

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：34428
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590051
 研究課題名（和文）糖鎖を導入した高分子複合体の消化管膜機能制御に基づく糖尿病治療戦略の構築
 研究課題名（英文） Manipulation of gastrointestinal functions by polymeric conjugates bearing glucosides, oral anti-diabetic drugs
 研究代表者
 佐久間 信至（SAKUMA SHINJI）
 摂南大学・薬学部・教授
 研究者番号：80388644

研究成果の概要（和文）：経口投与された糖質は、消化酵素により単糖に分解された後、小腸膜上に局在する Na⁺/糖共輸送体（SGLT1）を介して能動的に吸収される。さらに糖質は、小腸に存在する L 細胞を刺激し、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）の血中への分泌、GLP-1 による膵臓 β 細胞の刺激を介して糖依存性のインスリン分泌を促進する。我々は、配糖体を側鎖に持つ高分子複合体を合成し、その SGLT1 阻害作用と GLP-1 分泌促進作用の有無を検証した。その結果、末端にカルボキシル基を持つポリアミドアミン dendrimer にアルブチンを結合させた複合体は、両作用を併せ持つ新しいタイプの経口抗糖尿病薬のシーズとなる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Carbohydrates in the human diet are hydrolyzed by digestive enzymes in the gastrointestinal tract. The resulting monosaccharides, such as glucose, are absorbed from the small intestine via influx hexose transporters, mainly sodium-dependent Na⁺/glucose cotransporters (SGLT1). Carbohydrates also induce the secretion of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) from intestinal L cells. Insulin secretion is subsequently enhanced by GLP-1 because this peptide stimulates β cells in pancreas. Polymeric conjugates bearing glucosides were synthesized and their abilities for SGLT1 inhibition and induction of GLP-1 secretion were examined. We successfully proved that carboxyl group-terminated polyamidoamine dendrimers bearing arbutin was a potential candidate as oral anti-diabetic drugs having above-mentioned abilities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：高分子複合体、配糖体、糖尿病、ヘキソーストランスポーター、インクレチン

1. 研究開始当初の背景

薬物の体内動態や物性を改善する、あるいはオリジナル薬物が持たない特性を付与することを目的として、薬物-高分子複合体に

関する様々な研究が行われている。代表的な研究は、生分解性のペプチドスペーサーを介して抗癌剤を高分子に結合させた複合体に関する研究であり、血管内に投与された複合

体が腫瘍部位にデリバリーされた後、スペーサーの分解に伴って放出された抗癌剤が抗腫瘍効果を示す。主だった研究が注射薬を想定して行われている中、我々は、経口薬としての複合体の有用性を検討している。

経口投与された複合体は、高分子量であるため、消化管から吸収されず、全身循環血へ移行しない。そのため、その適用範囲は制限されるが、従来の低分子薬物に比べ、循環血中へ移行しない複合体は、安全性に優れ、複数の薬物を服用したときの薬物相互作用の少ないことが期待される。生涯に渡って薬物を服用し、併用薬も多い生活習慣病の治療薬の創薬戦略として、複合体技術は有用と考えられる。このことを背景に、我々は、「非吸収性の薬物-高分子複合体を用いて、消化管膜の機能を制御し、それ自体は全身循環血へ移行することなく、全身性疾患を治療する」、新しい創薬戦略の構築を目指している。

この創薬戦略構築の可能性を実証するため、我々は、糖尿病に着目して研究を開始した。糖尿病とは、インスリン分泌の低下やインスリン抵抗性により血糖異常が生じる代謝性疾患である。発症すると治療することはなく、放置すると網膜症、腎症等の合併症を引き起こす。また、脳卒中、虚血性心疾患等の心血管疾患の発症、進展も促進する。糖尿病が強く疑われる本邦の患者数（2006年）は約800万人で、予備軍を含めると2000万人弱と言われている。医療経済的にも大きな負担であり、高齢化社会になるにつれて深刻化すると考えられる。糖尿病は1型と2型に分類される。生活習慣病の后者は、遺伝及び環境因子が複雑に組み合わさって発症する多因子性疾患であり、糖尿病患者の9割以上に相当する。糖尿病の治療では、薬物療法等により、空腹時血糖を下げ、食後の過血糖を抑制することが重要であることが臨床的に証明されている。

経口投与された糖質は、図1に示すように、アミラーゼによって二糖類に分解された後、 α -グルコシダーゼによってグルコースに代表される単糖類に分解される。グルコースは、 Na^+ /glucose cotransporter 1 (SGLT1) に代表される小腸上皮細胞刷子縁膜に局在するトランスポーターを介して能動的に吸収される（血糖上昇）。さらに糖質は、図2に示すように、小腸に存在するL細胞を刺激し、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の血中への分泌を介して糖依存性のインスリン分泌を促進する（血糖低下）。グルコースの吸収の第一段階はSGLT1によるグルコースの認識である。従って、小腸管腔側からSGLT1を阻害し、上皮細胞内へのグルコースの取り込みを抑制し、血糖上昇を防ぐことは、非吸収性の高分子複合体を用いた糖尿病の治療戦略になり得ると考えられる。また、小腸管腔側

からL細胞を刺激し、GLP-1の作用を介して血糖値をコントロールすることも、同様の戦略になり得ると考えられる。我々は、この二通りの観点から、配糖体を側鎖に導入した高分子複合体を設計し、経口抗糖尿病薬としての可能性を実証している。

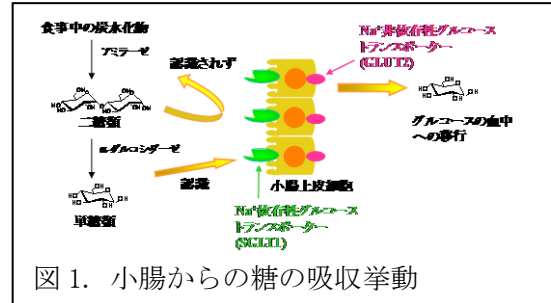


図1. 小腸からの糖の吸収挙動

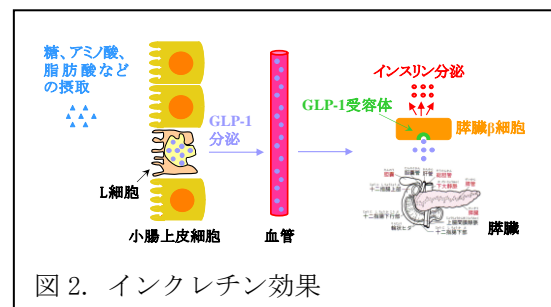


図2. インクレチン効果

我々はまず、図1に示すSGLT1阻害の観点から研究を開始した。SGLT1阻害剤のフロリジン（Florzin）を非分解性の ω -アミノトリエチレングリコールスペーサーを介して直鎖状高分子のポリ γ -グルタミン酸に結合させた複合体を合成し、そのSGLT1阻害活性を測定した。その結果、本複合体は、*in vitro* 及び *in vivo* 試験において、SGLT1を阻害し、グルコースの膜透過及び血糖上昇を抑制することが確認された。一方、複合体化に伴うフロリジンの *in vitro* 阻害活性の低下と、複合体から放出されることはないもののフロリジンのアグリコン部位（フロレチン）に由来する毒性の問題があり、これらの問題を解決した複合体の設計が必要とされた。

2. 研究の目的

研究の全体構想は、「高分子複合体技術を用いた経口剤の創薬戦略を構築すること」である。本申請研究の目的は、(1)前述のフロリジン-ポリ γ -グルタミン酸複合体の問題点の解決に取り組み、複合体の化学構造を最適化し、新規経口抗糖尿病薬創製に向けたSGLT1機能制御の実行性を実証すること、(2)同複合体を用いて、高分子複合体技術によるL細胞刺激のルートを介した糖尿病治療戦略の可能性を検証すること、の2点である。

3. 研究の方法

(1) 複合体の合成

活性低下の解決策として、我々はデンドリマーに着目した。デンドリマーとは、単一のコアから規則的に分岐した樹状構造をもつナノサイズの星型高分子であり、その表面に多数の末端官能基が局在している。これらの官能基を介してデンドリマー表面にリガンドを導入した場合、リガンドが協同的にターゲット分子と多点で相互作用することにより親和性が向上することがある。例えば、マンナンとレクチンとの結合はマンノースの添加により阻害されるが、デンドリマー表面にマンノースを固定化した複合体では、阻害活性がマンノースの約 30 倍まで上昇することが報告されている (Bioconjugate Chem. 8 (1997) 714-723)。我々は、カルボキシル基を末端に持つポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマーをプラットフォームとして用いて、安全性の高い SGLT1 の基質のアルブチンに配糖体を変更したアルブチン-PAMAM デンドリマー複合体 (PAMAM-ARB) を設計し、アルブチン導入率及び世代の異なる 6 種類の複合体を合成した。

(2) SGLT1 阻害活性の検証

小腸刷子縁膜小胞 (brush-border membrane vesicles: BBMs) を用いて、SGLT1 阻害を介した複合体のグルコース取り込み阻害活性を *in vitro* で測定した。各濃度の複合体の存在下、BBMs 内へのグルコースの取り込み速度を測定し、取り込みを 50%抑制するときの阻害剤濃度 (IC_{50}) を求めた。

(3) GLP-1 分泌促進効果の検討

ラット下部消化管 GLP-1 分泌初代培養細胞と複合体をインキュベートした後の培養液中の GLP-1 濃度について、ポジティブコントロールのリノール酸及び高濃度グルコース、ネガティブコントロールの低濃度グルコースを用いたときの結果と比較した。

4. 研究成果

(1) 複合体の合成

アルブチンのアグリコン部位のベンゼン環の 4 位の水酸基に ω -アミノトリエチレングリコールを結合させた中間体を合成した。1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 存在下、PAMAM デンドリマーの末端カルボキシル基に ω -アミノトリエチレングリコール化アルブチンのアミノ基を結合させ、アルブチン-PAMAM デンドリマー複合体 (PAMAM-ARB) を得た。第 2 段階の反応における各成分の添加比率を変えることにより、表 1 に示すアルブチン導入率及び世代の異なる 6 種類の複合体を合成した。

表1. 本研究で用いたPAMAM-ARB

複合体 ^a	複合体中のアルブチン導入率	
	比 ^b	百分率 (%) ^c
PAMAM-ARB-2/32	2/32	6.25
PAMAM-ARB-4/32	4/32	12.5
PAMAM-ARB-10/32	10/32	31.3
PAMAM-ARB-2/128	2/128	1.56
PAMAM-ARB-4/128	4/128	3.13
PAMAM-ARB-18/128	18/128	14.1

^a第3世代のデンドリマーのカルボキシル基数: 32; 第5世代: 128

^bアルブチンが導入されたカルボキシル基数/全カルボキシル基数

^c比を百分率で表したもの

(2) SGLT1 阻害活性の検証

結果を表 2 に示す。PAMAM-ARB-4/32 を例にデータの見方を詳しく述べると、アルブチン 1 分子にグルコース 1 分子が結合しているため、両者の IC_{50} は等しくなる。一方、デンドリマー 1 分子にアルブチン 4 分子が結合しているため、デンドリマー当量の IC_{50} はアルブチン当量の IC_{50} の 1/4 になる。未反応の末端カルボキシル基はアルブチンが結合したカルボキシル基の 7 倍量存在するため、カルボキシル基当量の IC_{50} はアルブチン当量の IC_{50} の 7 倍になる。アルブチンの IC_{50} は平均で 1mM であり、非常に弱い SGLT1 阻害活性が確認された。アルブチンをデンドリマーに固定化した結果、その SGLT1 阻害活性は著しく上昇した (IC_{50} の低下)。一方、複合体の SGLT1 阻害活性は、アルブチン導入率の増加とともに低下した。デンドリマー表面のアルブチンが協同的に SGLT1 と多点で相互作用するならば、複合体の SGLT1 阻害活性は、アルブチン導入率の増加とともに上昇すると考えられる。結果が予想の逆であったことから、アルブチンを導入していないオリジナルのデンドリマーの SGLT1 阻害活性を測定した。その結果、カルボキシル基を末端に持つ PAMAM デンドリマーは、カルボキシル基当量で複合体の 1/10 程度であったが、SGLT1 阻害活性を示した (IC_{50} : 6.4 mM)。その IC_{50} は、グルコシド結合を酵素分解したグルコース鎖フリーの複合体と同程度であった (IC_{50} : 5.7 mM)。

以上のことから、複合体の強力な SGLT1 阻害の本質は、アルブチン由来のグルコシル基であり、アルブチンが導入されていないデンドリマーのカルボキシル基は SGLT1 阻害に相補的に働くと考えられた。デンドリマーの世代に関係なく、複合体のアルブチン導入率に対してグルコシル基当量及びカルボキシル基当量の IC_{50} をプロットした結果、アルブチン導入率 6.25%を境に、それ以上グルコシル基を増やしても、また、それ以上カルボキシル基を増やしても、SGLT1 阻害活性は増強されないことが明らかとなった。この解析から、検討した中ではアルブチン含有率 6.25%の複合体 (PAMAM-ARB-2/32、図 3) が最も強力で、

かつスリムな阻害剤であることが示唆された。

阻害剤	グルコースベースのIC ₅₀ (nM)		高分子ベースのIC ₅₀ (nM)	
	アルブチン当量	β-D-グルコシド当量	アルブチン当量	β-D-グルコシド当量
アルブチン	1.0	1.0	-	-
PAMAM-ARB-2/32	0.045	0.045	0.023	0.68
PAMAM-ARB-4/32	0.15	0.15	0.038	1.1
PAMAM-ARB-10/32	0.36	0.36	0.036	0.79
PAMAM-ARB-2/128	0.040	0.040	0.020	2.5
PAMAM-ARB-4/128	0.045	0.045	0.011	1.4
PAMAM-ARB-18/128	0.11	0.11	0.0063	0.69

n=4~5の平均値
*アルブチンが結合していない未反応の末端カルボキシル基当量

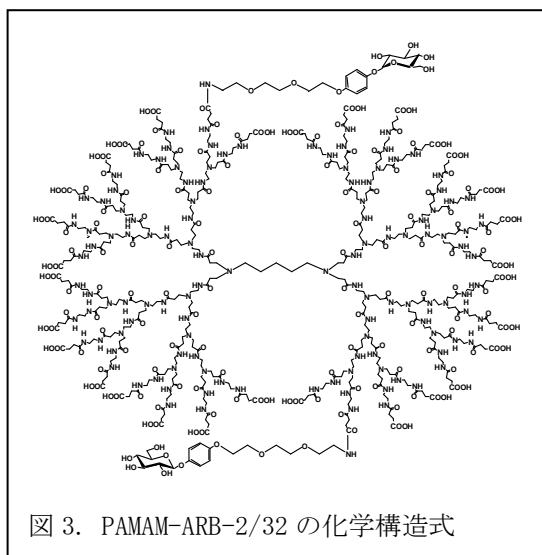


図3. PAMAM-ARB-2/32の化学構造式

(3) GLP-1 分泌促進効果を検討

PAMAM-ARB-2/32のGLP-1分泌促進効果を検討した結果を図4に示す。図から明らかなように、複合体とラット初代培養細胞をインキュベートしたとき、ポジティブコントロールのリノール酸同様、細胞からのGLP-1の分泌が促進された。一方、同様の分泌促進効果は、複合体の原料であるアルブチン及びオリジナルのデンドリマーに認められなかった。この結果は、複合体化によって初めてGLP-1分泌促進効果が獲得されたことを意味しており、SGLT1阻害と異なる結果であった。

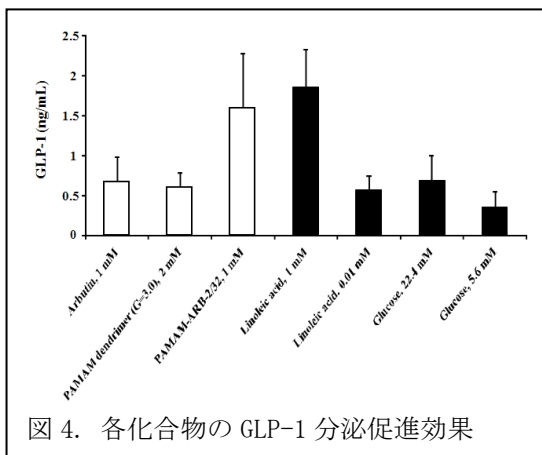


図4. 各化合物のGLP-1分泌促進効果

以上の結果から、アルブチン-PAMAM デンドリマー複合体 (PAMAM-ARB) は、SGLT1 阻害作用と GLP-1 分泌促進作用 (L 細胞刺激作用) を併せ持つ、新しいタイプの経口抗糖尿病薬のシーズとなる可能性が示された。

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2件)

- ① Shinji Sakuma, Shun Kanamitsu, Yumi Teraoka, Yoshie Masaoka, Makoto Kataoka, Shinji Yamashita, Yoshiyuki Shirasaka, Ikumi Tamai, Masahiro Muraoka, Yohji Nakatsuji, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, Involvement of functional groups on the surface of carboxyl group-terminated polyamidoamine dendrimers bearing arbutin in inhibition of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1)-mediated D-glucose uptake. *Mol. Pharmaceutics*, in press. 査読有り
- ② Shinji Sakuma, Yumi Teraoka, Tomokazu Sagawa, Yoshie Masaoka, Makoto Kataoka, Shinji Yamashita, Yoshiyuki Shirasaka, Ikumi Tamai, Yusuke Ikumi, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, Carboxyl group-terminated polyamidoamine dendrimers bearing glucosides inhibit intestinal hexose transporter-mediated D-glucose uptake. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75 (3) (2010) 366-374. 査読有り

[学会発表] (計6件)

- ① 佐久間信至, 金光俊, 寺岡裕美, 政岡祥江, 片岡誠, 山下伸二, 白坂善之, 玉井郁巳, 村岡雅弘, 中辻洋司, 木田敏之, 明石満, 消化管膜機能制御に基づく抗糖尿病作用を有する配糖体-高分子複合体の精密設計, 日本薬学会第132年会, 札幌, 2012年3月30日.
- ② Shun Kanamitsu, Shinji Sakuma, Yumi Teraoka, Yoshie Masaoka, Makoto Kataoka, Shinji Yamashita, Yoshiyuki Shirasaka, Ikumi Tamai, Masahiro Muraoka, Yohji Nakatsuji, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, Inhibitory effect of arbutin conjugated to polyamidoamine dendrimers on intestinal glucose transport, International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, Kobe, Japan, June 30, 2011.
- ③ 金光俊, 佐久間信至, 寺岡裕美, 政岡祥江, 片岡誠, 山下伸二, 白坂善之, 玉井郁巳, 村岡雅弘, 中辻洋司, 木田敏之, 明石満,

デンドリマー型アルブチンの化学構造と SGLT1 (Na⁺/糖共輸送体) の阻害活性との 相関の検証, 第 27 回日本 DDS 学会, 東京, 2011 年 6 月 9 日.

- ④ Yumi Teraoka, Shinji Sakuma, Yoshie Masaoka, Makoto Kataoka, Shinji Yamashita, Yoshiyuki Shirasaka, Ikumi Tamai, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, Polyamidoamine dendrimers enhance inhibitory effect of arbutin on SGLT1-mediated glucose uptake through their conjugation, 2009 American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition, Los Angeles, CA, November 11, 2009.
- ⑤ 寺岡裕美, 佐久間信至, 政岡祥江, 片岡誠, 山下伸二, 白坂善之, 玉井郁巳, 木田敏之, 明石満, グルコース側鎖を有する高分子複合体の経口抗糖尿病薬としての可能性評価, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2009 年 11 月 16 日.
- ⑥ 寺岡裕美, 佐久間信至, 政岡祥江, 片岡誠, 山下伸二, 白坂善之, 玉井郁巳, 木田敏之, 明石満, 末端にグリコシル基を持つデンドリマーによる Na⁺/糖共輸送体阻害能の検証, 第 25 回日本 DDS 学会, 東京, 2009 年 7 月 3 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 信至 (SAKUMA SHINJI)
摂南大学・薬学部・教授
研究者番号: 80388644

(2) 研究分担者

山下 伸二 (YAMASHITA SHINJI)
摂南大学・薬学部・教授
研究者番号: 00158156
玉井 郁巳
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号: 20155237
明石 満 (AKASHI MITSURU)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号: 20145460

(3) 連携研究者

木田 敏之 (KIDA TOSHIYUKI)
大阪大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 20234297
2009-2010 年度は研究分担者だったが、
2011 年度に「最先端・次世代若手研究支援
プログラム」に採択されたため、研究分担
者から連携研究者に変更。