

氏名	中山和男
生年月日	
本籍	千葉県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博乙第105号
学位授与の日付	平成7年9月26日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	Studies on antihyperglycemic effects of M16209, a novel aldose reductase inhibitor (新規アルドース還元酵素阻害剤 M16209 の抗高血糖効果の研究)
論文審査委員	(主査) 板垣英治 (副査) 五味保男, 奥田潤 小山内実, 大熊勝治

## 学位論文要旨

Antihyperglycemic effects of M16209 (1-(3-bromobenzo[b]furan-2-yl-sulfonyl)hydantoin), a novel aldose reductase inhibitor, were investigated. M16209 was shown to potently inhibit recombinant human aldose reductase and strongly suppress the sorbitol accumulation in isolated human erythrocytes incubated under high glucose concentration. In addition, M16209 exhibited antihyperglycemic effects: in normal rats, M16209 (100 mg/kg, p.o.) had a weak hypoglycemic effect but markedly stimulated the disappearance of serum glucose in intravenous glucose tolerance tests. In diabetic rats, M16209 (100 mg/kg, p.o.) significantly suppressed the hyperglycemia of streptozotocin-induced, mildly diabetic rats and stimulated serum glucose disappearance in neonatally streptozotocin-induced, non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) rats in glucose tolerance tests. Furthermore, M16209 augmented insulin secretion in glucose-loaded, normal and NIDDM rats and restored the reduced serum insulin in streptozotocin-induced, mildly diabetic rats. In the isolated, perfused pancreases from normal rats, M16209 (100  $\mu$ M) greatly augmented glucose-stimulated insulin secretion, but showed no effect on unstimulated insulin secretion at 2.8 mM glucose. M16209 (100  $\mu$ M) improved appreciably the decreased insulin response to 22.2 mM glucose and enhanced slightly unstimulated insulin secretion in the pancreases of NIDDM rats. These results suggest that M16209 suppresses hyperglycemia through augmentation of glucose-stimulated insulin secretion by directly acting on the pancreas. The site of action remains unknown, but the inhibition of aldose reductase or the ATP-sensitive  $K^+$  channels is unlikely to be involved. The antihyperglycemic activity of M16209, combined with its potent aldose reductase inhibiting activity, is expected to be beneficial in the treatment of diabetic complications.

## 要旨

M16209 (1-(3-bromobenzo[b]furan-2-yl-sulfonyl)hydantoin, 構造式: Fig. 1) は糖尿病合併症の発症に関与するとされるアルドース還元酵素 (AR) の新規阻害剤である。本論文では、M16209のAR阻害作用をヒトrecombinant ARを用いてさらに検討するとともに、本化合物の抗高血糖作用およびその作用機序を検討した。

M16209はヒトrecombinant ARを、強力 ( $IC_{50}=0.051 \mu M$ ) に阻害した (Table 1) ばかりでなく、高濃度のグルコース下でインキュベートしたヒト赤血球中のソルビトールの蓄積を強力に抑制した。さらに、M16209は糖尿病性合併症モデルのガラクトース食負荷ラットの白内障発症を予防し、streptozotocin (STZ) 糖尿病ラットの糖尿病性神経障害を改善した。また、M16209はこれらの動物のレンズ中あるいは坐骨神経中ポリオール蓄積を有意に抑制した。以上のように、M16209はヒトARを強力に阻害するとともに、vivoの糖尿病性合併症モデルに有効であった。

M16209は、正常ラットの空腹時血糖値はごく軽度にしかな低下させなかったが (Fig. 2)、静脈内糖負荷した時の血糖の消失は著明に促進した (Fig. 3A)。一方STZ糖尿病ラットでは、M16209 (100 mg/kg p.o.) は軽症糖尿病ラットの高血糖を抑制し (Fig. 4)、静脈内糖負荷した非インスリン依存性糖尿病 (NIDDM) ラットの血糖の消失を促進した (Fig. 5A)。また、M16209投与により、正常ラット (Fig. 3B) 及びNIDDMラット (Fig. 5B) のグルコース刺激性インスリン分泌の促進および軽症糖尿病ラットの血中インスリン値の増加 (Fig. 6) が認められた。しかしながら、M16209は膵のインスリンが枯渇した重症糖尿病ラットでは血糖降下作用を示さなかった。対照的に、代表的な血糖降下剤であるsulfonylurea (SU) 剤のgliclazideは、正常ラットで著明な血糖降下作用を示したが、糖尿病ラットでは軽度な作用しか示さなかった。以上の結果から、M16209はSU剤とは異なり、高血糖時に選択的に血糖降下作用を示すことが明らかとなり、その作用機序としてインスリン分泌の促進が関与している可能性が示唆された。

次に、インスリン分泌に対する作用をラット単離灌流膵を用いて検討した結果、M16209 (100  $\mu M$ ) は正常ラットのグルコース刺激性インスリン分泌を著明に促進した (Fig. 7C, D) が、グルコース非刺激インスリン分泌には全く作用を及ぼさなかった (Fig. 7A)。対照的に、gliclazide (10  $\mu M$ ) はグルコース刺激及び非刺激インスリン分泌のいずれも著明に促進した (Fig. 8)。さらに、M16209 (100  $\mu M$ ) はNIDDMラット膵からのグルコース (22.2 mM) 刺激性インスリン分泌の低下を改善するとともに、非刺激インスリン分泌を軽度に促進した。一方、gliclazide (10  $\mu M$ ) はこれらのいずれに対しても無作用であった。M16209のインスリン分泌促進作用は他のAR阻害剤のsorbiniilあるいはepalrestatでは見られなかった。また、M16209はSU剤のインスリン分泌促進作用の主要な作用機序とされる、膵 $\beta$ 細胞のATP-sensitive  $K^+$ -channelの抑制作用を示めさなかった。以上の結果から、M16209は膵に直接作用し、グルコース刺激性インスリン分泌を特異的に促進することが示唆された。M16209の作用部位は明らかではないが、ARの阻害あるいはATP-sensitive  $K^+$ -channelの抑制は関与しないものと考えられた。

本研究において、M16209が強力なヒトAR阻害作用の他に、高血糖時に選択的な抗高血糖作用を有する事が明らかとなった。また、本薬物は膵に直接作用し、グルコース刺激性インスリン分泌を特異的に促進することが示され、これが作用機序の一つと考えられた。M16209の抗高血糖作用は、AR阻害作用と併せ、糖尿病性合併症の治療にとっ

て有用であると考えられ、本研究の結果を基に今後臨床試験を進めていく予定である。

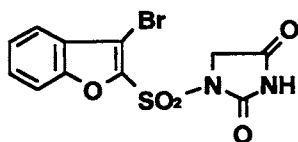


Fig. 1. Chemical structure of M16209.

Table 1 The inhibitory activities of M16209, epalrestat and sorbinil on rhAR, RLAR, BLAR, BKAR, CLAR and HPAR

Enzymes	IC <sub>50</sub> (μM)		
	M16209	epalrestat	sorbinil
rhAR	0.051	0.032	0.35
RLAR	0.12	0.06	0.60
BLAR	0.24	0.07	1.3
BKAR	4.5	11.0	20<
CLAR	1.2	0.53	9.1
HPAR	9.3	14.2	20<

rhAR, recombinant human AR from muscle; RLAR, rat lens AR; BLAR, bovine lens AR; BKAR, bovine kidney AR; CLAR, canine lens AR; HPAR, human placental AR. The assay of AR activity was performed at 25°C with a reaction mixture containing 0.4 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.2), 10 mM DL-glyceraldehyde and 0.16 mM NADPH.

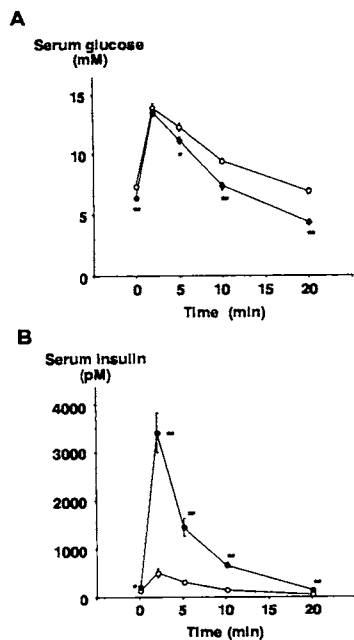


Fig. 3. Effects of oral administration of M16209 on serum glucose levels (A) and serum insulin levels (B) in normal (non-diabetic) rats injected intravenously with a 250 mg/kg bolus of glucose. Glucose was injected at time 0. M16209 was administered 3 h before glucose injection. Vehicle control (○), M16209 100 mg/kg (●). Values are means ± S.E. (n = 5). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. vehicle control.

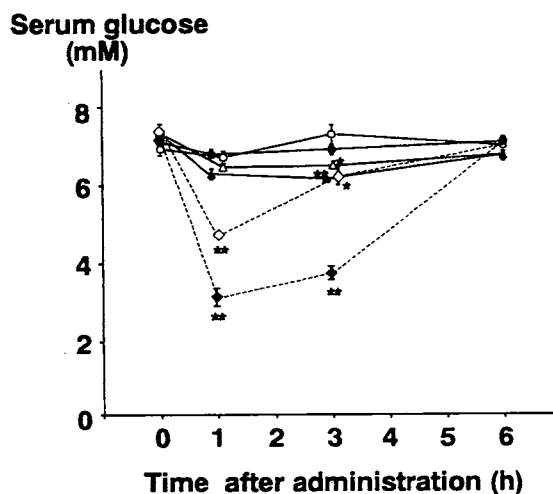


Fig. 2. Effects of oral administration of M16209 and gliclazide on serum glucose levels in normal (non-diabetic) rats. Vehicle control (○), M16209 10 mg/kg (●), M16209 30 mg/kg (△), M16209 100 mg/kg (▲), gliclazide 3 mg/kg (◇), gliclazide 10 mg/kg (◆). Values are means ± S.E. (n = 5). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. vehicle control.

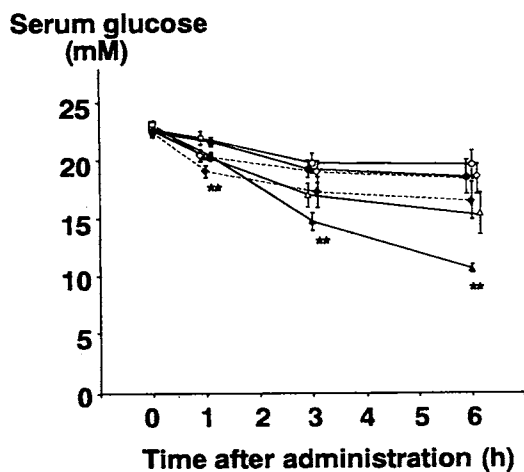


Fig. 4. Effects of oral administration of M16209 and gliclazide on serum glucose levels in STZ-induced, mildly diabetic rats. Vehicle control (○), M16209 10 mg/kg (●), M16209 30 mg/kg (△), M16209 100 mg/kg (▲), gliclazide 10 mg/kg (◇), gliclazide 100 mg/kg (◆). Values are means ± S.E. (n = 5). \*\*P<0.01 vs. vehicle control.

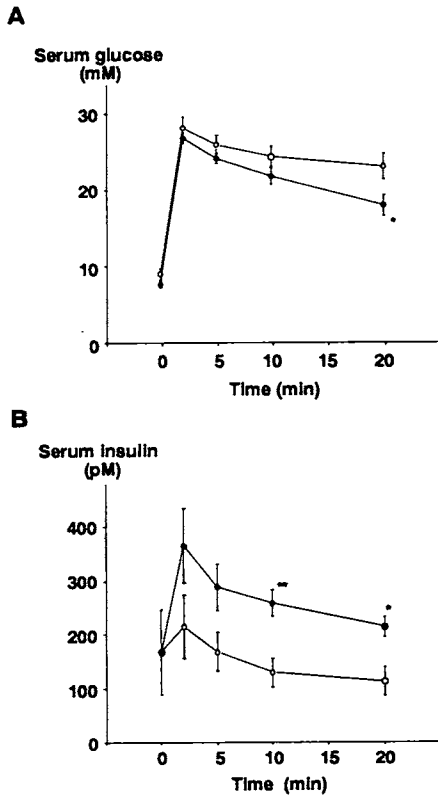


Fig. 5. Effects of oral administration of M16209 on serum glucose levels (A) and serum insulin levels (B) in NIDDM rats injected intravenously with a 1000 mg/kg bolus of glucose. Glucose was injected at time 0. M16209 was administered 3 h before glucose injection. Vehicle control (—○—), M16209 100 mg/kg (—●—). Values are means  $\pm$  S.E. (n = 5). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. vehicle control.

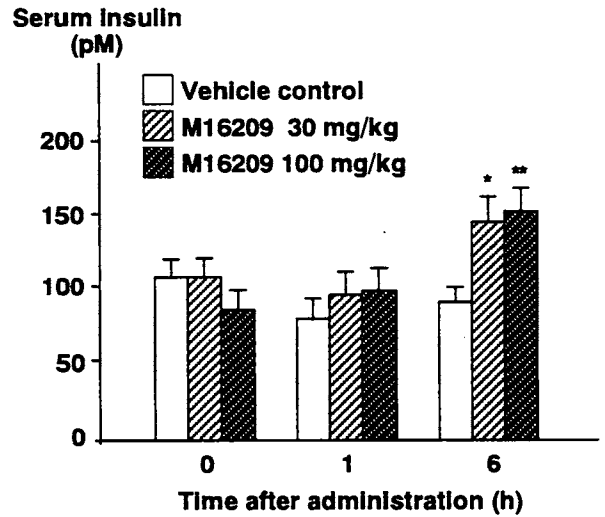


Fig. 6. Effect of oral administration of M16209 on serum insulin levels in STZ-induced, mildly diabetic rats. Values are means  $\pm$  S.E. (n = 8-10). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. vehicle control.

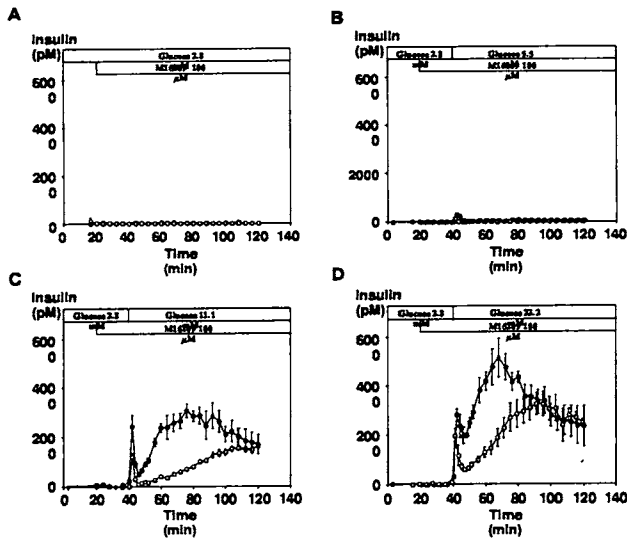


Fig. 7. Effects of M16209 on unstimulated insulin release (A) and insulin release in response to 5.5 mM glucose (B), 11.1 mM glucose (C) and 22.2 mM glucose (D) in isolated, perfused pancreases of normal rats. The basal glucose concentration was 2.8 mM and the glucose concentration was raised, starting 40 min after the perfusion started. M16209 (100  $\mu$ M) was present in the perfusion buffer starting at 20 min. Control (—○—), M16209 100  $\mu$ M (—●—). Values are means  $\pm$  S.E. (n = 3).

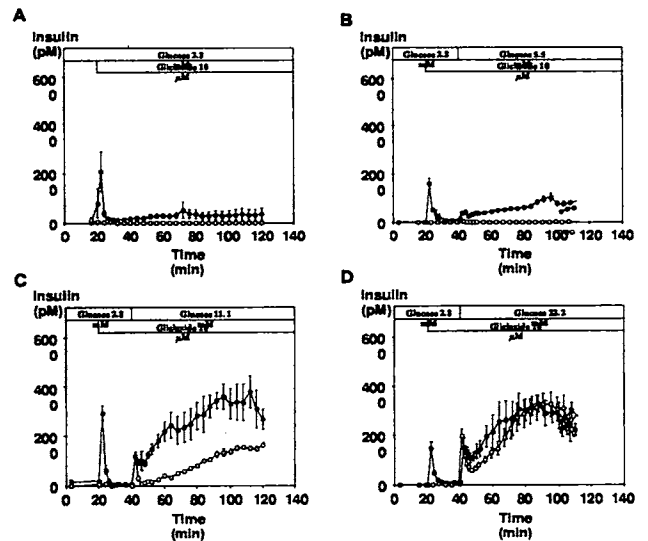


Fig. 8. Effects of gliclazide on unstimulated insulin release (A) and insulin release in response to 5.5 mM glucose (B), 11.1 mM glucose (C) and 22.2 mM glucose (D) in isolated, perfused pancreases of normal rats. The perfusion was performed as described in the legend for Fig. 1. Control (—○—), gliclazide 10  $\mu$ M (—●—). Values are means  $\pm$  S.E. (n = 3).

## 学位論文の審査結果の要旨

当該論文に関して、各審査委員が申請論文に対して予備審査を行い、7月25日の口頭発表とその質疑応答の結果をふまえて、同日の審査委員会において慎重審議を行った結果、次のとおり判定した。

本研究は、糖尿病性合併症の治療薬の開発を目的として、新規に合成された M16209 (1-(3-bromobenzo [b]furan-2-yl-sulfonyl) hydantoin) が糖尿病合併症の発症に関与するとされるアルドース還元酵素に対し強力に阻害作用を示すことを明らかにし、さらにグルコース負荷赤血球のソルビトール蓄積を強力に抑制することを見い出した。またガラクトース食負荷ラットの白内障発症を予防し、糖尿病性神経障害の改善もみられ、*in vivo* の糖尿病性合併症モデルで本化合物が有効であることを示した。M16209 の作用機序の解明のために正常ラット、streptozotocin 糖尿病ラット、非インスリン依存性糖尿病ラットにおける、静脈内血糖負荷時の血糖消失とインスリン分泌量の測定から、代表的な血糖降下剤 gliclazide の作用とは異なり、高血糖時に選択的に血糖降下作用を示す重要な結果がえられ、その作用機序として、インスリン分泌の促進が関与している可能性が示唆された。この事を確かめるために、ラット単離灌流膵に対する M16209 の作用を調べ、本剤が直接膵臓インスリン分泌細胞に働き、グルコース刺激性インスリン分泌を特異的に促進することを示唆する結果をえた。以上の結果は、M16209 が新規糖尿病合併症治療薬として生化学的および薬理的に有用である事を示す業績であるとともに、今後の臨床的研究に期待をかけるものである。よって、その内容は博士（理学）論文に値するものである。