

平成30年6月1日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18917

研究課題名(和文)薬動学的解析に基づくインスリン分泌促進薬の薬剤選択法および薬物投与設計法の構築

研究課題名(英文) Methods for drug selection and decision of drug administration design of insulin secretagogue based on PK/PD analysis

研究代表者

荒木 拓也 (Araki, Takuya)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00568248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン分泌促進薬の薬効に関する個人差および薬剤抵抗性に着目し、その要因を探索するとともに、薬剤選択法および薬物療法設計法について検討した。

薬剤抵抗性の要因としては、LDLの細胞内蓄積による膵細胞のアポトーシスが知られている。LDLの取り込みに関与するLDLRやPCSK9の動態に与える薬剤の影響を解析した結果、一定条件下ではPCSK9分泌量が上昇するが、臨床的条件下では影響は小さいことが確認された。個人差の要因解明として各種成分の生体内濃度の分析法を構築し、インクレチン分泌能との関係について検討したが、最適なモデルの構築には至っておらず、血液中成分の網羅的分析について検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：To develop methods to select insulin secretagogue for individual patients and decide its administration protocol, I focused on individual differences and drug resistance concerning the efficacy of insulin secretagogue, and investigated the factors of individual differences of drug efficacy and establishment of drug resistance. As a factor of drug resistance, apoptosis of pancreatic cells due to intracellular accumulation of LDL have been reported by some studies.

In this study, the influence of insulin secretagogue on the kinetics of low density lipoprotein (LDL) and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) was analyzed, and PCSK9 secretion was found to increase under certain conditions with some insulin secretagogue. On the other hand, it was also confirmed that the influence was vanishingly small under clinical conditions.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

多くの血糖降下薬の開発により、強力な血糖コントロールが可能となったが、その一方で薬効の個人差や薬剤抵抗性の発現が臨床上の問題となっている。強力な血糖降下作用を有する薬の一つとして、sulfonylurea (SU) 薬が広く使われており、SU 薬は血糖降下作用のみならず、高血糖と併せて大血管障害の発現要因となる血中 Low density Lipoprotein Cholesterol (LDL) に対する低下作用を有することもその大きな特徴の一つとして知られている。しかし、SU 薬も他の血糖降下薬同様に薬物抵抗性の存在が知られており、特に後天的に生じる 2 次無効が大きな問題とされている。SU 薬による 2 次無効は、膵細胞のアポトーシスに伴うインスリン分泌能低下が大きな要因の一つとして考えられているが、その機序は明らかにされていない。

近年、LDL の取り込みに関わる LDL 受容体 (LDLR) が細胞の細胞膜上で増加した場合、細胞内に LDL が蓄積し、細胞がアポトーシスすることが報告されている。さらに、Proprotein convertase subtilisin /kexin type 9 (PCSK9) の発現低下により、肝細胞の LDLR の分解速度が抑制され、LDL の取り込みが亢進することや、PCSK9 ノックアウトマウスにおいて、細胞における LDLR 発現量が上昇し、それに伴い細胞のアポトーシスが増加し、インスリン分泌低下と血糖上昇をもたらしたことも報告されている。これらの報告から、SU 薬の 2 次無効の要因の一つとして、細胞内への LDL の取り込み量の変動が関係している可能性が考えられた。そこで、本研究では、SU 薬が細胞内 LDL 量の変動に与える影響に焦点を当て、SU 薬の 2 次無効の要因を探索することとした。

また、近年新たな作用機序を有するインスリン分泌促進薬として dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬が開発され、他

のインスリン分泌促進薬に対する抵抗性を認めた患者に対する治療の幅が広がってきたが、DPP-4 阻害薬についても例外ではなく、その薬効発現の個人差や抵抗性発現などが問題になっている。DPP-4 阻害薬は、競合的かつ可逆的に DPP-4 を阻害することから、その薬効は血中 DPP-4 濃度と DPP-4 阻害薬の濃度比によって決定されることが考えられるが、DPP-4 阻害薬の効果や抵抗性発現に影響を与える因子については十分に検討されておらず、DPP-4 阻害薬投与からインクレチンの作用発現までのプロセスにおける個人差についても十分な検討はなされていない。そこで、本研究では DPP-4 阻害薬投与からインクレチンが作用するまでのプロセスを詳細に評価し、薬効の個人差および薬物抵抗性発現に関する要因の探索を行うことで、患者ごとに最適なインスリン分泌促進薬の投与設計法を検討することとした。

## 2. 研究の目的

本研究は SU 薬が膵細胞内 LDL 濃度変動に与える影響を評価するとともに、各種 SU 薬曝露による膵細胞内のタンパク質発現量の変動を解析することで、SU 薬に対する抵抗性発現機構ならびに薬効の個人差の要因を解明することとした。また、DPP-4 阻害薬の薬効に関する個人差および抵抗性発現要因を解明するために、DPP-4 阻害薬投与からインクレチンの作用発現までのプロセスを細分化し、各プロセスに関するタンパク質変動等を評価する。これにより、各要因の変動をモデル化することで DPP-4 阻害薬の薬効を数理モデル化し、患者ごとに適した投与設計法を検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) SU薬に対する抵抗性発現機構の検討

SU薬が細胞内LDL濃度に与える影響について評価するために、*in vitro* study を実施した。SU薬としては、2次無効を生じるリスクが高いと報告されている glibenclamide および glimepiride、および2次無効を生じ難いとされる gliclazide を用い、HMG-CoA還元酵素阻害薬である atorvastatin を LDL-R および PCSK9 発現量に影響を与える positive control として用いた。なお、細胞株には膵細胞およびPCSK9を主に分泌する肝細胞の2つを用いた。

評価項目は細胞内および細胞膜上の LDL-R 量および細胞内、細胞膜上および培地中に分泌された PCSK9 量とし、LDL-R 量は Western blotting 法により、PCSK9 量は ELISA 法により分析した。各 SU薬を曝露した際の曝露濃度とこれらの値の変化の関係を評価するとともに、曝露時間との関係性を評価した。

また、LDL 以外の要因を探索するために、各 SU薬を曝露した後の細胞を回収し、TOF-MS を用いた網羅的プロテオーム解析手法を用いて細胞内タンパク質を解析した。その後、2次無効発現低リスク薬 (glibenclamide および glimepiride) もしくは高リスク薬 (gliclazide) のどちらかのみを高発現しているタンパク質を主成分分析により探索し、SU薬の曝露濃度と関連する因子を検索することで、SU薬に対する2次的抵抗性発現機構について、LDLの動態関連以外の関与を検討した。

#### (2) DPP-4 阻害薬の薬効に関する個人差および抵抗性発現要因の探索

本検討に必要な分析条件の構築として、各種 DPP-4 阻害薬および DPP-4 の生体内濃度分析法を構築した。分析には LC/MS/MS 法を用いた。インスリンおよび GLP-1 の濃度分析並

びに DPP-4 活性測定には ELISA 法を用いた。DPP-4 阻害薬は DPP-4 に対して競合的かつ可逆的に作用することから、DPP-4 活性は両者の濃度比によって決定されると考えられたため、複数名の血液サンプルに対して各種 DPP-4 阻害薬を様々な濃度で添加し、添加した DPP-4 阻害薬の濃度および血液サンプル中 DPP-4 濃度と DPP-4 活性の関係性を評価した。

同様に、複数名の血液サンプルに対して各種 DPP-4 阻害薬を様々な濃度で添加し、30分～2時間反応させた後に、添加した DPP-4 阻害薬の濃度および血液サンプル中 DPP-4 濃度と DPP-4 活性の関係性を解析するとともに、血液サンプル中インクレチン濃度の DPP-4 阻害薬添加前からの変動量を評価した。

インクレチン曝露によるインスリン分泌に関する解析には膵細胞を用い、インクレチン曝露濃度を変動させた際のインスリン分泌量を評価した。なお、培地中グルコース濃度や培地の組成などの影響を評価するために、複数の培地ならびにグルコース濃度での評価を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) SU薬に対する抵抗性発現機構の検討

*in vitro* study において、試験薬の調整方法 (有機溶媒の使用など) や曝露条件 (同時曝露薬の種類など)、曝露濃度などを特定の条件にした場合、glibenclamide もしくは glimepiride を曝露した際に、細胞内 LDLR 発現量および PCSK9 発現量が大きく変動したが、臨床において発生しうる条件下においては細胞内 LDLR および PCSK9 の発現量はともに変動しなかった。また、細胞を破碎したのちに、細胞膜画分および細胞質画分に分離して各分画中の LDLR および PCSK9 の変動を解析したが、いずれも変動は見られなかった。培地中への PCSK9 の分泌量については、

gliclazide 曝露に比べて glimepiride 曝露によって上昇したが、分泌量のバラツキが大きく、有意差は認められなかった。

以上のことから、SU 薬による 2 次無効発現機構は少なくとも LDLR の発現量変動を介する肝細胞への LDL の取り込み過剰によるものではないことが示唆された。

なお、実験に供した細胞から抽出したタンパク質を網羅的に解析し、発現量が PCSK9 分泌量と相関するタンパク質を探索することで、PCSK9 分泌量に影響を与える要因を検索中である。

同様に、各 SU 薬を曝露した後の細胞を対象とした、網羅的プロテオーム解析手法を用いた SU 薬に対する 2 次的抵抗性発現要因の探索としては、2 次無効発現低リスク薬 (glibenclamide および glimepiride) もしくは高リスク薬 (gliclazide) のいずれかのみの特異的に認められる成分ピークを複数検出した。現在までに、インスリン生成時に関与する C-peptide が SU 薬の 2 次無効のマーカーとして使用できる可能性を確認しているが、C-peptide の濃度と SU 薬の効果の直接的な関係性については評価できておらず、SU 薬の効果に関係する、もしくは 2 次無効の発現要因になりうるタンパク質の同定には至っていない。

これらの結果については、詳細が判明し次第、論文発表の形で報告する予定である。

## (2) DPP-4 阻害薬の薬効に関する個人差および抵抗性発現要因の探索

本研究により、生体サンプル中の各種 DPP-4 阻害薬濃度および DPP-4 濃度の分析法が構築された。また、ex vivo 実験において、インクレチンの分解速度は DPP-4 阻害薬および DPP-4 の濃度比によって十分に説明できる可能性が示された。本結果については、臨床検体を用いた検証実験を実施する予定である。一方、インクレチン刺激によるインスリ

ン分泌に関する濃度 作用関係については評価できたものの、インクレチン濃度の時間変化を考慮したインスリン分泌量の適切な予測モデルの構築には至っていない。また、インクレチン刺激によるインスリン分泌の速度等は培地条件等によって大きく異なることが示されたことから、インクレチン刺激によるインスリン分泌をモデル化するためには、さらに詳細なインスリン分泌に影響を与える要因解明が必要であると考えられた。

以上、DPP-4 阻害薬によるインクレチン作用の増強効果については DPP-4 阻害薬および DPP-4 の血液中濃度比によって十分説明できる可能性が認められたことから、今後、DPP-4 濃度解析に基づく DPP-4 阻害薬投与設計法について検討する。得られた結果については論文発表によって報告する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

荒木 拓也 (ARAKI, Takuya)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00568248

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )