

(第 32 回)

公益財団法人 篷庵社

研究助成発表会

講演要旨集

平成 25 年 7 月 26 日 (金)

於 塩野義製薬株式会社 医薬研究センター

# プログラム

日時：平成25年7月26日（金） 13時00分から17時20分まで

場所：塩野義製薬株式会社医薬研究センター オーディトリウム

※所属は発表当時のもの

|             |   |                                  |
|-------------|---|----------------------------------|
| 13:00-13:05 | ご挨拶 公益財団法人篷庵社 理事長 前田 孝  |                                  |
|             | <u>演題および演者（講演25分、討論15分）</u>   | <u>座長</u>                        |
| 13:05-13:45 | 1. 《特別研究助成》<br>Wnt/ $\beta$ -Cateninシグナル制御分子をシードとする創薬研究<br>-精密合成化学からの挑戦-<br><b>好光 健彦 先生</b><br>(大阪大学薬学研究科 薬品製造化学分野) | (塩野義製薬(株)<br>創薬・疾患研究所)<br>村井 均 氏 |
| 13:45-14:25 | 2. 病態の体内微小環境で作用する活性天然物の探索と<br>その標的分子の解明<br><b>荒井 雅吉 先生</b><br>(大阪大学大学院薬学研究科 天然物化学分野)                                | (篷庵社評議員)<br>小林 資正 先生             |
| 14:25-15:05 | 3. ジアミン新合成法開発を基軸とした<br>医薬品候補物質効率合成法への展開<br><b>石塚 忠男 先生</b><br>(熊本大学大学院 生命科学研究部)                                     | (篷庵社理事)<br>廣部 雅昭 先生              |
| 15:05-15:20 | 休 憩   |                                  |
| 15:20-16:00 | 4. 膵 $\beta$ 細胞を中心とした糖尿病発症原因の解明とその治療の<br>多角的研究<br><b>大杉 満 先生</b><br>(東芝病院 代謝内分泌内科)                                  | (篷庵社理事)<br>北村 幸彦 先生              |
| 16:00-16:40 | 5. 消化管における糖シグナル伝達を介した糖吸収の制御と<br>末梢血白血球および内臓脂肪組織の遺伝子発現プロファイルとの関連<br><b>合田 敏尚 先生</b><br>(静岡県立大学 食品栄養科学部)              | (篷庵社評議員)<br>伊勢村 護 先生             |
| 16:40-17:20 | 6. ポリフェノール類の薬効と毒性についての研究<br><b>今岡 進 先生</b><br>(関西学院大学理工学部 生命科学科)  | (篷庵社評議員)<br>岩尾 洋 先生              |

## 目 次

1. 好光 健彦  
「Wnt/ $\beta$ -Cateninシグナル制御分子をシードとする創薬研究  
-精密合成化学からの挑戦-」1
  
2. 荒井 雅吉  
「病態の体内微小環境で作用する活性天然物の探索とその標的分子の解明」11
  
3. 石塚 忠男  
「ジアミン新合成法開発を基軸とした医薬品候補物質効率合成法への展開」21
  
4. 大杉 満  
「膵 $\beta$ 細胞を中心とした糖尿病発症原因の解明とその治療の多角的研究」31
  
5. 合田 敏尚  
「消化管における糖シグナル伝達を介した糖吸収の制御と末梢血白血球  
および内臓脂肪組織の遺伝子発現プロファイルとの関連」45
  
6. 今岡 進  
「ポリフェノール類の薬効と毒性についての研究」57

# Wnt/ $\beta$ -Catenin シグナル制御分子をシードとする創薬研究 -精密合成化学からの挑戦-

大阪大学薬学研究科 薬品製造化学分野  
好光 健彦

## 1. はじめに

自然界には、人知を超えたユニークな構造と顕著な生物活性を有する多様な有機化合物が存在する。現代の有機合成化学の高度精密化は、これら生物活性天然物に見出される有望な医薬シーズの人工的創製を加速し、医薬品開発を支えている。最近市場に登場した新規抗がん剤、すなわち、群体ホヤ *Ecteinascidia turbinata* を起源とするヨンデリス<sup>®</sup>や、クロイソカイメン *Halichondria okadai* から単離されたハリコンドリル B の誘導體化によって得られたハラヴェン<sup>®</sup>などは、まさに生物活性天然物と精密合成化学のインターフェースが生んだ成功例といえよう。これまで我々は、有機合成化学者の立場から、生物活性天然物を構造基盤とする創薬研究を展開してきた。本講演会では、ある特定の細胞増殖シグナル因子（タンパク）の機能を制御し、がん細胞を死に至らしめる海洋産天然物 (-)-アゲラスタチン A (AA) (**1**) をモチーフとする、抗悪性脳腫瘍（中枢神経系原発悪性リンパ腫）薬の創製に向けた我々の挑戦について報告したい。

## 2. 海洋天然物アゲラスタチン A と Wnt/ $\beta$ -Catenin シグナル、そしてオステオポンチン

1993年、Pietraらは、海綿 *Agelas dendromorpha* の抽出成分が示す細胞毒性の原因物質がユニークな四環性骨格をもつアルカロイド(-)-アゲラスタチン A (AA) (**1**) であることを突き止めた（図 1）。<sup>1</sup> その後、本天然物は、種々のがん細胞に対してシスプラチンを凌ぐ強力な増殖阻害活性を示すことが明らかにされ、さらに、動物実験によって抗腫瘍活性と延命効果が認められて以来、一気に注目を集めてきた。<sup>2</sup> AAの抗腫瘍活性の発現機構は未だ明確ではないが、細胞の増殖や分化に関わる Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを抑制し、がん細胞の G2 期での増殖阻害を誘起することが示されている。<sup>3</sup> さらに、最近の研究により、AAは、がんの転移過程への関与が示唆されているタンパク オス

テオポンチン (osteopontin) の発現を抑制することが判明し、転移抑制効果を持つ新たな抗がん剤のシードとしての活用にも期待が寄せられている。このような状況下、米国 Mayo Clinic Hematology/Oncology 部門の Tun 医師らは、悪性脳腫瘍において、オステオポンチンが高発現していることを見出した。<sup>4</sup>すなわち、彼らの発見は、オステオポンチンの発現を抑制する AA、そして、AA より導き得る各種誘導体が悪性脳腫瘍を克服する分子標的創薬の戦略の鍵となり得る可能性を示唆している。そこで、我々と Mayo Clinic は、AA を構造基盤とする脳腫瘍薬の共同開発に着手した。

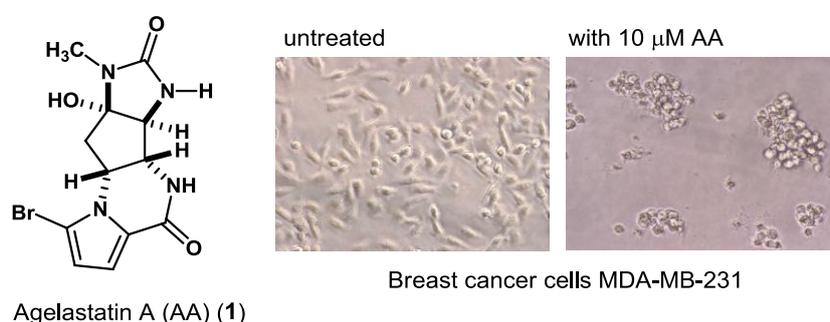


図1. Agelastatin A (AA) とがん細胞増殖阻害

### 3. 海洋天然物アゲラストチン A の化学合成（第一世代～第三世代全合成）

細胞増殖に関わる Wnt/ $\beta$ -catenin 経路に顕著な作用を示し、しかも多数の窒素官能基によって修飾された特異な化学構造を有する AA は、世界中の有機合成化学者を魅了し、激しい獲得競争を巻き起こしてきた<sup>5</sup>その結果、これまでに日本、英国、米国等における研究グループによって、さまざまな化学合成経路が開拓されている。我々は、自らの化学合成研究を開始するにあたり、前臨床試験に求められる AA の大量供給路の確立は勿論のこと、優れた AA 誘導体を開発するための構造活性相関研究に適した合成経路の確立を目指した (図 2)。<sup>6</sup>すなわち、AA の活性発現に関わると考えられる種々の官能基の導入が合成経路の後半において容易となるよう、ダイバージェンスをもったアプローチを設計した。本研究のような医薬化学展開を企図する‘全合成’と、目的天然物の合成が主たるゴールとなる‘全合成’の合成戦略の本質的な相違がここにある。

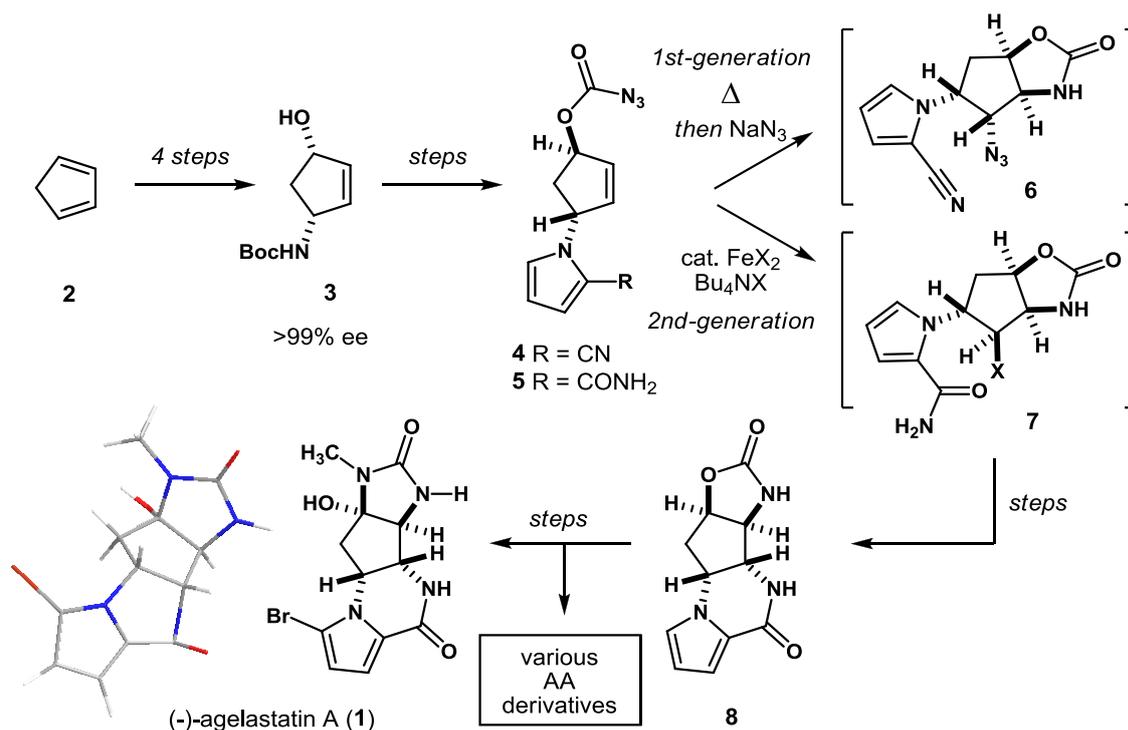


図2. Agelastatin A (AA) の第一及び第二世代全合成

窒素官能基によって高度に修飾された AA の合成においては、骨格の中心部に存在する五員環ユニットに含まれる多連続不斉中心の立体制御が課題となる。我々は、アジドホルマー 4 の立体選択的な変換を鍵として、この課題を解決することとした。なお、我々が着目した出発物は、炭化水素のシクロペンタジエン (2) である。AA は極性が高いことから、その合成には酸化段階が高く極性基の導入が容易な出発物が好まれるが、我々は敢えて安価で入手容易な物質を選んだ。まず、既知の手法を用いてシクロペンタジエン (2) から 4 工程を経て光学的に純粋なアミノアルコール誘導体 3 を調製した。ついでこれを鍵中間体アジドホルマー 4 へ導き、熱条件での分子内アジリジン形成とその後の窒素官能基導入を経て、四環性化合物 8 を得た (4→6→8)。さらに、オキサゾリジノン 8 のメチルアミノ化と酸化によって、AA の分子骨格の特徴を成すヘミアミナル単位を構築し、最後に臭素原子をピロール環に導入して、目的とする AA (1) に至る全合成経路の開拓に成功した。<sup>6</sup>

さて、こうして AA の全合成には成功したものの、取り扱いに注意を要するアジド化合物の熱処理は、大量合成時の安全性の観点から必ずしも好ましくは

ない。そこで我々は、アジドホルマート **4** の熱処理を回避すべく、新たな合成経路の開拓に着手した。検討の結果、アジドホルマート **5** が二価のハロゲン化鉄の存在下、室温という緩和な条件下でアミノハロゲン化を起こして環化体 **7** を与えることを見出し、続く塩基処理によるラクタム化によって第一世代合成における既知中間体 **8** を得ることに成功した。さらに、これよりウレア形成、酸化、ブロム化を含む 3 工程を経て、AA の第二世代全合成経路を確立した (**5**→**7**→**8**→AA (**1**))。7 本第二世代経路は、シクロペンタジエンから総 14 工程で標的天然物に至るものであり、18 工程を要した第一世代合成経路に比べ、より安全かつ効率的な経路である。この第二世代合成経路により、数百ミリグラムの AA を得て後述するマウス薬物動態解析を行うとともに、各種 AA 誘導体の化学合成が極めて容易となった。8,9

さらに最近、我々は第二世代合成経路を進化させ、アジドホルマート (**4** あるいは **5**) を一切用いることのない第三世代合成経路を開拓することにも成功した (図 3)。10 すなわち、アジドホルマートの安全な代替物として機能する *N*-トシルオキシカルバマート **9** を経由するラジカル環化経路である。11 合成経路の良し悪しの基準は、個々の研究者が持つ価値観や研究目的により一様ではないが、安全性やコスト等への配慮は、アカデミズムの全合成研究においても今や軽視できない事項となりつつあり、改良を重ねてきた我々の‘全合成’研究は、そういった要求にも応え得るものである。

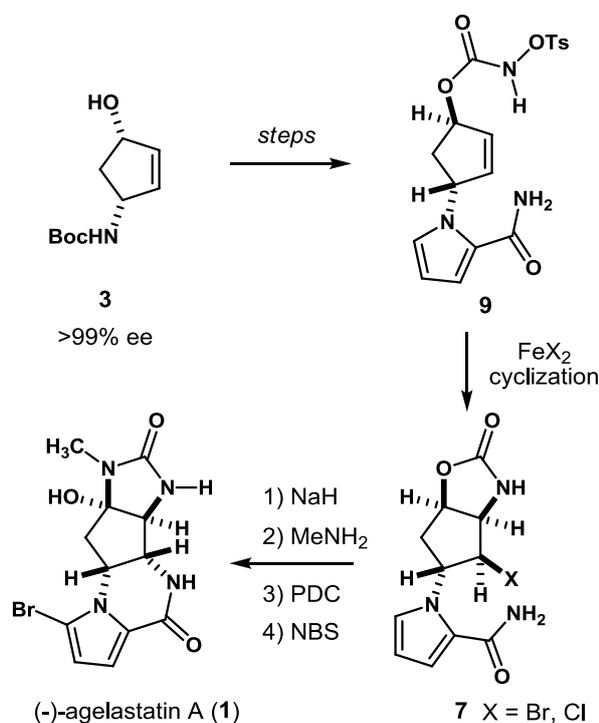


図 3. Agelastatin A (AA) の第三世代全合成

#### 4. 化学合成アゲラスタチン A の生物活性・動態評価：がん細胞増殖阻害活性評価 (*in vitro*)、マウス微小透析法による薬物動態解析 (pharmacokinetics)、Raji 細胞移植マウス脳腫瘍増殖抑制評価 (*in vivo*)

上述の化学合成により獲得した AA を用いる *in vitro* 生物活性試験によって、当然のことながら、AA の強力な細胞増殖阻害作用が確認された。しかし、実は、本研究で我々が最も重要視したのは化合物の細胞毒性の強弱ではない。その主な理由は、我々の創薬対象が脳腫瘍（中枢神経系）であり、中枢神経系薬開発における最大のハードルが適切な薬物動態の確立、すなわち、化合物の血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) 移行の良し悪しにあるからである。そこで、我々と Mayo Clinic は、上記の手法で合成した AA が如何なる薬物動態を示すかをマウスに対する微小透析法 (microdialysis) 法によって解析した。<sup>8</sup> この薬物動態解析 (pharmacokinetics) の結果、AA が良好な血液脳関門移行性を示すことが判明し (腹腔内投与 *i.p.* CSF/serum ratio = 10.09%、静脈投与 *i.v.* CSF/serum ratio = 6.4%)、AA をモチーフとする創薬構想の妥当性を確かめることができた (図 4 及び 5)。また、本薬物動態解析に加え、Raji 細胞移植マウスを用いた動物実験により、AA が用量依存的に脳腫瘍増殖を抑制し、延命効果を示すことを見出した。<sup>12</sup>

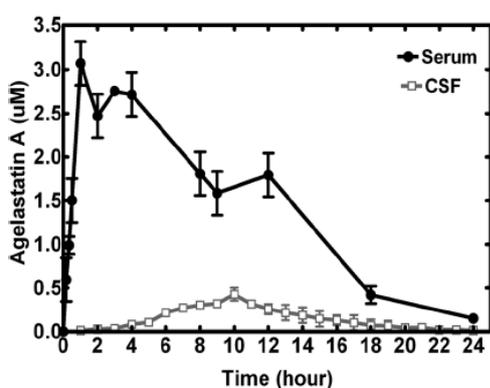


図4. 腹腔内投与後の血清および脳脊髄液中のAA (2.5 mg kg<sup>-1</sup>) の濃度 (Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry) (文献8より引用)

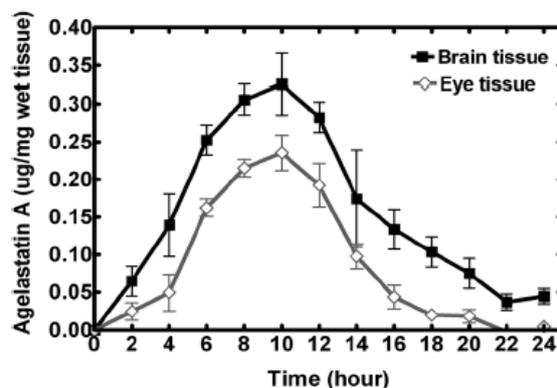


図5. 腹腔内投与後のAA (2.5 mg kg<sup>-1</sup>) の組織分布 (Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry) (文献8より引用)

## 5. 構造活性相関 (SAR) 研究によるアゲラストチン A 新規誘導体の発見

さて、AA の化学合成経路を確立した我々にとって、次なる課題は、構造活性相関 (SAR) 研究による優れた物性を有する AA 誘導体の獲得である。既に述べたように、脳腫瘍薬開発における分子設計のハードルは、血液脳関門移行性をもたらす物性の確保にある。この目的に対して、ランダムに官能基を修飾・改変して多数の化合物を合成し、SAR によって活性の認められた化合物のす

べてを *in vivo* 評価に付すアプローチは効率性の観点から得策ではない。そこで我々は、化学合成によって得た化合物群の *in vitro* 評価と、それによって見出された高活性 AA 誘導体の chemoinformatics 解析による物性予測、そして、pharmacokinetics 解析の融合を基軸とするリード探索を試みた (図 6)。

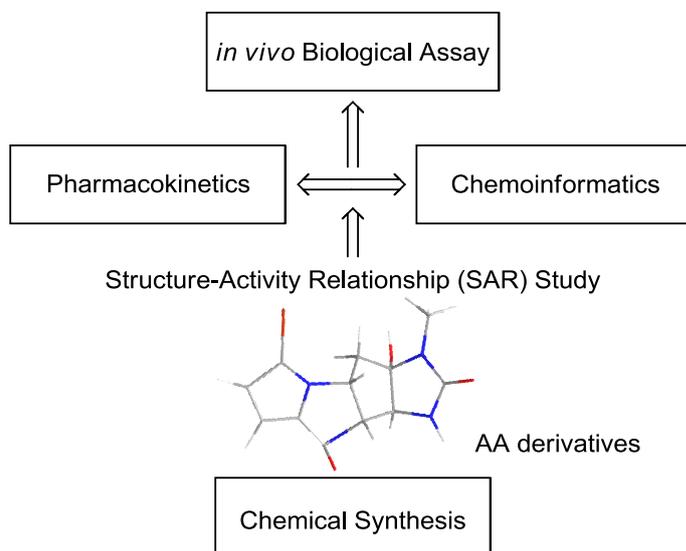


図6. 新規 Agelastatin A (AA) 誘導体開発への統合的アプローチ

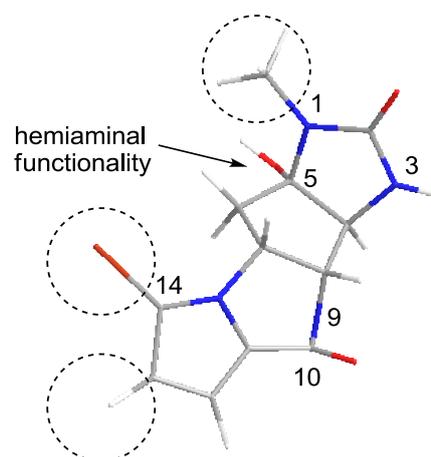


図7. Agelastatin A (AA) 誘導体化

### 5-1. アゲラストチン A 誘導体の分子設計

これまでの AA の構造活性相関に関する関連研究では、天然型 AA に匹敵する高い生物活性を維持した新規誘導体の獲得は、極めて困難であることが報告されている (図 7)。<sup>13</sup> 特に、5 位ヘミアミナルの酸素原子や 3 位及び 9 位窒素官能基の構造改変は活性の消失をもたらすことが明らかにされている。そこで、我々は、これらの位置での化学修飾を避け、1 位窒素原子とピロール環の化学修飾を主たる構造改変の指針とした。なお、後述するように、我々が開拓した AA の全合成経路は、1 位窒素原子とピロール環上での多様な化学修飾を可能とし、これらの位置に存在する官能基がもたらす活性への影響を明らかにする強力な基盤となった。

### 5-2. アゲラストチン A 誘導体の化学合成

AA の全合成中間体 **8** を出発物とし、種々の化学変換によって多様な構造をもつ AA 誘導体を得た (図 8)。すなわち、**8** のエチルアミン処理と続くハロゲン化によって誘導体 **11**~**13** を調製した他、AA の臭素原子を置換した誘導体

14~18 や D 環の欠如した誘導体 19 及び 20 を合成した。また、化合物 8 の鏡像体より、天然型 AA の鏡像体である(+)-AA (*ent*-AA) (21)を得た。

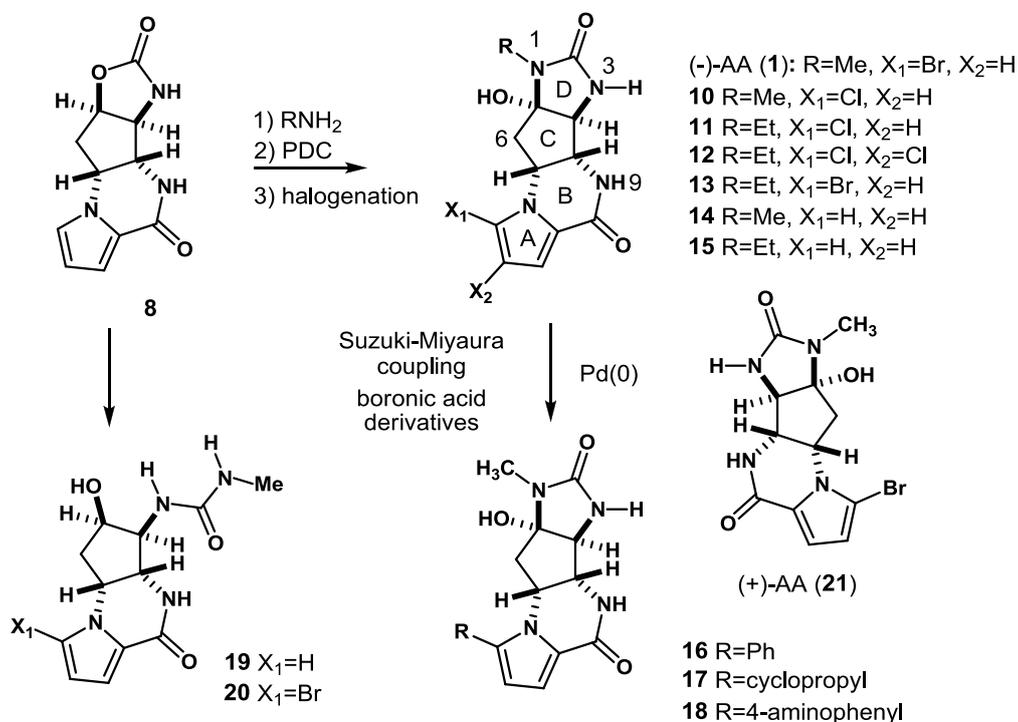


図8. Agelastatin A (AA) 誘導体 (抜粋)の化学合成

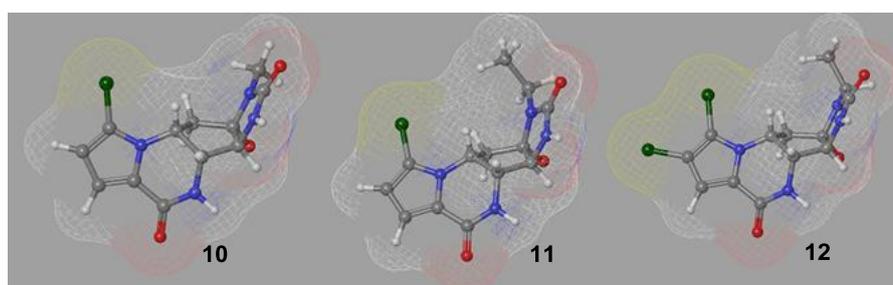


図9. 新規高活性 Agelastatin A (AA) 誘導体 (文献14から改変引用)

### 5-3. アゲラストチン A 誘導体の生物活性・物性予測・薬物動態評価

上記の化学合成で獲得した AA 誘導体を、がん細胞増殖阻害を指標とする *in vitro* 活性評価に付したところ、三種の誘導体 10、11、および 12 が有望な活性を示すことが明らかとなった (表 1)。なお、これら三種の誘導体は、共通し

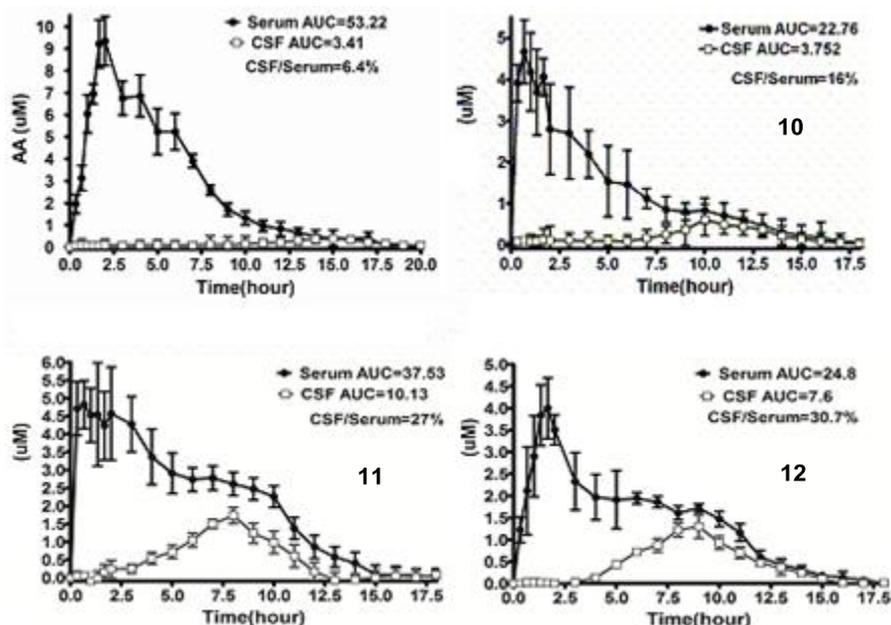
てピロール環上にハロゲン置換基を有している。このことから、活性の発現には、AA 誘導体と標的分子の間での‘ハロゲン結合’のような分子間相互作用の関与が示唆される。また、本 *in vitro* 活性評価において、天然型 AA の鏡像体(+)-AA (*ent*-AA) (**21**) が全く活性を示さなかった事実は、明らかに天然型 AA の三次元構造を空間的に認識する標的分子が存在することを示している。

表1. Agelastatin A (AA) および AA 誘導体のがん細胞増殖阻害活性

| Compounds | Cytotoxicity (IC <sub>50</sub> / μM) |      |            |
|-----------|--------------------------------------|------|------------|
|           | DU145                                | Raji | MDA-MB-132 |
| <b>1</b>  | 2.3                                  | 0.14 | 2.8        |
| <b>8</b>  | ND                                   | >10  | >10        |
| <b>10</b> | 1.2                                  | 0.18 | 0.08       |
| <b>11</b> | 2.6                                  | 0.30 | 0.28       |
| <b>12</b> | 1.4                                  | 0.62 | 0.44       |
| <b>13</b> | >10                                  | —    | —          |
| <b>14</b> | >10                                  | 3.16 | 3.0        |
| <b>15</b> | >10                                  | —    | —          |
| <b>16</b> | 6.0                                  | 3.8  | 1.5        |
| <b>17</b> | 5.0                                  | 0.40 | 1.0        |
| <b>18</b> | >10                                  | —    | —          |
| <b>19</b> | —                                    | >10  | >10        |
| <b>20</b> | —                                    | >10  | >10        |
| <b>21</b> | >10                                  | —    | —          |

次いで、顕著な活性を示した三種の AA 誘導体 **10**、**11**、および **12** を cheminformatics 解析に付したところ、本誘導体のすべてが天然型 AA に比べてより優れた BBB 透過性を有することが予想された。実際、マウス微小透析法による薬物動態解析により、これら三種の AA 誘導体が期待通り 3–5 倍もの優れた血液脳関門移行性を有することが明らかとなった (図 10)。<sup>14</sup> 以上の新知見は、AA を構造基盤とする世界初の新規高活性 AA 誘導体の発見を意味しており、さらなるリード創製に極めて重要な礎となる。現在、これらの候補化合物を用いて、がん細胞移植マウスに対する抗脳腫瘍活性評価を進めてお

り、すでに、いくつかの誘導体が AA を超える延命効果を示すことを見出している。



AA analogue levels in serum and cerebrospinal fluid (CSF) after intravenous injection of 2.5 mg kg<sup>-1</sup> analogues. Shown are means and SEMs. *N*=5 at each time point in serum samples and *N*=5 for microdialysis experiments. (Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry) (文献14より改変引用)

図10. AA誘導体のマウス微小透析法による薬物動態解析

## 6. おわりに

以上、海洋天然物(-)-アゲラストチン A (AA) をモチーフとする抗脳腫瘍薬創製に向けた、我々のこれまでの創薬研究について報告した。精密合成化学と生物活性評価、そして、薬物動態解析の統合的アプローチを基軸とする本研究によって、これまで創出が極めて困難とされてきた新規 AA 誘導体を獲得することに成功した。さらに、これら新規誘導体が抗脳腫瘍薬候補化合物として好ましい物性を有し、有望な抗腫瘍活性を示すことを見出した。目指すべき目的地は未だ遠方にあるが、ここに見出した知見は、その地に向かう力強い一歩となる。

## 7. 謝辞

以上の成果は、Tun 博士を初めとする米国 Mayo Clinic (Department of Hematology/Oncology, Jacksonville, FL) の共同研究者の協力により得られたものであります。また、本研究に際し、前立腺がん細胞 DU145 に対する細胞増殖阻害活性評価にご協力いただいた大阪大学薬学研究科 荒井雅吉先生に御礼申し上げます。本研究は、平成 23-24 年度篷庵社特別研究助成によって遂行されました。暖かいご援助に深く感謝申し上げます。

## 8. 参考文献

- 1) D'Ambrosio, M.; Guerriero, A.; Debitus, C.; Ribes, O.; Pusset, J.; Leroy, S.; Pietra, F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1305.
- 2) Hale, K. J.; Domostoj, M. M.; El-Tanani, M.; Campbell, F. C.; Mason, C. K. In *Strategies and Tactics in Organic Synthesis*, Harmata, M. ed., Academic Press, London, **2005**, p. 352.
- 3) Mason, C. K.; McFarlane, S.; Johnston, P. G.; Crowe, P.; Erwin, P. J.; Domostoj, M. M.; Campbell, F. C.; Manaviazar, S.; Hale, K. J.; El-Tanani, M. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 548.
- 4) Tun, H. W.; Personett, D.; Baskerville, K. A.; Menke, D. M.; Jaeckle, K. A.; Kreinest, P.; Edenfield, B.; Zubair, A. C.; O'Neill, B. P.; Lai, W. R.; Park, P. J.; Mckinney, M. *Blood* **2008**, *111*, 3200.
- 5) For pertinent reviews, see: (a) Dong, G. *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 2231. (b) Yamaoka, T.; Ichikawa, Y.; Kotsuki, H. *J. Synth. Org. Chem., Jpn.* **2012**, *70*, 615.
- 6) Yoshimitsu, T.; Ino, T.; Tanaka, T. *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 5457.
- 7) Yoshimitsu, T.; Ino, T.; Futamura, N.; Kamon, T.; Tanaka, T. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 3402.
- 8) Li, Z.; Kamon, T.; Personett, D. A.; Caulfield, T.; Copland, J. A.; Yoshimitsu, T.; Tun, H. W. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 233.
- 9) MTA11-113 : アゲラスタチン (エーザイ株式会社オンコロジー創薬ユニット) 2011 年 11 月 好光健彦 (大阪大学) 他
- 10) Shigeoka, D.; Kamon, T.; Yoshimitsu, T. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 860-865
- 11) Kamon, T.; Shigeoka, D.; Tanaka, T.; Yoshimitsu, T. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 2363.
- 12) Patent (Provisional) (USA): EFS ID (13987678), Application No (61713974), Confirmation No (5178), Date: Oct. 15 (2012), Title: Treating Brain Cancer Using Agelastatin A (AA) and Analogues Thereof, Applicants: Han W. Tun, Takehiko Yoshimitsu *et al.*
- 13) D'Ambrosio, M.; Guerriero, A.; Ripamonti, M.; Debitus, C.; Waikedre, J.; Pietra, F. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 727-735.
- 14) Li, Z.; Shigeoka, D.; Caulfield, T. R.; Kawachi, T.; Qiu, Y.; Kamon, T.; Arai, M.; Tun, H. W.; Yoshimitsu, T. *Med. Chem. Commun.*, **2013**, *5*, *accepted*.

# 病態の体内微小環境で作用する活性天然物の探索と その標的分子の解明

大阪大学大学院薬学研究科 荒井雅吉

## 1. はじめに

近年、数多くの動物細胞や微生物が比較的簡単に培養できるようになり、これらを利用する医薬シーズの探索研究が数多く行われている。その一方で、生体内の病態部位の細胞や感染部位に存在する病原微生物は、一般的な培養環境で示す表現型とは異なる表現型を示すことが明らかにされつつある。このような背景のもと我々は、細胞や病原微生物が生体内で示す特殊な表現型変化に着目して、それを新しい医薬シーズ探索のためのスクリーニング系構築へと応用し、既存の医薬シーズ探索とは異なる方向からの探索研究を展開している。例えば、腫瘍周辺で見られる血管内皮細胞の表現型変化である、がん血管新生を抑制する活性天然物の探索研究のほか、上皮がん細胞の転移過程に着目したがん転移抑制物質の探索スクリーニング系を構築して活性物質を探索してきた。<sup>1-4)</sup> また、病原微生物が感染部位で示す表現型変化に **biofilm** 形成があるが、抗菌活性を示さない濃度で **biofilm** 形成を阻害する活性天然物の探索研究を進めている。<sup>5,6)</sup> 最近は以下に示す、腫瘍内部や細菌感染部位などで観察される生体内微小環境、特に低酸素環境に起因するがん細胞や病原微生物 (*Mycobacterium* 属細菌) の表現型変化に着目した評価系を構築して、海綿を中心とする底生海洋生物の抽出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物からのスクリーニングにより活性物質の探索研究を進め、見出した活性天然物をシーズとする合成化学的な創薬研究とともに、標的分子の解析による新しい薬剤標的の開拓を展開している。

## 2. 低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質の探索

### 1) 背景

腫瘍内部は血管新生により誘導された血管網が無秩序に存在し、その血管構造も脆弱であることから、部分的な低酸素環境が存在する。また、低酸素環境のがん細胞はその代謝系を変化させ低酸素状況に適応するとともに、活発に血管新生促進因子やがん転移に関与する因子の産生を行うため、病態の悪化に大きく寄与している。一方、がん細胞の低酸素適応において重要な転写因子として **Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$**  (**HIF-1 $\alpha$** ) が知られており、**HIF-1 $\alpha$**  やその関連分子を標的とする化合物の創薬研究が活発に行われている。しかし、がん細胞の低酸素適応機構の全容は明らかにされていないため、これら以外を標的とする研究はほとんどない。このような背景のもと我々は、がん細胞の低酸素適応に関わる新規責任分子を標的とするがん分子標的治療

薬の創製を目的に、ヒト前立腺がん DU145 細胞を HIF-1 $\alpha$  の発現量が上昇する 1% の低酸素条件で培養を行い、通常培養条件と比較して低酸素培養条件選択的に細胞増殖阻害活性を示す活性天然物の探索を行う Phenotypic Screening を進めてきた。そしてこれまでに、インドネシア産海綿 *Dactylosporgia elegans* の MeOH 抽出エキスから、フラノセスタテルペン furospinosulin-1 (1) <sup>7,8)</sup> を見出している (図 1)。

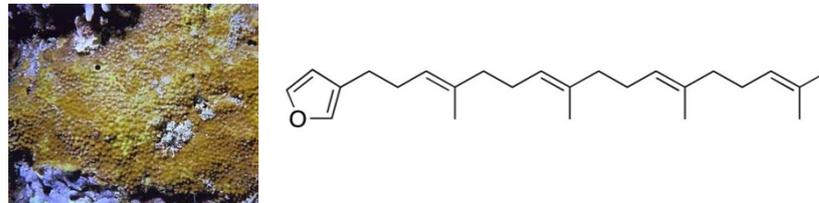


図 1 海綿 *Dactylosporgia elegans* と furospinosulin-1 (1) の化学構造

## 2) Furospinosulin-1(1) の活性

Furospinosulin-1(1) は、単純な化学構造ではあるが濃度依存的かつ低酸素環境選択的な細胞増殖阻害活性を示し、マウスでの *in vivo* 試験において、経口投与で良好な抗腫瘍活性を示すことを明らかにした (図 2)。また低酸素領域のマーカーとなる pimonidazole を腫瘍摘出前にマウスへ投与し、腫瘍切片を免疫染色後、低酸素領域を定量した。その結果、1 投与群の腫瘍はコントロール群と比較して、顕著な低酸素領域の減少が観察された。一方、抗がん剤 cisplatin 投与群についても同様に検討した結果、腫瘍重量は 1 投与群と同程度であるにも関わらず、低酸素領域の顕著な減少は観察されなかった (図 3)。

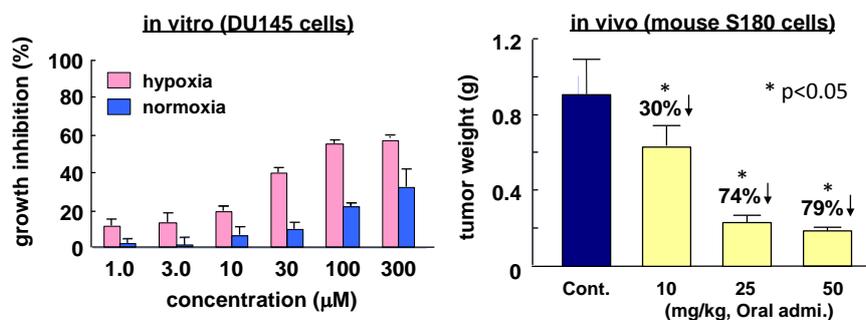


図 2 In vitro および in vivo における furospinosulin-1 (1) の活性

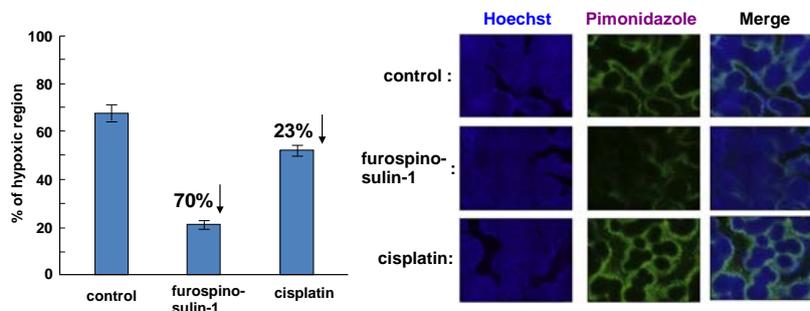


図 3 Furospinosulin-1 (1) の腫瘍内低酸素領域への効果

### 3) 新規 furospinosulin-1 アナログの創製<sup>9)</sup>

我々はまた、天然物より優れた活性を示す化合物の創製を目指し、各種 allyl bromide 体と prenyl phenylsulfone とのカップリング反応を用いる、立体選択的かつ各種類縁体の合成に適用可能な合成法を確立し、furospinosulin-1 (**1**)および芳香環部や側鎖上の置換基等が異なるアナログ化合物の合成を行ってきた。その結果、天然物と比較して幅広い低酸素条件選択性を有し、マウス腫瘍移植モデルにおいても経口投与で抗腫瘍活性を示す3つのアナログ化合物 (analog-k5 (**2**), analog-f9 (**3**) および analog-k13 (**4**)) の創出に成功した (図4)。

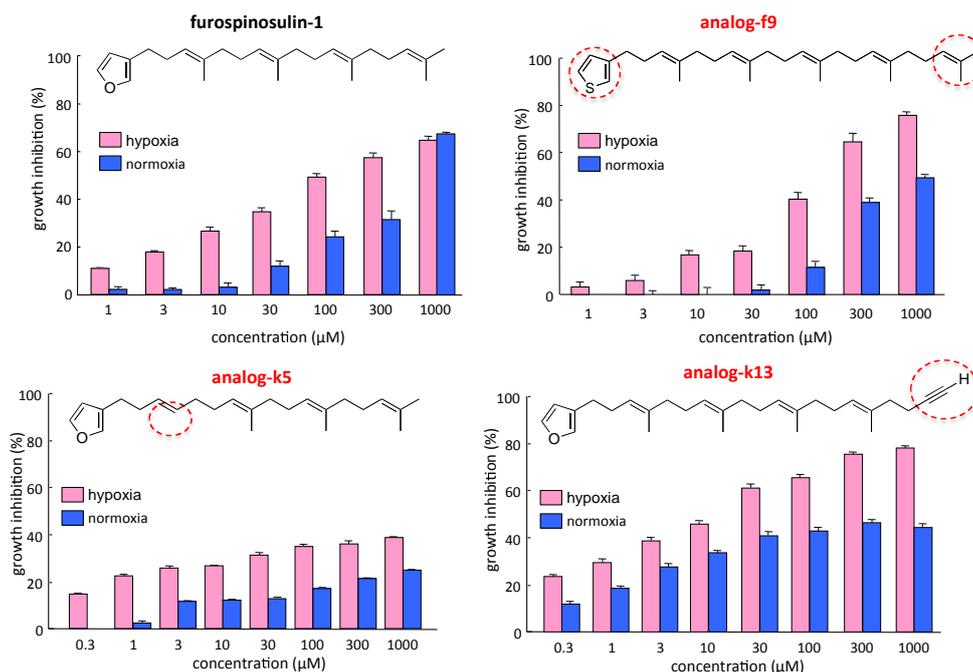


図4 Furospinosulin-1 (**1**)アナログの DU145 細胞に対する低酸素環境選択的な細胞増殖阻害活性

### 4) Furospinosulin-1(**1**)の作用メカニズムと結合タンパク質の同定

次に我々は、**1** の作用メカニズムを解析することを目的に、経路特異的 Oligo GEMArray を利用して解析を行った。その結果、**1** は、低酸素環境で発現誘導される Insulin-like growth factor (IGF) -2 を転写レベルで阻害し、IGF-1 受容体および Insulin 受容体の下流のシグナル伝達を阻害することにより、低酸素環境選択的な細胞増殖阻害活性を示すことを明らかにした。また、ゲルシフトアッセイを利用する IGF-2 遺伝子のプロモーター解析により、furospinosulin-1 (**1**)が、低酸素環境下で培養した細胞の核タンパク質と IGF-2 遺伝子 P3 プロモーターの-171 から-142 の遺伝子配列 (Sp1-like 配列) との複合体形成を阻害することを見出した (図5)。

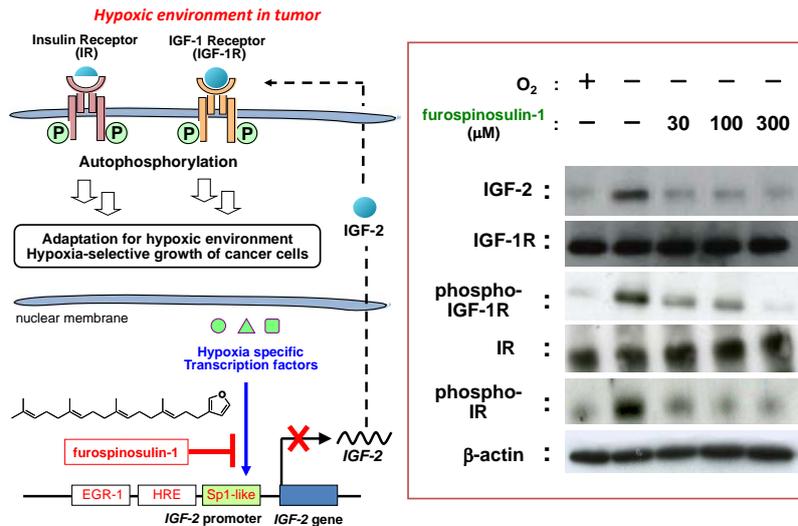


図 5 Furospinosulin-1 (1) の IGF-2 シグナル伝達経路への影響と作用メカニズム

さらに我々は、1 が阻害する複合体中のタンパク質の同定を試みた。その結果、それが、これまでがん細胞の低酸素適応や代謝変化に関与することが報告されていない、2つの転写制御因子 (p54<sup>nrb</sup> および LEDGF) であることを見出した。また、プローブ分子を用いた解析研究から、1 は2つの転写制御因子と直接結合することを証明し、興味深いことに 1 は、低酸素環境下で培養した細胞の p54<sup>nrb</sup> とのみ結合することを見出した (図 6)。また、それぞれの標的タンパク質の発現を siRNA でノックダウンした細胞は、低酸素環境選択的な増殖阻害を受けることが確認された。

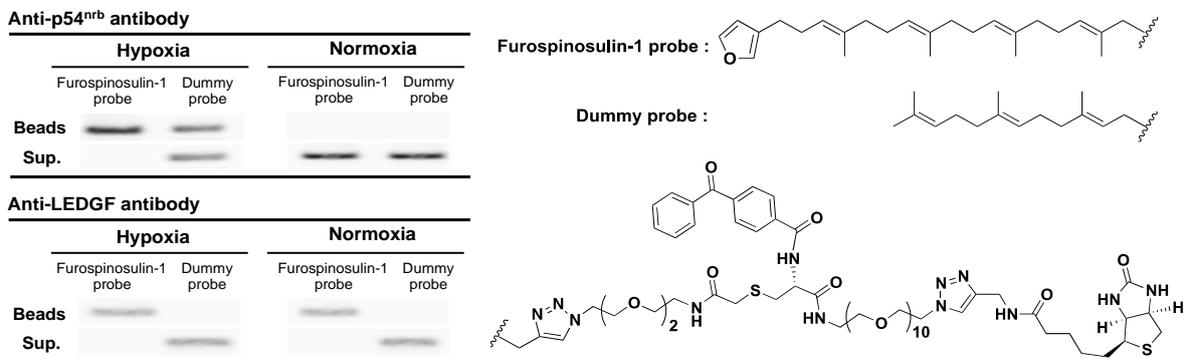


図 6 プローブ分子の化学構造と p54<sup>nrb</sup> および LEDGF との結合

### 3. 潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索

#### 1) 背景

結核の原因菌である *Mycobacterium tuberculosis* は、感染部位の granuloma (肉芽腫) 内において非分裂状態で長期に渡り潜在し、抗結核薬に抵抗性を示すことが知られている。そしてこのことが、最低6ヶ月という長期の化学療法が必要な主因と考えられている。このため、次世代の抗結核薬には、潜在状態の結核菌にも有効で短期

間で治療効果を示すことが望まれている。我々は、*M. smegmatis* および *M. bovis* BCG を 0.2 % の低酸素条件で培養することにより、granuloma 内の結核菌と同様に、抗結核薬 isoniazid に 10 倍以上の抵抗性を示す潜在状態を誘導し、このような isoniazid に高度に抵抗性を示す条件下においても抗菌活性を示す活性天然物の探索を実施した。そしてこれまでに、*Agelas* 属海綿から、ジテルペンアルカロイド agelasine 類、*Haliclona* 属海綿から大環状アルカロイド halicyclamine 類<sup>10-12)</sup>、*Neamphius* 属海綿から新規デプシペプチド neamphamide B<sup>13)</sup>、海洋由来 *Trichoderma* 属真菌から新規アミノリポペプチド trichoderin 類<sup>14,15)</sup>などを、潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として見出している。本発表会では agelasine 類に関する研究について報告する。

## 2) Agelasine 類の抗菌活性

インドネシア産海綿 *Agelas* sp. の MeOH 抽出エキスが、好気および低酸素の両培養条件下で *M. smegmatis* に対して抗菌活性を示すことを見出し、活性試験の結果を指標に活性物質の精製を進めた。その結果、活性物質として agelasine B (2)、agelasine C (3) および agelasine D (4)<sup>16)</sup> を単離・同定した (図 7)。Agelasine 類は好気および低酸素培養条件の *M. smegmatis* に対して 0.8~3.13  $\mu\text{g/mL}$  の最小生育阻止濃度 (MIC) を示し、*M. bovis* BCG に対して 1.56~12.5  $\mu\text{g/mL}$  の MIC を示した。さらに最も強い活性を示した agelasine D (4) を用いて抗菌活性の作用様式を検討した。その結果、4 は好気および低酸素の両培養条件下で、殺菌的に作用することが明らかとなった。

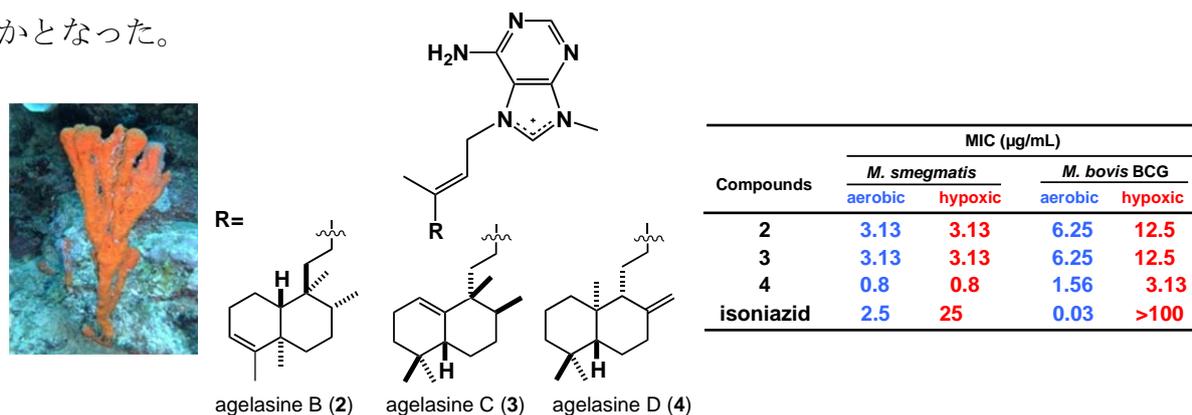


図 7 Agelasine 類の化学構造と抗菌活性

## 3) ゲノム DNA ライブラリーを利用する agelasine D(4) の標的分子の解析

一方、見出した抗菌物質の標的分子を明らかにすることは、新しい薬剤標的の開拓という観点から非常に重要である。細菌の薬剤に対する感受性は、その薬剤の標的分子を高発現させることにより変化して耐性化する。我々は、これらの知見を基に、見

出した抗菌物質の標的タンパク質を簡便に明らかにする方法として、ゲノム DNA ライブラリーを利用する標的分子の解析法を確立した。すなわち、*M. bovis* BCG のゲノム DNA を断片化して、コスミドベクターに組み込んだゲノム DNA ライブラリーを作成し、これで *M. smegmatis* を形質転換することで、ランダムに *M. bovis* BCG の遺伝子を高発現する約 4,000 株の形質転換株を作成して、これをライブラリー化した。そしてこの中から、見出した抗菌物質に対して耐性を示す形質転換株を選択後、その形質転換株に導入されている *M. bovis* BCG のゲノム DNA 配列を解析し、さらに分割した小さなゲノムを高発現する形質転換株の作成と化合物に対する耐性の有無を確認して行き、最終的に、化合物に対して耐性を付与する遺伝子を明らかにすることを試みた (図 8)。

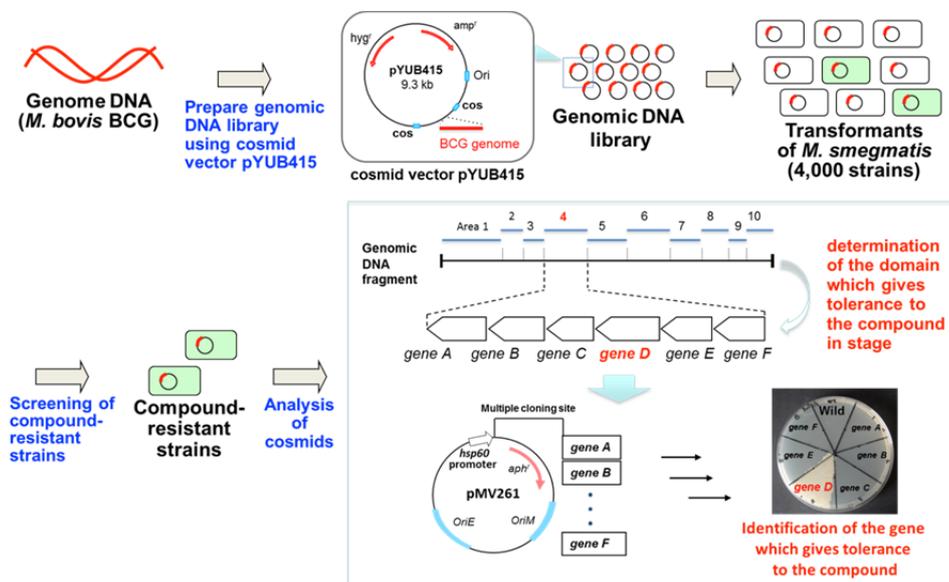


図 8 ゲノム DNA ライブラリーを利用する標的分子の解析法

本手法を agelasine D (4) の標的分子の解析に適応し、作成した形質転換株の中から 4 に対して耐性を示す株をスクリーニングした。その結果、6 株の形質転換株 (Strain 1-6) が、1.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (2xMIC) の 4 を含む培地においても増殖することが明らかとなった (図 9 A)。次に strain 1~6 からコスミドを抽出し、それらに含まれる *M. bovis* BCG ゲノムの遺伝子配列を解析した。その結果、各形質転換株から抽出したコスミドには、図 9 B に示す *M. bovis* BCG の遺伝子が含まれていることが明らかとなった。また以上の結果から、4 に対して耐性を付与する遺伝子は、図 9 B に示す領域の共通部分である、*M. bovis* BCG ゲノムの 3475.051kb ~ 3502.901 kb の 27.85 kb 内に存在することが示唆された。

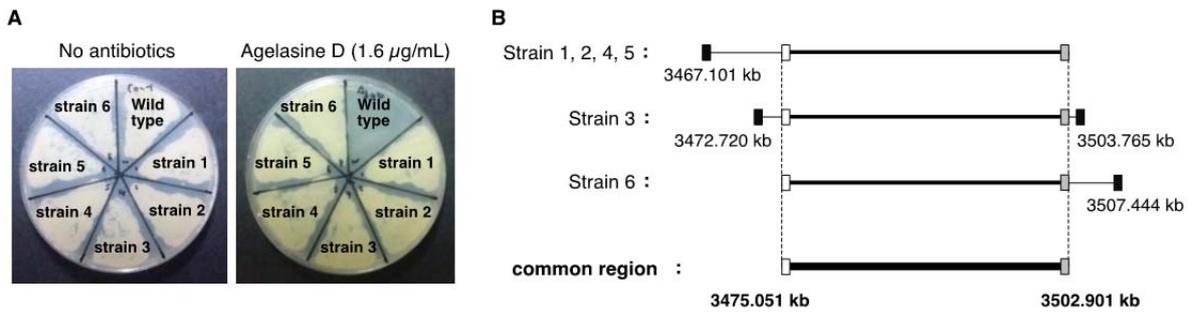


図 9 Agelasine D (4)耐性株の増殖と挿入コスミドの遺伝子配列

さらに、**4** に対して耐性を付与する遺伝子領域を絞り込むため、得られた 27.85 kb の遺伝子領域を 10 領域 (S1~S10) に分割してそれぞれサブクローニングを行い、形質転換株 (Strain 7~16) を作成した (図 10 A)。そして、作成した形質転換株の中から、**4** に対して耐性を示す形質転換株を調べた結果、*BCG3184c*、*BCG3185c*、*BCG3186c*、*BCG3187c* の 4 遺伝子が含まれる領域の高発現株 (Strain 10) のみが **4** に耐性を示した (図 10 B)。さらに同様な検討を進めた結果、最終的に dioxygenase と予想されるタンパク質をコードしている *BCG3185c* 遺伝子の高発現株 (Strain 18) が agelasine D (**4**) に耐性を示すことが明らかとなった (図 10 C)。以上の結果から、agelasine D (**4**) の標的分子は、*BCG3185c* 遺伝子の翻訳産物であることが強く示唆された。

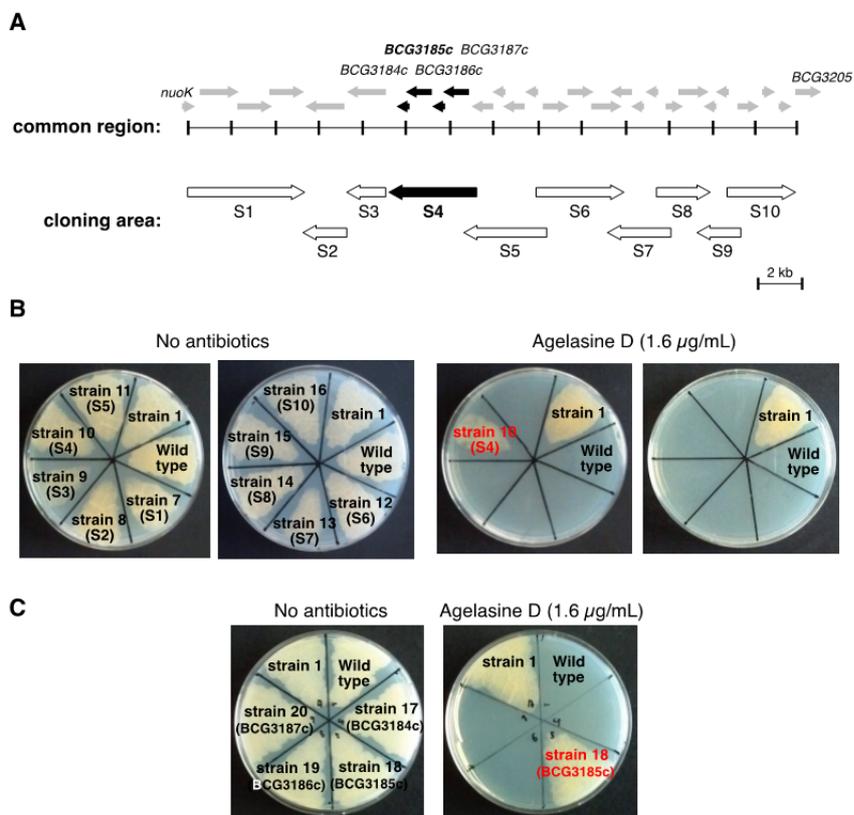


図 10 各形質転換株の agelasine D (4)含有培地での増殖

#### 4) *BCG3185c* 遺伝子高発現による agelasine D (4)代謝への影響

*BCG3185c* 遺伝子の高発現株 (Strain 18) が agelasine D (4)の代謝を促進することにより、見かけ上 4 に耐性を示しているか否かを確認するため、野生株と *BCG3185c* 高発現株 (Strain 18) における 4 の代謝量を比較した。野生株および strain 18 それぞれに、終濃度 0.4  $\mu\text{g/mL}$  (0.5xMIC) で 4 を添加し、経時的に菌体内の 4 の量を HPLC で定量した。また rifampicin を内部標準として用いた。その結果、両菌株間の agelasine D (4)の代謝量に差は見られなかった (図 11)。

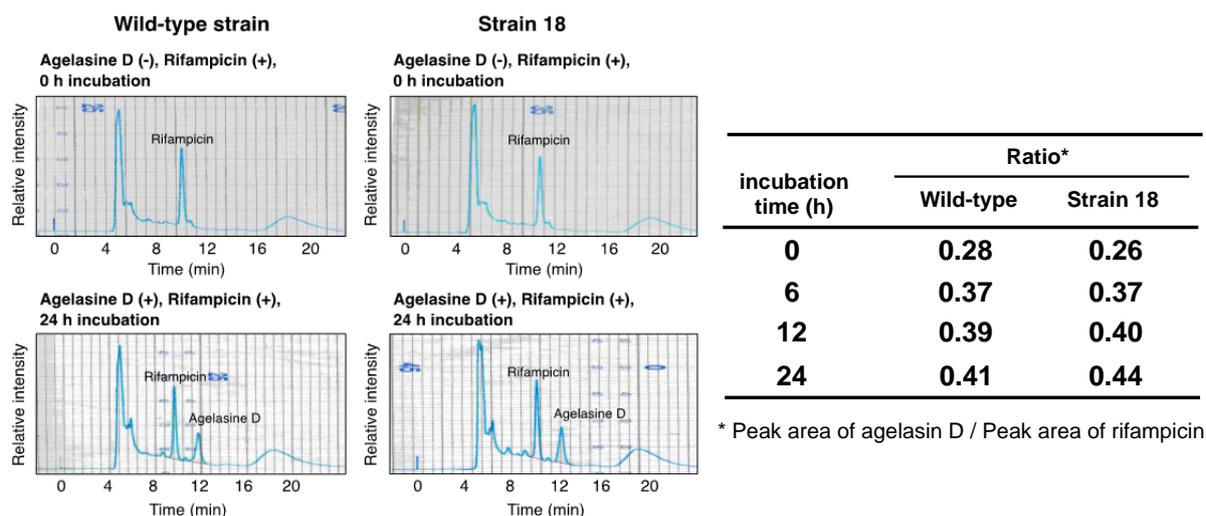


図 11 Wild-type と strain 18 の agelasine D (4)代謝の比較

#### 4) Agelasine D(4)と *BCG3185c* タンパク質の結合親和性

次に、*BCG3185c* 遺伝子を His-tag 融合タンパク質として *Escherichia coli* で発現・調製し、agelasine D (4)との結合親和性を Biacore を利用して解析した (図 12)。その結果、4 と *BCG3185c* タンパク質との解離定数は 2.42  $\mu\text{M}$  と算出された。一方、23S リボソームに結合することが知られている streptomycin を用いて、同様に検討した結果、その解離定数は 1.47 mM であった。以上の結果から、agelasine D (4)は、*Mycobacterium* 属細菌の dioxygenase と予想される *BCG3185c* タンパク質に結合し、その機能を阻害することにより抗菌活性を示すことが強く示唆された。

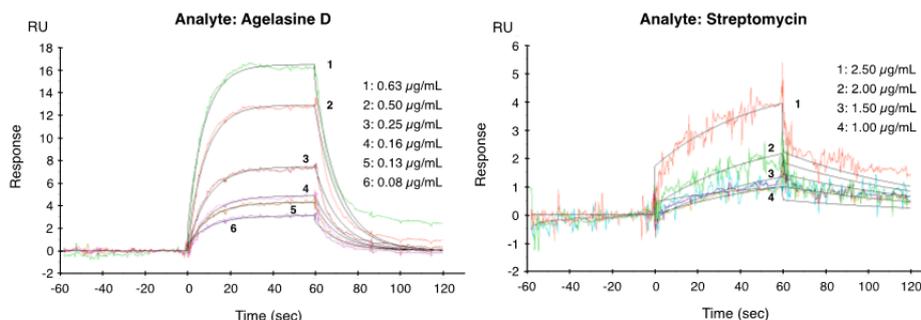


図 12 Agelasine D (4)と *BCG3185c* タンパク質との結合親和性解析

#### 4. おわりに

以上のように我々は、細胞や病原微生物が生体内で示す特殊な表現型変化に着目した Phenotypic Screening の評価系構築、それを利用した海洋薬用資源からの医薬シーズ探索、さらに、分子生物学的手法とケミカルバイオロジーの手法を組み合わせ、見出した活性天然物の標的分子の解析と新規薬剤標的の開拓を展開してきた。特に、低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 furospinosulin-1 およびそのアナログ化合物は、がんに対する新しい分子標的治療薬のシーズとしての有用性が高く、見出した標的分子 (p54<sup>nrb</sup> および LEDGF) は、今後 HIF-1 $\alpha$ に代わる新規薬剤標的となることが期待される。また、ゲノムライブラリーを利用する抗菌物質の標的分子解析法は、活性物質に耐性を示す形質転換株の取得に成功すれば、非常に簡便にその結合タンパク質まで同定することが可能である。今後はこの方法論を動物細胞に作用する活性天然物の標的分子解析法に応用することを検討して行きたい。

#### 謝辞

本研究の一部は、公益財団法人蓬庵社の研究助成によるものであり、ここに厚く御礼を申し上げます。また、ご推薦を賜りました北川 勲先生に心より感謝致します。

#### 参考文献

- 1) S. Aoki, Y. Watanabe, D. Tanabe, M. Arai, H. Suna, K. Miyamoto, H. Tsujibo, K. Tsujikawa, H. Yamamoto, M. Kobayashi Structure-activity relationship and biological property of cortistatins, anti-angiogenic spongean steroidal alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.* (2007) 15(21), 6758-6762.
- 2) A. Hayashi, M. Arai, M. Fujita, M. Kobayashi Pyripyropenes, fungal sesquiterpenes conjugated with  $\alpha$ -pyrone and pyridine moieties, exhibits anti-angiogenic activity against human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* (2009) 32(7), 1261-1265.
- 3) M. Arai, A. Hayashi, M. Sobou, S. Ishida, T. Kawachi, N. Kotoku, M. Kobayashi Anti-angiogenic effect of triterpenoidal saponins from *Polygala senega*. *J. Nat. Med.* (2011) 65(1), 149-156.
- 4) M. Arai, Y. Yamano, M. Fujita, A. Setiawan, M. Kobayashi Stylistamide X, a new proline-rich cyclic octapeptide as an inhibitor of cell migration, from an Indonesian marine sponge of *Stylissa* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2012) 22(4), 1818-1821.
- 5) S. Ishida, M. Arai, H. Nikawa, M. Kobayashi Inhibitory effect of cyclic trihydroxamate siderophore, desferrioxamine E, on the biofilm formation of *Mycobacterium* species. *Biol. Pharm. Bull.* (2011) 34(6), 917-920.
- 6) M. Arai, H. Niikawa, M. Kobayashi Marine derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. *J. Nat. Med.* (2013) 67(2), 271-275.

- 7) G. Cimino, S. De Stefano, L. Minale Polyprenyl derivatives from the sponge *Ircinia spinosula*: 2-Polyprenylbenzoquinones, 2-polyprenylbenzoquinols, prenylated furans and a C-31 difuranoterpene. ***Tetrahedron*** (1972) 28(5), 1315-1324.
- 8) M. Arai, T. Kawachi, A. Setiawan, M. Kobayashi Hypoxia-selective growth inhibition of cancer cells by furospinosulin-1, a furanosesterterpene isolated from an Indonesian marine sponge. ***ChemMedChem***, (2010) 5(11), 1919-1926.
- 9) N. Kotoku, S. Fujioka, C. Nakata, M. Yamada, Y. Sumii, T. Kawachi, M. Arai, M. Kobayashi Concise synthesis and structure-activity relationship of furospinosulin-1, a hypoxia-selective growth inhibitor from marine sponge. ***Tetrahedron*** (2011) 67(35), 6673-6678.
- 10) M. Arai, M. Sobou, C. Vilchèze, A. Baughn, H. Hashizume, P. Pruksakorn, S. Ishida, M. Matsumoto, W.R. Jacobs Jr., M. Kobayashi Halicyclamine A, a marine spongean alkaloid as a lead for anti-tuberculosis agent. ***Bioorg. Med. Chem.*** (2008) 16(14), 6732-6736.
- 11) M. Arai, S. Ishida, A. Setiawan, M. Kobayashi Haliclonyclamines, tetracyclic alkylo-piperidine alkaloids, as anti-dormant mycobacterial substances from a marine sponge of *Haliclona* sp. ***Chem. Pharm. Bull.*** (2009) 57(10), 1136-1138.
- 12) M. Arai, L. Liu, T. Fujimoto, A. Setiawan, M. Kobayashi DedA protein relates to action-mechanism of halicyclamine A, a marine spongean macrocyclic alkaloid, as an anti-dormant mycobacterial substance. ***Marine Drugs*** (2011) 9(6), 984-993.
- 13) Y. Yamano, M. Arai, M. Kobayashi Neamphamide B, new cyclic depsipeptide, as an anti-dormant mycobacterial substance from a Japanese marine sponge of *Neamphius* sp. ***Bioorg. Med. Chem. Lett.*** (2012) 22(14), 4877-4881.
- 14) P. Pruksakorn, M. Arai, N. Kotoku, C. Vilchèze, A.D. Baughn, P. Moodley, W.R. Jacobs Jr., M. Kobayashi Trichoderins, novel aminolipopeptides from a marine sponge-derived *Trichoderma* sp., are active against dormant mycobacteria. ***Bioorg. Med. Chem. Lett.*** (2010) 20(12), 3658-3663.
- 15) P. Pruksakorn, M. Arai, L. Liu, P. Moodley, W.R. Jacobs Jr., M. Kobayashi Action-mechanism of trichoderin A, an anti-dormant mycobacterial aminolipopeptide from marine sponge-derived *Trichoderma* sp. ***Biol. Pharm. Bull.*** (2011) 34(8), 1287-1290.
- 16) H. Nakamura, H. Wu, Y. Ohizumi, Y. Hirata Agelasine-A, -B, -C and -D, novel bicyclic diterpenoids with a 9-methyladeninium unit possessing inhibitory effects on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from the Okinawa sea sponge *Agelas* sp. ***Tetrahedron Lett.*** (1984) 25(28), 2989-2992.

# ジアミン新規合成法開発を基軸とした医薬品候補物質効率合成法への展開

熊本大学大学院 生命科学研究所 石塚 忠男

はじめに

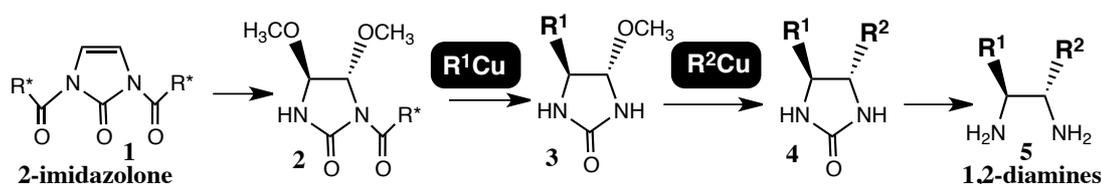
1,2-ジアミン構造は、ビオチン、タミフル（オセルタミビル）、リレンザ（ザナミビル）等の極めて多岐にわたる医薬品・生理活性物質に含まれる部分構造であるばかりでなく、2-アミノアルコール構造、1,2-ジオール構造を持つ生理活性化合物をシーズに医薬品候補物質を探索する際には、アナログとして合成が試みられることが多い。

また、さまざまな金属イオンのキラル配位子として不斉触媒に利用されたり、有機分子触媒として環境配慮型反応の構築に利用されることも多い。

いずれにしても、側鎖構造の異なるものを多数合成することが必要であるが、合成法<sup>1)</sup>として汎用性の高いものは少なく、2つの異なる置換基を導入したエチレンジアミン誘導体を共通の原料から合成できる方法論はほとんどない。

我々は、2-イミダゾロンを出発原料にした合成方法論を以前から検討しており、Scheme 1のような方法論による“ルート”はほぼ確立していた<sup>2)</sup>。しかし、このルートは、“気兼ねなく使う”、には若干の問題があったので、今回、その問題点を解決し、医薬品候補分子などを多種類合成する方法として使用に耐えるものにするための検討をおこなった。

Scheme 1 2-イミダゾロンを構築剤とした1,2-ジアミン類合成



さらに、2-imidazolone から合成可能な、コンホメーションが固定された 1,2-ジアミンについて、有機触媒としての展開を図り興味深い結果を得たので、併せて報告する。

まず、確立済であったところを示す

## (1) Methoxy 基の置換変換について

4,5-dimethoxy-2-imidazolidinone には 2つの methoxy 基があるが、これらは区別して段階的に置換変換することが出来る。(Scheme 1 2→3→4)

Methoxy 基は、BF<sub>3</sub>・OEt<sub>2</sub> 存在下、各種求核反応剤と立体保持で置換反応するが、*mono-acyl* 体、*mono-sulfonyl* 体と、片方の窒素原子を修飾することにより反応性をコントロールすることが可能であり、NH 基側（修飾されていない側）の methoxy 基だけを置換変換できる。

Table 1 には、Cu 反応剤を用いた反応を示しているが、各種 alkyl 基、Phenyl 基が立体特異的に導入でき、また vinyl 基の導入も可能である。ほとんどすべての置換反応において、得られるものは立体保持の *trans* 体であり、まれに *cis* 体がわずかに生成することがあっても、カラムクロマトにより分離することが可能であった。

Table 1

| Entry | R <sup>1</sup> M              | CuCN (eq.) | LiCl (eq.) | BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub> (eq.) | Temp. (°C) | Time (h) | R <sup>2</sup> | Yield (%) |
|-------|-------------------------------|------------|------------|---|------------|----------|----------------|-----------|
| 1     | n-BuLi (4eq.)                 | 8.8        | 8.8        | 2                                       | -30        | 2        | n-Bu           | 78        |
| 2     | iso-PrMgBr (4eq.)             | 8.8        | 8.8        | 2                                       | -30→0      | 2        | iso-Pr         | 42        |
| 3     | t-BuLi (4eq.)                 | 4.4        | 8.8        | 4                                       | -30        | 48       | t-Bu           | 88        |
| 4     | PhLi (4eq.)                   | 4.4        | 8.8        | 2                                       | -30→0      | 1        | Ph             | 75        |
| 5     | CH <sub>2</sub> CHMgBr (8eq.) | 8.0        | 17.6       | 8                                       | -78        | 6        | Vinyl          | 68        |

置換反応後に反応した NH 側をスルホニル基で修飾し、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/MeOH などの弱アルカリ性条件下で処理すると、acetyl 基を選択的に除去することができ、残りの methoxy 基を置換変換することが可能となる。

Table 2 に、*N*-Tosyl-5-butyl-4-methoxy 体の反応を示しているが、最初の methoxy 基の置換と同様に Cu 反応剤によるアルキル化の他、Si 試薬によるアリル化やシアノ化も可能である。もちろん、これらの反応は、最初の methoxy 基の変換においても有効であり、本方法論は、さまざまな置換基の組合せの 1,2-ジアミン類を類似の反応条件で合成していくことに適していると言える。

Table 2

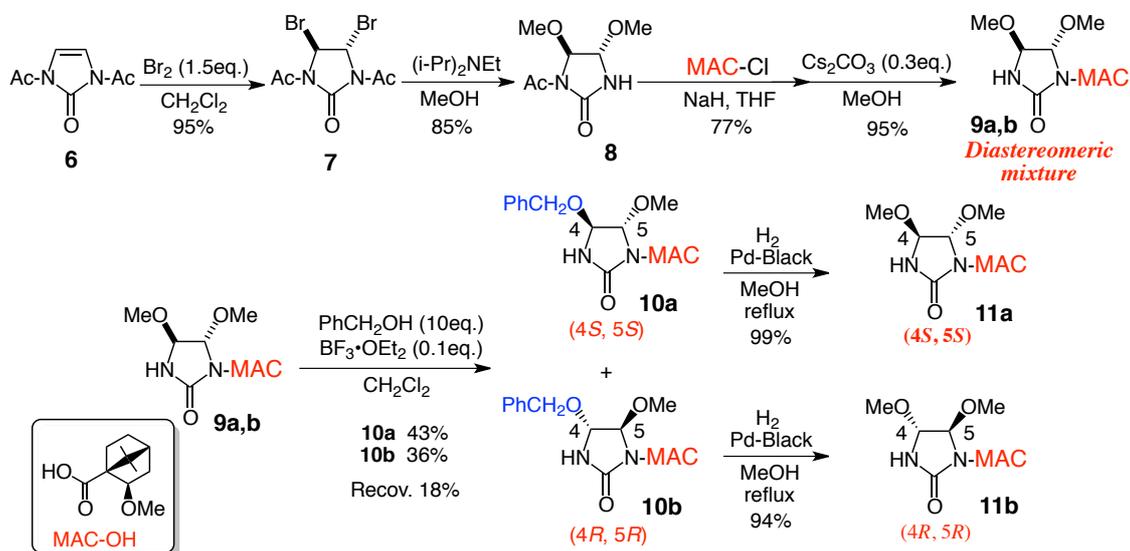
| Entry | Reagents  | Solvent                         | Temp. (°C) | Time (h) | R     | Yield (%) |
|-------|---|---------------------------------|------------|----------|-------|-----------|
| 1     | n-BuLi (4eq.), CuCN (4.4eq.)<br>LiCl (8.8eq.), BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub> (4eq.) | THF                             | -30→0      | 3        | n-Bu  | 94        |
| 2     | ≡SiMe <sub>3</sub> (2eq.), BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub> (1eq.)                     | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 0          | 0.5      | Allyl | 76        |
| 3     | TMSCN (2eq.), BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub> (1eq.)                                  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 0          | 0.5      | CN    | 90        |

4,5-両置換体を  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  による加水分解により開環すれば、mono-*N*-tosyl-1,2-diamines を得ることができる。(Scheme 1 4→5)

## (2) 光学分割について

我々は光学分割剤として、2-*exo*-methoxyapocanphane carboxylic acid(MAC acid)を開発しており、多くの 2-oxazolidinones, 2-imidazolidinones の光学分割に成功している<sup>3)</sup>が、合成子として用いる 4,5-dimethoxy-2-imidazolidinone の光学分割は、N 位に MAC 基を導入するだけでは困難であった。一度 4-benzyloxy-5-methyl-体に変換すると可能ではあり、分割後に、再度 benzyloxy → methoxy の変換を行えばキラルシントンとして利用可能であった。(Scheme 2)<sup>(2)</sup>

Scheme 2



また、*meso*-diol により 4,5-dimethoxy 体を *meso*-dialkoxy 体に変換後、キラル触媒存在下での脱アシル化反応により、片方のエナンチオマーだけを得ることに成功していた。<sup>(4)</sup>

このように、一応は 2-imidazolidinone からキラル 1,2-ジアミン類を合成することは出来たのであるが、問題となっていたのは次の点である

- 合成子 (8 : 4,5-dimethoxy-2-imidazolidinone) の合成ルートの長さ
- 合成子の光学分割の操作の煩雑さ
- *N*-位保護基としての sulfonyl 基の脱保護について

これらの点について、解決策を見出し、Scheme 1 の方法論を より使いやすいもの にすることが出来たので以下で紹介する。

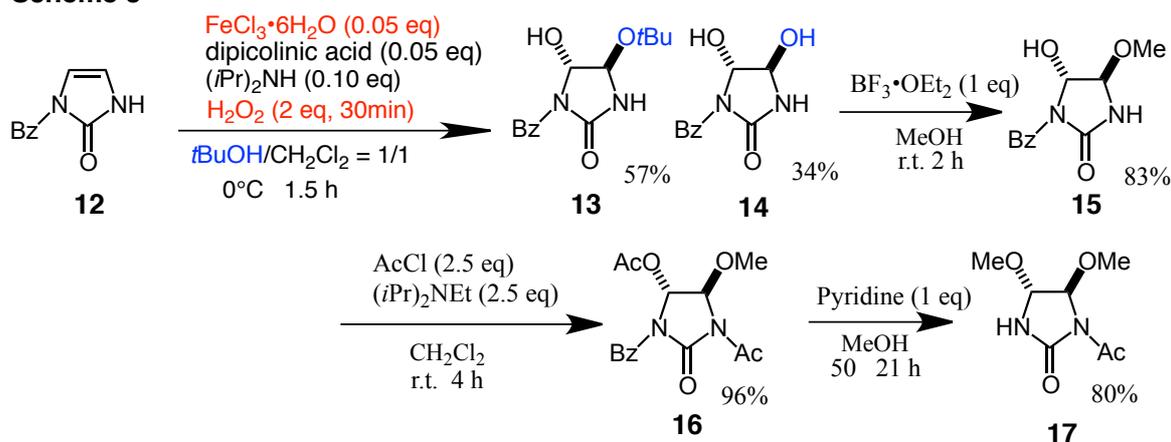
## 2-Imidazolone の 4, 5 位二重結合部位への新規付加反応の開発

4,5-Dimethoxy-2-imidazolidinone (**8**)は、Scheme 2 に示す様に、2-imidazolone (**6**)の二重結合部位に  $\text{Br}_2$  を付加させた後に、MeOH により dimethoxy 化して合成している。NBS/MeOH や  $\text{Br}_2/\text{MeOH}$  などの条件による bromomethoxylation や、PhSeCl / MeOH による Phenylseleno-methoxylation においては、付加反応の位置選択性が低く、生成する異性体の分離が困難なために合成子として用いることが出来ず、4, 5 位を同置換基 (methoxy 基) に変換してから用いているのであるが、このために、2 重結合への diastereo / enantio 選択的付加反応を試みるのが困難であった。

4, 5 位に同時に酸素官能基を導入することを目的として、エポキシ化反応を検討したところ、 $\text{Fe}^{3+}$ 触媒存在下  $\text{H}_2\text{O}_2$  により反応がすみやかに進行し、エポキシ体は得られないものの、溶媒に用いたアルコール (および  $\text{H}_2\text{O}$ ) がエポキシ環を位置選択的に開環したと考えられる 4-alkoxy-5-hydroxy 誘導体、4,5-dihydroxy 誘導体を得られた。(Scheme 3)

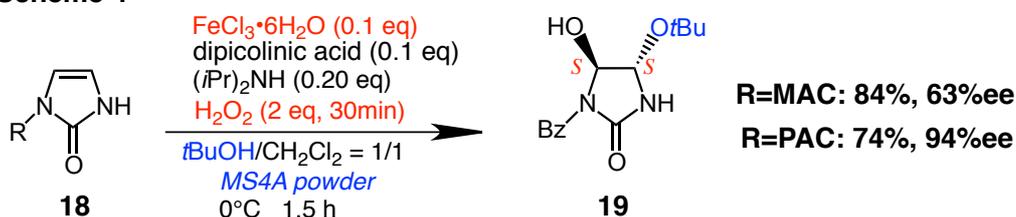
本付加体は、多段階にはなるが 4,5-dimethoxy 体へ変換できることができ、エポキシ化による合成子調整が可能であることが明らかになった。

Scheme 3



$\text{H}_2\text{O}_2$  との反応を、N 位に MAC 基を導入した 2-imidazolone (**18**) で実施すると 63%de の選択性で付加体を得られ、ジアステレオマーはカラムクロマトにより分離可能であることがわかり、更に嵩高いキラルカルボン酸である PAC acid (2-exo-propoxyapocanphane carboxylic acid)の導入により 94%de という高い選択性で反応が進行することが明らかになった。(Scheme 4)

Scheme 4



エポキシ化反応剤として、 $\text{H}_2\text{O}_2$  水溶液の代わりに  $\text{H}_2\text{O}_2$ -urea complex を使用しても同様に反応が進行し、さらに溶媒に trimethyl orthoacetate を用いると 4,5-dihydroxy 体が減少して 5-hydroxy-4-methoxy 体が効率よく得られること、Fe-dipicolinic acid 錯体を単離して用いることも可能であることが明らかになった。

$\text{H}_2\text{O}_2$ -urea complex を用いると、反応系中の  $\text{H}_2\text{O}$  の量が減り 4,5-dihydroxy 体が減少するだけでなく、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の slow addition が不要になる。trimethyl orthoacetate は、methoxy 供与剤として働くだけでなく、脱水剤としても働き、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  に添加する形で用いることにより 5-hydroxy-4-methoxy 体のみを得ることが出来るようになった。(Table 3)

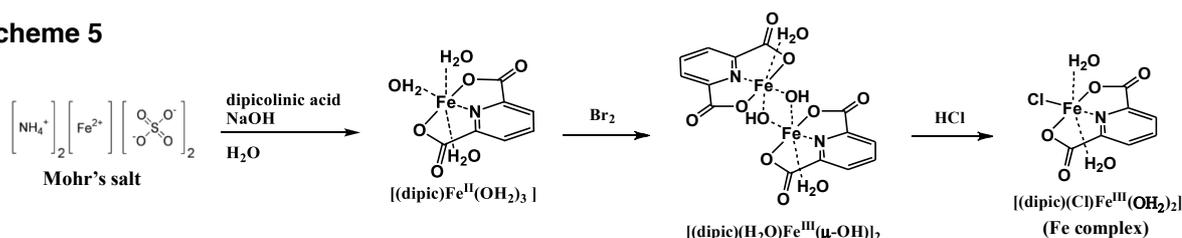
**Table 3**

$\text{Fe}^{3+}$  complex (0.1 eq)  
*i*PrNH<sub>2</sub>·HCl (0.2 eq)  
 Oxydant (1.5 eq)  
 $\text{MeC(OMe)}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 3/7$   
 rt, time

| entry | Oxydant                         | time(h) | yield(%) |      |
|-------|---------------------------------|---------|----------|------|
|       |                                 |         | 4-OMe    | 4-OH |
| 1     | $\text{H}_2\text{O}_2$ aq (30%) | 0.5     | 60       | 9    |
| 2     | $\text{H}_2\text{O}_2$ -urea    | 2.5     | 83       | 0    |

また、 $\text{Fe}^{3+}$ -dipicolinic acid 錯体は Mohr's salt から合成できることが報告されているが (Scheme 5)  $\text{FeCl}_3$  と dipicolinic acid から容易に合成することが出来ることがわかった。保存が出来るだけでなく、アミンを添加すると有機溶媒に溶けて反応系が均一にすることができる。

**Scheme 5**



A.Gourdon et. al, *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 5156

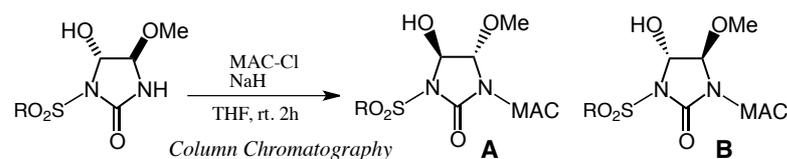
#### 4, 5-Dimethoxy-2-imidazolidinone の光学分割法の改良

4,5-dimethoxy-2-imidazolidinone の光学分割において、問題点は 4,5-dimethoxy 体のまま分割出来なかったことである。

さまざまな検討を行った結果、片方の N 位に導入するスルホン基の種類によっては、カラムクロマトで分割可能となることが明らかになった (Table 4)。

ジアステレオマーのカラム分離性や、おのおのジアステレオマーの結晶性、を考慮する

Table 4



| R   | A (%)* | B (%)* | total (%) |
|---|--------|--------|-----------|
| Tol   | 0      | 0      | 100       |
| Ph  | 39     | 47     | 99        |
| 2,4,6-Me <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 38     | 47     | 98        |

\* separated yield

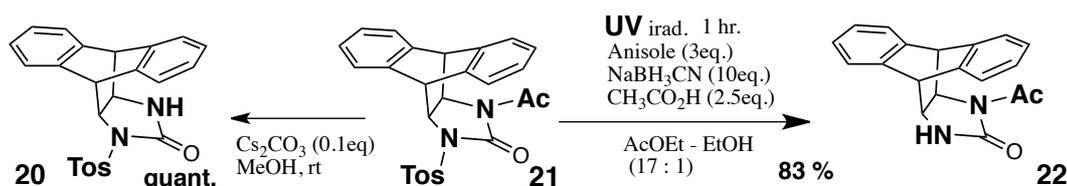
sulfonyl-4,5-dimethoxy-2-imidazolidinone の両エナンチオマーを得ることに成功した。

### 脱スルホニル化反応について

合成子として 1-sulfonyl-4,5-dimethoxy-2-imidazolidinone を用いると、4 位の methoxy 基の変換後に 3 位の窒素原子を保護して 1 位の sulfonyl を脱離させることが必要となる。しかし、一般には *N*-sulfonyl 基の脱離性は低く、アシル基やウレタン基が共存すると、それらの脱離反応が優先してしまう。

*N*-sulfonyl 基の脱離について、非求核的反応として光反応を検討したところ、NaBH<sub>3</sub>CN 存在下での UV 照射により容易に脱離可能であることが明らかになった。Scheme 6 に示すように、*N*-acetyl 基を残したまま *N*-tosyl 基だけを完全に除去すること (21 → 22) が出来、1-sulfonylsubstituted-4,5-dimethoxy 体を合成子として用いることが可能となった。

Scheme 6



### キラル 1,2-diamine の不斉触媒としての応用について

さまざまなキラル 1,2-diamines が合成することが出来れば、ジアミン系不斉触媒を開発し、それによる反応により医薬品候補分子の合成に寄与することも可能になる。

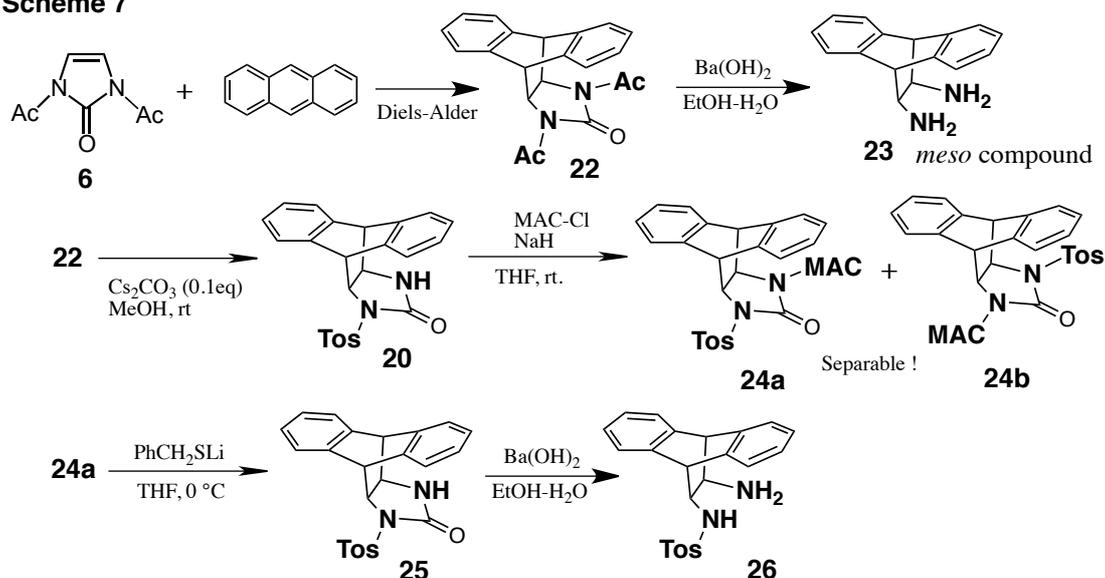
キラル 1,2-diamine として名高いものに、1,2-diphenylethylenediamine(DPEN)があるが、2-imidazolone からは DPEN はもちろんのこと、芳香環上に置換基を持つものなどを含めてさまざまな誘導体を合成することが可能である。

既存反応の最適化などに利用することも出来るが、ここでは、2-imidazolone と anthracene から合成できる、9,10-dihydroanthraceno-ethylenediamine (23) を用いた興味深い結果を

紹介する。

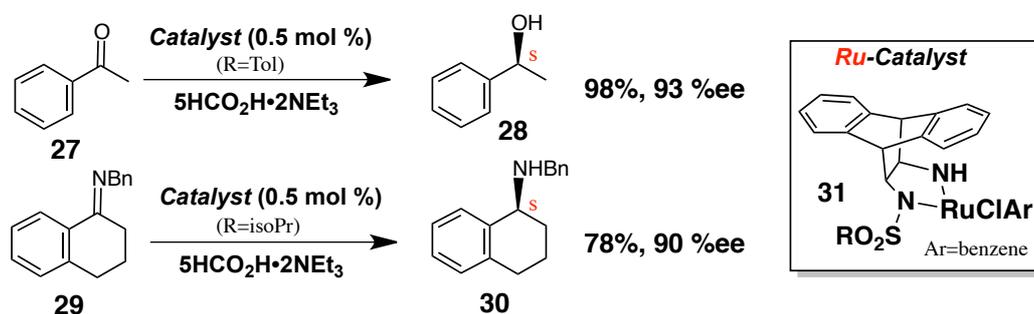
本アミンは、2-imidazolone と anthracene の Diels-Alder 反応成績体である 9,10-dihydroanthraceno-2-imidazolidinone (**22**:DHAI<sub>m</sub>) を加水分解すれば容易に得られるが、N 上に置換基が無ければアキラル (meso 体) である。しかし、Scheme 7 のように、MAC 基を用いた光学分割 (**20** → **24a** + **24b**) を行った後に、N 上に保護基を導入しながら変換していけばキラルジアミン化合物 (**26**) とすることが可能である。つまり、骨格そのものは左右対称であるキラルジアミンを合成することが出来る。

Scheme 7



*cis* にコンホメーションが固定されていること、9,10-dihydroanthraceno 基が屋根のようにジアミン部分の片方だけを効率的に遮蔽していること、により、これまでに本ジアミン (**26**) を配位子として Ru 錯体 (**31**) を合成し、不斉還元反応を報告してきている<sup>5)</sup> (Scheme 8)。

Scheme 8



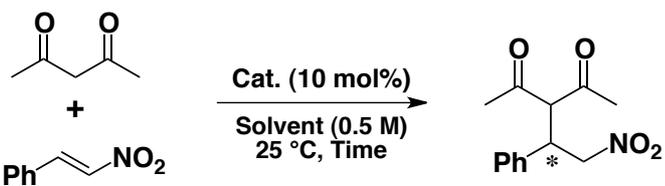
#### 《アミン-チオウレア型有機触媒への応用》

今回、Amine-Thiourea 型有機触媒に本骨格を導入し、amino 基と thiourea 基の位置関係により触媒の反応性・選択性が大きく変化するという興味深い知見を得たので、以下に示す。Acetylacetone と nitrostyrene の反応において、dimethylamino 基、thiourea 基との間にそ

れぞれスペーサーとして(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>を導入したところ、スペーサーの導入位置により選択性が逆転し、さらにスペーサーの長さにより反応性の変化が見られた。

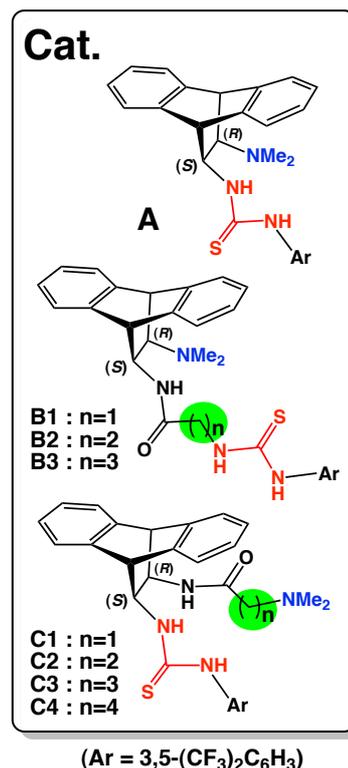
特に、dimethylamino 基側に(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>をスペーサーとして導入したもの (**C3**) については、反応性が著しく向上し、わずか 15 分の反応で高いエナンチオ選択性で生成物を与えることが明らかになった。(Table 5)

Table 5



| Entry | Cat. | Solvent                         | Time (h) | Yield (%) | ee (%) |
|-------|------|---------------------------------|----------|-----------|--------|
| 1     | A    | Toluene                         | 24       | 0         | --     |
| 2     | B1   | Toluene                         | 48       | 93        | 87 (R) |
| 3     | C1   | Toluene                         | 24       | 82        | 72 (S) |
| 4     | C2   | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 4        | 96        | 89 (S) |
| 5     | C3   | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 15 min   | 98        | 89 (S) |
| 6     | C4   | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 20 min   | 92        | 57 (S) |
| 7*    | C3   | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 10 h     | 97        | 97 (S) |

\* 2.5 mol% of catalyst was used at -30°C

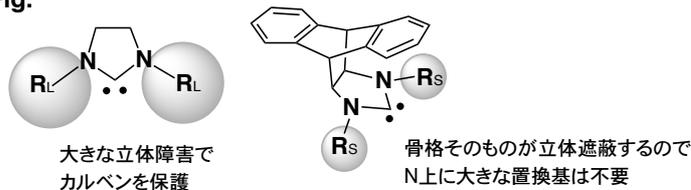


### 《NHC 触媒への応用》

本ジアミン骨格の、効率的な立体遮蔽、を実証するために、NHC(N-heterocyclic carbene) への導入を試みた。カルベンは本来極めて反応性が高く、不安定であり、通常は大きな立体障害で保護することで、ほどほどの反応性を持たせることで利用されている。

Fig.に示すように、通常はN上に大きな置換基を導入することでカルベンを保護しているが、本ジアミン骨格の場合、骨格そのものの立体障害のためにN上に大きな置換基は不要であり、

Fig.

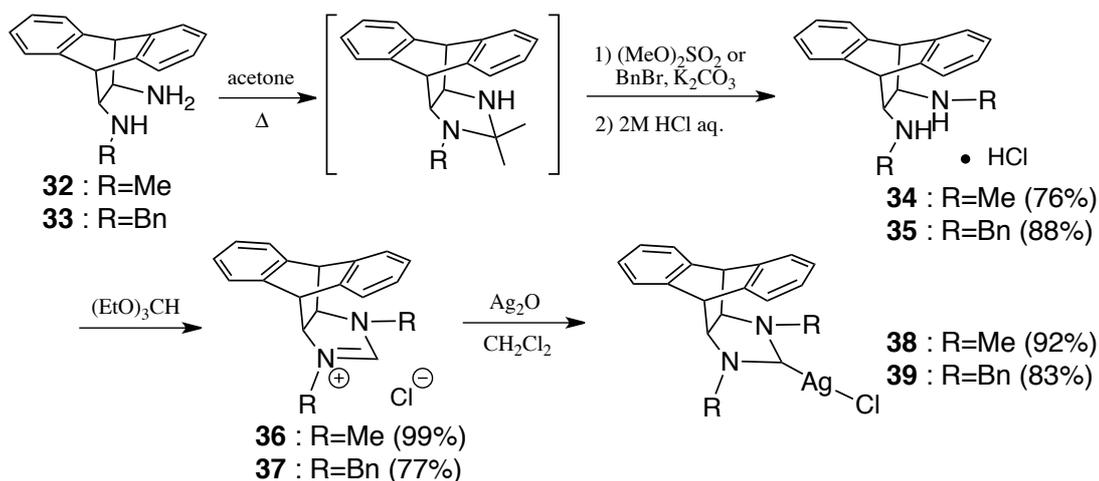


反応性をあまり損なうことなく、取扱易い(程度の安定性をもつ)カルベンを生成させられることが期待できる。また、2つのN上の置換基を異なるものにすればキラルカルベン

とすることが出来、不斉触媒としての応用が可能である。

Scheme 9 に示すようなルートで合成をしたところ、カルベン Ag 錯体 (**38,39**) を安定な結晶として得ることができた<sup>6)</sup>。化合物 **38** は、N 上に立体障害の小さなメチル基を有する化合物であるが、骨格の 9,10-dihydroanthraceno 基による立体遮蔽により十分に保護されていると考えることが出来る。

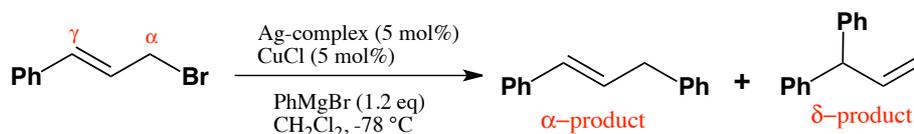
**Scheme 9**



これらのカルベン錯体の立体的嵩高さを判断するために、Cu 触媒でのアリル位の置換反応に適用してみた。本反応においては、嵩高いカルベンだと  $\gamma$  付加体が優先するということが知られている。

Table 6 に示す様に、**38, 39** 共に  $\gamma$  選択性を示し、十分な立体的嵩高さを持っていることが明らかになった。

**Table 6**



| Entry | Ag-complex | Yield (%) | Ratio ( $\alpha$ : $\gamma$ ) |
|-------|------------|-----------|-------------------------------|
| 1     | None       | 95        | 96 : 4                        |
| 2     | <b>38</b>  | 98        | 20 : 80                       |
| 3     | <b>39</b>  | 95        | 5 : 95                        |

現在、N 上の 2 つの置換基の異なるキラルカルベン錯体について研究を進めている。

## References

- (1) Lucet, D., Le Gall, T., Mioskowski, C., *Angew. Chem. Int. ed.*, **1998**, *37*, 2580-2627.
- (2) Seo, R., Ishizuka, T., Alaa A. -M. Abdel-Aziz, Kunieda, T.  
*Tetrahedron Lett.*, **42**, 6353-6355 (2001)
- (3) Matsunaga, H., Kimura, K., Ishizuka, T., Haratake, M., Kunieda, T.  
*Tetrahedron Lett.*, **32**, 7715-18 (1991)
- Hashimoto, N., Ishizuka, T., Kunieda, T.  
*Tetrahedron Lett.*, **35**, 721-4 (1994)
- (4) Ishizuka, T., Katahira, T., Seo, R., Matsunaga, H., Kunieda, T.  
*Tetrahedron Lett.*, **45**, 9327-9330 (2004)
- (5) Matsunaga, H., Ishizuka, T., Kunieda, T.  
*Tetrahedron Lett.*, **46**, 3645-3648 (2005)
- Matsunaga, H.; Nakanishi, K.; Nakajima, M.; Kunieda, T.; Ishizuka, T.,  
*Heterocycles*, **2009**, *78*, 617-622.
- (6) Ando, S., Matsunaga, H., Ishizuka, T.  
*Tetrahedron*, **2013**, *69*, 1687-93.

## 膵β細胞を中心とした糖尿病発症原因の解明とその多角的研究

大杉満(東芝病院代謝内分泌内科)

### 【研究の背景】

本研究は、インスリン分泌能とインスリン感受性を日本人と白人(デンマーク人)で詳細に直接比較し、耐糖能を決定づける分泌能と感受性が民族によって異なるのか、異なるならば体格、運動量や、血中ホルモンなどの何がその差を決定づけているかを研究した。

糖尿病の95%以上を占める2型糖尿病では、インスリン抵抗性(血糖値を下げるインスリンが効きにくくなること)とインスリン分泌不全(インスリンの出が悪くなること)の両方が存在することが知られている。日本人とその他の民族、コーカシアン白人との間では、2型糖尿病の発症素因や発症状態の違いが知られている。具体的には日本人2型糖尿病患者では肥満度が少なくインスリン抵抗性が小さいが、インスリン分泌が少ないために糖尿病を発症していることを示唆する報告があるが、現在のところ日本人と他民族で、同一の測定方法でインスリン分泌能とインスリン感受性を比較した研究は知られていない。現在までに2型糖尿病の病態について、民族差が存在することが議論され、その具体的例証として別々に計画された臨床試験を後ろ向き解析で比較することにより、民族差を明らかにする試みは既に行われていた。優れた着想点と既存のデータを最大限活用する点で評価はできるものの、統一プロトコルを用いて耐糖能を調査していないこと、検体検査が中央測定されていないこと、試験に組み入れるコホートにバランスよく体格・耐糖能別の群が必ずしも組み入れられていないこと、耐糖能検査に統一プロトコルを用いていないために交絡因子の統計的調整などのデータの多角的解析が困難であったことなどの欠点が存在した。

また、インスリン分泌能とインスリン感受性を測定する方法は、正常血糖高インスリンクラン

ブ試験を用いた方法が最善であるが、時間的・肉体的に患者負担が大きく汎用されていない。血液検査を用いた簡便な指標 (Homeostatic Model Assessment (HOMA)やインスリンレジニク・インデックス)も存在するが、先のクランプ試験で得られる結果と一致しないことがあり、真に簡便で正確な指標の開発が望まれている。

この研究では、コペンハーゲン大学(デンマーク)ならびにノボ・ノルディスク社研究所(デンマーク)と共同研究し、日本人と白人の被験者を同数集め、同一の試験方法でインスリン分泌能とインスリン抵抗性を測定し直接比較した。

## 【方法】

日本側は糖尿病患者40名、境界型耐糖能障害患者40名、健常者40名の計120名、デンマーク側糖尿病患者50名、境界型耐糖能障害患者50名、健常者50名の計150名被験者を目標とし、臨床試験を行った。凡用されているインスリン分泌・感受性の指標の過去の報告に基づき、インスリン分泌の差をパワー80%で認めるためには糖尿病患者、境界型耐糖能障害、健常者の各群で20名に試験を必要であることを根拠にこれらの症例数設定を行った。最終的には日本側糖尿病48名、境界型26名、健常者46名合計120名、デンマーク側糖尿病48名、境界型39名、健常者63名、合計150名に試験を行った。

各被験者について、以下の検査項目が行われた。

・経口的ブドウ糖負荷試験 (OGTT): グルコース71g 及び D2-グルコース(安定同位体) 4g を用い300分間で12点採血しOGTTの間は、すべての測定時点で以下の項目を測定した: 血糖値、血漿中重水素グルコース、血清中C-ペプチド、血清中インスリン、血漿中グルカゴン、血漿中GLP-1、血漿中GIP及び血漿中遊離脂肪酸(FFA)。

・二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)スキャン: 体脂肪組成を推定する。

- ・間接的 $VO_2max$ -text (ステーションナリバイクを用いる): 体力を推定する。
- ・Whatman FTA<sup>®</sup> DNA採血カードによる血液の採取: 17の確認された2型糖尿病感受性遺伝子検査を行った。これとは別に次々に報告される遺伝子多型の検討を行うために末梢血からのDNAを採取し長期保存を行う。H20年度時点では報告の無かったKCNQ1遺伝子多型などが解析候補である。
- ・その他、空腹時血漿の測定: HbA<sub>1c</sub>、TNF  $\alpha$ 、IL-6、アディポネクチン、レプチン、総コレステロール、高比重リポタンパク(HDL)、低比重リポタンパク (LDL)及び中性脂肪
- ・正常血糖高インスリンクランプ法: 点滴静注でインスリンを注入し、同時にブドウ糖注入量を可変しながら正常血糖を維持することにより、インスリン感受性を測定する。最低1.5時間の定常状態を含め、4時間のグルコースクランプ試験を実施した。クランプ法の目的は、OGTT及びクランプ法の推定値から得られたインスリン感受性を比較するためである。なお、これは被験者全体の一部である日本人、白人の各群40例を検査した。

両群の検体は、アッセイ法の違いによる差異を避けるため、デンマーク、ならびに University of Padova の同一の検査施設で分析された。

インスリン感受性は、OGTTデータに基づき、モデル手法を用いて推定された。すなわち、集団アプローチ(混合効果モデル)を用いて、すべての被験者に対し、一つのモデルで動力学グルコース代謝を推定した。また、比較検討するために、ミニマルモデルを用いた指標、HOMA-IR、ISI-composite等の指標を用いてインスリン感受性も推定した。クランプ法によるインスリン感受性は、それぞれグルコース及びインスリン注入量から直接推定し、OGTTデータから得られるインスリン感受性指標と比較し、高い相関が得られた(データ省略)。 $\beta$ 細胞機能も同様にOGTTデータに基づくモデル手法、及びHOMA  $\beta$ とインスリン分泌指数等の

単純指標を用いて推定した。混合効果モデル法から得られた結果を、主成分分析、多変量回帰分析などの統計手法により解析した指標に基づき、共変量分析と比較した。

## 【主要結果】

試験参加者の基礎データを表1に示す。デンマーク白人に比べて、日本人は身長が小さく、体重が軽く、BMIもそれに伴い日本人は小さかった。

ほとんどの空腹時測定値は二国群間で差はないが、空腹時インスリン値、C ペプチド値はデンマーク白人で高く、簡易法で測定した最大酸素摂取量( $VO_2Max$ )は日本人で高い結果であった。

糖負荷試験後の血糖、血中インスリン濃度、血中C ペプチド濃度曲線を図1に示す。血糖反応曲線は、耐糖能別ごとに2つの民族でほぼ同様であったが、血中インスリン、血中C ペプチド濃度曲線は、同一耐糖能では日本人が小さい結果であった。しかしながら正常耐糖能群と境界型耐糖能異常群を比較すると、同一民族内では負荷後60分まではほぼインスリンやC ペプチド濃度が同様に上昇するが、そのあとは濃度の最大値が境界型群でより大きく、かつ遅い時間でピークを迎えることが判明した。また境界型耐糖能異常群と2型糖尿病群を比べると、同一民族内で2型糖尿病群で負荷後60分までのインスリン及びC ペプチドの上昇が低下しており、かつその最大値も境界型群と比して2型糖尿病群で低下していた。

インスリン抵抗性(HOMA-IR)ならびにインスリン感受性(Matsuda Index)をそれぞれ糖負荷試験から得られる血糖値、インスリン値を元に計算した。図2A,Bに見られるようにインスリン抵抗性は白人で大きく、その逆にインスリン感受性は日本人で大きいという結果になった。

表 1. 被験者の基礎データ一覧

|                                 | Caucasians  |             |             |             | Japanese    |             |             |                |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
|                                 | NGT         | IGT         | T2D         | Total       | NGT         | IGT         | T2D         | Total          |
| No of subjects                  | 63          | 39          | 48          | 150         | 46          | 26          | 48          | 120            |
| Low BMI <sup>a</sup> (%)        | 32 (51%)    | 14 (36%)    | 24 (50%)    | 72 (48%)    | 25 (54%)    | 12 (46%)    | 27 (56%)    | 64 (53%)       |
| Age (yr)                        | 53 (7)      | 54 (8)      | 57 (7)      | 55 (7)      | 49 (7)      | 54 (8)      | 57 (7)      | 54 (8)         |
| Sex (male)                      | 29 (46%)    | 15 (38%)    | 29 (60%)    | 73 (49%)    | 21 (46%)    | 12 (46%)    | 33 (69%)    | 66 (55%)       |
| Height (m)                      | 1.74 (0.11) | 1.71 (0.10) | 1.76 (0.10) | 1.74 (0.10) | 1.63 (0.10) | 1.62 (0.10) | 1.64 (0.08) | 1.63 (0.09)*** |
| Weight (kg)                     | 90.3 (21)   | 97.7 (22)   | 94.0 (21)   | 93.4 (21)   | 64.6 (13)   | 69.6 (18)   | 68.0 (13)   | 67.1 (14)***   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )        | 29.8 (5.9)  | 33.0 (6.3)  | 30.4 (5.7)  | 30.8 (6.1)  | 24.0 (3.2)  | 26.3 (5.0)  | 25.3 (4.4)  | 25.0 (4.2)***  |
| Waist-to-hip ratio              | 0.91 (0.09) | 0.94 (0.08) | 0.97 (0.08) | 0.94 (0.09) | 0.93 (0.05) | 0.94 (0.05) | 0.95 (0.05) | 0.94 (0.05)    |
| FPG (mmol/L)                    | 5.5 (0.5)   | 5.9 (0.4)   | 8.3 (2.0)   | 6.5 (1.7)   | 5.5 (0.5)   | 6.0 (0.6)   | 7.7 (1.3)   | 6.5 (1.3)      |
| FSI (pmol/L)                    | 46 (36)     | 56 (34)     | 77 (47)     | 58 (41)     | 30 (19)     | 36 (24)     | 36 (23)     | 34 (22)***     |
| FS C-peptide(nmol/L)            | 0.74 (0.30) | 0.89 (0.27) | 1.13 (0.42) | 0.90 (0.37) | 0.57 (0.22) | 0.66 (0.32) | 0.70 (0.20) | 0.64 (0.25)*** |
| HbA <sub>1C</sub> (%)           | 5.5(0.3)    | 5.7(0.4)    | 6.6(0.9)    | 5.9(0.8)    | 5.2(0.3)    | 5.5(0.3)    | 6.2(0.7)    | 5.7(0.7)*      |
| HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol)    | 36.6(3.5)   | 38.8(3.8)   | 48.2(10)    | 40.9(8.2)   | 33.5(2.9)   | 36.5(3.2)   | 44.3(7.1)   | 38.5(7.1)*     |
| VO <sub>2</sub> max (mL/min/kg) | 28.0(9.9)   | 24.9(6.1)   | 24.7(6.4)   | 26.1(8.1)   | 31.7(7.2)   | 29.8(7.4)   | 27.6(7.8)   | 29.7(7.7)***   |

FPG, fasting plasma glucose; FS, fasting serum; FSI, fasting serum insulin; T2D, type 2 diabetes. Data are presented as number of participants (%) or mean (SD). To convert the values for glucose to mg/dL, divide by 0.05551. To convert the values for insulin to mU/L, divide by 6. P-values for differences between the Japanese and Caucasian cohorts were obtained from two-sided unpaired t-tests (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001)

<sup>a</sup>Cut-offs for the low-BMI group were <25 and <30 kg/m<sup>2</sup> for Japanese and Caucasians, respectively.

インスリン分泌能の指標である HOMA- $\beta$ 、Insulinogenic Index を算出した(図 2C-E)。Insulinogenic Index に関しては血漿インスリン値を用いた従来からの計算方法及び、血漿 C ペプチドを用いた指標も計算した(Prehepatic Insulinogenic Index)。これは膵ベータ細胞から分泌されたインスリンは肝臓においてインスリン受容体に結合、ないしインスリン分解酵素で分解されるため、肝臓におけるインスリン・クリアランスに民族差があれば血中インスリン濃度を用いる指標のみでは正確にインスリン分泌能を算出できないと考えたからである。空腹時の血糖ならびにインスリン値を用いる HOMA- $\beta$  は日本人がすべての耐糖能において低いという結果になった。インスリン値を用いる、ないし C ペプチド値を用いた Insulinogenic Index は全体として日本人はデンマーク人に比べて各耐糖能別に低い傾向にあるものの、インスリン値を用いた Insulinogenic Index では2型糖尿病群でのみ、C ペプチド値を用いた同指標では境界型群でのみ統計的有意に差が認められた。

次に ANCOVA モデルを用い、基礎データ、遺伝因子、生活環境因子などが、上記インスリン感受性指標と分泌指標をどれだけ説明するかを検討した。表2に見られるように、インスリン感受性指標である Matsuda Index においては腹囲、Android Fat(体幹部分の最下部5分の1)、などの体格指標が重要な説明因子となることが判明した。Insulinogenic Index を代表として取り上げるが、インスリン分泌指標においても Android fat、BMI などの体格指標が重要な説明変数となることが判明した。

次に民族の違いとインスリン抵抗性・分泌指標全体との関係を ANCOVA モデルを用いて解析した。表3に見られるように体格指標の中の代表として BMI を用い、BMI をモデルに含めない解析では Prehepatic Insulinogenic Index を除く指標で、民族差があるという結果になるが、BMI をモデルに含めるとその統計的有意差は消失することが示された。そこで図 2 F) - J)に示すように、インスリン抵抗性・分泌指標を BMI で補正すると、図 2 A) - E) で見られた統計的有意差は大部分が消失するか、有意差があっても(2型糖尿病群の HOMA-IR、Matsuda Index、HOMA- $\beta$ )その差は補正前と比べて減弱した。

図1 糖負荷試験後の血糖値、血中インスリン値、C ペプチド値の推移

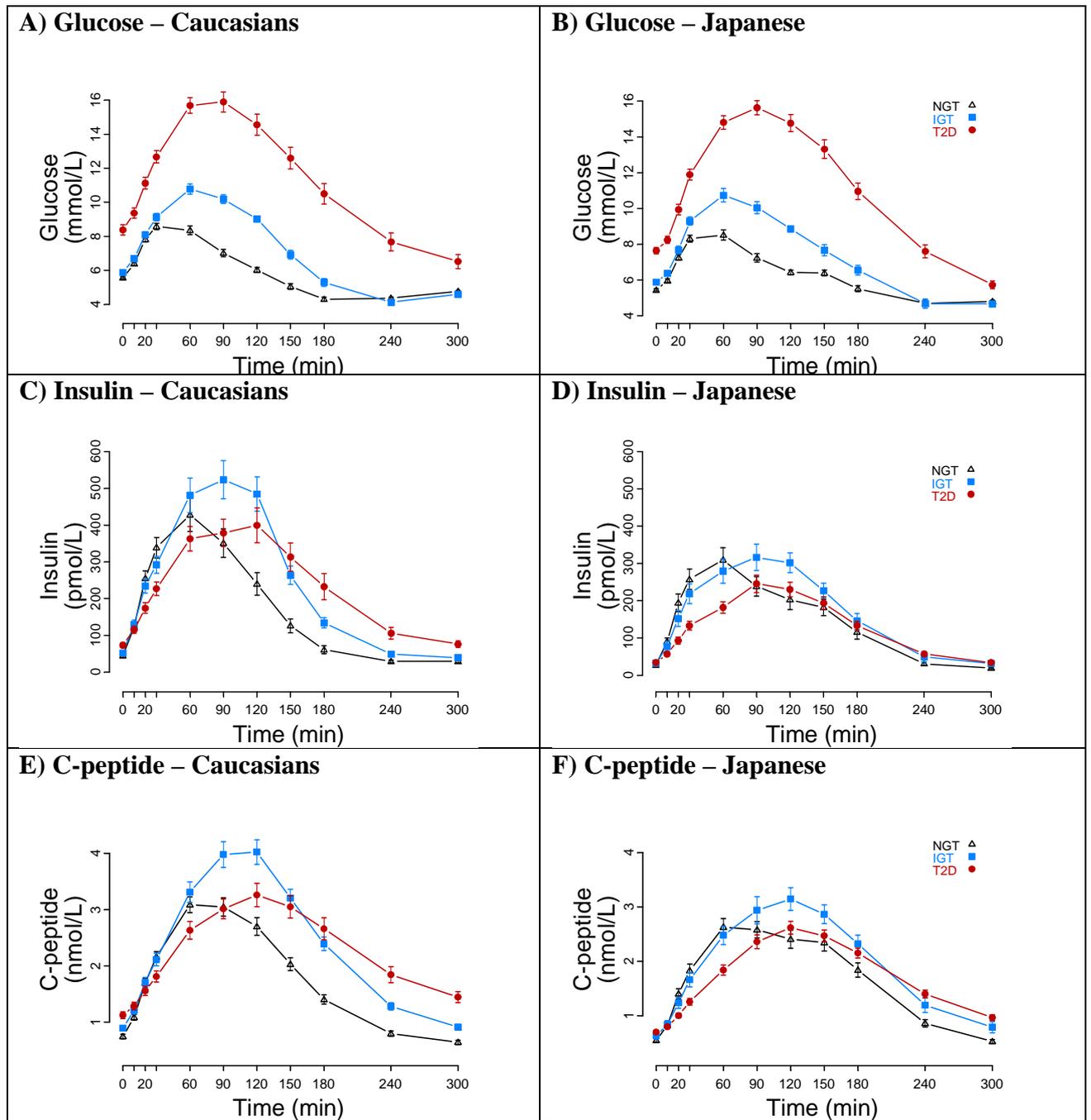


図2 インスリン感受性指標とインスリン分泌指標の各民族(■デンマーク人、■日本人)。

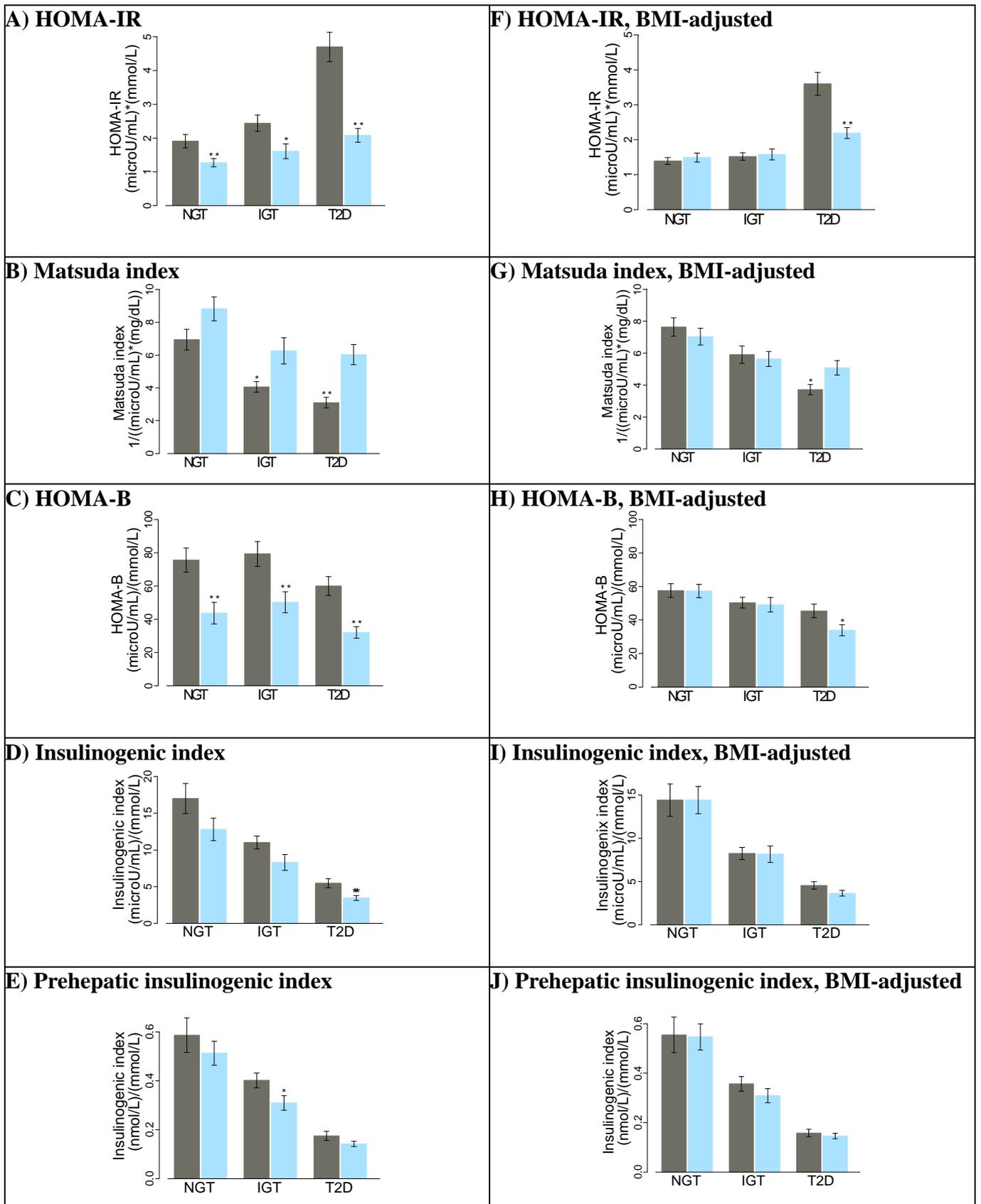


Table 2. Contribution of covariate factors for Matsuda and insulinogenic indices.

| Covariate<br>(unit)     | Matsuda index |  |   | Insulinogenic index |  |   |
|-------------------------|---------------|--|---|---------------------|--|---|
|                         | P-value       | Percentage<br>of<br>variance<br>explained <sup>a</sup> | Sign of<br>covariate<br>relationship <sup>b</sup> | P-value             | Percentage<br>of<br>variance<br>explained <sup>a</sup> | Sign of<br>covariate<br>relationship <sup>b</sup> |
| Waist (cm)              | <0.001        | 39.9   | -   | <0.001              | 12.3   | +   |
| Android fat             | <0.001        | 39.8   | -   | <0.001              | 15.8   | +   |
| Hip (cm)                | <0.001        | 30.6   | -   | <0.001              | 10.5   | +   |
| BMI                     | <0.001        | 30.5   | -   | <0.001              | 11.7   | +   |
| Weight (kg)             | <0.001        | 29.9   | -   | <0.001              | 9.4  | +   |
| Trunk fat               | <0.001        | 29.3   | -   | <0.001              | 12.2   | +   |
| Triglycerides           | <0.001        | 17.3   | -   | <0.001              | 5.9  | +   |
| VO <sub>2</sub> max per | <0.001        | 17.3   | +   | 0.001               | 4.9  | -   |
| Waist-to-hip            | <0.001        | 16.6   | -   | 0.001               | 3.7  | +   |
| Whole-body              | <0.001        | 15.3   | -   | <0.001              | 7.7  | +   |
| HDL                     | <0.001        | 13.5   | +   | 0.010               | 2.1  | -   |
| Genetic                 | n.s.          | N/A  | N/A   | 0.003               | 2.8  | -   |
| Genetic                 | 0.195         | 2.7  | +   | N/A                 | N/A  | N/A   |
| Gynoid fat              | 0.025         | 1.8  | N/A   | 0.006               | 2.5  | +   |
| Lower-limb              | 0.073         | 1.2  | N/A   | 0.019               | 1.7  | N/A   |
| LDL                     | 0.134         | 0.9  | N/A   | 0.116               | 1.0  | N/A   |
| Cholesterol             | 0.446         | 0.2  | N/A   | 0.294               | 0.4  | N/A   |
| Age (year)              | 0.308         | 0.2  | N/A   | 0.238               | 0.4  | N/A   |
| Total activity          | 0.850         | <0.1   | N/A   | 0.040               | 1.6  | N/A   |

HDL, high-density lipids; LDL, low-density lipids; MET, metabolic equivalent of task; n.s., not significant. P-values were obtained from log-linear models having Matsuda index and the insulinogenic indices, respectively, as dependent variable and each covariate, glucose tolerance state and ethnicity as independent variables.

<sup>a</sup>Explained variance was calculated using the variance of residuals from log-linear models with and without each covariate included as independent factor. <sup>b</sup>+ or - indicate positive or negative slopes for covariate relationship. Slopes for non-significant relationships (p<0.01) were not reported.

Table 3. インスリン感受性と分泌指標と民族差の統計解析の一覧

| Index  | Without BMI in model          |   | With BMI in model             |   |
|--|-------------------------------|---|-------------------------------|---|
|  | P-value for ethnic difference | P-value for interaction between ethnicity and glucose tolerance state | P-value for ethnic difference | P-value for interaction between ethnicity and glucose tolerance state |
| HOMA-IR  | <0.01                         | 0.04  | 0.14                          | <0.01   |
| Matsuda index                                  | <0.01                         | 0.10  | 0.18                          | <0.05   |
| HOMA-B   | <0.01                         | 0.39  | 0.24                          | 0.16  |
| Insulinogenic index (0-30 min)                 | <0.01                         | 0.59  | 0.63                          | 0.43  |
| Insulin secretion ratio (0-120 min)            | <0.01**                       | 0.63  | 0.36                          | 0.57  |
| Prehepatic insulinogenic index (0-30 min)      | 0.58                          | 0.99  | 0.20                          | 0.99  |
| Prehepatic insulin secretion ratio (0-120 min) | <0.01**                       | 0.52  | 0.26                          | 0.50  |

P-values were obtained from ANCOVA models containing ethnicity, glucose tolerance state, the interaction between the two, and with BMI and interaction between BMI and ethnicity included in the models.

## 【考察】

本研究は日本人とデンマーク白人がそれぞれの国に在住したままで、両群のインスリン分泌能とインスリン感受性を同一の方法で直接比較した試験である。

現在までの報告では日本人と白人の二民族のインスリン分泌能とインスリン感受性には差がある(日本人で分泌能が小さく、感受性は大きい)とされていたが、本研究により体格指標(BMI や体脂肪率など)で補正することによりその差の大部分が消失することが示された。

本研究の特徴としては、それぞれの民族が自国に在住したままで耐糖能などを測定しているところあげられる。先行研究の中には同一国に在住する複数の民族の耐糖能を比較検討しているものがあり、一定の知見をもたらしている。しかしながら、日本を始めとする移民研究などから、耐糖能やそれを決定するインスリン分泌や感受性は遺伝的背景が同一であっても生活環境の影響を大きく受けることが判明した。一例をあげれば日本から米国(ハワイ、カリフォルニア、シアトル)への移民は、母国の集団に比べ、体重は重くなり、インスリン反応は増強し、インスリン抵抗性が増加していると報告されている。これから糖尿病などの生活習慣病の民族差を議論する際には、遺伝的背景となる民族の差違のみならず、生活環境も同時に考慮して研究を進めることが必要であることがわかる。

インスリン分泌・感受性の検討も二国間で同一のプロトコールを用い、検体計測も同一の試験機関を用いて測定し、測定誤差が結果に影響することがないように配慮した。

本研究は横断研究であってコホート研究ではない。そのため各国住人でそれぞれ肥満度が増した際にインスリン分泌能や抵抗性が経時的にどのように変化するか、といった疑問に答えることは出来ない。同様に試験計画の性質上、経時的な耐糖能の変化を追っているわけではないので、例えば日本人を含めて東アジア人で糖尿病患者が増加している理由は何か、糖尿病患者数増加が欧米諸国よりも東アジアで急激に増加している理由は何か、と

いった疑問に答えることは出来ない。それらの疑問にはコホート研究を行う必要がある。

肥満の有無に関して二国それぞれの肥満基準を用いた(日本 BMI25、デンマーク BMI30)。被験者の平均 BMI を同一にすることも検討されたが、日本側では肥満者を、デンマーク側では非肥満者を多く集めることになり、被験者選択でのバイアスを増す恐れから、本研究では敢えて二国間の BMI を揃えず、しかしながら十分に BMI25 以上 30 以下で被験者数に重なりが出るように配慮した。

インスリン分泌能や感受性の測定に経口糖負荷試験を用いた。これに関しても、インスリン感受性の測定には正常血糖高インスリンクランプ試験がゴールドスタンダードとして認められており、本試験でも一部の症例にはこれを行った。インスリン分泌測定にはそのような標準的な試験方法はないと考えられ、どのような測定方法にも長所はある反面、非生理的な条件を作り出す、という批判がある。例えば高血糖クランプでは経静脈的にブドウ糖を点滴し、急速に血糖値を上昇させた後にそれを維持し、その間のインスリン分泌を見る方法であるが、経口摂取で食物を摂取した時にそのように血糖値が変化することはなく、非生理的である。そのため、本研究では経口ブドウ糖摂取後のインスリン反応を検査し、それらを元にインスリン分泌能と感受性を計算した。

最終的に日本人とデンマーク白人にはインスリン感受性とインスリン分泌能の差が存在し、日本人はインスリン抵抗性とインスリン分泌が共に小さいが、BMI などの体格因子で調整するとその差の大部分が消失する。このことから日本人とデンマーク白人の2型糖尿病の病態基盤には共通する部分が大いだと結論づけられる。

## 【文献】

1. Chen L et al. *Nature Reviews Endocrinology* 2011; 8, 228–236
2. Yoon KH et al. *Lancet* 2006; 368:1681–1688.
3. Abate N et al. *Journal of Diabetes and its Complications* 2001; 17:39–58.
4. Nakanishi S et al. *Biomedecine & Pharmacotherapy* 2004; 58:571–577.
5. Lyssenko V et al. *Diabetes* 2005; 54:166–174.
6. Bergman RN et al. *Diabetes* 2002; 51 Suppl 1:S212–S220.
7. Fukushima M, Suzuki H, Seino Y. et al. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66 Suppl 1:S37–S43.
8. Fukushima M et al. *Metabolism* 2004; 53:831–835.
9. Fujimoto WY et al. *Diabetes Res Clin Pract* 1989; 6: 121–127.
10. Abdul-Ghani MA et al. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 2007; 1:105–112.
11. Lennon OC et al. *Disabil. Rehabil.* 2012; 34: 1149–1156.
12. Matthews DR et al. *Diabetologia* 1985; 28:412–419.
13. Matsuda M, DeFronzo RA. *Diabetes Care* 1999; 22:1462–1470.
14. Phillips DI et al. *Diabet Med* 1994; 11:286–292.
15. Weedon MN, McCarthy MI, Hitman G, Walker M et al. Combining Information from Common Type 2 Diabetes Risk Polymorphisms Improves Disease Prediction. *PLoS Med.* 2006; 3(10): e374. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030374.
16. Hovorka R et al. *Diabetologia* 1998; 41:548–554,
17. Hart LM et al. *Diabetes* 2010; 59:287–292
18. Tripathy D et al. *Diabetes* 2000; 49:975–980.
19. Kuroe A et al. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 59:71–77.
20. Boffetta P et al. *PloS one* 2011; 6:e19930.
21. Chan JC et al. *JAMA.* 2009; 301:2129–40
22. Møller JB, Dalla Man C, Overgaard RV, Ingwersen SH, Tornøe CW, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Ueki K, Lyng J, Vasconcelos NM, Pedersen BK, Kadowaki T, Cobelli C. Ethnic Differences in Insulin sensitivity, Beta-cell Function, and Hepatic Extraction between Japanese and Caucasians: A Minimal Model Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 Nov;99(11):4273-80. doi: 10.1210/jc.2014-1724
23. Møller JB\*, Pedersen M\*, Tanaka H\*, Ohsugi M\*, Overgaard RV, Lyng J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK, Kadowaki T. Body Composition is Main Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes

Pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care*. 2014  
Mar;37(3):796-804. doi: 10.2337/dc13-0598. (\*: co-first authors)

# 消化管における糖シグナル伝達を介した糖吸収の制御と末梢血白血球および内臓脂肪組織の遺伝子発現プロファイルとの関連

静岡県立大学食品栄養科学部栄養生理学研究室

合田 敏尚

## 1. はじめに

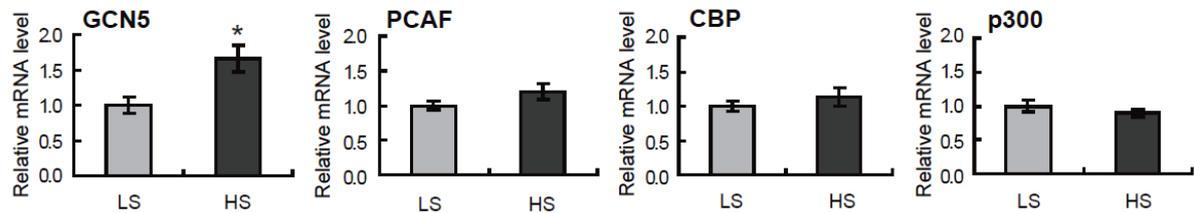
糖尿病の発症の前段階では食後高血糖がみられ、これがインスリン過剰分泌および肥満をもたらし、脂質代謝異常と脂肪組織における炎症を促進することが明らかにされてきた。また、高血糖の程度とその持続時間により進展する細小血管障害に加えて、食後高血糖による局所の炎症が動脈硬化を介して大血管障害の誘因になることも明らかになってきた。一方、小腸における糖質の消化・吸収にかかわる膜消化酵素や吸収担体の遺伝子発現制御機構が明らかになるにつれて、食後の血糖上昇の初発因子である小腸における糖質の消化・吸収の速度を制御する方策も考慮できるようになってきた。そこで本研究では、食事要因による糖質消化吸收関連遺伝子の転写制御機構の解析を通して、小腸を標的にした食後高血糖の効果的な抑制手段を検討し、さらに、食後高血糖の履歴とその末梢組織に及ぼす炎症促進作用の評価に有用なバイオマーカーを探索するために、食後高血糖と末梢血白血球および内臓脂肪組織における遺伝子発現プロファイルとの関連を検討してみた。

## 2. 小腸糖吸収関連遺伝子の糖シグナルによる転写制御機構

小腸は管腔内に流れ込む糖質の量と種類の変化を敏感に感じ取り、糖応答性の糖吸収関連遺伝子の発現を誘導することによって、糖質の消化・吸収を効率的におこなうように適応することが知られている。近年の研究から、ヒストン上に記載される情報であるヒストンコード（ヒストン修飾）による標的遺伝子の転写制御領域における転写複合体の形成の促進が、このような遺伝子発現の誘導の一因となることが明らかになってきた。そこで、まず、糖質の量が異なる食事（高糖質食と低糖質食）をマウスおよびラットに摂取させ、空腸組織を採取し、糖応答性小腸糖吸収関連遺伝子の発現量と遺伝子周辺のヒストン修飾の変化を調べてみた。高糖質食の摂取により、マウス空腸におけるスクラーゼ・イソマルターゼ複合体 (*Si*)、マルターゼ・グルコアミラーゼ複合体 (*Mga*)、Na<sup>+</sup>-グルコース共輸送体 (*Sglt1*) の遺伝子発現はいずれも著しく増大し、クロマチン免疫沈降法によって、ヒストン H3 のアセチル化が、これらの遺伝子上流のプロモータ領域だけでなく転写領域においても増大していることが明らかになった<sup>1)-3)</sup>。高糖質食の摂取により、ラット空腸においても、*Si* と *Mga* の遺伝子発現は著しく増大したが、この場合も、これらの遺伝子上流のプロモータ領域だけでなく転写領域においても、ヒストン H3 およびヒストン H4 のアセチル化およびヒストン

H3 の 4 番目リジン（ヒストン H3 K4）のメチル化が増大していることが明らかになった<sup>4)</sup>。ヒストンのアセチル化あるいは脱アセチル化酵素活性を持つコアクチベータの候補分子の中で、高糖質食の摂取によって発現が増大するものを探索したところ、ヒストンアセチル化酵素である general control of amino acid synthesis 5 (*Gcn5*) の mRNA 量が増大しており、クロマチン免疫沈降法によって、SI 遺伝子と MGA 遺伝子のいずれでも、プロモータから転写領域の広い部分で GCN5 の結合が高まっていることが明らかになった（図 1）<sup>4)</sup>。すなわち、管腔からの糖シグナルの量的な増大は、*Si* と *Gma* という 2 種類の  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子の発現を、共通のヒストンコードを介して転写レベルで高めていることが示唆された。

### A) mRNA



### B) ChIP

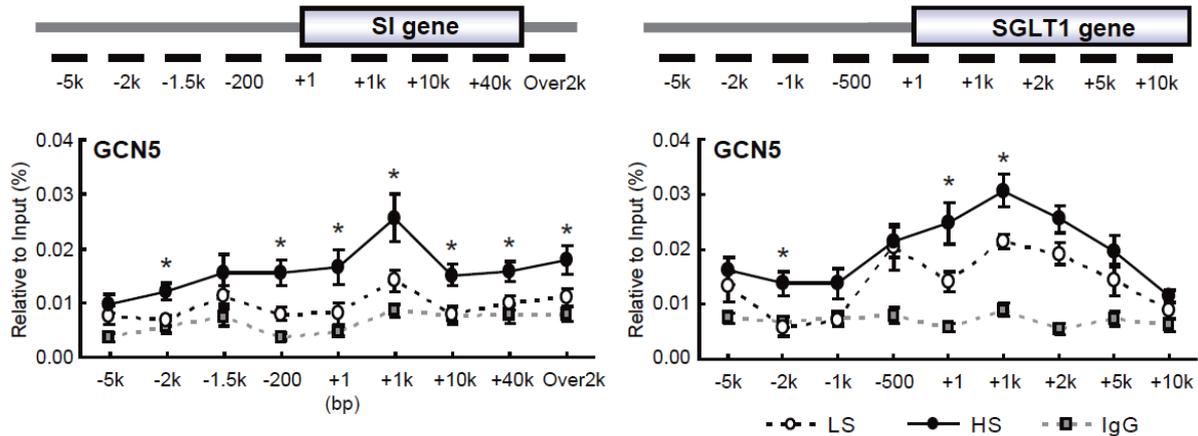


図 1 高糖質食摂取はラットの空腸におけるヒストンアセチル化酵素 GCN5 の発現増大を介して標的遺伝子の転写領域におけるヒストンコードを修飾する。

糖質の中でもフルクトースは肝臓における解糖系や脂肪酸合成系の酵素を誘導し、小腸においても、SI の遺伝子発現をヒストンコードを介して調節する<sup>5)</sup> など、シグナル分子として作用することが知られている。そこで、フルクトース水溶液をラットに経口投与し、6 時間以内に発現が増大する小腸の遺伝子を Affymetrix 社のマイクロアレイ (Rat Gene 1.0ST アレイ) を用いて網羅的に探索したところ、検出された 27,343 遺伝子のうち 51 の遺伝子が、グルコース投与に比べてフルクトース投与によって著しく

発現が増大していた。その中には、糖質消化吸収関連遺伝子としてフルクトース輸送体 (*Glut5*) が含まれていた。クロマチン免疫沈降法によって、*Glut5* 遺伝子の周辺のコドン修飾を解析してみたところ、フルクトースの投与によって *Glut5* 遺伝子の転写領域におけるヒストン H3 のトリメチル化とアセチル化が増大していた<sup>6)</sup>。また、フルクトース摂取による *Glut5* 遺伝子周辺のコドン修飾の変化はマウスの空腸でも *Glut5* 遺伝子の幅広い転写領域で観察された (図 2)。フルクトースを投与したマウスの空腸における *Glut5* 遺伝子の転写領域においては、アセチル化ヒストン結合タンパク質 Brd4 の結合が増大するとともに、転写伸長因子 pTEFb の結合が高まっており、RNA ポリメラーゼ II の結合の増大とよく対応していることが明らかになった。この結果は、小腸管腔からのフルクトースのシグナルは、標的遺伝子である *Glut5* 遺伝子の転写領域に作用し、転写伸長反応の効率を高めるという新規のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構があることを示唆している (図 3)。

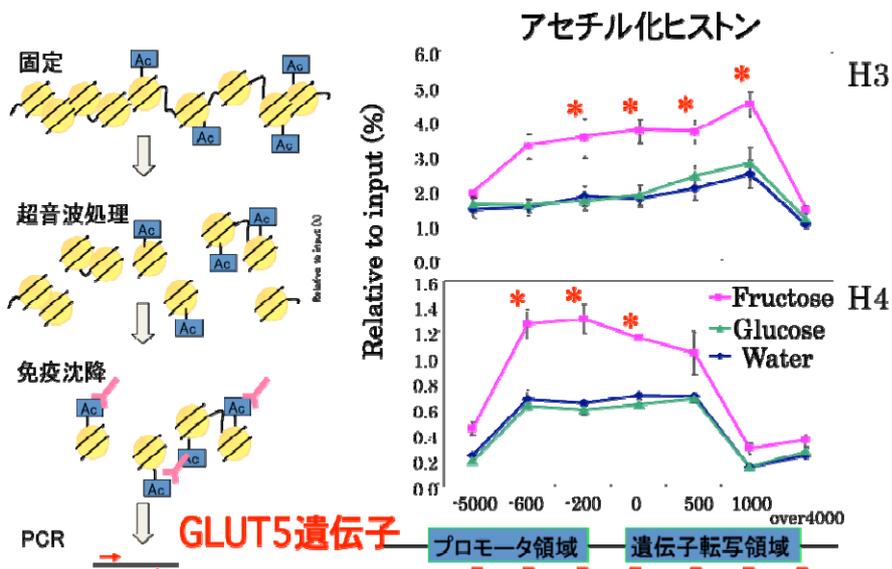


図 2 クロマチン免疫沈降法によるヒストン修飾部位の同定

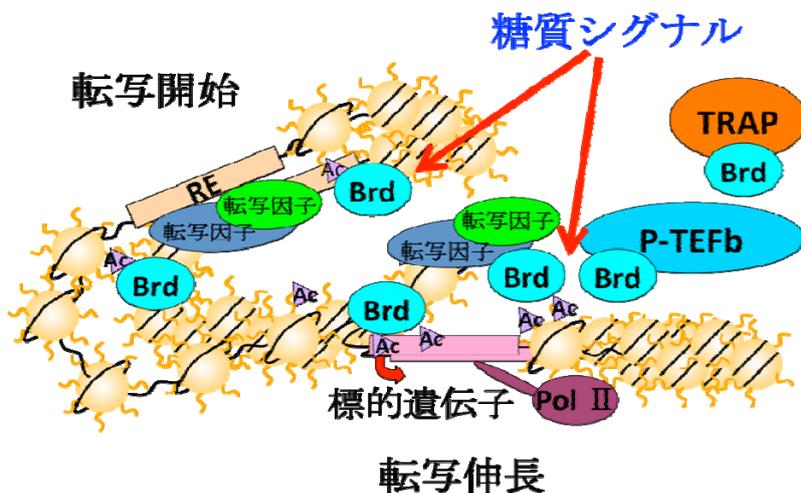


図 3 糖質シグナルによるフルクトース輸送体遺伝子の転写制御機構 (モデル)

小腸様細胞株 Caco-2 を用いて、*GLUT5* 遺伝子の転写制御機構における核内受容体と脱リン酸化シグナルの役割を調べてみたところ、p44/42 MAP キナーゼの抑制による脱リン酸化シグナルは、甲状腺ホルモンによる *GLUT5* 遺伝子発現の誘導を促進するとともに、グルココルチコイドホルモンによる *GLUT5* 遺伝子発現の誘導も促進することが明らかになった。さらに、これらの脱リン酸化シグナルは、甲状腺ホルモン核内受容体 TR $\alpha$ -1<sup>7)</sup> およびグルココルチコイドホルモン核内受容体 GR の核移行<sup>8)</sup> を促進することによって標的遺伝子の転写を増大させることが示された。p44/42 MAP キナーゼの抑制による脱リン酸化シグナルとグルココルチコイドホルモンの相互作用による *GLUT5* 遺伝子の転写制御には、*GLUT5* 遺伝子の転写領域におけるヒストン H3 K9/14 のアセチル化の増大<sup>9)</sup> とともに、ヒストン H3 K4 のジメチル化とトリメチル化の亢進<sup>10)</sup> が関与していることが明らかになった。

次に、小腸における糖質の消化吸収遅延をもたらす食事要因としてレジスタントスターチを用い、小腸管腔からの糖質の流入速度の低下に伴い、空腸における糖質消化吸収関連遺伝子の発現低下が起こる機構を解析してみた。レジスタントスターチ添加食をラットに7日間投与することにより、空腸における *Sglt1* 遺伝子および MGA 遺伝子の発現が低下した。このときに、*Sglt1* 遺伝子のプロモータ領域から転写開始点付近のヒストン H3 のアセチル化が低下していた<sup>11)</sup>。また、レジスタントスターチ添加食を投与したラットでは、*Mga* 遺伝子のプロモータ領域から転写領域の広い範囲にわたって、ヒストン H3 の9番目/14番目リジン (H3 K9/14) のアセチル化が低下しており、ヒストン H3 K4 のトリメチル化もプロモータ領域から転写領域で著しく低下していた (図4)<sup>12)</sup>。また、レジスタントスターチ添加食の投与に伴う空腸への糖シグナルの低下は、糖質応答領域結合タンパク質 (ChREBP) を介して糖応答遺伝子の転写制御因子の一つである *Thrsp* の遺伝子発現の低下をもたらす<sup>13)</sup> とともに、インクレチンの一つである GIP の遺伝子発現を低下させることが示された<sup>14-15)</sup>。

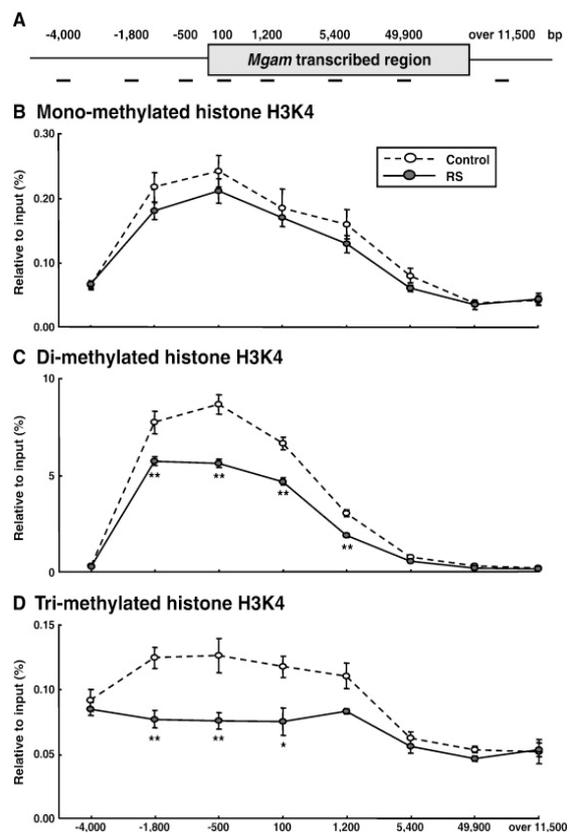


図4 レジスタントスターチ添加食投与による標的遺伝子のヒストン H3 K4 トリメチル化の低下

### 3. 血糖上昇に伴う末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現制御機構

糖尿病モデルラットに $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤を投与することによって食後の高血糖を慢性的に抑制することが可能である。このモデルを用いて、食後高血糖という糖シグナルの亢進が、体内組織にどのような特異的な遺伝子発現の変動をもたらすかを検討するために、まず、血液環境の変化の影響を直接受けることが想定される末梢血白血球にける遺伝子発現プロファイルを解析した。

少量のストレプトゾトシン投与により誘発させた食後高血糖モデルラットを用い、スクロースの強制投与を毎日1回、4日間継続するという断続的な食後の高血糖によって発現が変動する遺伝子を探索したところ、初回であってもスクロース投与3時間後には末梢血白血球におけるIL-1 $\beta$ ならびにTNF- $\alpha$ の遺伝子発現が増大することが明らかになった(図5)<sup>16)</sup>。興味深いことに、スクロース投与3時間後の末梢血白血球においては、血管内皮細胞への接着に関与する $\beta$ 2インテグリン(CD11b)の遺伝子発現も増大していた<sup>17)</sup>。また、スクロース投与開始4日目には、空腹時においてもこれらの遺伝子発現が高まっていることも見出された<sup>16)</sup>。すなわち、食後高血糖の履歴は、一過性だけでなく慢性的にも、末梢血白血球における炎症性サイトカインの遺伝子発現を変動させるものと考えられた。

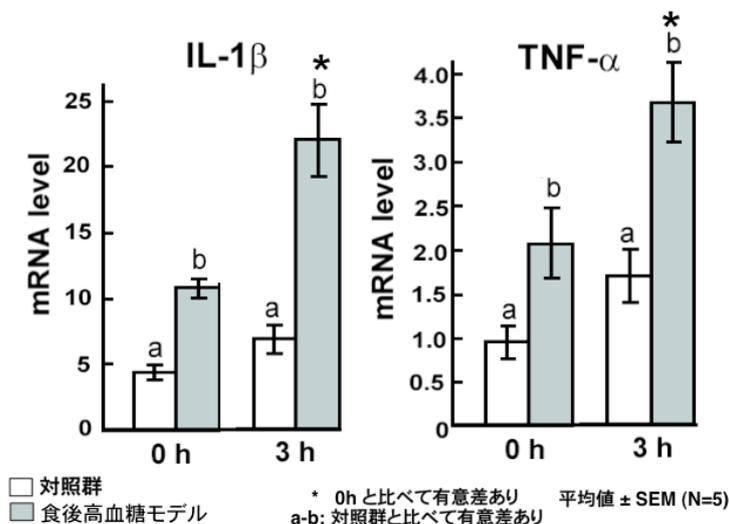


図5 ショ糖投与による血糖上昇はラット末梢血白血球における炎症性サイトカインの遺伝子発現を増大させる

ストレプトゾトシンの投与により糖尿病を発症したラットを用い、末梢血白血球総RNAについてマイクロアレイ解析を行なったところ、発現が確認された11,389遺伝子のうち、著しい発現増大が観察された遺伝子が52あり、その中の多くは、白血球の活性や遊走を促進する炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ や炎症関連サイトカイン様マーカーであるS100タンパク質であった<sup>18)</sup>。さらに、高脂肪食を77日投与することによ

ってインスリン抵抗性を惹起させたラットを用い、末梢血白血球総 RNA についてマイクロアレイ解析を行なったところ、発現が確認された 8,574 遺伝子のうち、著しい発現増大が観察された遺伝子が 97 あり、その中には、IL-1 $\beta$  や S100 タンパク質のほかに、好中球分化因子であるコロニー促進因子の受容体 Csf3r が含まれていた<sup>19)</sup>。

自然発症糖尿病 db/db マウスの末梢血白血球においても、糖尿病の進展に伴い、IL-1 $\beta$  や S100 タンパク質の遺伝子発現が増大することが示された<sup>20)</sup>。db/db マウスおよびコントロールマウス (db/m+) の内臓脂肪 (腸間膜脂肪) から総 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行なったところ、db/db マウスでは、発現が確認された 16,661 遺伝子のうち、104 の遺伝子がコントロールに比べて 4 倍以上に発現が増大し、その中の 40% 以上がシグナル伝達系や免疫応答に関与する遺伝子であった。電子伝達系を活性化し、活性酸素種の産生に関与する ATP アーゼ (Atp6v0d2) やマトリックスメタロプロテアーゼ (Mmp12) などの代表的な 13 の遺伝子について、ヒストン修飾の変化を検討したところ、転写領域におけるヒストン H3 K4 のジメチル化が亢進しており、転写伸長反応が亢進していることが示唆された<sup>21)</sup>。

ヒト単球様細胞 U937 を用いて、グルコース負荷による炎症性サイトカインの遺伝子発現誘導機構を解析したところ、グルコース刺激に応答して IL-1 $\beta$  および S100A8、S100A9 の遺伝子発現が増大することが明らかになった。特に、グルコースとともにインスリン抵抗性惹起サイトカインである TNF- $\alpha$  を培養液に添加すると、これらの炎症関連遺伝子の発現は著しく増大した (図 6)<sup>19)</sup>。クロマチン免疫沈降法によって、IL-1 $\beta$  遺伝子周辺のヒストンコードの変化を検討したところ、高グルコースの刺激と TNF- $\alpha$  は、IL-1 $\beta$  遺伝子の転写領域におけるヒストン H3 K4 のトリメチル化と H3 K36 のトリメチル化を相乗的に促進することが示された。それゆえ、末梢血白血球は TNF- $\alpha$  の存在下では、血糖上昇に対して鋭敏に応答し、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の遺伝子発現を増大させるものと考えられたが、その発現増大には、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな制御機構が関与していることが示唆された。

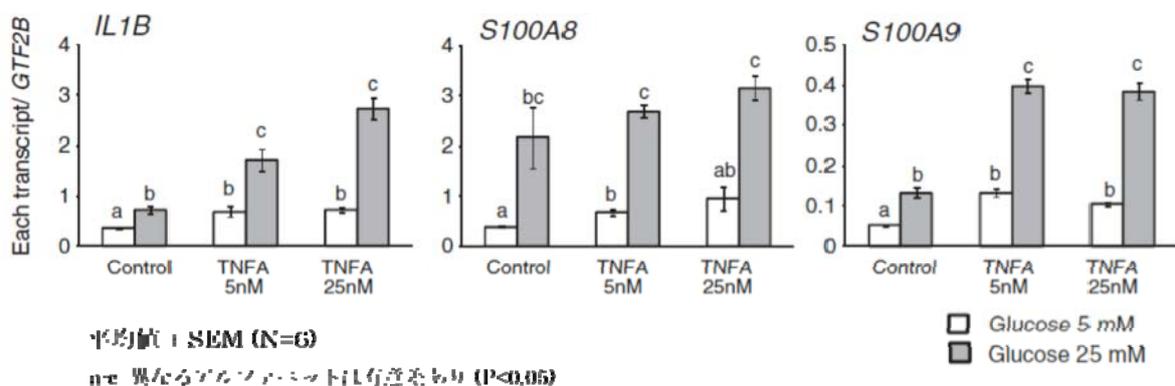


図 6 ヒト単球様細胞 U937 の炎症関連遺伝子はグルコースと TNF $\alpha$  によって誘導される

#### 4. 2型糖尿病モデル動物の発症進展に及ぼす血糖上昇抑制の予防的意義

非肥満2型糖尿病モデルGKラットに $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤（ミグリトール）を添加した飼料を投与し、食後の高血糖を抑制すると、投与開始8週間後にはHbA1cの上昇が抑制され、膵臓ランゲルハンス島の繊維化が抑制されるとともに、 $\beta$ 細胞の数が維持される<sup>22)</sup>。そこで、過食型の自然発症2型糖尿病モデルであるOLETFラットに $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤（ミグリトール）を添加した飼料を投与し、末梢血白血球における炎症性サイトカイン遺伝子の発現と糖尿病の発症との関連性を検討してみた。対照食を投与したOLETFラットでは、投与開始28週間後には血糖値が上昇するとともに末梢血白血球におけるTNF- $\alpha$ 、IL-6およびIFN- $\gamma$ の遺伝子発現が増大したが、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤添加食投与群では、血糖値の上昇が抑制されるとともに、これらの炎症関連遺伝子の発現増大が抑制された<sup>23)</sup>。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤添加食投与開始63週間後には、対照群よりも膵臓ランゲルハンス島における繊維化面積が小さく、 $\beta$ 細胞の面積が高いレベルに維持されているとともに、耐糖能の低下が軽減されていた（図7）<sup>24)</sup>。これらの結果は、消化管における糖質消化吸収の遅延を介した食後高血糖の抑制が長期的には糖尿病の発症・進展を抑制することを示唆し、また、この作用機構には、末梢血白血球における炎症性サイトカイン発現の減少が関与していることを示唆している。

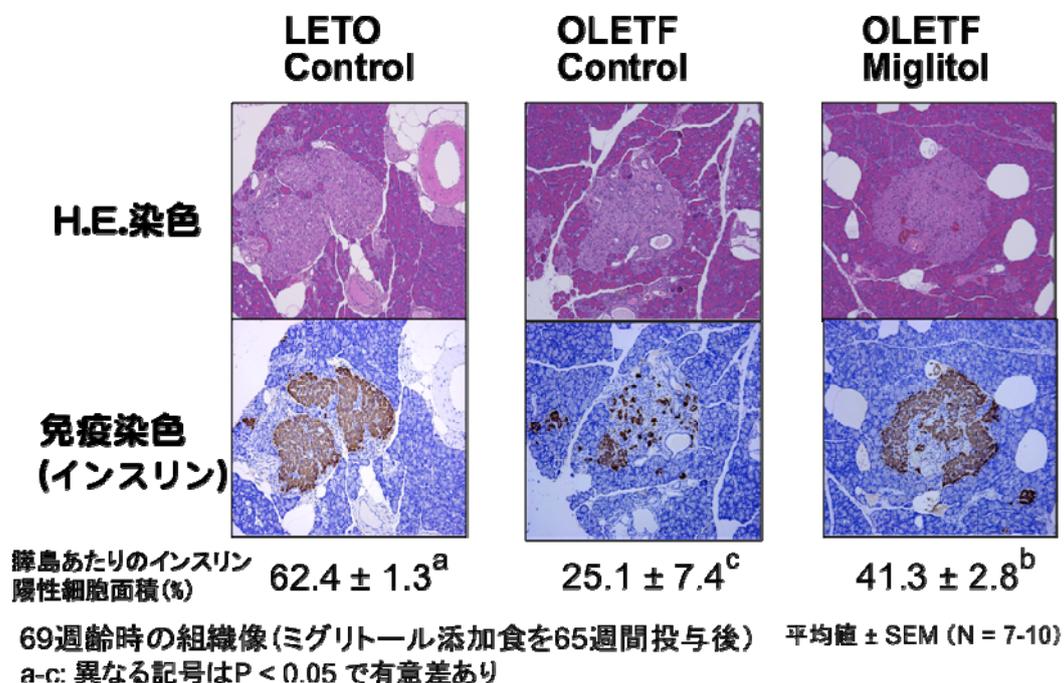


図7 自然発症糖尿病モデルラットOLETFにおける膵島のインスリン陽性細胞面積に及ぼす $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤添加食投与の影響

## 5. ヒトにおける代謝性疾患リスク指標としての実践的バイオマーカーの検討

これまで見てきたように、一過性の食後高血糖に対して、ラットの末梢血白血球は速やかに応答し、IL-1 $\beta$ などの多くの炎症性サイトカインの遺伝子発現を変動させる。ヒトの2型糖尿病患者においても、食事負荷に伴って末梢血白血球におけるIL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインの遺伝子発現が変動することが確認された。2型糖尿病患者に対して、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤（ミグリトール）の投与によって食事前後の血糖の振幅を少なくすると、12週間後には、末梢血白血球におけるIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの遺伝子発現が低下した<sup>25)</sup>。それゆえ、ヒトの末梢血白血球でも、これらの炎症性サイトカインの発現は食後血糖値の変動を反映するといえる。

健常者から境界領域者までの集団では、血漿中のIL-1 $\beta$ およびIL-6濃度は、肥満度とは関係なく、空腹時血糖およびHbA1cと有意な正の相関を示す<sup>26)</sup>。それゆえ、末梢血白血球における炎症性サイトカインの発現は、間欠的な食後高血糖の履歴を鋭敏に反映するバイオマーカーとして有用と考えられた。そこで、40-69歳の日本人男性健診受診者で治療中でない者を対象とし、炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ の血漿中の濃度と関連する身体計測値や血液生化学検査値を探索したところ、年齢、空腹時血糖、血漿 $\gamma$ -GTP活性、アルコール摂取量はいずれも、血漿IL-1 $\beta$ 濃度に関与する独立した説明変数であった。この中で、血漿 $\gamma$ -GTP活性は、血漿IL-1 $\beta$ 濃度との関連性が最も高い指標であった<sup>27)</sup>。また、血漿IL-6濃度に関与する独立した説明変数は、年齢、拡張期血圧、血漿 $\gamma$ -GTP活性、アルコール摂取量であり、この中で、血漿 $\gamma$ -GTP活性が、血漿IL-6濃度との関連性が最も高い指標であった<sup>27)</sup>。血漿ALT値や血漿 $\gamma$ -GTP値のような実践的なバイオマーカーと血中のアディポネクチン、IL-6などのサイトカインの濃度との関連性を検討したところ、血漿ALT値は血漿アディポネクチン濃度と強く負の関連を示し、血漿 $\gamma$ -GTP値は血漿IL-6濃度とも関連していた<sup>28)</sup>。また、血漿 $\gamma$ -GTP値は炎症指標である血漿CRP濃度とも関連していた<sup>29)</sup>。

CTスキャンによって測定した内臓脂肪面積および皮下脂肪面積と各種の臨床検査指標との関連性を解析したところ、皮下脂肪面積と関連を示した検査指標は、関連の強い順に、エネルギー摂取量、アルコール摂取量、拡張期血圧であったのに対し、内臓脂肪面積と関連性を示したのは、関連の強い順に、血漿ALT値、血漿 $\gamma$ -GTP値、拡張期血圧であった<sup>30)</sup>。次に、食べる速さと各種の臨床検査指標および生活習慣指標との関連性を解析したところ、食べる速さは血漿IL-1 $\beta$ 濃度、血漿IL-6濃度、HOMA-IR、喫煙量と有意な正の相関を示した。重回帰分析の結果、食べる速さは、血漿IL-1 $\beta$ 濃度に関与する独立した説明変数であった<sup>31)</sup>。また、食べる速さは、血漿ALT値とも関連したが、ロジスティック重回帰分析によりBMIで補正すると、この関連性は消失した<sup>32)</sup>。

本研究により、血漿 $\gamma$ -GTP活性は血漿IL-1 $\beta$ 濃度と関連性が高い指標であることが明らかになった。この結果は、血漿 $\gamma$ -GTP活性が、血糖上昇、内臓脂肪蓄積、酸化

傷害などに伴って起こる炎症の指標として有用であることを示唆している。すなわち、食後血糖上昇を介した IL-1 $\beta$  の炎症惹起作用と  $\gamma$ -GTP による酸化傷害除去作用には密接な関連性があるものと考えられる。一方、血漿 ALT 値は血漿アディポネクチン濃度と強く負の関連を示し、内臓脂肪面積とも強く関連していた。それゆえ、血漿 ALT 値は、内臓脂肪蓄積型肥満および肝臓におけるインスリン抵抗性の指標として有用である可能性が考えられた。これらの一般的な臨床検査指標を代謝性疾患リスク指標のひとつとして組み込むことにより、代謝性疾患に対する個別栄養ケアの有効性を実践的に評価することが可能になると考えられる（図8）。

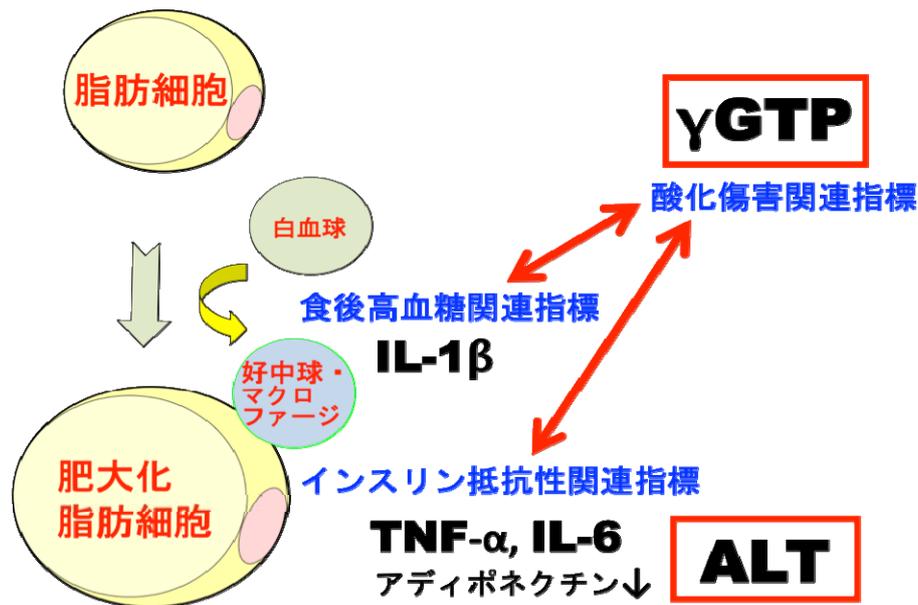


図8 代謝性疾患のリスク評価指標としての利用が期待される実用的なバイオマーカー

## 6. おわりに

本研究により、慢性的な食後高血糖は、糖シグナル伝達あるいはインスリン作用に関わる複数の遺伝子の発現を一過性に制御するだけでなく、主要調節遺伝子のヒストンのアセチル化・メチル化を介して、後天的な、すなわちエピジェネティックな遺伝子発現の修飾により、炎症の増大による糖尿病の発症・進展に関与している可能性が示唆された。糖質の消化吸收速度の調節を介した食後高血糖の制御の有用性については、末梢血白血球における炎症関連遺伝子ならびに脂肪細胞におけるインスリン感受性遺伝子の発現レベルの変動とそれらに関連したエピジェネティックな遺伝子発現の修飾の機構を解析することにより、さらに明確になると考えられる。これらのエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解析は、血糖コントロールを標的にした医薬品等の設計のためにも有用な情報を提供することが期待される。

## 謝辞

本研究に助成いただきましたことを、財団法人篷庵社に御礼申し上げます。また、助成に際してご推薦いただきました伊勢村護先生をはじめ、関係の諸先生方に御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Honma, K., Mochizuki, K., Goda, T.: Carbohydrate/fat ratio in the diet alters histone acetylation on the sucrase-isomaltase gene and its expression in mouse small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **357**, 1124-1129, 2007.
2. Mochizuki, K., Honma, K., Shimada, M., Goda, T.: The regulation of jejunal induction of the maltase-glucoamylase gene by a high-starch/ low-fat diet in mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, **54**, 1445-1451, 2010.
3. Honma, K., Mochizuki, K., Goda, T.: Inductions of histone H3 acetylation at lysine 9 on SGLT1 gene and its expression by feeding mice a high carbohydrate/fat ratio diet. *Nutrition*, **25**, 40-44, 2008.
4. Inoue, S., Mochizuki, K., Goda, T.: Jejunal induction of SI and SGLT1 genes in rats by high-starch/low-fat diet is associated with histone acetylation and binding of GCN5 on the genes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **57**, 162-169, 2011.
5. Honma, K., Mochizuki, K., Goda, T.: Acute induction of histone acetylation on the jejunal sucrase-isomaltase gene by dietary fructose. *Br. J. Nutr.*, **100**, 698-702, 2008.
6. Yoshinaga, Y., Mochizuki, K., Goda, T.: Trimethylation of histone H3K4 is associated with the induction of fructose-inducible genes in rat jejunum. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **419**, 605-611, 2012.
7. Mochizuki, K., Sakaguchi, N., Takabe, S. and Goda, T.: De-phosphorylation of TR  $\alpha$ -1 by p44/42 MAPK inhibition enhances T3-mediated GLUT5 gene expression in the intestinal cell line Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **359**, 979-984, 2007.
8. Takabe, S., Mochizuki, K. and Goda, T.: De-phosphorylation of GR at Ser203 in nuclei associates with GR nuclear translocation and GLUT5 gene expression in Caco-2 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **475**, 1-6, 2008.
9. Mochizuki, K., Takabe, S. and Goda, T.: Changes of histone H3 modifications on the GLUT5 gene and its expression in Caco-2 cells co-treated with a p44/42 MAPK inhibitor and glucocorticoid hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **371**, 324-327, 2008.
10. Inamochi, Y., Mochizuki, K., Osaki, A., Ishii, T., Nakayama, T., Goda, T.: Histone H3 methylation at lysine 4 on the SLC2A5 gene in intestinal Caco-2 cells is involved in SLC2A5 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **392**, 16-21, 2010.
11. Shimada, M., Mochizuki, K. and Goda, T.: Feeding rats dietary resistant starch shifts the peak of SGLT1 gene expression and histone H3 acetylation on the gene from the upper jejunum towards the ileum. *J. Agr. Food Chem.*, **57**, 8049-8055, 2009.
12. Shimada, M., Mochizuki, K., Goda, T.: Methylation of histone H3 at lysine 4 and

- expression of the maltase-glucoamylase gene are reduced by dietary resistant starch. *J. Nutr. Biochem.*, **24**, 606-612, 2013.
13. Shimada, M., Mochizuki, K., Goda, T.: Feeding rats dietary resistant starch reduces both the binding of ChREBP and the acetylation of histones on the Thrsp gene in the jejunum. *J. Agr. Food Chem.*, **59**, 1464-1469, 2011.
  14. Shimada, M., Mochizuki, K. and Goda, T.: Dietary resistant starch reduces levels of GIP mRNA along the jejunum-ileum in both normal and type 2 diabetic rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72**, 2206-2209, 2008.
  15. Shimada, M., Mochizuki, K. and Goda, T.: Dietary resistant starch reduces histone acetylation on the glucose-dependent insulinotropic polypeptide gene in the jejunum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2754-2757, 2009.
  16. Tanaka, Y., Mochizuki, K., Fukaya, N., Shimada, M., Goda, T.: The  $\alpha$ -glucosidase inhibitor miglitol suppresses postprandial hyperglycemia and IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  gene expression induced in rat peripheral leukocytes by intermittent sucrose loading. *Br. J. Nutr.*, **102**, 221-225, 2009.
  17. Mochizuki, K., Shimada, M., Tanaka, Y., Fukaya, N., Goda, T.: Reduced expression of  $\beta$ 2 integrin genes in rat peripheral leukocytes by inhibiting postprandial hyperglycemia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2470-2474, 2010.
  18. Fukaya, N., Mochizuki, K., Shimada, M., Goda, T.: The  $\alpha$ -glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and gene expression of inflammatory cytokines induced by hyperglycemia in peripheral leukocytes. *Nutrition*, **25**, 657-667, 2009.
  19. Fujimoto, S., Mochizuki, K., Shimada, M., Murayama, Y., Ohashi, N., Goda, T.: Insulin resistance induced by a high-fat diet is associated with the induction of genes related to leukocyte activation in rat peripheral leukocytes. *Life Sci.*, **87**, 679-685, 2010.
  20. Fujimoto, S., Mochizuki, Goda, T.: Gene expression of inflammatory cytokines in peripheral leukocytes in db/db mice rose with progression of diabetes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1488-1490, 2010.
  21. Fujimoto, S., Goda, T., Mochizuki, K.: In vivo evidence of enhanced di-methylation of histone H3 K4 on upregulated genes in adipose tissue of diabetic db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **404**, 223-227, 2011.
  22. Goda, T. Suruga, K., Komori, A., Kuranuki, S., Mochizuki, K., Makita, Y. and Kumazawa, T.: Effects of miglitol, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, on glycaemic status and histopathological changes in islets in non-obese, non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats. *Br. J. Nutr.*, **98**, 702-710, 2007.
  23. Mochizuki, K., Fukaya, N., Tanaka, Y., Fuchigami, M., Goda, T.: Treatment with the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor miglitol from the preonset stage in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats improves glycemic control and reduces the expression of inflammatory cytokine genes in peripheral leukocytes. *Metabolism*, **60**, 1560-1565, 2011.
  24. Fukaya, N., Mochizuki, K., Tanaka, Y., Kumazawa, T., Jiuxin, Z., Fuchigami, M., Goda, T.:

- The alpha-glucosidase inhibitor miglitol delays the development of diabetes and dysfunctional insulin secretion in pancreatic beta-cells in OLETF rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **624**, 51-57, 2009.
25. Osonoi, T., Saito, M., Mochizuki, K., Fukaya, N., Muramatsu, T., Inoue, S., Fuchigami, M., Goda, T.: The  $\alpha$ -glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and inflammatory cytokine gene expression in peripheral leukocytes of Japanese patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, **59**, 1816-1822, 2010.
  26. Misaki, Y., Miyauchi, R., Mochizuki, K., Takabe, S., Shimada, M., Ichikawa, Y., Goda, T.: Plasma interleukin-1b concentrations are closely associated with fasting blood glucose levels in healthy and preclinical middle-aged nonoverweight and overweight Japanese men. *Metabolism*, **59**, 1465-1471, 2010.
  27. Mochizuki, K., Misaki, Y., Miyauchi, R., Takabe, S., Shimada, M., Miyoshi, N., Ichikawa, Y., Goda, T.: Circulating interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 concentrations are closely associated with g-glutamyltranspeptidase activity in middle-aged Japanese men without obvious cardiovascular diseases. *Metabolism*, **60**, 914-922, 2011.
  28. Mochizuki, K., Misaki, Y., Miyauchi, R., Takabe, S., Shimada, M., Ichikawa, Y., Goda, T.: Associations between markers of liver injury and cytokine markers for insulin sensitivity and inflammation in middle-aged Japanese men not being treated for metabolic diseases. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **57**, 409-417, 2011.
  29. Sunto, A., Mochizuki, K., Miyauchi, R., Misaki, Y., Shimada, M., Kasezawa, N., Tohyama, K., Goda, T.: Serum  $\gamma$ -GTP activity is closely associated with serum CRP levels in non-overweight and overweight middle-aged Japanese men. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **59**, 108-114, 2013.
  30. Mochizuki, K., Miyauchi, R., Misaki, Y., Shimada, M., Kasezawa, T., Tohyama, K., Goda, T.: Accumulation of visceral fat is positively associated with serum ALT and  $\gamma$ -GTP activities in healthy and preclinical middle-aged Japanese men. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **57**, 65-73, 2011.
  31. Mochizuki, K., Misaki, Y., Miyauchi, R., Takabe, S., Shimada, M., Kuriki, K., Ichikawa, Y., Goda, T.: A higher rate of eating is associated with higher circulating interleukin-1b concentrations in Japanese men not being treated for metabolic diseases. *Nutrition*, **28**, 978-983, 2012.
  32. Mochizuki, K., Miyauchi, R., Hariya, N., Misaki, Kasezawa, N., Tohyama, K., Goda, T.: Self-reported rate of eating is associated with higher circulating ALT activity in middle-aged apparently healthy Japanese men. *Eur. J. Nutr.*, **52**, 985-990, 2013.

## ポリフェノール類の薬効と毒性についての研究

関西学院大学工学部生命科学科  
今岡 進

### はじめに

最近、食品に含まれるポリフェノールの生体への効果が注目されている。一つの例として、フランス人において、飽和脂肪酸が多い食事の摂取や喫煙率が高いにも関わらず、心疾患の罹患率が低くフレンチパラドックスと呼ばれる。これはワインに含まれるレスベラトロール (RES) というポリフェノールの効果と考えられている。RESのターゲット因子候補はいくつか報告されているが、今のところ詳しいメカニズムは明らかではない。一方、ビスフェノール A (BPA) は内分泌かく乱化学物質の一つと考えられており、性ホルモンや甲状腺ホルモンのかく乱作用が報告されているが、実際にはそれぞれのホルモン受容体への親和性は、エストロゲンなど、生体内のリガンドと比べると極めて低いことが明らかになっており、その生理作用メカニズムについては十分解明されていない(図1)。

一方、申請者らの先行研究において、BPAの結合因子としてプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) を明らかにした。PDIの発見は古く、半世紀前に Anfinsen によってなされたものである。新生タンパク質のフォールディングや小胞体ストレスなどにより生成したミスフォールドタンパク質の

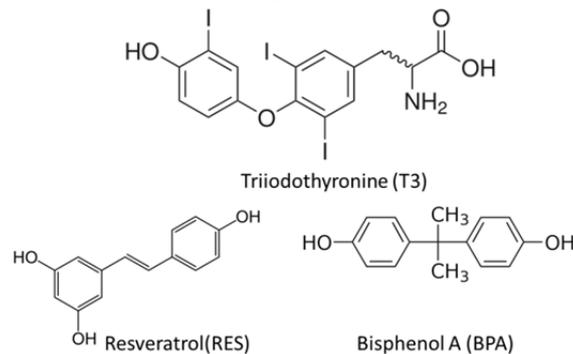


図1. ビスフェノールA,レスベラトロール、T3の化学構造

リフォールディングを行うシャペロンタンパク質である(図2)。本研究では申請者らが明らかにしてきた低酸素応答や細胞のレドックス制御におけるネットワークにフェノール化合物が影響を与える仕組みを解明し、薬の開発や病気の予防に役立てることを目的としている。

### PDIの機能

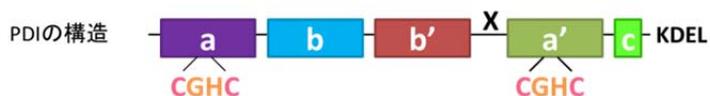


図2. PDIの機能と構造

## フェノール性化合物による低酸素応答阻害

低酸素応答は、心筋梗塞や脳梗塞といった虚血性の疾患、癌の増殖時や発生過程のように急激な細胞の増加において、重要な役割を演じていると考えられている。この低酸素応答に中心的な役割を果たしているのが HIF-1 $\alpha$ である (図3)。HIF-1 $\alpha$ は通常酸素状態ではそのプロリン残基水酸化酵素 PHD によって、水酸化され、さらに pVHL によりユビキチン化され、プロテアゾーム分解を受ける。低酸素状態においては PHD の水酸化が抑制

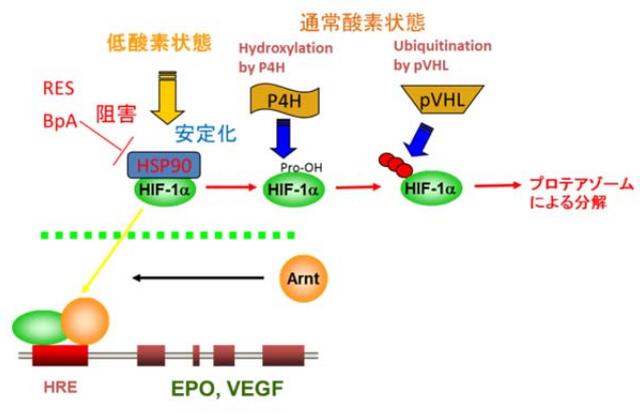


図3. 低酸素応答機構

されるため、HIF-1 $\alpha$ は HSP90 と結合し安定化し、核内移行する。核内では HIF-1 $\alpha$ は ARNT と結合して、赤血球増殖因子(エリスロポエチン, EPO)や血管内皮増殖因子 VEGF さらには Glut-1 の誘導によるグルコースの取り込み、グルコース代謝にかかわる酵素の誘導を行う。申請者は RES や BPA がこの低酸素応答を阻害することを明らかにした。そこで、BPA のどの構造が阻害に必要で且つ低酸素応答においてどの因子に結合するのかについても検討した。因子との結合性については、HIF-1 $\alpha$ や HSP90 を大腸菌で発現して精製し、表面プラズモン共鳴を利用して相互作用を解析できる Biacore を用いて検討を行った。チップに BPA の誘導体を結合して、アナライトとして HIF-1 $\alpha$ や HSP90 の精製品を用いて検討したが、一切相互作用は観察されなかった。これらの因子と相互作用することで不安定化をしているのではないと思われる。一方、BPA 側の構造としては、BPA のフェノール部位と中心部のジメチル部位のどちらが重要なのか誘導体を用いて検討した。フェノール部位についてはメチル化によってフェノール部位をブロックしても、阻害効果に変化がなかった。このジメチル BPA は現在低酸素応答の阻害剤として市販されている。一方、中心部のメチル基を除去すると阻害効果が弱まった。ジエチルなど、疎水性を上昇するとより阻害性が高まるが、フェニル基など大きな置換基が結合すると阻害性が低下し、この部分は適当なサイズが必要であることが明らかになっている。これらの試薬について現在低酸素応答阻害剤として特許申請中である。

## BPA の PDI への結合と活性阻害及びその化学構造

BPA は内分泌かく乱物質として報告され、エストロゲンや甲状腺ホルモンのかく乱作用が疑われている。動物実験においては妊娠した母マウスに BPA を与えると、生まれてきた仔に多動性などの異常が現れると報告され、BPA の脳への影響が懸念されている。申請者らは BPA の脳への影響を明らかにするために先に述べたように BPA のア

フィニティーカラムを作成し、ラット脳から結合因子としてPDIを精製した。PDIのイソメラーゼ活性はRNaseを用いて簡単に測定することができる。PDIのイソメラー

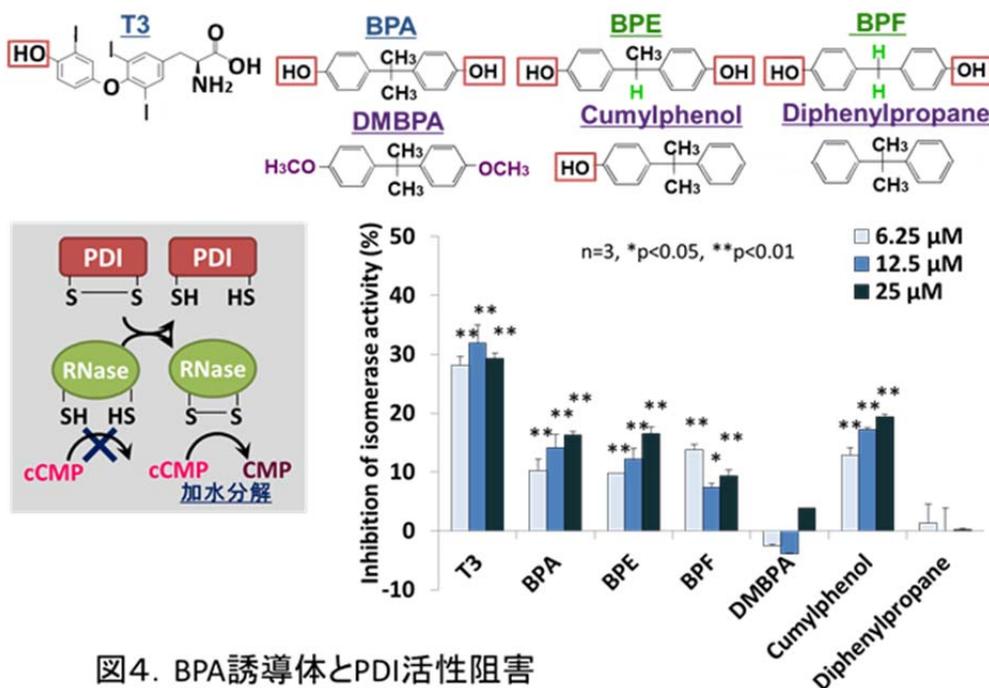


図4. BPA誘導体とPDI活性阻害

ゼ活性はBPAの添加によって阻害された。まず、PDIとBPAとの結合においてBPAのどの構造が必要なのかを検討した。ジメチルBPA、2,2-ジフェニルプロパン、BPE、BPFについて検討した結果、前者二つすなわちフェノール基を持たないものは、PDIとの結合性もなく、また阻害活性も見られなかった(図4)。この結果から、BPAについて低酸素応答阻害にはBPAの中心部のメチル基の疎水性が重要であるがPDIとの結合にはフェノール基が重要であることが明らかとなった。

#### BPAのPDIへの結合ドメインの同定

BPAがPDIに結合して、イソメラーゼ活性を阻害することは既に述べた通りであるが、PDIのどの部位に結合し、どのような機構で活性を阻害するのかを検討した。PDIはa, b, b', a', cの5個のドメインからなり、aとa'ドメインにCGHCの配列を持つイソメラーゼ活性中心が存在する。まずこれらをa, b, b', a', cフラグメントに分けて大腸菌で発現精製してBPAとの結合性をBiacoreで検討した(図5)。その結果、a, b'のフラグメントにBPA結合性が見られた。このことから結合にはaとb'が重要であると考えられた。次にab, b' a', c, a, b, b', a', abb', a', abb', b' a', Δb', a' c (Δはそのドメインがないことを示す)フラグメントを発現精製してBPAによるイソメラーゼ活性阻害を調べた。このうちaとa'ドメインを含んでいるものに活性が見られたが、b'ドメインを含むものにものみ、BPAによる活性阻害が見られた(図6)。

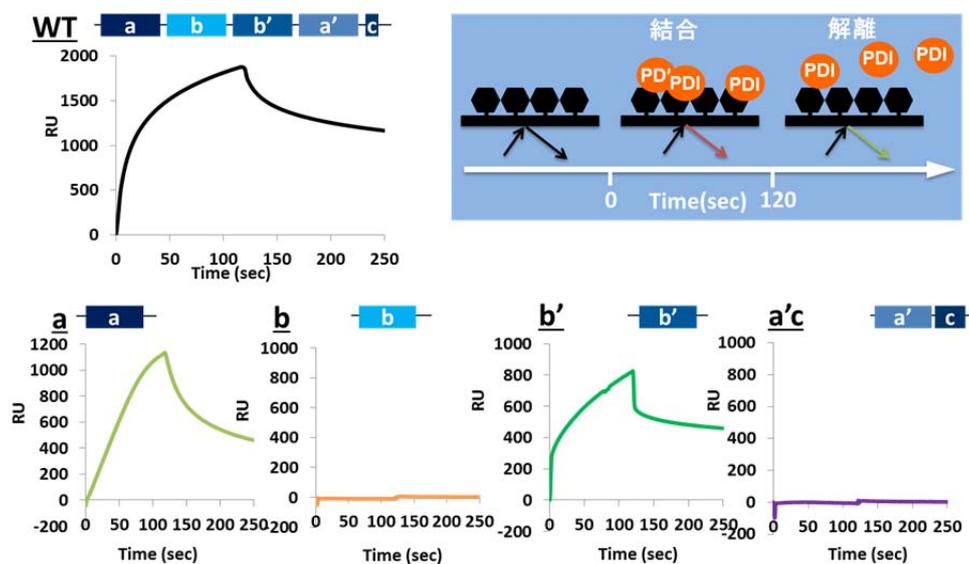


図5. PDIのBPA結合ドメインの検索

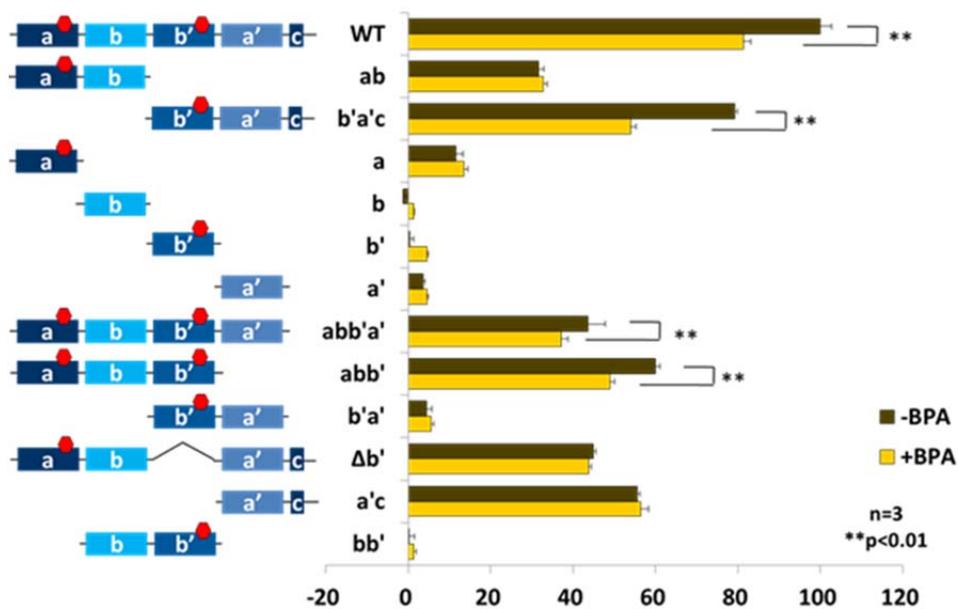


図6 BPAによるPDI阻害ドメイン

このことから、BPAがPDIのb'ドメインに結合することで、そのイソメラーゼ活性を阻害していることが明らかになった。

## PDI の甲状腺ホルモン応答活性に関わる機能

ラットの脳下垂体由来細胞 GH3 は甲状腺ホルモン T3 に応答して成長ホルモン (GH) を分泌する細胞で、この細胞を利用して甲状腺ホルモン応答機能を解析した。GH3 細胞に T3 を添加すると顕著な GH 分泌が見られたが、同様に BPA を添加しても GH の分泌は見られず、BPA の T3 様の作用は弱いと考えられた。しかし、T3 を添加して GH の分泌が見られる状態で BPA を添加すると GH 分泌の促進が観察された。一方、この細胞に PDI を過剰発現すると T3 による GH 発現は抑制された。PDI は BPA のみならず、T3 と結合することが知られ、演者らは T3 と BPA の結合部位が同一であることも明らかにしている。ところで、PDI を過剰発現すると T3 応答が低下することは以前から知られ、これは T3 が PDI にトラップされて、甲状腺ホルモン受容体に結合できなくなることによる、PDI 甲状腺ホルモンリザーバー説が報告されている。申請者らの本研究によって T3 及び BPA の PDI への結合部位が明らかになったことで、上記のメカニズムを検討した。まず、GH3 細胞に様々な PDI 変異体を発現して、甲状腺ホルモンの応答を GH の発現で調べた。変異体としてはイソメラーゼ活性中心の変異体である C/A Mt, 及び BPA が結合するそれぞれのドメイン欠損体  $\Delta a$ ,  $\Delta b'$  である。その結果、 $\Delta b'$  では過剰発現すると GH3 細胞の T3 応答に低下がみられたが、 $\Delta a$ , C/A Mt では低下しなかった(ただし、a ドメインの除去は活性ドメインの除去にもなる)。このことから、これまで、PDI を過剰発現すると甲状腺ホルモン応答が低下する原因は PDI に T3 が結合してその細胞内の濃度が低下するためと考えられてきたが T3 の結合部位を除去した  $\Delta b'$  でも T3 応答に影響があることから、上記の説は否定された。一方、PDI のイソメラーゼ活性中心を除去した C/A Mt の過剰発現では影響が軽微であることから、甲状腺ホルモン受容体の活性には PDI のイソメラーゼ活性が必要であることが証明された(図 7)。

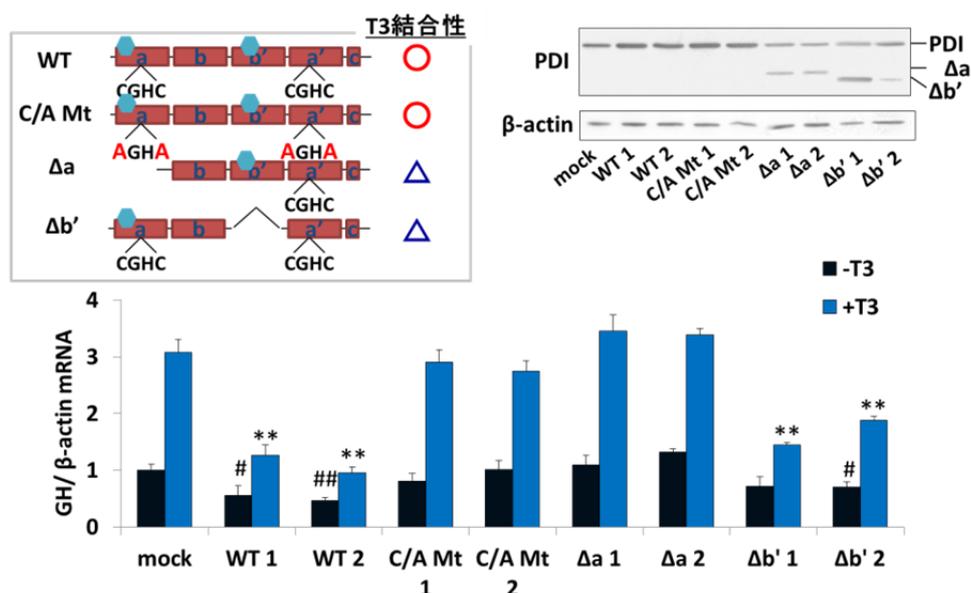


図7. PDIによるT3応答阻害

そこで、次に細胞の酸化状態、還元状態がどのように甲状腺ホルモン受容体の活性に影響を及ぼしているかについて検討した。まずチオール基の酸化剤である diamide や過酸化水素を添加して T3 応答を検討したところ低下がみられ、チオールの酸化は T3 応答を低下させることが明らかになった。それに対して還元剤である DTT の添加は影響を与えなかった。そこで核内因子を酸化還元している因子を検索したところ、Ref-1 の可能性が示唆された。Ref-1 は本来低酸素感受性因子 HIF-1 $\alpha$  を還元活性化する因子として見いだされたものである。このことから Ref-1 が甲状腺ホルモン受容体 TR を還元活性化している可能性が示唆された。そこで、まず、GH3 細胞に Ref-1 を過剰発現した。すると、GH3 細胞における T3 応答が増加した。一方で Ref-1 の活性中心である 64 番目のシステイン残基をセリン残基に変換した変異体 C64S Ref-1 では全く効果は見られなかった(図 8)。すなわち Ref-1 による TR の還元が活性化にかかわっていることが示された。

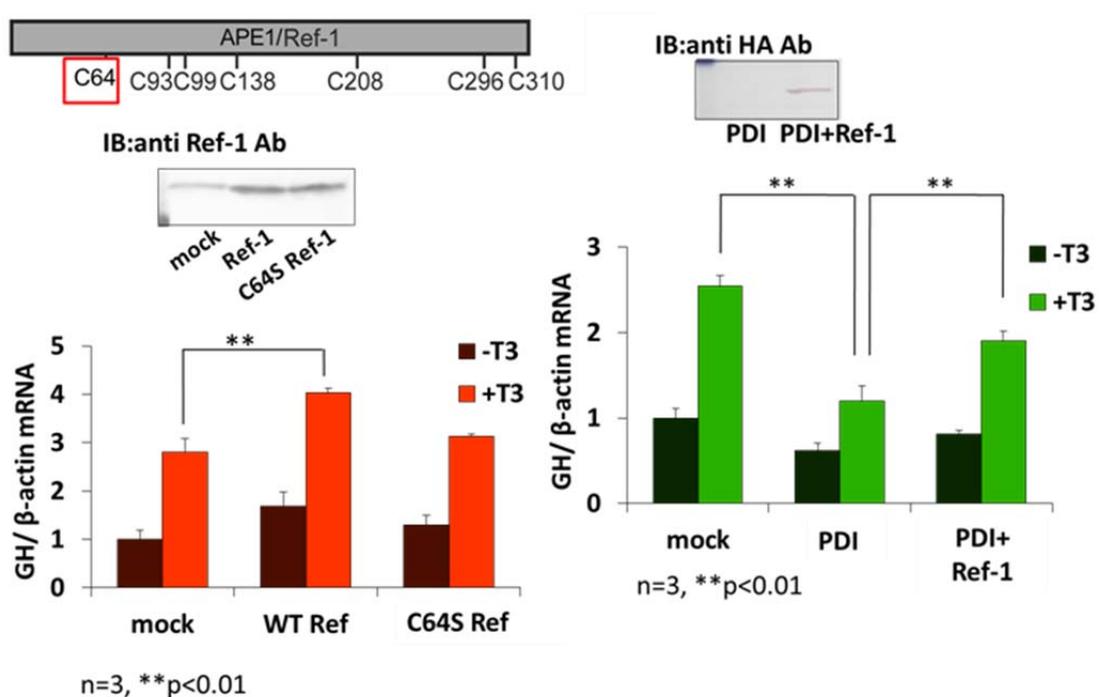


図8. Ref-1のT3応答への関与

### PDI-Ref-1-TR の酸化還元の検討

次に GH3 細胞における PDI-Ref-1-TR の酸化還元について in vitro および in vivo で検討を行った。まず、甲状腺ホルモン受容体のアイソフォーム TR $\alpha$ , TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 のうちどの分子種がかかわっているのかを明らかにした。これらを GH3 細胞に過剰発現して、T3 応答を調べた。その結果 TR $\alpha$ の効果が最も大きかった。一方、酸化剤であ

る diamide 添加では TRβ1 の過剰発現体が応答した。このことから PDI-Ref-1-TR の酸化還元には TRβ1 が関わっていることが示唆された。次にこれらの因子の直接的な相互作用と酸化還元について検討した。まず、TRβ1 と Ref-1 の免疫沈降実験を行った。Flag-tag を結合した TRβ1 と内在性の Ref-1 について Flag-tag 抗体で沈降すると内在性の Ref-1 が検出できた。さらに Ref-1 の抗体で沈降すると PDI が共沈降した。このことから PDI-Ref-1-TR の直接的相互作用が示唆された。

そこで次に PDI-Ref-1-TR の酸化還元について検討した。まず、Ref-1 の活性中心の変異体 C64S Ref-1 を用いて免疫沈降を行った。C64S Ref-1 と WT Ref-1 に HA-tag を結合して HEK293 細胞に過剰発現して、HA 抗体で免疫沈降を行ったところ、WT Ref-1 で PDI が共沈したが、C64S Ref-1 では共沈の量に変化がみられた。in vitro の実験において精製した C64S Ref-1、WT Ref-1 と PDI を用いて、酸化還元の実験を行った(図 9)。

WT Ref-1 では PDI が還元すなわち Ref-1 は酸化されたが、C64S Ref-1 では変化がなかった。このことは PDI が Ref-1 を酸化すなわち、ジチオールジスルフィド変換をしていることを示している。一方、通常細胞のレドックス状態を調節しているグルタチオンやチオレドキシンでは PDI と同じような効果は現れなかった。

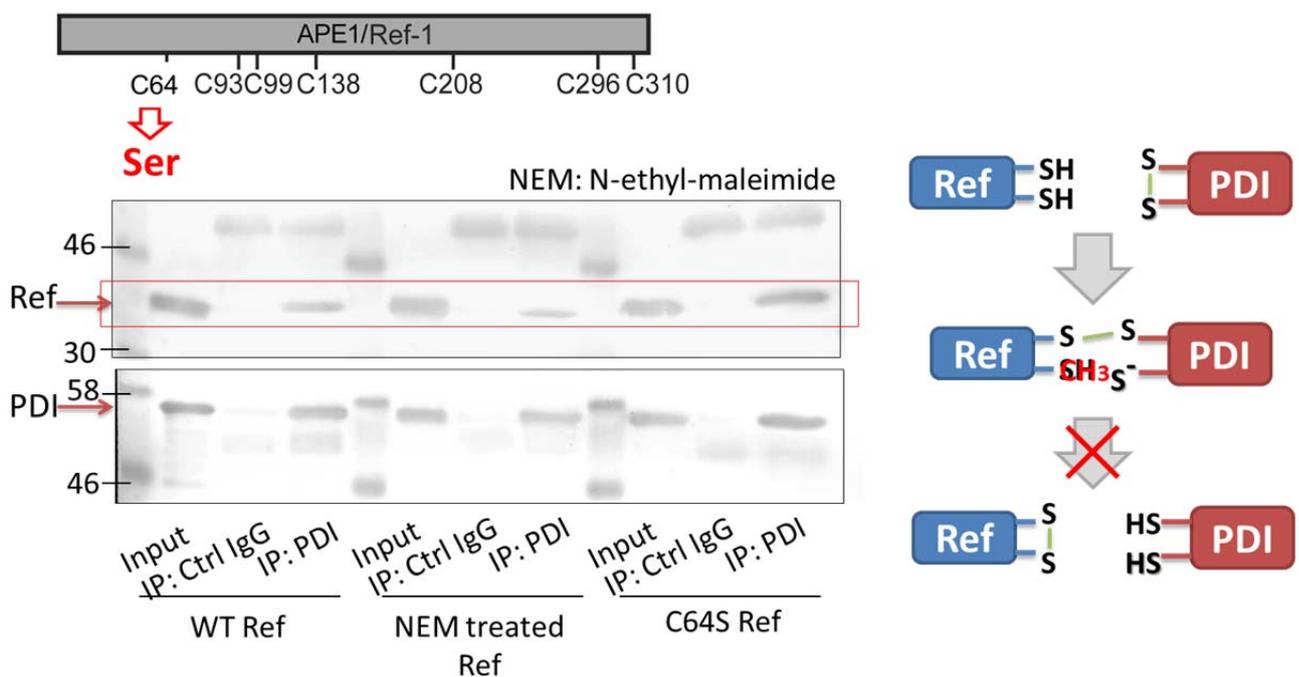


図9. PDIによるRef-1の酸化・還元

### 酸化ストレス応答とポリフェノール

生体の酸化ストレス応答にはいくつかのパスが知られているが、活性酸素などラジ

カルによって活性化される Keap1-Nrf2 はその典型的なものでヘムオキシゲナーゼなどの抗酸化因子を誘導する。すなわち、通常の状態では Nrf2 は Keap1 によって補足されユビキチン化されプロテアゾーム系で分解されているが、活性酸素が発生する様な酸化ストレス下において、活性酸素は Keap1 の構造を変化させ Nrf2 を解放して、これは様々な抗酸化因子の誘導に関わる。BPA は Nrf2 の発現を誘導した。これは細胞に BPA を投与すると NO が発生することから、これが Keap1 を不活性化するためと考えられる。一方、RES は Nrf2 の発現量を低下させた。この理由は明らかでないが、おそらく RES の抗酸化作用によるものと考えられる。

### 酸化ストレス応答と低酸素応答のクロストーク及びポリフェノール

虚血・再灌流は酸化ストレスを引き起こす典型的な例である。虚血すなわち血流が遮断され低酸素状態となり、再灌流によって血流が再開されるとそこで酸化ストレスが引き起こされる。このように生体では低酸素状態と酸化ストレス状態が連続して起こる。すなわち低酸素状態で引き起こされる遺伝子発現の変化が次の酸化ストレス状態を変化させる。そこで、酸化ストレス応答の鍵因子である Nrf2 が低酸素下でどのように変化するのかを調べたところ、低酸素状態で顕著な低下が見られた。そして、さらに検討の結果、この低下の原因が Siah2 というユビキチンリガーゼであることが明らかとなった。Nrf2 は低酸素下ではリン酸化され、Keap1 による分解が阻害されているが、Siah2 はリン酸化された Nrf2 も分解でき、しかも Siah2 は低酸素によって誘導されることで Nrf2 の代謝が亢進することが明らかとなった（図 10）。

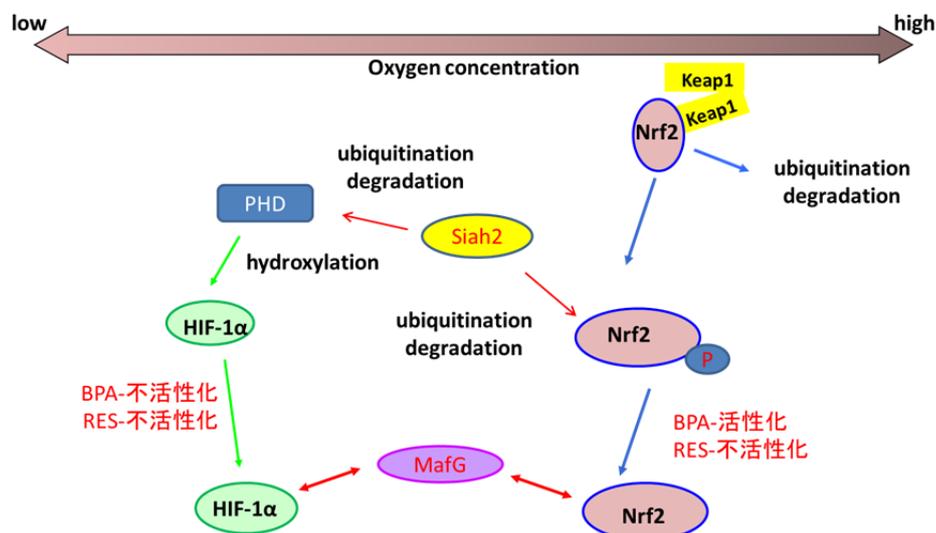


図 10. 低酸素応答と酸化ストレス応答のクロストーク

## おわりに

本研究においては、甲状腺ホルモン応答、低酸素応答、酸化ストレス応答と当研究室でターゲットとしている細胞の応答とシグナリングについて、典型的なポリフェノール、内分泌かく乱物質 BPA と食品由来ポリフェノール RES について、そのシグナリングへの影響や効果を見たものである。本研究によって、これらのシグナリングの新たな分子機構が解明でき、そこに働きかけるポリフェノールの作用の解明につながった。例えば BPA は内分泌かく乱物質の一つで、甲状腺ホルモンかく乱作用が報告されているが、甲状腺ホルモン受容体への結合は弱いとされる。これは PDI に対する BPA の影響で説明できるかもしれない(図 11)。

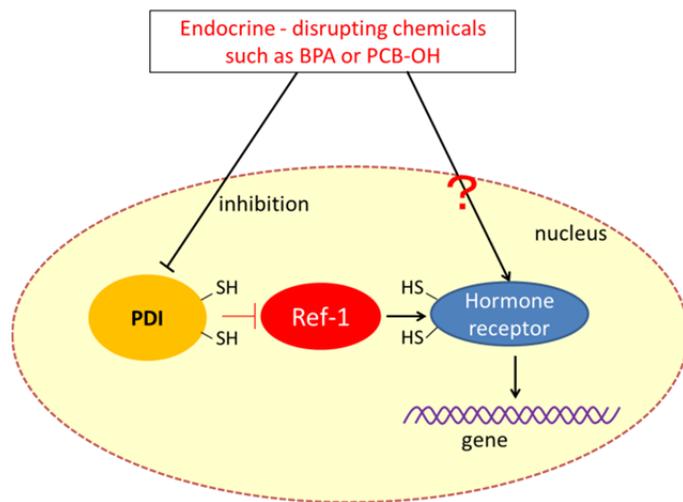


図 11. PDIを介した甲状腺ホルモン受容体制御

## 謝辞

本研究の一部は公益財団法人蓬庵社の研究助成によるものであり、ここに厚くお礼申し上げます。また、ご推薦を賜った大阪市立大学大学院医学研究科岩尾洋先生に心より、感謝いたします。この研究は研究室の多くの大学院生や博士研究員によって実施されました。

## 業績

1. Okada, K., Hashimoto, S., Funae, Y., and Imaoka, S. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) interact with protein disulfide isomerase and inhibit its activity. **Chem. Res. Toxicol.** 22, 899-904, 2009.
2. Mandai, T., Fujiwara, S., and Imaoka, S. Construction and engineering of a thermostable self-sufficient cytochrome P450. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 384, 61-65, 2009.
3. Oguro, A., Fujita, N., and Imaoka, S. Regulation of soluble epoxide hydrolase (sEH) in mice with diabetes: high glucose suppresses sEH expression. **Drug Metab. Pharmacokinet.** 24, 438-445, 2009.
4. Oguro, A., Sakamoto, K., Suzuki, S., and Imaoka, S. Contribution of hydrolase and phosphatase domains in soluble epoxide hydrolase to vascular endothelial growth factor expression and cell growth. **Biol. Pharm. Bull.** 32, 1962-1967, 2009.

5. Okada, K., Hashimoto, S., and Imaoka, S. Biological functions of protein disulfide isomerase as a target of phenolic endocrine-disrupting chemicals. (Review) **J. Health Sci.** 56: 1-13, 2010.
6. Komurasaki, R, Imaoka, S., Tada, N., Okada, K., Nishiguchi, S., and Funae, Y. LKM-1 sera from autoimmune hepatitis patients that recognize ERp57, carboxylesterase 1 and CYP2D6. **Drug Metab. Pharmacokinet.** 25: 84-92, 2010.
7. Osada-Oka, M., Hashiba, Y., Akiba, S., Imaoka, S., and Sato, T. Glucose is necessary for stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha under hypoxia: contribution of the pentose phosphate pathway to this stabilization. **FEBS Lett.** 584, 3073-3079, 2010.
8. Kinoshita, T., Haruta, Y., Sakamoto, C., and Imaoka, S., Antagonistic role of XESR1 and XESR5 in mesoderm formation in *Xenopus laevis*. **Int. J. Dev. Biol.** 55, 25-31, 2011.
9. Imaoka, S. Chemical stress on protein disulfide isomerases and inhibition of their functions. (Review) **Int. Rev. Cell Mol. Biol.** 290, 121-166, 2011.
10. Oguro, A., Sakamoto, K., Funae, Y., and Imaoka, S. Overexpression of CYP3A4, but not CYP2D6, promotes hypoxic response and cell growth of Hep3B cells. **Drug Metab. Pharmacokinet.** 26, 407-415, 2011.
11. Hashimoto, S., Shiimoto, K., Okada, K., and Imaoka, S. The binding site of bisphenol A to protein disulfide isomerase (PDI). **J. Biochem.** 151, 35-45, 2012.
12. Hashimoto, S., Yoshimura, H., Okada, K., Uramaru, N., Sugihara, K., Kitamura, S., and Imaoka, S. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their derivatives on protein disulfide isomerase activity and growth hormone release of GH3 cells. **Chem. Res. Toxicol.** 25(3):656-63, 2012.
13. Oguro, A. and Imaoka, S. Lysophosphatidic acids are new substrates for the phosphatase domain of soluble epoxide hydrolase. **J. Lipid Res.** 53(3):505-512, 2012.
14. Hou, H.H., Hammock, B.D., Su, K.H., Morisseau, C., Kou, Y.R., Imaoka, S., Oguro, A., Shyue, S.K., Zhao, J.F., Lee, T.S. N-terminal domain of soluble epoxide hydrolase negatively regulates the VEGF-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. **Cardiovasc. Res.** 93(1): 120-129, 2012.
15. Hashimoto, S., Ito, L., Okumura, M., Shibano, T., Nawata, M., Kumasaka, T., Yamaguchi, H., and Imaoka, S. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the complex between triiodothyronine and the bb' fragment of rat protein disulfide isomerase. **Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.** 68(Pt 4):476-478, 2012.
16. Hashimoto, S., and Imaoka, S. Protein disulfide isomerase regulates the thyroid hormone receptor-mediated gene expression via redox factor-1 through thiol reduction-oxidation. **J. Biol. Chem.** 288, 1706—1716, 2013.
17. Baba, K., Morimoto, H. and Imaoka, S. Seven in absentia homolog 2 (Siah2) is a regulator of NF-E2-related factor 2 (Nrf2) **J. Biol. Chem.** 2013, in press.