

学位論文要旨

インスリンの線維化要因および線維化がインスリンの吸収に与える影響に関する研究

大野 由依

インスリン (Ins) 療法の合併症として近年問題視されているのが、注射された Ins が注射部位で線維化 (アミロイドタンパク質に変化) して皮下に沈着したインスリン由来アミロイドーシス (IDA) と沈着により皮下に腫瘤が生じたインスリンボール (IB) である。これらは、同一部位への Ins の繰り返し投与によって生じると考えられており、Ins の吸収障害による血糖コントロールの悪化を招く。本研究では、Ins の線維化に関わる要因を解明するために、実際に臨床で使用されている製剤を用いて、Ins の線維化に及ぼす製剤中添加剤の影響や、製剤中での会合状態、分子構造の違いに着目した。また、IDA および IB を回避できる新規 Ins 誘導体の検討、IDA および IB による Ins 吸収抑制作用の考察など、臨床での問題から製剤開発までの広い範囲に視点を当て、基礎的な研究を行った。

第1章では、Ins の製剤であるヒューマリン®R (HR) の線維化要因に関して、線維化結晶共存下での線維形成性と、HR 中の添加剤や pH 変化が線維化に与える影響を *in vitro* で評価した。その結果、物理的刺激により促進されることが報告されている Ins の線維化が、線維化結晶の共存により、物理的刺激が弱い条件においても進行し、線維化結晶が核として機能することを明らかにした。また、HR 中の亜鉛イオン (Zn^{2+}) や *m*-クレゾール (CRS) などの添加剤が時間とともに消失する *in vitro* 実験系で線維化の過程を評価した結果、CRS は線維化に抑制的に働くこと、 Zn^{2+} の消失は CRS の消失により起こりやすくなることを明らかにした。さらに、CRS などの物質移動が起きている膜近傍でアミロイド線維を含むゲルが生じ、局所での Ins を含む各成分の濃度変化や周囲環境の変化は、*in vivo* の注射部位でも、各成分の拡散や体液による希釈によって生じることから、治療を受けている患者の皮下においてアミロイドーシスが生じる際に、同様な現象が引き金となる可能性があることを示した。製剤中の pH が時間とともに変化する拡散セルを用いた実験系においては、中性付近の pH が維持された状態では、線維化が進行しやすく、一方、等電点付近の pH に変化していく系では、時間とともに線維化よりも等電点沈殿物の析出が生じていくことを示した。

第2章では、各種持効型 Ins の線維化の比較と、持効型 Ins の線維化に対する Ins の線維化結晶の影響を調べ、さらに、アミロイドーシスを回避可能な新規 Ins 誘導体として、糖への結合能を有するフェニルボロン酸を Ins に修飾した PBA-Ins の血糖降下作用と線維化能を調べた。レベミル® (Lev) 原液をラットの背部の同一部位に、3 週間皮下投与した結果、皮下にアミロイドーシスが生じ、臨床では、Ins および Ins 誘導体の使用歴が数年～数十年の患者に IB が発見されること多いが、臨床で考えられているよりも短期間でアミロイドーシスが生じる可能性があることが示した。*In vitro* で、各種持効型製剤原液に強い物理的刺激を与えた結果、全ての製剤において線維化が認められた。製剤間で線維化速度は異なっており、製剤中にモノマーが多いものは速く、ヘキサマーやダイヘキサマーの形成率が高いものは遅い傾向にあることを明らかにした。その中でも、他と比べて著しく線維化が遅かったトレシーバ® (Tre) について、製剤中添加物を除き、その主薬であるインスリン デグルデク (Ins Deg) 自体の線維化を評価した

結果、Ins Deg は製剤原液に比べて著しく線維化が促進されることを示した。添加剤が存在しない Ins Deg ではモノマーの比率が増加しており、Tre の線維化に対する耐性は、安定なダイヘキサマーとして存在することによるものであること、皮下投与された Tre は、マルチヘキサマーの形成後、低分子である添加剤が高分子の Ins よりも速く拡散消失することで、徐々にモノマーを生じて吸収されるため、*in vivo* において、Tre が線維化しにくい有用な製剤であるとまでは言いきれないことを明らかにした。

持効型 Ins の線維化は、Ins の線維核の存在によって、物理刺激が弱い条件でも促進されることが *in vitro* の系で明らかとなり、また同様の結果は、*in vivo* でも観察された。異種分子間においても、線維化が促進されることから、臨床で、ある製剤において IDA や IB が疑われた場合、別の製剤に変更することによって、アミロイドーシスの進行を抑制しようとする試みはあまり期待できないことが明らかとなった。このことから、IDA や IB が疑われた場合は、投与部位を変更することが、アミロイドーシスの進行抑制と適切な治療を行う上で、現状最も有効な方法であると考えられる。そのほかに、今後、新たに IDA や IB が形成されないように、薬剤師が患者に、Ins および Ins 誘導体を同一部位に投与しないように働きかけることや、こまめに投与の仕方を患者に聞くことが大切であると考ええる。

In vivo でアミロイドーシスを生じない Ins 誘導体として、糖鎖結合能を有するフェニルボロン酸(PBA)修飾 Ins (PBA-Ins) を合成した。PBA 修飾数は平均 2 個で、A 鎖の N 末端 (A1) と B 鎖の N 末端 (B1) に主に修飾されていること、血糖降下作用を示し、赤血球に結合することで作用持続性を有していることを明らかにした。PBA-Ins は、CRS 非存在下でも、*in vitro* において線維化が進行しにくく、PBA-Ins のモノマー含有率は Ins と同等であったことから、A 鎖 B 鎖の N 末端への修飾は β 構造形成に抑制的に働き、線維化を防ぐのに効果的であることを明らかにした。*In vivo* での PBA-Ins のアミロイドーシスの形成性に関しては、本研究では未調査であるが、*in vitro* において CRS 非存在下でも線維化が進行しにくいという結果は、製剤の保存中において線維化が進行しにくい製剤を開発する上で役に立つ結果である。

第 3 章では、線維化インスリン (F-Ins) が皮下に存在するラットを作製し、同部位での Ins (MW:5807) と Fluorescein-Dextran (FD-10) (MW:10000) の吸収性を比較するとともに、血流量や血管透過性を評価することで、IDA や IB における Ins 吸収障害機構の理解を試みた。*In vitro* で調製した F-Ins を、ラットに 2 週間皮下投与することで、明確な腫瘍は形成していない、皮下に F-Ins が存在するラットを作製できた。そのラットでは、FD-10 の吸収は、PBS 投与部位に比べて F-Ins 投与部位で高かった一方、Ins の吸収は、PBS 投与部位に比べて F-Ins 投与部位で低い結果となった。PBS を 2 週間皮下投与した部位では、炎症や血管透過性の亢進は見られなかったのに対し、F-Ins 投与部位では、炎症による血管透過性の亢進が見られ、両部位の血流量には差が確認されなかったことから、F-Ins 投与部位では血管透過性の亢進により、FD-10 の吸収促進が生じたこと、また、血管透過性の亢進という、吸収に対して正に働く状況下であるにも関わらず、Ins の吸収が低下したことから、F-Ins の存在自体が Ins の吸収を抑制していると考えられた。そこで、その現象の再現を *in vitro* の実験系で試み、線維への Ins 分子の吸着により、拡散・移動可能な Ins の濃度が減少して Ins の吸収抑制が生じていることを確認した。

本研究成果は、アミロイドーシスを生じないように Ins 治療を行っていく上で、また、それが生じた場合でも安定かつ有効な治療を継続していく上で重要な情報となるだけでなく、線維化かつアミロイドーシスを生じにくい Ins 誘導体を開発することにもつながることが期待できる。

Thesis abstract

Study on the factor of insulin fibril formation and the effect of fibril on insulin absorption

Yui Ohno

Insulin-derived amyloidosis (IDA) is a phenomenon when injected insulin (Ins) forms fibrils (Ins takes a beta structure and turns into an amyloid protein) at the injection site, which are then deposited subcutaneously. Insulin ball (IB), in which the deposition leads to a subcutaneous mass, has been a problem in recent years as a complication of Ins therapy. IB is thought to be caused by repeated administration of Ins to the same site, and leads to poor glycemic control due to suppressed Ins absorption. In this study, I investigated the effect of additives in formulations, association state of formulations, and differences in molecular structure on the fibril formation of Ins using clinically used formulations to elucidate the factors affecting fibril formation. In addition, basic research was conducted with focus on a wide range of issues from clinical problems to formulation development, such as the investigation of new Ins that can avoid IDA and IB, and examination of Ins absorption superstition for IDA and IB.

