

## 抗糖尿病作用を有する亜鉛(II)－アミド錯体

植田 英里好<sup>1)</sup>, 吉川 豊<sup>1)</sup>, 桜井 弘<sup>2)</sup>, 小嶋 良種<sup>1)</sup>( <sup>1)</sup>大阪市立大学大学院理学研究科\*, <sup>2)</sup>京都薬科大学\*\*)

## Antidiabetic Zinc(II) Complexes with Amide Derivative Compounds

Eriko UEDA<sup>1)</sup>, Yutaka YOSHIKAWA<sup>1)</sup>, Hiromu SAKURAI<sup>2)</sup> and Yoshitane KOJIMA<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka City University,

3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585, Japan

<sup>2)</sup>Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University,

5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

## Summary

Zn(II) complexes with amide derivative ligands exhibited the *in vitro* insulinomimetic activities in isolated rat adipocytes treated with epinephrine in terms of inhibition of free fatty acid release. It was found that the blood glucose levels are normalized by daily intraperitoneal injection of Zn(II) complexes with 2-picolinamide (pa-a) and 6-methyl-2-picolinemethylamide (6mpa-ma) for 14 days in KK-A<sup>y</sup> mice who are a model animal with hereditary type 2 diabetes mellitus (DM). After the administrations of the complexes for 14 days, improvement of the glucose metabolism was confirmed by an oral glucose tolerance test. In addition, the hemoglobin A<sub>1c</sub>, which shows the average blood glucose levels over a long period, was improved. Based on the results, Zn(II)-picolinamide derivative complexes are proposed to be a possible therapeutic agent to treat type 2 DM.

## 【序】

生活習慣病として知られている糖尿病は、高血糖を主症とする代謝系の疾患であり、多くの合併症を引き起こす<sup>1,2)</sup>。近年、日本のみならず世界中で糖尿病の患者数は増える傾向にあり、国内だけでも境界域の患者を含めると1370万人に達すると推定される<sup>3)</sup>。このような状況下で、これまでに多くの抗糖尿病薬が開発されてきたが副作用の報告などもあり、より安全で効果のある薬剤の開発が望まれている。

近年、クロム、マグネシウム、バナジウム、亜鉛などの金属イオンがインスリン様作用を示すことが報告されている<sup>4)</sup>。なかでも、生体内必須微量元素としての亜鉛は、イオン型が1980年に*in vitro*でインスリン様作用があることが報告されて以来、*in vivo*での報告も数々なされてきた<sup>5-8)</sup>。しかし、投与された亜鉛の量がLD<sub>50</sub>をこえる報告もあり、より少量で効果を示し、毒性の少ない薬剤の開発が必要である。すでに、著者らは亜鉛イオンより少量でインスリン様作用を示す種々の配位様式をもつ亜鉛(II)錯体を見出してきた<sup>9-11)</sup>。さらに新しい錯体を考案することを目指して、これまでに用いられていない新しいタイプの錯体として、アミド化合物を配位子とする亜鉛(II)錯体を合成して、それらのインスリン様作用を検討した。

\*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)

## 【実験方法】

配位子およびアミド化合物-亜鉛(II)錯体の合成は、既知の方法に準じて行った<sup>12)</sup>。

1. *in vitro*におけるアミド化合物-亜鉛(II)錯体のインスリン様作用の評価

Wistar系雄性ラットの副睾丸周辺脂肪組織から、コラゲナーゼ処理により分離した脂肪細胞に錯体を加え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を測定した<sup>13)</sup>。

2. *in vivo*におけるアミド化合物-亜鉛(II)錯体の血糖降下作用

8週齢のKK-A<sup>y</sup>マウス(2型糖尿病モデル動物)に錯体を1日1回、14日間腹腔内投与した。投与は、亜鉛量としてマウスの体重1 kgあたり、4 mgの錯体をアカシア5%水溶液に懸濁して行った。コントロール群は5%アカシア溶液のみを腹腔内投与した。投与期間中は、血糖値・体重・摂餌量・摂水量をモニターした。錯体投与前と投与後の糖化ヘモグロビン(HbA1c)を測定し、長期間の糖尿病状態を評価した。糖負荷試験は、14日間の投与後、14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て、血糖値の時間変化を30分間隔で120分まで測定した。

## 3. 阻害剤を用いた作用部位の検討

ホスホジエステラーゼの阻害剤であるシロスタミド、グルコーストランスポーターGLUT4を阻害するサイトカラシンBをラットの脂肪細胞に作用させて、遊離脂肪酸抑制効果により、錯体の作用部位を同定した。

