

グルコキナーゼ活性化剤長期投与時の血糖低下作用減弱機序の解明

山口大学大学院 共同獣医学研究科

津村 好紀

2022年9月

目次

第 1 章.	緒言	4
1.1	2 型糖尿病と現在の治療.....	5
1.2	グルコキナーゼ	6
1.3	グルコキナーゼ活性化剤.....	6
1.4	本研究の目的	7
第 2 章.	新規ラット肝臓糖代謝評価系の構築	8
第 1 節	背景及び目的	9
第 2 節	実験結果	10
2.2.1	肝臓部分灌流法の開発	10
2.2.2	灌流液中の[U- ¹² C]グルコースと[U- ¹³ C]グルコースの定量法の構築	13
2.2.3	本評価系を用いた病態生理学分析及び薬理学的分析.....	18
第 3 節	考察	21
第 3 章.	2 型糖尿病動物モデルを用いたグルコキナーゼ活性化剤長期投与時の血糖低下作用減弱機序の解明	23
第 1 節	背景及び目的	24
第 2 節	実験結果	24
3.2.1	Goto-Kakizaki ラットにおける GK 活性化剤の長期投与試験	24
3.2.2	肝臓中酵素活性評価	28
3.2.3	肝臓灌流実験による糖代謝評価	30
第 3 節	考察	32
3.3.1	GK 活性化剤長期投与による薬効減弱.....	32
3.3.2	GK 活性化剤長期投与後の肝臓酵素活性評価.....	33
3.3.3	GK 活性化剤長期投与後の糖代謝評価.....	34

3.3.4	薬効減弱へのインスリンの関与	34
3.3.5	GK 活性化剤の薬効持続の違い	35
第 4 章.	総合考察	37
第 5 章.	実験材料及び実験方法	41
5.1	実験動物	42
5.2	長期投与実験	42
5.3	肝臓酵素活性評価	43
5.4	肝臓灌流実験	43
5.5	GC-MS を用いた[U- ¹² C]グルコースと[U- ¹³ C]グルコースの存在比の測定	44
5.6	肝臓の糖利用量、糖取り込み量、及び糖産生量の算出	47
5.7	統計解析	47
引用文献	48
謝辞	55

第1章. 緒言

1.1 2型糖尿病と現在の治療

糖尿病は、インスリン分泌低下、インスリン作用不足、またはその両方により起こる慢性の高血糖を主徴とする代謝性疾患であり、絶対的なインスリン欠乏に起因する1型糖尿病と、インスリン抵抗性の増大及び代償的なインスリン分泌の不足による相対的なインスリン欠乏に起因する2型糖尿病に主に分けられる [1]。2021年時点で全世界の糖尿病患者数は約5.4億人と推計されており、そのうち90%を2型糖尿病が占める [2]。2型糖尿病の治療としては、高血糖状態を改善し、合併症である細小血管障害および大血管障害を予防するために食事療法や運動療法が行なわれるが、これらの療法では血糖コントロールが不十分な場合、薬物療法が推奨される [3,4]。2型糖尿病の主要な薬物療法は、インスリン治療に加えて、スルホニル尿素薬、グリニド薬、dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) 阻害薬、ビグアナイド薬、チアゾリジン薬、 α グルコシダーゼ薬、sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬、及び glucagon-like peptide 1 (GLP-1) 受容体作動薬などの多種多様な薬剤が用いられており、これらはインスリン分泌亢進、インスリン感受性の改善、グルコースの吸収遅延による食後高血糖上昇の抑制、及び腎臓でのグルコース再吸収抑制等の作用を発揮する [4,5]。薬物療法においては、各患者の病態や、それぞれの薬物作用の特性及び副作用を考慮に入れながら薬剤を選択し、また必要に応じて作用機序が異なる薬剤を併用することによって、患者個々に設定した血糖値目標の達成を目指す [4]。このように現在、各種作用機序を示す多くの種類の血糖低下薬が用いられているが、合併症予防のための Hemoglobin A1C (HbA1c) の目標値である7%未満を達成できている2型糖尿病患者は半数程度にとどまっており [6]、現在も新たな作用機序を持った糖尿病治療薬の開発がなされている [7,8]。

1.2 グルコキナーゼ

Glucokinase (GK) は六炭糖の 6 位のリン酸化を触媒する Hexokinase (HK) ファミリーの一員であり、HK type IV とも呼ばれる [9]。GK は糖代謝の最初の反応であるグルコースからグルコース-6-リン酸への変換を触媒する酵素であり、膵β細胞、肝臓、中枢、消化管等の組織での発現が確認されている [10, 11]。グルコースに対する GK の親和性は、他の HK と比較して低く、ミカエリス・メンテン定数 (Km 値) は生理的血糖値 (5-7 mmol/L) 付近である [9, 10]。また、GK は酵素反応産物であるグルコース-6-リン酸によって阻害を受けない [9]。膵β細胞において、GK は血糖上昇に伴って糖代謝を亢進することで、代謝により産生された ATP が ATP 感受性 K⁺チャンネルを不活化し、細胞内への Ca²⁺流入を促進することによってインスリンの分泌を亢進する [12]。また、肝臓細胞では、GK は血糖上昇に伴って糖代謝を亢進することで、肝臓への糖取り込みを亢進する [13]。以上のように、GK は全身のグルコース恒常性維持に重要な役割を担っている。さらに、若年発症成人型糖尿病 (MODY2) の原因遺伝子として GK 遺伝子の変異が特定されており [14]、GK は糖尿病治療薬の標的タンパクとして着目されてきた。

1.3 グルコキナーゼ活性化剤

上述のように、GK は糖尿病治療薬の標的タンパクとして着目されており、GK を活性させる薬剤が 2 型糖尿病に対する新しい治療戦略として検討されている [15]。これまで多くの GK 活性化

剤が報告されており、いくつかの薬剤は2型糖尿病患者を対象とした臨床試験が実施された [16]。臨床試験においては、過去 1-2 ヶ月間の平均血糖値を反映する HbA1c 値の有意な低下が確認されており、GK 活性化剤の血糖低下作用が示された。しかしながら、一部の GK 活性化剤では長期投与時に薬効の減弱が認められた [17, 18, 19]。GK 活性化剤長期投与時の薬効減弱の機序は明らかになっておらず、薬効減弱が GK 活性化剤に共通のクラスエフェクトであるかどうかは結論がついていない。薬効持続性は慢性疾患である 2 型糖尿病の治療薬という観点で重要であり、薬効減弱メカニズムを解明し、回避できる新規候補薬剤を開発することが求められている。

1.4 本研究の目的

本研究の目的は、GK 活性化剤長期投与時の薬効減弱機序解析である。第 2 章では、GK 活性化剤の長期投与時の薬効減弱機序解析に用いるため、ラットの肝臓を用いた新たな糖代謝評価系を構築した。第 3 章では、2 型糖尿病動物モデルを用いた薬効減弱解析を行い、長期投与時の薬効減弱機序として肝臓での糖代謝異常の関与を明らかにした。

第2章. 新規ラット肝臓糖代謝評価系の構築

第1節 背景及び目的

肝臓は、グリコーゲン合成・分解や解糖系・糖新生等、糖代謝に関する様々な代謝経路を調節することで全身のグルコース恒常性維持に重要な役割を担っている [20, 21]。グリコーゲン合成及び解糖系の亢進は糖取り込み量に、またグリコーゲン分解及び糖新生は糖産生量に影響し、糖取り込み量と糖産生量の差が糖利用量を規定している。そのため、これらの肝臓糖代謝に関するパラメータを評価できる実験系は、2型糖尿病の病態生理学的分析や糖尿病治療薬の作用機序解析において有用である。

これまでの報告では、実験動物の肝臓糖代謝の分析に肝臓灌流法が用いられてきた。肝臓灌流法では、門脈よりグルコースを含む緩衝液を灌流し、灌流前後の緩衝液中のグルコース濃度の差を算出することで糖利用量を評価する [22]。しかしながら、この方法では糖利用量の変化が糖取り込み量または糖産生量のどちらに起因するか評価することはできない。また Burn らは、乳酸を含む緩衝液を灌流し、灌流後の緩衝液中のグルコース濃度を測定することで糖産生を評価する実験系を報告しているが [23]、この方法では糖利用量を同時に測定することはできず、独立した実験の実施または灌流する緩衝液の組成等の実験条件の変更が必要となる。糖利用量、糖取り込み、糖産生の関係を適切に評価するためには、これらを同時に測定できる実験系が望ましいが、これまでにそのような実験系は報告されていない。

糖利用量、糖取り込み量、及び糖産生量を同時に評価するためには、糖産生やグリコーゲン分解に由来するグルコースを、灌流液中に含まれるグルコースと区別して評価する必要がある。安定同位体である ^{13}C で標識されたグルコースは、質量分析によって天然同位体である ^{12}C と区別

できるため、糖代謝を評価するための有用な分析ツールであり、これまでにグルコースクランプ実験及び糖代謝物の解析等に用いられている [24, 25]。本研究では、¹³C 標識グルコースを含む緩衝液を用いた灌流実験を確立し、糖利用量、糖取り込み量、及び糖産生量を同時に評価できる実験系を構築した。

第2節 実験結果

2.2.1 肝臓部分灌流法の開発

ラットの肝臓灌流実験においては、肝臓へ十分な酸素を供給し組織障害を抑制するために、3 mL/min/g liver の灌流液が必要であることが報告されている [26]。8 週齢以上のラットの肝臓はおおよそ 10 g を超えており、肝臓全体の灌流を行う場合、30 mL/min 以上の流量が必要となる。[U-¹³C]グルコースは安定同位体を含むため購入量が限られること、及び高価であることから、汎用性のある実験系とするためには、灌流液の使用量を低減する必要があると考えた。そこで、肝臓の一部のみを灌流する手技を確立することとした。14-15 週齢の Wistar ラットを用いて、門脈の左枝を結紮し、肝臓をエバンスブルー溶液で灌流した。エバンスブルーで染色された肝臓の領域は右葉に限定されていたこと (図 2-1)、また灌流液の流出量が流入量と同程度であったことから、門脈の左枝を結紮することで肝臓が部分的に灌流されたことが示された。エバンスブルーによって特定された灌流領域の肝臓重量は約 2 g であったことから、既報を参考に本部分灌流に必要な灌流液の流量は 6 mL/min と規定された [26]。規定した流量で灌流実験を行った結果、還流後液は灌

流前液と比較してグルコース濃度は 90 mg/dL から約 80 mg/dL に、酸素分圧は約 450 mmHg から約 150 mmHg に低下した。さらに、灌流後液中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性は低く、肝臓部分灌流法が確立できたと考えられた。

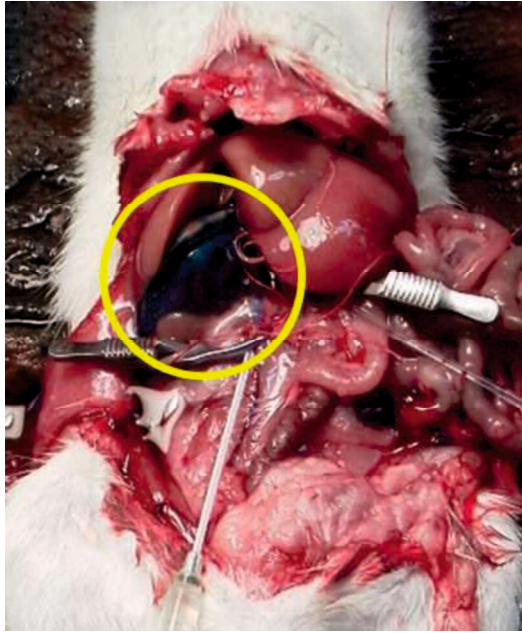


図 2-1 肝臓部分灌流法の開発

門脈の左枝を結紮した後に門脈よりエバンスブルー溶液を灌流した際の写真を示した。灌流領域であるエバンスブルー染色部位を黄丸で囲って示した。

2.2.2 灌流液中の[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの定量法の構築

灌流液中の[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの定量法を構築するため、サンプル誘導体化とガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) 測定手順を確認した。2 mg/dL の D-グルコース ([U-¹²C]グルコースと想定して使用) 及び[U-¹³C]グルコースを溶解した水溶液を 4 サンプル調整し、既報を参考とした誘導体化の後 [27]、GC-MS で測定した。その結果、m/z 314 ([U-¹²C]グルコース) と m/z 319 ([U-¹³C]グルコース) に単一のピークが検出された (図 2-2a)。4 サンプルの変動係数は m/z 314 では 4.3%、m/z 319 では 3.3%であり、手順間の再現性が良好であることが確認された。

次に、Wistar ラットの肝臓部分灌流実験で採取した灌流前液及び灌流後液を誘導体化し、GC-MS で分析した。灌流前液では m/z 319 のみのピークが検出され、灌流後液では m/z 314 及び m/z 319 両方のピークが検出された (図 2-2b, c)。これは灌流前液に含まれるグルコースは[U-¹³C]グルコースのみである一方で、灌流後液には[U-¹³C]-グルコースと肝臓で産生された[U-¹²C]グルコースの両方が含まれることを示している。これらの結果から、灌流後液をサンプルとして用いた場合でも m/z 314 及び m/z 319 で単一のピークが検出可能であることが示された。

灌流後液のマスクロマトグラムにおいては、[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの保持時間は同じであった (図 2-2c)。灌流後液中には肝臓中に含まれる様々な代謝物が含まれることから、その影響によって分析対象物のピーク形状や面積が変動するマトリクス効果が懸念される。灌流後液中の[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコース量の定量には、規定量の[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースを水または緩衝液に溶解した検量線サンプルを用いて推定する方法が考えられるが、灌流後液中のみに夾雑物が含まれることから、マトリクス効果の有無で定量性に影響が生じ

る可能性がある。そこで、マトリクス効果を避けるため、[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの定量化の際には、比色分析によって定量化された全グルコース濃度とそれぞれグルコースのピーク面積の比率から算出する方法を用いることとした。まずは、ピーク面積の比率が適切に検出されることを確認するため、同濃度の[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースを Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液 (KHBB) に溶解したサンプルのピーク面積の比率を複数回評価した。1-100 mg/dL のグルコース濃度の範囲では、[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースのピーク面積の比率の平均値は概ね 1 であり、標準偏差も小さかったことから (表 2-1)、存在比が適切に反映されていることが確認できた。次いで、比色分析によって定量化された全グルコース濃度と[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの存在比から各グルコース濃度を定量する方法が適切であることを確認するため、合計の濃度が 90 mg/dL となるように 0-90 mg/dL の[U-¹²C]グルコースと 0-90 mg/dL の[U-¹³C]グルコースを含んだサンプルを調整し、誘導体化の後 GC-MS による分析を行った。結果として、各サンプルの測定値は調整した濃度を反映しており、本評価方法が適切であることが示された (図 2-3)。

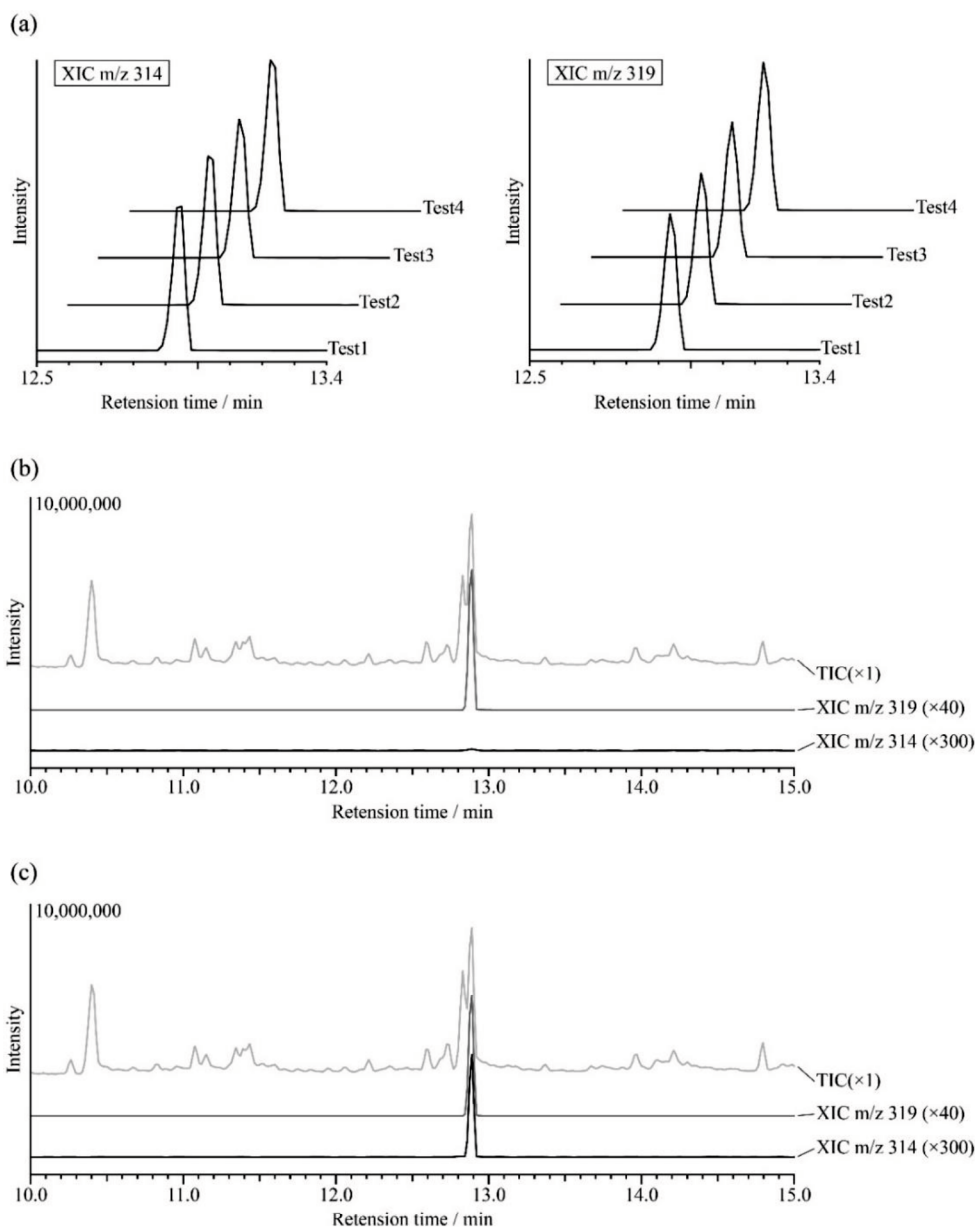


図 2-2 [U-¹²C]グルコース及び[U-¹³C]グルコース誘導体のマスクロマトグラム

(a) D-グルコース誘導体の m/z 314 及び[U-¹³C]グルコース誘導体の m/z 319 における抽出イオンクロマトグラム。誘導體化及び測定操作を独立して行った 4 サンプルの抽出イオンクロマトグラムを示した。Wistar ラットを用いた灌流実験の灌流前液 (b) 及び採取した灌流後液 (c) の総イオンクロマトグラム及び抽出イオンクロマトグラム。TIC: Total ion current、XIC: Extracted ion current.

表 2-1 同濃度の D-グルコース及び[U-¹³C]グルコースを含む KHBB サンプル測定時のピーク面

積比率

Glucose concentration before derivatization / mg dL ⁻¹		Ratio of peak areas [U- ¹² C]-glucose/ [U- ¹³ C]-glucose	Estimated [U- ¹² C]-glucose concentration / mg dL ⁻¹	Estimated [U- ¹³ C]-glucose concentration / mg dL ⁻¹
D-glucose	[U- ¹³ C]-glucose			
1	1	1.00 ± 0.06	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
3	3	1.06 ± 0.08	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1
10	10	1.04 ± 0.05	10.2 ± 0.2	9.8 ± 0.2
30	30	1.06 ± 0.02	30.9 ± 0.3	29.1 ± 0.3
100	100	1.05 ± 0.04	102.6 ± 1.8	97.4 ± 1.8

Data are expressed as mean ± standard deviation (n=6)

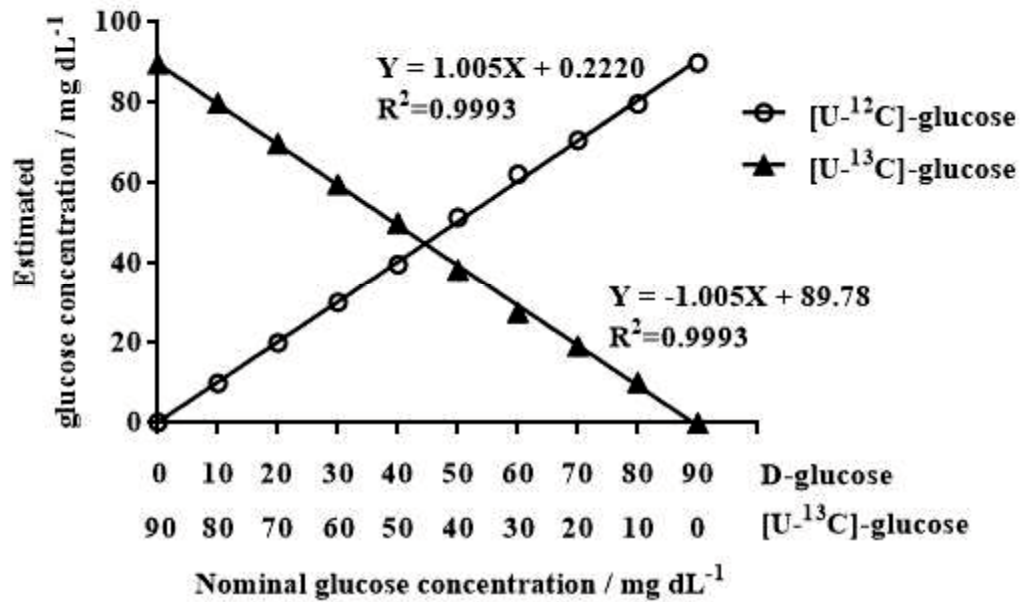


図 2-3 異なる濃度の D-グルコース及び[U-¹³C]グルコースを含む KHBB サンプルの測定

D-グルコース ([U-¹²C]グルコースとして使用) 濃度及び[U-¹³C]グルコース濃度の合計が 90 mg/dL となる複数のサンプルを測定した際に推定された[U-¹²C]グルコース及び[U-¹³C]グルコース濃度。各サンプルの D-グルコース及び[U-¹³C]グルコース濃度を Nominal glucose concentration として、測定結果より算出された[U-¹²C]グルコース及び[U-¹³C]グルコース濃度を Estimated glucose concentration として示した。

2.2.3 本評価系を用いた病態生理学分析及び薬理学的分析

本評価系を用いて、2型糖尿病の動物モデルである Goto-Kakizaki ラットの肝臓糖代謝を評価した。14 週齢における Goto-Kakizaki ラットの血糖値は Wistar ラットと比較して有意に高値であり、糖尿病を発症していることが確認された (図 2-4a)。本週齢の Goto-Kakizaki ラットを用いて肝臓灌流実験を実施したところ、糖利用量は Wistar ラットと比較して低値を示す傾向が認められ、糖産生量は有意に高値であった (図 2-4b, d)。一方で、糖取り込み量は同程度であった (図 2-4c)。これらの結果から、Goto-Kakizaki ラットは 14 週齢において肝臓の主に糖産生の増加に起因して糖利用量が低下していることが示された。

次いで、本評価系を用いて、GK 活性化剤の肝臓糖代謝への薬理学的作用を評価した。Goto-Kakizaki ラットに、GK 活性化剤 (TMG-123) または Vehicle (Gelucire/Polyethylene glycol 400 = 3/2) を自由摂餌下で経口投与した際に、投与 1 時間後の血糖値は GK 活性化剤投与群で Vehicle 投与群と比較して有意に低値を示していたことから、投与 1 時間後に GK 活性化剤は血糖低下作用を發揮していることが確認された (図 2-5a)。この時点における肝臓灌流実験を実施した結果、GK 活性化剤投与群の糖利用量及び糖取り込み量は Vehicle 投与群と比較して有意に高値であった (図 2-5b, c)。一方で、糖産生量は両群で同程度であった (図 2-5d)。これらの結果から、GK 活性化剤の投与による肝臓での糖利用量の増加が血糖低下作用に寄与していること、及び肝臓での糖利用量の増加は主に糖取り込み量の増加が寄与していることが示唆された。

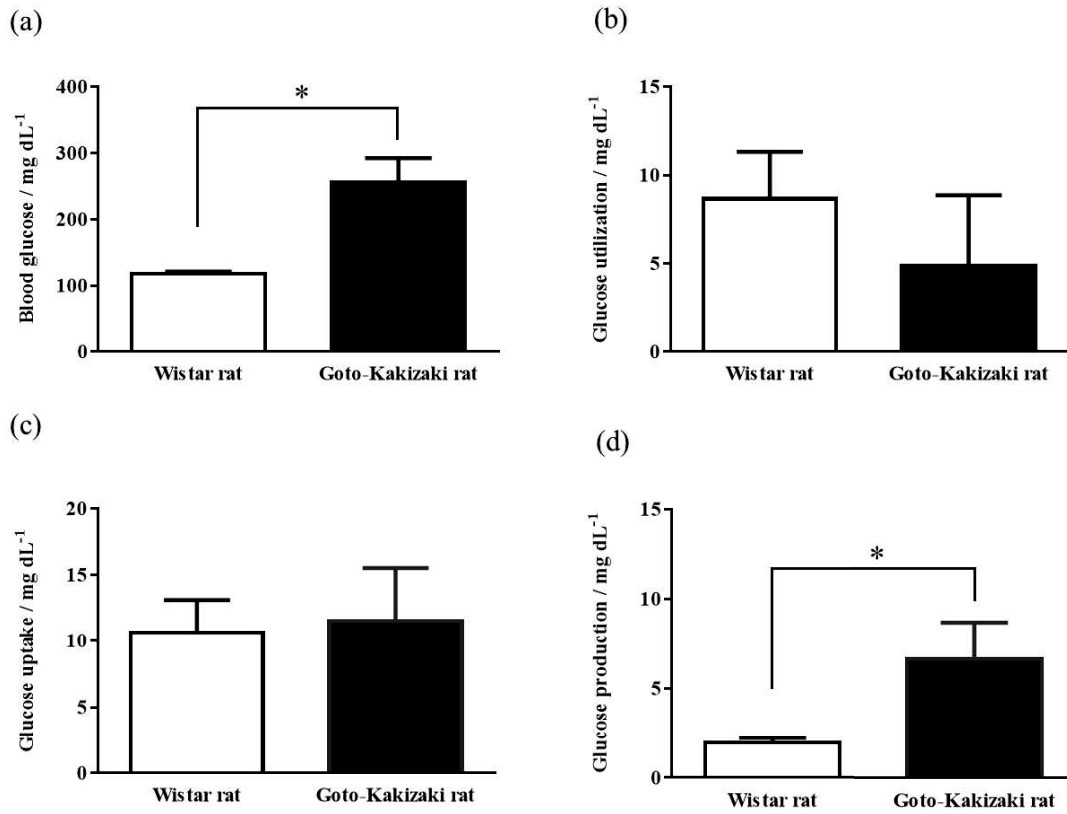


図 2-4 Goto-Kakizaki ラット及び Wistar ラットの糖代謝評価

Goto-Kakizaki ラット及び Wistar ラットの (a) 肝臓灌流実験直前の血糖値、(b) 糖利用量、(c) 糖取

り込み量、及び (d) 糖産生量。* : $p < 0.05$ 。N=6-7。

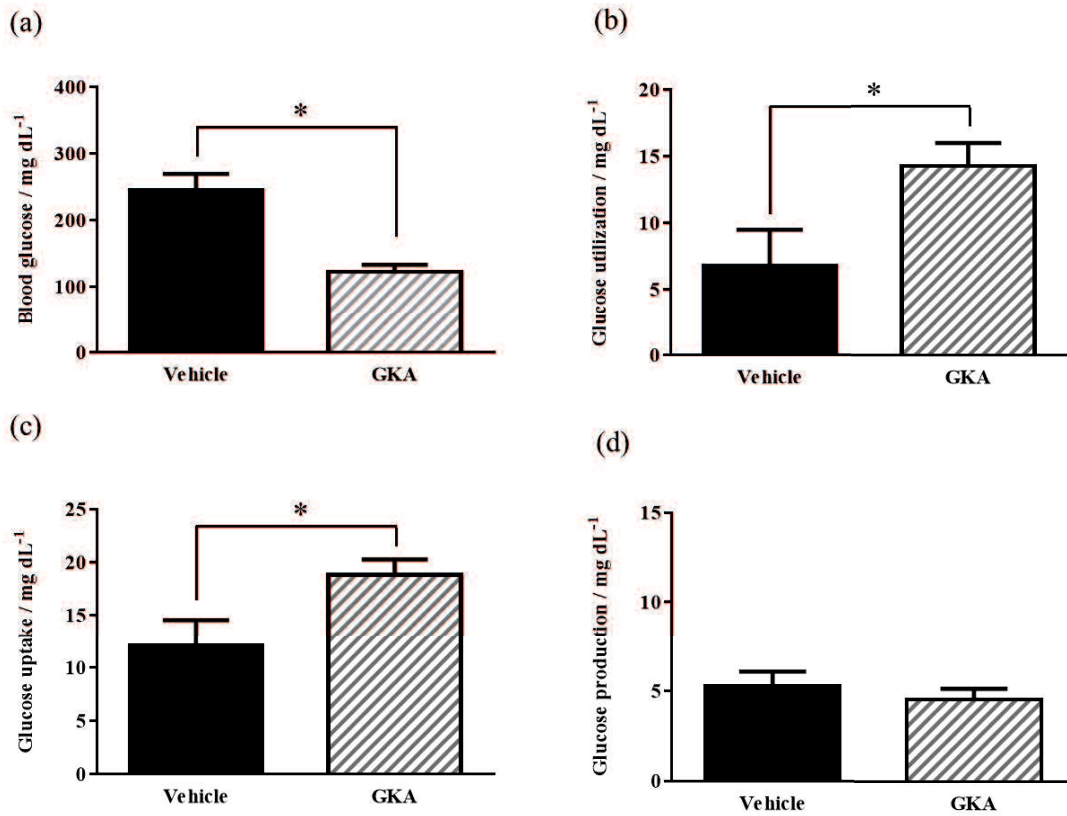


図 2-5 GK 活性化剤投与時の糖代謝評価

Goto-Kakizaki ラットに対し GK 活性化剤を経口投与した 1 時間後の (a) 血糖値、(b) 糖利用量、

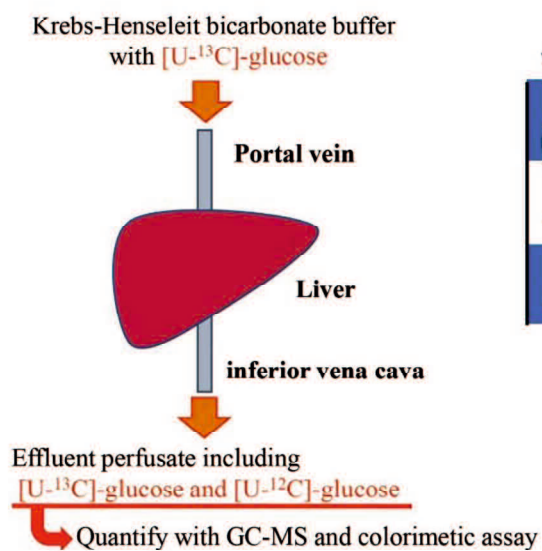
(c) 糖取り込み量、及び (d) 糖産生量。* : $p < 0.05$ 。N=9-10。

第3節 考察

本研究では、ラットの肝臓の一部に[U-¹³C]グルコースを含む灌流液を灌流し、灌流前液及び灌流後液中の総グルコース濃度及び[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコース濃度を測定することで、肝臓の糖利用量、糖取り込み量、及び糖産生量を同時に測定できる世界で最初となる *ex vivo* 評価系を構築した。本評価系の概略図を図 2-6 に示した。

本評価系を用いた Goto-Kakizaki ラットの病態生理学分析では、Goto-Kakizaki ラットは 14 週齢において肝臓の糖利用量が低下しており、主に糖産生の増加に起因することが示された。また、GK 活性化剤を用いた薬理学的分析においては、GK 活性化剤の投与による肝臓での糖利用量の増加が血糖低下作用に寄与していること、及び肝臓での糖利用量の増加は主に糖取り込み量の増加が寄与していることが示唆された。これまでに、Goto-Kakizaki ラットは肝臓の糖産生量の増加が高血糖に寄与していることが報告されている [28]。また、GK 活性化剤は解糖系の最初の代謝反応を亢進することで、肝臓の糖取り込み量を増加させることが報告されている [29]。本研究で認められた分析結果は既報と一致したことから、開発した試験系は適切に肝糖代謝を評価可能と考えた。さらに、Goto-Kakizaki ラットの糖産生の増加が主に糖利用量の減少に寄与すること、及び GK 活性化剤の投与による糖利用量の増加が主に糖取り込み量に起因し、糖産生の影響は小さいことが、本研究で初めて明らかとなった。以上より、本評価系は、糖利用量、糖取り込み量、及び糖産生量を同時に評価することで、糖尿病ラットの肝臓での病態生理学分析及び肝臓の糖代謝に与える薬剤の影響分析に有用であると考えられる。

Experimental outline



Definitions of hepatic glucose utilization, uptake, and production

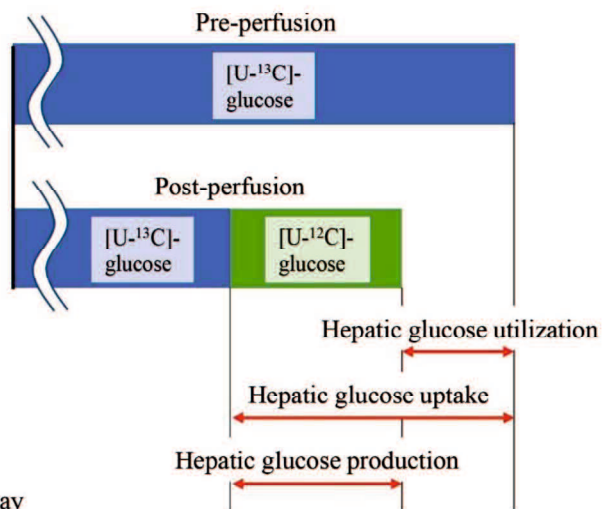


図 2-6 肝臓糖代謝評価系の概略図

第3章. 2型糖尿病動物モデルを用いたグルコキナーゼ活性化剤長期投与時の血糖低下作用減弱機序の解明

第1節 背景及び目的

臨床試験では GK 活性化剤長期投与時の血糖低下作用減弱機序は解析されておらず、詳細な解析のためには、*in vivo* または *in vitro* 実験系での薬効減弱の再現が不可欠である。しかしながら、GK 活性化剤の長期投与による薬効減弱が再現された実験系は報告されていない。本研究では、臨床試験で薬効減弱が認められた GK 活性化剤 (MK-0941) を用い、2 型糖尿病動物モデルである Goto-Kakizaki ラットに投与することで、GK 活性化剤長期投与時の薬効減弱を動物モデルで再現し、当該動物モデルを用いて GK 活性化剤の薬効減弱機序を解析した。同時に、他の GK 活性化剤である TMG-123 の当該モデルにおける長期投与時の薬効を評価した。

第2節 実験結果

3.2.1 Goto-Kakizaki ラットにおける GK 活性化剤の長期投与試験

最初に、2 型糖尿病モデルである Goto-Kakizaki ラットに MK-0941 及び TMG-123 を 24 週間投与し投与 4 週ごとに HbA1c 値、血糖値、及び血漿インスリン値を測定した (図 3-1)。投与 4 週時点において、MK-0941 群及び TMG-123 群の HbA1c 値は Control 群と比較して有意に低値を示し、正常動物群の HbA1c 値よりも低値を示した (図 3-1a)。しかしながら、長期に投与することで MK-0941 群の HbA1c 値は徐々に増加し、投与 20、24 週時点においては、MK-0941 群と Control 群の間に有意な差は認められなかった。一方、TMG-123 群の HbA1c 値は投与期間を通じて大きな変化は認められず、投与 24 週時点において、TMG-123 群の HbA1c 値は Control 群と比較して有意に

低値を示した。投与前の MK-0941 群及び TMG-123 群の HbA1c 値は Control 群と比較して有意な差は認められなかった (図 3-2a)。HbA1c 値と同様に、投与 4 週時点において、MK-0941 群及び TMG-123 群の血糖値は Control 群と比較して有意に低値を示し、正常動物群の血糖値よりも低値を示した (図 3-1b)。しかしながら、長期に投与することで MK-0941 群の血糖値は投与 8 週から投与 12 週の間で顕著に増加し、投与 24 週時点においては、MK-0941 群と Control 群の間に有意な差は認められなかった。一方で、TMG-123 群の血糖値は投与期間を通じて大きな変化は認められず、投与 24 週時点において、TMG-123 群の血糖値は Control 群と比較して有意に低値を示した。投与前の MK-0941 群及び TMG-123 群の血糖値は Control 群と比較して有意な差は認められなかった (図 3-2b)。以上の結果から、MK-0941 は Goto-Kakizaki ラットにおいて、一過的に有効性を示すものの、長期に投与することで薬効減弱が認められることが示された。一方で、TMG-123 は Goto-Kakizaki ラットにおいて投与 24 週まで有効性を示し、薬効の持続性に GK 活性化剤間で違いが認められた。

Goto-Kakizaki ラットに MK-0941 を長期投与した際の血漿インスリン値は、Control 群と比較して投与 8 週時点及び 12 週時点で高値を示したが、投与 16 週時点以降では Control 群と同程度であった (図 3-1c)。TMG-123 群の血漿インスリン値は Control 群と比較して投与 8 週時点以降で高値を示した。投与前の MK-0941 群及び TMG-123 群の血漿インスリン値は Control 群と比較して有意な差は認められなかった (図 3-2c)。

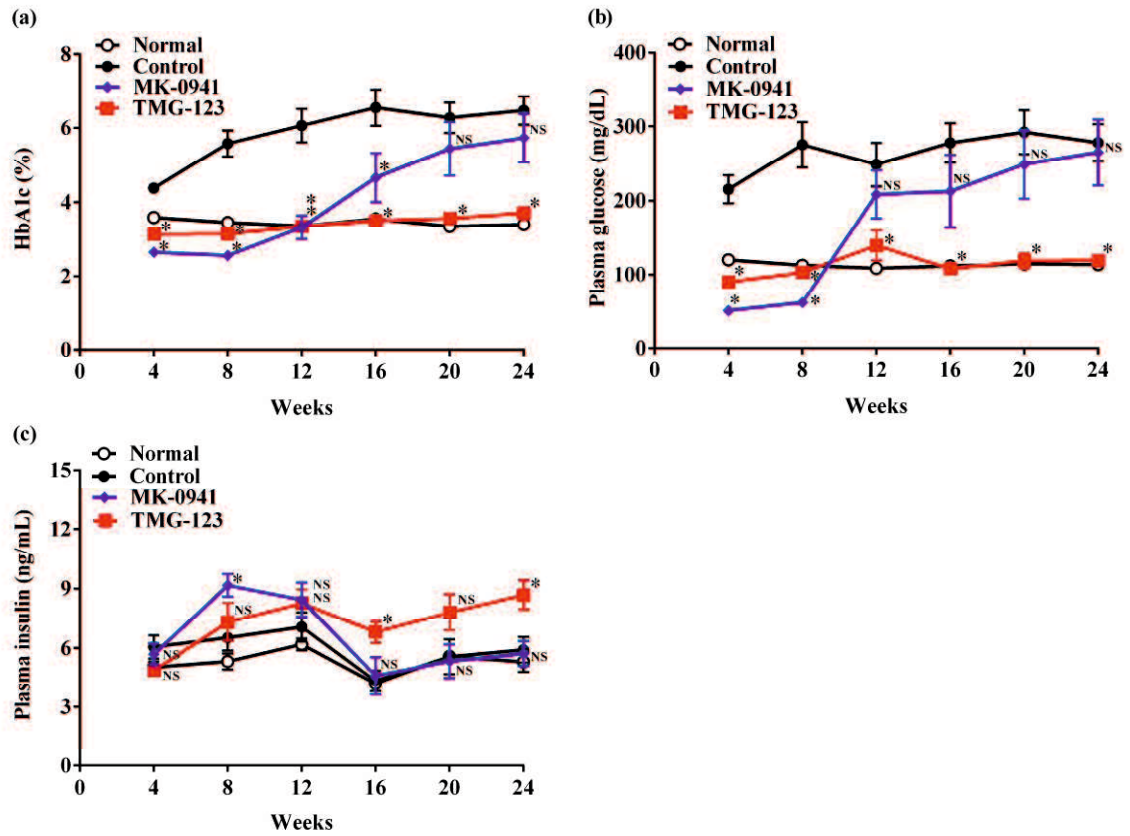


図 3-1 Goto-Kakizaki ラットにおける GK 活性化剤の長期投与試験

Goto-Kakizaki ラットに GK 活性化剤を長期投与した際の (a) HbA1c 値、(b) 血糖値、及び (c)

血漿インスリン値の経時推移。Normal : Wistar ラット、Control : Goto-Kakizaki ラット (通常摂

餌)、MK-0941 : Goto-Kakizaki ラット (0.1%MK-0941 混餌投与)、TMG-123 : Goto-Kakizaki ラッ

ト (0.2%TMG-123 混餌投与)。* : $p < 0.05$ vs Control、NS=not significant。N=7-8。

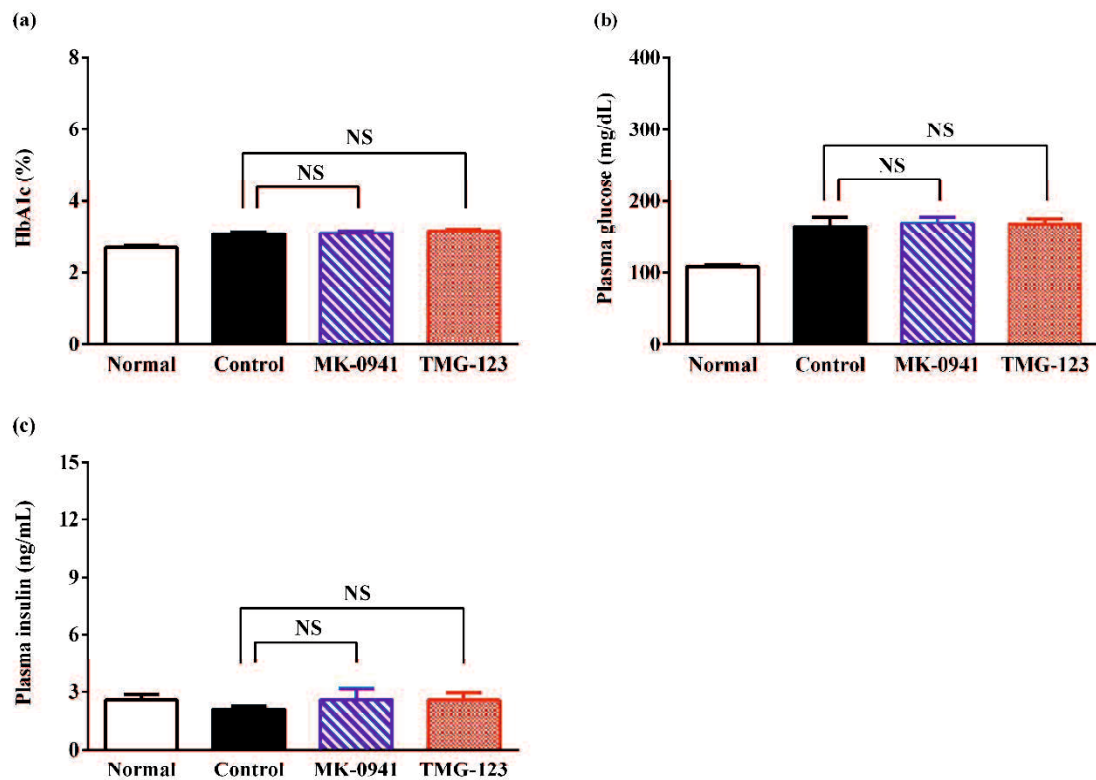


図 3-2 Goto-Kakizaki ラットにおける GK 活性化剤の長期投与試験 投与前値

Goto-Kakizaki ラットに GK 活性化剤を投与する前の (a) HbA1c 値、(b) 血糖値、及び (c) 血漿インスリン値。Normal : Wistar ラット、Control : Goto-Kakizaki ラット (通常摂餌)、MK-0941 : Goto-Kakizaki ラット (0.1%MK-0941 混餌投与)、TMG-123 : Goto-Kakizaki ラット (0.2%TMG-123 混餌投与)。NS=not significant。N=7-8。

3.2.2 肝臓中酵素活性評価

MK-0941 長期投与時の薬効減弱の機序解析のため、長期投与後の Goto-Kakizaki ラットの肝臓中の GK 活性、及び糖新生の律速酵素であり、グルコース-6-リン酸からグルコースへの変換を触媒する酵素である Glucose 6-phosphatase (G6Pase) 活性を評価した。投与 20 週において、MK-0941 群及び TMG-123 群の肝臓中 GK 活性は Control 群と比較して有意に高値を示した (図 3-3a)。一方で、G6Pase 活性は MK-0941 群で Control 群と比較して有意に高値を示し、TMG-123 群では Control 群と同程度であった (図 3-3b)。これらの肝臓中酵素活性結果から、MK-0941 の長期投与による薬効減弱に肝臓中 G6Pase 活性の上昇が寄与していることが示唆された。

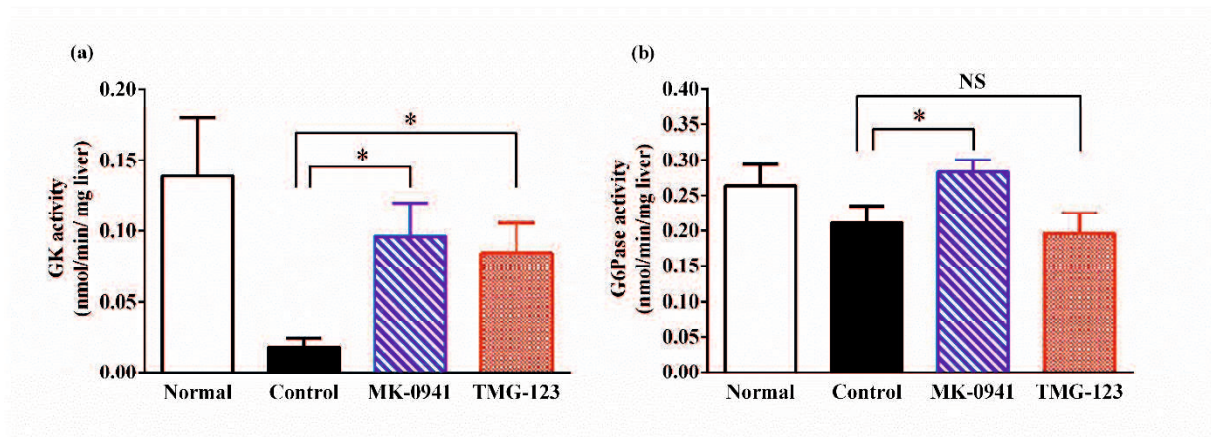


図 3-3 GK 活性化剤投与 20 週時点における肝臓中酵素活性

GK 活性化剤長期投与試験の投与 20 週における (a) 肝臓中 GK 活性及び (b) 肝臓中 G6Pase

活性。Normal: Wistar ラット、Control: Goto-Kakizaki ラット (通常摂餌)、MK-0941: Goto-Kakizaki

ラット (0.1%MK-0941 混餌投与)、TMG-123: Goto-Kakizaki ラット (0.2%TMG-123 混餌投与)。

* : $p < 0.05$ 、NS=not significant。N=7-8。

3.2.3 肝臓灌流実験による糖代謝評価

GK 活性化剤は、肝臓の糖利用量を増加させることによって血糖低下作用を発揮することが報告されている [29, 30]。GK 活性化剤長期投与時の肝臓中の糖代謝を詳細に評価するため、投与 20 週時点において、第 2 章で確立した肝臓部分灌流実験を実施した。その結果、肝臓の糖利用量は MK-0941 群で Control 群と比較して有意に低値を示した (図 3-4a)。一方で TMG-123 群では、肝臓の糖利用量 Control 群と同程度であった。これらの結果から、MK-0941 群では長期投与による肝臓の糖利用量低下が薬効減弱に関与していることが示唆された。

肝臓の糖利用量は肝臓中への糖取り込みと糖産生の差である。肝臓灌流実験において、[U-¹³C] グルコースを含む灌流液を灌流することによって、長期投与試験の投与 20 週時点における糖取り込み量と糖産生量を評価した。その結果、MK-0941 群では Control 群と比較して糖取り込み量は低値、糖産生量は高値を示す傾向が認められた (図 3-4b, c)。一方で、TMG-123 群では糖取り込み量及び糖産生量は Control 群と同程度であった。これらの結果から、長期投与後の MK-0941 群の肝臓の糖利用量低下には糖取り込み量の減少及び糖産生量の増加の両方に起因することが示された。

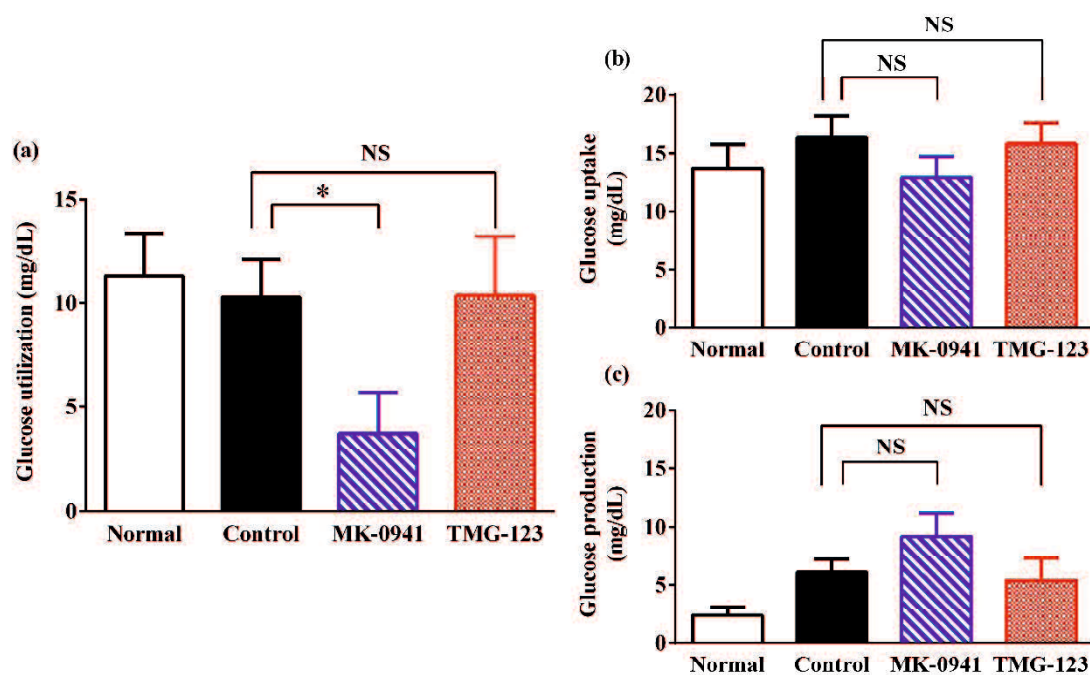


図 3-4 GK 活性化剤投与 20 週時点における肝臓糖代謝評価

GK 活性化剤長期投与試験の投与 20 週時点における (a) 肝臓糖利用量、(b) 肝臓糖取り込み量、及び (c) 肝臓糖産生量。Normal : Wistar ラット、Control : Goto-Kakizaki ラット (通常摂餌)、MK-0941 : Goto-Kakizaki ラット (0.1%MK-0941 混餌投与)、TMG-123 : Goto-Kakizaki ラット (0.2%TMG-123 混餌投与)。* : $p < 0.05$ 、NS=not significant。N=5-7。

第3節 考察

本研究では、MK-0941 を 2 型糖尿病モデルである Goto-Kakizaki ラットに長期投与した際に薬効減弱が認められることを示し、本動物モデルを用いて薬効減弱のメカニズムを解析した。加えて、TMG-123 を本動物モデルに長期投与し MK-0941 と TMG-123 で薬効の持続性が異なることを示した。

3.3.1 GK 活性化剤長期投与による薬効減弱

2 型糖尿病患者を対象とした MK-0941 の臨床試験においては、HbA1c 値はプラセボ群と比較して投与 14 週まで改善が認められたが、投与 30 週までに薬効減弱が認められた [17]。本臨床試験に組み入れられた被験者の HbA1c 値の平均値は約 9%であったことから、血糖値の平均値は約 240 mg/dL であったと算出される [31]。また、被験者はインスリン療法を受けており、重度の糖尿病であることから、インスリン抵抗性とインスリン分泌低下の両方の病態を惹起していることが考えられる。本研究においては、平均血糖値が MK-0941 の臨床試験と同程度の値を示し、インスリン抵抗性及びインスリン分泌低下の両方の病態を惹起することが報告されている Goto-Kakizaki ラットを長期投与試験の動物モデルとして選択した [32, 33]。結果として、MK-0941 を長期投与した群においては、HbA1c 値及び血糖値は投与 4 週、8 週時点では Control 群及び正常動物群と比較して有意に低値を示したものの、その後上昇し、投与 24 週においては Control 群と同程度の値となった (図 3-1)。これらの結果から、臨床試験で認められた GK 活性化剤長期投与時の薬効減

弱が Goto-Kakizaki ラットでも同様に認められることが明らかとなった。これまでに GK 活性化剤の長期投与によって薬効減弱が認められる動物モデルは報告されておらず、本モデルは GK 活性化剤の薬効持続性の評価及び薬効減弱機序の解析に有用であると考えられる。本モデルにおいて、TMG-123 は HbA1c 値及び血糖値を投与 24 週まで持続的に低下させており、GK 活性化剤間で薬効持続性に違いが認められた。

3.3.2 GK 活性化剤長期投与後の肝臓酵素活性評価

MK-0941 の薬効減弱の機序解析のため、GK 及び G6Pase に着目し、肝臓の酵素活性を評価した。MK-0941 群及び TMG-123 群の肝臓 GK 活性は Control 群と比較して高値を示したことから、薬効減弱の機序として GK 活性の低下の寄与は低いと考えられた。一方で、肝臓 G6Pase 活性は MK-0941 群で Control 群と比較して有意に高値を示したが、TMG-123 群では同程度であったことから (図 3-3)、肝臓 G6Pase 活性の上昇が薬効減弱に寄与している可能性が示唆された。これまでに、肝臓細胞及び動物モデルを用いた研究において GK 活性化剤の投与が G6Pase の遺伝子発現を誘導することが報告されており、G6Pase の遺伝子発現上昇の機序として糖代謝産物によるフィードバック機構の関与及び転写因子である carbohydrate response element binding protein (ChREBP) 発現上昇の関与が報告されている [34, 35]。本研究における MK-0941 投与による肝臓 G6Pase 活性の上昇について、MK-0941 の作用によって増加した糖代謝産物または活性化された転写因子が関与している可能性がある。

3.3.3 GK 活性化剤長期投与後の糖代謝評価

GK 活性化剤投与 20 週時点の肝臓灌流実験において、MK-0941 群の糖利用量は Control 群と比較して有意に低下していることが示された (図 3-4a)。本灌流実験においては、 ^{13}C 標識グルコースをトレーサーとして用い、糖取り込み量及び糖産生量を同時に評価した。その結果、MK-0941 群では糖取り込み量は低値、糖産生量が高値を示す傾向が認められた (図 3-4b, c)。これらの結果から、MK-0941 は長期投与によって糖取り込み量と糖産生量が不均衡となり、肝臓の糖利用量が減少することで血糖値低下作用が減弱することが考えられた。一方で、TMG-123 群では糖利用量は Control 群と同程度であり、TMG-123 長期投与によっては肝臓糖代謝の異常は生じなかったことが示された。肝臓灌流実験では、 ^{13}C 標識グルコースは GK の作用によって ^{13}C 標識グルコース-6-リン酸に変換され、変換された ^{13}C 標識グルコース-6-リン酸の一部は G6Pase によって ^{13}C 標識グルコースに戻っており、差分が糖取り込み量として評価されていると考えられる。本研究においては、MK-0941 群の肝臓中 GK 活性は Control 群と比較して上昇したが (図 3-3a)、糖取り込み量は減少した。糖取り込み量と GK 活性の結果が一致しなかった理由として、糖取り込み量に G6Pase 活性が影響を与える本評価系の特性が関与している可能性がある。

3.3.4 薬効減弱へのインスリンの関与

GK 活性化剤はインスリン分泌を亢進し、血糖低下作用を示すことが報告されている [15]。また、膵臓 β 細胞に恒常的に活性が高い変異型の GK を発現させた遺伝子改変マウスにおいては、

発現後一過的に血糖値の低下が認められるものの、糖毒性によって膵臓β細胞のアポトーシスが生じ、血糖値が上昇することが報告されている [36]。さらに、ラット初代膵島を用いた研究においては、高グルコース濃度条件下で、GK 活性化剤処置によって膵臓β細胞のアポトーシスを起こすことが報告されている [37]。これらの報告から、MK-0941 長期投与時の薬効減弱にインスリン分泌の低下または膵臓β細胞の障害が関与する可能性が考えられる。本研究においては、MK-0941 群は投与 8 週より 12 週の間著しく血糖値が上昇していることから、薬効減弱はこの期間に主に生じていることが考えられた (図 3-1b)。しかしながら、この期間における血漿インスリン値は、MK-0941 群で Control 群と比較して高値を示しており、大きな変化は認められなかった (図 3-1c)。これらの結果から、Goto-Kakizaki ラットにおける MK-0941 長期投与時の薬効減弱について、インスリン分泌の低下または膵臓β細胞のアポトーシスは主要な要因ではないことが考えられた。

3.3.5 GK 活性化剤の薬効持続の違い

本研究では、長期投与時の薬効持続性に MK-0941 と TMG-123 で違いが生じた。両群の投与 4 週及び 8 週時点では、MK-0941 群で血糖値がわずかに低値を示したことが薬効持続性に影響した可能性は否定できないが、両群の血糖値は正常動物より低値を示しており、いずれの GK 活性化剤も糖尿病治療薬として十分な血糖低下作用を示した条件下で評価されたと考えられた (図 3-1b)。TMG-123 で薬効持続性が認められた要因として、第一に TMG-123 長期投与によって肝臓の糖代謝異常が認められなかったことが考えられた。GK 活性化剤は肝臓の糖代謝に大きな影響を与えることが報告されているほか [24]、GK のコンフォメーション変化に与える影響、glucokinase

related protein との相互作用に与える影響、及び glycogen phosphorylase に対する作用等が GK 活性化剤の化学構造によって異なることが報告されており [38, 39]、糖代謝に与える影響が GK 活性化剤間で異なることが考えられる。本研究においては、MK-0941 と TMG-123 で肝臓の糖代謝に与える影響が異なり、薬効持続性の違いに關与することが示唆された。しかしながら、本研究においては、2 剤間の糖代謝に与える影響の違いに関する詳細な解析は実施しておらず、今後 GK 活性化剤の化学構造と糖代謝に与える影響の關係、及び糖代謝への影響と薬効持続性の關係に着目した更なる研究が必要である。第二に、TMG-123 の長期投与によって Control 群と比較して血漿インスリン値が高値を示したことが考えられた。TMG-123 は Goto-Kakizaki ラットを含む 2 型糖尿病動物モデルにおいて、血漿インスリン値を上昇させることなく血糖低下作用を示すことが報告されている [29]。この報告は、長期投与試験の 4 週時点において、TMG-123 群の血漿インスリン値の上昇なく血糖値を低下した結果と一致している。長期投与試験における血漿インスリン値の上昇は、血糖値の低下に遅れて生じたことから、膵 β 細胞への直接的なインスリン分泌亢進作用ではなく、糖毒性からの保護による膵 β 細胞の機能回復に起因する間接的な作用の可能性が考えられた。他の糖尿病治療薬の最近の研究では、血糖値の低下によって 2 型糖尿病患者の膵 β 細胞機能が改善したことが報告されており [40, 41]、本研究の結果から TMG-123 の持続的な血糖低下作用によって膵 β 細胞機能が改善されることが期待された。

第4章. 総合考察

GK 活性化剤は 2 型糖尿病に対する新しい治療戦略として着目され、2022 年時点においても治療薬としての開発が継続されている [42]。これまでに多くの GK 活性化剤が開発され、いくつかの薬剤では 2 型糖尿病患者を対象とした第 2 相または第 3 相臨床試験における良好な血糖改善効果が報告されている一方で、長期投与時の薬効減弱や脂質パラメータの異常等、GK 活性化剤特有の事象によって開発が中止となった薬剤も報告されている [17, 18, 19]。本研究では、GK 活性化剤長期投与時の薬効減弱に着目し、薬効減弱が起こる作用機序の解明及び薬効減弱を回避できる GK 活性化剤の開発推進を目指して、薬効減弱機序の解析を行った。

臨床試験では GK 活性化剤の薬効減弱機序は明らかにされておらず、詳細な解析のためには、*in vivo* または *in vitro* 実験系での薬効減弱の再現が不可欠であった。しかしながら、これまでに GK 活性化剤の長期投与による薬効減弱を再現できる実験系は報告されていない。本研究では、臨床試験と近い病態条件と考えられた Goto-Kakizaki ラットを用い、臨床試験で薬効減弱が認められた MK-0941 を長期投与することで薬効減弱が再現されることを明らかにした。本実験モデルは GK 活性化剤の薬効持続性の評価及び薬効減弱機序の解析に有用であると考えられる。

本実験モデルを用いた肝臓酵素活性評価により、肝臓中 G6Pase 活性上昇が薬効減弱機序に関与する可能性が示唆されたが、さらなる機序解析には肝臓糖代謝の評価が必要であった。これまでに肝臓糖代謝を評価する試験系はいくつか報告されているものの [22, 23]、糖利用量、糖取り込み量、及び糖産生量はそれぞれ異なる実験条件で評価する必要があり、それぞれの関係性を適切に評価することができなかった。本研究では、安定同位体である ^{13}C で標識されたグルコースを含む緩衝液をラットの肝臓の一部に灌流し、灌流前後の緩衝液中の総グルコース濃度と $[\text{U-}^{12}\text{C}]$

グルコース及び[U-¹³C]グルコースの存在比からそれぞれの濃度を算出することで糖利用量、糖取り込み量、及び糖産生量を同時に解析する *ex vivo* 評価系を開発した。本評価系を用いた解析によって、Goto-Kakizaki ラットに MK-0941 を長期投与した際、糖取り込み量の低下及び糖産生量の増加を伴う糖利用量の低下が MK-0941 群で生じていることが確認された。以上から、肝臓での糖代謝異常が薬効減弱に寄与していることが示唆された。

これまでの研究では、GK 活性化剤の長期投与時の薬効減弱機序として主に 3 つの機序が想定されている。一つ目は、GK 活性化剤の作用による過剰な糖代謝亢進によって、膵臓 β 細胞で酸化ストレスによるアポトーシスが生じ、2 型糖尿病患者のインスリン分泌能の低下が生じる機序である [36, 37]。本研究において、Goto-Kakizaki ラットに MK-0941 を長期投与した際に、薬効減弱は主に投与 8-12 週において認められたが、血漿インスリン値の大きな変化は認められず、GK 活性化剤の薬効減弱機序として、インスリン分泌低下以外の機序が想定された。二つ目は、GK 活性化剤が GK に結合することによって、GK の安定化に寄与する GK related protein と GK の結合を阻害し、GK の発現低下が生じる機序である [39]。本研究においては、Goto-Kakizaki ラットにおける長期投与試験で、MK-0941 及び TMG-123 群の GK 活性は Control 群と比較して高い結果が得られ、薬効減弱に GK の発現低下の寄与は低いことが考えられた。最後に、糖代謝産物によるフィードバック機構の関与及び転写因子である ChREBP 発現上昇による糖新生の亢進である。本研究においては、Goto-Kakizaki ラットにおける長期投与試験で MK-0941 群の G6Pase 活性は Control 群と比較して高い結果が得られたことから、本研究で認められた薬効減弱の少なくとも一部に本機序が関与すると考えられる。

本研究においては、Goto-Kakizaki ラットに TMG-123 を長期投与した際に、投与期間を通した血糖低下作用の持続が認められた。薬効持続が認められた要因としては、TMG-123 投与によって肝臓の糖代謝異常が認められなかったこと、及び TMG-123 の長期投与によって血漿インスリン値の上昇が認められたことが考えられた。長期投与試験における血漿インスリン値の上昇は、糖毒性からの保護による膵β細胞の機能回復に起因する GK 活性化剤の間接的な作用の可能性が考えられた。従って、薬効の持続性は主に肝臓の糖代謝異常の有無に起因することが考えられる。GK 活性化剤は肝臓の糖代謝に様々な影響を与え、その作用は GK 活性化剤の化学構造によって異なることが考えられる [24, 38, 39]。MK-0941 のような GK 活性化剤が肝臓の糖代謝異常を引き起こす機序、及び糖代謝異常を回避できる GK 活性化剤の特性の解明には、Goto-Kakizaki ラットを用いた肝臓中の糖代謝物の経時的な解析や GK 活性化剤間の糖代謝への影響の違いに着目した更なる研究が必要である。

本研究では、GK 活性化剤の長期投与時の薬効減弱機序として、肝臓での糖代謝異常が関与していることを示した。薬効減弱が起こる作用機序の解明には更なる研究が必要と考えられるが、薬効持続が期待できる GK 活性化剤として TMG-123 が挙げられた。これらの成果は、GK 活性化剤の開発推進に貢献するものであると考える。

第5章. 実験材料及び実験方法

5.1 実験動物

Goto-Kakizaki ラット及び Wistar ラットは日本エスエルシー株式会社から入手した。全ての動物は、ヒューマンサイエンス振興財団動物実験実施施設認定センターの認定をうけた動物実験施設において、12時間の明暗サイクル下で飼育され、飼料として CE-2（日本クレア）を自由に摂取させた。全ての動物実験は帝人ファーマ株式会社生物医学総合研究所の動物実験委員会にて承認され、動物に与える苦痛を最小限に抑えるための措置が取られた。

5.2 長期投与実験

7週齢の Goto-Kakizaki ラットに CE-2、0.1% MK-0941 を含む CE-2、または 0.2% TMG-123 を含む粉末 CE-2 を、7週齢の Wistar ラットに CE-2 を最大 24 週間摂餌させた。0.1% MK-0941 を含む CE-2 は株式会社ナードケミカルズにて合成した MK-0941 を日本クレアにてペレット化したものを用いた。0.2% TMG-123 を含む CE-2 は帝人ファーマ株式会社にて合成した TMG-123 を粉末 CE-2 とロッキングミルにて混合したものを用いた。投与前及び投与期間中は 4 週ごとに採血し、HbA1c 値（9:00 に測定）、血糖値（投与前は 9:00 に測定、投与期間中は 9:00 及び 21:00 に測定）、血漿インスリン値（血糖値と同時刻に測定）を測定した。HbA1c 値の測定には DCA Vantage Analyzer（シーメンス）、血糖値の測定にはグルコース CII-テストワコー（富士フイルム和光純薬株式会社）、血漿インスリン値の測定には超高感度マウスインスリン測定キット（株式会社森永生科学研究所）を用いた。

5.3 肝臓酵素活性評価

長期投与試験の投与 20 週時点において、50mg/kg のペントバルビタールナトリウム（共立製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下にてラットを開腹し、放血安楽死させた。その後、肝臓を採取し、直ちに液体窒素で凍結した。凍結した肝臓にホモジナイズバッファー（50 mmol/L HEPES、5 mmol/L MgCl₂、100 mmol/L KCl、1 mmol/L EDTA、1% Triton-X、プロテアーゼインヒビターカクテル（シグマアルドリッチ））を添加し、4℃下で TaKaRa BioMasher Standard（タカラバイオ株式会社）を用いてホモジナイズした。得られたライセートを 12,000 g にて 15 分間遠心分離し、GK 活性評価及び G6Pase 活性評価のために上清を回収した。GK 活性評価は既報を参考に 100 mmol/L グルコース条件と 0.5 mmol/L グルコース条件でのグルコースリン酸化速度の差から算出した [43]。G6Pase 活性評価は、上清を 105,000 g にて 60 分間遠心し得られたライセートをカコジル酸バッファー（50 mmol/L Cacodylic acid-HCl、2 mmol/L EDTA、pH6.5）で溶解し、既報を参考に 150 mmol/L のグルコース 6-リン酸溶液にて 30℃で 10 分間インキュベートし、得られたリン酸量から算出した [44]。

5.4 肝臓灌流実験

ラットを自由摂餌下、50 mg/kg のペントバルビタールを腹腔内に投与した。麻酔下にて開腹し 30 単位のヘパリンナトリウム注 1 万単位/10 mL（ニプロ株式会社）を下大静脈に注射し、同時に下大静脈より採血し、GlutestAce（株式会社三和化学研究所）を用いて血糖値を測定した。門脈の

左枝を結紮し、灌流領域を制限し、門脈及び下大静脈にカニューレを挿入した(図 2-1)。挿入後、肝臓の温度を維持するため、ラットの全身を 33°C の生理食塩水浴槽に浸した。肝臓の右葉を安定化のため、95% O₂/5%CO₂ でバブリングした 5 mmol/L のグルコースを含む Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液 (KHBB) (118.5 mmol/L NaCl、4.7 mmol/L KCl、2.5 mmol/L CaCl₂、1.2 mmol/L KH₂PO₄、1.2 mmol/L MgSO₄、24.9 mmol/L NaHCO₃、33°C) を門脈より 6 mL/min (3 mL/min/g liver) で 30 分間灌流した。続いて、灌流液を 95% O₂/5%CO₂ でバブリングした 5 mmol/L の[U-¹³C]グルコース (昭光サイエンス株式会社) を含む KHBB に切り替え、切り替え後 10、15、及び 20 分後の灌流後液を下大静脈のカニューレより測定サンプルとして採取した。採取したサンプル及び灌流前液中のグルコース濃度は、グルコース CII-テストワコーを用いて測定した。また、サンプル及び灌流前液中の酸素分圧を i-STAT (アボットジャパン合同会社) 及び i-STAT G3+カートリッジを用いて測定した。灌流実験手技による組織の損傷をモニタリングするため、採取したサンプル中の LDH 活性を LDH-細胞毒性テストワコー(富士フイルム和光純薬株式会社)を用いて測定し、吸光度が高い (> 0.3) 動物を除外した。

5.5 GC-MS を用いた[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの存在比の測定

肝臓灌流実験で採取したサンプルの誘導体化は、既報を参考に実施した [27]。サンプル 100 µL を KHBB にて 10 倍に希釈し、100 µL 分取した後、除タンパク操作のためエタノールを 300 µL 加え、1,000 g にて 5 分間遠心分離した上清を 100 µL 回収した。回収した上清は減圧下で蒸発乾固させ、グルコースのニトロ化反応のため 0.2 mol/L の塩酸ヒドロキシルアミン (ピリジン溶液) を 30

μL 添加し、90°Cで 60 分間インキュベートした。その後、アセチル化反応のため、無水酢酸を 150 μL 添加し、90°Cで 120 分間インキュベートした。サンプルは再度蒸発乾固し、酢酸エチル 100 μL に溶解し、GC-MS による測定サンプルとした。GC-MS は GCMS-QP2010 Plus (株式会社島津製作所)、オートインジェクターとして AOC-20s、カラムとして SH-Rtx-5MS (長さ 30 m×内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm) を用いた。GC はキャリアガスとしてヘリウムを用い、線速度は 36.8 cm/sec とした。注入はスプリットモードで使用し、注入温度は 250°Cとした。カラムは 15°C/min の速度で 80°Cから 320°Cに上昇するようにプログラムした。[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの保持時間は約 13 分であった。MS はイオン源温度を 200°C、スキャン範囲を 45-600 m/z、イベント時間を 0.5 秒に設定した。各サンプルは 1 μL ずつオートインジェクターによって GC に注入され、[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの存在比は GCMSsolution ver. 4.11 で 314 m/z ([U-¹²C]グルコース) と 319 m/z ([U-¹³C]グルコース) の面積比から算出した (図 5-1)。その際、242.1 及び 246.1 m/z のイオンも確認イオンとして測定した。

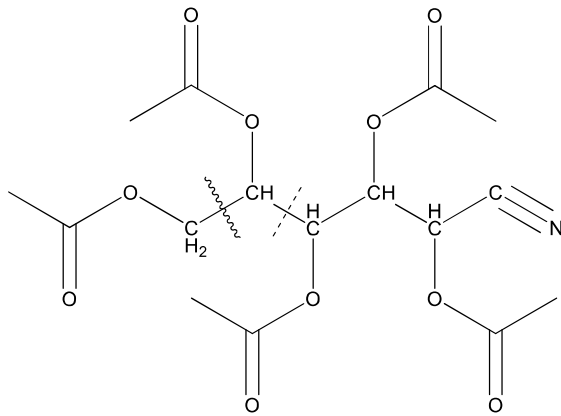


図 5-1 質量分析におけるフラグメントパターン

[U-¹²C]グルコースまたは[U-¹³C]グルコースは、グルコースアルドニトリルペンタアセテートに誘導体され、質量分析によって m/z 314 ([U-¹²C]グルコース)または m/z 319 ([U-¹³C]グルコース)のイオン (波線)、または m/z 242.1 ([U-¹²C]グルコース)または m/z 246.1([U-¹³C]グルコース)のイオン (点線) にフラグメント化される。

