

# Dipeptidyl peptidase IV 阻害剤、K579 の抗糖尿病作用に関する研究

高崎 浩太郎

福岡大学薬学部、〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Anti-diabetes effects of K579, dipeptidyl peptidase IV inhibitor

Kotaro Takasaki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,  
8-19-1 Nanakuma, Fukuoka, 814-0180, Japan

## Abstract

Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors are expected to be categorized in a new type of antidiabetic drugs. K579 is a long-acting DPP-IV inhibitor. In Wistar rats, K579 suppressed the blood glucose elevation after an oral glucose tolerance test with the increment of plasma insulin and active forms of glucagon-like peptide-1. During repetitive glucose loading using Zucker fatty rats, pretreatment with K579 attenuated the glucose excursion after the second glucose loading as well as the first glucose loading without inducing hypoglycemia. The kinetic study using cell extract revealed that K579 was a more potent and slower binding inhibitor than the existing DPP-IV inhibitor (NVP-DPP728). Next, the plasma concentrations of K579 after oral administration to rats were measured. However, K579 was eliminated rapidly from plasma after oral administration to rats. Therefore, it was postulated that there are active metabolites of K579 in rat plasma. The duration of inhibitory action of plasma DPP-IV after the administration of K579 in bile duct-cannulated rats was shorter than that in sham-operated rats. The bile collected from K579-treated rats exhibited tardive and potent inhibitory activity of normal rat plasma. Finally, the effects of orally administered DPP-IV inhibitor on the glucose-lowering effect of glibenclamide were investigated. Treatment with K579 inhibited the plasma DPP-IV activity even 8 h after the administration. K579 significantly suppressed the blood glucose elevation in glibenclamide-pretreated rats without excessive hypoglycemia.

These results suggest that K579 sustained the duration of inhibitory action of plasma DPP-IV by the character as a slow-binding inhibitor, and, as well, by the presence of metabolites of K579 which exhibit the inhibitory activity of DPP-IV. These profiles of K579 might be advantageous over the existing DPP-IV inhibitor with respect to less dosing frequency, and could be useful agent to correct the postprandial glucose excursion in type 2 diabetes patients by combination treatment with glibenclamide.

Key Words; Anti-hyperglycemic effect, Dipeptidyl peptidase IV, Glucagon-like peptide-1, Insulin, Rats, Active metabolite, Bile, Glibenclamide, Glucose tolerance

## 緒言

生活習慣の欧米化により日本における糖尿病罹患者数、中でも2型糖尿病罹患者数は増加の一途をたどっている。2型糖尿病患者に汎用される血糖低下剤であるスルフォニルウレア剤は膵β細胞の受容体に結合し、ATP感受性K<sup>+</sup>チャンネル電流を強く阻害する<sup>1)</sup>ことによりインスリン分泌を促進する (Fig. 1)。スルフォニルウレア剤は血中グルコース濃度にかかわらずインスリン分泌を促進するため低血糖を引き起こす可能性があり、この低血糖は実際に臨床では好ましくない副作用として報告されている<sup>2-4)</sup>。このため、血中のグルコース濃度に依存した生理的なインスリン分泌反応を増強するような物質が低血糖を引き起こす危険性の少ないインスリン分泌促進剤となる可能性がある。

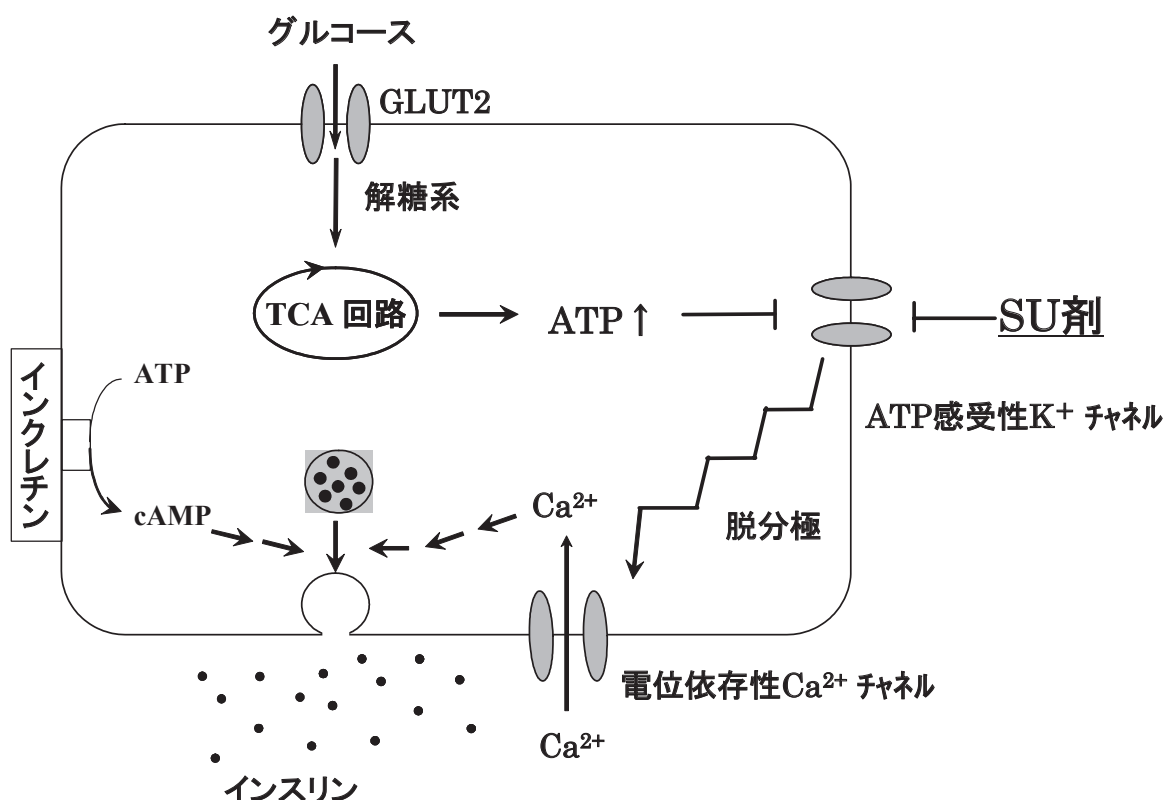


Fig. 1 Schema of insulin secretion by glucose, sulfonylurea and incretin in pancreatic β cell

