

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17129

研究課題名（和文）ヒト多能性幹細胞からの効率的な心筋細胞分化に向けた新規低分子化合物の開発

研究課題名（英文）Novel small molecule chemical compounds for promoting the differentiation efficiency of iPS-derived cardiomyocytes

研究代表者

岸野 喜一（Kishino, Yoshikazu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：20594568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：心筋分化誘導において分化初期のBMPシグナルの活性化が重要であり、同シグナルを活性化する低分子化合物候補の探索を行った。RNAiとルシフェラーゼアッセイにより選出した標的因子に結合可能な化合物の*in silico*探索を行い、最終的に結合親和性の高い150化合物を選出した。候補化合物をヒトiPS細胞の心筋分化誘導系に添加し、分化誘導促進効果をFACS、PCR、免疫染色を用いて定量的に評価した。結果、化合物の有効濃度が高い為、細胞毒性を認めてはいるが、低濃度において、心筋分化効率の改善を示唆する結果が確認された。より低濃度で有効性を認める化合物の二次探索を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BMPシグナルを活性化する実用性のある低分子化合物の同定は報告されておらず、独創性でありかつ有用性の高い研究であった。ヒト多能性幹細胞由来心筋を用いた再生医療では、その作成過程において必要な組み換え蛋白の置換によるコスト削減は再生医療の具現化において必要不可欠となっている。また再生医療以外でもBMPシグナル作動低分子化合物の利用価値は高く、骨折や骨形成不全に対して骨形成効果を持つ治療薬として有用である可能性、肺動脈性肺高血圧症などBMPシグナル低下に起因する難病疾患への治療適用の可能性がある。有効性が期待出来るリード化合物候補の探索に繋がるヒット化合物が同定された点で、当研究の意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In cardiac differentiation, activation of BMP signaling in the early stage is important. We searched for small molecule compound activating BMP signaling. To develop the screening system, we used luciferase assay including BMP-responsive element and RNA interference. Among many candidate regulators, we found that knockdown of target factor significantly enhanced luciferase activity. Next, to identify novel antagonists which have high binding-affinity for the candidate factor, we screened compounds by *in silico* protein structure analysis and narrowed down to 50 candidates among chemical compound data libraries. Next, to test the efficacy of candidate compounds, we confirmed that compounds promoted cardiac differentiation in human iPS cells. Finally, calculating the correlation function between the chemical structure and the enhancement of BMP signaling activity, we have planned to perform full-screening to identify high efficient lead compounds among massive compound data libraries.

研究分野：循環器、心不全、心筋再生

キーワード：再生医療 ヒトiPS細胞由来心筋細胞 BMPシグナル 心不全 低分子化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、内科的治療に抵抗性の重症心不全に対する最後の唯一の治療方法は心臓移植であるが、ドナー数不足や長期に渡る移植待機期間の点から、十分な治療選択肢となり得ていない。それに対して近年、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療が新たな治療選択肢として期待されており、実際滲出型加齢黄斑変性症に対してヒト iPS 細胞から作成した網膜色素上皮細胞の臨床応用化が行われており (Michiko Mandai et al : N Engl J Med 2017; 376:1038-1046)、心不全に対してもヒト iPS 細胞から分化した心筋細胞移植の臨床化応用が待ち望まれている。一方で、心不全症例に対する移植に必要なヒト iPS 細胞由来心筋細胞数は 1×10^9 個と大量であり、ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導に関して効率改善されているものの、細胞株間や継代数間での心筋分化効率の差異やコスト的に非常に高価な組み換え蛋白を添加する必要性などの点が未だ改善の余地がある。その為、再生医療への応用にあたって、分化に用いる試薬として動物由来の成分を可能な限り除去し、より安価で高効率な低分子化合物などで置換することが望ましいと考えられている。実際にヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導に関わる低分子化合物への置換の例として、Wnt シグナル阻害作用を持つ低分子化合物が既に報告されており、これにより心筋分化誘導効率の劇的な改善が報告されているが、分化初期に重要な BMP シグナルを活性化する化合物の報告は現時点で報告されていない。そこで申請者、分化初期における活性化が重要な BMP シグナル作動性の低分子化合物の開発に着目した。

また近年、低分子化合物ライブラリーから結合親和性の高い化合物のスクリーニングにおいて、結晶構造解析を事前に行うことによって数万～数十万の低分子化合物スクリーニングを数百のオーダーまでスケールダウンすることが可能となっている。そこで本研究の目的として、in silico 3次元構造解析を用いて化合物スクリーニングの効率化を図り、ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導に有効な BMP シグナル作動性の新規低分子化合物を同定するという着想に至った。

2. 研究の目的

近年ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞が移植細胞ソースや疾患解析ツールとして注目されているが、高効率の心筋分化誘導方法の確立は十分とはいえない。ヒト iPS 細胞から特定の胚葉、系統へと分化誘導するためには、特定の因子を特定の順序・時期・濃度で加える必要があり、再生医療への応用にあたって、分化に用いる試薬因子は動物由来の成分を可能な限り除去し、より安価で高効率な低分子化合物で置換することが望ましい。心筋分化誘導においては、分化初期の BMP シグナルの活性化が重要であり、同シグナルを活性化する低分子化合物は未だ存在しない為、当研究では低分子化合物のスクリーニングによりヒト多能性幹細胞からの心筋分化に有効な BMP シグナル作動化合物を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まずは(1)ヒト細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイにより、標的とする BMP シグナル寄与因子の一次スクリーニングを行った。次に(2)選出された候補因子の阻害部位の in silico 3次元構造解析を行うことにより、化合物ライブラリーから標的因子に結合可能な低分子化合物を効率的に探索した。そして最終的に(3)同定した低分子化合物をヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導系に用いて、心筋分化誘導の効率化を検証した(図 1)。

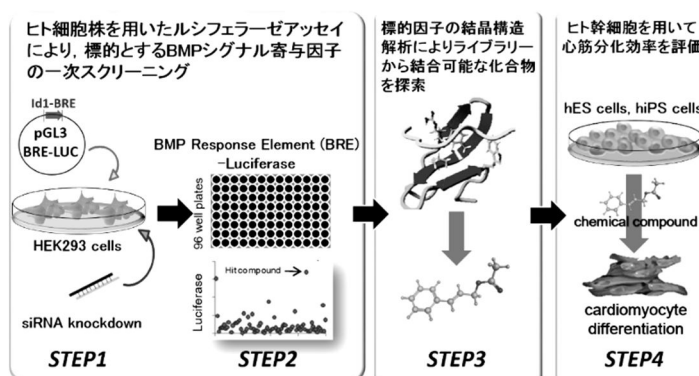


図 1. 本研究の概要

4. 研究成果

(1) ヒト細胞株を用いた BMP シグナル標的因子スクリーニング

BMP シグナル作動化合物のターゲット選出のため、ヒト胎児腎細胞株(HEK293)に BMP シグナル下流遺伝子の *Id-1* プロモーターを有する既知の BMP 反応性ルシフェラーゼベクターを導入し(Korchynskiy O et al: J Biol Chem 277: 4883-4891:2002)、ルシフェラーゼアッセイを用いた BMP シグナル活性の評価系を確立した。RNAi を用いて候補因子をノックダウンすることで BMP シグナル活性が上昇する標的因子をスクリーニングし、申請者はこれらの方法を用いて、既に文献的に選出した BMP シグナル抑制因子群の中から、ノックダウンによって有効な BMP シグナル活性上昇が得られる標的因子候補の一つとしてユビキチン関連遺伝子 *TRIM33* を同定した(図 2)。

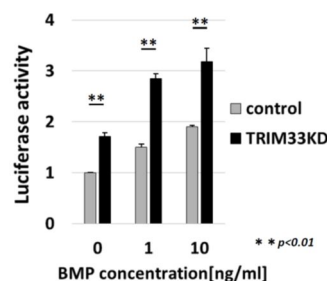


図 2. TRIM33KD によるルシフェラーゼ活性の上昇を認める。

(2) 標的因子の in silico 構造解析を用いた低分子化合物の選出

標的因子に結合可能な化合物の in silico 探索を行った。第一段階では、標的因子の構造に基づき pharmacophore (Ph4) を推定し(図 3)、838174 個の化合物データベースライブラリーから Ph4 が一致する分子を高速に探索した。第二段階では、選択した化合物群と標的因子のドッキングスコアを計算し、結合親和性の高い低分子化合物の効率的な選出を行った(J.Goto et al.: J. Chem. Inf. Model. 48: 583: 2008, C.R.Corbeil et al.: J. Comput.-Aided Mol. Des. 26: 775: 2012)。申請者は前述の方法を用いて、最終的に最も結合親和性の高かった 50 化合物を選出した(図 4)。

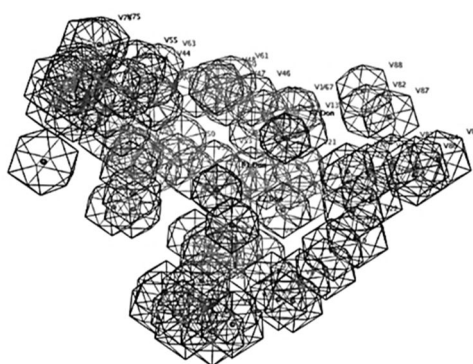


図 3. 標的ドメインからの Ph4 の予測の 1 例。

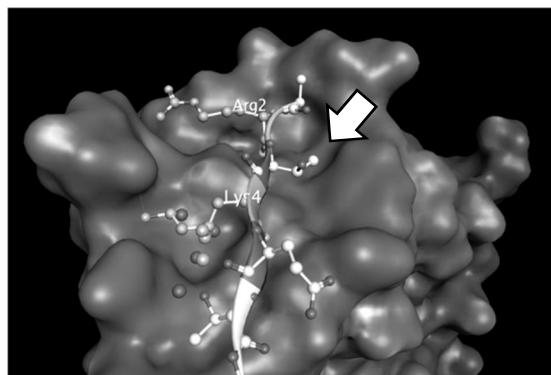


図 4. 標的ドメインの in silico 解析の 1 例。矢印の部分が阻害標的部位。

(3) ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導における低分子化合物の有効性評価

選出した低分子化合物をヒト iPS 細胞の心筋分化誘導系に実際に添加し、その分化誘導促進効果を FACS、PCR、免疫染色を用いて定量的に評価を行った。結果、化合物の有効濃度が高い為、細胞毒性を認めてはいるが、低濃度において心筋分化効率の改善を示唆する結果が確認された(図 5)。

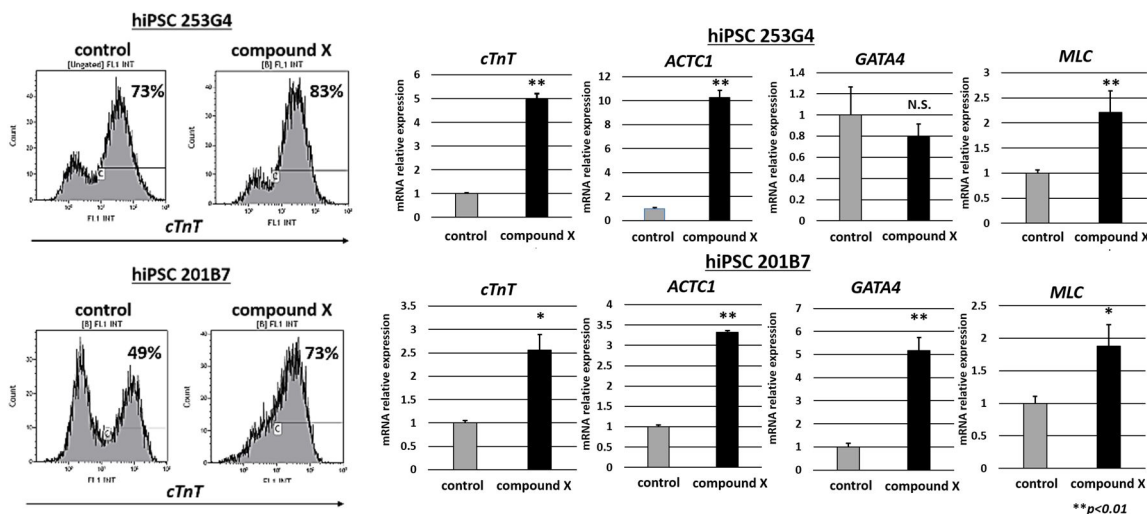


図 5. 同定した化合物添加により、心筋分化効率の改善が FACS、RT-PCR、免疫染色で確認された。

(4) 標的因子の立体構造に基づいた in silico フルスクリーニングによる候補化合物の選出

パイロットスクリーニングで得られた候補化合物の有効性評価結果を踏まえて、さらに低濃度で効果の高い化合物を選出する為、大規模化合物データベースを用いた in silico フルスクリーニングを行った。具体的には、化合物の化学構造式と得られた BMP シグナル相対活性値から、ソフトウェア AutoQSAR(<https://www.molsis.co.jp/wpcontent/themes/molsis/images/ccg/support/svl/2016.08/autoqsar/autoqsar.html>)を用いて、定量的構造活性相関 (Quantitative Structure-Activity Relationships: QSAR) 式の算出を行い(図 6)、約 800 万個の化合物を含むライブラリーから、さらに高い効果を示し、かつリード化合物の条件を備えた化合物を選出した。次に、パイロットスクリーニング時同様に、選出された候補化合物と標的因子ドメインとのドッキングスコアを、プログラム ASEDock を用いて算出し(J.Goto et al.: J. Chem. Inf. Model. 48:583:2008)、GBVI/WSA_dG を用いた結合親和性の評価を in silico で行い(C.R.Corbeil et al.: J. Comput.-Aided Mol. Des. 26:775:2012)、候補化合物の絞り込みを行った。最終的には 50 個の候補化合物を選出し、現在ヒト細胞株 HEK293 を用いた BMP 反応性ルシフェラーゼアッセイで候補化合物の有効性を定量的評価し、絞り込みを実施している。

