

バナジルーホスホネート関連錯体の *in vitro* および *in vivo* インスリン様活性

川 辺 賢 司, 桜 井 弘  
(京都薬科大学・代謝分析学教室\*)

***In vitro and in vivo insulinomimetic activity of vanadyl-phosphonate complexes***

Kenji KAWABE and Hiromu SAKURAI

*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University*

Much interest has been focused on the potency of vanadyl (VO) complexes as an orally active antidiabetic agent. Because the numbers of insulinomimetic VO complexes reported to date are still limited, we prepared a new series of VO complexes with ligands containing phosphonate group.

*In vitro* insulinomimetic activities of the complexes were higher than that of  $\text{VOSO}_4$  (VS) in terms of  $\text{IC}_{50}$  value, 50% inhibition concentration of VO complex on epinephrine-stimulated free fatty acids (FFA) release from isolated rat adipocytes. Among them, a vanadyl-*N*-(phosphonomethyl) iminodiacetate (VO(pida)) complex exhibited the highest activity. In *in vivo* trial, high blood glucose levels of streptozotocin-induced diabetic rats (STZ-rats) were normalized within 7 days after daily oral administrations of the complex, and glucose tolerance of rats was improved. From the results, it was concluded that vanadyl-phosphonate complexes are proposed to be a new candidate for orally active therapeutic of type 1 diabetes mellitus.

バナジウムイオンにインスリン様作用が見出されて以来<sup>1,2)</sup>, インスリン注射に代わる経口糖尿病治療薬の開発研究が世界的に注目されてきた。最近, 無機塩である  $\text{VOSO}_4$  や  $\text{NaVO}_3$  が1型および2型糖尿病患者に経口投与され, それらの治療効果が報告されはじめているが<sup>3-9)</sup>, 消化管からの吸収性の低さから投与量の設定が困難であり, より低用量で経口的に有効なバナジウム錯体の開発が望まれている。現在までに様々な配位形式をもつバナジル (VO) 錯体が報告されてきたが<sup>10-14)</sup>, 研究例はまだ少なく, さらに多種多様な錯体に関する研究が求められている。

経口投与法による場合, 投与された錯体が胃を通過するために胃の酸性条件下で錯体が分解する可能性があるため, 酸性で高い安定性をもつ錯体の開発が求められる。また, 消化管からの吸収性を考慮して, 脂溶性が高く, 錯体全体として無電荷の中性錯体が主に開発されてきた。しかし, 疎水性が高まることにより, 錯体が水に難溶となる傾向も少ない。一方, ホスホン酸由来のドナー性酸素原子をもつ VO(pida) (pida = *N*-(phosphonomethyl) iminodiacetate) 錯体 (Fig. 1) は, 水溶液中では,  $\text{VO}^{2+}$  イオンに4座配位子である pida が1:1で配位し, さらに一分子の  $\text{H}_2\text{O}$  が配位した6配位八面体構造をとるため, 錯体全体として負電荷をもつことがすでに知られている<sup>15)</sup>。したがって, VO(pida) 錯体は  $\text{VO}^{2+}$ : 配位子 = 1:2の錯体よりも安定性と水溶性が高くなると期待される。そこで, これまで評価されてこなかった錯体として, VO(pida) およびその関連錯体がインスリン様作用を有しているかどうかを検討することにした。

