

論文内容の要旨

論文題目

Foxo1 と TRPV1 の糖・脂質代謝制御機構とその糖尿病治療薬への応用
(Mechanism of the regulation of glucose and lipid metabolism by Foxo1 and TRPV1, and the application to therapeutic medicine for diabetes)

氏名

田中 祐嗣

生物にはエネルギーの恒常性を保つ機構が存在し、とりわけヒトを含めた高等生物においてその機構は複雑かつ精巧に制御されている。ヒトを含む哺乳動物においてエネルギーの担体である糖・脂質の恒常性を保つ機構は膵臓・肝臓・脂肪・骨格筋等多くの臓器で多様に制御されているが、様々な原因からこれら機構が破綻すると糖尿病を発症する。発症した糖尿病は複数の臓器で高脂血症とともに相乗的に進行し、膵臓ではインスリンの分泌不全を、肝臓では糖新生の亢進を、脂肪では細胞肥大とそれに伴う悪玉アディポサイトカインの放出を、骨格筋ではインスリン抵抗性惹起と糖消費の減少を引き起こし、総合的に血糖値の上昇と全身の臓器不全を引き起こす。この糖尿病・高脂血症の治療薬に関しては現在数多くの種類が開発・上市されており、様々な臓器で多様な作用を示す。しかし、糖尿病・高脂血症は多臓器での複合要因に起因するため一剤で多くの臓器に多様な作用を及ぼすことは難しく、その作用は限定的である。そこで新たに全身性の糖・脂質代謝を一剤で改善できる薬剤を探索するため、一つの遺伝子産物が多臓器へ作用しうるターゲットに着目しようと考えた。多くの機能を持ちうる分子として、初めに多くの臓器で多くの遺伝子の転写調節に関わる転写因子をその候補として考え、そしてこの観点から肝臓で糖新生への関与が報告されているフォークヘッド型転写因子 Foxo1 に着目した。また次に、下流シグナル経路により多くの臓器で多くの遺伝子の発現やその産物の制御に影響しうる受容体に着目し、いくつかの臓器で糖代謝への関与が報告されている CGRP の分泌にかかわる受容体 TRPV1 に着目した。これら Foxo1, TRPV1 はそれぞれ特に肝臓、膵臓での糖・脂質代謝への関与が示唆されているが、その他全身性への糖・脂質代謝への影響の全貌に関しては未知数である部分が多い。そこで、本研究では、これら分子の機能調節を行う低分子薬剤の探索と評価を行うことでこれら分子の全身性の糖・脂質代謝への影響とその分子基盤を見極めるとともに、これら因子の機能調節薬が新たな糖尿病治療薬となりうる可能性を探索することとした。

Foxo1 は多くの組織で発現するフォークヘッド型転写因子であり、肝臓を中心として糖・脂質代謝関連遺伝子の転写への影響が報告されている。特に肝臓において Foxo1 は糖新生の律速酵素 G6Pase,PEPCK の発現を正に制御して糖新生を促進するとともに、中性脂肪合成に関わる apoCIII の発現を正に制御して中性脂肪合成を促進することが報告されている。しかし、Foxo1 のノックアウトマウスは胎生致死であり成体形成後に全身性で Foxo1 を阻害した時に複合的にどのように糖代謝に影響するかについては不明であり、また Foxo1 の機能を阻害する低分子についてもいまだ報告はない。そこで、私はこの Foxo1 を全身性に阻害した時の糖・脂質代謝への影響を調べるため、はじめにその低分子阻害剤を探索することとし、その後得られた阻害剤によってその下流遺伝子の変動・全身性作用を検証することを試みた。

TRPV1 は主に疼痛シグナルの伝達に重要な働きをしている受容体であるが、その下流の血中因子 CGRP は、膵臓においてインスリン分泌を抑制することが報告されているとともに肝臓と骨格筋において糖取り込みを抑制する可能性が示唆されている。ここでは TRPV1 とその下流の CGRP のどちらを阻害してもこの経路の阻害は可能と考えたが、ペプチドである CGRP を低分子により機能調節することは困難であると考えられ実際報告も存在しないため、より低分子で機能調節が容易であると考えられるターゲットとして受容体である TRPV1 に着目した。さらに、TRPV1 は CGRP を介さなくても膵臓と脂肪において糖代謝を抑制する可能性が示唆されており、全身性の糖・脂質代謝を低分子により一分子の機能調節で制御するにはターゲットとして CGRP よりも TRPV1 の方がより適していると考えた。TRPV1 の機能を抑制する低分子に関しては既にいくつか報告があり、中でも BCTC は直接アンタゴニストとして TRPV1 機能を抑制することが報告されている。BCTC は炎症性神経疼痛に有効であることが報告されているが、この BCTC の糖・脂質代謝について検証した例はこれまで見られなかった。そこでこの BCTC を糖尿病モデルマウスに投与し、糖・脂質代謝への影響を検証した。

