

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：34511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460048

研究課題名(和文) 糖尿病克服を目指した有機・無機ナノ複合体である高活性金属錯体の探索研究

研究課題名(英文) Exploratory research of high activity metal complexes by organic and inorganic nano-composite with anti-diabetic effect

研究代表者

吉川 豊 (YOSHIKAWA, Yutaka)

神戸女子大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：20388028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、各種金属錯体の合成、ならびに、食品成分や医薬品成分と金属の混合物を作成し、糖尿病治療効果の評価を行った。その結果、亜鉛錯体の中でも配位原子に硫黄やセレンを含有するものが動物を用いた *in vivo* 実験で効果が高いことが分かり、今後の臨床研究で使用可能な錯体を提案することができた。さらに、亜鉛錯体の作用メカニズムの解明のため、グルコシダーゼ阻害作用や3T3L1脂肪細胞を用いた検討から、インスリンシグナル経路とは異なった経路で抗糖尿病作用を示していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we synthesized various metal complexes with organic compounds, medicine, and natural products. Above the results, we suggested that the metal complex with the high anti-diabetic effect was Zn complex with ZnS<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ZnSe<sub>2</sub>O<sub>2</sub> coordination mode. These complexes showed the blood glucose normalizing, anti-insulin resistance, and glucose tolerance improved effects by using type 2 diabetes mellitus model KKAY or obob mice. Moreover, Zn complexes activates the insulin signaling pathway with inducing Akt phosphorylation by a insulin-independent manner. It is suggested that this signal activation of Zn complexes in insulin signaling pathway has the potent to ameliorate the insulin resistance in the peripheral tissues; such as muscles and adipose. And it is expectable that this would be the novel mechanism for the treatment of DM.

研究分野：生物無機化学

キーワード：金属錯体 無機医薬品 糖尿病 生活習慣病 天然物

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病患者は激増しており、2007年の国民健康・栄養調査によると、糖尿病患者とその予備軍は合わせて2,210万人と推測され、20歳以上の成人の5人に1人が糖尿病あるいはその可能性がある。一方世界に目を向けると、糖尿病関連の疾患による死亡者数はAIDSによるそれに並び、WHOは2006年「糖尿病の全世界的脅威を認知する決議」により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を推進している。2008年からは厚生労働省主導で「メタボ検診と保健指導の実施」が義務づけられ、メタボリックシンドロームと生活習慣病の予備軍の人を減らすことで国の医療費負担を減少させ、高齢者医療の充実を図る試みが実施されている。このような背景の下、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。

(2) このような時代背景を受け、我々は、生体内必須微量元素である亜鉛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、新規糖尿病治療薬開発への道筋をつけようと種々の試みを行ってきた。近年、2-メルカプトピリジン-N-オキシドを配位子に持つ亜鉛錯体を糖尿病マウスに経口投与すると、糖尿病状態を改善し、血漿アディポネクチン量を増加させることを世界で初めて我々は見出した。さらに、この亜鉛錯体は、生活習慣病の一つである高血圧の要因であるレプチン抵抗性も改善する傾向を示すことも証明してきた。その中でこのような亜鉛錯体を始めとする無機医薬品開発においては、錯体の中心に位置する金属イオンが活性本体であるが、金属イオンと配位結合している配位子のデザインが薬効や体内動態などに大きく影響するため、このデザインが無機医薬品開発の重要なファクターになる事に気付いた。つまり、低毒性かつ高活性な新規糖尿病金属錯体の創製を目指した配位子の探索や最適化、ならびにそれらのメカニズムを解明する事は非常に重要な課題であり、今回の研究課題とした。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、経口投与により高い糖尿病治療効果を有する金属錯体の開発を試みることを目的とする。使用する金属は、現在までに金属イオンとして糖尿病治療効果が報告されており、我々が10年来研究を続けているZnを筆頭に、第一遷移系金属を中心に用いる。糖尿病治療効果は、ラット脂肪細胞を用いたin vitroスクリーニング試験、糖尿病モデル動物を用いたin vivo薬効試験に焦点をあてた。配位子は脂溶性の変換とハードな塩基からソフトな塩基に変換させたものを構造活性相関的に合成する。合成した配位子をもつ金属錯体は、の評価系で、脂肪酸遊離抑制作用・グルコース取込み作用を増強させる錯体を見出す実験を行う。さらに、過去の我々の研究において、マルトールを配位子に持つ亜鉛錯体が、強い血糖降下作用を有することを見出しているため、特にマルトールの配位元素を硫黄やセレンに変えた配位子やその金属錯体の合成に焦点をあて、構造活性相関の評価を行う。特に活性の高かった金属錯体は、の評価系を用いたin vivo実験で、糖尿病状態の改善作用やアディポネクチン分泌量の変化を定量し、血糖値、耐糖能、レプチン分泌量の変化など、多面的評価から糖尿病治療効果の有無を評価し、無機医薬品として最も適した金属錯体を選抜する。

(2) 亜鉛錯体が世界で初めて血糖降下作用を有することは、世界で初めて我々が報告した論文から明らかであるが、糖尿病治療に最適な金属錯体は未だ決定できておらず、構造活性相関的な研究が必須であった。また、血中のアディポネクチンレベルを上昇させる化合物としては、チアゾリジン系の数種の抗糖尿病薬剤しか存在しておらず、またこれら市販の医薬品は、循環血流量の増加による浮腫の副作用や心不全の憎悪を伴うことがあるため、心不全既往歴のある患者への適用が難しい。それ故、本研究課題で血糖降下作用、インスリン抵抗性改善作用などを併せ持つ、低毒性な金属錯体の開発ができれば、既存の治療薬がもつ浮腫などの副作用を軽減できる可能性もあり、新たな医薬品素材と成りうる点で、非常に特徴的かつ独創性が高い研究である。一方、金属元素の中で、抗糖尿病作用を示すものには前述のZn以外にもCu、Ni、Cr、Vなどが知られているが、どの金属が最も有効であるか、未だ明らかにされていないため、金属元素の違いによる効能の違いに関しても明らかにしていくことを目的とする。さらに新しい発想として、市販の医薬品と金属との相互作用、また、食品素材と金属との相互作用で抗糖尿病作用が現れれば、サプリメントとしての金属の使用価値が広がるため、新たな試みとして評価研究を行うことも目的に加えた。さらに、抗糖尿病作用が明ら

かになれば、その作用メカニズムの開発が次なる目的になるため、作用メカニズムの解明にも着手できる研究を行うことも大きな目的の一つと考え研究の目的に加えた。

### 3. 研究の方法

(1) 現在までに我々が報告した抗糖尿病作用を有する配位子をリード化合物とし、構造活性相関に基づき種々の配位子の誘導体を合成する。配位子の「脂溶性やソフト性の増大」が抗糖尿病活性を強める可能性が示唆されているため、現在までの研究で、活性の高いことが判明している配位子をリード化合物に用いて、様々な脂溶性やソフト性に富む配位子の合成を行い、効率よく配位子の構造変換を行う工夫をする。

(2) 特に、配位原子の変換による活性の違いを評価するため、カルコゲン元素に属する、酸素、硫黄、セレンに変換することを目的としたため、ローソン試薬(S化)やウーリンズ試薬(Se化)を用いて、メルカプト基やセレノ基を導入し使用する。

(3) 合成した配位子と、Znや第一遷移系列金属などの硫酸塩を我々が開発した反応条件下で反応させ、再結晶、再沈殿、カラムクロマトグラフィーなどの手法を用いて精製し、新規金属錯体を合成する。また、元素分析、質量分析、分配係数測定、赤外吸収スペクトル法、NMRスペクトル法、および、ESRスペクトル法などから物性評価を行う。

(4) 我々の研究室で開発した、ラット脂肪細胞を用いた *in vitro* 評価系で、遊離脂肪酸抑制効果、ならびに、脂肪細胞へのグルコース取込み促進効果(インスリン様作用)を評価し、抗糖尿病作用のスクリーニング試験を行う。

(5) 最も活性の高い金属錯体を選抜し、我々が現在までの抗糖尿病作用の評価で使用してきた、2型糖尿病とメタボリックシンドローム状態を併せ持つKK-A<sup>y</sup>マウスや、正常なレプチンがつかれないことから肥満が引き起こされ、2型糖尿病を発症するモデルのobobマウスを用い、*in vivo* 実験での糖尿病治療効果を、摂餌量変化、体重変化、血糖値変化、耐糖能変化、糖化ヘモグロビン量、および各種生化学血清パラメータの測定から評価する。さらに血清中のアディポネクチン量をELISA法を用いて定量評価し、適切な形に構造変換した、高活性な金属錯体の提案を行う。

(6) 臨床現場で使用されている抗糖尿病薬のアガルボースや、健康食品として名高い黒ニンニク、健康増進作用が期待されるコーヒーなどの食品素材と金属イオンの複合体を調整し、それらの糖尿病治療効果を *in vitro*

実験系で評価する。

(7) 我々の研究室で使用している3T3L1培養脂肪細胞を用い、合成した金属錯体を細胞に作用させ、インスリンシグナル経路に影響を及ぼすタンパクの発現量、リン酸化促進作用、細胞内酵素に及ぼす影響を、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降法、ならびに酵素を用いた *in vitro* 実験法で評価を行う。

### 4. 研究成果

(1) 新規化合物の合成に関しては、次の試みを行った。マルトールをリード化合物として用い、酸素原子を硫黄原子に変換可能なローソン試薬や、酸素原子をセレン原子に変換可能なウーリンズ試薬を用い、マルトールの酸素原子をイオン原子やセレン原子に変換し、亜鉛錯体の合成をおこなった。新規のシッフ塩基由来の有機化合物およびその金属錯体の合成、ヒドロキサム酸誘導体-亜鉛錯体の合成、チオセミカルバゾン配位子にもつ金属錯体、異種金属(ZnとVの二核錯体)を含有させた錯体の合成を行った。

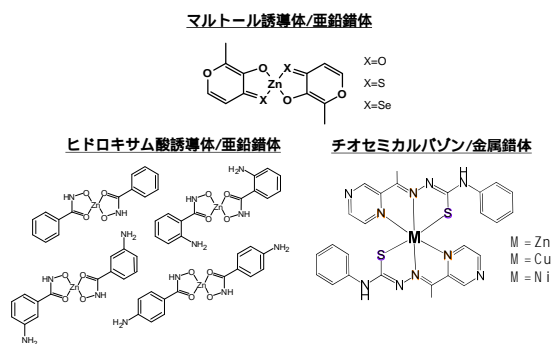


図1 合成した金属錯体の一例

(2) これらの合成した有機物ならびに金属錯体は、カラムクロマトグラフィーや再結晶により精製し、赤外吸収スペクトル法、質量スペクトル法、および元素分析法などを用い、合成が成功していることを確認した。

(3) これら合成された金属錯体は、脂肪細胞を用いたインスリン様作用の評価、および、二糖類を単糖類に分解する酵素である $\alpha$ グルコシダーゼの阻害活性の評価を行った。その結果、酸素原子を硫黄やセレン原子に変換することで活性が上昇することが明らかとなった。他にも、ヒドロキサム酸誘導体の亜鉛錯体や異種金属を含有する金属錯体は、それぞれ対応する金属イオンより高いインスリン様作用を有すること、また、チオセミカルバゾンの亜鉛錯体は、チオセミカルバゾンの銅錯体と比較して、高い体内移行性を示し、2型糖尿病モデル動物に対して抗糖尿病作用を示すことを明らかにした。上述の錯体のなかで、*in vitro* スクリーニング評価で活性の高かった、チオマルトールやセレノマルトールの亜鉛錯体を用い、2型糖尿病モデル動物のKKA<sup>y</sup>マウスやobobマウスに対する経口投

と実験を行った。その結果、両化合物とも、顕著な血糖降下作用、耐糖能改善作用を有することが明らかとなり、糖化ヘモグロビン、インスリン抵抗性も改善する傾向が認められた。これらの結果より、酸素原子を硫黄原子やセレン原子に置き換えた、 $ZnS_2O_2$  や  $ZnSe_2O_2$  配位様式を持つ亜鉛錯体の有効性が高く、臨床応用を目指す上で最も可能性が高いと判断した。

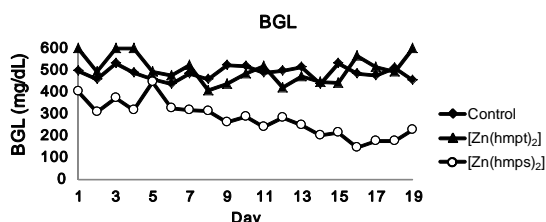


図2 10週齢のobobマウスに一日一回、マルトールの誘導体である、 $[Zn(hmpt)_2]$  (hmpt: 3-ヒドロキシ-4H-ピラン-4-チオン)と $[Zn(hmps)_2]$  (hmps: 3-ヒドロキシ-2-メチル-4H-ピラン-4-セレン)を2.5-15 mg Zn/kg 体重となるように18日間連続経口投与したときの血糖値の変化

(4) 糖尿病治療薬として臨床で使用されているアガルボースと亜鉛や第一遷移系金属元素を緩衝液中で攪拌し、有機物と無機物の複合体を形成させ、新規化合物を得ることに成功した。そしてこれらの複合体は、 $\alpha$ グルコシダーゼの阻害作用を強めることが判明した。さらに、加温熟成させたユリ科植物の抽出物に亜鉛を加えること、また、コーヒーと金属イオンを混合することで相加作用が生まれ、 $\alpha$ グルコシダーゼやアンジオテンシン変換酵素の働きをインビトロ実験系で阻害することも明らかにし、食品由来成分と亜鉛などのミネラルの混合物が、糖尿病が気になる人への食材として有益であることを示唆するデータを得た。

(5) 様々な亜鉛錯体が抗糖尿病作用を示すことが明らかになってきたため、それらの抗糖尿病作用のメカニズム解明も行った。抗糖尿病作用を有する中で、 $[Zn(hkt)_2]$ 錯体を用い、インビトロでのインスリンシグナル経路への影響評価、各種酵素への影響評価、インビボでの組織形態学的評価を行った。 $[Zn(hkt)_2]$ 錯体の3T3-L1脂肪細胞に対してインスリンシグナル経路の活性化効果を検討したところ、 $[Zn(hkt)_2]$ 錯体が高いAktおよびGSK3 $\beta$ のリン酸化促進作用を示した。その効果は濃度依存的かつ時間依存的なAktリン酸化促進作用を示した。さらに、 $[Zn(hkt)_2]$ 錯体によるインスリンシグナル経路上流への影響について、検討を進めると、 $[Zn(hkt)_2]$ 錯体がIR $\beta$ のチロシンリン酸化を増加させ、Aktのリン酸化を促進させることが分かった。そこで、生体酵素であるPTP1BおよびPTENに対する

$[Zn(hkt)_2]$ 錯体の影響について評価すると、 $[Zn(hkt)_2]$ 錯体がPTP1BとPTENに対して阻害作用を示した。これらの酵素はインスリンシグナル経路の上流に存在するタンパク質に対して作用することで、シグナル経路の活性化抑制に働く。そのため、 $[Zn(hkt)_2]$ が、インスリンシグナル経路に促進的に働き、効率的にインスリンの効果を高める可能性が示唆された。結論として、 $[Zn(hkt)_2]$ は錯体として細胞の中に取り込まれ、取り込まれた $[Zn(hkt)_2]$ はPTP1BとPTENに対して阻害作用を示す。PTP1Bへの阻害効果は、IR $\beta$ のチロシンリン酸化活性を上昇させ、インスリン作用とインスリンシグナル経路の活性化を促進させる。さらに、PTENへの阻害はPI3Kより生成され、Aktリン酸化を活性化させるセカンドメッセンジャー-PIP<sub>3</sub>量を維持することができることと結論付けた

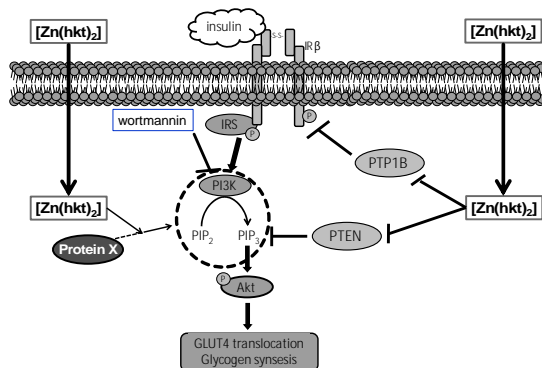


図3  $[Zn(hkt)_2]$ 錯体の細胞内作用メカニズムの概略

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Rie Miyazaki, Hiroyuki Yasui, Yutaka Yoshikawa,  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by new Schiff base complexes of Zn(II), 査読有, Open Journal of Inorganic Chemistry, 6, 114-124 (2016).

DOI: 10.4236/ojic.2016.62007

Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, Kazufumi Masuda, Hiroyuki Yasui, Bis(hinokitiolato)zinc complex ( $[Zn(hkt)_2]$ ) activates Akt/protein kinase B independent of insulin signal transduction, 査読有, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 21(4), 537-548 (2016).

<http://link.springer.com/article/10.1007/s00775-016-1364-9>

DOI: 10.1007/s00775-016-1364-9

〔学会発表〕(計16件)

西口貴之、吉川豊、安井裕之、2型糖尿病モデル ob/ob マウスに対する有機カルコゲン亜鉛錯体の抗糖尿病効果、日本薬学会第136年会、2016/3/29、パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, et al., [Zn(hinokitiol)<sub>2</sub>] complex showed the insulin-like effects on the insulin signaling pathway through an insulin-independent manner, Pacificchem 2015, 2015/12/16, Honolulu, America

三上優衣、古根隆広、寺尾啓二、吉川 豊、加温熟成した植物性食品における  $\alpha$ -グルコシダーゼおよび ACE 阻害活性、日本薬学会第 135 年会、2015/3/28、神戸学院大学、兵庫県、神戸市

Yutaka Yoshikawa et al., Study of zinc compounds with lifestyle-related disease therapeutic effect, International Joint Symposium: 8th Bali Geriatric Update Symposium-21th Annual Scientific Meeting Japan Society of Hemorheology-Kobe Women's University, 2014/8/22, Bali, Indonesia

内藤行喜、吉川 豊、安井裕之、O<sub>4</sub>型亜鉛錯体による PTP1B 阻害作用の検討、メタルバイオサイエンス研究会 2013、2013/9/26、静岡県立大学、静岡県、静岡市

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：血糖降下作用を持つセレン含有新規亜鉛(II)有機錯体  
発明者：西口貴之、吉川 豊、安井裕之  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2015-150567  
出願年月日：平成 27 年 7 月 30 日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉川 豊 (YOSHIKAWA, Yutaka)  
神戸女子大学・健康福祉学部・教授  
研究者番号：20388028

### (2)連携研究者

加来田 博貴 (KAKUTA, Hiroki)  
岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：80362961

内藤 行喜 (NAITO, Yuki)  
京都薬科大学・助手  
研究者番号：80610120