

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15282

研究課題名（和文）天然資源からの骨粗鬆症治療薬の探索

研究課題名（英文）Search for anti-osteoporosis compounds from natural resources

研究代表者

Eldesoky Ahmed (Eldesoky, Ahmed)

熊本大学・大学院生命科学研究部（薬）・特別研究員

研究者番号：10874521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：骨粗鬆症の治療・予防薬のリード化合物を天然資源から探索した。真菌 *Aspergillus taichungensis* の培養物から16種類の新規ジテルペン *taichunin* を単離した。最も活性が強かった *taichunin G* は $0.2 \mu\text{M}$ で多核化および細胞融合を92%阻害した。植物 *Artemisia judaica* から、天然物としては珍しいパーオキシドの架橋構造を有する新規テルペン *arterperoxide* を単離した。*Stylotella* 属海綿から、塩素とカルバメイトを有する新規セスキテルペンを単離した。さらに、骨粗鬆症の予防・治療薬の探索に関して、海洋生物資源からの探索に注目した総説を執筆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における骨粗鬆症患者は1,300万人と推計されているが、急速な高齢化にともない患者数は増加の傾向にある。したがって、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・治療することが極めて重要である。骨粗鬆症の中でもステロイド性骨粗鬆症は、ステロイド薬の長期服用をきっかけとして発症し、全米の骨粗鬆症患者の約20%がステロイド薬の服用に起因するといわれている。しかし、ステロイド性骨粗鬆症に対しては、既存の治療薬は有効ではないため、新薬の開発が強く望まれている。以上の背景から、優れた治療薬あるいは予防薬を開発することは、超高齢社会を迎える日本社会にとっては喫緊の研究課題である。

研究成果の概要（英文）：The inhibitors of osteoclastogenesis were searched from natural sources. The culture of the fungus, *Aspergillus taichungensis*, afforded 16 new diterpenes, *taichunins*. Among them, *taichunin G* showed 92% inhibition of antiosteoclastogenic activity. The Egyptian plant, *Artemisia judaica*, afforded new terpenes, *arterperoxides*, with unique peroxide-bridges. So far, antiosteoclastogenic compounds were isolated mainly from plants and we wrote a review article of those from marine organisms.

研究分野：天然物化学

キーワード：骨粗鬆症治療薬 天然資源 探索

1. 研究開始当初の背景

健康な状態では、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による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が亢進し骨密度が減少する(図1)。したがって、破骨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シーズとなる。「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2015年度版」では、日本における骨粗鬆症患者は1,300万人と推計されているが、急速な高齢化にともない患者数は増加の傾向にある。したがって、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・治療することが極めて重要である。

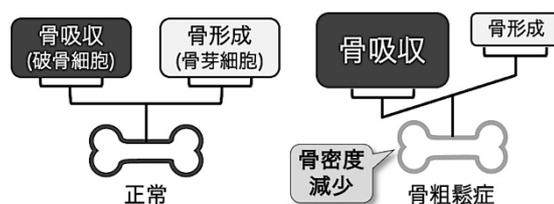


図1. 骨吸収と骨形成のバランスにより正常な骨質量が維持されるが、骨吸収が亢進すると骨粗鬆症が進行する。

骨吸収阻害薬として広く用いられているビスフォスフォネート製剤の問題点として、投与後に骨中に沈着し長期間にわたり有効性を示すが、5年後には薬剤が骨全体に行き渡り、ある一定以上の骨量増加が認められないことが報告されている。また、薬剤が骨中に長期間蓄積され、骨吸収抑制の長期化による骨への悪影響も懸念されている。そこで、投与期間中のみ薬効を示す骨吸収阻害剤の開発が必要とされている。

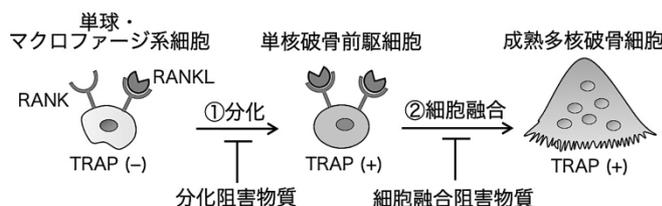


図2. 多核破骨細胞の形成過程

そこで、投与期間中のみ薬効を示す骨吸収阻害剤の開発が必要とされている。

単球・マクロファージ系細胞は、単核の破骨前駆細胞に分化した後(図2の①)、それらが融合して多核破骨細胞へと成熟する(図2の②)。骨吸収阻害薬の創薬標的として、破骨細胞の分化因子であるRANKL(receptor activator of NF-κB ligand)が注目されている。RANKLが、単球・マクロファージ系細胞の表面に発現している受容体RANK(receptor activator of NF-κB)に結合すると、下流のシグナル伝達系が活性化され、破骨細胞へと分化する(①)。分化の進行は、細胞内におけるTRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)酵素の発現の有無で判断できる。そして、RANKLに対するモノクローナル抗体医薬であるデノスマブが2013年に日本でも承認されているので、RANKL/RANKシグナル伝達系が骨粗鬆症治療薬の標的になることは明らかである。また、デノスマブの骨折に対する予防効果は高く評価されているので、RANKLに作用する薬剤は治療に加えて予防薬としての効果も期待される。

