

生物無機化学的アプローチを基盤とした亜鉛ヒノキチオール錯体の
インスリン抵抗性改善効果に関する作用機構解明

平成 29 年度
内藤 行喜
(Yuki Naito)

目次

| | | |
|-------|---|----|
| 序 章 | 研究の背景と目的..... | 3 |
| 第 1 章 | [Zn(hkt) ₂]を用いたマウス由来 3T3-L1 培養細胞におけるインスリン様活性の評価 .. | 6 |
| 1-1 | 緒言 | 6 |
| 1-2 | 実験材料及び実験方法..... | 6 |
| 1-3 | 結果 | 13 |
| 1-4 | 考察 | 39 |
| 第 2 章 | [Zn(hkt) ₂]を用いたラットインスリノーマ培養細胞 (RIN-5F 細胞) における膵 β 細胞への影響 | 46 |
| 2-1 | 緒言 | 46 |
| 2-2 | 実験材料及び実験方法..... | 46 |
| 2-3 | 結果 | 49 |
| 2-4 | 考察 | 54 |
| 第 3 章 | [Zn(hkt) ₂]の 2 型糖尿病モデルマウス (KK-A ^y マウス) への高脂肪食混餌長期投与による抗 DM 効果の評価 | 56 |
| 3-1 | 緒言 | 56 |
| 3-2 | 実験材料及び実験方法..... | 56 |
| 3-3 | 結果 | 59 |
| 3-4 | 考察 | 72 |
| 総 括 | | 75 |
| 謝 辞 | | 77 |
| 業績目録 | | 78 |
| 参考文献 | | 79 |

-本文中および図中に用いた略語-

| | |
|-------------------------|--|
| Akt | : Akt/protein kinase B |
| BCA | : bicinchoninic acid |
| BSA | : bovine serum albumin |
| DM | : diabetes mellitus |
| DMEM | : Dulbecco's modified Eagle's medium |
| DMSO | : dimethylsulfoxide |
| DTPA | : diethylenetriaminepentaacetic acid |
| EDTA | : ethylenediaminetetraacetic acid |
| ELISA | : enzyme-linked immunosorbent assay |
| FBS | : fetal bovine serum |
| FFA | : free fatty acid |
| GLUT | : glucose transporter |
| HbA1c | : hemoglobine A1c |
| HFD | : high fat diet |
| HRP | : horseradish peroxidase |
| HSP90 | : heat shock protein 90 |
| IDF | : International Diabetes Federation |
| IR β | : insulin receptor β |
| IRS-1 | : insulin receptor substrate-1 |
| NCS | : newborn calf serum |
| PBS | : phosphate-buffered saline |
| PCR | : polymerase chain reaction |
| PDX-1 | : pancreatic and duodenal homeobox-1 |
| PI3K | : phosphatidyl inositol 3-kinase |
| PMSF | : phenylmethylsulfonyl fluoride |
| PTP1B | : protein tyrosine phosphatase 1B |
| QOL | : quality of life |
| RT-PCR | : reverse transcription polymerase chain reaction |
| RPMI-1640 | : Roswell Park Memorial Institute-1640 |
| SDS-PAGE | : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| TBS | : tris-buffered saline |
| TPEN | : <i>N,N,N',N'</i> -tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine |
| Zn(OAc) $_2$ ·2H $_2$ O | : zinc acetate dihydrate |
| ZnSO $_4$ | : zinc sulphate |
| [Zn(glc) $_2$] | : bis(gluconato)zinc(II) complex |
| [Zn(hkt) $_2$] | : bis(hinokitiolato)zinc(II) complex |
| [Zn(trp) $_2$] | : bis(tropolonato)zinc(II) complex |

序 章 研究の背景と目的

糖尿病 (DM) は高血糖を主症状とする慢性代謝疾患である。膵臓からのインスリン分泌量の不足、インスリン標的組織におけるインスリンの機能不全の一方、もしくは両方が原因となり、結果として慢性的な高血糖をもたらす。国際糖尿病連合 (IDF) の最近の発表によると、全世界の DM 人口は爆発的に増加しており、2015 年現在では DM 有病患者数は 4 億 1,500 万人に上り、有効な対策を取らなければ 2040 年までに 6 億 4,200 万人にまで増加すると予測している [1]。日本においては 2015 年厚生労働省が発表した「2014 年国民健康・栄養調査」の結果から、DM が強く疑われる人の割合は日本人口のうち、男性で 15.5%、女性で 9.8%と 2006 年調査に比べ増加している [2]。また、「糖尿病アトラス 2015」では、世界を 7 区域に分けて統計を出しており、日本が属する「西太平洋地域」は世界最大の DM 人口を抱えている。この地域の DM 有病者数は 1 億 5,320 万人であり、全世界の 37%がこの地域に集中している計算となっている。現に、2015 年の DM 人口トップ 10 ヶ国には、西太平洋地域に含まれる、中国 (1 位 ; 1 億 960 万人)、インドネシア (7 位 ; 1,000 万人)、日本 (9 位 ; 720 万人) の 3 ヶ国が入っている。IDF は「DM はコントロールできる病気であり、適切な治療を続けていれば合併症を予防できる」と呼びかけている。DM 性合併症 (腎症・網膜症・神経障害) は難治性疾患であり、未だに医療品や医療への強い要望が求められており、アンメットメディカルニーズに分類されている。適切な DM の治療を続けていれば、合併症の多くは予防が可能であり、DM の早期診断、治療及び症状の進行遅延は患者の生活の質 (QOL) を維持、向上させる上で非常に重要である。

世界保健機関 (WHO) は、不健康な食事や運動不足、喫煙、過度の飲酒などの発症の原因が共通しており、生活習慣の改善により予防可能な疾患をまとめて「非感染性疾患 (Non-Communicable diseases; NCDs)」と位置付けている。心血管疾患、がん、慢性呼吸器疾患などが主であり、DM もこの一つに含まれている [3]。DM は NCD による死亡の直接的な原因であり、全体の 3.5%を占めると報告されている。「糖尿病アトラス 2015」においても、DM が原因で死亡する人の数は年間 500 万人に上り、DM と DM 合併症はほとんどの国で死亡原因の上位を占めている。

一方、DM に対する「豊かな先進国に多い病気」というイメージは偏ったものであり、DM 有病者の 4 分の 3 は低・中所得の国に集中している。この理由として、低・中所得の国では食事の中心が、安価な炭水化物で占められていることが指摘されている。日本においても「所得が低い人ほど肉類、野菜類を避け、栄養源として穀類に頼り、所得が高い人ほど、穀類の摂取量が少なく、肉類、野菜類を多く摂取する」傾向があることが厚生労働省による調査で明らかとなっている [2]。DM は病因に基づき、主に 3 つのタイプ (1 型 DM、2 型 DM、妊娠 DM) に分類される。1 型 DM は膵臓ランゲルハンス島 β 細胞の破壊により、インスリンの分泌不全が生じることによって引き起こされる DM である。2 型 DM はインスリン分泌低下とインスリン抵抗性の 2 つの要因により、結果としてインスリンの作用不足に伴うグルコースの利用低下を引き起こし発症する。また妊

娠 DM は、妊娠中にはじめて発見される糖代謝異常のことを指す。いずれの DM のタイプにおいても血糖値のコントロールは必要であり、患者はその症状、重症度によってインスリン注射または経口治療薬を単剤もしくは複数剤服用する。日々のインスリン注射がもたらす苦痛とストレス、治療薬の長期服用による浮腫や重篤な低血糖などの深刻な副作用の発現は、患者の QOL を著しく低下させている。このような DM 及び DM 患者を取りまく現状のもと、病態改善のための生活習慣の改善と同時に、副作用の少ない新規 DM 治療薬の開発が望まれている。

亜鉛 (Zn) は生体必須微量元素の 1 つであり、様々な生体調節機能を示す。ヒトの体内に約 2 グラム存在しており、細胞の恒常性維持において重要な役割を担っている。Zn 欠乏症及び過剰症は細胞の増殖、分化、生存に関連する生体の情報伝達機構を破綻させ、その結果、細胞死をもたらすことが報告されている[4, 5]。また Zn イオンはインスリン合成、インスリン分泌、並びに細胞内シグナル経路における情報伝達物質の 1 つとして機能する[6-8]。以上のように、Zn は様々な生体への機能を有しており、Zn を含む製剤は胃潰瘍治療薬 (ポラプレジンク)、皮膚疾患治療薬 (亜鉛華軟膏)、ウィルソン病治療薬 (ノベルジン) として、臨床現場において使用されている[9-11]。

また、Zn は DM と関連していることが、以前より報告されている。1980 年に $ZnCl_2$ がラット脂肪細胞において脂質生成量を増加し、インスリン様活性を有することが報告されている[12]。その他、Zn イオンが受容体およびキナーゼを介した作用メカニズムによりグルコース輸送を促進すること[13]、マウス由来培養脂肪細胞である 3T3-L1 細胞を用いた検討より、Zn イオンが示すグルコース輸送に関するインスリン様活性は PI3K および Akt のリン酸化によるものであることが報告されている[14]。最近の研究では、生体内でのグルコース恒常性に関与している GPR39 に対して Zn イオンが GPR39 の発現を増強し、インスリン分泌に関与していること[15]、細胞外の Zn イオンが GPR39 を直接的に活性化し、Akt のリン酸化を調節することが報告されている[16]。ヒトにおいては、健常者と DM 患者では体内の Zn 量が異なることが明らかになってきている。DM 患者の血漿中および臓器中の Zn 量は健常者に比べると低く、一方で、尿中に排泄される Zn 量は健常者よりも多いことが報告されている[17-20]。また最近では、健常者のうち「家族歴の中に DM を患っている人がいる健常者」と「家族歴の中に DM を患っている人がいない健常者」とで血清中 Zn 濃度を比較したところ、「家族歴の中に DM を患っている人がいる健常者」では、そうではない健常者に比べて、有意に低い結果が報告されており、Zn と DM の関係は密接であることがうかがえる[21]。以上のことから、体内 Zn 量の減少が DM の重症度を反映していると言っても過言ではなく、DM 患者における体内 Zn 量を調節することは DM 治療の新たな指針の 1 つになり得ると考えられる。

そこで、著者の所属する研究室では、これまでの研究報告から高用量の Zn イオンが使用されていることに着目し、低用量で高いインスリン様活性を示す Zn 化合物として様々な化学構造の Zn 錯体を合成してきた。マルトールを配位子に用いた亜鉛マルトール錯体 ($[Zn(mal)_2]$) が Zn イオンよりも高いインスリン様活性を示すことを報告した 2000 年以降[22]、様々な配位子と配位形式を有する Zn 錯体を合成し、評価してきた[23-27]。本研

究では、それらの中で配位子にヒノキチオールを用いた亜鉛ヒノキチオール錯体 ($[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$) に着目した。ヒノキチオールは 1936 年に野副らによりタイワンヒノキの精油成分から発見され、1944 年にその化学構造が決定された化合物である。このヒノキチオールは天然物から抽出された化合物であり、人に対する安全性は高いことが報告されている化合物でもあり [28]、現在では、アトピー性皮膚炎に見られる肌の痒みや乾燥を抑えることを目的として、入浴オイルや化粧品に使用されている。実際に、広い生理活性を有することも報告されている [29-33]。

加えて、前述の $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ は同じ O_4 配位様式の Zn 錯体である $[\text{Zn}(\text{mal})_2]$ や亜鉛アリキシン錯体よりも *in vitro* 系における遊離脂肪酸放出抑制作用やグルコース取り込み活性が高いことが報告されている [34]。さらに、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ の腹腔内投与により血糖降下作用や糖化ヘモグロビン (HbA1c) 低下作用、インスリン抵抗性、レプチン抵抗性改善作用が認められている [34]。これらの結果は、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ が末梢組織、特に、膵臓や脂肪組織に作用していることを示唆している。以上のことから、高い生理活性を有する O_4 型配位様式を持つ Zn 錯体の中で、生体適合性が高いと考えられる $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ の脂肪組織もしくは膵臓への作用機構を検討するため、本研究に着手した。

第1章 [Zn(hkt)₂]を用いたマウス由来 3T3-L1 培養細胞におけるインスリン様活性の評価

1-1 緒言

以前から、著者の所属する研究室では様々な化学構造および配位様式を持つ Zn 錯体が *in vitro* 系では高いインスリン様活性を、*in vivo* 系では DM モデル動物において強い抗 DM 作用を有することを示してきた[22, 35-37]。これらの研究結果から、著者は Zn 錯体の方が Zn イオンよりも高い抗 DM 効果を示すと判断してきた。しかし、Zn イオンや Zn 錯体が見せるインスリン様活性の作用メカニズムは未だ完全には解明されていない。一方、これまでの先行研究の報告から Zn が示す抗 DM 作用のメカニズムとして、Zn がインスリンシグナル経路に作用し、GLUT4 の膜移行性を促進していることが考えられている[14, 38, 39]。

これらのことから Zn 錯体摂取が血糖降下作用、すなわち、DM 治療方法のひとつになる可能性がある。それゆえ、配位子に天然物由来化合物のヒノキチオールを用い、*in vitro* における高いインスリン様活性と *in vivo* における抗 DM 活性を示した亜鉛ヒノキチオール錯体 ([Zn(hkt)₂]) に着目し[34]、インスリン標的組織の1つである脂肪組織におけるインスリンシグナル経路への影響を検討した。

1-2 実験材料及び実験方法

1-2-1 試薬

3T3-L1 マウス線維芽細胞は、DS ファーマバイオメディカル株式会社（大阪）から購入した。ウシ胎仔血清（FBS）は Thermo Fisher Scientific 株式会社（マサチューセッツ州、アメリカ合衆国）、Equitech-Bio 株式会社（テキサス州、アメリカ合衆国）より購入し、新生仔ウシ血清（NCS）は GIBCO 株式会社（カリフォルニア州、アメリカ合衆国）より購入した。抗生物質-抗真菌剤は Invitrogen 株式会社及び、ナカライテスク株式会社（京都）から購入した。細胞培養のため Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）を、ウシ血清アルブミン（BSA）は標準タンパク質として使用するため、デキサメサゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンは 3T3-L1 線維芽細胞の分化誘導に使用するため Sigma-Aldrich 社（ミズーリ州、アメリカ合衆国）から購入した。特異的抗体として、モノクローナルマウスホスホチロシン抗体 (Phospho-Tyrosine Mouse mAb (P-Tyr100))、モノクローナルウサギ抗マウス IRβ 抗体 (Insulin Receptor β (4B8) Rabbit mAb)、モノクローナルウサギ抗マウス IRS-1 抗体 (IRS-1 (D23G12) Rabbit mAb)、ポリクローナルラビット抗マウス Phospho-Akt (Ser473) 抗体 (Phospho-Akt (Ser473) Antibody)、ポリクローナルラビット抗マウス Akt 抗体 (Akt Antibody)、ポリクローナルラビット抗マウス Phospho-GSK-3β (Ser9) 抗体 (Phospho-GSK-3β (Ser9) Antibody)、モノクローナルラビット抗マウス GSK-3β 抗体 (GSK-3β (27C10) Rabbit mAb) および、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody)、HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody) を Cell Signaling Technology 社（マサチューセッツ州、アメリカ合衆国）から購入した。イモビロン化学発光検出試薬 (Immobilon™ Western

Chemiluminescent HRP Substrate) は、ミリポア社 (マサチューセッツ州、アメリカ合衆国) から購入した。PI3K 阻害剤であるワートマニン (Wortmannin) は ENZO Life Sciences 社 (ペンシルベニア州、アメリカ合衆国) から購入した。トロポロン (IUPAC 名; 2-ヒドロキシシクロヘプタ-2,4,6-トリエノン) は東京化成工業株式会社 (東京) から購入した。4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニウム酢酸 (HEPES) は同仁化学研究所 (熊本) より購入した。グルコン酸 Zn ($[Zn(glc)_2]$)、ヒノキチオール (IUPAC 名; 2-ヒドロキシ-4-イソプロピルヘプタ-2,4,6-トリエノン)、ヒトインスリン組換え体 (細胞培養用)、クロロホルム、および分子生物学用ジメチルスルフォキシド (DMSO)、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) に使用した亜鉛標準液、インジウム標準液、硝酸 (有害金属測定用)、過塩素酸 (有害金属測定用)、過酸化水素 (原子吸光分析用) は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。

1-2-2 Zn 錯体の合成

亜鉛トロポロン錯体 ($[Zn(trp)_2]$) 及び $[Zn(hkt)_2]$ は以前に報告された方法に従って、本研究室で合成した[34]。

1-2-2-1 $[Zn(trp)_2]$ の合成

トロポロン (995.7 mg, 8.2 mmol) および $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ (878 mg, 4 mmol) をそれぞれ超純水に溶解し、30 分間攪拌した。その後、これらの溶液を混合し、室温で一晩攪拌した。生じた沈殿物を濾取し、真空下で乾燥させ、淡黄色固体を得た。

なお、実験に用いた全ての超純水は Milli-Q 超純水装置システム (日本ミリポア、東京) により調製された超純水 (比抵抗値 $18.2 M\Omega \cdot cm$) を使用した。

1-2-2-2 $[Zn(hkt)_2]$ の合成

ヒノキチオール (3.3 g, 20 mmol) を試薬特級エタノール (99.5) (純正化学株式会社、東京) に溶解し、 $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ (2.2 g, 10 mmol) は超純水に溶解した。それぞれの溶液は 30 分間攪拌した後、混合し、室温で一晩攪拌した。生じた沈殿物を濾取し、冷エタノールで洗浄した後、真空下で乾燥させ、淡黄色固体を得た。

1-2-3 Zn 錯体の特性とその油水分配係数 ($\log P$) の測定

合成した $[Zn(trp)_2]$ 及び $[Zn(hkt)_2]$ は、元素分析及び電子イオン化質量分析 (EI-MS)、赤外吸収スペクトルを測定し、その構造を推定した。元素分析、EI-MS は KPU 共同機器利用センターにおいて測定し、赤外吸収スペクトルは Shimadzu FTIR-8400s (株式会社島津製作所、京都) を用いて KBr 錠剤法により $400-4600 cm^{-1}$ の波長領域で測定を行った。

また、Zn 錯体の $\log P$ 値はフラスコ振盪法により求めた。Zn 錯体を終濃度 $5 \mu M$ となるように $10 mM$ HEPES 緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、遠心分離を行い、上清を回収してサンプルとした。回収した Zn 錯体含有 HEPES 緩衝液の上清に同量のクロロホルムを添

加し、37°C 1 時間振盪させ、10 分間静置後、HEPES 層（水層）中の亜鉛錯体濃度を UV スペクトルにより測定した。 $\log P$ は $\log P = \log ((\text{Abs}_{0 \text{ 時間後}} - \text{Abs}_{1 \text{ 時間後}}) / \text{Abs}_{1 \text{ 時間後}})$ 式を用いて算出した。なお、本計算式における各項目は、以下のことを表す。

$\text{Abs}_{0 \text{ 時間後}} - \text{Abs}_{1 \text{ 時間後}}$: クロロホルム層（油層）に移行したと考えられる Zn 錯体による吸光度の計算値

$\text{Abs}_{1 \text{ 時間後}}$: HEPES 層（水層）における Zn 錯体による吸光度

UV スペクトルは Agilent-8453 spectrometer (株式会社横河アナリティカルシステムズ、東京) を用いて測定した。

1-2-4 細胞培養

3T3-L1 線維芽細胞は 60 mm および 100 mm ディッシュに播種し、10% NCS 含有 DMEM 中で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。成長した細胞が 70% コンフルエント状態に達すると、0.25% Trypsin-EDTA 溶液を用いて細胞を剥離し、1,000 rpm で 1 分間遠心し、沈殿した細胞を 10% NCS 含有 DMEM で播種、培養し 2 代目より実験に用いた。なお、すべての培地において 50 U/mL ペニシリン及び 50 µg/mL ストレプトマイシンを含有した DMEM を使用した。細胞が 100% コンフルエント状態に達した後、分化誘導処理を行った。分化誘導には、0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、0.25 µM デキサメサゾン および 10 µg/mL インスリンを溶解した 10% FBS 含有 DMEM を用いて、72 時間培養した。続いて、培養液を 10 µg/mL インスリンを溶解した 10% FBS 含有 DMEM に交換し、48 時間培養した。その後の培養には、10% FBS 含有 DMEM を用い、2 日毎に培地交換を行った。実験には、分化誘導後 9-15 日目の細胞を用い、実験に用いる際には直前に 6 時間及び 12 時間無血清処理を行った。

1-2-5 [Zn(hkt)₂] および ヒノキチオール による細胞毒性

分化誘導処理を行った 3T3-L1 脂肪細胞を 10% FBS 含有 DMEM で培養し、分化誘導後 9-15 日の 3T3-L1 脂肪細胞を FBS 非含有 DMEM で 6 時間インキュベートし、FBS の影響を除いた。3T3-L1 脂肪細胞に [Zn(hkt)₂]、ヒノキチオールを処理し、37°C で 10 分間インキュベートを行った。その後、37°C に温めたリン酸緩衝食塩水 (PBS) を用いて 2 回洗浄し、0.2% トリパンブルー溶液を用いて細胞を染色した後、再度、PBS を用いて 2 回洗浄し、細胞を顕微鏡下で観察した。

1-2-6 Zn 錯体による 3T3-L1 脂肪細胞インスリンシグナル経路への影響

1-2-6-1 イムノブロッティング

分化誘導処理を行った 3T3-L1 脂肪細胞を 10% FBS 含有 DMEM で培養し、分化誘導後 9-15 日の 3T3-L1 細胞を FBS 非含有 DMEM で 6 時間及び 12 時間インキュベートし、FBS の影響を除いた。3T3-L1 脂肪細胞にインスリン、Zn 錯体、もしくはインスリン+

Zn 錯体を処理し、37°C で各処理時間インキュベーションを行った。その後、サンプルを処理した細胞は氷冷した PBS を用いて 2 回洗浄し、細胞溶解液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.875% Brij-97、0.125% ノニデット P-40 (NP-40)、150 mM NaCl、2.5 mM EDTA、10 mM NaF、0.1 mM Na₃VO₄、200 μM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、5 μg/mL leupeptin) で細胞抽出液を回収し、氷上で 30 分間静置した。回収した細胞抽出液は 4°C、15,000 × g、20 分間遠心分離を行い、上清を回収した。回収した上清は、Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific 社) を用いて BCA 法によりタンパク質の定量を行った。標準タンパク質としては、BSA を用いて測定を行った。総タンパク質量として 5 μg または 10 μg を含有するサンプル溶液を 10% ミニプロティアン® TGX™ プレキャストゲル (BIO-RAD 社、カリフォルニア州、アメリカ合衆国) により分離した。分離されたタンパク質は PVDF 膜に転写し、0.1% Tween 20 含有 TBS (TBS-T) にスキムミルクを溶解し 5% スキムミルク-TBS-T 溶液としたものをブロッキング剤とし、室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。その後、ブロッキング剤に溶解した一次抗体 (希釈倍率: 1,000 倍) を 4°C 条件下において、一晚振盪させた。その後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄した後、2 次抗体 (希釈倍率: 1,000-5,000 倍) を室温で 1 時間振盪させた。特異的免疫反応は Immobilon™ ウェスタン化学発光 HRP 基質を用いて可視化し、Amersham Hyperfilm™ ECL (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社、東京) に感光させた。

なお、一次抗体にポリクローナルラビット抗マウス Phospho-Akt (Ser473) 抗体 (Phospho-Akt (Ser473) Antibody)、ポリクローナルラビット抗マウス Akt 抗体 (Akt Antibody)、ポリクローナルラビット抗マウス Phospho-GSK-3β (Ser9) 抗体 (Phospho-GSK-3β (Ser9) Antibody)、モノクローナルラビット抗マウス GSK-3β 抗体 (GSK-3β (27C10) Rabbit mAb)、モノクローナルラビット抗マウス HSP90 抗体 (HSP90 (C45G5) Rabbit mAb)、ポリクローナルラビット抗マウス β-actin 抗体 (β-actin Antibody) を、二次抗体には HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody) を用いた。

1-2-6-2 免疫沈降法

分化誘導処理を行った 3T3-L1 脂肪細胞を 10% FBS 含有 DMEM で培養し、分化誘導後 9-15 日の 3T3-L1 細胞を FBS 非含有 DMEM で 6 時間及び 12 時間インキュベーションし、FBS の影響を除いた。3T3-L1 脂肪細胞にインスリン、Zn 錯体、もしくはインスリン + Zn 錯体を処理し、37°C で各処理時間インキュベーションを行った。その後、サンプルを処理した細胞は氷冷した PBS を用いて 2 回洗浄し、細胞溶解液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1% NP-40、150 mM NaCl、1 mM EDTA、10 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 mM PMSF、5 μg/mL leupeptin) を用いて細胞抽出液を回収した。回収した抽出液は氷上で 30 分間静置したのち、4°C、13,000 × g で 30 分間遠心分離を行った。その後、上清を回収し BCA 法によりタンパク質定量を行い、総タンパク質量として、160 μg または 170 μg を免疫沈降法に用いた。サンプルのクリーニングを目的として 50% [v/v] nProtein A Sepharose 4 Fast Flow (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を添加し、4°C 条件下、2 時間緩やかに振盪した

後、4°C、1,600 × g、3 分間遠心分離を行い、得られた上清を回収した。その後、回収した上清に抗体を添加し、4°C 条件下、一晚緩やかに振盪し抗原抗体反応を進めた。なお、免疫沈降法に用いた抗体は、モノクローナルウサギ抗マウス IRβ 抗体 (Insulin Receptor β (4B8) Rabbit mAb)、モノクローナルウサギ抗マウス IRS-1 抗体 (IRS-1 (D23G12) Rabbit mAb) であり、希釈倍率はともに 100 倍となるように添加した。その後、抗原抗体複合体を形成するための担体である 50% [v/v] nProtein A Sepharose 4 Fast Flow を添加し、4°C 条件下でさらに 1 時間緩やかに振盪した。抗原抗体複合体を沈降させるため、4°C、13,000 × g、10 秒間遠心分離を行い、上清を除いた。沈殿物として得られた抗原抗体複合体は、洗浄を行うため細胞溶解液を添加し懸濁化させ、さらに 4°C、13,000 × g、10 秒間遠心し、上清を除いた。この操作を 5 回繰り返した。得られた沈殿に 2 × SDS-PAGE サンプルバッファー (100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、20% グリセロール、4% SDS、12% 2-メルカプトエタノール、0.01% ブロモフェノールブルー) を加え、95°C、3 分間煮沸し、4°C、13,000 × g、10 秒間遠心し、上清を回収した。回収した上清を 4-15% ミニプロテイン® TGX™ プレキャストゲルに添加し、SDS-PAGE を行った。分離されたタンパク質は PVDF 膜に転写し、0.1% Tween 20 含有 TBS (TBS-T) に BSA を溶解し 5% BSA-TBS-T 溶液としたものをブロッキング剤とし、室温で 2 時間ブロッキング処理を行った。その後、ブロッキング剤に溶解した一次抗体 (希釈倍率: 1,000 倍) を 4°C 条件下において、一晚振盪させた。その後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄した後、2 次抗体 (希釈倍率: 1,000-5,000 倍) を室温で 1 時間振盪させた。特異的免疫反応は Immobilon™ ウェスタン化学発光 HRP 基質を用いて可視化し、Amersham Hyperfilm™ ECL に感光させた。

なお、一次抗体にはモノクローナルマウスホスホチロシン抗体 (Phospho-Tyrosine Mouse mAb (P-Tyr100))、モノクローナルウサギ抗マウス IRβ 抗体 (Insulin Receptor β (4B8) Rabbit mAb)、モノクローナルウサギ抗マウス IRS-1 抗体 (IRS-1 (D23G12) Rabbit mAb)、二次抗体に P-Tyr100 は HRP 標識抗マウス抗体、IRβ および IRS-1 は HRP 標識抗ラビット抗体を用い、リプローブ処理にはストリッピング溶液 (和光純薬工業株式会社) を使用した。

1-2-7 Zn 錯体による *in vitro* 酵素阻害活性の検討

1-2-7-1 Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) に対する阻害活性

PTP1B に対する阻害活性は、*p*-ニトロフェノールリン酸 (pNPP) を基質、Na₃VO₄ を PTP1B 阻害剤のポジティブコントロールとして検討を行った。PTPase バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl、1 mM MnCl₂、2 mM ジチオトレイトール (DTT)) を調製し、これを用いて実験した。[Zn(hkt)₂] およびヒノキチオールは 100% DMSO に溶解させた後、PTPase バッファー中の DMSO の割合が 1% DMSO (終濃度: 10-100 μM) となるように添加した。これに 1 μg PTP1B (14 ユニット) を加え 37°C、10 分間インキュベーションを行った。これに 50 mM pNPP を添加し、さらに 37°C、10 分間インキュベーションを行った。その後、反応中止液として、0.1 M NaOH を添加した。酵素基質反応により生成した *p*-ニトロフェノールをプレートリーダー・スペクトラフルオプラス (テカンジ

ヤパン、神奈川) を用いて測定波長 405 nm における吸光度により定量した。コントロールサンプルの吸光度に対する Zn 錯体サンプルの吸光度の割合から、阻害率を算出し IC₅₀ 値を求めた。

1-2-7-2 Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN)に対する阻害活性

PTEN に対する阻害活性について、PIP₃ を基質として検討を行った。アッセイバッファー (25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、0.5% DTT、0.03% Brij-35) を調製し、実験に用いた。[Zn(hkt)₂]及びヒノキチオールを 100% DMSO に溶解した後、アッセイバッファー中に 1% DMSO となるように添加した。なおこの時、終濃度が[Zn(hkt)₂]は 100 μM、ヒノキチオールは 200 μM となるように調製した。PTEN (40 ユニット) を加え、37°C、10 分間インキュベートを行った。その後、基質である 120 μM PIP₃ を添加し、さらに 37°C、60 分間インキュベートした。BIOMOL[®] GREEN 溶液 (BML-AK111-0250, Enzo Life Sciences, Inc.、ニューヨーク州、アメリカ合衆国) をサンプルに添加し、室温で 20 分間インキュベートすることで、遊離した無機リン酸をマラカイトグリーン法に基づいて測定波長 620 nm における吸光度により定量した。

1-2-8 [Zn(hkt)₂]と PTP1B、PTEN のドッキングシミュレーション解析

[Zn(hkt)₂]の構造は、以前に報告された 3 次元座標[40]を参考に、単量体、正四面体型となるように MOPAC (半経験的分子軌道法) により最適化して使用した。ドッキングシミュレーションに用いたヒト PTP1B (4I8N)、ヒト PTEN (1D5R)は、プロテインデータバンク (<http://www.rcsb.org/pdb/>) から構造データを得た。[Zn(hkt)₂]とドッキングする酵素の標的領域は、UniProt に登録されているデータから、PTP1B は Asp-181、Cys-215、Gln-262 の 3 領域、PTEN は Cys-124 の 1 領域を対象とした。酵素と[Zn(hkt)₂]とのドッキングシミュレーションには、Molegro Virtual Docker (MVD) 2013.6.0.1 をソフトウェアとして使用した。

1-2-9 [Zn(hkt)₂]の 3T3-L1 脂肪細胞への取り込み評価

Zn 錯体による 3T3-L1 脂肪細胞への Zn 取り込み量については、ICP-MS を用いて検討を行った。分化誘導後 9-15 日の 3T3-L1 脂肪細胞を FBS 非含有 DMEM で 6 時間培養した後、ZnSO₄ (終濃度: 20 μM)、[Zn(hkt)₂] (終濃度: 20 μM) を用いて 10-30 分間、37°C でインキュベートを行った。その後、細胞を 1 mM EDTA 含有 PBS を用いて 3 度洗浄し、1 mL 滅菌水を添加し細胞を回収した。回収した細胞液は、湿式灰化を行った。すなわち、回収した細胞液の全量をトールビーカーに移し、180°C に加熱し、細胞液中に含まれる有機物を除去するため、60% HNO₃ を 2 mL、60% HClO₄ を 2 mL、30% H₂O₂ を 2 mL 順次添加し、白色の残渣物が得られるまで、この作業を繰り返した。室温において 5% HNO₃ 9 mL を添加し、2 時間静置し白色残渣物を溶解させた。このサンプルを Agilent

7700x/Mass Hunter ICP-MS（アジレントテクノロジー株式会社、カリフォルニア州、アメリカ合衆国）を用いて、細胞内の全 Zn 量を定量した。

1-2-10 Zn 錯体によるグルコース取り込み促進評価

分化誘導後 9-15 日の 3T3-L1 脂肪細胞を FBS 非含有 DMEM で 6 時間培養した後、3T3-L1 脂肪細胞を 100 nM インスリンまたは 50 μ M [Zn(hkt)₂] を溶解させたフェノールレッド非含有 FBS 非含有 DMEM を用いて 10 分間、37°C 条件下で刺激を行った。その後、刺激に用いたディッシュ中 DMEM をすべて回収し、グルコース取り込み量を DRI-CHEM4000sV（富士フィルム株式会社、東京）を用いて定量した。

1-2-11 統計解析法

得られた全ての実験結果は平均値および標準偏差として表し、統計的な有意差は Student's *t* 検定もしくは、Tukey-Kramer 法を用いて評価した。

1-3 結果

1-3-1 Zn 錯体の特性とその log P の測定

[Zn(trp)₂]と[Zn(hkt)₂]は以前に報告されている方法に従い作成し、その特性を測定した [41]。[Zn(trp)₂]と[Zn(hkt)₂]の物性データは Table 1-1 に示す通りである。これらの錯体構造は、元素分析、EI-MS、および赤外吸収スペクトルの結果から、Zn : 配位子 = 1 : 2 の比で結合した Zn(O₄)型配位様式であると推定した。配位子であるグルコン酸、トロポロン、ヒノキチオールでの赤外吸収スペクトルから O-H 結合および C=O 結合の伸縮振動に起因するスペクトルは、3,000-3,250 および 1,600 cm⁻¹ 付近で観測された。合成した Zn(II)錯体における赤外吸収スペクトルでは、O-H 伸縮振動に起因するスペクトルは消失し、C=O 結合による伸縮振動スペクトルは低波数側にシフトした (Table 1-1)。これらの結果から、Zn 錯体のヒドロキシル基およびカルボニル基の配位様式は Fig. 1-1 に示す構造であると示唆される。3 種類の Zn 錯体 ([Zn(glc)₂]、[Zn(trp)₂]、および[Zn(hkt)₂]) の log P 値は、クロロホルム/ HEPES (pH 7.4) 緩衝液系で測定し、Table 1-1 の結果を得た。

Table 1-1 Physicochemical properties of Zn(II) complexes

(*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 298-305., Table 1 より一部改変)

| Complexes (Chemical formula) | Elemental analysis (found/estimated) | | Infrared spectra (complex/ligand) ν(C=O) (cm ⁻¹) | EI(+) MS m/z | Partition coefficient (log P) | Yield (%) |
|---|---|---------------------|--|-------------------------|----------------------------------|-----------|
| | C (%) | H (%) | | | | |
| [Zn(glc) ₂]·2.5H ₂ O | 28.78 28.78 | 5.46 5.43 | 1600/1633 | – | -1.19 ± 0.78 | – |
| [Zn(trp) ₂]·0.5H ₂ O | 53.26 53.10 | 3.63 3.50 | 1595/1606 | – | 0.45 ± 0.02 | 65 |
| [Zn(hkt) ₂]·0.8H ₂ O | 59.40 59.14 | 5.91 5.86 | 1591/1608 | 390 [M] ⁺ | 0.81 ± 0.28 | 57 |

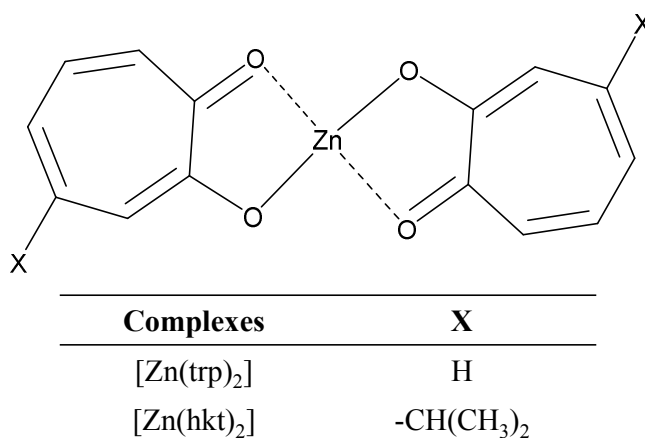


Fig. 1-1 Estimated structures of Zn complexes

(*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 298-305., Fig. 2 より一部改変)

1-3-2 3T3-L1 脂肪細胞に対する[Zn(hkt)₂]およびヒノキチオールによる細胞毒性についての検討

1-3-1 で合成した Zn 錯体のうち、細胞実験を行うにあたり[Zn(hkt)₂]および、その配位子であるヒノキチオールについて細胞毒性について検討を行った。分化誘導後 9-15 日目の 3T3-L1 脂肪細胞に対して[Zn(hkt)₂]、ヒノキチオールを処理し、0.2%トリパンブルー溶液を用いて細胞を染色し、顕微鏡で細胞の状態を検討した。20 μM [Zn(hkt)₂]、50 μM [Zn(hkt)₂]、40 μM ヒノキチオール、100 μM ヒノキチオール処理細胞のほか、比較のため、無処理、CNT (1% DMSO 含有) 処理細胞についても同様に 0.2%トリパンブルー溶液で染色を行った (Fig. 1-2)。その結果、今回の細胞毒性の検討に用いた [Zn(hkt)₂] およびヒノキチオールの濃度設定では細胞毒性を示さないことを確認した。

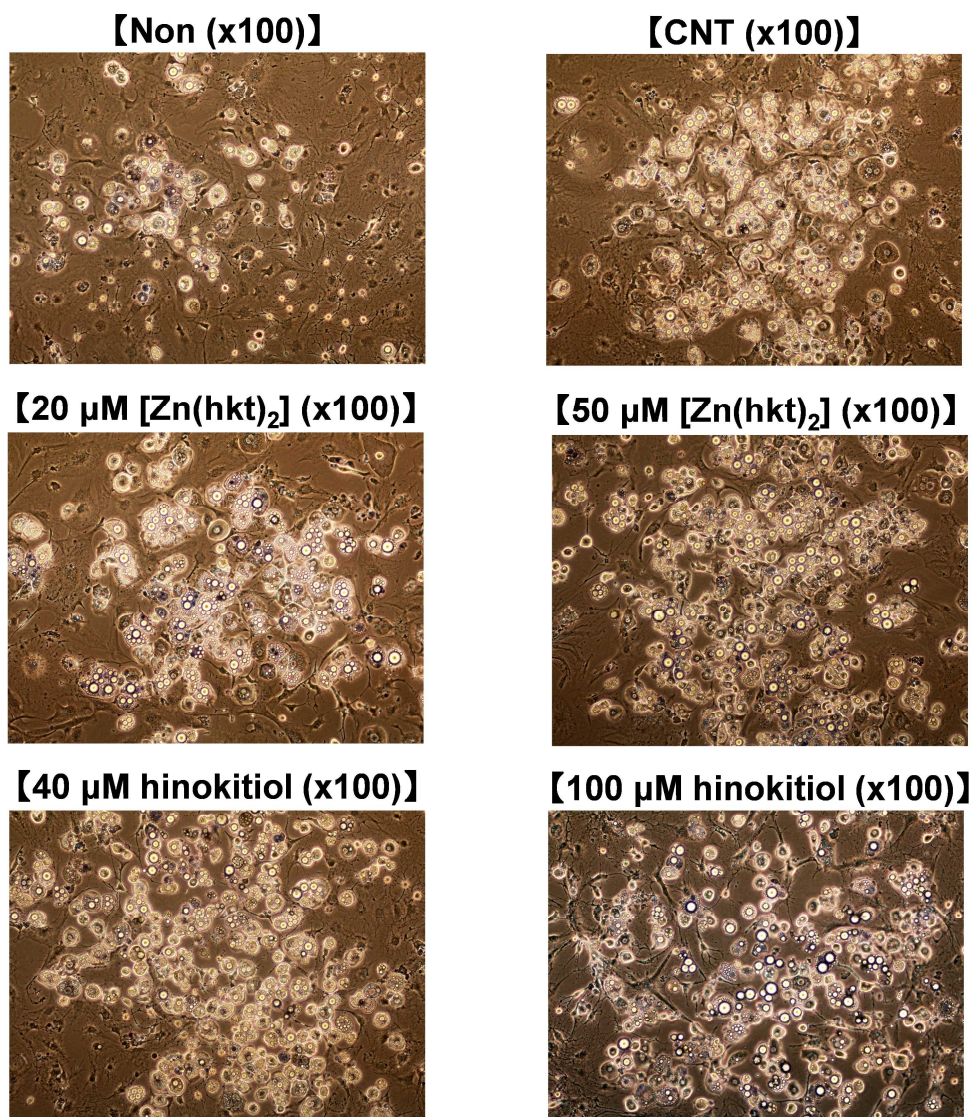


Fig. 1-2 Cell staining by 0.2% Trypan blue solution after 10-min sample treatment. The examination was conducted to analyze the cell toxicity of [Zn(hkt)₂] or hinokitiol. Serum-starved 3T3-L1 adipocytes were treated with [Zn(hkt)₂] or hinokitiol for 10 min and then analyzed by the trypan-blue staining.

1-3-3 3T3-L1 脂肪細胞でのインスリンシグナル経路における Akt リン酸化促進作用

3 種類の Zn 錯体によるインスリンシグナル経路への影響を検討するため、3T3-L1 脂肪細胞を無刺激 (Non)、コントロール (CNT; 1% DMSO)、100 nM インスリン及び 25 μ M Zn 錯体で刺激し、37°C、10 分間インキュベートした。その結果、[Zn(hkt)₂] の刺激による Akt タンパク質のリン酸化促進効果が最も高かった (Fig. 1-3)。

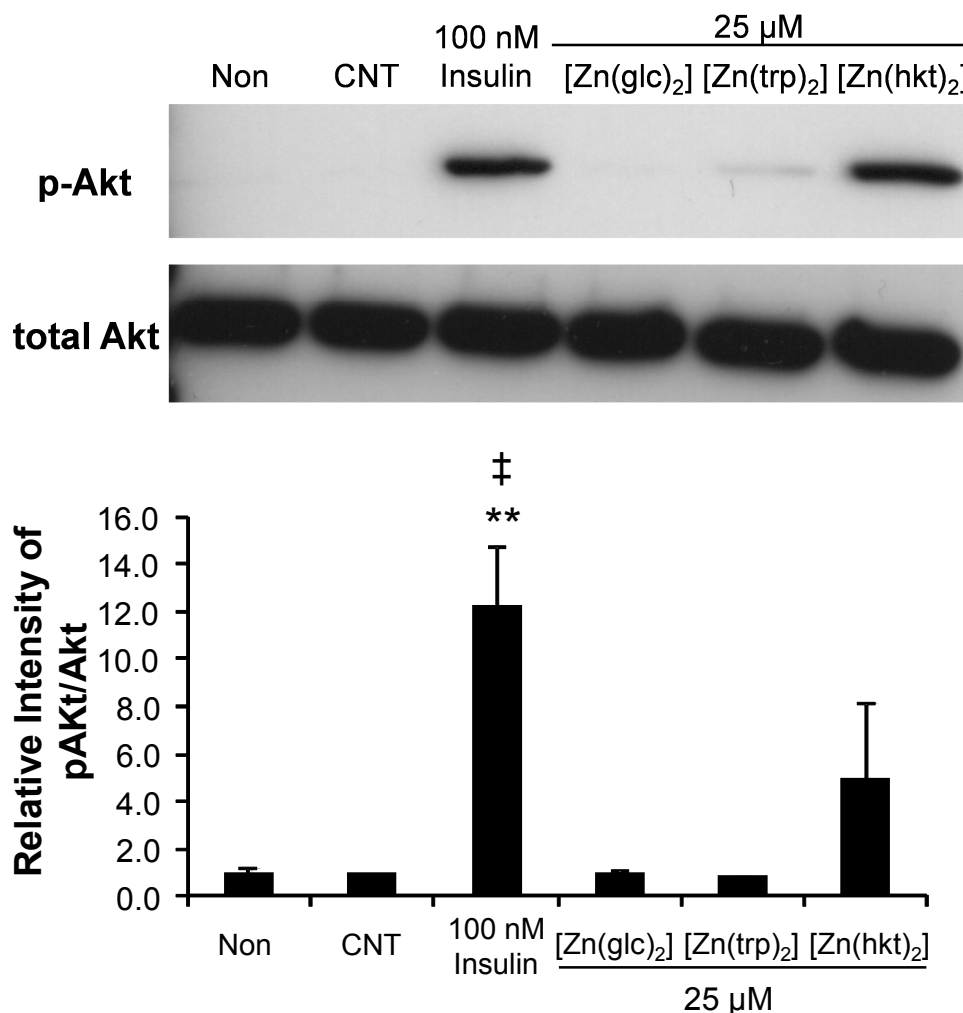


Fig. 1-3 Akt/PKB phosphorylation by Zn(II) complexes.

Serum-starved 3T3-L1 adipocytes were treated with 25 μ M Zn complexes for 10 min. The cell lysates (10 μ g of protein) were separated with 10% SDS-PAGE, and immunoblotted with phospho-Akt (p-Akt) and Akt antibodies. Data are expressed as the means and standard deviations for three separated experiments. Significance: [‡] $P < 0.01$ vs. Non, ^{**} $P < 0.01$ vs. CNT

(*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 298-305., Fig. 3 (A), (B)より一部改変)

1-3-4 Akt および GSK3 β リン酸化促進効果における[Zn(hkt)₂]の濃度依存性評価

[Zn(hkt)₂]が他の2種類のZn錯体よりもリン酸化促進効果が高かったため、以降の検討では、[Zn(hkt)₂]に注目した。

Akt および GSK3 β に対するリン酸化促進効果が[Zn(hkt)₂]濃度依存的なものであるか検討するため、[Zn(hkt)₂]を終濃度 10、25、および 50 μ M となるように調製し、3T3-L1 脂肪細胞に 37°C で 10 分間作用させた。本実験では、Akt のリン酸化促進効果だけでなく、GSK3 β のリン酸化促進効果についても併せて検討を行った。Fig. 1-4 (A)に[Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進効果について、Fig. 1-4 (B)には GSK3 β のリン酸化促進効果について示した。Fig. 1-4 (A)と(B)から[Zn(hkt)₂]は濃度依存的に Akt、GSK3 β のリン酸化促進効果を示すことが分かった。特に、50 μ M [Zn(hkt)₂]は Akt リン酸化を強く促進する結果となった。

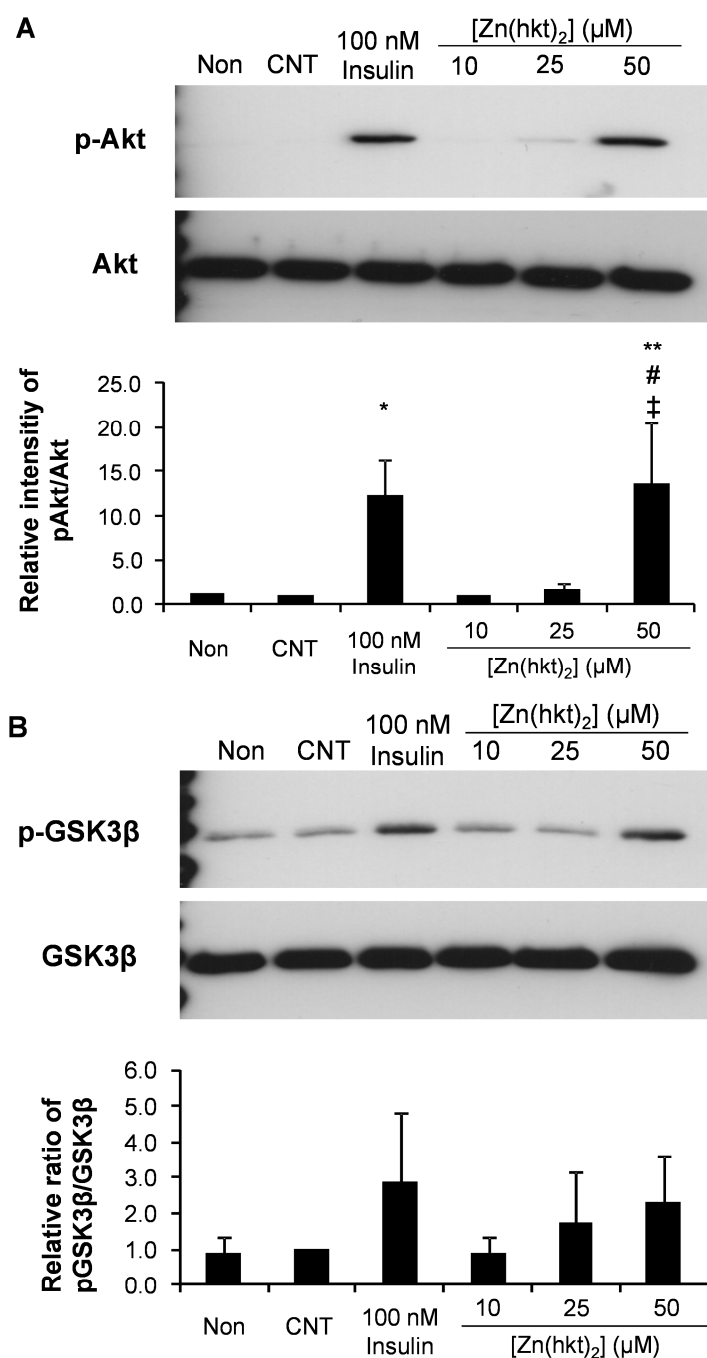


Fig. 1-4 Concentration-dependent Akt (A) and GSK3β (B) phosphorylation by [Zn(hkt)₂]. Serum-starved 3T3-L1 adipocytes were treated with the different concentration of [Zn(hkt)₂] for 10 min and the cell lysates (10 μg of protein) were separated with 10% SDS-PAGE, and immunoblotted with phospho-Akt (p-Akt) and Akt antibodies or phospho-GSK3β (p-GSK3β) and GSK3β antibodies. Data are expressed as the means and standard deviations for three separated experiments. Significance: **P* < 0.05 vs. CNT, ***P* < 0.01 vs. CNT, #*P* < 0.01 vs. 10 μM [Zn(hkt)₂], ‡*P* < 0.01 vs. 25 μM [Zn(hkt)₂]

(*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 298-305., Fig. 4 より一部改変)

1-3-5 [Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進効果における時間依存性評価

[Zn(hkt)₂]による濃度依存的な Akt リン酸化促進効果が判明したことから、時間依存性についても併せて検討を行った (Fig. 1-5)。20 μM [Zn(hkt)₂]を 10、20、30 分間 3T3-L1 脂肪細胞に処理すると、時間依存的に Akt リン酸化促進効果が上昇し、20 分処理時および 30 分処理時には有意なリン酸化促進効果が見られた。ポジティブコントロールには 1 nM インスリンを使用し、インスリン処理サンプルについては時間依存的にリン酸化促進効果が減少する傾向が観察された。

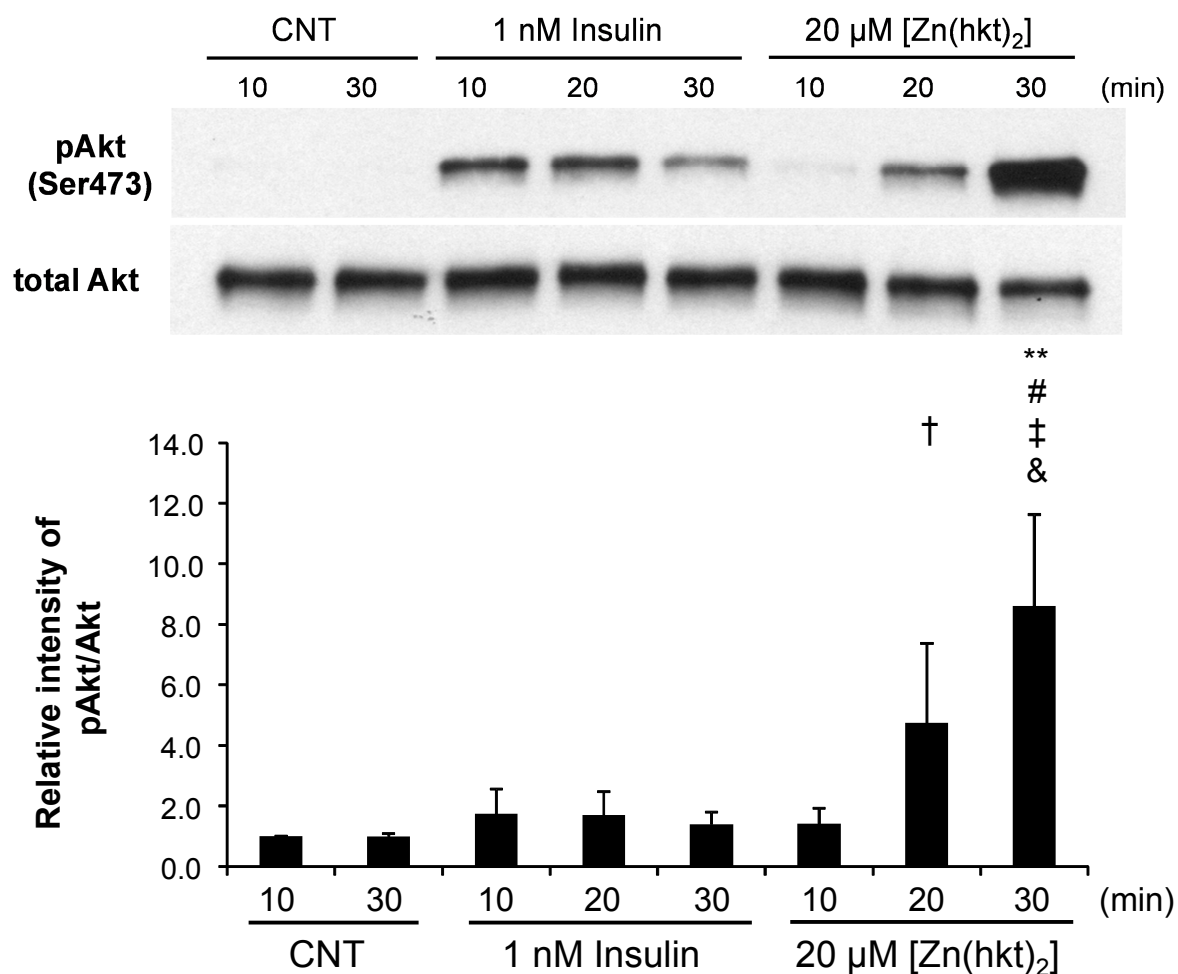


Fig. 1-5 Effects of [Zn(hkt)₂] on Akt phosphorylation with respect to time in 3T3-L1 adipocytes.

Serum-starved 3T3-L1 adipocytes were treated with 20 μM Zn complexes for 10, 20, and 30 min. The cell lysates were separated with 10% SDS-PAGE and immunoblotted with phospho-Akt (p-Akt) and Akt antibodies. Data are expressed as means and standard deviations for three independent experiments. Significance: ***P* < 0.01 vs. CNT 30min-treatment, #*P* < 0.01 vs. insulin 30 min-treatment, †*P* < 0.05 vs. [Zn(hkt)₂] 10 min-treatment, ‡*P* < 0.01 vs. [Zn(hkt)₂] 10 min-treatment, &*P* < 0.01 vs. [Zn(hkt)₂] 20 min-treatment

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. 2 (A))

1-3-6 インスリン併用刺激時における Akt リン酸化促進効果への影響

[Zn(hkt)₂]を単独で作用させた場合、Akt リン酸化促進効果が濃度依存的、時間依存的に得られることが分かった。そこで、インスリンを併用して3T3-L1 脂肪細胞に作用させた場合のリン酸化促進効果について検討を行った。併用刺激に用いるインスリンは1 nM とした。結果、1 nM インスリンと 20 μM [Zn(hkt)₂]併用刺激サンプルでは、20 μM [Zn(hkt)₂]単独刺激サンプルに比べて有意にリン酸化促進効果が上昇した (Fig. 1-6)。インスリンと[Zn(hkt)₂]を併用することによって、相加効果が得られることが分かった。

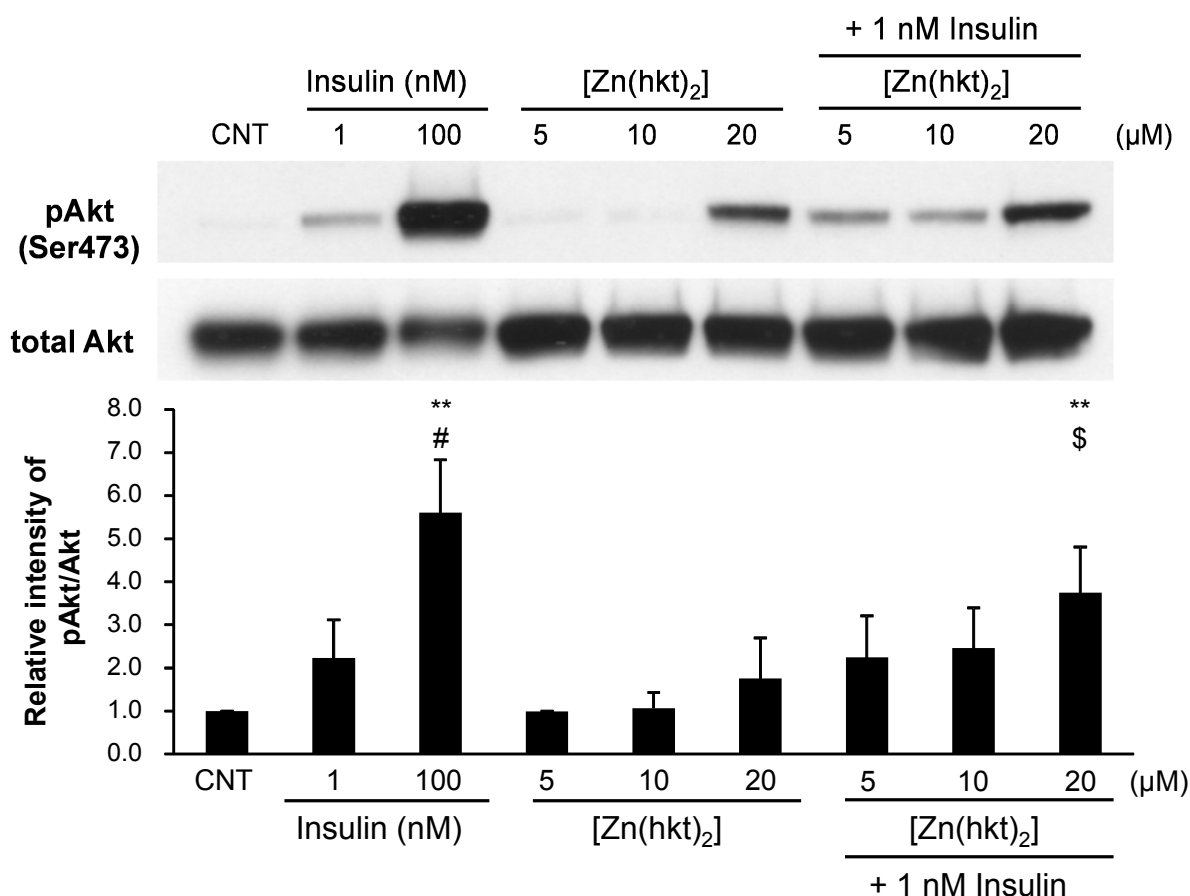


Fig. 1-6 Effects of [Zn(hkt)₂] on Akt phosphorylation by the combined stimulation with 1 nM insulin + [Zn(hkt)₂].

Serum-starved 3T3-L1 adipocytes were treated with the combination of 1 nM insulin + Zn complexes for 10 min. The cell lysates were separated with 10% SDS-PAGE and immunoblotted with phospho-Akt (p-Akt) and Akt antibodies. Data are expressed as the means and standard deviations for six to seven experiments. Significance: ^{**}*P* < 0.01 vs. CNT, [#]*P* < 0.01 vs. 1nM insulin, ^{\$}*P* < 0.05 vs. 20 μM [Zn(hkt)₂]

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. 2 (B))

1-3-7 キレート剤処理時の[Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進効果への変化

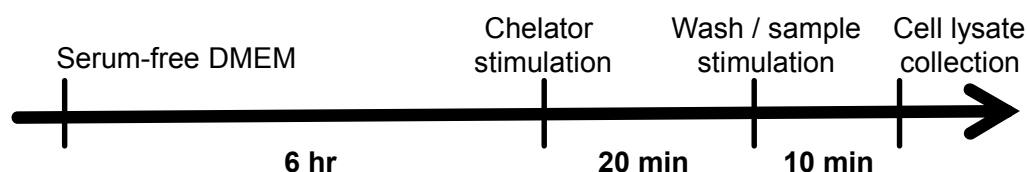
[Zn(hkt)₂]の示す Akt リン酸化促進効果が、3T3-L1 脂肪細胞の膜表面に作用した結果もたらされるものであるのか、もしくは、[Zn(hkt)₂]が細胞内に取り込まれた後に Akt リン酸化活性化をもたらしているものかを検討するために、キレート剤である DTPA 及び TPEN を用いて実験を行った。なお、DTPA は細胞外キレート剤、TPEN は細胞内キレート剤として実験に用いた。

3T3-L1 脂肪細胞に対して 50 μM のキレート剤を 20 分間処理した後に、20 μM [Zn(hkt)₂]を 10 分間刺激した (<Pre-treatment 実験>)。DTPA 処理時における [Zn(hkt)₂]の Akt リン酸化促進作用は、DTPA 未処理サンプルと比較して、変化は見られなかった (Fig. 1-7 (A))。一方で、TPEN 処理時における促進作用は、抑制された (Fig. 1-7 (B))。これらの結果から、[Zn(hkt)₂]は細胞内へ輸送された後、インスリンシグナル経路を活性化していることが考えられる。

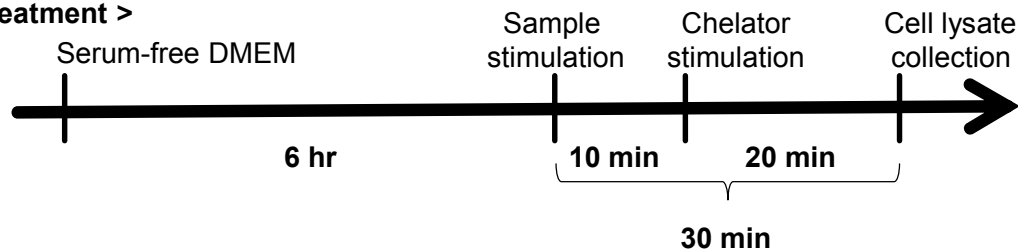
そこで、[Zn(hkt)₂]を作用させた後に、キレート剤を添加した場合の Akt リン酸化促進効果について検討を行った。[Zn(hkt)₂]を 10 分間刺激した後にキレート剤を 20 分間作用させた (<After-treatment 実験>)。キレート剤として DTPA、TPEN のいずれを使用しても Akt のリン酸化促進効果は著しく抑制された (Fig. 1-8 (A), (B))。これらの結果から、キレート剤を添加すると [Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進作用は抑制されること、また、[Zn(hkt)₂]は時間依存的に細胞内へ取り込まれ、細胞内でインスリンシグナル経路を活性化させることがわかった。

なお、本キレート剤添加の実験 (Figs. 1-7, 1-8) におけるタイムスキームを以下に示す (Scheme 1-1)。

<Pre-treatment>



<After-treatment >



Scheme 1-1

Time scheme of sample treatment using chelators on the chelators experiments

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Scheme 1 より一部改変)

A

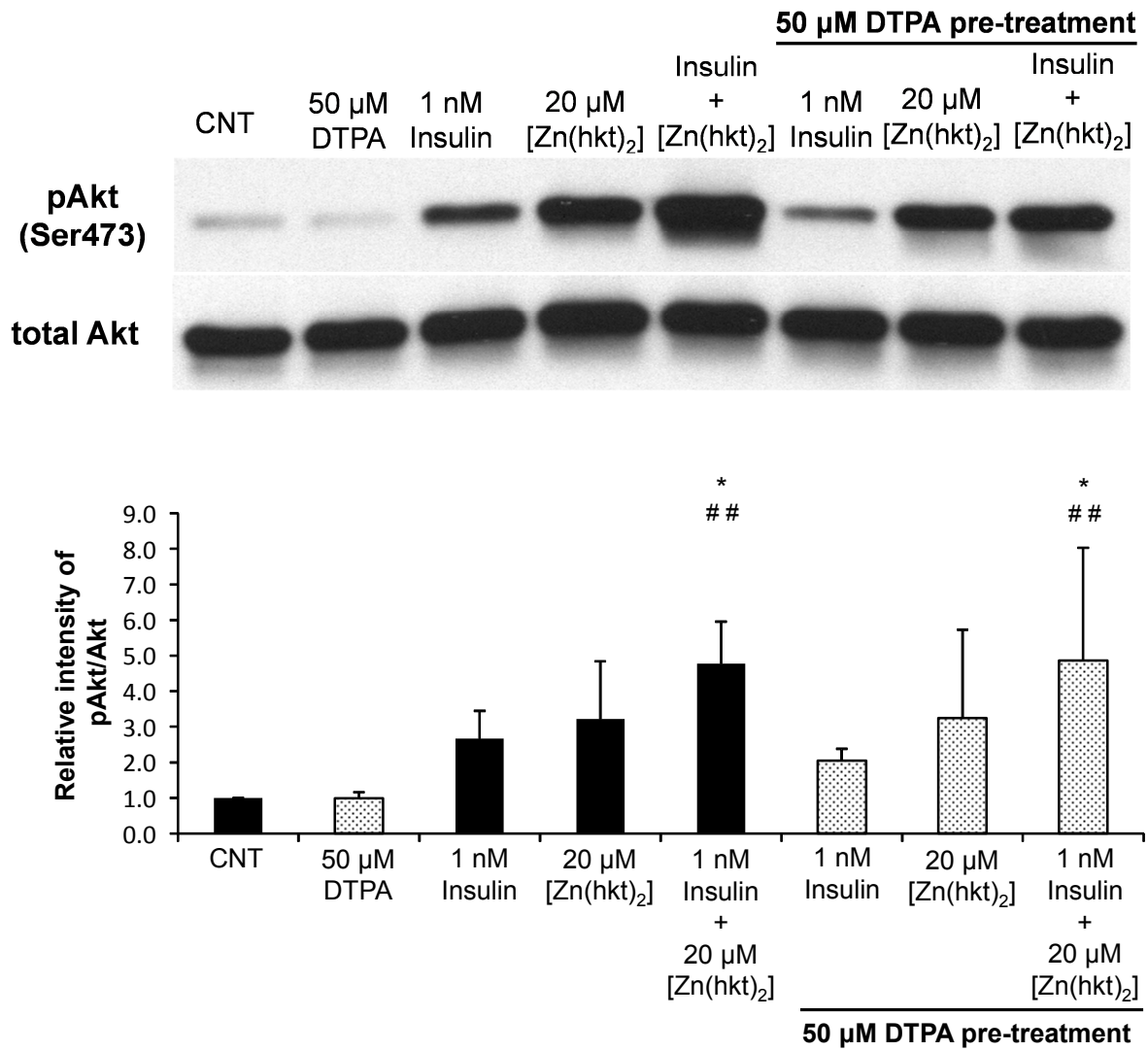


Fig. 1-7 Continued

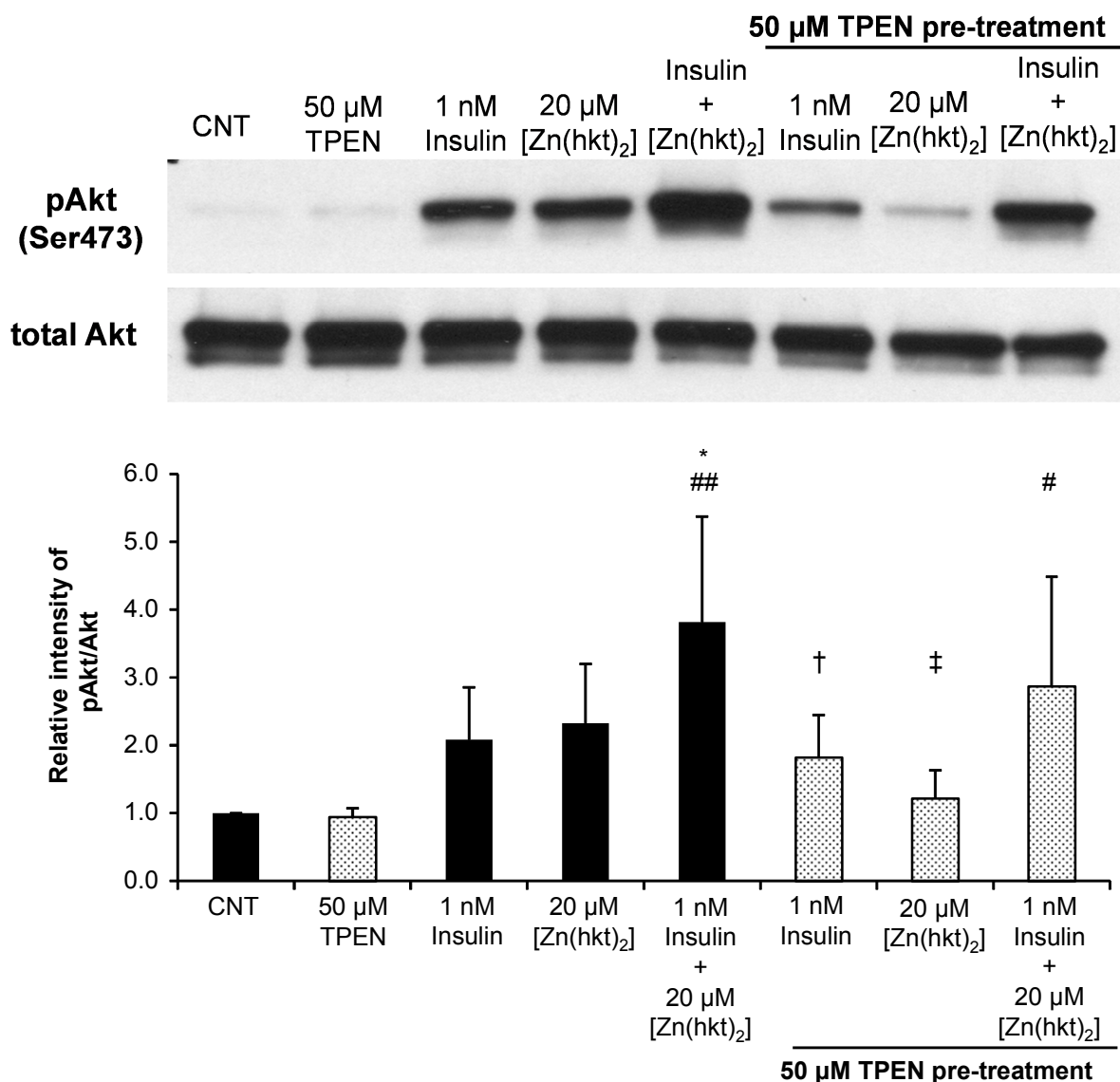
B

Fig. 1-7 Effects of [Zn(hkt)₂] on Akt phosphorylation (A) after pre-treatment with 50 μM DTPA and (B) 50 μM TPEN.

Serum-starved 3T3-L1 adipocytes were treated with chelators for 20 min. Cells were then washed with ice-cold PBS and stimulated with [Zn(hkt)₂] for 10 min. The lysates (10 μg) were separated with 10% SDS-PAGE and immunoblotted with phospho-Akt (p-Akt) and Akt antibodies. Data are expressed as the means and standard deviations for five to six experiments. Significance: **P* < 0.01 vs. CNT, #*P* < 0.05 vs. 50 μM chelator, ##*P* < 0.01 vs. 50 μM chelator, †*P* < 0.05 vs. 1nM insulin + 20 μM [Zn(hkt)₂], ‡*P* < 0.01 vs. 1 nM insulin + 20 μM [Zn(hkt)₂]

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. 3 (A), (B))

A

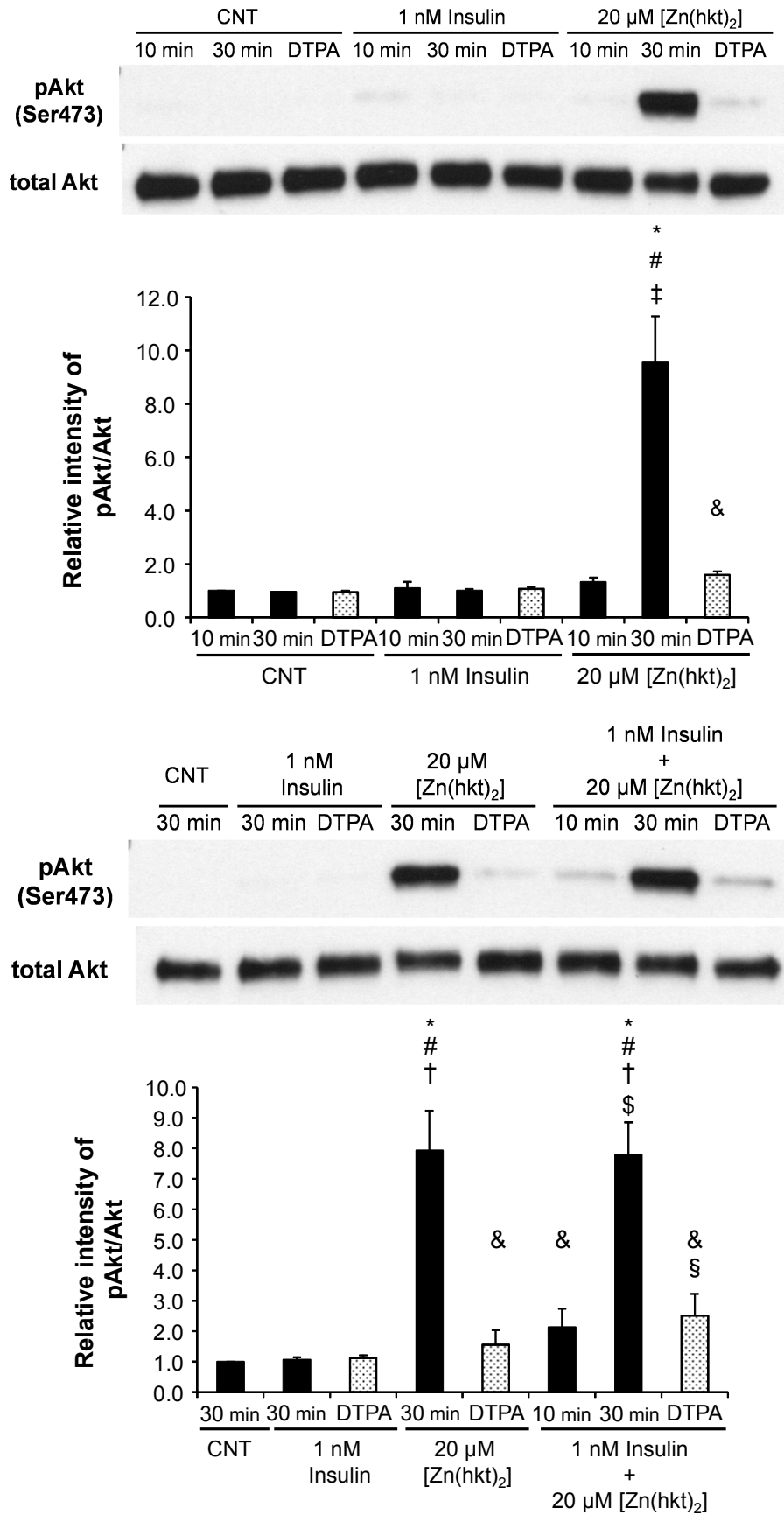


Fig. 1-8 Continued

B

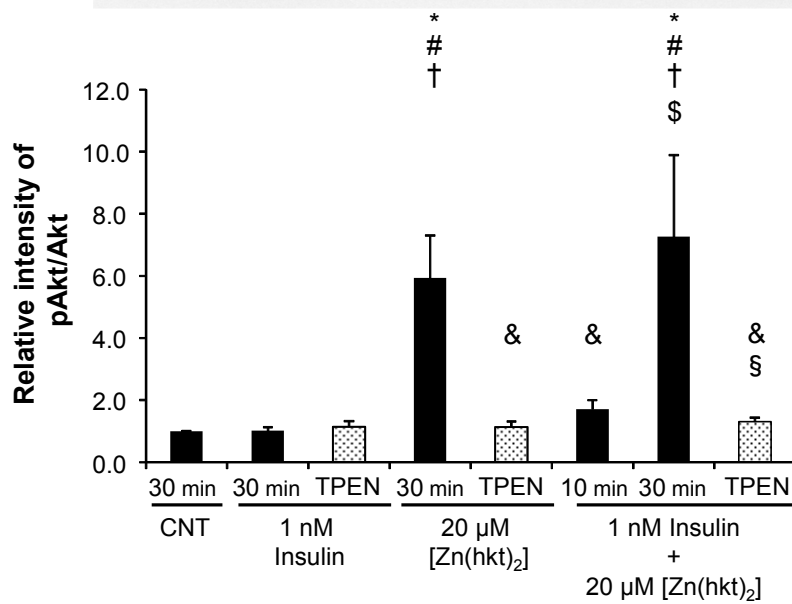
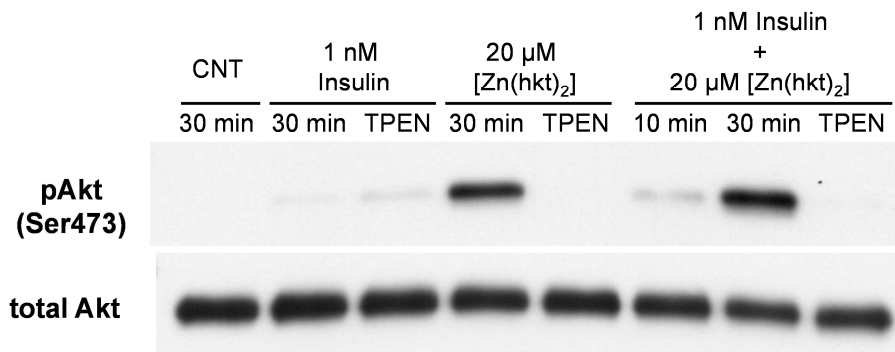
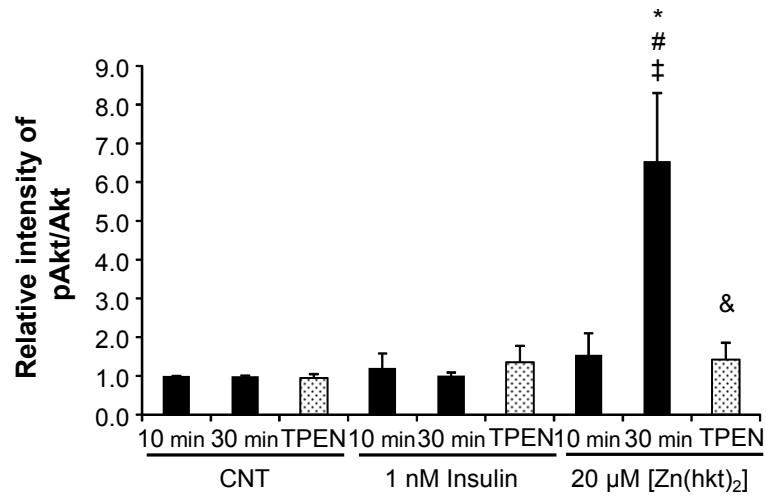
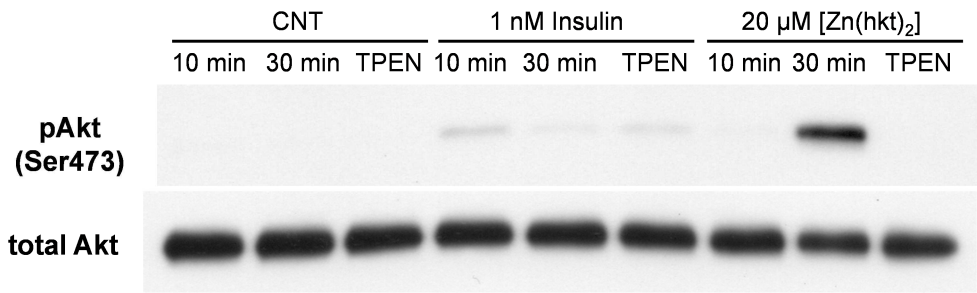


Fig. 1-8 Continued

Fig. 1-8 Effects of [Zn(hkt)₂] on Akt phosphorylation (A) after treatment with 50 μM DTPA and (B) 50 μM TPEN.

Serum-starved 3T3-L1 adipocytes were treated with [Zn(hkt)₂] for 10 min. Then, chelator was added to the cells, when [Zn(hkt)₂] was still present, for 20 min. The lysates were separated with 10% SDS-PAGE and immunoblotted with phospho-Akt (p-Akt) and Akt antibodies. Data are expressed as the means and standard deviations of four independent experiments. The upper western blotting data and bar graph showed the differences of Akt phosphorylation between insulin or [Zn(hkt)₂] treatment on time-dependency and chelators treatment. The bottom ones showed the results of the combined effect using chelators comparing the single treatment of insulin or [Zn(hkt)₂]. Significance: **P* < 0.01 vs. 30-min CNT treatment, #*P* < 0.01 vs. 30-min insulin treatment, †*P* < 0.01 vs. insulin + Zn²⁺ chelator treatment, ‡*P* < 0.01 vs. 10-min [Zn(hkt)₂] treatment, &*P* < 0.01 vs. 30-min [Zn(hkt)₂] treatment, §*P* < 0.01 vs. 10-min insulin + [Zn(hkt)₂] treatment, §*P* < 0.01 vs. 30-min insulin + [Zn(hkt)₂] treatment

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. 4 (A), (B))

1-3-8 PI3K 阻害剤ワートマニン処理下における[Zn(hkt)₂]の Akt リン酸化促進効果への影響

[Zn(hkt)₂]が Akt を直接的にリン酸化させているかどうかの検討を行うため、本実験では PI3K 阻害剤であるワートマニンを用いて検討した。[Zn(hkt)₂]が Akt に直接的に作用しリン酸化を促進している場合、ワートマニン処理条件下においても[Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進効果は観察されるはずである。一方、[Zn(hkt)₂]による作用が Akt に対して間接的である場合は、ワートマニン処理下における[Zn(hkt)₂]の Akt リン酸化促進効果は抑制されると仮定した。

3T3-L1 脂肪細胞は無血清処理後、ワートマニン処理群には 100 nM ワートマニンを 60 分間、37°C でインキュベートし処理を行った。ワートマニン未処理群については、無血清処理細胞に対して引き続き無血清 DMEM を用いて 60 分間、37°C でインキュベートした。その後、両群ともに 100 nM インスリンまたは 50 μM [Zn(hkt)₂]を用いて、10 分間、37°C 条件下で刺激を与えた。ワートマニン処理条件下における[Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進作用は、ワートマニン未処理群に比べ約 80%抑制された。インスリンによる Akt リン酸化促進効果については、ワートマニン未処理/処理群の間では約 70%の差があった。(Fig. 1-9 (A))。また、ワートマニン処理によって GSK3β のリン酸化促進効果が減少した。しかしながら、この GSK3β リン酸化促進効果の減少は、ワートマニン処理時の Akt リン酸化促進効果でみられたような強い抑制効果ではなく (Fig. 1-9 (B))、GSK3β リン酸化抑制は部分的なものであった。

これらの結果から、ワートマニン処理によって PI3K の機能が阻害された 3T3-L1 脂肪細胞での Akt 活性化、すなわちリン酸化促進効果は減少した。よって、[Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進効果は PI3K を介するものであり、これらの結果は[Zn(hkt)₂]が PI3K の上流に存在する IRβ および IRS-1 に対して作用し、結果として Akt を間接的に活性化していることを示唆している。

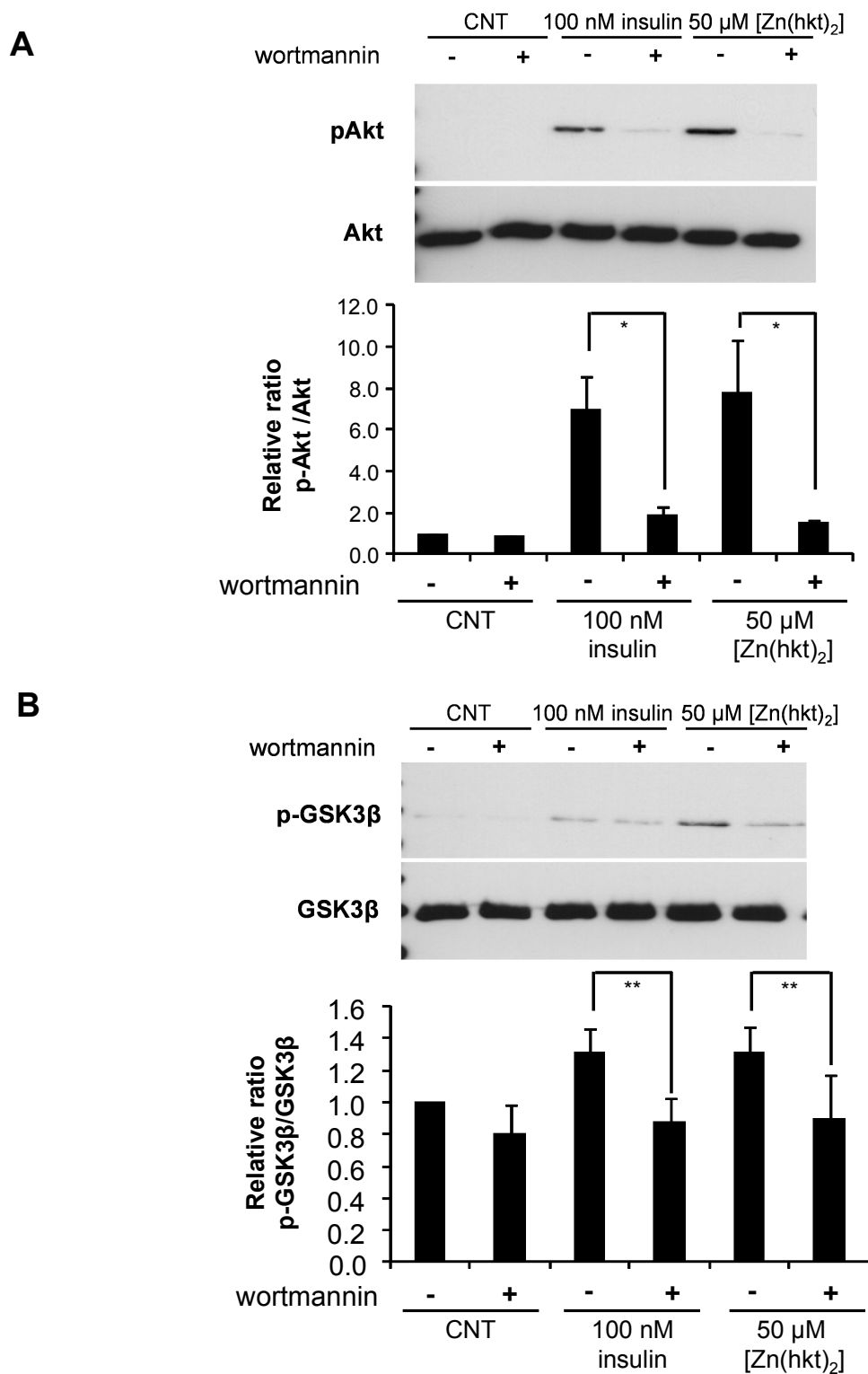


Fig. 1-9 Inhibitory affect of wortmannin on [Zn(hkt)₂]-induced both Akt (A) and GSK3 β (B) phosphorylation.

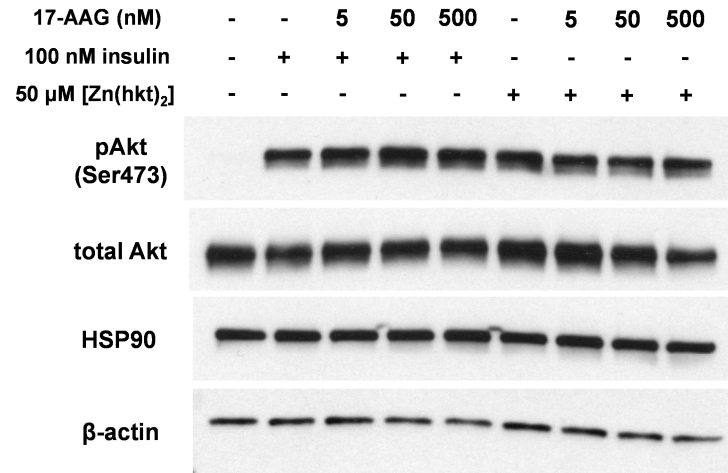
The cells were pretreated with (+) or without (-) 100 nM wortmannin for 60 min, then incubated with 100 nM insulin and 50 μ M [Zn(hkt)₂]. The cell lysates (10 μ g of protein) were separated with 10% SDS-PAGE, and immunoblotted with phospho-Akt (p-Akt) and Akt antibodies or with phospho-GSK3 β (p-GSK3 β) and GSK3 β antibodies. Data are expressed as the means and standard deviations for three separated experiments in Akt

phosphorylation experiments and for five separated experiments in GSK3 β phosphorylation experiments. Significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. wortmannin (-)

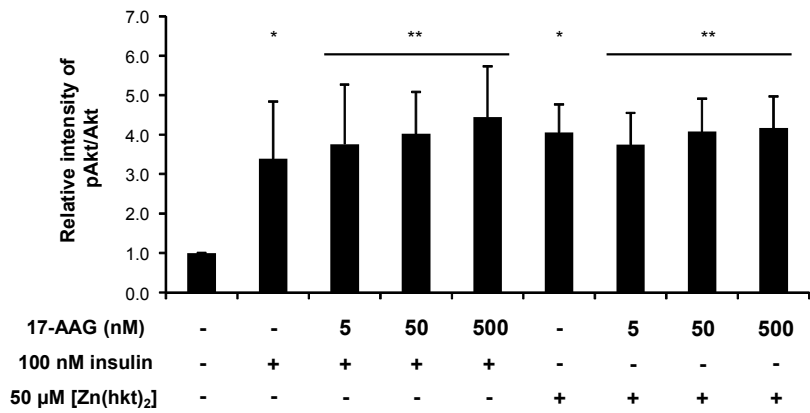
(*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 298-305., Fig. 5 より一部改変)

1-3-9 HSP90 の阻害剤であるタネスピマイシン (17-AAG) 処理時における[Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進効果への影響

[Zn(hkt)₂]が Akt のリン酸化を促進させることはこれまでの結果で示した通りである。しかしながら、この[Zn(hkt)₂]が示す Akt に対するリン酸化促進効果が、インスリンシグナル経路によるものだけかは明確には分かっていない。そこで Akt に関連するシグナル経路の中で HSP90 というタンパク質に注目した。HSP90 は Akt と結合することで、Akt の活性化を維持する。そこで、[Zn(hkt)₂]が示す Akt のリン酸化促進効果について、[Zn(hkt)₂]が HSP90 に対して作用を示した結果、リン酸化 Akt の発現上昇につながるのかを検討するため、HSP90 特異的阻害剤である 17-AAG を用いて検討した。17-AAG を濃度依存的 (5-500 nM) に 6 時間 3T3-L1 脂肪細胞に処理した後、50 μM [Zn(hkt)₂]を 10 分間刺激した。その結果、17-AAG 処理の有無による Akt のリン酸化促進効果の変化は見られず、また同時に HSP90 の発現減少も見られなかった (Fig. 1-10)。このことから、[Zn(hkt)₂]が示すリン酸化促進効果には HSP90 は関与せず、Akt よりも上流である PI3K に対して影響を示すことで、リン酸化促進効果を発揮していると考えられる。



A



B

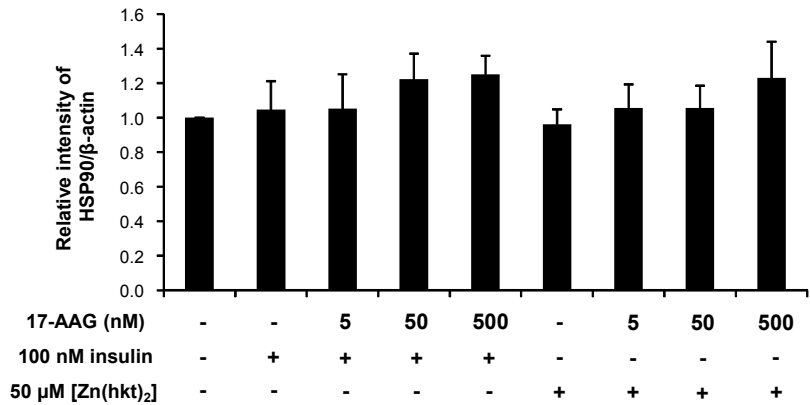


Fig. 1-10 Effect of [Zn(hkt)₂] on HSP90-related Akt phosphorylation (A) and HSP-90 protein expression (B).

The cells were pretreated with 5-500 nM 17-AAG for 6 h, and then incubated with 100 nM insulin or 50 μ M [Zn(hkt)₂]. The cell lysates (5 μ g of protein) were separated with 10% SDS-PAGE, and immunoblotted with phospho-Akt (p-Akt) and Akt antibodies. Data are expressed as the means and standard deviations for four separated experiments. Significance: **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. CNT

1-3-10 免疫沈降法を用いた[Zn(hkt)₂]によるインスリンシグナル上流に存在する IRβ、IRS-1 への影響

これまでの結果より、[Zn(hkt)₂]によるインスリンシグナル経路への影響はインスリンシグナル経路上流へ作用していることが示唆された。そこでより詳細な検討を行うため、免疫沈降法を用いて IRβ、IRS-1 のチロシンリン酸化活性について評価を行った。これまでの実験と同様に[Zn(hkt)₂]を単独で 3T3-L1 脂肪細胞に 10 分間、37°C においてインキュベート処理した場合、IRβ、IRS-1 におけるチロシンリン酸化活性は見られなかった (Fig. 1-11)。過去の報告から亜鉛マルトール錯体 ([Zn(mal)₂]) をインスリンと併用することによって、亜鉛錯体の示すインスリン様作用が増強するという知見が得られている[42]。そこで、本実験においてインスリンを併用した場合のシグナルへの影響を検討した。1 nM インスリンと[Zn(hkt)₂]を併用して 3T3-L1 脂肪細胞に作用させた場合のチロシンリン酸化の変化について検討を行った (Fig. 1-12 (A))。この時、IRβ、IRS-1 に対するチロシンリン酸化促進効果は見られなかった。一方でインスリン高用量 (100 nM インスリン) を併用して細胞を刺激した場合、チロシンリン酸化活性は起こり、また IRβ に対して 100 nM インスリンと 50 μM [Zn(hkt)₂]の併用サンプル処理時に、有意なチロシンリン酸化活性が見られた (Fig. 1-12 (B))。すなわち、[Zn(hkt)₂]はインスリンの働きを強める作用があることを見出した。

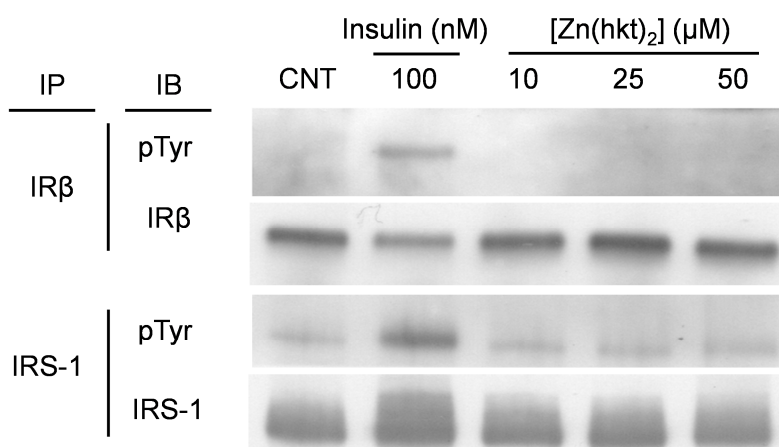


Fig. 1-11 Effects of [Zn(hkt)₂] on tyrosine phosphorylation of IRβ and IRS-1 for a 10-min treatment.

The cells were treated with 10-50 μM [Zn(hkt)₂] for 10 min. As an immunoprecipitation control, membranes were reprobed with anti-IRβ (insulin receptor β (4B8) rabbit mAb), or anti-IRS-1 (IRS-1 (D23G12) rabbit mAb).

