The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	糖尿病治療薬FK614の作用機序に関する分子薬理学的研究
Author(s)	藤村, 高穂
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47232
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【26】

氏　　名	藤（ふじ）　村（むら）　高（たか）　穂（お）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２１４３６　号
学位授与年月日	平成 19 年３月 23 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	**糖尿病治療薬 FK614 の作用機序に関する分子薬理学的研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　土井　健史 （副査） 教　授　八木　清仁　　教　授　今西　　武　　教　授　中川　晋作

論　文　内　容　の　要　旨

Peroxisome proliferator-activated receptor（PPAR）γは、主に脂肪細胞に発現しており、脂肪細胞の分化などを制御している核内受容体の一種である。インスリン抵抗性改善薬であるグリタゾン系薬物は、標的分子である PPARγを活性化して未分化脂肪細胞を脂肪細胞に分化誘導し、インスリン抵抗性を改善すると考えられている。一方で、臨床においては肥満や浮腫などのグリタゾン系薬物による副作用が問題となっている。FK614 は、２型糖尿病モデル動物の血糖降下作用を指標にスクリーニングされた薬物であり、グリタゾン系薬物である pioglitazone や rosiglitazone とは異なった母核を有している。FK614 はグリタゾン系薬物とほぼ同等の強度で２型糖尿病モデル動物のインスリン抵抗性を改善するが、*in vitro* のレポーターアッセイでは、グリタゾン系薬物ほどは強く PPARγを活性化しないパーシャルアゴニストとして作用することがわかっている。しかし、どうして *in vitro* と *in vivo* における FK614 の効力が異なるのかは不明であった。そこで、PPARγ活性化及びインスリン抵抗性改善に対する FK614 の作用機序の解明を行った。

まず、PPARγの活性化はリガンド依存的な PPARγとコアクチベーターとの結合によって主に制御されていることから、FK614 の PPARγとコアクチベーターの相互作用に対する作用を two-hybrid アッセイ等で検討した。その結果、cyclic AMP response element-binding protein-binding protein（CBP）などのコアクチベーターを PPARγへリクルートする FK614 の作用はグリタゾン系薬物より弱かったのに対し、PPARγ coactivator-1α（PGC-1α）や脂肪細胞の分化に重要なコアクチベーターの PPAR binding protein などを PPARγへリクルートする FK614 の作用はグリタゾン系薬物と同等であった。従って、PPARγへコアクチベーターをリクルートする FK614 の効力は、コアクチベーターの種類によって異なることがわかった。更に、種々のコアクチベーターをレポーターアッセイの宿主内に共発現し PPARγの活性化を検討したところ、PPARγへのリクルートメント作用において FK614 がグリタゾン系薬物と同等の強さを示す PGC-1αを共発現した宿主では、FK614 はグリタゾン系薬物とほぼ同等の強い PPARγ活性化作用を示した。従って、FK614 は細胞内に存在しているコアクチベーターの種類や量比によって、異なった効力を示す PPARγモジュレーターであることがわかった。

次に、FK614 が PPARγモジュレーターとしての特性を示す機序を解明するため、分子レベルでの詳細な解析を行った。まず、[^{3}H]rosiglitazone を用いた結合阻害試験を行った。その結果、FK614 は PPARγに対して高い親和性（*Ki* ＝11 nM）を示し直接 PPARγに結合して PPARγを活性化すること、及びグリタゾン系薬物とは異なった Hill 係数を示すことがわかった。従って、FK614 はグリタゾン系薬物とは異なった PPARγに対する結合様式を示すことが示唆された。更に、PPARγとの複合体構造の違いを明らかにするためプロテアーゼ感受性試験を行った結果、FK614

はグリタゾン系薬物とは異なったPPARγとの複合体高次構造を形成することがわかった。次に、PPARγ-リガンド複合体の高次構造の違いが、コアクチベーターに対する親和性の違いに寄与することを確認するため、Homogeneous time-resolved fluorescenceアッセイによりPPARγ-各リガンド複合体のCBPに対する親和性を検討した。その結果、FK614-PPARγ複合体のCBPに対する*Kd*値は1.9μMで、グリタゾン系薬物-PPARγ複合体より親和性が約3倍弱く、PPARγ-リガンド高次構造の違いがコアクチベーター親和性の違いに反映されることがわかった。

次に、PPARγアゴニストの標的臓器と考えられる脂肪細胞における、FK614のPPARγ活性化及び生理的な作用について検討した。まず、マウス3T3L-1脂肪細胞におけるPPARγ活性化作用を検討した結果、分化誘導期の脂肪細胞において、FK614はグリタゾン系薬物と同様にPPARγを強く活性化したが、成熟期においてはFK614はグリタゾン系薬物に比べPPARγを強く活性化しなかった。更に、脂肪細胞への分化誘導作用を3T3L-1脂肪細胞内のトリグリセライド蓄積を指標に検討した結果、FK614はグリタゾン系薬物と同等の強さで脂肪細胞の分化を促進することがわかった。従って、このことがFK614がグリタゾン系薬物と同様に2型糖尿病モデルにおいて強いインスリン抵抗性改善作用を示す一因と考えられた。また、過剰なPPARγの活性化は脂肪細胞の肥大化やインスリン抵抗性の要因になることが示唆されていることから、各薬物で長期間処置した3T3L-1脂肪細胞において、インスリン抵抗性の指標であるPhosphodiesterase 3B（PDE3B）のmRNA量を定量した。その結果、グリタゾン系薬物は濃度依存的にPED3Bの発現量を減少させたが、FK614にはその様な作用はなかった。従って、FK614は成熟期の脂肪細胞においてPPARγを強く活性化しないことから、脂肪細胞の肥大化やインスリン抵抗性を惹起する作用が弱いことが示唆された。

今回の研究から、グリタゾン系薬物とは異なった母核構造を有する糖尿病治療薬であるFK614は、標的分子であるPPARγと結合することでグリタゾン系薬物とは異なったPPARγ-リガンド複合体の高次構造を形成し、グリタゾン系薬物とは異なったコアクチベーター親和性と選択性を示すことがわかった。このような特性より、FK614は標的細胞の種類や状態によって作用の強さの異なるモジュレーターとして働く為、FK614はレポーターアッセイではPPARγを部分的に活性化するにも関わらず、主作用を発現する分化誘導期の脂肪細胞においてはPPARγを強く活性化することにより、2型糖尿病モデル動物においてグリタゾン系薬物と同等の強いインスリン抵抗性改善作用を発揮すると考えられる。更に、FK614は成熟期の脂肪細胞においてはPPARγを強く活性化しないことから、脂肪細胞の肥大化やそれに伴うインスリン抵抗性惹起のリスクが低い糖尿病治療薬であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

藤村さんは、本論文において、2型糖尿病モデル動物の血糖降下作用を指標にスクリーニングされた薬物であるFK614について、そのPPARγ活性化能及びインスリン抵抗性改善に対する作用機序の解明を行った。

まず、PPARγの活性化はリガンド依存的なPPARγとコアクチベーターとの結合によって主に制御されていることから、FK614のPPARγとコアクチベーターの相互作用に対する作用を検討した。その結果、PPARγへコアクチベーターをリクルートするFK614の作用強度は、コアクチベーターの種類と量比によって異なることが判明し、FK614は一種のPPARγモジュレーターであることがわかった。

次に、FK614がPPARγモジュレーターとしての特性を有する機序の解明を分子レベルで行った。その結果、FK614はグリタゾンとは異なったPPARγに対する結合様式、複合体高次構造を形成することがわかった。また、PPARγ-リガンド高次構造の違いがコアクチベーター親和性の違いに反映されることがわかった。

さらに、PPARγアゴニストの標的臓器と考えられる脂肪細胞における、FK614のPPARγ活性化及び生理的な作用について検討を行った。その結果、分化誘導期の脂肪細胞において、FK614はグリタゾンと同様にPPARγを強く活性化したが、成熟期においては強く活性化しなかった。また、FK614はグリタゾンと同等の強さで脂肪細胞の分化を促進することが判明した。これらの作用からFK614は、グリタゾンと同様の強いインスリン抵抗性改善作用を示し、脂肪細胞の肥大化やインスリン抵抗性を惹起する作用が弱いと考えられた。

以上の結果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。