1.Foxo1 阻害剤 AS1708727,AS1842856 の発見

今回新たに Foxo1 の阻害剤を探索するにあたり、今回私は One-hybrid 法を主とした方法と、MADS 法 (Mass spectrometric Affinity Detection System)を主とした方法の2種類の方法を用いた。One-hybrid 法は Foxo1 の転写活性に着目した転写活性を指標にしたスクリーニング法であり、ここでは Foxo1 の転写活性ドメインのみを用いてその転写活性を検出できる系を構築し、ここに化合物を反応させることで Foxo1 に作用して転写活性を抑制する化合物を探索する方法を用いて、約 170000 の化合物ライブラリーについて評価を行った。MADS 法は Foxo1 への物理的な結合に着目したスクリーニング法であり、精製した活性化型 Foxo1 蛋白質を化合物と混合して結合させて蛋白質ごと結合化合物を分離し、その後化合物のみを単離して Mass spectrometry による同定を行う方法であって、本法により約 560000 の化合物ライブラリーについて評価を行った。それぞれのスクリーニングの結果、目的の化合物を複数単離し、そのうち最もその活性が高い化合物として One-hybrid 法からは AS1708727、MADS 法からは AS1842856 という新規 Foxo1 阻害剤を見出すことに成功した。AS1708727 と AS1842856 は図 1 に示すように全く異なった構造をもち、これらは Foxo1 を阻害する物質として初めての報告例である。

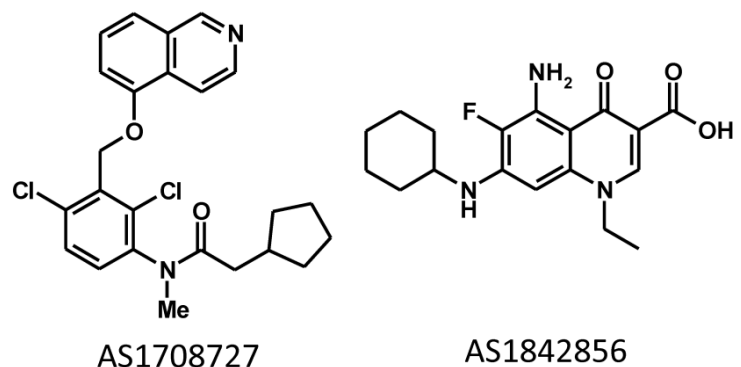


図1 AS1708727 と AS1842856 の構造

2. Foxo1 阻害剤は肝臓を中心とした糖・脂質代謝改善作用を示す

上記より得られた AS1708727 と AS1842856 の 2 つの Foxo1 阻害剤は共に肝臓由来 HepG2 細胞に導入した Foxo1 レポーター系において濃度依存的に Foxo1 の転写活性を抑制した。そして、これら 2 つの阻害剤は肝臓由来 Fao 細胞において Foxo1 下流で糖新生にかかわる G6Pase, PEPCK 遺伝子の発現を濃度依存的に抑制し、結果としてこの細胞で糖新生をも濃度依存的に抑制することを見出した。また、AS1708727 と AS1842856 は糖尿病モデルマウスに投与することで、共に肝臓において G6Pase, PEPCK 遺伝子、および中性脂肪合成に関連する apoCIII 等複数の遺伝子の発現を低下させた(図 2)。さらにこの時に糖新生の基質となるピルビン酸を糖尿病モデルマウスに負荷することで生体内で糖新生による血糖値の上昇を抑制した(図 3)。また、AS1708727 と AS1842856 はマウス生体での体内動態が大きく異なっていたが、血中持続の長い AS1708727 は糖尿病モデルマウスへの連投試験により長期間の全身性の Foxo1 阻害を実現し、血糖値と血中中性脂肪値の低下を中心とした糖・脂質代謝全般を改善することを見出した。一方、AS1842856 は骨格筋由来 C2C12 細胞において糖消費亢進作用も示し、骨格筋においても糖代謝を改善することが明らかになった。よって、Foxo1 阻害剤は肝臓のみならず骨格筋等への作用も併せ持ち、複合的に糖・脂質代謝を改善していく可能性が示唆され、上記の連投試験で観察された全身性の糖・脂質代謝改善は肝臓での作用のみならず、このような多臓器での作用が奏功している可能性が示唆された。

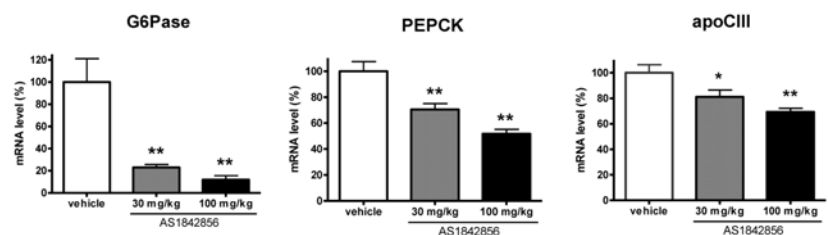


図2 AS1842856 による肝臓内遺伝子発現抑制

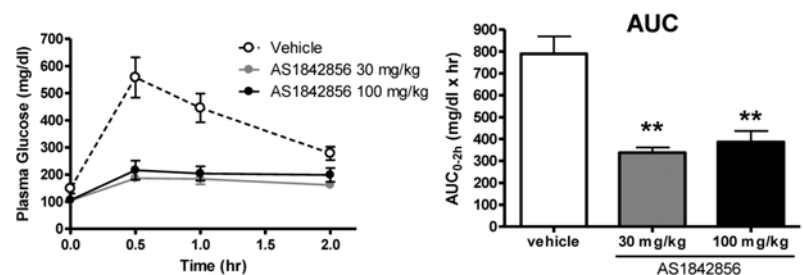


図3 AS1842856 による糖尿病モデルマウスでの糖新生抑制

3. TRPV1 阻害剤は膵臓を中心とした糖・脂質代謝改善作用を示す

TRPV1 阻害剤として報告のある BCTC を用いて糖尿病モデルマウスへの影響を検証するため連投試験を行ったところ、BCTC 投与によって血糖値と血中中性脂肪値の低下、そして血中インスリン値の低下傾向という全身性の糖・脂質代謝の改善作用を示すことを見出した(図 4)。これは同時に並行して投与したインスリン抵抗性改善剤 Pioglitazone と同様の傾向を示し、BCTC も Pioglitazone 同様末梢組織でインスリン抵抗性を改善した可能性が示唆された。さらに私は、BCTC の連投後に経口糖負荷試験を行ってインスリン分泌作用を検証したところ、BCTC は今

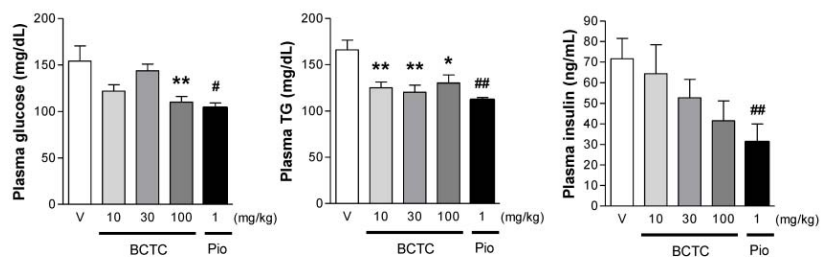


図4 BCTC による糖尿病モデルマウスでの糖代謝改善作用

度は Pioglitazone と異なりインスリン分泌促進作用を示すことを発見した(図 5)。インスリン分泌促進とインスリン抵抗性改善の両作用を併せ持つ薬剤は現在のところ存在しないが、今回の結果から TRPV1 阻害剤はこれら作用を併せ持ち、膵臓のみならず他末梢組織でも糖脂質代謝を改善して全身性の糖・脂質代謝を改善した可能性が示唆された。糖尿病態ではインスリン分泌不全とインスリン抵抗性惹起によるインスリン作用不全が相乗的におこり病態を悪化に導くが、今回の結果から TRPV1 阻害剤は逆に必要時にインスリンを分泌し、かつ同時にインスリン抵抗性を改善してその作用を増強するという正の相乗効果がおこり病態を改善していくことが期待できる。

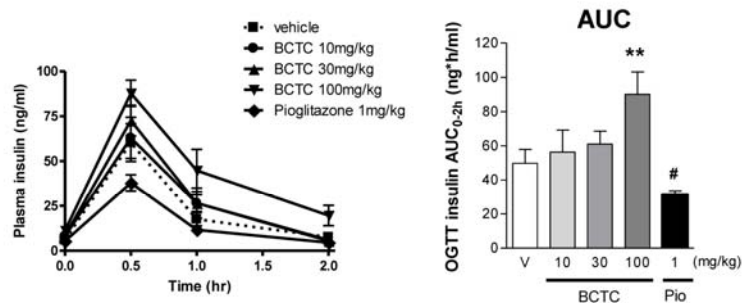


図5 BCTCによる糖尿病モデルマウスでのインスリン分泌亢進作用

以上の結果から Foxo1 阻害剤および TRPV1 阻害剤は糖尿病モデルマウスに対して抗糖尿病作用を示すことが明らかになり、Foxo1 および TRPV1 はその一遺伝子産物を阻害することによって多臓器に影響し、全身性の糖・脂質代謝を改善するマスター因子たりうる可能性が示唆された。それぞれの糖尿病への作用モデルとして、Foxo1 阻害剤は特に肝臓での糖新生阻害・中性脂肪合成阻害作用を中心として加えて骨格筋での糖消費を促進する等の作用によって、TRPV1 阻害剤は特に膵臓でのインスリン分泌促進作用を中心として加えて骨格筋等の末梢組織でのインスリン抵抗性を改善する等の作用によって全身性の糖・脂質代謝を改善し、抗糖尿病作用を示すというモデルが考えられる(図 6)。以上のことより、本研究はこれら阻害剤が新しいクラスの糖尿病治療薬になる可能性を示唆し、また本研究によって見出された新たな Foxo1 阻害剤である AS1708727 と AS1842856 自体が新たな糖尿病治療薬となりうる可能性を示した。

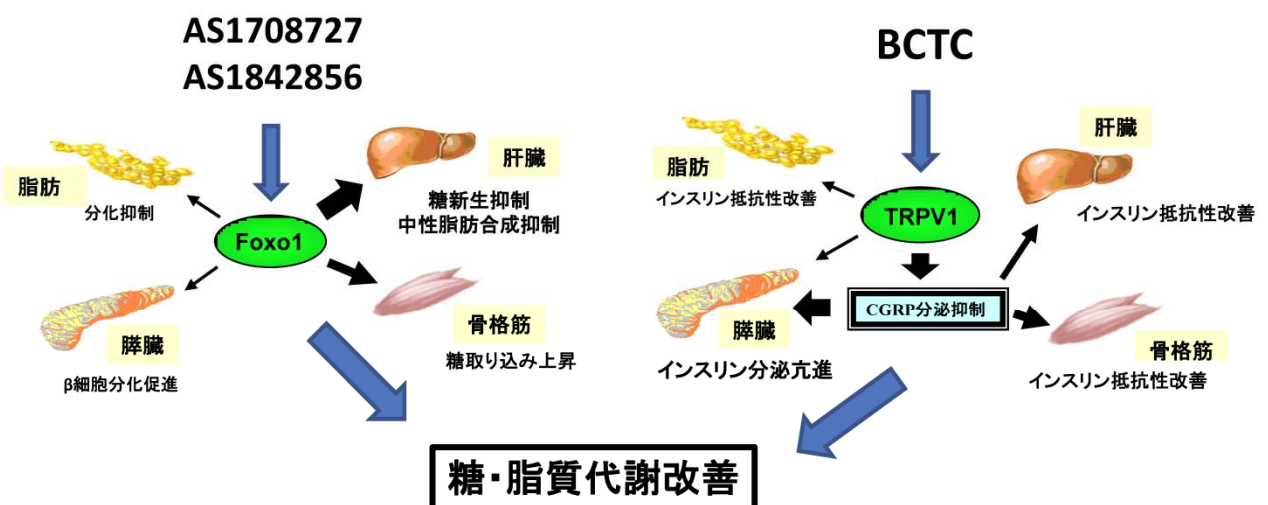


図6 Foxo1阻害剤とTRPV1阻害剤の作用仮説モデル