イメグリミン塩酸塩
製造販売承認申請

CTD 第 2 部

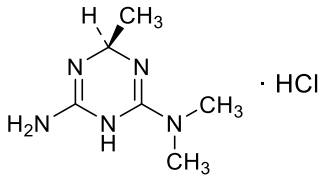
2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1　緒言

大日本住友製薬株式会社

目次

2.6.1 緒言
2.6.1 緒言.....5

【本項における用語の説明】

用語	定義、読み替え等
イメグリミン	一般名： イメグリミン塩酸塩 化学名： (6*R*)-N^2,N^2,6-Trimethyl-3,6-dihydro-1,3,5-triazine-2,4-diamine monohydrochloride 化学式（分子量）： $C_6H_{13}N_5$・HCl（191.66） 構造式： 

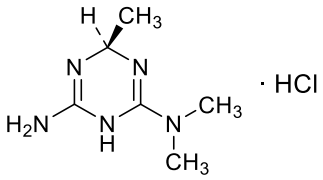
【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議

2.6.1　緒言

イメグリミン塩酸塩（開発コード：PXL008、以下、イメグリミン）は、Tetrahydrotriazine 構造を有する新規化合物（図 2.6.1-1）であり、グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用とインスリン抵抗性改善作用を併せ持つ新規作用機序の薬剤である。イメグリミンの薬理作用はミトコンドリア機能改善に基づくと考えられる。イメグリミンは Merck Serono 社から Poxel SA 社に 2009 年に導出され、大日本住友製薬株式会社は 2017 年 10 月 30 日、国内開発・販売権を Poxel SA から獲得した。イメグリミンの薬理作用から、2 型糖尿病発症の病因がインスリン分泌低下、インスリン抵抗性亢進のいずれであっても血糖降下作用が期待できることから、単独療法、併用療法共に 2 型糖尿病患者の新たな治療選択肢になると考え、イメグリミンの開発に至った。

図 2.6.1-1　イメグリミンの構造式



イメグリミンの特性を明確にするため、各種 *in vitro* 試験及び *in vivo* 非臨床薬理試験を実施した。すなわち、糖尿病モデル動物での長期血糖降下作用（2.6.2.2.1）、正常及び糖尿病モデル動物を用いたグルコース濃度依存的インスリン分泌作用（2.6.2.2.2）及び糖尿病モデル動物及び細胞を用いたインスリン抵抗性改善作用を検討した（2.6.2.2.3）。また、イメグリミンの作用機序として、糖尿病モデル動物由来膵島を用いてグルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用の機序を検討した（2.6.2.3.1、2.6.2.3.2、2.6.2.3.3、2.6.2.3.4、2.6.2.3.5、2.6.2.3.6）。

副次的薬理試験では、125 種類の受容体若しくは酵素に対する結合試験及び阻害試験を行った（2.6.2.4）。

イメグリミンの安全性薬理に関して、中枢系（2.6.2.5.1）、心血管系（2.6.2.5.2）、呼吸系（2.6.2.5.3）を検討した。更に、イメグリミンはミトコンドリア機能に作用して complex I 活性を低下させること（2.6.2.3.8）、また、イメグリミンのラット及びイヌの安全性試験（2.6.6.3）にて血漿中乳酸濃度上昇がみられたことから、乳酸アシドーシス惹起に及ぼす影響を評価した（2.6.2.5.4）。

薬物動態試験として、イメグリミンの動物での体内動態を検討するため、マウス、ラット、イヌ及びサルに、非標識イメグリミン又は[^{14}C]標識イメグリミンを投与して、吸収（2.6.4.3）、分布（2.6.4.4）、代謝（2.6.4.5）及び排泄（2.6.4.6）を検討した。また、イメグリミンは不斉構造を有することから、生体での異性体変換の可能性を検討した（2.6.4.5.3.4）。

ヒト試料（血漿、血液、肝細胞、各種臓器ミクロソーム又は S9）、ヒト-トランスポーター

発現細胞又はCaco-2細胞を用いて、たん白結合（2.6.4.4.2）、血球移行性（2.6.4.4.2）、代謝安定性（2.6.4.5.2）、CYP誘導（2.6.4.5.4）、CYP阻害（2.6.4.5.5）、膜透過やトランスポーター基質（2.6.4.7.1、2.6.4.7.2）及びトランスポーター阻害（2.6.4.7.3）について、*in vitro*の系で検討した。

毒性試験として、イメグリミンの単回投与毒性試験（2.6.6.2）、反復投与毒性試験（ラット26週間（2.6.6.3.7）、イヌ12月間（2.6.6.3.10））、生殖発生試験（2.6.6.6）、遺伝毒性試験（2.6.6.4）、がん原性試験（遺伝子改変マウス6か月間（2.6.6.5.2.2）、ラット2年間（2.6.6.5.1.2））を実施した。これらの試験は、適切なガイドラインに準拠し、主要な試験についてはGLPを遵守して実施した。一部の*in vivo*試験では、適切な分析法を用いたトキシコキネティクスを実施した。上述の試験のほかに、局所刺激性試験を実施した（2.6.6.7）。なお、「医薬品の光安全性評価ガイドラインについて（ICH-S10）」に従い、イメグリミンは光化学的性質から光毒性ポテンシャルを有さないと判断されるため（2.3.S.3.1）、光毒性試験を実施しなかった。

ヒトに[^{14}C]標識イメグリミンを投与した試験結果から（2.7.2.2.1.2）、いずれの代謝物もICHの「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス（ICH M3(R2)）」で規定された安全性確認の必要な閾値を下回るため、安全性を確認するための評価は実施しなかった（2.6.4.9）。

イメグリミンの原薬および製剤中に認められた不純物のうち鏡像異性体（S体）及び、不純物A*（[redacted]の[redacted]）の安全性評価（2.6.6.8.3.1、2.6.6.8.3.2）をICHの「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン（ICH Q3A(R2)）」及び「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン（ICH Q3B(R2)）」に従い実施した。

【予定されている効能・効果】

2型糖尿病

【予定されている用法用量】

通常、成人にはイメグリミン塩酸塩として1回1000 mgを1日2回朝、夕に経口投与する。

＊ 新薬情報提供時に置き換え

イメグリミン塩酸塩
製造販売承認申請
CTD 第 2 部

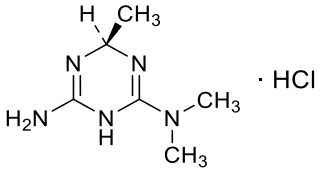
2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2　薬理試験の概要文

大日本住友製薬株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験....9
2.6.2.3 作用機序 23
2.6.2.4 副次的薬理試験 37
2.6.2.5 安全性薬理試験 38
2.6.2.6 薬力学的薬物相互作用試験....41
2.6.2.7 考察及び結論 42
2.6.2.8 図表 46

【本項における用語の説明】

用語	定義、読み替えなど
イメグリミン	一般名： イメグリミン塩酸塩 化学名： (6*R*)-N^2,N^2,6-Trimethyl-3,6-dihydro-1,3,5-triazine-2,4-diamine monohydrochloride 化学式（分子量）： $C_6H_{13}N_5$・HCl（191.66） 構造式： 

【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン 3 リン酸
qd	Quaque die	1 日 1 回
bid	Bis in die	1 日 2 回
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	環状アデノシン一リン酸
CD	Cluster of differentiation	–
DPP4	Dipeptidyl Peptidase-4	ジペプチジルペプチダーゼ 4
GK ラット	Goto-Kakizaki rat	後藤-柿崎ラット
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GLP-1	Glucagon-like peptide-1	グルカゴン様ペプチド-1
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価法
HAD	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ
$HCO3^-$	Hydrogen carbonate ion	炭酸水素イオン
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児由来腎臓
HF	High fat	高脂肪
HFHS	High fat high sucrose	高脂肪高スクロース
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IPGTT	Intraperitoneal glucose tolerance test	腹腔内グルコース負荷試験
ITT	Insulin tolerance test	インスリン負荷試験
K_{ATP}	ATP sensitive potassium	ATP 感受性 K^+
MC	Methylcellulose	メチルセルロース
mGPDH	Mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase	ミトコンドリア・グリセロール 3-リン酸脱水素酵素
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
N0-STZ	Neonatal streptozotocin	新生児 STZ
NAD^+	oxidized form nicotinamide adenine dinucleotide	酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NADH	reduced form nicotinamide adenine dinucleotide	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ

略号	省略しない表現	日本語
OGTT	Oral glucose tolerance test	経口ブドウ糖負荷試験
PKB	Protein kinase B	プロテインキナーゼ B
QTc	Corrected QT interval	補正 QT 間隔
Pgc1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	−
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	定量的ポリメラーゼ連鎖反応
ROS	Reactive Oxygen Species	活性酸素種
siRNA	small interfering RNA	−
SD ラット	Sprague Dawley rat	−
SE	Standard Error	標準誤差
STZ	Streptozotocin	ストレプトゾトシン
ZDF ラット	Zucker diabetic fatty rat	−

2.6.2.1　まとめ

2.6.2.1.1　効力を裏付ける試験

2 型糖尿病治療におけるイメグリミンの薬理学的作用及び臨床的有用性を検討するため、種々の *in vitro* 及び *in vivo* 非臨床試験を実施した。

非肥満糖尿病モデル動物である GK ラットを用いた試験では、25～150 mg/kg のイメグリミンを 1 日 2 回（週末は 1 日 1 回）で反復経口投与すると投与 35 日目で用量依存的な空腹時血糖降下作用を示し、56 日目でも 150 mg/kg の用量で有意な血糖降下作用を示したことから、イメグリミンは GK ラットで長期にわたり血糖降下作用を持続させることが示された。

GK ラット及び非肥満糖尿病モデル動物である STZ 誘発糖尿病モデルラットでの OGTT、肥満モデル動物である HF 食負荷ラットでの IPGTT を実施した。STZ 誘発糖尿病モデルラット（雄性 Wistar ラット）にイメグリミン（150 mg/kg）を単回経口投与すると、イメグリミンはグルコース負荷後の血糖値上昇を有意に抑制し、血中インスリン濃度を有意に上昇させた。GK ラットを用いた試験では、イメグリミン（200 mg/kg bid）を 4 週間経口投与することにより、空腹時血糖の有意な低下が認められた。また、同投与後に実施した OGTT では、イメグリミンはグルコース負荷後の血糖値上昇を有意に抑制し、血中インスリン濃度を上昇させる傾向を示した。HF 食負荷ラット（雄性 SD ラット）にイメグリミン（150 mg/kg bid）を 2 週間経口投与した後の IPGTT でも、イメグリミンは、グルコース負荷後の血糖値上昇を抑制し、血中インスリン濃度を有意に上昇させた。また、正常 Wistar ラット及び非肥満糖尿病モデルである N0-STZ 誘発糖尿病モデルラットでのグルコースクランプ試験では、生理食塩水の持続投与或いは 9.5～25 mmol/L を目標としたグルコース持続注入で、イメグリミン（200 mg/kg）を単回経口投与すると、グルコース濃度依存的なインスリン分泌促進作用を示した。これらの結果から、イメグリミンの耐糖能異常改善作用の機序にはグルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用が寄与すると考えられた。

STZ 誘発糖尿病モデルラットを用い、イメグリミン（150 mg/kg bid）を 2 週間経口投与した後に実施した euglycemic hyperinsulinemic clamp 試験（0.5 IU/h/kg でインスリンを持続投与）では、イメグリミンは定常状態グルコース注入率を有意に増加させた。肥満糖尿病モデル動物である HFHS 食負荷マウス（雄性 C57BL/6JOlaHsd マウス）を用い、イメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間経口投与した後に実施した ITT では、インスリン負荷による血糖降下作用を有意に増強させた。また、イメグリミンは、HFHS 食負荷マウスの肝臓及び筋肉で、HFHS 食負荷により低下した PKB のリン酸化を有意に回復させた。Wistar ラット由来初代培養肝細胞で、イメグリミンは 0.25 mmol/L 以上の濃度で糖新生を有意に抑制した。また、イメグリミン（25～100 mg/kg qd）を 45 日間経口投与した STZ 誘発糖尿病モデルラットの筋肉では、25 mg/kg 以上の用量で病態により低下した糖取り込みを有意に上昇させた。H-2Kb 筋肉細胞株でも、0.5 mmol/L 以上の濃度で糖取り込みを有意に上昇させた。これらの結果から、イメグリミンはインスリン抵抗性改善作用を示すと考えられた。

イメグリミンの作用機序を検討する一環として、グルコース濃度依存的インスリン分泌

促進作用及び肝臓、筋肉でのミトコンドリアに対する作用を検討した。

インスリン分泌促進作用の機序として、膵島での細胞内 NAD^+量、Ca^{2+}量、ATP 量及びNAD^+代謝物の生成に関わる CD38 分子のインスリン分泌への影響を検討した。GK ラット由来膵島を用いた試験で、イメグリミンは高濃度（16.7 mmol/L）グルコース存在下で 50 μmol/L 以上の濃度でインスリン分泌作用を示した。同膵島を用いた試験で、100 μmol/L のイメグリミンはニコチンアミドを出発物質とする NAD^+合成経路（salvage 経路）の律速酵素である NAMPT 遺伝子発現を上昇させると共に、細胞内 NAD^+量を増加させたことから、salvage 経路を介して細胞内の NAD^+量を増加させると考えれられた。また、イメグリミンは、ミトコンドリアの電子伝達に関わる NAD^+量に加えて、ATP 量を増加させたことから、ミトコンドリア機能を改善したと考えられた。イメグリミンは Ca^{2+}量も同様に増加させたことから、細胞内で増加した ATP によって K_{ATP} チャネル活性を抑制することで細胞外からの Ca^{2+}流入を増加させ、インスリン分泌を促進したと考えられた。更に、CD38 の発現を抑制することにより、イメグリミンのインスリン分泌促進作用が消失したことから、NAD^+の代謝酵素である CD38 によって生成される NAD^+代謝産物による細胞内 Ca^{2+}量増加もイメグリミンのグルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用に寄与していると考えられた。これらの結果から、イメグリミンは膵臓でミトコンドリア機能を改善することによるインスリン分泌の主経路である惹起経路の増強に加え、NAD^+を介したインスリン分泌の増幅経路を活性化することで、グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用を示すと考えられた。

更に、ZDF ラットを用いた試験でイメグリミン（150 mg/kg bid）を 5 週間経口投与により、イメグリミンはβ細胞の脱落を抑制し、ヒト膵島由来初代培養細胞を用いた試験では、グルコース又はフルクトースにより誘発される糖毒性による細胞死を 100 μmol/L の濃度で抑制したことから、イメグリミンのβ細胞保護作用により、長期にわたり血糖管理が可能である可能性も示唆された。肝臓及び筋肉でのミトコンドリアに対する作用の検討として、イメグリミンを 200 mg/kg bid で 6 週間経口投与した HFHS 食負荷マウスの肝臓及び筋肉でのミトコンドリア関連分子の酵素活性やたん白質量への影響を検討した。その結果、イメグリミンは HFHS 食負荷により低下した Complex III たん白質量及び活性を回復させると共に Complex I 活性を低下させ、ROS 産生を抑制した。また、イメグリミンは ATP 合成酵素量も増加させた。

更に、同モデルマウスの筋肉でも、イメグリミンはミトコンドリアの生合成に関わる Pgc1a の発現を増加させ、筋肉から抽出したミトコンドリアの呼吸を回復させたことから、ミトコンドリアの生合成と機能を回復させたと考えられた。これらの結果から、イメグリミンは肝臓及び筋肉でもミトコンドリア機能を回復させることにより、インスリン抵抗性改善作用を示すと考えられた。

2.6.2.1.2　副次的薬理試験

125 種類の受容体若しくは酵素に対する結合試験及び阻害試験を行い、イメグリミンは 1

μmol/L で明確な作用を示さなかった。

2.6.2.1.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験では生命維持を司る中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する影響を評価した GLP 適用試験（コアバッテリー）を 4 試験実施した。また、心血管系に対する影響を評価した GLP 非適用試験（hERG 試験）を 1 試験、更に、乳酸アシドーシス惹起に及ぼす影響を評価した GLP 非適用試験（重度急性腎不全ラットを用いた *in vivo* 試験及びラット肝臓由来 mGPDH に対する影響を評価した *in vitro* 試験）を 2 試験実施した。

イメグリミンはラットで単回経口投与により 1500 mg/kg まで中枢神経系及び呼吸器系に対して有意な影響を及ぼさなかった。心血管系に対しては、500 mg/kg を経口投与したイヌ 6 例中 3 例で軽微な心拍数減少が認められたが、血圧及び心電図パラメータに対して影響を及ぼさず、また、hERG テール電流に対して 500 μmol/L まで影響を及ぼさなかった。

イメグリミンは、重度急性腎不全ラットを用いた試験において、180 分間の静脈内持続投与で 100 mg/kg/h まで乳酸アシドーシスを起こさなかった。一方、メトホルミンでは、重度急性腎不全ラットにおいて 50 mg/kg/h で乳酸アシドーシスに伴う死亡が認められた。また、イメグリミンは mGPDH 活性を抑制しなかったが、メトホルミンは有意に抑制した。これらの結果から、イメグリミンは、メトホルミンと異なり、ヒトで乳酸アシドーシスを惹起するリスクは低いと考えられた。

