

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860169

研究課題名(和文) 2型糖尿病治療の創薬標的分子としてのリゾホスファチジン酸第4受容体

研究課題名(英文) Lysophosphatidic acid receptor 4 as a potential drug target for the treatment of type 2 diabetes

研究代表者

大戸 貴代(Ohto-N, Takayo)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80511378

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)：本研究は、生理活性脂質であるリゾホスファチジン酸の第4受容体(LPA4)特異的アンタゴニストが2型糖尿病の新規創薬ターゲットとなりうると考え、特異性・親和性に優れたLPA4アンタゴニストを得ることを目的としている。研究期間内に、東京大学創薬機構保有の化合物ライブラリーよりLPA4特異的なアンタゴニスト活性をもつ37の化合物を得た。また、LPA4に対するアンタゴニスト活性が報告されている化合物とその類縁体の計7化合物の活性についても評価したが、アンタゴニスト活性は検出できなかった。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid receptor 4 (LPA4)-deficient mice are resistant to high-fat diet-induced diabetes. This observation suggests that LPA4 antagonists may provide new therapeutic approaches for type 2 diabetes. Thus, the purpose of this project was to find LPA4 antagonists by screening a chemical library of Drug Discovery Initiative, The University of Tokyo.

I used rat neuroblastoma B103 cells, which lack endogenous responses to LPA, to assess the functions of LPA4. In contrast to the parental B103 cells, LPA4-expressing B103 cells (B103-LPA4) showed Ca²⁺ influx in response to LPA. By using B103-LPA4 cells, I identified 37 compounds that activate LPA4 predominantly. Furthermore, I examined commercially available two compounds, which were reported to be LPA4 antagonists, and their derivatives. However, no antagonist activities were detected in these compounds.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リゾホスファチジン酸

1. 研究開始当初の背景

わが国において、糖尿病は疑い例を含めた有病率が 20% を超える代表的な国民病である。その大部分は生活習慣が原因で発症する 2 型糖尿病であり、主に過食、運動不足に起因して生じるインスリン抵抗性が病態の根幹をなしている。過食によって摂取した余剰のエネルギーは、エネルギー貯蔵効率の高い中性脂肪の形で脂肪細胞に蓄積される。インスリン抵抗性は、過剰な脂肪の蓄積によって肥大化した脂肪細胞を含む脂肪組織に炎症が誘導されることで生じる。2 型糖尿病には複数のメカニズムによる治療薬が存在しているが、これらの薬剤を適切に処方しても、治療の良好例が約 30% 前後にとどまっているという問題点や低血糖、体重増加などの副作用、禁忌となる疾患が存在しており、さらなる新薬の開発が望まれている。

リゾホスファチジン酸(LPA)は、がん細胞の浸潤や増殖の誘導、疼痛反応、受精卵の着床、血管/リンパ管形成、体毛形成など多彩な生命現象への関与が知られる生理活性脂質である。LPA は、G タンパク質共役型受容体(GPCR)を介した応答によってその生理機能を発揮することが、遺伝子欠損マウスの表現型解析によって明らかにされている。現在までに計 6 つの GPCR が LPA 受容体として報告されており、これらは Endothelial Differentiation Gene (Edg)ファミリーに属する 3 つの Edg 型受容体(LPA1, LPA2, LPA3)と 3 つの非 Edg 型受容体(LPA4, LPA5, LPA6)に分類される。本研究グループは、これまでに初の非 Edg 型受容体である LPA 第 4 受容体(LPA4)(Noguchi, *JBC*, 2003)を世界に先駆けて同定してきた。また、LPA4 が胎生期における血管及びリンパ管形成に関与すること(Sumida, *Blood*, 2010)に加え、新たに 2 型糖尿病の病態発症に関与することをみいだした。

2. 研究の目的

マウス 2 型糖尿病モデルとして知られる高脂肪食負荷モデルでは、体重や内臓脂肪重量の増加を伴ったインスリン抵抗性や脂肪肝への移行が認められる。LPA4 欠損マウスでは、体重や内臓脂肪重量の増加は野生型と同等に生じるにもかかわらず、インスリン抵抗性や脂肪肝などの 2 型糖尿病の病態が軽減している。解析の結果、LPA4 欠損マウスで認められた脂肪組織の質的变化は、糖尿病治療薬チアゾリジン誘導体として知られる核内受容体 PPAR γ アゴニストによって起きるものと酷似していることがわかった。PPAR γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして、前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞へと分化する過程を厳密に制御しているが、実際 LPA4 欠損マウスの脂肪組織では PPAR γ の発現が亢進していた。そこで我々は、LPA4 アンタゴニストが 2 型糖尿病の新規創薬ターゲットとなりうると思った(図)。LPA の受

