

平成30年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09132

研究課題名(和文) 内因性心筋再生の増幅を目的とした心筋細胞Hippo-YAP経路の制御方法の開発

研究課題名(英文) Enhancement of the endogenous cardiac regeneration via activation of Hippo-YAP signaling pathway

研究代表者

武田 憲文 (TAKEDA, NORIFUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60436483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：成体の心筋細胞も僅かに増殖しており、その増殖性シグナルであるYAP-TEAD活性を指標に機能未知低分子化合物をスクリーニングし、心筋細胞の増殖を強く誘導し、抗酸化、抗アポトーシス作用も併せ持つ新規フッ素化合物TT-10を創出した。マウス心筋梗塞モデルに投与したところ、心機能改善とともにクローン性増殖を増幅し、一方で活性酸素種産生や線維化を軽減した。従来の心不全治療を補足・促進させる新たな治療手段として期待される。

研究成果の概要(英文)：Accumulating data suggest that new cardiomyocytes in adults are generated from existing cardiomyocytes throughout life. To enhance the endogenous cardiac regeneration, we performed chemical screenings to identify compounds that activate pro-proliferative YAP and TEADs activities in cardiomyocytes. We synthesized a novel fluorine-containing TT-10 (C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) from the biologically hit compound. TT-10 promoted cardiomyocyte proliferation and simultaneously exerted anti-oxidant and anti-apoptotic effects in vitro. TT-10 treatment in mice ameliorated myocardial infarction-induced cardiac dysfunction at least in part via enhancing clonal expansion of existing cardiomyocytes. Stimulating cardiomyocyte proliferation and/or protection with TT-10 might complement current therapies for myocardial infarction.

研究分野：医歯薬学

キーワード：創薬 心筋再生 心筋細胞分裂 Hippo-YAP経路 心筋梗塞 心不全

## 1. 研究開始当初の背景

成体の心筋細胞もターンオーバーしており、「既存の成体心筋細胞の分裂・増殖」がその主なメカニズムであることが示された。この心筋細胞の増殖能を制御・増幅できれば、安全で効率的な心筋再生療法を提供し、iPS/ES細胞、骨髄細胞などを用いた移植治療と共に、将来的な心筋再生戦略の基軸を担う可能性がある。

最近、臓器や器官の適切な「大きさ(増殖の程度)」を決める Hippo-YAP 経路が、心筋細胞の増殖にも関与していることが明らかとなった。心筋細胞特異的に恒常的核内型 YAP (S127A) を永続的に発現させたマウスへの心筋梗塞モデルでは、既存の心筋細胞が再び「増殖型」の形質を獲得して増殖することで、心機能が改善した( *PNAS* 110:13839, 2013 )。Hippo-YAP 経路を制御することで、成体心筋細胞の増殖能を獲得・促進させることが出来ることを示唆するが、心筋細胞での Hippo-YAP 経路の詳細は十分には知られておらず、またその制御方法もないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本課題では、内因性の心筋再生(とくに既存の心筋細胞の分裂)を制御・増幅して、従来の心不全治療の効能を補足・促進させる新たな治療手段を開発するため、Hippo 経路の最終的な転写複合体 YAP-TEADs の転写活性を指標に、心筋細胞増殖や心筋再生を増幅する薬剤の創出(創薬)を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬剤スクリーニング

約 18,600 種類の機能未知低分子化合物から、2 種類の上皮細胞を用いて YAP-TEAD 転写活性を持つ化合物の高速大量スクリーニングを行った( *Mol Cancer Res* 2018;16:197-211, *Mol Cell Biol* 2014;34:1607-21 )。次に、培養ラット新生児心筋細胞の増殖能を促す化合物について、DNA 合成( EdU 取り込み )、核分裂( pH3 染色 )、細胞質分裂( Aurora B 染色 ) を指標に 2 次スクリーニングを行った。さらに、得られた薬剤( TAZ-12 )について、側鎖・構造改変を実施し、増殖能がさらに強

く細胞毒性が少ない薬剤( TT-10 )を創薬した。

### (2) 新規化合物 TT-10 の細胞活性の検証

心筋細胞の YAP-TEAD 活性に与える影響を検証するとともに、その他の生物活性についてもトランスクリプトーム解析( RNA-Seq ) や細胞アッセイ( Wnt- catenin 経路, Keap1-NRF2 経路、酸化ストレス応答に与える影響など ) を用いて検証した。

### (3) マウス心筋梗塞モデルにおける TT-10 腹腔内投与の効果

マウス心筋梗塞モデル作成後、TT-10 の腹腔内投与( 10mg/kg/day ) を連日実施し、術後 1 ヶ月までの心筋リモデリングに与える影響を検証した。成獣心筋細胞の増殖能( 細胞分裂 ) に与える影響については、*αMHC-MerCreMer; Rosa26<sup>tbw/+</sup>* mice マウスを用いた細胞系譜追跡実験( fatemap )を行うことで検証した。

## 4. 研究成果

(1) 約 18,600 種類の機能未知化合物ライブラリーを用い、上皮細胞( 2 種類の細胞アッセイ系 ) での YAP-TEADs 転写活性を指標とした候補化合物の選出作業を行い( 64 種類 )、その中の数種類の化合物は培養心筋細胞の増殖能を著しく増幅させた。特に効果の高い化合物( TAZ-12 ) について 26 種類以上の側鎖改変作業を行い、その活性中心構造を同定し、さらに毒性が低く、心筋細胞での効果選択性が極めて高く、生体内安定性にも考慮したフッ素化合物 TT-10 を創出した。

(2) 新規化合物 TT-10 は、心筋細胞でも YAP-TEADs 転写活性を促進し、さらに Wnt/ -catenin 経路を活性化( GSK3 阻害効果 ) させることで、強力な増殖促進作用を発揮すると考えられた。一方で、非心筋細胞( 線維芽細胞や血管内皮細胞 ) の増殖能に対する効果には乏しく、心筋細胞での効果選択性が極めて高い薬剤であることが判明した。

薬剤を投与した心筋細胞の網羅的な発現解析( RNA-seq ) から、細胞周期の進行とサルコメア蛋白分解などの効果の他、抗酸化作用や抗アポトーシス作用も併せ持つことが明らかとなり、これらには NRF2 酸化ストレス応答系の活性化が関与していた。

(3)生体内での効果を検証するため、マウス心筋梗塞モデルに対して腹腔内投与したところ、梗塞境界域での心筋細胞の細胞周期進行の促進とクローン性増殖 (fatemap 実験) が誘導され、活性酸素種 (ROS) の産生も低減し、線維化の軽減と心機能改善に効果的であった。

(4)考察：成体心筋細胞も、僅かながら分裂し増殖していることが実証され、その分裂能を保持・再獲得するメカニズムに着目した研究が今後発展していくと予想される。特に、心筋細胞増殖能と Hippo-YAP 経路とは強い関連性が報告されており、有望な薬物標的と考えられているが、現在まで創薬に至っていない。本課題では、Hippo-YAP 経路に着目し、培養心筋細胞の増殖を強く誘導する新規フッ素化合物 TT-10 を創出し、マウス心筋梗塞モデルでの心機能改善効果も確認できた。生体内での安定性、低毒性、心筋細胞での効果選択性の高さ、多面的作用 (抗酸化、抗アポトーシス作用など) を有する点、などから、心不全患者で効果的な心筋再生・保護効果が期待できると考える。

高齢化に伴い慢性心不全患者数は急増しており、患者への侵襲や合併症 (催不整脈性、催腫瘍性など) 費用対効果等の観点から、本課題のような安全で効果的な「内因性の心筋再生の増幅」を用いた治療戦略の重要性が益々大きくなっていくと予想される。今後は各種の臨床応用を念頭に、iPS 細胞由来の心筋細胞での増殖効果や、iPS 心筋誘導や増殖増幅過程、電気生理学的特性に与える影響などについても検証する予定である。

#### 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 12 件)

(1) Sayama S, Takeda N, Iriyama T, Inuzuka R, Maemura S, Fujita D, et al. Peripartum type B aortic dissection in patients with Marfan syndrome who underwent aortic root replacement: a case series study. *BJOG*. 2017. doi: 10.1111/1471-0528.14635. (査読有)

(2) Oshima T, Hara H, Takeda N, Hasumi E, Kuroda Y, Taniguchi G, et al. A novel mutation of NFIX causes Sotos-like syndrome (Malan syndrome) complicated with thoracic aortic aneurysm and dissection. *Hum Genome Var*. 2017;4:17022. doi: 10.1038/hgv.2017.22. (査読有)

(3) Hara H, Takeda N, Morita H, Hatano M, Amiya E, Maki H, et al. Three novel BMPRII mutations associated with advanced pulmonary arterial hypertension. *Hum Genome Var*. 2017;4:17010. doi: 10.1038/hgv.2017.10. (査読有)

(4) Hara H, Takeda N and Komuro I. Pathophysiology and therapeutic potential of cardiac fibrosis. *Inflammation and regeneration*. 2017;37:13. doi: 10.1186/s41232-017-0046-5. (査読有)

(5) Takeda N, Yagi H, Hara H, Fujiwara T, Fujita D, Nawata K, et al. Pathophysiology and Management of Cardiovascular Manifestations in Marfan and Loeys-Dietz Syndromes. *Int Heart J*. 2016;57:271-277. doi: 10.1536/ihj.16-094. (査読有)

(6) Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Takeda N, Aoyama N, et al. Periodontitis May Deteriorate Sinus of Valsalva Dilatation in Marfan Syndrome Patients. *Int Heart J*. 2016;57:456-460. doi: 10.1536/ihj.15-395. (査読有)

(7) Yagi H, Hatano M, Takeda N, Harada S, Suzuki Y, Taniguchi Y, et al. Congenital Contractural Arachnodactyly without FBN1 or FBN2 Gene Mutations Complicated by Dilated Cardiomyopathy. *Intern Med*. 2015;54:1237-1241. doi: 10.2169/internalmedicine.54.4280. (査読有)

(8) Takeda N, Morita H, Fujita D, Inuzuka R, Taniguchi Y, Nawata K, et al. A deleterious MYH11 mutation causing familial thoracic aortic dissection. *Hum Genome Var*. 2015;2:15028. doi: 10.1038/hgv.2015.28. (査読有)

(9) Takeda N, Morita H, Fujita D, Inuzuka

R, Taniguchi Y, Imai Y, et al. Congenital contractural arachnodactyly complicated with aortic dilatation and dissection: Case report and review of literature. *Am J Med Genet A*. 2015;167A:2382-2387. doi: 10.1002/ajmg.a.37162. (査読有)

(10) Li D, Takeda N, Jain R, Manderfield LJ, Liu F, Li L, et al. Hopx distinguishes hippocampal from lateral ventricle neural stem cells. *Stem cell research*. 2015;15:522-529. doi: 10.1016/j.scr.2015.09.015. (査読有)

(11) Jain R, Barkauskas CE, Takeda N, Bowie EJ, Aghajanian H, Wang Q, et al. Plasticity of Hopx(+) type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung. *Nat Commun*. 2015;6:6727. doi: 10.1038/ncomms7727. (査読有)

(12) Imai Y, Morita H, Takeda N, Miya F, Hyodo H, Fujita D, et al. A deletion mutation in myosin heavy chain 11 causing familial thoracic aortic dissection in two Japanese pedigrees. *Int J Cardiol*. 2015;195:290-292. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.05.178. (査読有)

〔学会発表〕(計 14件)

(1) Hironori Hara, Norifumi Takeda, Tatsuo Saito, Takyuki Fujiwara, Sonoko Maemura, Yutaka Hara, Masanobu Uchiyama, Issei Komuro. Discovery of a small molecule to increase cardiomyocytes and protect the heart after ischemic injury. 第82回日本循環器病学会学術集会, 大阪(2018/3/23-25, 大阪)

(2) Hironori Hara, Norifumi Takeda, Tatsuo Saito, Takyuki Fujiwara, Sonoko Maemura, Yutaka Hara, Masanobu Uchiyama, Issei Komuro. Discovery of a small molecule to increase cardiomyocytes and protect the heart after ischemic injury. *Basic Cardiovascular Research (BCVR)* 2018/1/6-7 (東京)

(3) 近藤正樹, 原弘典, 武田憲文, 斉藤竜男, 畑裕, 小室一成, 内山真伸. 心筋細胞増殖と心筋再生を促進する低分子化合物の

創出. 第35回メディスナリーケミストリーシンポジウム. (2017/10/25-27. 名古屋大学豊田講堂)

(4) 近藤正樹, 原弘典, 武田憲文, 斉藤竜男, 畑裕, 小室一成, 内山真伸. 心筋細胞増殖と心筋再生を促進する低分子化合物の創出. 第7回CSJ化学フェスタ2017-日本化学会周期事業-. (2017/10/17-19. 東京)

(5) 武田憲文. 組織幹細胞の分化・増殖機構の解明と内因性心筋再生の増殖法開発への応用. 第21心血管内分泌代謝学会・高峰謙吉研究奨励賞(受賞記念講演)2017/12/8-10(大阪)

(6) 原弘典, 武田憲文, 小室一成. 心筋細胞増殖作用と心筋障害への保護作用を併せ持つ新薬創出の試み. 第21回心血管内分泌代謝学会. 2017/12/8-10(大阪)

(7) 原弘典, 武田憲文, 斉藤竜男, 藤原隆行, 前村園子, 畑裕, 内山真伸, 小室一成. Hippo経路を標的とした心筋再生・保護効果を有する新規薬剤の開発. *Molecular Cardiovascular Metabolic Conference* 2017.2017/9/1-2(神戸)(Best Abstract Award)

(8) Hara Hironori, Takeda N, Saito T, Fujiwara T, Maemura S, Hata Y, Uchiyama M, Komuro I. Discovery of a small molecule to increase cardiomyocytes and protect the heart after ischemic injury. *AHA Scientific Sessions 2017*. 2017/11/11-15(米国Anaheim)

(9) 原弘典, 武田憲文, 小室一成. Hippo経路を標的として心筋細胞増殖と心筋再生を増幅する薬剤の開発. 第54回日本臨床分子医学会学術集会. (2017/4/14-15. 東京)

(10) 原弘典, 武田憲文, 小室一成. 心筋細胞の分裂機構の解明・制御と医療への応用. 第4回東京未来医療フォーラム. (2017/2/3. 東京)(最優秀賞)

(11) 原弘典, 武田憲文, 小室一成. 心筋細胞増殖・心筋保護作用を有し、心筋再生を促進する薬剤開発の試み. 第8回東京循環器専門医交流会. (2017/1/21. 東京)

(12) 原弘典, 武田憲文, 小室一成. Hippo-YAP/TAZ-TEADs経路を標的とした、心

筋細胞増殖と心筋再生を促進する薬剤開発の試み. 第4回 Heart Science Club.  
(2016/12/17. 東京)(研究奨励賞)  
(13) 武田憲文. 心臓線維化の病態と制御. 第37回日本炎症・再生医学会. シンポジウム6「臓器線維化制御の戦略と臨床応用」  
(2016/6/16-17, 京都)  
(14) 原弘典, 武田憲文, 小室一成. 成体心筋細胞の分裂機序の解明と心筋再生療法への応用を目指して. 成人病の病因・病態に関する研究助成第21回研究研究会(TMFC)  
(2015/7/4-5, 大阪)

〔図書〕(計 1件)

(1) 武田憲文, 原弘典, 小室一成. 生体心筋細胞は分裂するのか? Annual Review 2015. 小室一成, 佐地勉, 坂田隆造, 赤阪隆史編集(中外医学社)p1-7, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称:新規化合物、並びにそれを有効成分とする心筋細胞増殖誘導剤および心筋の機能障害を伴う疾患の治療剤

発明者:小室一成、武田憲文、原弘典、内山真伸、斉藤竜男、畑裕

権利者:小室一成、武田憲文、原弘典、内山真伸、斉藤竜男、畑裕

種類:特許願

番号:特願 2016-244870

出願年月日:2016年12月16日

国内外の別:国内

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[https://cardiovasc.m.u-tokyo.ac.jp/study/cardiovascular\\_analysis](https://cardiovasc.m.u-tokyo.ac.jp/study/cardiovascular_analysis)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 憲文(TAKEDA NORIFUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:60436483

(2)研究分担者

(3)連携研究者

( )

(4)研究協力者