

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14938

研究課題名(和文) BMP/Smadシグナル制御に着目した天然資源からの新規骨形成促進薬の網羅的探索

研究課題名(英文) Search for Novel Bone Formation Promoters from Natural Resources Focusing on BMP/Smad Signaling Regulation

研究代表者

矢作 忠弘 (YAHAGI, Tadaihiro)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：40632766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：BMP/Smadシグナルを制御する天然薬物の探索を目的とし、ミャンマー産植物エキス700種類、琉球弧植物エキス1496種類についてレポーターアッセイによるスクリーニングを行った。その結果、ミャンマー植物では29種類、琉球弧植物では26種類にSmad活性が認められた。ミャンマー植物ではソリザヤノキの樹皮について成分探索を行い、5種のフラボノイドを単離した。琉球弧植物ではアカボシタツナミソウの全草について成分探索を行い、3種の新規化合物を含む14種のポリメトキシフラボノイドを単離した。これらの化合物について、Smad活性および骨芽細胞への影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本は世界でもトップクラスの長寿国であるが、多くの人が長い間「健康ではない」状態で過ごしており、特に骨粗鬆症による骨折は高齢者が寝たきりになる理由の上位であることから、骨を健康に保つことができるような医薬品の開発は急務である。今回、骨形成に関与するシグナル伝達の一つであるBMP/Smadシグナルを活性化させる天然物の探索を行い、ミャンマー植物および琉球弧植物より、Smad活性を有するフラボノイドを単離した。さらなるエビデンスの蓄積により、シード化合物としての発展や、健康食品・サプリメントとしての利用につながることを期待したい。

研究成果の概要(英文)：To search for natural drugs that regulate BMP/Smad signaling, we screened 700 Myanmar plant extracts and 1496 Ryukyu arc plant extracts by reporter assay. As a result, Smad activity was observed in 29 Myanmar plant extracts and 26 Ryukyu Arc plant extracts. In the Myanmar plant, five flavonoids were isolated from the bark of the *Oroxylum indicum* (L.). In the Ryukyu Arc plant, forty polymethoxyflavonoids including 3 new compounds were isolated from the whole plants of *Scutellaria rubropunctata*. These compounds were examined for their Smad activity and effects on osteoblasts.

研究分野：生薬学・天然物化学

キーワード：BMP/Smad 骨代謝 ミャンマー植物 琉球弧植物 フラボノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し骨折の危険性が増大する疾患である。骨は、破骨細胞が行なう骨吸収と骨芽細胞が行なう骨形成の絶妙なバランスで動的な恒常性を維持 (=骨リモデリング) しているが、これが破綻することで様々な骨疾患を惹起する。現在の第一選択薬であるビスホスホネート製剤は、破骨細胞による骨吸収を抑制するため、骨吸収が増強する閉経後骨粗鬆症においては有効であったが、骨リモデリングを止めてしまうため、微小な骨損傷や古い骨が蓄積し骨質の改善には至らず、重大な副作用を惹起していた。また、老人性骨粗鬆症では、様々な要因によって骨芽細胞による骨形成の働きが減弱し、破骨細胞による骨吸収が相対的に上回り引き起こされているため、骨形成を亢進させることが重要である。骨リモデリングのうち、骨形成に深く関与する細胞内シグナルとして BMP/Smad シグナルが挙げられる。BMP/Smad シグナルの中心を担う Smad は、特異的 R-Smad、共有型 Co-Smad、抑制型 I-Smad に分類される。特に骨と関係が深い R-Smad としては、Smad1、5 および 8 があり、これらが Co-Smad である Smad4 と複合体を形成し、核内に移行した後、転写調節領域に存在する SBE (Smad binding element) に結合することで、Runx2 の転写を調節する。骨形成の主要制御因子である Runx2 が活性化することにより、Osterix などの様々な骨形成関連遺伝子が発現誘導され、骨芽細胞の分化や骨形成を促す。以上の学術的背景から、骨形成に深く関与する BMP/Smad シグナルの制御が、骨粗鬆症の新たな治療戦略となる可能性を秘めていると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨形成に深く関与する BMP/Smad シグナルを選択的に制御することで骨リモデリングの正常化に寄与する天然薬物の探索を行い、その構造的特徴や詳細なメカニズムを *in vitro* および *in vivo* で解析することである。骨粗鬆症は、破骨細胞と骨芽細胞により形成される骨リモデリングの破綻が主な原因であり、生じる骨折が日常生活 (ADL) や生活の質 (QOL) を著しく低下させることから、骨リモデリングの正常化が重要な課題の一つとなっている。しかし、第一選択薬である骨吸収抑制薬は、骨リモデリングの動きを止め、微小な骨損傷や古い骨が蓄積するため骨質の改善には至らない。実際にビスホスホネート製剤の継続服用は非定型大腿骨骨折のリスクが増大し、これには骨リモデリング機能の抑制が関与していると考えられている。これらのことから、従来の破骨細胞の骨吸収を抑制するのではなく、低下した骨芽細胞による骨形成能力を賦活化させることが、骨リモデリングの正常化に寄与する最適なアプローチだと考え、骨形成に深く関与する BMP/Smad シグナルに着目した研究を構想するに至った。これらのことから、本研究を推進させることで骨粗鬆症の治療や予防への臨床応用に展開するための新たな治療戦略の構築を目指す。

以上の研究目的を達成するために、 - の項目について明らかにしていく。

スクリーニングにより BMP/Smad シグナルを制御する天然薬物を見出す。

得られた化合物の構造活性相関を検討することにより、活性発現に必要な構造的特徴を明らかにする。

活性天然薬物の BMP/Smad シグナル中の標的遺伝子を *in vitro* 実験で明らかにする。

3. 研究の方法

Reporter Assay による BMP/Smad シグナルを制御する天然薬物の探索

BMP/Smad シグナルに影響を与える天然薬物を検出するために、Smad 結合配列の下流にホタルルシフェラーゼが導入されたプラスミド (pGL4.48) を HEK293 細胞にトランスフェクションし、Reporter Assay を行う。探索素材としては、これまでに植物環境調査を実施し独自に構築したエキスライブラリー (2500 種、170 科 1072 分類) および高知県立牧野植物園より提供されているエキスライブラリー (700 種) を用いた。

Reporter Assay を指標にした活性成分の探索

活性を認めた植物に関して、Reporter Assay を指標に各種クロマトグラフィー (Silica gel、ODS、Sephadex LH-20、HPLC) を用いて分離精製を行う。得られた化合物は各種機器分析法を用いて構造解析し、活性の評価および活性発現に必要な部分構造や骨格を明らかにする。

骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた骨形成促進作用の評価

天然薬物について骨芽細胞分化の指標である ALP 活性を検討した。分化誘導剤 (ascorbic acid、hydrocortisone、 β -glycerophosphate) と検体を加え培養 4 日後の ALP 活性をマイクロプレートリーダーにて測定する。細胞毒性は MTT 法や BCA 法で評価をする。長期培養時の検討を行うために 14 日感培養後にアリザリンレッド S 染色を行い、石灰化への影響を検討した。

活性天然薬物の BMP/Smad シグナル制御機構の解明

MC3T3-E1 細胞を用いて、BMP/Smad シグナルに関与する遺伝子群 (BMP2、Smad family、Runx2、OSX など) について、Real-time qPCR を用いて検討を行う。

酒石酸耐性フォスファターゼ (TRAP) 活性試験

RAW264.7 細胞を sRANKL で刺激することで破骨細胞へ分化誘導し、細胞内に産生される TRAP の活性を評価した。

4. 研究成果

(1) ミャンマー植物産植物からの BMP/Smad シグナル活性化成分の探索

高知県立牧野植物園より提供されたミャンマー植物のエキスライブラリー700 種について、レポーターアッセイを用いて Smad 活性を有する植物スクリーニングした。その結果、29 種類の植物エキスについて活性が認められた。活性の認められた植物のうちソリザヤノキ *Oroxylum indicum* の樹皮およびアザミゲシ *Argemone Mexicana* L. の全草について、活性成分探索を行った。

ソリザヤノキの樹皮について 80%MeOH で抽出後、常法により分配抽出を行い、Hexane 層、CHCl₃ 層、EtOAc 層、*n*-BuOH 層および水層を得た。各層についてレポーターアッセイを用いて活性評価を行ったところ、EtOAc 層に活性が認められたため、各種クロマトグラフィーを用いて分離精製を行い、フラボノイド 5 種を単離し構造を同定した。単離化合物について活性評価を行ったところ、oroxylin A (Fig. 1.) に Smad 活性が認められた。骨芽細胞分化活性の評価では 0.1-3μM の濃度で分化を促進させ、1μM の濃度で長期培養における石灰化も認められた。遺伝子解析では OPN および Smad の mRNA 発現を有意に促進させたことから、oroxylin A は BMP/Smad シグナルを活性化させる可能性が示唆された。