インクレチンとは、栄養素の刺激により腸管から分泌され、インスリン分泌を増強させるホルモンの総称である。代表的なインクレチンとして glucagon-like peptide 1 (GLP-1)が知られている<sup>5)</sup>。GLP-1の作用は、末梢においては、膵β細胞でのグルコース依存的なインスリン分泌増強作用<sup>6)</sup>、胃排泄の抑制<sup>7)</sup>、グルカゴンの分泌抑制<sup>8)</sup>、膵β細胞の保護および増殖作用<sup>9)</sup>などである。一方、中枢では、視床下部の摂食中枢に作用して摂食量の減少を引き起こし、結果として体重増加を抑制する。これらの多様な作用は、2型糖尿病治療において有用と考えられる<sup>10-12)</sup>。しかしな

から GLP-1 は生体内で、ペプチドの N 末端より 2 残基目のプロリンあるいはアラニン残基を特異的に認識し 2 アミノ酸を切り離す酵素である dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) により酵素的に分解されるため、その活性の持続時間は短い<sup>13-15)</sup>という特性も無視できない。

近年、GLP-1 を酵素的な分解から保護する DPP-IV 阻害剤が、経口投与の可能な血糖低下剤として注目を集めている<sup>16,17)</sup>。実際に、シアノピリミジン誘導体である NVP-DPP728 (Fig. 2) は、健康成人において食後の GLP-1 の増加と食後血糖の低下をもたらすこと<sup>18)</sup>が報告されている。しかしながら、*in vitro* 実験ではバッファー中で分子内環化反応が進行することが報告されており (Fig. 2)<sup>19)</sup>、ラットに経口投与したときの血漿中 DPP-IV 阻害時間は短いこともわかっている<sup>20)</sup>。

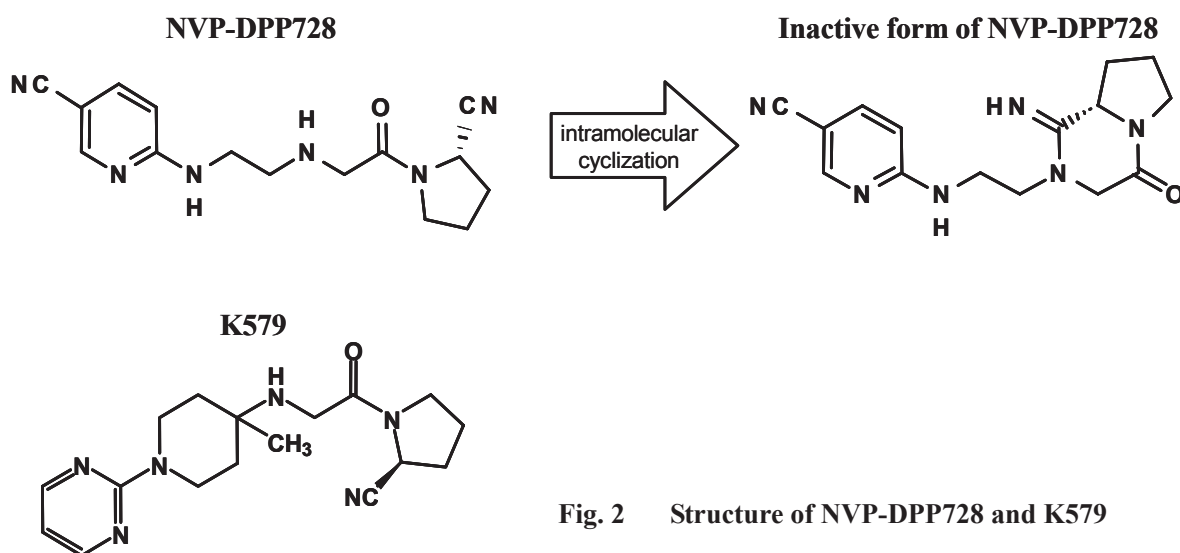


Fig. 2 Structure of NVP-DPP728 and K579

NVP-DPP728 の DPP-IV 阻害時間が短いという欠点を克服する目的で見出された K579 (Fig. 2) は、NVP-DPP728 のエチレンジアミン部分がかさ高い置換基に変換されていることから、立体障害により分子内環化反応による異性化を回避する可能性があり、その DPP-IV 阻害持続時間は NVP-DPP728 のそれよりも長いことが予想される。

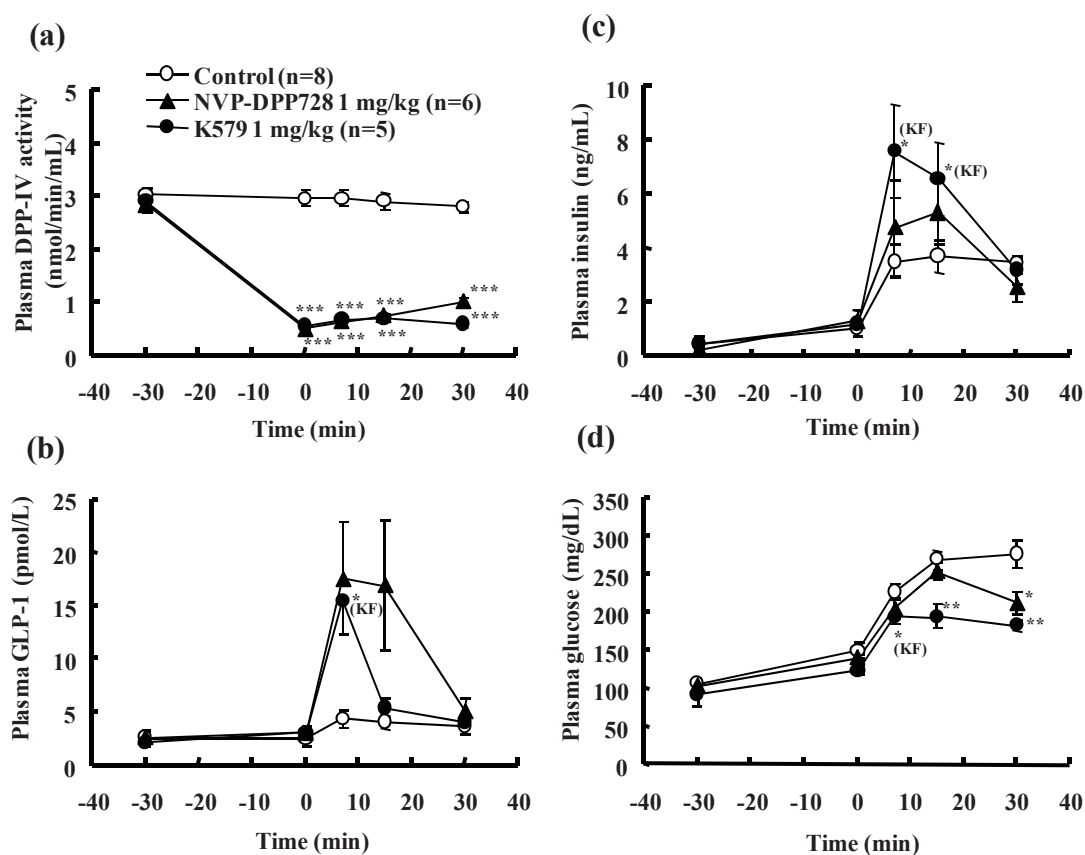
K579 は、*in vitro* の実験においてラット血漿中の DPP-IV を阻害する活性を示し、それに対する半数阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) は 3 nmol/l であることが報告されている<sup>20)</sup>。しかし、K579 の薬理活性に関する検討は十分に行われておらず、*in vivo* における血糖低下作用や、DPP-IV 阻害剤としての作用メカニズム、さらには既存の糖尿病治療薬との併用による有用性などについては不明である。

本研究では、K579 が血漿中グルコース、インスリン、GLP-1 濃度および血漿中 DPP-IV 活性に対する効果についてラットを用いて検討した。また、K579 が DPP-IV を阻害するメカニズムを *in vitro* における DPP-IV との結合実験および K579 およ

びその代謝物の血漿中動態から解明した。さらに、現在臨床において糖尿病治療薬として汎用されているスルフォニルウレア剤と K579 の併用効果について検討した。

### 1) K579 の薬理学的特徴の把握

Wistar ラットを用いてグルコース負荷後の血漿中グルコースおよびインスリン、活性型 GLP-1 濃度および血漿中 DPP-IV 活性に対する K579 の影響を検討した。その結果、K579 および K579 と同様にシアノピリミジン誘導体である NVP-DPP728 はグルコース負荷前の血漿中グルコース濃度には何ら作用を示さず、グルコース負荷後の血漿中活性型 GLP-1 およびインスリン濃度上昇作用、ならびにグルコース負荷後の血漿中グルコース濃度の上昇抑制作用を示すことが明らかになった (Fig. 3)。

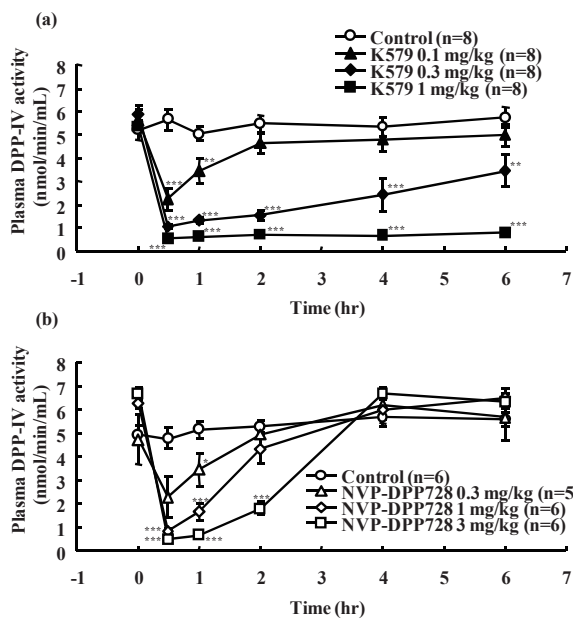


**Fig. 3** Effects of K579 and NVP-DPP728 on plasma dipeptidyl peptidase IV activity (a), GLP-1 (b), insulin (c) and glucose (d) levels after glucose-loading (2 g/kg) in Wistar rats

Oral glucose tolerance test (2 g/kg) was performed 30 min after administration of K579 or NVP-DPP728. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. (n=5-8). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001; significantly different from the control by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

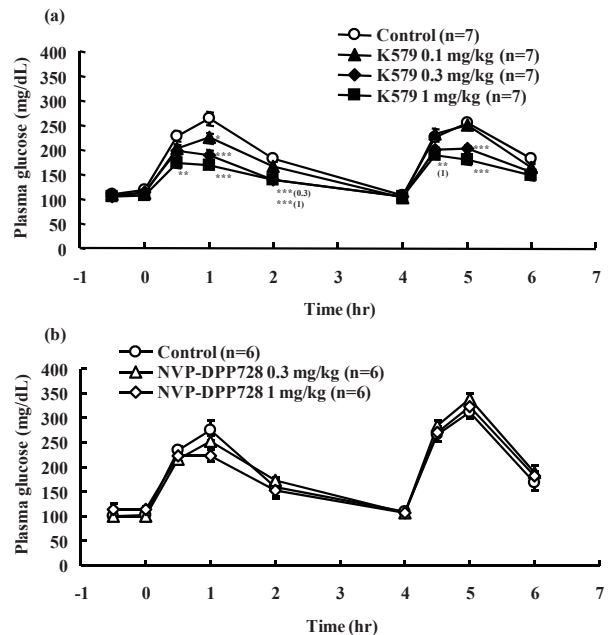
次に、糖尿病モデルラットである Zucker fatty ラットに反復グルコース負荷試験を行ったときの K579 の影響を検討した。K579 は同用量の NVP-DPP728 に比べて持続

