

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19515

研究課題名（和文）膵 細胞特異的オートファジー活性化を介した新規の糖尿病治療薬の創出

研究課題名（英文）Discovery of new anti-diabetic drugs activating autophagy in beta cells

研究代表者

綿田 裕孝（Watada, Hirotaka）

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60343480

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病の根本病態がインスリン抵抗性に対する膵 細胞機能不全であることを考えると、膵 細胞機能温存を目指した治療法を確立することが求められる。

オートファジーは細胞内の主要なタンパク分解系であり、細胞の恒常性維持に重要な役割を担っている。申請者のこれまでの研究の結果、膵 細胞特異的なオートファジー活性化薬が有用である可能性があり、これを同定する目的で低分子化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングを行った。その結果、濃度依存性に膵 細胞株であるMIN6細胞でオートファジー誘導を起こす4つの化合物を同定した。今後、本化合物の膵 細胞保護効果に関してさらなる検討を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病に対する治療薬は進歩を遂げているが、その根本病態である膵 細胞機能障害の抑制薬の開発には至っていない。そのような中で、本研究は、膵 細胞特異的なオートファジー活性化薬の同定により、膵 細胞保護を介した全く新規の糖尿病治療法の確立を目的とするものである。オートファジー制御による疾患治療は神経変性疾患などでも模索されているが、膵 細胞を対象とした研究は他に類をみない。そのようななかで、薬剤候補として4つの化合物を同定したことは本研究の有用性を示すとともに将来の新規糖尿病薬剤開発につながる可能性があることから、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Considering that the underlying pathology of type 2 diabetes is pancreatic β -cell dysfunction in response to insulin resistance, it is necessary to establish treatment methods aimed at preserving pancreatic β -cell function.

Autophagy is a major intracellular proteolytic system and plays an important role in maintaining cellular homeostasis. As a result of our previous studies, it was found that an autophagy activator specific to pancreatic β -cells may be useful. Thus, a high-throughput screening using a small molecule compound library was conducted to identify such an autophagy activator. As a result, we identified four compounds that induce autophagy in MIN6 cells, a pancreatic β -cell line, in a concentration-dependent manner. Further studies on the protective effects of these compounds on pancreatic β -cells will be conducted in the future.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：膵 細胞 オートファジー 2型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、世界的な健康問題ととらえられており、その患者数は急速に増加している。糖尿病患者の多くは、肥満と密接に関連するインスリン抵抗性により、体内のインスリン作用が低下する2型糖尿病である。本疾患においてはインスリン抵抗性によって引き起こされる大量のインスリンの需要に対する膵細胞の代償不全がその根本病態であり、2型糖尿病の発症と進行に深く関わっていると推測されている。膵細胞の機能低下は、細胞の恒常性の破綻と密接な関係があり、小胞体ストレス応答やオートファジーなどの様々なストレス応答機構が重要な役割を担っている。

オートファジーは、二重膜のオートファゴソームが細胞質成分を取り込み、リソソームと融合し、その内容物をリソソームのプロテアーゼで分解するバルク分解メカニズムである。オートファジーの分子機構は真核生物によく保存されており、酵母での解析が、その病態生理的意義の解明に道を開くことに成功した。糖尿病の基礎研究において、私たちは、これまで、膵細胞特異的にオートファジーの機構を欠損させることにより、オートファジーが細胞の機能維持に必須であることを明らかにしてきた (Ebato, C. et al. Cell Metab 2008)。

一方、膵細胞においてオートファジーを調節することで、その機能障害を改善できるかどうかは、まだ明らかになっていない。例えば、免疫抑制剤として臨床応用されているラパマイシンは、mTORの活性を阻害することでオートファジーを活性化する。しかし、我々は臨床的にラパマイシンは細胞の機能を低下させ、耐糖能異常の原因となることを報告している (Suzuki, L. et al. J Endocr Soc 2018)。また、オートファジーが細胞死を促進することが報告されており、藤本らは、Pdx-1ノックアウトマウスで起こる細胞死に、正規のオートファジー制御因子の一つであるBeclin-1で制御されるオートファジー細胞死が関与することを明らかにしている (Fujimoto K. et al J Biol Chem 2009)。このような背景もあり、オートファジー活性化剤の臨床応用はまだなく、膵細胞でオートファジーを調節する新規化合物の探索が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、オートファジックフラックスの蛍光プローブを発現するMIN6細胞を用いて、オートファジックフラックスを活性化する化学物質のハイスループットスクリーニングを行い膵細胞でオートファジーを活性化する新規薬剤を同定することである。

3. 研究の方法

細胞培養

MIN6細胞は、宮崎純一教授(大阪大学)からご提供いただいた。MIN6細胞は、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、0.0005% 2-Mercaptoethanol 添加 DMEM で培養された。Atg5 KO MIN6細胞は、清水重臣教授(東京医科歯科大学)により提供され、0.0001% puromycin を含む DMEM で培養した。

プラスミドと遺伝子発現

pHluorin-LC3-mCherry プローブ発現細胞では ATG4 によって本プローブが pHluorin-LC3 と mCherry に分解され、細胞内では pHluorin-LC3 がオートファゴソームに、mCherry が細胞質に局在する。オートファジーフラックスが亢進している場合には、pHluorin-LC3 の分解が進む一方で細胞質の mCherry は残存するため、pHluorin/mCherry 比が低下する。我々は以前 pLVSIN-pHluorin-LC3-mCherry レポーターを作成している (Yazawa R. et al. BBRC 2019)。このプローブは、レンチウイルスを介したトランスダクションにより MIN6 で発現させ、その後、10 ug/ml blasticidin (InvivoGen, USA) で処理した。

スクリーニングのためのコライブラリー

コライブラリーの化合物は、東京大学創薬科学研究所から入手した。このライブラリーは、創薬研究所が保存している化合物の中から、活性や機能に基づき選択された 9600 種類の代表的な化合物で構成されてる。

Incucyte®を用いたハイスループットスクリーニング

96 ウェルプレート 6 枚で同時にリアルタイム蛍光イメージングが可能な Incucyte® (Sartorius, Germany) を用いて、ハイスループット・スクリーニングを実施した。pHluorin-LC3 mCherry を発現する 5.0×10^4 MIN6 細胞を 96 ウェルプレートで、37 °C で 24 時間インキュベートした。

誘導剤のスクリーニングのため、次に DMEM で 10 μ M に希釈した Core Library 化合物で細胞を刺激し、Torin-1 の投与は陽性対照とした。Incucyte®で刺激から 24 時間後まで、3 時間ごとに蛍光画像を撮影した。オートファジックフラックス阻害剤スクリーニング用の化合物を含む HBSS で細胞を処理し、ポジティブコントロールとして Bafilomycin A1 を投与した。pHluorin/mCherry 比は、特定された細胞領域における pHluorin の蛍光面積を mCherry の蛍光面積で割って自動的に算出した。2 回目のスクリーニングでは、異なる濃度で希釈した化合物で細胞を処理し、同じ設定で Incucyte®を使用して分析した。

