

平成 30 年 5 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08275

研究課題名(和文) 2型糖尿病に対する新規分子標的薬の確立

研究課題名(英文) Establishment of new molecular targeting drugs to type 2 diabetes

研究代表者

松田 友和 (Matsuda, Tomokazu)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20570344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵 細胞量に対して小胞体ストレスは負の影響を及ぼすことを明らかにしてきた。また、膵 細胞において、小胞体ストレスやAMPKの不活性化により誘導されるC/EBP は、膵 細胞量を減少させることを示してきた。これらの状況下でC/EBP がリン酸化修飾を受けること、さらにはその新たに発見されたリン酸化部位に対する酵素がカゼインキナーゼ2 (CK2)であることを同定した。AMPK不活性化や小胞体ストレス下で、CK2がC/EBP をリン酸化することを確認した。したがって、CK2阻害剤は膵 細胞に保護的に作用する新規糖尿病治療薬の標的になり得ると考えている。

研究成果の概要(英文)：During the development of type 2 diabetes, endoplasmic reticulum (ER) stress leads to pancreatic cell failure. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) is highly induced by ER stress and AMP-activated protein kinase (AMPK) suppression in pancreatic cells, and its accumulation reduces pancreatic cell mass. We investigated the phosphorylation state of C/EBP under these conditions. Casein kinase 2 (CK2) was found to co-localize with C/EBP in MIN6 cells. It phosphorylated S222 of C/EBP, a previously unidentified phosphorylation site. We found that C/EBP is phosphorylated by CK2 under AMPK suppression and ER stress, which are important from the viewpoint of the worsening pathological condition of type 2 diabetes, such as decreased insulin secretion and apoptosis of pancreatic cells. Therefore, we consider that CK2 inhibitors might reduce insulin resistance and play a protective role in pancreatic cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：小胞体ストレス 膵 細胞量 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病患者数は約950万人であり、糖尿病関連死の増加も社会問題となっている。2型糖尿病に対する治療薬は21世紀に入ってから急速に多様化しており、その病態に応じて様々な選択肢を有するようになってきている。しかし、2型糖尿病を「寛解」出来ても完全に「治癒」することは出来ないのが現状である。2型糖尿病の病態は、膵細胞からのインスリン分泌不全とインスリン標的臓器である肝臓、筋肉および脂肪組織などのインスリン抵抗性である。近年、膵細胞量が2型糖尿病の初期から減少していることが多くの報告より明らかとなってきており、2型糖尿病の「治癒」を目指すためには膵細胞保護を主眼とした薬剤の開発が望まれる。

これまでに代表者は、2型糖尿病における膵細胞不全の発症メカニズムの解明とその予防方法の開発に取り組んできた。膵細胞における「インスリンシグナル」が低下しても(*Nat Genet*.38:589, 2006)、あるいは恒常的に活性化しても(*Mol Cell Biol*.28:2971, 2008)、膵細胞量を減少させることを明らかにし、膵細胞量維持におけるインスリンシグナルの重要性を確立してきた。その一方で、前糖尿病状態の膵細胞には、遊離脂肪酸や炎症性サイトカインなどの多種多様な刺激を介して、「小胞体ストレス」という負荷が過剰にかかっている結果、通常ではほとんど発現していない蛋白質である C/EBP が蓄積し、膵細胞不全を促進させていることを明らかにしている。この C/EBP の発現を遺伝子学的(*J Clin Invest*.120:115, 2010)、あるいは既存の抗糖尿病薬により(*J Mol Endocrinol*.30:125, 2012)抑制することで、2型糖尿病モデルマウスの膵細胞量を増加させることを示してきた。また、C/EBP の全身ノックアウトマウスが2型糖尿病モデルマウスの耐糖能を改善させることや、肝臓や