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. S1)

A

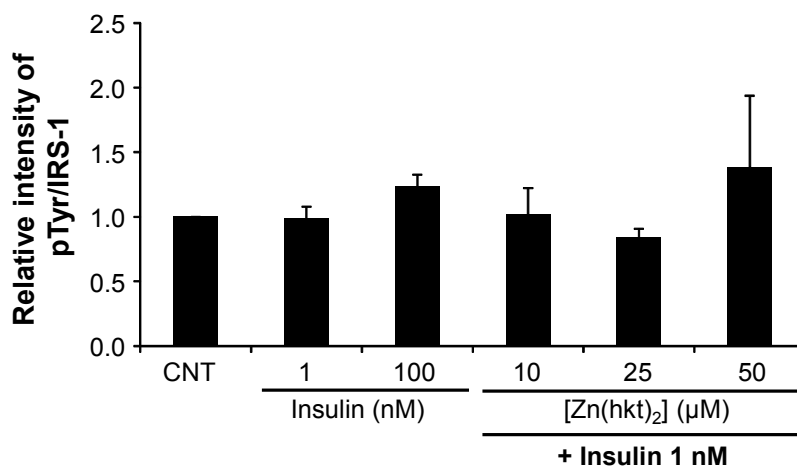
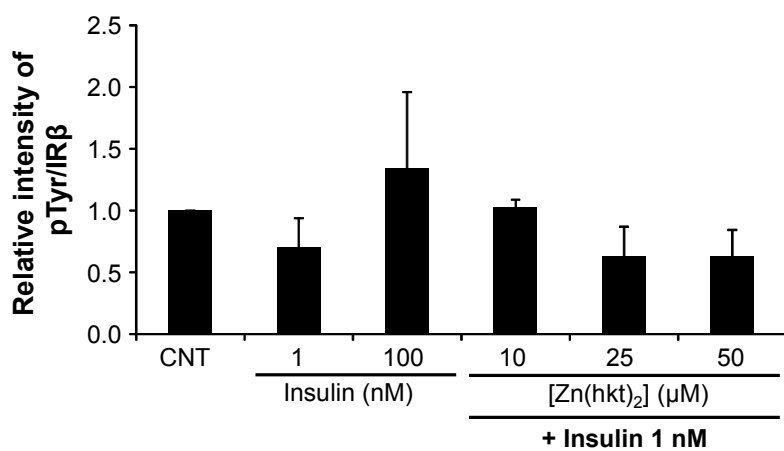
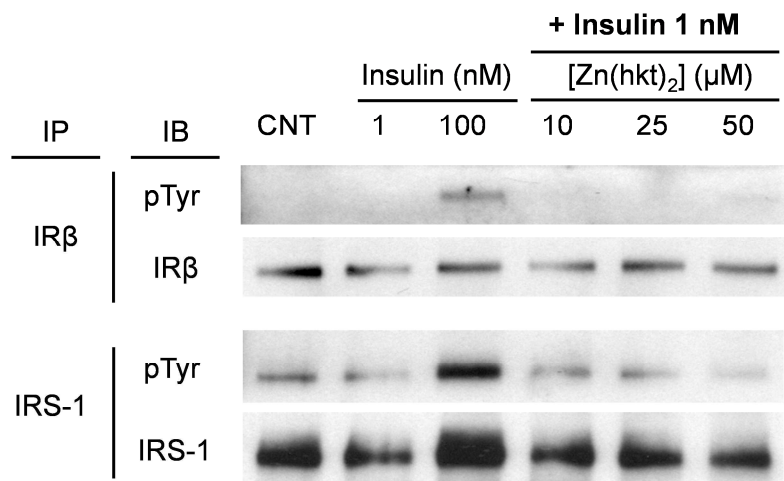


Fig. 1-12 Continued

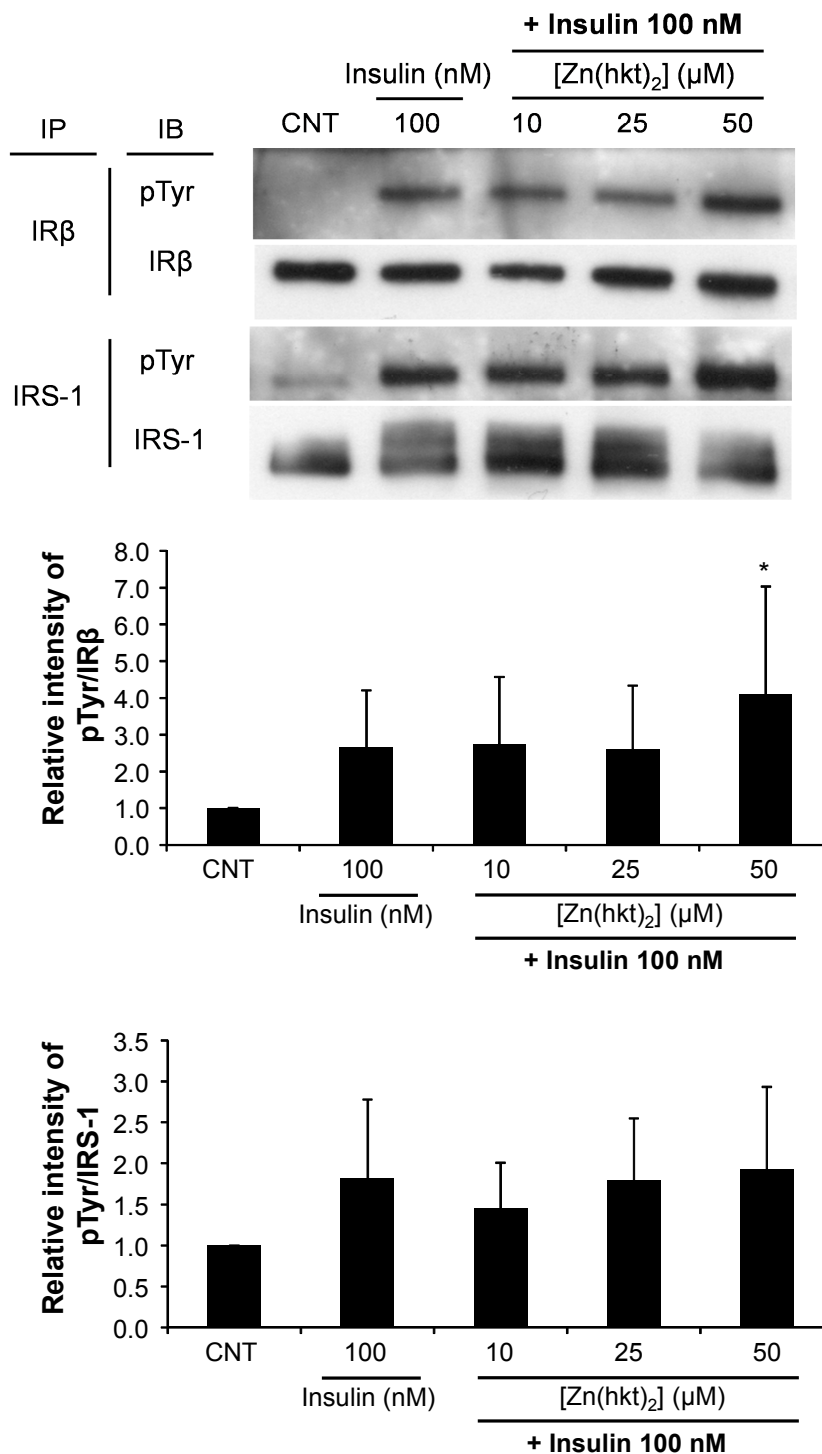
B

Fig. 1-12 Effects of the combination of insulin + [Zn(hkt)₂] on tyrosine phosphorylation of IRβ and IRS-1 for a 10-min treatment.

The cells were treated with (a) a low dose of insulin, 1 nM, and (b) a high dose of insulin, 100 nM. Data are expressed as the means and standard deviations for four to seven experiments. Significance: **P* < 0.05 vs. CNT

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. 6)

1-3-11 PTP1B および PTEN に対する [Zn(hkt)₂] による阻害活性

PTP1B の酵素活性に対して、Zn イオンが阻害活性を示すことは、過去に報告されている[43, 44]。そこで、Zn 錯体である [Zn(hkt)₂] による PTP1B への阻害活性について検討を行った。[Zn(hkt)₂] は PTP1B の pNPP に対するリン酸加水分解反応を阻害し、その IC₅₀ 値は 40.3 μM であった (Table 1-2)。なお、本実験において Na₃VO₄ は PTP1B 阻害作用を示すポジティブコントロールとして使用した。

また、PTEN はインスリンシグナル経路において PIP₃ の脱リン酸化をおこし、インスリンシグナル経路においてシグナル伝達を抑制する働きをすることが知られている。この PTEN に対する 100 μM [Zn(hkt)₂] 時の阻害活性についてマラカイトグリーン法を用いて検討を行った。阻害活性の強度を比較するため 100 μM ZnSO₄、200 μM ヒノキチオールについても検討を行った。その結果、100 μM [Zn(hkt)₂] が PTEN に対して最も強い阻害作用を示した (Fig. 1-13)。

Table 1-2 Inhibitory activity on PTP1B (*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Table 2)

| Sample | IC ₅₀ (μM) |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Na ₃ VO ₄ | 3.0 ± 0.3 |
| ZnSO ₄ | 22.4 ± 1.0 |
| [Zn(hkt) ₂] | 40.3 ± 3.6 |
| hinokitiol | 432.6 ± 33.5 ^{#, ‡, &} |

Significant difference: [#] *P* < 0.01 vs. Na₃VO₄, [‡] *P* < 0.01 vs. ZnSO₄, [&] *P* < 0.01 vs. [Zn(hkt)₂]

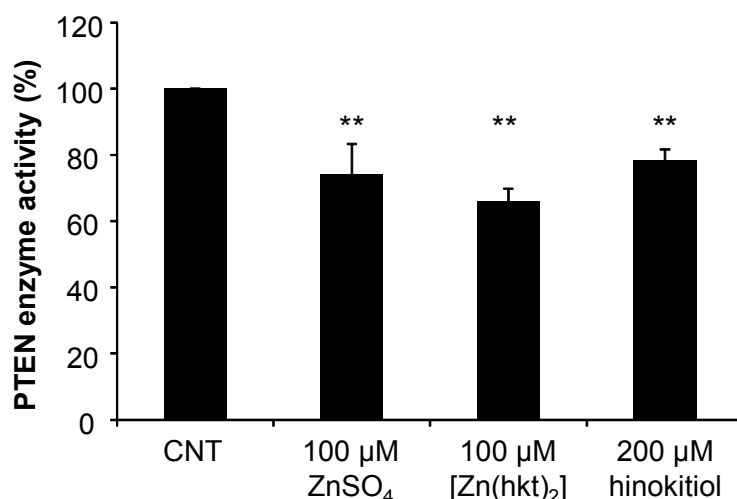


Fig. 1-13 [Zn(hkt)₂] inhibited *in vitro* PTEN enzyme activity.

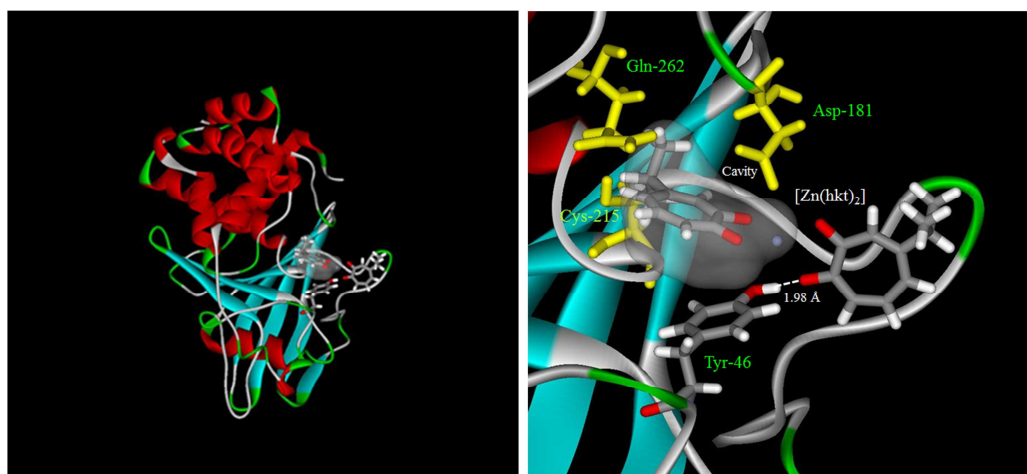
Data are expressed as the means and standard deviations for three to four experiments. Significance: ***P* < 0.01 vs. CNT

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. 7)

1-3-12 [Zn(hkt)₂]による PTP1B および PTEN へのドッキングシミュレーションを用いた検討

1-3-11 の酵素阻害実験により、[Zn(hkt)₂]が PTP1B と PTEN へ作用していることが示唆された。そこで、[Zn(hkt)₂]が錯体として両酵素へ接近し、作用することが可能であるのかドッキングシミュレーションを用いて検討を行った。なお、PTP1B と PTEN の三次元構造は、UniProt から情報を得て、シミュレーションに用いた。計算の結果、[Zn(hkt)₂]は PTP1B と PTEN の両酵素に対して、その活性部位に錯体として接近し、水素結合を形成することが可能であることがわかった (Fig. 1-14)。

A



B

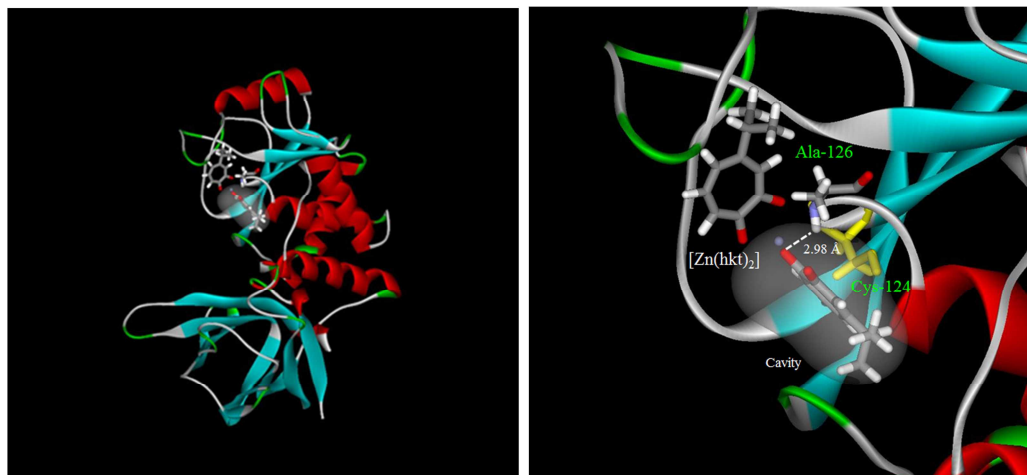


Fig. 1-14 Molecular modeling of [Zn(hkt)₂] interactions with (A) PTP1B and (B) PTEN. We evaluated the docking models by simulations based on Rerank Scores reported in Yang JM, Chen CC, GEMDOCK (2015) Proteins 55: 288-304.

(A) left: the whole view of the interaction with human PTP1B and [Zn(hkt)₂], right: the magnified view of the interaction of human PTP1B and [Zn(hkt)₂] with amino acids
(B) left: the whole view of the interaction with human PTEN and [Zn(hkt)₂], right: the magnified view of the interaction of human PTEN and [Zn(hkt)₂] with amino acids.

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. S2)

1-3-13 [Zn(hkt)₂]の3T3-L1脂肪細胞内への取り込み評価

これまでの実験結果より、[Zn(hkt)₂]は3T3-L1脂肪細胞に作用することで最終的にAktのリン酸化を促進することが分かり、その作用はZnイオンよりも高いことを示した。この[Zn(hkt)₂]によるAktリン酸化促進効果は[Zn(hkt)₂]が細胞膜受容体に対して作用し発揮されるのではなく、[Zn(hkt)₂]はその脂溶性の高さから受動拡散などによって細胞膜を透過し、細胞質内に取り込まれてから発揮する可能性が高いことをIRβ、IRS-1のチロシンリン酸化活性および重金属キレート剤添加時におけるAktのリン酸化促進効果の結果は示唆している。そこで、本実験では[Zn(hkt)₂]が細胞内に取り込まれ、様々なタンパク質に作用しているか否かを検討するため、ICP-MSを用いて3T3-L1脂肪細胞内のZn量を定量評価した (Fig. 1-15)。

3T3-L1脂肪細胞に対して20 μM ZnSO₄で継時的に刺激した場合、細胞内Zn量に変化はあまり見られなかった。一方で、20 μM [Zn(hkt)₂]を継時的に刺激した場合、細胞内Zn量は継時的に増加し、30分間刺激時においては有意な増加を認めた。

3T3-L1脂肪細胞へは、[Zn(hkt)₂]を長時間作用させた場合に3T3-L1脂肪細胞内へのZn取り込み量の上昇が見られたため、Aktリン酸化促進効果を検討した実験と同様に[Zn(hkt)₂]の細胞内への取り込み評価においても、キレート剤を用いた検討を行った

([Zn] + DTPA; [Zn(hkt)₂] 20分間刺激したのち、DTPAを培地中に添加し、さらに10分間作用、DTPA + [Zn], TPEN + [Zn]; キレート剤20分間作用させたのち、[Zn(hkt)₂]を培地中に添加し30分間作用)。なお、細胞液回収時に1 mM EDTA含有PBSを用いて3度細胞を洗浄し、細胞外に残留したZnは取り除いた。これらの実験では、[Zn(hkt)₂]単独処理時における細胞内のZn量と、キレート剤を処理した場合での細胞内のZn量を比較することによって、[Zn(hkt)₂]が細胞膜受容体のみならず、細胞膜表面に作用しているかどうかを検討することを目的とした。なお、[Zn(hkt)₂]による3T3-L1細胞への作用時間が30分となるように、先の[Zn(hkt)₂]によるAktリン酸化促進作用におけるキレート剤処理実験でのサンプル処理を参考にした。その結果、キレート剤を処理した場合の細胞内Zn量は、CNTに比べて有意な差は見られなかった。また、[Zn] + DTPAサンプルでは、理論上では[Zn(hkt)₂]20分間処理時と細胞内のZn量は同等になると予想されたが、結果として、[Zn(hkt)₂]のみを20分間処理した時よりも細胞内のZn量は減少する傾向となった。つまり、[Zn(hkt)₂]は細胞膜受容体などを介さず、[Zn(hkt)₂]の脂溶性によって細胞膜を透過し、細胞内に取り込まれていることが分かった。

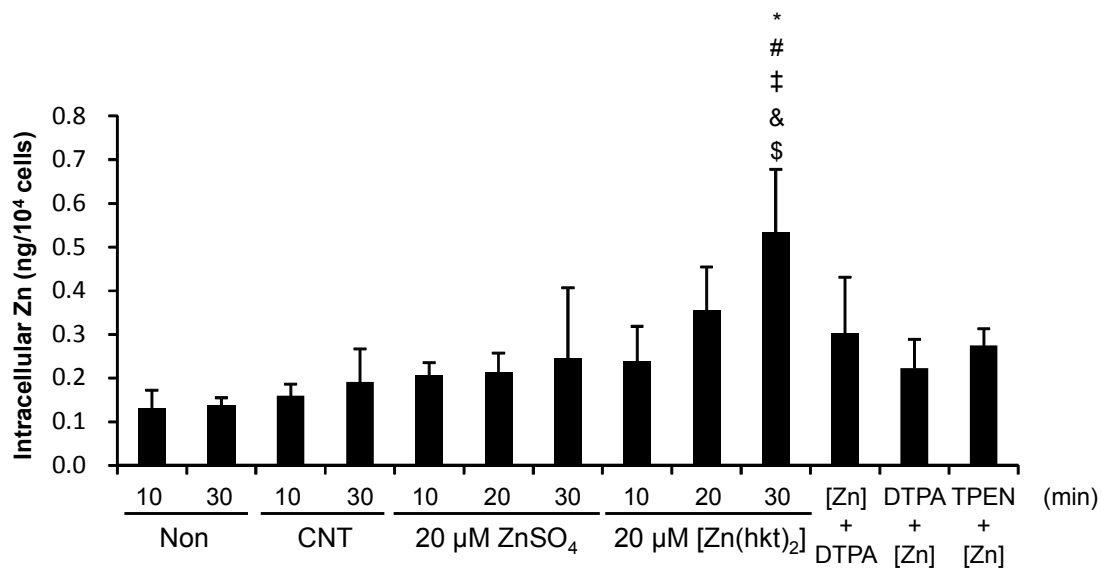


Fig. 1-15 Zn uptake in 3T3-L1 adipocytes treated with [Zn(hkt)₂].

Serum-starved 3T3-L1 adipocytes were treated with 20 μM ZnSO₄ or [Zn(hkt)₂] and incubated at 37°C for 10, 20, and 30 min. [Zn] + DTPA means 20 μM [Zn(hkt)₂] 20 min-pretreatment and then DTPA 10 min-treatment, and chelators + [Zn] means chelators 20 min-pretreatment and 20 μM [Zn(hkt)₂] 30 min-treatment. The whole cell lysates were used to measure Zn uptake. Data are expressed as the means and standard deviations for five to six experiments. Significance: **P* < 0.01 vs. non-30-min treatment, #*P* < 0.01 vs. 30-min CNT treatment, ‡*P* < 0.01 vs. ZnSO₄ 30 min-treatment, &*P* < 0.01 vs. [Zn(hkt)₂] 10 min-treatment, \$*P* < 0.05 vs. DTPA 20 min + [Zn(hkt)₂] 30 min-treatment

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. 5 より一部改変)

1-3-14 Zn 錯体によるグルコース取り込み促進効果の評価

本研究において対象としている DM は高血糖を主症状とする慢性代謝疾患である。そのため、治療には血糖値レベルを改善し、コントロールすることが重要となってくる。これまでの実験結果より、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ がインスリンシグナル経路においてインスリン様活性を有することが示唆された。そこで、抗 DM 作用のうち血糖値降下作用について評価を行った。

この実験では、コントロールとして 1% DMSO 含有フェノールレッド非含有 DMEM 培地を用い、 $50 \mu\text{M}$ $[\text{Zn}(\text{trp})_2]$ 、 $50 \mu\text{M}$ $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ と比較した。その結果、各サンプルを 10 分間刺激した場合、 $50 \mu\text{M}$ $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ 刺激により、培地中の 93 mg/L に相当するグルコースが細胞質内に取り込まれた (Fig. 1-16)。この結果は、コントロール (1% DMSO 含有フェノールレッド非含有 DMEM) 処理サンプルよりも、約 3.7 倍高い取り込み量であった。

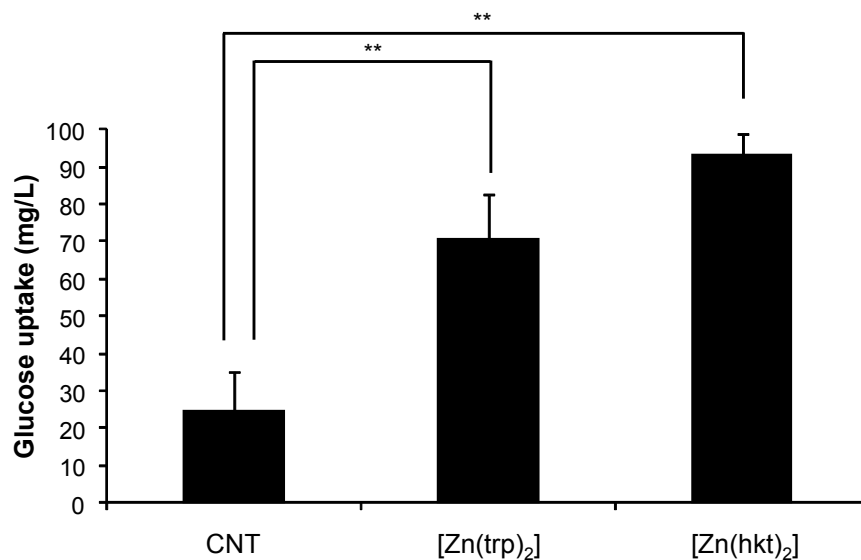


Fig. 1-16 Glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes treated with $[\text{Zn}(\text{trp})_2]$ and $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$.

3T3-L1 adipocytes were treated with $50 \mu\text{M}$ $[\text{Zn}(\text{trp})_2]$ or $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ and incubated at 37°C for 10 min. The outer media of phenol red free DMEM were used for measuring the glucose uptake. Significant difference: $**P < 0.01$ vs. CNT

(*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 298-305., Fig. 7 より一部改変)

1-4 考察

以前から、Zn と DM は細胞代謝において深く関連していることが報告されてきた[45]。Zn がインスリンシグナル経路に影響を及ぼすことは報告されているが[12, 14, 20, 46-48]、その多くが Zn イオン (Zn^{2+}) を使用したものであり、相対的にバイオアベイラビリティが低いことが問題であった。そこで、Zn のバイオアベイラビリティ向上および治療効果向上を目的として、様々な配位様式を持った Zn 化合物が合成されてきた[22, 35-37, 49-51]。今回、抗 DM 効果が報告されている Zn 錯体のうち、亜鉛ヒノキチオール錯体 ($[Zn(hkt)_2]$) に注目し研究を進めることにした。

研究に用いる Zn 錯体を論文既知の方法に従い合成した[34]。得られた Zn 錯体について、物性を評価し、Zn 錯体が合成できたと判断した (Fig. 1-1)。本研究において、配位子に用いたヒノキチオールが天然由来化合物であることから安全性が高く、またその錯体である $[Zn(hkt)_2]$ が細胞毒性を示しにくいことが期待される。そこで本研究において、 $[Zn(hkt)_2]$ の 3T3-L1 脂肪細胞に対する影響を検討するために、トリパンプルー染色法を用いて $[Zn(hkt)_2]$ の細胞毒性について評価したところ、実験に用いた濃度において $[Zn(hkt)_2]$ および配位子であるヒノキチオールは細胞毒性を示さないことが確認できた (Fig. 1-2)。

続いて、 $[Zn(hkt)_2]$ と同じ配位形式を持つ Zn 錯体を用いて、Zn 錯体間における 3T3-L1 脂肪細胞に対するインスリンシグナル経路の活性化促進作用を比較することにした。3種類の O_4 型 Zn 錯体 ($[Zn(glc)_2]$ 、 $[Zn(trp)_2]$ 、および $[Zn(hkt)_2]$) を用いて 3T3-L1 脂肪細胞に対するインスリンシグナル経路の活性化を比較したところ、 $[Zn(hkt)_2]$ が最も高い Akt および GSK3 β のリン酸化促進作用を示した (Fig. 1-3)。先行研究における Zn 錯体のインスリン様活性評価の一つである、*in vitro* 遊離脂肪酸 (FFA) 放出抑制試験の結果においても、 $[Zn(hkt)_2]$ が高いインスリン様作用を示すことが報告されていた[34]。一般的に Zn 錯体は、その配位子によって脂溶性を変えることができ、配位子の脂溶性が高いほど Zn 錯体としての細胞膜透過性が高くなることが期待される。 $[Zn(glc)_2]$ 、 $[Zn(trp)_2]$ 、 $[Zn(hkt)_2]$ の log *P* を測定したところ、脂溶性の高い順に、 $[Zn(hkt)_2] > [Zn(trp)_2] > [Zn(glc)_2]$ であり (Table 1-1)、この順番はこれまでの FFA 放出抑制試験並びに 3T3-L1 脂肪細胞におけるインスリンシグナル経路中の Akt リン酸化促進効果と合致している。そこで、3T3-L1 脂肪細胞での Akt リン酸化促進作用が高かった $[Zn(hkt)_2]$ を用いて、Zn 錯体によるインスリンシグナル経路活性化の詳細な作用機序を解明することを目的として、実験を進めた。

$[Zn(hkt)_2]$ による濃度依存的なインスリン様作用について検討を行った。10-50 μ M $[Zn(hkt)_2]$ 刺激時において、濃度依存的な Akt リン酸化促進作用が見られた。またこの時、インスリンシグナル経路において Akt の下流に存在する GSK3 β のリン酸化促進作用についても検討したところ、GSK3 β に関しても濃度依存的なリン酸化促進作用が見られた (Fig. 1-4)。続いて、 $[Zn(hkt)_2]$ による時間依存的なインスリン様作用について検討した。これまで検討に用いた濃度よりも低い濃度を 3T3-L1 脂肪細胞に作用させ、10、20、30 分間経過後の時間依存的な Akt リン酸化促進作用を評価したところ、20 分および 30 分作用時において有意な Akt リン酸化促進作用を示した。このことから 3T3-L1 脂肪細胞に

対して[Zn(hkt)₂]は単独刺激時において、濃度依存的、時間依存的な Akt リン酸化促進作用を示すことがわかった。

将来的に臨床現場において[Zn(hkt)₂]を使用することを想定した時に、高用量の[Zn(hkt)₂]を単独で使用し高いインスリン様活性を得るよりも、インスリンと併用することでインスリンと[Zn(hkt)₂]ともに低用量化が図れるのではないかと考え、1 nM という低用量のインスリンとの併用作用について検討を行った。この併用刺激により、Akt リン酸化促進作用は[Zn(hkt)₂]単独刺激時よりも増加した。先行研究では、FFA 放出抑制試験において配位子にマルトールを用いた[Zn(mal)₂]がインスリンと併用することで相加効果を示している[42]。これらの実験結果から、[Zn(hkt)₂]は単独刺激によるインスリン様作用を示すだけではなく、[Zn(hkt)₂]はインスリンとの併用刺激によってインスリンシグナル伝達を増強し、インスリンの作用を強める効果があることが示唆された (Fig. 1-6)。

次に、[Zn(hkt)₂]が脂肪細胞に対してどの様に作用しているのかについて、検討を進めることにした。[Zn(hkt)₂]が細胞膜表面に作用しているのか、もしくは、[Zn(hkt)₂]が脂肪細胞内に取り込まれた後、インスリン様作用を示すのかについて検討するため、金属イオンキレート剤である DTPA および TPEN を用いた。DTPA および TPEN はそれぞれ細胞外、細胞内のキレート剤として使用した。本実験では、それぞれのキレート剤を 1) [Zn(hkt)₂]による刺激前に処理した場合 (Fig. 1-7)、2) [Zn(hkt)₂]による刺激後に処理した場合 (Fig. 1-8) に分けて、[Zn(hkt)₂]による Akt のリン酸化促進作用について検討した。1)、2) それぞれの実験の結果から、キレート剤処理サンプルにおいて Akt のリン酸化が抑制されており、[Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進作用は、細胞内に[Zn(hkt)₂]が持続的に取り込まれることが重要であることが分かった (Figs. 1-7、1-8)。特に 2) の[Zn(hkt)₂]による刺激後にキレート剤を処理した実験で、この作用は顕著であった。このことから、[Zn(hkt)₂]がインスリンシグナル伝達を増強させ、Akt のリン酸化を促進するには、[Zn(hkt)₂]が細胞内に取り込まれる、細胞内の Zn 濃度を上昇させる必要があることから、ICP-MS を用いて[Zn(hkt)₂]による細胞内 Zn 濃度の時間依存的な変化を定量評価した。20 μM [Zn(hkt)₂]を作用させたときの細胞内 Zn 濃度は時間依存的に上昇していた (Fig. 1-15)。キレート剤を処理した場合における細胞内 Zn 濃度についても検討を行った結果、[Zn(hkt)₂]単独処理時に見られた細胞内 Zn 濃度よりも減少する結果が得られ、[Zn(hkt)₂]は細胞膜を透過して細胞内へ取り込まれ、3T3-L1 脂肪細胞内で作用していることが分かった。このことから、[Zn(hkt)₂]は持続的に 3T3-L1 脂肪細胞に取り込まれ、その後、インスリンシグナル伝達を増強すると考えた。本研究におけるこれまでの実験結果のみならず、他の先行研究からも、細胞内でのシグナル伝達増強には、細胞内の Zn 濃度が重要であることが示唆されている。例えば Haase らは、3T3-L1 脂肪細胞とは異なるラットグリブア芽種 C6 細胞において、TPEN を処理した細胞ではインスリン刺激性、IGF-1 刺激性のリン酸化が抑制され、チロシンリン酸化タンパク質の発現量が減少する一方で、DTPA を処理した細胞ではチロシンリン酸化タンパク質の発現が減少しなかったことを報告しており、この差はキレート剤によって細胞内の Zn が抑制されたことによると結論付けて

おり[43]、シグナル経路の調整には細胞内 Zn 濃度が非常に重要であることを明らかにした。

これまで、 $[Zn(hkt)_2]$ が Akt リン酸化促進効果を有することを示してきた。しかしながら、この効果が Akt に対して $[Zn(hkt)_2]$ が直接的に作用し Akt リン酸化が促進しているのか、また、インスリンシグナル経路のみに依存している作用かどうかは不明である。そこで、Akt リン酸化に関与する PI3K および HSP90 に注目し、 $[Zn(hkt)_2]$ の PI3K、HSP90 それぞれへの影響について検討することにした。PI3K 阻害剤であるワートマニン存在下における Akt リン酸化促進効果は、ほぼ完全に抑制された (Fig. 1-9 (A))。一方、ワートマニン存在下における GSK3 β のリン酸化促進作用はワートマニン処理コントロールサンプルに比べ、わずかにリン酸化が上昇していた (Fig. 1-9 (B))。これらのワートマニン処理時での Akt と GSK3 β へのリン酸化促進効果の違いから、 $[Zn(hkt)_2]$ がインスリンシグナル経路以外に作用していることが考えられた。さらに HSP90 に関する検討では、3T3-L1 脂肪細胞に対して HSP90 特異的阻害剤である 17-AAG を処理し、 $[Zn(hkt)_2]$ による Akt リン酸化促進効果を評価したところ、17-AAG の影響は無かった (Fig. 1-10)。これらの結果から、 $[Zn(hkt)_2]$ による Akt リン酸化促進作用は PI3K を介するものであることが示唆され、また、 $[Zn(hkt)_2]$ による Akt リン酸化効果には HSP90 が関与していないことが示唆された。

