

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：34306

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20734

研究課題名(和文) 亜鉛錯体を用いたインスリン抵抗性改善効果・糖尿病の発症予防効果へのチャレンジ

研究課題名(英文) The challenges in improving insulin resistance and preventing the onset of diabetes by zinc complexes

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) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：現在、炎症シグナルの原因となる終末糖化産物(AGEs)に注目が集まっている。糖尿病発症原因の1つであるインスリン抵抗性は、脂肪組織における慢性炎症が惹起すると考えられている。本研究では抗炎症作用を持つことが知られているヒノキチオールを配位子に有し、インスリン様作用、血糖降下作用が報告されている亜鉛ヒノキチオール錯体が、AGEsの生成を抑制し、過剰なAGEs蓄積を防ぐことでインスリン抵抗性および糖尿病発症予防につながるのではないかと考え、そのAGEsの生成抑制効果を評価した。検討した亜鉛錯体のうち、トロポノイド骨格を持つ亜鉛錯体は強い糖化抑制反応およびペントシジン生成抑制効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は発症すると完治は困難であり、症状進行とともに糖尿病性合併症へと進行する。このため、糖尿病の発症予防および発症の要因であるインスリン抵抗性を抑制することは、生活の質を維持するうえで重要である。今回の研究成果から、種々の亜鉛錯体が糖化反応を抑制し、AGEsの一種であるペントシジンの生成抑制効果を持つことを見出した。特に、7員環トロポノイド骨格を有する亜鉛錯体の効果は強いことを明らかにした。本知見は、インスリン抵抗性をはじめとする炎症反応に關与する終末糖化産物(AGEs)に対して亜鉛錯体が生成抑制効果を示すことを初めて明らかにしたものであり、学術的および社会的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：Currently, much attention is being focused on advanced glycation end products (AGEs), which are responsible for inflammatory signaling. Insulin resistance, one of the causes of diabetes, is thought to be induced by chronic inflammation in adipose tissue. In this study, we hypothesized that a zinc-hinokitiol complex, which ligand contains hinokitiol that is known to have anti-inflammatory properties, has been reported insulin-like and hypoglycemic effects in previous study, would inhibit the formation of AGEs and prevent excessive AGEs accumulation, leading to insulin resistance and diabetes onset. We therefore evaluated the inhibitory effect of the zinc complexes on AGEs formation.

Among the zinc complexes examined, zinc complexes with a troponoid skeleton showed strong inhibitory reactions against glycation and pentosidine formation.

研究分野：生物無機化学、分析化学

キーワード：亜鉛錯体 終末糖化産物(AGEs) 糖化反応 糖化抑制 ペントシジン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病をはじめとする生活習慣病の研究において、炎症シグナルの原因となる終末糖化産物 (AGEs) に注目が集まっている。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。慢性的な高血糖状態は、過剰な AGEs の生成、ポリオール経路の亢進ならびにフルクトース蓄積に伴うインスリン抵抗性を引き起こす。過剰に生成した AGEs は AGEs-AGEs 受容体 (RAGE) 系シグナルを介したシグナル伝達により過剰な炎症を誘発し、腎症、網膜症、および神経障害といった糖尿病性三大合併症に加えて、大血管障害を引き起こす。このため、AGEs 生成抑制は重要である。

我々はこれまでに糖尿病治療を目指した亜鉛 (Zn) 医薬品の開発を行っており、様々な Zn 錯体のインスリンシグナル経路に対する分子メカニズム解明を行ってきた (Naito et al., *J Biol Inorg Chem*, 2016)。その過程で、4 ヶ月間高脂肪食給餌マウスに Zn ヒノキチオール錯体 ($[Zn(hkt)_2]$) を摂取させると、臓器中での脂肪蓄積が抑制されていたこと (Naito et al., *In vivo*, 2017) および、KK-A y マウスの膵ランゲルハンス島肥大化を抑制する効果 (Naito et al., *Biol Pharm Bull*, 2017) を明らかにした。このことから、 $[Zn(hkt)_2]$ は糖・脂質代謝障害を引き起こす炎症性サイトカインの分泌抑制、すなわち、抗炎症作用を示す可能性が示唆された。そこで、Zn 錯体が示す抗糖尿病効果が抗炎症作用に由来するかを検討し、AGEs の生成抑制効果の評価することで、糖尿病発症要因であるインスリン抵抗性阻止および糖尿病発症予防が期待出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、Zn 錯体が臓器中の過剰な AGEs 蓄積ならびに炎症反応抑制を示すかを検討することを目的とし、Zn 錯体が生体における過剰な炎症反応を抑制することで糖尿病の発症および糖尿病合併症への進展の予防に貢献することを最終目標として実施した。本検討着手時には、Zn 錯体による AGEs への作用が不明であったため、検討の第一段階として *in vitro* 系における AGEs 生成反応、糖化反応への効果および作用について検討を始めた。

3. 研究の方法

本研究での検討に用いる Zn 錯体を合成した。*In vitro* 系においては AGEs 生成抑制効果について、論文既知の方法にて(1)ヒト血清アルブミン (HSA) - グルコース反応系における蛍光性 AGEs を測定対象とし、合成した Zn 錯体による生成抑制効果を蛍光強度測定することで評価した。(2)この時の反応溶液を用いて、AGEs の一種であるペントシジンの定量分析を行った。すなわち、糖化反応溶液中での Zn 錯体によるペントシジンの生成抑制効果を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 蛍光分析法により定量分析した。また、合成した一部の Zn 錯体については、(3)生体におけるポリオール代謝経路への影響を検討するため、アルドース還元酵素阻害活性を評価した。(1)および(2)の陽性対照にはアミノグアニジン (AG) を、(3)にはエパルレストアットを用いた。

In vivo 系においては、AGEs 生成抑制効果による糖尿病発症抑制および糖尿病性合併症の抑制効果について検討を行った。糖尿病発症抑制効果の検討には(4)AGEs 腹腔内投与または 0.5% メチルグリオキサール (MGO) 飲水投与による糖化ストレスモデルを用いて Zn 錯体腹腔内投与を行った。糖尿病性合併症の抑制効果については、(5)自然発症型 2 型糖尿病モデル KK-A y マウスに対して Zn 錯体を腹腔内投与、ならびに、(6)ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルマウスに対して Zn 錯体腹腔内投与を実施し検討した。

4. 研究成果

検討に用いる種々の Zn 錯体であるカルニチン Zn 錯体 ($[Zn(Car)_2Cl_2]$)、アスコルビン酸 Zn 錯体 ($[Zn(Vc)_2]$)、*N*-アセチル-*L*-システイン Zn 錯体 ($[Zn(NAC)]$)、*L*-ヒスチジン Zn 錯体 ($[Zn(L-His)_2]$) をはじめとする 20 種類の Zn 錯体合成を行った。合成した Zn 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。

これらの合成した Zn 錯体を用いて、(1)HSA - グルコース糖化反応系における蛍光性 AGEs 生成量抑制効果を検討した。なお、本検討において Zn 錯体の溶解性によって、水溶性 Zn 錯体

表 1 蛍光性 AGEs 生成に対する水溶性 Zn 化合物による

Sample	IC ₅₀ (μM)
AG	549 ± 49
ZnSO ₄	3,455 ± 267
[Zn(Vc) ₂]	486 ± 50 **
[Zn(NAC)]	1,652 ± 180 **
[Zn([9]aneN ₃)Cl ₂]	64 ± 9 **

Significant difference : Dunnett's test, ** p<0.01 vs ZnSO₄

表 2 蛍光性 AGEs 生成に対する脂溶性 Zn 化合物による

Sample	IC ₅₀ (μM)
AG	859 ± 70
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	610 ± 93**
[Zn(mal) ₂]	468 ± 33**
[Zn(ema) ₂]	1,531 ± 257
[Zn(trp) ₂]	20 ± 1**
[Zn(hkt) ₂]	9 ± 3**

Significant difference : Dunnett's test, ** p<0.01 vs AG

表 3 ペントシジン生成に対する脂溶性 Zn 化合物による

Sample	IC ₅₀ (μM)
AG	102 x 10 ³ ± 73 x 10 ³
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	638 ± 212**
[Zn(mal) ₂]	304 ± 84**
[Zn(ema) ₂]	371 ± 155**
[Zn(trp) ₂]	19 ± 6**
[Zn(hkt) ₂]	15 ± 8**

Significant difference : Dunnett's test, ** p<0.01 vs AG

表 4 アルドース還元酵素阻害活性における水溶性 Zn 化合物による IC₅₀ 値

Sample	IC ₄₀ (μM)
Epalrestat	14 ± 0.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	122 ± 14
[Zn(Vc) ₂]	142 ± 22
[Zn(Car) ₂]	161 ± 49
[Zn(NAC)]	204 ± 44

群に比べてコントロール群において ELISA 法により求めた血漿中 AGEs 量では増加は認められず、十分な糖化ストレスをかけることが出来なかった。一方で、0.5% MGO 飲水投与と実験において解剖前 24 時間に採取した蓄尿サンプルを用いて尿中ペントシジンを定量分析したところ、健常ノーマル群に比べて、0.5% MGO 飲水投与していたコントロール群では上昇した。コントロール群に対して ZnSO₄ 投与群、[Zn(hkt)₂]投与群では減少傾向が認められた (図 1)。また、この時の長期間における平均血糖値指標である HbA1c 値は、コントロール群に比べて ZnSO₄ 投与群、[Zn(hkt)₂]投与群において減少傾向を認めた (図 1)。このことから、Zn 化合物投与によって、食後高血糖の上昇抑制が期待できた。

系統および脂溶性 Zn 錯体系統の 2 つに分けて検討を行った。特に脂溶性 Zn 錯体においては糖化反応溶液中での溶解性を考慮するため、脂溶性 Zn 錯体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ、反応溶液中において 1% DMSO 含有溶液となるように調製し糖化反応を進めた。検討の結果、Zn 錯体の種類によって蛍光性 AGEs 生成抑制効果が異なることが明らかになった。各系において、特に活性が高かった一部の Zn 錯体とその活性値を表 1、表 2 に示した。水溶性 Zn 錯体系での検討においては、配位子に還元性を有する Zn 錯体や第 2 級アミンを有する Zn 錯体に強い糖化抑制作用を有することが明らかとなった。脂溶性 Zn 錯体系においては、7 員環トロポノイド骨格を有する Zn トロポロン錯体 ([Zn(trp)₂])、[Zn(hkt)₂]が強い糖化反応抑制効果を示すことが明らかとなった。(2)HPLC - 蛍光分析法を用いたペントシジン定量分析法の結果からも、Zn 錯体の種類によってペントシジン生成抑制効果が異なることが明らかとなり、検討に用いた 7 員環トロポノイド骨格を有する 2 錯体が強いペントシジン生成抑制効果を示した (表 3)。(3)アルドース還元酵素阻害活性に対しては、水溶性 Zn 錯体を中心に検討を進めた。比較対照であるイオン型の硫酸 Zn と比較して、Zn を錯体化しても強い酵素阻害活性は認められず、水溶性 Zn 錯体はアルドース還元酵素に対して直接的な酵素阻害作用を有さないと考えられる (表 4)。また、脂溶性 Zn 錯体を用いた検討では、測定結果が安定しないことが明らかとなった。

In vitro 系における、(1)、(2)の結果を踏まえて、*in vivo* 系での検討も行った。*In vitro* 系の中で特に糖化反応に対する抑制効果が強かった [Zn(hkt)₂]を用いて、AGEs 腹腔内投与による糖化ストレスモデル、0.5% MGO 飲水投与による糖化ストレスモデルおよび、2 型糖尿病モデル KK-Ay マウスに対してそれぞれ[Zn(hkt)₂]を腹腔内投与したときの、糖尿病発症予防効果ならびに糖尿病性合併症への進展予防効果を検討した。AGEs 腹腔内投与ならびに 0.5% MGO 飲水投与によって糖化ストレスを実験動物に与え、炎症反応を引き起こすことでインスリン抵抗性および糖尿病発症への進展を期待したが、健常ノーマル

KK-A^y マウスを用いた検討では糖尿病を自然発症させた後 7 週間通常飼育を行い、糖化ストレス状態を維持した。その後、[Zn(hkt)₂]を 2 週間連日腹腔内に投与し、糖尿病性合併症への影響を検討した。血漿中ペントシジン定量分析では、*in vivo* サンプル測定条件における更なる分析条件最適化が必要であることが判明した。解剖時に摘出した肝臓、腎臓、眼球への組織形態学的変化を組織染色により評価を実施したが、コントロール群での明らかな糖尿病合併症への進展が認められず、飼育条件および飼育期間の再検討が必要であることが分かった。なお、[Zn(hkt)₂]腹腔内投与において、糖尿病由来の腎肥大を抑制する傾向が認められた(図 2)。

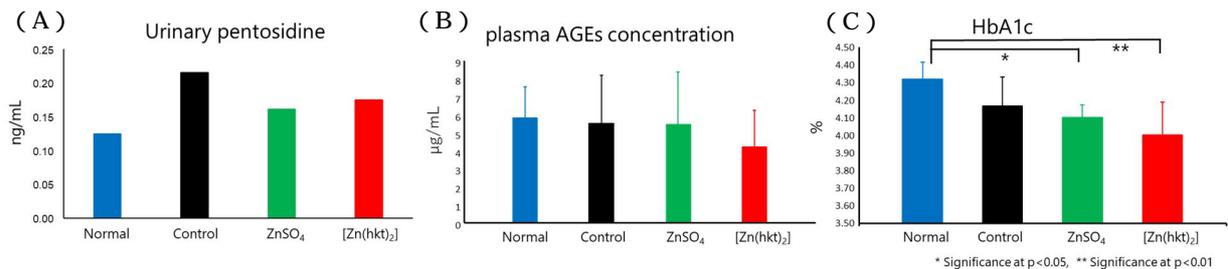


図 1 C57BL/6J マウス(6 週齢)に対して 60 日間 0.5% MGO 飲水投与および ZnSO₄ および[Zn(hkt)₂]腹腔内投与実験での体内糖化産物量

