

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790062

研究課題名(和文) 糖尿病モデルカイコを用いた血糖降下薬の開発と作用機序の解明

研究課題名(英文) Development of hypoglycemic drugs using diabetic silkworm model

研究代表者

松本靖彦 (MATSUMOTO YASUHIKO)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：60508141

研究成果の概要(和文)：我々は、安価で倫理的な問題が少ないカイコをモデル動物とした生活習慣病モデルの開発と、その疾患モデルを用いた創薬法の開発を目指している。本課題で、我々は、カイコを用いた糖尿病モデルの確立し、生薬であるジオウから有効成分としてガラクトースの単離に成功した。また、カイコを用いた糖尿病合併症モデルも開発した。本研究は、無脊椎動物を用いた糖尿病モデルを用いて血糖降下物質を同定した初めての研究である。(196文字)

研究成果の概要(英文)：We have proposed a novel method for development of drugs using invertebrate pathogenic animal model. In this study, we established hyperglycemic model in silkworm and identified galactose as a hypoglycemic drug from herbal medicine, jiou, by monitoring hypoglycemic activity in the hyperglycemic silkworm model. Moreover, we also developed diabetic complication model in silkworm. This is a first report to identify anti-diabetic compound using invertebrate hypoglycemic model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：糖尿病、血糖降下薬、カイコ、無脊椎動物モデル

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は慢性の高血糖状態の持続、及び耐糖能の異常を示す疾患であり、腎症、末梢神経障害、網膜症などの様々な臓器障害を引き起こす原因となる。近年、先進諸国において、インスリン抵抗性が原因となるII型糖尿病の患者数は増加傾向にある。インスリン、及びインスリン抵抗性改善作用により血糖値を低下させる医薬品が糖尿病の治療に用いられているが、薬剤抵抗性や

副作用を引き起こすという問題があり、新たな治療薬の開発が望まれている。

血糖値は、インスリンなどのホルモンの作用により、全身の組織における糖の取り込み、代謝により調節されている。よって、糖尿病治療薬の効果を評価するためには、動物個体を用いる必要がある。そのため、マウスやラットなどの哺乳動物による糖尿病の病態モデルを用いた研究が行われている。しかし、多数の哺乳動物を用いて糖尿

病治療薬をスクリーニングすることは、高い飼育コストばかりでなく、動物愛護の観点からも問題があると指摘されている。我々は、無脊椎動物であるカイコを用いて、病態モデルを構築し、医薬品の治療効果を評価できることを提唱している。すでに我々は、カイコ感染モデルを用いて、細菌感染治療薬、及び抗ウイルス薬の評価を行えること、及び抗生物質の体内動態において哺乳動物とカイコで共通した面があることを報告している。無脊椎動物であるカイコは、容易に多数の個体を用いて治療薬の評価を行うことができる。また、カイコは、哺乳動物より安価で、狭いスペースで大量の個体を飼育することが可能である。さらに、カイコは線虫やショウジョウバエのような小型無脊椎動物では困難な注射器を用いた定量的な薬物の血液内注射が容易に実施できる。また、比較的大量の血液を採取することが可能である。よって、カイコは、薬物の治療効果を評価するモデル動物として有用であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、カイコを用いた糖尿病治療薬の評価、及び同定のための無脊椎動物糖尿病モデルの構築である。

## 3. 研究の方法

### (1) カイコの種類、飼育条件、注射条件

カイコの受精卵(交雑種ふ・よう x つくば・ね)は愛媛養蚕株式会社から購入した。孵化した幼虫は室温で人工飼料シルクメイト2S(日本農産工業株式会社)を与えて5令幼虫まで育てた。飼育容器は卵から2令幼虫までを角型2号シャーレ(栄研器材)、それ以降をディスプレイザブルのプラスチック製フードパック(フードパックFD 大深、中央化学株式会社)を用いた。飼育温度は27°Cとした。特に記載がない限り、実験には4齢眠以後絶食させた5令1日目の幼虫を用いた。

糖添加試料は、人工飼料シルクメイト2S(日本農産工業株式会社)に、種々の重量比でD-Glucoseを混合して調製した。

カイコの注射実験では、5令幼虫の第5体節の模様がある体節に0.05 mlの試料を注射した。注射筒(1ml)と注射針(27Gx3/4)はテルモ株式会社より購入した。

### (2) 血糖値の定量法

体液(20 $\mu$ l)は第一腹肢{first proleg}にはさみでつけた切り傷から採取し、タンパク質を沈殿させるために9倍量の0.6N過塩素酸と混合した。3,000rpmで10分間遠心分離し、上清を体液抽出液{hemolymph extract}とした。

カイコ血液中の総糖量はフェノール硫酸法(Hodge et al)により定量した。蒸留水で適当な濃度に希釈した体液抽出液100 $\mu$ lと5%(w/v)フェノール水溶液100 $\mu$ lを混合し、濃硫酸500 $\mu$ lを加えて激しく攪拌し、室温で20分間静置した後、490nmにおける吸光度を測定した。グルコース水溶液を標準糖溶液とした。

マウスの血糖値は、血中グルコース定量機器であるアキュチェックアピバ(Roche)を用いて定量された。

### (3) 試薬

組換え型ヒトインスリンはSigmaより購入し、0.1%の酢酸を含む生理食塩水(0.9%NaCl)に溶解して用いた。AICAR(5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside)はトロントリサーチケミストリーズより購入し、生理食塩水に溶解して用いた。ワートマニンはCALBIOCHEMより購入し、DMSOに溶解して用いた。

### (4) ウェスタンブロット

カイコから抽出した脂肪体を、Insect saline(130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>)で洗浄した後、ペニシリン、ストレプトマイシンを添加したGrace's medium 200 $\mu$ l中で27°Cにおいて馴染ませた。ワートマニンをを用いた実験においては、同時に培地中にワートマニンを加えた。30分間の前培養の後、培地にインスリン(3 mg/ml)、もしくはAICAR(4 mg/ml)を50 $\mu$ l添加し、27°Cで1時間培養した。脂肪体をInsect salineで洗浄した後、NP-40 lysis buffer(10 mM Tris/HCl(pH=7.5)、150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% NP-40, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>V0<sub>4</sub>) 250 $\mu$ lの溶液と混合し、20秒間、超音波処理した。その後、TCA沈殿を行い、タンパク質をSDS電気泳動し、PVDFメンブレンに移行させた。抗Akt抗体、抗リン酸化Akt抗体、抗AMPK抗体、抗リン酸化AMPK抗体をそれぞれ用いてウェスタンブロットを行い、脂肪体のリン酸化Akt量(リン酸化Akt量/全Akt量)、及びリン酸化AMPK量(リン酸化AMPK量/全AMPK量)を測定した。

### (5) カイコ体液中のAGEsの検出

カイコから抽出した体液を、遠心分離し、血球を除いた。その後、上清をTCA沈殿し、タンパク質をSDS電気泳動し、PVDFメンブレンに移行させた。抗AGEs抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 高血糖カイコモデルの確立

我々は、生活習慣病に対する治療薬の薬効を評価できる無脊椎動物疾患モデルの開発を目指している。まず、我々は、糖尿病治療薬の作用を評価するためのカイコを用いた高血糖モデルの開発を試みた。カイコに高グルコース餌を与えることにより、カイコの体液中の糖濃度（以下、血糖値と表記）が有意に上昇した（図1）。カイコの脂肪体（哺乳動物の脂肪細胞、及び肝臓の機能を有する臓器）、マルピギー管（哺乳動物の腎臓に相当する臓器）、筋肉において臓器中の糖の蓄積量が増加した。カイコに高グルコース餌を与えたとき、30分ですでに有意な血糖値、血液中のグルコース濃度の上昇が見られた。餌に含ませるグルコースの量依存にカイコの血糖値は上昇した。高グルコース餌の摂食により高血糖となったカイコを絶食させることにより、カイコの血糖値が低下した。哺乳動物の腸管を通過しないマンニトールを加えた餌では、カイコ血糖値が上昇しなかった。よって、カイコを高血糖にする条件を見出せた。また、カイコは、哺乳動物同様、グルコースの腸管からの取り込み、各臓器への移行、貯蔵を行っていることがわかった。

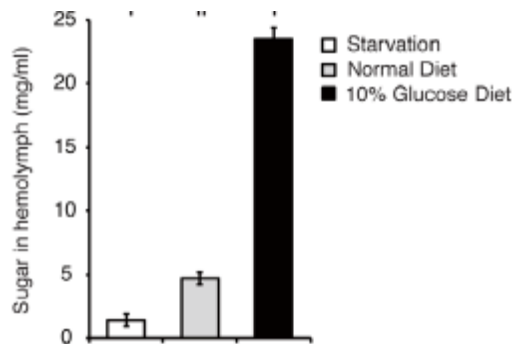


図1 高グルコース餌によるカイコの血糖値の上昇

### (2) 高血糖カイコにおける成長阻害

糖尿病患者は、網膜症、腎症、末しょう神経障害など糖尿病合併症を発症する。そこで、カイコに長時間高グルコース餌を与えると症状が現れるか検討した。三日間、高グルコース餌を与えることにより、カイコの体長、体重が通常餌を食べたカイコより小さかった。その成長阻害は、餌に含ませるグルコースの濃度に依存していた（図2）。また、直接グルコースを体液中に投与して、血糖値を高めたときに成長阻害が起こるか検討した。グルコース溶液を繰り返し投与されたカイコは、体長、体重が小

さかった。よって、カイコは高血糖となると成長阻害という症状を呈することが明らかとなった。

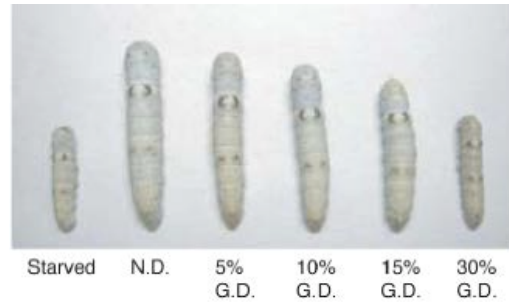


図2 高グルコース餌によるカイコの成長阻害

### (3) 高血糖カイコを用いた糖尿病治療薬の評価系の確立

我々は、高血糖カイコを用いて、糖尿病治療薬の血糖降下作用を評価できるか検討した。ヒト臨床においてI型糖尿病患者に血糖降下薬として用いられている最も代表的な医薬品はインスリンである。グルコースを摂食したカイコの血糖値は、組み換え型ヒトインスリン投与により低下した（図3）。哺乳類において、インスリンは、Aktのリン酸化を介して脂肪組織における細胞内への糖の取り込みを亢進させる。我々は、in vitroの組織培養系を用いて、ヒトインスリンにより、カイコのAktがリン酸化するか検討した。培養液にグルコースを添加することにより、脂肪体中の糖の蓄積量が増加した。培養液にヒトインスリンを添加すると、脂肪体細胞中の糖の蓄積量、及びリン酸化Aktの量が増加した。さらに、ヒトインスリンによるカイコの脂肪体での糖含量の増加、及びAktのリン酸化の亢進は、PI3キナーゼの阻害剤であるワートマニンにより抑圧された。さらに、ヒトインスリンによる高血糖カイコの血糖値の低下作用もワートマニンにより抑制された。以上の結果は、カイコの脂肪体細胞においても哺乳動物の脂肪細胞で報告されているように、ヒトインスリンがPI3キナーゼの活性化を介したAktのリン酸化を起こすことを示唆している。

哺乳動物においては、インスリンシグナル伝達経路以外にAMPキナーゼの活性化による血糖降下経路が知られている。我々は、AMPキナーゼの活性化剤であるAICARがカイコに対しても血糖降下作用を示すかについて検討した。その結果、AICAR投与によりカイコの血糖値が低下することがわかっ

た。また、抽出した脂肪体を AICAR で処理すると、リン酸化 AMPK の量が増加していた。以上の結果は、AICAR がカイコの脂肪体に作用し、AMPK 活性を上昇させ、その結果カイコの血糖値を低下させることを示唆している。

次に我々は、高血糖によるカイコの成長阻害が血糖降下作用を示すヒトインスリン、及び AICAR により回復するか検討した。10% グルコース餌を四日間給餌したカイコは、通常飼料給餌群のカイコより、体長が小さく、体重が減少していた。グルコース餌を摂食しているカイコにヒトインスリン、もしくは AICAR を投与すると、非投与群と比べて、体長の増大と、体重の増加が認められた。この結果は、ヒトインスリンや AICAR が高血糖状態におけるカイコの血糖値を低下させることにより、成長を回復させることを示唆している。

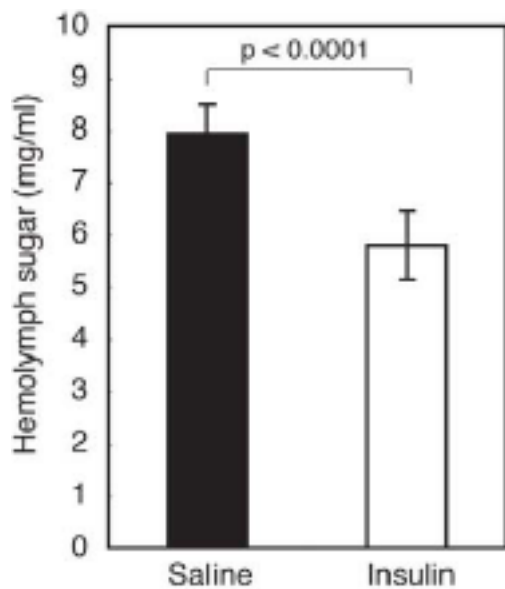


図3 ヒトインスリンの投与によるカイコの血糖値の低下

#### (4)メイラード反応を介した血糖値の上昇に伴うカイコの成長阻害

ヒトの高血糖患者において、糖のアルデヒド残基とタンパク質のアミノ酸残基のアミノ基がメイラード反応を引き起こし、その反応により生じたフリーラジカル、及び変性タンパク質 (AGEs) が組織障害や血流阻害を起こすと考えられている。糖尿病における合併症のひとつである糖尿病性腎症の発症とメイラード反応の生成物の蓄積量には相関関係があることが報告されている (Melinda T. Coughlan, et., al., Ann. N.Y.

Acad. Sci. (2008)、Miura J., et., al., Journal of Diabetes and Its Complications (2003))。我々は、高血糖により成長阻害を起こしたカイコの血液を採取し、血液中の AGEs 量の変化の有無を検討した。未処理のカイコの血液中タンパク質について、抗 AGEs 抗体によるウェスタンブロット解析を行ったところ、120 kDa のタンパク質が抗体と反応することがわかった。グルコースを添加した人工餌を摂食したカイコでは、抗 AGEs 抗体と結合するタンパク質の量が増加していた (図 4)。メイラード反応の阻害剤であるアミノグアニジンは、糖尿病ラットの心肥大やアルブミン尿 (albuminuria) に対して治療効果を示すことが報告されている (Krisztian Stadler et., al., Diabetes/Metabolism Research and Reviews (2005)、T. Soulis, et., al., Diabetologia (1997))。グルコース餌を食べたカイコにおいて増加した 120 kDa の糖化タンパク質 (AGEs) 量は、アミノグアニジンの投与により減少した (図 4)。グルコース餌の給餌によるカイコの成長阻害は、アミノグアニジンを 12 時間ごとに五回注射することによりアミノグアニジン非投与群に比べ、体長、及び体重の点からみて回復していた。これらの結果は、アミノグアニジンが高血糖状態におけるカイコの体液中のメイラード反応の生成物の生成を阻害することにより、成長を回復させることを示唆している。さらに、我々は、高血糖カイコの成長阻害を回復させる化合物を探索し、化合物 B の同定に成功した。

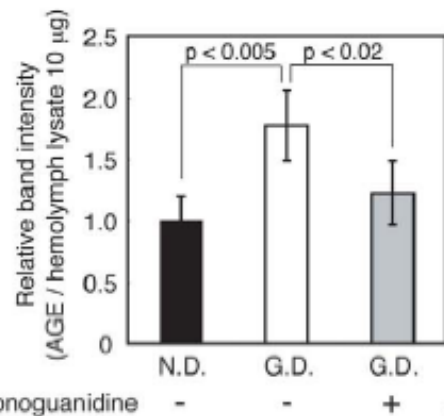


図 4 高血糖カイコにおけるメイラード反応の生成物量の増加

#### (5) 高血糖カイコモデルを用いた漢方薬ジオウの血糖降下作用の評価、及び血糖降下物質としてのガラクトースの同定

次に我々は、高血糖カイコモデルを血糖

降下作用物質の探索に利用できるかを検討した。漢方薬であるジオウは、糖尿病に有効であるとされており、ヒト、マウスに対する血糖降下作用が報告されている。しかしながら、血糖値を低下させる成分は、同定されていない。我々は、高血糖カイコモデルを用いて、ジオウ中の血糖降下物質を同定できるか検討した。マウスに対して血糖降下作用を有することが報告されているジオウ熱水抽出画分を高血糖カイコの血中に投与すると血糖値が低下した。ジオウ熱水抽出画分の大部分は糖であり、エタノール沈殿可能であることから、多糖であることが示唆された。そこで、酸処理によりジオウ熱水抽出画分の糖の組成を調べた。ジオウ熱水抽出画分の酸加水分解産物は、TLCによる分析において、ガラクトースと移動度が同じであった。また、ガラクトースの投与により、高血糖カイコの血糖値が低下した(図 5)。さらに我々は、哺乳動物においても、ガラクトースが血糖降下作用を示すか検討した。その結果、ストレプトゾトシン処理により高血糖状態にしたマウスにガラクトースを腹腔内投与すると、血糖値が低下することがわかった。したがって、ガラクトースには、カイコばかりでなく、マウスの血糖値を低下させる作用があることが示された。さらに、ガラクトースによる糖尿病マウスの血糖低下作用の分子機構の解明を試みた。ガラクトースの投与により、糖尿病マウスの肝臓における GLUT2(グルコーストランスポーター2)の発現が上昇していた。よって、高血糖カイコを用いて、哺乳動物にも血糖降下作用を示す化合物が同定できることがわかった。

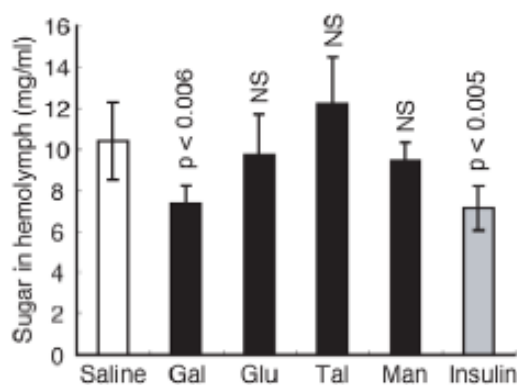


図 5 ガラクトースの投与によるカイコの血糖値の低下

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1)

Matsumoto Y, Sumiya E, Sugita T, Sekimizu K.

An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs. *PLoS One.* ; 6 (3):e18292. 2011

査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)

松本靖彦、住谷瑛理子、杉田拓也、関水 and 久

糖尿病治療薬の同定のための無脊椎動物糖尿病モデル

第 82 回日本生化学会、神戸、2009 年 10 月 21-24 日

〔図書〕(計 1 件)

(1)

関水 and 久、垣内力、浜本洋、松本靖彦 廣川書店

創薬化学の魅力 -東京大学大学院薬学系研究科からの発信-

2010 年

P263-274

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 4 件)

(1)

名称：薬剤の評価法及び薬剤のスクリーニング方法

発明者：松本靖彦、関水 and 久

権利者：東京大学、株式会社ゲノム創薬研究所

種類：特願

番号：2010-128203

出願年月日：2010 年 6 月 3 日

国内外の別：国内

(2)

名称：糖尿病予防・改善剤のスクリーニング方法及び糖尿病予防・改善剤のスクリーニング用キット

発明者：松本靖彦、関水 and 久

権利者：東京大学、株式会社ゲノム創薬研究所

種類：特願

番号：2010-34286

出願年月日：2010 年 2 月 19 日

国内外の別：国内

(3)

名称：血糖低下剤及びそれを添加してなる糖尿病の予防又は病状改善のための飲食品  
発明者：松本靖彦、小方康至、関水和久  
権利者：東京大学、株式会社ゲノム創薬研究所

種類：国際特許

番号：PCT/JP2009/061978

出願年月日：2009年6月30日

国内外の別：国内及び、国外

(4)

名称：薬剤の評価法及び薬剤のスクリーニング方法

発明者：松本靖彦、小方康至、関水和久  
権利者：東京大学、株式会社ゲノム創薬研究所

種類：特願

番号：2009-251567

出願年月日：2009年11月1日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本靖彦 (MATSUMOTO YASUHIKO)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：60508141

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：