

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08884

研究課題名（和文）鉄キレート作用を介したメトホルミンによる新規耐糖能改善メカニズムの解明

研究課題名（英文）A novel mechanism of metformin through iron chelation

研究代表者

菅原 健二（Sugawara, Kenji）

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：70645217

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はメトホルミンのキレート作用という化学的特性が、同薬剤の薬理作用の発現に關与するか否かについて明らかにすることを目的とした。

培養肝細胞HepG2細胞を用いて、細胞透過性の銅キレート剤であるテトラチオモリブデン酸アンモニウム(TM)によるAMPKのリン酸化能を検証した結果、0.01 mM, 0.1 mMにおいてメトホルミンと同様にAMPKのリン酸化効果を認めた。さらに、肥満糖尿病モデルマウスKK-Ayに対してTMを4週間飲水投与したところ、血糖改善作用および体重減量作用を示唆する結果が得られた。以上より、メトホルミンによる薬理作用の少なくとも一部は銅キレート作用を介することが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メトホルミンは60年以上に亘って使用されている薬剤であるが、その詳細な作用メカニズムは不明な点が多い。本研究でメトホルミンの新たな作用機序が明らかになれば、糖尿病診療における臨床上の大きな進歩となる。また、本成果は生体の金属動態の破綻が糖尿病病態に寄与する可能性を示すことになるため、新たな糖尿病病態の解明に大きく貢献する。さらに、本成果は生体内の金属自体が糖尿病治療の標的となることを示すことから、「キレート能を有する新たな糖尿病治療薬の開発」に繋がる可能性もあり、本研究の意義と波及効果は大きい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate whether the chelating property of metformin is involved in the pharmacological effects of the drug. Utilizing HepG2 cells, we examined the effect of cell permeable copper-chelating agent, ammonium tetrathiomolybdate (TM), on phosphorylation of AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase). The results showed that at concentrations of 0.01 mM and 0.1 mM, TM enhanced AMPK phosphorylation similar to metformin. Furthermore, administration of TM to obese diabetic KK-Ay mice via drinking water for four weeks resulted in improvements in blood glucose levels and weight loss effects. Based on these findings, it is indicated that at least in part, the pharmacological effects of metformin are mediated through its copper chelation property.

研究分野：糖尿病学

キーワード：メトホルミン キレート作用 糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メトホルミンの血糖降下作用の主体は肝糖新生抑制であり、この作用にはミトコンドリア呼吸機能の抑制が関与すると考えられている。実際、メトホルミンが呼吸鎖複合体 Complex I の機能を抑制することは古くから報告があり(J Biol Chem 2000,275:223)、呼吸鎖抑制によって生じる細胞内 AMP の相対的増加がアデニル酸シクラーゼ(Nature 2013,494:256)やフルクトース 1, 6-ビスホスファターゼ(Nat Med 2018,44:1359)の活性抑制を介して血糖降下に関与することが示されている。また血糖降下作用への関与は限定的と考えられるが、脂質代謝改善作用などのメトホルミンの多面的作用を媒介する AMPK も細胞内 AMP の相対的増加によって活性化する。しかし、メトホルミンがどのようなメカニズムでミトコンドリア機能を抑制するかは明らかではない。

代表者はメトホルミンが金属イオンと錯体を形成し得る化学構造を有することに着目し(図 1)、3 価鉄(FeCl₃)溶液に対しメトホルミン滴定を行ったところ、色調変化および吸光スペクトル変化が生じることを見出した。この結果はメトホルミンが鉄キレート能を有することを示唆する所見である。呼吸鎖複合体機能における鉄-硫黄クラスターの重要性や鉄キレート剤がミトファジーを誘導する(EMBO rep 2013,14:1127)といった知見も踏まえ、代表者は「メトホルミンが金属キレート作用を通じてミトコンドリア機能を制御する」という、新規仮説の着想に至った。

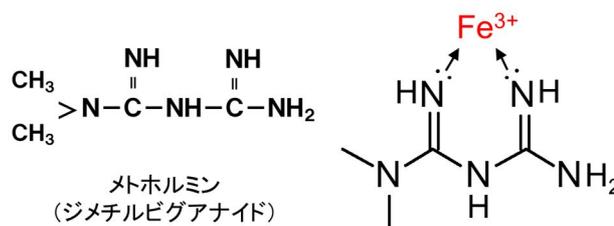


図1メトホルミンの化学構造および鉄キレートモデル

2. 研究の目的

代表者が見出した以上の知見を踏まえ、「金属キレート作用はメトホルミンの薬理作用に関与するか」という疑問に答えるため、メトホルミンのキレート能がミトコンドリア機能抑制作用及び代謝改善作用の発現に関与するか否かを明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

メトホルミンの金属キレート作用の特性解析、およびメトホルミン 金属複合体の三次元立体構造解析

メトホルミンのキレート形成能を詳細に検証するため、分析化学的手法によりメトホルミンのキレート作用の発現条件やキレート結合強度を明かにするとともに、X線結晶構造解析により金属-メトホルミン複合体の三次元立体構造を決定する。

金属キレート作用を介したミトコンドリア機能調節機構の解明

培養肝細胞 HepG2 を用いて、メトホルミンによるミトコンドリア呼吸機能への影響をフラックスアナライザーにより解析し、さらに、デフェリプロンやトリエンチンなどの既存の鉄や銅のキレート剤がメトホルミン様の作用を及ぼすか否かを検討することにより、金属キレート作用を介したミトコンドリア呼吸機能抑制作用を検証する。

金属キレート作用による糖代謝改善作用の検証

細胞透過性である銅キレート剤 Ammonium Tetrathiomolybdate (TM) を HepG2 に 16 時間刺激し、AMPK のリン酸化に与える影響をウェスタンブロッティング法により確認する。また、肥満糖尿病モデルマウスである KK-Ay に TM を投与し、血糖低下作用や体重減量作用への影響を明らかにする。

4. 研究成果

メトホルミンの金属キレート作用の特性解析およびメトホルミン 金属複合体の三次元立体構造解析

代表者は、メトホルミンが金属とキレートを形成しうる化学構造を有する事に着目し、メトホルミンの金属キレート形成能を詳細に検証した。メトホルミンと鉄(II)もしくは鉄(III)の複合体に関しては、色調変化、沈殿形成、吸光スペクトル変化など、キレート形成を示唆する現象は確認しているものの、構造解析に使用できる単結晶は得られず、一つのコンフォメーションのみではなく、複雑かつ不均一な構造を形成することが推測された。一方で、メトホルミン 銅(II)複合体およびメトホルミン ニッケル(II)複合体は安定して合成でき、単結晶を得ることが可能であった。得られた結晶を用いた X 線回折像から構造を決定することに成功し、いずれの金属

複合体も平面四角形の2量体構造を形成することを明らかにし(図2)、鉄を含めた多くの金属のキレート形成において共通する構造であることが示唆された。

さらに、メトホルミンのキレート形成による化学特性の変化を解析するため種々の分析化学実験を行った。分子軌道解析では、メトホルミン-金属複合体は電荷および最高被占軌道HOMOが非局在化することで、メトホルミン単独よりも酸化還元反応を受けやすい物性となることが示された。

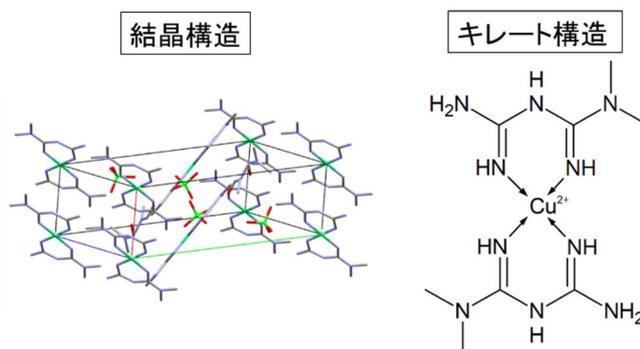


図2 メトホルミン-銅(II)キレート構造および分子軌道

金属キレート作用を介したミトコンドリア機能調節機構の解明

メトホルミンはミトコンドリアの呼吸鎖複合体であるComplex Iの阻害作用が知られており、細胞内AMP濃度の上昇を介したAMPキナーゼの活性化により肝臓での糖新生抑制効果を示すと考えられてきた。そこで、メトホルミンおよび種々の金属キレート剤を用いてフラックスアナライザーによるミトコンドリア呼吸機能解析を施行した。その結果、メトホルミンでは基礎呼吸および最大呼吸のいずれも著明に抑制したのに対して(図3上)、鉄キレート剤であるデフェリプロンや銅キレート剤であるバソクプロインではいずれに対しても有意な抑制作用は認めなかった(図3下)。また、HepG2細胞株を用いた検討では、デフェリプロンおよびバソクプロインはいずれもAMPKの活性化作用は有していなかった。デフェリプロン、バソクプロインは細胞膜非透過性のキレート剤であり、金属キレート作用は細胞外ではなく細胞内での作用が重要である可能性が示唆された。

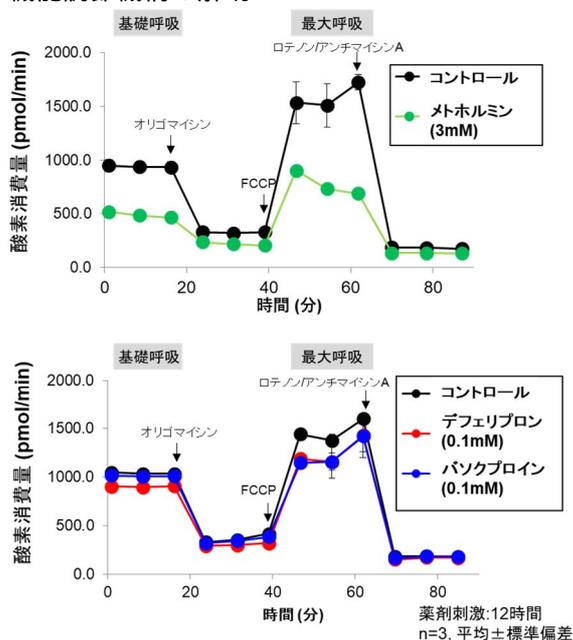


図3 フラックスアナライザーによるミトコンドリア呼吸機能解析

金属キレート作用による糖代謝改善作用の検証

の結果から、次に細胞透過性の銅キレート剤であるAmmonium Tetrathiomolybdate(TM)を用いて同様の検証を行うことで、TMがメトホルミンと同様の作用を有するか否かを検証した。はじめに、ヒト由来肝細胞株HepG2に16時間TMによる刺激を行った結果、TM 10 μM-300 μMの範囲において、濃度依存性にAMPKのリン酸化効果が認められた(図4)。さらに、メトホルミンによる血糖改善効果および体重減量作用が銅キレート作用を介するか検討するため、肥満糖尿病モデルマウスKK-AyにTMを4週間飲水投与(0.1%、0.3%)

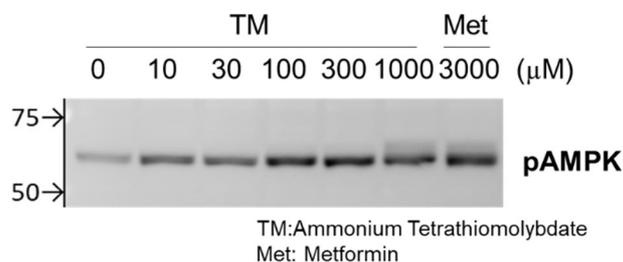


図4 銅キレート剤によるAMPKの活性化

した結果、TM投与量依存的に血糖改善作用および体重減量作用を認めた。以上より、メトホルミンによる薬理作用の少なくとも一部は銅キレート作用を介していることが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1. 著者名 Kenji Sugawara, Wataru Ogawa | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 New mechanism of metformin action mediated by lysosomal presenilin enhancer 2. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of diabetes investigation | 6. 最初と最後の頁 12-14 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13925 | 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 - |
| 1. 著者名 Kaori Hozumi, Kenji Sugawara, Takaya Ishihara, Naotada Ishihara, Wataru Ogawa | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Effects of imeglimin on mitochondrial function, AMPK activity, and gene expression in hepatocytes. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Scientific reports | 6. 最初と最後の頁 746 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-27689-y | 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 - |
| 1. 著者名 Kiyosuke Sato, Kenji Sugawara, Wataru Ogawa | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 A novel view of the insulin signaling pathway based on prediction of protein structure by the AI platform AlphaFold. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of diabetes investigation | 6. 最初と最後の頁 635-639 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13988 | 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 - |
| 1. 著者名 Quan Yingyue, Kenji Sugawara, Harumi Takahashi, Norihide Yokoi, Kento Ohbayashi, Yusaku Iwasaki, Susumu Seino, Wataru Ogawa | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Stimulatory effect of imeglimin on incretin secretion. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of diabetes investigation | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.14001 | 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 - |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Kenji Sugawara, Wataru Ogawa | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 The gut microbial metabolite imidazole propionate inhibits metformin action. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of diabetes investigation | 6. 最初と最後の頁 1319-1321 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13566 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 Kei Yoshino, Yushi Hirota, Wataru Ogawa, Kenji Sugawara, Akira Kawaguchi, Hiroshi Yoshino, Midori Ishibashi, Gen Yoshino, Masafumi Koga | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 A case of -chain variant hemoglobin (Hb Chad) with falsely high HbA1c levels measured by immunoassay | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Diabetology International | 6. 最初と最後の頁 330-335 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13340-021-00529-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 Sugawara K, Okada Y, Hirota Y, Sakaguchi K, Ogawa W | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Relation between metformin use and vitamin B12 status in patients with type 2 diabetes in Japan | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation | 6. 最初と最後の頁 917-922 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13200 | 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 - |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Morita Y, Nogami M, Sakaguchi K, Okada Y, Hirota Y, Sugawara K, Tamori Y, Zeng F, Murakami T, Ogawa W | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Enhanced Release of Glucose Into the Intraluminal Space of the Intestine Associated With Metformin Treatment as Revealed by [18F]Fluorodeoxyglucose PET-MRI. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Diabetes Care | 6. 最初と最後の頁 1796-1802 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/dc20-0093 | 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 - |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 Ito J, Nogami M, Morita Y, Sakaguchi K, Komada H, Hirota Y, Sugawara K, Tamori Y, Zeng F, Murakami T, Ogawa W. | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Dose-dependent accumulation of glucose in the intestinal wall and lumen induced by metformin as revealed by 18 F-labelled fluorodeoxyglucose positron emission tomography-MRI. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Diabetes, Obesity and Metabolism | 6. 最初と最後の頁 692-699 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dom.14262 | 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9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

| |
|----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 穂積 かおり, 菅原 健二, 石原 孝也, 石原 直忠, 小川 涉 |
| 2. 発表標題 肝臓におけるイメグリミンとメトホルミンの作用の類似性と相違性 |
| 3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 伊藤 潤, 坂口 一彦, 野上 宗伸, 金子 景弘, 森田 靖子, 山田 倫子, 駒田 久子, 菅原 健二, 廣田 勇士, 小川 涉 |
| 2. 発表標題 新規FDG-PET/MRI撮像法の開発によるメトホルミンの消化管ブドウ糖排泄作用の定量的分析 |
| 3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 伊藤 潤, 坂口 一彦, 野上 宗伸, 金子 景弘, 森田 靖子, 山田 倫子, 駒田 久子, 菅原 健二, 廣田 勇士, 小川 涉 |
| 2. 発表標題 新規FDG-PET/MRI撮像法の開発によるメトホルミン服用者における腸管ブドウ糖排泄の定量的解析 |
| 3. 学会等名 第65回糖尿病学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 穂積 かおり, 菅原 健二, 石原 孝也, 石原 直忠, 小川 渉 |
| 2. 発表標題 肝臓におけるイメグリミンとメトホルミンの作用の類似性と相違性 |
| 3. 学会等名 第65回糖尿病学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 高吉 倫史, 廣田 勇士, 竹内 健人, 芳村 魁, 西影 星二, 浜口 哲矢, 菅原 健二, 高岡 裕, 佐竹 渉, 小川 渉 |
| 2. 発表標題 HNF1AとNEUROD1の変異を認めた若年発症糖尿病の1例 |
| 3. 学会等名 第65回糖尿病学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 芳村 魁, 廣田 勇士, 西影 星二, 上田 真莉子, 山本 あかね, 高吉 倫史, 竹内 健人, 中川 靖, 浜口 哲矢, 菅原 健二, 小川 渉 |
| 2. 発表標題 耐糖能の変遷を長期間観察し得た反応性低血糖を呈するA型インスリン抵抗症の1例 |
| 3. 学会等名 第65回糖尿病学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 森田 靖子, 坂口 一彦, 野上 宗伸, 伊藤 潤, 金子 景弘, 山田 倫子, 駒田 久子, 菅原 健二, 廣田 勇士, 小川 渉 |
| 2. 発表標題 PET/MRI連続撮像法によるメトホルミン依存性腸管FDG排泄動態の解析 |
| 3. 学会等名 第65回糖尿病学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 森田 靖子, 野上 宗伸, 坂口 一彦, 伊藤 潤, 金子 景弘, 山田 倫子, 駒田 久子, 菅原 健二, 廣田 勇士, 村上 卓道, 小川 渉 |
| 2. 発表標題 PET-MRI連続撮像法によるメトホルミン依存性腸管FDG排泄動態の解析 |
| 3. 学会等名 第43回日本肥満学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 伊藤 潤, 野上 宗伸, 坂口 一彦, 金子 景弘, 森田 靖子, 山田 倫子, 駒田 久子, 菅原 健二, 廣田 勇士, 村上 卓道, 小川 渉 |
| 2. 発表標題 新規PET-MRI撮像法の開発によるメトホルミンによる腸管FDG集積の解析 |
| 3. 学会等名 第43回日本肥満学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|