ところで、骨粗鬆症の中でもステロイド性骨粗鬆症は、ステロイド薬の長期服用をきっかけとして発症する。1996年の米国リウマチ学会の報告によると、全米の骨粗鬆症患者の約20%がステロイド薬の服用に起因するといわれている。しかし、ステロイド性骨粗鬆症に対しては、ビスホスフォネートやデノスマブもあまり有効ではないため(「ステロイド性骨粗鬆症の管理と治療ガイドライン」2014年改訂版)、新薬の開発が強く望まれている。

以上の背景から、既存の骨粗鬆症治療薬の作用を補完するような治療薬あるいは予防薬を開発することは、超高齢社会を迎える日本社会にとっては喫緊の研究課題である。

2. 研究の目的

本研究では、多核破骨細胞の形成において進行する「①RANKL 依存的な分化」と「②破骨前駆細胞の融合」(図2)のそれぞれに対する阻害物質を天然資源から探索することを目的とする。RANKL/RANKシグナル伝達系を標的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治療薬が誕生する可能性が考えられる。

申請者の所属研究室のエキスライブラリーは、微生物(真菌、細菌、放線菌)、海洋無脊椎動物(海綿、ホヤ、軟体サンゴ)、植物など多様な生物種から構成されているので、エキス成分の化学的多様性が高い。さらに、干潟という特殊環境に生息する微生物のエキスが多い点、及び真菌を共培養したエキスが多い点において、他機関のライブラリーにはない独自性を有しているので、未知の有効成分が発見される可能性が高い。本ライブラリーのポテンシャルは高く、ユニークな成果が得られる可能性がきわめて高いといえる。

3. 研究の方法

研究室で保有する薬用資源エキスライブラリー(約17,000種)から、新規骨粗鬆症治療薬シーズを探索する。その際、①RANKL 依存的な分化と②細胞融合のそれぞれに着目して評価することにより、融合を特異的に阻害する化合物を発見できると考えている。細胞融合に対する特異的阻害物質の報告はほとんど知られていないので、治療薬シーズとしてだけでなくプローブと

して学術研究での活用も期待される。

(1) 分化に対する評価：マクロファージ系細胞 (RAW264) から単核の破骨細胞に分化する際に、TRAP 酵素が発現する (図 2)。そこで、TRAP 酵素活性を調べることにより分化の進行を評価できる。TRAP 酵素により、*p*-nitrophenylphosphate が加水分解されて黄色の *p*-nitrophenol が生成するのを比色定量する。

(2) 融合に対する評価：添加した naphthol AS-MX phosphate が TRAP 酵素により加水分解され、fast red violet LB salt と反応してアゾ色素が生成する。細胞が赤紫色に染色されるので、顕微鏡下で多核化した細胞数を計測する。

4. 研究成果

(1) 真菌のエキスをスクリーニングし、*Aspergillus taichungensis* (IBT 19404) から新規 isopimarane diterpenes である taichunins E-T (1-15) および 20-*nor*-isopimarane (16) を単離した (図 3)。平面構造は NMR スペクトルおよびマススペクトルで決定し、絶対立体配置は NOESY スペクトルと ECD スペクトルの計算で決定した。単離した化合物の中で、3, 7, 10 は 5 μ M で作用を示したが、最も活性が強かった 3 は、0.2 μ M で多核化および細胞融合を 92%阻害した (図 4) (The 11th JSP/CSP/KSP Joint Symposium on Pharmacognosy でポスター発表 (2021 年 9 月) ; 引用文献①)。

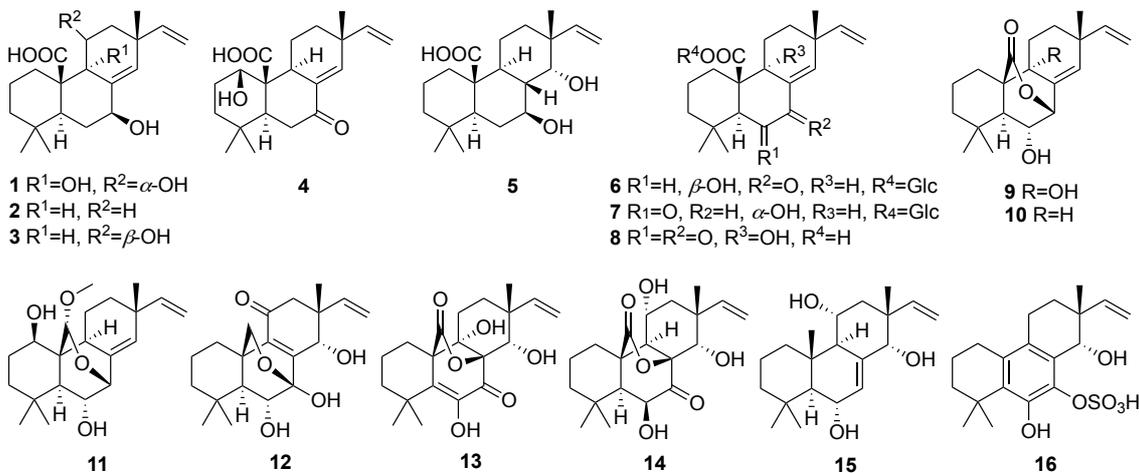


図 3. Taichunins E-T (1-15) および 20-*nor*-isopimarane (16) の構造

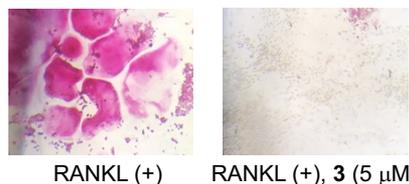


図 4. Taichunin G (3) による RAW264 細胞の多核化および細胞融合の阻害

(2) エジプトで採集した 120 種類の薬用植物のエキスをスクリーニングした後、*Artemisia judaica* に含まれる成分を単離し構造決定した。その結果、既知化合物である davanon の新規誘導体として artemperoxide A-C (17-19) を単離した (図 5)。それら化合物はパーオキシドの架橋構造を有すると考えられたので、それを証明するため半合成を試みたが、得られた化合物はパーオキシドではなくエーテルの架橋構造を有する化合物であった。しかし、両者のスペクトルを比較することにより、天然物はエーテル化合物ではなくパーオキシド化合物であることが明らかとなった。破骨細胞の分化・融合に対する阻害活性は、19 が最も強かった (第 23 回天然薬物の開発と応用シンポジウムで口頭発表 (2021 年 10 月) ; 第 9 回食品薬学シンポジウムで口頭発表 (2022 年 10 月) ; 引用文献②)。

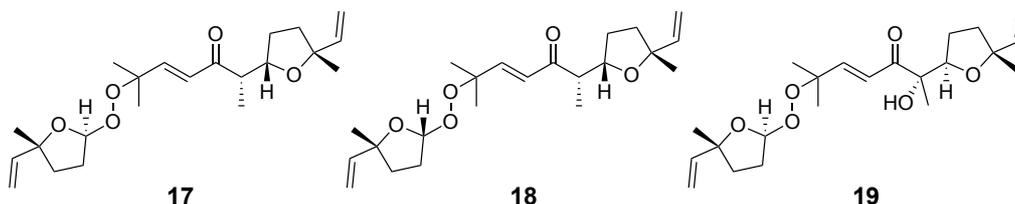


図 5. Artemperoxides A-C (17-19) の構造

(3) インドネシアで採集した *Stylotella* 属の海綿から、塩素とカルバメイトを有する新規セスキテルペンを単離し構造決定した (図6) (日本薬学会第143年会で口頭発表 (2023年3月); 論文執筆中)。

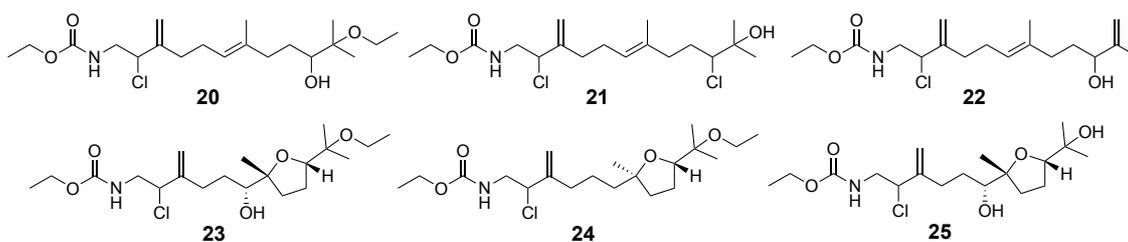


図6. *Stylotella* 属海綿から単離した新規化合物 (20-25) の構造

(4) 骨粗鬆症の予防・治療薬のリード化合物の探索に関しては、植物資源を用いた研究が多く報告されているが、海洋生物資源を用いた探索研究に着目し、総説を執筆した (引用文献③)。

<引用文献>

- ① A. H. H. El-Desoky, N. Inada, Y. Maeyama, H. Kato, Y. Hitora, M. Sebe, M. Nagaki, A. Kai, K. Eguchi, T. Inazumi, Y. Sugimoto, J. C. Frisvad, R. M. Williams, S. Tsukamoto. Taichunins E-T, Isopimarane and a 20-nor-isopimarane diterpene, from *Aspergillus taichungensis* (IBT 19404): structures and inhibitory effects on RANKL-induced formation of multinuclear osteoclasts. *J. Nat. Prod.* **84**, 2475-2485 (2021).
- ② A. H. H. El-Desoky, T. Asano, Y. Maeyama, H. Kato, Y. Hitora, E. Goto, S. Kotani, M. Nakajima, S. Tsukamoto. Arteperoxides A-C, tris-normonoterpene-sesquiterpene conjugates with peroxide-bridges from *Artemisia judaica* exhibiting antiosteoclastogenic activity. *Phytochemistry* **206**, 113548 (2023).
- ③ A. H. H. El-Desoky, S. Tsukamoto. Marine natural products that inhibit osteoclastogenesis and promote osteoblast differentiation. *J. Nat. Med.* **76**, 575-583 (2022).

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 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 El-Desoky Ahmed H. H., Inada Natsumi, Maeyama Yuka, Kato Hikaru, Hitora Yuki, Sebe Momona, Nagaki Mika, Kai Aika, Eguchi Keisuke, Inazumi Tomoaki, Sugimoto Yukihiko, Frisvad Jens C., Williams Robert M., Tsukamoto Sachiko	4. 巻 84
2. 論文標題 Taichunins E-T, Isopimarane Diterpenes and a 20-nor-Isopimarane, from <i>Aspergillus taichungensis</i> (IBT 19404): Structures and Inhibitory Effects on RANKL-Induced Formation of Multinuclear Osteoclasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2475 ~ 2485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00486	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
1. 著者名 El-Desoky Ahmed H. H., Tsukamoto Sachiko	4. 巻 76
2. 論文標題 Marine natural products that inhibit osteoclastogenesis and promote osteoblast differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 575 ~ 583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-022-01622-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 El-Desoky Ahmed H., Asano Toshifumi, Maeyama Yuka, Kato Hikaru, Hitora Yuki, Goto Eishu, Kotani Shunsuke, Nakajima Makoto, Tsukamoto Sachiko	4. 巻 206
2. 論文標題 Arteperoxides A-C, tris-normonoterpene-sesquiterpene conjugates with peroxide-bridges from <i>Artemisia judaica</i> exhibiting antiosteoclastogenic activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 113548 ~ 113548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2022.113548	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ahmed H. H. El-Desoky、浅野聡文、前山夕歌、加藤光、人羅勇氣、後藤栄舟、小谷俊介、中島誠、塚本 佐知子
2. 発表標題 Artemisia judaicaから得られた新規davanone類縁体の構造と破骨細胞の分化阻害活性について
3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ahmed El-Desoky, Natsumi Inada, Yuka Maeyama, Hikaru Kato, Yuki Hitora, Momona Sebe, Mika Nagaki, Aika Kai, Keisuke Eguchi, Sachiko Tsukamoto
2. 発表標題 Taichunins E-T that Inhibit RANKL-Induced Formation of Multinuclear Osteoclasts from Aspergillus taichungensis (IBT 19404)
3. 学会等名 The 11th JSP/CSP/KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ahmed H. H. El-Desoky、浅野聡文、前山夕歌、加藤光、人羅勇氣、後藤栄舟、小谷俊介、中島誠、塚本佐知子
2. 発表標題 破骨細胞の分化阻害作用を示す新規Arteperoxides A-Cの構造と類縁体の合成
3. 学会等名 第9回食品薬学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ahmed H. H. El-Desoky, Keisuke Eguchi, Epei Kagiyama, Yuki Hitora, Hikaru Kato, Sachiko Tsukamoto
2. 発表標題 New chlorinated sesquiterpene carbamate esters with antiosteoclastogenic activities from the marine sponge <i>Stylotella</i> sp.
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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研究部附属 グローバル天然物科学研究センター 天然薬物学分野
<http://kumamoto-natmed.org/>

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			
エジプト	National Research Centre			
米国	Colorado State University			
デンマーク	Technical University of Denmark			