的に血漿中 DPP-IV 活性を阻害し(Fig. 4)、持続的に血糖上昇を抑制する (Fig. 5) ことが明らかとなった。K579 の持続的な DPP-IV 阻害作用は立体障害に基づく構造上の安定性に起因していることが推察された。



**Fig. 4** Effects of K579 (a) and NVP-DPP728 (b) on plasma DPP-IV activity in Zucker fatty rats

Each compound was orally administered to rats at 0 h. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=5-8). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001; significantly different from the control by one-way analysis of variance and post hoc Dunnett test.



**Fig. 5** Effects of K579 (a) and NVP-DPP728 (b) on glucose excursion during repetitive oral glucose tolerance test in Zucker fatty rats

All rats received 2 g/kg glucose orally both at 0 and 4 h. Each compound was orally administered to rats at -0.5 h. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6 or 7). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001; significantly different from the control by one-way analysis of variance and post hoc Dunnett test.

## 2) K579 と DPP-IV の結合様式

K579 と Caco-2 由来のヒト DPP-IV との結合実験から、K579 が DPP-IV の slow-binding inhibitor である性質が薬効持続に寄与している可能性が明らかになった。K579 および NVP-DPP728 の  $K_i$  は、いずれもほぼ同じ値であったのに対し、 $k_{on}$  および  $k_{off}$  については、NVP-DPP728 よりも K579 の値が小さいことがわかった (Table 1)。このことから K579 は、slow-binding inhibitor であり、DPP-IV に対する結合、および、DPP-IV との複合体からの解離は、NVP-DPP728 に比べてより遅い阻害剤であることが明らかとなった。この性質も *in vivo* 実験で観察された K579 の DPP-IV 阻害活性の持続に一部寄与している可能性が示された。

Table 1; Kinetic constants for DPP-IV inhibition by K579 and NVP-DPP 728

	$k_{on}$ ( $10^6 \text{ sec}^{-1} (\text{mol/l})^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ )	$K_i$ (nmol/l)	EI half-life (min)	n
<b>NVP-DPP728</b>	<b>1.06</b>	<b>2.57</b>	<b>2.6</b>	<b>4.6</b>	<b>2</b>
<b>K579</b>	<b>0.22</b>	<b>0.39</b>	<b>1.8</b>	<b>37</b>	<b>4</b>

### 3) K579 の体内動態の解析

K579 は構造上の安定性により、その未変化体の血漿中濃度の持続時間は比較的長いことが予想された。しかしながら、投与後 6 時間までほぼ完全に血漿中 DPP-IV を阻害する投与量 (Fig. 4a) の 3 倍に相当する 3 mg/kg をラットに経口投与したときの消失半減期  $t_{1/2}$  は 0.144 時間と非常に短く (Table 2)、K579 を投与後の K579 の未変化体の血漿からの消失は速かった。

すなわち、K579 の未変化体の血漿中濃度だけでは持続する DPP-IV 阻害活性の説明がつけられないことが明らかとなった。また、K579 経口投与後に少なくとも 5 つの血漿中代謝物があることが示された (Fig. 6)。

構造と活性の相関関係より DPP-IV 阻害剤の活性発現には、シアノピロリジン部分、特にシアノ基が必須と考えられている<sup>20)</sup>。NVP-DPP728 のシアノピロリジン部分が失われた化合物および K579 構造類縁化合物のシアノ基がカルボニル基に変換した化合物のいずれも DPP-IV 阻害活性を示さないことから、K579 が同様に変換した UK3、UK4 および UK5 も DPP-IV 阻害活性を有していないものと推察された。また、UK2 はグルクロン酸抱合体であることから、DPP-IV 阻害活性を有しているとは考え難い。以上より、血漿中で認められた代謝物の中で、UK1 (酸化代謝物) のみが DPP-IV 阻害活性を有し、経口投与後の活性代謝物であることが示唆された。

Table 2; Pharmacokinetic parameters of K579 after oral administration to rats at a dose of 3 mg/kg

	$t_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/ml)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/ml)	B.A. (%)
Mean	0.139	30.0	0.144	8.94	6.00
S.D.	0.048	5.2	0.055	1.27	0.85

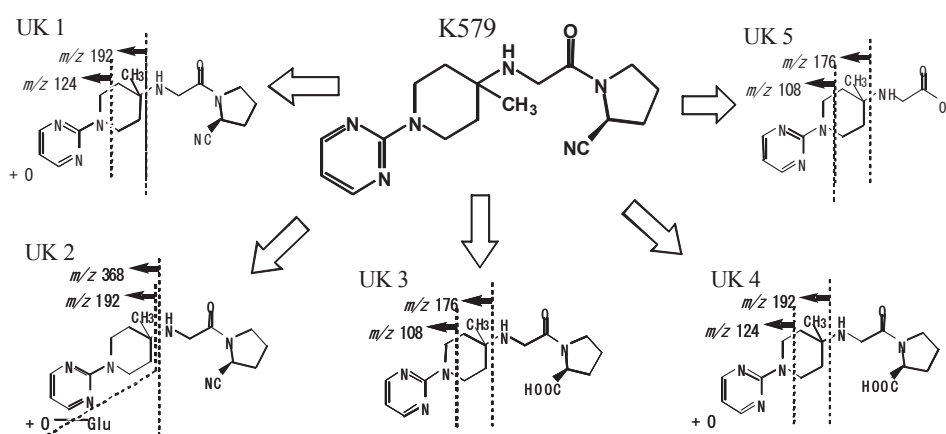


Fig. 6 Proposed chemical structures and fragmentation of UK 1, UK 2, UK 3, UK 4 and UK 5

