

# 学 位 論 文 要 旨

学位論文題名

PTP1B 阻害作用を有する PPAR  $\gamma$  部分アゴニストのインスリン増感作用と安全性に関する研究

**Insulin sensitizing effects and safety of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$**

**agonist with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity**

生命科学専攻分子作用学講座

氏 名 久保 勝裕

## Abstract

Insulin sensitizing and adverse effects of KY-201, a novel PPAR $\gamma$  agonist, in female KK-A $^y$  mice and ovariectomized (OVX) rats were compared with those of rosiglitazone. In female KK-A $^y$  mice, repeated administration of KY-201 10 and 30 mg/kg/day for 4 weeks showed weaker adverse effects such as increase in heart weights and decrease in hematocrit and bone mineral density (BMD) than rosiglitazone. In OVX rats after 6 weeks administration at 3 and 10 mg/kg/day, the serum NEFA reducing effects of KY-201 were similar to those of rosiglitazone. KY-201 had no effects on body weight gain, blood volume, heart or adipose weights, while rosiglitazone at 10 mg/kg/day increased these parameters. Rosiglitazone, but not KY-201 strongly decreased BMD and increased fat in marrow. In 3T3-L1 cells and ST-2 cells, KY-201 showed a PPAR $\gamma$  partial agonist activity. KY-201 reduced osteoblast differentiation in bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and increased adipocyte differentiation 3T3-L1 cells and BMSCs less potently than rosiglitazone in BMSCs. KY-201, but not rosiglitazone increased phosphorylation of the insulin receptor in HepG2 cells probably via its PTP1B inhibitory activity. These results show that KY-201 is a safer insulin sensitizing drug due to the combination of PPAR $\gamma$  partial activation and PTP1B inhibition.

## 学位論文要旨

**背景と目的:** 2 型糖尿病患者数は近年世界中で増加しており、深刻な健康問題となっている。インスリン抵抗性を基盤とする患者ではインスリン増感剤が必要となるのは言うまでもないが、糖尿病では病態の進行に伴い  $\beta$  細胞が減少していくことから分泌不全型の患者においてもインスリン増感剤は重要な治療薬である。pioglitazone や Rosi (Rosi) は PPAR $\gamma$  アゴニストであり、強力なインスリン増感作用を示すが、体重増加や体液貯留、心肥大、骨密度の低下といった副作用が問題であり、より安全で強力なインスリン増感剤の開発が望まれている。共同研究者らにより、KY-201 の体液貯留に関する安全域は Rosi の 10 倍以上と報告されている。しかし、正常血糖動物での評価であるため、本来インスリン増感剤が用いられる病態時においても KY-201 の副作用が Rosi よりも軽減されているかは明らかでない。また、Rosi と KY-201 の作用の違いが何に起因するのかも定かでない。そこで本研究においては、インスリン増感剤が使用されるような高血糖病態や、閉経など元来副作用のリスクの高い病態での副作用について明らかにするため、雌性 KK-A $^y$  マウスや卵巣摘除 (OVX) ラットを用いて PPAR $\gamma$  が関与する副作用を KY-201 と Rosi で比較検討した。また、KY-201 と Rosi の副作用の違いについて探るため、脂肪前駆細胞株である 3T3-L1 細胞やラット骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) における分化への影響について検討した。さらにこれまでに報告している KY-201 の有する PTP1B 酵素阻害が細胞レベルでインスリンシグナルを増強しているか検討した。

## KY-201

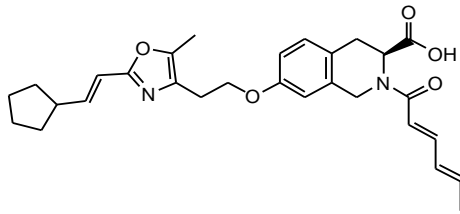


Fig.1. Chemical structure of KY-201.

**方法:** 雌性 KK-A<sup>y</sup> マウスに 10 および 30 mg/kg の投与量に相当する KY-201 および Rosi 混餌飼料を 4 週間摂取させ、体重増加、体液貯留、骨密度の低下など副作用について検討した。また、OVX ラットに 3 および 10 mg/kg/day の KY-201 および Rosi を 6 週間強制経口投与し、同様に副作用について検討した。続いて、3T3-L1 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイによる PPAR $\gamma$  アゴニスト活性と real-time PCR により、GPDH mRNA 発現について検討した。次に骨髄由来間葉系幹細胞株 ST-2 細胞でルシフェラーゼアッセイによる PPAR $\gamma$  アゴニスト活性とラット BMSCs を採取し、骨芽細胞分化に対する影響を ALP 活性を指標に、脂肪細胞分化に対する影響を GPDH 活性および脂肪細胞関連遺伝子の発現を real-time PCR により検討した。また、KY-201 の PTP1B 阻害作用が細胞レベルでインスリンシグナルを増強するか HepG2 細胞を用いて、インスリン受容体 (IR) のリン酸化に対する作用を検討した。

**結果:** 雌性 KK-A<sup>y</sup> マウスにおいて KY-201 は 30 mg/kg のみでヘマトクリットの低下および心臓重量増加作用を示したが、Rosi は 10 mg/kg から有意な作用が見られ、KY-201 の体液貯留作用は Rosi よりも弱いことが示された。また、KY-201 は骨密度や骨髄の脂肪化に影響しなかったのに対し、Rosi は 30 mg/kg で有意に骨密度を低下させた。体重増加量 KY-201 と Rosi とほぼ同程度であり、脂肪重量には両化合物とも有意な影響を与えなかった (Table. 1)。OVX ラットにおいて KY-201 と Rosi は同等の血中脂質低下作用を示し、インスリン増感作用は同等と考えられた。KY-201 による骨密度の低下および骨髄の脂肪化は Rosi よりも弱かった。KY-201 は血液量および心臓重量に影響しなかったが、Rosi は 10 mg/kg から有意に増加させた。さらに、KY-201 は体重増加量や脂肪重量に有意に影響しなかったが、Rosi は 10 mg/kg で増加させた (Table. 2)。

Table. 1. Main and side effects of KY-201 and rosiglitazone in female KK-A<sup>y</sup> mice.

|                           | Control    | KY-201     |             | Rosiglitazone |             |
|---------------------------|------------|------------|-------------|---------------|-------------|
|                           |            | 10 mg/kg   | 30 mg/kg    | 10 mg/kg      | 30 mg/kg    |
| Glucose (mg/dL)           | 243.7±30.6 | 179.4±4.9* | 166.0±3.3** | 177.9±4.1**   | 174.2±7.1** |
| Hematocrit (%)            | 49.5±0.9   | 46.8±0.8   | 45.8±0.6**  | 44.6±0.6**    | 43.6±0.8**  |
| Heart (g)                 | 0.19±0.01  | 0.21±0.00  | 0.22±0.01** | 0.22±0.01*    | 0.23±0.01** |
| BMD (mg/mm <sup>2</sup> ) | 46.1±0.8   | 44.0±0.7   | 43.4±0.9    | 42.6±0.5      | 41.3±1.0*   |
| Body weight gain (g)      | 2.6±0.6    | 7.6±0.9**  | 8.0±0.6**   | 7.7±0.4**     | 6.9±0.6**   |
| Visceral adipose (g)      | 9.6±0.6    | 10.9±0.4   | 10.9±0.4    | 10.4±0.6      | 10.3±0.4    |
| Subcutaneous adipose (g)  | 7.9±0.3    | 8.3±0.2    | 9.0±0.4     | 9.1±0.4       | 8.9±0.4     |

The values are the mean ± S.E.M. (n=8). \*p<0.05 and \*\*<0.01 (vs. Control group, Dunnett's multiple comparison test).

Table. 2. Main and side effects of KY-201 and rosiglitazone in OVX rats.

|                                  | Sham operated | Control   | KY-201      |             | Rosiglitazone |             |
|----------------------------------|---------------|-----------|-------------|-------------|---------------|-------------|
|                                  |               |           | 3 mg/kg     | 10 mg/kg    | 3 mg/kg       | 10 mg/kg    |
| NEFA (mEq/L)                     | 0.50±0.02     | 0.61±0.03 | 0.54±0.03** | 0.43±0.02** | 0.48±0.02**   | 0.41±0.02   |
| Blood volume (mL)                | 7.2±0.1       | 7.3±0.2   | 7.5±0.2     | 7.5±0.1     | 7.4±0.1       | 8.0±0.1*    |
| Heart (g)                        | 0.63±0.01     | 0.64±0.02 | 0.65±0.01   | 0.66±0.01   | 0.64±0.01**   | 0.71±0.01** |
| BMD Femur (mg/mm <sup>2</sup> )  | 559.1±4.7**   | 495.2±3.9 | 488.5±3.0   | 478.2±4.3   | 479.5±4.6     | 468.3±5.3** |
| BMD Lumbur (mg/mm <sup>2</sup> ) | 710.1±6.1**   | 640.3±4.6 | 627.9±3.1   | 616.3±3.9** | 615.5±5.6**   | 604.1±6.6** |
| Body weight gain (g)             | 45.9±2.4**    | 70.4±3.0  | 72.4±3.4    | 72.4±3.0    | 71.6±3.8      | 82.8±2.1*   |
| Adipose tissue (g)               | 8.7±0.7       | 10.4±0.9  | 13.2±1.2    | 13.3±0.7    | 12.3±0.3      | 14.3±0.6*   |

The values are the mean ± S.E.M. (n=8). \*p<0.05, \*\*<0.01 (vs. Control group, Dunnett's multiple comparison test).

KY-201 は 3T3-L1 細胞および ST-2 細胞において PPAR $\gamma$  の部分アゴニスト活性を示した。また、3T3-L1 細胞における KY-201 の GPDH mRNA 発現誘導作用は Rosi よりも弱かった。さらに、ラット BMSCs において KY-201 による骨芽細胞分化抑制および脂肪細胞分化促進作用は Rosi よりも弱かった (Fig. 2, 3). KY-201 は PTP1B 阻害作用を示し、また、濃度依存的にインスリンによる IR のリン酸化を増強した (Fig. 4).

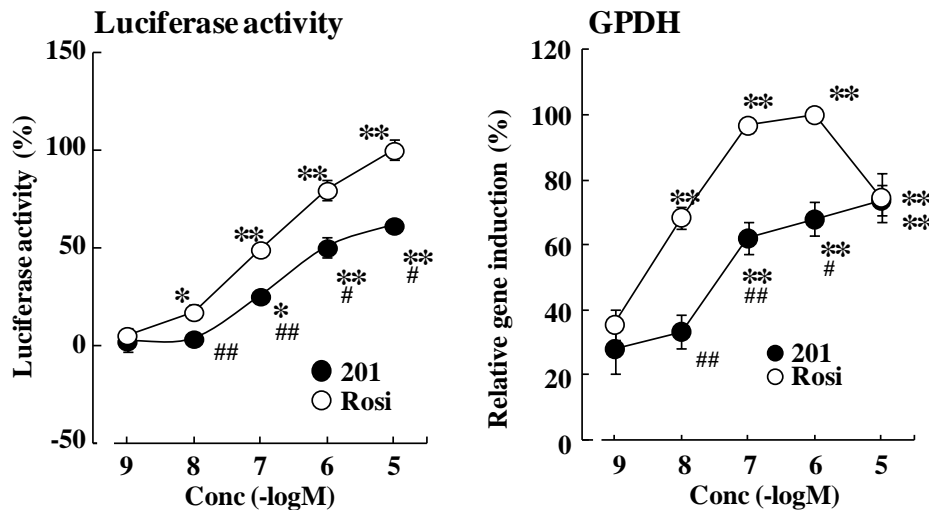


Fig.2. Transactivation of mouse PPAR $\gamma$  and GPDH mRNA induction in 3T3-L1 cells by KY-201 and rosiglitazone. The values are the mean  $\pm$  S.E.M (n=3-4). \*p<0.05, \*\*p<0.01 (vs. DMSO-treated cells, Dunnett's comparison test). #p<0.05, ##p<0.01 (vs. rosiglitazone-treated cells). 201; KY-201, Rosi; rosiglitazone.

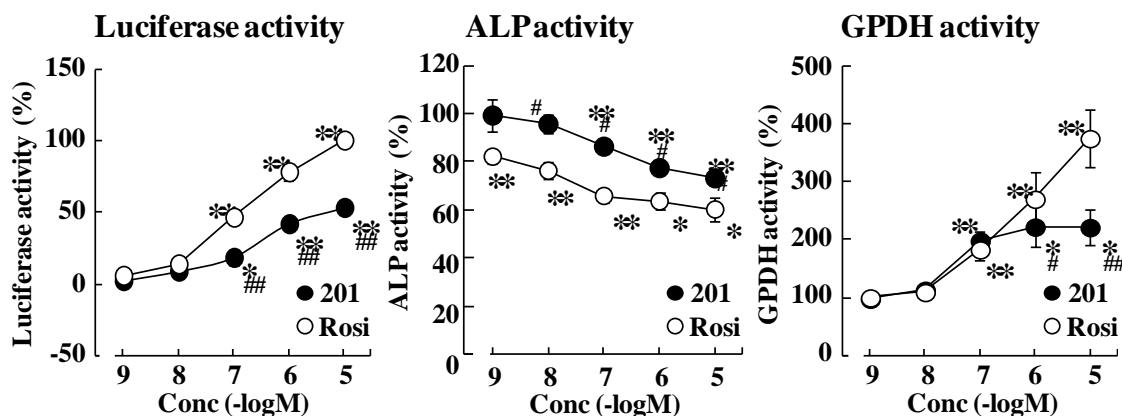


Fig.3. Transactivation of mouse PPAR $\gamma$  by KY-201 and rosiglitazone in ST-2 cells, and effects on osteoblastic and adipogenic differentiation in rat BMSCs by KY-201 and rosiglitazone. The values are the mean  $\pm$  S.E.M (n=3-5). \*p<0.05, \*\*p<0.01 (vs. DMSO-treated cells, paired t-test). #p<0.05, ##p<0.01 (vs. rosiglitazone-treated cells, paired t-test). 201; KY-201, Rosi; rosiglitazone.

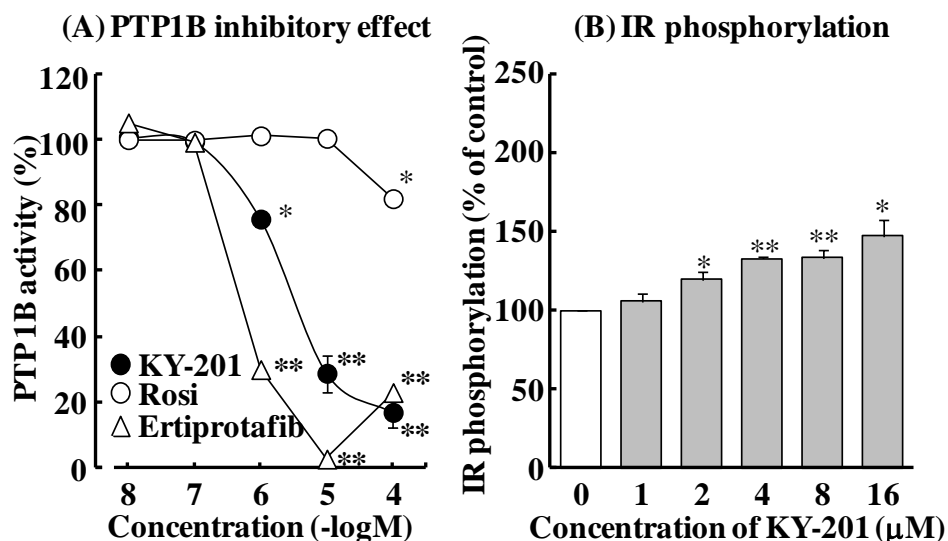


Fig. 4. Effect of KY-201 on PTP1B enzyme activity and on amount of insulin receptor phosphorylated by insulin in KY-201-treated HepG2 cells. (A) The DMSO-treated enzymatic activity level was taken as 100%, and the values are the mean  $\pm$  S.E.M (n=3). \*p<0.05, \*\*p<0.01 (vs. DMSO-treated, paired-t-test.). (B) The phosphorylation level in DMSO-treated cells was taken as 100%, and the values are the mean  $\pm$  S.E.M (n=4). \*p<0.05, \*\*p<0.01 (vs. DMSO-treated cells, paired-t-test.). Rosi; rosiglitazone.

考察および結論: 雌性 KK-A<sup>y</sup> マウスおよび OVX ラットの結果から, KY-201 では Rosi に比べて PPAR $\gamma$  に起因する副作用が弱いことが明らかとなった. KY-201 は PPAR $\gamma$  の部分アゴニスト活性を示し, 前駆細胞からの脂肪細胞分化や骨髄の間葉系幹細胞の脂肪細胞分化促進および骨芽細胞分化抑制作用が弱いことから, KY-201 の PPAR $\gamma$  に起因する副作用が弱い理由として PPAR $\gamma$  部分作動性が関係すると考えられた. また, KY-201 は細胞レベルでインスリンシグナルを増強することが明らかとなった. 以上より, KY-201 は PPAR $\gamma$  部分作動活性と PTP1B 阻害作用のために, Rosi よりも安全なインスリン増感剤である可能性が示された. 以上の研究成績から, KY-201のようなPTP1B阻害活性を有するPPAR $\gamma$  部分作動薬やPTP1B阻害剤とPPAR $\gamma$  部分作動薬の併用が副作用リスクの高い糖尿病患者における安全かつ有効な治療アプローチとなる可能性が明らかとなった.

## 学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

PTP1B 阻害作用を有する PPAR $\gamma$  部分アゴニストのインスリン増感作用と安全性に関する研究

2. 論文提出者 (1) 所属 生命科学 専攻 分子作用学 講座

(2) 氏名 久保 勝裕

3. 審査結果の要旨（600～650 字）

本研究は PTP1B 阻害活性を有する新規 PPAR $\gamma$  アゴニスト KY-201 の薬効および安全性と作用機序を明らかにする目的で実施された。KY-201 の PPAR $\gamma$  アゴニスト活性は rosiglitazone(Rosi)と同等以下にも拘わらず、糖尿病マウスで強力な血糖低下作用を示し、正常マウスで体液貯留作用が弱いことから、何らかの別の機序の関与が示唆されていた。本研究では、糖尿病マウスにおいて薬効用量を超える極量でも低血糖作用を示さず、体液貯留、心肥大および骨密度低下作用は Rosi より著しく弱いことが明らかにされた。さらに、閉経後患者モデルの卵巣摘除ラットにおいて、脂質低下作用は Rosi と同等で、体重増加、脂肪増加、体液貯留、心肥大および骨密度低下作用は著しく弱いことが明らかにされた。次いで、作用機序の検討により薬効および副作用標的細胞である脂肪前駆細胞と副作用標的細胞である骨髄間葉系幹細胞において PPAR $\gamma$  を部分的に活性化し、そのため副作用が Rosi より弱い、薬効は PTP1B 阻害作用によるインスリン増感作用により増強され Rosi の同等以上に達した可能性が示された。以上の研究成績は、KY-201 のような PTP1B 阻害活性を有する PPAR $\gamma$  部分作動薬や PTP1B 阻害剤と PPAR $\gamma$  部分作動薬の併用が副作用リスクの高い糖尿病患者における安全かつ有効な治療アプローチとなる可能性を示し、糖尿病治療への貢献が期待される点で高く評価でき、審査委員会は本論文が博士(薬学)に値すると判断した。

4. 審査結果 (1) 判定 (いずれかに○印) 合格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博士(薬学)