

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成25年度)**

本様式の内容は一般に公表されません

研究課題名	合成小分子化合物による細胞の操作と分析
研究機関・ 部局・職名	京都大学・物質－細胞統合システム拠点・教授
氏名	上杉 志成

1. 当該年度の研究目的

**目的1 小分子接着因子の創成と利用**

生体内で細胞は細胞外マトリックスに接着して、組織や臓器を形成している。そのような細胞接着を誘発するのは、フィブロネクチンという巨大タンパク質である。このプロジェクトでは、この 440 kDa のタンパク質を模倣する小分子化合物を創成する。「小分子フィブロネクチン」はヒト細胞の培養、増殖、移植を加速する。基礎細胞生物学や細胞治療の複数の場面で利用が期待できる。これまでの研究で、そのような小分子化合物の設計と合成に成功した。培養細胞の動物内への生着を高め、治療効果を示すことをマウスとウサギで証明した。その第1報は現在投稿中である。

平成25年度では、ウサギの水疱性角膜症モデルへの細胞治療で最も強力な効果を示した合成類縁体の分子メカニズムの詳細を分子生物学、生化学、細胞生物学、有機化学の手法で追究し、第2報を公表する。

**目的2 小分子成長因子の創成と利用**

細胞治療用のヒト細胞の培養には、成長因子とよばれる様々な分泌タンパク質が利用されている。これらのタンパク質は動物細胞や大腸菌から精製されており、高価であり不安定である。細胞治療や基礎細胞生物学に有用な成長因子を小分子化合物で模倣する。

これまでの研究で、細胞のアノイキス（細胞脱着による細胞死）を阻害し、浮遊化細胞の生存を高める成長因子様化合物の合成に成功した。例えば、この化合物の存在下では、NIH3T3 細胞を7日間浮遊させても細胞は死滅しない。接着ヒト分化細胞やヒト幹細胞の大量浮遊培養に役立つ可能性があり、細胞培養や細胞移植に大きく役立つ。目的1と合わせて、その化合物と合成類縁体の分子メカニズムの詳細を分子生物学、生化学、細胞生物学、有機化学の手法で追究する。

**目的3 ヒト幹細胞化学プローブの創成と利用**

ヒト幹細胞を選択的に染める蛍光物質は、ヒト幹細胞の検出、精製、除去を簡便化する。これまでの研究で、そのような蛍光化合物 KP-1 を発見した。これまで、この蛍光化合物が幹細胞をどのようにして識別しているのかを調べ、メカニズムを解明した。現在第一報目の論文を投稿し、その Revision を行っている。特に、KP-1 が iPS 細胞の作成時に早期に iPS 前駆細胞を検知し、iPS 細胞作成を効率化できるかについて、ヒト細胞を用いた研究を進めている。

25年度の第1目的は、この実験を完結し、第1報目を公表することである。第2目標は、KP-1 にさらなるアイデアを付加することでより選択性に優れた誘導体を得ることである。昨年度までにそのような候補物質は化学合成した。本年度はそれらの化合物をヒトプライマリー細胞や iPS 細胞などで試験し、最も有用な化合物を絞り込む。

第3目標は、KP-1 のメカニズム解析により得られた知識を化学にフィードバックすることで、幹細胞治療で大きな問題となっている残存幹細胞を死滅させる化合物の設計と合成を行う。すでに、そのような化合物として、天然物合成誘導体 # 185 を得ている。詳細なメカニズムの確認を行い、本年度中に論文として公表する。また2万個のライブラリーのスクリーニングにより、さらに3つ

## 様式19 別紙1

の候補物質を発見している。KP-1と#185は公表後に研究用試薬として市販する。

## 2. 研究の実施状況

### <目的1><目的2>

- 細胞移植の際、細胞はそれぞれバラバラにされ、体内に注入される。細胞レベルの実験で、本研究で合成された化合物のいくつかは、培養細胞の移植の際にその生存率を向上させている知見が得られた。
- 小分子フィブロネクチンによる接着誘発の具体的なメカニズムとして、浮遊によるプログラム細胞死（アノイキス）を強く防ぐ効果が示唆された。つまり、細胞移植の際に浮遊された細胞はアノイキスを起こすが、この化合物があると細胞のアノイキスが阻害され、体内に導入された後にも生存し、生着する可能性が高まっていると考えられる。
- 詳細な分子生物学的・細胞生物学的実験を行い、そのメカニズムをさぐった。その結果、シンデカンとインテグリンに結合し、その凝集体を形成し、Rac1とAktというキナーゼを活性化する。
- 現在論文投稿中

### <目的3>

- ヒト多能性幹細胞を選択的に染色する蛍光化合物 KP-1 (Kyoto Probe 1) やの各種誘導体について更なる研究を進めた。ヒトプライマリー細胞により、KP-1 (Kyoto Probe 1) の選択性を確認した。ヒト多能性幹細胞と神経細胞に選択的であることがわかった。神経細胞は血液脳関門によって守られているために ABC トランスポーターの発現が低い。
- 山中ファクターによって細胞をリプログラミングする際に、ABC トランスポーターの発現が変化することを確認。
- KP-1 (Kyoto Probe 1) の論文が Cell Reports に掲載され、新聞 8 社に報道された。
- KP-1 の誘導体を合成し、X線構造解析に有用な化合物を発見。
- 残存幹細胞を死滅させる化合物 # 185 についても、構造活性相関を確立した。ヒトES細胞やiPS細胞を死滅させるが、分化すると細胞はこの化合物に耐性となる。# 185 について、メカニズムや活性の確認を行った。
- # 185 の論文を投稿中。# 185 の特許出願準備中。

## 3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済みー査読有り) 計7件
計7件	<ul style="list-style-type: none"><li>● Kumagai, H., Suemori, H., <b>Uesugi, M.</b>, Nakatsuji, N. Kawase, E. Identification of Small Molecules That Promote Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 434(4), 710-716 (2013).</li><li>● Natsume, A., Ito, M., Katsushima, K., Ohta, F., Hatanaka, A., Shinjo, K., Sato, S., Takahashi, S., Ishikawa, Y., Takeuchi, I., Shimogawa, H., <b>Uesugi, M.</b>, Okano, H., Kim, S.U., Wakabayashi, T., Issa, J.P., Sekido, Y., Kondo, Y. Chromatin Regulator PRC2 is a Key Regulator of Epigenetic Plasticity in Glioblastoma. <i>Cancer Res.</i> 73 (14), 4559-4570 (2013).</li><li>● 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., <b>Uesugi, M.</b> Small Molecule-induced Clustering of Heparan Sulfate Promotes Cell Adhesion. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 135 (30), 11032-11039 (2013).</li><li>● Kita, M., Hirayama, Y., Yoneda, K., Yamagishi, K., Chinen, T., Usui, T., Sumiya, E., <b>Uesugi, M.</b>, Kogoshi, H. Inhibition of Microtubule Assembly by A Complex of Actin and Antitumor Macrolide Apilyronine. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 135(48), 18089-18095 (2013).</li><li>● Sakano, D., Shiraki, N., Kikawa, K., Yamazoe, T., Kataoka, M., Umeda, K., Araki, K., Mao, D.,</li></ul>

