

代謝性疾患モデルにおける GPR119 agonist (JTP-109192) の薬効解析

2021 年

唯木 洋暢

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

## 略 語

$\alpha$ -GI ( $\alpha$ -Glucosidase inhibitor :  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬)  
ABCA1 (ATP-binding cassette A1 : ATP 結合カセット輸送体 A1)  
ABCG5/G8 (ATP-binding cassette G5/G8 : ATP 結合カセット輸送体 G5/G8)  
ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes 試験)  
ACAT2 (Acetyl-CoA acetyltransferase 2 : コレステロールアシル転移酵素 2)  
ADP (Adenosine diphosphate : アデノシン二リン酸)  
ATP (Adenosine triphosphate : アデノシン三リン酸)  
ApoE (Apolipoprotein E : アポリポタンパク E)  
BA (Bile acid : 胆汁酸)  
BG (Biguanide : ビグアナイド)  
BSA (Bovine serum albumin : ウシ血清アルブミン)  
cAMP (Cyclic adenosine monophosphate : 環状アデノシン一リン酸)  
CE (Cholesteryl ester : コレステリルエステル)  
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium : ダルベッコイーグル最小必須培地)  
DMSO (Dimethyl sulfoxide : ジメチルスルホキシド)  
DPP-4 (Dipeptidyl Peptidase-4 : ジペプチジルペプチダーゼ-4)  
ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay : 酵素結合免疫吸着法)  
FBS (Fatal bovine serum : ウシ胎子血清)  
FC (Free cholesterol : 遊離コレステロール)  
FDA (Food and Drug Administration : アメリカ食品医薬品局)  
FOXO1 (Forkhead box protein O1 : フォークヘッドボックスタンパク質 O1)  
G-6-Pase (Glucose-6-phosphatase : グルコース-6-ホスファターゼ)  
GLUT2 (Glucose transporter 2 : グルコース輸送体タンパク 2)  
GLP-1 (Glucagon-like peptide-1 : グルカゴン様ペプチド-1)  
GPCRome (G-protein-coupled receptor receptorome : G タンパク質共役受容体網羅解析)  
GPR, GPCR (G protein-coupled receptor : G タンパク質共役受容体)  
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution : ハンクス平衡塩溶液)  
HbA1c (Hemoglobin A1c : ヘモグロビン A1c)  
HEK293 (Human Embryonic Kidney cells 293 : ヒト胎児腎細胞株)  
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid : ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸)  
HDL (High density lipoprotein : 高比重リポタンパク)

HMG-CoA (Hydroxymethylglutaryl-CoA : 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA)  
HoFH (Homozygous familial hypercholesterolemia : 家族性高コレステロール血症ホモ接合体)  
IBMX (Isobutylmethylxanthine : 3-イソブチル 1-メチルキサンチン)  
INS-1E (ラット膵β細胞株)  
K-ATP チャンネル (ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel : ATP 感受性カリウムチャンネル)  
KRB (Krebs-Ringer Modified Buffer : クレブスリンガー緩衝液)  
LDL (Low density lipoprotein : 低比重リポタンパク)  
LPC (Lysophosphatidylcholine : リゾホスファチジルコリン)  
LRP (Low density lipoprotein receptor-related protein : LDL 受容体関連タンパク)  
M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus : マウス白血病ウイルス)  
MTP (Microsomal triglyceride transfer protein : ミクロソームトリグリセリド転送タンパク質)  
NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1 : ニーマンピック C1 様コレステロール輸送体 1)  
OEA (Oleylethanolamine : オレイルエタノールアミド)  
PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 : 前駆蛋白質転換酵素サブチリシン/ケキシシ 9 型)  
PCR (Polymerase chain reaction : ポリメラーゼ連鎖反応)  
PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase : ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ)  
PL (Phospholipid : リン脂質)  
PKA (Protein kinase A : プロテインキナーゼ A)  
PPAR $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  : ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\alpha$ )  
RNA (Ribonucleic acid : リボ核酸)  
RPMI (Roswell Park Memorial Institute : ロズウェルパーク記念研究所)  
SAR (Structure-Activity Relationship : 構造活性相関)  
SD (Sprague-Dawley) ラット  
SGLT2 (Sodium glucose transporter 2 : ナトリウムグルコース共輸送体 2)  
SHL (Spontaneous Hyperlipidemic) マウス  
SRB1 (Scavenger receptor B1 : スカベンジャー受容体 B1)  
SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein 1c : ステロール調節要素結合転写因子 1c)  
SU (Sulfonyl Urea : スルホニル尿素)  
TC (Total cholesterol : 総コレステロール)

TG (Triglyceride : トリグリセリド)

TLR (Toll-like receptor : Toll 様受容体)

TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1 : TRP 型カチオンチャンネル V1)

TZD (Thiazolidinedione : チアゾリジン)

UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study)

WHO (World Health Organization : 世界保健機関)

ZF (Zucker fatty) ラット

## 目 次

第1章 緒 論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7

第2章 JTP-109192 の基本プロファイル・・・・・・・・19

第1節 緒 言

第2節 材料及び方法

第3節 結 果

第4節 考 察

第5節 要 約

第3章 Zucker fatty ラットを用いたインスリン抵抗性に対する作用・・・・・・・・32

第1節 緒 言

第2節 材料及び方法

第3節 結 果

第4節 考 察

第5節 要 約

第4章 SHL マウスを用いた脂質代謝改善作用・・・・・・・・48

第1節 緒 言

第2節 材料及び方法

第3節 結 果

第4節 考 察

第5節 要 約

第5章 総括	67
謝辞	70
引用文献	71
SUMMARY	76

## 第1章 緒論

### 糖尿病の疾患背景

生活習慣病は「生活習慣がその発症・進行に關与する疾患群」と定義されており，糖尿病，脂質異常症，肥満，高血圧等が含まれる現代病である。糖尿病については国際糖尿病連合による発表では2017年の全世界の成人糖尿病患者数は約4億人であり，その主な原因として食生活の欧米化，過剰な糖質摂取，運動量減少等，近年におけるライフスタイルの変化が挙げられている。今後，全世界の糖尿病患者数は更に増加することが見込まれている（図1-1）。日本国内においても平成28年「国民健康・栄養調査」による集計では，糖尿病及び糖尿病予備軍の合計は2000万人と推定されている（図1-2）。糖尿病はインスリン分泌不足を主因とする1型糖尿病，分泌不足に加えてその作用が低下するインスリン抵抗性を主因とする2型糖尿病に大別される。2型糖尿病においては，遺伝因子又は環境因子あるいはその両方によりインスリン分泌能低下及びインスリン抵抗性が惹起され，インスリン作用が相対的に低下することにより脂肪及び筋の糖取り込み減少，肝糖放出の増加により高血糖に至る（図1-3）。日本糖尿病学会が示す診断基準は血糖値（空腹時126 mg/dL，随時200 mg/dL，75g 経口ブドウ糖負荷後2時間値200 mg/dL）のいずれかと，血中HbA1c値6.5%により確定診断される。糖毒性により更にインスリン分泌不全及びインスリン抵抗性が助長され，細小血管症及び大血管症を発症進展させることが知られている一方，厳格な血糖コントロールによりそれらの発症進展を予防できることが明らかとなっている。大規模臨床試験UKPDSでは新規糖尿病患者の細小血管症発症を血糖コントロールにより予防することが可能であった（図1-4）。また，試験終了から8.5年後（中央値）の調査においては，強化療法群と従来療法群との間に血糖コントロールにもはや差がなかったにも関わらず，試験期間中に強化療法群に割り付けられた患者では，細小血管症のみならず大血管症の発症も少なく，遺産効果(Legacy

effect) として知られている。一方, ACCORD ではインスリン強化療法により厳格な血糖コントロールを行ったにも関わらず, 総死亡率が上昇する結果となった (図 1-5)。この研究における教訓は HbA1c コントロールのみならず, 一日の血糖変動幅を小さくすることが必要であり, 特にインスリン強化療法による低血糖を回避することが重要であると考察された。これらの試験から, 食事, 運動, 睡眠等のライフサイクルに伴う血糖値変動に合わせた血糖コントロールが肝要であり, 先述のインスリン強化療法で用いたインスリン製剤では低血糖リスクを回避することは容易ではないと考えられる。血糖降下薬については, 非経口のインスリン製剤の他, 経口血糖降下薬が上市されている。経口血糖降下薬の国内現状については, SU 薬, DPP-4 阻害薬, 速効性インスリン分泌促進薬,  $\alpha$ -GI, BG 薬, TZD 薬, SGLT2 阻害薬の 7 種類が上市されている (図 1-6)。これらの薬剤は互いに異なる機序で血糖降下作用を示し, また, その作用臓器は膵臓, 骨格筋, 肝臓, 小腸, 腎臓と多岐に渡る。その副作用については低血糖 (SU 薬, 速効性インスリン分泌促進薬), 膵炎 (DPP-4 阻害薬), 消化器症状 ( $\alpha$ -GI), 乳酸アシドーシス (BG 薬), 体重増加 (TZD 薬), 尿路感染症, ケトアシドーシス及び脱水 (SGLT2 阻害薬) 等が報告されている (Kerru et al., 2018)。糖尿病は様々な成因により長期に発症進展するため, 病態進行に合わせた多剤併用が行われる (図 1-7)。一方で, 長期的な薬効及び副作用低減並びに他剤との併用のし易さについては必ずしも十分とは言えず, 薬剤開発のニーズは依然高いものと考えられる。

## GPR119 と糖尿病

GPR119 タンパクは主に小腸 L 細胞及び膵  $\beta$  細胞に発現するタンパクとして発見され (Chu et al., 2008), 内因性リガンドである OEA や LPC を用いた研究により (Lauffer et al., 2009, Drzazga et al., 2018), セカンドメッセンジャーである cAMP の上昇を介して, L 細胞では GLP-1 分泌を,  $\beta$  細胞ではインスリン分泌をそれぞれ促進すること



が明らかとなった。膵β細胞においては GPR119 を介したインスリン分泌は糖濃度依存的であることが明らかとなっており、糖濃度非依存的なインスリン分泌を促進する SU 薬等とは異なり低血糖リスクの少ない薬剤となる可能性がある。グルコースは、GLUT を介してβ細胞内に取り込まれた後、解糖系における ATP が上昇することにより ATP/ADP 比が上昇し、K-ATP チャンネルを閉鎖することにより脱分極が生じる (図 1-8)。この結果電位依存性カルシウムチャンネルが開口し、カルシウムイオンの流入が生じる。カルシウムイオン流入はインスリン顆粒からインスリン分泌を促進させる経路を辿る (惹起経路)。一方、消化管ホルモンである GLP-1 は経口によるグルコース負荷や脂質負荷などにより、腸管 L 細胞から分泌される。GLP-1 は膵β細胞膜表面の GLP-1 受容体に結合したのち、アデニル酸シクラーゼを介して細胞内 cAMP を上昇させる。cAMP-PKA 経路はグルコースなどの惹起物質があってはじめてインスリン分泌を促進する (増幅経路)。GPR119 は GLP-1 受容体と同様のセカンドメッセンジャーを有する G<sub>s</sub> 共役型タンパクであり、膵β細胞においては GLP1 受容体と同様の増幅経路を辿りシグナルを伝達する。GPR119 agonist 投与によるインスリン分泌反応には、消化管 GPR119 を介した GLP-1 分泌による膵β細胞への作用及び膵β細胞における GPR119 への直接作用があるが、いずれの作用も糖濃度依存的であることが明らかとなっている。このため低血糖リスクの少ない薬剤開発が可能な標的であることが期待される。

### 脂質異常症の疾患背景

GPR119 を標的とした創薬の適応可能性は多岐に渡ることが知られている (Yang et al., 2018)。そのうちのひとつである脂質異常症は遺伝因子、食生活の欧米化、肥満等を主な原因として発症し、WHO による解析では成人の 39%が脂質異常症とりわけ高コレステロール血症である。脂質異常症とそれに続く粥状動脈硬化症は、虚血性心疾患、心筋梗塞、脳血管障害、末梢動脈疾患等の疾患におけるリスク因子であることが知られてい

る。主要な血中脂質 (TG, HDL 及び LDL) のうち, LDL は損傷を受けた血管内皮細胞の裏側に侵入し, 主に酸化され酸化 LDL となったのち, マクロファージに貪食される。泡沫化したマクロファージ (泡沫細胞) は内膜の裏側に蓄積し, 粥状動脈硬化症を発症進展させる。冠動脈で粥状動脈硬化を生じ破裂すると急性冠症候群の原因となりうる。一方, HDL はコレステロール引き抜き作用や LDL 酸化を阻害する作用のほか(Toth, 2003), 抗炎症作用, 血管拡張作用, 抗血栓作用を有し抗動脈硬化的に作用する(Kosmas et al., 2018)。脂質異常症の診断基準を図 1-9 に示す。大規模臨床試験においては, 血漿中 LDL-C 値低下が心血管疾患の抑制につながることを示唆している(Martin et al., 2012)。日本で 2017 年に発表された動脈硬化性疾患予防ガイドラインにおいては, 年齢, 性別, 喫煙, 血圧, HDL-C 値, LDL-C 値, 耐糖能及び家族歴から算出されたリスク評価に基づいて, 一次予防のための LDL-C をはじめとする脂質管理目標値が設定されている(図 1-10)。米国においても日本と同様に LDL-C 低下は大きな治療目標となっている。薬剤アプローチについては HMG-CoA reductase 阻害薬であるスタチン系薬剤が第一選択薬として推奨される(日本動脈硬化学会, 2017, Arnett et al., 2019)。一方で, スタチン強化療法にも関わらず, 心血管イベント相対リスクは依然として高い場合があり, 残存リスク(70-80%)として知られている(図 1-11)。臨床においてスタチン治療を継続するためには良好な服薬アドヒアランスが必要であるが, アドヒアランスを向上させるためには, ミオパチーなどの副作用を適切に評価することが重要である(梶波, 2017)。軽度のミオパチー及び重度の横紋筋融解症を含むミオパチーは, 治療アドヒアランス不良, 用量減少及び治療中止をもたらし, 結果として最適下限(sub-optimal)のコレステロール低下に至るとの報告がある(Akyea et al., 2019)。2002年に上市された Ezetimibe はスタチン以外の LDL-C 低下薬で初めて単剤で CV イベントを抑制することが近年報告されたが(Ouchi et al., 2019), 研究における患者層や LDL-C 低下作用については更に精査が必要であると考えられる。近年においては PCSK9 抗体である Evolocumab や

Alirocumab が上市されたが、生物製剤であるゆえ、7000 ドル/年と薬価が高く (Shah et al., 2016)、現在は一部の希少疾患 (HoFH) に適応があるのみである。そのため、今日においてもアンメットメディカルニーズは依然高いものと考えられる。

### 小腸と肝臓におけるコレステロール代謝と GPR119

小腸と肝臓におけるコレステロール代謝を図 1-12 に示す。小腸内腔では、食事及び胆汁分泌由来の FC が、BA と PL を含むミセルに可溶化され、小腸刷子縁膜に到達する。FC は絨毛頂端に存在する NPC1L1 タンパク質により、小腸細胞に取り込まれる。既存薬である Ezetimibe は、この NPC1L1 依存性コレステロール取り込みを阻害する。吸収されたコレステロールの大部分は小胞体に運ばれた後、Acy1 CoA によって CE に変換され、ACAT2 及び MTP によりカイロミクロンに構成され、リンパ系を介して全身循環に分泌される。FC は管腔側に発現したヘテロ二量体ステロール輸送体 ABCG5/G8 によって消化管腔に排出される。FC は、腸細胞の基底膜側の ABCA1 を介して HDL-C の成分として全身循環に入る。肝臓においては、コレステロールが合成されるほか、LDL, HDL 及びカイロミクロンなどのリポタンパク質が LDL 受容体, SRB1 及び LRP を介して肝細胞に取り込まれる。FC は胆汁酸に変換され胆汁として分泌される。近年、*Gpr119* 過剰発現 *ApoE* 欠損動脈硬化症マウスにおいて、小腸及び肝臓中コレステロール輸送タンパクの発現上昇を伴う血中脂質及び炎症性サイトカインの低下とそれに続く粥状動脈硬化巣の改善が報告された (Hu et al., 2014)。また、GPR119 の内因性リガンドである OEA が *ApoE* 欠損動脈硬化症マウスにおいて抗動脈硬化作用を示すことが報告された (Fan et al., 2014)。一方、臨床試験においてはグラクソスミスクライン社創製の GSK1292263 は脂質異常症適応で開発されていた経緯があり、同症を対象に実施した 2 週間反復投与試験においては、HDL-C の上昇及び LDL-C の低下が認められた (Nunez et al., 2012)。従って、GPR119 agonist は糖尿病改善薬のみならず、脂質低下薬としての可能性があることが

期待される。

本研究においては，原田ら(Harada et al., 2018)によって創製された新規合成化合物である JTP-109192 の *in vitro* 及び *in vivo* における基本プロファイルを確認し，インスリン抵抗性モデル動物である ZF ラットを用いた反復投与時における糖代謝改善作用を検討し，更にインスリン抵抗性改善について確認した。脂質異常症については自然発症型 *ApoE* 欠損動脈硬化モデル動物である SHL マウスを用いて，高脂肪食負荷時の血中脂質と動脈硬化巣発現について検討し，JTP-109192 の同症に対する改善作用について検討した。

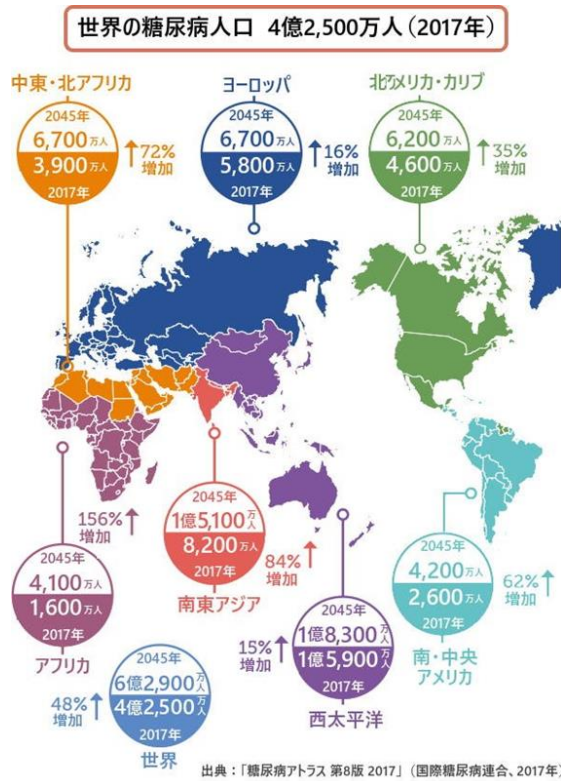


図 1-1. 世界の糖尿病人口

全世界の成人糖尿病患者数は約 4 億人であり、今後更に増加することが見込まれている(糖尿病アトラス第 8 版, 2017)。

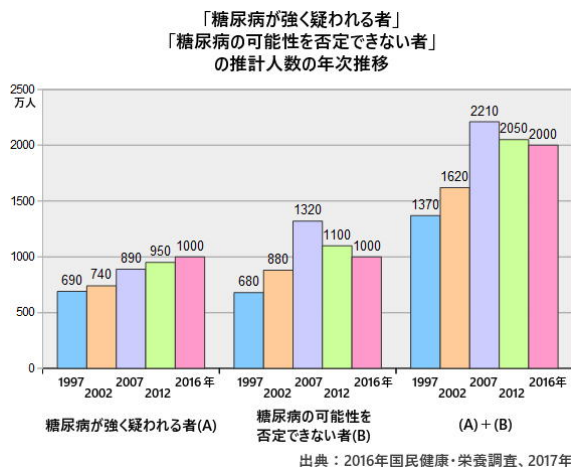


図 1-2. 日本における糖尿病が強く疑われる者及び糖尿病の可能性を否定できない者の合計

糖尿病患者は約 2000 万人と推定されている(平成 28 年「国民健康・栄養調査」, 2017)。

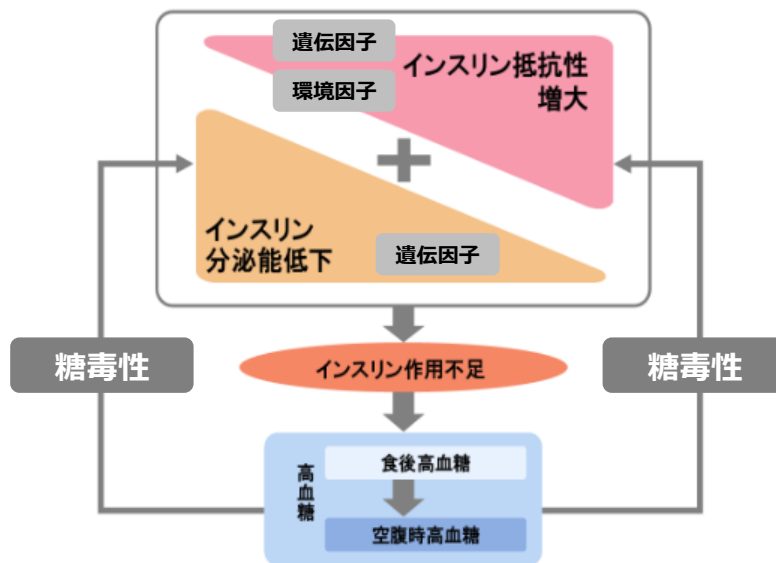


図 1-3. 2 型糖尿病の成因と病態

インスリン分泌能低下及び抵抗性から高血糖に至り、更に糖毒性により助長される (日本糖尿病学会編糖尿病治療ガイド 2018-2019, 2018)。

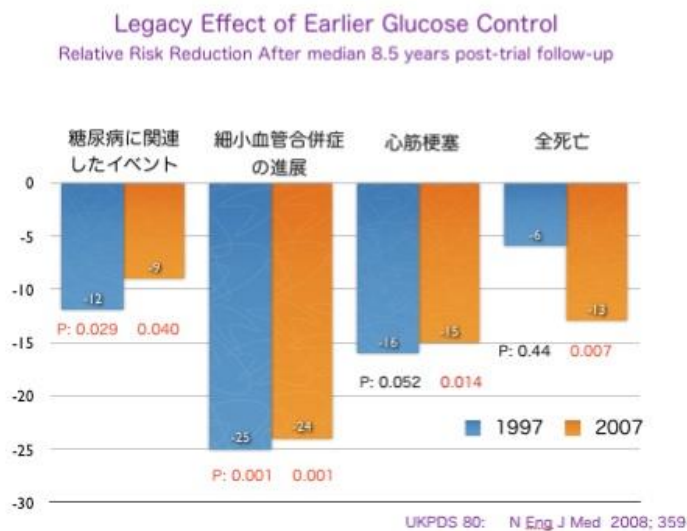


図 1-4. 血糖コントロールの遺産効果 (Legacy effect)