5.6 肝臓の糖利用量、糖取り込み量、及び糖産生量の算出

肝臓の糖利用量は灌流前の緩衝液中のグルコース濃度から、肝臓灌流実験において[U-¹³C]-グルコースを含む KHBB に灌流液を切り替え後 10、15、20 分に採取した各サンプルのグルコース濃度の平均値の差で算出した。灌流後液中の[U-¹²C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの濃度は、グルコース CII-テストワコーを用いて測定した液中の全グルコースの濃度と GC-MS 測定で得られた存在比から算出した。肝臓の糖取り込み量は灌流前液の[U-¹³C]-グルコース濃度と灌流後液中の[U-¹³C]グルコース (3 サンプルの平均値) 濃度差から算出した。糖産生量は灌流後液中の[U-¹²C]グルコース (3 サンプルの平均値) 濃度と灌流前液の[U-¹²C]-グルコース濃度の差から算出した (図 2-6)。

5.7 統計解析

統計分析は、SAS ソフトウェア ver 9.2 (SAS Institute Inc) を用いた。第 2 章においては、データは各図で平均+標準誤差または平均±標準誤差として示した。統計解析は two-tailed Student's t-test または Aspin-Welch test を行い、p 値が 0.05 未満の場合に差が有意であるとした。第 3 章においては、統計解析は two-tailed Student's t-test を行い、p 値が 0.05 未満の場合に差が有意であるとした。また、回帰分析は GraphPad Prism ソフトウェア ver. 6.07 (GraphPad Software 社) にて実施した。

引用文献

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37 Suppl 1: S81-90.
2. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 10th edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021. <http://www.diabetesatlas.org>
3. American Diabetes Association., 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018; 41(Suppl 1): S73-85.
4. Araki E, Goto A, Kondo T, Noda M, Noto H, Origasa H, et al. Japanese Clinical Practice Guideline for Diabetes 2019. *Diabetol Int*. 2020; 11(3): 165-223.
5. Inzucchi SE, Majumdar SK. Current Therapies for the Medical Management of Diabetes. *Obstet Gynecol*. 2016; 127(4): 780-794.
6. Tajima N, Nishimura R, Izumi K, Hayashino Y, Origasa H, Noda M, et al. A large-scale, observational study to investigate the current status of diabetes complications and their prevention in Japan: research outline and baseline data for type 2 diabetes—JDCP study 1. *Diabetol Int*. 2015; 6: 243–251.
7. Mittermayer F, Caveney E, De Oliveira C, Gourgiotis L, Puri M, Tai LJ, et al. Addressing unmet medical needs in type 2 diabetes: a narrative review of drugs under development. *Curr Diabetes Rev*. 2015; 11 (1): 17-31.

8. Johansson KS, Sonne DP, Knop FK, Christensen MB. What is on the horizon for type 2 diabetes pharmacotherapy? - An overview of the antidiabetic drug development pipeline. *Expert Opin Drug Discov.* 2020; 15(11): 1253-1265.
9. Wilson JE. Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1995; 126: 65-198.
10. Massa ML, Gagliardino JJ, Francini F. Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity. *IUBMB Life.* 2011; 63(1): 1-6.
11. Matschinsky FM, Magnuson MA, Zelent D, Jetton TL, Doliba N, Han Y, et al. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes.* 2006; 55(1): 1-12.
12. Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta cells and hepatocytes. *Diabetes.* 1990; 39(6): 647-652.
13. Ferre T, Riu E, Bosch F, Valera A. Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J.* 1996; 10(10): 1213-1218.
14. 安田和基. 1. グルコキナーゼ遺伝子異常による糖尿病. *糖尿病.* 2019; 62(8): 454-456.
15. Matschinsky FM. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(5): 399-416.
16. Ren Y, Li L, Wan L, Huang Y, Cao S. Glucokinase as an emerging anti-diabetes target and recent progress in the development of its agonists *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2022; 37(1): 606-615.

17. Meininger GE, Scott R, Alba M, Shentu Y, Luo E, Amin H, et al., Effects of MK-0941, a novel glucokinase activator, on glycemic control in insulin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34(12): 2560-2566.
18. Wilding JP, Leonsson-Zachrisson M, Wessman C, Johnsson E. Dose-ranging study with the glucokinase activator AZD1656 in patients with type 2 diabetes mellitus on metformin. *Diabetes Obes Metab*. 2013; 15(8): 750-759.
19. Kiyosue A, Hayashi N, Komori H, Leonsson-Zachrisson M, Johnsson E. Dose-ranging study with the glucokinase activator AZD1656 as monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 2013; 15(10): 923-930.
20. Sherwin RS. Role of the liver in glucose homeostasis. *Diabetes Care*. 1980; 3(2): 261-265.
21. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp. Mol. Med*. 2016; 48(3), e218.
22. Alvares FL, Nordlie RC. Quantitative correlation of glucose uptake and phosphorylation with the activities of glucose-phosphorylating enzymes in perfused livers of fasted and fed rats. *Biol. Chem.*, 1977; 252(23), 8404-8414.
23. Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP, et al. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest*. 1997; 100(7): 1768-1774.

24. Nissim I, Horyn O, Nissim I, Daikhin Y, Wehrli SL, Yudkoff M, et al. Effects of a glucokinase activator on hepatic intermediary metabolism: study with ¹³C-isotopomer-based metabolomics. *Biochem J.* 2012, 444(3):537-551.
25. Erion DM, Lapworth A, Amor PA, Bai G, Vera NB, Clark RW, et al. The hepatoselective glucokinase activator PF-04991532 ameliorates hyperglycemia without causing hepatic steatosis in diabetic rats. *PLoS One.* 2014; 9(5): e97139.
26. Sugano T, Suda K, Shimada M, Oshino N. Biochemical and ultrastructural evaluation of isolated rat liver systems perfused with a hemoglobin-free medium. *J Biochem* 1978; 83(4): 995-1007.
27. Hannestad U, Lundblad A. Accurate and precise isotope dilution mass spectrometry method for determining glucose in whole blood. *Clin Chem.* 1997; 43(5): 794-800.
28. Picarel-Blanchot F, Berthelier C, Bailbé D, Portha B. Impaired insulin secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the diabetic GK rat. *Am J Physiol.* 1996; 271(4 Pt 1): E755-762.
29. Tsumura Y, Tsushima Y, Tamura A, Hasebe M, Kanou M, Kato H, et al., TMG-123, a novel glucokinase activator, exerts durable effects on hyperglycemia without increasing triglyceride in diabetic animal models. *PLoS One.* 2017; 12(2): e0172252.
30. Eiki J, Nagata Y, Futamura M, Sasaki-Yamamoto K, Iino T, Nishimura T, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the glucokinase activator MK-0941 in rodent models of type 2 diabetes and healthy dogs. *Mol Pharmacol.* 2011; 80(6):1156-1165.

31. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 2002; 25(2):275-278.
32. Koyama M, Wada R, Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi S. Accelerated loss of islet beta cells in sucrose-fed Goto-Kakizaki rats, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Pathol*. 1998; 153(2): 537-545.
33. Farese RV, Standaert ML, Yamada K, Huang LC, Zhang C, Cooper DR, et al. Insulin-induced activation of glycerol-3-phosphate acyltransferase by a chiro-inositol-containing insulin mediator is defective in adipocytes of insulin-resistant, type II diabetic, Goto-Kakizaki rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(23):11040-11044.
34. Al-Oanzi ZH, Fountana S, Moonira T, Tudhope SJ, Petrie JL, Alshawi A, et al. Opposite effects of a glucokinase activator and metformin on glucose-regulated gene expression in hepatocytes. *Diabetes Obes Metab*. 2017; 19(8):1078-1087.
35. Ford BE, Chachra SS, Alshawi A, Brennan A, Harnor S, Cano C, et al. Chronic glucokinase activator treatment activates liver Carbohydrate response element binding protein and improves hepatocyte ATP homeostasis during substrate challenge. *Diabetes Obes Metab*. 2020; 22(11):1985-1994.
36. Tornovsky-Babeay S, Dadon D, Ziv O, Tzipilevich E, Kadosh T, Schyr-Ben Haroush R, et al. Type 2 diabetes and congenital hyperinsulinism cause DNA double-strand breaks and p53 activity in β cells. *Cell Metab*. 2014; 19(1): 109-121.

37. Roma LP, Duprez J, Jonas JC. Glucokinase activation is beneficial or toxic to cultured rat pancreatic islets depending on the prevailing glucose concentration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015; 309(7): E632-E639.
38. Thilagavathi R, Hosseini-Zare MS, Malini M, Selvam C. A comprehensive review on glucokinase activators: Promising agents for the treatment of Type 2 diabetes. *Chem Biol Drug Des.* 2022; 99(2): 247-263.
39. Egan A, Vella A. TTP399: an investigational liver-selective glucokinase (GK) activator as a potential treatment for type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs.* 2019; 28(9):741-747.
40. Merovci A, Mari A, Solis-Herrera C, Xiong J, Daniele G, Chavez-Velazquez A, et al. Dapagliflozin lowers plasma glucose concentration and improves beta-cell function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100(5):1927-1932.
41. Al Jobori H, Daniele G, Adams J, Cersosimo E, Solis-Herrera C, Triplitt C, et al. Empagliflozin Treatment Is Associated With Improved β -Cell Function in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018; 103(4):1402-1407.
42. Ren Y, Li L, Wan L, Huang Y, Cao S. Glucokinase as an emerging anti-diabetes target and recent progress in the development of its agonists. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2022; 37(1): 606-615.
43. Desai UJ, Slosberg ED, Boettcher BR, Caplan SL, Fanelli B, Stephan Z, et al., Phenotypic correction of diabetic mice by adenovirus-mediated glucokinase expression. *Diabetes.* 2001; 50(10): 2287-2295.

44. Burchell A, Hume R, Burchell B. A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Clin Chim Acta*. 1988; 173(2): 183-191.

謝辞

本論文の作成を進めるにあたり、懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学研究室 佐藤晃一教授、大浜剛准教授、獣医内科学研究室 水野拓也教授、生体機能学講座 白石聖教授、鹿児島大学獣医薬理学研究室 宮本篤教授に心より感謝致します。

主論文の共著者である帝人ファーマ株式会社 医薬政策室 小林恒文氏、薬理研究部 對馬佑氏、田村梓氏、法務・知的財産戦略部 加藤浩嗣氏、帝人株式会社 医療機器事業推進班 長谷部牧子氏をはじめ、特に TMG-123 の研究においてご指導いただいた狩野理延氏、並びに研究へのご助言・ご助力を頂いた帝人ファーマ株式会社 薬理研究部の皆様に心より感謝いたします。また、本研究の肝臓灌流実験系の構築におきましては、大阪大学 医学系研究科 栩野義博先生より貴重なご指導をいただきました。心より感謝するとともに、栩野先生のご冥福を心からお祈り申し上げます。

本論文の作成において温かい励ましをいただきました父・津村芳輝、母・満由美、兄・宏一、妻・さおり、また、義父・米澤覚氏、義母・るり子氏に心より感謝致します。

最後に、本研究で犠牲になった多くの動物たちに深く感謝するとともに、その霊が鎮められるよう心よりお祈り致します。