

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19537

研究課題名（和文）ケミカルプロテオミクスによる新規インスリン分泌増強メカニズムの解明

研究課題名（英文）A chemical proteomics approach to identify the novel mechanism of insulin secretion.

研究代表者

菅原 健二（Sugawara, Kenji）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70645217

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：in silico化合物探索および表現型スクリーニングにおいて見出された化合物Xは、膵細胞に対し、新規メカニズムを介してグルコース濃度依存的にインスリン分泌を増強する。本研究では、化合物Xを用いたケミカルプロテオミクスの手法を用い、新規インスリン分泌増強メカニズムの解明を目的とした。はじめに化合物Xに関するSAR情報を取得し、高活性誘導体のデザイン、合成に成功した。この化合物が含むエステル基は有機化学的な活性基であり、今後の化学プローブ合成に有用である。最終的に、インスリン分泌に影響を与えないリンカーを選択し、タグ、リンカーおよび化合物を結合することで化学プローブの合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、化合物XのSAR情報からデザイン・合成に成功したインスリン分泌増強作用を有する新規化合物は、グルコース濃度依存的かつ直接的に膵細胞を刺激することから、2型糖尿病患者に対するより高い有効性を備える薬剤開発への展開を可能とする。さらに本研究で合成した化学プローブを用いたケミカルプロテオミクス解析により化合物Xの標的分子が同定可能となり、細胞における新規インスリン分泌増強経路の解明に向けた応用研究の基盤となる。

研究成果の概要（英文）：Compound X identified by in silico search and phenotypic screening has a novel insulinotropic effect in a glucose-dependent manner in pancreatic cells. In this study, we aimed to elucidate the novel mechanism of insulin secretion by chemical proteomic approach utilizing compound X.

First, according to the structure-activity relationship information on compound X, we synthesized a highly active derivative compound. This compound had an ester group which is chemically active. Therefore, it has been shown that this novel compound is useful for chemical modification. Then, we identified an appropriate linker with no effect on insulin secretion. Finally, compound X was added to linker and tag compound to successfully synthesize a chemical probe for chemical proteomic approach.

研究分野：糖尿病学

キーワード：インスリン分泌 ケミカルプロテオミクス 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

本邦における 2 型糖尿病に対する経口投与可能な薬物療法においては、スルホニル尿素薬 (SU 薬) や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。しかし、SU 薬は、直接膵細胞上の KATP チャネルに作用することから、効果はグルコース濃度によらず、临床上低血糖が問題視されている。また、経口投与可能であるインクレチン関連薬である DPP-4 阻害薬は、インスリン分泌増強経路に作用することから低血糖のリスクが少ないメリットがあるものの、作用は膵細胞を直接刺激しない間接的なものであり、薬効が十分でないことから薬剤不応性の患者も多く報告されている。したがって、グルコース濃度依存かつ直接膵細胞を刺激する新たな薬剤は、2 型糖尿病患者に対してより高い有効性を備える治療方法となることが期待され、薬剤標的となりうる新規インスリン分泌増強経路の解明が重要な課題となっている。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者はこれまでに、化学構造の類似性に基づく *in silico* 化合物探索および表現型スクリーニングにおいて、インスリン分泌促進作用を有する複数の低分子化合物を同定してきた。研究代表者はそのうちの一化合物 (化合物 X と呼ぶ) が膵細胞において、低濃度グルコース存在下では作用を示さない一方で、高濃度グルコース存在下はインスリン分泌量を増大することを見出し、化合物 X は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ことを明らかにしている (図 1)。

(2) 化合物 X は膵細胞内において重要なセカンドメッセンジャーであるカルシウムや cAMP 濃度、さらに既知のインスリン分泌増強経路のいずれにも影響を与えないことから、化合物 X は新たなインスリン分泌増強経路を活性化する可能性が示唆された。本研究では、構造活性相関情報からより高活性の新規誘導体を合成し、さらにケミカルプロテオミクス的手法により化合物 X の標的蛋白質を同定することで、新たな薬剤標的となりうる新規インスリン分泌増強メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化合物 X に関する SAR 情報の取得および新規高活性誘導体のデザイン・合成
化合物 X に種々の官能基を付加もしくは置換した誘導体を合成し、各誘導体のインスリン分泌増強能を比較検討することで、構造活性相関 (SAR) 情報を得る。最終的に、SAR 情報を基に高活性を有する化合物をデザインし合成する。