厳格な血糖コントロールは細小血管症の発症を予防する。その効果は長期にわたり持続する (Holman et al., 2008)。

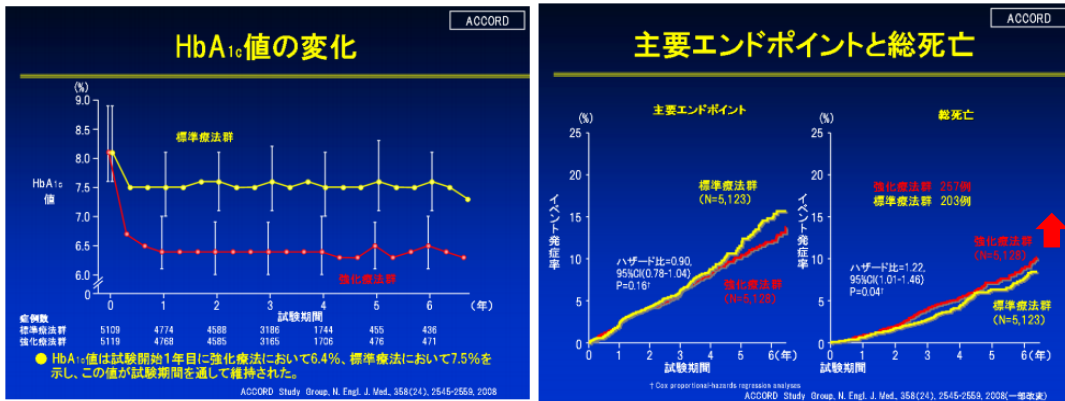


図 1-5. ACCORD における血糖コントロールとイベント発生率

インスリン強化療法により厳格な血糖コントロールを行ったにも関わらず、総死亡率が上昇した (赤色矢印部分) (Gerstein et al., 2008)。

病態に合わせた経口血糖降下薬の選択

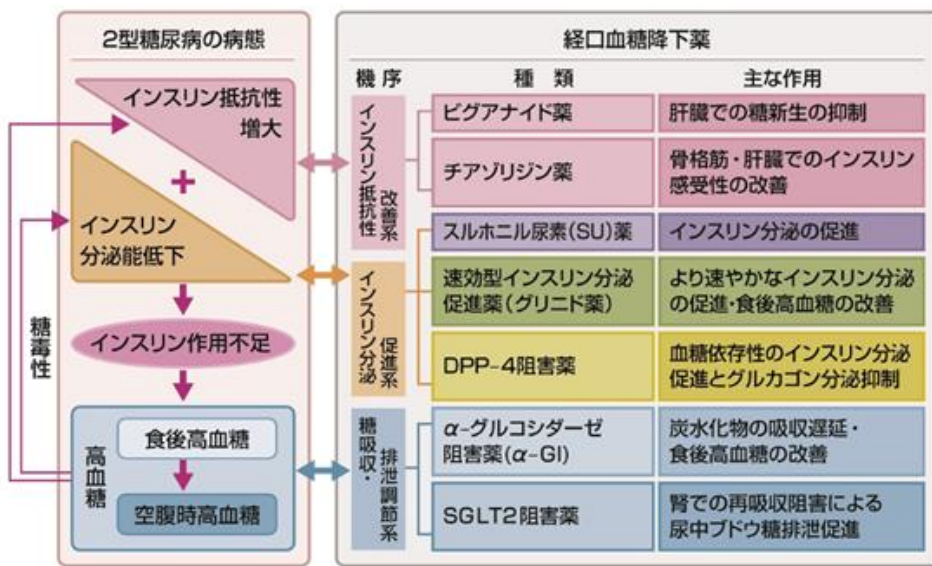


図 1-6. 日本における経口血糖降下薬(日本糖尿病学会, 2018)

今日までに 7 種類が上市されている。



図 1-7. 経口血糖降下薬使用患者の HbA1c 値の分布

病態進行に合わせ多剤併用される(小林ら, 2006)。

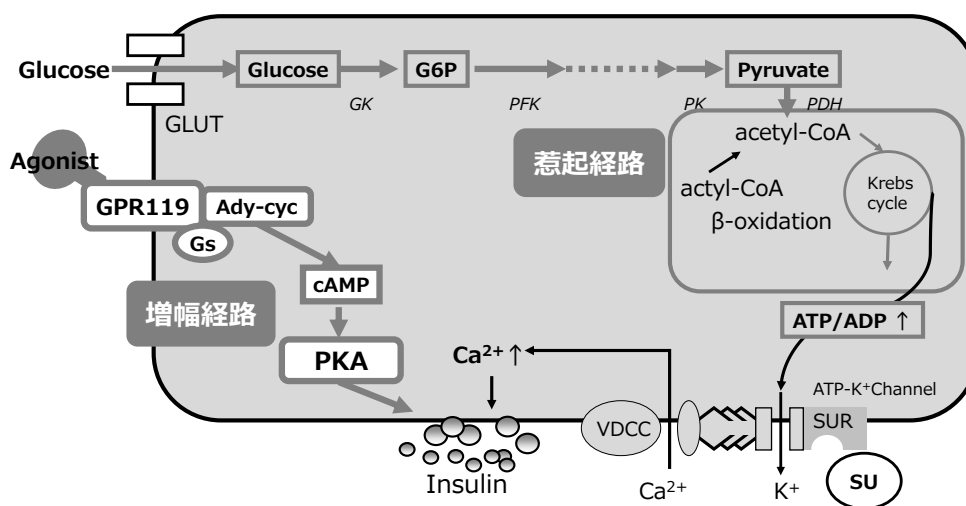


図 1-8. 膵β細胞におけるグルコースによるインスリン分泌と GPR119 を介したインスリン分泌のシグナル経路

GPR119 agonist によるシグナルは増幅経路を辿る。(西, 2013)より改変。



LDL コレステロール	140mg/dL 以上	高 LDL コレステロール血症
	120~139mg/dL	境界域高 LDL コレステロール血症 **
HDL コレステロール	40mg/dL 未満	低 HDL コレステロール血症
トリグリセライド	150mg/dL 以上	高トリグリセライド血症
Non-HDL コレステロール	170mg/dL 以上	高 non-HDL コレステロール血症
	150~169mg/dL	境界域高 non-HDL コレステロール血症 **

- \* 10 時間以上の絶食を「空腹時」とする。ただし水やお茶などカロリーのない水分の摂取は可とする。
- \*\* スクリーニングで境界域高 LDL-C 血症、境界域高 non-HDL-C 血症を示した場合は、高リスク病態がないか検討し、治療の必要性を考慮する。
- LDL-C は Friedewald 式 (TC - HDL-C - TG/5) または直接法で決める。
- TG が 400mg/dL 以上や食後採血の場合は non-HDL-C (TC - HDL-C) か LDL-C 直接法を使用する。ただしスクリーニング時に高 TG 血症を伴わない場合は LDL-C との差が +30mg/dL より小さくなる可能性を念頭においてリスクを評価する。

図 1-9. 脂質異常症診断基準 (空腹時採血) (日本動脈硬化学会, 2017)

治療方針の原則	管理区分	脂質管理目標値 (mg/dL)			
		LDL-C	Non-HDL-C	TG	HDL-C
一次予防 まず生活習慣の改善を行った後 薬物療法の適用を考慮する	低リスク	<160	<190	<150	≥40
	中リスク	<140	<170		
	高リスク	<120	<150		
二次予防 生活習慣の是正とともに 薬物治療を考慮する	冠動脈疾患の既往	<100 (<70)*	<130 (<100)*		

図 1-10. リスク区分別脂質管理目標値 (日本動脈硬化学会, 2017)

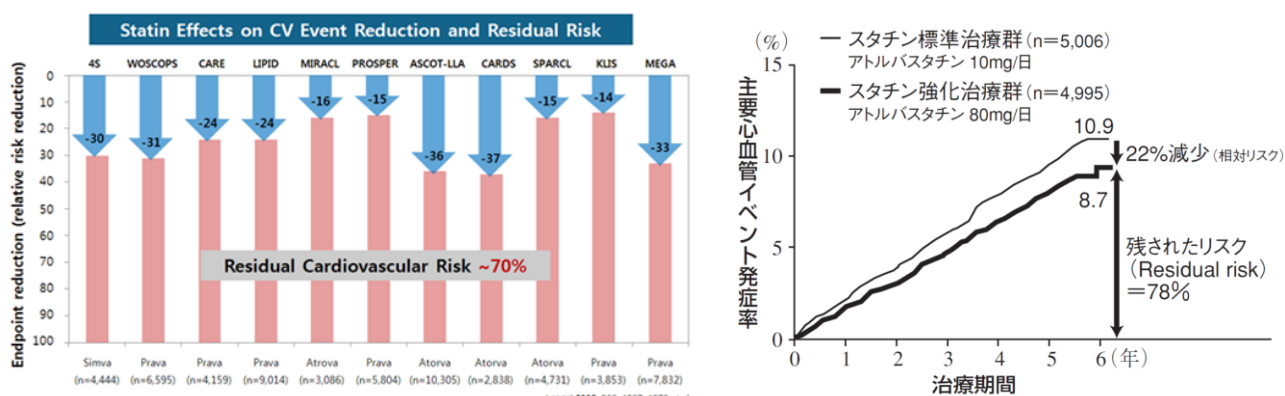


図 1-11. 各種スタチンにおける残存リスクとスタチン強化療法における残存リスク (Baigent et al., 2005), (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002)。

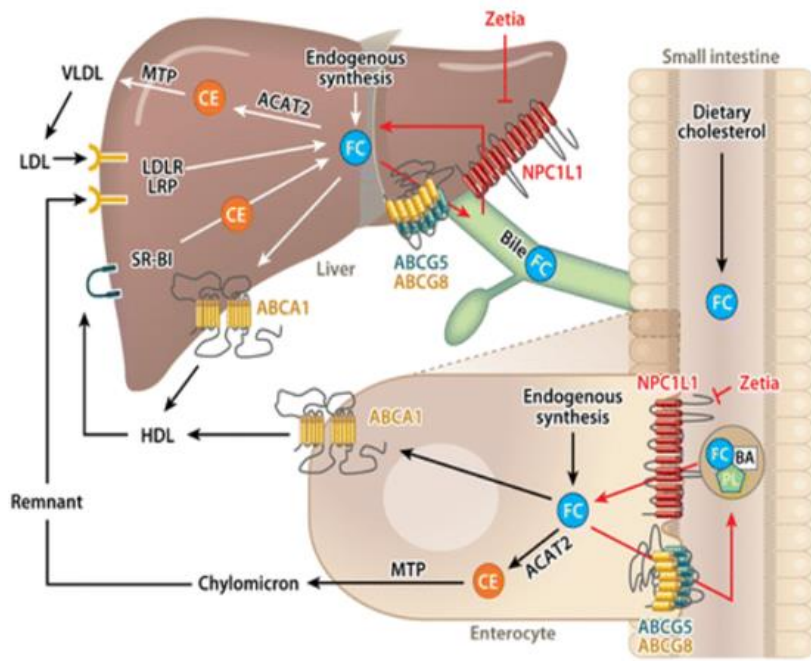


図 1-12. 小腸と肝臓におけるコレステロール代謝(Jia et al., 2011)

## 第2章 JTP-109192の基本プロファイル

### 第1節 緒言

本研究の標的分子である GPR119 は、G<sub>s</sub> 共役型のタンパク受容体として同定されており、セカンドメッセンジャーである cAMP の上昇により種々の作用を示す。主な発現組織である膵臓や消化管においては、膵臓では  $\beta$  細胞を介し糖濃度依存的なインスリン分泌を、消化管では L 細胞を介して GLP-1 分泌を促進することが、OEA や LPC 等の内因性リガンドを用いた研究により明らかとなっている (Lauffer et al., 2009, Drzazga et al., 2018)。本章においては JTP-109192 の基礎的な作用としてヒト、ラット及びマウス GPR119 に対するアゴニスト活性、膵  $\beta$  細胞株を用いたインスリン分泌能及び腸管 L 細胞株を用いた GLP-1 分泌能についてそれぞれ検討し、同化合物の *in vitro* におけるプロファイルを明らかにした。また、JTP-109192 の *in vivo* における基礎的な作用として、SD ラットを用いて血糖値を変化させた際の同化合物の糖濃度依存性インスリン分泌に対する作用について高血糖クランプ法により検討した。

## 第2節 材料及び方法

### cAMP 産生能

各種 GPR119 アゴニスト活性を cAMP 産生能を指標に以下のとおり評価した。ヒト、ラット及びマウス GPR119 強制発現 HEK293 細胞を用い、cAMP HiRange assay kit (Cisbio 社) を用いて測定した。JTP-109192 を刺激培地 (HBSS, 20mmol/L HEPES, 0.1%BSA, 0.1mmol/L IBMX, 0.1mmol/L Ro20-1724) に溶解し、96 穴ハーフエアプレートに分注したのち、強制発現細胞を 12500 cells/well となるよう播種し、30 分間室温で培養した。その後、anti-cAMP cyptase conjugate をウェルに添加し、室温遮光下に 3 時間静置した。マイクロプレートリーダーを用い、細胞内 cAMP 産生量を定量化した。OEA による最大活性の 50%活性化する際の濃度を EC<sub>50</sub> 値として算出した。

### INS-1E 細胞を用いたインスリン分泌能

ラット膵β細胞株である INS-1E を用い、グルコース濃度依存性インスリン分泌に対する作用を以下のとおり評価した。INS-1E を RPMI 培地 (5 mmol/L Glucose, 4.5%FBS 添加) を用いて、37°C で 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> で維持培養し、24 ウェルプレートに 3×10<sup>5</sup> cell/well の濃度で播種し、2 日間維持培地で培養した。上清を除去したのち、細胞を KRB (3.3 mmol/L Glucose) を用い 2 回洗浄し、37°C で 2 時間培養した。DMSO を用いて JTP-109192 を段階希釈し 0.0001-1 μmol/L となるよう処置し、37°C で 2 時間培養した。上清中に分泌されたインスリンの濃度をラット高感度インスリン ELISA キットを用いて測定した。

### GLUTag 細胞を用いた GLP-1 分泌能

マウス腸管分泌細胞株である GLUTag 細胞を Low Glucose DMEM 培地 (1% ペニシリン, 1% ストレプトマイシン, 10% FBS 添加) を用いて、37°C で 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> で維持培養し、24 ウェルプレートに 1.25×10<sup>5</sup> cell/well の濃度で播種し、3 日間維持培地で培養した。DMSO を用いて JTP-109192 を段階希釈し 0.0001-1 μmol/L となるよう処置し、37°C

で2時間培養した。上清中に分泌された活性型 (Active) GLP-1 である GLP-1 (7-36) amide 及び GLP-1 (7-37) amide の濃度を GLP-1 ELISA キット (LINCO Research 社) を用いて測定した。

### 高血糖クランプ法を用いた単回投与時インスリン分泌

動物実験方法については、事前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所における動物倫理委員会の承認を得た。日本チャールスリバー社から購入した雄性 SD ラットを実験に供した。動物には紫外線照射済みの水道水及びオリエンタル酵母工業株式会社製の CRF-1 固形飼料を自由摂取させ、12時間の明暗周期 (明期: 8~20時, 暗期: 20時~8時), 温度  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 15\%$  に環境統御された飼育室で維持した。図 2-1 に示すように、一晩絶食したカニューレーション処置 7 週齢 SD ラットに、グルコース注入 30 分前に、JTP-109192 を 0.5%メチルセルロースに懸濁し 10 mg/kg の用量で経口投与した。Vehicle 群には 0.5%メチルセルロースを経口投与した。動脈カテーテルから血液を採取し、簡易血糖測定器 (堀場製作所, アントセンス III) を用いて、10分おきに 40 分間血糖値をモニターした。25%グルコース溶液を 0 分より頸静脈カテーテルよりシリンジポンプ (Harvard Bioscience, Econoflo) を用いて持続注入した。1 分間かけてグルコースを 150 mg/kg の用量で投与し、グルコース注入開始 2 及び 5 分後以降、60 分まで 5 分おきに血糖値をモニターし、250 mg/dL となるようグルコース注入速度を調節した。60 分における採血後、1 分間かけてグルコースを 300 mg/kg の用量で投与し、62 及び 65 分後以降、120 分まで 5 分おきに血糖値をモニターし、血糖値が 300 mg/dL となるようグルコース注入速度を調節した。血液をヘパリン添加チューブに回収し遠心分離 ( $10000 \times g$ , 5 分間) し、血漿を分離したのち、血漿中インスリン濃度を測定した。各血糖値におけるグルコース注入開始後 5 分間の血漿中インスリン値曲線下面積を第一相インスリン分泌とし、残りの 55 分間における血漿中インスリン値曲線下面積を第二相インスリン分泌として算出した。

## 統計学的解析

統計学的解析を以下のとおり実施した。2群の比較では、Student の  $t$  検定又は Aspin-Welch の  $t$  検定を、多群の比較においては、Dunnett 検定又は Steel 検定を実施し、 $p < 0.05$  を有意とした。結果は、GPR1119 に対するアゴニスト活性（図 2-2）のみ独立 3 回の試験における平均値±標準誤差で表記し、他は全て平均値±標準偏差で示した。

## 第 3 節 結果

cAMP 産生能については、ヒト、ラット及びマウスの JTP-109192（図 2-2） 4-[5-(3,3-dimethyl-2-oxa-spiro[4.5]dec-8-yl)-pentyloxy]-N,N-dimethyl-benzamide の GPR119 アゴニスト活性を各種 GPR119 強制過剰発現 HEK293 を用いて検討した。結果、JTP-109192 は処置濃度の増加に応じて、cAMP 産生量を顕著に増加させた。OEA による最大活性の 50%を活性化する際の濃度として算出した JTP-109192 の  $EC_{50}$  値はヒト、ラット及びマウスでそれぞれ 3.6, 4.5 及び 5.2 nmol/L であった（図 2-2a, 2b 及び 2c）。

INS-1E 細胞を用いたインスリン分泌能については、3.3 及び 11.2 mmol/L グルコース存在下の JTP-109192 の糖濃度依存性インスリン分泌作用を INS-1E 細胞を用いて検討した。結果、11.2 mmol/L グルコース濃度下には、JTP-109192（1 mmol/L）は DMSO 単独に比べ 1.9 倍のインスリン分泌を示した（図 2-3）。一方、3.3 mmol/L グルコース濃度では、JTP-109192（1 mmol/L）はインスリン分泌に影響を与えなかった。

GLUtag 細胞を用いた GLP-1 分泌能については、JTP-109192 の GLP-1 分泌作用を GLUtag 細胞を用いて検討した。結果、JTP-109192 は 0.1  $\mu$ mol/L の濃度より DMSO 単独に比べ顕著な GLP-1 分泌を示し、10  $\mu$ mol/L の処置濃度では、5.6 倍の GLP-1 分泌を示した（図 2-4）。

単回投与時インスリン分泌については、頸動脈及び頸静脈にカテーテルを留置したのち一晩絶食した SD ラットを用い、JTP-109192 単回投与時におけるインスリン分泌に対

する作用を高血糖クランプ法を用いて検討した。グルコース注入速度を調節することにより、Vehicle 群及び JTP-109192 群の血糖値は両群に差なく、0 分から 60 分までは 250 mg/dL に、60 分から 120 分までは 400 mg/dL に維持された (図 2-5a)。Vehicle 群の血漿中インスリン値は血糖値の上昇に応じて上昇し、250 及び 400 mg/dL のいずれの血糖値においても第一相及び第二相からなる二相性のインスリン分泌を示した (図 2-5b)。JTP-109192 群の血漿中インスリン値も上昇し、グルコース注入期間中を通じて Vehicle 群より高値を示した (図 2-5b)。JTP-109192 群の第一相及び第二相インスリン分泌は Vehicle 群に比べ顕著な上昇を示した (図 2-5c 及び 5d)。試験終了時に門脈及び末梢血中の GLP-1 値の上昇が認められた (図 2-5e)。

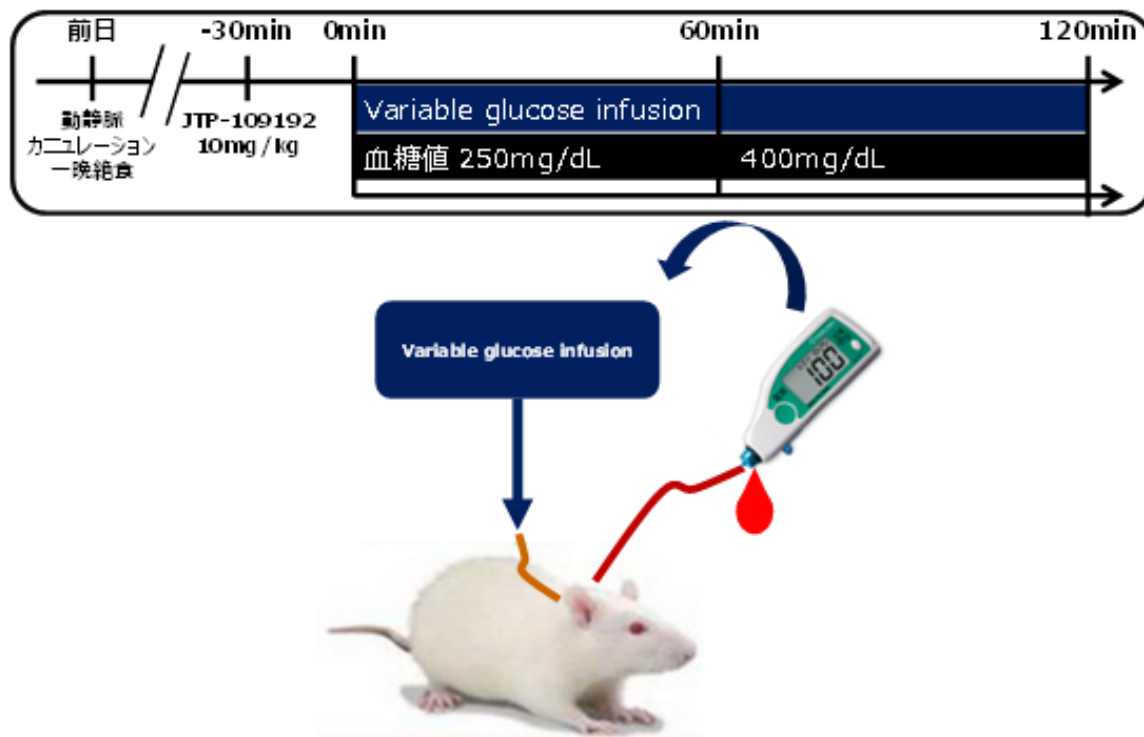


図 2-1. 高血糖クランプ法を用いた JTP-109192 単回投与時インスリン分泌の概略

グルコース持続注入用のカテーテルを頸静脈に、経時採血用のカテーテルを頸動脈に挿入したのち、一晩絶食した。グルコース注入開始 30 分前に JTP-109192 を 10 mg/kg の用量で経口投与した。グルコース注入開始後、0 分より 60 分までは血糖値を 250 mg/dL とするよう、60 分から 120 分までは血糖値が 400 mg/dL とするよう、グルコース注入速度を調節した。



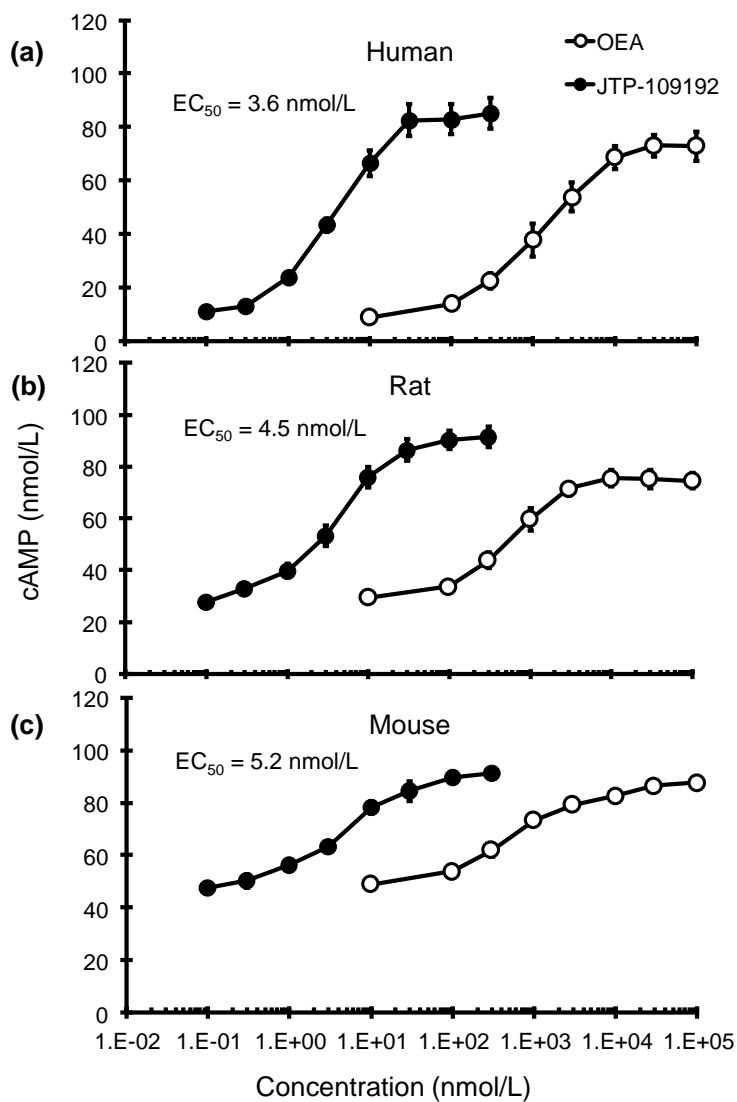
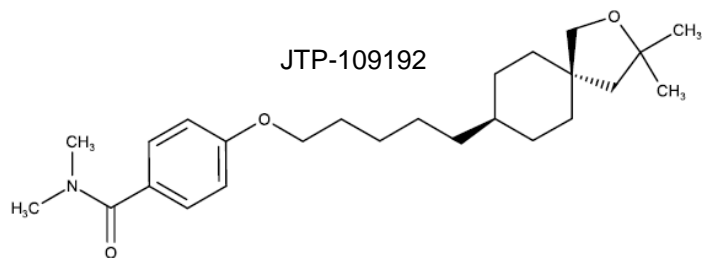


図 2-2. JTP-109192 の構造と各種 GPR119 に対するアゴニスト活性

(a): ヒト GPR119, (b): ラット GPR119, (c): マウス GPR119

各種 GPR119 における  $EC_{50}$  値: OEA による最大活性の 50%活性化する際の濃度

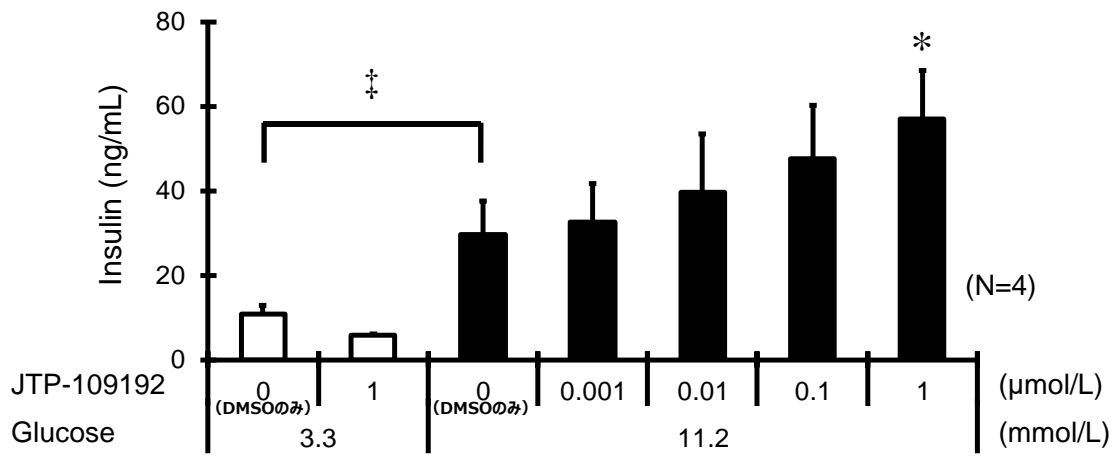


図 2-3. INS-1E 細胞を用いたインスリン分泌に対する作用

‡:  $p < 0.01$

(3.3 mmol/L と 11.2 mmol/L Glucose 条件における DMSO 単独群との比較)

\*:  $p < 0.05$

(11.2 mmol/L Glucose の DMSO 単独群と JTP-109192 1 μmol/L との比較)

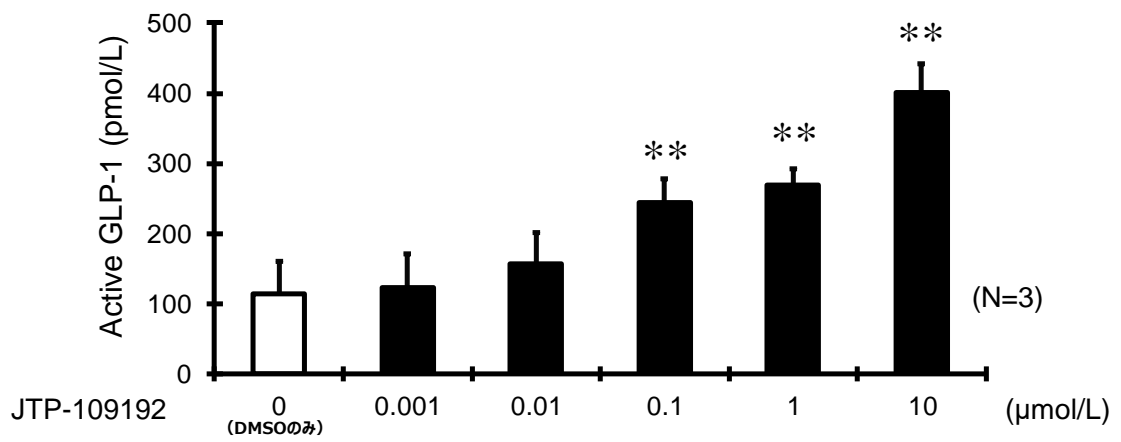


図 2-4. GLUTag 細胞を用いた GLP-1 分泌に対する作用

\*\*：  $p < 0.01$  (DMSO 単独群と JTP-109192 0.1, 1, 10 μmol/L との比較)

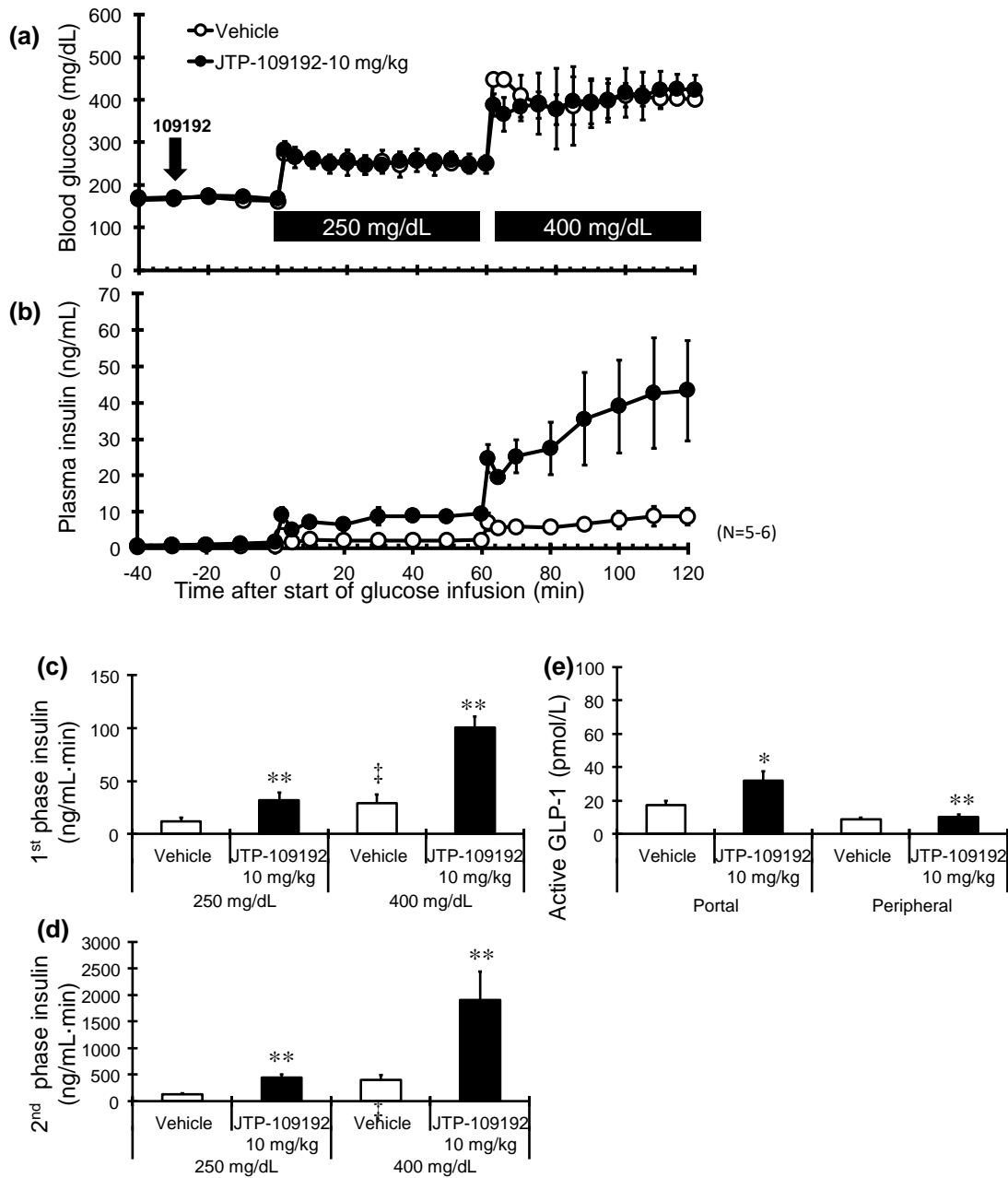


図 2-5. JTP-109192 単回投与時におけるインスリン分泌 (高血糖クランプ法)

(a): 血糖値, (b): 血漿中インスリン値, (c): 第一相インスリン分泌,

(d): 第二相インスリン分泌, (e): 血漿中GLP-1 値

‡:  $p < 0.01$  (250 mg/dL Vehicle と 400 mg/dL Vehicle との比較)

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  (Vehicle と JTP-109192 10 mg/kg との比較)

第一相インスリン分泌: 各血糖値の 0-5 分間の血漿中インスリン値 AUC

第二相インスリン分泌: 各血糖値の 5-55 分間の血漿中インスリン値 AUC

#### 第4節 考察

近年においては経口血糖降下薬開発における GPCR を標的とした研究進展は依然目覚ましく、遊離長鎖脂肪酸受容体 GPR40, GPR41, GPR43, グルカゴン受容体やエンドカンナビノイド受容体 GPR55 (McKillop et al., 2013), アミノ酸受容体 GPR142 (Wang et al., 2016) 等, 各種 GPCR の糖尿病治療への可能性が報告されている (Riddy et al., 2018)。GPCR 網羅解析である GPCRome によれば, インスリン分泌促進を作用機序とする観点から GPR119 は薬剤標的としての可能性が高いと報告されている (Amisten et al., 2013)。GPR119 agonist の作用機序は門脈又は末梢血中 GLP-1 濃度を上昇させる点において, GLP-1 受容体作動薬又は DPP4 阻害薬と類似している (Edgerton et al., 2009)。更に, 膵β細胞において直接的に糖濃度依存性インスリン分泌を促進させる点においては, GPR40 と類似した表現型を示す (Usui et al., 2019)。本試験においては, GPR119 agonist である JTP-109192 の *in vitro* 及び *in vivo* における基本プロファイルを確認した。JTP-109192 は, ヒト, ラット及びマウス GPR119 に対し, 種差なく数 nmol/L で強力な cAMP 産生能を示した。JTP-109192 の糖濃度依存性インスリン分泌作用を INS-1E 細胞を用いて検討した結果では DMSO 処置群で糖濃度依存的インスリン分泌が認められ, JTP-109192 の処置濃度に応じて糖濃度依存的インスリン分泌の促進が認められた。本試験における低グルコース条件 (3.3 mmol/L Glucose) は血糖値に換算すると約 60 mg/dL に相当し, 臨床において様々な低血糖症状を引き起こす基準値である 70 mg/dL (国立国際医療研究センター糖尿病情報センターHP) を下回っている。JTP-109192 はこのような低グルコース条件では作用せず, 高グルコース条件 (11.2 mmol/L Glucose) のみインスリン分泌を促進した。このため, JTP-109192 は既存薬である SU 薬とは異なり, 低血糖リスクの少ない薬剤である可能性が示された。GPR119 を介した細胞内シグナルは図 1-8 に示すように増幅経路を辿るため, 惹起経路のシグナルであるグルコースが存在しはじめてインスリン分泌が促進される。このため, GPR119 agonist によるインス

リン分泌作用は糖濃度依存的となると考えられる。一方, GLUTag 細胞を用いた GLP-1 分泌作用の検討においては, JTP-109192 は  $0.1 \mu\text{mol/L}$  より GLP-1 分泌を促進することが明らかとなった。続いて, カニュレーション処置 SD ラットを用い, 高血糖クランプ法により異なる血糖値 (250 mg/dL 及び 400 mg/dL) に維持した際の JTP-109192 のインスリン分泌促進作用について検討した。前者の血糖値は耐糖能不全者の, 後者の血糖値は 2 型糖尿病患者の食後高血糖値をそれぞれ模倣している (Harris, 1993)。結果, JTP-109192 は 250 から 400 mg/dL の血糖値の上昇に合わせてインスリン分泌第一相及び第二相のいずれも促進したが, グルコース注入前の正常血糖域ではインスリン分泌促進作用を示さなかった。また, 試験終了時に門脈及び末梢血中の GLP-1 値の上昇が認められ, GLUTag 細胞で認められた GLP-1 分泌促進作用を *in vivo* においても確認することができた。

以上より, JTP-109192 は各種 GPR119 に対し種差なくアゴニスト活性を示し, 膵  $\beta$  細胞株では糖濃度依存的インスリン分泌を, 腸管 L 細胞株では GLP-1 分泌をそれぞれ促進することが明らかとなった。また, インスリン分泌促進作用は *in vivo* においても糖濃度依存的に認められ, 既存薬である SU 薬とは異なり, 低血糖リスクの少ない薬剤である可能性が示された。

## 第5節 要約

JTP-109192 の基礎的な作用を検討した結果、GPR119 に対しては種差なく数 nmol/L で強力な cAMP 産生能を示した。膵  $\beta$  細胞株においては糖濃度依存的インスリン分泌の促進並びに腸管 L 細胞においては GLP-1 分泌の促進が認められた。また、SD ラットを用いた高血糖クランプ法により糖濃度依存的インスリン分泌の促進を確認した。

以上より、JTP-109192 は基礎的な作用として GLP-1 分泌及びインスリン分泌を促進することが明らかとなった。また、インスリン分泌促進作用は糖濃度依存的であり低血糖リスクの少ない糖尿病治療薬となりうる可能性が示された。

### 第3章 Zucker fatty ラットを用いた GPR119 agonist JTP109192 の

#### インスリン抵抗性に対する作用

##### 第1節 緒言

第2章においては JTP-109192 の基礎的な作用として、同化合物の糖濃度依存的インスリン分泌及び GLP-1 分泌を *in vitro* 及び *in vivo* において確認した。一方、インスリン抵抗性を成因とする病態モデル動物において同化合物の有効性は未検討であった。本章において使用した ZF ラットでは (図 3-1), レプチン受容体遺伝子 (*Lep<sup>fa</sup>*) の単一劣性突然変異を有し, レプチン受容体以下のシグナル伝達阻害を示す (Phillips et al., 1996)。レプチンは脂肪細胞より分泌されるホルモンであり視床下部におけるレプチン受容体に作用することにより, 摂食抑制及びエネルギー産生亢進作用を有することが知られている (Jequier, 2002)。このシグナル伝達経路に異常を持つ ZF ラットは過食に基づく肥満, 耐糖能異常及びインスリン抵抗性を示すモデル動物として広く用いられている (Okuno et al., 1998)。本章においては, まず ZF ラットを用いて同化合物の単回投与後における耐糖能に対する作用を検討した。

