

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08864

研究課題名（和文）新たなゲノム創薬手法により同定されたKIF11阻害薬の耐糖能改善機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of beneficial effect of a compound identified by genomic-based drug discovery on metabolic disorders

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々はゲノムワイド関連解析（GWAS）により同定された疾患感受性領域の情報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阻害剤の代謝改善効果について食事誘発性肥満モデルマウスを用いた検討を行い、さらにその詳細な機序について培養細胞を用いた検討を行った。その結果、KIF11阻害薬は食事誘発性肥満モデルマウスの体重増加を抑制し、その機序はKIF11阻害薬による脂肪細胞分化抑制である可能性が示唆された。

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、これらの成果の臨床への還元は十分に達成されていない。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食事性肥満に対する予防効果をin vivo 実験系で検証し、さらに培養細胞を用いてその機序の一部を明らかにした。本研究の成果は新規の肥満および2型糖尿病の予防・治療法開発に有用な知見であり、さらに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すものである。

研究成果の概要（英文）：Genome-wide association studies (GWAS) have identified more than 500 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. In this study, we examined the beneficial effect against metabolic disorders of a KIF11 inhibitor, using diet-induced obesity model mice, and further investigated the detailed mechanism by in vitro study. The study has identified that a KIF11 inhibitor suppressed body weight gain in diet-induced obesity model mice, which mechanism could be explained by the inhibition of adipocyte differentiation by a KIF11 inhibitor.

研究分野：生活習慣病の遺伝要因解明とその臨床応用

キーワード：ゲノム創薬 多因子疾患 遺伝要因

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2007年以降、ゲノムワイド関連解析(GWAS)を用いた疾患感受性遺伝子領域探索が国内外の研究グループで精力的に行われ、2019年時点で2型糖尿病については250ヶ所以上の疾患関連遺伝子領域がGWASを用いた研究により報告されていた。GWASは遺伝統計学に基づく網羅的な疾患関連遺伝子探索法であり、既知の病因論・仮説に基づかない方法であるため、新規の分子標的の探索には極めて有用である。2016年、研究代表者らはGWASの成果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*解析を用いた新しいゲノム創薬手法によりKIF11阻害薬が新規2型糖尿病治療薬候補となることを報告した¹⁾。さらに研究代表者らは、抗がん剤として開発された現存するKIF11阻害薬(SB-743921)を実験動物に投与する*in vivo*解析系での検証を行い、KIF11阻害薬は肥満2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスのインスリン感受性亢進を介して耐糖能を改善することを見出した²⁾。KIF11阻害薬は紡錘体形成阻害による有糸分裂停止(mitotic arrest)やapoptosisの誘導を介した抗がん作用を持つことが知られているが、耐糖能改善作用機序の詳細は未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究では前述のこれまでの我々の研究を進展させ、KIF11阻害薬の耐糖能改善効果の詳細な分子機序を明らかにすることを目的としている。

本研究の原点はOkadaらによって2013年に開発されたGWASの成果に基づいた新しいゲノム創薬手法である³⁾。従来のゲノム創薬はゲノム情報から病態の詳細な分子機序の解明を介した創薬を目指すものであったが、この新しいゲノム創薬はゲノム情報から詳細な病態・分子機序の解明を介さずに直接創薬を目指す点でこれまでのゲノム創薬とは異なっている^{3),4)}。この新しいゲノム創薬手法によってはじめてKIF11阻害薬が2型糖尿病の治療薬となりうる可能性が示されたが、KIF11と糖代謝との機能的な関連の詳細については未だ解明されていない。本研究においてマウスモデルを用いた*in vivo*解析系による詳細な検証を行い、KIF11阻害薬の耐糖能改善効果における分子機序を明らかにすることで、2型糖尿病の新しい分子機序を解明し、新しい治療法の開発に貢献することができる。

3. 研究の方法

(1) KIF11阻害薬投与食事誘導性肥満(DIO)モデルマウスの代謝関連表現型解析

肥満および耐糖能障害の1)予防効果と2)治療効果を検証するためにKIF11阻害薬の投与をi)食事性肥満誘導開始時、ii)肥満および耐糖能障害誘導後とした2つの検証を行った。

本研究におけるDIOマウスはC57BL/6J雄マウスに6週齢より高脂肪高シヨ糖食(オリエンタル酵母F2HFHSD)を投与することで獲得した。DIOマウスは琉球大学医学部附属動物実験施設において自由摂取下で飼育した。

KIF11阻害薬の肥満および耐糖能障害に対する予防効果の検証

6週令のC57BL/6Jマウスに対し、高脂肪高シヨ糖食投与を開始と同時にKIF11阻害薬SB-2.5: SB-743921 2.5mg/kg/week iv (n=6), SB-5: SB-743921 5mg/kg/week iv (n=7),あるいはvehicleの(コントロール群、n=8)投与を開始し、18週齢まで定期的な血糖値、体重のモニタリングを行った。糖負荷試験(血糖値、血漿インスリン値測定)、インスリン負荷試験(血糖値測定)により耐糖能を評価した。糖負荷試験は試験開始の14時間前より絶食と

したあと、グルコース溶液 1.5g/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は試験開始の 5 時間前より絶食としたあと、インスリン溶液 1.5U/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 分後の計 4 ポイントで簡易血糖測定器を用いて血糖値を測定した。全観察期間終了後、5 時間絶食後に組織採取を行った。開腹・開胸し、肝臓、心臓、腹腔内脂肪組織、皮下脂肪組織、褐色脂肪組織重量を測定した。

