

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06804

研究課題名(和文) SGLT2 阻害剤による重篤な皮膚障害の発症メカニズムの解明と予防/治療法の探索

研究課題名(英文) Serious skin and subcutaneous disorders caused by a sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, ipragliflozin

研究代表者

栄田 敏之 (Sakaeda, Toshiyuki)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00304098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病治療薬であるNa⁺/グルコース共輸送担体2(SGLT2)阻害剤については、ipragliflozinに特異的な重篤な皮膚障害が問題となっている。本研究では、ヒト正常皮膚角化細胞と繊維芽細胞からなる再構築モデルにおいて、ipragliflozin特異的にcytokine pathwayが変動することを見出した。角化細胞のみ、繊維芽細胞のみからなる系ではipragliflozin特有の現象を認めなかったことから、多様な細胞間のinteractionが重要であると推察できた。また、ipragliflozinに特異的な角化細胞への濃縮的な移行も見出し、これも関与しているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、SGLT2阻害剤の適正使用、具体的には、どのSGLT2阻害剤で重篤な皮膚障害が起こりやすいかに関して情報を提供し、糖尿病の治療における問題の解決の一助となるものであるが、将来的にも、医薬品による重篤な皮膚障害の発症メカニズムの解明並びに予防/治療方法の探索に有用な情報を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In Japan, sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors, which are used for the treatment of type 2 diabetes mellitus, have been reported to be associated with serious skin and subcutaneous disorders (SSSD). These events were suggested to be specific for the first inhibitor, ipragliflozin. This study was conducted to elucidate the mechanisms underlying the ipragliflozin-specific SSSD and establish its preventive or therapeutic strategies. Alteration of cytokine pathway by ipragliflozin was suggested in the 3-D human normal skin model consisting of fibroblasts and keratinocytes, but ipragliflozin-specific alterations were not found when fibroblasts or keratinocytes only, suggesting cell-to-cell interaction might be important for the ipragliflozin-specific SSSD. Additionally, concentrative uptake of ipragliflozin into keratinocytes was found in this study, possibly being an important factor, although the transporter remained unclear.

研究分野：医療薬学

キーワード：SGLT2阻害剤 重篤な皮膚障害 ipragliflozin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2014年4月、尿糖排泄促進作用を有する経口糖尿病治療薬である Na⁺/グルコース共輸送担体2 (SGLT2) 阻害剤の臨床使用が開始されたが、臨床使用開始直後から、重篤な低血糖、ケトアシドーシス、尿路・性器感染症、脱水・脳梗塞、皮膚障害等の報告が相次ぎ、現在もお、糖尿病治療に少なからず支障をきたしている。低血糖、ケトアシドーシスについては、その効能・効果から想定されるものである。また、尿路・性器感染症、脱水・脳梗塞についても、尿糖排泄促進、あるいは尿糖排泄促進に伴う浸透圧利尿で説明可能である。これらを踏まえて副作用対策が講じられているが、一方、重篤な皮膚障害に関しては、その発症メカニズムは不明であり、有用な予防/治療方法は確立されていない。

現在、計6種類のSGLT2阻害剤が上市されており、1年間の製造販売後の安全性調査の結果、皮膚障害は計1548件、そのうち重篤なものは計155件報告されている。重篤でない皮膚障害は6種類全てで報告されており、各々の市場規模を考慮すると、起こりやすさの点で薬剤間に差異はなく、同じメカニズム(例えば、脱水に伴うもの)で発症していると考えることが可能である。一方、重篤な皮膚障害はipragliflozinに特異的である。具体的には、計155件中146件がipragliflozinによるものである。このことから、SGLT2阻害剤の効能・効果から推定できる理由以外の理由で、重篤な皮膚障害を発症しているという仮説を立て、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

SGLT2阻害剤による重篤な皮膚障害の発症メカニズムの解明、並びに予防/治療方法の探索を目的とする。

3. 研究の方法

1) 医薬品の有害事象自発報告データベースの解析

1年間の製造販売後の安全性調査は、当該医薬品に関して、製造販売業者が実施するものであり、医薬品同志の比較には必ずしも適切でないと考えられた。よって、最初に、重篤な皮膚障害はipragliflozinが特異的であるか否かを知る目的で、(独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)が管理する医薬品の市販後安全性に関するデータベース the Japanese adverse drug event report (JADER)より、2004年第1四半期から2016年第4四半期のレコード計691,359件をダウンロードして解析に用いた。

JADERデータベースにある副作用が日米EU医薬品規制調和国際会議でまとめられた国際医薬用語集MedDRAで定義されていることから、スティーブンス・ジョンソン症候群、全身性皮疹、帯状疱疹、皮膚炎、皮膚壊死、皮膚障害、皮膚浮腫、薬剤性皮膚炎などのMedDRA-HLGT10014982「表皮および皮膚異常」に属する計77のいずれかの副作用が起こったレコードを重篤な皮膚障害が起こったレコードとして抽出した。なお、本研究ではMedDRA ver.19.1を利用した。一方、SGLT2阻害薬については、本邦にて使用可能な6剤、すなわち、ipragliflozin、dapagliflozin、tofogliflozin、luseogliflozin、canagliflozin、empagliflozinのいずれか1剤が投与されているレコードを抽出した。

解析にあたって、事前に、年齢に関する情報が欠損しているレコード、性別に関する情報が欠損しているレコード、2剤以上のSGLT2阻害薬が投与されているレコードの計30,444件を除外した。すなわち、計660,915件を解析に用いた。SGLT2阻害薬と重篤な皮膚障害との因果関係の解析にあたっては、最も検出感度が高いとされるシグナル検出指標であるreporting odd ratio (ROR)を用いた。年齢、性別の影響を考慮し、ロジスティック解析によりROR値を補正し、95%両側信頼区間の下限值が1を超える場合にシグナル検出(因果関係あり)とした。

2) SGLT2阻害剤のラット皮膚組織中濃度推移の検討

重篤な皮膚障害は全身性のものと局所性のものに大別されるが、局所性のものについては皮膚組織に存在する何らかの物質との相互作用を介して起こるとの仮説を立て、Wistar系雄性ラットを用いて、体内動態の比較を行った。具体的には、重篤な皮膚が起こるとされるipragliflozin、起こり難いとされるdapagliflozin、tofogliflozin、luseogliflozin、canagliflozinを臨床用量に相当する量で経口投与し、投与1、8、24時間後に、血液、皮膚、脳、心臓、小腸、腎臓を採取して、組織または臓器中濃度の血漿中濃度に対する比の比較を行った。また、得られた結果を用いて数理的な解析を行った。解析にあたっては、非線形最小二乗法プログラムPhoenix WinNonlin ver.6.3を用い、赤池情報量基準(AIC)、PKパラメーターの収束/発散、および実測値と推定値の乖離度合いを指標に、最適なモデルを探索した。

3) SGLT2阻害剤のラット皮膚組織間質液中濃度推移の検討

臨床用量に相当する量で経口投与し、投与 1、8、24 時間後に、皮膚組織間質液中濃度を測定した。皮膚組織間質液の採取にあたっては、直径 1.5cm の円形支持体上に 225 本の自己溶解性ニードルを配したマイクロニードルアレイチップを用いた。

4) in vitro 細胞培養系における生物学的な検討

ヒト正常皮膚角化細胞と繊維芽細胞から構成された再構築モデル (EFT-400、クラボウバイオメディカル (Mattek 社製)) を用いて、24 時間の preincubation 後、ipragliflozin 0.5 μ M、dapagliflozin 0.05 μ M、tofogliflozin 0.2 μ M で 120 時間曝露した。なお、これらの濃度はヒトに対する単回投与後の曝露量 (AUC) より算出した定常状態の平均血漿中濃度に相当する濃度である。曝露後の細胞より RNA を抽出して microarray 解析 (GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array、Affymetrix、クラボウに委託) を行い、その結果に基づいて、培地を用いて cytokine assay (Bio-Plex Pro ヒトケモカイン 40-Plex アッセイキット、BIO-RAD) を、また、anti-phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 抗体 (#9145、Cell Signaling Technology) を用いて免疫染色を行った。

続いて、ヒト正常皮膚角化細胞から構成された再構築モデル (EPI-200、クラボウバイオメディカル (Mattek 社製)) を用いて、24 時間の preincubation 後、ipragliflozin 5 μ M、dapagliflozin 0.5 μ M、tofogliflozin 1 μ M、canagliflozin 2.5 μ M、empagliflozin 1 μ M で 120 時間曝露した。なお、これらの濃度はヒトに対する単回投与後の最高血漿中濃度 C_{max} に相当する濃度である。曝露後の細胞、培地を用いて、microarray 解析 (Clariom S Array、Affymetrix、クラボウに委託) cytokine assay (Bio-Plex Pro ヒトケモカイン 40-Plex アッセイキット、BIO-RAD) を行った。

さらに、ヒト皮膚角化細胞株 HaCaT、ヒト皮膚線維芽細胞株 SY-TY を、常法に従い、単層培養系とし、ipragliflozin 0.5 μ M、dapagliflozin 0.05 μ M、tofogliflozin 0.2 μ M で 48 時間曝露して、リン酸化 STAT3 の変動を検討した。

5) in vitro 細胞培養系における薬物動態学的な検討

ヒト皮膚角化細胞株 HaCaT の単層培養系を用いた。24 well を用いて、 1×10^4 cells/well で播種、3 日間培養してコンフルエントとし、常法に従い、取り込み実験を行った。

4. 研究成果

1) 医薬品の有害事象自発報告データベースの解析

計 660,915 件のレコードのうち、2,673 件でいずれかの SGLT2 阻害薬が投与されていた。SGLT2 阻害薬以外の糖尿病治療薬が投与されていたレコードは計 42,901 件であった。また、重篤な皮膚障害を認めたレコードは計 44,977 件であった。Table 1 に解析結果を示した。

全医薬品との比較、糖尿病治療薬との比較のいずれの場合でも、SGLT2 阻害薬 6 剤のうち 95% 両側信頼区間の下限値が 1 を超えるものは ipragliflozin のみであった。

すなわち、ipragliflozin のみ重篤な皮膚障害を発症することが示された。なお、JADER データベースにおける ipragliflozin、dapagliflozin、tofogliflozin、luseogliflozin、canagliflozin、empagliflozin による重篤な皮膚障害の件数は、各々、159、15、2、10、7、2 件であり、これらが製薬企業による製造販売後 1 年間の安全性調査における件数、すなわち、146、5、1、3、0、0 件とほぼ同等であることから、1 年間の安全性調査の情報のほとんどが JADER データベースに登録されていることが推察できた。

2) SGLT2 阻害剤のラット皮膚組織中濃度推移の検討

Table 2 に SGLT2 阻害剤のラット皮膚組織中濃度 / 血漿中濃度比の時間推移を示した。重篤な皮膚が起るとされる ipragliflozin の場合、で、各々、 0.45 ± 0.20 (\pm SD)、 2.15 ± 2.55 、 5.82 ± 3.66 であり、経時的に上昇することが示された。血漿中濃度が低下しても、それに対応する形で皮膚組織中濃度が低下しないことを意味しており、皮膚組織中に滞留しているために起こる、と推察された。なお、その他の SGLT2 阻害剤では同様の現象は認められなかった。よって、皮膚組織中における滞留は ipragliflozin に特有であると考えられた。Table 2 にあるデータを用いて数理的解析を行った結果、ipragliflozin の皮膚組織中濃度推移は、皮膚組織

Table 1. Adjusted reporting odds ratio of SGLT2 inhibitors for serious skin and subcutaneous tissue disorders

	Drugs other than SGLT2 inhibitors	T2DM drugs other than SGLT2 inhibitors
Ipragliflozin	1.667 (1.415, 1.963)	2.395 (2.019, 2.840)
Dapagliflozin	0.514 (0.317, 0.835)	0.703 (0.432, 1.144)
Tofogliflozin	0.149 (0.048, 0.465)	0.200 (0.064, 0.623)
Luseogliflozin	0.624 (0.331, 1.177)	0.843 (0.447, 1.592)
Canagliflozin	0.590 (0.277, 1.257)	0.792 (0.371, 1.690)
Empagliflozin	0.293 (0.073, 1.187)	0.398 (0.098, 1.617)

The reference was drugs or T2DM drugs other than SGLT2 inhibitors.
The reporting odds ratio was adjusted by logistic regression analysis and shown with 95% confidence limit in the parentheses.

中に deep compartment を設定することで回帰できることが示された。

全ての SGLT2 阻害剤で、脳中濃度 / 血漿中濃度比、心臓中濃度 / 血漿中濃度比、小腸中濃度 / 血漿中濃度比の経時的な上昇は認められなかった (data not shown)。一方、腎臓中濃度 / 血漿中濃度比は、全ての SGLT2 阻害剤で経時的に上昇した (data not shown)。SGLT2 阻害剤の標的である SGLT2 は腎臓の近位尿細管に発現しており、SGLT2 への結合を介して薬効を発揮することから、ipragliflozin が皮膚組織中に存在する何らかの物質と相互作用する、あるいは ipragliflozin が皮膚組織中へ濃縮的に移行し、その結果、重篤な皮膚障害を引き起こすものと考えられた。

Table 2. SGLT2 inhibitor concentrations in skin tissue (ng/g) in rats

	1 h	8 h	24 h
Ipragliflozin	151.7 ± 53.4 (0.45 ± 0.20)	168.2 ± 28.7 (2.15 ± 2.55)	90.6 ± 38.9 (5.82 ± 3.66) *
Dapagliflozin	42.6 ± 24.7 (0.74 ± 0.30)	13.0 ± 5.0 (0.20 ± 0.05) *	ND (-)
Tofogliflozin	103.4 ± 29.2 (0.59 ± 0.16)	27.1 ± 3.2 * (0.77 ± 0.21)	- a) (-) ^{a)}
Luseogliflozin	ND (-)	ND (-) ^{b)}	ND (-) ^{b)}
Canagliflozin	37.0 ± 18.5 (0.18 ± 0.18)	82.6 ± 22.9 (0.17 ± 0.03)	20.1 ± 11.6 (0.26 ± 0.20)

The values are mean ± SD of the concentrations with their ratios to plasma concentrations in the parentheses.

* P < 0.05, compared with the data at 1hr.

ND: below the limit of detection.

a) The data included 1 or more data of ND.

b) The plasma concentration was below the limit of detection.

3) SGLT2 阻害剤のラット皮膚組織間質液中濃度推移の検討

全ての SGLT2 阻害剤で、皮膚組織間質中濃度 / 血漿中濃度比は、一定であった。具体的には、ipragliflozin で 0.09-0.14、dapagliflozin で 0.09-0.15、tofogliflozin で 0.18-0.28、canagliflozin で 0.05-0.11 であった。なお、luseogliflozin は血漿中濃度濃度、皮膚組織中濃度とも検出限界未満であった。以上のことから、血漿中と皮膚組織間質液中の間の濃度平衡は速やかに達するものと考えられた。また、これらの値は皮膚組織中濃度 / 血漿中濃度比 (Table 2) より低く、Table 2 にある皮膚組織濃度は皮膚組織の実質細胞における濃度を反映しているものと考えられた。

4) in vitro 細胞培養系における生物学的な検討

ヒト正常皮膚角化細胞と繊維芽細胞から構成された再構築モデルの microarray 解析の結果、ipragliflozin でのみ発現量が上昇する 15 genes、ipragliflozin でのみ発現量が低下する 16 genes が示唆された。発現量の変動に基づいた pathway 解析の結果、cytokine pathway が変動すること、具体的には、Src ファミリーキナーゼの 1 つである Lyn、および細胞増殖 / 分化に関わる STAT3 の mRNA レベルが上昇することが示唆された。また、培地を用いた cytokine assay にて、いくつかの cytokine の分泌が ipragliflozin により変動することが示された。しかしながら、この現象は ipragliflozin に特有ではなかった。また、免疫染色によって、ipragliflozin によりリン酸化 STAT3 が増加することが示唆されたが、有意な増加ではなく、かつ ipragliflozin に特有ではなかった。続いて、ヒト正常皮膚角化細胞から構成された再構築モデルでも同様の検討を行ったが、ipragliflozin に特有の現象は見出せなかった。さらに、ヒト皮膚角化細胞株、ヒト皮膚線維芽細胞株の単層培養系でも、ipragliflozin に特有の現象は見出せなかった。

5) in vitro 細胞培養系における薬物動態学的な検討

in vitro 細胞培養系における生物学的な検討から、ipragliflozin により、cytokine pathway が変動することが示唆されたが、培地を用いた cytokine assay および免疫染色で確認できなかった。その原因の 1 つとして、生物学的な検討における SGLT2 阻害剤の曝露濃度が低すぎることが懸念された。すなわち、ipragliflozin に特有の何らかの輸送系が存在するのであれば、ipragliflozin のみ、濃縮的な細胞内移行を介して、より高濃度な条件下で反応が進む可能性が考えられた。そこで、HaCaT 細胞の単層培養系を用いて、取り込み実験を行った。

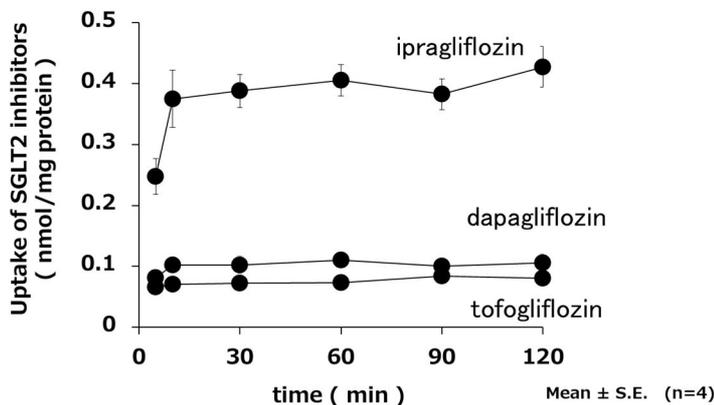


Figure 1 Uptake of SGLT2 inhibitors in HaCaT cell

Figure 1 に ipragliflozin、dapagliflozin、tofogliflozin の HaCaT 細胞への取り込み - 時間推移を示した。なお、いずれの SGLT2 阻害薬も 2 μ M で添加した。いずれも速やかに取り込まれたが、dapagliflozin、tofogliflozin と比べて、ipragliflozin の細胞内濃度が高かった。

SGLT2 阻害薬の取り込みへの能動的輸送経路の関与を明らかにする目的で同様の実験を 4 で行った。Ipragliflozin の場合、37 と比べて、4 で取り込みは大きく減少した。一方、dapagliflozin、tofogliflozin の取り込みは変化しなかった。このことから、ipragliflozin の細胞内取り込みにおける能動的輸送経路の関与が示唆された。続いて、能動的輸送経路を同定するために、細胞外の Na⁺ を K⁺ に置換して同様の実験を行ったが、取り込みは変化しなかった。すなわち、内向きのナトリウム勾配を駆動力にしないことが示された。

6) まとめ

ヒト正常皮膚角化細胞と繊維芽細胞から構成された再構築モデルにおける生物学的な検討から、ipragliflozin により、cytokine pathway が変動することが示唆されたが、培地を用いた cytokine assay および免疫染色で確認できなかった。また、ヒト正常皮膚角化細胞のみ、ヒト繊維芽細胞のみからなる系では ipragliflozin 特有の現象は見いだせなかった。これらのことから、ipragliflozin に特異的な重篤な皮膚障害には、皮膚組織における多様な細胞間の interaction を介した細胞内の cytokine pathway の変動が関与しているものと推察できた。また、一方で、ipragliflozin に特異的な皮膚角化細胞への濃縮的な移行が少なからず関与しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakaeda Toshiyuki, Kobuchi Shinji, Yoshioka Ryosuke, Haruna Mariko, Takahata Noriko, Ito Yukako, Sugano Aki, Fukuzawa Kazuki, Hayase Toshiki, Hayakawa Taro, Nakayama Hideo, Takaoka Yutaka, Tohkin Masahiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Susceptibility to serious skin and subcutaneous tissue disorders and skin tissue distribution of sodium-dependent glucose co-transporter type 2 (SGLT2) inhibitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 937 ~ 943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.22224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 足立任、今村悠太、桑津明子、山口玲奈、河淵真治、伊藤由佳子、栄田敏之
2. 発表標題 2型糖尿病モデルラットにおけるSGLT2阻害薬canagliflozinの体内動態と血糖降下作用との関係
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村悠太、足立任、桑津明子、山口玲奈、河淵真治、伊藤由佳子、栄田敏之
2. 発表標題 2型糖尿病モデルラットにおけるSGLT2阻害薬tofogliflozinの体内動態と血糖降下作用との関係
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山英人、豊田凌大、鈴木悠実、松尾直弥、河淵真治、伊藤由佳子、栄田敏之
2. 発表標題 ラットにおけるSGLT2阻害剤の血漿中濃度および臓器、皮膚組織中濃度推移の比較
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会（神戸）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田凌大、片山英人、鈴木悠実、松尾直弥、河淵真治、山本和宏、伊藤由佳子、矢野育子、栄田敏之
2. 発表標題 SGLT2阻害剤の皮膚障害に関する研究 ラット体内動態データの薬物動態学的解析とマイクロアレイ解析
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会（神戸）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越智章展、森克仁、河淵真治、上殿英記、角谷佳則、山崎祐子、森岡与明、塩井淳、庄司哲雄、絵本正憲、栄田敏之、稲葉雅章
2. 発表標題 SGLT2阻害薬の糖新生に対する肝での直接作用
3. 学会等名 第31回分子糖尿病学シンポジウム（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栄田敏之
2. 発表標題 SGLT2阻害薬による重篤な皮膚障害と皮膚組織への移行性
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会（つくば）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口玲奈、桑津明子、今村悠太、足立任、河淵真治、伊藤由佳子、栄田敏之
2. 発表標題 2型糖尿病モデルラットにおけるSGLT2阻害薬ipragliflozinの血漿中濃度と血糖値との関係
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会（兵庫）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑津明子、山口玲奈、今村悠太、足立任、河瀬真治、伊藤由佳子、栄田敏之
2. 発表標題 2型糖尿病モデルラットにおけるSGLT2阻害薬canagliflozinの血漿中濃度と血糖値との関係
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会（兵庫）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西口 工司 (Nishiguchi Kohshi) (80379437)	京都薬科大学・薬学部・教授 (34306)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------