GPR119 の発見から今日に至るまで大手製薬各社において GPR119 agonist の開発がなされてきたが, 低分子 agonist を用いた第三相臨床試験は未だ実施されていない (Sloop et al., 2018)。グラクソスミスクライン社の開発化合物である GSK1292263 は第二相臨床試験において血中 GLP-1 濃度の上昇及び血糖値の低下を認めず, ジョンソンエンドジョンソン社の JNJ-38431055 においても血糖値の有意な低下は認められなかった。このように臨床試験が中止となった理由の一つとして, 長期投与による薬効減弱 (Tachyphylaxis) の可能性が示されている (Han et al., 2018)。本章では, 上述のように単回投与時の耐糖能を確認したのち, 引き続いて約 1 か月間経口反復投与することにより長期投与における薬効持続を検討した。更に反復投与後動物を用い, 高インスリン正常血糖クランプ法にてインスリン抵抗性に対する作用を検討した。



## 第2節 材料及び方法

### ZF ラット単回投与及び反復投与後の耐糖能に対する作用

動物実験方法については、事前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所における動物倫理委員会の承認を得た。日本チャールスリバー社から購入した雄性 ZF ラットを実験に供した。ZF ラット(9 週齢)に 0.5%メチルセルロース又は JTP-109192(3 又は 10 mg/kg)を経口投与し、絶食した。16 時間後、ラットにグルコースを 2 g/kg の用量で腹腔内投与した。0 分後 (グルコース投与前)、グルコース投与 30 分後、60 分後及び 120 分後に尾静脈より採血し遠心分離 (10000×g, 4°C, 5 分間) により血漿を回収し、同時間帯の血漿中グルコース濃度を測定した。0 分後、7 分後、30 分後、60 分後、120 分後の血漿中インスリン濃度を測定した。インスリン分泌の指標となる Insulinogenic index を以下の式に従って算出した。

$$\text{Insulinogenic index} = \frac{\text{グルコース負荷 0 分から 30 分後における血漿中インスリン値変化量の曲線下面積}}{\text{グルコース負荷 0 分から 30 分後における血漿中グルコース値変化量の曲線下面積}}$$

反復投与試験は以下の通り実施した。30 匹のラットから 12 匹の ZF ラット (9 週齢) を以下のように選抜した。投与開始の 4 日前に、尾静脈から採血し、HbA1c 値を測定した。残りの血液を遠心分離 (10000×g, 4°C, 5 分間) して血漿を回収し、血漿中グルコース及びインスリン濃度を測定した。投与開始日に体重を測定した。これらのパラメータについて、平均値からの乖離が大きい個体 18 匹をまず除外した後、12 匹のラットを 2 群間で各パラメータに偏りが生じないように各群 6 匹ずつの 2 群 (JTP-109192 10 mg/kg 群又は Vehicle 群) に割り付けた。投与初日を 1 日目とし、1 日目及び 28 日目に腹腔内投与耐糖能試験を実施した。投与 40 日目から 42 日目には高インスリン正常血糖

クランプ試験を実施した。摂餌量、体重及び血液生化学的パラメータ（HbA1c、血漿グルコース、インスリン）を毎週測定した。血液サンプルをラットの尾静脈から採取した。グルコース濃度を市販キット（リキテック グルコース HK テスト、ロシュ ダイアグノスティックス社）と自動分析装置（日立 7170 型、株式会社日立製作所）を用いて測定した。インスリン濃度を ELISA キットを用いて測定した。総ヘモグロビン濃度及び総 HbA1c 濃度を市販キット（リキテック HbA1C II、ロシュ ダイアグノスティックス社）及び自動分析装置（日立 7170 型）を用いて測定した。

#### ZF ラットを用いた高インスリン正常血糖クランプ法によるインスリン抵抗性に対する作用

概略を図 3-1 に示す。インスリン（ノボリン R 注<sup>®</sup>100 U/mL、ノボノルディスクファーマ株式会社）を生理食塩水を用いて希釈し調製したインスリン溶液を、頸静脈カニューレを介して 3.2 U/kg の用量で投与し、シリンジポンプを用いて 15 mU/kg/min の速度でインスリン溶液を持続注入した。その後、5 分毎に頸動脈カニューレを介して採血し、簡易血糖測定器（メディセーフミニ<sup>®</sup>、テルモ株式会社）を用い、血糖値をモニターした。モニターした血糖値を基に、正常血糖となるように頸静脈カニューレを介して 25%グルコース溶液の注入速度を調節した。グルコース注入速度に 10 分間変化がなく、血糖値が  $110 \pm 10$  mg/dL に維持された状態を定常状態と定義し（5 分毎の連続 3 点における採血）、定常状態における更に次の 3 点の時間で採血した。定常状態の血液を遠心分離し（ $10000 \times g$ , 4°C, 5 分間）、血漿を回収し、血漿インスリン濃度の測定まで -20°C で保存した。グルコース注入速度を、以下の式に従って算出した。

$$\left( \text{Glucose infusion rate (mg/kg/min)} = \frac{\text{定常状態における 25\%グルコース溶液注入速度 (mL/hr)} \times 250 \text{ (mg/mL)}}{60 \text{ (min/hr)} \times \text{体重 (kg)}} \right)$$

なお、JTP-109192 単回投与時の ZF ラットにおけるインスリン抵抗性に対する作用に

については、上記の方法を用い、3, 6, 9 及び 15 mU/kg/min の速度でインスリン溶液を持続注入し定常状態におけるグルコース注入速度を算出した。

### インスリン抵抗性に対する作用（肝糖産生）

肝からの糖産生については[3-<sup>3</sup>H]Glucose (NET331A, パーキンエルマー社) を用い、以下の方法により検討した。[3-<sup>3</sup>H]Glucose 溶液を頸静脈カニューレから 740 kBq/head の用量で投与し、その後 7.4 kBq/min の速度で連続的に注入した。[3-<sup>3</sup>H]Glucose 注入開始から 110 分後、115 分後、120 分後 (basal 期間) に簡易血糖測定器 (メディセーフミニ) を用い、血糖値をモニターした。また、頸動脈カニューレを介して採血し、血漿インスリン濃度及び basal 期間中の[3-<sup>3</sup>H]Glucose 放射活性を測定した。120 分後採血直後に、頸静脈カニューレを介してインスリン (3.2 U/kg) を注入し、次いで、[3-<sup>3</sup>H]Glucose 及びインスリン溶液をそれぞれ 7.4 kBq/min 及び 15 mU/kg/min の速度で連続注入した。その後、5 分毎に頸動脈カニューレを介して採血し、簡易血糖測定器 (メディセーフミニ<sup>®</sup>, テルモ株式会社) を用い、血糖値をモニターした。モニターした血糖値を基に、正常血糖となるように頸静脈カニューレを介して 25%グルコース溶液の注入速度を調節した。定常状態における更に次の 3 点の採血時間で採血し、定常状態の血液を遠心分離し (10000×g, 4°C, 5 分間)、血漿を回収しクランプ期間中の血漿中インスリン濃度及び <sup>3</sup>H 放射活性を測定した。血漿インスリン濃度及び <sup>3</sup>H 放射活性を測定するまで血漿サンプルを-20°Cで保存した。

<sup>3</sup>H 放射活性は以下の方法により測定した。0.3 mol/L 硫酸亜鉛溶液 200 μL 及び 0.3 mol/L 水酸化バリウム溶液 180 μL を血漿 20 μL に添加し、十分に混合した。その後、遠心分離 (10000×g, 15°C, 5 分間) し、上清 360 μL のうち 200 μL をチューブに移し、窒素ガス下で 100°Cまで加熱し <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O を含む水分を蒸発させて乾燥した。残渣に精製水 300 μL を添加し、液体シンチレーションカクテル (クリアソル I, ナカライテスク社) と十分に混合し、液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 2500TR, PACKARD)

を用いて, [3-<sup>3</sup>H]Glucose の放射活性を測定した。肝からの糖産生抑制率を Steele の報告 (Steele, 1959) に基づき以下の式に従って算出した。

$$R_d \text{ (グルコース消失速度) (mg/kg/min)} = R_a \text{ (グルコース出現速度) (mg/kg/min)} = [3\text{-}^3\text{H}]\text{Glucose 注入速度 (dpm/min)} / [3\text{-}^3\text{H}]\text{Glucose 比活性 (dpm/mg)} / \text{体重 (kg)}$$

$$[3\text{-}^3\text{H}]\text{Glucose 比活性 (dpm/mg)} = [3\text{-}^3\text{H}]\text{Glucose 濃度 (dpm/mL)} / \text{血糖値 (mg/dL)} \\ \times 100$$

$$\text{肝糖産生速度 (mg/kg/min)} = R_a \text{ (mg/kg/min)} - \text{Glucose infusion rate (mg/kg/min)}$$

$$\text{肝糖産生抑制率 (\%)} = 100 - \text{肝糖産生速度 (mg/kg/min)} / \text{肝糖産生速度 (mg/kg/min)} \\ \times 100$$

### GPR119agonist 前処置による cAMP 産生能

ヒト GPR119 強制発現 HEK293 細胞を用い第 2 章に示す方法を改変して hGPR119 アゴニスト活性を評価した。JTP-109192 又は GSK1292263 を 100 nmol/L の最終濃度となるよう刺激培地に溶解し, 強制発現細胞に添加した (前処置)。添加 24 時間後に細胞を洗浄し, 再び 100 nmol/L となるよう添加し 30 分間室温で静置した。その後, anti-cAMP cyptase conjugate をウェルに添加し, 室温遮光下に 3 時間静置した。マイクロプレートリーダーを用い, 細胞内 cAMP 産生量を定量化し, 前処置なしと前処置ありを比較した。

### 統計学的解析

統計学的解析を以下のとおり実施した。2 群の比較では, Student の *t* 検定又は Aspin-Welch の *t* 検定を, 多群の比較においては, Dunnett 検定又は Steel 検定を実施し,  $p < 0.05$  を有意とした。結果は, 平均値±標準偏差で示した。GPR119agonist 前処置による cAMP 産生能については平均値のみを示した。

## 第 3 節 結 果

6週間反復投与期間中、体重は増加し、JTP-109192(10 mg/kg)とVehicleの群間に差は認められなかった(図3-2a)。JTP-109192投与群の血漿中グルコース値、血漿インスリン値及び血中HbA1c値は、Vehicle群よりも低値を示した(図3-2b, 2c及び2d)。

Vehicle又はJTP-109192単回投与時の血漿中グルコース値は、耐糖能試験後に上昇した(図3-3a)。JTP-109192 10 mg/kg投与群の血漿中グルコース値は、Vehicle群及びJTP-109192 3 mg/kg投与群と比べて、グルコース投与後に顕著に低下した。また10 mg/kg投与群では、グルコース投与後の血漿中インスリン値及びInsulinogenic indexは上昇し、Vehicle又は3 mg/kg投与群よりも高値を示した(図3-3b及び3c)。6週間反復投与後の耐糖能試験におけるJTP-109192 10 mg/kg群の血漿中グルコース値及びインスリン値は低下し(図3-3d及び3e)、グルコース投与後のInsulinogenic indexはVehicle群よりも有意に高値を示した(図3-3f)。

6週間の反復投与後、高インスリン正常血糖クランプ試験前のJTP-109192 10 mg/kg群の末梢血中GLP-1値は、Vehicle群よりも高い傾向にあった(図3-4a)。また、JTP-109192群のグルコース注入速度は、Vehicle群よりも有意に高値を示した(図3-4b)。更なる検討の結果、JTP-109192群のグルコース注入率の上昇は、肝糖産生の抑制によるものであることが明らかとなった(図3-4c)。解剖後の肝臓中トリグリセライド含量は顕著に低下し、肝糖産生抑制率と相関関係を示す傾向にあった(図3-4d及び4e)。一方、JTP-109192 10 mg/kg単回投与時には3, 6, 9及び15 mU/kg/minのいずれのインスリン条件においても、JTP-109192群におけるグルコース注入速度の上昇は認められなかった(図3-5)。

hGPR119に対し、JTP-109192及びGSK1292263を100 nmol/Lの濃度で刺激した際には、約5倍のcAMP産生能を示した。それぞれの化合物で前処置した際のcAMP産生能は、前処置しない場合に比べて、GSK1292263では43%減少した一方、JTP-109192では23%の減少に留まった(図3-6a及び6b)。

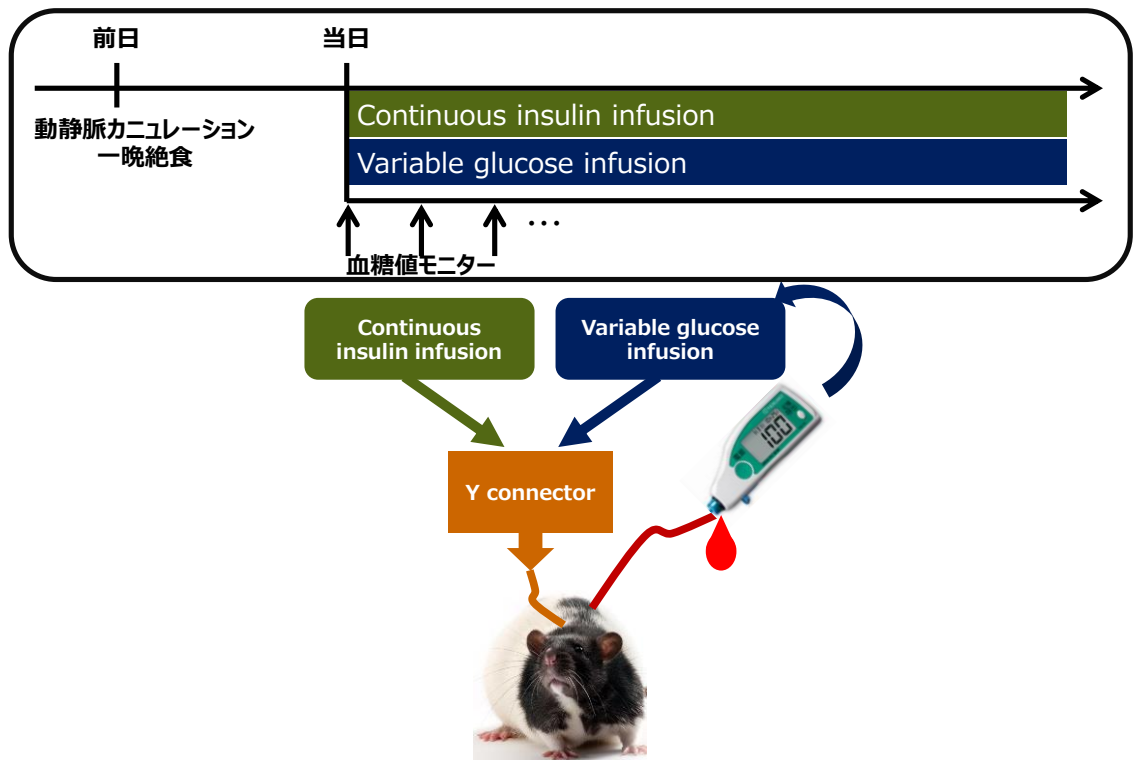


図3-1. ZF ラットの外観（左）と高インスリン正常血糖クランプ法によるインスリン抵抗性評価の概略

グルコース持続注入用のカテーテルを頸静脈に、経時採血用のカテーテルを頸動脈に挿入したのち一晚絶食した。一定量のインスリンを静脈より持続注入しながら簡易血糖測定器により血糖値をモニターし、正常血糖に達するようグルコース注入速度を調節した。定常状態に達したグルコース注入速度（Glucose Infusion Rate）をもってインスリン抵抗性の指標とした。

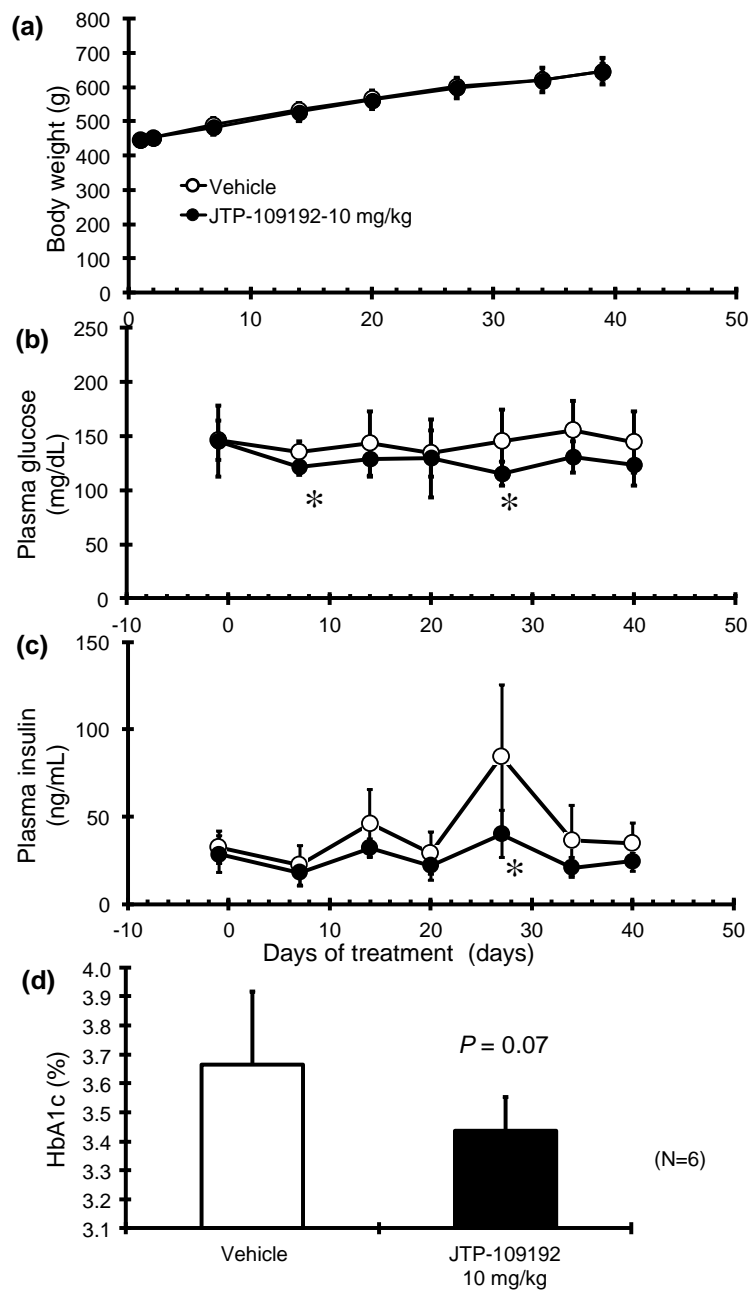


図 3-2. JTP-109192 10mg/kg 反復投与中の各種パラメータ

(a): 体重, (b): 血漿中グルコース値, (c): 血漿中インスリン値,

(d): 血中HbA1c 値

\*:  $p < 0.05$  (Vehicle と JTP-109192 10 mg/kg との比較)

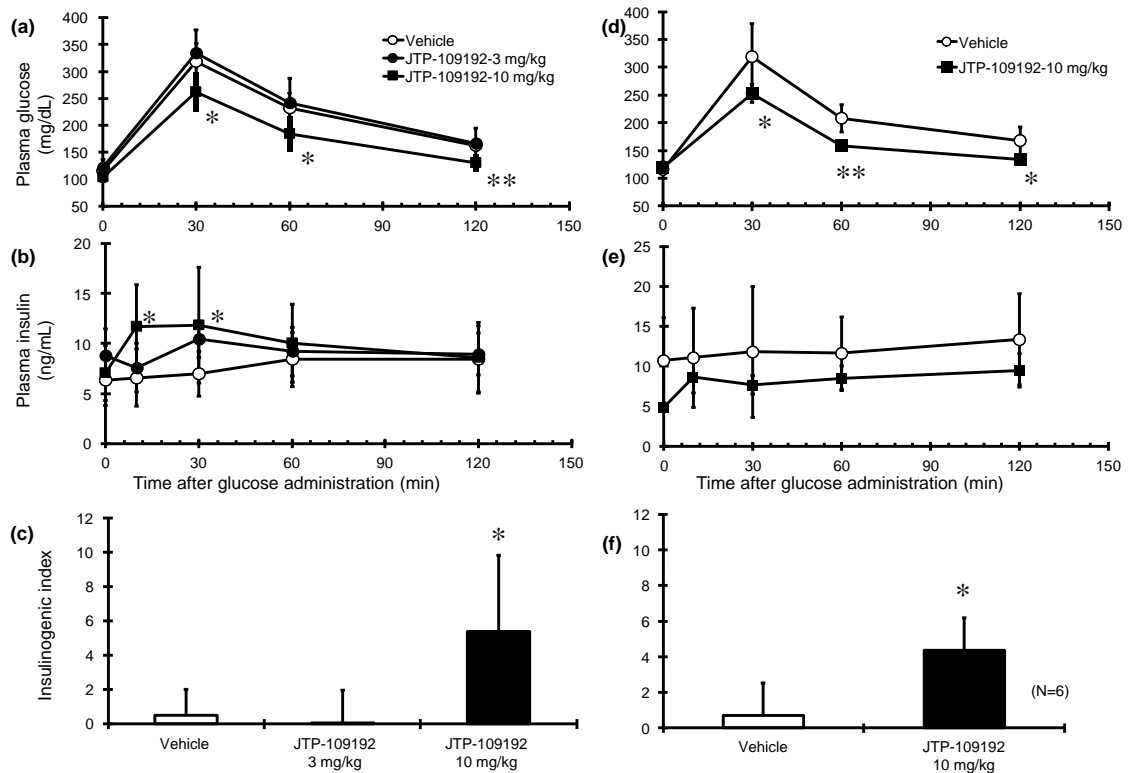


図 3-3. JTP-109192 単回及び反復投与後における耐糖能試験

(a): 血漿中グルコース値 (単回投与後), (b): 血漿中インスリン値 (単回投与後),  
 (c): Insulinogenic index (単回投与後), (d): 血漿中グルコース値 (反復投与後),  
 (e): 血漿中インスリン値 (反復投与後), (f): Insulinogenic index (反復投与後)

