

氏名（本籍）	すずきまさゆき 鈴木昌幸（東京都）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	乙第 858 号
学位授与の日付	平成 26 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Pharmacological profile of tofogliflozin, a novel SGLT2 inhibitor, in preclinical studies （新規 SGLT2 阻害剤トホグリフロジンの前臨床薬効評価）

論文審査委員	（主査）教授 田代 文夫
	教授 山登 一郎 教授 村上 康文
	教授 西山 千春 准教授 樋上 賀一

論文内容の要旨

ヒトを含む高等生物では血糖値は消化管、膵臓、肝臓、骨格筋、脂肪、腎臓および中枢神経系によって厳密に制御されており、これらの臓器は糖尿病治療の標的としても重要である。腎臓の糖代謝における主要な役割としては、絶食が持続した場合の糖新生や尿細管でのグルコース再吸収があるが、このうち特に尿細管でのグルコース再吸収は血糖維持に重要な役割を担っている。健康成人では 1 日約 180 g のグルコースが糸球体で濾過されるが、それらのほぼ全てが尿細管で再吸収され、食後の高血糖時にもグルコースは尿中には排泄されない。

ヒトの糖輸送体としてはナトリウムの濃度勾配を機動力とし、ナトリウムと糖類を共輸送する sodium glucose cotransporter (SGLT) family (SGLT1-6 と sodium myo-inositol cotransporter 1: SMIT1) と糖類の受動輸送を担う facilitated glucose transporter (GLUT) family (GLUT1-13) が知られるが、これらの中で腎尿細管に発現し、主にグルコースを輸送する輸送体は SGLT1, SGLT2, GLUT1, GLUT2 である。遺伝的 SGLT2 機能不全による家族性腎性糖尿家系では尿糖排泄が健康成人のグルコース濾過量に近いレベルまで達する患者が確認されており、SGLT2 が腎グルコース再吸収調節機構の主体であると考えられている。このため SGLT2 は、その輸送能を阻害することで糖尿病患者の高血糖改善を

実現し得る標的として注目されている。

Tofogliflozin (トホグリフロジン) は中外製薬 (株) が創製した SGLT2 阻害剤で、これまでに 2 型糖尿病を適応とした治験で尿糖排泄促進作用と血糖低下作用、体重減少作用を有することが確認されている。2014 年 3 月 24 日にサノフィ (株) および興和 (株) が本薬剤の 2 型糖尿病を適応とした製造販売承認を厚生労働省から取得し (商品名: アプルウェイ錠 20mg、デベルザ錠 20mg)、本薬剤は体重減少を伴う経口血糖降下薬として糖尿病治療に貢献するものと期待されている。

本研究では、トホグリフロジンの前臨床薬効プロファイルを検討し、糖尿病治療薬としての有用性を明らかにする目的で、以下の 3 つの検討を行った。

- (1) in vitro における SGLT2 阻害特性と糖尿病モデル動物における基本薬効の検討
- (2) 肥満モデル動物における体重減少メカニズムの検討
- (3) 尿路感染症出現メカニズムの検討

- (1) in vitro における SGLT2 阻害特性と糖尿病モデル動物における基本薬効の検討

ヒトまたはラット、マウス SGLT2 を強制発現させた CHO 細胞の Na⁺ 依存的なグルコースアナログ (methyl- α -D-[U-¹⁴C] glucopyranoside) 取り込み活性評価系で、トホグリフロジンは SGLT2 を拮抗阻害した (*K_i* 値 2.9, 14.9, 6.4 nM)。ヒト SGLT subtype (SGLT1, SGLT3, SGLT4, SGLT6, SMIT) に対する阻害活性を同様の評価系で評価した結果、ヒト SGLT2 選択性は SGLT1, SGLT3, SGLT4, SGLT6, SMIT に対してそれぞれ 2900、19000、1500、6200、28000 倍だった。細胞のグルコース取り込みやグルコース酸化、グリコゲン合成、肝グルコース産生、インスリン分泌、グルコシダーゼ活性等の in vitro 糖代謝関連反応に対する阻害は認められなかった。各種受容体に対するリガンド結合活性に対する阻害も認められなかった。これらの結果から、トホグリフロジンは特異性の高い SGLT2 阻害剤であることが確認された。

