

平成30年6月12日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18898

研究課題名(和文) RANKL 依存的な破骨細胞の分化を阻害する天然有機化合物の探索

研究課題名(英文) Search for natural organic compounds that inhibit RANKL-dependent osteoclastogenesis

研究代表者

加藤 光 (Kato, Hikaru)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：20547129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症は、骨と溶かす破骨細胞の働きが亢進されることにより骨密度が低下し、骨折の危険性が増加する疾患である。本研究では、骨粗鬆症の治療薬を開発することを最終的な目標とし、薬の候補となる化合物を天然資源から探した。そして、本研究を実施した2年間の研究期間において、20個の新規化合物を単離し、5報の論文として発表した。本研究で得られた化合物の中には、破骨細胞の形成を阻害するものが多く存在する。さらに、それらの化合物の中には既存の治療薬とは異なる機構で破骨細胞の形成を阻害するものが存在することから、骨粗鬆症の新たな治療薬として活用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Osteoporosis is a disease in which bone mineral density decreases and bone fracture risk increases due to increased osteoclasts. In this study, the ultimate goal is to develop a therapeutic agent for osteoporosis, and we searched for natural candidate compounds for drugs. In the 2 year research period in which this study was conducted, 20 new compounds were isolated and we published as 5 articles. Many of the compounds obtained in this study inhibit the formation of osteoclasts. In addition, some of these compounds inhibit the formation of osteoclasts by a mechanism different from the existing therapeutic agents, so they can be expected to be used as a new therapeutic agent for osteoporosis.

研究分野：天然物化学

キーワード：骨粗鬆症 破骨細胞 阻害剤 インドールアルカロイド

## 1. 研究開始当初の背景

骨は一見、静止した器官のように見えるが、骨吸収と骨形成を絶えず繰り返している。正常な状態では骨吸収と骨形成のバランスは保たれているが、骨粗鬆症患者では骨吸収の方が優位になっており、骨密度が次第に低下する。骨吸収を担うのは破骨細胞なので、その細胞の形成を阻害し、骨吸収を抑制することができる化合物は骨粗鬆症治療薬のリード化合物となる。

日本骨粗鬆症学会が刊行している「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2011年度版」によれば、2011年の時点で骨粗鬆症の患者は1300万人と推測された。人口の急速な高齢化に伴い、現在その数はさらに増加している。超高齢社会において、健康寿命を延ばすためには、骨粗鬆症を予防し治療することが重要である。

現在、臨床現場で最も使用されている薬剤は、骨吸収抑制作用を示すビスホスホネートである。この薬剤の大きな特徴の一つとして、ビスホスホネートが骨中に沈着し、長期間にわたりその有効性を示すことが挙げられる。しかし、5年後には薬剤が骨全体に行き渡り、ある一定以上は骨量が増加しなくなってしまう。その一方で、ビスホスホネートが骨中に長期間蓄積され、骨吸収を抑制し続けることが骨に悪影響を与えないかどうかは未だ明らかにされていない。そこで現在、投与の中断により薬効を示さなくなる骨吸収阻害剤が臨床的に有用であると考えられ、その開発が進められている。

骨吸収阻害薬の創薬標的として、破骨細胞分化因子として同定されたサイトカインであるRANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) が注目されている。RANKL がその受容体であるRANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B) に結合することで、下流のシグナル伝達系が活性化され、破骨細胞の分化が進行する。このRANKL/RANK シグナル伝達系の阻害剤が骨粗鬆症の治療薬として働くことはすでに明らかになっており、日本では2013年に初めてRANKLに対するモノクローナル抗体医薬品であるデノスマブが承認された。RANKL を標的としたデノスマブは、承認されてからまだ2年しか経過していないので安全性は完全には証明されていないが、その骨折予防の効果が高く評価されている。

ところで、骨粗鬆症の中でもステロイド性骨粗鬆症は、ステロイド薬を長期にわたり服用している患者が発症しやすい。日本におけるステロイド性骨粗鬆症の実態は不明だが、1996年の米国リウマチ学会の調査では、全米の骨粗鬆症患者の20%がステロイド薬の服用に起因することが明らかになった。しかし、一般的な骨粗鬆症に対する治療薬とは異なり、ステロイド性骨粗鬆症に対する有効な治療薬は種類が非常に限られている。2014年改訂版の「ステロイド性骨粗鬆症の管理と治療ガイドライン」によれば、デノスマブもあまり有効とされていない。現在、ステロイド性骨粗鬆症に対する治療薬としてビスホスホネートが主に使用されているが、その治療効果も限られており、新薬の開発が望まれている。ステロイ

ド性骨粗鬆症においても破骨細胞による骨吸収が促進されているため、本研究では、ステロイド性骨粗鬆症に対しても破骨細胞の分化を阻害する薬剤が有効であると考え、デノスマブとは構造や作用機構の異なる低分子化合物から阻害剤を探索した。

## 2. 研究の目的

破骨細胞では、TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) が高発現しているため、TRAP 活性を破骨細胞のマーカーとして使える。そこで本研究では、このTRAP 活性を指標に破骨細胞の形成を調べた。当研究室では、これまで骨粗鬆症の医薬品リード化合物の探索を目的として、日本やインドネシアで採取した海綿、微生物および植物のエキス (約4,500種) についてTRAP 活性を指標にスクリーニングを行った。そして、インドールアルカロイドである (-)-6-*epi*-notoamide T (図1) が破骨細胞の分化を強く阻害していることを発見した (IC<sub>50</sub> 値は1.7  $\mu$ M)。(-)-6-

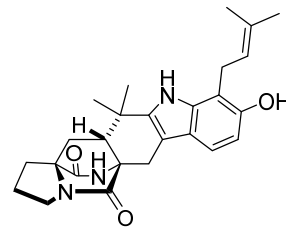


図1. (-)-6-*epi*-Notoamide T の構造

*epi*-notoamide T は、当研究室で真菌から単離したインドールアルカロイドの類縁体で、共同研究者であるWilliams教授 (コロラド州立大学、米国) らが合成した化合物である。一方、(-)-6-*epi*-notoamide T の類縁体として当研究室で保有している12種の天然物は、いずれも10  $\mu$ Mでも全く阻害作用を示さなかった。そこで、本研究では、以下の2つの点について調べることを目的とした。

- (1) (-)-6-*epi*-Notoamide T による破骨細胞分化に対する阻害機構をより詳細に調べる。すなわち、破骨細胞に特異的な遺伝子や破骨細胞の分化に関与する細胞内シグナルについて調べ、(-)-1 が分化のどの段階を阻害しているのか明らかにする。
- (2) (1) と並行して、当研究室で保有する約4,500種の薬用資源ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、より強力な破骨細胞の分化阻害剤を単離し、阻害機構を調べる。

従来、破骨細胞の分化が阻害されているかどうかを調べるには、細胞の形態を一つずつ目視で確認する必要があったが、TRAP 活性を指標に破骨細胞の分化阻害剤をスクリーニングする方法が開発されて以来、研究を効率的に進めることができるようになった。TRAP 活性を指標に分化阻害剤を探索した研究は2005年に報告された論文が最初のものであるため、まだ未調査の天然資源が数多く残されていると考えられる。また、低分子化合物でRANKL をターゲットとする骨粗鬆症治療薬はまだ開発されていないので、

既存の医薬品とは構造や作用機構が全く異なる薬物を見出すことができるといえる。なお、デノスマブが多発性骨髄腫の骨病変の治療にも用いられていることから、破骨細胞の分化阻害剤は抗がん剤の候補にもなり得る。

また、本応募者が破骨細胞分化阻害剤として発見した (-)-6-*epi*-notoamide T はインドールアルカロイドであるが、RANKL 依存的な破骨細胞の分化阻害作用を示すインドールアルカロイドは、(-)-6-*epi*-notoamide T が初めての例である。(-)-6-*epi*-notoamide T の類縁体である 12 種のインドールアルカロイドは分化を阻害しなかったため、(-)-6-*epi*-notoamide T に特有な構造が破骨細胞の分化を阻害していることが期待できる。

