

氏名 (生年月日) 伊藤 亮 (1979年9月3日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博 第205号

学位授与の日付 2017年3月18日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 新規インスリン分泌促進薬 GPR40 作動薬 fasiglifam の薬効薬理研究

論文審査委員 (主査) 教授 加藤 伸一

(副査) 教授 秋葉 聡

(副査) 教授 安井 裕之

## 論文内容の要旨

インスリン分泌促進活性を示す2型糖尿病治療薬としてスルホニルウレア (SU) 薬が臨床で使用されているが、血糖値とは無関係にインスリン分泌を促進し、副作用として低血糖や二次無効が懸念されている。近年、dipeptidyl peptidase-4 阻害薬など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が開発されたが、これらの薬剤を用いても未だ十分な血糖コントロールが実現できていない患者も存在することから、作用メカニズムの異なる新たな薬剤の開発が求められている。G-protein coupled receptor 40 (GPR40)/free fatty acid receptor 1 (FFAR1) は、膵β細胞に高発現し、遊離脂肪酸によるインスリン分泌に関与するG蛋白共役型受容体である。GPR40は主にGαqに共役しており、その活性化はイノシトール3リン酸産生、細胞内カルシウム濃度上昇を介してインスリン分泌を促進する。既存薬とは異なるその作用メカニズムから、選択的作動薬は新たなインスリン分泌促進薬として期待された。申請者らは、選択的GPR40作動薬であるfasiglifam (TAK-875)を見出し、その薬理的検討から、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にとって重要な特徴を証明するとともに、長期投与による有効性および安全性を明らかにした。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有効性が確認されており、本研究成果はその創薬過程に大きく貢献するものである。

### 1. 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

Fasiglifam は、*in vitro* において内因性リガンドであるオレイン酸と比較して400倍強いGPR40活性化作用を示した(イノシトールリン酸産生 EC<sub>50</sub>: fasiglifam, 0.072 μM; オレイン酸, 29.9 μM)。ラット膵β細胞株および単離膵ラ氏島において、fasiglifam は3 mM以下の低グルコース存在下では作用を示さず、高グルコース存在下においてのみインスリン分泌を促進した。その細胞内メカニズムを解析したところ、fasiglifam 刺激によるイノシトールリン酸産生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起こることから、細胞内カルシウム上昇がインスリン分泌のグルコース濃度依存性に重要な役割を担っていることが示唆された。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。一方、正常血糖値を示す空腹時Sprague-Dawleyラットにおいて、SU薬である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に影響を与えなかった。興味深いことに、同じ空腹状態でも、空腹時高血糖を呈する2型糖尿病モデルZucker Diabetic Fatty (ZDF)ラットに対して、fasiglifamは強力な空腹時高血糖改善作用を示した。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、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。

## 2. 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

SU薬と比較してfasiglifamの低い低血糖リスクが示されたので、更なる差別化点を見出すため、より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、血糖低下作用の最大活性を比較したところ、fasiglifamの作用はグリベンクラミドの作用よりも有意に強力であった(血糖面積の低下率: fasiglifam, -37.6%; グリベンクラミド, -12.3%)。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する、二次無効を生じることが知られている。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。同モデルにおいて、十分に強力な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薬による二次無効状態のN-STZ-1.5ラットにおいても、fasiglifam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薬による二次無効状態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。また、N-STZ-1.5ラットにfasiglifamとSU薬であるグリメピリドを併用投与すると、作用を打ち消し合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は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く、併用治療の可能性も示唆された。

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

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示すことが懸念された。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、インスリン含量低下や細胞死を誘発しなかった。高脂血症を呈するZDFラットは、加齢とともに膵疲弊を示し、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糖化ヘモグロビン値(GHb)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、各単独投与群と比較して、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pancreas duodenum homeobox-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、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。

2型糖尿病患者を対象とした臨床試験において、fasiglifam は良好な血糖コントロールを示し、GPR40 作動薬のヒトにおける有効性が世界で初めて証明された。その後の臨床試験において、肝毒性の懸念が発覚したことから上市には至らなかったが、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、その興味は未だ尽きない。Fasiglifam を用いた本研究結果は、GPR40 作動薬の特徴的な薬理学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可能性を強く示唆する。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。

## 論文審査の結果の要旨

インスリン分泌促進活性を示す 2 型糖尿病治療薬としてスルホニルウレア (SU) 薬が臨床で使用されているが、低血糖および二次無効などの副作用が懸念されている。近年、dipeptidyl peptidase-4 阻害薬など新たな薬剤も上市されたが、これらの薬剤を用いてもいまだ十分な血糖コントロールが実現できていない患者も多く、作用メカニズムの異なるあらたな薬剤が期待されている。GPR40/FFAR1 は膵β細胞に高発現し、遊離脂肪酸によるインスリン分泌を介する G 蛋白共役型受容体である。申請者らは選択的 GPR40 作動薬である fasiglifam を見出し、その薬理学的検討から、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重要な特徴を見出すとともに、長期投与による有効性および安全性を明らかにし、これらの研究成果を 3 章に纏めた。

第 1 章では、ラット膵β細胞株および単離膵ラ氏島を用いて、fasiglifam が高グルコース存在下においてのみインスリン分泌促進活性を示すことを証明した。また、耐糖能異常を呈する 2 型糖尿病モデル N-STZ-1.5 ラットにおいて fasiglifam が強力な血糖低下およびインスリン分泌促進作用を示す一方、正常空腹時血糖値を呈する Sprague-Dawley ラットにおいては、SU 薬が低血糖を誘導するのに対して、fasiglifam は薬効量よりも高用量投与しても空腹時血糖に影響を与えず、高い安全性が確認された。

第 2 章では、fasiglifam の長期投与の影響を SU 薬と比較した。SU 薬は N-STZ-1.5 ラットへの 2 週間反復投与で薬効が完全に消失するのに対して、fasiglifam は同モデルに 15 週間反復投与しても血糖低下作用を維持し、二次無効を惹起しなかった。また、SU 薬が無効なラットに fasiglifam を投与しても血糖低下作用が観察されたことから、SU 二次無効患者に対して有効性を示す可能性が示唆された。

GPR40 の内因性リガンドである脂肪酸は、膵β細胞に長期暴露すると機能低下や細胞死 (脂肪毒性) を惹起する。第 3 章では、fasiglifam の脂肪毒性への関与について検討した。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。高脂血症を呈する Zucker Diabetic Fatty 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 週間反復投与は糖化ヘモグロビン値の改善に加え、膵インスリン含量増加を示し、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投与により、さらなる血糖低下および膵β細胞機能改善作用を示した。これらの結果から、fasiglifam が脂肪毒性を誘導する可能性が極めて低いことが示された。

これらの研究成果は、国際学術雑誌3編に掲載されており、GPR40の薬理学的性質を明らかにするとともに、GPR40作動薬の低血糖や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可能性を強く示唆する成績である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。