

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15987

研究課題名(和文) Hippo-YAP経路を標的とした心筋再生を促進する薬剤の開発

研究課題名(英文) Drug discovery targeting Hippo-YAP pathway for heart regeneration

研究代表者

原 弘典 (HARA, Hironori)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60792439

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)：成人において、心筋細胞は壊死しても再生することはないと思われてきたが、わずかながらに分裂し続けることが近年、明らかとなった。本研究では増殖を司るHippo経路の転写因子TEADsの転写活性を指標に、心筋細胞増殖と心筋再生を促進する薬剤の創出を試みた。約18,600種類の機能未知化合物ライブラリーから有効な化合物を選択し、さらに改変することで、マウス心筋梗塞モデルにおいて心臓線維化の軽減と心機能改善に有効な化合物を創出した。この化合物はヒトiPS細胞由来心筋細胞でも増殖効果を示しているため、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高齢化に伴い、虚血性心疾患・慢性心不全を患う患者数が増加している。既存の虚血性心疾患・慢性心不全に対する治療に、本研究のような「内因性の心筋再生の増幅」を用いた治療を併用することで、これまで以上の治療効果を期待できる。また、化合物による治療は、患者への侵襲・安全性や費用対効果などの点からも有効といえる。本研究の成果は、心疾患による死亡を減らし得るため社会に与える貢献も極めて大きいと考えられる。

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 TEAD activities in cardiomyocytes. We synthesized a novel fluorine-containing compound (TT-10) from the biologically hit compound. TT-10 treatment in mice ameliorated myocardial infarction-induced cardiac dysfunction. In addition, TT-10 markedly promoted cell cycle activation and increased cell division of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Stimulating cardiomyocyte proliferation and/or protection with TT-10 might complement current therapies for myocardial infarction.

研究分野：心筋再生

キーワード：心筋再生 Hippo経路 YAP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心疾患に伴う死亡数は年間約 20 万人と多く、特に、生活習慣病の増加とともに虚血性心疾患は増え続けている。虚血性心疾患に対する治療の一つとして経皮的冠動脈形成術が普及しているものの、広範な壊死心筋領域を伴った低心機能患者の予後は極めて不良であり、心移植ドナーが少ない本邦では、安全で効果的な新たな治療戦略の構築が喫緊の課題である。

従来、心筋細胞の増殖能は、生後に急激に低下し「成体心筋細胞は増殖しない」と考えられてきたが、近年、成体心筋細胞が僅かでも「ターンオーバー」していることが実証され(引用文献) 様々な臓器・組織の大きさ(増殖)を制御する Hippo-YAP/TAZ-TEADs 経路が、心筋細胞の増殖(発生期や傷害時)にも関与することが報告された(引用文献)。成体の心筋細胞が分裂能を保持・再獲得できるのであれば、この内因性心筋再生(増殖)のメカニズムを解明して増幅することは、従来の虚血性心疾患・心不全治療や開発中の細胞治療の効果を補足・促進する新たな治療手段の提供に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

虚血性心疾患・心不全治療に対する新規治療を提案するために、Hippo 経路の最終的な転写因子 TEADs の転写活性を指標に、心筋細胞増殖や心筋再生(修復)を促進する薬剤の創出を試みる。

3. 研究の方法

約 18,600 種類の機能未知化合物ライブラリーと次の 2 種類の上皮細胞系の cell assay を用いて、TEADs 転写活性を指標とした候補薬剤スクリーニング:

ヒト網膜色素上皮細胞に YAP と TEADs 応答レポーターを発現させて、化合物投与後のレポーター活性を指標に薬剤を選別する。

ヒト乳腺上皮細胞に野生型の TAZ を発現させた細胞は、TAZ が活性化されると浮遊状態で生存可能となりスフェア(mammosphere)を形成する現象をもとに TAZ 活性化薬を 1 次スクリーニングし、次に YAP と TEADs 応答レポーターを発現させた HEK293 細胞への効果を併せ持つ薬剤を選別する。

