

受けた製品については、新審査方式での販売承認を再取得しなければ、遺伝子治療薬・体細胞治療薬の場合には2011年末、組織工学製品の場合には2012年末に販売承認が取り消されることになっている。EMAはEUの医薬品産業の強化に必要な新技術の開発支援に積極的な姿勢を示しており、開発者に対するATMPに関する科学的助言や、中小開発企業の非臨床・品質データの暫定認証を行ったりすると同時に、研究開発が進むiPS細胞等の多能性幹細胞を加工したATMPに関する特別な留意点をまとめた文書を公表するなどしている。なお、EMAはあくまで販売承認審査を行う機関であり、臨床試験の開始・実施に関する手続きは加盟国の管轄となっている。加盟各国の規制当局もそれぞれ独自に、商業目的・非商業目的に拘わらず臨床試験開始前の開発早期から相談を安価ないし無料で受け付けるなど、ATMPの開発支援に積極的である。

#### 4 米国の規制

米国ではヒト細胞・組織を利用した製品および遺伝子治療薬はHCT/P (human cell, tissue, or cellular/tissue-based product) と総称される。中でも細胞に一定以上の加工を施したものや遺伝子治療薬などは、州を越えて流通させる場合には公衆衛生サービス法351条により食品医薬品局(FDA)の販売承認が必要とされ、351HCT/Pと呼ばれる。EUとは異なり、351HCT/Pはその主な作用様式が細胞・組織の生化学的・免疫学的又は代謝的機能に基づく場合には生物製剤、細胞・組織の物理的又は構造的機能の場合には医療機器としての規制を受ける。これまでに2品目が生物製剤、5品目が医療機器として販売承認を受けている。EU同様、製品化を目的とするかどうかに関わらず、351HCT/Pの臨床試験を行う場合には、FDAに申請して承認を得る必要がある。近年の351HCT/Pの臨床試験申請の過半数は大学などによる非商業目的(研究目的)のものであるが、FDAは、生物製剤でも医療機器でも、商業目的・非商業目的に拘わらず臨床試験の申請前に非公式な相談を無料で行うほか、各種の開発段階において相談制度を設けて351HCT/Pの開発を支援している

#### 5 おわりに

欧米の細胞・組織加工製品の開発に関する環境は、資金面、インフラ面の他、上に挙げたように規制に関しても日本とは大きく異なっている部分がある。ただし、細胞・組織加工製品を効率的・効果的・合理的に実用化するためには、必要な技術的要件や方策を、出口である行政側がガイドラインや相談制度などを通じて開発早期から提示し、研究者・開発企業・規制側が認識を共有することが不可欠であることは共通である。我が国における先端医療の実用化促進や規制の国際協調のためにも彼らの規制および促進策は参考とすべきものと考えられる。

# Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound

Shigeki Kiyonaka<sup>a</sup>, Kenta Kato<sup>a</sup>, Motohiro Nishida<sup>b</sup>, Kazuhiro Mio<sup>c</sup>, Takuro Numaga<sup>a</sup>, Yuichi Sawaguchi<sup>a</sup>, Takashi Yoshida<sup>a</sup>, Minoru Wakamori<sup>a</sup>, Emiko Mori<sup>a</sup>, Tomohiro Numata<sup>a</sup>, Masakazu Ishii<sup>d</sup>, Hiroki Takemoto<sup>e</sup>, Akio Ojida<sup>e</sup>, Kenta Watanabe<sup>b</sup>, Aya Uemura<sup>b</sup>, Hitoshi Kurose<sup>b</sup>, Takashi Mori<sup>f</sup>, Tsutomu Kobayashi<sup>g</sup>, Yoji Sato<sup>h</sup>, Chikara Sato<sup>c</sup>, Itaru Hamachi<sup>e</sup>, and Yasuo Mori<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Molecular Biology, <sup>e</sup>Laboratory of Bioorganic Chemistry, Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto 615-8510, Japan; <sup>b</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Higashiku, Fukuoka 812-8582, Japan; <sup>c</sup>Neuroscience Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Umezono 1-1-4, Tsukuba Ibaraki 305-8568, Japan; <sup>d</sup>Department of Pathophysiology, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Tokyo 142-8555, Japan; <sup>f</sup>Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan; <sup>g</sup>Pharmacology Laboratory, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation 2-2-50, Kawagishi, Toda 335-8505, Japan; and <sup>h</sup>National Institute of Health Sciences, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

Edited by Lutz Birnbaumer, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, and approved February 12, 2009 (received for review September 8, 2008)

**Canonical transient receptor potential (TRPC) channels control influxes of Ca<sup>2+</sup> and other cations that induce diverse cellular processes upon stimulation of plasma membrane receptors coupled to phospholipase C (PLC). Invention of subtype-specific inhibitors for TRPCs is crucial for distinction of respective TRPC channels that play particular physiological roles in native systems. Here, we identify a pyrazole compound (Pyr3), which selectively inhibits TRPC3 channels. Structure-function relationship studies of pyrazole compounds showed that the trichloroacrylic amide group is important for the TRPC3 selectivity of Pyr3. Electrophysiological and photoaffinity labeling experiments reveal a direct action of Pyr3 on the TRPC3 protein. In DT40 B lymphocytes, Pyr3 potently eliminated the Ca<sup>2+</sup> influx-dependent PLC translocation to the plasma membrane and late oscillatory phase of B cell receptor-induced Ca<sup>2+</sup> response. Moreover, Pyr3 attenuated activation of nuclear factor of activated T cells, a Ca<sup>2+</sup>-dependent transcription factor, and hypertrophic growth in rat neonatal cardiomyocytes, and in vivo pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. These findings on important roles of native TRPC3 channels are strikingly consistent with previous genetic studies. Thus, the TRPC3-selective inhibitor Pyr3 is a powerful tool to study in vivo function of TRPC3, suggesting a pharmaceutical potential of Pyr3 in treatments of TRPC3-related diseases such as cardiac hypertrophy.**

Ca<sup>2+</sup> signaling | pyrazole compounds | TRPC channels | TRPC3

Ca<sup>2+</sup> signals control diverse cellular processes, ranging from ubiquitous activities like gene expression to tissue specific responses such as lymphocyte activation and cardiac diseases (1, 2). Stimulation of plasma membrane (PM) receptors that generates 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG) from phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) via phospholipase C (PLC) elevates cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), which is controlled by 2 components, IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release from intracellular Ca<sup>2+</sup> store, endoplasmic reticulum (ER), and Ca<sup>2+</sup> influx across PM. Ca<sup>2+</sup> influx is mediated by diverse Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channels activated by various triggers (1, 2). *Drosophila transient receptor potential (trp)* protein and its homologues are assembled to form cation- and Ca<sup>2+</sup>-permeable channels (3). Members of the “canonical” TRPC subfamily are characterized by activation induced upon stimulation of PLC-coupled receptors (4, 5). TRPC channels have been originally proposed as store-operated channels (SOC) activated by Ca<sup>2+</sup> depletion of stores, whereas closely related TRPC3, TRPC6, and TRPC7 showed activation sensitivity to the membrane-delimited action of DAG (6, 7). Hence, the exact roles of TRPCs in mediating Ca<sup>2+</sup> entry in response to Ca<sup>2+</sup> store depletion and messenger molecules upon receptor activation remain controversial. In native systems, genetic disruption experiments have

revealed important roles of TRPC1 and TRPC4 in the formation of SOCs in different cell types (8–10), and TRPC6 in receptor-operated cationic channels in vascular smooth muscle cells (11). Specific pharmacological inhibitors greatly facilitate functional identification of native TRP channel subtypes.

TRPC channels have been implicated in diverse biological functions. In B lymphocytes, TRPC1 or TRPC3 regulates B cell receptor (BCR)-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations that activate nuclear factor of activated T cells (NFAT), a Ca<sup>2+</sup>-responsive transcription factor (8). In particular, TRPC3 is associated with PLCγ2 to control amplification of receptor-mediated signals (12, 13). TRPC3 is also important in the T cell receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> entry pathway (14). Recently, studies employing transgenic mice and RNAi-mediated knockdown or overexpression strategy in cardiac myocytes have showed that TRPC3 and TRPC6 promote cardiac hypertrophy through activation of calcineurin and its downstream effector, NFAT (15–19). These results suggest TRPC channels as new targets for the development of pharmaceutical agents to treat cardiac hypertrophy. Roles are demonstrated as well for TRPC3 in the brain (20) and skeletal muscle (21), for TRPC6 in smooth muscle (22) and kidney (23), and for TRPC4 in endothelial cells (10).

Bis(trifluoromethyl)pyrazoles (BTPs) are a class of pyrazole derivatives that act as potent immunosuppressive compounds by inhibiting cytokine release from human lymphocytes and suppressing T cell proliferation (24). The BTP derivative 4-methyl-4'-[3,5-bis(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-1,2,3-thiadiazole-5-carboxanilide, BTP2 (YM-58483), was shown to block SOCs in T lymphocytes and TRPC channels in HEK293 cells (25–27). Importantly, unlike other TRP inhibitors, SK&F 96365 and 2-aminoethyldiphenylborate, BTP2 is selective to TRP channels and does not affect Ca<sup>2+</sup> handling by mitochondria or ER, or K<sup>+</sup> channels or voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels (25–27). Pharmacological profiles of BTP2 have been investigated in vitro and in vivo to evaluate its potential as a therapeutic anti-asthma drug (28). However, BTP2 failed to show subtype selectivity among members of the TRPC family, inhibiting both TRPC3 and TRPC5 (27).

Author contributions: S.K., M.N., and Y.M. designed research; S.K., K.K., M.N., K.M., T. Numaga, Y. Sawaguchi, T.Y., M.W., E.M., T. Numata, M.I., H.T., K.W., and A.U. performed research; S.K., K.K., M.N., A.O., H.K., T.M., T.K., Y. Sato, C.S., I.H., and Y.M. analyzed data; and S.K., K.K., M.N., and Y.M. wrote the paper.

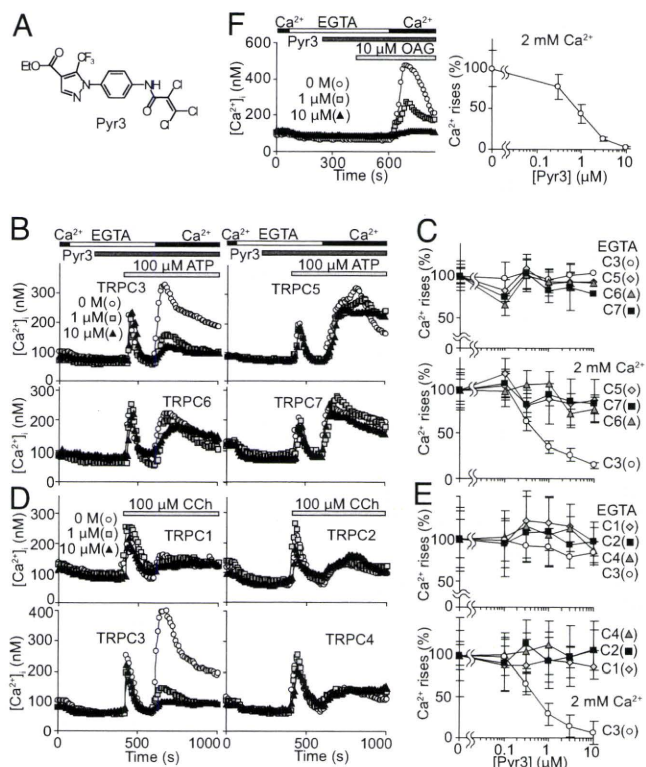
The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: mori@sbchem.kyoto-u.ac.jp.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0808793106/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0808793106/DCSupplemental).





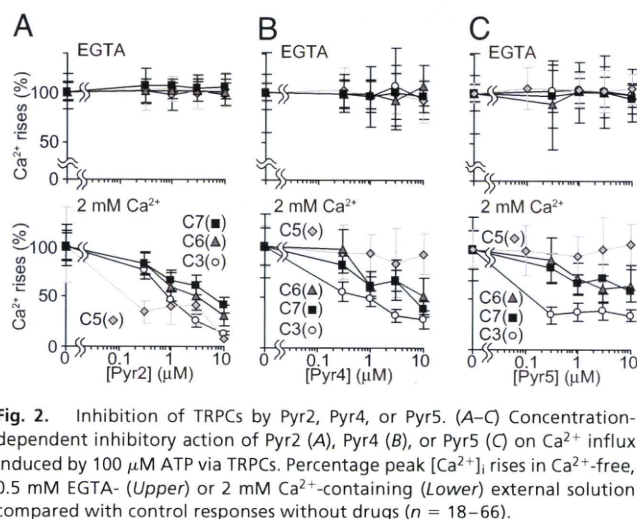
**Fig. 1.** Selective inhibition of TRPC3-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx by Pyr3. (A) Chemical structure of Pyr3. (B–E) Concentration-dependent inhibitory action of Pyr3 on ATP receptor-induced (B and C) or mAChR-induced (D and E) induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx via TRPCs. (B and D) Average time courses of  $\text{Ca}^{2+}$  responses induced by 100  $\mu\text{M}$  ATP in HEK293 cells (B) or by 100  $\mu\text{M}$  CCh in HEK293T cells (D) transfected with TRPCs at indicated Pyr3 concentrations. (C and E) Percentage peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises in  $\text{Ca}^{2+}$ -free, 0.5 mM EGTA-containing (Upper) or 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -containing (Lower) external solution compared with control responses without Pyr3 ( $n = 33$ –104). (F) Pyr3 inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  influx via OAG-activated TRPC3. Average time courses of  $\text{Ca}^{2+}$  responses induced by 10  $\mu\text{M}$  OAG at indicated Pyr3 concentrations in TRPC3-transfected HEK293 cells (Left). Percentage peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises in 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  solution (Right) ( $n = 19$ –37).

Here, we study pharmacological properties of the pyrazole compound Pyr3 and demonstrate that Pyr3 selectively and directly inhibits TRPC3 channels among TRPC family members. Pyr3 potently inhibits BCR-induced responses and hypertrophic responses, in which importance of TRPC3 have been reported. Our findings suggest that Pyr3 is a useful tool for clarification of crucial and widespread functions of TRPC3 and for treatments of TRPC3-mediated diseases as well.

## Results

### Pyr3 Selectively Inhibits TRPC3-Mediated $\text{Ca}^{2+}$ Influx in HEK293 Cells.

Ethyl-1-(4-(2,3,3-trichloroacrylamide)phenyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate was synthesized as reported in ref. 24 (Fig. 1A and Fig. S1 in *SI Appendix*). It lacks the BTP group in contrast to BTP1 and BTP2. Therefore, we recategorized the compound together with BTP1 and BTP2 as pyrazole compounds (Pyr3), and abbreviated it as Pyr3 and BTP1 and BTP2 as Pyr1 and Pyr2, respectively. Effects of Pyr3 were examined on TRPC channel-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx observed separately from  $\text{Ca}^{2+}$  release as prominent  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises upon readministration of  $\text{Ca}^{2+}$  to the extracellular solution under stimulation of native P2Y purinoceptors by ATP or UTP in HEK293 cells or muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) by carbachol (CCh) in HEK293T cells (Fig. S2 in *SI Appendix*),



**Fig. 2.** Inhibition of TRPCs by Pyr2, Pyr4, or Pyr5. (A–C) Concentration-dependent inhibitory action of Pyr2 (A), Pyr4 (B), or Pyr5 (C) on  $\text{Ca}^{2+}$  influx induced by 100  $\mu\text{M}$  ATP via TRPCs. Percentage peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises in  $\text{Ca}^{2+}$ -free, 0.5 mM EGTA- (Upper) or 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -containing (Lower) external solution compared with control responses without drugs ( $n = 18$ –66).

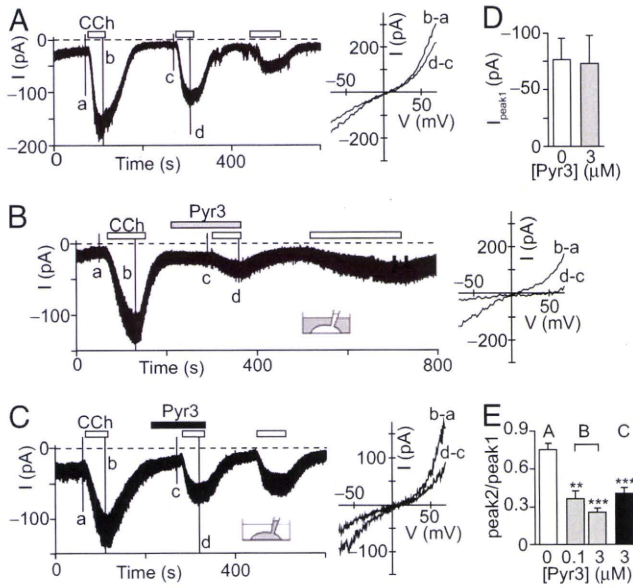
which have only low endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  influx activity (29). Application of Pyr3 inhibited TRPC3-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx in a dose-dependent manner with the  $\text{IC}_{50}$  value of 0.7  $\mu\text{M}$  (Fig. 1B–E and Figs. S3 and S4 in *SI Appendix*): inhibitory action of Pyr3 became apparent at 0.3  $\mu\text{M}$ , and was almost complete at 3  $\mu\text{M}$ . Ten  $\mu\text{M}$  Pyr3 failed to significantly alter  $\text{Ca}^{2+}$  influx mediated by other TRPC members,  $\text{Ca}^{2+}$  responses in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 1B–E), and the control basal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  levels (data not shown). Interestingly,  $\text{Ca}^{2+}$  influx was inhibited by Pyr3 in cells coexpressing TRPC3 plus TRPC6 but not in cells coexpressing TRPC1 plus TRPC5 (Fig. S5 in *SI Appendix*). The results suggest a selectivity of Pyr3 to TRPC3 channels among TRPC family members and intactness of  $\text{Ca}^{2+}$  release and  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion machinery after Pyr3 administration.

Because DAG has been suggested as a physiological activation trigger for TRPC3, TRPC6, and TRPC7 channels (6), we examined effects of Pyr3 on  $\text{Ca}^{2+}$  influx induced by the membrane-permeable DAG analogue, 1-oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG) in TRPC3-transfected HEK293 cells (Fig. 1F). The OAG-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx via TRPC3 was inhibited by Pyr3 in a dose-dependent manner as observed for receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx via TRPC3:  $\text{IC}_{50}$  of Pyr3 was 0.8  $\mu\text{M}$ . The results support the TRPC3 channel as the main action site of Pyr3.

### Structural Motif Important for TRPC3 Channel Selectivity on Pyr3.

Pyr2 inhibited only TRPC5 at 0.3  $\mu\text{M}$ . However, at higher concentrations, Pyr2 inhibited TRPC3, TRPC5, TRPC6, and TRPC7 (Fig. 2A and Fig. S6A and D in *SI Appendix*) as reported in ref. 27. Thus, Pyr2 is different from Pyr3 in not distinguishing members of the TRPC family. We designed chimeric pyrazole derivatives, Pyr4 and Pyr5 (Fig. S1 in *SI Appendix*) to determine structural requirements for the selectivity to TRPC3 in Pyr3. Pyr4, a Pyr3 analogue with 4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide group of Pyr2 substituted for trichloroacrylic amide group, at 10  $\mu\text{M}$  inhibited TRPC3, TRPC6, and TRPC7 but not TRPC5 (Fig. 2B and Fig. S6B and E in *SI Appendix*). These results indicate a selectivity of Pyr4 to DAG-activated TRPC channels, suggesting that 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole group is important for Pyr2 to recognize TRPC5. Pyr5, a Pyr3 analogue with 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole group of Pyr2 substituted for ethyl-3-trifluoromethylpyrazole-4-carboxylate group, at 0.3  $\mu\text{M}$  inhibited only TRPC3, suggesting that the trichloroacrylic amide group shared by Pyr3 and Pyr5 is critical for the TRPC3 selectivity (Fig. 2C and Fig. S6C and F in *SI Appendix*). Interestingly, at higher concentrations such as 10  $\mu\text{M}$ , Pyr5 enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  response in vector-transfected cells or

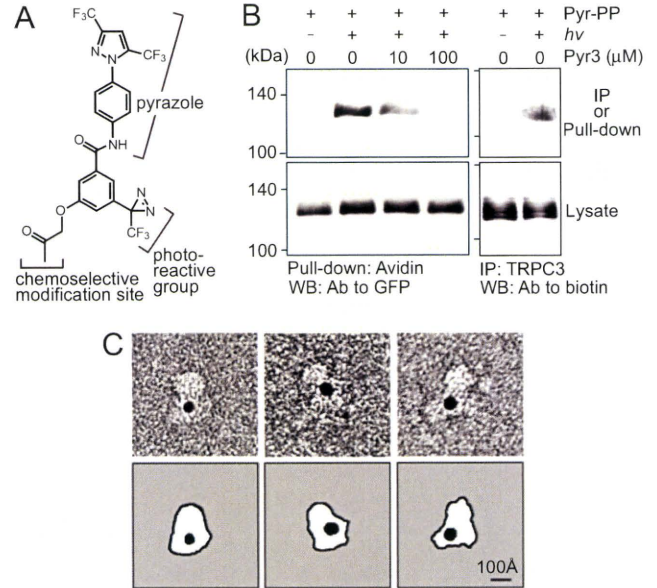




**Fig. 3.** mAChR-activated TRPC3 current is suppressed by extracellular application of Pyr3. (A–C) Traces of ionic currents induced by 60  $\mu\text{M}$  CCh at a holding potential of  $-50$  mV in TRPC3-transfected HEK293 cells (Left). I–V relationships obtained by subtracting the currents evoked by the voltage-ramps before activation of channels (a and c) from those after activation (current traces b and d) (Right). (B) Three  $\mu\text{M}$  Pyr3 is added 1.5 min before second stimulation of CCh into the external solution. (C) Three  $\mu\text{M}$  Pyr3 is added in internal solution before the recordings, and then external Pyr3 is also applied 1.5 min before second CCh stimulation. (D) Average current amplitudes of the first response at  $-50$  mV in the presence ( $n = 7$ ) or absence ( $n = 8$ ) of 3  $\mu\text{M}$  Pyr3 in the internal solution. (E) Concentration-dependent inhibitory action of Pyr3, using the testing paradigm depicted in B and C. The amplitude of the second response was normalized to that of the first (peak2/peak1) ( $n = 4$ –8). \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. 0  $\mu\text{M}$  Pyr3.

at sustained phase in TRPC-expressing cells (Fig. S6C in *SI Appendix*), indicating a stimulatory side effect of Pyr5 on endogenous  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  regulation mechanism in HEK293 cells.

**Direct Action of Pyr3 on TRPC3 Channel.** Inhibitory action of Pyr3 on the TRPC3 channel was confirmed in TRPC3-transfected HEK293 cells, using the whole-cell mode of patch-clamp method (Fig. 3). When 60  $\mu\text{M}$  CCh was added to stimulate endogenously expressed mAChRs, TRPC3-transfected HEK293 cells showed inward currents accompanied with an increase in the current fluctuation in the 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  external solution (Fig. 3A). Current-voltage (I–V) relationships of the currents in TRPC3-expressing cells showed a reversal potential at  $+7.2 \pm 3.4$  mV ( $n = 5$ ) and the prominent rectification at depolarizing potentials, corresponding well with those reported for receptor-activated TRPC3 currents (30). Ionic currents with a similar I–V characteristics were absent in control HEK293 cells (data not shown). The CCh-induced TRPC3 current was suppressed by extracellular perfusion of Pyr3 in a dose-dependent manner (Fig. 3B and E) on top of run down in TRPC3 currents (Fig. 3A). TRPC3 maintains the same current level after washout of Pyr3 in contrast to control currents that gradually decrease with repeated CCh stimulation, suggesting that the Pyr3 block of TRPC3 is at least in part reversible but that the recovery from the blockade is a slow process (Fig. S7A in *SI Appendix*). Notably, because CCh induced indistinguishable  $\text{Ca}^{2+}$  response levels at the second and the third CCh stimulation in the presence and absence of Pyr3 (Fig. S7B in *SI Appendix*), mAChR desensitization induced by Pyr3 should be minimal if at all during repeated stimulation. Intracellular application of Pyr3 from the

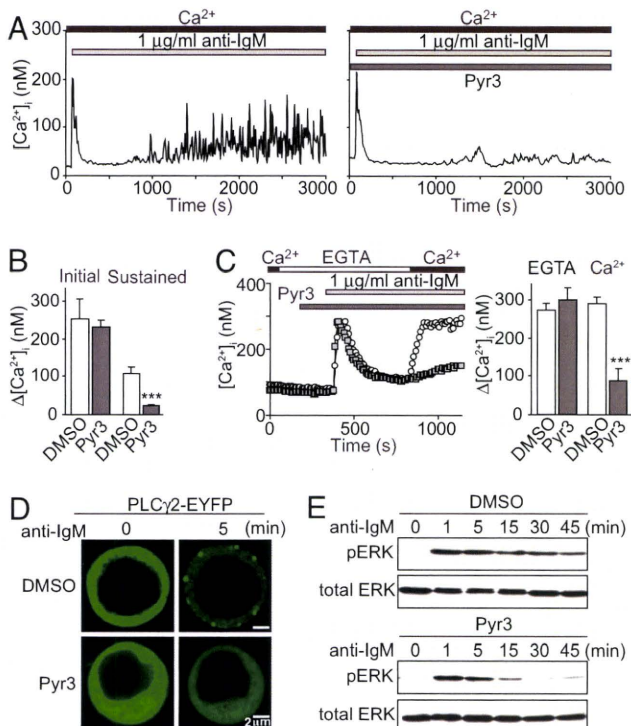


**Fig. 4.** Photochemical cross-linking of TRPC3 with Pyr-PP. (A) Chemical structure of Pyr-PP. (B) Pyr-PP directly binds TRPC3. After P-PALM, TRPC3-GFP proteins are detected with anti-GFP antibody by Western blot analysis (WB) in avidin pull-down samples. The photochemical Pyr-PP cross-linking of TRPC3 is inhibited by 3-min preincubation and subsequent incubation with Pyr3 (10 or 100  $\mu\text{M}$ ) (Left). After P-PALM, the incorporation of the Pyr-PP-ARP adduct is detected with anti-biotin antibody by WB in immunoprecipitated (IP) samples with anti-TRPC3 antibody (Right). (C) Electron microscopic visualization of negatively stained TRPC3 after P-PALM with gold nanoparticles. Streptavidin-gold conjugate is attached to labeled-TRPC3 via biotin-labeling site.

patch pipette failed to elicit significant changes in current levels or I–V relationships (Fig. 3C and D), and, importantly, in susceptibility to inhibition by Pyr3 applied extracellularly (Fig. 3C and E). OAG-activated TRPC3 currents were also inhibited by extracellular Pyr3 (3  $\mu\text{M}$ ) application, which failed to affect CCh- and OAG-activated TRPC6 currents (Fig. S8 in *SI Appendix*), TRPM4 currents (Fig. S9 in *SI Appendix*), and TRPM2 and TRPM7 currents (unpublished results). Inhibition of glycosylation by tunicamycin, however, failed to affect Pyr3 sensitivity of TRPC3  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Fig. S10 in *SI Appendix*). These results suggest that the action site of Pyr3 is located in the external side of the TRPC3 protein.

Photoaffinity labeling method is a powerful tool to identify target proteins of biologically active molecules. Recently, bifunctional photoaffinity probes having ligand moiety and biotin-tag were used for cross-linking studies of ligand/receptor complex (31). However, the introduction of a highly polar and sterically congested biotin-anchored tag to an affinity compound often resulted in marked impairment of intrinsic biological activity in the crucial probe design step. Therefore, we have carried out postphotoaffinity labeling modification (P-PALM), using a compact bifunctional Pyr probe, Pyr-PP, which carries a small functional group for selective modification by aldehyde/keto-reactive biotin derivative ARP (chemoselective modification site) and a photoreactive group for subsequent photoaffinity labeling (Fig. 4A and Fig. S11A in *SI Appendix*) (32). Importantly, Pyr-PP retained the activity to inhibit TRPC3-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Fig. S11B in *SI Appendix*). In cells expressing the green fluorescent protein (GFP)-tagged TRPC3 protein, photoirradiation followed by biotin modification elicited incorporation of Pyr-PP into an  $\approx 130$ -kDa protein band, which corresponds well with the molecular mass of an adduct of TRPC3-GFP (130 kDa) (Fig. 4B Left). Notably, Pyr-PP incorporation was inhibited





**Fig. 5.** Pyr3 inhibits native TRPC3 channels and downstream responses in DT40 B lymphocytes. (A and B) Inhibitory action of 0.3  $\mu\text{M}$  Pyr3 on  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation upon BCR stimulation with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-IgM. (A) Representative time courses with (Right) or without of Pyr3 (Left). (B) Peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises at initial and sustained phases (30–40 min). (C) Inhibitory action of 1  $\mu\text{M}$  Pyr3 on BCR-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Average time courses (Left). Peak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises in  $\text{Ca}^{2+}$ -free, 0.5 mM EGTA- or 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution ( $n = 42\text{--}49$ ) (Right). (D) Confocal fluorescence images indicating PM translocation of PLC $\gamma$ 2-EYFP upon BCR-stimulation with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-IgM. Three  $\mu\text{M}$  Pyr3 is applied 10 min before BCR stimulation. (E) Effects of Pyr3 on ERK activation induced by BCR stimulation (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-IgM). Three  $\mu\text{M}$  Pyr3 is applied 10 min before BCR stimulation. Cells are analyzed by WB, using anti-phospho-ERK2 antibody. \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. DMSO.

by coapplication of Pyr3. Furthermore, immunoprecipitation of TRPC3 followed by Western blot analysis with anti-biotin antibody strongly supports that Pyr-PP is incorporated into TRPC3 (Fig. 4B Right). To further confirm direct attachment of Pyr-PP on the TRPC3, biotin-labeled Pyr-PP in the negatively stained preparation was visualized with electron microscopy after incubation with streptavidin-gold conjugates (Fig. 4C) (33). Thus, Pyr3 selectively and directly binds to TRPC3. Interestingly, CCh failed to influence labeling of TRPC3 by Pyr-PP (Fig. S11C in *SI Appendix*). This is consistent with the observation that Pyr3 potentially inhibited basal activity of TRPC3 but not that of TRPC6 (Fig. S12 in *SI Appendix*), excluding a possibility that receptor-induced channel activation mediates the Pyr3 action.

**Pyr3 Suppresses Receptor-Activated Signaling by Inhibiting Native TRPC3 Channels in B Lymphocytes.**  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation is important for the efficiency and specificity of gene expression in lymphocytes (34). We recently reported that the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation is maintained by  $\text{Ca}^{2+}$  entry via TRPC3 that evokes translocation toward PM and secondary activation of PLC $\gamma$ 2 in DT40 B lymphocytes (13). Fig. 5A depicts a typical  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation that follows initial transient  $\text{Ca}^{2+}$  responses upon stimulation of BCR in DT40 cells. Pyr3 significantly suppressed the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation (Fig. 5A and B) and NFAT activity (Fig. S13 in *SI Appendix*), whereas it failed to suppress the initial  $\text{Ca}^{2+}$  responses. Pyr3 also

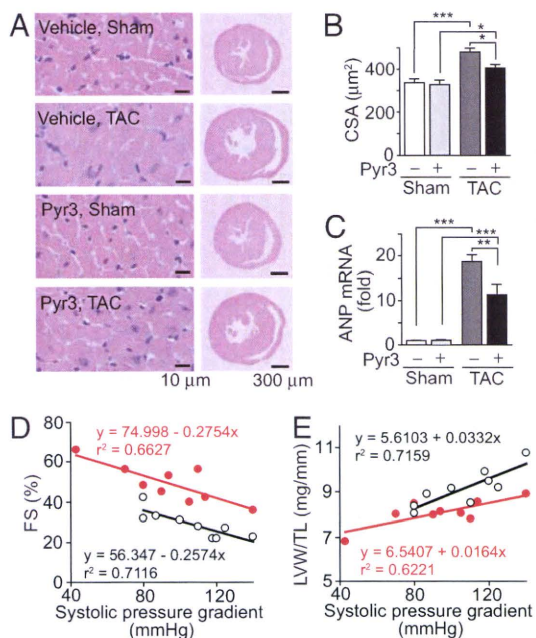
suppressed BCR-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx but not  $\text{Ca}^{2+}$  release (Fig. 5C). In addition, observation by time-lapse confocal laser microscopy showed localization of EYFP-tagged PLC $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2-EYFP) near PM upon BCR stimulation, which was inhibited by 3  $\mu\text{M}$  Pyr3 (Fig. 5D). Interestingly, coimmunoprecipitation of PLC $\gamma$ 1 and PLC $\gamma$ 2 with TRPC3 is unaffected by Pyr3 (Fig. S14 in *SI Appendix*), suggesting that Pyr3 acts independently of PLC-TRPC3 interaction. Thus, Pyr3 efficiently attenuates TRPC3-mediated PLC $\gamma$ 2 translocation and  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation.

The activation of protein kinase C (PKC) by DAG promotes activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) through phosphorylation in DT40 cells (13). The PLC $\gamma$ 2 translocation and subsequent activation also enhance the downstream responses of DAG. In fact, the ERK phosphorylation maintained by BCR stimulation over 45 min became transient after application of 3  $\mu\text{M}$  Pyr3 (Fig. 5E). Hence,  $\text{Ca}^{2+}$  influx via TRPC3 is required for full ERK activation in DT40 B lymphocytes.

**Pyr3 Suppresses Cardiac Hypertrophy.** Cardiac hypertrophy is an adaptive response of the heart to many forms of cardiac disease, including hypertension and mechanical load abnormalities (35). The importance of G protein-coupled receptors such as angiotensin II (Ang II) receptors, that activate PLC, is well established in cardiac hypertrophy (36). Recently, it has been revealed through siRNA strategy that  $\text{Ca}^{2+}$  influx through TRPC3 and TRPC6 activation is essential for Ang II-induced NFAT activation and cardiomyocyte hypertrophy (16). Pyr compounds were examined on hypertrophic responses in rat neonatal cardiomyocytes. The Ang II-induced NFAT translocation was suppressed by Pyr3, but weakly by Pyr2 in a concentration-dependent manner ( $\text{IC}_{50}$  value was 0.05  $\mu\text{M}$  for Pyr3 and 2  $\mu\text{M}$  for Pyr2) (Fig. S15A and B in *SI Appendix*). Therefore, compared with Pyr2, Pyr3 is more potent in inhibiting NFAT signaling of cardiac myocytes. Pyr3 also suppressed the mechanical stretch-induced NFAT activation (Fig. S15C in *SI Appendix*). Notably, the Ang II-induced hypertrophic responses, such as actin reorganization, brain natriuretic peptide (BNP) expression, and protein synthesis were completely suppressed by Pyr3, but weakly by Pyr2 (Fig. S15D–F in *SI Appendix*).

We further examined Pyr3 in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in vivo. Importantly, systolic and diastolic blood pressure, heart rate, mortality, body weight, and weight for liver, lung, and heart were unaffected by chronic treatment with Pyr3 (0.1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) in sham operated mice (Fig. S16A and Tables S1 and S2 in *SI Appendix*). In addition, transverse aortic constriction (TAC) operation significantly increased left ventricular end-systolic pressure (ESP) in mice treated with vehicle or Pyr3 (Tables S1 and S2 in *SI Appendix*), suggesting that pressure overload was equally induced in these mice. Strikingly, increased size of the heart by 1-week TAC operation was significantly attenuated by Pyr3 (Fig. 6A and B and Fig. S16B in *SI Appendix*). The Pyr3 effect refers to concentric hypertrophy, because the ratio of internal ventricular radius at end diastole ( $r$ ) to ventricular wall thickness ( $h$ ) was significantly decreased in echocardiography in mid transverse heart sections (Fig. 6A and Fig. S16C in *SI Appendix*), in contrast to fractional shortening (FS) and the right ventricle unaffected by TAC (Fig. S16D and E in *SI Appendix*). The TAC-induced increase in expression of atrial natriuretic peptide (ANP) mRNA, a reliable marker for cardiac hypertrophy, was also suppressed by Pyr3 (Fig. 6C). Six-weeks TAC operation induced an  $r/h$  ratio increase characteristic of dilated hypertrophy (Fig. S16F in *SI Appendix*), and deterioration of FS and elevation of weight-to-tibia length ratio of the left ventricle (LVW/TL) in good correlation with systolic pressure gradient. These symptoms were suppressed by Pyr3 (Fig. 6D and E). Thus, Pyr3 is potent against concentric and dilated cardiac hypertrophy.





**Fig. 6.** Potent suppressive effects of Pyr3 on cardiac hypertrophy induced by pressure overload in mice. (A–C) Effects of Pyr3 on 1-week TAC-induced concentric hypertrophy. (A) H&E-stained mid transverse sections of hearts isolated from sham- and TAC-operated mice. (B and C) Effects of Pyr3 on the increase in cross-sectional areas (CSA) (B) and ANP mRNA expressions (C). \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , and \*\*\*,  $P < 0.001$ . (D and E) Effects of Pyr3 on 6-weeks TAC-induced dilated hypertrophy. Scattergram of systolic pressure gradient vs. FS, a surrogate of systolic function (D) and LVW/TL (E) in TAC-operated mice with (red) and without (black) treatment with Pyr3. Pyr3 significantly shifts relationships upward in FS ( $P < 0.001$ ) and downward in LVW/TL ( $P < 0.01$ ).

## Discussion

The present investigation demonstrates a potent inhibitory action of Pyr3 on both recombinant and native TRPC3 channels. Photoaffinity labeling with Pyr-PP reveals direct action of Pyr3 on the TRPC3 channel. Pyr3 efficiently suppressed biological responses in which critical involvements of TRPC3 have been reported. In B lymphocytes, Pyr3 eliminated the BCR-induced  $Ca^{2+}$  oscillation regulated by TRPC3-mediated  $Ca^{2+}$  influx. In the cardiac system, Pyr3 attenuates NFAT activation and hypertrophic growth in myocytes and pressure overload-induced hypertrophy in vivo.

BTPs were originally identified as inhibitors of T lymphocyte activation (24). Several reports have suggested that BTP2 (Pyr2) is a potent inhibitor for both  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  (CRAC) channels and TRPC channels and for NFAT-driven IL-2 production (25–27). Structure-function relationships in BTPs proposed that 4'-[3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazol-1-yl]-carboxanilide moiety is useful for discovering potent inhibitors for CRAC channels (37). However, here we demonstrate that the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole group is not required for the inhibition of TRPC3, because Pyr3 without this group selectively inhibited TRPC3 channel, and is more potent than Pyr2 in inhibiting NFAT of cardiac myocytes. Moreover, our structure-function relationship study using Pyr4 and Pyr5 demonstrates that the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole or trichloroacrylic amide group is critical for the selectivity of Pyr4 or Pyr5 to TRPC5 or TRPC3, respectively. Thus, pyrazole group provides a molecular skeleton to invent potent inhibitors for each TRPC.

It has been suggested that Pyr2 activates the  $Ca^{2+}$ -activated nonselective cation channel TRPM4 that decreases  $Ca^{2+}$  influx

by depolarizing membrane potential and reducing the  $Ca^{2+}$  entry driving force in lymphocytes (38). This contradicts with the report that Pyr2 failed to alter membrane potential in Jurkat cells (25). In addition, when external  $Na^+$  ions were completely replaced by the nonpermeant organic cation *N*-methyl-D-glucamine,  $Sr^{2+}$  influx activated by CCh still showed an intact sensitivity to Pyr2, leading to an idea that the action of Pyr2 to block TRPC3 channels is independent of the membrane-depolarizing action of TRPM4 (27). This idea is consistent with our results. Importantly, if Pyr3 activates TRPM4-mediated membrane depolarization, it should also inhibit receptor-activated  $Ca^{2+}$  influx via TRPC channels other than TRPC3. However, this is not the case. Hence, the action of Pyr3 is mainly attributable to inhibition of TRPCs.

Pyr2 unlikely acts from the cytosolic side of CRAC channels, for instance, by inhibiting the activation mechanism or the intracellular part of the channel pore (26). It has been also proposed that Pyr2 inhibits TRPC3 by preventing channel interactions with DAG or by compromising the conformational change in the channels that leads to opening (27). We have confirmed direct action of Pyr3 on TRPC3 through observation that Pyr3 inhibition of TRPC3 activity or incorporation of Pyr-PP does not require receptors or their activation. Electrophysiological recording (Fig. 3) locates the action site on the extracellular side of TRPC3 proteins. Amino acid residues unique for TRPC3 in functionally important domains such as E3 (39) may be responsible for the TRPC3 selectivity of Pyr3. Recently, we reported a reconstruction of a 3-dimensional (3D) structure of TRPC3 at 15 Å resolution by single particle analysis of images taken by a cryoelectron microscope (33). It would be interesting to locate Pyr-binding site in 3D reconstruction of TRPC3 proteins at this resolution.

Functions of native TRPC3 channels are yet to be established. Initial overexpression studies reported that TRPC3 forms SOCs (5). However, constitutive channel activity suppressed by strong intracellular  $Ca^{2+}$  buffering (40, 41) and DAG-induced activation via a membrane-delimited pathway have been reported for TRPC3 (6). Therefore, depending on the expression system and protein expression levels, TRPC3 can function in a store-dependent or -independent manner (42, 43). Physical interactions have been suggested for TRPC3 also with  $IP_3$  receptors, PLC $\gamma$ 1, and PLC $\gamma$ 2 (12, 13, 44). Interestingly, BCR stimulation failed to induce PLC $\gamma$ 2 translocation to PM in DT40 B cell mutant lines engineered with disruption of TRPC3 localization at PM (unpublished results), in support of the importance of TRPC3 in the PLC $\gamma$ 2 translocation. We have also found that TRPC3 mediates  $Ca^{2+}$  influx responsible for translocation of PKC $\beta$  to the PM and anchors PKC $\beta$  at PM. This suggests that TRPC3 functions not only as an ion conducting channel but also as a protein scaffold. Pyr3 should be extremely useful in selectively dissecting multiple roles of native TRPC3.

$[Ca^{2+}]_i$  elevation by various hypertrophic stimuli plays a critical role in the development of cardiac hypertrophy (36). Continuous blockage of L-type voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels by  $Ca^{2+}$  antagonists effectively suppresses the development of cardiac hypertrophy (16). However, because L-type  $Ca^{2+}$  channels controls excitation-contraction coupling, these  $Ca^{2+}$  channel antagonists may exert serious influence on the myocardial contraction. Recently, TRPC3 and TRPC6 channels have been reported to regulate cardiac hypertrophy (15–19). Suppression of Ang II- or mechanical stretch-induced NFAT activation and hypertrophic growth of cardiomyocytes by Pyr3 strongly suggest a potential of Pyr3 in the treatment of cardiac hypertrophy. Compared with Pyr2, which was reported to inhibit ANP secretion and  $\beta$ -myosin heavy chain expression in rat neonatal ventricular myocytes stimulated with  $\alpha$ -adrenergic agonist, phenylephrine (15), Pyr3 has improved potency in inhibiting hypertrophic responses. Moreover, attenuation of pressure over-



load-induced cardiac hypertrophy in vivo by Pyr3 will give efficacy for the pathological heart without serious influence of the normal myocardial contraction. This Pyr3 property may lead to a safer therapeutic approach to cardiac hypertrophy.

## Methods

The detailed methods for cell culture and cDNA expression,  $[Ca^{2+}]_i$  measurements, electrophysiology, photoaffinity labeling, coimmunoprecipitation, confocal image analysis, measurements of NFAT and ERK activation, and analysis of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo are described in *SI Appendix*.

taion, confocal image analysis, measurements of NFAT and ERK activation, and analysis of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo are described in *SI Appendix*.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank N. Onohara and S. Tanabe for technical support. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Core Research for Evolutional Science and Technology, and the National Institute of Biomedical Innovation of Japan.

- Abramowitz J, Birnbaumer L (2009) Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB J* 23:297–328.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient receptor potential channels in disease. *Physiol Rev* 87:165–217.
- Hardie RC, Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated  $Ca^{2+}$  channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643–651.
- Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76:387–417.
- Zhu X, et al. (1996) *trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative  $Ca^{2+}$  entry. *Cell* 85:661–671.
- Hofmann T, et al. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259–263.
- Okada T, et al. (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. *J Biol Chem* 274:27359–27370.
- Mori Y, et al. (2002) Transient receptor potential 1 regulates capacitative  $Ca^{2+}$  entry and  $Ca^{2+}$  release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *J Exp Med* 195:673–681.
- Liu X, et al. (2007) Attenuation of store-operated  $Ca^{2+}$  current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(–/–) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17542–17547.
- Freichel M, et al. (2001) Lack of an endothelial store-operated  $Ca^{2+}$  current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>–/–</sup> mice. *Nat Cell Biol* 3:121–127.
- Inoue R, et al. (2001) The transient receptor potential homologue TRP6 is the essential component of vascular  $\alpha_1$ -adrenoceptor-activated  $Ca^{2+}$ -permeable cation channel. *Circ Res* 88:325–332.
- Patterson RL, et al. (2002) Phospholipase C- $\gamma$  is required for agonist-induced  $Ca^{2+}$  entry. *Cell* 111:529–541.
- Nishida M, et al. (2003) Amplification of receptor signalling by  $Ca^{2+}$  entry-mediated translocation and activation of PLC- $\gamma$ 2 in B lymphocytes. *EMBO J* 22:4677–4688.
- Philipp S, et al. (2003) TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *J Biol Chem* 278:26629–26638.
- Bush EW, et al. (2006) Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J Biol Chem* 281:33487–33496.
- Onohara N, et al. (2006) TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J* 25:5305–5316.
- Brenner JS, Dolmetsch RE (2007) TrpC3 regulates hypertrophy-associated gene expression without affecting myocyte beating or cell size. *PLoS ONE* 2:e802.
- Nakayama H, Wilkin BJ, Bodi I, Molkenin JD (2006) Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB J* 20:1660–1670.
- Kuwahara K, et al. (2006) TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest* 116:3114–3126.
- Li HS, Xu XZ, Montell C (1999) Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* 24:261–273.
- Rosenberg P, et al. (2004) TRPC3 channels confer cellular memory of recent neuromuscular activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9387–9392.
- Dietrich A, et al. (2005) Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>–/–</sup> mice. *Mol Cell Biol* 25:6980–6989.
- Winn MP, et al. (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308:1801–1804.
- Djuric SW, et al. (2000) 3,5-Bis(trifluoromethyl)pyrazoles: A novel class of NFAT transcription factor regulator. *J Med Chem* 43:2975–2981.
- Ishikawa J, et al. (2003) A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained  $Ca^{2+}$  influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol* 170:4441–4449.
- Zitt C, et al. (2004) Potent inhibition of  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem* 279:12427–12437.
- He L-P, Hewavitharana T, Soboloff J, Spassova MA, Gill DL (2005) A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2. *J Biol Chem* 280:10997–11006.
- Ohga K, et al. (2008) The suppressive effects of YM-58483/BTP-2, a store-operated  $Ca^{2+}$  entry blocker, on inflammatory mediator release in vitro and airway responses in vivo. *Pulm Pharmacol Ther* 21:360–369.
- Okada T, et al. (1998) Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP  $Ca^{2+}$  channel from mouse brain. *J Biol Chem* 273:10279–10287.
- Trebak M, Bird GS, McKay RR, Birnbaumer L, Putney JW Jr (2003) Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels. *J Biol Chem* 278:16244–16252.
- Tomohiro T, Hashimoto M, Hatanaka Y (2005) Cross-linking chemistry and biology: Development of multifunctional photoaffinity probes. *Chem Rec* 5:385–395.
- Nagase T, Shinkai S, Hamachi I (2001) Post-photoaffinity labeling modification using aldehyde chemistry to produce a fluorescent lectin toward saccharide-biosensors. *Chem Commun* 229–230.
- Mio K, et al. (2007) The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas. *J Mol Biol* 367:373–383.
- Tomida T, Hirose K, Takizawa A, Shibasaki F, Iino M (2003) NFAT functions as a working memory of  $Ca^{2+}$  signals in decoding  $Ca^{2+}$  oscillation. *EMBO J* 22:3825–3832.
- Frey N, Olson EN (2003) Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65:45–79.
- Molkenin JD, Dorn II GW (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63:391–426.
- Yonetoku Y, et al. (2006) Novel potent and selective calcium-release-activated calcium (CRAC) channel inhibitors. Part 2: Synthesis and inhibitory activity of aryl-3-trifluoromethylpyrazoles. *Bioorg Med Chem* 14:5370–5383.
- Takezawa R, et al. (2006) A pyrazole derivative potently inhibits lymphocyte  $Ca^{2+}$  influx and cytokine production by facilitating transient receptor potential melastatin 4 channel activity. *Mol Pharmacol* 69:1413–1420.
- Xu SZ, et al. (2005) Generation of functional ion-channel tools by E3 targeting. *Nat Biotechnol* 23:1289–1293.
- Zitt C, et al. (1997) Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J Cell Biol* 138:1333–1341.
- Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S (1999) The N-terminal domain of the IP<sub>3</sub> receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* 4:423–429.
- Vazquez G, Lievreumont JP, St J Bird G, Putney JW Jr (2001) Human Trp3 forms both inositol triphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11777–11782.
- Trebak M, Bird GS, McKay RR, Putney JW Jr (2002) Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition. *J Biol Chem* 277:21617–21623.
- Boulay G, et al. (1999) Modulation of  $Ca^{2+}$  entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): Evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated  $Ca^{2+}$  entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14955–14960.



