

審査の結果の要旨

論文題目 : Acetyl-CoA Carboxylase 2 (ACC2) の阻害に基づく抗糖尿病作用に関する研究

氏名 高木 寛之

インスリン抵抗性は2型糖尿病の主要な成因の一つであり、その発症には慢性的なエネルギーの過剰供給により引き起こされる異所性脂肪の蓄積が関与している。特に骨格筋における細胞内脂質 (IMCL, Intramyocellular lipid) の蓄積はインスリン抵抗性と密接に関連する。エネルギー供給が慢性的に過剰な状態では、ミトコンドリアにおける脂肪酸の酸化機能が障害され、IMCLの蓄積が引き起こされる。したがって、骨格筋における脂肪酸酸化の亢進と IMCL 蓄積の解消は、糖尿病治療の新たなアプローチとして期待される。Acetyl-CoA carboxylase 2 (ACC2) は、ミトコンドリア近傍のアセチル CoA をマロニル CoA へ変換する酵素であり、主に骨格筋などの脂肪酸酸化が活発な組織に発現する。ACC2 由来のマロニル CoA は、脂肪酸のミトコンドリアへの流入を阻害するため、ACC2 は細胞内の脂肪酸酸化を負に制御する。ACC2 の阻害は脂肪酸酸化の亢進を介した骨格筋 IMCL 量の低下、さらにはインスリン抵抗性の改善が期待され、ACC2 は2型糖尿病治療薬の新規標的分子として注目される。しかしながら、①細胞内エネルギー代謝の競合機構により、脂肪酸酸化の過剰な亢進はグルコース利用の低下を引き起こす、という仮説が先行研究により提唱されていること、および②ACC2 阻害剤の抗糖尿病作用に関する薬理学的研究が不十分であることから、ACC2 阻害による脂肪酸酸化の亢進が抗糖尿病作用を示すかについては、未だ結論付けられていない。本研究において、高木は、ACC2 阻害による脂肪酸酸化の亢進が糖尿病治療の新たなアプローチとして有用であるかを検証するために、①および②の研究課題に対して、ACC2 ノックアウト (KO) マウスを用いた検討および新規 ACC2 選択的阻害剤を用いた検討をそれぞれ実施した。

1. ACC2 阻害と細胞内のグルコース/脂肪酸の競合機構に関する検証

グルコースと脂肪酸のエネルギー基質としての競合機構を説明する代表的なモデルとして、Glucose-fatty acid cycle が存在する。このモデルでは、過剰な脂肪酸酸化により生じるミトコンドリア内のアセチル CoA 蓄積がグルコース代謝経路を抑制すると考えられており、脂肪酸酸化の亢進が糖代謝に悪影響を及ぼす可能性を示唆する仮説となっている。この仮説に基づくこと、ACC2 阻害による脂肪酸酸化の亢進は骨格筋 IMCL 量の減少が期待される一方で、細胞内のグルコース代謝に対し抑制的に作用する可能性も考えられる。先行研究により、ACC2 の遺伝的欠損は骨格筋の脂質量低下と全身のインスリン抵抗性改善をもたらすことが報告されているが、ACC2 の阻害が細胞内グルコース代謝との競合機構にどのような影響を与えるかに関しては研究されていない。本研究において、高木は、新規に作製した ACC2 KO マウスのエネルギー代謝について、グルコースと脂肪酸の競合に焦点を当て解析し、ACC2 を介した脂肪酸酸化の調節機構が細胞内グルコース代謝経路に与える影響について検証した。

はじめに、ACC2 KO マウスの全身のエネルギー代謝について野生型マウスと比較したところ、脂肪酸酸化の亢進に加えグルコース負荷試験において糖利用の亢進が確認された。次に、骨格筋の脂肪酸およびグルコース代謝物について詳細に検討した。ACC2 KO マウスの骨格筋において、長鎖アシル CoA 量の減少および長鎖アシルカルニチン量の増加、IMCL 量の顕著な低下といった、脂肪酸酸化の亢進を示唆する代謝物変動が確認された一方で、解糖系代謝物やグリコーゲンの蓄積は見られなかった。さらに、グルコース利用との競合機構で重要となるアセチル CoA についても蓄積はなく、むしろ有意に低下していた。そこで、ミトコンドリア内アセチル CoA の主要な代

謝経路であるクエン酸回路やアセチルカルニチン生成経路について解析したところ、ACC2 KO マウスの骨格筋において、クエン酸回路の代謝物量の増加および酵素活性の亢進が確認され、さらにアセチルカルニチン量の増加およびその生成酵素の活性についても亢進が確認された。これらの結果より、ACC2 阻害は脂肪酸酸化とともにアセチル CoA 代謝の亢進を引き起こすため、Glucose-fatty acid cycle で問題となるアセチル CoA の蓄積が起こらず、その結果、糖利用が抑制されずに IMCL 量が低下することが示唆された (図 1)。

次に、糖尿病病態における ACC2 欠損の影響について検証するため、高脂肪食を 3 か月間負荷したマウスを用いて解析を実施したところ、ACC2 KO マウスは高脂肪食負荷により誘導される骨格筋の IMCL 蓄積および全身のインスリン抵抗性に対し耐性を示した。また、通常食条件の解析と同様に、骨格筋アセチル CoA 量の低下、クエン酸回路およびアセチルカルニチン生成経路の亢進が確認された。以上より、病態時においても ACC2 阻害を介した脂肪酸酸化の亢進はアセチル CoA 代謝と連動しており、骨格筋 IMCL 量の低下および抗糖尿病作用を示すことが明らかとなった。

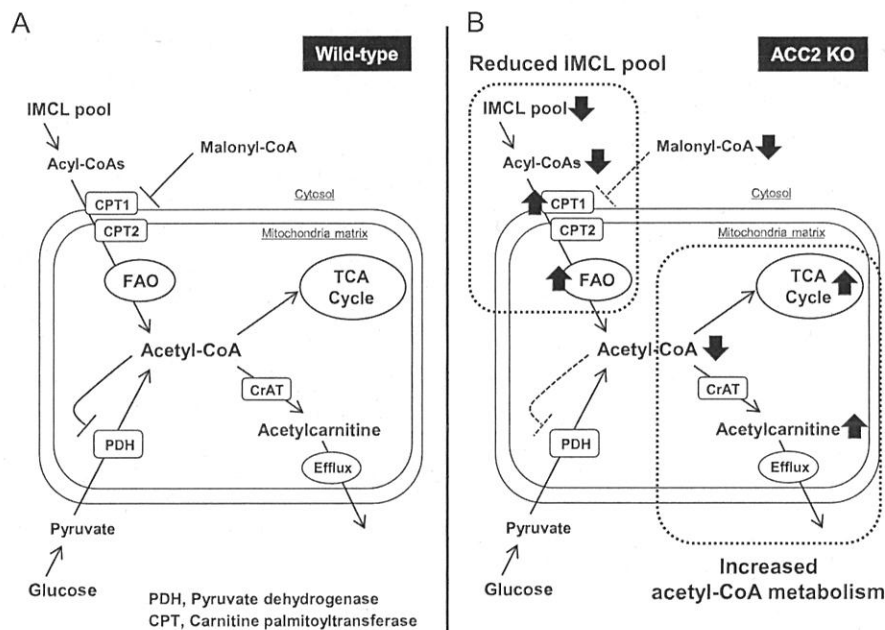


図 1. ACC2 欠損による骨格筋エネルギー代謝経路の変化

(A) IMCL は脂肪酸酸化 (FAO, Fatty acid oxidation) によりアセチル CoA まで分解されるが、アセチル CoA が蓄積すると PDH は阻害されるためグルコース代謝が抑制される。(B) ACC2 欠損はマロニル CoA の低下と CPT1 の活性化を介しアシル CoA の FAO への流入を増加させるため、IMCL の分解が亢進する。加えて、ACC2 欠損はクエン酸回路 (TCA cycle) とアセチルカルニチン生成をともに活性化させるため、FAO の亢進状態においてもアセチル CoA の蓄積が生じない。結果、ACC2 欠損状態において IMCL 分解の亢進はグルコース代謝の抑制をもたらさない。

2. 新規 ACC2 選択的阻害剤を用いた薬理的検証

これまでに抗糖尿病作用が報告されている既存の ACC2 阻害剤については、ACC2 阻害とは非依存的にてんかんの発症あるいは血中トリグリセライドの低下をもたらすことが報告されており、ACC2 の薬理的阻害そのものが抗糖尿病作用を示すかについては、結論付けられていない。本研究において、高木は、新たに創製された ACC2 選択的阻害剤である Compound 2e (図 2) を用いて、既報の ACC2 阻害剤の有するオフターゲット作用の有無および ACC2 阻害に基づいた抗糖尿病作用について検証した。

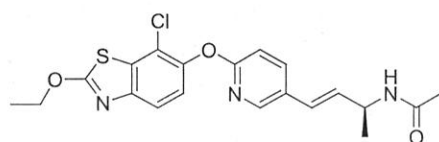


図 2. Compound 2e の化学構造

Compound 2e の高用量 (50 mg/kg/day) を Sprague-Dawley ラットに 4 日間反復投与 (once per day) したところ、中枢症状も含め、重大な毒性所見は認められなかった。次に、Compound 2e を糖尿病モデルマウスである db/db マウスに単回投与したところ、骨格筋において、マロニル CoA 量の低下 (1.7 mg/kg 投与)、長鎖アシルカルニチン量の増加および IMCL 量の低下 (2.5 mg/kg 投与) といった ACC2 阻害に起因する脂質代謝物の変動が確認された。続いて、ACC2 阻害非依存的な血中トリグリセライド低下作用の有無について、ACC2 KO マウスを用いた 4 日間反復投与 (twice per day) 試験により検証した。既報の ACC2 阻害剤である A-908292 投与群 (15 mg/kg) では、媒体投与群と比較して血中トリグリセライド濃度の有意な低下が確認された一方で、Compound 2e 2.5 mg/kg 投与群では、血中トリグリセライド濃度の低下は確認されなかった。これらの結果より、Compound 2e は、既報の ACC2 阻害剤の有するオフターゲット作用を示さない条件において、ACC2 阻害作用を示すことが確認された。最後に、Compound 2e の ACC2 阻害作用に基づいた抗糖尿病作用について検証するため、Compound 2e の 1.7 mg/kg を db/db マウスに長期反復投与 (twice per day) したところ、血糖値および HbA1c 値の有意な改善が確認され、高インスリン正常血糖クランプ試験により全身のインスリン抵抗性の顕著な改善が確認された。以上、Compound 2e を用いた検証により、ACC2 の薬理的な阻害は、既報の ACC2 阻害剤が有するオフターゲット作用とは独立して、骨格筋 IMCL 量の低下、高血糖状態の改善および全身インスリン抵抗性の改善をもたらすことが明らかとなった。

以上、高木は、ACC2 KO マウスを用いたグルコースおよび脂肪酸代謝経路の研究により、ACC2 阻害はグルコース代謝経路を抑制せずに脂肪酸酸化を亢進するメカニズムを有し、高脂肪食誘導性の骨格筋 IMCL 蓄積およびインスリン抵抗性に対し抑制的に作用することを明らかとした。さらに、Compound 2e を用いた研究により、ACC2 の薬理的阻害は、遺伝的欠損と同様に、骨格筋 IMCL 量の低下作用および抗糖尿病作用を有することを明らかとした。本研究の結果は、ACC2 阻害に基づく脂肪酸酸化の亢進が、骨格筋 IMCL 蓄積の解消とインスリン抵抗性の改善に有効であり、2 型糖尿病の新たな治療法となる可能性を示す有力なエビデンスと考えられる。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。