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  (Vehicle と JTP-109192 10 mg/kg との比較)



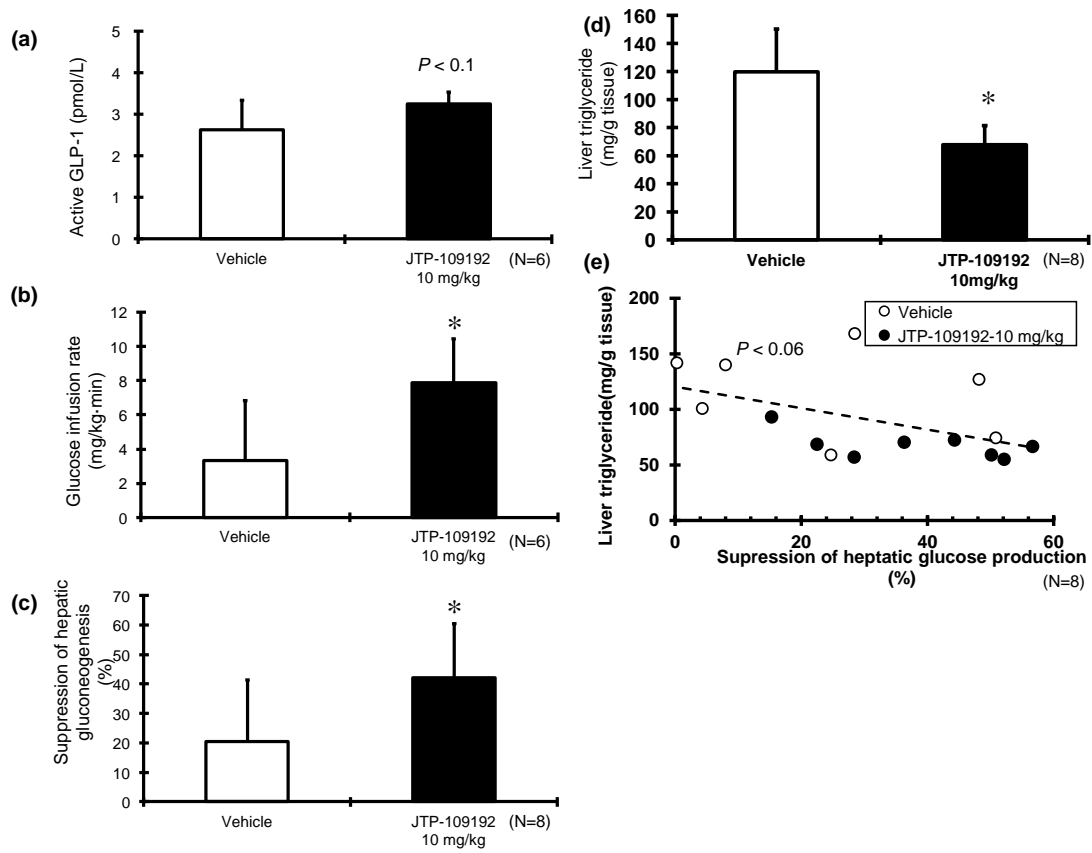


図 3-4. JTP-109192 10 mg/kg 反復投与後における各種パラメータ

(a): 血漿中 GLP-1 値, (b): グルコース注入速度, (c): 肝糖産生抑制率,

(d): 肝中 TG 含量, (e): 肝中 TG 含量と肝糖産生抑制率の関係

\*\* :  $p < 0.05$  (Vehicle と JTP-109192 10 mg/kg との比較)

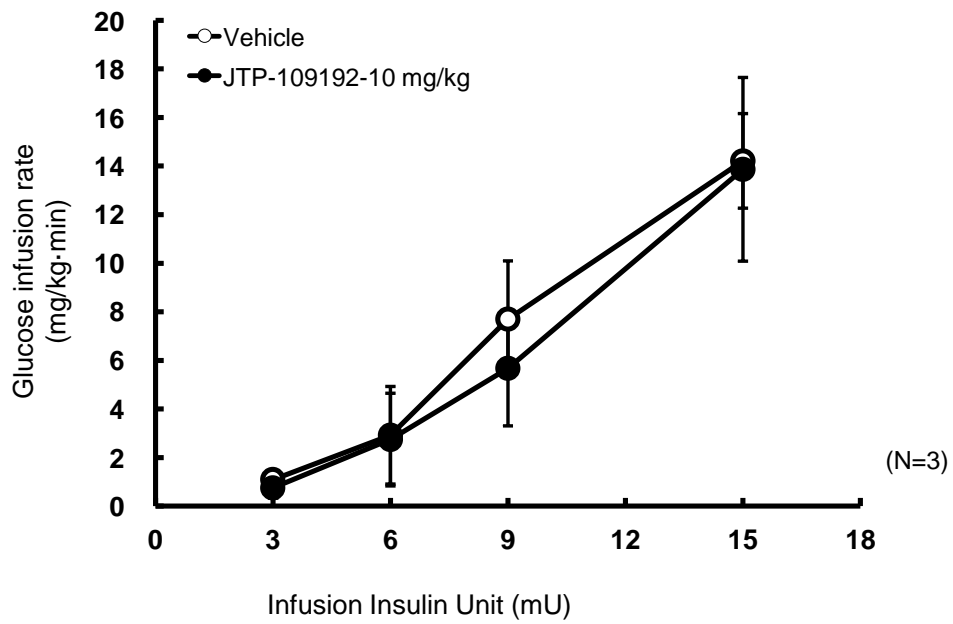


図 3-5. ZF ラット JTP-109192 10 mg/kg 単回投与時のインスリン抵抗性への作用

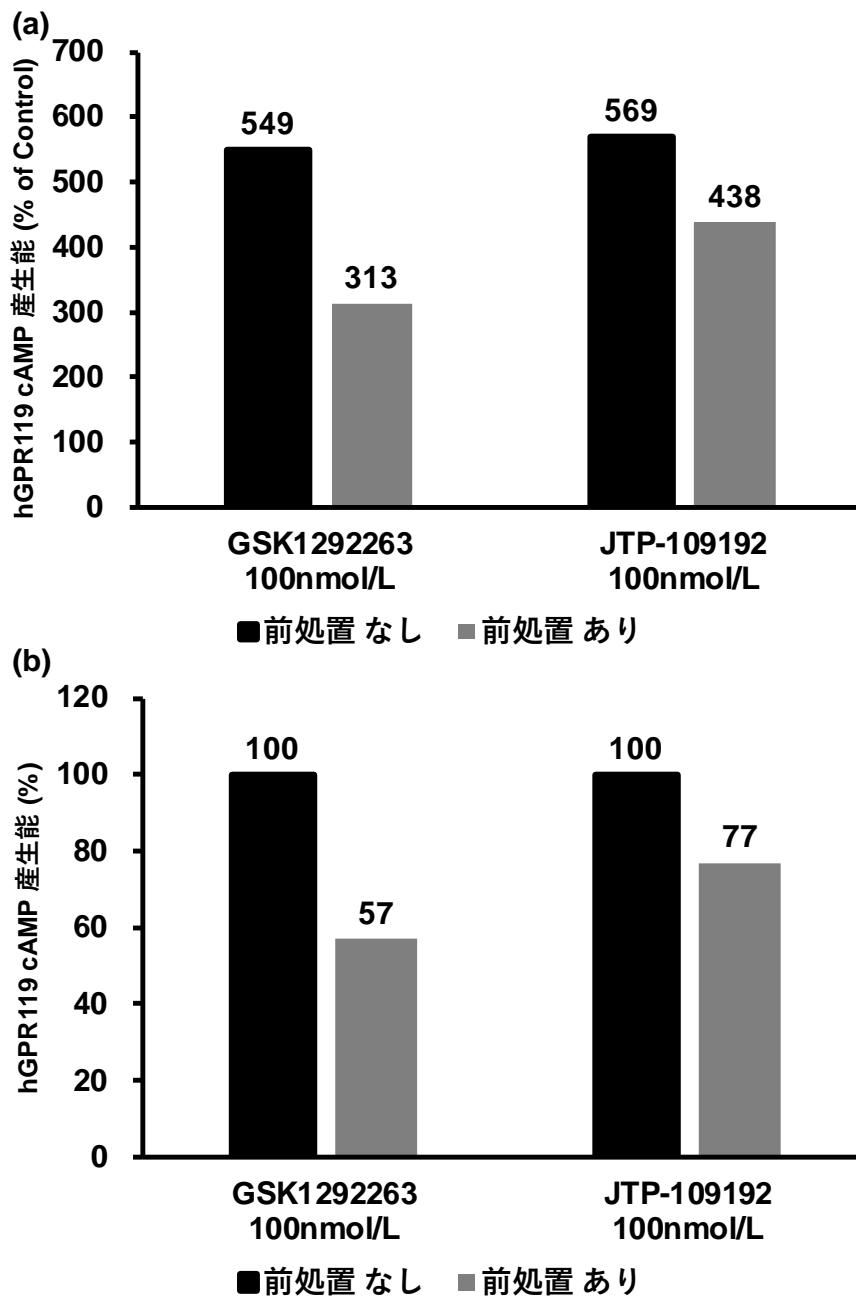


図 3-6. GSK1292263 及び JTP-109192 の hGPR119 cAMP 産生能に対する前処置の影響  
 (a): cAMP 産生能 (Control (DMSO 単独) 群に対する比率),  
 (b): cAMP 産生能 (前処置なしに対する比率)

#### 第4節 考察

GPR119 agonist の SAR 及び本試験に用いた JTP-109192 の創製についてはこれまで原田らによって報告されており (Harada et al., 2018), SD ラットにおける JTP-109192 の単回経口投与 0.5 時間後における糖濃度依存性インスリン分泌促進による耐糖能改善作用が認められている。一方, 病態モデル動物を用いた JTP-109192 の単回及び反復投与における血糖降下作用については未検討であった。また一般に GPR119 を含む GPCR agonist の開発において, 反復投与による Tachyphylaxis の可能性が知られているため, 反復投与による薬効持続性の検討は疾患領域に関わらず薬剤を開発するうえで重要であると考えられる。本章ではインスリン抵抗性モデル動物である ZF ラットを用いて, JTP-109192 を単回投与した際の, 同化合物の耐糖能に対する作用を検討した。更に同動物を用い, 10 mg/kg の用量における 6 週間反復経口投与した場合の糖代謝への影響を検討した。また, 反復投与期間終了時には, 高インスリン正常血糖クランプ法を用いて同反復投与動物におけるインスリン抵抗性を評価した。結果, JTP-109192 10 mg/kg 単回投与 16 時間後の耐糖能試験においては, グルコース投与 30 分後まで血漿中グルコース値が顕著に低下し, 血漿中インスリン値及び Insulinogenic index の上昇が認められた。従って, JTP-109192 10 mg/kg を投与した ZF ラットにおいては, 16 時間後においても十分に耐糖能改善を示す血中濃度が維持されていたと考えられた。JTP-109192 10 mg/kg を反復投与することにより, 投与期間中の血漿中グルコース値及びインスリン値は低下する傾向が認められた。4 週間後における耐糖能試験では糖濃度依存的インスリン分泌の促進による耐糖能改善が認められた。6 週間後における同動物を用いた高インスリン正常血糖クランプ法を用いた検討では, JTP-109192 はインスリン抵抗性を有意に改善した。更なる研究により, そのインスリン抵抗性改善は肝糖産生抑制によることが明らかとなった。一般に GLP-1 は糖産生に關与する PEPCK や G6Pase などの肝糖産生遺伝子発現を抑制することが報告されている (Yang et al., 2017)。高インスリン正常

血糖クランプ試験終了後には JTP-109192 群において肝中 TG 含量の低下が認められ、全群を通じて肝糖産生速度との相関関係が認められた (図 3-4e)。肥満モデルマウスを用いた報告では、インスリン抵抗性を惹起し転写因子 FOXO1 及び SREBP1c の活性が保持されることによって肝糖産生亢進及び脂肪肝に至ることが明らかとなっており (篁, 2013), JTP-109192 によるインスリン抵抗性改善が脂肪肝及び肝糖産生改善に至ったものと推測される。また、近年においては高脂肪食負荷マウスにおける肝脂肪蓄積を複数の GPR119 agonist が SREBP-1c の発現制御により改善することが報告されている (Yang et al., 2016)。従って、脂肪肝及び肝糖産生の改善は GLP-1 分泌促進による作用のほか、インスリン抵抗性改善による作用若しくは GPR119 シグナルに基づく直接作用である可能性が考えられた。

先行品 GPR119 agonist である GSK1292263 等において、Tachyphylaxis が報告されている (Han et al., 2018)。GSK1292263 は糖尿病を適応とした臨床試験において、GLP-1 分泌を増加させず、血糖値をコントロールすることができなかつた一方、前臨床試験では GSK1292263 は反復投与後も血糖降下作用を維持した。そこでラットからヒトへの外挿を検討する一環として、hGPR119 を GSK1292263 及び JTP-109192 を用いて前処理することにより、前処理を行わなかつた群と比較した。結果、GSK1292263 の cAMP 産生能は 43%減少することが明らかになった一方、JTP-109192 前処理後の cAMP 産生能は 23%の減少に留まった。これらの結果は Hothersall らの報告 (Hothersall et al., 2015) と類似した結果であることから、GPR119 agonist の脱感作の程度の違いが Tachyphylaxis の原因の一つとなり得ることが推測された。JTP-109192 の反復投与 6 週間後においても、基本的機序である血漿中 GLP-1 上昇を伴うインスリン分泌促進が認められ、耐糖能改善が改善したことを考慮すると、JTP-109192 は少なくとも 6 週間は Tachyphylaxis を生じないことが明らかとなった。

以上から、JTP-109192 は 2 型糖尿病治療を目的とした長期投与での忍容性も良好な

強力な新規血糖低下薬として期待される。

## 第5節 要約

インスリン抵抗性モデル動物である ZF ラットに JTP-109192 を 10 mg/kg の用量で反復投与した結果、投与期間を通じて体重又は摂餌量に影響することなく JTP-109192 は血漿中グルコース値及びインスリン値を低下させることが明らかとなった。また、反復投与期間前後において実施した耐糖能試験においては、JTP-109192 は薬効減弱することなくインスリン分泌促進に基づく耐糖能改善作用を示した。この反復投与後の動物を用いた高インスリン正常血糖クランプ法によるインスリン抵抗性に対する検討では、JTP-109192 はインスリン抵抗性を有意に改善し、その改善は肝糖産生抑制に基づくことが明らかとなった。肝糖産生抑制に至ったメカニズムについては、GLP-1 は肝糖新生遺伝子発現を抑制することが知られている他、インスリン抵抗性改善による二次的な作用である可能性が考えられた。

JTP-109192 は 2 型糖尿病治療を目的とした長期投与での忍容性も良好な強力な新規血糖低下薬として期待される。

## 第4章 SHL マウスを用いた脂質代謝改善作用

### 第1節 緒言

近年、*Gpr119*過剰発現 *ApoE* 欠損動脈硬化症マウスにおいて、小腸及び肝臓中コレステロール輸送タンパクの発現上昇を伴う血中脂質及び炎症性サイトカインの低下とそれに続く粥状動脈硬化巣の改善が報告された。また、GPR119 の内因性リガンドである OEA が *ApoE* 欠損動脈硬化症マウスにおいて抗動脈硬化作用を示した。グラクソスミスクライン社創製の GSK1292263 は脂質異常症適応で開発されていた経緯があり (Nunez et al., 2012), 同症を対象に実施した 2 週間反復投与試験においては、HDL-C 値の上昇及び LDL-C 値の低下が認められた。従って、GPR119 agonist は糖尿病改善薬のみならず、脂質低下薬としての可能性があることが期待された。

脂質異常症治療薬前臨床研究において、正常マウスは血漿中 HDL-C 値が高く、高コレステロール食負荷による外因性負荷であっても動脈硬化症を惹起しづらいことが一般に知られている。一方、本研究で用いた SHL マウス (図 4-1) は、自然発症 *ApoE* 遺伝子欠損により高脂血症を発現するため、遺伝子組み換え動物である *ApoE* 欠損マウスや大型実験動物 (ウサギ) と比較しても、その取り扱いや化合物必要量の面から本系統マウスを用いる利点は大きいと考えられる。本章では、SHL マウスに JTP-109192 を約 12 週間混餌反復投与し、*in vivo*における同化合物の脂質代謝改善作用及びそれに続く動脈硬化の病理組織学的検討を実施した。また、JTP-109192 誘導体を単回投与した際の組織中脂質代謝遺伝子発現を評価し、脂質代謝改善作用の作用機序を推定した。



## 第2節 材料及び方法

### SHL マウス 2 系統 C57BL/6 及び BALB/c の動脈硬化発症期間検討

動物実験方法については、事前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所における動物倫理委員会の承認を得た。日本エスエルシー株式会社から購入した C57BL/6 及び BALB/c SHL マウスに、Western diet (F2WTD, 組成：ショ糖 34%, 無塩バター20%, 417 kcal/100g, オリエンタル酵母工業株式会社)又は通常食 (CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社) を与え、粥状動脈硬化面積率と血漿中 TC 値との関係を比較した。雄性マウス (7 週齢) を用いて、2, 3 及び 4 ヶ月間飼育した。1 又は 2 週間ごとに血液生化学的パラメータ (血漿中 TC 値) を測定した。これらの 2 飼料 2 系統のマウスについて、血漿中 TC の曲線下面積 (TC-AUC) 値及び動脈硬化性病変の面積率について二次元散布図を作成し比較した。GraphPad Prism version 7.0 for Windows (GraphPad Software) を用いて線形及び非線形回帰フィッティングを実施した。

### JTP-109192 の SHL マウスにおける反復投与

20 匹のマウスの中から 16 匹の雄性 BALB/c SHL マウス (7 週齢) を以下のとおり選抜した。投与開始の 4 日前に、イソフルラン麻酔下に尾静脈より 100  $\mu$ L 採血し、これを遠心分離し (10000 $\times g$ , 4 $^{\circ}$ C, 5 分間), 血漿を回収した。TC 濃度を、市販キット (リキテック TC II, ロシュ・ダイアグノスティックス) と自動分析装置 (日立 7170 型) を用いて測定した。HDL-C 及び non-HDL-C 濃度を、高速自動電気泳動装置 (REP, 株式会社ヘレナ研究所) を用いて測定した。投与開始日 (day1 と定義) に体重を測定した。これらのパラメータについて、平均値からの乖離が大きい個体 4 匹をまず除外した後、16 匹のマウスを 2 群間で各パラメータに偏りが生じないように各群 8 匹ずつの 2 群 (JTP-109192 100 mg/kg 群又は Vehicle 群) に割り付けた。JTP-109192 を Western diet に混餌し自由摂食させ、Vehicle 群には Western diet を摂食させた。投与期間 84 日間にわたり、1 週間ごとに摂餌量及び体重を測定した。1~2 週間ごとに血液生化学的パラメー

タ (TC 値) を測定した。血漿中 HDL-C 及び non-HDL-C 濃度を, 1 日目, 49 日目及び 84 日目に測定した。1~7 日目, 21~28 日目及び 77~84 日目のそれぞれの期間に, 糞中コレステロール及び胆汁酸を以下のように測定した。各期間中に糞を採取し, 90°C で 16 時間乾燥させた。乾燥重量を測定した後, 糞をミキサーミルで粉砕し 100%エタノールを添加してコレステロール及び胆汁酸を抽出した。抽出液を乾固させた後, 2-プロパノールに再溶解して市販キット (総胆汁酸テストワコー, 富士フイルム和光純薬株式会社, リキテック TC II, ロシユ・ダイアグノスティックス) を用いて測定した。

### 粥状動脈硬化巣の定量化

投与 84 日目に解剖し胸部及び腹部大動脈を採材したのち, Oil red O を用い染色した。無作為単盲検の下, 大動脈展開標本の血管内腔表面のデジタル画像を得た。画像処理ソフト (Adobe Photoshop CS, Version 8.0.1; Adobe Systems Incorporated) 及び解析ソフト (WinROOF Version 5.01; 三谷産業株式会社) を用いて, 粥状動脈硬化領域及び血管内腔全体の面積を測定し, 血管内腔総面積に対する粥状動脈硬化領域の割合を算出した。

### JTP-109192 誘導体投与によるリアルタイム qPCR 法を用いた mRNA 量の定量解析

雄性 C57BL/6 SHL マウス 14 匹を 2 群に分け, 各群 7 匹ずつ (JTP-109192 誘導体 100 mg/kg 又は Vehicle 群) に割り付けた。JTP-109192 誘導体を Western diet に混餌し, 16 時間自由摂食させた。Vehicle 群には Western diet を摂食させた。16 時間後, イソフルラン麻酔下に解剖し, 上腸 (十二指腸, 空腸), 下腸 (空腸, 回腸) 及び結腸を採取し, total RNA 抽出時まで -80°C で凍結した。

これらの組織より RNA 抽出キット (miRNeasy Mini Kit, 株式会社キアゲン) を用いて Total RNA を抽出した。M-MLV 逆転写酵素及び random primer (Invitrogen 社) を用いて, RNA から逆転写することにより cDNA を作成した (25°C 10 分間, 37°C 2 時間, 85°C 5 分間)。自動配列検出器及び ABI Prism7700 Sequence Detection System ソフトウエ

ア (Applied Biosystems 社) を用い、リアルタイム PCR 法により定量した。反応構成は、cDNA サンプル 50 ng, TaqMan universal PCR master mix 及び TaqMan primer/probe mix (Applied Biosystems 社) とし 40 サイクル分実施した (1 サイクル: 95°C 10 分, 95°C 15 秒, 60°C 1 分)。18s rRNA 量を用い、mRNA 発現量を補正した。Primer Express ソフトウェア (Applied Biosystems 社) を用いて、以下の primer 及び FAM-conjugated probe を設計した。*Abca1* (probe, Mm00442646\_m1), *Abcg5* (probe, Mm00446241\_m1), *Abcg8* (probe, Mm00445970\_m1), *Npc1l1* (probe, Mm01191972\_m1) 及び *18s* rRNA (Applied Biosystems 社より購入)。

#### CaCO-2 細胞を用いた *ABCA1* 遺伝子定量

ヒト大腸がん由来細胞株である CaCO-2 を用い、*ABCA1* mRNA に対する作用を以下のとおり評価した。小腸絨毛様に分化した CaCO-2 細胞に HBSS 培地 (GIBCO BRL, 19.45 mmol/L Glucose, 10 mmol/L HEPES, Mucosal 側 : pH6.5, Serosal 側 : pH7.4, 4.5% BSA あり) を添加し、37°C で 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> の条件にて 20 分間静置した。JTP-109192 を終濃度 1  $\mu$ mol/L となるよう Mucosal 側に処置し、37°C で 24 時間培養した。陽性対照には T0901317 (LXR agonist, Sigma-Aldrich 社) 1  $\mu$ mol/L を用いた。培養後、TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit を用いて細胞を溶解し、リアルタイム PCR 法により定量した。primer 及び FAM-conjugated probe には *ABCA1* (probe, Hs01059137\_m1) を用いた。

#### 統計学的解析

統計学的解析を以下のとおり実施した。2 群の比較では、Student の *t* 検定又は Aspin-Welch の *t* 検定を、多群の比較においては、Dunnett 検定又は Steel 検定を実施し、*p* < 0.05 を有意とした。結果は、平均値 ± 標準偏差で示した。

### 第 3 節 結果

#### SHL マウス 2 系統 C57BL/6 及び BALB/c のキャラクタライゼーション

JTP-109192 反復投与評価に先立ち、Western diet 又は通常食を給餌した C57BL/6 及び BALB/c SHL マウスを用いて、血漿中 TC と動脈硬化病変との関係を 4 ヶ月間検討した。4 ヶ月間の飼育期間中、2 系統のマウスにおいて動脈硬化面積率は飼育期間に応じて増加した (図 4-2a, 2b, 2c 及び 2d)。Western diet 給餌 C57BL/6 SHL マウスでは動脈硬化性病変の面積が指数関数的な増加が認められた一方、Western diet 給餌 BALB/c SHL マウスでは 4 ヶ月間を通じて直線的な増加を示した。従って、動脈硬化形成において、動脈硬化病変面積率と TC-AUC の間に直線関係が認められた Western diet 給餌 BALB/c SHL マウスを採用し以降の実験を実施することとした。

#### **BALB/c SHL マウスにおける JTP-109192 反復投与の影響**

12 週間の JTP-109192 (100 mg/kg) 反復投与期間中、摂餌量及び体重は増加し、Vehicle 群との間に差は認められなかった (図 4-3a, 図 4-3b)。JTP-109192 100 mg/kg 群の血漿中 TC 値は、投与開始後いずれの期間においても Vehicle 群に比べ低値を推移した ( $p < 0.01$ ) (図 4-3c)。組成分析により JTP-109192 100 mg/kg 群では非 HDL-C 値が有意に低下し、HDL-C 値が有意に上昇することが明らかになった ( $p < 0.01$ ) (図 4-3d 及び 3e)。JTP-109192 100 mg/kg 群の血漿中 TG 値は、投与 21 日目まで高値を示したが ( $p < 0.01$ )、以降は有意な変化は認められなかった (図 4-3f)。JTP-109192 100 mg/kg 群の血漿中グルコース及びインスリン値は、投与開始後いずれの期間においても有意な変化は認められなかった (図 4-3g 及び 3h)。解剖時の JTP-109192 100 mg/kg 群における肝コレステロール含量は低下を示した (図 4-3i)。

更に血漿中コレステロール値の低下が吸収抑制に基づくかを検討するため、糞中コレステロール量及び胆汁酸量を測定した。0~7 日目、21~28 日目及び 77~84 日目には、JTP-109192 100 mg/kg 群で糞中コレステロール含量が増加した ( $p < 0.01$ ) (図 4-4a)。21~28 日目、77~84 日目には、JTP-109192 100 mg/kg 群で糞中胆汁酸が減少した ( $p < 0.01$ ) (図 4-4b)。

## 粥状動脈硬化巣の定量化

マウスの粥状動脈硬化病変に対する JTP-109192 の改善作用を検討するため、胸部及び腹部大動脈の病理組織標本を作成し、脂肪沈着物を染色し粥状動脈硬化面積率を評価した。代表例を図に示す (図 4-5a)。Vehicle 群では、Western diet 給餌により粥状動脈硬化が大動脈全体の 9%以上の割合で進行した。一方、JTP-109192 100 mg/kg を投与することによって、動脈硬化面積率が有意に減少した (図 4-5b)。

## JTP-109192 誘導体投与によるリアルタイム qPCR 法を用いた mRNA 量の定量解析

GPR119 agonist が血漿コレステロール値を低下させ、動脈硬化病変を改善するメカニズムを推定するため、脂質代謝関連遺伝子の発現変化を検討した。JTP-109192 誘導体を単回混餌投与することにより、小腸上部及び大腸における *Abca1*, *Abcg5* 及び *Abcg8* の mRNA 発現量は増加した ( $p < 0.01$ ) (図 4-6a, 6b 及び 6c)。*Npc1l1* の mRNA 発現量は大腸で低値を示した (図 4-6d)。*Gpr119* 発現は小腸下部で低下した (図 4-6e)。

## 動脈硬化面積率と血漿中脂質パラメータの関係

予備検討及び JTP-109192 の作用検討から、3 群 (Western diet 給餌 BALB/c SHL マウス, 通常食給餌 BALB/c SHL マウス, Western diet 給餌 JTP-109192 投与 BALB/c SHL マウス) を抜粋し、TC-AUC 値と動脈硬化面積率との相関を検討したところ、TC-AUC 値は全群を通じて正の相関を示した ( $R^2=0.48$ ) (図 4-7a)。本研究における TG-AUC 値と動脈硬化面積率の相関を検討したが、両者に正相関は認められなかった (図 4-7b)。

## CaCO-2 細胞における *ABCA1* mRNA に対する作用

CaCO-2 細胞に JTP-109192 を 24 時間処置することで *ABCA1* mRNA の発現が増加した (図 4-8)。



図 4-1. SHL マウスの外観

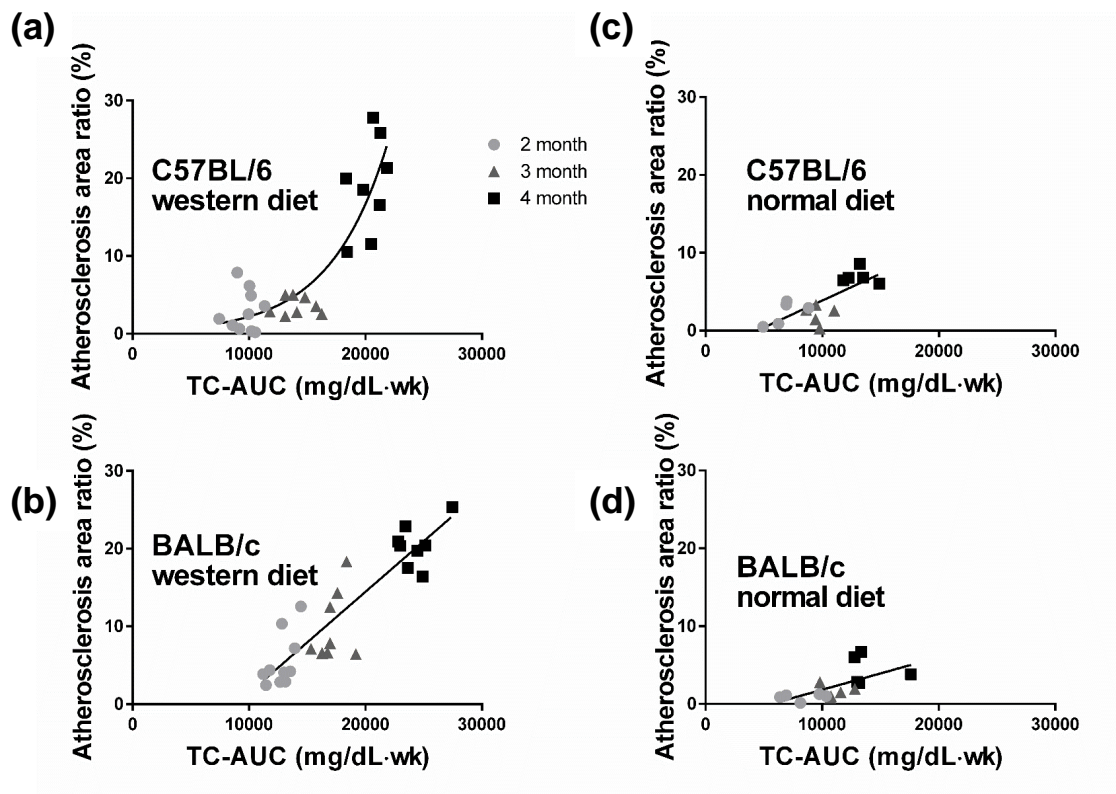


図 4-2. C57BL/6 及び BALB/c SHL マウスにおける動脈硬化面積率と TC-AUC 値の関係

- (a): Western diet 給餌 C57BL/6 SHL マウス
- (b): Western diet 給餌 BALB/c SHL マウス
- (c): 通常食給餌 C57BL/6 SHL マウス
- (d): 通常食給餌 BALB/c SHL マウス

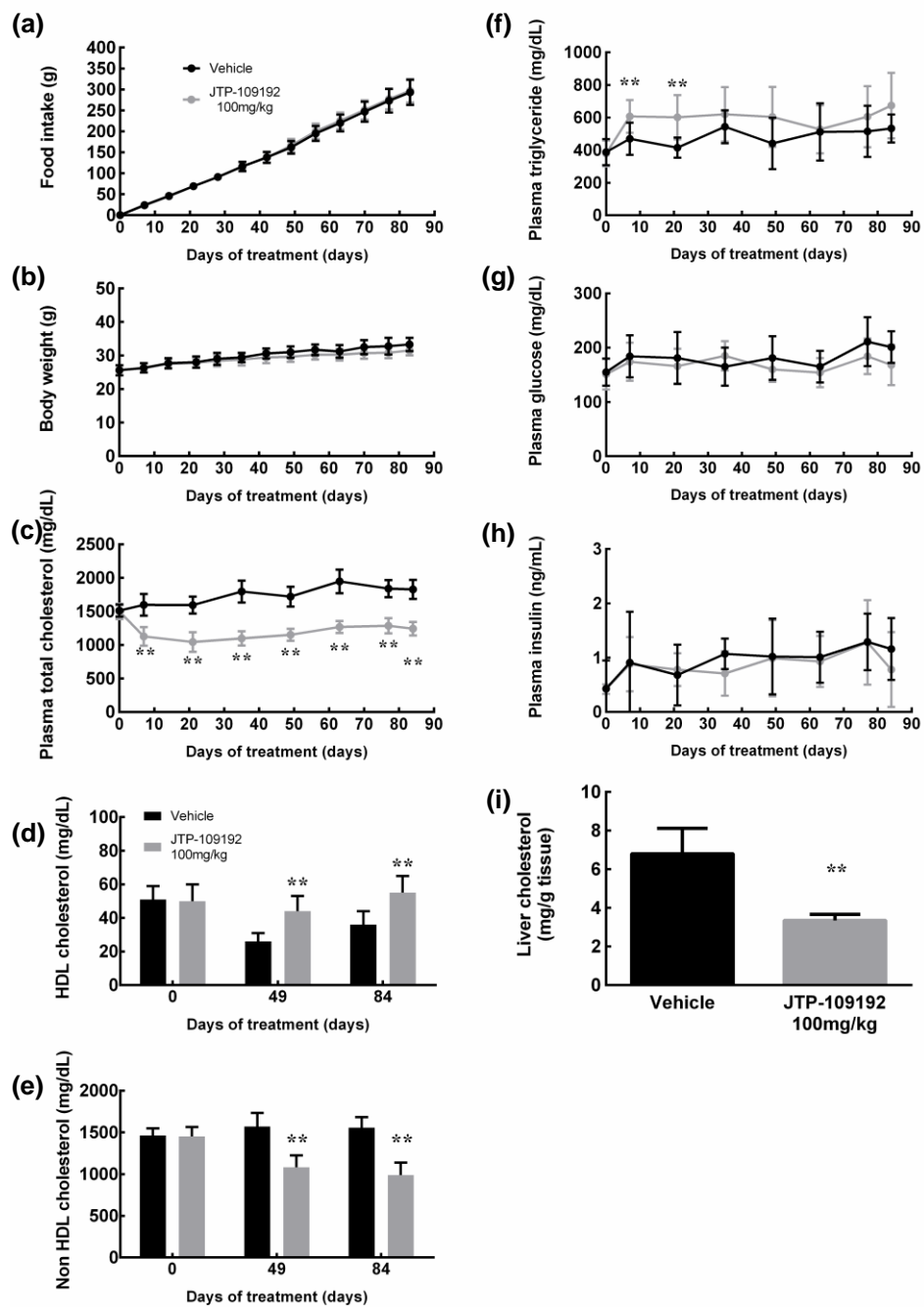


図 4-3. JTP-109192 の体重，摂餌量，血漿中パラメータ及び肝中コレステロール含量への作用

(a): 体重，(b): 摂餌量，(c): 血漿中 TC 値，(d): 血漿中 HDL-C 及び non-HDL-C 値，(e): 血漿中 TG 値，(f): 血漿中グルコース値，(g): 血漿中インスリン値，(h): 肝中コレステロール含量

\*\* :  $p < 0.01$  (Vehicle と JTP-109192 100 mg/kg との比較)

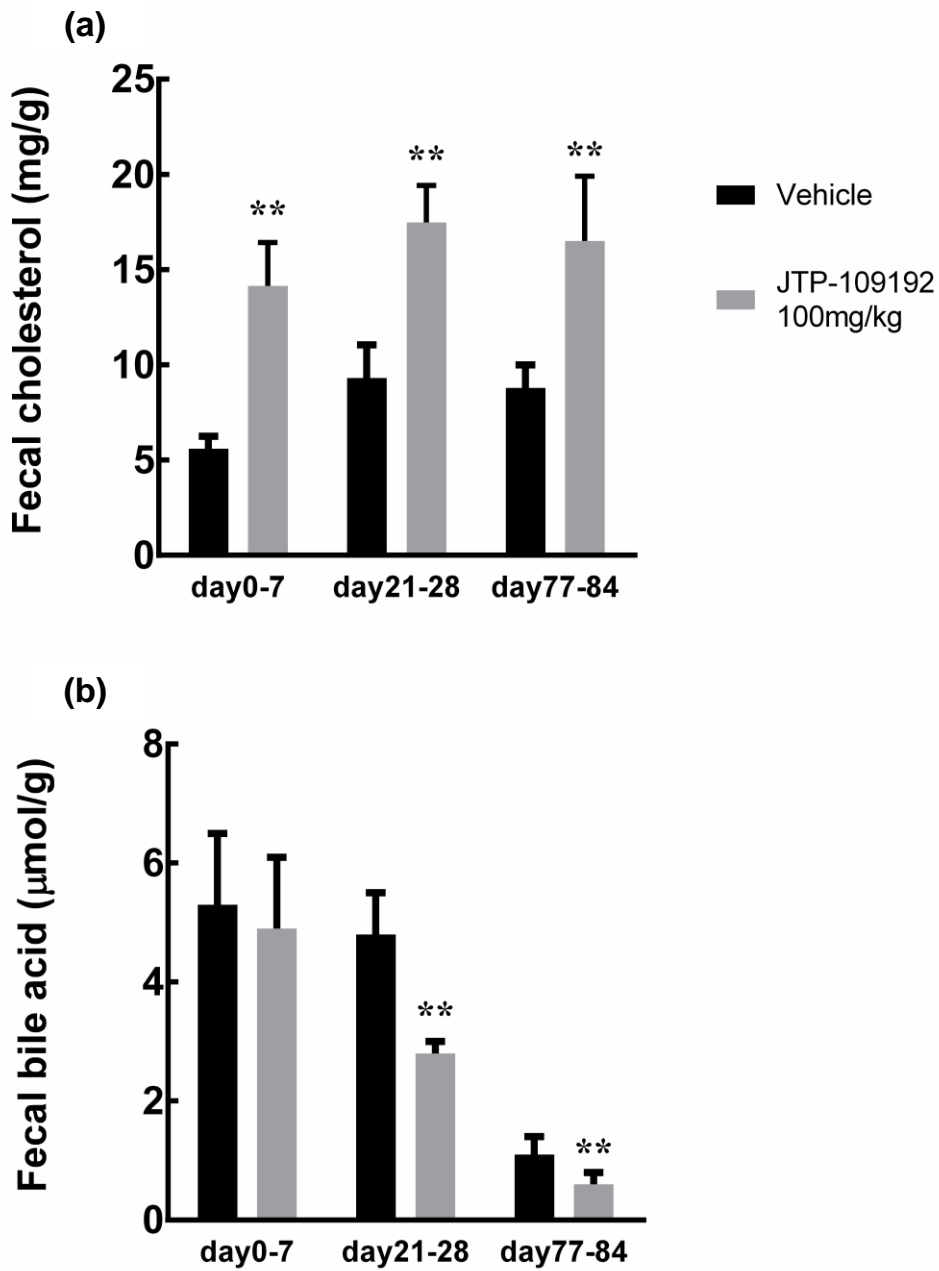


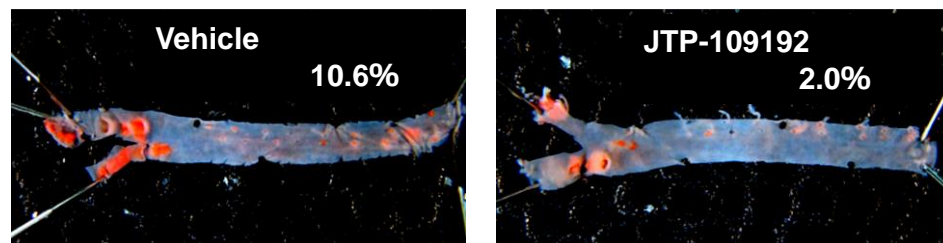
図 4-4. JTP-109192 による糞中コレステロール及び胆汁酸含量への作用

(a): 糞中コレステロール含量, (b): 糞中胆汁酸含量

\*\* :  $p < 0.01$  (Vehicle と JTP-109192 100 mg/kg との比較)



(a)



(b)

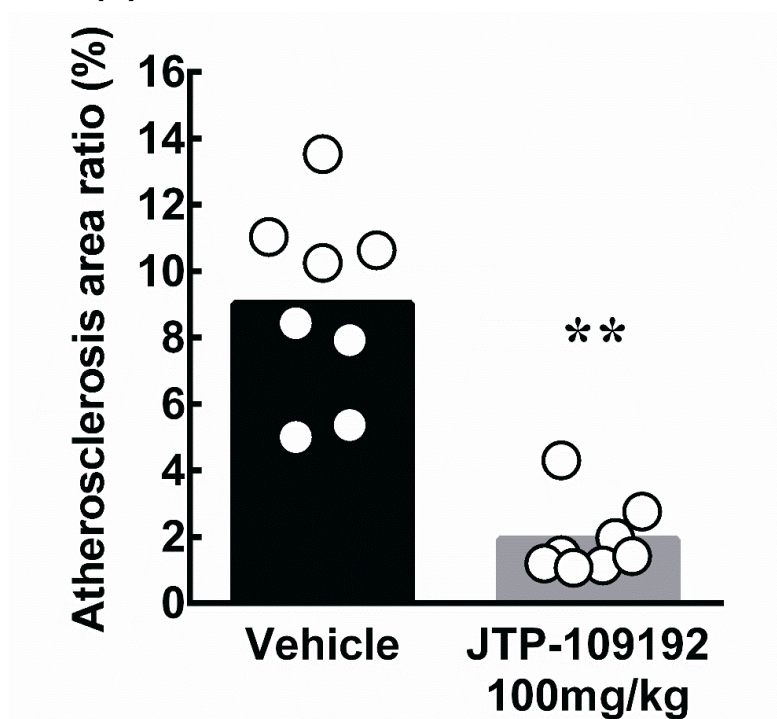


図 4-5. JTP-109192 による動脈硬化への作用

(a): 動脈硬化染色像 (典型例), (b): 動脈硬化面積率

\*\* :  $p < 0.01$  (Vehicle と JTP-109192 100 mg/kg との比較)

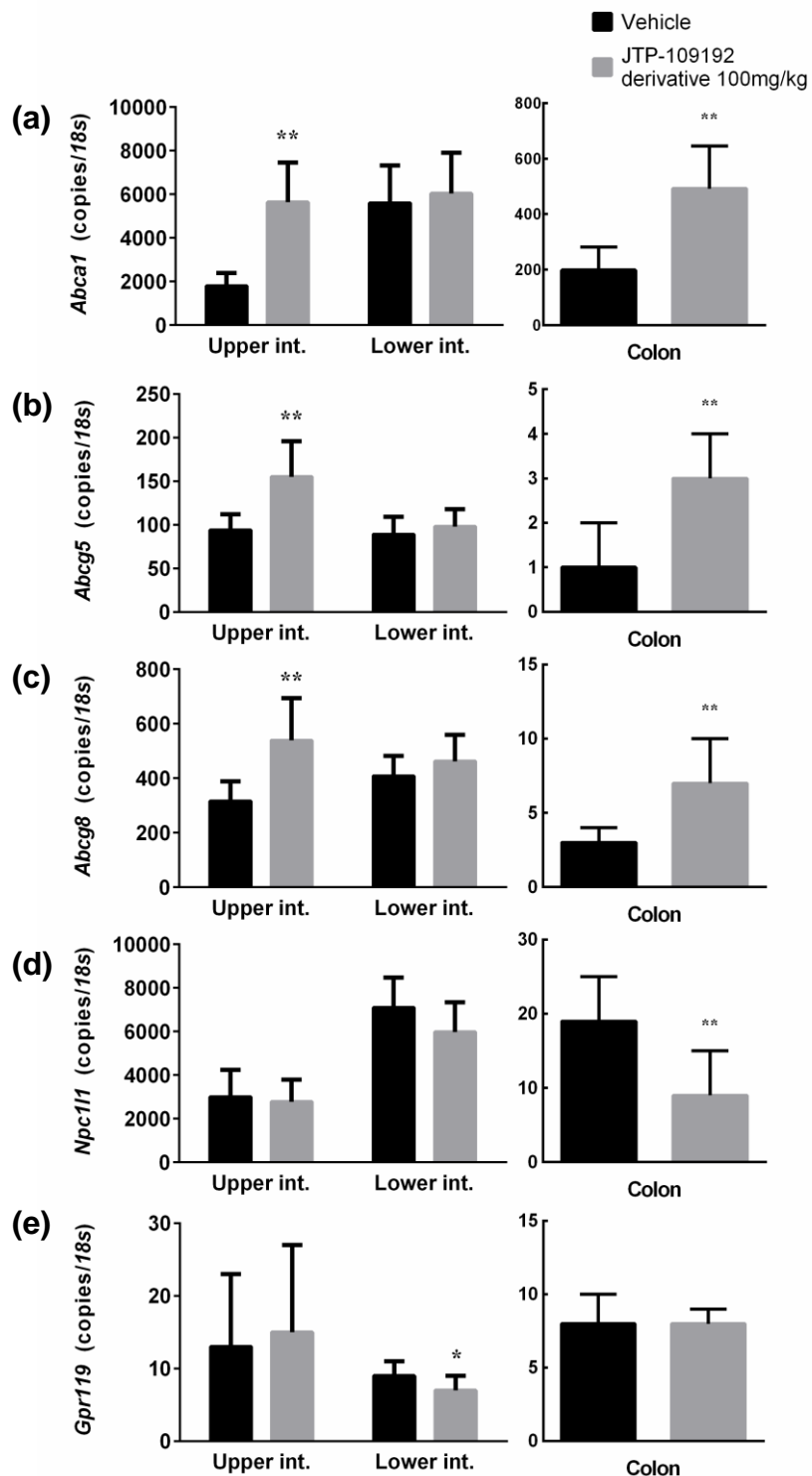


図 4-6. JTP-109192 誘導体単回投与における腸管 mRNA 発現への作用

(a): *Abca1*, (b): *Abcg5*, (c): *Abcg8*, (d): *Npc111*, (e): *Gpr119*

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  (Vehicle と JTP-109192 誘導体 100 mg/kg との比較)

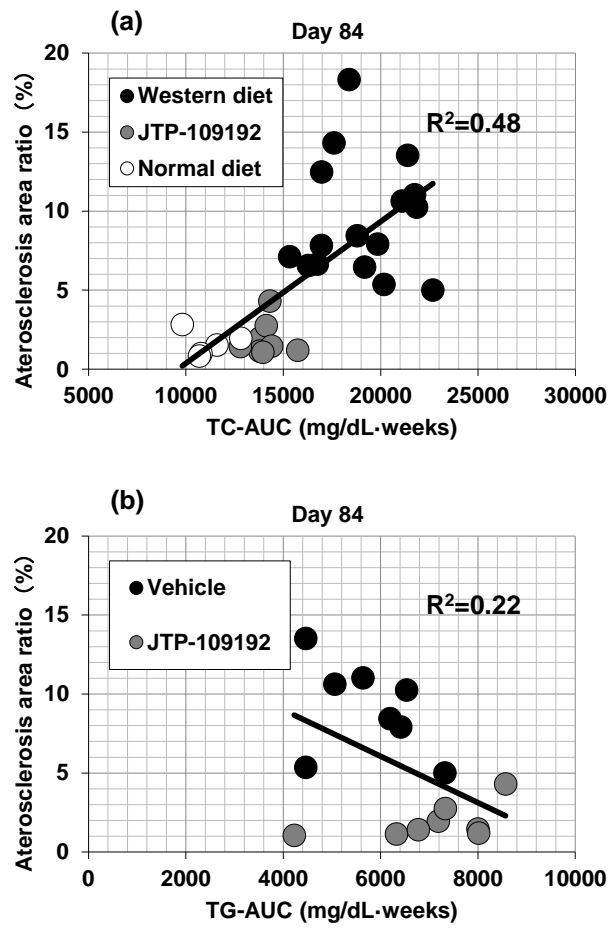


図 4-7. 動脈硬化面積率と血漿中脂質パラメータの関係

(a): 動脈硬化面積率と TC-AUC 値, (b): 動脈硬化面積率と TG-AUC 値

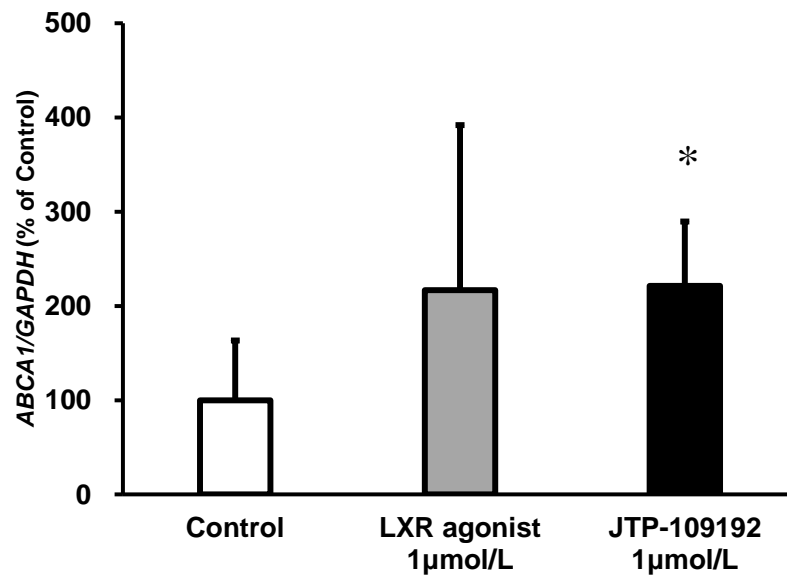


図 4-8. CaC02 細胞における JTP-109192 の *ABCA1* 発現への作用

\*:  $p < 0.05$  (Control と JTP-109192 1  $\mu\text{mol/L}$  との比較)

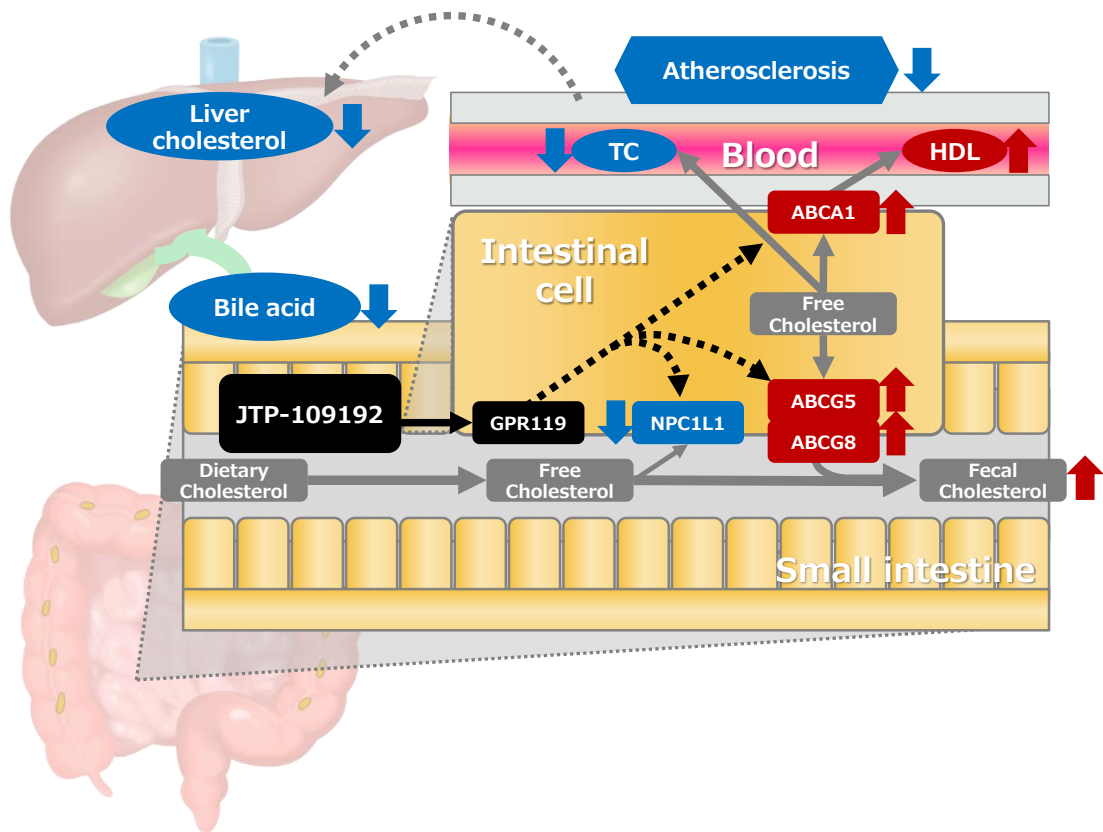


図 4-9. JTP-109192 の血漿中コレステロール低下作用と各種パラメータとの関係

本実験で増加又は上昇が認められたパラメータを赤色で、減少又は低下が認められたパラメータを青色で示した。JTP-109192 はコレステロール排泄促進を伴う血漿中脂質改善作用とそれに続く動脈硬化の予防作用を示した。JTP-109192 投与群において糞中胆汁酸及び肝中コレステロール含量の低下が認められた。JTP-109192 誘導体を用いた単回投与時の遺伝子発現解析により消化管コレステロール代謝遺伝子の変動が認められた。

#### 第4節 考察

動脈硬化は心血管疾患の主要な危険因子であり、高コレステロール血症は動脈硬化の重要な因子として知られている。一方、薬剤により血漿中コレステロール値を低下させた効果も十分に研究されており、「the lower, the better」の原則が知られている (Martin et al., 2012)。HMG-CoA 阻害薬であるスタチンは、高コレステロール血症の第一選択治療薬として世界中で広く使用されている。一方で、スタチンを増量して投与する強化療法にも関わらず心血管リスクは依然として高いままであることが明らかとなり残存リスクとして知られている。2015年に家族性高コレステロール血症を適応として PCSK9 抗体が発売されたが、生物由来製品であることによるコスト面から患者ニーズを満足する治療薬とは必ずしも言えず、希少疾患への適応があるのみなのが現状である。このように高コレステロール血症の治療には、新規の強力な低分子医薬品が必要であることが伺える。

本研究では、JTP-109192 の反復投与における抗動脈硬化作用の検討に先立ち、自然発生的に動脈硬化を発症する2系統の SHL マウス (C57BL/6 及び BALB/c バックグラウンド) を用い、血漿 TC 値と粥状動脈硬化病変の発症進展の関係を比較し、どちらの系統が JTP-109192 の薬効確認検討に適しているかを検討した。結果、C57BL/6 SHL マウスでは血漿中 TC 値の AUC に対し、動脈硬化病変の面積が指数関数的に増加したが、BALB/c SHL マウスでは直線的に増加した。BALB/c SHL マウスにおける粥状動脈硬化病変の進展は、血漿コレステロール値の上昇と密接に関係していると考えられる。これら2つの系統の比較は松島らによって報告されており (Matsushima et al., 2001)、BALB/c SHL マウスでは C57BL/6 SHL マウスと比較して大動脈の動脈硬化病変の進行が緩徐であることが示されている。また、白井らは、C57BL/6 及び BALB/c SHL マウスがそれぞれ Th1 型及び Th2 型のマウスであることを報告しており (Shirai et al., 2018)、C57BL/6 SHL

マウスの動脈硬化性病変の面積が指数関数的に増加した本実験結果は、動脈硬化発症進展に血漿中コレステロール以外の因子（炎症性サイトカイン等）が関与する可能性が推察された。BALB/c SHL マウスにおいて Vehicle 群では飼育期間に応じて動脈硬化病変面積が増加した一方、JTP-109192 を 12 週間投与することにより、血漿中 TC 値の減少、糞中コレステロール排泄量の増加及び動脈硬化病変面積の減少が認められた。糞中コレステロール排泄量の増加は吸収抑制又は排泄促進によるものと考えられた。下痢症状はコレステロールを含む消化管内容物を洗い流す可能性があると考えられるが、両群とも反復投与期間を通じて下痢症状は観察されなかった。糞中胆汁酸は、投与期間中盤から終盤にかけて増加した一方、投与初期において変化は認められなかったことから、本結果で認められた糞中胆汁酸の減少は、生体内コレステロールプールの減少による二次的な作用によるものであることが示唆された。実際に肝コレステロール含量は減少しており、この考察を支持するものと考えられた。JTP-109192 誘導体単回投与による遺伝子発現解析により、コレステロール低下作用及びそれに続く抗動脈硬化作用の作用機序の一部が明らかとなった。JTP-109192 誘導体を投与した SHL マウスの小腸上部及び大腸における *Abca1*, *Abcg5* 及び *Abcg8* mRNA の発現が増加した。*Abca1* は血中 HDL-C の増加に、後二者は食餌性コレステロールの排泄促進にそれぞれ寄与したと考えられた。本結果は、腸内 ABCA1 タンパク質発現の増加、粥状動脈硬化症に対する保護、ABCG5 タンパク質の減少を示した Hu らの報告 (Hu et al., 2014) と部分的に共通している。一方、我々の結果においては *Abcg5* mRNA の増加は興味深いものであるが、JTP-109192 のオフターゲット作用を示している可能性がある。また、大腸 *Npc1l1* mRNA 発現量は低下しており、血漿中コレステロール低下作用に寄与する可能性が示された。なお、本研究においては、SHL マウスに JTP-109192 誘導体を単回投与しても *Gpr119* 発現は増加しなかった。

本章及び第三章の結果より、JTP-109192 は抗糖尿病効果のみならず抗動脈硬化作用も有することから、JTP-109192 は多角的な作用を示す可能性がある有望な候補化合物

であると考えられる。しかし、抗糖尿病作用と抗動脈硬化作用を発揮する用量には 10 倍以上の乖離が認められている。この乖離の説明として、抗糖尿病作用を確認した種はラットである一方、抗動脈硬化作用はマウスを用いて検討しており、種差に基づく可能性が考えられる。第一章で示すとおり JTP-109192 はラット及びマウスにおいて種差なく強力なアゴニスト活性を示すが、肝ミクロソームにおける JTP-109192 の安定性はラットよりもマウスの方が低いことが明らかとなっている。加えて、本章の 3 ヶ月間の反復投与実験に先立ち、予備実験として SHL マウスに JTP-109192 を 10, 30 及び 100 mg/kg の 3 用量で 2 週間反復投与した結果、血漿中コレステロール値は用量依存的に低下し、100 mg/kg でその作用が最大となったことから、マウスにおける抗動脈硬化の最大作用を確認するためには少なくとも 100 mg/kg の用量は必要であると考えられた。予備検討及び JTP-109192 の作用検討における TC-AUC 値と動脈硬化面積率との間には全群を通じて正の相関を示したが、血漿 TG-AUC 値と動脈硬化面積率の相関を検討したところ、両者には正相関は見られなかった。従って、本モデル動物の動脈硬化の発症進展は血漿中 TC 値に大きく依存し、更に JTP-109192 投与群は乖離することなく正相関の範疇にあることから、JTP-109192 の動脈硬化改善効果の主たる機序はコレステロール低下作用に基づく可能性が考えられた。前章において耐糖能不全を示すインスリン抵抗性 ZF ラットにおける JTP-109192 の血漿中グルコース低下作用が示されたが、本モデル動物においては JTP-109192 投与による血漿中グルコース値及びインスリン値の影響はなかった。SHL マウスは食後高血糖を示さない病態モデル動物である可能性が考えられるものの、更なる検討が必要である。また、ヒトの外挿検討の一環としてヒト大腸がん細胞株 CaCO-2 に JTP-109192 を 24 時間処置することにより、*ABCA1* mRNA の発現が増加することを確認した。

JTP-109192 の抗動脈硬化作用の確度を高めるためには更なるデータ蓄積が必要であり、知見を深めることができるアプローチは以下のとおりと考えられる。動脈硬化面積



率の検討に加え、大動脈洞切片における動脈硬化性プラークの組成を検討することにより、多くの情報を得られる可能性がある。また、動脈硬化薬への直接作用を検討する目的で THP-1 マクロファージからのコレステロール引き抜きに対する作用の検討も有効であり、*Gpr119* 過剰発現モデルにおいて報告されている (Hu et al., 2014)。JTP-109192 の抗動脈硬化作用のヒトにおける有効性を見積もるための検証には、本試験系を用いて既存薬であるスタチンやエゼチミブ等の薬剤との比較試験が有効であると考えられる。また、先述の残存リスクといったアンメットメディカルニーズを満たす可能性を検証するためにも、これら薬剤と JTP-109192 との併用効果は重要であり今後の研究課題である。

以上より、JTP-109192 は SHL マウスの脂質代謝異常とそれに続く動脈硬化性病変を改善した。その作用機序の一つとして、消化管におけるコレステロール代謝遺伝子発現を調節することにより、糞中コレステロール排泄量を増加させた可能性があることが示された。活性及び特異性の高い低分子 GPR119 agonist を用いた抗動脈硬化作用の報告は、我々の知る限りではこれまでになく、JTP-109192 は抗糖尿病作用もあわせ持つ新規の脂質異常改善薬となり得ると考えられた。

