

平成 22 年 6 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19310138

研究課題名（和文） 幹細胞分化制御機構のケミカルバイオロジー

研究課題名（英文） Chemical Biology of Stem cell differentiation

研究代表者

中尾 洋一（NAKAO, Yoichi）

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：60282696

研究成果の概要（和文）：

マウス ES 細胞を用いた in vitro 血管再構築系によって新たな血管新生阻害剤を見出し、それらを用いて ES 細胞から血管への分化過程を制御するメカニズム解明につながるような知見を得ることを目的に研究を行った。研究代表者が見出した血管新生阻害剤であるアズマミドについてはマウス iPS 細胞を用いて血管新生阻害活性を評価したところ、ES 細胞を用いた場合と同様に血管新生阻害活性を認め、iPS 細胞を用いた血管再構築系の化合物評価系としての有効性を確認できたため、ES と iPS 細胞を用いた場合の違いを詳細に検討している。また、アジェラディンについては海外共同研究者との連携によって誘導体の活性評価を行い、これまで考えられていたマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）以外の標的分子の存在があることを見出し、血管への細胞分化誘導における機能を検討している。

研究成果の概要（英文）：

We were planning to find small molecules useful for the study of the controlling mechanism of stem cell differentiation to vascular systems. We have studied application of marine natural anti-angiogenic compounds, azumamides, to the in vitro vascular re-organizing model using mouse iPS cells, in which we confirmed their potent effects. Therefore, this model, as well as that using mouse ES cells, was shown to be useful for the study of stem cell differentiation systems. Next, we have evaluated anti-angiogenic effects of analogues of geladine, in which we could identified unknown targets for ageladines besides the known MMP.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 7,600,000  | 2,280,000 | 9,880,000  |
| 2008年度 | 3,500,000  | 1,050,000 | 4,550,000  |
| 2009年度 | 3,400,000  | 1,020,000 | 4,420,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：生理活性物質・ケミカルバイオロジー

## 1. 研究開始当初の背景

本研究を開始した当初は、2006年に京都大学の山中らはマウス繊維芽細胞に4つの遺伝子を導入してES細胞と同様に全能性を有する幹細胞へのリプログラミングに成功すしてはいたものの[Yamanaka et al. *Cell* 126, 1-14, (2006)], まだヒトiPS細胞へのリプログラミングは報告されておらず、その後のいわゆるiPSフィーバーが起こる以前の研究申請であった。

しかしながら、来るべき次世代の研究トレンドを低分子化合物による細胞分化制御機構の解明と考え、本研究申請をおこなった。本研究を申請するきっかけとして、2004年に米国Scripps研究所のSchultzらによって報告されたreversineという低分子性化合物が、マウスの筋芽細胞を多能性前駆細胞へと脱分化を誘導し、そこから脂肪細胞および骨芽細胞を再分化誘導することに成功したことがあげられる[Schultz et al. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 410-411, (2004)]。

われわれもすでに、低分子化合物を用いた化学遺伝学的手法による幹細胞研究の有効性に早くから着目し、それまでに、血管および心筋の再生モデルであるマウス ES 細胞を用いた *in vitro* 血管再構築系と、血管新生に関連する各種酵素群の阻害活性試験をアッセイ系として、さまざまな分子を標的とする血管新生阻害剤を数多く見出していた。

## 2. 研究の目的

そこで、これらの低分子阻害剤を分子プローブとして、ES細胞から血管が発生する際の分化プロセスを解析すれば、幹細胞の分化制御機構の解明を目指したケミカルバイオロジー研究に展開出来るのではないかと考えた。

幹細胞の分化制御機構を解明するには、さまざまな刺激が遺伝子発現プログラムにそれぞれどのような影響を及ぼすかを同定することが必要となるため、さまざまなシグナル伝達の変化と、それにともなうエピジェネティックな修飾と遺伝子発現パターンの変化、および細胞の表現系を関連付けて総合的に解析することが可能な表現型のはっきりした細胞分化系である、マウスES細胞を用いた *in vitro* 血管再構築系[Yamashita et al. *Nature* 408, 92-96, (2000)]を表現型として、各種血管新生阻害剤により引き起こされる、ES細胞から血管への分化誘導プロセスにおけるエピジェネティックな修飾パターンの変化、および遺伝子発現の変化を詳細に解析して相互に関連付け、それぞれの遺伝子産物の機能と相互作用ネットワークを解明することで、幹細胞の分化制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は生物活性を有する低分子化合物を広く海洋生物から探索し、これらについて、血管新生阻害活性を評価することで、有効な低分子プローブ分子を同定し、これらを用いて作用メカニズムの解析を試みた。

## 4. 研究成果

これまでに得られた、血管新生阻害剤であるアズマミドについてはマウス iPS 細胞を用いて血管新生阻害活性を評価したところ、ES細胞を用いた場合と同様に血管新生阻害活性を認め、iPS細胞を用いた血管再構築系の化合物評価系としての有効性を確認できた(論文7)。また、アジェラジンについては海外共同研究者との連携によって誘導体の活性評価を行い、これまで考えられていたマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)以外の標的分子の存在があることを見出した(未発表)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

すべて査読有

1. Ueoka, R.; Nakao, Y.; Kawatsu, S.; Yaegashi, J.; Matsumoto, Y.; Matsunaga, S.; Furihata, K.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. Gracilioethers A-C, Anti-malarial Metabolites from the Marine Sponge *Agelas gracilis* J. *Org. Chem.* 74, 4204-4207, (2009).
2. Umehara, M.; Takada, Y.; Nakao, Y.; Kimura, J. Intramolecular Ester Exchange of Potent Cytotoxic Kulokekahilide-2 *Tetrahedron Lett.* 50, 840-843, (2009).
3. Yamashita, T.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.; Oikawa, T.; Imahara, Y.; Fusetani, N. A New Antiangiogenic C<sub>24</sub> Oxylipin from the Soft Coral *Sinularia numerosa* *Bioorg. Med. Chem.* 17, 2181-2184, (2009).
4. Araki, T.; Matsunaga, S.; Nakao, Y.; Furihata, K.; West, L.; Faulkner, D. J.; Fusetani, N. Koshikamide B, a cytotoxic peptide lactone from a marine sponge *Theonella* sp. *J. Org. Chem.* 73, 7889-7894, (2008).
5. Murayama, S.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.

- Asteropterin, an Inhibitor of Cathepsin B, from the Marine Sponge *Asteropus simplex* *Tetrahedron Lett.* **49**, 4186-4188, (2008).
6. Ueoka, R.; Nakao, Y.; Fujii, S.; van Soest, R. W. M.; Matsunaga, S. Aplysinolides A-C, Cytotoxic Monoamide Derivatives from the Marine Sponge *Aplysinopsis digitata* *J. Nat. Prod.* **71**, 1089-1091, (2008).
  7. Nakao, Y.; Narazaki, G.; Hoshino, T.; Maeda, S.; Yoshida, M.; Maejima, H.; Yamashita, J. K. Evaluation of Antiangiogenic Activity of Azumamides by the *in vitro* Vascular Organization Model Using Mouse Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 2982-2984, (2008).
  8. Nakao, Y.; Kawatsu, S.; Okamoto, C.; Okamoto, M.; Matsumoto, Y.; Matsunaga, S.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. Ciliatamides A-C, Bioactive Lipopeptides from the Deep-sea Sponge *Aaptos ciliata* *J. Nat. Prod.* **71**, 469-472, (2008).
  9. Takada, Y.; Umehara, M.; Nakao, Y.; Kimura, J. Revised absolute stereochemistry of natural kulokekahilide-2 *Tetrahedron Lett.* **49**, 1163-1165, (2008).
  10. Okamoto, C.; Nakao, Y.; Fujita, T.; Iwashita, T.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N.; Matsunaga, S. Cytotoxic C<sub>47</sub>-Polyacetylene Carboxylic Acids from a Marine Sponge *Pertrosia* sp., *J. Nat. Prod.* **70**, 1816-1819, (2007).
  11. Umeda, Y.; Furihata, K.; Sakuda, S.; Nagasawa, H.; Ishigami, K.; Watanabe, H.; Izumikawa, M.; Takagi, M.; Doi, D.; Nakao, Y.; Shin-ya, K. Absolute Structure of Prunustatin A, a Novel GRP78 Molecular Chaperone Down-Regulator, *Org. Lett.* **9**, 4239-4242, (2007).
  12. Takada, Y.; Mori, E.; Umehara, M.; Nakao, Y.; Kimura, J. Reinvestigation of the stereochemistry of kulokekahilide-2, *Tetrahedron Lett.* **48**, 7653-7656, (2007).
  13. Meketa, M. L.; Weinreb, S. M.; Nakao, Y.; Fusetani, N. Application of a 6 $\pi$ -1-Azatriene Electrocyclization Strategy to Total Synthesis of the Marine Sponge Metabolite Ageladine A and Biological Evaluation of Synthetic Analogues, *J. Org. Chem.* **72**, 4892-4899, (2007).
  14. Kobayashi, H.; Miyata, Y.; Okada, K.; Fujita, T.; Iwashita, T.; Nakao, Y.; Fusetani, N.; Matsunaga, S. The Structures of Three New Shishididemniols from a Tunicate of the Family Didemnidae, *Tetrahedron* **63**, 6748-6754, (2007).
  15. Wen, S.; Carey, K. L.; Nakao, Y.; Fusetani, N.; Packham, G.; Ganesan A. Total Synthesis of Azumamide A and Azumamide E, Evaluation as Histone Deacetylase Inhibitors, and Design of a More Potent Analogue, *Org Lett.* **9**, 1105-1108, (2007).
- 〔学会発表〕(計 11 件)  
一般
1. 勝俣良祐、中尾洋一『海綿由来の細胞毒性物質の探索研究』日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 27 日、大坂
  2. 前島寛、渡部裕喜、中尾洋一『海洋生物由来の細胞毒性化合物に関する研究』日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 27 日、大坂
  3. 石上進太郎、中尾洋一『海洋生物由来の抗リーシュマニア活性化化合物に関する研究』日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 28 日、大坂
- 招待講演
1. 中尾洋一『医薬品素材としての海洋天然化合物』富士山麓産学官金連携フォーラム 2010 沼津 2010年3月
  2. 中尾洋一『天然化合物を利用したケミカルエピゲノミクス研究の可能性について』大阪大学蛋白質研究所セミナー「疾患の基盤としてのエピジェネティクス」大坂 2009 年 6 月
  3. Nakao, Y. “Search for Chemical-“Epi”genetic Probes from Marine Invertebrates” Waseda-NUS Joint Symposium, Chemical Epigenomics -The fusion of Epigenetics, Stem Cell Biology and Chemical Biology.(主催) シンガポール 2009 年 3 月
  4. Nakao, Y. “Marine Natural Products as Tool for Chemical Biology” The Second Waseda-NTU Symposium in Chemistry 2009. シンガポール 2009 年 3 月
  5. Nakao, Y. “Searching Probe molecules for Chemical-Epigenetics from Marine