容体が 6 種類も存在することから、2 型糖尿病治療薬としての LPA4 アンタゴニストにはより高い受容体反応特異性が求められる。しかしながら、LPA4 特異的なアンタゴニストはこれまで報告がない。

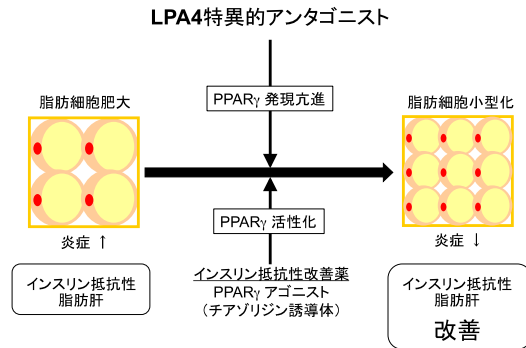


図 LPA4 アンタゴニストのインスリン抵抗性改善作用による糖尿病治療薬としての可能性

本研究では、東京大学創薬機構保有の化合物ライブラリーより LPA4 を拮抗阻害する特異的アンタゴニストのリード化合物を同定することを目的とする。本研究の遂行によって得られた LPA4 特異的アンタゴニストは、2 型糖尿病の新薬の開発にシーズを提供できるものと期待される。

3. 研究の方法

本研究を遂行するための基盤となるハイスループットアンタゴニストスクリーニングのアッセイ系は、スクリーニング系の精度の指標である Z' 値(0.5 以上であることが望ましいとされる)が 0.7 を超える精度を安定的に保っているうえ、日間変動も小さく再現性に優れていた。化合物のアンタゴニストとしての活性は、LPA4-Gq 経路による細胞内カルシウム応答の阻害効果を指標として評価した。アッセイには、LPA に対する応答を示さない特徴をもつラット神経芽腫細胞株 B103 細胞を用いた。この細胞に LPA4 を安定的に過剰発現させることで(B103-LPA4 細胞)、LPA4 依存的な LPA への応答を明確に検出することができた。細胞をカルシウム指示薬(Fluo-4 AM)で標識した後、384 ウェルプレートに自動分注装置によって 2×10^4 /well で播種し、東京大学創薬機構が保有するライブラリー由来の化合物を終濃度 $10 \mu\text{M}$ で 1 種類ずつ室温にて 45 分間インキュベートした。リガンドであるオレオイル LPA を終濃度 $1 \mu\text{M}$ で作用させた時の細胞内カルシウム応答をハイスループット対応測定機器(浜松ホトニクス社製、FDSS7000)で測定し、溶媒(DMSO)でのみ処理した細胞の応答と比較することにより、各化合物の阻害率を算出した。

上記の測定において阻害率が高かった化合物を、以下の項目を評価し段階的に絞り込んでいった。

- ・自家蛍光の有無
- 測定波長の光を吸収して自家蛍光を放つ化

化合物は評価が困難であるため除外した。

・阻害効果の再現性

1次評価では化合物の数が多かったためn=1で測定を行ったが、阻害率が高かった化合物についての2次評価はn=4で阻害効果の再現性を確認した。

・特異性の検討

LPAの代わりにATPを作用させた際に阻害効果が認められた化合物はLPA4非特異的な反応を引き起こしているとして除外した。

・特異性の検討

上記の3項目の評価によって絞り込んだ化合物については、さらに他の4種類のLPA受容体(LPA1,2,3,5)に対する阻害効果も評価した。LPA4と同様にB103細胞に各LPA受容体を安定発現させ、細胞内カルシウム応答を測定した。LPA6はG12/13との共役のみが確認できているため、受容体の活性化を細胞内カルシウム応答として検出することができない。したがって、G12/13を介した細胞の形態変化(定性的評価)とG12/13-Gsキメラタンパク質の過剰発現によってG12/13シグナルを細胞内cAMP上昇に変換するアッセイ系(定量的評価)(Yanagida K., *JBC*, 2009)でLPA6に対する応答性を評価する計画であった。

・親和性の検討

化合物のLPA4受容体に対する親和性を、用量依存性を測定することで評価した。さらに他のLPA受容体に対する用量依存性も測定した。

4. 研究成果

LPAに対する内在性の応答を示さないラット神経芽腫細胞株B103細胞にLPA4を安定的に過剰発現させたB103-LPA4細胞をLPAで刺激したとき、LPA-LPA4-Gq経路による細胞内カルシウム応答が起きる。本研究では、細胞に添加した化合物がこのLPAへの応答を阻害する程度を指標としてアンタゴニスト候補の同定を進めた。平成26年度には、東京大学創薬機構が保有する化合物コアライブラリー(約1万種類の化合物から構成される)のLPA4に対するアンタゴニスト活性を評価した。「研究の方法」で記載した項目のうち「自家蛍光の有無」「阻害効果の再現性」「特異性の検討」を検討した結果、18の候補化合物の絞り込みに成功した。東京大学創薬機構の全化合物ライブラリー(約20万化合物から構成)に含まれる、絞り込んだ18の候補化合物の類縁体を探索したところ、97化合物がヒットした。引き続き、LPA4に対するアンタゴニスト活性が確認できた18化合物とその類縁体97化合物の計115化合物に対し「特異性の検討」「親和性の検討」を進めた。その結果、最終的に37のLPA4特異的アンタゴニストの候補化合物を得た。その中でも最も活性が強かった化合物Aは、LPA4に対するIC₅₀(50%阻害濃度)が314 nMであり、LPA4以外のLPA受容体

(LPA1,2,3,5)に対しては、効果的な阻害作用を示さなかった。G12/13を共役しているLPA6へのアンタゴニスト活性に関しては、研究期間内に評価することが出来なかった。

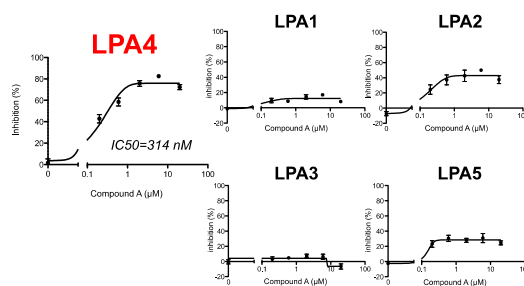


図 化合物Aの各LPA受容体に対する用量依存性

平成27年度にはこれらの化合物に加え、LPA4に対するアンタゴニスト活性が報告されている化合物についても阻害効果の評価を行った。BrP-LPA (*ChemMedChem*, 2007, 2, 679-690), H2L 5987411 (*J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 17304-17319)は、IC₅₀がそれぞれ0.3 μM, 1.5 μMの化合物として報告されている。BrP-LPA, H2L 5987411に加え5つのH2L 5987411類縁化合物の計7化合物を評価した結果、アンタゴニスト活性は検出できなかった。この結果は、実験に用いたシグナル測定系や細胞株の違いに起因するかもしれないが、明確な理由は不明である。

今後は、候補化合物で認められているアンタゴニスト活性が受容体への直接結合によるものか検証する。具体的には、LPA4を過剰発現している細胞の膜画分を生化学的手法によって分離し、放射線同位体標識されているリゾホスファチジン酸の膜画分への結合を各候補化合物が競合阻害するか否かによって評価する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Igarashi H., Akahoshi N., Ohto-Nakanishi T., Yasuda D., Ishii S.

The lysophosphatidic acid receptor LPA4 regulates hematopoiesis-supporting activity of bone marrow stromal cells.

Scientific Reports (2015) 5, 11410

doi: 10.1038/srep11410. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

大戸貴代、竹田正秀、石井聡

リゾホスファチジン酸第五受容体(LPA5)の喘息病態進展における重要性

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015)

2015年12月1-4日 神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル(兵庫県 神戸市)

口頭発表/ポスター発表

大戸貴代、竹田正秀、石井聡

マウス喘息モデルにおけるリゾホスファチジン酸第五受容体(LPA5)の病態生理機能

第57回日本脂質生化学会

2015年5月28日 一橋大学一橋講堂(東京)

都 千代田区) 口頭発表

〔図書〕(計1件)

大戸貴代、柳田圭介、清水孝雄、石井聡
2型糖尿病の新規創薬ターゲットとしての
LPA 第4受容体
実験医学増刊号(羊土社)(2014) 32 286-291

6. 研究組織

(1)研究代表者

大戸 貴代(OHTO-N Takayo)

秋田大学 大学院医学系研究科 助教

研究者番号: 80511378

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし