

令和元年6月20日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18231

研究課題名(和文) 糖尿病治療を目指す亜鉛錯体を含むバイオメタル医薬品の分子メカニズム解明

研究課題名(英文) The elucidation of molecular mechanism of bio-metal medicines including zinc complexes targeting for diabetes treatment

研究代表者

内藤 行喜 (NAITO, YUKI)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80610120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：1) 3T3-L1脂肪細胞、2) HePG2細胞、3) 実験動物のインスリン標的組織、において亜鉛錯体がインスリンシグナル経路をどのように活性化するかPI3KおよびAktタンパク質のリン酸化作用に着目し検討を行った。1) よりPI3K p85のチロシンキナーゼの活性化、または、脱リン酸化酵素に対して作用し、2) よりAktならびにFoxO1のリン酸化を促進し、3) より健常マウスに対して脂肪でのAktリン酸化を上昇させた。2型糖尿病マウスへの投与では、臓器に対する有意な作用は認められなかった。亜鉛錯体は生体のインスリンシグナル伝達へ影響を及ぼし、健常時と病態時ではその応答性が異なっていると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前より亜鉛を用いた糖尿病治療薬開発研究より、インスリン製剤の代替薬となる可能性を有していたが、その作用機序は不明であった。経口服用可能なインスリン様活性を持つバイオメタル医薬品開発を最終目標とし、本研究は分子メカニズムを解明することを目的として進めてきた。今回の研究成果から、インスリン標的組織での亜鉛が作用する標的分子の候補を絞り込めたこと、実験動物における亜鉛錯体の作用を初めて明らかにしたことは学術的に意義があり、医薬品開発に向けて前進している。この前進は糖尿病治療を行っている糖尿病患者にとって有益であり、本研究結果は新しい作用メカニズムの新薬のシーズ提供という点から、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：We investigated how Zn complexes activate the insulin signaling pathway in 1) 3T3-L1 adipocytes, 2) HepG2 cells, and 3) the insulin target tissues of experimental animals. We revealed that Zn complexes could 1) activate the tyrosine kinase or effect on the phosphatase of PI3K p85, 2) induce Akt and FoxO1 phosphorylation, and 3) increase Akt phosphorylation in adipose tissue of ICR normal mice. However, Zn complexes did not show the significant effect on diabetes mice.

We concluded Zn complexes influence the insulin signaling in the living body, but their responsiveness differs between the diabetic conditions and the normal healthy conditions.

研究分野：生物無機化学

キーワード：糖尿病 亜鉛錯体 インスリンシグナル 作用メカニズム シグナル伝達 PI3K 2型糖尿病モデルマウス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリン分泌またはその機能不全によって引き起こされる、慢性高血糖を主症状とする代謝性疾患である。WHOは2006年「糖尿病の全世界的脅威を認知する決議」により毎年11月14日を「世界糖尿病デー」に指定し、世界各地で糖尿病の予防、治療、療養を喚起する啓発運動（ブルーサークル運動）を推進しているが、世界では糖尿病患者数は増加の一途である。糖尿病治療に用いられる薬剤のうち、インスリンはペプチド製剤である。経口服用すると消化管内で分解されるため、臨床で用いられるインスリン製剤の用法は皮下注射のみであり、現時点では経口服用は不可能である。そのため日々のインスリン注射がもたらす痛みとストレスは、患者のQOL・薬物治療コンプライアンスの低下をもたらしている。インスリンの長期投与はインスリン抵抗性を生じる原因でもあり、日々のインスリンの投与量調整が重要となってくる。