#### 4) K579 の DPP-IV 阻害作用に対する代謝物の関与

Wistar ラットに K579 を経口投与したときの血漿中 DPP-IV 阻害活性の変動を検討した。次に、K579 を投与した動物から得た胆汁をラットに投与することにより、K579 の代謝物が DPP-IV 阻害作用を有しているか否かを検討した。さらに、胆管カニュレーションを行ったラットを用いて K579 経口投与後の血漿中 DPP-IV 阻害活性に腸肝循環がどのような影響を及ぼすかを検討した。その結果、K579 を投与した動物から得た胆汁中に遅延性の強力な血漿中 DPP-IV 阻害活性を有する化合物が含まれていること、および胆管カニュレーションを行ったラット、すなわち腸肝循環系が存在しない動物において K579 の血漿中 DPP-IV 阻害活性の持続が短縮されることが明らかになった。

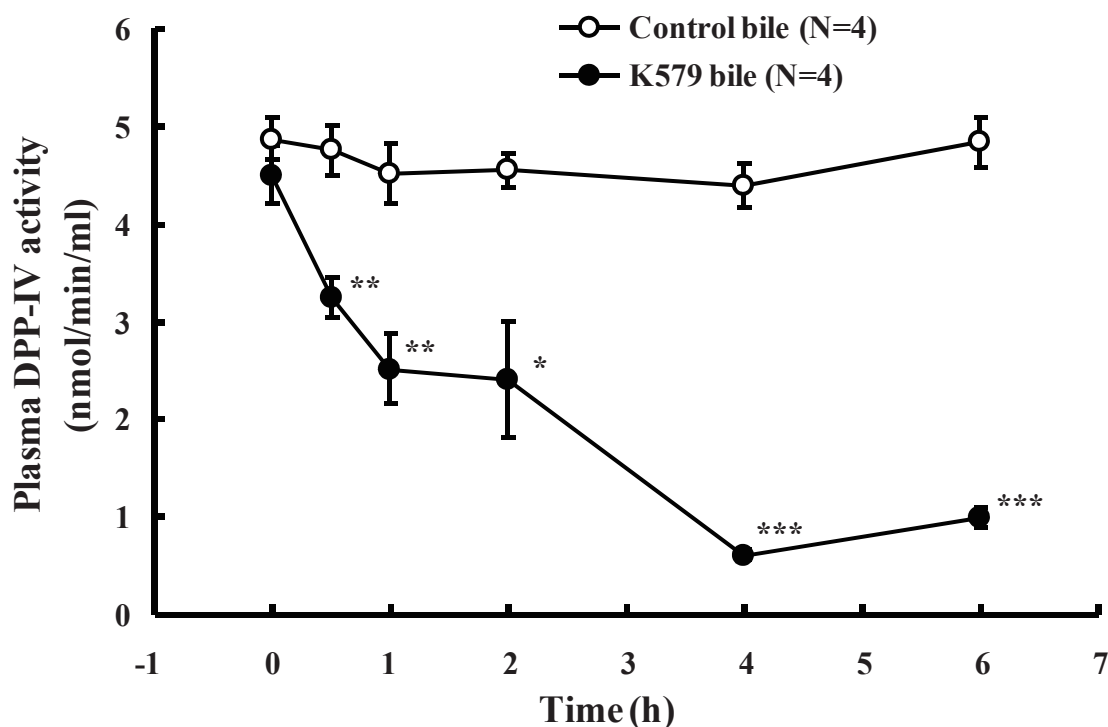
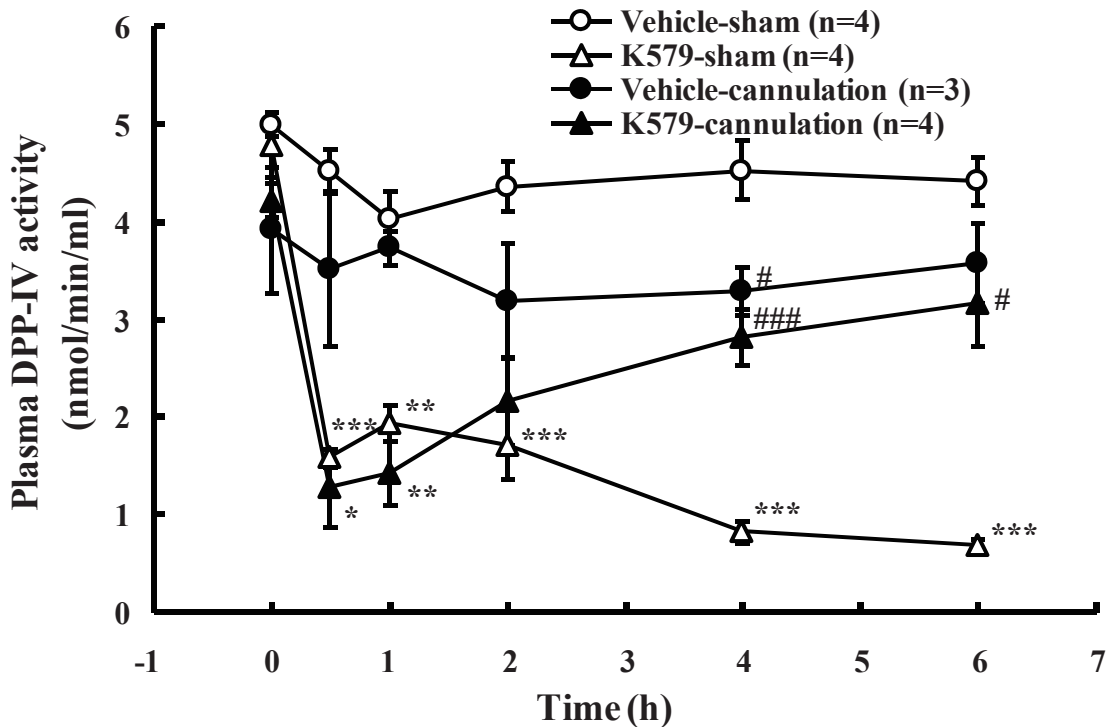


Fig. 7 Effects of the bile collected from K579-treated rats on the plasma DPP-IV activity in normal rats

The bile collected from K579-treated rats was orally administered at 0 min to Wistar rats. All rats were fasted for 24 hours before the test. Data represent means  $\pm$  S.E.M. (n=4). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; significantly different from the control by Student's t test or Aspin-Welch test.

K579 を経口投与した Wistar ラットから得た胆汁は投与 4 時間後を阻害頂値とした遅延性の強力な血漿中 DPP-IV 阻害活性を示した (Fig. 7)。一方で、胆管カニュレーションを行ったラットに K579 を投与した時の血漿中 DPP-IV 阻害活性は投与 0.5 時間後を阻害頂値とした単峰性を示した (Fig. 8)。



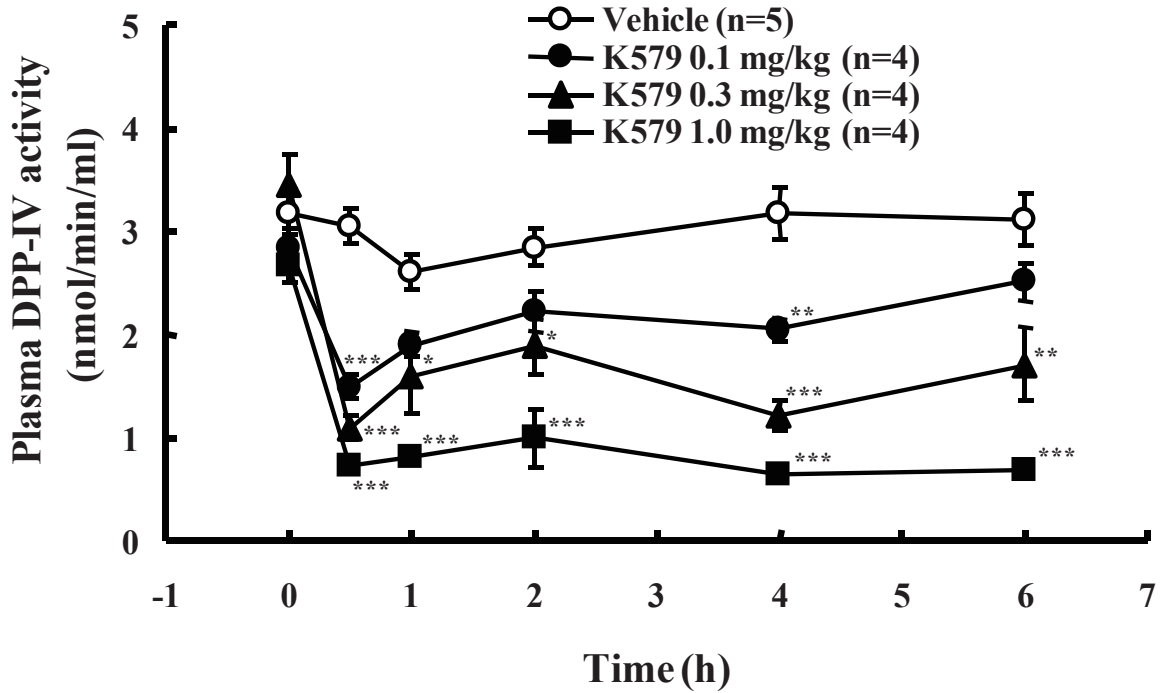
**Fig.8** Effects of cannulation into the bile duct on the inhibitory activity against plasma DPP-IV by K579 in normal rats

K579 was orally administered at 0 min to sham-operated (open symbol) or bile duct-cannulated (closed symbol) rats. All rats were fasted for 24 hours before the test. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. (n=3 or 4). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; significantly different from the corresponding vehicle-treated group by Student's t test or Aspin-Welch test. #p<0.05, ###p<0.001; significantly different from the corresponding sham-operated group by Student's t test or Aspin-Welch test.

さらに、Wistar ラットに K579 を 0.3 および 0.1 mg/kg 経口投与した後に認められる DPP-IV 阻害活性は、投与後 2 時間で一旦減弱するが、投与後 4 時間で再び上昇する二峰性を示しており (Fig. 9)、K579 による血漿中 DPP-IV 阻害活性の二峰目と酸化代謝物の血漿中濃度推移の二峰目が一致していた (Fig. 10)。また、Wistar ラットに K579 を 3 mg/kg 投与した時の K579 の酸化代謝物の二峰性の血漿中濃度推移のうち、第一峰の血漿中濃度は第二峰に比べ約 10 倍低かった (Fig. 10)。