アザミゲシの全草について 80%MeOH で抽出後、常法により分配抽出を行い、CHCl₃ 層、EtOAc 層、*n*-BuOH 層および水層を得た。各層についてレポーターアッセイを用いて活性評価を行ったところ、CHCl₃ 層に活性が認められたため、各種クロマトグラフィーを用いて分離精製を行い、イソキノリン系アルカロイド 2 種および脂肪酸を単離し構造を同定した。これらの Smad 活性について評価を行ったが、顕著な活性は認められなかったため、引き続き活性本体の探索を行っている。

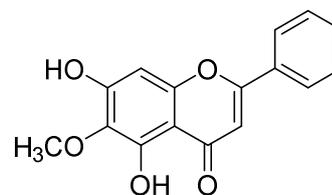


Fig. 1. oroxylin A

(2) 琉球弧植物からの BMP/Smad シグナル活性化成分の探索

植物環境調査を通して作製した琉球弧植物のエキスライブラリー1496 種類について、レポーターアッセイを用いて Smad 活性を有するエキスをスクリーニングした。その結果、26 種類の植物エキスについて活性が認められた。活性の認められた植物のうちアカボシタツナミソウの全草について活性成分探索を行った。アカボシタツナミソウの全草について 80%MeOH で抽出後、常法により分配抽出を行い、Hexane 層、CHCl₃ 層、EtOAc 層、*n*-BuOH 層および水層を得た。各層についてレポーターアッセイを用いて活性評価を行ったところ、CHCl₃ 層に活性が認められたため、各種クロマトグラフィーを用いて分離精製を行い、新規化合物 3 種 (Fig. 2.) を含むポリメトキシフラボノイド類 15 種を単離し、構造を決定した。新規化合物はフラボノイドの A 環にメチレンジオキシ基を有する構造をしており、これまでに *Scutellaria* 属から同様の部分構造を有する化合物の単離情報は無い。これらの化合物について Smad 活性を評価したところ、顕著に活性化作用を有する化合物はなかった。より高濃度での評価や活性成分の探索を行う予定であるが、これらの化合物が相補的に Smad を活性化させている可能性も考えられた。骨芽細胞分化活性の評価では、新規化合物の 1 つに促進活性が認められた。現在、長期培養時の石灰化への影響および分化関連遺伝子への影響を検討中である。

また、アカボシタツナミソウ全草の 80%MeOH エキスについて、骨芽細胞への影響を検討したところ、ALP 活性および石灰化を有意に促進させた。qPCR による遺伝子解析では、短期培養において Runx2、Osteocalcin、Osteopontin および Smad1 の mRNA の発現量を有意に増加させた。また長期培養では、Runx2、Osteopontin および Smad1 の mRNA の発現量を有意に増加させた。破骨細胞への影響も検討したが、影響は認められなかった。これらのことから、アカボシタツナミソウ全草の 80%MeOH エキスは骨芽細胞の分化初期に影響している可能性が示唆された。

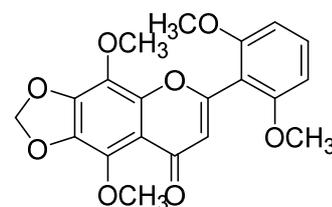


Fig. 2. アカボシタツナミソウから得られた新規化合物の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 矢作忠弘, 渡辺美咲, 松崎桂一	4. 巻 35
2. 論文標題 骨代謝に影響を与える天然薬物	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 102-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡辺 美咲、福富 遥都、矢作 忠弘、三宅 克典、小谷 仁司、小川 拓哉、松崎 桂一
2. 発表標題 エストロゲン受容体活性化作用を有する琉球弧植物の骨代謝への影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺 美咲、福富 遥都、矢作 忠弘、上倉 りな、三宅 克典、小谷 仁司、松崎 桂一
2. 発表標題 アカバシタツナミソウのBMP/Smadシグナル活性化成分の探索
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢作 忠弘、渡辺 美咲、今 依麻、小谷 仁司、松野 倫代、川原 信夫、松崎 桂一
2. 発表標題 ミャンマー産植物からのBMP/Smadシグナル活性化成分の探索
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺美咲, 矢作忠弘, 白山貴大, 三宅克典, 小谷仁司, 松崎桂一
2. 発表標題 エストロゲン受容体を標的とした骨形成促進作用を示す琉球弧植物の探索
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺美咲, 矢作忠弘, 小谷仁司, 小川拓哉, 古川めぐみ, 松崎桂一
2. 発表標題 桂枝加朮附湯の骨芽細胞および破骨細胞に対する影響
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会 (広島)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	三宅 克典 (MIYAKE Katsunori) (20597687)	東京薬科大学・薬学部・講師 (32659)	
研究協力者	渡辺 美咲 (WATANABE Misaki)	日本大学・薬学部・大学院生 (32665)	

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
---------	---------