

新規インスリン分泌促進薬 **GPR40** 作動薬 **fasiglifam** の
薬効薬理研究

2016 年

伊藤 亮

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、報文内容の転載許可は、各出版社から取得済みである。

- 1) Yoshiyuki Tsujihata, Ryo Ito, Masami Suzuki, Ayako Harada, Nobuyuki Negoro, Tsuneo Yasuma, Yu Momose, Koji Takeuchi : TAK-875, an orally available G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonist, enhances glucose-dependent insulin secretion and improves both postprandial and fasting hyperglycemia in type 2 diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, **339**, 228-37 (2011). [第1章および第3章]
- 2) Ryo Ito, Yoshiyuki Tsujihata, Masami Suzuki, Kazumasa Miyawaki, Kae Matsuda, Koji Takeuchi : Fasiglifam/TAK-875, a Selective GPR40 Agonist, Improves Hyperglycemia in Rats Unresponsive to Sulfonylureas and Acts Additively with Sulfonylureas. *J Pharmacol Exp Ther.*, **357**, 217-27 (2016). [第2章]
- 3) Ryo Ito, Yoshiyuki Tsujihata, Kae Matsuda-Nagasumi, Ikuo Mori, Nobuyuki Negoro, Koji Takeuchi : TAK-875, a GPR40/FFAR1 agonist, in combination with metformin prevents progression of diabetes and β -cell dysfunction in Zucker diabetic fatty rats. *Br J Pharmacol.*, **170**, 568-80 (2013). [第3章]

目次

序論

第1章 GPR40 作動薬 fasiglifam のグルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用

第1節 緒言

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物
2. 使用細胞
3. 細胞内イノシトールリン酸産生の測定
4. 細胞内カルシウム濃度測定
5. 動物
6. *In vitro* インスリン分泌試験
7. 経口グルコース負荷試験
8. 空腹時血糖に対する作用の検討
9. 統計解析

第3節 結果

1. 内因性リガンド脂肪酸との GPR40 アゴニスト活性の比較
2. *In vitro* グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用
3. グルコース濃度依存性の細胞内メカニズム解析
4. *In vivo* インスリン分泌促進作用と血糖低下作用

第4節 考察

第2章 GPR40 作動薬 fasiglifam と SU 薬との差別化および併用投与の可能性の検討

第1節 緒言

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物
2. 動物
3. 経口グルコース負荷試験 (単独作用の比較試験)
4. 二次無効リスクの評価
5. SU 二次無効モデルを用いた検討
6. 経口グルコース負荷試験 (併用効果の検討)
7. 非絶食正常血糖に対する作用の検討
8. 血漿パラメーターの測定
9. 統計解析

第3節 結果

1. SU 薬と血糖低下作用の比較
2. 長期投与による二次無効リスクの検討
3. SU 二次無効を呈する糖尿病モデルラットにおける作用
4. SU 薬との併用効果

第4節 考察

第3章 GPR40 作動薬 fasiglifam の脂肪毒性への関与についての検討

第1節 緒言

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物
2. 使用細胞
3. インスリン分泌および細胞内インスリン含量の測定
4. カスパーゼ 3/7 活性の測定
5. 動物
6. 反復投与試験
7. 血漿および膵パラメーターの測定
8. 免疫組織化学的解析
9. 統計解析

第3節 結果

1. 膵 β 細胞における長期暴露の影響
2. 高脂血症を呈する糖尿病モデルラットにおける長期投与効果
3. インスリン抵抗性改善薬メトフォルミンとの併用効果

第4節 考察

総括

引用文献

謝辞

序論

2 型糖尿病の発症や進展の一因に、膵 β 細胞からのインスリン分泌能低下が強く関与していることが知られている (1)。そのため、スルフォニルウレア (SU) 薬や速効型インスリン分泌促進薬などの経口インスリン分泌促進薬が、これまで糖尿病治療薬の中でも重要な役割を占めてきた (2)。一方でこれらの薬剤は、血中グルコース濃度非依存的にインスリン分泌を促進するため低血糖を引き起こすことが懸念されている (3)。また、長期投与では膵機能を低下させる (二次無効) ことも臨床現場で問題となっている (4)。このような背景から、近年、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進する薬剤として dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) 阻害薬 (5) や glucagon-like peptide-1 (GLP-1) アナログ (6) が新しいインスリン分泌促進薬として注目を集めている。しかしながら、DPP4 阻害薬は食後に分泌される内因性の GLP-1 および glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) に作用が依存するため、その薬効がマイルドであること、GLP-1 アナログは注射剤であり費用や利便性の観点から十分でないことなど、改善すべき課題も残されている。また、様々な糖尿病治療薬が使用されているにも関わらず、多くの糖尿病患者ではいまだ十分な血糖コントロールが得られていないのが現状であり (7)、安全かつ新たな作用機序を有する薬剤の開発が望まれている。

遊離脂肪酸は栄養素としての役割に加えて、様々な細胞イベントに関与していることが知られている。すなわち、空腹時に上昇する血中遊離脂肪酸は、食後のインスリン分泌を増強させる作用を担っており、食事により吸収された糖質を速やかにエネルギーとして貯蔵するのに役立っている。GPR40/FFAR1 は、内因性リガンドの不明なオーファン G タンパク共役型受容体 (GPCR) として 1997 年にクローニングされた (8)。2003 年、武田薬品工業を含む 3 つの研究グループからほぼ同時期に、GPR40 が中鎖脂肪酸を内因性リガンドとし、膵 β 細胞に高発現して遊離脂肪酸によるインスリン分泌促進作用を介していることが報告された (9-11)。この発見により、長年にわたり不明であった脂肪酸がインスリン分泌を増強するメカニズムが明らかとなった。GPR40 は主に $G_{\alpha q}$ に共役する GPCR であり、受容体活性化は細胞内でホスホリパーゼ C (PLC) を活性化し、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) を分解し、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DAG) を産生する。生じた DAG は、プロテインキナーゼを活性化し、IP₃ は小胞体 (ER) に作用して、ER からのカルシウム放出を引き起こし、細胞内のカルシウム濃度を上昇させる。膵 β 細胞では細胞内カルシウム濃度上昇は、インスリン分泌と直結することから、結果としてインスリン分泌が促進される (10,12,13)。GPR40 を介したインスリン分泌機構は、既存薬とはまったく異なることから、GPR40 が新規インスリン分泌促進薬のターゲット分子になり得ると考えられた。

Fasiglifam (TAK-875) は武田薬品工業で創製された GPR40 作動薬である (14)。ヒト GPR40 を強制発現した Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用いた細胞内カルシウムアッセイにおいて、EC₅₀ 値が 14 nM と強力なアゴニスト活性を示した (14)。最近、X 線結晶構造解析により fasiglifam とヒト型 GPR40 の共結晶構造が明らかとなり、内因性リガンドが結合するオルソステリック結合部位とは異なる特有の結合部位に fasiglifam が結合していることが示された (15)。このような特

徴が薬理作用としてどのように反映されるか、脂肪酸と何が異なるのかに関しては、薬理的観点からも関心が高い。本研究において、著者は、*in vitro* および *in vivo* の詳細な薬理的検討から、**fasiglifam** がグルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進するというインスリン分泌促進薬として最も重要な特徴を明らかにした。また、**fasiglifam** の様々な病態モデルへの長期投与試験を通して、既存薬が無効な病態に対しても有効性を示すこと、内因性リガンドの脂肪酸の有する有害作用 (脂肪毒性) を惹起しないことなどを明らかにし、その高い安全性を証明した。実際、**fasiglifam** は2型糖尿病患者を対象とした臨床試験においても有効性が確認されており (16)、本研究成果はそれに至る創薬過程に大きく貢献するものである。本研究成果を以下に3章にまとめて報告する。

第1章

GPR40 作動薬 fasiglifam のグルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用

第1節 緒言

序論にも述べたように、GPR40 を介したインスリン分泌機構は既存薬とは異なることから、GPR40 作動薬が新たなインスリン分泌促進薬として期待された。これまで、GPR40 の生理機能を明らかにするため、*in vitro* において詳細な解析が行われてきたが、その多くにおいてリガンドに脂肪酸が用いられてきた (10,12,13)。しかしながら、これら脂肪酸の中には GPR40 以外の細胞膜上の GPCR に対して作用を有するものもあり (17)、また、細胞内で代謝されることで別の生理活性物質に変換されることから (18)、GPR40 非依存的な作用も含まれる。実際、GPR40 欠損マウスの単離膵ラ氏島を用いた検討から、GPR40 が脂肪酸刺激インスリン分泌の約 50% を担っていることが報告されている (19,20)。したがって、脂肪酸を用いた解析には限界があり、GPR40 の機能をより理解するためには、選択的な GPR40 作動薬を用いた検討が必要である。

ヒト GPR40 を強制発現した CHO 細胞を用いた細胞内カルシウムアッセイにおいて、GPR40 作動薬 fasiglifam (TAK-875、Figure 1) は、他の類似する脂肪酸受容体 (GPR41、43、120) には作用せず、高い選択性を有することが示された (14)。また、ラットおよびイヌにおける高い経口吸収性も確認された (14)。本研究では、fasiglifam の詳細な *in vitro* の解析から、脂肪酸よりも強力なアゴニスト活性を示すとともに、グルコース濃度依存的なインスリン分泌促進活性を有することを明らかにした。これらの特徴は *in vivo* においても保持されており、その結果、低血糖を誘発することなく血糖低下作用を達成し得ることを見出したので報告する。

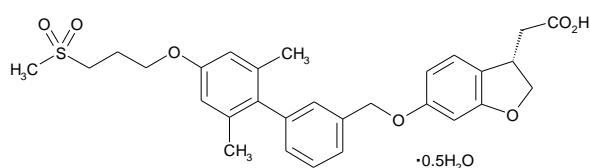


Figure 1. Chemical structure of fasiglifam.

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物

Fasiglifam、[(3S)-6-({2',6'-dimethyl-4'-[3-(methylsulfonyl)propoxy]biphenyl-3-yl}methoxy)-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl]acetic acid hemi-hydrate (Figure 1) は武田薬品工業株式会社

Chemistry, Manufacturing and Control Center にて合成された。グリベシクリドは和光純薬株式会社 (大阪、日本)、ナテグリニドは Toronto Research Chemicals, Inc. (North York, Canada) より購入された。 *In vitro* 試験に際しては、fasiglifam はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用した。 *In vivo* 試験に際しては、fasiglifam は 0.5% メチルセルロース (MC) 溶液に懸濁し、示された用量で投薬した。

2. 使用細胞

ヒトおよびラット GPR40 発現 CHO 細胞およびその対照 CHO 細胞 (14) は、10% 透析および非働化処理済ウシ胎仔血清 (Thermo Fisher Scientific, Australia)、100 IU/ml penicillin および 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA) 含有 α -minimum essential medium で培養した。ラットインスリノーマ INS-1 833/15 細胞は Dr. Christopher B. Newgard (Duke University Medical Center, Durham, NC) より供与され、L-glutamine (Invitrogen)、1 mM sodium pyruvate (Invitrogen)、10 mM HEPES (Invitrogen)、10% 非働化処理済ウシ胎仔血清 (Thermo Fisher Scientific)、55 µM 2-mercaptoethanol (Invitrogen)、100 IU/ml penicillin および 100 µg/ml streptomycin 含有 RPMI 1640 培地 (Invitrogen) で 37°C、5%CO₂ 環境下で培養した。

3. 細胞内イノシトールリン酸産生の測定

細胞内イノシトールリン酸濃度は、IP-One ELISA kit (Cisbio, Bedford, MA) を用いて定法に従って測定した。CHO 細胞あるいは INS-1 833/15 細胞をそれぞれ 8×10^4 あるいは 5×10^4 cells/well の細胞密度で 96-well plate に播種し、一晚培養した。培地を除去後、化合物を含む stimulation buffer (146 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 5.5 mM グルコース、50 mM LiCl, pH 7.4) で 37°C で 1 時間培養した。INS-1 細胞を用いた実験では、1、3 あるいは 10 mM のグルコースを含む stimulation buffer を用いた。細胞溶解液を添加し細胞を溶解し、37°C で 30 分培養した後、細胞内 IP 濃度を測定した。EC₅₀ 値は logistic regression analysis (SAS Institute, Cary, NC) によって算出された。

4. 細胞内カルシウム濃度測定

INS-1 833/15 細胞は 5×10^4 cells/well の細胞密度で poly-D-lysine-coated 96-well black plate で 1 晩培養した。1 µM Fura-2 acetoxymethyl ester (同仁科学研究所、熊本、日本)、0.025% pluronic F-127 (Invitrogen)、1 mM グルコースおよび 1% ウシ胎仔血清を含む Krebs-Ringer-bicarbonate HEPES buffer (KRBH) (loading buffer) で 37°C で 30 分培養した後、Fura-2 acetoxymethyl ester 非含有 loading buffer で細胞を洗浄した。細胞内カルシウム濃度は、1、3 および 10 mM グルコース含有 KRBH を添加後、細胞を 340 と 380 nm で交互に励起し、cooled charge-coupled device camera を用いて 510 nm の emission シグナルとして検出され、AquaCosmos (浜松ホトニクス、浜松、日本) によってその ratio が算出された。グルコース応答性のカルシウム変化が観察された後、化合物および各濃度のグルコースを含む等量の KRBH が添加され、ランダムに選択された 30 細胞の平均 340/380 fluorescence ratio が計算された。

5. 動物

雄性 neonatally streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats 1.5 days after birth (N-STZ-1.5 ラット) は生後 1-2 日齢の Wistar Kyoto (WKY) ラットに 120 mg/kg の STZ を皮下投与して作製した (21)。N-STZ-1.5 ラットおよび対照 WKY ラットは武田ラビックス (大阪、日本) より取得した。雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット、Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラットおよびその対照 Zucker Lean (ZL) ラットは日本チャールスリバー (横浜、日本) から購入した。動物の取り扱いおよび実験は、武田実験動物倫理委員会の定める基準に準じて実施した。すべてのラットは CE-2 (日本クレア、東京、日本) 給餌および自由飲水条件下で飼育した。

6. *In vitro* インスリン分泌試験

INS-1 833/15 細胞は 5×10^4 cells/well の細胞密度で 96-well plate で 1 晩培養した。細胞は 1 mM グルコース含有 KRBH で 37°C で 2 時間プレインキュベーションした後、化合物および示された濃度のグルコースを含む KRBH でさらに 2 時間培養した。各 well から上清を回収し、分泌されたインスリン濃度をラットインスリン ELISA (森永生科学研究所、横浜、日本) を用いて定法に従って測定した。腓ラ氏島を用いた試験においては、雄性 SD ラット (7 週齢) をペントバルビタール (50 mg/kg、大日本住友製薬、大阪、日本) にて麻酔後、総胆管の十二指腸側を結紮し、肝臓側から 1 mg/mL コラゲナーゼ溶液 (和光純薬) を注入した。膵臓を単離した後、37°C で 20 分間コラゲナーゼ処理を行ない、Ficoll-Conray 液 (8.3% Ficoll PM400、11.1% Conray 400、0.0004% フェノールレッド、1 mg/mL グルコース、100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin) を用いた密度勾配遠心法により、腓ラ氏島を回収した。ラ氏島を 5.5 mM グルコース、10% ウシ胎仔血清、10 mM HEPES、100 U/mL penicillin および 100 μ g/mL streptomycin 含有 RPMI1640 培地で、37°C、1 晩インキュベートした。1 mM グルコースおよび 0.2% 脂肪酸フリーウシ血清アルブミン (和光純薬) 含有 KRBH を添加した 48 well プレートに、1well あたり腓ラ氏島を 10 個ずつ移し、30 分インキュベートした。化合物含有 KRBH を等量添加し、37°C でさらに 2 時間インキュベートした。上清を回収後、分泌されたインスリンを測定した (ラットインスリン RIA キット、Millipore、Bedford、MA)。また、残った腓ラ氏島は超音波破碎し、PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、DNA 含量を測定した。インスリン値は DNA 含量で補正した値で表記した。

7. 経口グルコース負荷試験

18 週齢の N-STZ-1.5 ラットを 1 晩絶食後、0.5% MC 懸濁液あるいは fasiglifam (1-10 mg/kg) 懸濁液を 5 mL/kg で経口投与した。化合物投与 1 時間後に、グルコース (1 g/kg) を経口投与した。グルコース負荷直前 (0 分値) および 10、30、60、120 分後に尾静脈採血し、血漿中グルコースおよびインスリンを測定した。血漿中グルコースは、自動分析装置 7080 (日立、東京、日本) で測定し、インスリンは、ラットインスリン RIA キット (Millipore) を用いて測定した。

8. 空腹時血糖に対する作用の検討

正常および 2 型糖尿病動物の空腹時血糖に対する作用を検討するため、それぞれ雄性 SD ラット (8 週齢) および雄性 ZDF ラット (12 週齢) を用いた。ZDF ラットの正常対照ラットとして、

ZL ラット (12 週齢) を用いた。1 晩絶食後、0.5% MC 懸濁液あるいは fasiglifam (30 mg/kg)、ナテグリニド (50 mg/kg)、グリベンクラミド (10 mg/kg) の 0.5%MC 懸濁液を 5 mL/kg で経口投与後、経時的に採血し、上記と同様の方法で血漿中グルコースおよびインスリンを測定した。

9. 統計解析

2 群間の比較は Student's t-test あるいは Aspin-Welch test を行った。多重比較は Dunnett's test あるいは Steel test を用いて解析した。用量依存性の評価は片側 Williams' test を用いた。すべてのデータは平均±標準偏差で示した。

第3節 結果

1. 内因性リガンド脂肪酸との GPR40 アゴニスト活性の比較

ヒトおよびラット GPR40 発現 CHO 細胞において、fasiglifam は細胞内カルシウム濃度を上昇させることが示されたが (14)、内因性リガンドである脂肪酸との直接比較は検討されていない。そこで、Gαq 共役型 GPCR のもう一つの主要な細胞内シグナルである IP₃ の代謝物イノシトール 1-リン酸 (IP) の細胞内濃度を指標に、内因性リガンドであるオレイン酸と fasiglifam のアゴニスト活性を比較した。ヒト GPR40 発現 CHO 細胞において、fasiglifam (0.01–10 μM) およびオレイン酸 (3–100 μM) はともに濃度依存的に細胞内 IP 濃度を上昇したが (Figure 2A)、GPR40 非発現 CHO 細胞においては両刺激とも細胞内 IP 産生を亢進しなかった (Figure 2B)。ヒト GPR40 発現 CHO 細胞における fasiglifam およびオレイン酸の IP 産生作用の EC₅₀ 値を算出したところ、それぞれ 0.072 μM および 29.9 μM となり、fasiglifam はオレイン酸に比して 400 倍強いアゴニスト活性を有することが明らかとなった。

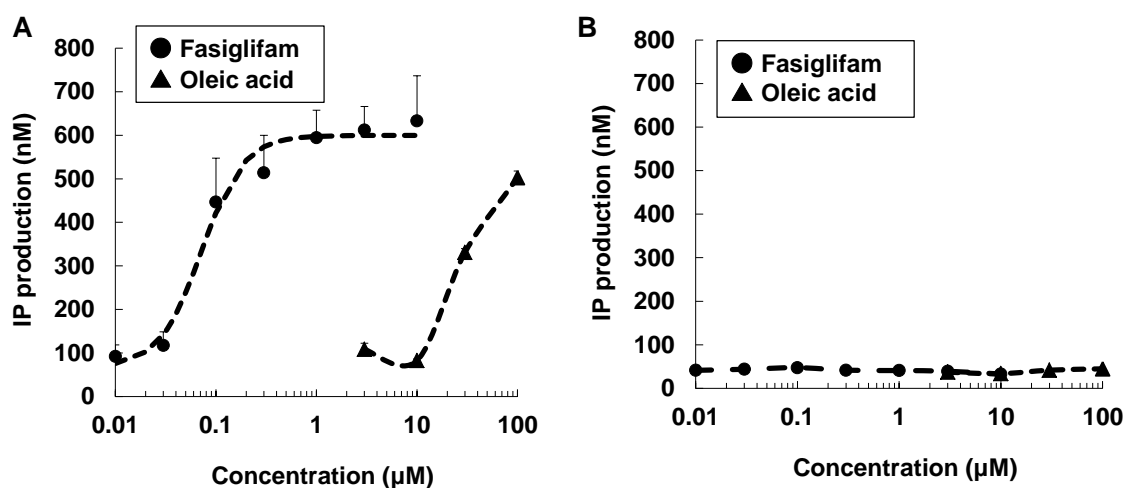


Figure 2. Fasiglifam shows potent agonist activity in CHO cells expressing human GPR40. Intracellular inositol monophosphate (IP) concentrations in CHO cells stably expressing human GPR40 (A) and control vector (B) were measured after stimulation with fasiglifam (0.01–10 μM; ●) or oleic acid (3–100 μM; ▲). Data are mean + S.D. of duplicate wells.

(出典) Tsujihata *et al. J Pharmacol Exp Ther.*, **339**, 228-37 (2011)., Figure 1

2. *In vitro* グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用

次に、ラット膵β細胞株 INS-1 833/15 細胞を用いて fasiglifam のインスリン分泌促進作用を評価した。10 mM グルコース存在下、fasiglifam (0.001-10 μM) は濃度依存的にインスリン分泌を促進し、10 μM 添加時のインスリン分泌量は非添加時の約 1.8 倍に達した (Figure 3A)。興味深いことに、fasiglifam (10 μM) によるインスリン分泌促進作用は 10 mM グルコース存在下においてのみ認められ、低グルコース環境下 (1 および 3 mM グルコース) では認められなかった (Figure 3B)。一方、SU 薬のグリベンクラミド (10 μM) によるインスリン分泌促進作用は、グルコース濃度非依存的に認められた (Figure 3B)。同様の検討をラット単離膵ラ氏島の初代培養を用いて実施した。Fasiglifam (10 μM) は 8 および 16 mM グルコース存在下においてのみ有意にインスリン分泌を促進し、3 mM グルコース存在下では作用を示さなかった (Figure 3C)。

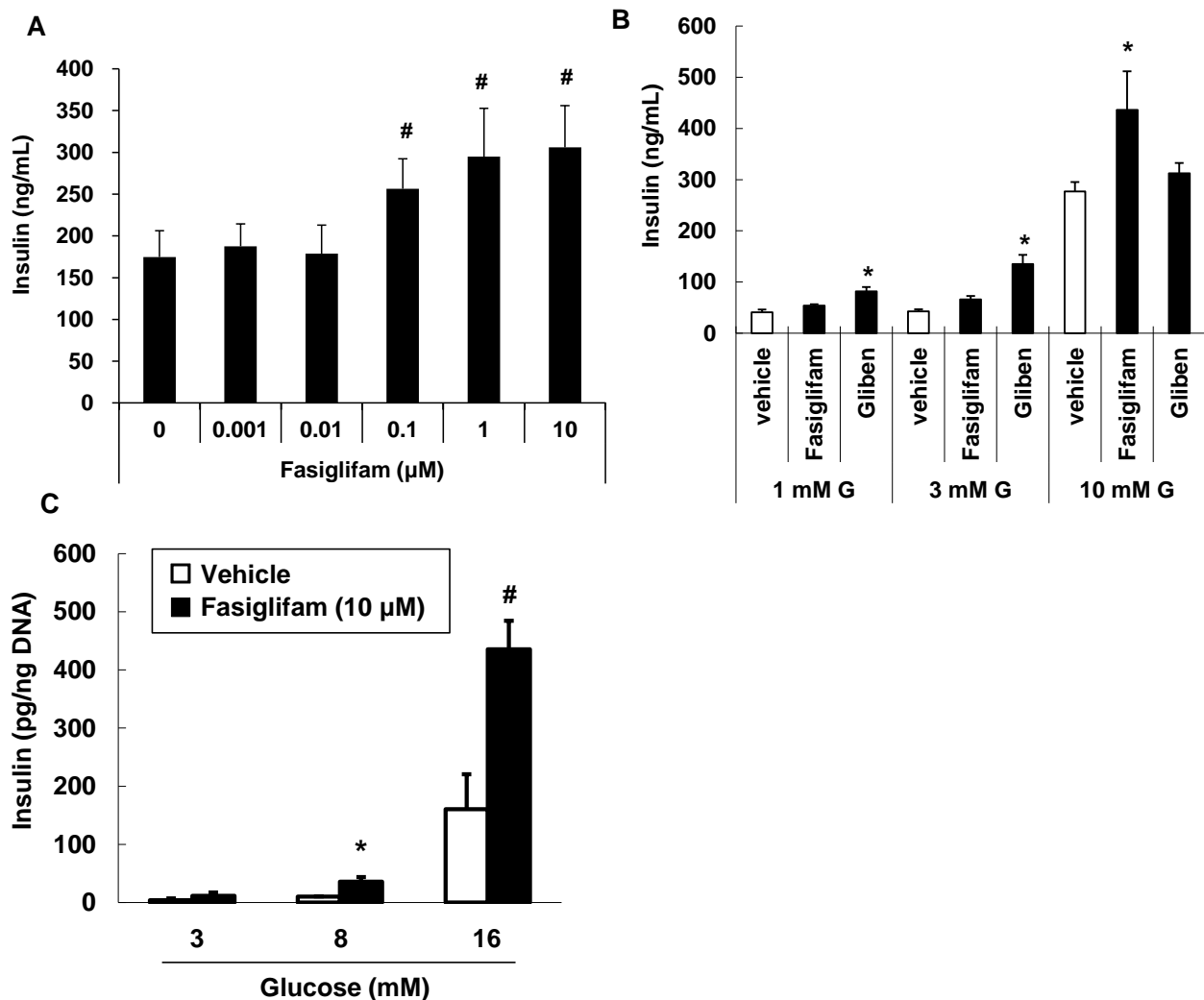


Figure 3. Fasiglifam enhances insulin secretion in INS-1 833/15 cells and primary rat islets in a glucose-concentration dependent manner. A, INS-1 833/15 cells were stimulated with 10 mM glucose in the absence or presence of fasiglifam (0.001–10 μM) for 2 h. Secreted insulin concentration in each supernatant was measured by ELISA. Data are mean + S.D. (n=3). [#]p≤0.025 versus vehicle control by one-tailed Williams' test. B, INS-1 833/15 cells were treated with 1, 3, or 10 mM glucose (G) in the absence or presence of fasiglifam (10 μM) or glibenclamide (Gliben; 10 μM) for 2 h. Empty bars, vehicle;

filled bars, fasiglifam or glibenclamide. Data are mean + S.D. (n=3). *p<0.01 versus vehicle control by Dunnett's test. C, Isolated rat pancreatic islets (10 islets per test) were stimulated with 3, 8, or 16 mM glucose in the absence or presence of fasiglifam (10 μM) for 2 h. Secreted insulin concentration was normalized with intracellular DNA content. Empty bars, vehicle; filled bars, fasiglifam. Data are mean + S.D. (n=3). *p<0.05 and #p<0.01 versus vehicle control by Aspin-Welch test and Student's t-test, respectively.

(出典) Tsujihata *et al. J Pharmacol Exp Ther.*, **339**, 228-37 (2011)., Figure 4

3. グルコース濃度依存性の細胞内メカニズム解析

Fasiglifam のインスリン分泌促進作用のグルコース濃度依存性の細胞内メカニズムを明らかにする目的で、fasiglifam によって惹起される各種細胞内シグナル (細胞内 IP およびカルシウム産生) に対するグルコース濃度の影響を評価した。INS-1 833/15 細胞において、10 mM グルコース存在下、グリベンクラミドとは対照的に fasiglifam (0.1-10 μM) は化合物濃度依存的に IP 産生を亢進した (Table 1)。インスリン分泌促進作用を示さなかった 1 および 3 mM グルコース環境下においても fasiglifam (0.1-10 μM) は同程度に IP 産生を上昇し、グルコース濃度による影響を受けなかった (Table 1)。Figure 4C に示されるように、INS-1 833/15 細胞に 10 mM グルコースを添加すると細胞内カルシウム濃度上昇が観察され、そこに fasiglifam (30 μM) を処置するとさらなるカルシウム濃度上昇が観察された。Fasiglifam 刺激カルシウム上昇は、1 および 3 mM グルコース存在下では大きく減弱した (Figure 4A, B)。一方、グリベンクラミド刺激によっても細胞内カルシウム濃度上昇が観察されたが、その上昇はグルコース濃度に依存せず一定であった (Figure 4D-F)。これらの結果から、fasiglifam による細胞内カルシウム濃度上昇もまたグルコース濃度依存的に惹起され、インスリン分泌のグルコース濃度依存性のプロセスにおいて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Table 1. Fasiglifam enhances intracellular inositol monophosphate production in INS-1 833/15 cells.

| Compound | Intracellular inositol monophosphate concentration (nM) | | |
|-----------------------|---|---------------------------|---------------------------|
| | 1 mM glucose | 3 mM glucose | 10 mM glucose |
| vehicle | 153.9 ± 14.7 | 151.8 ± 8.8 | 161.5 ± 15.1 |
| Fasiglifam (0.1 μM) | 226.0 ± 19.3 ^a | 236.7 ± 31.7 ^a | 239.9 ± 14.2 ^a |
| Fasiglifam (1 μM) | 436.2 ± 30.9 ^a | 478.4 ± 30.7 ^a | 415.5 ± 80.8 ^a |
| Fasiglifam (10 μM) | 486.0 ± 38.5 ^a | 521.2 ± 67.3 ^a | 464.2 ± 13.1 ^a |
| Glibenclamide (10 μM) | 143.4 ± 19.2 | 134.5 ± 16.7 | 128.8 ± 12.2 |

^ap<0.025 versus control (vehicle with each respective glucose concentration) by one-tailed Williams' test. Data are mean ± S.D. (n=3).

(出典) Tsujihata *et al. J Pharmacol Exp Ther.*, **339**, 228-37 (2011)., Table 1

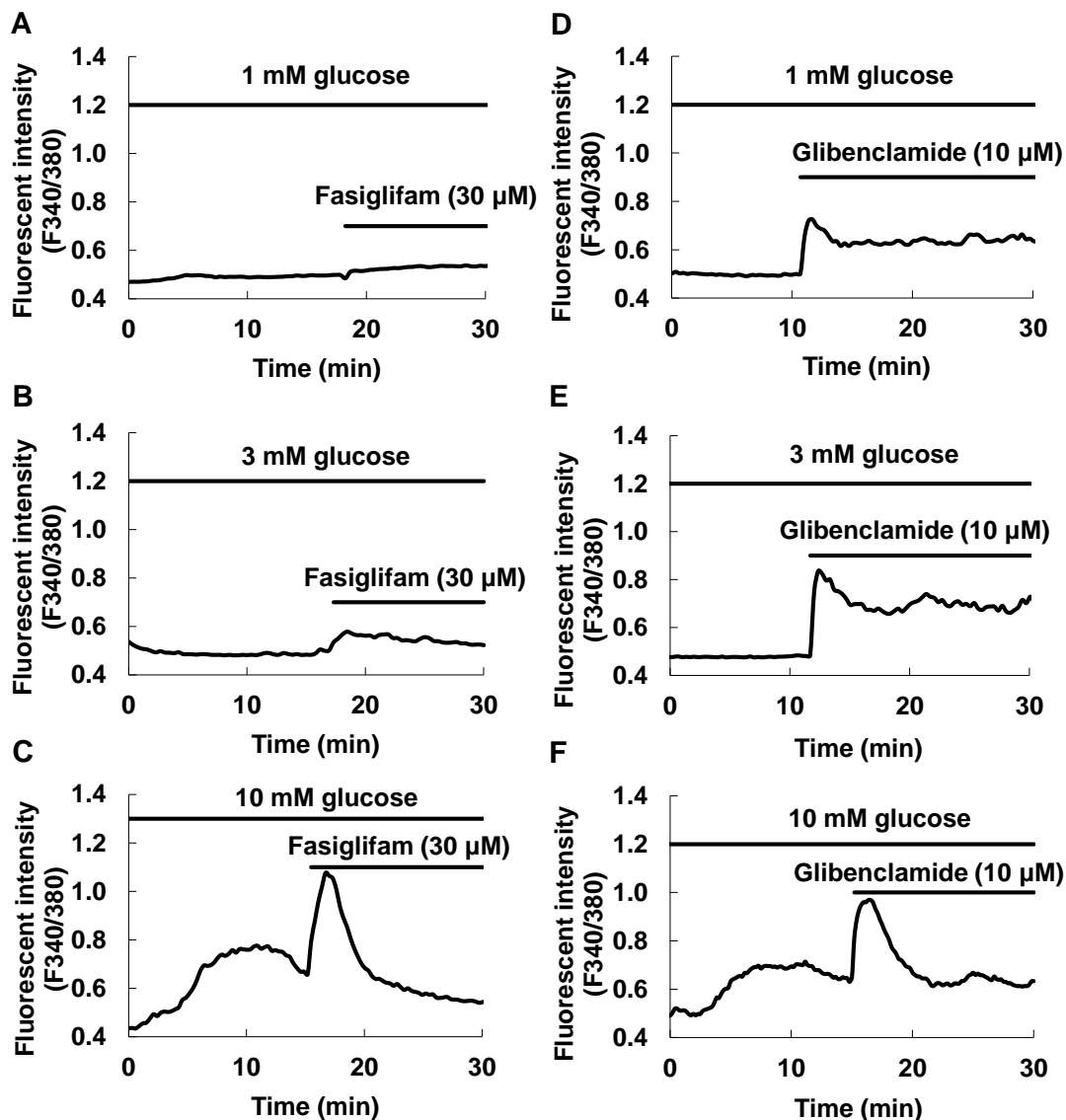


Figure 4. Fasiglifam, but not glibenclamide, exhibits glucose-dependent enhancement of intracellular calcium concentration in INS-1 833/15 cells. Changes in intracellular calcium concentration in INS-1 833/15 cells after initial challenge with various concentrations of glucose and subsequent challenge with each glucose concentration and fasiglifam or glibenclamide are shown. Fura-2-loaded INS-1 833/15 cells were initially treated with 1 mM (A and D), 3 mM (B and E), or 10 mM (C and F) glucose. The cells were subsequently stimulated with 30 μ M fasiglifam (A–C) or 10 μ M glibenclamide (D–F) in the presence of each glucose concentration. The traces shown are averages of the ratio of fluorescent intensity at 340 and 380 nm (average of 30 cells). Bars indicate the presence of glucose, vehicle, fasiglifam, or glibenclamide in the buffer solution.

(出典) Tsujihata *et al. J Pharmacol Exp Ther.*, **339**, 228-37 (2011)., Figure 3

4. *In vivo* インスリン分泌促進作用と血糖低下作用

Fasiglifam の *in vivo* インスリン分泌促進作用を確認する目的で、耐糖能異常を呈する非肥満 2 型糖尿病モデルである N-STZ-1.5 ラットを用いてグルコース負荷試験を試みた。グルコース負荷 60 分前に fasiglifam (1-10 mg/kg) を単回経口投与したところ、用量依存的にグルコース負荷後 10-60 分のインスリン分泌が促進した (Figure 5C、D)。インスリン分泌と相関して、3 mg/kg の用量から有意な耐糖能改善作用が観察された (Figure 5A、B)。 *In vivo* における fasiglifam のインスリン分泌促進作用のグルコース濃度依存性を確かめる目的で、正常血糖値を示す空腹状態の SD ラットを用いて fasiglifam の作用を評価した。SD ラットへのグリベンクラミド (10 mg/kg) あるいは即効型インスリン分泌促進薬であるナテグリニド (50 mg/kg) の単回投与は、空腹時インスリンレベルの上昇とともに空腹時血糖値を有意に低下し、その低下は 60 mg/dL 付近にまで達し低血糖を生じた (Figure 6A、B)。一方、N-STZ-1.5 ラットで耐糖能改善作用を示した用量の 3-10 倍高用量の 30 mg/kg の fasiglifam を SD ラットに投与しても、空腹時インスリンおよびグルコースレベルに有意な影響は認められなかった (Figure 6A、B)。重症 2 型糖尿病モデルである ZDF ラットは、耐糖能異常に加え空腹時高血糖を呈することが知られている。興味深いことに、同じ空腹状態でも、本モデルにおいて fasiglifam は強力に空腹時インスリンレベルを上昇し、空腹時高血糖を改善した (Figure 6C、D)。一方、グリベンクラミド (10 mg/kg) あるいはナテグリニド (50 mg/kg) は血糖低下およびインスリン分泌傾向を示すものの有意な作用を示さなかった (Figure 6C、D)。

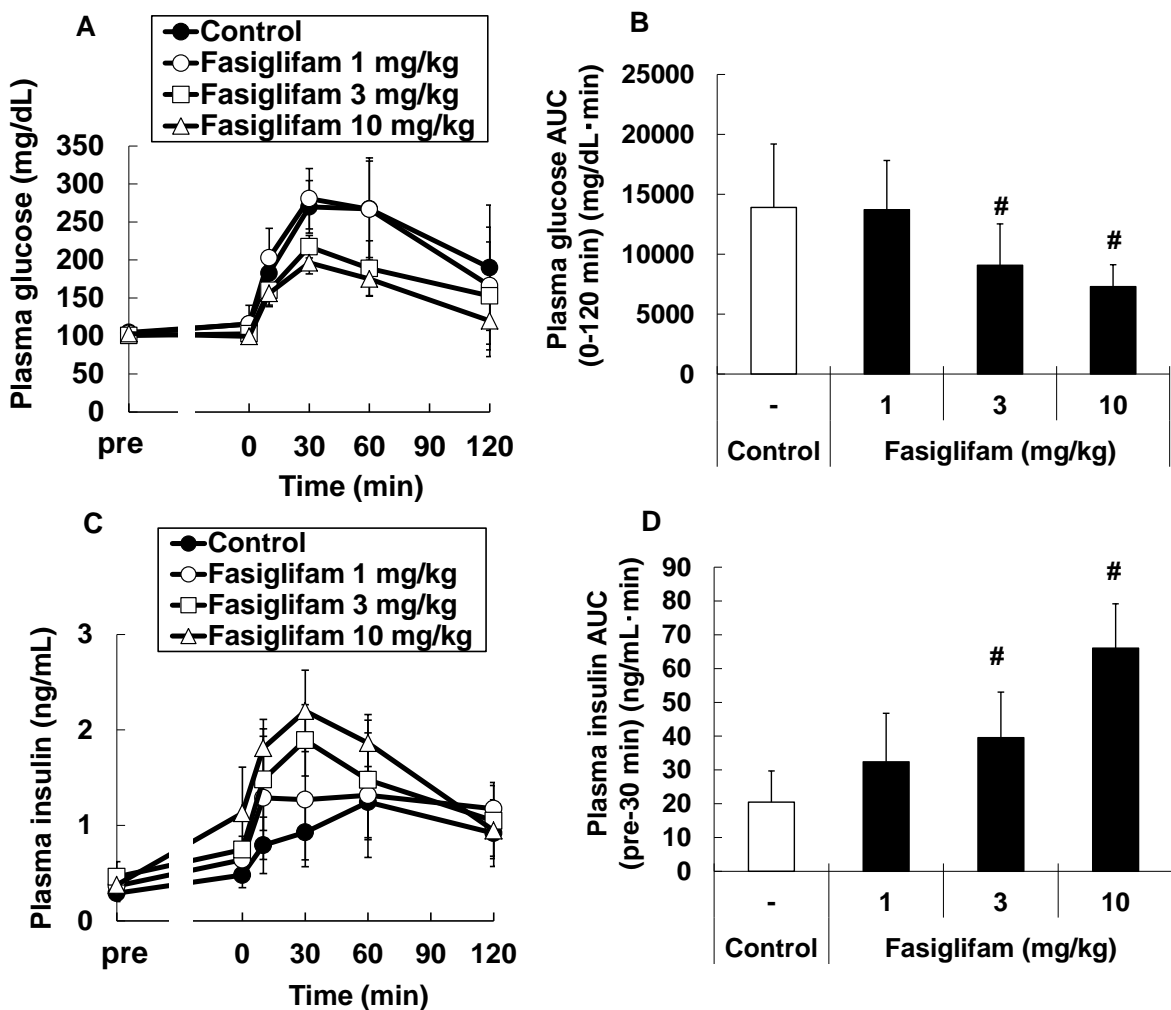


Figure 5. Fasiglifam improves postprandial hyperglycemia in type 2 diabetic rats. Male N-STZ-1.5 rats were fasted overnight and orally given vehicle or fasiglifam (1, 3, and 10 mg/kg). One hour later, all animals received an oral glucose load (1 g/kg), and plasma glucose and insulin were monitored for 2 h. A, time-dependent change of plasma glucose. B, area under the curve of plasma glucose (0–120 min). C, time-dependent change of plasma insulin. D, area under the curve of plasma insulin (pre-30 min). Data are mean \pm S.D. (n=6). #p \leq 0.025 versus control by one-tailed Williams' test.

(出典) Tsujihata *et al. J Pharmacol Exp Ther.*, **339**, 228-37 (2011)., Figure 6

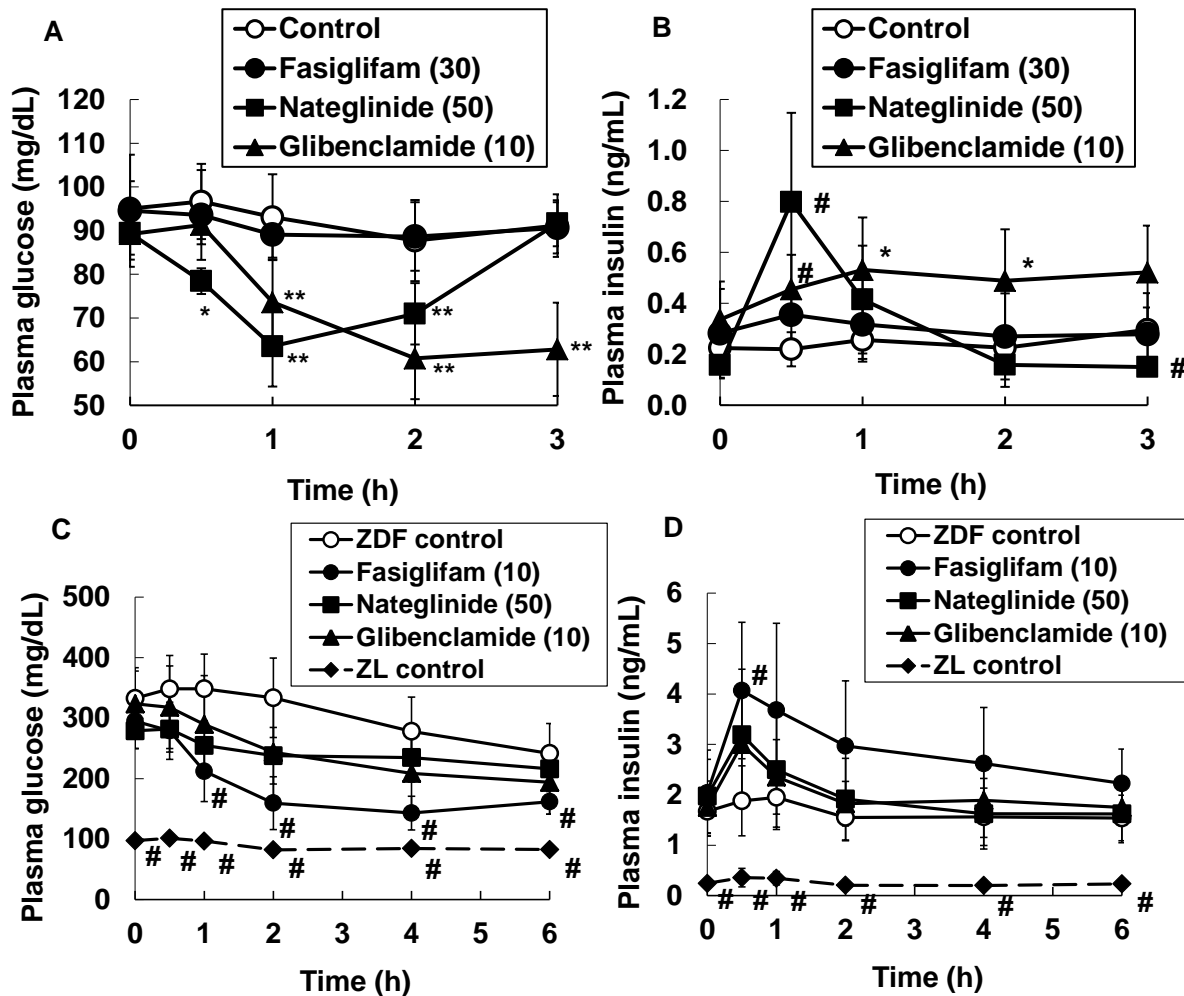


Figure 6. Fasiglifam improves fasting hyperglycemia without affecting fasting normoglycemia. A and B, Male SD rats were fasted overnight and orally given vehicle, fasiglifam (30 mg/kg), nateglinide (50 mg/kg), or glibenclamide (10 mg/kg). Plasma glucose (A) and insulin levels (B) were monitored over 3 h. C and D, Male ZDF and age-matched ZL rats were fasted overnight and orally given vehicle, TAK-875 (10 mg/kg), nateglinide (50 mg/kg), or glibenclamide (10 mg/kg). Plasma glucose (C) and insulin levels (D) were monitored over 6 h. Data are mean \pm S.D. (n=6). *p \leq 0.05 and **p \leq 0.01 versus control by Dunnett's test. #p \leq 0.05 versus control by Steel test.

