

201307049A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

アジア人種型 2 型糖尿病の治療法及び治療薬の開発を可能にする
マウス及びヒト膵 β 細胞由来のモデル細胞系の構築

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 魏 范研

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
アジア人種型 2 型糖尿病の治療法及び治療薬 の開発を可能にするマウス及びヒト膵 β 細胞 由来のモデル細胞系の構築 魏 范研	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	7
III. 研究成果の刊行物・別刷	8

アジア人種型 2 型糖尿病の治療法及び治療薬の開発を可能にする

マウス及びヒト膵 β 細胞由来のモデル細胞系の構築

研究代表者 魏 范研 熊本大学 助教

研究要旨

アジア型 2 型糖尿病は、非肥満及び低インスリン分泌といった特徴を持ち、欧米型 2 型糖尿病とは異なる病態を示す。一方、既存の糖尿病治療薬は、特にアジア人種において高頻度の副作用が報告されている。従って、アジア人種に適した新規治療薬及び治療法の開発が必要である。しかし、アジア型 2 型糖尿病の発症原因が不明であったため、治療薬の開発及び評価が不可能であった。

Cdkal1 遺伝子の一塩基多型変異(SNPs)は、アジア人種において約四人に一人という高い頻度で保有されており、アジア型 2 型糖尿病の原因遺伝子の一つである。Cdkal1 は、リジン tRNA をチオメチル化し、リジンコドンの正確な翻訳に必要であった。また、Cdkal1 の膵臓 β 細胞欠損マウス(Cdkal1 KO)マウスでは、プロインスリンのリジンコドンにおける誤翻訳が原因となり、低インスリン分泌及び非肥満といったアジア型 2 型糖尿病に類似した表現型を呈した。さらに、2 型糖尿病発症と関連する危険型 Cdkal1 SNPs を有する人において Cdkal1 の特異的な転写産物の発現量が低下し、Cdkal1 活性が低下していた。以上のことから、Cdkal1 遺伝子変異を伴うアジア型 2 型糖尿病の発症は、Cdkal1 活性低下による tRNA 修飾異常ならびにリジンコドンの誤翻訳に起因すると明らかになった。

本研究では、Cdkal1 KO マウス由来の Cdkal1 欠損膵 β 細胞株、また、危険型 Cdkal1 SNPs を有するヒト Fibroblast 由来の iPS 細胞から分化誘導したヒト膵 β 細胞を利用して、アジア型 2 型糖尿病の特徴を有する細胞評価系を構築することを目指す（24 年度）。また、既存の治療薬や独自の低分子化合物ライブラリーを利用し、Cdkal1 遺伝子変異に伴うアジア型 2 型糖尿病治療薬の評価及び新規開発にも着手する（25 年度）。

本研究成果により、世界初の Cdkal1 遺伝子変異に起因するアジア型 2 型糖尿病の特徴を有するマウス及びヒト膵 β 細胞のモデル系の確立が期待され、Cdkal1 遺伝子変異を有する 2 型糖尿病に対する最適な治療薬及び治療法を確立することが可能となる。

国立大学法人 熊本大学
大学院生命科学研究部 助教
魏 范研

A. 研究目的

日本における2型糖尿病患者は、その予備軍も含めると現在1,370万人と推定されており（厚生労働省実態調査より）、年々患者数は増加している。また近年中国やインドでも経済の発展に伴い、患者数が激増しており、アジア地域における糖尿病の治療法の確立は社会的な要請が高い。

2型糖尿病に対する治療薬は、既に多く開発され、広く一般使用されている。しかし、これらの治療薬は人種間の体質差及び病態差を考慮に入れて開発されたものではない。そのため、同様な治療薬を用いても、日本における重症低血糖発見率は米国食品医薬品局データベースのデータに比べて1,000倍以上と高率である（Medical Tribune, Vol. 44. No. 47）。この事実が示すように、現在の治療薬や治療法は、必ずしも日本人を含むアジア人種にとって最適なものではない。従って、アジア人種に適した治療法や新規治療薬の開発が必要である。しかし、なぜ欧米人種とアジア人種に2型糖尿病の病態差が生じるか、その分子機構は不明であったため、アジア型2型糖尿病に対する治療法や新規治療薬を開発するための基盤が存在しなかった。

我々は世界に先駆けてCdkal1の分子機能を明らかにし、アジア2型糖尿病発症の分子機構の一端を明らかにした。そこで、我々独自の研究成果

に基づき、本研究においてアジア型2型糖尿病に対する治療法及び治療薬の開発を可能にするマウス及びヒト膵β細胞由来のモデル細胞系の構築を目的とし、研究を行った。

平成24年度の研究においてすでにモデル細胞系の構築に成功した。そこで、平成25年度において、保有する2000種類の低分子化合物を用いて、細胞ライブラリー及びin vivoにおけるスクリーニングを行い、臨床応用を目指した化合物探索を行った。

B. 研究方法

1. モデル細胞を用いた化合物スクリーニング

平成24年度に作製した翻訳精度を検出するモデル細胞に既存の糖尿治療薬或は低分子化合物ライブラリーを加えた後、細胞を融解し、Dual Luciferase Reporter System (Promega)を用いたFirefly ルシフェラーゼ及びRenilla ルシフェラーゼ活性を測定することにより、治療薬あるいは低分子化合物の誤翻訳改善効果を評価する。抗糖尿病薬は、スルフォニル尿素系薬（グリベンクラミド）、GLP-1に対する治療薬（Exendin-4やDPP4阻害剤）、ビッグアナイド系薬（メトホルミン）を予定している。低分子化合物ライブラリーはすでに現有するものを用いる。

2. 二次スクリーニング

次に、低グルコース培地で培養中の同細胞アレイに一次陽性化合物を加え、15分後に化合物を含む高グルコース培地を置換して刺

激する。インスリンが分泌されるには細胞内カルシウム濃度の上昇が重要であるため、刺激時の培地中に分泌されるインスリンの量または細胞内カルシウムの上昇を測定する。化合物を加えない細胞を対照とし、化合物を加えた細胞においてインスリン分泌量またはカルシウム濃度が2倍以上に上昇した化合物を二次陽性化合物とする。

3. In vivo による耐糖能及び翻訳改善効果の検討

二次陽性化合物の in vivo における効果を検討するために、陽性化合物を 1mg/kg の用量で Cdkal1 欠損マウスに経腹投与する。最後の投与から 3 6 時間後に糖負荷試験を行う。具体的には、1 g/kg の用量でブドウ糖液を腹腔に注射し、15 分ごとに尾静脈から採血し、血糖値を測定する。また、翻訳改善効果を検討するために、化合物投与後に Cdkal1 欠損マウスからランゲルハンス島を精製し、Total RNA を抽出する。その後、誤翻訳の指標である小胞体ストレス遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により検討する。

4. 新規化合物の創出

本研究によって得られた陽性化合物群は、翻訳の精度を改善することでインスリン分泌を向上させ、膵島の機能を回復させると考えられる。翻訳改善の効果を最大化させるために、陽性化合物群に共通する骨格を見出し、化合物の最適化を図り、独自の化合物リソースの確保を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は、患者もしくは患者からの得られたサ

ンプルを使用するような臨床研究、臨床疫学研究では無い。本研究で計画されているヒト細胞での遺伝子解析研究はすでに学内倫理委員会によって承認されている（ゲノム第159号）。

組換え DNA 実験は、本大学の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全委員会の承認を受けた後、使用する微生物のレベルに応じた実験室で行なう。また、研究開発の過程で使用する遺伝子組み換え生物（ウィルス等）はすべて倫理委員会から承認されている（承認番号 21-075）。

ヒト iPS 細胞の使用に関しては、「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」を遵守し、本大学のヒト ES 細胞研究倫理委員会の承認を受けた後、研究を実施する。

C. 研究結果

1. 既存糖尿病治療薬によるスクリーニング

平成 24 年度において Cdkal1 KO マウス由来の Cdkal1 欠損膵β細胞株からなる細胞評価系の構築に成功したので、本年度において既存の糖尿病治療薬が Cdkal1 欠損に由来する誤翻訳に対して効果を有するかを検討するために、糖尿病治療薬を細胞評価系に投与し、誤翻訳率を検討した。具体的には、用いた治療薬は現在もっとも頻繁に使用されているスルフォニル尿素剤、メトホルミン、グルコシダーゼ阻害剤、インクレチン分解阻害剤を最終濃度 10μM になるように培地に添加した後、ルシフェラーゼの活性を測定し、誤翻

