創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第２分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第２分野　課題番号　KH23105

アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた創薬探索技術の確立と新規糖尿病治療薬開発への応用

所　属　千葉大学大学院医学研究院
研究者　柴崎　忠雄

要旨

cAMP-GEFII に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを　薬剤のスクリーニングに利用する方法を確立し、cAMP-GEFII を標的分子とした cAMP 依存性インスリン分泌を増強する新規糖尿病治療薬を開発する。

1.　研究目的

日本人の糖尿病の特徴は発症初期より膵β細胞からのインスリン分泌が障害されている２型糖尿病である。２型糖尿病の治療薬として最も広く用いられているのが ATP 感受性 K^+チャネルを標的とし、膵β細胞からのインスリン分泌を促進するスルホニル（SU）尿素剤である。しかし、糖尿病患者の中には SU 剤の治療開始時より不応性である「一次無効」や治療開始時から一定期間で効かなくなる「二次無効」が知られており、糖尿病治療を困難なものにしている。主任研究者らは最近、新たな cAMP 結合分子、cAMP-GEFII を同定し、cAMP-GEFII が cAMP 依存性インスリン分泌を PKA の活性化を介さずに増強するという新たなメカニズムを発見した。本研究はスルホニル（SU）尿素剤とは全く異なる作用点を持つインスリン分泌刺激薬として、cAMP-GEFII を標的分子とした新規糖尿病治療薬の開発とともに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた薬剤スクリーニング方法を確立する。

2.　研究方法

マウス単離膵臓ランゲルハンス島（膵島）あるいはマウスインスリン分泌細胞株 MIN6 を用いて以下の解析を行った。

①アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた薬物スクリーニング法を確立するために、cAMP 依存性インスリン分泌増強における種々の条件を検討した。1）cAMP 依存性インスリン分泌増強が適切に評価できる刺激条件を検討した。2）アンチセンスオリゴヌクレオチドの処置期間を検討した。3）ウエスタンブロットを行い、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を蛋白レベルで確認した。4）cAMP-GEFII を介したインスリン分泌増強機構と PKA 介したインスリン分泌増強機構をアンチセンスオリゴヌクレオチドと PKA 阻害剤 H-89 を組み合わせ検討した。

① cAMP-GEFII を標的分子とした新規糖尿病治療薬の作用機序を解析するために、cAMP-GEFII を介したインスリン分泌増強の分子機構について検討した。1) cAMP-GEFII は Rab3 の標的分子 Rim2 と相互作用することから、Rim2 変異体や Rim2 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを作成し、cAMP-GEFII を介するインスリン分泌増強における Rim2 の役割について MIN6 細胞を用いて検討した。2) cAMP 依存性インスリン分泌増強には細胞内カルシウム濃度の上昇が必要であることから、cAMP-GEFII を介する分泌にもカルシウム濃度上昇が関与するかを検討した。

3. 研究成果

①薬物スクリーニング法の確立

1) インクレチン (GLP-1 と GIP) によるインスリン分泌増強はグルコース：11.1mM と GLP-1 (あるいは GIP)：100nM が至適濃度であった。

1) 4 日間のアンチセンスオリゴヌクレオチド処置で cAMP-GEFII 蛋白の発現レベルは有意に低下した。なお、PKA の調節サブユニット IIα、分泌関連分子である Rab3、VAMP-2 の発現に対し、アンチセンスオリゴヌクレオチド処置は影響なかった。

1) アンチセンスオリゴヌクレオチド処置によって cAMP アナログの 8-brome-cAMP やインクレチンによるインスリン分泌増強は約 50％抑制された。一方、アンチセンスオリゴヌクレオチドと PKA 阻害剤 H-89 を組み合わせて処置すると cAMP 依存性インスリン分泌増強は約 80-90％抑制された。

②cAMP 依存性インスリン分泌増強における cAMP-GEFII の作用機序

1) Rim2 変異体を導入した MIN6 細胞におけるインスリン分泌増強は、Rim2 変異体を導入しなかった細胞に比し有意に低下した。

1) Rim2 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した MIN6 細胞において内因性 Rim2 の発現は低下しなかった。したがって、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは Rim2 の発現を抑制する効果が無く、cAMP-GEFII を標的分子とした新規糖尿病治療薬の作用機序の解析には使用できないことが明らかになった。現在、Rim2 に対するリボザイムを作成し、内因性 Rim2 の発現に対する効果を検討中である。

1) cAMP-GEFII を介したインスリン分泌増強でも細胞外からの流入あるいは細胞内カルシウムストアからの放出による細胞内カルシウム濃度の上昇は必要であった。

4. 考　察

cAMP 依存性インスリン分泌増強を評価して新規薬物を開発する上で、測定条件の基礎的検討や cAMP-GEFII の生理的役割の解明は不可欠である。cAMP-GEFII に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置は膵島の内因性 cAMP-GEFII の発現を特異的に抑制したことから、同様の条件下で膵島のバッチ法によるインスリン分泌アッセイを行うことができると考えられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドと PKA 阻害剤 H-89 を組み合わせたインスリン分泌の解析から、cAMP-GEFII を介するインスリン分泌機構は cAMP 依存性インスリン分泌において極めて重要であることが明らかとなった。また Rim2 は cAMP-GEFII と相

互作用することによって、cAMP-GEFII を介するインスリン分泌機構に関与することが解明された。以上の研究成果によって薬剤プールを用いた 1 次スクリーニングのための準備は整ったことから、現在、薬物のスクリーニング中である。

5. まとめ

cAMP 依存性インスリン分泌において、cAMP-GEFII を介するインスリン分泌機構は重要な役割を果たしており、cAMP-GEFII を標的とした新規糖尿病治療薬の開発は有用であると考えられる。単離膵島、膵β細胞株へアンチセンスオリゴヌクレオチドを処置し、インスリン分泌を評価する方法は確立され、今後、薬剤スクリーニングを効率的に進めることができると期待される。

6. 研究発表

Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., & Seino, S. Critical role of cAMP-GEFII-Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. J. Biol. Chem. 276, 46046-46053(2001).

Ueno, H., Shibasaki, T., Iwanaga, T., Takahashi, K., Yokoyama, Y., Liu, LM., Yokoi, N., Ozaki, N., Matsukura, S., Yano, H., & Seino, S. Characterization of the gene EPAC2: structure, chromosomal localization, tissue expression, and identification of the liver-specific isoform. Genomics. 78, 91-98(2001).

知的所有権の取得状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行　財団法人　ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001　東京都中央区日本橋小伝馬町13番４号
共同ビル（小伝馬町駅前）４Ｆ
電話　03(3663)8641　　FAX　03(3663)0448

印刷　株式会社　ソーラン社