

氏名 (生年月日) 内藤 行喜 (1985年1月4日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博 第209号

学位授与の日付 2017年9月29日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 (主査) 教授 安井 裕之

(副査) 教授 秋葉 聡

(副査) 教授 中田 徹男

論文内容の要旨

序章

糖尿病は高血糖を主症状とする慢性代謝疾患であり、全世界における糖尿病人口は増加し続けている。日本においても例外ではなく、糖尿病発症の予防や症状の悪化を抑える対策は急務である。糖尿病および糖尿病患者を取り巻く現状は、糖尿病治療薬の長期使用による副作用やストレスによる QOL の低下が顕在化しており、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糖尿病治療薬の開発が急務である。

インスリン分泌、糖代謝など生体内の反応において、亜鉛と糖尿病が関連していることが報告されている。著者の所属する研究室では、低用量で高いインスリン様活性を示す様々な化学構造の亜鉛錯体を合成し、糖尿病モデルマウスを用いた実験で血糖降下作用を示すことを報告しているが、その作用機構は解明できていなかった。そこで、亜鉛錯体が示す抗糖尿病作用のメカニズムを解明することを目的として研究に着手した。

第1章 マウス由来 3T3-L1 脂肪細胞における $[Zn(hkt)_2]$ のインスリンシグナル経路への影響

先行研究より、亜鉛錯体が *in vitro* 系においてインスリン様活性を示すことから、インスリン標的組織の1つである脂肪組織に対するインスリンシグナル経路への影響について検討した。実験には配位子に天然物由来化合物であるヒノキチオールを配位結合させた亜鉛ヒノキチオール錯体 ($[Zn(hkt)_2]$) を用いた。論文既知の方法に従い $[Zn(hkt)_2]$ を合成し、 $[Zn(hkt)_2]$ が 3T3-L1 脂肪細胞に対して細胞毒性を示さないことを確認し、インスリンシグナル経路への影響を Akt のリン酸化促進作用から検討した。 $[Zn(hkt)_2]$ は濃度依存的、時間依存的に Akt のリン酸化促進作用を示し、加えてこの作用は 1 nM インスリンを併用することによって相加効果を示すことを明らかにした。金属キレート剤 (DTPA, TPEN) を併用して評価した結果、 $[Zn(hkt)_2]$ が細胞内に取り込まれることで Akt のリン酸化促進作用を発揮していることが示唆され、ICP-MS を用いた定量分析により、 $[Zn(hkt)_2]$ を 3T3-L1 脂肪細胞に作用させると、時間依存的に細胞内の亜鉛量が上昇することも明らかになった。免疫沈降法を用いた検討では、 $[Zn(hkt)_2]$ は IR β 及び IRS-1 に対して作用を示さなかったが、 $[Zn(hkt)_2]$ がインスリン刺激による IR β 、

IRS-1 のチロシンリン酸化活性を増強させる結果を得た。また、インスリン刺激によるシグナル伝達に抑制的に作用する PTP1B と PTEN に対して [Zn(hkt)₂] は阻害作用を示し、インスリンの作用を増強することが明らかとなった。以上の結果から、[Zn(hkt)₂] はインスリンのように細胞膜受容体に対して作用するのではなく、細胞内に取り込まれた後、インスリンとは異なる作用点で、インスリンシグナル経路に影響を及ぼし、インスリンのシグナル伝達を増強する働きがあることが示唆された。

第2章 ラットインスリノーマ RIN-5F 細胞への [Zn(hkt)₂] の影響

臨床現場における糖尿病治療指針の1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維持させることが重要だと考えられている。そこで [Zn(hkt)₂] が膵臓に直接作用した場合の影響について、RIN-5F 細胞を用いて検討を行った。PDX-1 は糖尿病との関連性が強く示唆されている転写因子の1つであり、膵臓β細胞に発現し、β細胞の分化・成熟に関与している。PDX-1 の活性化に Akt のリン酸化が関与していることから、RIN-5F 細胞における [Zn(hkt)₂] の Akt リン酸化促進作用について検討を行った。RIN-5F 細胞を刺激した結果、ポジティブコントロールとして用いた 100 nM インスリンの処理によって有意な Akt リン酸化促進作用がみられ、一方、[Zn(hkt)₂] 処理においても Akt のリン酸化促進効果が見られた。また、[Zn(hkt)₂] 処理による PDX-1 発現量についてリアルタイム PCR を用いて検討した結果、高グルコース培地中で [Zn(hkt)₂] を処理すると有意に PDX-1 mRNA 量が増加することが分かった。また、PDX-1 はインスリンの転写にも関与することからインスリン mRNA についても検討を行ったところ、[Zn(hkt)₂] 処理によって発現量が増加していた。以上のことから、[Zn(hkt)₂] が直接膵臓に作用すると PDX-1 mRNA の発現量は増加し、膵臓機能を保護する可能性が示された。

第3章 KK-A^y マウスにおける長期間高脂肪食混餌投与による抗糖尿病効果

In vitro 系における検討結果から、[Zn(hkt)₂] が脂肪組織や膵臓に作用し、糖尿病治療に有効である可能性を示したため、*in vivo* での効果を検討すべく 2 型糖尿病モデル動物の KK-A^y マウスを用いた治療効果の検討を行った。これまで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ことから、今回、高脂肪食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、膵臓に対する保護作用を検討した。健常 (Normal) 群として C57BL/6J マウスを用い、KK-A^y マウスはコントロール (CNT) 群、ピオグリタゾン摂取 (PIO) 群、[Zn(hkt)₂] 摂取 (Zn) 群の 3 群に分けた。Zn 群では、飼育期間中血糖値が低下する傾向は認められたが、継続的な随時血糖値の有意な低下には至らなかった。しかし、投与期間終了時の耐糖能試験において、有意なグルコース処理能力の改善が見られた。また、Zn 群では糖尿病状態で認められる症状の1つである高インスリン血症が改善されていたが、血漿中アディポネクチン濃度の改善は見られなかった。一方、PIO 群では投与開始直後から有意な随時血糖値の低下がみられ、高インスリン血症改善作用、アディポネクチン分泌量増加が観察された。これらのことから、[Zn(hkt)₂] 摂取による抗糖尿病効果はピオグリタゾンによる作用とは異なることが示唆された。インスリン分泌に関与している膵臓について、病理組織学的検査の一つである HE 染色の結果より、CNT 群で観察されたランゲルハンス島の肥大化が PIO 群、Zn 群では抑制されていた。さらに免疫染色の結果より、ランゲルハンス島 1 個あたりのインスリン陽性細胞数は CNT 群に対して Zn 群では有意に減少し、PDX-1 陽性細胞数については減少する傾向にあった。各臓器における亜鉛の蓄積量を ICP-MS を用いて定量した結果、膵臓では CNT 群に比べると Zn 群で上昇する傾向にあり、肝臓、骨格筋、脂肪についても同様に増加する傾向であった。しかし、[Zn(hkt)₂] 摂取による著しい亜鉛量の

蓄積が膵臓では認められなかったことから、 $[Zn(hkt)_2]$ による膵臓への直接的な作用は顕著ではなく、むしろ末梢組織、特に脂肪組織に作用していることが示唆された。

総括

これまでの *in vitro* 系、*in vivo* 系の結果をまとめると、 $[Zn(hkt)_2]$ が脂肪組織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よってインスリンシグナル経路を活性化することが明らかとなった。さらに、インスリンによるシグナル伝達を相加的に増強することで、インスリン抵抗性を改善し、糖尿病時における代償的なインスリン産生を抑制することを示唆している。つまり、 $[Zn(hkt)_2]$ による抗糖尿病効果の作用機構は、直接的な膵臓への作用によるものではなく、末梢におけるインスリン抵抗性を改善することで発揮され、ピオグリタゾン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る結論付けることができた。

論文審査の結果の要旨

内藤行喜氏は、亜鉛錯体が示す糖尿病モデル動物における血糖降下作用の作用機序が十分に解明されていないことに着目し、亜鉛錯体の1つである亜鉛ヒノキチオール錯体 ($[Zn(hkt)_2]$) が有する抗糖尿病作用の機構解明を目的として、本研究を実施した。糖尿病 (DM) は、高血糖を主症状とする慢性代謝疾患であり、DM 患者にとっては QOL の低下が顕在化しており、生活習慣の改善と同時に、副作用の少ない新規 DM 治療薬の開発が急務である。内藤氏は、亜鉛錯体の作用機序として、 $[Zn(hkt)_2]$ が脂肪組織でのインスリンシグナル伝達を増強することによりインスリン抵抗性を改善することを明らかにし、DM 時における代償的なインスリン産生を抑制し得ることを明らかにし、その内容を論文博士の学位論文で3つの章としてまとめた。

第1章では、マウス由来 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、 $[Zn(hkt)_2]$ が濃度依存的、時間依存的に Akt のリン酸化促進作用を示すことを証明した。また、金属キレート剤を用いた検討及び ICP-MS を用いた定量分析法により、 $[Zn(hkt)_2]$ が細胞内に取り込まれることが Akt のリン酸化促進作用にとって最も重要な作用発現の因子であることを明らかにした。さらに、インスリンシグナル経路に抑制的に働く酵素に対して *in vitro* での酵素阻害実験並びにドッキングシミュレーションを行い、 $[Zn(hkt)_2]$ がインスリンとは異なる作用点で、細胞内シグナル伝達を増強する作用を有する結果を示した。

第2章では、ラットインスリンノーマ RIN-5F 細胞への影響を検討した。 $[Zn(hkt)_2]$ は RIN-5F 細胞においても Akt のリン酸化促進作用を示し、膵臓β細胞の分化・成熟に関与している PDX-1 並びにインスリンの mRNA 発現量を高グルコース培地条件下で有意に増加させることが分かった。これより、 $[Zn(hkt)_2]$ が直接膵臓に作用した場合、PDX-1 発現量の増加を伴う膵臓保護機能を示す可能性を示した。

第3章では、高脂肪食中への $[Zn(hkt)_2]$ 混餌投与による18週間長期摂食による2型糖尿病モデル動物 KK-A^yマウスへの糖尿病治療効果ならびに膵臓保護作用を検討した。 $[Zn(hkt)_2]$ 摂取による随時血糖値の有意な低下は断続的にしか認められなかったものの、投与終了時に評価された耐糖能試験では有意な改善が認められ、高インスリン血症の改善作用も併せて観察された。加えて、ランゲルハンス島の肥大化が抑制されたにもかかわらず、膵臓中亜鉛量の分布に有意な変化が認められなかったことより、亜鉛錯体の中でも $[Zn(hkt)_2]$ は直接膵臓に作用するよりむしろ、膵臓以外の末梢組織に作用していることを動物実験レベルで証明した。

これらの研究成果は、国際学術雑誌3誌に掲載されている。 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ が示す抗糖尿病作用機序の中心部分が明らかとなり、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ はインスリンとは異なる作用点に働きかけ、既存の医薬品には見られない機構によりインスリンシグナル伝達を増強するものであった。これらは、末梢組織のインスリン抵抗性を改善し、間接的に膵臓を保護する、安全性の高い抗DM作用を示す新規医薬品候補物質としての研究成果である。

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