\*所在地: 京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

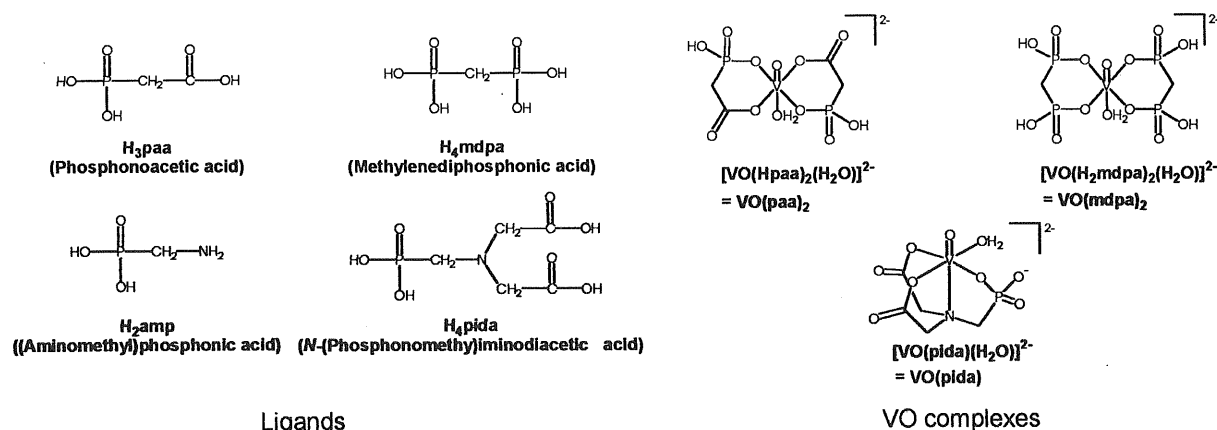


Fig. 1 Ligands used in this study and the possible structures of their VO complexes.

## 実験方法

試薬はすべて市販のものを精製せずに用いた。動物実験には全てWistar系雄性ラット（7週齢，体重200-220g）を用いた。

### 1. VO 錯体の合成

VO 錯体は，それぞれの配位子をアルカリで処理した水溶液に  $\text{VOSO}_4$  を加えて合成し，元素分析やIR，電子吸収およびESRスペクトルを用いて同定した。

### 2. ラット脂肪細胞からの遊離脂肪酸（FFA）抑制活性（インスリン様活性）の評価

文献<sup>16)</sup>にしたがいラット副睾丸周辺の脂肪組織より単離した脂肪細胞（ $1 \times 10^6$  cells/ml）に，2%牛血清アルブミン（BSA）を含むKrebs-Ringer bicarbonate（KRB）buffer（pH 7.4）中に， $1.0 \times 10^{-4}$ ， $5.0 \times 10^{-4}$ ， $1.0 \times 10^{-3}$  Mの  $\text{VOSO}_4$  およびVO錯体を加えて37℃で30分，プレインキュベートした。次に， $10^{-5}$  Mエピネフリン（アドレナリン）を加え37℃で3時間インキュベートした。氷冷により反応を停止させ，遠心分離（4℃，3000rpm，10分）した後，FFA定量キット（NEFA C-テスト ワコー）を用いて細胞外液中のFFAを定量した。エピネフリン刺激によるFFAの放出量を100%としたとき，放出量を50%抑制するバナジル錯体の濃度  $\text{IC}_{50}$  値を算出した。

### 3. *in vivo* インスリン様活性の評価

ラット尾静脈より，体重1kgあたり35mgのSTZ（ストレプトゾシン）を投与し，STZ誘導糖尿病ラット（STZ-ラット）を作成した。数日間にわたりラットが安定して高い血糖値を維持していることを確認した後，コントロール群（3匹）と投与群（10匹）の2群にわけ，コントロール群には生理食塩水のみを，投与群には生理食塩水に溶解したVO（pida）錯体を経口的に14日間毎日投与した。その間毎日，血糖値，体重，摂餌および摂水量をモニターした。14日後に，12時間絶食後，糖負荷試験および血清パラメータを測定した。

