

海洋生物由来新規心筋再生物質の探索

1. はじめに

受賞者等は ES 細胞を用いて心血管分化再生研究を行ってきた。すなわち ES 細胞から誘導した Flk1 陽性の中胚葉細胞を共通の前駆細胞として血管及び心筋を経時的系統的に分化誘導する新しい分化系を開発した(Nature, 2000; FASEB J, 2005)。最近受賞者らは、ES 細胞由来心筋前駆細胞および心筋細胞の誘導効率を約 10 倍促進する新しい心筋分化誘導物質 (X) を見出した。化学物質(X)は中胚葉から直近の心筋前駆細胞に作用する新しい心筋分化後期作用型物質であると考えられる。このように本分化システムにより、世界で初めて心筋の分化ステージ特異的に投与物質の作用を検討することが可能となった。

受賞者はすでに東京大学農学研究科中尾洋一氏(現・早稲田大学)との共同研究により、未開拓の低分子化合物の宝庫である海産無脊椎動物等を素材とした血管新生制御物質の探索を行い、血管新生を抑制するマトリックスメタロプロテアーゼ(J Am Chem Soc, 2003)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の同定 (Angew Chem Int Ed, 2006; 同誌表紙)に成功している。本研究は、受賞者のES細胞分化系を用いて新しい心筋再生誘導物質を同定し、心筋再生治療薬として活用することを目的とし、心筋再生作用を有する低分子化合物を海洋生物由来ライブラリーを用いて探索する。創薬による新しいモードの再生医療の開拓を目指す。

2. 方法

1) ES細胞を用いた心筋分化評価システムの構築

- i) 細胞は α MHC promoter-GFP発現マウスES細胞株(EMG7; FASEB J, 2005)を用い、心筋に分化した細胞をGFPの蛍光により定量的に評価する。
- ii) 誘導したFlk1陽性細胞をFACSにより純化しOP9ストローマ細胞上で共培養する。
- iii) 低分子化合物を細胞に投与する。(培養3日目に1回の培地交換を必要とする。)
- iv) 培養6日目にGFPまたは心筋トロポニン発現量を蛍光強度により定量化する。

以上により、心筋分化誘導能を効率的かつ定量的に評価する。

2) ヒットサンプルから活性化合物の同定

スクリーニングには、中尾らが調製した海洋無脊椎動物由来抽出物ライブラリー(約 2000 サンプル)を用いる。海洋生物と同時に海底の沈殿物を採集し、これらから培養可能な海洋性微生物を単離して、スクリーニングサンプルライブラリーとする。これらの生物からスクリーニングサンプルを調整し、1次スクリーニングにかける。ヒットしたサンプルについて活性成分の精製とマススペクトル解析による化学構造の決定を行う。

3) 心筋分化誘導作用の分化ステージ特異性の検討

上記1次スクリーニングにおいて5倍以上の心筋分化誘導効果を認めた物質(1次候補物質)に関して、同物質の作用点を検討する。

1. 中胚葉→心筋前駆細胞：Flk1陽性細胞をOP9上で培養後2日目において細胞を回収し、FACS解析を行う。心筋前駆細胞分画の誘導効率を定量的に評価する。
2. 心筋前駆細胞→心筋細胞：心筋前駆細胞をFACSにて純化・OP9細胞上で再培養し、GFPもしくは心筋トロポニン染色の染色強度により心筋分化効率を定量化する。
心筋分化の最終過程である2.の心筋前駆細胞特異的作用物質を優先的に検討する(2次候補物質)。

4) 2次候補物質の動物モデルにおける検討

1. マウス心筋梗塞モデルを作製し、2次候補物質の梗塞心への注入または腹腔内投与を行い、梗塞巣の縮小効果を検討する。(縮小効果を有するものを3次候補物質とする。)

これらの検討により、心筋再生能を有する新規低分子化合物を網羅的に同定する。

3. 結果・研究成果

1) ES細胞を用いた心筋分化評価システムの構築

受賞者等は、 α MHC promoter-GFP発現マウスES細胞株(EMG7; FASEB J, 2005)を用いてOP9ストローマ細胞上において心筋細胞を誘導し、心筋分化誘導能を定量的に評価することに成功した。

2) ヒットサンプルから活性化化合物の同定

海洋生物由来低分子化合物ライブラリーのスクリーニングの前段階として、いくつかの既存の化合物に関して、心筋分化誘導能の解析を行ったところ、免疫抑制剤のサイクロスポリン A (CSA) が強力な心筋細胞誘導効果を有することが明らかとなった。ES細胞から誘導・純化した Flk1 陽性細胞を OP9 細胞上で再培養する際に、CSA を添加すると誘導心筋細胞量が対照の約 10-20 倍に増加した。

3) 心筋分化誘導作用の分化ステージ特異性の検討

2) にて明らかにした CSA の効果の分化ステージ特異性を検討した。未分化 ES 細胞からの分化誘導開始時に添加した場合には、中胚葉誘導及び心筋細胞誘導に影響を与えなかった。純化した Flk1 陽性細胞に添加した場合には、心筋細胞の著しい増加とともに、心筋前駆細胞分画 (FCV 細胞; Yamashita, FASEB J, 2005) が特異的に増加した (約 20 倍)。純化した FCV 細胞に添加した場合には弱い心筋分化促進作用が認められた (約 2-3 倍)。以上の結果より、CSA は中胚葉段階の細胞に特異的に作用し、心筋前駆細胞の分化を促進する作用があると考えられた。

4) 2次候補物質の動物モデルにおける検討

3) までの成果により、著しく効率的に誘導することが可能となったFCV心筋前駆細胞を純化し、ラット慢性心筋梗塞モデルへの移植実験を行った。移植されたFCV細胞は、心筋細胞として梗塞巣内に生着・分化した。心筋前駆細胞移植の有用性が示唆された。

以上の結果に関し、論文報告した(Yan, Biochem Biophys Res Commun, in press)。

4. 考察・まとめ

受賞者らが開発したES細胞心筋分化誘導システムを用いて、新規物質の心筋分化誘導作用とそ

の機構を解析することが可能となった。同システムにより、新しいCSAの作用を見出し、高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞誘導法の開発に成功した。同システムを新たな低分子化合物のスクリーニングに用いることにより、全く新しい作用の新規心筋再生物質の同定が期待される。受賞者等は、低分子化合物スクリーニングのためのハイスループットスクリーニング系を構築し、スクリーニングを開始している。

5. 発表論文

1. Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, in press
2. Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. **Circulation**, 118: 498-506, 2008
3. Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, Maeda S, Yoshida M, Maejima H, Yamashita JK. Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. **Bioorg Med Chem Lett**, 18: 2982-2984, 2008
4. Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Nakao K. Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. **PLoS One**, 3: e1666, 2008.
5. Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita JK, Nishi E, Tsukita S, Furuse M. Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. **Exp Cell Res**, 314:939-49, 2008.
6. Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor {beta}. **J Appl Physiol**, 104: 766-772, 2008
7. Yamashita JK. A linkage in the developmental pathway of vascular and hematopoietic cells. In Tanaka K, Davie EW. **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008**. Part 5, p363-p373. Springer, Tokyo, 2008
8. 山下 潤. 「iPS細胞を用いた血管再生」CLINICIAN「再生医療を考える」56: 61-74, 2008. エーザイ株式会社
9. 山下 潤. 「血管再生」総合臨床 58: 72-78, 2008. 永井書店
10. 山下 潤. 「ES細胞による血管の分化再生」遺伝子医学MOOK「進み続ける細胞移植治療の実際」下巻. 田畑泰彦編, 107p-111p, 2008. メディカルドゥ社