## 【結果と考察】

錯体の合成に用いたアミド化合物をFig. 1に示した。

ラット脂肪細胞を用いた系で、脂肪酸の遊離を50%抑制する錯体の濃度をIC<sub>50</sub>としてインスリン様作用を評価した。Table 1に示すように、ピコリンアミド(pa-a)、6-メチルピコリンメチルアミド(6mpa-ma)、ニコチンアミド(na)、ニコチンメチルアミド(nma)およびニコチンエチルアミド(nea)を配位子とする錯体は基準物質のVOSO<sub>4</sub>やZnSO<sub>4</sub>より高いか同程度のインスリン様作用を示した。なかでも、na、nmaおよびneaを配位子とする錯体のIC<sub>50</sub>値は、置換

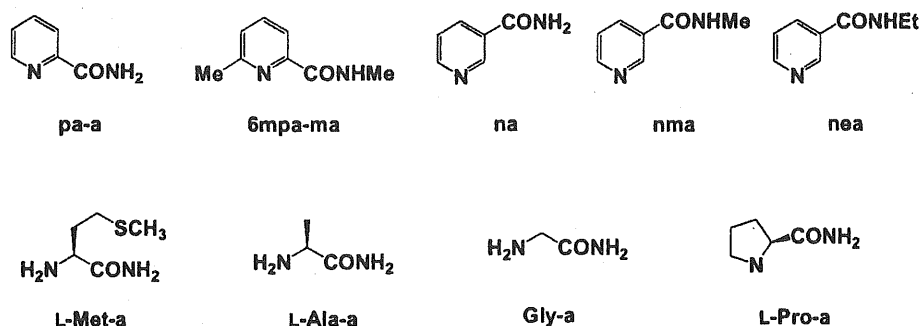


Fig. 1 Structures of Amide Derivative Ligands

Table 1. Estimated IC<sub>50</sub> Values of Zn(II) Complexes with Amide for Free Fatty Acid Release from Isolated Rat Adipocytes Treated with Epinephrine

| Complex                                | IC <sub>50</sub> (mM) | Complex                                | IC <sub>50</sub> (mM) |
|----------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| VOSO <sub>4</sub>                      | 1.00 ± 0.08           | ZnSO <sub>4</sub>                      | 1.58 ± 0.05           |
| Zn(pa-a) <sub>3</sub> <sup>2+</sup>    | 0.70 ± 0.04**         | Zn(6mpa-ma) <sub>2</sub> <sup>2+</sup> | 0.97 ± 0.04**         |
| Zn(na) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>      | 1.34 ± 0.11*          | Zn(nma) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>     | 1.12 ± 0.05*          |
| Zn(nea) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>     | 0.96 ± 0.03**         | Zn(L-Met-a) <sub>2</sub> <sup>2+</sup> | 2.24 ± 0.05           |
| Zn(L-Ala-a) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> | 3.12 ± 0.04           | Zn(Gly-a) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>   | 8.17 ± 0.05           |
| Zn(L-Pro-a) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> | none                  |                                        |                       |

Values are means ± SDs for three runs

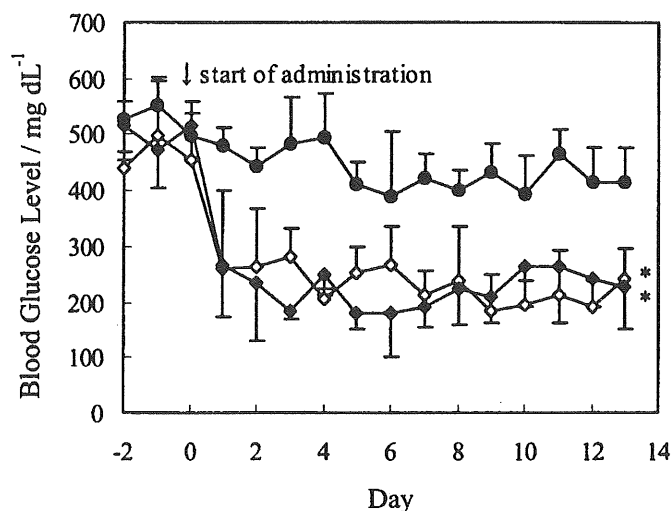
\*Significance at  $p < 0.01$  v.s. ZnSO<sub>4</sub>

\*\*Significance at  $p < 0.005$  v.s. ZnSO<sub>4</sub>

基の脂溶性が高まるにつれてインスリン様作用も高くなった。

*in vitro* 評価で活性の高かった  $\text{Zn}(\text{pa-a})_3^{2+}$  **1** と  $\text{Zn}(\text{6mpa-ma})_2^{2+}$  **2** を KK-A<sup>y</sup> マウスに、4 mg Zn/kg 体重の用量で14日間腹腔内投与した。投与期間中の血糖値の変化を Fig. 2 に示す。投与開始前 500 mg/dL 前後あった血糖値は、錯体投与群では投与2日で 200 mg/dL まで降下した後、200–300 mg/dL を維持した。錯体投与により明らかに血糖正常化作用がみられた。

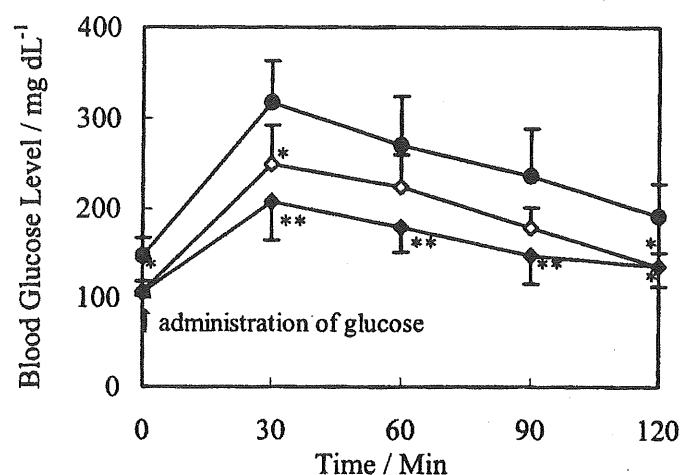
次に、耐糖能が改善されているかどうかを評価するために、14日後に経口糖負荷試験を行った (Fig. 3)。錯体を投与しなかったコントロール群では、グルコース投与30分後、血糖値が 300 mg/dL 以上まで上昇し、その後緩やかに降下したが120分後でもグルコース投与前の血糖値までは回復しなかった。それに対して、錯体**1**と**2**を投与した群では、



**Fig. 2** Changes of Blood Glucose Levels of KK-A<sup>y</sup> Mice During Daily i.p. Injection of Complex **1** ( $\text{Zn}(\text{pa-a})_3^{2+}$ ) and **2** ( $\text{Zn}(\text{6mpa-ma})_2^{2+}$ ) at a Dose of 4 mg Zn/kg Body Weight for 14 Days. (n=5)

—●— control, —◇— complex 1, —◆— complex 2

\*Significance at  $p < 0.001$  v.s. control



**Fig. 3** Oral Glucose Tolerance Test in Control KK-A<sup>y</sup> Mice and KK-A<sup>y</sup> Mice Treated with Complex **1** ( $\text{Zn}(\text{pa-a})_3^{2+}$ ) and **2** ( $\text{Zn}(\text{6mpa-ma})_2^{2+}$ ) (n=5)

—●— control, —◇— complex 1, —◆— complex 2

\*Significance at  $p < 0.05$  v.s. untreated KK-A<sup>y</sup> mice

\*\*Significance at  $p < 0.01$  v.s. untreated KK-A<sup>y</sup> mice

グルコース投与30分後に血糖値は最高まで上昇したが、コントロール群に比べて低く、120分後にはグルコース投与前の血糖値まで回復した。これらの結果より、錯体1と2は、糖代謝を改善することにより糖尿病状態を改善していることが明らかとなった。

長期間にわたる血糖値のコントロール状態を知ることができ、糖尿病状態の指標となるヘモグロビンA<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>)を錯体の投与前後で測定した (Table 2)。コントロール群では、14日間を通して400-500 mg/dLと高血糖状態が続いたため、HbA<sub>1c</sub>は投与前に比べて、0.7%上昇した。一方、錯体1と2の投与群では、それぞれ0.6と1.3%低下し、血糖値の降下が一時的なものではなく、投与期間中を通じて低下していたことが明らかとなった。

これら錯体の作用機構を検討するため、脂肪細胞に種々の阻害剤を加えた (Fig. 4)。その結果、これら錯体はグルコ

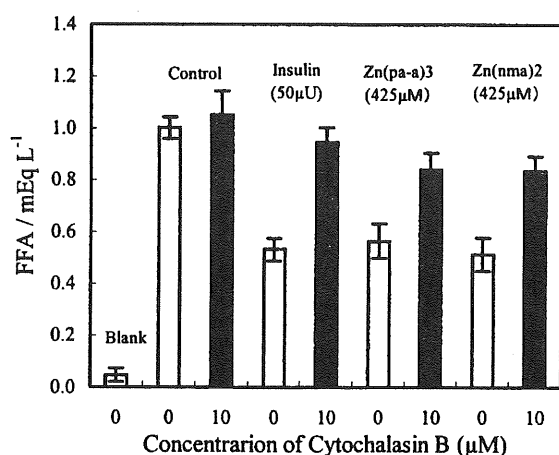
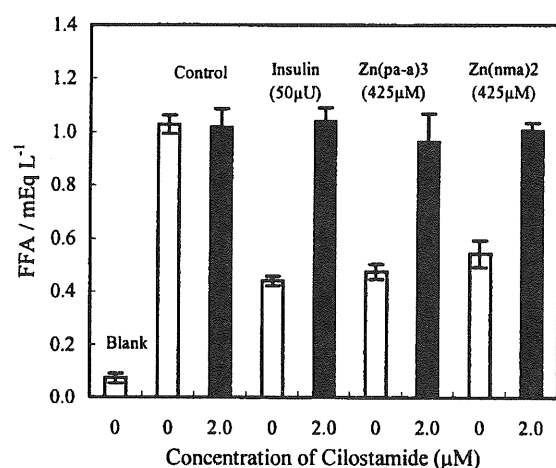
**Table 2.** Hemoglobin A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) Levels of KK-A<sup>y</sup> Mice before and after Daily i.p. Injections of 5% Acacia (Control), Complex 1 (Zn(pa-a)<sub>3</sub><sup>2+</sup>) and 2 (Zn(6mpa-ma)<sub>2</sub><sup>2+</sup>) at a Dose of 4 mg Zn/kg Body Weight for 14 Days

| Treatment | HbA <sub>1c</sub> (%) |                |
|-----------|-----------------------|----------------|
|           | pre treatment         | post treatment |
| control   | 7.6 ± 0.5             | 8.3 ± 0.3      |
| complex 1 | 7.0 ± 0.8             | 6.4 ± 0.8*     |
| complex 2 | 7.4 ± 0.8             | 6.1 ± 0.5**    |

Values are means ± SDs for 5 or 4 mice (1; 5 mice and control and 2; 4 mice).

\*Significance at  $p < 0.005$  v.s. after the treatment of control KK-A<sup>y</sup> mice

\*\*Significance at  $p < 0.001$  v.s. after the treatment of control KK-A<sup>y</sup> mice



**Fig. 4** Effects of Cilostamide (top) as a Phosphodiesterase and Cytochalasin B (bottom) as a GLUT4 Inhibitor, on Antilipolytic Effects of Insulin (50 μU), Zn(pa-a)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (425 μM), and Zn(nma)<sub>2</sub><sup>2+</sup> (425 μM). Values are means ± SDs for three runs.

ーストランスポータに作用し、グルコースの取り込みを促進することにより、インスリン様作用を示す可能性を示唆した。

以上の結果より、今回用いたアミド化合物-亜鉛(II)錯体の多くは、インスリン様作用ならびに血糖降下作用を示し、糖代謝やHbA<sub>1c</sub>を改善することが明らかになった。特に、糖負荷試験とHbA<sub>1c</sub>では錯体**1**に比べて**2**の方がより高い効果を示した。

### 【文献】

- 1) Okawara T., Kawamura N., Kitagawa Y., and Taniguchi N. (1992) J. Biol. Chem. 267 : 18505.
- 2) Rasmussen L. H. and Ledet T. (1996) Diabetologia 39 : 696.
- 3) Tsuda K. and Seino Y. (1998) J. Japan Diabetes Soc. 41 : 959.
- 4) 糸川嘉則 (1992) Diabetes Frontier 3 : 425.
- 5) Coulson L. and Dandona P. (1980) Diadetes 29 : 665.
- 6) Shisheva A., Gefel D., and Schechter Y. (1992) Diabetes 41 : 982.
- 7) Chen M. D., Liou S. J., Lin P. Y., Yang V. C., Alexander P. S. and Lin W. H. (1998) Biol. Trace Elem. Res. 61 : 303.
- 8) Moon K. S., Mark J. R., Sukijin H., Diane M. H., Inkyung H., Ian Y., Michael S. G., Marvin E. A., and Vay L. W. G. (2001) Metabolism 50 : 53.
- 9) Yoshikawa Y., Ueda E., Miyake H., Sakurai H., and Kojima Y. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 281 : 1190.
- 10) Yoshikawa Y., Ueda E., Suzuki Y., Yanagihara N., Sakurai H., and Kojima Y. (2001) Chem. Pharm. Bull. 49 : 652.
- 11) Yoshikawa Y., Ueda E., Kawabe K., Miyake H., Takino T., Sakurai H., and Kojima Y. J. Biol. Inorg. Chem. in press.
- 12) Ueda E., Yoshikawa Y., Kishimoto N., Tadokoro M., Yanagihara N., Sakurai H., and Kojima Y. (2001) Chem. Lett. 11 : 1184.
- 13) Nakai M., Watanabe H., Fujisawa C., Kakegawa H., Stoh T., Takada J., Matsushita R., and Sakurai H. (1995) Biol. Pharm. Bull. 18 : 719.