

## 卵膜由来間葉系幹細胞を用いた新規心筋細胞分化誘導法の開発 —GSK-3 の活性化による分化誘導促進—

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	イシカネ シン 石 兼 真
所属等	産業医科大学 医学部 助教
プロフィール	2010年福岡大学大学院薬学研究科博士課程修了、博士（薬学）。国立循環器病研究センター研究所再生医療部流動研究員、同研究所生化学部特任研究員、福井大学医学部生命情報医科学講座特命助教を経て、2015年より現職の産業医科大学医学部薬理学講座助教に。学生の頃より循環器疾患に興味を持ち、血管病変が関与する心筋梗塞や閉塞性動脈硬化症、がんなどの難治性疾患に対する新しい治療法の開発を目指して研究を進めている。日本薬理学会、日本臨床薬理学会、日本癌学会に所属。

### 1. 研究の概要

産業医学において、労働環境に起因する肉体的・精神的ストレスは様々な疾患リスクを増加させると考えられており、過労死の要因の一つに心不全がある。心不全の発症後は、生活習慣の改善、薬物治療、バイパス術などの治療を受けながら就労する患者が多いが、根本的な治療には至らないため身体活動が制限されるケースも多く、生活の質（QOL）の低下が懸念される。

近年、様々な細胞へと分化することのできる多能性幹細胞を用いた再生医療が注目され、国内外で研究が盛んに行われている。2015年には、間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells; MSC）を用いた急性移植片対宿主病に対する再生医療製品として「テムセル HS 注」が保険適用医薬品として承認・販売され、再生医療が臨床治療に用いられるようになってきている。

循環器分野においても MSC 移植による治療効果が基礎・前臨床研究にて報告されており、重度の心不全患者に対する心臓移植や人工心肺の使用に変わる新たな根本的治療法として期待されている。しかし、細胞移植療法を臨床応用へと用いるためにはクリアすべき課題が多く残されており、移植した細胞が生体内で長期間生存することができないため、時間経過とともに生存細胞数が減少する「低生着率」と、わずかに生着した細胞でも目的の細胞に分化する割合が非常に少ない「低分化率」は、現時点における細胞移植療法の治療効果を限定的なものにしているとして、早期改善が渴望されている。

本研究では、心筋梗塞患者へのMSC移植療法において、移植細胞の心筋細胞への分化効率を改善することで、より効果的な細胞移植療法を確立することを目的として、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3（GSK-3）の活性化薬を用いたMSC分化誘導効率の改善に関する研究を行った。

### 2. 研究の動機、目的

MSC の分化誘導効率を改善する取り組みは様々な手法で行われており、ウイルスベクターなどを用いた遺伝子導入法も検討されているが、十分な分化効率を得ることはできていないことに加え、安全性の面から臨床応用については慎重な意見も多い。そこで、臨床での使用に影響が少ない方法で MSC の分化誘導効率を改善すべく検討を行った。

当講座では、GSK-3 をターゲットとした創薬研究を行っているが、幹細胞の分化能調節に GSK-3 が重要な役割を有しているとの報告がある。しかし、その関与メカニズムについては明

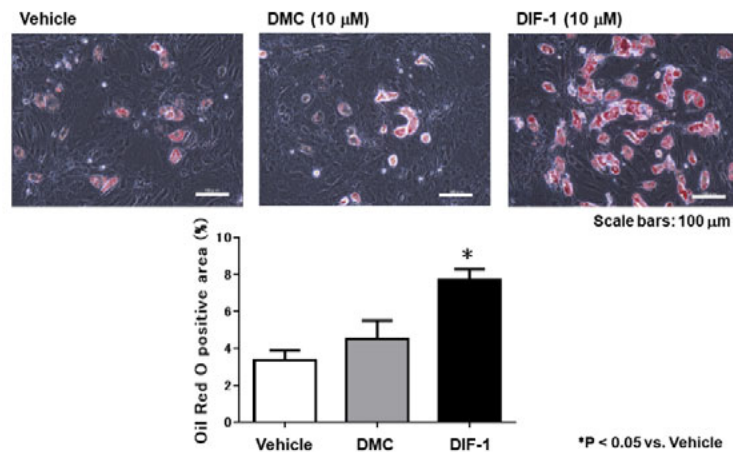
らかになっておらず、分化誘導効率改善を目的とした応用には至っていない。申請者は、GSK-3 のホモノックアウトマウスは胎生致死性であり、その原因の一つに心臓形成不全があることに着目し、GSK-3 の活性化が心筋細胞への分化過程において促進的に作用しているのではないかと仮説を立てた。

