

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月13日現在

合成小分子化合物による細胞の操作と分析

Control and Analysis of Cells
by Synthetic Small Molecules

課題番号：26220206

上杉 志成 (Uesugi Motonari)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授



研究の概要

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。

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

本研究では、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。①アノイクス阻害剤の創成と活用、②心筋分化促進化合物の創製と理解、③ヒト幹細胞可視化化合物の創成と活用、④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。

3. 研究の方法

＜目的1 アノイク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「アノイクス（細胞接着喪失によるアポトーシス）」である。通常の細胞は接着していると、アノイクスは起こさない。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。本研究では、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、細胞のアノイクスを阻害する。合成化合物によって細胞移植効率を改善する。

＜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。本研究では、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[Cell Rep., 2012]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＞ KP-1はヒト多能性幹細胞と多種の分化細胞を染め分けることができる。代表

者らはケミカルバイオロジー的手法により、KP-1 の選択性メカニズムをすでに解明した [Cell Rep., 2014]。分化細胞の多くで発現している数種の ABC トランスポーター (薬剤排出ポンプ) が多能性幹細胞では発現しておらず、KP-1 はそれらのトランスポーターに選択的な基質である。つまり、KP-1 は分化細胞で排出され、多能性幹細胞で蓄積する。本研究では、KP-1 とトランスポーターとの相互作用を理解し、KP-1 にさらなる工夫を加える。KP-1 誘導体を種々合成し、iPS 細胞や分化細胞で評価する。

<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。KP-1 と同じ ABC トランスポーター選択性をもつ毒物は、多能性幹細胞を選択的に死滅できるはずである。代表者らは、KP-1 の選択性に近い細胞毒性分子として、#185 を発見した。各種細胞を用いたさらなる検証、腫瘍形成抑制実験を行う。また、KP-1 のメカニズムや化合物特性から学び、多能性幹細胞を選択的に死滅できる化合物の設計・合成・評価を行う。

4. これまでの成果

研究は 4 つの目的すべてにおいて、おおむね順調に進展している。本研究開始以降に、*Angew. Chem. Int. Ed.* に 2 報、*J. Am. Chem. Soc.* に 1 報の成果を報告し、偶発的な成果として *J. Am. Chem. Soc.* に 2 報に報告した。

<目的 1> 計画通り、平成 26 年度にアノイク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イクス阻害剤を発見できた。当初の発想よりもさらに大胆な着想で研究は進展している。

<目的 2> 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、ついに標的タンパク質の同定に至った。心筋分化に新しい知見を提供すると思われる。来年度以降も計画通り、研究を進める。

<目的 3> 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。

<目的 4> 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]。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たないが、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]。

5. 今後の計画

当初の計画通り研究を続行し、4 つの目標の達成を目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Mao, D., Ando, S., Sato, S., Qin, Y., Hirata, N., Katsuda, Y., Kawase, E., Kuo, T.F., Minami, I., Shiba, Y., Ueda, K., Nakatsui, 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).
2. 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).
3. Takaya, J., Mio, K., Shiraishi, 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).
4. 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).

ホームページ

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~uesugi/>