(A): 24 時間蓄尿中ペントシジン量、(B): 血漿中 AGEs 量、(C): HbA1c 値

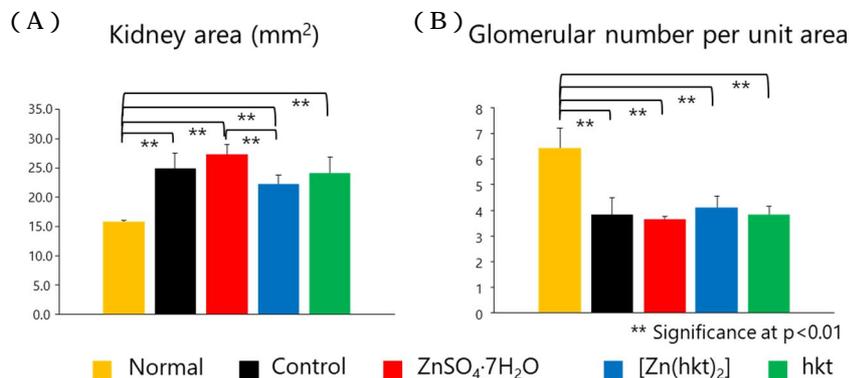


図 2 KK-A^y マウス(6 週齢)に対して 7 週間糖化ストレス負荷後、2 週間連日[Zn(hkt)₂]腹腔内投与実験での腎臓における組織形態学的変化

(A): 腎臓面積 (mm²) (B): 単位面積あたり糸球体個数

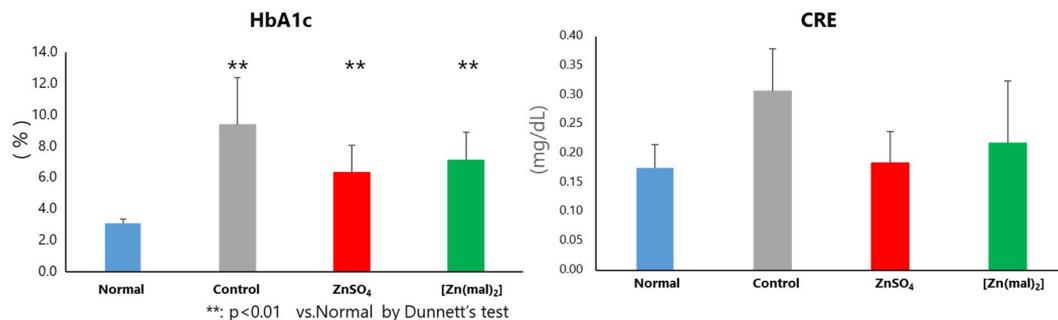


図 3 STZ 誘発性糖尿病マウス(6 週齢)に対して 2 ヶ月間 ZnSO₄ および [Zn(mal)₂]腹腔内投与実験での HbA1c 値および血漿中クレアチニン (CRE) 値

[Zn(hkt)₂]並びに蛍光性 AGEs 生成抑制とペントシジン生成抑制効果が認められた亜鉛マロニル錯体 ([Zn(mal)₂])を STZ 誘発性糖尿病モデルマウスに 2 ヶ月間腹腔内投与を行った。投与期間終了時における HbA1c 値は Zn 化合物投与により糖尿病モデルであるコントロール群よりも減少傾向が認められ、血漿サンプルを用いて血漿中クレアチニン値を測定したところ、ノーマル群(健常群)に近い値を示した(図 3)。このことから、腎機能に対して[Zn(mal)₂]は保護効果を有することが期待できた。

以上の研究結果から、*in vitro* 系において Zn 錯体は糖化反応により生じるペントシジンを含む蛍光性 AGEs に対して生成阻害作用を示すことを明らかにした。特に 7 員環トロポノイド骨格を有する Zn 錯体は、より強い生成阻害作用を示すことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuki Naito, Masaki Kojima, Kana Hayashi, Katsuyuki Tsukamoto, Masayuki Yagi, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui	4. 巻 11
2. 論文標題 Suppressive effects of O4 coordination-type zinc complexes on in vitro AGE formation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Glycative Stress Research	6. 最初と最後の頁 33-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24659/gsr.11.1_33	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島正暉、内藤行喜、塚本勝之、八木雅之、義澤克彦、吉川豊、安井裕之
2. 発表標題 亜鉛錯体のAGEs生成抑制作用ならびにKK-Ayマウスへの腹腔内投与による糖尿病治療効果との関連
3. 学会等名 第34回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小島 正暉、内藤 行喜、塚本 勝之、八木 雅之、義澤 克彦、吉川 豊、安井 裕之
2. 発表標題 AGEs生成抑制作用を有する亜鉛錯体の探索と糖尿病モデルマウスを用いた合併症抑制効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林 佳奈、小島 正暉、内藤 行喜、八木 雅之、安井 裕之
2. 発表標題 タンパク質の糖化反応を抑制する亜鉛錯体の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山田 幸奈、内藤 行喜、西林 妃奈、八木 雅之、安井 裕之
2. 発表標題 ビタミン類、アミノ酸、アミンを配位子に用いた水溶性亜鉛錯体による糖化反応抑制作用のスクリーニング評価
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 内藤行喜、塚本勝之、西林妃菜、八木雅之、吉川 豊、安井裕之
2. 発表標題 抗糖尿病効果をもつ亜鉛錯体の終末糖化産物 (AGEs) 生成阻害作用の検討
3. 学会等名 第31回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎千恵子、内藤行喜、吉川 豊、安井裕之
2. 発表標題 糖尿病予防を目的としたインスリン様作用を持つ亜鉛錯体のアルドース還元酵素阻害活性の評価
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都薬科大学 代謝分析学分野 https://labo.kyoto-phu.ac.jp/taisya/ 京都薬科大学 代謝分析学分野 https://labo.kyoto-phu.ac.jp/taisya/index.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------