Invertebrates” 大阪大学蛋白質研究所リポート 2008 兵庫 2008 年 12 月

6. 中尾洋一『幹細胞のケミカルバイオロジー』理研ケミカルゲノミクスセミナー 和光市 2008 年 4 月
7. Nakao, Y. “Bioactive small molecules from marine organisms” Symposium A: Aquatic Ecosystems, 4<sup>th</sup> Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology. つくば 2007年9月
8. 中尾洋一『海洋生物からの血管新生阻害剤の探索』理化学研究所神戸研究所分子イメージング科学研究センターセミナー 神戸 2007年5月

〔図書〕(計1件)

1. Nakao, Y.; Fusetani, N. Marine Invertebrates: Sponges. In *Comprehensive Natural Products ; Chemistry II Chemistry and Biology*; Mander, L.; Lui, H.-W., Eds. Elsevier: Oxford, , Vol. 2, pp. 327-362, (2010).

〔産業財産権〕

出願状況(計5件)

1. 名称:新規環状デプシペプチドおよびその用途  
発明者:山下潤、中尾洋一  
権利者:国立大学法人京都大学、学校法人早稲田大学出願日:平成22年5月17日  
種類:米国仮出願  
番号:US 61/334,961  
出願年月日:平成22年5月17日  
国内外の別:国外
2. 名称:腔腸動物由来抗原虫化合物  
発明者:中尾洋一、石上進太郎、後藤康之、河津信一郎、井上昇  
権利者:学校法人早稲田大学、国立大学法人帯広畜産大学  
種類:出願特許申請  
番号:特願2010-055150  
出願年月日:平成22年3月11日  
国内外の別:国内
3. 名称:環状デプシペプチド  
発明者:木村純二、中尾洋一、梅原将洋  
権利者:学校法人青山学院  
種類:出願特許申請  
番号:特願2009-21622  
出願年月日:平成21年2月2日  
国内外の別:国内
4. 名称:環状デプシペプチド  
発明者:木村純二、中尾洋一、梅原将洋

権利者:学校法人青山学院  
種類:出願特許申請  
番号:特願2009-21621  
出願年月日:平成21年2月2日  
国内外の別:国内

5. 名称: Evaluation of Antiangiogenic Activity of Azumamides by the *in vitro* Vascular Organization Model Using Mouse Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells.  
発明者:山下潤、中尾洋一  
権利者:国立大学法人京都大学、学校法人早稲田大学  
種類:米国仮出願  
番号:US 61/124,721  
出願年月日:平成20年4月18日  
国内外の別:国外

取得状況(計1件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.chem.waseda.ac.jp/nakao/>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
中尾 洋一(早稲田大学・理工学術院)

研究者番号:60282696

(2)研究分担者  
宮本 和明(独・国立病院機構・中国がんセンター臨床研究部)

研究者番号:30332373

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: