

博士学位論文

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) を標的とした新規 2 型糖尿病治療薬の開発：JTT-654 の作用機序解析と有効性評価

日本たばこ産業株式会社

医薬総合研究所 生物研究所

平宅 史朗

略語集

11 β -HSD1	: 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type1
11 β -HSD2	: 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type2
2-DG	: 2-deoxy-D-[1-3H]glucose
ACTH	: adrenocorticotropic hormone
BSA	: bovine serum albumin
β -NAD	: beta-Nicotinamide adenine dinucleotide
CBNX	: carbenoxolone
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	: fetal bovine serum
FFA	: free fatty acid
GIR	: glucose infusion rate
GK rat	: Goto-Kakizaki rat
HE	: Hematoxylin-Eosin
HGP	: hepatic glucose production
HPA axis	: hypothalamic-pituitary-adrenal axis
IBMX	: 3-Isobutyl-1-methylxanthine
IDF	: International Diabetes Federation
KRP	: Krebs Ringer phosphate buffer
MC	: methyl cellulose
NADPH	: β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodiumsalt hydrate
PAS	: Periodic acid-Schiff
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PTT	: pyruvate tolerance test
Rd	: rate of glucose disposal
Ra	: rate of glucose appearance
SD rats	: Sprague-Dawley rat
SHR	: Spontaneously Hypertensive Rat
SPA PVT	: scintillation proximity assay polyvinyl toluene
TLC	: Thin-Layer Chromatography
WKY	: Wistar Kyoto

目 次

序論	5
本論	9
1 JTT-654 の in vitro/ex vivo 阻害プロファイル解析	9
1.1 序文	9
1.2 実験材料及び実験方法	9
1.2.1 実験材料	9
1.2.2 酵素活性測定（主活性及び種差評価）	10
1.2.3 酵素活性測定（阻害様式の検討及び K_i 算出）	11
1.2.4 酵素活性測定（hHSD2 に対する作用）	11
1.2.5 Rat ex vivo 脂肪組織又は肝臓 11β -HSD1 活性測定	12
1.3 結果	14
1.3.1 JTT-654 の各種酵素に対する阻害作用	14
1.3.2 JTT-654 の脂肪組織及び肝臓 11β -HSD1 活性に対する抑制作用	17
1.4 考察	19
2 JTT-654 の過剰なグルコルチコイドに起因する病態に対する改善作用	20
2.1 序文	20
2.2 実験材料及び実験方法	20
2.2.1 全身に対する作用	20
2.2.2 脂肪組織（細胞）に対する作用	24
2.2.3 肝臓に対する作用	27
2.3 結果	29
2.3.1 JTT-654 の全身の過剰なグルコルチコイドに起因する病態に対する改善作用	29
2.3.2 JTT-654 の脂肪組織（細胞）における過剰なグルコルチコイドに起因する病態に対する改善作用	36
2.3.3 JTT-654 の肝臓における過剰なグルコルチコイドに起因する病態に対する改善作用	39
2.4 考察	41
3 JTT-654 の各種病態モデルに対する改善作用	42
3.1 非肥満型 2 型糖尿病モデル動物（Goto-Kakizaki Rat）に対する作用	42

3.1.1	序文	42
3.1.2	実験材料及び実験方法	42
3.1.3	結果	43
3.1.4	考察	47
3.2	高血圧モデル動物（Spontaneously Hypertensive Rat）に対する作用	48
3.2.1	序文	48
3.2.2	実験材料	48
3.2.3	実験方法	49
3.2.4	結果	50
3.2.5	考察	54
3.3	メタボリックシンドロームモデル動物（SHR/NDmc-cp rat）に対する作用	56
3.3.1	序文	56
3.3.2	実験材料	56
3.3.3	実験方法	56
3.3.4	結果	58
3.3.5	考察	68
総括		69
研究業績		71
参考文献		72
謝辞		78

序論

近年、2 型糖尿病患者の数は世界中で増加し続けている¹⁾。International Diabetes Federation (IDF) によると、2000 年における世界の糖尿病患者数は 1 億 5100 万人であったのに対して、2019 年には 4 億 6,300 万人にまで増加した。また IDF の推計では、世界の糖尿病感者数は 2030 年までに 5 億 7800 万人、2045 年までには 7 億人に達すると予測している²⁾。すべての糖尿病症例の約 90% が 2 型糖尿病である。2 型糖尿病は、インスリン抵抗性の初期段階とその後の β 細胞消耗段階を特徴としており、この疾患の主な原因は、インスリン効率の低下、すなわち、過食、不十分な運動、老化などの要因によるインスリン抵抗性の発症に加えて、複数の遺伝的要因であると考えられている³⁾。

2 型糖尿病においては糖代謝異常のみならず、肥満、脂質代謝異常、高血圧などを併発している症例が多く存在し⁴⁾、これらの合併症を伴う 2 型糖尿病患者の大血管症発症リスクは高血糖状態のみを呈する糖尿病患者よりも大幅に高まることが示されている⁵⁾。メタボリックシンドロームの概念においても、複数の代謝異常の重積が虚血性心疾患の重要な発症要因として提唱されている⁶⁾。これらの知見は、インスリン抵抗性が基盤となり、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧といった種々の代謝異常が生じている可能性を示唆している。これらの合併症例に対して、血糖に加えて脂質や血圧などの危険因子を総合的に是正することにより、大血管症の発症率を有意に低下させるということが、大規模臨床試験からも明らかとなっている⁷⁾。このことは、2 型糖尿病を症候群として捉え、大血管症の効果的な予防のためには血糖コントロールのみならず、一つ一つの危険因子を包括的に管理することが今後の治療戦略として重要であることを示している。事実、血糖低下作用だけでなく血圧低下作用も有する SGLT2 阻害薬は、心血管イベント発症を抑制することに成功している^{8) 9) 10) 11)}。

また、2023 年 11 月、日本糖尿病学会は「2 型糖尿病の薬物療法のアルゴリズム」を発表した（図 1）。このアルゴリズム設定の背景の一つとして、欧米では肥満に起因するインスリン抵抗性主体の糖尿病が多くを占めるが、それとは異なり、日本人 2 型糖尿病は肥満と非肥満が半々で、インスリン分泌低下と抵抗性の程度が個人ごとに異なっていることが挙げられている¹²⁾。



薬物療法開始後は、およそ3か月ごとに治療法の再評価と修正を検討する

目標HbA1cを達成できなかった場合は、病態や合併症に沿った食事療法、運動療法、生活習慣改善を促すと同時に、冒頭に立ち回り、インスリン適応の再評価も含めて薬剤の追加等を検討する

図 1. 2 型糖尿病の薬物治療のアルゴリズム

したがって、非肥満型の 2 型糖尿病患者に対して、インスリン抵抗性改善作用を発揮できる薬剤や、血糖コントロールのみならず、最小血管合併症や大血管イベントに対しての additional benefit を発揮できる薬剤は、有用な治療オプションとなりうると考えられる。

インスリン抵抗性の成因の一つとして、副腎皮質ホルモンであるグルコルチコイドの関与が古くから指摘されている。グルコルチコイドは、血糖の恒常性維持においてはグルカゴンと同様にインスリンと逆の作用を示す因子として知られており、糖代謝異常発症の摂動因子としての働きがあると考えられている。グルコルチコイドの慢性的な過剰分泌によって発症する代表疾患例としてはクッシング症候群があり、インスリン抵抗性、高血糖、脂質異常、肥満及び高血圧などを併発することでメタボリックシンドローム様の表現型を示すことが知られている¹³⁾。一方、メタボリックシンドロームの患者においては、必ずしもグルコルチコイド過剰分泌による血中グルコルチコイドの濃度上昇は認められておらず、標的組織における細胞内の活性型グルコルチコイドの過剰な産生と作用発現がインスリン抵抗性を引き起こし、糖代謝異常を始めとする一連の内分泌・代謝系の変調を導く可能性があることが近年指摘されている¹⁴⁾。

11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) は、肝臓、脂肪組織などで広く発現しており、細胞中で不活性型のグルコルチコイドを活性型へ変換する唯一の酵素であり、グルコルチコイドの標的組織中での作用の発現調節に重要な役割を担っている¹⁴⁾ (図 2)。

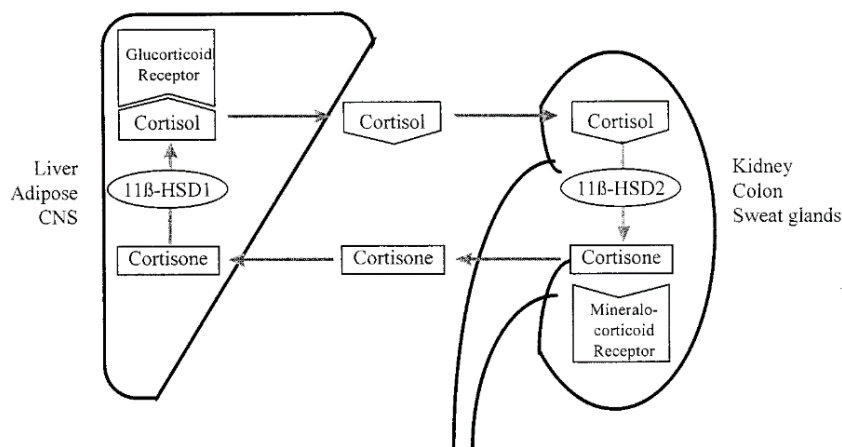


図 2. 11 β -HSD1 の発現と生理的機能

脂肪組織、または肝臓特異的 11 β -HSD1 トランスジェニックマウスでは、インスリン抵抗性、耐糖能異常、肥満、脂質代謝異常、高血圧など、さまざまな代謝障害が観察されている^{15) 16) 17)}。一方で、11 β -HSD1 ノックアウトマウスは、高脂肪食により引き起こされる内臓脂肪の蓄積、インスリン抵抗性、糖代謝異常及び脂質代謝異常に対して明らかな抵抗性を示す^{18) 19) 20)}。さらに、糖尿病患者や肥満者の脂肪組織では 11 β -HSD1 の遺伝子発現、あるいは酵素活性は増加しており、その増加はインスリン抵抗性指標や肥満度と相関すると報告されている^{21) 22) 23) 24)}。

これらの情報より、11 β -HSD1 を阻害する薬剤は、グルコルチコイドの細胞内作用を抑制することにより、2 型糖尿病の高血糖状態を是正するだけでなく、脂質異常症や高血圧などのさまざまな代謝障害を是正する有望な新規抗糖尿病薬となりうると期待できる。私の所属する研究所において、11 β -HSD1 を特異的に阻害する低分子化合物探索を行った結果、新規の 11 β -HSD1 阻害薬として JTT-654 (化学名: [1-(4-

[5-Cyclopropyl-4-({(3S)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]pyrrolidin-1-yl}carbonyl)-1H-pyrazol-1-yl]piperidin-1-yl}carbonyl)cyclopropyl]methanol) を創出した (図 3)。

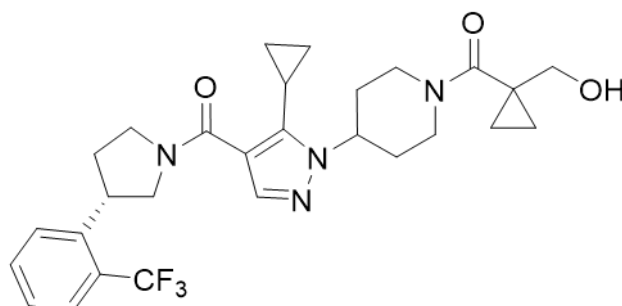


図 3. JTT-654 の化学構造

本研究は, JTT-654 の *in vitro*, 及び *in vivo* における作用機序解析を通して薬理プロファイルを明らかにし, 2 型糖尿病に対する有効性のみならず, additional benefit としての高血圧や糖尿病性腎症に対する作用の有無について明らかにすることを目的として実施した (図 4)。

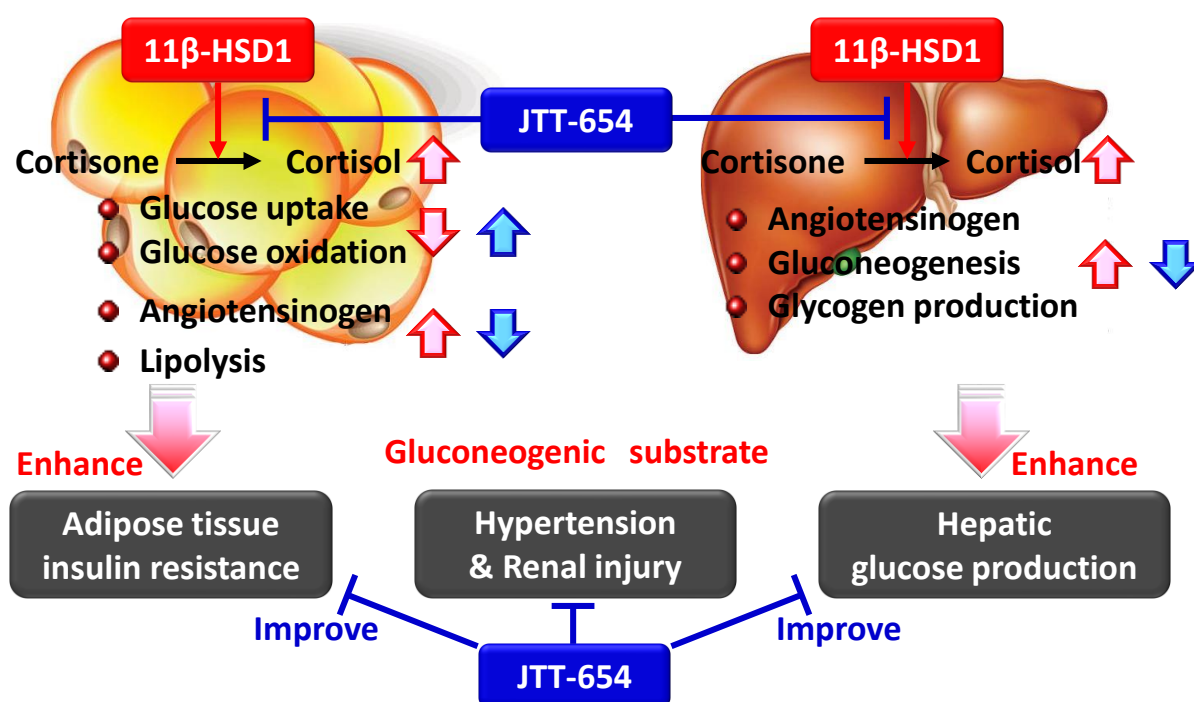


図 4. 2 型糖尿病治療薬としての additional benefit を有する JTT-654 の想定作用機序

本論

1 JTT-654 の *in vitro*/*ex vivo* 阻害プロファイル解析

1.1 序文

グルココルチコイド作用の過剰が肥満症やインスリン抵抗性の病態に関与することが知られている。クッシング症候群の患者にグルココルチコイド受容体拮抗薬を投与すると一連の代謝異常が改善する²⁵⁾。血中コルチゾル濃度は主に視床下部-下垂体-副腎軸によって制御されるが、グルココルチコイドの標的細胞におけるコルチゾル作用強度は細胞内グルココルチコイド活性化酵素である 11 β -HSD1 と、不活性化酵素である 11 β -HSD2 の活性バランスによってコントロールされている (図 2)^{14) 26)}。大部分の細胞では 11 β -HSD1 と 11 β -HSD2 が共存するが、11 β -HSD1 は肝臓や脂肪組織、中枢神経系、骨格筋に高発現し、11 β -HSD2 は水・電解質代謝に関与する腎尿細管上皮、大腸、汗腺、胎盤に高発現することが分かっている²⁷⁾。

これら、及び前述の情報から、脂肪組織、及び肝臓において 11 β -HSD1 を阻害する低分子化合物は 2 型糖尿病を含む複数の代謝障害に対して有用であることが考えられた。一方、11 β -HSD2 を阻害してしまうと、有害作用が生じる懸念が考えられた。

したがって、まず JTT-654 の *in vitro* 阻害プロファイルの解析を行った。主活性としてヒト 11 β -HSD1 (hHSD1) に対する作用、種差の有無についてラット及びマウス 11 β -HSD1 (rHSD1, mHSD1) を用いて評価した。また、JTT-654 の hHSD1 に対する阻害様式の解析を行った。酵素選択性評価として、ヒト腎臓ミクロソーム (Ms) を用いて JTT-654 の 11 β -HSD2 に対する阻害能評価を実施した。次に、JTT-654 の *ex vivo* 阻害プロファイル解析を実施した。脂肪組織、または肝臓特異的 11 β -HSD1 トランスジェニックマウスにおいて、インスリン抵抗性、耐糖能異常、肥満、脂質代謝異常、高血圧など、さまざまな代謝障害が観察されていることから^{15) 16) 17)}、JTT-654 の脂肪組織、及び肝臓での 11 β -HSD1 阻害強度を解析した。

1.2 実験材料及び実験方法

1.2.1 実験材料

JTT-654 は日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所 (Osaka, Japan) にて合成されたものを使用した。hHSD1, mHSD1 及び rHSD1 に対する阻害作用評価には、日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所にて作製された強制発現 Sf9 細胞由来の全長型精製酵素を使用した。ヒト腎 Ms は Tissue Transformation Technologies (Rockville, U.S.A.) より購入した。[1, 2-³H] cortisone, 及び [1, 2-³H] cortisol は American Radiolabeled Chemicals (St. Luis, U.S.A.) より購入した。Scintillation proximity assay (SPA) polyvinyl toluene (PVT) antibody-binding beads (anti-mouse reagent) は PerkinElmer Japan (Yokohama, Japan) より購入した。Mouse

anti-cortisol monoclonal antibody は EastCoast Bio (North Berwick, U.S.A.) より購入した。Methyl cellulose (MC) は信越化学工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬は Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan) より購入した。

Sprague-Dawley (SD) ラットは Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) より購入した。SD ラットは標準飼料として CRF-1 (Charles River Japan) を給餌し、自由摂食及び自由摂水させた。SD ラットは特定病原微生物のない状態で温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、12 時間毎の明暗サイクル (明期は 8 時-20 時) の飼育室にて飼育した。全ての手順は日本たばこ産業医薬総合研究所動物実験委員会のガイドラインに基づいて行った。

1.2.2 酵素活性測定 (主活性及び種差評価)

酵素活性測定は 96 ウェルマイクロプレート (OptiPlate™-96, PerkinElmer Japan, Tokyo, Japan) を使用した。主活性である hHSD1, また種差評価の対象とした r 及び mHSD1 活性測定においては, JTT-654 存在または非存在下で, ヒト (120 ng/mL), ラット (80 ng/mL) またはマウス (80 ng/mL) を各酵素源として, 基質として $[1, 2\text{-}^3\text{H}]$ cortisone (10 nmol/L), 補酵素として β -nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH) (500 $\mu\text{mol/L}$) をアッセイバッファー (bovine serum albumin (BSA) を 0.1% (w/v) となるように Phosphate Buffered Saline (PBS) に溶解させたもの) に添加した (() 内は全て最終濃度を示す)。JTT-654 は反応液中の dimethyl sulfoxide (DMSO) 濃度が 2% となるように各種濃度に調製し, 添加した。Background 群として, JTT-654 の代わりに 11 β -HSD1 及び 2 非選択的阻害剤である carbenoxolone (CBNX, 最終濃度: 100 $\mu\text{mol/L}$) を添加した系列を設けた。各酵素反応は $[1, 2\text{-}^3\text{H}]$ cortisone を添加することにより開始し, 室温で 2 時間反応を行った。反応終了後, 酵素反応液の 1/2 容量の検出液 (組成: 30 mg/mL SPA PVT Antibody-Binding Beads, 12 ng/ μL mouse anti-cortisol monoclonal antibody 及び 300 $\mu\text{mol/L}$ CBNX をアッセイバッファーに添加したもの) を添加し, 酵素反応を停止させた上で, 室温で 2 時間反応させた。室温, 1,000 \times g, 2 分間遠心後, マイクロプレートシンチレーション・ルミネッセンスカウンター (TopCount NXT, PerkinElmer Japan, Tokyo, Japan) を用いて, 各ウェルの酵素反応生成物である $[1, 2\text{-}^3\text{H}]$ cortisol の放射活性を測定した。N = 2 の試験を独立して 3 回実施した。DMSO 群又は JTT-654 群の放射活性 (平均値) から background 群の放射活性 (平均値) を差し引き, 得られた値を酵素活性とした。実験毎に, DMSO 群の酵素活性を 100% としたときの, 被験物質群の酵素活性阻害率 (% inhibition) を以下の式に従って計算した。

$$\% \text{Inhibition} = 100 - (100 \times \text{JTT-654 群の酵素活性} / \text{DMSO 群の酵素活性})$$

被験物質の設定濃度を常用対数, 酵素活性阻害率 (% inhibition) を実数として, ロジスティック曲線に当てはめ, 酵素活性を 50% 阻害する濃度 (IC_{50}) を算出した。解析には SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 及び SAS System Version 8.2 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

1.2.3 酵素活性測定（阻害様式の検討及び K_i 算出）

酵素活性測定は 2 mL マイクロチューブ（Eppendorf, Eppendorf Japan, Tokyo, Japan）を使用した。JTT-654 存在または非存在下（0, 10 及び 30 nmol/L）で, hHSD1（120 ng/mL）を酵素源として, 基質として $[1, 2-^3\text{H}]$ cortisone（60, 75, 100, 150 及び 300 nmol/L）, 補酵素として NADPH（500 $\mu\text{mol/L}$ ）をアッセイバッファー（BSA を 0.1%（w/v）となるように PBS に溶解させたもの）に添加した（（ ）内は全て最終濃度を示す）。JTT-654 は反応液中の DMSO 濃度が 2%となるように各種濃度に調製し, 添加した。各酵素反応は $[1, 2-^3\text{H}]$ cortisone を添加することにより開始し, 室温で 2 時間反応を行った。反応終了後, 酵素反応液の 1/2 容量の反応停止液（組成：300 $\mu\text{mol/L}$ CBNX をアッセイバッファーに添加したもの）を添加し, 酵素反応を停止させた。クロロホルム：メタノール（2：1）を 1 mL 加えた後, 攪拌して脂質を抽出した。4°C, 2,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離後, 水層を除去し, 窒素ガス通気下にて有機層を乾固させた。乾固させた脂質をクロロホルムに再溶解し, thin layer chromatography (TLC) プレート（K6 シリカゲル, 層厚 250 μm , Whatman plc.）にスポットした。TLC プレート上の脂質をジクロロメタン：メタノール（10：1）混合溶媒にて展開分離した。TLC プレートをイメージングプレート BAS-TR2040（富士フイルム株式会社, Tokyo, Japan）に露光し, バイオイメージングアナライザー（Typhoon FLA7000, GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan）及び解析ソフト ImageQuantTL（GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan）を用いて画像解析を行い, $[1, 2-^3\text{H}]$ cortisol 画分のシグナル強度を測定した。N = 1 の試験を独立して 3 回実施した。各サンプルのコルチゾール画分のシグナル強度で得られた値から, 以下の式に従って各々の反応速度を算出した。

$$\text{反応速度} = [1, 2-^3\text{H}] \text{ cortisol 画分シグナル強度} / 120\text{min}$$

JTT-654 の設定濃度毎に基質濃度及び反応速度を実数として, Michaelis-Menten プロットに当てはめ, Michaelis 定数 (K_m) 及び最大反応速度 (V_{max}) を算出した。解析には GraphPad Prism Version 4.00（GraphPad Software, San Diego, U.S.A.）を用いた。得られた K_m 及び V_{max} を用いて, JTT-654 の設定濃度毎に以下の Lineweaver-Burk プロットの直線式を求めた。

$$Y = \frac{K_m}{V_{max}} X + \frac{1}{V_{max}} S$$

これらの直線が交差する点の象限から阻害様式を解析した。また, Lineweaver-Burk プロットの直線式の勾配 (K_m/V_{max}) を JTT-654 の濃度に対してプロットし, 二次プロット法にて K_i を算出した。

1.2.4 酵素活性測定（hHSD2 に対する作用）

酵素活性測定は 2 mL マイクロチューブを使用した。JTT-654 存在または非存在下で, ヒト腎臓ミクロソーム（40 $\mu\text{g/mL}$ ）を hHSD2 の酵素源として, 基質として $[1, 2-^3\text{H}]$ cortisol（35 nmol/L）, 補酵素として β -Nicotinamide adenine dinucleotide sodium salt (β -NAD）（500 $\mu\text{mol/L}$ ）をアッセイ

バッファー（BSA を 0.1% (w/v) となるように PBS に溶解させたもの）に添加した（（ ）内は全て最終濃度を示す）。被験物質である JTT-654 又は対照物質である CBNX は、反応液中の DMSO 濃度が 2% となるように各種濃度に調製し、添加した。各酵素反応は [1, 2-³H] cortisol を添加することにより開始し、室温で 1 時間反応を行った。反応終了後の手順は 1.2.3 項と同様の操作を実施した。イメージングプレートの解析の際は、[1, 2-³H] cortisone 画分のシグナル強度を測定した。N = 2 の試験を独立して 3 回実施した。各サンプルのコルチゾン画分のシグナル強度（平均値）を酵素活性とした。実験毎に、DMSO 群の酵素活性を 100%としたときの、被験物質群の酵素活性阻害率（% inhibition）を以下の式に従って計算した。

$$\% \text{Inhibition} = 100 - (100 \times \text{JTT-654 又は CBNX 群の酵素活性} / \text{DMSO 群の酵素活性})$$

JTT-654 又は CBNX の設定濃度を常用対数、酵素活性阻害率（% inhibition）を実数として、ロジスティック曲線に当てはめ、酵素活性を 50% 阻害する濃度（IC₅₀）を算出した。解析には SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 及び SAS System Version 8.2（SAS Institute Japan 株式会社）を用いた。

1.2.5 Rat ex vivo 脂肪組織又は肝臓 11β-HSD1 活性測定

試験概要を下図に示した。



媒体として 0.5% (w/v) MC、被験物質として JTT-654（1, 3, 10 mg/kg, 0.5% MC を用いて懸濁）を SD ラット（雄性、8 週齢）に強制経口投与した。経口投与 2, 4, 8 及び 24 時間後に、イソフルラン吸入麻酔下で解剖を行い、精巣上体周囲脂肪及び肝臓を摘出した。1 サンプル当たり脂肪組織は約 50 mg、肝臓は約 25 mg となるように組織片を作製し培養用組織片とした。

脂肪を培養用組織片とした場合は、予め 1 ウェル当たり 100 μL のバックグラウンド適用液（200 μmol/L CBNX）又は Krebs Ringer phosphate buffer (KRP, 組成：122 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L KCl, 1.16 mmol/L MgSO₄, and 16.7 mmol/L Na₂HPO₄ (pH7.4)）を添加した 48 ウェルプレートに培養用組織片の 1 組織片を添加した。続いて、基質として 20 nmol/L [1, 2-³H] cortisone 100 μL を添加して反応を開始させた（duplicate（2 ウェル）で実施した）。37°C で 90 分間反応させた後、2 mmol/L CBNX 10 μL を添加して反応を停止させた。培養用組織片を除去し、反応液 150 μL を 96 ウェルマイクロプレート（OptiPlate™-96）に移し、anti-cortisol SPA beads 懸濁液（20 mg/mL anti-Mouse PVT SPA Scintillation beads 懸濁液, 200 mmol/L CBNX 溶液, 10% BSA 溶液及び 3.62 mg/mL mouse anti-cortisol monoclonal antibody を 100 対 0.1 対 1 対 0.5 の割合で混合したもの）50 μL を添加した。プレートシーラーを用いて密閉し、室温で 2 時間静置した。25°C, 1,000 × g, 2 分間遠心し、マイクロプレートシンチレーション・ルミネッセンスカウンター（TopCount NXT）を用いて放射活性（dpm）を測定した。肝臓を培養用組織片として用いた測定は、脂肪を用いた場合に準

じて行った。ただし，反応は室温で 10 分間実施した。各群 N = 5 で試験を実施した。各サンプルの cortisol から cortisone への変換活性 (dpm) を以下の式にしたがって計算した。

- cortisol から cortisone への変換活性 (dpm)
= 媒体群又は被験物質群の放射活性 (dpm) - バックグラウンド群の放射活性の平均値 (dpm)

媒体群の変換活性を 100%としたときの，被験物質群の変換活性阻害率 (% inhibition) を以下の式に従って計算した。

- %inhibition = $100 - (100 \times \text{被験物質群の変換活性} / \text{媒体群の変換活性の平均値})$

1.3 結果

1.3.1 JTT-654 の各種酵素に対する阻害作用

JTT-654 の化学構造を図 3 に示した。JTT-654 の各種 11β -HSD1 に対する阻害作用について、 $[1, 2-^3\text{H}]$ cortisone を基質とし、組換えヒト、ラット及びマウス 11β -HSD1 を酵素として $[1, 2-^3\text{H}]$ cortisol 産生量を測定した。また、hHSD1 に対して阻害様式を検討した。さらに、酵素選択性評価として、hHSD2 活性に対する作用について、 $[1, 2-^3\text{H}]$ cortisol を基質とし、ヒト腎臓ミクロソームを酵素として $[1, 2-^3\text{H}]$ cortisone 産生量を測定した。各種 HSD1 の DMSO 群の酵素活性値を 100%とした際の、JTT-654 の各濃度における活性値を図 5 に、 IC_{50} を表 1 に示した。JTT-654 はいずれの種の 11β -HSD1 に対しても用量依存的な阻害作用を示し、その IC_{50} はそれぞれ、ヒト (4.65 ± 0.28)、ラット (0.97 ± 0.019) 及びマウス (0.74 ± 0.050) であり、阻害能に大きな種差を認めなかった (() は IC_{50} , 単位は nmol/L を示す)。また、ヒト 11β -HSD1 に対する阻害様式を解析した。Michaelis-Menten プロット、 K_m 及び V_{max} の値 (代表例) を以下の図 6 に、Lineweaver-Burk プロット (代表例) を図 7 に示した。JTT-654 はヒト 11β -HSD1 に対して基質拮抗型の阻害様式を示し、 K_i は 14.91 ± 2.45 nmol/L であった。さらに、JTT-654 の酵素選択性評価として、ヒト 11β -HSD2 に対する阻害作用についてヒト腎臓ミクロソームを用いて評価した。DMSO 群の 11β -HSD2 酵素活性値を 100%とした際の、JTT-654 の各濃度における活性値を図 8 に、 IC_{50} を表 1 に示した。非選択的 11β -HSD1, 2 阻害剤である CBNX は、ヒト 11β -HSD2 に対して用量依存的な阻害作用を示したのに対して、JTT-654 は 30 $\mu\text{mol/L}$ まで阻害作用を示さなかった。

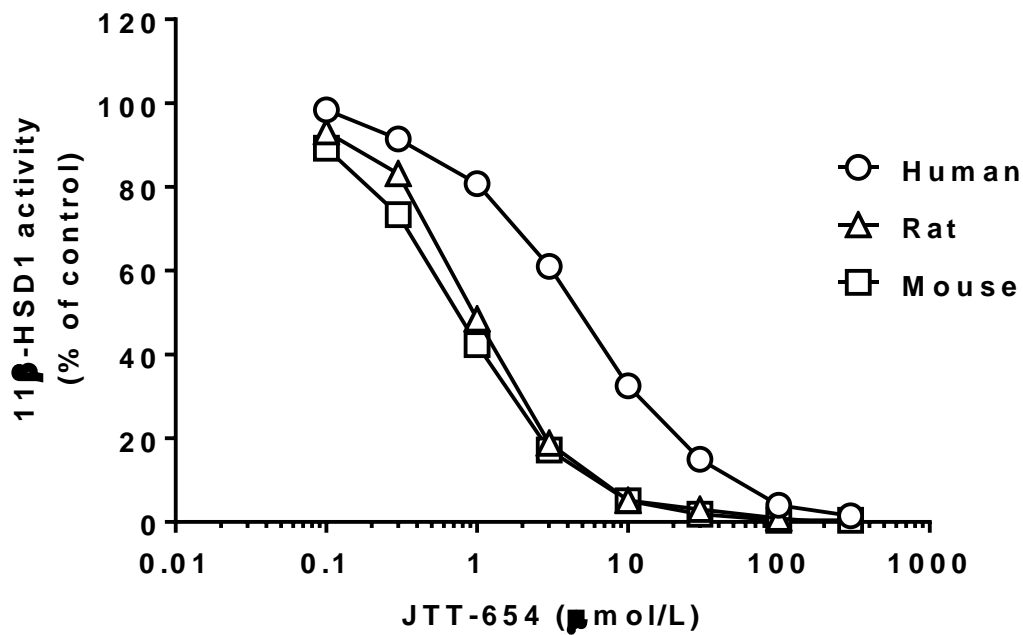


図 5. JTT-654 のヒト, ラット及びマウス 11β-HSD1 に対する阻害作用

酵素活性は [1, 2-³H] cortisone 及びリコンビナント各種 HSD1 を用いて測定した。数値は 3 回の実験結果の平均値±標準誤差として表記した。

表 1. JTT-654 のヒト, ラット, マウス 11β-HSD1 及びヒト 11β-HSD2 に対する阻害作用

11β-HSD1				11β-HSD2
Human	Rat	Mouse		Human
IC ₅₀ (nmol/L)	4.65 ± 0.28	0.97 ± 0.019	0.74 ± 0.050	>30000

IC₅₀ はロジスティック曲線に数値をあてはめ算出した。数値は 3 回の実験結果の平均値±標準誤差として表記した。

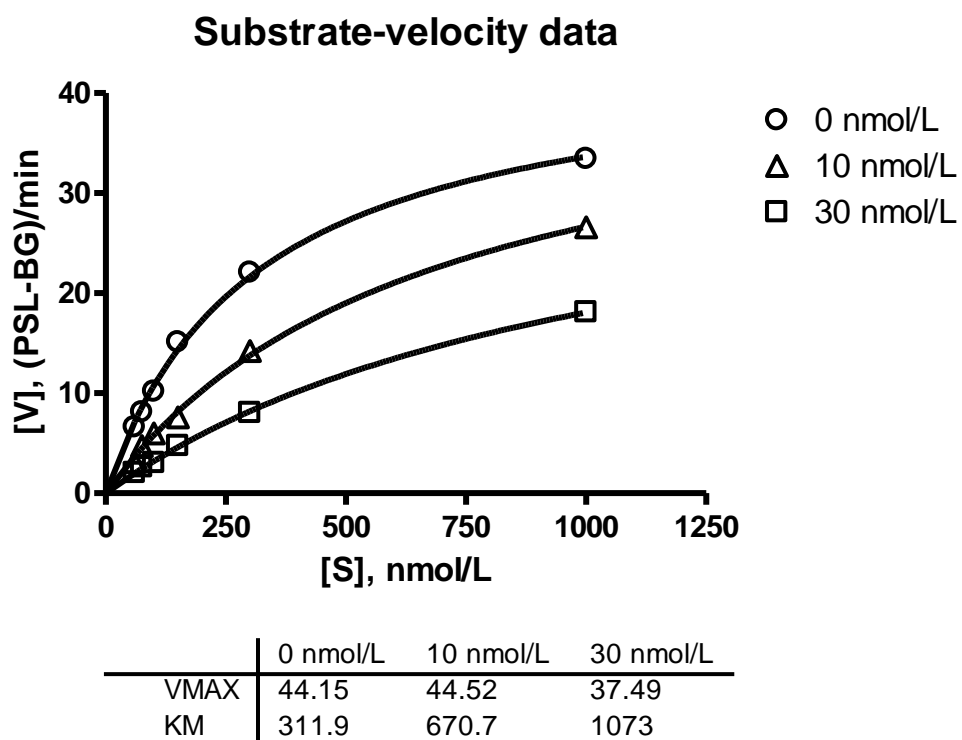


図 6. JTT-654 存在下におけるヒト 11 β -HSD1 の Michaelis-Menten プロット

Michaelis-Menten プロット及び各 JTT-654 濃度における Vmax 及び Km の代表例を示した。

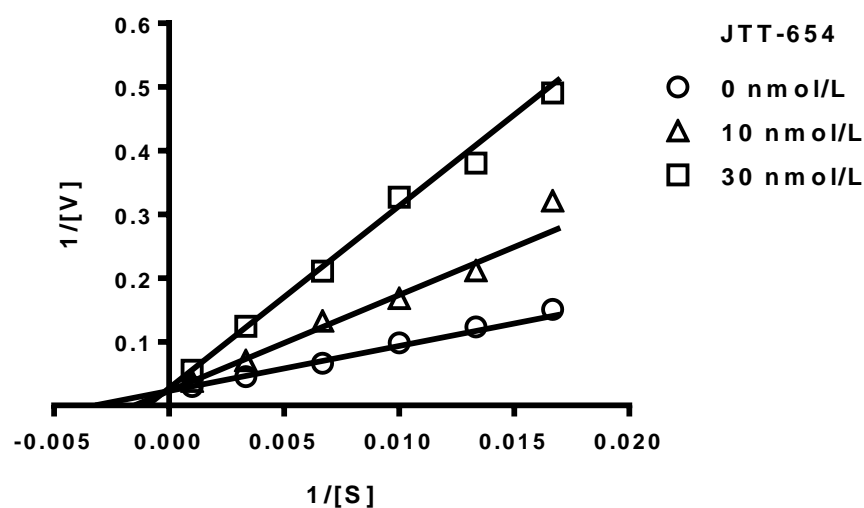


図 7. JTT-654 のヒト 11 β -HSD1 に対する阻害様式

Lineweaver-Burk プロットの代表例を表記した。JTT-654 は競合阻害作用を示した。

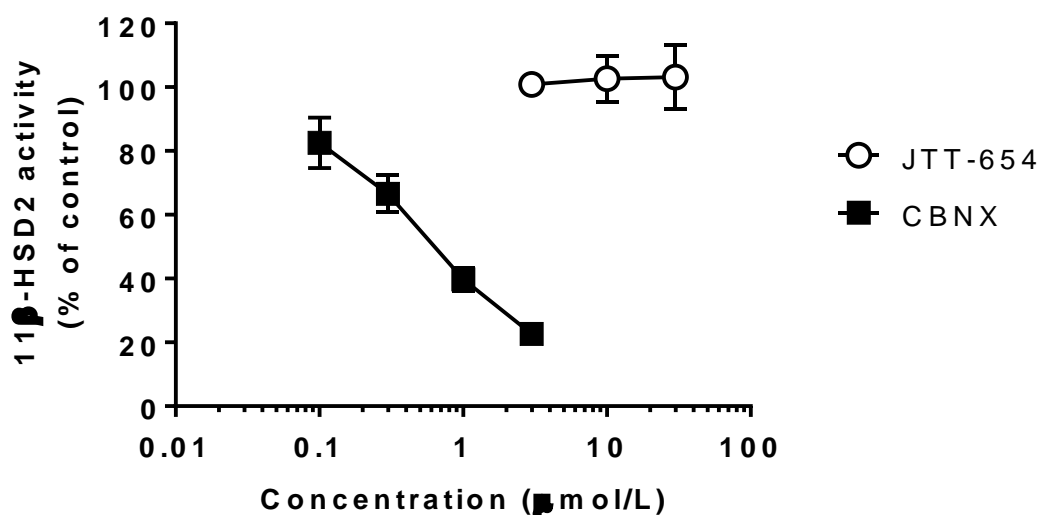


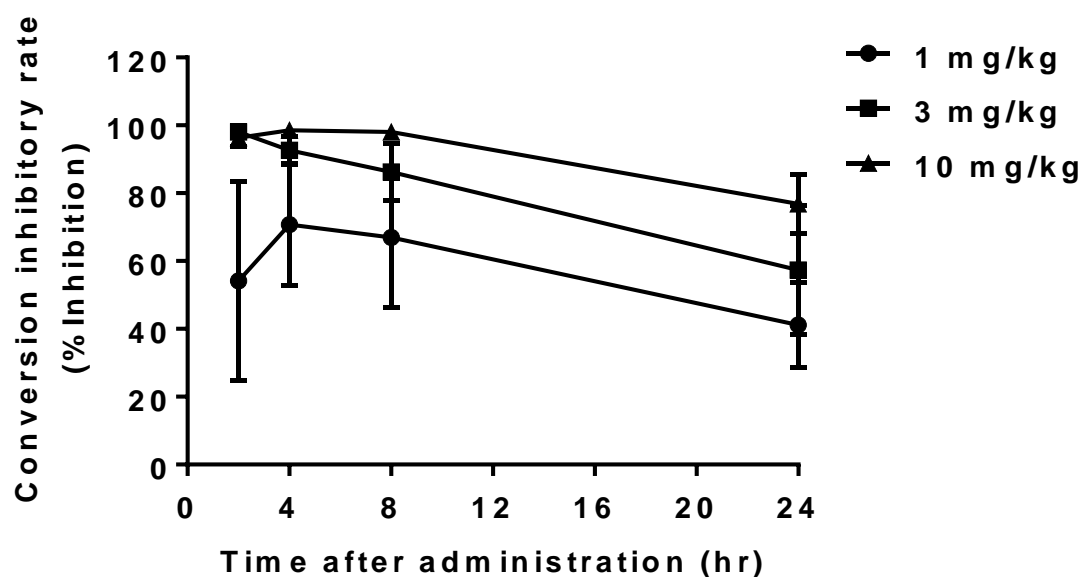
図 8. JTT-654 のヒト 11β-HSD2 に対する阻害作用

酵素活性は [1, 2-³H] cortisol 及びヒト腎臓 Ms を用いて測定した。数値は 3 回の実験結果の平均値 ± 標準誤差として表記した。

1.3.2 JTT-654 の脂肪組織及び肝臓 11β-HSD1 活性に対する抑制作用

JTT-654 の脂肪組織及び肝臓における 11β-HSD1 活性に対する抑制作用を検証することを目的として、ラット ex vivo による組織 11β-HSD1 活性を測定した。SD ラットに媒体又は JTT-654 を経口投与し、2, 4, 8 及び 24 時間後に動物を解剖した。解剖した動物より精巣上体周囲脂肪及び肝臓を摘出し、それらより得られた組織片の [1, 2-³H] cortisone から [1, 2-³H] cortisol への変換活性に対する JTT-654 の阻害作用を評価した。脂肪組織及び肝臓の結果をそれぞれ図 9 (A) 及び (B) に示した。JTT-654 は、脂肪組織及び肝臓いずれの 11β-HSD1 活性に対しても投与用量依存的な抑制作用を示した。JTT-654 10 mg/kg 投与 24 時間後における脂肪組織及び肝臓における 11β-HSD1 活性に対する抑制率はそれぞれ、脂肪組織で 1 mg/kg: 41 ± 13%, 3 mg/kg: 57 ± 19%, 10 mg/kg: 77 ± 9%, 肝臓で 1 mg/kg: 26 ± 11%, 3 mg/kg: 55 ± 19%, 10 mg/kg: 65 ± 8 であり、持続的な抑制作用を示すことが確認された。

A



B

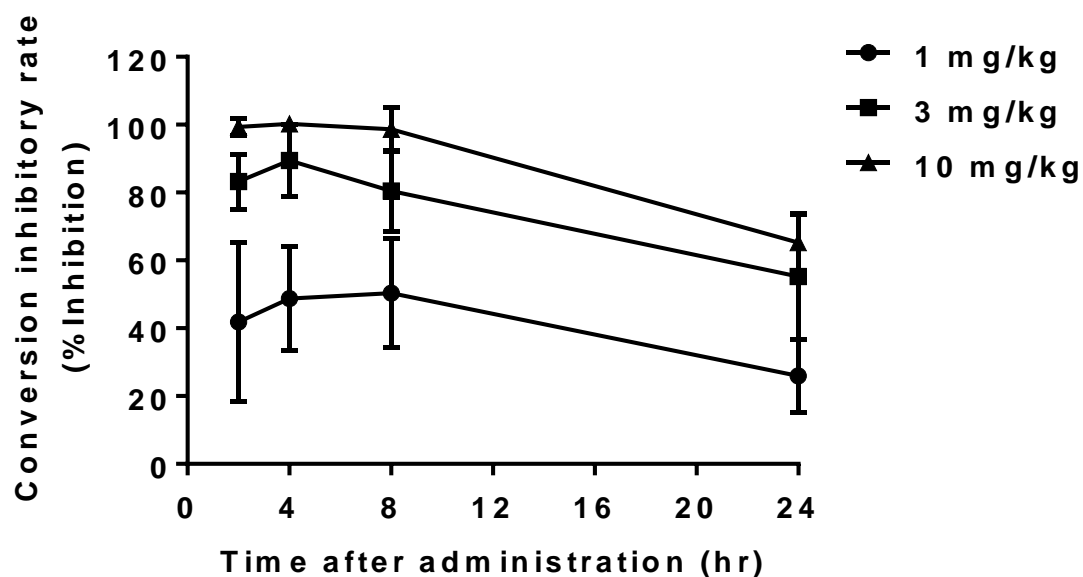


図 9. JTT-654 の脂肪組織及び肝臓 11 β -HSD1 活性に対する抑制作用

SD ラットに媒体 (0.5% MC) 又は JTT-654 1, 3 及び 10 mg/kg を経口投与し, 2, 4, 8 及び 24 時間後に脂肪組織及び肝臓における 11 β -HSD1 活性を測定した。媒体投与群の活性値に対する抑制率を脂肪組織 (A) 及び肝臓 (B) の両組織について算出した。数値は平均値 \pm 標準偏差として表記した (N = 5)。

1.4 考察

JTT-654 は選択的かつ強力な 11β -HSD1 阻害作用を有し、げっ歯類及びヒトの 11β -HSD1 を種差なく同等に阻害することが明らかとなった（表 1, 図 5, 及び図 8）。また, JTT-654 は基質である cortisone に対して競合阻害を示すことが明らかとなった（図 7）。 11β -HSD2 は活性型グルコルチコイドである cortisol を cortisone へ変換する酵素である。 11β -HSD2 は水・電解質代謝に関与する腎尿細管上皮, 大腸, 汗腺, 胎盤に高発現することが分かっており²⁷⁾, 本酵素を阻害することで, 循環器系に対する悪影響が懸念された。したがって, 薬剤開発の安全性面から 11β -HSD2 に対して阻害作用を示さないプロファイルを有していることは極めて重要であると考えられた。

過剰なグルコルチコイド作用が脂肪組織や肝臓で生じることで, メタボリックシンドロームの種々の症状を呈するようになる^{15) 16) 17)}。このことから, JTT-654 の標的臓器は脂肪組織及び肝臓であると考えられた。JTT-654 は脂肪組織及び肝臓のいずれの組織 11β -HSD1 活性に対しても用量依存的, かつ持続的な阻害作用を示した（図 9）。2 型糖尿病患者は一般的に服薬コンプライアンスが悪いとされており, SGLT2 阻害薬や DPPVI 阻害薬のほとんどは 1 日 1 回服用型の薬剤である。げっ歯類からヒトへの外挿は必要となるが, JTT-654 は 1 日 1 回ないしは 2 回の投与により, 24 時間にわたって脂肪組織及び肝臓の両臓器における 11β -HSD1 活性をほぼ完全に抑制することができるのではないかと考えられた。

2 JTT-654 の過剰なグルコルチコイドに起因する病態に対する改善作用

2.1 序文

グルコルチコイド作用の過剰が肥満症やインスリン抵抗性の病態に関与することが知られており、クッシング症候群の患者にグルコルチコイド受容体拮抗薬を投与すると一連の代謝異常が改善することは前述のとおりである²⁵⁾。これまでの検討により、JT-654 は脂肪組織及び肝臓 11 β -HSD1 に対して持続的な阻害作用を有し、副作用懸念のある 11 β -HSD2 に対しては阻害作用を示さないことが明らかとなっている。

一般的に、肝臓での過剰なグルコルチコイド作用は過剰な糖新生とグリコーゲン合成を促す^{28) 29)}。また、ヒト内臓脂肪細胞は、過剰なグルコルチコイド処理により、インスリン依存的な糖取り込みが障害されることがわかっている³⁰⁾。さらに、昇圧物質であるアンジオテンシノーゲンもこれらの臓器により産生される^{16) 17)}。そこで、JTT-654 が過剰なグルコルチコイド作用によって生じる種々の病態に対して改善作用を示すかについて検討を行った。また、各臓器における JTT-654 の作用メカニズム解析を行った。

2.2 実験材料及び実験方法

2.2.1 全身に対する作用

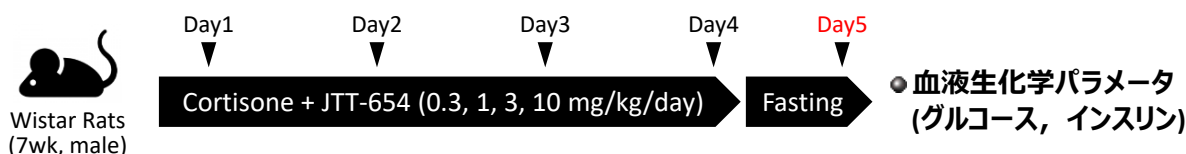
2.2.1.1 実験材料

Wistar ラットは Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) より購入した。Wistar ラットは標準飼料として CRF-1 (Charles River Japan) を給餌し、自由摂食及び自由摂水させた。Wistar ラットは特定病原微生物のない状態で温度 23 \pm 3°C、湿度 55 \pm 15%、12 時間毎の明暗サイクル（明期は 8 時-20 時）の飼育室にて飼育した。全ての手順は日本たばこ産業医薬総合研究所動物実験委員会のガイドラインに基づいて行った。

Cortisone は Sigma-aldrich Japan (Tokyo, Japan) より購入した。D-[3-³H]Glucose は株式会社パーキンエルマージャパン (Tokyo, Japan) より購入した。D-(+)Glucose は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。インスリンはノボリン R 注 100U/mL を使用し、ノボルディスクファーマ株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。

2.2.1.2 コルチゾン負荷モデルラットにおける血漿グルコース及びインスリンに対する作用

試験概要を下図に示した。



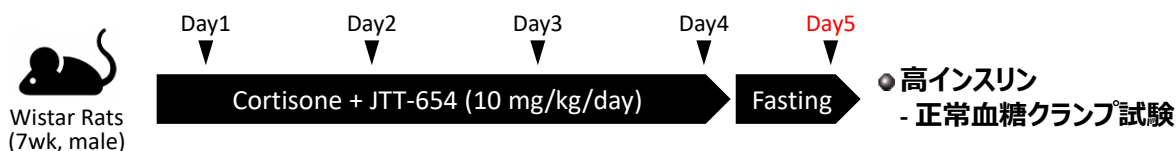
非絶食の Wistar ラット（雄性，7 週齢）に JTT-654 及びコルチゾンを 1 日 1 回，4 日間反復投与した。コルチゾン投与は，各投与日の JTT-654 投与 1 時間後に実施した。投与 4 日目の被験物質投与前に，非絶食状態で作用を評価するために採血を実施した。また，絶食時の作用を評価することを目的に，投与 4 日目のコルチゾン投与後，ラットを絶食させた。絶食 16 時間後に採血を行った。各採血ポイントにおいて，コルチゾン負荷により誘発されるグルコース及びインスリンの血漿中濃度の上昇に対する JTT-654 の作用を評価した。

JTT-654 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg は 0.5% (w/v) MC（信越化学工業株式会社，Tokyo, Japan）により懸濁したものを，5 mL/kg の投与容量で経口投与した。コルチゾン 100 mg/kg は 12% (w/v) シクロデキストリン（2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Sigma-aldrich Japan, Tokyo, Japan）に懸濁したものを 1 mL/kg の投与容量で腹腔内投与した。採血は尾静脈より行い，採取した血液は予めヘパリンを添加したチューブに移し，転倒混和した後，遠心分離するまで氷中に保管した。血液を $10,000 \times g$ で 5 分間，4°C にて遠心分離して血漿を得た。血漿中グルコースは，生化学自動分析装置（HITACHI7180，株式会社日立製作所，Tokyo, Japan）を用いて，ヘキソキナーゼ法により測定した。血漿中インスリンは，超高感度ラットインスリン測定キット（株式会社森永生科学研究所，Tokyo, Japan）を用いて ELISA 法により測定した。

JTT-654 投与群と対照群の間の有意差検定には Bartlett の等分散検定を行い，等分散性が確認された場合は Dunnett の多重比較検定，不等分散であれば Steel の多重比較検定を行った。対照群と正常対照（コルチゾン非投与）群の間の有意差検定には F 検定による等分散性の確認を行い，等分散性が確認された場合は Student の t 検定，不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5% とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0（SAS Institute Japan 株式会社）を用いた。

2.2.1.3 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおけるインスリン抵抗性改善作用

試験概要を下図に示した。



一晩絶食条件でのコルチゾン負荷モデルラットを用いて，高インスリン正常血糖クランプ試験を実施した。コルチゾン負荷モデルラットの作製は 2.2.1.2 項に準じた。4 日目の夕方に絶食を開始し，5 日目に 50 mg/kg の用量でペントバルビタール溶液を腹腔内投与し，麻酔した。頸部を切開し，右頸静脈及び左頸動脈にそれぞれカニューレ（SP 45，夏目製作所）を挿入し，縫合糸で血管ごと縛りカニューレを固定した。2 本のカニ

ーレは皮下を通し、頸背部に導出した。頸部の切開部を縫合した。カニューレ内を 100 U/mL ヘパリンナトリウム液で満たした。

5 日目の試験開始前に、頸動脈カニューレから約 250 μ L ヘパリン添加チューブに採血を行った。頸静脈カニューレから、[3-³H]グルコースを 740 kBq/head で注入した後、7.4 kBq/min の速度で持続注入した。注入開始 110, 115, 120 分後に basal 状態でのパラメータ測定用に頸動脈カニューレより約 250 μ L 採血を行った。採血終了後、頸静脈カニューレから、インスリンを 0.15 U/kg で注入した後、[3-³H]グルコース及びインスリンをそれぞれ 7.4 kBq/min 及び 5 mU/kg/min の速度で持続注入した。以降、5 分毎に頸動脈カニューレより採血を行い、簡易血糖測定器（メディセーフミニ、テルモ株式会社、Tokyo, Japan）にて血糖値を測定しながら、血糖値が 110 \pm 10 mg/dL の範囲となるように、頸静脈カニューレから 25%グルコース溶液を速度（mL/min）を調節しながら持続注入した。測定した血糖値が 3 ポイント（10 分間）連続して 110 \pm 10 mg/dL の範囲を維持した時点を定常状態とみなし、以降の 3 ポイント（10 分間）で clamp 状態でのパラメータ測定用に頸動脈カニューレより予めヘパリンを添加したチューブに約 250 μ L 採血を行った。ただし、採血時間は、インスリン注入開始 90 分後以降とした。clamp 状態での 25%グルコース溶液注入速度（mL/min）より、グルコース注入速度（GIR）（mg/kg/min）を算出した。

血漿パラメータはそれぞれ次のように測定した。血漿中インスリンは、超高感度ラットインスリン測定キット（株式会社森永生科学研究所、Tokyo, Japan）を用いて ELISA 法により測定した。[3-³H]グルコースの血漿中放射能は次のように測定した。200 μ L の ZnSO₄ と 180 μ L の Ba(OH)₂ を 20 μ L の血漿に加え、完全に混合した後、10,000 \times g, 5 分間、15°C で遠心分離し、上清 360 μ L を回収した。上清 200 μ L を新しいチューブに移し、窒素ガス通気下で 100°C に加熱して、³H₂O を含む水を除去した。残渣を 300 μ L の精製水で再溶解し、3 mL の液体シンチレーションカクテル（Clear-sol I, ナカライテスク株式会社、Kyoto, Japan）と完全に混合して、液体シンチレーションカウンター（TRI-Carb 2500TR, 株式会社パーキンエルマージャパン、Tokyo, Japan）を用いて[3-³H]グルコースの放射能を測定した。

全身のインスリン感受性の指標であるグルコース注入速度（Glucose Infusion Rate, GIR : mg/kg/min）, 末梢のインスリン感受性の指標であるグルコース消失速度（Rate of glucose disposal, Rd）及び肝臓のインスリン感受性の指標である肝糖産生速度（Hepatic Glucose Production, HGP）は、以下の計算式により算出した。

- GIR (mg/kg/min)
= 25%グルコース注入速度 (mL/h) \times 250 / 60 / 体重 (kg)
- Rd (mg/kg/min) = Ra (Rate of glucose appearance)
= [3-³H]グルコース注入速度 (dpm/min) / [3-³H]グルコース比放射能 (dpm/mg) / 体重 (kg)
- [3-³H]グルコース比放射能 (dpm/mg)
= [3-³H]グルコース放射能濃度 (dpm/mL) / 血漿中グルコース濃度 (mg/dL) \times 100
- HGP (mg/kg/min) = Ra (mg/kg/min) - GIR (mg/kg/min)

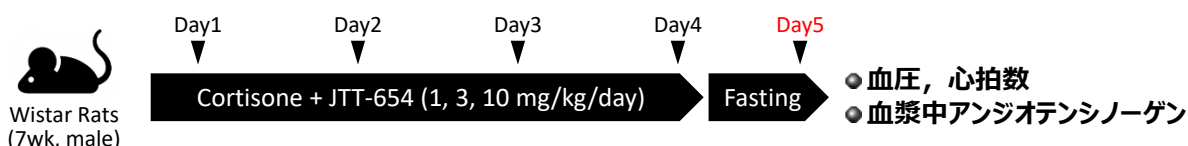
(basal 状態では, GIR = 0)

正常対照（コルチゾン非投与）群と対照群, 及び対照群と JTT-654 投与群の間の各パラメータの検定は, F 検定による等分散性の確認を行い, 等分散性が確認された場合は Student の t 検定, 不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5%とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

2.2.1.4 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおける血圧, 及び血漿中アンジオテンシノーゲン濃度

に対する作用

試験概要を下图に示した。



一晩絶食条件でのコルチゾン負荷モデルラットを用いて, 血圧を測定した。コルチゾン負荷モデルラットの作製は 2.2.1.2 項に準じた。4 日目の夕方に絶食を開始し, 5 日目に非観血式自動血圧測定装置 (BP-98A, 株式会社ソフトロン, Tokyo, Japan) を用いて収縮期血圧及び心拍数の測定を行った。ラットを測定の 30 分以上前に測定場所へ移動し, 実験台上に放置して落ち着かせた。ラットを保温筒及びポケットに入れて拘束し, 10 分程度予備加温した。ラットの尾部をカフセンサーに入れ, 心拍数・脈波が安定した後測定を行った。測定は 1 匹につき 5 回行った。捕定時に落ち着きのなかった動物は, 一通りの測定終了後に再測定を行った。収縮期血圧及び心拍数は, 5 回の測定結果のうち, 収縮期血圧の最高値と最低値の 2 例を除く 3 例の平均値を代表値とした。

血圧測定後の動物の尾静脈より採血を行った。採血, 及び血漿分離の方法は 2.2.1.2 項に準じた。血漿中のアンジオテンシノーゲン濃度を ELISA 法 (Human Total Angiotensinogen Assay Kit, 株式会社免疫生物研究所, Gunma, Japan) により測定した。サンプル測定の前に, 使用したキットがラットアンジオテンシノーゲンに対して交差反応性を示すかについて確認した。

JTT-654 投与群と対照群の間の有意差検定には Bartlett の等分散検定を行い, 等分散性が確認された場合は Dunnett の多重比較検定, 不等分散であれば Steel の多重比較検定を行った。対照群と正常対照（コルチゾン非投与）群の間の有意差検定には F 検定による等分散性の確認を行い, 等分散性が確認された場合は Student の t 検定, 不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5%とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

2.2.2 脂肪組織（細胞）に対する作用

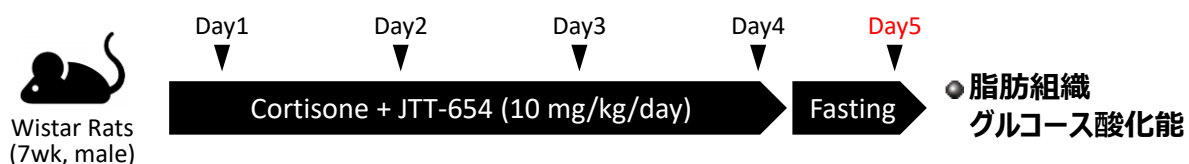
2.2.2.1 実験材料

Wistar ラットは Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) より購入し、飼育環境及び飼育基準は 2.2.1.1 項に準じた。全ての手順は日本たばこ産業医薬総合研究所動物実験委員会のガイドラインに基づいて行った。

D-[U-¹⁴C]Glucose 及び 2-Deoxy-D-[1-³H]Glucose (2-DG) は株式会社パーキンエルマージャパン (Yokohama, Japan) より購入した。Cortisone, insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 及び Albumin from Bovine Serum (BSA, essentially fatty acid free) は Sigma-aldrich Japan (Tokyo, Japan) より購入した。3T3-L1 細胞 (マウス線維芽細胞) は財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 研究資源バンクより購入した。上記購入元より 6 代で入手後、継代用培地 (10% fetal bovine serum [FBS], 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin を含む Dulbecco's modified eagle medium [DMEM] (High Glucose), 10% FBS-DMEM) にて 11 代まで継代培養し、液体窒素中に保管した。更にこれを 3 回継代培養して液体窒素中に保管したものを使用した。2.2.2.3 項の plate への播種には 17 代の細胞を使用した。

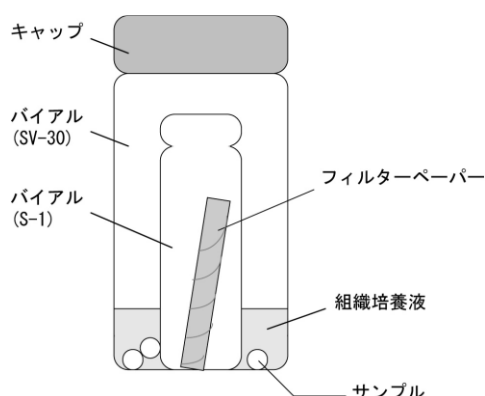
2.2.2.2 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおける脂肪組織のグルコース酸化能に対する作用

試験概要を下図に示した。



一晩絶食条件でのコルチゾン負荷モデルラットを用いて、脂肪組織のグルコース酸化能を評価した。コルチゾン負荷モデルラットの作製は 2.2.1.2 項に準じた。4 日目の夕方に動物を絶食した。5 日目、一晩絶食状態のラットをイソフルラン吸入麻酔可下、頸動脈切開により放血死させ、精巣上体周囲脂肪を摘出した。摘出した脂肪組織を 3~5 mm 角程度の組織片に細断後、秤量した。合計約 200 mg となるように 3~4 ブロックを選抜し 1 サンプルとした。

脂肪組織におけるグルコース酸化の測定は Rodbell らの報告を参考に実施した²⁸⁾。インスリンの最終濃度が 0, 1, 100 nmol/L の各組織培養液 (D-[U-¹⁴C]Glucose を最終濃度 20.66 kBq/mL となるように、4%(w/v) BSA/Hank's Balanced Salt Solution で溶解したもの) をサンプル瓶 (Vials with Screw Cap SV-30 側) に 2 mL ずつ添加し、予め 37°C で加温した。同一組織由来の 3 サンプルを各インスリン濃度の組織培養液中に 1 サンプルずつ移し、密栓して 37°C, 2 時間振とうし、D-[U-¹⁴C] Glucose を反応させた。反応後、培養液に反応停止液 (0.05 mol/L H₂SO₄) を 0.25 mL 添加して反応を停止させた。



サンプル瓶 (S-I) 内のフィルターペーパーに Hyamine Hydrozide 10-X (パーキンエルマー・ジャパン株式会社, Tokyo, Japan) を 0.2 mL 添加して室温で 30 分間静置し, D-[U- ^{14}C]Glucose から生成した [^{14}C]CO $_2$ を吸着させた。フィルターペーパーを液体シンチレーションカウンター用バイアル瓶に移して液体シンチレーションカクテル (クリアソル I) を 10 mL 添加し, 放射活性値を液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 2500TR, 株式会社パーキンエルマー・ジャパン, Yokohama, Japan) で測定した。

反応後の組織片を生理食塩液で洗浄した後, 2 mL エッペンチューブに移し, 液体窒素にて凍結した。凍結した組織を融解し, ジルコニアボール (YTZ $^{\text{®}}$ ボール, 株式会社ニッカトー, Osaka, Japan) と共に 0.5% (w/v) SDS 水溶液中で振とうして脂肪組織を破碎した。組織液を 10,000 \times g で 5 分間, 室温にて遠心分離し, 下層の水溶性画分を回収した。回収した水溶性画分のタンパク量を, Lowry 法 (BCA Protein assay kit, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) を用いて測定した。標準品としてアルブミン標準液 (Albumin standard 2 mg/mL, Pierce Biotechnology, Inc., Waltham, USA) を用いた。標準品より標準曲線を求め, 各サンプルのタンパク量を算出した。

反応時間 2 時間での, タンパク量 (mg) あたりの放射活性値 (dpm) をグルコース酸化活性 (dpm/mg protein/2hr) として以下の式により算出した。

$$\begin{aligned} & - \text{グルコース酸化能 (dpm/mg protein 2hr)} \\ & = \text{放射活性値 (dpm)} / \text{脂肪組織の総タンパク量 (mg)} \end{aligned}$$

正常対照 (コルチゾン非投与) 群と対照群, 及び対照群と JTT-654 投与群の間の各パラメータの検定は, F 検定による等分散性の確認を行い, 等分散性が確認された場合は Student の t 検定, 不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5%とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

2.2.2.3 JTT-654 のコルチゾン処置における脂肪細胞の糖取り込みに対する作用

3T3-L1 細胞を, 24 well plate に 1×10^5 cells/500 μL /well の密度で播種した。コンフルエントに達した細胞を 2 日間培養し, 培地を分化誘導培地 (10 μg /mL insulin, 1 μmol /L dexamethasone, 0.5 mmol/L IBMX を含む 10% FBS-DMEM) と交換した。分化誘導後 2 日目に, 培地を分化促進培地 (5 μg /mL Insulin を含む 10% FBS-DMEM) と交換した。分化誘導後 8 日目まで 2 日毎に新しい

分化促進培地に交換した。分化誘導後 9 日目に、顕微鏡観察下で脂肪滴を有する細胞の割合が 90%以上であることを確認した後、試験に供した。細胞培養は、CO₂ インキュベーター内で 37°C, 5% CO₂ の条件で実施した。

糖取り込み評価は、Sakoda らの方法³¹⁾ を一部変更して行った。分化させた 3T3-L1 脂肪細胞に JTT-654 (最終濃度 : 0, 0.1, 1 及び 10 µmol/L) および及びコルチゾン (最終濃度 : 0 及び 10 µmol/L) を添加し、無血清培地 (0.2% BSA を含む DMEM) にて 24 時間培養した。アッセイバッファー (0.2% (w/v) BSA, 122 mmol/L NaCl, 5.1 mmol/L KCl, 1.16 mmol/L MgSO₄, 16.62 mmol/L Na₂HPO₄, pH 7.4) へと交換後、JTT-654 (最終濃度 : 0, 0.1, 1 及び 10 µmol/L) , コルチゾン (最終濃度 : 0 及び 10 µmol/L) 及びインスリン (最終濃度 : 0, 1, 10 及び 100 nmol/L) 存在下で、2-DG (最終濃度 : 0.4 µmol/L, 162.8 kBq/mL) を添加し 10 分間培養した。培地交換時には PBS (-) で細胞をそれぞれ 3 回洗浄ずつした。培地を除いた後、細胞を PBS (-) で 3 回洗浄した後、0.5% (w/v) Sodium dodecyl sulfate 水溶液で細胞を溶解した。細胞溶解液を液体シンチレーションカウンター用バイアル瓶に移して液体シンチレーションカクテル (クリアソル I) を 10 mL 添加し、放射活性値を液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 2500TR) で測定した。この際、48, 24, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0 kBq/mL の 2-DG 標準溶液 (50 µL) を調製し、放射活性を測定した。

標準曲線の直線式を用いて細胞内に取込まれた 2-DG 量 (pmol/10min) を算出した。また、各群のインスリン添加による 2-DG uptake (pmol/10 min) の増加量を、2-Deoxy-D-[1-3H] glucose uptake change (pmol/10 min) として以下の式により算出した。

$$\begin{aligned} & - \text{2-Deoxy-D-[1-3H] glucose uptake change (pmol/10 min)} \\ & = (\text{各サンプルの細胞内 2-DG uptake [pmol/10 min]}) \\ & - (\text{同一群のインスリン 0 nmol/L における 2-DG uptake [pmol/10 min]}) \end{aligned}$$

JTT-654 処置群と対照群の間の有意差検定には Bartlett の等分散検定を行い、等分散性が確認された場合は Dunnett の多重比較検定、不等分散であれば Steel の多重比較検定を行った。対照群と正常対照 (コルチゾン非処置) 群の間の有意差検定には F 検定による等分散性の確認を行い、等分散性が確認された場合は Student の t 検定、不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5%とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

2.2.2.4 JTT-654 のコルチゾン処置における脂肪細胞からの脂肪酸、グリセロール及びアンジオテンシノ

ーゲン分泌に対する作用

3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化は、2.2.2.3 項に準じた。

脂肪酸及びグリセロール分泌量の評価を以下に示す。

分化させた 3T3-L1 脂肪細胞を PBS (-) で 3 回洗浄した後, JTT-654 (最終濃度 : 0, 0.1, 1 及び 10 $\mu\text{mol/L}$) および及びコルチゾン (最終濃度 : 0 及び 10 $\mu\text{mol/L}$) を添加し, 10% FBS-DMEM にて 24 時間培養した。

培養後の 3T3-L1 脂肪細胞を PBS (-) で 3 回洗浄した後, JTT-654 (最終濃度 : 0, 0.1, 1 及び 10 $\mu\text{mol/L}$) および及びコルチゾン (最終濃度 : 0 及び 10 $\mu\text{mol/L}$) を添加し, 10% FBS-DMEM にて 2 時間培養した。培養後の培養上清をチューブに回収し, 10,000 $\times g$ で 5 分間, 4°C にて遠心分離して培養上清サンプルを得た。

培養上清中の遊離脂肪酸濃度を, アシル-CoA シンセターゼ・アシル-CoA オキシダーゼ法 (ラボアッセイ™ NEFA, 富士フィルム和光純薬株式会社, Osaka, Japan) により, 培養上清中グリセロール濃度をグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ・3,5-ジメトキシ-N-エチル-N- (2'-ヒドロキシ-3'-スルホプロピル) -アニリンサトリウム法 (ラボアッセイ™ トリグリセライド, 富士フィルム和光純薬株式会社, Osaka, Japan) により, それぞれ測定した。

アンジオテンシノーゲン分泌量の評価を以下に示す。

分化させた 3T3-L1 脂肪細胞を PBS (-) で 3 回洗浄した後, JTT-654 (最終濃度 : 0, 0.1, 1 及び 10 $\mu\text{mol/L}$) および及びコルチゾン (最終濃度 : 0 及び 10 $\mu\text{mol/L}$) を添加し, 分化促進培地にて 12 時間培養した。

培養後の培養上清をチューブに回収し, 10,000 $\times g$ で 5 分間, 4°C にて遠心分離して培養上清サンプルを得た。

培養上清中のアンジオテンシノーゲン濃度を ELISA 法 (Human Total Angiotensinogen Assay Kit, 株式会社免疫生物研究所, Gunma, Japan) により測定した。サンプル測定の前に, 使用したキットがマウスアンジオテンシノーゲンに対して交差反応性を示すかについて確認した。

JTT-654 処置群と対照群の間の有意差検定には Bartlett の等分散検定を行い, 等分散性が確認された場合は Dunnett の多重比較検定, 不等分散であれば Steel の多重比較検定を行った。対照群と正常対照 (コルチゾン非処置) 群の間の有意差検定には F 検定による等分散性の確認を行い, 等分散性が確認された場合は Student の t 検定, 不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5%とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

2.2.3 肝臓に対する作用

2.2.3.1 実験材料

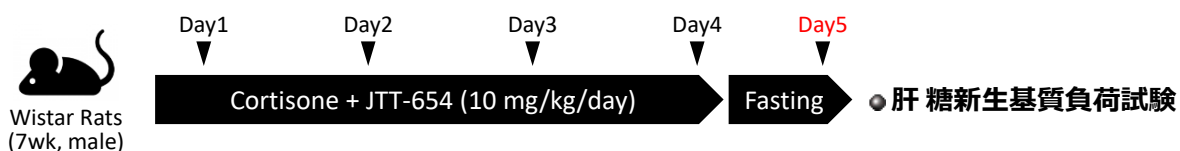
Wistar ラットは Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) より購入し, 飼育環境及び飼育基準は 2.2.1.1 項に準じた。全ての手順は日本たばこ産業医薬総合研究所動物実験委員会のガイドラインに基づいて行った。

Sodium pyruvate 及び amyloglucosidase は Sigma-aldrich Japan (Tokyo, Japan) より購入した。10 U/mL amyloglucosidase 溶液は, 2 mol/L 酢酸ナトリウムバッファー (2 mol/L 酢酸ナトリウム

水溶液を 2 mol/L 酢酸を用いて pH 4.8 に調製したもの) を精製水で希釈し、0.4 mol/L 酢酸ナトリウムバッファーを調製した後、これを用いて amyloglucosidase を希釈し、調製した。

2.2.3.2 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおける糖新生に対する作用

試験概要を下図に示した。



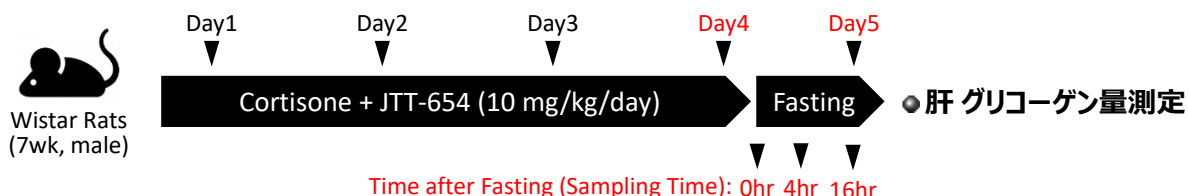
一晚絶食条件でのコルチゾン負荷モデルラットを用いて、肝臓での糖新生能を評価した。コルチゾン負荷モデルラットの作製は 2.2.2 項に準じた。4 日目の夕方に動物を絶食した。5 日目に、一晚絶食状態のラットに糖新生基質溶液 (sodium pyruvate を生理食塩液で 0.2 g/mL となるように溶解したもの) を 1 mL/kg の投与容量で腹腔内投与した。糖新生基質溶液投与前及び投与 10, 20 及び 30 分後に尾静脈より採血を行った。採取した血液より血漿を分離し、血漿中グルコース濃度を測定した。血漿中グルコース濃度測定は 2.2.1 項に準じた。また、以下の計算式により、血漿中グルコース濃度変化量を算出した。

- 血漿中グルコース濃度変化量 (mg/dL)
= 糖新生基質溶液投与 10, 20, 30 分後における血漿中グルコース濃度 (mg/dL)
- 糖新生基質溶液投与前の血漿中グルコース濃度 (mg/dL)

正常対照 (コルチゾン非投与) 群と対照群、及び対照群と JTT-654 投与群の間の各パラメータの検定は、F 検定による等分散性の確認を行い、等分散性が確認された場合は Student の t 検定、不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5%とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

2.2.3.3 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおける肝グリコーゲン量に対する作用

試験概要を下図に示した。



コルチゾン負荷モデルラットを用いて、肝臓における肝グリコーゲン量を評価した。コルチゾン負荷モデルラットの作製は 2.2.2 項に準じた。4 日目の JTT-654 投与後にラットを経時的に絶食させ、非絶食、4 時間絶食及び 16 時間絶食という条件を設け、5 日目に解剖を行った。解剖はラットをイソフルラン吸入麻酔可下、頸動脈切開により放血死させ、素早く肝臓を摘出し液体窒素にて凍結した。

凍結した肝臓に重量の 2 倍量 (v/w) の精製水を加え、解凍後氷冷下にてポリトンホモジナイザー (Polytron PT3100, Kinematica, Inc., Walters, Switzerland) を用いて破碎した。得られたホモジネートを精製水で 200 倍希釈したものをサンプルとした。96 穴プレートにサンプル 100 μ L を入れ、10 U/mL Amyloglucosidase 溶液を 100 μ L 添加して、振とう (170 r.p.m.) しながら 40°C で 2 時間インキュベートし、グリコーゲンをグルコースに分解した。ブランクは、アミログルコシダーゼ非添加とした。得られたサンプルを 1000 \times g, 室温で 10 分間遠心分離した後、上清 40 μ L を 96 穴プレートに移し、0.25 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 10 μ L/well 添加し中和した。この中和サンプル中のグルコース濃度をグルコース測定キット (ラボアッセイ™グルコース, 富士フィルム和光純薬株式会社, Osaka, Japan) を用いてムロターゼ・GOD (グルコースオキシダーゼ) 法により測定した。

蛋白定量は、上記希釈サンプルを、Lowry 法 (BCA Protein assay kit, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) を用いて測定した。標準品としてアルブミン標準液 (Albumin standard 2 mg/mL, Pierce Biotechnology, Inc., Waltham, USA) を用いた。標準品より標準曲線を求め、各サンプルのタンパク量を算出した。

グリコーゲン量は以下の計算式に示すように、mg 蛋白当たりのグルコース換算濃度で算出した。

$$\begin{aligned} & \text{肝グリコーゲン量 (glucose } \mu\text{g/mg protein)} \\ &= \left((\text{Amyloglucosidase 処理グルコース濃度 (}\mu\text{g/mL)} - \right. \\ & \quad \left. (\text{酢酸ナトリウムバッファー処理グルコース濃度 (}\mu\text{g/mL)}) \right) \times 2.5 / \text{タンパク濃度 (mg/mL)} \end{aligned}$$

正常対照群、対照群及び JTT-654 群の間の肝臓中グリコーゲン量、及び 16 時間絶食群と非絶食群の間、及び 16 時間絶食群と 4 時間絶食群の間の肝臓中グリコーゲン量に関して、有意差検定には F 検定による等分散性の確認を行い、等分散性が確認された場合は Student の t 検定、不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5%とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

2.3 結果

2.3.1 JTT-654 の全身の過剰なグルココルチコイドに起因する病態に対する改善作用

2.3.1.1 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおける血漿中グルコース及びインスリンに対する作用

JTT-654 の過剰なグルココルチコイド作用に対する改善作用を評価することを目的として、病態モデル動物としてコルチゾン負荷モデルラットを用いた検討を行った。非絶食の Wistar ラットに JTT-654 及びコルチゾンを 1 日 1 回、4 日間反復投与した。非絶食及び絶食状態でのコルチゾン負荷により誘発される病態に対する JTT-654 の作用を評価した。

非絶食時及び絶食時の血漿中グルコース及びインスリン濃度を図 10、及び図 11 にそれぞれ示した。コルチゾンの負荷により対照群の非絶食時の血漿中グルコース及びインスリンは、正常対照群に対してそれぞれ上昇した。また、この変化は絶食時により顕著であり、いずれのパラメータも有意な上昇が認められた。過剰なグルコ

コルチコイド作用によるこれらの作用に対して，JTT-654 投与群では用量依存的な改善作用が認められ，10 mg/kg 投与群においては正常対照群と同程度まで改善した。

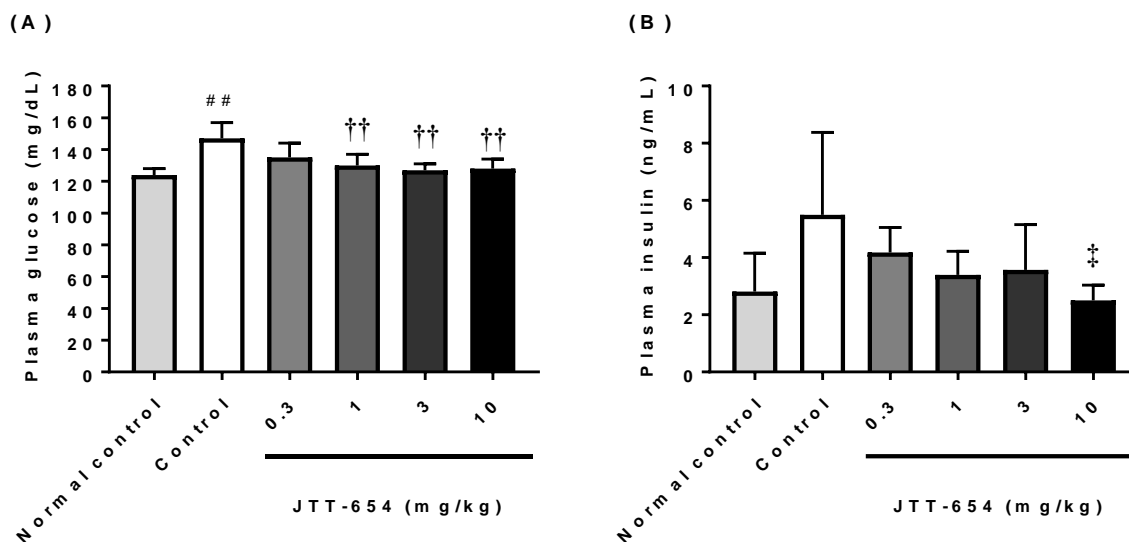


図 10. JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットの非絶食時血漿中グルコース及びインスリン濃度に

対する作用

(A) 血漿中グルコース濃度，(B) 血漿中インスリン濃度を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 5)。

##p<0.01 vs Normal Control (Student's t test)

††p<0.01 vs Control (Dunnett test) , ‡p<0.05 vs Control (Steel test)

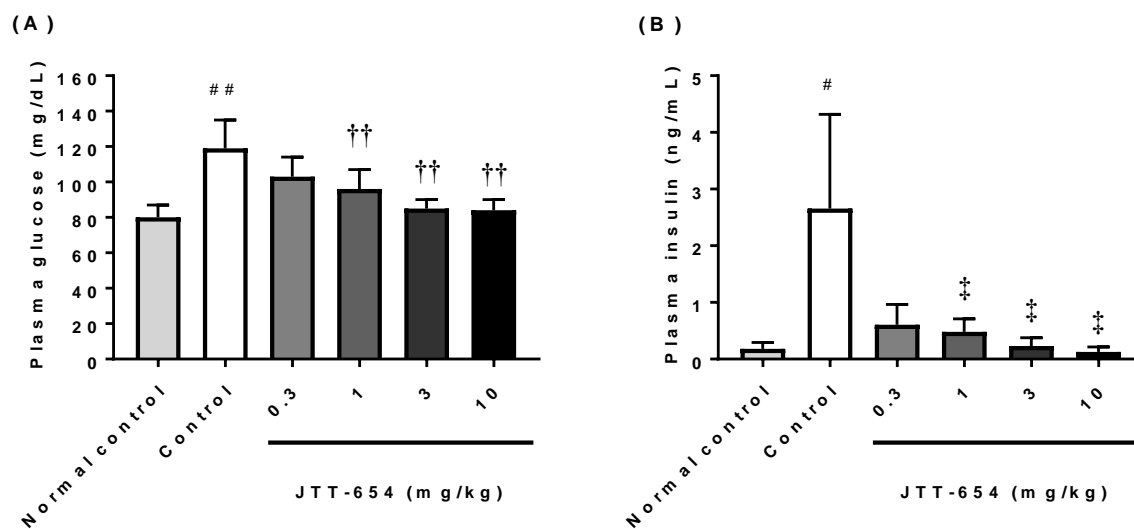


図 11. JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットの絶食時血漿中グルコース及びインスリン濃度に対する作用

(A) 血漿中グルコース濃度, (B) 血漿中インスリン濃度を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 5)。

#p<0.05, ##p<0.01 vs Normal Control (Student's t test)

††p<0.01 vs Control (Dunnett test), ‡p<0.05 vs Control (Steel test)

2.3.1.2 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおけるインスリン抵抗性改善作用

JTT-654 の過剰なグルココルチコイド作用に対する改善作用を評価することを目的として、病態モデル動物としてコルチゾン負荷モデルラットを用いた検討を行った。非絶食の Wistar ラットに JTT-654 及びコルチゾンを 1 日 1 回、4 日間反復投与した。絶食状態でのコルチゾン負荷により誘発される病態に対する JTT-654 の作用を評価した。

正常血糖クランプ試験における血漿中グルコース、インスリン、GIR、Rd 及び HGP を表 2 に示した。Basal 状態での Rd 及び HGP は群間に有意な差はなかった。Clamp 状態において、対照群の GIR は、コルチゾン非投与群に対して低下した。更に、対照群の Rd 及び HGP は、コルチゾン非投与群に対し、それぞれ低下及び上昇傾向を示した。一方、JTT-654 はコルチゾン負荷による GIR の低下をコルチゾン非投与群と同程度まで抑制した。更に、JTT-654 はコルチゾン負荷による Rd の低下及び HGP の上昇を抑制した。

表 2. JTT-654 の高インスリン-正常血糖クランプ試験時の血漿中グルコース, インスリン, GIR,

Rd 及び HGP に対する作用

	Normal control	Control	JTT-654 (10 mg/kg)
Plasma Glucose (mg/dL)			
Basal	99 ± 12	110 ± 8 [#]	106 ± 14
Clamp	111 ± 4	110 ± 2	112 ± 5
Plasma Insulin (ng/mL)			
Basal	0.89 ± 0.20	2.39 ± 1.14 ^{##}	1.06 ± 0.41 [†]
Clamp	4.94 ± 0.51	6.68 ± 2.28	5.15 ± 0.55
GIR (mg/kg/min)	18.3 ± 3.5	12.9 ± 4.8 [#]	20.9 ± 3.6 ^{††}
Rd (mg/kg/min)			
Basal	6.6 ± 0.5	8.3 ± 2.3	7.3 ± 1.3
Clamp	18.6 ± 2.9	14.2 ± 3.9 [#]	19.7 ± 4.0 ^{††}
HGP (mg/kg/min)			
Basal	6.6 ± 0.5	8.3 ± 2.3	7.3 ± 1.3
Clamp	0.3 ± 2.9	1.3 ± 2.4	-1.3 ± 1.4 [†]

数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 8-10)。

[#]p<0.05, ^{##}p<0.01 vs Normal Control (Student's t test or Welch's test)

[†]p<0.05, ^{††}p<0.01 vs Control (Student's t test or Welch's test)

2.3.1.3 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおける血圧，及び血漿中アンジオテンシノーゲン濃度に対する作用

JTT-654 の過剰なグルココルチコイド作用に対する改善作用を評価することを目的として，病態モデル動物としてコルチゾン負荷モデルラットを用いた検討を行った。非絶食の Wistar ラットに JTT-654 及びコルチゾンを 1 日 1 回，4 日間反復投与した。絶食状態でのコルチゾン負荷により誘発される病態に対する JTT-654 の作用を評価した。

絶食時の収縮期血圧，心拍数，及び血漿中アンジオテンシノーゲン濃度の結果を図 12 にそれぞれ示した。コルチゾンの負荷により対照群の絶食時の収縮時血圧は正常対照群に対して有意に上昇した。また，JTT-654 投与群では用量依存的な改善作用が認められ，10 mg/kg 投与群においては正常対照群と同程度まで改善した。一方で，心拍数についてはいずれの群間においても差が認められなかった。

対照群の血漿中アンジオテンシノーゲン濃度は，正常対照群に対して有意な上昇が認められた。この対照群で認められたアンジオテンシノーゲンの上昇に対して，JTT-654 1 mg/kg 群，及び 10 mg/kg 群では有意な低下が認められた。

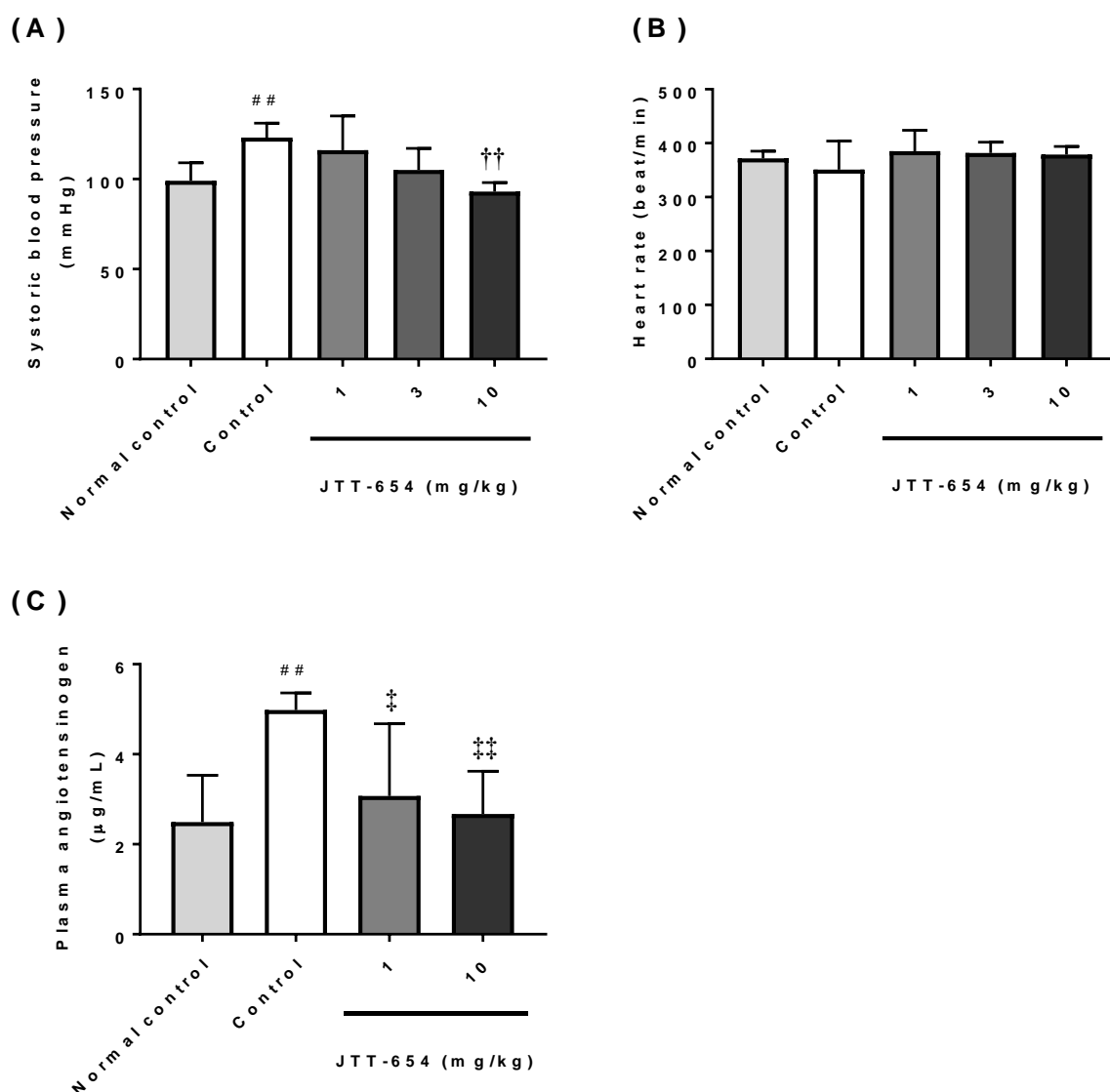


図 12. JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットの血圧、心拍数、及び血漿中アンジオテンシノーゲン濃度に対する作用

(A) 収縮期血圧、(B) 心拍数、及び (C) 血漿中アンジオテンシノーゲン濃度を示した。数値は平均値 ± 標準偏差として表記した (N = 5)。

##p<0.01 vs Normal Control (Student's t test)

††p<0.01 vs Control (Dunnett test), †p<0.05, †††p<0.01 vs Control (Steel test)

2.3.2 JTT-654 の脂肪組織（細胞）における過剰なグルコルチコイドに起因する病態に対する改善作用

2.3.2.1 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおける脂肪組織のグルコース酸化能に対する作用

JTT-654 の過剰なグルコルチコイド作用に対する改善作用を評価することを目的として、病態モデル動物としてコルチゾン負荷モデルラットを用いた検討を行った。非絶食の Wistar ラットに JTT-654 及びコルチゾンを経口投与した。絶食状態でのコルチゾン負荷により誘発される病態に対する JTT-654 の作用を評価した。

脂肪組織におけるインスリン感受性に対する作用を評価するために、一晩絶食条件下で精巣上体周囲脂肪及び腸間膜脂肪組織を用いてグルコース酸化試験を行った。結果を図 13 に示した。コルチゾン負荷により精巣上体周囲脂肪及び腸間膜脂肪の両部位においてインスリンの有無に関わらずグルコース酸化が低下した。JTT-654 はコルチゾン負荷により低下したグルコース酸化を両部位において改善した。その改善作用はインスリン濃度の増加に伴って強く表れた。以上の結果より、JTT-654 はコルチゾン負荷によるグルコース酸化能及びそのインスリンに対する反応性の低下を改善することが示された。

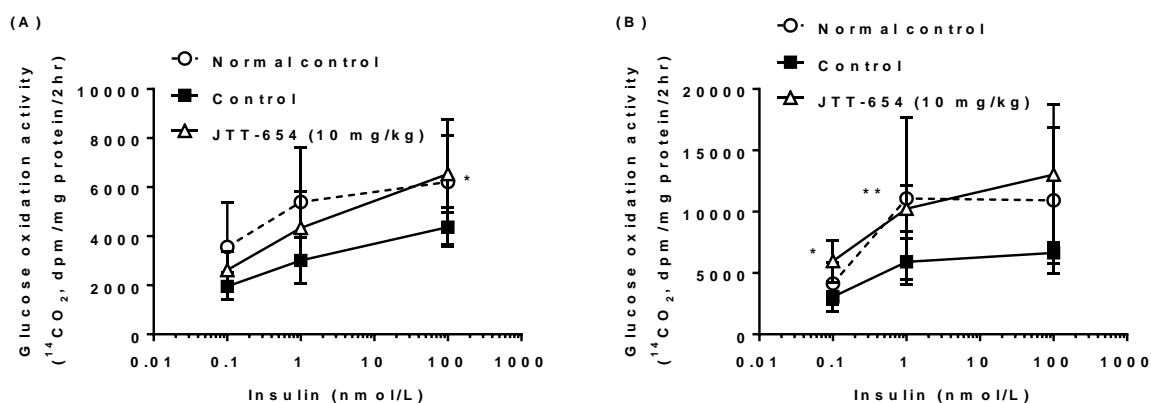


図 13. JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットの脂肪組織グルコース酸化能に対する作用

(A) 精巣上体周囲脂肪, (B) 腸間膜脂肪を用いたグルコース酸化能を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 5)。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Control (Student's t test)

2.3.2.2 JTT-654 のコルチゾン処置における脂肪細胞の糖取り込みに対する作用

JTT-654 の脂肪細胞での過剰なグルココルチコイド作用に対する改善作用を評価することを目的として、3T3-L1 脂肪細胞を用いた検討を行った。3T3-L1 脂肪細胞を用いてコルチゾン処置を行い、糖取り込み能低下に対する JTT-654 の作用を評価した。

結果を図 14 に示した。分化した 3T3-L1 脂肪細胞の糖取り込みは、1 $\mu\text{mol/L}$ のコルチゾン処置によって有意に低下した。JTT-654 はコルチゾン処置による糖取り込みの低下を、濃度の増加に応じてコルチゾン無処置群と同程度まで改善した。この作用はインスリン存在下・非存在下ともに確認された。全ての処置群において、糖取り込み量はインスリン濃度の増加に伴って増加したが、対照群の糖取り込みの変化量は無処置群に比べて小さく、インスリン感受性が低下していると考えられた。JTT-654 はコルチゾン処置によるインスリン感受性の低下に対し、濃度の増加に応じた改善作用を示した。

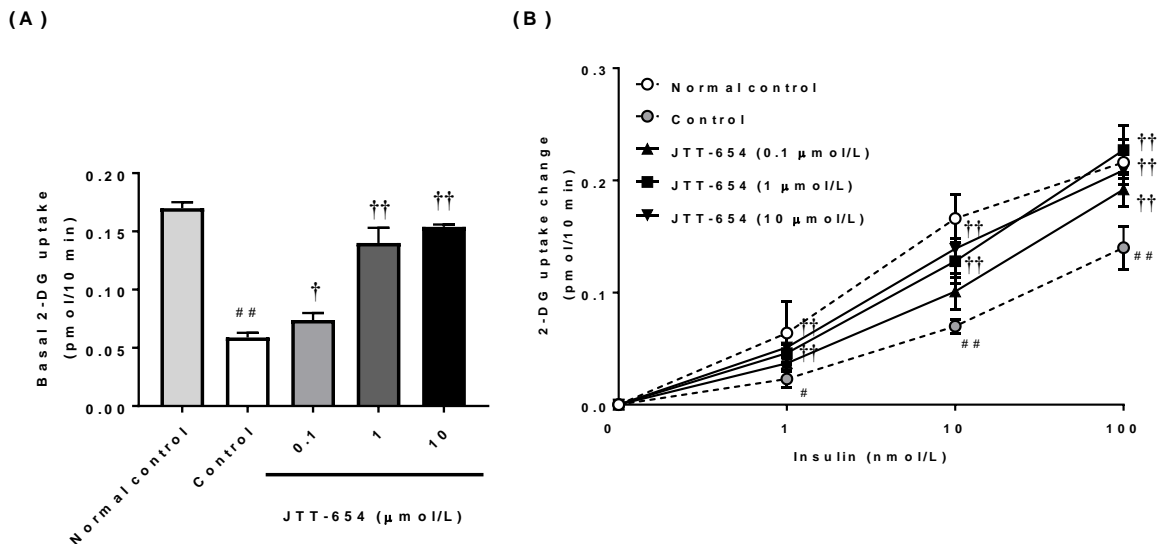


図 14. JTT-654 のコルチゾン刺激による脂肪細胞の糖取り込み能低下に対する作用

(A) インスリン濃度 0 nmol/L における基礎取込み量, (B) インスリン刺激による取込みの変化量を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (n = 4)。

#p<0.05, ##p<0.01 vs Normal Control (Student's t test)

†p<0.05, ††p<0.01 vs Control (Dunnett test)

2.3.2.3 JTT-654 のコルチゾン処置における脂肪細胞からの脂肪酸、グリセロール及びアンジオテンシノーゲン分泌に対する作用

JTT-654 の脂肪細胞での過剰なグルココルチコイド作用に対する改善作用を評価することを目的として、3T3-L1 脂肪細胞を用いた検討を行った。3T3-L1 脂肪細胞を用いてコルチゾン処置を行い、脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸、グリセロール及びアンジオテンシノーゲン分泌に対する JTT-654 の作用を評価した。

結果を図 15 に示した。分化した 3T3-L1 脂肪細胞の遊離脂肪酸、グリセロール及びアンジオテンシノーゲン分泌量は、1 $\mu\text{mol/L}$ のコルチゾン処置によって上昇した。JTT-654 はコルチゾン処置によるこれらアディポカイン分泌量の上昇を、濃度の増加に応じてコルチゾン無処置群と同程度まで改善した。

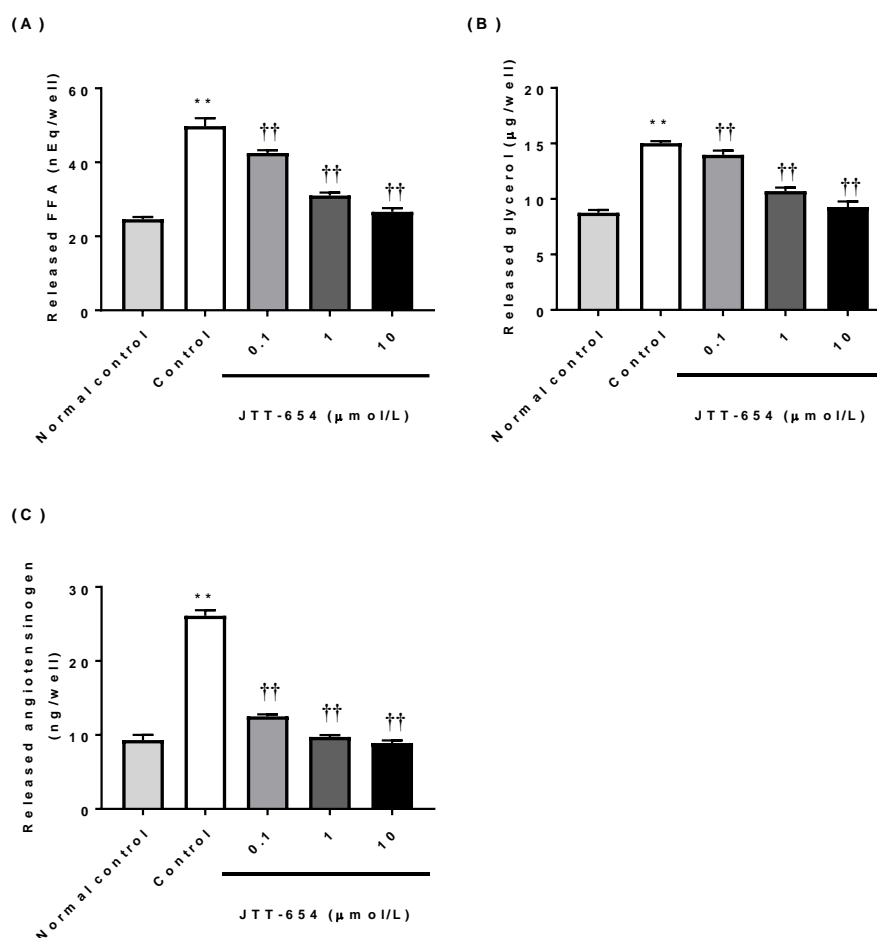


図 15. JTT-654 のコルチゾン刺激による脂肪細胞のアディポカイン分泌に対する作用

(A) 遊離脂肪酸、(B) グリセロール及び (C) アンジオテンシノーゲンの 3T3-L1 脂肪細胞からの分泌量を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (n = 4)。

**p<0.01 vs Normal Control (Student's t test)

††p<0.01 vs Control (Dunnett test)

2.3.3 JTT-654 の肝臓における過剰なグルココルチコイドに起因する病態に対する改善作用

2.3.3.1 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおける糖新生に対する作用

JTT-654 の過剰なグルココルチコイド作用に対する改善作用を評価することを目的として、病態モデル動物としてコルチゾン負荷モデルラットを用いた検討を行った。非絶食の Wistar ラットに JTT-654 及びコルチゾンを 1 日 1 回、4 日間反復投与した。絶食状態でのコルチゾン負荷により誘発される病態に対する JTT-654 の作用を評価した。

肝臓における糖新生に対する作用を評価するために、一晚絶食条件下で糖新生基質であるピルビン酸を用いた負荷試験を行った。結果を図 16 に示した。コルチゾン負荷により対照群のピルビン酸負荷前の絶食時血漿中グルコース濃度が正常対照群に対して有意に上昇した。この変化はピルビン酸負荷後の血漿中グルコース濃度の推移に関しても同様であった。血漿中グルコース濃度変化量においても、ピルビン酸負荷 20 分までの対照群の推移は上昇傾向にあった。JTT-654 はコルチゾン負荷によるこれらの変化を正常対照群のレベルまで抑制した。

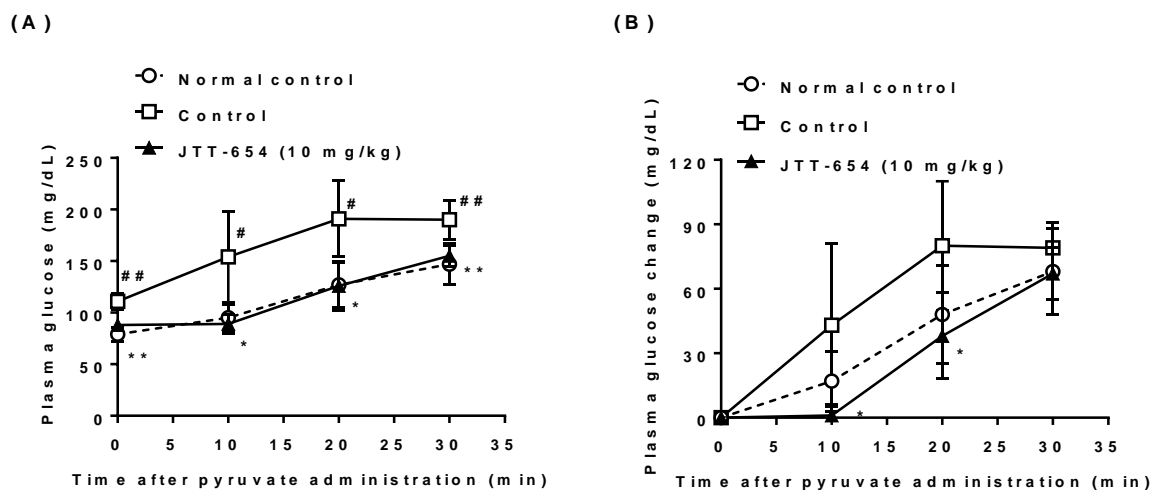


図 16. JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットの糖新生に対する作用

(A) 血漿中グルコース濃度、(B) 血漿中グルコース濃度変化量を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 5)。

#p<0.05, ##p<0.01 vs Normal Control (Student's t test or Welch's test)

*p<0.05, **p<0.01 vs Control (Student's t test or Welch's test)

2.3.3.2 JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットにおける肝グリコーゲン量に対する作用

JTT-654 の過剰なグルココルチコイド作用に対する改善作用を評価することを目的として、病態モデル動物としてコルチゾン負荷モデルラットを用いた検討を行った。非絶食の Wistar ラットに JTT-654 及びコルチゾンを 1 日 1 回、4 日間反復投与した。4 日目の JTT-654 投与後よりラットを絶食し、経時的に解剖を行い、コルチゾン負荷により誘発される病態に対する JTT-654 の作用を評価した。

肝臓における肝グリコーゲン量に対する作用を評価するために、絶食処置を行ったラットを経時的に解剖した。結果を図 17 に示した。非絶食、4 時間絶食、16 時間絶食条件での肝臓中グリコーゲン量を測定した結果、正常対照群と比較して、対照群ではいずれの条件においても肝臓中グリコーゲン量が増加しており、16 時間絶食後も肝臓中グリコーゲン量の減少が認められなかった。これに対して JTT-654 は正常対照群と同様、絶食時間に応じて肝臓中グリコーゲン量を減少させた。

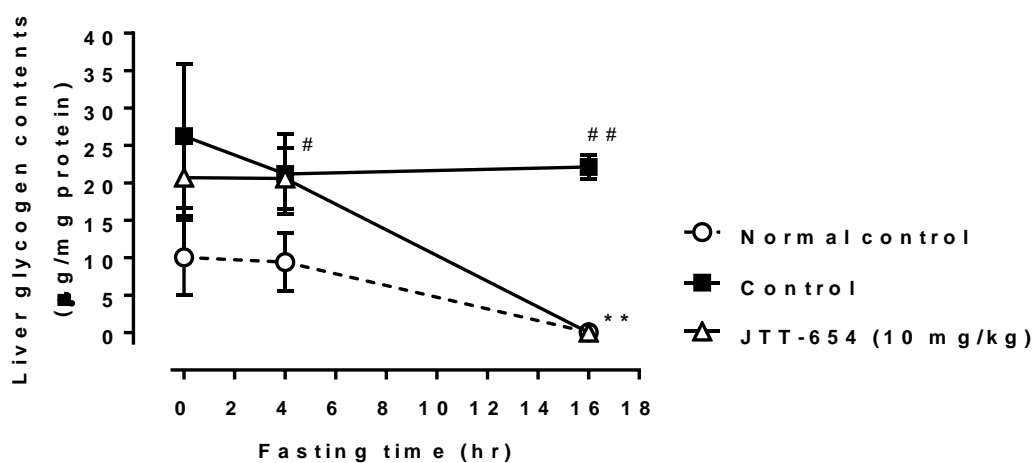


図 17. JTT-654 のコルチゾン負荷モデルラットの肝グリコーゲン量に対する作用

肝グリコーゲン量の絶食後の経時的变化を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 5)。

**p<0.01 vs Control (Student's t test)

#p<0.05, ##p<0.01 vs Normal Control (Student's t test)

2.4 考察

JTT-654 の作用メカニズムを精査する目的で、過剰なグルココルチコイド作用によって生じる種々の病態に対する改善作用を評価した。過剰なグルココルチコイド作用を示す *in vivo* 病態モデルとして、コルチゾン負荷モデルラットを使用した。

高インスリン-正常血糖クランプ試験を実施した結果、JTT-654 は対照群に対して GIR, Rd 及び HGP のいずれのパラメータも正常化した (表 2)。このことから、JTT-654 の主作用は末梢組織における糖利用、及び肝臓からの糖放出の改善作用であることが考えられた。11 β HSD1 を脂肪組織、または肝臓に過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、それぞれ耐糖能異常や高血圧症状を呈することから^{14) 15) 16) 17)}、脂肪組織及び肝臓が JTT-654 の主作用臓器であると考えられた。

過剰なグルココルチコイド作用によって、インスリン感受性の低下や糖代謝だけでなく、中心性肥満や高血圧、さらに脂質異常症といった種々の病態を呈することが報告されている³³⁾。グルココルチコイドは肝臓において糖新生及びグリコーゲン合成に関与する酵素活性を亢進させ、糖新生とグリコーゲン蓄積を亢進させる。また、末梢組織においてはインスリン抵抗性を惹起し、耐糖能障害をきたすことも知られている。特に脂肪組織においては、糖利用能を低下させるとともに、糖新生基質である遊離脂肪酸やグリセロール、及び昇圧物質であるアンジオテンシノーゲンの放出を惹起させることが分かっている。

JTT-654 の脂肪細胞に対する作用として、コルチゾンによる糖取り込み能の低下を改善する作用 (図 14) 及び、糖新生基質や昇圧物質の過剰な放出を改善する作用 (図 15) が認められた。また、コルチゾン負荷モデルラットの脂肪組織において、コルチゾン負荷により低下したインスリン感受性及びグルコース酸化能が JTT-654 投与によって改善した (図 13)。このグルコース酸化能改善作用には、JTT-654 による脂肪組織での糖取り込みの改善が一部寄与していると考えられた。さらに、アディポカイン分泌試験において注目した遊離脂肪酸、グリセロール、及びアンジオテンシノーゲンはそれぞれ、インスリン感受性、過剰な糖新生及び高血圧といった種々の病態に関与することが報告されている³⁵⁾。JTT-654 は 3T3-L1 脂肪細胞においてコルチゾン処置によるアディポカイン分泌の異常を改善した。従って、これらの作用は、JTT-654 の多面的な薬効をアディポカインという側面からも説明しうるものであると考えられた。

JTT-654 の肝臓における作用として、コルチゾンによる肝臓中グリコーゲン量の増加 (図 17)、及び糖新生の亢進 (図 16) を改善する作用が認められた。コルチゾン負荷モデルラットにおける JTT-654 の血漿中グルコース及び血漿中インスリンの上昇抑制作用が、絶食時においてより明確であったことを説明する結果であると考えられた。また、コルチゾン負荷モデルラットにおいて、JTT-654 は脂肪組織からの糖新生基質の動員量及び肝臓への流入量も減少させており、肝臓及び脂肪組織両方への作用が相まって、HGP が正常化している可能性が考えられた。

以上より、JTT-654 は脂肪組織及び肝臓の 11 β HSD-1 阻害を介して活性型グルココルチコイドの生成を抑制することで、種々の病態に対しての改善作用を示しうる可能性があると考えられた。

3 JTT-654 の各種病態モデルに対する改善作用

3.1 非肥満型 2 型糖尿病モデル動物 (Goto-Kakizaki Rat) に対する作用

3.1.1 序文

11 β -HSD1 を阻害する薬物は、グルココルチコイドの細胞内作用を抑制することにより、2 型糖尿病のインスリン感受性を改善する有望な抗糖尿病薬として期待されている。いくつかの 11 β -HSD1 阻害薬が 2 型糖尿病の治療薬として検討されており、動物モデルにおいてインスリン感受性や耐糖能異常を改善することが報告されている^{35) 36) 37) 38) 39)}。しかし、これらの報告では肥満糖尿病モデルを対象としており、非肥満糖尿病における薬理的評価は不足している。これまで、11 β -HSD1 阻害薬が非肥満型 2 型糖尿病モデルラットである Goto-Kakizaki (GK) ラットにおいて抗糖尿病作用を示すことは報告されていない。現在、日本を含むアジア諸国では 2 型糖尿病患者が増加している。肥満や過体重の有病率は、欧米に比べてアジアでは比較的低い。特に東アジアではこの傾向が顕著であり、低 Body mass index (BMI) でもインスリン抵抗性と糖尿病の有病率が高い⁴⁰⁾。本検討では、非肥満型 2 型糖尿病モデル動物である GK ラットを用いて、脂肪組織および肝臓の糖代謝に対する JTT-654 の効果を評価した。

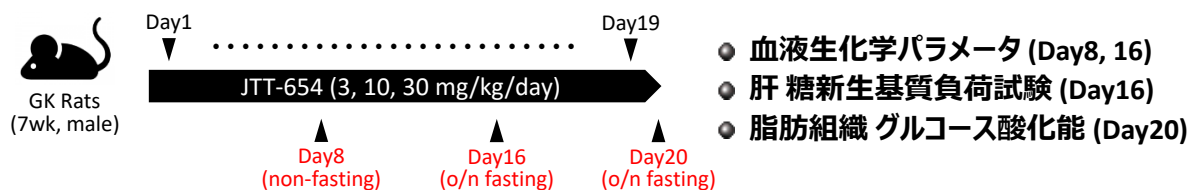
3.1.2 実験材料及び実験方法

3.1.2.1 実験材料

GK ラットは日本クレア株式会社 (Fujinomiya, Japan) より購入した。GK ラットは標準飼料として CRF-1 (Charles River Japan) を給餌し、自由摂食及び自由摂水させた。GK ラットは特定病原微生物のない状態で温度 23 \pm 3°C、湿度 55 \pm 15%、12 時間毎の明暗サイクル (明期は 8 時-20 時) の飼育室にて飼育した。全ての手順は日本たばこ産業医薬総合研究所動物実験委員会のガイドラインに基づいて行った。

3.1.2.2 実験方法

試験概要を下図に示した。



GK ラット (雄性, 7 週齢) に媒体 (0.5% MC) , または JTT-654 を朝夕 1 日 2 回, 19 日間反復経口投与した。投与 8 日後 (day 8) 及び 15 日後 (day 15) に非絶食状態において, 投与 16 日後 (day 16) に絶食状態において尾静脈より採血を行い, 血漿中グルコース, 及びインスリン濃度を測定した。

さらに、絶食状態において糖新生基質溶液（ピルビン酸ナトリウム）を負荷することにより糖新生に対する作用を評価し（糖新生基質負荷試験，day 16），摘出脂肪組織を用いたグルコース酸化試験により，精巢上体周囲脂肪組織のインスリン感受性に対する作用を評価した（グルコース酸化試験，day 20）。なお，投与開始日を day 1 とした。

JTT-654 1.5, 5, 及び 15 mg/kg は 0.5% (w/v) MC（信越化学工業株式会社，Tokyo, Japan）により懸濁したものを，5 mL/kg の投与容量で朝夕 1 日 2 回，経口投与した（JTT-654 の 1 日投与量は 3, 10, 及び 30 mg/kg となる）。採血，血漿の取得，血漿中グルコース及びインスリン濃度測定は 2.2.1.2 項に準じた。糖新生基質負荷試験は 2.2.3.2 項に，精巢上体周囲脂肪組織のグルコース酸化能評価は 2.2.2.2 項にそれぞれ準じて実施した。

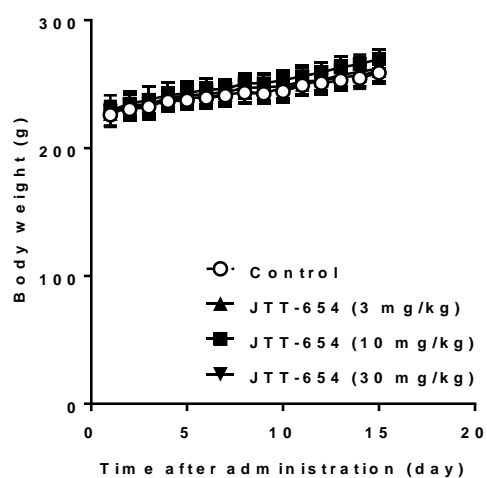
多群比較の場合，JTT-654 投与群と対照群の間の有意差検定には Bartlett の等分散検定を行い，等分散性が確認された場合は Dunnett の多重比較検定，不等分散であれば Steel の多重比較検定を行った。2 群比較の場合，JTT-654 投与群と対照群の間の有意差検定には F 検定による等分散性の確認を行い，等分散性が確認された場合は Student の t 検定，不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5% とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0（SAS Institute Japan 株式会社）を用いた。

3.1.3 結果

試験期間における体重および累積摂餌量の結果を図 18A 及び B に示した。10 mg/kg/day 投与により体重及び摂餌量の増加傾向が認められたが，用量依存性は認められず，JTT-654 がこれらのパラメータに与える影響はほぼないものと判断された。非絶食状態の血漿中グルコース及びインスリン濃度に対する結果を図 19A 及び B に，絶食状態の結果を図 19C 及び D に示した。JTT-654 は非絶食状態において，30 mg/kg/day 投与により血漿中インスリンの有意な低下作用（投与 8 日後）及び低下傾向（投与 15 日後）を示した。絶食状態においては，JTT-654 投与により，血漿中グルコース，血漿中インスリンが各々 10 mg/kg/day 及び 3 mg/kg/day 以上の用量で低下した。

血漿中グルコース及び血漿中インスリン低下の作用機序を検討するために，糖新生と脂肪組織のインスリン感受性に対する影響を検討した。結果を図 20A 及び B にそれぞれ示した。糖新生基質負荷試験の結果から，JTT-654 投与により，ピルビン酸ナトリウム負荷後の血漿中グルコース濃度の上昇すなわち糖新生が抑制されることが示された（図 20A）。また，精巢上体周囲脂肪組織を用いたグルコース酸化試験の結果から，JTT-654 投与により，インスリンによるグルコース酸化が増強し，脂肪組織のインスリン感受性が亢進することが示された（図 20B）。

(A)



(B)

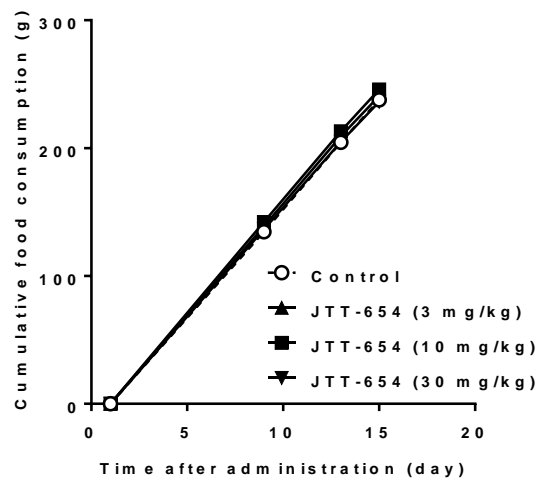


図 18. JTT-654 の GK ラットの体重, 及び摂餌量に対する作用

(A) 体重, 及び (B) 累積摂餌量を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 6)。

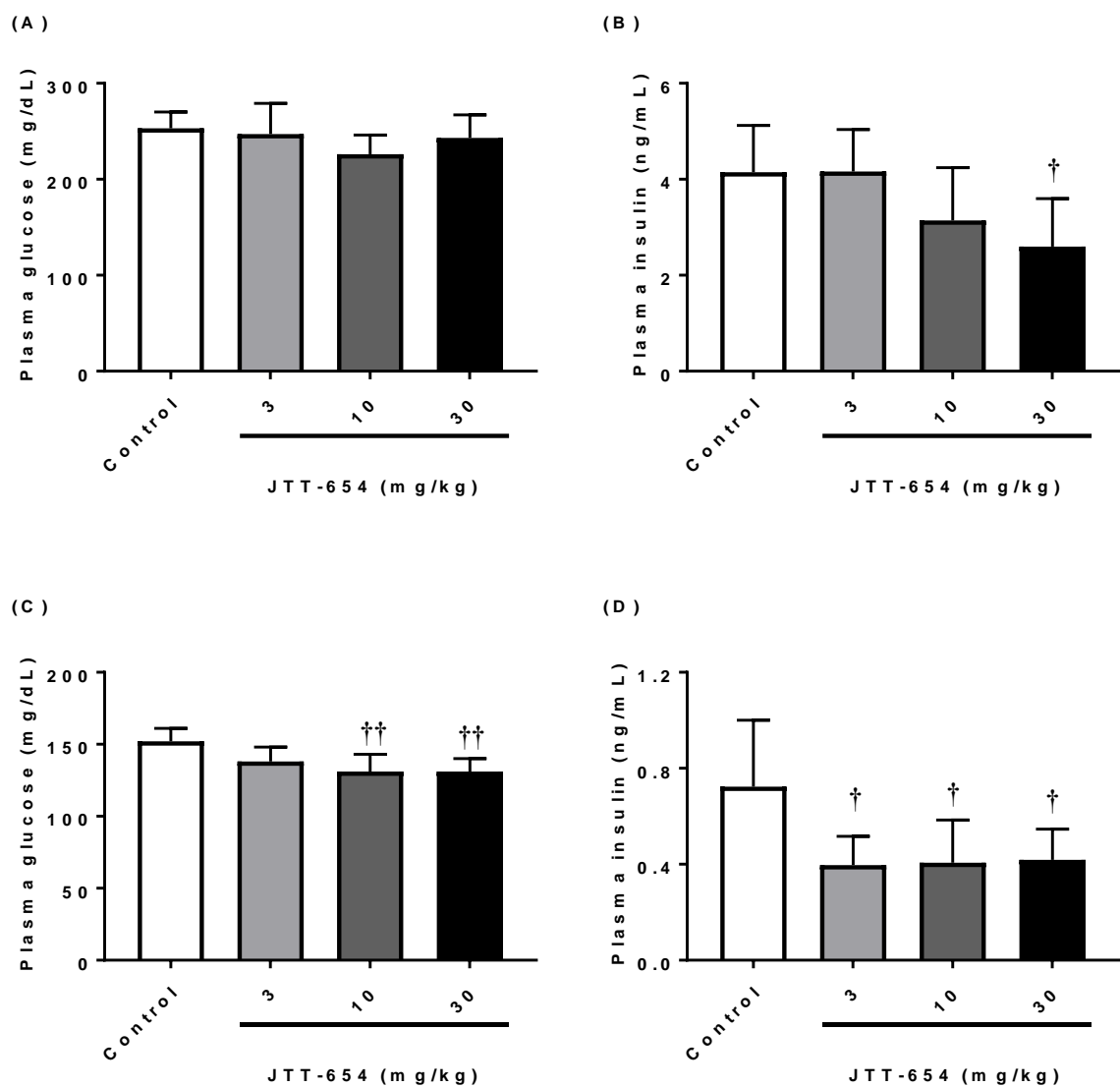
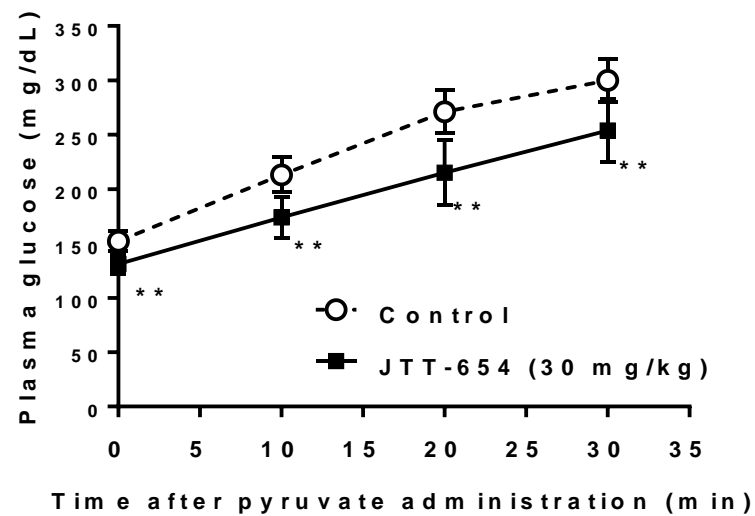


図 19. JTT-654 の GK ラットの血漿中グルコース, 及びインスリン濃度に対する作用

(A) 非絶食時血漿中グルコース濃度 (day8) , (B) 非絶食時血漿中インスリン濃度 (day8) , (C) 絶食時血漿中グルコース濃度 (day16) , 及び (D) 絶食時血漿中インスリン濃度 (day16) を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 6) 。

†p<0.05, ††p<0.01 vs Control (Dunnett's test)

(A)



(B)

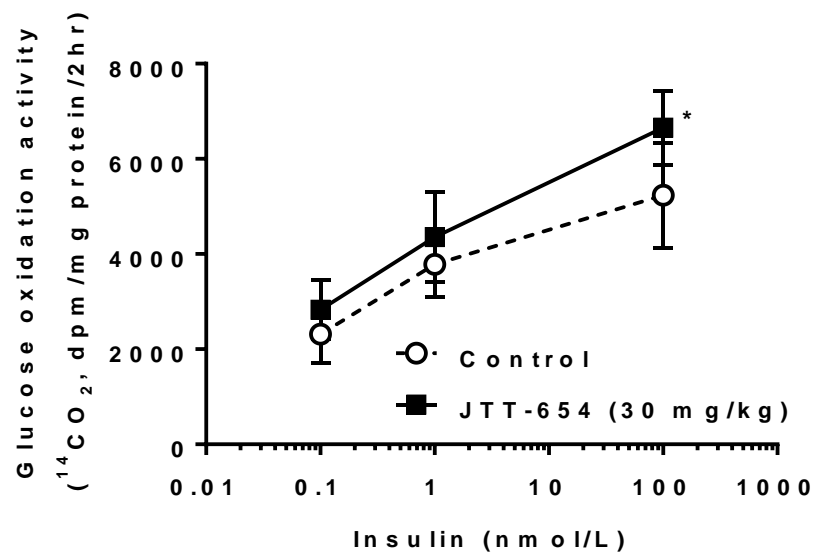


図 20. JTT-654 の GK ラットの肝糖新生, 及び脂肪組織グルコース酸化能に対する作用

(A) 糖新生基質負荷試験, 及び (B) 精巣上体周囲脂肪組織グルコース酸化能を示した。数値は平均値 \pm 標準偏差として表記した (N = 6)。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Control (Student's t test)

3.1.4 考察

自然発症の 2 型糖尿病モデル動物における JTT-654 の有効性及びそのメカニズムを明らかにすることを目的として、GK ラットに対する評価を行った。11 β -HSD1 阻害薬を評価する報告の多くは、肥満糖尿病モデル動物を用いており、非肥満型の病態モデル動物を用いた報告はこれまでになかった。

肝臓および脂肪組織における 11 β -HSD1 の発現および活性は、肥満糖尿病動物と非肥満糖尿病動物で異なることが報告されており、GK ラットは特に肝臓での 11 β -HSD1 の発現が上昇している⁴¹⁾。肝臓および脂肪組織の 11 β -HSD1 を 24 時間以内に長時間かつ最大に阻害する必要があるため、図 9 の結果を参考に JTT-654 (1.5, 5, 15 mg/kg) を 1 日 2 回経口投与した。JTT-654 を 30 mg/kg 投与したところ、対照群と比較して摂餌量や体重に変化はなく、空腹時および摂餌時の血糖値およびインスリン値はともに低下した。正常ラットでは、10 mg/kg の JTT-654 の単回投与により、脂肪組織および肝臓において 8 時間にわたって 90%以上の 11 β -HSD1 阻害作用が認められたが、投与 8 時間後から 24 時間後にかけて 11 β -HSD1 阻害作用は約 70%に低下した(図 9)。これらの結果から、JTT-654 が最大限の効果を発揮するためには、肝臓および脂肪組織の 11 β -HSD1 活性が 24 時間、少なくとも 90%以上の阻害レベルに維持される必要があることが示唆された。

JTT-654 は GK ラットにおいて脂肪組織のグルコース酸化活性を改善した。図 20B と図 13A を比較すると、GK ラットの脂肪組織におけるグルコース酸化能は、コルチゾン処理ラットと同様である。図 13 A に示すように、JTT-654 は脂肪組織のグルコース酸化を正常対照レベルまで改善した。これは、JTT-654 が脂肪組織を含む末梢組織におけるインスリン需要を減少させる効果を有することが示唆された。また、JTT-654 は GK ラットの肝臓における糖新生を改善した。JTT-654 の最低用量でも空腹時血漿インスリンが低下した理由は、末梢組織におけるインスリン抵抗性の改善と肝糖新生抑制の相乗効果であると考えられた。

以上の結果から、JTT-654 はコルチゾン負荷モデルラットと同様の作用メカニズムによって非肥満 2 型糖尿病 GK ラットのインスリン抵抗性を改善することが明らかとなった。したがって、JTT-654 は肥満の有無にかかわらず 2 型糖尿病のインスリン抵抗性を改善することができると考えられた。

3.2 高血圧モデル動物 (Spontaneously Hypertensive Rat) に対する作用

3.2.1 序文

脂肪組織における 11β -HSD1 トランスジェニックマウスは、細胞内の 11-dehydrocorticosterone 濃度が低下し、corticosterone 濃度が上昇し高血圧を伴うメタボリックシンドローム様の表現型を呈する^{15) 16)}。これらの所見は、 11β -HSD1 トランスジェニックマウスの脂肪組織でレニン-アンジオテンシン系 (RAS) が亢進するためと考えられている。アンジオテンシノーゲンは主に肝臓と脂肪組織から分泌され、その発現はグルココルチコイドによって調節されるが、レニンの特異的基質として機能し、RAS の活性化を制御する^{14) 15) 16) 17) 42) 43) 44) 45)}。これらの知見は、 11β -HSD1 阻害薬が多面的な効果を有し、メタボリックシンドロームの治療に有用であることを示唆している。

多くの 11β -HSD1 阻害薬が 2 型糖尿病やクッシング症候群の治療薬候補として報告されていることは既に述べた^{35) 36) 37) 38) 39)}。これらの多くは、種々の動物モデルにおいてインスリン感受性や耐糖能異常を改善することが見出されている。しかしながら、血圧低下作用を評価している報告は少なく、それらの化合物の一つは 11β -HSD1 ノックアウトマウスでも血圧降下作用を示しており、非特異的な効果によるものだと考察されている^{46) 47) 48)}。末梢組織における 11β -HSD1 の慢性的な阻害は、下垂体におけるコルチゾル (げっ歯類においてはコルチコステロン) のシグナル伝達の負のフィードバックの減少につながり、HPA 軸の過剰な活性化を引き起こすことが示唆されている^{49) 50)}。したがって、化合物が HPA 軸に何らかの影響を及ぼす場合に、血圧に対して非特異的な変化が現れることが考えられた。

JTT-654 は過剰なグルココルチコイド作用に基づく血圧上昇に対して、抑制作用を示すことはすでに確認済みである。本検討では、自然発症高血圧モデル動物である SHR を用いて、JTT-654 が血圧低下作用を示すかについて評価した。また、SD (IGS) ラット (正常ラット) に対して高用量の JTT-654 を投与することで、JTT-654 の正常血圧、及び HPA 軸への影響を評価した。

3.2.2 実験材料

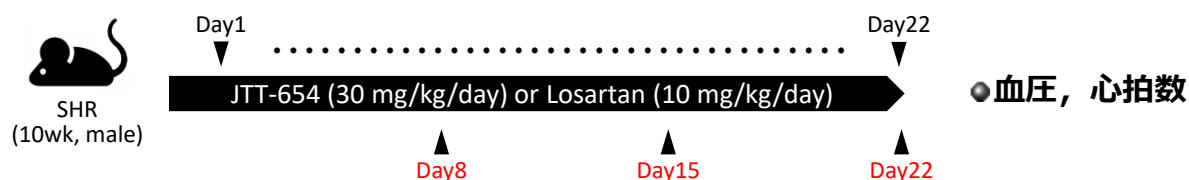
SHR/NCrIcrIj (SHR) , 及び WKY/NCrIcrIj (Wistar Kyoto, WKY) は Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) より購入した。いずれのラットも標準飼料として CRF-1 (Charles River Japan) を給餌し、自由摂食及び自由摂水させた。いずれのラットも特定病原微生物のない状態で温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、12 時間毎の明暗サイクル (明期は 8 時-20 時) の飼育室にて飼育した。全ての手順は日本たばこ産業医薬総合研究所動物実験委員会のガイドラインに基づいて行った。

Losartan は Cayman chemical company (Ann Arbor, Michigan, USA) より購入した。Adrenocorticotrophic Hormone (Human, 1-24, ACTH) は株式会社ペプチド研究所 (Osaka, Japan) より購入した。

3.2.3 実験方法

3.2.3.1 SHR 反復投与試験

試験概要を下図に示した。



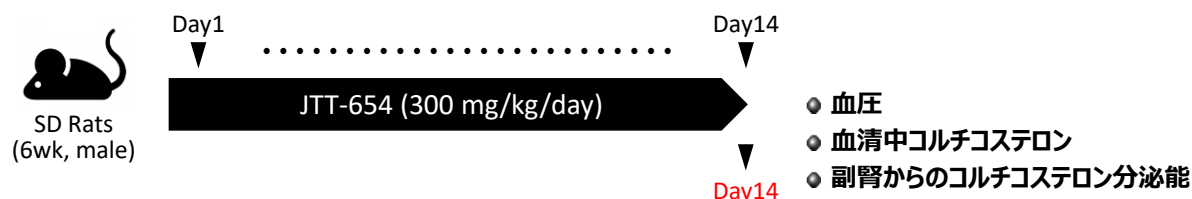
非絶食のSHR（雄性，10週齢）に媒体（0.5% MC），JTT-654，またはlosartan（対照物質）を1日1回，22日間反復経口投与した。投与1週間後（day 8），2週間後（day 15）及び3週間後（day 22）の各投与前に非観血式自動血圧測定装置（BP-98A，株式会社ソフトロン，Tokyo，Japan）を用いて収縮期血圧及び心拍数の測定を行った。測定手順は2.2.1.3項に準じた。なお，投与開始日をday 1とした。

JTT-654 30 mg/kg，及び losartan 10 mg/kg は 0.5%（w/v）MC（信越化学工業株式会社，Tokyo，Japan）により懸濁したものを，5 mL/kg の投与容量で経口投与した。

統計解析は2群の検定を閉手順で実施した。対照群と正常対照群の有意差が確認された時点で，対照群と losartan（陽性対照）群を検定した。両群間の有意差を確認した後，対照群と JTT-654 群の差異を検定した。それぞれの2群間の検定はF検定による等分散性の確認を行い，等分散性が確認された場合は Student の t 検定，不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5%とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0（SAS Institute Japan 株式会社）を用いた。

3.2.3.2 SD rat の血圧，及びコルチコステロン分泌に対する作用評価

試験概要を下図に示した。



非絶食のSDラット（雄性，6週齢）に媒体（0.5% MC），またはJTT-654を1日1回，14日間反復経口投与した。最終日（day 14）の投与2時間後（JTT-654の血中濃度が最高となる時間）に非観血式自動血圧測定装置（BP-98A，株式会社ソフトロン，Tokyo，Japan）を用いて収縮期血圧及び心拍数の測定を行った。測定手順は2.2.1.3項に準じた。なお，投与開始日をday 1とした。

JTT-654 300 mg/kg は 0.5%（w/v）MC（信越化学工業株式会社，Tokyo，Japan）により懸濁したものを，5 mL/kg の投与容量で経口投与した。

コルチコステロン分泌の評価においては、ラットを最終投与日 (day 14) の朝から絶食・絶水処置を行った。ただし、最終投与 24 時間後に採血した動物には、投与翌日の朝まで餌と水を自由に摂取させた。最終投与から 2, 8, 及び 24 時間後に動物を無麻酔で断頭し、セパラピッドチューブ (Sekisui Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan) に血液を採取した。血液サンプルを室温 ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$) で 30 分間静置した後、 4°C で 15 分間、 $3,000 \times g$ で遠心分離して血清を分離した。血清コルチコステロン濃度は、ELISA 法 (Corticosterone ELISA kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) を用いて測定した。最終投与 24 時間後に副腎および下垂体を摘出し、重量を測定した。摘出した副腎を 4 分割し、 37°C で 30 分間インキュベートした (培地: 0.1% BSA (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を含む Minimum Essential Medium (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan))。その後、ACTH (最終濃度: 30 ng/mL) を添加し、副腎を再び 37°C で 1 時間インキュベートした。培養上清中のコルチコステロン濃度は ELISA 法により測定した。

JTT-654 投与群と対照群の間の有意差検定には F 検定による等分散性の確認を行い、等分散性が確認された場合は Student の t 検定、不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5% とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

3.2.4 結果

3.2.4.1 SHR 反復投与試験

試験期間における各群の体重、及び累積摂餌量の結果を図 21A, 及び B に示した。JTT-654 30 mg/kg 群、及び losartan 10 mg/kg 群においてはいずれも、累積摂餌量が対照群よりも上昇傾向を示したが、正常対照群の推移と同程度であったことから、両化合物ともに摂餌に与える影響はほぼないと考えられた。また、体重に関しては各群間で大きな差が認められなかった。

試験期間における各群の収縮期血圧、心拍数の推移を図 21C, 及び D に示した。SHR の収縮期血圧は試験開始時において WKY ラットよりも高値を示した。JTT-654 は投与 1 週間後では収縮期血圧に影響を与えなかったが (対照群: 185 ± 22 mmHg, JTT-654/30 群: 184 ± 24 mmHg), 2 週間後には低下作用を示し (対照群: 184 ± 21 mmHg, JTT-654/30 群: 167 ± 22 mmHg), 3 週間後には有意な低下作用を示した (対照群: 188 ± 18 mmHg, JTT-654/30 群: 162 ± 17 mmHg)。陽性対照物質の losartan は、投与 1 週間後から対照群に対して、有意な収縮期血圧の低下作用を示した。正常対照群の収縮期血圧の平均値は試験中 115~128 mmHg の範囲であり、大きな変動は認められなかった。試験期間を通じ、いずれの群においても心拍数に大きな変化はなかった。

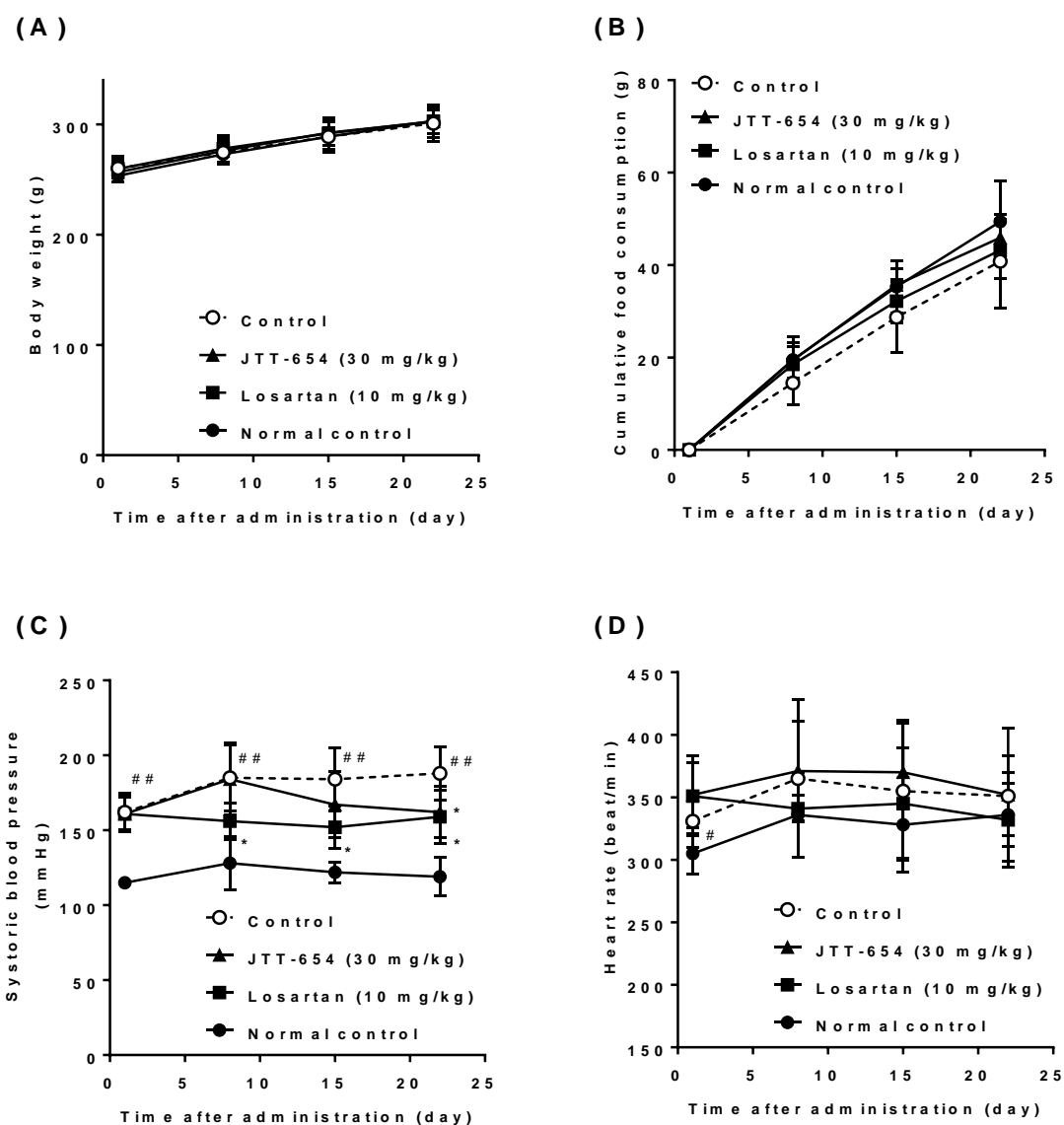


図 21. JTT-654 の SHR の各種パラメータに対する作用

(A) 体重, (B) 累積摂餌量, (C) 収縮期血圧, 及び (D) 心拍数を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 6)。

* $p < 0.05$ vs Control (Student's t test)

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs Normal Control (Student's t or Welch's test)

3.2.4.2 SD rat の血圧, 及びコルチコステロン分泌に対する作用評価

収縮期血圧の結果を図 22 A に, 血清中コルチコステロン濃度の測定結果を図 22B に, 体重, 副腎重量, 及び下垂体重量の測定結果を図 22C, D, 及び E にそれぞれ示した。

2 週間反復投与後の収縮期血圧は, JTT654 投与群は対照群と同程度であった。また, 心拍数においても対照群が 387 ± 45 beats/min に対して, JTT-654 投与群は 412 ± 27 beats/min であり, 有意な差を認めなかった。血清中コルチコステロン濃度においては, JTT-654 投与群は対象群と同様の推移を示し, 明らかな変化を示さなかった。すなわち, 最終投与 2 時間後は低値 (平均値 33.1 ng/mL) を示し, 暗期 (活動期) の直前である 8 時間後には上昇して (平均値 393.4 ng/mL) , 24 時間後には再び低値 (平均値 69.1 ng/mL) を示した。JTT-654 投与群の最終投与 8 時間後の値は, 媒体投与群と比較して若干高い傾向が認められたが, 有意な差は認められなかった。

2 週間反復投与後の体重においても, JTT-654 投与群は対象群と比べて有意差は認められなかった。また副腎重量においては, 対照群と比較して JTT-654 投与群で有意な増加が認められ, その増加率は約 20%であった。下垂体重量においては, JTT-654 投与群は対象群と比較して有意な差は認められなかった。

副腎単位重量当たりの上清中コルチコステロン濃度の測定結果を図 22F に示した。

副腎単位重量当たりの上清中コルチコステロン濃度においては, ACTH 非刺激下及び刺激下いずれにおいても, JTT-654 投与群は対象群と比較して明らかな変化を示さなかった。すなわち, JTT-654 投与群において, ACTH 刺激下は ACTH 非刺激下と比較して約 5 倍程度の濃度上昇が認められた。

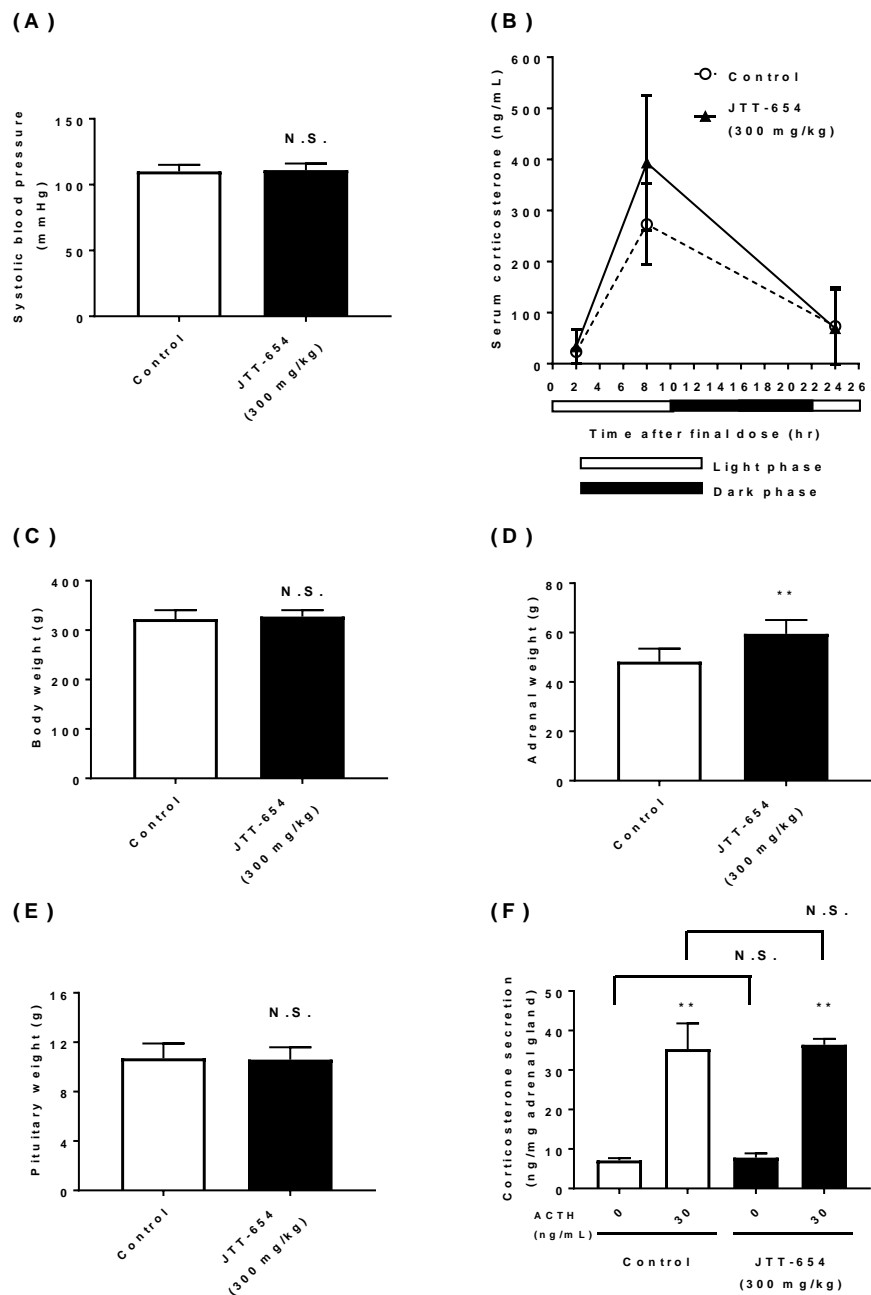


図 22. JTT-654 の SD (IGS) ラットの各種パラメータに対する作用

(A) 収縮期血圧, (B) 血清中コルチコステロン濃度, (C) 体重 (day14), (D) 副腎重量 (day14), (E) 下垂体重量 (day14), 及び (F) 摘出副腎を用いた ACTH 刺激によるコルチコステロン分泌量を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 6)。

** $p < 0.01$ vs Control (Student's t test)

** $p < 0.01$ vs ACTH 0 ng/mL (Student's t or Welch's test)

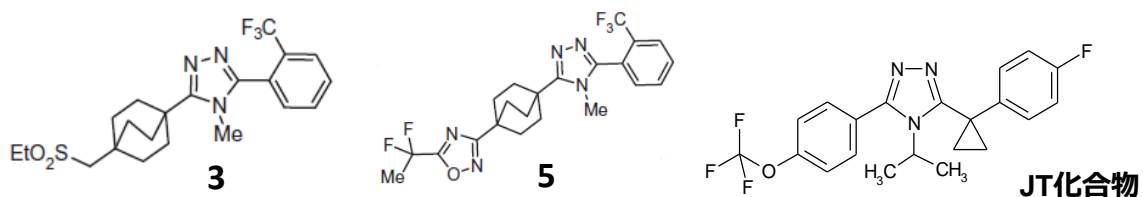
3.2.5 考察

JTT-654 は SHR において降圧作用を示した。この JTT-654 の降圧作用は、ラットにコルチゾンを負荷することで起こる血圧上昇を JTT-654 が抑制すること（第 2 章 JTT-654 の過剰なグルココルチコイドに起因する病態に対する改善作用）、及び 11β HSD-1 を脂肪組織、又は肝臓で高発現させたトランスジェニックマウスで血圧が上昇していることなどから、 11β HSD-1 阻害を介した脂肪や肝臓でのグルココルチコイドの活性化抑制が関与していると考えられた^{15) 16) 17)}。

また、アンジオテンシン受容体拮抗薬である losartan の速やかな降圧作用の発現に対して、JTT-654 の作用発現には一定期間を要することが示唆された。 11β HSD-1 は細胞内でグルココルチコイドを活性化する酵素であるが、核内受容体であるグルココルチコイドレセプターの標的遺伝子としてアンジオテンシノーゲンが存在する。JTT-654 は遺伝子レベルでのアンジオテンシノーゲンの発現量を調節している可能性があり、それにより血圧低下作用が表れているものと考えられた。腎機能や心臓に対する作用をさらに正確に評価するには高血圧の期間及び投与期間を延長することが必要であると考えられた。

JTT-654 投与群の血清中コルチコステロン濃度は媒体投与群と同様の推移を示し、明らかな変化は認められなかった。また、摘出副腎の単位重量当りの ACTH 刺激による上清中コルチコステロン濃度においても、JTT-654 投与群では媒体投与群と同程度であり明らかな変化を示さなかった。以上の結果から、JTT-654 の 2 週間反復経口投与では副腎重量は軽度増加するものの、下垂体重量に変化を及ぼすほどの影響は無く、HPA 軸は正常に機能していることから、コルチコステロン分泌に対して JTT-654 は明らかな作用を示さないものと考えられた。

末梢組織における 11β -HSD1 の慢性的な阻害は、下垂体におけるコルチゾル（げっ歯類においてはコルチコステロン）のシグナル伝達の負のフィードバックの減少につながり、HPA 軸の過剰な活性化を引き起こすことが示唆されている^{49) 50)}。正常動物を用いた高用量での反復投与の結果から、JTT-654 は HPA 軸に対しては影響を及ぼさない可能性が示唆された。それに加えて、JTT-654 は腎臓においてコルチゾルからコルチゾンへの変換反応（ 11β HSD-1 と逆反応）を触媒する 11β -HSD2 に対する阻害作用を示さない。これらの作用により、過剰なグルココルチコイド作用がもたらす特殊な病態の条件のみならず、複合的な要因から成る一般的な高血圧モデルである SHR に対しても降圧作用を示したと考えられた。これまでに数多くの 11β HSD-1 阻害剤が報告されているが、血圧低下作用を評価している報告は少なく、それらの化合物の一つは 11β -HSD1 ノックアウトマウスでも血圧降下作用を示しており、降圧作用は非特異的効果によるものだと考察されている^{46) 47) 48)}。予備的な検討結果ではあるが、参考文献 48 に記載されている下図の化合物（3 及び 5）を基に合成された化合物（JT 化合物）は、強い中枢への移行性を示し、コルチゾン負荷モデルラットで発症する高血圧を低下させない。また、JT 化合物は正常動物に反復投与することで、コルチコステロン濃度も異常値をきたす（data not shown）。これらの事実より、中枢における持続的な 11β -HSD1 阻害が、HPA 軸に対して悪影響を及ぼし、降圧効果に対する非特異的効果をもたらしているものと考えられた。また、このような中枢移行性には化合物の中央部分に存在するトリアゾール構造が重要である可能性が考えられた。



参考文献 48 に報告されている降圧効果を示さない化合物（3）, 非特異的に降圧効果を示す化

合物（5）, 及び JT にて意図合成された化合物（JT 化合物）の構造式

JTT-654 についても, 11β -HSD1 ノックアウトマウスを用いた同様な検証試験を行うこと等, 非特異的効果の有無についてのさらなる検証が既報の化合物群との差別化につながるものと考えられた。JTT-654 は高糖尿病作用のみならず, 高血圧に対しても有効性を示したことから, 臨床的にも有用なプロファイルを示すことが期待された。

3.3 メタボリックシンドロームモデル動物（SHR/NDmc-cp rat）に対する作用

3.3.1 序文

11 β -HSD1 を阻害する薬物は、グルココルチコイドの細胞内作用を抑制することにより、2 型糖尿病のインスリン感受性を改善する有望な抗糖尿病薬として期待されている。いくつかの 11 β -HSD1 阻害薬が 2 型糖尿病の治療薬として検討されており、動物モデルにおいてインスリン感受性や耐糖能異常を改善すること、及び高血圧に対する明確な有効性は報告されていないことはすでに述べた^{35) 36) 37) 38) 39) 46) 47) 48)}。JTT-654 はインスリン抵抗性改善作用を有するのみならず、高血圧に対しても改善作用を示しうる新たな化合物である。したがって、本研究では肥満、高血圧、及び 2 型糖尿病を呈するメタボリックシンドロームモデルである SHR-cp を用いて、JTT-654 の複合的な病態に対する改善作用を評価した。評価にあたって、同じインスリン抵抗性改善作用に分類される pioglitazone とのプロファイル比較を行った。

3.3.2 実験材料

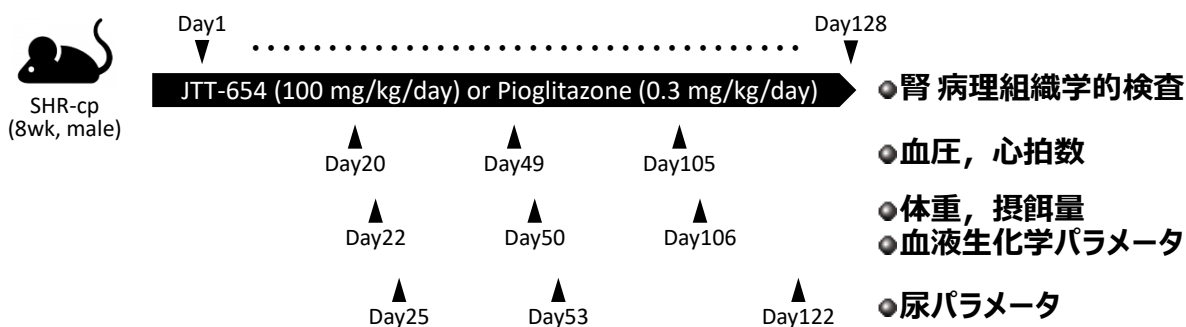
SHR/NDmc-cp(cp/cp) (SHR-cp) は日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。WKY/NCrIcrlj (Wistar Kyoto, WKY) は Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) より購入した。いずれのラットも標準飼料として CRF-1 (Charles River Japan) を給餌し、自由摂食及び自由摂水させた。標準飼料として CRF-1 (Charles River Japan) を給餌し、自由摂食及び自由摂水させた。いずれのラットも特定病原微生物のない状態で温度 23 \pm 3°C、湿度 55 \pm 15%、12 時間毎の明暗サイクル（明期は 8 時-20 時）の飼育室にて飼育した。全ての手順は日本たばこ産業医薬総合研究所動物実験委員会のガイドラインに基づいて行った。

Pioglitazone は Cayman chemical company (Michigan, USA) より購入した。

3.3.3 実験方法

3.3.3.1 概略

試験概要を下図に示した。



SHR-cp (雄性, 8 週齢) に, JTT-654 100 mg/kg/day 相当, または pioglitazone (reference article, 比較対象物質) 0.3 mg/kg/day 相当の用量で 128 日間混餌投与を行った。投与開始より約 3 週間後 (day 22), 7 週間後 (day 50), 及び 15 週間後 (day 106) に非絶食状態において体重, 飼料重量の測定, 及び採血を行い, 血漿中グルコース, 及びインスリン濃度を測定した。採血, 血漿の取得, 血漿中グルコース, 及びインスリン濃度測定は 2.2.1.2 項に準じた。採血の前日に当たる day 20, 49, 及び 105 に非絶食条件下で, 非観血式自動血圧測定装置 (BP-98A, 株式会社ソフトロン, Tokyo, Japan) を用いて収縮期血圧及び心拍数の測定を行った。測定手順は 2.2.1.3 項に準じた。Day 25, 53, 及び 122 において, 代謝ケージを用いて 24 時間採尿し, 尿量を測定した後, 尿中の尿糖, 尿タンパク, 尿アルブミン, 及び尿中アンジオテンシノーゲン濃度を測定した。Day 128 に非絶食状態において解剖を行い, 腎臓における病理組織学的検査を行った。なお, 投与開始日を day 1 とし, WKY ラットを正常対照群として設定した。

統計解析は 2 群の検定を閉手順で実施した。対照群と正常対照群の有意差が確認された時点で, 対照群と JTT-654 (被験物質) 群を検定した。両群間の有意差を確認した後, 対照群と pioglitazone (reference article, 比較対象物質) 群の差異を検定した。それぞれの 2 群間の検定は F 検定による等分散性の確認を行い, 等分散性が確認された場合は Student の t 検定, 不等分散であれば Welch の検定を実施した。有意水準は両側 5%とした。検定には SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

3.3.3.2 混餌飼料の調製

飼料は粉末 CRF-1 を使用した。1 週間ごとに飼料の交換を行った。乳鉢を用いて被験物質を粉碎した後, 粉末 CRF-1 を少量ずつ添加し, 被験物質と餌の一部をよく混和した。少量の餌を添加, 混和した後, 餌をミキサーに移し, 残りの餌を加えた。ミキサーで約 10 分間攪拌し JTT-654 100 mg/kg/day 相当, または pioglitazone 0.3 mg/kg/day 相当の飼料を調製した。なお, 調製濃度は, 1 週間毎の見込み体重と, 見込み摂餌量に基づいて算出した。

3.3.3.3 尿パラメータの測定

午後 1 時 30 分頃から翌日午後 1 時 30 分頃まで 24 時間の採尿を行い, その尿パラメータとして, 尿量, 尿糖, 尿タンパク及び尿アルブミンを測定した。尿量は尿重量を測定し, 尿 1 g を 1 mL に換算して算

出した。尿糖は、血漿中グルコース濃度測定と同様に測定した。尿タンパク濃度は、尿、髄液中タンパク濃度測定用試薬（トネイン-TP II, 大塚製薬株式会社, Tokyo, Japan）を用いて測定した。尿アルブミン濃度は、EIA法を用いて測定した（レビス尿中アルブミン-ラット, 株式会社シバヤギ, Gunma, Japan）。尿アンジオテンシノーゲンはELISA法（Human Total Angiotensinogen Assay Kit, 株式会社免疫生物研究所, Gunma, Japan）により測定した。サンプル測定の前に、使用したキットがラットアンジオテンシノーゲンに対して交差反応性を示すかについて確認した。

3.3.3.4 解剖、及び病理組織学的検査

Day 128 の午前 9 時 30 分頃よりラットをイソフルラン吸入麻酔下で腹部大動脈切開にて放血死させた後、解剖を行った。腎臓を摘出した後、直ちに 10% 中性ホルマリン緩衝液にて固定させた。摘出後、組織をパラフィン包埋し、薄切片（3～5μm）を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン（hematoxylin and eosin, HE）と過ヨウ素酸シッフ（periodic acid Schiff, PAS）で染色した。

糸球体は、標本の視野全体にわたって個別に観察し、病理所見ごとに評定した。糸球体肥大の重症度は、約 200μm 以上の糸球体の出現頻度に従って以下のように等級分けした。-：陰性，±：ごく軽度，+：軽度。メサンギウム領域の拡大は、糸球体全域にわたって領域拡大を示す場合と半月形成、または PAS 陽性糸球体の数によって以下のように等級分けした。-：15 未満（陰性），±：16-25（ごく軽度），+：26-35（軽度），2+：36-45（中等度），及び 3+：46 以上（重度）。毛細血管管腔の減少は、変化した糸球体の数によって以下のように等級分けした。-：は 5 未満（陰性），±は 6～10（ごく軽度），+は 11～20（軽度），2+は 21～30（中等度），3+は 30 以上（重度）。

尿細管は、標本の視野全体にわたって個別に観察し、病理学的所見に従って評定した。拡張した尿細管の出現は、拡張した尿細管の数によって以下のように等級分けした。-：（陰性），±：小領域に 3 個まで（ごく軽度），+：小領域に 7 個まで（軽度），2+：顕微鏡視野 2 ～ 3 個に広範囲（中等度），3+：顕微鏡視野 4 個以上に広範囲（重度）。皮質または髄質における PAS 陽性円柱は、PAS 陽性円柱の数によって以下のように等級分けした。-：小領域に 2 個まで（ごく軽度），+：小領域に 7 個まで，2+：2 ～ 3 顕微鏡視野に広範に存在（中等度），3+：4 顕微鏡視野以上に広範に存在（重度）。

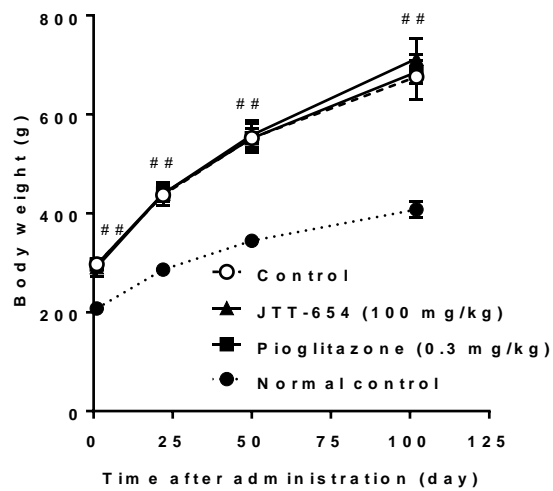
3.3.4 結果

3.3.4.1 SHR-cp の体重、摂餌量、収縮期血圧、及び心拍数に対する作用評価

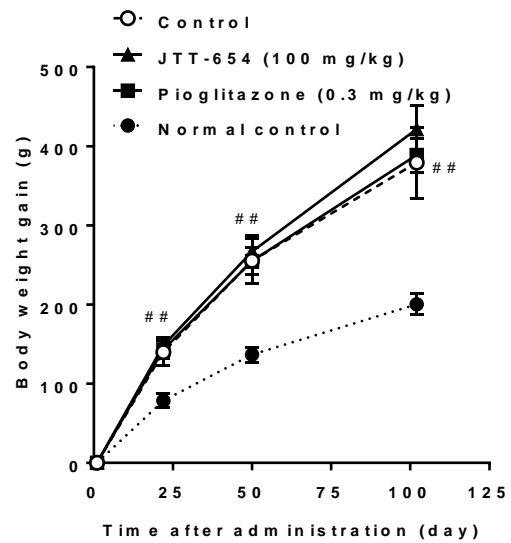
メタボリックシンドロームモデルラットである SHR-cp において、JTT-654 の体重、摂餌量、収縮期血圧、及び心拍数に対する作用を評価し、pioglitazone と比較した。図 23 A, B, 及び C に示すように、対照群の体重、体重増加量、累積摂餌量は正常対照群と比較して有意に高かった。一方、対照群、JTT-654 投与群、及び pioglitazone 投与群では、体重、体重増加量、及び累積摂餌量に有意な差は認められなかった。対照群の収縮期血圧（図 24A）、及び収縮期血圧変化量（図 24B）は、正常対照群と比較して、day21 より上昇し始め、day49 以降に有意な上昇が認められた。JTT-654、または pioglitazone 投与群においては収縮期血圧の有意な低下が認められなかった。しかし、JTT-654 投与群で

は day109 における収縮期血圧変化量の有意な低下が認められた。一方, pioglitazone 投与群では同様の作用は認められなかった。JTT-654 投与群は治療期間を通して心拍数に対する影響が認められなかったが, pioglitazone 投与群においては day109 における心拍数の有意な低下が認められた (図 24C)。

(A)



(B)



(C)

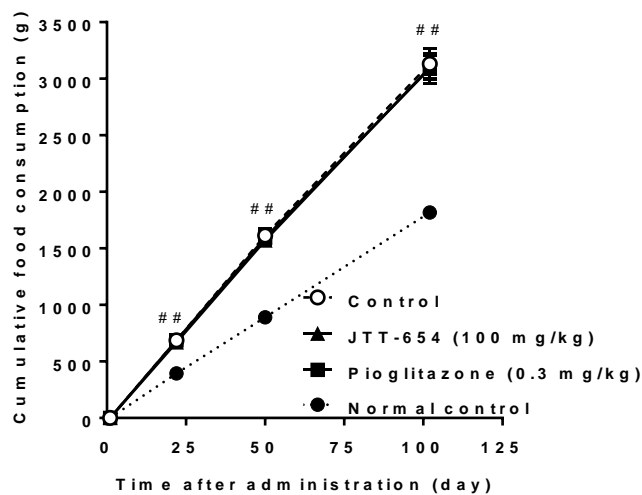
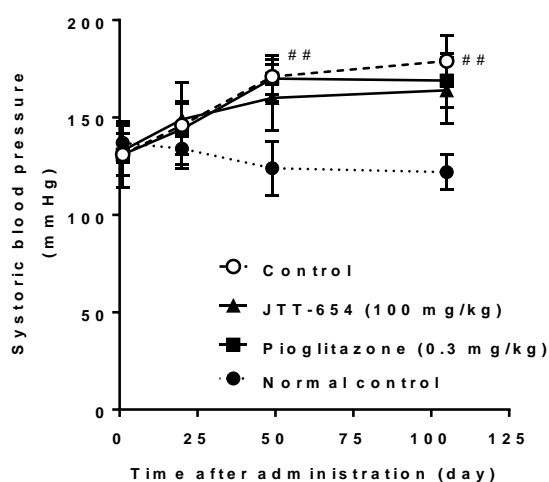


図 23. JTT-654, 及び Pioglitazone の SHR-cp の体重, 及び摂餌量に対する作用

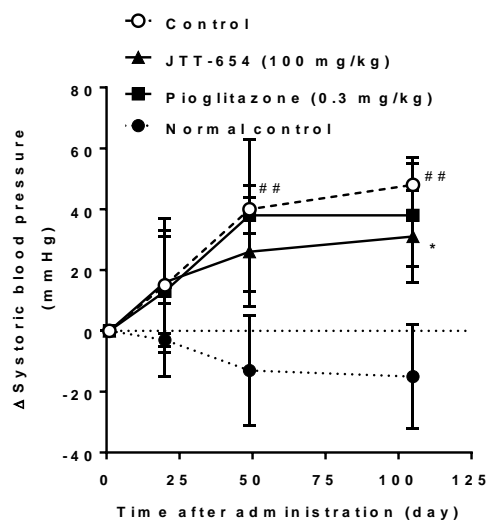
(A) 体重, (B) 体重増加量, 及び (C) 累積摂餌量を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 5-6)。

##p<0.01 vs Normal Control (Student's t test)

(A)



(B)



(C)

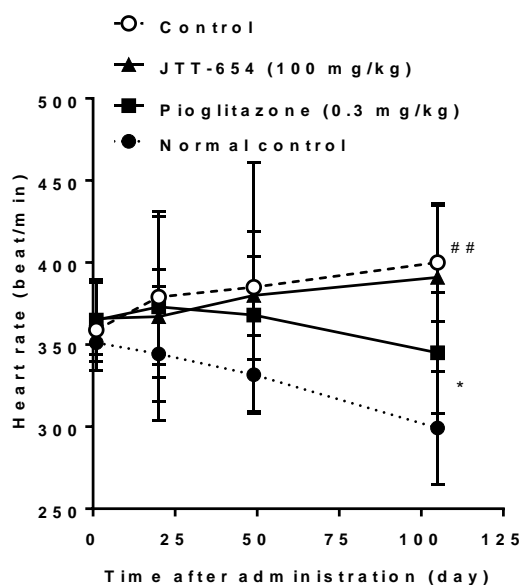


図 24. JTT-654, 及び Pioglitazone の SHR-cp の血圧, 及び心拍数に対する作用

(A) 収縮期血圧, (B) 収縮期血圧変化量, 及び (C) 心拍数を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 5-6)。

* $p < 0.05$ vs Control (Student's t test)

$p < 0.01$ vs Normal Control (Student's t or Welch's test)

3.3.4.2 SHR-cp の血漿中グルコース, 及びインスリン濃度に対する作用評価

SHR-cp における JTT-654, 及び pioglitazone の血漿中グルコース, 及びインスリン濃度に対する作用を評価した (図 25A, 及び B)。その結果, 対照群の血漿中インスリン濃度は, 正常対照群と比較して評価期間の全ての時点で有意に高く, 投与期間を通じて上昇し続けた。また, 血漿中グルコース濃度についても, 投与 22 日目以降で正常対照群に対して有意な上昇が認められた。一方, JTT-654 投与群, 及び pioglitazone 投与群はいずれも血漿グルコース, 及びインスリン濃度を低下させなかった。

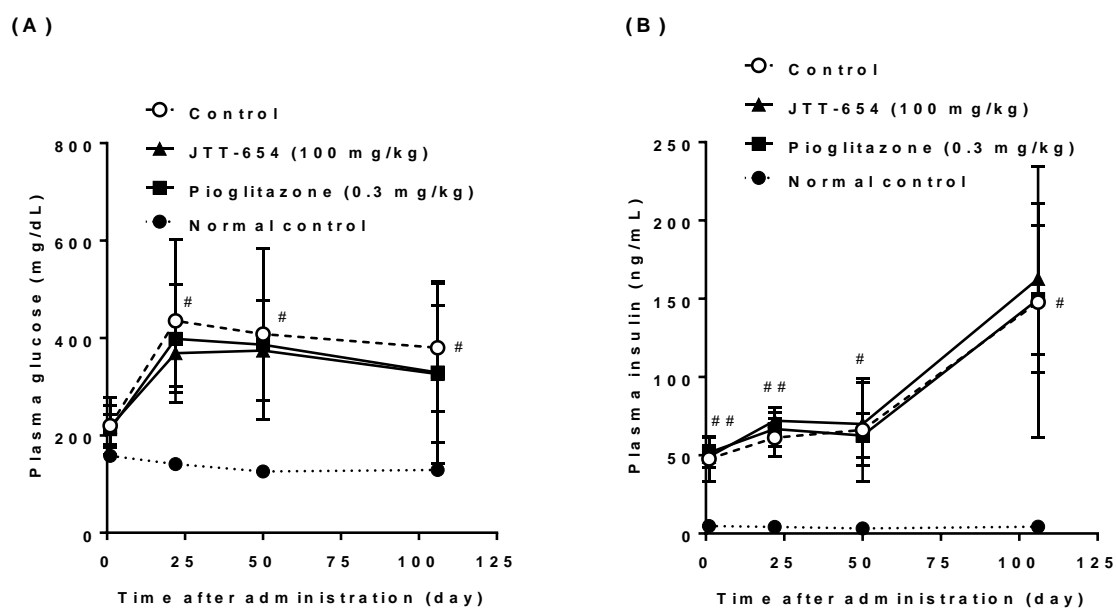


図 25. JTT-654, 及び pioglitazone の SHR-cp の血漿中グルコース, 及びインスリン濃度に対する作用

(A) 血漿中グルコース濃度, 及び (B) インスリン濃度を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 5-6)。

#p<0.05, ##p<0.01 vs Normal Control (Student's t or Welch's test)

3.3.4.3 SHR-cp の各種尿パラメータに対する作用評価

SHR-cp における JTT-654, 及び pioglitazone の各種尿パラメータに対する作用を評価した (図 26, 及び図 27)。図 26A, 及び B に示すように, 対照群の尿量, 及び尿糖は, 正常対照群と比較して投与 25 日目に有意に増加し, それ以降の時点でも増加する傾向が認められた。対照群のこれらパラメータの経時変化は, 血漿中グルコース濃度の変化と概ね相関するものであった。JTT-654 投与群, 及び pioglitazone 投与群の尿量, 及び尿糖は, 投与 25 日目時点までは対照群と同程度であったが, それ以降の時点では対照群よりも低い傾向にあった。

対照群における尿蛋白, 尿アルブミン, 及び尿中アンジオテンシノーゲン濃度は, 正常対照群と比較して評価期間を通じて有意に上昇した (図 27A, B, 及び C)。対照群のこれらパラメータの経時変化は, 評価機関を通じて上昇し続けるような変化であった。JTT-654 投与群においては, これらのパラメータの有意な減少が認められた。一方, pioglitazone 投与群においては, これらのパラメータに対して低下傾向を示したものの, 有意な差ではなかった。

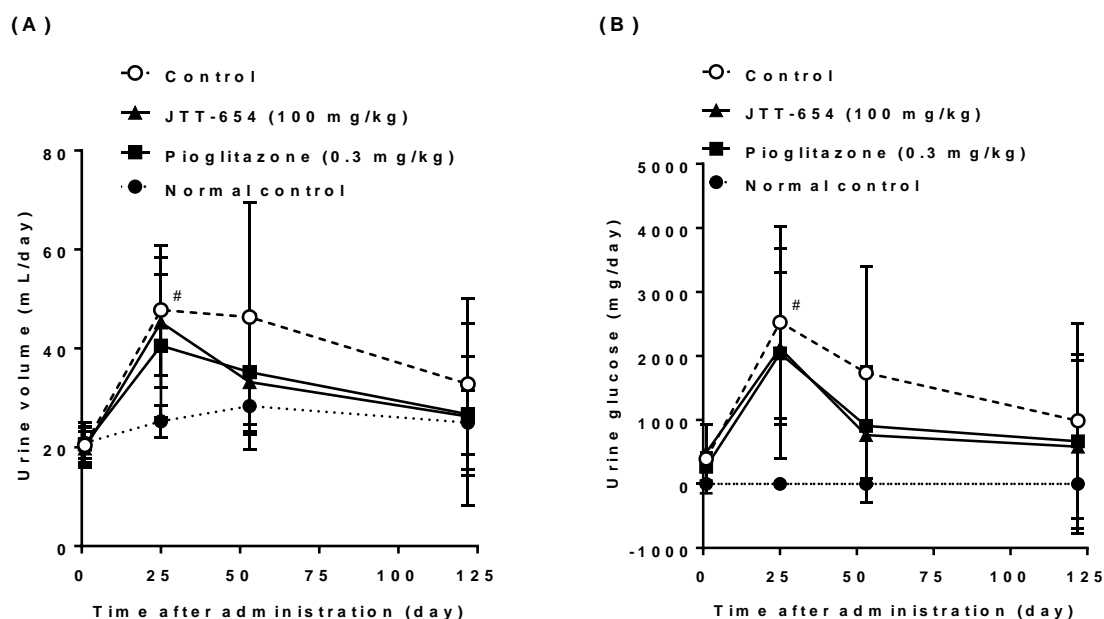


図 26. JTT-654, 及び Pioglitazone の SHR-cp の尿量, 及び尿糖に対する作用

(A) 尿量, 及び (B) 尿糖を示した。数値は平均値±標準偏差として表記した (N = 5-6)。
#p<0.05 vs Control (Student's t or Welch's test)

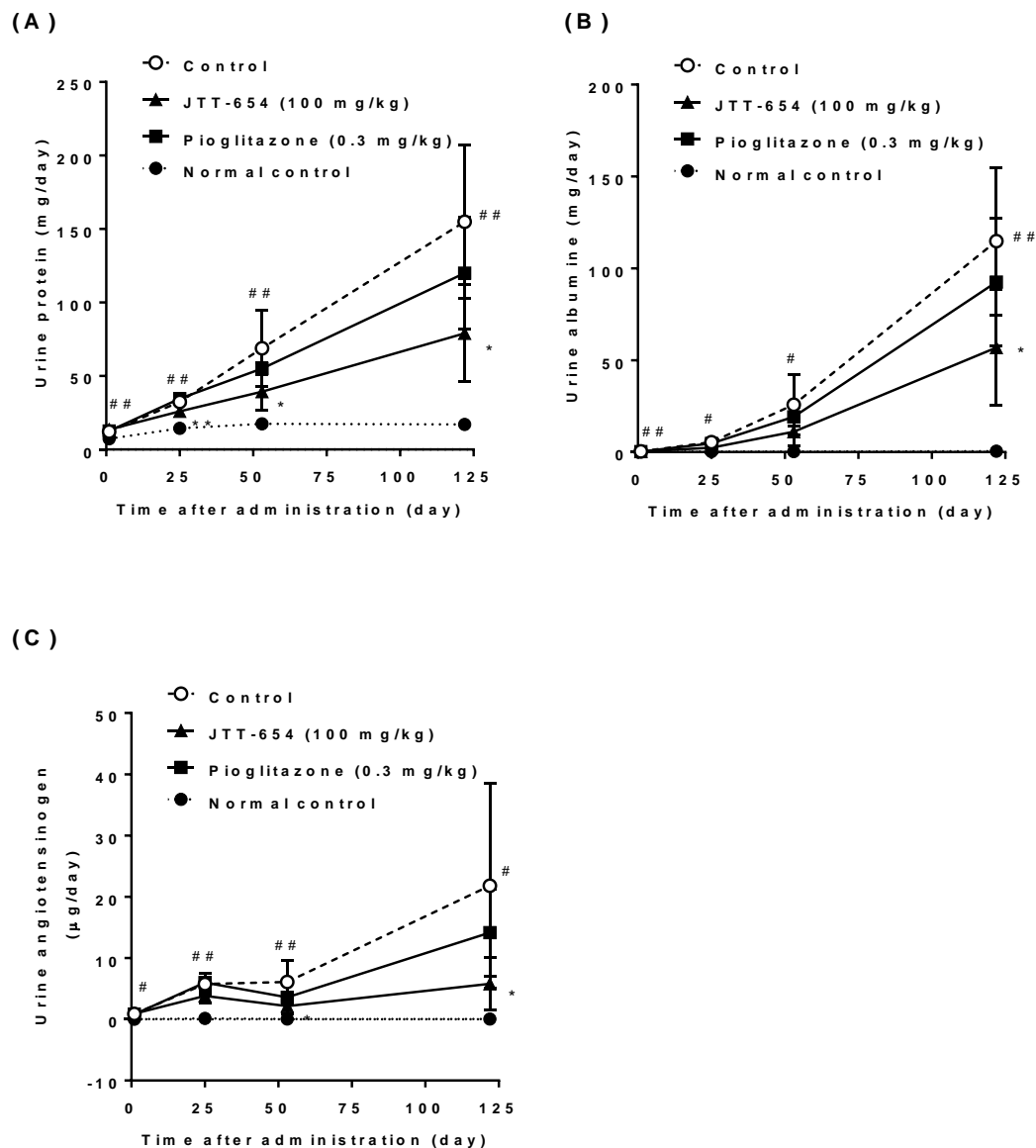


図 27. JTT-654, 及び Pioglitazone の SHR-cp の尿タンパク, 尿アルブミン, 及び尿中
angiotensinogen 濃度に対する作用

(A) 尿タンパク, (B) 尿アルブミン, 及び (C) 尿中アンジオテンシノーゲン濃度を示した。数値は平均値
±標準偏差として表記した (N = 5-6)。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Control (Student's t or Welch's test)

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs Control (Student's t or Welch's test)

3.3.4.4 SHR-cp の糖尿病性腎症に対する作用評価

JTT-654 投与群では pioglitazone 投与群と異なり、収縮期血圧変化量、及び尿パラメータに対する改善作用が認められた。したがって、投与 128 日目にラットを解剖し、腎臓の病理組織学的検査を行った。図 28 に各群の糸球体、及び尿細管傷害に関する代表例の顕微鏡写真を示した。また、これらの個体別病理所見の一覧を表 3 に示した。

正常対照群を除き、メサンギウム領域の拡大（white arrow）、糸球体の肥大（grey arrow）、及び毛細血管内腔の減少（black arrow）など、糸球体の変化は様々な程度で観察された。これらは尿細管の萎縮（多くは基底膜の肥厚を伴う）や好塩基性尿細管が集合してみられる部位で高頻度に認められた。したがって、好塩基性尿細管/萎縮性尿細管群のグレード（傷害度）が高い症例では、糸球体病変のグレード（傷害度）も高かった。

尿細管では、拡張した尿細管群と萎縮した尿細管群の両方が観察された（white arrowhead：拡張した尿細管を示す）。尿細管管腔内に PAS 陽性物質の蓄積（black arrowhead）が正常対照群を除く全例で観察され、これは糸球体病変のグレード（傷害度）が高い例とほぼ一致していた。

対照群と異なり、JTT-654 100mg/kg 群ではグレード 3+（severe）の症例は認められず、グレード+またはグレード 2+（ごく軽度、または軽症）の症例が多かったことから、糖尿病性腎症の改善効果が認められた。一方、pioglitazone 投与群は JTT-654 投与群と異なり、これらの病理所見のグレード（傷害度）が対照群とほぼ同等であり、糖尿病性腎症の改善効果は認められなかった。

表 3. 試験終了時の媒体, JTT-654, 及び pioglitazone 投与 SHR-cp, 及び WKY ラットの糸球体, 及び尿細管の組織学的損傷の病理組織

学的所見

Findings	Group Animal No.	Day 127 (26 weeks of age)																						
		Control					JTT-654/100					Pioglitazone/0.3					Wistar Kyoto rat							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Glomerulus																								
Glomerular hyepertrophy		+	+	+	+	+	-	+	+	-	±	+	+	+	-	+	±	-	-	-	-	+	-	-
Mesangial expansion		+	3+	3+	3+	3+	+	+	2+	2+	2+	+	+	3+	3+	2+	2+	3+	-	±	±	-	-	-
Reduction in capillary lumen		+	2+	2+	3+	3+	+	+	2+	+	2+	+	+	2+	2+	+	2+	2+	-	-	-	-	-	-
Renal tubule																								
Tubular dilation		2+	2+	+	3+	3+	2+	2+	2+	+	+	+	2+	3+	2+	2+	2+	2+	-	-	-	-	-	-
PAS-positive tubular cast, cortex		+	+	+	3+	2+	+	±	+	±	+	+	2+	3+	2+	2+	+	2+	-	-	-	-	-	-
PAS-positive tubular cast, medulla		+	2+	+	3+	3+	+	±	2+	±	+	+	2+	3+	2+	2+	+	+	-	-	-	-	-	-

'-': Negative, ±: Very slight, +: Slight, 2+: Moderate, 3+: Severe

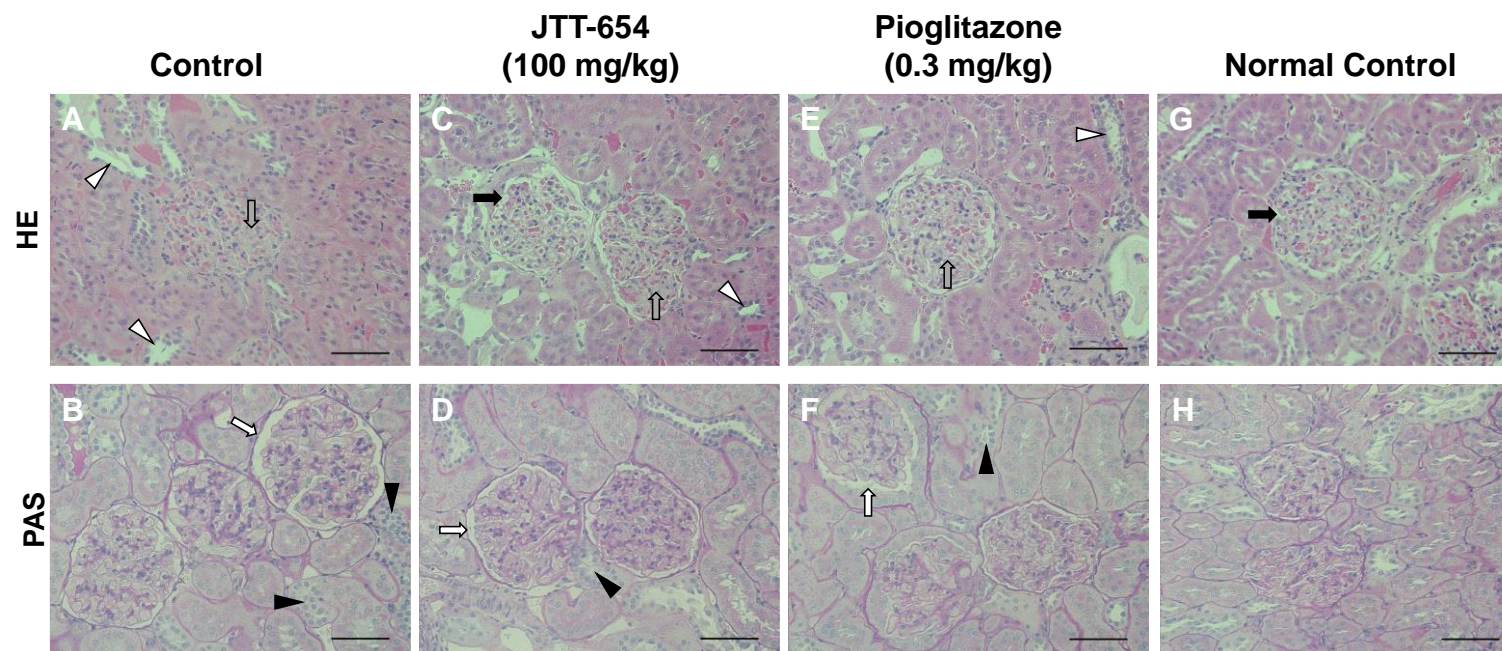


図 28. 試験終了時の媒体, JTT-654, 及び pioglitazone 投与 SHR-cp, 及び WKY ラットの糸球体, 及び尿細管の組織学的損傷を示す顕

微鏡写真

(A) , 及び (B) 対照群, (C) , 及び (D) JTT-654 投与群, (E) , 及び (F) Pioglitazone 投与群, (G) , 及び (H) 正常対照群
 (A) , (C) , (E) , 及び (G) HE 染色, (B) , (D) , (F) , 及び (H) PAS 染色, Scale bar = 50 μ m
 White arrow ; メサンギウム領域の拡大, Gray arrow ; 肥大した糸球体, Black arrow ; 毛細血管
 White arrowhead ; 拡張した尿細管, Black arrowhead ; PAS 陽性円柱

3.3.5 考察

JTT-654 はインスリン抵抗性改善作用を有するのみならず、高血圧に対しても改善作用を示しうる新たな化合物である。したがって、本試験では肥満、高血圧、及び 2 型糖尿病を呈するメタボリックシンドロームモデルである SHR-cp を用いて、JTT-654 の複合的な病態に対する改善作用を評価した。評価にあたって、同じインスリン抵抗性改善作用にカテゴライズされる pioglitazone とのプロファイル比較を行った。

予備検討より、100 mg/kg JTT-654 を混餌にて経口投与することで、脂肪組織、及び肝臓における 11 β -HSD1 活性を 24 時間完全に抑制することを確認した。また、reference 化合物である pioglitazone の投与用量は、臨床用量である 15 mg、または 30 mg 錠のヒトにおける血中濃度に近い 0.3 mg/kg と設定した (data not shown)。Pioglitazone は臨床ではしばしば体重増加を引き起こすことが報告されているが^{51) 52)}、今回の試験では、体重および摂餌量に影響を与えなかった (図 23A, B, 及び C)。さらに、pioglitazone は SHR-cp における血漿中グルコース、及びインスリン濃度の低下作用を示さなかった (図 25A, 及び B)。これらの結果より、pioglitazone の有効性が検出できなかった理由として、今回の試験で用いた SHR-cp の病態は想定以上に重篤であった可能性が示唆された。

3.1 にて、JTT-654 が非肥満型 2 型糖尿病モデルである GK ラットに対して、脂肪組織、及び肝臓におけるインスリン抵抗性を改善することを報告したが、JTT-654 の有効性は体重および摂餌量の増加を伴わなかった。メタボリックシンドロームモデルである SHR-cp に対しても JTT-654 は体重、及び摂餌量には影響を与えなかったが、pioglitazone と同様に、血漿中グルコース、及びインスリン濃度の低下作用も示さなかった。したがって、SHR-cp の病態が想定以上に重篤であった今回の試験結果からは、体重、及び摂餌量という観点での両化合物の特徴を比較することはできないと考えられた。

今回の検討で明らかとなった両化合物の特徴の違いの一つは、収縮期血圧に対する作用の有無であった。JTT-654 は SHR-cp に対して血圧低下作用を示したが、pioglitazone は血圧低下作用を示さなかった。JTT-654 の SHR-cp に対する血圧低下作用のメカニズムは、アンジオテンシノーゲン産生・分泌抑制作用によるものであると考えられた。腎臓内におけるレニン・アンジオテンシン系 (Renin-angiotensin system : RAS) の活性化は高血圧だけでなく腎障害の進展にも深く関与している。実際に、アンジオテンシン II 依存性高血圧モデルにおける尿中アンジオテンシノーゲン排泄量は、局所 RAS の活性化のバイオマーカーとなっている^{53) 54)}。また、臨床的にも尿中アンジオテンシノーゲン排泄量は、高血圧および慢性腎臓病患者における腎臓内 RAS 活性化のバイオマーカーとなると考えられている^{55) 56)}。さらに、11 β -HSD1 は腎血管系、近位および遠位尿細管、ポドサイト、マクラデンサ、腎髄質の間質細胞等で発現している⁵⁷⁾。

Pioglitazone は尿中アンジオテンシノーゲン排泄量を減少させなかったが、JTT-654 は有意に減少させた。同様に、JTT-654 は尿蛋白、及び尿アルブミン排泄量を有意に減少させた (図 27A, B, 及び C)。さらに、病理組織学的所見においても、JTT-654 は糖尿病性腎症を改善したが、Pioglitazone ではその作用が認められなかった (表 3, 及び図 28)。

以上の結果より、JTT-654 は 11 β -HSD1 阻害を介して、肝臓、及び脂肪組織のみならず、腎臓におけるアンジオテンシノーゲンの産生・分泌を抑制することにより、腎臓内の局所的な RAS 活性をも抑制している可能性があると考えられた。

総括

本研究では、新規 11 β -HSD1 阻害薬である JTT-654 を用いて標的臓器と考えられる脂肪組織および肝臓における作用機序解析、及び各種病態モデル動物における有効性評価を検討した。その結果、図 29 に示されるような以下の知見が明らかとなった。

- 1) JTT-654 は 11 β -HSD1 を強力かつ選択的に阻害し、その作用はげっ歯類からヒトまで種差のない化合物である。
- 2) JTT-654 は脂肪組織、及び肝臓におけるインスリン抵抗性を改善し、過剰なグルココルチコイド作用に基づくグルコースの取り込み、酸化、放出、及びグリコーゲンへの変換・貯留というグルコースクリアランスの悪化を改善する経口投与可能な化合物である。
- 3) JTT-654 は非肥満型 2 型糖尿病モデルにおいても有効性を示す化合物である。
- 4) JTT-654 は HPA 系には悪影響を及ぼさず、脂肪組織および肝臓だけでなく、腎臓におけるアンジオテンシノーゲン産生・分泌を介して 2 型糖尿病治療薬としての additional benefit である全身血圧の低下作用、及び糖尿病性腎症に対する改善作用を示す化合物である。

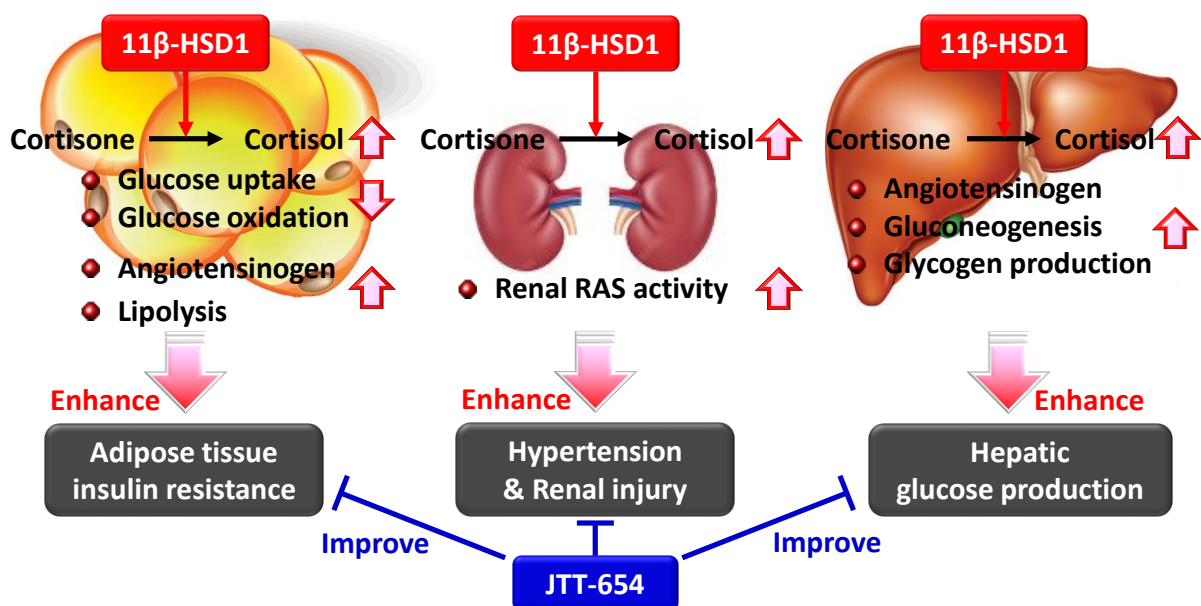


図 29. 2 型糖尿病治療薬としての additional benefit を有する JTT-654 の想定作用機序

2 型糖尿病は慢性疾患であり、早期からの適切な治療と管理が必要であるが、就労している糖尿病患者では治療と仕事の両立が困難である場合が多く、特に生産年齢層においては多くの患者が多忙を理由に糖尿病治療を自己中断している現状がある。企業や社会の糖尿病患者への理解がさらに進むとともに、新規作用機序のみならず、服用回数や方法などについても患者にとっての幅広い治療選択肢が求められている。JTT-654を始めとした 11β -HSD1 阻害薬は、その治療選択肢の一つとして有用性が期待される。今後、さらなる薬剤開発が進み、2 型糖尿病を始めとする代謝性疾患が克服されることを期待する。

研究業績

1. **Heitaku S**, Sasase T, Sotani T, Maki M, et al. (2023) An 11-Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibitor, JTT-654 Ameliorates Insulin Resistance and Non-obese Type 2 Diabetes. Biol Pharm Bull. 46(7):969-978.
2. **Heitaku S**, Sasase T, Sotani T, Maki M, et al. (2024) JTT-654, an 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, improves hypertension and diabetic kidney injury by suppressing angiotensinogen production. J Pharmacol Sci. 154(4):246-255.

参考文献

- 1) Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Kaabi JA. (2020) Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health*, 10, 107-111.
- 2) Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R; IDF Diabetes Atlas Committee. (2019) Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 157:107843.
- 3) Fonseca VA; Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. (2009) *Diabetes Care*. 32 Suppl 2:S151-S156.
- 4) Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM; Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III); National Cholesterol Education Program (NCEP). (2003) NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes*. 52(5):1210-1214.
- 5) Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. (1993) Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. 16(2):434-444.
- 6) Nakamura T, Tsubono Y, Kameda-Takemura K, Funahashi T, Yamashita S, Hisamichi S, Kita T, Yamamura T, Matsuzawa Y; Group of the Research for the Association between Host Origin and Atherosclerotic Diseases under the Preventive Measure for Work-related Diseases of the Japanese Labor Ministry. (2001) Magnitude of sustained multiple risk factors for ischemic heart disease in Japanese employees: a case-control study. *Jpn Circ J*. 65(1):11-17.
- 7) Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. (2003) Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 348(5):383-393.
- 8) Weber MA, Mansfield TA, Cain VA, Iqbal N, Parikh S, Ptaszynska A. (2016) Blood pressure and glycaemic effects of dapagliflozin versus placebo in patients with type 2 diabetes on combination antihypertensive therapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 4(3):211-220.
- 9) Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondun N, Shaw W, Law G, Desai M, Matthews DR; CANVAS Program Collaborative Group. (2017) Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 377(7):644-657.
- 10) Wanner C, Lachin JM, Inzucchi SE, Fitchett D, Mattheus M, George J, Woerle HJ,

- Broedl UC, von Eynatten M, Zinman B; EMPA-REG OUTCOME Investigators. (2018) Empagliflozin and Clinical Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus, Established Cardiovascular Disease, and Chronic Kidney Disease. *Circulation*. 137(2):119-129.
- 11) Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, Silverman MG, Zelniker TA, Kuder JF, Murphy SA, Bhatt DL, Leiter LA, McGuire DK, Wilding JPH, Ruff CT, Gause-Nilsson IAM, Fredriksson M, Johansson PA, Langkilde AM, Sabatine MS; DECLARE-TIMI 58 Investigators. (2019) Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 380(4):347-357.
 - 12) Ryotaro B, Kondo T, Ohta Y, Goto A, Tanaka D, Satoh H, Yabe D, Nishimura R, Harada N, Kamiya H, Suzuki R, Yamauchi T; JDS Committee on Consensus Statement Development (2023) A consensus statement from the Japan Diabetes Society: A proposed algorithm for pharmacotherapy in people with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*. 2023 Jan;14(1):151-164.
 - 13) Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. (2009) Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 94(8):2692-2701.
 - 14) Seckl JR, Walker BR. (2001) Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. (2001) *Endocrinology*. 142(4):1371-1376.
 - 15) Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*. 294(5549):2166-2170.
 - 16) Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, Elmquist JK, Morton NM, Paterson JM, Shinyama H, Sharp MG, Fleming S, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2003) Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J Clin Invest*. 112(1):83-90.
 - 17) Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ. (2004) Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(18):7088-7093.
 - 18) Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmolli D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. (1997) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(26):14924-14929.
 - 19) Morton NM, Holmes MC, Fiévet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, Seckl JR. (2001) Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose

- tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem.* 276(44):41293-41300.
- 20) Morton NM, Paterson JM, Masuzaki H, Holmes MC, Staels B, Fievet C, Walker BR, Flier JS, Mullins JJ, Seckl JR. (2004) Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Diabetes.* 53(4):931-938.
 - 21) Rask E, Olsson T, Söderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O, Walker BR. (2001) Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(3):1418-1421.
 - 22) Lindsay RS, Wake DJ, Nair S, Bunt J, Livingstone DE, Permana PA, Tataranni PA, Walker BR. (2003) Subcutaneous adipose 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and messenger ribonucleic acid levels are associated with adiposity and insulinemia in Pima Indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(6):2738-2744.
 - 23) Kannisto K, Pietiläinen KH, Ehrenborg E, Rissanen A, Kaprio J, Hamsten A, Yki-Järvinen H. (2004) Overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 in adipose tissue is associated with acquired obesity and features of insulin resistance: studies in young adult monozygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(9):4414-4121.
 - 24) Nair S, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ, Permana PA. (2004) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1: genetic polymorphisms are associated with Type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia.* 47(6):1088-1095.
 - 25) Chu JW, Matthias DF, Belanoff J, Schatzberg A, Hoffman AR, Feldman D. (2001) Successful long-term treatment of refractory Cushing's disease with high-dose mifepristone (RU 486). *J Clin Endocrinol Metab.* 86(8):3568-3573.
 - 26) Walker BR. (2007) Extra-adrenal regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: physiological regulator and pharmacological target for energy partitioning. *Proc Nutr Soc.* 66(1):1-8.
 - 27) Morton NM, Seckl JR. (2008) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and obesity. *Front Horm Res.* 36:146-164.
 - 28) Jitrapakdee S. (2012) Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(1):33-45.
 - 29) Margolis RN, Curnow RT. (1984) Effects of dexamethasone administration on hepatic glycogen synthesis and accumulation in adrenalectomized fasted rats. *Endocrinology.* 115(2):625-629.
 - 30) Lundgren M, Burén J, Ruge T, Myrnäs T, Eriksson JW. (2004) Glucocorticoids

- down-regulate glucose uptake capacity and insulin-signaling proteins in omental but not subcutaneous human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6):2989-2997.
- 31) Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H, Fukushima Y, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. (2000) Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes.* 49(10);1700-1708.
 - 32) M RODBELL. (1964) METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. *J Biol Chem.* 239:375-380.
 - 33) Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR. (2004) Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Prog Horm Res.* 59:359-393
 - 34) Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. (2008) Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 1:2-11
 - 35) Gathercole LL, Lavery GG, Morgan SA, Cooper MS, Sinclair AJ, Tomlinson JW, Stewart PM. (2013) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1: translational and therapeutic aspects. *Endocr. Rev.,* 34, 525–555.
 - 36) Hong SP, Han D, Chang KH, Ahn SK. (2018) A novel highly potent and selective 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, INU-101. *Eur. J. Pharmacol.,* 835, 169–178.
 - 37) Li J, Kennedy LJ, Walker SJ, et al. (2018) Discovery of clinical candidate BMS-823778 as an inhibitor of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta-HSD-1). *ACS Med. Chem. Lett.,* 9, 1170–1174.
 - 38) Oh H, Jeong KH, Han HY, Son HJ, Kim SS, Lee HJ, Kim S, Sa JH, Jun HS, Ryu JH, Choi CS. (2015) A potent and selective 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, SKI2852, ameliorates metabolic syndrome in diabetic mice models. *Eur. J. Pharmacol.,* 768, 139–148.
 - 39) Okazaki S, Takahashi T, Iwamura T, Nakaki J, Sekiya Y, Yagi M, Kumagai H, Sato M, Sakami S, Nitta A, Kawai K, Kainoh M. (2014) HIS-388, a novel orally active and long-acting 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, ameliorates insulin sensitivity and glucose intolerance in diet-induced obesity and nongenetic type 2 diabetic murine models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* 351, 181–189.
 - 40) Ramachandran A, Snehalatha C, Shetty AS, Nanditha A. (2012) Trends in prevalence of diabetes in Asian countries. *World J. Diabetes.,* 3, 110–117.
 - 41) Czeglé I, Margittai E, Senesi S, Benedetti A, Banhegyi G. (2008) Different expression and distribution of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese and lean animal models of type 2 diabetes. *Acta Physiol.,* 95, 419–424.
 - 42) Goodwin JE, Geller DS. (2012) Glucocorticoid-induced hypertension. *Pediatric*

nephrology., 27, 1059-1066.

- 43) Aubert J, Darimont C, Safonova I, Ailhaud G, Negrel R. (1997) Regulation by glucocorticoids of angiotensinogen gene expression and secretion in adipose cells. *The Biochemical journal.*, 328 (Pt 2), 701-706. 10,
- 44) Ailhaud G, Teboul M, Massiera F. (2002) Angiotensinogen, adipocyte differentiation and fat mass enlargement. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care.*, 5, 385-389.
- 45) Lalouel JM, Rohrwasser A, Terreros D, Morgan T, Ward K. (2001) Angiotensinogen in essential hypertension: from genetics to nephrology. *Journal of the American Society of Nephrology.*, 12:606-615.
- 46) Feig PU, Shah S, Hermanowski-Vosatka A, et al. (2011) Effects of an 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, MK-0916, in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Diabetes, obesity & metabolism.*, 13:498-504.
- 47) Schnackenberg CG, Costell MH, Krosky DJ, et al. (2013) Chronic inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity decreases hypertension, insulin resistance, and hypertriglyceridemia in metabolic syndrome. *BioMed research international.*, 427640.
- 48) Bauman DR, Whitehead A, Contino LC, et al. (2013) Evaluation of selective inhibitors of 11 β -HSD1 for the treatment of hypertension. *Bioorganic & medicinal chemistry letters.*, 23, 3650-3653.
- 49) Cooper MS, Stewart PM. (2009) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.*, 94, 4645-4654.
- 50) Harno E, White A. (2010) Will treating diabetes with 11 β -HSD1 inhibitors affect the HPA axis? *Trends Endocrinol Metab.*, 10, 619-627.
- 51) Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, et al. (2005) Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial in macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet.*, 366(9493):1279-89.
- 52) Yokoyama H, Araki S, Kawai K, et al. (2015) Pioglitazone treatment and cardiovascular event and death in subjects with type 2 diabetes without established cardiovascular disease (JDDM 36). *Diabetes Res Clin Pract.*, 109(3):485-492.
- 53) Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. (2002) Urinary excretion of angiotensinogen reflects intrarenal angiotensinogen production. *Kidney Int.* 61(2):579-585.
- 54) Kobori H, Nishiyama A, Harrison-Bernard LM, Navar LG. (2003) Urinary

angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension. Hypertension. 41(1):42-49.

- 55) Kobori H, Alper AB Jr., Shenava R, et al. (2009) Urinary angiotensinogen as a novel biomarker of the intrarenal renin-angiotensin system status in hypertensive patients. Hypertension. 53(2):344-350.
- 56) Ishigaki S, Ohashi N, Aoki T, et al. (2021) Baseline urinary angiotensinogen excretion predicts deterioration of the kidney function in patients with chronic kidney disease. Intern Med. 15;60(14):2201-2206.
- 57) Hunter RW, Bailey MA. (2015) Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: mechanisms for hypertension. Curr Opin Pharmacol. 21:105-114.

謝辞

本稿を終えるにあたり、学位取得のきっかけを与えてくださり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました北里大学 薬学部 分子薬理学教室 中原 努教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文の審査過程におきまして、多岐に渡るご助言及びご協力を賜りました北里大学 薬学部 薬理学教室 田辺光男教授、北里大学 薬学部 生薬学教室 小林義典教授、北里大学 薬学部 臨床薬学研究・教育センター 臨床薬学（大講座） 薬物治療学 III 教室 平山武司教授に謹んで感謝の意を表します。

予備審査の資料作成に当たり、多岐にわたるご助言及びご協力を賜りました北里大学 薬学部 分子薬理学教室 柏原 俊英講師、森田 茜助教を始め、研究室スタッフの皆さまに謹んで感謝の意を表します。

本研究の機会を与えていただきました日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 所長 角谷 真博士、同生物研究所 所長 西宇 淳博士に深く感謝いたします。

研究、及び論文作成における多大なるご協力とご支援をいただきました日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 生物研究所 笹瀬智彦博士、河合 孝博士、曾谷智裕研究員、槇 美実研究員に深く感謝いたします。