

GPR119アゴニストの新規経口2型糖尿病治療薬としての 開発可能性について

中村, 英生

<https://hdl.handle.net/2324/7363734>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン :
権利関係 :



博士論文

GPR119 アゴニストの新規経口2型糖尿病治療薬
としての開発可能性について

2025年3月

九州大学大学院薬学府

創薬科学専攻・薬理学分野

中村 英生

指導教員 津田 誠 教授

目 次

序論	1
第 1 章 GPR119 アゴニスト NCP-322 の同定	4
緒言	4
1. 方法	5
2. 結果	17
3. 考察	30
第 2 章 GPR119 アゴニストの薬効減弱に対する検証	32
緒言	32
1. 方法	33
2. 結果	39
3. 考察	44
第 3 章 GPR119 アゴニストに求められる薬理学的および薬物動態的プロファイルを 有する新規化合物 NCP-870 の同定	46
緒言	46
1. 方法	47
2. 結果	54
3. 考察	65
総括	67
引用文献	68
謝辞	72

序論

糖尿病は糖代謝の異常によって慢性的な高血糖を呈する進行性の疾患であり、1型、2型、その他（遺伝子異常、他の疾患に伴うもの等）および妊娠糖尿病の4つの病型に大別されるが、糖尿病患者の9割以上は2型糖尿病に分類される。2型糖尿病ではインスリンの分泌低下を主体とする「インスリン分泌不全」とインスリンに対する感受性の低下による「インスリン抵抗性」が複合的に組み合わさり、インスリンの作用不足によって高血糖状態が生じる。慢性的な高血糖状態は、網膜症、腎症、神経障害等の微小血管障害による合併症を引き起こす。さらに、虚血性心疾患、脳梗塞、動脈硬化等の大血管障害による合併症を誘発し、QOLの低下のみならず、患者の高い死亡率につながっている。したがって、これらの重篤な合併症リスクを低減させるために、適切な血糖コントロールは極めて重要である。

糖尿病の治療には、運動療法・食事療法に加えて、インスリン分泌促進、インスリン抵抗性改善、糖吸収、糖排泄調節など機序の異なる複数の血糖降下薬の併用が必要である。インスリン分泌促進薬であるスルホニルウレア（SU）系抗糖尿病薬は強力な血糖降下作用を示すが、重篤な低血糖が問題となる[1-3]。また、SU系抗糖尿病薬の長期投与は薬効を低下させる[4, 5]。インスリン抵抗性を改善するために、ビッグアニド系薬剤やチアゾリジン系薬剤が頻用され、糖の吸収・排泄調節薬として α -グルコシダーゼ阻害薬も2型糖尿病の治療戦略に頻用されている。しかし、これらの薬剤は消化器症状（下痢、嘔吐、腹部膨満、便秘）、体重増加、浮腫などの副作用を引き起こすことがある[6-11]。ナトリウム・グルコース共役輸送体2（SGLT2）阻害薬は、糖の排泄を調節する2型糖尿病の新しい治療薬として最近使用されているが、これらの阻害薬にも尿路感染症や夜間頻尿などの副作用がある[12-14]。グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）受容体作動薬やジペプチジルペプチダーゼ4（DPP-IV）阻害薬などのインクレチンベースの治療薬は、低血糖を引き起こしにくく、食欲抑制作用による体重減少が期待できることから、2型糖尿病治療薬として注目されている。しかし、すべてのインクレチン製剤で体重減少が起こるわけではなく、消化器症状（悪心、下痢）などの副作用も報告されている[15, 16]。この20年間で、2型糖尿病治療薬としていくつかの新しいクラスの薬剤が開発されたにもかかわらず、2型糖尿病治療において、目標とする血糖値に到達できていない患者の割合は多く、長期間にわたる持続的な血糖コントロールという面において高いアンメットメディカルニーズが残っている。

このような観点から、新たなメカニズムの血糖降下薬としては、低血糖や体重増加等の副作用が無いことに加えて、糖尿病の発症や進展に関与する肥満状態を是正する作用や、持続的な血糖低下作用に寄与すると考えられる膵 β 細胞の保護作用を併せ持つことが重要である。その点で、インクレチン製剤であるDPP-IV阻害剤やGLP-1受容体作動薬は上記の要件に合致する血糖降下薬である。しかし、DPP-IV阻害剤は内在性のGLP-1量に依存した間接的な作用であるため、薬効強度に課題がある。また、GLP-1受容体作動薬は注射剤であるため服薬アドヒアランスの維持に難がある。2020年6月に発売された唯一の経口GLP-1受容体作動薬も空腹時に服用かつ服用後30分は食事できない制約があり、バイオアベイラビリティも1%と極めて低いことから吸収量や薬効のバラつきが課題である。

Gタンパク質共役型受容体119（GPR119）はヒトのオーファンG蛋白質共役型受容体（GPCR）の一つであったが、2005～2006年にリゾホスファチジルコリン（LPC）やカン

ナビノイドのオレオイルエタノールアミド (OEA) が生体内リガンドとして報告され、2型糖尿病治療における新規ターゲットとして注目されている[17-20]。

GPR119は膵臓のβ細胞、消化管、脳に発現しており[18, 21]、Gsタンパク質に共役するGPCRでアゴニスト刺激により細胞内cAMPを上昇させる作用を持つ。GPR119は上述したOEAやLPCなどの生理活性脂質によって活性化されるが、OEAは、その食欲抑制作用により、糖尿病発症リスクを高める肥満を抑制することが報告されている[18, 19]。また、そのGPR119アゴニスト活性は、GPR119の内因性リガンドとして最初に報告されたLPCの10倍以上であると報告されており[20]、合成GPR119アゴニストであるAR231453とPSN632408は、ラットモデルにおいて、細胞内cAMPレベル、グルコース依存性インスリン分泌、摂食量と体重を増加させることが示されている[19, 22]。さらに、GPR119アゴニストはヒトおよびマウスの腸管L細胞モデルにおいてGLP-1の分泌を刺激することも報告されている[23, 24]。GPR119アゴニストが高血糖依存的なインスリン分泌に基づく血糖上昇抑制作用を示すメカニズムとしては、下記のように考えられている。

膵β細胞におけるインスリンの分泌機構として惹起経路と増幅経路の2つのシグナル経路が提唱されているが、GPR119アゴニストおよびGLP-1は増幅経路を介して作用発現することが想定されている (図1)。惹起経路は血中グルコース濃度の上昇に伴い、膵β細胞上の糖輸送担体 (GLUT2) から細胞内にグルコースが取り込まれることから始まる。取り込まれたグルコースがグルコキナーゼによる代謝を受けTCA回路を経由して細胞内でATPが産生されると、細胞膜上のATP感受性カリウムチャネル (K_{ATP}) が閉鎖する。続いて細胞外へのカリウム流出が阻害されることで細胞膜電位が脱分極すると電位依存性のカルシウムチャネル (VDCC) が開口する。細胞外カルシウムの流入に伴い細胞内カルシウム濃度の上昇が起こると、インスリン顆粒の細胞膜への融合が起こりインスリン分泌に至る。一方で、増幅経路はGLP-1やGPR119アゴニストによる細胞内cAMP濃度の上昇により、主にプロテインキナーゼA (PKA) 依存性の経路とPKA非依存性の経路によりインスリン分泌を促進させる。PKA依存性経路は膵β細胞における K_{ATP} チャネルのポア成分である内向き整流性カリウムチャネル (Kir) 6.2、サブユニットであるスルホニルウレア受容体 (SUR) 1それぞれをリン酸化しインスリン分泌を促進させる[25]ほか、電位依存性カリウムチャネル (K_v) を閉鎖することで、細胞膜の脱分極を延長させることでも分泌促進に寄与している[26]。PKA非依存性経路にはcAMP結合蛋白であるEpac2Aが関与している[27]。膵β細胞内でcAMP濃度が上昇するとEpac2Aの構造変化が起こりRap1を活性化させる。インスリンの分泌は、2相性の分泌過程をたどることが知られている[28]が、Epac2A / Rap1シグナルは第1相のインスリン分泌を増強する[29]。

このように、GPR119の作用機序は単剤でインスリン分泌とインクレチン分泌を促進することが可能な新しいメカニズムであり、膵臓と小腸における2重の高血糖依存的な血糖降下作用により、必要以上の血糖値低下を引き起こすことなく血糖をコントロールすることができ、単独では低血糖のリスクが少ないことが想定される。加えて、従来用いられているSU系抗糖尿病薬等とは異なる経路で作用するため、SU系抗糖尿病薬等に無効例[30]にも作用する可能性があり、併用での使用も期待できる。また、膵β細胞における細胞内cAMP濃度の上昇が膵β細胞を保護・分化・増殖させること[31, 32]や、小腸内分泌細胞で分泌されたGLP-1が中枢神経系に作用し食欲を抑制することが知られている[33, 34]ことから、体重増加を伴わず、膵β細胞の増殖・細胞保護作用を有することが予想され、長期にわたる膵細胞機能維持とインスリン感受性の改善・維持効果が期待される。さらに、GLP-1を分泌させるGPR119アゴニストをDPP-IV阻害薬と併用すれば、薬効における

相乗効果が期待される。

GPR119アゴニストは新規の経口2型糖尿病治療薬として期待される一方で、現在までに多くの製薬会社はその開発に取り組んできたが、未だに上市された化合物はない。その要因の1つとして反復投与時の薬効減弱が挙げられる。臨床第2相試験まで進んだGPR119アゴニストは、GSK1292263A（GlaxoSmithKline社）、MBX-2982（Metabolex社）、PSN821（Prosion社）およびDS-8500（第一三共）の4つであるが、GSK1292263Aは反復投与することで薬効減弱が認められたことから開発を断念している。対照的にPSN821およびDS-8500は良好な結果を収めている。そのため、これらの先行他社化合物の開示データを精査し、薬効減弱を回避するための仮説検証を行うことが、新規のGPR119アゴニストを開発する上での重要な課題であると考えている。

本研究では、薬理および薬物動態プロファイルの両面からGPR119アゴニストに求められる薬物プロファイルについて検証することを目的とする。

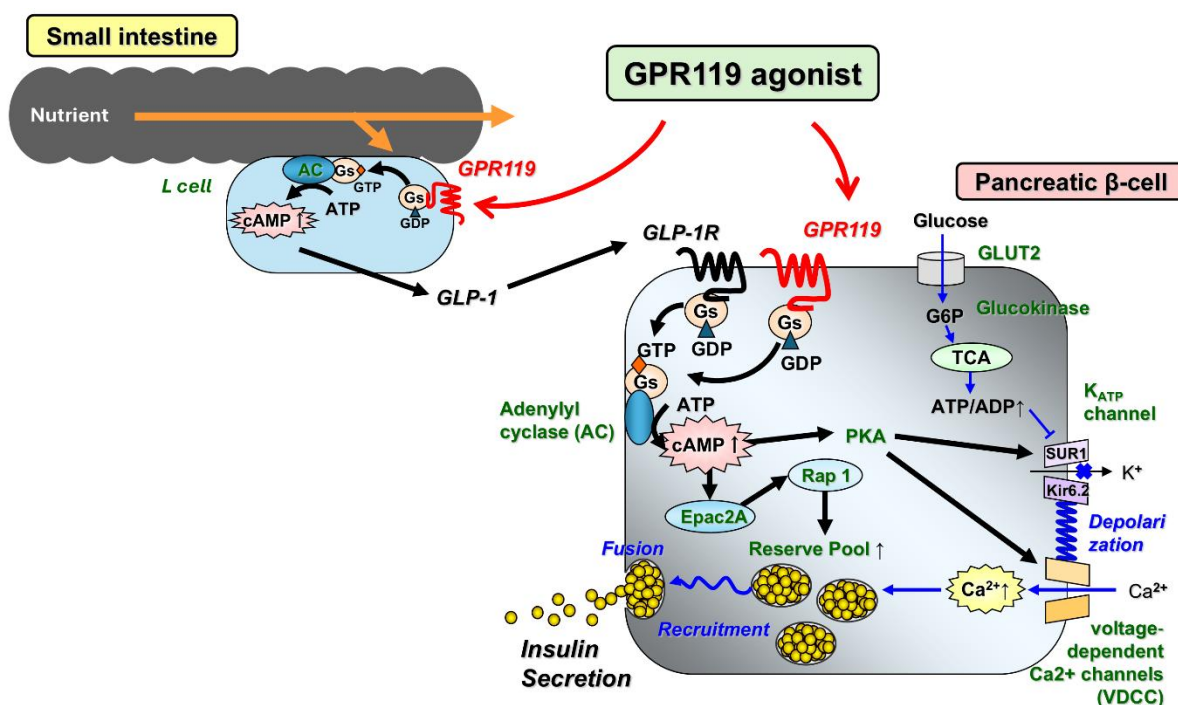


図 1. GPR119 アゴニストによる血糖依存性インスリン分泌のシグナル伝達（文献 25–29 より引用）

第 1 章 GPR119 アゴニスト NCP-322 の同定

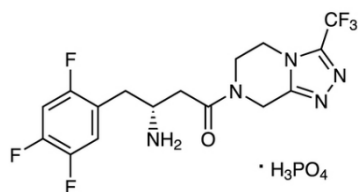
緒言

現在の糖尿病治療では、複数の異なる作用機序の血糖降下薬を併用する治療法が一般的となっているが、上述したように長期間にわたる持続的な血糖コントロールおよび副作用面における課題から、治療選択肢を増やす新たな作用機序の新薬登場が望まれている。

日本ケミファ株式会社では、GPR119 アゴニストの単一薬剤で膵島 β 細胞からのインスリン分泌促進、腸管 L 細胞からの GLP-1 分泌促進、グルコース依存性のインスリン分泌、摂食量および体重増加の抑制など多面的な有益作用を提供するユニークな作用様式に注目し、新規 2 型糖尿病治療薬創製を目的として GPR119 アゴニストのスクリーニングを行ってきた。

まず、生体内リガンドである OEA や他社特許化合物を中心とした構造展開から着手し、その構造活性相関の情報を基に計算科学技術も取り入れた *in silico* スクリーニングも実施した。その結果、強力な GPR119 アゴニストである NCP-322 を新たに同定した。本章では、NCP-322 の様々な *in vitro* および *in vivo* 薬理作用について、これまでに開発された GPR119 アゴニストと比較し、その優位性について検討を行った。

Sitagliptin phosphate (日本ケミファ株式会社創薬研究所にて合成)



分子式 : $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_5\text{O} \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$

分子量 : 505.31

2) 試薬

Flp-In T-REx293 tetracycline inducible gene expression system (Invitrogen, #R780-07)

KOD-Plus-Ver.2 (TOYOBO, #KOD-211)

pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen, #V6520-20)

NIT-1 cell line (ATCC, #CRL-2055)

Lipofectamine 2000 (Invitrogen, #11668027)

Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM, high glucose (Invitrogen, #11965-092)

Fetal bovine serum: FBS (Bio west, Inc, #S1560-500)

Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, #15070-063)

Sodium Pyruvate (Invitrogen, #11360-070)

Hygromycin B (Invitrogen, #R220-05、10687-010)

Blasticidin (Invitrogen, #R210-01)

Tetracycline (Invitrogen, #Q10019、550205)

Ethanol (和光純薬工業株式会社, #054-07225)

HITHUNTER® cAMP kit (DiscoverX, #90-0075A)

Dimethyl sulfoxide: DMSO (和光純薬工業株式会社, #049-07213)

Isobutylmethylxanthine, 1-Methyl-3-Isobutylxanthine: IBMX (Sigma-Aldrich #I7018)

Forskolin (Sigma-Aldrich #F6886)

ダルベッコ PBS (ー) 粉末「ニッスイ」(日水製薬, #05913)

0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen #25200-072)

Trypan blue stain, 0.4% (Life Technologies, Inc., #15250061)

NaCl (和光純薬工業株式会社, #191-01665)

NaHCO_3 (和光純薬工業株式会社, #191-01305)

HEPES (株式会社同仁化学研究所, #342-01375)

KCl (和光純薬工業株式会社, #163-03545)

MgCl_2 (Sigma-Aldrich, #M1028)

KH_2PO_4 (和光純薬工業株式会社, #169-04245)

CaCl_2 (Sigma-Aldrich, # 21115)

NaOH (和光純薬工業株式会社, #190-02171)

D (+) -Glucose (和光純薬工業株式会社, #041-00595)

Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, #A7030)
Hank's Balanced Salt Solution without Ca and Mg (CMF-Hank's BSS) (Life Technologies, Inc., #14170112)
EDTA・2Na (株式会社同仁化学研究所, #345-01865)
Dispase I (合同酒精株式会社, #GD 81060)
レビスTM マウスインスリン ELISA キット (株式会社シバヤギ, #AKRIN-011H)
カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC・Na) (純正化学株式会社, #24370-1201)
Tween80 (和光純薬工業株式会社, # 161-21621)
注射溶液 (株式会社大塚製薬工場, 日本薬局方)
イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」: Isoflurane (ファイザー株式会社)
EDTA・2Na (テルモ株式会社, # VP-NA050K)
DPP- IV Inhibitor (Millipore Co., Ltd, #DPP4)
GLP-1 (Active) 96-Well Plate Assay (Millipore Co., Ltd, #EGLP-35K)
グルコース C-II キットワコー (和光純薬工業株式会社, #439-90901)
ヘパリン・Na (テルモ株式会社, #VP-H050K)

3) 細胞株

(1) 細胞株の構築

ヒト GPR119 遺伝子 (hGPR119, NM_178471) は ATCC から購入し (ATCC No.10807349)、5'側に BamHI サイト、3'側に Apa I サイトができるように PCR 増幅をおこなった (フォワード側プライマー: TCCTGGATCCatggaatcatcttctcat t、下線部は酵素サイト BamHI、リバーズ側プライマー: TCCTGGGCCCCtagccat caaactctgagc、下線部は酵素サイト ApaI)。PCR 条件は以下のとおりである。DNA ポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用いて 1 サイクルあたり 98℃で 10 秒間 2 本鎖 DNA を熱変性し、55℃で 30 秒間プライマーを変性した 1 本鎖 DNA にアニーリングさせ、引き続き 68℃で 1 分 15 秒間 DNA 伸長反応させる。これを 35 サイクル繰り返した。PCR 産物をインサートとしてプラスミド pcDNA5/FRT/TO に組み込み、できたプラスミドを Flp-in T-Rex-293 細胞に導入し、hGPR119 定常発現細胞株を構築した。

マウス GPR119 遺伝子 (mGPR119, NM_181751) は、ATCC から購入したマウス腭ランゲルハンス島由来の NIT-1 cell line から PCR 法を用いて増幅および精製を行った。具体的は、5'側に BamHI サイト、3'側に Apa I サイトができるように PCR 増幅をおこなった (フォワード側プライマー: TCCTGGATCCatggagtcatt ccttctcatt、下線部は酵素サイト BamHI、リバーズ側プライマー: TCCTGGGCCCCtagccatcgagctccggat、下線部は酵素サイト ApaI)。PCR 条件は以下のとおりである。DNA ポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用いて 1 サイクルあたり 98℃で 10 秒間 2 本鎖 DNA を熱変性し、50℃で 30 秒間プライマーを変性した 1 本鎖 DNA にアニーリングさせ、引き続き 68℃で 1 分 30 秒間 DNA 伸長反応させる。これを 35 サイクル繰り返した。増幅した PCR 産物をインサートとしてプラスミド

pcDNA5/FRT/TO に組み込み、できたプラスミドを Flp-in T-Rex-293 細胞に導入し、mGPR119 定常発現細胞株を構築した。

ラット GPR119 遺伝子 (rGPR119, NM_181770) は、雄性 Wistar rat から採取したランゲルハンス島から PCR 法を用いて増幅および精製を行った。具体的は、5'側に HindIII サイト、3'側に BamHI サイトができるように PCR 増幅をおこなった (フォワード側プライマー: CTAAGCTTatggagtcattctctcatttgag、下線部は酵素サイト HindIII、リバーズ側プライマー: TCCTGGATCCttatccctgcattgctc a、下線部は酵素サイト BamHI)。PCR 条件は以下のとおりである。DNA ポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用いて 1 サイクルあたり 98℃で 10 秒間 2 本鎖 DNA を熱変性し、60℃で 30 秒間プライマーを変性した 1 本鎖 DNA にアニーリングさせ、引き続き 68℃で 1 分 30 秒間 DNA 伸長反応させる。これを 35 サイクル繰り返した。増幅した PCR 産物をインサートとしてプラスミド pcDNA5/FRT/TO に組み込み、できたプラスミドを Flp-in T-Rex-293 細胞に導入し、rGPR119 定常発現細胞株を構築した。

導入法については、トランスフェクション試薬として Lipofectamine 2000 を用いて製品のプロトコール通り行い、各種 GPR119 定常発現細胞株を構築した。

また、pcDNA5/FRT/TO に同梱されているコントロールプラスミド pcDNA5/FRT/TO/CAT (Chloramphenicol acetyl transferase) を用いて、上述した導入方法にて CAT 定常発現細胞株も構築した。

(2) 細胞株

hGPR119 (NM_178471) 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞 ; 日本ケミファ株式会社
mGPR119 (NM_181751) 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞 ; 日本ケミファ株式会社
rGPR119 (NM_181770) 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞 ; 日本ケミファ株式会社
CAT 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞 ; 日本ケミファ株式会社

4) 使用動物

8~11 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールスリバー株式会社より購入し、約 1 週間馴化飼育後に使用した。全ての動物は設定温度 23±2℃、設定湿度 55±15%、照明時間 7:00~19:00 環境の下、水道水および固形飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母株式会社) を自由摂取させた。また、試験前日までは、ポリカーボネート製ケージ (282 mm×451 mm×157 mm) にてケージ当たり 5 匹以下になるように飼育した。

尚、全ての動物実験は日本ケミファ株式会社創薬研究所における動物倫理委員会の承認を受け実施した。

1-2 細胞内 cAMP 測定法を用いた GPR119 アゴニスト活性評価

1) 試薬の調製方法

(1) 培養培地

組成を下記に示す。

Culture medium	DMEM (10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin, 1 mmol/L Sodium Pyruvate, 15 µg/mL Blasticidin, 100 µg/mL Hygromycin)
Assay medium	DMEM (10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin, 1 mmol/L Sodium Pyruvate)

(2) HITHUNTER® cAMP kit の Working Solution

① CL substrate/Lysis solution の作製

キットに同梱されている Galacton-Star、Emerald-II、Lysis buffer の 3 つの試薬を Galacton-Star: Emerald-II: Lysis buffer = 1 : 5 : 19 の割合で加え、転倒混和した。

② Working Solution の調製

キットに同梱されている cAMP XS + ED reagent と 1)-(2)-①で調製した CL substrate/Lysis solution を cAMP XS + ED reagent: CL substrate/Lysis solution = 1 : 1 の割合で混ぜた。

(3) Stimulation buffer の調製

IBMX を必要量精秤した後、0.5 mmol/L になるように PBS (－) で溶解し調製した。

(4) 被験物質、対照物質および forskolin 溶液の調製

NCP-322、MBX-2982 および AR231453 を精秤した後、DMSO に 10^{-2} mol/L の濃度で溶解した。さらに DMSO で評価濃度の 100 倍濃度となるよう希釈系列を作製した。forskolin は精秤した後、DMSO に 10^{-2} mol/L の濃度で溶解した。さらに DMSO で 10 倍希釈し 10^{-3} mol/L とした。尚、forskolin は GPR119 を発現していない CAT 定常発現細胞株での cAMP 産生能の確認のために使用した。

(5) Assay buffer の調製

(4) で調製した被験物質および対照物質の各希釈系列および forskolin 溶液を (3) で調製した stimulation buffer で評価濃度の 2 倍濃度となるよう希釈した。DMSO の最終濃度は 1%とした。

2) 細胞の継代

継代には、φ 60 mm の cell culture dish (株式会社グライナージャパン、#628160) を使用し、culture medium を用いて、3～4 日に 1 回の頻度で行った。培地を除去して PBS (－) で細胞を 1 回洗浄後、0.25% Trypsin/EDTA を 300 µL 加え 37°C で 3 分間インキュベーションした。細胞が剥離したのを確認後、培地

を 2.7 mL 加えて穏やかに懸濁し、15 mL の遠沈管に移し遠心分離した。上清を除去し、再び培地で懸濁して 1/5～1/20 量の細胞液を新しい dish に移した。細胞の遠心分離条件は、20°C、360 × g で 3 分間とし、培養は温度 37°C、CO₂ 濃度 5 vol%、湿度 96±3% rh に設定した CO₂ インキュベータ内で行った。

3) 細胞の播種および蛋白誘導

Assay 時は、96 well white plate (株式会社グライナージャパン、#675075) を使用し、assay medium を用いて細胞を播種した。継代と同様の方法で細胞を剥離後、assay medium を用いて懸濁し遠心分離した。上清を除去し、PBS (－) を用いて懸濁し細胞を洗浄した。遠心分離後、上清を除去し、assay medium で懸濁して細胞液を調製した。trypan blue stain を用いて細胞数を数え、96 well white plate に 2500 cells/well で播種し 24 時間培養した。その後、hGPR119 受容体の誘導には、tetracycline を 10 ng/mL、mGPR119 および CAT 蛋白の誘導には tetracycline を 20 ng/mL となるよう添加し、20 時間培養することで蛋白誘導を行い、cAMP assay に用いた。

4) cAMP assay

3) にて蛋白誘導を行った細胞を播種した 96 well plate の培地を除去し、1)- (5) で調製した被験物質、対照物質および forskolin の希釈系列を含む assay buffer (0.5mM IBMX PBS (－)) を添加した。化合物添加後 30 分間 25°C でインキュベーションし、この間に産生される細胞内 cAMP 量を市販のキット (HITHUNTER® cAMP kit) および測定機器 (FLUOstar Optima: BMG LABTECH) を用いて測定した。

5) データ解析

アッセイは各濃度 triplicate で行い、独立したアッセイを 3 回実施した。データの集計には Microsoft Office Excel (日本マイクロソフト株式会社) を用い、作図、検量線の作成および非線形解析には GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) を用いた。

まず、standard well の化学発光値を用いて検量線を作成した。次に、compound well の化学発光値を先の検量線を用いて cAMP 濃度 (nmol/L) に換算した。その値をプロットして用量反応曲線を作成し、非線形解析により EC₅₀ 値 (最大反応の 50% の反応を惹起する濃度) を求めた。さらに、対照物質である AR231453 が示す最大反応を 100% としたときの各被験物質の最大反応値を E_{max} 値 (%) として算出した。

1-3 グルコース依存性インスリン分泌作用の評価

1) 試薬の調製

(1) HEPES-balanced Krebs-Ringer Buffer (HKRB) の調製

119 mmol/L NaCl, 25 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L HEPES, 4.74 mmol/L KCl, 1.19 mmol/L MgCl₂, 1.19 mmol/L KH₂PO₄, 2.54 mmol/L CaCl₂ (10 mol/L NaOH にて pH7.4 に調整)

(2) 5.6 mmol/L glucose (5.6G) Ca-free HKRB の調製

119 mmol/L NaCl, 25 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L HEPES, 4.74 mmol/L KCl, 1.19 mmol/L MgCl₂, 1.19 mmol/L KH₂PO₄, 5.6 mmol/L glucose, 0.1% BSA (10 mol/L NaOH にて pH7.4 に調整)

(3) 0.04% EDTA 溶液の調製

HBSS に 0.04%EDTA を添加して調製した。

(4) Dispase 溶液の調製

dispase は 1 瓶 10000PU に対し、10mL の HBSS を加え、1000PU/mL に調製した。

(5) 培養培地 (25 mmol/L glucose) の調製

DMEM に 10%FBS および 1% Penicillin-Streptomycin を添加して調製した。

(6) Wash buffer (3.3 mmol/L glucose) の調製

HKRB に 0.1% BSA および 3.3 mmol/L glucose を添加して調製した。

(7) Stimulation buffer-low glucose (3.3 mmol/L glucose) の調製

HKRB に 0.1% BSA、3.3 mmol/L glucose および 0.5 mmol/L IBMX を添加して調製した。

(8) Stimulation buffer-high glucose (25 mmol/L glucose) の調製

HKRB に 0.1% BSA、25 mmol/L glucose および 0.5 mmol/L IBMX を添加して調製した。

(9) 被験物質および対照物質の調製

NCP-322、MBX-2982、AR231453 および glibenclamide を精秤した後、DMSO に 10⁻² mol/L の濃度で溶解した。さらに DMSO で評価濃度の 100 倍濃度となるよう希釈系列を作製した。

(10) Assay buffer の調製

(9) で調製した被験物質および対照物質の各希釈系列を (7) および (8) で調製した stimulation buffer で評価濃度となるよう希釈した。DMSO の最終濃度は 1%とした。

2) 膵 β 細胞の単離および播種

C57BL/6J マウスを頸椎脱臼後、速やかに瀉血を行い、常法[22, 37]に従って膵臓からランゲルハンス島を単離した。単離したランゲルハンス島は、氷冷した 5.6G Ca-free HKRB を満たした 35mm dish (株式会社グライナージャパン、#627160) 上で、ピペットマンを用いて、顕微鏡下でピックアップした。ピックアップしたランゲルハンス島は、氷冷した 2 mL の 5.6G Ca-free HKRB を入れた 15 mL 遠沈管 (株式会社グライナージャパン、#188271) に集めた。以後の遠心操作は 20°C、360 $\times$ g で 3 分間の条件で実施した。

遠心後に上清を除去し、2 mL の 0.04% EDTA を加え懸濁した。次にランゲルハンス島が沈まないようにピペッティングしながら 5 分間室温で処理した。さらに遠心し上清を除去した後、HBSS を 5 mL 加え懸濁した。この工程を 2 回繰り返した後、上清を除去し 1 mL の dispase (1000PU) を加え、懸濁後に 24 well plate に移した。温度制御機能付きのプレート攪拌機内で 15 min 攪拌処置 (37°C、330 r/min) し、ランゲルハンス島が β 細胞にまで分散したことを確認した。その後、培養培地を添加し酵素反応を止め、細胞液を 15mL 遠沈管に集めた。上清を遠心除去した後、培養培地を 5 mL 加え懸濁する工程を 2 回繰り返した後、細胞を 5.6G Ca-free HKRB に懸濁し trypan blue stain を用いて細胞数を数えた。48 well plate (株式会社グライナージャパン、#677180) に 5000 cells/well で播種し、37°C で 40 hr インキュベーションした。

3) グルコース依存性インスリン分泌作用の評価

2) にて細胞を播種した 48 well plate の培地を除去し wash buffer にて洗浄し、被験物質を含む wash buffer に置換後 30 分静置した。その後、被験物質または対照物質を含む assay buffer-low glucose または high glucose に置換し、さらに 30 分静置した後に採取した buffer のインスリン濃度を測定した。液交換方法は灌流式 (1 mL/ min) を採用し、インスリンの定量には、ELISA キット (レビスTM マウスインスリン ELISA キット) および測定機器 (FLUOstar Optima: BMG LABTECH) を用いた。測定波長は 450 nm とし、測定は各試料について duplicate で実施した。

4) データ解析

データの集計には Microsoft Office Excel (日本マイクロソフト株式会社) を用い平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で表した。また、作図および検量線の作成には GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) を用いた。

まず、standard well の吸光度値を用いて検量線を作成した。次に、媒体 (vehicle)、被験物質および対照物質の well の吸光度値を先の検量線を用いてインスリン濃度 (ng/mL) に換算した。さらに被験物質および対照物質それぞれのインスリン濃度を媒体に対する比率を算出した。

5) 統計学的処理

Vehicle 群と AR231453、NCP-322、MBX-2982 または glibenclamide 処置群との群間比較については、一元配置分散分析を行った後に Dunnett's multiple comparison test (有意水準 5%、両側) を行い、vehicle 群との間の有意差を検定した。

1-4 GLP-1 分泌作用の評価

1) 投与液の調製

(1) Sitagliptin 投与液の調製

Sitagliptin を必要量精秤した後、メノウ製の乳鉢で良く粉碎 (3 分以上) し、投与液量が 5 mL/kg 体重になるよう注射用水 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場) を加えて溶解し投与液を調製した。

(2) 被験物質および対照物質投与液の調製

NCP-322 および MBX-2982 を必要量精秤した後、メノウ製の乳鉢で良く粉碎 (3 分以上) し、投与液量が 5 mL/kg 体重になるよう投与媒体 (1%カルボキシメチルセルロース (CMC) + 2% tween80) を加えて懸濁または溶解し投与液を調製した。

2) GLP-1 分泌作用の評価

試験前日より絶食させた C57BL/6J マウスに GLP-1 の分解を抑制するため Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) 阻害薬である sitagliptin 10 mg/kg を経口投与した。sitagliptin 投与対照群には、注射用水を経口投与した。sitagliptin 投与 40 分後に投与媒体 (1% CMC+ 2% tween80)、NCP-322 または MBX-2982 を経口投与し、30 分後にイソフルラン吸入麻酔下で門脈から採血 (抗凝固剤: EDTA・2Na) を行った。注射用水投与後に投与媒体を投与した群を sitagliptin 投与対照群 (control)、sitagliptin 投与後に投与媒体を投与した群を媒体投与対照群 (vehicle) とした。得られた血液は、予め DPP-IV Inhibitor 10 μ L を分注したマイクロチューブに回収し、4°C、1000 $\times$ g で 15 分間遠心分離して血漿を分取した。得られた血漿は、GLP-1 測定に用いるまで -80°C で凍結保存した。GLP-1 の定量には、ELISA キット (GLP-1 (Active) 96-Well Plate Assay) および測定機器 (FLUOstar Optima: BMG LABTECH) を用いた。測定波長は励起波長 340 nm、蛍光波長 460 nm とし、測定は各試料について duplicate で実施した。

3) データ解析

データの集計には Microsoft Office Excel (日本マイクロソフト株式会社) を用い平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で表した。また、作図および検量線の作成には GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) を用いた。

まず、standard well の蛍光値を用いて検量線を作成した。次に、control、vehicle、被験物質および対照物質投与群の well の蛍光値を先の検量線を用いて

GLP-1 濃度 (pmol/mL) に換算した。

4) 統計学的処理

Vehicle 群と control 群との 2 群間の比較は、F 検定を行い等分散性が認められた場合 ($F > 0.05$) は student's t-test を、等分散性が認められなかった場合 ($F \leq 0.05$) は welch 法を用いて有意差を検定した (有意水準 5%、両側)。Vehicle 群と NCP-322 または MBX-2982 投与群との群間比較については、一元配置分散分析を行った後に Dunnett's multiple comparison test (有意水準 5%、両側) を行い、vehicle 群との間の有意差を検定した。また、データのばらつきを最小限にするために、各群の血漿中 GLP-1 濃度について Smirnov-Grubbs の棄却検定を行い、棄却された値を除外した (有意水準 5%、両側)。

1-5 経口糖負荷試験 (OGTT) を用いた耐糖能の評価

1) 試薬および投与液の調製

(1) グルコース溶液の調製

Glucose を必要量精秤した後、投与用量が 3 g/kg、投与液量が 10 mL/kg 体重になるよう注射用水を加えて溶解し投与液を調製した。

(2) 被験物質および対照物質投与液の調製

NCP-322、MBX-2982 および glibenclamide を必要量精秤した後、メノウ製の乳鉢で良く粉砕 (3 分以上) し、投与液量が 5 mL/kg 体重になるよう投与媒体 (1% CMC + 2% tween80) を加えて懸濁または溶解し投与液を調製した。

2) 耐糖能の評価

試験前日より絶食させた C57BL/6J マウスに投与媒体あるいは試験物質を経口投与し、30 分後にグルコース溶液あるいは注射用水を経口負荷した。試験物質または投与媒体の投与直前 (-30 分)、グルコース負荷直前 (0 分)、グルコース負荷 30、60 及び 120 分後に、ヘパリン処理したガラスキャピラリー (Drummond Scientific Company, #2-000-044-H) を用いて無麻酔下で外側尾静脈から採血を行った。投与媒体投与後に注射用水を投与した群を正常対照群 (control)、投与媒体投与後にグルコース溶液を投与した群を媒体投与対照群 (vehicle) とした。

得られた血液は、マイクロチューブに回収し、4°C、1000 × g で 15 分間遠心分離して血漿を分取した。血漿中グルコース濃度の測定には、グルコース測定キット (グルコース C-II キットワコー) および測定機器 (FLUOstar Optima: BMG LABTECH) を用いた。測定波長は主波長 510 nm、副波長 620 nm とし、測定は各試料について duplicate で実施した。

3) データ解析

データの集計には Microsoft Office Excel（日本マイクロソフト株式会社）を用い平均値±標準誤差（SEM）で表した。また、作図および検量線の作成には GraphPad Prism（GraphPad Software Inc.）を用いた。

まず、standard well の吸光度値を用いて検量線を作成した。次に、control、vehicle、被験物質および対照物質投与群の well の吸光度値を先の検量線を用いてグルコース濃度（mg/dL）に換算した。また、各時点でのグルコース濃度（血糖値）から、グルコース負荷 0～120 分後までの個体毎の血糖値の時間曲線下面積（AUC_{0-120min}）を求めた。

下式により血糖 AUC 変化率を算出した。

$$\text{血糖 AUC 変化率} = (C-B) / (B-A) \times 100$$

A：正常対照群の血糖値 AUC_{0-120min}（mg・min/dL;平均値）

B：媒体対照群の血糖値 AUC_{0-120min}（mg・min/dL;平均値）

C：媒体対照群または試験物質投与群の血糖値 AUC_{0-120min}（mg・min/dL;個別値）

4) 統計学的処理

群間比較は、一元配置分散分析を行った後に Dunnett's multiple comparison test（有意水準 5%、両側）を行い、vehicle 群との間の有意差を検定した。また、データのばらつきを最小限にするために、各群の血糖値 AUC_{0-120min} について、Smirnov-Grubbs の棄却検定を行い、棄却された値を除外した（有意水準 5%、両側）。

1-6 経口糖負荷による血漿中インスリン、GLP-1 およびグルコース濃度変化に及ぼす影響

1) 試薬および投与液の調製

(1) グルコース溶液の調製

1-5-1)-(1)と同様に調製した。

(2) 被験物質投与液の調製

NCP-322 を必要量精秤した後、メノウ製の乳鉢で良く粉碎（3 分以上）し、投与液量が 5 mL/kg 体重になるよう投与媒体（1% CMC + 2% tween80）を加えて懸濁し投与液を調製した。

2) 血漿中インスリン、GLP-1 およびグルコース濃度測定

試験前日より絶食させた C57BL/6J マウスに NCP-322 または投与媒体を経口投与し、30 分後にグルコース溶液を経口負荷した。NCP-322 または投与媒体の投与前、グルコース負荷直前（0 分）、グルコース負荷 5、10、20、30 及び 40 分後に、イソフルラン吸入麻酔下で腹部大静脈（抗凝固剤：ヘパリン Na）及び門脈（抗凝固剤：EDTA・2Na）から同時採血を行った。得られた血液を 4°C、1000 × g で 15 分間遠心分離して血漿を分取し、各測定に用いた。検体は各測定に用い

るまで-80°Cで凍結保存した。腹部大静脈血から得られた血漿を用いてインスリン濃度および血糖値を、門脈血から得られた血漿を用いて GLP-1 濃度を測定した。インスリンおよび GLP-1 の定量には、それぞれ 1-3-3)、1-4-2) で使用した ELISA キットを用いた。また、グルコースの定量は 1-5-2) で使用したグルコース測定キットを用いた。

3) データ解析

データの集計には Microsoft Office Excel (日本マイクロソフト株式会社) を用い平均値±標準誤差 (SEM) で表した。また、作図および検量線の作成には GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) を用いた。

インスリン、GLP-1 およびグルコース濃度はそれぞれ 1-3-4)、1-4-3) および 1-5-3) と同様の方法で算出した。

4) 統計学的処理

Vehicle 群と NCP-322 群との 2 群間の比較は、F 検定を行い等分散性が認められた場合 ($F > 0.05$) は student's t-test を、等分散性が認められなかった場合 ($F \leq 0.05$) は welch 法を用いて有意差を検定した (有意水準 5%、両側)。また、データのばらつきを最小限にするために、各群の血糖値、血漿中インスリン濃度および血漿中 GLP-1 濃度について Smirnov-Grubbs の棄却検定を行い、棄却された値を除外した (有意水準 5%、両側)。

1-7 オフターゲット評価

1) 76 種類の受容体に対する結合能の評価

76 種類の受容体タンパク質に対する NCP-322 の活性評価は Cerep 社 (Celle l'Eves cault, France) の Diversity Profile サービスを利用し、実施した。

2) 76 種類の酵素類 (キナーゼおよびその他の酵素類) に対する阻害活性の評価

76 種類のキナーゼおよびその他の酵素類 (オキシゲナーゼ、エステラーゼ、ホスファターゼ、トランスアミラーゼなど) に対する NCP-322 の阻害活性の評価は Cerep 社の Diversity Profile および ExpresS Diversity Kinase Profile サービスを利用し、実施した。

3) 4 種類の受容体に対する機能活性評価

GPR40、GPR41、GPR43 および GLP-2 受容体に対するアゴニストおよびアンタゴニスト活性に対する影響について、Cerep 社のサービスを利用し、実施した。

2. 結果

2-1 細胞内 cAMP 測定法を用いた GPR119 アゴニスト活性評価

1) NCP-322 の GPR119 アゴニスト活性の評価

NCP-322 のヒト GPR119 受容体に対するアゴニスト活性を調べるため、hGPR119 受容体を定常発現させた Flp-In T-Rex 293 細胞を用い、NCP-322 および対照物質 AR231453 の hGPR119 アゴニスト活性を評価した (図 2A)。また、種差について評価するため mGPR119 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞を用い、NCP-322 および対照物質の mGPR119 アゴニスト活性を評価した (図 2B)。さらに、評価系に用いた宿主細胞である Flp-In T-Rex 293 細胞が GPR119 アゴニストに対する反応性を持たないことを確認するため、CAT 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞を用いた評価も行った (図 2C)。

ヒトおよびマウス GPR119 定常発現細胞株において、NCP-322 は濃度依存的に細胞内 cAMP レベルを上昇させ、ヒトおよびマウス GPR119 受容体に対する EC_{50} 値および E_{max} 値は AR231453 と同程度であることが確認された (hGPR119 : $EC_{50}=9.4$ nmol/L、 $E_{max}=95\%$ 、mGPR119 : $EC_{50}=68$ nmol/L、 $E_{max}=100\%$)。また、NCP-322 と AR231453 は、GPR119 を発現していない対照宿主細胞株では cAMP レベルを上昇させなかったことから、本試験系における GPR119 アゴニスト活性の評価に宿主細胞による影響はないことが確認できた (表 1)。

2) MBX-2982 の GPR119 アゴニスト活性の評価

NCP-322 の GPR119 アゴニスト活性を先行他社化合物の MBX-2982 と比較するため 2-1-1) と同様に hGPR119 および mGPR119 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞を用い、MBX-2982 のヒト GPR119 およびマウス GPR119 アゴニスト活性を評価した (図 3A および 3B)。

その結果、 EC_{50} 値については、NCP-322 および MBX-2982 でヒトおよびマウス GPR119 とともに同程度の数値を示したのに対して、 E_{max} 値については、マウス GPR119 に対しては、NCP-322 が MBX-2982 よりも 31%高い結果であった (表 1)。

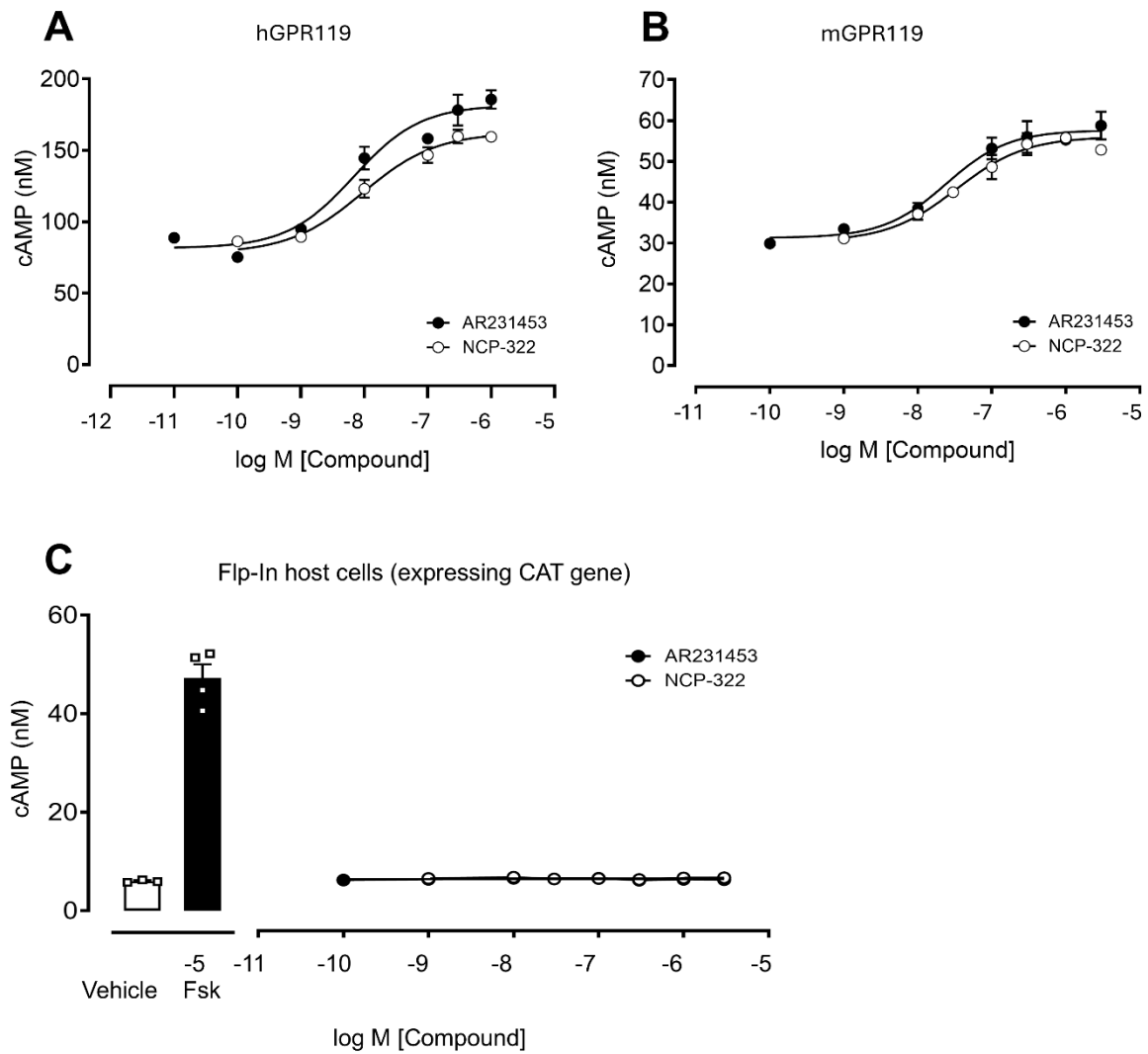


図 2. NCP-322 のヒトおよびマウス GPR119 アゴニスト活性

(A) ヒト GPR119 アゴニスト活性. (B) マウス GPR119 アゴニスト活性. (C) 宿主細胞における GPR119 アゴニスト反応性の評価. Fsk: forskolin

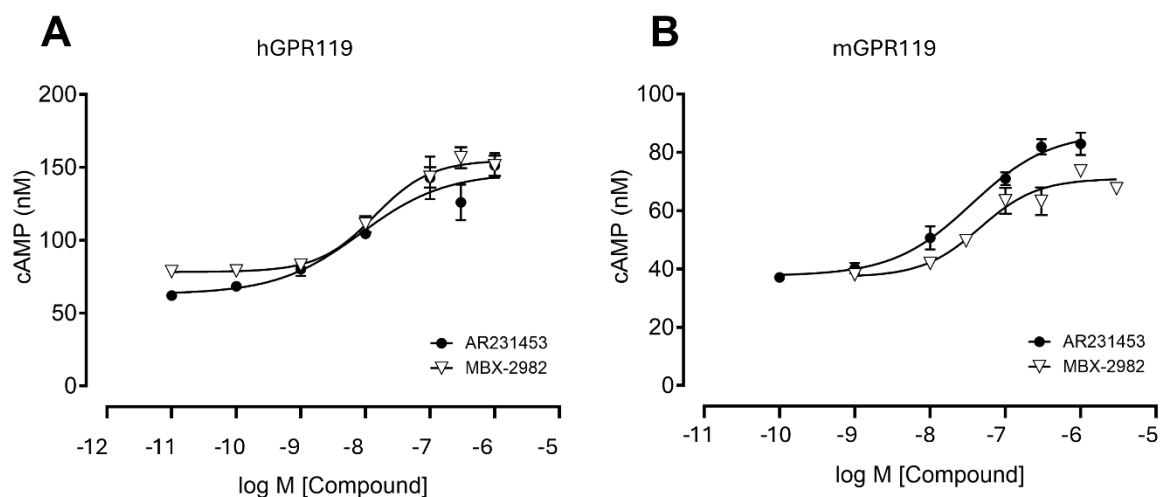


図 3. MBX-2982 のヒトおよびマウス GPR119 アゴニスト活性
(A) ヒト GPR119 アゴニスト活性. (B) マウス GPR119 アゴニスト活性.

表 1. NCP-322 および MBX-2982 の GPR119 アゴニスト活性の比較

Compound	EC ₅₀ : nmol/L (E _{max} : %AR231453)		
	Human	Mouse	CAT
NCP-322	9.4 (95%)	68.0 (100%)	N.D.
MBX-2982	13.7 (92%)	45.9 (69%)	N.T.

2-2 グルコース依存性インスリン分泌作用の評価

以前の研究で、膵臓ランゲルハンス島における GPR119 アゴニストのインスリン分泌促進作用はグルコース依存的であり、GPR119 アゴニストがグルコース濃度 8~17 mM で単離されたマウス膵島のインスリン分泌を刺激することが示されている[22]。そこで、単離されたマウス β 細胞からのグルコース依存性インスリン分泌に対する NCP-322 の効果を MBX-2982 と比較した。

その結果、高グルコース濃度 (25 mM) 存在下では、NCP-322 はマウス β 細胞からのインスリン分泌を用量依存的に亢進した (図 4A) が、MBX-2982 はこの実験条件下で有意な効果を示さなかった (図 4B)。また、グルコース非依存的にインスリン分泌を促進する SU 系抗糖尿病薬である glibenclamide を比較対象とし、低グルコース濃度 (3.3 mM) 存在下での NCP-322 のインスリン分泌に対する効果を評価した。その結果、glibenclamide はマウス β 細胞からのインスリン分泌を著しく促進したのに対し、NCP-322 はその効果を示さなかった (図 4C)。

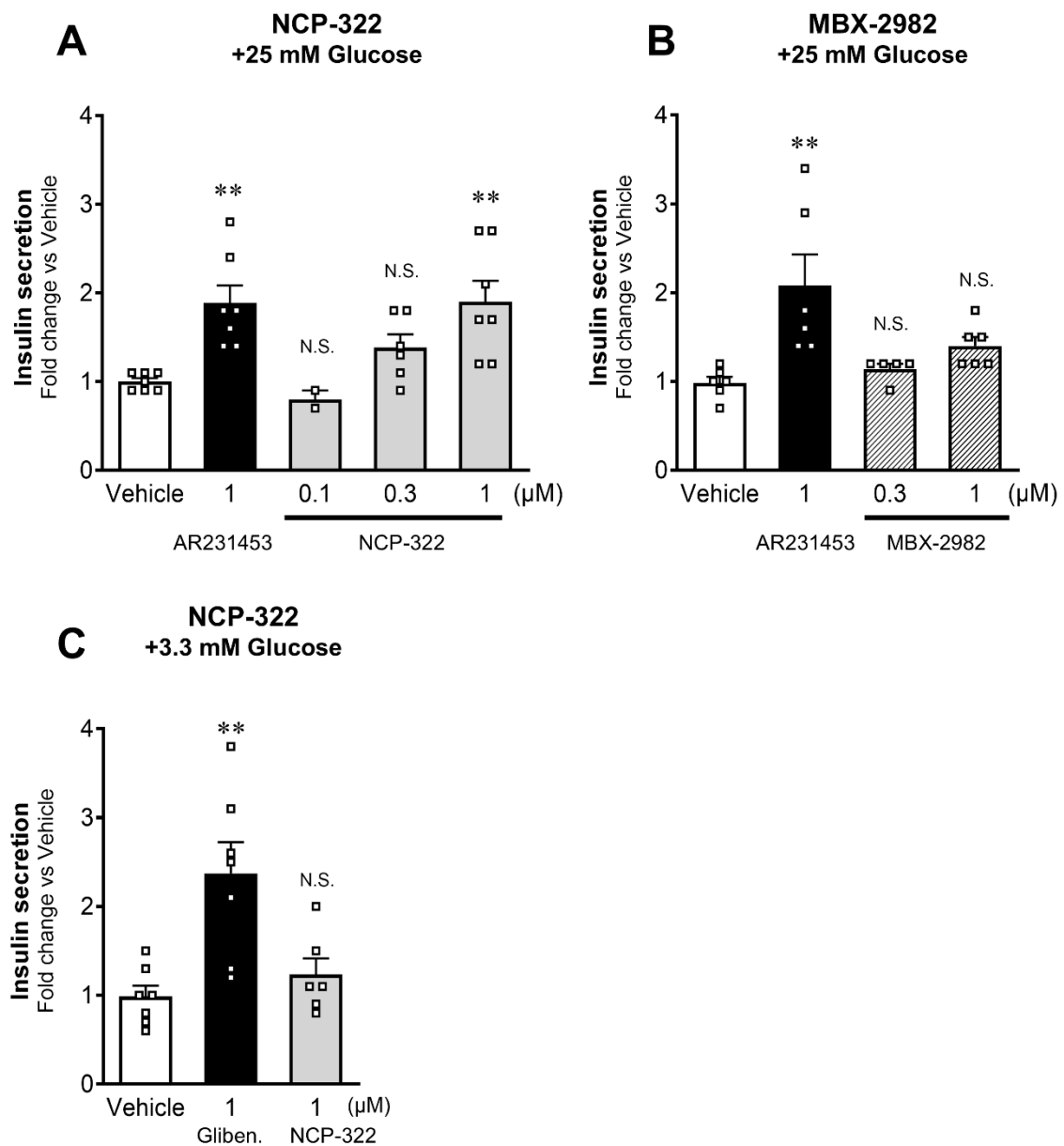


図 4. グルコース依存性インスリン分泌作用の評価

高グルコース濃度 (25 mM) 存在下での (A) NCP-322 の効果、(B) MBX-2982 の効果、(C) 低グルコース濃度 (3.3 mM) 存在下での NCP-322 の効果

Means $\pm$ standard error of the mean (SEM) ($n = 2-7$ wells) . ** $p < 0.01$, and N.S.: no significant versus vehicle (one-way analysis of variance [ANOVA] Dunnett's multiple comparison test) . Gliben. : glibenclamide

2-3 GLP-1 分泌作用の評価

GPR119 の活性化は腸管 L 細胞からの GLP-1 分泌を促進することが報告されている [23, 24] ことから、in vivo モデルで NCP-322 と MBX-2982 の GLP-1 分泌に対する効果を比較検討した。

その結果、媒体投与対照群 (vehicle) では、sitagliptin 投与対照群 (control) と比較して、血漿中 GLP-1 濃度の有意な上昇が確認された (図 5A および 5B)。また、NCP-322 の経口投与は、用量依存的に血漿中 GLP-1 濃度を上昇させた (図 5A)。一方、MBX-2982 は高用量でのみ血漿中 GLP-1 濃度の上昇が確認された (図 5B)。

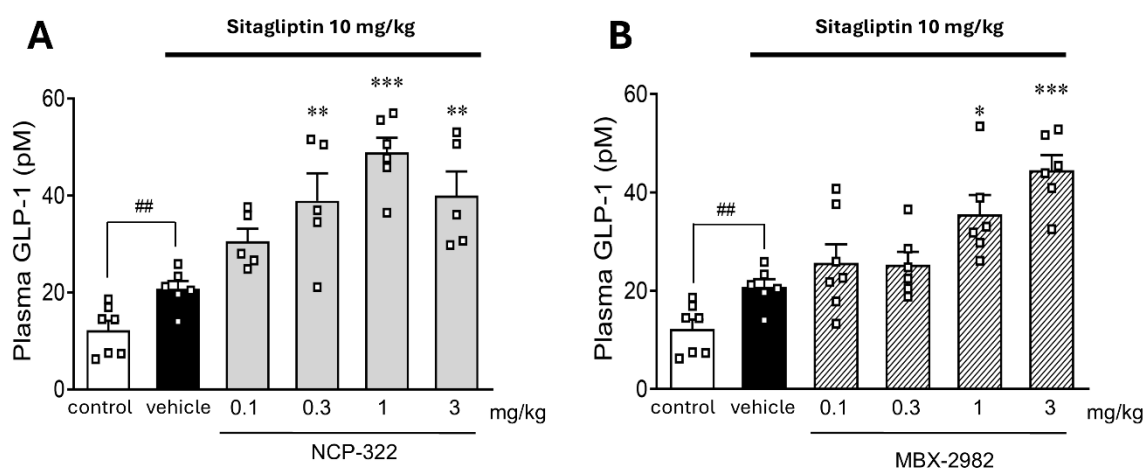


図 5. GLP-1 分泌作用の評価

(A) NCP-322. (B) MBX-2982.

Means $\pm$ SEM ($n = 5-7$ mice) . ## $p < 0.01$ versus control group (Student's t-test) ,
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test) .

2-4 経口糖負荷試験 (OGTT) を用いた耐糖能の評価

2-1 および 2-3 の結果に基づいた血糖上昇抑制作用を確認するために、C57BL/6J マウスを用いて OGTT による薬効評価を実施した。

1) NCP-322 および MBX-2982 の血糖上昇抑制作用の比較

低用量の NCP-322 (0.1~3 mg/kg) を用いて OGTT を実施したところ、NCP-322 は 0.1 mg/kg からグルコース負荷後の血糖上昇を有意に抑制し (図 6A)、その結果、 $AUC_{0-120min}$ を有意に低下させた (図 6C)。また、MBX-2982 (0.1~3 mg/kg) の経口投与は 3 mg/kg から血糖上昇を有意に減少させ (図 7A)、 $AUC_{0-120min}$ を用量依存的に減少させた (図 7C)。さらに、glibenclamide (1 mg/kg) は血糖上昇を著しく減少させたが、正常対照群 (control) と比較して、0 分後の血漿グルコース濃度の有意な減少を伴う低血糖の惹起が確認された (図 6A および 図 7A)。一方で、NCP-322 および MBX-2982 は低血糖を惹起しなかった。

NCP-322 の高用量 (3~30 mg/kg) 投与では、いずれの用量においても血糖上昇を有意に抑制し (図 6B)、 $AUC_{0-120min}$ を有意に減少させた (図 6D)。また、MBX-2982 の高用量 (3~30 mg/kg) 投与では、30 mg/kg でグルコース負荷後 30 分の血漿中グルコース濃度は著しく低下したが、グルコース負荷後 120 分の血漿中グルコース濃度は有意に上昇した (図 7B)。 $AUC_{0-120min}$ については、10 mg/kg から有意な減少が認められた (図 7D)。NCP-322 と MBX-2982 は高用量においても低血糖を惹起しなかった。

2) 低血糖リスクの評価

2-4-1) において、NCP-322 は高用量でも低血糖を惹起しないことが明らかとなったが、さらに NCP-322 の低血糖リスクについて評価した。

前日より絶食したマウスに NCP-322 を単回投与し、150 分間の血漿中グルコース濃度の変化をモニターした。その結果、NCP-322 (3 mg/kg) の投与では、vehicle 群と同様の血漿グルコース濃度推移を示し低血糖を惹起することはなかったが、glibenclamide (1 および 3 mg/kg) は投与後 30 から 150 分まで有意な血糖値の低下を引き起こし、低血糖が惹起された (図 6E)。

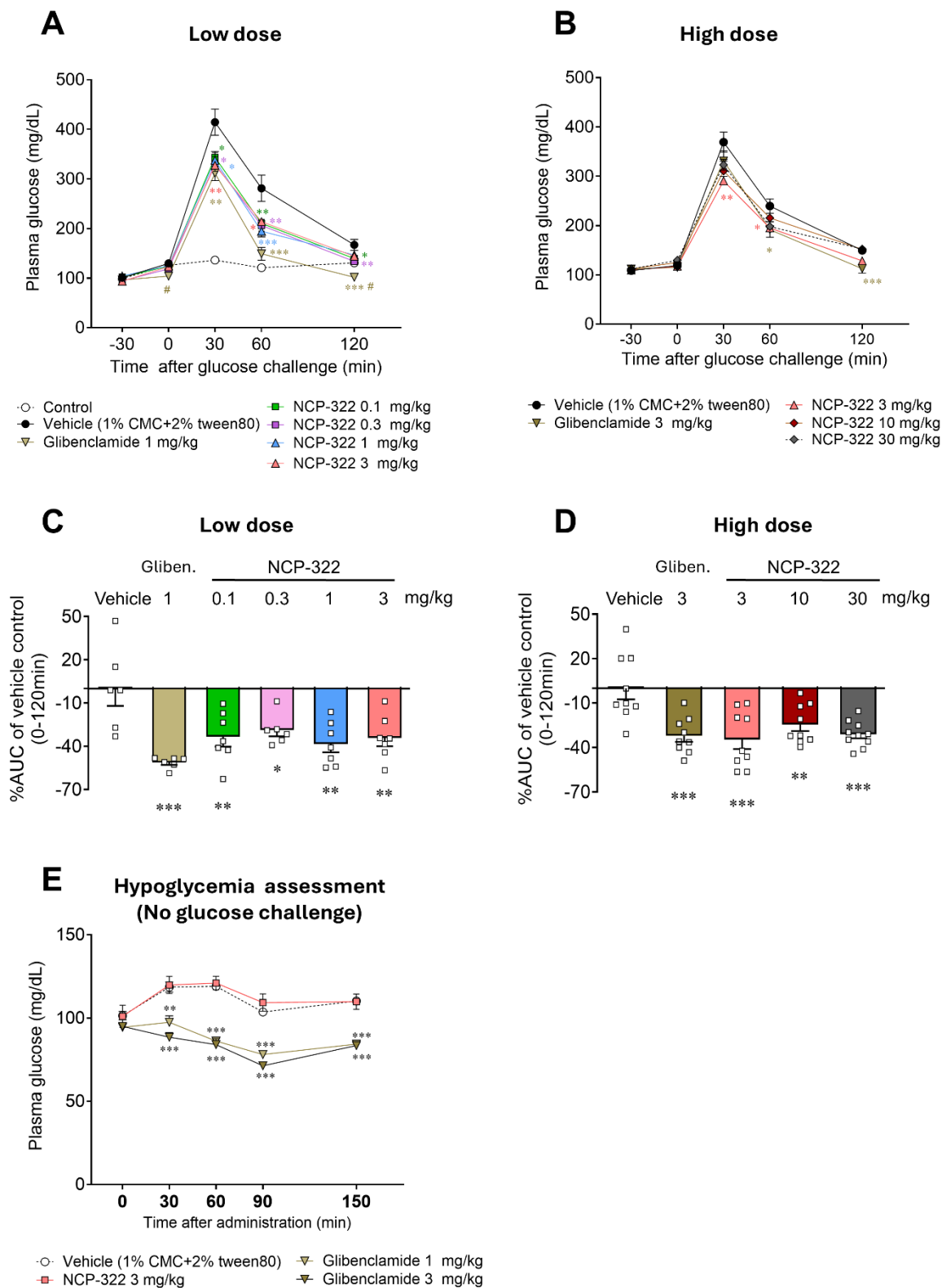


図 6. NCP-322 の血糖上昇抑制作用および低血糖リスクの評価

(A-D) 血糖上昇抑制作用の評価. (E) 低血糖リスクの評価.

Means $\pm$ SEM. (A-E) $n = 6-10$ mice; # $p < 0.05$ versus control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test).

Gliben.: glibenclamide

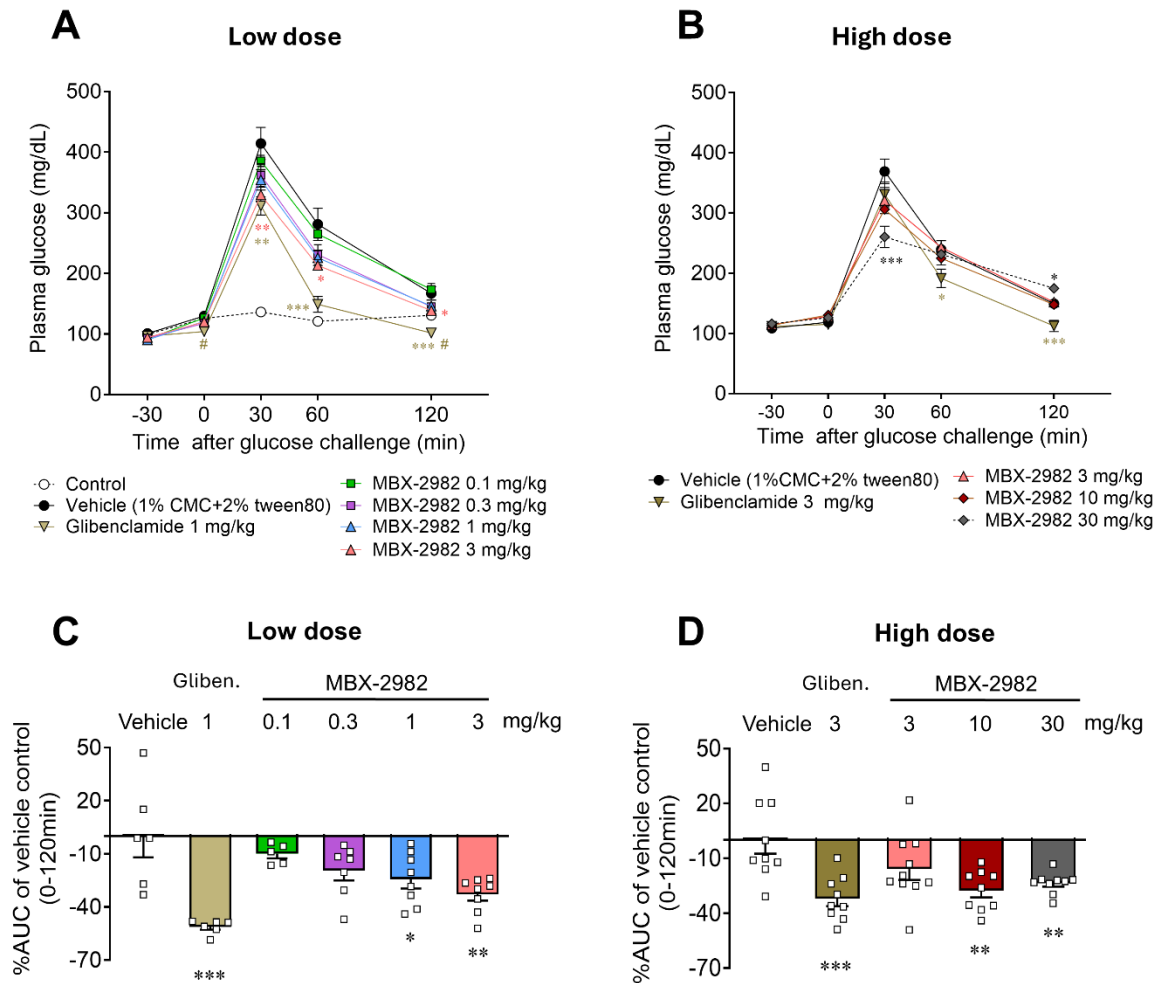


図 7. MBX-2982 の血糖上昇抑制作用の評価

(A-D) Means $\pm$ SEM (n = 5-10 mice) . #p < 0.05 versus control. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test) . Gliben. : glibenclamide

2-5 経口糖負荷による血漿中インスリン、GLP-1 およびグルコース濃度変化に及ぼす影響

2-4 にて示された耐糖能の向上がグルコース依存性のインスリンおよび GLP-1 分泌の亢進と関連しているかどうかを調べるために、C57BL/6J マウスを用いて GLP-1 およびインスリンの薬力学的解析を行った。

媒体投与対照群 (vehicle) では、血漿中 GLP-1 およびインスリン濃度はグルコース負荷後に上昇し、それぞれ 10 分および 20 分にピークを示した。また、NCP-322 投与により、グルコース負荷後 0、5、10 分で血漿中 GLP-1 濃度の有意な上昇が確認され、GLP-1 濃度の上昇に伴い、血漿中インスリン濃度はグルコース負荷後 20 分で、vehicle 群と比較して有意に上昇した (図 8)。さらに、NCP-322 はグルコース負荷後 40 分におけるグルコース濃度を有意に低下させた。

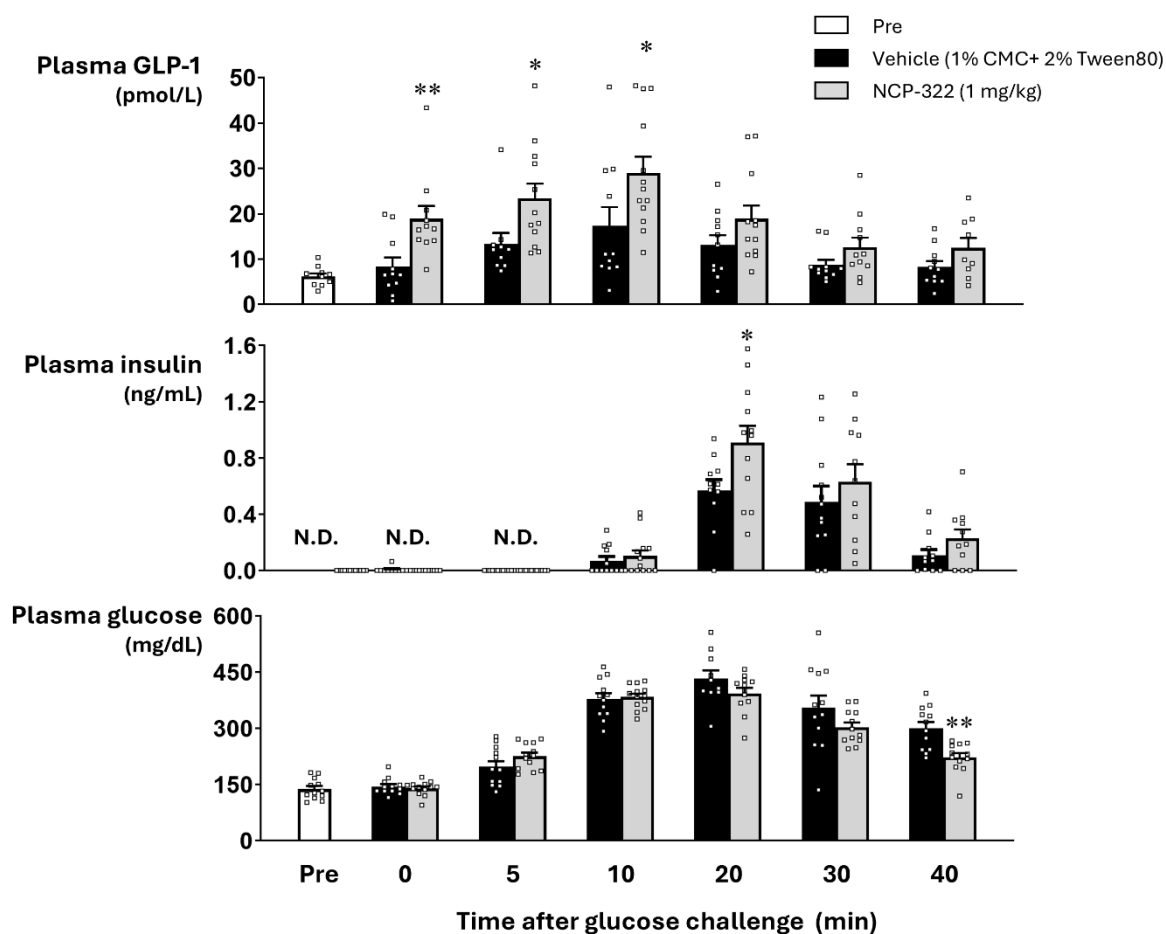


図 8. NCP-322 のグルコース依存性 GLP-1 およびインスリン分泌作用の薬力学的解析

Means $\pm$ SEM (n = 9–13 mice) . *p < 0.05, **p < 0.01, and N.D.: not detected versus vehicle (Student's t-test) .

2-6 オフターゲット評価

NCP-322 のオフターゲットスクリーニングとして、GPR119 受容体以外のターゲットに対する相互作用（76 種類の受容体・イオンチャネル・トランスポーターに対する結合活性評価、76 種類のキナーゼ、オキシゲナーゼ、エステラーゼ、ホスファターゼ、トランスアミラーゼなどの酵素類に対する阻害活性評価、GPR40、GPR41、GPR43 および GLP-2 受容体に対するアゴニストおよびアンタゴニスト活性）を Cerep 社のサービス（Diversity Profile、ExpresS Diversity Kinase Profile および機能活性評価）を用いて行った。その結果、7 種類のターゲットに対して 10 μ mol/L で 50%以上の結合活性を示した（表 2-4）。

表 2. 10 $\mu\text{mol/L}$ NCP-322 の 76 受容体に対する結合能の評価結果

Assay	Concentration (M)	% Inhibition of Control Specific Binding
<i>Non-peptide receptors</i>		
A ₁ (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	27
A _{2A} (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-10
A ₃ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	53
a ₁ (non-selective) (antagonist radioligand)	1.0E-05	13
a ₂ (non-selective) (antagonist radioligand)	1.0E-05	19
b ₁ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	4
b ₂ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	9
BZD (central) (agonist radioligand)	1.0E-05	-26
CB ₁ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	26
CB ₂ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	30
D ₁ (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	30
D _{2S} (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	9
D ₃ (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	12
D _{4.4} (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	-4
GABA (non-selective) (agonist radioligand)	1.0E-05	1
AMPA (agonist radioligand)	1.0E-05	25
kainate (agonist radioligand)	1.0E-05	-3
NMDA (antagonist radioligand)	1.0E-05	6
H ₁ (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	1
H ₂ (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	-11
H ₃ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-2
I ₂ (antagonist radioligand)	1.0E-05	-19
BLT ₁ (LTB ₄) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	23
CysLT ₁ (LTD ₄) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	24
M (non-selective) (antagonist radioligand)	1.0E-05	84
N neuronal a ₄ b ₂ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-21
PCP (antagonist radioligand)	1.0E-05	3
EP ₂ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	31
IP (PGI ₂) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	25
P2X (agonist radioligand)	1.0E-05	-4
P2Y (agonist radioligand)	1.0E-05	16
5-HT (non-selective) (agonist radioligand)	1.0E-05	-11
s (non-selective) (agonist radioligand)	1.0E-05	51
MT1 (ML1A) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	72
<i>Peptide receptors</i>		
AT ₁ (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	12
AT ₂ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	6
B ₁ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-2
B ₂ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	7
CCK ₁ (CCK _A) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	24
CCK ₂ (CCK _B) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-14
CRF ₁ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-23
ET _A (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-2
ET _B (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-7

MC ₄ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	5
NK ₁ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	19
NK ₂ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	29
NK ₃ (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	9
Y (non-selective) (agonist radioligand)	1.0E-05	-1
opioid (non-selective) (antagonist radioligand)	1.0E-05	24
NOP (ORL1) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	2
PAR1 (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-26
TRH ₁ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	22
V _{1a} (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-4
V ₂ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-3
glucagon (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-19
GLP-1 (agonist radioligand)	1.0E-05	-10
PAC1 (PACAP) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-10
VPAC2 (VIP2) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-26
Nuclear receptors		
PPAR γ (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	41
GR (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	5
ER (non-selective) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-16
PR (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	89
AR (<i>h</i>) (agonist radioligand)	1.0E-05	-8
Ion channels		
Ca ²⁺ channel (L, dihydropyridine site) (antagonist radioligand)	1.0E-05	30
Ca ²⁺ channel (L, diltiazem site) (benzothiazepines) (antagonist radioligand)	1.0E-05	6
Ca ²⁺ channel (L, verapamil site) (phenylalkylamine) (antagonist radioligand)	1.0E-05	-1
K _{ATP} channel (antagonist radioligand)	1.0E-05	9
K _v channel (antagonist radioligand)	1.0E-05	0
SK _{Ca} channel (antagonist radioligand)	1.0E-05	-10
Na ⁺ channel (site 2) (antagonist radioligand)	1.0E-05	-12
Cl ⁻ channel (GABA-gated) (antagonist radioligand)	1.0E-05	98
Amine transporters		
norepinephrine transporter (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	19
dopamine transporter (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	29
GABA transporter (antagonist radioligand)	1.0E-05	-10
choline transporter (CHT1) (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	0
5-HT transporter (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	1.0E-05	5

表 3. 10 $\mu\text{mol/L}$ NCP-322 の 76 酵素類に対する阻害活性の評価結果

Assay	Concentration (M)	% Inhibition of Control Values
5-lipoxygenase (<i>h</i>)	1.0E-05	24
PDE1B (<i>h</i>)	1.0E-05	3
PDE2A ₁ (<i>h</i>)	1.0E-05	7
PDE3A (<i>h</i>)	1.0E-05	4
PDE4D ₂ (<i>h</i>)	1.0E-05	-6
PDE5 (<i>h</i>) (non-selective)	1.0E-05	20
phosphatase 1B (<i>h</i>) (PTP1B)	1.0E-05	5
phosphatase 2A (<i>h</i>) (PP2A)	1.0E-05	0
phosphatase CDC25A (<i>h</i>)	1.0E-05	-4
phosphatase MKP1 (<i>h</i>)	1.0E-05	3
Abl kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	55
Akt1/PKBa (<i>h</i>)	1.0E-05	-2
AurA/Aur2 kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	1
CaMK2a (<i>h</i>)	1.0E-05	-11
CDC2/CDK1 (<i>h</i>) (cycB)	1.0E-05	2
CDK2 (<i>h</i>) (cycA)	1.0E-05	5
CHK1 (<i>h</i>)	1.0E-05	21
CHK2 (<i>h</i>)	1.0E-05	27
CK1a (<i>h</i>)	1.0E-05	20
c-Met kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	-7
EGFR kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	12
EphA2 kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	-8
EphA3 kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	5
EphB4 kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	30
ERK ₂ (<i>h</i>) (P42 ^{mapk})	1.0E-05	39
FGFR1 kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	29
FGFR3 kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	48
GSK3b (<i>h</i>)	1.0E-05	28
HGK (<i>h</i>) (MAP4K4)	1.0E-05	0
IKKa (<i>h</i>)	1.0E-05	-2
IRAK4 (<i>h</i>)	1.0E-05	9
IRK (<i>h</i>) (InsR)	1.0E-05	-4
JAK3 (<i>h</i>)	1.0E-05	43
JNK1 (<i>h</i>)	1.0E-05	16
KDR kinase (<i>h</i>) (VEGFR2)	1.0E-05	-7
Lck kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	-3
MAPKAPK2 (<i>h</i>)	1.0E-05	14
MARK1 (<i>h</i>)	1.0E-05	-4
MKK6 (<i>h</i>)	1.0E-05	-1
MNK2 (<i>h</i>)	1.0E-05	-1
MST4 kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	-7
NEK2 (<i>h</i>)	1.0E-05	13
p38a kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	14
PAK2 (<i>h</i>)	1.0E-05	8
PAK4 (<i>h</i>)	1.0E-05	-3

PDK1 (<i>h</i>)	1.0E-05	0
Pim2 kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	12
PKA (<i>h</i>)	1.0E-05	-3
PKCa (<i>h</i>)	1.0E-05	1
PKCb2 (<i>h</i>)	1.0E-05	16
PLK1 (<i>h</i>)	1.0E-05	12
ROCK1 (<i>h</i>)	1.0E-05	-1
SGK1 (<i>h</i>)	1.0E-05	14
SIK (<i>h</i>)	1.0E-05	4
Src kinase (<i>h</i>)	1.0E-05	6
TAOK2 (TAO1) (<i>h</i>)	1.0E-05	-5
mTOR kinase (<i>h</i>) (FRAP1)	1.0E-05	4
TRKA (<i>h</i>)	1.0E-05	19
acetylcholinesterase (<i>h</i>)	1.0E-05	19
COMT (catechol- O-methyl transferase)	1.0E-05	-1
GABA transaminase	1.0E-05	5
MAO-A (<i>h</i>)	1.0E-05	0
MAO-B (<i>h</i>)	1.0E-05	11
PNMT (phenylethanolamine N-methyl transferase)	1.0E-05	15
tyrosine hydroxylase	1.0E-05	-6
ATPase (Na ⁺ /K ⁺)	1.0E-05	2
CENP-E (<i>h</i>)	1.0E-05	-9
Eg5 (<i>h</i>)	1.0E-05	4
HDAC3 (<i>h</i>)	1.0E-05	3
HDAC4 (<i>h</i>)	1.0E-05	-8
HDAC6 (<i>h</i>)	1.0E-05	0
HDAC11 (<i>h</i>)	1.0E-05	17
sirtuin 1 (<i>h</i>)	1.0E-05	3
sirtuin 2 (<i>h</i>)	1.0E-05	11
adenylyl cyclase (basal)	1.0E-05	1
guanylyl cyclase (basal) (<i>h</i>)	1.0E-05	-4

表 4. 1 μ mol/L NCP-322 の 4 受容体に対する機能活性評価結果

Assay	Concentration (M)	% of Control Agonist Response
FFA1 (<i>h</i>) (GPR40) (agonist effect)	1.0E-06	0
FFA1 (<i>h</i>) (GPR40) (antagonist effect)	1.0E-06	-6
FFA2 (<i>h</i>) (GPR43) (agonist effect)	1.0E-06	-2
FFA2 (<i>h</i>) (GPR43) (antagonist effect)	1.0E-06	0
FFA3 (<i>h</i>) (GPR41) (agonist effect)	1.0E-06	17
FFA3 (<i>h</i>) (GPR41) (antagonist effect)	1.0E-06	-2
GLP-2 (<i>h</i>) (agonist effect)	1.0E-06	0
GLP-2 (<i>h</i>) (antagonist effect)	1.0E-06	9

3. 考察

本章では、日本ケミファ株式会社にて実施した化合物スクリーニングにより見出した新規低分子 GPR119 アゴニスト NCP-322 について、先行他社化合物 MBX-2982 との比較により薬理学的プロファイルを取得した。

本章では、まず細胞内 cAMP 濃度を指標とした *in vitro* 評価系において NCP-322 が強力な GPR119 アゴニスト活性を示すことを確認するとともに、オフターゲット試験にて、76 種類の受容体・イオンチャネル・トランスポーター、76 種類の酵素および 4 種類の細胞機能に対する結合アッセイを行い、高い選択性を確認した。NCP-322 はいくつかの受容体への特異的リガンド結合および酵素活性を阻害したが、これらの効果の多くは高濃度 (10 $\mu\text{mol/L}$) において 50% 程度の阻害作用であり、NCP-322 の GPR119 アゴニスト作用と比較して IC_{50} 値で 1000 倍程度の開きがあるため影響は少ないと考えられた。また、マウスから単離した膵 β 細胞において濃度依存的なグルコース依存性インスリン分泌促進作用を示し、0.3 mg/kg の低用量から用量依存的な GLP-分泌促進作用を示した。さらにマウスを用いた OGTT において、0.1 mg/kg の低用量から血糖上昇抑制作用を示した。従って、本章の *in vitro* および *in vivo* 実験で得られた NCP-322 の薬理作用は、GPR119 を介したものであり、高濃度の NCP-322 で観察された他のオフターゲット効果によるものではないと考えられる。

また、細胞内 cAMP 濃度を指標とした *in vitro* 評価系の結果から、NCP-322 のヒト GPR119 アゴニスト活性は Arena 社の開発化合物である AR231453 および Metabolex 社の開発化合物である MBX-2982 と同等であることが示された。一方で、マウス GPR119 アゴニスト活性については、NCP-322 は MBX-2982 よりも 31% 高い E_{max} 値を示した。 E_{max} 値の高さは cAMP の産生量を反映しており、強い薬理学的反応を得る上で重要である。上述した NCP-322 の *in vivo* 実験で得られた NCP-322 の薬理作用は、いずれも先行他社化合物の MBX-2982 を上回る強力な作用であったが、この要因として NCP-322 の高い E_{max} 値が関与していると考えている。これは、DS-8500 が糖尿病モデル動物における薬効比較において、MBX-2982 よりも優位な効果を示した要因として E_{max} 値が高いことを言及した報告例[38]によっても支持される考察であり、GPR119 のアゴニスト活性において、 E_{max} 値が高いことは重要な因子となるものと考えている。

NCP-322 のもう一つの特筆すべき特徴は、副作用が少ないことであった。糖尿病治療において治療薬を使用する際に最も一般的な副作用は低血糖である。症状としては、冷や汗、顔面蒼白、動悸などがあるが、低血糖状態が続くと意識障害やけいれんなどの重篤な症状を引き起こすことがある。膵 β 細胞を用いたインスリン分泌作用の評価では、SU 系抗糖尿病薬である glibenclamide は低グルコース濃度でもインスリン分泌作用を示したが、NCP-322 は全く作用を示さなかった。加えて、一晚絶食させたマウスに経口投与したところ、glibenclamide は血糖降下作用を示したのに対し、NCP-322 は vehicle 群と同等の血糖値の推移を示した。これらの結果から、NCP-322 は少なくとも試験した用量では、低血糖を誘導することはなく、極めて低血糖を起こしにくいことが示された。

さらに GLP-1 およびインスリン分泌の薬力学的解析を行い、NCP-322 の血糖上昇抑制作用が、グルコース負荷後に起こる素早い血漿中 GLP-1 濃度の上昇とその後に促進されるインスリン分泌に起因することを明らかとした。また、膵 β 細胞を用いた *in vitro* でのグルコース依存性インスリン分泌促進作用の結果から、NCP-322 のグルコース依存性インスリン分泌は、膵 β 細胞への直接的および GLP-1 を介した間接的な GPR119 アゴニスト作用により発現したものと考えている。

以上、本章の研究により、NCP-322 がこれまでの治療薬の欠点であった低血糖などの顕著な副作用を引き起こすことなく、低用量でインスリンおよび GLP-1 の分泌を促進する能力を有し、更なる研究により有望な 2 型糖尿病治療薬になり得る新規の経口 GPR119 アゴニストであることを明らかとした。

第2章 GPR119 アゴニストの薬効減弱に対する検証

緒言

現在までに4つのGPR119作動薬（GSK1292263A、MBX-2982、PSN821、DS-8500）が第II相臨床試験に進んでいるが、GSK1292263Aは臨床試験中に反復投与による薬効の減弱が観察されたため、開発が断念された。一方、PSN821とDS-8500は良好な結果を得ている[39-43]。したがって、動物モデルを用いた反復投与によって治療効果が維持されるかどうかを明らかにすることは、重要な研究課題である。

本章では最終的な開発化合物を選択する上で、臨床上の課題となっている薬効減弱について検証することとした。検証にあたって、上述した先行他社化合物の開示データを精査した結果、反復投与で薬効が認められた化合物は、いずれもその試験で対象としている動物種（ラットおよびヒト）での血中からの消失半減期（ $t_{1/2}$ ）が短いという共通点があることを見出した（表5）。一方で、第1章で見出したNCP-322と同等の*in vitro* および*in vivo* 薬効プロファイルを有し $t_{1/2}$ が長い傾向が確認されていたNCP-332が、2型糖尿病モデルマウス（db/dbマウス）における反復投与試験では薬効を示さなかった（日本ケミファ株式会社、社内資料）という結果も得ていた。そこで、本章ではこの2点に着目し、「反復投与時のGPR119アゴニストの血漿中濃度と薬効発現には逆の相関がある」という仮説を立て、その検証を行うこととした。検証に用いるツールとしては、ラットにおいて $t_{1/2}$ が短いことが明らかとなっているGSK1292263AおよびMBX-2982、マウスにおいて $t_{1/2}$ が長い傾向が確認されていたNCP-332を用いることとした。

表5. 先行他社化合物の開示データ

化合物		GSK1292263	MBX-2982	PSN821	DS-8500
開発会社		GlaxoSmithKline	Metabolex	アステラス・アストロゼネカ	第一三共
PhII試験 (ヒト)	結果	×	不明	○	○
	血中動態	$t_{1/2} = 13-18h$	$t_{1/2} = 15-20h$	$t_{1/2} < 8h$	$t_{1/2} \approx 7.3h$
前臨床 反復投与試験 (ラット)	結果	○	○	○	○
	血中動態	$t_{1/2} = 3h$	$t_{1/2} = 2.5h$	不明	不明

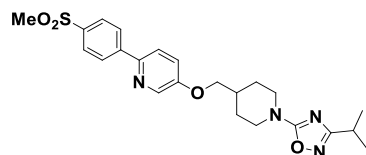
1. 方法

1-1 実験材料および使用動物

1) 使用薬物

GSK1292263A（日本ケミファ株式会社創薬研究所にて合成）

GlaxoSmithKline 社の開発した GPR119 アゴニスト[44]



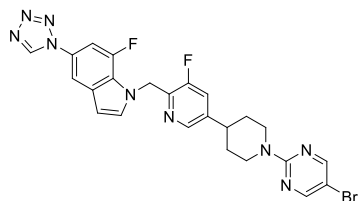
分子式：C₂₃H₂₈N₄O₄S

分子量：456.56

MBX-2982（日本ケミファ株式会社創薬研究所にて合成）

化合物情報については、第 1 章を参照。

NCP-332（日本ケミファ株式会社創薬研究所にて合成）



分子式：C₂₄H₂₀BrF₂N₉

分子量：552.38

2) 薬物調製方法

細胞を用いた実験の場合は、GSK1292263A および NCP-332 を必要量精秤した後、DMSO に 10⁻² mol/L の濃度で溶解した。さらに DMSO で評価濃度の 100 倍濃度となるよう希釈系列を作製した。

動物実験の場合は、GSK1292263A、MBX-2982 および NCP-332 を必要量精秤した後、メノウ製の乳鉢で良く粉砕（3 分以上）し、投与液量が 5 mL/kg 体重になるよう投与媒体（1% メチルセルロース（MC））を加えて懸濁し投与液を調製した。

3) 試薬

第 1 章と同じである。新たに用いた試薬を下記に示す。

メチルセルロース（MC）（信越化学工業株式会社, #SM-15）

4) 細胞株

hGPR119 (NM_178471) 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞 ; 日本ケミファ株式会社
mGPR119 (NM_181751) 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞 ; 日本ケミファ株式会社

5) 使用動物

8~11 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールスリバー株式会社より購入し、約 1 週間馴化飼育後に使用した。飼育条件および動物倫理委員会の承認は第 1 章と同じである。

1-2 細胞内 cAMP 測定法を用いた GPR119 アゴニスト活性評価

第 1 章と同じである。

1-3 OGTT を用いた耐糖能の評価

下記の点以外は、第 1 章と同じである。

投与媒体を 1% CMC + 2% tween80 から 1% MC に変更した。

1-4 マウスにおける GPR119 アゴニストの血漿中濃度推移の評価

1) 投与液の調製

各評価化合物の調製に関しては、1-1-2) の通りである。

2) 投与および採血

16 時間絶食した C57BL/6J マウスに GSK1292263A (1 mg/kg)、MBX-2982 (3 mg/kg) および NCP-332 (3 mg/kg) 投与液を経口投与した。GSK1292263A および MBX-2982 については、投与後 0.25、0.5、1、2、4、8 および 24 時間に、NCP-332 については、投与後 2、4、8、24、48、72 時間にイソフルラン麻酔下で後大静脈 (抗凝固剤 : ヘパリン Na) から血液を全採血した。尚、24 時間以降に採血する動物については、投与 8 時間後に給餌し、以後は非絶食下で採血した。また、GSK1292263A および NCP-332 の投与用量は 1-3 にて、MBX-2982 については第 1 章の 1-5 にて、十分な血糖上昇抑制作用が認められた用量を設定した。

得られた血液は、4°C、1000 × g で 15 分間遠心分離して血漿を分取し、血漿中の未変化体濃度を測定した。

3) 血漿中濃度測定

GSK1292263A、MBX-298 および NCP-332 の血漿中濃度測定は 1-4-1) において、分取した各化合物の血漿から HPLC システム (検出器 : L-4000 形 UV 検出器*、ポンプ : L-7100 形ポンプ*、オートサンプラー : 2003 オートサンプラー**、データ処理装置 : D-2500 Chromato-Integrator*、カラム恒温水槽 : THERMO ACE IT-77N*** (*株式会社日立ハイテクノロジーズ、**株式会社資生堂、***株式会社池田理化)) を用いて実施した。

4) 血漿中濃度および薬物動態パラメータの算出

検量線の作成および各パラメータの算出には、JMP 4J（株式会社 SAS インスティテュートジャパン）および Microsoft Excel（日本マイクロソフト株式会社）を用いた。

検量線試料の未変化体濃度を X、内標準物質に対する未変化体のピーク高さ比を Y とし、 $Y = aX + b$ （重み $1/Y^2$ ）にあてはめ最小二乗法により傾き a、Y 切片 b を求め検量線を作成した。QC 試料および測定試料の未変化体濃度は、得られた検量線の傾き a および Y 切片 b を用いて Y に各々のピーク高さ比を代入し算出した。ピーク高さ比、重み、検量線の傾きおよび Y 切片は四捨五入して、小数点以下第 6 位まで求めた。相関係数は小数点以下第 5 位を切り捨て、第 4 位まで求めた。濃度の単位は ng/mL とし、有効数字 3 桁（4 桁目を四捨五入）まで求めた。また、定量下限（100 ng/mL）未満の場合は N.D.（not detected）と表示した。真度は四捨五入して、小数点以下第 1 位まで求めた。

薬物動態パラメータの算出については、各採血時間の血漿中濃度の平均値を用いて、ノンコンパートメントモデルにより解析し、最高血漿中濃度（ C_{max} ）、最高血漿中濃度到達時間（ T_{max} ）、消失半減期（ $t_{1/2}$ ）、濃度・時間曲線下面積（ AUC_{last} ：最終観測点までの AUC）について算出した。尚、 C_{max} および T_{max} は実測値を用い、AUC は台形法を用いて算出した。

1-5 GPR119 アゴニスト投与時の血漿中薬物濃度と薬効減弱の関連についての検討

1) 試薬および投与液の調製

グルコース溶液の調製に関しては、第 1 章と同じである。各評価化合物の調製に関しては、1-1-2) の通りである。

2) 耐糖能の評価

媒体投与群（vehicle）、評価化合物の 1 回投与群（single）および 2 回投与群（double）を設定した。Vehicle 群は 1 回目および 2 回目ともに投与媒体を投与した。Single 群は、1 回目は投与媒体、2 回目に評価化合物を投与した。Double 群は、1 回目および 2 回目ともに評価化合物を投与した。

8 時間絶食した C57BL/6J マウスに投与媒体、GSK1292263A（1 mg/kg）、MBX-2982（3 mg/kg）および NCP-332（3 mg/kg）を経口投与した。さらに 8 時間絶食を継続した動物から採血（-30 分）し、2 回目の投与として投与媒体および各評価化合物を経口投与した。30 分後に再び採血（0 分）して、グルコース溶液を経口負荷し、グルコース負荷 20、40 および 60 分後にも採血を実施した。採血方法、血漿分取方法およびグルコース濃度測定法については、第 1 章の 1-5-2) と同じである。

3) データ解析

下記の点以外は第 1 章と同じである。

各時点での血糖値から、グルコース負荷 0～60 分後までの個体毎の血糖値の時間曲線下面積 (AUC_{0-60min}) を求め、下式により血糖 AUC 変化率を算出した。
血糖 AUC 変化率 = (B-A) / A × 100

A : vehicle 群の血糖値 AUC_{0-60min} (mg・min/dL; 平均値)

B : vehicle 群または評価化合物投与群の血糖値 AUC_{0-60min} (mg・min/dL; 個別値)

4) 統計学的処理

Vehicle 群と GSK1292263A、MBX-2982 または NCP-332 投与群の single および double 群との群間比較については、一元配置分散分析を行った後に Dunnett's multiple comparison test (有意水準 5%、両側) を行い、vehicle 群との間の有意差を検定した。各評価化合物の single 群と double 群との 2 群間の比較は、F 検定を行い等分散性が認められた場合 (F>0.05) は student's t-test を、等分散性が認められなかった場合は welch 法を用いて有意差を検定した (有意水準 5%、両側)。また、データのばらつきを最小限にするために、各群の血糖値 AUC_{0-60min} について、Smirnov-Grubbs の棄却検定を行い、棄却された値を除外した (有意水準 5%、両側)。

1-6 GSK1292263A および MBX-2982 の血中濃度維持が耐糖能試験に及ぼす影響の検討

1) 試薬および投与液の調製

グルコース溶液の調製に関しては、第 1 章と同じである。各評価化合物の調製に関しては、1-1-2) の通りである。

2) 耐糖能の評価

媒体投与群 (vehicle)、評価化合物の 1 回投与群 (single) および反復投与 (5 回) 投与群 (multi) を設定した。Vehicle 群は 1～5 回目いずれも投与媒体を投与した。Single 群は、1～4 回目は投与媒体、5 回目に評価化合物を投与した。Multi 群は、1～5 回目いずれも評価化合物を投与した。

8 時間絶食した C57BL/6J マウスに投与媒体、GSK1292263A (1 mg/kg) および MBX-2982 (3 mg/kg) を経口投与した。その後、絶食を継続したまま 2 時間おきに 4 回、同様に反復経口投与した。5 回目の投与から 30 分後にグルコース溶液を経口負荷し耐糖能試験を実施した。採血は 5 回目の投与直前 (-30 分)、グルコース負荷直前 (0 分)、グルコース負荷 20、40 及び 60 分後に実施した。採血方法、血漿分取方法およびグルコース濃度測定法については、第 1 章の 1-5-2) と同じである。

3) 血漿中濃度測定用の採血および濃度測定

GSK1292263A および MBX-2982 の multi 群については、耐糖能試験とは別に血漿中濃度測定用の動物を反復投与の各ポイント（1、2、3 および 4 回目の投与から 2 時間後）で用意し、イソフルラン麻酔下で後大静脈（抗凝固剤：ヘパリン Na）から血液を全採血した。血漿分取方法および血漿中濃度測定法については、1-4-2)、1-4-3) および 1-4-4) と同じである。

4) 耐糖能試験のデータ解析

1-5-3) と同じである。

5) 統計学的処理

Vehicle 群と GSK1292263A または MBX-2982 投与群の single および multi 群との群間比較については、一元配置分散分析を行った後に Dunnett's multiple comparison test（有意水準 5%、両側）を行い、vehicle 群との間の有意差を検定した。各評価化合物の single 群と multi 群との 2 群間の比較は、F 検定を行い等分散性が認められた場合 ($F > 0.05$) は student's t-test を、等分散性が認められなかった場合は welch 法を用いて有意差を検定した（有意水準 5%、両側）。また、データのばらつきを最小限にするために、各群の血糖値 $AUC_{0-60min}$ について、Smirnov-Grubbs の棄却検定を行い、棄却された値を除外した（有意水準 5%、両側）。

1-7 NCP-332 の血中濃度と薬効減弱の相関についての検討

1) 試薬および投与液の調製

グルコース溶液の調製に関しては、第 1 章と同じである。NCP-332 の調製に関しては、1-1-2) の通りである。

2) 耐糖能の評価

媒体投与群 (vehicle)、NCP-332 の 1 回投与群 (single) および 2 回投与群 (double) を設定した。Vehicle 群は 1 回目および 2 回目ともに投与媒体を投与した。Single 群は、1 回目は投与媒体、2 回目に評価化合物を投与した。Double 群は、1 回目および 2 回目ともに評価化合物を投与した。

16 時間絶食した C57BL/6J マウスに投与媒体および NCP-332 (3 mg/kg) を経口投与した。さらに 8 時間絶食を継続した後に給餌をした。1 回目の投与から 72 時間後に動物から採血 (-30 分) し、2 回目の投与として投与媒体および NCP-332 を経口投与した。30 分後に再び採血 (0 分) して、グルコース溶液を経口負荷し、グルコース負荷 20、40 および 60 分後にも採血を実施した。採血方法、血漿分取方法およびグルコース濃度測定法については、第 1 章の 1-5-2) と同じである。

3) データ解析

1-5-3) と同じである。

4) 統計学的処理

Vehicle 群と NCP-332 投与群の single および double 群との群間比較については、一元配置分散分析を行った後に Dunnett's multiple comparison test (有意水準 5%、両側) を行い、vehicle 群との間の有意差を検定した。NCP-332 の single 群と double 群との 2 群間の比較は、F 検定を行い等分散性が認められた場合 ($F > 0.05$) は student's t-test を、等分散性が認められなかった場合は welch 法を用いて有意差を検定した (有意水準 5%、両側)。また、データのばらつきを最小限にするために、各群の血糖値 $AUC_{0-60min}$ について、Smirnov-Grubbs の棄却検定を行い、棄却された値を除外した (有意水準 5%、両側)。

2. 結果

2-1 細胞内 cAMP 測定法を用いた GPR119 アゴニスト活性評価

新たに GSK1292263A および NCP-332 の GPR119 アゴニスト活性を評価した。GSK1292263A および NCP-332 は濃度依存的に細胞内 cAMP レベルを上昇させ、ヒトおよびマウス GPR119 受容体に対する EC_{50} 値および E_{max} 値は、GSK1292263A では hGPR119 : $EC_{50}=69.2$ nmol/L、 $E_{max}=99\%$ 、mGPR119 : $EC_{50}=157$ nmol/L、 $E_{max}=92\%$ であり、NCP-332 では hGPR119 : $EC_{50}=12.9$ nmol/L、 $E_{max}=103\%$ 、mGPR119 : $EC_{50}=17.3$ nmol/L、 $E_{max}=90\%$ であった (表 6)。

表 6. GSK1292263A および NCP-332 の GPR119 アゴニスト活性

Compound	EC_{50} : nmol/L (E_{max} : %AR231453)	
	Human	Mouse
GSK1292263A	69.2 (99%)	157 (92%)
NCP-332	12.9 (103%)	17.3 (90%)

2-2 OGTT を用いた耐糖能の評価

新たに GSK1292263A および NCP-332 の血糖上昇抑制作用を確認するために、C57BL/6J マウスを用いて OGTT による薬効評価を実施した。また、投与媒体を 1% MC に変更したため、MBX-2982 についても改めて評価した。

GSK1292263A (0.1~1 mg/kg) を用いて OGTT を実施したところ、GSK1292263A は $AUC_{0-120min}$ を用量依存的に低下させ 1 mg/kg から有意な変化を示した (図 9A)。また、NCP-332 (0.3~10 mg/kg) の経口投与は $AUC_{0-120min}$ を用量依存的に低下させ 3 mg/kg から有意な変化を示した (図 9B)。MBX-2982 (1~10 mg/kg) の経口投与は 3 mg/kg から $AUC_{0-120min}$ を有意に低下させ、1% CMC + 2% tween80 を投与媒体とした場合と同等の薬効を示した (図 9C)。

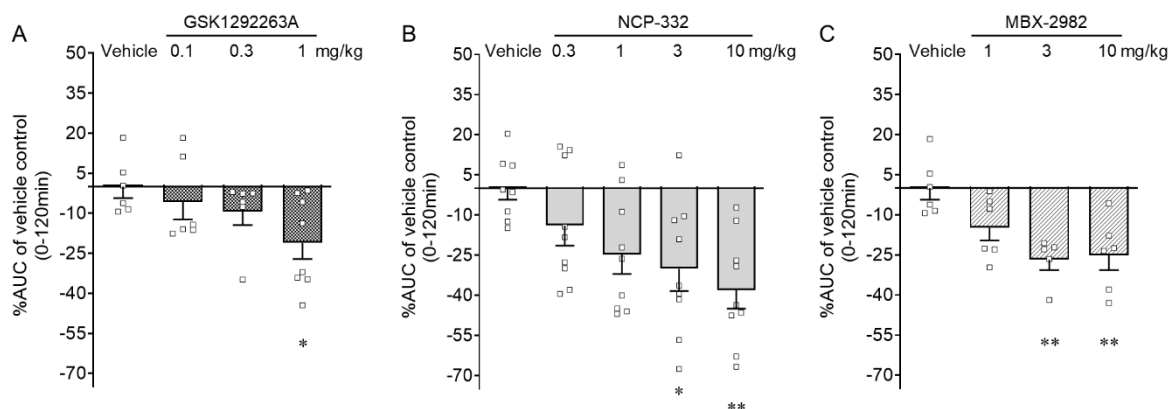


図 9. GSK1292263A、NCP-332 および MBX-2982 の血糖上昇抑制作用

(A) GSK1292263A. (B) NCP-332. (C) MBX-2982.

Means $\pm$ SEM. (A–C) $n = 6-9$ mice; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test) .

2-3 マウスにおける GPR119 アゴニストの血漿中濃度推移の評価

GSK1292263A、MBX-2982 および NCP-332 のマウスにおける薬物動態プロファイルを把握するため、経口投与後の血漿中濃度推移を評価した。

GSK1292263A および MBX-2982 の単回経口投与によるマウス血漿中濃度は、経口投与後 0.25～1 時間でピークを示し、投与 8 時間後には定量下限（LLOQ）未満となった（図 10）。一方、NCP-332 の単回経口投与によるマウスの血漿中濃度は、投与後約 4 時間まで上昇し、投与後 24 時間まで持続的な上昇が認められた（図 10）。

各化合物の薬物動態パラメータを表 7 に示す。GSK1292263A および MBX-2982 は $t_{1/2}$ が約 2 時間以下と血漿からの速やかな消失を示したが、NCP-332 は $t_{1/2}$ が 8 時間以上と血中からの消失が遅い傾向を示した。

表 7. 各化合物の薬物動態パラメータ

Compound	Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	AUC_{last} (ng · hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
GSK1292263A	1	1510	1	4261	2.21
MBX-2982	3	4337	1	11725	1.66
NCP-332	3	1615	24	55028	> 8

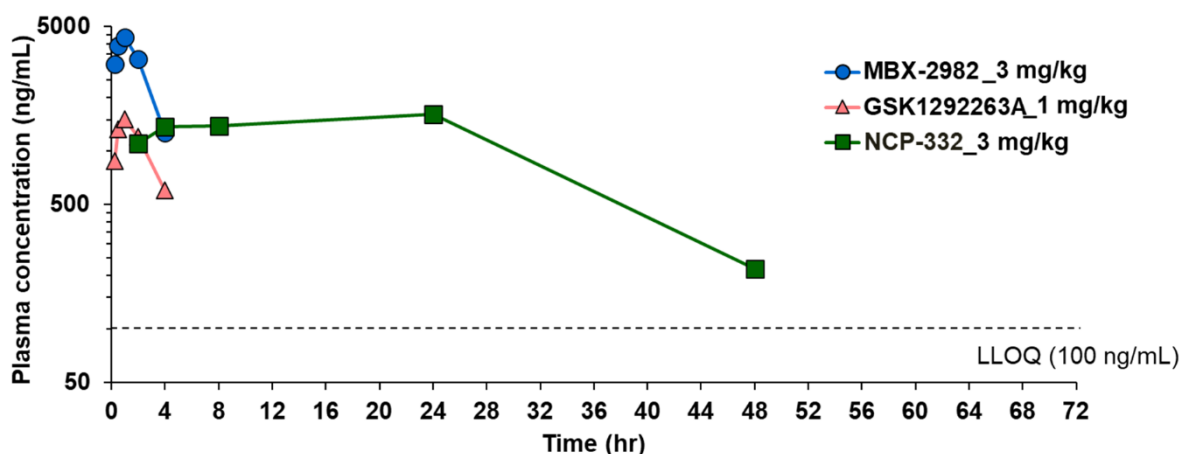


図 10. 各化合物の血漿中濃度推移

n = 3 mice. * LLOQ（定量下限）: Lower limit of quantification

2-4 GPR119 アゴニスト投与時の血漿中薬物濃度と薬効減弱の関連についての検討

次に薬効の減弱と薬物動態プロファイルの関連について検討するために、血中に薬効発現に十分な化合物濃度がある場合と無い場合で薬効発現にどのような影響が出るかを検討した。検証に用いる 3 化合物の薬物動態プロファイル ($t_{1/2} < 8$ hr :

GSK1292263A および MBX-2982、 $t_{1/2} > 8$ hr : NCP-332) から 8 時間間隔で 2 回投与した際の 2 回目の投与後に実施する OGTT における耐糖能に対する影響を指標とすることとした。2 回投与試験の試験スケジュールを図 11A に示す。

その結果、いずれの化合物も single 群では、血糖上昇抑制作用を示した。一方で、double 群では、 $t_{1/2}$ の長い NCP-322 の血糖上昇抑制作用は消失した（図 11B）のに対して、MBX-2982 および GSK1292263A は薬効を維持した（図 11C および 11D）。

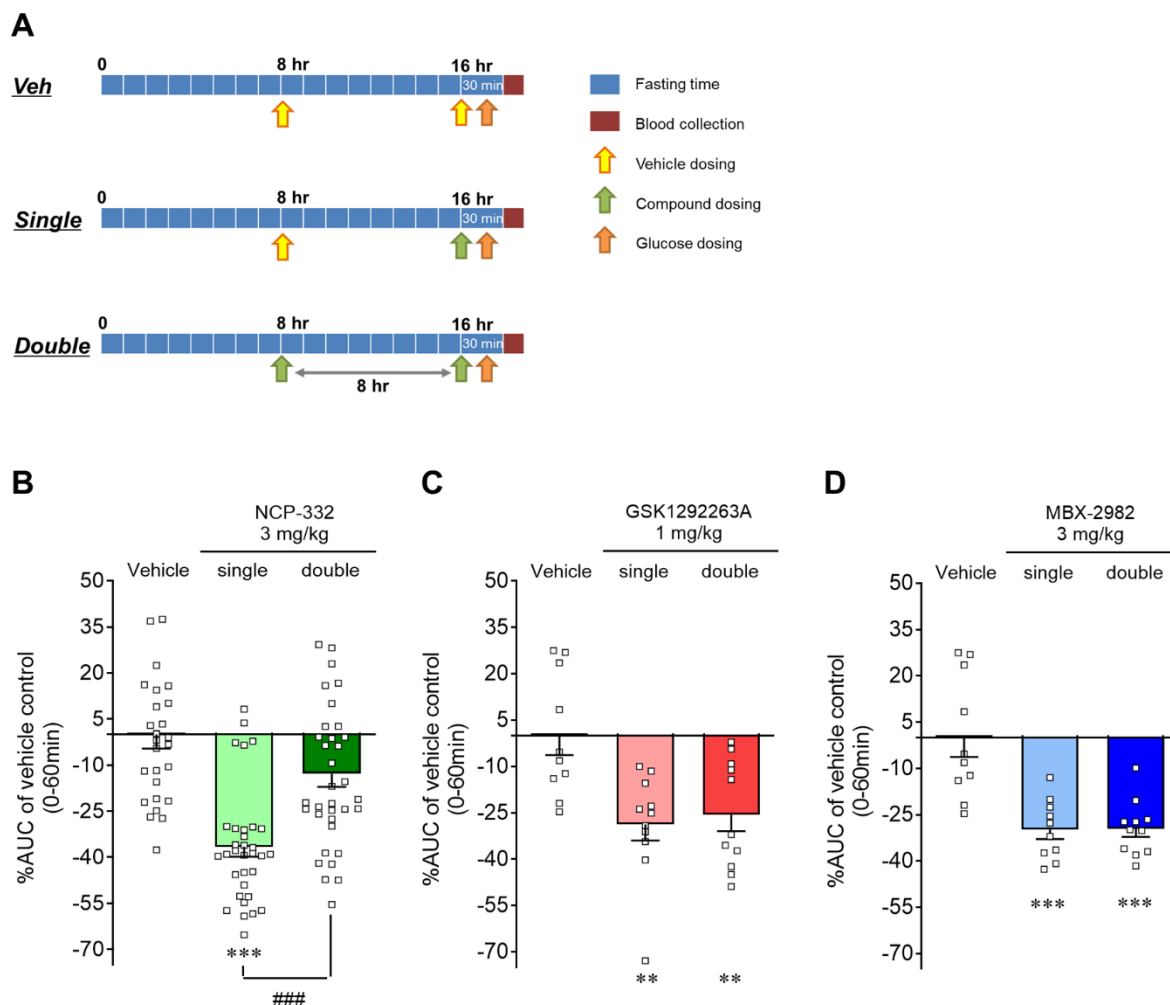


図 11. 2 回投与試験における GPR119 アゴニストの血糖上昇抑制作用に対する影響

(A) 2 回投与試験の試験プロトコール

(B) NCP-332. (C) GSK1292263A. (D) MBX-2982.

Means $\pm$ SEM (B–D) $n = 10\text{--}35$ mice; ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test), ### $p < 0.001$ versus single group (Student's t-test).

2-5 GSK1292263A および MBX-2982 の血中濃度維持が耐糖能に及ぼす影響の検討

化合物の血漿中濃度持続時間と薬効発現の関係をさらに検証するため、2 回投与試験で有効性が認められた $t_{1/2}$ が短い GSK1292263A および MBX-2982 について、それぞれの化合物の血漿中濃度を維持した際の薬効発現について検討した（図 12A）。各化合物の血漿中濃度の維持は、それぞれの化合物の半減期で追加投与することにより行った（図 12B および 12C）。

その結果、両化合物とも single 群では、血糖上昇抑制作用を示したが、multi 群では、血糖上昇抑制作用が消失した（図 12D および 12E）

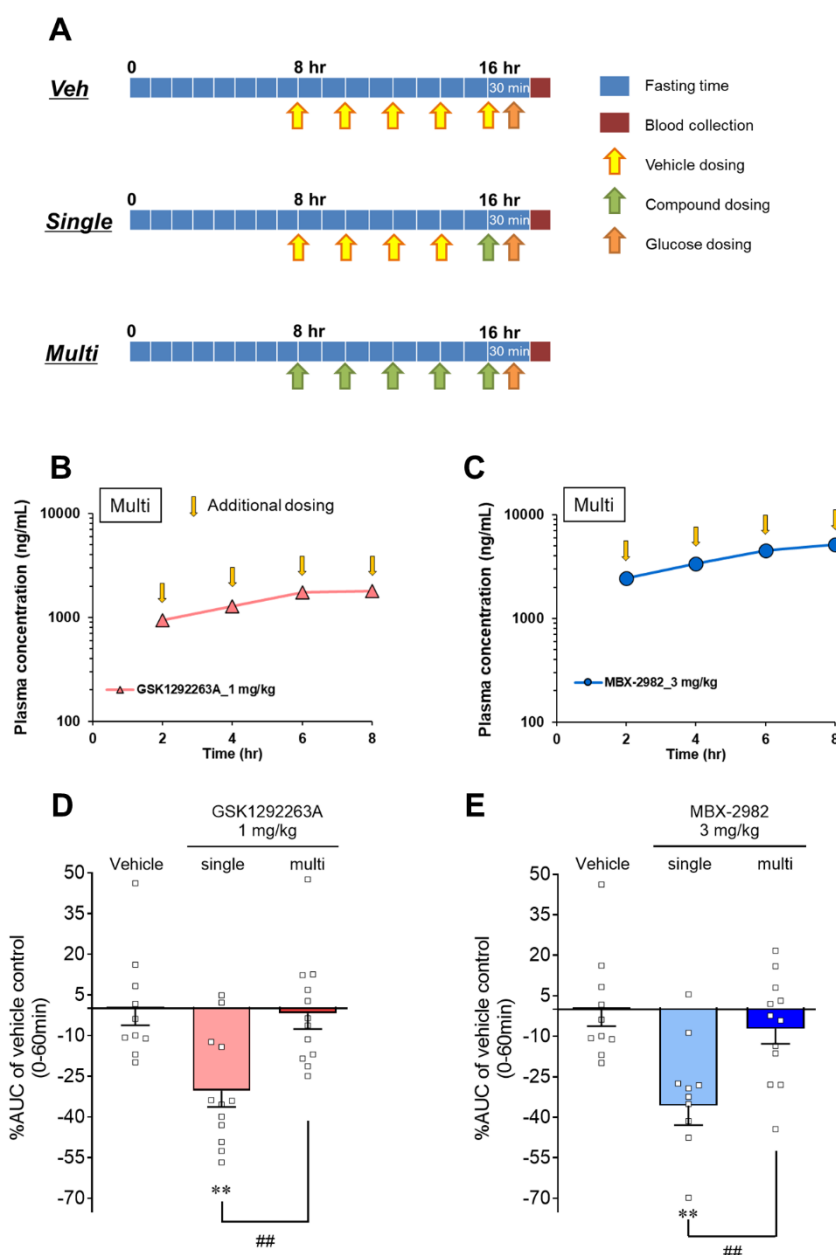


図 12. GSK1292263A および MBX-2982 の血中濃度維持が耐糖能に及ぼす影響

(A) 複数回投与試験の試験プロトコール

(B) GSK1292263A の血中濃度推移 n = 3 mice および (D) 複数回投与後の耐糖能

(C) MBX-2982 の血中濃度推移 n = 3 mice および (E) 複数回投与後の耐糖能

Means $\pm$ SEM (D and E) n = 10–12 mice; **p < 0.01, and **p < 0.01 versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test), ## p < 0.01 versus single group (Student's t-test).

2-6 NCP-332 の血中濃度と薬効減弱の相関についての検討

2-5 において、GSK1292263A および MBX-2982 は血漿中濃度の持続により薬効が消失したことから、血漿中に化合物が長時間持続して存在することが薬効減弱に繋がる可能性が考えられた。そこで、次にこの薬効減弱の可逆性について検討するため、2 回投与試験において薬効減弱が認められた NCP-332 を用いて、血漿中の薬物濃度と薬効発現の関係について検証した。

具体的には、NCP-332 が初回投与後、血漿中から検出されなくなる投与後 72 時間で 2 回目の投与を行い、OGTT を実施した (図 13A)。その結果、投与後 8 時間では消失してしまった血糖上昇抑制作用が、72 時間後では確認することができた (図 13B)。

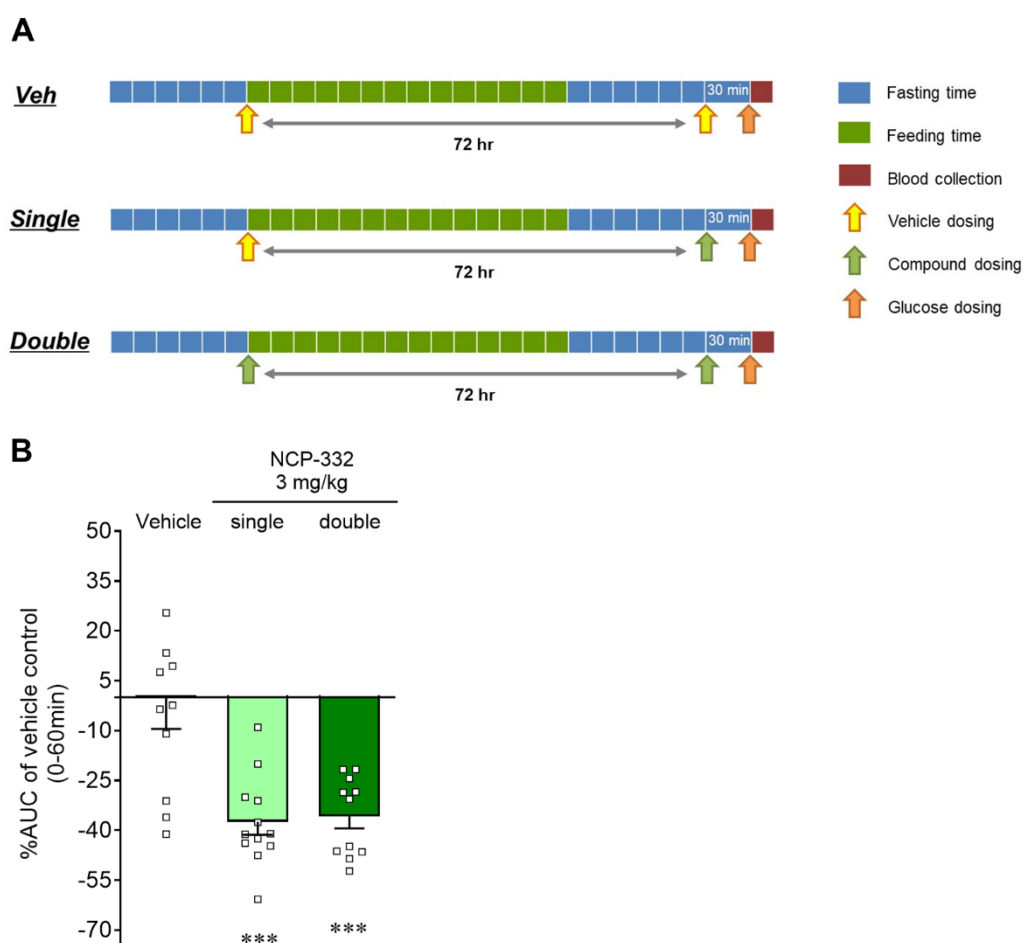


図 13. NCP-332 の血中濃度と薬効減弱の相関について

(A) 2 回投与試験の試験プロトコール

(B) Means $\pm$ SEM n = 11–12 mice; ***p < 0.001 versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test) .

3. 考察

本章では GPR119 アゴニストを開発する上で、臨床上の課題となっている薬効減弱について、薬物動態プロファイルとの関連性を検証した。

検証にあたり、比較化合物（GSK1292263A、MBX-2982 および NCP-332）の薬効および薬物動態プロファイルの取得を行った。マウス OGTT を用いた薬効評価では、GSK1292263A、MBX-2982 および NCP-332 はそれぞれ 1、3 および 3 mg/kg の用量から有意な血糖上昇抑制作用を示すことが確認された。また、薬効用量でのマウスにおけるそれぞれの血漿中薬物濃度推移について確認したところ、GSK1292263A および MBX-2982 は、経口投与後 0.25～1 時間でピークを示し、投与 8 時間後には定量下限未満となる、ラットと同様の血中から速やか消失する薬物動態プロファイルを示した。一方で、NCP-332 は投与後 24 時間でも C_{max} 付近の血中濃度を維持し、 $t_{1/2}$ が 8 時間以上となる血中からの消失が遅い薬物動態プロファイルを示した。

次に薬効の減弱と薬物動態プロファイルの関連について評価するために、血中に薬効発現に十分な化合物濃度がある場合と無い場合で薬効発現にどのような影響が出るか検討した。前者については、 $t_{1/2}$ が長い NCP-332 を後者については、 $t_{1/2}$ が短い GSK1292263A および MBX-2982 を用いて、8 時間間隔での 2 回投与試験で検証した。その結果、NCP-332 の血糖上昇抑制作用は消失したのに対して、MBX-2982 および GSK1292263A は薬効を維持した。

また、化合物の血漿中濃度持続時間と薬効発現の関係をさらに検証するため、2 回投与試験で有効性が認められた $t_{1/2}$ が短い GSK1292263A および MBX-2982 について、それぞれの化合物の血漿中濃度を維持した際の薬効発現について検討した。その結果、血漿中濃度を維持すると GSK1292263A および MBX-2982 両化合物とも血糖上昇抑制作用が消失した。以上から、血漿中に GPR119 アゴニストが長時間持続して存在することは薬効減弱に繋がる可能性が考えられた。

そこで、次にこの薬効減弱の可逆性について検討するため、2 回投与試験において薬効減弱が認められた NCP-332 を用いて、血漿中の薬物濃度と薬効発現の関係についてさらに検証した。その結果、2 回投与試験において投与後 8 時間では消失した血糖上昇抑制作用が、血漿中から NCP-332 が検出されなくなる投与後 72 時間では確認できることが明らかとなった。

これまでの検討結果から血漿中薬物濃度の維持は、GPR119 アゴニストの薬効発現の妨げとなるが、その影響は可逆的であることが示唆された。アゴニストの薬効が減弱する要因として、その対象とする受容体の内在化という機構が一般的に知られている[45]。内在化は特異的なリガンドが GPCR に結合した際に起こる各種シグナル伝達が過剰に持続されることを防ぐための生体防御の機構と考えられており正常な生体反応であるが、アゴニストを対象とする医薬品開発においては障壁となることも少なくない。内在化までの基本的な流れとしては、細胞膜上の GPCR にリガンドが結合し、共役する G 蛋白がシグナル伝達を起こす。続いて活性化された各種キナーゼにより GPCR がリン酸化されると、そのリン酸化部位に β アレスチンが結合し、シグナル伝達を減衰させる。GPCR と β アレスチンの複合体は AP2、クラスリンおよびダイナミ

ンなどの働きにより細胞質内へと移行するといった順となる。そして最終的に内在化した GPCR はリソソームによって分解されるか、分解を免れ細胞膜上にリサイクルされる。この内在化からリサイクルまでの間は、応答性が低下した状態（脱感作）となる[45]。

GPR119 受容体の内在化までを確認した報告例は無いが、内在化の最初のステップである β アレスチンの結合までを確認した報告がある[46]。一方で、GLP-1 受容体の内在化については、複数の報告がある[47, 48]。GLP-1 受容体はリガンド結合後数分で細胞膜上にある受容体の約半数が内在化することが報告されており、脱感作速度は非常に速い[49]。新たに受容体が細胞膜上に移行するターンオーバーまでの時間については情報が無いが、少なくとも GLP-1 受容体を介した血糖上昇抑制作用に関して、血中での長時間の薬物暴露は、内在化による脱感作が関連する薬効発現の低下を引き起こす要因となり得ることが考えられる。

また、別の観点としては化合物の脂溶性が関与している可能性も考えられる。医薬品開発において、脂溶性を考慮した化合物デザインは薬理活性や毒性（溶解度、膜透過性、代謝および消失、経口吸収性、分布、一般毒性、hERG 阻害、CYP 阻害など）とも関連するため重要である。一般的に脂溶性の指標としては logP 値や logD 値（LogP を pH で補正した値）が用いられ、医薬品開発においては、logP 値は 5 以下であること、望ましくは 1~3 の範囲であることが推奨されている[50-52]。

膜透過性に焦点を当てると、LogD 値が低すぎると親水性の高さから細胞膜を通過できず、逆に高すぎるとその脂溶性から細胞膜に取り込まれ細胞内へ移行できない。関連して、細胞膜に取り込まれ細胞内に移行できなかった化合物は、細胞膜に蓄積され細胞膜上で受容体へ持続的なアクセスを続ける可能性が報告されている[53]。一方で、 β -アドレナリン受容体の事例では、短時間のアゴニスト曝露（数分程度）は、細胞内で検出される受容体の総数を変えないが、より長時間の曝露（数時間以上）では、内在化後に分解される受容体数が増加し、新たに細胞膜上に受容体をリクルートするために新しいタンパク質合成が必要になることが報告されている[54]。GLP-1 受容体においては、長時間作用型の GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 が GLP-1 と比較して、より持続的な受容体脱感作を引き起こすことが報告されている[49]。

脂溶性の指標である logD_{7.4} 値は、GSK1292263A、MBX-2982 および NCP-332 で、それぞれ 3.53、3.56 および 4.81 であり、GSK1292263A および MBX-2982 と比較して NCP-332 は脂溶性が高い。上述の報告を踏まえると、この脂溶性の高さが、長時間作用による持続的な脱感作や内在化後の受容体分解促進に寄与し、薬効発現の低下に繋がった可能性も考えられた。

以上、本章の研究により GPR119 アゴニストの血漿中濃度と薬効発現には逆の相関があるという仮説をある程度支持する結果が得られたものと考えられる。ただし、検証した化合物数が少ないため更なる検証が必要であると考えられた。一方で、薬効減弱について評価する上で、本章で検討した 2 回投与試験は有効な手段であると考えられたため、次章ではこの評価系を用いてさらに検証を進めることとした。

第3章 GPR119 アゴニストに求められる薬理学的および薬物動態的プロファイルを有する新規化合物 NCP-870 の同定

緒言

第2章において、実施した検証の結果、血漿中薬物濃度が高く維持されている状態で追加投与を行っても薬効が減弱する結果となり、GPR119 アゴニストの血漿中濃度と薬効発現には逆の相関がある可能性が示された。本章ではこの考えをさらに補足するデータを得るため、様々な薬理学的および薬物動態的プロファイルを持つ GPR119 アゴニストを用いて、薬効減弱と血漿中薬物濃度の関連について検討を行い、最終的な開発化合物を選択することを目的とした。

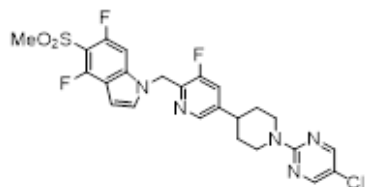
尚、第1章において有力な GPR119 アゴニストである NCP-322 を同定したが、その後の検討で NCP-322 には変異原性が認められたため、開発を断念することとした。代わりに継続して実施していた化合物スクリーニングにおいて見出した NCP-322 と同等の *in vitro* および *in vivo* プロファイルを有する複数の NCP 化合物を用いて検証を行うこととした。また、薬効減弱の評価系としては第2章において確立した2回投与試験を用いることとした。

1. 方法

1-1 実験材料および使用動物

1) 使用薬物

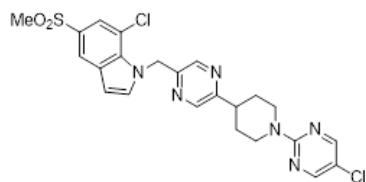
NCP-370（日本ケミファ株式会社創薬研究所にて合成）



分子式：C₂₄H₂₁ClF₃N₅O₂S

分子量：535.97

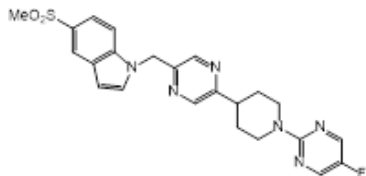
NCP-384（日本ケミファ株式会社創薬研究所にて合成）



分子式：C₂₃H₂₂Cl₂N₆O₂S

分子量：517.43

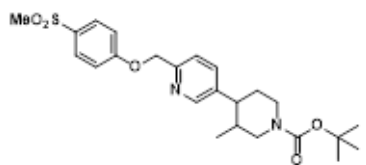
NCP-405（日本ケミファ株式会社創薬研究所にて合成）



分子式：C₂₃H₂₃FN₆O₂S

分子量：466.53

NCP-426（日本ケミファ株式会社創薬研究所にて合成）



分子式：C₂₄H₃₂N₂O₅S

分子量：460.59

COc1nc2c(nc3c2c1)cc4c3n(Cc5ccc(cc5N6CCN(CC6)C(=O)OC(C)(C)C)cc5)cc5

分子量：470.59

CC(C)OC(=O)N1CCN(C1)c2ncnc2CN3C=CC=C(C=C3)C4=CC=CC=C4C(=C5C=CC=C(C=C5)OC(=O)S)S

分子量：457.55

COC(=O)c1cc(F)c2c(c1)c3ccccc3n2Cn4cnc5c4cnc5C6CCN(C6)c7ncnc8cc(C(F)(F)F)nc78

分子量：534.53

COc1ccc2c(c1)c(c3ccccc23)N(C4=CC=CC=C4)C5=CC=CC=C5C6=CC=CC=C6N7C=CC(=C8C=CC(=C9C=CC(=C8)N9)N7)C6

分子量：545.43

COC(=O)N1CCN(C1c2ncnc2CN3C=CC=C(C=C3)SC(=O)OC)CC4

分子量：471.57

2) 薬物調製方法

第 1 章および第 2 章と同じである。

3) 試薬

第 1 章および第 2 章と同じである。新たに用いた試薬を下記に示す。

HTRF cAMP Hirange kit 1000test (Cisbio, #62AM6PEB)

4) 細胞株

hGPR119 (NM_178471) 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞；日本ケミファ株式会社
mGPR119 (NM_181751) 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞；日本ケミファ株式会社
rGPR119 (NM_181770) 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞；日本ケミファ株式会社
CAT 定常発現 Flp-In T-Rex 293 細胞；日本ケミファ株式会社

5) 使用動物

マウスについては、8～11 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールスリバー株式会社より購入し、約 1 週間馴化飼育後に使用した。飼育条件および動物倫理委員会の承認は第 1 章と同じである。

イヌについては、ハムリー株式会社筑波研究センター動物技術研究所が飼育する北山ラベス株式会社より購入した 1 歳 8 ヶ月～3 歳 11 ヶ月齢の雄性ビーグル犬を用いた。また、サルについては、ハムリー株式会社筑波研究センター動物技術研究所が飼育する中国より購入した 6 歳～7 歳の雄性カニクイザルを用いた。全ての動物は設定温度 $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、設定湿度 $50 \pm 20\%$ 、照明時間 7:00～19:00 環境の下、水道水および固形飼料（イヌ：TC-1、サル：PS-A、オリエンタル酵母株式会社）を自由摂取させた。また、試験前日までは、イヌはステンレスケージ（650 mm×750 mm×700 mm）、サルはサル用飼育ケージ（620 mm×760 mm×830 mm）にてケージ当たり 1 匹になるように飼育した。

尚、全ての動物実験はハムリー株式会社筑波研究センター動物技術研究所における動物倫理委員会の承認を受け実施した。

1-2 OGTT を用いた耐糖能の評価

第 2 章と同じである。

1-3 マウスにおける GPR119 アゴニストの血漿中濃度推移の評価

第 2 章と同じである。

1-4 2 回投与試験を用いた GPR119 アゴニスト投与時の血漿中薬物濃度と薬効減弱の関連についての検討

第 2 章と同じである。

1-5 反復投与試験における NCP 化合物の有効性の評価

1) 試薬および投与液の調製

グルコース溶液の調製に関しては、第 1 章と同じである。各評価化合物の調製に関しては、第 2 章 1-1-2) の通りである。

2) 耐糖能の評価

媒体投与群 (vehicle)、評価化合物の 1 回投与群 (single) および反復投与 (2 回/日) 投与群 (multi) を設定し、8 日間反復投与後に耐糖能試験を実施した。Vehicle 群は 1~8 日間いずれも投与媒体を投与した。Single 群は、1~7 日間および 8 日目の 1 回目の投与までは投与媒体、8 日目の 2 回目に評価化合物を投与した。Multi 群は、1~8 日間いずれも評価化合物を投与した。

8 日目に 8 時間絶食した C57BL/6J マウスに投与媒体、評価化合物を経口投与した。さらに 8 時間絶食を継続した動物から採血 (-30 分) し、2 回目の投与として投与媒体および各評価化合物を経口投与した。30 分後に再び採血 (0 分) して、グルコース溶液を経口負荷し、グルコース負荷 20、40 および 60 分後にも採血を実施した。採血方法、血漿分取方法およびグルコース濃度測定法については、第 1 章の 1-5-2) と同じである。

1-6 細胞内 cAMP 測定法を用いた GPR119 アゴニスト活性評価

1) 試薬の調製方法

(1) 培養培地

第 1 章と同じである。

(2) HTRF cAMP Hirange kit の Working Solution

① cAMP 標準溶液の調製

キットに同封されている 11.2 $\mu\text{mol/L}$ の cAMP 標準溶液をキットに同封されている diluent で終濃度の 4 倍濃度となるように希釈系列を作製した。

② cAMP-d2 working solution の調製

cAMP-d2 を、キットに同封されている conjugate & lysis buffer を用いて添加直前に 5 倍希釈した。

③ anti cAMP-Cryptate working solution の調製

anti cAMP-Cryptate を、キットに同封されている conjugate & lysis buffer を用いて添加直前に 5 倍希釈した。

(3) Stimulation buffer の調製

第 1 章と同じである。

(4) 被験物質および対照物質の調製

第 1 章と同じである。

(5) Assay buffer の調製

(4) で調製した被験物質および対照物質の各希釈系列を (3) で調製した stimulation buffer で評価濃度の 2 倍濃度となるよう希釈した。DMSO の最終濃度は 1%とした。

2) 細胞の継代

第 1 章と同じである。

3) 細胞の播種および蛋白誘導

Assay 時は、384 well white plate (株式会社グライナージャパン、#781080) を使用し、assay medium を用いて細胞を播種した。継代と同様の方法で細胞を剥離後、assay medium を用いて懸濁し遠心分離した。上清を除去し、PBS (－) を用いて懸濁し細胞を洗浄した。遠心分離後、上清を除去し、assay medium で懸濁して細胞液を調製した。trypan blue stain を用いて細胞数を数え、384 well white plate に 750 cells/well で播種し 24 時間培養した。その後、hGPR119 受容体の誘導には、tetracycline を 10 ng/mL、mGPR119 および rGPR119、CAT 蛋白の誘導には tetracycline を 20 ng/mL となるよう添加し、20 時間培養することで蛋白誘導を行い、cAMP assay に用いた。

4) cAMP assay

3) にて蛋白誘導を行った細胞を播種した 384 well plate の培地を除去し、1) - (5) で調製した被験物質および対照物質の希釈系列を含む assay buffer (0.5mM IBMX PBS (－)) を添加した。化合物添加後 30 分間 25°C でインキュベーションし、この間に産生される細胞内 cAMP 量を市販のキット (HTRF cAMP Hirange kit) および測定機器 (EnVisionXcite Multilabel Reader、PerkinElmer Japan Co., Ltd.) を用いて測定した。

5) データ解析

アッセイは各濃度 triplicate で行い、独立したアッセイを 3 回実施した。データの集計には Microsoft Office Excel (日本マイクロソフト株式会社) を用い、作図、検量線の作成および非線形解析には GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) を用いた。

まず、standard well の Delta F 値を算出し検量線を作成した。次に、compound well の Delta F 値を算出し、先の検量線を用いて cAMP 濃度 (nmol/L) に換算し

た。その値をプロットして用量反応曲線を作成し、非線形解析により EC₅₀ 値（最大反応の 50%の反応を惹起する濃度）を求めた。さらに、対照物質である AR231453 が示す最大反応を 100%としたときの各被験物質の最大反応値を E_{max} 値（%）として算出した。

Delta F 値の算出式

(1)

$$\text{Ratio} = \frac{A_{665 \text{ nm}}}{B_{615 \text{ nm}}} \times 10^4$$

A_{665 nm} = fluorescence at 665 nm
B_{615 nm} = fluorescence at 615 nm

(2)

$$\text{Delta F (\%)} = \frac{\text{Ratio}_{\text{standard or compound}} - \text{Ratio}_{\text{nega}}}{\text{Ratio}_{\text{nega}}} \times 100$$

Ratio_{standard} = standard well ratio
Ratio_{compound} = compound well ratio
Ratio_{nega} = negative control well ratio

1-7 GLP-1 分泌作用の評価

下記の点以外は第 1 章と同じである。

投与媒体を 1% CMC + 2% tween80 から 1% MC に変更した。

1-8 イヌおよびサルにおける GPR119 アゴニストの血漿中濃度推移

1) 投与液の調製

各評価化合物の調製に関しては、1-1-2) の通りである。

2) 投与および採血

16 時間絶食したビーグル犬またはカニクイザルに NCP-870 (3 mg/kg) 投与液を経口投与した。投与後 0.5、1、3、5、8 および 24 時間に、NCP-332 については、投与後 2、4、8、24、48、72 時間に覚醒下で橈側皮静脈（抗凝固剤：ヘパリン Na）から血液を 1 mL/時点で採血した。尚、24 時間以降に採血する動物については、投与 8 時間後に給餌し、以後は非絶食下で採血した。得られた血液は、4°C、1670 × g で 15 分間遠心分離して血漿を分取し、血漿中の未変化体濃度を測定した。

3) 血漿中濃度測定

NCP-870 の血漿中濃度測定は LC/MS/MS 法を用いて積水メディカル株式会社で実施した。

4) 薬物動態パラメータの算出

各採血時間の血漿中濃度推移を Microsoft Excel（日本マイクロソフト株式会社）を用いて、ノンコンパートメントモデルにより解析し、最高血漿中濃度（ $C_{\max}$ ）、最高血漿中濃度到達時間（ $T_{\max}$ ）、消失半減期（ $t_{1/2}$ ）、濃度・時間曲線下面積（ AUC_{last} ：最終観測点までの AUC）について算出した。尚、 $C_{\max}$ および $T_{\max}$ は実測値を用い、AUC は台形法を用いて算出した。

2. 結果

2-1 OGTT を用いた NCP 化合物の血糖上昇抑制作用の評価

まずは、10 mg/kg 以下の用量で十分な血糖上昇抑制作用（vehicle 群に対して 20% 以上の血糖値 AUC₀₋₁₂₀ の低下）を示す NCP 化合物を得るため OGTT を用いたスクリーニングを実施した。

その結果、NCP-370、384、405、426、436、445、539、684 および 870（血糖値 AUC 変化率 36%、22%、24%、29%、29%、25%、27%、30% および 27%）の 9 種類の NCP 化合物を見出した（図 14）。

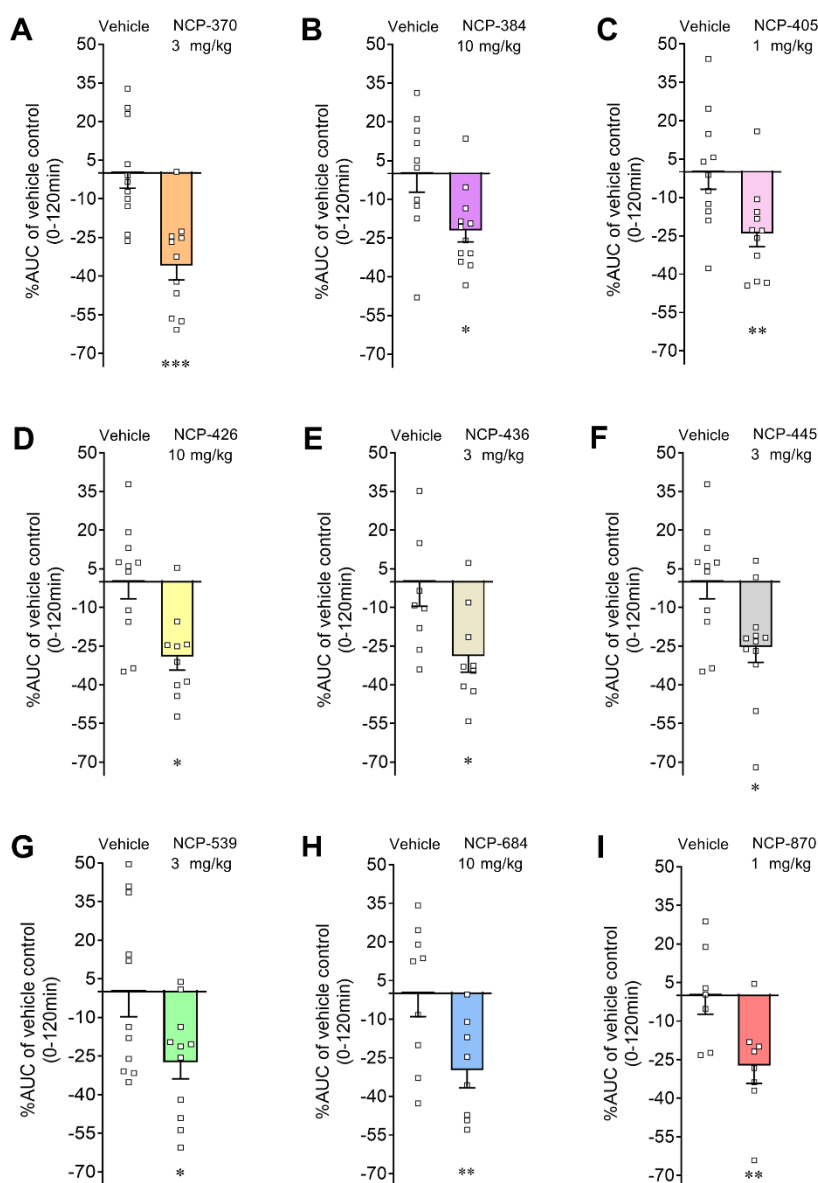


図.14 NCP 化合物の血糖上昇抑制作用

(A) NCP-370. (B) NCP-384. (C) NCP-405. (D) NCP-426. (E) NCP-436.
(F) NCP-445. (G) NCP-539. (H) NCP-684. (I) NCP-870.

Means ± SEM (A–I) n = 7–12 mice; *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 versus vehicle (Student's t-test) .

2-2 マウスにおける GPR119 アゴニストの血漿中濃度推移の評価

次に、2-1 にて見出した NCP 化合物の薬物動態プロファイルを把握するため、経口投与後の血漿中濃度推移を評価した。

NCP-426、436、445 および 870 の単回経口投与によるマウス血漿中濃度は、経口投与後 0.25～1 時間でピークを示し、投与 8 時間後には定量下限（LLOQ）未満となり、血中からの消失が早い傾向を示した（図 15A）。一方、NCP-370、384、405、539 および 684 の単回経口投与によるマウスの血漿中濃度は、投与後 8 時間まで薬物濃度が維持される血中濃度推移を示し、血中からの消失が遅い傾向を示した（図 15B）。

各化合物の薬物動態パラメータを表 8 に示す。

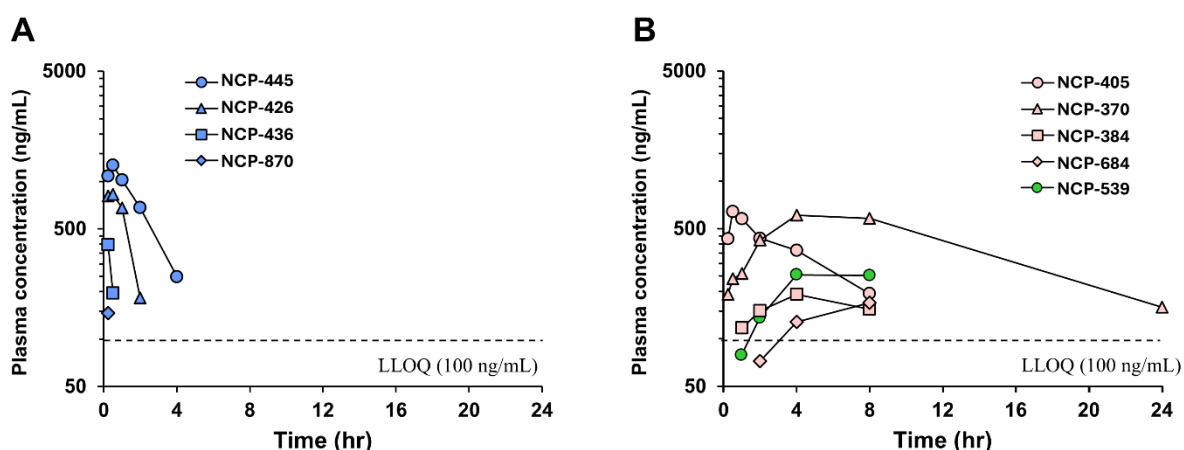


図.15 NCP 化合物の血漿中濃度推移の評価

表 8. NCP 化合物の薬物動態パラメータ

血中からの消失が早い化合物

Compound	Dose (mg/kg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC _{last} (ng · hr/mL)	t _{1/2} (hr)
NCP-445	3	1268	0.5	2781	1.49
NCP-426	10	828	0.5	1112	0.66
NCP-436	3	396	0.25	124	N.C.
NCP-870	1	147	0.25	18	N.C.

血中からの消失が遅い化合物

Compound	Dose (mg/kg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC _{last} (ng · hr/mL)	t _{1/2} (hr)
NCP-405	1	643	0.5	2913	4.50
NCP-370	3	610	4	9883	9.74
NCP-384	10	191	4	1225	> 8
NCP-684	10	169	8	830	> 8
NCP-539	3	255	4	1532	> 8

2-3 2回投与試験を用いた GPR119 アゴニスト投与時の血漿中薬物濃度と薬効減弱の関連についての検討

2-2 において、血中からの消失速度が速い化合物および遅い化合物を、それぞれ $t_{1/2} < 0.5$ hr および $t_{1/2} > 8$ hr を指標として選択し、薬効減弱と血漿中濃度の持続時間との相関をさらに検証した。血中からの消失速度が速い化合物としては、NCP-436 および 870、血中からの消失速度が遅い化合物としては、NCP-370、384、539 および 684 を用いて第 2 章 2-4 と同様に 2 回投与試験を実施した。また、医薬品としては幅広い用量範囲で有効性を維持することが重要であるため、薬効を維持した化合物については、高用量についても評価した。

その結果、 $t_{1/2}$ の短い NCP-436 および NCP-870 は薬効減弱することなく血糖上昇抑制作用を示した（図 16A および 16B）。 $t_{1/2}$ の長い NCP-370 および NCP-384 は single 群に対して有意な薬効減弱を示した。一方で、NCP-539 および NCP-684 は薬効を維持したが、single 群に対して減弱する傾向を示した。

薬効を維持した化合物のうち NCP-870、NCP-539 および NCP-684 については、高用量（30 mg/kg）についても評価した。結果としては、 $t_{1/2}$ の短い NCP-870 は低用量と同様に高用量でも薬効減弱することなく血糖上昇抑制作用を示した（図 17A）。一方で、 $t_{1/2}$ の長い NCP-539 および NCP-684 は低用量と同様に高用量でも薬効が減弱する傾向を示し、NCP-684 では有意な血糖上昇抑制作用が消失した（図 17B および 17C）。また、各化合物の血中濃度推移は高用量においても低用量と同様であり、NCP-870 は血中からの消失が早く、NCP-539 および NCP-684 は消失が遅い傾向を示した（表 9）。

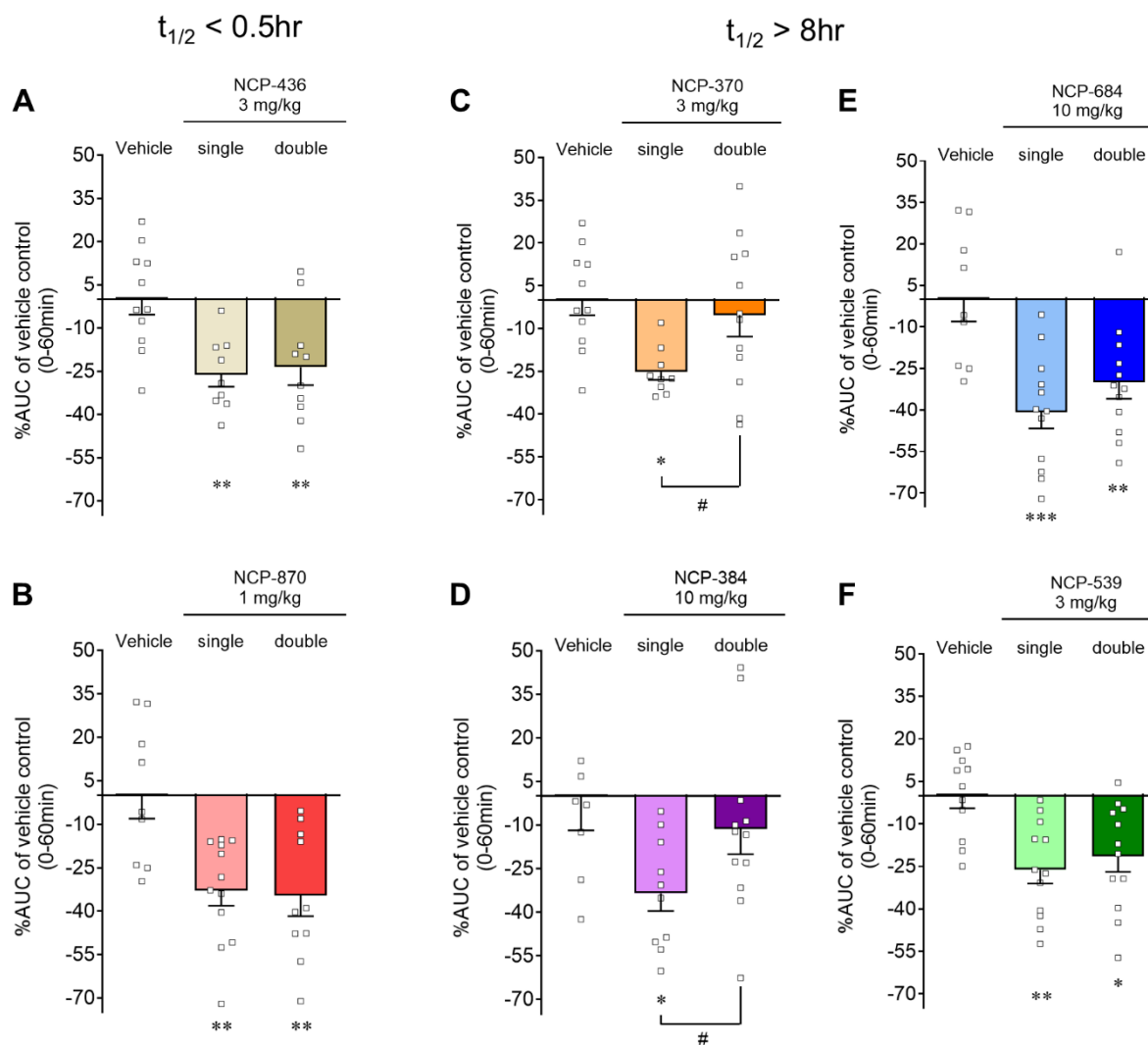


図 16. 2 回投与試験における NCP 化合物の血糖上昇抑制作用に対する影響
(低用量)

(A) NCP-436. (B) NCP-870. (C) NCP-370. (D) NCP-384. (E) NCP-684. (F) NCP-539.

Means $\pm$ SEM (A-F) $n = 8-12$ mice; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test), # $p < 0.05$ versus single group (Student's t-test).

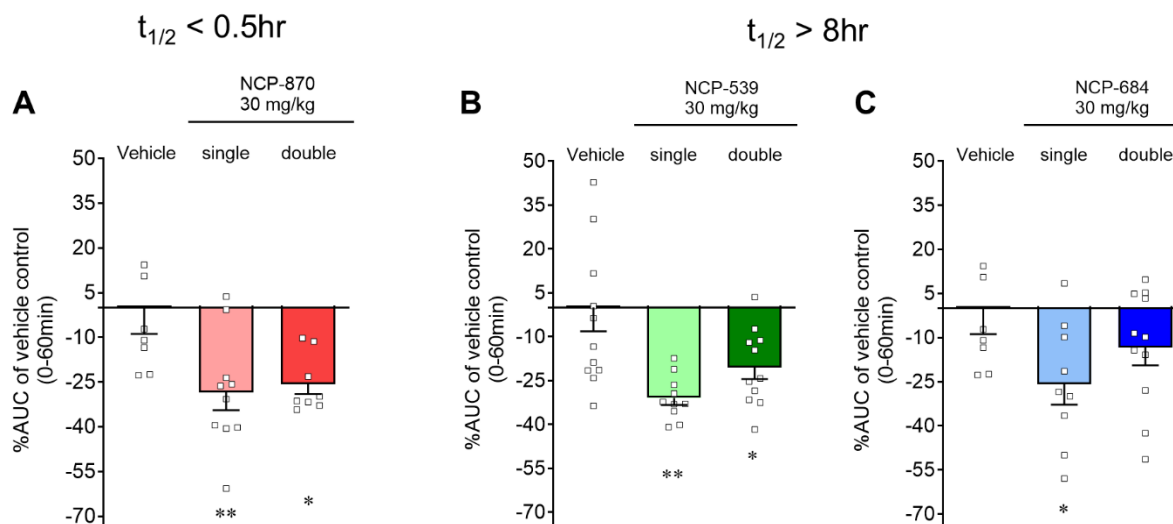


図 17. 2 回投与試験における NCP 化合物の血糖上昇抑制作用に対する影響
(高用量)

(A) NCP-870. (B) NCP-539. (C) NCP-684.

Means $\pm$ SEM (A–C) $n = 8$ – 12 mice; * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$ versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test) .

表 9. NCP-870、539 および 684 の薬物動態パラメータ (高用量)

Compound	Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	AUC_{last} (ng $\cdot$ hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
NCP-870	30	3603	0.50	5720	0.83
NCP-539	30	600	8	3845	> 8
NCP-684	30	764	8	3550	> 8

2-4 反復投与試験における NCP 化合物の有効性の評価

2-3 において、NCP-870 および NCP-539 は低用量から高用量まで薬効を維持した。しかし、NCP-539 は高用量では薬効が減弱する傾向が認められたため、さらに投与回数を増やした際に薬効が消失する可能性が懸念された。そのため、ある程度の期間反復投与した際の薬効に対する影響を検討するため、反復投与試験を実施した。試験では、1 日 2 回、8 日間、各化合物の高用量を反復投与した後、OGTT を実施した (図 18A)。その結果、両化合物とも single 群では、血糖上昇抑制作用を示したが、multi 群では、NCP-870 は全く薬効の減弱が起きなかったのに対し (図 18B)、NCP-539 では血糖上昇抑制作用が完全に消失した (図 18C)。

124%、rGPR119 : $EC_{50}=372.4$ nmol/L、 $E_{max}=129\%$ であり、 EC_{50} 値については、マウスおよびラットではヒトの約 6~8 倍程度高値を示したが、 E_{max} 値はいずれの種においても同等であった（図 19A–C）。また、CAT 定常発現細胞株では cAMP レベルを上昇させなかった（図 19D）ことから、本試験系における GPR119 アゴニスト活性の評価に宿主細胞による影響はないことが確認できた（表 10）。

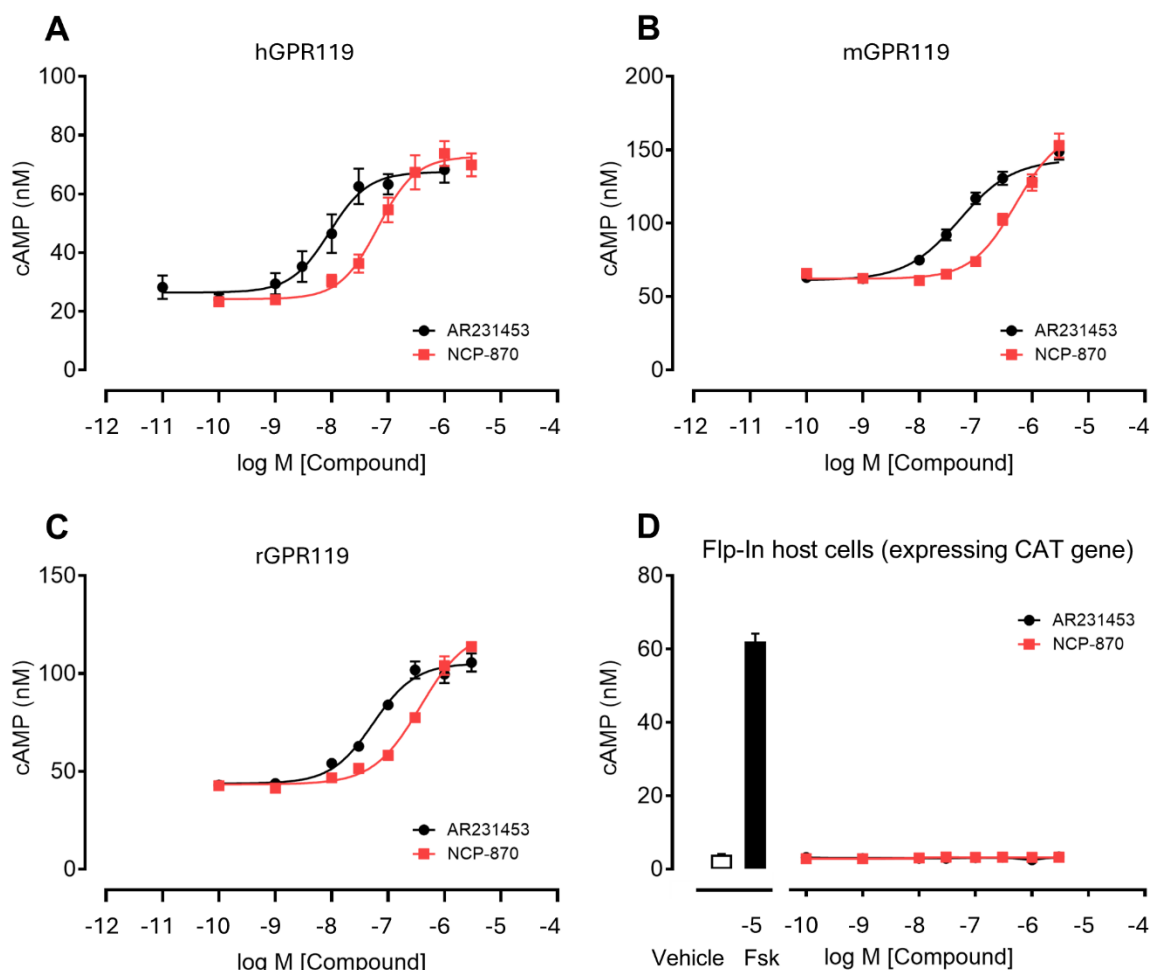


図 19. NCP-870 のヒト、マウスおよびラット GPR119 アゴニスト活性

(A) ヒト GPR119 アゴニスト活性. (B) マウス GPR119 アゴニスト活性. (C) ラット GPR119 アゴニスト活性. (D) 宿主細胞における GPR119 アゴニスト反応性の評価.

Fsk: forskolin

表 10. NCP-870 のヒト、マウスおよびラット GPR119 アゴニスト活性

Compound	EC_{50} : nmol/L (E_{max} : %AR231453)	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Human	65.4 (118%)	40.6	105.3
Mouse	515.1 (124%)	289.8	915.5
Rat	372.4 (129%)	244.3	568.0

2-6 NCP-870 の GLP-1 分泌作用の評価

NCP-870 の GLP-1 分泌促進作用について評価した。その結果、NCP-870 の経口投与は、用量依存的に血漿中 GLP-1 濃度を上昇させ、1 mg/kg から有意な GLP-1 分泌促進作用を示すことが明らかとなった（図 20）。

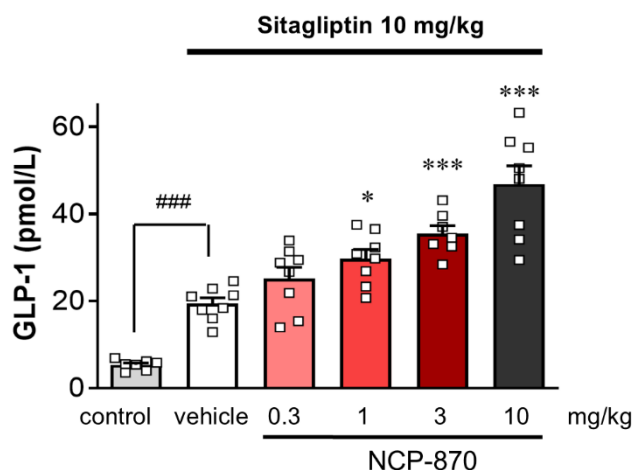


図 20. NCP-870 の GLP-1 分泌促進作用

Means $\pm$ SEM (n = 7–8 mice) . ### p < 0.001 versus control group (Student's t-test) , *p < 0.05, and ***p < 0.001 versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test) .

2-7 NCP-870 の血糖上昇抑制作用の用量依存性の評価

NCP-870 の血糖上昇抑制作用の用量依存性について評価した。低用量の NCP-870 (0.1~1 mg/kg) を用いて OGTT を実施したところ、NCP-870 は用量依存的にグルコース負荷後の血糖上昇を抑制し（図 21A）、1 mg/kg から AUC_{0-120min} を有意に低下させた（図 21C）。一方で、NCP-870 は低血糖を惹起しなかった。NCP-870 の高用量（1~10 mg/kg）投与では、いずれの用量においても血糖上昇を有意に抑制し（図 21B）、用量依存的に AUC_{0-120min} を有意に減少させた（図 21D）。また、高用量においても NCP-870 は低血糖を惹起しなかった。

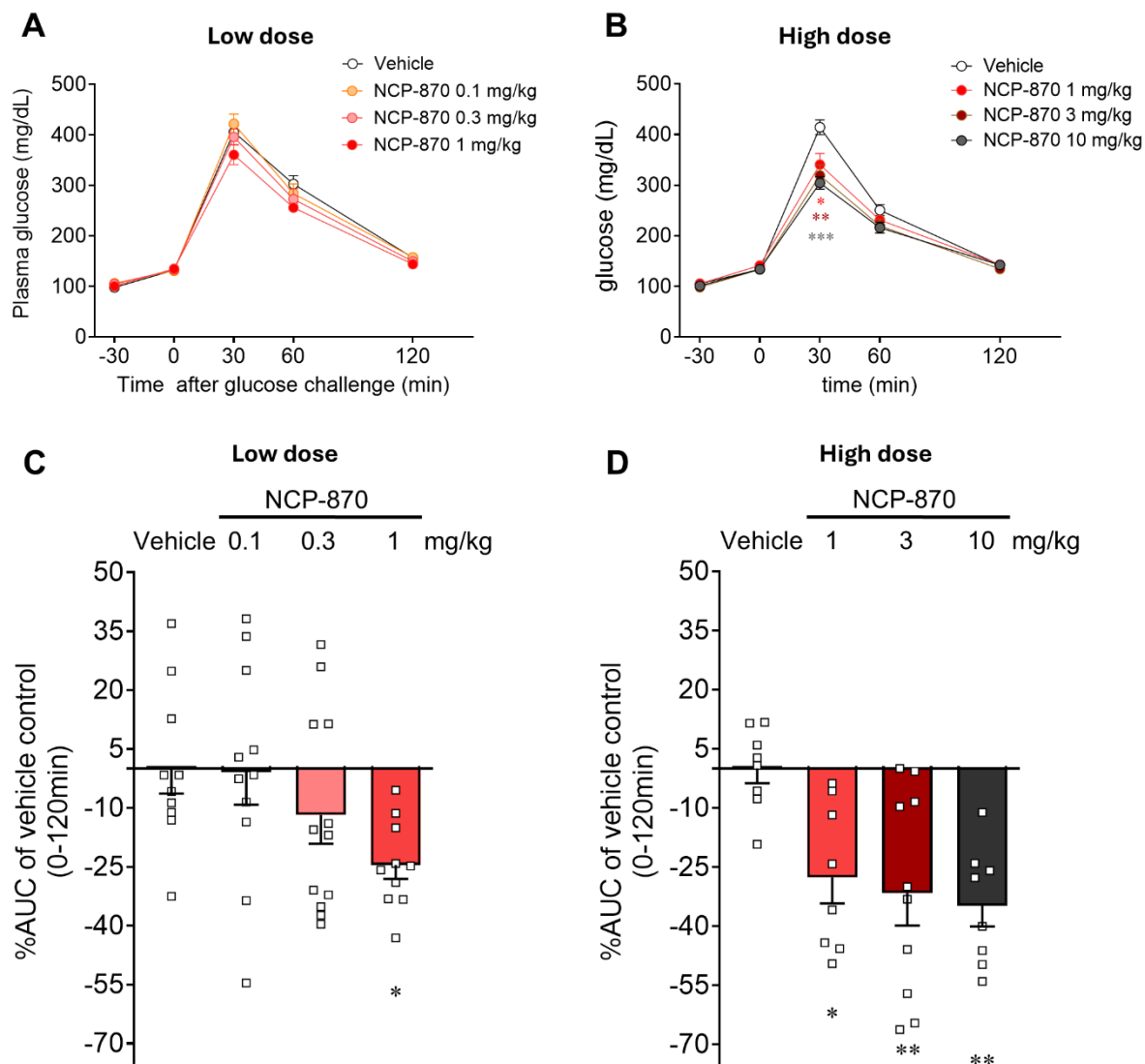


図 21. NCP-870 の血糖上昇抑制作用の用量依存性

(A、C) 低用量. (B、D) 高用量.

Means $\pm$ SEM. (A–D) $n = 8$ –12 mice; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus vehicle (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test) .

2-8 NCP-870 のイヌおよびサルにおける血漿中濃度推移

げっ歯類以外の動物種として、イヌおよびサルにおける血漿中濃度推移についても評価した。その結果、NCP-870 はイヌおよびサルにおいてもマウスと同様に経口投与後 0.5～1 時間でピークを示し、 $t_{1/2}$ が約 4 時間以下と血中からの速やかに消失する血漿中濃度推移を示した (図 22 および表 11)。

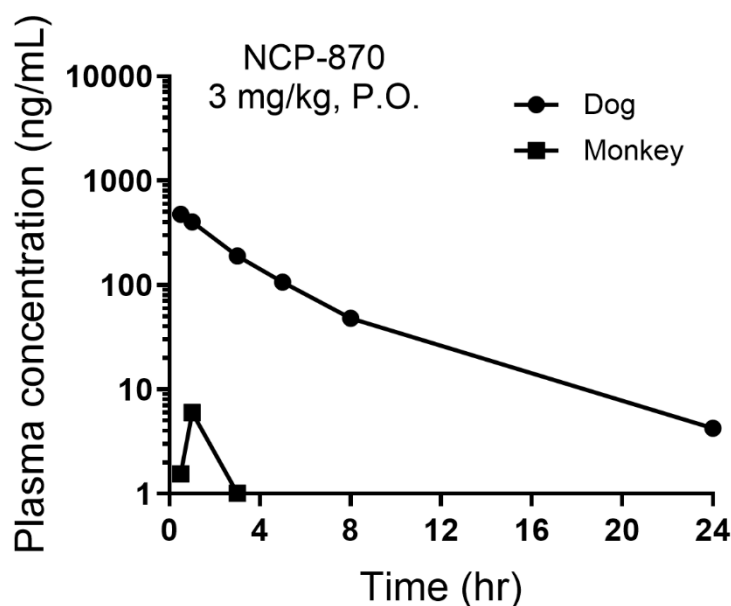


図 22. NCP-870 のイヌおよびサルにおける単回投与後の血漿中濃度推移
n = 1 dog and monkey

表 11. NCP-870 のイヌおよびサルにおける薬物動態パラメータ

	Dose (mg/kg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC _{last} (ng · hr/mL)	t _{1/2} (hr)
Dog	3	477	0.5	1879	4.23
Monkey		5.98	1	9.27	N.C.

2-9 GPR119 アゴニスト活性および薬物動態パラメータについての NCP-539 および 684 と NCP-870 との比較

NCP-870 が反復投与でも薬効を維持した要因を考察するため、NCP-539 および 684 について、追加で各種 GPR119 アゴニスト活性のデータ取得を行った。NCP-539 および 684 の EC₅₀ 値については、マウスおよびラットではヒトの約 6~13 倍程度高値を示し、E_{max} 値はいずれの種においても 80%程度以下のパーシャルアゴニスト様の反応を示した（図 23 および表 12）。また、各化合物の高用量での薬物動態パラメータについては、いずれの化合物も低用量と同様に、NCP-870 は t_{1/2} が約 1 時間以下と血漿からの速やかな消失を示したが、NCP-539 および 684 は t_{1/2} が 8 時間以上と血中からの消失が遅い傾向を示した（表 8 および表 9）。

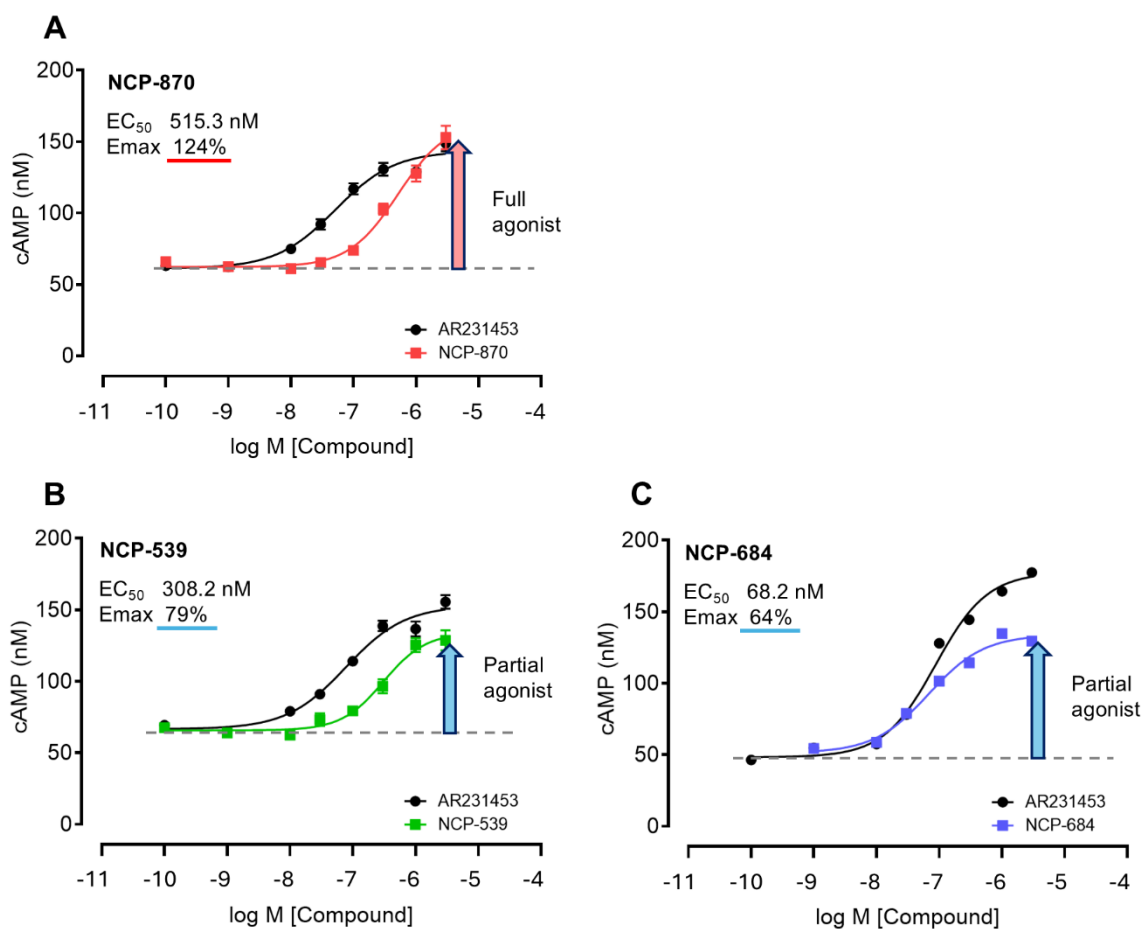


図 23. NCP-870、539 および 684 のマウス GPR119 アゴニスト活性
 (A) NCP-870. (B) NCP-539. (C) NCP-684.

表 12. NCP-870、539 および 684 の GPR119 アゴニスト活性の比較

Compound	EC_{50} : nmol/L (E_{max} : %AR231453)		
	Human	Mouse	Rat
NCP-870	65.4 (118%)	515.1 (124%)	372.4 (129%)
NCP-539	30.5 (82%)	308.2 (79%)	172.4 (55%)
NCP-684	5.4 (58%)	68.2 (64%)	50.4 (74%)

3. 考察

本章では、薬効減弱と血漿中濃度の持続時間との関係をさらに検証するため、様々な薬理学的および薬物動態的プロファイルを持つその他の NCP 化合物についても 2 回投与試験を実施し、薬効減弱と血漿中薬物濃度の関連について検討を行った。

その結果、 $t_{1/2}$ の短い NCP-436 および NCP-870 は低用量および高用量共に薬効減弱することなく血糖上昇抑制作用を示した。一方で、 $t_{1/2}$ の長い NCP-370 および NCP-384 は有意な薬効減弱を示した。また、NCP-539 および NCP-684 は薬効を維持したが、低用量および高用量共に薬効が減弱する傾向を示し、NCP-684 の高用量投与では有意な血糖上昇抑制作用が消失した。2 回投与試験において、NCP-870 および NCP-539 は低用量から高用量まで薬効を維持したが、各化合物の高用量について反復投与試験（1 日 2 回投与、8 日間）を実施した結果、 $t_{1/2}$ の短い NCP-870 は全く薬効の減弱が起こらなかったのに対し、 $t_{1/2}$ の長い NCP-539 では血糖上昇抑制作用が完全に消失した。

以上の結果から、GPR119 アゴニストを反復投与した際、減弱なしに確実に薬効を発現させるには、その時の血漿中薬物濃度がある程度減衰している必要があることが示された。一方で、 $t_{1/2}$ の長い NCP-539 および NCP-684 は 2 回投与試験において、高用量でより強く薬効減弱が認められたことから、血漿中薬物濃度の持続時間だけでなく、別の要因による調節の可能性も考えられた。そこで、これら化合物の *in vitro* プロファイルを精査したところ、NCP-870 がフルアゴニストであるのに対して、NCP-539 および NCP-684 はパーシャルアゴニストであり、 E_{max} 値が低いという違いがあった（図 23）。 E_{max} 値の高さの重要性については、第 1 章においても考察したが、 E_{max} 値が高いということは、細胞内 cAMP 上昇活性が大きいことを示している。病態モデルラットにおける反復投与試験で DS-8500 が MBX-2982 や GSK1292263A と比較して安定した薬効発現を示した要因として、DS-8500 の E_{max} 値の高さについて言及している[38]が、その違いは 30%であった。動物種が異なるため単純な比較はできないが NCP-870 の E_{max} 値は NCP-539 および NCP-684 と比較してそれぞれ 45 および 60%も高値であり、2 回投与試験や反復投与試験での有効性維持の結果も E_{max} 値の高い順に良い結果が得られているように推察されることから、この違いも薬効減弱リスクの低減に寄与したものと考えている。

上記を踏まえ、NCP-870 を最終的な開発化合物として選択することとした。NCP-870 の薬効プロファイルの特徴としては、まず種差が少ないことがあげられる。GPR119 アゴニスト活性においては、ヒトと比較して、マウスおよびラットの EC_{50} 値は約 6～8 倍高い程度であり、 E_{max} 値はいずれの種においても同等であった。また、薬物動態プロファイルにおいては、げっ歯類以外の動物種としてイヌおよびサルにおいてもマウスと同様に経口投与後 0.5～1 時間でピークを示し、 $t_{1/2}$ が約 4 時間以下と血中からの速やかに消失する血漿中濃度推移を示した。このように薬理および薬物動態プロファイルに種差が少ないことは、ヒトでの臨床試験において動物試験の結果とのギャップを少なくし、その効果の予測精度を上げることに貢献する。また、もう 1 つの特徴としては、 E_{max} 値がいずれの種においても約 120～130%と非常に高いことで

あった。第 1 章において評価した MBX-2982 と比較すると NCP-870 の EC_{50} 値は約 10 倍程度高い結果であったが、その GLP-1 分泌促進作用および血糖上昇抑制作用は同等かそれ以上の効果を示した。この点からも上記において考察した E_{max} 値の高さの重要性が示されたものと考えている。さらに第 2 章において考察した脂溶性についても NCP-870 は $\log D_{7.4}$ 値 1.92 とバランスの良い数値であった。

以上から GPR119 アゴニストが安定した薬効発現をするためには、十分な血中濃度の上昇と速やかに消失する薬物動態プロファイルを示し、高い GPR119 アゴニスト活性の最大反応値を有する必要があることを提案する。この考えを補足する考察をさらに下記に記載する。

膵 β 細胞におけるインスリンの分泌機構として惹起経路と増幅経路の 2 つのシグナル経路が提唱されているが (図 1)、インスリンの分泌様式としては 3 つのモードが提唱されており、1 つ目は、既に細胞膜上にドッキングしているインスリン顆粒が、惹起経路による細胞内カルシウムの増加が刺激となり細胞膜と融合して分泌に至る。細胞膜から離れた場所にプールされている顆粒が新たに細胞膜へ動員され、ドッキングせずにそのまま細胞膜と融合して分泌に至るのが 2 つ目のモードであり、細胞膜とのドッキングを経て、惹起経路の刺激により細胞膜と融合して分泌に至るのが 3 つ目のモードである。Epac2A / Rap1 シグナルは 2 つ目のモードにおける細胞膜付近のインスリン顆粒のプールを増大させることでインスリン分泌を促進することが報告されている[29]。興味深いことにこのモードで増大したインスリン顆粒は、cAMP シグナル伝達の活性化だけでは細胞膜に融合することではなく、グルコース誘発性の惹起経路による細胞内カルシウムの増加によって初めて、細胞膜への動員および融合が起こる点である。この特徴が GPR119 アゴニストの血糖依存的なインスリン分泌の根底にあるメカニズムであることを踏まえると、GPR119 アゴニストは Epac2A / Rap1 シグナルを介した細胞膜付近のインスリン顆粒を増加させるためのスイッチであり、Epac2A / Rap1 シグナルの活性化に必要な一定量の血中薬物濃度の上昇が得られれば、その後血中濃度が維持されている必要はなく、むしろ脱感作の懸念をなくすために速やかに消失したほうが良いという考え方もできる。

結論として、NCP-870 はげっ歯類において上記に提案した要件を満たし、イヌおよびサルにおいても類似の薬物動態プロファイルを示す種差の少ない化合物であることから、ヒトにおいても反復投与による薬効減弱が無く、安定して血糖上昇抑制作用を発揮することが期待できる、新規の経口投与可能な GPR119 アゴニストである。

総括

本研究では、薬理および薬物動態プロファイルの両面から GPR119 アゴニストに求められる薬物プロファイルについて検討し、GPR119 アゴニストの臨床上の課題である薬効減弱を回避し、有用な新規経口 2 型糖尿病治療薬となる可能性がある NCP-870 を最終的な開発化合物として同定した。

最初に見出した NCP-322 を用いて、各種 *in vitro* および *in vivo* 試験において既存の GPR119 アゴニスト MBX-2982 との薬効比較を実施することで、その強力な血糖上昇抑制作用が、GPR119 アゴニスト活性の $E_{\max}$ 値の高さに起因する可能性を考察し、その重要性を示した。また、糖尿病治療における副作用として、最も一般的であり重要な課題である低血糖を、GPR119 アゴニストは極めて起こしにくい特徴を有することを明らかとした。また、GLP-1 およびインスリン分泌の薬力学的解析から、GPR119 アゴニストのグルコース依存性インスリン分泌促進作用が、膵 β 細胞への直接的および GLP-1 を介した間接的な GPR119 アゴニスト作用により発現していることを明らかとし、2 型糖尿病治療薬としての GPR119 アゴニストの有用性を示した。

さらに、GPR119 アゴニストの臨床上の課題となっている薬効減弱について薬物動態プロファイルとの関連に着目し、様々な薬理学的および薬物動態的プロファイルを持つ化合物を用いて検証した結果、GPR119 アゴニストが安定した薬効発現をするためには、十分な血中濃度の上昇と速やかに消失する薬物動態プロファイルが必要である可能性を示した。

結論として、NCP-870 は投与後速やかに薬効発現に十分な血中濃度上昇を示し、その後速やかに消失する薬物動態プロファイルおよび高い GPR119 アゴニスト活性の最大反応値を有する薬理学的プロファイルを示す化合物であり、両プロファイルの種差が少ないことから、ヒトにおいても反復投与による薬効減弱が無く、安定して血糖上昇抑制作用を発揮することが期待できる、新規の経口投与可能な GPR119 アゴニストであると考ええる。

今後さらに開発を進め GPR119 アゴニストの臨床における有効性を明らかにしていきたい。また、本研究で得られた薬効減弱低減に関する知見が今後の創薬に役立てられることを期待したい。

引用文献

1. Burge, M.R., et al., *Sulphonylurea-induced hypoglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a review*. Diabetes Obes Metab, 1999. **1**(4): p. 199-206.
2. Amiel, S.A., et al., *Hypoglycaemia in Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2008. **25**(3): p. 245-54.
3. Azoulay, L. and S. Suissa, *Sulfonylureas and the Risks of Cardiovascular Events and Death: A Methodological Meta-Regression Analysis of the Observational Studies*. Diabetes Care, 2017. **40**(5): p. 706-714.
4. *U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease*. U.K. Prospective Diabetes Study Group. Diabetes, 1995. **44**(11): p. 1249-58.
5. Watanabe, H., et al., *Cyb5r3 activation rescues secondary failure to sulfonylurea but not β -cell dedifferentiation*. PLoS One, 2024. **19**(2): p. e0297555.
6. Tang, W.H., *Do thiazolidinediones cause heart failure? A critical review*. Cleve Clin J Med, 2006. **73**(4): p. 390-7.
7. Lebovitz, H.E., *Thiazolidinediones: the Forgotten Diabetes Medications*. Curr Diab Rep, 2019. **19**(12): p. 151.
8. Hermann, L.S., *Clinical Pharmacology of Biguanides*, in *Oral Antidiabetics*, J. Kuhlmann and W. Puls, Editors. 1996, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 373-407.
9. Meyers, A.G., et al., *Metformin treatment and gastrointestinal symptoms in youth: Findings from a large tertiary care referral center*. Pediatr Diabetes, 2021. **22**(2): p. 182-191.
10. Asano, N., *Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use*. Glycobiology, 2003. **13**(10): p. 93r-104r.
11. van de Laar, F.A., et al., *Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis*. Diabetes Care, 2005. **28**(1): p. 154-63.
12. Johnsson, K.M., et al., *Urinary tract infections in patients with diabetes treated with dapagliflozin*. J Diabetes Complications, 2013. **27**(5): p. 473-8.
13. Pishdad, R., P.G. Auwaerter, and R.R. Kalyani, *Diabetes, SGLT-2 Inhibitors, and Urinary Tract Infection: a Review*. Curr Diab Rep, 2024. **24**(5): p. 108-117.
14. Nakajima, H., et al., *Multicenter, open label, randomized controlled superiority trial for availability to reduce nocturnal urination frequency: The TOP-STAR study*. J Diabetes Investig, 2024.
15. Yao, H., et al., *Comparative effectiveness of GLP-1 receptor agonists on glycaemic control, body weight, and lipid profile for type 2 diabetes: systematic review and network meta-analysis*. Bmj, 2024. **384**: p. e076410.

16. Karagiannis, T., et al., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus in the clinical setting: systematic review and meta-analysis*. Bmj, 2012. **344**: p. e1369.
17. Fredriksson, R., et al., *Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives*. FEBS Lett, 2003. **554**(3): p. 381-8.
18. Overton, H.A., M.C. Fyfe, and C. Reynet, *GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity*. Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**(Suppl 1): p. S76-81.
19. Overton, H.A., et al., *Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 167-75.
20. Soga, T., et al., *Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(4): p. 744-51.
21. Madiraju, S.R. and V. Poitout, *G protein-coupled receptors and insulin secretion: 119 and counting*. Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2598-600.
22. Chu, Z.L., et al., *A role for beta-cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release*. Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2601-9.
23. Chu, Z.L., et al., *A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release*. Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2038-47.
24. Lauffer, L.M., R. Iakoubov, and P.L. Brubaker, *GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell*. Diabetes, 2009. **58**(5): p. 1058-66.
25. Béguin, P., et al., *PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation*. Embo j, 1999. **18**(17): p. 4722-32.
26. MacDonald, P.E., et al., *Antagonism of rat beta-cell voltage-dependent K⁺ currents by exendin 4 requires dual activation of the cAMP/protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52446-53.
27. Ozaki, N., et al., *cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(11): p. 805-11.
28. Kunii, M. and A. Harada, *Functional role of SNAP23 and effect of SNAP23-binding compound for insulin secretion*. SEIKAGAKU, 2017. **89**(6): p. 921-924.
29. Shibasaki, T., et al., *Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19333-8.
30. *Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)*. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 854-65.

31. Holst, J.J., *The physiology of glucagon-like peptide 1*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(4): p. 1409-39.
32. Baggio, L.L. and D.J. Drucker, *Biology of incretins: GLP-1 and GIP*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(6): p. 2131-57.
33. Katsurada, K., et al., *Endogenous GLP-1 acts on paraventricular nucleus to suppress feeding: projection from nucleus tractus solitarius and activation of corticotropin-releasing hormone, nesfatin-1 and oxytocin neurons*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **451**(2): p. 276-81.
34. Richard, J.E., et al., *GLP-1 receptor stimulation of the lateral parabrachial nucleus reduces food intake: neuroanatomical, electrophysiological, and behavioral evidence*. *Endocrinology*, 2014. **155**(11): p. 4356-67.
35. Semple, G., et al., *Discovery of fused bicyclic agonists of the orphan G-protein coupled receptor GPR119 with in vivo activity in rodent models of glucose control*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011. **21**(10): p. 3134-41.
36. B, R., et al., *MBX-2982, a Novel GPR119 Agonist, Shows Greater Efficacy in Patients with the Most Glucose Intolerance: Results of a Phase I Study with an Improved Formulation*. American Diabetes Association – 70th Meeting, Orlando:, 2010. **Abstract No. 603-P.**
37. Takaki, R. and J. Ono, *Preparation and culture of isolated islets and dissociated islet cells from rodent pancreas*. *Journal of tissue culture methods*, 1985. **9**(2): p. 61-66.
38. Matsumoto, K., et al., *DS-8500a, an Orally Available G Protein-Coupled Receptor 119 Agonist, Upregulates Glucagon-Like Peptide-1 and Enhances Glucose-Dependent Insulin Secretion and Improves Glucose Homeostasis in Type 2 Diabetic Rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018. **367**(3): p. 509-517.
39. B, R., et al., *MBX-2982, a Novel Oral GPR119 Agonist for the Treatment of Type 2 Diabetes: Results of Single & Multiple Dose Studies*. American Diabetes Association – 69th Meeting, New Orleans:, 2009. **Abstract No. 164-OR.**
40. DJ, N., et al., *A study in healthy volunteers to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of single and multiple doses of GSK1292263, a novel GPR119 agonist*. American Diabetes Association – 70th Meeting, Orlando:, 2010. **Abstract No. 0080-OR.**
41. ML, G., et al., *The novel GPR119-receptor agonist PSN821 shows glucose lowering and decreased energy intake in patients with T2DM after 14 days treatment*. American Diabetes Association – 71th Meeting, San Diego:, 2011. **Abstract No. 0306-OR.**
42. Gater, D., *32nd National Medicinal Chemistry Symposium--medicinal chemistry developments for neurodegeneration, diabetes and cancer*. *IDrugs*, 2010. **13**(8): p. 514-6.
43. Kato, M., et al., *Pharmacokinetics and Safety of DS-8500a, an Antidiabetic Drug, in Japanese Subjects with Hepatic or Renal Impairment: A Single-Center, Open-Label, Single-Dose Study*. *Adv Ther*, 2018. **35**(8): p. 1239-1250.

44. KK, B., et al., *The Role of GPR119 in the Physiology of the Islet B-Cell*. American Diabetes Association – 70th Meeting, Orlando:, 2010. **Abstract No. 1733-P**.
45. Hamamoto, A., et al., *Molecular Mechanisms of Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Internalization*. KENBIKYO, 2016. **51**(1): p. 13-16.
46. Hassing, H.A., et al., *Biased signaling of lipids and allosteric actions of synthetic molecules for GPR119*. Biochem Pharmacol, 2016. **119**: p. 66-75.
47. Widmann, C., W. Dolci, and B. Thorens, *Desensitization and phosphorylation of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor by GLP-1 and 4-phorbol 12-myristate 13-acetate*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(1): p. 62-75.
48. Widmann, C., W. Dolci, and B. Thorens, *Internalization and homologous desensitization of the GLP-1 receptor depend on phosphorylation of the receptor carboxyl tail at the same three sites*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(8): p. 1094-102.
49. Baggio, L.L., J.G. Kim, and D.J. Drucker, *Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 3**: p. S205-14.
50. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
51. Waring, M.J., *Lipophilicity in drug discovery*. Expert Opinion on Drug Discovery, 2010. **5**(3): p. 235-248.
52. Arnott, J.A. and S.L. Planey, *The influence of lipophilicity in drug discovery and design*. Expert Opin Drug Discov, 2012. **7**(10): p. 863-75.
53. Anderson, G.P., A. Lindén, and K.F. Rabe, *Why are long-acting beta-adrenoceptor agonists long-acting?* Eur Respir J, 1994. **7**(3): p. 569-78.
54. Su, Y.F., T.K. Harden, and J.P. Perkins, *Isoproterenol-induced desensitization of adenylate cyclase in human astrocytoma cells. Relation of loss of hormonal responsiveness and decrement in beta-adrenergic receptors*. J Biol Chem, 1979. **254**(1): p. 38-41.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なるご指導、ご鞭撻およびご配慮を賜りました九州大学大学院薬学府薬理学分野 津田誠 教授に謹んで深謝いたします。

また、日本ケミファ株式会社創薬研究所在職中に、九州大学大学院薬学府社会人博士課程における研究の場を与えて下さり、本研究に対し多大なるご支援、ご助言を賜りました日本ケミファ株式会社創薬研究所 山川富雄 取締役専務執行役員、國上敏浩 研究所長、遠藤剛 海外事業部長、平井利武 創薬第二研究室長に厚く御礼申し上げます。

本研究に対し、多大なるご協力とご助言を賜りました日本ケミファ株式会社創薬研究所 小川亨 主任研究員、金久保紀子 研究員、神田佐和子 研究員、伊藤麻衣 研究員、江幡幸子 研究員、島田和昭 研究員ならびに創薬第二研究室諸氏に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、数多くの尊い命を捧げてくれた動物たちに感謝すると共に、ご冥福をお祈りいたします。

最後に、教育の機会を与えてくださった両親、本研究の遂行および論文執筆にあたり、終始心の支えとなってくれました妻をはじめ家族に感謝いたします。