### 3. 研究の方法

はじめに、(-)-6-*epi*-notoamide T の破骨細胞の分化阻害を遺伝子レベルで解析した。まず、マクロファージ様細胞株である RAW264 細胞を RANKL および (-)-6-*epi*-notoamide T (5  $\mu$ M) 存在下で 4 日間培養した。そして、破骨細胞に特異的な遺伝子である *TRAP* と *NFATc1* (nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1) の発現を RT-PCR により調べたところ、いずれもコントロールと比較し 25% 程度阻害されているが、破骨細胞に特異的な *TRAP* mRNA および *NFATc1* mRNA は十分に発現していることが分かった。*TRAP* mRNA が発現していてもその産物である *TRAP* の活性が検出されないということは、(-)-6-*epi*-notoamide T が *TRAP* mRNA の翻訳を阻害しているか、あるいは、生合成された *TRAP* を活性化するカテプシン K の作用を阻害している可能性が考えられる。カテプシン K の阻害剤として知られているオダナカチブは、骨粗鬆症の治療薬として、現在、第 III 相試験が行われている。(-)-6-*epi*-notoamide T が同様の阻害活性を示すのであれば、骨粗鬆症の医薬品リードとして期待できる。そこで、カテプシン K に加えて、破骨細胞に特異的な遺伝子である *CathK*、*Atp6v0d2*、*DC-STAMP* および *OC-STAMP* などの発現が、(-)-6-*epi*-notoamide T の添加により変化するかどうかについて調べた。これら 4 種の遺伝子は破骨細胞のマーカーで、発現量も多いので検出が容易であり、また、それぞれの細胞内における役割もよく知られている。そのため、これら遺伝子発現の経日変化を調べれば、(-)-6-*epi*-notoamide T が分化のどの段階を阻害しているのかが明確になると考えられる。その結果、4 種の遺伝子の発現はいずれも 20-50% 程度阻害された。

また、(-)-6-*epi*-notoamide T の阻害機構を調べる研究と並行して、新たな破骨細胞の分化阻害剤を探索した。すなわち、当研究室ではインドネシアや日本国内で採集した海綿、真菌および植物の抽出物 (薬用資源ライブラリー) を約 4,500 種有しているため、それらの抽出物について *TRAP* 活性を指標にスクリーニングを行った。そして、阻害活性の認められた抽出物から阻害剤を探索し、強い阻害活性が認められた化合物については、(-)-6-*epi*-notoamide T と同様の方

法により阻害機構を解析することを目指した。

### 4. 研究成果

本研究を実施した 2 年間の研究期間において、20 個の新規化合物を単離し、5 報の論文として発表した ((a) *J. Nat. Prod.* 79, 1922-1928 (2016)、(b) *J. Nat. Prod.* 80, 90-95 (2017)、(c) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 4975-4978 (2017)、(d) *Fitoterapia* 128, 43-49 (2018)、(e) *Heterocycles* 97, in press)。 (a)、(b) および (e) の論文はいずれも海綿から得られた活性物質について報告したが、(a) の論文では、ジテルペンである ceylonamides A と B (図 2) が破骨細胞の分化を阻害することを示した。また、(b) の論文では、ジテルペンである ceylonin A (図 3) が破骨細胞の分化は阻害せずに、細胞融合を阻害することを明らかにした。また、(d) と (e) の論文では、最終年度である平成 29 年度に発見した新規化合物 neviotine D (図 4) および aaptic acid (図 5) とそれらの類縁体の活性について報告した。一方、(c) の論文では、海洋由来 *Aspergillus* 属真菌から得られたプレニル化インドールアルカロイドについて活性を調べたところ、(-)-6-*epi*-notoamide T (図 1) が強い阻害活性を示すことが分かった。破骨細胞の分化に対する強い阻害活性がインドールアルカロイドに認められた報告は初めてであり、新たな作用機構で分化を阻害していることが期待できる。

