

細胞を操る合成化合物

京都大学化学研究所・物質－細胞統合システム拠点(WPI-iCeMS)

上杉 志成

人間の歴史の中で、生理活性小分子化合物は、さまざまな形で用いられてきました。その利用法を大きく分ければ三つあります。医薬品、農薬、基礎生物学研究のツールです。私たちの研究室が焦点を当ててきたのは、細胞生物学のツールとしての化合物です。細胞の基本的性質を変える合成化合物を見つけ出し、それらを道具として生命現象を操作・解析してきました。細胞の仕組みは非常に複雑ですが、有機化合物をツールとして用いることで、新たな切り口で細胞を研究することができます。

今回の講演の前半では、最近のツール研究を短く紹介します。例えば、RNA G-quadruplex に結合する合成小分子化合物 RGB-1 [Katsuda *et al.* 2016]、ワサビレセプターとして知られる TRPA1 チャンネルの強力なアゴニスト [Takaya *et al.* 2015] などが挙げられます。

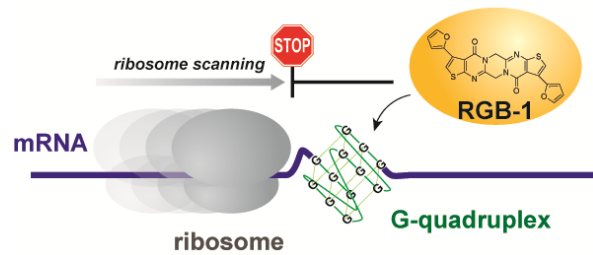
講演の後半では、生理活性化合物を利用する第4の道を紹介します。生理活性化合物は、医薬品、農薬、基礎生物学研究のツール以外にも利用できるはずです。そんな利用法のひとつとして、細胞治療を助ける化合物という考え方をとりあげます。細胞治療では、細胞が疾病を治癒します。しかし、ヒト細胞の基本的な性質を操る化合物の中に、細胞治療を効率化するものがあるかもしれません。化合物を細胞治療にも活用することができればと考えています。

私たちの研究室は、他の研究室と共同して、心筋細胞分化誘導化合物 [Minami *et al.* 2012] や膵β細胞分化誘導化合物 [Sakano *et al.* 2014] などを発見してきました。今回の講演では、ヒト多能性幹細胞に選択的な蛍光物質 KP-1 [Hirata *et al.* 2014]、ヒト多能性幹細胞に選択的除去する化合物 [Kuo *et al.* 2014] [Mao *et al.* 2017]、そして細胞移植効率を高める化合物 [Takemoto *et al.* 2013] [Frisco *et al.* 2014] を中心に最新の研究成果を議論します。

これまでの古典的な医薬品の枠にとらわれなければ、化合物にはさまざまな可能性や未来が想像できます。新しいサイズ、新しいカタチ、新しい見つけ方、新しい作用メカニズムなどを考えれば、化合物の新しい使い方や未来が垣間見えます。

● G-quadruplex 結合化合物 RGB-1

グアニンの繰り返し配列が DNA 四重鎖構造(DNA G-quadruplex)を形成することが広く知られている。この構造は、細胞死や転写反応といった生体内反応に深く関与している。近年、このような G-quadruplex は、DNA のみではなく RNA でも形成することが明らかになった。5′-非翻訳



領域に存在する RNA G-quadruplex がタンパク質翻訳反応を制御していることが報告されている。しかし、細胞内において“どの遺伝子”が“どの位置”で RNA G-quadruplex を形成しているのかは未だに捉えられていない。我々は RNA G-quadruplex に結合する合成小分子化合物をツールとして利用し、細胞内 RNA G-quadruplex を見出す方法の開発に取り組んだ。

