

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 SU 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の確立を目的とする。

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剤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、さらに薬剤のスクリーニングを開始した。具体的に、
 - 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) ウェ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 を単独あるいは組み合わせて検討した。

5) SU 剤は現在、抗糖尿病薬として最も広く使用されている。したがって SU 剤をリード化合物とした新規糖尿病治療薬の有力な候補となることから、SU 剤で検討を加えた。なお一次無効、二次無効については薬剤のスクリーニング後、十分に検討する。

② cAMP-GEFII を介する cAMP 依存性インスリン分泌増強の分子機構には多くの不明な点がある。cAMP-GEFII を標的分子とした新規糖尿病治療薬を開発するにあたり、その作用機序を明らかにすることは副作用の検討等を含めて極めて重要である。そこで、

- 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) インスリン分泌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) cAMP-GEFII と相互作用する分子の同定とその役割を検討した。

3. 研究成果

①薬剤スクリーニング法の確立と薬剤スクリーニング

- 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、GLP-1 (あるいは GIP) : 100nM が至適濃度であった。
- 2) 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 II α 、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。
- 3) 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-bromo-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。
- 4) SU 剤からの薬剤スクリーニングにあたり、低血糖時に SU 剤存在下かつ cAMP 非存在下でアンチセンスオリゴヌクレオチド処置しインスリン分泌を検討したところ、インスリン分泌は抑制された。当初、cAMP 非存在下、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置しても SU 剤はインスリン分泌に影響を及ぼさないと予想していた。しかし今回、インスリン分泌が低下したことから、SU 剤は cAMP 依存性で cAMP-GEFII を介したインスリン分泌経路の一部を担っていることを示唆している。したがって SU 剤は 1 次スクリーニングで除外する薬剤 (インスリン分泌促進効果はあるが、cAMP を介していない薬剤) に分類されないと考えられ、2 次スクリーニングの候補の一つとしてスクリーニングを継続する。

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

- 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。
- 2) 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。
- 3) cAMP-GEFII と相互作用する分子として Piccolo を同定した。Piccolo 変異体を導入した MIN6 細胞で cAMP によるインスリン分泌増強は有意に低下した。
- 4) Piccolo 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、単離膵島において、cAMP によるインスリン分泌増強は有意に低下し、しかもこの低下は cAMP-GEFII を介した分泌であることが明らかになった。したがって、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは 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使用できることが明らかになった。
- 5) 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

- 1) cAMP 依存性インスリン分泌増強を評価して新規薬剤を開発する上で、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た。これらの条件の下で行った薬剤スクリーニングの結果、SU 剤が 2 次スクリーニングの候補の一つに挙げられた。他の薬剤のスクリーニングも継続する。
- 2) 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 あるいは Piccolo 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、薬剤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。13 年度、単離膵島、膵β細胞株をアンチセンスオリゴヌクレオチド処置し、インスリン分泌を評価する方法は確立された。14 年度の薬剤スクリーニングから、SU 剤が候補の一つであることと予想されたため、2 次スクリーニングを進めている。また cAMP-GEFII の機能解析から、Rim2/Piccolo が関与していることが明らかとなり、スクリーニングされた薬剤の作用機序の解析に繋がると期待される。

6. 研究発表

誌上発表

- 1) Fujimoto, K., Shibasaki, T., Yokoi, N., Kashima, Y., Matsumoto, M., Sasaki, T., Tajima, N., Iwanaga, T., & Seino, S. Piccolo, a Ca^{2+} sensor in pancreatic β -cells. Involvement of cAMP-GEFII-Rim2-Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.* 277, 50497-50502 (2002) (FK and ST contributed equally to this work.)

口頭発表

- 1) 柴崎忠雄、鹿島康薫、清野進：cAMPによるインスリン開口放出のダイナミズム バイオ分子センサー研究会（2002）
- 2) 柴崎忠雄、鹿島康薫、清野進：cAMPによるインスリン開口放出のダイナミズム 第45回 日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム（2002）

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