

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460261

研究課題名(和文)大規模ケミカルライブラリーを駆使した、新規心臓形成シグナルパスウェイの探索と解明

研究課題名(英文)Search of novel cardiogenesis signal pathway using large scale chemical library

研究代表者

伊藤 弓弦 (ITO, Yuzuru)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・研究グループ長

研究者番号：30500079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞や間葉系幹細胞を用いて、様々な臓器細胞を作り出し、創薬分野や再生医療分野に提供するための研究が世界中で行われている。効率的な新薬のスクリーニングや治療効果の高い再生医療を実現するには、高性能の細胞を供給する必要があるが、十分に機能する臓器細胞を作り出すことは、まだ難しい。そこで本研究では、大量の初期胚を使用することが出来るアフリカツメガエル初期胚を用い、化合物ライブラリーを駆使したスクリーニングを行い、心筋誘導に影響を与える新規化合物を探索した。その化合物により後期心筋細胞で特異的に発現する遺伝子の発現解析及び機能解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：Using pluripotent stem cells and mesenchymal stem cells, many researchers study to produce various organ cells and to provide them aiming to the drug discovery and regenerative medicine. In order to realize efficient screening of new drugs and regenerative medicine with high therapeutic effect, it is necessary to supply high-performance cells, but it is still difficult to produce fully functioning organ cells. Therefore, in this study, I used a compound library to screen novel compounds that affect myocardial induction using *Xenopus laevis* embryos that can use a large number of early embryos. Expression analysis and functional analysis of genes specifically expressed in late cardiomyocytes by the compound were advanced.

研究分野：発生生物学

キーワード：ツメガエル 心筋 化合物 発生

1. 研究開始当初の背景

近年ヒト ES 細胞や iPS 細胞などの多分化能を応用した再生医療研究が盛んに行われている。ところが、目的とする臓器・組織細胞への分化制御技術は依然として不十分なものばかりで、体系的な方法論も十分整理されていない。その理由の一つとして、従来の「原因遺伝子/変異体を元にした解析」に頼った手法から得られる成果が少なくなってきた点があげられる。また、制御技術を確認する際に、関連遺伝子の導入やタンパク性成長因子の添加に頼る事が多く、再現性、安全性、コストといった面から、再生医療技術としては満足できない事も指摘され続けている。それ故、異なるアプローチからの研究が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、上述の問題点を回避するため、大量の初期胚を手ででき、膨大な発生学的知見が蓄積したモデル生物であるアフリカツメガエル初期胚を用いて、大規模ケミカルライブラリーを駆使した、新規心臓形成シグナルパスウェイの探索と解明をすることを目的とした。特に3次元構造が生体内での機能に重要な心臓に焦点を絞り、哺乳類胚では不可能な胚内の心臓形成に対する影響を、ケミカルライブラリー等を用いて解析することを目指した。

3. 研究の方法

先ず始めにツメガエル初期胚を用いて、シグマ社等から購入した化合物ライブラリーの心臓形成に対する影響を解析し、心臓形成に関与する候補化合物のリスト化を行う。続いて、リスト化された候補化合物の作用機序解析を切り口に、心臓形成シグナルパスウェイを補完する。その情報を元に、哺乳類 ES/iPS 細胞での機能を検証し、再生医療に出口を見据えた革新的心臓分化制御技術を実現する。

4. 研究成果

平成26年度は、数百種の化合物が搭載された化合物ライブラリーを準備し、アフリカツメガエル初期胚に対して処理、スクリーニング実験を行った。(図1)

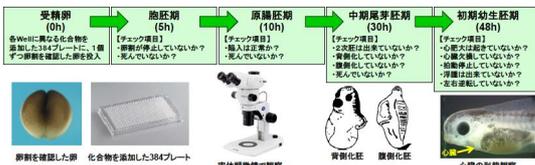


図1 スクリーニングのスキーム

その結果、1種類の化合物(プロテオグリカンの生合成経路に対する阻害効果が、先行研究で報告されている)に心臓形成に対する強い影響が観察された。そこで、当該化合物に

関して、濃度、処理開始時間、処理時間の最適値を検討した。決定した濃度で処理した胚を用い、尾芽胚期及び初期幼生胚期に whole mount in situ hybridization 法を行い、Nkx2.5 及び cardiac troponin I 等心臓マーカーの発現を解析したところ、発現減少が観察された。(図2)

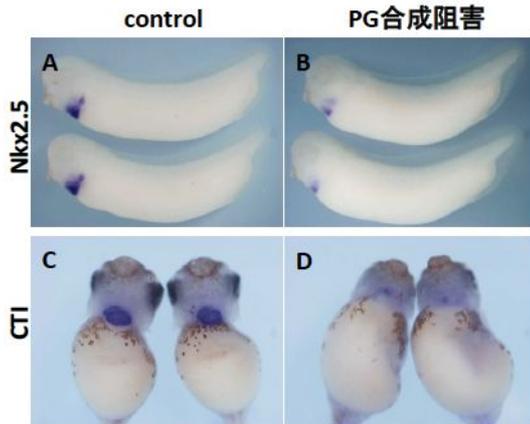


図2 コントロール胚及び処理胚における心臓原基マーカー Nkx2.5(A,B) 及び Cardiac troponin I (C,D) の発現解析
PG 合成処理胚において、心臓形成が阻害されていることが示された。

平成27年度は、当該化合物の機能解析をさらに進めてきた。さらに処理胚に対して DNA マイクロアレイ解析等を行った結果、これまで明らかになっていなかった後期心筋細胞で特異的に発現する遺伝子を誘導することが分かってきた。(図3)

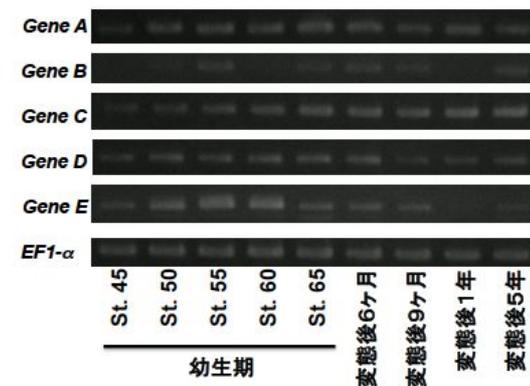


図3 新規スクリーニングした遺伝子の発現解析
GeneA~GeneE まで、どの遺伝子も心臓において、経時的に発現が観察された。

心筋細胞の誘導系において、成熟した心筋を誘導することは一つの重要な問題となっているが、当該申請研究からその問題の解決が期待される結果が出てきた。

一方、さらにスクリーニングの種類をこなすべく、スクリーニングを続行したが、有力な候補因子は追加されなかった。よって、最終年度は、これまでにスクリーニングした遺伝子に関して、さらに解析を進めることにした。

平成28年度は、心筋誘導に影響を与えた化合物によって誘導され、後期心筋細胞で特異的に発現する遺伝子の発現解析及び機能解析を進めてきた。また、ヒト/マウス等哺乳類におけるオルソログ遺伝子の機能をKnowledgeベースで調べたところ、どの遺伝子も心臓での発現及び機能は報告されていなかったが、

Gene A: 脳神経、内耳等神経発生への関与

Gene B: 骨格筋の発生への関与

Gene C: 胎盤、肺、血管、血球、骨格筋の発生への関与、及び未分化性の維持

Gene D: 報告なし

Gene E: 血管の発生への関与、性決定といった機能を持つことが予測された。

心筋細胞の誘導系において、成熟した心筋を誘導することは一つの重要な問題となっているが、当該申請研究からその問題の解決が期待される結果が出てきた。

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 16 件)

Session AM, Uno Y, Kwon T, Chapman JA, Toyoda A, Takahashi S, Fukui A, Hikosaka A, Suzuki A, Kondo M, van Heeringen SJ, Quigley I, Heinz S, Ogino H, Ochi H, Hellsten U, Lyons JB, Simakov O, Putnam N, Stites J, 45名中略, Ito Y, Asashima M, Ueno N, Matsuda Y, Veenstra GJ, Fujiyama A, Harland RM, Taira M, Rokhsar DS. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*. 査読有, 538, 2016, 336-343.
DOI: 10.1038/nature19840.

