

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08020

研究課題名(和文) SHIP2阻害に基づく新規インスリン抵抗性改善薬の創製

研究課題名(英文) Studies on novel insulin-sensitizing agent based on SHIP2 inhibitors

研究代表者

豊岡 尚樹 (Toyooka, Naoki)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：10217565

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)：現在、経口糖尿病治療薬において、インスリン抵抗性改善薬が最も不足しており、新規作用メカニズムによる創製が急務である。そのような背景の下、我々はインスリンシグナル伝達系においてその抵抗性に密接に関連している脱リン酸化酵素であるSHIP2阻害に着目し、その阻害剤の創製を検討した。先に報告した我々独自のデザインに基づく新規SHIP2阻害剤の構造を基に、独自のファーマコフォアを設定し、インシリコスクリーニングを行い候補化合物を得た。さらに合成展開によって得た新規誘導体のAktのリン酸化を指標としたスクリーニングにより新規SHIP2阻害剤の創製を行った。

研究成果の概要(英文)：Among the oral diabetic drugs, insulin-sensitizing agent is insufficient. So the development of new insulin-sensitizing agent based upon novel mechanism is urgent matter. We have investigated on the development of inhibitor of SHIP2, which shows important role for insulin resistance in the insulin signal pathway. Based on the structure of our original new insulin-sensitizing agent, we designed new pharmacophore, and acquired candidate compounds using in silico screening. Furthermore we performed the synthetic development based on the structure of candidates. The evaluations of synthetic compounds using the phosphorylation of Akt resulted in the discovery of novel SHIP2 inhibitors.

研究分野：有機合成化学, 医薬品化学

キーワード：インスリン抵抗性改善薬 SHIP2 Akt ファーマコフォア

1. 研究開始当初の背景

世界で開発中の糖尿病治療に用いられる新薬の作用機序は、インスリン抵抗改善薬とインスリン分泌促進薬に大別される。現在、2型糖尿病治療薬の開発は、グリタゾン系薬剤に代表されるインスリン抵抗改善薬からインレクチンに関連するインスリン分泌促進薬にシフトしている。しかしながら、インスリン抵抗改善薬のニーズは依然として高いが、現在ピオグリタゾンに代表される PPAR γ 活性化薬のみ臨床利用されている。よって新たな作用機序によるインスリン抵抗改善薬の開発が急務である。

2. 研究の目的

5'-リピッドホスファターゼの SH2-domain containing inositol 5'-phosphatase 2 (SHIP2) は、インスリンの代謝作用の発現に中心的な役割を担う phosphatidylinositol 3 kinase (PI3キナーゼ) 系に対して抑制性の制御を行う細胞内因子であり 2 型糖尿病でのインスリン抵抗性の増大に関与している。その根拠として、SHIP2 が 2 型糖尿病モデル動物の db/db マウスの骨格筋や肝臓で発現が亢進していること、SHIP2 発現が亢進する 2 型糖尿病患者の遺伝子多型が存在すること、さらに SHIP2 過剰発現マウスではインスリン抵抗性と耐糖能障害が惹起されることが示されている。一方、SHIP2 選択的阻害効果を持つ化合物は、培養骨格筋細胞や培養肝細胞においてインスリンシグナル伝達分子の活性化、糖の取込み活性の増大、糖新生活性の抑制を引き起こし、さらに 2 型糖尿病 db/db マウスの耐糖能を改善させる。また、その類縁化合物は、株化ラット骨格筋細胞 (L6 細胞) において、インスリンシグナルの増強およびインスリンによる糖取り込みの促進作用を示す。そのため、次世代型の糖尿病治療薬として SHIP2 阻害剤の開発の重要性が指摘されており、世界中で開発研究が行われているが、未だに臨床利用に適さないリード化合物の報告があるのみである。例えば、ピラゾール骨格を有する化合物は、試験管内で SHIP2 と基質 (BODIPY-PIP3) の反応を選択的に阻害するが、生体内での作用は不明であり、それらの効力はいずれも十分高くなく、糖尿病治療には用いられていない。今回我々は、新規 SHIP2 阻害剤の開発を目指し、独自のアプローチによる開発研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

我々は、既存の複数の SHIP2 阻害剤の構造をベースに、立体配座解析と分子重ね合わせ計算を Ligand-based drug design 手法により行い、SHIP2 阻害剤が有するべきファーマコホア (官能基の三次元配置) を推定し、分子重ね合わせ計算の結果を基に新規化合物を

