

## 論文の内容の要旨

論文題目 心筋細胞分裂能の増幅・制御による心筋再生医療を目指した研究

氏名 原 弘典

### [序文]

心疾患に伴う死亡数は年間約 20 万人と増加しつつある。今後も生活習慣病の増加に伴い、冠動脈の動脈硬化によって生じる虚血性心疾患はさらに増えると予想される。しかし、低心機能に至った重症患者に十分有効といえる治療はない。そのため、安全で効果的な新たな治療戦略が必要であり、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)などを用いた細胞治療、筋芽細胞を培養して作成した心筋細胞シートの移植、非心筋細胞の心筋細胞へのダイレクトリプログラミングなど様々な治療が検討されている。

一方で、近年、増殖することはないと考えられてきた成人の心筋細胞が、既存の心筋細胞が分裂することでわずかながら増殖していることが示された。既存心筋細胞の分裂を促すことによる再生医療は安全で効率的な治療となり得る。

従来、心筋細胞の分裂評価が免疫組織染色だけであったこともあり、心筋細胞の分裂機序は十分には解明されていない。新たに開発された生細胞の細胞周期インディケーター蛍光プローブ Fucci では生きたまま細胞を解析できる。心筋細胞にも応用されており、分裂機序解明の手助けとなることが期待されている。

本研究では、細胞の増殖能に関与し臓器や器官の適切な大きさを決める Hippo 経路が、哺乳類成体心筋細胞の増殖にも関与していることに着目した。Hippo 経路の活性化状態では、転写補因子 YAP、TAZ がリン酸化され、リン酸化された YAP、TAZ は 14-3-3 に捕捉されて核外にとどまる。一方、Hippo 経路不活化状態では YAP、TAZ が核内に移行し、転写因子 TEAD などと共役することで、細胞周期を回す遺伝子や細胞死を抑制する遺伝子の転写が行われる。

Hippo 経路の転写補因子 YAP は、成体よりも胎児で多く発現し、心筋細胞増殖に関与している。心筋細胞特異的に YAP を欠損または活性化させると、心臓は低形成または過形成になるとの報告もある。Hippo 経路を標的とした薬剤は、心筋再生を促進することで、重症心不全患者に奏功する可能性がある。癌治療領域で YAP、TAZ を抑制する薬剤開発が行われているが、再生医療への応用を検討されている YAP、TAZ を活性化する薬剤は存在しない。そのため、YAP、TAZ の活性化を指標に心筋再生医療に応用可能な化合物を探索し、心筋再生の機序を検討することとした。

## [方法]

東京医科歯科大学疾患生命科学研究部ケミカルライブラリーセンター所有化合物を対象とし、東京医科歯科大学大学院病態代謝解析学分野畑裕教授研究室で  $10 \mu\text{M}$  の濃度にて下記スクリーニングを行った。

YAP を活性化する化合物の選択には、ヒト網膜色素上皮細胞に YAP と TEAD 応答プロモーターの下で H2B mCherry を発現するレポーターを組み込み、レポーター活性を指標に 47 候補化合物(YAP 1-YAP 47)を選択した。

また、TAZ を活性化する化合物の選択には、ヒト乳腺上皮細胞(MCF10A 細胞) に野生型の TAZ を発現させてもスフェアを形成しないが、TAZ の 89 番目のセリンをアラニンに置換したことでリン酸化を受けず、核内にとどまる TAZ S89A(核内型)を発現させるとスフェアを形成する現象を利用した。MCF10A 細胞に野生型の TAZ を発現させた細胞株に化合物を投与し、スフェアを形成した 50 化合物を選択した。これらの化合物は、YAP と TEAD 結合配列レポーターを発現させた HEK293 細胞にも投与し、レポーター活性を指標に 17 候補化合物(TAZ 1-TAZ 17)に絞り込んだ。以上、TAZ 1-TAZ 17 と YAP 1-YAP47 の計 64 化合物を使用した。

心筋での効果検討ではラット新生児初代培養細胞に化合物を投与し、免疫組織学染色で核合成 (EdU)、核分裂(phospho-Histone H3(pH3))、細胞質分裂(Aurora B)を確認して評価した。毒性試験は MTS assay で行い、心筋細胞以外の線維芽細胞、H9C2 細胞、NIH3T3 細胞でも施行した。

心筋細胞の分裂をより促進しうる化合物を得るため、上記評価で選択した化合物の改変も行い、改変した化合物でも同様に評価をした。さらに、新たに作成した心筋特異的に Fucci が発現する組み換えアデノウィルス cTnT-Fucci G1、cTnT-Fucci G2 を使用しての細胞周期評価も追加した。これらの評価からもっとも心筋細胞の分裂を促進しうる化合物を選択した。

選択した化合物では作用機序も検討した。TEAD 結合配列レポーターの評価、さらには Hippo 経路とクロストークすることが知られている Wnt シグナル経路、TGF $\beta$  シグナル経路への作用も確認するため、各々、TCF-LEF 応答配列、SMAD 結合配列レポーターの評価もした。作用が考えられる経路に対して、関与する蛋白の発現、mRNA の発現も確認した。

