

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19611

研究課題名（和文）マルチキナーゼ阻害剤としてのヘリオキサントチン類縁体の作用機序と応用の可能性の探索

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of actions of the helioxanthin-derivative and its application as a multi-kinase inhibitor

研究代表者

大庭 伸介（Ohba, Shinsuke）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：20466733

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、申請者らが骨形成促進剤として見出したヘリオキサントチン類縁体THの作用機序、標的分子を探索し、その応用の可能性の検証を目指した。ゲノムワイド解析・バイオインフォマティクス・ケモインフォマティクス・分子生物学・生化学的アプローチを駆使することで、有望な標的分子候補（キナーゼ）を取得した。さらに、THが当該分子を阻害することで、その下流分子の制御にも影響を与え、生物学的機能が発揮されることが示唆された。THの生物学的機能については、マウスの多能性幹細胞の幹細胞特性維持作用に関して検討したが、明確な効果は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数のキナーゼがTHの標的分子候補として得られたことはTHがマルチキナーゼ阻害剤であることを示唆しており、骨形成促進剤としてのTHの作用機序の解明につながる。THの作用機序の解明によりその薬理作用を分子レベルで理解することが可能となるだけでなく、副作用の予測が可能となる。その結果、THの骨形成促進作用を利用した骨粗鬆症治療薬、骨修復・骨増生剤としての応用への可能性が広がると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to explore the mode of action and target molecules of TH, an osteogenic helioxanthin-derivative, and to assess the possibilities of its application. By taking advantage of genome-wide analysis, bioinformatics, cheminformatics, and molecular biology/biochemistry, we obtained promising candidates for kinases targeted by TH. Furthermore, the data suggest that TH inhibits activities of the candidates, affects regulation of their downstream molecules, and thereby exerts its biological function. In terms of biological functions of TH, we examined whether TH was able to maintain stemness properties of mouse pluripotent stem cells; the data indicated that TH had no obvious effect on the properties.

研究分野：発生学・幹細胞生物学

キーワード：ヘリオキサントチン類縁体

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、2007年に骨形成促進剤としてヘリオキサントニン類縁体 TH (4-(4-Methoxyphenyl)thieno[2,3-b:5,4-c']dipyridine-2-carboxamide) を同定した(1)。その後、THの *in vivo* 骨再生誘導作用(2)、多能性幹細胞の骨芽細胞分化への応用(3-6)、歯髄幹細胞を用いた骨再生への応用(7)について報告してきた。これらに基づき、THは東京化成工業株式会社より市販化に至ったが、THの作用機序、標的分子については不明であった。磁気ビーズとマススペクトロメトリーを併用した標的分子探索も試みたが、有望な結果を得ることができなかった。そこで *in silico* による予備的な検討を行ったところ、THが複数のキナーゼの阻害剤＝マルチキナーゼ阻害剤であることを示唆するデータを得た。

骨組織の形成と維持に関わる細胞要素（骨芽細胞・骨細胞・破骨細胞）の分化機構と個々の機能については多くの知見が集積している。その結果、破骨細胞と骨芽細胞/骨細胞それぞれの分化制御シグナル分子を標的とした抗体医薬（Denosumab、Romosozumab）が骨粗鬆症治療薬として開発され、当該学問分野全体のこれまでの研究成果が実を結びつつある。このような状況において、骨変性性疾患に対する次世代の治療薬の可能性を探索する必要があると思われた。

これまでに様々なキナーゼ阻害剤が分子標的薬として開発されてきた。例えば抗がん剤の分野では、単一のキナーゼではなく、治療標的となる複数のキナーゼに作用（阻害）することで薬理作用を発揮するマルチキナーゼ阻害薬という概念が提唱されている。骨代謝改善薬ではマルチキナーゼ阻害薬という概念は未だ導入されていないことから、申請者らはマルチキナーゼ阻害剤としての TH の可能性に着目した。上述の予備検討の結果に基づいて、従来型の *wet* アプローチのみならず、*dry* アプローチ（バイオインフォマティクス・ケモインフォマティクス）を駆使することで、マルチキナーゼ阻害性骨形成促進剤としての TH の作用機序を同定する必要があると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、TH を新規マルチキナーゼ阻害剤として位置づけ、ゲノムワイド解析・バイオインフォマティクス・ケモインフォマティクス・分子生物学・生化学的アプローチを駆使してその作用機序を同定するとともに、その応用の可能性を探索することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) TH の標的分子の探索

##### ①ゲノムワイド解析（RNA-seq）による変動シグナル予測

マウスES細胞由来中胚葉細胞の骨芽細胞分化系において、TH刺激前後のRNA-seqデータをすでに取得していた。そこで、TH刺激前後のRNA-seqデータをバイオインフォマティクスにより解析し、TH刺激で変動するシグナル経路・蛋白質間相互作用を予測した。

##### ②ケモインフォマティクスによる標的分子予測

標的分子が同定済みの既知の分子の構造（Similarity ensemble approach : SEA）や pharmacophore との類似性（PharmMapper）に基づいてTHの標的分子を予測した。

##### ③統合的解析による標的候補分子リストの作製とキナーゼアッセイによる確認

上記(1)および(2)のリストを統合し、キナーゼに焦点をあててTHの標的分子候補の絞り込みを行った。現在の治療薬の多くがキナーゼを標的にしていることを考慮して絞り込む。次に、

in vitroキナーゼアッセイ (Z' -LYTE Kinase Assay; Thermo Fisher Scientific) により、標的キナーゼ候補に対するTHの作用を確認した。

#### ④ドッキングシミュレーションによるTHと標的候補分子の相互作用の確認

THの標的キナーゼ候補に対して、ドッキングシミュレーションにより相互作用のconfirmationを行うと同時に、その分子内標的部位と活性調節メカニズムに関する知見を取得した。

#### (2) THの生物学的機能の検証

マウスの多能性幹細胞の幹細胞特性維持作用について、複数のキナーゼ阻害剤との併用や置換について検討を行った。幹細胞性の検証においては、多能性関連遺伝子の発現をRT-qPCR (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction) 法にて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) THの標的分子の探索

研究代表者らはマウス胚性幹細胞 (ES細胞) から中胚葉細胞を誘導し、続いて骨芽細胞分化を誘導する培養系をすでに開発していた(3)。この系では、誘導した中胚葉系細胞をヘッジホッグシグナル活性化剤SAGとヘリオキサンチン類縁体 (TH) 存在下で培養し、骨芽細胞へ分化させる。そこで、骨芽細胞分化誘導前の中胚葉細胞をコントロールとして用い、TH刺激前後のマイクロアレイデータを解析した。まず、ヘリオキサンチン類縁体 (TH) 刺激で発現が変動する遺伝子を同定した。発現変動遺伝子をもとに、シグナル経路・蛋白質間相互作用を予測するため、約50種のキナーゼに焦点を絞った。

続いて、標的分子予測として、標的分子が明らかな分子の構造やpharmacophoreとの類似性に基づいてTHの標的分子を予測した。構造類似性ではSimilarity ensemble approach (SEA) を、ファーマコフォア類似性ではPharmMapperを用いた。その結果、SEAでは約40種、PharmMapperでは約20種の候補を取得した。これらのリストを統合し、キナーゼに焦点をあててTHの標的分子候補の絞り込みを行った。このうちの1つのキナーゼ (キナーゼX) については、ドッキングシミュレーションを行った。その結果、既存のキナーゼX阻害剤6種と同じ部位を標的とすることで、THの阻害作用が発揮されることが予測された。

一連の予測結果を検証するため、Thermo Fisher Scientific 社の Z' -LYTE Kinase Assay を用いて、PharmMapper と SEA から得られた候補のうち約 50 種のキナーゼの活性に対する TH の効果を in vitro キナーゼアッセイにより検討した。その結果、上記のキナーゼ X を含む 7 種のキナーゼに対して、TH は 75%以上の強い活性阻害効果を示した。そのうち特に強く阻害された 5 種のキナーゼに対する TH の阻害効果の用量依存性を検討した。いずれのキナーゼにおいても TH は用量依存的に阻害効果を示した。特にキナーゼ X に対しては低濃度より TH の阻害効果が認められ、IC50 は数十 nM であった。

TH は通常疎水性を示すが、側鎖の構造を変えることで、この骨芽細胞分化促進能を保持したまま親水性となることが分かっている。そこで、キナーゼ X に対する親水性 TH の活性阻害効果を in vitro キナーゼアッセイにて検証した。その結果、親水性 TH もキナーゼ X に対して 70%の阻害効果を示すことが明らかとなった。以上より、キナーゼ X は TH の生物学的作用における標的分子の一つであることが示唆された。

キナーゼ X の下流分子は複数存在するが、そのうちの 2 種類に対して TH 処理による変化を検出することができたことから、TH によるキナーゼ X の阻害はこれらの分子に対するキナーゼ X の制御を変容させることで、生物学的活性が発揮されることが示唆された。さらに、TH による

キナーゼ X の阻害効果が骨芽細胞関連転写因子の発現制御に関わる可能性を示唆するデータが現在までに得られている。本データを取得するにあたって、骨芽細胞関連転写因子に関するこれまでの知見をまとめ、総説論文を発表するに至っている(8)。

## (2) THの生物学的機能の検証

マウス胚性幹細胞を用いて検証したところ、TH単独あるいは他のキナーゼ阻害剤との併用においても幹細胞特性維持作用を示さないことが明らかとなった。THの骨代謝改善・骨折治癒促進効果についても現在までにマウスモデルを作出し(9)、検討の準備を進めている。

## 引用文献

1. Ohba, S., Nakajima, K., Komiyama, Y., Kugimiya, F., Igawa, K., Itaka, K., Moro, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Takato, T., and Chung, U. I. (2007) A novel osteogenic helioxanthin-derivative acts in a BMP-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 854-860
2. Maeda, Y., Hojo, H., Shimohata, N., Choi, S., Yamamoto, K., Takato, T., Chung, U. I., and Ohba, S. (2013) Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* **34**, 5530-5537
3. Kanke, K., Masaki, H., Saito, T., Komiyama, Y., Hojo, H., Nakauchi, H., Lichtler, A. C., Takato, T., Chung, U. I., and Ohba, S. (2014) Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem cell reports* **2**, 751-760
4. Zujur, D., Kanke, K., Lichtler, A. C., Hojo, H., Chung, U. I., and Ohba, S. (2017) Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions. *Sci Adv* **3**, e1602875
5. Zujur, D., Kanke, K., Onodera, S., Tani, S., Lai, J., Azuma, T., Xin, X., Lichtler, A. C., Rowe, D. W., Saito, T., Tanaka, S., Masaki, H., Nakauchi, H., Chung, U. I., Hojo, H., and Ohba, S. (2020) Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers. *Regen Ther* **14**, 19-31
6. Onodera, S., Saito, A., Hojo, H., Nakamura, T., Zujur, D., Watanabe, K., Morita, N., Hasegawa, D., Masaki, H., Nakauchi, H., Nomura, T., Shibahara, T., Yamaguchi, A., Chung, U. I., Azuma, T., and Ohba, S. (2020) Hedgehog Activation Regulates Human Osteoblastogenesis. *Stem cell reports* **15**, 125-139
7. Fujii, Y., Kawase-Koga, Y., Hojo, H., Yano, F., Sato, M., Chung, U. I., Ohba, S., and Chikazu, D. (2018) Bone regeneration by human dental pulp stem cells using a helioxanthin derivative and cell-sheet technology. *Stem Cell Res Ther* **9**, 24
8. Hojo, H., and Ohba, S. (2022) Sp7 Action in the Skeleton: Its Mode of Action, Functions, and Relevance to Skeletal Diseases. *Int J Mol Sci* **23**
9. Kitaura, Y., Nakamura, U., Awada, C., Yamaguchi, M., Kim, M., Ikeda, Y., Matsuo,

Y., Moriishi, T., Sawase, T., Chung, U. I., Hojo, H., and Ohba, S. (2022) Orally administrable peptides derived from egg yolk promote skeletal repair and ameliorate degenerative skeletal disorders in mouse models. *Regen Ther* **21**, 584-595

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Doi T, Hojo H, Ohba S, Obayashi K, Endo M, Ishizaki T, Katoh A, Kouji H.	4. 巻 8(2)
2. 論文標題 Involvement of activator protein-1 family members in -catenin and p300 association on the genome of PANC-1 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2022.e08890.	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 -
1. 著者名 Ito S, Minamizaki T, Kohno S, Sotomaru Y, Kitaura Y, Ohba S, Sugiyama T, Aubin JE, Tanimoto K, Yoshiko Y.	4. 巻 22(13)
2. 論文標題 Overexpression of miR-125b in Osteoblasts Improves Age-Related Changes in Bone Mass and Quality through Suppression of Osteoclast Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22136745.	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 -
1. 著者名 Kitaura Y, Nakamura U, Awada C, Yamaguchi M, Kim M, Ikeda Y, Matsuo Y, Moriishi T, Sawase T, Chung UI, Hojo H, Ohba S	4. 巻 21
2. 論文標題 Orally administrable peptides derived from egg yolk promote skeletal repair and ameliorate degenerative skeletal disorders in mouse models.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 584-595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.11.002	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 -
1. 著者名 Hojo H, Ohba S	4. 巻 23
2. 論文標題 Sp7 action in the skeleton: its mode of action, functions, and relevance to skeletal diseases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23105647	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tani S, Okada H, Seki M, Suzuki Y, Saito T, Tanaka S, Chung UI, Hojo H, Ohba S
2. 発表標題 Elucidating dynamic gene regulatory networks in human skeletal development using single cell analyses on a human pluripotent stem cell-based model of endochondral ossification.
3. 学会等名 ASHBi Symposium 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tani S, Okada H, Seki M, Suzuki Y, Saito T, Tanaka S, Chung UI, Hojo H, Ohba S
2. 発表標題 Elucidating human skeletal development by integrating single-cell analysis and bone tissue induction using human pluripotent stem cells.
3. 学会等名 ISSCR/JSRM International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tani S, Okada H, Seki M, Suzuki Y, Saito T, Tanaka S, Chung UI, Hojo H, Ohba S
2. 発表標題 Elucidating human skeletal development using single-cell analysis by inducing bone tissue formation from human pluripotent stem cells.
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北浦義昭, 粟田ちひろ, 重光隆成, 青笹正義, 山口基徳, 金武祐, 鄭雄一, 北條宏徳, 大庭伸介
2. 発表標題 卵黄由来生理活性ペプチドの経口投与は骨粗鬆症と骨形成不全症モデルマウスにおいて骨量と骨強度を改善する
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap  
<https://researchmap.jp/shin-o>

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
研究分担者	森石 武史 (Moriishi Takeshi) (20380983)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教  (17301)	
研究分担者	松尾 友紀 (Matsuo Yuki) (40792601)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員  (17301)	
研究分担者	北條 宏徳 (Hojo Hironori) (80788422)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授  (12601)	

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