

糖尿病克服を目指した新規亜鉛錯体の開発研究に挑む

吉川 豊,^{*,a} 桜井 弘,^b 安井裕之^a

Challenge of Studies on the Development of New Zn Complexes to Treat Diabetes Mellitus

Yutaka YOSHIKAWA,^{*,a} Hiromu SAKURAI,^b and Hiroyuki YASUI^a^aKyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan, and^bSuzuka University of Medical Science, 3500-3 Minamitamagaki-cho, Suzuka, Mie 513-8670, Japan

(Received September 22, 2010)

In recent years, people all over the world have suffered from various diseases such as cancer, myocardial infarction, osteoporosis, hypertension, and diabetes mellitus (DM). Especially, DM, well-known as one of lifestyle-related diseases, has been regarded as a serious problem, because it is difficult to fully recover. The number of patients suffering from DM in 2007 was reported to be approximately 200 million people worldwide. However, insulin preparations and synthetic therapeutics, which are clinically used treatment of DM, have been associated with problems such as physical and mental pain due to daily injections and certain severe side effects, respectively. Zn, which is an essential trace element in animals and humans and plays an important role in maintenance of their lives, has been indicated to exhibit insulin-like activity. Since the finding of insulin-like effects of Zn, several Zn complexes have been proposed as a new type of anti-diabetic therapeutics which differ from existing medicines. In this symposium, we introduce the anti-diabetic effect, complication relieving effect, and action mechanism of bis(2-mercaptopyridine-N-oxidato)Zn complex with Zn(S₂O₂) coordination mode.

Key words—diabetes mellitus; Zn complex; inorganic medicine

1. はじめに

近年、糖尿病は世界中でその患者数が急増しており、わが国において740万人にのぼると言われている。^{1,2)}さらに、世界中の糖尿病患者数は、2010年には3億人になるとも予測されている。糖尿病患者の大部分を占める2型糖尿病患者の治療法は、運動・食事療法がメインであるが、効果が不十分な場合には薬物療法が行われている。しかし、薬物療法には低血糖等の副作用があり、血糖コントロールが困難になるケースが多い。

亜鉛はヒトの体内に約2g存在しており、新陳代謝の促進、味覚の正常化、脳の機能維持、免疫力の維持などの生体内ホメオスタシスに係わる必須微量元素である。^{3,4)}亜鉛を活性中心とするタンパク質や

酵素が生体内に300種類以上存在し、2007年には亜鉛がシグナル伝達分子として作用することも明らかにされた。⁵⁾さらに亜鉛は糖尿病と密接な関係があることが知られている。糖尿病になると、多飲・多尿などの症状が現れるが、糖尿病患者では健常者と比較して、かなり高い濃度で亜鉛が尿中に排泄されることが有名である。^{6,7)}1980年Coulstonらはラット脂肪細胞を用いた実験によって、亜鉛にインスリン様作用があることを世界で初めて見出した。⁸⁾その後、ChenらはZnCl₂を高濃度(20mM)含有する水を2型糖尿病のob/obマウスに8週間飲ませ、空腹時血糖値を約25%低下させたことも報告している。⁹⁾

このような背景の下、われわれの研究室ではバイオアベイラビリティの向上を目的として亜鉛を錯体化し、ZnN₂O₂、ZnN₄、ZnS₄、ZnO₄及びZnS₂O₂型の配位様式を持つ様々な亜鉛錯体を合成し、*in vitro*インスリン様作用及び*in vivo*抗糖尿病作用を比較検討してきた。¹⁰⁻¹⁶⁾それらの成果から、亜鉛に

^a京都薬科大学 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町5), ^b鈴鹿医療科学大学 (〒513-8670 三重県鈴鹿市南玉垣町3500番地3)

*e-mail: yutaka@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS15で発表したものを中心に記述したものである。

4つの硫黄原子が配位した ZnS_4 型や2つの酸素原子と2つの硫黄原子が配位した ZnS_2O_2 型の配位様式を持つ亜鉛錯体が、非常に強い抗糖尿病作用を有することが分かった。^{15,16} そこで本論文では、亜鉛の輸送体として古くから用いられてきた 2-mercaptopyridine-*N*-oxide を配位子に用い、 ZnS_2O_2 型配位様式を持つ亜鉛錯体 ($Zn(mpno)_2$) を合成し、この錯体が示す抗糖尿病作用並びにその作用メカニズムに関して報告する。

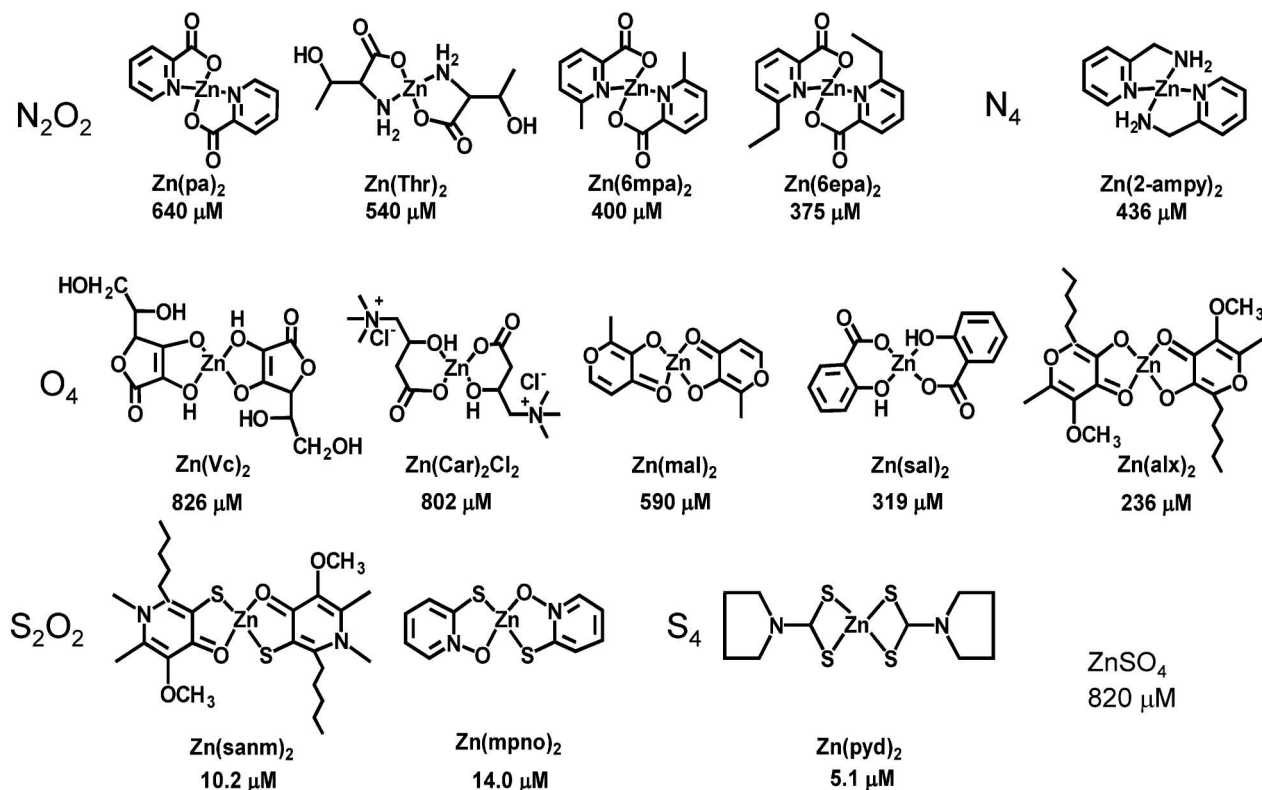
2. 亜鉛錯体のインスリン様作用

われわれの研究室では、過去にアミノ酸（及びその誘導体）(ZnN_2O_2 型)、マルトール類（及びその誘導体）(ZnO_4 or ZnS_2O_2 型)、アミン類 (ZnN_4 型)、ビタミン類 (ZnO_4 or ZnN_2O_2 型)、及びジチオカルバメート類 (ZnS_4 型)、などを配位子とする 100 種類以上の亜鉛錯体を合成してきた。それら合成した種々の亜鉛錯体の、*in vitro* 系でのインスリン様作用の評価は、¹⁰⁻¹⁶ 脂肪細胞を用いた文献既知の方法を用い、スクリーニング評価により行った。¹⁷ すなわち、Wistar 系雄性ラットの副睾丸周辺の脂肪

