

トピックス

High-throughput脂肪細胞分化スクリーニングによるPPAR γ 発現を調節する新規抗糖尿病薬の同定

脇 裕典^{*1,2}, 山内 敏正^{*1,3}, 門脇 孝^{*1}, Peter Tontonoz^{*4}

東京大学大学院医学系研究科

^{*1}糖尿病・代謝内科

^{*2}分子エネルギー代謝学

^{*3}統合的分子代謝疾患科学

^{*4}Howard Hughes Medical Institute and Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of California, Los Angeles

はじめに

表現型スクリーニングによる生理活性をもつ化合物の発見は、創薬に有用であるとともに新たな生命現象のメカニズムの解明に役立つ¹⁾。In vivoのインスリン抵抗性改善作用を指標にスクリーニングされたチアゾリジン誘導体(Thiazolidinedione, TZD)は、その後、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである核内受容体PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)の強力なアゴニストであることが見出され²⁾、PPAR γ や脂肪組織の糖脂質代謝における役割に関する一連の重要な研究の端緒となった³⁻⁷⁾。また骨格筋細胞分化を促進することが知られていた低分子5-アザシチジンを用いた表現型cDNAスクリーニングにより筋細胞分化のマスターレギュレーターMyoDが同定された⁸⁾。われわれは、新たな脂肪細胞分化の制御メカニズム・新たな機序に基づく抗糖尿病薬

のターゲットの探索に有効と思われる、「脂肪細胞分化」を表現型にしたhigh-throughput化合物スクリーニングを試みた⁹⁾。

High-throughput脂肪細胞分化スクリーニング系の構築

脂肪細胞分化の細胞アッセイによるhigh-throughputスクリーニングを行うためのレポーター細胞として、脂肪細胞分化依存的なaP2の-5.4kbプロモーターにより発現制御をうけるルシフェラーゼコンストラクトを作成し、それを安定発現させた3T3-F442A前駆脂肪株を樹立した。この細胞株はポジティブコントロールとなるPPAR γ アゴニスト、GW7845により6日後に50倍のルシフェラーゼ活性の上昇を示し、96 well, 384 wellフォーマットにおいても優れた信号対ノイズ比を得た(図1A, B)。この系を用いUCLAの化合物スクリーニングコアであるMolecular Screening Shared Resource¹⁰⁾におい

て、BioMol生理活性物質ライブラリーのスクリーニングを施行した。

PPAR γ 発現の誘導を介して脂肪細胞分化を促進する化合物Harmineの同定

*Peganum harmala*の種子に含まれるHarmineは、3T3-F442Aの脂肪細胞分化を濃度依存的に促進した(図1C)。遺伝子発現の解析において、harmineは予測通りaP2などのPPAR γ 標的遺伝子の発現を上昇させたが、興味深いことに、PPAR γ アゴニスト、GW7845ではPPAR γ の発現は誘導されないのに対して、harmine刺激においてPPAR γ の発現レベルが著明に上昇していた(図1D)。またこの発現上昇は4時間という短い時間で認められた(data not shown)。一方、Gal4-PPAR γ を用いた検討においては、GW7845が20倍近いPPAR γ アゴニスト活性を起こすのに対し、harmineには認めなかった(data not shown)。このことからharmineはGW7845と異なり、PPAR γ の発現量を増加させることによりPPAR γ 経路を活性化していると考えられた。異なるメカニズムであることに一致して、harmineは、PPAR γ 標的遺伝子の発現量やOil-red-Oによる中性脂肪含量において、harmineとGW7845は相加的な作用を示した(図1E)。DMI(デキサメサゾン、IBMX、インスリン)刺激による3T3-L1脂肪細胞分化ではC/EBP β 、C/EBP δ やKLF5を含む転写因子がPPAR γ の上

Identification of Anti-Diabetic Regulator of PPAR γ Expression by High Throughput Adipogenic Screening

Hironori WAKI^{*1,2}, Toshimasa YAMAUCHI^{*1,3}, Takashi KADOWAKI^{*1}, Peter TONTONAZ^{*4}

^{*1} Department of Metabolic Diseases,

^{*2} Laboratory of Molecular Physiology on Energy Metabolism,

^{*3} Department of integrated Molecular Science on Metabolic Diseases,

Graduate School of Medicine, the University of Tokyo

^{*4} Howard Hughes Medical Institute and Department of Pathology and Laboratory

Medicine, University of California, Los Angeles

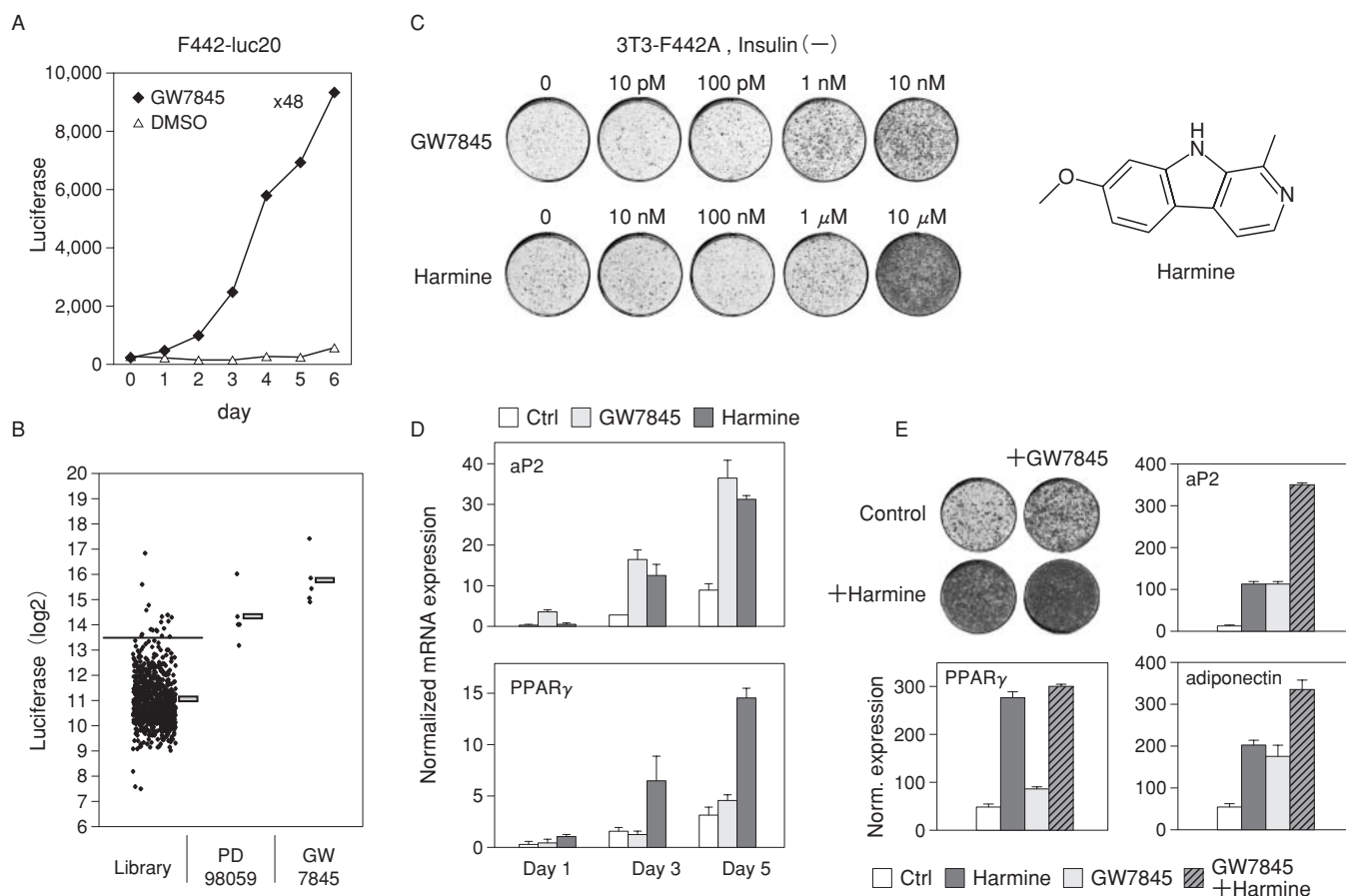


図 1 HarmineはPPAR γ 発現の増加を介し、脂肪細胞分化を促進する
 A. PPAR γ アゴニストGW7845によるレポーター細胞F442-luc20のルシフェラーゼ活性の上昇
 B. BioMolライブラリースクリーニング(縦軸: log₂ルシフェラーゼ)
 C. Harmineによる濃度依存的な脂肪細胞分化の制御(Oil-red-O染色)とharmineの構造式
 D. HarmineとPPAR γ アゴニストGW7845によるPPAR γ の発現量の変化
 E. 脂肪細胞分化におけるharmineとPPAR γ アゴニストGW7845との相加的作用
 (Waki H, et al.: Cell Metab 2007, 5: 357. より引用. Elsevier Science引用許諾済)

流にあるとされる。しかしながら、harmine刺激によってPPAR γ の発現が上昇するのに対し、これらの転写因子の発現に変化は見られなかった。興味深いことに、harmineによるPPAR γ の発現量の増加作用は細胞選択的であり、脂肪細胞やマクロファージには認めるが、初代継代肝細胞や骨格筋細胞C2C12では認めなかった(data not shown)。

