

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670406

研究課題名(和文)肥満・メタボリック症候群に対する新しい治療薬の開発：ARIA阻害化合物の合成

研究課題名(英文) Developing drugs of a new class for the treatment against obesity and metabolic syndromes: synthesis of chemical compounds that inhibit ARIA

研究代表者

池田 宏二 (IKEDA, KOJI)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90423871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ARIA欠損マウスは肥満・メタボリック症候群に抵抗性を示す。私達は以前にC30がARIA阻害作用を有することを見出し、今回C30類似化合物のARIA阻害作用を検討した。70種類の化合物を抽出し、ARIA阻害作用を検証した結果、基本骨格が同一である4つの化合物にARIA阻害作用があることが判明した。4つの化合物はC30に比して低い細胞毒性を示したものの、ARIA阻害作用はC30に比べて明らかに弱く、優れたARIA阻害剤を開発する手がかりを得ることは残念ながら叶わなかった。そこで私達はARIA阻害化合物を探索するための新しいスクリーニング系の開発を行い、アルファスクリーニングの系を構築した。

研究成果の概要(英文)：ARIA-KO mice were resistant against obesity and obesity-related metabolic syndromes. We previously identified a compound (C30) that inhibits ARIA function. Here we analyzed effects of compounds structurally related to C30 on ARIA functions. We picked up 70 compounds and analyzed their inhibitory effect on ARIA. Four C30-like compounds practically inhibited ARIA function, and they all contain the same basic structure. However, these four compounds showed less inhibitory effect on ARIA function comparing to C30, while they showed lower cytotoxicity than C30. We then tried to establish a new assay method for compound screening for ARIA-inhibitor, and constructed cell free alpha-screening system that could detect inhibitory effect of compounds against ARIA.

研究分野：血管生物学

キーワード：肥満 メタボリック症候群 脂肪血管新生 ARIA

### 1. 研究開始当初の背景

私達が世界に先駆けて発見した新規遺伝子 ARIA は血管新生を抑制的に制御する分子である。ARIA 欠損マウスでは下肢虚血モデルにおける虚血肢の血流回復が著名に改善し、虚血誘導性血管新生が顕著に亢進することがわかった。その後の検討で、ARIA は白色・褐色脂肪組織において高い発現を示すことが明らかとなった。脂肪組織は非常に血管に富む臓器であり、その血管密度は脂肪組織の機能と密接に関係することが知られている。肥満に伴い脂肪組織の血管密度は低下し、褐色脂肪では熱産生・エネルギー消費の低下から肥満の更なる進行を招き、また白色脂肪は低酸素に陥る結果、慢性炎症が惹起され、肥満関連代謝異常が引き起こされる。ARIA 欠損マウスを用いて代謝表現型を検討した結果、ARIA 欠損マウスでは脂肪組織の血管新生が亢進する結果、肥満時でも褐色・白色脂肪組織の血管密度が維持され、エネルギー消費が低下しないため肥満抵抗性を示し、また白色脂肪の慢性炎症が軽減する結果、メタボリック症候群を発症しにくいことが明らかとなった。従って、ARIA の阻害は全く新しい肥満・メタボリック症候群の治療法となる可能性が高いと考えられた。ARIA は PTEN との結合を介してその効果を発揮するため、ARIA 阻害化合物の作用点として、ARIA-PTEN 結合阻害に焦点を当てた。私達は *in silico* スクリーニングを行い、ある化合物 (C30) が ARIA-PTEN 結合阻害作用を有することを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究課題の目的は C30 類似化合物の ARIA 阻害作用を検討し、ARIA 阻害化合物のリード化合物を得るための情報を収集することである。

### 3. 研究の方法

70 種類の C30 類似化合物を既存の化合物リストから抽出し、その ARIA-PTEN 阻害作用を検証した。

### 4. 研究成果

70 種類の C30 類似化合物の ARIA 阻害作用を検討した結果、4 つの C30 類似化合物に ARIA-PTEN 阻害作用があることが判明した。これら 4 つの化合物はいずれも同じ基本骨格を有していた。4 つの化合物は C30 に比して総じて低い細胞毒性を示したものの、ARIA-PTEN 結合阻害作用は C30 に比べて明らかに弱く、優れた ARIA 阻害剤を開発する手がかりを得ることは残念ながら叶わなかった。

そこで私達は化合物スクリーニングを新たに行うためのスクリーニング系の開発を行った。リコンビナント蛋白を用いた cell free のアッセイ系をアルファスクリーニン

グの系で構築することとし、複数のリコンビナント ARIA, PTEN を合成・精製した。PTEN は全長の N 末あるいは C 末に GST タグを付けたリコンビナントタンパクを大腸菌を用いて合成・精製した。一方 ARIA は初めに細胞内ドメインに His タグを付けたリコンビナントタンパクを大腸菌により合成・精製したが、リコンビナント PTEN との結合を検出することが出来なかった。次に ARIA 全長に His タグを付けたリコンビナントタンパクを大腸菌により合成・精製した。ARIA 全長-His はリコンビナント PTEN と結合したが、その親和性は予想以上に低かった。そこで ARIA 全長に FLAG タグを付けたリコンビナントタンパクを培養細胞を用いて合成・精製した。このリコンビナント ARIA-FLAG は PTEN と良く結合した。次にアルファスクリーニングの系を用いて ARIA と PTEN の結合を検出するため、アクセプター・ドナービーズの組み合わせを検討した。Glutathione、anti-GST 抗体、anti-FLAG 抗体のビーズを用いて検討し、最終的に Glutathione アクセプター・anti-FLAG 抗体ドナービーズの組み合わせで、リコンビナント ARIA-PTEN の結合を検出できるところまで到達した。しかし、現状ではバックグラウンドが相応に高く、Signal/Noise 比 (S/N 比) が悪いことが改善すべき問題として残っている。今後はバッファー中に界面活性剤や BSA など加えることでバックグラウンドを低減させ、S/N 比を改善させることを目指した実験を行っていく予定である。

### 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)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Diabetes-related ankyrin repeat protein (DARP/Ankrd23) modifies glucose homeostasis by modulating AMPK activity in skeletal muscle.

Shimoda Y, Matsuo K, Kitamura Y, Ono K, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, Wu T, Chen J, Emoto N, Ikeda K, *PLoS One*. 2015;10(9):e0138624 (査読あり; doi: 10.1371/journal.pone.0138624)

2. Targeted activation of endothelin-1 exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension.

Satwiko MG, Ikeda K, Nakayama K, Yagi K, Hocher B, Hirata KI, Emoto N, *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;465(3):356-62 (査読あり; doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.002)

3. Pyk2 aggravates hypoxia-induced

pulmonary hypertension by activating HIF-1 $\alpha$ .

Fukai K, Nakamura A, Hoshino A, Nakanishi N, Okawa Y, Ariyoshi M, Kaimoto S, Uchihashi M, Ono K, Tateishi S, **Ikeda K**, Ogata T, Ueyama T, Matoba S, *Am J Physiol Circ Physiol*. 2015;308(8):H951-9 ( 査読あり ; doi: 10.1152/ajpheart.00770.2014 )

4. Loss of Apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) protects blood vessels from atherosclerosis.

Matsuo K, Akakabe Y, Kitamura Y, Shimoda Y, Ono K, Ueyama T, **Matoba S**, Yamada H, Hatakeyama K, Asada Y, Emoto N, **Ikeda K**, *J Biol Chem*. 2015;290(6):3784-92 ( 査読あり ; doi: 10.1074/jbc.M114.605287 )

5. Transplantation of periaortic adipose tissue from angiotensin receptor blocker-treated mice markedly ameliorates atherosclerosis development in apoE-/- mice.

Irie D, Kawahito H, Wakana N, Kato T, Kishida S, Kikai M, Ogata T, **Ikeda K**, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015;16(1):67-78 ( 査読あり ; doi: 10.1177/1470320314552434 )

6. Aging differentially alters the expression of angiogenic genes in a tissue-dependent manner. Shimoda Y, Matsuo K, Ono K, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, **Ikeda K**, *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(4):1243-9 ( 査読あり ; doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.098 )

7. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by  $\alpha$ 1-adrenergic receptors. Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, **Ikeda K**, Yamada H, Oh H, Ueyama T, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(10):3811-6 ( 査読あり ; doi: 10.1073/pnas.1315359111 )

8. Inhibition of p53 preserves Parkin-mediated mitophagy and pancreatic  $\beta$ -cell function in diabetes. Hoshino A, Ariyoshi M, Okawa Y, Kaimoto S, Fukai K, Iwai-Kanai E, **Ikeda K**, Ueyama T, Ogata T, Matoba S, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(8):3116-21 ( 査読あり ; doi: 10.1073/pnas.1318951111 )

9. Manipulation of cardiac phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling by apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) regulates cardiomyocyte death during doxorubicine-induced cardiomyopathy. Kitamura Y, Koide M, Akakabe Y, Matsuo K, Shimoda Y, Soma Y, Ogata T, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, **Ikeda K (corresponding author)**, *J Biol Chem*. 2014;289(5):2788-800 ( 査読あり ; doi: 10.1074/jbc.M113.508143 )

[学会発表](計 7件)

1. A novel angiogenic adipokine Neuregulin-4 preserves metabolic homeostasis by regulating adipose tissue angiogenesis.

Dhite Bayu Nugroho, **Koji Ikeda**, Agian Jeffilano Barinda, Donytra Arby Wardhana, Ken-ichi Hirata, Noriaki Emoto  
*American Heart Association 2015 Scientific Session*, November 7-11, 2015 at Orlando, FL

2. Signaling crosstalk between endothelial cell and mature adipocyte regulates adipose tissue angiogenesis and homeostasis

**Koji Ikeda**

Cold Spring Harbor Asia Session

第38回日本分子生物学会年会 2015年12月4日 神戸

3 血管内皮-成熟脂肪細胞クロストークによる脂肪血管新生制御と脂肪組織恒常性維持機構の解明

**池田 宏二**

日本内分泌学会学術総会 2016年4月21日 京都

4. Identification and characterization of a novel gene that regulates lipolysis to preserve metabolic homeostasis  
Donytra Arby Wardhana, **Koji Ikeda**, Noriaki Emoto, Ken-ichi Hirata

**第80回日本循環器学会総会** 2016年3月19日 仙台

5. Vascular senescence-messaging secretome disrupts metabolic function of mature adipocytes

Agian Jeffilano Brinda, **Koji Ikeda**, Noriaki Emoto, Ken-ichi Hirata

**第80回日本循環器学会総会** 2016年3月18日 仙台

6. A novel angiogenic adipokine neuregulin-4 preserves metabolic homeostasis by regulating adipose tissue angiogenesis

Dhite B. Nugroho, Koji Ikeda, Noriaki Emoto, Ken-ichi Hirata

**第80回日本循環器学会総会** 2016年3月18日 仙台

7. 血管内皮-成熟脂肪細胞ネットワークによる脂肪血管新生制御と脂肪組織恒常性維持機構

**池田 宏二**、Dhite Bayu Nugroho、江本 憲昭

Cardiovascular and Metabolic Week 2015  
2015年12月12日 神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/clinical/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 宏二 (IKEDA KOJI)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：9042371

### (2) 研究分担者

該当なし。

### (3) 連携研究者

該当なし。