

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09886

研究課題名(和文) 新たなゲノム創薬手法による新規2型糖尿病治療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of novel therapeutic target for type 2 diabetes through genome-based drug discovery

研究代表者

今村 美菜子 (Imamura, Minako)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00596124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイド関連解析(GWAS)によりこれまでに200以上の2型糖尿病の疾患感受性遺伝子領域が同定されている。我々はGWASの成果を応用した新しいゲノム創薬手法により複数の2型糖尿病に対する新規の治療薬候補を同定した。本研究ではその一つであるKIF11阻害剤の血糖改善効果を2型糖尿病モデルマウスを用いて評価した。KIF11阻害薬は肥満2型糖尿病モデルマウスの耐糖能障害を改善し、その機序は肝臓でのインスリン抵抗性改善であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のゲノム解析技術の進歩により、これまでに多くの2型糖尿病をはじめとする生活習慣病の疾患感受性遺伝子領域が同定されてきた。しかしながら、これらの成果の臨床への還元は十分に達成されておらず、ヒトゲノム研究成果の効率的な臨床応用手法の開発が現在の課題のひとつとなっている。本研究では新しいゲノム創薬手法により同定された新規候補治療薬の効果を *in vivo* 実験系で検証し得たことから、この創薬手法が有用であり、ゲノム研究成果の効率的な臨床応用に貢献しうることを示した。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide association studies (GWAS) have identified more than 200 genetic loci associated with susceptibility for type 2 diabetes (T2D). We have previously proposed several new potential pharmacological targets for T2D treatments using systematic bioinformatics approach integrating the findings of GWAS for T2D, and biological or pharmacological information from various databases. KIF11 is one of the potential therapeutic targets identified by the *in silico* pipeline. We have demonstrated that administration of KIF11 inhibitor ameliorated impaired glucose tolerance on db/db mice through increasing the insulin sensitivity and suppressing hepatic glucose production. The results suggest that our GWAS-based drug discovery platform is useful to identify novel drug targets for the treatment of common diseases, such as T2D.

研究分野：生活習慣病の遺伝要因の解明とその臨床応用

キーワード：2型糖尿病 ゲノム創薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析技術の進歩により、これまでに 2 型糖尿病をはじめとする生活習慣病の疾患感受性遺伝子領域が多数同定されてきた。しかしながら、これらの成果の臨床への還元は進んでおらず、ヒトゲノム研究成果の効率的な臨床応用の実現が課題となっている。研究代表者らはゲノムワイド関連解析(GWAS)により同定された 2 型糖尿病疾患感受性領域の情報と各種生物学的データベースおよび創薬データベースからの網羅的な情報を系統的に照合する *in silico* 解析¹⁾を用いて 2 型糖尿病新規治療薬標的の効率的な探索を試み、現在 2 型糖尿病以外の疾患治療薬として開発中の薬剤の標的遺伝子(*KIF11*, *GSK3B*, *JUN*)が新たな 2 型糖尿病の治療標的となりうることを示した²⁾。新しい治療標的 *KIF11*, *GSK3B*, *JUN* の阻害薬はそれぞれがん(*KIF11* 阻害薬, *GSK3B* 阻害薬)、慢性関節リウマチ (*AP-1* 阻害薬) の治療薬として開発中の薬剤であるが、耐糖能改善効果が *in vivo* で検証できれば新規の糖尿病治療薬としての可能性が期待できる。現時点ではこれらの薬剤を投与した動物モデルの耐糖能に関する文献的報告はないため、本研究における糖尿病モデルマウスを用いた検証は極めて重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新しいゲノム創薬手法を用いることにより GWAS で同定された疾患感受性遺伝子領域の情報を活用して新規の 2 型糖尿病治療薬の開発に貢献することである。GWAS で同定された 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子領域の情報と様々な生物学的、薬理学的データベースに蓄積された網羅的な情報を系統的に照合する *in silico* 解析により研究代表者らが同定した新規 2 型糖尿病治療薬候補である *KIF11* 阻害剤を 2 型糖尿病モデルマウスに投与し、これらの薬剤の *in vivo* での耐糖能改善効果を検証する。

3. 研究の方法

実験動物：C57bl/6 (以下 C57) あるいは B6.BKS(D)-Leprdb/J (以下 db/db) を用いた。琉球大学医学部附属動物実験施設において Normal Chow(日本クレアマウス・ラット飼育繁殖用固形飼料 CE-2)の自由摂取下で飼育した。

KIF11 阻害剤：Ispinesib および SB-743921 は 10 % エタノール、10 % クレモフォル EL 4 % グルコース水溶液に 0.5g/kgBW (10ml/kgBW) となるように用時調製し、腹腔内投与を行った³⁾。

糖負荷試験：試験開始の 5 時間前より絶食としたあと、グルコース溶液 1.0~2.0g/kgBW(10ml/kgBW)を腹腔内投与し、グルコース溶液投与前(0 分値)、グルコース溶液投与後、15、30、60 および 120 分後の計 5 ポイントで簡易血糖測定器を用いて血糖値を測定し、同時に投与前、15、30 分後の 3 ポイントでは血漿を採取し、血漿インスリン値測定に供した。

インスリン負荷試験：試験開始の 5 - 15 時間前より絶食としたあと、インスリン溶液 0.5~2U/kgBW(10ml/kgBW)を腹腔内投与し、投与前(0 分値)、インスリン投与後、15、30、60 および 120 分後の計 5 ポイントで簡易血糖測定器を用いて血糖値を測定した。

ピルビン酸負荷試験：試験開始の 5-15 時間前より絶食としたあと、ピルビン酸溶液 12g/kgBW(10ml/kgBW)を腹腔内投与し、投与前(0 分値)、ピルビン酸投与後、15、30、60 および 120 分後の計 5 ポイントで簡易血糖測定器を用いて血糖値を測定した。

組織採取および網羅的遺伝子発現解析：全試験および全観察期間終了後、5 時間絶食後に全採血および組織採取を行う。開腹・開胸し、発現解析に用いる臓器を摘出した。肝臓組織より total RNA を抽出し、マイクロアレイ(Clariom S Array Mouse, Applied Biosystems)を用いて網羅的に遺伝子発現解析を行った。

4 . 研究成果

(1) C57bl/6 マウスにおける KIF11 阻害剤投与の検討

予備検討

Normal Chow 飼育下の C57bl/6 マウス(8 週令)を用いて、KIF11 阻害剤である Ispinesib および SB-743921 の投与量、投与方法の検討を行った。過去の報告³⁾に基づいた投与量[4 日毎、計 3 回、10mg/kg bw (body weight) 腹腔内投与(ip)]では Ispinesib あるいは SB-743921 の投与により一部のマウスに急激な体重減少がみられた。そこで 1 回の投与量 5mg/kgbw あるいは 1mg/kgbw に調節し、vehicle (V) 投与群を含めた 5 群[V 群, Ispinesib 1mg/kgbw 投与群(Isp-1), Ispinesib 5mg/kgbw 投与群(Isp-5), SB-743921 1mg/kgbw 投与群(SB-743921-1), および SB-743921 5mg/kgbw 投与群(SB-743921-5), n = 3]の投与後の経過を観察した。投与開始から 14 日間の経過中 5 群間に体重の差は観察されず(BW(g) mean±S.D, V = 24.6±1.2, Isp-1 = 24.6±0.5, Isp-5 = 24.6 ±1.3, SB-743921-1 = 23.9±0.7, SB-743921-5 = 24.6±0.6) 外観上明らかな異常は認められなかったことから、1 回の投与量の上限を 5mg/kgbw に設定した。

C57bl/6 マウスにおける KIF11 阻害剤投与による糖代謝改善効果の検討

Normal Chow 飼育下で 9 週齢の C57bl/6 雄マウスを 3 群に分け KIF11 阻害剤の投与を行った[V 群 Isp-5 群, および SB-743921-5 群, n = 8]。グルコース負荷試験(D-glucose 2g/BW 腹腔内投与)における血糖値は 3 群間で有意差は認められなかったが、Isp-5 群および SB743921-5 群は V 群と比較し、血糖値の曲線下面積(AUC)は低い傾向を示した[AUC ; V 群 46258 ± 6282, Isp-5 群 41763 ± 4301 (vs V 群, p = 0.46) SB743921-5 群 38328 ± 5053 (vs V 群 p = 0.24)。糖負荷試験におけるインスリン値は Isp-5 群および SB743921-5 で低い傾向であり AUC; V 21.4 ± 8.0、Isp-5 15.3 ± 1.6 (vs V, p = 0.39) SB743921-5 16.1 ± 1.65 (vs V, p = 0.44)]、インスリン負荷試験では 30 分値(%0 分値)が V で 0.79 ± 0.07、Isp-5 で 0.47 ± 0.076 (p < 0.01)であった。

(2)肥満 2 型糖尿病モデルマウスにおける KIF11 阻害剤投与による糖代謝改善効果の検討

次に、肥満 2 型糖尿病モデルである BKS.Cg-Dock7m +/- Leprdb/J(db/db) マウスにおける KIF11 阻害剤の糖代謝改善効果を検討した。7 週齢の C57bl/6 雄マウスを 2 群に分け KIF11 阻害剤の投与を行った [V 群, SB-743921-5 群, n = 3]。グルコース負荷試験(D-glucose 1g/BW 腹腔内投与)では 2 群間に有意差は認められなかったが、SB743921-5 群は V 群と比較し、血糖値の曲線下面積(AUC)は低い傾向を示した (IPGTT-AUC, vs. SB743921-5, 59268 ± 5097 vs 49370 ± 383, P=0.09)。インスリン負荷テストの結果、SB-743921-5 群の AUC 値は有意に低値であった (IPITT-AUC 23423 ± 2273 vs 13620 ± 551, P<0.005)。また、ピルビン酸負荷テストにおいても AUC 値は SB-743921-5 群で有意に低値であった (IPPTT-AUC 66830 ± 7763 vs 47430 ± 5690, P<0.05)。

(3)肥満 2 型糖尿病モデルマウスにおける KIF11 阻害剤投与による糖代謝改善機序の検討

インスリン負荷テストの結果 KIF11 阻害剤投与群ではインスリン抵抗性が改善していること、また、ピルビン酸負荷試験の結果 KIF11 阻害剤投与により肝臓での糖新生が抑制されていることが示された。そこで、さらに詳細な分子機序を解明するために、KIF11 阻害剤投与 db/db マウスの肝臓より RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。KIF11 阻害剤投与 db/db マウスの肝臓での遺伝子発現プロファイルをコントロール (vehicle 投与群) と比較したところ、355 個の

遺伝子発現レベルに差が観察された(t-test, $P < 0.05$ かつ 発現量 > 1.5 倍あるいは < 0.67 倍)。さらに、Gene set enrichment analysis (GSEA)解析を行ったところ、治療群とコントロール群の間に差を認める複数の遺伝子群 (mitotic spindle, notch signaling, beta catenin signaling) が同定された (FDR $q < 0.05$)。

(4)まとめ

これまでの一連の検討により、新しいゲノム創薬手法を用いて同定された新規2型糖尿病治療薬候補である KIF11 阻害薬は、コントロールマウスの血糖値には影響を与えないが、肥満2型糖尿病モデルマウスにおいて耐糖能改善効果を持つ可能性が示された。このことから、我々が開発した新しいゲノム創薬手法の有用性が示唆された。

(5) 参考文献

- 1.Okada et al Okada Y et al. *Nature*. 2014; 506:376-81.
- 2.Imamura M et al. *Nat Commun*. 2016; 7:10531
- 3.Purcell JW et al, *Clin Cancer Res* 18(2) 566-576, 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 今村 美菜子
2. 発表標題 2型糖尿病ゲノム研究の現状とその臨床応用～新しいゲノム創薬の可能性～
3. 学会等名 第55回日本糖尿病学会九州地方会（宮崎）平成29年10月13日 14日
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今村 美菜子
2. 発表標題 2型糖尿病ゲノム研究の現状-疾患感受性遺伝子Update 2018-
3. 学会等名 第52回糖尿病学の進歩（福岡）平成30年3月2-3日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minako Imamura
2. 発表標題 In vivo evaluation of a novel therapeutic target for type 2 diabetes identified through genome wide association study-based drug discovery
3. 学会等名 UNIV RYUKYUS & OIST JOINT SYMPOSIUM 2019, (Okinawa)16th Dec 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minako Imamura
2. 発表標題 In vivo evaluation of a novel therapeutic target for type 2 diabetes identified through genome wide association study-based drug discovery
3. 学会等名 EASD2019 (European Association for the Study of Diabetes) (Barcelona, Spain) Sep, 16-20, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

<p>1. 著者名 Minako Imamura, Momoko Horikoshi, Shiro Maeda et al Editors; Tatsuhiko Tsunoda, Toshihiro Tanaka, Yusuke Nakamura</p>	<p>4. 発行年 2019年</p>
<p>2. 出版社 Springer Nature Singapore</p>	<p>5. 総ページ数 209</p>
<p>3. 書名 Genome-wide association studies</p>	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	<p>氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)</p>	<p>所属研究機関・部局・職 (機関番号)</p>	<p>備考</p>
<p>研究 分担 者</p>	<p>前田 士郎 (Maeda Shiro) (50314159)</p>	<p>琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)</p>	