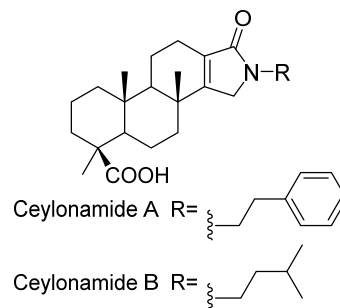


図 2. Ceylonamides A と B の構造

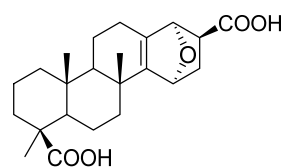


図 3. Ceylonin A の構造

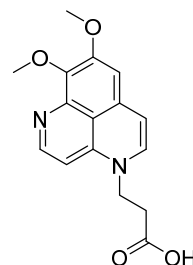


図 4. Aaptic acid の構造

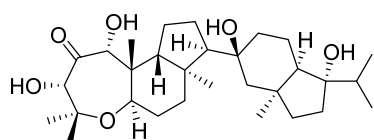


図 5. Neviotine D の構造

本研究では、破骨細胞の分化を阻害する新規化合物を発見するとともに、破骨細胞の分化は阻害せずに、細胞融合を阻害する化合物を見出すことができました。細胞融合を特異的に阻害する化合物が骨粗しょう症の医薬リードとして有望であるかどうかを調べることで、今後、さらに研究を展開したい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. A. H. El-Desoky, H. Kato, E. D. Angkouw, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, S. Tsukamoto, Ceylonamides A-F, nitrogenous spongian diterpenes that inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis, from the marine sponge *Spongia ceylonensis*, *J. Nat. Prod.*, 査読有り, 79 巻, 2016 年, 1992-1928  
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00158
2. A. H. El-Desoky, H. Kato, I. Kagiya, Y. Hitora, F. Losung, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, S. Tsukamoto, Ceylonins A-F, spongian diterpene derivatives that inhibit RANKL-induced formation of multinuclear osteoclasts, from the marine sponge *Spongia ceylonensis*, *J. Nat. Prod.*, 査読有り, 80 巻, 2017 年, 90-95  
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00725
3. H. Kato, A. Kai, T. Kawabata, J. D. Sunderhaus, T. J. McAfoos, J. M. Finfield, Y. Sugimoto, R. M. Williams, S. Tsukamoto, Enantioselective inhibitory abilities of enantiomers of notoamides against RANKL-induced formation of multinuclear osteoclasts, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有り, 27 巻, 2017 年, 4975-4978  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.10.017
4. A. A. El-Beih, A. H. El-Desoky, M. A. Al-hammady, A. I. Elshamy, M-E. F. Hegazy, H. Kato, S. Tsukamoto, New inhibitors of RANKL-induced osteoclastogenesis from the marine sponge *Siphonochalina siphonella*, *Fitoterapia*, 査読有り, 128 巻, 2018 年, 43-49  
DOI:10.1016/j.fitote.2018.05.001
5. A. Fukumoto, Y. Hitora, A. Kai, H. Kato, E. D. Angkouw, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, S. Tsukamoto. Isolation of aaptacic acid from the marine sponge *Asptos lobata* and inhibitory effect of aaptamines on

RANKL-induced formation of multinuclear osteoclasts, *Heterocycles*, 査読有り, 97 巻, 2018 年, in press  
DOI:10.3987/COM-18-S(T)73

[学会発表](計2件)

1. A. H. El-Desoky, 加藤光, 賀儀山一平, 人羅 勇気, 塚本 佐知子, 海綿 *Spongia ceylonensis* より単離した ceylonin 類の生成機構, 日本生薬学会第 64 回年会, 東邦大学 習志野キャンパス, 2017 年 9 月 9 日
2. A. H. El-Desoky, 賀儀山一平, 加藤光, 人羅 勇気, 塚本 佐知子, 海綿 *Spongia ceylonensis* より単離した ceylonin 類の構造と生物活性, 第 7 回食品薬学シンポジウム, 京都薬科大学愛学館, 2017 年 10 月 28 日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://kumamoto-natmed.net/>

#### 6. 研究組織

研究代表者

加藤 光(KATO, Hikaru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 20547129