

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293024

研究課題名(和文) 骨吸収抑制作用と骨形成促進作用を併せ持つ天然物を起点にした骨代謝の理解と創薬

研究課題名(英文) Biological activities and drug development of natural compounds with bone-resorbing and bone-forming properties during bone metabolism

研究代表者

禹 濟泰 (WOO, Je-Tae)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：20272693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨吸収抑制作用と骨形成促進作用を併せ持つ天然化合物の作用を解明することを目的として、細胞および個体レベルにおける以下の研究を行った。ホノキオールはレチノイドX受容体及びソニックヘッジホッグ経路を介して骨芽細胞分化を促進する可能性が明らかになった。また、卵巣摘出およびRANKL誘導骨粗鬆症モデルマウスにおいて、ホノキオールの投与が骨量の減少を有意に抑制することを確認した。また、南米原産植物Pterogynine Nitensに含まれるNitensidine Aと、生薬シセイに含まれることが知られるEpimagnolin AがABCB1と相互作用することを見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the effect and mechanism of natural compounds which have both anti-resorptive action and anabolic action in bone metabolism, the following studies in vitro and in vivo were performed. It is demonstrated that honokiol might promote osteoblast differentiation through retinoid X receptor and sonic hedgehog pathway. The in vivo study revealed that honokiol suppresses bone loss in ovariectomized and RANKL-treated osteoporosis model mice. We also found that Nitensidine A from Pterogynine Nitens and Epimagnolin A from Magnolia Flower interact with ABCB1.

研究分野：天然物化学

キーワード：骨代謝 骨吸収抑制剤 骨形成促進剤 天然化合物

1. 研究開始当初の背景

骨においては破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が絶えず繰り返されており、この骨リモデリングのバランスにより骨の恒常性が維持されている。骨粗鬆症や歯周病においてはこのバランスが崩れて、骨吸収が過剰となることで、骨量が減少しており、骨折や抜歯の要因となる。したがって、骨量の管理は高齢社会における QOL 維持に重要な課題である。骨の減少を抑制するだけでなく、積極的に骨量を増加させるような化合物は、骨粗鬆症や歯周病等の骨減少性疾患に対する効率的な予防・治療薬として有用である。

2. 研究の目的

これまでの研究によって、破骨細胞の分化を抑制する活性を持ち、かつ、骨芽細胞の分化を促進するような次世代型骨減少性疾患予防・治療薬候補となりうるような天然化合物として、リグナン化合物のホノキオールやカルボリンアルカロイド化合物のハルミンなどを見出しているが、その詳細なメカニズムと個体レベルにおける作用は完全に解明できていない。そこで、本課題においては、この骨吸収抑制と骨形成促進の両活性を保有する次世代型骨代謝調節化合物の作用を分子、細胞、個体レベルで解明することを目的として、メカニズムの解析と動物モデルを用いた解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞を用いた解析

骨芽細胞のモデルとしてマウス頭頂骨由来前骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞を、ホノキオール、および、各種阻害剤等とともに培養後、骨芽細胞分化の指標としてアルカリフォスファターゼ(ALP)の活性と石灰化を測定して解析した。また、細胞を各時間培養後にタンパク質溶液を調製して、高速・高精度 2 次元電気泳動法にて、発現タンパク質の解析を行った。歯根形成に深く関わるヘルトピッチ上皮鞘由来細胞(HERS 細胞)においても、ホノキオールで培養後に各種分化マーカーの検出と遺伝子発現解析等を行った。

(2) 動物を用いた解析

骨量減少に対するホノキオール投与の効果を検討するために、卵巣摘出、および、RANKL 投与による骨粗鬆症モデルマウスを作製した。ホノキオールを一定期間腹腔投与したのち、骨を採取した。採取した骨は μ CT または pQCT によって骨形態計測を行った。

(3) インシリコ解析

ホノキオールとハルミンに共通する標的分子の一つとして知られる ABCB1 に着目し、Molegro Virtual docker を用いたドッキング

シミュレーションによって相互作用する化合物の探索を行った。化合物の構造は Chem 3D Pro にて半経験的分子軌道法に基づいて最適化した。マウス Abcb1 の X 線結晶構造情報 (PDB code: 3G60) を基にし、MODELLER 9.11 および Swiss-MODEL の Alignment Mode を利用してヒト ABCB1 の立体構造を作成した。ABCB1 の基質である verapamil の相互作用領域を含む直径 50 Å の空間を対象にして、ヒト ABCB1 とのドッキングシミュレーションを各化合物ごとに 10000 回実施した。

4. 研究成果

MC3T3-E1 前骨芽細胞試験において、ホノキオールによる ALP 活性促進作用が RXR 受容体アンタゴニストによって部分的に抑制されたことから、ホノキオールの骨形成促進作用に RXR との相互作用が関与している可能性が示唆された。2 次元電気泳動においては、ホノキオールの刺激によって発現に変動がみられる蛋白質の候補を複数見出すことができ、さらなる同定作業を進めている。

また、ホノキオールは、HERS 細胞試験において、Shh シグナル下流で活性化される Gli1 の発現を誘導すること、また、その発現誘導が Shh シグナル阻害剤によって抑制されることから、ホノキオールの作用には、Shh 経路も関与していることが示唆された。

動物レベルにおける作用検証においては、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウス、および、RANKL 投与による骨減少モデルのどちらにおいても、ホノキオールの腹腔投与によって骨量や骨密度などのパラメーターが改善したことから、ホノキオールは個体レベルにおいても、骨代謝を改善して骨量を維持する作用があることを確認した。

ABCB1 と相互作用する天然化合物を探索した結果、南米原産植物 *Pterogynine Nitens* から単離された Nitensidine A が ABCB1 と相互作用することを確認し、その作用にはイソプレニル基の重合度やグアニジン骨格の重要性を見出した。また、生薬シンイから精製された Epimagnolin A が ABCB1 と相互作用することを見出し、シミュレーションから ABCB1 との結合に関わるアミノ酸残基の推定も行った。

以上の結果から、効果的な骨量維持/増加作用が期待できるホノキオールの作用メカニズムに関する新知見を得るとともに、個体レベルにおける有用性も明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Effert, T., Banerjee, M., Paul, N.W., Abdelfatah, S., Arend, J., Elhassan, G., Hamdoun, S., Hamm, R., Hong, C.,

Kadioglu, O., Naß, J., Ochwangi, D., Ooko, E., Ozenver, N., Saeed, M.E.M., Schneider, M., Seo, E.J., Wu, C.F., Yan, G., Zeino, M., Zhao, Q., Abu-Darwish, M.S., Andersch, K., Alexie, G., Bessarab, D., Bhakta-Guha, D., Bolzani, V., Dapat, E., Donenko, F.V., Efferth, M., Greten, H.J., Gunatilaka, L., Hussein, A.A., Karadeniz, A., Khalid, H.E., Kuete, V., Lee, I.S., Liu, L., Midiwo, J., Mora, R., Nakagawa, H., Ngassapa, O., Noysang, C., Omosa, L.K., Roland, F.H., Shahat, A.A., Saab, A., Saeed, E.M., Shan, L., Titinchi, S.J.J. (2016). Biopiracy of natural products and good bioprospecting practice. *Phytomedicine*, 23, 166-73. 査読有

Lee, J.W., Asai, M., Jeon, S.K., Iimura, T., Yonezawa, T., Cha, B.Y., Woo, J.T., Yamaguchi A. (2015) Rosmarinic acid exerts an anti-osteoporotic effect in the RANKL-induced mouse model of bone loss by promotion of osteoblastic differentiation and inhibition of osteoclastic differentiation. *Mol Nutr Food Res*, 59, 386-400. 査読有

Lee, Y.S., Choi, S.S., Yonezawa, T., Teruya, T., Woo, J.T., Kim, H.J., Cha, B.Y. (2015) Honokiol, magnolol, and a combination of both compounds improve glucose metabolism in high-fat diet-induced obese mice. *Food Sci Biotech.* 24, 1467-1474. 査読有

Tajima, Y., Murase, H., Satake, K., Mitani, Y., Regasini, L.O., Bolzani Vda, S., Efferth, T., and Nakagawa, H. (2015). Nitensidine A, a guanidine alkaloid from *Pterogyne nitens*, induces osteoclastic cell death. *Cytotechnology*, 67, 585-592. 査読有

Satake, K., Tsukamoto, M., Mitani, Y., Regasini, L.O., Bolzani Vda, S., Efferth, T., and Nakagawa, H. (2015). Human ABCB1 confers cells resistance to cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Biomed. Mater. Eng.*, 25, 249-256. 査読有

Doi, T., Yamaguchi, N., Ohsawa, K., Nakai, K., Yoshida, M., Satake, K., Mitani, Y., Nakagawa, H., Takahashi, T., and Ishikawa, T. (2015). Synthesis and Biological Evaluation of C-Aromataxane Derivatives as P-Glycoprotein-Mediated Multi Drug Resistance Reversal Agents. *Heterocycles*, 90, 482-501. 査読有

Tajima, Y., Nakagawa, H., Tamura, A., Kadioglu, O., Satake, K., Mitani, Y., Murase, H., Regasini L.O., Bolzani Vda S, Ishikawa, T., Fricker, G., and Efferth, T. (2014). Nitensidine A, a guanidine alkaloid from *Pterogyne nitens*, is a novel substrate for human ABC transporter ABCB1. *Phytomedicine*, 21, 323-332. 査読有

[学会発表](計15件)

古川沙織, 丹羽悠菜, 柳瀬亜美, 中川大. (2017年3月27日, 宮城県仙台市, 仙台国際センター他). 抗マラリア薬 Artesunate 類による破骨細胞傷害作用機構の解析. 日本薬学会.

Mitani, Y., Satake, K., Tsukamoto, M., Teruya, T., Cha, B.Y., Woo, J.T., and Nakagawa, H. (July 27, 2016. Copenhagen, Denmark). Preparation of epimagnolin A, a tetrahydrofurofuranoid lignan from *Magnolia* sp., and evaluation of anti-drug-resistance activity. International Congress (Joint Meeting with ASP, AFERP, JSP, PSE and SIF) and Annual Meeting of GA.

