量体化と活性化を誘導し、アポトーシスにつながる。

注 1) A. Di Stasi, S.-K. Tey, G. Dotti, Y. Fujita, A. Kennedy-Nasser, C. Martinez, K. Straathof, E. Liu, A. G. Durett, B. Grilley, H. Liu, C. R. Cruz, B. Savoldo, A. P. Gee, J. Schindler, R. A. Krance, H. E. Heslop, D. M. Spencer, C. M. Rooney, M. K. Brenner, Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 365, 1673–83.
注 2) M. Stavrou, B. Philip, C. Traynor-White, C. G. Davis, S. Onuoha, S. Cordoba, S. Thomas, M. Pule, “A Rapamycin-Activated Caspase 9-Based Suicide Gene.” *Mol. Ther.* **2018**, 26, 1266–1276.

研究手法と成果

共同研究グループは iCasp9、RapaCasp9 に続く新しい停止スイッチの開発を目指し、植物ホルモンであるオーキシシンに着目しました。オーキシシンは植物体内では二つのタンパク質 TIR1 と Aux/IAA の間に接着剤のように結合し、二つのタンパク質を近づけることで、ユビキチンリガーゼ複合体⁵⁾による Aux/IAA のユビキチン化⁶⁾を誘導し、最終的に Aux/IAA が分解されることが知られています(図 2A)。また、タンパク質分解を起こさず、タンパク質の 2 量体化を誘導することに特化して、TIR1 のユビキチンリガーゼ複合体との相互作用部位を改変したシステムの開発も報告されています(図 2B)^{注 3)}。さらに、オーキシシン誘導体 (5-Ad-IAA) とそれに合わせてオーキシシン結合部位に変異を導入した TIR1 を用いて、高い結合能を実現するシステムも開発されています^{注 4)}。

共同研究グループはこれらの報告を基に、カスパーゼ 9 に TIR1 変異体と Aux を融合させたタンパク質「AuxiCasp9 (auxin-activated caspase 9)」をデザインしました(図 2C)。このデザインでは、二つの AuxiCasp9 間で片方の Aux ともう片方の TIR1 が 5-Ad-IAA の結合により近接し、カスパーゼ 9 の 2 量体化と活性化が誘導できるように設計しています。

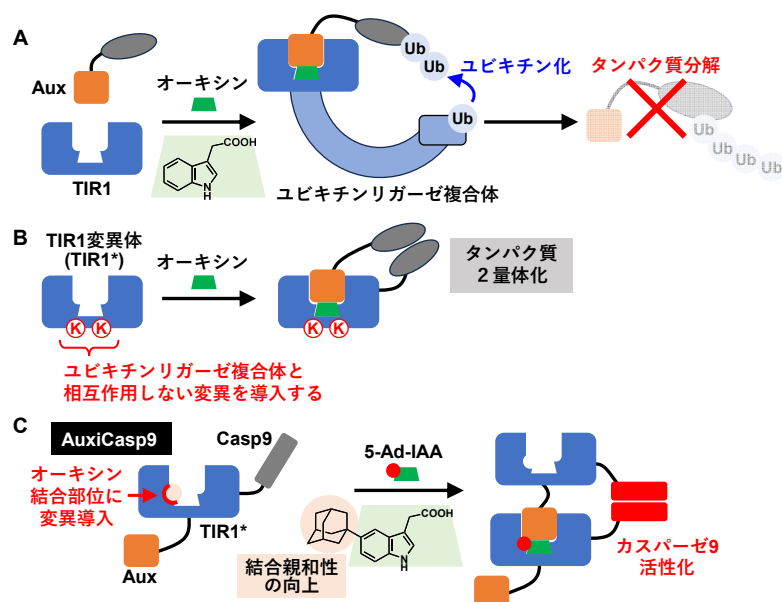


図 2 AuxiCasp9 のデザイン

- オーキシシンによる Aux タンパク質の分解誘導機構。
- ユビキチンリガーゼと相互作用する二つのグルタミン酸 (E) をリシン (K) に変異させることで (E → K)、タンパク質の 2 量体化誘導に特化したシステムが構築できる。
- Aux、TIR1 変異体およびカスパーゼ 9 を融合させた AuxiCasp9 をデザインした。B の TIR1 変異体のオーキシシン結合部位に変異導入し、オーキシシン誘導体 (5-Ad-IAA) が選択的に結合するようにした。

デザインした AuxiCasp9 をヒト培養細胞 HEK293T に発現させ、iCasp9 および RapaCasp9 とその細胞死誘導活性を比較しました (図 3)。その結果、iCasp9 は 0.01 ナノモラー (nM、1nM は 1L 中に 10 億分の 1 モル) という極めて低濃度の薬剤 AP1903 で 80%以上の細胞死誘導活性を示し (図 3 右、緑実線)、さらに薬剤 AP1903 は iCasp9 を発現しないコントロール細胞では全く細胞死を誘導せず、毒性も低いことが確認できました (図 3 右、緑点線)。一方で RapaCasp9 は、1nM のラパマイシン処理で 90%以上の細胞死誘導が見られたものの (図 3 右、青実線)、RapaCasp9 を発現しないコントロール細胞でも 40%の細胞死誘導を示し、ラパマイシン単独で細胞毒性を示すことが確認されました (図 3 右、青点線)。これに対して AuxiCasp9 は薬剤 AP1903 に比べて 1nM とやや高い濃度の 5-Ad-IAA が必要ではあるものの、80%近い細胞死誘導活性を示すことが明らかとなりました (図 3 右、赤実線)。さらに用いた 5-Ad-IAA はラパマイシンのような細胞毒性を示さないことも分かりました (図 3 右、赤点線)。このことは、AuxiCasp9 が iCasp9 に次いで有望な停止スイッチとして機能する可能性を示唆しています。

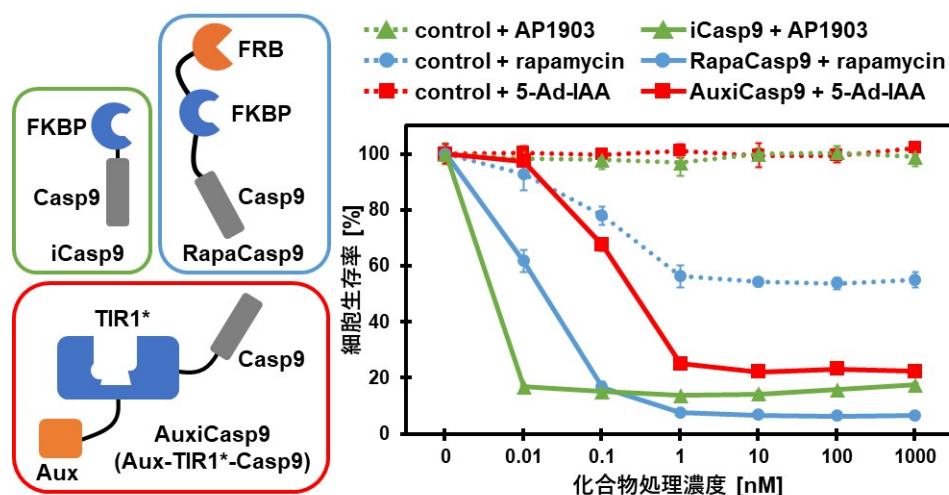


図 3 iCasp9/RapaCasp9/AuxiCasp9 によるアポトーシス誘導活性の比較

HEK293T 細胞に iCasp9、RapaCasp9、AuxiCasp9 をそれぞれ発現させた細胞を作製し、それぞれに対応する化合物で細胞死を誘導し、細胞生存率を測定した (実線)。その際、何も発現させないコントロール細胞に化合物を処理したときの細胞生存率を見ることで化合物単独の毒性も評価した (点線)。

最後に、共同研究グループは iCasp9 と AuxiCasp9 が併用可能かどうかを調べるために、2 種類の停止スイッチを同時に機能させ、お互いに干渉しないかどうかを確認しました。まず iCasp9 と EGFP (緑色蛍光タンパク質)、および AuxiCasp9 と mCherry (赤色蛍光タンパク質) の組み合わせで、停止スイッチとマーカーの蛍光タンパク質を共発現 (同一細胞内で発現) させた HEK293 細胞を作製しました。さらにこれら 2 種類の細胞を共培養 (同一シャーレ内で培養) し、薬剤 AP1903 または 5-Ad-IAA を処理した後に、蛍光イメージングにより 2 種類の細胞それぞれに細胞死が誘導されるかどうかを検証しました (図 4A)。

