

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23710269
 研究課題名（和文） ケミカルスクリーニングによる ES/iPS 細胞-心筋分化促進化合物の発見と機能解析
 研究課題名（英文） Discovery and characterization of ES/iPSCs-cardiac differentiation promoting molecules by using chemical screening system
 研究代表者 南 一成 (Minami Itsunari)
 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 助教
 研究者番号：40362537

研究成果の概要（和文）：ES細胞を用いたケミカルスクリーニング系を構築し、心筋分化を促進する新しい低分子化合物KY02111を発見した。さらにこの化合物を用いて、安定で高効率な臨床グレードのiPS-心筋分化誘導法を世界で初めて開発した。この方法は現在最も臨床に適しており、低コストで高純度な心筋細胞が得られる。またこの方法は従来の誘導法よりも成熟した心筋細胞に分化していた。この研究はCell姉妹誌であるCell ReportsのBest of 2012に選ばれた。またこの心筋分化誘導法を用いて、ヒトiPS-心筋細胞から心筋シートを作製し、心筋梗塞後の不整脈の原因となる廻旋波モデルを作製することに世界で初めて成功した。

研究成果の概要（英文）： I discovered a novel small molecule (KY02111) by the chemical screening system using ES cells. This molecule promotes iPS-cardiac differentiation strongly and robustly. By using this molecule, I developed a new cardiac differentiation method that has many advantages for clinical application because of high efficiency, no xeno-contamination and low cost. In addition, this method can create mature cardiac cells from iPSCs comparing with other studies. This study was published by Cell Reports (a sister journal of Cell) and selected for ‘Best of Cell Reports’ of 2012. Moreover, we made cardiac sheets by using my method, and for the first time, we established a heart disease model that is the spiral wave propagation in an arrhythmia after myocardial infarction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,873,860	660,000	2,533,860
2012年度	1,626,140	390,000	2,016,140
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：幹細胞生物学、ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：iPS細胞、心筋分化、ケミカルスクリーニング、低分子化合物、臨床グレード

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞は、薬剤安全性において大きな問題となるQT延長試験の創薬スクリーニングや、心臓疾患への細胞

移植技術に重要であるが、それらの技術に使用できる安定した純度の高い細胞系は今のところ確立されておらず、心筋分化をさらに

誘導・促進する因子の探索が望まれている。

2. 研究の目的

ヒト ES/iPS 細胞から高効率で心筋分化を誘導する低分子化合物を同定する。そしてこれらの化合物の標的となる分子を同定し、そのシグナル伝達経路・遺伝子発現変化を明らかにする。またそれらの発現変化した遺伝子群がどのように心筋分化を促進しているのかを明らかにする。そしてその分子機構を基に新しい低分子化合物の合成や組み合わせを行い、成熟した純度の高い心筋細胞を簡便かつ低コストで生産する技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

ケミカルスクリーニングシステムによって発見された心筋分化促進化合物について、各種心筋マーカー分子の発現や心筋の電気生理学的変化を調べ、化合物によって誘導された心筋細胞の性質を多面的に解析する。さらにその標的となる分子・タンパク質やシグナル伝達系などを明らかにするため、DNA アレイを用いて発現誘導される遺伝子群の解析により、化合物の標的をある程度限定する。分子発現、生理学的変化のデータに基づき絞られた標的分子を対象に結合分子アッセイを行い、心筋分化促進化合物の標的分子を明らかにする。そして、それらの化合物を用いた効率的な心筋分化誘導系を確立し、実際に創薬モデル細胞や移植細胞に適用できる心筋細胞を生産する。

4. 研究成果

心筋細胞でのみ発現する GFP 遺伝子を導入したサル ES 細胞を用いて、ケミカルスクリーニングシステムにより約 10000 化合物から新規の心筋分化促進化合物 KY02111 を発見した。この KY02111 の心筋分化促進効果を調べたところ、KY02111 を入れなかった対照細胞

(図 1 左) に比べ、入れた場合の心筋細胞で発現する GFP 蛍光量が約 70 倍に増加していた (図 1 右)。

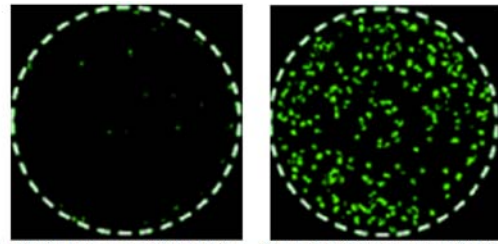


図1 KY02111による心筋分化促進効果。緑色はGFP蛍光で示された心筋細胞集団。

また、ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株、さらにマウス ES 細胞株においても KY02111 が顕著な心筋分化促進効果を持つことを確認した。これは、KY02111 はヒト多能性幹細胞の株に依存せず、生物種を越えて安定して心筋分化促進効果があることを示している。次に、KY02111 を入れた培地で培養した iPS 細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、WNT シグナルによって制御されている遺伝子群の発現量が KY02111 により減少していることが分かり、KY02111 が新規の WNT シグナル阻害剤であることも明らかにした。これらの結果は、KY02111 が WNT シグナルを効果的に抑えることにより心筋分化を促進していることを示している (図 2)。

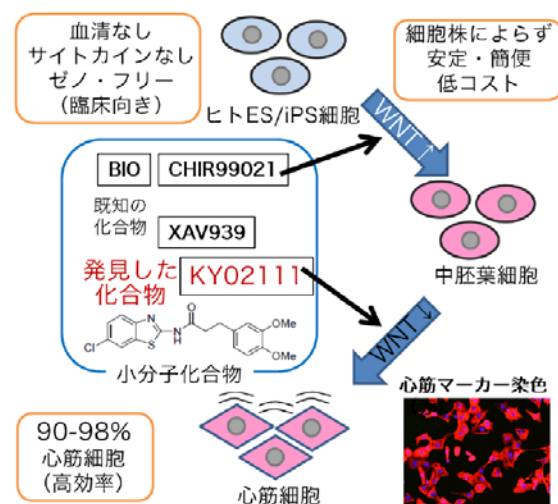


図2 KY02111を用いた心筋分化誘導法。

また本研究では、①高効率で、②高価な増

殖因子を使わず、③感染リスクを伴う動物由来因子を使わない心筋分化誘導法の確立を目指し、WNT シグナル伝達を阻害もしくは活性化する試薬を KY02111 以外にも試した。その結果、心筋分化の初期には WNT シグナルを活性化する小分子化合物を加え、後期には WNT シグナル阻害剤である KY02111 などの小分子化合物を加えることによって、最大 98% の心筋分化効率を得ることができ、かつそれら WNT シグナルに関与する小分子化合物のみを使い、動物成分を用いない分化誘導法の開発に、世界で初めて成功した (図 2)。これにより高純度の心筋細胞を ES/iPS 細胞から生産することが可能となったのに加えて、低コストで臨床グレードの心筋細胞を生産できるようになった。

最後に、本研究で得られた心筋細胞は、心毒性試験に重要な分子が機能的に発現しており (図 3A)、心毒性試験に使用可能であることを株式会社リプロセルとの共同研究によって明らかにした。また、心室筋・心房筋マーカー分子の発現によって成人型の心室筋細胞に近いことが明らかになり (図 3B)、さらに整然とした筋原繊維や筋小胞体が観察されたこと (図 3C、D) により、本研究で得られた心筋細胞は従来の方法より比較的成熟した心筋細胞であることが分かった。

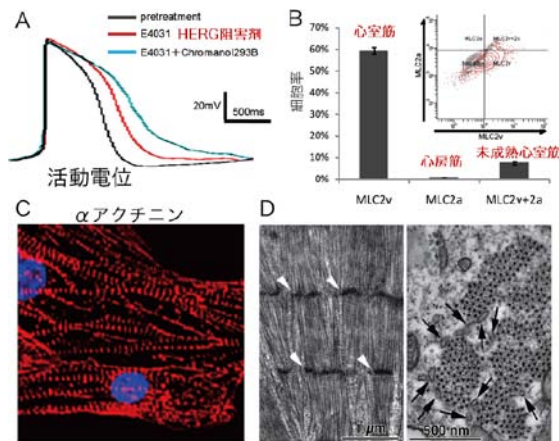


図3 心筋分化誘導法によって得られた心筋細胞の電気的・構造的な特徴。

また、ヒト ES/iPS 細胞から上述の方法で心筋細胞に分化誘導させた後、その心筋細胞を低密度で培養することで、心筋梗塞後などに出現する不整脈の原因となる旋回波 (心臓内における興奮の旋回) を起こす心筋細胞シートが形成されることを発見した (図 4)。また心筋細胞を比較的高密度で培養した場合は、興奮旋回を起こしにくい正常な心筋細胞シートが形成された。さらに、旋回波が起こっている心筋細胞シートに抗不整脈薬を投与することで、その旋回波を止めることができることを示し、病状の再現だけでなく実際に臨床で使用されている薬剤の治療効果を再現することに、世界で初めて成功した。