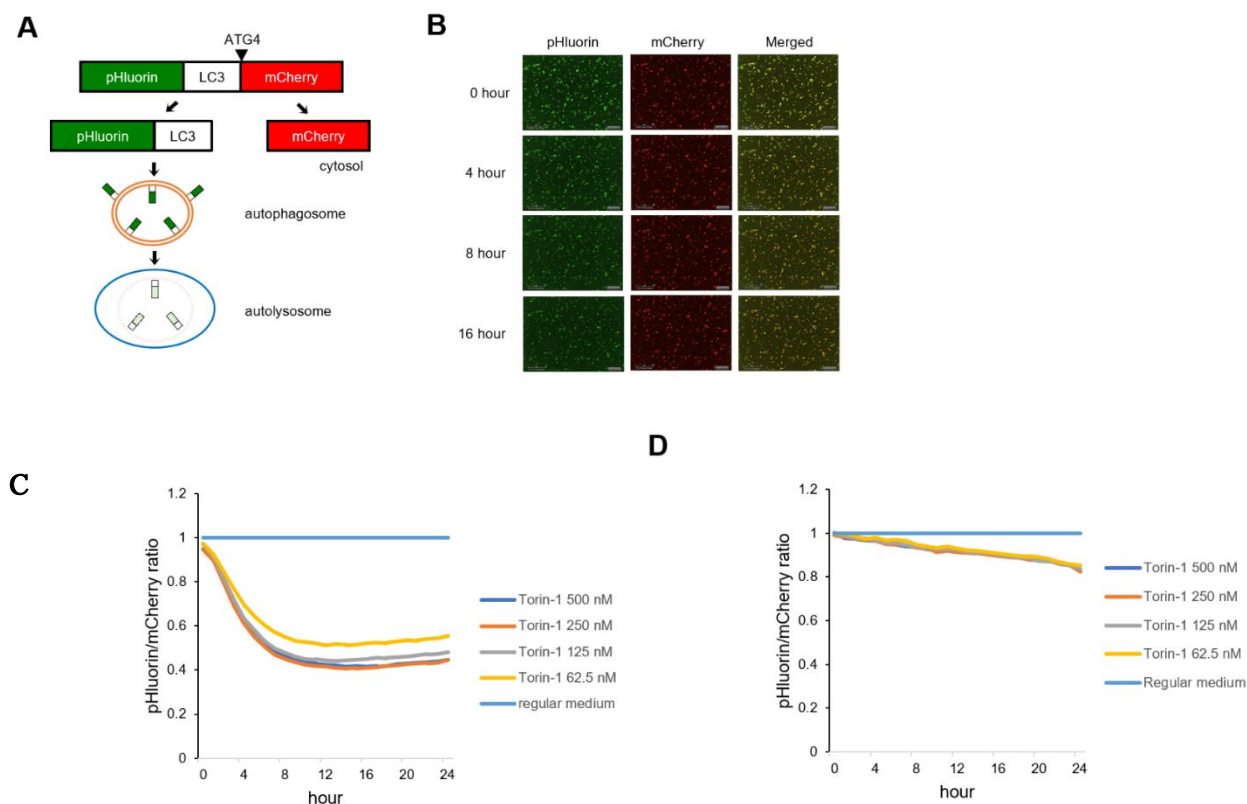
4. 研究成果

pHluorin-LC3-mCherry プロープのスクリーニングによる有用性

図 1A に示すように、pH 感受性の蛍光タンパク質 pHluorin と感受性のない mCherry を pro-LC3 に結合させ、マウス脾臓 細胞株の代表である MIN6 細胞で発現させた。オートファジーが誘導されると、ATG4 が LC3 の C 末端でプロープを切断し、pHluorin-LC3 と mCherry を生成する。pHluorin-LC3 はホスファチジルエタノールアミンによる脂質化の後、オートファゴソーム膜に移動するが、mCherry はそのまま細胞質内にとどまる。オートファゴソームはその後リソソームと融合し、酸性成分が pHluorin の緑色蛍光を消光し、pHluorin/mCherry の蛍光比が減少する。この原理を利用して、pHluorin-LC3-mCherry プロープを発現する安定な MIN6 細胞株を樹立し、自動ライブセルイメージングシステム Incucyte を用いてオートファジックフラックス刺激による蛍光の変化を観察した。

オートファジックフラックスを誘導する強力な mTORC1 阻害剤である Torin-1 を投与すると、pHluorin/mCherry 比は時間および用量依存的に有意に減少した(図 1B-1C)。一方、Atg5 KO MIN6 細胞では、Torin-1 による pHluorin/mCherry 比の減少が Torin-1 濃度と無関係にかなり抑制されており、pHluorin-LC3-mCherry プロープが MIN6 細胞でもオートファジックフラックスの活性化を反映できることが示唆された(図 1D)。さらに、アッセイの品質に関連する代表的な因子を評価したところ、シグナル/バックグラウンド比 2.0、Z' factor 0.5 となり、本スクリーニングシステムの妥当性を確認することができた。

図 1 pHluorin-LC3-mCherry プロープのスクリーニングによる有用性

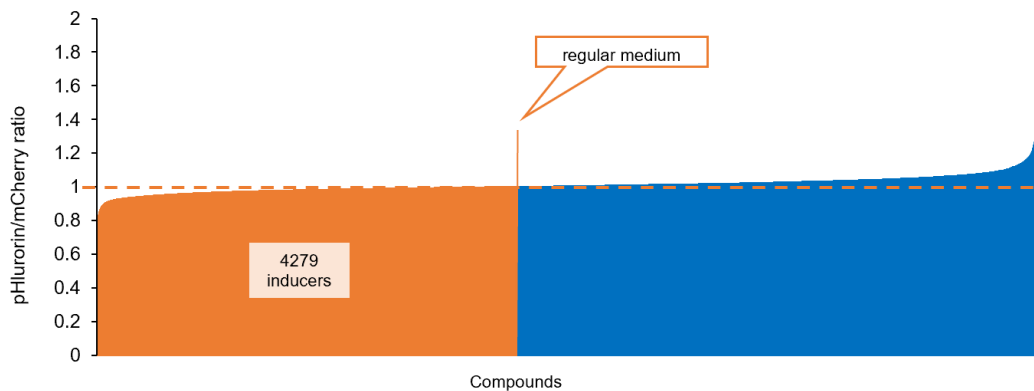


オートファジー フラックス活性化因子の一次スクリーニング

本手法を確立した後、東京大学創薬科学研究所のコアライブラリーを用いて、スクリーニングを実施した。コアライブラリーは約 9600 種類の代表的な化合物で構成されており、pHluorin/mCherry 比が 1.0 未満である 4279 種類を同定した(図 2)。候補を絞り込むため、カットオフ値を 0.91 とし、108 化合物をインデューサーとして選択した。さらに、pHluorin-LC3mCherry プロープを用いた Atg5 KO MIN6 細胞によるカウンタースクリーニングを実施し、Torin-1 よりも pHluorin/mCherry 比が低い 24 化合物を非特異的蛍光変化とみなして除外

