

令和元年6月18日現在

機関番号：31305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15134

研究課題名(和文) 微生物資源からの難病「進行性骨化性繊維異形成症(FOP)」予防治療薬の探索研究

研究課題名(英文) Screening of inhibitors of bone morphogenetic protein (BMP) signaling on Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) from natural resources

研究代表者

内田 龍児 (UCHIDA, Ryuji)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60280632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、進行性異所性骨化線維異形成性症(FOP)患者の病態を模倣した2種類の培養細胞評価系をスクリーニングに導入し、FOPが惹起する異常なBMPシグナル伝達経路を特異的に阻害する低分子化合物を天然資源より探索した。その結果、放線菌 *Streptomyces* sp. BYK11038 株より新規化合物 scopranone を発見した。その構造は3-フラン環を基本骨格とし、スコップ様の置換基を2つ含む非常に新奇的な構造であることを明らかにした。また、真菌の培養液から destruxin 類や citreoviridin 類を、海綿から lamellolactone 類や dysidenin 類を単離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回新規化合物として見出した scopranone は、その新規な構造から有機化学の研究者によって全合成が達成され、構造活性相関研究が進められている。また、生合成研究にも興味を持たれ、遺伝子レベルでの解析も行われていることから、他の研究領域にも注目される化合物を提供できている。さらに、治療法が全く確立されていない難病 FOP の予防治療薬の開拓を目的とした本研究は、社会的貢献度の高い内容と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a rare congenital disorder of progressive and widespread postnatal heterotopic bone formation in soft tissues. Accordingly, we have screened microbial metabolites for inhibitors of bone morphogenetic protein (BMP) signaling on two types of cell-based assay system with a pathological mutation of FOP. As a result, three novel compounds, designated scopranones, were isolated from the culture broth of *Streptomyces* sp. BYK-11038. Scopranones have an unusual common structure with two atypical scooplke moieties linked at the tails to form part of a unique 3-furanone ring. In addition, destruxins and citreoviridins were isolated from fungal cultures broths, and lamellolactones and dysidenins were isolated from sponges.

研究分野：天然物化学

キーワード：進行性異所性骨化線維異形成性症(FOP) BMPシグナル伝達 阻害剤 天然資源

1. 研究開始当初の背景

FOP は、200 万人に 1 人の確率で発症する難治性疾患克服対策事業の指定を受けた難病で、全身の筋肉やその周囲の膜・腱・靭帯など、本来骨形成を起こさない部位が骨化し、身体の自由が奪われる重篤な疾患である(図 1)。本疾患は成長期に著しく進行するほか、筋肉が損傷を受けただけでその部位の急激な骨化が進行し、外科的処置のみならず生体組織検査、注射、歯科治療などによっても病状が悪化してしまう。さらに平均寿命も約 40 歳と非常に短いにもかかわらず^①、有効な治療方法が全く確立されていない。昨年、iPS 細胞を用いた病態解析が開始され^②、また本年、マウスレベルで抗体による異常骨化の抑制^③が報告されたが、創薬研究への進展にはまだ時間を要することが予想される。

Kaplan らは、FOP 患者(図 1)の BMP I 型受容体(アクチビン受容体様キナーゼ-2; ACVR1 (ALK2))の GS 領域にある 206 番目のアルギニンがヒスチジンに点突然変異することで BMP に対する反応が亢進し、恒常的に BMP シグナル伝達が活性化していることを発見し(図 2)、これが FOP 発症メカニズムの主な原因であることを示した^④。したがって、この異常な BMP シグナル伝達経路に対する特異的な阻害剤を微生物資源から提供することで、FOP 予防治療薬の開拓に挑戦することにした

2. 研究の目的

本研究では、治療法が全く確立されていない難病「進行性骨化性線維異形成症(FOP)」の予防治療薬を開拓し、FOP の予防治療に向けた一歩を踏み出すことを目的とした。すなわち FOP 病巣に直接働き、その発症と進展を抑制するために効果的な標的として考えられている骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達を特異的に阻害する低分子化合物を、申請者独自の微生物資源(主に培養液)を探索源としたスクリーニングを展開し候補化合物を見出す、誘導他合成により薬理活性を上げ、創薬シードとして提供することにある。

