

氏 名 (生年月日) にし ぐち たか ゆき
西 口 貴 之 (1989 年 10 月 3 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 第 175 号

学位授与の日付 2018 年 9 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 セレノマルトールを配位子とした亜鉛錯体の抗糖尿病効果及び臓器分布
解析に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 安 井 裕 之

(副査) 教 授 斎 藤 博 幸

(副査) 教 授 山 下 正 行

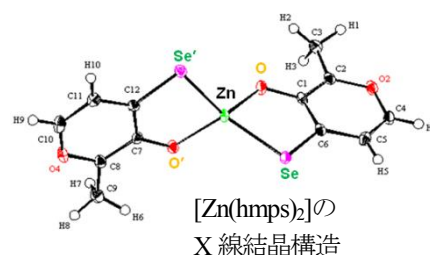
論文内容の要旨

序章

糖尿病の治療にはインスリンを始めとした治療薬が使用されるが、それぞれの医薬品には副作用も存在し、根治が困難な糖尿病の治療薬開発は継続されている。著者の所属する研究室では、生体必須元素である亜鉛; Zn の錯体が高い *in vitro* インスリン様活性を示すこと、および硫黄; S やセレン; Se を配位原子とした Zn 錯体が *in vivo* においても高い抗糖尿病効果を示すことを見出した。しかし、Zn 錯体の血糖値降下作用に関与する臓器は未だ明確でなく、Zn 錯体を投与後の臓器移行性を詳細に評価する必要がある。そこで、中心金属である Zn と配位子の臓器分布を inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) を用いて同時に分析するため、有機 Se 化合物-Zn 錯体を新たに合成し、Zn 錯体の *in vitro* 活性、*in vivo* 抗糖尿病効果及び投与終了後の臓器分布を包括的に評価することを目指して、研究に着手した。

第 1 章 ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン (O,S,Se)-Zn 錯体の合成と *in vitro* インスリン様活性の評価

ヒトでの使用が認められているマルトールを含む、3 種類のヒドロキシピロン誘導体を原料に合計 6 種類の有機 S 及び Se 配位子を合成し、O、S 及び Se を配位原子とする Zn 錯体を合成した。元素分析、質量分析、¹H-NMR 及び ¹³C-NMR の結果から、2 分子の配位子が、水酸基及びカルボニル基、チオカルボニル基もしくはセレノカルボニル基を介して Zn イオンと配位結合した化合物であると決定した。セレノマルトールを配位子とした新規の有機 Se-Zn 錯体であるビス (3-ヒドロキシ-2-メチル-4H-ピラン-4-セレノ) 亜鉛 (II) ([Zn(hmps)₂]) は、その X 線結晶構造解析の結果から、Se₂O₂ 配位型の歪んだ 4 配位四面体構造をしていることが分かった。続いて、既知の方法に従った、ラット脂肪細胞における遊離脂肪酸放出抑制活性及びグルコース取込促進活性から、*in vitro* インスリン様活性を評価した。その結果、有機 O-Zn 錯体と比較して有機 S-及び Se-Zn 錯体は非常に高い活性を示し、Zn 錯体の *in vitro* 活性と油水分分配係数との間には相関関係が認められた。



第2章 チオマルトール及びセレノマルトールによる有機 S-及び Se-Zn 錯体の ob/ob マウスにおける抗糖尿病効果の評価と Zn 錯体の臓器分布解析

これまで、著者の所属する研究室では2型糖尿病モデル動物として主にインスリン抵抗性を発症機序とする KKA^y マウスを用いて抗糖尿病効果の評価してきた。そこで、異なる発症機序をもつレプチン欠損による2型糖尿病モデル動物である ob/ob マウスを用いて、*in vitro* で活性の高かったビス (3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-チオノ) 亜鉛 (II) ([Zn(hmpt)₂]) 及び[Zn(hmps)₂]の抗糖尿病効果の評価した。その結果、両 Zn 錯体とも高い血糖値降下作用、HbA1c 値改善作用、耐糖能異常の改善作用、及び空腹時血漿インスリン濃度の低下作用を示した。一方で、[Zn(hmpt)₂]投与群では体重減少、[Zn(hmps)₂]投与群では肝機能の指標である AST 及び ALT の有意な上昇が認められた。また、ICP-MS 法を用いて Zn 及び Se の臓器中濃度を定量した。非投与群に対して Zn 錯体投与群で観測される臓器中 Zn 濃度の差 ($\Delta[Zn]$) を求め、加えて[Zn(hmps)₂]投与群に関しては臓器中 Se 濃度の差 ($\Delta[Se]$) 及び $\Delta[Zn]/\Delta[Se]$ のモル濃度比も求めた。 $\Delta[Zn]$ の結果より、[Zn(hmpt)₂]投与群では肝臓及び膵臓において、[Zn(hmps)₂]投与群では膵臓において $\Delta[Zn]$ の上昇分が認められた。また、[Zn(hmps)₂]投与群の膵臓における $\Delta[Zn]/\Delta[Se]$ 比は 27 であり、Zn がイオン形で存在していることが示唆された。ここで、 $\Delta[Zn]/\Delta[Se]$ 比が 0.5 もしくは 1.0 であれば、それぞれの化学形態は[Zn(hmps)₂]もしくは[Zn(hmps)⁺]であると仮定した。臓器分布の結果から、[Zn(hmpt)₂]投与群では肝臓及び膵臓、[Zn(hmps)₂]投与群では Zn イオンの化学形態で膵臓において抗糖尿病効果を示していることが示唆された。そこで、両 Zn 錯体の作用が示唆された膵臓の組織染色を行ったが、膵臓ランゲルハンス氏島の肥大化抑制効果は認められず、むしろ肥大化は促進傾向であった。以上より、ob/ob マウスへの Zn 錯体による投与実験では、連日経口投与の終了後に蓄積していた Zn の臓器分布から推定された作用臓器と、その組織形態学的な改善効果との間に関連性は認められなかった。

第3章 マルトール及びセレノマルトールによる有機 O-及び Se-Zn 錯体の KKA^y マウスにおける抗糖尿病効果の評価と Zn 錯体の臓器分布解析

KKA^y マウスにおける Zn 錯体の抗糖尿病効果及び臓器分布解析を行うため、マルトールを配位子としたビス (3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-チオノ) 亜鉛 (II) ([Zn(hmpo)₂]) 及び[Zn(hmps)₂]の連日経口投与実験を行った。その結果、[Zn(hmps)₂]投与群では [Zn(hmpo)₂]投与群と比べて高い血糖値降下作用、HbA1c 値改善作用、インスリン抵抗性及びレプチン抵抗性に対する改善効果が認められた。第2章と同様に Zn 及び Se の臓器中濃度を定量した結果、[Zn(hmps)₂]投与群の肝臓で有意な Zn 濃度の上昇が認められた。また、 $\Delta[Zn]/\Delta[Se]$ 比は肝臓において 0.9 であり、[Zn(hmps)⁺]の化学形態で存在していることが示唆された。肝臓の組織染色を用いた画像解析により、肝臓での脂質蓄積が Zn 錯体投与群において有意に減少していた。臓器分布及び組織形態学的な改善の結果より、[Zn(hmps)₂]は肝臓において[Zn(hmps)⁺]の化学形態で分布し、抗糖尿病効果を示していることが示唆された。

総括

In vitro においては、S や Se といった HSAB 則によるソフトな配位原子を持つ Zn 錯体が、ハードな O を配位原子とした錯体と比べて高いインスリン様活性を示した。この高い活性には、Zn 錯体の歪んだ 4 配位四面体構造および油水分配係数が関与することが明らかとなり、今後の亜鉛錯体の設計に有益な知見となった。一方、*in vivo* においては、異なる発症機序を持つ ob/ob マウスおよび KKA^y マウスにおいてマルトール誘導体を配位子とした Zn 錯体は抗糖尿病効果を示し、有機 Se 配位子を用いた [Zn(hmps)₂]の投与群では臓器中の $\Delta[Zn]/\Delta[Se]$ モル比より、Zn 錯体の化学形態を推定できることが分かった。しかし、連続投与を終えた後の臓器分布の解析からは、明確な作用臓器の特定には至らなかった。

た。今後、作用臓器を含めた Zn 錯体の抗糖尿病効果を評価するには、連続投与による治療中の経時的かつ経日的な臓器移行性に関する精査が必要である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

《緒言》

現在、糖尿病の治療にはインスリン及び有機低分子の治療薬が使用されているが、それぞれの医薬品には副作用も存在し、根治困難な糖尿病の治療薬開発は継続されている。本学の代謝分析学分野では、生体必須元素である亜鉛; Zn の錯体が高い *in vitro* インスリン様活性を示すこと、および硫黄; S やセレン; Se を配位原子とした Zn 錯体が *in vivo* においても高い抗糖尿病効果を示すことを見出してきた。しかし、Zn 錯体の血糖値降下作用に関与する臓器は未だ明確でなく、Zn 錯体の臓器移行性を評価する必要がある。

西口貴之氏は、Zn と配位子の臓器分布を inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) を用いて同時分析するため、有機 Se 化合物-Zn 錯体を新たに合成し、錯体の *in vitro* 活性、*in vivo* 抗糖尿病効果及び臓器分布を包括的に評価することを目指して、研究に着手した。以下、結果を3章に分けて論述する。

《審査結果の要旨》

第1章 ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン-Zn 錯体の合成とインスリン様活性

3種類のヒドロキシピロン誘導体を原料に合計6種類の有機 S 及び Se 配位子を合成し、O、S 及び Se を配位原子とする Zn 錯体を合成した。物性評価の結果から、2分子の配位子が、水酸基及びカルコゲンカルボニル基を介して Zn イオンと配位結合していることを決定した。セレノマルトールを配位子とした新規の有機 Se-Zn 錯体であるビス (3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-セレン) 亜鉛 (II) ($[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$) は、X 線結晶構造解析から、 Se_2O_2 配位型の歪んだ4配位四面体構造であった。続いて、ラット脂肪細胞を用いて *in vitro* インスリン様活性を評価し、有機 O-Zn 錯体と比較して有機 S-及び Se-Zn 錯体は非常に高い活性を示し、錯体の *in vitro* 活性と油水分分配係数に強い相関関係が認められた。

第2章 ヒドロキシピロン骨格の有機 S-及び Se-Zn 錯体の ob/ob マウスにおける抗糖尿病効果と臓器分布解析

レプチン欠損による2型糖尿病モデル動物である ob/ob マウスを用いて、 $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ もしくはインスリン様活性の高かったビス (3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-チオノ) 亜鉛 (II) ($[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$) の抗糖尿病効果を評価した。その結果、両錯体とも高い血糖値降下作用、HbA1c 値改善作用、耐糖能異常の改善作用、及び空腹時血漿インスリン濃度の低下作用を示した。Zn 及び Se の臓器中濃度を定量し、 $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ 投与群では肝臓及び脾臓、 $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ 投与群では Zn イオンの化学形態で脾臓において抗糖尿病効果を示していることが示唆された。

第3章 ヒドロキシピロン骨格の有機 O-及び Se-Zn 錯体の KKA^y マウスにおける抗糖尿病効果と臓器分布解析

インスリン抵抗性による2型糖尿病モデル動物である KKA^y マウスに $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ もしくはマルトールを配位子としたビス (3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-オノ) 亜鉛 (II)

([Zn(hmpo)₂]) の連日経口投与実験を行った。その結果、[Zn(hmps)₂]投与群では 高い血糖値降下作用、HbA1c 値改善作用、インスリン抵抗性及びレプチン抵抗性に対する改善効果が認められた。Zn 及び Se の臓器分布解析及び組織形態学的な改善の結果より、[Zn(hmps)₂]は肝臓において[Zn(hmps)⁺]の化学形態で分布し、脂質蓄積を減少させるなどの抗糖尿病効果を示していることが示唆された。

《審査の結論》

Zn 錯体の *in vitro* インスリン様活性には、歪んだ 4 配位四面体構造および油水分配係数が関与することが明らかとなり、今後の錯体設計に有益な知見となった。*In vivo* においては、異なる発症機序の ob/ob マウスおよび KKA^y マウスにヒドロキシピロン誘導体の有機 Se 配位子を用いた[Zn(hmps)₂]は抗糖尿病効果を示し、投与後の臓器中化学形態も推定できた。しかし、連続投与後の臓器分布解析から作用臓器を特定することは困難であった。

今後、Zn 錯体の効果を臓器レベルで評価するには、連続投与による治療中の経時的な臓器移行性に関する精査が必要との結論に至った。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。