S1-11

グリコシル化によるペプチドの腸管吸収の改善

東京理科大学薬学部薬剤学研究室

○野本真博、芳賀 信、林 正弘

Improvement of intestinal absorption of peptides by glycosylation

Masahiro NOMOTO, Makoto HAGA and Masahiro HAYASHI

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Science University of Tokyo, Tokyo 162

【目的】 ペプチド性薬物の腸管からの吸収性を改善するためには、薬物の上皮細胞膜透過を促進させること及び吸収可能な形の薬物の吸収部位における分子数(濃度)を増大させることが重要である。一般にジペプチドおよびトリペプチドはペプチド輸送系によって能動輸送されるが、テトラペプチド以上になると担体介在性の輸送は見出されておらず、その吸収機構は受動拡散またはエンドサイトーシスが主と言われている。

当研究室では、インスリン(INS)の腸管からの吸収性改善のために、INSのD-グルコース置換体であるp-(succinylamido)-phenyl- α -D-glucopyranoside(SAPG)-INSの利用を考えた。すなわち、小腸上皮細胞刷子縁膜に存在するNa⁺依存性D-グルコース輸送担体の利用に着目し、INSをさらに効率よく吸収させることを企図したものである。その結果、SAPG-INSをラット腸管内に投与した時に有意な血糖降下作用がみられたこと[1]、又この理由としてグリコシル化による酵素に対する抵抗性の上昇[2]、小腸上皮細胞刷子縁膜に存在するNa⁺依存性D-グルコース輸送担体の関与[3]、[4]が考えられることを報告した。しかし、SAPG-INSがジペプチドやトリペプチドのように、D-グルコース輸送担体により輸送される可能性はその分子量からみて考えにくい。そこで本研究では、グリコシル化の有用性をSAPG-INSが高血糖ラットにおいても確かに有効な血糖降下作用を示すことから確認した。次に、H⁺共輸送担体が存在しないとされているペプチドの内でも小さいテトラペプチド(Gly-Gly-Tyr-Arg; GGYR)のグリコシル体(SAPG-GGYR)を合成し、その輸送特性に関してラット小腸上皮細胞刷子縁膜を用いて、Na⁺依存性D-グルコース輸送担体の関与について詳細な検討を行い、グリコシル化がペプチド吸収改善の一方法になり得るかを考察した。

【実験方法】 **Phe²¹-1置換SAPG-INSの合成**：SAPGは混合酸無水物法により、p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(NPG)からp-aminophenyl- α -D-glucopyranoside(APG)を経由し

て合成した。これにUekiらの方法[5]に従ってdimethylphosphinothioyl chloride(Mpt-Cl)を作用させSAPG-Mptとした。一方、bovine-INSと4-(p-methoxybenzyloxycarbonyloxy)phenyl dimethyl sulfonium methylsulfate(pMZ-DSP)とを反応させると収率よくGly^{A1},Lys^{εB29}-2保護pMZ-INSを生成するので、これをアニオン交換クロマトグラフィーにより精製した。SAPG-Mptと上記の2保護体を反応させ、保護基をアニソールを含むトリフルオロ酢酸で除去することにより、Phe^{B1}-1置換SAPG-INSを選択的に合成することができた。作成したPhe^{B1}-1置換SAPG-INSは、HPLC、2次元展開TLCによるN末端置換部位の解析、及びアミノ酸分析により確認した。

SAPG-INSの吸収性：In situ Doluisio法を用いてインスリンの生理活性すなわち血糖降下作用の発現の有無を、正常ラット(Wistar系雄性ラット, 7~8週令)及び高血糖ラットを用いて行った。高血糖ラットは、ストレプトゾトシン 60mg/Kgを腹腔内投与して3日後の血糖値が正常ラットの約3倍の値である平均400mg/dlを示すものを用いた。

SAPG-GGYRの合成：SAPG-GGYRは、SAPG-INSと同様に混合酸無水物法を用いて合成した。作成したSAPG-GGYRの糖：ペプチドの結合比はフェノール硫酸法を用いて定量した。またSIMSを用いて分子量を測定し、DNS化によりGlyのN末端に糖が付加していることを確認した。

SAPG-GGYRの酵素抵抗性：37℃においてGGYR及びSAPG-GGYRを、ラット小腸からMg²⁺沈殿法[6]により調製したBBMVと共にインキュベーションし、経時的に分解性をHPLCを用いて求めた。

SAPG-GGYRのBBMVへの取り込み：SAPG-GGYRをラクトペルオキシターゼ法[7]を用い¹²⁵I標識し、37℃において迅速ろ過法を用いてBBMVへの取り込みを調べた。

【結果及び考察】 **SAPG-INSの血糖降下作用：** Phe^{B1}-1置換SAPG-INSを高血糖ラットの空腸内に投与したときの血糖値(BGL)の変化をFig.1に示した。投与後240分でcontrol値の約25%となる血糖降下作用を発現し、240分以後360分まで低血糖値を維持した。正常ラットでは、投与後240分に高血糖ラットとほぼ同程度の血糖降下作用を示したが、その後血糖値は正常値に戻った(data not shown)。これらの結果は、インスリンをグリコシル化することによって、その吸収量が増大し、その作用は高血糖時に、より有効に働くことを示唆している。

Fig.1. Changes of Blood Glucose Level after the administration of Phe^{B1}-monosubstituted SAPG-INS in diabetic rats (*P<0.05, **P<0.01)

□ Phe^{B1}-monosub. SAPG-INS 50U/Kg
● Bovine-INS 50U/Kg (control)

SAPG-GGYRの酵素抵抗性：BBMV上に存在する酵素による α -SAPG-GGYRの分解をFig.2に示した。GGYRは20分間で約90%が分解するのに対し、 α -SAPG-GGYRは約20%の分解にとどまり、グリコシル化によりBBMV上に存在する酵素に対する抵抗性が上昇することが示唆された。

SAPG-GGYRの取り込みに及ぼす浸透圧の影響： α -SAPG-GGYRのBBMVへの取り込みに及ぼすmediumの浸透圧の影響を、mannitol量により浸透圧を変化させることから検討した(data not shown)。その結果、 α -SAPG-GGYRのBBMVへの吸着の寄与は小さく、 α -SAPG-GGYRはBBMV内に取り込まれていることが示された。

Fig.2. Decomposition of α -SAPG-GGYR and GGYR in BBMV suspension (* $P < 0.001$)

Fig.3. Time course of α -SAPG-GGYR uptake by BBMV

—□— α -SAPG-GGYR (37°C Na⁺ gradient)
 —●— α -SAPG-GGYR (4°C Na⁺ gradient)
 - - -▲- - α -SAPG-GGYR (37°C K⁺ gradient)

Fig.4. Comparison between α - and β -SAPG-GGYR uptake by BBMV

—□— α -SAPG-GGYR
 —●— β -SAPG-GGYR
 - - -▲- - GGYR

SAPG-GGYRのBBMVへの取り込み： 125 Iラベルした α -SAPG-GGYR及びGGYRのBBMVへの取り込み量を、迅速ろ過法により測定した結果をFig.3に示した。37°Cで内向きのNa⁺勾配存在下において、BBMVに取り込まれる α -SAPG-GGYR量は、Na⁺勾配非存在下及びNa⁺勾配存在下4°Cの場合に比較し、有意に大であった。さらに1mMのPhlorizinを添加することにより取り込み量が有意に減少したことから(data not shown)、 α -SAPG-GGYRの取り込みは、SAPG-INSのときには明確ではなかったNa⁺依存性D-グルコース輸送担体が関与していることが示された。次に、 α 体及び β 体のアノマー間でのBBMVへの取り込みの違いを比較した結果をFig.4に示した。その結果、 β 体の方がBBMVへの取り込みが大きく、 α 体よりも

β 体の方が、 Na^+ 依存性D-グルコース輸送担体への親和性が高いことが示唆された。これは、水間らの報告[8]と矛盾しない結果であった。

以上、ペプチドの吸収性改善を目的としたグリコシル化により、INSの場合では、高血糖ラットに対してより有効な血糖降下作用が認められた。またテトラペプチドの場合では、分解酵素に対する抵抗性の増大、 Na^+ 依存性D-グルコース輸送担体の関与及び α 、 β アノマー間での取り込みの差が示された。このように本研究で見い出されたD-グルコース修飾により、ペプチドが H^+ 共輸送ペプチド担体ではなく、 Na^+ 依存性D-グルコース輸送担体により輸送されるという結果は新しい知見であり、吸収性が低いペプチド性薬物の腸管吸収性を改善するうえで有用な知見であると考えられる。今後は、どの程度の大きさのペプチドまでがこの輸送担体により輸送されるのか、その特性ならびに実際の吸収時の安定性について更に検討していく予定である。

【Abstract】 Major obstacles to the oral administration of peptide drugs are their low transmembrane permeability and enzymatic degradation in the gastrointestinal tracts. We glycosylated insulin (INS) to try to solve these problems. When the derivative, B1-Phe monosubstituted p-(succinylamido)-phenyl- α -D-glucopyranoside (SAPG)-substituted insulin (SAPG-INS), was administered intraintestinally to rats, it showed a greater hypoglycemic effect than the native bovine insulin. One of the causes of this effect was considered to be the interaction of SAPG-INS with the D-glucose transporter. To investigate more clearly the possibility whether a glycosylated peptide is transported by the Na^+ , D-glucose cotransporter, we synthesized ^{125}I -labeled SAPG-Gly-Gly-Tyr-Arg (SAPG-GGYR) and examined its uptake to BBMV by a rapid filtration technique. In the presence of Na^+ -gradient inward to BBMV, the amount of SAPG-GGYR taken up to BBMV was significantly increased in comparison with that in the absence of Na^+ -gradient. These findings suggested that the glycosylated tetra-peptide is transported by the Na^+ dependent D-glucose cotransporter. Consequently it is suggested that the glycosylation of peptide drugs increases the resistance to enzymatic degradation and is useful for the improvement of its intestinal absorption.

【Reference】 [1] M. Haga et al., Chem. Pharm. Bull., 38 (7) 1983-1986 (1990)

[2] 嶋谷 隆祐ら 日本薬学会 第110年会講演要旨集IV, 1990, pp.84

[3] 橋本 匡ら 日本薬学会 第112年会講演要旨集IV, 1992, pp.58

[4] 橋本 匡ら 第23回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム(京都)講演要旨集, 1992, pp.77-80

[5] M. Ueki et al., Chem. Lett., 45-48 (1982)

[6] C. Tiruppathy et al., Biochem. Pharmacol., 37 1399-1405 (1988)

[7] J. L. Hamlin et al., J. Biol. Chem., 249 21-32 (1974)

[8] T. Mizuma et al., Biochem. Pharmacol., 45 (7) 1520-1523 (1993)