	<p>Matsumoto, S., Nakagata, N., Andersson, O., Stainier, D., Endo, F., Kume, K., <b>Uesugi, M.</b>, Kume, S. VMAT2 Identified as a Regulator of Late-stage Beta Cell Differentiation. <i>Nat. Chem. Biol.</i> 10, 141-148 (2014).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Araoka, T., Mae, S., Kurose, Y., <b>Uesugi, M.</b>, Ohta, A., Yamanaka, S., Osafune, K. Efficient and Rapid Induction of Human iPSCs/ESCs into Nephrogenic Intermediate Mesoderm Using Small Molecule-Based Differentiation Methods. <i>PLoS One</i> 9(1), e84881 (2014)</li> <li>• 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., <b>Uesugi, M.</b> A Chemical Probe That Labels Human Pluripotent Stem Cells. <i>Cell Reports</i> 6(6), 1165-1174 (2014)</li> </ul> <p>(掲載済み－査読無し) 計 0 件  (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表  計 15 件</p>	<p><u>専門家向け 計 12 件</u></p> <p><b>【国際会議】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Uesugi, M.</b> “Small Molecule Tools for Cell Therapy.” RIKEN – Max Planck – Joint Research Center for Systems Chemical Biology The 2nd Symposium. Saitama, Japan. 2013/04/15-17. RIKEN.</li> <li>• <b>Uesugi, M.</b> “Small Molecule Tools for Cell Therapy.” 2013 KSBMB Annual Meeting. Seoul, Korea. 2013/05/14-16. KSBMB.</li> <li>• <b>Uesugi, M.</b> “Small Molecules for Cell Biology and Cell Therapy.” The 2nd Annual Conference ICBS 2013. Kyoto, Japan. 2013/10/07-09. ICBS.</li> <li>• <b>Uesugi, M.</b> “Three Experiments for Changing Japanese Universities.” Inauguration Ceremony and Symposium of the JSPS Alumni Association of the Philippines (JAAP). Manila, Philippines. 2013/11/22. JSPS.</li> <li>• <b>Uesugi, M.</b> “Synthetic Bioactive Molecules with New Uses, New Sizes, and New Shapes.” The Crocher Advanced Study Institute on Chemical Biology 2013. Hong Kong. 2013/12/16-17. The University of Hong Kong.</li> <li>• <b>Uesugi, M.</b> “Small Molecule-Based Imaging of Endogenous RNA.” Asian Chemical Biology Initiative 2014 Manila Meeting. Manila, Philippines. 2014/01/24-27. ACBI.</li> <li>• <b>Uesugi, M.</b> “Small Molecules that Block Fat Synthesis.” 2014 Queenstown Molecular Biology Meetings in Shanghai. Shanghai, China. 2014/03/13-14. National Center for Drug Screening, etc.</li> </ul> <p><b>【国内会議】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>上杉 志成</b> 「細胞治療を助ける化合物」 独立行政法人医薬基盤研究所セミナー 茨木市 2013/07/30 独立行政法人医薬基盤研究所</li> <li>• <b>上杉 志成</b> 「細胞治療を助ける合成化合物」 生命分子機能研究会 2013 学術集会「生命分子・ペプチド創薬の医療へのインパクト」 長浜市 2013/09/19-20 生命分子機能研究会</li> <li>• <b>上杉 志成</b> 「大学を国際化する 3 つの実験」 岩手大学基礎自然科学系講演会 盛岡市 2013/12/9 岩手大学</li> <li>• <b>上杉 志成</b> 「細胞治療を助ける合成化合物」 バイオインフォマティクス・ジャパン、システム薬学研究機構シンポジウム「第 5 回新たな創薬パラダイムの創出」 東京都港区 2014/01/10 NPO 法人バイオインフォマティクス・ジャパン NPO 法人システム薬学研究機構</li> <li>• <b>上杉 志成</b> 「細胞を操る合成化合物」 名古屋大学大学院生命農学研究科公開セミナー 名古屋市 2014/02/06 名古屋大学</li> </ul> <p><u>一般向け 計 3 件</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>上杉 志成</b> 「ケミカルバイオロジーについて」 Shiga Science Project 夏季大学研修 京都市 2013/08/01</li> <li>• <b>上杉 志成</b> 「日本初 edX 講義での実験」 第 20 回大学教育研究フォーラム 京都市 2014/03/18-19 京都大学高等教育研究開発推進センター</li> <li>• <b>Uesugi, M.</b> “Chemical Biology Research: Basics and Examples” 2013 Peking University Summer School. Kyoto University, Kyoto. 2013/08/20. Peking University.</li> </ul>

様式19 別紙1

<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計4件</p>	<p><u>(取得済み) 計3件 (全件海外)</u></p> <p>Title: Additive for graft cell suspension, and therapeutic composition                  Inventors: <b>Uesugi, M.</b>, Nishikawa, M., Kinoshita, S., Koizumi, N., Okumura, N.                  Applicant: Kyoto University, Kyoto Prefectural Public University Corporation, The Doshisha                  Publication Number: WO2013168807                  Publication Date: 2013/11/14                  International Application Number: PCT/JP2013/063211                  International Filing Date: 2013/5/10</p> <p>Title: Method for sorting of pluripotent cells                  Inventors: <b>Uesugi, M.</b> et al.                  Applicant: Kyoto University                  Publication Number: WO2013103156                  Publication Date: 2013/07/11                  International Application Number: PCT/JP2013/050501                  International Filing Date: 2013/01/07</p> <p>Title: Method for inducing differentiation of pluripotent stem cell into cardiac muscle                  Inventors: Nakatsuji, N., Minami, I., <b>Uesugi, M.</b>, Aiba, K.                  Applicant: Kyoto University                  Publication Number: WO2013111875                  Publication Date: 2013/08/01                  International Application Number: PCT/JP2013/051644                  International Filing Date: 2013/1/25</p> <p><u>(出願中) 計1件</u></p> <p>発明の名称: 多能性幹細胞の心筋分化を促進する化合物                  発明者: 中辻憲夫、南一成、上杉志成、大塚慎也                  権利者: 国立大学法人京都大学                  国内・外国の別: 国内                  出願番号: 特願 2013-190462                  出願日: 2013/9/13</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>上杉研究室ウェブサイト: <a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~uesugi/">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~uesugi/</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 「ケミカルバイオロジーについて」 2013年8月1日 京都大学物質-細胞統合システム拠点 Shiga Science Project 夏季大学研修 生徒32名、教員18名</li> </ul>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計8件</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 読売新聞 2014年3月17日 13面 「iPS細胞 簡単に判別」</li> <li>・ 日本経済新聞 2014年3月10日 16面 「京大、iPS細胞だけ光らせる化合物発見」</li> <li>・ 朝日新聞 2014年3月7日 2面 「iPS細胞、光って簡単判別 京大など化合物発見」</li> <li>・ 中日新聞 2014年3月7日 2面 「iPS、緑に光らせる化合物 京大が発見」</li> <li>・ 京都新聞 2014年3月7日 28面 「光らせて iPS 選別、京大発見 移植応用に期待」</li> <li>・ 毎日新聞 2014年3月7日 2面 「京大:iPS細胞だけ光らせる化合物発見 未分化細胞識別」</li> <li>・ 日刊工業新聞 2014年3月7日 17面 「京大、iPS細胞と分化細胞を見分ける蛍光化合物を発見」</li> <li>・ 産経新聞 2014年3月7日 30面 「京大、iPS細胞と分化細胞を見分ける蛍光化合物を発見」</li> </ul>

様式19 別紙1

	見」
その他	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	125,000,000	88,400,000	36,600,000	0	0
間接経費	37,500,000	26,520,000	10,980,000	0	0
合計	162,500,000	114,920,000	47,580,000	0	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	2,154	36,600,000	0	36,602,154	36,602,154	0	0
間接経費	22,649,072	10,980,000	0	33,629,072	33,629,072	0	0
合計	22,651,226	47,580,000	0	70,231,226	70,231,226	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	10,461,876	解析装置、実験試薬、炭酸ガス等
旅費	147,120	国内旅費、招へい旅費
謝金・人件費等	18,028,163	博士研究員人件費、労務謝金
その他	7,964,995	DNA配列解析、機器修理費、論文出版費等
直接経費計	36,602,154	
間接経費計	33,629,072	
合計	70,231,226	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
CV1000用 40倍対 物レンズ	横河電機(株) ドラ イ40倍対物レン ズ	1	578,550	578,550	2013/12/16	京都大学
ImageQuant LAS 500及び分光光度 計	GEヘルスケ製 アルミノ・イメージ アナライザー(ペ ルティエ冷却方 式、CCDカメラ搭 載)及び SimpliNano with printer(微量サン プル)	1	2,693,250	2,693,250	2014/2/20	京都大学
				0		