

2014年3月3日

Press Release

京都大学 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS)

ヒト多能性幹細胞を光らせる化合物

京都大学（総長：松本紘）の上杉志成（物質-細胞統合システム拠点（iCeMS＝アイセムス）・化学研究所教授）、植田和光（iCeMS・農学研究科教授）、中辻憲夫（iCeMS・再生医科学研究所教授）、山中伸弥（CiRA・iCeMS 教授）、東京大学の中内啓光（東京大学医科学研究所教授）らの研究グループは、ヒト多能性幹細胞（ES 細胞や iPS 細胞）と分化細胞を簡便に見分けることができる蛍光化合物を発見しました。ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療の安全性の向上に役立つことが期待されます。

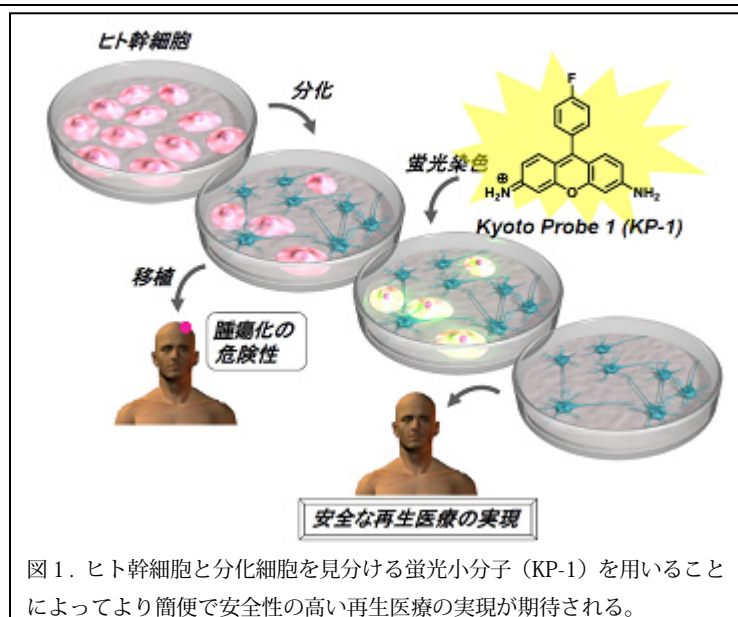
ヒト多能性幹細胞は、さまざまな細胞や組織に分化できる能力を持ち、再生医療技術への応用が期待されています。しかし、未分化の幹細胞が残ったまま体の中に移植すると腫瘍化するという問題点もあります。ヒト多能性幹細胞を使った再生医療への実現のためには、未分化のヒト幹細胞と分化細胞とを明確に区別しなければなりません。

同研究グループの平田直 iCeMS 研究者らは、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) と名付けました。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（※1）の作用によることをつきとめました。この成果により、簡便で安全性の高い再生医療の実現が期待されます。

本成果は米国標準時間 2014 年 3 月 6 日（木）午後 12 時（日本時間 3 月 7 日（金）午前 2 時）に米国誌「Cell Reports（セル・レポート）」にて公開される予定です。

1. 背景

ヒト多能性幹細胞は増殖する能力とさまざまな細胞へ分化する能力を合わせ持つ細胞です。このような能力を利用して再生医療へ応用しようとする研究が行われてきました。しかしながら、依然として残っている問題もあります。ヒト幹細胞から誘導した分化細胞を患者に移植する場合、未分化のヒト幹細胞が少しでも残っていると腫瘍化の危険性が高くなることです。この危険性を避けるために、未分化のヒト多能性幹細胞と分化細胞とを見分けることが重要。これまでに、ヒト幹細胞



および分化細胞に対して特異的な抗体を用いて両者を識別する方法が開発されています。この研究では、より簡便な手法の開発を目的として、未分化のヒト幹細胞と分化細胞を見分ける蛍光化合物 (KP-1) を発見し、そのメカニズムを解明しました。この蛍光小分子はヒト多能性幹細胞を用いた再生医療の補助ツールとして応用できるものと期待されます。

