

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670151

研究課題名(和文)ケミカルライブラリによる新規糖尿病薬の開発と作用機序の解析

研究課題名(英文)Identification of activator of glucose-stimulated insulin secretion by high-throughput chemical screening

研究代表者

牛込 剛史(Ushigome, Takeshi)

群馬大学・生体調節研究所・技術職員

研究者番号：60529551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は、世界中に患者が四億人以上いると言われ、細胞の状態を良好に保ち、かつ分泌をコントロールできるような新規薬剤の開発が望まれる。研究代表者らは、ハイスループットにインスリン分泌をアッセイできる系を開発し、ケミカルライブラリを用いて、インスリン分泌に直接影響のある化合物の網羅的スクリーニングを行った。その結果、分泌に強く影響のある化合物を同定した。さらにこれら化合物に結合するたんぱく質を探索したところ、分泌促進化合物の一つがミトコンドリアたんぱく質と特異的に結合することがわかった。これにより本研究の目的であった、新規糖尿病薬開発へつなげるための基礎的なデータを得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Over 400 million people had diabetes mellitus in the world, and new drug development is important for the reason. We established a high-throughput screening assay system for the identification of chemical compounds that enhance (or inhibit) insulin secretion. In consequence, we identified six effective chemicals. To investigate molecular mechanism of these chemical compound activated (or inhibited) insulin secretion, we performed comprehensive binding assay with these chemicals in INS1 832/13 cells. we identified mitochondrial protein as the one of activator of chemical. Therefore, we obtained basic data to develop a new drug for diabetes.

研究分野：分子生物学

キーワード：インスリン 糖尿病 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、世界中に患者が4億人以上いると言われる。我が国でも増加の一途を辿っており、国民の健康維持や医療費の増加において深刻な問題になっている。糖尿病の主な原因として、膵細胞の破壊(1型糖尿病)、もしくは機能低下によるインスリン分泌の減少(2型糖尿病の主因の一つ)が挙げられる。特に我が国ではインスリン分泌低下による糖尿病発症が大きな要因になっており、インスリン分泌をコントロールできる薬剤の開発は依然重要である。したがって細胞の状態を良好に保ち、かつ分泌をコントロールできるような新規薬剤の開発が望まれる。

2. 研究の目的

研究代表者らは、ハイスループットにインスリン分泌をアッセイできる系を開発し、理化学研究所が所有するケミカルライブラリを用いて、インスリン分泌に直接影響のある化合物の網羅的スクリーニングを行った。その結果、分泌に強く影響のある化合物を6種同定した。本研究の目的は、これらヒット化合物を元にして、より効果的な化合物の同定、さらに細胞や個体における作用機序を解析し、新しい糖尿病薬開発へとつなげることである。

3. 研究の方法

3-1 化合物スクリーニング解析

研究代表者らは、インスリン顆粒に内包されるたんぱく質と緑色蛍光たんぱく質を融合した分子(NPY-Venus)を、安定的に発現させたINS1ラット細胞株を作成し、グルコース刺激時のインスリン分泌量を、培養液中に放出されるGFP蛍光量に置き換えて、マイクロプレートリーダーで簡便かつハイスループットに計測できる系を開発した(図1)。この系を用いて、理研・NPDepoの化合物ライブラリ(約25000種類)から類縁体ごとにク

ラストリングした、パイロットライブラリ376化合物を細胞に添加し、スクリーニング解析を行った(図1)。その結果、著しくインスリン分泌に影響のある6種類の化合物を同定した。すなわち、1種類は追加分泌(グルコース刺激時の分泌)のみを、3種類は基礎分泌(グルコース非刺激時の分泌)のみを促進する化合物であり、他の2種類は分泌をほぼ完全に阻害する化合物であった。分泌促進化合物は、新規糖尿病薬となる可能性を秘めており、阻害化合物においては、その作用機序を調べることにより、新たな分泌メカニズムの解明につながる可能性がある。実際、これらの化合物をマウス膵島に付加してインスリン分泌を計測したところ、本アッセイ系での知見と同様の効果が得られることを確認している。

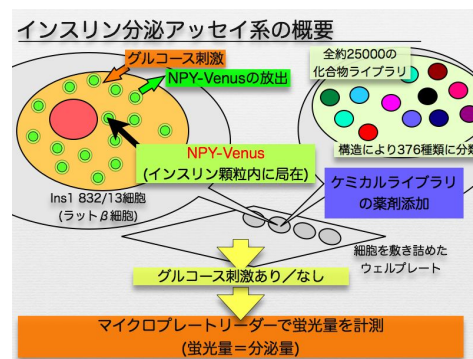


図1 インスリン分泌アッセイ系の概要

3-2 類縁体の解析

分泌に影響のあった6種類の化合物それぞれの類縁体(一つにつき約60種類)について、スクリーニング解析で用いたアッセイ系による再解析を行った。

3-3 単離膵島を用いた解析

C3Hマウスから膵島を単離し、それに化合物を添加し、グルコース刺激によるインスリン分泌への影響を調べた。

3-4 同定されたインスリン分泌促進化合物

のターゲット分子の同定

同定された分泌促進化合物がどのようなメカニズムで細胞に作用するかを調べるため、これら化合物と結合する細胞内たんぱく質を探索し、作用するターゲット分子の同定を試みた。まずアガロースビーズにヒット化合物を共有結合させたものを、共同研究先の理化学研究所・ケミカルバイオロジー研究グループから供与を受けた。これと INS1 細胞のたんぱく質抽出液を混合してプルダウンアッセイを行った。結合たんぱく質は SDS-PAGE により展開し、たんぱく質検出試薬によりたんぱく質バンドを検出した。その後バンドを切り出し、質量分析装置によりたんぱく質を同定した。

4. 研究成果

細胞から分泌されるインスリン量をハイスループットに計測できる系を開発し (図 1)、化合物ライブラリの化合物を一種類ずつ添加して、グルコース刺激によるインスリン分泌に影響のある化合物を探索した。その結果、著しくインスリン分泌に影響のある 6 種類の化合物を同定した。すなわち、1 種類は追加分泌 (グルコース刺激時の分泌) のみを、3 種類は基礎分泌 (グルコース非刺激時の分泌) のみを促進する化合物であり、他の 2 種類は分泌をほぼ完全に阻害する化合物であり、これらの化合物を以後の解析に用いた。

分泌に影響のあった 6 種類の化合物それぞれの類縁体 (一つにつき約 60 種類) についてアッセイ系を用いた再解析を行い、より効果的に分泌に影響する類縁体を同定した。

次にマウス単離膵島においてインスリン分泌に影響があるかどうかを調べた。ヒット化合物をマウス膵島に付加し、高グルコース刺激によるインスリン分泌を計測したところ、アッセイ系での知見と同様の促進・阻害効果が得られることを確認した。このことにより、これらヒット化合物が *in vivo* におい

ても同様の効果を示す可能性が示唆された。

次にこれらヒット化合物が、どのような分子メカニズムで膵細胞に働き、インスリン分泌を促進・阻害するかを調べるため、ヒット化合物に特異的に結合するたんぱく質分子の同定を行った。解析の結果、最も強く分泌を促進する化合物に、ミトコンドリアのたんぱく質が結合することがわかった。ミトコンドリアは、高グルコース刺激によるインスリン分泌メカニズムに必須の役割を担っており、本分泌促進化合物がミトコンドリアのたんぱく質に作用している可能性は、十分に考えられる。今後同定されたミトコンドリアたんぱく質に、この分泌促進化合物がどのように作用しているのかを解析する予定である。

これまでに膵細胞に直接働きかける糖尿病薬はいくつか開発されているが、基礎分泌、追加分泌特異的に作用し、より少ない副作用で効果的にインスリン分泌をコントロールできる薬剤の開発は未だ喫緊の課題である。本研究で行われた網羅的な薬剤スクリーニング解析は、今後行われる新規糖尿病薬開発や、新しい分泌調節機序解明のための基盤となると思われる。

5. 主な発表論文等

〔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)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛込 剛史 (USHIGOME Takeshi)

群馬大学・生体調節研究所・技術職員

研究者番号：60529551

(2) 研究分担者

松永 耕一 (MATSUNAGA Kohichi)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20570162

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし