

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 8 年 3 月 31 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 山口大学
職 名 講師
研究代表者 田口 昭彦

下記のとおり令和7年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:)

1. 共同研究課題名	体内時計の調和による新たな糖尿病治療戦略の確立		
2. 共同研究目的	本共同研究は、概日リズム制御因子 E4BP4 を標的とした革新的な糖尿病治療薬の開発を目指すものである。現代社会における生活リズムの乱れが代謝疾患の発症リスクを高めることから、体内時計システムを標的とした新しい治療戦略の確立が求められている。本研究では、山口大学が持つ E4BP4 研究の専門性と群馬大学が有する膵β細胞研究の知見を組み合わせ、候補化合物の同定から機能評価、作用機序の解明まで、両大学の強みを活かした研究を展開する。このように、本研究は基礎研究の知見を臨床応用へと橋渡しする重要な取り組みであり、代謝疾患の新規治療法開発に貢献するものである。		
3. 共同研究期間	令和7年4月1日 ~ 令和8年3月31日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属等	職名等	役 割 分 担
田口 昭彦	山口大学医学部附属病院 第三内科	講師	研究の総括 Dry スクリーニング
(分担研究者)			
太田 康晴	山口大学大学院医学系研究科	教授	研究のスーパーバイズ
永尾 優子	山口大学健康科学センター	助教	データ解析・Wet スクリーニング、マウス実験
寄元 海渡	山口大学医学部医学科	医学科 5 年生	データ解析・Wet スクリーニング、マウス実験
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御分野	氏 名 藤谷 与士夫

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

(課題番号:)

6. 共同研究計画

本共同研究は、概日リズム制御因子 E4BP4 を標的とした革新的な糖尿病治療薬の開発を目指し、山口大学が持つ E4BP4 研究の専門性と群馬大学生体調節研究所が有する膵β細胞研究の知見を融合させた創薬研究を展開するものである。現代社会における生活リズムの乱れが代謝疾患の発症リスクを高めることが明らかになりつつあり、体内時計システムを標的とした新しい治療戦略の確立が求められている。本研究では、以下の計画に基づき研究を推進した。

- (1) 理化学研究所のスーパーコンピュータ「富岳」を用いて、E4BP4 タンパク質の立体構造(PDB:8K89)に基づく大規模インシリコスクリーニングを実施する。分子ドッキングソフトウェア myPresto および AutoDock を使用し、E4BP4 の DNA 結合部位ならびに二量体形成・調節部位の双方を標的として、約 30 万化合物のライブラリーから結合親和性の高い低分子化合物を網羅的に探索する。なお、本スクリーニングは AMED-BINDS 事業(課題番号 6538)の支援を受け、東京大学大学院薬学系研究科附属 創薬機構との連携のもとで実施する。
- (2) 同定された候補化合物について、山口大学において確立済みの D-box Luc レポーターアッセイ系を用いて E4BP4 の転写抑制活性に対する阻害効果を評価する。本アッセイ系は MIN6 細胞に D-box エlement 制御下のルシフェラーゼレポーターを導入したものであり、384 ウェルプレート対応で Z' 値 0.7 以上の高い再現性を有するハイスループットスクリーニング系である。さらに、培養膵β細胞株 MIN6 および CRISPR-Cas9 により樹立した WFS1-KO MIN6 細胞、E4BP4-KO MIN6 細胞を用いて、候補化合物のインスリン分泌能への影響を多角的に検討する。
- (3) 有望な候補化合物については、群馬大学生体調節研究所の膵β細胞研究の専門性を活かし、単離膵島を用いたグルコース応答性インスリン分泌試験、共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内 Ca²⁺イメージング、カルシウム蛍光光度計による定量的 Ca²⁺シグナル解析、および qRT-PCR による時計遺伝子群・インスリン関連遺伝子の発現解析等の詳細な機能評価を実施する。特に、E4BP4 とそのカウンターパートである DBP による D-box 依存的転写制御への影響を分子レベルで解明することを目指す。
- (4) 藤谷教授との定期的な情報交換を通じ、膵β細胞における E4BP4 の機能に関する最新知見を共有するとともに、候補化合物の評価戦略および実験計画の最適化に反映させる。群馬大学生体調節研究所は膵β細胞研究において世界的な実績を有しており、同研究所が保有する薬液投与システム、小動物テレメータシステム等の設備を活用した将来的な in vivo 評価も視野に入れて研究を推進する。

7. 共同研究の成果

本共同研究課題において、生体調節研究所との共同研究が貢献した内容についても具体的に記載してください。

本年度は、E4BP4 を標的とした糖尿病治療薬の候補化合物の同定を主目的として、インシリコスクリーニングの完遂および候補化合物の in vitro 評価に向けた実験基盤の整備を中心に研究を推進し、以下の成果を得た。

- (1) スーパーコンピュータ「富岳」を用いた大規模インシリコスクリーニングの完了
理化学研究所のスーパーコンピュータ「富岳」上で、E4BP4 タンパク質の結晶構造(PDB:8K89)を基盤とした大規模分子ドッキングシミュレーションを実施し、本年度中にスクリーニングを完了した。myPresto および AutoDock を用いて、E4BP4 の DNA 結合部位と二量体形成・調節部位の双方を標的とした解析を行い、約 30 万化合物のライブラリーから結合親和性スコアの上位化合物として約 1,000 個の E4BP4 結合候補化合物を同定することに成功した。同定された候補化合物は、E4BP4 の DNA 結合部位に作用して E4BP4-DNA 間相互作用を阻害する化合物群と、二量体形成・調節部位に結合して E4BP4 の構造安定性に影響を及ぼすと予測される化合物群に大別された。これらの結果は、E4BP4 に対する低分子化合物の結合様式には複数のメカニズムが存在し得ることを示しており、今後の構造活性相関研究の基盤となる重要な知見である。現在、候補化合物の購入を完了しており、次年度以降の in vitro 評価に向けた準備を整えた段階である。

(2) 候補化合物評価のための Wet 実験系の整備と最適化

候補化合物の *in vitro* 評価に向けて、山口大学において D-box Luc レポーターアッセイ系の最適化を進めた。本アッセイ系は、MIN6 細胞に D-box エlement 制御下のルシフェラーゼレポーターを導入し、E4BP4 の転写抑制活性を定量的に測定するものである。E4BP4 をウイルスベクターで発現させた場合をポジコン、LacZ 発現をネガコンとして、Z' 値 0.7 以上の高い再現性を確認し、384 ウェルプレートでのハイスループットスクリーニングに対応可能であることの検証を開始した。また、CRISPR-Cas9 を用いて樹立した E4BP4-KO MIN6 細胞、さらにマクロファージ細胞株 RAW264.7 の維持・拡大培養を行い、候補化合物の多面的評価に対応できるスクリーニング体制を確立した。

(3) 群馬大学生体調節研究所との連携

藤谷教授とはメールおよび学術集会での対面を通じて情報交換を行い、本共同研究の進捗共有および今後の実験方針について協議を行った。特に、インシリコスクリーニングにより同定された候補化合物の評価戦略に関して、藤谷教授の膵β細胞研究における豊富な経験に基づく助言を得た。具体的には、単離膵島を用いたインスリン分泌試験における至適条件の設定や、候補化合物の細胞毒性評価の優先順位、将来的な *in vivo* 評価のエンドポイント設計(耐糖能試験、インスリン分泌動態等)について有益な議論を行った。次年度以降の候補化合物の機能解析において本格的な共同実験を展開する計画である。本共同研究の枠組みが、両機関間の研究ネットワークの強化に寄与していると考えられる。

(4) 今後の展望

次年度は、購入済みの 1,000 補化合物について D-box Luc アッセイによる一次スクリーニングを実施し、E4BP4 阻害活性 (IC₅₀) を指標に有望化合物を 10 化合物程度に絞り込む。さらに、QikProp による ADMET 予測および Lipinski's rule of five に基づく薬物動態学的評価を行い、リード化合物の選定を進める。選定されたリード化合物については、群馬大学生体調節研究所において単離膵島を用いたグルコース応答性インスリン分泌試験および Ca²⁺ シグナル解析を実施し、E4BP4 阻害剤の膵β細胞機能に対する効果を詳細に検証する計画である。

8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り記載してください。なお、論文の場合は、PDF ファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係: kk-msomu4@ml.gunma-u.ac.jp

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

該当なし

② この共同研究に基づくとの記載のある論文

該当なし

③ 学会発表を行った主なもの3件以内(学会名, 開催日, 演題)

第 68 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2025 年 5 月 29 日, 出力系時計遺伝子 E4BP4/DBP による代謝制御の新展開

④ 本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

- ・学術集会において対面で、候補化合物の評価戦略および *in vitro* スクリーニングの優先順位について協議を行った。
- ・単離膵島を用いたインスリン分泌試験の至適条件や Ca²⁺ イメージングの手法について藤谷教授より助言を得た。
- ・次年度以降の山口大学における機能解析の実験計画について意見交換を行った。