

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26220206

研究課題名(和文) 合成小分子化合物による細胞の操作と分析

研究課題名(英文) Control and Analysis of Cells by Synthetic Small Molecules

研究代表者

上杉 志成 (Uesugi, Motonari)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：10402926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 153,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、合成小分子化合物の新しい利用法を提案した。合成小分子化合物でヒト細胞の基本的性質を操作・検出して、細胞治療の効率を高める。本研究で開発した化合物は、近未来、難病の細胞治療に役立つだろう。基礎細胞研究のツールであると同時に、一般国民が熱望する細胞治療に役立つ化合物を創製し、その利用法の原理の証明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テクノロジーブレークスルー 細胞治療の分野に化合物ツールを活かすという新しいコンセプトを提案した。実際、本基盤研究で開発したアノキス阻害剤は国内化学大手に、KP-1は国内試薬会社に、KY02111は国内ベンチャー企業にライセンスアウトされた。

サイエンスブレークスルー 本研究で開発した化合物はいずれも、基礎細胞生物学のツールとなる可能性がある。実際、KP-1やKY02111は試薬として販売され、さまざまな研究者の研究に利用されている。アノキス阻害剤やTRPA1アゴニストは細胞研究者に個別に分与し、活用されている。

研究成果の概要(英文)：This research project proposed a new way of using synthetic small molecules, in which small chemical compounds serve as tools for improving the efficacy and productivity of cell therapy by manipulating and detecting fundamental biological processes in human cells. The proposed research included proof-of-concept experiments that developed and used small molecule tools both for basic cell biology and cell therapy.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 化学プローブ 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

これまでの人間の歴史の中で、生理活性化合物はさまざまな用途に利用されてきた。主な用途を3つ上げると、基礎生物学研究のツール、医薬品、農薬だろう。本研究では、生理活性化合物を利用する第4の道を切り拓く。第4の道とは、細胞治療を化合物で効率化することである。細胞治療が今後の医療で大きな役割を果たすと予想される。化合物医薬品の重要性は変わらないが、化合物医薬品だけでは治癒不可能な疾病に対して、一般国民は細胞治療に大きな期待をかけている。

細胞治療の問題の一つは、高価であることだ。化合物の最大の利点は安価な大量生産性。細胞治療の生産性や効果を安価な化合物で効率化できれば、細胞治療の高コストを軽減できる。本研究が成功すれば、細胞治療の分野に化合物ツールを活かすという新しいコンセプトを実証できる。

2. 研究の目的

本プロジェクトの目的は、医薬品や農薬の開発ではない。本プロジェクトでは、合成小分子化合物の新しい利用法を提案する。合成小分子化合物でヒト細胞の基本的性質を操作・検出して、細胞治療の効率を高める。近未来、難病の細胞治療が実現化すると予想される。基礎細胞研究のツールであると同時に、一般国民が熱望する細胞治療に役立つ化合物を創製し、その利用法の原理の証明を行う。具体的な目標は以下の4つである。アノキス阻害剤の創成と活用、心筋分化促進化合物の創製と理解、ヒト幹細胞可視化化合物の創成と活用、ヒト幹細胞を選択的に死滅させる化合物の創成と活用。これらの研究を通じて、生理活性化合物の新しい世界を開拓したい。

目的1 アノキス阻害剤の創製と活用

細胞治療の大きな問題の一つに、移植効率の悪さがある。細胞を培養して、それを浮遊させ、注射器に入れ、体内に注入すると、ほとんどの細胞は死滅する。この原因は「アノキス(細胞接着喪失によるアポトーシス)」である。通常細胞は接着していると、アノキスは起こさない。これはフィブロネクチンなどの細胞外マトリクスタンパク質に結合して、細胞死抑制シグナルを受けているからである。本プロジェクトでは、フィブロネクチンという440 kDaの巨大タンパク質を模倣する小分子合成化合物を創製し、細胞のアノキスを阻害する。

目的2 心筋分化促進化合物の創製と理解

幹細胞治療では、iPS細胞やES細胞を十分に増殖させた後、必要な細胞に分化させる必要がある。ゆえに、特定細胞への分化を促進する化合物の研究が世界で活発化している。例えば、代表者は、熊本大学桑昭苑教授との共同研究で膵細胞への分化を促進する化合物の発見とそのメカニズム解明を行った[Nat. Chem. Biol., 2014]。また、京都大学中辻憲夫教授との共同研究では、心筋細胞への分化を促進する化合物を発見した[Cell Rep., 2012]。本プロジェクトでは、代表者らが発見・合成した世界最強の心筋分化促進化合物KY02111のメカニズムを解明し、心筋分化の分子基盤を理解する。また、さらに強力な心筋分化促進化合物を創製する。

目的3 ヒト幹細胞可視化化合物の創製と活用

幹細胞治療の問題の一つに、残存多能性幹細胞による腫瘍形成がある。ヒト多能性幹細胞(ES細胞やiPS細胞)に選択的な蛍光小分子プローブがあれば、分化後も残存している多能性幹細胞の検出や精製を簡便化できる。代表者らはヒト多能性幹細胞を選択的に染める蛍光物質を蛍光化合物ライブラリーから探索し、Kyoto Probe 1 (KP-1)を発見した。KP-1はヒト多能性幹細胞と多種の分化細胞(副腎、肝、気管支上皮、微小血管内皮、血液幹細胞、心筋細胞など)を染め分けることができる。しかし、その特異性は完全ではなく、神経細胞は染め分けできない。本プロジェクトでは、KP-1にさらなる工夫を加え、その特異性を向上させる。

目的4 ヒト幹細胞を選択的に死滅させる化合物の創製と活用

KP-1はヒト多能性幹細胞を染め分けることができるが、直接除去することはできない。残存多能性幹細胞を選択的に死滅させる化合物があれば、幹細胞治療による腫瘍形成を軽減し、移植安全性をあげることができる。代表者らは、KP-1がなぜ多能性幹細胞に選択的であるかを調べ、その分子メカニズムを解明した[Cell Rep, 2014]。このメカニズム

を利用して、KP-1と同様な選択性をもつ毒性化合物#185を見いだした。この化合物は海洋天然物の誘導体である。本プロジェクトでは、化学的改良と利用法の実証を行う。

3. 研究の方法

世界的な細胞治療研究やケミカルバイオロジー研究の進展は早く、競争は激しい。4つの目的を早期に達成するため、それぞれ同時に実験を行った。有機合成、細胞生物学、分子生物学の手法を組み合わせたケミカルバイオロジー研究を展開した。目的 1、2、3、4 共に、予備実験によって発見した化合物を元にして研究をすすめた。メカニズム研究、合成展開、細胞や動物を用いた研究を組み合わせた。融合分野であるため、我が国を代表する専門家と連携して研究を進めた。

4. 研究成果

研究は4つの目的すべてにおいて、おおむね目的を達成した。

目的1 アノキス阻害剤の創製と活用

計画通り、平成 26 年度にアノキス阻害剤のプロトタイプを発表できた[ACIE, 2014]。さらに、ヒトプライマリー細胞に有効な新規アノキス阻害剤を発見できた。これらの成果を利用して、正常細胞をがん細胞のように転移させる化合物を設計し合成した。アノキス阻害剤にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP2) を結合した分子は、培養細胞でアノキスの抑制と細胞の浸潤を促進した。分担研究者西川が動物での皮下移植実験を行い、筋肉組織中への細胞浸潤を確認した。この化合物-タンパク質複合体を用いて、多様な細胞種での生着効率や細胞機能への影響を解析し、ACS Chem Biol に発表した。

目的2 心筋分化促進化合物の創製と理解

生理活性化合物のメカニズム決定は通常困難を極める。平成 26 年度、平成 27 年度、平成 28 年度の3年間にわたって粘り強くメカニズム研究を続け、ついに KY02111 の標的タンパク質としてタンパク質 X を同定した。KY02111 がタンパク質 X の機能に及ぼす影響を解析したところ、KY02111 はタンパク質 X に結合するものの、その古典的な酵素活性にはほとんど影響しないことが示された。一方、KY02111 はタンパク質 X に結合してタンパク質 Y との相互作用を阻害することが確認された。タンパク質 Y は核膜の維持に重要とされているがその役割は明確にされていない。タンパク質 Y の変異は主に心臓疾患に見られるため、心筋発生に関与している可能性が高い。「先端モデル動物支援プラットフォーム 分子プロファイリング支援活動」での活性評価により、KY02111 が TGFβ 刺激による N-カドヘリンの発現を抑制することが見出された。タンパク質 X のノックダウン及びタンパク質 Y のノックダウンでも、TGFβ 刺激による N-カドヘリンの発現が抑制された。また、KY02111 の添加、あるいはタンパク質 Y のノックダウンにより、SMAD4 の発現量の低下が認められた。以上の結果より、KY02111 はタンパク質 X とタンパク質 Y の結合を阻害することでタンパク質 Y を不活性化し、SMAD4 の発現量を低下させることで TGFβ シグナルを抑制し、心筋分化を促進することが示唆された。今後論文発表する。

目的3 ヒト幹細胞可視化化合物の創製と活用

多能性幹細胞を選択的に染色する蛍光化学プローブ Kyoto Probe 1 (KP-1)の研究を進展させ、企業にライセンスすることで市販されるようになった。現在幹細胞研究に活用されている。KP-1 の構造活性相関を得ることに成功し、目的 4 の進展に大きく貢献した。ただし、KP-1 と ABC トランスポーターの共結晶については、よい分解能の結晶は得られなかった。

目的4 ヒト幹細胞を選択的に死滅させる化合物の創製と活用

平成 26 年度に海洋天然物オカダ酸誘導体誘導体#185 を論文発表した[JACS, 2014]。平成 27 年度には、ヒト多能性幹細胞を選択的に死滅させる KP-1 の毒性類縁体 KP-C3-SN38 を発見した。この化合物は優れた選択性を示し、ヒト多能性幹細胞の除去に利用されると期待される。平成 28 年度に論文発表を達成した[ACIE, 2017]。また、ヒト iPS 細胞や神経幹細胞などの幹細胞はアルカリフォスファターゼを細胞表面に発現している。SN38 にリン酸基を導入し、細胞透過性を抑えた化合物を合成した。この化合物はアルカリフォスファターゼによってリン酸基が除去されるときのみ細胞内に入り、多能性幹細胞や神経幹細胞を死滅させ、分化した神経細胞を純化した。平成 29 年度に Chem. Comm. に論文を発表した。ヒト iPS 細胞由来の神経混合細胞での試験をさらに行い、米国のベンチャー企業で神経細胞作成の際に利用されるようになった。世界で活用されることが期待される。

本研究の目標は、合成小分子化合物でヒト細胞の基本的性質を操作・検出して、細胞治療の効率を高めることである。しかし、その新規物質探索研究の中で、細胞治療の効率化には直接役立つが、ヒト細胞の基本的性質を操作・検出する化合物を偶発的に発見することがあった [JACS, 2015] [JACS, 2016]。また、本研究で開拓した方法が他の研究に活用できることがあった [Cell Chem Biol, 2017] [Stem Cell Rep, 2016] [JACS, 2016] [ACIE, 2015] [J. Biol. Chem, 2018] [Chem. Commun., 2018]。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

- 1) Takashima, I., Kusamori, K., Hakariya, H., Takashima, M., Vu, TH., Mizukami, Y., Noda, N., Takayama, Y., Katsuda, Y., Sato, S., Takakura, Y., Nishikawa, M., Uesugi, M. Multifunctionalization of Cells with a Self-Assembling Molecule to Enhance Cell Engraftment. *ACS Chem. Biol.*, 14, 775-783 (2019). DOI: 10.1021/acscchembio.9b00109 査読有
- 2) Yatsuzuka, K., Sato, S., Pe, KB., Katsuda, Y., Takashima I., Watanabe, M., Uesugi, M. Live-Cell Imaging of Multiple Endogenous mRNAs Permits the Direct Observation of RNA Granule Dynamics. *Chem. Commun.* 54, 7151-7154 (2018). DOI: 10.1039/c8cc03805h 査読有
- 3) Perron, A., Nishikawa, Y., Iwata, J., Shimojo, H., Takaya, J., Kobayashi, K., Imayoshi, I., Mbenza, NM., Takenoya, M., Kageyama, R., Kodama, Y., Uesugi, M. Small-molecule screening yields a compound that inhibits the cancer-associated transcription factor Hes1 via the PHB2 chaperone. *J Biol Chem.* 293, 8285-8294 (2018). DOI: 10.1074/jbc.RA118.002316 査読有
- 4) Mao, D., Chung, X. K. W., Andoh-Noda, T., Qin, Y., Sato, S., Takemoto, Y., Akamatsu, W., Okano, H., Uesugi, M. Chemical decontamination of iPS cell-derived neural cell mixtures. *Chem. Commun.*, 54, 1355-1358 (2018). DOI: 10.1039/C7CC08686E 査読有
- 5) Asano, L., Watanabe, M., Ryoden, Y., Usuda, K., Yamaguchi, T., Khambu, B., Takashima, M., Sato, S., Sakai, J., *Nagasawa, K., *Uesugi, M. Vitamin D metabolite, 25-Hydroxyvitamin D, regulates lipid metabolism by inducing degradation of SREBP/SCAP. *Cell Chem Biol.* 24, 207-217 (2017). DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.12.017 査読有
- 6) Mao, D., Ando, S., Sato, S., Qin, Y., Hirata, N., Katsuda, Y., Kawase, E., Kuo, T.F., Minami, I., Shiba, Y., Ueda, K., Nakatsuji, N., *Uesugi, M. A synthetic hybrid molecule for selective removal of human pluripotent stem cells from cell mixtures. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 1765-1770 (2017). DOI: 10.1002/anie.201610284 査読有
- 7) Sakano, D., Choi, S., Kataoka, M., Shiraki, N., Uesugi, M., Kume, K., Kume, S. Dopamine D2 receptor-mediated regulation pancreatic beta cell mass. *Stem Cell Rep.* 7(1), 95-109 (2016). DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.05.015 査読有
- 8) Katsuda, Y., *Sato, S., Asano, L., Morimura, Y., Furuta, T., Sugiyama, H., *Hagihara, M., *Uesugi, M. A small molecule that represses translation of G-quadruplex-containing mRNA. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 9037-9040 (2016). DOI: 10.1021/jacs.6b04506 査読有
- 9) Takaya, J., Mio, K., Shiraiishi, T., Kurokawa, T., Otsuka, S., Mori, Y., *Uesugi, M. A potent and site-selective agonist of TRPA1. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 15859-15864 (2015). DOI: 10.1021/jacs.5b10162 査読有
- 10) Parvatkar, P., Kato, N., Uesugi, M., Sato, S., *Ohkanda, J. Intracellular generation of a diterpene-peptide conjugate that inhibits 14-3-3-mediated interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 15624-15627 (2015). DOI: 10.1021/jacs.5b09817 査読有
- 11) *Sato, S., Watanabe, M., Katsuda, Y., Murata, A., Wang, D. O., *Uesugi, M. Live-cell imaging of endogenous mRNAs with a small molecule. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 1855-1858 (2015). DOI: 10.1002/anie.201410339 査読有
- 12) Frisco-Cabanos, H.L., Watanabe, M., Okumura, N., Kusamori, K., Takemoto, N., Takaya, J., Sato, S., Yamazoe, S., Takakura, Y., Kinoshita, S., *Nishikawa, M., *Koizumi, M., *Uesugi, M. Synthetic molecules that protect cells from Anoikis and their use in cell transplantation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 11208-11213 (2014). DOI: 10.1002/anie.201405829 査読有

[学会発表] (計 97 件)

- 1) Uesugi, M. “Small Molecules That Control Energy Metabolism.” 2019 Queenstown Molecular Biology (QMB) Meetings in Shanghai. March 2019, Shanghai, China.
- 2) Uesugi, M. “Small Molecules That Control Energy Metabolism.” The 1st International Symposium on the Chemical Communications (ISCC2019), January 2019. Tokyo, Japan.
- 3) Uesugi, M. “Nutrient-Oriented Peptide Library as a Source of Energy Metabolism Modulators.” 10th International Peptide Symposium. December 2018, Kyoto, Japan.
- 4) Uesugi, M. “Natural Product Derivatives for Controlling Stem Cells.” 6th International Symposium on Marine Drugs in the Yangtze River Delta. November 2018, Nanjing, China.
- 5) Uesugi, M. “Synthetic Molecules for Detecting and Eliminating Human Pluripotent Stem Cells.”

- IBS Conference on Molecular Recognition & Imaging in Complex System. July 2018, Pohang, Korea.
- 6) Uesugi, M. “*Synthetic Molecules for Cell Biology and Cell Therapy.*” BOSS XVI - 16th Belgian Organic Synthesis Symposium. July 2018, Brussels, Belgium.
 - 7) Uesugi, M. “*Small Molecules That Control Lipid Homeostasis.*” The 24th IUBMB and 15th FAOBMB Congress. June 2018, Seoul, Korea.
 - 8) Uesugi, M. “*25-hydroxyvitamin D and Lipid Metabolism.*” The 21st Workshop on Vitamin D. May 2018, Barcelona, Spain.
 - 9) Uesugi, M. “*Synthetic Small-Molecule Tools for Cell Biology and Cell Therapy.*” AFPS2017 Integration, Improvement and Innovation toward Targeted Drug Discovery. November 2017, Xiamen, China.
 - 10) Uesugi, M. “*Synthetic Molecules for Cell Biology and Cell Therapy.*” The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. January 2017, Osaka, Japan.
 - 11) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell biology and cell therapy.*” Department of Chemistry and Oncology Seminar, University of Oxford. January 2017, Oxford, UK.
 - 12) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell biology and cell therapy.*” Special Seminar, Peking-Tsinghua Center for Life Sciences (CLS). November 2016, Beijing, China.
 - 13) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell biology and cell therapy.*” Special Seminar, Department of Chemistry, Seoul National University. November 2016, Seoul, Korea.
 - 14) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell biology and cell therapy.*” Nano/Bioscience International Symposium. October 2016, Kyoto, Japan.
 - 15) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell therapy.*” 2016 Queenstown Molecular Biology Meetings in Shanghai. March 2016, Shanghai, China.
 - 16) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for detecting and eliminating human pluripotent stem cells.*” ABC2016 – 6th Special Meeting on ABC Proteins. March 2016, Innsbruck, Austria.
 - 17) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell biology and cell therapy.*” The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. January 2016, Osaka, Japan.
 - 18) Uesugi, M. “*Small molecule tools for cell biology and cell therapy.*” Pacificchem 2015: Natural Product-based Drug Discovery. December 2015, Hawaii, USA.
 - 19) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell biology and cell therapy.*” XVII NOST-Organic Chemistry Conference. October 2015, Jaipur, India.
 - 20) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell biology and cell therapy.*” AIMECS 2015 (10th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium in 2015). October 2015, Jeju, Korea.
 - 21) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell biology and cell therapy.*” IUPAC2015 (45th World Chemistry Congress). August 2015, Busan, Korea.
 - 22) Uesugi, M. “*Synthetic molecules for cell biology and cell therapy.*” The 51th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2015) - "Drug Discovery and Selection - Understanding Targets and Mechanisms." July 2015, Avignon, France.
 - 23) Uesugi, M. “*Small molecule tools for cell therapy.*” The 3rd Asian Chemical Biology Conference (ACBC2014). December 2014, Singapore.
 - 24) Uesugi, M. “*Small molecules that detect and remove human pluripotent stem cells.*” Sino-Japan Workshop on Chemical Biology. October 2014, Shanghai, China.
 - 25) Uesugi, M. “*Small molecule tools that detect and remove human pluripotent stem cells.*” 11th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry.” September 2014, Nagano, Japan.
 - 26) Uesugi, M. “*Small molecule tools for cell therapy.*” Forth Norman Bethune International Forum on Medical Sciences. September 2014, Jilin, China.

〔図書〕(計1件)

- 1) 佐藤 慎一、勝田 陽介、上杉 志成. 化学同人. “*ビオチン化体を利用した化学的標的タンパク質精製法*” 「*生理活性分子のケミカルバイオロジー：標的の同定と作用機構*」2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計4件)

名称： 免疫を賦活化する自己集合体
 発明者： 上杉 志成、フエ・ティ・ブー、吉田 大樹、山崎 晶、島根 徹
 権利者： 国立大学法人京都大学
 種類： 特許
 番号： 特願 2018-161582
 出願年： 2018/08/30
 国内外の別： 国内

名称： Nutrient Conjugates
発明者： 上杉 志成、古田 智行、西川元也
権利者： 国立大学法人京都大学
種類： 特許
番号： 特願 2019-007537
出願年： 2019/01/21
国内外の別： 国内

名称： 細胞移植を効率化する化合物
発明者： 上杉 志成、高嶋 一平、西川元也
権利者： 国立大学法人京都大学 / 学校法人東京理科大学
種類： 特許
番号： PCT/JP2019/011320
出願年： 2019/03/19
国内外の別： 国外

名称： Cell Cycle Progression Inhibitor
発明者： 上杉 志成、ペロン アメリ、児玉 裕三
権利者： 国立大学法人京都大学
種類： 特許
番号： PCT/JP2019/007414
出願年： 2019/02/27
国内外の別： 国外

取得状況（計1件）

名称： Compound for Removing Human Pluripotent Stem Cells
発明者： Motonari Uesugi, Di Mao, Eihachiro Kawase
権利者： Kyoto University
種類： 特許
番号： WO2018/043567
取得年： 2018/03/08
国内外の別： 国外

〔その他〕

【ホームページ】 <https://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~uesugi/ja/index.php>

【新聞記事・テレビニュース】

- ・ 2017年1月27日 産経新聞28面「ビタミンDの脂質制御 京大が仕組みを解明」
- ・ 2017年1月27日 朝日新聞33面「ビタミンDに脂質抑制効果 京大教授ら、仕組み解明」
- ・ 2017年1月28日 毎日新聞24面「ビタミンDが脂質合成を阻止」
- ・ 2017年1月29日 日本経済新聞朝刊30面「ビタミンDが脂質制御」
他に掲載。関西テレビ、KBS京都でも放送された。

【文部科学省「一家に1枚」】

- ・ 上杉 志成 他 「くすりの形」 文部科学省「一家に1枚」シリーズ 2015年4月1日発行。24万枚が印刷され、文部科学省より配布。日本全国の小中高等学校4万校で掲示された。



「一家に1枚 くすりの形」ポスター

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 西川 元也
ローマ字氏名： Nishikawa Makiya
所属研究機関名： 東京理科大学
部局名： 薬学部
職名： 教授
研究者番号（8桁）： 40273437

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。