組織から、コラゲナーゼ処理により分離した脂肪細胞液に、対照に用いた $ZnSO_4$ や被験物質である亜鉛錯体を添加し、プレインキュベーションした。これらの溶液にエピネフリンを加え、インキュベーション後、放出される遊離脂肪酸 (FFA) を測定することにより評価した。脂肪酸の遊離を 50% 抑制する濃度を IC_{50} 値と定義し、合成した亜鉛錯体の IC_{50} 値を Fig. 1 に示した。この結果より筆者らは、硫黄が亜鉛と配位結合し ZnS_2O_2 型や ZnS_4 型配位様式となる亜鉛錯体が、非常に強いインスリン様作用を持つ化合物であることを突きとめ、*in vivo* での高い生理作用を有する可能性が期待された。¹⁶ そこで、活性の高かった化合物の中から、シャンプーなどヘアケアの部門で使用経験のある $Zn(mpno)_2$ (ジंकピリチオン) を用いて *in vivo* 実験を行うことを試みた。

3. $Zn(mpno)_2$ 錯体の消化管吸収性

$Zn(mpno)_2$ の消化管吸収性を評価するため、C57BL/6J マウスを用い、経口投与後の消化管吸収性を検討した。亜鉛の定量にあたり、検討したサン



IC_{50} (μM): 50% inhibitory concentration of FFA release from adipocyte

Fig. 1. Zn Complexes with Various Coordination Modes and IC_{50} Values

プルとして、投与溶媒である PEG 400, イオン型の亜鉛として $ZnCl_2$, 及び *in vitro* 実験系で効果の高かった $Zn(mpno)_2$ を用いた. 各サンプルを経口投与後, 経時的にマウスを解剖し腹部大静脈から採血した後, その血液を硝酸, 過塩素酸, 過酸化水素で湿式灰化を行い, 原子吸光光度法により, 全血中の亜鉛量を定量した. その結果, $Zn(mpno)_2$ の消化管吸収性はイオン型の $ZnCl_2$ と比して 5 倍以上高く, $ZnCl_2$ 投与群と比較して $Zn(mpno)_2$ 投与群は亜鉛の吸収率を高め, 有意に亜鉛の血中濃度を上昇させることが明らかとなった.¹⁸⁾

4. $Zn(mpno)_2$ 錯体の経口投与による血糖降下作用

$Zn(mpno)_2$ とそのリガンドである mpno, そして既にインスリン抵抗性改善薬として上市されている pioglitazone を用いた. Pioglitazone は, ポジティブコントロールとして, $Zn(mpno)_2$ の抗糖尿病作用と比較検討するために用いた. 2 型糖尿病モデル動物として遺伝的に 2 型糖尿病を発症する $KKAY$ マウスを用い, 16 日間にわたる連続経口投与実験を行った. その結果, 投与開始 3 日後からコントロール群と比較し, $Zn(mpno)_2$ を投与した群で, 有意に血糖値が降下した (Fig. 2).¹⁹⁾ Pioglitazone

投与群でも血糖降下作用はみられたものの, $Zn(mpno)_2$ を投与した群よりも作用は弱かった. また, mpno を投与した群では血糖降下作用はみられなかった. さらに投与終了後の HbA_{1c} 値を測定したところ, $Zn(mpno)_2$ は, 正常レベル近くにまで HbA_{1c} 値を低下させることが分かった (Table 1). イオン型の亜鉛を経口投与しても, 血糖降下作用は示さないため,²⁰⁾ $Zn(mpno)_2$ 投与によりみられたこの強い血糖降下作用は, リガンドに mpno を用いて亜鉛を錯体化することによるものと確認できた. 投与終了後, 血漿中の種々の酵素及び糖尿病に密接に関連するホルモン量を測定した. 肝障害を示唆する GPT 及び GOT 値は, サンプル投与により変動しなかった. さらに腎障害を示唆する BUN 値は, サンプル投与群において $KKAY$ -vehicle 群と比較すると減少していた. また脂質パラメータである TG 及び TCHO 値は, $Zn(mpno)_2$ 投与群において $KKAY$ -vehicle 群と比較し, 有意に減少した. これらの結果から $Zn(mpno)_2$ は, 7.5 mg Zn/kg の投与量では顕著な毒性を示すことなく, 強い抗糖尿病作用を示すことが分かった. さらに, $Zn(mpno)_2$ を 16 日間経口投与することにより, インスリン値が有意に低下することが分かり, インスリン抵抗性

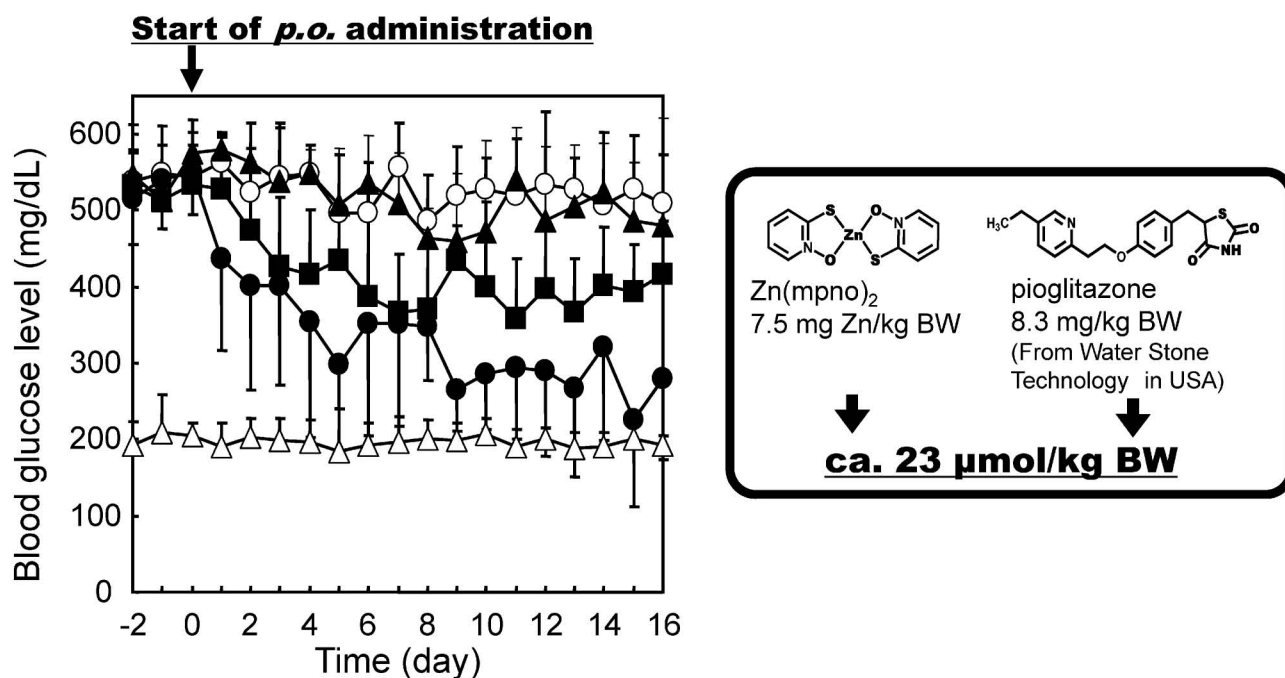


Fig. 2. Changes of Blood Glucose Levels

Normal C57BL/6J mice (Δ) and $KKAY$ mice treated with PEG400 (\circ ; control), $Zn(mpno)_2$ (\bullet), mpno (\blacktriangle), pioglitazone (\blacksquare) by daily oral injections for 17 days. Data are expressed as means \pm SDs for 4–10 mice.

Table 1. HbA_{1c} Level, Serum Insulin Level, and Serum Adiponectin Level in C57BL/6J Mice (Normal) and KK-A^y Mice Treated with PEG400 (Control), mpno, Zn(mpno)₂, and Pioglitazone

	Normal C57BL/6J mice	Control KK-A ^y mice	mpno administration	Zn(mpno) ₂ administration	Pioglitazone administration
HbA _{1c} (%)	2.8±0.2	9.1±0.6	9.9±0.8	4.4±0.8**	7.6±0.5*
Insulin (ng/ml)	1.7±0.7	34.2±2.6	36.5±4.1	23.3±3.3**	32.4±5.5
Adiponectin (μg/ml)	10.3±1.5	4.7±0.3	4.9±0.7	7.8±0.8†	9.7±1.3**

Significance: ** $p < 0.0001$, * $p < 0.001$, † $p < 0.01$, ‡ $p < 0.05$ vs. control KK-A^y mice. Data are expressed as means±SDs for 4–10 mice.

が改善されていることも示唆された (Table 1).¹⁹⁾ 一方, pioglitazone 投与群においては, 若干の減少傾向がみられたものの, 有意な差はみられなかった。これは, pioglitazone が *in vivo* 実験において十分な効果を示すことができる投与量ではなかったこと (高投与量として 30 mg/kg, 低投与量として 10 mg/kg で経口投与実験している報告が多い²¹⁾ が, 今回の投与量は 8.3 mg/kg であった), さらに投与期間が短かったことに起因すると考えられた。また, 脂肪細胞から分泌される抗動脈硬化因子として近年注目されているアディポネクチンは, Zn(mpno)₂ 及び pioglitazone 投与群において, 有意に上昇することが分かった (Table 1)。

5. Zn(mpno)₂ 錯体の作用メカニズム

亜鉛錯体の作用メカニズムを解明するときに最も重要なこととして, 投与した亜鉛が体内のどの部分に分布しているのかを評価することが挙げられる。われわれは, 現在までに合成し動物実験に供してきた亜鉛錯体の体内移行性の評価を行ってきた。その結果, 合成した亜鉛錯体の多くは, 脂肪組織, 膵臓, 骨に比較的多く蓄積することを明らかにしてきた。^{14,15)} そこで, Zn(mpno)₂ の作用メカニズムを解明するために, 脂肪細胞分化モデル細胞である 3T3-L1 細胞を用いて, 詳細なメカニズムの解明に取り組んだ。その結果, Zn(mpno)₂ は脂肪細胞内の PI3-K のリン酸化や Akt のリン酸化などに関与し, 糖輸送単体の GLUT4 の膜移行性を促進することが明らかとなった。²²⁾ その結果, 細胞外のグルコースを細胞内に取り込み, 糖尿病状態を改善する可能性が示唆された (Fig. 3)。

このように, 脂肪細胞における作用メカニズムは解明されてきたが, 亜鉛が多く分布することが示唆されており, インスリン分泌臓器でもある膵臓での作用に関してはほとんど評価されていない。そこで

われわれはラット膵臓 β 細胞由来のインスリノーマ細胞である RIN-5F 細胞を用い, 亜鉛が膵臓に及ぼす影響の評価を始めている。詳細に関しては, 近日中に発表予定であるが, 現在までのところ, 亜鉛が糖輸送体遺伝子などの発現を制御し, 膵臓の β 細胞の分化増殖に関係していることが知られている pdx-1 の発現量に影響を及ぼしていることが分かりつつあり, 詳細な検討が急がれるところである。

6. おわりに

糖尿病を完治させる薬剤の開発を目指し, 多くの研究者が昼夜を問わず実験にいそしんでいる。特に, 糖尿病治療の難しい点は, 膵臓 β 細胞機能が回復不能なほど悪化してから医療機関を訪れていることが挙げられる。そのため, 膵臓の β 細胞が悪化しないうちに, また, 悪化しない状態までに細胞を戻すことができれば, 糖尿病の治療に対する満足度も今まで以上に上昇すると考えられている。²³⁾ 一方, 今までの糖尿病治療薬は有機化合物が大部分であり, 臨床で用いられている無機医薬品はわずかである (Fig. 4).²⁴⁾ つまり, 無機医薬品は, 臨床で用いられている種類が少ないがゆえに, よく分かっていない点も多く, なかなか製薬会社なども, 無機医薬品からの創薬というテーマには手を出し難いのが現実である。また, 日本においては, 「無機化合物 = 重金属中毒」という図式ができあがり易く, なかなか正確な情報が伝わり難いのも実情である。しかし, 今回の発表のように, 糖尿病治療において新しいターゲティングを目的とした治療薬の開発を目指すためには, 既存のアイデアだけではなく, 亜鉛錯体などのような無機化合物を利用することも重要ではないかと考える。さらに, 本亜鉛錯体が転写因子である pdx-1 の発現量を増加させる働きは, 新たな糖尿病治療薬として, 1 つのエポックメイキングなものになることを期待したい。

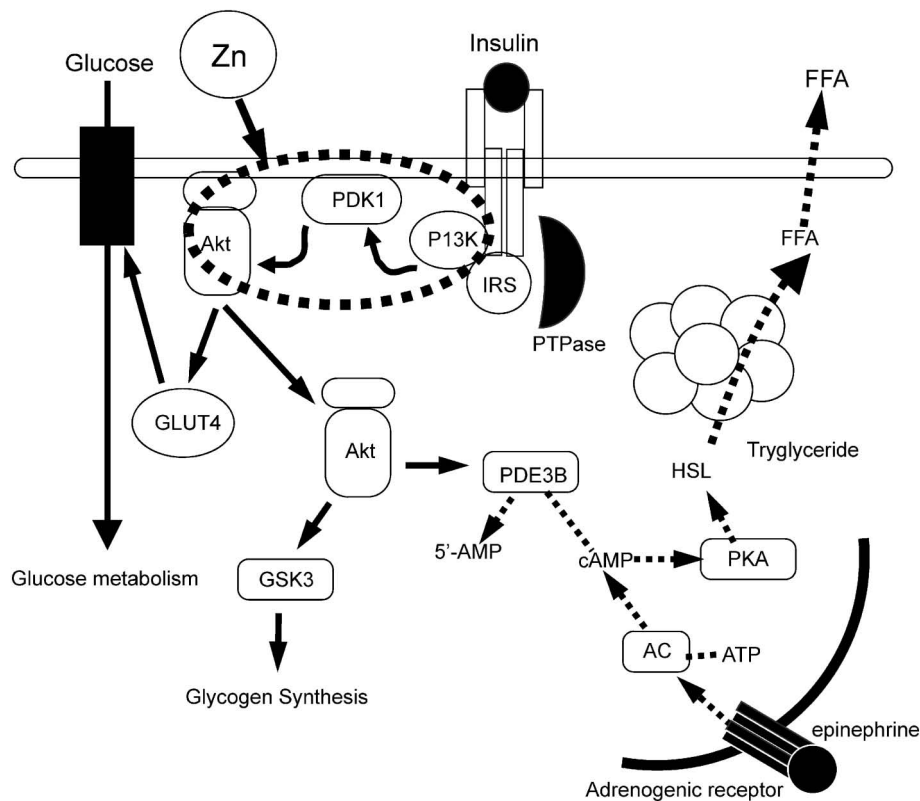


Fig. 3. Proposed Mode of Action of Zn Complexes in the Insulin Signal Cascade in a Cell

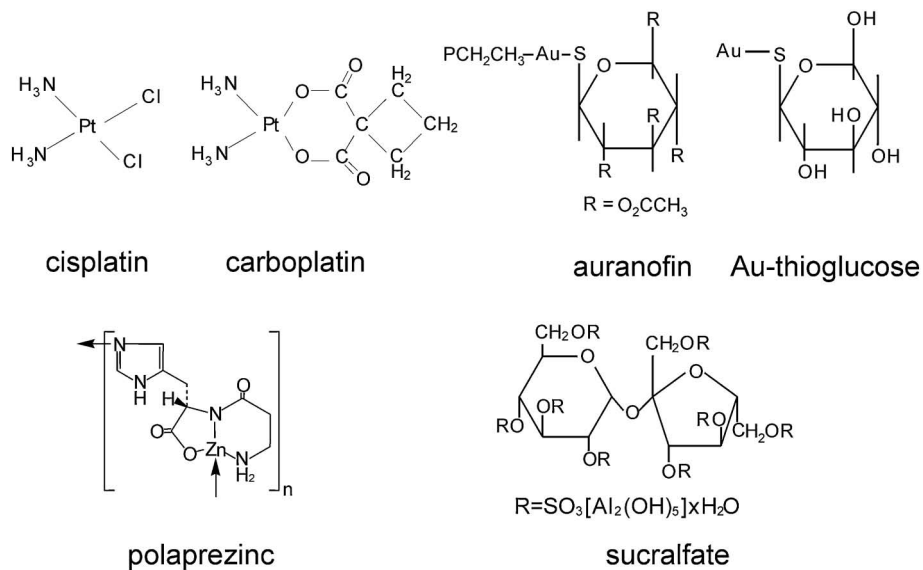


Fig. 4. Structures of Inorganic Medicines Used in Japan

謝辞 本研究を遂行するに当たり、多くの方々に協力を頂いた。特に、京都薬科大学代謝分析学分野の学生諸氏（安達祐介博士並びに村山彰人修士には本研究において特に多くの協力を頂いた）には多大なる貢献をして頂いた。ここに、心から深く感謝申し上げる。

