

論文内容要旨

【目的】骨は生体を支える骨格系の中心であるとともに、カルシウムの貯蔵庫としても重要な組織である。骨では骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が絶えず繰り返されており、この骨形成と骨吸収のバランスにより骨の恒常性が維持されている。高齢化社会において急速に患者数が増加している骨粗鬆症や歯周病は、種々の要因によりこのバランスが崩れて骨吸収が過剰になることにより誘発される。骨粗鬆症の治療薬としては主にビスフォスフォネートや選択的エストロゲン受容体調節薬 (SERM) をはじめとした骨吸収抑制薬が臨床で使用されているが、その効果や副作用など改善すべき問題点も残されている。一方、減少した骨を積極的に回復させる骨形成促進薬の開発は遅れており、最近、骨形成促進薬として副甲状腺ホルモン製剤が認可されたものの、長期使用の制限やビスフォスフォネートとの併用で効果が認められなくなるとの報告がある。また、ペプチド製剤であることからコストや品質管理、投与方法など課題も多く、新たな作用機序を持つ骨代謝調節剤が求められている。このような背景のもと、新規骨吸収抑制薬および骨形成促進薬を開発するために、本研究では、破骨細胞または骨芽細胞の分化を調節する天然由来低分子化合物を探索し、見出した骨代謝調節化合物の作用機構を解明することを目的として研究を行った。

【方法】破骨細胞分化に対する作用は、マウスマクロファージ様細胞株である RAW264 細胞、マウス骨髄由来マクロファージ (BMM) および、骨髄細胞 (BMC) と骨芽細胞株との共存培養を用いて検討した。破骨細胞への分化は、破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 活性の測定および多核破骨細胞数の計測により解析した。成熟破骨細胞のアポトーシスに対する作用は、核染色およびカスパーゼ活性の測定により評価した。また、RAW264 細胞において破骨細胞分化誘導因子である RANKL 刺激により誘導される各種シグナル分子の活性化についてウエスタンブロット法により解析した。破骨細胞分化に関わる遺伝子の発現についてはリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。器官培養における骨吸収に対する作用については、胎生 15 日齢のマウスの橈骨または尺骨を、RANKL 存在下で培養後、培地中のカルシウム濃度を測定することで検討した。また、組織切片を作製して TRAP 染色を行った。個体レベルにおける骨吸収に対する作用については、4 週齢の雌マウスの卵巣を摘出して作製した卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスを用い、被検化合物を毎日腹腔内投与して 3 ヶ月間飼育後、pQCT 法または μ CT にて骨の解析を行った。

骨芽細胞分化に対する作用はマウス前骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞、マウス胎児由来間葉系幹細胞株の C3H10T1/2 細胞、マウス頭頂骨由来初代培養骨芽細胞を用いた。骨芽細胞分化の指標として、分化初期のマーカー酵素であるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を測定し、骨芽細胞による石灰化を解析した。また、骨芽細胞分化関連遺伝子およびタンパク質の発現について RT-PCR および ELISA にて検討した。各種シグナル経路の関与について検討するため、各種シグナル特異的阻害剤の影響を検討するとともに、ルシフェラーゼアッセイを行った。

【結果及び考察】破骨細胞分化を抑制する化合物を約 2,500 の天然由来化合物より探索した結果、ハル

ミンが RAW264 細胞において、RANKL による TRAP 活性の増加および多核破骨細胞形成を濃度依存的に抑制することを見出した。また、ホルミンの破骨細胞分化抑制作用は、初代培養細胞である BMM および、BMC と骨芽細胞株の共存培養系のいずれにおいても認められた。構造活性相関を明らかにするため、ホルミンとその類似化合物 4 種の破骨細胞分化抑制作用を比較検討した結果、 β カルボリン骨格の C3-C4 の二重結合および 7 位のメトキシ基あるいは水酸基が活性に寄与していることが示唆された。メカニズム解析のために、RANKL によって誘導される各種 MAP kinase (MAPK) および、I κ B のリン酸化に対する作用をウェスタンブロットにて検討した結果、これらの初期シグナルには影響は認められなかった。しかしながら、ホルミンは、RANKL により誘導され、破骨細胞分化に重要な転写因子である c-Fos および NFATc1 の発現を mRNA レベルおよびタンパク質レベルで抑制した。以上のことから、ホルミンは c-Fos および NFATc1 の発現を抑制することで、破骨細胞分化を抑制することが示唆された。カルシウムアパタイトコーティングディッシュ上で RANKL 存在下 RAW264 細胞を培養すると骨吸収窩 (ピット) が形成されるが、ホルミンを添加するとピット形成が抑制された。また、骨片上における BMC と骨芽細胞株の共存培養による破骨細胞分化においても、ホルミンによってピット形成が抑制され、細胞レベルにおいて骨吸収を抑制することが示された。RANKL 存在下マウス胎児の橈骨または尺骨を培養後、培地中のカルシウム濃度を測定した結果、ホルミンを添加すると培地中のカルシウム濃度が低下した。また、培養後の骨の組織切片の解析において、ホルミン存在下では破骨細胞数が減少していたことから、ホルミンは器官レベルにおいても破骨細胞分化を抑制して骨吸収を抑制することが示唆された。さらに、卵巣摘出による骨粗鬆症モデルマウスを用いてホルミンの作用を検討した結果、ホルミン投与により卵巣摘出による大腿骨骨密度および骨梁数の減少が抑制され、骨梁間隙の増加も抑制された。このことからホルミンは、生体レベルにおいても、骨吸収を抑制することが示唆された。

同様に、破骨細胞分化阻害化合物を探索した結果、海洋シアノバクテリア由来 18 員環マクロライド化合物であるビセリングビアサイドも、RAW264 細胞、BMM および共存培養のいずれにおいても破骨細胞分化を抑制することを見出した。作用機構の解析から、ビセリングビアサイドは RANKL による c-Fos および NFATc1 の発現誘導を抑制することが判明した。また、ビセリングビアサイドは、ホルミンとは異なり成熟破骨細胞に対してアポトーシスを誘導し、骨片上において破骨細胞による骨吸収を抑制した。同じ 18 員環マクロライド化合物で、V-ATPase 特異的阻害剤であるコンカナマイシンは破骨細胞のアポトーシスを誘導して骨吸収を抑制することが報告されているが、ビセリングビアサイドは V-ATPase 阻害作用を示さなかったことから、コンカナマイシンとは異なる機序でアポトーシスを誘導することが示唆された。

一方、骨芽細胞分化促進化合物の探索のために、MC3T3-E1 細胞を用いて ALP 活性を指標に種々の化合物をスクリーニングした結果、破骨細胞分化抑制作用が認められたホルミンは ALP の mRNA 発現および ALP 活性を促進する作用も持つことを見出した。また、後期分化のマーカである osteocalcin の発現も mRNA レベルおよびタンパク質レベルのいずれにおいてもホルミン処理により増加した。さらにホルミンは、骨芽細胞による石灰化も著しく促進し、骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。

ハルミンの骨芽細胞分化促進作用はマウス頭頂骨由来初代培養骨芽細胞および C3H10T1/2 細胞においても確認された。ハルミンとその類似化合物の構造活性相関の検討より、 β カルボリン骨格の C3-C4 の二重結合および 7 位のメトキシ基あるいは水酸基が活性に寄与していることが示唆された。次に、骨芽細胞分化を強力に誘導するサイトカインである bone morphogenetic protein (BMP) シグナルがハルミンの骨芽細胞分化促進作用に関与しているかどうかについて阻害剤を用いて検討した。その結果、ハルミンの ALP 活性促進作用は BMP アンタゴニストである Noggin, および、I 型 BMP 受容体キナーゼ阻害剤である dorsomorphin および LDN-193189 によって抑制された。また、ハルミン処理によって BMP 応答ルシフェラーゼ活性が有意に亢進した。さらに、ハルミンは、骨芽細胞分化に重要な転写因子である、Runx2 および Osterix の mRNA 発現も増加させた。以上のことから、ハルミンは BMP シグナルを介して Runx2 や Osterix の発現を誘導して骨芽細胞分化を促進することが示唆された。