まず、RNA G-quadruplex に結合する化合物の探索を行った。2010 年中谷和彦教授らによって報告された RNA G-quadruplex が逆転写酵素の cDNA の伸長反応を阻害することを応用して、スクリーニング系を確立した。8,000 種の小分子化合物のスクリーニングを行ったところ RGB-1 を見出すことに成功した。次に RGB-1 の特性を知るべく、RNA G-quadruplex に対する選択性及び結合定数の評価を行った。その結果、RGB-1 は RNA G-quadruplex に選択的に結合し、結合定数は 5.9 μM であった。

現在知られている RNA G-quadruplex の機能の一つはリボソームの伸長反応を阻害し、タンパク質合成を阻害することである。我々はこの事実に着目し、RGB-1 を用いてタンパク質翻訳反応の制御を試みた。無細胞タンパク質合成システムを用いて評価したところ、RGB-1 は RNA G-quadruplex に高い選択性をもち、タンパク質翻訳反応を抑制することができることがわかった。

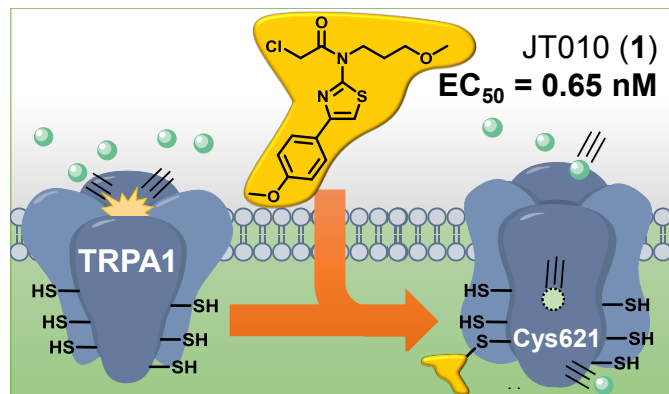
次に、細胞を用いたレポーターアッセイをおこなった。5′-非翻訳領域に RNA G-quadruplex を導入し、RGB-1 の濃度を変化させ検討を進めたところ、RGB-1 は細胞の中でも RNA G-quadruplex に対して高い選択性を維持したままタンパク質翻訳反応を抑制した。NRAS の mRNA に RNA G-quadruplex が存在しているという事が知られている。内在性タンパク質 NRAS の発現量をウエスタンブロットにより評価したところ、RGB-1 の濃度を上昇させるにつれ NRAS の発現量が低下した。RGB-1 は細胞内で RNA G-quadruplex に結合し、タンパク質翻訳反応を抑制すると考えられる。また、RGB-1 をツールとして利用することで、NRAS に新たな RNA G-quadruplex が存在するという事も明らかとなった。

● 強力かつ選択的 TRPA1 アゴニスト

TRPA1 の属する Transient receptor potential (TRP)チャネルファミリーは、様々な生理的機能を有するイオンチャネルで構成されるスーパーファミリーである。現在までに哺乳類では 29 種の TRP が同定されている。この TRP チャネルのメンバーである TRPA1 は、様々な内・外因性刺激によって活性化され、時には痛みを生ずるセンサーとして知られる。もっともよく知られた TRPA1 のアゴニストは、ワサビの辛み成分の一つである Allyl isothiocyanate (AITC)であろう。このため、TRPA1 はワ

サビレセプターという異名も持つ。

我々は、TRPA1 の解析に有用な新しい化合物を、反応性化合物で構成された化合物ライブラリーから探索することとした。カルシウム蛍光プローブ (Fluo-8) の蛍光量変化によってスクリーニングを行った。その結果、新規アゴニスト JT010 (1) が同定された。TRPA1 を 1 nM 以下で活性化できる極めて強力な活性をもつ。