その結果、薬剤 AP1903 処理では iCasp9 を発現する緑色の細胞だけに細胞死が誘導される一方で、5-Ad-IAA では AuxiCasp9 が発現する赤色の細胞だけに細胞死が誘導されました（図 4B）。このことは二つのスイッチはお互いに干渉せず、独立に機能できることを示しています。

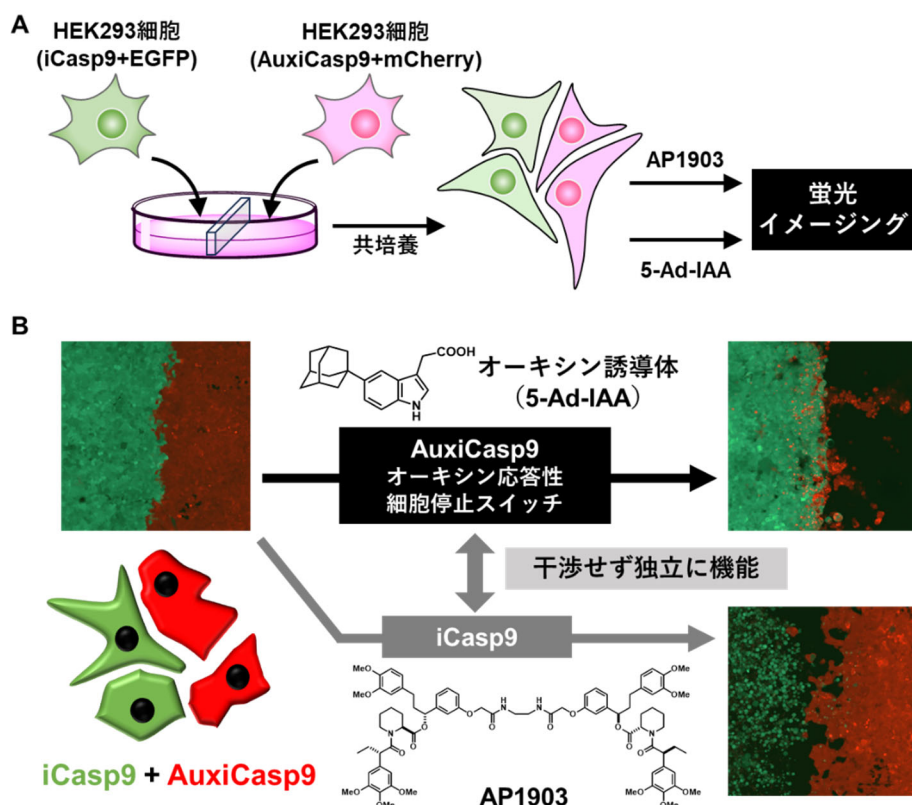


図 4 AuxiCasp9 と iCasp9 の独立性確認

- A. iCasp9 と蛍光マーカーEGFP、AuxiCasp9 と蛍光マーカーmCherry の組み合わせで、共発現させた HEK293 細胞を作製。これら 2 種類の細胞を共培養し、AP1903 または 5-Ad-IAA を処理した後に、蛍光イメージングにより 2 種類の細胞に細胞死が誘導されるかどうかを検証した。
- B. AP1903 処理では iCasp9 を発現する緑色の細胞だけに細胞死が誘導された（右下部：緑色が減り、細胞が存在しない黒色部分が多くなっている）。5-Ad-IAA では AuxiCasp9 が発現する赤色の細胞だけに細胞死が誘導された（右上部：赤色部分がほとんど黒色になっている）。

注 3) W. Zhao, H. Nguyen, G. Zeng, D. Gao, H. Yan, F.-S. Liang, "A chemically induced proximity system engineered from the plant auxin signaling pathway." *Chem. Sci.* **2018**, 9, 5822–5827.

