

信州大学審査学位論文

新規 GLP-1 受容体作動薬の創製と薬理学的研究

令和元年 9 月

竹内 光明

目次

略語表.....	1
第 1 章 緒言	3
1-1. 糖尿病の病態分類と疫学	3
1-2. 糖尿病の治療.....	5
1-3. 糖尿病治療における GLP-1 受容体作動薬の位置づけ	11
第 2 章 新規 GLP-1 受容体作動薬の創製	14
2-1. 序論.....	14
2-2. 新規 GLP-1 受容体作動薬のデザイン.....	14
2-3. 合成ペプチドのラット血漿安定性とインスリン分泌能評価	17
2-4. 糖尿病モデル動物による血糖降下スクリーニング	19
2-5. ペプチド 6 の GLP-1 受容体結合能及びアルブミンへの結合特性評価	21
2-6. ペプチド 6 のヒト血漿及び NEP-24.11 安定性評価	21
2-7. ペプチド 6 のラットにおける薬物動態評価.....	23
2-8. 考察.....	25
2-9. 小括.....	26
2-10. 実験の部.....	27
第 3 章 SKL-18287 の生体内安定化メカニズムの検証	32
3-1. 序論.....	32
3-2. 各動物種における血清タンパク結合率の測定	32
3-3. 超遠心分析法による溶液中の存在形態確認.....	33
3-4. TLGC 法による生体中の存在形態確認	35
3-5. 考察.....	37

3-6. 小括	38
3-7. 実験の部	38
第 4 章 SKL-18287 の薬理学的特徴	41
4-1. 序論	41
4-2. 各 GLP-1 受容体作動薬の血漿安定性及びインスリン分泌能	41
4-3. 正常マウスにおける薬理評価	42
4-4. 肥満型 2 型糖尿病マウスにおける薬理評価	44
4-5. 非肥満型 2 型糖尿病ラットにおける薬理評価	46
4-6. 正常ラットにおける胃排泄運動抑制評価	48
4-7. モルモットにおけるアナフィラキシー試験	50
4-8. ラットにおける組織分布評価	52
4-9. ラットにおける薬物動態評価	55
4-10. カニクイザル及びミニブタにおける薬物動態評価	57
4-11. アニマルスケールアップによるヒト薬物動態学的パラメータの予測	59
4-12. 考察	61
4-13. 小括	63
4-14. 実験の部	64
第 5 章 結語	70
引用・参考文献	73
謝辞	77

略語表

ABD3	: albumin-binding domain 3	アルブミン結合ドメイン 3
ACN	: acetonitrile	アセトニトリル
AUC	: area under the curve	血漿中濃度 - 時間下面積
BA	: bioavailability	生物学的利用率
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate	環状アデノシン一リン酸
CHO	: chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
DIEA	: diisopropyl ethylene diamine	ジイソプロピルエチレンジアミン
Cmax	: peak plasma concentration	最高血漿中濃度
CLp	: plasma clearance	血漿クリアランス
DMF	: dimethyl formamide	ジメチルホルムアミド
DPP-4	: dipeptidyl peptidase-4	ジペプチジルペプチダーゼ 4
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
EMA	: European Medicines Agency	欧州医薬品庁
FBS	: fetal bovine serum	ウシ胎児血清
Fmoc	: 9-fluorenylmethyl chlorohormate	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル
G148-ABD3	: albumin binding domain 3 of protein G from the bacterial Streptococcal G strain 148	連鎖球菌 G148 由来アルブミン結合ドメイン 3
GLP-1	: glucagon-like peptide-1	グルカゴン様ペプチド
GLP-1R	: GLP-1 Receptor	GLP-1 受容体
HBSS	: hanks-balanced salt solution	ハンクスバランスソルトソリューション
HBTU	: O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate	O-ベンゾトリアゾリル-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン-1-スルホン酸
HPLC	: high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HSA	: human serum albumin	ヒト血清アルブミン
KRH	: HEPES-Krebs ringer	ヘペスクレブスリンゲル
LC/MS	: liquid chromatography/mass spectrometry	液体クロマトグラフィー質量分析
MALDI-TOF/MS	: matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry	マトリックス支援レーザー脱離イオン化法
MRT	: mean residence time	平均滞留時間

NEP-24.11	: neutral endopeptidase 24.11	中性エンドペプチダーゼ
PBS	: phosphate buffered saline	リン酸鑑賞生理食塩水
PCR	: polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PEG	: polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PK	: pharmacokinetic	薬物動態
$t_{1/2}$: elimination half-life	消失半減期
TFA	: trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸
TLGC	: thin layer gel-chromatography	薄層ゲルクロマトグラフィー
Tmax	: time to reach Cmax	最高血漿中濃度到達時間
Vdss	: volume of distribution at steady state.	定常状態分布容積

第1章 緒言

1-1. 糖尿病の病態分類と疫学

日本糖尿病学会（The Japan Diabetes Society; JDS）では、糖尿病の概念を「糖尿病は、インスリン作用の不足による慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群である。その発症には遺伝因子と環境因子がともに関与する。代謝異常の長期間にわたる持続は特有の合併症を来たしやすく、動脈硬化症をも促進する。代謝異常の程度によって、無症状からケトアシドーシスや昏睡に至る幅広い病態を示す。」と提示している[1]。また、糖代謝異常を指標とした成因及びインスリン作用不足の程度に基づく病態（病期）は以下のように分類されている。

病態 (病期) 成因 (機序)	正常血糖	高血糖			
	正常領域	境界領域	糖尿病領域		
			インスリン非依存状態		インスリン依存状態
			インスリン不要	高血糖是正に必要	生存に必要
1型	←	→	→	→	→
2型	←	→	→	→	→
その他特定の型	←	→	→	→	→

Figure 1-1 糖尿病における成因（発症機序）と病態（病期）の概念

右向きの矢印は糖代謝異常の悪化（糖尿病の発症を含む）をあらわす。矢印の線のうち、**■ ■ ■ ■** の部分は、「糖尿病」と呼ぶ状態を示す。左向きの矢印は糖代謝異常の改善を示す。矢印の線のうち、破線部分は頻度の少ない事象を示す。例えば2型糖尿病でも、感染時にケトアシドーシスに至り、救命のために一時的にインスリン治療を必要とする場合もある。また、糖尿病がいったん発病した場合は、糖代謝が改善しても糖尿病とみなして取り扱うという観点から、左向きの矢印は黒く塗りつぶした線であらわした、その場合、糖代謝が完全に正常化するに至ることは多くないので、破線であらわした。（文献[1]から転用）

1型糖尿病は、発症機構として膵β細胞破壊を特徴とする。一方、2型糖尿病は、「インスリン分泌低下」と「インスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）」の両者が発症に関与している。その他特定の型として、遺伝因子として遺伝子異常が同定されたものと、他の

疾患や病態に伴うものとに大別されている（Table 1-1）。

Table 1-1 糖尿病と糖代謝異常*の成因分類

-
- I. 1 型（膵 β 細胞の破壊，通常は絶対的インスリン欠乏に至る）
 - A. 自己免疫性
 - B. 特発性
 - II. 2 型（インスリン分泌低下を主体とするものと，インスリン抵抗性が主体で，それにインスリンの相対的不足を伴うものなどがある）
 - III. その他の特定の機序，疾患によるもの
 - A. 遺伝因子として遺伝子異常が同定されたもの
 - (1) 膵 β 細胞機能にかかわる遺伝子異常
 - (2) インスリン作用の伝達機構にかかわる遺伝子異常
 - B. 他の疾患，条件に伴うもの
 - (1) 膵外分泌疾患
 - (2) 内分泌疾患
 - (3) 肝疾患
 - (4) 薬剤や化学物質によるもの
 - (5) 感染症
 - (6) 免疫機序によるまれな病態
 - (7) その他の遺伝的症候群で糖尿病を伴うことの多いもの
 - IV. 妊娠糖尿病
-

注：現時点では上記のいずれにも分類できないものは分類不能とする。

*一部には、糖尿病特有の合併症を来すかどうかを確認されていないものも含まれる。
(文献[1]から転用)

近年、糖尿病は全世界規模で拡大しており、世界の人口の約 9 %が罹患している状況である。そのうちの 90 %は 2 型糖尿病と診断され、2 型糖尿病に対する治療対策は、各国の保健機関の大きな課題となっている[2,3,4]。アジアでは、食事の欧米化の影響もあり、特に中国やインドで 2 型糖尿病の罹患率が増大している[5,6]。また、日本では、厚生労働省の調査報告（2016 年度）から、糖尿病有病者と糖尿病予備群はいずれも約 1,000 万人と推計されている[7]。さらに、日本での 2 型糖尿病患者数は 2030 年までに 8,900 万人にまで増大すると予測され、その予防対策や効果的な治療手法の確立が急務となっている[6]。2 型糖尿病の特徴として、上述したように血糖値のレベルに応じたインスリン分泌機能が阻害

される「インスリン分泌不全」とインスリン受容体の感受性が低下する「インスリン抵抗性」が挙げられる。また、2 型糖尿病発症には、遺伝形質ならびに環境的要因として、食事の習慣や運動不足等のライフスタイルが影響する事が知られている[2~6]。さらに、肥満や加齢も 2 型糖尿病発症に対して高いリスクとなっている。糖尿病の遺伝的背景として、東アジア人は欧米人と比較して膵臓のインスリン分泌組織である β 細胞の絶対量が少ないが、インスリン感受性が欧米人と比較して高いため、「インスリン分泌不全」を呈しやすい事が報告されている[6,8,9]。また、東アジアの 2 型糖尿病患者の特徴として、肥満度指数である BMI (Body Mass Index) 及び腹囲の平均値が低く、肥満を伴わない患者が多い。生活習慣の悪化や肥満はインスリン抵抗性を増悪させる因子である事から、東アジアの糖尿病患者では「インスリン分泌不全」が 2 型糖尿病の発症に大きな影響を及ぼしていると推測される。

このように、2 型糖尿病の発症や病態進展は人種間でも異なってくる事から、糖尿病治療を目的として生活習慣の改善を進める事や新規糖尿病治療薬を開発するためには、遺伝形質ならびに環境的要因を背景とした患者の生理学的特徴を把握し、適切な対策、治療をする必要があると考える。

1-2. 糖尿病の治療

糖尿病治療の目標は、糖尿病状態を除くことはもとより、糖尿病に特徴的な合併症、糖尿病に併発しやすい合併症の発症、増悪を防ぎ、健康人と同様な日常生活の質を保ち、健康人と変わらない寿命を全うする事である[10]。そのためには、高血糖状態の是正、すなわち血糖をコントロールする事が重要であり、治療上、血糖値を可能な限り正常に近づけることが望まれる。治療開始後早期に良好な血糖コントロールを達成し、その状態を維持する事ができれば、長期予後の改善が期待される。

糖尿病診断基準は、日本糖尿病学会により、高血糖状態を反映する「HbA1c」、「空腹時血糖値」及び「食後 2 時間血糖値」の基準値が設定されている (Table 1-2)。

このなかで、ヘモグロビン A1c (HbA1c) は、血中のヘモグロビンの β 鎖の N 末端にグルコースが非酵素的に安定結合した糖化蛋白質であり、採血時点から 1~2 ヶ月の平均血糖値を反映する事が報告されている[11,12]。また、各個体でのバラツキも少なく、血糖コントロールの指標として最も重要なパラメータである。日本糖尿病学会の治療ガイドでは、血糖コントロールにおいて、上記した 3 つのパラメータが「優」または「良」となるよう心掛けるとされている[10]。

糖尿病に特徴的な合併症である細小血管症（慢性的な高血糖による微小血管障害）として、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症及び糖尿病性腎症が挙げられるが、これら合併症

を抑制するためには、空腹時血糖値と HbA1c 値の是正が重要である。さらに、糖尿病に併発しやすい大血管症（動脈硬化症、心筋梗塞、脳梗塞、末梢動脈疾患、足病変）を抑制するためには、前述した 3 つのパラメータ（空腹時高血糖値、HbA1c 値及び食後高血糖）の是正が必要となる[13,14]。

Table 1-2 血糖コントロール指標と評価

指標	コントロールの評価とその範囲				
	優	良	可		不可
			不十分	不良	
HbA1c (国際標準値) (%)	6.2 未満	6.2~6.9 未満	6.9~7.4 未満	7.4~8.4 未満	8.4 以上
空腹時血糖値 (mg/dL)	80~110 未満	110~130 未満	130~160 未満		160 以上
食後 2 時間血糖値 (mg/dL)	80~140 未満	140~180 未満	180~220 未満		220 以上

文献[10]より引用

1 型糖尿病はインスリン分泌組織である膵 β 細胞が自己免疫等により破壊され、インスリンが分泌されない状態であることから、その治療は外からインスリンを補充する必要がある。インスリンは、1 日を通して分泌される「基礎分泌」と食事の摂取により分泌される「追加分泌」があり、インスリンが分泌できない 1 型糖尿病患者では、これら基礎分泌と追加分泌をインスリン注射薬で補う「強化インスリン療法」が基本治療となっている。強化インスリン療法では、基礎分泌を補うため、持続的な効果を示す長時間型または中間型のインスリン製剤を 1 日 1~2 回皮下注射し、さらに追加分泌を補うための追加インスリン（超速効型または速効型）を食事の前に皮下注射し、合計で 1 日 4~5 回のインスリン注射を行う必要がある（頻回注射法）[10]。この頻回注射法の他に、超速効型インスリン製剤をインスリンポンプにセットし、あらかじめ設定した速度でインスリンをポンプから皮下へ持続的に注入することによって「基礎分泌」を補う持続皮下インスリン注入法がある。これは、ポンプのボタン操作により食事の前にインスリンを追加で注入し、「追加分泌」を補うことができ、且つ 1 日のなかでインスリンの注入量を細かく調節することで、低血糖を起こすリスクを減らす事も可能となる。なお、この手法では皮膚にカニューレを留置する必要がある、そのカニューレは 2~3 日に 1 回の交換が必要となることから、頻回注射法と

比較するとデメリットも存在する。現在、血糖測定センサーと連携したインスリンポンプにより、血糖値に応じて自動的にインスリン投与量を調節するコンピューターが内蔵された機器等も開発されており、デバイス面の発達で1型糖尿病患者の生理学的特徴を捉えた治療も可能となっていくと考える。

2 型糖尿病は、その発症に遺伝的要因や環境的要因が影響することから、食事療法、運動療法及び薬物療法の3療法を中心に治療が進められる。また、治療開始時に、食事療法、運動療法及び肥満等の生活習慣改善を患者が実践し、血糖コントロールの目標が達成できない場合に、薬物療法として経口血糖降下療法、インスリン療法または血糖降下作用を持つGLP-1受容体作動薬療法が選択される。以降、各治療ステップにおいて血糖コントロールの目標が達成できない場合は、薬物療法において投与量の増量や併用療法が選択される[15] (Figure 1-2)。

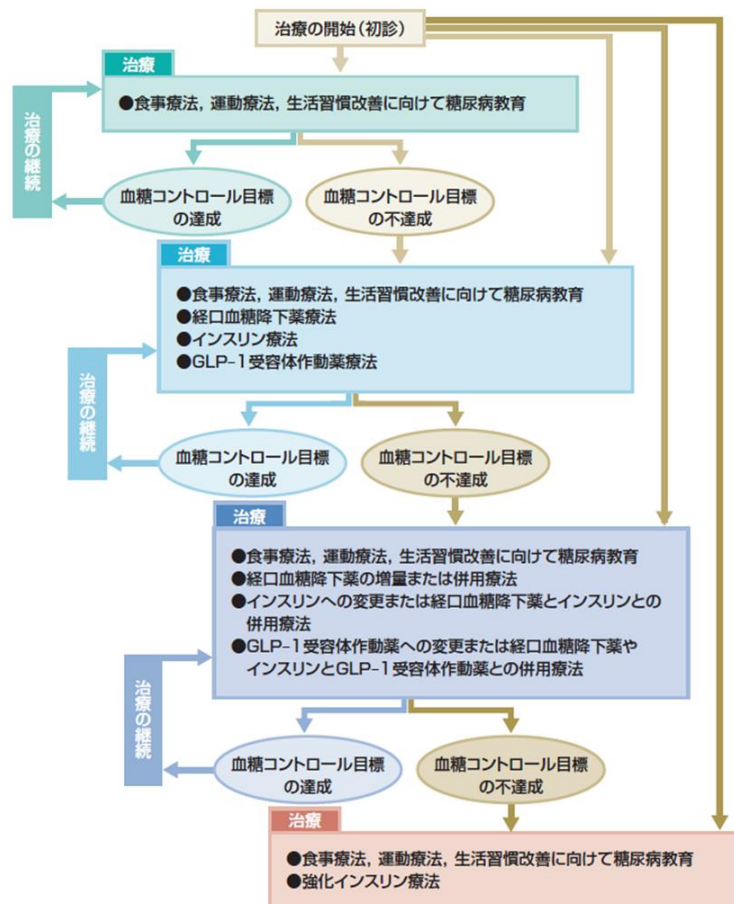


Figure 1-2 2 型糖尿病（インスリン非依存型）の治療

急性代謝失調を認めない（随時血糖値 250～300 mg/dL またはそれ以下で尿ケトン体陰性）場合の治療方針。血糖コントロールはHbA1c 7.0 以下を目指す。患者の年齢や病態を考慮して個々に設定する。文献[15]から引用

1-2-1.食事療法

2 型糖尿病における食事療法は、総エネルギー摂取量の適正化によって肥満を解消して、インスリン分泌不全を補完し、インスリン作用からみた需要と供給のバランスをとることによって、高血糖のみならず糖尿病の種々の病態を是正する事を目的としている。食事療法を実践するに当たっては、各個人の病態に合わせ、高血糖のみならず、あらゆる側面からその妥当性が検証されなければならない。JDS のガイドラインでは、BMI 22 を目標として標準体重を求め、以下の式から総エネルギー摂取量を算定している。

・ 総エネルギー摂取量＝標準体重^a×身体活動量^b

a: 標準体重 (kg) = [身長 (m)]² × 22

b: 身体活動量 (kcal/kg 標準体重)

＝25～30 軽い労作（デスクワークが多い職業など）

＝30～35 普通の労作（立ち仕事が多い職業など）

＝35～ 重い労作（力仕事が多い職業など）

患者の背景情報（性別、年齢、肥満度、日常生活やスポーツによる活動量）から適正なエネルギー摂取量が策定され、医師の食事指導を受けて治療が継続される[15]。

1-2-2.運動療法

継続的な運動により心肺機能の改善、血糖コントロールの改善、脂質代謝の改善、血圧低下、インスリン感受性の増加が認められ、有酸素運動とレジスタンス運動はともに血糖コントロールに有効であり、それらの併用による効果も認められている。

運動療法の進め方は、個人の基礎体力、年齢、体重、健康状態により異なるが、最初は歩行時間を増やすなど無理のない程度に身体活動量を増加させることより始め、段階的に運動量を増加させていく。さらに、患者の嗜好にあった運動を取り入れるなど、安全かつ運動の楽しさを実感できるように工夫する事で、運動療法の継続が期待される。

運動療法には、以下に示す項目での実施が推奨されている。

1) 運動種目

全身の筋肉を使用するウォーキング、ジョギング、水泳、自転車などの有酸素運動

2) 運動時間

20 分以上の運動により、血中の糖、遊離脂肪酸がエネルギーとして利用される。

3) 運動強度

糖及び遊離脂肪酸がエネルギーとして利用される中等度（ややきつい）と感じる程

度の運動強度（心拍数；100～120 拍/分、最大酸素摂取量；40～60%）あるいはそれ以下の強度

4) 運動頻度

できれば毎日継続して行い、実施できない場合は少なくとも 1 週間のうち 3 日以上行う。実施可能な時間であれば、いつ行ってもよいが、特に食後 1 時間後に行うと食後の高血糖状態が抑制されると考えられている。

1-2-3.薬物療法

十分な食事療法、運動療法を 2～3 ヶ月間行っても、良好な血糖コントロールが得られない場合、血糖降下薬が適応される。また、速やかな高血糖の是正が必要な場合は、早期からのインスリンも含めた血糖降下薬が適応となりうる。

現在、糖尿病治療薬として適応されている血糖降下薬は、スルホニル尿素薬（SU 薬）、ビグアノイド薬（BG 薬）、 α グルコシダーゼ阻害薬（ α -GI 薬）、チアゾリジン薬（TZD 薬）、速攻型インスリン分泌促進薬（グリニド薬）、Dipeptidyl peptidase-4 阻害薬（DPP-4 阻害薬）、Glucagon like-peptide-1 受容体作動薬（GLP-1 受容体作動薬）、Sodium glucose co-transporter 阻害薬（SGLT2 阻害薬）、ヒトインスリン及びヒトインスリンアナログである。

血糖降下薬は、合併症抑制のエビデンス、病態に適した作用機序、禁忌でないことなどを考慮して選択し、患者への説明と同意のもとに開始されるべきである。急激な血糖コントロールに伴う生体への影響を考慮し、第一選択薬が単独で少量から開始され、血糖コントロールが不十分な場合は徐々に増量される。第一選択薬の単独投与によっても血糖コントロールの目標値に到達しない場合は、さらなる増量や、より血糖改善効果の強い血糖降下薬への変更または作用機序が異なる血糖降下薬の併用を考慮する。しかしながら、現状では、いかなる薬剤の併用でも、血糖降下作用における明らかな相乗効果が認められることはなく、併用に関するガイドラインは確立されていない。なお、最小血管症の抑制効果は血糖コントロールレベルに強く関連し、薬物間の差はないと考えられている。一方、大血管症の抑制効果は血糖コントロールレベルとの関係や薬物間の差が臨床試験のエビデンスとして蓄積されている。これには、臨床試験の背景や標準治療レベルに差がある事も把握されており、薬剤間の差が明確になっていない事が課題となっている。

現在、作用機序が異なる血糖降下薬が糖尿病治療に広く使用されているが、十分な血糖コントロールを達成するためには、それぞれの薬剤の特徴を把握し、糖尿病患者の背景情報、から適切な薬剤を選択する事が重要となってくる。日本で使用されている血糖降下薬（インスリン製剤を除く）の特徴を以下に示す。

Table 1-3 血糖降下薬の特徴

血糖降下薬	主な作用	特徴的な副作用
スルホニル尿素薬 (SU 薬)	インスリン分泌促進	低血糖、体重増加
ビグアノイド薬 (BG 薬)	肝臓での糖新生の抑制 骨格筋及び肝臓でのインスリン感受性の改善	消化器症状、乳酸アシドーシス
α グルコシダーゼ阻害薬 (α -GI 薬)	炭水化物の吸収遅延、食後高血糖の改善	消化器症状、重篤な肝機能障害
チアゾリジン薬 (TZD 薬)	骨格筋及び肝臓でのインスリン感受性の改善	体重増加、浮腫、貧血、血清乳酸脱水素酵素上昇、血清クレアチンホスホキナーゼ上昇、肝機能障害、心不全
速攻型インスリン分泌促進薬 (グリニド薬)	速やかなインスリン分泌促進、食後高血糖改善	低血糖
Dipeptidyl peptidase-4 阻害薬 (DPP-4 阻害薬)	血糖依存性のインスリン分泌の促進とグルカゴン分泌抑制	報告されていない
Glucagon like-peptide-1 受容体作動薬 (GLP-1 受容体作動薬)	血糖依存性のインスリン分泌促進とグルカゴン分泌抑制 膵 β 細胞保護作用	消化器症状
Sodium glucose co-transporter 阻害薬 (SGLT2 阻害薬)	近位尿細管におけるブドウ糖の再吸収抑制	尿路感染、ケトアシドーシス

文献[15]の情報を引用

これら血糖降下薬の中で、DPP-4 阻害薬、GLP-1 受容体作動薬及び SGLT2 阻害薬は、2000 年以降に日本国内で承認された比較的新しい血糖降下薬である。特に DPP-4 阻害剤と GLP-1 受容体作動薬は、GLP-1 の生理作用であるインスリン分泌作用に加えて、膵 β 細胞の保護や増殖等、これまでの糖尿病治療薬にはない特徴を持つ。我々は、この GLP-1 受容体作動薬が優れた糖尿病治療薬になると考え、既存の GLP-1 受容体作動薬と異なるアプローチにて新規 GLP-1 受容体作動薬の創製を進めた。GLP-1 の概要を以降に示す。

