

氏 名 (生年月日) ^{もろ き たか やす}
諸 木 孝 泰 (1978 年 9 月 1 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 論博 第 201 号

学位授与の日付 2015 年 9 月 30 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 組織形態学を基盤としたヘテロ複核錯体を含む亜鉛および 4 価バナジウム錯体による抗糖尿病作用の評価に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 安 井 裕 之

(副査) 教 授 山 下 正 行

(副査) 教 授 渡 辺 徹 志

論 文 内 容 の 要 旨

近年、インスリン抵抗性を発症する、あるいはインスリン分泌不全を呈することで血糖値のコントロールが困難となる 2 型糖尿病 (NIDDM: 非インスリン依存型) の患者数が急増し、問題視されている。NIDDM は生活習慣病であることから、その病態改善のためには生活習慣の改善が強く提唱されているが、それとともに新規医薬品の創出も切望されている。

このような背景の中、金属イオンが有する抗糖尿病作用の評価に多くの研究者が取り組んできた。また、研究の発展に伴い、水溶性が高く消化管からの吸収が見込まれにくい金属イオンよりも、脂溶性が高い金属錯体に関する研究に注目が集まってきた。中でも、亜鉛及び 4 価バナジウムの金属錯体は、抗糖尿病作用と錯体の化学構造との関連性について深く研究されている。これまで我々が行ってきた研究では、主に血液や血漿から得られる生化学パラメータによる評価や分子生物学的アプローチに関する研究が主体であったが、着手していない研究領域の一つとして形態学的評価に関する研究があげられる。本研究では金属錯体の抗糖尿病治療薬開発の過程でこれまでに実施されていない新たな評価方法として、組織形態学を基盤とした研究を行うことを目的とし、その有用性について検討した。

形態学的評価法の検討に先立ち、2 型糖尿病モデル動物である雄性の KK-A^y マウスと、健常動物である雄性の C57BL/6J マウスの膵臓、肝臓及び腎臓の病理組織標本を 5、10 及び 14 週齢で観察し、形態学的評価を行うモデル動物としての妥当性について検証した。その結果、10 から 14 週齢の KK-A^y マウスの膵臓ではランゲルハンス島の肥大、肝臓では脂質沈着、腎臓では糸球体の肥大が確認された。また、定量解析の結果、膵臓の単位面積当たりのランゲルハンス島及び肝臓の単位面積当たりの脂質の割合が、KK-A^y マウスで C57BL/6J マウスの 2 倍程度に増加し、腎臓の単位面積当たりの糸球体は 1.5 倍程度に増加していた。この結果から、10 週齢以降の KK-A^y マウスは医薬品候補物質による抗糖尿病活性の形態学的評価を行う系統として適切であると判断した。

次に、1-oxy-2-pyridine-thiolate (opt) を配位子とする亜鉛及び 4 価バナジウム錯体 ([Zn(opt)₂]₂]及び [VO(opt)₂]₂) は、共に高い抗糖尿病活性を示すことが過去に報告されていることから、[Zn(opt)₂]₂及び [VO(opt)₂]₂を本研究の代表化合物として選定した。10 週齢の雄性 KK-A^y マウスに対して錯体を 4 週間反復経口投与し、膵臓及び肝臓を採取して生化学パラメータと合わせて形態学的評価を実施した。また、それぞれの錯体の比較物質として、医薬品候補物質として治験が進行中であるエチルマルトール

4 価バナジウム錯体 ($[\text{VO}(\text{emal})_2]$) 及び食品添加物として認可されているグルコン酸亜鉛錯体 ($[\text{Zn}(\text{glc})_2]$) を投与し、opt を配位子とした錯体と同様の検討を行った。その結果、 $[\text{Zn}(\text{opt})_2]$ 及び $[\text{VO}(\text{opt})_2]$ 各投与群で肝臓の脂質沈着に改善効果が認められ、脂質が肝臓の単位面積あたりに占める割合は無処置の KK- A^y マウスの 1/2 以下であった。一方、ランゲルハンス島の肥大の改善は $[\text{Zn}(\text{opt})_2]$ 投与群でのみ認められ、ランゲルハンス島が膵臓の単位面積あたりに占める割合は無処置の KK- A^y マウスの 1/2 程度に減少した。血漿中インスリン濃度は $[\text{Zn}(\text{opt})_2]$ 、 $[\text{VO}(\text{opt})_2]$ 及び $[\text{VO}(\text{emal})_2]$ 各投与群のいずれにおいても改善が認められたことから、生化学的パラメータの改善と器質的改善効果は必ずしも関連せず、両評価系による検討を同時に実施することが重要であるとわかった。また、 $[\text{VO}(\text{opt})_2]$ 及び $[\text{VO}(\text{emal})_2]$ 各投与群で血漿中インスリン濃度とランゲルハンス島の改善効果が関連しなかった原因として、4 価バナジウム錯体が血漿中インスリン濃度を低下させる作用メカニズムや主たる作用臓器が亜鉛錯体のそれらとは異なっている可能性や、後述するような 4 価バナジウム錯体の投与による毒性変化に伴う組織の再生反応にインスリンが消費されていることが示唆された。なお、各錯体投与群で、腎臓の器質的改善効果は確認できなかった。

一方、 $[\text{VO}(\text{opt})_2]$ 及び $[\text{VO}(\text{emal})_2]$ を投与した動物の臓器重量を測定すると、一部の動物で精巣の小型化が認められた。この変化は 4 価バナジウム錯体の投与に起因する可能性が深く疑われたため、精巣の形態学的評価を実施した。その結果、精細管内の細胞の変性壊死または石灰沈着が認められ、精子への分化の起点となる精祖細胞も壊死していたことから、この変化は不可逆的であると判断した。また、精巣中へのバナジウムの分布では、組織変化が認められた精巣のみからバナジウムが検出された。さらに、精巣の組織変化の程度と蓄積したバナジウム量には明確な相関性 ($R^2=0.98$) が認められた。

ここまでの研究で、4 価バナジウム錯体は過去に薬効用量として検討されてきた投与量で、精巣に重篤な毒性を発現することが明らかとなった。生殖器の不可逆的な変化は医薬品としての利用を考慮する際に大きな障害となる。しかし、亜鉛と 4 価バナジウムを同時に投与することで、亜鉛が 4 価バナジウムの精巣毒性を軽減させるという報告もある。また前述の通り、4 価バナジウムと亜鉛はそれぞれ異なるメカニズムで抗糖尿病作用を発現すると考えられる。そこで、両金属元素を一つの錯体構造内に共存させれば、高い抗糖尿病活性を維持しつつ、薬物動態的に同じ臓器へ両金属元素を分布させることが可能となる。そこで、4 価バナジウムに起因する毒性変化を軽減できることが期待できる錯体として、ヘテロ複核錯体の合成及び抗糖尿病活性の評価を行った。

ヘテロ複核錯体として、 H_4 formyl salicyliden ethylene diamine (H_4fsaen) を配位子とする二核錯体である $[(\text{VOZn})\text{fsaen}]$ を合成し、その物性評価ならびに抗糖尿病活性を評価した。物性評価では、常磁性金属イオンの配位構造を分析できる ESR スペクトル及び金属錯体の中心金属周辺の結合距離を推定できる EXAFS スペクトルの解析結果から、錯体の化学構造を特定した。抗糖尿病活性の評価では、10 週齢の雄性 KK- A^y マウスに 2 週間反復経口投与し、生化学パラメータの評価、肝臓及び精巣の形態学的評価、さらに臓器中金属濃度を定量した。その結果、投与期間中の随時血糖値及び投与期間終了後の血漿中インスリン濃度の低下が認められた。肝臓の形態学的評価では脂質沈着を改善し、精巣では精細管の変化は認められなかった。肝臓中金属の濃度は、亜鉛で $48.4 \mu\text{g/g}$ 、バナジウムで $25.4 \mu\text{g/g}$ と定量され、いずれも有意に無処置動物より高濃度であり、肝臓への両元素の分布が確認された。また、精巣中でバナジウムは $0.45 \mu\text{g/g}$ と低い濃度を示した。

以上の結果から、 $[(\text{VOZn})\text{fsaen}]$ は生化学パラメータのみならず、器質的改善効果を示し、かつ精巣毒性を示さないヘテロ複核錯体であることが明らかとなった。

本研究では、形態学的評価が重要な評価系の一つであること及び亜鉛と4価バナジウムのヘテロ複核錯体が高い抗糖尿病活性を示すことを明らかにした。今回初めて、ヘテロ複核錯体が有効な抗糖尿病作用を示したことから、亜鉛および4価バナジウムの単核錯体の同時投与による併用効果や、亜鉛と4価バナジウムが共存して同じ組織に分布することによる金属元素の相加あるいは相乗効果について、今後は深く追及していくことが必要と考える。

論文審査の結果の要旨

近年、2型糖尿病の患者数が急増し、問題視されている。2型糖尿病は生活習慣病であることから、その病態改善には生活習慣の改善が強く提唱されているが、新規医薬品の創出も切望されている。これまで、金属イオンが有する抗糖尿病作用の解明に多くの研究者が取り組んできたが、生物学的利用能がより高い金属錯体に関する研究が近年では注目を集めている。亜鉛及び4価バナジウムの金属錯体は、抗糖尿病作用と錯体の化学構造との関連性について深く研究されており、従来から生化学パラメータによる評価や分子生物学的アプローチに関する研究が主に実施されてきたが、統計的解析を伴った形態学的観測法はこれまで着手されていない。申請者である諸木孝泰氏はここに着目し、金属錯体を抗糖尿病治療薬として開発するための新規評価法として、組織形態学を基盤とした研究を遂行し、その成果を三章にわたり記述した。

第1章では、2型糖尿病モデル動物であるKK-A^yマウスと健常動物であるC57BL/6Jマウスの膵臓、肝臓及び腎臓の病理組織標本を経時的に観察かつ定量解析し、形態学的評価を行うモデル動物としての妥当性を検証し、10週齢以降のKK-A^yマウスは抗糖尿病活性の形態学的評価を行う系統として適切であることを見出した。続いて、1-oxy-2-pyridine-thiolate (opt) を配位子とする亜鉛及び4価バナジウム錯体 ([Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]) を選択し、10週齢のKK-A^yマウスに4週間経口投与し、膵臓及び肝臓を採取して生化学パラメータと同時に形態学的評価を実施した。ランゲルハンス島の肥大改善は[Zn(opt)₂]投与群でのみ有意に認められたが、血漿中インスリン濃度は[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]の両投与群において改善が認められ、生化学的パラメータの改善と組織の器質的改善効果は必ずしも連関せず、両評価系を同時に検討することが重要であることを明らかにした。

第2章では、[VO(opt)₂]を投与した一部の動物で精巣の小型化を見出した。この変化は4価バナジウム錯体に起因する可能性が疑われたため、精巣の形態学的評価を実施した。精細管内細胞に変性壊死または石灰沈着が認められ、精子への分化の起点となる精祖細胞も壊死していた。また、精巣の組織変化の程度と精巣中へ蓄積したバナジウム量には明確な相関性が認められ、4価バナジウム錯体の安全性を評価する上で新しい知見を得た。

第3章では、亜鉛が4価バナジウムの精巣毒性を軽減させる報告があることから、高い抗糖尿病活性を維持しながら4価バナジウムに起因する精巣毒性を軽減できると期待されるヘテロ複核錯体として、H4 formyl salicyliden ethylene diamine (H4fsaen) を配位子とする[(VOZn)fsaen]を合成し、その化学構造ならびに抗糖尿病活性を評価した。10週齢のKK-A^yマウスに2週間経口投与した結果、血糖値及び血漿中インスリン濃度の低下が認められ、肝臓の脂質沈着は改善され、精細管の変化は認められなかった。[(VOZn)fsaen]は生化学パラメータの改善及び器質的改善効果を示し、精巣毒性を示さないヘテロ複核錯体であることが明らかとなった。

以上、三章にわたる研究の成果は、国内外の学術専門誌に英語論文としても発表されており、基礎分野の糖尿病治療研究において無機医薬品の探索や開発に基本となる知見および情報を提供するものである。

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。