Nakagawa, H., Mitani, Y., Satake, K., Tsukamoto, M., Teruya, T., Cha, B.Y., and Woo, J.T. (March 6, 2016. Innsbruck, Austria). Epimagnolin, a tetrahydrofurofuranoid lignan from *Magnolia* sp., reverses ABCB1-mediated multidrug resistance. The 6th Special Meeting on ABC Proteins - ABC2016: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases.

佐竹一紘, 塚本めぐみ, 石川智久, 中川大. (2015年10月8日, 愛知県名古屋市, 名古屋国際会議場). Predicted crucial amino acid residues for substrate recognition by human ABCB1: in vitro analysis-based calculation. 日本癌学会.

米澤貴之, 太田正人, 李智媛, 中川大, 車炳允, 禹濟泰. (2015年7月9日, 宮城県仙台市, 東北大学 片平さくらホール). 骨・歯周組織形成に対するネオリグナン化合物の作用. 日本動物細胞工学会.

佐竹一紘, 塚本めぐみ, 三宅美月, 豊田優, 石川智久, 中川大. (2015年6月21日, 東京都港区, 慶應義塾大学 薬学部 芝共立キャンパス). グアニジンアルカロイ

ドおよびリグナンを用いた ABCB1 の基質認識に重要なアミノ酸残基の推定. トランスポーター研究会.

Nakagawa, H., Satake, K., Tsukamoto, M., Toyoda, Y., Kadioglu, O., Regasini L0, Bolzani Vda S, Ishikawa, T., Fricker, G., and Efferth, T. (April 27-30, 2015. Lucca, Italy). Predicted crucial amino acid residues for substrate recognition by human ABCB1: in vitro analysis-based calculation using novel substrates for human ABCB1 from *Pterogyne nitens* and *Magnolia* sp. Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems.

米澤貴之, 夏目矩行, 禹 濟泰, 鄭 雄二. (2015 年 3 月 28 日, 兵庫県神戸市, 神戸学院大学他). カルノシン酸およびカルノソールの破骨細胞分化抑制作用. 日本薬学会.

佐竹一紘, 塚本めぐみ, 三宅美月, 豊田優, 石川智久, 中川大. (2015 年 3 月 28 日, 兵庫県神戸市, 神戸学院大学他). ヒト ABCB1 の基質認識機構に重要なアミノ酸残基の推定. 日本薬学会.

佐竹一紘, 三谷勇仁, 塚本めぐみ, 三宅美月, 村瀬隼人, 石川智久, 中川大. (2014 年 10 月 17 日, 京都府京都市, 国立京都国際会館). ヒト ABC 輸送体 ABCB1 の基質認識に重要なアミノ酸残基同定に向けた in silico 解析. 日本生化学会.

三谷勇仁, 佐竹一紘, 塚本めぐみ, 三宅美月, 車炳允, 禹濟泰, 中川大. (2014 年 10 月 16 日, 京都府京都市, 国立京都国際会館). In vitro/in silico 解析によるヒト ABCB1 とリグナンとの相互作用解析. 日本生化学会.

佐竹一紘, 三谷勇仁, 塚本めぐみ, 村瀬隼人, 三宅美月, 石川智久, 中川大. (2014 年 6 月 14 日, 愛知県名古屋市, 名古屋市立大学). ドッキングシミュレーションを基盤にしたヒト ABCB1 の基質認識に必要なアミノ酸残基の探索. トランスポーター研究会.

三谷勇仁, 佐竹一紘, 塚本めぐみ, 三宅美月, 車炳允, 禹濟泰, 中川大. (2014 年 6 月 14 日, 愛知県名古屋市, 名古屋市立大学). Epimagnolin は、ヒト ABC 輸送体 ABCB1 によるアントラサイクリン系抗生物質の輸送を阻害する. トランスポーター研究会.

佐竹一紘, 三谷勇仁, 塚本めぐみ, 村瀬

隼人, 三宅美月, 石川智久, 中川大. (2014 年 5 月 24 日, 愛知県名古屋市, 名古屋大学野依記念学術交流会館). ヒト ABCB1 が基質を認識する際に必要とするアミノ酸残基の探索. 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

禹 濟泰 (WOO, Je-Tae)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号: 20272693

(2) 研究分担者

大西 素子 (OHNISHI, Motoko)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号: 00312653

車 炳允 (CHA, Byung-Yoon)
中部大学・生物機能開発研究所・准教授
研究者番号: 00410663

中川 大 (NAKAGAWA, Hiroshi)
中部大学・応用生物学部・講師
研究者番号: 40397039

林 宣宏 (HAYASHI, Nobuhiro)
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授
研究者番号: 80267955

(3) 連携研究者

鄭 雄一 (TEI, Yuichi)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号: 30345053

太田 正人 (OTA, Masato)
日本女子大学・家政学部・准教授
研究者番号: 70313228