1-3. 糖尿病治療における GLP-1 受容体作動薬の位置づけ

GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) は食事の際に小腸下部の L 細胞から分泌されるペプチド (30 または 31 アミノ酸からなる消化管ホルモン) であり、小腸上部の K 細胞から分泌される GIP (glucose- dependent insulinotropic polypeptide) と共に、インクレチン (Intestine secretin insulin; Incretin) に分類されている[16]。GLP-1 はプログルカゴンからプロセッシングを受けて産生され、L 細胞の分泌顆粒内に貯蔵される[17,18]。貯蔵された GLP-1 は食事による消化管管腔内でのグルコース、アミノ酸及び脂肪酸の刺激を受け、細胞内 Ca^{2+} レベルが上昇して、エクソサイトーシスにより血管内に分泌される[19,20,21,22]。L 細胞から分泌された GLP-1 は、体循環を介して膵臓 β 細胞に発現している GLP-1 受容体に作用し、インスリン分泌作用を示す。GLP-1 受容体を介するインスリン分泌促進作用を Figure 1-3 に示す。血糖値が高くなるとグルコースが膵臓 β 細胞に取り込まれ、グルコキナーゼ及び解糖系を介して ATP が産生される。細胞内 ATP が増加すると K_{ATP} チャンネルが閉鎖し、細胞膜が脱分極を起こす。細胞膜の脱分極により、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化され、細胞内に Ca^{2+} が流入する。この細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によりインスリンが分泌される (グルコース依存性インスリン分泌)。GLP-1 受容体シグナルは、G タンパクを介するアデニル酸シクラーゼの活性化により、細胞内の ATP がサイクリック AMP (cAMP) に変換され、この cAMP を介してグルコース依存性インスリン分泌が活性化される。すなわち、GLP-1 を介するインスリン分泌はグルコース濃度依存的であるため、血糖値が低いときはインスリンが分泌されず、低血糖を起こしにくい特徴を有する。

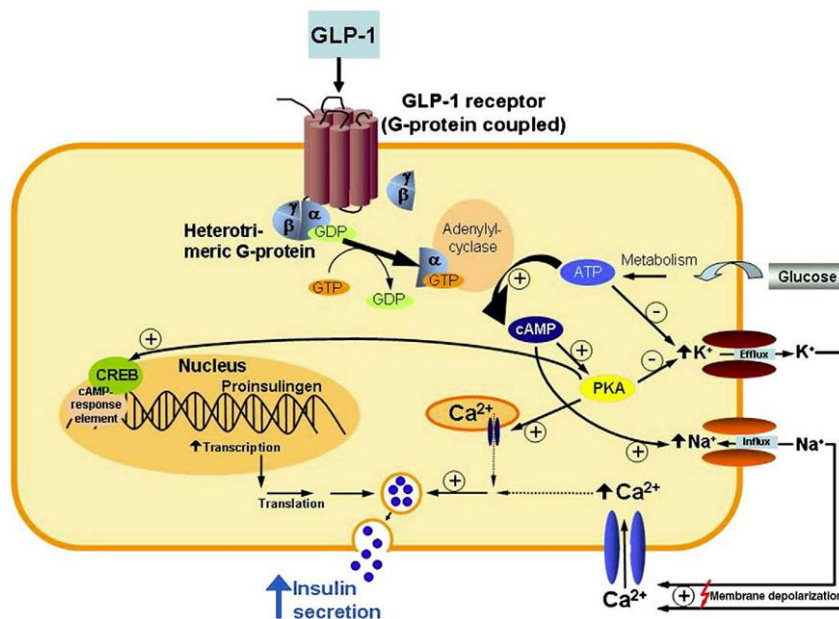


Figure 1-3 Mechanisms of action of GLP-1.(Adapted from ref 23)

さらに GLP-1 は膵臓以外の組織に対し、直接作用として胃排泄運動抑制作用や中枢を介する食欲抑制作用を有し、間接的には肝臓でのグルコース産生抑制や筋肉でのインスリン感受性増加といった作用を示す事が報告されている (Figure 1-4)。

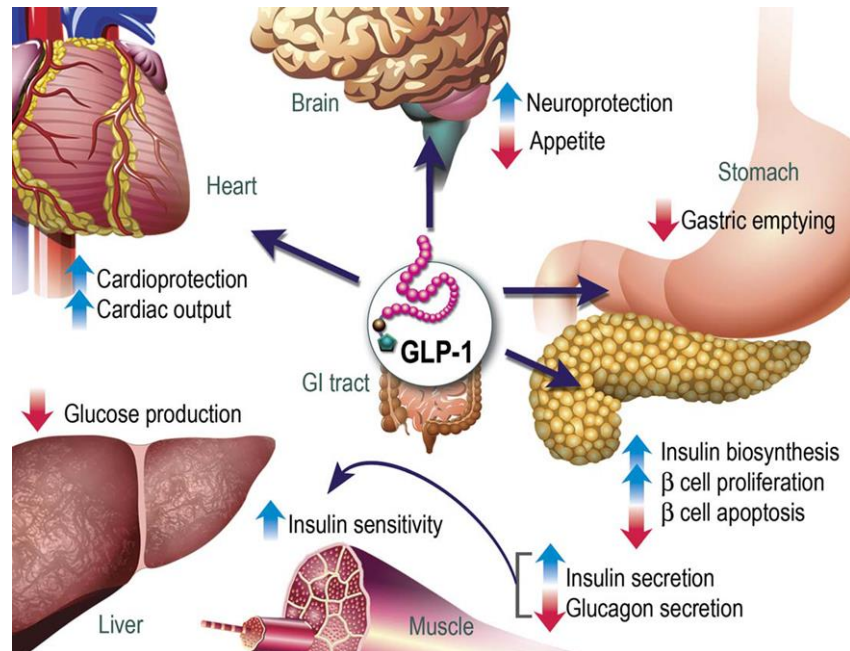


Figure 1-4. GLP-1 actions in peripheral tissues

GLP-1 acts directly on the endocrine pancreas, heart, stomach, and brain, whereas actions on liver and muscle are indirect (Adapted from ref 16).

GLP-1 は発見された当初から、低血糖を呈しない 2 型糖尿病の治療薬となると考えられ、各種の研究が進められていた。しかしながら、GLP-1 は L 細胞から分泌後、体循環へ移行すると、腎からの排泄及び速やかに分解酵素 (DPP-4、NEP-24.11 等) によって分解される事から (Figure 1-5)、その作用を持続させる試みが数多く検証されている[24,25,26]。実際に、分解酵素耐性を示す Exendin-4 やアルブミンとの結合を介して生体内安定性が高められた Liraglutide 等の GLP-1 受容体作動薬及び GLP-1 の主要な分解酵素である DPP-4 阻害薬は、糖尿病治療薬として既に認可され、2 型糖尿病治療に広く適応されている。一方、GLP-1 受容体作動薬の課題として、臨床において消化管に関連する副作用が多数報告されている。この副作用を軽減できる GLP-1 受容体作動薬を創製する事ができれば、糖尿病治療の新たなオプションとなる可能性が高いと考えた。

第2章 新規 GLP-1 受容体作動薬の創製

2-1. 序論

GLP-1 受容体作動薬である Exendin-4 及び Liraglutide は 2 型糖尿病患者の第一選択薬として現在広く処方されている。これら GLP-1 受容体作動薬の特徴として、強力な血糖降下作用に加え、低血糖を起こしにくく、インスリン分泌組織である膵臓 β 細胞の保護及び増殖能を有する事である。さらに、膵臓以外の作用として、胃排泄運動抑制作用を示し、中枢を介する食欲抑制作用から、欧米では抗肥満薬としても開発が進められ、Liraglutide は FDA で抗肥満薬として承認されている[27]。しかしながら、GLP-1 受容体作動薬は糖尿病患者に対して強力な血糖降下作用を示す一方で、投与初期に悪心、嘔吐等の消化管に由来する副作用を示す事が知られている。この投与初期の副作用により、投与量を増量する事ができず、十分な有効性を示す事ができない事例も存在する。我々は、新規 GLP-1 受容体作動薬を創製し、その特徴を把握する事で、既存の GLP-1 受容体作動薬に無い特性が得られるかを検証した。

2-2. 新規 GLP-1 受容体作動薬のデザイン

これまで、GLP-1 の安定性を確保するために様々な手法が検討されている[28]。そのなかでも、高分子化は、他のペプチドにも応用されている有望な手法であると考えられる[29,30,31]。ペプチドの高分子化として、ペプチドとポリエチレングリコール (PEG) との結合や、抗体の Fc ドメインまたはアルブミン等のタンパクとの結合、さらには血中のアルブミンに結合できるアルキル側鎖の導入等が検証されてきた。実際に、GLP-1 を基にしたペプチド配列内にアルキル側鎖を導入し、アルブミンとの結合を高めた Liraglutide やアルブミンと GLP-1 を結合した Albiglutide は、半減期が十数時間及び数週間まで延長し、長時間持続型 GLP-1 受容体作動薬として糖尿病患者の治療に適用されている[32]。我々は、新たな高分子化の手法として、細菌由来プロテイン G のアルブミン結合ドメイン (ABD) に着目した[33]。プロテイン G はグラム陽性菌の細胞膜に発現しており、この ABD は細菌とアルブミンとの結合に関与するドメインとなる。さらに、Streptococcus strain G148 由来の ABD 配列 (G148-ABD3) はアルブミンに対して強い結合能を示す事が報告されていることから[33,34]、GLP-1 と G148-ABD3 の部分配列を組み合わせたキメラペプチドをデザインし、アルブミンとの結合能を高める事で、高分子化による酵素分解や腎臓からの排泄を回避できる新規 GLP-1 受容体作動薬が創製できると考えた。G148-ABD3 は 3 つのヘリックスで構成されており、さらに、各種類似 ABD 配列の検討からも、アルブミンとの結合には「ヘリックス 3」が関与する事が強く示唆されている[33,35,36] (Figure 2-1, 2-2)。そこ

で、キメラペプチドに用いる配列として、ヘリックス 3 を含む部分配列に着目し、7~17 残基のアミノ酸を選択した。



Figure 2-1 Primary structure of G148-ABD3

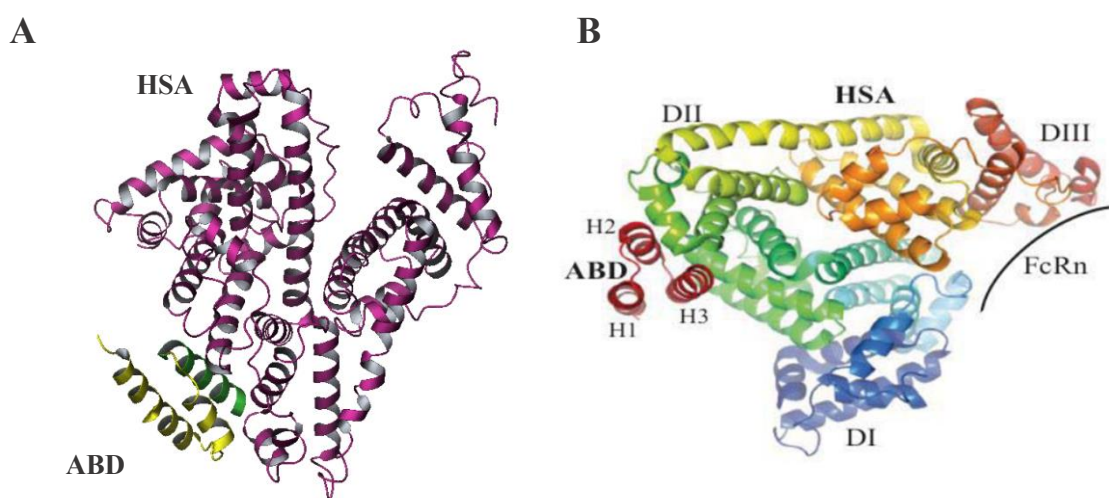


Figure 2-2 Schematic structure of the HSA-ABD complex. (A) The HSA molecule is shown in *pink* and the ABD of protein PAB from *Finnegoldia magna* in *yellow* (helix 1 and 2) and *green* (helix 3). Data from PDB-file 1FT0 and ref. 35. (B) The albumin-binding domains recognize a site located in domain II of HSA that does not overlap with the binding site for the neonatal Fc-receptor (FcRn), which plays an important role in albumin homeostasis (Adapted from ref. 36).

さらに、GLP-1 は N 末端側が受容体結合に重要である事が示唆されているため[37]、GLP-1 の C 末端側に G148-ABD3 のヘリックス 3 の部分ペプチドを付加した。また、GLP-1 は DPP-4 により速やかに分解される点を考慮し、DPP-4 の切断部位である 8 位のアラニンをセリンに置換した[Ser⁸]-GLP-1 をキメラペプチドの基本配列と設定した。今回合成したペプチド 1 ~10 の配列と純度及び質量分析結果を Table 2-1 に示した。各ペプチドは、Fmoc アミノ酸を用いた固相合成により、C 末端から N 末端まで縮合反応を実施した。HPLC により精製したペプチドの純度は 95.0 ~ 100 %であり、合成したペプチドの精密質量は、ペプチド配列から算出した質量とほぼ等しく、実験への使用に問題ないと判断した。

Table 2-1 Chemical purity and identity of the peptides 1 – 10.

Peptide	Sequence	Purity %	Calculated mass (monoisotopic)	Observed mass (deconvoluted)
1	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- GVKALIDEILAA-NH ₂	100 ^a	4333.263	4333.264
2	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- KALIDEILAA-NH ₂	100 ^a	4177.173	4177.171
3	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- AKTVEGVKALIDEILAA-NH ₂	96.4 ^b	4877.549	4877.551
4	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- VEGVKALIDEILAA-NH ₂	95.4 ^b	4577.369	4577.358
5	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- EGVKALIDEILAA-NH ₂	97.2 ^b	4478.301	4478.294
6	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- GVKALIDEILAA-NH ₂	96.1 ^b	4349.258	4349.264
7	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- VKALIDEILAA-NH ₂	95.2 ^b	4292.237	4292.250
8	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- KALIDEILAA-NH ₂	95.0 ^b	4193.168	4193.176
9	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- LIDEILAA-NH ₂	95.1 ^b	3994.036	3994.061
10	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG- IDEILAA-NH ₂	96.4 ^b	3880.952	3880.979

^a HPLC condition, detection UV 220 nm, eluent A-0.1 % TFA/H₂O, B-0.1 % TFA/ACN, gradient 30 % to 90 % solvent B in 30 minutes, flow rate 1.0 mL/min.

^b HPLC condition, detection UV 220 nm, eluent A-0.05 % TFA/H₂O, B-0.05 % TFA/ACN, gradient 20 % to 90 % solvent B in 34 minutes, flow rate 1.0 mL/min.

2-3. 合成ペプチドのラット血漿安定性とインスリン分泌能評価

合成したペプチド 1~10 の生体内安定性及び GLP-1 受容体に対するアゴニスト作用を確認するため、ラット血漿中の安定性試験及び MIN6 (マウスインスリノーマ) 細胞によるグルコース濃度依存的なインスリン分泌能を確認した。その結果を Table 2-2 に併せて示した。野生型 GLP-1 をラット血漿中で 8 時間インキュベートした結果、未変化ペプチドは検出されず、完全に分解している事が確認された。野生型 GLP-1 の 8 位アラニンをセリンに変換した[Ser⁸]-GLP-1 (7-36)-NH₂ では、血漿中で 8 時間インキュベートした際の残存率が 17 %であり、大部分が分解している事が確認された。一方、G148-ABD3 の部分配列 (7~17 残基) を付加したペプチド 1~10 のラット血漿中の残存率は、8 時間で 77 ~115 %であり、48 時間インキュベートしても残存率は 68 ~117 %を保持しており、ほとんど分解されていなかった。この結果から、ペプチド 1~10 は血漿中で安定である事が確認された。

MIN6 細胞を用いて、各ペプチドのインスリン分泌能を比較評価した。野生型 GLP-1 のインスリン分泌能を 100 %とした際、ペプチド 7 のインスリン分泌は野生型 GLP-1 の 44 %であったが、それ以外のペプチドは 80 %以上のインスリン分泌能を保持している事が確認された。ペプチド **1, 2, 3, 6** 及び **10** のインスリン分泌の EC₅₀ 値はそれぞれ 0.55, 0.09, 0.21, 1.7 及び 0.27 nM であり、野生型 GLP-1 の 1/10 から同等のインスリン分泌能を示す事が確認された。

Table 2-2 Stability and insulinotropic potency of peptides 1-10.

Peptide	Sequence	Stability in rat plasma (%)		Insulinotropic action	
		8 h	48 h	% of maximum	EC ₅₀ (nM)
GLP-1 (7-36)-NH ₂	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂	0	-	100	0.12
1	GLP-1 (7-35)-GVKALIDEILAA-NH ₂	102	76	99	0.55
2	GLP-1 (7-35)-KALIDEILAA-NH ₂	97	75	106	0.09
[Ser ⁸]-GLP-1 (7-36)-NH ₂	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂	17	0	83	0.18
3	[Ser ⁸]- GLP-1 (7-35)- AKTVEGVKALIDEILAA-NH ₂	107	116	105	0.21
4	[Ser ⁸]- GLP-1 (7-35)- VEGVKALIDEILAA-NH ₂	99	92	83	-
5	[Ser ⁸]- GLP-1 (7-35)- EGVKALIDEILAA-NH ₂	96	68	109	-
6	[Ser ⁸]- GLP-1 (7-35)- GVKALIDEILAA-NH ₂	104	93	118	1.7
7	[Ser ⁸]- GLP-1 (7-35)- VKALIDEILAA-NH ₂	115	113	44	-
8	[Ser ⁸]- GLP-1 (7-35)- KALIDEILAA-NH ₂	77	117	115	-
9	[Ser ⁸]- GLP-1 (7-35)- LIDEILAA-NH ₂	113	95	82	-
10	[Ser ⁸]- GLP-1 (7-35)- IDEILAA-NH ₂	97	95	120	0.27

Data are expressed as the mean value (n=3). -, Not measured.

2-4. 糖尿病モデル動物による血糖降下スクリーニング

合成ペプチドの血糖降下作用を確認するため、肥満型 2 型糖尿病モデル動物である db/db マウスを用いてペプチド **6**, **8** 及び **10** を 12.5 nmol/kg の投与量で単回皮下投与し、投与後 0, 1, 2, 4 及び 6 時間後の血漿グルコースの AUC を算出して溶媒投与群（コントロール）の AUC と比較した。その結果を Table 2-3 に示した。ペプチド **6** は皮下投与後 1 時間及び 6 時間で溶媒投与群と比較して有意な血糖降下（血漿グルコース低下）作用を示す事が確認された。ペプチド **8** は投与後 6 時間において、血漿グルコース AUC が溶媒投与群に対し有意に低下する事が確認された。しかしながら、ペプチド **10** はいずれの時点においても、有意な血糖降下作用を示さなかった。続いて、ペプチド **6** を db/db マウスに 50 nmol/kg 単回皮下投与後の血漿グルコースの推移を対照ペプチド ($[\text{Ser}^8]\text{-GLP-1 (7-36)-NH}_2$) と比較した。その結果を Figure 2-3 に示した。ペプチド **6** は投与後 1, 2, 4 及び 6 時間において溶媒投与群と比較して有意な血糖降下作用が確認された。一方、 $[\text{Ser}^8]\text{-GLP-1 (7-36)-NH}_2$ 投与群は投与後 1 時間で血漿グルコースの有意な低下が認められたが、その時点以降、血漿グルコース濃度は溶媒投与群と同程度の推移を示した。これら検討結果より、以降の検討はペプチド **6** を中心に実施した。

Table 2-3 Comparison of plasma glucose-lowering effects of **6**, **8** and **10** in diabetic db/db mice.

Peptide	% of Vehicle control Glucose AUC 0-t (mg·h/dL)	
	1 h	6 h
6	86.9 ± 8.5*	83.0 ± 9.3**
8	94.6 ± 6.6	93.3 ± 7.3*
10	98.6 ± 5.9	101 ± 10.9

Data are expressed as the mean ± standard deviation (SD) of seven animals.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. vehicle control.

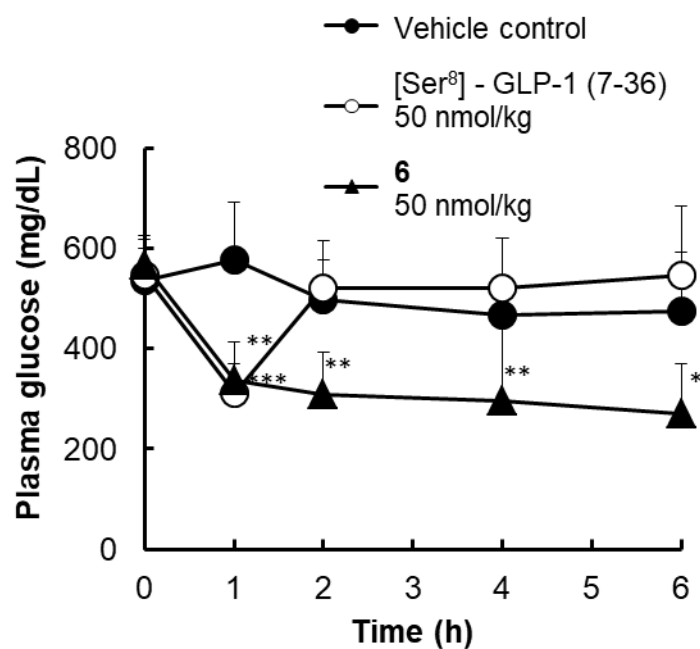


Figure 2-3 Glucose-lowering effects of **6** and [Ser⁸]-GLP-1 (7-36) in diabetic db/db mice. Data are expressed as the mean + SD of seven animals. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle control.

2-5. ペプチド 6 の GLP-1 受容体結合能及びアルブミンへの結合特性評価

ペプチド 6 の特徴を把握するため、 β TC6（マウスインスリノーマ）及びヒト GLP-1 受容体強発現細胞を用いて GLP-1 受容体のセカンドメッセンジャーである cAMP の生成能及びヒト GLP-1 受容体結合能を Liraglutide と比較した（Table 2-4）。ペプチド 6 の cAMP 生成における EC_{50} 値はマウス及びヒトでそれぞれ 1.2 及び 0.131 nM であり、Liraglutide と同程度（マウス 0.74 nM, ヒト 0.109 nM）である事が確認された。また、GLP-1 受容体発現細胞の膜各分を用いた結合試験において、ペプチド 6 は BSA 濃度の変化によらず IC_{50} 値は一定であった。一方、Liraglutide の結合試験では、BSA 濃度を 0.1 %から 2 %に変化させると IC_{50} 値は 1.25 nM から 7.12 nM へと 0.18 倍変化する事が確認された。この結果から、ペプチド 6 はアルブミンへの結合が弱いと推測され、Liraglutide とは別のメカニズムで生体内安定化が起こっていると考えられた。

2-6. ペプチド 6 のヒト血漿及び NEP-24.11 安定性評価

ペプチド 6 のヒト血漿中及び NEP-24.11 における安定性を確認した（Table 2-5, 2-6）。ペプチド 6 はヒト血漿中でインキュベートしても 8 時間及び 48 時間後でほとんど分解しない事が確認された。GLP-1 を NEP-24.11 溶液中で 8 時間インキュベートした結果、残存率は 29.4 %であり、約 70 %分解する事が確認された。一方、ペプチド 6 は NEP-24.11 溶液中で 8 時間インキュベートした結果、残存率は 84.4%であり、ほとんど分解しない事が確認された。

Table 2-4 Functional and binding abilities of **6** and liraglutide.

Peptide	cAMP production		$[^{125}\text{I}]$ -GLP-1 (7-36) binding		IC ₅₀ ratio (0.1% BSA / 2% BSA)
	EC ₅₀ (nM)		IC ₅₀ (nM)		
	Mouse	Human	0.1% BSA	2% BSA	
6	1.2	0.131	12.71	11.68	1.09
Liraglutide	0.74	0.109	1.25	7.12	0.18

Data are expressed as the mean value in duplicate or triplicate.

Table 2-5 Stability of GLP-1, [Ser⁸]-GLP-1 and **6** in human plasma.

Peptide	Stability in human plasma (%)	
	8 h	48 h
GLP-1(7-36)-NH ₂	0	0
[Ser ⁸] - GLP-1(7-36)-NH ₂	37.6	0
6	99.2	100

Data are expressed as the mean value (n = 3).

Table 2-6 Stability of GLP-1 and **6** for NEP-24.11.