脂肪細胞分化にかかわる経路の検討では、harmineが脂肪細胞分化の負の調節因子であるWnt経路を著明に抑制した(図2)。HarmineはWnt-3aや

LEF/ β cateninによるリポーターTOP-flashの活性化を有意に抑制し(図2A, B), また同様にWnt-3a刺激によるAxin2やWisp2など内因性標的遺伝子の発現の誘導も著明に抑制した(図2C)。Wnt-3aは既報通りPPAR γ の発現や脂肪細胞の分化を抑制するが、harmineはこの抑制を有意に解除した(図2C)。さらにドミナントネガティブ型TCFの発現により、harmineのPPAR γ の発現上昇作用が減弱することから、harmineがWnt経路の抑制を介してPPAR γ の発現を増加させることが示唆された(data not shown)。

肥満糖尿病マウスにおけるHarmineの抗糖尿病・抗高脂血症作用

次にわれわれはharmineの*in vivo*における抗糖尿病・抗高脂血症作用を検討した。肥満2型糖尿病モデルdb/dbマウスにおいて、2週間のharmine投与(30mg/kg)により、経時的な高血糖の発症が有意に抑制された(図3A)。糖負荷試験GTT, インスリン負荷試験ITTにおいて、harmine投与により耐糖能とインスリン抵抗性の改善を認めた(図3B)。またTZDと同様、血清

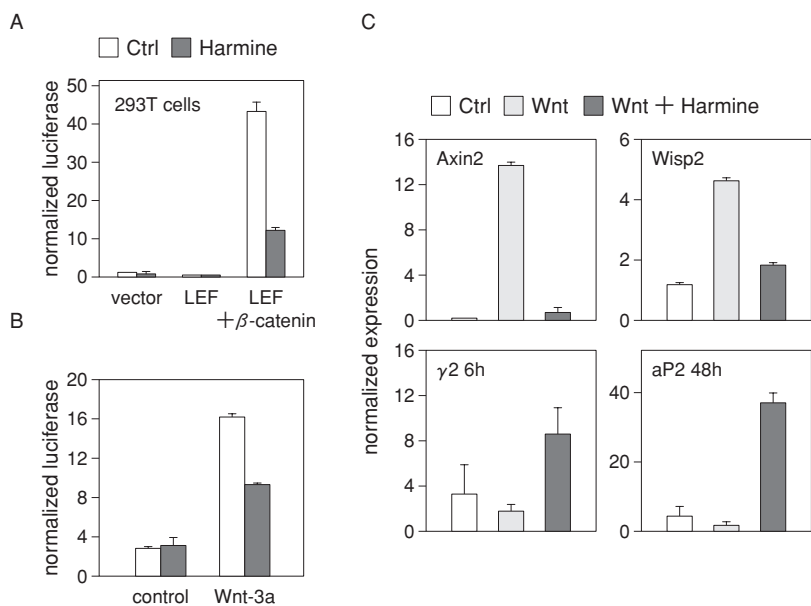


図2 Harmineは脂肪細胞分化の負の調節因子であるWnt経路を抑制する

A. LEF/ β カテニンによるWntレポーターアッセイTopFlashの活性化に対するharmineの抑制効果
 B. Wnt-3aによるTopFlashの活性化に対するharmineの抑制効果
 C. Wnt-3aによる内因性標的遺伝子の発現誘導に対するharmineの抑制効果と、Wnt-3aによるPPAR γ とその標的遺伝子の発現抑制に対するharmineの脱抑制効果
 (Waki H, et al. : Cell Metab 2007, 5 : 357. より引用. Elsevier Science引用許諾済)

