

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23710254

研究課題名（和文） ガンを誘発する未分化 iPS 細胞を特異的に認識して除去するための分子システムの開発

研究課題名（英文） Development of molecular system to distinguish and remove undifferentiated stem cells causing to tumor formation

研究代表者

平田 直（HIRATA NAO）

京都大学 物質—細胞統合システム拠点 研究員

研究者番号：90596355

研究成果の概要（和文）：幹細胞は高い増殖能と様々な細胞や組織へ分化する能力を持っており、汎用性の高い再生医療技術として注目されている。しかし、幹細胞から誘導した分化細胞を体内に移植する場合、未分化の幹細胞がガン化するという問題点もある。このようなリスクを低減するために、幹細胞と分化細胞とを識別することは重要である。申請者はスクリーニングにより、幹細胞を特異的に染色する蛍光小分子を見出した。興味深いことに、この分子はある種の分化細胞に対しては蛍光シグナルを示さない。申請者は、このような蛍光挙動が細胞膜に発現する2種類のトランスポーターに依存することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Human stem cells have been serving as valuable tools for regeneration therapy. Despite advances, substantial challenges remain for clinical application of stem cells. One problem is that tumors arise when animal models are transplanted with cell samples containing remaining undifferentiated stem cells. Strategies to detect and ablate undifferentiated stem cells are required for safer stem cell therapy. We have screened a fluorescent-compound library for molecules that selectively stain human iPS cells, and found one promising compound. Our analyses indicate that the selectivity results from distinct expression pattern of ABC transporters between human pluripotent stem cells and its differentiated cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：蛍光小分子、幹細胞、分化細胞、トランスポーター、バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞(induced pluripotent stem cell、人工多能性幹細胞)は高い増殖能と様々な細胞や組織へ分化する能力を持っている(Takahashi et al. 2007. Cell. 131. 861-872)。また、患者自身の細胞からiPS細胞を樹立することができるので、これまで再生医療技術が抱えていた倫理問題や拒絶反応といった重大な課題も克服できるである

う。このため、iPS細胞は汎用性および安全性の高い再生医療技術として、その応用研究が進められている。

しかしながら、実用化のためには依然として残っている問題もある。iPS細胞から誘導した分化細胞を患者に移植する場合、未分化のiPS細胞が少しでも残っているとガン化の危険性が高くなることだ。このリスクを避けるために、未分化のヒトiPS細胞と分化細胞

胞とを分離すること、すなわち、細胞の純化が必要とされている。

2. 研究の目的

(1) ガンを誘発する未分化幹細胞を選択的に検出し、それらを除去する手法の開発を目的として、未分化幹細胞に対して特異性を示す蛍光小分子を見出し、それらの発光メカニズムを解明する

(2) 未分化幹細胞を識別する蛍光小分子に対して、薬剤や光増感剤を導入することによって未分化幹細胞を選択的に排除する分子システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞を識別する蛍光小分子を探索し、その合成展開をすることで蛍光特性の向上を目指す。また、未分化幹細胞に対する特異性を評価することで構造活性相関を調べる。

(2) 構造活性相関で得られた情報を基に、未分化幹細胞特異的な蛍光小分子に光増感剤や薬剤を導入する。未分化幹細胞に対する選択的な蛍光シグナルおよび細胞毒性を評価し、構造の最適化を行う。

(3) 幹細胞を識別する蛍光小分子の発光メカニズムを解明する。蛍光小分子の動的挙動および標的タンパク質を特定することにより、特異的な蛍光発光のメカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1) 申請者は、326個の蛍光化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。その結果、未分化のhiPS細胞(human induced pluripotent stem cell、ヒト人工多能性幹細胞)のミトコンドリアに局在し特異的に染色する蛍光小分子(KP-1)を見出した。興味深いことに、KP-1は分化し始めた細胞に対しては蛍光シグナルを示さない(図1)。

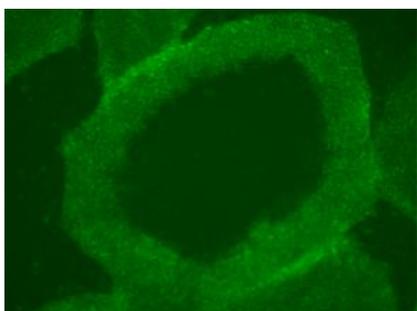


図1. KP-1は分化し始めた細胞に対しては蛍光シグナルを示さない

(2) ①このような蛍光挙動は細胞膜に発現する2種類のABC(ATP-Binding Cassette)トランスポーター; ABCB1、ABCG2に依存することが明らかとなった。分化細胞ではABCB1およびABCG2の発現量が分化誘導前に比べてそれぞれ2.9倍、2.4倍増加している(図2)。

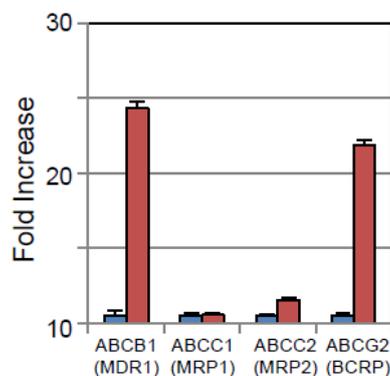


図2. ABCトランスポーターの発現量の比較
(青:分化誘導前、赤:分化誘導後)

②次に、ABCB1およびABCG2トランスポーターを過剰に発現するモデル細胞を用いた蛍光染色を行った。トランスポーターを発現していない親細胞(KB3-1細胞)に遺伝的に形質転換を施し、それぞれ、ABCB1およびABCG2トランスポーターを恒常的に発現させた(KB/ABCB1細胞およびKB/ABCG2細胞)。これらの細胞にKP-1を添加したところ、それぞれの細胞内で蛍光シグナルは観測されなかった。一方、ABCB1およびABCG2トランスポーターの阻害剤(サイクロスポリンA、CsAおよびフミトレモルギンC、FTC)で処理すると蛍光発光が観測された(図3)。これらの結果は、KP-1がABCB1およびABCG2トランスポーターの基質となり、細胞外へ排出されることを示している。

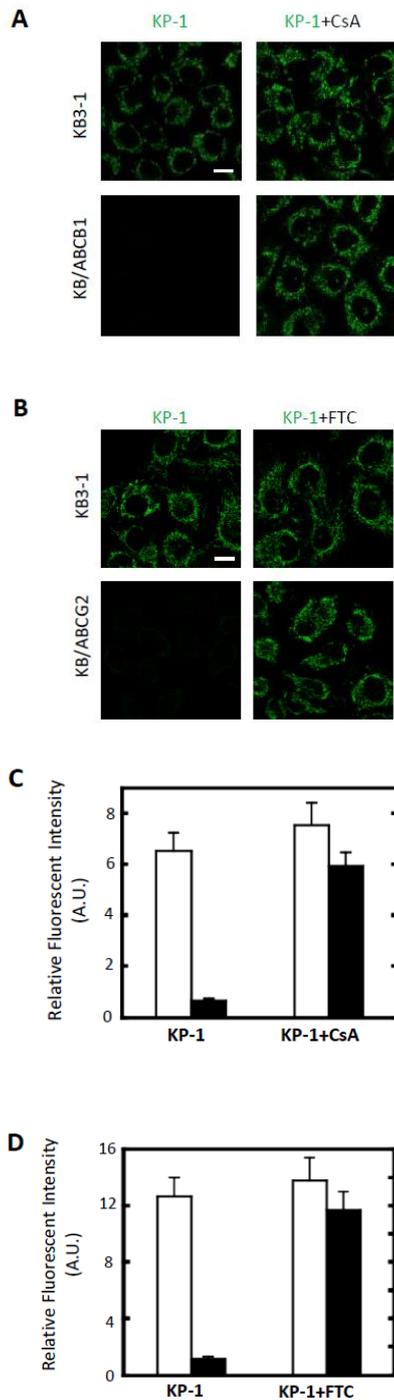


図3. (A) ABCB1 および(B)ABCG2 トランスポーターを過剰に発現するモデル細胞を用いた蛍光染色図
(C) KB3-1 細胞 (白) および KB/ABCB1 細胞 (黒) における蛍光強度
(D) KB3-1 細胞 (白) および KB/ABCG2 細胞 (黒) における蛍光強度

(3) ①幹細胞から誘導した分化細胞に対し

て KP-1 を添加すると、分化細胞内での蛍光シグナルは幹細胞の場合と比べて著しく減少した。次に、この分化細胞に対してトランスポーター阻害剤を加えて KP-1 を添加すると蛍光シグナルの上昇が見られた (図4)。

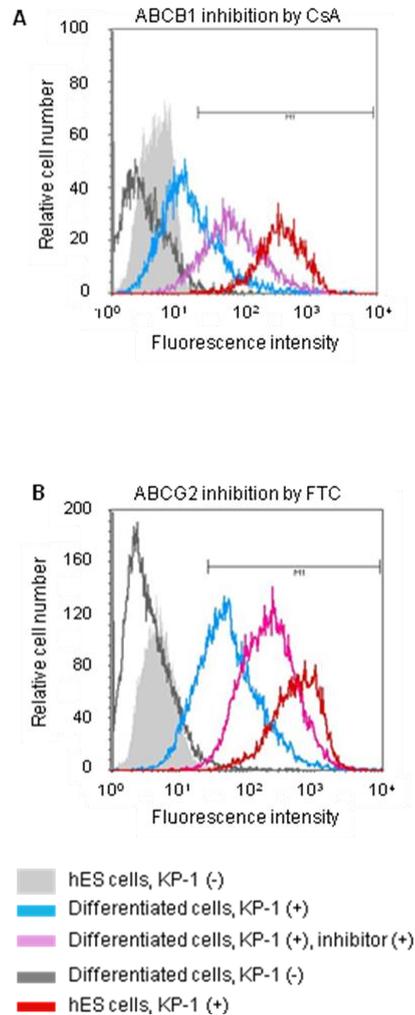


図4. 幹細胞 (赤) と分化細胞 (青) での蛍光シグナル強度の比較
分化細胞をトランスポーター阻害剤で処理すると蛍光強度が増加する (ピンク)