Peptide	Stability in NEP-24.11 (%)	
	4 h	8 h
GLP-1(7-36)-NH ₂	59.4	29.4
6	90.5	84.4

Data are expressed as the mean value (n = 3).

2-7. ペプチド 6 のラットにおける薬物動態評価

ペプチド 6 を 10 $\mu\text{g/kg}$ の投与量で 7 週齢の雄性 SD ラットに単回静脈内及び単回皮下投与し、血漿中ペプチド 6 濃度を測定して薬物動態学的パラメータを算出した。その結果を Figure 2-4 及び Table 2-7 に示した。ペプチド 6 は皮下投与後緩やかに吸収され、 C_{max} は $43 \pm 5.4 \text{ ng/mL}$ であり、 T_{max} は投与後 4 ± 2 時間であった。静脈内及び皮下投与後の消失半減期はそれぞれ 5.4 時間及び 5.8 時間であり、野生型 GLP-1 の消失半減期（2 分）に対して著しく改善しており、長半減期型の GLP-1 受容体作動薬になる可能性があると考えられた。分布容積（ V_{dss} ）は $75.6 \pm 1.7 \text{ mL/kg}$ であり、ラット循環血の分布容積と同程度であることから、投与後は主に循環血中に存在すると推測された。生物学的利用率は 64.3 %であり、皮下からの吸収は良好である事が確認された。

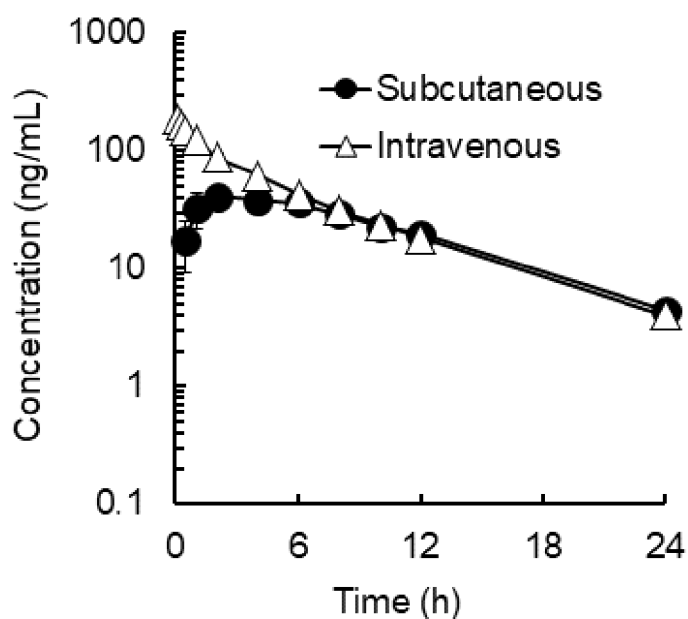


Figure 2-4 Plasma concentration of **6** in male SD rats after intravenous or subcutaneous administration of **6** at a dose of 10 $\mu\text{g/kg}$.

Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of five animals. n.d., not determined.

Table 2-7 PK parameters of **6** in SD rats.

Parameters	Subcutaneous	Intravenous
C_{max} (ng/mL)	43.0 ± 5.4	-
T_{max} (h)	4.0 ± 2.0	-
AUC_{0-t} (ng \cdot h/mL)	510 ± 58	820 ± 19
$\text{AUC}_{0-\infty}$ (ng \cdot h/mL)	548 ± 66	851 ± 23
CL_p (mL/h/kg)	-	11.8 ± 0.3
V_{dss} (mL/kg)	-	75.6 ± 1.7
$T_{1/2}$ (h)	5.8 ± 0.4	5.4 ± 0.3
MRT (h)	9.7 ± 0.7	6.4 ± 0.2
BA (%)	64.3 ± 7.7	-

Data were obtained after subcutaneous or intravenous administration at a dose of 10 $\mu\text{g/kg}$,

and are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of five animals.

2-8. 考察

GLP-1 の生体内安定性を確保するために、アルブミンとの結合による高分子化を目指して新規ペプチドをデザインした。アルブミンは複数の結合サイトを持ち、脂肪酸、カルシウム、マグネシウム、ホルモン、毒性物質及び薬物が結合して、それらを運搬する役割を持つ。近年、アルブミンは腎臓で糸球体ろ過を受け、近位尿細管で再吸収を受ける事が報告されており、そのプロセスは生体の恒常性維持に重要である事が示唆されている[38,39,40,41]。また、アルブミンが尿細管で再吸収される過程において、膜タンパクであるメガリン/キュービジンや胎児性Fc受容体(FcRn)との結合を介する事が報告されている[41]。アルブミンとの結合を介し、持続的な効果を示すGLP-1受容体作動薬を創製するためには、それら尿細管の再吸収に関与する膜タンパクとアルブミンとの相互作用（結合）に影響及ぼさない事が望ましいと考えられた。

DPP-4 は GLP-1 の主要な分解酵素であり、その基質特異性は、N 末端配列の 3～5 番目のプロリンまたはアラニンを認識してペプチド結合を切断する[42]。新規 GLP-1 受容体作動薬の基本配列として、DPP-4 耐性を付与する目的で、野生型の GLP-1 と同等の GLP-1 受容体アゴニスト作用を示す[Ser⁸]-GLP-1(7-35)を選択した[43]。なお、我々が選択した G148-ABD は、アルブミンと結合する際、FcRn とアルブミンとの結合に影響を及ぼさない事が確認されている[44]。また、G148-ABD は 3 つの相同配列（G148-ABD1~3）を持ち、各動物種のアルブミンに対して非常に強い結合を示す事が知られているが、そのなかでも G148-ABD3 は最も広く研究が進められている[44]。Jonsson らは、G148-ABD3 の C 末端のヘリックス 3 部分から構築したライブラリーを基に、ファージディスプレイの手法で、アルブミンに対してフェムトモラーレベルの強い結合能を示すバリエーション ABD035 を取得している[45]。さらに Ghosh らは ABD035 と Exendin-4 を組み合わせることで、高い生体内安定性を実現した GLP-1 受容体アゴニストを創製している[46]。

我々は、G148-ABD3 の部分配列（ヘリックス 3）を基に、[Ser⁸]-GLP-1 を基本配列としてキメラペプチドを 1~10 まで合成し、MIN6 細胞を用いて GLP-1 受容体アゴニストの主作用であるグルコース濃度依存的なインスリン分泌能をスクリーニングした。併せて、それらペプチドのラット血漿中安定性を確認し、活性と安定性を併せ持つペプチド **6** を獲得する事ができた。しかしながら、GLP-1 受容体に対する結合能を確認した際、ペプチド **6** はアルブミン濃度を変動させた条件において、比較対象とした Liraglutide とは異なる挙動を示した。この結果から、ペプチド **6** は Liraglutide と比較してアルブミンに対する結合能が低いと推測された。

ペプチド **6** は血漿安定性が非常に高い事が確認されたが、この血漿安定性は NEP-24.11 の耐性を獲得している事に起因するかを考察した。NEP-24.11 は内在的に GLP-1 を分解す

る酵素の一つであり[47]、GLP-1 の配列のうち、27 位と 28 位 (-E-F-)、31 位と 32 位 (-W-L-) に次いで、15 位と 16 位 (-D-V-)、18 位と 19 位 (-S-Y-)、19 位と 20 位 (-Y-L-) 及び 28 位と 29 位 (-F-I-) の 6 カ所を切断する。ペプチド **6** はいずれの切断部位も保持しており、且つ[Ser⁸]-GLP-1(7-35)の C 末端に付加させたペプチド配列は NEP-24.11.の切断部位に近い。そのため、付加したペプチド配列が NEP-24.11 の酵素分解を回避していると推測された。実際に、我々の検討では、ペプチド **6** は NEP-24.11 に対して非常に高い安定性を示す事が確認されている (Table 2-6)。一方、[Ser⁸]-GLP-1 は DPP-4 耐性を示す事が知られているが、*in vivo* における半減期は数分である事が報告されている[48]。また、*in vivo* での検討においては、NEP-24.11 を阻害した条件において、GLP-1 を infusion した際、GLP-1 を介するインスリン分泌能に影響がなかった事が報告されている[48]。これらの報告から、ペプチド **6** の血漿安定性に NEP 24.11 に対する耐性が影響している可能性が考えられたが、*in vivo* で認められた生体内安定性（薬効の持続及び消失半減期の延長）への寄与は少ないと推測された。

2-9. 小括

第 2 章において、[Ser⁸]-GLP-1(7-35)と G148-ABD3 の部分配列を組み合わせたキメラペプチドを 10 種類合成した。いずれのペプチドも GLP-1 受容体アゴニスト作用である MIN6 細胞でのグルコース濃度依存的なインスリン分泌能を保持していたが、生体内安定性は [Ser⁸]-GLP-1(7-35)の C 末端に付加したペプチドの配列長及び構成アミノ酸によって異なる結果が得られた。GLP-1 受容体アゴニスト作用とラット血漿安定性を保持するペプチド **6**、**8** 及び **10** の血糖降下作用を糖尿病モデル動物である db/db マウスにおいて評価した結果、ペプチド **10** は有意な血糖降下作用を示さなかった。一方、ペプチド **6** は糖尿病モデル動物において、持続的な血漿中グルコース濃度低下作用を示し、血漿安定性（ラット、ヒト）、GLP-1 受容体結合能、cAMP 活性及び生体内安定性の改善等の特徴を持つことから、長時間持続型の新規 GLP-1 受容体作動薬の候補となることが強く示唆された。

Liraglutide の生体内安定化は、Liraglutide のアルキル側鎖とアルブミンが結合して酵素耐性を獲得している事が報告されている[49]。今回の検証では、ペプチド **6** の GLP-1 受容体に対する結合能は、アルブミン濃度を変化させても変動せず、生体内安定化にアルブミンの寄与が低いと推測された。このことから、上記した生体内安定化は、Liraglutide とは別の機序で起こっていると推測された。第 3 章では、ペプチド **6** の生体内安定化に関する検証試験を実施した。

2-10. 実験の部

2-10-1 使用試薬及び対象物質

実験に使用した試薬及び溶媒は、市販品をそのまま使用した。

Native GLP-1 (7-36) はペプチド研究所 (Osaka, Japan) より購入した。[¹²⁵I]-GLP-1 (7-36), [Ser⁸]-GLP-1 (7-36)及び Liraglutide は Bachem Peninsula (CA, USA)から購入して各実験に使用した。

2-10-2 動物

雄性 SD ラット及び db/db マウス (Charles River Japan, Kanagawa, Japan) は 12 時間明暗サイクルの標準的な条件下で飼育し、最低 5 日間検疫と環境馴化をさせた。飲水及び市販のラット固形飼料 (Oriental Yeast, Japan) を給与し、自由摂取させた。実験は「株式会社三和化学研究所三重パーク動物実験指針」を遵守して適正に実施した。

2-10-3 GLP-1 受容体作動薬 (ペプチド) 合成

新規合成ペプチドは、株式会社ベックスにて委託合成した。委託先では、Fmoc 固相合成法を用いて C 末端から N 末端に向かってペプチド鎖を伸長した。

合成用の固相樹脂 (レジン) はポリスチレンにポリエチレングリコールが結合した Wang PEG レジンを使用した。また、C 末端のアミド化修飾が必要なため、レジンからの切り出しと同時にペプチドアミドを取得できる Fmoc-NH-SAL-PEG Resin 0.1mmol 分を固相担体として用いた。事前に乾燥レジンを DMF 中で 1 時間程度振とう攪拌しよく膨潤させてから合成を開始した。Fmoc アミノ酸は、Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH 及び Fmoc-Tyr(tBu)-OH を使用した。伸長反応のステップは、①Fmoc 基の脱保護、②洗浄、③縮合反応、④洗浄を繰り返した。いずれの操作もレシプロシェーカーを用い室温で緩やかに振とう攪拌しながら行った。反応工程の詳細を以下に示す。

	工程名	試薬	時間(分)	回数
①	脱保護	20%ピペリジン/DMF	5	2 または 3
②	洗浄	DMF	2	3
③	縮合反応	Fmoc アミノ酸 (mmol) : HATU(mmol) : DIEA(mmol) : DMF(mL) = 0.4 : 0.4 : 0.8 : 4	30	1
④	洗浄	DMF	2	3

上記操作を繰り返し、N 末端 His 残基まで伸長したら最後の脱保護を行い、N 末端をフリー状態とした。合成終了後、固相レジンは 0.1 mmol に対しスカベンジャーとしてチオアニソール(mL) : m-クレゾール(mL) : TIPS(mL) : TFA(mL) = 1.8 : 0.5 : 0.3 : 13 を加えて 1.5 時間攪拌し、脱レジンを脱保護を行った（切り出し操作）。切り出し後は、濾過により切り出し溶液を回収し、これを減圧濃縮して TFA を除去した。この濃縮液にエーテルを加え沈殿を濾別回収し、未精製ペプチドを得た。未精製ペプチドは 0.1%TFA を含む ACN-D.W.系による逆相 HPLC (C18)にて精製を行い、MALDI-TOF/MS を用いた質量分析にて目的物の確認を行ったのち、凍結乾燥により精製ペプチドの固体粉末を得た。

精製ペプチドの純度は HPLC により確認した。精密質量は LTQ-Orbitrap により再度確認し、純度 95%以上のペプチドを実験に用いた。

2-10-4 血漿安定性試験

8 週齢の雄性 SD ラットをイソフルラン吸入麻酔下で開腹して腹部大動脈より全採血し、1,500 rpm, 4℃、15 分間遠心分離によりラット血漿を得た。各合成ペプチド 100 μM PBS 溶液を血漿に添加して終濃度 5 μM とし、37 °Cでインキュベートして反応開始時点（0 時間）、8 時間及び 48 時間後に一部の血漿を採取した。採取した血漿に氷冷エタノールを添加し、12,000 rpm, 4 °C, 10分間遠心分離して上清中のペプチド濃度を LC/MSにて測定した。未変化ペプチドの安定性（残存率）は 0 時間のピークエリアを 100 %として各時点のピークエリアから残存率を算出した。ヒト血漿は(株)三和化学研究所の倫理規定の基で入手した健康成人の血液から血漿を採取し、ラットと同様の手法にて安定性を確認した。

2-10-5 NEP-24.11 安定性試験

ヒト組み換え Neutral endopeptidase 24.11（R&D システム）を反応 Buffer (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH7.4)に終濃度 0.04 μg/mL となるように溶解し、37℃で 5 分間プレインキュベーションした。GLP-1 及びペプチド 6 を酵素溶液に終濃度 2.5 μM となるように添加し、37℃で 4 時間及び 8 時間後に一部の酵素溶液を採取した。採取した酵素溶液に氷冷エ

タノール及び 1.6 %ギ酸を添加して酵素反応を停止した。採取したサンプルのペプチド濃度を LC/MS にて測定した。未変化ペプチドの安定性（残存率）は 0 時間のピークエリアを 100 %として各時点のピークエリアから残存率を算出した。

2-10-6 インスリン分泌試験

マウスインスリノーマ由来 MIN6 細胞は、大阪大学大学院医学研究科 宮崎純一教授より分与いただいた。MIN6 細胞を 15 % FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、25 mM グルコース及び 0.001% β -メルカプトメタノール (Thermo Fisher Scientific Inc.) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific Inc.) に懸濁し、96 well cell culture plate (BD Falcon) に播種して 37 °C で CO₂ インキュベータ (5% CO₂, 95%湿度) 内で 48 時間培養した。細胞が 80%コンフルエントになっている事を確認し、培地を除去後、播種した細胞を 2 mM グルコースを含む KRH buffer で 1 時間、37°C でインキュベートした。次いで、KRH buffer を除去し、各ペプチドが 10, 30, 100, 300, 1,000 及び 3,000 pM (終濃度) となるように調製した 15 mM グルコースを含む KRH buffer で 1 時間、37°C でインキュベートして各 well の上清を回収した。上清は測定まで -70°C 以下で保存した。上清中のインスリン濃度はインスリン ELISA キット (AKRIN-011T, Shibayagi Co., Ltd) により測定した。各ペプチドの EC₅₀ 値は GraphPAD Prism (GraphPad software) を用いて算出した。

2-10-7 肥満型 2 型糖尿病モデル動物(db/db マウス)における血糖降下スクリーニング

ペプチド **6**, **8** 及び **10** を生理食塩水に溶解し、9 週齢の雄性 db/db マウスに 12.5 nmol/kg または 50 nmol/kg の投与量で単回皮下投与した。各ペプチドを投与前及び投与後 1, 2, 4 及び 6 時間の時点でヘパリン処理済みの毛細管により尾静脈から血液を採取し、遠心分離 (12,000 rpm, 4°C, 15 分) により血漿を得た。血漿中のグルコース濃度はグルコーステスト・ワコー (和光純薬工業) を用いて測定した。

2-10-8 cAMP 産生能試験

ヒト GLP-1 受容体を用いた検討を実施するため、ヒト GLP-1 受容体の cDNA 遺伝子 (NM 002062) を pIRES ベクター (Clontech) に組み込み、遺伝子発現ベクターを作製した。CHO-K1 細胞を 10% FBS を含む Ham's F-12 培地により、37 °C で CO₂ インキュベータ (5% CO₂, 95 %湿度) 内で培養した。作製した発現ベクターをリポフェクタミン 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて CHO-K1 細胞に導入し、培地に 400 μ g/mL の geneticin (アミノグリコシド系抗生物質) を添加して、生存する細胞をセクションした。生存した細胞から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて GLP-1 受容体遺伝子が強発現している細

胞である事を確認した。GLP-1 受容体発現 CHO-K1 細胞は、1 ウェル当たり 8.0×10^3 細胞となるように 96 well cell culture plate (BD Falcon) に播種して 37 °C で CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 95 %湿度) 内で 48 時間培養した。播種した細胞を hanks-balanced salt solution (HBSS) で 2 回洗浄し、Assay buffer (0.5 % BSA, 1mM IBMX, 20 μM Ro201724 in HBSS) を各 well に添加して 37 °C で 15 分インキュベートした。ペプチド **6** 及び liraglutide を含む assay buffer (各ペプチドの終濃度 ; 1 pM~3 nM) を各 well に添加し、さらに 37 °C で 30 分インキュベートした。Assay buffer を吸引後、lysis buffer を添加して細胞を溶解し、細胞内 cAMP 量を ELISA キット (cAMP-Screen System, Applied Biosystems, CA, USA) により測定した。マウスインスリノーマ細胞 (BTC6) における cAMP 産生評価は、Cerep 社にて委託試験を実施した。試験方法は上記と同様の手法により、ペプチド **6** または Liraglutide 添加における細胞内 cAMP 産生を定量した。EC₅₀ は GraphPAD Prism (GraphPad softwear) を用いて算出した。

2-10-9 GLP-1 受容体結合試験

ヒト GLP-1 受容体膜画分は、ヒト GLP-1 受容体組み換え発現細胞から調製された膜 (hGLP-1R, ChemiSCREEN® Membrane Preparation Recombinant Human GLP-1, Millipore, MA, USA) を購入して使用した。GLP-1 と受容体膜の結合飽和を確認するため、アッセイ buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.2 % BSA) にヒト GLP-1 受容体膜画分と 0~1 nM の [¹²⁵I]-GLP-1 (7-36) を添加し、室温で 90 分インキュベートした。インキュベート後のサンプル溶液を 0.33% ポリエチレンイミン (PEI) で浸透させた GF/B ガラスファイバーフィルター (Whatman) に添加し、フィルターを吸引にて洗浄 buffer (50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 0.1 % BSA) で 3 回洗浄した。フィルターを乾燥後、Cobra Gamma Counter 5010 (Perkin-Elmer) で放射能濃度を測定して、結合飽和濃度を GraphPad Prism (GraphPad softwear, Inc.) で解析した。非特異的結合は [¹²⁵I]-GLP-1 (7-36) 1 μM を用いて上記操作法と同様の操作にて算出した。ペプチド **6** と Liraglutide の競合結合阻害評価は、ヒト GLP-1 受容体膜画分をアッセイ buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) に 0.1% BSA または 2% BSA を添加し、さらに各化合物を終濃度 1 pM~10 μM となるように添加して 25°C で 90 分間インキュベーションした。インキュベーション後、上記と同様の操作で放射能濃度を測定した。IC₅₀ 値は GraphPad Prism により算出した。

2-10-10 ラットにおけるペプチド **6** の薬物動態試験

ペプチド **6** を生理食塩水に溶解し、8 週齢の雄性 SD ラットに 10ug/kg の投与量で単回静脈内及び皮下投与した。静脈内投与では、投与後 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 及び 24

時間に、皮下投与では、投与後 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 及び 24 時間後にイソフルラン麻酔下で鎖骨下静脈よりヘパリン処理済みシリンジで 0.2~0.4 mL の血液を採取した。採取した血液を遠心分離 (3,000 rpm, 4°C、15 分) して血漿を得た。血漿は測定まで-70°C以下で保存した。血漿中ペプチド **6** 濃度は、LC/MS により測定した。PK パラメータは WinNonlin (Professional, Version 5.2.1; Pharsight Corporation)によりノンコンパートメント解析から算出した。

第3章 SKL-18287 の生体内安定化メカニズムの検証

3-1. 序論

第2章において血漿中安定性、MIN6 細胞におけるインスリン分泌能、GLP-1 受容体結合能、糖尿病マウスにおける持続的な血糖降下作用及びラットにおいて消失半減期が5時間以上且つ皮下からの吸収が良好なペプチド6を見出す事ができた。この新規 GLP-1 受容体アゴニストを「SKL-18287」と名称し、以降の詳細評価に用いた(Figure 3-1)。第3章では SKL-18287 の生体内安定化メカニズムに関する追加検証を実施した。SKL-18287 の結合能を確認するため、各動物種における血清タンパク結合率の測定、超遠心分析による溶液中の存在形態の確認及びサイズ排除 TLC クロマトグラフィー手法 (TLGC 法) を用いて溶液中及び生体内中の存在形態を確認した。

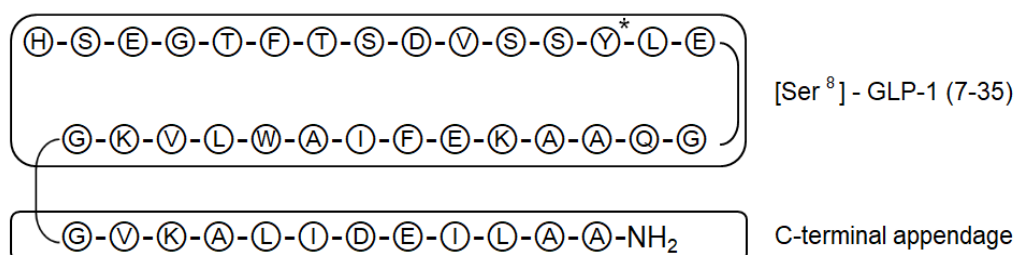


Figure 3-1 Primary structure of SKL-18287. *Position of [³H] label. The C-terminal appendage is derived from the C-terminal helix 3 of the albumin binding domain 3 of protein G from the bacterial Streptococcal G strain 148

3-2. 各動物種における血清タンパク結合率の測定

SKL-18287 の血清またはアルブミンに対するタンパク結合能を確認するため、ラット血清、マウス血清、ヒト血清及びヒト血清アルブミン (HSA) を用いてタンパク結合率を測定した。その結果を Table 3-1 に示した。なお、タンパク結合率は、[³H]-SKL-18287 を 10、100 及び 1,000 ng/mL の3濃度で算出した。各動物種の血清またはアルブミンにおける結合率は、マウス血清で 81.8~82.9 %、ラット血清で 73.8~82.2 %、ヒト血清で 69.7~80.4 %及び HSA で 55.3~62.4 %であった。SKL-18287 のタンパク結合率は、Liraglutide で報告されているタンパク結合率 99 %以上[50]よりも低く、ヒト血清アルブミンに対しても 50 %程度である事が確認された。

Table 3-1. Serum protein binding of [³H]-SKL-18287.

Species	Concentration of ³ H-SKL-18287 (ng/mL)		
	10	100	1000
Mouse	82.0 ± 3.4	82.9 ± 1.6	81.8 ± 1.4
Rat	73.8 ± 6.0	81.9 ± 0.4	82.2 ± 0.5
Human	69.7 ± 13.0	75.4 ± 5.0	80.4 ± 1.6
HSA	55.3 ± 4.1	62.4 ± 4.2	57.6 ± 5.5

Data are expressed as the mean ± standard deviation (SD) in triplicate.

3-3. 超遠心分析法による溶液中の存在形態確認

SKL-18287 が生体内安定性を獲得している要因として、分子自体が多量体を形成して高分子化していると推測した。Poon らの報告では、GLP-1 は小腸 L 細胞の分泌顆粒内で重合体を形成していることが示唆されている[18]。また、Liraglutide は投与部位（皮下）で多量体を形成し、循環血中の吸収が緩やかになっていると推測されている[49]。これら報告を参照し、SKL-18287 が溶液中で多量体を形成しているか確認するため、超遠心分析法による解析から、溶液中のみかけの分子量を推定した[51]。SKL-18287 100 μM の PBS 溶液を超遠心分析法にて測定、解析する事で、沈降係数及び PBS 中のみかけの分子量を算出した (Figure 3-2)。沈降速度法による解析では、SKL-18287 の PBS 溶液中に 3 つのピーク、1.34 S、2.46 S 及び 3.34 S が確認された。沈降係数から算出した分子量は約 10,000、25,000 及び 39,000 であり、その存在率はそれぞれ 6.3 %、45.7 %及び 48.0 %であった。これらの結果から、SKL-18287 は PBS 中で 3 量体、6 量体及び 10 量体で存在している事が強く示唆された。

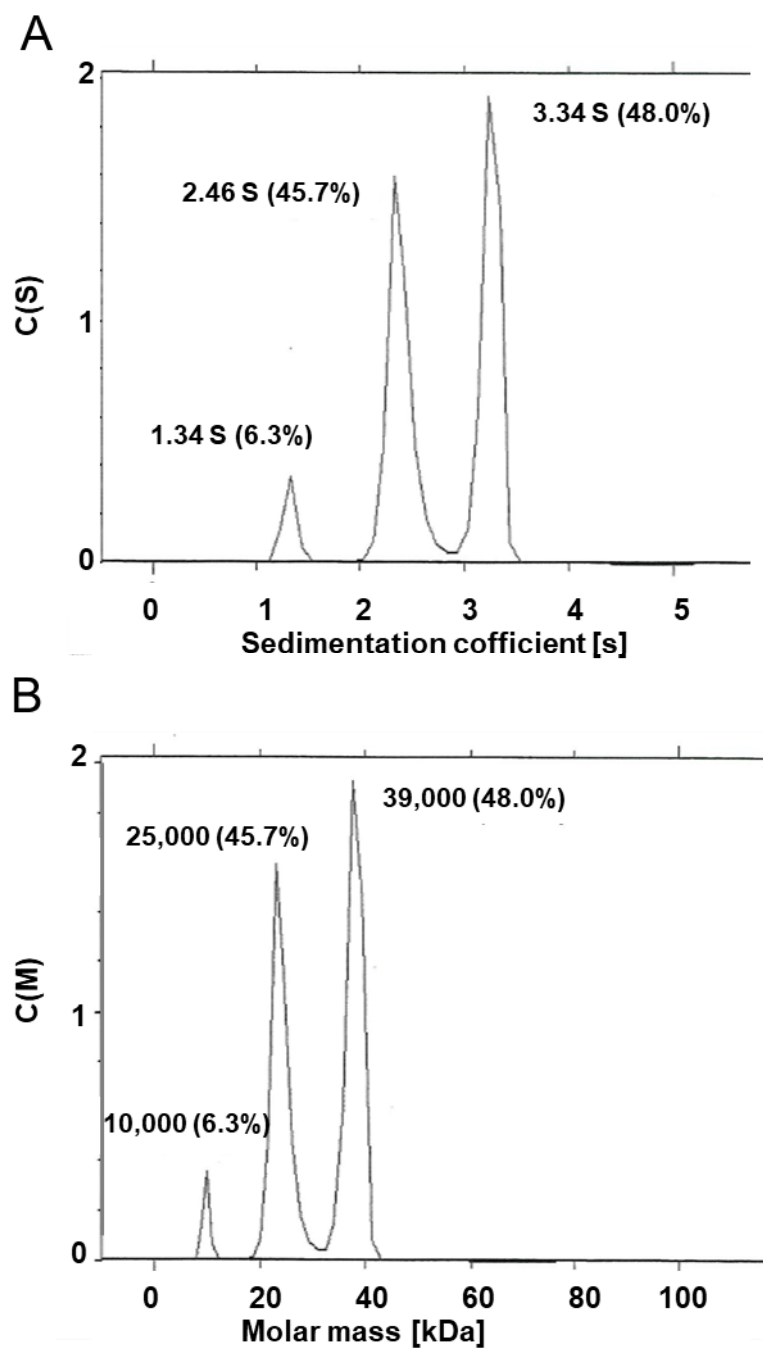


Figure 3-2. Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation of the stock solution of SKL-18287. Analytical ultracentrifugation was performed using Beckman Optima XL-A. Sedimentation coefficient (A) and molecular weight (B) for the stock solution of SKL-18287 were determined by SEDFIT software.

3-4. TLGC 法による生体中の存在形態確認

超遠心分析法により、SKL-18287 は PBS 溶液中で多量体を形成している事が強く示唆された。そこで、生体内中での存在形態を確認するため、ヨウ素 125 で標識された SKL-18287 をラットに単回皮下投与し、血漿中放射能の分子サイズを TLGC 法により確認した。TLGC 法はサイズ排除クロマトグラフィーであるゲルろ過樹脂をガラス板に薄層に均一に塗布し、緩やかな速度で移動相を流して測定試料を展開する事により、測定対象の分子間相互作用を保持したまま、分子量サイズが確認できる手法である[52]。

$[^{125}\text{I}]$ -SKL-18287 を 4 nmol eq./kg で雄性 SD ラットに皮下投与し、投与後 4 時間の血液を採取して血漿を得た。比較対象として、SKL-18287 PBS 溶液、 $[^{125}\text{I}]$ -SKL-18287 PBS 溶液、ラットブランク血漿及びラットブランク血漿に $[^{125}\text{I}]$ -SKL-18287 を添加したサンプルと、 $[^{125}\text{I}]$ -SKL-18287 をラットに単回皮下投与後の血漿を薄層ゲルに同時にアプライし、分子量マーカーを指標に移動相を一定の距離まで展開した。展開後、金コロイドによるタンパク染色とバイオイメージアナライザーによる放射能強度イメージを取得した (Figure 3-3)。その結果、SKL-18287 の PBS 中でのみかけの分子量は 44 KDa 以上である事が確認された。また、 $[^{125}\text{I}]$ -SKL-18287 をラットに投与後の血漿サンプルのバイオイメージアナライザー解析結果から、SKL-18287 は *in vivo* においても多量体が維持される事が確認された。さらに、ラット血漿に $[^{125}\text{I}]$ -SKL-18287 を添加したサンプルでも、ラット投与サンプルと同じバンド位置にタンパク及び放射能のバンドが確認された。これらの結果から、SKL-18287 は皮下投与後に体循環に移行しても、多量体を形成している事が強く示唆された。

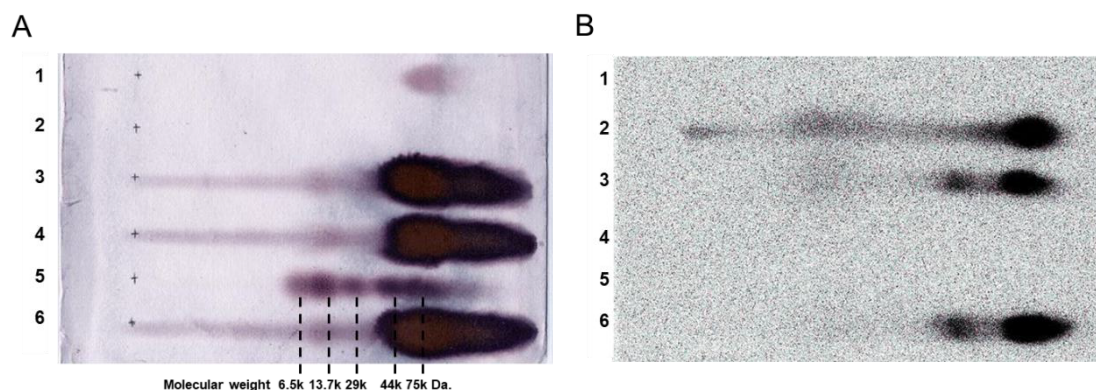


Figure 3-3 Size-exclusion thin layer gel chromatography of the plasma sample obtained from [125 I]-SKL-18287-treated rat. The plate was developed with 0.01% HBSS. The spots were detected by staining with colloidal gold (A), followed by Bioimage Analyzer for 120 h (radioactivity) (B). Lane 1, SKL-18287; lane 2, [125 I]-SKL-18287; lane 3, rat plasma (4 h after subcutaneous administration of [125 I]-SKL-18287 at the dose of 4 nmol/kg); lane 4, rat blank plasma; lane 5, molecular marker proteins (Aprotinin, Ribonuclease A, Carbonic anhydrase, Ovalbumin, Conalbumin); lane 6, rat blank plasma plus [125 I]-SKL-18287.

3-5. 考察

第2章において、GLP-1の生体内安定性を確保するために、GLP-1とG148-ABD3配列の部分配列とのキメラペプチドをデザインし、GLP-1受容体アゴニスト作用と生体内安定性を併せ持つSKL-18287を見出す事ができた。第3章では、SKL-18287の生体内安定化に関する検証として、タンパク結合率測定、超遠心分析法及びTLGC法により、SKL-18287の存在形態の解析を実施した。

SKL-18287のタンパク結合率はマウス、ラット及びヒトで80%程度であり、また、ヒト血清アルブミンに対するタンパク結合率も50～60%程度である事から、血清タンパクへの結合は高くない事が確認された。また、超遠心分析法による溶液中の存在形態及びTLGC法による生体中の存在形態の検証から、SKL-18287は自己会合により多量体を形成し、生体内で高分子化している事が強く示唆された。すなわち、第2章で認められたSKL-18287の糖尿病マウスにおける薬効の持続及びラットでの消失半減期の延長は、多量体形成に起因していると考えられた。

GLP-1はプログルカゴンからプロセッシングを受けて分泌顆粒内に貯蔵されるが、分泌顆粒内ではアミロイド様の重合体として安定化されて貯蔵されている[17]。さらに、化学合成されたGLP-1でもアミロイド様の重合体が認められており、重合体の形成には、ヘパリンの関与[53]やpH依存性[54]が示唆されている。Zapadkaらは、GLP-1の多量体は弱い塩基性（pH7.5-8.5）条件下で減少しており、会合していない状態が主要となる事を報告している[54]。今回の検証からSKL-18287の多量体形成の主要因を特定できていないが、SKL-18287の配列内にあるG148-ABD3の部分配列中には、電荷を持つアミノ酸であるリジン（K）、アスパラギン酸（D）及びグルタミン酸（E）が存在する事から、それらアミノ酸の荷電状態も多量体形成に影響を与えていると推測された。

50アミノ酸残基までのペプチド医薬品は世界的にも様々な疾患に適応されており、治療対象として重要な位置を占めている。米国では60以上のペプチド医薬品が承認され、そのうちの25製剤は2011年時点での売上が147億ドルまで達している。また、近年では、ペプチド製剤で140前後の臨床研究と500前後の前臨床研究が進められている。その技術の中でも、特に複数の機能を持つペプチド医薬品を指向したマルチファンクション化と細胞膜透過性を持つペプチドの研究が主要となっている。ペプチド医薬品はその有効性から臨床で広く使用されているが、経口吸収性に乏しく、慢性疾患では投与ルートが課題となっている。一方、ペプチドの安定化については、ペプチドのPEG化やアルブミンとの結合が、ペプチドの生体内安定性を向上する（半減期延長）手法として認知されつつある。PEG化製剤のリスクとして、抗PEG抗体の産生と補体の活性化が挙げられる。すなわち、抗PEG抗体が産生される事で薬効が消失し、持続的な効果が得られなくなる。また、補体の活性

化により重篤なアナフィラキシーが発生する可能性も考えられる。事例として、PEG 化製剤である腎性貧血治療薬 Peginesatide の EMERALD study において、0.02 %の患者にアナフィラキシーが確認されており、2013 年に承認申請の取り下げに至っている[55]。これら状況を踏まえ、現在、EMA（欧州医薬品庁）では、PEG 化製剤の臨床試験前に、基礎毒性試験を4週間以上追加する事を推奨している。このように、長時間の作用持続を目指してペプチドに付加物を付けることは、元のペプチドの効果を減弱させ、重篤な副作用を引き起こすリスクを併せもつ。また、低分子、例えば脂肪酸側鎖をペプチドへ導入して高分子化（アルブミン等への結合）を目指す場合、導入する側鎖の種類、長さ、位置及び組成により、各種タンパクへの結合特性が影響を受ける。さらに、母体となるペプチドとスペーサーとなる脂肪酸の関係性も影響するため[56]、それら要因を考慮して最適な側鎖を導入する必要がある。我々が見出した SKL-18287 は、[Ser⁸]-GLP-1(7-35)の C 末端に G148-ABD の部分配列である 12 アミノ酸を付加したのみで、GLP-1 と比較して著しい生体内安定性の改善及び糖尿病マウスにおいて持続的な血糖降下作用を実現する事ができた。第4章において、SKL-18287 の薬理学的特徴、安全性及びヒトへの適応性に関する検証を進め、上記課題を克服できるペプチド医薬品となるかを考察した。

3-6. 小括

第3章において、各動物種における血清タンパク結合率測定、超遠心分析法及び TLGC 法による存在形態の確認から、SKL-18287 の生体内安定化は、タンパク結合よりも自己会合による多量体形成に起因している事が強く示唆された。ペプチドの生体内半減期を延長する策として、前述した Liraglutide やインスリン製剤デグルデク[57]のようにスペーサーと脂肪酸を付加し、アルブミンへの結合を指向した例やポリエチレングリコール（PEG）化して高分子化する手法がある。SKL-18287 はそれら手法と異なり、G148-ABD の部分配列の付加により GLP-1 の薬効を保持して生体内安定性を著しく改善する事が実現できた。第4章では、各種糖尿病モデル動物を用いて既存の GLP-1 受容体作動薬との薬理作用を比較し、さらに安全性に関する検証と各動物種における薬物動態学的評価を実施して、SKL-18287 の特徴を把握すると共に、ヒトにおける薬物動態パラメータを予測した。

3-7. 実験の部

3-7-1 使用試薬及び対象物質

実験に使用した試薬及び溶媒は、市販品をそのまま使用した。

トリチウム標識 SKL-18287 は第2章の固相合成と同様の手法により、トリチウム標識されたチロシンを導入した。比放射能は 414 MBq/g であり、試験前に放射化学的純度を確認

し、純度が 95 %以下の場合は HPLC にて再度精製して純度が 95%以上となる標品を試験に使用した。

[¹²⁵I]-SKL-18287 は SKL-18287 (200 µg/mL) リン酸 Buffer (PB) 溶液 5 µL に Na¹²⁵I (37 MBq/10 µL, Perkinelmer) 4 µL を添加し、クロラミン-T (30 µg/mL) 2 µL を添加して 1 分間ボルテックスミキサーで混和した。クロラミン T を添加して混和する操作を 6 回繰り返して、200 mmol/L PB(pH 7.4) 200 µL で希釈してゲルろ過カラム (PD-10、GE ヘルスケア) に全量をアプライし、0.1 %Tween80 を含む 50 mmol/L PB(pH7.4)で約 1 mL/5min で溶出してフラクション (30 本) を分取し、γ—カウンターによる放射能濃度の測定から、[¹²⁵I]-SKL-18287 が溶出されているフラクションを分取した。純度は HPLC により 95 %以上であることを確認した。

3-7-2 動物

雄性 SD ラット及び ICR マウス (Charles River Japan, Kanagawa, Japan) は 12 時間明暗サイクルの標準的な条件下で飼育し、最低 5 日間検疫と環境馴化をさせた。飲水及び市販の固形飼料 (Oriental Yeast, Japan) を給与し、自由摂取させた。実験は「株式会社三和化学研究所三重パーク動物実験指針」を遵守して適正に実施した。

3-7-3 血清タンパク結合率

SKL-18287 の血清タンパク結合率は、超遠心法により測定した[58]。7 週齢の雄性 SD ラット及び 6 週齢の ICR マウスをイソフルラン麻酔下で開腹し、EDTA-2K を添加したシリンジにて全採血した。採決後、血液を 30 分間室温で静置し、遠心分離により血清を得た。ヒト血清は(株)三和化学研究所の倫理規定の基で入手した健常成人の血液から血清を採取した。ヒト血清アルブミン (シグマ) は PBS に溶解して 40mg/mL の溶液を調製した。各血清、ヒト血清アルブミン溶液及び PBS 990 µL をポリプロピレンチューブに添加し、10 µL の [³H]-SKL-18287 溶液を添加して最終濃度 10, 100 及び 1,000 ng/mL とした。各サンプルを 37°C で 1 時間インキュベートし、そのうち 200 µL を遠心チューブに添加して 200,000×g, 4°C、6 時間で超遠心した。各血清溶液及び PBS 溶液を超遠心後の上清 50 µL をバイアルに採取し、シンチレーター (Hionic-Fluor, Perkin Elmer) 10 mL を添加して液体シンチレーションカウンター (3100TR, PerkinElmer) で放射能濃度を測定した。タンパク結合率は以下の式に従い算出した。

タンパク結合率(%) = (1-S/P)

P: PBS 溶液の超遠心後の上清中の放射能濃度 (dpm/mL)

S: 各血清または血清溶液の上清中の放射能濃度 (dpm/mL)

3-7-4 超遠心分析法による溶液中の存在形態確認

SKL-18287 を 10 mM の PBS に溶解して 100 μ M の溶液を調製した。400 μ L の SKL-18287 サンプル溶液を超遠心分析用のセルに添加し、XL-A 超遠心分析機(ベックマン)にて 50,000 rpm, 20°C で 200 スキャン実施した。スキャン後の吸光度データは SEDFIT 法[59]により解析し、沈降係数の分布関数及び分子量の分布関数を算出した。

3-7-5 TLGC 法による生体中の存在形態の確認

[¹²⁵I]-SKL-18287 を 4nmol/kg の投与量で雄性 SD ラットに単回皮下投与した。投与後、イソフルラン麻酔下で採血し、血液を遠心分離して血漿を得た。別途、[¹²⁵I]-SKL-18287 (350 dpm/5 μ L) と SD ラットのブランク血漿を混和し、37°C でインキュベートした。上記 2 サンプルの TLGC へのアプライを同時に進めた。

ゲルろ過樹脂 SephadexG100 (GE ヘルスケア) を移動相 (0.01 %tween HBSS) に浸潤させ、スプレッターを用いてガラス板 (30 x 30 cm) に 0.9 mm の厚さで均一に塗布した。塗布したゲルは、緩やかな傾斜がつくように、上端側と下端側で高さが異なる容器の上に設置し、上端側には移動相を満たしてゲルに移動相が流れるようにろ紙をゲルの端に設置した。サンプルをアプライする前に、8 時間以上の移動相を流し、平衡化した。また、サンプルアプライ後はゲルが乾燥しないように移動相で満たした容器内で展開した。サンプルの移動度はブロモフェノールブルーを含む分子量マーカーのスポットを指標とし、展開時間を設定した。展開後、タンパク染色は金コロイドを使用した。また、各スポットの放射の強度はバイオイメージアナライザー (BAS2000、富士フィルム) により検出した。

第4章 SKL-18287の薬理学的特徴

4-1. 序論

第3章においてSKL-18287が生体内安定性を獲得している要因として、自己会合により多量体を形成して、酵素分解と腎臓からの消失を回避している事が強く示唆された。また、ラットを用いた検討では、SKL-18287は皮下投与後に血中で多量体として存在する事が示唆された。第4章ではSKL-18287のさらなる特性解析として、薬理学的検証を進めた。すなわち、各種糖尿病モデル動物における薬理評価を実施し、Exendin-4やLiraglutide等の既存GLP-1受容体作動薬との比較実験により、薬効の持続性やその他の特徴を確認した。また、安全性の検証として、アナフィラキシー試験であるASA及びPCA試験を実施した。さらに、薬物動態学的検証として、SKL-18287のラットにおける組織分布と各種動物における血漿中濃度推移を測定し、組織分布の特徴ならびに動物種間での多量体形成の保持とヒトにおける薬物動態について考察した。

4-2. 各GLP-1受容体作動薬の血漿安定性及びインスリン分泌能

SKL-18287とExendin-4及びLiraglutideの血漿安定性及びインスリン分泌能を比較した。ラット血漿を用いて各GLP-1受容体作動薬の8時間及び48時間における未変化化合物の安定性を確認した。併せて、MIN6細胞を用いてインスリン分泌の最大効果及びEC₅₀値を算出した(Table.4-1)。ラット血漿中安定性の比較では、Exendin-4が48時間のインキュベーションで未変化化合物が0%に対し、Liraglutideが61%、SKL-18287が93%であり、SKL-18287はExendin-4やLiraglutideよりも血漿中の安定性が高い事が確認された。インスリン分泌試験では、いずれのGLP-1受容体作動薬もGLP-1と同等の最大効果を示しており、フルアゴニストである事が確認された。EC₅₀値はExendin-4が最も低く0.04 nMであった。次いでLiraglutideが0.56 nM及びSKL-18287が1.7 nMであり、LiraglutideとSKL-18287の差は3倍であり、大きな差がないことが確認された。

Table 4-1 Stability and insulinotropic potency of SKL-18287, exendin-4, and liraglutide

Analog	Stability in rat plasma (%)		Insulinotropic action	
	8 h	48 h	% of maximum	EC ₅₀ (nM)
GLP-1 (7–36)-NH ₂	0	—	100	0.12
SKL-18287	104	93	118	1.7
Exendin-4	20	0	119	0.04
Liraglutide	83	61	96.7	0.56

— Not measured

Data are expressed as the mean value (n = 3).

4-3. 正常マウスにおける薬理評価

各 GLP-1 受容体作動薬の血糖降下作用を比較するため、正常マウス (C57BL/6) を用いて腹腔内グルコース負荷試験 (IPGTT) を実施した。この試験では、耐糖能の持続性を確認するため、各 GLP-1 受容体作動薬を単回皮下投与後 1 時間及び 4 時間にグルコースを腹腔内投与し、経時間的な血糖値を測定した。各 GLP-1 受容体作動薬の血中グルコース濃度推移及び投与量と血糖降下作用の関係を Figure 4-1 に示した。SKL-18287 をマウスに 0.3, 1 及び 3 nmol/kg 単回皮下投与後 1 時間の IPGTT では、1 及び 3 nmol/kg 投与群において血糖の有意な上昇が抑制され、その傾向は 2 回目の IPGTT でも維持された。投与量と血糖降下作用の関係を確認した結果、SKL-18287 の血糖降下作用は、1 回目と 2 回目で大きな差が認められなかった。Exendin-4 をマウスに 0.06, 0.2 及び 0.6 nmol/kg 単回皮下投与後 1 時間及び 4 時間の IPGTT では、投与後 1 時間においていずれの投与量群でも有意な血糖降下作用が確認された。一方、2 回目の IPGTT (投与後 4 時間) では、0.6 nmol/kg 投与群で有意な血糖降下作用が確認されたが、0.06 及び 0.2 nmol/kg 投与群では有意な血糖降下作用が確認されなかった。Liraglutide を 1, 3 及び 10 nmol/kg でマウスに単回皮下投与後 1 時間の IPGTT では 10 nmol/kg 投与群において、グルコース投与直後に有意な血糖降下作用が確認されたが、他の投与量群では有意な血糖降下作用は確認されなかった。2 回目の IPGTT では、いずれの投与量でも有意な血糖降下作用が確認されており、Liraglutide の血糖降下作用は投与初期 (1 時間) よりも投与 4 時間以降の方が強い事が確認された。

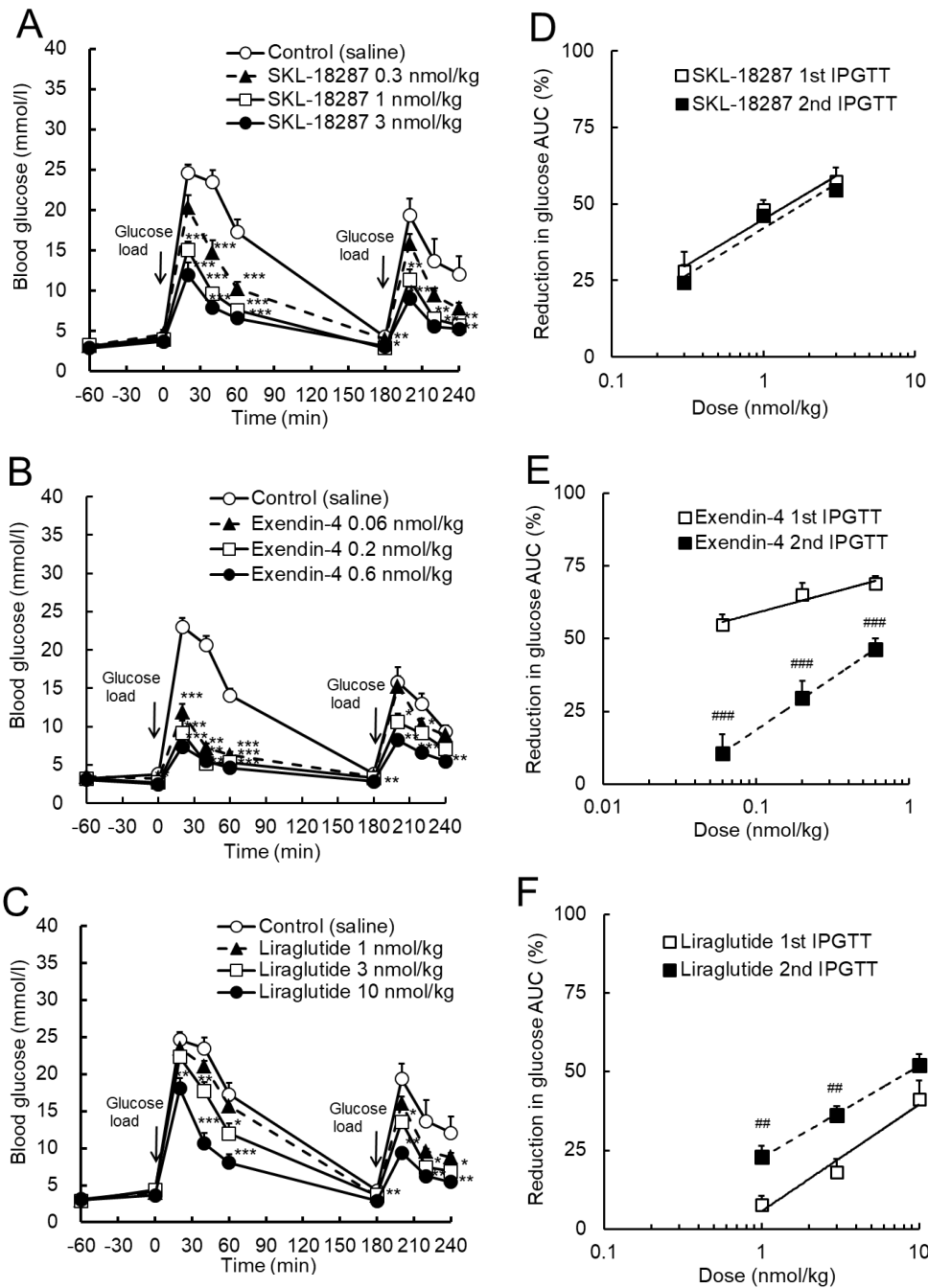


Figure 4-1 IPGTT of SKL-18287, exendin-4 and liraglutide in male C57BL/6 mice. Mice were given the drug or vehicle 1 h prior to the glucose challenge. A,B,C) Time course of plasma glucose in the GLP-1 RA treated mice. D,E,F) Comparison of % reduction of glucose AUC between 1st and 2nd glucose challenges in the GLP-1 RA. Data are expressed as the mean + SE. of eight animals. *p < 0.01, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. vehicle control (Dunnett's test). ###p < 0.01, ####p < 0.001 vs. 1st IPGTT control (Student's t-test)

4-4. 肥満型 2 型糖尿病マウスにおける薬理評価

肥満型 2 型糖尿病モデル動物である db/db マウスを用いて、SKL-18287 と Exendin-4 の血糖降下作用を比較した。併せて SKL-18287 の用量反応性を確認した。9 週齢の雄性 db/db マウスに vehicle コントロール、SKL-18287 2, 10, 50 nmol/kg 及び Exendin-4 10 nmol/kg を単回皮下投与して経時的に血漿グルコース濃度を測定した。Figure 4-2 に血漿グルコース濃度推移及び投与後 12 時間までの血漿グルコースの AUC を示した。SKL-18287 は投与量依存的な随時血糖降下作用を示し、高用量（50 nmol/kg）群における最大血糖降下作用は Exendin-4 投与群（10 nmol/kg）と同等であった。Exendin-4 は投与後 4 時間まで有意な血糖降下作用を示していたが、6 時間以降、徐々に血糖降下作用が消失した。一方、SKL-18287 10 nmol/kg 及び 50 nmol/kg 投与群はそれぞれ投与後 10 時間及び 12 時間まで有意な血糖降下作用を示した。投与後 12 時間までの血漿グルコースの AUC は SKL-18287 の投与量上昇に伴い減少しており、同一用量（10 nmol/kg）における SKL-18287 と Exendin-4 の AUC は同程度であった。この結果から、SKL-18287 は肥満型 2 型糖尿病モデルマウスにおいて用量依存的な血糖降下作用を示し、その作用は Exendin-4 よりも持続する事が確認された。

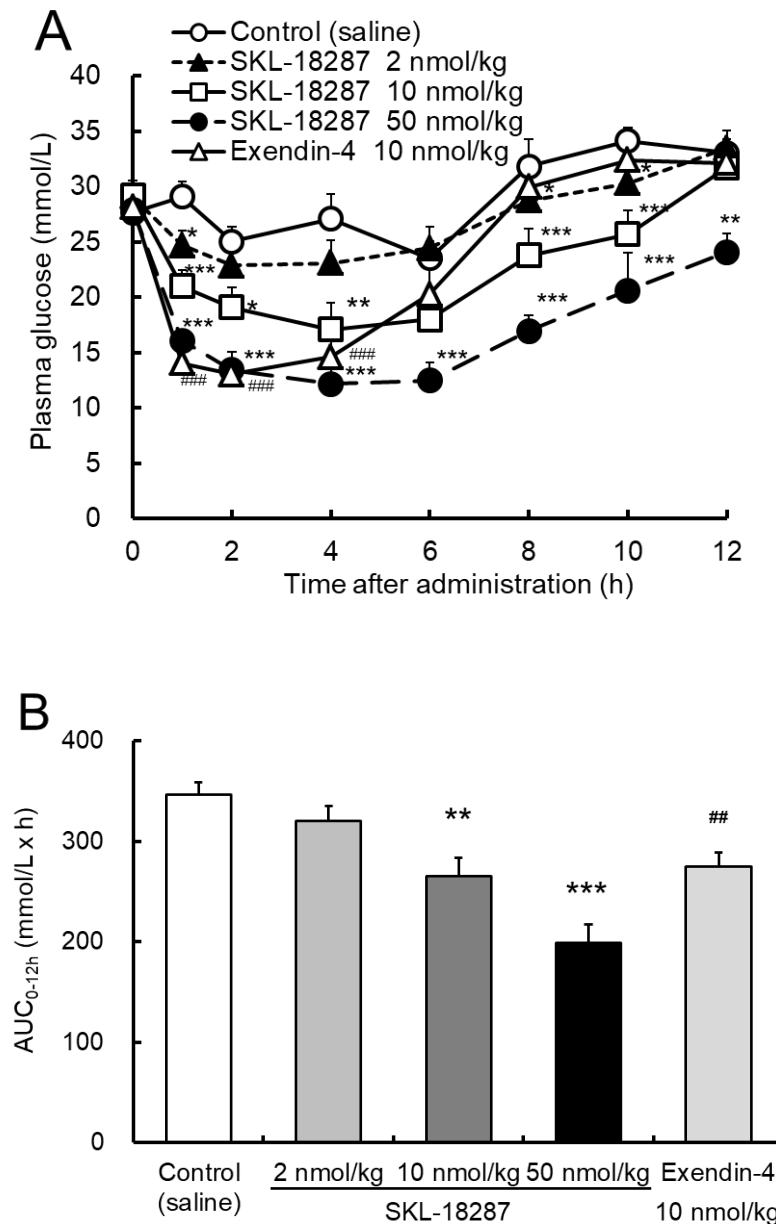


Figure 4-2 Glucose-lowering effects of SKL-18287 and exendin-4 in diabetic db/db mice. A Time course of plasma glucose. B AUC of plasma glucose. The mice (n = 8 per group), 9 week of age, were subcutaneously treated with drugs at the indicated doses. Blood samples were collected from the tail vein at 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h postdose, to determine plasma glucose (a) and AUC (b). Data are expressed as the mean + SE. of eight animals. *p < 0.01, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. vehicle control (Dunnett's test). ##p < 0.01, ###p < 0.001 vs. vehicle control (Student's t-test)

4-5. 非肥満型 2 型糖尿病ラットにおける薬理評価

SKL-18287 のさらなる特徴を検証するため、非肥満型 2 型糖尿病モデル動物である Goto-Kakizaki(GK) ラット[60]を用いて、SKL-18287 と Liraglutide の血糖降下作用を比較した。併せて SKL-18287 の用量反応性を確認した。7 週齢の雄性 GK ラットに vehicle コントロール、SKL-18287 6, 8, 12 nmol/kg 及び Liraglutide 8 nmol/kg を 1 日 2 回 28 日間反復皮下投与し、持続的な血糖降下作用の指標として、投与前、投与後 14 日及び 28 日のグリコヘモグロビンを測定した。また、その他の評価項目として、経日的に摂餌量及び体重を測定した。各試験群におけるグリコヘモグロビンの推移及び投与前と投与後 28 日における上昇を Figure 4-3A 及び 4-3B に示した。SKL-18287 は用量依存的に、グリコヘモグロビンの上昇を有意に抑制する事が確認された。一方、Liraglutide は、グリコヘモグロビンの上昇を有意に抑制しなかった。試験期間内での摂餌量推移及び累積摂餌量を Figure 4-3C 及び 4-3D に示した。投与初期は SKL-18287 投与群 (6~12 nmol/kg) 及び Liraglutide 投与群 (8 nmol/kg) において、コントロール群と比較して摂餌量の著しい減少が確認されたが、投与回数の増加と共に、各投与群の摂餌量はコントロール群に近似する事が確認された。試験期間内での体重推移及び体重増加を Figure 4-3E 及び 4-3F に示した。SKL-18287 の反復投与により、体重の用量依存的な減少が確認された。また、Liraglutide 投与群と比較して、同一用量 (8nmol/kg) における SKL-18287 投与群の体重減少レベルは低く、Liraglutide よりも体重抑制作用が強い事が確認された。

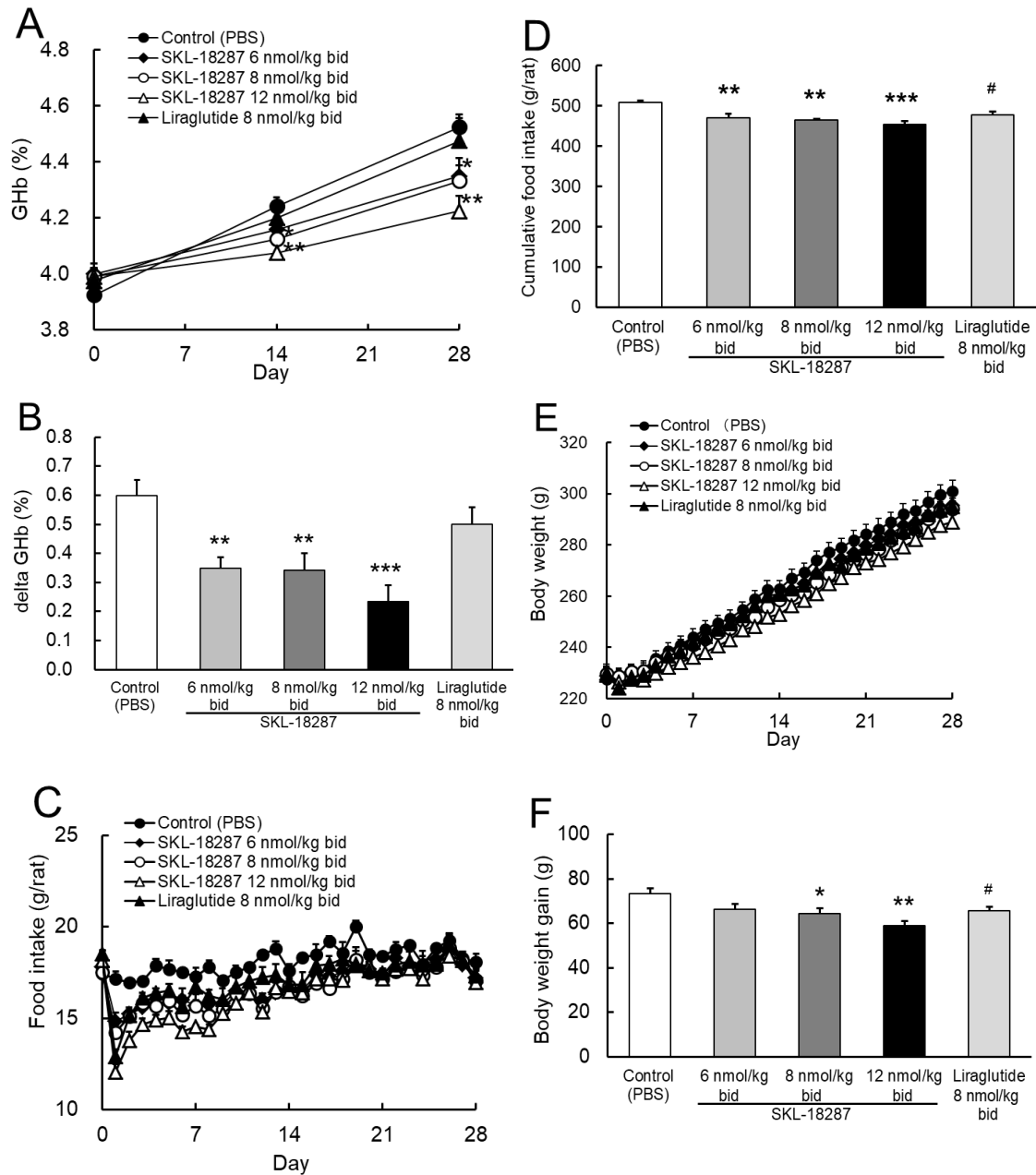


Figure 4-3. Effects of SKL-18287 and liraglutide on GHb in GK rats. (A) Time course of GHb. (B) Change in GHb. SKL-18287 or liraglutide was subcutaneously administered to the GK rats twice daily for 28 days. Blood samples were collected on Days 14 and 28 to determine GHb (A) and delta GHb (B). (C) Time course of food intake. (D) Cumulative food intake. (E) Time course of body weight. (F) Body weight gain. Food intake (C and D) and body weight (E and F) were monitored during the study. Data are expressed as the mean + SE. of eight animals. * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle control (Dunnett's test). # $p < 0.05$ vs. vehicle control (Student's t-test)

4-6. 正常ラットにおける胃排泄運動抑制評価

GK ラットにて確認された SKL-18287 と Liraglutide の摂餌量の差が、GLP-1 の作用である胃排泄運動抑制に起因するかを確認するため、アセトアミノフェンを指標とした胃排泄運動抑制評価を実施した。アセトアミノフェンは胃では吸収されず、小腸で速やかに吸収される特性を持つため、その血漿中濃度を評価する事で、胃排泄運動の指標となる事が確認されている[61]。正常ラットに SKL-18287 及び Liraglutide を 8 nmol/kg の投与量で 1 日 2 回、14 日間反復皮下投与し、投与 1 日目及び投与 14 日目にアセトアミノフェン 100mg/kg を経口投与した。各投与後 30 分及び 45 分に採血し、アセトアミノフェンの血漿中濃度を測定した。アセトアミノフェンの血漿中濃度及び AUC を Table 4-2 及び Figure 4-4 に示した。

投与 1 日目のアセトアミノフェンの血漿中 AUC は Liraglutide 投与群で有意な低下が確認されたが、SKL-18287 群では有意な低下は確認されなかった。一方、投与 14 日目におけるアセトアミノフェンの AUC は SKL-18287 と Liraglutide 投与群で差がなく、Liraglutide は投与初期で有意な胃排泄運動抑制作用を示すが、投与を継続するとその影響は少なくなる事が確認された。SKL-18287 は投与初期と投与 14 日目でアセトアミノフェンの AUC に有意な差がなく、Liraglutide よりも胃排泄運動抑制に対する影響が少ないと考えられた。

Table 4-2 Plasma concentration of acetaminophen

Analog	Acetaminophen concentration ($\mu\text{mol/L}$)			
	Day 1		Day 14	
	30 min.	45 min.	30 min.	45 min.
Control (PBS)	421 \pm 16	447 \pm 16	425 \pm 30	429 \pm 21
SKL-18287 8 nmol/kg	364 \pm 38	373 \pm 46	443 \pm 28	410 \pm 28
Liraglutide 8 nmol/kg	315 \pm 39 [#]	365 \pm 24 [#]	404 \pm 27	401 \pm 27

Male SD rats were subcutaneously treated with SKL-18287, liraglutide and phosphate buffered saline as vehicle control twice daily for 14 days. At Days 1 and 14, the rats were fasted 5 hours after first drug administration, and then acetaminophen aqueous solution at a dose of 100 mg/10 mL/kg were orally given. Data are expressed as the mean \pm SE. of eight animals. #; $p < 0.05$ vs control (Student's t-test).

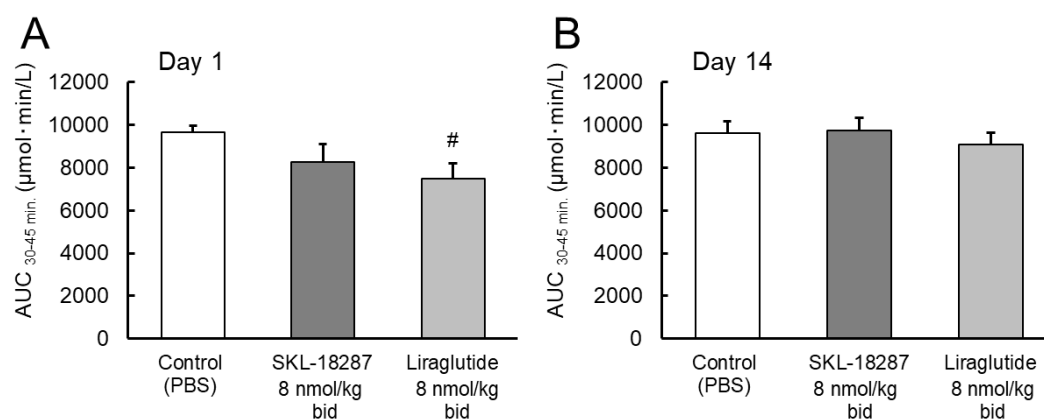


Figure 4-4 Effects of SKL-18287 and liraglutide on GE. (A) AUC of plasma acetaminophen on Day1. (B) AUC of plasma acetaminophen on Day 14. Male SD rats ($n = 8$ per group), 16 week of age, were subcutaneously treated with SKL-18287 and liraglutide a dose of 8 nmol/kg, or phosphate buffered saline as vehicle control twice daily for 14 days. On Days 1 and 14, the rats were fasted 5 h after first drug administration, and then acetaminophen aqueous solution at a dose of 100 mg/10 mL/kg were orally given. AUC of acetaminophen concentration was calculated trapezoidal rule. Data are expressed as the mean \pm SE. of eight animals. # $p < 0.05$ vs. vehicle control (Student's t-test)

4-7. モルモットにおけるアナフィラキシー試験

SKL-18287 の安全性を確認するため、Nagami らの手法[62]により、能動的全身アナフィラキシー（ASA）及び受身的皮膚アナフィラキシー（PCA）試験を実施した。雄性モルモットに対し、ovalbumin（OVA）を陽性対象として、SKL-18287、Exendin-4 及び Liraglutide を皮下投与して、ASA では症状を指標に、PCA ではエバンスブルー投与による漏出色素斑を指標としてアナフィラキシーを評価した。その結果を Table 4-3 及び 4-4 に示す。ASA 試験では、陽性対象である OVA 群において、グレード++の症状を示し、試験が成立する事が確認された。SKL-18287、Exendin-4 及び Liraglutide 投与群では、いずれの個体もグレード+以上に対応する症状を示さなかった。また、PCA 試験では、陽性対象である OVA 群において、625 倍希釈した血清を用いた漏出色素斑の平均値が 5 mm 以上を示し、試験が成立する事が確認された。ASA 試験と同様に、SKL-18287、Exendin-4 及び Liraglutide 投与群において、PCA 反応は確認されなかった。

Table 4-3. Summary for the ASA test

Group	Sensitization				Challenge			ASA reaction					
	Article	Dose	Route ^{a)}	Frequency	Article (concentration)	Dose	Route ^{a)}	Animals (N)	Grade ^{b)}				
									-	+	++	+++	++++
I	Saline + FCA (-)	-	s.c.	1 times/2 weeks ×3 times	Saline	-	i.v.	5	5				
II	SKL-18287 + FCA (100 µg/mL)	100 µg/kg	s.c.	1 times/2 weeks ×3 times	SKL-18287 (100 µg/mL)	100 µg/kg	i.v.	5	5				
III	Liraglutide + FCA (100 µg/mL)	100 µg/kg	s.c.	1 times/2 weeks ×3 times	Liraglutide (100 µg/mL)	100 µg/kg	i.v.	5	5				
IV	Exendin-4 + FCA (2 µg/mL)	2 µg/kg	s.c.	1 times/2 weeks ×3 times	Exendin-4 (2 µg/mL)	2 µg/kg	i.v.	5	5				
V	OVA + FCA (1 mg/mL)	1 mg/kg	s.c.	1 times/2 weeks ×3 times	OVA (1 mg/mL)	1 mg/kg	i.v.	5				5	

a) s.c.; subcutaneous administration, i.v.; intravenous administration

b) Grades of ASA reaction are as follows

Grade	Symptom
-	Normal
+	Chewing, nose rubbing, piloerection
++	Sneezing, cough, bradypnea, cyanosis, ataxic gait, decrease in locomotor activity
+++	Convulsion, collapse
++++	Death

Table 4-4. Summary for PCA test

Group	Sensitization			Challenge			PCA reaction					
	Sensitized serum	Dose	Route ^{a)}	Article	Dose	Route ^{a)}	Test	Titer				
								(N)	<5	5	25	125
		(mL/site)										
I	Saline + FCA	0.05	i.d.	Saline	-	i.v.	5	5				
II	SKL-18287 + FCA (100 µg/mL)	0.05	i.d.	SKL-18287 (100 µg/mL)	100 µg/kg	i.v.	5	5				
III	Liraglutide + FCA (100 µg/mL)	0.05	i.d.	Liraglutide (100 µg/mL)	100 µg/kg	i.v.	5	5				
IV	Exendin-4 + FCA (2 µg/mL)	0.05	i.d.	Exendin-4 (2 µg/mL)	2 µg/kg	i.v.	5	5				
V	OVA + FCA (1 mg/mL)	0.05	i.d.	OVA (1 mg/mL)	1 mg/kg	i.v.	5					5

a) i.d.; intradermal administration, i.v.; intravenous administration

4-8. ラットにおける組織分布評価

これまでの試験結果から、SKL-18287 は Liraglutide と比較して、血糖降下作用が強く、かつ胃排泄運動抑制に関与する消化管に対する作用が弱いと推測された。Liraglutide のラットにおける血漿中濃度推移は、SKL-18287 と大きな差がないと考えられ、両薬剤の血糖降下作用及び消化管に対する作用の差は、組織移行に違いにあると考えられた。そこで、正常ラットを用いて³H-SKL-18287 の組織分布を確認した。³H-SKL-18287 を SD 雄性ラットに 30 µg eq./kg で単回皮下投与し、投与後 0.5, 2, 6, 12, 24 及び 48 時間後に各組織を採取し、放射能濃度を測定した。その結果を Tabel 4-5 に示した。また、主要組織の放射能濃度推移と投与後 2 及び 6 時間における主要組織の組織放射能濃度/血漿中放射能濃度比を Figure 4-5 に示した。³H-SKL-18287 を正常ラットに単回皮下投与後、ほとんどの組織の放射能濃度は投与後 6 時間にピークを示し、放射能の組織移行は緩やかである事が確認された。投与後 6 時間において、最も放射能濃度が高い組織は血漿であり、次いで脾臓、血液、副腎、骨髄及び肝臓の順であった。一方、脂肪、大脳、小脳及び脊髄中の放射能濃度は、他の組織と比較して低く、中枢組織への移行性は低い事が確認された。GLP-1 受容体が高発現している消化管、肺及び心臓への放射能の分布は低かったが、GLP-1 受容体作動薬の標的組織である脾臓への放射能分布は他の組織と比較して高く、SKL-18287 は脾臓へ移行しやすい（特異性が高い）特徴を有する事が強く示唆された。

Table 4-5 Concentrations of the radioactivity in the tissues of SD rats after a single subcutaneous administration of [³H]-SKL-18287, at a dose of 30 µg eq. /kg.

Tissue	Radioactivity concentration (ng eq. of SKL-18287/g or mL)					
	0.5 h	2 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Plasma	98 ± 14.2	214 ± 36	191 ± 1	85.9 ± 14.4	29.5 ± 4.9	12.6 ± 0.5
Blood	59.4 ± 7.3	133 ± 20	115 ± 3	54.9 ± 9.1	22 ± 3.1	13.4 ± 0.3
Cerebrum	1.79 ± 0.49	4.73 ± 0.13	7.05 ± 0.04	8.24 ± 0.28	7.86 ± 0.18	8.27 ± 0.27
Cerebellum	2.06 ± 0.89	5.19 ± 0.05	7.81 ± 0.06	8.67 ± 0.54	8.15 ± 0.39	8.66 ± 0.28
Pituitary gland	12.2 ± 4.4	31.3 ± 4.6	41.7 ± 8.8	52.7 ± 3.7	38 ± 4.8	26.9 ± 0.3
Spinal cord	2.01 ± 0.93	3.6 ± 0.25	6.44 ± 0.78	6.58 ± 0.12	5.81 ± 0.39	5.98 ± 0.15
Eyeball	1.43 ± 0.42	4.97 ± 0.33	8.08 ± 0.83	7.75 ± 0.23	7.05 ± 0.03	6.8 ± 0.29
Harderian gland	3.65 ± 0.87	11.4 ± 1.2	20.4 ± 0.5	29.1 ± 0.8	25.1 ± 1.5	23.8 ± 1.1
Parotid gland	7.81 ± 1.45	35.1 ± 1.5	70 ± 9.7	54.2 ± 12.6	31.4 ± 6.2	20.6 ± 2.6
Sublingual gland	7.06 ± 1.45	29 ± 4.2	43.6 ± 2.6	34.7 ± 3.3	25.5 ± 3	19.5 ± 0.8
Mandibular gland	7.81 ± 2.25	29.8 ± 4.1	49.7 ± 5.6	39.9 ± 1.7	26.1 ± 3.1	22.8 ± 1.2
Thyroid gland	13.4 ± 4.2	30.1 ± 7.3	38.9 ± 8.2	40.8 ± 1.3	24.2 ± 4.6	24 ± 4.5
Trachea	4.66 ± 0.93	11.2 ± 5	26.9 ± 8.1	20.9 ± 3.4	16.4 ± 5.6	13.4 ± 0.8
Mandibular lymph node	4.73 ± 0.86	22.3 ± 1.6	33.8 ± 4.9	36.3 ± 0.8	26.1 ± 3.4	25.9 ± 1.6
Thymus	3.31 ± 1.41	12.3 ± 1	23.6 ± 1.7	31.2 ± 2.1	31.2 ± 2.6	29.7 ± 0.1
Heart	7.92 ± 1.75	21.8 ± 2.4	29.5 ± 0.3	23.2 ± 1.3	18.7 ± 0.6	17 ± 0.1
Lung	11.1 ± 1.1	31 ± 2.6	58.7 ± 1.9	64.3 ± 6	64.6 ± 12.3	53.8 ± 11.9
Liver	25.2 ± 6.3	93.6 ± 28.4	78.9 ± 3.8	69.6 ± 7.2	35.7 ± 1.9	26 ± 0.4
Kidney	23 ± 3.7	55.7 ± 4.9	54.6 ± 5.4	55.7 ± 1.4	42.8 ± 0.7	34.7 ± 0.3
Adrenal gland	32.8 ± 7.2	76.9 ± 16.6	90.9 ± 19.7	66.3 ± 6.8	44.9 ± 6.1	31.2 ± 3.3
Spleen	8.59 ± 1.64	31.6 ± 7.3	42.4 ± 2	48.5 ± 3.7	42 ± 5.2	29.8 ± 2.4
Pancreas	20.1 ± 6.6	93.5 ± 14.3	132 ± 8	96.4 ± 21.3	36.6 ± 2.7	22.5 ± 1.5
Aorta	4.49 ± 1.06	12.4 ± 0.7	21.7 ± 7.8	21.6 ± 3.2	17.9 ± 5.2	15.3 ± 3.3
Fat	0.935 ± 0.2	2.71 ± 0.28	3.27 ± 0.65	3.28 ± 0.48	3.99 ± 0.22	3.46 ± 0.27
Brown fat	4.42 ± 1.35	11.2 ± 1	26.1 ± 6.6	19.6 ± 0.8	16.7 ± 3.3	19.2 ± 2.6
Skeletal muscle	2.09 ± 0.43	7.07 ± 0.97	11.9 ± 0.5	11.3 ± 1.3	13.3 ± 0.5	12.4 ± 1.7
Dorsal skin*	382 ± 64	130 ± 36	51.8 ± 19.4	37 ± 4.3	26.4 ± 1.8	22.2 ± 5.4
Skin	3.77 ± 0.71	16.8 ± 0.7	28.7 ± 2.3	30.9 ± 3.7	38.5 ± 5.4	30.1 ± 5.3
Thigh bone	5.37 ± 1.1	15.3 ± 5.2	20.4 ± 4.5	14.1 ± 4.3	12.5 ± 3.8	10.4 ± 1.4
Bone marrow	10.5 ± 1.6	51.2 ± 16.3	79.3 ± 15.4	108 ± 13	96.3 ± 15.3	64.7 ± 7.7
Testis	1.92 ± 0.28	10.6 ± 2.3	20.2 ± 4.4	17.7 ± 1.1	15.5 ± 1.6	12.6 ± 0.6
Epididymis	2.3 ± 0.63	10.4 ± 2.1	20.6 ± 0.8	22.1 ± 1.4	17.9 ± 1.1	14.9 ± 1.4
Seminal vesicle	4.66 ± 1.59	14.8 ± 0.8	34.1 ± 1.2	39.2 ± 4	37.5 ± 1.7	42.4 ± 8.5
Prostate gland	5.67 ± 1.62	26.8 ± 9.4	39.9 ± 9	47.1 ± 5.5	41.9 ± 3.8	34.9 ± 4
Urinary bladder	3.93 ± 0.64	15.8 ± 4.2	27.3 ± 2.2	23.7 ± 1.7	16.2 ± 0.6	14.5 ± 1.7
Stomach	6.35 ± 1.33	23.4 ± 3.7	43.2 ± 5.2	44.8 ± 2.5	28.8 ± 5.6	23.9 ± 3.2
Small intestine	5.64 ± 0.59	21.8 ± 4.9	37.2 ± 3.5	48.9 ± 6.5	37.8 ± 3.7	23.2 ± 4.5
Cecum	5.13 ± 0.66	17.4 ± 4	30.3 ± 2.9	40.9 ± 15.2	26.4 ± 2.8	22.9 ± 0.7
Large intestine	4.26 ± 0.54	13.9 ± 3.6	23.2 ± 3.2	24.9 ± 1.4	22.5 ± 0.8	18.9 ± 1.4

Data are expressed as the mean ± SD (n=3), *, including dosing site.

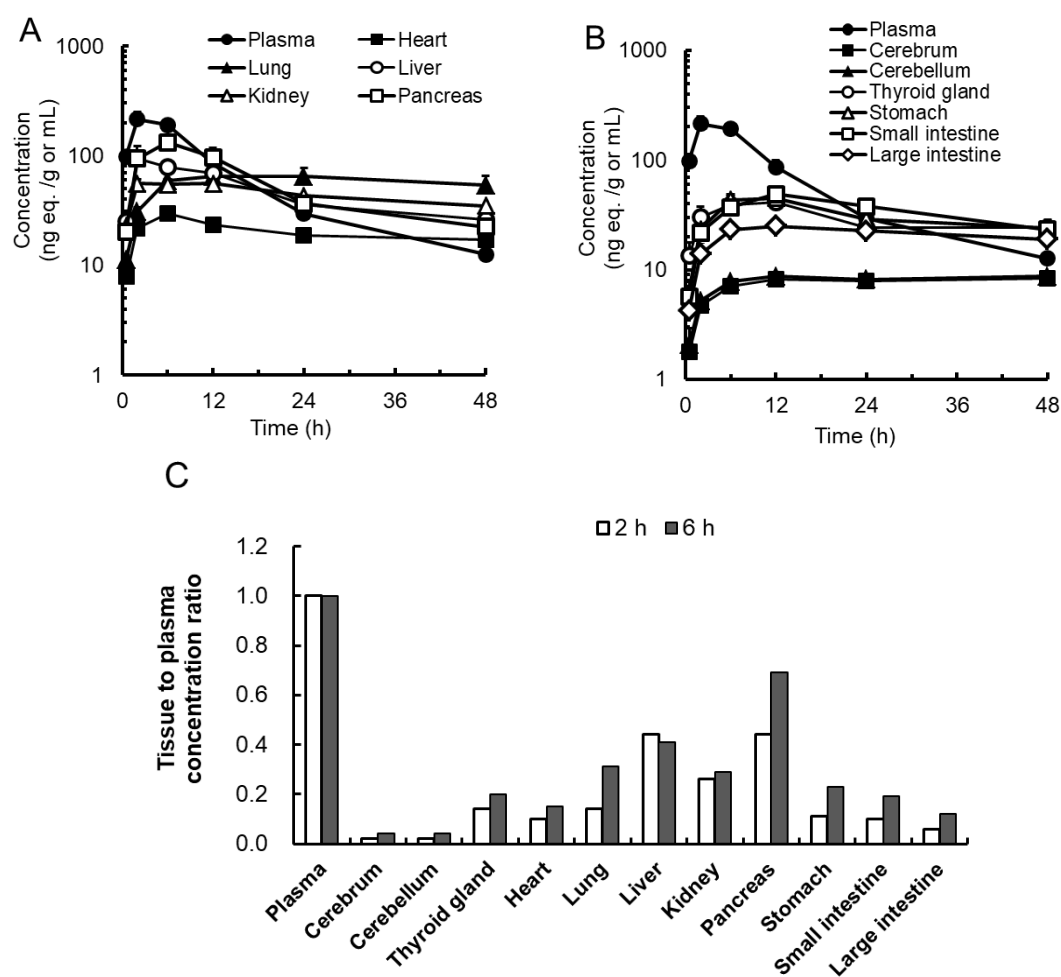


Figure 4-5. Tissue radioactivity concentrations and tissue to plasma concentration ratios in male SD rats after a single subcutaneous administration of [^3H]-SKL-18287 at a dose of 30 $\mu\text{g eq./kg}$. (A) Radio activity concentrations of plasma, heart, lung, liver kidney and pancreas, (B) Radioactivity concentration of plasma, cerebrum, cerebellum, thyroid gland, stomach, small intestine and large intestine, (C) Tissue to concentration ratios of radioactivity in major tissues after 2 h and 6 h post dose. Data are expressed as the mean \pm SD or mean value (n=3)

4-9. ラットにおける薬物動態評価

SKL-18287 の薬物動態を把握するため、ラットに SKL-18287 を 10 $\mu\text{g/kg}$ の投与量で単回静脈内投与、10, 30 及び 100 $\mu\text{g/kg}$ の投与量で単回皮下投与し、血漿中濃度推移を確認した。併せて、薬物動態学的パラメータを算出した (Figure 4-6 及び Table 4-6)。静脈内投与後の血漿中濃度推移は 2 相性を示し、消失半減期は 5.4 ± 0.3 時間であった。血漿クリアランス (CLp) 及び分布容積 (Vdss) はそれぞれ $11.8 \pm 0.3 \text{ mL/h/kg}$ 及び $75.6 \pm 1.7 \text{ mL/kg}$ であった。 AUC は $851 \pm 23 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$ と算出された。SKL-18287 をラットに皮下投与後の AUC 及び Cmax は用量の上昇とともに比例的に上昇した。 Tmax は 3.2~4 時間であり、用量間での差はほとんどなく、吸収が緩やかである事が確認された。また、バイオアベイラビリティ (BA) は 64.3 ~ 68.4 % であった。各用量での消失半減期は静脈内投与時の半減期と大きな差がなく、5.2 ~ 5.8 時間であった。 MRT は 8.8~9.7 時間であり、用量間で大きな差がなかった。以上の結果から、SKL-18287 のラットにおける薬物動態には線形性がある事が確認された。

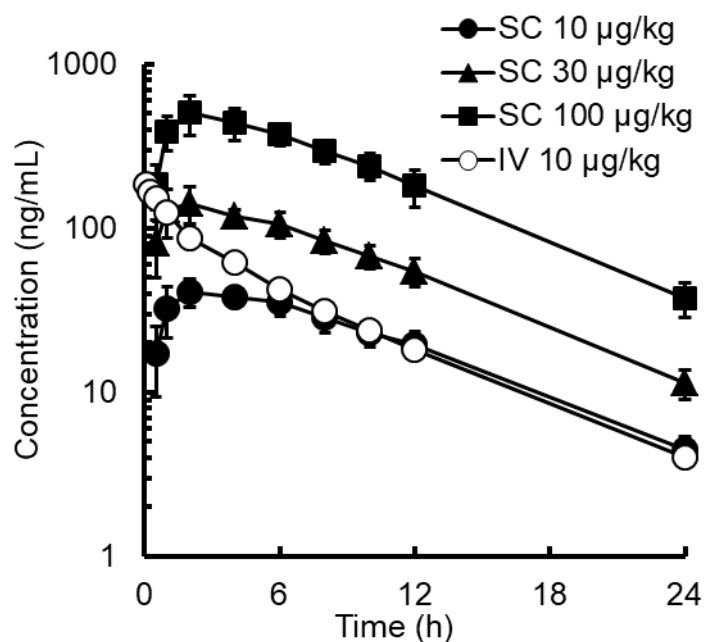


Figure 4-6. Plasma concentration versus the time profile of SKL-18287 in male SD rats, after single intravenous (IV) and subcutaneous (SC) administration of SKL-18287 at a dose of 10 and 10 to 100 µg/kg, respectively. Data are expressed as the mean ± SD (n=5)

Table 4-6. Pharmacokinetic parameters of SKL-18287 administered to male SD rats.

Parameters	IV	SC		
	10 µg/kg	10 µg/kg	30 µg/kg	100 µg/kg
C _{max} (ng/mL)	-	43.0 ± 5.4	145 ± 34	507 ± 132
T _{max} (h)	-	4.0 ± 2.0	3.2 ± 1.8	3.2 ± 1.8
AUC _{0-t} (ng · h/mL)	820 ± 19	510 ± 58	1560 ± 140	5810 ± 920
AUC _{0-∞} (ng · h/mL)	851 ± 23	548 ± 66	1640 ± 150	5820 ± 930
CL _p (mL/h/kg)	11.8 ± 0.3	-	-	-
V _{dss} (mL/kg)	75.6 ± 1.7	-	-	-
t _{1/2} (h)	5.4 ± 0.3	5.8 ± 0.4	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.2
MRT (h)	6.4 ± 0.2	9.7 ± 0.7	8.8 ± 1.0	9.0 ± 0.1
BA (%)	-	64.3 ± 7.7	64.4 ± 5.7	68.4 ± 10.9

Data are expressed as the mean ± SD (n=3).

IV; intravenous administration, SC; subcutaneous administration, BA; bioavailability

4-10. カニクイザル及びミニブタにおける薬物動態評価

SKL-18287 の各動物種における薬物動態を把握するため、カニクイザル及びミニブタに SKL-18287 を単回静脈内及び単回皮下投与し、血漿中濃度推移を確認した。併せて、薬物動態学的パラメータを算出した(Figure 4-7, Table 4-7)。

SKL-18287 をカニクイザル及びミニブタに単回静脈内投与した時の血漿中濃度推移は、カニクイザルで 2 相性を示したが、ミニブタは二峰性を示した。消失半減期はカニクイザルとミニブタでそれぞれ 9.0 ± 1.8 時間及び 12.9 ± 1.0 時間であり、両種間で大きな差はなかった。血漿クリアランスと分布容積はいずれの動物種とも低く、それぞれカニクイザルで 2.89 mL/h/kg 及び 34.0 mL/kg であり、ミニブタで 3.68 mL/h/kg 及び 67.0 mL/kg であった。SKL-18287 を皮下投与後の AUC と C_{max} は、カニクイザルで 3800 ± 1310 ng·h/mL 及び 151 ± 37.2 ng/mL、ミニブタで 3960 ± 943 ng·h/L 及び 130 ± 30 ng/mL であり、近似していた。T_{max} 及びバイオアベイラビリティはカニクイザルで 6.7 時間及び 58.1%であり、ミニブタで 8.7 時間及び 87.1%であった。

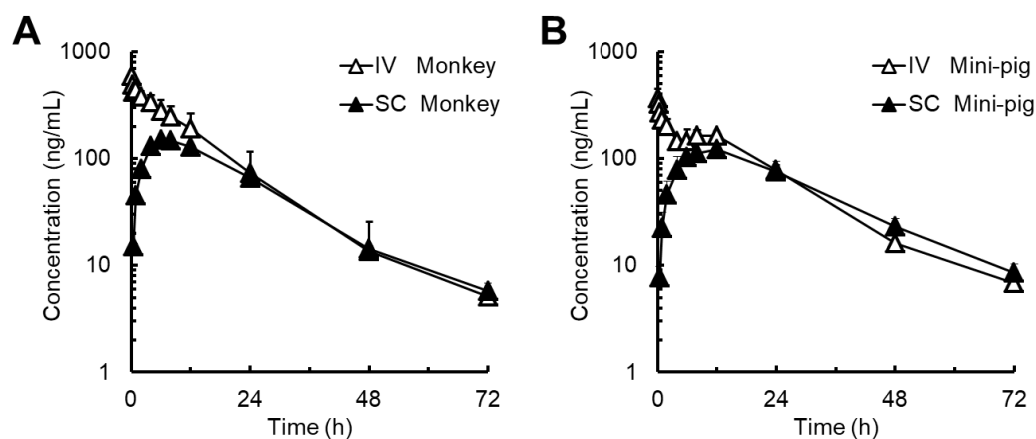


Figure 4-7 Plasma concentrations versus the time profile of SKL-18287 in monkeys and mini-pigs after single intravenous (IV) and subcutaneous (SC) administration of SKL-18287 at a dose of 17.4 $\mu\text{g/kg}$. (A) monkeys. (B) mini-pigs.

Data are expressed as the mean \pm SD (n=3-5)

Table 4-7. Pharmacokinetic parameters of SKL-18287 administered to monkeys and mini-pigs.

parameters	Monkey		Mini-pig	
Route	IV	SC	IV	SC
Cmax (ng/mL)	-	151 \pm 37.2	-	130 \pm 30
Tmax (h)	-	6.70 \pm 1.20	-	8.7 \pm 3.1
AUC _{0-t} (ng \cdot h/mL)	6350 \pm 2330	3660 \pm 1360	4960 \pm 477	3770 \pm 912
AUC _{0-∞} (ng \cdot h/mL)	6400 \pm 2340	3800 \pm 1310	5090 \pm 519	3960 \pm 943
CLp (mL/h/kg)	2.89 \pm 0.89	-	3.68 \pm 0.36	-
Vdss (mL/kg)	34.0 \pm 4.6	-	67 \pm 4.3	-
t _{1/2} (h)	9.0 \pm 1.8	11.4 \pm 1.0	12.9 \pm 1.0	15.4 \pm 0.3
MRT (h)	12.3 \pm 2.6	18.6 \pm 1.5	18.2 \pm 0.7	25.5 \pm 0.7
BA (%)	-	58.1 \pm 20.0	-	87.6 \pm 13.6

Data are expressed as the mean \pm SD (n=3)

IV; intravenous administration, SC; subcutaneous administration, BA; bioavailability

4-11. アニマルスケールアップによるヒト薬物動態学的パラメータの予測

SKL-18287 のヒトにおける薬物動態を予測するため、ラット、カニクイザル及びミニブタの薬物動態試験において算出した血漿クリアランス及び分布容積と各動物体重との関係性を基に、アニマルスケールアップ手法を用いてヒトの薬物動態パラメータを予測した [63]。血漿クリアランスと動物体重及び分布容積と動物体重をそれぞれ両対数グラフでプロットした。その結果を Figure 4-8 に示した。血漿クリアランスと体重または分布容積と体重には、高い相関性が認められた。次に、各プロットから得られた関係式により、ヒトの血漿クリアランス及び分布容積を予測した。予測したヒトの薬物動態学的パラメータを Table 4-8 に示した。ヒトの体重を 70kg と設定した際、血漿クリアランス及び分布容積はそれぞれ 148 mL/h 及び 3170 mL と算出された。それら数値から予測した SKL-18287 のヒトにおける半減期は 14.8 時間と算出され、ミニブタの半減期と同レベルであった。

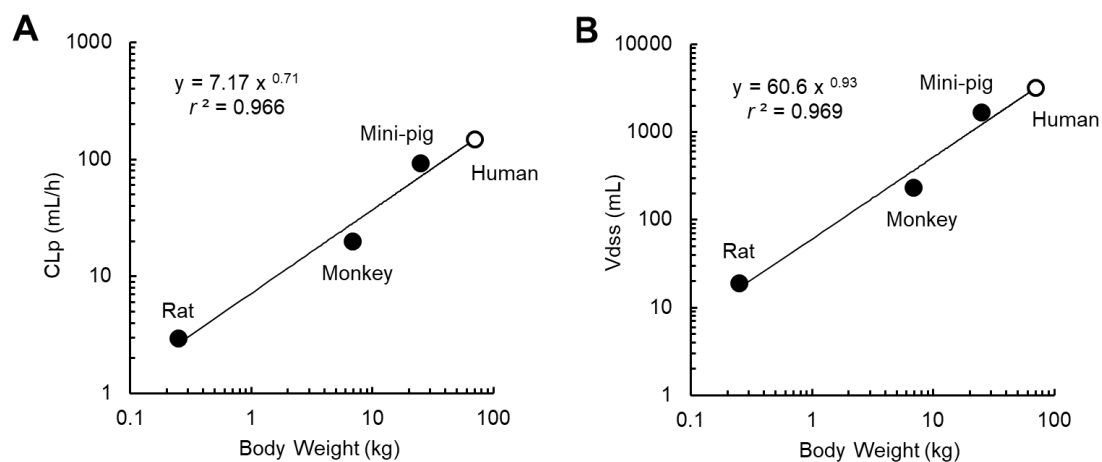


Figure 4-8 Allometric relationships between body weight and plasma clearance (A) and volume of distribution (B) of SKL-18287

The linear regression for the logarithmic value was calculated using the least-squares method (A, $y = 7.17x^{0.71}$, $r^2 = 0.966$; B, $y = 60.6x^{0.93}$, $r^2 = 0.969$). Extrapolated human values based on a body weight of 70 kg (open circle) and the values from individual animals (black circle) are also shown

Table 4-8. Predicted human pharmacokinetic parameters for SKL-18287

	W (kg)	CLp (mL/h)	Vdss (mL)	$t_{1/2}$ (h)
Rat	0.25	2.95	18.9	4.44
Monkey	6.9	19.8	233	8.2
Mini-pig	25.0	92	1675	12.6
Human	70.0	148	3170	14.8

4-12. 考察

内在性 GLP-1 は小腸の L-細胞から食事等の刺激により分泌され、GLP-1 受容体を介してインスリン分泌、グルカゴン分泌及び胃排泄運動抑制作用を示す。生理学的な GLP-1 分泌は 2 相性を示し、初期の GLP-1 分泌は食事の刺激により速やかに上昇して 30～60 分持続する。その後、第 2 相分泌として、60～120 分の持続的な GLP-1 分泌が起こる[64,65,66]。2 型糖尿病患者では、GLP-1 の分泌は健常人と同等レベルか、食事の刺激による分泌は健常人よりも増加している事が確認されている[67]。しかしながら、内因性 GLP-1 は生体内からの消失が早いと、2 型糖尿病患者の高血糖状態を是正するためには、GLP-1 受容体作動薬やその他薬剤の投与により、持続的な血糖降下を維持する必要がある。GLP-1 受容体作動薬は臨床適応上、短時間型と長時間型に分類されている[68]。Liraglutide は長半減期（11 時間）であり、長時間持続型に分類され、その薬理作用は食前（空腹時）または食後投与でも血中グルコース濃度に応じてインスリン分泌を示す。本検討で、Liraglutide と SKL-18287 は共に IPGTT 試験において持続的な血糖降下作用を示した。同一用量（1.0 及び 3.0 nmol/kg）の比較では、SKL-18287 の方がより強い血糖降下作用を示す事が確認された。さらに、SKL-18287 は 1 回目と 2 回目の IPGTT で同等の効果を示していたが、Liraglutide は 1 回目の IPGTT と比較して、2 回目の IPGTT の血糖降下作用の方が強かった。この結果から、SKL-18287 は Liraglutide と比較して血糖降下作用が最大に到達する時間が早い事が確認された。これは、タンパク結合率の違いや、投与部位において Liraglutide の吸収が緩やかである事が影響していると推測された[49]。Exendin-4 は短時間持続型の GLP-1 受容体作動薬に分類され、強力な血糖降下作用を示すが、1 日 2 回の投与が必要である。IPGTT 試験では、2 回目の IPGTT において血糖降下作用が減弱しており、血糖降下作用の持続時間が短い事が確認されている。これは、臨床での適用と同様に、マウスにおける生体内安定性が低い事に起因すると考えられた。

肥満型 2 型糖尿病マウス（db/db マウス）における検証では、Exendin-4 投与群は投与後 8 時間には溶媒コントロール群と同程度の血糖値を示したが、SKL-18287 10 nmol/kg 投与群では 10 時間以上有意な血糖降下作用が維持されることが確認された。同一用量における SKL-18287 と Exendin-4 の投与 12 時間までの血漿中グルコース AUC は、ほぼ同等のレベルであったが、最大血糖降下作用時点での血漿中グルコース濃度は Exendin-4 の方が低く、SKL-18287 は Exendin-4 よりも低血糖リスクが少ないと推測された。

GK ラットの表現型は日本人の 2 型糖尿病患者と近い病態（非肥満型でインスリン分泌障害、軽度のインスリン抵抗性及び膵 β 細胞の障害）を示す事が知られている[60]。GK ラットにおける検証では、SKL-18287 8 及び 12 nmol/kg 投与群において用量依存的に有意なグリコヘモグロビン上昇抑制作用が確認された。一方、Liraglutide 8 nmol/kg 投与群では、

グリコヘモグロビンの上昇抑制作用は確認されなかった。同様に、SKL-18287 の摂餌量抑制作用及び体重増加抑制作用も、SKL-18287 の方が Liraglutide より優れていた。Liraglutide は、非肥満型の日本人 2 型糖尿病患者では体重増加に対する影響が少ない事が報告されており、本検討は Liraglutide の臨床試験結果を反映していると推測された[69]。また、GK ラットにおいて、投与初期の摂餌量の低下は Liraglutide の方が顕著であり、SKL-18287 の消化管に対する作用は Liraglutide よりも弱いと推測された。

GLP-1 受容体作動薬で認められる胃排泄運動抑制作用は、膝外作用の一つとして、2 型糖尿病治療において重要な位置を占めている[70]。事実、臨床試験において、GLP-1 による食後の血糖値の上昇抑制作用は、胃排泄運動を促進するエリスロマイシンの投与により、その作用が減弱する[71]。しかしながら、胃排泄運動を促進すると悪心が緩和される事から[72]、胃排泄運動抑制作用は、GLP-1 受容体作動薬の副作用である悪心及び嘔吐に深く関連していると考えられる。正常ラットを用いたアセトアミノフェンによる胃排泄運動抑制評価では、SKL-18287 投与群は投与初期において有意な胃排泄運動抑制作用を示さず、消化管に対する影響は少ないと推測された。

GK ラットを用いた薬理試験において、Liraglutide 投与群で認められた、投与初期の顕著な摂餌量低下や投与継続による摂餌量の増加傾向は、近年実施された Liraglutide の臨床試験の結果と同様の傾向を示した[73]。この摂餌量の回復には、長時間持続型 GLP-1 受容体作動薬が高濃度で継続的に作用する事で、胃排泄運動抑制作用に対しタキフィラキシーが起こっていると推測されている[74]。SKL-18287 においても、投与継続により摂餌量が増加する傾向が認められる事から、Liraglutide と同様の現象が起こっていると推測された。

以上、第 4 章において実施された各種薬理試験と胃排泄運動抑制評価により、SKL-18287 は強力な血糖降下作用を示すとともに、他の GLP-1 受容体作動薬と異なり、胃排泄運動に対する影響が穏やかであり、新たな特徴を持つ GLP-1 受容体作動薬となる可能性が高いと考えられた。

第 3 章の検証から、SKL-18287 は生体内で多量体を形成する事が示唆されている。一方、Liraglutide は体循環でその大部分が血漿中のアルブミンに結合しており、両薬物の存在形態に違いがある。そのため、各種糖尿病モデル動物で確認された両薬物の血糖降下作用の違いは、組織移行性に差があると推測した。そこで、その検証のため、 $[^3\text{H}]$ -SKL-18287 を用いてラットにおける組織内の放射能分布を確認した。 $[^3\text{H}]$ -SKL-18287 を $30\text{ }\mu\text{g eq./kg}$ の投与量で SD ラットに投与した結果、Tmax 付近では、GLP-1 受容体作動薬の標的組織である膵臓の放射能濃度は他の組織と比較して高い事が確認され、SKL-18287 は膵臓へ移行しやすい事が確認された。 $[^{14}\text{C}]$ -Liraglutide の組織内濃度試験（皮下投与、 1.0 mg eq./kg ）では、投与後 4 時間における膵臓の放射能濃度は血漿中放射能濃度の 1/10 程度であった。ま

た、膵臓の放射能濃度は投与後 24 時間には血漿中放射能濃度と同レベルとなっていたが、そのレベルは肝臓中放射能濃度の 1/4 程度であり、膵移行性は高くない事が報告されている[75]。GLP-1 受容体の発現が報告されている肺、腎臓、心臓、消化管[76]における放射能濃度は、いずれも他の組織と同等かそれよりも低い濃度であった。

各動物種における SKL-18287 の薬物動態試験結果から、SKL-18287 は皮下からの吸収が良好であり、消失半減期もラットで 5.2～5.8 時間、サルで 9.0～11.4 時間及びミニブタで 12.9～15.4 時間を示し、GLP-1 の半減期（2 分以内）と比較して、半減期が著しく延長している事が確認された。これらの結果から、SKL-18287 の安定化メカニズムである多量体形成は、各動物種間でも維持されていると推測された。アロメトリックスケーリングにより、ラット、サル及びミニブタの血漿クリアランスと体重及び分布容積と体重の両対数プロットからヒトの薬物動態パラメータを予測した。SKL-18287 のヒトにおける半減期は 14.8 時間と予測され、Liraglutide と同レベル（11 時間）であることから、1 日 1 回投与可能な長時間持続型 GLP-1 受容体作動薬となると考えられた。

4-13. 小括

第 4 章の各種検討により、SKL-18287 の薬理学的及び薬物動態学的特徴を確認した。SKL-18287 は糖尿病モデルにおいて強力な血糖低下作用を示し、投与初期の急激な胃排泄運動抑制作用が弱く、GLP-1 受容体作動薬で懸念されている消化管に対する副作用の影響が少ない新規医薬品となると考えられた。また、 $[^3\text{H}]$ -SKL-18287 を用いたラット組織内放射能濃度推移から、SKL-18287 は GLP-1 受容体発現組織のなかでも、膵臓へ移行しやすく、膵特異的な GLP-1 受容体作動薬となる可能性があると考えられた。また、ペプチド医薬品の課題である中和抗体の産生によるアナフィラキシー発現は、モルモットを用いた基礎試験により、その可能性が低い事が確認された。

薬物動態学的検証では、ラット、サル及びミニブタにおいて皮下からの吸収が良好であり、生物学的利用率（BA）が高く、長半減期（5 時間以上）を示す特性に関し、動物種間で大きな差が認められなかった。すなわち、第 3 章で検証した SKL-18287 の多量体形成は、各動物種間でも保持されていると推測された。また、アニマルスケールアップ手法により予測した SKL-18287 のヒトにおける消失半減期は 14.8 時間であり、これは Liraglutide の半減期と同レベルであった。

上記検討結果より、SKL-18287 は既存の GLP-1 受容体作動薬とは異なる特性を持ち、1 日 1 回投与が可能な長時間持続型の GLP-1 受容体作動薬となる可能性が高いと考えられた。

4-14. 実験の部

4-14-1 使用試薬及び対象物質

実験に使用した試薬及び溶媒は、市販品をそのまま使用した。

トリチウム標識 SKL-18287 は第 2 章の固相合成と同様の手法により、トリチウム標識されたチロシンを導入した。比放射能は 414 MBq/g であり、試験前に放射化学的純度を確認し、純度が 95 %以下の場合は HPLC にて再度精製して純度が 95 %以上となる標品を試験に使用した。

Native GLP-1 (7-36) はペプチド研究所 (Osaka, Japan) より購入した。Exendin-4 は Sigma aldrich (MO, USA) から購入した。Liraglutide は Bachem Peninsula (CA, USA) から購入して各実験に使用した。

4-14-2 動物

雄性 SD ラット、C57BL/6 マウス及び db/db マウスは Charles River Japan (Kanagawa, Japan) から購入した。雄性 Goto-kakizaki ラットは CLEA Japan (Tokyo, Japan) から購入した。雄性モルモットは日本 SLC (Shizuoka, Japan) から購入した。いずれの動物も、12 時間明暗サイクルの標準的な条件下で飼育し、最低 5 日間検疫と環境馴化をさせた。飲水及び市販の固形飼料 (Oriental Yeast, Japan) を給与し、自由摂取させた。実験は「株式会社三和化学研究所三重パーク動物実験指針」を遵守して適正に実施した。

雄性モルモットは三菱化学メディエンス (Tokyo, Japan) で飼育及び投与実験を実施した。雄性カニクイザルは Japan Laboratory Animals, Inc. (Tokyo, Japan) で飼育及び投与実験を実施した。ミニブタは日本バイオリサーチセンター (Gifu, Japan) で飼育及び投与実験を実施した。

4-14-3 正常マウスにおける反復 IPGTT 試験

9~14 週齢の雄性 C57BL/6 マウスをオーバーナイトで 16 時間絶食させ、Vehicle コントロール、SKL-18287 (投与量 0.3, 1 及び 3 nmol/kg) ,Exendin-4 (0.06, 0.2 及び 0.6 nmol/kg) または Liraglutide (1, 3 及び 10 nmol/kg) を単回皮下投与した。投与 1 時間後にグルコース (2 g/kg) を腹腔内に投与し、グルコース投与時点 (0)、投与後 20, 40 及び 60 分に尾静脈から採血した。採取した血液中のグルコース濃度はグルテスト Pro (三和化学研究所、名古屋、日本) により測定した (IPGTT)。2 回目の IPGTT は、1 回目のグルコース投与から 3 時間後にグルコース (2 g/kg) を腹腔内投与して、0, 20, 40 及び 60 分後に尾静脈から採血して血中グルコース濃度を測定した。血中グルコースの AUC は台形公式により算出した。血中グルコース AUC の減少率 (%) は以下の式により算出した。

血中グルコース AUC の減少率 (%) = $(1 - \text{GA test} / \text{GA control})$

GA control : コントロール投与群の血中グルコース AUC
GA test : 各 GLP-1 受容体作動薬投与群の血中グルコース AUC

4-14-4 肥満型 2 型糖尿病モデル動物 (db/db マウス) における用量反応性試験

SKL-18287 (2, 10 及び 50 nmol/kg) または Exendin-4 (10 nmol/kg) を生理食塩水に溶解し、9 週齢の雄性 db/db マウスに単回皮下投与した。各 GLP-1 受容体作動薬を投与前及び投与後 1, 2, 4, 6, 8, 10 及び 12 時間の時点でヘパリン処理済みの毛細管により尾静脈から血液を採取し、遠心分離 (12,000 rpm, 4℃, 15 分) により血漿を得た。血漿中のグルコース濃度はグルコーステスト・ワコー (和光純薬工業) を用いて測定した。血漿中グルコース AUC は台形公式により算出した。

4-14-5 非肥満型糖尿病モデル動物 (GK ラット) における反復投与時の用量反応性試験

SKL-18287 (6, 8 及び 12 nmol/kg) または Liraglutide (8 nmol/kg) を PBS に溶解し、7 週齢の雄性 GK ラットに 1 日 2 回 28 日間、反復皮下投与を実施した。血中グリコヘモグロ빈は、投与前、投与開始 14 日目及び 28 日目に採血し、自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723G8 (東ソー、東京、日本) により測定した。投与期間中は各ケージ毎の摂餌量を測定して、個体毎の摂餌量を算出した。試験期間中の体重は各個体で毎日測定した。

4-14-6 正常ラットにおけるアセトアミノフェン濃度測定による胃排泄運動抑制試験

SKL-18287 (8 nmol/kg) 及び Liraglutide (8 nmol/kg) を PBS に溶解し、16 週齢の雄性 SD ラットに 1 日 2 回 14 日間、反復投与を実施した。投与初日と投与 14 日目に、各 GLP-1 受容体作動薬または PBS を投与後 5 時間絶食し、アセトアミノフェン溶液 (100mg/10mL/kg) を経口投与後 30 分及び 45 分後に血液を採取して遠心分離により血漿を得た。血漿中のアセトアミノフェン濃度は、paracetamol assay kit (Cambridge Life Science Ltd.) により測定した。血漿中アセトアミノフェンの AUC は、台形公式により算出した。

4-14-7 モルモットにおけるアナフィラキシー試験

SKL-18287 及び各 GLP-1 受容体作動薬のアナフィラキシーを確認するため、雄性モルモットを用いて能動的全身アナフィラキシー (ASA) 及び受身的皮膚アナフィラキシー (PCA) を Nagami らの手法[62]により確認した。

1) ASA テスト

SKL-18287、Exendin-4、Liraglutide 及び Ovalbunin を生理食塩水と CFA (Complete Freund adjuvant, DIFCO laboratory) を 1:1 に混合した溶液に溶解し、それぞれ 100, 100, 2 及び 1000

μg/mL となるように感作用のストック溶液を調製した。感作は、6 週齢の雄性モルモットに感作用ストック溶液をそれぞれ 1mL/kg 皮下投与し、その後、2 週間毎に 2 回皮下投与した。3 回目の感作用ストック溶液投与が終了して 2 週間後に、各 GLP-1 受容体作動薬または投与溶媒を単回静脈内投与し、投与直後から 30 分及び 2 時間後に、以下に示す項目の発現が認められるかを確認した。

判定基準	
	グレード
下記の症状がみられない	-
口をもぐつかせる、鼻を擦る、立毛	+
くしゃみ、咳、緩徐呼吸、チアノーゼ、歩行失調、自発運動の低下	++
痙攣、虚脱	+++
死亡	++++

なお、PCA テスト用の感作血清として、ASA テスト用のに感作した感作 3 回目の 1 週間後に、前肢静脈から 3mL の血液を採取し(n=1)、遠心分離(1870 × g, 4 °C, 10 min)にて血清を採取した。試験前までに PCA テスト用として -80°C 以下で保存した。

2) PCA テスト

1)で採取した血清を生理食塩水で 5, 25 及び 625 倍希釈した。希釈した血清またはコントロールをレシピエントモルモットの背部皮内に 0.05mL 投与した。投与 24 時間後に惹起用の投与液を静脈内投与し、その後、1%エバンスブルーを静脈内投与した。エバンスブルーを投与 30 分後に動物を放血死させ、背部皮膚を採取した。皮内投与部位に漏出色素斑が認められた場合、短径と長径をノギスにより測定して、その平均値が 5 mm 以上の場合を「陽性」とした。この「陽性」を示す最高希釈倍数を PCA 反応の抗体価とした。個体により抗体価に差が出た場合は抗体価の高いほうを採用した。なお、5 倍希釈血清で PCA 反応が認められない場合は「<5」と記して「陰性」と判定した。625 倍希釈血清で陽性の場合には「>625」と提示した。

4-14-8 正常ラットにおける ³H-SKL-18287 の組織分布試験

8 週齢の雄性 SD ラットに ³H-SKL-18287 を 30μg eq./kg の投与量で単回皮下投与し、投与後 0.5, 2, 6, 12, 24 及び 48 時間後にイソフルラン吸入麻酔下で開腹してヘパリン処理済みシリンジにて腹部大静脈より全採血して動物を放血致死させた。採取した血液は一部を放射

能濃度測定用としてバイアルに採取し、50~200 μL の血液を 1,500 rpm, 4°C、15 分間遠心分離して血漿を得た。各時点で採取した組織を以下に示す。

組織名 : 血漿*, 血液**, 大脳**, 小脳**, 下垂体**, 脊髄*, 眼球**, ハーダー腺**, 外涙腺**, 耳下腺**, 舌下腺**, 顎下腺**, 甲状腺**, 気管*, 顎下リンパ節*, 食道*, 胸腺**, 心臓**, 肺**, 肝臓**, 腎臓**, 腎皮質*, 腎髄質*, 副腎**, 脾臓**, 膵臓**, 大動脈*, 白色脂肪**, 褐色脂肪*, 骨格筋**, 背部皮膚 (投与部位を含む)**, 皮膚**, 大腿骨*, 骨髄*, 精巣**i), 精巣上体**, 精囊**, 前立腺**, 卵巣**, 子宮**, 膀胱**, 胃**, 小腸**, 盲腸**, 大腸**

* : 組織中放射能濃度を求めた。

** : 組織中放射能濃度及び分布率を求めた。なお、分布率を求めるとき、全量を測定できない血液、白色脂肪、骨格筋及び皮膚については、全量をそれぞれ体重の 6.4, 5.0, 40.0 及び 22.0 % として計算した[77,78]。

各組織の放射能濃度は、サンプルオキシダイザーを用いて燃焼法により測定した。血液及び血漿をフィルターカップに採取し、サンプルオキシダイザーに供した。他の組織は前処理として、組織を採取後に生理食塩水で洗浄し、ろ紙で生理食塩水を拭って湿重量を測定した。肝臓、膵臓及び腎臓はプラスチックの容器に入れ、同じ容量の氷冷アセトニトリルを添加して組織を切り刻んだ。その後、同量の生理食塩水を添加し、ポリトロンホモジナイザーでホモジネートした。肝臓は約 0.5 g を、膵臓と腎臓は約 0.3 g をフィルターカップに採取して測定に供した。投与部位を含む背部皮膚は 2 mol/L の水酸化ナトリウムを 100 mL 及び 10 mL のトルエンを添加して熱を加えて溶解し、200 mL の蒸留水で希釈した。希釈した溶液 1 mL をフィルターカップに採取して、測定に供した。各消化管組織は 0.5 mol/L の水酸化ナトリウムを添加して熱を加えて溶解し、蒸留水で希釈後フィルターカップに採取して測定サンプルとした。消化管内容物はあらかじめ 1 % tween 80 で処理したポリプロピレンチューブに添加し、蒸留水を添加して約 100 g としてポリトロンホモジナイザーにてホモジナイズした。約 0.5 g をフィルターカップに採取して測定した。上記以外の組織は、約 150 mg をフィルターカップに採取して測定サンプルとした。各組織のサンプルカップは 40°C で 24 時間以上インキュベートした後、サンプルオキシダイザーにより液体シンチレーションカウンター (LSC) 測定用のサンプルを調製した。なお、燃焼法の回収率は ^3H スタANDARD (Spec-Chec- ^3H , PerkinElmer, USA) を用いた。放射能濃度は LSC による測定結果から、ng eq./g または ng eq./mL で提示した。

4-14-9 正常ラットにおける SKL-18287 の薬物動態試験

SKL-18287 を生理食塩水に溶解し、8 週齢の雄性 SD ラットに投与量 10 µg/kg の投与量で単回静脈内投与した。さらに、投与量 10, 30 及び 100 µg/kg の投与量で単回皮下投与を実施した。静脈内投与では、投与後 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 及び 24 時間に、皮下投与では、投与後 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 及び 24 時間後にイソフルラン麻酔下で鎖骨下静脈よりヘパリン処理済みシリンジで 0.2~0.4 mL の血液を採取した。採取した血液を遠心分離 (3,000 rpm, 4℃、15 分) して血漿を得た。血漿は測定まで -70℃以下で保存した。血漿中 SKL-18287 濃度は、LC/MS により測定した。PK パラメータは WinNonlin (Professional, Version 5.2.1; Pharsight Corporation)によりノンコンパートメント解析から算出した。

4-14-10 カニクイザル及びミニブタにおける SKL-18287 の薬物動態試験

SKL-18287 を生理食塩水に溶解し、6~8 年齢の雄性カニクイザルまたは 6 ヶ月齢のミニブタに投与量 17.4 µg/kg (4 nmol/kg) の投与量で単回静脈内及び単回皮下投与した。静脈内投与では、投与後 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 及び 48 時間に、皮下投与では、投与後 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 及び 48 時間後にカニクイザルは橈側皮静脈から、ミニブタはカテーテルが留置された大静脈洞からヘパリン処理済みシリンジで血液を採取した。採取した血液を遠心分離 (3,000 rpm, 4℃、15 分) して血漿を得た。血漿は測定まで -70℃以下で保存した。血漿中 SKL-18287 濃度は、LC/MS により測定した。PK パラメータは WinNonlin (Professional, Version 5.2.1; Pharsight Corporation)によりノンコンパートメント解析から算出した。

4-14-11 ヒト薬物動態パラメータの予測

SKL-18287 のラット、サル及びミニブタの薬物動態試験結果を基に、アロメトリックスケーリング手法[63]によりヒトのクリアランス、分布容積から半減期を予測した。各動物の体重は、実測データを基に、ラットは 0.25 kg、カニクイザルは 6.9 kg 及びミニブタは 25 kg と設定して、血漿クリアランスと分布容積を対数でプロットした。以下の式に従い、ラット、カニクイザル及びミニブタの実測値から関係式を算出した。

$$\bullet \text{ CLp (mL/h)} = a \cdot W^b$$

$$\bullet \text{ Vdss (mL)} = c \cdot W^d$$

W; body weight (kg)

a, c; allometric coefficient

b, d; allometric exponent

ヒトの血漿クリアランスと分布容積はヒトの体重を 70 kg と設定して上記予測式から算出した。ヒトの半減期は以下に示す式から算出した。

・予測半減期 ($t_{1/2} = 0.693 \times \text{ヒト予測分布容積 (Vdss)} / \text{ヒト予測血漿クリアランス (CLp)}$)

4-14-12 血漿中 SKL-18287 濃度測定

血漿中 SKL-18287 濃度は LC-MS/MS を用いて測定した。血漿サンプル及び内部標準物質であるペプチド **2** を 200 μL のメタノールでプレ洗浄し、蒸留水で平衡化した OASIS MCX 96-ウェルプレートの各ウェルにアプライした。サンプルをアプライ後、ギ酸/蒸留水/アセトニトリル(1/95/5, v/v/v)の混合液 400 μL で洗浄し、続いてアセトニトリル 400 μL で洗浄した。その後、SKL-18287 とペプチド **2** を 30 μL の 28% 水酸化アンモニア/蒸留水/アセトニトリル(5/50/50, v/v/v)で溶出し、溶出液を 70 μL のギ酸/蒸留水/アセトニトリル (5/50/50, v/v/v) で希釈して LC-MS/MS 測定用のサンプルとした。

LC-MS/MS は SC-10A HPLC system (Shimadzu corporation, Kyoto, Japan) と API 4000 タンデム型質量分析計 (Sciex, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan)を用いた。上述したサンプルを移動相 A (ギ酸/蒸留水 = 0.5/100, v/v) 及び移動相 B (ギ酸/アセトニトリル= 0.5/100, v/v)のグラジェントにより、50℃に維持した逆相カラム YMC Triart C8 (2.0×50 mm, 5 μm , YMC Co., Ltd.)で分離した。SKL-18287 はペプチド **2** を内部標準物質として、多重反応モニタリングにより検出した。

第5章 結語

2 型糖尿病治療における GLP-1 受容体アゴニストの有用性に着目し、新規 GLP-1 受容体作動薬を創製すべく、GLP-1 の構造を基としたキメラペプチドをデザインした。それらペプチドの検証試験により、長時間持続型 GLP-1 受容体作動薬候補となる SKL-18287 を見いだした。さらに、SKL-18287 の薬理学特性を明らかにした。以下に本研究内容を総括する。

