

論文内容の要旨

破骨細胞への分化阻害活性を有する新規な有機低分子の開発

I. 研究目的

破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが壊れることで骨吸収が骨形成を上回り、骨強度が低下する病態である骨粗鬆症は、閉経後の女性には多く見られ、超高齢社会の日本においては克服すべき喫緊の問題の一つである。骨粗鬆症発症に関与する細胞である破骨細胞は、造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系前駆細胞が破骨細胞へ分化した後、骨基質へと接着することで骨吸収窩の形成、分泌リソソームにより骨吸収を行う。そのため、前駆細胞から破骨細胞へ分化を阻害する新たな化合物が骨粗鬆症治療薬として期待されている。そこで、破骨細胞への分化阻害作用を有するクルクミンに着目し、クルクミンの構造を基に新規類縁体の設計・合成および生物活性評価を通じて、低毒性でより強い阻害活性を示す化合物の探索を目的とした。

II. 研究対象ならびに方法

<化合物の合成> 化学的等価性および生物学的等価性の概念に基づいて分子の設計・合成を行なった。合成については、Wittig 反応を鍵反応として用いた。

<活性評価> マウス単球マクロファージ系の RAW264.7 細胞を用いて破骨細胞分化因子である RANKL とクルクミン、化合物とともに破骨細胞へと分化させる。その後、破骨細胞への分化にともない発現上昇する破骨細胞特有の酵素を測定する Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) Assay と細胞毒性を評価する XTT Assay をそれぞれ実施した。TRAP Assay にて強い阻害活性を示し XTT Assay にて毒性がないことを確認された化合物においては、さらに、TRAP 染色や破骨細胞の特有な酵素発現についてウエスタンブロット解析、リン酸カルシウムの吸収活性について Pit Assay を行い、化合物による破骨細胞への分化に及ぼす影響について検討を行なった。

III. 研究結果

第1章では、破骨細胞への分化を抑制することが報告されているクルクミンに着目し、クルクミンの β -ジケトン部位にチオフェン環やピラジン環を導入した標的分子を設計し合成、活性評価を行なった結果、クルクミンよりも TRAP 活性を有意に抑制する化合物 1a および 1c を見出した。

第2章では、 β -ジケトン部位を電子密度の高いフェノール骨格を含む構造へと変換した標的分子を設計し合成、活性評価を行なった結果、第1章で見出した 1a および 1c よりも TRAP 活性をさらに抑制する 4 を見出すことに成功した。4 について、さらなる高次評価を行なったところ、ウエスタンブロット解析や TRAP 染色、Pit Assay の結果から、4 は破骨細胞への分化を抑制するだけでなく、リン酸カルシウムの吸収を抑制することが明らかとなったことにより、骨吸収も抑制することが示唆された。

第3章から第5章では、クルクミンのアルケンスペーサー部を化学的等価体であるアミドやエステルへと変換した標的分子やアルケンを含みアミドやエステルを有する標的分子、さらに電子豊富なアルキンへと変換した標的分子の設計と合成、活性評価を行なった。各化合物の合成は、カルボン酸の活性化によるアミンまたはアルコールとの縮合反応により達成された。合成した化合物における TRAP Assay の結果から、クルクミンよりも TRAP 活性を有意に抑制する 53 を見出したため、53 の構造活性相関研究を行い、無置換のベンゼン環が TRAP 活性に影響を与えるパーツの1つであることが明らかとなった。さらなる構造活性相関研究を進めるために、53 と類似構造を有する当研究室所蔵の 1003 と 1025 の TRAP 活性を測定したところ、53 と同程度の TRAP 活性抑制作用を確認した。よって、1003 と 1025 の構造を基に活性増強を目的とした構造活性相関の検討と TRAP Assay の結果から、63 による TRAP 活性の抑制を確認した。

第6章では、TRAP 活性を 50%以下に抑制し、かつ細胞毒性の無い四化合物 (53, 1003, 1025, 63) に注目し、第2章で見出した高活性化化合物 4 との比較検討を行なった。TRAP Assay の結果、1003 と 63 は 4 よりも TRAP 活性を有意に抑制したことを確認した。TRAP 染色の結果、63 は他の化合物と比較して TRAP 陽性多核細胞数の減少や、細胞径の縮小も確認された。Pit Assay では、上記四化合物全てにおいて 4 よりもリン酸カルシウムの吸収面積を有意に減少させた。すなわち、四化合物は破骨細胞への分化を抑制するだけでなく、リン酸カルシウムの吸収を抑制することが明らかとなったことから、骨吸収も抑制することが示唆された。最後に、4 と 1003, 63 の TRAP 活性による濃度依存性を調査した結果、63 は 4 よりも約4倍 TRAP 活性を強力に抑制することを明らかにした。

IV. 結 語

骨粗鬆症に向けた創薬研究として、破骨細胞への分化抑制薬の創製を目的に、クルクミンに着目し、新規類縁体の設計と合成、活性評価を行なった。その結果、63 は、クルクミンよりも強い TRAP 阻害活性を有し、かつ低毒性な類縁体であり、破骨細胞への分化を阻害することが明らかとなった。また、リン酸カルシウムの吸収を抑制することから骨吸収も抑制すると示唆される。すなわち、破骨細胞への分化抑制作用による骨粗鬆症治療薬の新たなリード化合物となり得る 63 を見出すことに成功した。

論文審査担当者

主査 教授 三部篤（病態薬理学講座薬剤治療学分野）

副査 教授 中西真弓（生物薬学講座機能生化学分野）

副査 准教授 田村理（薬科学講座創薬有機化学分野）

論文審査の結果の要旨

申請者の研究テーマは、「破骨細胞への分化阻害活性を有する新規有機低分子の探索」である。申請者は、まず化合物スクリーニングを行うための評価系を構築した。それは、マウス腹水由来の単球マクロファージ RAW 264.7 細胞を RANKL 刺激により破骨細胞に分化させ、分化した細胞の破骨細胞マーカーである酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 活性を測定するものである。この TRAP 活性を阻害、すなわち破骨細胞への分化を抑制する化合物を探索した。具体的には、ウコンなどに含まれる黄色のポリフェノール化合物であるクルクミンを親化合物として様々な誘導体を合成し、その TRAP 活性阻害作用を測定した。その結果、クルクミンよりも TRAP 阻害作用が非常に強く、細胞毒性も示さない化合物を多数見いだした（化合物 No. 4、化合物 No. 1003 および化合物 No. 63）。これらの化合物は、TRAP 陽性多核細胞数の減少や細胞径の縮小だけでなく、リン酸カルシウムの吸収を抑制することも明らかとした。すなわち、申請者が見いだした化合物は骨吸収活性を抑制することが示唆された。本研究により新たに合成された化合物は、破骨細胞への分化抑制作用を有する骨粗鬆症治療薬の新たなリード化合物となり得ると考えられた。

試験・試問の結果の要旨

申請者は、上記の論文に沿った大量の結果を要領よくまとめて発表した。発表の際、研究の学術的背景や結果・考察を加え、その都度丁寧に説明した。また、追加の図をしっかりと準備し、説明の仕方も工夫していた。そのため、結果とその解釈が理解しやすく、質疑応答での非常に活発な議論につながった。

質疑応答での質問は、生物学的な研究の背景や TRAP アッセイの実験系に関する質問および化合物の合成法など多岐に及んだ。申請者は、全ての質問において、その意図を正しく理解し、これまでの報告などを踏まえながら丁寧に回答した。破骨細胞への分化抑制作用を有する骨粗鬆症治療薬の新たなリード化合物の発見は、骨粗鬆症治療薬を開発する上で非常に興味深い結果である。以上のことから、最終試験合格、博士（薬学）の学位にふさわしいものと考えられる。