



教授

西川恵三

経歴

共同研究者 なし

経歴

2005 年 筑波大学大学院修了・博士(医学)
取得

2005 年 東京医科歯科大学 研究員

2010 年 医薬基盤研究所 研究員

2011 年 大阪大学 助教 (2015 年より准教授)

2020 年 現職

ケミカルエピジェネティクスを活かした骨粗鬆症の予防効果をもつ食品成分の探索

1. 研究目的

衛生状態の改善や医療技術の進歩によって平均寿命が延伸した我が国では、高齢者の運動器障害によって要介護や寝たきりの患者が急増する問題が顕在化している。従って、健康寿命と生命寿命のギャップを生み出す原因になる運動器障害への対策は、超高齢化社会を背景に焦眉の急である。骨は、破骨細胞によって古い部分が壊され、新しい骨が骨芽細胞によって形成されることで新陳代謝される組織である。骨粗鬆症とは、骨破壊が骨形成を上回ることで、骨量の低下を生じる病態である。本研究では、運動器障害の主要因となる骨粗鬆症に注目し、新規の予防手段の開発に取り組む。

これまで国内外では骨粗鬆症の創薬研究が精力的に取り組まれており、様々な候補治療薬が生み出されている一方で、申請者らも新薬の開発において先導的な役割を果たしてきた (*Science* 319, 624-7, 2008, *J. Clin. Invest.* 120, 3455-65, 2010)。このため、昨今では、骨粗鬆症治療薬の充足感が高まりつつある。これに対して、近年では、骨粗鬆症を未病の段階で食い止める予防法に注目が集まっているが、効果的な方法が確立しているとは言い難い現状にある。そこで、本研究では、申請者が有効性を見出しつつあるエピゲノム創薬と食品科学を融合した学際的なアプローチを駆使することで、骨粗鬆症に対する新しい予防薬を探索することを目的とする。具体的には、「骨の形成を担う骨芽細胞」と「骨破壊にかかわる破骨細胞」の両方の細胞で重要な役割をもつことを申請者が見出した DNA の脱メチル化酵素 Kdm に注目する。Kdm に阻害効果をもつ食品化合物を探索し、骨破壊と骨形成を同時に操作することで骨粗鬆症を相乗的に予防する手段の確立を目標に掲げる

2. 研究方法

本研究では、*in silico* 解析によって Kdm に対して高い結合能をもつ候補化合物の選定を行い、選出された候補化合物を用いて、破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。Kdm の酵素活性部位に対して特異的に結合する候補化合物の探索は、ドッキング・スコアリングソフトウェア Glide を用いて行った (Friesner RA et al., *Journal of Medical Chemistry* 47, 1739-1749, 2004)。Glide による探索は次に述べる手順で行った。一連の階層フィルターを使用して、Kdm の酵素活性部位領域における結合可能な位置を検索する。ここで、酵素活性部位領域の形状と特性は、化合物のポーズ

(酵素活性部位領域に対する化合物の位置、方向、コアコンフォメーションおよび回転異性体コンフォメーションなど) をスコアリングするさまざまな場の組み合わせによって決定した。続いて、化合物のコンフォメーションの初期値は、化合物のねじれ角空間を最小値にする網羅的なデータ列挙から選択し、有望な化合物のポーズをもとに選定した。初期スクリーニングで用いたポーズから出発し、標準的な分子力学エネルギー関数(本解析では OPLS-AA 力場を利用)を距離依存性の誘電率モデルと組み合わせて使用することで、酵素活性部位領域の場に対する化合物を最小化する。そして、この方法で取得された 3 ~ 6 個の最低エネルギーのポーズに対してねじれ角空間の最小値の算出をモンテカルロ法によって行った。Glide は、溶媒がない条件下でも、従来の分子力学エネルギー関数が結合モードを予測するための合理的なモデルとして利用できる。しかし、異なる正味電荷を持つ化合物などをランク付けするには問題がある。この問題を解決するためには、ChemScore スコアリング関数の修正および拡張バージョンである GlideScore を実装した(Eldridge MD et al., *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 11, 425-445, 1997)。ただし、正しくドッキングされたポーズを選択するために、GlideScore、化合物 - 酵素活性部位領域との分子力学相互作用エネルギーおよび化合物のひずみエネルギーの組み合わせを行った。Emodel と呼ばれるこの複合スコアリング関数は、分子力学エネルギーまたは GlideScore のみの場合よりも、正しいポーズを選択するにはるかに優れていることを確認した。非常に重要な問題は、ドッキングに使用される Kdm の構造が一般に特定の化合物に適合するように最適化されないことがある。例えば、化合物のライブラリーを単一の剛直

な酵素活性部位領域の構造にドッキングする際、空洞が小さすぎるために一部の化合物がタンパク質の空洞に収まらないことがある。この解決のために、スコアリング関数、特に分子力学コンポーネントを変更することで、タンパク質および / または化合物の原子のファンデルワールス半径を縮小化することで、結合ポケットに追加のスペースを作成した。

3. 研究結果・考察

分子量が 150 から 900 までの天然物化合物 15083 化合物の情報を用いて、Kdm に対するドッキングシミュレーションを行い、結合親和性が高いと予想される候補化合物 200 種類を選定した。続いて、Kdm の内因性の基質である α ケトグルタル酸とのドッキングスコア (-12.185 kcal/mol) よりも優れた結合能を示した 14 種類の化合物に注目し、破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。その結果、破骨細胞分化を顕著に阻害する効果をもつ化合物を 3 種類、促進効果をもつ化合物を 1 種類同定することに成功した。

哺乳類の Kdm には、Kdma, Kdmb そして Kdmc の 3 つのパラログが存在するが、破骨細胞では Kdmb 並びに Kdmc が高発現する。近年、破骨細胞の初代培養を用いたシングルセル RNA シーケンシング (scRNA-seq) データを用いた疑時間解析の結果によると、破骨細胞の分化過程は 6 段階に大きく分類されることが示されている (Tsukasaki M et al., *Nature Metabolism* 2, 1382-1390, 2020)。具体的には、単球系のマーカーを発現する第 1 段階のクラスター、樹状細胞のマーカーを発現する第 2 段階のクラスター、膜ラフトアッセンブリ系のマーカーを発現する第 3 段階のクラスター、細胞増殖並びに RNA 代謝系のマーカーを発現する第 4 段階のクラスター、エネルギー代謝および破

骨細胞分化後期のマーカーを発現する第5段階のクラスター、破骨細胞機能である骨吸収関連のマーカーを発現する第6段階のクラスターである。本研究においても、破骨細胞分化過程（細胞分化開始後0、1および3日）の scRNA-seq データを Suratac によって結合し、クラスタリングした結果をUMAPにより二次元上にプロットした。さらに、Slingshot を用いて、疑時間解析を行ったところ、同じく6つの過程からなる分化系譜を作製することができた。即ち、破骨細胞の前駆細胞のマーカーである *Bcl6*、*Mafb* および *Irf8* を高発現する2種のクラスターから、破骨細胞分化の初期マーカーである *Nfkb2* や *Nfatc1* を発現する2種のクラスターを通して、破骨細胞の終末分化マーカーである *Ctsk* や *Oscar* を発現する2種のクラスターへ至る。この分化過程の情報をを用いて、Kdm の発現動態を解析したところ、Kdmc は破骨細胞の前駆細胞の段階から発現が高い一方で、Kdmb は細胞分化に伴って発現が高まることが明らかとなった。今後は、同定された候補化合物が破骨細胞分化のいずれの過程に作用して抑制機能を発揮するかの分子メカニズムを解析するとともに、骨粗鬆症病態モデルマウスに対する治療効果を検証することで、Kdm を標的とした骨粗鬆症治療の有効性の是非を明らかにする。

4. 研究成果

本研究に遂行するにあたり、ご支援いただいたサッポロ生物科学振興財団に深く感謝申し上げます。

5. 研究成果

1. Morimoto A, Kikuta J, Nishikawa K, Sudo T, Uenaka M, Furuya M, Hasegawa T,

Hashimoto K, Tsukazaki H, Seno S, Nakamura A, Okuzaki D, Sugihara F, Ninomiya A, Yoshimura T, Takao-Kawabata R, Matsuda H, and Ishii M, SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation, Novel method for gain-of-function analyses in primary osteoclasts using a non-viral gene delivery system. *Nature Communications* *inpress*.

2. Nishikawa K * and Ishii M, Novel method for gain-of-function analyses in primary osteoclasts using a non-viral gene delivery system. *Journal of Bone Mineral Metabolism* 27, 2020. * 責任著者

3. Suzuki T, Uruno A, Yumoto A, Taguchi K, Suzuki M, Harada N, Ryoike R, Naganuma E, Osanai N, Goto A, Suda H, Browne R, Otsuki A, Katsuoka F, Zorzi M, Yamazaki T, Saigusa D, Koshiha S, Nakamura T, Ikehata H, Nishikawa K, Suzuki N, Hirano I, Shimizu R, Oishi T, Motohashi H, Tsubouchi H, Okada R, Kudo T, Shimomura M, Kensler TW, Mizuno H, Shirakawa M, Takahashi S, Shiba D and Masayuki Yamamoto M, Space Travel of Mice Demonstrates Contribution of Nrf2 to Maintenance of Homeostasis. *Communication Biology* 7, 566, 2020.