

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07115

研究課題名(和文)変形性関節症治療薬を目指した微生物由来軟骨分化促進物質の探索

研究課題名(英文) Screening for chondrogenic enhancer from microbial origin.

研究代表者

大手 聡 (Ohte, Satoshi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：00547979

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)：本研究では、軟骨分化を誘導する化合物による変形性関節症の治療薬リード化合物提供を目指し、軟骨分化を評価する細胞評価系の検討と、微生物資源を対象とした軟骨分化を促進する低・中分子化合物の探索を行った。軟骨細胞として汎用されるATDC5細胞に加え、マウス肢芽由来細胞株MLB13MYC clone14細胞を導入し、評価系を構築した。構築した評価系を用い、微生物資源を対象にスクリーニングを行い、真菌由来化合物3種に軟骨分化促進活性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨分化を誘導するという新しいメカニズムによる変形性関節症の治療薬リード化合物の提供を目指し、微生物資源を対象にスクリーニングを行った結果、3種の活性化合物を単離・同定した。これらの化合物が軟骨分化を促進するという報告は過去になく、初めての知見であった。今後、これら化合物の詳細な作用機序の解析などから、新たな変形性関節症治療薬リード化合物としての展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we established an assay system to assess chondrogenic differentiation and screened for natural product that promote chondrogenic differentiation to provide lead compounds for the treatment of osteoarthritis with compounds that induce chondrogenic differentiation. In addition to ATDC5 cells, which are commonly used as chondrocytes, we introduced a mouse limb bud-derived cell line, MLB13MYC clone14 cells, and established an assay system. Using the established system, we screened microbial resources and found three fungal-derived compounds with chondrogenic differentiation-promoting activity.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 軟骨分化 変形性関節症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は全身を支える支持組織であるだけでなく、カルシウムの貯蔵や造血、内分泌も担う重要な組織である。骨の多くは発生過程で軟骨が形成された後に骨へと置き換わる「内軟骨性骨化」によって形成される。成人の軟骨は関節軟骨、椎間板軟骨、肋軟骨や鼻軟骨など体の一部に残るのみであるが、骨折治癒時には内軟骨性骨化による骨の修復が生じる。関節軟骨は各骨端を覆い、滑らかな関節運動やその保護を担う重要な結合組織であり、関節軟骨が加齢や炎症、過度の負荷によって損傷・変性されると変形性関節症を発症する。最も問題となるのは膝関節に生じる変形性膝関節症で、超高齢化社会である日本においてはその予備軍も含め 2500 万人いると言われており、要介護となる原因の第 4 位となっている。関節軟骨は血管を欠く組織であるため、血中に存在する組織修復に役立つサイトカインや栄養を利用しにくい状況にある。そのため、その治癒能力は限られており、損傷・変性はほとんど治癒することがない。変形性関節症の治療法として現在は消炎鎮痛剤やリハビリ、人工関節置換術が主に選択される。しかし、消炎鎮痛剤やリハビリはあくまでも対症療法であり、人工関節置換は数年で再置換が必要となる。変形性関節症の新しい治療戦略の一つとして、内在する間葉系幹細胞・軟骨前駆細胞の修復能を促進する方法があげられる。間葉系幹細胞から軟骨前駆細胞を経て軟骨細胞へと分化する過程には転写因子 (Sox9、Runx1/2) やサイトカイン (線維芽細胞増殖因子: FGF、トランスフォーミング増殖因子ベータ: TGF- β 、骨形成因子: BMP など) が重要であることが報告されている。しかし、その詳細な分子機構は十分に理解されておらず、軟骨分化を促進する医薬品は未だに開発されていない。合成低分子化合物である kartogenin や TD-198046 は、いずれも Runx1 の転写調節を介して軟骨分化を促進すると報告されている (*Science* 336, 717-21, 2012; *Biomaterials* 34, 5581-87, 2013)。すなわち低・中分子化合物によって軟骨分化を調節しうる可能性は十分想定される。

2. 研究の目的

本研究では軟骨分化を評価できる評価系の構築、微生物資源を対象に軟骨分化を促進する低・中分子化合物 (機能分子) を探索し、その作用機序解析を行う。このような機能分子は、標的因子の解析からの新規創薬標的の提供、軟骨分化の分子機構の解明、さらには変形性関節症の治療薬リード化合物へと発展することも期待できる。

3. 研究の方法

(1) 軟骨分化誘導: 軟骨分化誘導には軟骨細胞として汎用される ATDC5 細胞 (理研 BRC より入手, RCB0565) (*Cell Differ. Dev.*, 30, 109-116, 1990) と、マウス胚芽由来細胞株である MLB13MYC clone14 細胞 (米国 Harvard 大学 Rosen 教授より分与) (*J. Bone Miner. Res.*, 9, 1759-68, 1994) を用いた。各細胞を 1×10^5 cells/5 μ L (48 well culture plate) または 2×10^5 cells/10 μ L (24 well culture plate) で播種し、マイクロマスカルチャー法 (*Dev. Biol.*, 78, 41-150, 1980) にて 24 時間培養後、TGF- β 1 または BMP-4 を含有した軟骨細胞分化誘導培地に交換し、サンプルを添加してさらに 4 日間培養することで軟骨分化を誘導した。

(2) アルシヤンブルー染色: 軟骨分化誘導した ATDC5 または MLB13MYC clone14 細胞を固定し、アルシヤンブルー染色液 (0.5% アルシヤンブルー/0.1N HCl) で染色した。水洗後、目視または 6M グアニジン塩酸塩で色素を抽出し、630 nm の吸光度を測定することで軟骨分化を評価した。

(3) 遺伝子発現解析: 軟骨分化誘導した ATDC5 または MLB13MYC clone14 細胞から total RNA を抽出し、RT-qPCR 法にて遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

(1) ATDC5 細胞を用いたスクリーニングと機能分子の単離精製・構造解析: 研究開始当初は MLB13MYC clone14 細胞を入手できていなかったため、ATDC5 細胞を用いた機能分子のスクリーニングを進めた。申請者の所属研究室で供給された真菌及び放線菌の培養液 2,647 サンプルをスクリーニングした結果、真菌 2 株の培養液に軟骨分化促進活性を見出した。これら 2 株の培養液

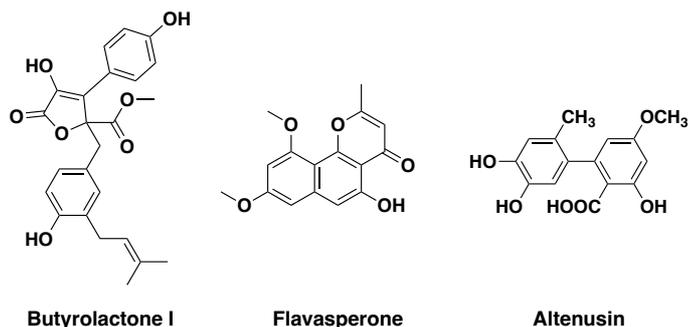


図 1 単離した機能分子の構造

から溶媒抽出、各種クロマトグラフィーによる分画を行い、最終的に HPLC を用いて 2 つの機能分子を単離した。MS、NMR を含む各種機器分析によりこれらの機能分子を、butyrolactone I (*Oncogene*, 8, 2425-2432, 1993) 及び flavasperone (*J. Chem. Soc.*, 1962, 40-44, 1962) とそれぞれ同定した (図 1)。

(2) Flavasperone の ATDC5 細胞に対する軟骨分化促進活性：単離した 2 つの機能分子のうち、flavasperone は顕著な細胞毒性を示さず、コントロールと比較して約 2 倍の軟骨分化促進活性を示した (図 2)。そこで、flavasperone が軟骨分化マーカー因子の発現に影響を与えているかを RT-qPCR 法で確認した。その結果、軟骨分化によって発現が誘導されるコラーゲンである Type II コラーゲン (Col2a1) と Type X コラーゲン (Col10) 及び軟骨基質を構成する主要なタンパク質である aggrecan の発現誘導の促進が確認された (図 3)。これらの結果より、flavasperone が ATDC5 細胞の軟骨分化を促進することが示された。

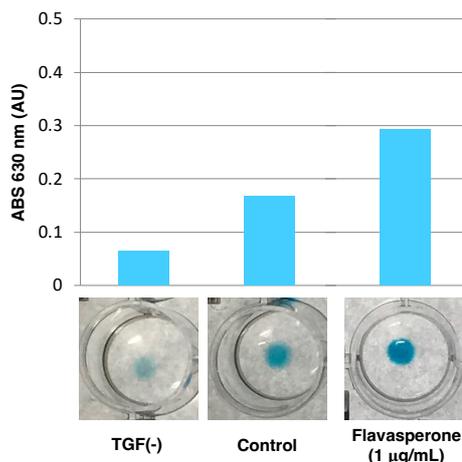


図 2 Flavasperone の ATDC5 軟骨分化促進活性

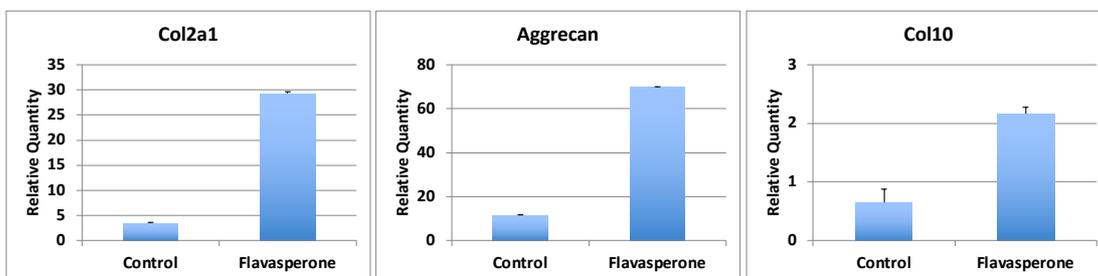


図 3 Flavasperone の軟骨分化マーカー遺伝子誘導促進活性

(3) MLB13MYC clone14 細胞を用いた軟骨分化評価系の検討：入手した MLB13MYC clone14 細胞について、軟骨分化に用いるサイトカインの種類と濃度の検討を行った。軟骨誘導活性の知られている TGF- β 1 と BMP-4 を 0-16 ng/mL の濃度で処理し、アルシアンブルー染色にて軟骨分化を評価した。その結果、TGF- β 1 と BMP-4 どちらも濃度依存的に MLB13MYC clone14 細胞の軟骨分化を誘導したが、その活性は BMP-4 が顕著に強かった (図 4)。一方、ATDC5 を同様に処理した場合には TGF- β 1 がより強い軟骨分化誘導活性を示した。この結果より、以降の MLB13MYC clone14 細胞を用いた軟骨分化評価の際には BMP-4 を用いた。

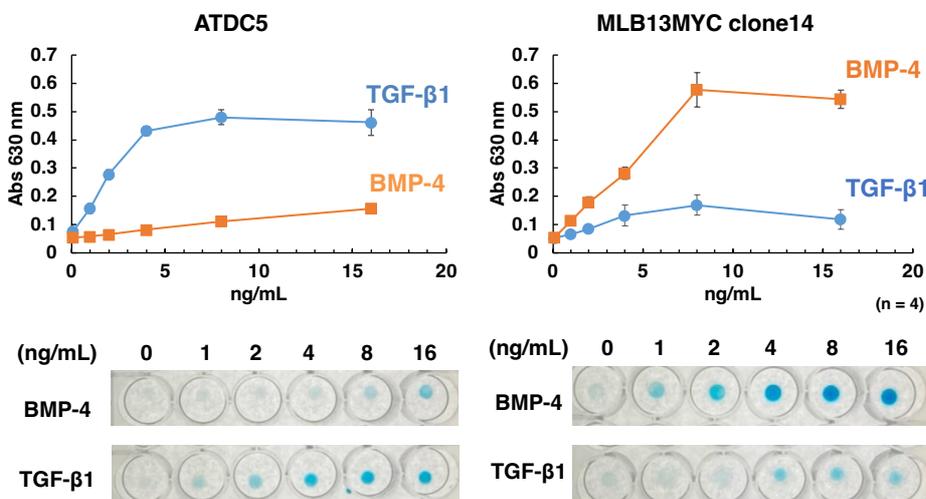


図 4 MLB13MYC clone14 細胞の軟骨分化に対するサイトカインの検討

(4) MLB13MYC clone14 細胞を用いたスクリーニングと機能分子の単離精製・構造解析：ATDC5 細胞を用いたスクリーニングと同様に、申請者の所属研究室で供給された真菌及び放線菌の培養液 3,248 サンプルに対し、MLB13MYC clone14 細胞の軟骨分化促進活性のスクリーニングを行った。その結果、真菌 1 株の培養液に軟骨分化促進活性を見出した。本菌株の培養液から溶媒抽出、HPLC を含む各種クロマトグラフィーにより精製し、機能分子 1 つを単離した。各種機器分析によりこの機能分子を altenusin (文献) と同定した (図 1)。

(5) Altenusin と flavasperone の MLB13MYC clone14 細胞に対する軟骨分化促進活性：単離した altenusin の MLB13MYC clone14 細胞の軟骨分化に対する影響をアルシヤンブルー染色にて評価した。その結果、altenusin を終濃度 34 μM で処理することで、コントロールと比較して約 4 倍の軟骨分化促進活性を示した。一方、ATDC5 細胞を用いたスクリーニングから単離した flavasperone も同様に評価した結果、終濃度 3.5 μM でコントロールと比較して約 2 倍の軟骨分化促進活性を示した。