## 第5節 要約

近年、*Gpr119* 過剰発現 *ApoE* 欠損動脈硬化症マウスにおいて、小腸及び肝臓中コレステロール輸送タンパクの発現上昇を伴う血中脂質及び炎症性サイトカインの低下とそれに続く粥状動脈硬化巣の改善が報告された。また、GPR119 の内因性リガンドである OEA が *ApoE* 欠損動脈硬化症マウスにおいて抗動脈硬化作用を示した。したがって、GPR119 agonist の新たな特徴として脂質異常症改善作用が考えられた。本章では、BALB/c 系統 SHL マウスを用い、JTP-109192 の脂質低下作用を12週間の混餌反復投与により検討した。その結果、JTP-109192 はコレステロール低下作用を示し、粥状動脈硬化の改善作用を示した。また、JTP-109192 のコレステロール低下作用とその後の抗動脈硬化作用は、腸内コレステロール代謝遺伝子発現の変化に起因することが明らかになった。

これらの結果から、JTP-109192 は脂質異常症治療のための新たな抗高コレステロール血症薬として期待される。

## 第5章 総括

2型糖尿病は、食生活の欧米化、過剰な糖質摂取、運動量減少等、近年におけるライフスタイルの変化を主な原因とし、世界人口の数%が罹患する広く知られた疾患である。その成因と病態については、遺伝因子又は環境因子あるいはその両方によりインスリン分泌能低下及びインスリン抵抗性が惹起され、インスリン作用が相対的に低下することにより高血糖に至ることが知られている。血糖降下薬については、非経口のインスリン製剤の他、経口血糖降下薬が上市されており病態進行に合わせた多剤併用が一般的であるが、長期的な薬効、副作用低減並びに他剤との併用のし易さについては必ずしも十分とは言えず、薬剤開発のニーズは依然高いものと考えられる。本研究における標的である GPR119 タンパクは主に小腸 L 細胞及び膵  $\beta$  細胞に発現する GPCR として発見された。内因性リガンドを用いた研究により cAMP 上昇を介して L 細胞では GLP-1 分泌を、 $\beta$  細胞ではインスリン分泌をそれぞれ促進することが知られている。そのインスリン分泌促進作用は糖濃度依存的であるため GPR119 を標的とした薬剤は、インスリン分泌を糖濃度非依存的に促進する SU 薬等とは異なり、低血糖リスクの少ない薬剤となる可能性がある。GPR119 agonist の SAR 及び本試験に用いた JTP-109192 の創製についてはこれまで原田らにより報告されている (Harada et al., 2018)。

本研究では、まず JTP-109192 の *in vitro* 及び *in vivo* における基礎的なプロファイルを明らかにした。JTP-109192 は、ヒト、ラット及びマウス GPR119 に対し、種差なく強力な cAMP 産生能を示した。JTP-109192 の糖濃度依存性インスリン分泌作用を INS-1E 細胞を用いて検討したところ、DMSO 処置群で糖濃度依存的なインスリン分泌が認められ、更に高グルコース条件においてのみ JTP-109192 のインスリン分泌促進作用が認められた。GLUTag 細胞を用いた GLP-1 分泌の検討においては、JTP-109192 は用量の増加に応じて GLP-1 分泌を促進した。続いて、カニューレーション処置 SD ラットを用

い、高血糖クランプ法により異なる血糖値（250 及び 400 mg/dL）に維持した際の JTP-109192 のインスリン分泌促進作用について検討したところ、JTP-109192 は血糖値の上昇に合わせてインスリン分泌の第一相及び第二相のいずれも促進したが、グルコース注入前の正常血糖域ではインスリン分泌促進作用を示さず、*in vivo*においても JTP-109192 のインスリン分泌促進は糖濃度依存的であることが明らかとなった。INS-1E 細胞及び SD ラットを用いた実験により、JTP-109192 は既存薬である SU 薬とは異なり、低血糖リスクの少ない薬剤である可能性が示された。

続いて、インスリン抵抗性モデル動物である ZF ラットを用いて、JTP-109192 を単回投与及び 6 週間反復経口投与した際の糖代謝への影響を検討した。GPR119 を含む GPCR agonist の開発においては、反復投与による薬効減弱（tachyphylaxis）の可能性が知られている。また、一般に反復投与による薬効持続性の検討は疾患領域に関わらず薬剤を開発するうえで重要であると考えられる。結果、JTP-109192 は単回投与 16 時間後においてグルコース投与後のインスリン分泌を促進することにより、耐糖能改善を示した。JTP-109192 を反復投与することにより、4 週間後における耐糖能試験では糖濃度依存的インスリン分泌の促進による耐糖能改善が認められた。6 週間後における高インスリン正常血糖クランプ法を用いた検討では、JTP-109192 はインスリン抵抗性を有意に改善し、肝糖産生を抑制した。JTP-109192 は 2 型糖尿病治療を目的とした長期投与での忍容性が高く、強力な新規血糖低下薬として有用である可能性が考えられた。

続いて、GPR119 agonist の脂質低下薬としての可能性を探索する目的で、自然発症 *ApoE* 遺伝子欠損により高脂血症を発現する SHL マウスを用い、JTP-109192 を約 12 週間反復投与し *in vivo* における同化合物の脂質代謝改善作用及びそれに続く動脈硬化の病理組織学的検討を実施した。結果、JTP-109192 を 12 週間投与することにより、血漿中 TC 値の減少、糞中コレステロール排泄量の増加及び動脈硬化病変面積の減少が認められた。JTP-109192 誘導体単回投与による遺伝子発現解析により、小腸上部及び大腸に

における *Abca1*, *Abcg5* 及び *Abcg8* mRNA の発現が増加し, それぞれ *Abca1* は血中 HDL-C の増加に, 後二者は食餌性コレステロールの排泄促進に寄与したと考えられ, コレステロール排泄促進作用及びそれに続く抗動脈硬化作用の作用機序の一部が明らかとなった。今後, 臨床で有効性を予測するための検証には, 本試験系において既存薬との比較試験や併用試験を実施することによりその可能性を推測できると考えられる。

以上より, JTP-109192 は抗糖尿病効果のみならず抗動脈硬化作用も有することから, JTP-109192 は代謝性疾患領域における多角的な作用を示す可能性がある有望な候補化合物であると考えられた。

## 謝辞

研究結果のとりまとめ及び論文作成にあたり，終始懇切丁寧なご指導，ご鞭撻を賜りました本学 山田宜永教授に心より感謝致します。

また本論文をご精読頂き，貴重なご意見を頂戴しました本学 杉山稔恵教授，中野優教授，山城秀昭准教授，放送大学新潟学習センター 新村末雄所長，京都大学大学院 太田毅教授に深謝致します。

最後に博士号取得に向けて背中を押し，常に支えてくれた妻と父母に深く感謝します。

## 引用文献

- Akyea, R. K., Kai, J., Qureshi, N., Iyen, B., and Weng, S. F. (2019). Sub-optimal cholesterol response to initiation of statins and future risk of cardiovascular disease. *Heart* **105**, 975-981.
- Amisten, S., Salehi, A., Rorsman, P., Jones, P. M., and Persaud, S. J. (2013). An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans. *Pharmacol Ther* **139**, 359-91.
- Arnett, D. K., Blumenthal, R. S., Albert, M. A., Buroker, A. B., Goldberger, Z. D., Hahn, E. J., Himmelfarb, C. D., Khera, A., Lloyd-Jones, D., McEvoy, J. W., Michos, E. D., Miedema, M. D., Munoz, D., Smith, S. C., Jr., Virani, S. S., Williams, K. A., Sr., Yeboah, J., and Ziaeian, B. (2019). 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* **140**, e596-e646.
- Baigent, C., Keech, A., Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R., Simes, R., and Collaborators, C. T. T. C. (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* **366**, 1267-78.
- Chu, Z. L., Carroll, C., Alfonso, J., Gutierrez, V., He, H., Lucman, A., Pedraza, M., Mondala, H., Gao, H., Bagnol, D., Chen, R., Jones, R. M., Behan, D. P., and Leonard, J. (2008). A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release. *Endocrinology* **149**, 2038-47.
- Drzazga, A., Sowińska, A., Krzemińska, A., Okruszek, A., Paneth, P., Koziolkiewicz, M., and Gendaszewska-Darmach, E. (2018). 2-OMe-lysophosphatidylcholine analogues are GPR119 ligands and activate insulin secretion from  $\beta$ TC-3 pancreatic cells: Evaluation of structure-dependent biological activity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1863**, 91-103.
- Edgerton, D. S., Johnson, K. M., Neal, D. W., Scott, M., Hobbs, C. H., Zhang, X., Duttaroy, A., and Cherrington, A. D. (2009). Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 by vildagliptin during glucagon-like Peptide 1 infusion increases liver glucose uptake in the conscious dog. *Diabetes* **58**, 243-9.
- Fan, A., Wu, X., Wu, H., Li, L., Huang, R., Zhu, Y., Qiu, Y., Fu, J., Ren, J., and Zhu, C. (2014). Atheroprotective effect of oleoylethanolamide (OEA) targeting

- oxidized LDL. *PLoS One* **9**, e85337.
- Gerstein, H. C., Miller, M. E., Byington, R. P., Goff, D. C., Bigger, J. T., Buse, J. B., Cushman, W. C., Genuth, S., Ismail-Beigi, F., Grimm, R. H., Probstfield, J. L., Simons-Morton, D. G., Friedewald, W. T., and Group, A. t. C. C. R. i. D. S. (2008). Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* **358**, 2545-59.
- Han, T., Lee, B. M., Park, Y. H., Lee, D. H., Choi, H. H., Lee, T., and Kim, H. (2018). YH18968, a Novel 1,2,4-Triazolone G-Protein Coupled Receptor 119 Agonist for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomol Ther (Seoul)* **26**, 201-209.
- Harada, K., Mizukami, J., Kadowaki, S., Matsuda, I., Watanabe, T., Oe, Y., Kodama, Y., Aoki, K., Suwa, K., Fukuda, S., Yata, S., and Inaba, T. (2018). Design and synthesis of novel and potent GPR119 agonists with a spirocyclic structure. *Bioorg Med Chem Lett* **28**, 1228-1233.
- Harris, M. I. (1993). Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues. *Diabetes Care* **16**, 642-52.
- Heart Protection Study Collaborative Group (2002). MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **360**, 7-22.
- Holman, R. R., Paul, S. K., Bethel, M. A., Matthews, D. R., and Neil, H. A. (2008). 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* **359**, 1577-89.
- Hothersall, J. D., Bussey, C. E., Brown, A. J., Scott, J. S., Dale, I., and Rawlins, P. (2015). Sustained wash-resistant receptor activation responses of GPR119 agonists. *Eur J Pharmacol* **762**, 430-42.
- Hu, Y. W., Yang, J. Y., Ma, X., Chen, Z. P., Hu, Y. R., Zhao, J. Y., Li, S. F., Qiu, Y. R., Lu, J. B., Wang, Y. C., Gao, J. J., Sha, Y. H., Zheng, L., and Wang, Q. (2014). A lincRNA-DYNLRB2-2/GPR119/GLP-1R/ABCA1-dependent signal transduction pathway is essential for the regulation of cholesterol homeostasis. *J Lipid Res* **55**, 681-97.
- Jequier, E. (2002). Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* **967**, 379-88.
- Jia, L., Betters, J. L., and Yu, L. (2011). Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annu Rev Physiol* **73**, 239-59.
- Kerru, N., Singh-Pillay, A., Awolade, P., and Singh, P. (2018). Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *Eur J Med Chem* **152**, 436-488.



- Kosmas, C. E., Martinez, I., Sourlas, A., Bouza, K. V., Campos, F. N., Torres, V., Montan, P. D., and Guzman, E. (2018). High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs Context* **7**, 212525.
- Lauffer, L. M., Iakoubov, R., and Brubaker, P. L. (2009). GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* **58**, 1058-66.
- Martin, S. S., Blumenthal, R. S., and Miller, M. (2012). LDL cholesterol: the lower the better. *Med Clin North Am* **96**, 13-26.
- Matsushima, Y., Sakurai, T., Ohoka, A., Ohnuki, T., Tada, N., Asoh, Y., and Tachibana, M. (2001). Four strains of spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice: phenotypic distinctions determined by genetic backgrounds. *J Atheroscler Thromb* **8**, 71-9.
- McKillop, A. M., Moran, B. M., Abdel-Wahab, Y. H., and Flatt, P. R. (2013). Evaluation of the insulin releasing and antihyperglycaemic activities of GPR55 lipid agonists using clonal beta-cells, isolated pancreatic islets and mice. *Br J Pharmacol* **170**, 978-90.
- Nunez, D. J., Bush, M., Collins, D., McMullen, S., Gillmor, D., Poss, G., Schott, R., and Feldman, P. (2012). Novel and profound lipid effects of GSK1292263, a potent and selective GPR119 agonist, in dyslipidemic subjects. *Circulation* **126**, A9918.
- Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* **101**, 1354-61.
- Ouchi, Y., Sasaki, J., Arai, H., Yokote, K., Harada, K., Katayama, Y., Urabe, T., Uchida, Y., Hayashi, M., Yokota, N., Nishida, H., Otonari, T., Arai, T., Sakuma, I., Sakabe, K., Yamamoto, M., Kobayashi, T., Oikawa, S., Yamashita, S., Rakugi, H., Imai, T., Tanaka, S., Ohashi, Y., Kuwabara, M., and Ito, H. (2019). Ezetimibe Lipid-Lowering Trial on Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in 75 or Older (EWTOPIA 75): A Randomized, Controlled Trial. *Circulation* **140**, 992-1003.
- Phillips, M. S., Liu, Q., Hammond, H. A., Dugan, V., Hey, P. J., Caskey, C. J., and Hess, J. F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* **13**, 18-9.

- Riddy, D. M., Delerive, P., Summers, R. J., Sexton, P. M., and Langmead, C. J. (2018). G Protein-Coupled Receptors Targeting Insulin Resistance, Obesity, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmacol Rev* **70**, 39-67.
- Shah, P., Glueck, C. J., Jetty, V., Goldenberg, N., Rothschild, M., Riaz, R., Duhon, G., and Wang, P. (2016). Pharmacoeconomics of PCSK9 inhibitors in 103 hypercholesterolemic patients referred for diagnosis and treatment to a cholesterol treatment center. *Lipids Health Dis* **15**, 132.
- Shirai, R., Sato, K., Yamashita, T., Yamaguchi, M., Okano, T., Watanabe-Kominato, K., Watanabe, R., Matsuyama, T. A., Ishibashi-Ueda, H., Koba, S., Kobayashi, Y., Hirano, T., and Watanabe, T. (2018). Neopterin Counters Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* **7**.
- Sloop, K. W., Emmerson, P. J., Statnick, M. A., and Willard, F. S. (2018). The current state of GPCR-based drug discovery to treat metabolic disease. *Br J Pharmacol* **175**, 4060-4071.
- Steele, R. (1959). Influences of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output. *Ann N Y Acad Sci* **82**, 420-30.
- Toth, P. P. (2003). Reverse cholesterol transport: high-density lipoprotein's magnificent mile. *Curr Atheroscler Rep* **5**, 386-93.
- Usui, R., Yabe, D., Fauzi, M., Goto, H., Botagarova, A., Tokumoto, S., Tatsuoka, H., Tahara, Y., Kobayashi, S., Manabe, T., Baba, Y., Kurosaki, T., Herrera, P. L., Ogura, M., Nagashima, K., and Inagaki, N. (2019). GPR40 activation initiates store-operated Ca(2+) entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic beta-cells. *Sci Rep* **9**, 15562.
- Wang, J., Carrillo, J. J., and Lin, H. V. (2016). GPR142 Agonists Stimulate Glucose-Dependent Insulin Secretion via Gq-Dependent Signaling. *PLoS One* **11**, e0154452.
- Yang, J. W., Kim, H. S., Choi, Y. W., Kim, Y. M., and Kang, K. W. (2018). Therapeutic application of GPR119 ligands in metabolic disorders. *Diabetes Obes Metab* **20**, 257-269.
- Yang, J. W., Kim, H. S., Im, J. H., Kim, J. W., Jun, D. W., Lim, S. C., Lee, K., Choi, J. M., Kim, S. K., and Kang, K. W. (2016). GPR119: a promising target for nonalcoholic fatty liver disease. *FASEB J* **30**, 324-35.
- Yang, M., Wang, J., Wu, S., Yuan, L., Zhao, X., Liu, C., Xie, J., Jia, Y., Lai, Y., Zhao, A. Z., Boden, G., Li, L., and Yang, G. (2017). Duodenal GLP-1 signaling regulates hepatic glucose production through a PKC-delta-dependent neurocircuitry. *Cell Death Dis* **8**, e2609.

- 梶波康二 (2017). スタチン不耐に関するステートメント. 日本動脈硬化学会.
- 国際糖尿病連合 (2017). 糖尿病アトラス第 8 版.
- 小林正, 山崎勝也, 薄井勲 (2006). わが国における 2 型糖尿病患者の治療実態 -6, 471 例を対象としたアンケート調査成績-. *Diabetes Frontier* **17**, 379-383.
- 国立国際医療研究センター糖尿病情報センターHP 低血糖.
- 篁俊成 (2013). 糖尿病発症における臓器の役割. *糖尿病* **56**, 409-412.
- 西勇一 (2013). 血糖改善作用のメカニズム. *糖尿病* **56**, 727-729.
- 日本糖尿病学会 (2018). 糖尿病治療ガイド 2018-2019.
- 日本動脈硬化学会 (2017). 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017 年版.
- 平成 28 年「国民健康・栄養調査」 (2017). 厚生労働省.

## Summary

Type 2 diabetes mellitus is a well-known disease with effects on several percent of the world's population being due to recent changes in lifestyle factors, including the westernization of dietary habits, excessive sugar intake, and reduced physical activity. It is known that genetic or environmental factors, or both, induce a decrease in insulin secretion and insulin resistance, leading to hyperglycemia stemming from a relative lack of insulin action. In addition to non-oral insulin, oral hypoglycemic agents are available on the market and are generally used in combination with other hypoglycemic agents as the disease progresses. The target protein, GPR119, was found to be a GPCR that is mainly expressed in small intestinal L cells and pancreatic  $\beta$ -cells. It has been shown in *in vivo* ligand studies that GPR119 promotes GLP-1 secretion in L cells and insulin secretion in  $\beta$ -cells via elevated cAMP. Considering that GPR119-targeted drugs enhance insulin secretion in a glucose concentration-dependent manner, they have the potential to reduce the risk of hypoglycemia, unlike SUs and other drugs that promote insulin secretion in a glucose concentration-independent manner.

The SAR of GPR119 agonist and the development of JTP-109192, which was used in this study, have been previously reported by Harada and colleagues. In the present study, we first characterized the basic profile of JTP-109192 *in vitro* and *in vivo*, and found that JTP-109192 stimulated cAMP production against human, rat, and mouse GPR119 without specific difference. An examination of the effect of JTP-109192 on insulin secretion in INS-1E cells showed a glucose-dependent insulin secretion effect in the DMSO-treated group and a stimulatory effect of

JTP-109192 on insulin secretion only under high glucose conditions. In the study of GLP-1 secretion in GLUTag cells, JTP-109192 promoted GLP-1 secretion in a dose dependent manner. Then, in cannulated SD rats maintained at different blood glucose levels (250 and 400 mg/dL) by the hyperglycemic clamp method, JTP-109192 promoted first- and second-phase insulin secretions in response to the increase in blood glucose level. On the other hand, JTP-109192 did not promote insulin secretion in the normoglycemic range before glucose infusion, indicating that the promotion of insulin secretion by JTP-109192 was dependent on the glucose concentration *in vivo*. These results suggest that JTP-109192 could be a potential candidate drug with a low risk of hypoglycemia, in contrast to existing SUs.

Next, we evaluated the effects of single and repeated oral administration of JTP-109192 on glucose metabolism in ZF rats, a model of insulin resistance, to address concerns about possible tachyphylaxis to GPCR agonists, including GPR119. In addition, it is generally considered important to examine the durability of the response after repeated administration to develop a drug, regardless of the disease for which it is used. Improved glucose tolerance was demonstrated by enhanced insulin secretion after glucose administration at 16 hours following a single JTP-109192 administration and by enhanced glucose-dependent insulin secretion after repeated administration of JTP-109192 at 4 weeks. In addition, using a hyperinsulinemic euglycemic clamp method, we showed that 6 weeks of JTP-109192 administration significantly improved insulin sensitivity and suppressed hepatic glucose production. The potential of GPR119 agonist as a glucose-lowering compound was also suggested.

To explore the potential of GPR119 agonist as a lipid-lowering agent, we administered JTP-109192 as a food admixture for approximately 12 weeks to SHL mice with spontaneous *ApoE* gene deletion. JTP-109192 for 12 weeks treatment decreased plasma TC levels, increased fecal cholesterol excretion, and reduced the area of atherosclerotic lesions. The gene expression analysis of a single dose of JTP-109192 derivative showed that *Abca1*, *Abcg5*, and *Abcg8* gene expressions were increased. The former gene and the latter two genes were thought to contribute to the increase in blood HDL-C and promotion of dietary cholesterol excretion, respectively. Thus, a part of the mechanism of JTP-109192's lipid-lowering effect was clarified.

In this study, possible clinical efficacy can be assessed by comparing JTP-109192 with existing drugs or by conducting a combination study. These results suggest that JTP-109192 is a promising candidate compound with multifaceted effects on metabolic diseases, as it has not only anti-diabetic but also anti-atherosclerotic effects.