骨格筋においても C/EBP の発現を抑制することが耐糖能を改善させる方向に作用することも、他の研究グループからも重ねて報告されている。これらの結果より代表者は直接的に C/EBP の発現誘導を抑制、あるいは減少させることが、膵細胞量の保護作用を有する糖尿病の完全な治癒を目的とした治療法の確立に結びつくのではないかと考えて検討を重ねてきた。最近になって C/EBP の安定性に重要な役割を担っている新規リン酸化部位を同定した。さらに同部位のキナーゼ候補としてカゼインキナーゼ2を同定した。カゼインキナーゼ2は種を超えて広範に分布しているセリン/スレオニンキナーゼの一種である。ノックアウトマウスなどの解析より、個体の生存と発生において必須であることや、細胞レベルの研究においても細胞周期の進行に重要な役割を果たしていることが報告されている。また、多数の細胞内基質の存在が知られているが、個々の基質リン酸化の生理的な役割に関してはほとんどわかっていない。しかし、カゼインキナーゼ2は癌研究の分野で注目を集めている。カゼインキナーゼ2を阻害することで、多くの癌細胞の増殖を抑制することが報告されており、現在は、多発性骨髄腫に対する抗癌剤として臨床試験の第2相試験が進行中である。興味深いことに、カゼインキナーゼ阻害剤は抑制作用やアポトーシス誘導作用を有するにも関わらず、正常細胞にはそのような作用を発揮しないという特徴を持っている。実際に、カゼインキナーゼ2阻害剤は、動物モデルに対して腫瘍以外の正常組織には悪影響を及ぼさないことが確認されており、臨床試験の第1相試験も終了していることから、その安全性は確認されている。さらには、動物モデルにおいては IL-6 の発現の抑制や、糸球体腎炎進展の抑制の報告もある。C/EBP は、元来 IL-6 を誘導する因子として同定された分子であり、これらの結果から

もカゼインキナーゼとの関与が示唆される。以上より、代表者は抗癌剤として臨床試験が行われているカゼインキナーゼ阻害剤が細胞の C/EBP の発現を抑制するだけでなく、肝臓や骨格筋などの全身の代謝関連臓器における C/EBP の発現を抑制することで抗糖尿病に作用するという仮説を構築した。代謝におけるカゼインキナーゼ 2 の役割がほとんどわかっていないことや、カゼインキナーゼ 2 を阻害した時に、C/EBP 以外の様々な因子の発現や作用にも影響を及ぼすことが予想されるという側面もある。しかし、抗癌剤としてはあるが、実際に臨床試験の第 2 相試験を実施中の薬剤であることを考慮すると、経口剤の分子標的薬剤として治療を目指した糖尿病治療の新たな枠組みの第一歩となる可能性を有した大変興味深い研究と考える。

## 2. 研究の目的

これまでに代表者は 2 型糖尿病における膵 β 細胞量維持機構の解明に従事してきた。その一環として、小胞体ストレスにより膵 β 細胞に蓄積する C/EBPβ が膵 細胞不全の一因となっており、その発現抑制が膵 β 細胞保護に作用することを明らかにした。代表者の予備検討により、カゼインキナーゼ 2 が新規リン酸化部位を介して C/EBP の発現に重要な役割を担っていることを明らかにしている。そこで、そのカゼインキナーゼ 2 が C/EBP の発現に及ぼす影響を明らかにするとともに、カゼインキナーゼ 2 の糖代謝に及ぼす影響を明らかにし、カゼインキナーゼ 2 阻害剤が膵 細胞保護作用を有する 2 型糖尿病の治療を目的とした新規の分子標的薬剤となり得ることを示すことを目的としている。

## 3. 研究の方法

( 1 ) Dominant Negative(DN)-AMPK および HA-C/EBP を用いて、C/EBP のリン酸化部位を質量分析法にて検索した。同定され

たリン酸化部位の変異体を作成し、DN-AMPK との相互作用に及ぼす影響や、C/EBP の安定化に及ぼす影響を評価した。

( 2 ) Group-based phosphorylation scoring(GPS) method により新たに同定した C/EBP の安定性に関与するリン酸化部位のキナーゼ候補の検索を施行した。候補キナーゼの阻害剤を用いて、MIN6 細胞に小胞体ストレスを負荷することで増加する C/EBP の発現量に及ぼす効果を検討した。有力な候補キナーゼとして絞り込んだ casein kinase 2 (CK2) が MIN6 細胞やマウスの単離膵島に及ぼす影響を検討した。

( 3 ) CK2 の C/EBP との関係、膵 細胞での役割について、マウスの膵 細胞株である MIN6 細胞及びマウスの単離膵島を用いて、分子生物学的評価により検討した。

( 4 )膵 細胞特異的 C/EBP トランスジェニック(TG)マウスに、CK2 阻害剤である emodin を投与し、膵 細胞量や全身の耐糖能に及ぼす影響を解析した。

## 4. 研究成果

( 1 ) 質量分析法の結果より、コントロールと比較して DN-AMPK により C/EBP の 222 番目のセリン(S222)がマススペクトル比で約 10 倍リン酸化していることが明らかになった。DN-AMPK と C/EBP を共発現させると、C/EBP の発現は増加するが、セリンをアラニンに置換した S222A-C/EBP は、DN-AMPK による C/EBP の発現増強作用を完全に消失させた。強発現させた C/EBP をシクロヘキシミド(CHX)処理後すると時間経過とともに発現量が約 80%に減少した。既報で C/EBP の安定化に重要な役割を果たしているとされている 188 番目のスレオニンのアラニンへの変異体(T188A-C/EBP ) では発現量は約 60 % になったが、S222A-C/EBP の発現量は約 20%にまで低下した。C/EBP は小胞体ストレスにより転写が誘導されることは知られていたが、シク

ロヘキシミド(CHX)処理後の蛋白質分解も小胞体ストレスにより安定化していることが明らかになった。一方、S222A-C/EBP では小胞体ストレスによる安定化効果は認めなかった。

(2) GPS method により、Casein kinase 1(CK1) および Casein kinase 2(CK2) が C/EBP $\beta$  の S222 のキナーゼ候補として検出された。まず、CK1 阻害剤である D4476 を MIN6 細胞に負荷したが、tunicamycin(Tm) による C/EBP の発現誘導に対する抑制効果は認めなかった。一方、CK2 阻害剤である benzimidazole は、Tm による C/EBP の発現誘導を完全に消失させた。

(3) CK2 は小胞体ストレス関連分子との相互作用が多く報告されており、酵素活性をもつ、酵素活性を調節するの二つのサブユニットで構成される。MIN6 細胞において、通常状態では CK2 は主に核に、CK2 は主に細胞質に分布することがわかった。一方、小胞体ストレス関連分子である C/EBP を強発現した MIN6 細胞および膵細胞特異的 C/EBP TG マウスの膵細胞では、C/EBP と CK2、CK2 は、ともに核において共局在していた。次に GST-C/EBP と recombinant CK2 を用いた Pull-down assay より、C/EBP と CK2 は in vitro で直接結合することが示された。さらに、C/EBP を強発現した Min6 細胞を CK2 阻害剤で処理し phospho tag-SDS-PAGE を行ったところ、C/EBP の脱リン酸化が示された。また、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを MIN6 細胞に負荷すると C/EBP の発現が亢進するが、CK2 阻害剤により抑制された。さらに、MIN6 細胞において、CK2 を欠損させると、小胞体ストレスにより誘導される C/EBP、CHOP、p-c-jun などの unfolded protein response(UPR)関連分子の発現は抑制されていた。

(4) 次に、CK2 が全身の耐糖能および膵

細胞量に及ぼす影響を検討した。

膵細胞特異的 C/EBP TG マウスに CK2 阻害剤である emodin を投与したところ、随時血糖や体重には有意な差を認めなかったが、空腹時血糖の有意な改善および Intraperitoneal Glucose Tolerance Test(IPGTT)における耐糖能の改善を認めた。

また、TG マウスで低下していた膵細胞量は、emodin 投与により有意に増加していた。

以上より、CK2 は小胞体ストレス関連分子である C/EBP と相互作用を有している可能性が示唆された。また、CK2 阻害剤は、糖尿病においてインスリン抵抗性を改善させるのみならず、膵細胞に対しても保護的に作用することが示唆された。

したがって、カゼインキナーゼ 2 阻害剤が膵細胞保護作用を有する 2 型糖尿病の治癒を目的とした新規の分子標的薬剤となり得ると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

Matsuura Y, Matsuda T, The role of casein kinase 2 in ER stress associated pancreatic cell failure、8th AASD Scientific Meeting、2016.10.28、台北(台湾)

松田友和、2 型糖尿病に対する新規分子標的標的治療薬の確立、第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、2018.5.25 東京国際フォーラム(東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 友和 (MATSUDA, TOMOKAZU)  
神戸大学大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号：20570344