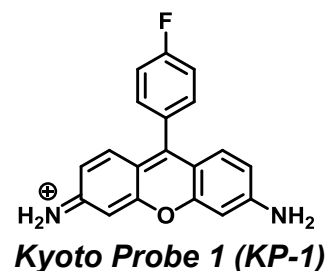
1 は、クロロアセトアミドを求電子性部位として持っている。そのため、既知の反応性アゴニストと同様にシステインへの付加反応を介して、TRPA1 を活性化しているものと考えられた。これを実験的に確かめるため、1 の塩素を水素に置換した非求電子性誘導体である JT010-H (2) を合成した。求電子性化合物である 1 が極めて低濃度 (hTRPA1 EC₅₀ = 0.65 nM) で TRPA1 を活性化する一方で、非求電子性誘導体である 2 は、1 と比較して ~1000 倍弱かった。この結果は、1 の活性に求電子性が重要であることを示すとともに、既知の TRPA1 の反応性アゴニストと同様に、システイン残基の修飾を介してチャネルの開口を引き起こしていることを強く示唆していた。

作用機序を詳細に検討するためのツールとして、ビオチン化誘導体である JT010-B (3) を合成した。3 は、1 のメトキシとビオチンを C6 リンカーでつないだシンプルなものであり、活性が 50 倍程度落ちているものの、それでもなお nM オーダーの活性 (hTRPA1 EC₅₀ = 30 nM) を維持していた。もし、TRPA1 と 3 が直接結合していれば、TRPA1 は共有結合的にビオチン化され、アビジンビーズを用いたアフィニティ精製によって回収されるはずである。3 で処理した TRPA1 (検出のため、N 末端に EGFP タグをもつ) 発現 HEK293 細胞から、回収したサンプルを SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングによって解析したところ、濃度依存的に TRPA1 がビオチン化されていた。これらの結果は、1 と 3 が TRPA1 と直接結合していることを示している。更なる解析の結果、アゴニスト 1、およびその類縁体 3 は、TRPA1 の Cys621 へ選択的に結合することでチャネルを活性化していることが明らかとなった。この結果は、反応性アゴニストによって修飾を受けうるシステイン残基が複数ある中で、Cys621 への修飾だけでも TRPA1 を活性化するには十分であることを示唆していた。

● Kyoto Probe 1 (KP-1)

ヒト多能性幹細胞を見分ける蛍光物質 (KP-1) を発見し、そのメカニズムを解明した [Hirata *et al.*, 2014]。幹細胞を染色する蛍光小分子を用いれば、幹細胞とその他の細胞を簡便に見分けたり、精製したり、除去することができる。

ヒト多能性幹細胞は、さまざまな細胞や組織に分化できる能力を持ち、再生医療技術への応用が期待されてい

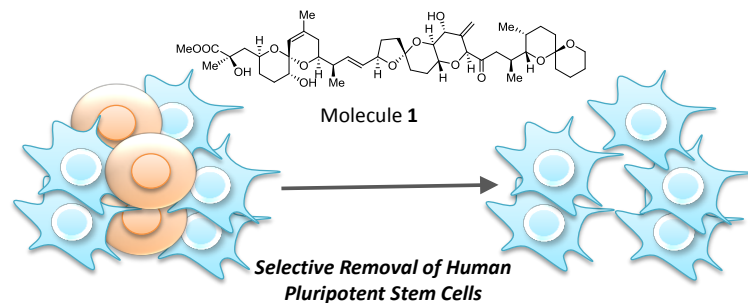


る。しかし、未分化の幹細胞が残ったまま体の中に移植すると腫瘍化するといった問題点がある。ヒト多能性幹細胞を使った再生医療への実現のためには、未分化のヒト幹細胞と分化細胞とを明確に区別しなければならない。

我々は、326 個の蛍光化合物をスクリーニングした結果、ヒト幹細胞中で強く蛍光を発するが分化細胞中では蛍光が弱い化合物を見つけ出し、KP-1 (Kyoto Probe 1) と名付けた。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。このような選択性は細胞膜上に発現している ABC タンパク質の作用によることをつきとめた。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。

●ヒト多能性幹細胞を除去する化合物

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。ヒト多能性幹細胞に発現しているトランスポーター、発現していないトランスポーターそれぞれを過剰発現するモデル細胞を作成し、333 個の細胞毒性分子 (毒性天然物及び誘導体や抗癌剤) をスクリーニングした。その結果、



KP-1 の選択性に近い細胞

毒性分子として、天然物合成誘導体を再発見した [Kuo *et al.*, 2014]。この化合物は約 25 年前に名古屋大学化学科天然物化学教室で合成された海洋天然物オカダ酸誘導体であった。当時合成されたものの論文発表はされなかった。我々はこの化合物を再合成し、ヒト多能性幹細胞を選択的に死滅させることを確認した。

さらに、KP-1 と様々な抗がん剤の組み合わせを試すことで、未分化細胞の除去に効果的な化合物の発見した [Mao *et al.*, 2017]。今後、この化合物自体の安全性について慎重に確認する必要があるが、未分化細胞だけを除去するための試薬が作成され、製品化にまでつながることが期待される。

● Small Molecule Anoikis Inhibitor (SMAI)

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「アノイキ

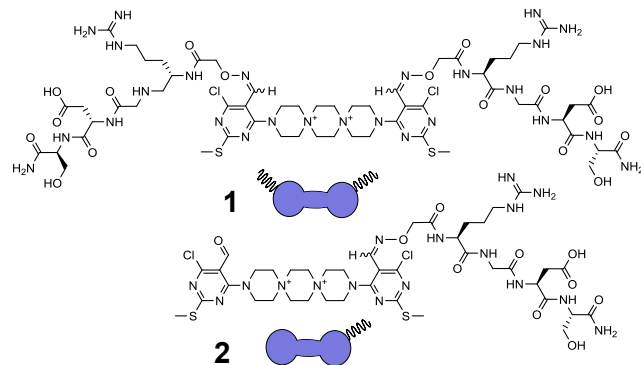
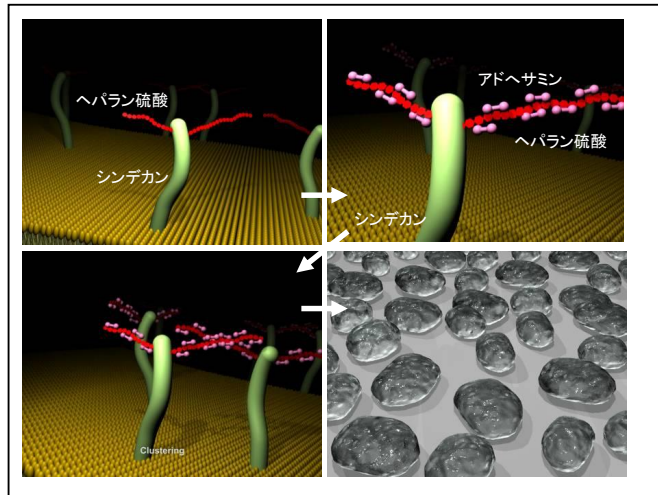
ス(細胞接着喪失によるアポトーシス)」である。通常の細胞は接着していると、アノキスは起こさない。これはフィブロネクチンなどの細胞外マトリクスタンパク質に結合して、細胞死抑制シグナルを受けているからである。我々は、フィブロネクチンという440 KDaの巨大タンパク質を模倣する小分子合成化合物を創製し、細胞のアノキスの阻害に成功した[Frisco *et al.*, 2014]。

アノキス阻害剤(化合物 1, 2)の化学構造式を下に示す。これら二つの化合物は、「アドヘサミン」にペプチドを連結した化合物である。ダンベル型のアドヘサミンは、細胞表面のヘパラン硫酸に結合して集合体を形成し、ヘパラン硫酸と結合したシンデカンタンパク質を凝集させることで、細胞の接着を誘発することが我々の研究で分かっている[Takemoto *et al.*, 2013]。

一方、細胞外マトリクスにあるフィブロネクチンは、細胞表面のヘパラン硫酸/シンデカンとインテグリンの両方に結合して、その二つの受容体を凝集させることで、強い細胞接着、増殖、アノキス阻害を發揮する。インテグリンとフィブロネクチンの結合は、フィブロネクチン内に存在するRGDペプチド配列によって仲介されている。RGDペプチドをアドヘサミンに共有結合したハイブリッド化合物1, 2は、フィブロネクチンを模倣できると考えた。

マウス繊維芽細胞を3日間浮遊させ、細胞の生存度を調べたところ、化合物1, 2の存在下で細胞は明らかに生存した。ペプチドとアドヘサミンを共有結合させず別々に加えても活性はなく、両者が共有結合していることが活性に重要である。免疫染色によると、これらの化合物はインテグリンβ1とシンデカン4を共凝集させて、下流の接着斑キナーゼ(FAK)を活性化している。

細胞治療では、増殖した細胞を患者に移植しなければならない。アノキス阻害剤が実際に細胞移植の生着を高めるかどうかを動物で確認した。化合物1はウサギ病態モデルにて角膜内皮細胞の生着率を高め、治療効果があった。また、糖尿モデルマウスの皮膚損傷領域への骨髄由来細胞移植においても化合物1は明らかな効果を認めた。



参考文献

- 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 the selective removal of human pluripotent stem cells from cell mixtures.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 1765-1770 (2017).

- 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).
- 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).
- 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, N., Uesugi, M. **Synthetic molecules that protect cells from anoikis and their use in cell transplantation.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 11208-11213 (2014).
- Kuo, T.F., Mao, D., Hirata, N., Khambu, B., Kimura, Y., Kawase, E., Shimogawa, H., Ojika, M., Nakatsuji, N., Ueda, K., Uesugi, M. **Selective elimination of human pluripotent stem cells by a marine natural product derivative.** *J. Am. Chem. Soc.* 136 (28), 9798-9801 (2014).
- Hirata, N., Nakagawa, M., Fujibayashi, Y., Yamauchi, K., Murata, A., Minami, I., Tomioka, M., Kondo, T., Kuo, T.F., Endo, H., Inoue, H., Sato, S., Ando, S., Kawazoe, Y., Aiba, K., Nagata, K., Kawase, E., Chang, Y.T., Suemori, H., Eto, K., Nakauchi, H., Yamanaka, S., Nakatsuji, N., Ueda, K., Uesugi, M. **A chemical probe that labels human pluripotent stem cells.** *Cell Rep* 6, 1165–1174 (2014).
- Sakano, D., Shiraki, N., Kikawa, K., Yamazoe, T., Kataoka, M., Umeda, K., Araki, K., Mao, D., Matsumoto, S., Nakagata, N., Andersson, O., Stainier, D., Endo, F., Kume, K., Uesugi, M., Kume, S. **VMAT2 identified as a regulator of late-stage beta cell differentiation.** *Nat. Chem. Biol.* 10, 141-148 (2014).
- Takemoto, N., Suehara, T., Frisco, H., Sato, S., Sezaki, T., Kusamori, K., Kawazoe, Y., Park, S., Yamazoe, S., Mizuhata, Y., Inoue, R., Miller, G., Hansen, S., Jayson, G., Gardiner, J., Kanaya, T., Tokitoh, N., Ueda, K., Takakura, Y., Kioka, N., Nishikawa, M., Uesugi, M. **Small molecule-induced clustering of heparan sulfate promotes cell adhesion.** *J. Am. Chem. Soc.* 135 (30), 11032-11039 (2013).
- Minami, I., Yamada, K., Otsuji, T.G., Yamamoto, T., Shen, Y., Otsuka, S., Kadota, S., Morone, N., Barve, M., Asai, Y., Tenkova-Heuser, T., Heuser, J. E., Uesugi, M., Aiba, K., Nakatsuji, N. **A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined cytokine- and xeno-free conditions.** *Cell Rep* 2(5), 1448-1460 (2012).