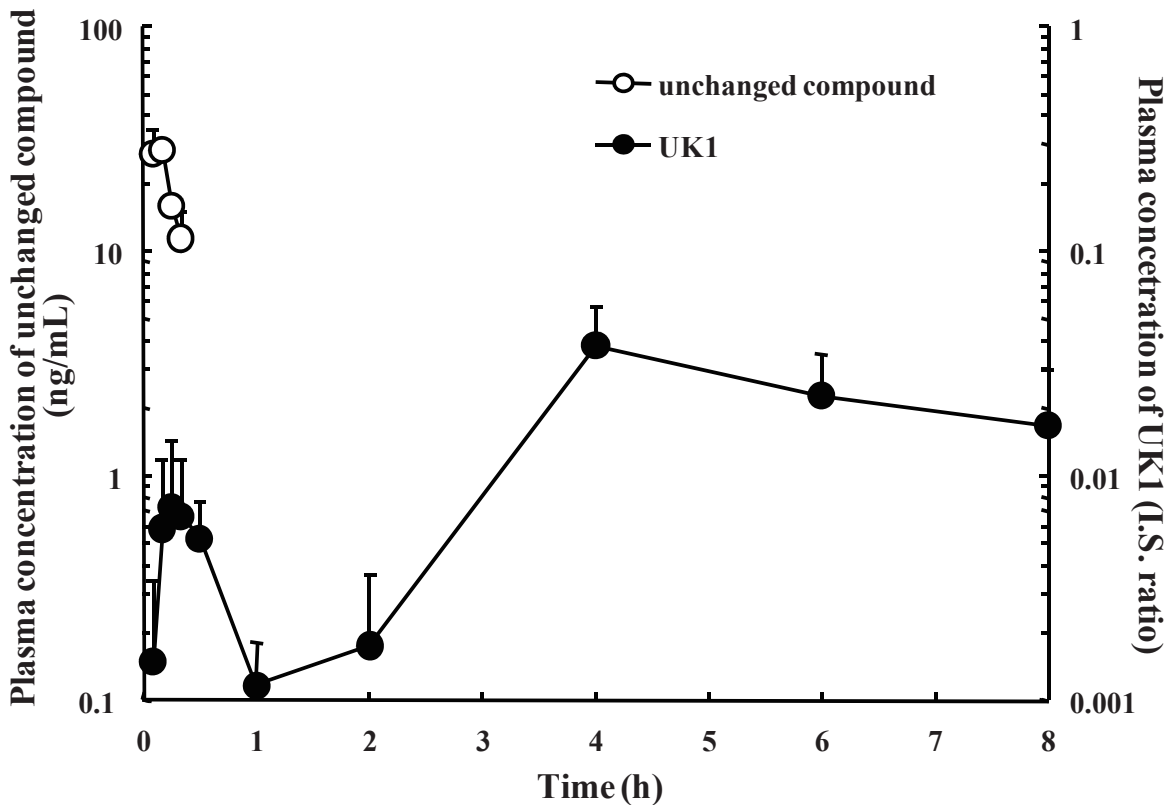
これらの結果は、K579 の持続する DPP-IV 阻害作用のうち、K579 が slow-binding inhibitor である性質が投与後初期の阻害活性を、遅延性の DPP-IV 阻害作用を示す K579 の活性代謝物が投与後後期の阻害活性を、それぞれ発現するのに大きく寄与していることを示唆している。





**Fig. 9** Effects of K579 on plasma DPP-IV activity in normal rats

K579 was orally administered to rats at 0 h. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=4 or 5). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001; significantly different from the control by one-way analysis of variance and further post hoc Dunnett test.



**Fig. 10** Time-dependent change in plasma concentrations of unchanged and changed (UK 1) compounds after oral administration of K579 to rats at a dose of 3 mg/kg

Each point with a bar represents the mean + S.D. (n=3).

## 5) スルフォニルウレア剤と K579 の併用効果

スルフォニルウレア剤と K579 の併用効果を正常ラットを用いて検討した。K579 は、Wistar ラットでグリベンクラミドの血糖低下作用が発現している時間帯でもグルコース負荷後の血糖上昇のみを抑制し、グリベンクラミドによる低血糖を悪化させることはないことが明らかになった。この結果は DPP-IV 阻害剤とスルフォニルウレア剤の併用投与は、スルフォニルウレア剤単独投与よりも 2 型糖尿病に対して有用である可能性を示唆している。

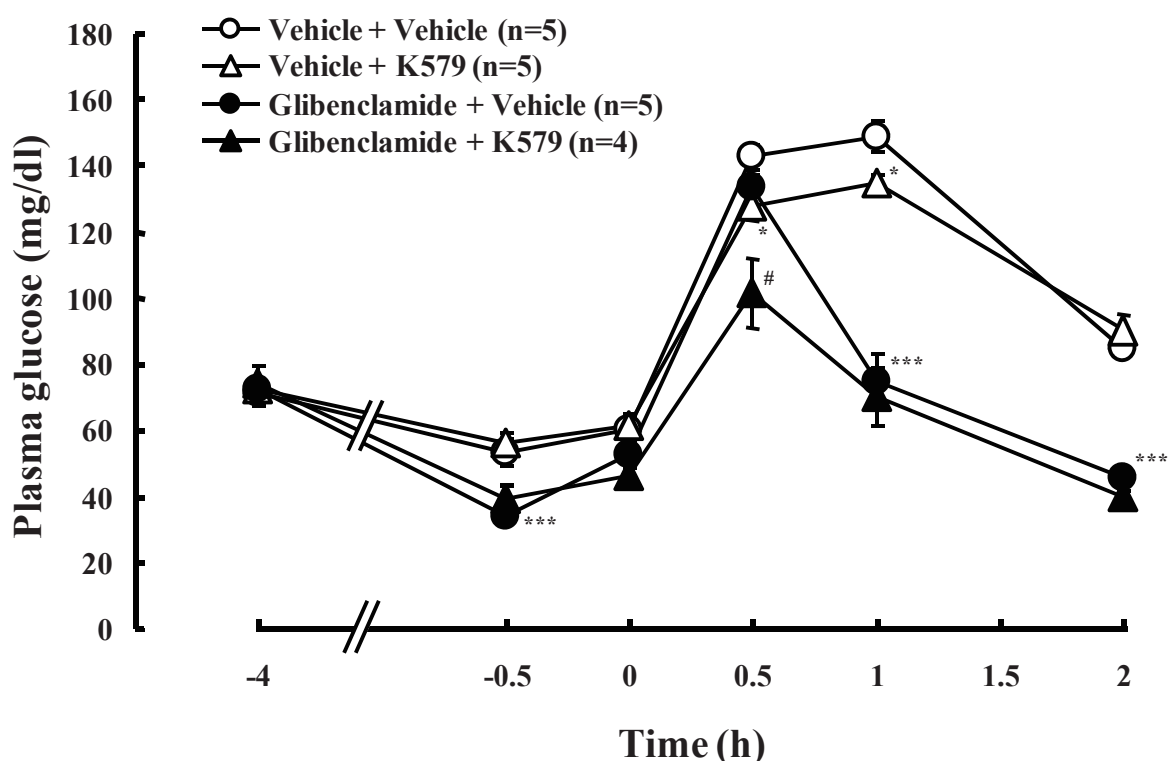


Fig. 11 Effects of K579 on glucose levels during oral glucose tolerance test in glibenclamide-treated Wistar rats

Oral glucose tolerance test (2 g/kg) was performed 0.5 h after administration of K579 (1 mg/kg). Glibenclamide or vehicle was orally administered to rats at 4 h before glucose loading. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. (n=4 or 5). \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001; significantly different from the vehicle-vehicle group, # $p$ <0.05; significantly different from the glibenclamide-vehicle group, by Student's t test or Aspin-Welch test, respectively.

## 結論

K579 は、低血糖を引き起こす危険性が少なく投与回数を減らせる可能性があり、さらに既存のスルフォニルウレア剤との併用効果が期待できる糖尿病治療薬として、2 型糖尿病患者の食後高血糖の是正に有用である可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Panten U., Schwanstecher M., Schwanstecher C., 1992. Pancreatic and extrapancreatic sulfonylurea receptors. *Horm. Metab. Res.* 24, 549-554.
- 2) Asplund K., Wiholm B.E., Lithner F., 1983. Glibenclamide-associated hypoglycaemia: a report on 57 cases. *Diabetologia* 24, 412-417.
- 3) Binder C., Bendtson I., 1992. Endocrine emergencies. Hypoglycaemia. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 23-39.
- 4) Stahl M., Berger W., 1999. Higher incidence of severe hypoglycaemia leading to hospital admission in Type 2 diabetic patients treated with long-acting versus short-acting sulphonylureas. *Diabetic Med.* 16, 586-590.
- 5) Holst J.J., 1997. Enteroglucagon. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 257-271.
- 6) Lu M., Wheeler M.B., Leng X.H., Boyd A.E., 3rd., 1993. The role of the free cytosolic calcium level in beta-cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide I (7-37). *Endocrinology* 132, 94-100.
- 7) Schjoldager B.T., Mortensen P.E., Christiansen J., Orskov C., Holst J.J., GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. 1989. *Dig. Dis.Sci.* 34,703-8.
- 8) Creutzfeldt W.O., Kleine N., Willms B., Orskov C., Holst J.J., Nauck M.A., 1996. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I (7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care.* 19, 580-586.
- 9) Drucker D.J., Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. 2003. *Mol.Endocrinol.* 17, 161-71.
- 10) Deacon C.F., 2004. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 53, 2181-9.
- 11) Drucker D.J., Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. 2003. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 12, 87-100.
- 12) Deacon C.F., Ahren B., Holst J.J., 2004. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: a novel approach for the prevention and treatment of Type 2 diabetes? *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 13, 1091-1102.
- 13) Deacon C.F., Johnsen A.H., Holst J.J., 1995. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 952-957.
- 14) Hansen L., Deacon C.F., Orskov C., Holst J.J., 1999. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 140, 5356-5363.

- 15) Kieffer T.J., McIntosh C.H., Pederson R.A., 1995. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136, 3585-3596.
- 16) Drucker D.J., 2001. Development of glucagon-like peptide-1-based pharmaceuticals as therapeutic agents for the treatment of diabetes. *Curr. Pharm. Des.* 7, 1399-1412.
- 17) Holst J.J., Deacon C.F., 1998. Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47, 1663-1670.
- 18) Rothenberg P., Kalbag J., Smith H., Gingerich R., Nederman J., Villhauer E., Mcleod J., Hughes T.E., 2000. Treatment with a DPP-IV inhibitor, NVP-DPP728, increases prandial intact GLP-1 levels and reduces glucose exposure in humans. *Diabetes* 49 (Suppl. 1), A39.
- 19) Hughes T.E., Mone M.D., Russell M.E., Weldon S.C., Villhauer E.B., 1999. NVP-DPP728 (1-[[[2-[(5-Cyanopyridin-2-yl)amino]ethyl]amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine), a slow-binding inhibitor of dipeptidyl peptidase IV. *Biochemistry* 38, 11597-11603.
- 20) Nakajima T., Ueno K., Matsuno K., Iwata Y., Ogawa A., Nakamura A., Iwase M., Nakanishi S., Takasaki K., Higo K., Yamaguchi N., Ushiki J., Nomoto Y., 2002. Synthesis of long-acting dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors. 22nd Symposium on Medicinal chemistry, 11th Annual Meeting of Division of Medicinal Chemistry, 2P-06.

## 謝辞

本稿を終わるにあたり、終始有益なるご指導、ご助言およびご校正を賜りました福岡大学薬学部教授、藤原 道弘 博士ならびに同大学薬学部教授、岩崎 克典 博士に深く感謝し、御礼申し上げます。また、福岡大学薬学部教授、添田 泰司 博士ならびに同大学薬学部教授、高野 行夫博士から貴重なご助言およびご示唆を賜りました。ここに深く感謝し、御礼申し上げます。

本研究は、協和発酵工業株式会社、石井 昭男 博士、唐澤 啓 博士、日下 英明 博士、比護 勝也 博士、市川 俊司 氏、二藤 眞明 氏、原 卓司 博士、加藤 譲 博士、栞原 隆 博士のたゆまぬご指導、ご鞭撻の賜物であります。ここに深く感謝し、御礼申し上げます。共同研究者として、多くの議論をともにして下さり、また、ともに実験を行ってくださった、協和発酵工業株式会社、中西 聡 博士、野本 裕二 博士、上野 公久 氏、丑木 順子 氏、中島 高雄 氏、高田 英宣 博士、荻野 史子 氏、岩瀬 美穂 氏、伊藤 美保 氏、に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、尊い命を提供していただきました実験動物諸霊に感謝いたします。また、福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室の皆様には、絶えざるご声援とご支持をいただきました。ここにあらためて感謝の意を表します。