

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06719

研究課題名(和文) 破骨細胞の分化あるいは細胞融合を選択的に阻害する活性天然物の探索と作用機構の解明

研究課題名(英文) Search for biologically active natural products that selectively inhibit osteoclast differentiation or cell fusion and elucidation of the inhibitory mechanism

研究代表者

加藤 光 (Kato, Hikaru)

熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・助教

研究者番号：20547129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、骨粗しょう症の医薬品となり得る化合物を探すため、当研究室がもつ薬用資源ライブラリー(約4500種)について調べ、5つの阻害物質(ジブロモインドールアルカロイド、ダバノン類縁体、テルペノイド taichunins、麦角アルカロイド、および、カテキン類縁体)を候補化合物として発見した。そのうち3種についてさらに効果を調べ、そのうち2種が従来の骨粗しょう症の医薬品とは異なる効果をもつことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい効果を示す医薬品を開発するためには、従来の医薬品とは異なる作用を示す医薬品候補化合物を見出すことが重要である。今後、日本が超高齢化社会を迎えるにあたり、我々は骨粗しょう症の治療薬の候補化合物を見出すことを目的とした。そして、本研究課題では、従来の骨粗しょう症の医薬品とは異なる効果をもつ化合物を天然物から見出すことに成功した。今回発見した化合物は、残念ながらすぐに医薬品として利用できるほど活性は強くなかったが、それらをモデル化合物として、新しい医薬品が開発されることを期待したい。

研究成果の概要(英文)：In this research project, in order to search for compounds that can be used as drugs for osteoporosis, we investigated the medicinal resource library (about 4500 species) that our laboratory has. As a result, five inhibitors (dibromoindole, dabanone analogs, terpenoids (taichunins), barley alkaloids, and catechin analogs) were discovered as candidate compounds. The effects of three of them were further investigated, and it was suggested that two of them had different effects from the conventional osteoporosis drugs.

研究分野：天然物化学

キーワード：骨粗しょう症 破骨細胞 分化 阻害剤 アルカロイド テルペノイド 天然物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は、骨が溶かされ壊れること（骨吸収）と骨が新たに作られること（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いるので、骨の量が次第に低下する。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候補化合物となる。一方、破骨細胞が形成されるためには、破骨細胞の(1)分化と(2)細胞融合の2つの段階を踏む必要がある。したがって、(1)と(2)のどちらかの段階を阻害することができれば、破骨細胞による骨吸収を阻害することができる。当研究室では、独自の薬用資源（約 4,500 種）を保有しており、それらの資源から、破骨細胞による骨吸収を阻害する化合物を探索している。

当研究室では、これまでに天然資源から、RANKL 依存的な分化の阻害剤として halenaquinone¹⁾と ceylonamide A²⁾、および(-)-6-epi-notoamide T³⁾を発見し、既に論文で報告した。また、ジテルペン ceylonin A は、50 μM の濃度で RANKL 依存的な分化は阻害せずに破骨前駆細胞の融合を阻害することを明らかにした。これまでに破骨前駆細胞の融合を標的とする化合物の探索は行われていなかったため、強く興味を持ち、分化は阻害せずに細胞融合を阻害する化合物を探索したところ、海綿由来のアルカロイドである aaptamine が特異的に細胞融合を阻害し、4.4 μM で 100% 阻害することが分かった。これは、初めに発見した ceylonin A よりも強い細胞融合の阻害効果であった。

本研究では、当初、当研究室で発見した細胞融合の阻害剤として最も阻害活性の強かった aaptamine について、さらに阻害メカニズムを詳細に調べることを計画していた。また、並行して当研究室独自の薬用資源ライブラリーについてスクリーニングし、さらに阻害活性の強い化合物を見出すことを目指していた。

2. 研究の目的

本研究では、多核破骨細胞の形成において必須である「①RANKL 依存的な分化」と「②破骨前駆細胞の融合」が別の機構で制御されていることに注目し、それぞれの阻害剤を天然資源から探索することを目的とした。RANKL/RANK シグナル伝達系をターゲットとする低分子化合物の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期待している。また、破骨前駆細胞の融合に対する阻害剤は、これまでに報告されていない。一方、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は、多発性骨髄腫の骨病変の治療にも用いられているので、破骨細胞の分化阻害剤は抗がん剤の候補としても期待できる。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞の分化・細胞融合の阻害活性を評価した方法

RAW264 細胞は分化誘導因子 RANKL により刺激されると単核破骨細胞へと分化を開始し、引き続き細胞融合により多核破骨細胞が形成される。RAW264 細胞は RANKL 刺激により分化を開始すると、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) を産生するようになるので、TRAP 活性を *p*-nitrophenyl phosphate を用いて調べた。これにより、破骨細胞の分化が開始したかどうかを評価した。また、TRAP 活性が認められ、かつ、中に 3 つ以上の核を含む細胞を数え、この数を多核破骨細胞の数と定義し、細胞融合が進行したかどうかを評価した。

(2) スクリーニング

本研究では、当研究室で保有する薬用資源ライブラリー（約 4,500 種：当研究室でこれまでに単離した化合物、インドネシアや熊本県天草市の海で採取した海綿のエキス、および、インドネシアやエジプトで採集した植物のエキスなどを含む）から、*in vitro*系でこれら一連の分化・細胞融合を阻害する低分子化合物をスクリーニングした。その際、上記のように、①RANKL 依存的な分化と②細胞融合のそれぞれに着目して阻害物質を探索した。

(3) (2)で発見した阻害物質について、阻害機構を調べた。

(3-1) ジブロモインドールアルカロイド

スクリーニングの結果、インドネシアや熊本県天草市の海で採取した海綿のエキスライブラリーには、多くのヒットエキスが存在した。ヒットしたエキスの内の 1 つを液々分配および各種クロマトグラフィーで精製した。そして、阻害活性が認められた新規ジブロモインドールアルカロイドについて、①RANKL 依存的な分化と②細胞融合に対する作用を評価した。

(3-2) ダバノン類縁体

エジプトで採取した *Artemisia* 属植物のエキスが、破骨細胞の分化・細胞融合を阻害する作用を示したので、エキスを精製した。その結果、複数のダバノン類縁体が阻害物質として得られたので、NMR や MS などの各種スペクトルを解析し、構造を決定した。また、得られたダバノン類縁体の①RANKL 依存的な分化と②細胞融合に対する作用を評価した。

(3-3) ジテルペン taichunins

当研究室で保有する *Aspergillus* 属真菌が生産する新規ジテルペン taichunins が、破骨細胞の分化・細胞融合を阻害する作用を示した。そこで、taichunins の阻害活性を詳細に調べ、構造活性相関を検討した。また、taichunins の類縁体である sphaeropsidin B が最も収量が多かったので、現在、阻害活性のメカニズムを sphaeropsidin B を用いて RT-PCR により検討している。

4. 研究成果

本研究課題では、当研究室で保有する薬用資源ライブラリーをスクリーニングすることで、5つの阻害物質（ジプロモインドールアルカロイド、ダバノン類縁体、テルペノイド taichunins、麦角アルカロイド、および、カテキン類縁体）を発見した。これらの5つの阻害物質の内、ジプロモインドールアルカロイド、ダバノン類縁体および taichunins は、以前に発見した阻害物質 aaptamine よりも阻害活性が強いことが分かった。そこで、それら3つの阻害物質について、より詳細に阻害活性を調べることにした。

(1) ジプロモインドールアルカロイドの阻害活性について

スクリーニングでヒットした海綿エキスの内の1つから、新規ジプロモインドールアルカロイド (1) を活性成分として単離した。RAW264 細胞と RANKL を用いた *in vitro* 評価系で阻害活性を調べたところ、1 を添加しても TRAP 陽性単核細胞の数が減少しなかった。この結果から、1 は RANKL 刺激による分化の開始を阻害しないと考えられた。また、1 の添加によって多核破骨細胞の数は減少したことから、1 は分化の開始を阻害せずに、細胞融合、あるいは、細胞融合より上流のイベントを阻害すると考えられた。このような機序をもつ医薬品は存在しないことから、1 は新しい機序をもつ骨粗鬆症の治療薬シードとして期待できる。そこで、ジプロモインドールアルカロイドの誘導体を化学合成により12種以上すでに取得し、現在、構造活性相関を調べている。

(2) ダバノン類縁体の阻害活性について

エジプトで採取した *Artemisia* 属植物のエキスから、新規化合物を含む複数のダバノン類縁体を阻害物質として得た。得られたダバノン類縁体の内いくつかは、RANKL 刺激下、TRAP 陽性単核細胞の数を減少させたので、RANKL 刺激による分化の開始から TRAP 産生までの間のイベントを阻害すると考えられた。さらに、新規化合物の内1つは数 nM で分化阻害活性を示した。今後、これらダバノン類縁体の阻害メカニズムの解明が期待される。

(3) ジテルペン taichunins の阻害活性について

スクリーニングの結果から、当研究室で単離した新規テルペノイド taichunins が破骨細胞の分化・細胞融合を阻害することが明らかになった。Taichunins は *Aspergillus* 属真菌から得られたテルペノイドなので、taichunins の類縁体を本真菌のエキスから探索してさらに新規 taichunins を得た。そして、得られた taichunin 類縁体について阻害活性を評価し、構造活性相関を検討した。現在、阻害機構の詳細を検討している。

当初、本研究課題では、海綿由来アルカロイド aaptamine について、破骨細胞の細胞融合を阻害するメカニズムを調べることを計画していた。しかし、当研究室の薬用資源ライブラリーのスクリーニングを行ったところ、aaptamine よりも活性の強い阻害物質が複数発見されたため、今回はそれら阻害剤の構造と活性を調べた。今後は、細胞融合の阻害メカニズムを詳細に調べることで、新たな機序の医薬シーズが発見されることを期待している。

<引用文献>

- 1) S. Tsukamoto, H. Kato *et al.*, Halenaquinone inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 5315-5317 (2014).
- 2) A. H. El-Desoky, H. Kato, S. Tsukamoto *et al.*, Ceylonamides A-F, nitrogenous spongian diterpenes that inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis, from the marine sponge *Spongia ceylonensis*. *J. Nat. Prod.* **79**, 1922-1928 (2016).
- 3) H. Kato, Y. Sugimoto, R. M. Williams, S. Tsukamoto *et al.*, Enantioselective inhibitory abilities of enantiomers of notoamides against RANKL-induced formation of multinuclear osteoclasts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 4975-4978 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukumoto Arina, Hitora Yuki, Kai Aika, Kato Hikaru, D. Angkouw Esther, E. P. Mangindaan Remy, J. de Voogd Nicole, Tsukamoto Sachiko	4. 巻 97
2. 論文標題 Isolation of Aaptic Acid from the Marine Sponge Aaptos lobata and Inhibitory Effect of Aaptamines on RANKL-Induced Formation of Multinuclear Osteoclasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 1219 ~ 1219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3987/COM-18-S(T)73	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤栄舟、Ahmed H. El-Desoky、加藤光、塚本佐知子
2. 発表標題 Artemisia judaicaに含まれるdavanone類縁体の破骨細胞の分化および細胞融合の阻害活性
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福元有菜、甲斐愛佳、人羅勇氣、加藤光、塚本佐知子
2. 発表標題 インドネシア産海綿由来新規aaptamine類縁体の単離と破骨細胞多核化阻害作用について
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧和彦、加藤光、塚本佐知子
2. 発表標題 海綿から得られた新規ブロム化インドールアルカロイドの構造と生物活性
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ahmed H. El-desoky, 瀬邊 桃菜, 永木 美夏, 甲斐 愛佳, 江口 啓介, 人羅 勇氣, 加藤 光, 塚本 佐知子
2. 発表標題 真菌Aspergillus taichungensisから得られた破骨細胞分化抑制物質 (1) 構造
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲田 夏実, 前山 夕歌, 人羅 勇氣, 加藤 光, 塚本 佐知子
2. 発表標題 真菌Aspergillus taichungensisから得られた破骨細胞分化抑制物質 (2) 活性
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院 生命科学部 天然薬物学分野HP http://kumamoto-natmed.net/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------