## 結果と考察

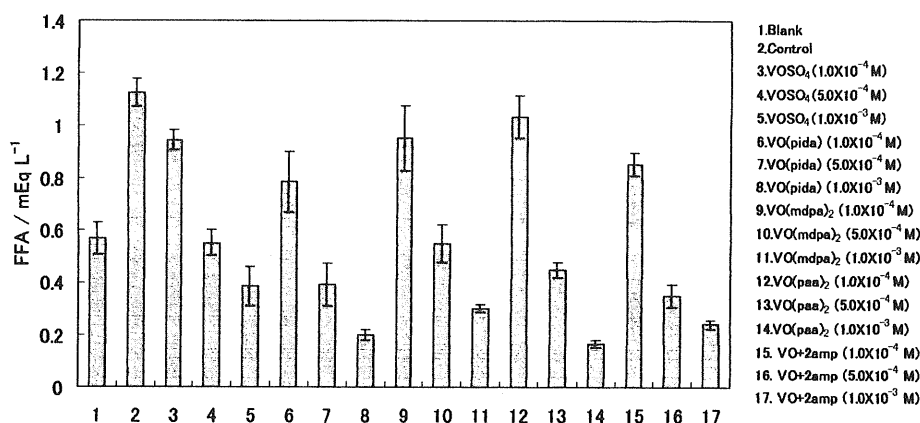
### *In vitro* インスリン様活性

用いた配位子および同定された錯体の推定構造をFig. 1に示す。VO（amp）<sub>2</sub>錯体に関しては， $\text{VOSO}_4$  が共存すると，pH8以下でポリマーを形成していると考えられ，単体を得ることが出来なかった。ラット脂肪細胞を用いたFFAの放出抑制活性にもとづいて，錯体のインスリン様活性を*in vitro*で評価した（Fig. 2）。上記のようにVO（amp）<sub>2</sub>錯体は単体を得ることができなかったため， $\text{VOSO}_4$  と  $\text{H}_2\text{amp}$  の2：1混合懸濁液（表中，VO + 2amp）を用いて評価した。得られた  $\text{IC}_{50}$  値（Table 1）を比較した結果，Fig. 1に示すバナジル錯体はいずれも， $\text{VOSO}_4$  に比べて強いインスリン様作用を示すことが明らかになった。

### *In vivo* 血糖値正常化作用

*In vivo*での血糖正常化作用の評価は， $\text{IC}_{50}$ 値が最も低いVO（pida）錯体に関して，STZ（ストレプトゾシン）誘導

糖尿病ラット (STZ-ラット) を用いて行った。2.5-10mg V/kgの用量で1日1回毎日経口投与したところ血糖正常化作用がみられ、一週間の連続投与で血糖値がほぼ正常域 (100-200mg/dL) に達した (Fig. 3上)。糖化ヘモグロビン (HbA<sub>1c</sub>) 値は、コントロール群が投与前と比較して増加していたのに対し、投与群では完全にその増加が抑えられていた (Table 2)。高血糖と共に上昇した摂餌量、摂水量に関しても、血糖値の正常化と共にそれぞれ約50%, 75%減少し、ほぼ正常量にまで改善された。14日間投与後の血中尿素窒素量 (BUN) に改善は見られなかったが、コントロール群に比べて高くないため、錯体の腎臓に対する毒性は低いと考えられた (Table 2)。しかし、若干の体重減少が観測されたため、今後、錯体の安全性についてさらに詳しく検討する必要がある (Fig. 3下)。また、これまでに報告されてきたVO錯体と同様にインスリン量に変化はなかったことから、VO(pida) 錯体の作用は、膵臓に特異的なものではなく、全身性であると考えられた。さらに、投与後の糖負荷試験の結果から、VO(pida) 錯体の投与により、耐糖能が改善されていることが明らかとなった (Fig. 4)。



**Fig. 2** Inhibitory effects of VOSO<sub>4</sub> as a positive control and VO complexes on epinephrine-stimulated FFA release from isolated rat adipocytes. Data are expressed as the means  $\pm$  standard deviations of 3 experiments.

**Table 1.** Estimated IC<sub>50</sub> values, 50% inhibition concentration of VO compounds on epinephrine-stimulated FFA release from isolated rat adipocytes.

| Complex               | IC <sub>50</sub> (mM) |
|-----------------------|-----------------------|
| VO(pida)              | 0.51 $\pm$ 0.02*      |
| VO + 2amp             | 0.57 $\pm$ 0.05*      |
| VO(paa) <sub>2</sub>  | 0.74 $\pm$ 0.03*, †   |
| VO(mdpa) <sub>2</sub> | 0.88 $\pm$ 0.02 †     |
| VOSO <sub>4</sub>     | 1.00 $\pm$ 0.08       |

\* Significance at  $P < 0.05$  vs. VOSO<sub>4</sub>.

† Significance at  $P < 0.05$  vs. VO(pida).

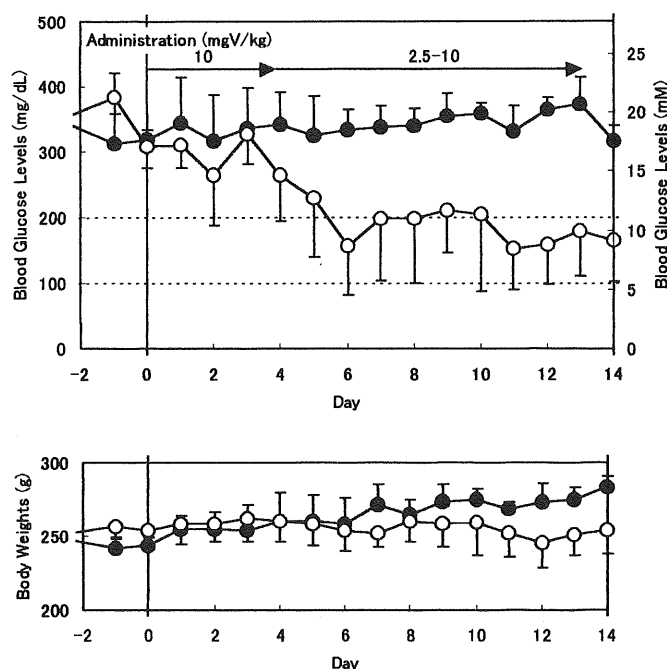
**Table 2.** Serum parameters in STZ-rats treated with VO (pida) complex.

|                                                        | <i>n</i> | HbA <sub>1c</sub><br>(%) | Insulin<br>( $\mu$ U/mL) | FFA<br>(mEq/L)  | BUN<br>(mg/mL)  |
|--------------------------------------------------------|----------|--------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| Normal rats                                            | 3        | 2.7 $\pm$ 0.1            | 12.7 $\pm$ 4.7           | 0.59 $\pm$ 0.12 | 10.0 $\pm$ 4.7  |
| STZ-rats before treatments                             | 13       | 4.5 $\pm$ 0.4*, †        | 5.1 $\pm$ 1.7*           | 0.55 $\pm$ 0.12 | 19.0 $\pm$ 2.5* |
| STZ-rats treated with saline for 14 days <sup>a)</sup> | 3        | 6.2 $\pm$ 0.5*           | 5.1 $\pm$ 1.2*           | 0.55 $\pm$ 0.10 | 21.9 $\pm$ 3.7* |
| STZ-rats with VO(pida) for 14 days <sup>b)</sup>       | 10       | 4.6 $\pm$ 1.4*, †        | 6.0 $\pm$ 4.5*           | 0.47 $\pm$ 0.17 | 27.0 $\pm$ 5.9* |

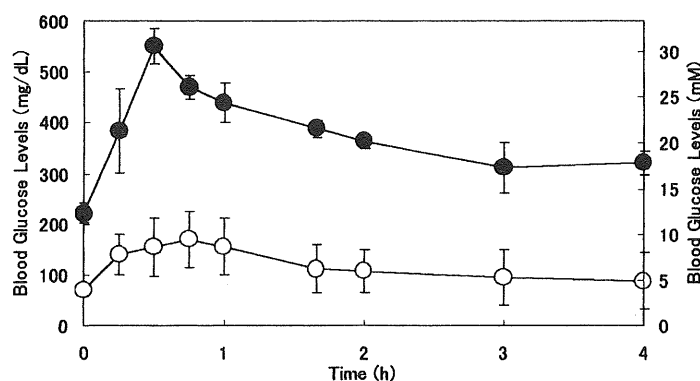
a) Control group. b) Treated group.

\* Significance at  $P < 0.01$  vs. Normal rats.

† Significance at  $P < 0.01$  vs. Control group.



**Fig. 3** Changes in blood glucose level (top) and body weight (bottom) of STZ-rats received daily oral administrations of saline (control group : ● ;  $n = 3$ ) and VO(pida) (treated group : ○ ;  $n=10$ ).



**Fig. 4** Glucose tolerance in STZ-rats after oral treatment of saline (control group : ●) or VO(pida) (treated group : ○) for 14 days. Oral glucose tolerance tests were performed after fasting of rats for 12 h and then glucose solution was given at a dose of 2 g/kg body weight.

### おわりに

今回、ホスホン酸を含むVO錯体の*in vitro*および*in vivo*インスリン様作用を検討し、糖尿病治療薬として可能であるかどうかを評価した。合成した錯体は、すべて $\text{VOSO}_4$ よりも強い*in vitro*インスリン様作用を示した。*In vitro*でのインスリン様活性が最も強かったVO(pida)錯体をSTZ-ラットへ経口投与したところ、血糖値正常化および耐糖能改善などの抗糖尿病作用が観察され、明らかな有効性を示すことができた。今回の研究結果により、バナジール-ホスホネート関連錯体は、新しいタイプの抗糖尿病性錯体の一つとして期待される。

### 文 献

- 1) Dubyak G.R. and Kleinzeller A. (1980) J. Biol. Chem. 255 : 5306.
- 2) Shechter Y. and Karlsh S.J.D. (1980) Nature 284 : 556.
- 3) Cusi K., Cukier S., DeFronzo R.A., Torres M., Puchulu F.M. and Pereira Redondo J.C. (2001) J. Clin. Endocrinol.

Metab. 86 : 1410.

- 4) Goldfine A.B., Patti M.E., Zuberi L., Goldstein B.J., LeBlanc R., Landaker E.J., Jiang Z.Y., Willsky G.R. and Kahn C.R. (2000) *Metabolism* 49 : 400.
- 5) Boden G., Chen X., Ruiz J., van Rossum G.D. and Turco S. (1996) *Metabolism* 45 : 1130.
- 6) Halberstam M., Cohen N., Shlimovich P., Rossetti L. and Shamooh H. (1996) *Diabetes* 45 : 659.
- 7) Goldfine A.B., Simonson D.C., Folli F., Patti M.-E. and Kahn C.R. (1995) *Mol. Cell. Biochem.* 153 : 217.
- 8) Goldfine A.B., Simonson D.C., Folli F., Patti M.-E. and Kahn C.R. (1995) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 : 3311.
- 9) Cohen N., Halberstam M., Shlimovich P., Chang C.J., Shamooh H. and Rossetti L. (1995) *J. Clin. Invest.* 95 : 2501.
- 10) Thompson K.H. and Orvig C. (2000) *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* : 2885.
- 11) Thompson K.H., McNeill J.H. and Orvig C. (1999) *Chem. Rev.* 99 : 2561.
- 12) Sakurai H. and Tsuji A. (1998) in *Vanadium in the Environment*, ed. by Nriagu J.O. John Wiley & Sons, New York : 297.
- 13) Takeshita S., Kawamura I., Yasuno T., Kimura C., Yamamoto T., Seki J., Tamura A., Sakurai H. and Goto T. (2001) *J. Inorg. Biochem.* 85 : 179.
- 14) Takino T., Yasui H., Yoshitake A., Hamajima Y., Matsushita R., Takada J. and Sakurai H. (2001) *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 : 133.
- 15) Crans D.C., Jiang F., Anderson O.P. and Miller S.M. (1998) *Inorg. Chem.* 37 : 6645.
- 16) Nakai M., Watanabe H., Fujiwara C., Kakegawa H., Satoh T., Takada J., Matsushita R. and Sakurai H. (1995) *Biol. Pharm. Bull.* 18 : 719.