In Chapter 1, I analyzed the fibril formation factors of Humulin®R (HR), a human Ins (HI) formulation. Specifically, fibril formation in the presence of fibril crystals as well as the effects of additives and pH changes on the fibril formation of HR were evaluated *in vitro*. The results showed that the fibril formation of HR was promoted by physical stimulation; however, the coexistence of fibril crystals progressed even under weak physical stimulation, suggesting that fibril crystals functioned as nuclei. In addition, *in vitro* evaluation revealed that the fibril formation process of HR disappeared over time in the presence of additives such as zinc ions (Zn^{2+}) and *m*-cresol (CRS). Moreover, CRS was shown to exert inhibitory effect on fibril formation, and Zn^{2+} disappearance was likely to occur owing to CRS disappearance. Furthermore, a gel containing amyloid fibrils was generated near the membrane where mass transfer of additives, such as CRS, occurred. Local changes in the concentration of each component, including Ins, and changes in the surrounding environment occurred at the site of injection *in vivo* owing to the diffusion of each component and dilution in body fluids. Therefore, a similar phenomenon could trigger subcutaneous IDA in treated patients. In an experimental system using a diffusion cell in which the pH of the formulation changed over time, it was shown that fibril formation easily progressed when the pH was maintained around neutral. Furthermore, it was shown that the isoelectric point precipitates rather than fibril formation in the system that changes to pH near the isoelectric point with time.

In Chapter 2, we compared the fibril formation of various long-acting Ins (LAIIns) and examined the effect of the fibril crystals of Ins on the fibril formation of LAIIns. Furthermore, as a new Ins that can avoid IDA, phenylboronic acid (PBA)-modified Ins (PBA-Ins) capable of binding to sugar was synthesized, and its hypoglycemic effect and fibril formation ability were investigated. Subcutaneous administration of Levemir® to the same site on the back of rats for 3 weeks resulted in subcutaneous IDA. A clinical case report showed that IB is often observed in patients who have used Ins for years to decades, but IDA can occur more quickly than clinically thought. *In vitro* experiments showed that fibril formation occurred as a result of the strong physical stimulus applied during the administration of the original solutions of all LAIIns formulations. The fibril formation of the Ins degludec (InsDeg) Tresiba® (Tre)

itself was evaluated without additives, which showed extremely slow fibril formation. The results showed that InsDeg significantly promoted fibril formation, compared with the original solution of the formulation. In the absence of additives, the proportion of monomers increased and Tre showed resistance to fibril formation owing to the presence of a stable dihexamer. When administered subcutaneously, Tre forms multi-hexamers, and its low-molecular-weight additives diffuse and disappear faster than the high-molecular-weight InsDeg; this leads to gradual generation of monomers, which are then absorbed. Therefore, it was shown that Tre cannot be used as a formulation that does not form fibrils *in vivo*. *In vitro* and *in vivo* experiments revealed that the fibril formation of LAIns was promoted by the presence of HI fibril nuclei even under weak physical stimulation. As fibril formation was promoted under different molecules, in clinical practice, if IDA or IB is suspected in one formulation, changing to another formulation cannot be expected to suppress the progression of IDA and IB. Therefore, if IDA or IB is suspected, changing the administration site was considered to be the most effective method for suppressing IDA and IB progression. In PBA-Ins, which was synthesized as an Ins that does not generate IDA, PBA was mainly modified at the N-terminus of the A chain and the N-terminal of the B chain of HI. Furthermore, it showed a hypoglycemic effect and a sustained action by binding to erythrocytes. PBA-Ins did not promote fibril formation *in vitro*, even in the absence of CRS. As the monomer content of PBA-Ins was equivalent to that of HI, it was clarified that modification of the N-terminus of the A-chain and B-chain suppressed β -structure formation and was effective in preventing fibril formation.

In Chapter 3, I tried to elucidate the suppression mechanism of Ins absorption in IDA and IB. Rats were subcutaneously treated with fibril-HI (F-HI), and the absorption of HI and Fluorescein-Dextran (FD-10) at the F-HI site was compared. Blood flow and vascular permeability were also evaluated. F-HI was prepared *in vitro* and then subcutaneously administered to rats for 2 weeks to produce rats that had no clear subcutaneous mass formation, but had F-HI. In the rats, FD-10 absorption was higher at the F-HI site than at the PBS site. On the contrary, HI absorption was lower at the F-HI site than at the PBS site. Vascular permeability did not increase at the PBS site, but increased at the F-HI site, presumably owing to inflammation. As no difference in blood flow was observed between the two sites, it was considered that FD-10 absorption was promoted at the F-HI site owing to enhanced vascular permeability. In addition, although absorption of vascular permeability positively affected absorption, the decrease in HI absorption suggested that the presence of F-HI itself suppressed HI absorption. This phenomenon was reproduced in an *in vitro* experiment. Therefore, it was confirmed that the HI concentration that allowed diffusion and migration was reduced by the adsorption of the HI molecule to the fibril, thereby suppressing HI absorption.

The results of this research provided important information not only for the treatment and prevention of IDA but also for maintaining stable and effective treatment of IDA. Furthermore, these findings are expected to lead to the development of Ins that are less likely to cause fibril formation and IDA. I believe that to realize safe and effective treatment for patients, it is important to provide the information obtained in this study to many pharmacists.

論文審査の結果の要旨

糖尿病患者は2019年には全世界で4億6000万人強と推定され、今後さらに増加することが予想される。我が国においても糖尿病患者は急速に増加し、1000万人に達すると予測されている。1型、2型を問わず糖尿病の治療においてインスリンは欠かすことのできない治療薬であり、作用の持続性を考慮した様々な製剤が開発され使用されている。インスリンの投与は皮下注射が基本であり、多くの場合、患者が自己投与する。インスリンを皮下投与すると、投与部位でアミロイド化して沈着すること（インスリンアミロイドーシス、線維化）は古くから知られていたが、近年、治療における大きな問題点として注目されている。インスリン線維化が生じた部位ではインスリンの吸収障害が起こり、血糖コントロールの悪化を招く。また、血糖コントロールが悪化したためインスリン投与量を増やした場合、患者が自己注射する場合に正常部位に投与すると、逆に重篤な低血糖を招く。さらに、高齢者の場合には認知機能の低下や併発疾患などのために正確に投与することが困難な場合があるものと予想される。

このような背景から、大野氏は本研究において、インスリンが線維化する要因を詳細に検討することによってインスリン線維化の過程を統一的に理解することを試みた。さらに、インスリン線維化部位では投与したインスリンの吸収率が低下するメカニズムの解明を試みた。論文は3章から構成され、第1章ではインスリンの線維化を促進する要因について *in vitro* で検討を行っている。第2章では種々のインスリンアナログ製剤に対し、それぞれ線維化のしやすさを *in vitro* および *in vivo* で比較するとともに、既存の製剤にはない修飾を施すことによって線維化が起こりにくいインスリン誘導体の作成を試みた。第3章では実験動物にインスリン線維化を生じさせ、インスリンの吸収阻害機構を検討している。

第1章では、ヒューマリン®Rを用い *in vitro* で線維化に影響を与える要因を検討した。ヒューマリン®R製剤においてインスリンは亜鉛の存在下に安定なヘキサマーとして存在している。インスリンは通常 α ヘリックス構造をとるが β シート構造に変化することが線維化の指標と考えられるため、線維化の程度を β シート構造との相互作用により蛍光を発するチオフラビンT (ThT) の蛍光強度により評価した。また、線維化により水に不溶なることから、溶液の濁度も併せて測定した。ヒューマリン®Rは強く振盪すると線維化が進むこと、線維化インスリン核を共存させると緩い振盪でも線維化が進むことが示唆された。次に、製剤を希釈すると予想に反してインスリンの線維化速度が上昇したことから、製剤溶液に含まれる *m*-クレゾールと亜鉛の関与が示唆されたため、さらに検証を行い、*m*-クレゾールの濃度低下により線維化速度が著しく上昇すること、*m*-クレゾールの濃度低下に伴い亜鉛濃度がやや低下することを見出した。また、タンパク質は等電点付近のpHで溶解度が最も低下するためpHの影響を検討し、溶解度低下により生じる沈殿と線維化は異なる現象であることを突き止めた。以上の結果から、インスリンの線維化を促進する要因として物理的な刺激と線維化核の存在があげられた。また、*m*-クレゾールの濃度が低下するとインスリンヘキサマーが不安定となり亜鉛が放出されやすくなり、亜鉛が失われることでヘキサマーからモノマーへと移行し、モノマーが線維化する可能性が示唆された。

第2章ではまず、市販されている様々なインスリン製剤について、線維化する条件を比較検討した。市販のインスリン製剤はインスリンのアミノ酸の置換・欠失、化学修飾などによって効き目の速さや持

続性に変化を持たせている。投与後の効果の出現時間から超速効型、速効型、中間型、持効型などに分類され、効果が長いものほどヘキサマー、ヘキサマーダイマーなどとして安定に存在し、効果が速いものほどモノマー体である。ヒューマリン®R、ランタス®、レベミル®、トレシーバ®を *in vitro* で強く振盪し線維化速度を ThT の蛍光強度で評価するとともに、ラマン分光法により α ヘリックスと β シートの割合を、また、円二色性分光法により分子の会合状態を評価した。これらの製剤のうちいくつかは *in vitro* において強い振盪あるいは線維化インスリン核の存在下で線維化が促進されることを明らかにした。また、*in vivo* で、線維化インスリン核が持効性のインスリン製剤の繰り返し皮下投与によるインスリン線維化を促進したことを確かめた。これらの比較により、モノマーが多い製剤ほど線維化が速いという傾向が認められたが、それ以外にも複数の要因があるものと推察された。次に、フェニルボロン酸 (PBA) で修飾したインスリンを作成し、*in vitro* で強い振盪により線維化が起こりにくいことおよび赤血球表面糖鎖に結合することを確認し、ラットの静脈に投与した。PBA 修飾インスリンは、血糖降下作用を有するばかりでなく、効果が持続することが確認されたことから、線維化しにくいインスリン製剤の候補としての可能性を示唆している。

第 3 章では *in vivo* において線維化インスリンがインスリンの吸収に与える影響を解析した。まず、*in vitro* で調製した線維化インスリンをラットの背面皮下に 2 週間投与し、投与部位を ThT と反応させ、 β シート構造物が生成していることを確認し、モデル動物とした。このモデルにおいて後から投与したインスリンの吸収率を経時的に調べたところ、正常ラットに比べてインスリンの吸収率が有意に低下した。ラット皮下に生じた線維化インスリン部位において血管透過性が亢進し、水溶性高分子 FD-10 の吸収が有意に上昇したことを考慮すると、インスリンの吸収低下は投与インスリンが投与部位において線維化インスリンに吸着された結果であることが推察された。そこで、*in vitro* の実験系において線維化インスリンがインスリンを吸着することを確認した。

以上、本論文は、*in vitro* およびラットを用いた *in vivo* 実験を組み合わせ、種々のインスリン製剤においてインスリンの線維化が生じる要因を系統的に明らかにし、線維化インスリンがインスリンの吸収を阻害する機構について考察を加えた。さらに、線維化を回避できるインスリン誘導体の作成を試みている。本研究における実験系の構築、得られたデータの解析と解釈は論理的で妥当なものと判断できる。また、本論文の知見はインスリン製剤の臨床上の問題を解決するためのいくつかの新しくかつ重要な情報を提示している。したがって、本論文は本研究科課程による博士 (薬学) の学位に値するものと判断する。