このような背景のもと、糖尿病治療効果を有する種々の有機薬剤が開発されており、糖尿病の原因因子の一つであるインスリン抵抗性改善作用をもつアディポネクチンを分泌させる薬剤（1999年にピオグリタゾンが上市）が開発され、臨床で使用されている。2009年12月には、副作用が少ない新規糖尿病治療薬（ジペプチジル・ペプチダーゼ（DPP）IV阻害薬）が上市され、臨床使用が可能となり、新たな作用機序をもつ糖尿病治療薬として脚光を浴びている。その他にも、グルコース/Na共輸送体を阻害することで血中グルコース濃度の上昇を抑制する薬剤（SGLT2阻害薬）、グルコースの代謝酵素であるグルコキナーゼを活性化する薬剤（GK活性化薬）など、糖尿病治療に対しては、今なお新薬の開発が続いており、副作用の少ない薬剤の開発が待ち望まれている。特に近年開発されたSGLT2阻害薬が有用な治療薬として臨床での展開も広く行われているが、多尿やそれに伴う脱水などの副作用が患者のQOLにマイナスの影響をもたらしていることも事実である。

このような糖尿病治療に関わる様々な状況を鑑み、申請者は、生体内必須微量元素である亜鉛（Zn）がインスリンシグナル経路におけるAktのリン酸化を促進する働きに着目し、糖尿病治療ならびにその作用機構解明を目指した研究計画を立てた。申請者の所属する研究室で合成したZn錯体；ジ（ヒノキチオレート）ジンク（II）錯体（ $[Zn(hkt)_2]$ ）は天然物由来化合物であるヒノキチオールを配位子とした吸収性の高いZn錯体である。これを2型糖尿病モデル動物のKK-A<sup>y</sup>マウスに腹腔内投与したところ、抗糖尿病効果を示すという報告がある（Yamane et al., Chem. Lett., 2005）。この知見から、3T3-L1細胞に $[Zn(hkt)_2]$ を作用させ、その作用機構の検討を行ったところ、インスリン非存在下において、 $[Zn(hkt)_2]$ がAktのリン酸化活性作用をもたらし、 $[Zn(hkt)_2]$ がインスリンと類似の作用を示すことを発見した。さらに、インスリン併用条件下で3T3-L1細胞に $[Zn(hkt)_2]$ を作用させるとインスリン受容体 $\beta$ （IR $\beta$ ）およびインスリン受容体基質-1（IRS-1）に対してチロシンリン酸化を促進させること、インスリンシグナル経路に対して阻害的に作用するチロシン脱リン酸化酵素（Protein tyrosine phosphatase 1B: PTP1B）PTEN（Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10）に対して、 $[Zn(hkt)_2]$ は阻害作用を示すことが分かった。以上より、 $[Zn(hkt)_2]$ はPI3K（Phosphoinositide 3-kinase）-Akt経路を活性化していることが示唆されるため、さらにZn錯体の標的分子を絞り込むため、インスリンシグナル経路に關与するPI3Kに着目し、Zn錯体による酵素活性への影響を中心に検討することにした。

### 2. 研究の目的

本研究では、インスリンに替わり、経口投与可能なインスリン様活性を持つバイオメタル医薬品の開発を最終目標とし、その目標達成の前段階として抗糖尿病効果を有するZn錯体のインスリン標的組織に対する分子メカニズムを解明することを、本研究の目的とした。Znや金（Au）に代表される金属元素による製剤は胃潰瘍治療薬のプロマック（ポラプレジック）や慢性関節リュウマチのオーラノフィンなどがあり、多くが錯体である。錯体化することで、脂溶性が増し、生体内での吸収性や組織移行性が高まり、経口投与でも効果を示す可能性が高まる。そこで、錯体化することで経口投与が可能で、生物学的利用能が高い抗糖尿病治療薬につながるのではないかと考えた。Znは以前から動物実験において血糖降下作用を示しており、インスリン製剤の代替薬となる可能性を有している。1型糖尿病モデルのSTZラットにZnCl<sub>2</sub>を投与し、血糖降下作用を示すことが報告され（Shisheva et al., Diabetes, 1992）てから、Znを錯体化することによる血糖降下作用の増強、副作用の軽減が図られ、ジ（1-オキシ-2-ピリジンチオレート）ジンク（II）錯体などがZnイオンよりも高いインスリン様活性を示すことが報告されている（Yoshikawa et al., Metallomics, 2011など多数）。このように様々なZn錯体が強い血糖降下作用を含む抗糖尿病効果を有することが報告されているが、この効果が実際にインスリンシグナル伝達の活性化をもたらした結果なのか、その詳細な作用機序は解明に至っていない。そこで、申請者はインスリン標的細胞の一つである脂肪細胞でのインスリンシグナル経路に対するZn錯体の作用を評価することで、Zn錯体がインスリンと同じ働きを有するか否かを検討することに着手した。そして、標的分子を明らかにすることで、Zn錯体による抗糖尿病効果について、今後の構造活性相関の研究や、医薬品開発へ繋がることを目的とした。

### 3. 研究の方法

申請者が所属する研究室において、これまでに合成してきた方法により、本研究に用いる酸

素原子4つを配位原子とする、 $O_4$ 型 Zn 錯体を合成した。例えば、天然物として抗菌活性を示すヒノキチオールや、食品添加物として利用されているマルトールを配位子として用いた Zn 錯体を合成した。これらの化合物は、申請者が所属する研究室で、実験動物を用いた検討において抗糖尿病効果やインスリン様活性を示すことが明らかとなっている。

これまでの研究結果から、インスリンシグナル経路において、3T3-L1 細胞に対して $[Zn(hkt)_2]$ を単独で作用させるとPI3Kより下流に存在する Akt および GSK3 $\beta$  に対してはリン酸化が起こる一方で、PI3K よりもシグナル上流に位置する IR $\beta$  および IRS-1 に対して $[Zn(hkt)_2]$ はインスリン併用条件下において、はじめてチロシンリン酸化を起こす。そこで、まず PI3K に対する Zn の活性化作用がインスリンの存在に影響を受けるのか否かを、 $[Zn(hkt)_2]$ について検討した。この時、 $[Zn(hkt)_2]$ を作用させる時間はこれまでの研究と同一時間に設定し、イムノブロット法により検討した。なお、シグナル伝達におけるタンパク質の相互作用の視点から検討するため、免疫沈降法を用いて検討を進めた。Zn による PI3K の活性化についてインスリンとの作用の違いを確認した後、 $O_4$ 型 Zn 錯体による PI3K 活性化を酵素実験により評価した。またこの時、各錯体による濃度依存性を検討した。

また、3T3-L1 細胞以外のインスリン標的組織における亜鉛錯体の影響を検討するため、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた検討を行った。検討には $[Zn(hkt)_2]$ 錯体を用い、セリン 473 リン酸化体 Akt (Akt(Ser473)) ならびにセリン 256 リン酸化 FoxO1 (FoxO1(Ser256)) の発現量を測定することにより、肝臓における $[Zn(hkt)_2]$ の作用を検討した。

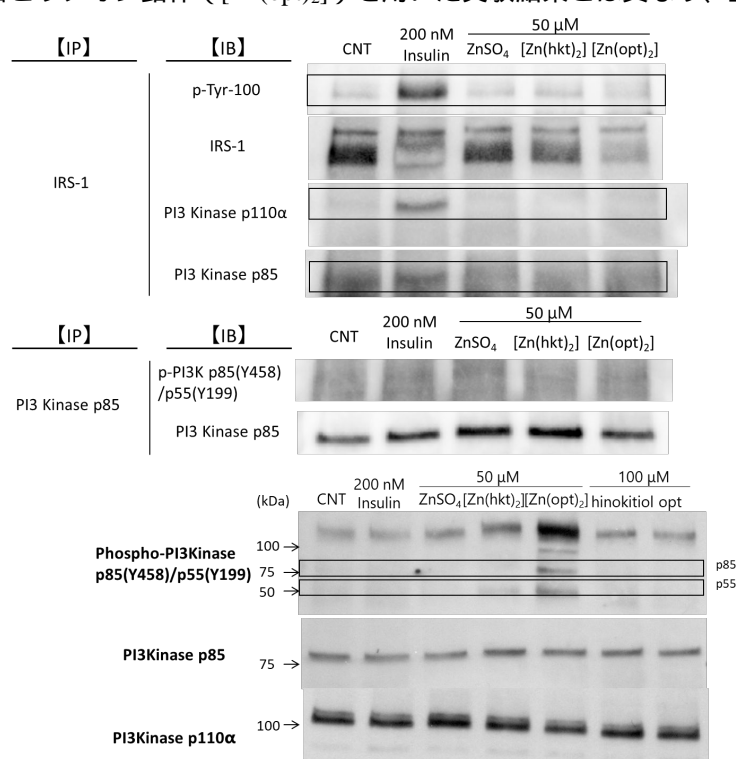
in vivo 実験としては、 $O_4$ 型 Zn 錯体が、インスリン標的組織である肝臓、脂肪、骨格筋で in vitro 系と同様のインスリン様活性を示すか否かを検討した。 $O_4$ 型 Zn 錯体のうち抗糖尿病効果が最も高いと考えられる Zn 錯体 ( $[Zn(hkt)_2]$ ) に注目し、実験動物に投与した。使用する実験動物は ICR マウスと、2 型糖尿病モデルマウスである KK-A $y$  マウスを用いた。投与方法は単回・腹腔内投与であり、Zn 錯体投与 40 分後に解剖を行い、標的組織を摘出し、ウェスタンブロットティング法を用いてセリン 473 リン酸化体 Akt (Akt(Ser473)) の発現量を測定することにより、インスリン様活性を評価した。投与する Zn 錯体量については、申請者が所属する研究室の知見・研究結果からマウス一頭体に対して 10 mg Zn / kg BW となるように設定した。

#### 4. 研究成果

検討に用いる $[Zn(mal)_2]$ 、 $[Zn(hkt)_2]$ の合成をまず行った。合成した亜鉛錯体は、赤外吸収スペクトル法、質量分析法、および元素分析法を用いて、合成が成功していることを確認した。

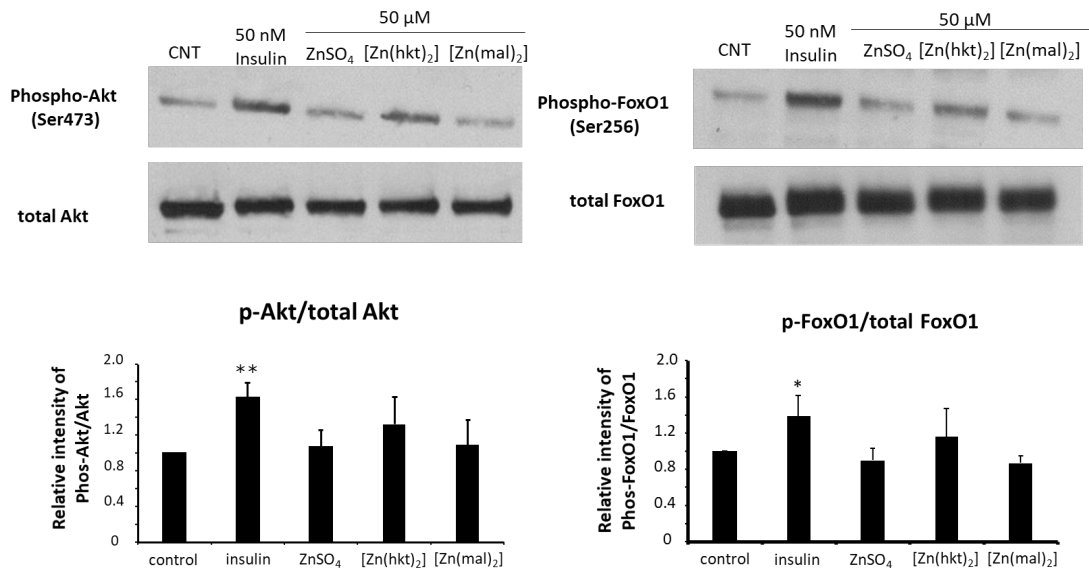
これら合成された錯体は、マウス由来 3T3-L1 脂肪細胞におけるインスリンシグナル経路中の PI3K 活性化への影響、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞における Akt および FoxO1 へのリン酸化促進作用についての検討、健常モデル動物ならびに 2 型糖尿病モデル動物に対するインスリン標的組織での Akt リン酸化促進作用の検討に用いた。

3T3-L1 脂肪細胞を用いた検討から、亜鉛錯体はインスリン受容体を介さず、直接的に PI3K の活性化をもたらす結果が得られた。さらに詳細な検討を進めていくと、比較対照に用いた亜鉛ピリチオン錯体 ( $[Zn(opt)_2]$ ) を用いた実験結果とは異なり、亜鉛錯体の配位形式の違いによ



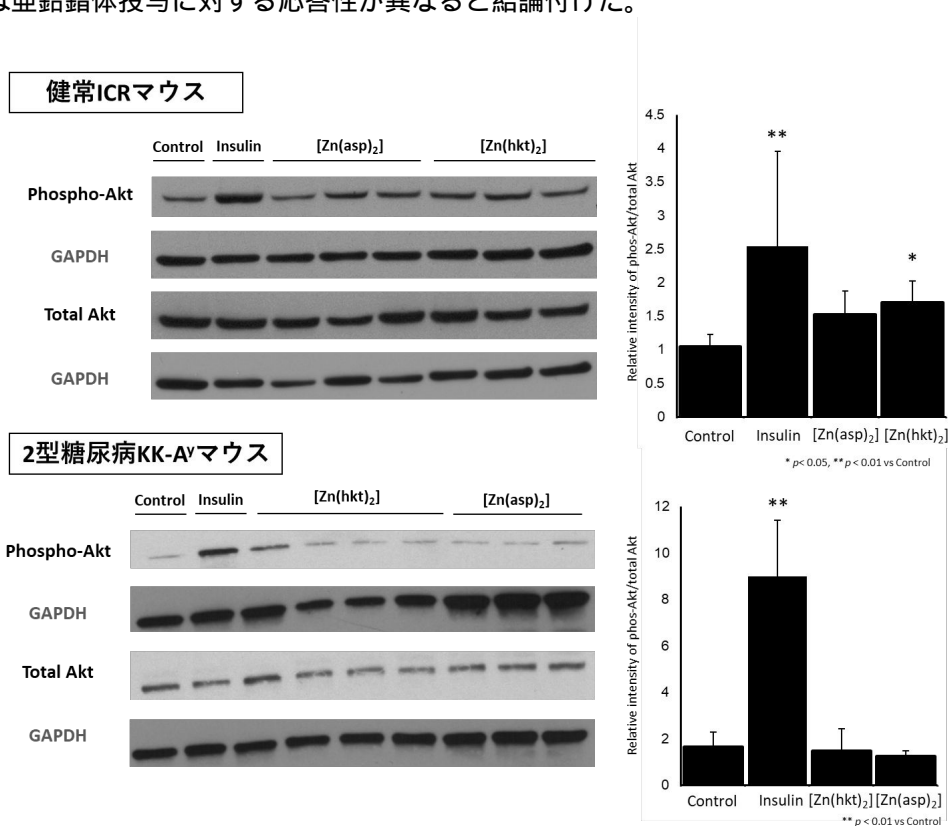
って PI3K への影響が異なることが示唆され、亜鉛錯体は PI3K p85 のチロシンリン酸化を制御するチロシンキナーゼの活性化、または、脱リン酸化酵素に対して作用している可能性が示唆される結果となった(【図 1】)。HepG2 細胞への影響については、 $[Zn(hkt)_2]$ は Akt ならびに FoxO1 のリン酸化促進作用を示すことが明らかとなった(【図 2】)。

【図 1】  
亜鉛錯体処置による 3T3-L1 細胞における PI3K への影響



【図2】 HepG2 細胞における亜鉛錯体処置による各種リン酸化タンパク質発現量の検討

また実験動物を用いた検討においては、健常モデル動物である ICR マウス（雄性 6 週齢）に対して、亜鉛錯体を腹腔内投与した時のインスリン標的組織（肝臓、脂肪、骨格筋）へのシグナル伝達に関わる影響を検討した。投与後 40 分において [Zn(mal)<sub>2</sub>]、[Zn(hkt)<sub>2</sub>] は脂肪組織において Akt リン酸化上昇作用が認められ、亜鉛錯体が脂肪組織に特異的に作用していることが考えられた。一方で、2 型糖尿病モデル KK-A<sup>y</sup> マウスに対して [Zn(hkt)<sub>2</sub>] を腹腔内投与したところ、投与後 40 分での各臓器に対する有意な作用は認められなかった（【図 3】）。この結果は、インスリン抵抗性状態においては、Zn 錯体の効果は僅かであり、腹腔内単回投与ではインスリン標的組織、特に、脂肪組織作用するには至らなかった。また、ICP-MS を用いた臓器中の亜鉛定量実験を行ったところ、少なくとも脂肪組織への亜鉛量の増加が必ずしもシグナル伝達活性化をもたらすわけではないことも明らかにした。これらのことから、亜鉛錯体は培養細胞だけでなく、生体においてもシグナル伝達へ影響を及ぼしていることが考えられるが、健常時と病態時では亜鉛錯体投与に対する応答性が異なると結論付けた。



【図3】 健常 ICR マウスおよび 2 型糖尿病モデル KK-A<sup>y</sup> マウスへの亜鉛錯体腹腔内投与時の脂肪組織での Akt リン酸化促進作用

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Yuki Naito, Hiroyuki Yamamoto, Yutaka Yoshikawa, and Hiroyuki Yasui, In vivo effect of bis(maltolato)Zinc(II) complex on Akt phosphorylation in adipose tissue of mice., 査読有, Biol. Trace Elem. Res., (2019)  
doi: 10.1007/s12011-019-1648-3.

### 〔学会発表〕(計6件)

内藤行喜、吉川 豊、安井裕之、抗糖尿病作用を有する亜鉛錯体が P13 Kinase に及ぼす特異的な作用、日本薬学会第 139 年会、2019/03/21、幕張メッセ、千葉県、千葉市

久本真琴、内藤行喜、吉川 豊、安井裕之、抗糖尿病作用を示す ZnO<sub>4</sub> 型配位形式を有する亜鉛錯体の in vivo におけるメカニズム解明、日本薬学会第 139 年会、2019/03/21、幕張メッセ、千葉県、千葉市

内藤行喜、山元裕章、西口貴之、吉川 豊、安井裕之、In vivo におけるインスリンシグナル伝達系への亜鉛マルトール錯体による Akt リン酸化促進作用の検討、第 28 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2018/06/29、東北大学、宮城県、仙台市

内藤行喜、吉川 豊、安井裕之、亜鉛錯体による 3T3-L1 脂肪細胞における PI3 Kinase 活性に対する効果、日本薬学会第 138 年会、2018/3/26、もてなしドーム、石川県、金沢市

山元裕章、内藤行喜、安井裕之、インスリンシグナル伝達系における亜鉛イオン及び亜鉛錯体による Akt リン酸化促進作用、第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2017/10/14、兵庫医療大学、兵庫県、神戸市

吉川 豊、内藤行喜、安井裕之、糖尿病治療を目指したバイオメタルによるメタロミクス研究、メタルバイオサイエンス研究会 2017、2017/10/13、岡山大学、岡山県、岡山市

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/taisya/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：なし

所属研究機関名：なし

部局名：なし

職名：なし

研究者番号(8桁): なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: なし

ローマ字氏名: なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。