本研究では、GSK-3 活性化作用を有する 2,5-Dimethyl celecoxib(DMC) と Differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) を用いて、MSC の分化誘導効率の改善作用や分化調節機序を明らかにすることにより、マウス心筋梗塞モデルを用いた *in vivo* 解析、大動物を用いた前臨床研究へとステップアップするための基礎的研究を行った。

### 3. 研究の結果

#### (1) DMC、DIF-1 による MSC の脂肪細胞分化効率の変化

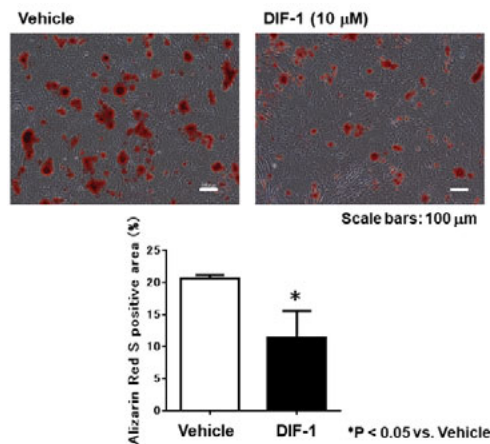
ラット MSC に対し、DMC (10  $\mu$ M)、DIF-1 (10  $\mu$ M) を前処置し、48 時間後に脂肪細胞分化誘導メディウムにて分化誘導を行った。14 日後、オイルレッド O 染色にて脂肪細胞への分化効率を評価した。DMC 処置群では、Vehicle 処置群と比較してオイルレッド O 陽性細胞数の変化は確認されなかったが、DIF-1 処置群では有意なオイルレッド O 陽性細胞の増加が確認された (図 1)。この結果より、DIF-1 は MSC の脂肪細胞への分化誘導促進作用を有することが示唆された。



【図 1. MSC の脂肪細胞分化に対する DMC、DIF-1 の作用】

#### (2) DIF-1 による MSC の骨芽細胞分化効率の変化

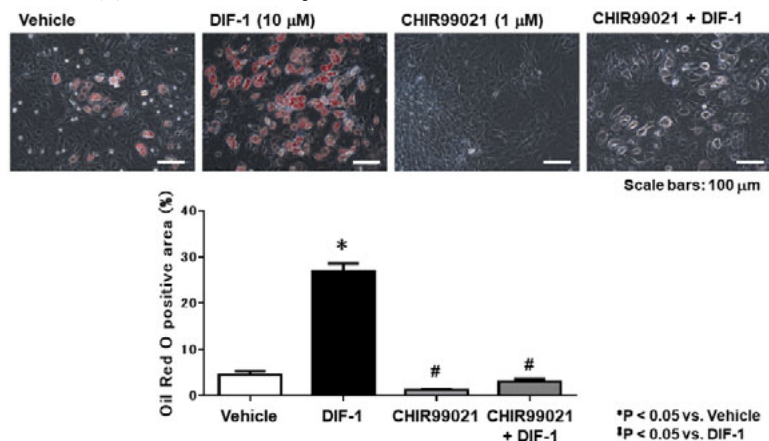
ラット MSC に対し、DIF-1 (10  $\mu$ M) を前処置し、48 時間後に骨芽細胞分化誘導メディウムにて分化誘導を行った。21 日後、アリザリンレッド S 染色にて骨芽細胞への分化効率を評価した。DIF-1 処置群では、Vehicle 群と比較して有意なアリザリンレッド S 陽性部位の減少が確認された (図 2)。この結果より、DIF-1 は MSC の骨芽細胞への分化誘導抑制作用を有することが示唆された。