デザインした。さらにそれらを合成し、培養神経細胞を用いて薬効の検討を行った。その結果、N-(ピリジン-2-イル)フェニルアルカンアミド誘導体を見出した。(Rational design and synthesis of 4-substituted 2-pyridin-2-ylamides with inhibitory effects on SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase 2 (SHIP2); Ichihara, Y.; Fujimura, R.; Tsuneki, H.; Wada, T.; Okamoto, K.; Gouda, H.*; Hirono, S.; Sugimoto, K.; Matsuya, Y.; Sasaoka, T.*; Toyooka, N.* *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 62, 649-660.) その後、SHIP2 の X 線結晶構造が報告されたので、我々は分子動力学シミュレーション、分子ドッキング計算、および結合自由エネルギー計算を行うことで、SHIP2 と (N-(ピリジン-2-イル)フェニルアルカンアミド誘導体の一つとの結合様式モデルを構築した。次に、得られた結合様式モデルを利用したイン・シリコスクリーニングを行うことで、約 400 万化合物の既存ライブラリーから新規 SHIP2 阻害剤候補化合物を抽出した。(CP2) (Figure 1) そして、CP2 の構造を基に合成展開し、20 種類の誘導体合成を完了し、セルベースアッセイによる評価を行った。

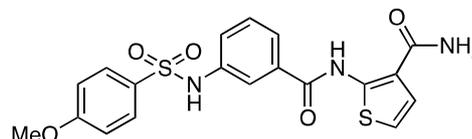
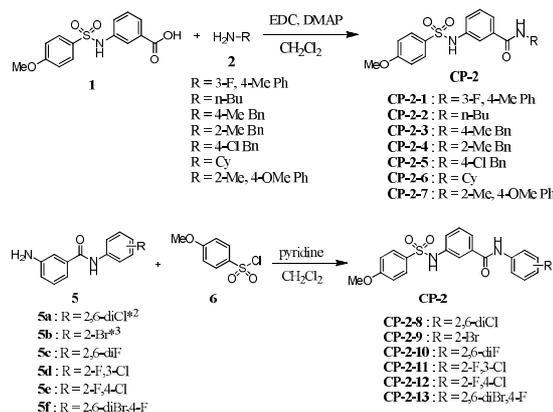
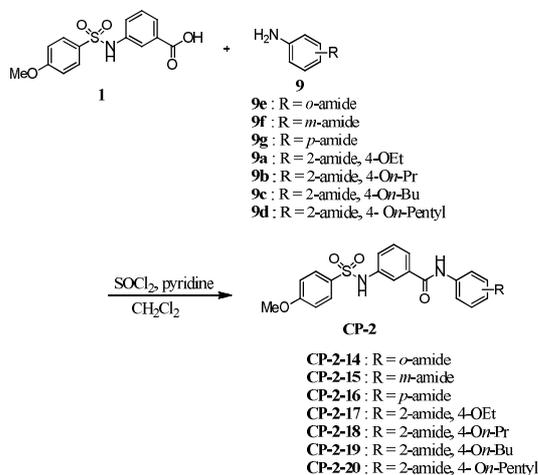


Figure 1

4. 研究成果

以下に示す合成経路により 20 種類の CP2 誘導体 (CP-2-1~CP-2-20) を合成した。





マウス由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞 (American Type Culture Collection, VA, USA)は、10%成牛血清 (DBS; Life Technologies, CA, USA)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies; 100 U/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン含有)に懸濁し、10cm 培養皿に播種した後、37 $^{\circ}$ C、10% 炭酸ガス条件下で培養した。70% コンフルエントまで培養した後、6 穴培養皿に播種し、100% コンフルエントまで増殖させ、3 日間 10%DBS を含む DMEM で培養した。さらに脂肪細胞への分化誘導のため、10% ウシ胎児血清 (FBS; Life Technologies), 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma, MO, USA), 1 μ M dexamethasone (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan), 1 μ M insulin を含んだ DMEM で 3 日間培養した後、10% FBS, 0.8 μ M insulin を含む DMEM に交換して、さらに 3 日間培養し、脂肪細胞に分化させた。以後実験に使用するまで、10% FBS を含む DMEM で 3 日ごとに細胞培養液を交換した。

分化誘導後 10-12 日目の 3T3-L1 脂肪細胞を用いてインスリン刺激による Akt リン酸化を指標に SHIP2 阻害活性のスクリーニングを行った。3T3-L1 脂肪細胞を 16 時間、20ng/mL の TNF α にて前処置を行いインスリン抵抗性を誘導した。その後に SHIP2 阻害剤および阻害候補化合物 (CP2 とその誘導體 CP-2-1 ~ CP-2-20)を 3 μ M の濃度で 15 分間処置し、100ng/mL のインスリンで 2 時間刺激を行った。これらの細胞を以下に記すウエスタンブロット法で解析した。Lysis buffer [20 mM Tris (pH=7.4), 140 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 2 mM Na₃VO₄, 50 mM sodium fluoride, 0.62% aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]で溶解し、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離した。この細胞溶解液を氷上で 20 分間かけて徐々に溶解した後、4 $^{\circ}$ C、14000 rpm で 10 分間遠心分離して不溶成分を取り除き、上清を細胞溶解液とした。本細胞溶解液をジチオスレイトールを含むレムリ溶液と混和し、ボルテックスミキサーで攪拌した後、5 分間煮沸した。本サンプルを SDS-ポリアクリルア

ミドゲル電気泳動を用いて、蛋白質を分子サイズにしたがって分離し、ポリフッ化ビニリデン膜に転写した。このポリフッ化ビニリデン膜を 5% 非脂肪ミルク溶液で、25 $^{\circ}$ C、1 時間ブロッキングした後、抗 Thr308 phospho-Akt 抗体 (Cell Signaling Technology, MA, USA)および抗 Akt1 抗体 (Santa Cruz, CA, USA) と、4 $^{\circ}$ C、16~20 時間反応させた。さらに、ポリフッ化ビニリデン膜を洗浄後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス (または抗ウサギ) IgG 抗体 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)と 25 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare)を用いた化学発光法によりルミノイメージアナライザー (LAS-4000, Fujifilm, Tokyo, Japan)にて検出した。その結果、3 種類の優れた誘導體を見出した。(CP-2-8, -2-14, -2-16) (Figure 2, 3, 4)

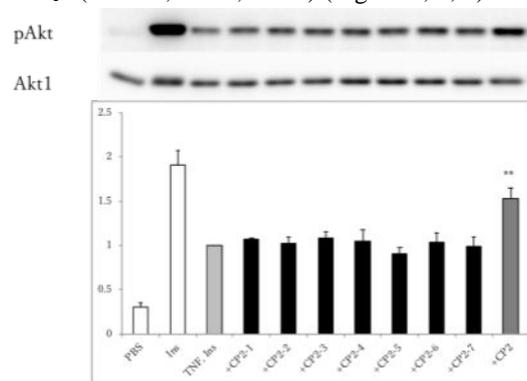


Figure 2

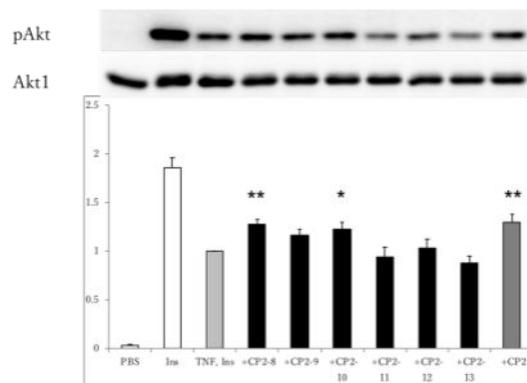


Figure 3

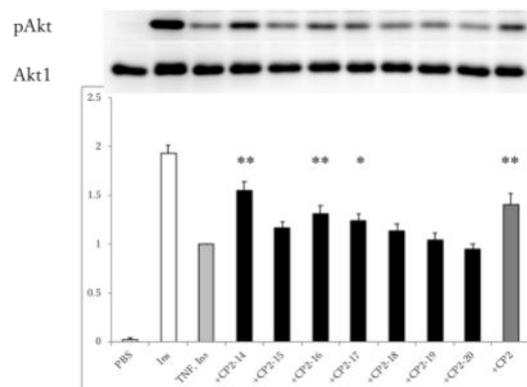


Figure 4

和田 努 (WADA, Tutomu)
合田 浩明 (GODA, Hiroaki)

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:(ベンゼンスルホニルアミノ)ベンズ
アミド誘導体およびそれらを有効成分とす
るSHIP2阻害剤

発明者:笹岡 利安、恒枝 宏史、和田 努、
豊岡 尚樹、広野修一、合田浩明

権利者:富山大学

種類:特許

番号:2015-529608

出願年月日:2014/7/31

国内外の別:国内

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊岡 尚樹 (TOYOOKA, Naoki)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・

教授

研究者番号:10217565

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号:

(4)研究協力者

笹岡 利安 (SASAOKA, Toshiyasu)