(出典) Tsujihata *et al. J Pharmacol Exp Ther.*, **339**, 228-37 (2011)., Figure 7

第4節 考察

Briscoe らは、マウス膵β細胞株 MIN6 細胞を用いて、GPR40 作動薬 GW9508 がグルコース刺激インスリン分泌を亢進することを報告した (22)。また、Tan らは食餌性肥満マウスを用いた腹腔内グルコース負荷試験において、GPR40 作動薬 compound C の単回投与が耐糖能改善作用を示すことを報告した (23)。このように、本研究よりも以前に低分子 GPR40 作動薬を用いた GPR40 の薬理作用の検討がいくつか報告されているが、これらは主にマウスで検討されている。GPR40 はマウス、ラットおよびヒトと種を越えて、膵ラ氏島に多く発現していることが知られている (9,10,24)。しかしながら、マウスにおいては、インスリン陽性細胞 (膵β細胞) に加えて、グルカゴン陽性細胞 (膵α細胞) にも GPR40 の発現が報告されているが (25)、ラットおよびヒトにおいてはインスリン陽性細胞に選択的な発現が認められている (10,24)。したがって、本研究では、GPR40 作動薬の膵β細胞に対する作用により焦点を当てるため、またヒトへの外挿性の高い結果を取得するため、*in vitro* および *in vivo* ラットモデルを用いて GPR40 作動薬 fasiglifam の薬理作用の解析を試みた。ラット膵β細胞株 INS-1 833/15 細胞あるいはラット単離膵ラ氏島において、fasiglifam は 8 mM 以上の高グルコース存在下においてのみインスリン分泌促進作用を示し、低グルコース存在下では作用を示さなかった。本結果と一致して、ヒト膵ラ氏島においても、fasiglifam は高グルコース環境下においてのみインスリン分泌促進作用を発揮した (26)。これらの結果は、GPR40 作動薬によるインスリン分泌が厳密にグルコース濃度によって制御されていることを示しており、インスリン分泌促進薬として重要な特徴を有していることが明らかとなった。

上述の通り GPR40 を介したインスリン分泌促進作用はグルコース濃度によって厳密に制御されているが、その詳細な細胞内メカニズムは完全には明らかとなっていない。本研究において、fasiglifam 刺激による IP₃ 産生作用はグルコース濃度非依存的であるのに対して、その後の細胞内カルシウム濃度上昇はグルコース濃度依存的に惹起されたことから、細胞内カルシウム上昇がそのプロセスにおいて重要な役割を担っていることが示唆された。興味深いことに、Yang らは、グルコース刺激以外にも、電位依存性カルシウムチャネル開口薬によって誘導されるインスリン分泌に対しても GPR40 作動薬が増強作用を発揮することを示し (27)、本結果と一致して、細胞内カルシウム濃度上昇の重要性を示唆する結果を報告している。GPR40 活性化により IP₃ 産生と同時に DAG が産生され、プロテインキナーゼを介した細胞内イベントを活性化することが知られている (19)。最近、膜透過性の DAG 類似薬を用いて直接 PKC を活性化すると、細胞内カルシウム濃度に変化が認められないにもかかわらず、グルコース濃度依存的にインスリン分泌が惹起されることが報告された (28)。このことは、GPR40 によって誘導される IP₃ および DAG 経路の両方が独立してグルコース濃度依存性のメカニズムに関与していることを示唆している。

食後過血糖は糖尿病患者の発症初期から認められる臨床的特徴であり、その是正が糖尿病に対して有効であることはよく知られている。耐糖能異常を呈する 2 型糖尿病モデル N-STZ-1.5 ラットへの fasiglifam 単回投与は、グルコース負荷後の血漿インスリン濃度を上昇し、耐糖能を改善した。一方、正常血糖値を示す空腹時の SD ラットにおいて、耐糖能改善作用を示す薬効量の 3-10 倍高用量の fasiglifam を投与しても、血漿インスリンやグルコース濃度に有意な影響を示さなかった。本ラットにおける fasiglifam の良好な体内動態 (3 mg/kg 経口投与後 AUC_{0-24h} = 65 μg·h/mL、

$C_{max} = 5.77 \mu\text{g/mL}$ 、 $T_{max} = 1 \text{ hr}$ 、 $t_{1/2} = 4.1 \text{ hr}$ 、 $\text{bioavailability} = 76\%$) を考慮すると (14)、約 90 mg/dL (約 5 mM) の正常空腹時血糖値が *fasiglifam* のインスリン分泌反応のグルコース濃度閾値に到達しなかったためだと推察される。同条件下、グリベンクラミドおよびナテグリニドが低血糖を惹起したことから、*fasiglifam* が *in vivo* においても、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進するため、低血糖リスクが低いことが示された。

近年、血中 GLP-1 および GIP 濃度上昇を介した経口インスリン分泌促進薬として DPP4 阻害薬が広く使用されている (5,29)。DPP4 阻害薬もまた、GPR40 作動薬同様、グルコース濃度依存的なインスリン分泌を起こすことから、低血糖リスクが低い薬剤として知られている。しかしながら、その作用は食後に分泌される内因性の GLP-1 や GIP の量に依存するため、主な作用が食後に限定され、抗糖尿病作用は SU 薬等と比較してマイルドであるとも言われている (1)。GPR40 作動薬は膵 β 細胞膜上に存在する GPR40 を直接刺激してインスリン分泌を惹起することから、その作用は食後に加え空腹時においても有効であると考えられる。実際、本検討において *fasiglifam* は空腹時高血糖を示す重症 2 型糖尿病モデル雄性 ZDF ラットに対して、強力な空腹時高血糖改善作用を示した。

生体内において様々な種類の脂肪酸が存在しており、その血漿レベルは日内でも大きく変動し、糖尿病患者では $0.4\text{-}0.8 \text{ mEq/L}$ に達すると言われている (30)。これら脂肪酸の一部が GPR40 に対するリガンドであることを考慮すると (10)、*fasiglifam* の *in vivo* 作用は血漿中脂肪酸レベルに応じて競合し打ち消し合うのではないかという疑問が生じる。しかしながら、本研究において、血漿中脂肪酸レベルが高値に達していると考えられる空腹条件下においても、食後と同様、*fasiglifam* は強力なインスリン分泌促進作用を示した。序論で述べたとおり、*fasiglifam* とヒト型 GPR40 の共結晶構造から、*fasiglifam* は内因性リガンドの作用すると考えられるオルソステリック結合部位とは明らかに異なる特有の結合部位に結合していることが示されている (15)。また、最近の *in vitro* の詳細な解析から、*fasiglifam* が脂肪酸に対してアロステリックモデュレーターとして作用し、協調する形でインスリン分泌を促進していることが示された (31)。*In vivo* で認められる良好なインスリン分泌促進作用は、脂肪酸とのこうした協調作用を反映した結果であると考えられる。

結論として、*fasiglifam* は内因性リガンドである脂肪酸より強力かつ選択的な GPR40 作動薬であり、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進するという特徴を有していることが明らかとなった。このような特徴から、*fasiglifam* は高血糖状態における強力な血糖低下にもかかわらず、正常血糖に対して影響を示さず、低血糖リスクが極めて低いことが示めされた。以上の結果に基づき、GPR40 作動薬 *fasiglifam* は新たな作用機序を有する新規インスリン分泌促進薬として有用である可能性が示唆された。

第2章

GPR40 作動薬 fasiglifam と SU 薬との差別化および併用投与の可能性の

検討

第1節 緒言

序論にも述べたように、現在最も広く使用されている 2 型糖尿病治療薬の一つとしてインスリン分泌促進薬の SU 薬がある (2)。しかしながら、SU 薬は血中グルコース濃度非依存的にインスリン分泌を促進するため低血糖を引き起こすことが懸念されている (3)。また、長期投与ではかえって膵機能を低下させる、いわゆる二次無効を発症することも臨床現場で問題となっている (4)。したがって、GPR40 作動薬の新規インスリン分泌促進薬としての可能性を考える上で、SU 薬と直接比較により明確な差別化点を示すことが不可欠である。

糖尿病治療において、十分な血糖コントロールを達成するために、作用機序の異なる複数の薬剤の併用が頻繁に行われる (32)。そのため、既存薬との併用効果に関する知見も重要である。Yang らは、ラットインスリンノーマ細胞を用いた *in vitro* の検討において、GPR40 を介したインスリン分泌促進のグルコース濃度依存性は、SU 薬との共添加により破綻することを報告した (27)。このことは、SU 薬との併用投与時、低グルコース濃度環境下においても GPR40 作動薬がインスリン分泌を促進し得ることを示唆しており、低血糖の可能性が懸念される。しかしながら、これまでのところ、*in vivo* における GPR40 作動薬と SU 薬の併用効果について詳細な検討はなされていない。

第 1 章において、GPR40 作動薬 fasiglifam はグルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進することで、SU 薬に比して低い低血糖リスクを有することを示した。本章では、SU 薬とのさらなる差別化点を明らかにする目的で、長期投与効果について比較したところ、SU 薬に比して fasiglifam は二次無効を惹起する可能性が明らかに低いこと、SU 二次無効状態のラットにおいても fasiglifam は強力な血糖低下作用を発揮し得ることが明らかとなった。また、fasiglifam と SU 薬を同時投与しても低血糖を助長することなく、相加的に血糖低下作用を発揮し得ることが示唆されたので、以下にまとめて報告する。

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物

Fasiglifam および alogliptin (33) は武田薬品工業株式会社 Chemistry, Manufacturing and Control Center にて合成された。グリベンクラミドおよびグリメピリドは和光純薬株式会社 (大阪、日本)、ナテグリニドは Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada) より購入された。薬物は 0.5% MC 溶液に懸濁し、示された用量で投薬した。

2. 動物

雄性 N-STZ-1.5 ラットは生後 1-2 日齢の WKY ラットに 120 mg/kg の STZ を皮下投与して作製した (21)。N-STZ-1.5 ラットおよび対照 WKY ラットは武田ラビックス (大阪、日本) より取得した。雄性 SD ラットは日本クレア (東京、日本) から購入した。動物の取り扱いおよび実験は、武田実験動物倫理委員会の定める基準に準じて実施した。すべてのラットは CE-2 (日本クレア) 給餌および自由飲水条件下で飼育した。

3. 経口グルコース負荷試験 (単独作用の比較試験)

20-27 週齢の N-STZ-1.5 ラットおよび WKY ラットを 1 晩絶食後、N-STZ-1.5 ラットは体重および血漿パラメーターを指標に 7 群 (n=6) に群分けした。0.5% MC 懸濁液 (vehicle)、fasiglifam (3-30 mg/kg) 懸濁液あるいはグリベンクラミド (3-30 mg/kg) 懸濁液を 5 mL/kg で経口投与した。正常対照群として、WKY ラット (n=5) には vehicle を経口投与した。化合物投与 1 時間後に、グルコース (1.5 g/kg) を経口投与し、グルコース負荷直前 (0 分値) および 10、30、60、120 分後に尾静脈採血し、血漿中グルコースおよびインスリンを測定した。

4. 二次無効リスクの評価

16 週齢の N-STZ-1.5 ラットを体重および血漿パラメーターを指標に 2 群 (n=12) に群分けした。0.5% MC 懸濁液 (vehicle) あるいは fasiglifam (10 mg/kg) 懸濁液を 2.5 mL/kg で 1 日 1 回 15 週間経口投与した。投与 90 日目に、予期せぬ体重低下により vehicle 群のラットが 1 匹死亡したため、本個体のデータを解析から除外した。投与 14 週目で、各処置群をそれぞれ 2 群 (n=5-6) に再群分けし、さらに 1 週間投与を継続した後、1 晩絶食した。Vehicle あるいは fasiglifam (3 mg/kg) 懸濁液を 2.5 mL/kg で経口投与 30 分後、グルコース (1 g/kg) を経口投与した。グルコース負荷直前 (0 分値) および 10、30、60、120 分後に尾静脈採血し、血漿中グルコースおよびインスリンを測定した。正常対照群として、同様の期間 WKY ラット (n=6) に vehicle を反復投与し、同様のグルコース負荷試験を実施した。グルコース負荷試験後のラットから膵臓を摘出し、Bouin's solution (Polysciences, Inc, Warrington, PA) を用いて 1 晩固定し、パラフィン包埋切片を作製した。一次抗体として抗インスリンおよび抗グルカゴン抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) を用いて染色し、染色画像を inverted microscope IX71 (オリンパス、東京、日本) を用いて取得した。

5. SU 二次無効モデルを用いた検討

20 週齢の N-STZ-1.5 ラットを体重および血漿パラメーターを指標に 2 群 (n=16 および n=32) に群分けした。0.5% MC 懸濁液 (vehicle, n=16) あるいはグリベンクラミド (10 mg/kg, n=32) 懸濁液を 2.5 mL/kg で 1 日 1 回 4 週間経口投与した。1 晩絶食後、vehicle 投与群を 2 群に再群分けし (n=8)、vehicle あるいはグリベンクラミド (10 mg/kg) 懸濁液をグルコース負荷 (1 g/kg) 1 時間前に 5 mL/kg で経口投与した。グリベンクラミド投与群を 4 群に再群分けし (n=8)、vehicle、グリベンクラミド (10 mg/kg) 懸濁液および fasiglifam (3 mg/kg) 懸濁液をグルコース負荷 1 時間前に 5 mL/kg で経口投与し、残り 1 群にはナテグリニド (50 mg/kg) 懸濁液をグルコース負荷 30 分前に 5

mL/kg で経口投与した。グルコース負荷直前 (0 分値) および 10、30、60、120 分後に尾静脈採血し、血漿中グルコースおよびインスリンを測定した。

6. 経口グルコース負荷試験 (併用効果の検討)

21 週齢の N-STZ-1.5 ラットおよび WKY ラットを 1 晩絶食後、N-STZ-1.5 ラットは体重および血漿パラメーターを指標に 4 群 (n=6) に群分けした。0.5% MC 懸濁液 (vehicle)、fasiglifam (3 mg/kg) 懸濁液、グリメピリド (10 mg/kg) 懸濁液あるいはこれらの併用懸濁液を 5 mL/kg で経口投与した。正常対照群として、WKY ラット (n=5) は vehicle を経口投与した。化合物投与 1 時間後に、グルコース (1.5 g/kg) を経口投与した。グルコース負荷直前 (0 分値) および 10、30、60、120 分後に尾静脈採血し、血漿中グルコースおよびインスリンを測定した。

7. 非絶食正常血糖に対する作用の検討

10 週齢の雄性 SD ラットは、体重をもとに 6 群 (n=6) に群分けした。0.5% MC 懸濁液、fasiglifam (3 mg/kg) 懸濁液、alogliptin (1 mg/kg) 懸濁液、グリメピリド (10 mg/kg) 懸濁液、fasiglifam (3 mg/kg) + グリメピリド (10 mg/kg) 併用懸濁液および alogliptin (1 mg/kg) + グリメピリド (10 mg/kg) 併用懸濁液を 5 mL/kg で経口投与後、示された時間で経時的に採血し、血漿中グルコースおよびインスリンを測定した。

8. 血漿パラメーターの測定

血漿中のグルコースは、自動分析装置 7080 (日立、東京、日本) で測定した。血漿中インスリンは、ラットインスリン RIA キット (Millipore、Bedford、MA) を用いて測定し、低い血漿インスリン値を検出するために、ラットインスリン ELISA (森永生科学研究所、横浜、日本) を使用した。

9. 統計解析

2 群間の比較は Student's t-test あるいは Aspin-Welch test を行った。用量依存性の評価は片側 Williams' test あるいは Shirley-Williams test を使用した。併用効果は 2 元配置分散分析 (ANOVA) を用いて解析した (34)。解析結果は以下の基準に従って解釈された。1) 有意な interaction ($p \leq 0.05$) が観察された場合、その併用効果は相乗効果 (単独効果の総和を上回る効果)、2) 各薬剤の有意な main effect ($p \leq 0.05$) かつ有意でない interaction が観察された場合、その併用効果は相加効果 (単独効果の総和に等しい効果) と解釈された。すべてのデータは平均 \pm 標準偏差で示された。

第3節 結果

1. SU 薬との血糖低下作用の比較

最初に、fasiglifam および SU 薬の食後過血糖低下作用を比較する目的で、N-STZ-1.5 ラットを用いたグルコース負荷試験を試みた。Fasiglifam (3、10 および 30 mg/kg) の単回経口投与は用量依存的な血糖面積の低下 (vehicle 群に比してそれぞれ 19.1%、33% および 37.6% 低下) およびインスリン分泌面積の上昇 (vehicle 群に比してそれぞれ 1.5 倍、1.5 倍 および 1.7 倍 上昇) を示し、30

mg/kg 投与時の耐糖能は正常対照ラットに匹敵するレベルに達した (Figure 1)。対照的に、SU 薬グリベンクラミド (3, 10 および 30 mg/kg) 投与による血糖低下作用は 3 mg/kg でプラトーに達し、グルコース負荷後のインスリン分泌も上昇傾向にとどまった (Figure 1)。同モデルにおいて、別の SU 薬グリメピリドについて、同様の血糖低下およびインスリン分泌促進パターンが観察された (data not shown)。最大投与量 30 mg/kg で比較したところ、fasiglifam の作用は有意にグリベンクラミドの作用を上回った (Figure 1C、D)。この時、両薬剤ともグルコース負荷直前 (空腹時) の血糖低下およびインスリン分泌上昇作用を示したが、その作用は薬剤間で明確な差は認められなかった (空腹時血糖値: vehicle、 98.1 ± 2.1 mg/dL; fasiglifam、 91.9 ± 4.1 mg/dL; グリベンクラミド、 88.4 ± 3.7 mg/dL; 空腹時インスリン値: vehicle、 0.5 ± 0.1 ng/mL; fasiglifam、 1.4 ± 0.3 ng/mL; グリベンクラミド、 1.1 ± 0.2 ng/mL; Figure 1A、B)。

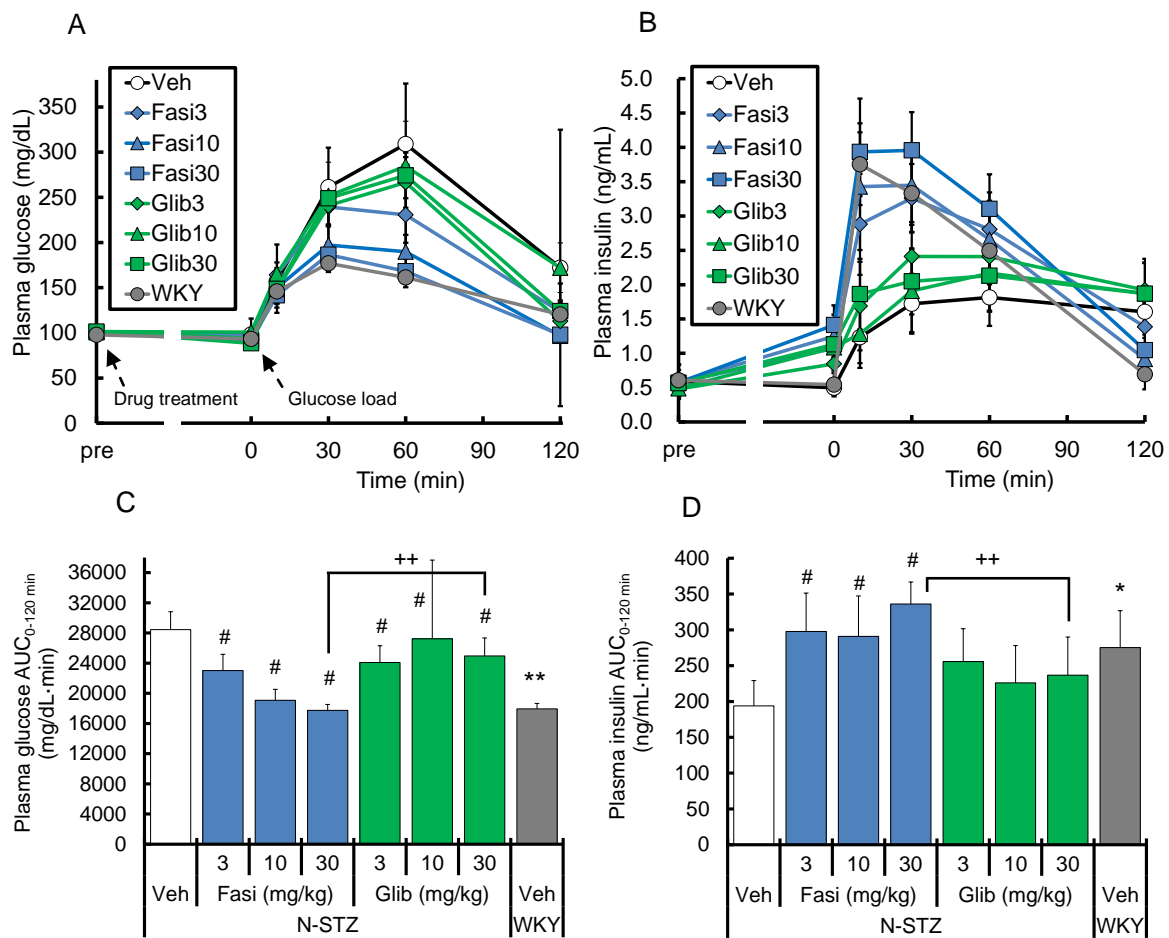


Figure 1. Fasiglifam improves glucose tolerance more effectively than glibenclamide during oral glucose tolerance tests in male N-STZ-1.5 rats. (A) and (B) show time-dependent changes in plasma glucose and insulin levels, respectively, after glucose load (1.5 g/kg) in N-STZ-1.5 rats treated with vehicle (Veh), 3-30 mg/kg of fasiglifam (Fasi) or 3-30 mg/kg of glibenclamide (Glib), and in WKY rats (normal controls) treated with vehicle. Data in (C) and (D) represent plasma glucose $AUC_{0-120 \text{ min}}$ and plasma insulin $AUC_{0-120 \text{ min}}$, respectively. # $p \leq 0.025$ compared with vehicle-treated N-STZ-1.5 rats by one-tailed Williams' test or one-tailed Shirley-Williams test. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ compared with vehicle-treated N-STZ-1.5 rats by Student's t-test or Aspin-Welch test. ++ $p \leq 0.01$ by Student's t-test or Aspin-Welch test.