動物モデルでの検討は 4 つの評価系で実施した。1) 肥満 2 型糖尿病モデルである ZDF rat への単回経口投与 (0.1-10mg/kg) で、用量依存的にグルコース腎排泄クリアランス値が亢進し、血糖が低下した。2) db/db mouse への 4 週間反復経口投与 (0.1-10 mg/kg) で、用量依存的に血糖および糖化ヘモグロビンを低下させ、投与終了 3 日後の耐糖能を改善した。3) 非肥満型 2 型糖尿病モデルである GK rat へのミール負荷試験では、単回経口投与 (1-10mg/kg) で血糖値上昇を用量依存的に抑制した。4) 正常血糖に対する作用を評価する目的で正常動物である Wistar rat に単回経口投与 (0.1-10 mg/kg) した場合には、血糖低下は認められなかった。トホグリフロジンは糖尿病モデル動物において尿糖排泄を促進することで血糖を低下させ、病態を改善する一方で、正常動物においては低血糖を誘発しないことが確認された。

(2) 肥満モデル動物における体重減少メカニズムの検討

肥満モデル動物（高脂肪食負荷肥満ラット：DIO rat）と肥満型糖尿病モデル動物（KKAy mouse）において、トホグリフロジンの体重に対する作用を検討した。

DIO rat では、9 週間混餌投与により尿糖排泄が促進され、体重増加が抑制された。摂餌量は増加し、エネルギー消費は変化しなかったが、尿糖排泄促進によるエネルギー消失が摂餌量の増加を上回ったため、推定エネルギー収支は低下した。CT スキャンや解剖による体組成の解析では、主に脂肪組織が減少し、骨や体幹には変化が認められなかった。代謝測定では呼吸商の低下が、血液生化学値の測定では血中トリグリセライドの低下と総ケトン体の上昇が確認された。血中レプチン濃度が低下すると同時に、腸管膜脂肪組織の病理解析では脂肪細胞の肥大化と炎症性細胞（CD68 陽性細胞）の組織内への浸潤が抑制された。

KKAy mouse における 3 または 5 週間混餌投与では、血糖が低下し、体重増加が抑制された。この際、体水分含量には変化は認められなかったが、肝重量と肝トリグリセリド含量が低下した。インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンとの併用では、ピオグリタゾン誘導性の体重増加を抑制し、より強い血糖降下作用を示した。

これらの結果から、トホグリフロジンは主に尿糖排泄促進によるエネルギー消失により体重減少を誘導することが示唆された。さらに代謝を糖代謝から脂肪酸代謝に移行することで、脂肪組織や肝臓への脂肪の蓄積と炎症反応の誘導を抑制する可能性が示された。トホグリフロジンには、高血糖だけでなく肥満や脂肪肝、インスリン抵抗性を改善できる可能性がある。

(3) 尿路感染症出現メカニズムの検討

糖尿病患者において尿路感染症の出現リスクが高いことが報告されているが、尿糖と尿路感染症の関係は明確になっていない。SGLT2 阻害剤の尿糖排泄促進作用と尿路感染発症リスクの関係について C57BL mouse を用いた実験系を用いて検討した。

Candida albicans を膀胱内に注入した翌日から数日間 SGLT2 阻害剤を経口投与（1 回/日）し、6 日後に安楽死処置後のマウスから腎臓を摘出し、腎臓内の *C. albicans* の細胞数を測定することで上行性尿路感染の進展を評価した。SGLT2 阻害剤ダパグリフロジン（10 mg/kg を 2、3 または 6 日間投与、0.1、1 または 10 mg/kg を 3 日間投与）を用いた検討では、投与期間と投与用量に依存して腎臓内の *C. albicans* の細胞数が増加した。SGLT2 阻害剤（ダパグリフロジン、カナグリフロジンまたはトホグリフロジン）を 10 mg/kg で 3 日間投与した際には、ダパグリフロジン投与群とカナグリフロジン投与群では腎臓内の *C. albicans* の細胞数が有意に上昇したが、トホグリフロジン投与群では上昇は認められなかった。一方、これらの SGLT2 阻害剤（10 mg/kg）を C57BL mouse に単回投与した際の尿糖濃度は、ダパグリフロジン投与群とカナグリフロジン投与群では投与後 24 時間まで、

