



Antidiabetic Sulfonylureas and cAMP Cooperatively Activate Epac2A

高橋, 利匡

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5987号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005987>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Antidiabetic Sulfonylureas and cAMP Cooperatively Activate Epac2A

抗糖尿病薬であるスルホニル尿素とcAMPは協調的にEpac2Aを活性化する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

糖尿病・内分泌・腎臓内科学

(指導教員：平田 健一教授)

高橋 利匡

【背景および目的】

Adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) は様々な生理的反応において重要なセカンドメッセンジャーである。cAMP はイオンチャネル、PKA (Protein Kinase A) や Epac に結合することでその作用を発揮する。Epac には Epac1 と Epac2 のアイソフォームが存在し、Epac2 には Epac2A、2B、2C と 3 つのバリエントが存在する。以前に 2 型糖尿病の治療に広く用いられているスルホニル尿素 (SU) 薬が直接 Epac2A を活性化することが発見された。今回、私は SU 薬による Epac2A 活性化機構を解明する目的で、Epac2A における SU 薬の結合部位とその結合特性を検討した。

【結果と考察】

SU 薬による Epac2A と Epac1 の活性化の差

私は SU 薬の種類による Epac2A 活性化の差を Epac2A FRET (fluorescence resonance energy transfer) センサーを用いて検討した。マウス脾β細胞株 (MIN6-K8 β細胞) に発現させた Epac2A FRET センサーでは Epac 選択的 cAMP アナログである 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (8-pCPT) 濃度依存的に FRET 反応が減少し、Epac2A を活性化した。SU 薬であるグリベンクラミド、グリビジド、アセトヘキサミドは 10 μM 以上で、グリメピリドは 10 μM で、トルブタミド、クロルプロパミドは 100 μM 以上で Epac2A を活性化したが、グリクラジドはいずれの濃度でも活性化しなかった。この結果は、SU 薬の種類によって、Epac2A の活性化が異なることを示唆している。

次に SU 薬は Epac1 も活性化するかを Epac1 FRET センサーを用いて検討した。8-pCPT は Epac1 を活性化したが、グリベンクラミド、トルブタミド、グリメピリドは Epac1 を活性化しなかった。Epac2A と Epac1 のドメインを比較すると、Epac1 にはないドメインとして Epac2A には N 末端に cAMP 結合ドメイン (ドメイン A) と RA ドメインを有しており、これらの SU 薬による Epac2A 活性化はドメインの違いが関与していることが考えられた。

ドッキングシミュレーションによる SU 薬と結合するアミノ酸残基の予測

Epac2A に特異的なドメイン A と RA ドメインに SU 薬がどのように結合するかをドッキングシミュレーションで検討した。既報の Epac2A の結晶構造は全長の不活性型とドメイン A を欠いた部分的な活性型しか存在しない。BLAST 解析では Epac2A のドメイン A と最も同一性、類似性が高い cAMP 結合タンパク質は Epac2A のドメイン B であったため、不活性型のドメイン A と活性型のドメイン B を使ったホモロジー モデリングを行い、活性型ドメイン A のモデルを構築し、ドッキングシミュレーションに用いた。グリクラジド、クロルプロパミド、トルブタミド、アセトヘキサミド、グリメピリド、グリベンクラミド、グリビジドはドメイン A の Cys105、Gly114、Ser116、Arg151 と結合することが予測された。更にドメイン A を欠いた既報の活性型 Epac2A の結晶構造ではトルブタミドは RA ドメインの Asn715、Glu719 と結合することが予測された。

Epac2A 変異体を用いた SU 薬結合部位の検証

ドッキングシミュレーションで予測された結合様式を検証するために各アミノ酸残基を Alanine に置換した種々の Epac2A 変異体を作製し、FRET にて変異の効果を検証した。Gly114、Ser116、His124 を変異させた Epac2A FRET センサーでは、8-pCPT による FRET 反応は保持されていたが、トルブタミド、グリベンクラミドによる反応は減弱していた。Cys105 を変異させた Epac2A FRET センサーでは、8-pCPT、トルブタミドによる FRET 反応は保持されていたが、グリベンクラミドによる反応は減弱していた。一方、ドメイン A の Arg151 と RA ドメインの Asn715、Glu719 を変異させた Epac2A FRET センサーは野生型と変わらなかった。以上の結果から、Arg151、Asn715、Glu719 ではなく、Cys105、Gly114、Ser116、His124 が SU 薬との結合に関与することが示された。次にこれらのアミノ酸残基を Epac1 の cAMP 結合ドメインの相当する部位に導入した Epac1 変異体 (T302C, L313S, A322H) FRET センサーを MIN6-K8 β細胞に発現させ、変異の効果を検証した。野生型 Epac1 FRET センサーはグリベンクラミド、トルブタミドで活性化されないが Epac1 (T302C, L313S, A322H) FRET センサーはグリベンクラミド、トルブタミドで活性化された。この結果は Cys105、Gly114、Ser116、His124 が SU 薬の結合に重要であることを示している。

SU 薬の Rap1 活性化における His124 の重要性

Epac2A のドメイン A で Histidine に相当する部位は PKA や Epac1 の cAMP 結合ドメインでは Alanine であり、また PKA や Epac2A の cAMP 結合ドメインの解析から cAMP ドメイン内の Alanine が cAMP の結合に重要であると報告されている。このことから Epac2A のドメイン A の His124 が cAMP と SU 薬の結合選択性に関与していることが推測された。そこで、His124 の重要性を検討するため、Epac2A 欠損脾β細胞株に Epac2A H124A 変異体を発現させて、Epac2A の下流シグナルである Rap1 の活性化を検証したところ、8-pCPT は Rap1 を活性化したが、グリベンクラミドは Rap1 を活性化しなかった。この結果から、His124 は SU 薬による Epac2A/Rap1 の活性化に重要であることが示唆された。

Epac2A、Rap1 活性化における SU 薬と cAMP の協調的作用

Epac2A のドメイン A とドメイン B は互いに“向かい合い”で閉鎖された構造を形成しており、cAMP の結合がこの構造を開放することが推測されている。私は閉鎖された構造では SU 薬はドメイン A に結合することができず、cAMP の結合が必要であると推測した。この仮説を検証するため、³H 標識されたグリベンクラミドと Epac2A の結合実験を行った。結合実験では内在性に Epac2A や SUR1 を発現しておらず、cAMP 濃度が他の細胞より低い COS-1 細胞を使用した。COS-1 細胞に発現した野生型 Epac2A は ³H 標識されたグリベンクラミドと特異結合を示さなかったが、8-pCPT (1 μM) 存在下では特異的結合を認めた。一方、H124A 変異体では 8-pCPT (1 μM) 存在下でも特異的結合を認めなかつたことから、SU 薬はドメイン A に結合し、その結合には cAMP が必要であることが示された。

次に、Epac2A 活性化における SU 薬と cAMP の相互作用の効果を検討した。MIN6-K8 β細胞では低濃度グリベンクラミド (100 nM) と低濃度 8-pCPT (1 μM) は単独では Epac2A FRET を減少しなか

つたが、組み合わせにより Epac2A FRET は相乗的に減少した。しかし、H124A 変異体では、低濃度グリベンクラミド (100 nM) と 8-pCPT (1 μM) は単独、またその組み合わせにおいても Epac2A FRET は変化しなかった。更に Rap1 活性化においても低濃度グリベンクラミドと低濃度 8-pCPT の組み合わせ刺激により Rap1 は相乗的に活性化したが、H124A 変異体ではその効果は認められなかつた。これらの結果から、SU 薬と cAMP は協調的に Epac2A を活性化することが示された。

SU 薬による Epac2A 活性化における内在性の cAMP の重要性

これまでの結果から、SU 薬による Epac2A 活性化には cAMP が必要であることが示されたが、実際に内在性 cAMP の濃度によって SU 薬による Epac2A 活性化は影響されるか検討した。脾β細胞においてアドレナリン刺激は Gi タンパク質と共に α 受容体を活性化し cAMP 産生を抑制することが知られている。そこで、MIN6-K8 β細胞の cAMP 濃度を 5 μM アドレナリンにより 67.1% まで減少させたところ、グリベンクラミド、トルブタミドによる Epac2A FRET 反応はほとんど変化しなかつた。またグリベンクラミド、トルブタミドによる Rap1 活性化も減弱した。これらの結果から、Epac2A と Rap1 の SU 薬による活性化は内在性の cAMP 濃度に依存することが示された。

SU 薬と cAMP による Epac2A 活性化のモデル

以上の結果から、Epac2A のドメイン A が SU 薬の結合部位であり、一方ドメイン B が cAMP 結合部位であることが示された。したがって Epac2A は、cAMP がドメイン B に結合することで“向かい合い”で閉鎖された構造が解放され、SU 薬はドメイン A に結合できるようになり、SU 薬が Epac2A の活性化状態を安定化すると考えられる。

【結論】

本研究で、私は抗糖尿病薬である SU 薬は Epac2A のドメイン A に結合するが、その結合は SU 薬の構造に依存することを明らかにした。また、SU 薬と cAMP が協調的に作用し Epac2A を活性化することを示した。Epac2A は cAMP と SU 薬によって活性化されることから、Epac2A を標的とした新たな抗糖尿病薬の開発につながることが期待される。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2378 号	氏名	高橋 利匡
論文題目 Title of Dissertation	Antidiabetic Sulfonylureas and cAMP Cooperatively Activate Epac2A 抗糖尿病薬であるスルホニル尿素と cAMP は協調的に Epac2A を活性化する		
審査委員 Examiner	主査 木戸 良明 Chief Examiner 副査 平井 みどり Vice-examiner 副査 勾坂 敏朗 Vice-examiner		
(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)			

【背景・目的】

2型糖尿病患者はインスリン分泌能、インスリン感受性が種々の程度に障害されており、適切な治療法の選択にはこれらの病態評価が不可欠である。血清 CPR 値は内因性インスリン分泌量の指標として用いられるが、血糖値とインスリン分泌は相互に影響しながら変化するため、血清 CPR 値単独ではインスリン分泌能も感受性も適切に評価できない。一方、CPR 値と、同時に測定した血糖値との比である CPR index(CPI) が、インスリン治療の適応決定に有用とする報告があるが、その理由は明らかではない。本研究では CPI のインスリン分泌指標としての臨床的意義、および罹病期間との関係を明らかにすることを目的としている。

【対象と方法】

対象は、血糖コントロール目的に神戸大学医学部附属病院糖尿病内分泌内科に入院した 2 型糖尿病患者で、腎機能障害者、重度の肝機能障害者、インスリン抗体が 20% 以上、インスリン使用者および、糖尿病性網膜症に対する治療歴のある患者を除いた、121 名において検討している。

血清 CPR 値と血糖値との比である CPR index(CPI) は、入院翌日に早朝空腹時と標準食摂取後 2 時間において、 $CPR(\text{ng/ml}) / \text{血糖値}(\text{mg/dl}) \times 100$ の計算式を用いて算出している (F-CPI, PP-CPI)。

【結果】

インスリン分泌指標と CPI の関係においては、F-CPI, PP-CPI はともに、経ロブドウ糖負荷試験の初期分泌指標である Insulinogenic index とは弱いが相関を認め ($r=0.359$, $p<0.0001$; $r=0.457$, $p<0.0001$)、総インスリン分泌指標である Σ CPR とは強い相関を認めた ($r=0.582$, $p<0.0001$; $r=0.635$, $p<0.0001$)。また、F-CPI, PP-CPI はともに、グルカゴン負荷後 6 分 CPR 値 (CPR₆) とも、それぞれ中等度の相関を認めた ($r=0.562$, $p<0.0001$; $r=0.484$, $p<0.0001$)。

一方、インスリン抵抗性指標と CPI との関係においては、F-CPI と HOMA-R⁻¹ と間に弱いが有意な相関を認めた ($r=-0.373$, $p<0.0001$)。また、F-CPI, PP-CPI はともに、Composite Index と弱いが有意な相関を認めた ($r=-0.452$, $p<0.0001$; $r=-0.354$, $p=0.0003$)。CPI と糖尿病の罹病期間との関係においては、PP-CPI が罹病期間と有意な相関を認め ($r=-0.339$, $p<0.0001$)、さらに PP-CPI は網膜症の進行とともに低下が確認された。

【考察】

本研究の結果から、CPR index は F-CPI, PP-CPI とともに、経ロブドウ糖負荷試験におけるインスリン総分泌量や、非ブドウ糖インスリン分泌刺激であるグルカゴン負荷試験におけるインスリンの最大分泌量と、強い相関を認めた。F-CPI は空腹時における基礎状態で

得られる指標にも関わらず、2型糖尿病患者においては負荷後のインスリン分泌能を強く反映することが明らかとなった。

また分泌指標のみならず、CPI はインスリン感受性指標とも、弱いが相関を認め、F-CPI と感受性指標との関係は、PP-CPI と感受性指標との関係より、より強い相関関係を認めたことは、興味深い知見である。

今回、CPR index とインスリン分泌との関係を検討することで、CPR index におけるインスリン分泌指標としての意義を明らかにすることができた。まぜ、CPR index が2型糖尿病患者におけるインスリン治療選択の基準として、有用であるとされるのか、なぜ CPR index が脾β細胞面積と関係したのかの根拠の一つとなりうる。

本研究から、F-CPI、PP-CPI とも比較的簡便に測定可能な指標であるが、ブドウ糖刺激や非ブドウ糖刺激におけるインスリン分泌指標と相関を認めるのみならず、抵抗性指標とも弱いが相関を認めることが明らかとなり、臨床上有用な指標であることがわかった。また、進行性の疾患である2型糖尿病患者の罹病期間とも相関を認めたことから、耐糖能障害の度合いや進行度を反映する指標であることが明らかとなった。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。