

機関番号：72801

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790218

研究課題名 (和文) 骨形成促進剤開発を指向した骨芽細胞分化制御機構に関する化学遺伝学的研究

研究課題名 (英文) Chemical genetic study of the molecular mechanism for the regulation of osteoblast differentiation

研究代表者

坂本 修一 (SAKAMOTO SHUICHI)

財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・研究員

研究者番号：60346070

研究成果の概要 (和文)：骨芽細胞は骨を造る為に重要な細胞であり、骨芽細胞分化を誘導する低分子化合物は、骨粗鬆症等の骨疾患の新しい治療薬のシーズになりうる。本研究では間葉系幹細胞に骨芽細胞分化マーカーである骨型アルカリフォスファターゼを発現させる低分子化合物を探索し、それらがどのように作用するのかを解析した。三種得られた活性化合物のうち一種はレチノイド活性を持つ新規の天然化合物であり、**Decalpenic acid** と命名した。

研究成果の概要 (英文)：Osteoblasts are the cells responsible for bone formation during embryonic development and adult life. Small compounds that could induce osteoblast differentiation might be promising sources of therapies for bone diseases such as osteoporosis. To identify inducers of early osteoblastic marker bone ALP in the pluripotent mesenchymal cells, in-house natural and synthetic chemical libraries were screened. Three small compounds were identified as active molecules and one of these compounds is a novel natural product with retinoid activity named decalpenic acid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：化学遺伝学・間葉系幹細胞・骨芽細胞・天然低分子・レチノイド

1. 研究開始当初の背景

我が国の高齢化は世界に類をみない速度で進行しており、それに伴って骨粗鬆症の患者数も増加の一途をたどり、現在は1,000万人を超えるとされている。骨粗鬆症による脊椎や大腿骨頸部の骨折は寝たきりの主因であり介護医療費の増大に直結することから、有効な治療薬の開発等の対応策の確立は社会的な急務である。

個体の骨量は骨芽細胞が担う骨形成と、破

骨細胞が作用する骨吸収という二つの過程のバランスによって維持されており、骨粗鬆症患者では相対的に骨吸収量が骨形成量を超過することによって骨量が減少する。これを治療する薬剤としては現在ビスフォスフォネート等の骨吸収抑制剤が中心であるが、骨量の増加や骨質の改善の観点から、安全で効果的な低分子の骨形成促進剤の開発が強く望まれている。

骨形成促進剤の開発において、骨芽細胞分

化の制御機構の分子レベルでの知見は創薬分子標的を設定する上で不可欠な情報である。骨芽細胞は、脂肪細胞や筋芽細胞にも分化可能な間葉系幹細胞から分化するが、近年の分子生物学・生化学的研究によってこの過程に BMP や Wnt といったサイトカインや Runx2 及び Osterix 等の転写因子が重要であることが明らかにされている。しかし、より研究が進んでいる血球系や神経系における知見が示すように、細胞分化は多数の転写因子及び細胞外からのシグナルが関わる複雑な過程であり、骨芽細胞分化の解明は未だ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

骨芽細胞は骨形成において必須の役割を果たす細胞であり、骨吸収を司る破骨細胞とともに個体の骨量の維持に深く関与する。従ってその分化制御機構を分子レベルで理解することは、基礎生物学における学問的意義に加えて骨粗鬆症の治療薬を開発する上でも非常に有用である。本研究では、従来の分子生物学的アプローチとは一線を画した化学遺伝学的アプローチにより、骨芽細胞分化制御機構に関する新しい知見を見出すこと、及び骨形成促進剤のシードとなる低分子化合物の探索すること、を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では低分子化合物を利用した遺伝学である化学遺伝学の手法を駆使して骨芽細胞分化の制御機構の解明を試みた。まず、未分化の多能性間葉系細胞に対して骨芽細胞分化を特異的に誘導する化合物を主に微生物培養液由来の天然化合物より探索した。次に、得られた化合物の作用機序について主に遺伝子発現変動に着目して解析を行った。

化合物の探索では、骨芽細胞だけでなく筋芽細胞や脂肪細胞、軟骨細胞など複数の細胞種に分化可能な、すなわち間葉系幹細胞に近い性質を持つマウス間葉系細胞株 C3H10T1/2 あるいは ST-2 を用い、早期骨芽細胞分化マーカーである骨型アルカリフォスファターゼ活性を指標として骨芽細胞分化を促進する低分子化合物の探索を行った。この骨芽細胞分化アッセイ系で、主に申請者の所属機関が独自に構築した微生物培養液サンプル及び低分子化合物からなるライブラリーをスクリーニングし、最終的に約4万5千サンプルのスクリーニングを完了した。ヒットした微生物培養液サンプルについては、各種クロマトグラフィーにより活性物質を精製し、精密質量分析計による分子式の特定を行った。分子式と他の機器分析の結果を基にデータベース検索を行い、既知化合物二種類を同定した。さらに新規物質と推定されたサンプルについては核磁気共鳴法 (NMR) や紫外吸収

スペクトル等を駆使して構造決定を行った。

作用機序解析では、リアルタイム PCR 法や DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析を中心に検討を行った。

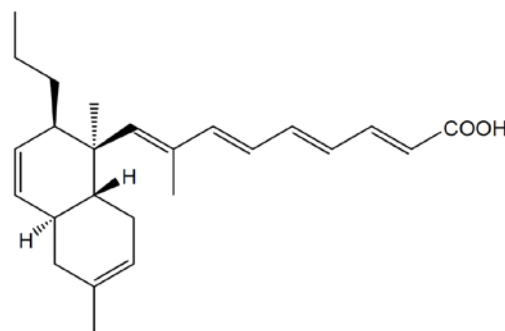
4. 研究成果

(1) スクリーニング結果について

マウス間葉系細胞株を用いた一連のスクリーニングの結果、各々構造が異なる計三種の活性化化合物を得る事が出来た。そのうち一種は新規天然化合物、二種は構造既知の天然化合物であった。これらの化合物の活性をプロファイルするために、マウス間葉系細胞あるいは前骨芽細胞等複数の細胞株をこれらの化合物を含む培地で培養し、骨芽細胞分化マーカー遺伝子や各種シグナル伝達系の下流遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR 法によって調べた。その結果、これら三種の化合物の活性はそれぞれ異なる特徴を有しており、異なる作用点に作用して活性を示していることが示唆された。

(2) 新規天然化合物 Decalpenic acid について

得られた化合物のうち、Penicillium 属のカビ CR37010 の培養液から精製した分子量 366.5 の天然化合物は、データベース検索の結果新規物質と推定されたので、NMR 等の各種機器分析を用いて相対立体構造を決定し Decalpenic acid と命名した (Sakamoto et al., J. Antibiotics, 2010)。下に Decalpenic acid の相対立体構造、及び物理化学的データを示した。



Appearance	Yellow powder
Molecular formula	C ₂₅ H ₃₄ O ₂
Molecular weight	366.54
HRESI-MS (negative, m/z)	
Found	365.2480 (M-H) ⁻
Calcd.	365.2475 (for C ₂₅ H ₃₃ O ₂)
UV λ _{max} (nm, ε) in MeOH	334 (18,000)
[α] _D ²² (c 0.39, CHCl ₃)	-130.0°
IR ν _{max} (cm ⁻¹) (KBr)	3438, 2958, 2871, 1684, 1621, 1591, 1269, 1144, 1005

C3H10T1/2 細胞を 1μM の Decalpenic acid で処理すると、早期骨芽細胞分化マーカーである骨型アルカリフォスファターゼやオステオポンチンの発現が顕著に誘導された。一

方、後期骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシンや Osterix、あるいは脂肪細胞マーカーである Fabp4 については発現誘導がみられなかった。

活性を検討する過程で、細胞形態への影響として Decalpenic acid により細胞がやや紡錘状に伸展すること、それが活性型ビタミン A 代謝産物 all-trans retinoic acid (ATRA) による形態変化と類似していることを見出した。そこで、Decalpenic acid がレチノイド活性を有するか否かについて検討を行った。リアルタイム PCR 法で Rarb2 や Stra6 等のレチノイド受容体標的遺伝子の発現を調べたところ、Decalpenic acid はそれらの発現を顕著に誘導した。さらに、レチノイド応答配列レポーターアッセイでも Decalpenic acid は ATRA の 1/3 程度の活性を示した。また、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現変動解析でも、Decalpenic acid による遺伝子発現変動パターンは ATRA によるものと高い相関性を示した。以上の結果から、Decalpenic acid はレチノイド活性を持つことが明らかとなった。

レチノイド受容体には大別して 3 種類のサブタイプ (Rar α , Rar β , Rar γ) があり、またレチノイド X 受容体 Rxr とヘテロ二量体を形成して下流標的遺伝子の発現を制御することが知られている。そこで、Decalpenic acid がこれらのどの受容体を活性化するかを、GAL4 誘導受容体遺伝子を用いたレポーターアッセイで検討した。その結果、Decalpenic acid は Rar γ と Rar α を活性化する事が判明した。その活性化の強さは Rar γ については ATRA の約 1/4、Rar α については約 1/10 程度であった。

次に、Decalpenic acid による骨型アルカリフォスファターゼ等の早期骨芽細胞マーカーの誘導が、レチノイド受容体を介するか否かを検証した。まず、レチノイド受容体のアンタゴニストである合成低分子化合物 LE540 (5 μ M) と Decalpenic acid (1 μ M) を共処理したところ、Decalpenic acid による骨型アルカリフォスファターゼの誘導は顕著に抑制された。また、siRNA により Rar γ をノックダウンしたところ、LE540 と同様に Decalpenic acid による骨型アルカリフォスファターゼの誘導が顕著に抑制された。これらの結果から、Decalpenic acid はレチノイド受容体、特に Rar γ を活性化することで骨型アルカリフォスファターゼを誘導すると考えられた。

以上の一連の実験結果から、本研究で発見した新規天然化合物 Decalpenic acid の主作用はレチノイド活性であることが示された。Decalpenic acid の構造にはカルボン酸に連結する共役した 4 つの二重結合があるが、この部分構造はレチノイドと良く類似して

おり、レチノイド活性に重要な構造である可能性が高い。一方、レチノイド受容体サブタイプ特異性の面では、ATRA が全てのサブタイプを活性化するのに対し、Decalpenic acid は主に Rar γ 、そして弱いながらも Rar α にも作用するが、Rar β には作用しないという特徴を持っている。このサブタイプ特異性の違いは、直鎖共役二重結合に連結したデカリン骨格に起因する可能性が考えられる。レチノイド受容体サブタイプはそれぞれ生体内において発生や免疫、がんなど様々な生命現象に関与することが知られており、サブタイプに一定の選択性を示す Decalpenic acid はケミカルバイオロジー研究におけるプローブ化合物や医薬品シーズとして応用展開できるポテンシャルを持つと考えられる。

(3) 構造既知の活性化合物二種について

構造既知の活性化合物二種はいずれも天然物であり、これまで骨芽細胞分化誘導に関する報告がない化合物である。これらについてもリアルタイム PCR により骨芽細胞分化マーカー群やレチノイド標的遺伝子群の発現解析を行った。レチノイド標的遺伝子群については、いずれの化合物でも発現誘導は認められなかったが、一方の化合物では Hedgehog シグナルに関与する Gli の発現を上昇させることを見出しており、現在この詳細について解析を進めているところである。今後これらの化合物の作用機序・作用点を明らかにすることで、骨芽細胞分化制御機構の新しい知見が得られる可能性がある。

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 1 件)

- ① Sakamoto, S., Kojima, F., Igarashi, M., Umekita, M., Sawa, R., Kubota, Y., Momose, I., Nakae, K., Yamaguchi, S., Adachi, H., Nishimura, Y., and Akamatsu, Y. Decalpenic acid, a novel small molecule from *Penicillium verruculosum* CR37010, induces early osteoblastic markers in pluripotent mesenchymal cells. *The Journal of Antibiotics*. Vol. 63, 703-708, 2010. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 坂本修一、小島露子、五十嵐雅之、梅北まや、澤竜一、久保田由美子、百瀬功、中栄功一、安達勇光、西村吉雄、赤松穰；新規天然化合物 Decalpenic acid はレチノイド受容体 Rar γ を介して間葉系幹細胞における早期骨芽細胞分化マ

一カーの発現を誘導する、日本ケミカル
バイオロジー学会第6回年会、平成23
年5月24日、東京都

- ② 坂本修二、小島露子、五十嵐雅之、梅北
まや、澤竜一、久保田由美子、百瀬功、
中栄功一、山口昭一、安達勇光、西村吉
雄、赤松穰；間葉系幹細胞の骨芽細胞分
化を誘導する微生物代謝産物の探索、日
本薬学会第130回年会、平成22年3
月29日、岡山市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 修一 (SAKAMOTO SHUICHI)

財団法人微生物化学研究会・微生物化学研
究所沼津支所・研究員

研究者番号：60346070