3. 研究の方法

申請者は、埼玉医大・片桐らが構築した、過剰な BMP シグナル伝達が発症の原因とされる FOP 患者の病態を模倣した 2 種類の培養細胞評価系^{⑤⑥}を用い、微生物資源を探索源とした FOP 予防治療薬のスクリーニングを実施した。以下に、方法の概要を示す。

(1) 酵素アルカリフォスファターゼ活性を指標とした骨分化阻害活性の細胞評価系 (ALP 評価系)

筋芽細胞は骨芽細胞に分化すると、骨分化マーカーである酵素アルカリフォスファターゼ(ALP)を発現することから、ALP 活性を指標とした骨分化阻害活性の測定を行った。また、本評価系に用いるマウス筋芽細胞より樹立された C2C12 細胞に変異型 ACVR1 (ACVR1(R206H))を強制発現させた C2C12(R206H)細胞は、FOP 様の BMP シグナル伝達が恒常的に活性化された状態を再現することができる^{⑤⑦}。

(2) 標的遺伝子 *Id1* プロモータ活性を指標とした骨分化阻害活性の細胞評価系 (Luc 評価系)

FOP 患者では BMP 受容体 ACVR1 の恒常的な活性化が原因で、その標的遺伝子 *Id1* の発現が促進することも明らかになっている⁹⁾(図 2)。そこで、ACVR1(R206H)ベクター、*Id1* プロモータ領域を含むルシフェラーゼベクターおよび転写調節ベクターで形質転換した C2C12 細胞を利用し、*Id1* プロモータ活性を指標としたルシフェラーゼ評価系を用いた^⑧。本評価系によって、異常な BMP シグナル伝達経路に対し直接的な阻害であるか否かを明確にすることができる。

(3) 微生物資源からのスクリーニング、単離精製および構造決定

スクリーニングのサンプルには、これまで申請者が様々な生物活性物質の探索源として用いて来た微生物の培養液を用いた。土壌、海洋、温泉地などから分離した独自の真菌および放線菌に加え、外部共同研究機関より供与される微生物の培養液をスクリーニングに供した。

(4) 活性物質の生産および単離精製

選択された培養液サンプルは大量培養を行い、抽出操作(溶媒、各種吸着剤)、各種クロマ

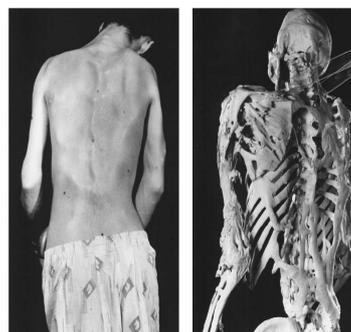


図 1 FOP 患者とその骨格標本

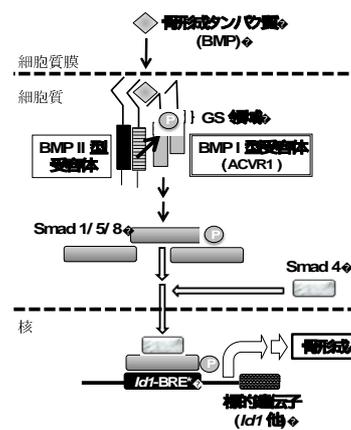


図 2 BMP シグナル伝達経路

トグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーにより目的とする活性物質の単離を行った。さらに単離した化合物は、各種機器分析（質量分析、核磁気共鳴スペクトル (NMR) 等）の測定および解析を行ない、立体構造を含めた化学構造を明らかにすると共に、その新規性を化合物検索システムにより調査した。

(5) 活性物質の評価

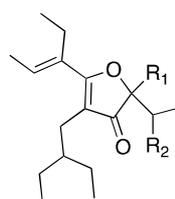
発見した新規化合物については、所属研究室が所有する細胞、微生物および酵素を利用した他の評価系での阻害活性を調査し、得られたデータを総合的に解析することで、候補化合物となり得るか否かを判断した。ただし既知化合物であっても、Luc 評価系で阻害活性を示す化合物については新規化合物と同様の評価を行った。

4. 研究成果

真菌・放線菌の培養液約 2,000 サンプル、および海洋生物（インドネシア近海で採取された海綿）の抽出物 377 サンプルについて、ALP 評価系により骨分化阻害活性のスクリーニングを実施した結果、真菌の培養液 9 サンプル、海綿 6 サンプルがスクリーニングを通過した。このうち放線菌 1 サンプル、真菌 3 サンプル、海綿 2 サンプルから活性物質を取得したので、以下に単離した各化合物について示す。

(1) スコップラノン類 (新規物質)

Streptomyces に属する一放線菌 BYK11038 株から新規化合物 3 成分 (スコップラノン: scopranone A-C と命名) の発見に成功した[®]。その構造は 3-フラノン環を基本骨格とし、スコップ様の置換基を 2 つ含む非常に新奇的な構造であることを、各種機器分析の解析から明らかにした。スコップラノン類の骨分化阻害活性は、A 成分：2.70、B 成分：8.20 および C 成分：28.9 μM の IC_{50} 値を示した。また、Luc 評価系により BMP シグナル伝達経路に対する依存性を評価した結果、A および C 成分は BMP シグナル伝達非依存的、B 成分は低い依存性と判断された。このことからこのことから、スコップラノン類は *Id1* の転写以降あるいは別の経路に作用し、骨分化阻害活性を示す可能性が示唆された (図 2 参照)、弱い細胞毒性 (IC_{50} 値：96.1、307 および 253 μM) も示している。



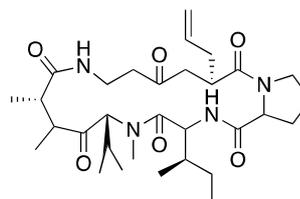
Scopranone	R ₁	R ₂
A (1)	OH	H
B (2)	H	H
C (3)	OH	OH

一方で、連携研究者により本化合物の全合成が達成されたことから[®]、構造の新奇性も証明でき、誘導体合成への展開が可能となった。そこで本化合物が持つ弱い細胞毒性 (IC_{50} 値：96.1、307 および 253 μM)、あるいは BMP シグナル伝達経路への非依存性を改善するために誘導体合成も進めているが、現在までに有効な化合物の取得はできていない。

さらにその新奇的な構造から生合成経路の解明にも興味を持たれ、各種 [¹³C]ラベル体の取り込み実験、および生合成遺伝子の解析が共同研究者によって進められている。

(2) デストラキシン類 (既知化合物)

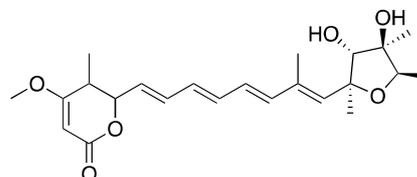
真菌 BF-0336 株の培養液より 9 種類のデストラキシン (destruxin) 類を単離した。そのうち、デストラキシン A、B および E クロロヒドリン、[β -Me-pro]デストラキシン E クロロヒドリン、デスメチルデストラキシン B およびトリコミド A は、ALP 評価系において細胞毒性を示すことなく、骨芽細胞分化抑制作用 (IC_{50} 値：0.73~13.4 μM) を示した。



Destruxin A

(4) シトレオビリジン (既知化合物)

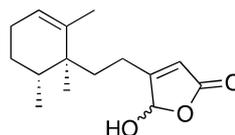
真菌 BF-0391 株の培養液より、シトレオビリジン (citreoviridin) およびその異性体イソシトレオビリジン[®]を単離した。その骨芽細胞分化抑制作用は IC_{50} 値：1.5 μM を示したが、細胞毒性 (IC_{50} 値：7.5 μM) との差が認められなかった。



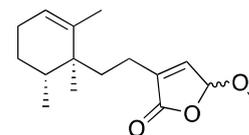
Citreoviridin

(5) ラメロラクトン類 (既知化合物)

サンプル No. 2 からは、ラメロラクトン (lamellolactone) A および B を単離した。各成分は ALP 評価系において、40 μM の濃度で細胞毒性を示すことなく、骨芽細胞分化抑制作用 (IC_{50} 値：4.3 および 19.6 μM) を示した。これまでにラメロラクトン類の生物活性の報告はなく、今回が生物活性の初めての知見となる。なお、本サンプルからは新規化合物の生産も確認されており、構造および活性の詳細について検討を進めている。



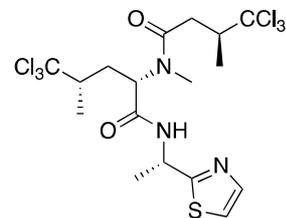
Lamellolactone A



Lamellolactone B

(6) ダイシデニン類 (既知化合物)

サンプル No. 256 からは、ダイシデニン (dysidenin) 類 を単離した。本化合物は ALP 評価系において、18 μM の濃度で細胞毒性を示すことなく骨芽細胞分化抑制作用 IC_{50} 値 (4.2 μM)を示した。



Dysidenin

<引用文献>

- ① Shore ら、*Nat Genet*, 38 巻、2006、525-527、
- ② Matsumoto ら、*Stem cells*, 33 巻、2015、1730-1742、
- ③ Hatsell ら、*Sci Transl Med*, 7 巻、2015、303ra137、
- ④ Kaplan ら、*J Bone Miner Metab*, 26 巻、2008、521-530、
- ⑤ Fukuda ら、*J Biol Chem*, 284 巻、2009、7149-7156、
- ⑥ Katagiri ら、*Genes Cells*, 7 巻、2002、949-960、
- ⑦ Katagiri ら、*J Cell Biol*, 127 巻、1994、1755-1766、
- ⑧ Uchida ら、*Org Lett*, 9 巻、2017、5980-5983、
- Pedras ら、*Phytochemistry*, 59 巻、2002、579-96、
- ⑩ Cole ら、*Appl Environ Microbiol*, 42 巻、1981、677-681、
- Kapojos ら、*Phys Lett*, 24 巻、2018、10-14、
- Kazlauskas ら、13 巻、1997、3183-3186

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

- ① Uchida R, Lee D, Suwa I, Ohtawa M, Watanabe N, Demachi A, Ohte S, Katagiri T, Nagamitsu T, Tomoda H, Scopranones with Two Atypical Scooplike Moieties Produced by *Streptomyces* sp. BYK-11038, *Org Lett*, 査読有、19 巻、2017 5980-5983
DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03003.

[学会発表](計7件)

- ① 出町 歩、金田 幸歩、内田 龍児、長光 亨、新家 一男、池田 治生、供田 洋、新奇ポリケチド scopranone 生合成における 2-pyranone 中間体の解析、日本薬学会第 140 年会: 幕張メッセ (千葉)、平成 31 年 3 月
- ② 大手 聡、山崎 寛之、Rotinsulu H, S. Wewengkang DS, Sumilat DA, 内田 龍児、浪越 通夫、片桐 岳信、供田 洋、インドネシア産海綿由来の新規骨芽細胞分化阻害物質に関する研究、日本薬学会第 140 年会: 幕張メッセ (千葉)、平成 31 年 3 月
- ③ Ohte S, Yamazaki H, Rotinsulu H, Wewengkang DS, Sumilat DA, Uchida R, Namikoshi M, Katagiri T, Tomoda H, Isolation and characterization of small molecule inhibitors of BMP induced osteoblastic differentiation from the Indonesian marine sponge, 12th International BMP conference: Tokyo, 平成 30 年 10 月
- ④ 出町 歩、内田 龍児、新家 一男、池田 治生、供田 洋、新奇な構造を有する放線菌由来 scopranone 類の生合成研究、日本薬学会第 138 年会: 金沢 (石川)、平成 31 年 3 月
- ⑤ 李 大葵、大多和 正樹、内田 龍児、供田 洋、長光 亨、FOP 治療薬を指向した scopranone A の全合成及び構造活性相関研究、第 35 回メディスナルケミストリーシンポジウム: 名古屋 平成 29 年 10 月
- ⑥ 李 大葵、渡邊 望、大多和 正樹、下山 健太、内田 龍児、供田 洋、長光 亨、FOP 治療薬の創製を目指した scopranone A の全合成ならびに誘導體合成、日本薬学会第 137 年会, 仙台, 平成 29 年 3 月
- ⑦ 内田 龍児、諏訪 いぶき、片桐 岳信、供田 洋、放線菌 *Streptomyces* sp. BYK11038 株が生産する骨形成因子シグナル阻害剤 scopranone 類に関する研究、日本薬学会第 137 年会, 仙台, 平成 29 年 3 月

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計1件)

名称: 骨代謝阻害活性を有する新規化合物及びその製造方法
発明者: 供田 洋、内田 龍児、長光 亨、大多和 正樹、片桐 岳信
権利者: 学校法人北里研究所、学校法人埼玉医科大学
種類: 特許
番号: 特許願 2016-250667
出願年: 平成 28 年
国内外の別: 国内

取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/tennen/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。