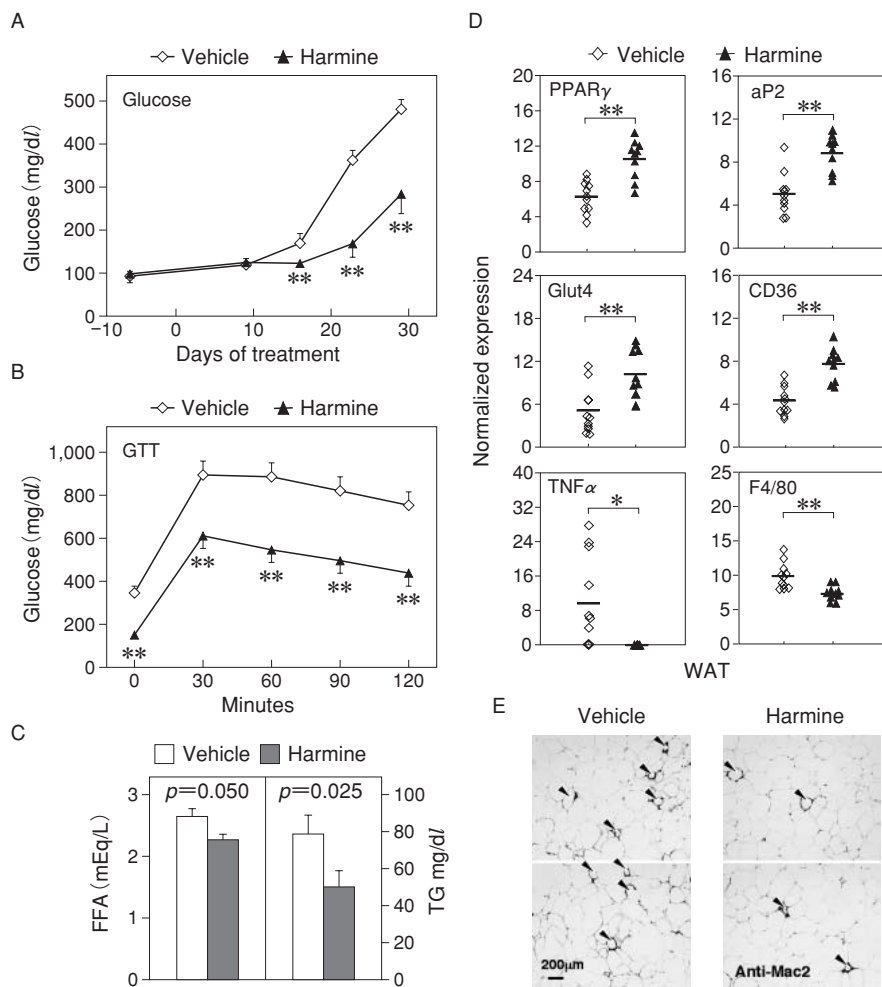


図3 *db/db*マウスへのharmine投与(30mg/kg)による糖脂質代謝の変化と脂肪細胞でのPPAR γ 経路の活性化

A. Harmine投与による空腹時高血糖発症の抑制
 B. Harmineの高脂血症の改善作用
 C. 糖負荷試験における血糖曲線
 D. Harmineによる脂肪組織における遺伝子変化
 E. 免疫組織化学による脂肪組織内マクロファージの染色(Mac2抗体)
 (Waki H, et al. : Cell Metab 2007, 5 : 357. より引用. Elsevier Science引用許諾済)

中性脂肪レベル, 血清遊離脂肪酸レベルの有意な低下を認めた(図3C). 脂肪組織における遺伝子解析においては, harmine投与群においてPPAR γ とその標的遺伝子の有意な発現レベルの上昇を認めた(図3D). TZDでの報告と同様にTNF α , IL-1 β 等の炎症性サイトカインの発現の減少, 脂肪細胞におけるマクロファージのマーカー(F4/80, Mac1)の発現の減少を認めた(図3D). 免疫組織染色においても同様に脂肪組織内マクロファージ数が有意に減少していた(図3E). Harmineの*in vivo*におけるこれらの遺伝子変化と糖脂質代謝に対する作用はTZDと類似しており, 脂肪細胞におけるPPAR γ 経路の活性化による結果と考えられた.

一方, 肝臓, 骨格筋, 腎臓を含む脂肪組織以外の組織では, harmineによるPPAR γ 標的遺伝子の発現の変化は認めなかった(data not shown). 肥満マウスの肝臓におけるPPAR γ の活性化は, 肝臓内中性脂肪含量を増加させ, また腎臓におけるPPAR γ の活性化による体液貯留は, TZDによる副作用の一つである体重増加に寄与することが組織特異的PPAR γ 遺伝子欠損マウスの研究で明らかにされている^{7,11-13}. これらの組織においてharmine投与によるPPAR γ 経路の活性化を認めなかったことに一致して, harmine投与マウスにおいては, 体重増加や肝臓内中性脂肪含量の増加は認められなかった(data not shown).

おわりに

脂肪細胞分化を指標とした表現型化合物スクリーニングを行い, PPAR γ の発現量を増加させるという新たなメカニズムでPPAR γ 経路を活性化する低分子harmineを見出した. 肥満糖尿病動物モデルにおいてPPAR γ アゴニ

ストであるチアゾリジン誘導体(TZD)と同様にインスリン抵抗性や高脂血症の改善作用を認め, 「PPAR γ の発現調節機構」が新しい抗糖尿病薬のターゲットとなりうることを示唆された. Harmineには複数の標的タンパクが知られており, 幻覚等の生理作用も知られるため, そのものが有用な薬剤にはならないが, 今後, harmineをリード化合物とした副作用を持たない誘導体の探索や, PPAR γ の発現調節を司るharmineの新規標的の同定により, 糖尿病に有用な薬剤の開発に加え, 脂肪細胞分化の分子メカニズムの解明に役立つと期待される.

謝 辞

本研究を直接御指導いただいたPeter Tontonoz先生と留学の機会を与えていただきました門脇 孝先生, 山内敏正先生に厚くお礼申し上げます. また, この研究の発表の場ならばにこの研究に対して若手研究奨励賞(YIA)を頂き, 日本肥満学会のオーガナイザーならびに関係者の方々に感謝申し上げます.

文献

- 1) Schreiber SL : The Small-Molecule Approach To Biology. Chem Eng News 2003, **81** : 51.
- 2) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, et al. : An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J Biol Chem 1995, **270** : 12953.
- 3) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. : PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Mol Cell 1999, **4** : 597.
- 4) Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et

- al. : PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. Mol Cell 1999, **4** : 585.
- 5) Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. : PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. Mol Cell 1999, **4** : 611.
- 6) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, et al. : Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. J Clin Invest 1998, **101** : 1354.
- 7) Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, et al. : Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. J Clin Invest 2000, **106** : 1221.
- 8) Davis RL, Weintraub H, Lassar AB : Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell 1987, **51** : 987.
- 9) Waki H, Park KW, Mitro N, et al. : The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPARgamma expression. Cell Metab 2007, **5** : 357.
- 10) UCLA Molecular Screening Shared Resource <http://mssr.pharmacology.ucla.edu/>, <http://cancer.ucla.edu/Index.aspx?page=152>.
- 11) Guan Y, Hao C, Cha DR, et al. : Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. Nat Med 2005, **11** : 861.
- 12) Zhang H, Zhang A, Kohan DE, et al. : Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. Proc Natl Acad Sci USA 2005, **102** : 9406.
- 13) Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, et al. : Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. J Clin Invest 2003, **111** : 737.

* 本論文の内容は2008年度日本肥満学会若手研究者奨励賞(YIA)の受賞対象となったものである