KIF11 阻害薬の肥満および耐糖能障害に対する治療効果の検証

C57BL/6J マウスに対し 6 週令より 12 週間の高脂肪高シヨ糖食投与を行い、肥満および耐糖能障害を誘導したあと、18 週令時に体重および血糖値が均等になるように治療薬投与群と対照 vehicle 投与群の 2 群に群分けし、KIF11 阻害薬の投与を行った。

(2) マウス培養線維芽細胞 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化における KIF11 阻害薬の影響

マウス 3T3-L1 線維芽細胞 (JCRB 細胞バンク) は 500 mg/dl D-glucose, 含有 DMEM で培養した。成熟細胞への分化誘導は分化誘導カクテル (DEXA/insulin/IBMX) 添加により成熟脂肪細胞へ分化させた。3T3-L1 細胞分化過程における kif11 発現変化を rt-qPCR 法で定量した。各遺伝子の発現量は Ppia, Hmbs, Eef1g で補正した。さらに、KIF11 阻害薬添加、非添加下で分化誘導し、Oil-red-O 染色を行い、吸光度測定にて細胞内中性脂肪を定量した。

4. 研究成果

(1) 6 週齢の C57BL6 マウスを 3 群に分割し高脂肪高シヨ糖食 (HFHSD) 飼育下で vehicle 週 1 回投与 (n=8)、SB-743921 2.5mg/bw (SB-2.5) 週 1 回投与 (n=6)、HFHSD 飼育 SB-743921 5mg/bw (SB-5) 週 1 回投与 (n=7) を 12 週間継続し、経時的な体重測定と血糖測定を行ったところ、KIF11 阻害薬投与群にて容量依存性に体重増加の抑制が観察された (SB-2.5 SB-5 vs コントロール = 28.5 ± 1.4 , 26.3 ± 2.0 vs 35.7 ± 4.7 , $p < 0.05$)。12 週間観察後の各群の体重当たりの臓器重量は、腹腔内脂肪および皮下脂肪では SB-743921 投与により容量依存的に重量の減少が観察されたが、肝臓の重量は 3 群間での差は観察されなかった。グルコース負荷試験では治療群 (SB-2.5, SB-5) とコントロール群の間に耐糖能の差は観察されなかったが (IPGTT-曲線下面積 (AUC) : (IPGTT-AUC : 0-120 分、SB-2.5, SB-5 vs コントロール = 45866 ± 9433 , 42031 ± 5537 vs 42503 ± 5556 $p > 0.05$)、治療群 (SB-2.5, SB-5) の血中インスリン値はコントロール群に比して低値を示した (インスリン値 AUC : 0-30 分、SB-2.5, SB-5 vs コントロール = 19.2 ± 2.5 , 20.3 ± 16.8 vs 36.9 ± 17.4 , $p < 0.05$)。インスリン負荷試験においても治療群 (SB-2.5, SB-5) とコントロール群の間に明確な差は観察されなかった (IPITT-AUC : 0-60 分、SB-2.5 SB-5 vs コントロール = 7782.5 ± 1188.04 , 6280.7 ± 1780.1 vs 8397.2 ± 1780.1 $p > 0.05$)。

また、高脂肪高シヨ糖食を、6 週齢より 16 週間投与し肥満を誘導した後の C57BL6 マウスに KIF11 阻害薬を投与し、代謝への影響を確認した。まず、肥満マウスに安全に投与可能な SB-743921 の容量 2.0mg/bw であることを確認した。この容量で 14 週間 SB-743921 投与を行ったが、投与群の血糖値、体重はコントロールとの間に有意な差を認めなかった (IPGTT-AUC : 0-120 分、SB-2 vs コントロール = 40856 ± 7657 vs 37928 ± 10432 , $p > 0.05$ 、体重 SB-2 vs コントロール = 48.6 ± 6.2 vs 48.9 ± 3.5 $p > 0.05$)。

(2) 次に、SB-743921の脂肪細胞分化抑制効果を検討した。まず、マウス線維芽細胞3T3-L1を分化誘導カクテル(DEXA/insulin/IBMX)により成熟脂肪細胞に分化させ、その過程でのKIF11の発現量の変化をRT-qPCR法で検討したところ、分化誘導24時間後に発現量が増加し、その後減少した。そこで3T3-L1細胞に対しSB-743921添加/非添加下で成熟脂肪細胞へ分化誘導したところ、SB-743921添加により中性脂肪蓄積含量が著明に減少した(吸光度測定平均値 SB-743921 1 uM:0.096, 非添加 1.256)。

以上を総括すると、DIO マウスモデルにおいて SB-743921 は食事誘導性肥満を抑制したが、すでに誘導された肥満を改善する効果は観察されなかった。本研究により SB-743921 の食事性肥満に対する予防効果が示唆されたが、肥満に対する治療効果は示されなかった。また、SB-743921 は脂肪細胞分化を抑制することで、食事誘導性肥満マウスの体重増加を抑制したと推察された。

参考文献

- 1)Imamura M et al. *Nat Commun.* 2016; 7:10531
- 2) Imamura M et al. *In vivo* evaluation of a novel therapeutic target for type 2 diabetes identified through genome wide association study-based drug discovery (2019 年欧州糖尿病会議にて発表)
- 3)Okada Y et al. *Nature.* 2014; 506:376-81.
- 4)岡田随象 新着論文レビュー DOI: 10.7875/first.author.2014.014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今村 美菜子
2. 発表標題 ヒトゲノム解析研究による2型糖尿病および糖尿病合併症の病因解明と新規治療法探索
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今村 美菜子
2. 発表標題 2型糖尿病のゲノム研究の現状とその臨床応用
3. 学会等名 第58回 日本糖尿病学会 九州地方会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前田 士郎 (Maeda Shiro) (50314159)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	
研究分担者	松波 雅俊 (Matsunami Masatoshi) (60632635)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------