し、84 化合物を 2 次スクリーニング対象として決定した。

図2 オートファジー フラックス活性化因子の一次スクリーニング



用量依存性に基づくオートファジックフラックス活性化剤の二次スクリーニング

次に、オートファジックフラックスの用量依存性反応に基づく誘導剤の二次スクリーニングを実施した。ほとんどの化合物は pHluorin/mCherry 比に用量依存性を示さなかったが、4 つの化合物は pHluorin/mCherry 比の用量依存的な減少を示した。次に、これらの化合物が、脂質毒性で抑制されたオートファジー フラックスを活性化できるかどうかを検討した。我々は以前、遊離脂肪酸パルミテートが膵臓 細胞株のオートファジーを活性化することをウェスタンブロットティングで報告したが、同様の設定で pHluorin-LC3-mCherry で測定したオートファジーフラックスがどのように変化するかを調べた。2mM のパルミチン酸で処理すると、当初は pHluorin/mCherry が減少し、我々が以前確認したようにオートファジックフラックスが増加したことになり、その後、徐々に比率が増加することから、パルミチン酸を長期投与するとオートファジックフラックスが抑制されることが示唆されました。さらに、化合物 B を除くこれらの化合物をパルミテートと一緒に添加すると、より長時間の投与でも pHluorin/mCherry 比の増加が抑制されたことから、同定した化合物は脂質毒性下で抑制された 細胞においてオートファジックフラックスを誘導できると考えられた。

膵 細胞におけるオートファジックフラックスの阻害剤のスクリーニング

膵 細胞では、過剰なオートファジーを介した細胞死が、2 型糖尿病で見られる 細胞の機能障害に関与している可能性も考えられているため、最後に、オートファジー フラックスに対する阻害剤を同定した。オートファジックフラックスをアミノ酸フリー培地である Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) で活性化し、処理後のフラックスの阻害を調べることでコライブラリーの化合物をスクリーニングしました。一次スクリーニングでは、HBSS で pHluorin/mCherry 比 > 1.0 を示す 4718 化合物を選択した。候補を絞り込むため、カットオフ値を 1.5 とし、111 化合物を阻害剤として選択した。次に、これらの化合物の用量依存的な反応に基づき、二次スクリーニングを行った。その結果、膵 細胞におけるオートファジー細胞死を制御する候補として、用量依存的にオートファジー フラックスを阻害する 5 つの化合物が同定された。

本研究では、pHluorin-LC3-mCherry プローブを発現させた MIN6 細胞を用いて、膵臓 細胞におけるオートファジー フラックスのモジュレーターに関する薬剤スクリーニングを実施した。誘導剤については、Core Library に登録されている 9600 化合物の中から 4 化合物を選択し、その化合物の投与により、脂質毒性によるオートファジックフラックスの阻害が回復することを示した。さらに、阻害剤についても薬剤スクリーニングを実施し、オートファジー細胞死によって引き起こされる 細胞機能障害を改善する可能性のある 5 つの化合物を同定した。

pHluorin-LC3-mCherry プローブは、オートファジックフラックスの高感度レポーターであり、用量依存的な反応の違いを検出することが可能である。また、この連続モニタリングにより、同一サンプルにおける蛍光の変化を観察することができ、本実験における脂質毒性の複雑な影響を示すことができた。

同定された化合物は、パルミチン酸で処理した MIN6 細胞のオートファジックフラックスの抑制を回復させることに成功し、これらの化合物が膵 細胞におけるオートファジックフラックスの活性化剤、2 型糖尿病で特徴的な 細胞機能不全の治療薬の有力な候補であることを示唆している。今後、ob/ob マウスやヒト IAPP トランスジェニックマウスなどの 2 型糖尿病モデルに対して、これらの誘導剤の効果を検討する必要がある。また、mTOR 阻害剤のような活性化因子は、細胞の生存を妨げることで 細胞の機能を低下させるため、これらの化合物がオートフ

アジを活性化するメカニズムを明らかにする必要がある。

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 1件）

1. 発表者名 Minami Ito, Yuya Nishida, Shuhei Aoyama, Hirotsugu Uzawa, Tatsuya Iwamoto, Hirotatsu Kojima, Hirotaka Watada
2. 発表標題 Identification of Novel Compounds That Regulate Autophagy Flux and Their Application to Drug Discovery
3. 学会等名 10th International Symposium of Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤南, 西田友哉, 青山周平, 金井晶子, 植木響政, 岩本達也, 鷗澤博嗣, 飯田雅, 小島宏達, 綿田裕孝
2. 発表標題 : 膵細胞においオートファジーフラックスを制御する新規化合物の同定と創薬への応用.
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会, 鹿児島県(日本), 2023/5/11-13,
4. 発表年 2023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	西田 友哉 (Yuya Nishida) (10581449)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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
---------	---------