これまで心筋細胞シートを用いた病態研究は動物モデルの研究のみであったため、ヒト心臓組織の病状を解明する手段は限られていたが、本研究の成果によって、ES/iPS 細胞からより臓器に近い形でヒトの心臓病メカニズムを解明することが可能になり、新たな治療法の開発に繋がることが期待できる。

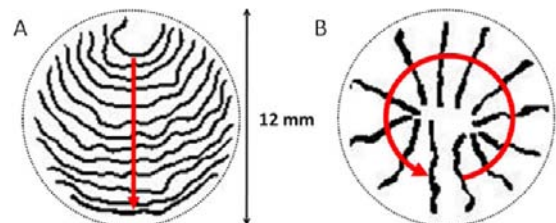
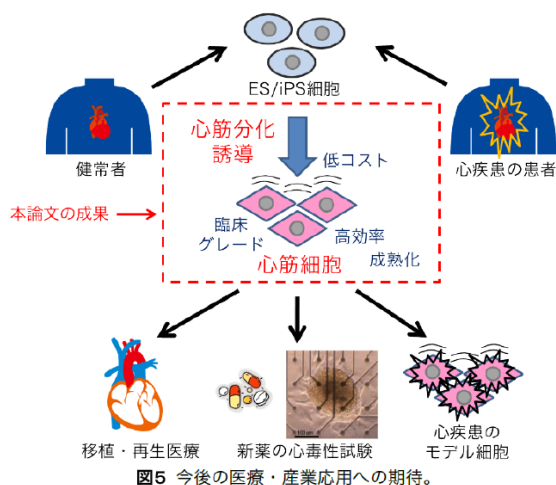


図4 心筋シートにおける興奮伝播波形。赤矢印は進行方向を示す。A：一様に伝わる波形。B：細胞濃度の低いシートにおいて高頻度刺激により誘発された旋回波形 (頻脈性不整脈モデル)。

本研究で発見された新しい小分子化合物 KY02111 を用いた心筋分化誘導法によって、安全・安価・高効率な臨床グレードの心筋細胞をヒト ES/iPS 細胞から生産する技術が確立できた。この成果は、心筋細胞移植の再生医療の実現化に大きく貢献することが期待される。また従来の方法より比較的成熟した心筋細胞に分化していたことから、この心筋細胞を用いた新薬の心毒性試験によって、よ

り正確な成人心臓に対する毒性結果の取得が可能になるだろう。さらに心臓病患者の細胞株由来の心臓病モデル細胞がより成人心筋に近い形で作成でき、それらの解析を通じて、心臓病の病態の解明および治療法の開発に繋がる可能性がある(図5)。さらに、KY02111はWNTシグナル伝達を阻害する分子であり、WNTシグナルは、本研究で注目した心筋分化だけでなく、生物発生から癌にいたるまで様々な現象に関わることが知られている。そのため、KY02111を利用することによって医生物学分野の研究進展に貢献することも期待できる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, Kadota S, Morone N, Barve M, Asai Y, Heuser TT, Heuser JE, Uesugi M, Aiba K, Nakatsuji N. A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions. *Cell Reports*, doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.015. 2012 Oct 25. 査読有

2. Kadota S, Minami I, Morone N, Heuser

JE, Agladze K, Nakatsuji N.

Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J*. doi: 10.1093/eurheartj/ehs418. 2012 Nov 30. 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 多能性幹細胞の心筋分化誘導法

発明者: 中辻憲夫、南一成、上杉志成、饗庭一博

権利者: 同上

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2013/051644

出願年月日: 2013年1月25日

国内外の別: 国際

名称: 多能性幹細胞の心筋分化促進剤

発明者: 中辻憲夫、南一成、上杉志成、山田耕平

権利者: 同上

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2011/069054

出願年月日: 2011年8月24日

国内外の別: 国際

[その他]

ホームページ等

ヒトES/iPS細胞から臨床応用に適した心筋分化誘導法を開発

<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/pr/2012/10/26-nr.html>

ヒトES/iPS細胞から作った心筋細胞シートで不整脈モデルを開発

<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/pr/2012/12/01-nr.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 一成 (Minami Itsunari)

研究者番号 : 40362537