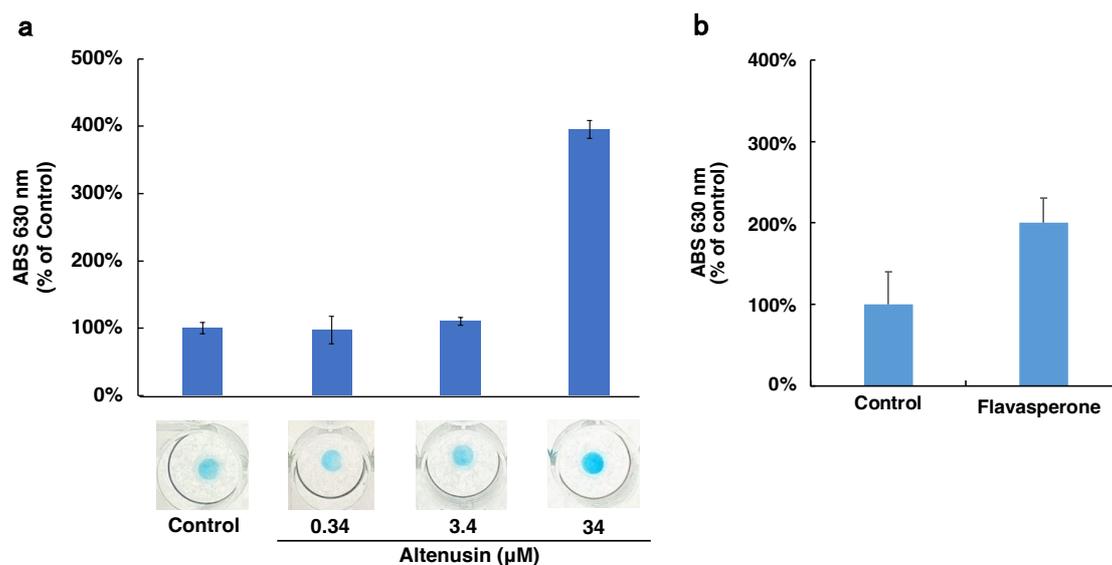


図 5 Altenusin (a) 及び flavasperone (b) の MLB13MYC clone14 細胞の軟骨分化に対する影響

本研究から、軟骨分化促進活性を示す微生物由来の低分子化合物を見出すことができた。これらの化合物が軟骨分化に影響を与えることは初めての知見であった。今後、より詳細な作用メカニズムの解明等を通し、変形性関節症治療薬のリード化合物としての可能性を追求する必要がある。

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 Ohte Satoshi, Shiokawa Takehiro, Koyama Nobuhiro, Katagiri Takenobu, Imada Chiaki, Tomoda Hiroshi	4. 巻 73
2. 論文標題 A new diketopiperazine-like inhibitor of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation produced by marine-derived <i>Aspergillus</i> sp. BFM-0085	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 554 ~ 558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-020-0316-3	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 -

1. 著者名 Yamazaki Hiroyuki, Ohte Satoshi, Rotinsulu Henki, Wewengkang Defny S., Sumilat Deiske A., Abdjul Delfly B., Maarisit Wilmar, Kapojos Magie M., Namikoshi Michio, Katagiri Takenobu, Tomoda Hiroshi, Uchida Ryuji	4. 巻 18
2. 論文標題 Screening for Small Molecule Inhibitors of BMP-Induced Osteoblastic Differentiation from Indonesian Marine Invertebrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 606 ~ 606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/md18120606	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 -

1. 著者名 Ohte Satoshi, Yamazaki Hiroyuki, Takahashi Ohgi, Rotinsulu Henki, Wewengkang Defny S., Sumilat Deiske A., Abdjul Delfly B., Maarisit Wilmar, Kapojos Magie M., Zhang Huiping, Hayashi Fumiaki, Namikoshi Michio, Katagiri Takenobu, Tomoda Hiroshi, Uchida Ryuji	4. 巻 35
2. 論文標題 Inhibitory effects of sesquiterpene lactones from the Indonesian marine sponge <i>Lamellodysidea</i> cf. <i>herbacea</i> on bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127783 ~ 127783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2021.127783	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大手聡、金田幸歩、供田洋
2. 発表標題 天然化合物ライブラリーからの軟骨分化促進活性物質の探索
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学薬学部 微生物薬品製造学教室 https://www.kitasato-u.ac.jp/pharm/research/laboratory/laboratory-detail/content/?lab_pk=1669807811

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