Data are mean \pm S.D. (n=6 for N-STZ-1.5 rats, n=5 for WKY rats).

(出典) Ito et al. *J Pharmacol Exp Ther.*, **357**, 217-27 (2016)., Figure 1

2. 長期投与による二次無効リスクの検討

N-STZ-1.5 ラットを用いた以前の検討において、グリベンクラミドの4週間反復投与は耐糖能悪化およびグリベンクラミドに対する応答性消失を示し、二次無効を惹起することが報告された(35)。そこで、同モデルを用いて fasiglifam の二次無効リスクについて検証した。グリベンクラミドよりも十分強い耐糖能改善作用を示した 10 mg/kg の fasiglifam (Figure 1) を用いて 15 週間反復投与を行ったが、グルコース負荷試験における耐糖能およびインスリン分泌能は、vehicle 反復投与ラットのそれと比較して明確な違いは認められなかった (Figure 2、Rep. Veh-Veh versus Rep. Fasi-Veh)。興味深いことに、15 週間 fasiglifam を反復投与したラットに再び fasiglifam (3 mg/kg) を単回投与すると、初回投与時と同程度の有意な血糖低下作用が観察された (Figure 2A、C、Rep. Fasi-Fasi versus Veh-Fasi)。この時、15 週間 fasiglifam を反復投与したラットにおいて、fasiglifam 単回投与後のインスリンレベルは初回投与時に匹敵するレベルに達していたが (Figure 2B、D、Rep. Fasi-Fasi versus Veh-Fasi)、同ラットにおいては vehicle 単回投与によるインスリン分泌反応も上昇しており (Figure 2B、D、Rep. Fasi-Veh)、vehicle に比して有意なインスリン分泌上昇には至らなかった (Figure 2B、D、Rep. Fasi-Veh versus Fasi-Fasi)。また、反復投与後の膵組織を免疫染色により解析したところ、N-STZ-1.5 ラットの膵ラ氏島は正常ラットよりもやや小さいラ氏島構造を示したが、vehicle および fasiglifam を反復投与した N-STZ-1.5 ラット間でラ氏島形態およびその大きさ、インスリンおよびグルカゴンの染色性に明確な違いは認められなかった (Figure 3)。

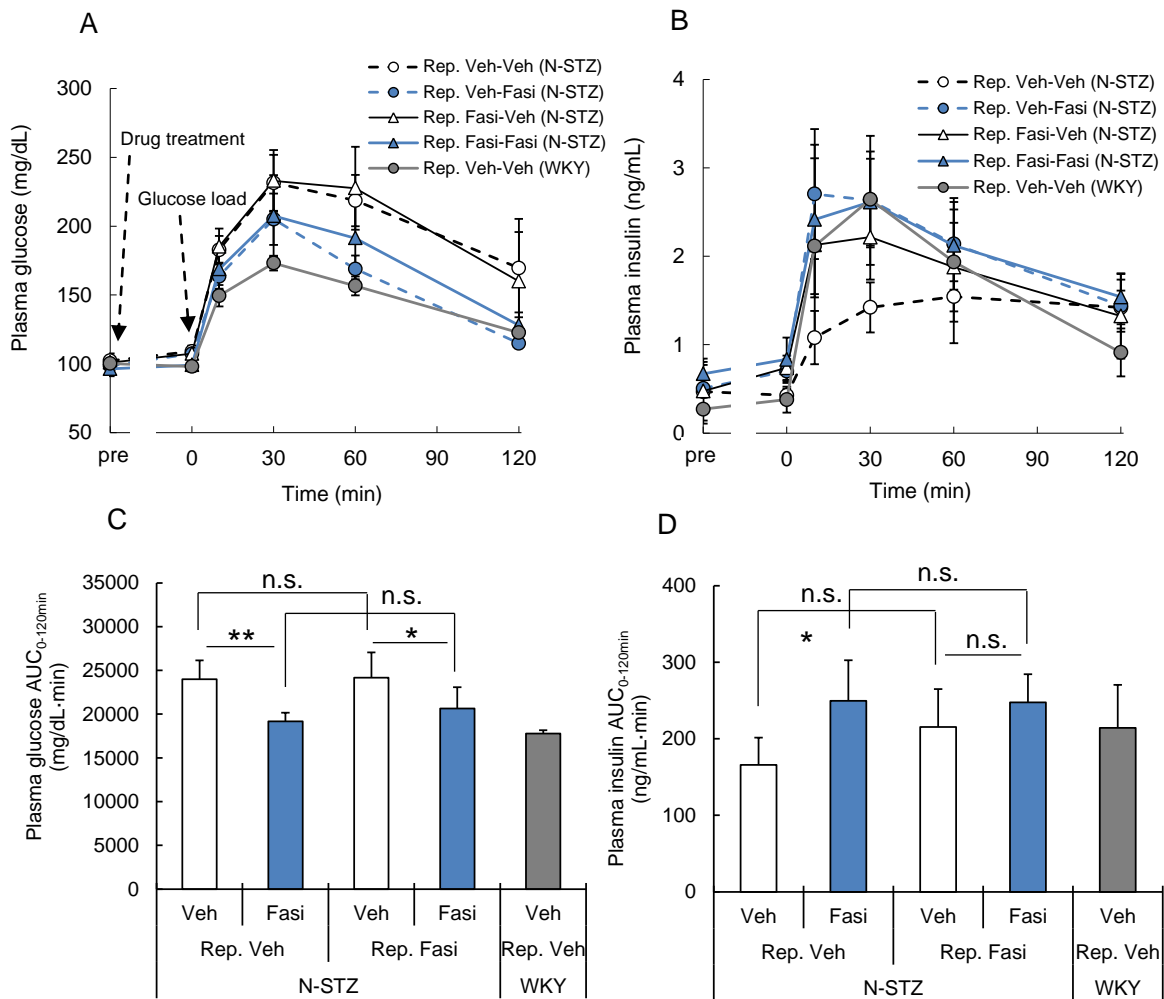


Figure 2. Chronic treatment with fasiglifam does not cause secondary loss of glucose-lowering efficacy. N-STZ-1.5 rats were treated once daily with vehicle (Rep. Veh) or fasiglifam (Rep. Fasi, 10 mg/kg) for 15 weeks. After fasting overnight, vehicle (Veh) or fasiglifam (Fasi, 3 mg/kg) was given orally to both groups 30 min before glucose load (1 g/kg). Similarly, WKY rats (normal controls) were treated with vehicle once daily for 15 weeks, and the same oral glucose tolerance test was performed. (A) and (B) show time-dependent changes in plasma glucose and insulin levels, respectively. Data in (C) and (D) represent plasma glucose AUC_{0-120 min} and plasma insulin AUC_{0-120 min}, respectively. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ by Student's t-test or Aspin-Welch test. n.s., not significant, Rep., repeatedly treated. Data are mean \pm S.D. (n=5-6).

(出典) Ito et al. *J Pharmacol Exp Ther.*, **357**, 217-27 (2016)., Figure 2

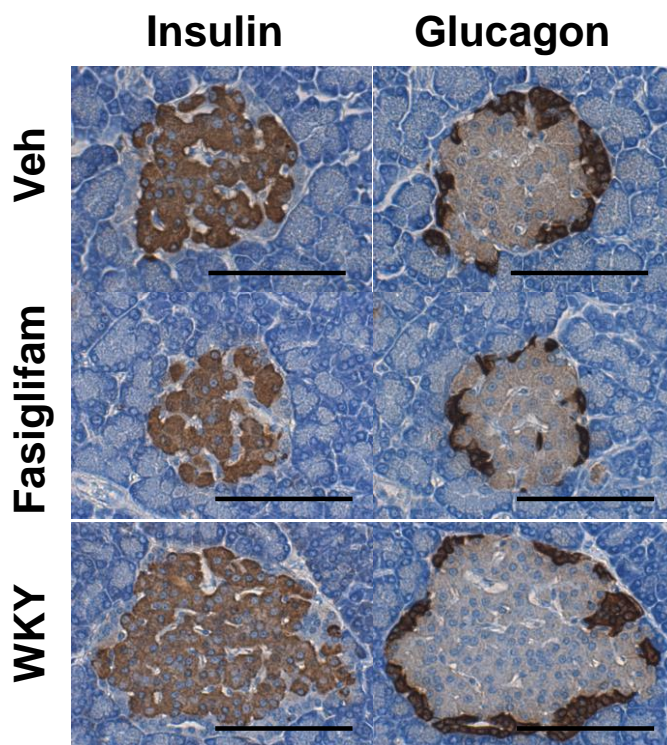


Figure 3. Pancreatic islet morphology in male N-STZ-1.5 rats after multiple dosing of fasiglifam. N-STZ-1.5 rats were treated with vehicle (Veh) or fasiglifam (10 mg/kg), and WKY rats (normal controls) were treated with vehicle, once daily for 15 weeks. Fixed pancreata were immunostained with anti-insulin and anti-glucagon antibodies. Scale bar = 100 μ m.

(出典) Ito et al. *J Pharmacol Exp Ther.*, **357**, 217-27 (2016)., Figure 3

3. SU 二次無効を呈する糖尿病ラットにおける作用

次に、SU 二次無効を呈する糖尿病ラットに対して、fasiglifam が作用を発揮し得るかどうかを検証した。以前の報告と一致して (35)、N-STZ-1.5 ラットにグリベンクラミド (10 mg/kg) の4週間反復投与は、耐糖能の有意な悪化を示した (Figure 4A, C, Rep. Veh-Veh versus Rep. Glib-Veh)。4週間 vehicle を反復投与した N-STZ-1.5 ラットにおいて、グリベンクラミド (10 mg/kg) は有意な耐糖能改善作用を示したが (Figure 4, Rep. Veh-Veh versus Rep. Veh-Glib)、4週間グリベンクラミド反復投与後の N-STZ-1.5 ラットにおいて、その反応は完全に消失し (Figure 4, Rep. Glib-Veh versus Rep. Glib-Glib)、SU 二次無効の誘発が確認された。本モデルに、同 SU 受容体に作用する即効型インスリン分泌促進薬であるナテグリニド (50 mg/kg) を投与しても血糖低下およびインスリン分泌促進作用は観察されなかった (Figure 4, Rep. Glib-Veh versus Rep. Glib-Nate)。対照的に、fasiglifam (3 mg/kg) の単回投与は、有意なインスリン分泌促進および耐糖能改善作用を示した (Figure 4, Rep. Glib-Veh versus Rep. Glib-Fasi)。

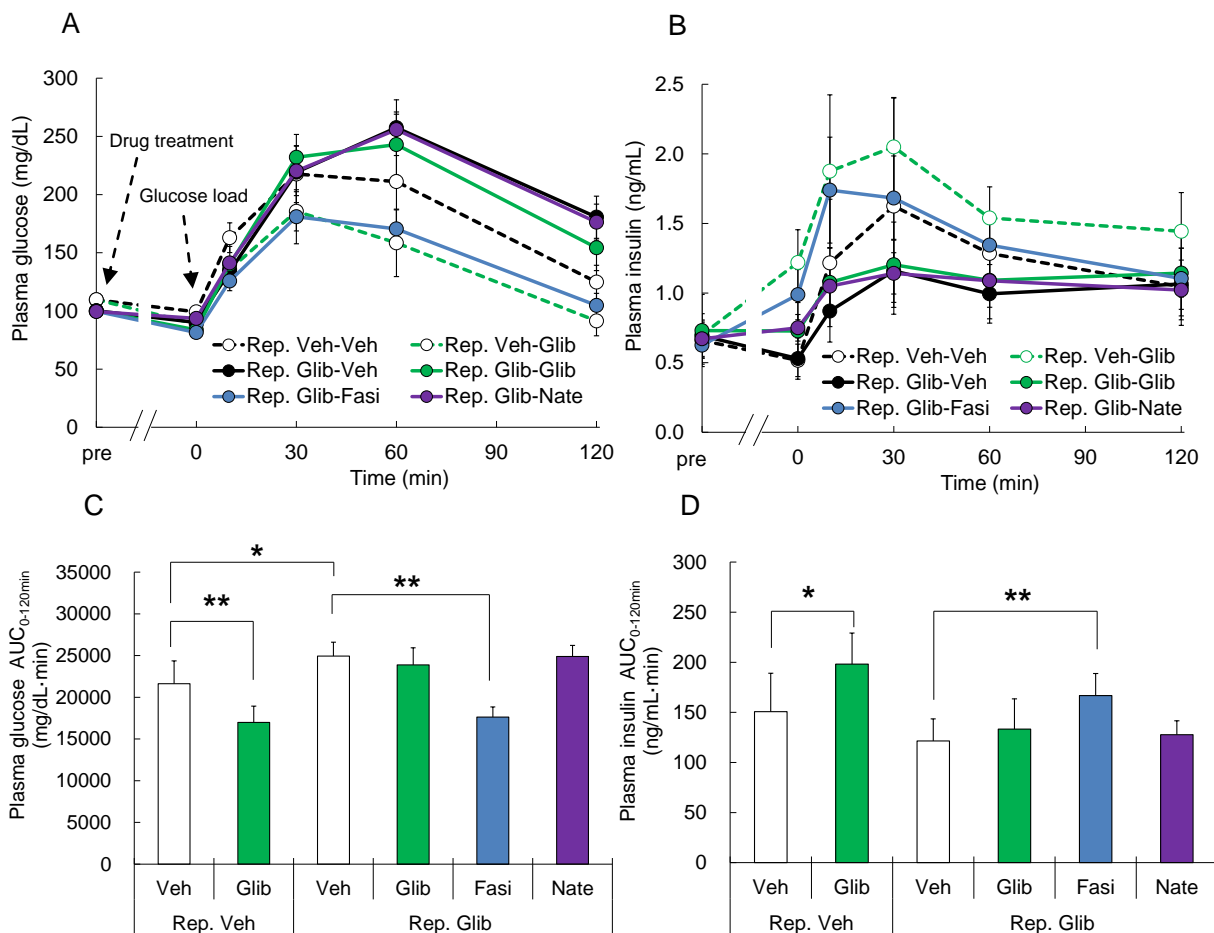


Figure 4. Fasigliam is effective in male N-STZ-1.5 rats with SU secondary failure. N-STZ-1.5 rats were treated once daily with vehicle (Rep. Veh) or glibenclamide (Rep. Glib, 10 mg/kg) for 4 weeks. After the treatment, vehicle (Veh) or glibenclamide (Glib, 10 mg/kg) was given orally to the Rep. Veh group, and vehicle, glibenclamide (10 mg/kg), or fasigliam (Fasi, 3 mg/kg) or nateglinide (Nate, 50 mg/kg) was given orally to the Rep. Glib group. Following 1 hr (vehicle, glibenclamide and fasigliam) or 30 min (nateglinide) after dosing, all animals received oral glucose load (1 g/kg). (A) and (B) show time-dependent changes in plasma glucose and insulin levels, respectively. Data in (C) and (D) represent plasma glucose AUC_{0-120 min} and plasma insulin AUC_{0-120 min}, respectively. *p<0.05, **p<0.01 by Student's t-test or Aspin-Welch test. Data are mean ± S.D. (n=8).

(出典) Ito et al. *J Pharmacol Exp Ther.*, **357**, 217-27 (2016)., Figure 4

4. SU薬との併用効果

Fasigliam および SU 薬の併用効果の有無について、N-STZ-1.5 ラットを用いたグルコース負荷試験により評価した。本検討では、臨床外挿性の高い結果を得るために、SU 薬としてより臨床で汎用されているグリメピリドを選択した。Fasigliam (3 mg/kg) および SU 薬グリメピリド (10 mg/kg) の単回投与はそれぞれ 25.3% および 20.0% 血糖面積を低下し、また、これらの併用は 43.1%

のさらなる低下作用を示し、相加的な耐糖能改善作用が確認された (Figure 5A、C、2-way ANOVA; fasiglifam、 $p \leq 0.01$; glimepiride、 $p \leq 0.01$; interaction, not significant)。血糖値と相関して、fasiglifam 単独、グリメピリド単独およびそれらの併用はそれぞれ 1.4 倍、1.3 倍および 1.7 倍グルコース負荷後のインスリン分泌を促進し、相加作用が確認された (Figure 5B、D、2-way ANOVA; fasiglifam、 $p \leq 0.01$; glimepiride、 $p \leq 0.01$; interaction, not significant)。

次に、非絶食飼育下の正常ラットを用いて、上記と同用量の fasiglifam およびグリメピリドを用いて併用単回投与の影響について検討した。グリメピリド (10 mg/kg) 単独投与は 60 分をピークとするインスリン分泌促進作用を示し、血糖値を 65 mg/dL 以下にまで低下し、低血糖を誘発した (Figure 6)。Fasiglifam (3 mg/kg) 単独投与は有意に血糖値を低下するものの、その低下は正常血糖範囲内 (120 mg/dL 以上) にとどまり、グリメピリドの作用に比して血糖およびインスリン値に対する影響は軽微であった (Figure 6)。興味深いことに、fasiglifam およびグリメピリドの併用投与は、グリメピリド単独投与時に比してさらなるインスリン分泌促進および血糖低下作用を示すことはなかった (Figure 6)。GPR40 作動薬と同様グルコース濃度依存的にインスリン分泌促進することが知られている DPP4 阻害薬 alogliptin についても同評価系で評価した。用量は、N-STZ-1.5 ラットを用いた以前の検討において (35)、十分強い耐糖能改善作用を示した 1 mg/kg の alogliptin を用いた。Alogliptin 単独投与もまた正常血糖範囲以下に血糖低下することはなく (Figure 6)、また、グリメピリドとの併用投与時において、グリメピリドによる血糖低下作用を増強せず、fasiglifam と同様の結果が確認された (Figure 6)。この結果から、fasiglifam と SU 薬との併用は低血糖を増悪することなく、相加的に食後過血糖を改善し得ることが示された。

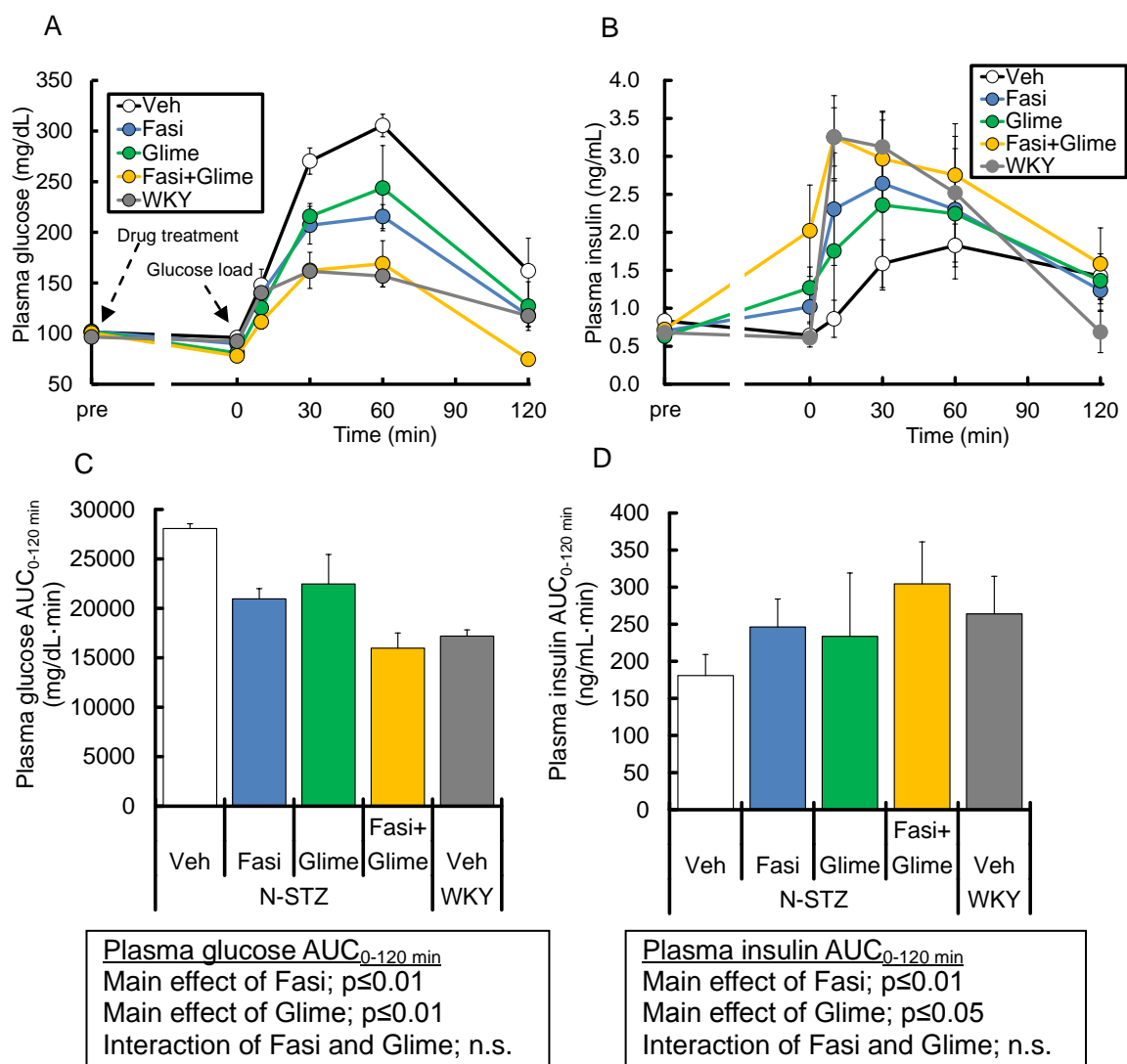


Figure 5. Combination of fasiglifam and glimepiride additively improves glucose tolerance in N-STZ-1.5 rats. (A) and (B) show time-dependent changes in plasma glucose and insulin levels, respectively, after glucose load (1.5 g/kg) in N-STZ-1.5 rats treated with vehicle (Veh), 3 mg/kg of fasiglifam (Fasi) or 10 mg/kg of glimepiride (Glime), and in WKY rats (normal controls) treated with vehicle. Data in (C) and (D) represent plasma glucose AUC_{0-120 min} and plasma insulin AUC_{0-120 min}, respectively. The results of two-way ANOVA are indicated in insets. n.s., not significant. Data are mean ± S.D. (n=6 for N-STZ-1.5 rats, n=5 for WKY rats).

(出典) Ito et al. *J Pharmacol Exp Ther.*, **357**, 217-27 (2016)., Figure 6

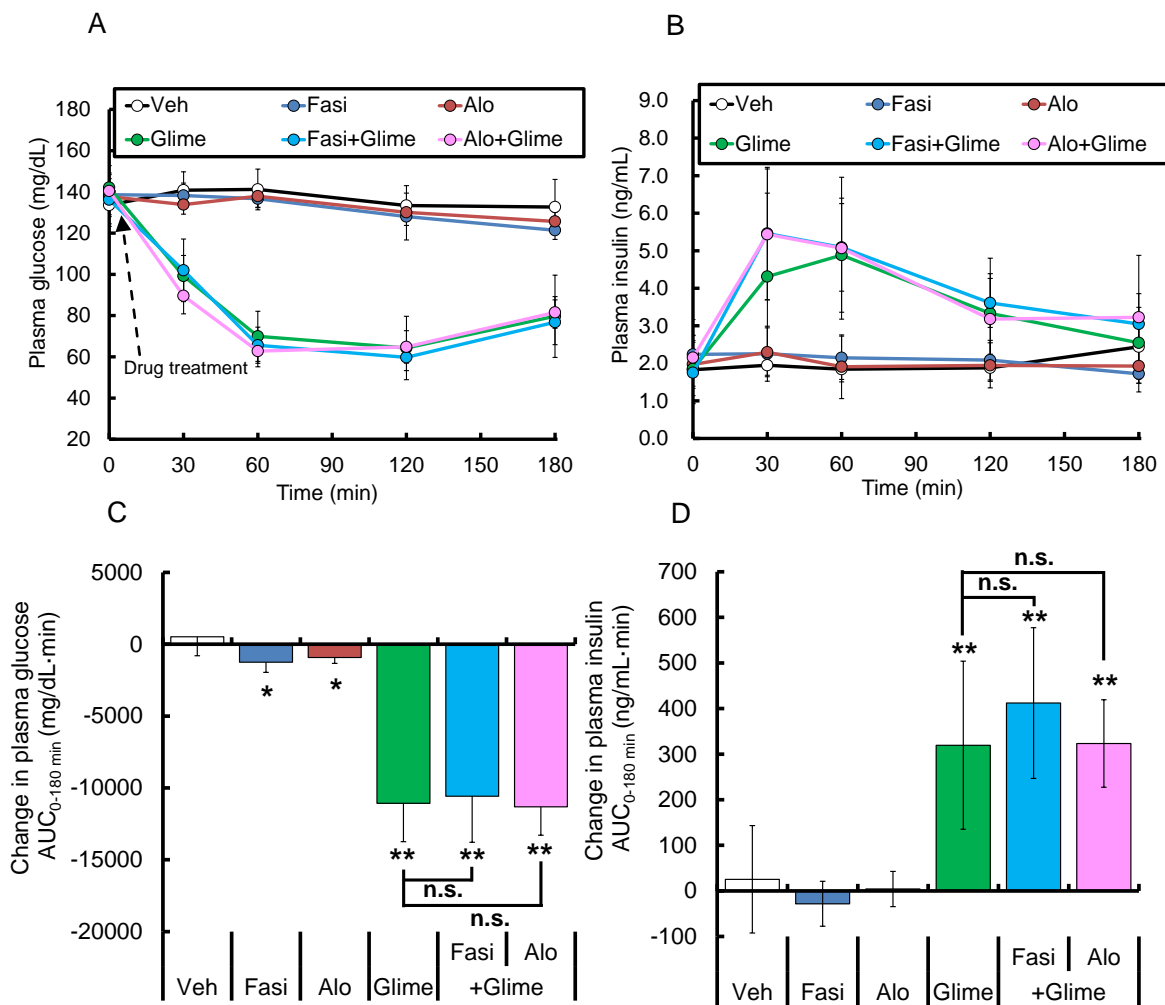


Figure 6. Fasiglifam does not induce hypoglycemia or exacerbate SU-induced hypoglycemia in normal rats. (A) and (B) show time-dependent changes in plasma glucose and insulin levels, respectively, after treatment with vehicle (Veh), 3 mg/kg of fasiglifam (Fasi), 3 mg/kg of alogliptin (Alo), 10 mg/kg of glimepiride (Glime), 3 mg/kg of fasiglifam in combination with 10 mg/kg of glimepiride, or 1 mg/kg of alogliptin in combination with 10 mg/kg of glimepiride. Data in (C) and (D) represent change in plasma glucose AUC_{0-180 min} and change in plasma insulin AUC_{0-180 min} after drug treatments, respectively. Data are mean \pm S.D. (n=6). *p \leq 0.05, **p \leq 0.01 compared with vehicle by Student's t-test or Aspin-Welch test. n.s., not significant.

(出典) Ito et al. *J Pharmacol Exp Ther.*, **357**, 217-27 (2016)., Figure 7

第4節 考察

第1章において、GPR40 作動薬 fasiglifam はグルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進することで、SU 薬に比して低血糖リスクが低いことが示された。GPR40 作動薬の新規糖尿病治療薬としての可能性を考える上で、SU 薬とのさらなる差別化点を明確にする必要がある。しかしながら、これまで GPR40 作動薬と SU 薬の *in vivo* 作用を詳細に比較した報告はまだない。本研究において、fasiglifam が SU 薬グリベンクラミドに比してより強力に食後過血糖を低下することが示された。また、SU 薬よりも十分強い血糖低下を達成し得る用量の fasiglifam を 15 週間にわたって反復投与しても、SU 薬で認められるような二次無効は惹起されず、良好な薬効持続性を有することが確認された。興味深いことに、SU 二次無効を呈するラットに対しても、fasiglifam は血糖低下およびインスリン分泌促進作用を維持し、二次無効患者に対する有効性も示唆された。また、fasiglifam と SU 薬グリメピリドの併用投与は糖尿病モデルに対して相加的に血糖低下作用を示す一方で、正常ラットにおいて SU 薬によって誘導された低血糖を増悪することはなかった。これら SU 薬を用いた多面的な解析から、SU 薬服用でも十分効果が得られない患者に対する新しい選択肢として GPR40 作動薬の可能性が示された。

GPCR は選択的な作動薬により繰り返し刺激し続けると、その応答性が次第に減弱し脱感作を生じることが知られている。膵 β 細胞においてもインスリン分泌に関与する GPCR について、脱感作がいくつか報告されている (36-38)。近年、インスリン分泌促進薬として開発されてきた GPR119 作動薬 GSK1292263 が臨床において長期投与で薬効減弱することが報告され (39)、GPCR の脱感作リスクによる作動薬の開発の難しさが浮き彫りとなった。本研究において、SU 薬が二次無効を生じる期間よりも長期の4ヶ月にわたって fasiglifam を投与しても二次無効症状は惹起されず、fasiglifam が脱感作を起しにくい特徴を有している可能性が示唆された。第1章の考察でも述べたが、最近、fasiglifam は GPR40 のアゴアロステリックモデュレーターとして作用し、内因性リガンドである脂肪酸と協調する形でインスリン分泌を促進することが明らかとなった (31)。また、fasiglifam の結合部位は類似の GPCR のオルソステリック結合部位とは異なる、脂質二重膜内に存在する特有の結合部位に結合することが示されている (15)。一般的に、オルソステリック作動薬と比較して、アロステリックモデュレーターは受容体脱感作を誘導する可能性が低いことが知られており (40)、本検討で認められた fasiglifam の低い脱感作リスクは、この特有の GPR40 活性化形式に起因すると推測される。

臨床において、SU 薬に対して二次無効を生じる正確なメカニズムは明らかになっていないが、非臨床研究から長期活性化による膵 β 細胞の疲弊あるいは不十分な血糖コントロールによる糖毒性等が原因として考えられている (41,42)。本検討において、N-STZ-1.5 ラットに4週間グリベンクラミドを反復投与することで二次無効を生じたが、正常空腹時血糖値を維持していたことから、その原因は糖毒性よりもむしろ膵 β 細胞の長期刺激によるインスリン分泌機構の不応答 (疲弊) であると考えられる。以前の *in vitro* の検討において、グリベンクラミドに長期間さらした β 細胞は高い細胞内カルシウム濃度を維持する一方で、細胞膜上の機能性 K_{ATP} チャンネルの量が低下することが報告されている (43,44)。二次無効を呈する N-STZ-1.5 ラットに対して fasiglifam がインスリン分泌促進作用を維持していた本結果から、十分な細胞内カルシウム濃度存在下であれば、

GPR40を介したインスリン分泌に K_{ATP} チャネルは必ずしも必要ないことを示唆しているのかもしれない。これは、第1章の考察中でも論じたが、 K_{ATP} チャネルを介さず、電位依存性カルシウムチャネルの直接開口で誘導されるインスリン分泌に対して GPR40 作動薬が増強作用を発揮するという以前の報告 (27) と一致する結果である。

以前のラットインスリンノーマ細胞を用いた検討において、GPR40を介したインスリン分泌促進のグルコース濃度依存性は、SU薬の共添加により破綻することが報告され (27)、SU薬との併用により GPR40 作動薬が低血糖を助長する懸念があった。糖尿病ラットにおいて fasiglifam とグリメピリドの併用は相加的に耐糖能改善およびインスリン分泌促進作用を示す一方で、同用量を非絶食の正常ラットに投与しても、fasiglifam がグリメピリドによって惹起される低血糖を増悪することはなかった。これらの結果から、SU存在下における GPR40 のグルコース濃度依存性の破綻は *in vivo* では起こりにくい (代償される) ことが想定される。*In vivo* におけるインスリン分泌はグルコース以外にも神経制御や他の内分泌細胞からのパラクライン機構による制御など様々な因子によって調節されており、これが *in vitro* と *in vivo* の結果の違いに貢献していると考えられる。また、正常ラットを用いた同評価系において、DPP4 阻害薬 alogliptin もまたグリメピリドによる低血糖に影響を与えなかった。しかしながら、高齢者あるいは腎機能の低下した特定の患者層に比較的高用量の SU薬を使用したケースで、DPP4 阻害薬と SU薬の併用が重篤な低血糖をもたらすという臨床報告がある (45)。臨床における fasiglifam 単独処置による低血糖リスクは極めて低いことがすでに確認されているが (46)、SU薬との併用治療においては細心の注意を払う必要があるだろう。

これらの結果から、GPR40 作動薬が SU薬に比して強力にかつ持続的に血糖低下作用を発揮し得ることが示された。また、SU薬二次無効患者に対する置き換え、あるいは血糖コントロール不十分な SU薬服用患者への追加投与など広範な患者への治療オプションとして GPR40 作動薬が有効である可能性が示唆された。

第3章

GPR40 作動薬 fasiglifam の脂肪毒性への関与についての検討

第1節 緒言

膵β細胞への脂肪酸の短期暴露はインスリン分泌を促進するが、長期に高濃度暴露するとむしろ膵β細胞機能低下および細胞死を誘発する、いわゆる脂肪毒性を惹起することが知られている(47)。GPR40の内因性リガンドが脂肪酸であることから、GPR40の持続的な活性化が脂肪毒性を惹起する可能性が懸念され、GPR40の遺伝子改変マウスを用いた検証が行われてきた。2005年にStenebergらが報告したpancreas duodenum homeobox-1 (PDX-1)プロモーター下GPR40を膵β細胞に高発現したマウスの解析では、β細胞機能低下や糖尿病悪化などの表現系が確認され、脂肪毒性への関与を示唆する成績が示された(48)。一方、長住らはインスリンIIプロモーター下で膵β細胞特異的にヒトGPR40を高発現するマウスを作製したところ、野生型マウスと比較してむしろ経口グルコース負荷後のインスリン分泌の上昇および耐糖能の改善が認められ(49)、Stenebergらと相反する結果を報告した。また、GPR40欠損マウスについても複数のグループから報告されており(20,50,51)、これらはすべてGPR40の脂肪毒性への関与を否定している。このように、GPR40の遺伝子改変マウスの結果からはGPR40の脂肪毒性への関与について一定の結論が得られておらず、膵β細胞機能に対するGPR40作動薬の長期的な影響について高い関心が集まっている。

一般的に、脂肪毒性の原因となる遊離脂肪酸は、肥満にともない内臓脂肪細胞から過剰に放出されると考えられている。したがって、脂肪毒性が危惧されるのは、主に肥満・インスリン抵抗性を呈する欧米型2型糖尿病患者である。ビッグアナイト薬のメトフォルミンは、肝臓における糖産生抑制、末梢組織における糖利用亢進あるいは消化管における糖吸収抑制などさまざまな作用により血糖低下作用を発揮するインスリン抵抗性改善薬である(52)。その安全性の高さから、糖尿病治療指針の中で、肥満2型糖尿病患者の多い欧米における第一選択薬として推奨されている(53)。複数の薬剤を併用する糖尿病治療の現状を考えると、脂肪毒性との関連性が懸念されるGPR40作動薬に関してはメトフォルミン併用下での膵β細胞に対する影響は特に考慮する必要がある。

本研究では、fasiglifamを用いてGPR40の脂肪毒性への関与を*in vitro*および*in vivo*で検討した結果、fasiglifamが膵β細胞に対して脂肪毒性を誘導する可能性は極めて低いことが示され、GPR40作動薬の糖尿病治療薬としての可能性を考える上でも重要な知見が得られた。また、メトフォルミンとの併用投与条件においても、fasiglifamは膵β細胞をむしろ改善しながら、強力な血糖コントロールを達成し得ることが証明されたので以下に報告する。

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物

Fasiglifam は武田薬品工業株式会社 Chemistry, Manufacturing and Control Center にて合成された。メトフォルミンは和光純薬株式会社 (大阪、日本) より購入された。In vitro 試験に際して、fasiglifam は DMSO に溶解して使用し、10% 脂肪酸フリーウシ血清アルブミン (和光純薬) 溶液で希釈した。また、パルミチン酸ナトリウム (Chem Service、West Chester、PA) およびオレイン酸ナトリウム (Sigma、St. Louis、MO) は加温した蒸留水に溶解後、氷上で攪拌しながら等量の 20% 脂肪酸フリーウシ血清アルブミン溶液と混和した。アルブミンおよび DMSO の最終濃度はそれぞれ 1 および 0.1% となるよう調製した。In vivo 試験に際して、fasiglifam およびメトフォルミンはともに 0.5% MC 溶液に懸濁し、示された用量で投薬した。

2. 使用細胞

ラットインスリノーマ INS-1 832/13 細胞は Dr. Christopher B. Newgard (Duke University Medical Center、Durham、NC) より供与され、L-glutamine (Invitrogen、Carlsbad、CA)、1 mM sodium pyruvate (Invitrogen)、10 mM HEPES (Invitrogen)、10% 非働化处理済ウシ胎仔血清 (Thermo Fisher Scientific)、55 μM 2-mercaptoethanol (Invitrogen)、100 IU/ml penicillin および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin 含有 RPMI 1640 培地 (Invitrogen) で 37°C、5%CO₂ 環境下で培養した。本章では脂肪毒性に対する影響を評価するという目的から、第 1 章で用いたサイトカイン耐性株 INS-1 833/15 細胞ではなく、サイトカイン感受性株 INS-1 832/13 細胞を選択した (54)。

3. インスリン分泌および細胞内インスリン含量の測定

短期刺激によるインスリン分泌を評価するため、INS-1 832/13 細胞は 5×10^4 cells/well の細胞密度で 96-well plate に播種し、1 晩培養した。細胞は 1 mM グルコース含有 KRBH で 37°C で 2 時間プレインキュベーションした後、1% 脂肪酸フリーウシ血清アルブミンおよび 0.1% DMSO (control)、パルミチン酸 (10-1000 μM)、オレイン酸 (10-1000 μM) あるいは fasiglifam (1-100 μM) および示された濃度のグルコースを含む KRBH でさらに 2 時間培養した。各 well から上清を回収し、分泌されたインスリン濃度をラットインスリン ELISA (森永生科学研究所、横浜、日本) を用いて定法に従って測定した。長期暴露のインスリン分泌に対する影響を評価するため、INS-1 832/13 細胞は 2×10^4 cells/well の細胞密度で 96-well plate に播種し、1% 脂肪酸フリーウシ血清アルブミンおよび 0.1% DMSO (control)、パルミチン酸 (10-1000 μM)、オレイン酸 (10-1000 μM) あるいは fasiglifam (1-100 μM) が添加された。72 時間培養後、細胞は 1 mM グルコースおよび 0.2% 脂肪酸フリーウシ血清アルブミン含有 KRBH で 37°C で 2 時間プレインキュベーションし、示された濃度のグルコースを含む KRBH でさらに 2 時間培養した。各 well から上清を回収し、分泌されたインスリン濃度をラットインスリン ELISA を用いて定法に従って測定した。細胞内インスリン含量を測定するために、細胞は PBS で洗浄後、酸エタノール (0.15 M 塩酸含有 74% エタノール) 溶液を添加し、氷上で超音波破碎した。-30°C で 1 晩静置後、上清を 4°C、12000 rpm で 5 分遠心し、細胞から抽出したインスリン量を測定した。

4. カスパーゼ 3/7 活性の測定

INS-1 832/13 細胞は、 2×10^4 cells/well の細胞密度で poly-D-lysine coated 96-well black plate に播種し、1%脂肪酸フリーウシ血清アルブミンおよび0.1%DMSO (control)、パルミチン酸 (62.5-1000 μ M)、オレイン酸 (62.5-1000 μ M) あるいは fasiglifam (6.25-100 μ M) を添加した。72 時間培養後、カスパーゼ 3/7 活性を Apo-one homogenous caspase 3/7 assay (Promega, Madison, WI) を用いて定法に従って蛍光強度を測定した (励起波長 485 nm、測定波長 535 nm)。

5. 動物

雄性 ZDF ラットおよびその対照ラット ZL ラットは日本チャールスリバー (横浜、日本) から購入した。すべてのラットは CE-2 (日本クレア、東京、日本) 給餌および自由飲水条件下で馴化飼育し、試験時に示された飼育条件に変更した。動物の取り扱いおよび実験は、武田実験動物倫理委員会の定める基準に準じて実施した。

6. 反復投与試験

ZDF ラットおよび ZL ラットは粉末 CE-2 食の朝晩 1 日 2 回 (各 2 時間) の時間制限給餌条件下で 5 日間飼育した。10 週齢で ZDF ラットを体重および血漿パラメーターを指標に 4 群 (n=6) に群分けし、餌を高カロリー食 (Quick Fat、日本クレア) に変更した。0.5% MC 懸濁液 (vehicle)、fasiglifam (10 mg/kg、1 日朝晩 2 回) 懸濁液、メトフォルミン (50 mg/kg、1 日夕方 1 回) 懸濁液あるいは fasiglifam (10 mg/kg、1 日朝晩 2 回) およびメトフォルミン (50 mg/kg、1 日夕方 1 回) 併用懸濁液を各給餌 30 分前に 2.5 mL/kg で投与した。ZL ラット (n=5) は 0.5% MC 懸濁液を投与された。反復投与 2、4 および 6 週目の朝の給餌前に尾静脈採血し、血中糖化ヘモグロビン値、血漿中グルコース、トリグリセリド、総コレステロール、遊離脂肪酸、インスリンおよびグルカゴン測定した。体重および摂餌量は週 1 回測定した。投与 44 日目、ラットから膵臓を摘出し、2 つに分けた。1 片は膵インスリン含量の測定に、もう 1 片は免疫組織化学的解析に用いられた。

7. 血漿および膵パラメーターの測定

血中糖化ヘモグロビン値は HPLC-based automated analyzer HLC-723 G7 (東ソー、東京、日本) を用いて測定した。血漿中グルコース、トリグリセリド、総コレステロール、遊離脂肪酸は、自動分析装置 7080 (日立、東京、日本) で測定した。血漿中インスリンおよびグルカゴンは、RIA キット (Millipore, Bedford, MA) を用いて測定した。膵インスリン含量を測定するために、膵臓を酸エタノール溶液中でホモジナイズし、遠心した。上清中のインスリンおよびグルカゴンは、RIA キット (それぞれ Millipore および TFB、東京、日本) を用いて測定した。

8. 免疫組織化学的解析

膵臓は Bouin's solution (Polysciences, Inc, Warrington, PA) を用いて 1 晩固定し、パラフィン包埋切片を作製した。一次抗体としてモルモット抗インスリン抗体 (Dako, Glostrup, Denmark)、ウサギ抗グルカゴン抗体 (Dako)、ウサギ抗 PDX-1 抗体 (TransGenic、熊本、日本) およびマウス抗 PCNA 抗体 (Dako) を、発色基質として 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を使用して染色し、対比染色として haematoxylin 染色を行った。染色画像を inverted microscope IX71 (オリンパス、東

京、日本) あるいは Apero ScanScope XT system (Aperio Technologies、Vista、CA) を用いて取得した。

8. 統計解析

Homeostasis model assessment of β -cell function (HOMA- β) index は、(360 × 空腹時インスリン値 [μ U/ml]) ÷ (空腹時血糖値 [md/dL] - 63) (55) で算出された。Vehicle との比較は Dunnett's test あるいは Steel test を用いて解析した。2 群間の比較は Student's t-test あるいは Aspin-Welch test により行った。併用効果は 2 元配置分散分析 (ANOVA) を用いて解析した (34)。解析結果は以下の基準に従って解釈した。1) 有意な interaction ($p \leq 0.05$) が観察された場合、その併用効果は相乗効果 (単独効果の総和を上回る効果)、2) 各薬剤の有意な main effect ($p \leq 0.05$) かつ有意でない interaction が観察された場合、その併用効果は相加効果 (単独効果の総和に等しい効果) と解釈された。すべてのデータは平均 \pm 標準偏差で示された。

第3節 結果

1. 膵 β 細胞における長期暴露の影響

Fasiglifam の長時間暴露の影響について評価する目的で、第 1 章で用いたサイトカイン耐性ラット膵 β 細胞株である INS-1 833/15 ではなく、本章ではサイトカイン感受性株の INS-1 832/13 細胞を用いた (54)。また、血漿中において、脂肪酸のほとんどはアルブミンと結合することで長期間安定して存在することから、本検討では 1% ウシ血清アルブミン条件が選択された。最初に、1% ウシ血清アルブミン存在下における脂肪酸あるいは fasiglifam 短期刺激によるインスリン分泌を評価した。10 mM グルコース存在下、GPR40 の内因性リガンドであるパルミチン酸およびオレイン酸はともに 62.5-1000 μ M において濃度依存的なインスリン分泌促進活性を示し、同条件下 fasiglifam も 6.25-100 μ M の濃度範囲において同等以上のインスリン分泌促進作用を示した (Figure 1A-C)。次に、同 INS-1 832/13 細胞を用いて、脂肪酸あるいは fasiglifam 長期暴露のグルコース刺激インスリン分泌能および膵インスリン含量に対する影響を評価した。パルミチン酸 (1000 μ M) の 72 時間暴露は、20 mM グルコース刺激インスリン分泌を有意に低下させ、また細胞内インスリン含量を低下させた (Figure 2A、B)。同条件下、オレイン酸 (1000 μ M) は、インスリン分泌の低下を示さなかったが、インスリン含量を有意に減少させた (Figure 2A、B)。対照的に、高濃度の fasiglifam (1000 μ M) を 72 時間暴露しても、インスリン分泌および膵インスリン含量に明確な影響は確認されなかった (Figure 2A、B)。また、パルミチン酸 (62.5-1000 μ M) およびオレイン酸 (62.5-1000 μ M) の INS-1 832/13 細胞への 72 時間暴露は、濃度依存的にアポトーシスの指標であるカスパーゼ 3/7 活性を亢進し、それぞれ 250 μ M および 500 μ M から有意な上昇を示した (Figure 2C、D)。一方、インスリン分泌を惹起するのに十分な濃度の fasiglifam (62.5-100 μ M) を同期間処置しても、カスパーゼ 3/7 活性の上昇は確認されなかった (Figure 2E)。これらの結果から、*in vitro* において、fasiglifam による GPR40 の長期活性化が脂肪毒性様作用を誘発する可能性が低いことが示された。

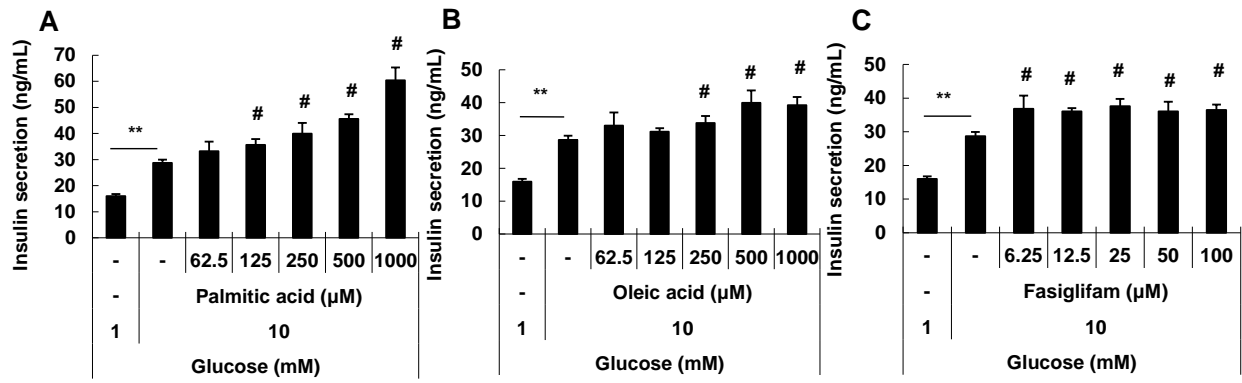


Figure 1. Effects of palmitic acid, oleic acid and fasiglifam in the presence of 1% bovine serum albumin (BSA) on insulin secretion in INS-1 832/13 cells. INS-1 832/13 cells were stimulated with 1 or 10 mM glucose, in the absence (shown as -) or presence of palmitic acid (62.5-1000 μM, A), oleic acid (62.5-1000 μM, B), or fasiglifam (6.25-100 μM, C), together with 1% BSA. Data are mean + S.D. (n=3). **p<0.01 by Student's t-test. # p<0.025 versus control (10 mM glucose alone) by one-tailed Williams' test.

(出典) Tsujihata *et al. J Pharmacol Exp Ther.*, **339**, 228-37 (2011)., Supplemental Figure 1-2

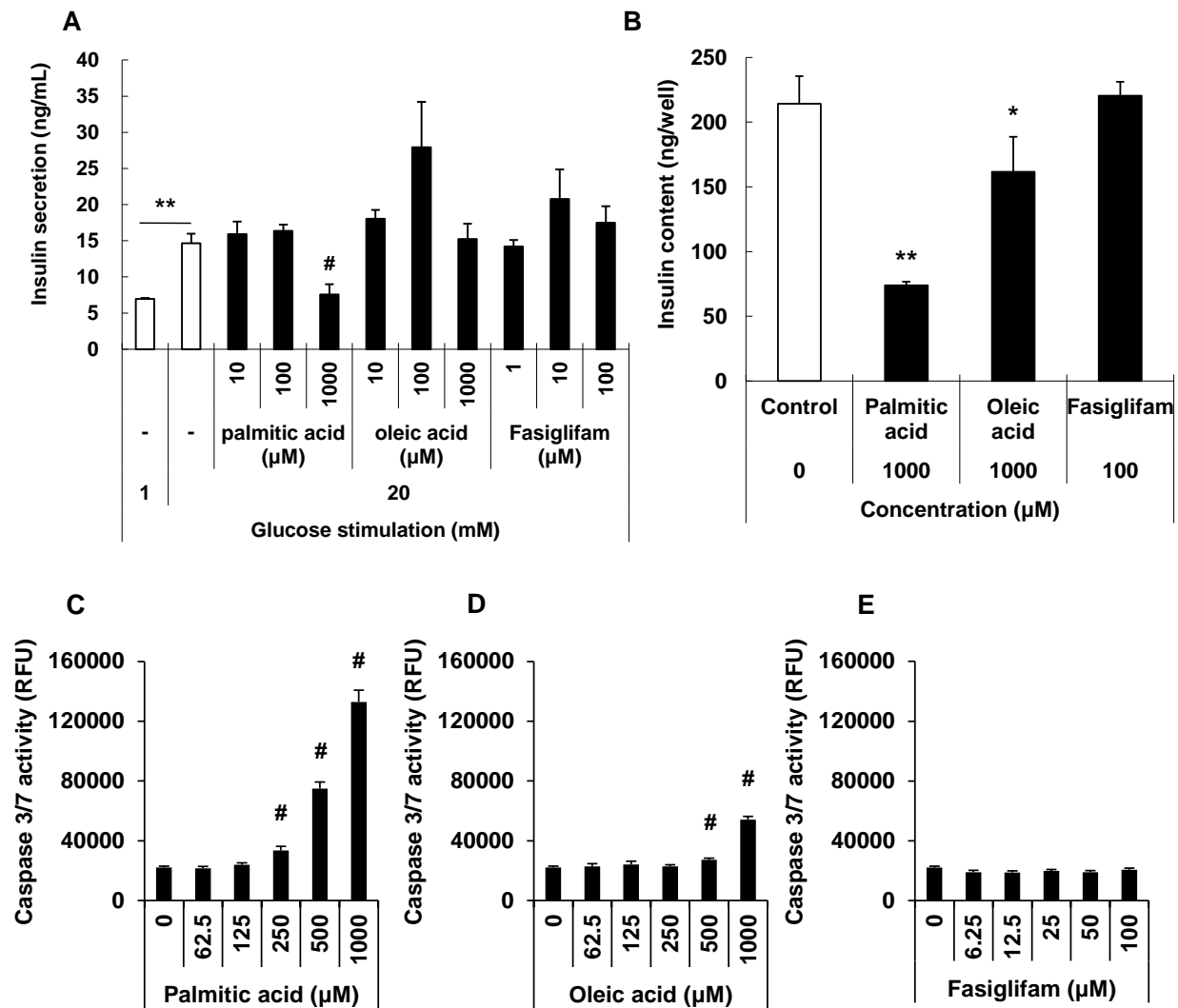


Figure 2. Prolonged stimulation of GPR40 with fasiglifam does not cause β cell dysfunction and initiate apoptotic signaling in INS-1 832/13 cells. A, insulin secretion capacity in response to high glucose concentration after 72-h exposure to palmitic acid, oleic acid, or fasiglifam in INS-1 832/13 cells. INS-1 832/13 cells were treated with palmitic acid (10, 100, or 1000 μ M), oleic acid (10, 100, or 1000 μ M), or fasiglifam (1, 10, or 100 μ M) for 72 h, and subsequent insulin secretory capacities in response to 20 mM glucose were examined. Empty bars, vehicle alone; filled bars, palmitic acid, oleic acid, or fasiglifam. Data are mean + S.D. (n=3). ** $p \leq 0.01$ by Aspin-Welch test. # $p \leq 0.025$ versus control (20 mM glucose stimulation) by one-tailed Williams' test. B, intracellular insulin content in INS-1 832/13 cells after 72-h exposure to palmitic acid (1000 μ M), oleic acid (1000 μ M), or fasiglifam (100 μ M). Data are mean + S.D. (n=3). * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$ versus control by Dunnett's test. C to E, caspase 3/7 activity in INS-1 832/13 cells after 72-h exposure to palmitic acid (62.5–1000 μ M) (C), oleic acid (62.5–1000 μ M) (D), or fasiglifam (6.25–100 μ M) (E). Data are mean + S.D. (n=3). # $p \leq 0.025$ versus control by one-tailed Williams' test.

(出典) Tsujihata *et al. J Pharmacol Exp Ther.*, **339**, 228-37 (2011)., Figure 5

2. 高脂血症を呈する糖尿病モデルラットにおける長期投与効果

ZDF ラットは高脂血症、インスリン抵抗性を呈する 2 型糖尿病モデルである。加齢とともに膵 β 細胞の機能低下を示し、高血糖に先行して血漿中脂肪酸レベルの上昇や膵ラ氏島内の脂質蓄積が認められることから、その病態形成に膵 β 細胞の脂肪毒性の関与が示唆されている (56,57)。そこで、高カロリー食の 1 日 2 回時間制限給餌条件下で飼育した ZDF ラットを用いて、fasiglifam の長期投与による膵 β 細胞に対する影響を評価した。ZDF ラットは 12 週齢 (試験開始 2 週目) から血糖が上昇し始め、16 週齢 (6 週目) で顕著な高血糖に達した (Figure 3A)。Fasiglifam (10 mg/kg、1 日 2 回) の 6 週間反復投与は、空腹時血糖値を 22.4% 低下する傾向を示し、また血糖コントロールの長期指標である糖化ヘモグロビン値 (GHb) を 1.7% 有意に低下させた (Figure 3)。ZDF ラットでは、反復投与 4 週目まで血漿中インスリンレベルが上昇し、高インスリン血症を呈するが、6 週目以降、血糖値上昇に伴って急速にインスリンレベルが低下し、膵 β 細胞機能低下が確認された (Figure 4A)。Fasiglifam 投与群において、血漿インスリンレベルは vehicle 投与ラットに比して 2.2 倍高値、膵 β 細胞の機能指標である HOMA- β 値も 5 倍高値を示した (Figure 4A-C)。一方、膵 α 細胞から分泌される血糖上昇ホルモンであるグルカゴンの血漿レベルに対して、fasiglifam 反復投与は、明確な影響を与えなかった (Figure 4D)。反復投与 6 週目時点で、対照ラットに比して、ZDF ラットは、血漿トリグリセリド (TG) および総コレステロール (TC) レベルが有意に高値を示し、高脂血症を呈することが確認された (Table 1)。Fasiglifam の 6 週間反復投与は血漿脂質レベルに対して影響を与えなかった (Table 1)。これらの結果から、高脂血症環境下においても、fasiglifam による GPR40 の長期活性化は、膵 β 細胞機能を悪化するよりもむしろ血糖コントロールをとめない機能改善することが示唆された。

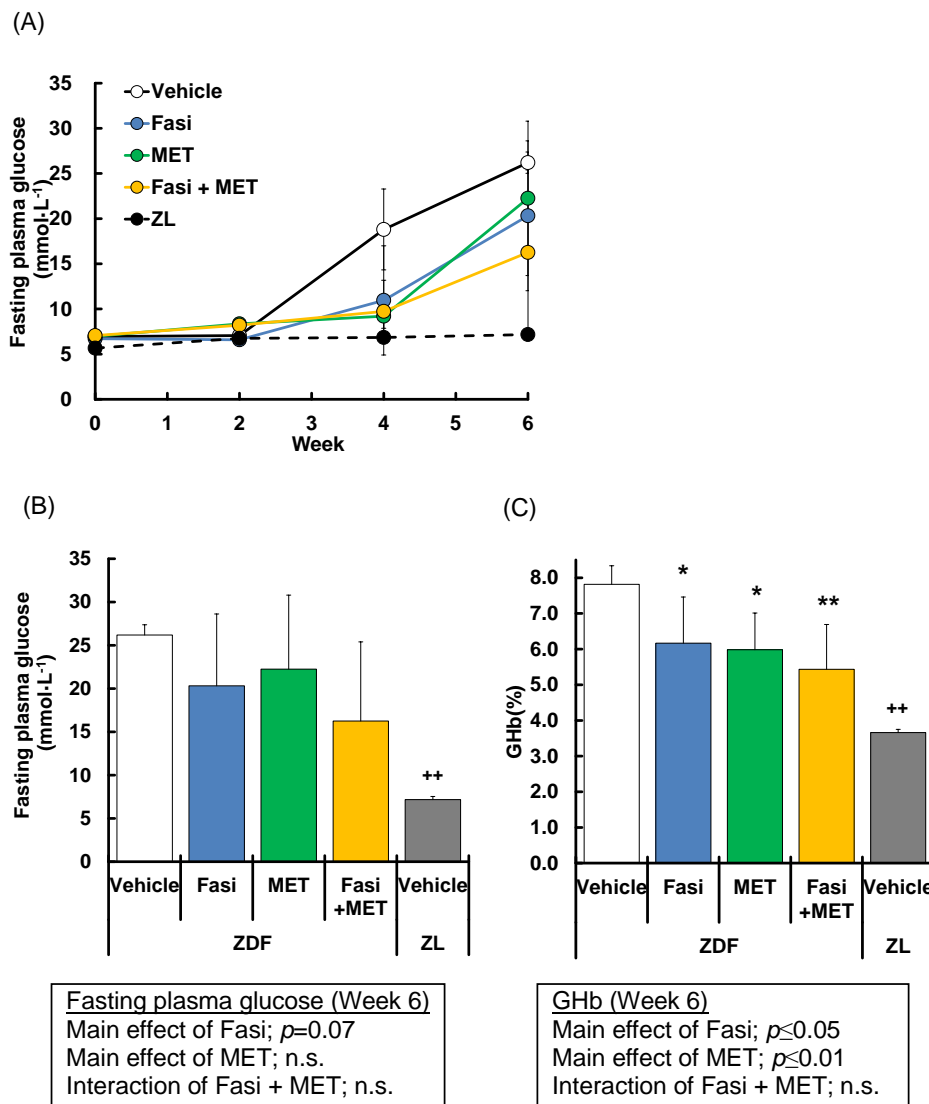


Figure 3. Effects of 6 week treatment with fasiglifam (Fasi), metformin (MET) and Fasi in combination with MET on glycaemic parameters in ZDF rats. A shows fasting plasma glucose levels in ZDF rats during 6 weeks of treatment with vehicle, 10 mg/kg, b.i.d. of Fasi, 50 mg/kg, q.d. of MET, or their combination, and in ZL rats during 6 weeks of treatment with vehicle. Data in B and C represent fasting plasma glucose and GHb levels after 6 weeks of treatment, respectively. * $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$ compared with vehicle-treated ZDF rats by Dunnett's test or Steel test. ++ $p\leq 0.01$ compared with vehicle-treated ZDF rats by Student's t-test or Aspin-Welch test. The results of two-way ANOVA are indicated in insets. Data are mean \pm S.D. ($n = 6$ for ZDF rats, $n = 5$ for ZL rats). n.s., not significant.

(出典) Ito *et al. Br J Pharmacol.*, **170**, 568-80 (2013)., Figure 4.

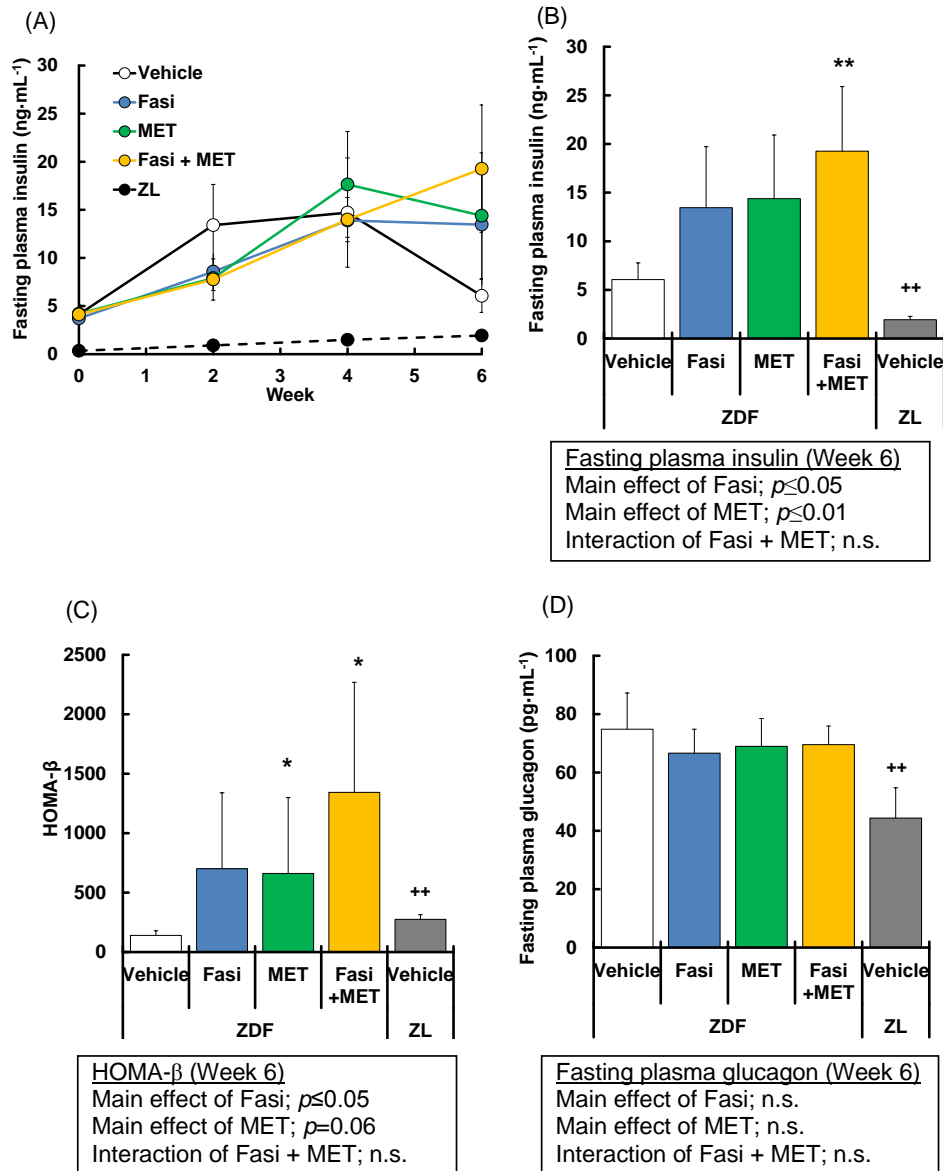


Figure 4. Effects of 6 week treatment with fasiglifam (Fasi), metformin (MET) and Fasi in combination with MET on plasma insulin and glucagon levels in ZDF rats. A shows fasting plasma insulin in ZDF rats during 6 weeks of treatment with vehicle, 10 mg/kg, b.i.d. of Fasi, 50 mg/kg, q.d. of MET, or their combination, and in ZL rats during 6 weeks of treatment with vehicle. Data in B, C and D represent fasting plasma insulin levels, homeostasis model assessment of β -cell function (HOMA- β) index calculated from fasting plasma glucose and insulin levels and fasting plasma glucagon levels after 6 weeks of treatment, respectively. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ compared with vehicle-treated ZDF rats by Dunnett's test or Steel test. ++ $p \leq 0.01$ compared with vehicle-treated ZDF rats by Student's t-test or Aspin-Welch test. The results of two-way ANOVA are indicated in insets. Data are mean \pm S.D. (n = 6 for ZDF rats, n = 5 for ZL rats). n.s., not significant.

(出典) Ito *et al. Br J Pharmacol.*, **170**, 568-80 (2013)., Figure 5

Table 1. Effects of 6-week treatment with Fasi, MET and Fasi in combination with MET on plasma lipid profile.

| Animal | Compound | TG | TC | NEFA |
|--------|------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | (mmol·L ⁻¹) | (mmol·L ⁻¹) | (mEq·L ⁻¹) |
| ZDF | Vehicle | 12.4 ± 2.9 | 4.8 ± 0.5 | 0.44 ± 0.05 |
| ZDF | Fasi | 12.9 ± 3.9 | 4.5 ± 0.6 | 0.49 ± 0.11 |
| ZDF | MET | 18.3 ± 3.7 ^a | 5.1 ± 0.4 | 0.48 ± 0.09 |
| ZDF | Fasi + MET | 18.0 ± 3.3 ^a | 4.9 ± 0.4 | 0.53 ± 0.1 |
| ZL | Vehicle | 2.1 ± 0.5 ^b | 2.1 ± 0.1 ^b | 0.48 ± 0.05 |

Data show plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and non-esterified fatty acids (NEFA) levels in ZDF rats after 6 weeks of treatment with vehicle, 10 mg/kg, b.i.d. of TAK-875 (TAK), 50 mg/kg, q.d. of MET, or their combination, and in ZL rats during 6 weeks of treatment with vehicle. ^ap≤0.05 compared with vehicle-treated ZDF rats by Dunnett's test or Steel test. ^bp≤0.01 compared with vehicle-treated ZDF rats by Student's t-test or Aspin-Welch test. Data are mean ± S.D. (n = 6 for ZDF rats, n = 5 for ZL rats). Fasi, fasiglifam; MET, metformin.

(出典) Ito *et al. Br J Pharmacol.*, **170**, 568-80 (2013)., Table 1

3. インスリン抵抗性改善薬メトフォルミンとの併用効果

メトフォルミン併用下における fasiglifam の作用を検証するために、同 ZDF ラットモデルを用いて併用反復投与を試みた。Fasiglifam (10 mg/kg, 1 日 2 回) およびメトフォルミン (50 mg/kg, 1 日 1 回) の 6 週間併用反復投与は、vehicle 処置群に比して 37.9%空腹時血糖値を低下する傾向を示し、その作用は各単独処置群よりも強い作用であった (Figure 3A, B)。また、併用群において GHb レベルの 2.4%の有意な低下が確認され、その作用は二元配置分散分析により相加作用であることが確認された (Figure 3C, fasiglifam, p≤0.05; メトフォルミン, p≤0.01; interaction, not significant)。また、併用投与群の血漿インスリンレベルは試験期間を通して高値を維持し、6 週目時点で vehicle 群の 3.2 倍高値に達し、各単独群に比して相加的な上昇が確認された (Figure 4A, B, fasiglifam, p≤0.05; メトフォルミン, p≤0.01; interaction, not significant)。HOMA-β 値も vehicle 群に比して 9.6 倍有意に高値を示した (Figure 4C)。

血漿インスリンレベルは、血糖値など様々な因子の影響を受けるので、膵 β 細胞に対するより直接的な影響を評価するため、膵臓中のインスリン含量を測定した。血漿インスリンレベルと相関し、fasiglifam およびメトフォルミン併用投与群の膵インスリン含量は vehicle 群に比して有意に高値を示し、その量は正常対照ラットに匹敵するレベルに達した (Figure 5A)。対照的に、膵グルカゴン含量は、すべての投与群で差は認められなかった (Figure 5B)。免疫染色により膵臓の詳細な組織学的解析を試みたところ、ZDF ラットの膵臓において、肥大化しかつ周囲の外分泌細胞が浸潤した異常なラ氏島構造が多く確認された (Figure 6A, Q)。また、通常インスリン陽性細

胞 (β 細胞) の外側に位置するグルカゴン陽性細胞 (α 細胞) がラ氏島内部にも散在し (Figure 6B、R)、 β 細胞機能の主要転写因子である PDX-1 の発現量の低下傾向が確認された (Figure 6C、S)。Fasiglifam 単独投与は膵ラ氏島形態あるいはインスリン、グルカゴンおよび PDX-1 の染色性に明確な影響を与えなかった (Figure 6A-C、E-G)。一方、fasiglifam およびメトフォルミンを併用投与したラットの膵臓において、多くのインスリン陽性細胞が丸い密集したラ氏島構造を維持し、正常対照ラットの膵ラ氏島に近い形態を示した (Figure 6M、Q)。また、vehicle 群に比して高い PDX-1 発現を示すラ氏島が多く観察される傾向があった (Figure 6C、O)。さらに、ラ氏島内に細胞増殖マーカーである PCNA 陽性細胞核が検出され (Figure 6P、矢印)、インスリンとの二重染色からこれらの細胞の多くがインスリン陽性細胞であることが確認された (Figure 7)。これらの結果から、fasiglifam はメトフォルミンとの併用投与により、相加的な血糖コントロールに加えて、さらなる β 細胞機能改善を発揮し得ることが示唆された。

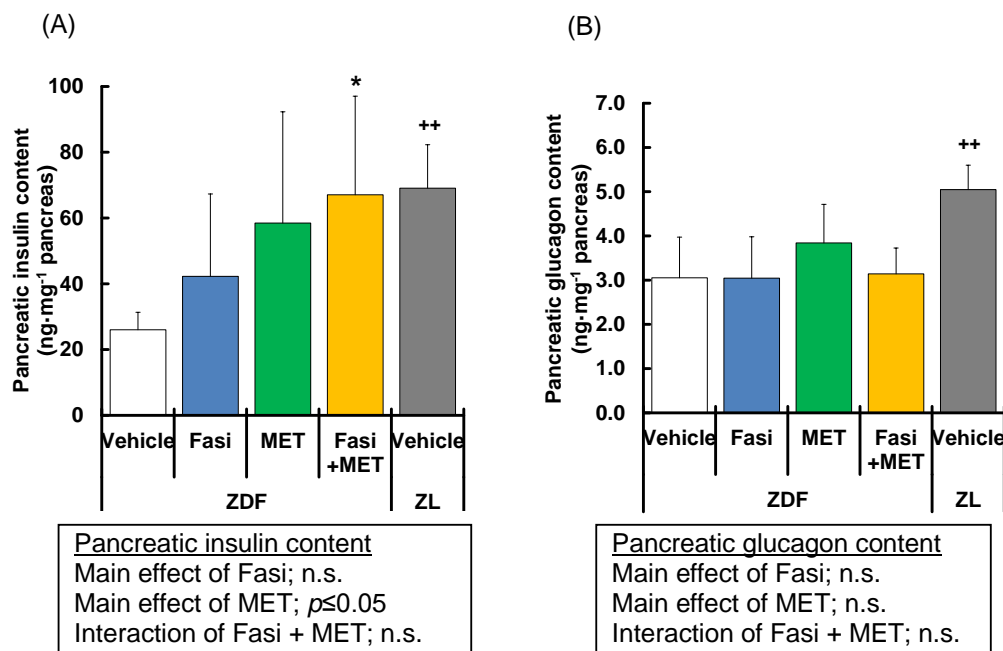


Figure 5. Effects of 44 day treatment with Fasiglifam (Fasi), metformin (MET) and Fasi in combination with metformin on pancreatic insulin and glucagon content. Data in A and B represent pancreatic insulin and glucagon content, respectively, in ZDF rats after 44 days of treatment with vehicle, 10 mg/kg, b.i.d. of Fasi, 50 mg/kg, q.d. of MET, or their combination, and in ZL rats after 44 days of treatment with vehicle. * $p \leq 0.05$ compared with vehicle-treated ZDF rats by Dunnett's test or Steel test. ** $p \leq 0.01$ compared with vehicle-treated ZDF rats by Student's t-test or Aspin-Welch test. The results of two-way ANOVA are indicated in insets. Data are mean \pm S.D. ($n = 6$ for ZDF rats, $n = 5$ for ZL rats). n.s., not significant.

(出典) Ito *et al. Br J Pharmacol.*, **170**, 568-80 (2013)., Figure 6

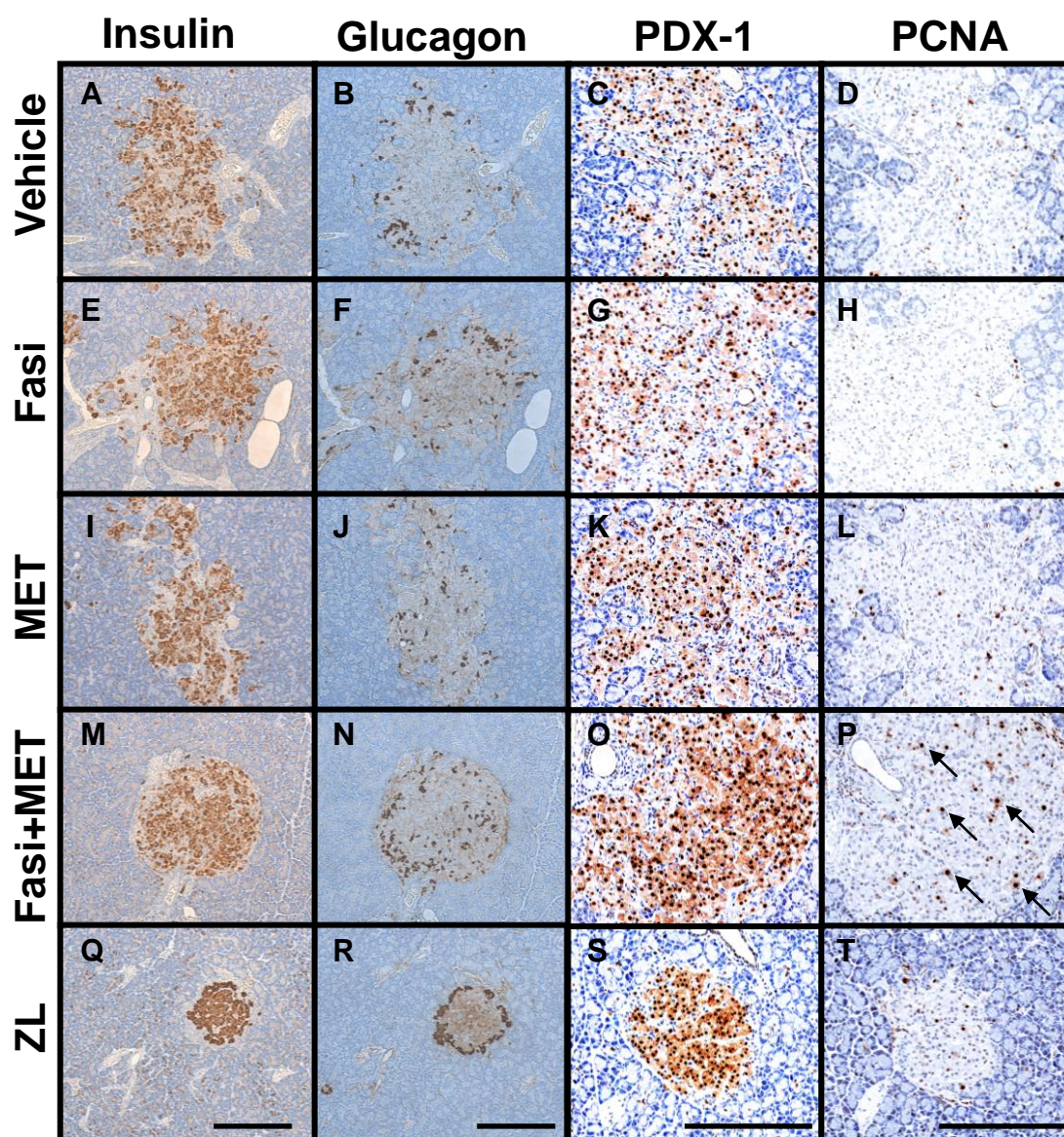


Figure 6. Effects of 44 day treatment with Fasiglifam (Fasi), metformin (MET) and Fasi in combination with MET on insulin staining, glucagon staining, PDX-1 expression and PCNA-positive cell numbers in pancreatic islets from ZDF rats. ZDF rats were administered vehicle (A–D), 10 mg/kg, b.i.d. of Fasi (E–H), 50 mg/kg, q.d. of MET (I–L), or their combination (M–P) for 44 days, and ZL rats were administered vehicle (Q–T). The pancreata were isolated and immunostained with anti-insulin (A, E, I, M, Q), anti-glucagon (B, F, J, N, R), anti-PDX-1 (C, G, K, O, S) and anti-PCNA (D, H, L, P, T) antibodies. Representative images for each group are shown. Arrows indicate PCNA-positive cells. Scale bar = 250 μ m.

(出典) Ito *et al. Br J Pharmacol.*, **170**, 568-80 (2013)., Figure 7

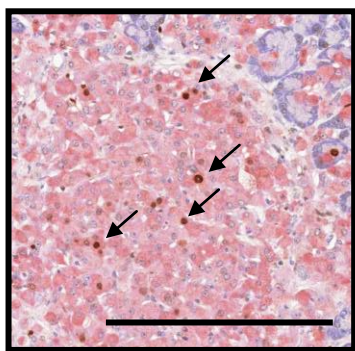


Figure 7. Effects of 44-day treatment with fasiglifam, metformin and Fasi in combination with MET on insulin- and PCNA-double positive cell numbers in pancreatic islets from ZDF rats. ZDF rats were administered the combination 10 mg/kg, b.i.d. of Fasi and 50 mg/kg, q.d. of MET for 44 days. The pancreata were isolated and immunostained with anti-insulin (red color) and anti-PCNA (brown color) antibodies. Arrows indicate the representative image of the co-localization of PCNA-positive nuclei with insulin staining. Scale bar = 250 μ m.

(出典) Ito *et al. Br J Pharmacol.*, **170**, 568-80 (2013)., Supplemental Figure

第4節 考察

遊離脂肪酸は膵 β 細胞に対して二面的な作用を持つことが知られている。短期間の暴露はインスリン分泌を促進するが、持続的な高濃度の暴露は膵 β 細胞の機能低下 (脂肪毒性) を促す (47)。糖尿病治療薬は長期間投与することが想定されることから、もし GPR40 作動薬が脂肪毒性様作用を惹起するのであれば致命的である。これまでも、遺伝子改変マウスを用いて GPR40 と脂肪毒性の関係について検討され、その大半がその関与を否定するものであったが (20,49-51)、一部関与を示唆する報告もあり (48)、一定の結論に至っていない。本研究において、INS-1 832/13 細胞にオレイン酸あるいはパルミチン酸を 72 時間暴露したところ、インスリン分泌およびインスリン含量の低下、アポトーシスの指標であるカスパーゼ 3/7 活性の上昇が確認された。一方、同条件下、インスリン分泌を惹起するのに十分な濃度の fasiglifam を暴露しても、これらの指標に明確な影響は確認されなかった。

重症 2 型糖尿病モデルである ZDF ラットは、血糖低下に先行して高脂血漿を呈し、その病態形成に膵 β 細胞に対する脂肪毒性の関与が示唆されており、脂肪毒性のリスクを評価するのに適した *in vivo* モデルであると考えられる。実際、本検討においても正常対照ラットに比して ZDF ラットは高脂血症を呈していることが確認された。本モデルへの fasiglifam の 6 週間反復投与は、血糖コントロールの長期指標である GHb 値を有意に低下するとともに、空腹時インスリンおよび膵インスリン含量の増加傾向を示し、むしろ膵 β 細胞機能を保持する結果を示した。反復投与後の膵組織の解析においても、ラ氏島形態に明確な悪化は認められなかった。これら *in vitro* および *in vivo* の一連の結果は、fasiglifam が脂肪毒性を惹起する可能性が極めて低いことを示唆する。序論

でも述べたように、内因性リガンドが結合すると考えられるオルソステリック結合部位とは異なる部位に結合するという fasigifam の特徴が (15)、その低い脂肪毒性リスクに寄与している可能性が考えられる。一方、脂肪酸は細胞内で代謝されることで、アシル CoA やセラミドなど別の生理活性物質に変換されることから (47,58)、これらが脂肪毒性の惹起に関与しているのかもしれない。

ビグアナイド薬のメトフォルミンは、肝臓における糖産生抑制、末梢組織における糖利用亢進あるいは消化管における糖吸収抑制などさまざまな作用により血糖低下作用を発揮するインスリン抵抗性改善薬として知られている (52)。その安全性の高さから、糖尿病治療指針の中で、欧米で第一選択薬として推奨されている (53)。複数の薬剤を併用する糖尿病治療の現状を考えると、メトフォルミンと良好な併用効果を示すことが必要不可欠である。本研究では ZDF ラットにおいて、fasiglifam とメトフォルミン併用の 6 週間反復投与は、相加的に GHb 値を低下し、血漿インスリンレベルを上昇させ、膵 β 細胞機能の指標である HOMA- β および膵インスリン含量を有意に増加させ、そのインスリン含量は正常対照ラットレベルにまで回復した。併用処置 ZDF ラットの膵臓の免疫染色を行ったところ、vehicle 処置あるいは各単独処置群に比して、膵ラ氏島構造の正常化、PDX-1 発現亢進および PCNA 陽性細胞数の上昇傾向が確認された。PCNA 陽性核の多くがインスリン陽性細胞であったことから、膵 β 細胞の増殖亢進がラ氏島構造の正常化およびインスリン含量の回復に寄与しているものと推察される。これらの結果は、メトフォルミンとの併用下、fasiglifam が膵 β 細胞機能のさらなる改善を示す可能性を示唆している。

上述の通り、fasiglifam 単独あるいはメトフォルミンとの併用反復投与は、膵 β 細胞をむしろ保護する作用を示したが、その作用機序は十分には分っていない。持続的な高血糖は膵 β 細胞機能低下 (糖毒性) をもたすことが知られており (59)、本検討においても血糖コントロール自体が β 細胞機能改善に一部寄与している可能性が考えられる。一方、Janssen らは腎臓におけるグルコースの再吸収を薬物により阻害し、ZDF ラットの血糖値を強力に低下しても、血漿インスリンレベルの回復は認められるが、ラ氏島構造の改善にまでは至らないことを報告しており (60)、fasiglifam およびメトフォルミンの β 細胞に対する直接的な保護作用の可能性も示唆される。特定の薬物にのみ反応するように設計された $G\alpha_q$ 共役 GPCR を膵 β 細胞に強制発現したマウスを用いた以前の検討で、 β 細胞における $G\alpha_q$ シグナルの持続的な活性化は、ERK1/2 および IRS-1 活性化を誘導し、 β 細胞機能亢進を導くことが報告された (61)。GPR40 が膵 β 細胞に高発現する $G\alpha_q$ 共役 GPCR であることから、本試験においても同様の細胞内イベントが惹起された可能性が考えられる。実際、 β 細胞株の MIN6 細胞において、脂肪酸が ERK1/2 のリン酸化を亢進することが報告されている (10)。別の可能性として、GPR40 は腸管内分泌細胞にも発現が報告され、脂肪酸刺激の GLP-1 分泌を介していることがマウスの検討で報告された (62)。メトフォルミンもまた血漿 GLP-1 濃度を亢進することが臨床試験において確認されている (63)。GLP-1 が膵 β 細胞に対して保護作用を有することは広く知られており (64)、本試験の β 細胞保護作用における GLP-1 の関与の検討は今後の重要な課題である。

一部の 2 型糖尿病患者において血漿グルカゴンレベルの亢進が認められ、肝糖産生の亢進を介して高血糖の増悪に寄与していると考えられている (65)。我々の検討においても、正常対照ラットに比して ZDF ラットは血漿グルカゴンレベルが有意に高値を示した。以前のマウスの検討において、GPR40 は β 細胞に加え α 細胞にも発現していることが確認され、脂肪酸刺激によるグル

カゴン分泌促進に関与することが報告された (25)。しかしながら、本試験において、ZDF ラットへの fasiglifam 反復投与は血漿グルカゴンレベル、膵グルカゴン含量および膵グルカゴン陽性細胞分布に明確な影響を与えなかった。これらの結果はヒト膵ラ氏島を用いた以前の *in vitro* の検討結果と一致する (26)。また、fasiglifam の 2 型糖尿病患者における臨床試験においても、明確なグルカゴン分泌亢進は観察されなかった (66)。第 1 章でも論じたとおり、これらの違いはマウスおよびラット・ヒト間の GPR40 の発現パターンの違いに起因するものと推察される (9,10,24)。近年、グルカゴン C 末抗体を用いた RIA 法での評価では、グリセンチンなどグルカゴン類縁ペプチドを区別できないことが報告されており (67)、グルカゴンへの影響をより明確にするために ELISA 法によるグルカゴンの正確な評価が必要であろう。

以上筆者らは、*in vitro* および *in vivo* の詳細な検討から、GPR40 作動薬 fasiglifam が脂肪毒性を誘発する可能性は極めて低いことを示した。本報告は、脂肪毒性に対する感受性の高いモデルを用いて GPR40 作動薬が β 細胞機能を低下するよりむしろ維持あるいは改善する可能性を *in vivo* において示した初めての報告である。また同時に、fasiglifam とインスリン抵抗性改善薬であるメトフォルミンとの併用が膵 β 細胞機能を保護しながら強力に血糖コントロールを達成し得る有用な治療戦略になり得ることを証明した。

総括

GPR40/FFAR1 は膵 β 細胞に高発現する $G\alpha_q$ 共役 GPCR であり、そのアゴニストは、既存薬とは異なる作用メカニズムを有する新たなインスリン分泌促進薬として期待された。著者らは、選択的 GPR40 作動薬 fasiglifam を見出し、*in vitro* および *in vivo* の詳細な薬理的検討から、fasiglifam がグルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進するというユニークな特徴を示すことを明らかにした。また、様々な病態モデルを用いた検討を通して、GPR40 作動薬が高い安全性を有するとともに、広範な糖尿病患者に対して有効性を発揮し得る可能性を示した。

Fasiglifam は、*in vitro* において内因性リガンドであるオレイン酸に比して 400 倍強い GPR40 活性化作用を示した。ラット膵 β 細胞株および単離膵ラ氏島において、fasiglifam は低グルコース存在下では作用を示さず、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進した。さらに、耐糖能異常を呈する 2 型糖尿病モデル N-STZ-1.5 ラットに fasiglifam を単回投与すると、経口グルコース負荷後のインスリン分泌を用量依存的に促進し、耐糖能を改善した。また、重症 2 型糖尿病モデル ZDF ラットにおいて、fasiglifam の単回投与は、空腹時高血糖を改善した。一方、正常血糖値を示す空腹時 SD ラットにおいて、既存インスリン分泌促進薬である SU 薬のグリベンクラミドが低血糖を誘発するのに対して、fasiglifam は薬効量よりも 3-10 高用量投与しても空腹時血糖およびインスリン値に影響を与えなかった。以上の結果から、fasiglifam のインスリン分泌はグルコース濃度によって厳密に制御されており、高血糖時においてのみ作用を発揮することで、低血糖リスクが極めて低く、かつ食後および空腹時高血糖とともに改善し得ることが示された。

著者は fasiglifam 刺激インスリン分泌のグルコース濃度依存性の細胞内メカニズムについても検討を行った。ラット膵 β 細胞株において、fasiglifam 刺激 IP 産生はグルコース濃度に非依存的であるのに対して、その後の細胞内カルシウム濃度上昇はグルコース濃度依存的に起こることを明らかにした。この結果は、fasiglifam のインスリン分泌促進作用のグルコース濃度依存性のメカニズムにおいて細胞内カルシウム上昇が重要な役割を担っていることを示唆している。本知見は、膵 β 細胞の生理機能を理解する上でも重要な基礎的知見であると考えられる。

上記の通り SU 薬に比して fasiglifam の低血糖リスクは低いことが示されたが、さらなる差別化点を明らかにするために、詳細な比較試験を行った。N-STZ-1.5 ラットを用いたグルコース負荷試験において、3-30 mg/kg の fasiglifam は、用量依存的な血糖低下作用を示し、その最大活性はグリベンクラミド (30 mg/kg) の作用を有意に上回った。SU 薬を使用する糖尿病患者の中には、長期使用で次第に血糖コントロールが悪化し、いわゆる二次無効を生じることがある。実際、N-STZ-1.5 ラットにグリベンクラミドを 4 週間反復投与すると、耐糖能の悪化が認められ、グリベンクラミド単回投与で認められた血糖低下作用が完全に消失した。同モデルにグリベンクラミドよりも十分強い耐糖能改善作用を示す用量の fasiglifam を 15 週間反復投与しても血糖低下およびインスリン分泌促進作用は維持され、二次無効は惹起されなかった。興味深いことに、SU 薬無効状態のラットにおいて、fasiglifam 単回投与は有意な耐糖能改善およびインスリン分泌促進作用を示し、SU 二次無効を呈する患者に対しても有効性を示す可能性が示唆された。

糖尿病治療において、十分な血糖コントロールを達成するために、作用機序の異なる複数の

薬剤の併用がよく用いられる。N-STZ-1.5 ラットに *fasiglifam* と SU 薬グリメピリドを併用投与すると、作用を打ち消しあうことなく相加的なインスリン分泌促進および血糖低下作用を示した。一方、正常ラットに同用量で併用投与しても、*fasiglifam* がグリメピリドにより誘発される低血糖を増悪することはなかった。

脂肪酸の膵 β 細胞への短時間暴露はインスリン分泌を促進するが、高濃度で長時間暴露すると膵 β 細胞の機能低下や細胞死を招く、いわゆる脂肪毒性を惹起する。脂肪酸が GPR40 の内因性リガンドであることから、GPR40 作動薬が脂肪毒性様作用を惹起することが懸念された。ラット膵 β 細胞株への *fasiglifam* の 3 日間暴露は、脂肪酸とは対照的に、インスリン分泌能低下や細胞死を誘発しなかった。ZDF ラットは、加齢とともに膵疲弊を呈し、その病態形成に膵 β 細胞における脂肪毒性の関与が示唆されている。本モデルへの *fasiglifam* の 6 週間反復投与は、血糖コントロールの長期指標である GHb 値の有意な低下に加え、血漿インスリンレベルおよび膵インスリン含量を増加する傾向を示し、膵 β 細胞機能をむしろ保持する結果を示した。しかも、インスリン抵抗性改善薬メトフォルミンとの併用反復投与により、相加的な GHb 低下および血漿インスリンレベル上昇を示し、良好な併用効果が確認された。この時、各単独投与群に比して、併用投与群では膵ラ氏島構造の正常化および膵 β 細胞の主要な転写因子 PDX-1 の発現亢進が観察され、膵 β 細胞機能のさらなる正常化が確認された。これらの結果から、*in vitro* および *in vivo* の両方において、*fasiglifam* が膵 β 細胞に対して脂肪毒性を誘導する可能性は極めて低いことが示唆された。

欧米における 2 型糖尿病患者を対象とした臨床試験において、*fasiglifam* の 1 日 1 回 12 週間反復投与は、陽性対照の SU 薬と同等の血糖コントロールを示す一方で、低血糖の頻度は SU 薬に比べて有意に低いことが報告され (46)、GPR40 作動薬のヒトにおける有効性および安全性が世界で初めて証明された。本研究で明らかとなった *fasiglifam* の様々な薬効プロファイルは、そこに至る過程に大きく貢献するものである。しかしながら、その後の大規模臨床試験において、*fasiglifam* は肝毒性の懸念を有することが明らかとなり、残念ながら上市には至らなかった (16)。これまでのところ、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。肝臓における GPR40 発現は膵臓に比して極めて低いこと (9,24)、また、最近 Li らが報告した *fasiglifam* の胆汁酸トランスポーターの直接阻害に関する知見 (68) を考慮すると、GPR40 非依存的なメカニズムが肝毒性の要因となっている可能性が示唆されるが、今後さらなる検討が必要である。*Fasiglifam* 以外にも非臨床および臨床段階には未だ複数の GPR40 作動薬が研究開発されており (69)、その興味はまだまだ尽きない。*Fasiglifam* を用いた本研究結果は、GPR40 作動薬の特徴的な薬理的性質を明らかにするとともに、低血糖および二次無効リスクが少なくかつ強力な血糖コントロールを達成し得る 2 型糖尿病治療薬としての GPR40 作動薬の可能性を強く示唆するものである。また、SU 薬無効状態に対しても有効性を示し、かつ既存薬とも良好な併用効果を示した本成績から、GPR40 作動薬の広範な患者層への適応の可能性が期待される。

引用文献

- 1) Wajchenberg BL: beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev.* **28**, 187-218 (2007).
- 2) Rendell M: The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs.* **64**, 1339-1358 (2004).
- 3) Burge MR, Sood V, Sobhy TA, Rassam AG, Schade DS: Sulphonylurea-induced hypoglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a review. *Diabetes Obes Metab.* **1**, 199-206 (1999).
- 4) Maedler K, Carr RD, Bosco D, Zuellig RA, Berney T, Donath MY: Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets. *J Clin Endocrinol Metab.* **90**, 501-506 (2005).
- 5) Pratley RE: Alogliptin: a new, highly selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Pharmacother.* **10**, 503-512 (2009).
- 6) Meier JJ: GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* **8**, 728-742 (2012).
- 7) U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes.* **44**, 1249-1258 (1995).
- 8) Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, Xu S, Kolakowski LF, O'Dowd BF: A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun.* **239**, 543-547 (1997).
- 9) Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR, Jr., Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI: The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem.* **278**, 11303-11311 (2003).
- 10) Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M: Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* **422**, 173-176 (2003).
- 11) Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B: A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun.* **301**, 406-410 (2003).
- 12) Fujiwara K, Maekawa F, Yada T: Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca²⁺ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca²⁺ channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **289**, E670-677 (2005).
- 13) Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershinkel M, Walker MD: Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun.* **335**, 97-104 (2005).
- 14) Negoro N, Sasaki S, Mikami S, Ito M, Suzuki M, Tsujihata Y, Ito R, Harada A, Takeuchi K, Suzuki N, Miyazaki J, Santou T, Odani T, Kanzaki N, Funami M, Tanaka T, Kogame A, Matsunaga S, Yasuma T, Momose Y: Discovery of TAK-875: a potent, selective, and orally bioavailable GPR40 agonist. *ACS*

- Medicinal Chemistry Letters*. **1**, 290-294 (2010).
- 15) Srivastava A, Yano J, Hirozane Y, Kefala G, Gruswitz F, Snell G, Lane W, Ivetac A, Aertgeerts K, Nguyen J, Jennings A, Okada K: High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature*. **513**, 124-127 (2014).
 - 16) Kaku K, Enya K, Nakaya R, Ohira T, Matsuno R: Efficacy and safety of fasiglifam (TAK-875), a G protein-coupled receptor 40 agonist, in Japanese patients with type 2 diabetes inadequately controlled by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Diabetes Obes Metab*. **17**, 675-681 (2015).
 - 17) Kostenis E: A glance at G-protein-coupled receptors for lipid mediators: a growing receptor family with remarkably diverse ligands. *Pharmacol Ther*. **102**, 243-257 (2004).
 - 18) Warnotte C, Gilon P, Nenquin M, Henquin JC: Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes*. **43**, 703-711 (1994).
 - 19) Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, Olson EN, Prentki M, Biden T, MacDonald PE, Poitout V: G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia*. **55**, 2682-2692 (2012).
 - 20) Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, Lin DC, Poitout V: GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes*. **56**, 1087-1094 (2007).
 - 21) Portha B, Blondel O, Serradas P, McEvoy R, Giroix MH, Kergoat M, Bailbe D: The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabete Metab*. **15**, 61-75 (1989).
 - 22) Briscoe CP, Peat AJ, McKeown SC, Corbett DF, Goetz AS, Littleton TR, McCoy DC, Kenakin TP, Andrews JL, Ammala C, Fornwald JA, Ignar DM, Jenkinson S: Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Br J Pharmacol*. **148**, 619-628 (2006).
 - 23) Tan CP, Feng Y, Zhou YP, Eiermann GJ, Petrov A, Zhou C, Lin S, Salituro G, Meinke P, Mosley R, Akiyama TE, Einstein M, Kumar S, Berger JP, Mills SG, Thornberry NA, Yang L, Howard AD: Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes*. **57**, 2211-2219 (2008).
 - 24) Tomita T, Masuzaki H, Iwakura H, Fujikura J, Noguchi M, Tanaka T, Ebihara K, Kawamura J, Komoto I, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Doi R, Shimada Y, Hosoda K, Imamura M, Nakao K: Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion. *Diabetologia*. **49**, 962-968 (2006).
 - 25) Flodgren E, Olde B, Meidute-Abaraviciene S, Winzell MS, Ahren B, Salehi A: GPR40 is expressed in glucagon producing cells and affects glucagon secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. **354**, 240-245 (2007).
 - 26) Yashiro H, Tsujihata Y, Takeuchi K, Hazama M, Johnson PR, Rorsman P: The effects of TAK-875, a selective G protein-coupled receptor 40/free fatty acid 1 agonist, on insulin and glucagon secretion in isolated rat and human islets. *J Pharmacol Exp Ther*. **340**, 483-489 (2012).

- 27) Yang M, Chisholm JW, Soelaiman S, Shryock JC: Sulfonylureas uncouple glucose-dependence for GPR40-mediated enhancement of insulin secretion from INS-1E cells. *Mol Cell Endocrinol.* **315**, 308-313 (2010).
- 28) Sakuma K, Yabuki C, Maruyama M, Abiru Y, Komatsu H, Negoro N, Tsujihata Y, Takeuchi K, Habata Y, Mori M: Fasiglifam (TAK-875) has dual potentiating mechanisms via $G\alpha_q$ -GPR40/FFAR1 signaling branches on glucose-dependent insulin secretion. *Pharma Res Per.* **4**, e00237 (2016).
- 29) Drucker DJ: Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes Care.* **30**, 1335-1343 (2007).
- 30) Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD: Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes.* **37**, 1020-1024 (1988).
- 31) Yabuki C, Komatsu H, Tsujihata Y, Maeda R, Ito R, Matsuda-Nagasumi K, Sakuma K, Miyawaki K, Kikuchi N, Takeuchi K, Habata Y, Mori M: A novel antidiabetic drug, fasiglifam/TAK-875, acts as an ago-allosteric modulator of FFAR1. *PLoS One.* **8**, e76280 (2013).
- 32) Charpentier G: Oral combination therapy for type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* **18 Suppl 3**, S70-76 (2002).
- 33) Feng DD, Luo Z, Roh SG, Hernandez M, Tawadros N, Keating DJ, Chen C: Reduction in voltage-gated K⁺ currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology.* **147**, 674-682 (2006).
- 34) Moritoh Y, Takeuchi K, Asakawa T, Kataoka O, Odaka H: Combining a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, alogliptin, with pioglitazone improves glycaemic control, lipid profiles and beta-cell function in db/db mice. *Br J Pharmacol.* **157**, 415-426 (2009).
- 35) Asakawa T, Moritoh Y, Kataoka O, Suzuki N, Takeuchi K, Odaka H: A novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, alogliptin (SYR-322), is effective in diabetic rats with sulfonylurea-induced secondary failure. *Life Sci.* **85**, 122-126 (2009).
- 36) Baggio LL, Kim JG, Drucker DJ: Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo. *Diabetes.* **53 Suppl 3**, S205-214 (2004).
- 37) DeRubertis FR, Craven P: Effects of reduced ATP concent on hepatic responses to glucagon. *Metabolism.* **25**, 57-67 (1976).
- 38) Hinke SA, Pauly RP, Ehses J, Kerridge P, Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA: Role of glucose in chronic desensitization of isolated rat islets and mouse insulinoma (betaTC-3) cells to glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *J Endocrinol.* **165**, 281-291 (2000).
- 39) Kang SU: GPR119 agonists: a promising approach for T2DM treatment? A SWOT analysis of GPR119. *Drug Discov Today.* **18**, 1309-1315 (2013).
- 40) Gjoni T, Urwyler S: Receptor activation involving positive allosteric modulation, unlike full agonism, does not result in GABAB receptor desensitization. *Neuropharmacology.* **55**, 1293-1299 (2008).
- 41) Poitout V, Robertson RP: Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology.* **143**, 339-342 (2002).
- 42) Rustenbeck I: Desensitization of insulin secretion. *Biochem Pharmacol.* **63**, 1921-1935 (2002).

- 43) Anello M, Gilon P, Henquin JC: Alterations of insulin secretion from mouse islets treated with sulphonylureas: perturbations of Ca²⁺ regulation prevail over changes in insulin content. *Br J Pharmacol.* **127**, 1883-1891 (1999).
- 44) Kawaki J, Nagashima K, Tanaka J, Miki T, Miyazaki M, Gono T, Mitsuhashi N, Nakajima N, Iwanaga T, Yano H, Seino S: Unresponsiveness to glibenclamide during chronic treatment induced by reduction of ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Diabetes.* **48**, 2001-2006 (1999).
- 45) Yabe D, Seino Y: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulfonylureas for type 2 diabetes: Friend or foe? *J Diabetes Investig.* **5**, 475-477 (2014).
- 46) Burant CF, Viswanathan P, Marcinak J, Cao C, Vakilynejad M, Xie B, Leifke E: TAK-875 versus placebo or glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* **379**, 1403-1411 (2012).
- 47) Morgan NG: Fatty acids and beta-cell toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **12**, 117-122 (2009).
- 48) Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H: The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab.* **1**, 245-258 (2005).
- 49) Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Ogi K, Tanaka H, Nakata M, Yano T, Shimakawa K, Taketomi S, Takeuchi K, Odaka H, Kaisho Y: Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes.* **58**, 1067-1076 (2009).
- 50) Kebede M, Alquier T, Latour MG, Semache M, Tremblay C, Poitout V: The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes.* **57**, 2432-2437 (2008).
- 51) Lan H, Hoos LM, Liu L, Tetzloff G, Hu W, Abbondanzo SJ, Vassileva G, Gustafson EL, Hedrick JA, Davis HR: Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease. *Diabetes.* **57**, 2999-3006 (2008).
- 52) Hundal RS, Inzucchi SE: Metformin: new understandings, new uses. *Drugs.* **63**, 1879-1894 (2003).
- 53) Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR: Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia.* **55**, 1577-1596 (2012).
- 54) Collier JJ, Fueger PT, Hohmeier HE, Newgard CB: Pro- and antiapoptotic proteins regulate apoptosis but do not protect against cytokine-mediated cytotoxicity in rat islets and beta-cell lines. *Diabetes.* **55**, 1398-1406 (2006).
- 55) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* **28**, 412-419 (1985).
- 56) Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE: Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes.* **50**, 1021-1029 (2001).

- 57) Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH: Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 10878-10882 (1994).
- 58) Haber EP, Ximenes HM, Procopio J, Carvalho CR, Curi R, Carpinelli AR: Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic beta-cells. *J Cell Physiol*. **194**, 1-12 (2003).
- 59) Harmon JS, Gleason CE, Tanaka Y, Oseid EA, Hunter-Berger KK, Robertson RP: In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. *Diabetes*. **48**, 1995-2000 (1999).
- 60) Janssen SW, Martens GJ, Sweep CG, Span PN, Verhofstad AA, Hermus AR: Phlorizin treatment prevents the decrease in plasma insulin levels but not the progressive histopathological changes in the pancreatic islets during aging of Zucker diabetic fatty rats. *J Endocrinol Invest*. **26**, 508-515 (2003).
- 61) Jain S, Ruiz de Azua I, Lu H, White MF, Guettier JM, Wess J: Chronic activation of a designer G(q)-coupled receptor improves beta cell function. *J Clin Invest*. **123**, 1750-1762 (2013).
- 62) Edfalk S, Steneberg P, Edlund H: Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes*. **57**, 2280-2287 (2008).
- 63) Mannucci E, Ognibene A, Cremasco F, Bardini G, Mencucci A, Pierazzuoli E, Ciani S, Messeri G, Rotella CM: Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. **24**, 489-494 (2001).
- 64) Perfetti R, Hui H: The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. *Horm Metab Res*. **36**, 804-810 (2004).
- 65) Sloop KW, Michael MD, Moyers JS: Glucagon as a target for the treatment of Type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Targets*. **9**, 593-600 (2005).
- 66) Araki T, Hirayama M, Hiroi S, Kaku K: GPR40-induced insulin secretion by the novel agonist TAK-875: first clinical findings in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. **14**, 271-278 (2012).
- 67) Kitamura T, Kobayashi M: What brought a glucagon revolution? What does this revolution bring for medicine? *Jikkenigaku*. **33**, 872-879 (2015).
- 68) Li X, Zhong K, Guo Z, Zhong D, Chen X: Fasiglifam (TAK-875) Inhibits Hepatobiliary Transporters: A Possible Factor Contributing to Fasiglifam-Induced Liver Injury. *Drug Metab Dispos*. **43**, 1751-1759 (2015).
- 69) Mancini AD, Poitout V: GPR40 agonists for the treatment of type 2 diabetes: life after 'TAKing' a hit. *Diabetes Obes Metab*. **17**, 622-629 (2015).

謝辞

本論文の作成にあたり、御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、京都薬科大学 薬物治療学 加藤伸一 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究は終始、武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 辻畑善行 博士、ジャパンファーマビジネユニット 武内浩二 氏の親身なご指導のもとに遂行されたものであります。また、本研究の遂行にあたり多大なるご協力とご助言を賜りました鈴木正美 博士、根来伸行 博士、松田香絵 博士、百瀬祐 博士、宮脇一真 博士、原田絢子 氏、森郁生 博士、平井加津子 氏、森藤雄亮 博士、上野光 氏、宮下裕久 氏、月見泰博 博士をはじめとした医薬研究本部の皆様ならびに安間常雄 博士をはじめとした Chemistry, Manufacturing and Control Center の皆様へ深く感謝の意を表します。また、*in vivo* 試験において技術協力いただいた武田ラビックスの井手昌洋 氏および旧武田ラビックスの浅野正一 氏、安藤敏一 氏に厚く御礼申し上げます。本論文の作成は、家族の支えをなくしては為し得なかったものであり、ここに心から感謝致します。

末筆ながら、本研究の機会を与えて下さいました武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 再生医療ユニットグローバルヘッド 出雲正剛 博士、循環代謝創薬ユニット副ユニット長 山田幸男 博士、同ユニットリサーチマネージャー 野田昌邦 博士、同ユニット主席研究員 西垣信裕 博士、基盤研究所所長 山本恵司 博士、同研究所 主席部員 中西淳 博士、同研究所 主席研究員 松本寛和 博士に深謝致します。

以上