新規 GLP-1 受容体作動薬の創製

本研究では、ペプチドを医薬品開発する際に課題となる生体内安定性を改善する手段として、細菌由来のアルブミン結合ドメイン (G-148ABD3) に着目し、アルブミンとの結合を介する長時間作用型 GLP-1 受容体作動薬の取得を目指した。GLP-1 の主要分解酵素である DPP-4 の耐性を示す[Ser⁸]-GLP-1 を基本配列として、C 末端に G148-ABD3 の配列中のアルブミン結合の直接結合に関与するヘリックス 3 を含む配列を基に、アミノ酸 7~17 残基を付加したキメラペプチドを合成した。いずれのペプチドも GLP-1 受容体アゴニスト作用である MIN6 細胞でのグルコース濃度依存的なインスリン分泌能を保持しており、ラット血漿を用いた安定性評価の結果、高い安定性を保持するペプチドが複数見出された。それらペプチドを肥満型 2 型糖尿病モデル動物である db/db マウスを用いて有効性を評価した結果、ペプチド 6 は持続的な血漿グルコース濃度低下作用を示し、且つ血漿安定性（ラット、ヒト）、NEP-24.11 耐性、GLP-1 受容体結合能、cAMP 活性及びラットにおける消失半減期の著しい改善（延長）等の特徴を持つことから、長時間持続型の新規 GLP-1 受容体作動薬となることが強く示唆された。ペプチド 6 の GLP-1 受容体に対する結合能を Liraglutide と比較評価した際、Liraglutide の結合能は、アルブミン濃度の変化により IC₅₀ 値が 5.6 倍変化した。しかしながら、ペプチド 6 はアルブミン濃度を変化させても結合能が変動せず、生体内安定化にアルブミンの寄与が低いと考えられた。このことから、ペプチド 6 の生体内安定化は、Liraglutide とは別の機序で起こっていると推測された。

本研究により、[Ser⁸]-GLP-1 の C 末端に G148-ABD3 の部分配列を付加する事で、GLP-1 受容体アゴニスト作用と生体内安定性が改善された新規ペプチドを複数取得する事ができた。さらに、長時間持続型の新規 GLP-1 受容体作動薬候補として、ペプチド 6 (SKL-18287) を見いだす事ができた。

SKL-18287 の生体内安定化メカニズムの検証

本研究では、各動物種におけるタンパク結合率、超遠心分析法による溶液中の存在形態の確認及び TLGC 法による生体中の存在形態を確認することにより、SKL-18287 の生体内安定化メカニズムを考察した。SKL-18287 の血清タンパク結合率は Liraglutide の結合率

(99%以上)と比較して低く(69.7~82.9%)、ヒト血清アルブミンに対する結合率も55.3~62.4%であった。また、超遠心分析によりSKL-18287の溶液中での存在形態を解析した結果、自己会合により3,6または10量体を形成している事が確認された。さらに、TLGC法により、ラットの血漿中での存在形態を検証した結果、SKL-18287は生体内で多量体を形成し、高分子化している事が強く示唆された。以上の結果から、SKL-18287の生体内安定性は、アルブミンとの結合により酵素分解及び腎臓からの排泄を回避しているのではなく、自己会合による多量体形成(高分子化)に起因すると考えられた。GLP-1はプログルカゴンからプロセッシングを受けて分泌顆粒内に貯蔵される際に、アミロイド様の重合体として安定化されている。さらに、重合体の形成には、ヘパリンの関与やpH依存性が示唆されている。SKL-18287は付加したG148-ABD3の部分配列内に電荷を持つアミノ酸であるリジン(K)、アスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)を保持しており、それらアミノ酸の荷電状態が多量体形成に関与している可能性が考えられた。従来、ペプチドの生体内半減期を延長する策として、Liraglutideやインスリン製剤デグルデクではアミノ側鎖にスペーサーと脂肪酸を付加し、アルブミンへの結合を指向した例やポリエチレングリコール(PEG)化して高分子化する手法がある。デグルデクは、インスリン分子が亜鉛分子の存在下で6量体を形成する特性を生かし、投与部位である皮下では6量体形成による持続的な吸収と体循環へ移行した後はアルブミンへの強い結合により生体内の安定化が確保されている。SKL-18287の生体内安定化も、多量体形成により投与部位での持続的な吸収と循環血中において酵素分解及び腎排泄を回避していると推測された。

本研究により、SKL-18287は血中アルブミンへの結合率が低く、溶液中及び血漿中で多量体を形成している可能性が高い事を示した。

SKL-18287の薬理学的特徴

本研究では、SKL-18287の薬理学的及び薬物動態学的な特徴を確認した。SKL-18287は糖尿病モデル動物において強力かつ持続的な血糖低下作用を示した。また、正常ラットにおける胃排泄運動抑制評価において、SKL-18287は投与初期の胃排泄運動抑制作用がLiraglutideと比較して弱く、GLP-1受容体作動薬で懸念されている消化管副作用の影響が少ない、新規医薬品候補になると考えられた。また、 $[^3\text{H}]$ -SKL-18287を用いたラット組織内放射能濃度推移から、SKL-18287はGLP-1受容体発現組織のなかでも、膵臓へ移行しやすく、膵特異的なGLP-1受容体作動薬となる可能性があると考えられた。さらに、モルモットを用いたアナフィラキシー試験により、SKL-18287は能動的全身アナフィラキシー(ASA)及び受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)を示さない事が確認された。

薬物動態学的検証では、ラット、サル及びミニブタにおいて皮下からの吸収が良好であ

り、生物学的利用率（BA）が高く、長半減期（5 時間以上）を示す特性は、動物種間で保持されていた。すなわち、第 3 章で検証した SKL-18287 の自己会合による多量体形成は、各動物種間でも保持されていると推測された。また、アニマルスケールアップ手法により予測した SKL-18287 のヒトにおける消失半減期は 14.8 時間であり、これは Liraglutide の半減期と同レベル（11 時間）であった。

本研究により、SKL-18287 は糖尿病モデルにおいて強力な血糖降下を示す事が確認された。さらに、GLP-1 受容体作動薬の適応において課題となる、投与初期での悪心、嘔吐による副作用の可能性が低く、安全性も高い長時間持続型 GLP-1 受容体作動薬の候補になる事を示した。

本研究では、現在糖尿病治療の第一選択薬として使用されている GLP-1 受容体作動薬に対し、これまでと異なる新しい生体内安定化アプローチを適用する事で、基礎レベルにおいて有効性及び安全性に優れた新規 GLP-1 受容体作動薬候補を見いだす事ができた。

これまでの検証により、従来の糖尿病治療に対する新たなアプローチを提供するための有益な情報を取得できたと考えている。また、GLP-1 の C 末端に細菌由来の ABD 配列に基づく天然型アミノ酸の部分配列を付加する事で、生体内で著しく安定化され、かつ GLP-1 の機能を損なうことがない新規ペプチド配列を獲得する事ができた。さらに、我々が創製した SKL-18287 はペプチド医薬品の安全性上の課題（アナフィラキシー等）も少なく、ヒトへの適応も問題ないと考えられた。今後の展開において、この ABD 由来の部分配列の応用例として、他のペプチド医薬品候補への汎用性が獲得できるかを検証すべきと考える。

我々が見いだした ABD 由来の部分配列は、GLP-1 のように安定性が著しく低いペプチドに対して、十数個のアミノ酸を付加する事で生体内安定化が実現できる事から、先行事例の Liraglutide のような脂肪酸付加といった合成面での工程を必要とせず、ペプチド合成のプロセスのみで対応できるため、その有用性は高くなると考えている。

引用・参考文献

1. 清野裕、南條輝志男、田嶋尚子、門脇孝、柏木厚典、荒木栄一、伊藤千賀子、稲垣暢也、岩本安彦、春日雅人、花房俊昭、羽田勝計、植木浩二郎、「糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告（国際標準化対応版）」、日本糖尿病学会、2010年
2. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.*, **414**, 782-787 (2001).
3. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.*, **14**, 88-98 (2018)
4. Unnikrishnan R, Pradeepa R, Joshi SR, Mohan V. Type 2 Diabetes: Demystifying the Global Epidemic. *Diabetes.*, **66**, 1432-1442 (2017)
5. Chen X, Yang W. Epidemic trend of diabetes in China. *J Diabetes Invest.*, **5**, 478-481 (2014)
6. Seino Y, Kuwata H, Yabe D. Incretin-based drugs for type 2 diabetes: focus on East Asian perspectives. *J Diabetes Invest.*, **7 Suppl 1**, 102-109 (2016)
7. 平成 28 年「国民健康・栄養調査報告」、厚生労働省、平成 29 年 12 月
8. Seino Y, Kurahachi H, Goto Y, Taminato T, Ikeda M, Imura H. Comparative insulinogenic effects of glucose, arginine and glucagon in patients with diabetes mellitus, endocrine disorders and liver disease. *Acta Diabetol Lat.*, **12**, 89-99 (1975)
9. Kodama K, Tojjar D, Yamada S, Toda K, Patel CJ, Butte AJ. Ethnic Differences in the Relationship Between Insulin Sensitivity and Insulin Response : a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.*, **36**, 1789-1796 (2013)
10. 日本糖尿病学会編集、糖尿病治療ガイド 2010、文光堂 2010
11. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umemoto M, Weykamp C. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). *Clin Chem Lab Med.*, **40**, 78-89 (2002).
12. Mosca A, Goodall I, Hoshino T, Jeppsson JO, John WG, Little RR, Miedema K, Myers GL, Reinauer H, Sacks DB, Weykamp CW. Global standardization of glycated hemoglobin measurement: the position of the IFCC Working Group. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine., IFCC Scientific Division, *Clin Chem Lab Med.*, **45**, 1077-1080 (2007)
13. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.*, **12**, 405-412 (2000).
14. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care.*, **22**, 920-924 (1999).
15. 日本糖尿病学会編集、科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン、南江堂、2013
16. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.*, **3**, 153-165 (2006).
17. Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, Singru PS, Nilsson KP, Simon R, Schubert D, Eisenberg D, Rivier J, Sawchenko P, Vale W, Riek R. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science.*, **325**, 328-332 (2009).
18. Poon S, Birkett NR, Fowler SB, Luisi BF, Dobson CM, Zurdo J. Amyloidogenicity and aggregate cytotoxicity of human glucagon-like peptide-1 (hGLP-1) *Protein Pept. Lett.*, **16**, 1548-1556 (2009).
19. Reimann F, Williams L, da Silva Xavier G, Rutter GA, Gribble FM. Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia.*, **47**, 1592-1601 (2004).
20. Reimann F, Williams L, da Silva Xavier G, Rutter GA, Gribble FM. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab.*, **8**, 532-539 (2008)

21. Oya M, Kitaguchi T, Pais R, Reimann F, Gribble F, Tsuboi T. The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 4513-4521 (2013).
22. Xiong Y, Swaminath G, Cao Q, Yang L, Guo Q, Salomonis H, Lu J, Houze JB, Dransfield PJ, Wang Y, Liu JJ, Wong S, Schwandner R, Steger F, Baribault H, Liu L, Coberly S, Miao L, Zhang J, Lin DC, Schwarz M. Activation of FFA1 mediates GLP-1 secretion in mice. Evidence for allosterism at FFA1. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **369**, 119-129 (2013)
23. Sheikh A. Direct cardiovascular effects of glucagon like peptide-1. *Diabetol Metab Syndr.*, **5**, 47 (2013).
24. Madsen K, Knudsen LB, Agersoe H, Nielsen PF, Thøgersen H, Wilken M, Johansen NL. Structure-activity and protraction relationship of long-acting glucagon-like peptide-1 derivatives: importance of fatty acid length, polarity, and bulkiness, *J. Med. Chem.*, **50**, 6126-6132 (2007)
25. Lau J, Bloch P, Schäffer L, Pettersson I, Spetzler J, Kofoed J, Madsen K, Knudsen LB, McGuire J, Steensgaard DB, Strauss HM, Gram DX, Knudsen SM, Nielsen FS, Thygesen P, Reedtz-Runge S, Kruse T. Discovery of the once-weekly glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue semaglutide, *J. Med. Chem.*, **58**, 7370-7380 (2015).
26. Lorenz M, Evers A, Wagner M. Recent progress and future options in the development of GLP-1 receptor agonists for the treatment of diabetes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 4011-4018 (2013).
27. Nuffer WA, Trujillo JM. Liraglutide: A New Option for the Treatment of Obesity. *Pharmacotherapy.*, **35**, 926-934 (2015).
28. L. Di, Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *AAPS J.*, **17**, 134-143 (2015).
29. Arvedson T, O'Kelly J, Yang BB. Design rationale and development approach for pegfilgrastim as a long-acting granulocyte colony-stimulating factor. *BioDrugs.*, **29**, 185-198 (2015).
30. Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. Pasireotide A novel treatment for patients with acromegaly. *Drug Des. Dev. Ther.*, **10**, 227-239 (2016).
31. Brønden A, Knop FK, Christensen MB. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of albiglutide. *Clin. Pharmacokinet.*, **56**, 719-731 (2017).
32. Courtney H, Nayar R, Rajeswaran C, Jandhyala R. Long-term management of type 2 diabetes with glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **10**, 79-87 (2017).
33. Johansson MU, Frick IM, Nilsson H, Kraulis PJ, Hober S, Jonasson P, Linhult M, Nygren PA, Uhlén M, Björck L, Drakenberg T, Forsén S, Wikström M. Structure, specificity, and mode of interaction for bacterial albumin-binding modules. *J Biol Chem.*, **277**, 8114-8120 (2002).
34. Kraulis PJ, Jonasson P, Nygren PA, Uhlén M, Jendeborg L, Nilsson B, Kördel J. The serum albumin-binding domain of streptococcal protein G is a three-helical bundle: a heteronuclear NMR study. *FEBS Lett.*, **378**, 190-194 (1996).
35. Lejon S, Frick IM, Björck L, Wikström M, Svensson S. Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin. *J Biol Chem.* **279**, 42924-42928 (2004)
36. Cramer JF, Nordberg PA, Hajdu J, Lejon S. Crystal structure of a bacterial albumin-binding domain at 1.4 Å resolution. *FEBS Lett.*, **581**, 3178-3182 (2007).
37. Wilmen A, Göke B, Göke R. The isolated N-terminal extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 (GLP)-1 receptor has intrinsic binding activity. *FEBS Lett.*, **398**, 43-47 (1996).
38. Tojo A, Kinugasa S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int. J. Nephrol.*, ID 481520 (2012).
39. Moeller MJ, Tenten V. Renal albumin filtration: alternative models to the standard physical barriers. *Nat. Rev. Nephrol.*, **9**, 266-277 (2013).
40. Dickson LE, Wagner MC, Sandoval RM, Molitoris BA. The proximal tubule and albuminuria: really!, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **25** 443-453 (2014).

41. Sand KM, Bern M, Nilsen J, Noordzij HT, Sandlie I, Andersen JT. Unraveling the interaction between FcRn and albumin: opportunities for design of albuminbased therapeutics. *Front. Immunol.*, **5** (article 682) (2015).
42. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide glucagon-like peptide-1 (7-36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.*, **214**, 829-835 (1993).
43. Deacon CF, Knudsen LB, Madsen K, Wiberg FC, Jacobsen O, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia* , **41** 271-278 (1998).
44. Andersen JT, Pehrson R, Tolmachev V, Daba MB, Abrahmsén L, Ekblad C. Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain. *J. Biol. Chem.*, **286**, 5234-5241 (2011).
45. Jonsson A, Dogan J, Herne N, Abrahmsén L, Nygren PA. Engineering of a femtomolar affinity binding protein to human serum albumin. *Protein Eng. Des. Sel.* **21**, 515-527 (2008).
46. Levy OE, Jodka CM, Ren SS, Mamedova L, Sharma A, Samant M, D'Souza LJ, Soares CJ, Yuskina DR, Jin LJ, Parkes DG, Tatarkiewicz K, Ghosh SS. Novel exenatide analogs with peptidic albumin binding domains: potent anti-diabetic agents with extended duration of action. *PLoS One.*, **9**, e87704 (2014).
47. Hupe-Sodmann K, McGregor GP, Bridenbaugh R, Göke R, Göke B, Thole H, Zimmermann B, Voigt K. Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1 (7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regul. Pept.*, **58**, 149-156 (1995).
48. Plamboeck A, Holst JJ, Carr RD, Deacon CF. Neutral endopeptidase 24.11 and dipeptidyl peptidase IV are both mediators of the degradation of glucagon-like peptide 1 in the anaesthetised pig. *Diabetologia.*, **48**, 1882-1890 (2005).
49. Steensgaard DB, Thomsen JK, Olsen HB, Knudsen LB. The molecular basis for the delayed absorption of the once-daily humanGLP-1 analogue, liraglutide. *Diabetes.*, **57** (Suppl. 1), A164 (2008).
50. Plum A, Jensen LB, Kristensen JB. In vitro protein binding of liraglutide in human plasma determined by reiterated stepwise equilibrium dialysis. *J Pharm Sci.*, **102**, 2882-2888 (2013).
51. Cole JL, Lary JW, P Moody T, Laue TM. Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. *Methods Cell Biol.*, **84**, 143-79 (2008).
52. 奥村保 溶着薄層クロマトグラフィーの薄層ゲルろ過法への応用、分析化学、**26**, 214-219 (1977).
53. Jha NN, Anoop A, Ranganathan S, Mohite GM, Padinhateeri R, Maji SK. Characterization of amyloid formation by glucagon-like peptides: role of basic residues in heparin-mediated aggregation. *Biochemistry.*, **52**, 8800-8810 (2013).
54. Zapadka KL, Becher FJ, Uddin S, Varley PG, Bishop S, Gomes Dos Santos AL, Jackson SE. A pH-induced switch in human glucagon-like peptide-1 aggregation kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 16259-16265 (2016).
55. Kaushik T, Yaqoob MM. Lessons learned from peginesatide in the treatment of anemia associated with chronic kidney disease in patients on dialysis. *Biologics.*, **7**, 243-246 (2013).
56. Penchala SC, Miller MR, Pal A, Dong J, Madadi NR, Xie J, Joo H, Tsai J, Batoon P, Samoshin V, Franz A, Cox T, Miles J, Chan WK, Park MS, Alhamadsheh MM. A biomimetic approach for enhancing the in vivo half-life of peptides. *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 793-798 (2015).
57. Haahr H, Heise T A review of the pharmacological properties of insulin degludec and their clinical relevance. *Clin Pharmacokinet.*, **53**, 787-800 (2014).
58. Nakai D, Kumamoto K, Sakikawa C, Kosaka T, Tokui T. Evaluation of the protein binding ratio of drugs by a micro-scale ultracentrifugation method. *J Pharm Sci.* **93**, 847-854 (2004).
59. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J.*, **78**, 1606-1619 (2000).

60. Akash MS, Rehman K, Chen S Goto-Kakizaki rats: its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* **9**, 387-396 (2013).
61. Hatanaka S, Kondoh M, Kawarabayashi K, Furuhashi K. The measurement of gastric emptying in conscious rats by monitoring serial changes in serum acetaminophen level. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, **31**, 161-165 (1994).
62. Nagami K, Matsumoto H, Maki E, Motegi K, Aoyagi K, Naruse S, Samura K, Losos GJ, Ikemoto F. Experimental methods for immunization and challenge in antigenicity studies in guinea pigs. *J Toxicol. Sci.*, **20**, 579-594 (1995).
63. Boxenbaum H. Interspecies pharmacokinetic scaling and the evolutionary-comparative paradigm. *Drug Metab Rev.*, **15**, 1071-121 (1984).
64. Steiner KE, Mouton SM, Williams PE, Lacy WW, Cherrington AD. Relative importance of first- and second-phase insulin secretion in glucose homeostasis in conscious dog. II. effects on gluconeogenesis. *Diabetes* , **35**, 776-784 (1986).
65. Bergstrom RW, Wahl PW, Leonetti DL, Fujimoto WY. Association of fasting glucose levels with a delayed secretion of insulin after oral glucose in subjects with glucose intolerance. *J Clin Endocrinol Metab.*, **71**, 1447-1453 (1990).
66. Byrne MM, Sturis J, Sobel RJ, Polonsky KS. Elevated plasma glucose 2 h postchallenge predicts defects in beta-cell function. *Am J Physiol.*, **270**, E572-E579 (1996).
67. Calanna S, Christensen M, Holst JJ, Laferrère B, Gluud LL, Vilsbøll T, Knop FK. Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies. *Diabetologia.*, **56**, 965-972 (2013).
68. Guo X-H. The value of short- and long-acting glucagon-like peptide-1 agonists in the management of type 2 diabetes mellitus: experience with exenatide. *Curr Med Res Opin.*, **32**, 61-76 (2016)
69. Ito D, Iuchi T, Kurihara S, Inoue I, Katayama S, Inukai K. Efficacy and clinical characteristics of liraglutide in Japanese patients with type 2 diabetes. *J Clin Med Res*, **7**, 694-699 (2015).
70. Seufert J, Gallwitz B. The extra-pancreatic effects of GLP-1 receptor agonists: a focus on the cardiovascular, gastrointestinal and central nervous systems. *Diabetes Obes Metab.*, **16**, 673-688 (2014).
71. Meier JJ, Kemmeries G, Holst JJ, Nauck MA. Erythromycin antagonizes the deceleration of gastric emptying by glucagon-like peptide 1 and unmasks its insulinotropic effect in healthy subjects. *Diabetes.*, **54**, 2212-2218 (2005).
72. Sanger GJ, Broad J, Andrews PL. The relationship between gastric motility and nausea: gastric prokinetic agents as treatments. *Eur J Pharmacol.*, **715**, 10-14 (2013).
73. Jelsing J, Vrang N, Hansen G, Raun K, Tang-Christensen M, Knudsen LB. Liraglutide: short-lived effect on gastric emptying - long lasting effects on body weight. *Diabetes Obes Metab.*, **14**, 531-538 (2012).
74. Nauck MA, Kemmeries G, Holst JJ, Meier JJ. Rapid tachyphylaxis of the glucagon-like peptide 1-induced deceleration of gastric emptying in humans. *Diabetes.*, **60**, 1561-1565 (2011).
75. ノボ・ノルディスク株式会社 ビクトーザ皮下注 18mg 申請資料概要
76. Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Ørskov C, Reedtz-Runge S, Kastrup P, Hvelplund A, Bardram L, Calatayud D, Knudsen LB. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology.*, **155**, 1280-90 (2014).
77. 田嶋嘉雄編集, 実験動物学各論, P12, 1972, 朝倉書店, 東京
78. Galtier P, Charpentier JL, Alvinerie M, Labouche C. The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metab Dispos.*, **7**, 429-434 (1979).

謝辞

本研究の遂行及び本学位論文をまとめるにあたりまして、多くの方々のご指導とご助力を賜りました。ここに厚くお礼申し上げます。

信州大学大学院総合医理工学研究科 真壁秀文教授には、ご多忙中にも関わらず、主査を引き受けていただきました。本論文の執筆において、丁寧かつ熱心なご指導を賜り、研究内容のまとめに関して、適切なお助言を頂きました。心より深く感謝申し上げます。

本論文を審査いただき、貴重なご指導とご助言をいただいた信州大学大学院総合医理工学研究科 藤井博教授、下里剛士教授、米倉真一准教授ならびに山形大学大学院理工学研究科 今野博行教授に、深く感謝申し上げます。

本論文は、株式会社 三和化学研究所で実施した研究をまとめたものであり、執筆の機会を与えていただいた取締役兼常務執行役員 研究開発本部長 野田倫博士ならびに研究開発の執行役員の皆様に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行、論文投稿及び本論文執筆にあたり、終始懇篤なる御指導、御鞭撻、激励を賜りました執行役員 ライセンス部長 渡邊信英博士に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、貴重なご助言や日常の議論を通じて多くの知識や示唆をいただいた岡本昌之博士、塚本桂博士、木下広志氏、重盛智大博士ならびに岡本隆司氏に深く感謝申し上げます。

本研究のペプチド合成と分析にご協力いただきました村瀬貴代博士、薬理評価にご協力いただきました山口悠氏ならびに薬物動態評価にご協力いただきました田村美由紀氏に深く感謝申し上げます。

本論文の執筆にご理解いただいた元上司の鈴木猛志博士および評価グループのメンバーに深く感謝申し上げます。

最後に、私の研究活動に常に理解を示し、様々な面で支えてくれた家族に心から感謝します。