(2) ケミカルプロテオミクスに向けた化学プローブの作成
上記で合成した化合物に樹脂や光感受性タグもしくはアフィニティータグなどを導入した化学プローブを合成する。この際、タグが化合物と標的の結合に影響を与えないように、化合物とタグの間にはリンカーを介在する。

(3) 化合物 X の標的蛋白質の同定
上記にて合成した化学プローブを用い、ケミカルプロテオミクス的手法により膵細胞株である MIN6 から化合物 X の標的蛋白質を同定する。

4. 研究成果

(1) 化合物 X に関する SAR 情報の取得および新規高活性誘導体のデザイン・合成

ケミカルプロテオミクスによる標的の同定には、より結合能が高い化合物を合成する必要がある。はじめに化合物 X よりも高活性化合物の同定を目的に、約 50 種類の化合物 X の誘導体を合成もしくは市販にて購入し、MIN6 細胞に対するインスリン分

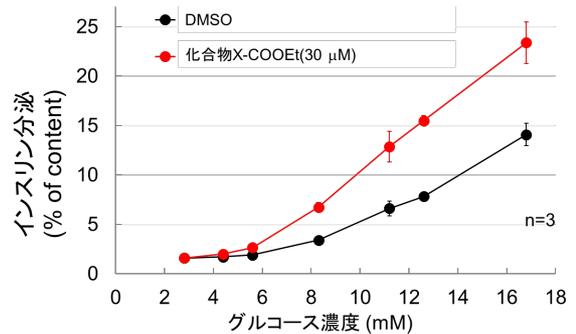


図1 化合物Xによるグルコース応答性インスリン分泌増強効果 (MIN6によるインスリン分泌アッセイ)

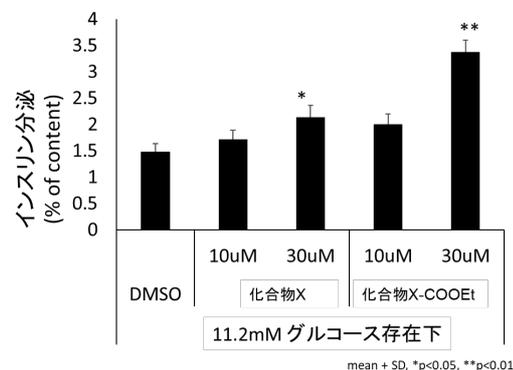


図2 化合物X-COOEtによるグルコース応答性インスリン分泌増強効果 (MIN6によるインスリン分泌アッセイ)

泌増強能を比較検討することで SAR 情報を取得した。最終的に得られた SAR 情報より、より高活性であることが期待された化合物 X のエチルエステル体(化合物 X-COOEt)に関して新規に有機合成を行った。実際、MIN6 を用いたインスリン分泌アッセイにおいて化合物 X-COOEt は化合物 X と比較して高いインスリン分泌促進作用を有していた(図 2)。また、膵細胞からのインスリン分泌は 2 相性であることが知られているが、マウス膵灌流実験において、化合物 X-COOEt は第 1 相には影響が少なかった一方で、第 2 相インスリン分泌を有意に増加することが明らかとなった(図 3)。得られた化合物 X-COOEt のエチルエステル基は有機化学的な反応活性基であることから、更なる合成展開を可能とした重要な化合物である。