BMP シグナルを活性化する実用性のある低分子化合物の同定は報告されておらず、ヒト多能性幹細胞由来心筋を用いた再生医療における組み換え蛋白の置換によるコスト削減以外にも、骨折や骨形成不全に対して骨形成効果を持つ治療薬として有用である可能性、肺動脈性肺高血圧症など BMP シグナル低下に起因する難病疾患への治療適用の可能性もある。その為、BMP シグナル作動低分子化合物の利用価値は高いと考えられ、今回の研究結果で同定したヒット化合物構造を参考に、今後は阻害標的ドメインに対する親和性を保ったまま効果が改善したより低濃度で有効性が高い候補化合物の取得を目指し、類似構造探索等を実施し、更なる検証を重ねる。

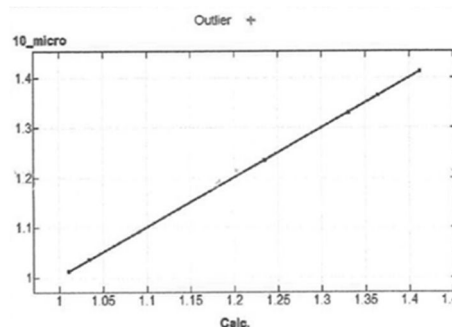


図 6. 化学構造式とシグナル活性の相関グラフの 1 例。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yoshikazu Kishino, Keiichi Fukuda	4. 巻 11
2. 論文標題 Unlocking the Pragmatic Potential of Regenerative Therapies in Heart Failure with Next-Generation Treatments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines11030915.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshikazu Kishino, Toshiki Kuno, Aaqib H Malik, Gregg M Lanier, Daniel B Sims, Ernesto Ruiz Duque, Alexandros Briasoulis	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of pulmonary artery pressure-guided therapy on heart failure readmission in a nationally representative cohort	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 2511-2517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ehf2.13956.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hidenori Tani, Shugo Tohyama, Yoshikazu Kishino, Hideaki Kanazawa, Keiichi Fukuda	4. 巻 164
2. 論文標題 Production of functional cardiomyocytes and cardiac tissue from human induced pluripotent stem cells for regenerative therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 83-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2021.11.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomohiko C Umei, Yoshikazu Kishino, Keiko Watanabe, Yasuyuki Shiraishi, Taku Inohara, Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda	4. 巻 4
2. 論文標題 Recurrence of Myopericarditis Following mRNA COVID-19 Vaccination in a Male Adolescent	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Cardiology Open	6. 最初と最後の頁 350-352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cjco.2021.12.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuika Morita, Yoshikazu Kishino, Keiichi Fukuda, Shugo Tohyama	4. 巻 55
2. 論文標題 Scalable manufacturing of clinical-grade differentiated cardiomyocytes derived from human-induced pluripotent stem cells for regenerative therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Proliferation	6. 最初と最後の頁 e13248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cpr.13248.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomohiko C Umei, Yoshikazu Kishino, Takashi Kawakami, Keiichi Fukuda	4. 巻 43
2. 論文標題 Recurrent pulmonary thrombosis after balloon pulmonary angioplasty in chronic thromboembolic pulmonary hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Heart Journal	6. 最初と最後の頁 3593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/eurheartj/ehac419.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shogo Ito, Hisayuki Hashimoto, Yoshikazu Kishino, Yoshihiro Fukumoto, Keiichi Fukuda, Shinsuke Yuasa, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 The complement C3-complement factor D-C3a receptor signalling axis regulates cardiac remodelling in right ventricular failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communication	6. 最初と最後の頁 5409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-33152-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiroki Kitakata, Takashi Kohno, Shun Kohsaka, Daisuke Fujisawa, Naomi Nakano, Otoya Sekine, Yasuyuki Shiraishi, Yoshikazu Kishino, Yoshinori Katsumata, Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda	4. 巻 11
2. 論文標題 Social Isolation and Implementation of Advanced Care Planning Among Hospitalized Patients With Heart Failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e026645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.122.026645.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takuya Ozawa, Hideki Terai, Akiyoshi Kajino, Shiro Otake, Ayaka Saito, Miyuki Nishie, Yoshikazu Kishino, Hirofumi Kamata, Kentaro Hayashida, Makoto Ishii, Koichi Fukunaga	4. 巻 23
2. 論文標題 Apixaban-Associated Diffuse Alveolar Hemorrhage in an Elderly Man with Multiple Complications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Case Reports	6. 最初と最後の頁 e937809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12659/AJCR.937809.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------