

血糖値降下作用を示す Nn 型配位様式をもつ亜鉛(II) 錯体

近 藤 真佑子¹⁾, 吉 川 豊¹⁾, 上 西 潤 一²⁾, 桜 井 弘³⁾, 小 嶋 良 種¹⁾

(¹⁾大阪市立大学大学院理学研究科生物無機化学研究室*, (²⁾京都薬科大学薬化学教室**,

³⁾京都薬科大学代謝分析学教室**)

New Insulinomimetic Zinc(II) Complexes of Amine Derivatives with Zn(Nn) Coordination Mode

M. KONDO¹⁾, Y. YOSHIKAWA¹⁾, J. UENISHI²⁾, H. SAKURAI³⁾, Y. KOJIMA¹⁾

¹⁾Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka City University,
3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585, Japan.

²⁾Department of Organic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University,
5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan.

³⁾Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University,
5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan.

We synthesized new insulinomimetic zinc(II) complexes of amine derivatives with Zn(Nn) coordination mode. The insulinomimetic activity was estimated by the inhibitory effect on free fatty acid release from the isolated rat adipocytes treated with epinephrine. Zn(2-ampy)₂, Zn(1,5,9-TN) etc. with the stability constants ($\log \beta$) lower than 11 have been found to have higher insulinomimetic activities than that of ZnSO₄. In *in vivo* studies, the high blood glucose level of KK-A^y mice with hereditary type 2 diabetes mellitus was lowered by daily intraperitoneal injections of Zn(2-ampy)₂ for 14 days. We proposed here that new zinc(II) complexes with Zn(N₄) coordination mode have high insulinomimetic activities and blood glucose normalizing effects.

【序】

近年生活習慣病として注目されている糖尿病の患者数は、その予備軍を併せると1400万人にも上ると言われている¹⁾。とりわけ我が国で95%を占めると言われている2型糖尿病の治療には、多くの有機薬剤が開発されているが、近年その副作用が大きな問題となっている。

著者らは、亜鉛(II)錯体が血糖値降下作用を有することを見出し²⁾、種々の配位様式をもつ亜鉛(II)錯体の血糖値降下作用の評価を行ってきた³⁻⁵⁾。本研究では、今までとは異なる配位様式をもつ Zn(Nn)型錯体を合成し、それらの生理作用を *in vitro* および *in vivo* 系で評価した。

【実験方法】

配位子としては、N₄型の配位様式をとる環状ポリアミン 1,4,8,12-Tetraazacyclopentadecane ([15]aneN₄)、ピリジン環を含むアミン 2-amino methyl pyridine (2-ampy) や絶対配置による活性の違いを評価するために (S)-および (R)-1-

*所在地：大阪市住吉区杉本3-3-138 (〒558-8585)

**所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

amino ethyl pyridine (SおよびR-aepy) を用いた。さらに、N₃型配位様式をもつ環状ポリアミン1,4,7-triazacyclononane ([9]aneN₃) および直鎖状のアミン1,5,9-triazanonane (1,5,9-TN) を用い、亜鉛(II)錯体を合成した。上記配位子の構造はFig. 1に示した。

*in vitro*におけるインスリン様活性の評価には、文献既知の方法である脂肪細胞からの脂肪酸の遊離を指標にした⁶⁾。すなわち、Wistar系雄性ラットの副睪丸周辺の脂肪組織から、コラゲナーゼ処理により脂肪組織を分散させ、その脂肪細胞液に对照としての硫酸バナジル (VOSO₄) と硫酸亜鉛 (ZnSO₄) および合成した亜鉛(II)錯体を添加し、プレインキュベーションした。さらに、エピネフリンを加えインキュベーション後、放出される遊離脂肪酸量を測定した。

*in vivo*における血糖値降下作用の評価は、2型糖尿病モデル動物 (KK-A^yマウス) を用いて行った。Zn(2-ampy)₂錯体を1日1回14日間腹腔内に2 mg Zn / kg体重の用量で投与した。14日間の投与終了後、KK-A^yマウスを12時間絶食させ、体重1 kgあたり1 gのグルコースを経口投与し、耐糖能の改善状態を評価した。また、投与後の肝機能、腎機能などの変化は、各個体の血清を採取し、富士ドライケム (富士メディカルシステム株式会社：東京) を用いて測定した。

長期糖尿病コントロールの指標となる糖化ヘモグロビン (HbA_{1c}) は、HA2000 (バイエルメディカル株式会社：東京) を用いて測定した。

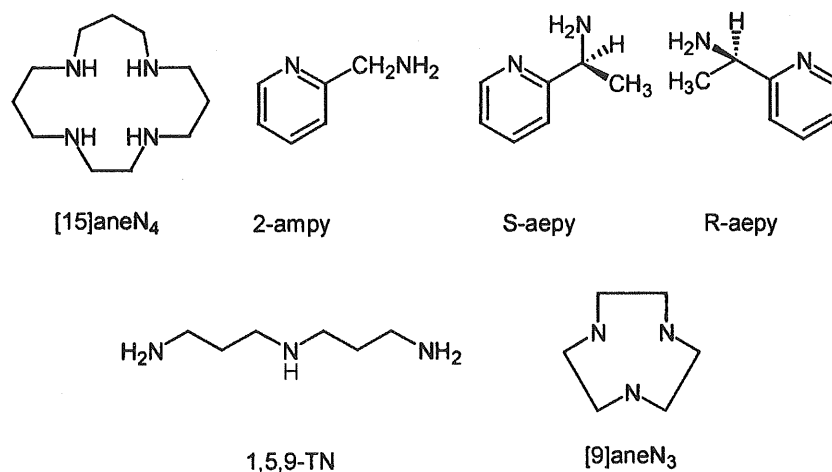


Fig. 1 Structural formula of Nn type ligands.

【結果および考察】

1. *in vitro*におけるインスリン様作用

脂肪細胞からの脂肪酸の遊離を50%抑制する錯体の濃度をIC₅₀と定義し、錯体の効果を对照として用いたVOSO₄やZnSO₄と併せてTable 1に示した。また、文献値の安定度定数 (log β) もTable 1に示した。この結果からlog βが11以下の亜鉛(II)錯体は、強いインスリン様作用を有することが明らかとなった。

2. *in vivo*における血糖値降下作用

*in vitro*の評価でインスリン様作用をもつことが明らかになった、N₄型の配位様式をもつZn(2-ampy)₂錯体を2 mg Zn / kg体重の割合で、KK-A^yマウスに投与すると、投与後数日で血糖値は降下し、その血糖値は2週間維持された (Fig. 2 (a))。毒性の指標となる体重の変化は、錯体投与群およびコントロール群共に順調に増加した (Fig. 2 (b))。さらに、耐糖能の改善を評価するために、経口糖負荷試験を行った (Fig. 3)。錯体投与群ではコントロール群と比較して、最大血糖値は有意に低下していることが明らかとなった。さらに、グルコース負荷後120分において、錯体投与群では、グルコース負荷前の血糖値レベルまで回復しているのに対し、コントロール群では、血糖値の回復が遅れていた。

Table 1. IC₅₀ values of zinc(II) complexes

Complex	Coordination mode	log $\beta^{\text{7)}$	IC ₅₀ ($\pm$ SD)
[Zn(2-ampy) ₂]Cl ₂	N ₄	9.44	0.85(0.04)*
[Zn(S-ampy) ₂]Cl ₂	N ₄		0.39(0.04)**
[Zn(R-ampy) ₂]Cl ₂	N ₄		0.40(0.05)**
[Zn([15]aneN ₄)](ClO ₄) ₂	N ₄	15.00	none
[Zn([9]aneN ₃)](NO ₃) ₂	N ₃	11.60	none
[Zn(1, 5, 9-TN)]Cl ₂	N ₃	7.92	0.85(0.03)*
VOSO ₄			1.00(0.08)
ZnSO ₄			1.58(0.05)

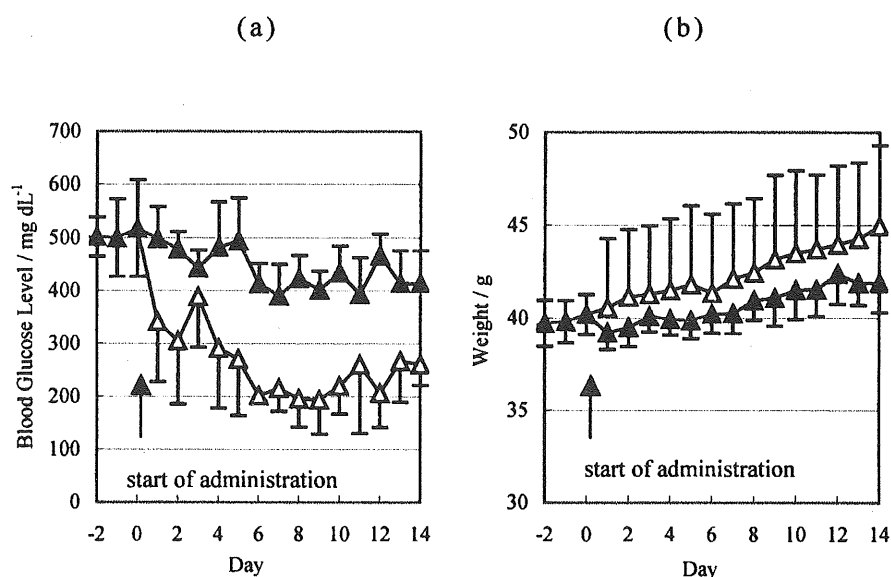
* Significance at $p < 0.01$ v.s. ZnSO₄** Significance at $p < 0.001$ v.s. ZnSO₄

Fig. 2 (a) Changes of blood glucose levels in ($\triangle$) KK-A^y mice treated with Zn(2-ampy)₂ (2 mg Zn / kg body weights) and ($\blacktriangle$) KK-A^y mice treated with 5% acacia vehicle (control KK-A^y mice) by daily i.p. injections (n=5). (b) Changes of body weights in ($\triangle$) KK-A^y mice treated with Zn(2-ampy)₂ (2 mg Zn / kg body weights) and ($\blacktriangle$) KK-A^y mice treated with 5% acacia vehicle (control KK-A^y mice) by daily i.p. injections (n=5).

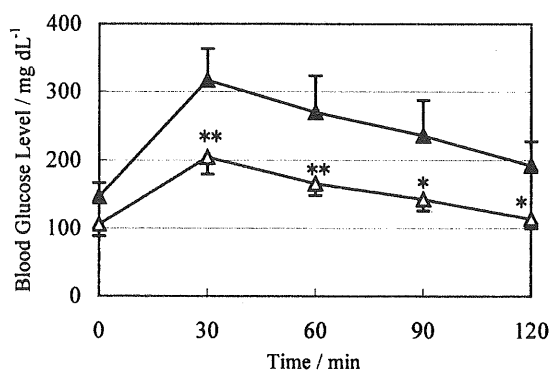


Fig. 3 Oral glucose tolerance tests for ($\triangle$) KK-A^y mice treated with Zn(2-ampy)₂ (2 mg Zn / kg body weights) and ($\blacktriangle$) KK-A^y mice treated with 5% acacia vehicle (control KK-A^y mice) by daily i.p. injections (n=5). Oral glucose tolerance test was performed on mice fasted for 12 h, and then they were given glucose solution orally at a dose of 1 g / kg body weight.

*Significance at $p < 0.05$ v.s. control KK-A^y mice**Significance at $p < 0.01$ v.s. control KK-A^y mice

3. 血清パラメータの変化

錯体投与後のマウスから血清を採取し、肝機能や腎機能の指標となる生化学パラメータの測定を行った。その結果、肝臓・腎臓への毒性、ならびに血清コレステロール値に変化はみられなかった (Table 2)。さらに、糖化ヘモグロビン量 (HbA_{1c}) を測定したところ、錯体投与群では、コントロール群と比較して、その値は有意に低下した (Table 2)。以上の結果から、血糖値の低下が一時的なものではなく、長期に渡って持続していることも明らかとなった。

Table 2. Serum parameters of KK-A^y mice given daily Zn(2-ampy)₂ injections at a dose of 2 mg Zn / kg body weight for 14 days

	Control	Zn(2-ampy) ₂
BUN (mg / dL)	32.9 ± 2.4	26.5 ± 1.2
GOT (U / L)	160 ± 26	128 ± 40
GPT (U / L)	30 ± 9	30 ± 4
TG (mg / dL)	181 ± 27	183 ± 44
TCHO (mg / dL)	176 ± 27	160 ± 20
HbA _{1c} (%)	9.6 ± 0.2	6.5 ± 1.2*

*Significance at $p < 0.01$ v.s. Control

【まとめならびに今後の方針】

上記の結果から、Nn型特にN4型の配位様式をもつ亜鉛(II)錯体は、耐糖能を改善し、血糖値を降下させることを明らかにした。また、血清パラメータの結果からは、高い毒性は観察されなかった。

今後は、これら亜鉛(II)錯体の作用機序の解明、ならびに経口投与可能な亜鉛(II)錯体の選別を検討していく予定である。

【参考文献】

- 1) Tsuda, K. and Seino, Y. (1998) J. Japan Diabetes Soc. 41: 959.
- 2) Yoshikawa, Y., Ueda, E., Kawabe, K., Miyake, H., Sakurai, H., and Kojima, Y. (2000) Chem. Lett.: 874.
- 3) Yoshikawa, Y., Ueda, E., Miyake, H., Sakurai, H., and Kojima, Y. (2000) Biomed. Res. Trace Elements 11: 349.
- 4) Yoshikawa, Y., Ueda, E., Miyake, H., Sakurai, H., and Kojima, Y. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 281: 1190.
- 5) Yoshikawa, Y., Ueda, E., Suzuki, Y., Yanagihara, N., Sakurai, H., and Kojima, Y. (2001) Chem. Pharm. Bull. 49: 652.
- 6) Nakai, M., Watanabe, H., Fujisawa, C., Kakegawa, H., Satoh, T., Takada, J., Matsushita, R., and Sakurai, H. (1995) Biol. Pharm. Bull. 18: 719.
- 7) Martell, A. E. and Smith, R. M. (1974) : "Critical Stability Constants," Vol.1, Plenum Press, New York and London.