訳の改善効果をを検討した。しかし、いずれの治療薬も <i>Cdkal1</i> 欠損による誤翻訳に対して効果を示さなかった。	
2. 低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニング	
既存の糖尿病治療薬が誤翻訳に対して効果を示さなかったことから、新たな薬剤の探索を目指して 2000 種類の低分子化合物ライブラリーを最終濃度 10μM になるように同細胞評価系に投与し、翻訳改善効果を有する化合物の探索を行った。その結果、平均改善効果が溶媒のみを投与した対照群と比較して 2 倍以上を有する化合物を 45 種類得ることができた。さらに、45 種類の化合物がインスリン分泌に対しても効果を有するかを検討するために、単離膵島に化合物を投与しインスリン分泌促進効果を検討した。その結果、15 種類の化合物についてインスリン分泌促進効果が見られた。	った。一方、溶媒のみを投与した <i>Cdkal1</i> KO マウスを対照群とした。最後の投薬から 36 時間以上経過した時点で、耐糖能変化を評価するために糖負荷試験を行った。具体的には、前晩から絶食させたマウスにブドウ糖液を 1g/kg の用量でマウスに経腹投与し、投与後 15 分おきに尾静脈より採血し、血糖値の変化を計測した。その結果、二種類化合物は <i>Cdkal1</i> KO マウスの血糖値を有意に改善することができた。 一方、本スクリーニング系によって得られた化合物は、翻訳を改善する効果を持つと期待される。そのため、化合物投与による <i>Cdkal1</i> KO マウスの耐糖能の改善は、誤翻訳の改善によるものと考えられる。その仮説を検討するために、化合物投与群及び対照群のマウスから膵 β 細胞を単離し、誤翻訳の指標である小胞体ストレス遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により検討したところ、小胞体ストレス遺伝子の発現量が対照群と比較して有意に低下した。
3. in vivo スクリーニング	4. 新規リード化合物の開発
細胞評価系によるスクリーニング計画が予定より早く実施できたため、新規化合物の臨床応用を目指し、化合物の翻訳改善効果が見られた化合物の動物におけるインスリン分泌改善効果並びに翻訳改善効果を検討した。まず、誤翻訳改善及びインスリン分泌促進効果の高さ、さらに既存化合物との類似性といった三つの判断基準で 45 種類の二次陽性化合物から二種類選定し、in vivo における耐糖能改善効果を検討した。二種類の化合物を 1mg/kg の用量で <i>Cdkal1</i> KO マウスに 1 週間にわたり連日投与を行	ライブラリーのスクリーニングによって得られた 45 種類の化合物の誤翻訳改善効果をさらに改良するために、これらの化合物に共通する構造をもとに、新たな化学修飾を加えた新規化合物種を 60 種類合成した。また、同 60 種類の化合物を最終濃度 10μM になるように細胞評価系に投与し、誤翻訳改善効果を検討した。また、対照として以前のスクリーニングで得られた化合物を用いた。その結果 5 種類の陽性化合物が得られた。

D. 考察

1. 本研究で開発した誤翻訳を検出する細胞評価系に既存の糖尿病治療薬を投与し検討した結果、誤翻訳を改善する効果が見られなかった。このことは、これまでの治療薬は受容体の活性化を介してインスリン分泌を促進することにより症状を改善するものであり、誤翻訳に対しては効果を示さないことを示唆する。従って、Cdkal1 遺伝子に変異を持つ2型糖尿病患者に対しては、その症状を根本的に改善するために全く新しいアプローチが必要であると考ええる。

2. 本研究で開発したモデル細胞及び Cdkal1 KO マウスを用いたスクリーニングにより、Cdkal1 欠損による耐糖能異常に対して効果的な化合物が二種類得られた。得られた化合物は in vivoにおいても翻訳精度を改善できたことから、開発した細胞評価系の有効性が示されたのみならず、得られた化合物は Cdkal1 欠損による2型糖尿病に対して新規治療薬となる可能性が示唆された。興味深いことに、今回得られた化合物は他の疾患に対して長く使用されている治療薬であった。これらの治療薬のヒトにおける安全性はすでに確かめられているため、2型糖尿病への臨床適用に向けて迅速に進めることが可能である。これらの結果を踏まえ、我々は、今回発見した化合物を特許出願し、臨床試験の開始に向けて準備を進めている。

3. 今回スクリーニングにおいて45種類の化合物が翻訳精度改善効果を示した。興味深いことに

これらの化合物に共通する化学構造が見出された。このことは、本細胞評価系の妥当性を示唆するものであると同時に、同化学構造を基にさらに改変を行えば、いままでにない斬新な2型糖尿病薬の開発が期待される。

E. 結論

平成25年度の研究において前年度に構築したスクリーニング系を用いてスクリーニングを行った結果、翻訳精度を向上させながら、インスリン分泌を促進する低分子化合物の発見に至った。さらに、同低分化合物は Cdkal1 KO マウスにおいて小胞体ストレスを低下させ、耐糖能を改善した。従って、本研究は、Cdkal1 遺伝子変異に起因するアジア型2型糖尿病の特徴を有するモデル細胞を確立し、Cdkal1 遺伝子変異を有する2型糖尿病に対する最適な治療薬の候補を同定した。

F. 健康危険情報

本開発においてウィルスなどを用いたが、健康に危険を及ぼすことはなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Zhou B, Wei FY, Kanai N, Fujimura A, Kaitsuka T, Tomizawa K. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human.

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

Hum Mol Genet. 2014. In Press	Nov;59(11):1604-12.2.
(2) Hakim F, Kaitsuka T, Raeed JM, <u>Wei FY</u> , Shiraki N, Akagi T, Yokota T, Kume S, Tomizawa K. High Oxygen Condition Facilitates the Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cells into Pancreatic Progenitors and Insulin-producing Cells. J Biol Chem. 2014 Apr 4;289(14):9623-38.	(6) Gotanda Y, <u>Wei FY</u> , Harada H, Nakamura KI, Ohta K, Tomizawa K, Ushijima K. Efficient transduction of eleven poly-arginine peptide in an ischemic lesion of mouse brain. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2014. In press
(3) Fujimura A, Michiue H, Cheng Y, Uneda A, Tani Y, Nishiki T, Ichikawa T, <u>Wei FY</u> , Tomizawa K, Matsui H. Cyclin G2 promotes hypoxia-driven local invasion of glioblastoma by orchestrating cytoskeletal dynamics. Neoplasia. 2013 Nov;15(11):1272-81.	2. 学会発表 (1) 第91回日本生理学会、鹿児島 Cdkal1 欠損マウスにおける抗糖尿病治療薬効果の検討（ポスター発表）
(4) Kaitsuka T, Noguchi H, Shiraki N, Kubo T, <u>Wei FY</u> , Hakim F, Kume S, Tomizawa K. Generation of functional insulin-producing cells from mouse embryonic stem cells through 804G cell-derived extracellular matrix and protein transduction of transcription factors. Stem Cells Transl Med. 2014 Jan;3(1):114-27.	(2) 第91回日本生理学会、鹿児島 チオメチル化修飾欠損によるタンパク質誤翻訳への効果的な化合物のスクリーニング系の開発（ポスター発表）
(5) Xie P, <u>Wei FY</u> , Hirata S, Kaitsuka T, Suzuki T, Suzuki T, Tomizawa K. Quantitative PCR measurement of tRNA2-methylthio modification for assessing type 2 diabetes risk. Clin Chem. 2013	H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) 特願 2013- 072391 出願日：平成25年3月29日 発明名称：2型糖尿病治療剤 PCT 出願：平成26年3月28日

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zhou B, <u>Wei FY</u> , Kainai N, Fujimura A, Kaitsuka T, Tomizawa K.	Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human.	Hum Mol Genet..			2014
Hakim F, Kaitsuka T, Raeed JM, <u>Wei FY</u> , Shiraki N, Akagi T, Yokota T, Kume S, Tomizawa K.	High Oxygen Condition Facilitates the Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cells into Pancreatic Progenitors and Insulin-producing Cells.	J Biol Chem.	289	9623-9638	2014
Fujimura A, Michiue H, Cheng Y, Uneda A, Tani Y, Nishiki T, Ichikawa T, <u>Wei FY</u> , Tomizawa K, Matsui H.	Cyclin G2 promotes hypoxia-driven local invasion of glioblastoma by orchestrating cytoskeletal dynamics. Neoplasia.	Neoplasia.	15	1272-1281	2013
Kaitsuka T, Noguchi H, Shiraki N, Kubo T, <u>Wei FY</u> , Hakim F, Kume S, Tomizawa K.	Generation of functional insulin-producing cells from mouse embryonic stem cells through 804G cell-derived extracellular matrix and protein transduction of transcription factors.	Stem Cells Transl Med.	3	1604-1612	2014
Xie P, <u>Wei FY</u> , Hirata S, Kaitsuka T, Suzuki T, Suzuki T, Tomizawa K.	Quantitative PCR measurement of tRNA2-methylthio modification for assessing type 2 diabetes risk.	Clin Chem.	59	23236-23245	2013
Gotanda Y, <u>Wei FY</u> , Harada H, Nakamura KI, Ohta K, Tomizawa K, Ushijima K.	Efficient transduction of eleven poly-arginine peptide in an ischemic lesion of mouse brain.	J Stroke Cerebrovasc Dis.			2014

Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human

Bo Zhou[†], Fan-Yan Wei[†], Narumi Kanai, Atsushi Fujimura, Taku Kaitsuka and Kazuhito Tomizawa*

Department of Molecular Physiology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, Japan

Received December 25, 2013; Revised March 7, 2014; Accepted April 17, 2014

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *CDKAL1* have been associated with the development of type 2 diabetes (T2D). *CDKAL1* catalyzes 2-methylthio modification of adenosine at position 37 of tRNA^{Lys}(UUU). A deficit of this modification causes aberrant protein synthesis, and is associated with impairment of insulin secretion in both mouse model and human. However, it is unknown whether the T2D-associated SNPs in *CDKAL1* are associated with downregulation of *CDKAL1* by regulating the gene expression. Here, we report a specific splicing variant of *CDKAL1* termed *CDKAL1-v1* that is markedly lower in individuals carrying risk SNPs of *CDKAL1*. Interestingly, *CDKAL1-v1* is a non-coding transcript, which regulates the *CDKAL1* level by competitive binding to a *CDKAL1*-targeting miRNA. By direct editing of the genome, we further show that the nucleotides around the SNP regions are critical for the alternative splicing of *CDKAL1-v1*. These findings reveal that the T2D-associated SNPs in *CDKAL1* reduce *CDKAL1-v1* levels by impairing splicing, which in turn increases miRNA-mediated suppression of *CDKAL1*. Our results suggest that *CDKAL1-v1*-mediated suppression of *CDKAL1* might underlie the pathogenesis of T2D in individuals carrying the risk SNPs.

INTRODUCTION

Recent advances in genome-wide association studies have successfully revealed a number of loci associated with susceptibility to type 2 diabetes (T2D) (1–4). Among these risk loci, the *Cdk5 Regulator Subunit Associated Protein 1-Like 1* (*CDKAL1*) locus is one of the most reproducible loci in European and Asian populations (5). Individuals carrying T2D-associated single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *CDKAL1* show impaired insulin secretion and up to a 2-fold increase in the risk of T2D (1). We showed that Cdkal1 is a mammalian methylthiotransferase that catalyzes the 2-methylthio (ms²) modification of N⁶-threonyl-carbamoyladenine (t⁶A) to produce 2-methylthio-N⁶-threonyl-carbamoyladenine (ms²t⁶A) at position 37 of tRNA^{Lys}(UUU) (6). The ms²-modification of tRNA^{Lys}(UUU) is critical for the accurate decoding of the lysine codons AAA and AAG by stabilizing the codon–anticodon interaction (7). The precise decoding of the lysine codon by ms²-modification was particularly important for proinsulin synthesis, because a lack of Cdkal1 significantly compromised the proper translation and processing of proinsulin (7). As a result, the Cdkal1 knockout mice showed impaired insulin secretion

and glucose metabolism. Furthermore, the downregulation of 2-methylthio modification level was also associated with impaired insulin secretion and T2D risk in human (8). Taken together, these results suggest that 2-methylthio modification in tRNA^{Lys}(UUU) by Cdkal1 is critical for precise protein synthesis and the development of T2D.

In contrast to the discovery of molecular function of *CDKAL1* and its pathological relevance, there remains fundamental question whether there is a correlation between the T2D-associated SNPs in *CDKAL1* with the regulation of the *CDKAL1* gene. Like most of disease-related SNPs, T2D-associated SNPs in *CDKAL1* are located in deep intronic region (9). These intronic regions are neither conserved across species, nor do these regions contain predictable regulatory elements (1). Because of these obstacles, how the T2D-associated SNPs in *CDKAL1* would affect gene function and lead to the development of T2D remains unknown.

In the present study, we investigated the functional role of T2D-associated SNPs in *CDKAL1* and showed that the SNPs were actively involved in the regulation of cellular *CDKAL1* levels through a unique post-transcriptional mechanism.

*To whom correspondence should be addressed at: Department of Molecular Physiology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan. Tel: +81 963735050; Fax: +81 963735052; Email: tomikt@kumamoto-u.ac.jp

[†]These authors contributed equally to this work.