

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710194

研究課題名（和文） PKC ϵ を標的とした2型糖尿病に対する新規治療薬の開発

研究課題名（英文） Generation of novel drug targeting protein kinase epsilon for type 2 diabetes mellitus.

研究代表者 米沢 朋（YONEZAWA TOMO）

独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・流動研究員

研究者番号：60515964

研究成果の概要（和文）：我々の研究グループによるゲノムワイドなマイクロサテライト解析の結果、2型糖尿病の感受性遺伝子の一つとしてプロテインキナーゼ C ϵ （PKC ϵ ）が同定された。また、*In silico* 分子デザイン戦略により6万種類の化合物ライブラリーから PKC ϵ の活性に変化を与える既存薬 X を含む多数の化合物を同定し、分子および培養細胞レベルで効果を確認している。

研究成果の概要（英文）：We identified the susceptible gene as a protein kinase C epsilon (PKC ϵ) for type 2 diabetes mellitus via genome-wide association study using microsatellites, prompting us to generate the small molecule drug targeting PKC ϵ . Our *in silico* strategy using over 60,000 chemical library identified several potential compounds including drug X possibly affecting the activity of PKC ϵ . We also validated the effect of them using molecular- and cell-based assay.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：2型糖尿病；プロテインキナーゼ C ϵ （PKC ϵ ）；新規治療薬；トランスレシヨナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

わが国において、糖尿病が強く疑われる成人は約 2210 万人と推定されている。厚生労働省の報告では、2007 年度では 2002 年の調査に比べ 590 万人（36.4%）増加し、今後、増加の一途をたどると予測され、迅速に対策

を取る必要のある社会問題である。東海大学医学部、我々の研究グループによる大規模なゲノムワイドなマイクロサテライト解析の結果、2型糖尿病の感受性遺伝子として PKC ϵ が同定された。また、我々の *In silico* 分子デザイン戦略により 6万種類の化合物ライブ

ラリーから PKC ϵ の活性に変化を与える多数の化合物を同定し、分子および培養細胞レベルで効果を確認している。解析の課程で、標的分子が未同定の既存糖尿病治療薬（既存薬 X）が PKC ϵ を標的としていることを確認している。本研究では、新規化合物および既存薬 X の改良薬により生活習慣病、特に 2 型糖尿病に対する新規治療薬の作出を目指す。

2. 研究の目的

これまでの研究により、In silico 解析により 6 万種類の化合物ライブラリーより、V1-2 と同様の活性をもつものを 22 個、機能未知ポケットに結合するものを 24 個を同定した。V1-2 と同様の活性をもつ化合物については、PKC ϵ と ϵ RACK の組み換え体蛋白質を大腸菌およびヒト培養細胞を用いて作製し、PKC ϵ と ϵ RACK との蛋白質相互作用をビアコアにより検出し、化合物による相互作用阻害効果を検討した。その結果、8 個の化合物の薬効が確認された。加えて、培養細胞においても PKC ϵ の膜移行を阻害することも確認している。一方、機能未知ポケットに結合する化合物に既存薬 X が同定され、培養細胞において PKC ϵ の膜移行を阻害する効果を確認している。同時に、既存薬 X と構造が類似する化合物も複数同定している。

3. 研究の方法

初年度には、化合物の病態への薬効を、また、既存薬 X と PKC ϵ との結合を検討する。
①インスリン分泌能など正常な性質を有しているマウス膵臓 β 細胞株である MIN6 を用いて、インスリン合成および分泌を検討する。加えて、脂肪細胞から分泌されるインスリン感受性を亢進させ糖尿病態を改善するホルモンについて、マウス脂肪細胞株 3T3-L1 を用いて、レプチンおよびアディポネクチン合成および分泌を検討する。化合物が細

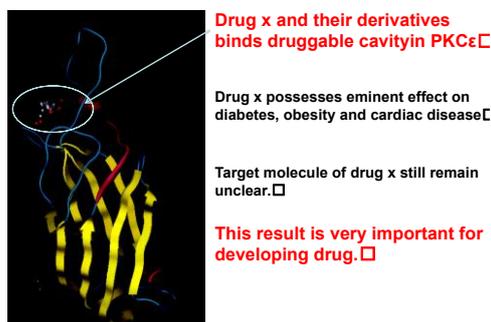
胞内脂肪蓄積におよぼす効果も検討する。②既存薬 X をセンサーチップ上に固定し、PKC ϵ との結合をビアコアを用いて検討する。また、放射性同位体や蛍光物質でラベルした既存薬 X を用い、分子および培養細胞レベルで結合を検討する。

