

高血糖カイコを用いた糖尿病の基礎研究と創薬展開

松本 靖彦, 関水 和久

糖尿病は、血液中のグルコース濃度(血糖値)が慢性的に高い値を示す状態が続く疾患であり、長期間高血糖状態が続くとさまざまな糖尿病合併症が発症する。糖尿病治療には、血糖値を低下させるインスリンの投与やインスリンの放出促進薬などが用いられるが、インスリン抵抗性のII型糖尿病患者が増加しており問題となっている。糖尿病治療薬の開発のために、マウスやラット等の哺乳動物の糖尿病病態モデルを用いた個体に対する候補化合物の治療効果の評価が行われている。最近著者らは、昆虫であるカイコの糖尿病病態モデルを確立し、糖尿病治療薬の評価が行えることを明らかにした。カイコを用いた評価系の導入により、殺傷せねばならない哺乳動物の数を激減させることができると期待される。本稿では、高血糖カイコを用いた糖尿病治療薬の開発における新しい創薬戦略の提案とその考えに至るまでの基礎研究を中心に概説する。

1. はじめに

糖尿病は慢性的な高血糖状態が持続する疾患である。高血糖状態が長期間続くと腎症、末梢神経障害、網膜症などのさまざまな糖尿病合併症が発症する。糖尿病は、血糖調節ホルモンであるインスリンが血中で枯渇して起こるI型糖尿病と、遺伝的な要因や肥満などの生活習慣に起因してインスリンが効かなくなるII型糖尿病に分けられる。近年、特に先進諸国において、インスリン抵抗性が原因となるII型糖尿病の患者数が増加傾向にある¹⁾。インスリン、およびインスリン抵抗性改善作用により血糖値を低下させる医薬品が糖尿病の治療に用いられている。インスリン製剤に抵抗性となった患者の増加や糖尿病治療薬のいくつかは低血糖や肥満などの副作用を引き起こすという問題があり、新たな治療薬の開発が望まれている²⁾。

血糖値は、インスリンなどの複数のホルモンの作用により厳密に維持されている。それらのホルモンにより、全身

の各種組織における糖の取り込み、代謝、排泄が統合的に調節されている。よって、糖尿病治療薬の候補となる化合物が血糖値を変動させる効果を有しているか評価するためには、動物個体を用いる必要がある。化合物の血糖降下活性を簡便に測定する新たな動物モデルを開発できれば、糖尿病治療薬の開発に貢献できると期待される。

本稿では、昆虫であるカイコを用いた高血糖モデルの開発と創薬への応用に関する我々の研究成果を中心に紹介する。

2. 糖尿病治療薬の開発にカイコを用いることの必要性

薬を開発するためには、治療効果が見込めそうな化合物を得る必要がある。近年、さまざまな研究機関や企業が化合物ライブラリーを保有しており、その中からどのように治療に有用な候補化合物を探索するかが創薬の一つの課題となっている。糖尿病治療薬を開発するためには、血糖値を簡便に測定することができるモデル動物を使うことが望ましい。一般的には、マウスやラットなどの哺乳動物が研究に利用されている。しかし、マウスやラットなどの個体に対して治療効果を評価するための十分量を化合物ライブラリーから得るのは困難である。また、多数の哺乳動物を用いて化合物のスクリーニングを行うことは、高い飼育コストばかりでなく、動物愛護の観点からも問題が生じる。一方、カイコは、体重がマウスの約10分の1であり、治療効果を評価するために使用する化合物の量が少ないの

東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)

Drug discovery for treatment against diabetes by using hypoglycemic silkworms

Yasuhiko Matsumoto and Kazuhisa Sekimizu (Laboratory of Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

で、少量のサンプルを用いて実験可能である。また、昆虫であるカイコは、哺乳動物より安価で狭いスペースで大量の個体を飼育することが可能であり、倫理的問題もほとんど生じない。よって、動物個体を用いた化合物の探索において、カイコを用いることは、哺乳動物を用いることに対する優位性がある。

哺乳動物を用いた実験は、国際原則である 3R、すなわち代替法の開発 (Replacement)、動物数の削減 (Reduction)、動物の苦痛の軽減 (Refinement) に従って実験を行わなければならない³⁾。また、哺乳動物の代わりに昆虫を用いて実験することは、Relative Replacement の考えと合致している。実験に用いられる代表的なモデル動物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*) やキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は、使用による倫理的問題が生じることはなく、動物モデルとしてさまざまな研究に用いられており、病態モデルの開発も行われている⁴⁻⁹⁾。しかし、個体が小さいので注射器を用いた定量的な化合物の投与が困難であり、個体ごとの体液中の糖濃度を測定することが容易ではない。カイコは線虫やキイロショウジョウバエより大きく、動きが緩慢で、注射器を用いた定量的な化合物の体液内注射が容易に実施できる¹⁰⁾。また、比較的大量の体液を採取することが可能であり、個体ごとの体液中の糖濃度を測定できる。よって、カイコは、線虫やキイロショウジョウバエのような小型動物より体液中の糖濃度の定量に基づく糖尿病治療薬の評価において優位性があるといえる。すでに我々は、カイコ感染モデルを用いて、抗生物質、抗真菌薬、および抗ウイルス薬の治療効果が定量的に評価できることを報告している¹¹⁻¹⁴⁾。また、抗生物質や毒物の体内動態において哺乳動物とカイコで共通した面があることを明らかにしている¹⁵⁾。上記の知見は、カイコを用いて薬物動態に基づく治療薬の薬効評価が行えることを示唆している。そこで、我々はカイコを用いて糖尿病を模擬した病態モデルを確立すれば、糖尿病治療薬の開発に貢献できるのではないかと考えた。

3. カイコの高血糖症

通常、カイコの飼育には桑の葉を与える。桑の葉に含まれる糖分は、腸管から体液中に移行し、各種臓器に取り込まれる (図 1A)。カイコは、哺乳動物における肝臓のようにさまざまな代謝酵素を有している脂肪体、腎臓のように物質の排泄の関わるマルピギー管、および絹糸の生合成器官である絹糸腺などの臓器を持つ。また、カイコは、糖分を脂肪体や筋肉にグリコーゲンとして保持することができる^{16,17)}。したがって、糖の取り込みと貯蔵に関する基本的なシステムはカイコとヒトで共通している点が多い。一方、血液について、カイコとヒトで大きく異なっている点がある。ヒトは血管を有しているが、昆虫であるカイコは血管を持たない開放血管系の動物である。よって、カイコの血液は、ヒトの血液とリンパ液の混合液であると考えら

れている。カイコは、血管がないものの体液中の総糖濃度を測定できるので、体液中の糖濃度の変化をモニタリングすれば糖尿病の研究に使うことに大きな問題はないと我々は考えた。さらに、考慮しなければならないカイコとヒトでの大きな違いとしては、カイコの体液中の大部分の糖がグルコース 2 分子で構成されているトレハロースであることがあげられる¹⁷⁾。カイコは、トレハロース合成酵素により 2 分子のグルコースからトレハロースを合成することができる¹⁸⁾。そのため、桑の葉を食べたカイコの体液中のグルコースはほとんど検出されず、本研究開始時に、体液中のグルコースによる糖毒性に関する研究はカイコを用いてはできないのではないかと危惧された。ヒトを含めた哺乳動物では、グルコースなどの糖の経口摂取により速やかに血糖値が上昇する。我々は、カイコも過剰にグルコースを餌から摂取すれば、高血糖となりグルコースによる毒性が現れるのではないかと考えた。そこで、桑の葉エキスが含まれているカイコの人工餌 (Silkmate 2S) に過剰のグルコースを加えた餌を作製しカイコに食べさせたところ、体液中の総糖濃度が上昇した (図 1B)。グルコースを添加した人工餌を食べさせたカイコでの脂肪体、筋肉、マルピギー管、絹糸腺中の糖含量は通常の人工餌を食べさせたカイコより高かった (図 1C)¹⁹⁾。さらに我々は、餌に添加するグルコース量、給餌時間を調節することにより、カイコを高血糖状態にする条件を見いだした (図 1D, E)。また、グルコースを添加した餌を食べさせたカイコでは、体液中にグルコースが大量に存在していた (図 1F)。これは、餌に含まれていた大量のグルコースが腸管内腔から体液中に移行したことによると考えられ、昆虫であるカイコを用いて、体液中のグルコースによる糖毒性に関する研究ができると期待できた。また、カイコは、哺乳動物と同様に、血糖値が増加すると臓器中にグルコースを取り込むことが示唆された。よって我々は、過剰なグルコースにより高血糖となったカイコの高血糖症モデルを確立できたと考えた。

4. カイコの糖尿病合併症

糖尿病患者は、高血糖状態が長期間持続するとさまざまな合併症を発症する。そこで、我々は、高血糖状態がカイコに及ぼす影響を検討した。グルコースを添加した餌を食べたカイコでは、体長および体重の増加が抑制されることを見いだした (図 2)。このとき、カイコの血糖値は餌に添加したグルコース量の増加に伴って上昇していた (図 2B)。また、カイコの体液中にグルコース溶液を注射しても、成長阻害が引き起こされた¹⁹⁾。これらの結果は、体液中のグルコース濃度の上昇により、カイコの成長が阻害されることを示唆している。

ヒトの糖尿病患者において、血中のグルコースのアルデヒド残基とタンパク質のアミノ酸残基のアミノ基がメイラード反応を引き起こし、組織障害や血流阻害を起こすことが知られている。血中のメイラード反応の生成物の一つ

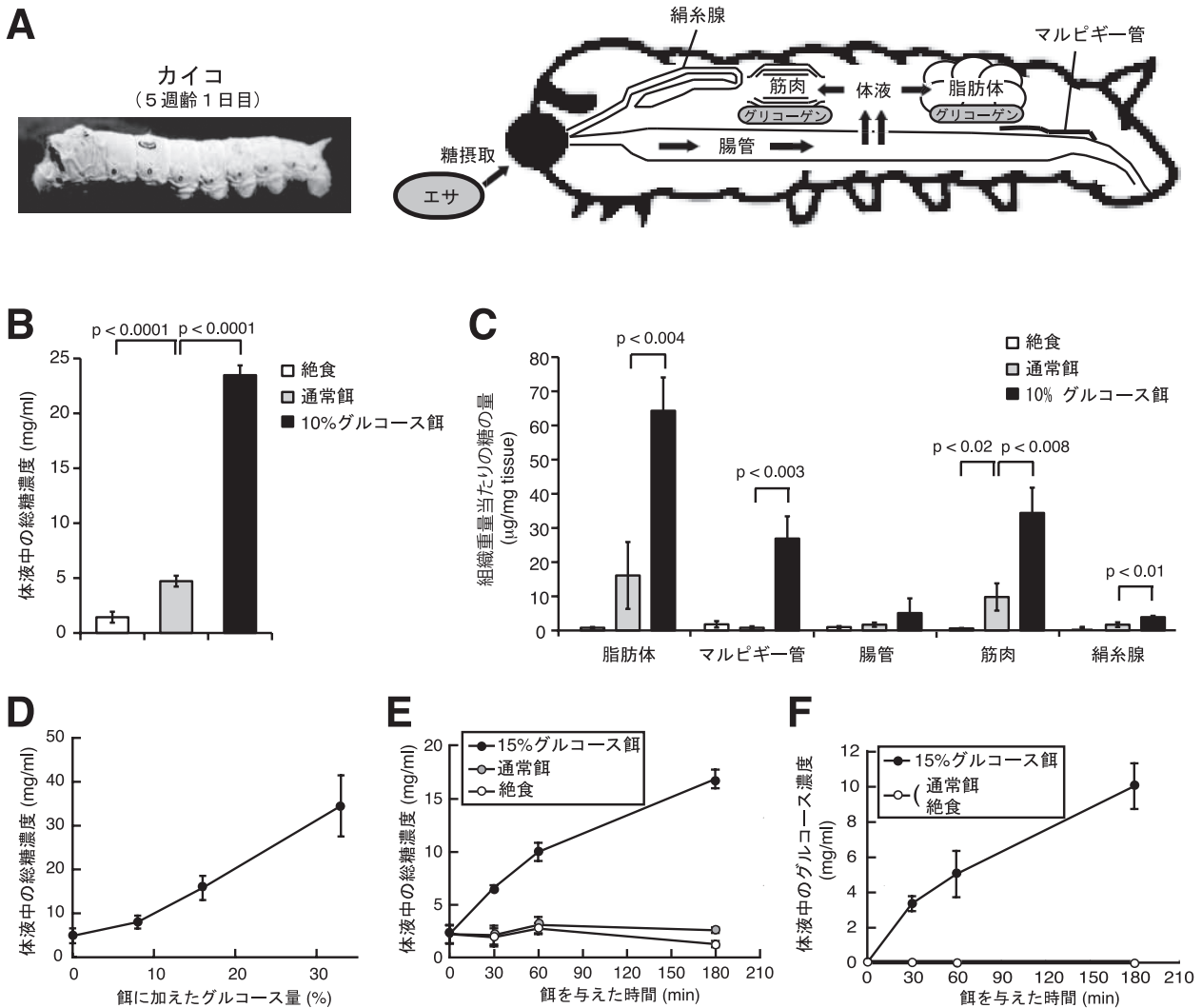


図1 高グルコース餌の摂食によるカイコの血糖値の増加と各種臓器の糖の蓄積 (A) 5週齢1日目のカイコ (左) とカイコの糖摂取後の糖の移行, 分布のモデル (右). (B) 10% グルコース餌の摂食によるカイコの体液中の糖濃度の上昇. (C) 10% グルコース餌の摂食によるカイコの各種臓器中の糖の蓄積量への影響. (D) カイコの体液中の糖濃度に対する餌に加えたグルコースの影響. (E) 15% グルコース餌の摂食によるカイコの体液中の糖濃度の即時的な上昇. (F) 15% グルコース餌の摂食によるカイコの体液中のグルコース濃度の即時的な上昇. (文献 19 から一部改変し転載)

であるヘモグロビン A1c の量と糖尿病網膜症, 糖尿病腎症の悪化には相関関係があることが報告されている²⁰⁾. メイラード反応においては, グルコースと反応したタンパク質の失活, 反応過程で生じたラジカル, および最終生成物である糖付加タンパク質や反応性の高い化合物群 (AGEs: advanced glycation end products) がその受容体と結合して過剰にシグナルを伝達し, 細胞障害を引き起こすと考えられている^{21~23)}. 我々は, 高血糖になり成長阻害を起したカイコの体液中の AGEs 量が増加していることを明らかにした (図 3A). メイラード反応の阻害剤であるアミノグアニジンは, 糖尿病ラットの心肥大やアルブミン尿に対して治療効果を示すことが報告されている^{24,25)}. 我々は, 高血糖カイコにアミノグアニジンを投与すると AGEs 量が低下し, 成長阻害が回復することを明らかにした (図 3A~D). メイラード反応の阻害剤であるアミノグアニジン投与により高血糖カイコの成長阻害が回復したことから, メイラー

ド反応の生成物が高血糖カイコの成長阻害を引き起こしていることが示唆される (図 3E). 糖尿病マウスにおいて, 網膜症などの合併症が発症するには, 半年以上の長期間の飼育が必要である. これに比べて高血糖カイコにおける成長阻害は, 3日間というきわめて短期で観察可能である. したがって, 高血糖カイコは, 糖尿病合併症に対する治療薬の簡便な評価方法として有用であると考えられる.

5. 高血糖カイコを用いた糖尿病治療薬の評価

我々は, 高血糖カイコを用いて, 糖尿病治療薬の血糖降下作用を評価できるか検討した. 1型糖尿病患者に血糖降下薬として用いられている最も代表的な医薬品はインスリンである. インスリンは, さまざまな臓器に作用し, Akt のリン酸化を介した肝臓における糖新生の抑制や, 脂肪細胞, 骨格筋におけるグルコース取り込みの亢進を導き, 血

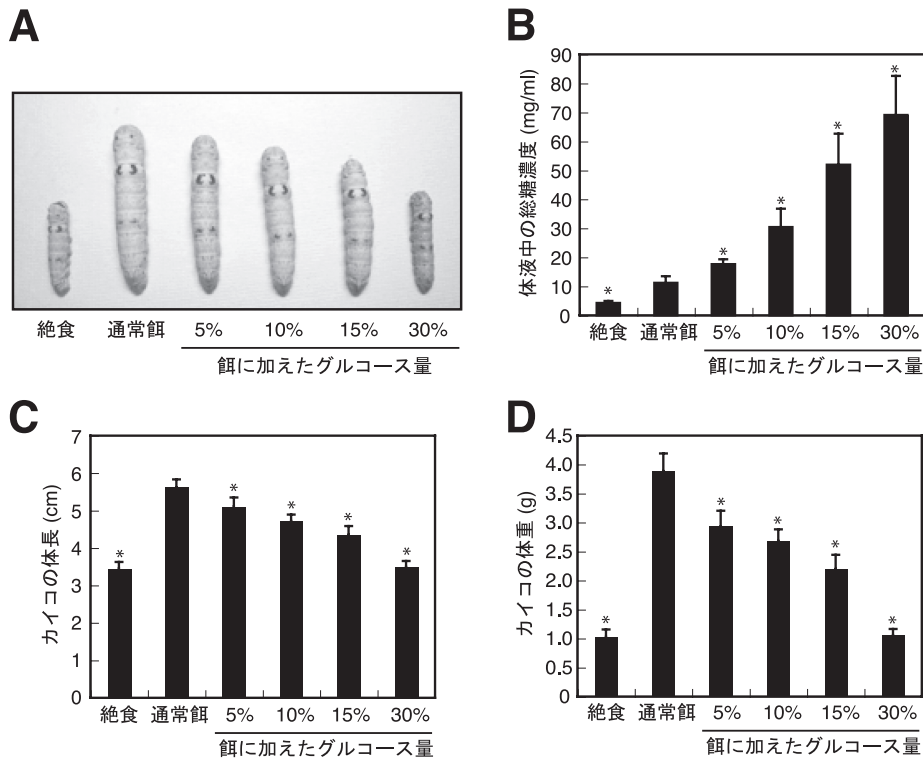


図2 高血糖カイコにおける成長阻害

(A) グルコースが含まれた餌を3日間摂食したカイコにおける成長阻害. (B) カイコの体液中の総糖濃度. (C) カイコの体長. (D) カイコの体重. (文献19から一部改変し転載)

糖値を低下させる。カイコには、哺乳動物のインスリンと相同性の高い、ボンビキシンと呼ばれるペプチドホルモンが存在することが知られている。また、ボンビキシンによりカイコの脂肪体中のAktのリン酸化が亢進することが報告されている²⁶⁾。よって、カイコは、哺乳動物同様、インスリンシグナル伝達経路の活性化を介した血糖調節機構を有していると考えられている。そこで、ヒトインスリンの血糖降下作用についてカイコを用いて評価できるか検討した。その結果、グルコースを摂食して高血糖となったカイコにヒトインスリンを投与するとカイコの血糖値が低下することが明らかとなった(図4A)。インスリンは、Aktのリン酸化を介して脂肪組織における細胞内へのグルコースの取り込みを亢進させるホルモンである²⁷⁾。我々は、摘出した臓器を用いた *in vitro* 組織培養系を用いて、ヒトインスリンがカイコの脂肪体へのグルコースの取り込みを促進すること¹⁹⁾、ならびに脂肪体細胞中のAktのリン酸化を亢進することを見いだした(図4B)。さらに、ヒトインスリンによるカイコの脂肪体へのグルコースの取り込みの促進、およびAktのリン酸化の亢進は、インスリンシグナル伝達経路の鍵因子であるPI3キナーゼ(phosphoinositide 3-kinase: PI3K)の阻害剤であるワートマニン(wortmannin)の前処理により抑圧された(図4B)。以上の結果は、ヒトインスリンがカイコのPI3キナーゼを必要とするインスリンシグナル伝達経路の活性化を介して、グルコースの取り込みを亢進させ、血糖値を低下させることを示唆している。

哺乳動物においては、インスリンシグナル伝達経路以外にAMPキナーゼ(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase: AMPK)の活性化による血糖降下作用が知られている。AICAR(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide)は、AMPキナーゼを活性化させる化合物であり、骨格筋細胞のグルコースの取り込みを促進することが報告されている²⁸⁾。このAICARの投与によりカイコの血糖値が低下することがわかった(図4C)。また、AICARによりカイコの脂肪体細胞中のAMPKのリン酸化が亢進していた(図4D)。以上の結果から、AICARが高血糖カイコの脂肪体に作用し、AMPK活性を上昇させ、その結果血糖値の低下が導かれることが示唆された。さらに、グルコース餌を摂食しているカイコにヒトインスリン、もしくはAICARを繰り返し投与すると成長阻害の回復が認められた(図4E~G)。この結果は、ヒトインスリンやAICARが高血糖により起こるカイコの成長阻害を、血糖値を低下させることにより抑圧したことを示唆している(図4H)。したがって、昆虫であるカイコを用いて、インスリンシグナル伝達経路やAMPKの活性化を作用機序とする薬剤の薬効評価が可能であることが示唆された。

6. 高血糖カイコを用いた糖尿病治療薬の創薬展開

我々は、高血糖症状が続く糖尿病、もしくは高血糖により個体に障害が起こる糖尿病合併症を模擬したカイコの病態モデルの確立に成功した。次の課題は、これらのカイコ

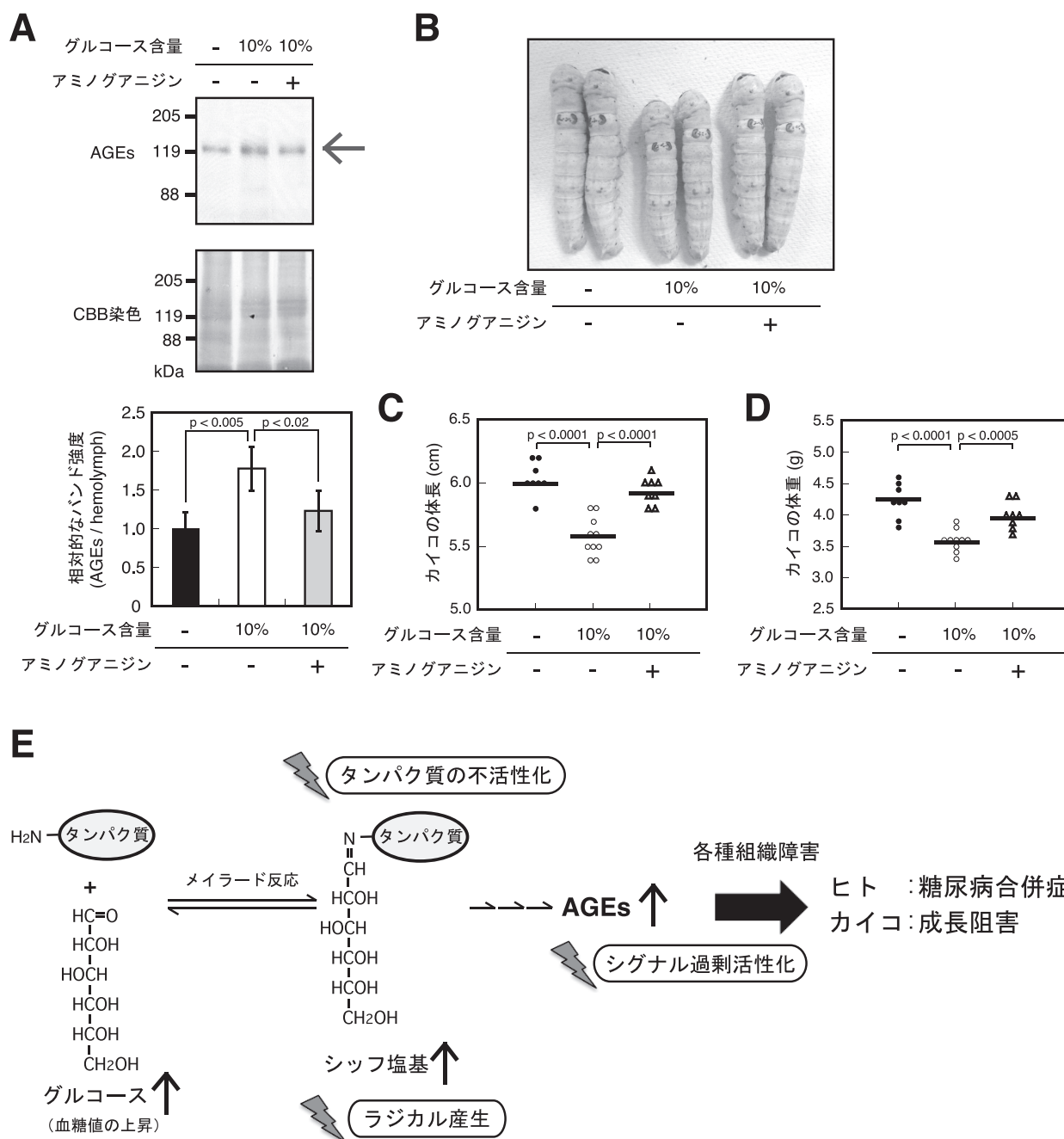


図3 メイラード反応の阻害剤の投与による高血糖カイコの成長阻害の回復

(A) アミノグアニジンの投与による高血糖カイコの体液中のAGEsの減少. AGEs抗体を用いたウェスタンブロットを行った. (B) グルコースが含まれた餌を4日間摂食したカイコにおける成長阻害とメイラード反応の阻害剤であるアミノグアニジンの回復効果. (C) カイコの体長. (D) カイコの体重. (E) メイラード反応によるAGEsの産生過程に起こる障害のモデル図. (文献19から一部改変し転載)

の病態モデルを用いてどのように糖尿病治療薬の開発を実現するかである. カイコは多数の個体を用いた *in vivo* の薬効評価に適しているので, 血糖降下活性を指標とした①生薬, 食品からの化合物の精製, ②化合物ライブラリーからの化合物の探索, ③化合物の合成展開による最適化に用いることが考えられる. いくつかの生薬や食品は, 経験的に血糖値の調節に影響を与えることが知られている. しかし, ほとんどの場合, 有効成分の同定に至っていない. これらの生薬や食品から, カイコの血糖降下活性を指標に

有効成分である化合物を精製, 同定する方法が考えられる. 実際に我々は, 生薬である地黄の熱水抽出画分にカイコの血糖値を低下させる活性があることを見だし, 活性物質の特定に成功している¹⁹⁾. また, 化合物ライブラリーを利用して, 血糖降下活性のある化合物をスクリーニングできると考えられる. 同定された血糖降下活性を有する化合物をリード化合物とした合成展開により, 血糖降下活性の強い化合物に最適化することが望まれる. 数多くの類縁体化合物群を合成した後, カイコを用いて血糖降下活性を

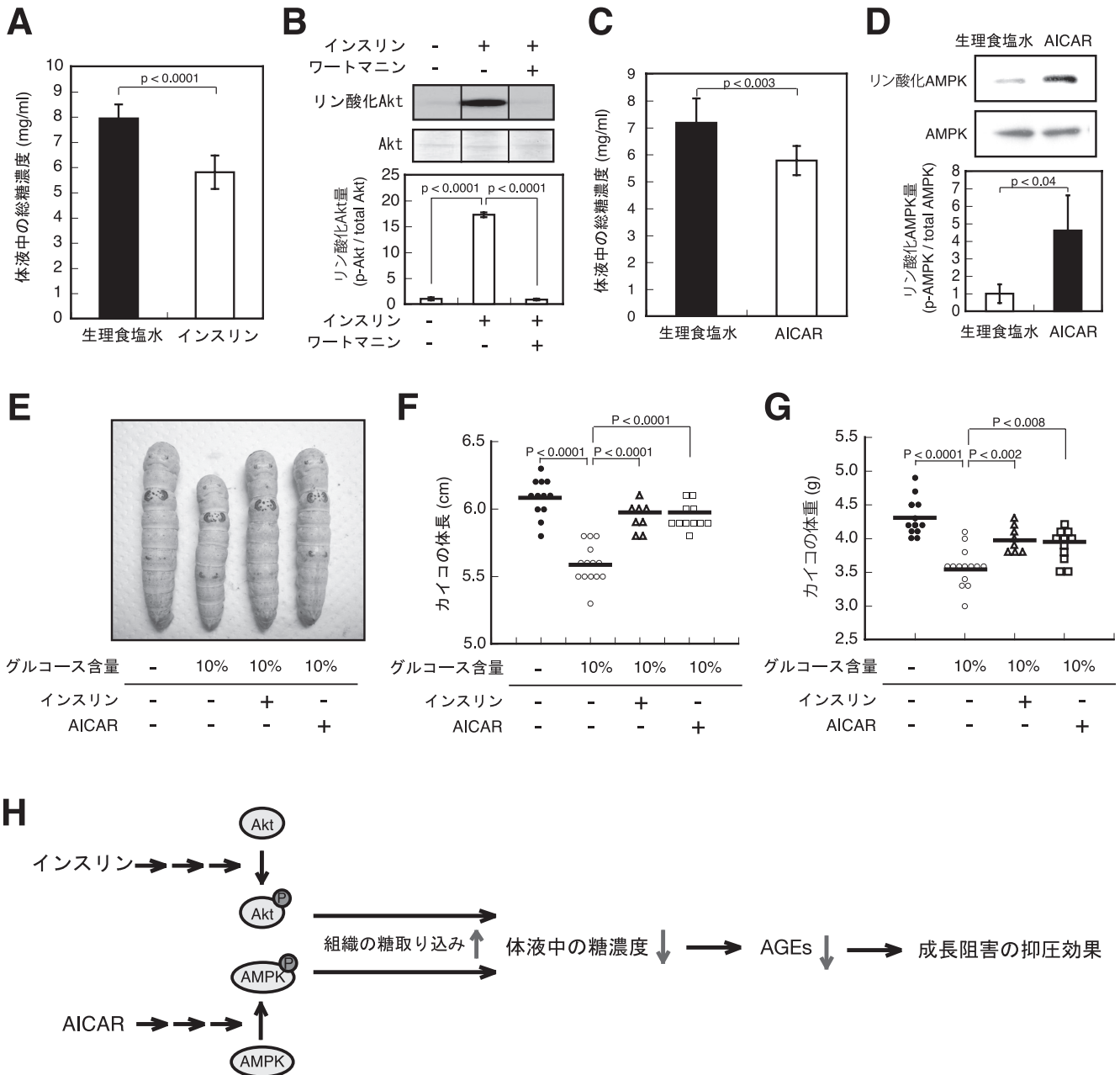


図4 カイコの血糖調節におけるインスリンシグナル経路や AMPK 経路の関与 (A) インスリンの投与による高血糖カイコの血糖値の低下. (B) インスリンの処理によるカイコの脂肪体中の Akt のリン酸化の亢進と PI3K の阻害剤であるワートマニンの同時処理による抑制効果. (C) AICAR の投与による高血糖カイコの血糖値の低下. (D) AICAR の処理によるカイコの脂肪体中の AMPK のリン酸化の亢進. (E) グルコースが含まれた餌を4日間摂食したカイコに対するインスリンと AICAR の回復効果. (F) カイコの体長. (G) カイコの体重. (H) インスリンや AICAR の作用機序モデル. (文献 19 から一部改変し転載)

測定し、最も比活性の高い化合物を選定することが可能である。それにより、糖尿病治療薬のリードとなる化合物の同定と最適化が行えると期待できる。得られた化合物は、マウスなどの動物モデルを用いた前臨床試験の後、ヒトの臨床試験に移行することになる。

7. まとめ

本稿では、高グルコース餌を与えることにより、カイコの血糖値が増加し、成長阻害が起こることを示した。すな

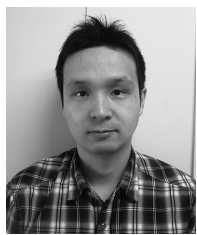
わち、カイコがグルコースによる糖毒性にさらされてヒトの糖尿病、さらには糖尿病合併症にみられる症状を示すことが明らかとなった。また我々は、インスリンや AICAR などの糖尿病治療薬の投与によりカイコの糖尿病、さらには糖尿病合併症が治療されることを示した。無脊椎動物を用いた生活習慣病モデルによる血糖降下薬の探索法を提案するのは、我々が知る限り本研究が初めてである。昆虫であるカイコを用いて生薬や食品、または化合物ライブラリーから糖尿病治療薬を創成できると我々は期待している。

文 献

- 1) Zimmet, P., Alberti, K.G., & Shaw, J. (2001) *Nature*, 414, 782-787.
- 2) Carver, C. (2006) *Diabetes Educ.*, 32, 910-917.
- 3) Russell, W.M.S. & Burch, R.L. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London.
- 4) O'Reilly, L.P., Luke, C.J., Perlmutter, D.H., Silverman, G.A., & Pak, S.C. (2014) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 69-70C, 247-253.
- 5) Labuschagne, C.F. & Brenkman, A.B. (2013) *Ageing Res. Rev.*, 12, 918-930.
- 6) Tipping, M. & Perrimon, N. (2014) *J. Cell Physiol.*, 229, 27-33.
- 7) Musselman, L.P., Fink, J.L., Narzinski, K., Ramachandran, P. V., Hathiramani, S.S., Cagan, R.L., & Baranski, T.J. (2011) *Dis. Model Mech.*, 4, 842-849.
- 8) Rudrapatna, V.A., Cagan, R.L., & Das, T.K. (2012) *Dev. Dyn.*, 241, 107-118.
- 9) Hirabayashi, S., Baranski, T.J., & Cagan, R.L. (2013) *Cell*, 154, 664-675.
- 10) Kurokawa, K., Kaito, C., & Sekimizu, K. (2007) *Methods Enzymol.*, 422, 233-244.
- 11) Kaito, C., Akimitsu, N., Watanabe, H., & Sekimizu, K. (2002) *Microb. Pathog.*, 32, 183-190.
- 12) Hamamoto, H., Kurokawa, K., Kaito, C., Kamura, K., Razanajatovo, I.M., Kusuhara, H., Santa, T., & Sekimizu, K. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 774-779.
- 13) Matsumoto, Y., Miyazaki, S., Fukunaga, D.H., Shimizu, K., Kawamoto, S., & Sekimizu, K. (2012) *J. Appl. Microbiol.*, 112, 138-146.
- 14) Orihara, Y., Hamamoto, H., Kasuga, H., Shimada, T., Kawaguchi, Y., & Sekimizu, K. (2008) *J. Gen. Virol.*, 89, 188-194.
- 15) Hamamoto, H., Tonoike, A., Narushima, K., Horie, R., & Sekimizu, K. (2009) *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 149, 334-339.
- 16) Satake, S., Kawabe, Y., & Mizoguchi, A. (2000) *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 44, 90-98.
- 17) Horie, Y. (1960) *Nature*, 188, 583-584.
- 18) Yamashita, O., Sumida, M., & Hasegawa, K. (1974) *J. Insect Physiol.*, 20, 1079-1085.
- 19) Matsumoto, Y., Sumiya, E., Sugita, T., & Sekimizu, K. (2011) *PLoS ONE*, 6, e18292.
- 20) Ohkubo, Y., Kishikawa, H., Araki, E., Miyata, T., Isami, S., Motoyoshi, S., Kojima, Y., Furuyoshi, N., & Shichiri, M. (1995) *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 28, 103-117.
- 21) Miura, J., Yamagishi, S., Uchigata, Y., Takeuchi, M., Yamamoto, H., Makita, Z., & Iwamoto, Y. (2003) *J. Diabetes Complications*, 17, 16-21.
- 22) Coughlan, M.T., Mibus, A.L., & Forbes, J.M. (2008) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1126, 190-193.
- 23) Yamamoto, Y., Kato, I., Doi, T., Yonekura, H., Ohashi, S., Takeuchi, M., Watanabe, T., Yamagishi, S., Sakurai, S., Takasawa, S., Okamoto, H., & Yamamoto, H. (2001) *J. Clin. Invest.*, 108, 261-268.
- 24) Stadler, K., Jenei, V., Somogyi, A., & Jakus, J. (2005) *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 21, 189-196.
- 25) Soulis, T., Cooper, M.E., Sastra, S., Thallas, V., Panagiotopoulos, S., Bjerrum, O.J., & Jerums, G. (1997) *Diabetologia*, 40, 1141-1151.
- 26) Nagata, S., Hakuno, F., Takahashi, S., & Nagasawa, H. (2008) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 151, 355-360.
- 27) Summers SA, Yin VP, Whiteman EL, Garza LA, Cho H, Tuttle, R.L., & Birnbaum, M.J. (1999) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 892, 169-186.
- 28) Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., & Winder, W.W. (1997) *Am. J. Physiol.*, 273, E1107-E1112.

著者寸描

●松本靖彦 (まつもと やすひこ)



東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室助教. 博士 (薬学).

■略歴 1980年神奈川県に生る. 2003年明治薬科大学衛生薬学科卒業. 08年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了. 同年より現職.

■研究テーマと抱負 感染症と生活習慣病の発症, 増悪化のメカニズムの解明と治療法の開発研究. 複雑で難しい生命現象の解明のための新しい解析技術を開発し, 疾患の統合的理解と克服をめざし挑戦し続けたい.

■ウェブサイト <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/>

■趣味 テニス, お手軽料理.