注 4) K. Nishimura, R. Yamada, S. Hagihara, R. Iwasaki, N. Uchida, T. Kamura, K. Takahashi, K. U. Torii, T. Fukagawa, "A super-sensitive auxin-inducible degron system with an engineered auxin-TIR1 pair." *Nucleic Acids Res.* **2020**, 48, e108.

今後の期待

本研究では新たな細胞停止スイッチとして AuxiCasp9 を開発し、既存の停止スイッチである iCasp9 および RapaCasp9 と比較することで、停止スイッチとして十分機能することを確認しました。AuxiCasp9 は動物とは異なる植物由来のシステムを利用していることから、動物のシステムと干渉しにくいと考えら

れ、今後、改変細胞の安全装置の一つとして広く応用されることが期待されます。

さらに iCasp9 との併用実験により、二つの停止スイッチが互い干渉せず、独立して機能することも示しました。独立して働く停止スイッチを二つ同時に改変細胞へ導入することで、一方が十分に機能しない場合でも、もう一方がバックアップとして働き、二重の安全装置として機能すると考えられます。従って近年急速に発展する細胞治療において、より安全な治療法の確立に貢献することが期待されます。

論文情報

<タイトル>

Auxin-activated caspase 9 system (AuxiCasp9), a suicide switch for engineered cells

<著者名>

Satoshi Yoshimoto, Shigeo S. Sugano, Shinya Sakuma, Yoko Yamanishi, Kosuke Dodo

<雑誌>

ACS Synthetic Biology

<DOI>

[10.1021/acssynbio.6c00010](https://doi.org/10.1021/acssynbio.6c00010)

補足説明

[1] プログラム細胞死

細胞が自らのプログラムに従って秩序立って死ぬ現象。不要になった細胞や異常な細胞を除去する仕組みとして、発生や組織の維持に重要な役割を果たす。

[2] アポトーシス

プログラム細胞死の代表例であり、がん細胞など体内で不必要な細胞を除去するために誘導される。死んだ細胞は小さく断片化し、周りの細胞によって安全に除去される。

[3] オーキシン (Auxin)

植物の伸長を促す植物ホルモンとして同定された化合物。

[4] カスパーゼ (Caspase)

アポトーシスの実行にはカスパーゼと呼ばれる一連のプロテアーゼファミリーの活性化が重要であり、中でもカスパーゼ 9 は多量体化することで活性化することが知られている。カスパーゼ 9 はさらに下流のカスパーゼ 3 を切断・活性化することで、アポトーシスを誘導する。

[5] ユビキチンリガーゼ複合体、ユビキチン化

ユビキチンリガーゼ複合体は、タンパク質に「ユビキチン」という小さなタンパク質を付加する「ユビキチン化」という反応を担っている。このユビキチンは、細胞内で不要になったタンパク質に付けられる目印として働き、主にタンパク質分解を促す。

研究支援

本研究は、科学技術振興機構（JST）ムーンショット目標 1「2050 年までに、人が身体、脳、空間、時間の制約から解放された社会を実現（プログラムディレクター：萩田紀博）」の研究開発プロジェクト「細胞内サイバネティック・アバターの遠隔制御によって見守られる社会の実現（プロジェクトマネージャー：山西陽子）」による助成を受けて行われました。

発表者・機関窓口

＜発表者＞ ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所 環境資源科学研究センター 触媒・融合研究グループ

専任研究員	瀧川孝介（ドド・コウスケ）
特別研究員	吉本 哲（ヨシモト・サトシ）

産業技術総合研究所 バイオものづくり研究センター 植物機能制御研究チーム
研究チーム付 菅野茂夫（スガノ・シゲオ）

九州大学 大学院工学研究院 機械工学部門
教授 山西陽子（ヤマニシ・ヨウコ）
准教授 佐久間臣耶（サクマ・シンヤ）

＜機関窓口＞

理化学研究所 広報部 報道担当

Tel: 050-3495-0247

Email: ex-press@ml.riken.jp

産業技術総合研究所 ブランディング・広報部 報道室

Email: hodo-ml@aist.go.jp

九州大学 広報課

Tel: 092-802-2130

Email: koho@jimu.kyushu-u.ac.jp