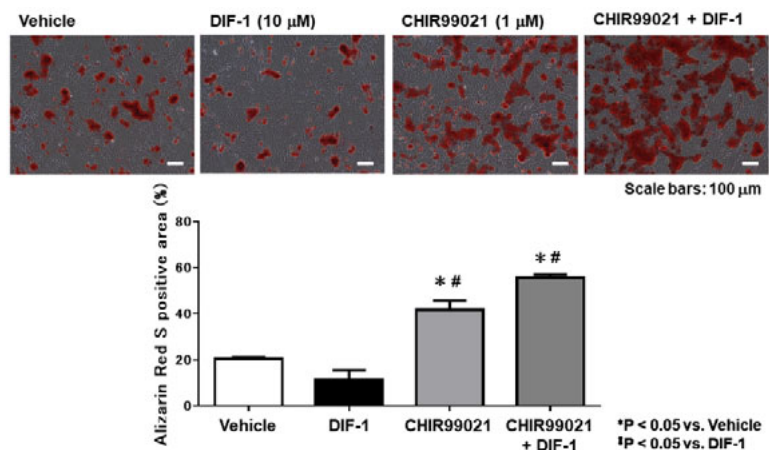
【図 2. MSC の骨芽細胞分化に対する DMC、DIF-1 の作用】

### (3) GSK-3阻害剤によるDIF-1の分化誘導調節作用の変化

ラット MSC に対し、GSK-3 阻害剤 (CHIR99021, 1 $\mu$ M) を前処置し、30 分後に DIF-1 (10  $\mu$ M) を添加した。48 時間後に脂肪細胞分化誘導メディウム、もしくは骨芽細胞分化誘導メディウムにて分化誘導を行った。DIF-1 による脂肪細胞への分化促進作用 (図 3)、骨芽細胞への分化抑制作用は GSK-3 阻害剤により有意に抑制された (図 4)。また、GSK-3 阻害剤単独処置群では、脂肪細胞への分化抑制作用、骨芽細胞への分化促進作用が確認された。この結果より、GSK-3 は MSC の分化誘導に重要な役割を有しており、その活性調節により幹細胞分化を制御できる可能性があることが明らかになった。



【図 3. DIF-1 による脂肪細胞分化促進作用に対する GSK-3 阻害剤の作用】



【図 4. DIF-1 による骨芽細胞分化抑制作用に対する GSK-3 阻害剤の作用】

## 4. これからの展望

本研究成果から、GSK-3 が MSC の分化制御に大きく関わっており、その調節作用により目的細胞への分化誘導効率を改善できることが示唆されました。GSK-3 の活性調節は、MSC 移植療法を臨床応用へと発展させるにあたり大きな課題となっている「低分化効率」を克服することができる可能性があります。現在、GSK-3 調節薬を用いて、MSC の心筋細胞への分化誘導効率を改善すべく研究を進めています。本研究成果は、心筋への分化効率を改善するだけでなく、多能性維持による他の分化系統 (血管内皮細胞、神経、肝細胞など) においても応用が可能であると考えられます。

加えて、細胞移植療法において、分化効率と同様に移植細胞生着率の改善が望まれています。DIF-1 が関与するシグナルには移植 MSC の生存に関わる因子があり、分化効率だけではなく、移植細胞の生着性を改善できる可能性があります。今後の展開として、GSK-3 調節により作製した“高心筋分化誘導型 MSC シート”を *in vivo* 移植実験へと発展させる際、分化効率、生着率のさらなる改善を期待して、DIF-1 の経口投与を細胞移植と組み合わせることを計画しており、より安全かつ効果的な細胞移植療法の確立に向けて研究を進めていきたいと考えています。

現在、主に基礎研究を進めていますが、今後は得られた研究成果をもとに臨床研究にも取り組みたいと考えています。将来的には、基礎と臨床を組み合わせた包括的な研究課題を遂行できる環境を整え、大学だけでなく病院勤務の方々ともコラボレーションした研究にも取り組んでいきたいと考えています。

## 5. 社会に対するメッセージ

再生医療は、難治性疾患に対する新たな治療法になるポテンシャルを持っていると考えられます。皮膚や角膜、軟骨などの構成細胞が少ない組織に対する細胞移植療法は臨床応用例も増えてきていますが、十分な治療効果を得るためにはさらなる改善が必要です。また、様々な細胞によって複雑に構成された臓器を再生させるには、これからも多くの時間と研究が必要だと考えられます。本研究成果から、MSCの分化制御にGSK-3が関与しており、DIF-1が分化調節薬として有用であることが示唆されました。DIF-1による詳しい分化制御機序については更なる解析が必要ですが、MSC移植療法の治療効果改善に有用である可能性があり、より効果的な細胞移植療法の開発へと発展させることで、難治性疾患に苦しむ方々の治療に貢献できるよう研究を進めていきたいと考えています。

本研究では、DIF-1のMSC分化誘導調節薬としての可能性を見出すことで、これまでの研究をさらに進める手がかりをつかむことができました。この研究を遂行するにあたり、ご支援を頂いたことを心より感謝申し上げます。