

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590112

研究課題名（和文）棘皮動物由来骨粗鬆症改善効果物質の再構築と構造活性相関

研究課題名（英文）Restructure and structure-activity relationship of the osteoporotic improvement effect compounds derived from echinoderms.

研究代表者

稲垣 昌宣 (INAGAKI MASANORI)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：90274480

研究成果の概要（和文）：これまでの研究により、ヒトデなどの棘皮動物が骨粗鬆症を改善する物質を有することを見出していたが、構造的にどのような部分構造が活性の発現に必要なのか詳細にはわからなかった。今回、オニヒトデより抽出・分離・精製して得られた化合物、またそれらを化学的に分解、再構築することにより得られた化合物について、活性試験を行うことにより活性発現に必要な部分構造が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the study of the constituents of echinoderms, we found that the echinoderms such as starfish had the glycosphingolipids (GSLs) which improved osteoporosis. However, we did not know it in detail what kind of partial structure was necessary. This time, we obtained GSLs from *Acanthaster planci* and the compounds which were provided by rebuilding it chemically again. The partial structure, necessary for active expression, was suggested by cell-based assay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生体分子、生理活性、骨粗鬆症、棘皮動物

1. 研究開始当初の背景

世界一の長寿国となった日本は高齢者人口が他国に類をみないほど急速に増加している。社会の高齢化に伴い、深刻な問題のひとつに骨粗鬆症が挙げられる。骨粗鬆症とは、骨形成速度よりも骨吸収速度が高いことにより骨に小さな穴が多発し、骨の変形、骨性の痛み、骨折の原因となる疾病であり、高齢者の生活の質（QOL）を著しく低下している。主に中年以降に見られ、患者の8割は女性であり、日本においては約1000万人に症状が現れている。

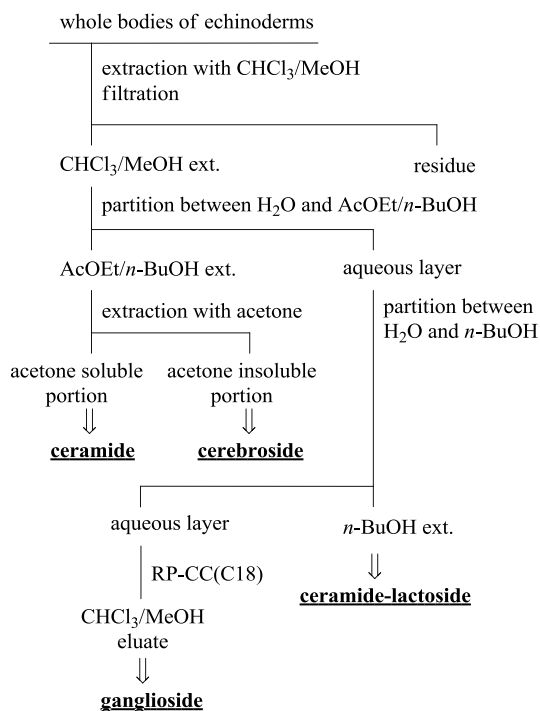
一方、申請者らは棘皮動物由来の骨粗鬆症改善物質の探索研究を行い、特定の構造を有するスフィンゴ糖脂質分子種が活性本体であることを明らかにしている。

2. 研究の目的

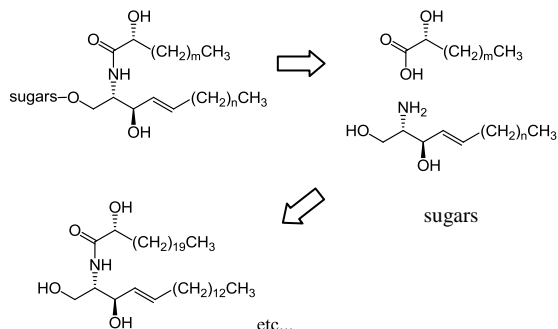
上記背景より、本課題は棘皮動物より骨粗鬆症改善物質を分離して、その成分を化学的に分解し、再構築、誘導体化することにより得られた化合物を用いて骨代謝に関する構造活性相関を検討し、骨粗鬆症改善薬のリード化合物を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試料動物である棘皮動物を確保し、それら进行处理することにより、目的化合物（セラミド、セレブロシド、セラミドラクトシド、ガングリオシド分子種などのスフィンゴ糖脂質）を得る。試料動物としてはサンゴ礁の食害問題で、毎年大量に駆除・廃棄されているオニヒトデを想定した。得られた試料動物について、クロロホルム・メタノール混液により抽出し、抽出液を濃縮して得られたクロロホルム・メタノール抽出エキスを水と酢酸エチル・ブタノール混液により分配、さらにその水層を水飽和ブタノールによる分配を行い、極性に応じたスフィンゴ糖脂質を得る。



(2) 得られたスフィンゴ糖脂質を化学的に分解することにより、脂肪酸部、長鎖塩基部、糖部とする。このうち、脂肪酸部 (FAM)、長鎖塩基部 (LCB) についてその鎖長に応じて分離精製し、得られた単一組成の脂肪酸と長鎖塩基を縮合することにより、単一の化合物（セラミド）を再構築する。セラミドは複数の不斉点を有するが、天然由来の原料を利用することにより光学的に純粋な化合物が効率的に得られると考えている。



(3) 再構築によって得られた化合物について細胞株を用いたアッセイ系によるスクリーニングを行う。具体的には①マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 を用いた骨芽細胞への分化に対する影響、および②マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の増殖に対する影響を検討する。

①骨芽細胞への分化に対する効果

ガングリオシドが、ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進するという報告があることより、マウス間葉系幹細胞株である C3H10T1/2 細胞を用いて骨芽細胞への分化に対する影響を検討する。C3H10T1/2 細胞は、様々な分化刺激により脂肪細胞、骨芽細胞、骨格筋細胞への分化能を有しており、間葉系細胞分化の *in vitro* モデルとして広く用いられている。培養には DMEM (10%FBS) を使い、37°C、5% CO₂ の条件下、80%コンフルエントの状態で行う。細胞を 35 mm ディッシュにまき、コンフルエントに達した 1 日後に骨芽細胞への分化誘導剤であるレチノイン酸 (1 μM) およびサンプル (5, 50 μM) を含むメディウムに交換し、分化誘導開始の 3 日後および 5 日後にメディウム交換を行い、7 日後に細胞を回収し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定する。

②骨芽細胞の増殖に対する効果

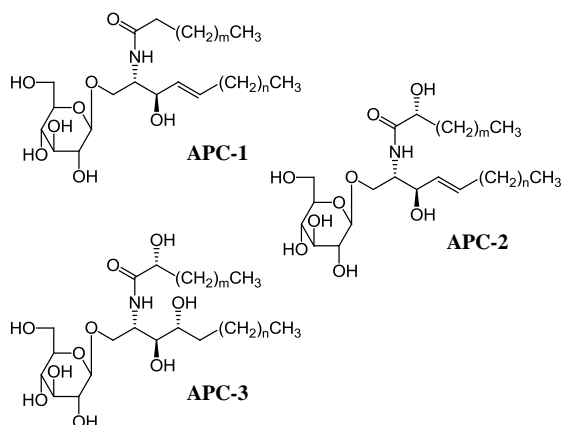
以前の研究において、増殖促進が観察されたマウス骨芽細胞株の一つである MC3T3-E1 細胞の増殖に対する影響を検討する。細胞増殖における生細胞の測定には、CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を用いる。この Assay reagent には、新しいテトラゾリウム化合物である 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) が含まれており、MTS テトラゾリウム化合物は、細胞によって生物的に還元され、組織培養液に可溶性発色性のホルマザン産物へと変換される。波長 490 nm の吸光度として表されるホルマザン産物の量は、培養液に含まれる生細胞数と直接的に比例することが確認されている。培養には α-MEM (10%FBS) を使い、37°C、5% CO₂ の条件下、80%コンフルエントの状態で行う。細胞を 96 ウェルプレートに 2 × 10⁴ cells/well になるようにまき、24 時間インキュベーションした後、各濃度のサンプルを含むメディウムに交換し、それから培養 3 日後および 5 日後における細胞数を CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) にて測定する。

以前の検討ではトリチウムチミジンの取り込み量により骨芽増殖活性の検討を行ったが、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定、MTS アッセイを用いることにより、簡便に試験が行えるものと思われる。

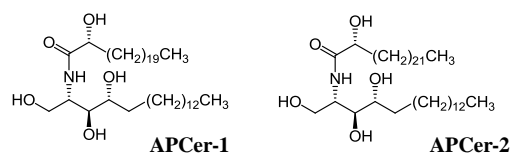
(4) 南氷洋産ヒモムシについて、オニヒトデと同様の溶媒抽出・分離・精製操作によるスフィンゴ糖脂質の探索を行う。

4. 研究成果

(1) 研究課題対象動物の確保のため、沖縄県国頭郡本部町瀬底島沿岸部にて採集活動を行い、オニヒトデ (約 35kg) が得られた。得られたオニヒトデについて、前述の常法により抽出、分離、精製を行い、脂肪酸+スフィンゴシン型長鎖塩基 (APC-1)、 α -オキシ脂肪酸+スフィンゴシン型長鎖塩基 (APC-2)、 α -オキシ脂肪酸+フィトスフィンゴシン型長鎖塩基 (APC-3) の 3 種のグルコセレブロシド分子種が得られた。それぞれをメタノリシス、誘導体化して脂肪酸 (脂肪酸メチルエステル)、長鎖塩基 (TMS エーテル誘導体)、糖 (TMS エーテル誘導体) の構成を GCMS にて分析するとともに、NMR の測定も行い、以下のような構造を有する分子種であることを確認した。



(2) 得られたスフィンゴ糖脂質 (APC-2, APC-3) を 5% HCl-MeOH とともに加熱することによりメタノリシスし、 α -ヒドロキシ脂肪酸メチルエステル、長鎖塩基、1-メチル糖とした。このうち、 α -ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルについて逆相 HPLC により、その鎖長に応じて分離精製した。得られた単一の α -ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルのうち収量の多いもの (C_{22} , C_{24}) をアルカリ加水分解によりメチルエステルを除去して、長鎖塩基 (C_{18} フィトスフィンゴシン) と縮合することにより、単一の化合物 (セラミド) を再構築した。なお、長鎖塩基の分離精製に要する時間が無かったため、長瀬産業株式会社より供与された長鎖塩基 (C_{18} フィトスフィンゴシン) を使用した。

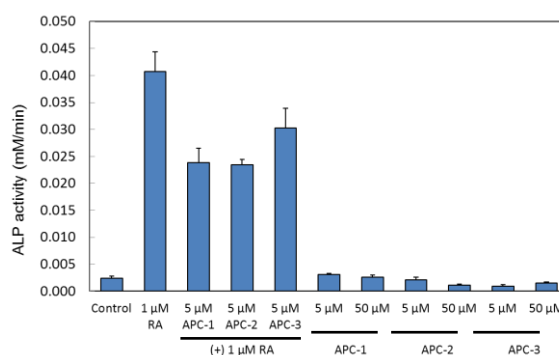


(3) 合成して得られた 2 種のセラミド (APCer-1, APCer-2) とオニヒトデより得られた 3 種のセレブロシド分子種 (APC-1, APC-2, APC-3) について、①マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 を用いた骨芽細胞への分化に対する影響、②マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の増殖に対する影響を検討した。

①骨芽細胞への分化に対する効果

骨芽細胞への分化については ALP 活性測定により評価した。予備実験より、APCer-1 および APCer-2 については、細胞の形態変化が少なく、また、ALP 染色でも検出できなかったため、ALP 活性については、APC-1, -2, -3 のみを行った。ポジティブコントロールであるレチノイン酸 (RA) の単独添加では ALP 活性が上昇したが、サンプルには分化誘導能はないことが示唆された。しかし、サンプルを加えて培養した細胞の形態が変化したことから、細胞に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。

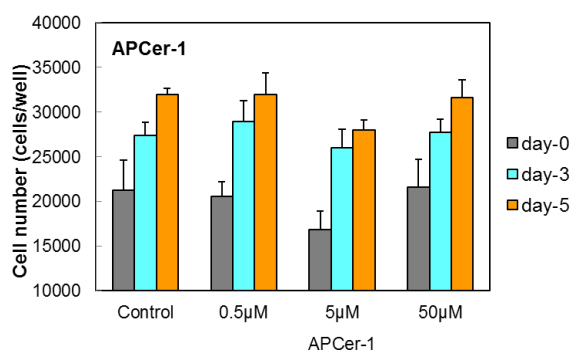
Effect of Glycosphingolipids on Cell Differentiation to Osteoblast

