

(続紙 1)

京都大学	博士（薬科学）	氏名	Michel Ngoma Mifundu
論文題目	Development of Bioactive Small Molecules for Controlling Mesenchymal Cells Fate (間葉系細胞の運命・分化を制御する生物活性小分子の開発研究)		
(論文内容の要旨)			
近年、世界的規模で高齢化社会を迎え、それに伴って骨粗しょう症をはじめとした老人性疾患が大きな問題となっている。骨粗しょう症は、代謝・リモデリングを続けている骨組織の吸収量が相対的に形成量を上回り、結果として骨量が減少する疾患である。この代謝・リモデリングの過程で、骨形成過程を担うのは骨芽細胞であり、骨吸収過程は破骨細胞が主に担っている。現在、骨粗しょう症の治療薬としては破骨細胞を標的としたビスホスホネート系薬剤が主流であるが投与方法・骨組織への過度の蓄積等に関する問題点などを抱えている。一方、骨芽細胞の機能亢進には主にタンパク製剤である骨形成因子(bone morphogenic protein (BMP)ファミリー分子など適用されているが、血中安定性などをはじめとしたタンパク製剤に起因する問題点などを抱えている。そこで、本研究では、幹細胞のなかでも、骨、脂肪、心筋、血管などの再構築を基盤とする再生医療への応用が期待されている間葉系細胞に着目し、間葉系細胞において多彩な分化能を誘導可能な生物活性小分子の探索・評価に適した評価系の構築と検証、ならびに分化誘導活性を有する生物活性物質のスクリーニング・開発・評価を目的に研究を行った。			
1. 間葉系細胞を用いたアルカリホスファターゼ誘導剤のスクリーニング系の構築と検証			
マウス間葉系細胞 C3H10T1/2 細胞、ヒト間葉系細胞 UEET12 細胞および UEET33 細胞などを用いて、初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性を測定可能な評価系の構築を検討した。アルカリホスファターゼ活性の測定については、化学発光基質(<i>p</i>-nitrophenyl phosphate)・蛍光発光基質(4-methylumbelliferyl phosphate)の両基質を用いて、細胞抽出液量、基質濃度、反応時間等を検討した。その結果、C3H10T1/2 細胞において分化誘導培地(アスコルビン酸/β-グリセロリン酸/デキサメタゾンを含む DMEM 培地)を用いることで、骨芽細胞への初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼを効率良く誘導可能となり、両基質を用いて検出することが可能となった。また、UEET12 細胞および UEET33 細胞は、未刺激な状態でのアルカリホスファターゼ活性が顕著に亢進していることが明らかになった。			
そこで、C3H10T1/2 細胞において確立した条件を用いて、レチノイン酸、BMP2、あるいはトリコスタチン A によるアルカリホスファターゼ誘導活性を検討した。その結果、トリコスタチン A はレチノイン酸、あるいは BMP2 によるアルカリホスフ			

ァターゼ誘導活性を顕著に増強させた。特に、レチノイン酸とトリコスタチン A との 2 剤の併用は、BMP2 単剤より約 5 倍程度強力にアルカリホスファターゼ誘導活性を示した。また、これら 3 剤の併用は BMP2 単剤刺激に比較して、約 10 倍程度強力にアルカリホスファターゼ誘導活性を示すことを明らかにした。なお、各条件下におけるアルカリホスファターゼ誘導活性は、分化誘導細胞の活性染色によっても確認した。さらに、C3H10T1/2 細胞において、各種シグナル伝達阻害剤や合成化合物を用いて、本スクリーニング系の検証を行った。その結果、トリコスタチン A を含む分化誘導培地において、radicicol、SU11652、staurosporine、AZT、DMAT、lactacystin、ellagic acid などアルカリホスファターゼ誘導活性物質として同定した。

2. 柑橘属果皮由来の生物活性小分子および誘導体を用いた間葉系細胞の分化誘導

上記 1 で確立したスクリーニング系を用いて、C3H10T1/2 細胞におけるアルカリホスファターゼ誘導活性を指標に、柑橘属果皮抽出物をスクリーニングした結果、サンプルコード A、B、C の 3 種のサンプルにアルカリホスファターゼ誘導活性を見出した。そこで、各サンプルから活性物質を各種クロマトグラフィーを用いて単離精製し、活性物質の構造を NMR および MS などの機器分析により解析した。その結果、サンプル A 由来の活性物質として aurapten、epoxyaurapten を同定し、サンプル B 由来の活性物質として nobiletin、tangeritin をはじめとした約 10 種類のフラボノイド類を同定し、サンプル C 由来の活性物質として hesperidin を同定した。特に強力かつ興味深い活性を示した hesperidin に関しては、hesperidin を原料として hesperitin および tamarixetin などの合成を行い、さらには、hesperitin を原料として 5,7,3'-triacetyl hesperitin などの各種誘導体の合成を行い、アルカリホスファターゼ誘導活性に関する構造活性相関研究を行った結果、多くの興味深い知見を得た。また、nobiletin, tangeritin, hesperidin, 5,7,3'-triacetyl hesperitin は、C3H10T1/2 細胞において、骨芽細胞への分化誘導のみではなく、脂肪細胞、筋芽細胞への分化誘導能を有することを各種染色法により明らかにした。

本研究では、骨、脂肪、心筋、血管などの再構築を基盤とする再生医療への応用が期待されている間葉系細胞に着目し、様々な機能性細胞（骨芽細胞、脂肪細胞、筋芽細胞など）への初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性を指標にしたハイスループットスクリーニング系を確立した。さらに、本スクリーニングの検証を行うとともに、柑橘属果皮由来の分化誘導物質として hesperidin 等を同定し、これら分化誘導物質が骨芽細胞、脂肪細胞、筋芽細胞などへの多分化能を有することを明らかにした。これらの結果は、間葉系細胞をはじめとした幹細胞の多彩な分化機構解析に適したツール開発研究に加えて、骨粗しょう症などに対する臨床分野への貢献が期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、骨、脂肪、心筋などの再構築を基盤とする再生医療への応用が期待されている間葉系細胞に着目し、様々な機能性細胞（骨芽細胞、脂肪細胞、筋芽細胞など）への初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性を指標にして、効率の良いスクリーニング系を確立した。また、各種細胞内シグナル伝達阻害剤などを用いて本スクリーニングの検証を行うとともに、柑橘属果皮由来の分化誘導物質として、hesperidinなどを同定後、各種誘導体を合成し構造活性相関研究を行った。さらに、hesperadinや5,7,3'-triacyetyl hesperitinなどがC3H10T1/2細胞において、骨芽細胞への分化誘導のみならず、脂肪細胞および筋芽細胞へも分化誘導させることを明らかにした。これらの知見は、間葉系細胞をはじめとした幹細胞の多彩な分化機構解析に適したツール開発研究に有用な知見を与えるとともに、今後、骨粗しょう症などに対する臨床研究分野への展開が期待される。

よって本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成24年2月27日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：平成25年3月31日以降