次に、化合物 X-COOEt が化合物 X と同様、新規メカニズムによる分泌増強効果を有することを確認するため、種々のアッセイにより特性解析を行った。結果、化合物 X-COOEt の処置はマウス膵細胞株 MIN6 における細胞内カルシウム濃度に変化を与えず(図 4)、さらに細胞内 cAMP 濃度も変化は認めなかった。実際、cAMP 活性化キナーゼである PKA の活性および cAMP 結合蛋白質である Epac2A の活性化に関しても化合物の処置により変化は認めなかった。以上より、化合物 X-COOEt はこれまで報告されているインスリン分泌増強効果に關与するセカンドメッセンジャーのいずれに対しても影響は認めず、化合物 X と同様に新規メカニズムを介してインスリン分泌を増強することが示唆された。

(2) ケミカルプロテオミクスに向けた化学プローブの作成

本研究では化学プローブに、Halo-tag テクノロジーを用いた手法を採用した。Halo-Tag テクノロジーは、低分子リガンドと特異的な共有結合を形成する 33kDa のタグタンパク質を利用し、標的蛋白質を精製に应用可能なシステムである。化学プローブ作成には低分子リガンドとして Chloroalkane (CA) リンカーを付加する必要があるが、MIN6 を用いたインスリン分泌実験では、CA リンカーのみではインスリン分泌に変化を与えず、CA リンカーが本システムにおいて利用可能であることを示した。最終的に、化合物 X-COOEt のエチルエステル基とリンカーを付加し、さらに Halo タグを付加することで化学プローブ(化合物 X-COOEt-CA)の合成に成功した。

しかし、Halo-tag を添加した化合物は膵細胞株である MIN6 において、化合物 X-COOEt とは逆にインスリン分泌を濃度依存性に抑制し(図 5)、化合物 X とは異なる特性を有することが明らかとなった。実際、MIN6 抽出液を用いたケミカルプロテオミクスを行ったが、遊離化合物の処置により結合量が減少する化学プローブとの結合蛋白質は検出されなかった。したがって、本研究において化合物 X-COOEt は化学プローブとしては適さないと判断した。

そこで、本研究では次に当初の研究計画に従い、化合物 X と類似した構造を持つ一方で、膵細胞に対してはインスリン分泌の阻害作用を有する化合物 X-I を応用する方針とした。この化合物は化合物 X とは逆にインスリン分泌に対する阻害作用を有するが、その作用は非常に強く、化合物 X が約 10 μM にて活性化作用を有する一方、化合物 X-I は 1 μM でほぼ完全にインスリン分泌を阻害するため、化合物 X-I と標的蛋白質の親和性は化合物 X と比べて著しく高いこ

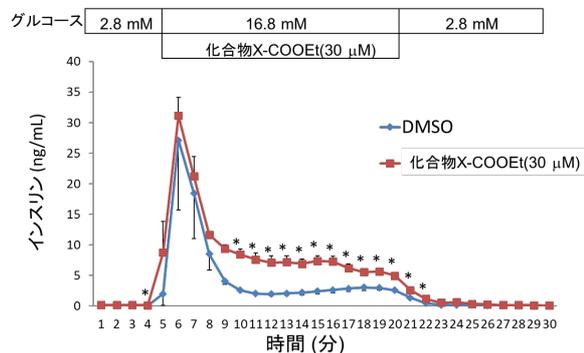


図3 化合物X-COOEtによるグルコース応答性インスリン分泌増強効果(マウス膵灌流実験)

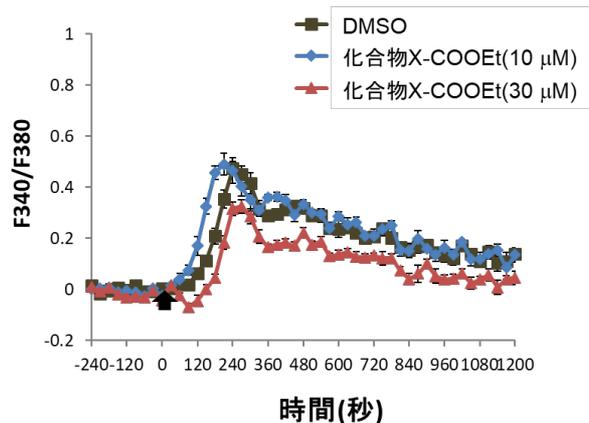


図4 化合物X-COOEtによる細胞内カルシウム濃度変化(16.8mMグルコース存在下)

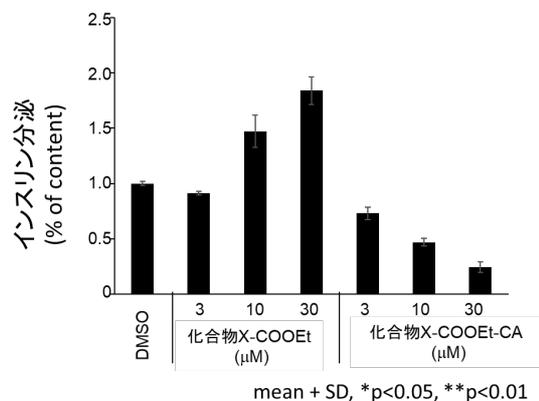


図5 化合物X-COOEt-CAによるインスリン分泌への影響(MIN6, 16.8mMグルコース存在下)

とが予想される。よって、今後は、化合物 X-I を元にした化学プローブを作成し、同様のケミカルプロテオミクスを行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Sugawara K, Honda K, Reien Y, Yokoi N, Seki C, Takahashi H, Minami K, Mori I, Matsumoto A, Nakaya H, Seino S. A Novel Diphenylthiosemicarbazide Is a Potential Insulin Secretagogue for Anti-Diabetic Agent. PLoS One. 2016 11: e0164785.

DOI: 0.1371/journal.pone.0164785

Seino S, Sugawara K, Yokoi N, Takahashi H. beta-Cell signalling and insulin secretagogues: A path for improved diabetes therapy. Diabetes Obes Metab. 2017 19 Suppl 1: 22-29.

DOI: 10.1111/dom.12995.

Sugawara K, Nomura K, Okada Y, Sugano A, Matsumoto M, Takarada T, Takeuchi A, Awano H, Hirota Y, Nishio H, Takaoka Y, Ogawa W. In silico and in vitro analyses of the pathological relevance of the R258H mutation of hepatocyte nuclear factor 4alpha identified in MODY1. J Diabetes Investig. 2019 10: 680-684

DOI: 10.1111/jdi.12960.

Ohara Y, Okada Y, Yamada T, Sugawara K, Kanatani M, Fukuoka H, Hirota Y, Maeda T, Morisada N, Iijima K, Ogawa W. Phenotypic differences and similarities of monozygotic twins with maturity-onset diabetes of the young type 5. J Diabetes Investig. 2019 in press.

DOI: 10.1111/jdi.13004

〔学会発表〕(計 6 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, 2016. (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。第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年

菅原健二、岡田裕子、松田友和、坂本洋一、岩橋泰幸、村前直和、山田倫子、中村友昭、福岡秀規、廣田勇士、坂口一彦、小川渉。インスリノーマの分泌特性を規定する遺伝子の検討。第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017 年

菅原健二、岡田裕子、坂本洋一、廣田勇士、坂口一彦、松本真明、栗野宏之、菅野亜紀、高岡裕、小川渉。新規変異型 HNF4A による MODY1 の症例。第 54 回日本糖尿病学会近畿地方会、2017 年

Takahashi H, Sugawara K, Honda K, Yokoi N, Mori I, Nakaya H, Seino S. Approaches to identification of novel small molecules that can be insulin secretagogues. 2nd Joint Meeting of the EASD Islet Study Group & Beta Cell Workshop, 2017.

菅原健二、岡田裕子、野村和弘、山田倫子、中川靖、福岡秀規、廣田勇士、細岡哲也、坂口一彦、木戸良明、小川渉。メトホルミン内服患者におけるビタミン B12 欠乏の実態調査。第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、2018 年

〔図書〕(計 1 件)

菅原健二、小川渉、糖尿病最新の治療 2019-2021, V-インスリン抵抗性改善薬 1. ビグアナイド, 南江堂, 2019, 116-117

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。