REFERENCES

- 1) Amos A., McCarthy D. G., Zimmet P., *Diabet. Med.*, **14** (Suppl. 5), S1-S85 (1997).
- 2) Neville S. E., Boye K. S., Montgomery W. S., Iwamoto K., Okamura M., Hayes R. P., *Dia-*

- betes Metab. Res. Rev.*, **25**, 705–716 (2009).
- 3) Vallee B. L., Falchunck K. H., *Physiol. Rev.*, **73**, 79–118 (1993).
 - 4) Berg J. M., Shi Y., *Science*, **271**, 1081–1085 (1996).
 - 5) Yamasaki S., Sakata-Sogawa K., Hasegawa A., Suzuki T., Kabu K., Sato E., Kurosaki T., Yamashita S., Tokunaga M., Nishida K., Hirano T., *J. Cell Biol.*, **177**, 637–645 (2007).
 - 6) Heise C. C., King J. C., Costa F. M., Kitzmiller J. L., *Diabetes Care*, **11**, 780–786 (1988).
 - 7) Kinlaw W. B., Levine A. S., Morley J. E., Silvis S. E., McClain C. J., *Am. J. Med.*, **75**, 273–277 (1983).
 - 8) Coulston L., Dandona P., *Diabetes*, **29**, 665–667 (1980).
 - 9) Chen M. D., Liou S. J., Lin P. Y., Yang V. C., Alexander P. S., Lin W. H., *Biol. Trace Elem. Res.*, **61**, 303–311 (1998).
 - 10) Yoshikawa Y., Ueda E., Kawabe K., Miyake H., Takino T., Sakurai H., Kojima Y., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 560–561 (2002).
 - 11) Yoshikawa Y., Kondo M., Sakurai H., Kojima Y., *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1497–1503 (2005).
 - 12) Yoshikawa Y., Ueda E., Kawabe K., Miyake H., Sakurai H., Kojima Y., *Chem. Lett.*, **8**, 874–875 (2000).
 - 13) Yamane M., Adachi Y., Yoshikawa Y., Sakurai H., *Chem. Lett.*, **34**, 1694–1695 (2005).
 - 14) Adachi Y., Yoshida J., Kodera Y., Tamas K., Tamas J., Ava E. A., Yoshikawa Y., Sakurai H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 165–170 (2006).
 - 15) Yoshikawa Y., Adachi Y., Sakurai H., *Life Sci.*, **80**, 759–766 (2007).
 - 16) Kojima Y., Sakurai H., JP patent, 2001–220348.
 - 17) Nakai M., Watanabe H., Fujiwara C., Kakegawa H., Satoh T., Takada J., Matsushita R., Sakurai H., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 719–725 (1995).
 - 18) Yoshikawa Y., Murayama A., Adachi Y., Yasui H., Sakurai H., Abstracts of papers, the 128th Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Yokohama, March 2008, No. 1, p. 30.
 - 19) Yoshikawa Y., Murayama A., Adachi Y., Sakurai H., Yasui H., *Metallomics*. (in press)
 - 20) Saha T. K., Yoshikawa Y., Sakurai H., *Chem-MedChem*, **2**, 218–225 (2007).
 - 21) Kubota N., Terauchi Y., Kubota T., Kumagai H., Itoh S., Satoh H., Yano W., Ogata H., Tokuyama K., Takamoto I., Mineyama T., Ishikawa M., Moroi M., Sugi K., Yamauchi T., Ueki K., Tobe K., Noda T., Nagai R., Kadowaki T., *J. Biol. Chem.*, **281**, 8748–8755 (2006).
 - 22) Basuki W., Hiromura M., Sakurai H., *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 692–699 (2007).
 - 23) Oka Y., Ishihara H., *Int. Rev. Diab.*, **2**, 4–7 (2010).
 - 24) Yasui H., Yoshikawa Y., “Innovated Bunseki Kagaku Practice,” Kyoto Hirokawa Publishing INC., Tokyo, 2009.