Haramoto Y, Saijyo T, Tanaka T, Furuno N, Suzuki A, Ito Y, Kondo M, Taira M, Takahashi S. Identification and comparative analyses of Siamois cluster genes in *Xenopus laevis* and *tropicalis*. *Dev Biol*. 査読有, 2016, in press.
DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.07.015.

Haramoto Y, Takahashi S, Oshima T, Onuma Y, Ito Y, Asashima M. Insulin-like factor regulates neural induction through an IGF1 receptor-independent mechanism. *Sci Rep*. 査読有, 5, 2015, 11603.
DOI: 10.1038/srep11603.

Ogawa-Otomo A, Kurisaki A, Ito Y. Aminolevulinate synthase 2 mediates erythrocyte differentiation by regulating larval globin expression during *Xenopus* primary hematopoiesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 456, 2015, 476-81.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.110.

Haramoto Y, Oshima T, Takahashi S, Ito Y. Characterization of the insulin-like growth factor binding protein family in *Xenopus tropicalis*. *Int. J. Dev. Biol*. 査読有, 58, 2014, 705-711.
DOI: 10.1387/ijdb.150032yi.

[学会発表](計 10 件)

山田しおり、原本悦和、小沼泰子、鈴木理、伊藤弓弦、ツメガエルを用いた幼若型心筋細胞から成体型心筋細胞への変換メカニズムの解析、第15回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2016年2月2日、産業技術総合研究所(茨城県・つくば市)

狩野絵吏子、原本悦和、二宮裕将、有泉高史、王碧昭、伊藤弓弦、中胚葉誘導因子に対する応答能の両生類間の比較、第15回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2016年2月2日、産業技術総合研究所(茨城県・つくば市)

梶山康平、王碧昭、伊藤弓弦、アフリカツメガエルを用いた初期心臓形成に関わる遺伝子の解析、平成26年度つくば学生研究交流会、2015年3月3日、筑波大学(茨城県・つくば市)

Yoshikazu Haramoto, Tomomi Oshima, Shuji Takahashi, Makoto Asashima, Yuzuru Ito, Comparative analysis of insulin-like growth factor binding proteins. 15th International *Xenopus* Conference, 2015年8月24日、(California City, USA)

原本悦和、高橋秀治、小沼泰子、伊藤弓弦、浅島誠、Functional analysis of a novel insulin-like factor、第47回日本発生活物学会、2014年5月28日、ウインクあいち(愛知県・名古屋市)

[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]

平成26年産総研一般公開にて、研究成果のアウトリーチ活動(2014/07/19)

平成 26 年産総研一般公開にて、研究成果
のアウトリーチ活動（2015/07/18）

平成 26 年産総研一般公開にて、研究成果
のアウトリーチ活動（2016/07/23）

6．研究組織

(1)研究代表者

伊藤 弓弦（ITO, Yuzuru）
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創
薬基盤研究部門・研究グループ長
研究者番号：3 0 5 0 0 0 7 9

(2)研究分担者

(3)連携研究者

原本 悦和（HARAMOTO, Yoshikazu）
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創
薬基盤研究部門・主任研究員
研究者番号：3 0 5 4 0 8 6 9

(4)研究協力者

山田 しおり（YAMADA, Shiori）
狩野 絵吏子（KANO, Eriko）
梶山 康平（KAJIYAMA, Kouhei）