

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860749

研究課題名(和文)新規糖尿病治療薬としてのEpac2A活性化化合物の同定

研究課題名(英文)Identification of Epac2A agonists as novel anti-diabetic agents.

研究代表者

菅原 健二 (Sugawara, Kenji)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70645217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新規糖尿病治療薬開発を見据え、Epac2A活性化化合物の同定を目的とした。はじめにEpac2A活性化効果が報告されているcAMPやスルホニル尿素薬をクエリーとしたin silicoスクリーニングおよびインスリン分泌アッセイにより、インスリン分泌増強効果を有する10化合物を同定した。このうち、Rap1-GTPアッセイにより、1化合物においてEpac2A活性化効果が示唆された。構造活性相関情報を元に合成した新規誘導体の経口投与により、野生型マウスや2型糖尿病モデル動物においてグルコース負荷後の耐糖能は有意に改善された。よって、本誘導体は糖尿病治療薬開発のリード化合物となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We attempted to discover novel small molecules that activate Epac2A by in silico similarity search using sulfonylureas and cAMP as queries, followed by the measurement of insulin secretion. Among 170 compounds selected by in silico similarity search, we found ten compounds that stimulate insulin secretion. By Rap1-GTP assay, one compound was indicated to stimulate Rap1 which is a substrate of Epac2A. Based on the structure-activity relationship of its derivatives, we identified compound X as being the most potent insulin secretagogue. Oral administration of compound X significantly suppressed rises in blood glucose levels after glucose load in wild-type mice and improved glucose tolerance in the Goto-Kakizaki (GK) rat, a model of type 2 diabetes with impaired insulin secretion. Our data indicate that compound X is a novel insulin secretagogue, which serves as a lead compound for development of a new anti-diabetic agent.

研究分野：糖尿病学

キーワード：Epac2A インスリン分泌 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人の2型糖尿病は膵臓からのインスリン分泌障害を病態の特徴とするため、その治療においてはスルホニル尿素薬(SU薬)およびインクレチン関連薬などのインスリン分泌促進薬が広く使用されている。SU薬の標的分子は K_{ATP} チャネルを構成するSU受容体(SUR1)が知られている。しかし、SUR1を介した経路は K_{ATP} チャネルを不活性化することで、血糖値が高くない状況下でも強いインスリン分泌促進作用を示すため、临床上副作用として低血糖発作の原因となる。

(2) 食物刺激により腸管内分泌細胞から分泌されるインクレチンホルモンは、膵細胞膜上の特異的受容体に結合し、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を増強する。この増幅経路において、cAMP結合蛋白質であるEpac2Aは重要な役割を担うことが知られている。したがって、Epac2Aは新たな糖尿病治療薬の標的蛋白質として注目されている。

(3) 近年、SU薬はEpac2Aにも直接結合し、活性化するという新たなメカニズムが発見された。また、Epac2AノックアウトマウスではSU薬のインスリン分泌促進効果が著しく低下することから、SU薬によるインスリン分泌促進作用は、SUR1を介した経路に加えてEpac2Aを介した経路も重要であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究ではEpac2A選択的な活性化化合物の同定により、グルコース濃度依存的なインスリン分泌増強効果を有する一方で、SU薬で認める低血糖発作のリスクが無い、新規糖尿病治療薬の開発のための基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in silicoスクリーニング

Epac2A活性化化合物同定の第一段階としてin silicoスクリーニングにより候補化合物を取得する。具体的には、約500万化合物からなる市販化合物データベースを用いて、類似構造検索およびフィルタリングの2ステップにより、候補化合物を200種類程度まで絞る。類似構造検索の後、SU骨格やcAMPに特徴的なプリン骨格を有する化合物はこの段階で除外する。

以上のin silico解析により、最終的に類似性を指標に上位200種類の低分子量化合物をデータベースより抽出する。

(2) 一次スクリーニング

膵細胞株MIN6細胞を10 μ M化合物にて刺激し、分泌されたインスリンを測定する。化

合物によるインスリン分泌促進効果を比較し、2倍以上の増強効果を認めた化合物をヒット化合物とした。

(3) 候補化合物によるEpac2A活性化効果の検証

候補化合物がEpac2Aを活性化するかをGTP-Rap1アッセイで検証する。具体的には、MIN6を用い、化合物刺激の有無でGTP型Rap1量を比較検討する。

また、Epac2Aに対する直接作用は、Epac2A FRETセンサーを発現させた膵細胞株を用いて検証する。Epac2A FRETセンサーは立体構造変化を伴い活性化されるとFRET反応が低下するので、この低下を指標に候補化合物がEpac2Aを活性化しうるか検討する。

