

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390197

研究課題名(和文) 多能性幹細胞研究を応用した新規血管標的治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of a novel vascular-targeting therapy through stem cell research

研究代表者

山下 潤 (Yamashita, Jun)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50335288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、研究代表者らの先進的多能性幹細胞研究を通して明らかとなった新たな分子機構を応用して、心筋梗塞等の虚血性疾患に対する血管再生治療戦略及び腫瘍に対する抗血管新生抑制戦略等の血管新生制御を主たる標的とした新たな治療戦略を開発することを目的とした。カッパ・オピオイド受容体(KOR)が血管内皮増殖因子VEGF2型受容体の発現を低下させることにより、腫瘍血管新生を抑制していることを明らかにした。また、東京大学循環器内科との共同研究により、アンジオポイエチン1による冠静脈誘導作用を明らかにし論文報告した。このように新たな血管新生・形成機構を明らかにし、新たな治療標的を開拓することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this study is that development of novel therapies for ischemic heart disease or cancer through manipulating vascular formation using advanced pluripotent stem cell research. We demonstrated that kappa-opioid receptor suppressed tumor angiogenesis through inhibiting expression of type II vascular endothelial growth factor receptor. In addition, we reported a novel function of angiopoietin-1 in coronary vein formation as a collaboration with Department of cardiovascular medicine, University of Tokyo.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血管新生 多能性幹細胞 内皮細胞 分化 血管内皮増殖因子 アンジオポイエチン

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は ES 細胞を用いた心血管分化再生研究を行ってきた。すなわち、ES 細胞から Flk1 陽性の中胚葉レベルの細胞を分化誘導し、そこから血管細胞の分化と血管形成を再現できる独自の分化誘導系を開発した (Nature, 2000)。単一 Flk1 陽性細胞からの心筋細胞誘導と新たな心筋前駆細胞の同定にも成功している (FASEB J, 2005)。さらに動脈静脈リンパ管の 3 種類の内皮細胞を ES 細胞から誘導することに成功している (Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006a, 2006b)。3 種類全ての内皮細胞の誘導に成功しているのは世界的にも研究代表者らのみである (Trends Cardiovasc Med, 2007)。我々の ES 細胞分化系は心血管系細胞の分化を経時的系統的に培養下に再現し、分化発生過程を段階的にかつ単一細胞でも解析可能な新しい分化誘導系である。研究代表者は、iPS 細胞研究にもいち早く取り組み、マウス iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導に世界に先駆けて成功している (Circulation, 2008) (2008 年 Circulation 誌基礎科学部門第 1 位 Best Paper Award 受賞)。ヒト iPS 細胞についても研究を進め、ヒト iPS 細胞からの機能的な心筋細胞の誘導や効率的な心筋細胞分化誘導法及び純化法の開発にも成功している (PLoS One, 2011a, 2011b)。このように、研究代表者は ES 及び iPS 細胞の分化再生研究において世界的にも先端的である (Exp Cell Res, 2010)。さらに最近、内皮細胞分化の分化多様化機構に関する解析を進め、cAMP シグナルの新しい意義を次々に明らかにした。すなわち、1) cAMP の下流で PI-3 kinase が Notch,  $\beta$ -catenin を介して動脈内皮化を誘導していること (J Cell Biol, 2010)、2) protein kinase A (PKA) が血管前駆細胞における VEGF 受容体 (Flk1 及び neuropilin1) の発現を亢進させ、内皮分化を促進していること (Blood, 2009)、さらに、3) 痛覚など神経機能に重要な役割を果たす Kappa オピオイド受容体 (KOR) が Flk1 陽性細胞において高発現し cAMP 抑制的に作用することにより内皮分化及び血管形成を抑制するという新しい血管制御機構 (Blood, 2011; 表紙) を明らかにした。さらに 4) 成体での KOR の血管形成における意義を検討するため KOR ノックアウトマウスへの腫瘍細胞移植実験を行い、血管新生の亢進とともに腫瘍の増大が認められる予備的結果を得ている (未発表; 星薬科大学との共同研究)。また、5) 内皮細胞分化過程において特異的発現様式を示す遺伝子を網羅的遺伝子解析から探索し、従来 ERK1/2 の下流においておもに細胞増殖等への関与が報告されてきた RSK (p90 ribosomal S6 kinase) が、PKA に結合し PKA 活性を阻害することにより内皮細胞の出現を抑制していることを新たに見出した (未発表; 図 3)。さらに、6) 内皮細胞分化過程において内皮細胞特異的に発現する miR を探

索することによって、内皮細胞の遊走を抑制する新しい miR の同定にも成功している (未発表; 図 4)。このように研究代表者の ES 細胞血管分化系を用いた検討によって、上記 1) - 6) の様々な血管分化形成機構が明らかとなってきており、これらを応用して新しい血管標的治療戦略を開拓することが可能になると考えられた。

### 2. 研究の目的

研究代表者等は、下記 1) - 6) の血管分化・形成に関する新たな知見を見出した。1) cAMP による内皮細胞動脈化機構 (J Cell Biol, 2010)、2) PKA による内皮細胞分化促進機構 (Blood, 2009)、3) オピオイドの PKA を介した内皮分化・血管形成抑制作用 (Blood, 2011; 表紙)、4) 成体におけるオピオイドの抗血管新生・抗腫瘍作用 (未発表)、5) RSK ファミリーの血管分化・形成抑制作用 (未発表)、6) 血管形成を制御する新しい内皮特異的マイクロ RNA (miR) の同定 (未発表)。

本研究は、これら先進的多能性幹細胞研究を通して明らかとなった新たな分子機構を応用して、心筋梗塞等の虚血性疾患に対する血管再生治療戦略及び腫瘍に対する抗血管新生抑制戦略等の血管新生制御を主たる標的とした新たな治療戦略を開発することを目的とした。研究期間内においては、未発表の新規知見である上記 4) - 6) に関連して、I) オピオイドの抗血管新生治療への応用、II) RSK 阻害による血管新生治療法の開発、及び III) 血管作動性 miR を用いた血管新生制御法の開発、の 3 項目の検討を行う。最終的に治療応用可能な低分子化合物や miR を用いた具体的治療戦略の確立に至ることを目指した。

### 3. 研究の方法

1) オピオイドの抗血管新生治療への応用  
研究代表者らは、オピオイド受容体の一つである KOR が Flk1 陽性血管前駆細胞に高発現していること、KOR のアゴニストの投与により血管前駆細胞からの内皮細胞分化及び培養下における 3 次元的血管形成が抑制されること、同作用は PKA の活性化により阻害されること、KOR 及びその内因性リガンドの一つである PDYN のノックアウトマウス双方において胎生期に血管形成の亢進を認めること、また体節間血管 (intersomitic vessels) の異所性走行を認めること、を示し、オピオイドが血管内皮細胞分化及び血管形成に抑制的に働く新しい分子であることを明らかにした (Blood, 2011; 表紙)。このオピオイドの新しい効果を成体においても確認し、新規抗腫瘍血管抑制治療法への応用を目指す。

オピオイドの成体における血管新生に対する効果の確認

研究代表者らはすでに、KOR ノックアウトマウス及び KOR の内因性リガンドの

一つである PDYN のノックアウトマウス (いずれも成体が得られる) への B16 黒色腫株及び Lewis 肺がん細胞株の移植実験を行い、両ノックアウトマウスにおける腫瘍血管新生促進を定量的に評価・確認する。

オピオイド投与による腫瘍血管新生抑制及び抗腫瘍効果の検討

腫瘍増大作用に関して、i) KOR の腫瘍細胞への直接作用及び ii) 血管新生効果の寄与をそれぞれ評価する。

- i) 培養腫瘍細胞への投与による細胞増殖抑制作用、apoptosis 誘導作用等を検討する。
- ii) 培養血管内皮細胞に対する増殖・遊走・apoptosis 抑制作用、2 次元培養下 (マトリゲルコート培養皿) における管腔様構造形成への作用等の *in vitro* 実験、およびマトリゲルプラグ移植アッセイ等の腫瘍細胞を用いない *in vivo* 血管新生実験を用いて、血管新生に対する KOR の効果を評価する。

) RSK 阻害による血管新生治療法の開発  
研究代表者は、RSK ファミリーが血管内皮細胞分化過程において特異的な発現様式を示し、PKA 活性抑制作用を介して血管形成に関与している新しい役割を見出した。すなわち、RSK ファミリーは RSK1-4 の 4 つの isoform により構成されるが、RSK1 が未分化 ES 細胞に、RSK2 が動脈内皮細胞に、RSK3 が静脈内皮細胞に、RSK4 が FIK1 陽性細胞におもに発現し、RSK コードとも言うべき特異的な発現様式を示すことを見出した。さらに、FIK1 陽性血管前駆細胞からの内皮分化過程において、RSK の作用を RSK 阻害剤 SL0101 (RSK1-4 のすべてを阻害) によりブロックすると、PKA の作用が増強され、内皮細胞分化が促進された。

*In vivo* においてはこの効果はより強く認められ、マウス早期胎仔を用いた *ex vivo* culture において SL0101 を添加すると、卵黄嚢血管における内皮細胞の増生のみならず、従来内皮にはならない領域も広範囲に内皮細胞に分化し、前駆細胞からの内皮細胞分化が著しく促進されると考えられた。現在同作用は、RSK4 を介した PKA 活性の抑制がおもである予備的結果を得ているが、他の RSK ファミリーを含めた RSK の成体での血管新生における意義を明らかにし、その治療応用の可能性を探索する。

◇ 血管分化・形成に關与する RSK isoform の同定

これまでに RSK isoform それぞれに特異的な shRNA を用いた特異的 RSK 阻害実験を行い、少なくとも *in vitro* 実験において RSK4 の阻害によって SL0101 による内皮細胞分化促進効果が再現できることを確認している。RSK4 と PKA との結合及び RSK4 による PKA 活性抑制を確認

し、RSK による血管分化・形成に關与する RSK isoform を確定する。

) 血管作動性 miR を用いた血管新生制御法の開発

研究代表者は、内皮細胞分化過程において発現する miR に関して網羅的発現解析を行い、内皮細胞、特に動脈内皮細胞に高い発現を示す miR を同定した (miR-x とする。これまで血管における作用は報告されていない)。

miR-x のヒト内皮細胞 (HUVEC) における発現と、miR-x による、内皮細胞遊走及び 2 次元培養下管腔様構造形成に対する作用を検討する。

#### 4. 研究成果

) オピオイドの抗血管新生治療への応用  
オピオイドの成体における血管新生に対する効果の確認

KOR ノックアウトマウス及び PDYN のノックアウトマウスへの B16 黒色腫株及び Lewis 肺がん細胞株の移植実験を行い、両ノックアウトマウスにおける腫瘍血管新生促進を検討した。両ノックアウトマウスにおいては、腫瘍血管新生が抑制されていることを明らかにした。

オピオイド投与による腫瘍血管新生抑制及び抗腫瘍効果の検討

腫瘍増大作用に関して、i) KOR の腫瘍細胞への直接作用及び ii) 血管新生効果の寄与をそれぞれ評価する。

- i) 培養腫瘍細胞への投与による細胞増殖抑制作用、apoptosis 誘導作用等を検討する。
- ii) 培養血管内皮細胞に対する増殖・遊走・apoptosis 抑制作用、2 次元培養下 (マトリゲルコート培養皿) における管腔様構造形成への作用等の *in vitro* 実験、およびマトリゲルプラグ移植アッセイ等の腫瘍細胞を用いない *in vivo* 血管新生実験を用いて、血管新生に対する KOR の効果を評価する。

KOR が血管新生増殖因子 VEGF 遺伝子発現を抑制することにより、腫瘍血管新生を抑制していることを明らかにした。

これらの成果を論文報告した (Yamamizu, Sci Rep, 2013)。

) RSK 阻害による血管新生治療法の開発  
血管分化・形成に關与する RSK isoform の同定

RSK isoform それぞれに特異的な shRNA を用いた特異的 RSK 阻害実験を行い、*in vitro* 実験において RSK4 の阻害によって SL0101 による内皮細胞分化促進効果が再現できること、及び免疫沈降 - ウェスタンブロットによって RSK4 と PKA とが結合すること及び RSK4 の結合により PKA 活性が抑制されることを明らかにした。RSK による血管分化・形成に關与する RSK isoform

は RSK4 であることを確認した。

#### 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 6 件)

1. Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, Fukushima H, Marui A, Katayama S, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK\*. Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. **Sci Rep**. 4: 6716, 2014. doi: 10.1038/srep06716.
2. Matsunaga T, Yamashita JK\*. Single-step generation of gene knockout-rescue system in pluripotent stem cells by promoter insertion with CRISPR/Cas9. **Biochem Biophys Res Commun**. 444:158-163, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.037.7
3. Arita Y, Nakaoka Y, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Kataoka-Hashimoto T, Ikeoka K, Yasui T, Masaki T, Yamamoto K, Higuchi K, Park JS, Shirai M, Nishiyama K, Yamagishi H, Otsu K, Kurihara H, Minami T, Yamauchi-Takahara K, Koh GY, Mochizuki N, Takakura N, Sakata Y, Yamashita JK, Komuro I. Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. **Nat Commun**. 5: 4552, 2014. doi: 10.1038/ncomms5552.
4. Cho SW, Park JS, Heo HJ, Park SW, Song S, Kim I, Han YM, Yamashita JK, Youm JB, Han J, Koh GY. Dual modulation of the mitochondrial permeability transition pore and redox signaling synergistically promotes cardiomyocyte differentiation from pluripotent stem cells. **J Am Heart Assoc**. 3: e000693, 2014. doi: 10.1161/JAHA.113.000693.
5. Uosaki H\*, Magadam A, Seo K, Fukushima H, Takeuchi A, Nakagawa Y, Moyes KW, Narazaki G, Kuwahara K, Laflamme M, Matsuoka S, Nakatsuji N, Nakao K, Kwon C, Kass DA, Engel FB, Yamashita JK\*. Identification of chemicals inducing cardiomyocyte proliferation in developmental stage-specific manner with pluripotent stem cells. **Circ Cardiovasc Genet**, 6:624-633, 2013. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000330
6. Yamamizu K, Furuta S, Hamada Y, Yamashita A, Kuzumaki N, Narita M, Doi K, Katayama S, Nagase H, Yamashita JK, Narita M.  $\kappa$ Opioids inhibit tumor angiogenesis by suppressing VEGF signaling. **Sci Rep**, 3:3213, 2013. doi: 10.1038/srep03213.

[学会発表](計 10 件)

1. Yamashita JK. : Blood vessels for cardiac regeneration with stem cells. 2014 International Vascular Biology Meeting (2014. 4. 14-17. Kyoto)
2. 山下 潤 : 「多能性幹細胞を用いた次世代心臓再生治療戦略の開発」, 第 35 回日本炎症・再生医学会 日本再生医療学会 ジョイントシンポジウム「幹細胞分化から見た再生医療」(2014.7.3. 沖縄)
3. 山下 潤 : Multiple Approaches for Cardiac Regeneration with Pluripotent Stem Cells, Small Molecules, and Tissue Engineering. 最先端セミナー(熊本大学リエゾンラボ研究会)(2014.7.16. 熊本)
4. 山下 潤 : 「多能性幹細胞由来心血管細胞の創薬および再生医療への応用」, 第 6 回メディバイオ事業研究会講演会(山口大学医学部消化器病態内科学・再生医療の実現化ハイウェイセミナー)(2014.7.24. 山口)
5. 山下 潤 : 「多能性幹細胞を用いた多面的心血管分化再生戦略」, ゲノム創薬・医療フォーラム第 2 回談話会「再生医療における創薬戦略」(2014.8.7. 東京)
6. Yamashita JK. : Application for High Throughput Drug Screening with human iPS cell derived cardiomyocyte. iPS related activities in Japan / application for safety evaluation using human iPS

- cell-derived cardiomyocyte.  
CiRA-Boehringer Ingelheim iPS  
Symposium (2014.10.9. Kyoto)
7. Yamashita JK. : Next Generation Strategies for Cardiac Regeneration with Pluripotent Stem Cells, Small Molecules, and Tissue Engineering. 第5回アジア細胞治療学会 (ACTO2014) (2014.11.10. Osaka)
  8. Yamashita, JK. : Multiple Approaches for Cardiac Regeneration Using Pluripotent Stem Cells. American Heart Association Scientific Meeting 2014, Joint AHA/Japanese Circulation Society Session: Use of ES/iPS Cells for Cardiovascular Medicine (2014.11.18. Chicago, USA)
  9. 山下 潤 : 「ヒト iPS 細胞からの効率的な心筋細胞誘導」, 第11回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム「ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて」(2014.12.9. 東京)
  10. Yamashita JK: Next-generation cardiac regenerative strategies using iPS cells: 3D tissue engineering and new cell populations. CiRA International Symposium (2015.1.16, Suita, Osaka)
  11. 山下 潤 : 「多能性幹細胞の心血管系再生医療への応用」, 第6回再生医療サポートビジネス懇話会 (2015.2.10 京都)
  12. 山下 潤 : 「多能性幹細胞を用いた多面的心臓再生治療戦略 - 血管の重要性を中心に - 」, 第13回下肢の創傷治療を考える会 (2015.2.12. 高松)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
山下研究室のホームページ  
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/yamashita/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
山下 潤 (YAMASHITA, Jun)  
京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50335288

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：