トホグリフロジン投与群では投与後 12 時間まで有意に上昇した。

これらの結果から、尿路感染発症リスクは尿糖濃度上昇の持続時間に依存することが示唆された。

以上の前臨床における検討から、トホグリフロジンは尿糖排泄促進により血糖降下作用を発揮すると同時に、肥満や脂肪肝、インスリン抵抗等の改善作用も併せ持つ可能性があることが確認された。また、SGLT2 特異性が高いことから SGLT2 以外の分子標的に対する作用が誘発する低血糖や予期せぬ副作用の出現リスクが低く、血中半減期が短いことから尿路感染発症リスクも低いものと考えられた。トホグリフロジンは副作用リスクが低く、血糖降下以外の病態改善作用も併せ持つ経口血糖降下薬として、2 型糖尿病治療に貢献できるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

Sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) は主に腎尿細管でのグルコース再吸収を担うトランスポーターで、その輸送能を阻害することで糖尿病患者の高血糖改善を実現し得る標的として注目される分子である。Tofogliflozin (トホグリフロジン) は中外製薬 (株) が創製した SGLT2 阻害剤で、これまでに 2 型糖尿病を適応とした治験で尿糖排泄促進作用と血糖低下作用、体重減少作用を有することが確認されている。本研究では、トホグリフロジンの前臨床薬効プロファイルを検討し、糖尿病治療薬としての有用性を明らかにする目的で、1) *in vitro* における SGLT2 阻害特性と糖尿病モデル動物における基本薬効、2) 肥満モデル動物における体重減少メカニズム、3) 尿路感染症出現メカニズムについて解析を行った。

(1) *in vitro* における SGLT2 阻害特性と糖尿病モデル動物における基本薬効の解析

ヒトまたはラット、マウス SGLT2 を強制発現させた CHO 細胞の Na⁺ 依存的なグルコースアナログ (methyl- α -D-[U-¹⁴C] glucopyranoside) 取り込み活性評価系で、トホグリフロジンは SGLT2 を拮抗阻害した。ヒト SGLT subtype (SGLT1, SGLT3, SGLT4, SGLT6, SMIT) に対する阻害活性の解析では、ヒト SGLT2 選択性は SGLT1, SGLT3, SGLT4, SGLT6, SMIT に対してそれぞれ 2900, 19000, 1500, 6200, 28000 倍だった。細胞のグルコース取り込みやグルコース酸化、グリコゲン合成、肝グルコース産生、インスリン分泌、グルコシダーゼ活性等の *in vitro* 糖代謝関連反応に対する阻害は認められなかった。各種受容体に対するリガンド結合活性に対する阻害も認められなかった。これらの結果から、トホグリフロジンは特異性の高い SGLT2 阻害剤であることを明らかにしている。

動物モデルでの検討は 4 つの評価系で実施した。1) 肥満 2 型糖尿病モデルである ZDF rat への単回経口投与 (0.1-10mg/kg) で、用量依存的にグルコース腎排泄クリアランス値が亢進し、血糖が低回経口投与 (0.1-10 mg/kg) で、用量依存的にグルコース腎排泄クリアランス値が亢進し、血糖が低下した。2) db/db mouse への 4 週間反復経口投与 (0.1-10 mg/kg) で、用量依存的に血糖および糖化ヘモグロビンを低下させ、投与終了 3 日後の耐糖能を改善した。3) 非肥満型 2 型糖尿病モデル

である GK rat へのミール負荷試験では、単回経口投与（1-10 mg/kg）で血糖値上昇を用量依存的に抑制した。4) 正常血糖に対する作用を評価する目的で正常動物である Wistar rat に単回経口投与（0.1-10 mg/kg）した場合には、血糖低下は認められなかった。これらのことより、トホグリフロジンは糖尿病モデル動物において尿糖排泄を促進することで血糖を低下させ、病態を改善する一方で、正常動物においては低血糖を誘発しないことを明らかにしている。

(2) 肥満モデル動物における体重減少メカニズムの解析

DIO rat では、9 週間混餌投与により尿糖排泄が促進され、体重増加が抑制された。摂餌量は増加し、エネルギー消費は変化しなかったが、尿糖排泄促進によるエネルギー消失が摂餌量の増加を上回ったため、推定エネルギー収支は低下した。CT スキャンや解剖による体組成の解析では、主に脂肪組織が減少し、骨や体幹には変化が認められなかった。代謝測定では呼吸商の低下が、血液生化学値の測定では血中トリグリセライドの低下と総ケトン体の上昇が確認された。血中レプチン濃度が低下すると同時に、腸管膜脂肪組織の病理解析では脂肪細胞の肥大化と炎症性細胞（CD68 陽性細胞）の組織内への浸潤が抑制された。KKAy mouse における 3 または 5 週間混餌投与では、血糖が低下し、体重増加が抑制された。この過程では体水分含量には変化は認められなかったが、肝重量と肝トリグリセリド含量が低下した。インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンとの併用では、ピオグリタゾン誘導性の体重増加を抑制し、より強い血糖降下作用を示した。

これらの結果から、トホグリフロジンは主に尿糖排泄促進によるエネルギー消失により体重減少を誘導することが示唆された。さらに代謝を糖代謝から脂肪酸代謝に移行することで、脂肪組織や肝臓への脂肪の蓄積と炎症反応の誘導を抑制することが推定された。トホグリフロジンには、高血糖だけでなく肥満や脂肪肝、インスリン抵抗性を改善することが期待される。

(3) 尿路感染症出現メカニズムの解析

糖尿病患者において尿路感染症の出現リスクが高いことが報告されているが、尿糖と尿路感染症の関係は明確になっていない。SGLT2 阻害剤の尿糖排泄促進作用と尿路感染発症リスクの関係について C57BL mouse を用いた実験系を用いて検討した。Candida albicans を膀胱内に注入した翌日から数日間 SGLT2 阻害剤を経口投与（1 回/日）し、6 日後に安楽死処置後のマウスから腎臓を摘出し、腎内の C. albicans の細胞数を測定することで上行性尿路感染の進展を評価した。SGLT2 阻害剤ダパグリフロジン（10 mg/kg を 2、3 または 6 日間投与、0.1、1 または 10 mg/kg を 3 日間投与）を用いた解析では、投与期間と投与用量に依存して腎臓内の C. albicans の細胞数が増加した。SGLT2 阻害剤（ダパグリフロジン、カナグリフロジンまたはトホグリフロジン）を 10 mg/kg で 3 日間投与した際には、ダパグリフロジン投与群とカナグリフロジン投与群では腎臓内の C. albicans の細胞数が有意に上昇したが、トホグリフロジン投与群では上昇は認められなかった。一方、これらの SGLT2 阻害剤（10 mg/kg）を C57BL mouse に単回投与した際の尿糖濃度は、ダパグリフロジン投与群とカナグリフロジン投与群では投与後 24 時間まで、トホグリフロジン投与群では投与後 12 時間まで有意に上昇した。これらの結果から、尿路感染発症リスクは尿糖濃度上昇の持続時間に依存することが明らかとなった。

以上の解析から、トホグリフロジンは尿糖排泄促進により血糖降下作用を有すると同時に、肥満や脂肪肝、インスリン抵抗等の改善作用も併せ持つことが明らかとなった。また、SGLT2 特異性が高いことから SGLT2 以外の分子標的に対する作用が誘発する低血糖や予期せぬ副作用の出現リスクが低く、血中半減期

が短いことから尿路感染発症リスクも低いものと推定される。トホグリフロジンは副作用リスクが低く、血糖降下以外の病態改善作用も併せ持つ経口血糖降下薬として、2型糖尿病治療に貢献できるものと大いに期待される。依って、本論文は、博士(工学)論文として十分価値あるものと認められる。