

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860555

研究課題名(和文) 生体内の幹細胞を動員する新規心臓再生治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of cardiac regenerative drug therapy recruiting endogenous cardiac stem/progenitor cells

研究代表者

福島 弘之 (Fukushima, Hiroyuki)

京都大学・学内共同利用施設等・研究員

研究者番号：10713860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、これまでに申請者がES/iPS細胞に対して心筋分化促進効果を示したCDC1を、心疾患に対する治療薬として最適化し、心臓組織自己再生治療法の開発を目的とする。研究期間内に、CDC1に対する1)類縁体の合成展開による最適化、2)相加・相乗効果を及ぼす化合物の探索、3)生体吸収性ゼラチンハイドロゲルの開発を試みた。CDC1と同等の活性を示すいくつかの類縁体を同定した。相加・相乗効果を及ぼす新たな化合物の同定には至らなかったが、偶然にもCDC1とは異なる有望な化合物を同定した。さらにゼラチンハイドロゲルを用いて治療薬としての最適化を検討している。

研究成果の概要(英文)：Previously, we identified CDC1 which induced cardiomyocyte differentiation from ES/iPS cells. This study aimed development of cardiac regenerative drug therapy with utilizing CDC1. Following term were investigated; 1) Structure-activity relationship among CDC1 analogs, 2) Identification of compounds having synergistic effect with CDC1, 3) Development of gelatin hydrogel particle containing CDC1. We successfully identified some analogs showing same effect, comparing with CDC1. Although, we could not identify a new synergistic effect compound, fortunately we obtained a compound, which was hopeful drug for therapeutic use, unlike CDC1. Furthermore we are investigating utility of gelatin hydrogel particle containing CDC1.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：心臓再生 ケミカルバイオロジー ES/iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、従来は生後不変であると考えられた心筋細胞もターンオーバーしていることが数々報告されている(Bergmann O. Science. 2009. Kajstura J. Circ. Res. 2010.)。すなわち心臓内においても幹細胞 前駆細胞

心筋細胞に至る組織再生プロセスが働いていると考えられる。しかしその再生能力は限定的であり、心筋梗塞などの傷害を自然治癒するほどの能力はない。そのため、心臓組織の再生には外因的な刺激を加えることによって、生体内の幹細胞の増殖・分化を増強する必要があると考えた。

これまで申請者が所属する研究室では、マウス及びヒトの ES/iPS 細胞を用いて経時的系統的に心血管系細胞を分化誘導できる独自のシステムを確立してきた。特に申請者は、このマウス ES 細胞を用いた心筋分化誘導システムを応用し、中胚葉細胞から心筋分化を促進する化合物を同定可能な効率的なスクリーニング系を開発した。またこのスクリーニング系により、天然化合物より新規化合物 (Cardiomyocyte Differentiation Compound 1: CDC1) の同定に成功した。CDC1 はマウス及びヒト ES/iPS 細胞由来の中胚葉・心筋前駆細胞から心筋細胞を高効率に誘導することを示した。またラット亜急性期心筋梗塞モデルに対して全身性に投与したところ、梗塞巣の縮小・心機能の改善治療効果を示した。

しかしながら、CDC1 は天然物由来の構造のままであり、薬剤として最適な構造ではなく、『新薬の候補化合物(リード化合物)』の域を脱していない。また投与方法においても単純に血流内を循環させているだけであり、薬物動態として制御されているとは言えない。

薬剤自体の治療効果を高める方法として、1) 構造活性相関に基づく類縁化合物の合成展開、2) ドラッグデリバリーシステム(DDS) がある。1) は化合物の薬効または毒性の活性中心となる官能基に化学修飾を行い、高活

性・低毒性を示す最適な構造をとる化合物を作製する手法である。2) DDS は目標とする患部(臓器や組織、細胞など)に、途中で吸収・分解されることなく到達させ、薬物を効果的かつ集中的に放出し治療効果を高める投与技術である。特に生体吸収性ハイドロゲル(ゼラチンハイドロゲル)を利用した徐放化 DDS は、成長因子である bFGF を用いた血管新生療法において、すでに臨床試験が行われている。またハイドロゲル粒子は、そのサイズ、形状、分解性、表面状態などを任意に変化させることができ、化合物の徐放も可能である(Shi M. J Control Release. 2011)。

一方、HIV/AIDS の治療として、抗 HIV 薬を 3 剤以上組み合わせて使用する多剤併用療法 (combination antiretroviral therapy: cART) が標準的な治療法となっている。HIV の増殖過程(1. ウィルス RNA DNA への逆転写、2. ウィルスタンパク質の合成、等)の理解に基づき、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の併用によって、劇的な治療効果・予後の改善を示している。生体における心筋細胞の発生・分化過程は、複数の成長因子のシグナルの作用によって形成されている。1 つの化合物が複数の異なるシグナル経路を惹起することは非常に困難である。さらなる梗塞巣に対する治療効果の改善には、複数の化合物を併用することも必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、『新薬候補』である CDC1 を、薬効、毒性について最適化することに主眼を置く。最終的には物性、吸収、分布、代謝についても最適化し、『新薬』へと洗練させることを目指す。研究期間内においては、1) . CDC1 をリード化合物とし構造活性相関に基づき合成展開を行い、より高活性・低毒性の最適化化合物を創出、2) . CDC1 と相加・相乗効果を示す併用化合物の探索、3) . CDC1 の投与方法として DDS 技術である生体吸収性の徐放

化ゼラチンハイドロゲルへの応用、を行う。  
上記 1) ~ 3)を相互に結び付けることによっ  
て、心疾患に対する薬剤による心臓組織の自  
己再生治療法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) CDC1 類縁体の合成展開による最適化

マウス ES 細胞を用いた心筋分化誘導化合物  
スクリーニング系を用いて、CDC1 の類縁体の  
スクリーニングを行う。百種類程度の類縁体  
を目標に行う予定である。1 つの類縁体対  
して複数の濃度の活性を測定し、至適濃度範  
囲・毒性濃度範囲を決定し、構造と活性の相  
関を解析する。構造と活性の相関を踏まえ、  
新たな CDC1 類縁体のデザイン及び合成を行  
い、最終的には、従来の CDC1 より高活性・  
低毒性の CDC1 類縁体を合成する。

#### 2) 相加・相乗効果を及ぼす化合物の探索

相加・相乗効果を及ぼす化合物の探索につ  
いては、標的分子既知の合成化合物ライブラ  
リーを中心に数千種類の化合物のスクリー  
ニングを行う。上記 CDC1 類縁体の最適化と同  
様に、マウス ES 細胞の心筋細胞分化誘導ス  
クリーニング系を用いて行う。相加・相乗効  
果を示す化合物の探索はすでに行っており、  
CDC1 の分化誘導効果を相加的に補助する  
CDC2 の同定にも成功している。本研究の最終  
目標はヒトに対して治療効果を示すこと  
である。そのため、マウス ES 細胞において相  
加・相乗効果を示した化合物は、随時ヒト iPS  
細胞の心筋分化誘導を用いて、ヒト細胞対  
しても相加・相乗効果を示すことを早期に検  
討・確認する。今後も継続して相加・相乗効  
果を及ぼす化合物のスクリーニングを行い、  
少なくとも数種類の化合物の同定を目標と  
する。

#### 3) CDC1 が梗塞巣に特異的に効果を及ぼす生 体吸収性ゼラチンハイドロゲルの開発

これまで生体吸収性ゼラチンハイドロゲル  
利用し、細胞増殖因子、核酸、化合物などを、  
活性を保持した状態で徐放化させることに  
成功している報告がある(Adv Dru Deliv Rev  
2006, J R Soc Interface 2009)。CDC1 が梗  
塞部位に限局し持続投与(徐放)できるハイ  
ドロゲル粒子のサイズ、形状、分解性、表面  
状態などの最適化を行い、従来行っていた浸  
透圧ポンプによる全身性投与との治療効果  
の比較を行う。治療効果については、当研究  
室で技術的に最も安定しているラット垂急  
性期心筋梗塞モデルを用いて、梗塞巣の組織  
学的検査、心エコー及び MRI による心機能の  
評価を行う。有望な CDC1 類縁体とハイドロ  
ゲル粒子の組み合わせについては、可能であ  
れば MerCreMer-ZEG マウスを用いた心筋梗塞  
モデルへの効果の検討を行う。MerCreMer-ZEG マウスの梗塞後に薬剤を投与  
し、健常体における GFP 陽性心筋細胞と LacZ  
陽性心筋細胞の比率の変化から、薬剤の効果  
による新生心筋細胞の定量的な評価を行う。  
さらに、中長期における心機能の改善効果の  
評価を行う。

### 4. 研究成果

#### 1) CDC1 類縁体の合成展開による最適化

マウス ES 細胞を用いた心筋分化誘導化合物  
スクリーニング系を用いて、百種類程度の類  
縁体を複数の希釈系列においてスクリー  
ニングを行った。いくつかの類縁体は CDC1 と  
同等の活性を示した。上記の結果から、構造  
と活性の相関を解析し、さらに活性の強い類  
縁体の作製を検討中である。

#### 2) 相加・相乗効果を及ぼす化合物の探索

標的分子既知の様々な化合物を用いて、相加  
相乗効果を及ぼす化合物のスクリーニング  
を行った。しかしながら、CDC2 を超える相  
加・相乗効果を持つ新たな化合物は同定でき  
なかった。そのため、さらに多くの化合物の

スクリーニングを行うことを検討中である。また上記のスクリーニングの結果、偶然の発見であるが、既に臨床試験が開始されており、今まで心筋分化促進効果が報告されていない化合物を新たに見出した。単独処理で CDC1 と同等の心筋分化誘導活性を有することから、ドラッグリポジショニングの可能性が示唆された。この化合物はヒト iPS 細胞にも同様に効果を及ぼしたため、ラット心筋梗塞モデルへの治療効果の確認を検討している。

3) CDC1 が梗塞巣に特異的に効果を及ぼす生体吸収性ゼラチンハイドロゲルの開発  
CDC1 を含浸させた生体吸収性ゼラチンハイドロゲル粒子のサイズ、形状、分解性、表面状態など種々の物性の最適化を検討中である。またラット亜急性期心筋梗塞モデルを用いて、ゼラチンハイドロゲル粒子の吸収・分解性、分布についての解析を準備している。

#### 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 1 件)

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. Scientific Reports. 査読有, 2014 Oct 22;4:6716. doi: 10.1038/srep06716.

〔学会発表〕(計 1 件)

Fukushima H. Identification of novel chemicals potently inducing cardiomyocyte differentiation from mouse and human pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting. 2014 年 6 月 18-21 日 . カナダ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

福島 弘之 (Fukushima, Hiroyuki)  
京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員  
研究者番号: 10713860

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし