

Hippo-YAP 経路を標的とした新規心筋再生治療の開発

原 弘典

東京大学医学部附属病院

【研究の背景】

心疾患に伴う死亡数は年間約 20 万人と多く、生活習慣病の増加とともに虚血性心疾患や心不全の患者数は増加している。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、安全で効果的な新たな治療戦略が求められている。

従来、成体心筋細胞は増殖しないと考えられてきたが、近年、成体心筋細胞も、主に既存の心筋細胞が分裂することで、僅かながら自己再生しており、その機序として「既存の心筋細胞の分裂」が注目されている¹⁾。また、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)に関与することも報告されている^{2,3)}。成体心筋細胞の増殖メカニズムを解明し増幅することができれば、従来の虚血性心疾患・心不全治療の効果を補足・促進する新たな治療手段の提供に繋がる可能性がある。

【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を試みる。

【方 法】

約 18,600 種類の機能未知化合物ライブラリーに対して、YAP-TEADs 転写活性を指標とした薬剤スクリーニング:

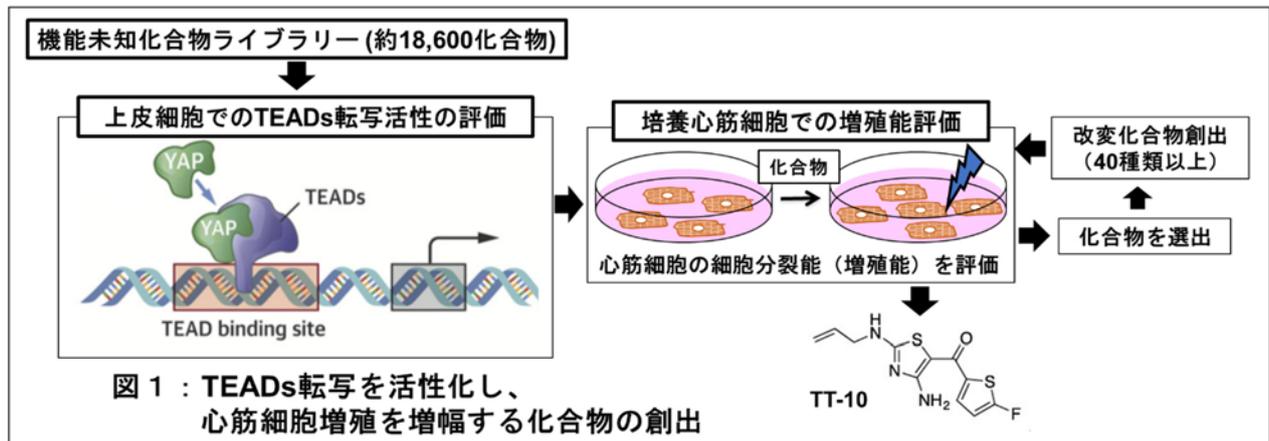
- ① ヒト網膜色素上皮細胞に YAP と TEADs 応答レポーターを発現させて、化合物投与後のレポーター活性を指標に薬剤を選別する
 - ② ヒト乳腺上皮細胞に野生型の TAZ を発現させた細胞は、TAZ が活性化されると浮遊状態で生存可能となりスフェア(mammosphere)を形成する現象をもとに TAZ 活性化薬を 1 次スクリーニングし、次に YAP と TEADs 応答レポーターを発現させた HEK293 細胞への効果を併せ持つ薬剤を選別する
- を施行した。

これらのスクリーニングから得られた化合物をラット培養心筋細胞に投与し、EdU 取り込み(核合成)、phosphohistone H3(核分裂)、aurora B kinase(細胞質分裂)を免疫染色法にて評価することで、心筋細胞の増殖を促進させる化合物を選択した。選択した化合物の改変作業を行い、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。

【結 果】

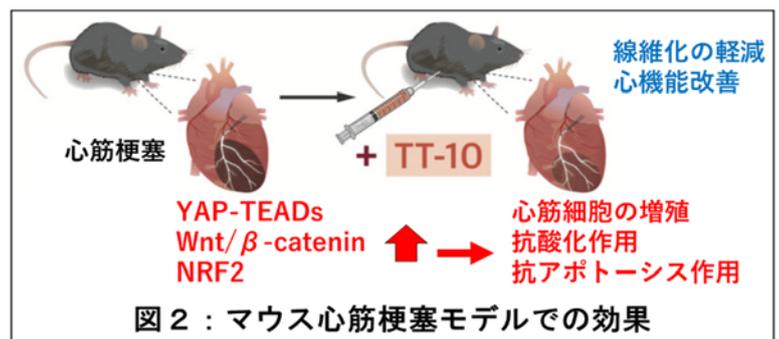
1) 化合物の創出

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。特に効果の高かった化合物 2 種類を対象に、40 種類以上の改変作業を行い、改変した化合物の有効性を解析、活性中心構造を同定した。特に、フッ素化合物 TT-10 は細胞毒性が低く、心筋細胞への効果選択性が高かった(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、GSK3 β 阻害効果による Wnt/ β -catenin 経路の活性化作用も持ち合わせ、強力な増殖促進作用を示した。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、抗酸化・抗アポトーシス作用を持つことを明らかにし、その作用が NRF2-KEAP1 複合体の形成を阻害することによることも見出した。

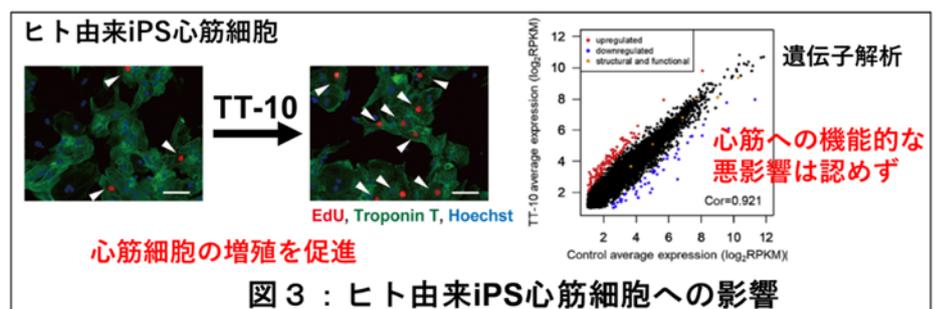


3) マウス心筋梗塞モデルでの効果

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。これらが、YAP の活性化による細胞増殖作用と、抗酸化・抗アポトーシス作用による心筋保護効果とによることも明らかとした(図 2)⁴⁾。

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)⁵⁾。



【考 察】

Hippo-YAP 経路を標的とした細胞アッセイ系を用いて、心筋細胞増殖作用と心筋障害に対する保護作用を併せ持つ化合物を創出し、ヒト由来 iPS 心筋細胞の増殖効果も実証した。重症心不全・虚血性心疾患患者に対する新たな治療を提供しうるとともに、心筋細胞の分裂機序解明にも貢献できると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

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ため、臨床的意義も極めて大きい。

【参考・引用文献】

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Ito M*, Hara H*, 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.