

(報告様式4)

【課題管理番号】 16nk0101339h0001

平成 29 年 5 月 17 日

平成 28 年度 委託実験調査成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 創薬支援推進事業 創薬総合支援事業
(英語) Drug Discovery Support Promotion Project “The iD3 Booster”

実験調査課題名 : (日本語) PTP 阻害薬の探求研究
(英語) Research for the discovery of PTP inhibitors

実験調査担当者 (日本語) 自然科学研究機構 基礎生物学研究所 教授 野田昌晴
所属 役職 氏名 : (英語) National Institute for Basic Biology, National Institutes for Natural Sciences, Professor, Masaharu Noda

実施期間 : 平成 28 年 5 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要

プロテインチロシンホスファターゼの一つ PTPX がインスリンシグナルを抑制することを明らかにしてきた。本プロジェクトにおいては、PTPX が、糖尿病治療の標的としてのポテンシャルを有するか検討している。また、PTPX の阻害剤をスクリーニングするためのハイスループットスクリーニング(HTS)アッセイ系の確立を進めている。

2型糖尿病モデル動物である KKAy マウスと NSY マウスの肝臓における、糖尿病発症による PTPX の発現変化

- ・糖尿病の発症に伴って PTPX の発現が肝臓で上昇することが明らかになった。インスリンシグナルは PTPX の発現上昇により減弱すると推定されるので、肝臓における PTPX の発現上昇が糖尿病の病態形成に関与していると推定された。

KKAy マウスの肝臓における PTPX の発現抑制による糖尿病の改善効果

- ・特異的な siRNA を用いることで、肝臓における PTPX の発現を抑制したところ、耐糖能の改善が観察され、PTPX の活性阻害によって耐糖能の改善効果が期待できることを示している。

高脂肪高シヨ糖食によって長期間飼育した PTPX 遺伝子欠損マウスの肝臓及び血清中の脂質についての解析

- ・野生型マウスに比べて、遺伝子欠損マウスの肝臓ではトリグリセリド量 (TG) 及びコレステロール量が有意に低いことが明らかになった。加えて、欠損マウスの血清中のコレステロール値が有意に低いこと、さらに、血清中の悪玉コレステロールである LDL コレステロール値が TG 値とともに顕著に低いことが明らかになった。これらの結果は、PTPX の活性阻害によって、脂質代謝も改善できることを示唆している。

肝臓の培養細胞株を用いて、PTPX の過剰発現及び発現抑制による影響

- ・PTPX を過剰発現すると、インスリン刺激によるインスリン受容体のリン酸化及び下流分子である AKT のリン酸化が低下すること、逆に、PTPX の発現を抑制すると、糖新生の律速酵素である PEPCK1 および G6Pase の発現が減少することが明らかになった。PTPX の活性抑制によってインスリンシグナルが亢進し、また、糖新生は抑制されると推測されることから、PTPX 阻害剤は糖尿病治療薬として機能すると考えられた。

PTPX の活性抑制剤をスクリーニングするための HTS アッセイ系の確立

- ・大腸菌を用いて PTPX の酵素タンパクを調製可能であり、インスリン受容体のアミノ酸配列を有する基質 pCAP ペプチドを良い基質することを確認でき、HTS アッセイ系を確立できると考えられた。

We previously found that PTPX, a protein tyrosine phosphatase, suppressed insulin signaling *in vivo*. In this project, we investigated the potential of PTPX as a drug target for the treatment of type 2 diabetes. We also attempted to develop a high-throughput screening (HTS) system to identify PTPX inhibitors.

Expression of PTPX expression in the liver of two model mouse lines KKAY and NSY mice with type 2 diabetes

- We found that mRNA and protein expression levels of PTPX were increased in both mice when diabetes were developed as compared with healthy stage. Because PTPX inhibits insulin signaling, it is conceivable that the increase of PTPX expression may be a cause of diabetes development.

The effect of suppression of PTPX expression in the liver on diabetes in KKAY mice.

- When PTPX expression was suppressed in the liver by using specific siRNA, glucose tolerance was improved in KKAY mice. These results suggest that inhibitors of PTPX ameliorate glucose tolerance in diabetes patients.

Lipid levels in the liver and serum of *PTPX*-deficient mice fed high-fat/high-sucrose diet (HF/HSD) for a long period

- Total triglyceride and cholesterol contents were significantly lower in *PTPX*-deficient mice than wild-type mice. Furthermore we found that total cholesterol levels in serum were significantly low in *PTPX*-deficient mice compared with wild-type mice, along with prominently lower levels of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, so-called “bad” cholesterol, and lower levels of LDL triglyceride. These results suggest that PTPX inhibitors also make improvement in lipid metabolism.

The effects of overexpression or suppression of PTPX

- We investigated using a hepatocyte cell line and adenovirus vectors. When PTPX was overexpressed, the insulin-induced phosphorylation of insulin receptor and AKT, a downstream effector of insulin signaling, was attenuated. On the other hand, suppression of PTPX expression led to downregulation of the expression of the key enzymes of gluconeogenesis, PEPCK1 and G6Pase. These results suggest that inhibitors of PTPX can function as drugs for diabetes by enhancing insulin signaling and suppressing gluconeogenesis.

HTS system to identify PTPX inhibitors.

- We prepared active PTPX proteins by using a recombinant *E. coli*. We demonstrated that the PTPX enzyme solution efficiently dephosphorylates a pCAP-containing substrate peptide carrying the amino acid sequence for the insulin receptor. These results indicate that HTS system to identify PTPX inhibitors can be developed by using the PTPX enzyme produced by *E. coli*.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし