

博士学位論文

2型糖尿病治療薬ビルダグリプチンの
適正使用に向けた薬物動態研究

2017年1月

北里大学大学院 薬学研究科

薬学専攻 博士課程 薬物治療学 I (薬剤学教室)

朝倉 充俊

指導：厚田 幸一郎 教授

略語

AADAC	arylacetamide deacetylase
AdipoQ	adiponectin
ALP	alkaline phosphatase
ALT	alanine aminotransferase
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
AST	aspartate aminotransferase
AUC	area under the blood concentration-time curve
BMI	body mass index
BNPP	bis(p-nitrophenyl) phosphate
CABYR	calcium-binding tyrosine phosphorylation regulated protein
cDNA	complementary DNA
cRNA	complementary RNA
CES	carboxylesterase
CIART	circadian associated repressor of transcription
C _{max}	maximum plasma concentration
Coll1a1	collagen type I alpha 1
CTCAE	common terminology criteria for adverse events
CYP	cytochrome P450
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
DTT	dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESRRB	estrogen-related receptor beta
FABP	fatty acid binding protein
FBF1	fas (TNFRSF6) binding factor 1
FBS	fetal bovine serum
FOXA2	forkhead box A2
GALNTL5	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 5
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GIP	glucose-dependent insulinotropic polypeptide

GLP-1	glucagon-like peptide-1
Gly-Pro-AMC	glycyl-prolyl-7-amino-4-methylcoumarin
HEK293	human embryonic kidney 293
HNF-1 α	hepatocyte nuclear factor-1 α
JCOG	Japan clinical oncology group
LC-MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry
LPS	lipopolysaccharide
MARS2	methionine-tRNA synthetase 2
MBP	myelin basic protein
MiR-29	microRNA-29
MT	metallothionein
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIT	nitrilase-like protein
PDB	Protein Data Bank
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
PIP5K1A	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 alpha
PLIN4	perilipin 4
RAGE	receptor for advanced glycation end products
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
S100	S100 calcium-binding protein
SMR3A	submaxillary gland androgen regulated protein 3A
SNP	single-nucleotide polymorphism
STZ	streptozotocin
TNF- α	tumor necrosis factor- α
UGT	uridine diphosphate glucuronosyltransferase
USP2	ubiquitin specific peptidase 2

目次

略語

I. 序論	1
II. 本論	8
第1章 ビルダグリプチンの主代謝酵素の解明を目指した <i>in vitro</i> 実験	9
1-1. ビルダグリプチン主代謝反応へのヒト NIT の関与を明らかにするための <i>in vitro</i> 実験	12
1-1-1. ヒト NIT と他の動物種の nitrilase とのアミノ酸配列の相同性の比較	13
1-1-2. マウスの主要な臓器およびヒト肝臓における NIT タンパク質の発現解析	15
1-1-3. 発現系を用いたヒト NIT のビルダグリプチン代謝能の評価	19
1-2. ビルダグリプチン主代謝反応における DPP-4 の寄与率を明らかにするための <i>in vitro</i> 実験	21
1-2-1. 発現系を用いたヒト DPP-4 のビルダグリプチン代謝能の評価	21
1-2-2. 肝臓におけるビルダグリプチン代謝活性と DPP-4 ペプチダーゼ活性の相関性	23
1-2-3. ビルダグリプチンに対するヒト肝臓サンプルとヒト DPP-4 の K_m 値の比較	25
1-2-4. ヒト肝臓におけるビルダグリプチン主代謝反応への DPP-4 の寄与率の算出	28
1-2-5. ヒト DPP-4 遺伝子多型のビルダグリプチン代謝能への影響	30
1-2-6. ヒト DPP-4 の活性部位 Ser630 のビルダグリプチン主代謝反応への関与	31
1-3. 考察	33
1-4. 小括	38
第2章 ビルダグリプチンの主代謝臓器の解明を目指したマウスを用いた <i>in vivo</i> 実験と ヒト肝ミクロソームを用いた個人差に関する検討	39
2-1. マウスの主要な臓器における DPP-4 タンパク質の発現解析	40
2-2. シタグリプチンを用いたマウス <i>in vivo</i> におけるビルダグリプチン主代謝反応への DPP-4 の寄与率の算出	41
2-3. 血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の個体差が M20.7 の生成量に及ぼす影響	43
2-4. マウスにおけるビルダグリプチンの主代謝臓器の同定	44
2-5. STZ 誘発糖尿病マウスの肝臓、腎臓、小腸における DPP-4 発現の変動因子の解明	49

2-6. ヒト肝ミクロソームにおけるビルダグリプチン代謝活性の個人差	52
2-7. 考察	56
2-8. 小括	58
第3章 ビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムの解明を目指した基礎研究	59
3-1. ビルダグリプチンにより肝臓内で誘導される炎症関連遺伝子の同定	59
3-2. マウス肝臓で誘導された遺伝子の HepG2 細胞における発現とビルダグリプチンによる発現変動	63
3-3. HepG2 細胞における S100A8、S100A9 の発現とビルダグリプチンによる発現変動	65
3-4. HL-60 細胞における S100A8、S100A9 の発現とビルダグリプチンによる発現変動	67
3-5. ビルダグリプチン処置による S100A8/A9 の発現誘導への M20.7 の関与	70
3-6. 考察	72
3-7. 小括	74
第4章 ビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度の調査	76
4-1. 北里大学病院におけるビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度	76
4-2. ビルダグリプチンによる肝障害の重症度分類	77
4-3. 考察	79
III. 総括	81
IV. 実験材料および実験方法	86
V. 謝辞	115
VI. 参考文献	118
VII. 主論文目録	131
VIII. 研究業績	133

I. 序論

2型糖尿病は、インスリン分泌低下やインスリン抵抗性などのインスリン作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患である。2型糖尿病の治療目標は、血糖、体重、血圧、血清脂質の良好なコントロール状態を維持することで糖尿病に特徴的な合併症（網膜症、腎症、神経障害）および併発しやすい動脈硬化性疾患（冠動脈疾患、脳血管障害、末梢動脈疾患）の発症、進展を阻止し、健康な人と変わらない日常生活の質および寿命を確保することである（日本糖尿病学会, 2013）。治療方針は、まず食事療法と運動療法を行い、これらを2、3ヶ月続けても目標の血糖コントロールを達成できない場合に薬物療法を選択する。近年、単独投与では低血糖を起こしにくく体重増加も来たしにくいことから、高齢者や肥満者を含む幅広い患者に使用しやすい2型糖尿病治療薬として dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬が注目されており、新薬として登場した2009年から短期間のうちに DPP-4 阻害薬の処方数が急速に増加している（Kohro et al., 2013）。

DPP-4 阻害薬の標的分子である DPP-4 は、肝臓、腎臓、小腸を含む様々な臓器で、主に細胞膜表面上に膜タンパク質として発現している（Mentlein, 1999; Gorrell et al., 2001）。また、細胞表面に留まる膜結合型 DPP-4 だけではなく、可溶型 DPP-4 として血液中にも存在する（Durinx et al., 2000）（Figure 1）。膜結合型および可溶型 DPP-4 は、インクレチンと呼ばれる glucagon-like peptide-1 (GLP-1) と glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) を含む40種類以上の多彩な内因性の生理活性ペプチドを基質として認識し、N末端のジペプチドを切断するジペプチジルペプチダーゼ活性（DPP-4 ペプチダーゼ活性）を有する（Mentlein, 1999; Mulvihill and Drucker, 2014）。活性型のインクレチンは食事摂取に伴い小腸から分泌され、膵臓に作用することで血糖依存的なインスリン分泌促進作用やグルカゴン分泌抑制作用を介して血糖降下作用を発揮するが、DPP-4 によって速やかに不活性化される（Figure 1）（Deacon et al.,

1995)。DPP-4 阻害薬は、DPP-4 ペプチダーゼ活性を選択的に阻害することで内因性の活性型インクレチン濃度を高め、インクレチンを介した低血糖の危険性の低い優れた血糖降下作用を発揮する 2 型糖尿病治療薬である (Figure 1) (Kirby et al., 2010)。DPP-4 の酵素活性には、細胞外ドメインの 630 番目のセリン (Ser630)、708 番目のアスパラギン酸 (Asp708)、740 番目のヒスチジン (His740) の三アミノ酸残基が酵素活性部位として重要である (Mentlein, 1999)。そのため DPP-4 阻害薬は、いずれの成分も DPP-4 の酵素活性部位付近に存在する基質結合部位に対して選択的に相互作用し、DPP-4 と活性型インクレチン (GLP-1、GIP) との結合を競合的に阻害することで、インクレチンの不活性化を抑制する (Figure 1) (Deacon, 2011)。

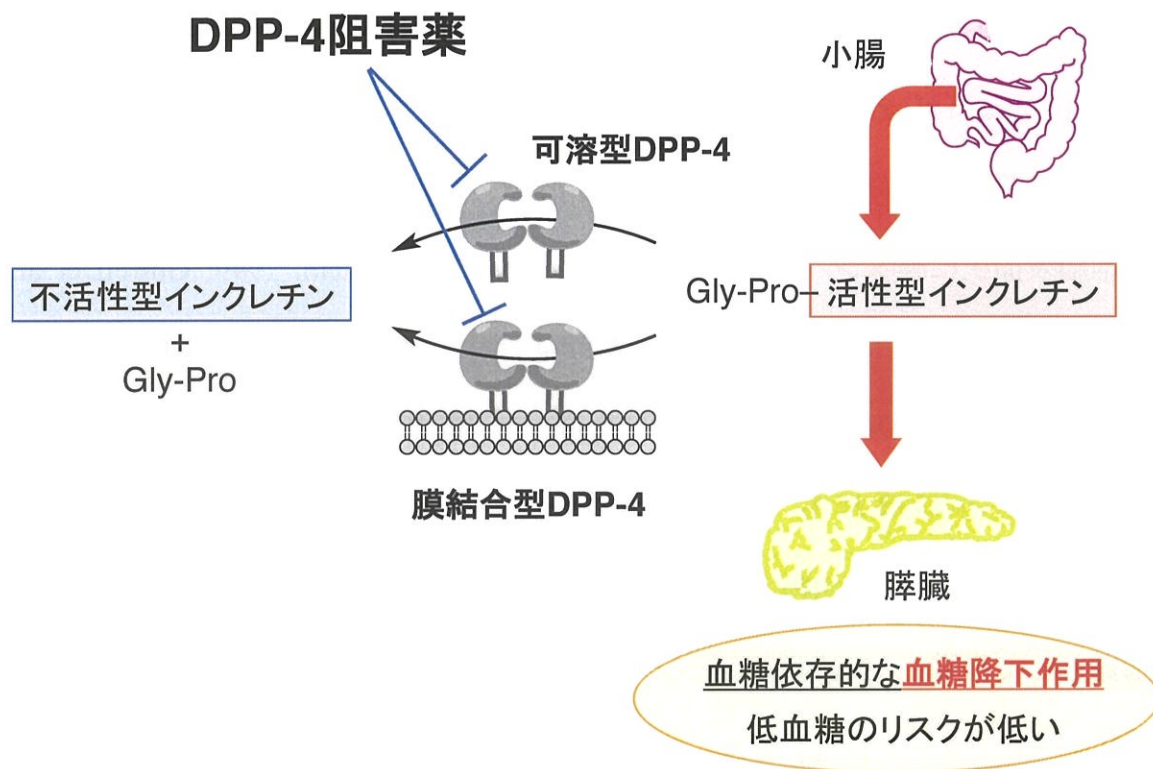


Figure 1. DPP-4 阻害薬の作用機序

本邦では2009年12月にシタグリプチンがDPP-4阻害薬として初めて販売開始され、現在では9種類のDPP-4阻害薬が臨床で使用されている (Table 1)。DPP-4阻害薬は前述のように活性型インクレチンを介した低血糖の危険性が低く、体重増加を来たさない優れた2型糖尿病治療薬であることから、臨床現場で速やかに普及した (Kohro et al., 2013)。一方で、臨床使用歴が短いことから長期的な有効性や副作用の個人差に関する情報が少ないことが課題の一つである。

Table 1. 日本で使用されている DPP-4 阻害薬の特徴

一般名	商品名	販売開始	用法	消失半減期	消失経路
シタグリプチン	ジャヌビア® グラクティブ®	2009年12月	1日1回	12時間	腎排泄
ビルダグリプチン	エクア®	2010年4月	1日2回	2時間	代謝 (腎排泄)
アログリプチン	ネシーナ®	2010年6月	1日1回	22時間	腎排泄
リナグリプチン	トラゼンタ®	2011年9月	1日1回	105時間	胆汁排泄
テネリグリプチン	テネリア®	2012年9月	1日1回	24時間	腎排泄 (代謝)
アナグリプチン	スイニー®	2012年11月	1日2回	2時間	腎排泄 (代謝)
サキサグリプチン	オングリザ®	2013年7月	1日1回	7時間	代謝 / 腎排泄
トレラグリプチン	ザファテック®	2015年5月	週1回	19時間	腎排泄
オマリグリプチン	マリゼブ®	2015年11月	週1回	39時間	腎排泄

(各インタビューフォームより作成)

DPP-4 阻害薬の用法用量は、薬物動態を考慮し、服用後に DPP-4 阻害作用を示すために十分な血中濃度を維持することを目標として設定されている (Deacon, 2011)。また、腎機能障害や肝機能障害を有する患者への用法用量の変更などの対応や、DPP-4 阻害薬間での使い分けにも薬物動態の情報が用いられてきた (Scheen, 2010)。しかし、DPP-4 阻害薬の薬理効果は薬物濃度依存的ではないことから、これまでに DPP-4 阻害薬の血中濃度の個人差については注目されてこなかった。一方で、DPP-4 阻害薬において課題とされている長期的な有効性や副作用の個人差を予測するためには、DPP-4 阻害作用を示す有効成分や生成される代謝物の血中濃度を変動させる因子を十分に理解することが求められる。そこで、本研究では DPP-4 阻害薬ビルダグリプチンの適正使用に貢献することを目指した薬物動態に着目した研究を行うこととした。

本研究において注目したビルダグリプチン (エクア[®]) は、本邦で 2 番目に販売が開始された DPP-4 阻害薬である (Table 1) (Vilhauer et al., 2003)。多くの DPP-4 阻害薬は 1 日 1 回服用であるが、ビルダグリプチンは消失半減期が 2 時間と短いことから 1 日 2 回の服用が必要であるという特徴を有する。また、ビルダグリプチンは糖尿病の代表的な合併症である腎機能障害を有する患者への投与量の設定方法においても、他の DPP-4 阻害薬とは異なる特徴を有する。多くの DPP-4 阻害薬は主要な消失経路が腎排泄であり、腎機能障害の程度によって大幅な投与量の減量が求められる (Deacon, 2011; Deacon and Lebovitz, 2016)。一方で、ビルダグリプチンの消失過程には代謝が大きく寄与するために、腎機能が軽度に低下した患者においては用法用量の変更は必要ないとされており、腎機能が中等度以上に低下した患者にはビルダグリプチン 50 mg 錠を通常の用法用量である 1 日 2 回から 1 日 1 回へ減量することで服用を継続することが可能となっている (Lukashevich et al., 2011; He, 2012)。このように、ビルダグリプチンの消失過程には代謝が大きな役割を担うが、主代謝酵素は明らかになっていない。

ビルダグリプチンを含む2型糖尿病治療薬は長期間多剤併用で使用されることが多く、代謝酵素の競合阻害や酵素誘導などの併用薬との薬物相互作用により、体内動態が変化することが考えられる。また、代謝酵素の遺伝子多型によるビルダグリプチン代謝の個人差が存在する可能性がある。ビルダグリプチンの長期服用における有効性や安全性を理解するためにも、血中濃度の個人差の要因となる主代謝酵素を明らかにすることは重要である。そこで、ビルダグリプチンの体内動態の変動因子として重要な主代謝酵素を解明することを研究テーマの一つとした。

さらに、本研究ではビルダグリプチンが副作用として肝障害を引き起こすことに着目した。ビルダグリプチンの添付文書 (第 14 版) には、現在本邦において使用されている 9 種類の DPP-4 阻害薬 (Table 1) の中で唯一、重篤な副作用の一つである肝障害の早期発見を目的として、服用開始から 1 年間は定期的な肝機能検査を行う必要性について記載されている。この肝機能検査の必要性は、海外で行われた臨床試験においてビルダグリプチンの関与が否定できない肝障害の事例を経験したために記載された (医薬品インタビューフォーム: エクア[®]; Karagiannis et al., 2014)。また、海外だけでなく、ビルダグリプチンが肝障害の原因薬物であると診断された本邦における症例も報告されている (Kurita et al., 2014)。このように、国内外においてビルダグリプチンによる肝障害の危険性について報告されているが、その発現メカニズムや実臨床下における発現頻度は明らかとなっていない。近年、薬物性肝障害の発現には、薬物の未変化体だけでなく代謝物も関与することが注目されている (Holt and Ju, 2006; Adams et al., 2010)。そのため本研究においては、未変化体のビルダグリプチンだけでなく代謝物の生成量の変動を理解する上でも有用な主代謝酵素を明らかにした上で、主代謝物の関与も考慮したビルダグリチンによる肝障害の発現メカニズムの解明を目指した基礎研究を行った。さらに、実臨床下におけるビルダグリチンによる肝障害

の発現頻度を明らかにするために、北里大学病院の電子カルテを用いた後ろ向き観察研究を行った。

本論文の第1章では、ビルダグリプチンの主代謝酵素の解明するために行った、ヒトおよびマウスの肝臓サンプルや発現系を用いた *in vitro* 実験について述べる。第2章では、ビルダグリプチンの主代謝臓器を解明するために行った、マウスを用いた *in vivo* 実験について述べる。第3章では、ビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムの解明を目指した基礎研究について述べる。第4章では、実臨床下におけるビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度を調査した臨床研究について述べる。

II. 本論

第 1 章

ビルダグリプチンの主代謝酵素の解明を目指した *in vitro* 実験

ビルダグリプチンは、経口により服用された後に消化管から速やかに吸収される (He et al., 2009a)。血漿中のタンパク結合率は 9.3% と非常に低く、血液中のビルダグリプチンは直ちに全身へと分布し、DPP-4 阻害薬としての機能を発揮する (He et al., 2009a; Golightly et al., 2012)。ヒトにおけるビルダグリプチンの未変化体排泄率は 27.1% と低く、投与されたビルダグリプチンの 56.5% はシアノ基加水分解反応により DPP-4 阻害作用を示さない主代謝物 M20.7 へと不活性化された後に体外へ排泄される (Figure 2) (He et al., 2009a)。ビルダグリプチンは M20.7 に加え、M15.3、M20.2、M20.9、M21.6 といった代謝物に変換されるが、M20.7 以外の代謝物は投与量に対する存在比が非常に少ない (Figure 2) (He et al., 2009a)。そのため、ヒトにおけるビルダグリプチンの体内動態の変動には主代謝物 M20.7 への代謝反応の個体差が大きく影響すると考えられる。また、実験動物として汎用されるマウス、ラット、イヌの主代謝物はヒトと同様に M20.7 であるが、ウサギでは M15.3、サルでは M20.2 が主代謝物であり、ビルダグリプチンの代謝反応には種差が存在することが報告されている (Table 2)。そのため、M20.7 生成反応の研究を行う上では、マウス、ラット、イヌが有用な実験動物であると考えられる。

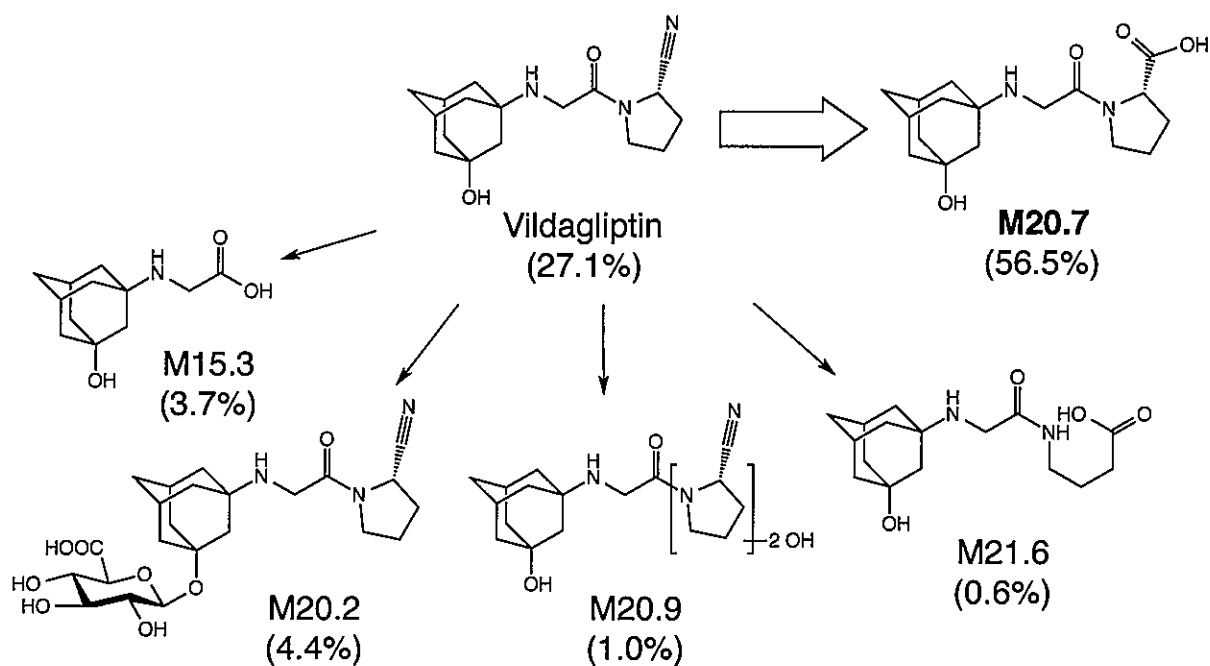


Figure 2. Metabolic pathways of vildagliptin in humans. Reported amount of vildagliptin and metabolites in urine and feces is indicated as percentage of dose (He et al., 2009a).

Table 2. Species differences of metabolite levels in plasma after oral administration.

Species	Metabolite (% of total AUC)			
	Parental vildagliptin	M15.3	M20.2	M20.7
Human	26	8.1	9.5	56
Mouse	46	Trace	3.8	17
Rat	40	0	11	42
Dog	23	26	1.4	33
Rabbit	22	53	0.9	7.4
Monkey	20	0.8	72	4.9

Australian public assessment report for vildagliptin, Department of Health and Ageing, Therapeutic Goods Administration, 2010 April. Available from: <http://www.tga.gov.au/auspar/auspar-vildagliptin> (Accessed June 7, 2016).

ビルダグリプチンの主代謝物である M20.7 の生成反応に関与する酵素の同定を目指した試みは、2009 年にビルダグリプチンを開発したノバルティス社の He らを中心に行われている (He et al., 2009a; He et al., 2009b)。様々な薬物代謝酵素を発現しているヒトの肝臓スライスとビルダグリプチンを反応させた反応液中から M20.7 が検出されたことから、肝臓に発現する酵素によって M20.7 の生成反応が触媒されることが示唆された (He et al., 2009a)。そのため、肝臓に発現する代表的な薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) の様々な分子種の発現系を用いた *in vitro* 実験が行われた (He et al., 2009a)。ビルダグリプチンを基質とした代謝実験の結果から、実験に用いられた 15 種類全ての CYP 分子種において M20.7 生成反応の触媒作用は認められず、M20.7 の生成に CYP は関与しないことが示された (He et al., 2009a)。

ビルダグリプチンは、DPP-4 の酵素活性部位であるセリン (Ser) 残基と不安定な共有結合を形成することで DPP-4 阻害作用を発揮すると考えられている (Ahrén et al., 2011; Nabeno et al., 2013)。その DPP-4 との不安定な共有結合はビルダグリプチンのシアノ基を介して形成されるため、シアノ基の加水分解体である M20.7 の生成にはビルダグリプチンの標的分子である DPP-4 が寄与することが示唆された。その仮説を検証するために DPP-4 ペプチダーゼ活性欠損ラットを用いた *in vivo* 研究が行われた (He et al., 2009b)。この DPP-4 ペプチダーゼ活性欠損ラットは、DPP-4 タンパク質の発現は認められるが、DPP-4 アミノ酸配列の 633 番目のグリシンがアルギニンに変異 (G633R) しており、全身において DPP-4 ペプチダーゼ活性が欠損している。DPP-4 ペプチダーゼ活性欠損 (G633R) ラットと野生型 DPP-4 を発現するラットに、それぞれビルダグリプチンを経口投与し、排泄物中に含まれる M20.7 の量を測定した。野生型 DPP-4 を発現するラットに比べて DPP-4 ペプチダーゼ活性欠損 (G633R) ラットの排泄物中から検出された M20.7 の量が約 20%減少していたことから、ラット体内での

M20.7 生成の約 20%に DPP-4 が寄与することが示唆された (He et al., 2009b)。以上の先行研究の結果から、ビルダグリプチンの主代謝経路である M20.7 の生成反応には、肝臓に発現する CYP 以外の酵素によって触媒されること、およびラットにおける M20.7 の生成の一部には DPP-4 が関与することが示唆されていたが、主代謝酵素は明らかになっていなかった。

以上の背景から、ヒトの肝臓におけるビルダグリプチン主代謝反応への DPP-4 の寄与率を解明すべきであると考えた。また、ビルダグリプチンから M20.7 への代謝反応はヒトの体内では稀なシアノ基の加水分解反応であることから、後述する nitrilase-like protein (NIT) が M20.7 の生成反応を触媒する可能性が考えられた。本章では、ヒト NIT およびヒト DPP-4 がビルダグリプチンの主代謝酵素であるか否かを明らかにするために、ヒトおよびマウスの肝臓サンプルと発現系を用いて行った *in vitro* 実験について述べる。

1-1. ビルダグリプチン主代謝反応へのヒト NIT の関与を明らかにするための *in vitro* 実験

ビルダグリプチンの主代謝反応は、ヒトの体内では稀なシアノ基の加水分解反応である。シアノ基の加水分解反応を触媒する既知の酵素としては、nitrilase が知られている (Pace and Brenner, 2001) (Figure 3)。Nitrilase は植物や細菌には発現が認められるが、ヒトを含めた多くの哺乳類には発現していない。一方、ヒトやマウスなどの哺乳類には nitrilase ファミリーに属する NIT (nitrilase-like protein) が発現している (Semba et al., 2006; Lin et al., 2007)。そこで、ヒト NIT がビルダグリプチンの主代謝反応であるシアノ基の加水分解反応に関与する可能性が考えられた。

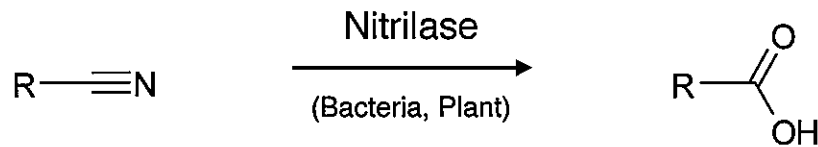


Figure 3. Enzymatic reaction of nitrile metabolism. Nitrilase catalyzes the hydration of nitriles to the corresponding acid.

1-1-1. ヒト NIT と他の動物種の nitrilase とのアミノ酸配列の相同性の比較

ヒト NIT には 2 つの分子種 NIT1、NIT2 が存在する (Semba et al., 2006; Lin et al., 2007)。はじめに、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST 解析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を使用して、ヒト NIT1 および NIT2 と細菌や植物に発現する nitrilase とのアミノ酸配列の相同性の比較を行った (Asakura et al., 2014)。細菌の *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110、*Pseudomonas putida*、*Rhodococcus rhodochros* および植物の *Arabidopsis thaliana* に発現する nitrilase のアミノ酸配列を鋳型として、NCBI database に登録されている全てのヒトタンパク質とのアミノ酸配列の相同性を比較した。また、マウスの組織を用いた実験を行うため、マウス NIT とヒト NIT とのアミノ酸配列の相同性の比較も行った。その結果、細菌や植物に発現する nitrilase とヒト NIT1 (NCBI accession number NP_005591.1) とヒト NIT2 (AAH20620.1) とのアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 25–30% と低かったが、全てのヒトタンパク質の中ではヒト NIT が最も nitrilase との相同性が高いことが明らかになった (Table 3)。また、マウス NIT1 はヒト NIT1 との相同性が 84% と高く、マウス NIT2 もヒト NIT2 との相同性が 89% と高いことが示された。以上の結果から、ヒトの体内で最も nitrilase との相同性が高い NIT が、ヒトにおけるビルダグリプチンの主代謝反応であるシアノ基の加水分解反応に関与する可能性が示唆された。

Table 3. Homology analysis of human NIT and nitrilase of other organisms.

Protein	Source	Accession No.	Amino acids	Human NIT1 Identity	Human NIT2 Identity
Bacteria					
Nitrilase	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	BAC48662.1	321	76/307 (25%)	72/287 (25%)
Nitrilase	<i>Pseudomonas putida</i>	WP_003257871.1	176	34/108 (31%)	47/162 (29%)
Nitrilase	<i>Rhodococcus rhodochros</i>	BAA01994.1	366	–	78/313 (25%)
Plant					
Nitrilase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_851011	346	81/321 (26%)	81/298 (27%)
Mammalia					
NIT1	Mouse	NP_036179	323	276/327 (84%)	106/281 (38%)
NIT2	Mouse	AAH20153	276	100/274 (36%)	246/276 (89%)
NIT1	Human	NP_005591.1	327	327/327 (100%)	100/274 (36%)
NIT2	Human	AAH20620.1	276	100/274 (36%)	276/276 (100%)

The accession number of the protein is derived from the NCBI protein database.

1-1-2. マウスの主要な臓器およびヒト肝臓における NIT タンパク質の発現解析

NIT1 と NIT2 がどの臓器に発現しているかを明らかにするために、マウスの 8 つの臓器 (心臓、肺、胃、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、大腸) の S9 画分を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、NIT1 と NIT2 は多くの臓器に発現しており、どちらも特に肝臓と腎臓に高く発現していることが明らかになった (Figure 4A) (Asakura et al., 2014)。このことから、NIT1 と NIT2 はどちらもビルダグリプチンの代謝に関与することが報告されている肝臓に高く発現していることが示された。

抗ヒト NIT1 抗体を用いてマウスの各臓器におけるマウス NIT1 タンパク質の発現量を評価したウェスタンブロット解析では、バンドが 2 本検出された (Figure 4A)。また、臓器ごとに 2 本のバンドの濃さが異なっており、心臓では低分子量側のバンドが濃く、その他の臓器では高分子量側のバンドが濃く検出された。そこで、抗ヒト NIT1 抗体で検出された 2 本のバンドが糖鎖修飾の違いにより生じたものであるか否かを評価するために、3 種類の glycosidase (PNGase F、O-glycosidase、neuraminidase) で処理をしたサンプルを用いたウェスタンブロット解析を行った。糖鎖修飾を切断する処理をしたマウス肝臓 S9 画分においてもバンドが 2 本検出されたことから、抗ヒト NIT1 抗体によって検出された 2 本のバンドは糖鎖修飾の違いにより生じたものではないことが示された (Figure 4B)。

抗ヒト NIT1 抗体によってバンドが 2 本検出された理由として、抗ヒト NIT1 抗体がマウス NIT2 に非特異的に反応している可能性が考えられた。そこで、抗ヒト NIT1 抗体のエピトープのアミノ酸配列とマウス NIT1 および NIT2 のアミノ酸配列との相同性を比較した (Asakura et al., 2014)。抗ヒト NIT1 抗体のエピトープのアミノ酸配列とマウス NIT1 中のアミノ酸配列との相同性は 81% と高かったが、マウス NIT2 とヒト NIT2 との相同性はそれぞれ 39%、46% と低いことが示された (Table 4)。これらの

結果から、抗ヒト NIT1 抗体は NIT2 と非特異的に反応しないことが示唆された。よって、本検討に用いた抗ヒト NIT1 抗体と抗ヒト NIT2 抗体は、それぞれマウス NIT1 とマウス NIT2 を特異的に検出していると判断した。抗ヒト NIT1 抗体によってバンドが 2 本検出された理由についての考察は、第 1 章 1-3 で述べる。

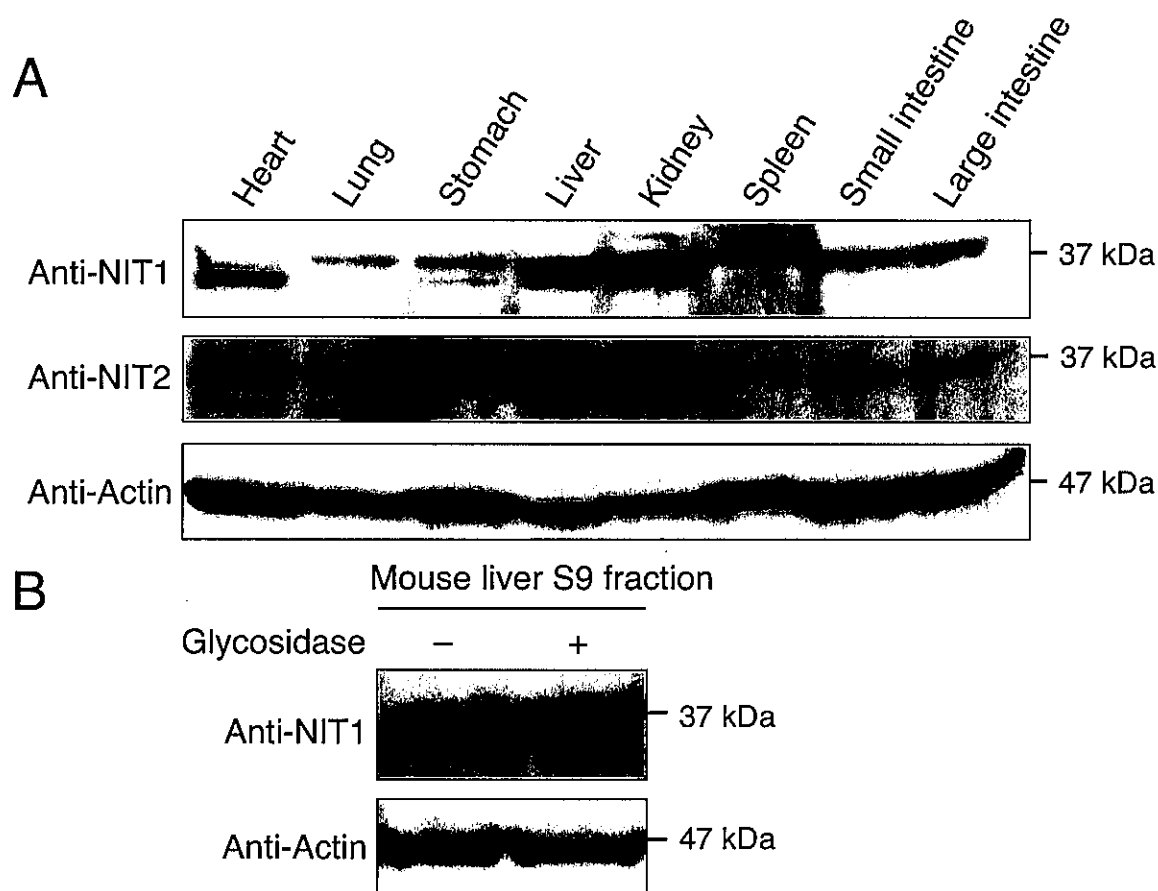


Figure 4. Characterization of NIT1 and NIT2 expression in mouse tissues (A) and deglycosylation of mouse NIT1 in the liver S9 fraction (B). (A) Mouse tissue S9 fraction (100 μ g of protein) were subjected to NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel and probed with the anti-NIT1 antibody and anti-NIT2 antibody, respectively. (B) Mouse liver S9 fraction (100 μ g) was treated with the PNGase F, O-glycosidase, and neuraminidase under native conditions for overnight at 37°C. The deglycosylated sample was subjected to NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel and probed with the anti-NIT1 antibody. Actin was used as protein loading control. The positions of the molecular weight markers are indicated.

Table 4. Homology analysis of epitope for anti-human NIT antibody, human NIT, and mouse NIT by BLASTP analysis.

Antibody	Epitope of amino acid sequence	Human NIT1 (NP_005591.1)	Human NIT2 (AAH20620.1)	Mouse NIT1 (NP_036179)	Mouse NIT2 (AAH20153)
		Identity			
Rabbit polyclonal anti-human NIT1 antibody (LS-C164881)	DLNYLRQLRRHLPVFQHRRPDLY GNLGHPLS	31/31 (100%)	11/24 (46%)	25/31 (81%)	9/23 (39%)
Rabbit polyclonal anti-human NIT2 antibody (PAB23095)	YLIGGSIPEEDAGKLYNTCAVFGP DGTLLAKYRKIHLFDIDVPGKITF QESKTLSPGDSFSTFTPYCRVGL GICYDMRFAELAQIYAQ	34/81 (42%)	89/89 (100%)	34/81 (42%)	84/89 (94%)

Homology analysis of epitope for anti-human NIT antibody, human NIT, or mouse NIT was performed using BLAST. The BLAST searches used the BLASTP algorithm with the BLOSUM62 scoring matrix. The amino sequences of human NIT1 (NCBI accession number NP_005591.1), human NIT2 (AAH20620.1), mouse NIT1 (NP_036179), and mouse NIT2 (AAH20153) were used as human NIT or mouse NIT for this homology analysis.

次に、ヒトとマウスの肝臓サンプル (S9 画分、サイトゾル画分、ミクロソーム画分) を用いたウェスタンブロット解析を行い、NIT タンパク質の発現が高い画分を調査した。その結果、NIT1 と NIT2 はヒトの肝臓にも発現していること、およびヒトとマウスのどちらにおいてもミクロソーム画分よりも、サイトゾル画分に NIT タンパク質が多く発現していることが明らかになった (Figure 5)。以上より、ヒト NIT1 と NIT2 タンパク質はビルダグリプチンの代謝に寄与することが報告されている肝臓に発現していること、および *in vitro* 実験で NIT の酵素活性を評価する上では S9 画分またはサイトゾル画分を使用すべきであることが示された (Asakura et al., 2014)。

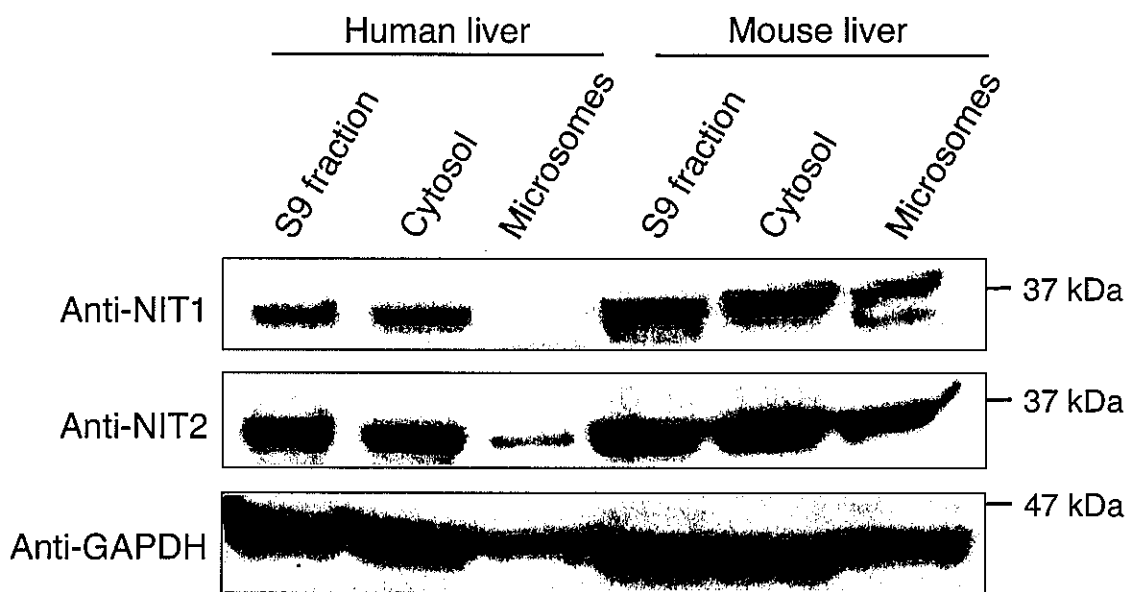


Figure 5. Western blot analysis of human NIT and mouse NIT expression in liver samples. Human liver samples (100 μ g of protein) and mouse liver samples (100 μ g of protein) were subjected to NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel and probed with the anti-NIT1 antibody and anti-NIT2 antibody, respectively. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as protein loading control. The positions of the molecular weight markers are indicated.

1-1-3. 発現系を用いたヒト NIT のビルダグリプチン代謝能の評価

NIT1 および NIT2 が肝臓に多く発現していることが示されたことから、M20.7 の生成に NIT が関与する可能性が考えられた。そこで、ヒト胎児腎細胞株である human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞にヒト NIT1 または NIT2 を過剰発現させた発現系 (HEK/NIT1、HEK/NIT2) を構築し、ヒト NIT1 および NIT2 がビルダグリプチン代謝能を有するか否かを明らかにするための検討を行った。ウェスタンブロット解析の結果から、構築した HEK/NIT1 と HEK/NIT2 はコントロールの mock 細胞と比較して NIT1 と NIT2 タンパク質を過剰に発現していることが示された (Figure 6A)。また、NIT1 の特異的な基質は明らかとなっていないため酵素活性を評価することができなかったが、酵素活性を評価する実験系が確立 (Krasnikov et al., 2009; Chien et al., 2012) している NIT2 については、succinamic acid を基質として NIT2 酵素活性の評価も行った。Mock 細胞、HEK/NIT1、HEK/NIT2 の S9 画分における NIT2 酵素活性は、それぞれ 10 ± 7.2 、 11 ± 2.3 および 250 ± 4.4 nmol/min/mg protein であった (Figure 6B)。Mock 細胞および HEK/NIT1 と比較して、HEK/NIT2 において著しく高い NIT2 活性が認められたことから、HEK/NIT2 は機能的なヒト NIT2 タンパク質を過剰に発現していることが示された (Asakura et al., 2014)。

HEK/NIT1 と HEK/NIT2 の S9 画分を用いてビルダグリプチンを基質とした代謝実験を行い、生成した代謝物 M20.7 を液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) で定量し M20.7 生成活性を算出することで、ヒトの NIT1 と NIT2 のビルダグリプチン代謝能を評価した。Mock 細胞、HEK/NIT1、HEK/NIT2 の S9 画分における M20.7 生成活性は、それぞれ 0.30 ± 0.2 、 0.39 ± 0.2 および 0.29 ± 0.1 pmol/h/mg protein であった (Figure 6C)。HEK/NIT1 と HEK/NIT2 の S9 画分には各分子種のヒト NIT タンパク質が過剰に存在するにもかかわらず

わらず、どちらも mock 細胞と同程度の M20.7 生成活性しか示さなかった。以上の結果から、ヒトの NIT1 と NIT2 は M20.7 の生成に関与することが報告されている肝臓に高く発現しているが、ビルダグリプチンの主代謝反応を触媒しないことが明らかとなった (Figure 5 and 6) (Asakura et al., 2014)。

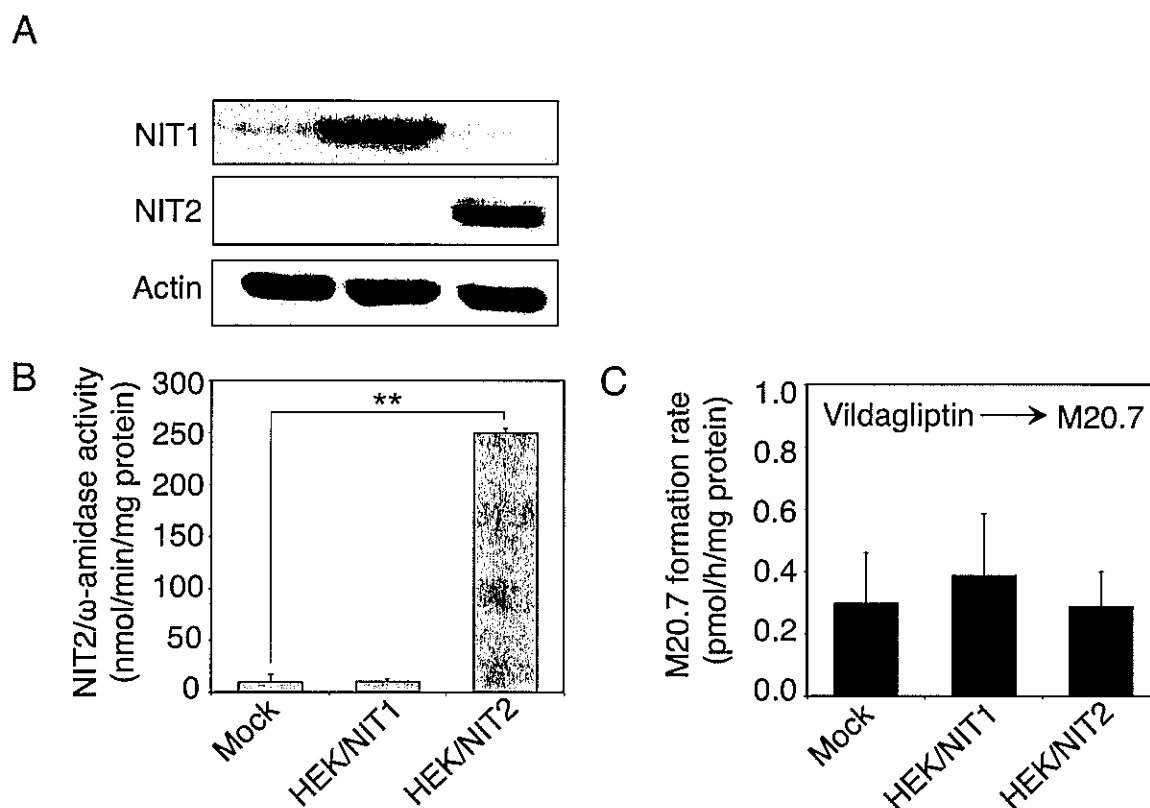


Figure 6. The protein expression level of NIT1 and NIT2 (A), the NIT2/ ω -amidase activity measured by a succinamic acid as a substrate (B), and the vildagliptin cyano group-hydrolyzing activity (C) of Mock-, NIT1-, and NIT2-transfected HEK293 cells. Data represent the means \pm S.D. of triplicate determinations. **, $P < 0.01$.

1-2. ビルダグリプチン主代謝反応における DPP-4 の寄与率を明らかにするための *in vitro* 実験

前述した DPP-4 ペプチダーゼ活性欠損 (G633R) ラットを用いた実験結果をもとに、ヒトにおけるビルダグリプチン主代謝反応への DPP-4 の関与も、ラットと同様に一部であると考えられていた。しかし、実際にヒトにおける DPP-4 の寄与率を明らかにするための試みは報告されていなかった。そこで、ビルダグリプチン主代謝反応への DPP-4 の寄与率を明らかにするために、発現系およびヒトにおけるビルダグリプチンの代謝に関与することが報告されている肝臓を用いた検討を行った。

1-2-1. 発現系を用いたヒト DPP-4 のビルダグリプチン代謝能の評価

ヒト DPP-4 がビルダグリプチン代謝能を有するか否かを明らかにするために、ヒト DPP-4 を HEK293 細胞に過剰発現させた発現系 (HEK/DPP-4) を用いた *in vitro* 実験を行った。ウェスタンブロット解析の結果から、構築した HEK/DPP-4 において mock 細胞に比べて著しく高いヒト DPP-4 タンパク質の発現が認められた (Figure 7A)。HEK/DPP-4 においてバンドが 2 本検出されたが、3 種類の glycosidase (PNGase F、O-glycosidase、neuraminidase) で処理をして糖鎖を切断したサンプルではバンドが 1 本のみ検出された (Figure 7B)。このことから、HEK/DPP-4 において認められた 2 本のバンドはどちらもヒト DPP-4 由来であり、非特異的なバンドではないことが示された。また、DPP-4 選択的な合成基質である glycyl-prolyl-7-amino-4-methylcoumarin (Gly-Pro-AMC) を用いて測定した DPP-4 ペプチダーゼ活性は、mock 細胞に比べて HEK/DPP-4 の S9 画分で高かったことから、HEK/DPP-4 は機能的なヒト DPP-4 タンパク質を過剰に発現していることが示された (Figure 7C)。そこで、mock 細胞または HEK/DPP-4 の S9 画分に対してビルダグリプチンを基質として反応させ、生成した M20.7 を LC-MS/MS で定量することで M20.7 生成活性を算出し、ビルダグリプチン

代謝活性を評価した。HEK/DPP-4 において、mock 細胞に比べて著しく高い M20.7 生成活性が認められたことから、ヒトの DPP-4 がビルダグリプチン代謝能を有することが明らかになった (Figure 7D) (Asakura et al., 2015a)。

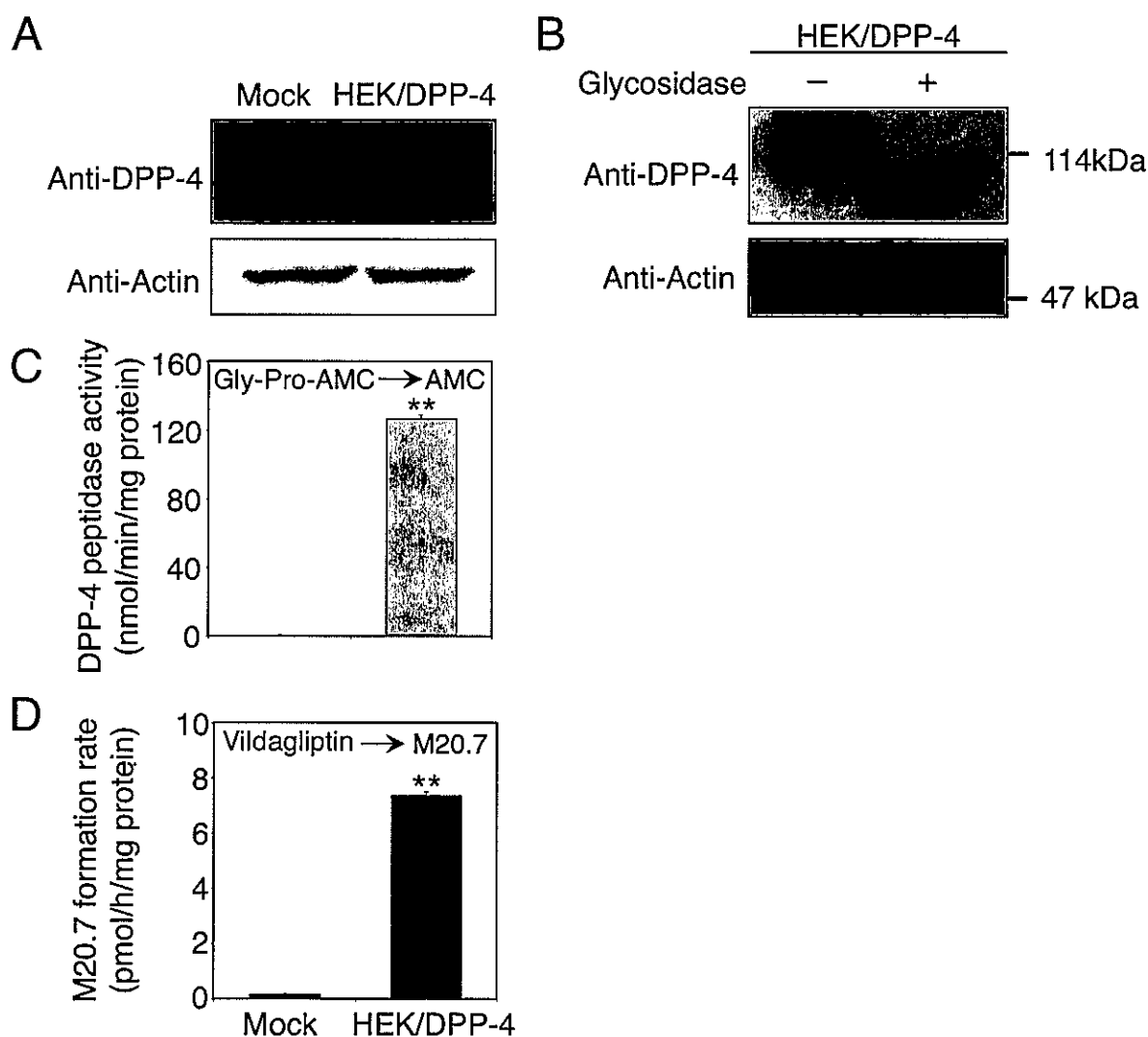


Figure 7. The protein expression level of human DPP-4 (A and B), the DPP-4 peptidase activity measured by using the synthetic substrate Gly-Pro-AMC (C), and the vildagliptin cyano group-hydrolyzing activity (D) of Mock- and human DPP-4-transfected HEK293 cells. Data represent the means \pm S.D. of triplicate determinations. **, $P < 0.01$.

1-2-2. 肝臓におけるビルダグリプチン代謝活性と DPP-4 ペプチダーゼ活性の相関性

M20.7 生成反応を触媒する酵素が多く含まれる肝臓画分を明らかにするために、ビルダグリプチンを基質として、ヒト肝臓サンプル (S9 画分、サイトゾル画分、ミクロソーム画分) の M20.7 生成活性を評価した。また、ヒトと同様に M20.7 を主代謝物として生成するマウスとラットの肝臓サンプルの M20.7 生成活性も合わせて評価した。M20.7 の生成は、マウス、ラットおよびヒトの全ての肝画分で認められた (Figure 8A)。また、全ての動物種において肝臓のサイトゾル画分と比較してミクロソーム画分において高い M20.7 生成活性が認められた (Figure 8A)。このことから、肝臓のサイトゾル画分よりもミクロソーム画分に多く含まれる酵素が M20.7 の生成反応に大きく寄与することが明らかになった (Asakura et al., 2015a)。

次に、マウス、ラットおよびヒトの肝臓サンプル (S9 画分、サイトゾル画分、ミクロソーム画分) に含まれる DPP-4 タンパク量を評価するために、Gly-Pro-AMC を用いた DPP-4 ペプチダーゼ活性の測定およびウェスタンブロット解析を行った。その結果、マウス、ラットおよびヒトのいずれの肝臓サンプルにおいても DPP-4 ペプチダーゼ活性および DPP-4 タンパク質のバンドが認められ、肝臓のサイトゾル画分よりもミクロソーム画分に DPP-4 が多く存在することが明らかになった (Figure 8B and 8C)。そこで、各動物種 (ヒト、マウス、ラット) の 3 種類の肝画分 (S9 画分、サイトゾル画分、ミクロソーム画分) から得られた M20.7 生成活性と DPP-4 ペプチダーゼ活性について相関解析を行った。その結果、9 つの肝臓サンプルにおける M20.7 生成活性と DPP-4 ペプチダーゼ活性との間に著しく高い正の相関関係が認められた ($R_s = 0.917$, $P < 0.01$) (Figure 9)。さらに、M20.7 生成活性および DPP-4 ペプチダーゼ活性と DPP-4 タンパク質のバンド強度も相関していた (Figure 8C)。以上より、肝臓における M20.7 の生成に DPP-4 が大きく寄与する可能性が示された (Asakura et al., 2015a)。

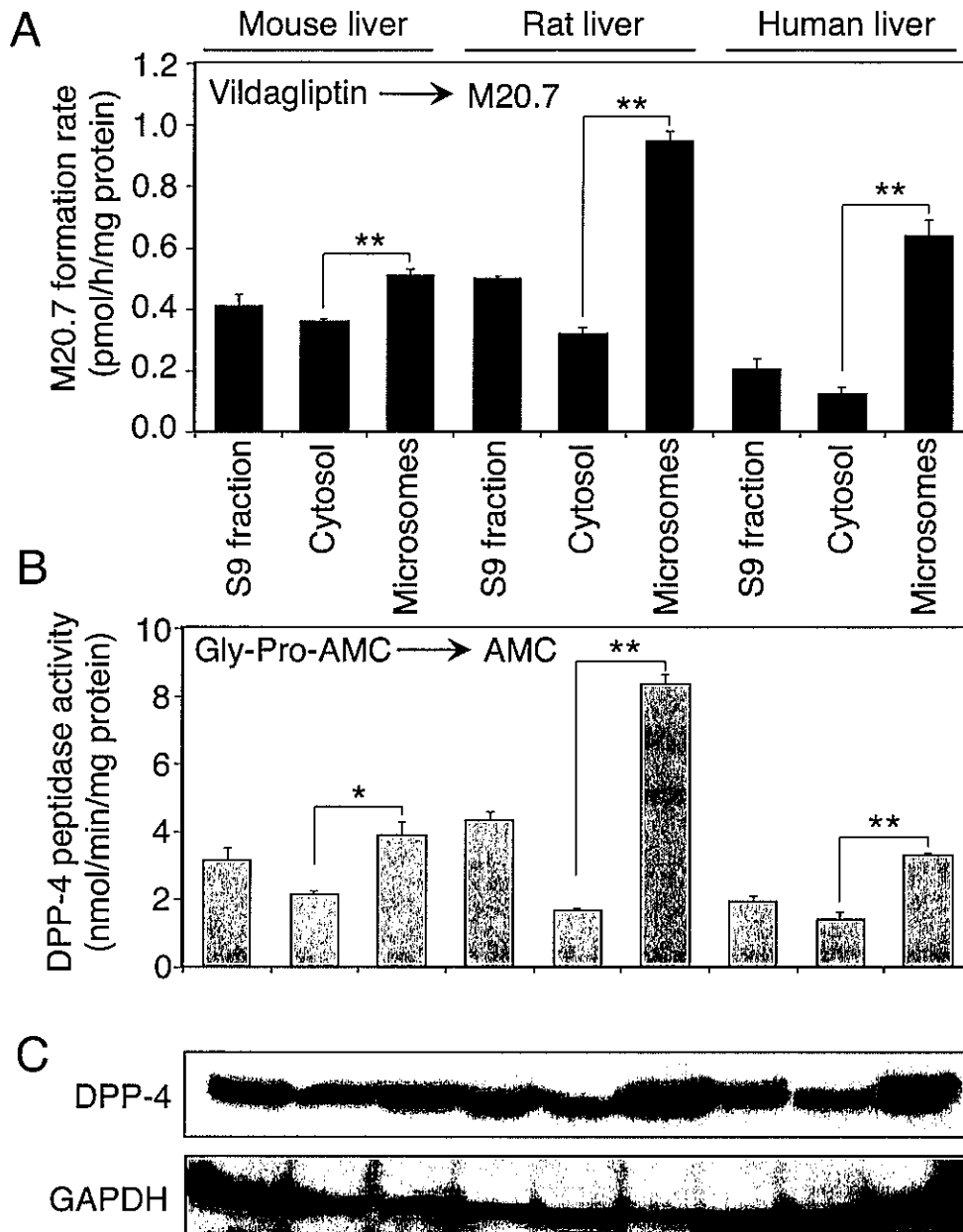


Figure 8. Vildagliptin cyano group-hydrolyzing activity (A), the DPP-4 peptidase activity measured by using the synthetic substrate Gly-Pro-AMC (B), and protein expression levels of DPP-4 (C) in mouse, rat, and human liver samples. (A) The substrate concentration was 10 μ M. Data represent the means \pm S.D. of triplicate determinations. **, $P < 0.01$. (B) Data represent the means \pm S.D. of triplicate determinations. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. (C) Mouse, rat, and human liver samples (100 μ g of protein) were subjected to NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel and probed with the anti-human DPP-4 antibody (AF1180). GAPDH was used as the protein loading control.

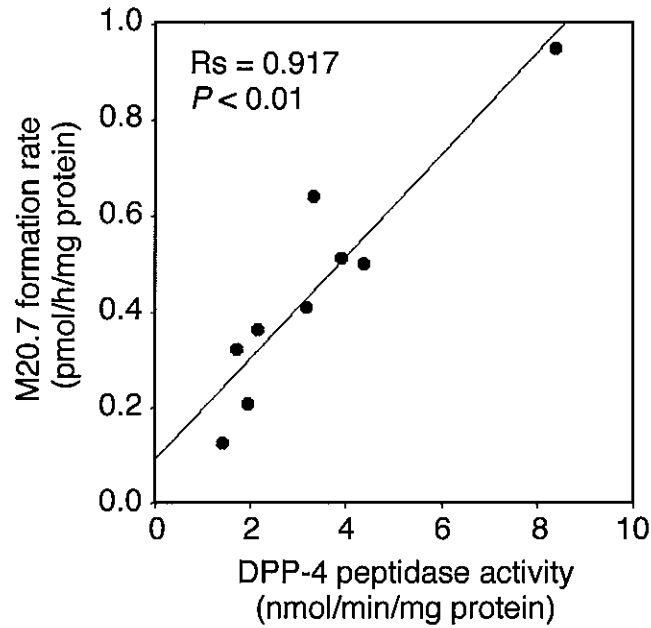


Figure 9. Correlation between M20.7 formation rates and DPP-4 peptidase activities in the liver samples. Data represent the means of triplicate determinations.

1-2-3. ビルダグリプチンに対するヒト肝臓サンプルとヒト DPP-4 の K_m 値の比較

ヒトの肝臓における M20.7 の生成反応に対する DPP-4 の寄与をさらに評価するために、ビルダグリプチンに対するヒト肝臓サンプル (S9 画分、サイトゾル画分、ミクロソーム画分) およびヒト DPP-4 発現系の K_m 値を算出した。 K_m 値は、基質と酵素との親和性を示す速度論的パラメータであり、ビルダグリプチンを基質とした濃度依存的な代謝実験から得られた基質濃度-時間曲線と Eadie-Hofstee plot を用いて算出した (Figure 10 and 11)。ヒト DPP-4 発現系の K_m 値は、HEK/DPP-4 の各基質濃度における M20.7 生成活性から mock 細胞の活性を差し引いた値を、真のヒト DPP-4 (hDPP-4) の M20.7 生成活性として算出した。算出されたビルダグリプチンに対するヒト肝臓 S9 画分、サイトゾル画分、ミクロソーム画分および hDPP-4 の K_m 値をそれぞれ Table 5 にまとめた。ヒト肝臓の S9 画分、サイトゾル画分、ミクロソーム画分の M20.7 生成

活性における Eadie-Hofstee plot は全て二相性を示した (Figure 11A)。また、hDPP-4 の M20.7 生成活性における Eadie-Hofstee plot も二相性を示した (Figure 11B)。ヒト肝臓の S9 画分、サイトゾル画分、ミクロソーム画分の高親和性部位における K_m 値はそれぞれ 1.95、2.34、0.75 μM であり、hDPP-4 の K_m 値 0.62 μM と近い値を示した (Table 5)。様々な酵素を含む肝臓サンプルのビルダグリプチンに対する K_m 値がヒト DPP-4 発現系の K_m 値と近い値を示したことから、本検討においてもヒト肝臓における M20.7 の生成には DPP-4 が大きく寄与することが示された (Asakura et al., 2015a)。

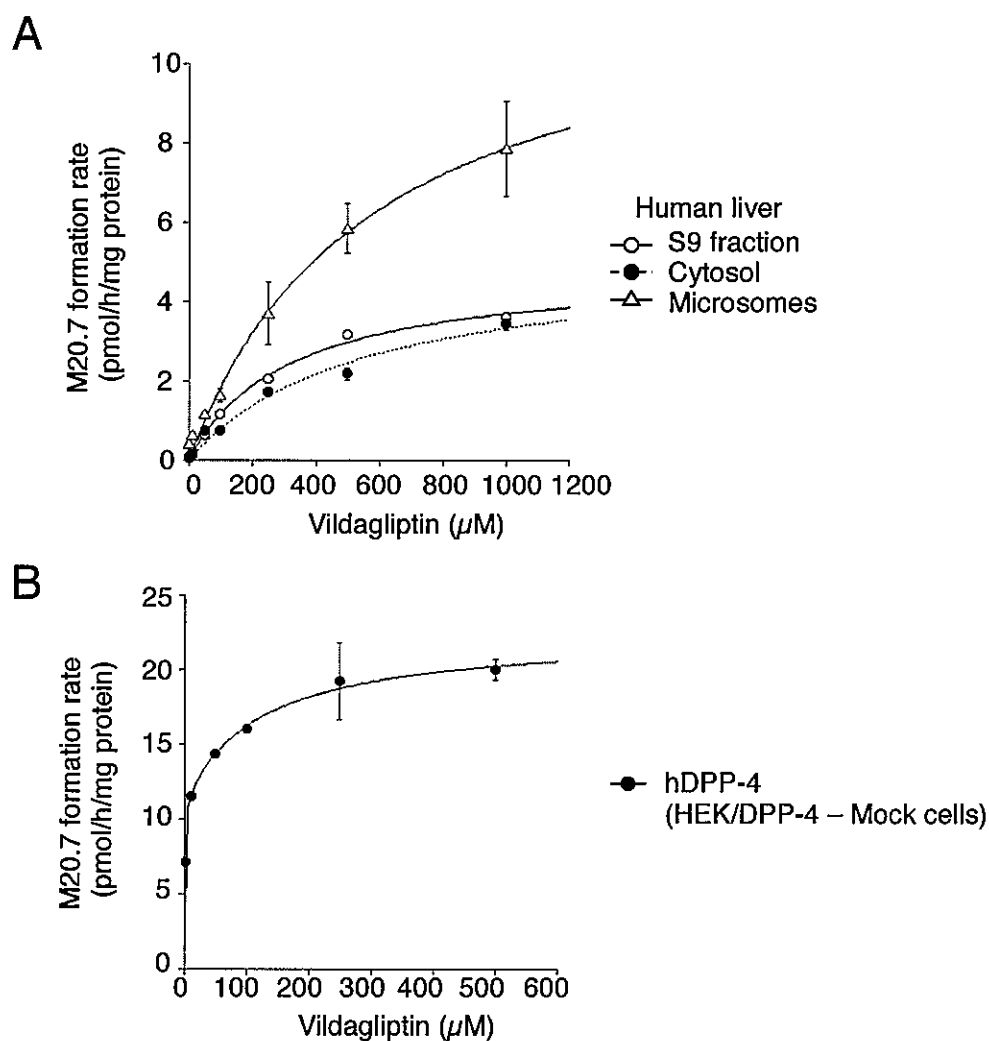


Figure 10. The substrate concentration-velocity curves of vildagliptin cyano group-hydrolyzing activities in human liver samples (A) and hDPP-4 (B). Data represent the means \pm S.D. of triplicate determinations.

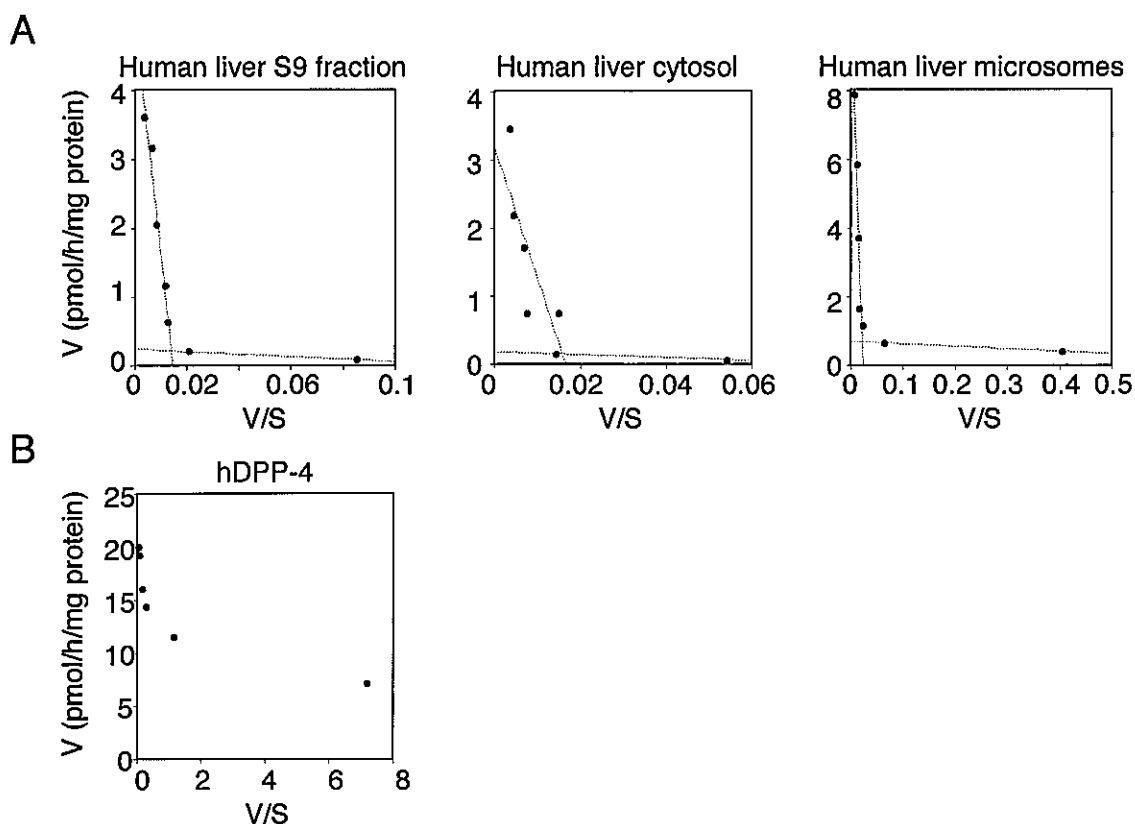


Figure 11. Eadie-Hofstee plots of the vildagliptin cyano group-hydrolyzing activities in human liver samples (A) and hDPP-4 (B). V is the initial velocity of the reaction. S is the substrate concentration. Each data point represents the mean of three independent experiments.

Table 5. Kinetic parameters of vildagliptin cyano group-hydrolyzing activity.

Enzyme source	Affinity site	K_m	V_{max}
		μM	pmol/h/mg protein
Human liver S9 fraction ^a	High	1.95 ± 0.57	0.25 ± 0.04
	Low	335 ± 10	4.97 ± 0.10
Human liver cytosol ^a	High	2.34 ± 0.96	0.18 ± 0.04
	Low	189 ± 5	3.18 ± 0.07
Human liver microsomes ^a	High	0.75 ± 0.42	0.69 ± 0.08
	Low	448 ± 104	10.8 ± 2.8
hDPP-4 ^b	High	0.62 ± 0.10	11.4 ± 0.8
	Low	151 ± 71	11.5 ± 1.6

^aCalculated from Eadie-Hofstee plots.

^bCalculated using a biphasic equation.

1-2-4. ヒト肝臓におけるビルダグリプチン主代謝反応への DPP-4 の寄与率の算出

ヒト肝臓におけるビルダグリプチン主代謝反応への DPP-4 の寄与率を明らかにするために、DPP-4 の選択的阻害剤であるシタグリプチンを用いたビルダグリプチンの代謝阻害実験を行った。この代謝阻害実験では、シタグリプチンを共存させることによって低下する M20.7 生成活性を評価することで、M20.7 生成反応への DPP-4 の寄与率を明らかにすることができる。ヒト肝臓 S9 画分の M20.7 生成活性は、共存させるシタグリプチンの濃度依存的に阻害された (Figure 12A)。そして、DPP-4 を過剰に発現する HEK/DPP-4 の M20.7 生成活性が約 90%阻害される高濃度 (1,000 μM) のシタグリプチン共存下においてヒト肝臓 S9 画分の活性が 40%まで低下したことから、ヒトの肝臓における M20.7 生成反応への DPP-4 の寄与率は約 60%と大きいことが明らかになった (Asakura et al., 2015a)。

また、マウスとラットの肝臓 S9 画分における M20.7 生成反応への DPP-4 の寄与率も同様の代謝阻害実験を行い評価した。マウスおよびラットの肝臓 S9 画分の M20.7 生成活性はシタグリプチンの濃度依存的に阻害され、高濃度 (1,000 μM) のシタグリプチン共存下において、それぞれ約 50%、約 10%まで阻害された (Figure 12A)。このことから、マウスとラットの肝臓における M20.7 生成反応への DPP-4 の寄与率はそれぞれ約 50%および約 90%と大きいことが明らかになった (Asakura et al., 2015a)。

ヒトの肝臓における M20.7 生成反応の 40%には DPP-4 以外の酵素が関与する可能性が示唆された。他の DPP-4 阻害薬であるアナグリプチンの消失経路には、腎臓からの未変化体の排泄が 51%と大きく寄与するが、一部 (29%) にはシアノ基の加水分解反応による不活性化が関与する (Furuta et al., 2013)。そのアナグリプチンのシアノ基の加水分解反応には、carboxylesterase (CES)と butyrylcholinesterase が関与することが報告されている (Furuta et al., 2013)。そこで、CES と butyrylcholinesterase の選択的阻

害剤である bis(p-nitrophenyl) phosphate (BNPP) と ethopropazine を用いたヒト肝臓 S9 画分におけるビルダグリプチン主代謝反応の代謝阻害実験を行った。その結果、1,000 μM の BNPP および ethopropazine 共存下においてもヒト肝臓 S9 画分における M20.7 生成活性は阻害されなかったことから、ビルダグリプチンのシアノ基の加水分解反応には CES と butyrylcholinesterase は関与しないことが示された (Figure 12B)。

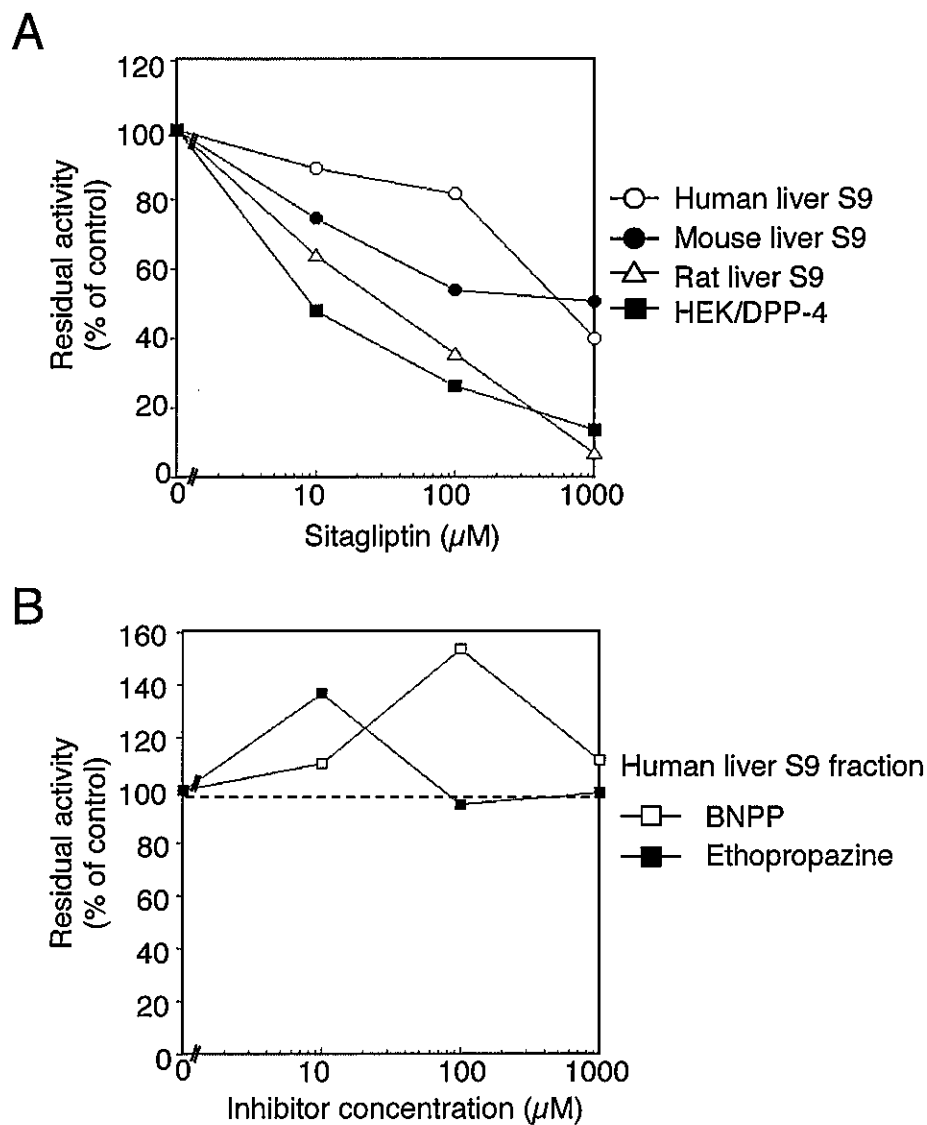


Figure 12. Inhibition study of vildagliptin cyano group-hydrolyzing activity. The substrate concentration was 10 μM . Data represent the means of triplicate determinations.

1-2-5. ヒト DPP-4 遺伝子多型のビルダグリプチン代謝能への影響

これまでの検討から、ヒトにおけるビルダグリプチンの主代謝酵素は DPP-4 であることが示された。そこで、DPP-4 の遺伝子多型によるビルダグリプチン代謝能への影響を明らかにするため、ヒト DPP-4 のアミノ酸配列の変異を伴う一塩基多型 (single-nucleotide polymorphism, SNP) の中で最も頻度が高かった 623 番目のアルギニンがグルタミンに変異した R623Q 変異体 (rs147614497, allele frequency = 0.0248, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, 2013 年 12 月) の発現系 (HEK/R623Q) を構築し、ビルダグリプチン代謝能の評価を行った。ウェスタンブロット解析の結果から、構築した HEK/R623Q は mock 細胞に比べ著しく高く、HEK/DPP-4 と同程度のヒト DPP-4 タンパク質を発現していることが示された (Figure 13A)。DPP-4 ペプチダーゼ活性を測定したところ、mock 細胞、HEK/DPP-4、HEK/R623Q の活性は、それぞれ 1.2 ± 0.1 、 134 ± 5.3 、 132 ± 6.2 nmol/min/mg protein であった (Figure 13B)。HEK/R623Q は HEK/DPP-4 と同程度の DPP-4 ペプチダーゼ活性を示したため、R623Q の変異は DPP-4 ペプチダーゼ活性には大きな影響を及ぼさないことが明らかになった (Figure 13B)。

一方で、mock 細胞、HEK/DPP-4、HEK/R623Q の M20.7 生成活性は、それぞれ 0.18 ± 0.01 、 7.4 ± 0.2 、 5.2 ± 0.1 pmol/h/mg protein であり、HEK/R623Q の M20.7 生成活性は HEK/DPP-4 の活性よりも有意に低下した ($P < 0.01$) (Figure 13C)。以上より、R623Q 変異体のようなアミノ酸配列に変異が生じる DPP-4 の遺伝子多型は、DPP-4 ペプチダーゼ活性は変化しないもののビルダグリプチンの血中濃度の個人差の要因となる可能性が示された (Asakura et al., 2015a)。

1-2-6. ヒト DPP-4 の活性部位 Ser630 のビルダグリプチン主代謝反応への関与

ビルダグリプチンは、DPP-4 の酵素活性部位の Ser630 と不安定な共有結合を形成することで DPP-4 阻害作用を発揮すると考えられている (Ahrén et al., 2011; Nabeno et al., 2013)。その DPP-4 との不安定な共有結合はビルダグリプチンのシアノ基を介して形成されるため、シアノ基の加水分解体である M20.7 の生成には DPP-4 の Ser630 が重要な役割を担うことが仮説として考えられていた (He et al., 2009a; He et al., 2009b; Ahrén et al., 2011)。しかし、M20.7 生成反応への Ser630 の重要性を証明する実験データは存在しなかった。そこで、ヒト DPP-4 の Ser630 をアラニンに変異させた S630A 変異体の発現系 (HEK/S630A) を用いた *in vitro* 実験を行った。ウェスタンブロット解析の結果から、構築した HEK/S630A は mock 細胞に比べ著しく高く、HEK/DPP-4 よりも高く DPP-4 タンパク質を発現していることが示された (Figure 13A)。そして、HEK/S630A は過剰に DPP-4 タンパク質を発現しているにもかかわらず mock 細胞と同程度の DPP-4 ペプチダーゼ活性しか示さず、過去の報告 (Tanaka et al., 1993) 通り DPP-4 ペプチダーゼ活性が欠損していることが示された (Figure 13B)。その HEK/S630A の M20.7 生成活性は、mock 細胞と同程度であり、S630A 変異体はビルダグリプチン代謝能を示さないことが本検討により新たに明らかとなった (Figure 13C)。このことから、DPP-4 によるビルダグリプチンの代謝にはインクレチンなどを分解する DPP-4 ペプチダーゼ活性と同様に、DPP-4 の酵素活性部位である Ser630 が重要な役割を担うことが示された (Asakura et al., 2015a)。

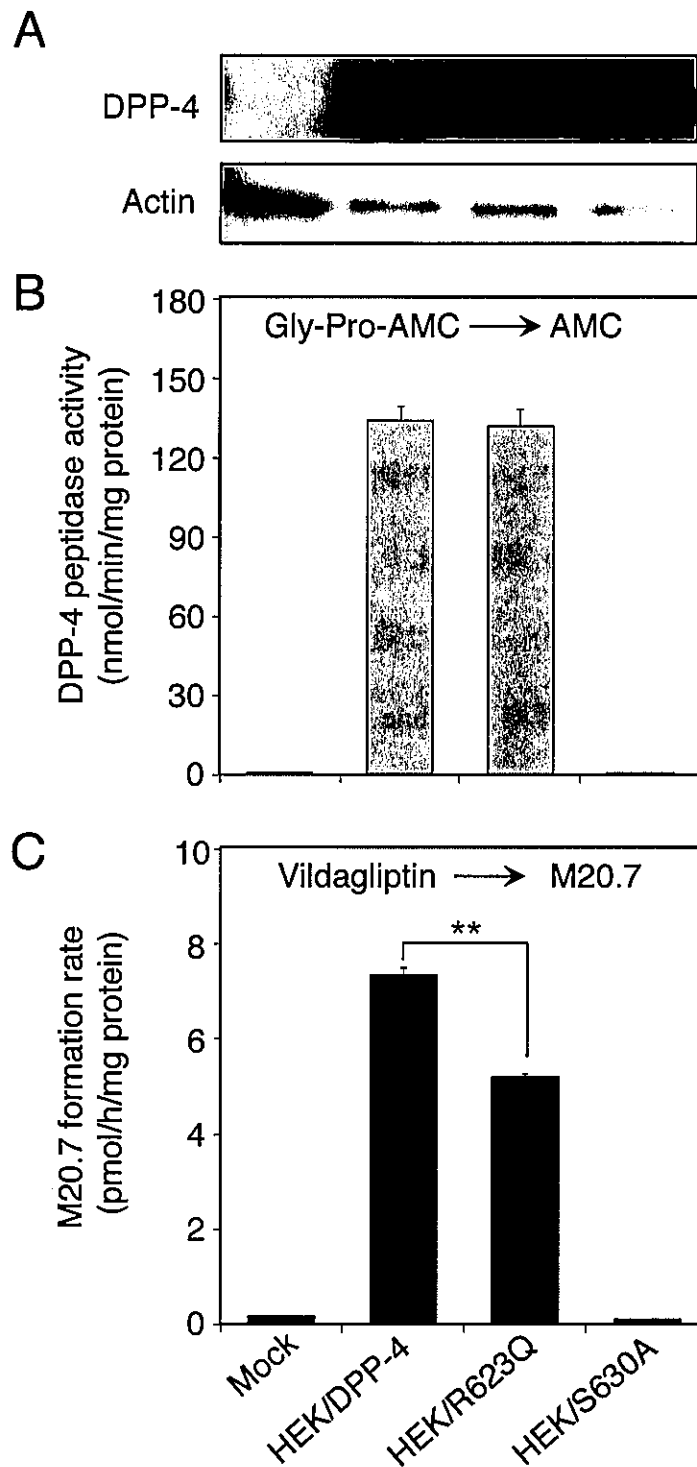


Figure 13. The protein expression level of human DPP-4 (A), the DPP-4 peptidase activity measured by using the synthetic substrate Gly-Pro-AMC (B), and the vildagliptin cyano group-hydrolyzing activity (C) of Mock cells, HEK/DPP-4, HEK/R623Q, and HEK/S630A. Data represent the means \pm S.D. of triplicate determinations. **, $P < 0.01$.

1-3. 考察

第1章では、ヒト NIT とヒト DPP-4 がビルダグリプチンの主代謝酵素であるか否かを明らかにするための *in vitro* 実験を行った。はじめに M20.7 生成反応がシアノ基の加水分解反応であることから、NIT に着目した検討を行った。ウェスタンブロット解析の結果から、ヒト NIT1 および NIT2 はどちらも肝臓に高く発現していることが示された (Figure 5)。M20.7 生成能を示すことが報告されていた肝臓に多く発現していたことから、ビルダグリプチンの主代謝反応にヒト NIT が関与することが考えられたが、発現系を用いた *in vitro* 実験によりヒト NIT は M20.7 の生成反応を触媒しないことが明らかになった (Figure 6)。近年は薬物相互作用を回避するために、CYP を介さずに UDP-グルクロン酸転移酵素 (uridine diphosphate glucuronosyltransferase, UGT) や加水分解酵素などの non-CYP 代謝酵素により代謝される化合物が医薬品として開発される傾向があり、non-CYP 代謝酵素に着目した研究が盛んに行われている (Nagai, 2010; Fukami and Yokoi, 2012)。NIT1 や NIT2 は未だに生体内における機能について不明な点が多い酵素であり、NIT が薬物代謝酵素として機能する可能性について検討したのは本研究がはじめてである。NIT1 や NIT2 はビルダグリプチンの代謝反応を触媒しないことが明らかとなったが、ヒトの肝臓に多く発現していたことから薬物代謝酵素として機能する可能性は十分にあると考えられる。本研究で得られた NIT に関する成果は、今後行われる non-CYP 代謝酵素に着目した研究に応用されることが期待される。

抗ヒト NIT1 抗体を用いたウェスタンブロット解析では、マウスの様々な臓器においてバンドが2本検出された (Figure 4A)。Glycosidase 処理により糖鎖を切断したマウス肝臓 S9 画分においてもバンドが2本検出されたことから、抗ヒト NIT1 抗体によって検出された2本のバンドは糖鎖修飾の違いにより生じたものではないことが示さ

れた (Figure 4B)。抗ヒト NIT1 抗体がマウスの NIT2 に反応している可能性が考えられたが、抗ヒト NIT1 抗体のエピトープのアミノ酸配列とマウスおよびヒト NIT2 との相同性は低く (Table 4)、実際に抗ヒト NIT1 抗体は HEK/NIT2 に過剰に発現しているヒト NIT2 タンパク質を認識しなかったことから (Figure 6A)、抗ヒト NIT1 抗体は NIT2 と非特異的に反応しないことが示された。一方で、マウス NIT1 には 2 つの transcript variant が存在し、マウス NIT1 transcript variant 1 (NCBI accession number NM_012049.2) の方がマウス NIT1 transcript variant 2 (NM_001242580.1) よりもアミノ酸配列が長いことが報告されている。このことから、抗ヒト NIT1 抗体はマウス臓器中のマウス NIT1 transcript variant 1 と transcript variant 2 のどちらも反応したためにウェスタンブロット解析でバンドが 2 本検出されたと考えられ、それぞれのマウス NIT1 の transcript variant の発現量の臓器間の差によって、バンドの濃さが変化したことが示唆された。NIT1 は未だに生体内における機能について不明な点が多い酵素であることから、この大変興味深い知見が NIT1 の機能解明に繋がることが期待される。

ヒト DPP-4 に着目した検討では、シタグリプチンを用いた代謝阻害実験の結果からビルダグリプチンの主要な代謝臓器である肝臓において DPP-4 が M20.7 生成反応の約 60% に寄与することを見出した (Figure 12A)。このことから、ビルダグリプチンの薬効の標的分子である DPP-4 が、M20.7 の生成反応を触媒する主要な酵素であることが明らかとなった (Asakura et al., 2015a)。DPP-4 は肝臓のみならず小腸や腎臓などの全身に広く分布することから、ヒトの全身において DPP-4 が M20.7 の生成に寄与することが考えられる。よって、ヒトの全身における M20.7 の生成に対する DPP-4 の寄与率は 60% よりも大きいと予想される (Asakura et al., 2015b)。In vivo における M20.7 の生成に対する DPP-4 の寄与率や、ビルダグリプチンの主代謝反応に関与する臓器についての検討は第 2 章で述べる。

シタグリプチンを用いた代謝阻害実験の結果からは、ヒトの肝臓における M20.7 生成反応の 40%には DPP-4 以外の酵素が関与する可能性が示唆された (Figure 12A)。そこで、さらに代謝阻害実験を行ったところ、CES や butyrylcholinesterase は M20.7 生成反応に関与しないことが示された (Figure 12B)。よって、ヒトの肝臓における M20.7 生成反応には DPP-4 が 60%と大きく寄与し、残りの 40%には CES や butyrylcholinesterase 以外の酵素が関与する可能性が示された。臨床においては、DPP-4 がビルダグリプチンの主代謝酵素として機能すると考えられるが、動物実験における種差を十分に理解するためには、M20.7 の生成に関与する DPP-4 以外の酵素が解明されることが望まれる。

ビルダグリプチンに対するヒト肝臓サンプルとヒト DPP-4 (hDPP-4) の K_m 値の比較において、ヒトの肝臓サンプルと hDPP-4 のどちらの活性でも二相性が認められた (Figure 11)。代謝反応が二相性を示す理由は、反応に 2 つの酵素が関与することや、1 つの酵素に 2 つの基質結合部位が関与することが考えられる。ヒトの肝臓サンプルには様々な代謝酵素が存在するために、2 つの酵素の関与と、2 つの基質結合部位の関与のどちらも考慮する必要がある。一方で、hDPP-4 については、理論上は DPP-4 以外の酵素の関与は除外できることから、DPP-4 にはビルダグリプチンを代謝する際の基質結合部位が 2 つ存在する可能性が示唆されたが、本研究において DPP-4 によるビルダグリプチンの代謝には DPP-4 の酵素活性部位の Ser630 が必須であることが明らかとなった (Figure 13C)。このことから、DPP-4 による M20.7 の生成反応には、ビルダグリプチンのシアノ基と不安定な共有結合を形成する Ser630 が重要な役割を担うこと、および 2 つの基質結合部位が関与する可能性は低いことが示された。DPP-4 には膜結合型と可溶型が存在し、どちらもペプチダーゼ活性を有することが報告されている (Durinx et al., 2000)。そのため、この膜結合型と可溶型の 2 種類の DPP-4 のビ

ルダグリプチンに対する親和性に違いが存在し、二相性を示した可能性が考えられる。本研究を通して、DPP-4 によるビルダグリプチンの代謝反応は、ヒトの体内では稀なシアノ基の加水分解反応であることに加えて、その反応機構に不安定な共有結合が関与すること、そして薬効の標的分子が薬物の代謝を担うことなど、興味深い薬物代謝反応であることを示すことができた。

ヒト DPP-4 の変異体の発現系を用いた検討から、ヒト DPP-4 の SNP として報告されている R623Q の変異は DPP-4 ペプチダーゼ活性には影響を及ぼさないが、ビルダグリプチン代謝活性を低下させるという興味深い結果が得られた (Figure 13)。また、DPP-4 によるビルダグリプチン代謝反応には DPP-4 ペプチダーゼ活性と同様に酵素活性部位の Ser630 が必須であることを明らかにした (Figure 13)。Arg623 (R623) は DPP-4 の酵素活性部位ではなく、Ser630 に直結する β シートに位置する (Figure 14)。そのため R623Q の変異は Ser630 の位置を変化させ、Ser630 とビルダグリプチンのシアノ基との結合や加水分解反応における解離に影響を及ぼすために、野生型に比べてビルダグリプチン代謝活性を低下させる可能性が考えられた。以上より、R623Q 変異体以外にもアミノ酸配列の変異が生じるヒト DPP-4 の SNP においては、ビルダグリプチン代謝活性が変化する可能性があるため、ビルダグリプチンの血中濃度の個人差の予測にヒト DPP-4 の遺伝子多型の情報が有用である可能性が示された。

シタグリプチンを用いた代謝阻害実験の結果から、ラット肝臓 S9 画分における M20.7 生成反応への DPP-4 の寄与率は約 90% と高いことが示された (Figure 12A)。一方で、過去の DPP-4 ペプチダーゼ活性欠損 (G633R) ラットを用いた *in vivo* 実験では M20.7 生成反応への DPP-4 の寄与率は 20% と低いことが報告されている (He et al., 2009b)。このラットにおける M20.7 生成反応への DPP-4 の寄与率が一致しなかった理由は 2 つ考えられる。一つは、*in vivo* においては肝臓以外に発現する酵素が M20.7 の

生成に大きく寄与することである。もう一つは、DPP-4 ペプチダーゼ活性欠損 (G633R) ラットには前述のとおり DPP-4 の G633R 変異体が発現しており DPP-4 ペプチダーゼ活性を示さないものの、DPP-4 による M20.7 生成反応に重要な酵素活性部位の Ser が存在するという実験系の問題である。本研究のヒト DPP-4 の R623Q 変異体から明らかになったように、DPP-4 のアミノ酸配列の変異による影響は DPP-4 ペプチダーゼ活性とビルダグリプチン代謝活性で異なる可能性がある。そのため、DPP-4 ペプチダーゼ活性欠損 (G633R) ラットにおいて算出された DPP-4 の寄与率は、G633R 変異の M20.7 生成反応への影響率である可能性が考えられた。よって、*in vivo* 実験でより正確な M20.7 生成反応への DPP-4 の寄与率を算出するためには、DPP-4 ノックアウト動物または DPP-4 の酵素活性部位である Ser の変異体を使用すること、もしくは DPP-4 の選択的阻害剤を使用した実験を行うことが必要である。

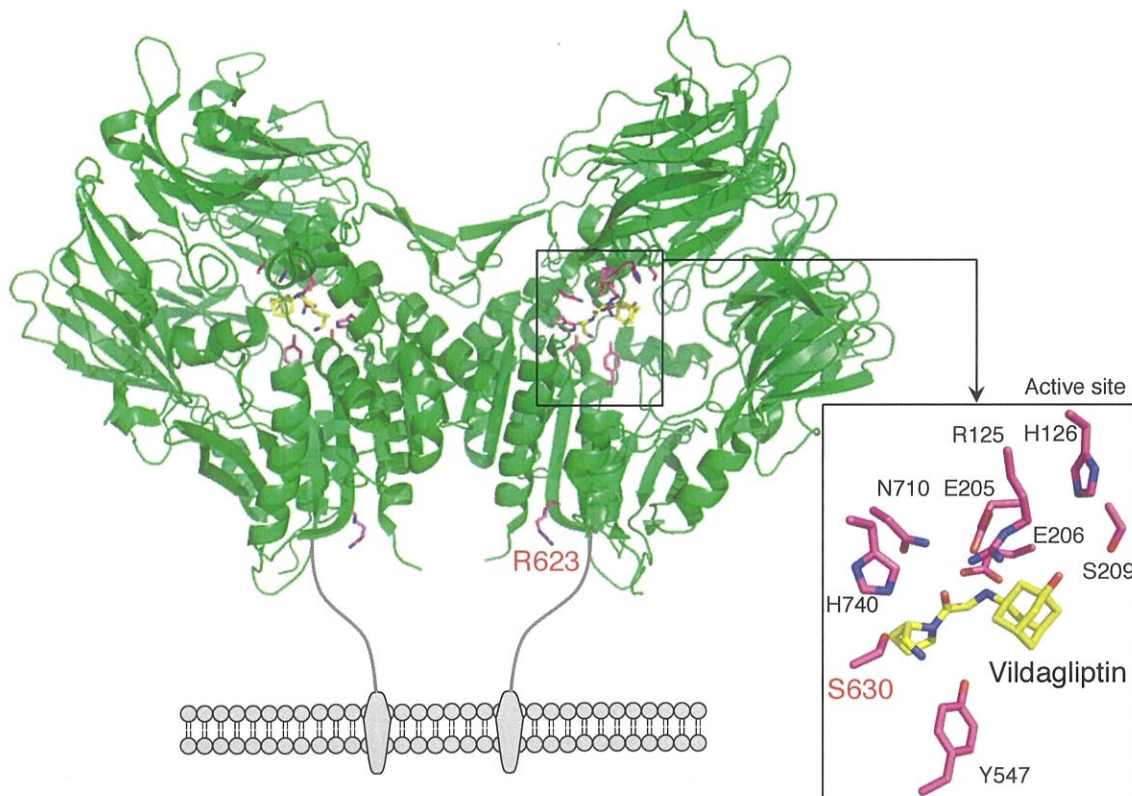


Figure 14. Structure of human DPP-4. The figure was generated using PyMOL software (<http://www.pymol.org>) with Protein Data Bank (PDB) accession number 3W2T (Nabeno et al., 2013).

1-4. 小括

今回の *in vitro* 研究結果から、ヒトにおけるビルダグリプチンの主代謝反応には NIT は関与しないこと、および薬効の標的分子である DPP-4 が大きく寄与することが明らかとなった (Figure 15) (Asakura et al., 2014; Asakura et al., 2015a; Asakura et al., 2015b)。また、DPP-4 によるビルダグリプチンの代謝反応には、インクレチンなどの基質を分解する DPP-4 ペプチダーゼ活性と同様に酵素活性部位の Ser630 が必須であることを明らかにした (Figure 13)。さらに、ヒト DPP-4 の遺伝子多型によりビルダグリプチン代謝能が変化することを見出した。

以上の *in vitro* 実験の成果をもとに、さらに臨床応用可能な知見を得るために第 2 章で述べるマウスを用いた *in vivo* 実験を行うこととした。

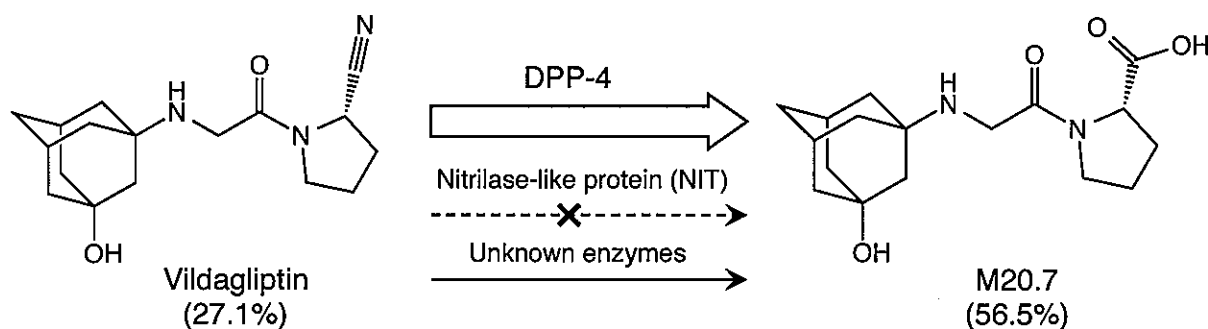


Figure 15. Proposed metabolic pathways of vildagliptin in humans. Reported amount of vildagliptin and metabolites in urine and feces is indicated as percentage of dose (He et al., 2009a).

第2章

ビルダグリプチンの主代謝臓器の解明を目指したマウスを用いた *in vivo* 実験とヒト肝ミクロソームを用いた個人差に関する検討

第1章では、ビルダグリプチンのヒト肝臓における主要な代謝酵素が DPP-4 であることを *in vitro* 実験で明らかにした。DPP-4 は細胞表面に留まる膜結合型 DPP-4 だけではなく、細胞外ドメインが切断されることで可溶型 DPP-4 として血液中にも存在する (Durinx et al., 2000)。これまでに、体格指数 (body mass index、BMI) や内臓脂肪などの肥満の指標となる因子と血中 DPP-4 濃度との間に正の相関関係が認められることが報告されている (Lamers et al., 2011; Sell et al., 2013)。また、健常人と比較して1型糖尿病や2型糖尿病の患者において、血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性が高い傾向にあることも報告されている (Ryskjær J et al., 2006; Varga et al., 2011; Fadini et al., 2012; Sell et al., 2013; Osawa et al., 2016)。このように、肥満や糖尿病といった病態により血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性が上昇することが報告されており、血中 DPP-4 濃度に個人差が存在することが注目されている。本章では、*in vivo* においても DPP-4 がビルダグリプチンの主要な代謝酵素として寄与することを明らかにすること、および血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の差が M20.7 の生成量に影響を及ぼすか否かを評価すること、そしてビルダグリプチンの主代謝臓器を明らかにすることを目的とした、マウスを用いた *in vivo* 実験について述べる。

2-1. マウスの主要な臓器における DPP-4 タンパク質の発現解析

第1章では、主に肝臓に着目した検討を行った。一方で、DPP-4 は肝臓以外の多くの臓器に発現することが報告されている (Mentlein, 1999; Gorrell et al., 2001)。そこで、*in vivo* 実験に使用する C57BL/6NCrSlc マウスの 8 つの臓器 (心臓、肺、胃、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、大腸) を用いてウェスタンブロット解析を行い、臓器ごとの DPP-4 タンパク質の発現量の比較を行った。その結果、用いた 8 つの臓器全てにおいて DPP-4 のタンパク発現が認められ、特に肺、肝臓、腎臓、小腸に高く発現していることが明らかになった (Figure 16)。これまでに DPP-4 は肝臓においてビルダグリプチン主代謝反応に大きく寄与することを示したが、肝臓以外の臓器でも DPP-4 が M20.7 の生成に関与する可能性が示唆された。

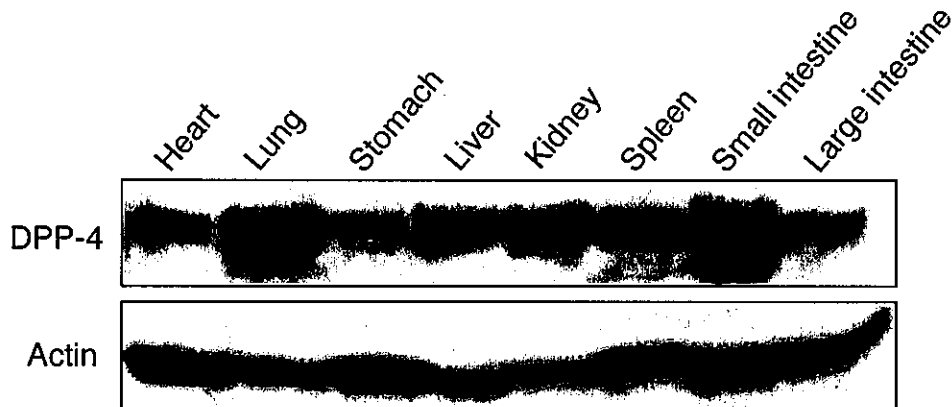


Figure 16. Characterization of DPP-4 expression in mouse tissues. Mouse tissue S9 fractions (100 μ g of protein) were subjected to NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel and probed with the anti-human DPP-4 antibody (AF1180). Actin was used as the protein loading

2-2. シタグリプチンを用いたマウス *in vivo* におけるビルダグリプチン主代謝反応への DPP-4 の寄与率の算出

マウス *in vivo* におけるビルダグリプチンの主代謝反応への DPP-4 の寄与率を明らかにするために、ビルダグリプチン (10 mg/kg) のみを経口投与したコントロール群と、ビルダグリプチンと DPP-4 選択的阻害剤のシタグリプチンを同時に経口投与したシタグリプチン (1,000 mg/kg) 併用群のマウスを用いた *in vivo* 実験を行った。それぞれのマウスにおいてビルダグリプチンを経口投与後に経時的に採血を行い、ビルダグリプチンと主代謝物 M20.7 の血漿中濃度を LC-MS/MS で定量することで体内動態を比較した。コントロール群とシタグリプチン併用群のマウスにおけるビルダグリプチンの血中濃度-時間曲線下面積 (area under the blood concentration-time curve, AUC) は、それぞれ 90 ± 14 および 108 ± 21 ng·h/mL であった (Figure 17 and Table 6)。ビルダグリプチンの AUC は、シタグリプチン併用群でやや上昇したが統計学的に有意な差は認められなかった。一方で、コントロール群とシタグリプチン併用群における M20.7 の AUC はそれぞれ 26 ± 2.6 および 8.5 ± 2.1 ng·h/mL であり、シタグリプチン併用群で 67%と著しく低下した ($P < 0.01$) (Figure 17 and Table 6)。このことから、*in vivo* におけるビルダグリプチンの M20.7 生成反応にも DPP-4 が約 70%と大きく寄与することが明らかになった (Asakura et al., 2017)。

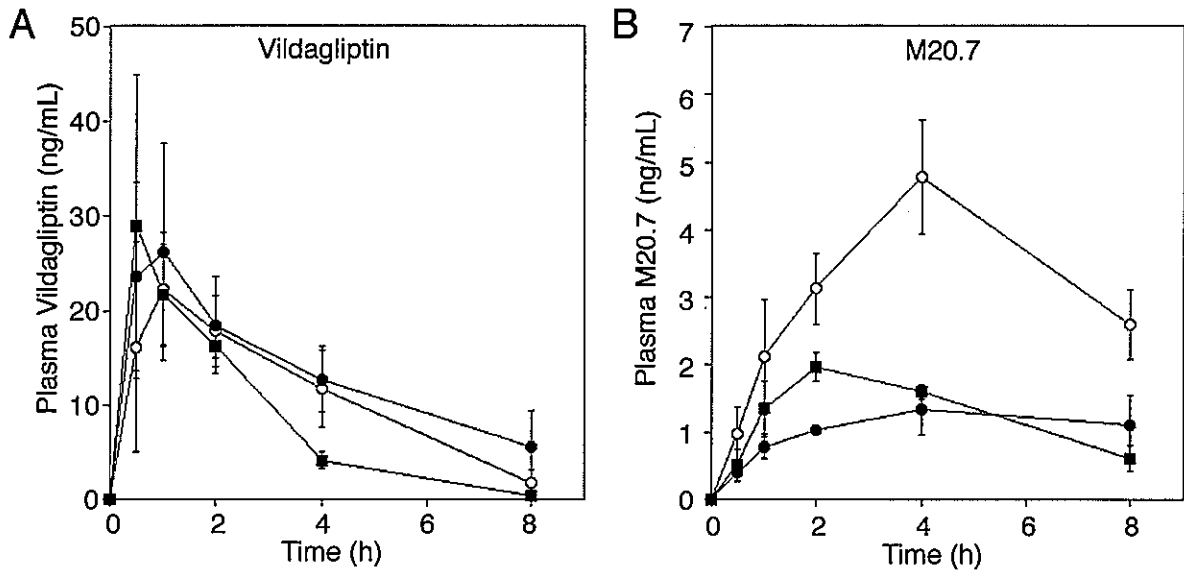


Figure 17. Pharmacokinetics of vildagliptin (A) and its main metabolite M20.7 (B) in control mice administered with vildagliptin (10 mg/kg, p.o.) ($n = 4$), mice co-administered with vildagliptin (10 mg/kg, p.o.) and sitagliptin (1,000 mg/kg) ($n = 3$), and STZ-induced diabetic mice administered with vildagliptin (10 mg/kg, p.o.) ($n = 3$). Results are shown as means \pm S.D. of the plasma concentrations of vildagliptin and M20.7. ○, Control mice. ●, Control mice + Sitagliptin. ■, STZ-induced diabetic mice (Day 7).

Table 6. AUC_{0-8h} in three mouse groups following oral administration of vildagliptin (10 mg/kg).

Group	Numbers	AUC_{0-8h} (ng·h/mL)	
		Vildagliptin	M20.7
Control mice	4	90 \pm 14	26 \pm 3
Control mice + Sitagliptin (1,000 mg/kg)	3	108 \pm 21	8.5 \pm 2.1**
STZ-induced diabetic mice (Day 7)	3	68 \pm 16	10 \pm 1**

** , $P < 0.01$ vs. Control mice.

2-3. 血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の個体差が M20.7 の生成量に及ぼす影響

糖尿病の病態に起因した血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の増加は、streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスで再現することが可能であることが報告されている (Das et al., 2014)。血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の差が M20.7 の生成量に与える影響について評価するため、STZ 誘発糖尿病マウスを用いた *in vivo* 実験を行った (Asakura et al., 2017)。STZ 投与後 7 日目 (Day 7) の STZ 処置群のマウスは、STZ 投与前 (Day 0) に比べて体重は有意に減少し ($P < 0.01$) (Figure 18A)、血糖値は 400 mg/dL と有意に高い値を示した ($P < 0.01$) (Figure 18B)。そして、STZ 処置群 Day 7 の血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性は Day 0 に比べて約 2 倍に増加していた (Figure 18C)。これらの結果は、過去の報告 (Das et al., 2014) と一致していることから、STZ 処置群のマウスを構築できたと判断した。

生理食塩水を投与したコントロール群と STZ 処置群 Day 7 のマウスにビルダグリプチン (10 mg/kg) を経口投与し、未変化体のビルダグリプチンと M20.7 の体内動態を比較した。STZ 処置群の血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性は約 2 倍に増加していたにもかかわらず (Figure 18C)、STZ 処置群の M20.7 の AUC はコントロール群に比べて約 0.4 倍に低下していた (Figure 17B and Table 6)。このことから、血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の個体差は、M20.7 の生成量に大きな影響を及ぼさないことが示された (Asakura et al., 2017)。

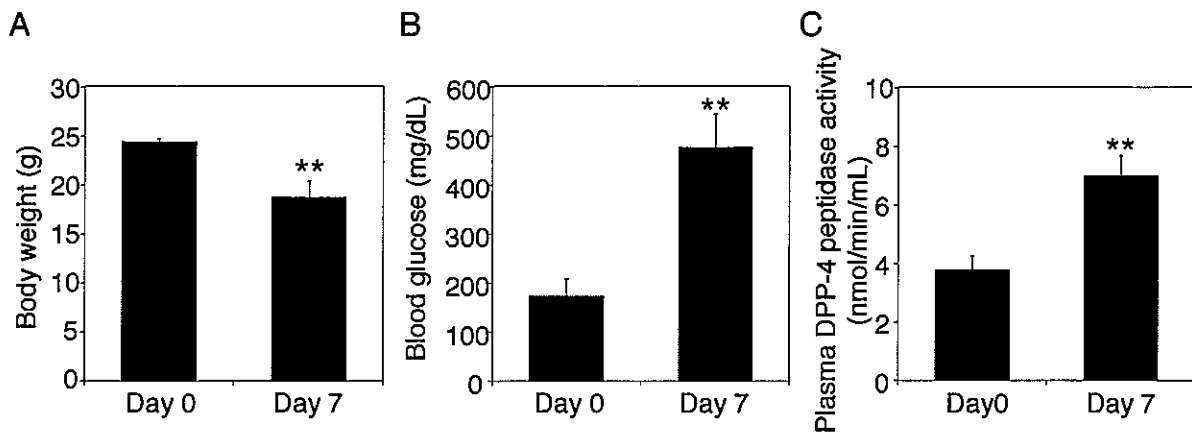


Figure 18. Body weight (A), blood glucose (B), and plasma DPP-4 peptidase activity (C) in control and STZ-induced diabetic mice. These data were measured at 0 and 7 days after the STZ injection. Data represent the means \pm S.D. ($n = 3$). **, $P < 0.01$.

2-4. マウスにおけるビルダグリプチンの主代謝臓器の同定

ビルダグリプチンの主代謝反応に大きく寄与する臓器を明らかにするために、血液に加えて各マウスの肝臓、腎臓、小腸を回収し、臓器重量を考慮した DPP-4 ペプチダーゼ活性とビルダグリプチン代謝能 (M20.7 生成活性) の評価を行った。はじめに、各マウスの肝臓、腎臓、小腸の S9 画分を用いて 1 mg protein あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性 (nmol/min/mg protein) を測定した。また、マウスの血漿を用いて血漿 1 mL あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性 (nmol/min/mL) を測定した。その結果、血液だけでなく腎臓と小腸の DPP-4 ペプチダーゼ活性もコントロール群に比べて STZ 処置群で有意に上昇していることが明らかになった ($P < 0.01$) (Figure 19A)。一方で、肝臓の DPP-4 ペプチダーゼ活性は STZ 処置群で有意に低下していた ($P < 0.01$)。さらにウェスタンブロット解析の結果から、DPP-4 のタンパク質発現においても DPP-4 ペプチダーゼ活性と同様に STZ 処置群の腎臓と小腸では発現が上昇し、肝臓では発現が低下する傾向が認められた (Figure 19B)。血液における DPP-4 ペプチダーゼ活性は他の臓

器に比べて著しく低く、DPP-4 のタンパク質発現をウェスタンブロット解析で検出することができなかった。

次に、各臓器の S9 画分のタンパク質含有量と臓器重量で補正した臓器あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性 (nmol/min/tissue) および全血漿あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性 (nmol/min/plasma) を見積もった。本研究に用いたマウスの肝臓、腎臓、小腸の臓器重量の平均値は、それぞれ 1.07、0.315、0.869 g であった。また、調製した肝臓、腎臓、小腸の S9 画分のタンパク質含有量は、121、90.0、49.0 mg protein/g tissue であった。これらの数値は過去の報告と一致していた (Davies and Morris, 1993; Abdullah et al., 2016)。臓器あたりの活性を見積もったところ、肝臓、腎臓、小腸の DPP-4 ペプチダーゼ活性はそれぞれ 367 ± 1 、 67.4 ± 1.3 、 97.5 ± 1.4 nmol/min/tissue であった (Figure 19C)。また、マウスの全血漿容積は約 1 mL であることから (Davies and Morris, 1993)、全血漿あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性は 4.5 ± 0.15 nmol/min/plasma と算出した。臓器あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性の値から、血液の活性は極めて低いこと、および腎臓と小腸に比べて肝臓が著しく高い活性を有することが明らかになった (Figure 19C)。

さらに、同様に臓器あたりのビルダグリプチン代謝活性 (M20.7 生成活性) の算出を行った。まず、各マウスの肝臓、腎臓、小腸の S9 画分と血液を用いて 1 mg protein あたりの M20.7 生成活性 (pmol/h/mg protein) を測定した。その結果、DPP-4 ペプチダーゼ活性と同様に腎臓と小腸の M20.7 生成活性はコントロール群に比べて STZ 処置群で有意に上昇し ($P < 0.01$)、肝臓の M20.7 生成活性は STZ 処置群で有意に低下していた ($P < 0.01$) (Figure 20A)。一方で、マウスの血液とビルダグリプチンを反応させても M20.7 の生成が認められなかったことから、血液における M20.7 生成活性は算出することができなかった。このことから、血液中に存在する可溶性 DPP-4 の M20.7

生成反応への寄与率は極めて小さいことが示された。そして、S9 画分のタンパク質含有量と臓器重量で補正した肝臓、腎臓、小腸の臓器あたりの M20.7 生成活性は、それぞれ 40.4 ± 1.2 、 6.5 ± 0.4 、 10.2 ± 0.1 pmol/h/tissue と算出され、腎臓と小腸に比べて肝臓が著しく高いビルダグリプチン代謝能を有することが明らかになった (Figure 20B)。

算出した臓器あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性と M20.7 生成活性は、どちらも腎臓と小腸においてはコントロール群に比べて STZ 処置群で増加していたが、肝臓では低下していた。そして、*in vivo* 実験に用いたコントロール群 4 匹と STZ 処置群 3 匹のマウス個々の肝臓における DPP-4 ペプチダーゼ活性と M20.7 生成活性との間に高い正の相関関係が認められた ($R_s = 0.886$, $P < 0.05$) (Figure 21A)。さらに、マウス個々の肝臓における DPP-4 ペプチダーゼ活性と M20.7 の AUC との間にも著しく高い正の相関関係が認められた ($R_s = 0.943$, $P < 0.05$) (Figure 21B)。このことから、DPP-4 は様々な臓器に発現するが、特に肝臓の DPP-4 が M20.7 の生成に大きく寄与することが明らかになった。以上の結果から、血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の個体差はビルダグリプチンの体内動態に重大な影響を与えないこと、および様々な臓器の中でも特に肝臓における DPP-4 発現量が M20.7 の生成量を変動させる重要な因子であることが明らかになった (Asakura et al., 2017)。

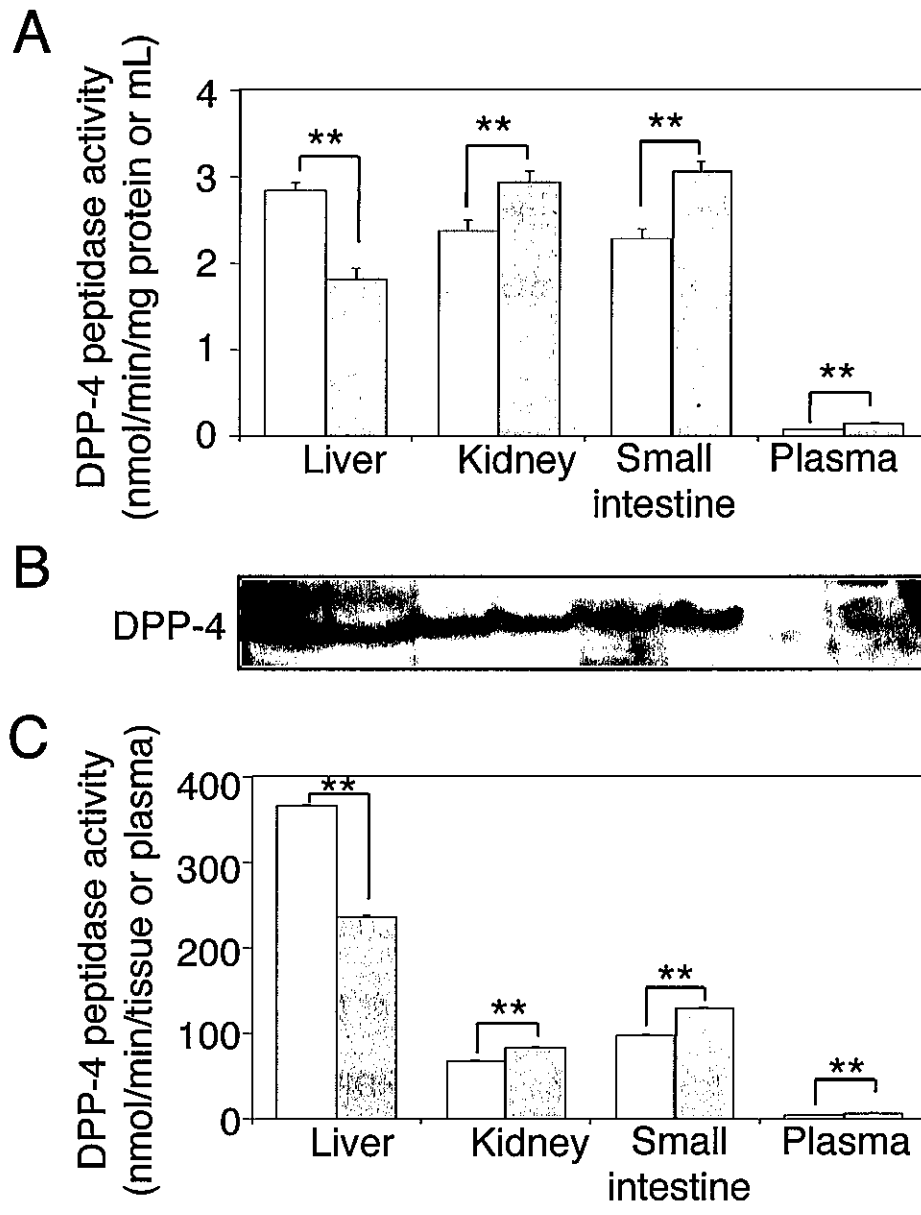


Figure 19. DPP-4 peptidase activities measured by using Gly-Pro-AMC (A), DPP-4 protein expression levels in liver, kidney, small intestine S9 fractions, and plasma (B), and the estimated DPP-4 peptidase activities in whole liver, kidney, small intestine tissues, and plasma (C). (A) DPP-4 activities in S9 fractions and plasma were measured by using Gly-Pro-AMC. (B) The DPP-4 protein expression levels were determined by Western blot analysis. Liver, kidney, small intestine S9 fractions, and plasma (100 μ g of protein) of control mice and STZ-induced diabetic mice were subjected to NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel and probed with the anti-DPP-4 antibody (AF1180). (C) The estimated DPP-4 activities (nmol/min/tissue or plasma) in whole liver, kidney, small intestine tissues, and plasma are shown. Data represent the means \pm S.D. of three independent experiments. **, $P < 0.01$. \square , Control mice. \blacksquare , STZ-induced diabetic mice (Day 9).

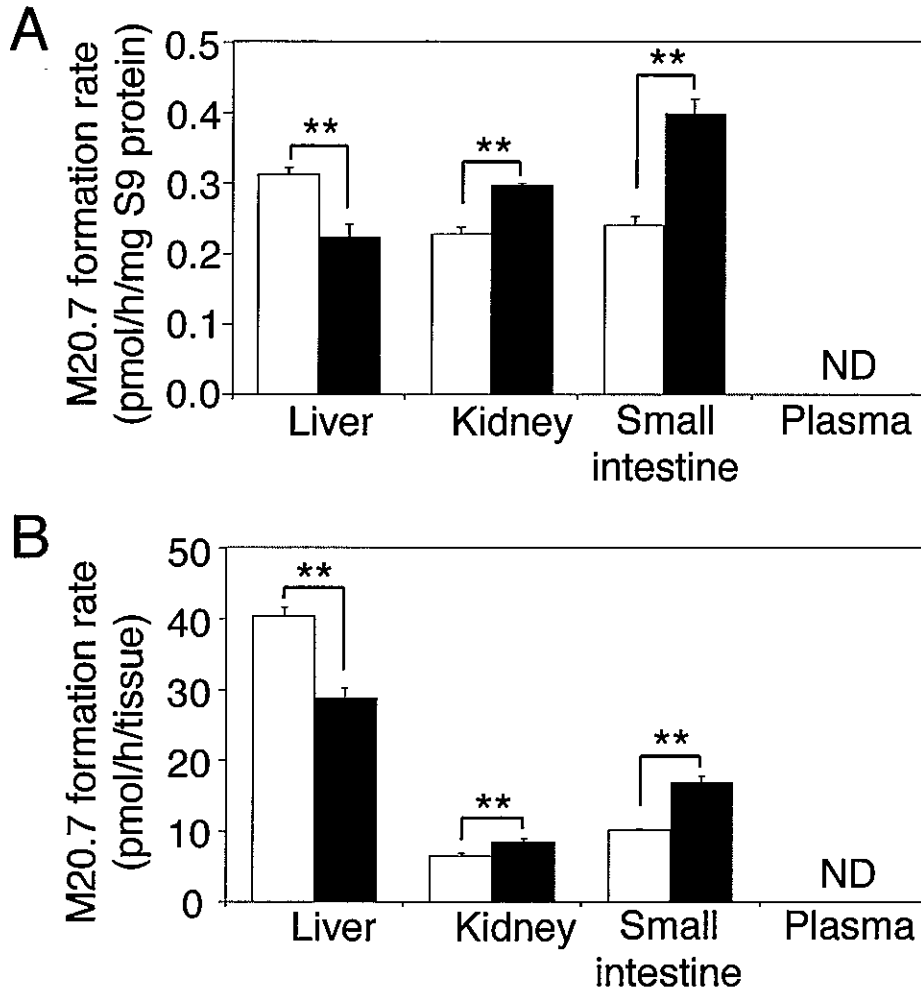


Figure 20. Vildagliptin cyano group-hydrolyzing activities in liver, kidney, small intestine S9 fractions, and plasma (A) and the estimated vildagliptin cyano group-hydrolyzing activities in whole liver, kidney, small intestine tissues, and plasma (B). (A) The vildagliptin cyano group-hydrolyzing activities in S9 fractions were measured. The substrate concentration was 1 μ M. (B) The estimated M20.7 formation rates (pmol/h/tissue) in whole liver, kidney, and small intestine tissues are shown. Data represent the means \pm S.D. of three independent experiments. **, $P < 0.01$. □, Control mice. ■, STZ-induced diabetic mice (Day 9). ND, not detectable.

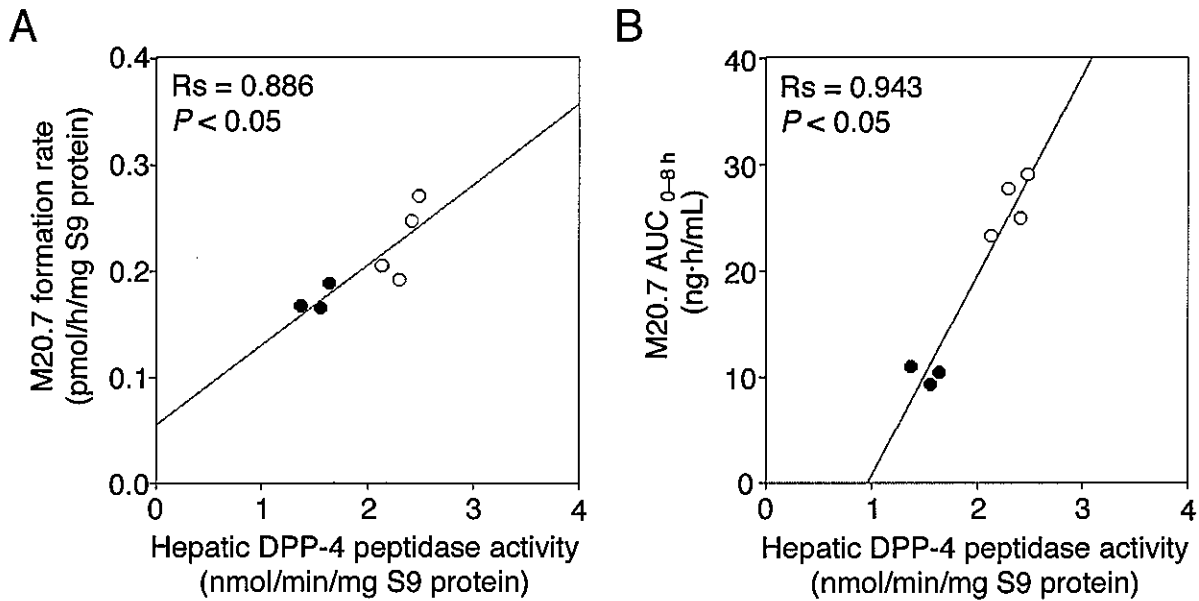


Figure 21. Correlation between hepatic DPP-4 peptidase activities and hepatic M20.7 formation rates (A) and the AUC_{0-8h} values of M20.7 (B) in individual mice. Data represent the means of triplicate determinations. ○, Control mice. ●, STZ-induced diabetic mice (Day 9).

2-5. STZ 誘発糖尿病マウスの肝臓、腎臓、小腸における DPP-4 発現の変動因子の解明

STZ 処置群のマウスの腎臓と小腸の DPP-4 ペプチダーゼ活性は、コントロール群に比べて有意に上昇していたが、肝臓の活性は有意に低下していた (Figure 19A)。この STZ 処置群における臓器間での DPP-4 発現の変動因子を明らかにするために、リアルタイム RT-PCR を用いた mRNA の発現解析を行った。STZ 処置群およびコントロール群の肝臓、腎臓、小腸の DPP-4 の発現を比較したところ、DPP-4 ペプチダーゼ活性と同様に STZ 処置群のマウスの肝臓で特異的に Dpp-4 mRNA がコントロール群に比べて低下していることが明らかになった (Figure 22A)。そこで、DPP-4 の発現変動に関与することが報告されている microRNA-29 (miR-29) (Kanasaki et al. 2014)、脂肪細胞 (adipocyte) の含有率 (Zilleßen et al. 2016)、hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) (Erickson et al. 1999) に着目した遺伝子解析を行った。MiR-29 は DPP-4 や collagen type

I alpha 1 (Colla1) の翻訳を負に制御する (Roderburg et al. 2011; Kanasaki et al. 2014)。MiR-29 自身は転写因子 forkhead box A2 (FOXA2) によって正に制御される (Kurtz et al. 2014)。Foxa2 の発現を評価したところ、全ての臓器において発現量が低すぎるためにリアルタイム RT-PCR で定量することができなかった (Figure 22B)。一方で、Colla1 mRNA は定量することができたが STZ 処置群のマウスの肝臓でやや上昇傾向を示し、Dpp-4 mRNA の変動と一致しなかった (Figure 22C)。また、脂肪細胞のマーカ遺伝子であると報告されている fatty acid binding protein (FABP) 4 と adiponectin (AdipoQ) (Hu et al. 1996; Westerbacka et al. 2007) の発現も評価したが、どちらも STZ 処置群のマウスの肝臓で有意に上昇しており ($P < 0.01$)、Dpp-4 mRNA の変動と一致しなかった (Figure 22D and 22E)。このことから、miR-29 と脂肪細胞含有率は STZ 処置群のマウス肝臓内の Dpp-4 mRNA を低下させた要因ではないことが示唆された。

次に、HNF-1 α に着目した検討を行った。HNF-1 α は、DPP-4 や FABP1 の発現を正に制御している転写因子である (Erickson et al. 1999; Akiyama et al. 2000)。Hnf-1 α mRNA は STZ 処置群のマウス肝臓で有意に上昇していたが ($P < 0.01$) (Figure 22F)、Fabp1 mRNA の発現量は STZ 処置群のマウス肝臓において、コントロール群に比べて約 50 倍と著しく低下していた (Figure 22G)。以上の結果から、STZ 処置群のマウス肝臓における Dpp-4 mRNA の発現低下には、HNF-1 α タンパク質の発現量または活性の低下が寄与している可能性が示された (Asakura et al., 2017)。

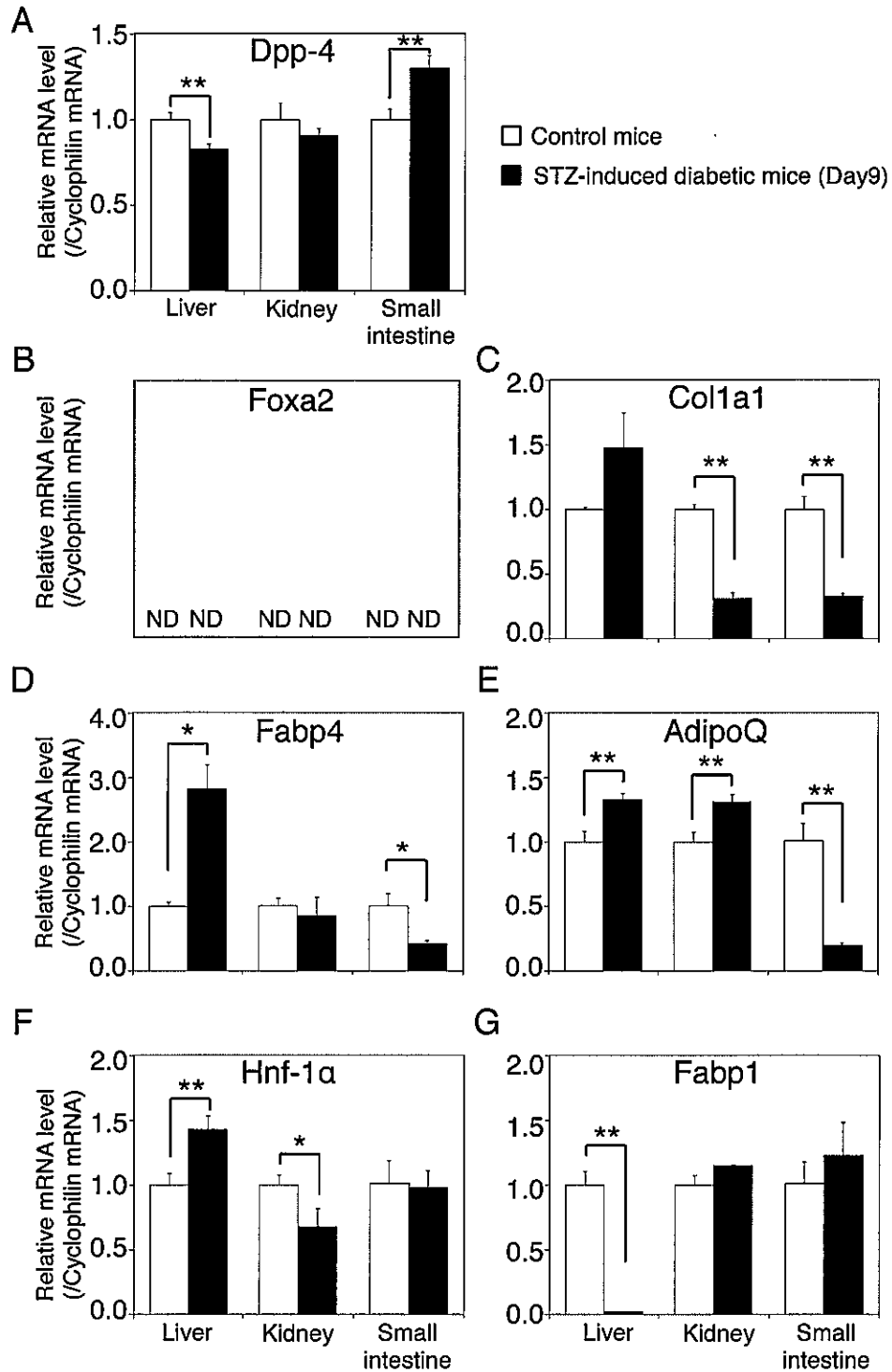


Figure 22. The mRNA expression levels of Dpp-4 (A), Foxa2 (B), Col1a1 (C), Fabp4 (D), AdipoQ (E), Hnf-1 α (F), and Fabp1 (G) in liver, kidney, and small intestine of control mice and STZ-induced diabetic mice. Expression was normalized with the expression of cyclophilin and the expression level in each tissue of control mice was defined as 1. Data represent the means \pm S.D. of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. ND, not detectable.

2-6. ヒト肝マイクロソームにおけるビルダグリプチン代謝活性の個人差

M20.7の生成に特に重要な臓器であることが示された肝臓におけるビルダグリプチン代謝活性の個人差を明らかにするために、23名の個人肝臓マイクロソームを用いてビルダグリプチン代謝活性を測定した。23名全ての肝臓マイクロソームにおいてビルダグリプチン代謝活性が認められ、活性の幅は0.79–2.83 pmol/h/mg microsomal proteinであり、最大で3.6倍の個人差が存在することが明らかになった (Figure 23A)。また、Gly-Pro-AMCを用いて測定したDPP-4ペプチダーゼ活性も全ての肝臓マイクロソームにおいて認められ、活性の幅は0.66–2.32 nmol/min/mg microsomal proteinであり、最大で3.5倍の個人差が存在した (Figure 23B)。さらに、23名の個人肝臓マイクロソームのビルダグリプチン代謝活性とDPP-4ペプチダーゼ活性との間に正の相関関係が認められた ($R_s = 0.678$, $P < 0.01$) (Figure 24A)。以上の結果は、DPP-4がビルダグリプチンの主代謝酵素であるというこれまでの研究成果を強く支持するとともに、肝臓におけるビルダグリプチン代謝活性には個人差が存在することを明らかにした (Asakura et al., 2017)。

23名の個人肝臓マイクロソーム間におけるビルダグリプチン代謝活性の個人差が、肝臓マイクロソーム酵素活性の全般的な失活によるものではないことを証明するために、ビルダグリプチン代謝活性と他の薬物代謝酵素の活性について相関解析を行った。他の薬物代謝酵素の活性として、同一の23名の個人肝臓マイクロソームを用いて過去に測定された、arylacetamide deacetylase (AADAC)、CES1、CES2の3種類の加水分解酵素の活性 (Shimizu et al., 2014) を使用した。その結果、AADACのフェナセチン加水分解活性 ($R_s = -0.0168$, $P = 0.939$)、CES1のフェノフィブラート加水分解活性 ($R_s = -0.226$, $P = 0.299$)、CES2のイリノテカン加水分解活性 ($R_s = -0.0929$, $P = 0.673$) の全ての酵素活性において、ビルダグリプチン代謝活性との相関関係は認められなかった。

(Figure 24B, 24C, and 24D)。このことから、23名の個人肝臓ミクロソームから得られた DPP-4 ペプチダーゼ活性とビルダグリプチン代謝活性のサンプル間での差は、サンプル中の全般的な代謝酵素の失活ではなく、DPP-4 活性の個人差を反映していることが示された。

さらに、23名の肝臓ドナーの情報として得られた、年齢と BMI の値とビルダグリプチン代謝活性について相関解析を行った。その結果、年齢 ($R_s = 0.112$, $P = 0.609$) または BMI ($R_s = 0.394$, $P = 0.0631$) とビルダグリプチン代謝活性との間に相関関係は認められなかった (Figure 24E and 24F)。このことから、年齢や BMI は肝臓におけるビルダグリプチン代謝活性を予測する因子とはならない可能性が示された (Asakura et al., 2017)。

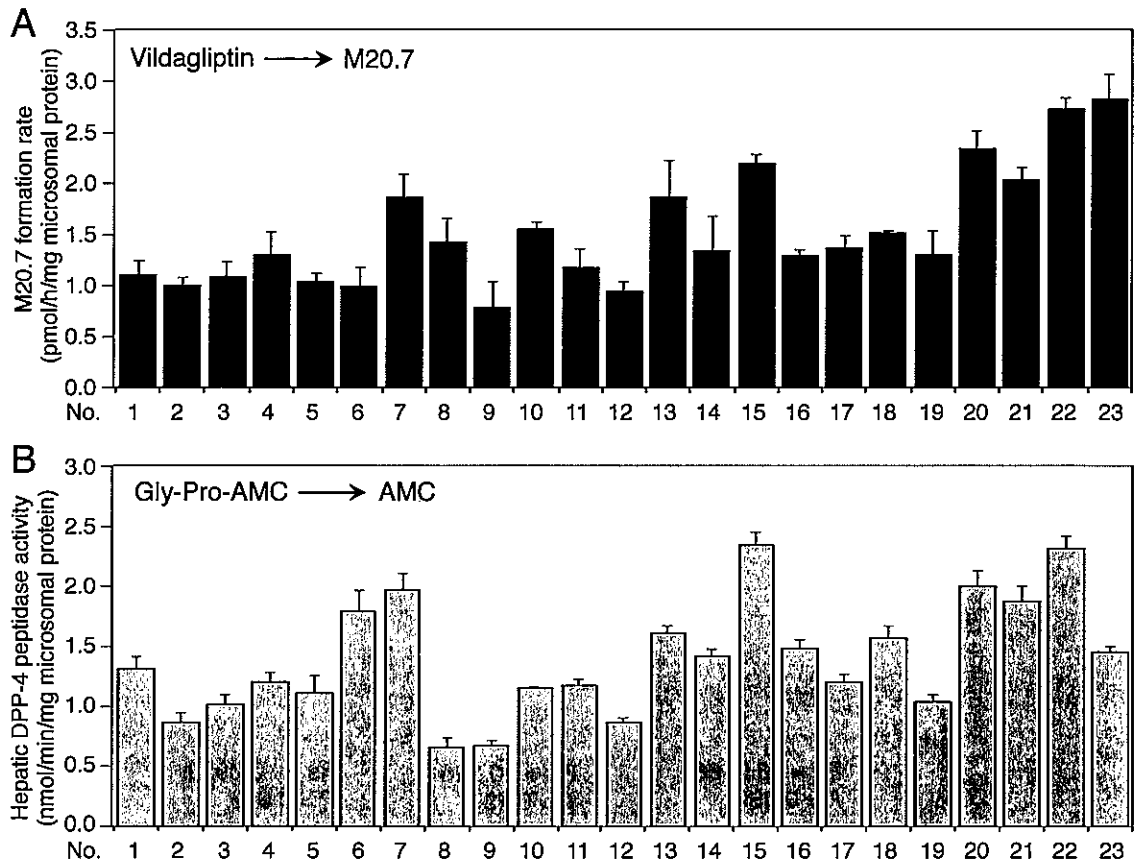


Figure 23. Interindividual variability of vildagliptin cyano group-hydrolyzing activities (A) and hepatic DPP-4 peptidase activities measured by using the Gly-Pro-AMC. Data represent the means \pm S.D. of three independent experiments.

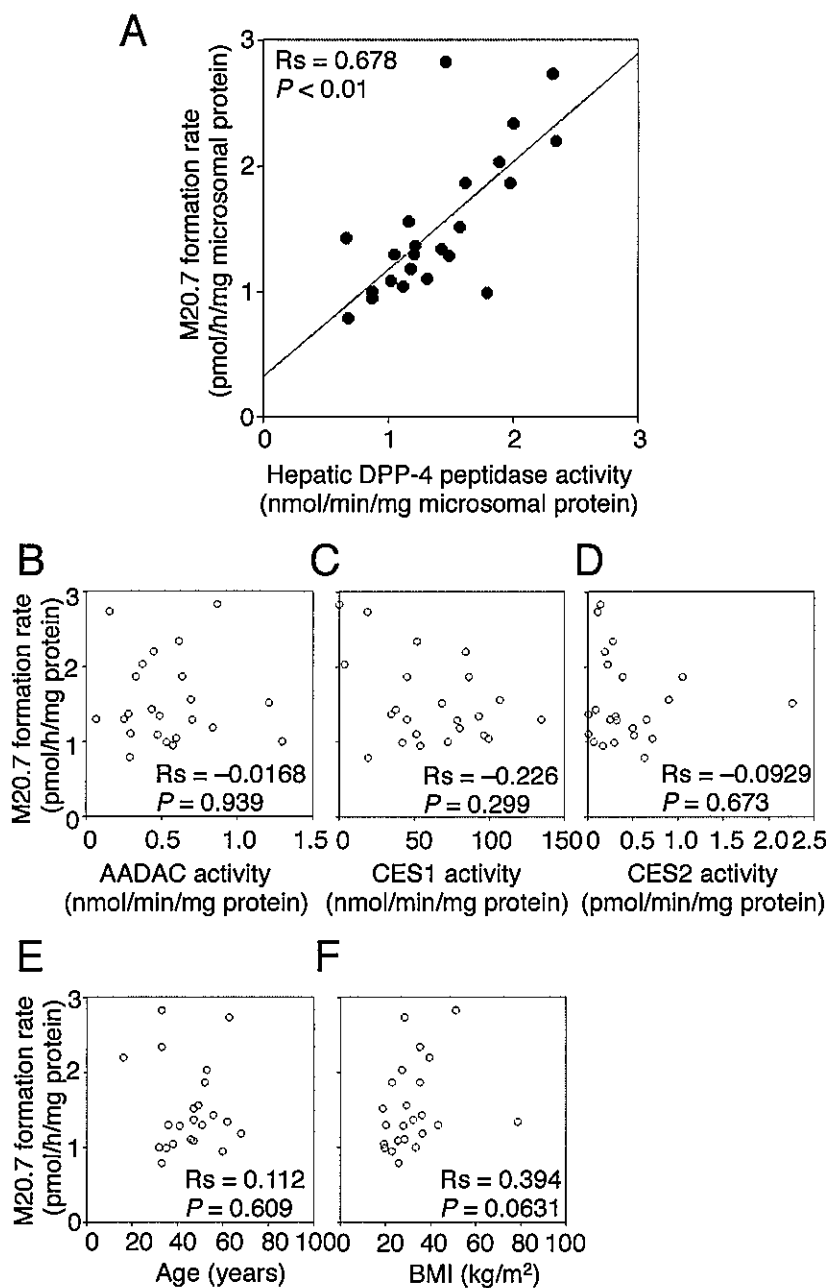


Figure 24. Correlation analyses between hepatic vildagliptin cyano group-hydrolyzing activities and DPP-4 (A), AADAC (B), CES1 (C), and CES2 (D) activities of individual HLMs from 23 donors and the relationships between hepatic vildagliptin cyano group-hydrolyzing activities and age (E) and BMI (F) of 23 donors. Data represent the means of triplicate determinations.

2-7. 考察

第1章では、*in vitro* 実験によってビルダグリプチンの主代謝酵素が DPP-4 であることを明らかにした。第2章では、*in vivo* においても M20.7 の生成反応における主代謝酵素として DPP-4 が機能することや主代謝臓器を明らかにするために、マウスを用いて検討した。シタグリプチンを用いたビルダグリプチンの代謝阻害実験を行った結果、シタグリプチン併用群における M20.7 の AUC は、コントロール群に比べて著しく (67%) 低下した (Figure 17B and Table 6)。このことから、*in vivo* でもビルダグリプチンの M20.7 生成反応に DPP-4 が約 70% と大きく寄与することが明らかになった。また、マウス肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 実験の代謝阻害実験から得られた M20.7 の生成反応における DPP-4 の寄与率は約 50% であったことから (Figure 12A)、肝臓以外に発現する DPP-4 も M20.7 の生成に関与すること可能性が示された。

また、臨床で報告されている血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の差が M20.7 の生成量に影響するか否かを明らかにするために、STZ 誘発糖尿病マウスを用いた *in vivo* 実験を行った。その結果、血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性は他の臓器に比べて著しく低く、血液における M20.7 生成活性も検出できないほど低いことが示されたことから (Figure 19 and 20)、血液中の DPP-4 活性の個人差は、ビルダグリプチンの体内動態に大きな影響を及ぼさない可能性が本研究により新たに明らかになった。また、様々な臓器の中でも特に肝臓の DPP-4 ペプチダーゼ活性が M20.7 の生成に大きく寄与することが明らかになった (Figure 19C and 20B)。さらに、23 名の個人肝臓ミクロソームを用いた検討から、ビルダグリプチンの主代謝臓器である肝臓において、ビルダグリプチンの代謝活性には約 3.6 倍の個人差が存在することが明らかになった (Figure 23A)。以上より、肝臓のビルダグリプチン代謝活性の個人差を把握することで、ビル

ダグリプチンや主代謝物 M20.7 の体内動態における個人差を予測することができる可能性が示された (Asakura et al., 2017)。

マウスにビルダグリプチンを経口投与し、未変化体のビルダグリプチンと M20.7 の体内動態を評価した際に、M20.7 の AUC の低下率とビルダグリプチンの AUC の上昇率が一致しなかった (Figure 17B and Table 6)。その要因として、マウスにおいてはビルダグリプチンの消失過程において M20.7 への代謝よりも未変化体の尿中排泄の割合が大きいことが影響したと考えられた (Table 2)。未変化体のビルダグリプチンと M20.7 は、最終的に腎臓から尿中に排泄される (He et al., 2009a; He, 2012)。STZ 処置群のマウスでは、コントロール群に比べて M20.7 の AUC が 62%と著しく低下していたが、未変化体のビルダグリプチンの AUC も 24%と僅かに低下していた (Table 6)。この結果から、STZ 処置群のマウスにおいては、糖尿病の病態から生じる多尿による影響から、未変化体のビルダグリプチンおよび M20.7 の尿中排泄量が僅かに増加していた可能性が考えられた。一方で、AUC の低下率は M20.7 では 62%であり、未変化体のビルダグリプチン (24%) よりも著しく大きいことから、M20.7 の AUC が減少した主な要因は尿中排泄が増加したためではなく、肝臓の DPP-4 ペプチダーゼ活性が低下したことにより M20.7 の生成量が低下したことが原因であると考えられた (Figure 17 and Table 6)。腎機能が正常であるシタグリプチン併用群のマウスにおける AUC は、コントロール群に比べて M20.7 では著しく低下し (67%)、未変化体のビルダグリプチンでは 20%増加した (Figure 17 and Table 6)。このことから、M20.7 生成能が低下することで、未変化体のビルダグリプチンの血中濃度が上昇する傾向が示された。尚、ヒトにおいてはビルダグリプチンの消失過程に M20.7 生成反応が大きく寄与することから、M20.7 生成能の低下は未変化体の血中濃度の上昇に繋がると考えられる。

第1章と第2章でビルダグリプチンの主代謝酵素は DPP-4 であること、さらにビルダグリプチンの主代謝臓器は肝臓であることを明らかにした。そのため、DPP-4 発現量の個人差を反映する臨床検査値や患者情報を明らかにすることで、ビルダグリプチンの投与量の個別化が可能になると考えられた。臨床において、BMI と血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性との間には正の相関関係が認められることが報告されている (Lamers et al., 2011)。しかし、本研究により血液中 DPP-4 のビルダグリプチン代謝への寄与は極めて小さいことが示された (Figure 20)。さらに、主代謝臓器である肝臓のビルダグリプチン代謝活性は、BMI と相関しなかった (Figure 24F)。よって、BMI はビルダグリプチンの体内動態を予測する因子とはならない可能性が示された。一方で、C 型肝炎の患者や非アルコール性脂肪肝の患者において、健常人に比べて肝臓内の DPP-4 発現量が増加していることが報告されている (Itou et al. 2008; Miyazaki et al. 2012)。今後、肝臓内の DPP-4 発現量を反映する病態が解明され血液中のバイオマーカーが見出されることで、ビルダグリプチンの投与量の個別化や副作用の早期発見に、本研究の成果が貢献することが期待される。

2-8. 小括

マウスを用いた *in vivo* 実験から、DPP-4 が *in vivo* においてもビルダグリプチン主代謝反応に大きく寄与することを明らかにした (Figure 17 and Table 6)。また、血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の差は M20.7 の生成量に大きな影響を及ぼさず、特に肝臓の DPP-4 ペプチダーゼ活性が M20.7 の体内動態に大きく寄与することを見出した (Figure 19, 20, and 21)。さらに、ヒトの肝臓におけるビルダグリプチン主代謝活性には個人差が存在することを明らかにした (Figure 23)。以上のことから、ビルダグリプチンの長期的な有効性や副作用の個人差の予測には、肝臓の DPP-4 発現量の情報が有用であることが示された (Asakura et al., 2017)。

第3章

ビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムの解明を

目指した基礎研究

ビルダグリプチンによる肝障害の危険性については国内外において報告されているが (Karagiannis et al., 2014; Kurita et al., 2014)、肝障害を引き起こしやすい患者背景や危険因子などは明らかとなっていない。本章では、ビルダグリプチンによる肝障害発現メカニズムの解明を目指した基礎研究について述べる。近年、薬物性肝障害の発現には、薬物の未変化体または代謝物が直接的に肝実質細胞を傷害する経路だけでなく、好中球などの免疫細胞からの炎症関連タンパク質の分泌を誘導することにより肝臓内の炎症反応を惹起または増悪する経路も重要であると考えられている (Holt and Ju, 2006; Adams et al., 2010)。ビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムに着目した先行研究は存在しないため、はじめにビルダグリプチンや M20.7 によりマウスの肝臓内で発現が誘導され得る炎症関連遺伝子の同定を行った。そして、薬物性肝障害に関与すると考えられる候補遺伝子を選択し、ヒト培養細胞を用いた検討を行うことで、ヒトの肝臓においてもビルダグリプチンや M20.7 の暴露によって変動する遺伝子の同定を試みた。

3-1. ビルダグリプチンにより肝臓内で誘導される炎症関連遺伝子の同定

ビルダグリプチンや M20.7 により肝臓内で発現が誘導され得る炎症関連遺伝子を同定するために、ビルダグリプチン (1,000 mg/kg) をマウスに経口投与し、24 時間後に摘出した肝臓由来の total RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。その結果、

ビルダグリプチン処置によりマウス肝臓内で発現量が2倍以上増加した遺伝子が276個、2倍以上低下した遺伝子が292個同定された。ビルダグリプチン処置によりマウス肝臓内で発現が低下した遺伝子の上位に薬物性肝障害との関連が報告されている遺伝子は存在しなかったが、発現が増加した遺伝子の上位には薬物性肝障害に関与することが報告されている metallothionein (MT) 1、MT2、S100 calcium-binding protein (S100) A8、S100A9 が含まれていた (Table 7 and Table 8) (Liu et al., 1998; Cho et al., 2012; Higuchi et al., 2012; Moles et al., 2014)。

次に、マイクロアレイ解析に用いた total RNA を使用して Mt1、Mt2、S100a8、S100a9 mRNA の発現解析をリアルタイム RT-PCR で行った。その結果、コントロール群に比べてビルダグリプチン処置群のマウスの肝臓内で Mt1、Mt2、S100a8、S100a9 mRNA の発現が有意に上昇していることをリアルタイム RT-PCR でも評価することができた (Figure 25A)。このことから、マイクロアレイ解析で得られた結果は、リアルタイム RT-PCR でも再現可能であることが示された。

さらに、ビルダグリプチンによる Mt1、Mt2、S100a8、S100a9 mRNA の発現変動には、薬理効果である DPP-4 阻害作用が関与している可能性が示唆されたため、シタグリプチン (1,000 mg/kg) を経口投与したマウス肝臓内における Mt1、Mt2、S100a8、S100a9 mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR で評価した。その結果、シタグリプチン処置群のマウスの肝臓内においては、Mt1、Mt2、S100a8、S100a9 mRNA の発現量は増加しないことが明らかになった (Figure 25B)。このことから、ビルダグリプチンによるマウス肝臓内における Mt1、Mt2、S100a8、S100a9 mRNA の発現誘導は、DPP-4 阻害薬の中でもビルダグリプチンに特有の反応であることが示唆された (Asakura et al., 2016)。

Table 7. Top 14 probes that were up-regulated more than 2-fold by vildagliptin in the mouse livers.

No.	Gene Symbol	Gene name	Fold change (Vildagliptin/Control)
1	Cabyr	Calcium-binding tyrosine phosphorylation regulated protein	13.82
2	Pip5k1a	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 alpha	6.56
3	Ciart	Circadian associated repressor of transcription	6.55
4	Mt1	Metallothionein 1	6.45
5	Fbfl	Fas (TNFRSF6) binding factor 1	5.99
6	Lpin1	Lipin 1	5.97
7	Pfkfb3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	5.76
8	Mbp	Myelin basic protein	5.76
9	Usp2	Ubiquitin specific peptidase 2	5.56
10	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	5.52
11	S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	5.52
12	Plin4	Perilipin 4	5.46
13	Mars2	Methionine-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)	5.30
14	Mt2	Metallothionein 2	5.29

Table 8. Top 10 probes that were down-regulated more than 2-fold by vildagliptin in the mouse livers.

No.	Gene Symbol	Gene name	Fold change (Vildagliptin/Control)
1	Olf394	Olfactory receptor 394	0.098
2	Smcp	Sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein	0.101
3	Saa1	Serum amyloid A 1	0.121
4	Lcn2	Lipocalin 2	0.121
5	Saa2	Serum amyloid A 2	0.123
6	Ric3	Resistance to inhibitors of cholinesterase 3 homolog	0.125
7	Arntl	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	0.139
8	Ccdc142	Coiled-coil domain containing 142	0.152
9	Cldnd2	Claudin domain containing 2	0.154
10	Cnn1	Calponin 1	0.158

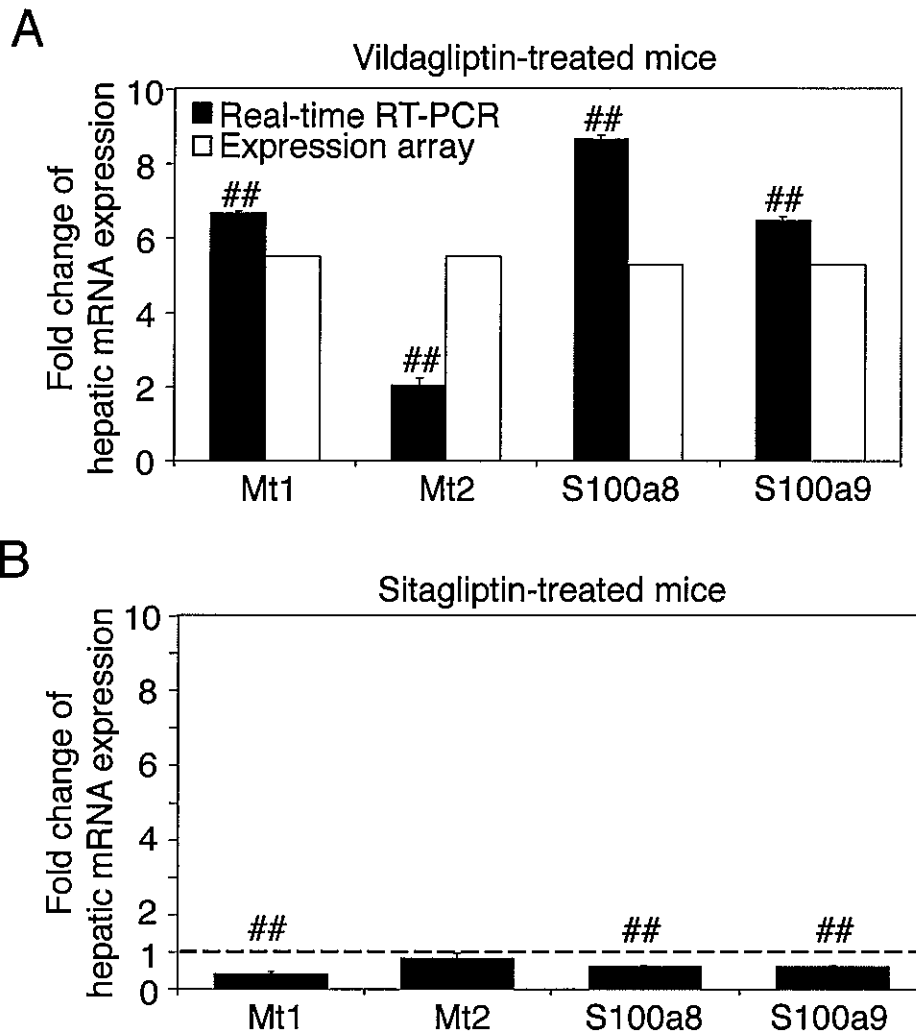


Figure 25. Effect of vildagliptin (A) and sitagliptin (B) on hepatic gene expression in mice. In the real-time RT-PCR analysis, expression was normalized with the expression of cyclophilin and the expression level in the liver of control mice was defined as 1. Data represent the means \pm S.D. of three independent experiments. ##, $P < 0.01$, compared with the liver of control mice.

3-2. マウス肝臓で誘導された遺伝子の HepG2 細胞における発現とビルダグリプチンによる発現変動

ビルダグリプチンによりマウス肝臓内で誘導された遺伝子が、ヒトの肝臓においても誘導されるか否かを評価するために、ヒトの肝実質細胞を想定したヒト肝癌細胞株 (HepG2 細胞) をビルダグリプチンで処置し、Table 7 に示した 14 遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で解析した。臨床において推奨されている用法用量であるビルダグリプチン 50 mg 錠を 1 日 2 回服用した際の C_{max} は約 1 μM であるが (He et al., 2008; He, 2012)、ビルダグリプチンは分布容積が 70 L と大きく組織移行性が高い薬物であることから、肝臓内では血中濃度の 10 倍から 30 倍高い濃度となることが報告されている (医薬品インタビューフォーム: エクア[®])。そのため、HepG2 細胞へのビルダグリプチン処置濃度は、1 μM 、10 μM 、100 μM を選択した。発現を評価した 14 遺伝子の中で、calcium-binding tyrosine phosphorylation regulated protein (CABYR)、ubiquitin specific peptidase 2 (USP2)、S100A9、methionine-tRNA synthetase 2 (MARS2) は、ビルダグリプチンの濃度依存的に誘導されることが明らかになった (Figure 26)。一方で、MT1 と MT2 を含む残りの 9 遺伝子は、ビルダグリプチンで処置しても HepG2 細胞において誘導されなかった。また、S100A8 は発現量が少ないためにリアルタイム RT-PCR で定量することができなかった。以上の HepG2 細胞を用いた検討より、ヒトの肝臓においてもビルダグリプチンにより CABYR、USP2、S100A9、MARS2 の mRNA 発現が誘導される可能性が示された (Asakura et al., 2016)。

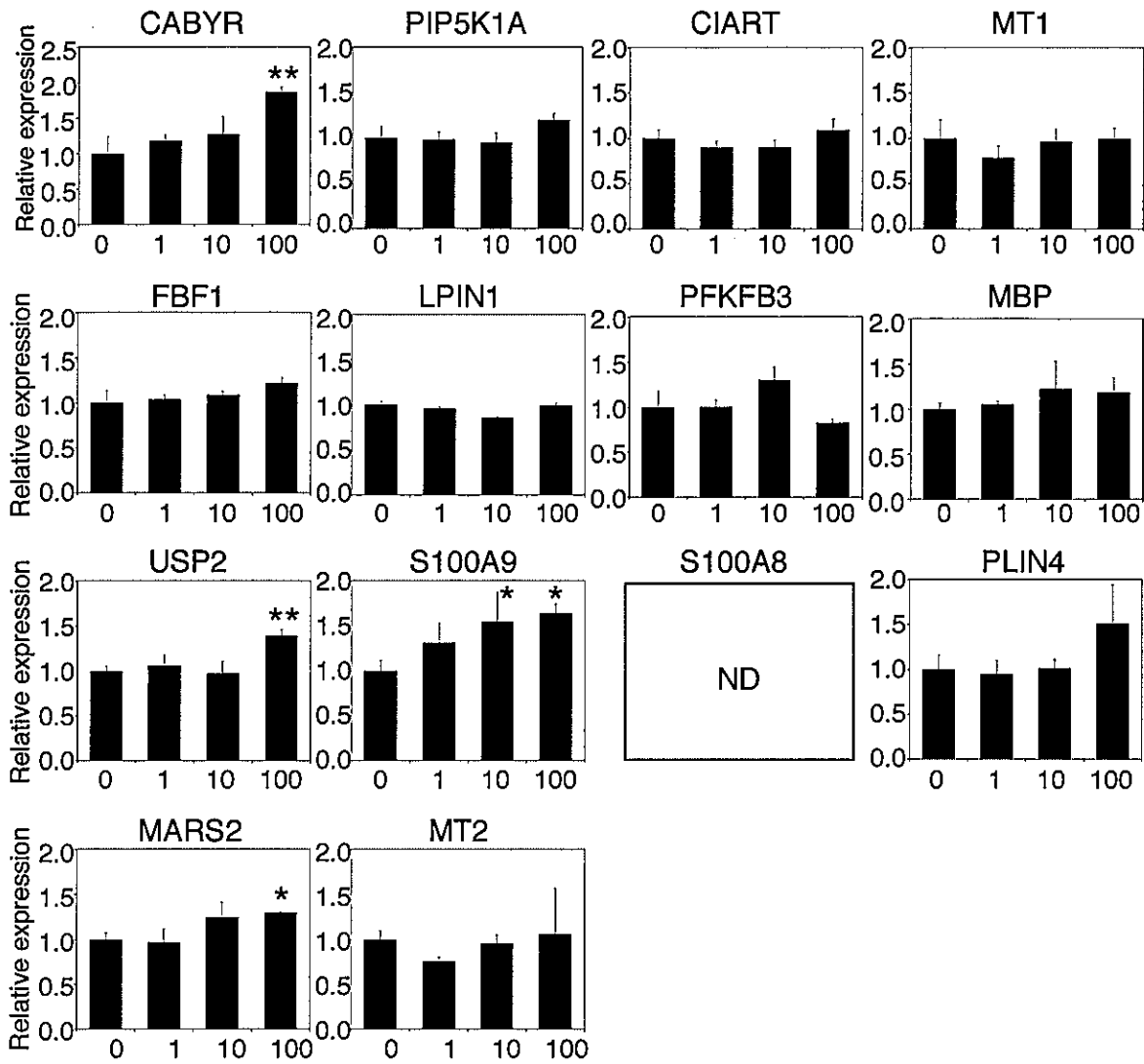


Figure 26. Effect of vildagliptin on gene expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 0, 1, 10, or 100 μM of vildagliptin for 24 h. Expression was normalized with the expression of GAPDH. Data represent the means \pm S.D. of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, compared with vildagliptin 0 μM . ND, not detectable.

3-3. HepG2 細胞における S100A9、TNF- α の発現とビルダグリプチンによる発現変動

S100A8 と S100A9 は、カルバマゼピンやフェニトインなどの薬物性肝障害に関与することが報告されている炎症関連タンパク質であり (Roth et al., 2003; Higuchi et al., 2012; Sasaki et al., 2013)、腫瘍壊死因子 (tumour necrosis factor- α , TNF- α) によって誘導されることが報告されている (Kido et al., 2005; Perera et al., 2010)。そのため、HepG2 細胞のビルダグリプチン処置による S100A9 mRNA の誘導に TNF- α が関与する可能性が考えられた。そこで、HepG2 細胞のビルダグリプチン処置による TNF- α の発現解析を行った。また、主代謝物 M20.7 と他の DPP-4 阻害薬であるシタグリプチンによる S100A9 と TNF- α の発現変動への影響についても検討した。

HepG2 細胞をビルダグリプチンで処置したところ、Figure 26 に示した結果と同様に S100A9 mRNA は約 2 倍増加が認められた (Figure 27)。また、ビルダグリプチンは処置濃度依存的に TNF- α mRNA を誘導することが明らかになった。さらに、M20.7 およびシタグリプチンでも S100A9 および TNF- α の mRNA の増加が認められた。HepG2 細胞で認められた S100A9 および TNF- α の mRNA の発現増加はシタグリプチン処置時にも認められたため、DPP-4 阻害作用を介した機序により起こる可能性が示唆された (Asakura et al., 2016)。

次に、S100A8 と S100A9 は S100A8/A9 複合体として細胞外に分泌され、toll-like receptor や receptor for advanced glycation end products (RAGE) のリガンドとして作用し、自然免疫の活性化を介した炎症反応の増悪を引き起こすことが報告されているため (Roth et al., 2003; Kido et al., 2003; Kido et al., 2005)、ビルダグリプチン、M20.7 およびシタグリプチンによる S100A9 mRNA の発現増加が、機能を示す S100A8/A9 複合体の分泌量の増加に繋がるかを評価した。S100A8/A9 複合体を特異的に検出する酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) で S100A8/A9 複合体の培養液中

への分泌量の変化を評価した。しかし、ビルダグリプチン、M20.7、シタグリプチンを S100A9 mRNA の誘導が認められた濃度で処置した際の培養液において、S100A8/A9 複合体の分泌を ELISA で検出することができなかった。また、TNF- α も ELISA で検出することができなかった。このことから、HepG2 細胞において認められた S100A9 mRNA の誘導は機能を示す S100A8/A9 複合体の分泌量の増加には繋がっていない可能性が示された (Asakura et al., 2016)。

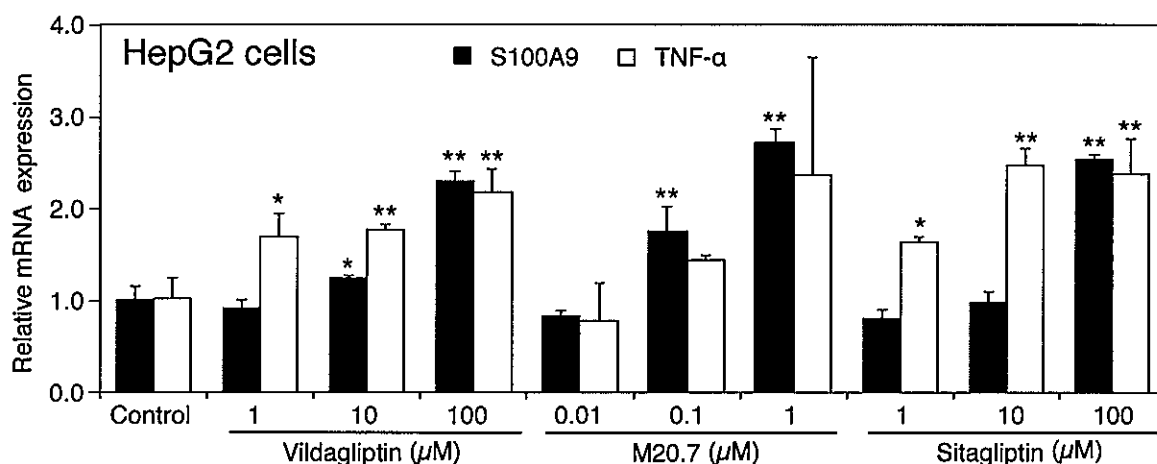


Figure 27. Effects of vildagliptin, M20.7, and sitagliptin on gene expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with the indicated concentration (μM) of vildagliptin, M20.7, or sitagliptin for 24 h. Expression was normalized with the expression of GAPDH. Data represent the means \pm S.D. of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, compared with control.

3-4. HL-60 細胞における S100A8、S100A9 の発現とビルダグリプチンによる発現変動

炎症関連タンパク質である S100A8 と S100A9 は、主に免疫細胞である好中球や単球に高く発現している (Roth et al., 2003; Foell and Roth, 2004; Foell et al., 2007)。フェニトインおよびカルバマゼピンの薬物性肝障害モデル動物において、肝臓内へ浸潤する免疫細胞数の増加や免疫細胞由来の S100A8 および S100A9 の発現増加が alanine aminotransferase (ALT) 値の上昇に関与することが示されている (Higuchi et al., 2012; Sasaki et al., 2013)。また、薬物性肝障害を引き起こす薬物による S100A8 と S100A9 の発現増加を *in vitro* 実験系で評価する上では、ヒトの免疫細胞を想定したヒト好中球様細胞株 (HL-60 細胞) を用いることが有用であることが報告されている (Yano et al., 2014; Oda et al., 2016)。そこで、HL-60 細胞をビルダグリプチンで処置した際の S100A8、S100A9 および TNF- α mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR で解析し、さらに S100A8/A9 複合体および TNF- α の培養液中へのタンパク分泌量の変化を ELISA で評価した。また、主代謝物 M20.7 と他の DPP-4 阻害薬であるシタグリプチンによる S100A8、S100A9、TNF- α の発現変動への影響についても検討した。好中球や単球における S100A8 と S100A9 の発現は、lipopolysaccharide (LPS) によって誘導されるため (Kido et al., 2003; Kido et al., 2005)、HL-60 細胞における S100A8 と S100A9 の発現増加のポジティブコントロールとして LPS 10 μ g/mL 処置を行った。

過去の報告 (Yano et al., 2014) 通り、LPS 処置により HL-60 細胞における S100A8、S100A9 の mRNA が約 5 倍誘導された (Figure 28)。HepG2 細胞の結果とは異なり、HL-60 細胞においては S100A8、S100A9 および TNF- α mRNA の増加はビルダグリプチン 100 μ M と M20.7 1 μ M 処置時には認められたが、シタグリプチン処置時には認められなかった (Figure 28)。さらに、HL-60 細胞においては培養液中に分泌された S100A8/A9 複合体の濃度を ELISA で定量することができた。コントロール、ビルダ

グリプチン 1 μM 、10 μM 、100 μM 処置時の培養液中の S100A8/A9 複合体の濃度は、それぞれ 355 ± 102 、 588 ± 171 、 731 ± 72 、 1982 ± 403 pg/mL (mean \pm S.D., $n = 3$) であり、ビルダグリプチンの処置濃度依存的に S100A8/A9 複合体の分泌量の増加が認められた (Figure 29A)。また、M20.7 を単独で処置した際にも S100A8/A9 複合体の分泌量が増加することが明らかになった (Figure 29B)。一方で、シタグリプチン処置時には S100A8/A9 複合体の分泌量の増加は認められなかった (Figure 29A)。さらに、HL-60 細胞から培養液中に分泌される TNF- α タンパク量は全ての処置条件で変化しなかった (Figure 29C and 29D)。以上のことから、ビルダグリプチンおよび主代謝物 M20.7 は TNF- α および DPP-4 阻害作用とは独立した機序により、HL-60 細胞の S100A8 と S100A9 の mRNA 発現量および S100A8/A9 複合体分泌量を増加させることが明らかとなった (Asakura et al., 2016)。

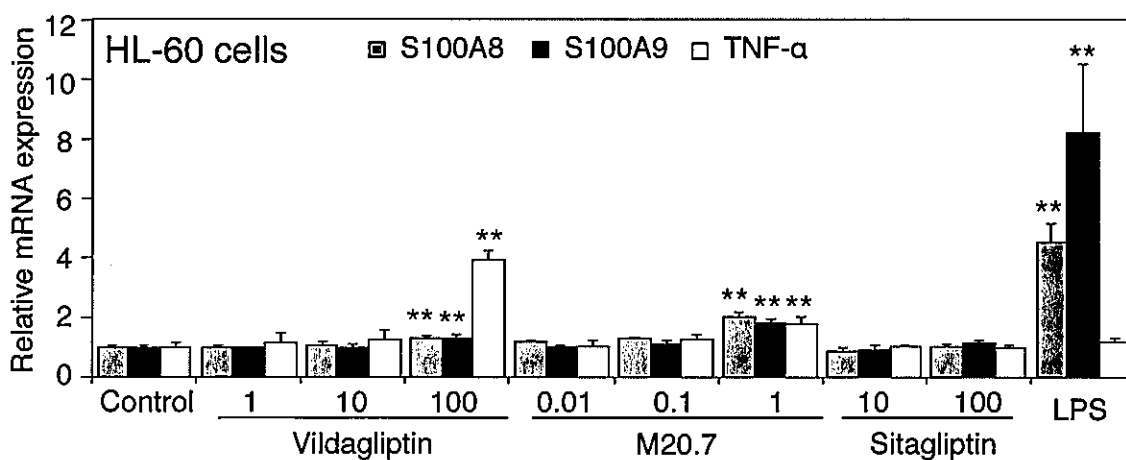


Figure 28. Effects of vildagliptin, M20.7, and sitagliptin on gene expression in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with the indicated concentration (μM) of vildagliptin, M20.7, sitagliptin, or LPS for 24 h. Expression was normalized with the expression of GAPDH. Data represent the means \pm S.D. of three independent experiments. **, $P < 0.01$, compared with control. LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as a positive control.

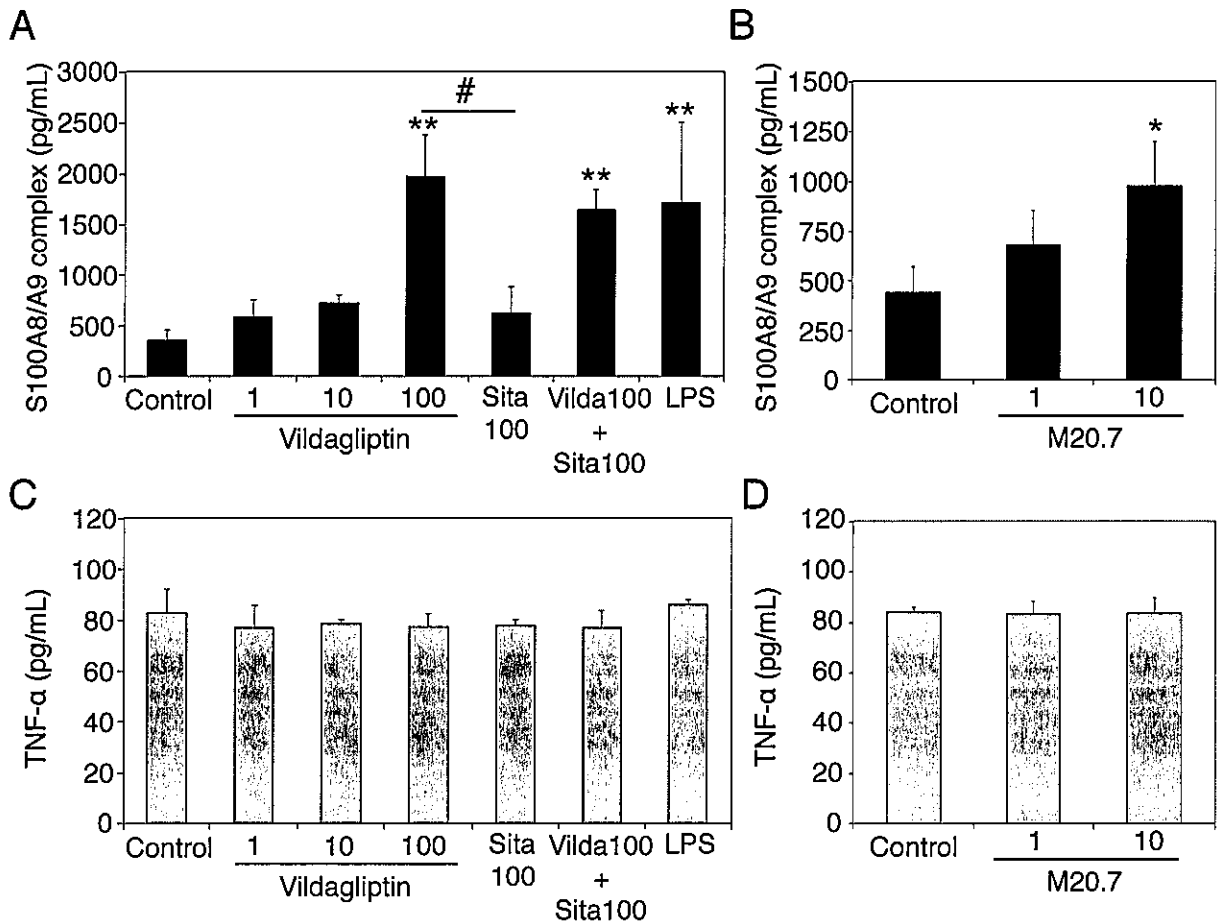


Figure 29. Effects of vildagliptin and M20.7 on gene expression in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with the indicated concentration (μM) of vildagliptin, M20.7, sitagliptin, or LPS for 48 h. The release of S100A8/A9 complex (A and B) and TNF- α (C and D) in the culturing medium was measured by ELISA. LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as a positive control. Data represent the means \pm S.D. of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, compared with control. #, $P < 0.05$, compared with 100 μM sitagliptin. Sita 100, sitagliptin 100 μM ; Vilda 100 + Sita 100, vildagliptin 100 μM + sitagliptin 100 μM .

3-5. ビルダグリプチン処置による S100A8/A9 の発現誘導への M20.7 の関与

第1章および第2章で、ビルダグリプチンは DPP-4 によって代謝されることを明らかにした。そのため、HL-60 細胞に未変化体のビルダグリプチンを単独で処置した際にも、培養液中に M20.7 が生成することが考えられた。未変化体のビルダグリプチンだけでなく主代謝物 M20.7 も S100A8/A9 複合体の分泌量の増加を引き起こしたことから (Figure 29B)、ビルダグリプチンによる S100A8/A9 の発現誘導への M20.7 の関与を評価した。

まず、HL-60 細胞に DPP-4 が発現しているか否かを明らかにするために、HL-60 細胞の S9 画分を用いて DPP-4 ペプチダーゼ活性を測定した。HL-60 細胞の S9 画分の DPP-4 ペプチダーゼ活性は 0.37 ± 0.04 nmol/min/mg protein であった (Figure 30A)。さらに、HL-60 細胞の S9 画分を熱処理により変性させたサンプルおよび HL-60 細胞の S9 画分と DPP-4 選択的阻害剤としてビルダグリプチン $1 \mu\text{M}$ を共存させたサンプルでは、DPP-4 ペプチダーゼ活性が認められなくなった (Figure 30A)。このことから、HL-60 細胞には機能を示す DPP-4 が発現していることが明らかになった (Asakura et al., 2016)。

次に、HL-60 細胞にビルダグリプチンを単独で処置した際の培養液中に M20.7 が生成するか否かを明らかにするために、HL-60 細胞にビルダグリプチン $100 \mu\text{M}$ を処置した際の培養液を経時的に回収し、M20.7 の濃度を LC-MS/MS で定量した。HL-60 細胞にビルダグリプチンを処置してから 6、12、24、36、48 時間後の培養液中の M20.7 の濃度は、それぞれ 5.0 ± 0.5 、 7.6 ± 0.1 、 21 ± 1.0 、 33 ± 2.4 、 44 ± 3.6 nM (mean \pm S.D., $n = 3$) であった (Figure 30B)。また、HL-60 細胞にビルダグリプチン $100 \mu\text{M}$ と DPP-4 選択的阻害剤としてシタグリプチン $100 \mu\text{M}$ を共処置した際の 6、12、24、36、48 時間後の培養液中の M20.7 の濃度は、 3.1 ± 0.1 、 3.9 ± 0.5 、 7.1 ± 0.3 、 8.7 ± 0.2 、 10 ± 1.2 nM

(mean \pm S.D., $n = 3$) であり、ビルダグリプチン単独処置時に比べてシタグリプチンを共存させることで M20.7 の生成量が著しく低下した (Figure 30B)。以上の結果から、HL-60 細胞にビルダグリプチン 100 μ M を処置した際の培養液中には時間依存的に M20.7 が生成していること、およびその M20.7 の生成には DPP-4 ペプチダーゼ活性が関与していることが示された。一方で、ビルダグリプチン 100 μ M を処置してから 48 時間後の培養液中に存在する M20.7 は約 40 nM と低濃度であったこと、およびビルダグリプチン 100 μ M 単独処置時と M20.7 の生成量の低下が認められたビルダグリプチン 100 μ M とシタグリプチン 100 μ M の共処置時の HL-60 細胞からの S100A8/A9 複合体の分泌量に顕著な差が認められなかったことから (Figure 29A and 30B)、M20.7 だけでなく未変化体のビルダグリプチンも S100A8/A9 の誘導能を有することが明らかになった (Asakura et al., 2016)。

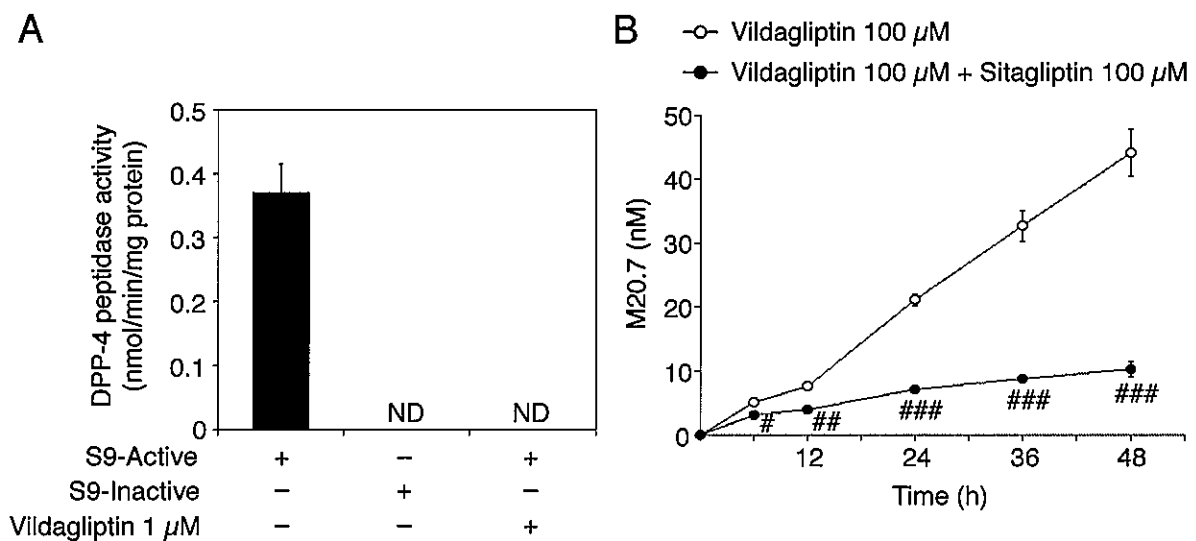


Figure 30. DPP-4 peptidase activity in HL-60 cells (A) and time-dependent changes of M20.7 concentration in the culturing medium of vildagliptin-treated HL-60 cells (B). Data represent the means \pm S.D. of triplicate determinations. S9-active, active S9 fraction; S9-inactive, heat-inactivated S9 fraction (negative control); ND, not detectable. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$, compared with vildagliptin and sitagliptin-treated HL-60 cells of each time point.

3-6. 考察

第3章では、ビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムを解明するために、マウスやヒト培養細胞を用いた基礎研究を行った。ヨーロッパで行われた臨床試験において、プラセボ服用群またはビルダグリプチン 50 mg 錠 1 日 2 回服用群に比べて、100 mg 錠 1 日 1 回服用群で ALT 値と aspartate aminotransferase (AST) 値が著しく上昇した患者が複数認められたことから、ビルダグリプチンの用法用量が 50 mg 錠 1 日 2 回に設定された (Deacon, 2011)。また、日本人のビルダグリプチンによる肝障害の症例は、糖尿病性腎症が進行し人工透析を行っている患者であり、最終的に腎臓から排泄されるビルダグリプチンおよび M20.7 の血中濃度が著しく高くなっていた可能性が考えられた (Kurita et al., 2014)。以上の背景から、高濃度のビルダグリプチンで暴露された際に肝障害のリスクが増加すると考えられた。そこで本研究では、高濃度のビルダグリプチン処置時にマウス肝臓内で誘導される遺伝子を探索し候補遺伝子を絞り、臨床で認められる血中または組織中濃度を想定した処置濃度においてヒト培養細胞においてもビルダグリプチンにより候補遺伝子が誘導されることを評価することとした。よって、マウスに投与したビルダグリプチンは高用量であったが、ビルダグリプチンおよび M20.7 による免疫細胞における S100A8 と S100A9 の誘導反応は、臨床でも認められると考えられる。これまでにビルダグリプチンの肝障害に関する先行研究やビルダグリプチンの肝障害モデル動物が存在しなかったために、このような研究方法を選択したが、今後は本研究の成果を足がかりにビルダグリプチンの肝障害モデル動物が構築されることで、さらに詳細な肝障害の発現メカニズムの研究を行うことが可能になると考えられる。

これまでに、薬物性肝障害を引き起こす薬物が好中球や HL-60 細胞の S100A8 や S100A9 mRNA の発現量を増加させることは報告されていたが、その誘導メカニズム

は明らかにされていなかった。本研究においては、S100A8 と S100A9 の発現を誘導することが報告されている TNF- α に着目し、培養液中の分泌量の変化を ELISA で評価することで、TNF- α はビルダグリプチンによる S100A8 と S100A9 の発現誘導に関与していない可能性を明らかにした (Figure 29C and 29D)。また、ビルダグリプチンの薬理効果である DPP-4 阻害作用が関与している可能性を考え、他の DPP-4 阻害薬であるシタグリプチンで処置した結果との比較も行った。マウス肝臓内における S100a8 と S100a9 mRNA の誘導や、HL-60 細胞からの S100A8/A9 複合体の分泌誘導は、ビルダグリプチン処置時には認められるが、シタグリプチン処置時には認められないことから、これらの反応には DPP-4 阻害作用は関与しない可能性を見出した (Figure 25 and 29)。さらに、主代謝物 M20.7 の単独処置の結果から、未変化体だけでなく M20.7 も S100A8/A9 の誘導能を有することが明らかになった (Figure 29B)。これらの知見は、薬物による S100A8 と S100A9 の発現誘導における詳細な分子メカニズムを明らかにする上で有用な情報であると考えている (Asakura et al., 2016)。

第 2 章で、ビルダグリプチンの主代謝物である M20.7 の生成には、肝臓の DPP-4 が大きく寄与することを明らかにした。また、ビルダグリプチンは分布容積が大きく組織移行性が高い薬物であることから、肝臓内では血中濃度の 10 倍から 30 倍高い濃度となることが報告されている (医薬品インタビューフォーム: エクア[®])。そのため、ビルダグリプチンの血中濃度は約 1 μ M (He et al., 2008; He, 2012) であるが、肝臓内の濃度は約 10-30 μ M になると考えられる。このことから、M20.7 の血中濃度も約 1 μ M (He et al., 2008) であるが、M20.7 が生成される主要な臓器である肝臓内においては 10 μ M 以上の高い濃度で存在することが予想される。M20.7 による S100A8/A9 複合体の分泌誘導は 10 μ M 処置時に認められたことから、臨床においても十分に起こり得る反応であることが示された。さらに、S100A8/A9 複合体を分泌する主要な細胞である好

中球や単球は様々な臓器に存在するが、M20.7 が生成される主要な臓器が肝臓であるために、肝臓内において特に炎症反応の増悪が引き起こされ、ビルダグリプチンの肝障害が惹起される可能性が考えられた。このことから、これまでに未変化体のビルダグリプチンの血中濃度の個人差すらも注目されてこなかったが、肝障害を早期発見することや未然に防ぐためには、M20.7 の生成能の個人差に着目する必要があると考えられた。ビルダグリプチンの未変化体だけでなく主代謝物である M20.7 も肝障害に関与する可能性があるというこの新たな知見は、ビルダグリプチンによる肝障害に対する危険因子の解明に応用されることにより、ビルダグリプチンの適正使用に貢献することが期待される。

3-7. 小括

ビルダグリプチンによりマウス肝臓内で S100a8 および S100a9 mRNA が誘導されることを明らかにした (Table 7 and Figure 25)。また、ヒトの培養細胞においてもビルダグリプチンが S100A8 と S100A9 mRNA の発現を誘導すること、および機能を示す S100A8/A9 複合体の分泌量の増加を引き起こすことを見出した (Figure 27, 28, and 29)。さらに、未変化体のビルダグリプチンだけでなく主代謝物 M20.7 も S100A8 と S100A9 の誘導能を有することを明らかにした (Figure 29B)。以上より、ビルダグリプチンおよび M20.7 が免疫細胞からの炎症関連タンパク質 S100A8/A9 の分泌を誘導することが、ビルダグリプチンによる肝障害の一因を担っている可能性が示された (Figure 31) (Asakura et al., 2016)。

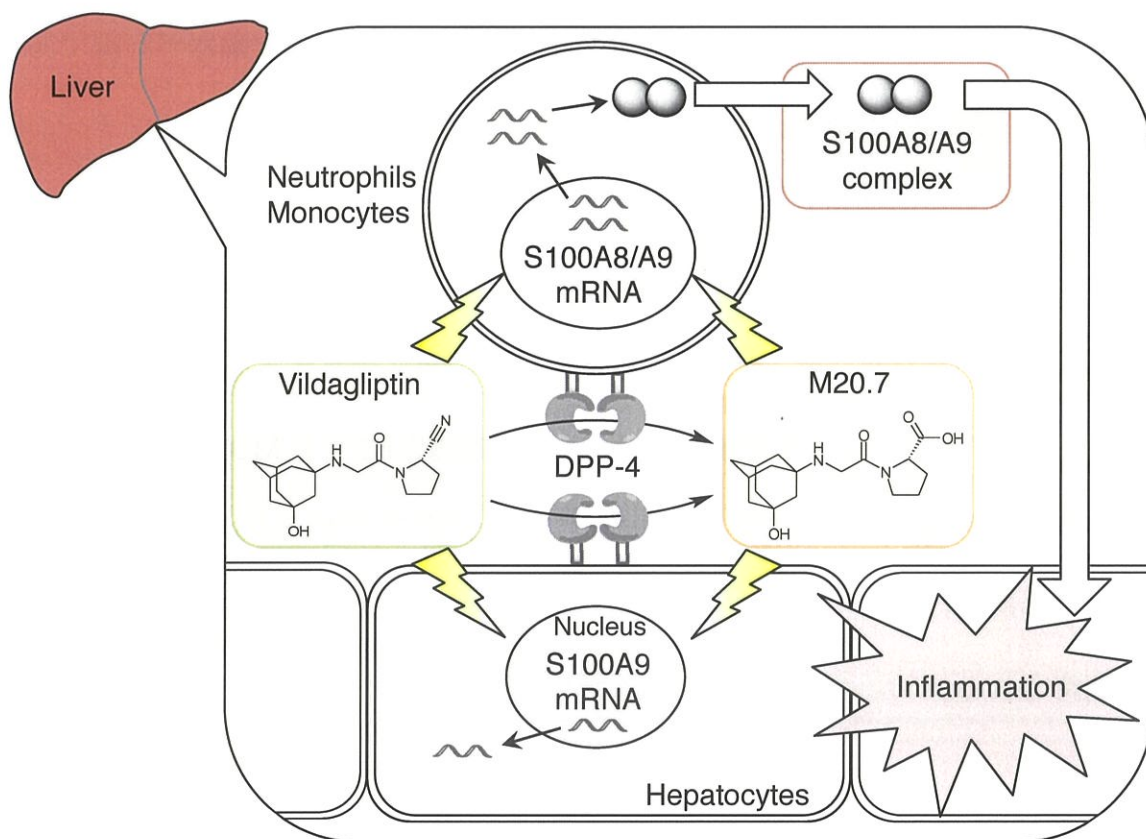


Figure 31. A proposed mechanism of vildagliptin-associated liver dysfunction. Vildagliptin is metabolized via DPP-4-mediated hydrolysis. Parental vildagliptin and its metabolite M20.7 induce the mRNA expressions of S100A8 and S100A9 and the release of S100A8/A9 complex from immune cells, such as neutrophils and monocytes, which result in inflammation in the liver.

第 4 章

ビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度の調査

ビルダグリプチンによる肝障害は添付文書により注意喚起はされているが、実臨床下における発現頻度は明らかになっていなかった。発現頻度が不明であると、ビルダグリプチンによって肝障害を引き起こす患者数を見積もることができないために、肝障害になりやすい患者背景や危険因子を探索するための大規模な臨床研究を行うことが困難となる。そのため、小規模であっても実臨床下における肝障害の発現頻度を明らかにすることは有用である。本章では、実臨床下におけるビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度を明らかにするために行った、北里大学病院の電子カルテを用いた後ろ向き観察研究について述べる。本研究は、厚生労働省「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」並びに「ヘルシンキ宣言」に従って実施し、北里大学医学部・病院倫理委員会の承認を得て行った (承認番号: B16-166)。

4-1. 北里大学病院におけるビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度

本研究では、DDW-J 2004 ワークショップ薬物性肝障害診断基準 (滝川一ら, 2005) に従って、ALT 値が施設基準値の 2 倍もしくは ALP 値が施設基準値を越えるもの (ALT 値 80 U/L 以上もしくは ALP 値 360 U/L 以上) を肝障害と定義した。北里大学病院で 2012 年 4 月から 2013 年 3 月までの 1 年間に、ビルダグリプチンが処方された患者数は 313 名であった (Figure 32)。そのうち、北里大学病院で初めてビルダグリプチンの服用を開始したことを確認することができ、さらに服用開始時点での ALT 値と ALP 値が正常であった患者数は 146 名であった。この 146 名について、ビルダグリプ

チン服用開始1年以内における肝障害の有無を調査した。その結果、146名中31名がビルダグリプチン服用開始1年以内に肝障害を経験しており、その発現頻度は21%であることが明らかになった。

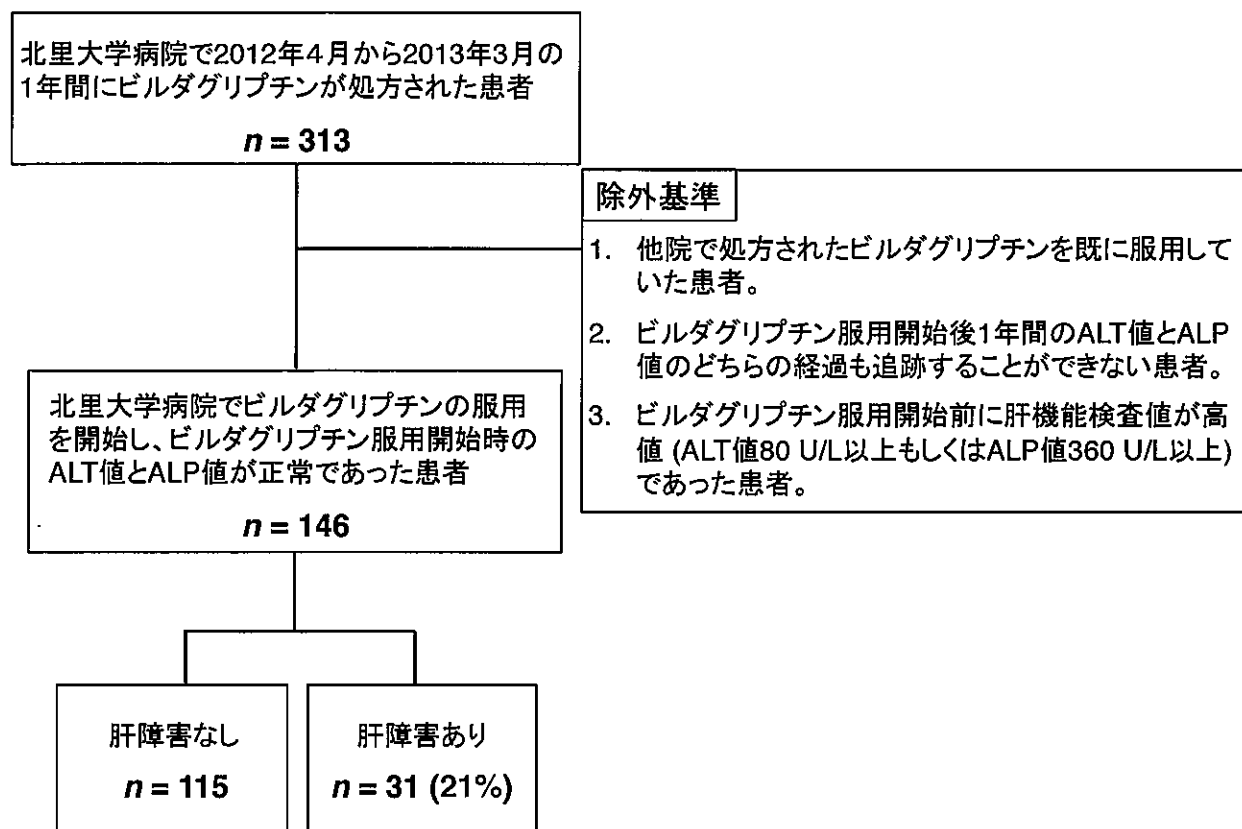


Figure 32. 電子カルテを用いた後ろ向き観察研究の調査結果

4-2. ビルダグリプチンによる肝障害の重症度分類

ビルダグリプチン服用開始後1年以内に肝障害を経験した患者における肝障害の重症度を明らかにするために、有害事象共通用語規準 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE) v4.0 日本語訳 日本臨床腫瘍研究グループ (Japan Clinical Oncology Group, JCOG) 版 (CTCAE v4.0-JCOG) の Grade 分類 (<http://www.jcog.jp/doctor/tool/ctcaev4.html>) を用いた肝障害の重症度の分類を行った。CTCAE v4.0-JCOG の Grade 1-4 の定義は、Table 9 に示した。ビルダグリプチンによ

る肝障害を経験した 31 名の ALT 値と ALP 値の重症度を分類したところ、ほぼ全ての患者の ALT 値と ALP 値の上昇の程度は、軽症を意味する Grade 1 であった (Table 10 and 11)。一方で、ALT 値と ALP 値のどちらも Grade 2 の中等症以上に上昇している患者も存在しており、さらに ALT 値については Grade 3 の重症に分類される程に上昇している患者が存在した。このことから、ビルダグリプチン服用後に肝障害を経験した多くの患者は軽症であったが、一部には重症の肝障害を発症していることが明らかになった。

Table 9. CTCAE v4.0-JCOG による有害事象の重症度 (Grade) の定義

Grade	定義
1	軽症; 症状がない、または軽度の症状がある; 臨床所見または検査所見のみ; 治療を要さない
2	中等症; 最小限/局所的/非侵襲的治療を要する; 年齢相応の身の回り以外の日常生活動作の制限
3	重症または医学的に重大であるが、ただちに生命を脅かすものではない; 入院または入院期間の延長を要する; 活動不能/動作不能; 身の回りの日常生活動作の制限
4	生命を脅かす; 緊急処置を要する

セミコロン (;) は「または」を意味する。

Table 10. ビルダグリプチンによる肝障害を経験した患者の ALT 値による分類

	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
ALT 値 (U/L)	> 40-120	> 120-200	> 200-800	> 800
人数 (n = 31)	28	2	1	0

Table 11. ビルダグリプチンによる肝障害を経験した患者の ALP 値による分類

	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
ALP 値 (U/L)	> 360-900	> 900-1800	> 1800-7200	> 7200
人数 (n = 31)	30	1	0	0

4-3. 考察

第4章では、実臨床下におけるビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度を明らかにするために行った、北里大学病院における電子カルテを用いた後ろ向き観察研究について述べた。ビルダグリプチンによって引き起こされる肝障害を調査するために、ビルダグリプチンの服用開始後に肝障害となっていることに特に注意した。そのため、診療録を調査し、北里大学病院で初めてビルダグリプチンの服用を開始したことが確認できない患者は除外した。また、ビルダグリプチン服用開始時に既にALT値とALP値が高値を示した患者も除外した。一方で、ビルダグリプチン服用開始時のALT値とALP値が正常であれば、ビルダグリプチンが肝障害の危険因子となる可能性があるため、肝障害を起こしやすい薬剤の併用の有無やウイルス性肝炎、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝疾患、自己免疫性肝炎、肝臓癌などの肝疾患の合併症の有無により除外基準を設けることはしなかった。この調査の結果、ビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度が21%であることが明らかになった (Figure 32)。この21%という数値が高いかどうかは、同様の基準で他の2型糖尿病治療薬における肝障害の発現頻度を調査し比較しなければ判断することはできないが、この数値を足がかりに、今後さらに大規模な臨床研究が行われることで、ビルダグリプチンによる肝障害の危険因子の解明に本研究の成果が貢献することが期待される。

ビルダグリプチン服用開始後1年以内に肝障害を経験した31名における肝障害の重症度をCTCAE v4.0-JCOGのGrade分類を用いて評価したところ、多くの患者はGrade 1の軽症であったが、Grade 2の中等症やGrade 3の重症に分類される患者も存在することが明らかになった。このことから、ビルダグリプチン服用中に認められる肝障害は軽症である場合が多いが、一部には重症となる患者も存在することから注意して経過を観察する必要があることが示された。この重症であった患者はビルダグリ

プチン服用開始後に、肝障害を引き起こす代表的な薬物であるアセトアミノフェンを併用していた。第3章で、ビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムの一因として S100A8/A9 複合体が関与する可能性を明らかにした。その S100A8/A9 は別の因子によって引き起こされた炎症反応を増悪させる作用を持つ (Roth et al., 2003; Kido et al., 2003; Kido et al., 2005)。そのため、ビルダグリプチンを服用し、肝臓内に高濃度で分布する未変化体および主に肝臓で生成される主代謝物 M20.7 によって、肝臓内の免疫細胞からの S100A8/A9 複合体の分泌量が増加した状態で、他の肝障害を惹起する薬剤を併用することが、重度の肝障害に繋がる可能性が考えられた。本研究により得られた新たな知見は、ビルダグリプチンによる肝障害の危険因子の解明に応用されることが期待される。

III. 総括

近年、2型糖尿病治療薬の中でも単独投与では低血糖や体重増加を起こしにくいことから、DPP-4阻害薬の処方数が急速に増加している (Kohro et al., 2013)。一方で、臨床使用歴が短いことから長期的な有効性や副作用の個人差に関する情報が少ないことがDPP-4阻害薬の課題の一つであった。そのような背景の中、本研究ではDPP-4阻害薬の一つであるビルダグリプチンの適正使用に貢献することを目指した基礎研究と臨床研究を行い、以下の成果を得た。

第1章 ビルダグリプチンの主代謝酵素の解明を目指した *in vitro* 実験

ビルダグリプチンの体内動態の変動因子として重要な主代謝酵素を解明することを目指した、ヒト肝臓サンプルや発現系を用いた *in vitro* 実験を行った。その結果から、ヒトNITはビルダグリプチン代謝能を示さないこと、およびヒトの肝臓におけるビルダグリプチンの主代謝酵素は薬効の標的分子であるDPP-4そのものであることを明らかにした (Asakura et al., 2014; Asakura et al., 2015a; Asakura et al., 2015b)。従って、ヒトの体内では稀なシアノ基の加水分解反応をDPP-4が触媒するという新たな知見が得られた。また、ヒトDPP-4の変異体の発現系を用いた検討から、DPP-4によるビルダグリプチン主代謝反応にはDPP-4ペプチダーゼ活性と同様に酵素活性部位のSer630が必須であること、およびヒトDPP-4の遺伝子多型によりビルダグリプチン代謝能が変化することを明らかにした。以上より、ビルダグリプチンの血中濃度の個人差の予測には、DPP-4発現量やヒトDPP-4の遺伝子多型の情報が有用であることが示された。これらの成果は、ビルダグリプチンだけでなく、今後開発されるシアノ基を有する医薬品の適正使用にも貢献することが期待される。

第2章 ビルダグリプチンの主代謝臓器の解明を目指したマウスを用いた *in vivo* 実験とヒト肝ミクロソームを用いた個人差に関する検討

マウスを用いた *in vivo* 実験の結果から、第1章でビルダグリプチンの主代謝酵素であることが示された DPP-4 が *in vivo* においても主代謝酵素として機能すること、および様々な臓器の中でも特に肝臓の DPP-4 発現量が M20.7 の生成量に大きく影響することを明らかにした。また、臨床で報告されている血液中の DPP-4 ペプチダーゼ活性の個人差は、M20.7 の生成量に大きな影響を及ぼさない可能性を見出した。そして、ヒト肝ミクロソームを用いた検討から、肝臓におけるビルダグリプチン代謝活性には個人差が存在することを見出した。第1章と第2章で明らかとなった新たな知見から、ビルダグリプチンの長期的な有効性や副作用の個人差の予測には、肝臓の DPP-4 発現量や DPP-4 の遺伝子多型の情報が有用である可能性が示された (Asakura et al., 2017)。今後、肝臓内の DPP-4 発現量を反映する病態が解明され、また血液中のバイオマーカーが発見されることで、ビルダグリプチンの投与量の個別化に本研究の成果が貢献することが期待される。

第3章 ビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムの解明を目指した基礎研究

ビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムを目指した基礎研究を行い、ビルダグリプチンによりマウス肝臓内で S100a8 と S100a9 mRNA が誘導されることを明らかにした。さらに、ヒトの培養細胞においてもビルダグリプチンが S100A8 と S100A9 mRNA の発現を誘導すること、および炎症の増悪作用を有する S100A8/A9 複合体の分泌量の増加を引き起こすことを見出した。そして、未変化体のビルダグリプチンだ

けでなく主代謝物 M20.7 も S100A8 と S100A9 の誘導能を有することを明らかにした。

これまでにビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムに関する研究は行われていなかった。しかし、本研究により、未変化体のビルダグリプチンおよび M20.7 が免疫細胞からの炎症関連タンパク質 S100A8/A9 の分泌を誘導することが、ビルダグリプチン服用による肝障害の一因を担っている可能性が示された (Asakura et al., 2016)。この本研究で得られた新たな知見が、さらに詳細なメカニズムを研究するためのビルダグリプチンの肝障害モデル動物の構築や、臨床研究による肝障害の危険因子の同定に貢献することが期待される。

第 4 章 ビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度の調査

北里大学病院におけるビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度を調査し、その頻度が約 21%であることを明らかにした。ビルダグリプチン服用開始後 1 年以内に肝障害を経験した 31 名における肝障害の重症度を CTCAE v4.0-JCOG の Grade 分類を用いて評価したところ、多くの患者は Grade 1 の軽症であったが、Grade 2 の中等症や Grade 3 の重症に分類される患者も存在することが明らかになった。また、ビルダグリプチンを服用中に、他の肝障害を惹起する薬剤を併用することが重度の肝障害の発症に繋がる可能性も示唆された。本研究の成果は、今後行われるさらに大規模な臨床研究の足がかりとなり、ビルダグリプチンによる肝障害の危険因子の解明に貢献することが期待される。

本研究を通して、ビルダグリプチンの主代謝酵素は DPP-4 であり、特に肝臓内の DPP-4 の発現量や代謝活性の個人差がビルダグリプチンの体内動態に大きく影響することを明らかにした。さらに、未変化体のビルダグリプチンだけでなく、主代謝物 M20.7 も肝障害の発現に関与する可能性を明らかにした。今後、これらの成果がビルダグリプチンの投与量の個別化や、肝障害の予防および早期発見に応用され、ビルダグリプチンの適正使用に貢献することが期待される。

IV. 実験材料および実験方法

第 1 章

ビルダグリプチンの主代謝酵素の解明を目指した *in vitro* 実験

I. 実験材料

ビルダグリプチンは北里大学薬学部生命薬化学研究室 藤井 秀明 教授、同 唐木 文霞 助教より合成品を御供与頂いた。Vildagliptin carboxylic acid metabolite (M20.7) は Santa Cruz Biotechnology (Delaware Avenue, CA, USA) より購入した。pTARGET Mammalian Expression Vector は Promega (Madison, WI, USA) より購入した。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit は Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) より購入した。G418、trichloroacetic acid、penicillin-streptomycin mixed solution はナカライテスク (Kyoto, Japan) より購入した。プライマー、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、fetal bovine serum (FBS)、Lipofectamine LTX & Plus Reagent、TRIzol Reagent は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。Dithiothreitol (DTT) は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。ウサギポリクローナル抗ヒト NIT1 抗体 (LS-C164881) は LifeSpan BioSciences (Seattle, WA, USA) より購入した。ウサギポリクローナル抗ヒト NIT2 抗体 (PAB23095) は Abnova (Taipei, Taiwan) より購入した。ヤギポリクローナル抗ヒト DPP-4 抗体 (AF1180) は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より購入した。マウスモノクローナル抗 GAPDH 抗体 (6C5) は American Research Products (Belmont, MA, USA) より購入した。Pooled human liver S9 fraction (50 donors, mixed gender)、pooled human liver cytosol (50 donors, mixed gender)、pooled rat liver S9 fraction (105 male Fischer 344 rats)、pooled rat liver cytosol (105 male Fischer 344 rats)、pooled rat liver microsomes (105 male Fischer 344 rats) は XenoTech, LLC (Lenexa, KS, USA) より購入した。Pooled human liver microsomes (50 donors, mixed gender) は

BD Gentest (Woburn, MA, USA) より購入した。Succinamic acid、hydroxylamine-HCl、FeCl₃、ウサギポリクローナル抗 actin 抗体 (A2103)、BNPP、ethopropazine は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。AMC は Setareh Biotech (Eugene, OR, USA) より購入した。Gly-Pro-AMC は Bachem (Bubendorf, Switzerland) より購入した。シタグリプチンは LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA) より購入した。その他の試薬は和光純薬工業等の HPLC 用試薬、試薬特級またはそれに相当するものを使用した。

II. 実験方法

1. ヒト NIT と他の動物種の nitrilase とのアミノ酸配列の相同性の比較

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いてヒト NIT と他の動物種の nitrilase とのアミノ酸配列の比較を行った。NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) に登録されている *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (NCBI accession number BAC48662.1)、*Pseudomonas putida* (WP_003257871.1)、*Rhodococcus rhodochros* (BAA01994.1)、*Arabidopsis thaliana* (NP_851011) のアミノ酸配列を用いて、BLAST の BLASTP 解析を使用し、全てのヒトタンパク質とアミノ酸配列と相同性を比較した。マウス NIT1 (NP_036179) およびマウス NIT2 (AAH20153) と全てのヒトタンパク質とアミノ酸配列と相同性も比較した。ヒト NIT のアミノ酸配列は、ヒト NIT1 (NP_005591.1)、ヒト NIT2 (AAH20620.1) を使用した。

2. マウスの臓器サンプルの調製とタンパク質定量

動物実験は、北里大学動物実験指針に従って行った。C57BL/6NCrSlc マウス (雄性、4 週齢、日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育した後に、ジエチルエーテルを吸入させることで麻酔し、1.15% KCl で肝臓の灌流を行い、心臓、肺、腎臓、肝臓、胃、脾

臓、小腸および大腸を採取した。採取した臓器は、1.15% KCl で洗浄後に直ちに液体窒素で凍結させ、使用するまで -80°C で保存した。

使用する組織片の重量に対して 3 等量の phosphate buffer (1.15% KCl, 0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ buffer, pH 7.4) を加えて、テフロンホモジナイザーを用いて氷上で 40 往復のホモジナイズを行い、臓器ホモジネートを得た。その臓器ホモジネートを 600g、 4°C で 10 分間遠心分離し、沈殿した核画分を除去した。さらに 9,000g、 4°C で 20 分間遠心分離した上清を S9 画分として実験に使用した。各臓器の S9 画分をさらに 105,000g、 4°C で 1 時間遠心分離した上清をサイトゾル画分、沈殿物を phosphate buffer で懸濁させテフロンホモジナイザーを用いて氷上でホモジナイズしたものをミクロソーム画分として実験に使用した。タンパク質定量は Bradford 法 (Bradford, 1967) に従い、Bio-Rad の protein assay kit を用いて行った。

3. ヒト NIT およびヒト DPP-4 発現系の構築

3-1. プラスミドベクターの構築

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo, Tokyo, Japan) を使用して、ヒト肝臓 total RNA 1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ に対して逆転写反応を行うことで complementary DNA (cDNA) を得た。cDNA は、PCR Thermal cycler dice (Takara, Otsu, Japan) を用いて 37°C で 15 分間、 50°C で 5 分間の逆転写反応、 98°C で 5 分間の酵素失活反応を行い作成した。cDNA 1 μL 、10 μM forward primer 1 μL および 10 μM reverse primer 1 μL (Table 12)、10x High Fidelity PCR Buffer 2.5 μL 、10 mM dNTP mixture 0.5 μL 、50 mM MgSO_4 1 μL 、Platinum Taq DNA High Fidelity 0.1 μL 、distilled water 17.9 μL をチューブに加え混合した。PCR Thermal cycler dice (Takara) を用いて、解離反応を 94°C で 30 秒間、アニーリングを 60°C で 30 秒間、伸長反応を 68°C で 2 分間とし、35 サイクル行い PCR 産物を得た。

0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い目的の PCR 産物を分離した後に、Rapid DNA ligation kit (Roche Molecular Biochemicals) を用いて精製することでインサート DNA を得た。pTARGET ベクターと 3 等量 (モル比) のインサート DNA とのライゲーション反応を行い、各プラスミドベクター (pTRAGET/NIT1、pTRAGET/NIT2、pTRAGET/DPP-4 vector 1、pTRAGET/DPP-4 vector 2) を得た。DNA 濃度の測定は、NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を使用した。

ヒト DPP-4 の全長の配列が組み込まれた pTRAGET/DPP-4 は、pTRAGET/DPP-4 vector 1 と pTRAGET/DPP-4 vector 2 を制限酵素 *Stu I* で消化し、0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行うことで目的の DNA 断片を分離精製し、ライゲーション反応を行うことで得た (Figure 33)。DPP-4 変異体のプラスミドベクターの作成は、まず構築した pTRAGET/DPP-4 vector 2 を鋳型として、目的の変異を含むプライマー (Table 12) を用いて KOD-plus-Neo DNA polymerase (Toyobo) で変異を導入した。その後に、pTRAGET/DPP-4 の作成と同様に pTRAGET/DPP-4 vector 1 と変異の導入された pTRAGET/DPP-4 vector 2 を制限酵素 *Stu I* で消化し、0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行うことで目的 DNA 断片を分離精製し、ライゲーション反応を行うことで pTRAGET/R623Q と pTRAGET/S630A を得た (Figure 33)。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いたシーケンスを行い、構築したプラスミドベクターに目的の DNA 配列が挿入されていること、目的以外の変異が存在しないことを確認した。

Table 12. Sequences of primer used for plasmid construction.

	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
NIT1	GGCTATATCTTCATGCTGGGCT	TGCCTCCAAGTCACATGAGC
NIT2	GAGTCATGACCTCTTTCCGCT	CACAAACTGCTTGGAGGCAA
DPP-4 vector 1	TGTTTAACTCGGGGCCGAAA	CAGACCAGGACCGGAACATC
DPP-4 vector 2	GTTGGAAGATTTAGGCCTTCAGA	CCCTAGTGACATCACTGCCC
R623Q mutant	CAACAAACAAATTGCAATTTGGG GCTGGTC	CCCAAATTGCAATTTGTTTGT GTCCACAAATCCC
S630A mutant	GCAATTTGGGGCTGGGCATATGG AGGGTACGTAACC	GGTTACGTACCCTCCATATGC CCAGCCCCAAATTGC

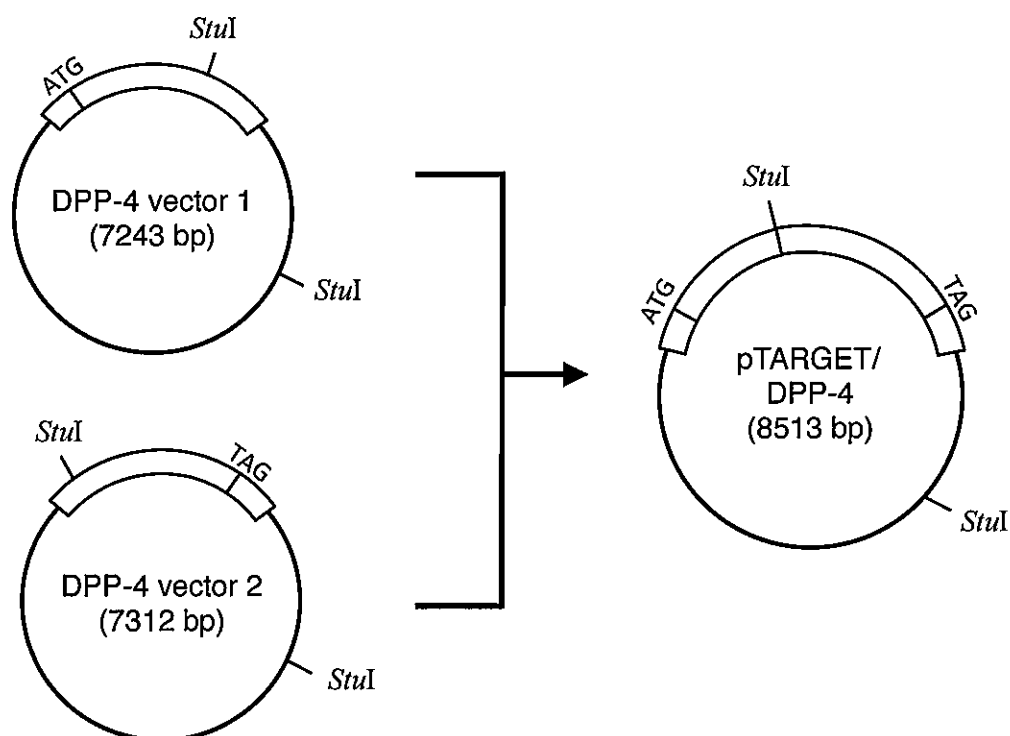


Figure 33. Schematic construction of pTARGET/DPP-4 vector. To construct the expression vector of full-length human DPP-4, we subcloned the 2.95-kb *Stu I* fragment of DPP-4 vector 2 into the 5.56-kb *Stu I* fragment of DPP-4 vector 1.

3-2. HEK293 細胞へのプラスミドベクターの導入

HEK293 細胞は 10% FBS、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin を含む DMEM で 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。プラスミドベクターの HEK293 細胞への導入は Lipofectamine LTX & Plus Reagent (Invitrogen) を用いて行った。Medium 150 µL に Lipofectamine LTX Reagent 10 µL を加え、タッピングで攪拌し、Diluted Lipofectamine LTX Reagent を得た。また、Medium 175 µL にプラスミド DNA 3.5 µg および Plus Reagent 3.5 µL を加えタッピングで攪拌し、Diluted DNA を得た。Diluted Lipofectamine LTX Reagent に Diluted DNA を加え (1:1 比) 、室温で 5 分間インキュベートし、Diluted LTX & DNA 溶液とした。HEK293 細胞を播種した 6-well プレートに 250 µL/well の Diluted LTX & DNA 溶液を滴下して加えた。48 時間後に、600 µg/mL G418 を含む DMEM で 96-well プレートに対して段階的に細胞濃度を希釈しながら播種し、限界希釈法より安定発現細胞株を得た。また、インサート DNA を組み込んでいない pTARGET ベクターを同様に HEK293 細胞に導入し、mock 細胞を得た。

3-3. 安定発現細胞株の S9 画分の調製とタンパク質定量

安定発現細胞株を培養後、dish 内の培地を除き、PBS で細胞表面を 2 回洗浄した。セルスクレイパーで細胞をかきとり、PBS で懸濁させて回収した。テフロンホモジナイザーを用いて氷上で 40 往復のホモジナイズを行い、total cell homogenate を得た。その total cell homogenate を 600g、4°C で 10 分間遠心分離した上清を回収し、さらに 9,000g、4°C で 20 分間遠心分離した上清を S9 画分として実験に使用した。タンパク質定量は Bradford 法 (Bradford, 1967) に従い、Bio-Rad の protein assay kit を用いて行った。

4. ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は、NuPAGE システム (Invitrogen) を用いて行った。タンパク試料、NuPAGE LDS Sample Buffer 9.38 μ L、500 mM DTT 3.75 μ L と精製水を 1.5 mL チューブに加え、全量 37.5 μ L の溶液を調製した。培養細胞由来のタンパク試料は 30 μ g/25 μ L/well、マウス、ラット、ヒトの臓器由来のタンパク試料は 100 μ g/25 μ L/well で電気泳動することができるように調製した。糖鎖修飾の影響を評価する際には、PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)、O-glycosidase/neuraminidase (New England Biolabs) と 37°C で一晩反応させ、糖鎖修飾を切断する前処理を行ったタンパク試料を使用した。作成した溶液を 70°C で 10 分間熱処理を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動用サンプルとした。電気泳動は NuPAGE 4–12% Bis-Tris Gel を使用し、NuPAGE MOPS SDS Running Buffer および NuPAGE antioxidant を含む泳動バッファで、200 V、120 mA で 35 分間行った。電気泳動後、分離されたタンパク質を NuPAGE Transfer Buffer を用いて、Immobilon-P PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) に 13 V、160 mA、1 時間で転写した。転写後、PVDF 膜を 5% スキムミルクを用いて室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体 (抗 actin 抗体と抗 GAPDH 抗体は 1:5000、その他は 1:1,000) を室温で一晩反応させた。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後、二次抗体 (Horseradish Peroxidase Conjugated Second Antibodies, 1:10,000, Promega) を室温で 1 時間反応させた。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後、Chemi-Lumi One L Western-blotting detection reagents (ナカライテスク) と Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を用いてバンドを検出した。

5. NIT2 酵素活性の測定

NIT2 酵素活性の測定は、Krasnikov (Krasnikov et al., 2009) らの方法に修正を加えて行った。酵素源として反応させる mock 細胞またはヒト NIT 発現系の S9 画分 (5 μg) と 5 mM DTT、100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)、100 mM hydroxylamine-HCl、精製水を混和し、湯浴上で振盪しながら 5 分間 37°C でプレインキュベートした。5 分間のプレインキュベート後に、基質の succinamic acid (最終濃度: 20 mM) を加えて代謝反応を開始させた。この反応液の全量は 50 μL となるように調製した。それぞれの試薬の濃度は、反応液 50 μL 中の最終濃度を示した。37°C で 30 分間反応させた後に、150 μL の反応停止液を加えた。反応停止液には、0.37 M FeCl_3 、0.67 M HCl、0.2 M trichloroacetic acid が含まれており、代謝反応が停止するとともに NIT2 酵素活性依存的に生成する succinyl hydroxamate と鉄 (III) イオンが錯体を形成することで赤紫色を呈する (Krasnikov et al., 2009)。反応後の溶液を 96-well プレートに 100 μL ずつ移し、SpectraMax M5 96-well plate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて 535 nm の吸光度測定を行い、extinction coefficient ($920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Krasnikov et al., 2009) を用いて NIT2 酵素活性 (nmol/min/mg protein) を算出した。

6. ビルダグリプチンを基質とした代謝実験と代謝阻害実験

6-1. 代謝実験の反応条件

酵素源として反応させるタンパク試料と Tris-HCl buffer (pH 7.4, 反応液 200 μL 中の最終濃度: 50 mM)、精製水を混和し全量 180 μL の溶液を調製し、湯浴上で振盪しながら 5 分間 37°C でプレインキュベートした。5 分間のプレインキュベート後に、ビルダグリプチン水溶液 20 μL (反応液 200 μL 中の最終濃度: 1 μM または 10 μM) を加えて代謝反応を開始させた。この反応液 200 μL 中に含まれるタンパク試料の濃度は、

マウス、ラット、ヒトの肝臓 S9 画分とサイトゾル画分は 1.0 mg/mL、マウス、ラット、ヒトの肝臓ミクロソーム画分および培養細胞由来の S9 画分は 0.5 mg/mL となるように調製した。2 時間の反応後に、氷冷アセトニトリル 200 μ L を加えて反応を停止させた。15,000g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清中の代謝物 M20.7 の濃度を LC-MS/MS で定量した。また、代謝反応に非特異的なシアノ基の加水分解体の影響を除外するために、それぞれのタンパク試料ごとに全ての行程において氷上で反応を行った non-reaction control も調製した。そして、37°C で 2 時間代謝反応を行った反応液中の M20.7 濃度から non-reaction control 中の M20.7 濃度を差し引くことで、代謝反応に特異的な M20.7 濃度を用いて M20.7 生成活性 (pmol/h/mg protein) を算出した。

6-2. 代謝阻害実験の反応条件

酵素源として反応させるタンパク試料と Tris-HCl buffer (pH 7.4, 反応液 200 μ L 中の最終濃度: 50 mM)、精製水および各阻害剤 (反応液 200 μ L 中の最終濃度: 0, 10, 100, 1,000 μ M) を混和し全量 180 μ L の溶液を調製し、湯浴上で振盪しながら 5 分間 37°C でプレインキュベートした。5 分間のプレインキュベート後に、ビルダグリプチン水溶液 20 μ L (反応液 200 μ L 中の最終濃度: 10 μ M) を加えて代謝反応を開始させた。その他の操作は、第 1 章 II. 6-1 に準じて行った。

6-3. LC-MS/MS の測定条件

LC-MS/MS は、LC 部に Waters Alliance 2695 Separation Module (Waters, Milford, MA, USA) を用い、MS 部には Waters Micromass tandem quadrupole Quattro micro mass spectrometer (Waters) を使用した。解析には MassLynx Software (version 4.0) を使用した。LC および MS の分析条件は以下の通りである。

カラム: Polaris 5 μm C18-A 50 \times 2.0-mm column (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)

ガードカラム: MetaGuard 2.0 mm Polaris 5 μm C18-A guard column (Agilent Technologies)

カラム温度: 25°C

移動相 A: methanol/10 mM ammonium acetate, pH 8.0 (5:95, v/v)

移動相 B: acetonitrile/methanol (10:90, v/v)

移動相の比率: 移動相 A/B (1:3, v/v)

流速: 0.2 mL/min

マスマスペクトロメトリー: positive ion mode、M20.7, m/z 323.1 > 173.3

イオン化の条件: capillary voltage、3.6 kV; cone voltage、32 V; collision energy、20 V; source temperature、120°C; desolvation temperature、400°C; collision gas、argon.

7. DPP-4 ペプチダーゼ活性の測定

DPP-4 ペプチダーゼ活性は、DPP-4 に選択的な合成基質の Gly-Pro-AMC を用いて、サンプル中の DPP-4 によって生成される AMC の蛍光を測定することで評価した (Leiting et al., 2003; Lee et al., 2009)。Black flat-bottom 96-well プレートに全量 100 μL となるように反応液を調製した。Assay buffer (50 mM glycine pH 8.7、1 mM EDTA) に酵素源として反応させるタンパク試料を 0.5–40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう加え室温で 15 分間インキュベーションした。インキュベーション後に、基質の Gly-Pro-AMC (最終濃度: 50 μM) を加えて反応を開始し、直ちに 96-well プレートを SpectraMax M5 96-well plate spectrophotometer (Molecular Devices) にセットし、25°C で 15 分間反応させた。反応開始から 5 分後と 15 分後に AMC の蛍光測定 (excitation、360 nm; emission、460 nm) を行った。15 分の蛍光値から 5 分の蛍光値を差し引くことで 10 分間で生成した AMC の濃度を見積もり、DPP-4 ペプチダーゼ活性 (nmol/min/mg protein) を算出した。

8. ビルダグリプチン代謝活性の速度論的パラメータの算出

ビルダグリプチンの濃度依存代謝実験を行い、速度論的パラメータの算出を行った。代謝実験の方法は、第 1 章 II. 6-1 に準じて行った。基質として反応させるビルダグリプチンの最終濃度は、ヒトの肝臓サンプルに対しては 1–1,000 μM 、mock 細胞または HEK/DPP-4 の S9 画分に対しては 1–500 μM とした。各基質濃度における代謝反応速度 (M20.7 生成活性) から速度論的パラメータ (K_m 値、 V_{\max} 値) を算出した。カーブフィッティングには、KaleidaGraph computer program (Synergy Software, Reading, PA, USA) を用いた。ヒトの肝臓サンプルの K_m 値、 V_{\max} 値は Eadie-Hofstee plot (Figure 11)

から算出し、hDPP-4 の K_m 値、 V_{max} 値は Biphasic Michaelis-Menten 式 (式 1) を用いて算出した。

$$V = V_{max1} \times S / (K_{m1} + S) + V_{max2} \times S / (K_{m2} + S) \quad (\text{式 1})$$

V は基質の代謝速度、 S は基質濃度、 V_{max1} は高親和性部位における最大代謝速度、 K_{m1} 値は高親和性部位における Michaelis 定数、 V_{max2} は低親和性部位における最大代謝速度、 K_{m2} 値は低親和性部位の Michaelis 定数を示す。

9. 統計解析

各値は、平均値 \pm 標準偏差で示した。二群間の比較は unpaired t-test により解析した。また、相関関係は Spearman rank method により解析した。 P 値が 0.05 未満のときに統計学的に有意とした。

第 2 章

ビルダグリプチンの主代謝臓器の解明を目指したマウスを用いた *in vivo* 実験とヒト肝ミクロソームを用いた個人差に関する検討

I. 実験材料

STZ は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix は Toyobo (Osaka, Japan) より購入した。第 1 章の実験方法と共通の試薬については、第 1 章で記載したものを使用した。その他の試薬は和光純薬工業等の HPLC 用試薬、試薬特級またはそれに相当するものを使用した。

II. 実験方法

1. マウスを用いたビルダグリプチンおよび M20.7 の体内動態の評価

1-1. マウスへのビルダグリプチンの投与と採血ならびに AUC の算出

動物実験は、北里大学動物実験指針に従って行った。C57BL/6NCrSlc マウス (雄性、8 週齢、日本 SLC) を馴化飼育した後に使用した。コントロール群 4 匹と第 2 章 II. 2 で作成方法を述べる STZ 処置群 (Day 7) 3 匹のマウスに、ビルダグリプチン (10 mg/kg) を経口投与し、投与から 0、0.5、1、2、4、8 時間後に採血を行った。シタグリプチン共処置群は、ビルダグリプチン (10 mg/kg) とシタグリプチン (1,000 mg/kg) の混合液を調製し、経口投与した。採血は顎下静脈より行い、ヘパリン入りの 1.5 mL チューブに血液を回収した。回収した血液を 3,000g、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を血漿として実験に使用した。血漿 20 μ L に氷冷アセトニトリル 20 μ L を加えてよく混和し、15,000g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清中の未変化体のビルダグリプチンおよび主代謝物 M20.7 の濃度を LC-MS/MS で定量した。得られた経口投与後 8 時間

までの血漿中濃度から、台形公式に従って AUC_{0-8h} を算出した。

1-2. LC-MS/MS の測定条件

LC-MS/MS は、LC 部に Waters ACQUITY UPLC system (Waters) を用い、MS 部には Waters Xevo TQD mass spectrometer (Waters) を使用した。解析には MassLynx Software (version 4.1) を使用した。LC および MS の分析条件は以下の通りである。

カラム: Polaris 5 μ m C18-A 50 \times 2.0-mm column (Agilent Technologies)

ガードカラム: MetaGuard 2.0 mm Polaris 5 μ m C18-A guard column (Agilent Technologies)

カラム温度: 25°C

移動相 A: methanol/10 mM ammonium acetate, pH 8.0 (5:95, v/v)

移動相 B: acetonitrile/methanol (10:90, v/v)

移動相の比率: 移動相 A/B (1:3, v/v)

流速: 0.2 mL/min

マスマススペクトロメトリー: positive ion mode、ビルダグリプチン, m/z 304.1 > 154.2、M20.7, m/z 323.1 > 173.3

イオン化の条件: capillary voltage、3.4 kV; cone voltage、42 V; collision energy、18 V; source temperature、150°C; desolvation temperature、200°C; collision gas、argon.

2. STZ 誘発糖尿病マウスの構築

C57BL/6NCrSlc マウス (雄性、8 週齢、日本 SLC) に、生理食塩水で溶解させた STZ (250 mg/kg) を腹腔内に単回投与した。投与前 (Day 0) と 7 日目 (Day 7) に体重、血糖値、血漿中の DPP-4 ペプチダーゼ活性を測定した。採血および血漿の作成は第 2 章 II. 1-1 に準じて行った。血糖値は、glucose CII-test Wako kit (和光純薬工業) を使用して測定した。血漿中の DPP-4 ペプチダーゼ活性は、第 1 章 II. 7 に準じて行った。Day 7 において、随時血糖値が 400 mg/dL 以上となったマウスを STZ 誘発糖尿病マウス (STZ 処置群) として実験に使用した。

3. マウスの臓器あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性および M20.7 生成活性の算出

3-1. マウスの肝臓、腎臓、小腸の採取

第 2 章 II. 1-1 で使用したコントロール群 4 匹と STZ 処置群 (Day 7) 3 匹のマウスの肝臓、腎臓、小腸および血漿を採取した。各臓器の採取は、ビルダグリプチンの経口投与から 48 時間後 (Day 9) に、第 1 章 II. 2 に準じて行った。採取した各臓器は液体窒素で直ちに凍結させ、使用するまで -80°C で保存した。

3-2. マウスの肝臓、腎臓、小腸の臓器重量の測定と S9 画分の調製

臓器あたりの活性を見積もるために必要な臓器重量を測定した後に、コントロール群 4 匹と STZ 処置群 (Day 9) 3 匹のマウスの肝臓、腎臓、小腸の S9 画分を第 1 章 II. 2 に準じて調製した。

3-3. マウスの全身における臓器あたりの活性の算出

コントロール群 4 匹と STZ 処置群 (Day 9) 3 匹のマウスの肝臓、腎臓、小腸の S9 画分および血漿を用いて、第 1 章 II.7 および第 1 章 II.6-1 に準じて、タンパク質 1 mg protein あたりまたは血漿 1 mL あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性 (nmol/min/mg protein or nmol/min/mL) と M20.7 生成活性 (pmol/h/mg protein or pmol/h/mL) をそれぞれ測定した。肝臓、腎臓、小腸の臓器あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性 (nmol/min/tissue) と M20.7 生成活性 (pmol/h/tissue) は、S9 画分の 1 mg protein あたりの活性を、S9 画分の調製に使用した組織片あたりのタンパク質濃度 (mg S9 fraction/g tissue) と臓器重量 (g tissue) で補正し、見積もった。マウスの全身における血漿あたりの DPP-4 ペプチダーゼ活性 (nmol/min/plasma) と M20.7 生成活性 (pmol/h/plasma) は、血漿 1 mL あたりの活性をマウスの全血漿容積 (1 mL) (Davies and Morris, 1993) で補正し、見積もった。

4. コントロール群と STZ 処置群のマウスの肝臓、腎臓、小腸における DPP-4 タンパク発現量の評価

コントロール群と STZ 処置群 (Day 9) のマウスの肝臓、腎臓、小腸の S9 画分を用いて、第 1 章 II.4 に準じてウェスタンブロット解析を行い、DPP-4 タンパク発現量の評価を行った。

5. リアルタイム RT-PCR による mRNA 発現量の評価

コントロール群と STZ 処置群 (Day 9) のマウスの肝臓、腎臓、小腸の total RNA を、TRIzol reagent (Life Technologies) を使用して抽出した。Total RNA の濃度および純度 (A260/A280 比) は、NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) を用いて測定した。純度 (A260/A280 比) が 1.8 以上の total RNA を実験に使用した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo) を使用して、total RNA 1 μ g/10 μ L に対して逆転写反応を行うことで cDNA を得た。cDNA 1 μ L に 10 pmol/ μ L の forward primer と reverse primer (Table 13) をそれぞれ 0.6 μ L、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) 10 μ L を加え滅菌精製水で全量を 20 μ L とした。CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使用して、初期変性を 95°C で 30 秒間行った後、解離反応を 95°C で 5 秒間、アニーリングと伸長反応を 60°C で 30 秒間を 45 サイクル行った。

Table 13. Primer sequences used for real-time RT-PCR analyses.

Target	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
Dpp-4	CAGCTCATCCTCTAGTGCGG	AGGTGAAGTGAGGTTCTGCG
Foxa2	ATGCACTCGGCTTCCAGTAT	TCATTCCAGCGCCCACATAG
Colla1	GAGAGGTGAACAAGGTCCCG	AAACCTCTCTCGCCTCTTGC
Fabp4	TTCCTTCAAACCTGGGCGTGG	TTCCATCCCACCTTCTGCACC
Adipoq	AGCCGCTTATGTGTATCGCT	GAGTCCCGGAATGTTGCAGT
Hnf-1 α	CCACCCTGGTTATCGGTCTG	TGTGGCTGTATAAGGCGTGG
Fabp1	GAAGGACATCAAGGGGGTGT	ACTGCCTTGACTTTTTCCCA
Cyclophilin*	CAGACGCCACTGTGCTTT	TGTCTTTGGAACCTTGTCTGCAA

* Fujiwara et al., 2012

6. ヒト肝ミクロソームの M20.7 生成活性および DPP-4 ペプチダーゼ活性の測定

6-1. 個人肝臓ミクロソームを用いた活性の測定

23名の個人肝臓ミクロソームは、金沢大学 医薬保健研究域薬学系 薬物代謝安全性学研究室 中島 美紀 教授、同 深見 達基 准教授より御提供頂いた。ドナー情報は Table 14 にまとめた。これらの個人肝臓ミクロソームを用いて、第1章 II. 6-1 および第1章 II. 7 に準じて、M20.7 生成活性 (pmol/h/mg microsomal protein) と DPP-4 ペプチダーゼ活性 (nmol/min/mg microsomal protein) を測定した。本実験は、金沢大学 医薬保健研究域薬学系 薬物代謝安全性学研究室 中島 美紀 教授、同 深見 達基 准教授のご協力を頂いて金沢大学で実施した。以下に金沢大学において M20.7 を定量した際の LC-MS/MS の測定条件および AMC を定量した際の蛍光測定の条件を示した。

6-2. LC-MS/MS の測定条件

LC-MS/MS は、LC 部に Agilent 1100 series pump (Agilent Technologies) を使い、MS 部には PE Sciex API 2000 tandem mass spectrometer (Applied Biosystems) を使用した。解析には Analyst software (version 1.5.1; Applied Biosystems) を使用した。LC および MS の分析条件は以下の通りである。

カラム: Polaris 5 μ m C18-A 50 \times 2.0-mm column (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)

ガードカラム: MetaGuard 2.0 mm Polaris 5 μ m C18-A guard column (Agilent Technologies)

カラム温度: 20°C

移動相 A: methanol/10 mM ammonium acetate, pH 8.0 (5:95, v/v)

移動相 B: acetonitrile/methanol (10:90, v/v)

移動相の比率: 移動相 A/B (1:3, v/v)

流速: 0.2 mL/min

マスマスペクトロメトリー: positive ion mode、M20.7, m/z 323.1 > 173.3

イオン化の条件: nebulizing gas、nitrogen (50 psi); turbo gas、nitrogen (85 psi, 550°C);

curtain gas、nitrogen (30 psi); collision energy、25 V

6-3. AMC の蛍光測定 の条件

金沢大学における AMC の蛍光測定には、MTP-880 fluorescence meter (excitation, 365 nm; emission, 450 nm, Corona Electric, Hitachinaka, Japan) を使用した。

7. 統計解析

各値は、平均値 ± 標準偏差で示した。二群間の比較は unpaired t-test により解析した。また、相関関係は Spearman rank method により解析した。P 値が 0.05 未満のときに統計学的に有意とした。

Table 14. Characteristics of 23 donors used in this study.

Sample No.	Sex	Age (years)	Ethnic
1	M	46	Caucasian
2	F	32	Hispanic
3	F	47	Caucasian
4	M	36	Caucasian
5	M	38	Caucasian
6	F	35	Hispanic
7	M	52	Caucasian
8	M	56	Caucasian
9	M	33	Caucasian
10	M	49	Hispanic
11	M	68	Caucasian
12	M	60	Hispanic
13	F	52	Black
14	M	62	Black
15	M	16	Caucasian
16	F	41	Caucasian
17	M	47	Caucasian
18	F	47	Caucasian
19	M	51	Caucasian
20	F	33	Hispanic
21	M	53	Caucasian
22	M	63	Caucasian
23	F	33	Caucasian

M, Male; F, Female

第3章

ビルダグリプチンによる肝障害の発現メカニズムの解明を 目指した基礎研究

I. 実験材料

LPS は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。RPMI-1640 medium は MP Bio (Tokyo, Japan) より購入した。第1章と第2章の実験方法と共通の試薬については、それぞれの章で記載したものを使用した。その他の試薬は和光純薬工業等の HPLC 用試薬、試薬特級またはそれに相当するものを使用した。

II. 実験方法

1. マウスへのビルダグリプチンまたはシタグリプチンの投与と肝臓の採取

動物実験は、北里大学動物実験指針に従って行った。C57BL/6N CrSlc マウス (雄性、8 週齢、日本 SLC) を馴化飼育した後に、vehicle (精製水)、ビルダグリプチン (1,000 mg/kg)、またはシタグリプチン (1,000 mg/kg) を経口投与した。投与から 24 時間後にジエチルエーテルを吸入させることで麻酔し、1.15% KCl で肝臓の灌流を行い、肝臓を採取した。採取した肝臓は、直ちに液体窒素で凍結させ使用するまで -80°C で保存した。

2. マイクロアレイ解析によるビルダグリプチンによりマウス肝臓内で発現が変動する遺伝子の同定

2-1. 肝臓由来の total RNA の回収

Vehicle (精製水) を経口投与したコントロール群 2 匹と、ビルダグリプチン (1,000 mg/kg) を経口投与したビルダグリプチン処置群 2 匹のマウスの肝臓を用意し、各群でそれぞれプールした後に、TRIzol reagent (Life Technologies) を使用して total RNA を抽出した。Total RNA の濃度および純度 (A260/A280 比) は、NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) を用いて測定した。純度 (A260/A280 比) が 1.8 以上の total RNA を実験に使用した。

2-2. マイクロアレイ解析

コントロール群とビルダグリプチン処置群のマウスの肝臓由来の total RNA を用いたマイクロアレイ解析 (Agilent 社マウス遺伝子発現量解析, 1 色法) を、一般財団法人化学物質評価研究機構 (CERI, Tokyo, Japan) に委託して行った。Total RNA からの complementary RNA (cRNA) の生成には Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を使用した。cRNA の精製には RNeasy mini columns (Qiagen, Hilden, Germany) を使用した。マイクロアレイは、SurePrint G3 Mouse GE 8 × 60 K DNA microarray (Agilent Technologies) を使用した。スキャニングには Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies) を使用し、Feature Extraction software (ver 10.7.1.1) を用いて発現量を数値化した。

3. 薬物処置によるヒト培養細胞における遺伝子発現の変動の評価

3-1. HepG2 細胞と HL-60 細胞の培養条件

HepG2 細胞は 10% FBS、100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin を含む DMEM で 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。HL-60 細胞は 20% FBS、100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin を含む RPMI-1640 medium で 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

3-2. HepG2 細胞への薬物処置

HepG2 細胞を 1×10^5 cells/mL/well で 12-well プレートに播種し、24 時間後に各濃度のビルダグリプチン、M20.7、またはシタグリプチンが含まれる培養液に交換し、各薬物で処置した。薬物が含まれる培養液に交換してから 24 時間後に TRIzol reagent (Life Technologies) を用いて回収した total RNA を使用して mRNA の発現を評価した。培養液中の S100A8/A9 複合体および TNF- α タンパク質の濃度は、薬物が含まれる培養液に交換してから 48 時間後に回収した培養液を使用して評価した。また、培養液は回収後に直ちに液体窒素で凍結させ、使用するまで-80°C で保存した。

3-3. HL-60 細胞への薬物処置

12-well プレートの well 内にあらかじめ最終濃度よりも 100 倍濃度が高いビルダグリプチン、M20.7、シタグリプチン、または LPS を 10 μ L 加えておき、そこへ HL-60 細胞を 1×10^6 cells/mL/well となるように播種し、各薬物で処置した。mRNA の発現は、薬物処置 24 時間後に TRIzol reagent (Life Technologies) を用いて回収した total RNA を使用して評価した。培養液中の S100A8/A9 複合体や TNF- α タンパク質の濃度評価には、薬物処置 48 時間後に回収した培養液を使用した。培養液は回収後に直ちに液体窒素で凍結させ、使用するまで-80°C で保存した。

3-4. リアルタイム RT-PCR による mRNA 発現量の評価

第3章 II. 3-2 および第3章 II. 3-3 で回収した HepG2 細胞と HL-60 細胞の total RNA を用いて、第2章 II. 5 に準じてリアルタイム RT-PCR を行い薬物処置による mRNA 発現量の変動を評価した。使用した primer の配列は Table 15 にまとめた。

Table 15. Primer sequences used for real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analyses.

	Target	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
Human	CABYR	CTGCGGGGCTATAAAAACGC	TGAGGCCATAGGGTACGACA
	PIP5K1A	CGTTGGGAAGATTCGATTCCG	CAAGGTACAGGAAGGGACCG
	CIART	TCATCATTGGGTGGTGGCAA	GTGGTGTGGATCCAGGTGAG
	MT1	CGTGCGCCTTATAGCCTCTC	TCTTCTGCAGGAGGTGCAT
	FBF1	CAACTGCACGAGAAAGACCG	TTTCTGGGTGCTCGGGAAAC
	LPIN1	GATGTCAATGCACCCTGAGA	GTGTTTGAATACAAAGGCG
	PFKFB3	AAGAAGGGACCTAACCCGCT	CCGGGAGCCTTTCATGTTTT
	MBP	AGGACTGTCCCTGAGCAGAT	TGGGTGATCCAGAGCGACTA
	USP2	AACGAGGTGAACCGAGTGAC	GTACACGTCAGCGAGCTCTT
	S100A9	GCAGCTGGAACGCAACATAG	TGTGTCCAGGTCCTCCATGA
	S100A8	GCCGTCTACAGGGATGACCT	CCACGCCCATCTTTATCACCA
	PLIN4	GCTGCAACCTTCGGAAAAGC	TAAGTGCAGACCGAGTGGTG
	MARS2	GGGCGTCTATGAAGTTGGT	CGGAACTGGGAAAGCCTGAA
	MT2	ATGCACCTCCTGCAAGAAAAG	CGGTCACGGTCAGGGTTGTA
	GAPDH*	CCAGGGCTGCTTTTAACTC	GCTCCCCCTGCAAATGA
Mouse	Mt1	GAATGGACCCCAACTGCTCC	GTTTCGTACATCAGGCACAG
	Mt2	GTGCTGGCCATATCCCTTGA	GCGGTTGAAGATCGACGAGA
	S100a8	AGGAAATCACCATGCCCTCTAC	TGAGATGCCACACCCACTTTT
	S100a9	GACTCTTTAGCCTTGAAGAGCAAG	AAAGGTTGCCAACTGTGCTTC
	CPH**	CAGACGCCACTGTCGCTTT	TGTCTTTGGAACCTTGTCTGCAA

* Nakamura et al., 2008

** Fujiwara et al., 2012

3-5. ELISA による培養液中へのタンパク分泌量の定量

第3章 II.3-2 および第3章 II.3-3 で回収した HepG2 細胞と HL-60 細胞の薬物処置 48 時間後の培養液中に含まれる、S100A8/A9 複合体と TNF- α のタンパク濃度を ELISA で定量した。S100A8/A9 (別名: MRP8/14) 複合体の定量には、S100A8 や S100A9 の単量体は検出せず、S100A8/A9 複合体を特異的に検出する Legend MAX Human MRP8/14 ELISA kit (BioLegend, San Diego, CA, USA) を使用した。TNF- α の定量には Human TNF- α ELISA Max Deluxe sets (BioLegend) を使用した。

4. HL-60 細胞の S9 画分における DPP-4 ペプチダーゼ活性の測定

第3章 II.3-1 に準じて培養した HL-60 細胞を回収し、100g、4°C で 5 分間遠心分離し上清の培養液を除去し、沈殿した HL-60 細胞を PBS で懸濁させた。その細胞懸濁液をテフロンホモジナイザーを用いて氷上で 40 往復のホモジナイズを行い、total cell homogenate を得た。その total cell homogenate を 600g、4°C で 10 分間遠心分離した上清を回収し、さらに 9,000g、4°C で 20 分間遠心分離した上清を S9 画分として実験に使用した。Gly-Pro-AMC を基質として使用した、HL-60 細胞の S9 画分における DPP-4 ペプチダーゼ活性の測定は、第1章 II.7 に準じて行った。ネガティブコントロールとして 95°C、5 分間で熱変性させた HL-60 細胞の S9 画分の活性も測定した。また、DPP-4 に特異的な活性であることを示すために、HL-60 細胞の S9 画分を含む反応液にビルダグリプチンを最終濃度が 1 μ M となるように添加した際の DPP-4 ペプチダーゼ活性も測定した。

5. ビルダグリプチン処置時に HL-60 細胞の培養液中に生成した M20.7 の濃度測定

5-1. 培養液の回収

12-well プレーートの well 内にあらかじめ最終濃度よりも 100 倍濃度が高いビルダグリプチン 10 μL と滅菌精製水 10 μL の合計 20 μL またはビルダグリプチン 10 μL とシタグリプチン 10 μL の合計 20 μL を加えておき、そこへ HL-60 細胞を 1×10^6 cells/mL/well となるように播種し、各薬物で処置した。薬物処置後 6、12、24、36、48 時間後に、HL-60 細胞が懸濁した培養液を回収した。100g、4°C で 5 分間遠心分離し上清の培養液のみを回収し、直ちに液体窒素で凍結させ、使用するまで -80°C で保存した。

5-2. LC-MS/MS を用いた培養液中の M20.7 の定量

第 3 章 II. 5-1 で回収した培養液 100 μL に対して氷冷アセトニトリル 100 μL を加えてよく混和させ、培養液に含まれるタンパク質を変性させた。15,000g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清中の M20.7 の濃度を第 2 章 II. 1-2 に準じて LC-MS/MS で定量した。

6. 統計解析

各値は、平均値 \pm 標準偏差で示した。二群間の比較は unpaired t-test により、多群間の比較は Dunnett's test により解析した。P 値が 0.05 未満のときに統計学的に有意とした。

第 4 章

ビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度の調査

I. 実施方法

1. 対象患者

2 型糖尿病と診断され、北里大学病院の処方によりビルダグリプチン (エクア[®]) の服用を開始した患者

2. 本研究における肝障害の定義

本研究では、DDW-J 2004 ワークショップ薬物性肝障害診断基準 (滝川一ら, 2005) に従って、ALT 値が施設基準値の 2 倍もしくは ALP 値が施設基準値を越えるもの (ALT 値 80 U/L 以上もしくは ALP 値 360 U/L 以上) を肝障害と定義した。

3. 除外基準

以下のいずれかに該当する患者は除外した。他院で処方されたビルダグリプチンを既に服用していた患者。ビルダグリプチン服用開始後 1 年間の ALT 値と ALP 値のどちらの経過も追跡することができない患者。ビルダグリプチン服用開始前に肝機能検査値が高値 (ALT 値 80 U/L 以上もしくは ALP 値 360 U/L 以上) であった患者。

4. 調査項目

電子カルテを用いてビルダグリプチン服用患者の診療録から、ビルダグリプチンの服用開始日、ビルダグリプチンの服用期間、ビルダグリプチンの服用開始日から1年間の臨床検査値 (ALT 値、ALP 値) を収集した。

5. 評価項目

ビルダグリプチンによる肝障害の発現頻度を評価項目とした。

6. 研究デザイン

後ろ向き観察研究

II. 倫理的配慮

本研究は、厚生労働省「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」並びに「ヘルシンキ宣言」に従って実施し、北里大学医学部・病院倫理委員会の承認を得て行った (承認番号: B16-166)。

V. 謝辭

本論文だけでなく投稿論文の執筆、国内および国際学会での学会発表にあたり直接の熱意ある御指導、御鞭撻を賜りました北里大学薬学部薬剤学教室 伊藤 智夫 教授、藤原 亮一 講師に謹んで御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、北里大学薬学部薬剤学教室で研究を行う機会を与えて下さいました、北里大学薬学部薬物治療学Ⅰ 厚田 幸一郎 教授に深く感謝致します。

本論文の審査を快く引き受けて下さいました北里大学薬学部衛生化学教室 今井 浩孝 教授、北里大学薬学部生化学教室 服部 成介 教授、北里大学薬学部薬理学教室 田辺 光男 教授に深く感謝致します。

ビルダグリプチンを合成し提供して下さいました北里大学薬学部生命薬化学研究室 藤井 秀明 教授、同 唐木 文霞 助教に心より御礼申し上げます。

金沢大学 医薬保健研究域薬学系 薬物代謝安全性学研究室において LC-MS/MS や個人肝臓ミクロソームを用いた実験を行わせていただき、貴重な御指導、御鞭撻を賜りました同研究室 中島 美紀 教授、同 深見 達基 准教授に謹んで御礼申し上げます。

臨床研究を行うにあたり、数々の有益な助言、ならびに御指導を頂きました北里大学薬学部臨床医学 (医薬開発学) 成川 衛 教授、同 金子 真之 助教、北里大学薬学部薬物治療学Ⅰ 毛利 順一 助教、北里大学病院薬剤部主任 稲野 寛 先生に心より御礼申し上げます。

研究室での生活の中で、数々の有益な助言および激励を頂きました北里大学薬学部薬剤学教室 奈良輪 知也 講師、同 高野 修平 助教、北里大学薬学部薬物治療学Ⅰ 尾鳥 勝也 前准教授 (現 北里大学薬学部薬物治療学Ⅳ 教授)、同 平山 武司 講師、同 春日井 公美 助教、同 田中 怜 助教、同 中山 萌美 助教、

同 秘書 倉持 敬子 様、北里大学薬学部医薬品情報学 岩澤 真紀子 講師に深く感謝致します。

平成 28 年度長井記念薬学研究奨励支援事業により研究に専念できる環境を援助して下さいました、日本薬学会の関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、研究室での生活の中で数々の助言、援助をして下しました北里大学薬学部薬剤学教室ならびに北里大学薬学部薬物治療学 I の大学院生、卒業研究生の皆様、私の研究生生活を経済的、精神的に支えてくれた家族に深く感謝致します。

平成 29 年 1 月 6 日

朝倉 充俊

VI. 参考文献

医薬品インタビューフォーム: エクア[®], ノバルティスファーマ株式会社, 2016年4月
改訂 (改訂第16版)

滝川一, 恩地森一, 高森頼雪, 村田洋介, 谷口英明, 伊藤正, 渡辺真彰, 綾田穰, 前田直人, 野本実, 村田浩之, 大森茂, 久持顕子, 炭田知宜 (2005) DDW-J 2004
ワークショップ薬物性肝障害診断基準の提案. *肝臓*, **46**, 85–90.

日本糖尿病学会: 科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン 2013 (2013).

Abdullah R, Alhusainy W, Woutersen J, Rietjens IM, and Punt A (2016) Predicting points of departure for risk assessment based on *in vitro* cytotoxicity data and physiologically based kinetic (PBK) modeling: The case of kidney toxicity induced by aristolochic acid I. *Food Chem Toxicol* **92**:104–116. ○

Adams DH, Ju C, Ramaiah SK, Uetrecht J, and Jaeschke H (2010) Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Toxicol Sci* **115**:307–321.

Ahrén B, Schweizer A, Dejager S, Villhauer EB, Dunning BE, and Foley JE (2011) Mechanisms of action of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin in humans. *Diabetes Obes Metab* **13**:775–783. ○

Akiyama TE, Ward JM, and Gonzalez FJ (2000) Regulation of the Liver Fatty Acid-binding Protein Gene by Hepatocyte Nuclear Factor 1 α (HNF1 α) ALTERATIONS IN FATTY ACID HOMEOSTASIS IN HNF1 α -DEFICIENT MICE. *J Biol Chem* **275**:27117–27122.

Asakura M, Nakano M, Hayashida K, Fujii H, Nakajima M, Atsuda K, Itoh T, and Fujiwara R

(2014) Human nitrilase-like protein does not catalyze the hydrolysis of vildagliptin. *Drug Metab Pharmacokinet* **29**:463–469.

Asakura M, Fujii H, Atsuda K, Itoh T, and Fujiwara R (2015a) Dipeptidyl Peptidase-4 Greatly Contributes to the Hydrolysis of Vildagliptin in Human Liver. *Drug Metab Dispos* **43**:477–484.

Asakura M, Fujiwara R, Itoh T, and Atsuda K (2015b) Recent research on metabolic enzymes and pharmacokinetics of vildagliptin. *Japanese Journal of Pharmaceutical and Diabetes* **4**:155–165.

Asakura M, Fukami T, Nakajima M, Fujii H, Atsuda K, Itoh T, and Fujiwara R (2017) Hepatic dipeptidyl peptidase-4 controls pharmacokinetics of vildagliptin *in vivo*. *Drug Metab Dispos* **45**:237–245.

Asakura M, Karaki F, Fujii H, Atsuda K, Itoh T, and Fujiwara R (2016) Vildagliptin and its metabolite M20.7 induce the expression of S100A8 and S100A9 in human hepatoma HepG2 and leukemia HL-60 cells. *Sci Rep* **6**:35633; doi:10.1038/srep35633.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254.

Chien CH, Gao QZ, Cooper AJ, Lyu JH, and Sheu SY (2012) Structural insights into the catalytic active site and activity of human Nit2/ ω -amidase: KINETIC ASSAY AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION. *J Biol Chem* **287**:25715–25726.

- Cho YE, Singh TS, Lee HC, Moon PG, Lee JE, Lee MH, Choi EC, Chen YJ, Kim SH, and Baek MC (2012) In-depth identification of pathways related to cisplatin-induced hepatotoxicity through an integrative method based on an informatics-assisted label-free protein quantitation and microarray gene expression approach. *Mol Cell Proteomics* **11**:M111.010884.
- Das SS, Hayashi H, Sato T, Yamada R, Hiratsuka M, and Hirasawa N (2014) Regulation of dipeptidyl peptidase 4 production in adipocytes by glucose. *Diabetes Metab Syndr Obes* **7**:185–194.
- Davies B and Morris T (1993) Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res* **10**:1093–1095.
- Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, and Holst JJ (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* **44**:1126–1131.
- Deacon CF (2011) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review. *Diabetes Obes Metab* **13**:7–18.
- Deacon CF and Lebovitz HE (2016) Comparative Review of DPP-4 Inhibitors and Sulphonylureas. *Diabetes Obes Metab* **18**:333–347.
- Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, Scharpé S, and De Meester I (2000) Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in

serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem* **267**:5608–5613.

Erickson RH, Gum JR, Lotterman CD, Hicks JW, Lai RS, and Kim YS (1999) Regulation of the gene for human dipeptidyl peptidase IV by hepatocyte nuclear factor 1 α . *Biochem J* **338**:91–97.

Fadini GP, Albiero M, Menegazzo L, De Kreutzenberg SV, and Avogaro A (2012) The increased dipeptidyl peptidase-4 activity is not counteracted by optimized glucose control in type 2 diabetes, but is lower in metformin-treated patients. *Diabetes Obes Metab* **14**:518–522.

Foell D and Roth J (2004) Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* **50**:3762–3771.

Foell D, Wittkowski H, Vogl T, and Roth J (2007) S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* **81**:28–37.

Fujiwara R, Chen S, Karin M, and Tukey RH (2012) Reduced expression of UGT1A1 in intestines of humanized UGT1 mice via inactivation of NF- κ B leads to hyperbilirubinemia. *Gastroenterology* **142**:109–118.

Fukami T and Yokoi T (2012) The emerging role of human esterases. *Drug Metab Pharmacokinet* **27**:466–477.

- Furuta S, Smart C, Hackett A, Benning R, and Warrington S (2013) Pharmacokinetics and metabolism of [¹⁴C]anagliptin, a novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in humans. *Xenobiotica* **43**:432–442.
- Golightly LK, Drayna CC, and McDermott MT (2012) Comparative clinical pharmacokinetics of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Clin Pharmacokinet* **51**:501–514.
- Gorrell MD, Gysbers V, and McCaughan GW (2001) CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* **54**:249–264.
- He YL, Sabo R, Campestrini J, Wang Y, Ligueros-Saylan M, Lasseter KC, Dilzer SC, Howard D, and Dole WP (2007) The influence of hepatic impairment on the pharmacokinetics of the dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitor vildagliptin. *Eur J Clin Pharmacol* **63**:677–686.
- He YL, Sabo R, Campestrini J, Wang Y, Riviere GJ, Nielsen JC, Rosenberg M, Ligueros-Saylan M, Howard D, and Dole WP (2008) The effect of age, gender, and body mass index on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **65**:338–346.
- He H, Tran P, Yin H, Smith H, Batard Y, Wang L, Einolf H, Gu H, Mangold JB, Fischer V, and Howard D (2009a) Absorption, metabolism, and excretion of [¹⁴C]vildagliptin, a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, in humans. *Drug Metab Dispos* **37**:536–544.

- He H, Tran P, Yin H, Smith H, Flood D, Kramp R, Filipeck R, Fischer V, and Howard D (2009b) Disposition of vildagliptin, a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, in rats and dogs. *Drug Metab Dispos* **37**:545–554.
- He YL (2012) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin. *Clin Pharmacokinet* **51**:147–162.
- Hu E, Liang P, and Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* **271**:10697–10703.
- Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012) Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci* **130**:4–16.
- Hoffmann P, Bentley P, Sahota P, Schoenfeld H, Martin L, Longo L, Spaet R, Moulin P, Pantano S, Dubost V, Lapadula D, Burkey B, Kaushik V, Zhou W, Hayes M, Flavahan N, Chibout SD, and Busch S (2014) Vascular origin of vildagliptin-induced skin effects in cynomolgus monkeys pathomechanistic role of peripheral sympathetic system and neuropeptide Y. *Toxicol Pathol* **42**:684–695.
- Holt MP and Ju C (2006) Mechanisms of drug-induced liver injury. *Aaps J* **8**:E48–E54.
- Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He J, Nagai T, Nakamura Y, Ishigaki Y, Kitada M, Srivastava SP, and Koya D (2014) Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. *Diabetes* **63**:2120–2131.

- Karagiannis T, Boura P, and Tsapas A (2014) Safety of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors: a perspective review. *Ther Adv Drug Saf* **5**:138–146.
- Kido JI, Kido R, Kataoka M, Fagerhol MK, and Nagata T (2003) Calprotectin release from human neutrophils is induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via the CD-14–Toll–like receptor–nuclear factor κ B pathway. *J Periodontol Res* **38**:557–563.
- Kido J, Hayashi N, Kataoka M, and Nagata T (2005) Calprotectin expression in human monocytes: induction by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . *J Periodontol* **76**:437–442.
- Kirby M, Yu D, O'Connor S, and Gorrell M (2010) Inhibitor selectivity in the clinical application of dipeptidyl peptidase-4 inhibition. *Clin Sci* **118**:31–41.
- Kohro T, Yamazaki T, Sato H, Harada K, Ohe K, Komuro I, and Nagai R (2013) Trends in antidiabetic prescription patterns in Japan from 2005 to 2011. *Int Heart J* **54**:93–97.
- Krasnikov BF, Nostramo R, Pinto JT, and Cooper AJ (2009) Assay and purification of ω -amidase/Nit2, a ubiquitously expressed putative tumor suppressor, that catalyzes the deamidation of the α -keto acid analogues of glutamine and asparagine. *Anal Biochem* **391**:144–150.
- Kurita N, Ito T, Shimizu S, Hirata T, and Uchihara H (2014) Idiosyncratic liver injury induced by vildagliptin with successful switch to linagliptin in a hemodialyzed diabetic patient. *Diabetes Care* **37**:e198–e199.

Kurtz CL, Peck BC, Fannin EE, Beysen C, Miao J, Landstreet SR, Ding S, Turaga V, Lund PK, Turner S, Biddinger SB, Vickers KC, and Sethupathy P (2014) MicroRNA-29 fine-tunes the expression of key FOXA2-activated lipid metabolism genes and is dysregulated in animal models of insulin resistance and diabetes. *Diabetes* **63**:3141–3148.

Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, Eckardt K, Kaufman JM, Ryden M, Müller S, Hanisch FG, Ruige J, Arner P, Sell H, and Eckel J (2011) Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* **60**:1917–1925.

Lin CH, Chung MY, Chen WB, and Chien CH (2007) Growth inhibitory effect of the human NIT2 gene and its allelic imbalance in cancers. *FEBS J* **274**:2946–2956.

Liu J, Liu Y, Habeebu SS, and Klaassen CD (1998) Metallothionein (MT)-null mice are sensitive to cisplatin-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **149**:24–31.

Lukashevich V, Schweizer A, Shao Q, Groop PH, and Kothny W (2011) Safety and efficacy of vildagliptin versus placebo in patients with type 2 diabetes and moderate or severe renal impairment: a prospective 24-week randomized placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab* **13**:947–954.

Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, and Nebert DW (2005) Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* **15**:677–685.

- Mentlein R (1999) Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) –role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* **85**:9–24.
- Moles A, Murphy L, Wilson CL, Chakraborty JB, Fox C, Park EJ, Mann J, Oakley F, Howarth R, Brain J, Masson S, Karin M, Seki E, and Mann DA (2014) A TLR2/S100A9/CXCL-2 signaling network is necessary for neutrophil recruitment in acute and chronic liver injury in the mouse. *J Hepatol* **60**:782–791.
- Mulvihill EE and Drucker DJ (2014) Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr Rev* **35**:992–1019.
- Nabeno M, Akahoshi F, Kishida H, Miyaguchi I, Tanaka Y, Ishii S, and Kadowaki T (2013) A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site. *Biochem Biophys Res Commun* **434**:191–196.
- Nagai N (2010) Drug Interaction Studies on New Drug Applications: Current Situations and Regulatory Views in Japan. *Drug Metab Pharmacokinet* **25**:3–15.
- Nakamura A, Nakajima M, Yamanaka H, Fujiwara R, and Yokoi T (2008) Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. *Drug Metab Dispos* **36**:1461–1464.
- Oda S, Matsuo K, Nakajima A, and Yokoi T (2016) A novel cell-based assay for the evaluation of immune-and inflammatory-related gene expression as biomarkers for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol Lett* **241**:60–70.

- Osawa S, Kawamori D, Katakami N, Takahara M, Sakamoto F, Katsura T, Yasuda T, Kaneto H, Matsuhisa M, Matsuoka TA, and Shimomura I (2016) Significant elevation of serum dipeptidyl peptidase-4 activity in young-adult type 1 diabetes. *Diabetes Res and Clin Pract* **113**:135–142.
- Pace HC and Brenner C (2001) The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol* **2**:1–9.
- Perera C, McNeil HP, and Geczy CL (2010) S100 Calgranulins in inflammatory arthritis. *Immunol Cell Biol* **88**:41–49.
- Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, and Luedde T (2011) Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* **53**:209–218.
- Roth J, Vogl T, Sorg C, and Sunderkötter C (2003) Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol* **24**:155–158.
- Ryskjær J, Deacon CF, Carr RD, Krarup T, Madsbad S, Holst J, and Vilsbøll T (2006) Plasma dipeptidyl peptidase-IV activity in patients with type-2 diabetes mellitus correlates positively with HbA1c levels, but is not acutely affected by food intake. *Eur J of Endocrinol* **155**:485–493.
- Sasaki E, Matsuo K, Iida A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2013) A novel mouse model for phenytoin-induced liver injury: involvement of immune-related factors and P450-mediated metabolism. *Toxicol Sci* **136**:250–263.
- Scheen AJ (2010) Pharmacokinetics of dipeptidylpeptidase-4 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* **12**:648–658.

Sell H, Blüher M, Klöting N, Schlich R, Willems M, Ruppe F, Knoefel WT, Dietrich A, Fielding BA, Arner P, Frayn KN, and Eckel J (2013) Adipose Dipeptidyl Peptidase-4 and Obesity Correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes Care* **36**:4083–4090.

Semba S, Han SY, Qin HR, McCorkell KA, Iliopoulos D, Pekarsky Y, Druck T, Trapasso F, Croce CM, and Huebner K (2006) Biological functions of mammalian Nit1, the counterpart of the invertebrate NitFhit Rosetta stone protein, a possible tumor suppressor. *J Biol Chem* **281**:28244–28253.

Shimizu M, Fukami T, Ito Y, Kurokawa T, Kariya M, Nakajima M, and Yokoi T (2014) Indiplon is hydrolyzed by arylacetamide deacetylase in human liver. *Drug Metab Dispos* **42**:751–758.

Tanaka T, Kameoka J, Yaron A, Schlossman SF, and Morimoto C (1993) The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:4586–4590.

Varga T, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, Rácz K, Selmeçi L, and Firneisz G (2011) Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. *Pathol Oncol Res* **17**:925–930.

Villhauer EB, Brinkman JA, Naderi GB, Burkey BF, Dunning BE, Prasad K, Mangold BL, Russell ME, and Hughes TE (2003) 1-[[[(3-hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: a potent,

selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. *J Med Chem* **46**:2774–2789.

Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T, Arkkila P, Sirén J, Hamsten A, Fisher RM, and Yki-Järvinen H (2007) Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes* **56**:2759–2765.

Yano A, Oda S, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2014) Development of a cell-based assay system considering drug metabolism and immune-and inflammatory-related factors for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol Lett* **228**:13–24.

Zilleßen P, Celner J, Kretschmann A, Pfeifer A, Racké K, and Mayer P (2016) Metabolic role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) in primary human (pre) adipocytes. *Sci Rep* **6**: DOI: 10.1038/srep23074

VII. 主論文目録

本学位論文の内容は下記の発表論文による。

第1章

Asakura M., Nakano M., Hayashida K., Fujii H., Nakajima M., Atsuda K., Itoh T., Fujiwara R. Human nitrilase-like protein does not catalyze the hydrolysis of vildagliptin. *Drug Metab Pharmacokinet* **29**, 463–469 (2014).

Asakura M., Fujii H., Atsuda K., Itoh T., Fujiwara R. Dipeptidyl peptidase-4 greatly contributes to the hydrolysis of vildagliptin in human liver. *Drug Metab Dispos* **43**, 477–484 (2015).

朝倉 充俊, 藤原 亮一, 伊藤 智夫, 厚田 幸一郎, ビルダグリプチンの代謝酵素と体内動態変動因子に関する最近の研究. *Japanese Journal of Pharmaceutical and Diabetes* **4**, 155–165 (2015).

第2章

Asakura M., Fukami T., Nakajima M., Fujii H., Atsuda K., Itoh T., Fujiwara R. Hepatic dipeptidyl peptidase-4 controls pharmacokinetics of vildagliptin *in vivo*. *Drug Metab Dispos* **45**:237–245 (2017).

第3章

Asakura M., Karaki F., Fujii H., Atsuda K., Itoh T., Fujiwara R. Vildagliptin and its metabolite M20.7 induce the expression of S100A8 and S100A9 in human hepatoma HepG2 and leukemia HL-60 cells. *Sci Rep* **6**, 35633; doi:10.1038/srep35633 (2016).

VIII. 研究業績

学術論文

Asakura M., Nakano M., Hayashida K., Fujii H., Nakajima M., Atsuda K., Itoh T., Fujiwara R. Human nitrilase-like protein does not catalyze the hydrolysis of vildagliptin. *Drug Metab Pharmacokinet* **29**, 463–469 (2014).

Asakura M., Fujii H., Atsuda K., Itoh T., Fujiwara R. Dipeptidyl peptidase-4 greatly contributes to the hydrolysis of vildagliptin in human liver. *Drug Metab Dispos* **43**, 477–484 (2015).

○ 朝倉 充俊, 藤原 亮一, 伊藤 智夫, 厚田 幸一郎, ビルダグリプチンの代謝酵素と体内動態変動因子に関する最近の研究. *Japanese Journal of Pharmaceutical and Diabetes* **4**, 155–165 (2015).

Asakura M., Karaki F., Fujii H., Atsuda K., Itoh T., Fujiwara R. Vildagliptin and its metabolite M20.7 induce the expression of S100A8 and S100A9 in human hepatoma HepG2 and leukemia HL-60 cells. *Sci Rep* **6**, 35633; doi:10.1038/srep35633 (2016).

○ Asakura M., Fukami T., Nakajima M., Fujii H., Atsuda K., Itoh T., Fujiwara R. Hepatic dipeptidyl peptidase-4 controls pharmacokinetics of vildagliptin *in vivo*. *Drug Metab Dispos* **45**:237–245 (2017).

学会発表 (ポスター発表)

朝倉充俊, 藤原亮一, 藤井秀明, 厚田幸一郎, 伊藤智夫, ビルダグリプチンの主代謝酵素の探索, 日本薬学会第 134 年会 (2014)

朝倉充俊, 藤原亮一, 伊藤智夫, 厚田幸一郎, ビルダグリプチン主代謝経路への DPP-4 及び nitrilase-like protein (NIT) の関与の検討, 第 3 回日本くすりと糖尿病学会 (2014)

朝倉充俊, 藤原亮一, 藤井秀明, 厚田幸一郎, 伊藤智夫, ジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) によるビルダグリプチンの代謝, 日本薬学会第 135 年会 (2015)

朝倉充俊, 藤原亮一, 藤井秀明, 厚田幸一郎, 伊藤智夫, 2 型糖尿病治療薬ビルダグリプチンによる S100A8/A9 の発現誘導, 日本薬学会第 136 年会 (2016)

Asakura, M., Fujii, H., Atsuda, K., Itoh, T., and Fujiwara, R., Effects of vildagliptin and its metabolite on inflammation-associated genes in human hepatoma HepG2 and monocytic HL-60 cells, The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT) (2016)

朝倉充俊, 藤原亮一, 藤井秀明, 伊藤智夫, 厚田幸一郎, DPP-4 阻害薬ビルダグリプチンによる炎症関連タンパク S100A8/A9 の発現誘導, 第 59 回日本糖尿病学会 (2016)

学会発表 (口頭発表)

朝倉充俊, 藤原亮一, 藤井秀明, 厚田幸一郎, 伊藤智夫, 2型糖尿病治療薬ビルダグリ
プチンの適正使用に向けた *in vitro* 薬物動態研究, 第28回 北里大学バイオサイエ
ンスフォーラム (2015)

朝倉充俊, 藤原亮一, 伊藤智夫, 厚田幸一郎, DPP-4阻害薬ビルダグリプチンの適正使
用に向けた *in vitro* 薬物動態研究, 第4回日本くすりと糖尿病学会 (2015)

朝倉充俊, 唐木文霞, 藤原亮一, 藤井秀明, 厚田幸一郎, 伊藤智夫, 2型糖尿病治療薬
ビルダグリプチンの適正使用に向けた薬物動態研究, 第29回 北里大学バイオサ
イエンスフォーラム (2016)

朝倉充俊, 藤原亮一, 深見達基, 中島美紀, 藤井秀明, 厚田幸一郎, 伊藤智夫, 2型糖尿
病治療薬ビルダグリプチンの主代謝酵素の解明, 日本薬物動態学会 第31回年会
第二回学生主催シンポジウム (2016)

朝倉充俊, 藤原亮一, 伊藤智夫, 厚田幸一郎, DPP-4阻害薬ビルダグリプチンの適正使
用に向けた薬物動態研究, 第5回日本くすりと糖尿病学会 (2016)