2. 研究内容と成果

326 個の蛍光化合物ライブラリを用いてヒト iPS 細胞に対してスクリーニングしました。この結果、フィーダー細胞 (※2) と比べてヒト iPS 細胞で強く蛍光発光する蛍光化合物を見つけました。これらの化合物の中で蛍光発光の差が最も顕著だった蛍光小分子を KP-1 (Kyoto Probe 1) と名付けました (図 2A-C)。このスクリーニングの過程で我々は不思議な現象を見つけました。KP-1 で蛍光染色すると、ドーナツ状に真ん中の部分だけ光らないヒト iPS 細胞のコロニーがあるのです (図 2D,G)。一般的に、ヒト iPS 細胞を培養する場合、分化する能力は抑えてあるのですが、ヒト iPS 細胞が形成するコロニーが大きく成長しすぎた時にコロニーの真ん中の部分から偶発的に分化することがあります。つまり、KP-1 はコロニーの真ん中の分化しはじめた細胞では蛍光発光せず、外側の未分化状態にあるヒト iPS 細胞中で特異的に蛍光発光すると推測されます。我々はこのような現象を確かめるために、ヒト ES 細胞 (embryonic stem cell、胚性幹細胞) とそれを分化誘導した細胞を準備し、それぞれに KP-1 を添加

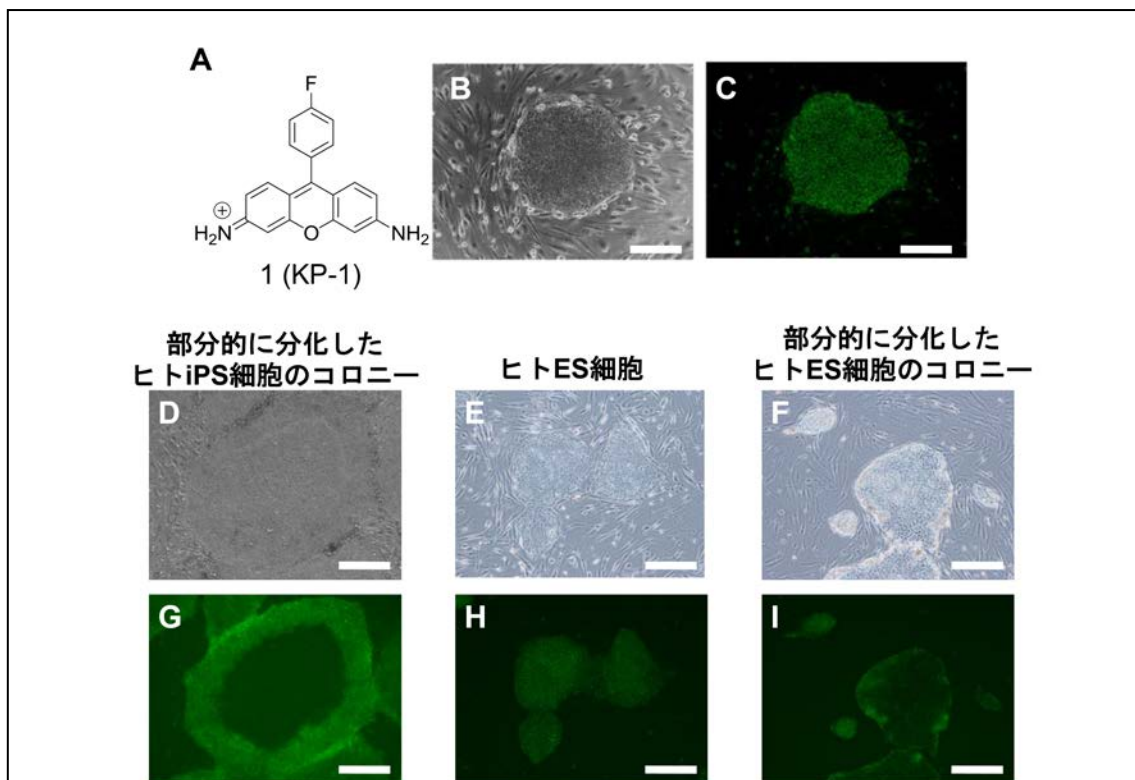


図 2. (A) KP-1 の構造 (B, C) KP-1 を用いてフィーダー細胞上に形成しているヒト iPS 細胞のコロニーを蛍光染色した写真。(B: 明視野像、C: 蛍光像、スケールバー: 300 μ m) (D, G) KP-1 を用いて部分的に分化したヒト iPS 細胞のコロニーを蛍光染色した写真。(D: 明視野像、G: 蛍光像、スケールバー: 450 μ m) 外側の未分化状態にあるヒト iPS 細胞で優位に蛍光染色している。(E, H) KP-1 を用いてヒト ES 細胞のコロニーを蛍光染色した写真。(E: 明視野像、H: 蛍光像、スケールバー: 450 μ m) (F, I) KP-1 を用いて部分的に分化したヒト ES 細胞のコロニーを蛍光染色した写真。(F: 明視野像、I: 蛍光像、スケールバー: 450 μ m) 分化した細胞中では蛍光発光が弱くなっている。(一部、DOI: 10.1016/j.celrep.2014.02.006 より改変)

しました。その結果、未分化のヒト ES 細胞では強い蛍光発光を示すのに対し（図 2E,H）、部分的に分化した細胞では蛍光強度が弱くなることが確認されました（図 2F,I）。これらの結果から、KP-1 はヒト幹細胞中では強い蛍光発光を示し、分化細胞中では蛍光発光が弱くなるということが示唆されました。

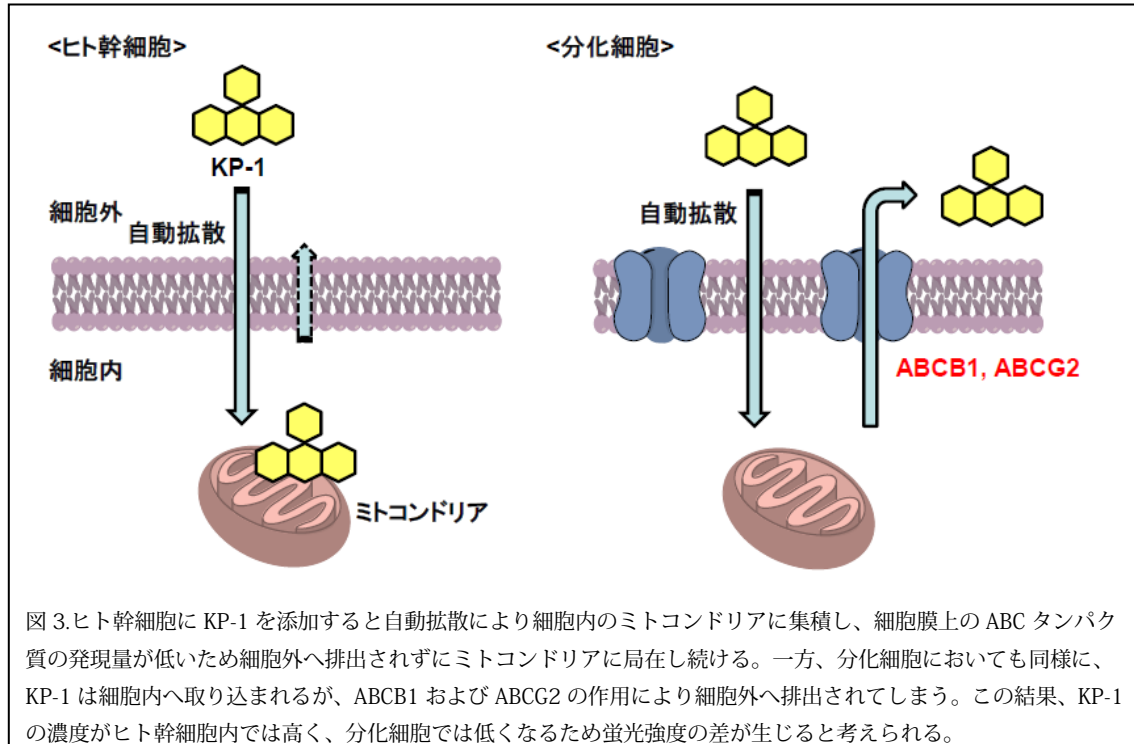
その他の実験により、KP-1 はヒト多能性幹細胞と多種の分化細胞（副腎、肝、気管支上皮、微小血管内皮、血液幹細胞、心筋細胞など）を染め分けることができることが分かった。KP-1 の大きな特徴として、培養液中に短時間添加するだけで、細胞を固定操作することなく生細胞のままラベルすることができ、汎用性が高いことがあげられます。

なぜ KP-1 はヒト幹細胞と分化細胞とで蛍光染色の様子が変化するのでしょうか？その後の実験により KP-1 はミトコンドリアに局在することがわかり、蛍光強度の差はミトコンドリアに関係すると考えて検討しました。しかし、明確な結果は得られませんでした。そんな中、分化誘導前後で ABC タンパク質の発現量が増減するという興味深い現象を植田グループの大学院生藤林悠人氏が見出しました。我々はこのような ABC タンパク質の中で化合物の輸送に関係するタンパク質に着目しました。その結果、ABCB1（※3）と ABCG2（※4）が分化誘導後にそれらのメッセンジャー RNA（※5）の発現量が大きく増加することが分かりました。

次に、藤林氏は ABCB1 および ABCG2 を発現するモデル細胞を準備し、それらに KP-1 を加えて蛍光発光がどのように変化するかを調べました。ABC タンパク質の発現量が少ない KB3-1 細胞（※6）を遺伝子改変によって ABCB1 および ABCG2 を過剰に発現するようにした細胞（それぞれ KB/ABCB1 細胞、KB/ABCG2 細胞と呼ぶ）を構築しました。これらの細胞に KP-1 を加えて観察したところ、いずれの細胞においても蛍光発光は見られませんでした。一方、ABCB1 と ABCG2 の活性を抑制する阻害剤であるサイクロスポリン A（CsA）およびフミトレモルギン C（FTC）をこれらの細胞に添加すると KP-1 の蛍光発光が観察されました。これらの結果から、KP-1 は ABCB1 と ABCG2 の基質となり、これらのタンパク質の作用によって細胞内から排出されることが示唆されました。

続いて同様の実験をヒト ES 細胞と分化細胞に対して行いました。ヒト ES 細胞と分化細胞をそれぞれ KP-1 で蛍光染色してフローサイトメーター（※7）で解析しました。その結果、ヒト ES 細胞中の蛍光発光強度は分化細胞に比べて約 100 倍程度強いことが示されました。次に、分化細胞を ABCB1 と ABCG2 の阻害剤である CsA および FTC で処理すると蛍光強度が増加することが確認されました。これらの結果から、KP-1 の蛍光挙動は細胞膜上に発現する ABCB1 および ABCG2 に依存することが明らかとなりました。

以上の結果より、ヒト幹細胞では ABCB1 と ABCG2 の発現が抑えられているために KP-1 は細胞内に留まって強い蛍光発光を示すが、分化細胞では ABCB1 と ABCG2 の発現が増加するため KP-1 が細胞外へ排出される結果、蛍光発光が弱くなるということが示唆されました（図 3）。



3. 今後の期待

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ます。欠点は、神経幹細胞を含めた神経系の細胞は KP-1 で染め分けることができないことです。しかしながら、培養液中に短時間添加するだけで、細胞を固定操作することなく生細胞のままラベルすることができます。KP-1 を用いることによって分化誘導した時に含まれる未分化のヒト幹細胞を簡単に見つけ出すことができ、より安全性の高い再生医療の実現に貢献できると期待できます。

用語解説・注釈

- ※ 1 **ABC タンパク質**： ATP 結合カセット (ATP Binding Cassette) タンパク質。ATP の加水分解時に得られるエネルギーを利用してアミノ酸、糖、脂質、ペプチドなどの生理活性物質を輸送するタンパク質。
- ※ 2 **フィーダー細胞**： マウス胎児組織から取り出した繊維芽細胞をガンマ線照射や薬剤処理によって増殖を停止させた細胞。ヒト幹細胞が接着して未分化状態を維持しながら増殖するのを助ける。
- ※ 3 **ABCB1**： 小腸、肝臓、腎臓、脳血液関門、胎盤などに分布しており生体異物を排出して重要な器官や胎児を保護している。また、がん細胞の多剤耐性に関与しており、これにより抗がん剤が効きにくくなるとされている。
- ※ 4 **ABCG2**： 抗がん剤耐性を示したヒト乳癌細胞から発見されたタンパク質。多くの組織に分布しており、種々の内因性・外因性基質化合物の細胞外への排出を介したバリア機能の役割を示す。

- ※5 **メッセンジャーRNA**：DNA 中に含まれる遺伝情報をアミノ酸配列に翻訳する役割を担う。DNA 中のアミノ酸配列を規定する部分が写し取られてメッセンジャーRNA となり、この情報に従ってタンパク質が形成される。
- ※6 **KB3-1 細胞**：ヒト表皮がん細胞。ABCB1 や ABCG2 の発現量が低く化合物感受性が高い。
- ※7 **フローサイトメーター**：細胞を個々に観察する手法。細胞の懸濁液を細管に通して細胞数の計測や蛍光測定などを短時間で多量（毎秒数千～数万）に分析することができる。

論文タイトルと著者

“A Chemical Probe that Labels Human Pluripotent Stem Cells”

Nao Hirata, Masato Nakagawa, Yuto Fujibayashi, Kaori Yamauchi, Asako Murata, Itsunari Minami, Maiko Tomioka, Takayuki Kondo, Ting-Fang Kuo, Hiroshi Endo, Haruhisa Inoue, Shin-ichi Sato, Shin Ando, Yoshinori Kawazoe, Kazuhiro Aiba, Koh Nagata, Eihachiro Kawase, Young-Tae Chang, Hirofumi Suemori, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Shinya Yamanaka, Norio Nakatsuji, Kazumitsu Ueda*, Motonari Uesugi**

Cell Reports | DOI: 10. 1016/j.celrep.2014.02.006