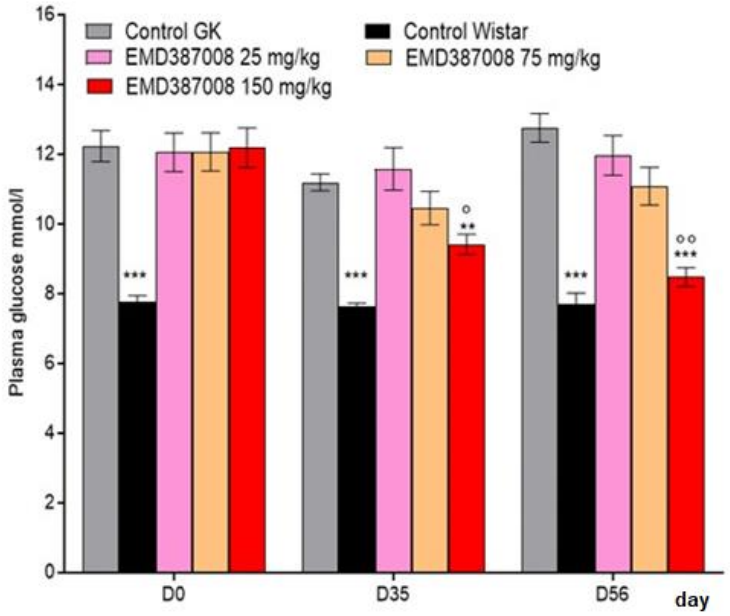
2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　糖尿病モデル動物での血糖降下作用（資料：4.2.1.1.01）

イメグリミンの長期血糖降下作用を検討するために、非肥満糖尿病モデル動物である GK ラットを用いて血糖値を測定した。7～8 週齢の雄性 GK ラットにコントロール（0.5% MC bid）又はイメグリミン（EMD 387008）を 25、75 又は 150 mg/kg bid（週末は 1 日 1 回）で 56 日間経口投与し、投与後 35 日目、56 日目の絶食後 3 時間時点の血糖値を測定した。コントロール GK 群では、試験期間中血糖値の変化は認められず、いずれの時点でも正常動物である Wistar ラットよりも高値を示した（図 2.6.2.2-1）。投与開始前の血糖値は、コントロール GK 群、イメグリミン 25 mg/kg 投与群、75 mg/kg 投与群及び 150 mg/kg 投与群の間で統計学的有意差はなかった。投与開始後 35 日目では、イメグリミン投与群で用量依存的に空腹時血糖値が低下し、150 mg/kg 投与群ではコントロール GK 群に対して、有意な空腹時血糖降下を示した。また、この空腹時血糖降下は投与開始後 56 日目でも認められ、150 mg/kg 投与群では有意な血糖降下を示した。

これらのことから、イメグリミンは GK ラットで長期にわたり血糖降下作用を持続させることが示された。

図 2.6.2.2-1　GK ラットに対するイメグリミンの血糖降下作用



7～8 週齢の雄性 GK ラットにコントロール（0.5% MC bid）又はイメグリミン（EMD 387008）を 25、75 又は 150 mg/kg bid（週末は 1 日 1 回）で 56 日間経口投与し、投与前、投与後 35 日目、56 日目の絶食後 3 時間時点の血糖値を測定した。データは、Mean ± SE (n = 10～18)を示す。

°:p < 0.05、 °°: p <0.001（D0 を対照とした paired t test）

**: p < 0.001、 ***: p < 0.0001（コントロール GK を対照とした Bonferroni/Dunnett's t test）

2.6.2.2.2　グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用

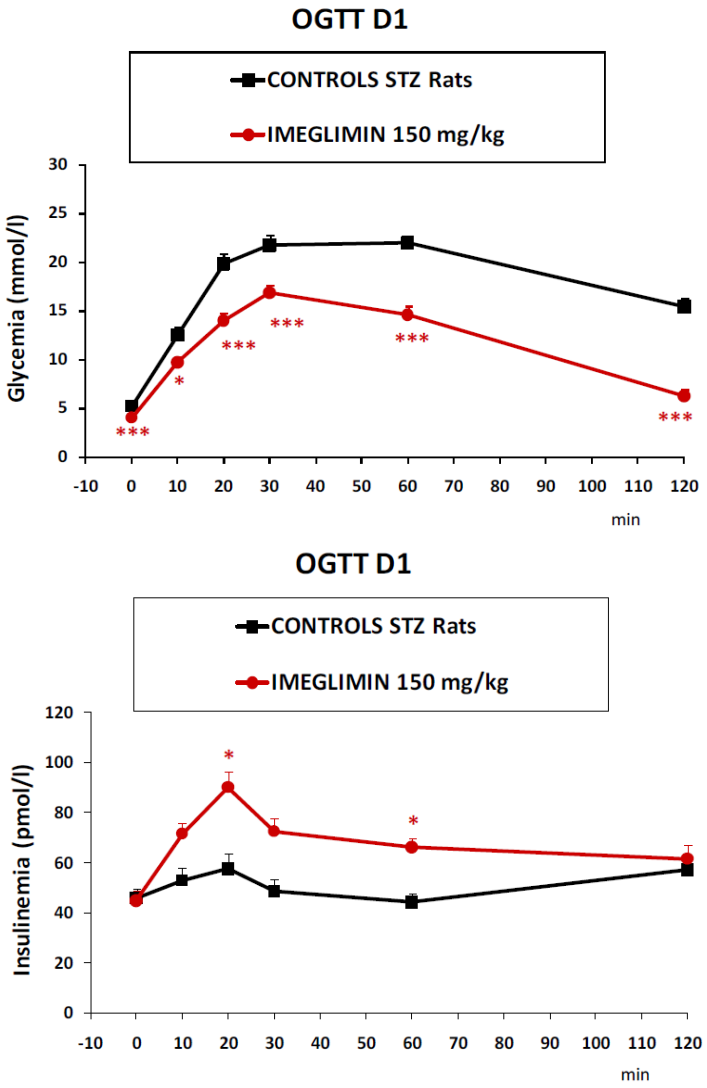
イメグリミンの耐糖能異常改善作用及びグルコース濃度依存的なインスリン分泌促進作用を評価するために、非肥満糖尿病モデル動物である STZ 誘発糖尿病モデルラット及び GK ラット並びに肥満モデル動物である HF 食負荷ラットを用いたグルコース負荷試験を実施し、また正常動物である Wistar ラット及び非肥満糖尿病モデル動物である N0-STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いたグルコースクランプ試験を実施した。

2.6.2.2.2.1　STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いた OGTT（資料：4.2.1.1.02）

雄性 Wistar ラットに STZ を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与した 10 日後に 15 時間絶食し、コントロール（0.5% MC）又はイメグリミン 150 mg/kg を単回経口投与し、その 1 時間後に 2 g/kg の用量でグルコースを経口投与した。グルコース投与直前、10、20、30、60、120 分後に採血し、血糖値及びインスリン濃度を測定した。その結果、イメグリミンは、グルコース負荷による血糖値上昇をコントロール群と比較して有意に抑制した（図 2.6.2.2-2）。また、イメグリミンは、グルコース投与後の血中インスリン濃度をコントロール群と比較して有意に上昇させた。すなわち、イメグリミンはグルコース投与後の血糖値上昇を抑制し、血中インスリン濃度の上昇作用を示した。

この結果から、イメグリミンは非肥満糖尿病モデル動物で耐糖能異常を改善し、その機序としてグルコース濃度上昇に応答したインスリン分泌促進作用の寄与が考えられた。

図 2.6.2.2-2　STZ 誘発糖尿病モデルラットに対する OGTT（上図：血糖値、下図：血中インスリン濃度）



雄性 Wistar ラットに STZ を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与した 10 日目に 15 時間絶食した後、0.5% MC 又はイメグリミン（150 mg/kg）を単回経口投与し（投与 15 時間前から絶食）、その 1 時間後に 2 g/kg の用量でグルコースを経口投与した。グルコース投与直前、10、20、30、60、120 分後に採血し、血糖値及びインスリン濃度を測定した。データは Mean ± SE (n = 25)を示す。
*: p<0.05、***: p<0.001（コントロール STZ ラットを対照とした Student's t test 又は Mann-Whitney U test）

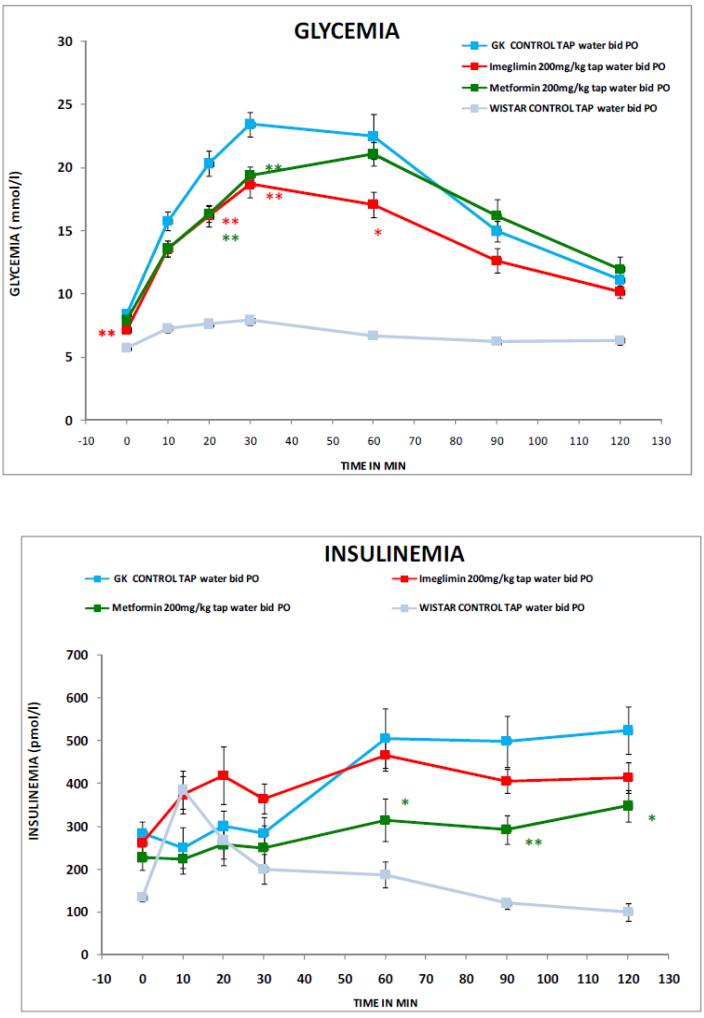
2.6.2.2.2.2　GK ラットを用いた OGTT（資料：4.2.1.1.03）

19～20 週齢の雌性 GK ラットにコントロール（蒸留水 bid）、イメグリミン（200 mg/kg bid）又はメトホルミン（200 mg/kg bid）を 4 週間経口投与した。最終投与の 2 時間後から 3 時間絶食させた後、グルコースを 2 g/kg の用量で経口投与した。グルコース投与直前、10、 20、 30、 60、 90 及び 120 分後に採血し、血糖値及び血中インスリン濃度を測定した。その結果、コントロール群では、Wistar ラット群と比較して、グルコース負荷後の血糖値上昇が高く（図 2.6.2.2-3）、GK ラットでは、耐糖能異常が生じていることが示された。イメグリミ

ン投与群では、コントロール群と比較して、グルコース投与前の空腹時血糖が有意に低下すると共にグルコース投与後の血糖値上昇が有意に抑制され、グルコース投与から 30 分後までの血中インスリン濃度は上昇傾向を示した。一方、メトホルミン投与群では 30 分後まで血糖値上昇が有意に抑制されたが、血中インスリン濃度の上昇はなかった。すなわち、イメグリミンは、メトホルミンとは異なり、グルコース投与後の血糖値上昇を抑制すると共に血中インスリン濃度の上昇作用を示すことが示唆された。

この結果から、イメグリミンは非肥満糖尿病モデル動物で、耐糖能異常を改善し、その機序としてグルコース濃度上昇に応答したインスリン分泌促進作用の寄与が考えられた。

図 2.6.2.2-3　GK ラットを用いた OGTT（上図：血糖値、下図：血中インスリン濃度）



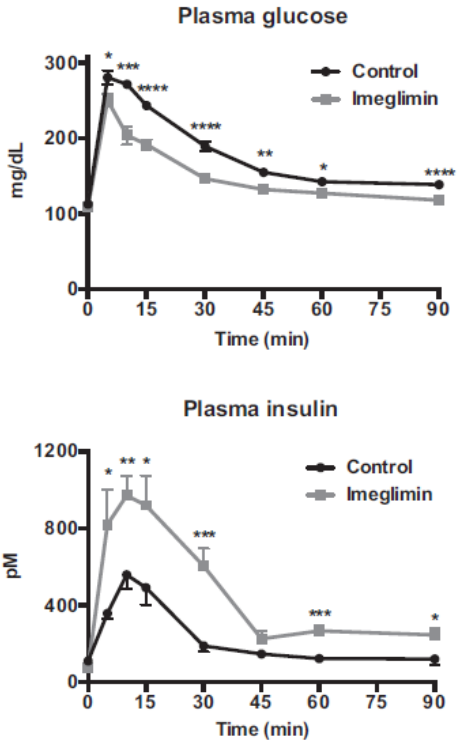
19～20 週齢の雌性 GK ラットにコントロール（蒸留水 bid）、イメグリミン（200 mg/kg bid）又はメトホルミン（200 mg/kg bid）を 4 週間経口投与し、最終投与の 2 時間後から 3 時間絶食させた後、グルコースを 2 g/kg の用量で経口投与した。グルコース投与直前、10、 20、 30、 60、 90 及び 120 分後に採血し、血糖値及び血中インスリン濃度を測定した。データは Mean ± SE（n = 10）を示す。
*: p<0.05、**: p<0.01（GK コントロールを対照とした Dunnett's t test、Wistar コントロールとの比較はなし）

2.6.2.2.2.3　HF 食負荷ラットを用いた IPGTT（参考文献：4.3.01）

雄性 SD ラットに HF 食（サフラワー油）を 2 週間摂取させた後、コントロール（ピーナッツバター bid）又はイメグリミンを 150 mg/kg bid で 2 週間経口投与した。化合物の最終投与（最終投与日の前日から絶食）から 15 分後にグルコース 1 g/kg を腹腔内投与し、グルコース投与直後、5、10、15、30、45、60 及び 90 分後に採血し、血糖値及び血中インスリン濃度を測定した。その結果、イメグリミン投与群では、グルコース投与後の血糖値上昇がコントロール群と比較して有意に抑制され、HF 食負荷ラットでの耐糖能異常の改善が認められた（図 2.6.2.2-4）。また、イメグリミン投与群では、グルコース投与後の血中インスリン濃度がコントロール群と比較して有意に上昇した。すなわち、イメグリミンはグルコース投与後の血糖値上昇を抑制し、血中インスリン濃度上昇作用を示した。

この結果から、イメグルミンは耐糖能異常を改善し、その機序としてグルコース濃度上昇に応答したインスリン分泌促進作用の寄与が考えられた。

図 2.6.2.2-4　HF 食負荷ラットを用いた IPGTT（上図：血糖値、下図：血中インスリン濃度）



HF 食負荷ラットにコントロール（ピーナッツバター bid）又はイメグリミン（150 mg/kg bid）で 2 週間経口投与した。化合物最終投与 15 分後にグルコース 1 g/kg を腹腔内投与し、グルコース投与直後、5、10、15、30、45、60 及び 90 分後に採血し、血糖値及びインスリン濃度を測定した。データは Mean ± SE (n = 6) を示す。
*: p<0.05、**: p<0.01、***: p<0.001、****: P <0.0001（コントロールを対照とした Student's t test）

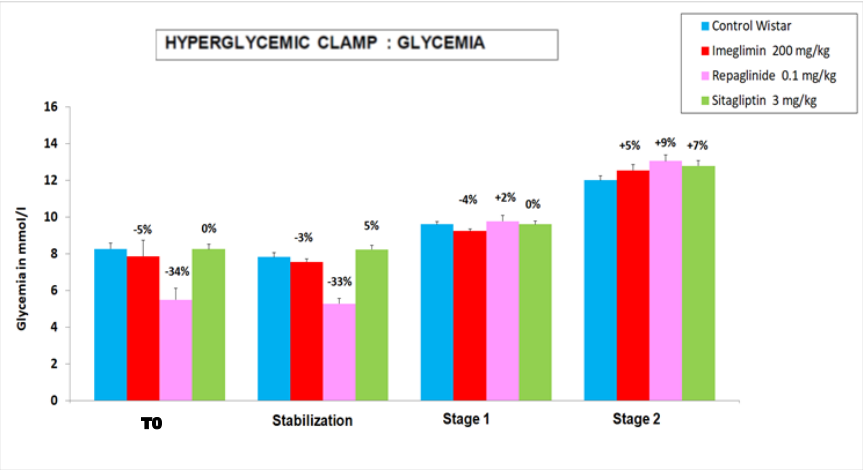
2.6.2.2.2.4　Wistar ラットを用いたグルコースクランプ試験（資料：4.2.1.1.04）

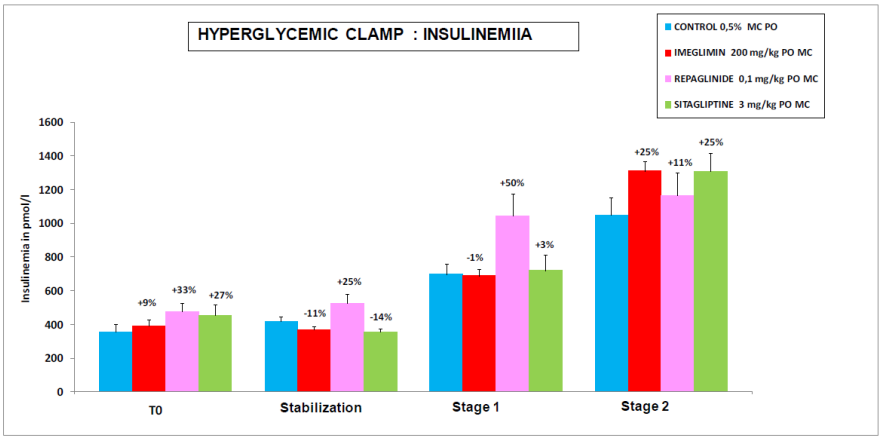
雌性 Wistar ラットにコントロール（0.5% MC）、イメグリミン 200 mg/kg、レパグリニド

0.1 mg/kg 又はシタグリプチン 3 mg/kg を単回経口投与した 15 分後にペントバルビタール麻酔を施し、その 40 分後を T0 として採血した。その後、生理食塩水の持続注入を開始し、その 20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stabilization）。Stabilization 段階での採血直後に、9.5 mmol/L グルコースを目標としたグルコースの持続注入を開始し、その 20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stage1）。Stage1 の採血直後に 12.5 mmol/L グルコースを目標としたグルコースの持続注入を開始し、その 20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stage2）。後日、それぞれの段階での血液サンプル中の血糖値及びインスリン濃度を測定した。その結果、イメグリミン投与群は、T0、Stabilization 及び Stage1 では、血中インスリン濃度の上昇を示さなかったが、Stage2 では血中インスリン濃度が上昇する傾向を示した（図 2.6.2.2-5）。一方、速効型インスリン分泌促進薬であるレパグリニド投与群は、T0 段階から血中インスリン濃度の上昇傾向を示した。DPP4 阻害薬であるシタグリプチンは、イメグリミンと同様に Stage2 のみで血中インスリン濃度を上昇させる傾向を示した。

イメグリミンは、高血糖条件である Stage2 でのみ血中インスリン濃度を上昇させたことから、正常範囲の血糖値ではインスリン分泌促進作用を示さず、DPP4 阻害薬であるシタグリプチンと同様にグルコース濃度依存的なインスリン分泌促進作用を有することが示唆された。

図 2.6.2.2-5　Wistar ラットを用いたグルコースクランプ試験（上図：血糖値、下図：血中インスリン濃度）





雌性 Wistar ラットに 0.5% MC、イメグリミン 200 mg/kg、レパグリニド 0.1 mg/kg 又はシタグリプチン 3 mg/kg を単回経口投与した 40 分後を T0 として採血した。その後、生理食塩水の持続注入を開始し、20、25、30 分後の 3 時点で採血した(Stabilization)。Stabilization 段階での採血直後に、9.5 mmol/L グルコースを目標としたグルコース持続注入を開始し、20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stage1）。Stage1 の採血直後に 12.5 mmol/L グルコースを目標としたグルコースの持続注入を開始し、20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stage2）。それぞれの段階での血糖値及び血中インスリン濃度を測定し、平均値を算出した。データは Mean ± SE (n = 7～9)を示す。
いずれの群でも有意差はなかった（コントロールを対照とした Dunnett's t-test）

2.6.2.2.2.5　N0-STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いたグルコースクランプ試験（資料：4.2.1.1.05）

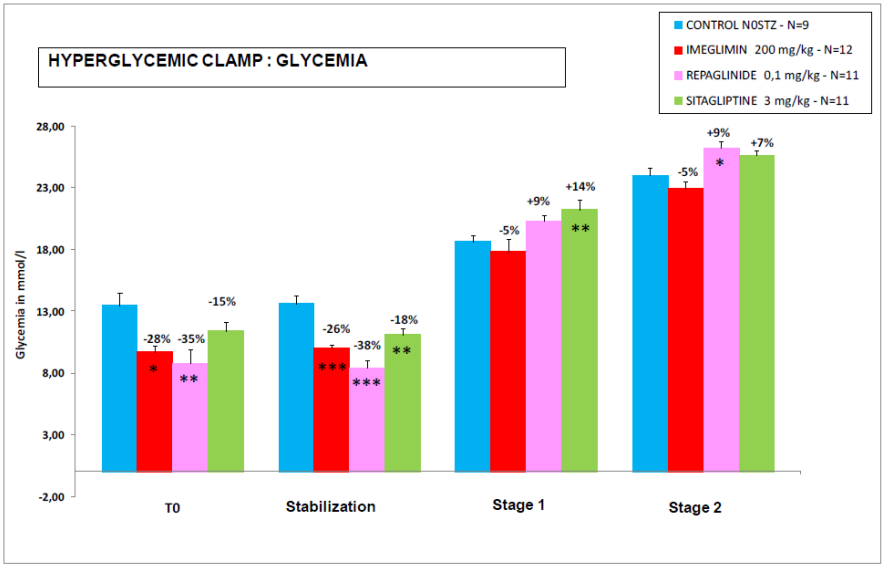
生後直後の雌性 Wistar ラットに 100 mg/kg の用量で STZ を静脈内投与し N0-STZ 誘発糖尿病モデルを作製し、成体 N0-STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いて試験を実施した。N0-STZ 誘発糖尿病モデルラットにコントロール（0.5% MC）、イメグリミン 200 mg/kg、レパグリニド 0.1 mg/kg 又はシタグリプチン 3 mg/kg を単回経口投与した 30 分後にペントバルビタール麻酔を施し、その 40 分後を T0 として採血した。その後、生理食塩水の持続注入を開始し、その 20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stabilization）。Stabilization 段階での採血直後に、18 mmol/L グルコースを目標としたグルコースの持続注入を開始し、その 20、

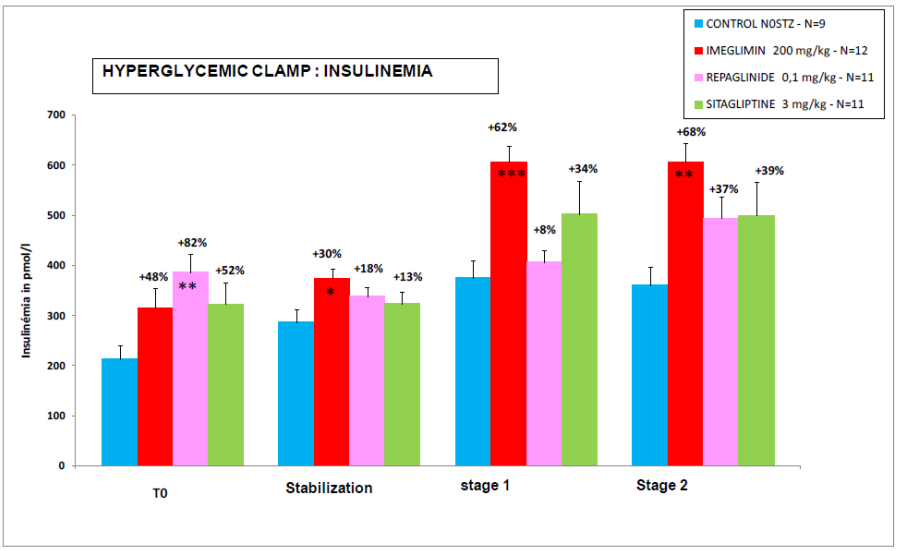
25、30 分後の 3 時点で採血した（Stage1）。Stage1 の採血直後に 25 mmol/L グルコースを目標としたグルコースの持続注入を開始し、その 20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stage2）。後日、それぞれの血液サンプル中の血糖値及びインスリン濃度を測定した。その結果、イメグリミン投与群は、グルコース投与前（T0 及び Stabilization）では血中インスリン濃度の上昇を示し（Stabilization では有意な上昇）、血中グルコース濃度を高めた Stage1 及び Stage2 でも血中インスリン濃度の有意な上昇を示した（図 2.6.2.2-6）。レパグリニド投与群は、T0 で有意な血中インスリン濃度の増加を示した。シタグリプチン投与群は、Stage1、Stage2 のいずれの高血糖条件でも血中インスリン濃度の上昇傾向を示した。

イメグリミンは、N0 -STZ 誘発糖尿病モデルラットでは、DPP4 阻害薬であるシタグリプチンと同様にグルコース投与前から血中インスリン濃度を上昇させたが、より高血糖状態にした Stage1 及び Stage2 では更に高い血中インスリン濃度を示した。

正常動物での結果（2.6.2.2.2.4）と併せると、イメグルミンはグルコース濃度依存的なインスリン分泌促進作用を有すると考えられた。

図 2.6.2.2-6　N0-STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いたグルコースクランプ試験（上図：血糖値、下図：血中インスリン濃度）





成体 N0-STZ 誘発糖尿病モデルラットに 0.5% MC、イメグリミン 200 mg/kg、レパグリニド 0.1 mg/kg 又はシタグリプチン 3 mg/kg を単回経口投与した 40 分後を T0 として採血した。その後、生理食塩水の持続注入を開始し、20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stabilization）。Stabilization 段階での採血直後に、18 mmol/L グルコースを目標としたグルコース持続注入を開始し、20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stage1）。Stage1 の採血直後に 25 mmol/L グルコースを目標としたグルコースの持続注入を開始し、20、25、30 分後の 3 時点で採血した（Stage2）。それぞれの段階での血糖値及び血中インスリン濃度を測定し、平均値を算出した。データは Mean ± SE (n = 9～12)を示す。
*: p<0.05、 **: p<0.01、***: p<0.001（コントロールを対照とした Dunnett's t-test）

2.6.2.2.3　インスリン抵抗性改善作用

インスリン抵抗性改善作用を検討するために、STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いた euglycemic hyperinsulinemic clamp 試験、肥満糖尿病モデル動物である HFHS 食負荷マウスを用いた ITT を実施した。また、肝臓及び筋肉でのインスリンシグナルの程度を測定するために HFHS 食負荷マウスの肝臓及び筋肉での PKB のリン酸化の程度を測定した。更に、*in*

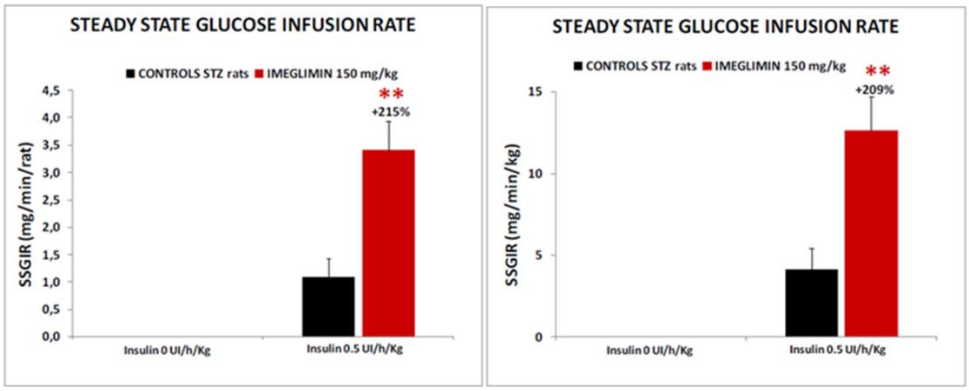
vitro 試験として、初代 Wistar ラット由来肝細胞での肝糖新生に対する効果、STZ 誘発糖尿病モデルラットの筋肉への糖取り込みに対する効果及び H-2Kb 筋肉細胞株での糖取り込みに対する効果を検討した。

2.6.2.2.3.1　STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いた euglycemic hyperinsulinemic clamp 試験（資料：4.2.1.1.02）

雄性 Wistar ラットに STZ を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与した 10 日目からコントロール（0.5% MC bid）又はイメグリミン（150 mg/kg bid）を 2 週間経口投与し、最終投与翌日に euglycemic hyperinsulinemic clamp 試験を実施した（最終投与から絶食）。その結果、イメグリミンは、0.5 IU/h/kg の用量でインスリンを持続投与した条件で定常状態グルコース注入率を有意に増加させた（図 2.6.2.2-7）。

この結果から、イメグリミンは、STZ 誘発糖尿病モデルラットでインスリンによる糖利用を改善することでインスリン抵抗性を改善することが示された。

図 2.6.2.2-7　STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いた euglycemic hyperinsulinemic clamp 試験（左図：ラットあたりの注入率、右図：体重当たりの注入率）



STZ 誘発糖尿病モデルラットにコントロール（0.5% MC bid）又はイメグリミン（150 mg/kg bid）を 2 週間経口投与し、最終投与翌日に 0.5 IU/h/kg の用量でインスリンを持続投与した条件で euglycemic hyperinsulinemic clamp 試験を実施し、定常グルコース注入率を測定した。Insulin 0 IU/h/kg はインスリン投与前を示す。データは Mean ± SE (n = 10)を示す。
**: p<0.01（コントロールを対照とした Student's t-test）

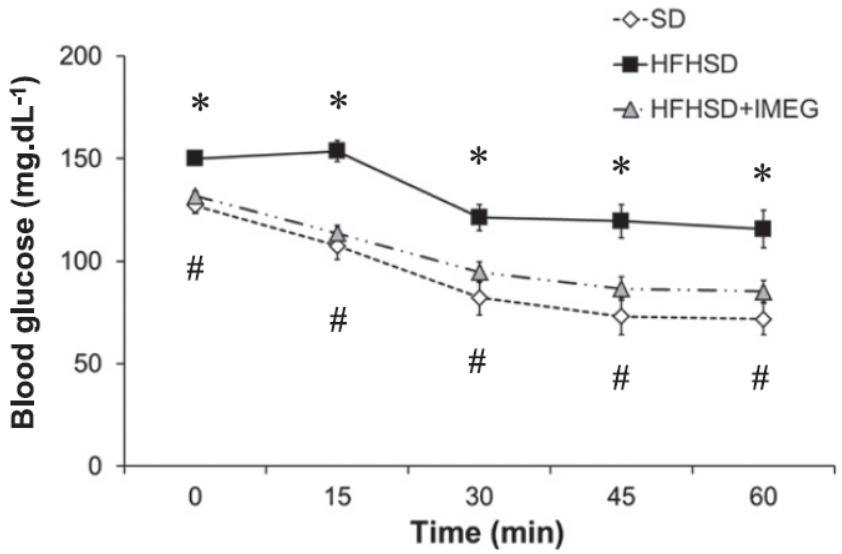
2.6.2.2.3.2　HFHS 食負荷マウスを用いた ITT（参考文献：4.3.02）

雄性 C57BL/6JOlaHsd マウスに通常食又は HFHS 食（TD99249; Harlan）を 16 週間摂餌させ、摂餌開始 10 週目から 16 週目までコントロール（0.5% MC bid）又はイメグリミン（200 mg/kg bid）を経口投与し、通常食マウスには 0.5% MC を 6 週間経口投与した。最終投与日に 6 時間絶食させた後にコントロール又はイメグリミン 200 mg/kg を経口投与し、更に 2 時間絶食させた後に 0.75 mU/g の用量でインスリンを腹腔内投与した。インスリン投与直前、15、30、45、60 分後に採血を行い、血糖値を測定した。その結果、イメグリミン投与群では評価時間を通じて、インスリン負荷による血糖値低下がコントロール群と比較して有意に

増強した（図 2.6.2.2-8）。

この結果から、イメグリミンは HFHS 食負荷マウスでインスリン抵抗性を改善することが示された。

図 2.6.2.2-8　HFHS 食負荷マウスを用いた ITT

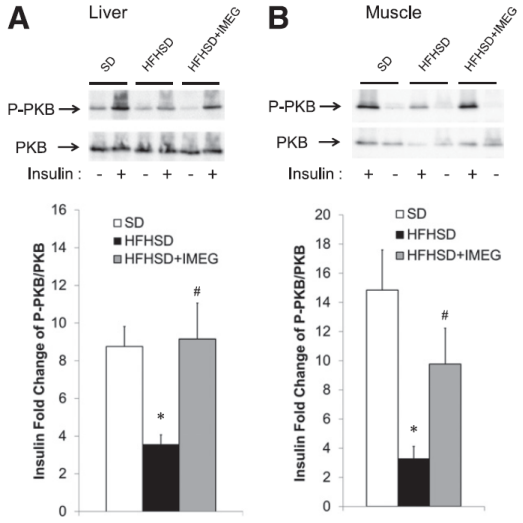


HFHS 食負荷マウスにコントロール（0.5% MC bid）（■：HFHSD）又はイメグリミン（200 mg/kg bid）（▲：HFHSD+IMEG）を 6 週間経口投与し、通常食マウス（◇：SD）にはコントロール（0.5%MC bid）を 6 週間経口投与した。最終投与日に 0.75 mU/g の用量でインスリンを腹腔内投与した。インスリン投与直前、15、30、45、60 分後に採血を行い、血糖値を測定した。データは Mean ± SE (n = 20)を示す。
*: P < 0.01（SD を対照として HFHSD と比較、Mann-Whitney U test）
#: P < 0.05（HFHSD を対照として HFHSD+IMEG と比較、Mann-Whitney U test）

また、本モデル動物での肝臓及び筋肉でのインスリンシグナル経路の活性化を検討するために、肝臓及び筋肉サンプル中のグルコースシグナル伝達分子である PKB のリン酸化を測定した。試験のサブグループマウスを 6 時間絶食させた後にコントロール（0.5% MC）又はイメグリミン 200 mg/kg を経口投与し、更に 2 時間絶食させた後に生理食塩水又はインスリン 10 mU/g を腹腔内投与し、その 10 分後に安楽死させ、肝臓又は腓腹筋を摘出した。摘出した肝臓又は腓腹筋での PKB のリン酸化を western blotting 法で測定した。その結果、イメグリミン投与群では､HFHS 食負荷群で通常食と比較して低下した肝臓及び腓腹筋の PKB のリン酸化が有意に回復した（図 2.6.2.2-9）。

これらの結果から、イメグリミンは、HFHS 食負荷で低下した肝臓及び筋肉でのインスリンシグナル伝達を回復させ、インスリン抵抗性を改善することが示された。

図 2.6.2.2-9　HFHS 食負荷マウスの肝臓及び筋肉でのインスリンシグナル伝達に対する作用（A：肝臓、B 筋肉）

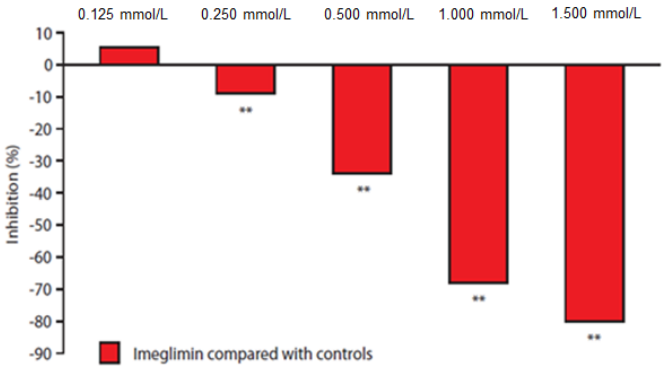


HFHS 食負荷マウスにコントロール（0.5% MC bid）（黒：HFHSD）又はイメグリミン（200 mg/kg bid）（グレー：HFHSD+IMEG）を 6 週間経口投与し、通常食マウス（白：SD）には 0.5% MC を 6 週間経口投与した。最終投与後 2 時間絶食させた後に生理食塩水又はインスリン 10 mU/g を腹腔内投与し、その 10 分後肝臓又は腓腹筋を摘出した。摘出した肝臓又は腓腹筋での PKB のリン酸化を測定した。データは mean ± SE (n = 5)を示す。
*: P < 0.01（SD を対照とした Mann-Whitney U test）
#: P < 0.05 （HFHSD を対照とした Mann-Whitney U test）

2.6.2.2.3.3　Wistar ラット由来初代培養肝細胞での肝糖新生試験（参考文献：4.3.03）

雄性 Wistar ラットの肝臓から単離した肝細胞に cAMP 50 µmol/L/ dexamethasone 0.5 µmol/L 存在下でコントロール（培地のみ）又は各種濃度のイメグリミン 0.125、0.25、0.5、1 又は 1.5 mmol/L を添加し、16～18 時間培養した。上清を回収後、上清中のグルコース濃度を測定し、コントロールに対する変化率を算出した（図 2.6.2.2-10）。その結果、イメグリミンは 0.25 mmol/L から濃度依存的な糖新生抑制作用を示した。

図 2.6.2.2-10　Wistar ラット由来初代培養肝細胞での肝糖新生試験

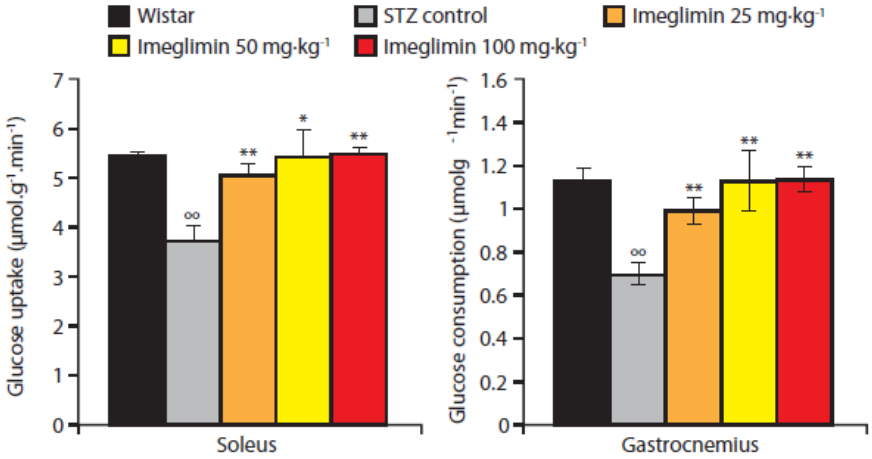


雄性 Wistar ラットの肝臓から単離した肝細胞に cAMP (50 µmol/L) / dexamethasone (0.5 µmol/L) 及び 0.125、0.25、0.5、1 又は 1.5 mmol/L のイメグリミンを添加し、16～18 時間培養後、上清中のグルコース濃度を測定し、コントロール群に対する平均変化率を算出した（n=5）。統計解析は個別のグルコース濃度データを基に行った。
**: p<0.01（コントロールを対照とした Dunnett's t-test）

2.6.2.2.3.4　STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いた筋肉での糖取り込み試験（参考文献：4.3.03）

雄性 Wistar ラットに STZ を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与した後、コントロール（蒸留水）又はイメグリミン（25、50 又は 100 mg/kg qd）で 45 日間経口投与し、正常 Wistar ラット群には蒸留水を投与した。最終日に、^{14}C-2-deoxy glucose を 150 mCi/mmol/L の用量で静脈内投与し、その 45 分後にヒラメ筋又は腓腹筋を採取し、筋肉中の ^{14}C-2-deoxy glucose 量を測定した。その結果、STZ 誘発糖尿病モデルラットでは、Wistar ラットと比較して、糖取り込みが有意に低下した。イメグリミン投与群では、25 mg/kg から糖取り込みが有意に改善し、50 mg/kg 投与群又は 100 mg/kg 投与群では、正常動物とほぼ同程度の取り込み活性を示した（図 2.6.2.2-11）。

図 2.6.2.2-11　STZ 誘発糖尿病モデルラットの筋肉での糖取り込みに対する作用（左図：ヒラメ筋、右図：腓腹筋）

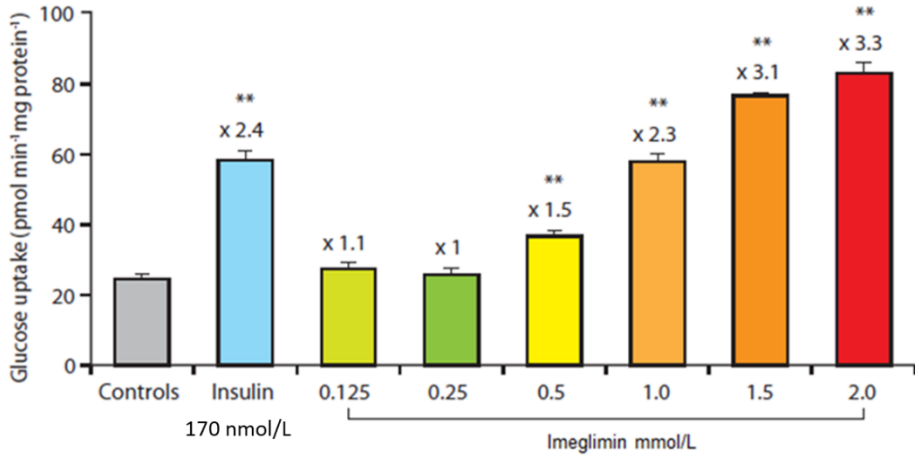


STZ 誘発糖尿病モデルラットにコントロール（蒸留水）又はイメグリミン（25、50 又は 100 mg/kg）を 45 日間経口投与し、正常 Wistar ラット群には蒸留水を投与した。最終日に 14C-2-deoxy glucose を 150 mCi/mmol/L の用量で静脈内投与し、その 45 分後にヒラメ筋又は腓腹筋を採取し、筋肉中の 14C-2-deoxy glucose 量を測定した。データは Mean ± SE (n = 10)を示す。
°°: p <0.01（Wistar を対照とした Student's t-test）
*: p< 0.05、**: p<0.01（STZ を対照とした Student's t-test）

2.6.2.2.3.5　H-2Kb 筋肉細胞株での糖取り込み試験（参考文献：4.3.03）

H-2Kb 筋肉細胞株を 1 g/L のグルコース及び各種濃度のイメグリミン（0.125、0.25、0.5、1.0、1.5 又は 2.0 mmol/L）又はインスリン 170 nmol/L を添加した条件で 4 時間培養した。その後、2-deoxy-D-[1,6 ^{3}H] glucose を添加し、10 分後に細胞を 0.1 N 水酸化ナトリウムで溶解し、溶解液中の放射活性を測定した。その結果、イメグリミンは 0.5 mmol/L から濃度依存的に糖取り込み上昇させ、1 mmol/L 以上では、170 nmol/L インスリンと同等以上の取り込みを上昇させた（図 2.6.2.2-12）。

図 2.6.2.2-12　H-2Kb 筋肉細胞株での糖取り込み試験



H-2Kb 筋肉細胞株を 1 g/L のグルコース及び各種濃度のイメグリミン（0.125、0.25、0.5、1.0、1.5 又は 2.0 mmol/L）又はインスリン 170 nmol/L を添加し、4 時間培養した。その後、2-deoxy-D-[1,6 ^{3}H] glucose を添加し、10 分後に細胞溶解液中の放射活性を測定した。データは Mean ± SE (n = 3～9)を示す。
**: p<0.01（コントロールを対照とした Dunnett's t test）

2.6.2.3　作用機序

イメグリミンの作用機序の検討の一環として、グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用及び肝臓、筋肉でのミトコンドリアに対する作用を検討した。

グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用のメカニズム検討では、GK ラット由来膵島を用いてインスリン分泌に対する影響、細胞内 NAD^{+}量、salvage 経路（ニコチンアミドを出発物質とする NAD^{+}合成経路）の律速酵素である NAMPT の遺伝子発現量、ATP 量、Ca^{2+}量に対する影響及びイメグリミンのインスリン分泌に対する CD38 の寄与を評価した。

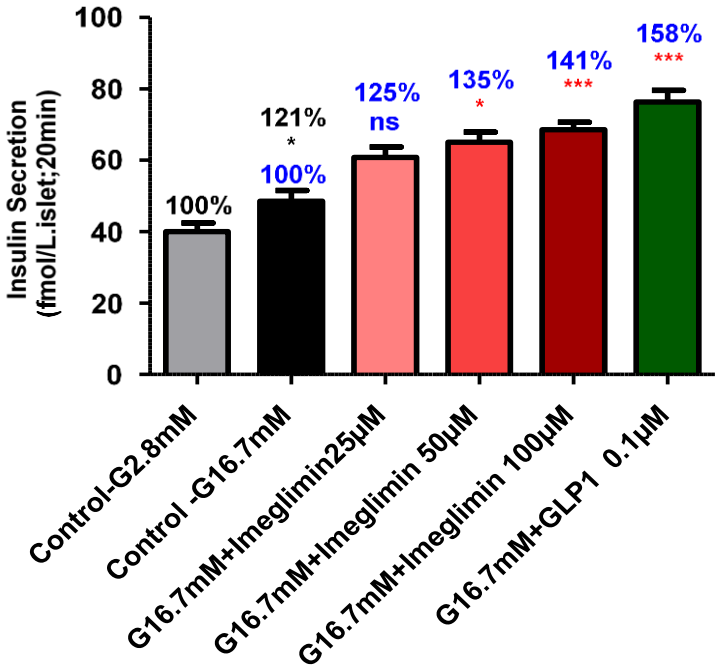
インスリン抵抗性改善作用のメカニズム検討では、HFHS 食負荷マウスの肝臓におけるミトコンドリア関連分子の活性及び脂質代謝に対する影響を評価した。また、筋肉での Pgc1a mRNA 発現量、酸素消費量に対する影響を検討した。

2.6.2.3.1　GK ラット由来膵島を用いたインスリン分泌試験（資料：4.2.1.1.06）

GK ラットから膵島を摘出し、24 well プレートで 1 well あたり 6 個の膵島を低濃度（2.8 mmol/L）又は高濃度（16.7 mmol/L）グルコース存在下で培養した。イメグリミン（25、50 又は 100 µmol/L）又は GLP-1 0.1 µmol/L を添加した 20 分後に培養液を回収し、培養液中のインスリン濃度を測定した。その結果、イメグリミンは、16.7 mmol/L のグルコース存在下で 50 µmol/L から濃度依存的に有意なインスリン分泌促進作用を示した（図 2.6.2.3-1）。

この結果から、イメグリミンは GLP-1 と同様にインスリン分泌促進作用を有すると考えられた。

図 2.6.2.3-1　GK ラット由来膵島を用いたインスリン分泌試験



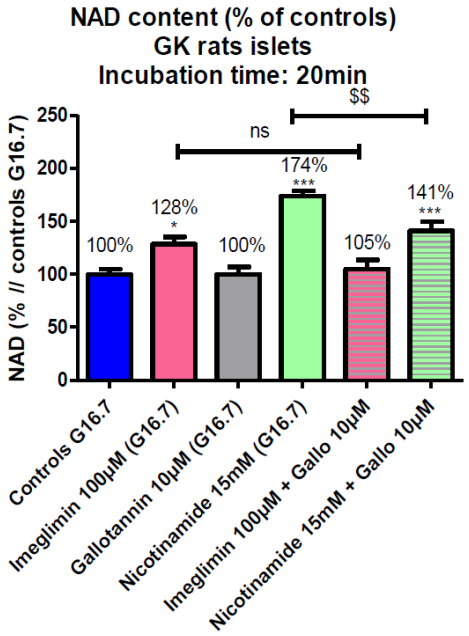
GK ラット由来の膵島をイメグリミン（25、50 又は 100 μmol/L）又は GLP-1 の存在下で、20 分間培養した後の培養液中のインスリン量を測定した。G2.8mM と G16.7mM はそれぞれ 2.8 mmol/L と 16.7 mmol/L の濃度のグルコース含有培養液を示す。データは Mean ± SE (n =15～16)を示す。
*(黒): p<0.05　（コントロール G2.8 を対照とした Student's t test）
*(赤): p<0.05、***: p<0.001、ns: 有意差なし（コントロール G16.7 を対照とした Dunn's test）

2.6.2.3.2　GK ラット由来膵島を用いた細胞内 NAD^+量に対する検討（資料：4.2.1.1.07）

イメグリミンのインスリン分泌促進作用の機序検討として、細胞内 NAD^+量の変化を検討した。GK ラットから膵島を摘出し、96 well プレートで 1 well あたり 20 個の膵島を 16.7 mmol/L グルコース存在下で培養し、膵島内の NAD^+量を市販の測定キットを用いて測定した。イメグリミン 100 μmol/L、Gallotannin 10 μmol/L［ニコチンアミドモノヌクレオチドから NAD を合成する酵素である Na/NMNAT-1,2,3（nicotinamide mononucleotide adenylyl transferases1, 2, 3）に対する阻害剤］、それらの両方、ニコチンアミド 15 mmol/ L 又はニコチンアミド 15 mmol/L と Gallotannin 10 μmol/L の両方を添加した 20 分後に膵島を回収し、細胞内の NAD^+量を測定した。NAD^+合成の基質であるニコチンアミド添加群ではコントロール群と比較して有意に NAD^+量を増加させた（図 2.6.2.3-2）。一方で、Gallotannin 存在下では、ニコチンアミド添加による NAD^+量の増加が有意に抑制された。Gallotannin 単独添加では細胞内 NAD^+量の変化はなかった。イメグリミン群では、コントロール群と比較して膵島内 NAD^+量が有意に増加し、Gallotannin 共存下では NAD^+量が低下する傾向が認められた。

これらの結果から、イメグリミンは salvage 経路で細胞内 NAD^+量を増加させることが示唆された。

図 2.6.2.3-2　GK ラット由来膵島を用いた細胞内 NAD^+量の検討



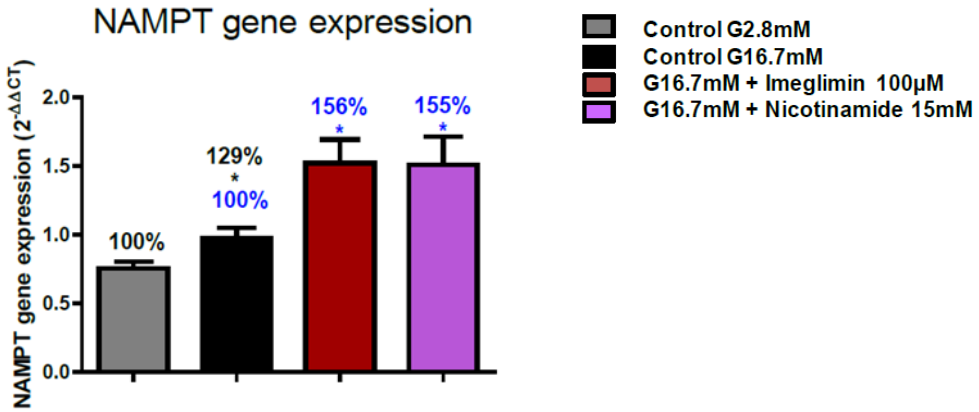
GK ラット由来の膵島にイメグリミン 100 µmol/L、Gallotannin 10 µmol/L、それらの両方、ニコチンアミド 15 mmol/L 又はニコチンアミド 15 mmol/L と Gallotannin 10 µmol/L の両方を添加し、20 分後の細胞内の NAD^+量を測定した。G16.7mM は 16.7 mmol/L の濃度のグルコース含有培養液を示す。データは Mean ± SE (n =10)を示す。
*: p<0.05、***: p<0.001(コントロールを対照とした Dunnett's t test)
$$: p<0.01（ニコチンアミド+Gallo を対照とした、Gallotannin、ニコチンアミドの 3 群間比較、Dunnett's t test）
ns: 有意差なし（イメグリミン+Gallo を対照とした、Gallotannin、イメグリミンの 3 群間比較、Dunnett't test）

2.6.2.3.3　GK ラット由来膵島での NAMPT 遺伝子発現に対する作用（資料：4.2.1.1.08）

イメグリミンの細胞内 NAD^+量増加機序の検討として、salvage 経路の関与を検討した。すなわち、salvage 経路の律速酵素である NAMPT の遺伝子発現に対するイメグリミンの作用を検討した。GK ラットから膵島を摘出し、96 well プレートで 1 well あたり 20 個の膵島を 2.8 mmol/L 又は 16.7 mmol/L グルコース存在下で培養した。イメグリミン 100 µmol/L 又はニコチンアミド 15 mmol/L を添加した 30 分後に膵島を回収し、膵島での NAMPT 遺伝子の発現量を qPCR 法で測定した。その結果、salvage 経路の基質であるニコチンアミドは NAMPT の発現を有意に上昇させた。イメグリミンもニコチンアミドと同様にコントロール群と比較して有意に NAMPT 遺伝子発現を上昇させた（図 2.6.2.3-3）。

本試験の結果及び細胞内 NAD^+量の検討の結果（2.6.2.3.2）から、イメグリミンは、salvage 経路を介して膵島内での NAD^+量を増加させると考えられた。

図 2.6.2.3-3　GK ラット由来膵島を用いた NAMPT 発現量の検討



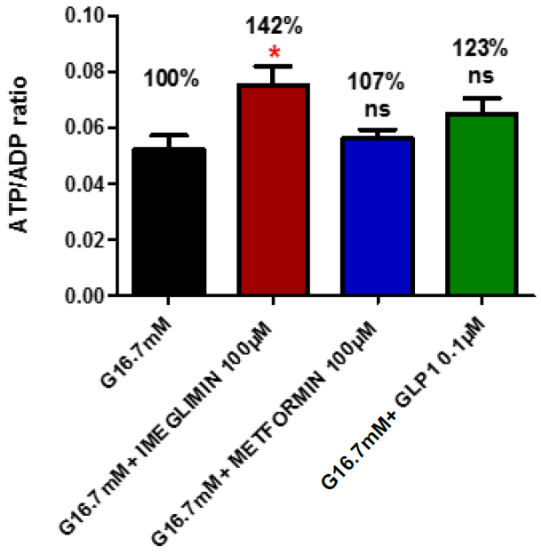
GK ラット由来の膵島をイメグリミン 100 μmol/L 又はニコチンアミド 15 mmol/L 存在下で 30 分間培養し、膵島内の NAMPT 遺伝子発現量を測定した。G2.8mM と G16.7mM はそれぞれ 2.8 mmol/L と 16.7 mmol/L の濃度のグルコース含有培養液を示す。データは Mean ± SE (n =9～10)で示す。
*(黒): p<0.05 （コントロールを対照とした Mann-Whitney U test）
*(青): p<0.05（コントロール G16.7 mM を対照とした Dunn's test）

2.6.2.3.4　GK ラット由来膵島を用いた細胞内 ATP 量に対する検討（資料：4.2.1.1.09）

GK ラットから膵島を摘出し、24 well プレートで 1 well あたり 20 個の膵島を 16.7 mmol/L グルコース存在下で培養した。イメグリミン 100 μmol/L、メトホルミン 100 μmol/L 又は GLP-1 0.1 μmol/L を添加した 10 分後に膵島を回収し、膵島内の ATP 量を市販の測定キットを用いて測定した。その結果、イメグリミン群では、コントロール群と比較して膵島内 ATP 量が有意に増加した（図 2.6.2.3-4）。一方、メトホルミンは ATP 量を変化させず、GLP-1 は ATP 量を増加させる傾向を示した。

イメグリミンは膵島内 ATP 量を増加させることから、イメグリミンは GK ラットの膵島で障害されているミトコンドリア機能[文献 1)]を改善すると考えられた。

図 2.6.2.3-4　GK ラット由来膵島を用いた細胞内 ATP 量の検討



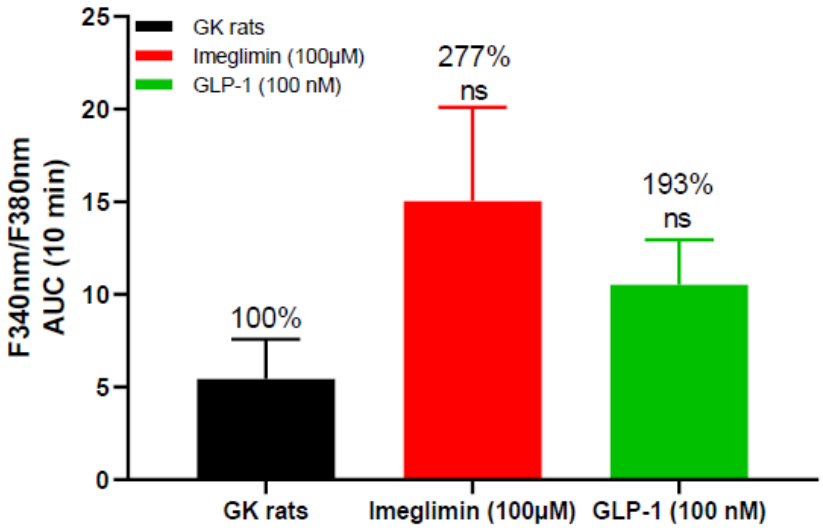
GK ラット由来の膵島をイメグリミン 100 μmol/L、メトホルミン 100 μmol/L 又は GLP-1 0.1 μmol/L 存在下で 10 分間培養し、膵島内の ATP 量を測定した。G16.7mM は 16.7 mmol/L の濃度のグルコース含有培養液を示す。
データは Mean ± SE (n = 10)を示す。
*: $p<0.05$、ns: 有意差なし（G16.7mM を対照とした Dunnet's t test）

2.6.2.3.5　GK ラット由来膵島を用いた細胞内 Ca^{2+}量に対する検討（資料：4.2.1.1.10）

GK ラットから膵島を摘出し、4 well プレートで 1 well あたり 12 個の膵島を培養し、16.7 mmol/L グルコース存在下でイメグリミン 100 μmol/L 又は GLP-1 100 nmol/L を添加後 10 分間の累積 Ca^{2+}量を Fura-2-AM を用いて測定した。その結果、イメグリミンは、F340nm/F380nm 比で示される細胞内 Ca^{2+}量を増加させる傾向を示した（図 2.6.2.3-5）。GLP-1 もイメグリミンと同様に細胞内 Ca^{2+}量を増加させる傾向を示した。

この結果から、イメグリミンのグルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用に細胞内 Ca^{2+}量の増加が寄与すると考えられた。

図 2.6.2.3-5　GK ラット由来膵島を用いた細胞内 Ca^{2+}量の検討



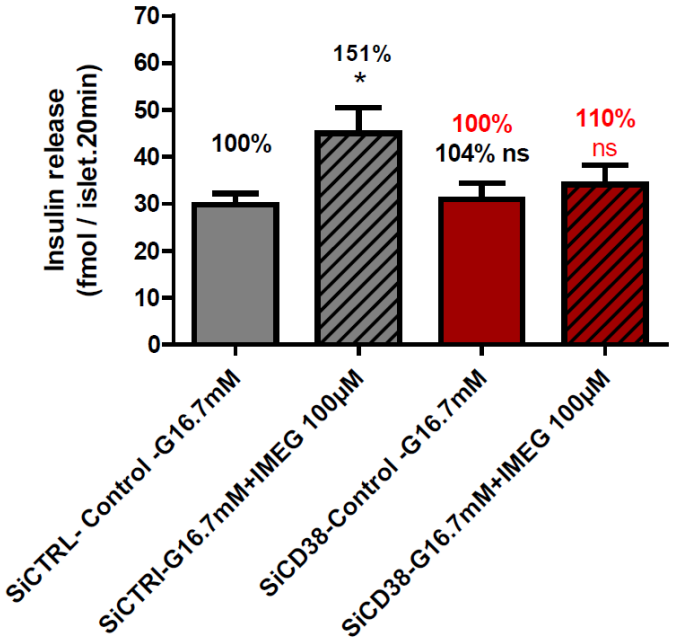
GK ラット由来の膵島を 16.7 mmol/L グルコース存在下でイメグリミン 100 μmol/L 又は GLP-1 100 nmol/L を添加後 10 分間の累積 Ca2+量を測定した。データは Mean ± SE (n =7～8 視野)を示す。
ns: 有意差なし（GK ラットを対照とした Dunn's test）

2.6.2.3.6 GK ラット由来膵島でのイメグリミンのグルコース濃度依存的インスリン分泌に対する CD38 の寄与の検討　（資料：4.2.1.1.11）

イメグリミンのインスリン分泌促進作用に対する NAD^+代謝物の生成に関わる CD38（NAD^+ glycohydrolase）の寄与を検討した。GK ラット由来膵島に CD38 siRNA をトランスフェクションし、その 48 時間後に 16.7 mmol/L グルコース存在下でコントロール（培地のみ）又はイメグリミンを添加し、更にその 20 分後のインスリン量を測定した。その結果、イメグリミン群ではコントロール群と比較してインスリン分泌促進が有意に上昇したのに対し、CD38 siRNA をトランスフェクションした群では、イメグリミンによるインスリン分泌促進作用は消失した（図 2.6.2.3-6）。

この結果から、イメグリミンのインスリン分泌促進作用には、CD38 が寄与していることが示された。CD38 による NAD^+の代謝物の一つである cADPR（環状アデノシン二リン酸リボース）が、膵島での Ca^{2+}量を増加させ、グルコースによるインスリン分泌を上昇させることが報告されている[文献 2)]。このことから、イメグリミンのインスリン分泌促進作用には、NAD^+代謝物による細胞内 Ca^{2+}量増加が寄与していると考えられた。

図 2.6.2.3-6　GK ラット由来膵島でのイメグリミンのインスリン分泌に対する CD38 の影響



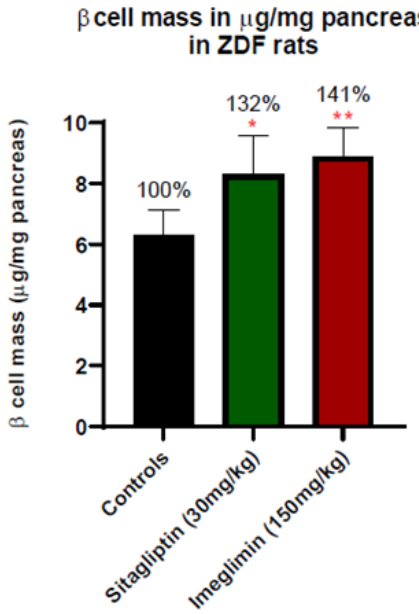
GK ラット由来膵島にコントロール siRNA（siCTRL）又は CD38 siRNA（siCD38）をトランスフェクションし、その 48 時間後に 16.7 mmol/L グルコース存在下でイメグリミン 100 µmol/L を添加し、更にその 20 分後のインスリン量を測定した。G16.7mM は 16.7 mmol/L の濃度のグルコース含有培養液を示す。
データは Mean ± SE (n = 15～20)を示す。
*(黒): p<0.05（siCTRL-Control を対照とした Mann-Whitney U test）
ns(赤): 有意差なし（siCD38-Control を対照とした Student's t test)

2.6.2.3.7　β 細胞障害に対するイメグリミンの作用（資料：4.2.1.1.12 及び 4.2.1.1.13）

β 細胞が障害され脱落することが知られている[文献 3)]ZDF ラット（6 週齢、雄性）にコントロール（0.5% MC bid）、イメグリミン（150 mg/kg bid）又はシタグリプチン（30 mg/kg qd）を 5 週間経口投与した後に膵臓を摘出し、病理組織学的検査を実施した。β 細胞は抗インスリン抗体を用いて検出した。その結果、イメグリミンはコントロールと比較して単位膵臓重量あたりのβ細胞量を増加させ、その程度はシタグリプチンと同程度であった（図 2.6.2.3-7）。

この結果から、ZDF ラットで認められた β 細胞数の増加は加齢により障害を受ける β 細胞の脱落を抑制した結果であることが示唆された。

図 2.6.2.3-7　ZDF ラットでの β 細胞量に対する影響

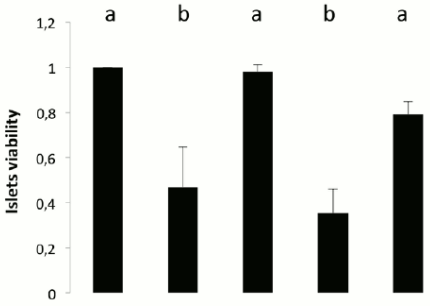


6 週齢の雄性 ZDF ラットにコントロール（0.5% MC bid）、イメグリミン（150 mg/kg bid）又はシタグリプチン（30 mg/kg qd）を 5 週間経口投与した後に、膵臓を摘出し、病理組織学的検査により β 細胞量を測定した。データは Mean ± SE (n = 6～8 視野/膵臓、n = 4 膵臓/群)を示す。
*: p<0.05、 **: p<0.01（コントロールを対照とした Dunnett's t-test）

また、ヒト膵島由来初代培養細胞を用いてグルコース又はフルクトースにより誘発される糖毒性に対するイメグリミンの影響を検討した。ヒト膵島由来初代培養細胞を媒体又はイメグリミン 100 μmol/L 存在下で 24 時間培養後、30 mmol/L グルコース又は 2.5 mmol/L フルクトースを添加して、更に 72 時間培養し、細胞生存率を測定した。その結果、イメグリミンは、グルコース又はフルクトースにより誘発される細胞死を有意に抑制した（図 2.6.2.3-8）。

この結果から、イメグリミンはヒト膵島由来初代培養細胞で糖毒性による細胞死に対する保護作用があることが示された。

図 2.6.2.3-8　ヒト膵島由来初代培養細胞への糖毒性に対する影響



Glucose, 30 mM	-	+	+	-	-
Fructose, 2.5 mM	-	-	-	+	+
Imeglimin	-	-	+	-	+

ヒト膵島由来初代培養細胞を媒体又はイメグリミン 100 µmol/L 存在下で 24 時間培養後、30 mmol/L グルコース又は 2.5 mmol/L フルクトースを添加して、更に 72 時間培養し、細胞生存率を測定した。データは Mean ± SE (n = 3)を示す。
全群総当たりの検定を実施し、同一文字（a 又は b）で示される群間での有意差はなく、異なる文字で示される群間は $p<0.05$ を示す（Tukey-Kramer HSD post-hoc test）

2.6.2.3.8　HFHS 食負荷マウスの肝臓に対するイメグリミンの影響（資料：4.2.1.1.14 及び参考文献：4.3.02）

HFHS 食負荷マウスに対して、コントロール（0.5% MC bid）又はイメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間経口投与し、通常食を摂取させたマウスには 0.5% MC を 6 週間経口投与した。肝臓からミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア複合体などミトコンドリアに存在する各種たん白質量及び活性を評価した。たん白質量は western blotting 法を用いて測定した。酵素活性は特異的な基質を用いて測定した。すなわち、Complex I 活性は decylubiquinone を electron acceptor とし、NADH を donor として吸光を測定した。Complex II 活性は dichlorophenolindophenol を基質として吸光の減少を測定した。Complex III 活性は cytochrome c を基質として吸光の減少を測定した。HAD は、NADH 及び S-acetoacetyl-CoA を基質として吸光の減少を測定した。

その結果、イメグリミン投与群では、HFHS 食負荷群で通常食群に比較して低下した Complex III たん白質量及び活性が有意に回復し、Complex I 活性は HFHS 群と比較して有意に低下した（表 2.6.2.3-1）。Complex I たん白質量は、HFHS 群と比較して有意な差はなかった。また、イメグリミン投与群では、ATP 合成酵素量が HFHS 群と比較して有意に増加した。更に、イメグリミン投与群では、HAD 活性が有意に上昇した。

これらの結果から、イメグリミンは肝臓のミトコンドリアで Complex I 活性を抑制し、Complex III の発現及び活性を回復させることで肝臓のミトコンドリアの機能を正常化すると考えられた。

表 2.6.2.3-1　HFHS 食負荷マウスの肝臓でのミトコンドリア関連分子の発現及び活性に対する作用

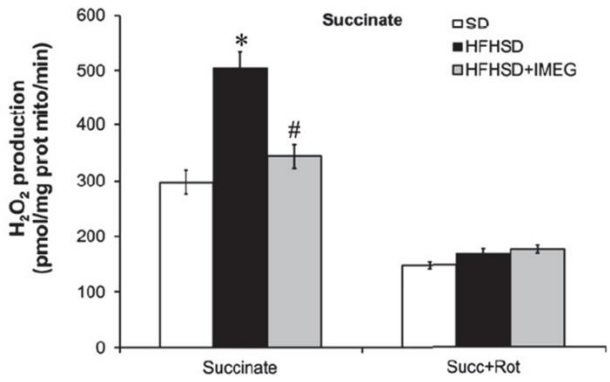
Mitochondrial characterization	SD	HFHSD	HFHSD + IMEG
Mitochondrial density			
mtDNA (Cox1/Ppia)	100 ± 6.4	136 ± 8.5*	171 ± 6.4#
Protein content (relative/SD)			
PGC1α	100 ± 26	201 ± 18*	211 ± 22
OPA1	100 ± 5.1	114 ± 12	111 ± 11
DLP1	100 ± 4.8	103.7 ± 5.4	94.4 ± 8.2
PARKIN	100 ± 19	114 ± 18	125 ± 23
PINK1	100 ± 16	92 ± 18	92 ± 19
CI	100 ± 4.6	98.8 ± 3.4	99.9 ± 6.1
CII	100 ± 3.3	90.5 ± 3.8	91.8 ± 5.0
CIII	100 ± 5.4	75.0 ± 1.9*	90.0 ± 3.9#
CIV	100 ± 2.2	95.7 ± 1.8	94.4 ± 5.3
ATP synthase	100 ± 3.6	137.1 ± 2.3*	150.3 ± 4.7#
ANT2	100 ± 3.0	121 ± 4.0*	140 ± 9.0†
UCP2	100 ± 8.7	120 ± 6.9	86 ± 4.7#
CPT1A	100 ± 7.5	113 ± 9.0	119 ± 9.9
FAT/CD36	100 ± 6.2	89 ± 4.6*	104 ± 3.8#
Activity (mmol/min/g prot)			
CI	324 ± 26	338 ± 20	252 ± 17#
CII	334 ± 12	324 ± 11	345 ± 22
CIII	401 ± 22	288 ± 21*	405 ± 23#
HAD	2,075 ± 80	2,908 ± 94*	3,334 ± 93#

HFHS 食負荷マウスに対してコントロール（0.5% MC bid）（HFHSD）又はイメグリミン（200 mg/ kg bid）（HFHSD＋IMEG）を 6 週間経口投与し、通常食マウス（SD）には 0.5% MC を 6 週間経口投与した。マウスの肝臓から単離したミトコンドリアでの各種たん白質量及び活性を測定した。データは Mean ± SE (n = 10)を示す。
*: $p < 0.05$（SD を対照とした protected least significant difference Fisher post hoc test）
#: $p < 0.05$、 †$p = 0.07$（HFHSD を対照とした protected least significant difference Fisher post hoc test）

単離ミトコンドリアを用いて Succinate を添加したときの ROS 産生を測定した。その結果、HFHS 食負荷群のマウスから単離したミトコンドリアは、通常食群のミトコンドリアと比較して ROS 産生が有意に上昇した（図 2.6.2.3-9）。HFHS 食負荷群のミトコンドリアと比較して、イメグリミン投与群のマウスから単離したミトコンドリアでは、ROS 産生が有意に低下した。

この結果から、イメグリミンは、肝臓のミトコンドリアでの ROS 産生を抑制したと考えられた。

図 2.6.2.3-9　HFHS 食負荷マウスの肝臓から単離したミトコンドリアでの ROS 産生

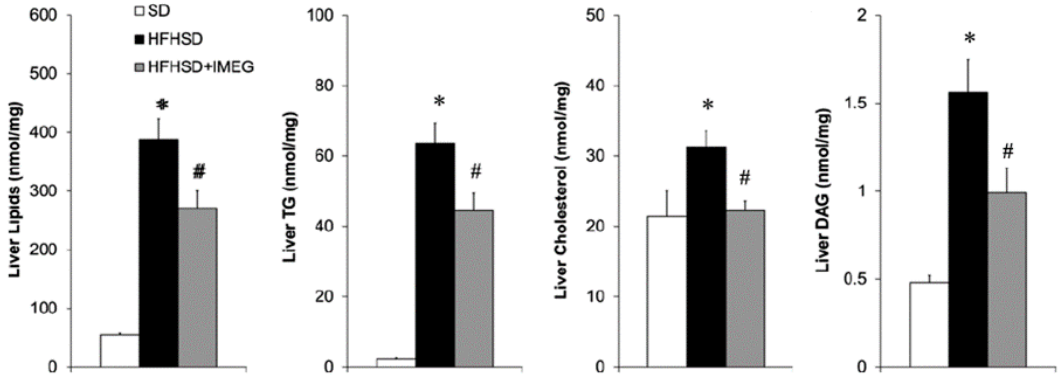


HFHS 食負荷マウスに対してコントロール（0.5% MC bid）（黒 : HFHSD）又はイメグリミン（200 mg/ kg bid）（グレー : HFHSD+IMEG）を 6 週間経口投与し、通常食マウス（白 : SD）には 0.5% MC を 6 週間経口投与した。マウスの肝臓から単離ミトコンドリアを用いて Succinate を添加したときの ROS 産生を測定した。データは Mean ± SE (n = 10)を示す。
*: $p < 0.01$（SD を対照とした protected least significant difference Fisher post hoc test）
#: $p < 0.05$（HFHSD を対照とした protected least significant difference Fisher post hoc test）

また、肝臓から抽出した総脂質抽出液中の各種脂質量をガスクロマトグラフィーにより測定した結果、HFHS 食負荷群では、通常食群と比較して脂質量、トリグリセリド量、コレステロール量及びジアシルグリセロール量が有意に増加した（図 2.6.2.3-10）。イメグリミン投与群では、全ての脂質量が HFHS 群と比較して有意に低下した。

この結果から、イメグリミンは、肝臓のミトコンドリア機能を回復させることで、β 酸化機能を回復させ、脂質代謝を改善したと考えられた。

図 2.6.2.3-10　HFHS 食負荷マウスの肝臓での脂質量に対する影響



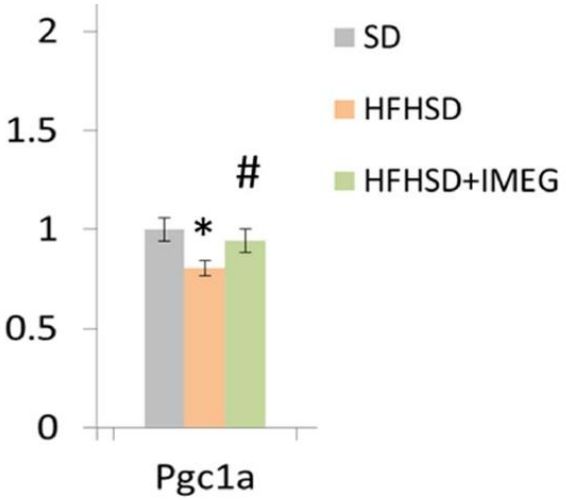
HFHS 食負荷マウスに対してコントロール（0.5% MC bid）（黒 : HFHSD）又はイメグリミン（200 mg/ kg bid）（グレー：HFHSD+IMEG）を 6 週間経口投与し、通常食マウス（白：SD）には 0.5% MC を 6 週間経口投与した。マウスの肝臓から抽出した総脂質抽出液中の各種脂質量を測定した。データは Mean ± SE (n = 7～10)を示す。
*: p < 0.01（SD を対照とした protected least significant difference Fisher post hoc test）
#: p< 0.05（HFHSD を対照とした protected least significant difference Fisher post hoc test）

2.6.2.3.9　HFHS 食負荷マウスの筋肉に対するイメグリミンの影響（資料：4.2.1.1.14 及び参考文献：4.3.02）

糖尿病患者及びモデル動物の筋肉ではミトコンドリア機能が低下することにより、糖取り込み能が低下している[文献 4)]。そこで、ミトコンドリアの生合成に関わる Pgc1a 発現に対するイメグリミンの作用を HFHS 食負荷マウスで検討した。すなわち、マウスから摘出した筋肉での Pgc1a mRNA 発現量を qPCR 法で測定した。その結果、イメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間経口投与した動物の腓腹筋では、HFHS 食負荷群で通常食群と比較して低下した、Pgc1a mRNA 発現が有意に回復した（図 2.6.2.3-11）。

この結果から、イメグリミンは筋肉でミトコンドリアの生合成を回復させると考えられた。

図 2.6.2.3-11　HFHS 食負荷マウスの腓腹筋での Pgc1a mRNA 発現

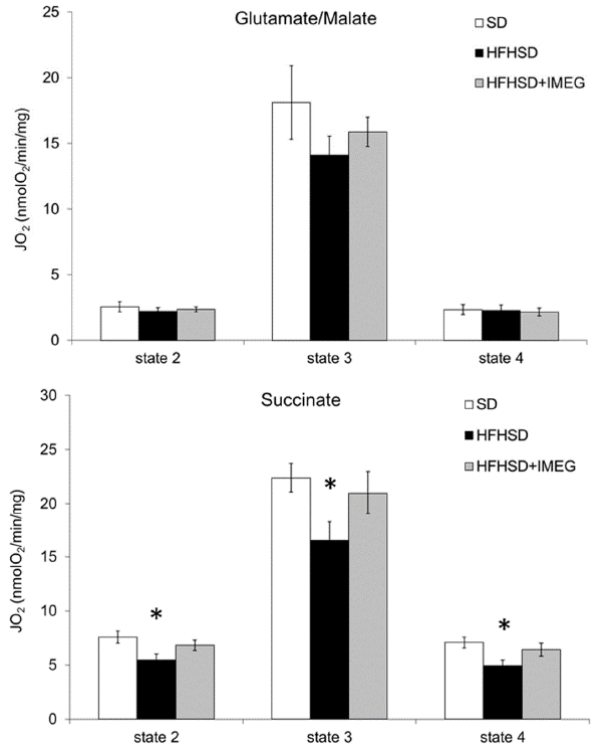


HFHS 食負荷マウスに対してコントロール（0.5% MC bid）（オレンジ：HFHSD）又イメグリミン（200 mg/kg bid）（緑：HFHSD+IMEG）を 6 週間経口投与し、通常食（SD）マウス（グレー：SD）には 0.5% MC を 6 週間経口投与した。マウスの腓腹筋を摘出し、Pgc1a mRNA 発現量を測定した。データは Mean ± SE (n = 12～13)を示す。
*: $p < 0.05$（SD を対照とした protected least significant difference Fisher post hoc test）
#: $p < 0.05$（HFHS 食を対照とした protected least significant difference Fisher post hoc test）

また、マウスの大腿四頭筋から抽出したミトコンドリアでの酸素消費に対するイメグリミンの影響を検討した。HFHS 食負荷群では、通常食群と比較して Glutamate/Malate を基質としたときの最大呼吸能（State3：ADP 存在下）が低下する傾向が認められ、Succinate を基質としたときの最大呼吸能（State2：基質添加前、State3：ADP 存在下、State4：ADP 非存在下）が有意に減少した（図 2.6.2.3-12）。それに対して、イメグリミン投与群の大腿四頭筋から摘出したミトコンドリアでは、Glutamate/Malate 又は Succinate を基質としたときの最大呼吸能（State3：ADP 存在下）が回復した。

この結果から、イメグリミンは、筋肉でミトコンドリア機能を回復させると考えられた。

図 2.6.2.3-12　HFHS 食負荷マウスの筋肉から抽出したミトコンドリアでの酸素消費量



HFHS 食負荷マウスに対してコントロール（0.5% MC bid）（黒 : HFHSD）又イメグリミン（200 mg/ kg bid）（グレー : HFHSD+IMEG）を 6 週間経口投与し、通常食（SD）を摂取させたマウス（白 : SD）には 0.5% MC を 6 週間経口投与した。マウスの大腿四頭筋から抽出したミトコンドリアでの酸素消費を測定した。データは Mean ± SE (n = 10)を示す。

*: $p < 0.05$（SD を対照とした protected least significant difference Fisher post hoc test）

2.6.2.4　副次的薬理試験

2.6.2.4.1　各種受容体及び酵素に対する作用（資料：4.2.1.2.01）

125 種類の受容体若しくは酵素に対する *in vitro* 結合試験及び活性阻害試験で、イメグリミンは 1 μmol/L で明確な作用を示さなかった。

2.6.2.5　安全性薬理試験

2.6.2.5.1　中枢神経系に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3.01）

約 7 週齢の Wistar ラット（雌雄各 5 例/群）に、媒体並びにイメグリミン 150、500 及び 1500 mg/kg を単回経口投与し、フォトビームを利用した自発運動測定装置を用いて、投与後 30 分の時点から 1 時間にわたり自発運動量を測定した。その後、FOB による機能検査を実施した。媒体は、0.25% ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液を用いた。

イメグリミンは、雌雄いずれでも自発運動量に対する影響を及ぼさなかった。また、FOB で認められた影響はごく軽微で、用量反応関係は認められず、自律神経機能、神経筋機能、感覚運動反応及び中枢神経系機能に有意な変化は認められなかった。陽性対照群では予想されたとおりの影響が認められ、カフェイン 20 mg/kg の経口投与で自発運動量の増加が、ハロペリドール 3 mg/kg の腹腔内投与では減少が認められた。

2.6.2.5.2　心血管系に及ぼす影響

2.6.2.5.2.1　hERG 電流に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3.02 及び 4.2.1.3.03）

hERG チャネルを安定発現させた HEK293 細胞を用い、hERG テール電流をホールセルパッチクランプ法で測定した（各濃度 4～5 細胞）。媒体は細胞外液又は注射用水を用いた。イメグリミンは 50、150 及び 500 µmol/L の濃度で、hERG テール電流をそれぞれ 8.1～12.3%、2.7～10.7%及び 4.6～15.2%抑制したが、いずれの濃度でも媒体群（抑制率 4.4～13.3%）と比較して同程度の抑制率であった。一方、陽性対照の E-4031 は、0.1 µmol/L で hERG テール電流を 81.7～89.7%抑制した。

2.6.2.5.2.2　覚醒イヌにおける心血管に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3.04）

58 ヵ月齢のビーグル犬（雌雄各 3 例/群）に媒体並びにイメグリミン 20、100 及び 500 mg/kg を 3 又は 4 日間の投与間隔を空けて単回漸増経口投与し、投与前並びに投与後 2、4、6 及び 24 時間に血圧（収縮期血圧、拡張期血圧及び平均血圧；tail-cuff 法で測定）、心拍数及び心電図パラメータ（PQ 間隔、QRS 幅、QT 間隔及び Van de Water の補正式による QTc）を Hellige EK 53 心電計を用いて測定した。また、投与開始の 1 週間前から投与期間終了時まで、摂餌量を 1 日 1 回、体重を週 1 回、一般状態を 1 日 1 回記録した。媒体は、0.25% ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液を用いた。

500 mg/kg の投与後 30～120 分に 6 例中 5 例で嘔吐が認められた。投与期間終了時に 6 例中 5 例で軽微な体重減少（最大 7%減）が認められたが、摂餌量に対する投与の影響は認められなかった。また、6 例中 3 例で軽微な心拍数減少（最大 37%減）が認められたが、心電図パラメータ及び血圧に、イメグリミン投与に関連した影響は認められなかった。

2.6.2.5.3　呼吸器系に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3.05）

Wistar ラット（雄 8 例/群）に、媒体並びにイメグリミン 150、500 及び 1500 mg/kg を単回経口投与し、投与 30 分前から投与後 4 時間までホールボディプレチスモグラフィ法を用

いて呼吸機能を測定した。媒体は 0.25% ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液を用いた。

イメグリミンは溶媒対照群と比較して、いずれの投与量でも、吸気時間、呼気時間、休止時間、最大吸気流量、最大呼気流量、1 回換気量、呼吸数、pause 及び enhanced pause に有意な影響を及ぼさなかった。一方、陽性対照群のテオフィリン 100 mg/kg 経口投与では、吸気時間、呼気時間、休止時間及び enhanced pause の顕著な減少、最大吸気流量、最大呼気流量及び呼吸数の増加が認められ、呼吸促進及び気管支拡張作用が確認された。

2.6.2.5.4　乳酸アシドーシス

2.6.2.5.4.1　重度急性腎不全ラットにおける乳酸アシドーシス惹起に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3.06）

イメグリミンと同じく血糖降下作用を有するメトホルミンは、ヒトで非常に低頻度ではあるものの乳酸アシドーシスを誘発することが知られているため、イメグリミン、鏡像異性体、ラセミ体及びメトホルミンの乳酸アシドーシスリスクを *in vivo* で比較検討した。

雄性 SD ラットに、ゲンタマイシン（250～275 mg/kg/日）を 1 日 1 回、4 日間皮下投与して急性腎不全を誘発し、初回投与から 7 日目に血漿中クレアチニン濃度を測定して、重度（2 mg/dL<血漿中クレアチニン<6 mg/dL）の急性腎不全ラットを試験に用いた。麻酔下で右頸静脈にカテーテルを留置した 2 日後に、無作為に各群 5～7 例の動物を割り付け、イメグリミン、鏡像異性体、ラセミ体、メトホルミン又は媒体（生理食塩液）を 8 mL/h/kg にて 180 分間静脈内持続投与し、血中グルコース濃度、血中乳酸濃度、血中 H^+濃度、血中 HCO_3^-濃度、血中酸素分圧、血中二酸化炭素分圧及び血中ヘモグロビン濃度を測定した。各化合物は 25、50、75 及び 100 mg/kg/h を投与した。

イメグリミン投与群では、死亡は認められず、血中乳酸濃度、血中グルコース濃度、血中 HCO_3^-濃度及び血中 H^+濃度に有意な影響は認められなかった。

鏡像異性体投与群では、75 mg/kg/h 群で 6 例中 3 例が死亡したが、100 mg/kg/h 群では死亡は認められなかった。75 mg/kg/h 以上の群で血中グルコース濃度の有意な低下が認められたが、血中乳酸濃度、血中 HCO_3^-濃度及び血中 H^+濃度に対して有意な影響は認められなかった。

ラセミ体投与群では、血中乳酸濃度、血中グルコース濃度、血中 HCO_3^-濃度及び血中 H^+濃度に対して有意な影響は認められなかった。100 mg/kg/h 群で 5 例中 2 例が死亡したが、これらの動物では低血糖や血中ヘモグロビン濃度の低下が認められたものの、血中乳酸濃度の上昇は中程度であった。

メトホルミン投与群では、50 mg/kg/h 以上の群で用量依存的な死亡数の増加が認められ、100 mg/kg/h 群では全例が死亡した。用量依存的な血中乳酸濃度及び血中 H^+濃度の上昇並びに血中グルコース濃度及び血中 HCO_3^-濃度の低下が認められ、50 mg/kg/h 以上の群で認められた死亡は乳酸アシドーシスに伴う死亡と考えられた。

2.6.2.5.4.2　mGPDH 活性に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3.07）

mGPDH は主に肝臓のミトコンドリア膜上に存在し、細胞質の NADH をミトコンドリア内に取り込む機能を有している。メトホルミンはこの mGPDH を阻害することで細胞質の NADH 濃度を上昇させ、乳酸とグリセロールからのグルコース生成を阻害し、それに伴い、乳酸の血中濃度を上昇させて乳酸アシドーシスのリスクを高めると考えられている[文献 5)]。乳酸アシドーシス惹起に及ぼす影響を評価することを目的として、mGPDH 活性に対するイメグリミンとメトホルミンの影響を *in vitro* で比較検討した。

ラット肝臓ミトコンドリア由来の mGPDH 活性を、電子供与体から電子受容体への電子の供与による光学濃度差を分光光度計で測定した。電子受容体として 2,6-ジクロロインドフェノール、電子供与体として還元型フラビンアデニンジヌクレオチド及び基質としてグリセロール 3-リン酸を用いた。イメグリミン及びメトホルミンの試験濃度は、それぞれ 12.5、25、50、75、100、175、250 µmol/L 及び 50、100、250 µmol/L とした。

メトホルミンは、mGPDH 活性を濃度依存的に抑制し、250 µmol/L で mGPDH 活性を 47%有意に抑制した。一方、イメグリミンは 250 µmol/L まで mGPDH 活性を抑制しなかった。

2.6.2.6 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

2.6.2.7　考察及び結論

2.6.2.7.1　効力を裏付ける試験

2.6.2.7.1.1　長期血糖降下作用

イメグリミンは、GK ラットでは、経口投与 35 日目で用量依存的な空腹時血糖降下作用を示し、その作用は経口投与 56 日目でも持続したことから、イメグリミンは長期間にわたり血糖降下作用を持続すると考えられた。

2.6.2.7.1.2　グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用

イメグリミンは、STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いた OGTT で、単回経口投与で耐糖能異常を改善させた。この耐糖能異常改善作用は HF 食負荷ラット及び GK ラットを用いたグルコース負荷試験では、単回のみならず 2 週間又は 4 週間経口投与した後でも認められた。また、これらのモデル動物を用いたグルコース負荷試験では、グルコース負荷後の血中インスリン濃度の上昇が認められた。更に、Wistar ラット及び N0-STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いたグルコースクランプ試験では、イメグリミンはグルコース濃度依存的なインスリン分泌促進作用を示した。

これらの結果から、イメグリミンは耐糖能異常改善作用を示し、その機序にはグルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用の寄与が考えられた。また、イメグリミンは、正常範囲の血糖値ではインスリン分泌促進作用を示さないことから、スルホニル尿素薬や速効型インスリン分泌促進薬のようなグルコース濃度非依存的インスリン分泌促進薬とは異なり、低血糖を引き起こしにくい血糖降下薬であると考えられた。

2.6.2.7.1.3　インスリン抵抗性改善作用

イメグリミンは、STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いた euglycemic hyperinsulinemic clamp 試験で、2 週間経口投与した後に有意な定常状態グルコース注入率の増加を示した。HFHS 食負荷マウスを用いた ITT では、イメグリミンを 6 週間経口投与することで、インスリン負荷による血糖低下作用が増強した。また、イメグリミンは、肝臓及び筋肉で、HFHS 食負荷により低下したインスリンシグナル伝達に関わる PKB のリン酸化低下を回復させた。更に、イメグリミンは、Wistar ラット由来初代培養肝細胞での糖新生を抑制し、H-2Kb 筋肉細胞株での糖取り込みを促進した。

これらのことから、イメグリミンは、グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用に加えて、肝臓と筋肉でのインスリン抵抗性改善作用を併せ持つ新規のプロファイルを有する薬剤であると考えられた。

2.6.2.7.1.4　作用機序

2.6.2.7.1.4.1　膵臓での作用

GK ラット由来膵島を用いた試験で、イメグリミンは高濃度グルコース存在下で濃度依存的なインスリン分泌作用を示した。同膵島を用いた試験で、イメグリミンはニコチンアミド

を出発物質とする NAD^+合成経路（salvage 経路）の律速酵素である NAMPT 遺伝子発現を上昇させ、細胞内 NAD^+量を増加させたことから、salvage 経路を介して細胞内の NAD^+量を増加させると考えれられた。また、イメグリミンはミトコンドリアの電子伝達に関わる NAD^+に加え、細胞内 ATP 量を増加させたことから、ミトコンドリアの機能を改善させたと考えられた。更に、イメグリミンは Ca^{2+}量も同様に増加させたことから、イメグリミンは細胞内で増加した ATP によって K_{ATP} チャネル活性を抑制することで細胞外からの Ca^{2+}流入を増加させ、インスリン分泌を促進したと考えられた。また、NAD^+の代謝酵素である CD38 の発現を抑制することにより、イメグリミンのインスリン分泌促進作用が消失したことから、CD38 によって生成される NAD^+代謝産物による細胞内 Ca^{2+}量増加が、イメグリミンのグルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用に寄与していると考えられた。すなわち、イメグリミンによるインスリン分泌促進作用は、既存の 2 型糖尿病治療薬とは異なり、膵臓でミトコンドリア機能を改善することによるインスリン分泌の主経路である惹起経路の増強に加え、NAD^+を介したインスリン分泌の増幅経路を活性化することによるものと考えられた。

ZDF ラットを用いた検討では、イメグリミンは β 細胞量の減少を抑制した。また、ヒト膵島由来初代培養細胞を用いた検討では、グルコース及びフルクトースによる細胞死を抑制した。ZDF ラットは加齢とともにβ細胞が障害され脱落することが報告されている[文献 3)]。イメグリミンは高血糖により誘発される細胞死を抑制することから、ZDF ラットで認められた β 細胞数の増加は加齢により障害を受ける β 細胞を保護した結果であることが示唆され、イメグリミンが長期にわたり血糖管理が可能である可能性も示唆された。

2.6.2.7.1.4.2　肝臓及び筋肉での作用

HFHS 食負荷マウスで、イメグリミンを 6 週間経口投与した後の肝臓から単離したミトコンドリア複合体量及び活性を評価した結果、イメグリミンは、HFHS 食負荷により低下した Complex III のたん白質量及び活性を回復させると共に Complex I 活性を低下させ、ROS 産生を抑制した。また、イメグリミンは ATP 合成酵素量を増加させたことから、HFHS 食負荷により障害されたミトコンドリア機能を回復させたと考えられた。イメグリミンの HFHS 食負荷の肝臓での脂質量低下作用は、ミトコンドリアでの脂質代謝の回復によるものと考えられた。

筋肉では、HFHS 食負荷により低下するミトコンドリアの生合成に関与する Pgc1a の発現が、イメグリミン投与により回復し、筋肉でのミトコンドリア呼吸が回復した。糖尿病ではミトコンドリア機能が低下することで、糖取り込みが低下していることが知られている[文献 4)]。イメグリミンは、H-2Kb 筋肉細胞株で糖取り込み促進作用を示し、STZ 誘発糖尿病モデルラットの筋肉でも糖取り込み促進作用を示した。

更に、イメグリミンは、HFHS 食負荷により低下した肝臓及び筋肉での PKB のリン酸化を回復させたことから、インスリン抵抗性改善作用を有することが示された（2.6.2.7.1.3）。

これらのことから、イメグリミンによるインスリン抵抗性改善作用は、肝臓や筋肉でミト

コンドリア機能を回復させることによる糖取り込み改善作用によるものと考えられた。

2.6.2.7.1.4.3　作用機序まとめ

2 型糖尿病の治療薬には、スルホニル尿素薬、速効型インスリン分泌促進薬、ビグアナイド薬、α-グルコシダーゼ阻害薬、チアゾリジン薬、DPP4 阻害薬、GLP1 受容体作動薬、SGLT2 阻害薬、インスリン製剤などがあり、作用機序の異なる薬剤が複数存在する[文献 6)]。イメグリミンは、非臨床薬理試験の結果から、既存の 2 型糖尿病治療薬とは異なり、インスリン分泌臓器である膵臓及びインスリン標的臓器である肝臓及び筋肉でミトコンドリア機能を改善し、単剤でグルコース濃度依存的なインスリン分泌促進作用とインスリン抵抗性改善作用を併せ持つ新規なプロファイルを有する薬剤であり、長期にわたり血糖降下作用を持続させると考えられた。また、グルコース濃度非依存的インスリン分泌促進薬とは異なり、低血糖を引き起こしにくい血糖降下薬であると考えられた。

その作用機序は、インスリン分泌臓器である膵臓や肝臓などのインスリン標的臓器でのミトコンドリア機能異常の改善と考えられる。すなわち、イメグリミンは膵島において NAD^+生合成 salvage 経路を介して NAD^+量を増加させることで細胞内の ATP 量を増加させ、K_{ATP} チャネル活性が抑制されることにより、細胞内 Ca^{2+}量を増加させた。また CD38 により NAD^+から生成される NAD^+代謝産物も細胞内 Ca^{2+}量の増加に寄与していると考えられた。更に、イメグリミンはヒト膵島由来初代培養細胞の高糖条件で誘発される細胞死を抑制した。これらのことから、イメグリミンはインスリン分泌の主経路である惹起経路の増強に加え、NAD^+を介したインスリン分泌の増幅経路を活性化することで、グルコース濃度依存的なインスリン分泌作用を示すことが示唆された。また、イメグリミンが β 細胞の保護効果を示すことから、イメグリミンが長期にわたり血糖管理が可能である可能性も示唆された。

一方、肝臓ではミトコンドリアの Complex III の活性を回復させると共に Complex I 活性を低下させ、ROS 産生を抑制し、ミトコンドリア機能を回復させたと考えられた。また筋肉においても病態で低下したミトコンドリアの生合成に関与する Pgc1a の発現をイメグリミン投与により回復させた。これらのことからイメグリミンは、インスリン標的臓器でのミトコンドリア機能を回復させることにより、糖取り込みや糖の生合成を含む全体の糖代謝を改善することで、インスリン抵抗性を改善することを示唆された。

よって、イメグリミンは 2 型糖尿病の成因であるインスリン分泌不全とインスリン抵抗性亢進の程度を問わず、2 型糖尿病患者に幅広く使用できると考えられた。また、既存の 2 型糖尿病治療薬とは異なる機序を有することから、単剤療法と共に DPP4 阻害薬やメトホルミンなどの他のいずれの 2 型糖尿病薬との併用療法でも血糖降下作用を発揮すると考えられた。

2.6.2.7.2　副次的薬理試験

125 種類の受容体及び酵素に対する *in vitro* 結合試験及び活性阻害試験で、イメグリミンは 1 μmol/L で明確な阻害活性を示さなかった。

2.6.2.7.3　安全性薬理試験

イメグリミンはラットで単回経口投与により 1500 mg/kg まで中枢神経系及び呼吸器系に対して影響を及ぼさなかった。心血管系に対しては、500 mg/kg を投与したイヌ 6 例中 3 例で軽微な心拍数減少が認められたが、血圧及び心電図パラメータに対して影響を及ぼさず、hERG 電流に対して 500 μmol/L まで影響を及ぼさなかった。これらの結果から、イメグリミンが心血管系、呼吸器系及び中枢神経系に対して重大な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

イメグリミンは、重度急性腎不全ラットにおいて、100 mg/kg/h で 180 分間の静脈内持続投与でも乳酸アシドーシスを起こさなかった。一方、メトホルミンでは、50 mg/kg/h 以上で乳酸アシドーシスに伴う死亡が認められた。

また、メトホルミンによる肝臓のミトコンドリア機能への影響として報告されている mGPDH 活性への影響を *in vitro* でイメグリミンとメトホルミンを用いて比較検討した結果、メトホルミンは、250 μmol/L で mGPDH 活性を 47%有意に抑制したが、イメグリミンは、250 μmol/L まで mGPDH 活性を抑制しなかった。

これらの結果から、イメグリミンは、メトホルミンとは異なり、ヒトで乳酸アシドーシスを惹起するリスクは低いと考えられた。

2.6.2.8　図表

該当なし。

参考文献

1) Giroix MH, Vesco L, Portha B. Functional and Metabolic Perturbations in Isolated Pancreatic Islets From the GK Rat, a Genetic Model of Noninsulin-Dependent Diabetes. Endocrinology. 1993; 132(2): 815-22.【4.3.04】
2) Kato I, Takasawa S, Akabane A, Tanaka O, Abe H, Takamura T, Regulatory Role of CD38 (ADP-ribosyl Cyclase/Cyclic ADP-ribose Hydrolase) in Insulin Secretion by Glucose in Pancreatic β Cells. The Journal of Biochemistry. 1995; 270(50): 30045–50.【4.3.05】
3) F Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. Diabetes.1998; 47:358–364.【4.3.06】
4) Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. Science. 2005; 307: 384-7.【4.3.07】
5) Anila K. Madiraju, Derek M. Erion, Yasmeen Rahimi, Xian-Man Zhang, Demetrios Braddock, Ronald A. Albright, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. Nature. 2014;510:542-6.【4.3.08】
6) 一般社団法人日本糖尿病学会編著. 3 治療. In: 糖尿病治療ガイド 2018-2019. 第 1 版. 東京: 文光堂; 2018. P.28-43. 【5.4.21】
7) Perry RJ, Cardone RL, Petersen MC, Zhang D, Fouqueray P, Hallakou-Bozec S et al., Imeglimin lowers glucose primarily by amplifying glucose-stimulated insulin secretion in high-fat-fed rodents. Am J Physiol Endocrinol Metab.2016;311:E461-70. 【4.3.01】
8) Vial G, Chauvin MA, Bendridi N, Durand A, Meugnier E, Madec AM et al. Imeglimin Normalizes Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity and Improves Mitochondrial Function in Liver of a High-Fat, High-Sucrose Diet Mice Mode. Diabetes 2015;64:2254-2264.【4.3.02】
9) Fouqueray P, Leverve X, Fontaine E, Baquié M, Wollheim C, Lebovitz H et al. Imeglimin - A New Oral Anti-Diabetic that Targets the Three Key Defects of Type 2 Diabetes. J Diabetes Metab 2011; 2(4): DOI: 10.4172/2155-6156.1000126. 【4.3.03】

イメグリミン塩酸塩
製造販売承認申請
CTD 第 2 部

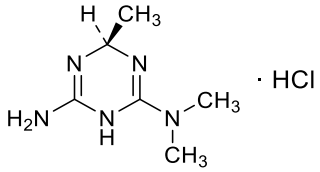
2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3　薬理試験概要表

大日本住友製薬株式会社

目次

2.6.3 薬理試験概要表
2.6.3.1 薬理試験：一覧表.....5
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....9
2.6.3.3 副次的薬理試験.....14
2.6.3.4 安全性薬理試験.....15
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....18

【本項における用語の説明】

用語	定義、読み替え等
イメグリミン	一般名： イメグリミン塩酸塩 化学名： (6*R*)-N^2,N^2,6-Trimethyl-3,6-dihydro-1,3,5-triazine-2,4-diamine monohydrochloride 化学式（分子量）： $C_6H_{13}N_5$・HCl（191.66） 構造式： 

【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
GK	Goto-Kakizaki	--
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
STZ	Streptozotocin	ストレプトゾトシン
N0-STZ	Neonatal streptozotocin	新生児 STZ
HF	High fat	高脂肪
HFHS	High fat high sucrose	高脂肪高スクロース
ZDF rat	Zucker Diabetic Fatty rat	ZDF ラット
ROS	Reactive oxygen species	活性酸素種
mGPDH	Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase	ミトコンドリア・グリセロール 3-リン酸脱水素酵素
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価法
qd	Quaque die	1 日 1 回
QTc	Corrected QT interval	補正 QT 間隔

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

表 2.6.3.1-1　一覧表

被験物質：イメグリミン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所	
					Vol.	Section
効力を裏付ける試験						
非肥満糖尿病モデルラットでの血糖降下作用	GK ラット	経口	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.01
非肥満糖尿病モデルラットでのインスリン分泌促進作用	STZ 誘発糖尿病モデルラット	経口	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.02
非肥満糖尿病モデルラットでのインスリン分泌促進作用	GK ラット	経口	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.03
肥満モデルラットでのインスリン分泌促進作用	HF 負荷ラット	経口	[redacted]	[redacted]	4.3	4.3.01
正常 Wistar ラットでのグルコース依存的インスリン分泌促進作用	正常 Wistar ラット	経口	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.04
非肥満糖尿病モデルラットでのグルコース依存的インスリン分泌促進作用	N0-STZ 誘発糖尿病モデル	経口	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.05
非肥満糖尿病モデルラットでのインスリン抵抗性改善作用	STZ 誘発糖尿病モデルラット	経口	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.02

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所	
					Vol.	Section
肥満糖尿病モデルマウスでのインスリン抵抗性改善作用	HFHS 食負荷マウス	経口	[redacted]	[redacted]	4.3	4.3.02
肝細胞での糖新生抑制作用	Wistar ラット由来初代培養肝細胞	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.3	4.3.03
非肥満糖尿病モデル動物の筋肉での糖込み改善作用	STZ 誘発糖尿病モデルラット	経口	[redacted]	[redacted]	4.3	4.3.03
筋肉での糖取り込み作用	H-2Kb 筋肉細胞株	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.3	4.3.03
作用機序の検討						
膵島からのインスリン分泌に対する作用	GK ラット由来膵島	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.06
膵島での NAD^+増加作用	GK ラット由来膵島	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.07
膵島での NAMPT 遺伝子発現に対する作用	GK ラット由来膵島	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.08
膵島での ATP 増加作用	GK ラット由来膵島	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.09
膵島での Ca^{2+}増加作用	GK ラット由来膵島	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.10
イメグリミンのグルコース依存的インスリン分泌での CD38 経路の寄与の検討	GK ラット由来膵島	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.11

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所	
					Vol.	Section
糖尿病ラットでのβ細胞に対する影響	ZDF ラット	経口	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1	4.2.1.1.12
ヒト膵島由来細胞に対する糖毒性に対する影響	ヒト膵島由来細胞	*in vitro*			4.2.1.1	4.2.1.1.13
肝臓でのミトコンドリア機能改善作用	HFHS 食負荷マウス	経口			4.3	4.3.02
筋肉での Pgc1a 遺伝子発現に対する影響	HFHS 食負荷マウス	経口			4.2.1.1	4.2.1.1.14
副次的薬理試験						
各種受容体若しくは酵素に対する作用	125 種類の受容体若しくは酵素	*in vitro*			4.2.1.2	4.2.1.2.01
安全性薬理試験						
中枢神経系に及ぼす影響	ラット /HsdCpb: WU Wistar	経口			4.2.1.3	4.2.1.3.01
hERG 電流に及ぼす影響	hERGチャネル安定発現 HEK293 細胞	*in vitro*			4.2.1.3	4.2.1.3.02
hERG 電流に及ぼす影響	hERGチャネル安定発現 HEK293 細胞	*in vitro*			4.2.1.3	4.2.1.3.03
心血管系に及ぼす影響	イヌ/Bor; Beagle	経口			4.2.1.3	4.2.1.3.04
呼吸機能に及ぼす影響	ラット/Rj Wistar (Han)	経口			4.2.1.3	4.2.1.3.05

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所	
					Vol.	Section
補足的安全性薬理試験						
重度急性腎不全ラットにおける乳酸アシドーシス惹起に及ぼす影響	重度急性腎不全ラット/SD	静脈内	[redacted]	[redacted]	4.2.1.3	4.2.1.3.06
mGPDH 活性に及ぼす影響	ラット肝臓ミトコンドリア由来 mGPDH	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.3	4.2.1.3.07

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

試験項目	試験系	主な結果	記載箇所
効力を裏付ける試験			
非肥満糖尿病モデルラットでの血糖降下作用	GK ラット	イメグリミン 25、75 又は 150 mg/kg を 1 日 2 回（以下、bid）（週末は 1 日 1 回）を 56 日間経口投与した結果、投与開始後 35 日目で用量依存的な空腹時血糖降下作用が認められ、150 mg/kg bid では 35 日目および 56 日目で有意な血糖降下が認められた。	4.2.1.1.01
非肥満糖尿病モデルラットでのインスリン分泌促進作用	STZ 誘発糖尿病モデルラット	イメグリミン 150 mg/kg を経口投与した 1 時間後に経口グルコース負荷試験を行った結果、イメグリミンはグルコース投与後の血糖値上昇を有意に抑制すると共に血中インスリン濃度を有意に上昇させた。	4.2.1.1.02
非肥満糖尿病モデルラットでのインスリン分泌促進作用	GK ラット	イメグリミン（200 mg/kg bid）又はメトホルミン（200 mg/kg bid）を 4 週間経口投与した後に経口グルコース負荷試験を行った結果、イメグリミンはグルコース投与後の血糖値上昇を有意に抑制すると共にグルコース投与後 30 分までの血中インスリン濃度を上昇させる傾向が認められた。一方、メトホルミンはグルコース投与後 30 分までの血糖値上昇を有意に抑制したが、血中インスリン濃度は上昇させなかった。	4.2.1.1.03
肥満モデルラットでのインスリン分泌促進作用	HF 負荷ラット	イメグリミン（150 mg/kg bid）を 2 週間経口投与した後に腹腔内グルコース負荷試験を行った結果、イメグリミンはグルコース投与後の血糖値上昇を有意に抑制すると共に血中インスリン濃度を有意に上昇させた。	4.3.01
正常 Wistar ラットでのグルコ	正常 Wistar ラット	イメグリミン 200 mg/kg、レパグリニド 0.1 mg/kg 又はシタグリプチ	4.2.1.1.04

試験項目	試験系	主な結果	記載箇所
ース依存的インスリン分泌促進作用		ン 3 mg/kg を経口投与した後にグルコースクランプ試験を実施した結果、イメグリミンは、グルコース投与前及び 9.5 mmol/L の血中グルコース濃度を目標にした Stage1 では血中インスリン濃度を上昇させなかったが、12.5 mmol/L の血中グルコース濃度を目標にした Stage2 では血中インスリン濃度を上昇させる傾向を示した。一方、レパグリニドはグルコース投与前から血中インスリン濃度を上昇させる傾向を示した。シタグリプチンは Stage2 でのみ血中インスリン濃度を上昇させる傾向を示した。	
非肥満糖尿病モデルラットにおけるグルコース依存的インスリン分泌促進作用	N0-STZ 誘発糖尿病モデル	イメグリミン 200 mg/kg、レパグリニド 0.1 mg/kg 又はシタグリプチン 3 mg/kg を経口投与した後にグルコースクランプ試験を実施した結果、イメグリミンはグルコース投与前で血中インスリン濃度を有意に上昇させ、18 mmol/L の血中グルコース濃度を目標にした Stage1 及び 25 mmol/L を目標にした Stage2 においても、血中インスリン濃度を有意に上昇させた。レパグリニド投与群は、グルコース投与前で血中インスリン濃度を有意に上昇させた。シタグリプチン群は、Stage1、Stage2 のいずれの高血糖条件でも血中インスリン濃度を上昇させる傾向を示した。	4.2.1.1.05
非肥満糖尿病モデルラットでのインスリン抵抗性改善作用	STZ 誘発糖尿病モデルラット	イメグリミン（150 mg/kg bid）を 2 週間経口投与した後に euglycemic hyperinsulinemic clamp 試験を実施した結果､イメグリミンは 0.5 UI/h/kg でインスリンを持続投与した条件での定常状態グルコース注入率を有意に増加させた。	4.2.1.1.02

試験項目	試験系	主な結果	記載箇所
肥満糖尿病モデルマウスでのインスリン抵抗性改善作用	HFHS 食負荷マウス	イメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間経口投与した後に、インスリン負荷試験を行った結果、イメグリミンはインスリン負荷による血糖降下を HFHS 群と比較して有意に増強した。	4.3.02
肥満糖尿病モデルマウスでのインスリン抵抗性改善作用	HFHS 食負荷マウス	イメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間投与した後にインスリンを投与し、その 10 分後に肝臓又は腓腹筋での PKB のリン酸化の程度を western blotting 法により評価した結果、イメグリミンは、HFHS 食負荷群で低下する PKB のリン酸化を有意に回復させた。	4.3.02
肝細胞での糖新生抑制作用	Wistar ラット由来初代培養肝細胞	イメグリミンは 0.25 mmol/L から濃度依存的な糖新生抑制作用を示した。	4.3.03
非肥満糖尿病モデル動物の筋肉での糖取り込み改善作用	STZ 誘発糖尿病モデルラット	イメグリミン 25、50 又は 100 mg/kg を 45 日間経口投与した後、ヒラメ筋及び腓腹筋での糖取り込みを評価した結果、イメグリミンは 25 mg/kg から糖取り込みを有意に改善した。	4.3.03
筋肉細胞株での糖取り込み作用	H-2Kb 筋肉細胞株	イメグリミンは 0.5 mmol/L から濃度依存的な糖取り込み上昇作用を示した。	4.3.03
作用機序の検討			
膵島からのインスリン分泌作用	GK ラット由来膵島	16.7 mmol/L のグルコース存在下で、イメグリミンは 50 µmol/L から濃度依存的なインスリン分泌促進作用を示した。	4.2.1.1.06
膵島での NAD^+増加作用	GK ラット由来膵島	16.7 mmol/L のグルコース存在下で、イメグリミンは 100 µmol/L で細胞内 NAD^+量を有意に増加させた。イメグリミンのインスリン分泌促進作用は Gallotannin 10 µmol/L［ニコチンアミドモノヌクレオチドから	4.2.1.1.07

試験項目	試験系	主な結果	記載箇所
		NAD を合成する酵素である Na/NMNAT-1,2,3（nicotinamide mononucleotide adenylyl transferases1, 2, 3）に対する阻害剤］で抑制される傾向を示した。	
膵島での NAMPT 遺伝子発現に対する作用	GK ラット由来膵島	16.7 mmol/L のグルコース存在下で、イメグリミンは 100 μmol/L で NAMPT 遺伝子発現を有意に上昇させた。ニコチンアミドは 15 mmol/L で NAMPT 遺伝子発現を有意に上昇させた。	4.2.1.1.08
膵島での ATP 増加作用	GK ラット由来膵島	16.7 mmol/L のグルコース存在下で、イメグリミンは 100 μmol/L で細胞内 ATP 量を増加させた。GLP-1 は 100 nmol/L で上昇させる傾向を示し、メトホルミンは 100 μmol/L で ATP 量を変化させなかった。	4.2.1.1.09
膵島での Ca^{2+}増加作用	GK ラット由来膵島	16.7 mmol/L のグルコース存在下で、イメグリミンは 100 μmol/L で細胞内 Ca^{2+}量を増加させる傾向を示した。GLP-1 は 100 nmol/L で細胞内 Ca^{2+}量を増加させる傾向を示した。	4.2.1.1.10
イメグリミンのグルコース依存的インスリン分泌での CD38 経路の寄与の検討	GK ラット由来膵島	NAD^+代謝酵素である CD38 の発現を抑制した細胞では、イメグリミン 100 μmol/L のインスリン分泌作用が消失した。	4.2.1.1.11
糖尿病ラットでのβ細胞に対する影響	ZDF ラット	イメグリミン（150 mg/kg bid）又はシタグリプチン（30 mg/kg qd）を 5 週間投与した結果、単位膵臓重量あたりのβ細胞量を有意に増加させた。シタグリプチンは単位膵臓重量あたりのβ細胞量を有意に増加させた。	4.2.1.1.12
ヒト膵島由来細胞に対する糖毒性に対する影響	ヒト由来膵島	イメグリミン 100 μmol/L は、グルコース又はフルクトースにより誘発される細胞死を抑制した。	4.2.1.1.13

試験項目	試験系	主な結果	記載箇所
肝臓でのミトコンドリア関連分子の発現に対する影響	HFHS 食負荷マウス	イメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間経口投与した肝臓では、HFHS 食負荷により低下した complex III のたん白質量及び活性が有意に回復すると共に complex I 活性が有意に低下した。また、イメグリミンは、ATP 合成酵素量を増加させた。更に、イメグリミンは、ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ活性を有意に増加させた。	4.3.02
肝臓のミトコンドリアの ROS 産生に対する影響	HFHS 食負荷マウス	イメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間経口投与した肝臓から単離したミトコンドリアでは、ROS 産生が有意に低下した。	4.3.02
肝臓での脂質代謝に対する影響	HFHS 食負荷マウス	イメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間経口投与した肝臓では、HFHS 食負荷により上昇した脂質量、トリグリセリド量、コレステロール量及びジアシルグリセロール量が有意に低下した。	4.3.02
筋肉での Pgc1a 発現に対する影響	HFHS 食負荷マウス	イメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間経口投与した腓腹筋では、HFHS 食負荷により低下した腓腹筋での Pgc1a mRNA 発現が有意に回復した。	4.2.1.1.14
筋肉でのミトコンドリア酸素消費に対する影響	HFHS 食負荷マウス	イメグリミン（200 mg/kg bid）を 6 週間経口投与した大腿四頭筋から抽出したミトコンドリアでは、HFHS 食負荷により低下した酸素消費が回復する傾向を示した。	4.2.1.1.14

2.6.3.3　副次的薬理試験

試験項目	試験系	主な結果	記載箇所
各種受容体若しくは酵素に対する作用	125 種類の受容体及び酵素	1 μmol/L でいずれの受容体若しくは酵素に対しても明確な作用を示さなかった。	4.2.1.2.01

2.6.3.4　安全性薬理試験

被験物質：イメグリミン

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号 Section
コアバッテリー							
心血管系（hERG チャネル）	hERG チャネル安定発現 HEK293 細胞	*In vitro*	イメグリミン：0, 50, 150 及び 500 µmol/L E-4031：0.1 µmol/L	4 細胞／濃度	イメグリミンは 50、150 及び 500 µmol/L で hERG テール電流をそれぞれ 12.3%、10.7%及び 15.2%抑制した。媒体群は 13.3%抑制し、E-4031 は、0.1 µmol/L で 81.7%抑制した。	非適用	[redacted] 4.2.1.3.02
心血管系（hERG チャネル）	hERG チャネル安定発現 HEK293 細胞	*In vitro*	イメグリミン：0, 50, 150 及び 500 µmol/L E-4031：0.1 µmol/L	5 細胞／濃度	イメグリミンは 50、150 及び 500 µmol/L で hERG テール電流をそれぞれ 8.1%、2.7%及び 4.6%抑制した。媒体群は 4.4%抑制し、E-4031 は、0.1 µmol/L で 89.7%抑制した。	適用	[redacted] 4.2.1.3.03
心血管系（血圧、心拍数、心電図）	イヌ /Bor; Beagle	経口	イメグリミン：0, 20, 100 及び 500 mg/kg	雌雄各 3 例	500 mg/kg で、投与後 30～120 分に 6 例中 5 例に嘔吐が認められた。6 例中 3 例で軽微な心拍数減少（最大 37%減）が認められたが、心電図パラメータ（PQ 間隔、QRS 間隔、QT 間隔及び QTc）及び血圧に対して影響を及ぼさなかった。	適用	[redacted] 4.2.1.3.04

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号 Section
中枢神経系（自発運動量測定及びFOB）	ラット /HsdCpb: WU Wistar	経口	イメグリミン：0, 150, 500 及び 1500 mg/kg カフェイン：20 mg/kg ハロペリドール：3 mg/kg（腹腔内投与）	雌雄各 5 例	イメグリミンは自発運動量に対して影響を及ぼさなかった。FOB で認められた影響はごく軽微で、用量反応関係は認められなかった。カフェインでは自発運動量増加、ハロペリドールでは自発運動量減少が認められた。	適用	[redacted] 4.2.1.3.01
呼吸器系（ホールボディプレチスモグラフィ法）	ラット/Rj Wistar (Han)	経口	イメグリミン：0, 150, 500 及び 1500 mg/kg テオフィリン：100 mg/kg	雄 8 例	イメグリミンは吸気時間、呼気時間、休止時間、最大吸気流量、最大呼気流量、1 回換気量、呼吸数、pause 及び enhanced pause に対して有意な影響を及ぼさなかった。 テオフィリンは、呼吸促進及び気管支拡張作用を示した。	適用	[redacted] 4.2.1.3.05

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号 Section
補足的安全性薬理試験							
乳酸アシドーシス惹起に及ぼす影響	ラット／SD（ゲンタマイシン誘発重度急性腎不全ラット）	静脈内持続	イメグリミン、鏡像異性体、ラセミ体及びメトホルミン：0, 25, 50, 75 及び 100 mg/kg/h（180 分間）	雄 5～7 例	イメグリミン：全群で死亡なし。血中乳酸濃度、血中グルコース濃度、血中 HCO_3^- 濃度及び血中 H^+ 濃度への影響なく、乳酸アシドーシスを示唆する変化なし。 鏡像異性体：75 mg/kg/h 群で 6 例中 3 例が死亡、100 mg/kg/h 群では死亡なし。75 mg/h/kg 以上の群で血漿中グルコース濃度の有意な低下。血中乳酸濃度、血中 HCO_3^- 濃度及び血中 H^+ 濃度に対して有意な影響なし。 ラセミ体 : 100 mg/kg/h 群で 5 例中 2 例が死亡。血中乳酸濃度、血中グルコース濃度、血中 HCO_3^- 濃度及び血中 H^+ 濃度への影響なし。 メトホルミン：50 mg/kg/h 以上の群で用量依存的な死亡数の増加。100 mg/kg/h 群では全例が死亡。用量依存的な血中乳酸濃度及び血中 H^+ 濃度の上昇並びに血中グルコース濃度及び血中 HCO_3^- 濃度の低下。50 mg/kg/h 以上の群の死亡は乳酸アシドーシスに伴う死亡と考えられた。	非適用	[redacted] 4.2.1.3.06
乳酸アシドーシス惹起に及ぼす影響	mGPDH 活性	*In vitro*	イメグリミン：12.5～250 µmol/L メトホルミン：50～250 µmol/L	3 例/濃度	イメグリミン：250 µmol/L まで mGPDH 活性の抑制なし。 メトホルミン：mGPDH 活性を濃度依存的に抑制し、250 µmol/L での抑制率は 47%。	非適用	[redacted] 4.2.1.3.07

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験