

学位論文内容要旨

氏名：朝倉 充俊



題目：「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」

1. 背景

近年、単独投与では低血糖を起こしにくく高齢者を含む多くの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¹⁾。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²⁾。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 (VDG) (エクア[®]) は消失半減期が短いことから1日2回の服用が必要であるという特徴を有する。VDG の未変化体排泄率は27.1%と低く、投与された VDG 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 1)³⁾。VDG 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かった。また、VDG は肝障害を引き起こすことが国内外で報告されているが^{2, 4)}、肝障害の発現メカニズムは不明であった。VDG 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薬物相互作用や、代謝酵素の遺伝子多型によって体内動態が変化する可能性が考えられる。VDG 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。そこで本研究では、1) VDG の主代謝酵素を解明すること、2) 主代謝酵素の発現量の個体差や遺伝子多型の影響を評価すること、3) VDG による肝障害の発現メカニズムを解明することを目的とした。

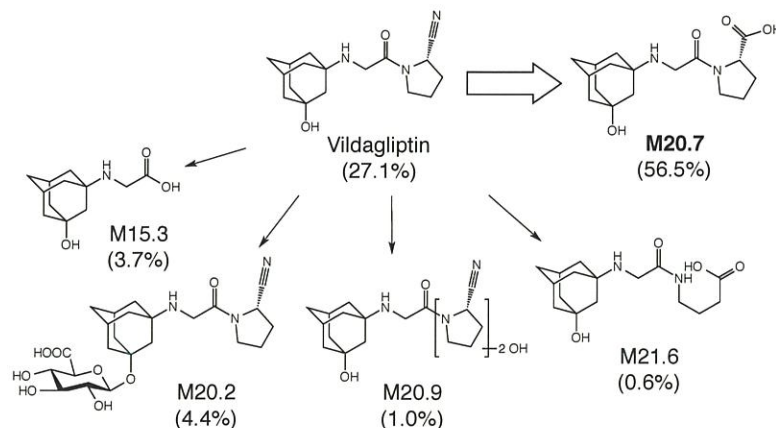


Figure 1. Metabolic pathways of vildagliptin in humans. Reported amount of vildagliptin and metabolites in urine and feces is indicated as percentage of dose³⁾.

2. VDG 主代謝反応への DPP-4 の寄与率を明らかにするための *in vitro* 実験

2-1. 発現系を用いたヒト DPP-4 の VDG 代謝能の評価

VDG の主代謝反応に関する先行研究において、ヒトの肝臓スライスと VDG を反応させることで M20.7 の生成が認められた³⁾。また、発現系を用いた検討から nitrilase-like protein や代表的な薬物代謝酵素である cytochrome P450 は、M20.7 の生成反応に関与しないことが示されている^{3, 5)}。そして、野生型 DPP-4 を発現するラットに比べて DPP-4 の酵素活性が全身で欠損しているラットにおいて、VDG を経口投与した後に排泄物中に含まれる M20.7 の量が約 20%低下したことが報告されている⁶⁾。以上より、ヒトの肝臓に発現する酵素が M20.7 の生成に関与すること、およびラットの体内における M20.7 生成反応の一部には DPP-4 が関与する可能性が示唆された。

ヒトの DPP-4 が VDG 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) を用いた検討を行った⁷⁾。ウェスタンブロット解析と 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 酵素活性の結果から、構築した 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 2A and 2B)。そこで、各サンプルに対して VDG 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 (pmol/h/mg protein) を算出し、VDG 代謝活性を評価した。HEK/DPP-4 において、コントロールの 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 VDG 代謝能を有することが明らかになった (Figure 2C)⁷⁾。

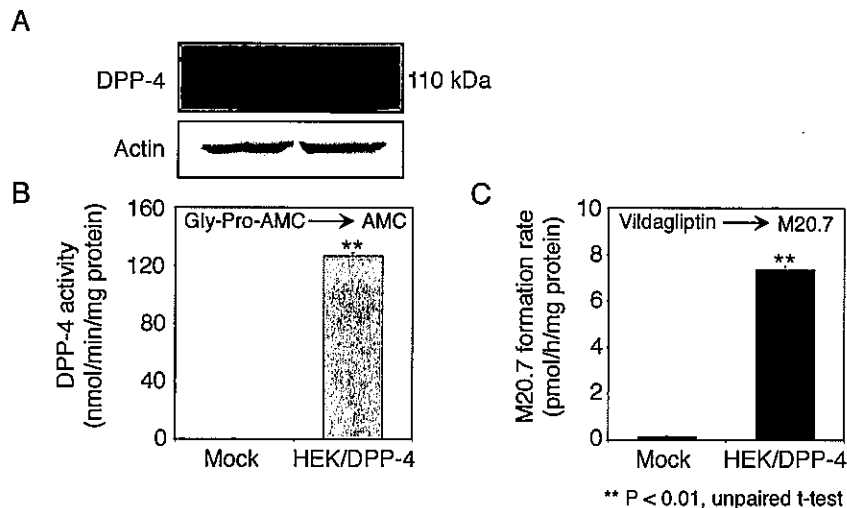


Figure 2. Protein expression levels of DPP-4 (A), DPP-4 activities (B), and vildagliptin-hydrolyzing activities (C) in mock cells and HEK/DPP-4.

2-2. ヒト肝臓における VDG 主代謝反応への DPP-4 の寄与率の算出

ヒト肝臓における VDG 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 VDG の代謝阻害実験を行った⁷⁾。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 3)。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 (1000 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。

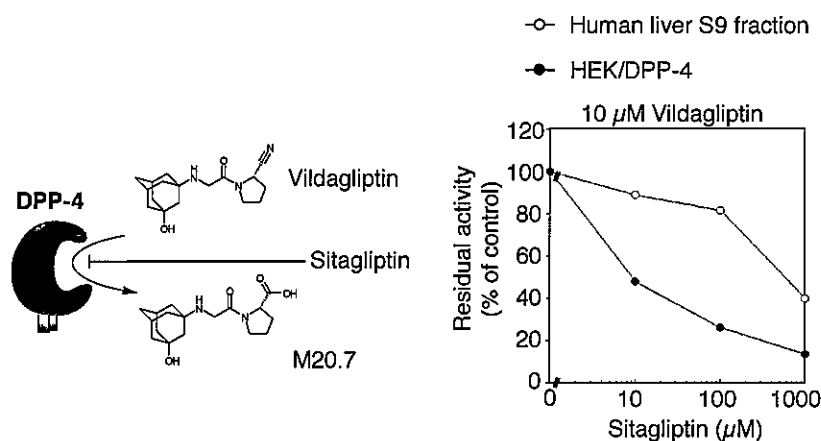


Figure 3. Inhibition study of vildagliptin-hydrolyzing activity.

3. DPP-4 の発現量の個体差や遺伝子多型による VDG 主代謝反応への影響

3-1. 血中 DPP-4 濃度の個体差が M20.7 の生成量に及ぼす影響

DPP-4 は肝臓以外にも血液中を含む全身に広く分布する酵素であり、肥満や糖尿病が要因となり血中 DPP-4 濃度が上昇することが報告されている^{8,9)}。そこで、血中 DPP-4 濃度の個体差が M20.7 の生成量に影響を与えるか否かについて評価するために、血中 DPP-4 濃度を上昇させることが報告¹⁰⁾されているストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスを用いた *in vivo* 実験を行った。過去の報告通り、STZ 処置群の血中 DPP-4 濃度はコントロール群に比べて約 2 倍に増加していた。STZ 処置群とコントロール群のマウスに VDG (10 mg/kg) を経口投与し、経時的に VDG と 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。STZ 処置群の M20.7 の血中濃度時間曲線下面積 (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 4 and Table 1)。このことから、血中 DPP-4 の個体差は M20.7 の生成量に大きな影響は及ぼさないことが示された。

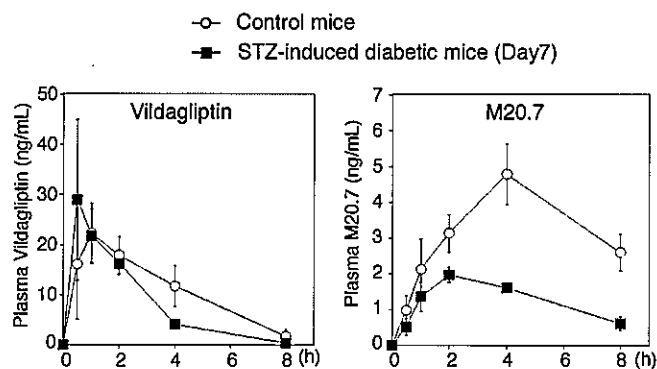


Figure 4. Pharmacokinetics study of vildagliptin and M20.7.

Table 1. AUC_{0-8h} following oral administration of vildagliptin (10 mg/kg).

Group	Numbers	AUC _{0-8h} (ng·h/mL)	
		Vildagliptin	M20.7
Control mice	4	90 ± 14	26 ± 2.6
STZ-induced diabetic mice (Day7)	3	68 ± 16	10 ± 0.8**

** P < 0.01 vs. Control mice.

3-2. マウスにおける VDG の主代謝臓器の同定

VDG 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 酵素活性と VDG 代謝能 (M20.7 生成活性) の評価を行った。臓器あたりの活性を見積もったところ、腎臓、小腸と血液に比べて肝臓が最も高い DPP-4 酵素活性と VDG 代謝能を有することが明らかになった (Figure 5A and 5B)。また、どちらの活性も腎臓と小腸においてはコントロール群に比べて STZ 処置群で約 2 倍に増加していたが、肝臓では約 0.7 倍に低下していた。さらに、マウス個々の肝臓における DPP-4 酵素活性と M20.7 の AUC との間に高い正の相関関係が認められた (Figure 5C)。以上より、血中 DPP-4 濃度の個体差は VDG 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。

3-3. 個人肝臓マイクロソームにおける VDG 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 VDG 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 VDG 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 VDG 代謝活性が認められ、最大で 3.5 倍の個人差が存在することが明らかになった (Figure 6A)。また、Gly-Pro-AMC を用いて測定した DPP-4 酵素活性と VDG 代謝活性との間に正の相関関係が認められた (Figure 6B and 6C)。以上より、臨床で認められる VDG の長期的な有効性や副作用の個人差に、肝臓における VDG 代謝活性の個人差が関与している可能性が示された。

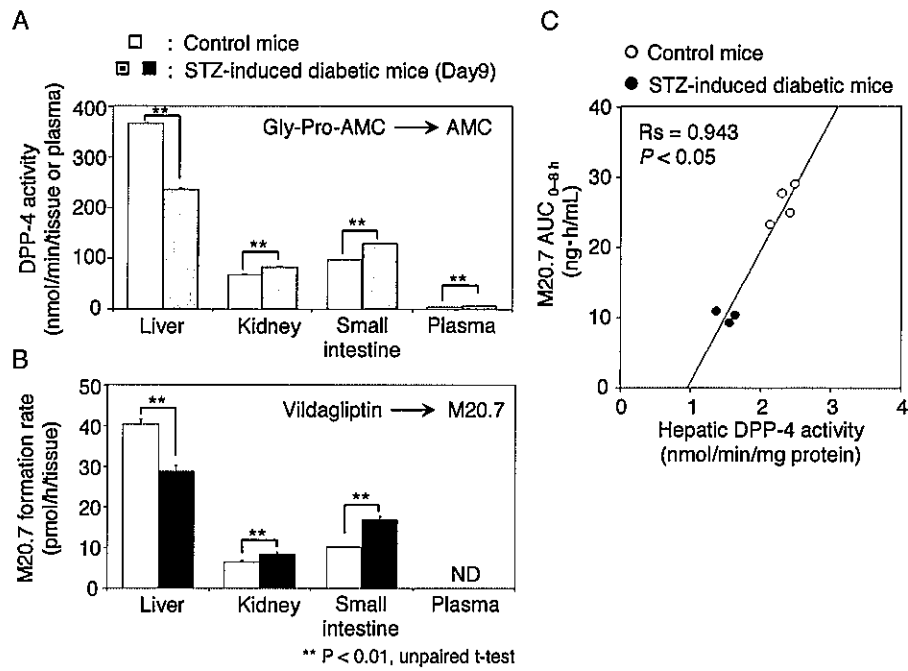


Figure 5. The estimated DPP-4 activities (A) and M20.7 formation rates (B) in whole liver, kidney, small intestine tissues, and plasma and correlation analyses between hepatic vildagliptin-hydrolyzing activities and between hepatic DPP-4 activities and the AUC_{0-8 h} values of M20.7 in individual mice (C).

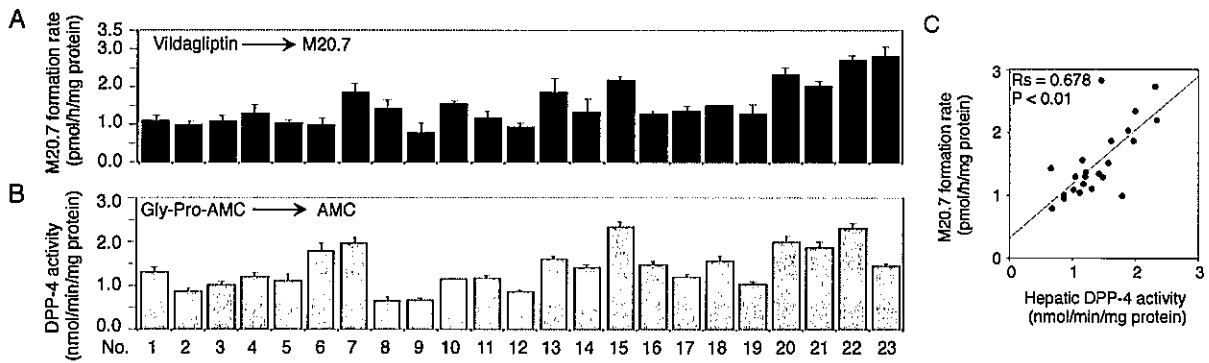


Figure 6. The hepatic DPP-4 activities (A) and vildagliptin-hydrolyzing activities (B) in a panel of 23 individual human liver samples and correlation analyses between hepatic vildagliptin-hydrolyzing activities and DPP-4 activities (C).

3-4. ヒト DPP-4 遺伝子多型の VDG 代謝能への影響

DPP-4 の遺伝子多型による VDG 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の中で最も頻度が高かった R623Q 変異体 (rs147614497, allele frequency = 0.0248)¹¹⁾ の発現系を構築し、VDG 代謝能の評価を行った⁷⁾。ウェスタンブロット解析の結果から、HEK/R623Q は mock 細胞に比べ著しく高く、HEK/DPP-4 と同程度の DPP-4 タンパクを発現していることが示された (Figure 7A)。HEK/R623Q は HEK/DPP-4 と同程度の DPP-4 酵素活性を示したため、R623Q の変異は DPP-4 酵素活性には重大な影響を及ぼさないことが明らかになった (Figure 7B)。一方で、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ていた (Figure 7C)。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、VDG の血中濃度の個人差の要因となる可能性が示された。

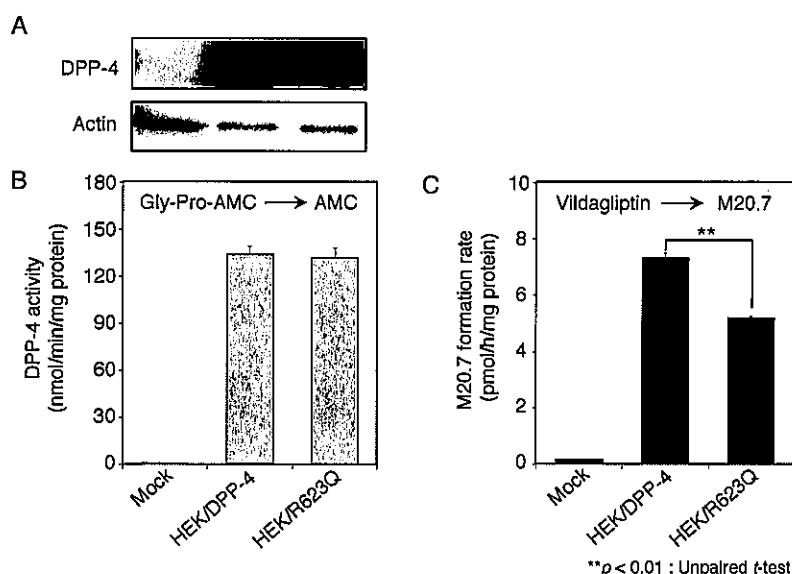


Figure 7. Protein expression levels of DPP-4 (A), DPP-4 activities (B), and vildagliptin-hydrolyzing activities (C) in mock cells, HEK/DPP-4, and HEK/R623Q.

4. VDG による肝障害発現メカニズムの解明

4-1. VDG により肝臓内で誘導される炎症関連遺伝子の同定

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¹²⁾。VDG 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かったため、はじめに VDG 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の同定を行った¹³⁾。VDG (1000 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、マイクロアレイ解析を行った。その結果、VDG 処置によりマウス肝臓内で発現量が 2 倍以上増加する遺伝子として、カルバマゼピン¹⁴⁾やフェニトイン¹⁵⁾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の S100 calcium-binding protein (S100) A8 と S100A9 を含む 276 個の遺伝子が同定された (Table 2)。

Table 2. Top 14 probes that were up-regulated more than 2-fold by VDG 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

4-2. ヒトの培養細胞における S100A8、S100A9 の発現と VDG による変動

炎症関連遺伝子である S100A8 と S100A9 がヒト肝臓においても発現変動するか否かを明らかにするために、ヒトの肝実質細胞と免疫細胞を想定したヒト肝癌細胞株 (HepG2) とヒト好中球様細胞株 (HL-60) を VDG で処置し、S100A8 と S100A9 の発現をリアルタイム RT-PCR および ELISA により解析した¹³⁾。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 と S100A9 の発現変動への影響についても検討した。

HepG2 細胞に VDG を処置したところ S100A9 mRNA の約 2 倍の増加が認められた (Figure 8A)。また、HepG2 細胞に M20.7 およびシタグリプチンを処置した際にも S100A9 mRNA の増加が認められた。S100A8 は発現量が少ないために定量することができなかった。一方で HL-60 細胞においては、S100A8 や S100A9 の mRNA 増加は VDG と M20.7 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 8B)。さらに、HL-60 細胞から培養液中に分泌される S100A8/A9 タンパク量についても VDG と M20.7 処置時に特異的に増加した (Figure 9)。HepG2 細胞で認められた S100A9 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ことが示唆された。一方

で、HL-60 細胞における S100A8/A9 の mRNA 発現量およびタンパク分泌量の増加はシタグリプチン処置時には認められなかった。以上のことから、VDG および主代謝物 M20.7 は 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 タンパク分泌量を増加させることが明らかとなった。これらの炎症関連タンパクの免疫細胞からの分泌増加が VDG による肝障害の一因を担っている可能性が示された (Figure 10)。

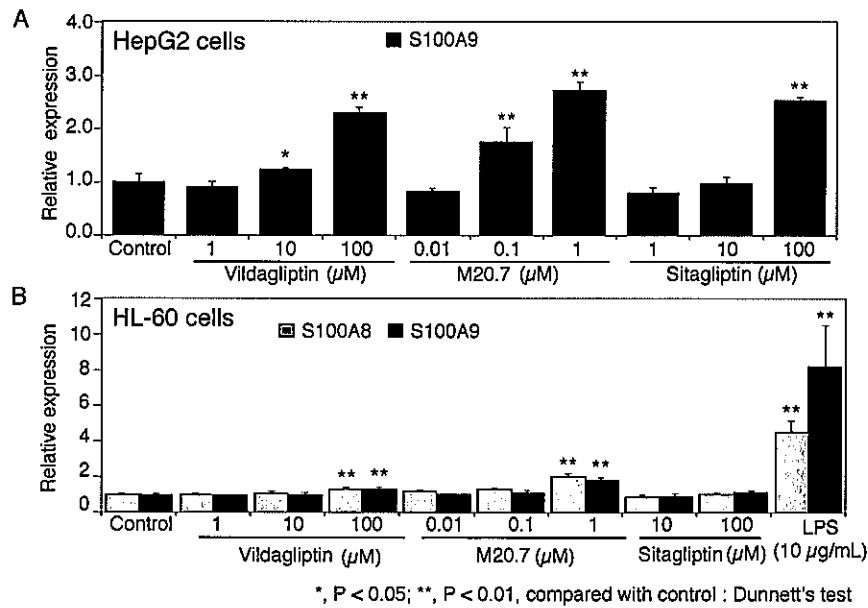


Figure 8. Effects of vildagliptin and M20.7 on gene expression of S100A8 and S100A9 in HepG2 (A) and HL-60 cells (B). Lipopolysaccharide (LPS) was used as a positive control.

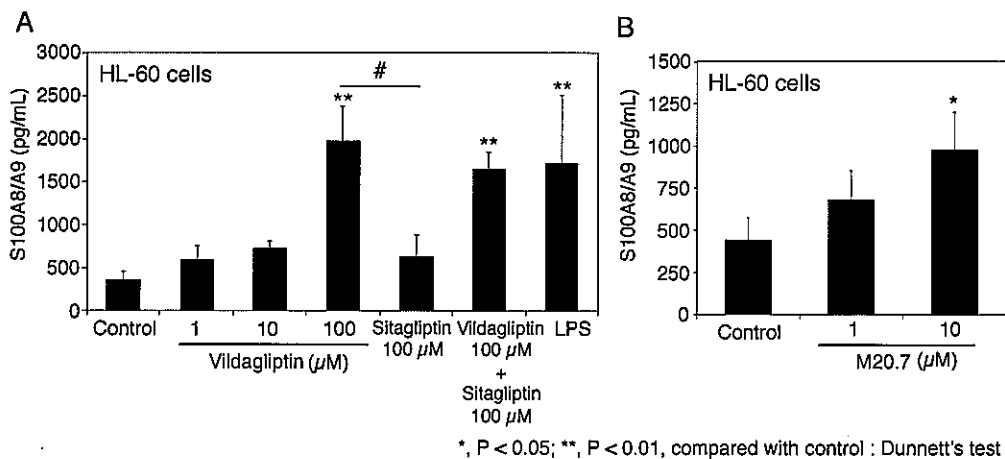


Figure 9. Effects of vildagliptin (A) and M20.7 (B) on the release of S100A8/A9 complex from HL-60 cells. LPS (10 μg/mL) was used as a positive control.

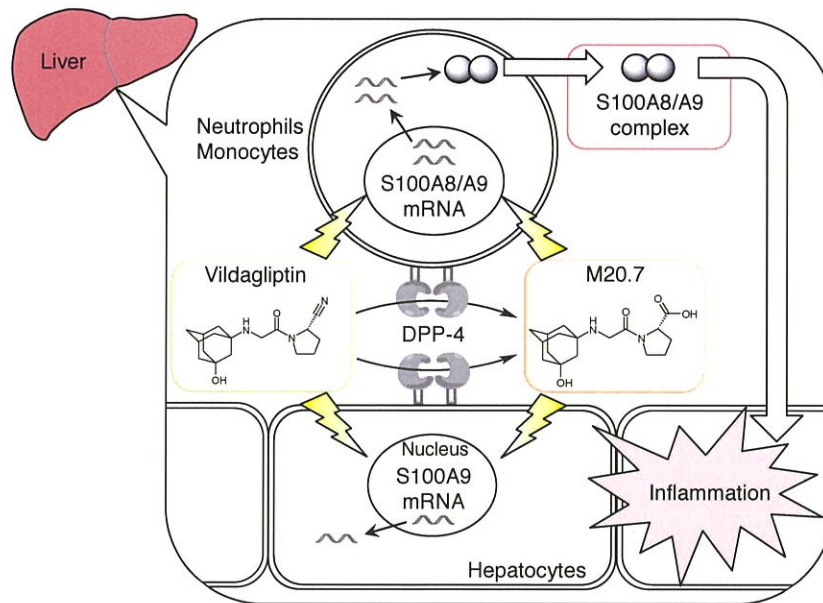


Figure 10. A proposed mechanism of vildagliptin-associated liver dysfunction.

5. 総括

ヒトにおける VDG の主代謝酵素は薬効の標的分子である DPP-4 であり、特に肝臓の DPP-4 が VDG の主代謝反応に大きく寄与していることが明らかになった^{7,16)}。また、肝臓における VDG 代謝活性には個人差が存在することや、DPP-4 の遺伝子多型が VDG 代謝能を変化させることを見出した⁷⁾。さらに、未変化体の VDG および主代謝物 M20.7 が免疫細胞からの炎症関連タンパク S100A8/A9 の分泌を誘導することが、VDG 服用による肝障害の一因を担っている可能性を見出した¹³⁾。これらの成果は、VDG の長期的な有効性や副作用の個人差を予測する上で有用な情報であると考えている。

6. 参考文献

- 1) Kohro T. *et al. Int. Heart. J.* **54**, 93–97 (2013).
- 2) Deacon C.F. *Diabetes Obes. Metab.* **13**, 7–18 (2011).
- 3) He H. *et al. Drug Metab. Dispos.* **37**, 536–544 (2009).
- 4) Kurita N. *et al. Diabetes Care* **37**, e198–e199 (2014).
- 5) Asakura M. *et al. Drug Metab. Pharmacokinet.* **29**, 463–469 (2014).
- 6) He H. *et al. Drug Metab. Dispos.* **37**, 545–554 (2009).
- 7) Asakura M. *et al. Drug Metab. Dispos.* **43**, 477–484 (2015).
- 8) Kirino Y. *et al. Endocr. J.* **59**, 949–953 (2012).
- 9) Sell H. *et al. Diabetes Care* **36**, 4083–4090 (2013).
- 10) Das S.S. *et al. Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **7**, 185–94 (2014).
- 11) NCBI SNP database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> (December 2013)
- 12) Adams D.H. *et al. Toxicol. Sci.* **115**, 307–321 (2010).
- 13) Asakura M. *et al. Sci. Rep.* **6**, 35633; doi:10.1038/srep35633 (2016).
- 14) Higuchi S. *et al. Toxicol. Sci.* **130**, 4–16 (2012).
- 15) Sasaki E. *et al. Toxicol. Sci.* **136**, 250–263 (2013).
- 16) Asakura M. *et al. Japanese Journal of Pharmaceutical and Diabetes* **4**, 155–165 (2015).

7. 研究業績

7-1. 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, ビルダグリブ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.* (2016). *In Press*

7-2. 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, ビルダグリブ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, ビルダグリブ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) によるビルダグリブチンの代謝, 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ブチンによる 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)

7-3. 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ブ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 阻害薬ビルダグリブ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ブ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ブ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 阻害薬ビルダグリブ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)