②以上の結果から、KP-1の蛍光挙動はトランスポーターに依存することが示された。すなわち、分化細胞においては、KP-1はABCB1およびABCG2トランスポーターの多剤排出機能により細胞外へ排出される。一方、分化誘導前の未分化幹細胞ではABCB1およびABCG2の発現量は著しく低下しており、KP-1は排出されずに細胞内のミトコンドリアに局在する(図5)。

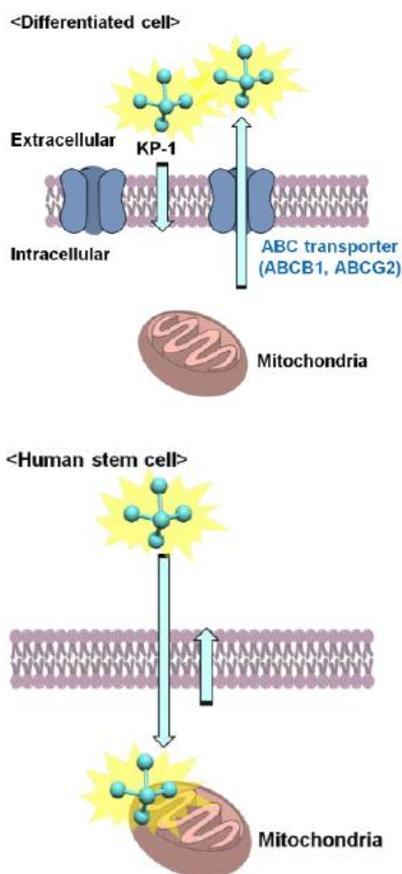


図5. 分化細胞と幹細胞におけるKP-1の蛍光発光メカニズム

(4) このようなKP-1の特性を利用して、現在、KP-1にリンカー部位とその先に抗がん剤を導入した新たな分子を合成した。この分子はトランスポーターに対してKP-1と同様の基質特異性を持ち、また、幹細胞に対して毒性を示すことが確認された。すなわち、この分子が未分化の幹細胞と分化細胞を識別し、かつ、幹細胞を死滅させることによって除去する新たな分子システムとなりうることを示唆された。

(5) 幹細胞と分化細胞を2種類のトランスポーター依存的に識別する蛍光小分子はこれまでに例がなく、新たなバイオイメージング技術として期待される。さらに、このような特性を利用して応用展開(例えば抗がん剤

を導入し、検出と毒性の二重の機能を持った分子)が可能であり、幹細胞を用いた再生医療への一助となるであろう。また、トランスポーターの発現と分化の関わりなど、未解明な問題も残されており、今回見出した蛍光小分子を用いることによって生物学的に重要な知見を与え得るものと期待される。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計4件)

(1) Nao Hirata et al., “Fluorescent Chemical Probes for Human Stem Cells” 8 CiRA International Symposium, 3/11-3/12(2013), 京都大学 百周年時計台記念ホール (京都)

(2) Nao Hirata et al., “Fluorescent Chemical Probes for Human Stem Cells” 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 12/1(2011), 京王プラザ (東京)

(3) Nao Hirata et al., “Development of a fluorescence probe for detecting undifferentiated stem cells” Heidelberg-Kyoto Joint Symposium, 7/21-7/23(2011), German Cancer Research Center (Heidelberg, Germany)

[図書] (計2件)

(1) 竹本尚弘、平田直、上杉志成、羊土社、実験医学(増刊) Vol. 30, No7, 2012 「疾患克服をめざしたケミカルバイオロジー」 第4章 7. 細胞治療を助ける小分子化合物、2012年、09頁-215頁

(2) 平田直、上杉志成、シーエムシー出版、蛍光イメージング/MRIプローブの開発(第16章 幹細胞を可視化する蛍光小分子化合物)、2011年、146頁-152頁

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: Method for sorting of pluripotent cells

発明者: Motonari Uesugi, Nao Hirata, Asako Murata, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori, Eihachiro Kawase, Kaori Yamauchi, Kazumitsu Ueda, Yuto Fujibayashi, Young-Tae Chang, Shinya Yamanaka, Masato Nakagawa

権利者: 同上

種類: 実用新案権

番号: 61/584, 110

出願年月日: 2011年

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 直 (HIRATA NAO)

京都大学・物質－細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：90596355