

経口インスリン分泌促進剤を指向した GPR40 アゴニスト DS-1558 の創製

第一三共株式会社
研究開発本部

高野 理恵子

目次

1, 背景・目的.....	1
2. 結果・考察.....	2
2-1, リード化合物獲得.....	2
2-2, GPR40 アゴニスト活性の向上.....	4
2-4, hGPR40 と DS-1558 のドッキングスタディによる構造活性相関の検証.....	9
2-5, DS-1558 の薬物動態と各種評価.....	10
2-6, DS-1558 の薬理評価.....	11
2-7, DS-1558 スケールアップ合成方法.....	13
3, 総括.....	14
4, 参考文献.....	14

1, 背景・目的

全世界的に糖尿病患者数は増加傾向にあり、2015年には4億1500万人に達した。糖尿病及びその合併症が原因の死亡者数は年間500万人にもものぼり、世界規模で適切な治療・対策を施す必要性が急増している。中でも2型糖尿病は全患者数の約90%を占める最も一般的な病型で、複数の遺伝的要因に生活環境要因が加わることで生じるインスリン作用不足を特徴とする。

その治療には、K-ATPチャンネル閉鎖作用によりインスリン分泌を促進させるスルホニルウレア剤が広く用いられているが、強力な血糖低下作用がある一方、血糖値に関係なくインスリン分泌を促進するため低血糖を惹起しやすい。さらに、長期使用は膵β細胞の疲弊をもたらす。

スルホニルウレア剤の問題点を克服し、適切な血糖コントロールが可能な新規抗糖尿病薬の研究開発がなされており、GPR40アゴニストも注目される創薬ターゲットの一つである。アゴニスト刺激により、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進するため低血糖を起こしにくく、さらにDPP-4阻害剤等作用機序の異なるインスリン分泌促進剤に比べ、強い薬効を発揮できることも利点である。実際に、代表的GPR40アゴニストであるTAK-875の臨床第二相試験において、低血糖発生率を上昇させることなくHbA1cを有意に低下させる事が確認されている^{1,2}。

膜タンパク質の一種であるGPR40は、膵β細胞に高発現するGタンパク質共役受容体(GPCR)であり、α-リノレン酸、DHAなどの中・長鎖脂肪酸を内因性のリガンドとして持つ。合成リガンドとしては、TAK-875、AMG-837等の脂肪酸を模倣したフェニルプロピオン酸構造を有するアゴニストが多く報告されている(図1)^{3,4}。我々は既知特許化合物**1**を起点として⁵、低血糖惹起リスクが低く、強い薬効を発揮できる薬剤の開発を目指し、本研究に着手した。

	インスリン分泌促進剤		
	スルホニルウレア (SU) 剤	DPP-4阻害剤*	GPR40アゴニスト
作用箇所	K-ATP channel	GPCR** (indirectly)	GPCR (directly)
グルコース依存性	×	○	○
血糖降下作用 (薬効)	High	Modest	High
低血糖惹起リスク (安全性)	High	Low	Low

CC(C(=O)O)C1=CC=C(C=C1)Oc2ccc(Oc3ccc(C(F)(F)F)=cc3)cc2

AMG-837 (EC₅₀ 14 nM)

CC(C(=O)O)C1=CC=C(C=C1)Oc2ccc(Oc3ccc(C)cc3)cc2

TAK-875 (EC₅₀ 14 nM)
(Phase III terminated)

CC(C(=O)O)C1=CC=C(C=C1)Oc2ccc(Oc3ccc(C)cc3)cc2

1
(WO2006011615A1)

*DPP-4, Dipeptidyl peptidase-4 **GPCR; G-protein coupled receptor

図 1. GPR40 アゴニストの利点と代表的 GPR40 アゴニスト

2. 結果・考察

2-1, リード化合物獲得⁶

化合物 **1** は、強い GPR40 アゴニスト活性を有する一方、クリアランス(CL)が高いため血中持続性が悪く、細胞障害性が強いという問題点があった(表 1)。

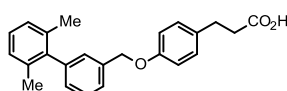
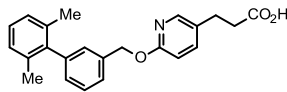
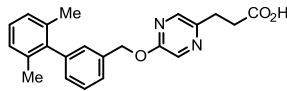
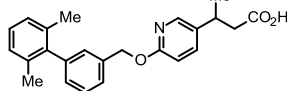
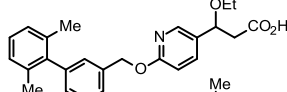
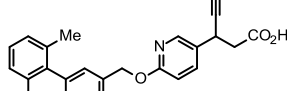
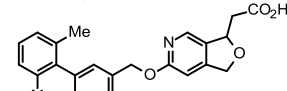
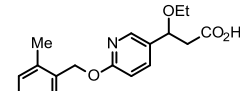
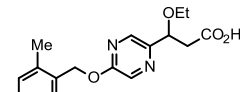
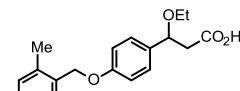
そこで、化合物 **1** の問題点を改善し、権利化可能な骨格を有する化合物を獲得する事を課題として、以下、誘導体展開に取り組んだ。

まず一つ目の問題点である血中持続性の悪さは、分子全体の高脂溶性(logD > 3.3)に原因があると予想し、中央環を複素環へ変換した。ピリジン (**2**)、ピラジン (**3**) に変換すると、脂溶性が低減しつつ活性が維持した。ピリジン誘導体 (**2**) は、予想通りクリアランスとバイオアベイラビリティ(F)に改善は見られたが、経口剤としての薬物動態は不十分なレベルであった。

次に、化合物 **1** の血漿中代謝物の解析から、カルボン酸 β 位が酸化を受ける事が予想されたため^{5,7}、カルボン酸 β 位に置換基を導入し代謝の抑制を試みた。メチル基(**4**)では活性はほぼ維持されるのに対し、AMG-837 が有するアセチレン基 (**6**) や環化構造 (**7**) では活性は 10 倍以上減弱した。種々検討した中で、エトキシ基では活性の維持と脂溶性の低減を両立することができ、カルボン酸 β 位での代謝を抑制した(**5**)。

同時に、もう一つの問題点である細胞障害性を、ミトコンドリア呼吸鎖 complex 1 阻害を指標として評価を進めた⁸。当初、脂溶性の低減は細胞障害性回避にも有効と期待していたが、脂溶性が低減した化合物(**3-5**)においても 30%以上の高いミトコンドリア阻害活性を示した。そこで、各化合物に共通するビアリール構造が complex 1 のファーマコフォアであるとの仮説をたて、ビアリール構造を除去した。その結果、細胞障害性は大幅に軽減した(**8, 9**)。しかし、同時に GPR40 アゴニスト活性も著しく減弱した。過度な脂溶性低下が、活性低下の原因と考えられたため、中央環をベンゼン環に変換したところ、complex 1 阻害に影響を与えず GPR40 アゴニスト活性が向上した(**10**)。また、化合物 **10** は、薬物動態にも大幅な改善が認められた。

このように、化合物 **1** に対して、分子全体の低脂溶性化、カルボン酸 β 位へのエトキシ基の導入、ビアリール構造の回避を行うことにより、薬物動態の改善と細胞障害性の軽減を図り、権利化可能な骨格であるβ-アルコキシプロピオン酸構造を有する化合物 **10** 獲得した。

compound		EC ₅₀ (nM) ^a	logD ^b	complex1(%) ^c	CL(L/h/kg)	F(%)
1		6.7 ^d	>3.3	58	4.816 ^e	0.9 ^e
2		3.5	3.0	NT ^f	1.2 ^g	24 ^g
3		3.8	2.5	47	NT	NT
4		10	3.3	39	NT	NT
5		14	2.8	66	NT	NT
6		38	3.5	NT	NT	NT
7		49	NT	NT	NT	NT
8		230	0.7	1.0	NT	NT
9		1400	0.4	4.0	NT	NT
10		20	1.2	6.0	0.37 ^h	64 ^h

^a A calcium flux assay in hGPR40-transfected CHO cells. Assay results are the average of triplicates. Standard deviation was $\pm 20\%$.

^b LogD values were determined at pH 7.4. ^c % inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex 1 at 100 μ M of compound.

^d in house data. ^e rat cassette, 0.1 mg/kg *i.v.*, 1 mg/kg *p.o.*. ^f NT=Not tested. ^g rat, 10 mg/kg *i.v.*, 10 mg/kg *p.o.*.

^h rat, 2 mg/kg *i.v.*, 3 mg/kg *p.o.*.

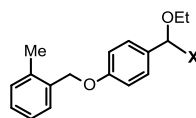
表 1. 化合物 1 のプロファイルとリード化合物 10 の創製

2-2, GPR40 アゴニスト活性の向上^{9,10}

強力な薬効発現のためには、高い *in vitro* 活性は必須である。しかし、得られたリード化合物 **10** は、当初目標としていた化合物 **1** よりも活性が低下していた。そこで次に、さらなる *in vitro* 活性向上を目指して、リード化合物 **10** の構造活性相関を取得した。

まず、カルボン酸部分の構造を変換した(表 2)。カルボン酸等価体であるテトラゾールやスルホンイミドに変換したところ、アゴニスト活性は著しく減弱した(**11**, **12**)。カルボン酸 α 位にジフルオロ基を導入して酸性度を高めた化合物 **13** を合成したが、活性はさらに大きく低下した。これらの結果から、カルボン酸近傍での空間的、電子的な許容範囲は狭いと考え、酸性基部分は無置換カルボン酸が最適であると判断した。

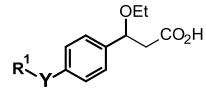
次に、ベンジルエーテル部分の変換を行った(表 3)。ベンゼン環をピリジン環で置換したところ、活性は大きく減弱した(**14**)。無置換のプロピオン酸誘導体では末端ベンゼン環の置換基導入は 3 位が有効との報告を参考に¹¹、3 位において種々の置換基効果の比較を行った。電子供与性基、電子吸引性基ともに良好な結果は得られず、特に高極性置換基では大きく活性が減弱した(**15-18**)。クロロ基は活性維持し、4 位に導入しても強い活性を示し(**19**, **20**)、3,4-二置換体ではさらに高活性を示した(**21**)。リンカーの長さは、2 元素が最適であり(**21-23**)、アミノリンカーでも活性は維持した(**24**)。以上より、ベンジル部分はハロゲン置換基の導入で活性を向上できることがわかった。



compound	X	EC ₅₀ (nM) ^a	pKa
10		20	3.92
11		1700	5.19
12		580	4.89
13		3800	-0.31

^a A calcium flux assay in hGPR40-transfected CHO cells. Assay results are the average of triplicates. Standard deviation was $\pm 20\%$.

表 2. カルボン酸部分の構造活性相関



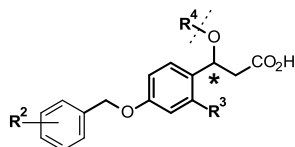
compound	R ¹	Y	EC ₅₀ (nM) ^a	compound	R ²	Y	EC ₅₀ (nM) ^a
10		O	20	19		O	19
14		O	2100	20		O	12
15		O	35	21		O	6.2
16		O	89	22		O	49
17		O	53	23		O	65
18		O	440	24		NH	27

^a A calcium flux assay in hGPR40-transfected CHO cells. Assay results are the average of triplicates. Standard deviation was $\pm 20\%$.

表 3. ベンジル部分の構造活性相関

カルボン酸β位のアルコキシ部分は、エチル基が最適の大きさであることを確認した(表 4)。また、ラセミ体である化合物 **21** を、キラル HPLC を用いて各光学異性体に分離した。その結果、*S* 体は *R* 体と比較して 100 倍程高活性であった(表 4)。

以上のように、ベンジル部分の適切な置換基の選択と、カルボン酸β位を *S* 体に固定することで、化合物 **28** や **30** のような、化合物 **1** を凌ぐ活性を有する化合物を獲得することができた。



compound	R ²	R ³	R ⁴	stereo	EC ₅₀ (nM) ^a
21	3Cl,4Cl-	H		<i>racemic</i>	6.2
25	3Cl,4Cl-	F		<i>racemic</i>	41
26	3Cl,4Cl-	H		<i>racemic</i>	48
27	3Cl,4Cl-	H		<i>racemic</i>	170
28	3Cl,4Cl-	H		S	3.9
29	3Cl,4Cl-	H		R	360
30	4-CF ₃	H		S	5.6

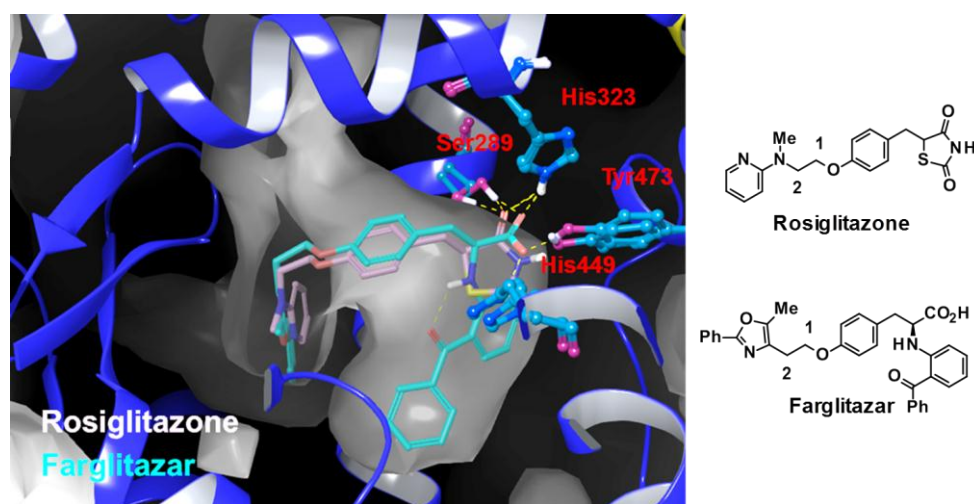
^a A calcium flux assay in hGPR40-transfected CHO cells. Assay results are the average of triplicates. Standard deviation was ± 20%.

表 4. アルコキシ基部分の構造活性相関

2-3, PPAR γ に対する選択性向上

化合物 **28** および **30** について、同じく脂肪酸をリガンドとする受容体 PPAR α 、 γ 、 δ に対する親和性を調べたところ、PPAR γ に対するアゴニスト活性が認められ、特に **28** は上市薬 Rosiglitazone と同等の強いアゴニスト活性を示した ($EC_{50} = 0.59 \mu\text{M}$)。

PPAR γ は核内受容体であり、脂肪組織や血管平滑筋をはじめ、各種臓器に広く発現している。アゴニスト作用により、インスリン抵抗性の改善、抗動脈硬化作用、抗炎症作用など好ましい効果がある一方、浮腫、心血管障害、肝障害などの副作用の存在も明らかにされている。一般的に、糖尿病患者は血管障害を有しており、心血管障害の副作用を有する薬剤は心不全、心筋梗塞等を誘発する可能性があるため、避ける事が望ましい。また、浮腫は腎臓に対する負担が大きく、糖尿病性腎症の患者には避けるべき副作用である。そこで、PPAR γ アゴニスト作用を回避することを次の課題として、構造変換に取り組んだ。

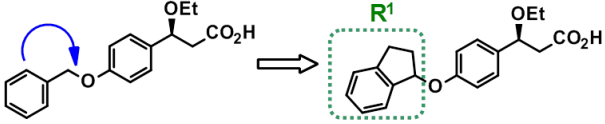


PPAR γ -agonist Rosiglitazone (pdb code 4ema), PPAR γ -agonist Farglitazar (pdb code 1fm9)

図 2. 代表的 PPAR γ アゴニストの複合体結晶構造

代表的な PPAR γ アゴニスト Rosiglitazone、Farglitazar のように、PPAR γ アゴニストも酸性基部分と鎖状構造から構成される。各化合物と hPPAR γ の複合体の X 線結晶構造の報告より、リガンドは湾曲して Y 字型のポケットに結合していた (図 2) ¹²。

そこで、化合物 **30** の鎖状部分のフレキシビリティを低下させれば PPAR γ の Y 字型リガンド結合ポケットに結合しにくくなるという仮説を立て、ベンジル位から環化した化合物を合成した (表 5)。



compound	R ¹	GPR40 EC ₅₀ (nM)	PPAR _γ EC ₅₀ (μM) ^a
30		5.6	10 ^b
31		13	NT ^c
DS-1558		3.7	>100
32		19	NT
33		9.9	>100

^a Luciferase assay in transfected-hPPAR_γ COS-7 cells. ^b Luciferase assay in transfected-rPPAR_γ HT-1080 cells. ^c Not Tested

表 5. 環化化合物の構造活性相関

予想通り、DS-1558をはじめとする環化化合物(31-33)では、PPAR_γ アゴニスト活性が消失した。さらに、環化構造の導入は主活性の向上にも繋がった。このように、環化構造の導入により、PPAR_γ アゴニスト活性消失に成功し、強力な *in vitro* GPR40 アゴニスト活性を有する DS-1558 を獲得した (図 3)。

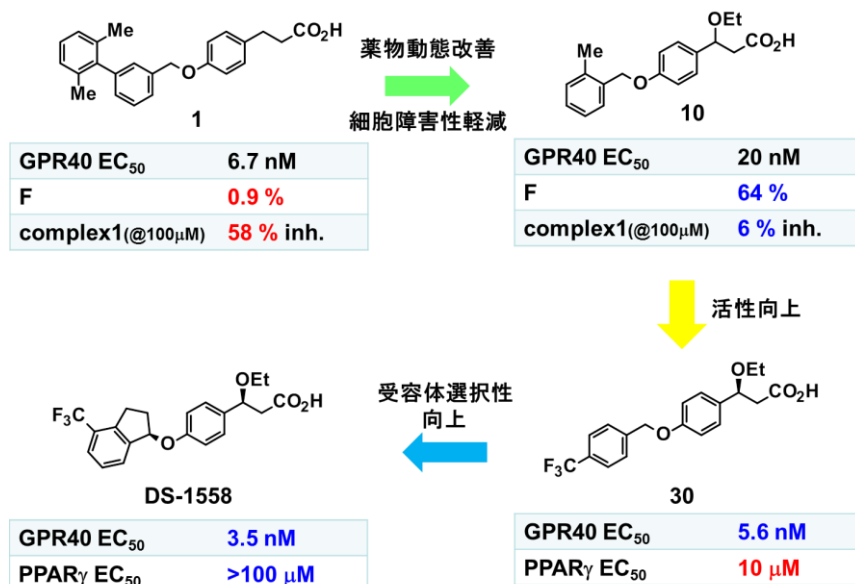


図 3. DS-1558 獲得の経緯

2-4, hGPR40 と DS-1558 のドッキングスタディによる構造活性相関の検証

TAK-875 と hGPR40 の共結晶の X 線結晶構造の報告を受け、DS-1558 と hGPR40 の induced-fit ドッキングスタディを行った(図 4)¹³。カルボン酸は、Arg183、Arg258、Trp91 と強い水素結合を形成していた。インダン環 4 位のトリフルオロメチル基はタンパク表面の疎水性部分と相互作用しており、他の置換基に比べて高活性を示したと考えられる。インダン環 1 位の立体配置はタンパク質表面の立体障害を受けにくい R 体(28)のほうが有利であった。さらに、カルボン酸側鎖から伸びるエトキシ基は、TAK-875 が利用していない小さい疎水性ポケットを利用していた。これら 2 つの不斉点の立体化学が活性発現に大きく影響することが示唆された。

GPR40 の結合ポケットは疎水性に富むため電子的相互作用できる箇所は少ないにも関わらず、DS-1558 が高親和性を示したのは、DS-1558 が結合ポケットとの形状相補性に優れていたためと考えられる。Ligand efficiency 値からも、有効性を裏づけることができた(DS-1558: 0.41, TAK-875: 0.29)¹⁴。

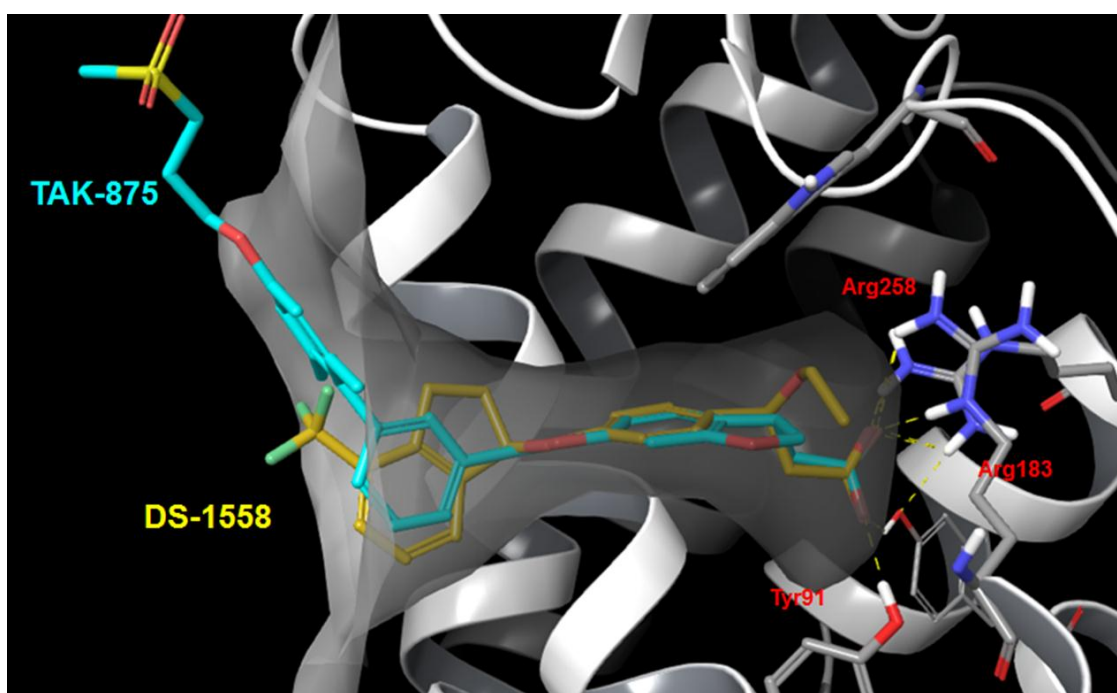


図 4. hGPR40 と DS-1558 のドッキングスタディ

2-5, DS-1558 の薬物動態と各種評価

化合物 **10**、**30**、DS-1558 のラットにおける PK パラメータの値を比較した(表 6)。電子吸引性基の導入、環化によるベンジル位への立体障害の導入により、代謝安定性が向上した結果、クリアランス、半減期が改善され、経口投与にて十分に薬効を発揮できるプロファイルとなった。さらに、DS-1558 は、サル、イヌにおいても良好な薬物動態を示すことがわかった。

また、本化合物は同じく脂肪酸を内因性リガンドとする GPR41, 43, 120 に対しても活性を示さなかった。さらに、他 68 種のレセプター、イオンチャネル、トランスポーターに対しても親和性は極めて低く、100 倍以上の高いレセプター選択性を有していた¹⁵。

Compd	Species	<i>i.v.</i>				<i>p.o.</i>			
		Dose (mg/kg)	CL (L/h/kg)	Vdss (L/kg)	T _{1/2} (h)	Dose (mg/kg)	Cmax (µg/mL)	AUC (µg*h/mL)	F (%)
10	Rat	2	0.37	0.16	0.37	3	3.3	5.3	64
30	Rat	1	0.012	0.38	22	1	0.95	14	32
DS-1558	Rat	1	0.020	0.19	6.0	1	3.1	40	80
	Dog	0.5	0.042	0.23	4.0	1	1.7	14	66
	Monkey	1	0.032	0.62	17	1	2.3	30	100

^a Data is the mean of experiments (n = 2). ^b The statistics are shown in ref.9. (n = 4).

表 6.化合物 **10**, **30**, DS-1558 の薬物動態の比較

2-6, DS-1558 の薬理評価

まずは、GPR40 アゴニストのコンセプトを検証するために、正常 SD ラットを用いた静脈内糖負荷試験において、DS-1558 のインスリン分泌能を試験した(図 5)。正常血糖値状態 (Saline) と、高血糖状態 (Glucose) において、化合物 DS-1558 (0.03 mg/kg, 0.3 mg/kg) を投与し、血漿中インスリン量を測定した。各グループの平均血糖値は、正常値グループで 68 - 88 mg/dL、高血糖値グループで 428 - 482 mg/dL であった。正常血糖状態では、コントロール群と化合物投与群ではインスリン分泌量に大きな違いはなかった。一方、高血糖状態では、化合物投与群でのインスリン分泌量は著しく高値を示し、その量は用量依存的であった。これらの結果から、DS-1558 は高血糖状態下でのみ、用量依存的にインスリン分泌を促進する、つまり、血糖値に依存したインスリン分泌促進作用を有し、低血糖惹起リスクが低いことが確認された。

別途、GPR40 ノックアウトマウスと wild-type マウスを用いた単離膵島におけるインスリン分泌試験を行い、DS-1558 によるグルコース依存性インスリン分泌作用は GPR40 を介した作用であるということを確認をした¹⁶

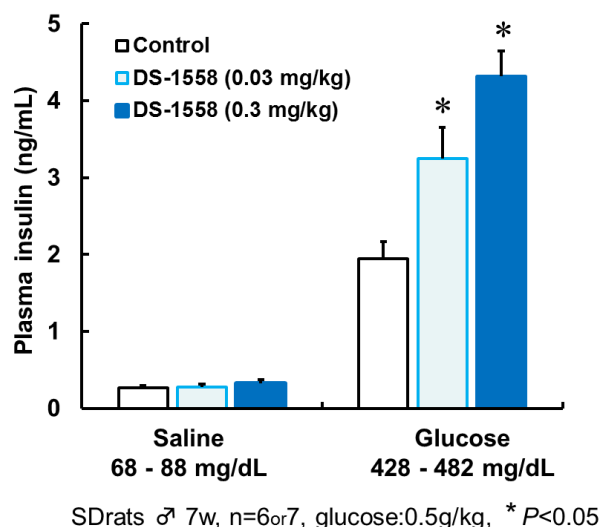


図 5. 正常 SD ラット静脈内糖負荷試験

The results are represented as the arithmetic mean + standard error. * Significant difference $P < 0.05$ compared to control by Dunnett's test.

次に、2 型糖尿病モデル ZDF ラットを用いた経口糖負荷試験を行い、DS-1558 の血糖降下作用を試験した(図 6)。化合物は糖負荷 (2 g/kg) の 30 分前に経口投与された。最小投与量の 0.03 mg/kg から、DS-1558 はコントロール群に比べて著しい血糖降下作用を示した。DS-1558 (0.1 mg/kg) の血糖降下能、ならびにインスリン分泌量は、上市品 DPP-4 阻害剤のシタグリプチン 10 mg/kg と同等であった。作用機序の異なるインスリン分泌促進剤である DPP-4 阻害剤と比較し、GPR40 アゴニストは強力な薬効を発揮できる事を確認できた。

また、同じく 2 型糖尿病モデル ZF ラットを用いた経口糖負荷試験においても、用量依存的に

インスリン分泌を促進し、血糖降下作用を示した(図 7)¹⁶。有効薬効用量 (ED₇₅) は、0.1 mg/kg であった。臨床開発に進んでいた GPR40 アゴニスト TAK-875 (30 mg/kg) と、DS-1558 (0.3 mg/kg) が同程度の薬効を示した。両者の *in vitro* 活性からの予測を超えて、DS-1558 は低用量から強力な薬効を発揮した。経口投与時の薬物動態や、溶解性 (JP2 (pH6.8) : DS-1558; 720 µg/mL, TAK-875; 8.1 µg/mL) において、DS-1558 は優れていることが薬効の差の要因と考えている。

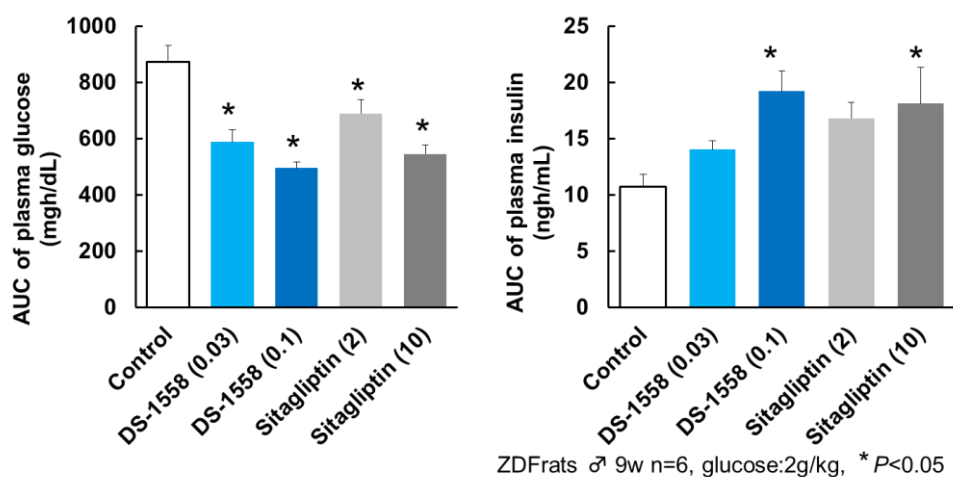


図 6.2 型糖尿病 ZDF ラット 経口糖負荷試験

The AUC of plasma glucose levels and plasma insulin levels from 0 to 180 min, respectively. The results are represented as the mean + standard error. * significant difference $P < 0.05$ compared to control by Dunnett's test.

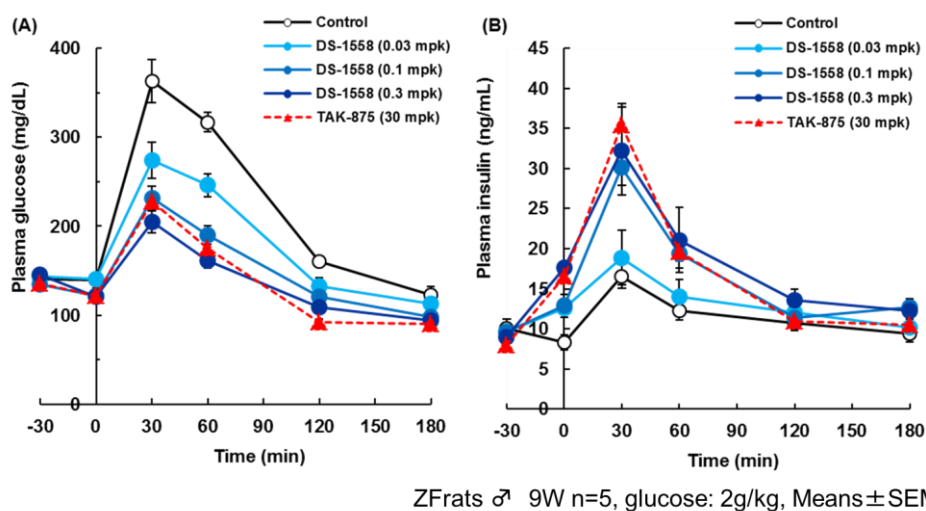


図 7.2 型糖尿病 ZF ラット 経口糖負荷試験 (ref.16 副論文より引用)

The results are represented as the mean ± standard error.

2-7, DS-1558 スケールアップ合成方法

スケールアップ合成では、カラム精製を避けるために、ジアステレオマーやβ脱離体などの副生成物を抑えるような反応を用いた(図 8)。二つの光学活性水酸基は、ルテニウム触媒を用いる不斉水素移動型還元反応により、**35**、**39** をそれぞれ高立体選択的に構築した。アルキル化反応を中性条件下で行うことで、retro aldol 反応を進行させずに **40** を高収率で得た。カルボン酸構築は、エステル基の一級アルコールへの還元、続く TEMPO を用いた再酸化という多段階反応を採用することでβ脱離反応を回避した。この合成方法では、カラム精製は 1 回で、その後は再結晶等で精製可能だ。実際に、90g のインダノン **34** から 80g の DS-1558 を高収率高純度で得ることに成功している。原薬合成にも応用可能な実効性の高いルートの構築に成功した。

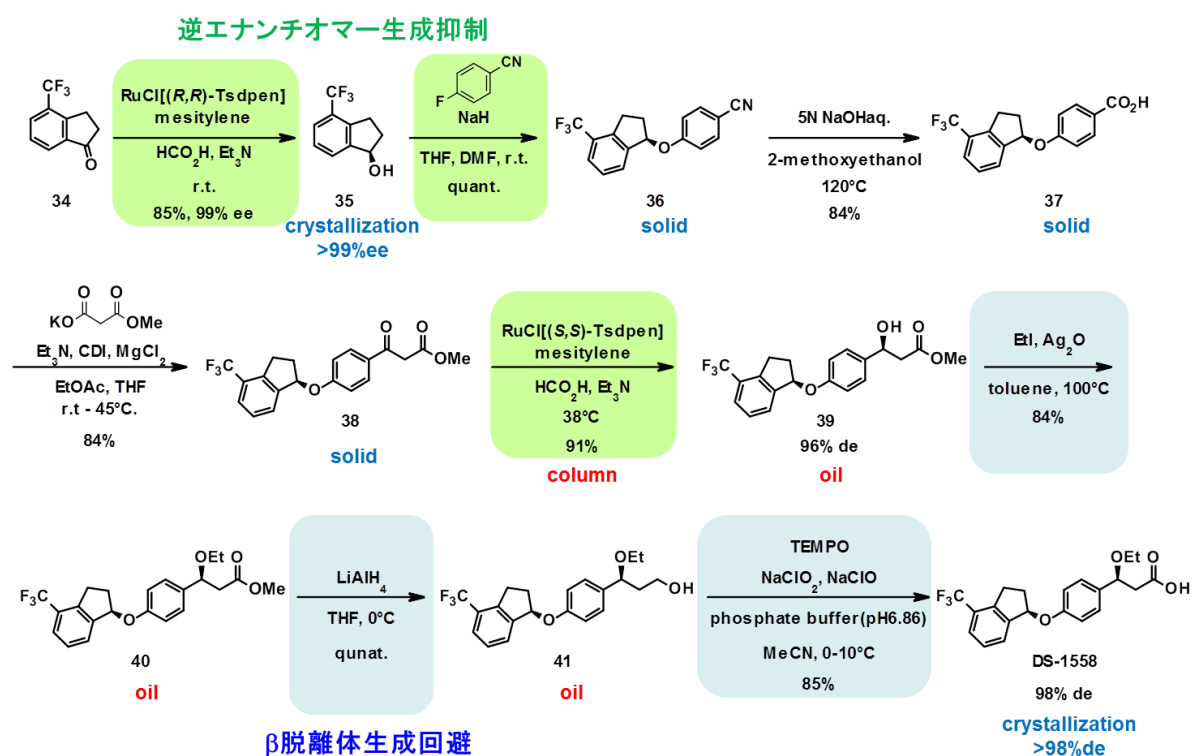


図 8. DS-1558 スケールアップ合成方法

3, 総括

本研究は、既存薬のスルホニルウレア剤の副作用を軽減した、強力な薬効と高い安全性を有するインスリン分泌促進剤の開発を目指して行なわれた。

GPR40 アゴニストをターゲットとして選択し、内因性リガンドを模倣した 3-フェニルプロピオン酸を誘導体展開を行った。カルボン酸 β 位へのエトキシ基の導入、環化構造の導入が、薬物動態の大幅な向上、GPR40 レセプター選択性の向上、*in vitro* 活性の向上に有効であることがわかった。その結果、高い GPR40 アゴニスト活性を有する DS-1558 を獲得に成功した。

hGPR40 の X 線結晶構造とのドッキングスタディから、DS-1558 は、結合ポケットとの形状相補性に非常に優れていることが示唆された。糖尿病モデルラットを用いた経口投与試験では、DPP-4 阻害剤シタグリプチンを凌ぐ強力な薬効を示した。さらに、よりヒト臨床例に近いと考えられる、耐糖能不全イヌを用いた食後高血糖抑制試験においても、経口投与 0.1 mg/kg から用量依存的に血糖上昇を抑制し、0.3 mg/kg でシタグリプチンの最大薬効を上回る薬効を示した

本化合物は、細胞障害性、薬物間相互作用、QT 間隔延長のリスクも軽微であり、サルテレメトリー試験では、有効薬効用量の 1000 倍まで投与し、心血管系における安全性を確認した。以上の結果より、本化合物は前臨床試験を進めることとなった。

本研究で得られた知見は、今後の糖尿病薬の研究開発に貢献すると期待できる。

4, 参考文献

- 1) Kaku K. *et al.*: *Diabetes Obesity and Metabolism*, **17**, 675-681 (2015).
- 2) Burant C. F. *et al.*: *Lancet*, **379**, 1403-1411 (2012).
- 3) Negoro N. *et al.*: *ACS Med. Chem. Lett.*, **1**, 290-294 (2010).
- 4) Houze J. B. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 1267-1270 (2012).
- 5) Sasaki S. *et al.*: *J. Med. Chem.*, **54**, 1365 (2011).
- 6) Takano R. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 2949-2953 (2014).
- 7) Negoro N. *et al.*: *J. Med. Chem.* **55**, 1538-1552 (2012).
- 8) Chen Y. *et al.*: *J. Cell Sci.*, **120**, 4155-4166 (2007).
- 9) Takano R. *et al.*: *ACS Med. Chem. Lett.*, **6**, 266-270 (2015).
- 10) Takano R. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 5546-5565 (2015).
- 11) Christiansen E. *et al.*: *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 345-349 (2010).
- 12) Nolte R. T. *et al.*: *Nature*, **395**, 137-143 (1998).
- 13) Srivastava A. *et al.*: *Nature*, **513**, 124-127 (2014).
- 14) Hopkins A. L. *et al.*: *Drug Discovery Today*, **9**, 430-431 (2004).
- 15) The screening package “Lead Profiling Screen” provided by MDS Pharma Services. The receptors were shown in ref. 9.
- 16) Nakashima R. *et al.*: *Eur. J. Pharmacol.*, **737**, 194-201 (2014).

謝辞

本論文を提出するにあたり、数多くの有益なご助言と熱心なご指導ご鞭撻を賜りました北里大学北里生命科学研究大学院 感染制御学府 教授 砂塚 敏明 先生に感謝するとともに深く御礼申し上げます。

ならびに、丁寧かつ細やかなご指導とご助力を賜りました北里大学北里生命科学研究大学院 感染制御学府 准教授 廣瀬 友靖 先生に心より感謝するとともに御礼申し上げます。

本研究を行う機会を与えてくださり、的確なご指導いただきました、第一三共 RD ノバーレ株式会社 取締役 西 剛秀 博士、ならびに、第一三共株式会社 研究開発本部 オンコロジー統括部 バイオ・癌免疫ラボラトリー グループ長 本田 雄 博士に感謝いたします。

本研究の発表の機会を与えてくださいました、アスピオファーマ株式会社 創薬化学ファンクション ファンクション長 長谷川 雅司 博士、第一三共株式会社 第一三共インド LTD. 主席 小林 慶行 博士、第一三共株式会社 研究開発本部 研究統括部 疼痛・神経ラボラトリー ラボラトリー長 中西 敏行 博士、第一三共株式会社 研究開発本部 研究統括部 臓器保護ラボラトリー グループ長 丸本 真志 博士、第一三共株式会社 研究開発本部 研究統括部 疼痛・神経ラボラトリー グループ長 島田 神生 博士に感謝いたします。

本研究の遂行、論文の執筆を行うにあたり、共に課題に取り組み、終始ご指導ご鞭撻いただきました、第一三共株式会社 研究開発本部 オンコロジー統括部 バイオ・癌免疫ラボラトリー 主任研究員 戸田 成洋 博士に厚く御礼申し上げます。

共に研究に励んだ、第一三共株式会社 研究開発本部 研究統括部 疼痛・神経ラボラトリー 副主任研究員 吉田 昌生 博士、第一三共株式会社 研究開発本部ベンチャーサイエンスラボラトリー 副主任研究員 井上 雅大 博士に感謝いたします。多方面からのご助言、ご協力を頂きました、第一三共株式会社 中島 隆太郎 博士、松本 康嗣博士、矢野 辰也博士、緒方 恒暉博士、渡邊 伸明博士、廣内 幹和博士、ならびに、第一三共 RD ノバーレ株式会社 伊藤 秀一郎博士、米山 智子 研究員、木村 貴子研究員に深く感謝いたします。

協力を惜しまず研究に集中させてくれた家族に心より感謝いたします。

2016年7月 著者