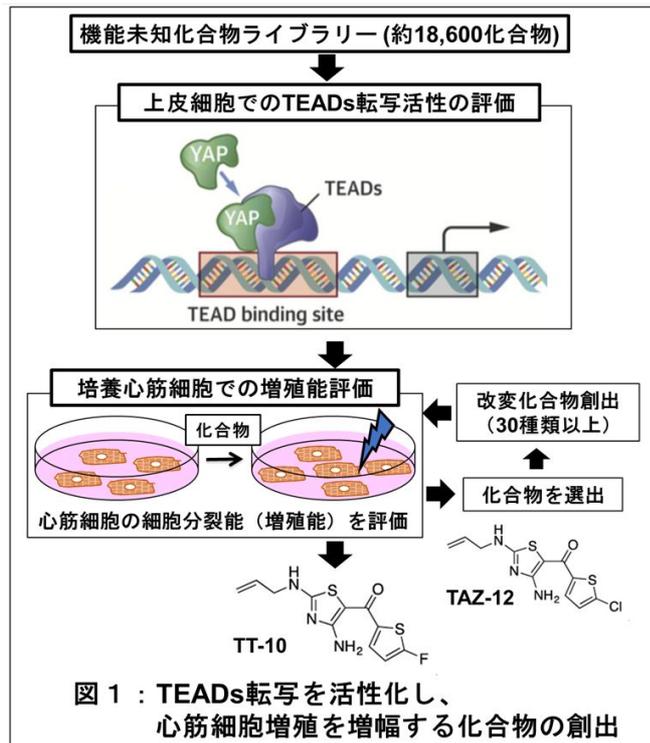
を施行した。

これらのスクリーニングから得られた化合物について、ラット培養心筋細胞を用いて、EdU 取り込み(核合成)や phosphohistone H3(核分裂)、aurora B kinase(細胞質分裂)への効果を免疫染色法にて評価し、心筋細胞の増殖能を増幅させる化合物を選択した。選択した化合物の側鎖改変作業を行い、細胞毒性が低く、心筋細胞での効果選択性が極めて高く、生体内安定性も考慮した化合物を創出した。この化合物の作用機序を検討するとともに、心筋梗塞モデルマウスへの効果、ヒト由来 iPS 心筋細胞への影響を評価した。

4. 研究成果

1) 化合物の創出

TEADs 転写活性を指標とした候補薬剤スクリーニングを行い、約 18,600 種類の化合物から 64 化合物を選出した。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 30 種類以上の側鎖改変作業を行い、改変した化合物の有効性を解析することで、TAZ-12 における活性中心構造を同定した。また、心筋細胞への毒性・効果選択性、さらには生体内安定性も考慮したフッ素化合物 TT-10 を創出した(図 1)。



2) 作用機序の検討

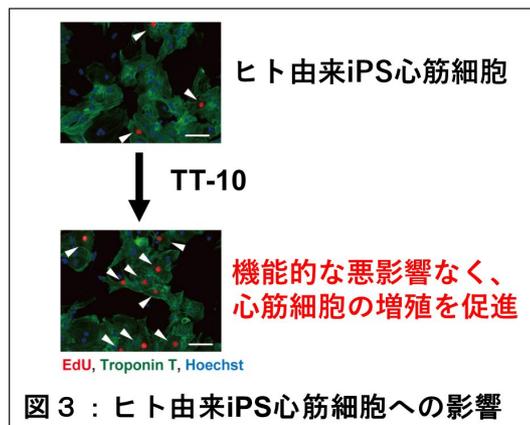
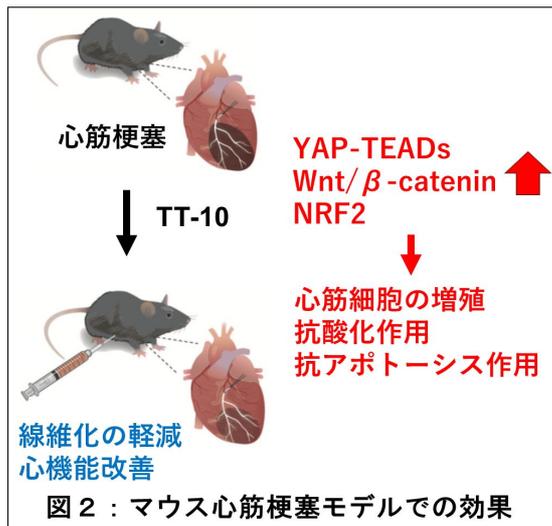
化合物 TT-10 は、心筋細胞でも YAP-TEADs 転写活性を促進し、さらに Wnt/ β -catenin 経路を活性化させることで、強力な増殖促進作用を発揮すると考えられた。また、薬剤を投与した心筋細胞の転写産物解析(RNA-seq)から、細胞周期の進行とサルコメア蛋白分解などの効果の他、酸化ストレス応答転写因子 NRF2 の効果(抗酸化・抗アポトーシス作用)も増強させていることを見出した。

3) マウス心筋梗塞モデルでの効果

マウス心筋梗塞モデルに TT-10 を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の促進とクローン性増殖が誘導され、心臓線維化軽減と心機能の改善にも効果的であった(図2、引用文献)

4) ヒト由来 iPS 心筋細胞への影響

TT-10 が健常者由来のヒト由来 iPS 心筋細胞の増殖も促進することを実証した。一方で、遺伝子発現、心筋細胞の拍動、細胞毒性を指標とした心筋細胞の機能評価では明らかな有害事象を認めなかった(図3、引用文献)



本研究のような「内因性の心筋再生の増幅」を用いた化合物治療は、増加しつつある虚血性心疾患・慢性心不全患者に対して、既存の治療に併用することでさらなる治療効果を期待することができる。今後、この化合物を臨床応用につなげていきたい。

<引用文献>

- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009 Apr 3;324(5923):98-102.
- Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, Martin JF. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 2011 Apr 22;332(6028):458-61.
- Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Murakami M, Qi X, McAnally J, Porrello ER, Mahmoud AI, Tan W, Shelton JM, Richardson JA, Sadek HA, Bassel-Duby R, Olson EN. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 20;110(34):13839-44.
- Hara H, Takeda N, Kondo M, Kubota M, Saito T, Maruyama J, Fujiwara T, Maemura S, Ito M, Naito AT, Harada M, Toko H, Nomura S, Kumagai H, Ikeda Y, Ueno H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Hata Y, Uchiyama M, Komuro I. Discovery of a small molecule to increase cardiomyocytes and protect the heart after ischemic injury. *JACC Basic Transl Sci*. 2018 Nov 12;3(5):639-653.
- Hara H*, Ito M*, Takeda N, Naito AT, Nomura S, Kondo M, Hata Y, Uchiyama M, Morita H, Komuro I. (*equally first contribution) Characterization of a small molecule that promotes cell cycle activation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 Jan 23;128:90-95.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- Hara H*, Ito M*, Takeda N, Naito AT, Nomura S, Kondo M, Hata Y, Uchiyama M, Morita H, Komuro I. (*equally first contribution) Characterization of a small molecule that promotes cell cycle activation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 Jan 23;128:90-95. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.01.020
- Hara H, Takeda N, Kondo M, Kubota M, Saito T, Maruyama J, Fujiwara T, Maemura S, Ito M, Naito AT, Harada M, Toko H, Nomura S, Kumagai H, Ikeda Y, Ueno H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Hata Y, Uchiyama M, Komuro I. Discovery of a

small molecule to increase cardiomyocytes and protect the heart after ischemic injury. JACC Basic Transl Sci. 2018 Nov 12;3(5):639-653. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.jacbts.2018.07.005
Hara H, Takeda N, Komuro I. Pathophysiology and therapeutic potential of cardiac fibrosis. Inflamm Regen. 2017 Jul 17; 37:13 (査読あり)
DOI: 10.1186/s41232-017-0046-5

〔学会発表〕(計6件)

Hara H, 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. 第82回日本循環器学会学術集会、2018年

Hara H, 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. 第1回日本循環器学会基礎研究フォーラム、2018年

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. 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, Discovery of a small molecule to increase cardiomyocytes and protect the heart after ischemic injury. 第21回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2017年

Hara H, 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. American Heart Association 2017 Scientific Sessions, Anaheim, USA, November 2017

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経路を標的として心筋細胞増殖・再生を促進する薬剤の開発. Molecular Cardiovascular Metabolic Conference 2017、2017年

原弘典、武田憲文、斉藤竜男、畑裕、内山真伸、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年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 武田 憲文

ローマ字氏名: Norifumi Takeda

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。