## 再生医療に期待する

—安全かつ有効な再生医療の実現を目指した産・官・学への期待—

*How shall we realize regenerative medicine for the health of all?*

### Keywords

再生医療  
再生医療機器

松山 晃文

大阪大学医学部附属病院未来医療センター

### Summary

A medical system is anticipated, where high-quality medical services are accessible without anxieties whenever we are ill or injured. The innovative regenerative medical products, or tissue-engineered medical products, have enabled us to overcome some life-threatening diseases, however, challenges still remain for others. The Ministry of Health, Labour and Welfare has released many guidelines for regenerative medical products using human stem cells. The major goal of the guideline is to reinforce and ensure safe on investigational and commercial new regenerative medical products. And in the next step, unmet medical needs shall be satisfied as tissue-engineered medical products for the patients who suffered from chronic disease in the long term. I will give some expectations for industries, governor and researchers, to intend to satisfy unmet medical needs in the field of regenerative medicine as well as to keep medical advances in Japan.

### はじめに

近年、体性幹細胞には胚葉を超えてさまざまな細胞への分化能をもったものが存在し、それらが可塑性を示すことが報告されている。すでにわが国においては、骨髄、末梢血、臍帯血中の造血幹細胞を用いた細胞治療が盛んに行われており、また骨髄細胞を直接心臓組織内に移植することにより、心筋梗塞などで壊死に陥った組織の機能を補う再生医療臨床研究も行われている。また、体性幹細胞を体外で増幅させさまざまな再生医療に応用する研究も盛んに行われている。上記のごとく、近年の生命科学領域の進歩により、その知見を基盤とした細胞工学・組織工学技術が日進月歩で発展している。一方で、再生医療を臨床実現するには、科学的にみても医学的にみてもいまだ不明な点も残されており、体外増幅による細胞の癌化、未知ウイルスなど感

Matsuyama, Akifumi

Medical center for Translational Research, Osaka University Hospital  
E-mail : akifumi-matsuyama@umin.ac.jp



染症伝播の可能性など安全性を危惧する声があることは否めない。

イノベーションの促進・社会還元の一層の加速・国民福祉への寄与という観点と、国民の公衆衛生上の安全安心の担保という観点を、両目でらみつつ、適正に再生医療を評価し、推進することが肝要であろう。

本稿では、再生医療に期待を抱く者としての、安全かつ有効な再生医療の実現を目指した産官学への期待をお示ししたい。

## 産業界への期待

### 1. 再生医療製品の研究開発・産業化にかかる今後の方向

財政・経済一体改革会議決定(平成18年7月6日)の「経済成長戦略大綱」において、わが国の医薬品・医療機器の国際競争力の強化が不可欠とされ、「医薬品・医療機器産業の国際競争力の強化」の項において、「がん等の生活習慣病や感染症等各種疾病対策の推進等国民の保健医療水準の向上に資する医薬品・医療機器産業について、関係府省・機関、企業等の双方の連携の下、特に基礎・基盤研究、臨床研究及び基礎研究から臨床研究への橋渡し研究を推進するとともに、臨床研究基盤の整備、治験環境の充実等の国民に医薬品・医療機器を迅速に届けるための環境整備を行う。」と言及されている。このような問題意識のもと、科学技術政策の根幹計画である第3期科学技術基本計画、ならびにそれを具体化

した3本柱である「新健康フロンティア戦略」「イノベーション25」「革新的医薬品医療機器創出のための5か年戦略」において、個別政策目標、成果目標、研究開発目標として達成すべき目標が掲げられているところであるが、そのなかでも再生医療による国民福祉への貢献、国際競争力強化への寄与は、ロードマップとして示されているところである。

### 2. 再生医療機器産業を取り巻く背景 細胞治療から再生医療機器へ—細胞組織工学という概念の出現—

細胞治療は、これまでも医療の発展に多大な影響を与えてきた。古くは輸血治療法であり、ついで骨髄移植による白血病治療であるが、細胞治療という概念から開始されたわけではなく、「細胞」を利用した「治療」であるというその態様から、細胞治療として分類される。これらは、体外での培養増幅などの処理を行わない治療法である。いわゆる“more than minimal manipulate”としての再生医療機器は、グリーン法による皮膚培養法を用いて体外にてヒト由来細胞を培養増殖させる培養皮膚を緒とし、これまで30年余にわたる臨床利用の実績がある。わが国でも初めて薬事承認を受けた再生医療機器は培養皮膚である。このように、ヒト組織再生技術を用いたいわゆる再生医療が可能となってきており、従来不可能だった治療法の開発が期待されている。再生医療製品は、臓器機能再生などを通じて、国民の健康の維

持ならびに疾病の予防、診断および治療に重要な役割を果たすものであるとの認識のもと、安全性および有効性を検証しつつ積極的に推進すべきである。なお、安全性の確保という観点で、培養皮膚の臨床利用における経験は、再生医療機器の安全性評価基準策定において、十分参考にされるべきであろう。

再生医療機器開発がアウトブレイクしたのは、組織工学(Tissue Engineering)との概念が、Vacantiにより提唱されてからであると認識している。確かに、技術的には従前の技術と連続性を有しており、組織工学技術あるいは細胞工学技術を用いたものであるが、それらはすべてTechnologyと解釈されていた。Engineeringとして細胞組織工学を捕らえたことこそ、Vacantiによるパラダイムシフトであったのである。細胞あるいは組織をTechnologyにおける「素材」から、Engineeringにおける「部品」として定義したということである。上記のように、組織工学が提唱されるのを機として、医学と工学の融合が一層加速している。組織を体外で再構築するために必要な生命科学的知見をベースに、工学研究者が支持体(足場)をデザインし、その有効性を医学研究者が検証するといった、医工連携・融合から、細胞組織工学は一層高度化し、イノベーションが一層加速されると認識している。

細胞組織工学を用いた再生医療のゴールは臨床応用であり、ひいては国民福祉への貢献である。細胞組織工学



の一層の社会還元に向けた加速が必要であるという統一した認識の下、最先端医療へ応用が可能となるよう、開発の初期段階から医工融合による出口を見据えたデザインが不可欠である。

### 3. 世界的な競争の激化

再生医療機器産業はいまだ未成熟産業といえ、製品として承認され販売されている製品は、わが国のみならず米国などにおいても数は少ない。現状は多額の研究費を投入した研究開発競争が中心である。しかし、研究開発競争には、研究開発を支える人材の教育、知的財産戦略などソフト面での競争、国による産業育成基盤の整備、再生医療周辺産業の育成が不可欠であると認識している。

確かに、医療機器産業においては、頻りに技術革新が起こっており、その結果として絶え間ない研究開発が産業発展の鍵となっている。加えて、これら再生医療機器の研究開発を推進するためには、再生医療機器周辺産業の育成も不可欠である。今後は、先端的細胞組織工学技術を用いたこれら再生医療などの分野においても、国際的な研究開発競争が進むとみられており、これら競争を勝ち抜くために、周辺技術を含めますます研究開発の重要性が増すものと考えられ、産業界のご尽力に期待したい。

## 行政への期待

### 1. 治験を含む臨床研究を取り巻く環境の変化

再生医療機器に関しては、感染症の伝播の可能性など、未知のリスクがあることから、治験届を行う前に、確認申請を行うこととされている。確認申請に関しては治験届と重複しているとの指摘があり、平成19年3月に通知の改正が行われている。再生医療機器の有用性担保のために平成12年医薬発1314号が発出されているが、昨今の生命科学の進歩に鑑み、平成19年10月現在見直しに向けた検討が行われている。具体的には、自己由来細胞組織を用いる当該医療機器と他家由来細胞組織を用いるそれとで、感染症の伝播などでリスクが異なることから、別立ての安全性基準を策定しているところである。加えて、確認申請に必要な検討項目に関しては、再生医療機器の治験を行おうとする者に、申請が行いやすいように改定が進められている。

これら治験にかかる審査の迅速化は国民の希望であり、産業の活性化にも資するものである。また、審査における特殊性・専門性の観点から、生物系審査部を改組し、生物系審査第一部と審査第二部の2部体制とし、細胞組織工学利用医療機器に関しては、審査第二部が担当し、審査の一層の迅速化と専門性の観点から審査官の育成を行っていると同っている。加えて、次世代

医療機器開発評価指標の策定を行っている。再生医療機器に関しては、平成17年度から19年度にかけて細胞シートにかかる評価指標の策定に向けた検討を行っているところであり、次世代医療機器開発指標の策定を行っている経済産業省と府省連携による医療機器開発の推進を図っているところである。

上記のように、再生医療機器に関する評価指標が策定されることは望ましいことであるが、一方で指標が固定化されてしまうのではないかと、という疑問もある。再生医療機器の基盤となる生命科学あるいは組織工学などの知見は日進月歩であることから、評価にかかる指針あるいはガイドラインは、「ガイドライン(案)」として提示すべきとの意見がある。「ガイドライン(案)」とすることで、審査側と開発者側の双方が参考にしつつ、科学的知見に柔軟に対応した改定が容易となり、真に再生医療機器分野の進歩に資するものと考えられ、傾聴に値すると思われる。

再生医療機器の産業化に向けたシーズの顕在化・育成は、大学など研究機関で行われることが多い。わが国においては、医師法の範囲内で行われる再生医療臨床研究が可能であって、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」による実施にあたっては、厚生労働大臣の意見を聴くこととされており、安全かつ有効な再生医療の推進を目指している。細胞組織工学利用医療機器の開発に、ヒト幹細胞臨床研究は



その安全性と有効性の担保のために不可欠であり、ヒト幹細胞臨床研究から細胞組織工学利用医療機器の治験に向けたシームレスな制度の構築が望まれ、臨床研究のデータの品質が確かなものであれば、確認申請などにおける資料として積極的に利用できるような制度改革を期待するところである。

## 2. 研究開発に向けた環境整備への期待

今後の国際競争に勝ち抜くためにも、新規性の高い革新的な再生医療機器の開発が急務である。そのためには、医療・医学あるいは生命科学分野だけでなく、工学、理学、化学、薬学など多岐にわたる分野の高度な連携・融合・統合が必要となってくる。また、新規の開発だけでなく、医師が臨床で使用して得られる経験に基づく改良など、医師と研究開発者の双方向の連携・融合・統合が、再生医療機器の製品が上市販売された後の技術革新にも大きな意味があることも特徴である。米国などにおいては、最先端の工学的シーズの再生医療分野における臨床応用にむけ、多くの大学など研究期間において組織工学センターが設置されており、共同して再生医療機器の研究開発ができるような環境整備が進められている。また、これら組織工学センターでは、研究開発のコーディネートが積極的に行われ、知的財産も一括管理されている。大学など研究機関の周辺には、再生医療を支える企業群があり、米国などにおける再生医療産業の

底支えを行っている。また研究機関での研究成果を産業化するベンチャー企業なども存在し、医療産業クラスターを形成、活発な連携・交流が行われている。わが国においても、医療・医学あるいは生命科学分野だけでなく、工学、理学、化学、薬学など多岐にわたる分野の高度な連携・融合・統合を行い、技術革新を製品化・産業化していくためには、先端的医療機関・研究機関だけでなく、再生医療産業やその周辺企業との連携、いわゆる産学連携が不可欠であり、国立高度医療センターなどに設置される医療クラスターにおいては、これら産学連携がスムーズに進行するように、再生医療を支える人材育成を進めるべきである。これらの観点から、再生医療機器の実用化にむけ、より効果的な政策の立案を期待したい。

## 3. 保険医療における再生医療機器の評価

イノベーションを評価するという観点と、広く国民に先端医療である細胞組織工学利用医療機器を用いた治療を教授する権利および機会を提供するという本来の目的を忘れてはならない。細胞組織工学利用医療機器は、患者未充足ニーズ、いわゆるアンメットニーズに応えるものであるという観点から、特に慢性疾患を対象とした政策立案を期待したい。ただし、イノベーションの適正な評価という美名の下、国民が均等に医療を享受する権利と機会を喪失させてはならない。再生医療

施策の在り方は、国際競争力の強化という観点も重要であるが、国民福祉に貢献するという観点からも議論されるべきである。

## 学への期待

### 1. 再生医療機器創出に向けた国際比較

わが国の再生医学研究は世界の先端を走っているといても過言ではない。しかし、再生医療の臨床応用という観点からみると、総じて欧米諸国に遅れをとっており、韓国、中国といったアジア諸国の猛烈な追い上げを受けている。わが国の再生医療機器の臨床応用の国際比較(図)をみると、皮膚、骨・軟骨領域では世界に遅れをとっていることがわかる。一方、角膜再生ではわが国が世界に先行しており、心筋や脊髄・神経再生、肝臓・膵臓の再生では世界に伍している。したがって、皮膚、骨・軟骨領域の研究開発では、すでに米国などで上市されている再生医療製品を機能的に凌駕するものを研究開発するべきであり、世界に先行している領域では、一刻も早い出口への到達をお願いしたい。

### 2. 子離れのススメ

再生医療シーズは、大学など研究機関で生み出されることが多い。これらシーズを臨床応用・産業化するには、研究者自らが起業するか、あるいは企業にライセンスアウトすることとなる。米国などでは、シーズを有する研



再生医療に期待する

—安全かつ有効な再生医療の実現を目指した産・官・学への期待—

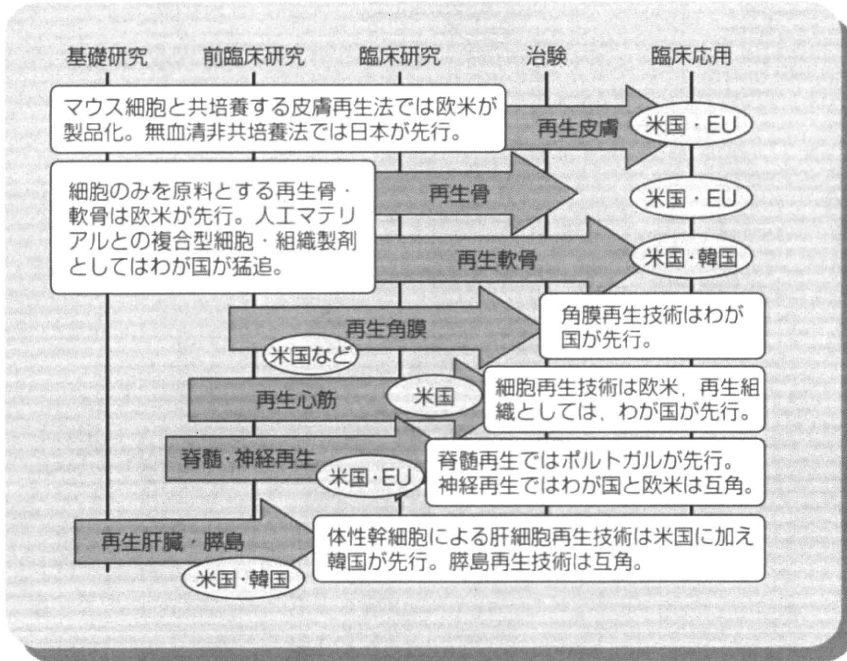


図 わが国の再生医療機器臨床応用国際比較

研究者が起業しても、方向性がみえてくると速やかにM&Aなどでシーズ実現可能な企業に引き渡していく。わが国において、研究開発型ベンチャーの成功例が少ないのは、研究者が過剰に「子(シーズ)」の育成に介入するからではないかともいわれている。子離れをお勧めしたい。

おわりに

幹細胞には科学的にみても医学的にみても、いまだ不明な点が多い。このため、再生医療機器の研究開発および臨床実現においては、十分に安全性・有効性が確保されるべきである。そのような再生医療機器こそが国民の健康福祉に資するものであると認識している。イノベーションの促進・社会還元の一層の加速・国民福祉への寄与という観点と、国民の公衆衛生上の安全安心の担保という観点を、両目でらみつつ、安全かつ有効な再生医療の実現を目指した産官学への期待をお示した。

lecture

# 再生医療と それに伴う行政施策

松山 晃文\*



## Regenerative medicine and health policy

近年の生命科学領域の進歩により、その知見を基盤とした再生医学・医療研究が日進月歩で発展している。一方で、再生医療を臨床実現するには、科学的にみても医学的にみてもいまだ不明な点が残されており、体外増幅やiPS細胞化による細胞の腫瘍化、未知ウイルス等の感染症伝播の可能性など、安全性を危惧する声があることは否めない。厚生労働行政に携わった経験から、まず再生医療臨床応用の現状を国際比較するとともに、わが国における再生医療の社会還元に向けた研究開発橋渡しの行政施策を概括し、再生医療の推進にかかる厚生労働省科学研究費補助金事業を俯瞰したい。

\*第20回新潟移植再生研究会特別講演\*より(2009年12月1日、於 新潟大学医学部有任記念館)

Akifumi Matsuyama\*

key words : 再生医療, 薬事法, 脂肪組織幹細胞

本日は、第20回新潟移植再生研究会にお招きいただきまして誠に光栄です。このような機会を与えていただきました、代表世話人である新潟大学の荒川正昭先生、高橋公太先生に御礼申し上げます。加えまして、シンポジウム“知的障害者の腎移植”では、県立広島病院の大田敏之先生ほか、新潟大学医歯学総合病院の先生方のお話を聞かせていただきましたが、こんなにおもしろい会はなかなかなくて、食い入るように拝聴させていただきました。

大田先生は功なり名を遂げた先生で、非常にわかりやすく説明していただきましたし、鈴木俊明先生のスライドは非常にクリアカットで、なるほどと合点のいくものでした。池田正博先生の発表では、1人の患者さんを治すことに苦労されていて、医者の方だと、私も医者として考え直さなければいけないと思いました。磯貝和也先生は、服薬アドヒアランスの話をされましたが、最初から

粉粒にして投与が可能であること、井越寿美子師長からは、患者さんへの思いと、患者さんと同室にすることがドナーのためになるという話に感動しました。

こういうプラットフォームをつくられた荒川先生をはじめとして、新潟ってすごいなと感じました。私は長野県飯山市の出身で、新潟県十日町の隣なのですが、ここに来る途中で見た夕焼けが長野の夕焼けとまったく同じで、懐かしく思いました。

僭越ではございますが、本日は厚生労働省で経験させていただいたことをもとにお話をさせていただきます。

## 再生医療臨床応用の現状

患者自身から細胞を採取して、なんらかのプロセスを経て、心臓や神経あるいは角膜に再生して患者に戻す。現在、日本で行われている再生医療といわれているもののほとんどがこれです。

一方で、たとえば患児のお父さんやお母さんから細胞を採取して、加工を加えて患児に戻す、同種といわれている再生医療もあります。これは臓

\*Department of Somatic Stem Cell Therapy and Health Policy, Institute of Biomedical Research and Innovation, Foundation for Biomedical Research and Innovation 財団法人先端医療振興財団先端医療センター 研究所 藤島肝臓再生研究グループ



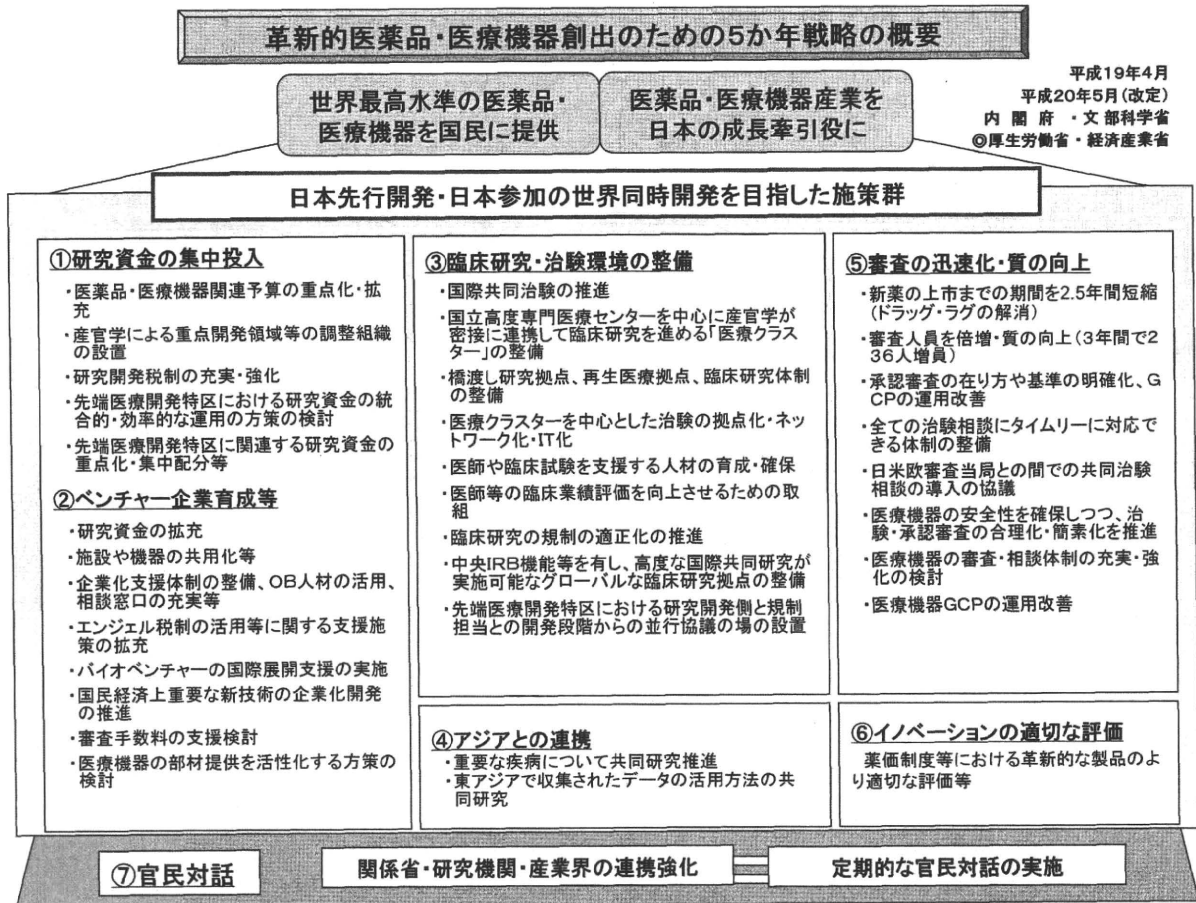


図1 革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略  
(厚生労働省ホームページ<<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2007/04/dl/h0427-3a-1.pdf>>より)

器移植に近いところもあり、なかでも免疫抑制薬の使い方は、臓器移植に携わる方しかわからないこともあって、私たちも協力を仰いでいます。特に、遺伝性疾患を治療しようと思ったら、自身の細胞ではなかなか治せません。iPS細胞(人工多能性幹細胞: induced pluripotent stem cells)による治療が話題となっていますが、たとえばパーキンソン病やハンチントン病の患者はもともと遺伝子変異がありますから、患者の細胞をiPS細胞化して治せるのかという議論があります。

再生医療への期待は大きいのですが、現在のところ再生医療は臓器移植を凌駕することはないといえます。なぜかという、再生医療では、身体に傷があったとしたらそれを修復することはできませんが、臓器自体を修復することは現状ではでき

ないからです。それには臓器移植しかありません。

厚生労働省が進める、イノベーションに向けた政策パッケージのなかで一番の中心が、現在進んでいる“世界最高水準の医薬品医療機器を国民に提供するための革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略”です(図1)。革新的医薬品には、適応外拡大も含まれます。ですから、臓器移植では新しい免疫抑制薬が別の疾患にも投与できる、たとえば脾臓移植では現在、MMF(ミコフェノール酸モフェチル)は保険適用ではありませんが、それを積極的に保険適用にするといったアイデアがこのなかに入っています。

ただ、医療経済的かどうかというクリティカルな問題がありますので、いいものが必ず利用されるわけではありません。一つの薬剤ならマーケッ

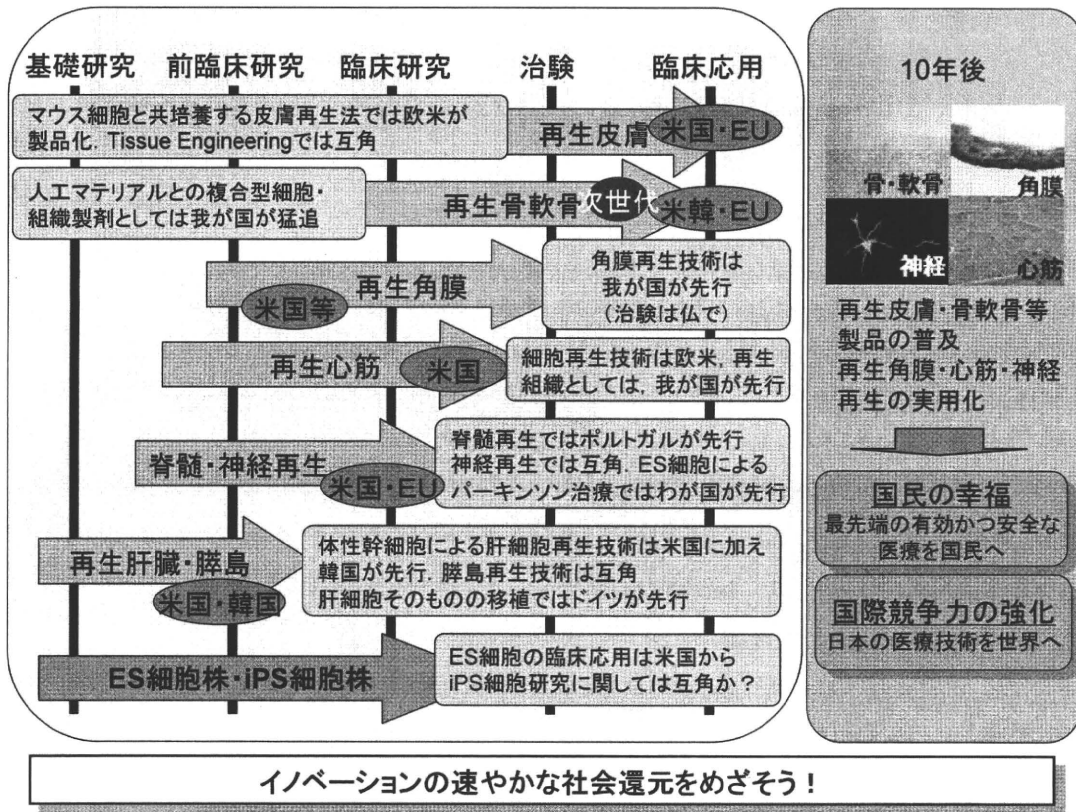


図2 再生医療俯瞰図  
 (松山晃文：再生医療に期待する—安全かつ有効な再生医療の実現をめざした産・官・学への期待。再生医療 7：31-35, 2008 より改変)

トに乗って、あたかも保険からの支出が増えるようにみえますが、そうではなく、患者さんを治すことによってどのぐらい社会資産が上がったのか。すなわち、本来なら治療に1,000万円かかる人が再生医療と免疫抑制剤という新しい治療法を使うことによって500万円ですむのであれば、社会的にメリットがあるといえます。

現在、第3期科学技術基本計画が進行中で、これに乗るかたちで“新健康フロンティア”や“イノベーション25”ならびに前出の“革新的医薬品・医療機器創出のための5カ年戦略”があります。大学病院などは治験によって潤っているところがありますが、今後新しい薬剤はなかなか出てこないと思われ、そうするとお金が入らなくなる。ではどうするかということになります。

おそらく医療機器の治験が、今後は大学病院の主要な収入となる可能性があります。大学病院で

なければ治験ができない医療機器は当然あって、医療機器に関しては医師の“腕”によるという問題がある。たとえば、特殊な機器を使うとなったら、やはり腕のいい医師がやらないとだめだということがあります。医療機器の治験が大学病院の収入の中心になっていくだろうと推測されます。

“革新的創薬等のための官民対話”という会議が設置されていますが、この“等”には、薬剤だけではなく医療機器も入るということです。ですから、臓器移植のときに使うデバイスも、従来は医療雑貨であったのが、医療機器として承認される可能性がある。医療機器で承認されるときに、もし日本発のものであれば、JIS規格(日本工業規格)、TS(technical standard)あるいはTR(technical report)というかたちで規制をつくっていくことによって、世界に打って出ていくことができるのです。



表1 細胞組織利用医薬品医療機器の臨床開発

企業の所属国	Phase I	Phase II	Phase III	合計
日本	1	1	0	2
米国	22(19)	33(11)	9(3)	64(33)
欧州	3	7	5	15
韓国	3	0	0	3
その他	1	5	4	10
合計	29	46	18	93

2008年10月末時点。米国のカッコ内の数字は2004年10月におけるデータ

(第4回PMDA国際バイオリジクスシンポジウム([http://www.pmda.go.jp/event/file/200900908event\\_6.pdf](http://www.pmda.go.jp/event/file/200900908event_6.pdf))より改変)

### 再生医療の社会還元に向けた行政施策

厚生労働省はこれまで、研究費の配分が基礎的研究に若干シフトしていたのではないかという反省がありました。そういう基礎的な部分ではなく、開発支援にウエイトを置きたいと、この開発とはなにかというと、1日でも早くいいものを患者さんにお届けすることです。

再生医療の社会還元に向けて、どうすればいいのでしょうか。まずなにか研究をするときには、自分がどの立ち位置にいるか認識しないとダメです。わが国と諸外国を比較してみましょう(図2)。わが国でも皮膚領域において、J-TEC社のJACEという培養皮膚が承認されましたが、アメリカやEUにくらべると遅れています。骨や軟骨に関しても遅れていて、競争しているとすれば心臓と神経に関してです。

ES細胞(胚性幹細胞: embryonic stem cells)とiPS細胞の臨床応用が実現するかは疑問です。いまiPS細胞に注目が集まっていますが、先日ハーバード大学のある教授と「iPS細胞の臨床応用は可能か」について話をしたときに、「(iPS細胞の臨床応用の実現なんて)君たちはクレイジーだ」と言われました。

iPS細胞は、創薬スクリーニングには使えると思います。日本は世界でも数少ない薬剤を自己開発できる国です。隣の韓国ではできません。スイスやドイツ、フランス、アメリカ、イギリスなど、そうそうたる国の一つに入ります。ですから、

iPS細胞が今後どのように生きるべきか考えると、創薬スクリーニングしかない。もしiPS細胞を創薬スクリーニングに使用できるとしたら、わが国発のガイドラインをつくっていくべきです。それならば日本が世界において勝つ余地があると思われれます。

世界的に再生医療は、実質的には販売されています。ただ正規に承認されたものはほとんどありません。アメリカでも承認されているものは一つしかないし、ヨーロッパでも一つしかありません。日本でも一つしかありません。これをもって日本が遅れているのではなく、アメリカでは有償治療ができるのです。それを考えて、実質的に販売されていると言わせていただきました。

再生医療の治療について日本は非常に寂しい状況で、ほとんど治療を行っていません。アメリカをみても、2004年のデータでは確実に治療プロトコル数が増えています(表1)。このPhase IIIの製品がアメリカやヨーロッパで承認されたあと日本に入ってくると思われれますが、ではどうやって日本の科学技術産業に活かしていくかは、喫緊の課題です。

わが国で承認されたものは、J-TEC社の自己由来培養皮膚JACEしかありませんが、これはアメリカから技術導入しています。治療の段階に入っているのがMSC(間葉系幹細胞: mesenchymal stem cell)で、これはGVHD(移植片対宿主病: graft-versus-host disease)治療用です。これらはほとんど海外から持ってきたものですが、このよう

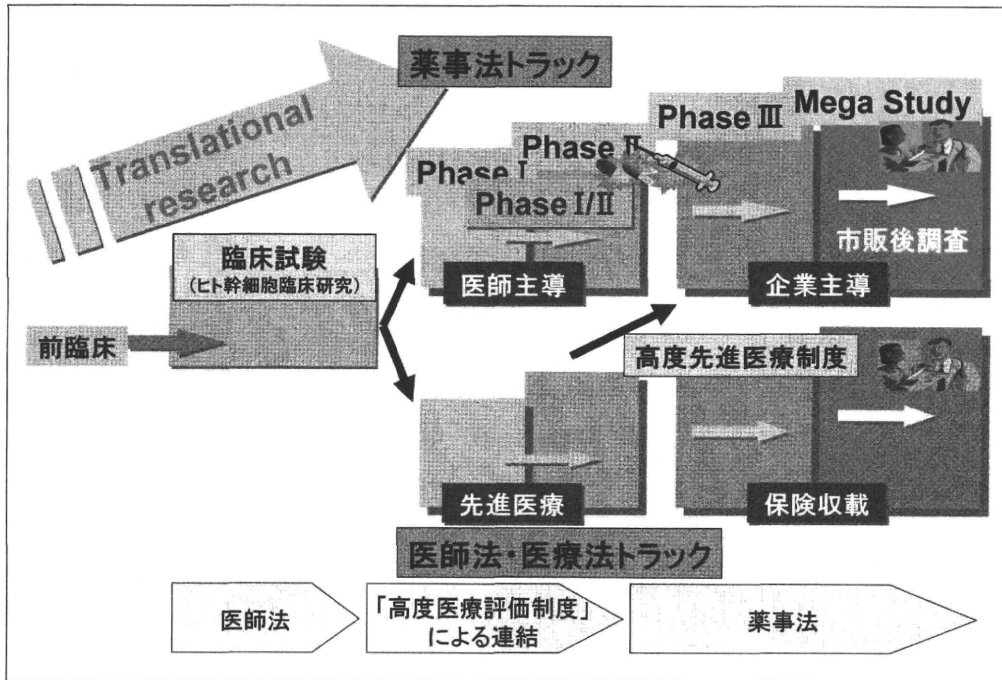


図3 わが国における再生医療の二つの出口  
 (松山晃文：再生医療の実現化—制度論的検討。再生医療 8：85-89, 2009より改変)

な現状はなんとかしなければならず、行政的には喫緊の課題です。ですから、いかに臨床研究を行っているみなさんを導くかが課題ですし、シームレスな、臨床研究を行ったあとに企業に引き取っていただくためのシステムが必要です。

アメリカでは、なぜこんな中途半端なことが起こっていないのかというと、FDA(食品医薬品局)という、日本でいえばPMDA(医薬品医療機器総合機構)に相当する組織が一括してfirst-in-manの部分管理しているためです。ただ、アメリカでも「それは厳しすぎる」という意見があって、Phase I GMP(good manufacturing practice)ガイドラインというガイドラインが出てきました。これはわが国のヒト幹細胞臨床研究のレベルとほぼ一緒です。世界的にみて、アメリカは厳しすぎたのが下がってきて、日本は甘すぎたのが上がってきたということで、ほぼ同じ水準に終息してきていることは興味深いといえます。

日本では再生医療のトラックは二つあって、臨床研究を行ったあとに治験に入っていくトラック

と、医師法・医療法のなかで医療技術として保険医療化を行うトラックがあります(図3)。薬事法トラックから企業主体でいけば償還価格、薬価がつくという流れになるし、医師法・医療法トラックでいけば手技料として保険収載がされます。ただ、いいものは企業主導に持っていきたいということがあって、ここを結びつける制度として、高度医療評価制度、いわゆる第3項先進医療が2008年4月にスタートしました。みなさんが頑張って得たデータを拾い上げて、なんとか企業に使ってもらえるように持っていくことが行政施策の一環です。

なかなかそれが通らないので、PMDAは厳しすぎるのではないかとされています。ですが、「そうではない」といいたい。たとえばiPS細胞ではなにをクリアしなければいけないかリストアップしてみると、さまざまなことがあります。iPS細胞は奇形腫形成が非常に多く、iPS細胞を未分化のまま維持することが非常に難しいのです。

現在、細胞組織加工製品の評価基準の見直しを



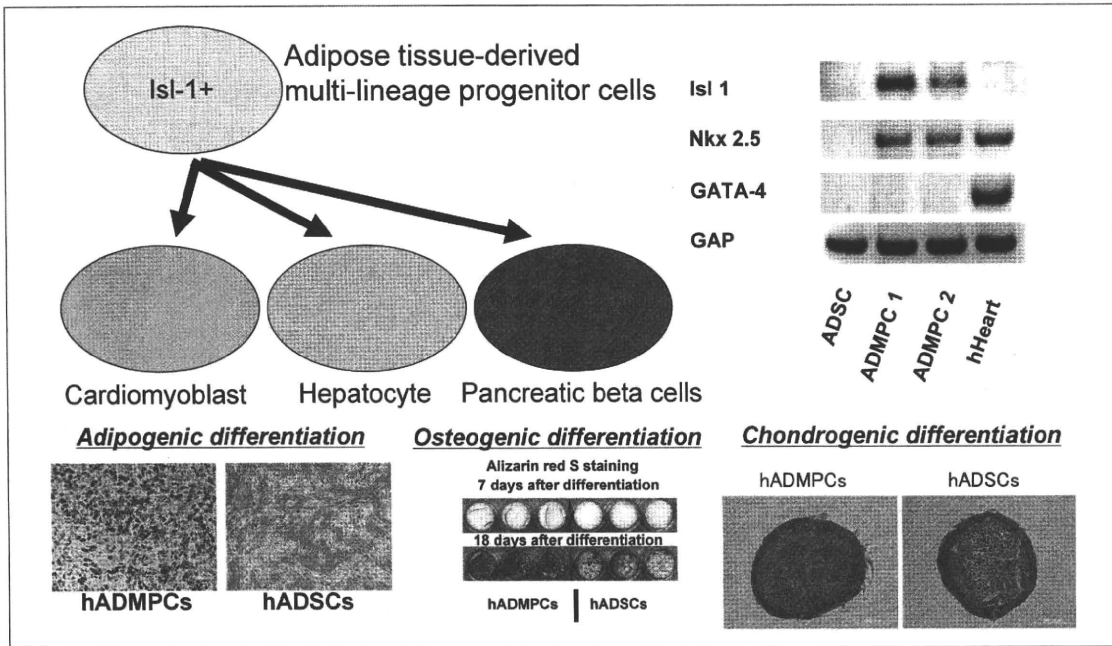


図4 新規脂肪組織由来幹細胞

行っています。ディスカウントするのではなく、「確かに、昔のガイドラインというのはわかりにくかったね」という反省で、自家細胞と同種細胞にわけて、わかりやすく書き下しをしたものが2008年に発出されています。現在、幹細胞由来製品の安全性評価ガイドラインとして、PMDA顧問で、近畿大学総合薬学研究所所長の早川堯夫先生たちと一緒に、ES細胞ならびにiPS細胞を使うときのガイドラインをつくっています。こういうものは公開性を持たないと、本当にOKかどうか分からないので、作成されたガイドラインをオフィシャルな形で公開し、みなさんの目でチェックしていただくことになっています。

それから現在進行形ですが、甘利明先生が規制改革担当大臣であったときに日本再生医療学会が中心になって行っていた、臨床研究における保険外併用療法と臨床研究費の問題があります。これは喫緊の課題で、現在のようにあまりにも規制をきつくすると、東京大学ならPhase IIIまでできる、京都大学ならPhase IIまでできるけれど、そのほかの大学ではPhase Iができるかできないかというレベルになってしまう。混合診療ができなかつ

たら臨床研究なんかできませんし、臨床研究に気合いを入れて、たとえば再生医療や臓器移植でやろうと思ったら、1億円、2億円の研究費ではどう考えても無理なわけです。これがいまホットな話題で、日々熱い議論がなされています。なかなか難しいのですが、アイデアの一つとして、DPC(診断群分類：diagnosis procedure combination)をやっているところは、包括診療のなかで臨床研究費をみたらいいのではないかという議論があります。

脂肪組織由来幹細胞の新展開

こんな話ばかりしていると、「おまえ、なにも研究していないだろう」というおしかりを受けそうですので、私が神戸で行っている研究について発表させていただきます。神戸発世界になるのか、神戸発神戸になるのか正直いってわかりませんが、いま頑張ってやっていることをお話しします。

この写真は、実は私のおなかです。これを出すと、私の研究室の女の子からは、「松山先生がいつも発表で、これを話のつかみにするのは恥ずかしくてしょうがない」と言われるのですが、この研

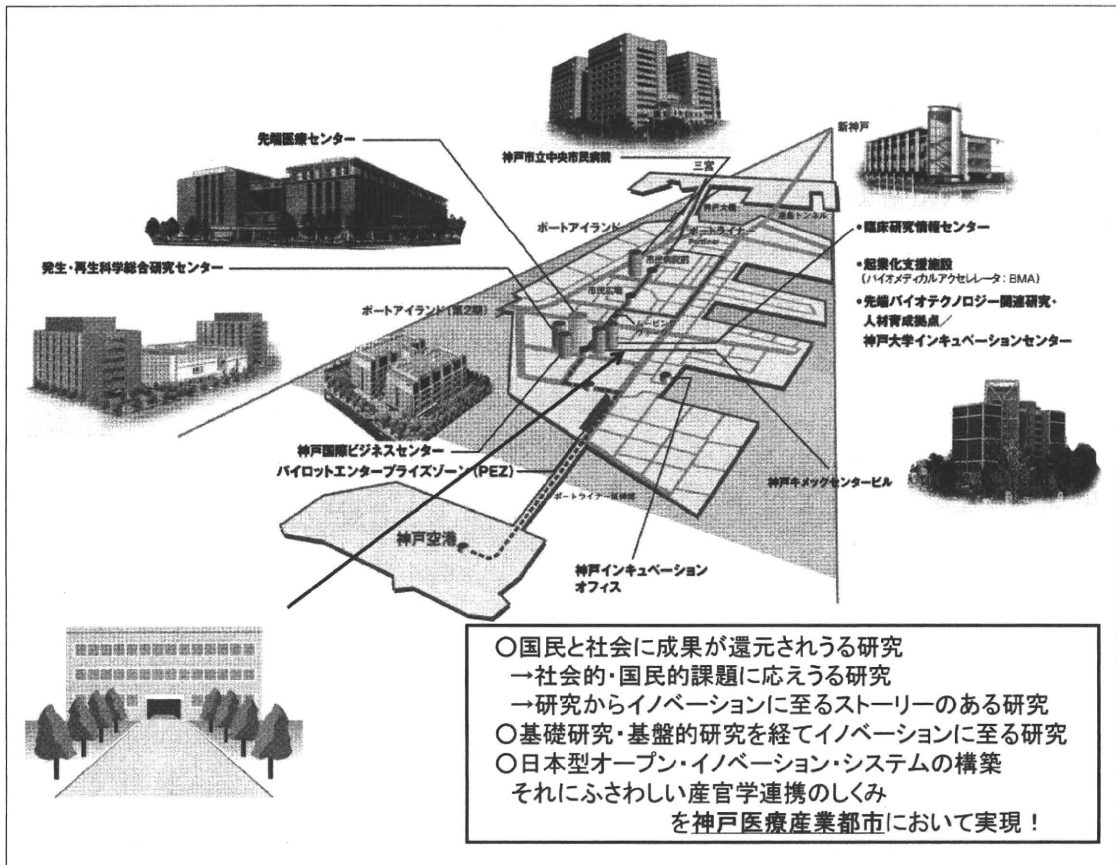


図5 神戸医療産業都市構想：神戸であればできること，神戸でなければできないこと

究を始めたとき、私には研究費がなかったので、10万円で研究をはじめました。研究費が10万円だとラットも試薬も買えません。以前勤務しておりました大阪大学医学部附属病院未来医療センターに、たまたま残っていた使い古しの薬剤と、自分のおなかの脂肪を使ってスタートした研究がここまできて、なんとか花開きつつあります。

この脂肪から新しい脂肪組織由来幹細胞を採取しましたが(図4)、従来の方法よりも効率よく脂肪にも分化し、骨化もして、islet-1という転写因子が発現しています。非常に未分化なマーカーを発現している細胞だけをとることに成功しました。

この islet-1 があると心臓や肝臓、膵臓になったりするので、「ではその心臓をつくらう」という話になりました。私のもとで仕事をしてきていた

のは大倉華雪さんという、もと薬剤師だった人ですが、「再生医療をやりたい」と大阪大学大学院心臓血管外科の門をたたいてくれました。しかしながら、「脂肪細胞から心臓をつくる」というテーマを大学院の何年間でやれと言われて、そのとき彼女は泣きそうでしたが、「先生、そんな無理です」と言いながらもなんとか研究をやり遂げました。

Cardiomyoblast-like cells といいますが、心臓マーカー蛋白質である alpha-cardiac actin, myosin light chain が発現してきます。0.1% DMSO をかけただけで心筋芽細胞に分化します。その細胞を細胞シートにして、澤芳樹先生のテクニックを使ってラットに移植をしました。移植すると生命予後が非常によく、28例に移植して全例が生存しています。一方、DMSOで処理しない群では、ある程度死んでいます。16週間後に比較してみ



ると、心臓は動きつづけていました。

つぎに膵臓ができるかどうか検討しました。非常に苦勞して、6個のステップでなんとかインスリンを分泌する細胞をつくることができました。これは大変試行錯誤しましたが、大学院生たちには、「私の青春を返してくれ」と言われたくらい研究はしんどかったです。膵島、膵臓の場合、周りにグルカゴンがきて、真ん中にインスリン分泌細胞、 $\beta$ 細胞がくるのですが、きちんとそういうクラスターをつくることができ、インスリンが分泌しています。糖尿病マウスに移植後には血糖がきれいに下がりました。

ここで、成功だとシャンパンを開けたのですが、2週間ちょっとしか血糖値が下がらないこと、あとになってわかったのですが、1匹のマウスを治すのに200万円近くかかっている、人に換算すると2週間治療するだけで2億円かかるのです。「これはどう考えても無理だよ」と。この話を行政官にすると真っ青な顔になって、「申しわけないけれど、その研究はやめてくれ」と言われました。現在はもう少し安く、なんとか700万円ぐらいで治療できるというプロトコルを開発しつつあります。

肝細胞への分化では、同じようにクラスターをつくって、oncostatinとか、FGF(fibroblast growth factor)、HGF(hepatocyte growth factor)を入れます。これも全部大倉さんがやってくれました。というのは、私の下についてくれたのが彼女しかいなかったんです。毎晩11時ぐらいにディスカッションしたり、彼女が家に帰ったあともノートの内容がわるいと夜中の1時でも電話したので、「人権無視だ」とよく言われました。それでも6本の論文が出来上がったから、「許してくれ」と言えるかなと。ちゃんとアルブミンも出ています。

それからLDLの取り込みを蛍光脂質でみていますが、きれいに細胞が赤色に染まり、索状で肝臓の構造ができているのがある程度わかります。これのいいところは、尿素もちゃんとつくっていることです。

この再生した肝細胞をマウスに移植しました。3カ月にわたって毎週2回、四塩化炭素を腹腔内

に打つという実験系です。これで慢性肝炎のモデルをつくりました。実際に移植すると、アルブミン、ビリルビンの値がともに改善しました。ただ残念なことに、実際にこれを人に投与すると1億円かかるんですね。それを考えると、いまのところはスクリーニングしかない。脂肪組織由来の幹細胞で、肝臓、膵臓、心臓ができるのですから、現実にはiPS細胞はいらないともいえます。

大阪大学では特任准教授をさせていただいたのですが、大学では循環器なら循環器、肝臓なら肝臓と、特定の疾患しかやらせてもらえないということがありました。それならと、脂肪を源にしていろいろな再生医療研究をしたところ、たまたま神戸市の医療産業都市(図5)から、「ぜひともこれを臨床応用してほしい」という話があり、アカデミアから出ることになりました。アカデミアで私が一番やりたかったのは教育で、アカデミアにはいつか帰りたいと思っていますが、神戸ではどうやって大学発シーズを臨床に持っていくか、社会還元するかということ、OJT(on the job training)という形でやっていきたいと考えています。

ハッピーなことに、当研究所の周りには神戸市立中央市民病院や理化学研究所など多くの施設があります。みなさんにサポートしていただき、神戸の医療産業都市構想を実現する、私の持っているシーズというものをアウトプットできるように、より努力したいと思っています。

本研究においては、特に肝臓、膵臓、心臓に関して、さまざまな先生方のサポートをいただきました。なかでも、話に出ました大倉華雪さんは日本学術振興会の研究員ですが、大変おもしろい経歴の持ち主です。6年間引きこもりで家にいましたが、ご家族が病気をされたことから一念発起して薬剤師になり、その後再生医療で頑張りたいということで大阪大学大学院心臓血管外科に来ました。修士2年間と大学院3年間、「私に人権はないのか」と言いながらもよく頑張ってくれました。本研究にサポートしていただきましたみなさまに感謝申し上げます。