同様に、骨芽細胞分化促進化合物を探索した結果、メグスリノキ樹皮由来環状ジアリールヘプタノイド化合物であるアセロゲニン A が ALP の mRNA 発現および ALP 活性を促進すること、osteocalcin の mRNA およびタンパク質の発現を促進すること、および、骨芽細胞による石灰化を促進することを見出した。メグスリノキ樹皮由来化合物 8 種について、骨芽細胞分化に対する作用を検討した結果、アセロゲニン A の異性体であるアセロゲニン B も同等の活性を有することを見出した。また、アセロゲニン A またはアセロゲニン B の配糖体であるアセロシド I, アセロシド B₁ およびアセロシド III は、アセロゲニン A, B よりもわずかに弱い骨芽細胞分化促進作用を示した。一方、直鎖状のジアリールヘプタノイド化合物であるセントロロボールには活性は認められなかった。BMP 経路の阻害剤である Noggin, LDN-193189, および BMP 下流シグナルの一つである p38 MAPK 阻害剤の SB203580 はいずれも、アセロゲニン A の ALP 活性促進作用を抑制したことから、アセロゲニン類化合物も BMP シグナルを介して骨芽細胞分化を促進することが示唆された。

本研究により、ハルミンが破骨細胞分化を抑制して骨吸収を抑制するとともに骨芽細胞分化を促進して骨形成を促進すること明らかとした。ビスリングピアサイドに破骨細胞分化抑制作用および破骨細胞選択的アポトーシス誘導作用があることを見出した。アセロゲニン類化合物が骨芽細胞分化を促進することを見出した。今後、さらに詳細なメカニズムや生体レベルにおける作用の解析が必要であるものの、これらの化合物は新規の骨吸収抑制薬や骨形成促進薬の候補として有用である。特にハルミンは骨吸収阻害作用と骨形成促進作用を併せてもつ稀有な化合物であり、新しい骨代謝調節薬開発のリード化合物と成ることが期待される。

審査結果の要旨

高齢化社会において骨が脆くなる骨粗鬆症は急速に増加しており、その予防・治療薬の開発は急務である。骨では骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収が常に繰り返されている。骨粗鬆症は骨形成／骨吸収のバランスが崩れて、骨吸収が過剰と成った場合に誘発される。これまで、骨粗鬆症の治療薬としては主にビスフォスフォネートや選択的エストロゲン受容体調節薬をはじめとした骨吸収抑制薬が用いられているが、その効果や副作用等改善すべき問題点も多い。本論文は、新規骨吸収抑制薬および骨形成促進薬を開発するために、約 2500 種の天然物化合物ライブラリーから、破骨細胞または骨芽細胞の分化を調節する活性を持つ 3 種の化合物を発見し、その作用機構を詳細に解析した結果を記したものである。

まず、破骨細胞の分化を抑制する化合物としてハルミンとビセリングビアサイドを見いだした。これらの化合物は、破骨細胞の分化に大きく関わる RANKL によるマウスマクロファージ様細胞株である RAW264 細胞およびマウス骨髄由来マクロファージの破骨細胞への分化、および骨髄細胞と骨芽細胞株との共培養により誘導される破骨細胞分化および多核破骨細胞の形成を抑制した。その作用機構を明らかにするために、RANKL により誘導されるシグナル伝達に対する効果を検討し、いずれの化合物も転写因子 c-fos ならびに NFATc1 の発現を抑制する事を見いだした。また、ビセリングビアサイドには成熟破骨細胞のアポトーシスを誘導する作用があることも明らかにした。さらに、ハルミンは卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおける大腿骨骨密度の減少、骨梁数の減少を抑制することも見だし、生体レベルにおいても骨吸収を抑制することを明らかにした。

次に、骨芽細胞分化促進作用を持つ化合物として、ハルミンとアセロゲニン A を見いだした。これらの化合物は MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化活性を示すとともに、マウス頭頂骨由来培養骨芽細胞、および C3H10T1/2 においても同様の作用を示した。その作用は骨芽細胞分化を強力に誘導するサイトカインである bone morphogenetic protein (BMP) のアンタゴニストや、I 型 BMP 受容体キナーゼ阻害剤 dorsomorphin および LDN-193189 により抑制されることを明らかにし、これらの化合物は BMP シグナルを介して骨芽細胞分化を促進することを示唆した。

以上のように本研究の結果、ハルミンには破骨細胞分化を抑制して骨吸収を抑制する作用とともに骨芽細胞分化を促進して骨形成を促進する全く新しいタイプの化合物であることを明らかにした。また、ビセリングビアサイドおよびアセロゲニンも、それぞれ新規の骨吸収抑制薬ならびに骨形成促進薬開発のリード化合物になることを示唆した。このように本研究成果は骨代謝調節を標的とした新たな治療薬開発につながる事が期待される。よって本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。