(4) 誘導体の合成および構造活性相関情報の取得

種々の誘導体合成はナード研究所に委託する。また、MIN6を用い、各誘導体によるインスリン分泌促進効果を指標に構造活性相関情報を取得する。

(5) 化合物によるインスリン分泌促進効果の検討

上記にて同定したEpac2A特異的活性化化合物で刺激した膵細胞株や単離膵島を用いて、化合物によるインスリン分泌促進特性を明らかにする。具体的にはグルコース濃度を低濃度から高濃度に変化させ、化合物によるインスリン分泌への影響を評価する。また、野生型マウスを用いた膵灌流実験により、化合物によるインスリン分泌促進効果の動態を検証する。

(6) in vivoにおけるインスリン分泌促進効果および血糖降下作用の検証

正常マウスに化合物を投与し、随時やグルコース負荷後の血糖プロファイル、血清インスリン値の解析から化合物の血糖降下作用を検証する。

インスリン分泌障害により糖尿病を発症するGKラットでも同様に検討し、新規糖尿病治療薬としての可能性を検証する。

4. 研究成果

(1) in silicoスクリーニング

Epac2Aに対する活性化効果が既に明らかにされているcAMPやSU薬をクエリーとして、in silico類似構造検索を行った(図1)。さらに、SU骨格やプリン骨格を除外するフィルタリングにより、約200種類の化合物を抽出した。そのうち、最終的に入手可能であった170種類の化合物を候補化合物とした。

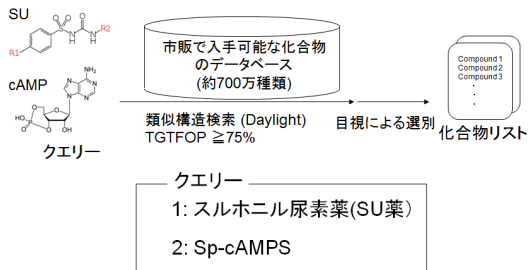


図1 in silico スクリーニングの模式図

(2) 一次スクリーニング

化合物による Epac2A 活性化効果の検証には単一細胞を用いた複数回の実験系が必要であることから、ハイスループットでの解析が困難である。そこで、in silico スクリーニングで抽出した 170 種類の化合物を対象とし、MIN6 細胞におけるインスリン分泌促進効果を指標に一次スクリーニングを行った。その結果、約 170 種類の化合物のうち、10 化合物で高いインスリン分泌促進作用を示すことが明らかとなった(図 2)。また、そのうち 9 化合物は低濃度グルコース条件下では効果を認めず、分泌促進効果のグルコース依存性が示唆された。

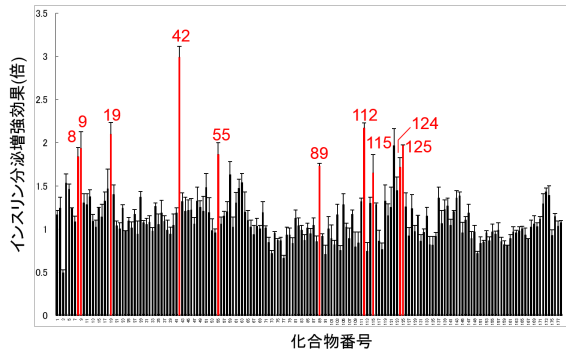


図2 一次スクリーニングの結果(MIN6 細胞)

(3) 候補化合物による Epac2A 活性化効果の検証

Epac2A は低分子量 G 蛋白質である Rap を活性化することから、化合物刺激による Rap1 の活性化を指標に、化合物による Epac2A への作用を検証した。その結果、一次スクリーニングで得られた 10 化合物のうち、1 化合物で Rap1 の活性化が認められ、Epac2A の活性化効果が示唆された。

次に、この Rap1 活性化が直接 Epac2A の活性化を介しているか確認するため、FRET 実験を行ったところ、いずれの化合物においても FRET 変化を認めなかった。しかし、Epac2A の FRET センサーの感度は他のセンサーよりも低いことが知られている。そこで、Rap1 を活性化した 1 化合物に注目し、さらに高活性化化合物を同定する必要性が考えられた。

(4) 誘導体の合成および構造活性相関情報の取得

高活性化化合物取得の第一段階として、構造活性相関情報を得るため、種々の化学修飾を加えた新規誘導体を計 130 種類合成した。MIN6 細胞を用いたインスリン分泌アッセイにより、誘導体間でインスリン分泌促進効果を比較検討したところ、カルボン酸修飾を加えた化合物(化合物 X とする)において高いインスリン分泌促進能を認めた。

(5) 化合物 X によるインスリン分泌促進効果の検討

MIN6 細胞を用いた検討では、化合物 X は元の化合物よりも高いインスリン分泌能を有しており、より低濃度(3 μ M)においてもインスリン分泌促進作用を示した(図 3)。また、マウス膺灌流実験においても、化合物 X 刺激は急峻で一過性のインスリン分泌を促すことが示された。

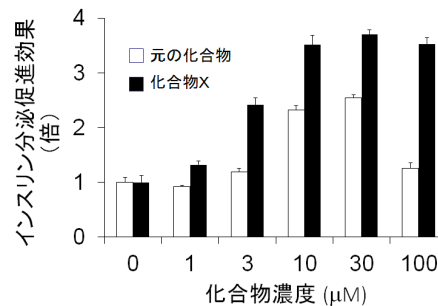


図3 化合物 X によるインスリン分泌促進効果 (MIN6 細胞)

(6) in vivo におけるインスリン分泌促進効果および血糖降下作用の検証

野生型マウスに化合物 X を経口投与し、血中インスリン濃度の推移を観察したところ、コントロールと比較して投与 20 分後に有意に上昇することが認められた。次に、野生型マウスを用いた OGTT による検討では、化合物 X の経口投与によりグルコース投与後の血糖上昇が有意に抑制されることが明らかとなった。効果は投与量依存的であり、また、いずれの時間においても明らかな低血糖発作も誘発しなかった。

さらに、インスリン分泌障害による 2 型糖尿病モデルラットである GK ラットにおいても同様の検討を加えたところ、グルコース負荷後の有意な血糖上昇抑制効果が確認された(図 4)。

化合物 X は従来の糖尿病治療薬とは異なる構造や特性を有しており、今後、新たな糖尿病治療薬開発のリード化合物としての有用性が期待される。

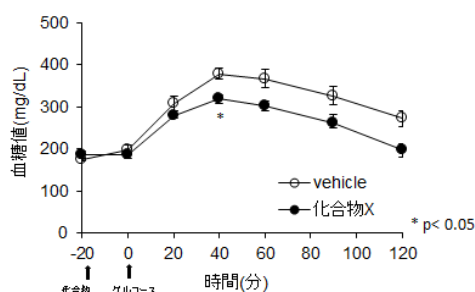


図4 化合物X投与後の経口ブドウ糖負荷試験(GKラット)

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)

[雑誌論文](計 3件)

Sugawara K, Shibasaki T, Takahashi H, Seino S. Structure and functional roles of Epac2 (Rapgef4). **Gene**, 575:577-83. (査読有)

DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.029.

Gheni, G., Ogura, M., Iwasaki, M., Yokoi, N., Minami, K., Nakayama, Y., Harada, K., Hastoy, B., Wu, X., Takahashi, H., Kimura, K., Matsubara, T., Hoshikawa, R., Hatano, N., Sugawara, K., Shibasaki, T., Inagaki, N., Bamba, T., Mizoguchi, A., Fukusaki, E., Rorsman, P. & Seino, S. (2014) Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion, **Cell reports**. **9**: 661-73. (査読有)

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.09.030.

Takahashi, T., Shibasaki, T., Takahashi, H., Sugawara, K., Ono, A., Inoue, N., Furuya, T. & Seino, S. (2013) Antidiabetic sulfonylureas and cAMP cooperatively activate Epac2A, **Science signaling**. **6**: ra94. (査読有)

DOI: 10.1126/scisignal.2004581.

[学会発表](計 5件)

Sugawara K, Yokoi N, Hoshikawa R,

Matsubara T, Seino S. Evaluation of the pharmacokinetics of a novel anti-diabetic agent using conventional LC/MS/MS. The 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 5-9, 2016, サンアントニオ (アメリカ)

菅原健二、本田洸平、霊園良恵、松本明郎、森 一郎、中谷晴昭、清野 進. KATPチャンネルを標的とした新規低分子化合物の同定とその特性解析. 2016年5月19日、第59回日本糖尿病学会年次学術集会、国立京都国際会館(京都)

Sugawara K, Shibasaki T, Minami K, Matsumoto A, Seki C, Mori I, Nakaya H, Seino S. Identification of a novel small molecule targeting KATP channels to stimulate insulin secretion. April 11, 2015, 16th International Group on Insulin Secretion, ニース(フランス)

下野琴絵、菅原健二、柴崎忠雄、清野 進. インスリン分泌増強効果を有する新規低分子化合物の同定とその特性解析. 2014年10月17日、第87回日本生化学会大会、国立京都国際会館(京都)

下野琴絵、菅原健二、柴崎忠雄、清野 進. インスリン分泌増強効果を有する新規低分子化合物の同定とその特性解析. 2014年5月24日、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪国際会議場(大阪)

[図書](計 1件)

菅原健二、清野 進. 西村書店. インスリン分泌. **糖尿病学** p39-50, 2015.

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅原 健二 (SUGAWARA, Kenji)
神戸大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：70645217