## [結果]

培養心筋細胞に選択した 64 化合物を  $10\ \mu\text{M}$  の濃度となるように投与し、まず核合成の指標となる EdU の評価を行い、陰性コントロールと比較して非劣性であった 17 化合物を選択した。これらの 17 化合物を対象に、EdU 陽性率を再評価、さらに、核分裂の指標となる pH3 も評価し、核合成、核分裂ともに陰性コントロールと比較して非劣性であった TAZ 12、YAP 22、YAP 26 を選択した。この 3 化合物に対して、EdU、pH3、Aurora B の評価と毒性試験(MTS assay)を施行した。MTS assay は心筋細胞以外に、線維芽細胞、H9C2 細胞、NIH 3T3 細胞でも評価をした。EdU、pH3、Aurora B すべての陽性率が上昇した化合物の中で最も細胞質分裂を促進し、さらに確認したすべての細胞種で毒性のないことが確認できた TAZ 12 を、心筋細胞の分裂を促進しうる化合物として選択した

選択した TAZ 12 の側鎖を改変し、TAZ E、TAZ K、TAZ N を合成した。各々の化合物で EdU 取り込み効果を評価し、最も有効な TAZ K を選択した。選択した TAZ K では、心筋細胞での EdU、pH3、Aurora B の陽性率が TAZ 12 より上昇し、MTS assay で毒性のないことを確認した。また作成した組み換えアデノウイルス cTnT-Fucci G1、cTnT-Fucci G2 を用いての評価でも TAZ K を投与することで分裂期にあたる S/G2/M 期の細胞が増加していた。

TAZ K の作用機序を検討するため、NIH3T3 細胞と心筋細胞で TEAD 結合配列レポーターアッセイを行った。TAZ 12、TAZ K とともに TEAD 結合配列レポーター活性の上昇を認めた。しかし、YAP、TAZ を過剰発現させても、TEAD 結合配列レポーターアッセイの効果で相乗効果は見られず、YAP、TAZ を直接は介さない可能性が考えられた。YAP、TAZ への直接の関与を検討するため、YAP、TAZ をノックダウンした上で TAZ 12、TAZ K を投与したところ、EdU 陽性率の上昇効果は残存していた。

また、Hippo 経路では、YAP、TAZ が非リン酸化状態で核内に移行、TEAD と結合して転写が開始される。そのため、心筋細胞に TAZ 12、TAZ K を投与した際の YAP、TAZ 蛋白の発現とリン酸化の評価も行ったが、YAP、TAZ 蛋白の発現、リン酸化ともに有意な変化は認めなかった。

Hippo 経路とクロストークすることが知られている Wnt シグナル経路、TGF $\beta$  シグナル経路との関連を調べるために、各々 TCF-LEF 応答配列、SMAD 結合配列レポーターアッセイの評価も施行した。YAP、TAZ を過剰発現させても、各々のレポーター活性の有意な上昇はないものの、TAZ K の投与で有意に TCF-LEF 応答配列レポーター活性が上昇し、Wnt シグナル経路の標的遺伝子の発現も上昇していた。Wnt シグナル経路に関与する蛋白の発現を確認したところ、GSK3 $\beta$  を活性化する GSK3 $\beta$  (Tyr216) のリン酸化が低下し、Active  $\beta$  catenin(非リン酸化  $\beta$  catenin)の発現が増加していたことから化合物 TAZ K は GSK3 $\beta$  の阻害効果を持ち、Wnt シグナルを活性化することが示された。

また、TAZ K の投与により、サルコメアに関与する遺伝子の発現が低下する一方で、細胞増殖、抗アポトーシス、抗酸化に関連する遺伝子の発現の上昇を認めた。

## [考察]

増殖することはないと考えられてきた成人の心筋細胞が、2009年にわずかながら増殖していることが示され、その後、成人、成体マウスの心筋細胞が増殖していることを示唆する報告が相次いでいる。心筋細胞分裂を促す可能性のある蛋白および化合物として Neuregulin 1、Periostin、Smoothed Agonist などが報告されており、Neuregulin 1 は臨床治験も行われているが、十分な有効性を示す結果には至っていない。

心筋再生医療への応用をめざし、遺伝子改変モデルマウスで心筋再生への関与が報告されている Hippo 経路を標的とすることとした。ハイスループットスクリーニングが可能である上皮細胞の細胞株を用いてのスクリーニングで選択された YAP、TAZ を活性化する化合物を対象とし、心筋細胞への効果を新生児ラット初代培養心筋細胞で検討した。上皮細胞で YAP、TAZ を活性化する化合物であるため、多くの化合物が有効であると想定していたが、陰性コントロールとの非劣性の選択で3化合物にまで絞られた。3化合物からの選択では、創薬において安全性の確保が求められるため、他細胞種での毒性も確認し、有効性、安全性のいずれも満たす化合物、TAZ 12 を選択した。

側鎖を改変することで、より心筋細胞での核分裂、核合成、細胞質分裂を促しうる化合物 TAZ K を合成できた。TAZ K では溶解可能な  $25 \mu\text{M}$  の濃度までで毒性試験を行い、毒性がなく、安全であることを確認した。その上で、化合物の具体的な作用機序を検討した。

TEAD 結合配列レポーターアッセイ、YAP、TAZ の過剰発現あるいはノックダウンを利用したの検討、YAP、TAZ 蛋白の発現・リン酸化の確認から、TAZ K は Hippo 経路における TEAD を介した転写の活性化作用を持つが、YAP、TAZ に直接作用する訳ではないと考えられた。

Hippo 経路とのクロストークが知られている Wnt シグナル経路を検討した結果、TAZ K は GSK3  $\beta$  の阻害効果を持ち、Wnt シグナル経路を活性化することも分かった。

心筋細胞への TAZ K の投与は、Hippo 経路における TEAD を介した転写を活性化し、Wnt シグナル経路も活性化する。しかし、これらでは説明できない抗酸化作用に関連する遺伝子発現の増加なども認めており、さらなる作用機序の検討が必要である。また、心筋梗塞モデルマウスなどでの効果検証も進めていく予定である。