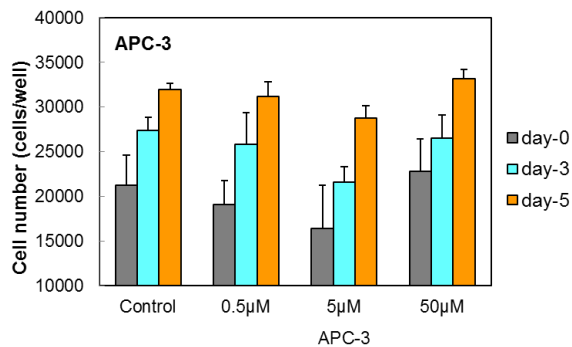
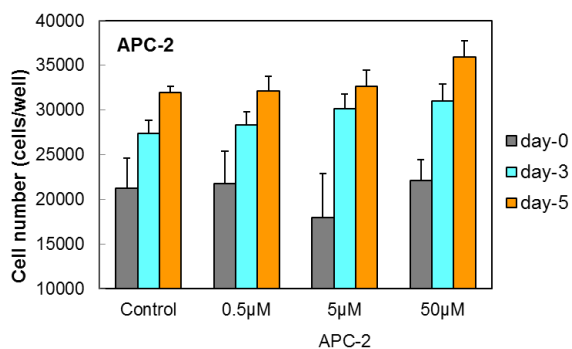
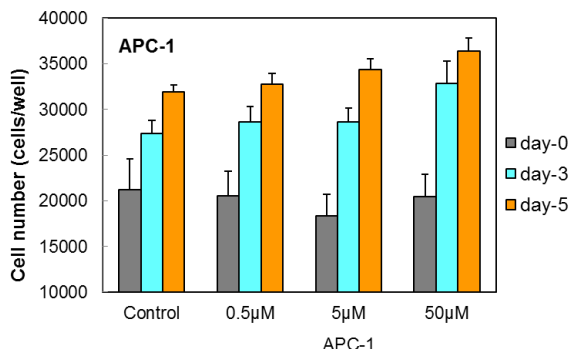
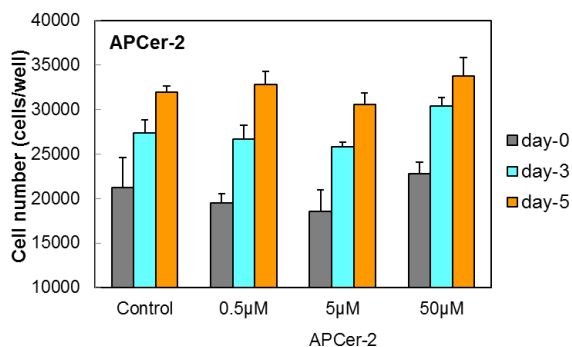


②骨芽細胞の増殖に対する効果

骨芽細胞の増殖については、MTS アッセイにより評価したところ、APC-1 および APC-2 において細胞増殖促進効果が認められた。

Effect of Glycosphingolipids MC3T3-E1 Cell Proliferation

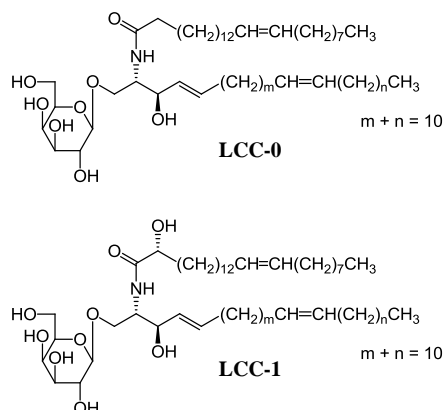




この結果では、構成脂肪酸の種類には関係なく、スフィンゴシン型長鎖塩基および糖の存在が活性に関与していることが示唆された。一方、まだ予備検討段階ではあるが、細胞をまくと同時にサンプルを添加した実験では、APCer-1 および APCer-2 において、細胞増殖促進効果が認められた。同様の実験をさらに繰り返し、確認する必要がある。また、 α 位に水酸基を有しない脂肪酸 (C_{22} ,

C_{24}) を用いたセラミドも合成しており、今後は水酸基の有無による活性の違い、結合する糖の種類、結合様式による違いを、また破骨細胞株である RAW 264 細胞における細胞増殖抑制効果を検討したい。

(4) 南氷洋産ヒモムシについて、溶媒抽出、液々分配、各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、 $CHCl_3$ -MeOH 抽出エキスの低極性脂質分画より、2 種のセレブロシド分子種が得られた。スペクトル及び化学的知見より、その構造を脂肪酸+スフィンゴシン型長鎖塩基をセラミド部に有するガラクトセレブロシド分子種 (LCC-0)、 α -オキシ脂肪酸+スフィンゴシン型長鎖塩基をセラミド部に有するガラクトセレブロシド分子種 (LCC-1) と決定した。南氷洋産ヒモムシのセレブロシドは、日本近海産の棘皮動物由来セレブロシドと比較すると、構成糖をグルコースではなくガラクトースとすること、構成脂肪酸・長鎖塩基に不飽和結合が多く含まれることなど、興味深い知見が得られた。今後、ヒト由来スフィンゴ糖脂質、再構築セラミドと活性の比較を行いたい。



5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

① 稲垣昌宣、小川麻里、伊村智、南氷洋産ヒモムシ (*Lineus corrugatus*) の成分研究 (第 1 報)、日本薬学会第 131 年会 (静岡, 2011 年 3 月 29-31 日)。

② 栗田真帆、稲垣昌宣、西村基弘、小川麻里、伊村智、南氷洋産ヒモムシ (*Lineus corrugatus*) の成分研究、第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会 (那覇, 2013 年 6 月 1-2 日)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 昌宣 (INAGAKI MASANORI)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号: 90274480

(2)研究分担者

森本 千恵 (MORIMOTO CHIE)

松山東雲短期大学・生活科学科・准教授

研究者番号：10332826

武田 美雄 (TAKEDA YOSHIO)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：70025716

(H23.3退職)