$[Zn(hkt)_2]$ による Akt のリン酸化促進作用が PI3K を介したものであることが示唆されたため、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た。様々な濃度に調製した $[Zn(hkt)_2]$ を 3T3-L1 脂肪細胞に処理し、その時のインスリンシグナル経路上流に存在する IR β 、IRS-1 のチロシンリン酸化活性について免疫沈降法を用いて評価した。この実験結果から、 $[Zn(hkt)_2]$ が単独処理ではインスリンシグナル経路上流に対しては直接的な効果を示さず、インスリンを併用すると初めてチロシンリン酸化促進効果を示したことから、 $[Zn(hkt)_2]$ は間接的な作用を示し、インスリン作用を増強させることで、インスリンシグナル伝達の活性をより高めていることが考えられる (Figs. 1-11, 1-12)。この時、3T3-L1 脂肪細胞に対して、インスリン単独処理ではインスリン高用量 (100 nM) 時のみ、チロシンリン酸化が見られた。

高用量インスリン処理時よりも高用量インスリンと $[Zn(hkt)_2]$ の併用処理時の方が IR β のチロシンリン酸化を促進させること、ならびに、低用量インスリン処理時よりも低用量インスリンと $[Zn(hkt)_2]$ の併用処理時の方が Akt のリン酸化を促進させることから、生体酵素である PTP1B および PTEN に対する $[Zn(hkt)_2]$ の影響について評価を行った。これらの酵素はインスリンシグナル経路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[52]。PTP1B は IR β に対してホスファターゼとして作用し、インスリンシグナル経路の活性化を抑制することが知られている[44, 53]。PTEN は PIP $_3$ を脱リン酸化させ、インスリンシグナル経路の活性化を抑制する[54-56]。PTP1B、PTEN それぞれに対して、 $[Zn(hkt)_2]$ を作用させたところ、 $[Zn(hkt)_2]$ が PTP1B と PTEN のそれぞれに対して阻害作用を示すことが分かった。PTP1B については、Zn イオンの方が $[Zn(hkt)_2]$ よりも強い阻害活性を示した。しかしながら、PTEN については、Zn イオンよ

りも[Zn(hkt)₂]の方が強い阻害活性を示した。これまでに PTP1B は IRβ の阻害酵素として作用するため、インスリン抵抗性と DM への治療を目的として PTP1B をターゲットとした研究が数多く報告されてきた[57]。さらに PTP1B に対して Zn イオンが阻害作用を示すことも報告されているが[44]、PTP1B に対する Zn 錯体の阻害作用についての報告はなかった。一方、PTEN に対しても Zn イオンが阻害作用を示し、PI3K シグナル経路を活性化させることも報告されている[58]。Plum らは、マウス T リンパ球系 CTLL-2 細胞、ヒト T 細胞系 Jurkat 細胞、HuT-78 細胞、Molt-4 細胞において Zn イオンとピリチオン混合物 (Zn²⁺/Pyr) を用いて PTEN への影響を検討しており、この混合物が Akt リン酸化を促進し、PTEN siRNA 処理時には、Zn²⁺/Pyr 刺激によって Akt リン酸化が増大していた。この時、PTEN のタンパク質レベルには影響を及ぼさないことも報告している[58]。以上のことをまとめると、今回の実験結果で得られた試験管レベルの反応だけでなく、細胞レベルにおいても、[Zn(hkt)₂]は PTP1B および PTEN に対して阻害作用を有する可能性があることが分かった。

また、[Zn(hkt)₂]を作用させると、3T3-L1 脂肪細胞においてグルコースの取り込みが観察された (Fig. 1-16)。以前に GLUT4 を蛍光標識抗体でラベル化し、Zn 錯体による影響を検討したところ、Zn 錯体によって GLUT4 の膜移行性が高まった結果が得られている[39]。今回の[Zn(hkt)₂]処理によるグルコース取り込み促進作用はその先行結果と合致しており、[Zn(hkt)₂]はインスリンシグナル経路を活性化し、GLUT4 の膜移行性を高めていることが示唆される。

さらに PTP1B や PTEN に対する[Zn(hkt)₂]の詳細な阻害効果を検討するために、酵素と[Zn(hkt)₂]間のドッキングシミュレーションを行った。このシミュレーション結果から、[Zn(hkt)₂]は錯体構造を保持したまま、酵素に作用できる可能性があることが分かり、Fig. 1-14 に示すように、[Zn(hkt)₂]は PTP1B および PTEN の活性中心に結合するシミュレーション結果が得られた。PTP1B はもちろんのことながら、リン脂質の脱リン酸化を触媒する PTEN もチロシン残基とセリン・スレオニン残基の脱リン酸化反応を触媒する MAP kinase phosphatase (MKP) と共に PTP ファミリーに含まれる。これらの PTP ファミリーには活性部位のシステイン残基を中心とした HCXXXXXR の配列からなるモチーフが保持されている (Table 1-3)。

Table 1-3 Active center cysteine residues of PTP (protein tyrosine phosphatase)

| | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| PTP1B | Val | Val | His | Cys ²¹⁵ | Ser | Ala | Gly | Ile | Gly | Arg | Ser |
| PTEN | Ala | Ile | His | Cys ¹²⁴ | Lys | Ala | Gly | Lys | Gly | Arg | Thr |
| MKP-1 | Phe | Val | His | Cys ²⁵⁸ | Gln | Ala | Gly | Ile | Ser | Arg | Ser |
| MKP-3 | Leu | Val | His | Cys ²⁹³ | Leu | Ala | Gly | Ile | Ser | Arg | Ser |
| MKP-5 | Leu | Ile | His | Cys ⁴⁰⁸ | Gln | Ala | Gly | Val | Ser | Arg | Ser |
| MKP-7 | Leu | Val | His | Cys ²⁴⁴ | Leu | Ala | Gly | Ile | Ser | Arg | Ser |

この活性中心のシステイン残基は極めてレドックス感受性が高く、容易に酸化されることになる[59]。この酸化体は極めて不安定であり、近傍にチオール基が存在するとジスルフィド結合を形成する。ジスルフィド結合は可逆的な酸化修飾であり還元剤でもとに戻すことが出来る。これに対して、システイン残基における不可逆的な酸化修飾がおこると、通常の還元剤処理ではもとに戻すことは出来ず、このような不可逆的な酸化修飾に対してジスルフィド結合を形成することで、PTP1B および PTEN は活性中心を保護していることが明らかにされてきた。例えば PTP1B は活性中心が酸化されるとスルフェニルアミドと呼ばれる構造をとり[60, 61]、PTEN では、その活性中心のシステイン残基が分子内ジスルフィド結合を形成することが報告されている[62]。これらの構造により、それぞれの生体酵素は不可逆的な酸化修飾を防ぎ、酸化後の速やかな活性回復が得られると考えられている。つまり、PTP1B および PTEN の活性中心において、システイン残基は Cys-SH から Cys-S⁻になることができる。Zn は 6 配位型を形成することが可能であるため、[Zn(hkt)₂]は 6 配位型として、これら酵素の活性中心である Cys-S⁻構造に近接、配位することによって、酵素阻害活性を示すことが出来ると考えられる。先行研究では、Zn イオンが PTEN の Cys124 の位置で配位結合することによって阻害作用を示すことが報告されている[59]。Plum らは、H₂O₂ 処理によって、Cys124 が Cys71 とジスルフィド結合を形成することを利用した実験系を用いて Zn イオンが Cys124 と配位結合することを示している[58]。さらに Plum らは、H₂O₂ 存在下において Zn イオンを添加した後、カタラーゼを加え H₂O₂ の影響を取り除き、その後、TPEN 溶液を加えて溶液中に存在する Zn イオンを取り除くと、PTEN の酵素活性が回復することから、Zn イオンが Cys124 に配位結合することにより、Cys124-Cys71 ジスルフィド結合によって生じる PTEN 酸化を防ぐことを証明した[58]。これらの PTEN に関する先行研究は、今回行った PTEN と [Zn(hkt)₂] とのドッキングシミュレーションのデータを支持するものである。一方で、PTP1B に対する阻害活性については、Zn イオンの方がその作用を強く示す結果であった。このため、酵素阻害活性についてはターゲットとする酵素の活性中心周辺の微細構造によって Zn イオンと Zn 錯体のどちらが強く作用するかは異なると考えられる。今回のドッキングシミュレーションによる分子間相互作用の結果は、[Zn(hkt)₂]が PTP1B と PTEN に対して影響を及ぼし、両方の酵素に対して潜在的な阻害作用を示すことを示唆した。

これまでの先行研究ならびに本研究における実験データより、Zn イオンよりも Zn 錯体の方がより強いインスリン様活性を示すことは明らかである。しかし、細胞内において作用している化学種が Zn イオンであるのか、Zn 錯体として作用しているかについては、明確には分かっていない。この点について議論する上では、溶液化学や錯体化学ならびに生物学的な化学種の観点から、検討する必要がある。

細胞に対して作用を示すためには、Zn 錯体が錯体の構造を維持し、細胞膜を透過することが重要であり、pH 7.4 の水溶液環境下において[Zn(hkt)₂]がどの程度の割合で錯体として存在しているかについて、明らかにしていく必要がある。Jakusch らは、2-ヒドロキシピリジン-N-オキシドやマルトールなどの O₄ 型配位形式をもつ配位子を用いて検討したところ、これらの亜鉛錯体が pH 7.4 の水溶液中で 45~86%が錯体として存在し、難溶

性である $\text{Zn}(\text{OH})_2$ がほとんど生成しないことを明らかにしている。なお、配位子に用いた化合物の酸解離定数 (pK_a) は $\text{pK}_a = 7.00 \sim 8.41$ の範囲内であった[63]。CAS (Chemical Abstract Service) 登録番号 (CAS: 499-44-5) による管理データより、ヒノキチオールの pK_a は 7.06 と推定され、上記の先行研究の結果を踏まえると pH 7.4 の水溶液中では $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ は少なくとも 40% 以上は水和を受けずに、その錯体構造を保持していると考えられる。一方で pH 7.4 の水溶液中では Zn イオンは、そのほとんどは水分子が配位結合した $[\text{Zn}(\text{OH}_2)_4]^{2+}$ (80%)、もしくは $[\text{Zn}(\text{OH}_2)_3(\text{OH})]^+$ (20%) として存在している[64]。

一方、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ が細胞内で作用するにあたって、生理学的環境下における真の活性化学種が何であるかを明らかにする必要がある。次の検討課題に挙げられる。

細胞内において、リン酸イオン (pH 7.4 条件下: H_2PO_4^- 、および HPO_4^{2-}) は豊富に存在し、細胞内の 2 価金属イオンと結合する。細胞内に取り込まれた $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ は、配位子置換反応によって $[\text{Zn}(\text{hkt})(\text{HPO}_4)]$ を形成している可能性がある。Taniguchi らは以前にニワトリ B 細胞由来の DT40 細胞を用いた検討結果から、Zn トランスポーターによる細胞内の Zn 濃度の調整、及びそれに応答したシグナル活性が起こることを提唱している。Zn トランスポーターには、細胞質から細胞外や細胞内小器官内の向きに Zn イオンを輸送する ZnT と細胞外や細胞内小器官から細胞質の向きに Zn イオンを輸送する ZIP がある。このうち、ZnT 5/6/7 の働きでゴルジ体内に Zn イオンが蓄積され、細胞内の Zn 濃度に応答して、ZIP9 によって細胞質内に Zn イオンを放出し、PTPase 阻害活性を示すことを報告している[65]。この先行結果は、細胞内に取り込まれた Zn イオンはゴルジ体内に蓄積されることによって、細胞質内に多く存在しているリン酸イオンとの錯形成を免れていると考えることができる。リン酸の酸解離定数、Zn-リン酸錯体の安定度定数を考慮しても、配位子をヒノキチオールとした $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ が錯体構造を維持していることによって、細胞内のリン酸イオンによる干渉から Zn イオンを保護し、細胞質内で錯体のままで比較的安定に存在し、直接的に酵素タンパク質と反応することができていると考えられる。

これまでのデータから $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ は錯体として細胞の中に取り込まれ、その取り込まれた $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ は PTP1B と PTEN に対して阻害作用を示し、インスリンシグナルの伝達を増強させる働きがある。また、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ はインスリンとは異なる作用点から Akt のリン酸化を促進し、結果としてインスリンシグナル伝達を活性化すると結論付けた (Fig. 1-17)。

この $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ によるインスリンの作用を増強させる働きは、今後、臨床現場においてインスリン療法におけるインスリン投与量の軽減や、慢性的なインスリン治療による自己インスリン抗体産生を防ぐ可能性が期待できる。

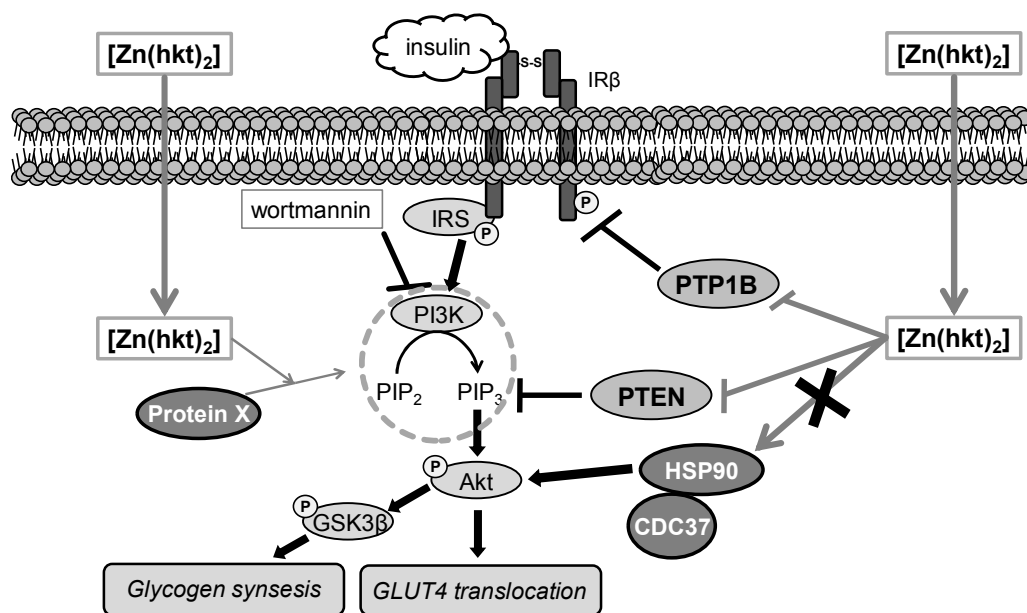


Fig. 1-17 Insulin signaling pathway and the proposed effects of [Zn(hkt)₂]

[Zn(hkt)₂] was taken up by cells as a complex, and had inhibitory effects on PTP1B and PTEN. Akt phosphorylation was then induced.

(*J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548., Fig. 8 より一部改変)

第2章 [Zn(hkt)₂] を用いたラットインスリノーマ培養細胞 (RIN-5F 細胞) における膵 β 細胞への影響

2-1 緒言

これまでの 3T3-L1 脂肪細胞を用いた研究から、[Zn(hkt)₂]が脂肪組織においてインスリンとは異なる作用機序を示し、Akt のリン酸化を引き起こすことによってインスリン様作用を示すことが分かった。

Pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1)はアミノ酸 283 個からなる転写因子であり、近年、DM との関連性が強く示唆されている[66]。PDX-1 は膵臓 β 細胞に発現しており、β 細胞内にグルコースが流入したり、β 細胞がインスリンにより刺激されると、PDX-1 はリン酸化され、核内に移行し転写活性を示し、インスリン、GLUT2 などの転写を促進することが知られている[67]。また、PDX-1 はインスリン及び IGF-1 シグナルとともに、インスリン抵抗性に対する β 細胞の肥大化、β 細胞前駆体の分化・成熟、インスリン分泌能の増強、及び、インスリン遺伝子の発現に深く関与していると言われている[68, 69]。また PDX-1 の活性低下がインスリン合成の減少をもたらすことも報告されている[70]

(Fig. 2-1)。以上のことから、インスリン分泌能についての観点から[Zn(hkt)₂]による PDX-1 の発現量への影響を検討、評価することは亜鉛錯体による抗 DM 効果のメカニズムを解明する上で非常に重要である。

そこでまず、ラットインスリノーマ β 細胞である RIN-5F 細胞を用いた *in vitro* 系における[Zn(hkt)₂]の影響を検討した。

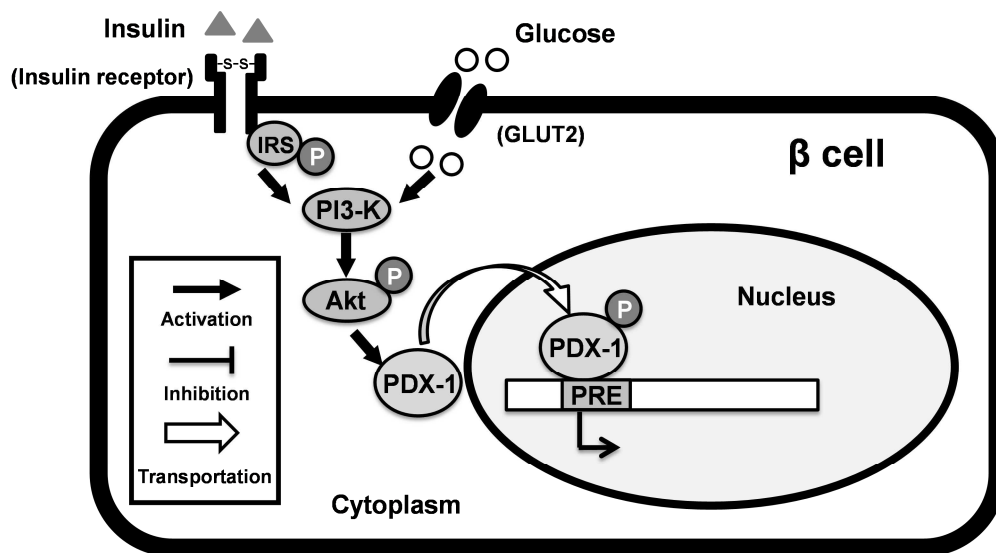


Fig. 2-1 PDX-1 activation pathway in pancreatic β cell

2-2 実験材料及び実験方法

2-2-1 試薬

ラットインスリノーマ β 細胞 RIN-5F を DS ファーマバイオメディカル株式会社より購入した。RPMI-1640 は Sigma-Aldrich 社 (ミズーリ州、アメリカ合衆国) から、硫酸

亜鉛七水和物 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、ヒノキチオールは和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。

2-2-2 RIN-5F 細胞培養

RIN-5F 細胞を 100 mm ディッシュに播種し、10%FBS 含有 RPMI-1640 中、 CO_2 5%、 37°C で培養した。成長した細胞は 0.25%トリプシン-EDTA 溶液を用いて剥離し、1,000 rpm で 1 分間遠心し、沈殿した細胞を 10% FBS 含有 RPMA-1640 中で培養し、3 代目より実験に用いた。なお、すべての実験において 50 U/mL ペニシリンおよび 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含有した RPMI-1640 を用いた。 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ およびヒノキチオールは DMSO に溶解し、 ZnSO_4 は Milli-Q 超純水装置システム (日本ミリポア、東京) により調製した超純水 (比抵抗値 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$) に溶解した。

2-2-3 Zn 錯体合成

実験に使用した Zn 錯体 ($[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$) の合成方法は、1-2-2-2 に示した通りである。

2-2-4 ZnSO_4 および $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ による PI3K/Akt シグナル経路への影響

RIN-5F 細胞を RPMI-1640 中で培養し、80~90%コンフルエント状態に達したものを実験に用いた。RIN-5F 細胞を FBS 非含有 RPMI-1640 中で 4 時間インキュベートし、FBS の影響を除いた。終濃度として 10 および 20 μM に調製した ZnSO_4 、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ およびポジティブコントロールとして 10、100 nM インスリンを低グルコース (11 mM) RPMI-1640 培地および高グルコース (25 mM) DMEM (Sigma-Aldrich 社) 培地を用いて調製した後、細胞に添加し 10 分間インキュベートした後に培地を除去し、氷冷した PBS を用いて細胞を 2 回洗浄した。その後、細胞溶解液を用いて細胞抽出液を回収し、細胞からタンパク質を得た。なお、細胞溶解液およびイムノブロッティング法については、1-2-6-1 に記載した内容に準じた。イムノブロッティング法に用いた一次抗体は、ポリクローナルラビット抗マウス Phospho-Akt (Ser473)抗体 (Phospho-Akt (Ser473) Antibody)、ポリクローナルラビット抗マウス Akt 抗体 (Akt Antibody)、二次抗体には HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody) を用いた。特異的免疫反応は Immobilon™ ウェスタン化学発光 HRP 基質を用いて可視化し、Amersham Hyperfilm™ ECL に感光させた。バンドの解析は、Image J を用いて行った。

2-2-5 ZnSO_4 および $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ によるインスリン遺伝子発現量および PDX-1 遺伝子発現量に及ぼす影響

RIN-5F 細胞を RPMI-1640 中で培養し、80~90%コンフルエント状態に達したものを実験に用いた。RIN-5F 細胞を FBS 非含有 RPMI-1640 中で 4 時間インキュベートし、FBS の影響を除いた。終濃度として 5 μM ZnSO_4 、1 μM $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ およびポジティブコントロールとして 200 nM インスリンを低グルコース (11 mM) RPMI-1640 培地および高グルコース (25 mM) DMEM 培地中に溶解し、細胞に添加した。2 時間インキュベートした

後に培地を除去し、細胞から total RNA を回収した。Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen 社) を用いて DNAase 処理した後、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics 社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA とした。逆転写反応によって得られた cDNA を用いて、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem 社) を使用し、SYBR-Green 法によるリアルタイム PCR 法により検討を行った。

各遺伝子の増幅に用いたプライマー配列は Table 2-1 に示す通りである。

Table 2-1 RT-PCR primer sequences for mRNA quantification

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Table S1)

| Gene Name | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|----------------|---------------------------|------------------------|
| Insulin | AGCAAGCAGGTCATTGTTC | ACCAGGTGAGGACCACAAAG |
| PDX-1 | GAGGACCCGTACAGCCTACA | GGCCGGGAGATGTATTTGTT |
| β -actin | CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC | ATGGAGCCACCGATCCACA |

2-2-6 統計学的処理法

得られた全ての実験結果は平均値および標準偏差として表し、統計的な差は Tukey-Kramer 法を用いて評価した。

2-3 結果

2-3-1 Zn 錯体の合成

1-3-1 で示したものと同様に、元素分析、EI-MS、および赤外吸収スペクトルの結果から、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ が合成できていることを確認した。

2-3-2 ZnSO_4 および $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ による Akt リン酸化促進効果への影響

PDX-1 は膵臓の機能、分化に関与しており、PDX-1 の活性化経路の上流に Akt が存在している。第 1 章の実験結果より、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ が 3T3-L1 脂肪細胞においてインスリンシグナル経路に作用し、Akt のリン酸化を促進することがわかった。そこで、RIN-5F 細胞においても同様に $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ が Akt のリン酸化を促進するかを検討した。無血清処理後の RIN-5F 細胞に対して、終濃度が 10、20 μM ZnSO_4 および $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ となるように (A) 低グルコース (11 mM) RPMI-1640 培地中に調製し、また、(B) 高グルコース (25 mM) DMEM 培地中には 20 μM ZnSO_4 および $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ となるように調製し、これを細胞に添加した。10 分間インキュベートした後、ウェスタンブロット法により Akt、phospho-Akt を検出した。結果、(A) 低グルコース RPMI-1640 培地を用いた検討では、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ 処理によって Akt のリン酸化が有意に上昇した (Fig. 2-2 (A))。一方で、(B) 高グルコース DMEM 培地を用いた検討では、100 nM インスリン処理サンプルにおいては有意な Akt のリン酸化促進作用が認められたが、20 μM ZnSO_4 処理サンプル、20 μM $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ 処理サンプルでは有意な Akt のリン酸化促進効果は見られなかった。しかし、20 μM $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ 処理サンプルでは Akt のリン酸化が上昇する傾向は認められた (Fig.2-2 (B))。このことから、RIN-5F 細胞を用いた実験では、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ が膵臓に直接作用した場合、Akt リン酸化を介した PDX-1 の活性化をもたらすことが示唆された。

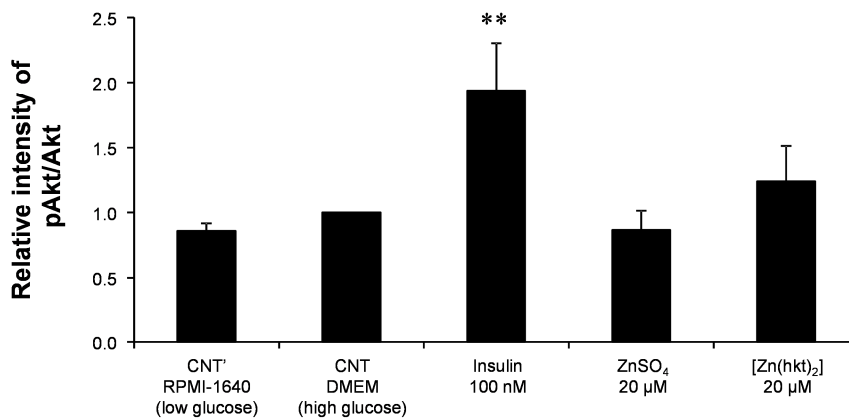
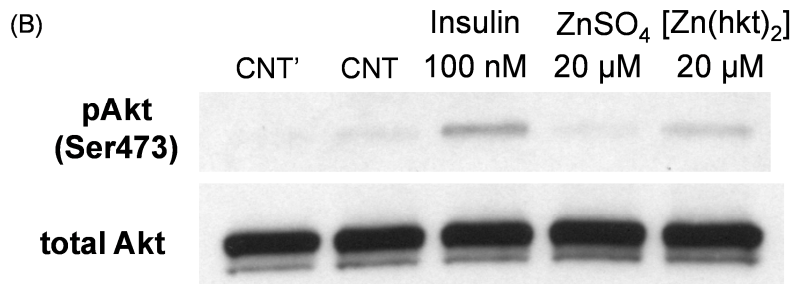
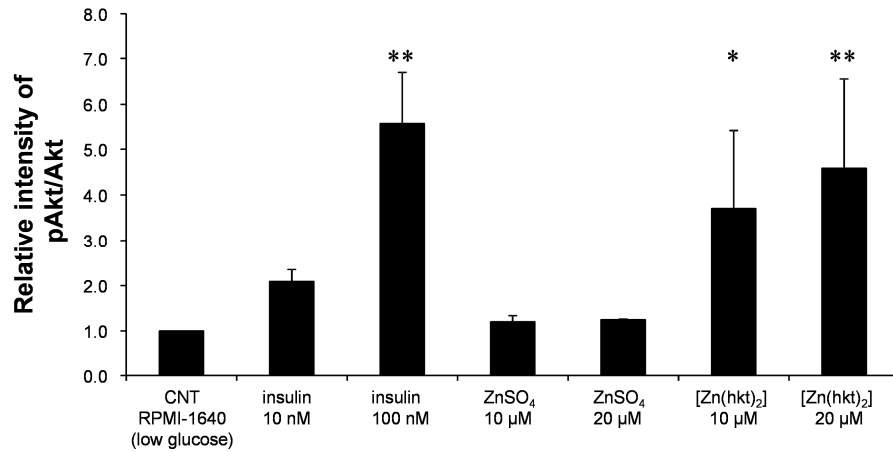
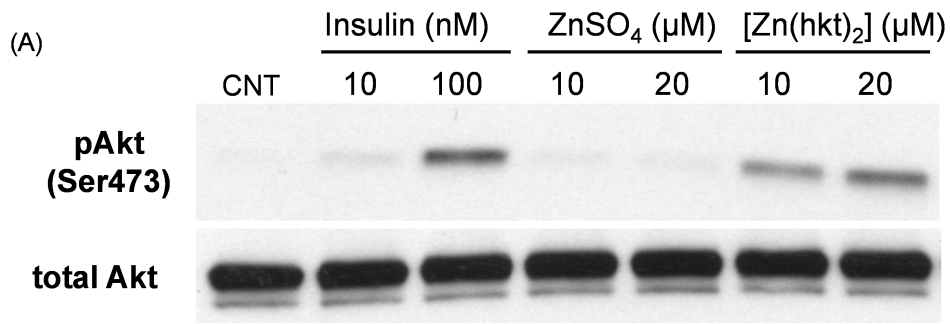


Fig. 2-2 Effects of [Zn(hkt)₂] on Akt phosphorylation with (a) low glucose (11 mM) and (b) high glucose (25 mM) medium.

Serum starved RIN-5F cells were treated with 100 nM insulin or 20 μM Zn samples for 10

min in (A) low glucose (11 mM) RPMI-1640 and (B) high glucose (25 mM) DMEM. The cell lysates were separated with 10% SDS-PAGE and immunoblotted with phospho-Akt (p-Akt) and Akt antibodies. Data are expressed as the means and standard deviations for three independent experiments. *Significance at $P < 0.05$ vs. CNT. **Significance at $P < 0.01$ vs. CNT.

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Fig. 1)

2-3-3 ZnSO₄および[Zn(hkt)₂]によるインスリン遺伝子発現量およびPDX-1遺伝子発現量に及ぼす影響

無血清処理を行った後、RIN-5F細胞に対してそれぞれ終濃度が5 μM ZnSO₄および1 μM [Zn(hkt)₂]となるように調製し、高グルコース(25 mM) DMEM培地を用いて2時間刺激したところ、PDX-1遺伝子発現量については200 nMインスリン、1 μM [Zn(hkt)₂]処理サンプルにおいて有意な発現量増加が認められた($P < 0.01$) (Fig. 2-3 (A))。また、インスリン遺伝子発現量については200 nMインスリン、および1 μM [Zn(hkt)₂]処理サンプルにおいて、有意な上昇が見られた($P < 0.01$) (Fig. 2-3(B))。

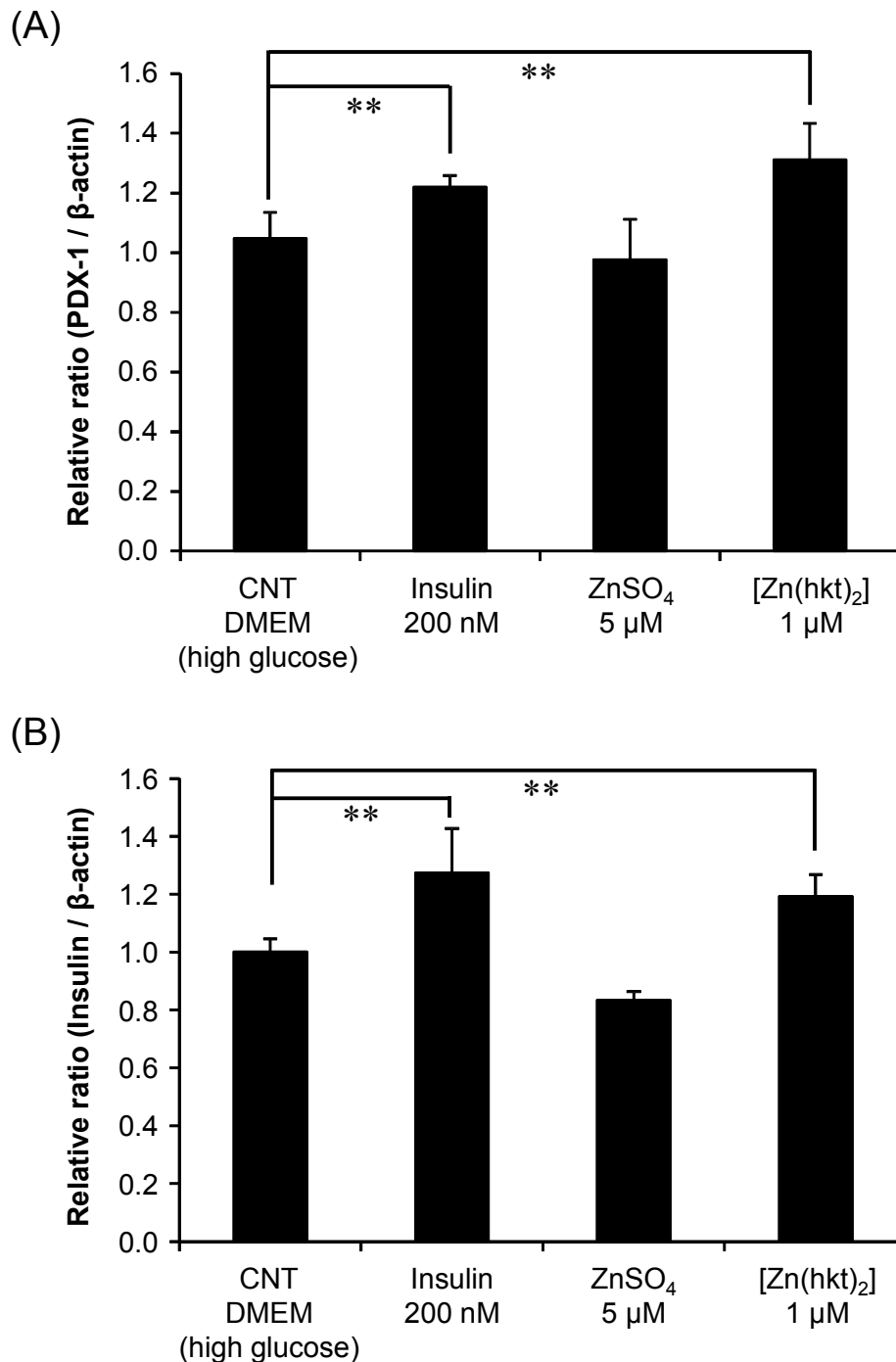


Fig. 2-3 PDX-1 (A) and insulin (B) mRNA expression levels in RIN-5F cells.

The cells were starved in serum-free RPMI-1640 for 4 h at 37°C and stimulated with 200 nM insulin, 5 μ M ZnSO₄, or 1 μ M [Zn(hkt)₂] for 2 h in high glucose (25 mM) medium. Real-time RT-PCR was performed using ABI PRISM 7500 Sequence Detection System and SYBR-Green with the primers. Data are expressed as the means and standard deviations for six to nine independent experiments. Significance: ** $P < 0.01$ vs. CNT

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Fig. S1)

2-4 考察

[Zn(hkt)₂]による膵臓での抗 DM 効果を評価、検討することを目的として実験を行った。ラットインスリノーマ培養細胞である RIN-5F 細胞を用いて、[Zn(hkt)₂]を作用させた場合の Akt リン酸化を介した PDX-1 の活性化、PDX-1 およびインスリン遺伝子発現量への影響を検討した。

まず初めに、PDX-1 活性化経路の上流に Akt が存在することから、RIN-5F 細胞での Akt リン酸化促進作用について実験を行った。本実験では、1) RPMI-1640 培地（低グルコース濃度：11 mM）、および食事性高血糖状態を模すため 2) DMEM 培地（高グルコース培地：25 mM）のそれぞれの条件下における [Zn(hkt)₂]による影響を検討した。その結果、1) の条件では [Zn(hkt)₂]を RIN-5F 細胞に作用させると Akt のリン酸化が有意に上昇したが、一方、2) の条件では [Zn(hkt)₂]を RIN-5F 細胞に作用させると Akt のリン酸化は上昇傾向を示したが、有意な促進効果は得られなかった（Fig. 2-2）。[Zn(hkt)₂]がもたらした 2 つの異なる条件における Akt リン酸化促進作用の結果から、RIN-5F 細胞を用いた実験では、培地中のグルコース濃度、すなわち細胞に対するグルコース暴露量の違いによって [Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化への効果が異なることが示唆された。[Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進効果については、培地中のグルコース濃度条件によって異なる結果を示したが、第 1 章で検討を行った 3T3-L1 培養脂肪細胞における結果と類似しており、ラットインスリノーマ RIN-5F 培養細胞においても [Zn(hkt)₂]は Akt のリン酸化促進作用を示し、この結果、PDX-1 の活性化が起こることが示唆された。また、今回の結果で [Zn(hkt)₂]が RIN-5F 細胞においても Akt のリン酸化促進作用を示したことから、[Zn(hkt)₂]のリン酸化促進作用に細胞種は影響しないことも分かった。

続いて、膵 β 細胞において β 細胞の分化、増殖、機能調整、また、インスリンや GLUT2 の遺伝子発現調整を担っている PDX-1 に着目し、その mRNA 発現量について [Zn(hkt)₂]の影響を検討した。[Zn(hkt)₂]による Akt リン酸化促進作用について、RIN-5F 細胞に対して暴露するグルコース濃度の条件により、細胞の応答性が異なることが判明したため、高血糖状態を想定した DMEM 培地（高グルコース濃度）を用いた条件下で、リアルタイム RT-PCR 法による検討を行うこととした。これまでの当分野における先行研究を参考にし、高グルコース DMEM 培地中での [Zn(hkt)₂]処理時間を 2 時間とし、この時の遺伝子発現量への影響をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。無血清処理 4 時間後の RIN-5F 細胞を用いて 2 時間処理時における PDX-1 mRNA 発現量を調べたところ、[Zn(hkt)₂]処理サンプルでは有意に増加する結果となった。この時、200 nM インスリン処理サンプルにおいても有意な発現量の増加が認められた。またインスリン mRNA 発現量についても検討したところ、200 nM インスリン処理サンプルならびに 1 μM [Zn(hkt)₂]処理サンプルにおいて発現量の増加が見られた（Fig. 2-3）。PDX-1 の発現量はインスリンの生合成を調節していることから、高グルコース培地を用いた実験条件において、[Zn(hkt)₂]処理による結果は、高血糖状態に曝された膵臓 β 細胞に対して [Zn(hkt)₂]が保護的な働きがあることを示唆している。

これまでに報告されている研究から、PDX-1 遺伝子は膵臓の発生段階と、生後の内分泌機能の2つ、すなわち、膵形成と β 細胞での適切なインスリン産生を維持する働きにおいて重要な役割を果たしていると考えられている[71, 72]。インスリンの分泌と生合成について注目すると、膵臓ランゲルハンス島細胞において、代謝時における膵臓ランゲルハンス島細胞での理想的な遺伝子発現の調節は、グルコースによるインスリン遺伝子の発現量調節である。 β 細胞におけるインスリン mRNA の発現レベルはグルコース量に応じて、インスリン遺伝子の転写の増加を伴い、インスリンプレ RNA スプライシングの増加、インスリン mRNA 分解の減少が合わさることにより増加する[73-75]。グルコース代謝によって β 細胞からインスリンが放出されると同時に、 β 細胞を刺激して速やかにインスリンの生合成を行い、インスリンを補充するという理想的な環境が整っている。先行研究では、分泌されたインスリンが IR に作用し、IR β 、PI3K および下流のシグナル経路を介して β 細胞中でインスリン遺伝子の転写を活性化するというフィードバック機序が提唱されている[76-78]。つまり、先行研究と本研究における実験データは、[Zn(hkt)₂] はインスリン発現量を増加させる可能性があるという点で合致する結果であると言える。これまでの先行研究、並びに、今回の *in vitro* 系での結果より、投与された[Zn(hkt)₂]が生体において膵臓に到達した場合、膵臓での PDX-1 発現量を増加することによって、膵臓を保護する機能を有する可能性があることを示した。

第3章 [Zn(hkt)₂]の2型糖尿病モデルマウス (KK-A^yマウス) への高脂肪食混餌長期投与による抗DM効果の評価

3-1 緒言

これまでの培養細胞を用いた[Zn(hkt)₂]の抗DM効果、インスリン様作用に関する *in vitro* 検討の結果から、[Zn(hkt)₂]が示すその効果は十分に高いことが伺える。そこで、2型DMモデルマウスのKK-A^yマウスを用い、[Zn(hkt)₂]が示す *in vivo* における影響について、検討を進めることとした。これまでに、[Zn(hkt)₂]を含む数多くの亜鉛錯体の抗DM効果について実験動物を用いた検討が報告されている[22-27, 34-36, 38, 39]。しかしながら、亜鉛錯体の長期摂取による各組織への影響は十分に検討されていない。そこで今回は、[Zn(hkt)₂]を用いて高脂肪食 (HFD) への混餌投与による18週間にわたる長期摂食実験を行い、インスリン分泌を担う膵臓における保護作用、及びDM性腎症への予防効果を検討した。

3-2 実験材料及び実験方法

3-2-1 動物

4週齢雄性C57BL/6Jマウス (n=4) およびKK-A^yマウス (n=23) を日本クレア株式会社 (大阪) より購入した。動物は実験開始までKPU中央動物研究センターで12時間周期の照明調節のもと、固形飼料MF (オリエンタル酵母工業株式会社、大阪) および水道水を自由摂取させ、プラスチック製飼育ゲージで飼育した。本動物実験は、KPU実験動物委員会により認可され、KPUの動物実験ガイドラインに従って行った。

3-2-2 動物の群分け及びHFD作製

6週齢時にHFD投与実験を開始した。C57BL/6Jマウスは2型DMモデルの対照とし、健常群 (Normal) とした。KK-A^yマウスはコントロール群 (CNT, n=6)、ピオグリタゾン摂取群 (PIO, n=8)、[Zn(hkt)₂]摂取群 (Zn, n=9) の3群に分けた。PIO群はポジティブコントロール群として設計した。Normal群、CNT群にはHFDを、PIO群には15-35 mg pioglitazone/kg BW/day となるように調製した薬剤を含有したHFDを、Zn群には10-30 mg Zn/kg BW/day となるように[Zn(hkt)₂]を含有したHFDを18週間与えた。投与開始から29日目まで、10 mg Zn/kg BW/day を、30日目から80日目には20 mg Zn/kg BW/day、81日目から投与実験終了まで30 mg Zn/kg BW/day を投与した。投与実験終了後に12時間絶食処置を行い、エーテル麻酔下においてヘパリン処理したシリンジで腹部大静脈より血液を採取した。これを4°C、600 × g、10分間遠心分離を行い、血漿を得た。また採血後に肝臓、腎臓、脂肪組織、骨格筋、膵臓を摘出した。肝臓、脂肪組織、骨格筋は液体窒素に入れ、瞬時に凍結させた。本実験に用いたHFDは全て神戸女子大学健康福祉学部にて作製した。なお、各群におけるHFD組成は、Table 3-1に示す通りである。

Table 3-1 Composition of the experimental diet
(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Table 1)

| | Normal and CNT | PIO | [Zn(hkt) ₂] | | |
|----------------------|----------------|--------|-------------------------|----------|----------|
| | | | 10 mg Zn | 20 mg Zn | 30 mg Zn |
| casein | 18.2 | 18.2 | 18.2 | 18.2 | 18.2 |
| sucrose | 30.0 | 30.0 | 30.0 | 30.0 | 30.0 |
| lard | 18.2 | 18.2 | 18.2 | 18.2 | 18.2 |
| vitamin mix. AIN 93N | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 |
| mineral mix. AIN 93N | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 |
| cellulose | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 |
| L-cystine | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| choline bitartrate | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| t-butylhydroquinone | 0.0007 | 0.0007 | 0.0007 | 0.0007 | 0.0007 |
| cornstarch | 15.5 | 15.5 | 15.5 | 15.4 | 15.3 |
| sample | 0.00 | 0.02 | 0.04 | 0.08 | 0.19 |
| water | 9.1 | 9.1 | 9.1 | 9.1 | 9.1 |
| Total (%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

3-2-3 飼育期間中における測定項目及び HFD 摂取時の[Zn(hkt)₂]による抗 DM 効果の検討

飼育期間中、血糖値は 6 日毎に、体重、摂水量、摂餌量は 3 日毎に測定した。血糖値測定はマウスの尾静脈から血液を採取し、グルコカード（アークレイ株式会社、京都）を用いて行った。18 週間摂食実験終了後に、HbA1c 測定および経口糖負荷試験（OGTT）を行った。OGTT は 12 時間絶食処置後、グルコース 1 g/kg BW を経口投与し、投与後 0、15、30、60、90、120 分の血糖値を経時的に測定した。HbA1c 値は DCA2000（バイエル-三共、東京）を用いて免疫測定法により測定した。

3-2-4 生化学検査

得られた血漿中のトリグリセリド（TG）、尿素窒素（BUN）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT (GPT)）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST (GOT)）、総コレステロール（TCHO）、高比重リポタンパク質（HDL）は富士ドライケム（富士フィルムメディカル株式会社、東京）を用いて測定した。血漿インスリン値は超高感度マウスインスリン測定キット（森永生科学研究所、横浜）を用いて、血漿アディポネクチン濃度は Quantikine（R&D システム社、ミネソタ州、アメリカ合衆国）を用いて定量した。摘出した臓器のうち、肝臓、腎臓、膵臓は生理食塩水で洗浄した後、10%ホルマリン緩衝溶液に浸け、病理組織学的検査に用いた。

3-2-5 病理組織学的検査

10%ホルマリン緩衝溶液中で保存していた肝臓、腎臓、および膵臓は京都大学大学院

医学研究科附属総合解剖センターに、パラフィン包埋ブロック作成および、HE 染色、腎 PAS 染色を依頼した。膵臓については酵素標識二重染色法により、膵臓ランゲルハンス島中のインスリンとグルカゴンの二重染色を神戸大学大学院保健学研究科にて行った。染色には抗インスリンウサギ抗体 Insulin (H-86) (Santa Cruz 社、テキサス州、アメリカ合衆国)、抗グルカゴンマウス抗体 Glucagone Antibody (Novusbiological 社、コロラド州、アメリカ合衆国) を用いた。

3-2-6 臓器中の Zn 量の定量

ホルマリン溶液中で保管していた腎臓、膵臓は生理食塩水で洗浄し、減圧下で乾燥した。凍結していた肝臓、脂肪組織、骨格筋は室温において溶解させた後、生理食塩水で洗浄し、減圧下で乾燥させた。その後、適当量（臓器乾燥重量: 25-100 mg）を 50 mL トールビーカーに量りとり、60%硝酸（有害金属測定用）、60%過塩素酸（有害金属測定用）および 30%過酸化水素（原子吸光分析用）を用いて湿式灰化した。残留物は超純水で希釈調製した 5%硝酸 9 mL に溶解させ、ICP-MS を用いて、臓器中の Zn 量の定量を行った。

3-2-7 統計解析法

すべての実験結果は、平均値および標準偏差として表し、統計的な差は CNT を対照群として Dunnett 検定を用いて評価した。

3-3 結果

3-3-1 飼育期間中における変動

飼育期間中の体重、血糖値変動、摂餌量、摂水量の変化を測定した (Fig. 3-1)。体重は Normal 群で緩やかに増加し、PIO 群では顕著な体重増加が見られた。CNT 群、Zn 群では Normal 群よりも体重が増加する結果となったが、CNT 群、Zn 群の 2 群間での差は見られなかった (Fig. 3-1 (A))。PIO 群の示した顕著な体重増加は、ピオグリタゾンの副作用として報告されている体重増加と一致している。血糖値変動は、投与実験開始直後から、PIO 群では CNT 群に対して有意な血糖降下作用が見られ、Normal 群とほぼ同じ血糖値レベルを維持した。一方で、Zn 群では PIO 群が示した明らかな血糖降下作用は見られなかったが、飼育期間中、CNT 群よりも低い血糖値を維持していた。特に Day 42、93、111 において CNT 群よりも有意に血糖値が低下し、Day 93 以降は CNT 群と Zn 群との血糖値の差が大きくなっていった (Fig.3-1 (B))。摂餌量は Normal 群と他の 3 群で差が見られたが、KK-A^yマウスを用いた 3 群 (CNT、PIO および Zn 群) 間では差がなかった (Fig. 3-1 (C))。摂水量は、Normal 群と PIO 群がほぼ同じ摂水量を示し、CNT 群、Zn 群の 2 群と比較するとその摂水量は少なく、約 4 mL/day であった (Fig. 3-1 (D))。

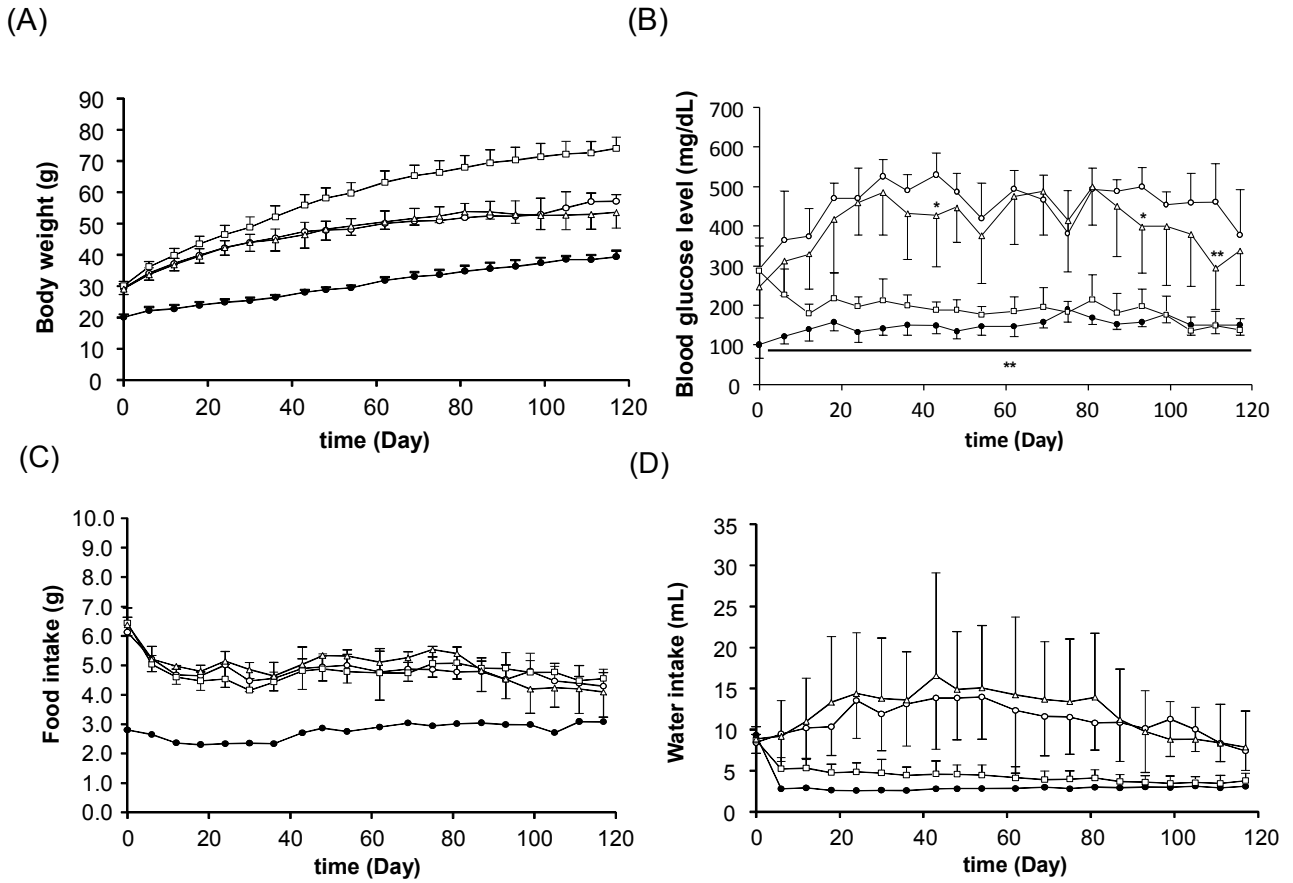


Fig. 3-1 Changes in body weight (A), blood glucose level (B), food intake (C), and water intake (D) in normal C57BL/6J mice (●), control KK-A^y mice (○), and KK-A^y mice treated with PIO (□) or [Zn(hkt)₂] (Δ).

Significance: * $P < 0.05$ vs. CNT, ** $P < 0.01$ vs. CNT

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Fig. 2)

3-3-2 生化学的検査

HFD 及び Zn 長期間摂取による腎機能、肝機能、脂質代謝への影響を、血漿サンプルを用いて測定した。腎機能の指標である BUN については 4 群間で差は見られなかった (Table 3-2)。肝機能については、ALT (GPT)、AST (GOT)ともに Normal 群に対して CNT 群で上昇し、DM 発症により肝機能が悪化していることが分かった (Table 3-2)。ALT (GPT)については PIO 群、Zn 群ともに CNT 群に対して数値が減少し、有意に肝機能が改善した。AST (GOT)については、PIO 群のみ CNT 群に対して有意な改善を示した。脂質代謝の指標である TG、TCHO、HDL についても測定を行った。TG では 4 群間で有意な変動は見られなかった。一方で、TCHO、HDL では PIO 群が有意に低値を示し、HDL では CNT 群に比べて Zn 群は減少傾向を示した。以上のことから、[Zn(hkt)₂]摂取によって肝機能が回復する傾向にあることが示された。

長期間にわたる血糖値変動の指標である HbA1c 値は PIO 群で有意な低下を示した (Fig. 3-2)。これは、飼育期間中の随時血糖値変動の結果と一致している。Zn 群については、CNT 群と有意な差は見られなかったが低下傾向を示した。

また、投与実験終了後に、インスリン抵抗性の指標である OGTT の実施ならびに血漿中インスリン濃度、アディポネクチン濃度の測定を行った。OGTT の結果、実験開始後 15 分、30 分、1 時間のポイントにおいて、Zn 群は CNT 群に対して有意な変化を示した (Fig. 3-3 (A))。この時の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) を算出すると、Zn 群は CNT 群に対して AUC が有意に減少し、空腹時における耐糖能の改善傾向が見られた (Fig. 3-3 (B))。血漿インスリン濃度については、CNT 群に対していずれの群においても有意なインスリン濃度の低下が見られた (Fig. 3-4 (A))。血漿アディポネクチン濃度については、CNT 群において低アディポネクチン血症を示し、Zn 群は CNT 群に対する有意な増加は見られなかった。一方で PIO 群は Normal 群と同程度にまで血漿中アディポネクチン濃度が回復していた (Fig. 3-4 (B))。

以上の結果から、Zn 群では PIO とは異なる作用点により、インスリン抵抗性が改善されている傾向にあると考えた。

Table 3-2 Serum parameters of normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), and KK-A^y mice treated with PIO or [Zn(hkt)₂] (Zn).

| | BUN | TG | TCHO | HDL | ALT (GPT) | AST (GOT) |
|---------------|------------|----------|------------|----------|-----------|-----------|
| | (mg/dL) | | | | (U/L) | |
| Normal | 21.2 ± 1.7 | 108 ± 20 | 135 ± 35* | 101 ± 28 | 16 ± 6** | 43 ± 5** |
| CNT | 21.5 ± 1.0 | 151 ± 29 | 184 ± 42 | 132 ± 31 | 95 ± 40 | 100 ± 7 |
| PIO | 20.2 ± 4.7 | 138 ± 36 | 121 ± 24** | 96 ± 9* | 61 ± 20* | 68 ± 10** |
| Zn | 18.6 ± 4.9 | 165 ± 47 | 175 ± 39 | 108 ± 28 | 53 ± 13** | 92 ± 22 |

Significance: * $P < 0.05$ vs. CNT, ** $P < 0.01$ vs. CNT

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Table 2 より一部改変)

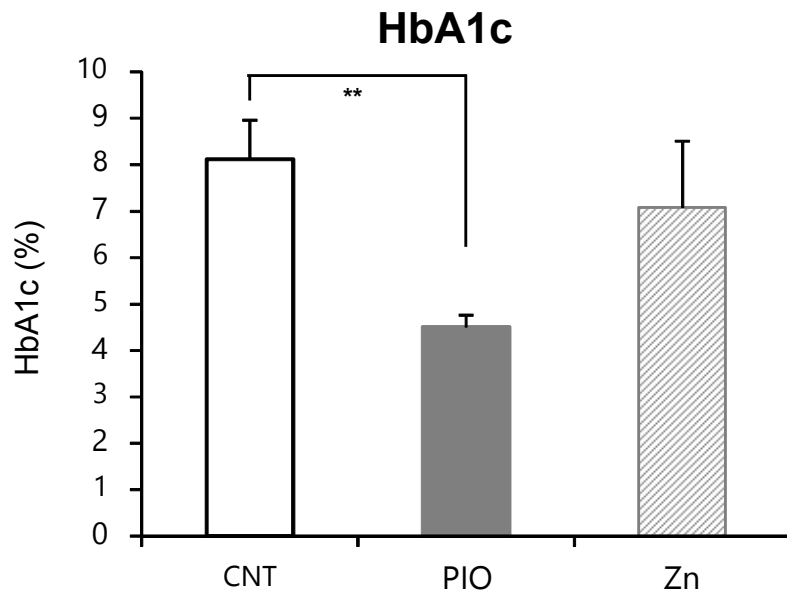


Fig. 3-2 HbA1c levels in control KK-A^y mice (CNT), and KK-A^y mice treated with PIO or [Zn(hkt)₂] (Zn).

Significance: ** $P < 0.01$ vs. CNT

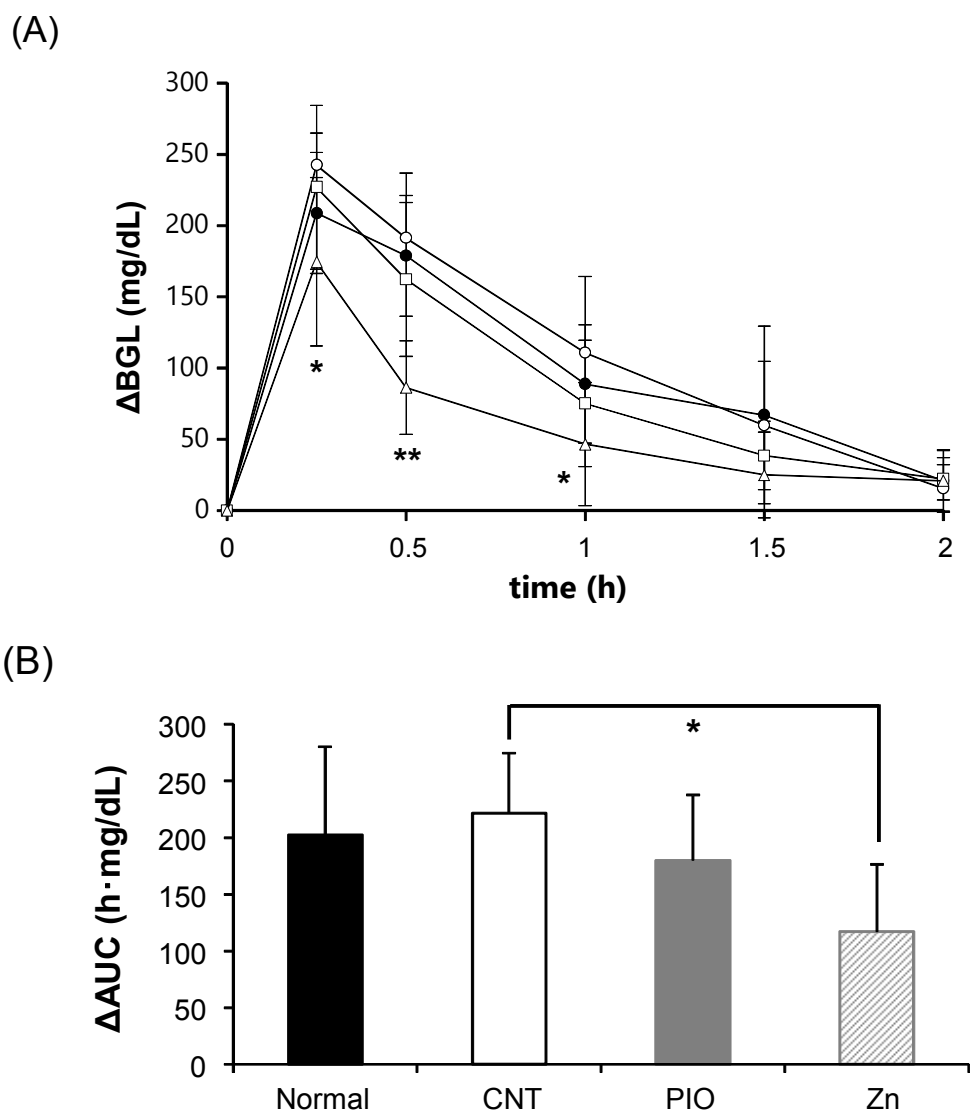


Fig. 3-3 OGTT for normal C57BL/6J mice (●), control KK- A^y mice (○), and KK- A^y mice after daily oral ingestion of PIO (□) or [Zn(hkt) $_2$] (Δ).

After being fasted for 12 h, mice were given an oral glucose solution at a dose of 1 g/kg body weight (A). Area under the blood glucose concentration-time curve (AUC) of normal C57BL/6J mice, control KK- A^y mice, and KK- A^y mice after daily oral ingestion of PIO or [Zn(hkt) $_2$] (B).

Significance: * $P < 0.05$ vs. CNT, ** $P < 0.01$ vs. CNT

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Fig. 3)

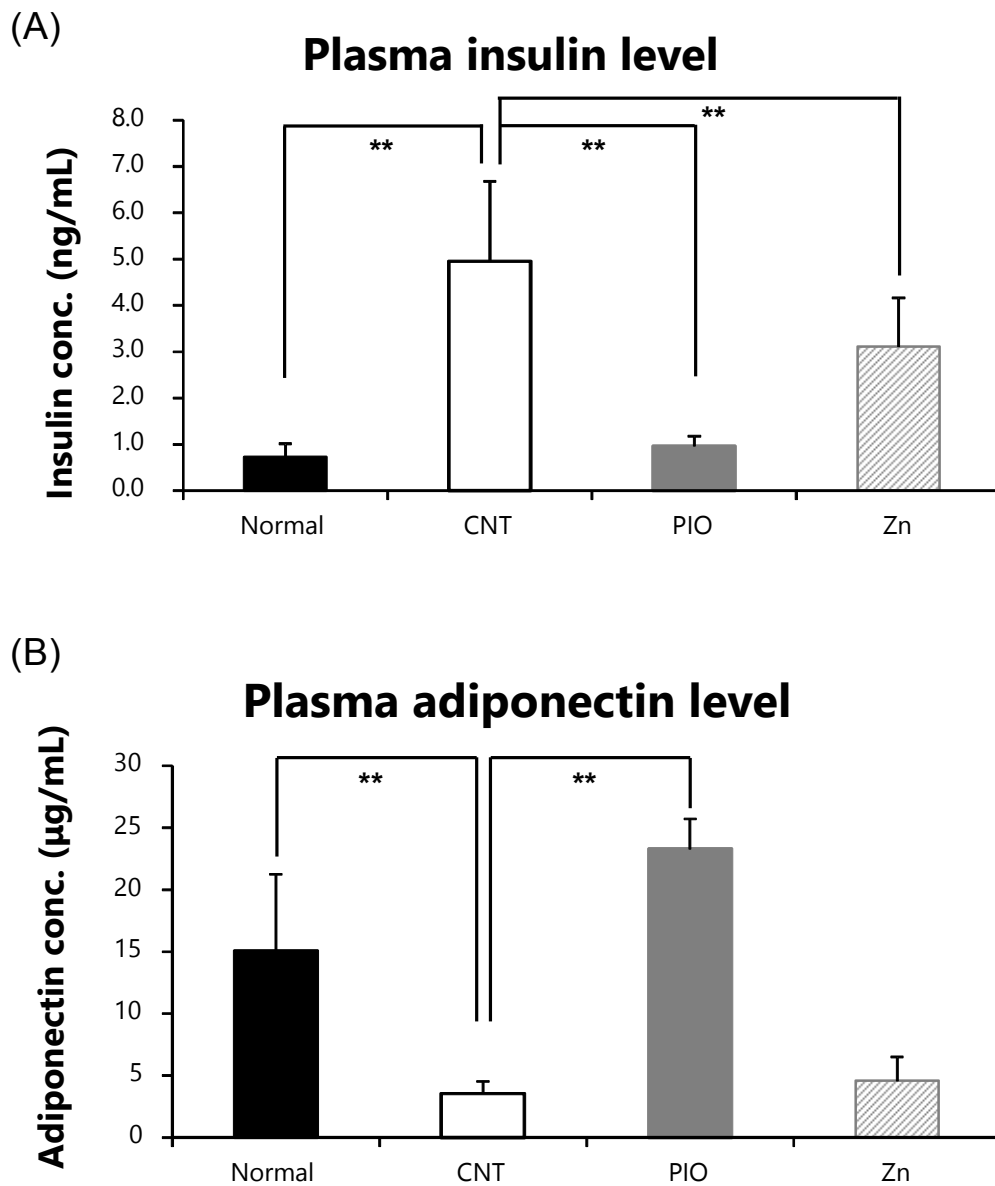


Fig. 3-4 Concentration of insulin (A) and adiponectin (B) in plasma of normal C57BL/6J mice (Normal), control KK- A^y mice (CNT), and KK- A^y mice treated with PIO or [Zn(hkt) $_2$] (Zn).

Significance: ** $P < 0.01$ vs. CNT

3-3-3 病理組織学的検討

[Zn(hkt)₂]の長期間摂取により血漿インスリン濃度が改善していることから、インスリン分泌に関与している膵臓の病理学的検討を行うこととした。また[Zn(hkt)₂]長期摂取による、DM 性合併症への進展予防効果についても併せて検討するため、腎臓についても病理組織学的検討を行った。膵臓については HE 染色ならびに酵素標識二重染色法により、インスリン陽性細胞およびグルカゴン陽性細胞について免疫染色を行った。腎臓は糸球体の変化を観察するため HE 染色に加え、PAS 反応を用いて染色を行った。

膵臓では、HE 染色標本から CNT 群において著しいランゲルハンス島の肥大化が観察されたが、PIO 群、Zn 群ではランゲルハンス島の肥大化が抑制されていた (Fig. 3-5)。そこで、膵臓ランゲルハンス島中のインスリン陽性細胞数ならびにグルカゴン陽性細胞数について、二重免疫染色法を用いて定量的な評価を行った (Fig. 3-6)。その結果、1つのランゲルハンス島中のインスリン細胞数は CNT 群に対して PIO 群、Zn 群は有意に減少し、Normal 群と同レベル程度であった (Fig. 3-6)。

また、膵臓における機能や分化の役割を担う PDX-1 についても免疫染色を行い、ランゲルハンス島中の PDX-1 陽性細胞数を定量した。その結果、PDX-1 陽性細胞数の群間における変動は、インスリン陽性細胞数の結果と類似した。CNT 群は Normal 群に比べて PDX-1 陽性細胞数が増加し、PIO 群、Zn 群は CNT 群に比べると減少した (Fig. 3-7)。

腎臓においては、組織切片中の皮質における一定面積あたりの糸球体ポーマン嚢数について PAS 染色標本を用いて観察した。4 群間での糸球体ポーマン嚢数に差は見られなかった (Fig. 3-8)。また同じ PAS 染色標本を用いて、DM による糸球体肥厚の変化を観察したが、糸球体肥厚についても 4 群間における組織形態学的な変化は見られなかった (Fig. 3-9)。

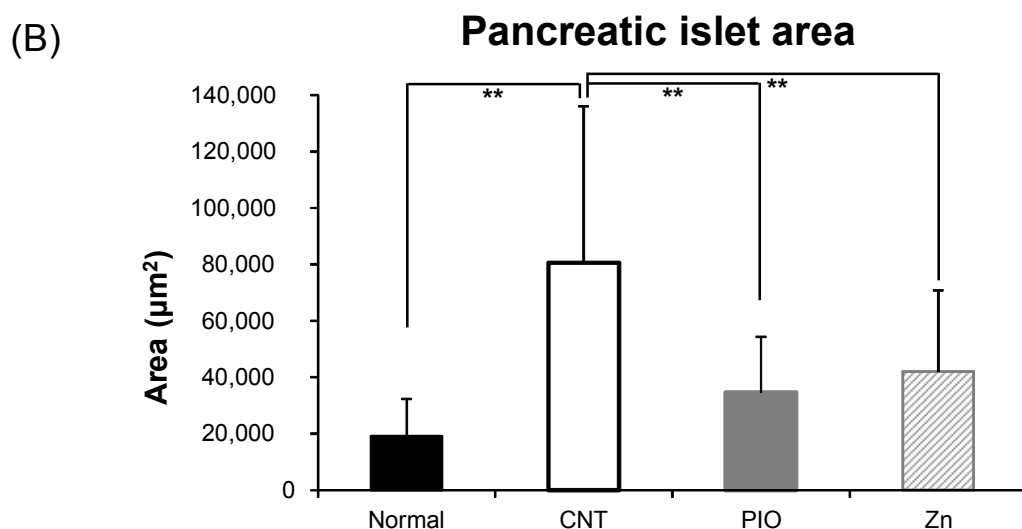
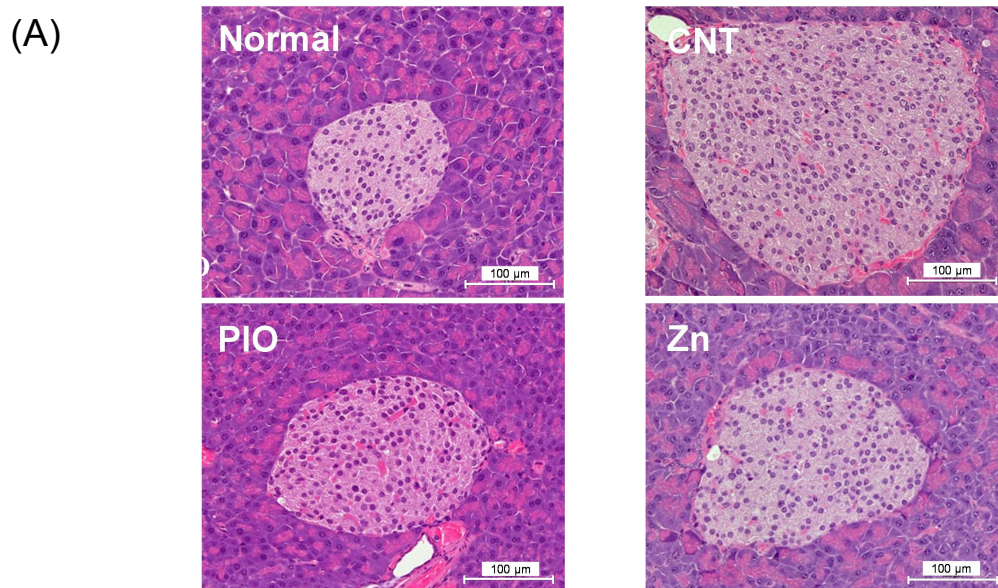


Fig. 3-5 HE staining of pancreatic islet cells in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), KK-A^y mice daily treated with PIO or [Zn(hkt)₂] (Zn).

HE staining (scale bar = 100 μm) (A) and pancreatic islet area (B) in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), KK-A^y mice daily treated with PIO or [Zn(hkt)₂] (Zn). The numbers of analyzed images are as follows: for the Normal group n = 35, the CNT group n = 42, the PIO group n = 33, and the Zn group n = 52.

Significance: ***P* < 0.01 vs. CNT

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Fig. 4)

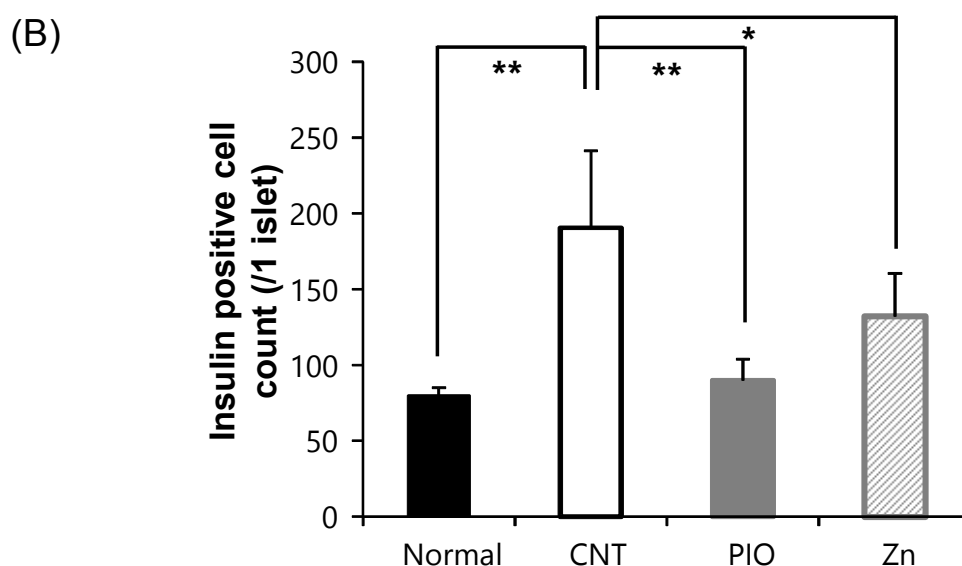
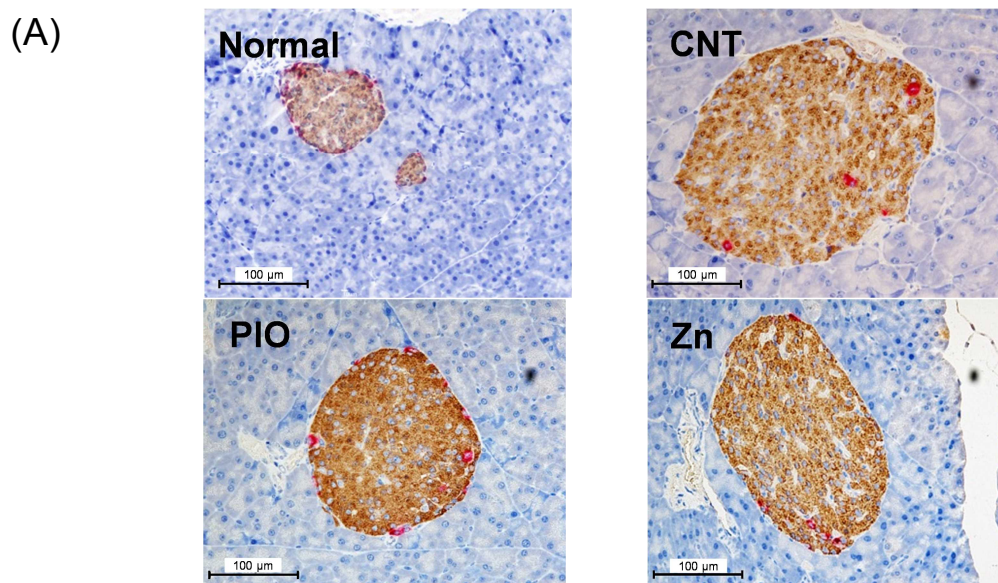


Fig. 3-6 Immunostaining of insulin in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), KK-A^y mice treated daily with PIO or with [Zn(hkt)₂] (Zn).

Double immunostaining for insulin (brown color) and glucagon (red color) (scale bar = 100 µm) (A) and insulin positive cell counts (B) in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), KK-A^y mice daily treated with PIO or [Zn(hkt)₂] (Zn). The numbers of analyzed images are as follows: for the Normal group n = 59, the CNT group n = 90, the PIO group n = 48, and the Zn group n = 100.

Significance: **P* < 0.05 vs. CNT, ***P* < 0.01 vs. CNT

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Fig. 5)

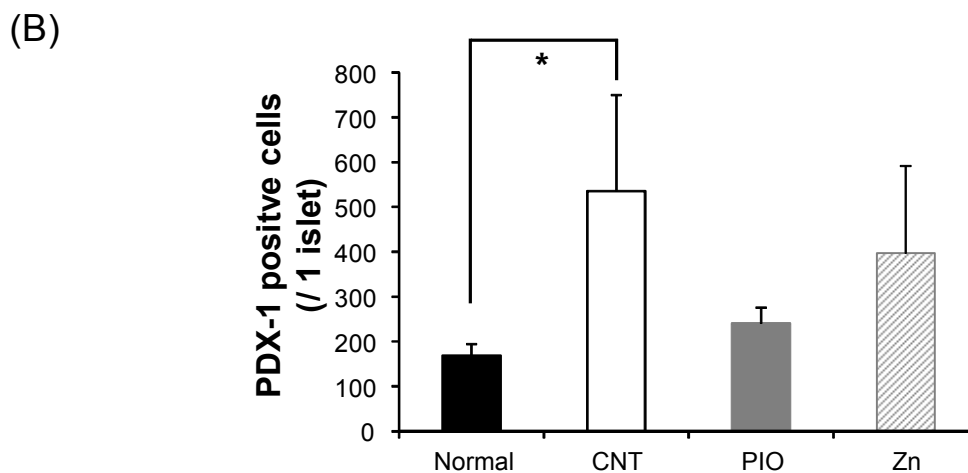
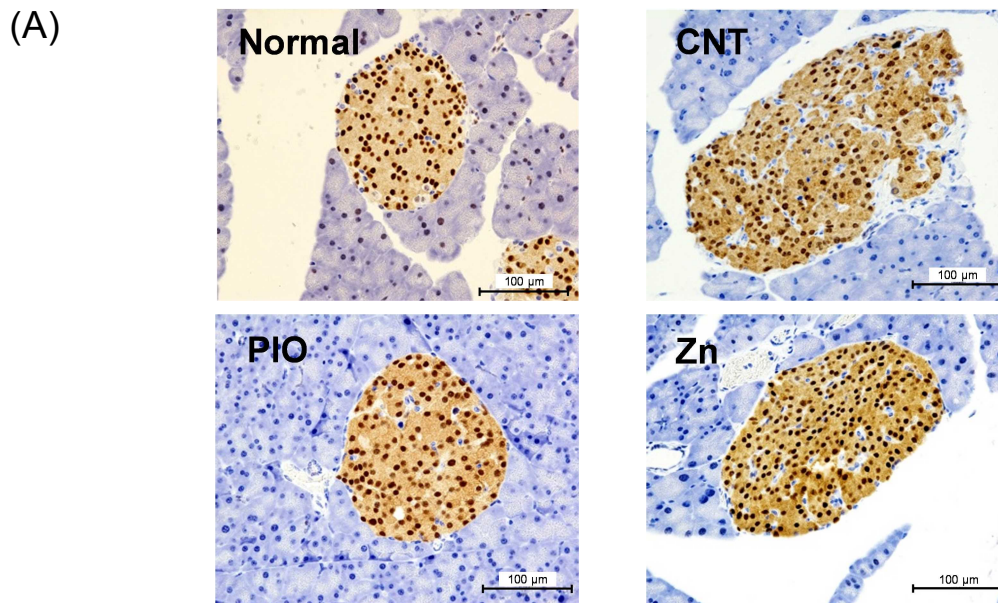


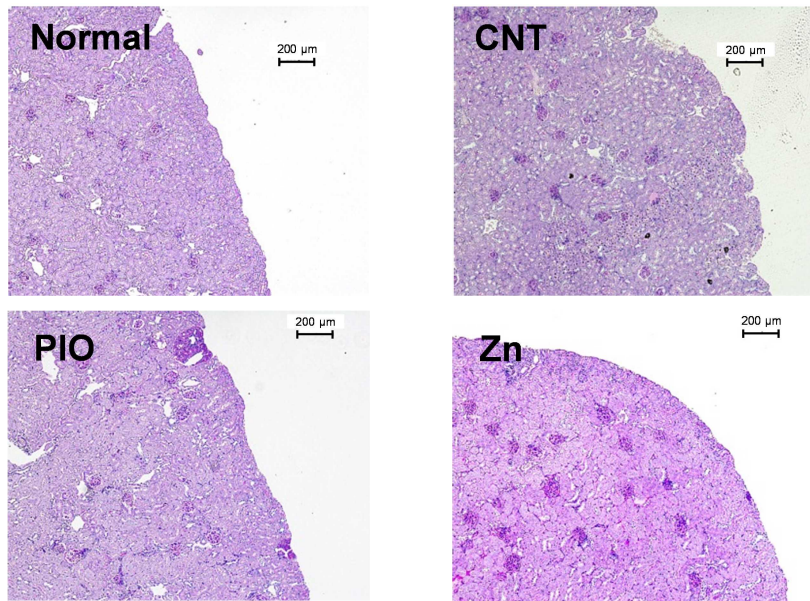
Fig. 3-7 Immunostaining of PDX-1 in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK- A^y mice (CNT), KK- A^y mice treated daily with PIO or [Zn(hkt) $_2$] (Zn).

Immunostaining for PDX-1 (scale bar = 100 μ m) (A) and PDX-1 positive cell counts (B) in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK- A^y mice (CNT), KK- A^y mice daily treated with PIO or [Zn(hkt) $_2$] (Zn). The numbers of analyzed images are as follows: for the Normal group n = 31, the CNT group n = 33, the PIO group n = 36, and the Zn group n = 59.

Significance: * $P < 0.05$ vs. CNT

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Fig. 6)

(A)



(B)

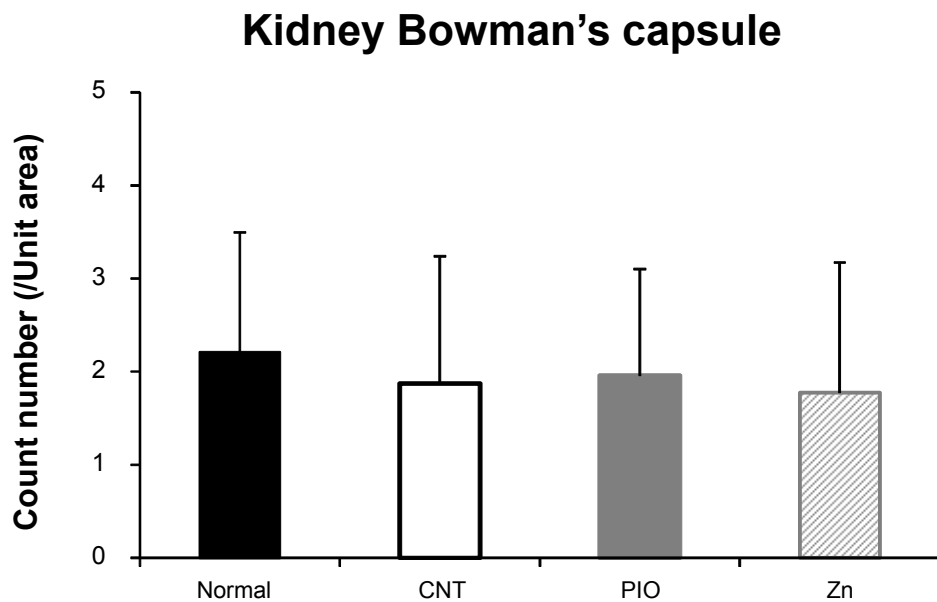


Fig. 3-8 PAS staining of kidney glomeruli in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), KK-A^y mice daily treated with PIO or [Zn(hkt)₂] (Zn).

PAS staining (scale bar = 200 μm) (A) and kidney Bowman's capsule counts (B) in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), KK-A^y mice daily treated with PIO or [Zn(hkt)₂] (Zn). The numbers of analyzed images are as follows: for the Normal group n = 60, the CNT group n = 60, the PIO group n = 60, and the Zn group n = 60.

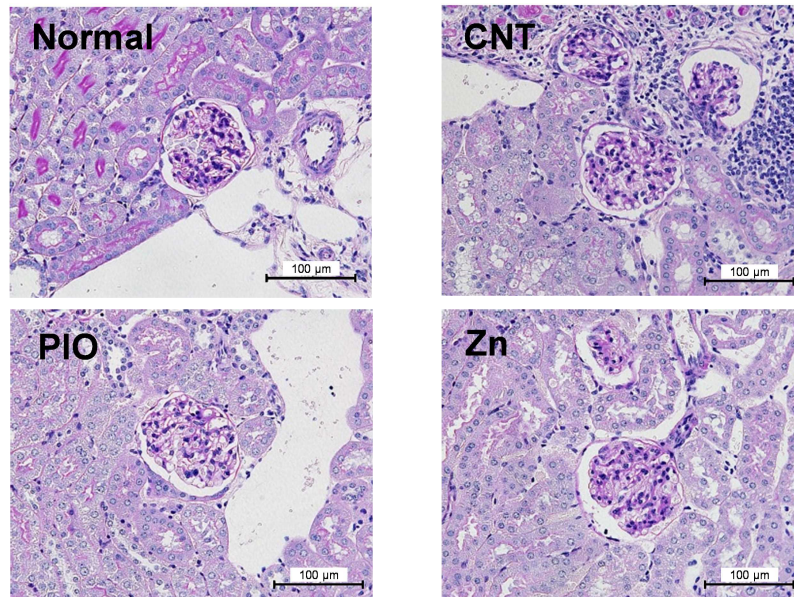


Fig. 3-9 PAS staining of kidney glomeruli to measure the thickened glomeruli in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), KK-A^y mice daily treated with PIO or [Zn(hkt)₂] (Zn).

PAS staining (scale bar = 100 μm) in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), KK-A^y mice daily treated with PIO or [Zn(hkt)₂] (Zn).

3-3-4 [Zn(hkt)₂]長期摂取による各組織への Zn 集積性

病理組織学的検討から、[Zn(hkt)₂]長期摂取による膵臓への影響が示唆されたので、膵臓への Zn 集積性について検討するため、ICP-MS を用いて膵臓中の Zn 量を定量した。また、膵臓の他に肝臓、腎臓、骨格筋、脂肪組織についても Zn 集積性に関して臓器中の Zn 量を定量し、検討を行った (Table 3-3)。

膵臓において Zn の集積性は 4 群間に差は見られず、乾燥臓器重量 1 g あたり約 40 μg 量の Zn が集積していた。肝臓については、Normal 群に対して CNT 群では Zn の集積性が著しく減少していた。一方、Zn 群は臓器中 Zn 量が回復する傾向にあった。腎臓においては、CNT 群に対して Zn 群は有意に減少する結果となった。骨格筋では、CNT 群に比べて PIO 群、Zn 群では Zn 量が増加する傾向にあった。脂肪組織では、Normal 群に比べ DM 状態である KK-A^y マウスでは Zn 量が蓄積する傾向にあり、さらに PIO 群、Zn 群では CNT 群に対して Zn 量が増加する傾向であった。

Zn 群について、特に注目すべき点として肝臓中の Zn 量が CNT 群に比べて増加していることが挙げられる。加えて、骨格筋と脂肪組織でも増加傾向であった。一方で、PIO 群について着目すると、膵臓と腎臓では Zn 量に大きな変化は見られなかったが、肝臓、骨格筋、脂肪組織では Zn 量が増加する傾向にあった。このことから、PIO による DM 治療効果には、インスリン抵抗性関連臓器における Zn 量の回復が関係している可能性がある。

Table 3-3 Organ distribution of Zn concentration (μg/g wet weight) in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A^y mice (CNT), and KK-A^y mice treated with pioglitazone (PIO) or [Zn(hkt)₂] (Zn).

| | Liver | Kidney | Muscle | Fat | Pancreas |
|--------|---------------|-----------|---------|-----------|----------|
| | (μg/ g organ) | | | | |
| Normal | 62 ± 14 * | 67 ± 4 | 30 ± 7 | 1.9 ± 0.7 | 44 ± 6 |
| CNT | 20 ± 6 | 71 ± 3 | 41 ± 10 | 5.6 ± 2.3 | 37 ± 5 |
| PIO | 39 ± 8 | 62 ± 8 | 57 ± 13 | 8.4 ± 6.0 | 36 ± 8 |
| Zn | 49 ± 21 | 56 ± 10 * | 52 ± 18 | 7.4 ± 3.7 | 44 ± 8 |

Significance: *P < 0.05 vs. CNT

(*Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326., Table 3)

3-4 考察

第2章の研究結果より、 $[Zn(hkt)_2]$ が直接膵臓に作用した場合、膵臓機能を保護する作用を有する可能性が示された。この知見をもとにして、18週間の長期間にわたり、 $[Zn(hkt)_2]$ を摂取した場合のDM治療効果について検討を行った。

長期間の $[Zn(hkt)_2]$ 摂取では、飼育期間中の顕著な血糖降下作用は見られなかった (Fig. 3-1 (B))。しかし、摂取期間終了後に行ったOGTTでは $[Zn(hkt)_2]$ 摂取群において有意な変化が見られ、かつ、解剖時に採取した血漿サンプルを用いて測定したインスリン濃度は有意に低下していた (Figs. 3-3, 3-4)。これらのデータは、 $[Zn(hkt)_2]$ 摂取群では、空腹時におけるグルコース処理能力が改善し、DMの症状の一つである高インスリン血症が正常化に向かう結果であり、 $[Zn(hkt)_2]$ 摂取はインスリン抵抗性を改善することが示唆された。一方、血漿中アディポネクチン濃度についてELISA法を用いて測定した結果、 $[Zn(hkt)_2]$ 摂取群ではアディポネクチン量の増加は見られなかった。これらの結果から、 $[Zn(hkt)_2]$ が示す抗DM効果、*in vivo*におけるインスリン抵抗性改善効果は、PIOが示す抗DM効果とは異なることが示唆された。一方、チアゾリジン系薬剤であるPIOを摂取した群では、飼育期間中、投与開始直後から顕著な血糖降下作用を示し、血漿中インスリン濃度および血漿中アディポネクチン濃度においてもCNT群に対して有意に改善する結果となった。

チアゾリジン系薬剤が脂肪細胞分化誘導作用を有していることはこれまでの研究から明らかであり[79]、PPAR γ に直接結合して転写活性化能を上昇させる[80]。また、血中アディポネクチン濃度はチアゾリジン薬によって正に制御されることが知られている[81]。実際、本研究においても、PIO群は血漿中アディポネクチン濃度を上昇させ、血漿中インスリン濃度は減少させる結果となり、インスリン抵抗性を改善している。PIO摂取では有意な血糖降下作用とインスリン抵抗性の改善が見られたが、飼育期間中において体重増加が顕著であり、他のKK-A y マウス群よりもその増加率は大きかった。この著しい体重増加は、PIO摂取による副作用の一つである浮腫によるものと考えられる[82]。このような顕著な体重増加は、 $[Zn(hkt)_2]$ 摂取では見られなかった。この点において、 $[Zn(hkt)_2]$ 摂取はPIO摂取に比べると副作用が少ないと言える。

病理組織学的に形態的および機能的評価を行ったところ、 $[Zn(hkt)_2]$ 摂取は膵臓ランゲルハンス島の肥大化抑制と、それに伴うランゲルハンス島1個あたりのインスリン陽性細胞数をNormal群レベルにまで回復する効果が認められた (Figs. 3-5, 3-6)。血漿中インスリン濃度の結果を踏まえると、 $[Zn(hkt)_2]$ 摂取はインスリン抵抗性を改善すると結論づけることが可能である。また、膵臓の機能的評価の一つとして抗PDX-1抗体を用いた免疫染色を行った結果、CNT群、PIO群、および $[Zn(hkt)_2]$ 群のうちでは有意な変化は見られなかったが、PDX-1陽性細胞数はインスリン陽性細胞数のカウント結果と類似した結果を示し、CNT群で著しく上昇したPDX-1陽性細胞数は、 $[Zn(hkt)_2]$ 摂取によって減少する傾向となった (Fig. 3-7)。

一方、PIO摂取群においては、血漿中インスリン濃度および膵臓におけるインスリン陽性細胞数が減少した。PIOは末梢組織の一つである脂肪組織において強い作用を示す

ことが知られている[83, 84]。すなわち、PIOはPPAR γ の標的分子の協調的変化に基づく糖代謝改善によって、肝臓や骨格筋に蓄積した脂肪が脂肪細胞へと流れるようになり、脂肪毒性が軽減し、また、アディポネクチンの分泌を促進させることでインスリン抵抗性を改善すると考えられている[81, 85, 86]。

さらに、各臓器中でのZn量をICP-MSを用いて測定を行い、群間における変化を評価した。膵臓におけるZn量は各群間で有意な差は認められなかった。また、形態的および機能的評価から膵臓ランゲルハンス島の単位面積あたりのインスリン陽性細胞数や、PDX-1陽性細胞数には、CNT群、PIO群、Zn群間では有意な差は無かった (Fig. 3-10)。さらに、2-3-3の結果より、仮に膵臓に対してZnの直接作用があればインスリンやPDX-1の陽性細胞数は増加すると予測されるため、*in vivo*において[Zn(hkt) $_2$]が膵臓に直接作用して、DM治療効果を示す可能性は低いと考えられた。

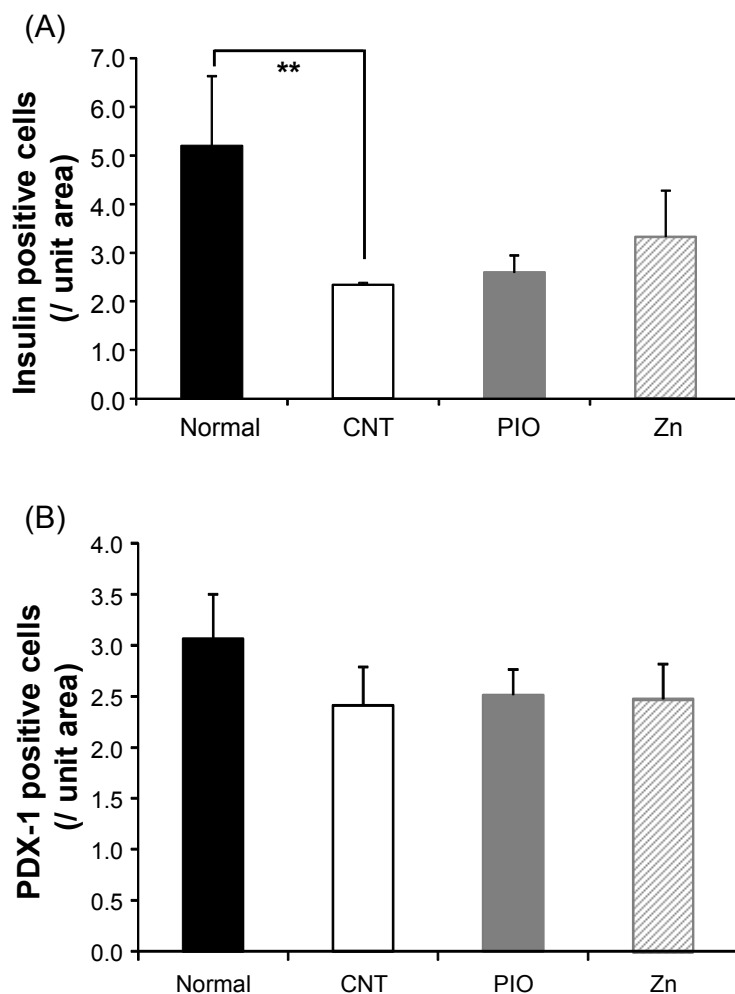


Fig. 3-10 Immunostained cell numbers of insulin (A) and PDX-1 (B) per unit area in normal C57BL/6J mice (Normal), control KK-A y mice (CNT), KK-A y mice daily treated with PIO or [Zn(hkt) $_2$] (Zn).

The numbers of analyzed images are the same as in Fig. 3-6, and Fig. 3-7.

Significance: ** $P < 0.01$ vs. CNT

また、肝臓における Zn 量は、[Zn(hkt)₂]摂取群では CNT 群に比べると約 2 倍程度まで上昇していた ($P < 0.08$) (Table 3-3)。アディポネクチン受容体 (AdipoR) として、AdipoR1 と AdipoR2 が知られている。AdipoR1 は主に骨格筋に発現し、肝臓中にも存在している。さらに、AdipoR2 は肝臓中で発現していると言われている[87]。Tanabe らは、AdipoR1 と AdipoR2 の 7 回膜貫通構造中での金属イオン配位領域において、Zn イオンが受容体に配位結合していることを報告している[88]。その X 線結晶構造解析による報告では、AdipoR1 と AdipoR2、およびそれぞれの変異型 AdipoR を用いた実験により、受容体が機能を発揮するための分子構造を維持するうえで受容体への Zn の配位結合が必要であることを示している。これらのことから、肝臓中における Zn 量の減少は AdipoR1、AdipoR2 の機能を低下し、アディポネクチン結合後における AdipoR の活性化を抑制することが示唆される。本研究において、CNT 群で減少していた肝臓中の Zn 量が、[Zn(hkt)₂]摂取群で回復していたことは、[Zn(hkt)₂]摂取が肝臓中の Zn 量を高め、AdipoR の感受性を改善し、結果として、アディポネクチンの効果を強めた可能性もある。

これまでに、著者は *in vitro* 系において [Zn(hkt)₂] が末梢組織の脂肪細胞においてインスリン様作用を示すことを報告している[89, 90]。[Zn(hkt)₂] は脂肪細胞に対して作用し、インスリンシグナル経路を活性化するが、本長期投与実験で用いた [Zn(hkt)₂] 設定量 (10-30 mg Zn/kg BW) では骨格筋や脂肪組織といった末梢組織において作用し、インスリン抵抗性を改善したが、随時血糖値を正常化するには不十分であったと考えられる。しかし、膵臓ランゲルハンス島の肥大化を抑制し、その結果インスリン陽性細胞数の増加を抑制し、最終的に膵臓ランゲルハンス島の機能保護作用に至ることは認められた[91]。今後、最適な Zn 投与量を確立していけば、より有効な結果が得られる可能性は高い。なお、この抗 DM 効果は PIO 摂取によるアディポネクチン分泌促進を介した抗 DM 効果とは異なるメカニズムである。

総括

DMは高血糖を主症状とする慢性代謝疾患であり、全世界におけるDM患者数は年々増加している。また、DM治療のみならず、発症予防についても有効な対策を取らなければ、DM患者数はさらに増加すると考えられている。DM治療の指針として、運動療法、食事療法の後に薬物療法があり、現在、様々な種類のDM治療薬が臨床現場では使用されているが、現在使用されているDM治療薬では低血糖など重篤な副作用を起こす可能性があり、副作用の少ない新規DM治療薬の開発が望まれている。

Znイオンはインスリンとβ鎖10位のヒスチジンに配位結合することでインスリン六量体を形成することができ、このインスリン六量体は血液中で安定に存在している。Znイオンはインスリン様活性を有するといった生理学的、薬理的機能において非常に重要な役割を担っている。一方で、これまで数々の研究において、DM患者の体内Zn量と健常者の体内Zn量が異なり、重症のDM患者は尿中のZn排泄量が多いことも知られている。このことから、Zn量をコントロールすることが、新たなDM治療の一つになり得る。

本研究では、Zn錯体の安全性に留意し、配位子に天然物抽出化合物であるヒノキチオールを使用した[Zn(hkt)₂]を用い、この[Zn(hkt)₂]が示すインスリン様活性の作用メカニズムを解明することを目的とし、第1章ではインスリン標的組織の一つである脂肪組織に着目し、マウス培養脂肪細胞である3T3-L1脂肪細胞を用いて検討を進めた。

生体内においてインスリンが標的組織における細胞に作用すると、インスリンは細胞膜に存在するインスリン受容体に結合し、IRβのチロシンリン酸化をきっかけに、シグナル伝達が下流へと伝わり、PI3Kを介してAktのリン酸化が促進されていく。この時PTP1Bは、IRβに対してチロシンホスファターゼとして働き、脱リン酸化を促し、PTENはPI3Kを介して生成されたPIP₃を脱リン酸化し、インスリンシグナル経路を抑制する働きをする。これに対して、3T3-L1脂肪細胞において[Zn(hkt)₂]はインスリンとは異なる作用点によってAktのリン酸化を促進することが示唆された。すなわち、[Zn(hkt)₂]がまず細胞内に取り込まれた後、インスリンシグナル経路においてPTP1B、PTENに対して阻害的に働くことでインスリンシグナル伝達が増強し、加えて、PI3Kに対して作用するIntegrin-FAK (Focal Adhesion kinase)、Paxillin-ILK (Integrin-linked kinase)、GPCRs経路などインスリンシグナル経路外のタンパク質を介してAktリン酸化を促進する可能性が考えられた。

臨床現場における最近のDM治療指針の一つとして、膵臓ランゲルハンス島β細胞数を保持し、インスリン分泌能を可能な限り維持させることが重要であると考えられている。そこで、[Zn(hkt)₂]が膵臓へ直接作用した場合の影響について検討するため、第2章ではラットインスリノーマRIN-5F細胞を用いて実験を行った。

グルコース濃度の異なる2つの培地条件で検討したところ、RIN-5F細胞は[Zn(hkt)₂]によるAktリン酸化促進作用に対して異なる応答性を示し、RIN-5F細胞に対するグルコース暴露量の違いによって、細胞の応答性が異なることが明らかとなった。膵β細胞におけるインスリンシグナル経路は、膵β細胞機能や膵β細胞量の調節に関わっている。Aktリン酸化促進作用の応答性が顕著では無かった高グルコース(25 mM)培地条件下でリアルタイム

ム PCR を用いて検討したところ、2 時間の[Zn(hkt)₂]処理時には PDX-1 mRNA 発現量が増加し、またこの時のインスリン mRNA は、[Zn(hkt)₂]処理によって発現量が増加していることが分かった。高グルコース (25 mM) 培地条件下では、[Zn(hkt)₂]は膵 β 細胞の機能維持および β 細胞量の調節に寄与していると考えられ、[Zn(hkt)₂]処理によって、まず PDX-1 mRNA 発現量が増加し、続いてインスリンの転写活性が上昇したと考えられる。以上より、[Zn(hkt)₂]処理は膵臓機能に影響する可能性があることが示された。

これまでの 3T3-L1 脂肪細胞およびラットインスリンノーマ RIN-5F 細胞を用いた *in vitro* 系の評価において[Zn(hkt)₂]が示す抗 DM 作用やインスリン様活性を示す作用メカニズムを明らかにしてきた。そこで第 3 章では、2 型 DM モデルの KK-A^y マウスを用いて *in vivo* 系における[Zn(hkt)₂]が示す抗 DM 作用、長期投与による安全性ならびに、インスリン分泌を担う膵臓に対する保護作用および DM 性腎症への予防効果を PIO 摂取群を対照薬物として検討した。なお DM 症状を早期に発症させ、重篤化させるため、HFD 負荷条件で検討した。

HFD に混ぜた[Zn(hkt)₂]を 18 週間長期間摂取した場合、CNT 群に比べてグルコース処理能力の改善が認められた。血漿中インスリン濃度、および、血漿中アディポネクチン濃度について測定した結果は、[Zn(hkt)₂]摂取による抗 DM 治療効果が、PIO 摂取による作用とは異なることを示唆した。インスリン分泌に関与している膵臓について病理組織学的検討を行い、形態的变化および機能的変化を評価したところ、[Zn(hkt)₂]摂取群においてはランゲルハンス島の肥大化が有意に抑制されていた。これらの変動が、膵臓への Zn の移行性によるものかを検討するため、ICP-MS を用いて各臓器における Zn 量について定量した。膵臓においては、[Zn(hkt)₂]摂取により CNT 群よりも Zn 量が増加する傾向にあった。しかし、この変化は有意なものではなかったため、[Zn(hkt)₂]摂取では膵臓への移行性および膵臓での直接的な作用は起こらなかったと考えた。その他、肝臓、骨格筋、脂肪組織についても [Zn(hkt)₂]摂取により増加する傾向が見られたが、腎臓においては逆に [Zn(hkt)₂]摂取群では CNT 群と比べると Zn 量が有意に減少し、[Zn(hkt)₂]摂取による腎臓への蓄積は認められなかった。[Zn(hkt)₂]摂取による DM 性腎症に対する保護効果を期待していたが、Zn の摂取過多により腎機能が低下するという報告もあるため、病理組織学的検討を同時に行った。その結果、腎臓への影響は CNT 群でも、各種サンプル投与群でも認められなかったため、今回の研究における Zn 量の変動は腎臓に影響を及ぼすレベルではないと判断した。

[Zn(hkt)₂]が脂肪組織内において作用することで、インスリンとは異なる作用点に働きかけ、インスリンシグナル経路を活性化させ、インスリン刺激によるシグナル伝達の活性化を促進する。これらの作用は PIO のようなチアゾリジン系薬剤が示すアディポネクチン分泌促進作用を介したものと異なっていた。つまり、脂肪組織におけるインスリン抵抗性を改善することで、DM 時に代償的に増加するインスリン産生を抑制し、血中インスリン濃度を正常化に導く。その結果、膵臓ランゲルハンス島中の β 細胞数の増加抑制ならびにランゲルハンス島の肥大化を抑制する。このランゲルハンス島の肥大化抑制が、最終的に膵臓における機能保護作用を示し、[Zn(hkt)₂]は末梢組織におけるインスリン抵抗性の改善作用ならびに間接的な膵臓保護作用により、安定的、持続的な抗 DM 作用を示すと結論づけた。

謝 辞

本学位論文は、筆者が京都薬科大学大学院 薬学研究科博士前期課程 在学中ならびに京都薬科大学 代謝分析学分野 奉職中に同研究室において行った研究をまとめたものです。

本研究を行うにあたり終始ご指導ご鞭撻を賜りました京都薬科大学 安井 裕之教授に謹んで深謝申し上げます。また数々のご助言およびご協力を頂きました神戸女子大学 健康福祉学部 吉川 豊教授に心より感謝申し上げます。

糖尿病モデル KK-A^yマウスを用いた *in vivo* 実験では、特殊高脂肪食の作製のためにご指導頂いた神戸女子大学 健康福祉学部 梶原 苗美特任教授、臓器を用いた病理組織学的な検討にご協力頂いた神戸大学大学院 保健学研究科 病理学研究室 鴨志田 伸吾教授、神戸常盤大学 保健科学部 新谷 路子准教授に深謝申し上げます。

[Zn(hkt)₂]が酵素タンパク質である PTP1B、PTEN に対して作用しうることを示唆するドッキングシミュレーションの計算を実行して下さいました就実大学 薬学部 増田 和文准教授に感謝申し上げます。

イムノプロットの実験手法に数多くのご助言を賜りました摂南大学 薬学部 山岸 伸行教授、京都薬科大学 薬学教育研究センター 開 章宏講師、同衛生化学分野 西田 健太郎講師に感謝申し上げます。

度重なる休日の時間外利用にもかかわらず、快く自動現像機の使用許可を下さり、メンテナンス対応して頂きました京都薬科大学 RI センター 村田 保元講師にお礼申し上げます。

厳しくも温かい助言を頂きました味の素株式会社 安達 祐介博士、マルホ製薬株式会社 諸木 孝泰博士にお礼申し上げます。

本実験に協力して頂いた京都薬科大学 代謝分析学分野の学生諸氏に謝意を表します。

最後になりましたが、これまで自分の思う道に進むことを応援し、数多くのサポートをして頂いた家族に、特に両親に、書面を借りて感謝申し上げます。

業績目録

学術論文

<主論文>

1. Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, and Hiroyuki Yasui. Cellular mechanism of zinc-hinokitiol complexes in diabetes mellitus. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 298-305.
2. Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, Kazufumi Masuda, and Hiroyuki Yasui. Bis(hinokitiolato)zinc complex ($[Zn(hkt)_2]$) activates Akt/protein kinase B independent of insulin signal transduction. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548.
3. Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, Michiko Shintani, Shingo Kamoshida, Naemi Kajiwara, and Hiroyuki Yasui. Anti-hyperglycemic effect of long-term bis(hinokitiolato)zinc complex ($[Zn(hkt)_2]$) ingestion on insulin resistance and pancreatic islet cells protection in type 2 diabetic KK- A^y mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326.

<副論文>

1. Yuki Naito, Naoko Ikuta, Daisuke Nakata, Keiji Terao, Kinuyo Matsumoto, Naemi Kajiwara, Ayaka Okano, Hiroyuki Yasui, and Yutaka Yoshikawa. Antidiabetic effects of the α -lipoic acid γ -cyclodextrin complex. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2014**, 55, 97-102.
2. Yuki Naito, Naoko Ikuta, Ayaka Okano, Hinako Okamoto, Daisuke Nakata, Keiji Terao, Kinuyo Matsumoto, Naemi Kajiwara, Hiroyuki Yasui, and Yutaka Yoshikawa. Isomeric effects of anti-diabetic α -lipoic acid with γ -cyclodextrin. *Life Sci.* **2015**, 136, 73-78.

プロシーディング

1. Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, and Hiroyuki Yasui. Zn(hinokitiol) $_2$ complex, as a potent anti-diabetic candidate, activates the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes through an insulin-independent stimulation. *Hemorheology and Related Research (suppl), Proceeding of IS BAGUH-KU.* **2014**, 24.
2. Ayaka Okano, Yuki Naito, Naoko Ikuta, Daisuke Nakata, Keiji Terao, Kinuyo Matsumoto, Naemi Kajiwara, Yutaka Yoshikawa, and Hiroyuki Yasui. Therapeutic and preventive effects of α -lipoic acid/ γ CD complex on type 2 diabetes in KKA y mice. *Hemorheology and Related Research (suppl), Proceeding of IS BAGUH-KU.* **2014**, 13.

参考文献

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes ATLAS 7th Edition. **2015**.
2. 厚生労働省. 平成 25 年国民健康・栄養調査報告. **2015**.
3. World Health Organization. World Health Statistics 2012. **2012**.
4. Michael S. Clegg, Lynn A. Hanna, Brad J. Niles, Tony Y. Momma, and Carl L. Keen. Zinc deficiency-induced cell death. *IUBMB Life* **2005**, 57, 661-669.
5. Wim Wätjen, Hajo Haase, Marta Biagioli, and Detmar Beyersmann. Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environ. Health. Perspect.* **2002**, 110, 865-867.
6. Arthur B. Chausmer. Zinc, Insulin and Diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.* **1998**, 7, 109-115.
7. Satoru Yamasaki, Kumiko Sakata-Sogawa, Aiko Hasegawa, Tomoyuki Suzuki, Koki Kabu, Emi Sato, Tomohiro Kurosaki, Susumu Yamashita, Makio Tokunaga, Keigo Nishida, and Toshio Hirano. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J. Cell. Biol.* **2007**, 177, 637-645.
8. Toshiyuki Fukada, Satoru Yamasaki, Keigo Nishida, Masaaki Murakami, and Toshio Hirano. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, 16, 1123-1134.
9. Tomoko Watanabe, Masashi Ishihara, Katsuhiko Matsuura, Keisuke Mizuta, and Yoshinori Itoh. Polaprezinc prevents oral mucositis associated with radiochemotherapy in patients with head and neck cancer. *Int. J. Cancer.* **2010**, 127, 1984-1990.
10. Virendra N. Sehgal, Pullabatta V. S. Prasad, Pichai K. Kaviarasan, and Deepak Rajan. Trophic skin ulceration in leprosy: evaluation of the efficacy of topical phenytoin sodium zinc oxide paste. *Int. J. Dermatol.* **2014**, 53, 873-878.
11. Norikazu Shimizu, Junko Fujiwara, Shin Ohnishi, Mari Sato, Hiroko Kodama, Takao Kohsaka, Ayano Inui, Tomoo Fujisawa, Hiroshi Tamai, Shinobu Ida, Susumu Itoh, Michinori Ito, Norio Horiike, Masaru Harada, Makoto Yoshino, and Tsugutoshi Aoki. Effects of long-term zinc treatment in Japanese patients with Wilson disease: efficacy, stability, and copper metabolism. *Transl. Res.* **2010**, 156, 350-357.
12. L. Coulston, and Paresh Dandona. Insulin-like effect of zinc on adipocytes. *Diabetes* **1980**, 29, 665-667.
13. Osamu Ezaki. Iib group metal ions (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) stimulate glucose transport activity by post-insulin receptor kinase mechanism in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 16118-16122.
14. Xiao-han Tang, and Neil F. Shay. Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. *J. Nutr.* **2001**, 5, 1414-1420.
15. Frédéric Tremblay, Ann-Marie T. Richard, Sarah Will, Jameel Syed, Nancy Stedman, Mylène Perreault, and Ruth E. Gimeno. Disruption of G protein-coupled receptor 39 impairs insulin secretion in vivo. *Endocrinology* **2009**, 150, 2586-2595.

16. Limor Cohen, Hila Asraf, Israel Sekler, and Michal Hershfinkel. Extracellular pH regulates zinc signaling via an Asp residue of the zinc-sensing receptor (ZnR/GPR39). *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 33339-33350.
17. John J. Cunningham, Aizhong Fu, Patricia L. Mearkle, and R. Glenn Brown. Hyperzincuria in individuals with insulin-dependent diabetes mellitus: concurrent zinc status and the effect of high-dose zinc supplementation. *Metabolism* **1994**, 43, 1558-1562.
18. Didier Quilliot, Brigitte Dousset, Bruno Guerci, Françoise Dubois, Pierre Drouin, and Olivier Ziegler. Evidence that diabetes mellitus favors impaired metabolism of zinc, copper, and selenium in chronic pancreatitis, *Pancreas* **2001**, 22, 299-306.
19. Satoru Takita, Yukari Wakamoto, Ichirou Kunitsugu, Shinichi Sugiyama, Masayuki Okuda, and Tatsuya Houbara. Altered tissue concentration of minerals in spontaneous diabetic rats (Goto-Kakizaki rats). *J. Toxicol. Sci.* **2004**, 29, 195-199.
20. Judith Jansen, Wolfram Karges, and Lothar Rink. Zinc and diabetes—clinical links and molecular mechanisms. *J. Nutr. Biochem.* **2009**, 20, 399-417.
21. Dhia J. Al-Timimi, Hivi M. Mahmoud, Dilveen A. Mohammed, and Idris H. Ahmed. Serum zinc and metabolic health status in siblings of patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Diagn. Res.* **2015**, 9, BC05-08.
22. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Kenji Kawabe, Hiroyuki Miyake, Hiromu Sakurai, and Yoshitane Kojima. New insulin-mimetic zinc(II) complexes. bis-maltolato Zinc (II) and bis-2-hydroxypyridine-N-oxido zinc(II) with Zn(O₄) coordination mode. *Chem. Lett.* **2000**, 29, 874-875.
23. Shigeyuki Fujimoto, Hiroyuki Yasui, and Yutaka Yoshikawa. Development of a novel antidiabetic zinc complex with an organoselenium ligand at the lowest dosage in KK-A^y mice. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 121, 10-15.
24. Saori Kadowaki, Masayuki Munekane, Yoji Kitamura, Makoto Hiromura, Shinichiro Kamino, Yutaka Yoshikawa, Hideo Saji, and Shuichi Enomoto. Development of new zinc dithiosemicarbazone complex for use as oral antidiabetic agent. *Biol. Trace Elem. Res.* **2013**, 154, 111-119.
25. Yutaka Yoshikawa, and Hiroyuki Yasui. Zinc complexes developed as metallopharmaceutics for treating diabetes mellitus based on the bio-medicinal inorganic chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, 12, 210-218.
26. Yutaka Yoshikawa, Akito Murayama, Yusuke Adachi, Hiromu Sakurai, and Hiroyuki Yasui. Challenge of studies on the development of new Zn complexes (Zn(opt)₂) to treat diabetes mellitus. *Metallomics* **2011**, 3, 686-692.
27. Hiromu Sakurai, Akira Katoh, and Yutaka Yoshikawa. Chemistry and biochemistry of insulin-mimetic vanadium and zinc complexes. Trial for treatment of diabetes mellitus. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, 79, 1645-1664.
28. Yukako Kitayama, Toshihiro Kanazawa, Toshihiro Okabe, Yasuhiro Morita, Toru Fukui,

- Tadamichi Yamamoto, and Shingo Nakamura. Development of extracts from Aomori Hiba and apple polyphenol as cosmetics materials. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **2006**, 31, 965-968.
29. Yaeno Arima, Yoriko Nakai, Ritsuko Hayakawa, and Takeshi Nishino. Antibacterial effect of β -thujaplicin on staphylococci isolated from atopic dermatitis: relationship between changes in the number of viable bacterial cells and clinical improvement in an eczematous lesion of atopic dermatitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, 51, 113-122.
 30. Hiroshi Suzuki, Tetsuji Ueda, Ivo Juránek, Shozo Yamamoto, Takahiro Katoh, Manabu Node, and Toshiyuki Suzuki. Hinokitiol, a selective inhibitor of the platelet-type isozyme of arachidonate 12-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 275, 885-889.
 31. Masatoshi Yamato, Kuniko Hashigaki, Nobuhiko Kokubu, Takashi Tsuruo, and Tazuko Tashiro. Synthesis and antitumor activity of tropolone derivatives. *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1749-1753.
 32. Yasuhiro Morita, Eiko Matsumura, Hiroshi Tsujibo, Masahide Yasuda, Yoshikazu Sakagami, Toshihiro Okabe, Nakao Ishida, and Yoshihiko Inamori. Biological activity of α -thujaplicin, the minor component of *Thujopsis dolabrata* SIEB. et ZUCC. var. *hondai* MAKINO. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, 24, 607-611.
 33. Mitsuru Shimizu, Tsutomu Noda, Tetsuo Yamano, Akio Yamada, and Shigeru Morita. Acute oral toxicity of natural food additives in mice and rats. *Seikatsu Eisei*, **1993**, 37, 215-220.
 34. Mizuki Yamane, Yusuke Adachi, Yutaka Yoshikawa, and Hiromu Sakurai. A new anti-diabetic Zn(II)-hinokitiol (β -thujaplicin) complex with Zn(O₄) coordination mode. *Chem. Lett.* **2005**, 34, 1694-1695.
 35. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Kenji Kawabe, Hiroyuki Miyake, Toshikazu Takino, Hiromu Sakurai, and Yoshitane Kojima. Development of new insulinomimetic zinc(II) picolinate complexes with a Zn(N₂O₂) coordination mode: structure characterization, in vitro, and in vivo studies. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, 7, 68-73.
 36. Yutaka Yoshikawa, Yusuke Adachi, and Hiromu Sakurai. A new type of orally active anti-diabetic Zn(II)-dithiocarbamate complex. *Life Sci.* **2007**, 80, 759-766.
 37. Hiromu Sakurai, Yutaka Yoshikawa, and Hiroyuki Yasui. Current state for the development of metallopharmaceuticals and anti-diabetic metal complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 2383-2392.
 38. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Yoshitane Kojima, and Hiromu Sakurai. The action mechanism of zinc(II) complexes with insulinomimetic activity in rat adipocytes. *Life Sci.* **2004**, 75, 741-751.
 39. Wanny Basuki, Makoto Hiromura, and Hiromu Sakurai. Insulinomimetic Zn complex (Zn(opt)₂) enhances insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, 101, 692-699.
 40. Marie C. Barret, Mary F. Mahon, Kieran C. Molloy, Jonathan W. Steed, and Philip Wright. Synthesis and structural characterization of tin(II) and zinc(II) derivatives of cyclic

- α -hydroxyketones, including the structures of Sn(maltol)₂, Sn(tropolone)₂, Zn(tropolone)₂, and Zn(hinokitiol)₂. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 4384-4388.
41. Yusuke Adachi, Jiro Yoshida, Yukihiro Kodera, Akira Kato, Yutaka Yoshikawa, Yoshitane Kojima, and Hiromu Sakurai. A new insulin-mimetic bis(allixinato)zinc(II) complex: structure–activity relationship of zinc(II) complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 885-893.
 42. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Hiroyuki Miyake, Hiromu Sakurai, and Yoshitane Kojima. Insulinomimetic bis(maltolato)zinc(II) complex: blood glucose normalizing effect in KK-A^y mice with type 2 diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 281, 1190-1193.
 43. Hajo Haase, and Wolfgang Maret. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp. Cell Res.* **2003**, 291, 289-298.
 44. Hajo Haase, and Wolfgang Maret. Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *BioMetals* 2005, 18, 333-338.
 45. Hiromu Sakurai, Yoshitane Kojima, Yutaka Yoshikawa, Kenji Kawabe, and Hiroyuki Yasui. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 226, 187-198.
 46. James M. May, and Charles S. Contoreggi. The mechanism of the insulin-like effects of ionic zinc. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 4362-4368.
 47. Assia Shisheva, Dov Gefel, and Yoram Shechter. Insulinlike effects of zinc ion in vitro and in vivo: preferential effects on desensitized adipocytes and induction of normoglycemia in streptozocin-induced rats. *Diabetes* **1992**, 41, 982-988.
 48. Ming-Der Chen, Shy-Jane Liou, Pi-Yao Lin, Vivian C. Yang, Paul S. Alexander, and Wen-Han Lin. Effects of zinc supplementation on the plasma glucose level and insulin activity in genetically obese (ob/ob) mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **1998**, 61, 303-311.
 49. Eriko Ueda, Yutaka Yoshikawa, Yoshio Ishino, Hiromu Sakurai, and Yoshitane Kojima. Potential insulinomimetic agents of zinc(II) complexes with picolinamide derivatives: preparations of complexes, in vitro and in vivo studies. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 337-340.
 50. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Hiromu Sakurai, and Yoshitane Kojima. Anti-diabetes effect of Zn(II)/carnitine complex by oral administration. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 230-231.
 51. Yoshitane Kojima, Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Rie Ueda, Shuhei Yamamoto, Katsumi Kumekawa, Naohisa Yanagihara, and Hiromu Sakurai. Insulinomimetic zinc(II) complexes with natural products: in vitro evaluation and blood glucose lowering effect in KK-A^y mice with type 2 diabetes mellitus. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 1006-1008.
 52. Morris F. White. Insulin signaling in health and disease. *Science* **2003**, 302, 1710-1711.
 53. B. Lynn Seely, Patricia A. Staubs, Donna R. Reichart, Paulos Berhanu, Kim L. Milarski, Alan R. Saltiel, Jyotirmoy Kusari, and Jerrold M. Olefsky. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes*, **1996**, 45, 1379-1385.
 54. Tomohiko Maehama, and Jack E. Dixon. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1,

- dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13375-13378.
55. Tomohiko Maehama, and Jack E. Dixon. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* **1999**, 9, 125-128.
 56. Naoki Nakashima, Prem M. Sharma, Takeshi Imamura, Robert Bookstein, and Jerrold M. Olefsky. The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 12889-12895.
 57. Evgeniy E. Panzhinskiy, Jun Ren, and Sreejayan Nair. Pharmacological inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B: a promising strategy for the treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Med. Chem.* **2013**, 20, 2609-2625.
 58. Laura M. Plum, Anne Brieger, Gabriela Engelhardt, Silke Hebel, Andreas Nessel, Marcus Arlt, Jennifer Kaltenberg, Ulrich Schwaneberg, Michael Huber, Lothar Rink, and Hajo Haase. PTEN-inhibition by zinc ions augments interleukin-2-mediated Akt phosphorylation. *Metallomics* **2014**, 6, 1277-1287.
 59. Nicholas K. Tonks. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 833-846.
 60. Annette Salmeen, Jannik N. Andersen, Michael P. Myers, Tzu-Ching Meng, John A. Hinks, Nicholas K. Tonks, and David Barford. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **2003**, 423, 769-773.
 61. Rob L. M. van Montfort, Miles Congreve, Dominic Tisi, Robin Carr, and Harren Jhoti. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* **2003**, 423, 773-777.
 62. Seung-Rock Lee, Kap-Seok Yang, Jaeyul Kwon, Chunghee Lee, Woojin Jeong, and Sue G. Rhee. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 20336-20342.
 63. Tamás Jakusch, Krisztina Gajda-Schranz, Yusuke Adachi, Hiromu Sakurai, Tamás Kiss, and László Horváth. Solution equilibrium characterization of insulin-mimetic Zn(II) complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 1521-1526.
 64. Randy A. Reichle, Keith G. McCurdy, and Loren G. Hepler. Zinc hydroxide: solubility product and hydroxy-complex stability constants from 12.5-75°C. *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 3841-3845.
 65. Masanari Taniguchi, Ayako Fukunaka, Mitsue Hagihara, Keiko Watanabe, Shinichiro Kamino, Taiho Kambe, Shuichi Enomoto, and Makoto Hiromura M. Essential role of the zinc transporter ZIP9/SLC39A9 in regulating the activations of Akt and Erk in B-cell receptor signaling pathway in DT40 cells. *PLoS One*, **2013**, 8, e58022.
 66. Hiroshi Inoue, Andrew C. Riggs, Yukio Tanizawa, Kohei Ueda, Akira Kuwano, Li Liu, Helen Donis-Keller, and Marshall A. Permutt. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of the human insulin promoter factor 1 (IPF-1) gene. *Diabetes* **1996**, 45, 789-794.

67. Hiroaki Watanabe, Hiroshi Saito, Haruto Nishimura, Junji Ueda, and Bernard M. Evers. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase regulates pancreatic duodenal homeobox-1 in duct cells during pancreatic regeneration. *Pancreas* **2008**, 36, 153-159.
68. Hongxiang Hui, and Riccardo Perfetti. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur. J. Endocrin.* **2002**, 146, 129-141.
69. Ming Li, Jun-ichiro Miyagawa, Makoto Moriwaki, Ming Yuan, Qin Yang, Junji Kozawa, Koji Yamamoto, Akihisa Imagawa, Hiromi Iwahashi, Yoshihiro Tochino, Kazuya Yamagata, and Yuji Matsuzawa. Analysis of expression profiles of islet-associated transcription and growth factors during β -cell neogenesis from duct cells in partially duct-ligated mice. *Pancreas* **2003**, 27, 345-355.
70. R. Paul Robertson. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 42351-42354.
71. Doris A. Stoffers, Noah T. Zinkin, Violeta Stanojevic, William L. Clarke, and Joel F. Habener. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat. Genet.* **1997**, 15, 106-110.
72. Sanjoy Dutta, Susan Bonner-Weir, Marc Montminy, and Christopher Wright. Regulatory factor linked to late-onset diabetes?. *Nature* **1998**, 392, 560.
73. David A. Nielsen, Michael Welsh, Malcolm J. Casadaban, and Donald F. Steiner. Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 13585-13589.
74. Michael Welsh, David A. Nielsen, Albert J. MacKrell, and Donald F. Steiner. Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 13590-13594.
75. Juehu Wang, Luping Shen, Habiba Najafi, Janice Kolberg, Franz M. Matschinsky, Mickey Urdea, and Michael German. Regulation of insulin preRNA splicing by glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 4360-4365.
76. Ingo B. Leibiger, Barbara Leibiger, Tilo Moede, and Per-Olof Berggren. Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. *Mol. Cell* **1998**, 1, 933-938.
77. Gang G. Xu, Zhi-yong Gao, Prabhakar D. Borge Jr., Patricia A. Jegier, Robert A. Young, and Bryan A. Wolf. Insulin regulation of beta-cell function involves a feedback loop on SERCA gene expression, Ca^{2+} homeostasis, and insulin expression and secretion. *Biochemistry* **2000**, 39, 14912-14919.
78. Gabriela Da Silva Xavier, Aniko Varadi, Edward K. Ainscow, and Guy A. Rutter. Regulation of gene expression by glucose in pancreatic beta-cells (MIN6) via insulin secretion and activation of phosphatidylinositol 3'-kinase. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 36269-36277.

79. Mayumi Sato, Koichi Shudo, and Akiyoshi Hiragun. Functional studies of newly synthesized benzoic acid derivatives: Identification of highly potent retinoid - like activity. *J. Cell. Physiol.* **1988**, 135, 179-188.
80. Timothy E. Johnson, Robert Vogel, Su Jane Rutledge, Gideon Rodan, and Azriel Schmidt. Thiazolidinedione effects on glucocorticoid receptor-mediated gene transcription and differentiation in osteoblastic cells. *Endocrinology* **1999**, 140, 3245-3254.
81. Norikazu Maeda, Masahiko Takahashi, Tohru Funahashi, Shinji Kihara, Hitoshi Nishizawa, Ken Kishida, Hiroyuki Nagaretani, Morihiro Matsuda, Ryutaro Komuro, Noriyuki Ouchi, Hiroshi Kuriyama, Kikuko Hotta, Tadashi Nakamura, Iichiro Shimomura and Yuji Matsuzawa. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* **2001**, 50, 2094-2099.
82. Christos V. Rizos, Moses S. Elisaf, Dimitri P. Mikhailidis, and Evangelos N. Liberopoulos. How safe is the use of thiazolidinediones in clinical practice?. *Expert Opin. Drug Saf.* **2009**, 8, 15-32.
83. Yoshinori Miyazaki, Archana Mahankali, Estela Wajcberg, Mandeep Bajaj, Lawrence J. Mandarino, and Ralph A. DeFronzo. Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, 89, 4312-4319.
84. Akira Okuno, Hiroyuki Tamemoto, Kazuyuki Tobe, Kohjiro Ueki, Yasumichi Mori, Keiji Iwamoto, Kazuhiko Umesono, Yasuo Akanuma, Toshihiko Fujiwara, Hiroyoshi Horikoshi, Yoshio Yazaki, and Takashi Kadowaki. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J. Clin. Invest.* **1998**, 15, 1354-1361.
85. Norikazu Maeda, Iichiro Shimomura, Ken Kishida, Hitoshi Nishizawa, Morihiro Matsuda, Hiroyuki Nagaretani, Naoki Furuyama, Hidehiko Kondo, Masahiko Takahashi, Yukio Arita, Ryutaro Komuro, Noriyuki Ouchi, Shinji Kihara, Yoshihiro Tochino, Keiichi Okutomi, Masato Horie, Satoshi Takeda, Toshifumi Aoyama, Tohru Funahashi, and Yuji Matsuzawa. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* **2002**, 8, 731-737.
86. Norikazu Maeda, Tohru Funahashi, and Iichiro Shimomura. Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2008**, 4, 627-634.
87. Toshimasa Yamauchi, Junji Kamon, Yusuke Ito, Atsushi Tsuchida, Takehiko Yokomizo, Shunbun Kita, Takuya Sugiyama, Makoto Miyagishi, Kazuo Hara, Masaki Tsunoda, Koji Murakami, Toshiaki Ohteki, Shoko Uchida, Sato Takekawa, Hironori Waki, Nelson H. Tsuno, Yoichi Shibata, Yasuo Terauchi, Philippe Froguel, Kazuyuki Tobe, Shigeo Koyasu, Kazunari Taira, Toshio Kitamura, Takao Shimizu, Ryoza Nagai, and Takashi Kadowaki. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **2003**, 423, 762-769.

88. Hiroaki Tanabe, Yoshifumi Fujii, Miki Okada-Iwabu, Masato Iwabu, Yoshihiro Nakamura, Toshiaki Hosaka, Kanna Motoyama, Mariko Ikeda, Motoaki Wakiyama, Takaho Terada, Noboru Ohsawa, Masakatsu Hato, Satoshi Ogasawara, Tomoya Hino, Takeshi Murata, So Iwata, Kunio Hirata, Yoshiaki Kawano, Masaki Yamamoto, Tomomi Kimura-Someya, Mikako Shirouzu, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki, and Shigeyuki Yokoyama. Crystal structures of the human adiponectin receptors. *Nature* **2015**, 520, 312-316.
89. Yuki Naito, Hiroyuki Yasui, and Yutaka Yoshikawa. Cellular mechanism of zinc-hinokitiol complexes in diabetes mellitus. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 298-305.
90. Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, Kazufumi Masuda, and Hiroyuki Yasui. Bis(hinokitiolato)zinc complex ($[Zn(hkt)_2]$) activates Akt/protein kinase B independent of insulin signal transduction. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548.
91. Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, Michiko Shintani, Shingo Kamoshida, Naemi Kajiwara, and Hiroyuki Yasui. Anti-hyperglycemic effect of long-term bis(hinokitiolato)zinc complex ($[Zn(hkt)_2]$) ingestion on insulin resistance and pancreatic islet cells protection in type 2 diabetic KK- A^y mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326.