

学位論文題名

Studies on the Glycosylation of Glucagon-like Peptide 1
for Improving the Duration of Therapeutic Action

(糖鎖修飾による GLP-1 の薬効持続性付与に関する研究)

学位論文内容の要旨

【緒言】

2 型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌低下と、肝臓、筋肉や脂肪組織におけるインスリン抵抗性によって発症し、慢性的な高血糖状態とそれによる様々な合併症を引き起こす。高血糖の状態を改善する薬物療法としては、スルホニルウレア系経口血糖降下剤やインスリン注射が挙げられるが、低血糖などの副作用の懸念があり、新しい治療薬の開発が望まれている。インクレチンホルモンの一つである glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は血糖依存的にインスリン分泌を促進することから低血糖の懸念が少ない上に、膵β細胞の保護・増殖促進、グルカゴン分泌抑制、胃排出抑制など糖尿病治療薬として魅力的な作用を有することから、近年大きな注目を浴びている。しかし、生体内で Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) や Neutral endopeptidase 24.11 (NEP24.11) による速やかな代謝をうけるため、血中半減期が 1~2 分と極めて短く、GLP-1 そのものを治療薬として利用するのは困難である。そこで本研究では、糖鎖修飾による GLP-1 の分解酵素耐性・体内動態の改善効果について検討した。



【結果及び考察】

GLP-1 は上図に示すとおり、30 アミノ酸からなるペプチドである。13 位 Thr から 34 位 Lys 付近がヘリックス構造をとり GLP-1 受容体と相互作用し、N 末端側のランダムコイル領域は、受容体結合やアゴニスト活性に重要な役割を果たすことが知られている。そこで糖鎖修飾位置として、活性への影響が低いと考えられるヘリックス領域の受容体結合面の反対側 (19、26、34 位) および C 末端 (37 位) を選択した (図 下線部)。修飾糖としては N 結合型糖鎖の非還元末端側構造を模倣し、GlcNAc、LacNAc、 α 2,6-sialyl LacNAc の三種を用いることとした。合成は酵素化学的手法により行い、糖アミノ酸をビルディングブロックに用いたペプチド固相合成により GlcNAc 修飾体を化学合成し、その後、糖転移酵素を用いた糖鎖伸張反応により LacNAc、sialyl LacNAc 修飾体へと誘導した。

GLP-1 活性として各糖鎖修飾体の cAMP 産生活性を、ヒト GLP-1 受容体を強制発現させた細胞を用い測定した。期待したとおり 26、34、および 37 位修飾体の活性は何れも天然型 GLP-1 と比較し大きな変化はなかったことから、これらは活性への影響が低い有望な修飾位置であると考えられた。一方、19 位への糖鎖修飾では活性が大きく低下した。GLP-1 は非特異的に細胞膜と結合しヘリックス構造をとった後、膜上での 2 次元拡散により受容体に結合すると考えられている。疎水性残基である 19 位 Tyr の置換は細胞膜との相互作用に影響を及ぼし、活性低下を招いたものと考えられた。

DPP-IV に対する安定性は、ヒト recombinant DPP-IV を用いた分解反応を Michaelis-Menten 式により動力学的に解析することで評価した。DPP-IV は N 末端から 2 アミノ酸 (His-Gly) を切断し、GLP-1 を不活化する。触媒効率を示す k_{cat}/K_M 値を評価した結果、天然型 GLP-1 に比べ 26、34、および 37 位修飾体では何れも 2~20 倍小さくなり、糖鎖修飾により DPP-IV 耐性が向上することを見出した。修飾糖の種類を比較すると、sialyl LacNAc 修飾体に対する k_{cat}/K_M 値は、GlcNAc、LacNAc 修飾体に比べ 2~3 倍低く、sialyl LacNAc 修飾が最も DPP-IV 耐性を向上させた。sialyl LacNAc を複数箇所に修飾することで、より顕著な耐性の向上がみられ、26、34、37 位 3 箇所 sialyl LacNAc 修飾体の k_{cat}/K_M 値は天然型 GLP-1 に比べ 100 倍以上低下した。GlcNAc や LacNAc と比較し、sialyl LacNAc 修飾は K_M 値を著しく増大させることから、GLP-1 と DPP-IV との親和性を低下させることで高い分解耐性をもたらしたと考えられた。また、sialyl LacNAc 修飾は DPP-IV と同様、NEP 24.11 に対しても高い分解耐性を付与した。

次に 2 型糖尿病モデル動物 *db/db* マウスを用い、各糖鎖修飾体の薬理作用を評価した。各検体を皮下投与し、投与後の血糖値を経時的に測定することで、急性血糖降下作用を測定した。天然型 GLP-1 は生体内で速やかな代謝を受けるため一過性の弱い血糖降下作用しか示さないが、糖鎖修飾体ではいずれも薬効の改善がみられ、特に 26、34、37 位 3 箇所 sialyl LacNAc 修飾体は、持続的かつ強力な血糖降下作用を示した。DPP-IV、NEP24.11 耐性と相関する結果であることから、sialyl LacNAc 修飾は分解酵素耐性を向上させることで体内動態を改善し、薬効持続性を付与したものと考えられた。

【結論】

糖鎖修飾により GLP-1 の分解酵素耐性・体内動態の改善を試み、修飾位置と糖鎖の種類・数を制御することで新規な持続型 GLP-1 アナログの創製に成功した。DPP-IV 分解反応の動力学的解析により、sialyl LacNAc 修飾は酵素との親和性を減弱させることにより、耐性を付与することが示された。本研究は単一構造を有する糖ペプチド誘導体を用い、糖鎖の分解酵素耐性改善効果について詳細に検討を行った初めての研究例であり、ペプチド・タンパク質の糖鎖修飾技術の発展に大きく寄与するものと考えられる。同様の手法により、アメリカ毒トカゲ由来のアナログである Exendin-4 の薬効持続時間を延長させることにも成功しており、他分子への応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 菅 原 一 幸
副 査 教 授 出 村 誠
副 査 助 教 比 能 洋
副 査 客員教授 武 本 浩 (シオノギ創薬
イノベーションセンター長)
副 査 客員准教授 十 亀 弘 子 (シオノギ創薬
イノベーションセンターグループリーダー)

学位論文題名

Studies on the Glycosylation of Glucagon-like Peptide 1 for Improving the Duration of Therapeutic Action

(糖鎖修飾による GLP-1の薬効持続性付与に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

2型糖尿病はインスリン分泌量の低下や細胞のインスリン作用の減弱等によって惹起される疾病であるが、既存の治療薬には低血糖などの副作用があり、新たな治療薬の開発が望まれている。Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は血糖依存的にインスリン分泌を促進するペプチドホルモンであるが、糖尿病患者では分泌が低下しており、その補充は糖尿病の病態改善に繋がるものと考えられる。しかし、GLP-1は生体内でDipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) や Neutral endopeptidase 24.11 (NEP24.11) による速やかな代謝をうけるため、血中半減期が1~2分と極めて短く、GLP-1そのものを治療薬として利用するのは困難である。本論文で筆者は、GLP-1の血中半減期を延長させる手法として糖鎖修飾に着目し、分解酵素耐性・体内動態の改善効果について検討を行った。

まず、筆者はGLP-1の構造や受容体との相互作用に関する情報を元に分子設計を行い、活性への影響が低いと考えられる糖鎖修飾位置として、ヘリックス領域の受容体結合面の反対側 (19、26、34位) およびC末端 (37位) を選択した。また修飾糖としては、簡便かつ安価に合成を達成するため糖鎖構造を簡素化し、N結合型糖鎖の非還元末端側構

造を模倣したGlcNAc、LacNAc、 α 2,6-sialyl LacNAcを用いることとした。設計した分子をペプチド固相合成および糖転移酵素を用いた酵素化学的手法により合成し、各評価を行った。

ヒト GLP-1 受容体発現細胞を用いた cAMP 産生活性評価では、期待通り 26、34、および 37 位修飾体は何れも天然型 GLP-1 の活性に比べ大きな変化はなく、活性への影響が少ない有望な修飾位置であることを明らかとした。一方、19 位への糖鎖修飾では活性が大きく低下したが、これは疎水性残基である 19 位 Tyr の置換が細胞膜との相互作用、ヘリックス構造形成に影響を及ぼし、活性低下を招いたものと考察した。

DPP-IV に対する安定性評価では、ヒト recombinant DPP-IV を用いた分解反応を Michaelis-Menten 式により動力的に解析した。その結果、糖鎖修飾により DPP-IV 耐性が向上することを確認し、また修飾糖の比較から、sialyl LacNAc 修飾が最も DPP-IV 耐性を向上させることを見出した。さらに sialyl LacNAc は GLP-1 と DPP-IV との親和性を低下させることで高い分解耐性をもたらしたことを明らかとした。複数箇所を修飾することで、より顕著に耐性が向上することを見出し、26、34、37 位 3 箇所 sialyl LacNAc 修飾体の k_{cat}/K_M 値は天然型 GLP-1 に比べ 100 倍以上低下することを示した。また、sialyl LacNAc 修飾は DPP-IV と同様、NEP 24.11 に対しても高い分解耐性を付与することも明らかとした。

モデル動物を用いた薬理評価では、糖鎖修飾体の急性血糖降下作用を測定した。天然型 GLP-1 は生体内で速やかな代謝を受けるため、弱い一過性の血糖降下作用しか示さないが、糖鎖修飾体では薬効の改善がみられ、特に DPP-IV、NEP24.11 耐性が顕著に改善した 26、34、37 位 3 箇所 sialyl LacNAc 修飾体は、持続的かつ強力な血糖降下作用を示すことを明らかとした。

これを要するに、著者は糖鎖修飾により GLP-1 の分解酵素耐性・体内動態の改善を試み、修飾位置と糖鎖の種類・数を制御することで新規な持続型 GLP-1 アナログを開発することに成功した。また、分解反応の動力的解析により、sialyl LacNAc 修飾が分解酵素耐性を付与する理由を明らかとした。糖鎖の分解酵素耐性改善効果についてこれほど詳細に検討した研究例はこれまでに無く、本研究の成果はペプチド・タンパク質の糖鎖修飾技術の発展に大きく寄与するものと考えられる。また、他分子への応用も期待され、新たなペプチド医薬品開発にも大きく貢献するものである。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与されるに十分な資格があるものと認める。