最終年度は、糖尿病モデルである db/db マウスへの低分子化合物投与による生体内での糖尿病態に対する治療効果を検討する。化合物をマウスに投与後、経時的に採血を行い血中のインスリン、インスリン前駆体から切り出される C-ペプチド、グルコース濃度を測定する。

4. 研究成果

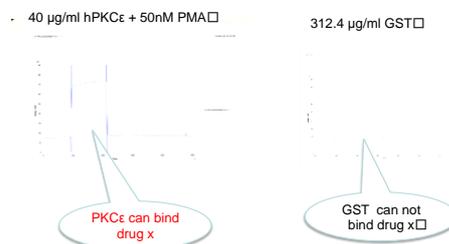
In silico 戦略により、⑥万種類の化合物ライブラリーから PKC ϵ の機能未知ポケットへ結合する化合物として既存薬 X が同定された（図①）。既存薬 X は薬効が高く特異的な構造を持つ化合物であり、構造の類似する類縁体も同定できた。

図① Docking simulation of PKC ϵ 's druggable cavity. □

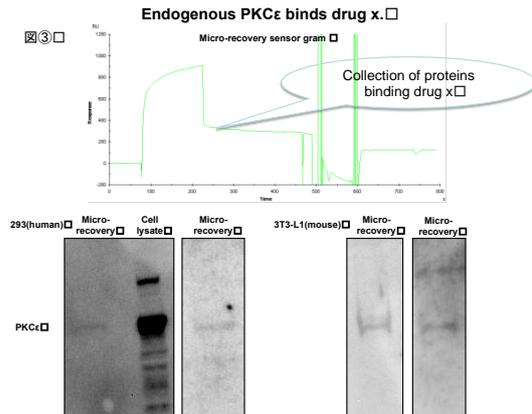


合するかどうかを調べるために、バキュロウイルスを用いて PKC ϵ の組み換え体蛋白質を作成し、ビアコアを用いて、既存薬 X および PKC ϵ の結合を検討した。既存薬 X をセンサーチップ上に固定し、そこへ組み換え体 PKC ϵ を流し、結合を検討した。我々の予測と一致し、PKC ϵ と既存薬 X との結合が確認できた（図②左）。PKC ϵ を流した量の約 8 倍量のグルタチオン S トランスフェラーゼを流したところ結合は全く確認できなかった（図②右）。

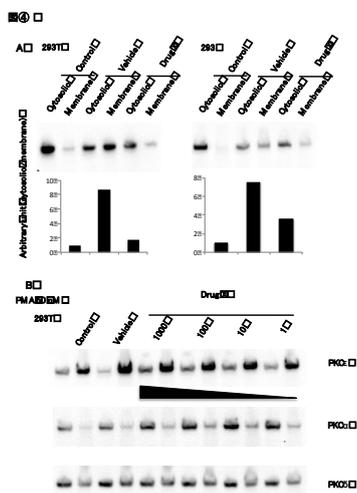
図② Recombinant human PKC ϵ binds drug x. □



また、ビアコアを用いたマイクロリカバリーおよびウェスタンブロッティングを用いて、既存薬 X および PKC ϵ との相互作用を検討した。具体的には、既存薬 X を固定したセンサーチップにヒト培養細胞株 293T またはマウス培養細胞株 3T3-L1 の細胞溶解液をセンサーチップ上に流し、細胞内の既存薬 X に結合するタンパク質を濃縮および回収した (図③上)。その後、PKC ϵ 特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングを用いて、濃縮液中に PKC ϵ が存在するかどうかを検討した。ヒトおよびマウスともに濃縮液中に PKC ϵ が存在することが確認できた (図③下)。



培養細胞において、PMA 刺激時の PKC ϵ のトランスロケーションへ既存薬 X が影響を及ぼすかどうかを検討した。具体的には、既存薬 X を全培養を行い、その後、PKC ϵ を含む PKC の作動薬である PMA を刺激後、細胞を回収し、細胞質画分および細胞膜画分を精製分離後、PKC α 、PKC δ および PKC ϵ 特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングによりタンパク質の量を定量した。既存薬 X は PMA 刺激による PKC ϵ の膜画分への移行を阻害することが認められた (図④上)。この阻害効果は既存薬 X の濃度依存的に起こることも確認できた (図④下)。加えて、他の PKC アイソフォームである PKC α および PKC δ への効果は確認できなかった (図④下)。



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 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○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

米沢 朋 (TOMO YONEZAWA)

独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・研究員

研究者番号: 60515964

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: