

201110005B

厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業)

カイコをモデル動物とした生活習慣病予防・治療薬の開発

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書  
研究代表者 関水 和久

平成 24 (2012) 年 5 月

目次

I. 総合研究報告書

カイコをモデル動物とした糖尿病治療薬の開発に関する研究 ----- 1  
関水 和久

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----36

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----37

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

カイコをモデル動物とした生活習慣病予防・治療薬の開発

研究代表者 関水 和久 東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室・教授

研究要旨

我々は、安価で倫理的な問題が少ないカイコをモデル動物とした生活習慣病モデルの開発と、その疾患モデルを用いた創薬法の開発を行った。本課題で、我々は、餌に添加したグルコースによって血糖値が上昇、成長阻害が起こり、ヒト・インシュリンによって回復するという糖尿病モデルの確立に成功した。長時間高グルコース餌を食べさせることにより、カイコが耐糖能の低下、体液中の遊離脂肪酸量の増加などの II 型糖尿病様の症状を示す、II 型糖尿病モデルを確立し、高血糖カイコにおいて成長阻害が起こる糖尿病合併症モデルの開発にも成功した。四塩化炭素等の肝薬物の投与に依り、カイコの血中 ALT が上昇する肝障害モデルや胆汁酸を餌に添加する事で、カイコの血中中性脂肪濃度が上昇する高脂血症モデルも確立できた。さらに、カイコの糖尿病モデルを用いて、生薬のジオウの熱水抽出画分から血糖降下活性を指標にジオウ中の血糖降下物質としてガラクトースを単離した。また、ガラクトースは糖尿病モデルマウスに対しても血糖降下作用を示した。また、血液注射では効果が無くても、経口投与を行う事によって、糖の吸収を穏やかにする物質を探索できる事を示し、その様な生薬として白鶴霊芝を特定した。糖尿病モデルを用いて新たに血糖降下作用を有する生薬として、ニンジンエキス、カロコンエキス、カンゾウエキスを同定した。さらに、カイコ糖尿病合併症モデルを回復させる化合物としてスペルミンを同定した。

以上の結果は、カイコ的生活習慣病モデルを用いて、生薬や食品から生活習慣病の治療に効果を示す候補化合物を同定できることを示唆する。本研究は、無脊椎動物を用いた生活習慣病モデルを用いて血糖降下物質を同定できるという初めての研究となった。

研究分担者

松本 靖彦 東京大学大学院薬学系研究科  
・助教  
片岡 啓子 株式会社ゲノム創薬研究所

・主任研究員

A. 研究目的

糖尿病は慢性の高血糖状態の持続、及び耐糖能の異常を示す疾患であり、腎症、末

稍神経障害、網膜症などの様々な臓器障害を引き起こす原因となる。近年、先進諸国において、インスリン抵抗性が原因となるII型糖尿病の患者数は増加傾向にある。インスリン、及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が、薬剤抵抗性や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。

血糖値は、インスリンなどのホルモンの作用により、全身の組織における糖の取り込み、代謝により調節されている。よって、糖尿病治療薬の効果を評価するためには、動物個体を用いる必要がある。そのため、マウスやラットなどの哺乳動物による糖尿病の病態モデルを用いた研究が行われている。しかし、多数の哺乳動物を用いて糖尿病治療薬をスクリーニングすることは、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あると指摘されている。

我々は、無脊椎動物であるカイコを用いて、病態モデルを構築し、医薬品の治療効果を評価できることを提唱している。すでに我々は、カイコ感染モデルを用いて、細菌感染治療薬、及び抗ウイルス薬の評価を行えること、及び抗生物質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報告している。無脊椎動物であるカイコは、容易に多数の個体を用いて治療薬の評価を行うことができる。また、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る。さらに、カイコは線虫やショウジョウバエ

のような小型無脊椎動物では困難な注射器を用いた定量的な薬物の血液内注射が容易に実施できる。また、比較的大量の血液を採取することが可能である。本研究で、我々はカイコを用いて、生活習慣病治療薬の評価、及び同定のための無脊椎動物糖尿病モデルの構築を試みた。

## B. 研究方法

### カイコの種類、飼育条件、注射条件

カイコの受精卵(交雑種ふ・よう x つくば・ね)は愛媛養蚕株式会社から購入した。孵化した幼虫は室温で人工飼料シルクメイト2S(日本農産工業株式会社)を与えて5令幼虫まで育てた。飼育容器は卵から2令幼虫までを角型2号シャーレ(栄研器材)、それ以降をディスプレイのプラスチック製フードパック(フードパックFD大深、中央化学株式会社)を用いた。飼育温度は27℃とした。特に記載がない限り、実験には4齢眠以後絶食させた5令1日目の幼虫を用いた。

糖添加試料は、人工飼料シルクメイト2S(日本農産工業株式会社)に、種々の重量比でD-Glucoseを混合して調製した。

カイコの注射実験では、5令幼虫の第5体節の模様がある体節に0.05 mlの試料を注射した。注射筒(1ml)と注射針(27Gx3/4)はテルモ株式会社より購入した。

### 血糖値の定量法

体液(20µl)は第一腹肢{first proleg}にはさみでつけた切り傷から採取し、タン

パク質を沈殿させるために9倍量の0.6N過塩素酸と混合した。3,000rpmで10分間遠心分離し、上清を体液抽出液(hemolymph extract)とした。

カイコ血液中の総糖量はフェノール硫酸法(Hodge et al)により定量した。蒸留水で適当な濃度に希釈した体液抽出液100 $\mu$ lと5%(w/v)フェノール水溶液100 $\mu$ lを混合し、濃硫酸500 $\mu$ lを加えて激しく攪拌し、室温で20分間静置した後、490nmにおける吸光度を測定した。グルコース水溶液を標準糖溶液とした。マウスの血糖値は、血中グルコース定量機器であるアキュチェックアビバ(Roche)を用いて定量された。

#### 肝障害モデル作出の方法

人工餌(シルクメイト2S)を1日給餌し、約2gに成長した後6時間絶食させ、四塩化炭素等の肝薬物を血体腔に注射、1日後に採血し、血中のALT活性を定量した。尚、脂溶性の肝薬物は、ガラス製注射筒(HAMILTON製MICROLITER™ #710)を用い0.025mlを、水溶性の肝薬物は、糖尿病モデルと同様にテルモ株式会社製の注射筒(1ml)を用い0.05mlを注射した。

#### 高脂血症モデル作出の方法

種々の重量比の大豆油と油脂の摂食に因る消化不良や衰弱を防ぐ事に依って治療効果を明確に観察する為(消化不良や衰弱に因って検体(を添加した餌)を摂取しなくなる)、胆汁酸を添加した人工餌を数日間摂

食させた後、採血し、血中のトリグリセリド量を定量した。

#### グルコース付加試験

カイコに18時間、通常餌、もしくは10%グルコース含有餌を摂食させた後、24時間絶食させた。それらのカイコに75mg/mlグルコース溶液を100 $\mu$ l注射し、計時的に体液を回収した。カイコ血液中の総糖量はフェノール硫酸法(Hodge et al)により定量した。グルコース濃度は、血中グルコース定量機器であるアキュチェックアビバ(Roche)を用いて定量された。

#### 試薬

組換え型ヒトインスリンはSigmaより購入し、0.1%の酢酸を含む生理食塩水(0.9%NaCl)に溶解して用いた。AICAR(5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside)はトロントリサーチケミストリーズより購入し、生理食塩水に溶解して用いた。ワートマニンはCALBIOCHEMより購入し、DMSOに溶解して用いた。

#### ウェスタンブロット

カイコから抽出した脂肪体を、Insect saline(130mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>)で洗浄した後、ペニシリン、ストレプトマイシンを添加したGrace's medium 200 $\mu$ l中で27 $^{\circ}$ Cにおいて馴染ませた。ワートマニンをを用いた実験においては、同時に培地中にワートマニンを加えた。30分間の前

培養の後、培地にインスリン (3 mg/ml)、もしくは AICAR (4 mg/ml) を 50  $\mu$  L 添加し、27°C で 1 時間培養した。脂肪体を Insect saline で洗浄した後、NP-40 lysis buffer (10 mM Tris/HCl (pH=7.5)、150 mM NaCl、0.5 mM EDTA、1 mM DTT、1% NP-40、10 mM NaF、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 250  $\mu$  l の溶液と混合し、20 秒間、超音波処理した。その後、TCA 沈殿を行い、タンパク質を SDS 電気泳動し、PVDF メンブレンに移行させた。抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体、抗 AMPK 抗体、抗リン酸化 AMPK 抗体をそれぞれ用いてウエスタンブロットを行い、脂肪体のリン酸化 Akt 量 (リン酸化 Akt 量/全 Akt 量)、及びリン酸化 AMPK 量 (リン酸化 AMPK 量/全 AMPK 量) を測定した。

#### カイコ体液中の AGEs の検出

カイコから抽出した体液を、遠心分離し、血球を除いた。その後、上清を TCA 沈殿し、タンパク質を SDS 電気泳動し、PVDF メンブレンに移行させた。抗 AGEs 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

#### カイコの脂肪体の Oil Red O 染色

カイコに 18 時間、通常餌、もしくは 10% グルコース含有餌を摂食させた。その後、それぞれの群のカイコの脂肪体を採取した。PBS で二回洗浄後、3.7%ホルマリン溶液に室温、30 分浸した。PBS で二回洗浄後、60% イソプロパノールに 1 分浸し、Oil Red O 染色液 (final 1.8 mg/ml) に室温、20 分浸した。60% イソプロパノール溶液で 5 回洗

淨し、写真を取った。水気を取った脂肪体サンプルの重量を測定後、脂肪体にキシレンを 200  $\mu$  l 加え、室温で 30 分攪拌した。その後、ソニケーター (Sonifier 450, Branson) で OPC (Output control) 2 で 30 秒処理し、10,000 rpm で 3 分遠心した。遠心上清画分の OD490 を測定し、脂肪体の重さ当たりの吸光度を算出し、比較した。

#### カイコの脂肪体、及び体液中のトリグリセリドと遊離脂肪酸の定量

カイコに 18 時間、通常餌、もしくは 10% グルコース含有餌を摂食させた。その後、それぞれの群のカイコの脂肪体、及び体液を採取した。採取したサンプルのトリグリセリド、及び遊離脂肪酸量を酵素法により定量した。トリグリセリドについては、トリグリセリド E-テストワコー (和光純薬、大阪、日本) を用い、遊離脂肪酸については、NEFA C-テストワコー (和光純薬、大阪、日本) を用いて定量した。

#### 糖尿病合併症の治療薬のスクリーニング方法

10% グルコース含有餌に、生理食塩水、及び検体を 12 時間ごとに 4 日間繰り返し注射した。注射後のカイコの体長を測定して、成長阻害の効果を検定した。

### C. 研究結果

#### ① 高血糖カイコモデルの確立

我々は、生活習慣病に対する治療薬の薬効を評価できる無脊椎動物疾患モデルの開

発を目指している。まず、我々は、糖尿病治療薬の作用を評価するためのカイコを用いた高血糖モデルの開発を試みた。カイコに高グルコース餌を与えることにより、カイコの体液中の糖濃度（以下、血糖値と表記）が有意に上昇した（図 1 A）。カイコの脂肪体（哺乳動物の脂肪細胞、及び肝臓の機能を有する臓器）、マルピギー管（哺乳動物の腎臓に相当する臓器）、筋肉において臓器中の糖の蓄積量が増加した（図 1 B）。カイコに高グルコース餌を与えたとき、30分ですでに有意な血糖値、血液中のグルコース濃度の上昇が見られた（図 1 C, D）。餌に含ませるグルコースの量依存にカイコの血糖値は上昇した（図 1 E）。高グルコース餌の摂食により高血糖となったカイコを絶食させることにより、カイコの血糖値が低下した（図 1 F）。哺乳動物の腸管を通過しないマンニトールを加えた餌では、カイコ血糖値が上昇しなかった（図 1 G）。よって、カイコを高血糖にする条件を見出せた。また、カイコは、哺乳動物同様、グルコースの腸管からの取り込み、各臓器への移行、貯蔵を行っていることがわかった。

## ②高血糖カイコにおける成長阻害

糖尿病患者は、網膜症、腎症、末しょう神経障害など糖尿病合併症を発症する。そこで、カイコに長時間高グルコース餌を与えると症状が現れるか検討した。三日間、高グルコース餌を与えることにより、カイコの体長、体重が通常餌を食べたカイコより小さかった。その成長阻害は、餌に含ませ

るグルコースの濃度に依存していた（図 2）。また、直接グルコースを体液中に投与して、血糖値を高めたときに成長阻害が起こるか検討した。グルコース溶液を繰り返し投与されたカイコは、体長、体重が小さかった（図 3）。よって、カイコは高血糖となると成長阻害という症状を呈することが明らかとなった。

## ③高血糖カイコを用いた糖尿病治療薬の評価系の確立

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。ヒト臨床において I 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。グルコースを摂食したカイコの血糖値は、組み換え型ヒトインスリン投与により低下した（図 4 A）。哺乳類において、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糖の取り込みを亢進させる。我々は、*in vitro* の組織培養系を用いて、ヒトインスリンにより、カイコの Akt がリン酸化するか検討した。培養液にグルコースを添加することにより、脂肪体中の糖の蓄積量が増加した（図 4 B）。培養液にヒトインスリンを添加すると、脂肪体細胞中の糖の蓄積量、及びリン酸化 Akt の量が増加した（図 4 C, D）。さらに、ヒトインスリンによるカイコの脂肪体での糖含量の増加、及び Akt のリン酸化の亢進は、PI3 キナーゼの阻害剤であるワートマニンにより抑圧された（図 4 C, E）。さらに、ヒトインスリンによ

る高血糖カイコの血糖値の低下作用もワートマニンにより抑制された(図 4 F)。以上の結果は、カイコの脂肪体細胞においても哺乳動物の脂肪細胞で報告されているように、ヒトインスリンが PI3 キナーゼの活性化を介した Akt のリン酸化を起こす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 キナーゼの活性化による血糖降下経路が知られている。我々は、AMP キナーゼの活性化剤である AICAR がカイコに対しても血糖降下作用を示すかについて検討した。その結果、AICAR 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 5 A)。また、摘出した脂肪体を AICAR で処理すると、リン酸化 AMPK の量が増加していた(図 5 B)。以上の結果は、AICAR がカイコの脂肪体に作用し、AMPK 活性を上昇させ、その結果カイコの血糖値を低下させることを示唆している。

次に我々は、高血糖によるカイコの成長阻害が血糖降下作用を示すヒトインスリン、及び AICAR により回復するか検討した。10% グルコース餌を四日間給餌したカイコは、通常飼料給餌群のカイコより、体長が小さく、体重が減少していた(図 6)。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 を投与すると、非投与群と比べて、体長の増大と、体重の増加が認められた(図 6)。この結果は、ヒトインスリンや AICAR が高血糖状態におけるカイコの血糖値を低下させることにより、成長を回復させることを示唆している。

#### ④長時間の高グルコース餌の摂食による高血糖カイコの II 型糖尿病様症状

ヒト、マウス、ラットやその他の多くの哺乳動物は、慢性的に高カロリーの食事を摂食することにより、脂質異常症やインスリン抵抗性を示す II 型糖尿病となることが知られている。そこで、カイコも同様に、高グルコース餌を与えることにより、II 型糖尿病と同様の症状を呈するか検討した。

18 時間、通常餌もしくは高グルコース餌を与えたカイコの血糖値、及びその後 24 時間絶食後の空腹時血糖を測定した。高グルコース餌を食べたカイコは、通常餌を食べたカイコより、食直後、及び空腹時血糖が低下していた(図 7)。次に耐糖能を測定するための方法の一つであるグルコース付加試験を行った。高血糖カイコは、グルコース投与後の血糖値、及びグルコース濃度が通常カイコより高かった(図 8)。これらの結果は、高グルコースを長時間食べさせることにより、カイコの耐糖能が低下したことを示唆している。ヒトにおいて高カロリー食の慢性的な摂食による耐糖能の低下の原因の一つとして、インスリン抵抗性による血糖調節機構の破綻が挙げられる。そこで、高血糖カイコにおいて、インスリン抵抗性となっているのではないかと考えた。通常カイコ、及び、高血糖カイコの脂肪体を摘出し、*in vitro* の組織培養系におけるインスリンの応答性を検討した。通常カイコの脂肪体では、インスリンにより Akt のリン酸化が亢進したが、高血糖カイコの脂肪体



では、インスリンによる Akt のリン酸化が検出されなかった(図 9)。このことから、長時間高グルコース餌を食べたことにより高血糖となったカイコは、インスリン抵抗性であることが示唆された。II 型糖尿病患者がインスリン抵抗性となる原因として、肝臓や脂肪組織などの臓器や血液中のトリグリセリド、遊離脂肪酸濃度の上昇が起因していることが知られている。そこで、高血糖カイコにおいても、組織中の脂質の蓄積が起こっているか検討した。通常カイコ、及び高血糖カイコの脂肪体を摘出し、脂質を染める Oil Red O 染色法を行ったところ、高血糖カイコの脂肪体は通常カイコの脂肪体より赤く染まった(図 10)。Oil Red O で染色される脂質の大部分はトリグリセリドであることが知られている。そこで、高血糖カイコの脂肪体中のトリグリセリドの蓄積量が上昇しているか検討した。高血糖カイコの脂肪体のトリグリセリド量は、通常カイコより上昇していた(図 11A)。このとき、遊離脂肪酸量は変化していなかった(図 11C)。インスリン抵抗性となっている患者の血液中では、遊離脂肪酸量が上昇していることが知られている。また、マウスを用いた研究から、遊離脂肪酸がインスリン抵抗性を惹起することも報告されている。そこで、高血糖カイコの体液において、遊離脂肪酸濃度が上昇しているか検討した。高血糖カイコの体液中の遊離脂肪酸濃度は、通常カイコより上昇していた(図 11D)。このとき、体液中のトリグリセリド濃度も上昇していた(図 11B)。以上の

結果は、長時間高グルコース餌を摂食したカイコが II 型糖尿病様の症状を呈することを示唆している。

カイコの糖尿病モデルの応用ができるか検討した。

血液注射では効果が無くても、経口投与を行う事によって、糖の吸収を「穏やかに」する物質が探索できるか検討した。その結果、食品であるガバ茶を混ぜた餌を食べたカイコは、コントロール群と比較して、血糖値が低かった(図 12)。さらに、生薬についても探索し、白鶴霊芝を混ぜた餌を食べたカイコの血糖値は低かった(図 12)。

⑤メイラード反応を介した血糖値の上昇に伴うカイコの成長阻害

ヒトの高血糖患者において、糖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、その反応により生じたフリーラジカル、及び変性タンパク質(AGEs)が組織障害や血流阻害を起こすと考えられている。糖尿病における合併症のひとつである糖尿病性腎症の発症とメイラード反応の生成物の蓄積量には相関関係があることが報告されている(Melinda T. Coughlan, et., al., Ann. N.Y. Acad. Sci. (2008)、Miura J., et., al., Journal of Diabetes and Its Complications (2003))。我々は、高血糖により成長阻害を起こしたカイコの血液を採取し、血液中の AGEs 量の変化の有無を検討

した。未処理のカイコの血液中タンパク質について、抗 AGEs 抗体によるウェスタンブロット解析を行ったところ、120 kDa のタンパク質が抗体と反応することがわかった。グルコースを添加した人工餌を摂食したカイコでは、抗 AGEs 抗体と結合するタンパク質の量が増加していた(図 13A)。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(albuminuria)に対して治療効果を示すことが報告されている(Krisztian Stadler et., al., Diabetes/Metabolism Research and Reviews (2005)、T. Soulis, et., al., Diabetologia (1997))。グルコース餌を食べたカイコにおいて増加した 120 kDa の糖化タンパク質(AGEs)量は、アミノグアニジンの投与により減少した(図 13A)。グルコース餌の給餌によるカイコの成長阻害は、アミノグアニジンを 12 時間ごとに五回注射することによりアミノグアニジン非投与群に比べ、体長、及び体重の点からみて回復していた(図 13B)。これらの結果は、アミノグアニジンが高血糖状態におけるカイコの体液中のメイラード反応の生成物の生成を阻害することにより、成長を回復させることを示唆している。糖尿病合併症モデルを用いて、高血糖カイコにおける成長阻害を回復させる化合物をスクリーニングした。カイコの成長阻害を回復させるメイラード反応の阻害剤であるアミノグアニジンは、分子中に複数のアミノ基を有していた。このことから、分子中にアミノ基を複数有する化合物の中に、高血糖カイコの成

長阻害を回復させる物質があるのではないかと考えて、アミノ基が豊富な化合物群について検討した。その結果、ポリアミンの一種であるスペルミンの投与により、高血糖カイコの成長阻害は抑圧された。このとき、カイコの血糖値は、スペルミンの投与により変化しなかった(図 14)。

⑥高血糖カイコモデルを用いた漢方薬の血糖降下作用の評価、及び血糖降下物質としてのガラクトースの同定

次に我々は、高血糖カイコモデルを血糖降下作用物質の探索に利用できるかを検討した。いくつかの生薬の抽出画分のうち、ニンジンエキス、カロコンエキス、カンゾウエキスの投与により、カイコの血糖値が有意に低下した(図 15)。また、漢方薬であるジオウは、糖尿病に有効であるとされており、ヒト、マウスに対する血糖降下作用が報告されている。しかしながら、血糖値を低下させる成分は、同定されていない。我々は、高血糖カイコモデルを用いて、ジオウ中の血糖降下物質を同定できるか検討した。マウスに対して血糖降下作用を有することが報告されているジオウ熱水抽出画分(図 16A)を高血糖カイコの血中に投与すると血糖値が低下した(図 16B)。ジオウ熱水抽出画分の大部分は糖であり、エタノール沈殿可能であることから、多糖であることが示唆された。そこで、酸処理によりジオウ熱水抽出画分の糖の組成を調べた。ジオウ熱水抽出画分の酸加水分解産物は、TLC による分析において、ガラクトースと移動

度が同じであった(図 16C, D)。また、ガラクトースの投与により、高血糖カイコの血糖値が低下した(図 16E)。さらに我々は、哺乳動物においても、ガラクトースが血糖降下作用を示すか検討した。その結果、ストレプトゾトシン処理により高血糖状態にしたマウスにガラクトースを腹腔内投与すると、血糖値が低下することがわかった(図 16G)。したがって、ガラクトースには、カイコばかりでなく、マウスの血糖値を低下させる作用があることが示された。さらに、ガラクトースによる糖尿病マウスの血糖低下作用の分子機構の解明を試みた。ガラクトースの投与により、糖尿病マウスの肝臓における GLUT2(グルコーストランスポーター2)の発現が上昇していた(図 16H)。よって、高血糖カイコを用いて、哺乳動物にも血糖降下作用を示す化合物が同定できることがわかった。

これまでに、哺乳動物に肝障害を起こす薬物である四塩化炭素をカイコに投与すると血中の ALT 活性が上昇することを見いだしている。そこで、四塩化炭素以外の肝薬物に依り、カイコに肝障害が起こるか検討した。その結果、アセトアミノフェン、サリチル酸、アスピリン、硫酸鉄、バルプロ酸ナトリウム、テトラサイクリン、アミオダロン塩酸塩、メチルドパ錠、ケトコナゾール、ベタナミン錠の投与により、カイコの血中の ALT 活性が上昇した(図 17-19)。さらに、平成 14 年の中国製健康食品に因る死者を出す程の重篤な健康被害(肝障害)の原因物質である *N*-ニトロソフェンフルラ

ミンや、かつてはウイルス性肝炎の病態モデル動物の作出に用いられていた D-ガラクトサミンがカイコにおいてもカイコの血中 ALT が上昇した(図 20、21、表 1)。

次に、高脂血症モデルの確立を試みた。昆虫が生合成できない胆汁酸(コール酸)を餌に添加する事によってカイコの血中中性脂肪濃度の飽和レベルが上昇した(図 22)。

#### D. 考察

本論文において、我々は、カイコが高血糖状態になるとカイコの成長が阻害されることを示した。我々は、ヒトインスリンにより、PI3 キナーゼの活性化を介する経路でカイコの脂肪体における Akt のリン酸化、及び糖の取込み能が亢進することを明らかにした。したがって、ヒトインスリンによるカイコの血糖降下作用は、哺乳動物における作用と同様、インスリン経路の亢進によると考えられる。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。最近、カイコにおいては、ボンビキシンの投与によりカイコの Akt のリン酸化が亢進することが報告された(Nagata S, et, al, Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. (2008))。カイコは、哺乳動物同様、インスリンシグナル伝達系の活性化を介した血糖調節機構を有している可能性が考えられる。また、我々は、カイコにおいても、AMPK の活性化により血糖値が低下することを示唆した。

したがって、糖尿病モデルカイコを用いて、インスリンシグナルや AMPK の活性化を作用機序とする薬剤を評価出来ると考えられる。

長時間高グルコース餌を与えられたカイコは、耐糖能の低下、インスリン抵抗性、脂質異常症を呈していた。これらの表現型は、II 型糖尿病患者が呈する代表的な症状である。よって、長時間の高グルコース餌の摂食により、カイコが II 型糖尿病になることが分かった。このカイコ II 型糖尿病モデルに対して治療効果を示す化合物は、II 型糖尿病治療薬の候補として有用である可能性がある。

カイコの糖尿病モデルを用いて、血液注射では効果が無くても、経口投与を行う事によって、糖の吸収を「穏やかに」する物質が探索できることが示唆された。糖尿病治療薬であるインシュリンの場合は、経口投与で効果がないので、注射に依る投与が必要であるが、その場合、患者に負担がかかる。食事のときに、経口投与で血糖値の上昇を抑えることができれば、患者の負担が軽減される。これまでに、グリコシダーゼ阻害薬は、糖の吸収を抑える作用を有する薬剤であるが、単糖であるグルコースを摂取した場合には効果がない。今回、我々が同定したガバ茶、及び白鶴霊芝を餌に加えることに依り、単糖であるグルコースを餌に添加しているにも関わらず、血糖値の上昇は抑制された。従って、ガバ茶、及び白鶴霊芝がカイコの血糖値の上昇を抑制する機構は、グリコシダーゼ阻害活性ではな

いと考えられる。ガバ茶や白鶴霊芝の作用機序を解析し、新規の機構の糖尿病治療薬のターゲットが発見できる可能性があると考えられる。

高血糖状態となったカイコは、成長阻害という顕著な症状を示す。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、高血糖カイコの成長阻害は、メイラード反応の生成物によることが示唆される。糖尿病マウスモデルにおいて、尿毒症や足の麻痺が起こることが知られているが、そのような症状を引き起こすためには、長期間の飼育が必要である。これに比べて高血糖によるカイコにおける成長阻害は、三日間という短期で観察可能である。したがって、カイコの系は、糖尿病治療薬の簡便な評価方法として適していると考えられる。実際に、糖尿病合併症を治療する候補化合物として、ポリアミンの一種であるスペルミンを同定できた。このことから、カイコの糖尿病合併症モデルを用いて、候補化合物が同定できることがわかった。さらに、ポリアミンは、人の細胞内に存在する内在性の分子であることから、治療薬として用いる場合、副作用が少ない可能性がある。今後、ポリアミンの糖尿病合併症の治療効果について、臨床試験が必要となるだろう。

我々は、高血糖カイコモデルを用いて、実際に血糖降下薬の探索を試みた。我々は、血糖値を低下させる作用があるとされている漢方薬のジオウに着目した。これまでに、ジオウの熱水抽出画分にマウスの血糖値を

低下させる活性があることが報告されている。しかし、血糖降下物質は同定されていなかった。我々は、高血糖カイコモデルを用いてジオウ熱水抽出画分中の血糖降下化合物としてガラクトースを同定した。さらに、ガラクトースは、マウスの高血糖モデルにおいても血糖降下作用を有することが明らかとなった。これらの結果は、高血糖カイコモデルを用いて、哺乳類において血糖降下作用を有する化合物を同定できることを示唆している。また、ガラクトースに血糖低下作用があるとの報告はこれまでになく、新しい発見であるといえる。さらに、その血糖降下の作用機序に肝臓における GLUT2 の発現量の上昇が関与することが示唆された。インスリンやその他のホルモンの多くは、GLUT4 の膜への移行により血液中の糖を組織に取り込み、血糖値を低下させる。肝臓の GLUT2 の発現上昇により血糖値を低下させる物質の報告はない。ガラクトースは、新たな糖尿病治療薬のシーズとして有用である可能性があると考えられる。

本研究で、カイコをモデル動物とした糖尿病モデルを用いて、経口投与で血糖値の上昇を抑える化合物が評価できること、さらに血糖値の上昇を抑える物質として、ガバ茶、白鶴霊芝を同定した。また、カイコを用いた肝障害モデル、及び高脂血症モデルの確立に成功した。カイコを用いた肝障害モデルに依り、肝毒性を起こすいくつかの化合物の評価ができることがわかった。肝障害モデルもコール酸を用いた高脂血症モデルも、今後、既存の治療薬の評価がで

きることが示されれば、それらの治療活性を有する化合物を探索することができると思われる。

哺乳動物を用いた実験は、国際原則である 3R、すなわち Replacement（代替法の開発）、Reduction（動物数の削減）、Refinement（動物の苦痛の削減）に従って実験を行わなければならない（reference, 1959 Russell and Burch）。よって、哺乳動物を用いて、糖尿病治療薬の候補をスクリーニングすることは倫理的な問題から、困難である。今回我々が開発した高血糖カイコを用いた血糖降下薬のスクリーニングは、3R のひとつである Replacement の考えと合致する。また、カイコは、病態モデル動物として、しばしば使われている線虫やショウジョウバエでは困難な、血液のサンプリング、及び血糖値の測定が容易である。従って、カイコは、これらの小型無脊椎動物に比べ、高血糖モデル動物として優れた利点がある。

## E. 結論

カイコを用いた生活習慣病モデルは、新たな治療薬の候補の探索系として有用である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs.

Matsumoto Y, Sumiya E, Sugita T, Sekimizu

K.

*PLoS One.* ; 6 (3):e18292. 2011

## 2. 学会発表

糖尿病治療薬の同定のための無脊椎動物糖尿病モデル

松本靖彦、住谷瑛理子、杉田拓也、関水  
和久

第 82 回日本生化学会、神戸、2009 年 10 月  
21-24 日、口頭発表

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

#### ①血糖降下物質

出願番号：特願2010-12803

松本靖彦、関水  
和久

②糖尿病予防・改善剤のスクリーニング方法  
及び糖尿病予防・改善剤のスクリーニ  
ング用キット

出願番号：特願2010-34286

松本靖彦、小方康至、関水  
和久

③血糖低下剤及びそれを添加してなる糖尿  
病の予防又は病状改善のための飲食品

出願番号：国際特許PCT/JP2009/061978

松本靖彦、小方康至、関水  
和久

④薬剤の評価法及び薬剤のスクリーニ  
ング方法

出願番号：特願2009-251567

松本靖彦、小方康至、関水  
和久

⑤血糖値を低下させる物質の評価方法、ス  
クリーニング方法及び製造方法

出願番号：特願2008-178397

松本靖彦、住谷瑛理子、杉田拓也、浜本洋、  
関水  
和久

⑥発明の名称：血糖低下剤

出願番号：特願2008-178450

松本靖彦、小方康至、関水  
和久

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

平成 23 年 4 月 1 日に、東京大学アントレプ  
レナープラザにて、カイコを用いて糖尿病  
治療薬が同定できるという発見について記  
者会見を行った。

薬事日報や日本経済産業新聞に記事が掲載  
された。

薬事日報；平成 23 年 4 月 11 日

日本経済産業新聞；平成 23 年 9 月 14 日

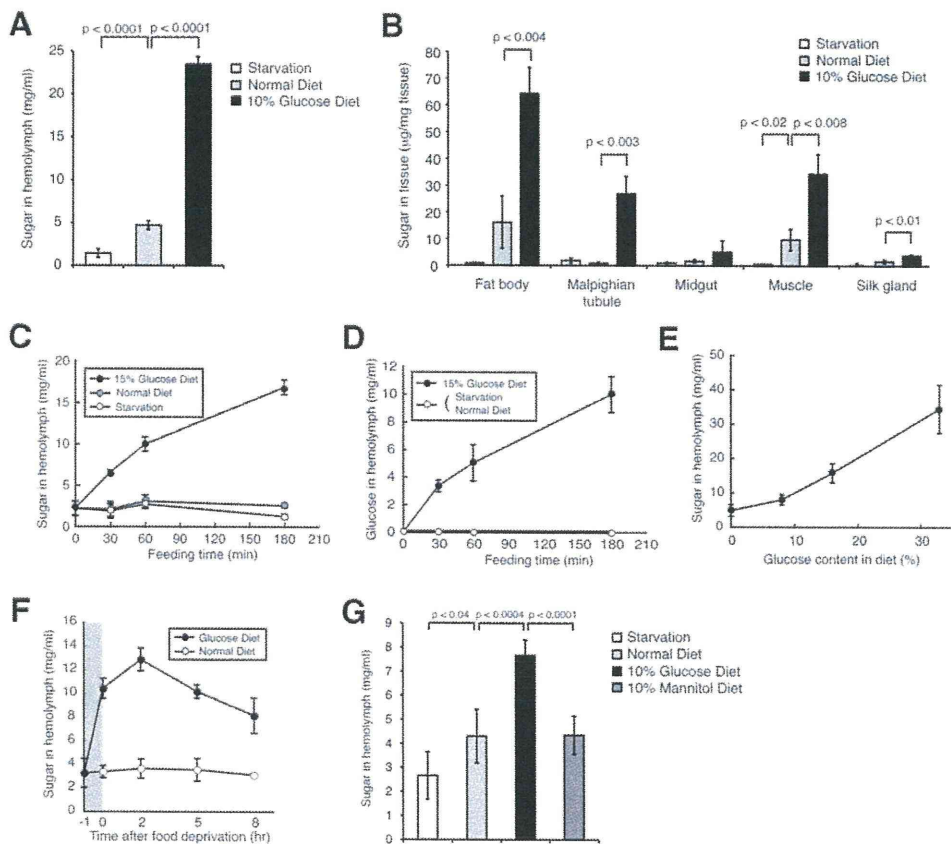


図1 高グルコース餌の摂食により、カイコが高血糖となる

絶食、通常餌、高グルコース餌を摂食したカイコの血糖値(A)、各組織中の糖含量(B)、経時的な血糖値(C)、グルコース濃度(D)を測定した。

E. 餌に含ませるグルコースの量依存的なカイコの血糖値の上昇

F. 食後、絶食させることによる血糖値の低下

G. グルコース餌とマンニトール餌の摂食におけるカイコの血糖値の比較

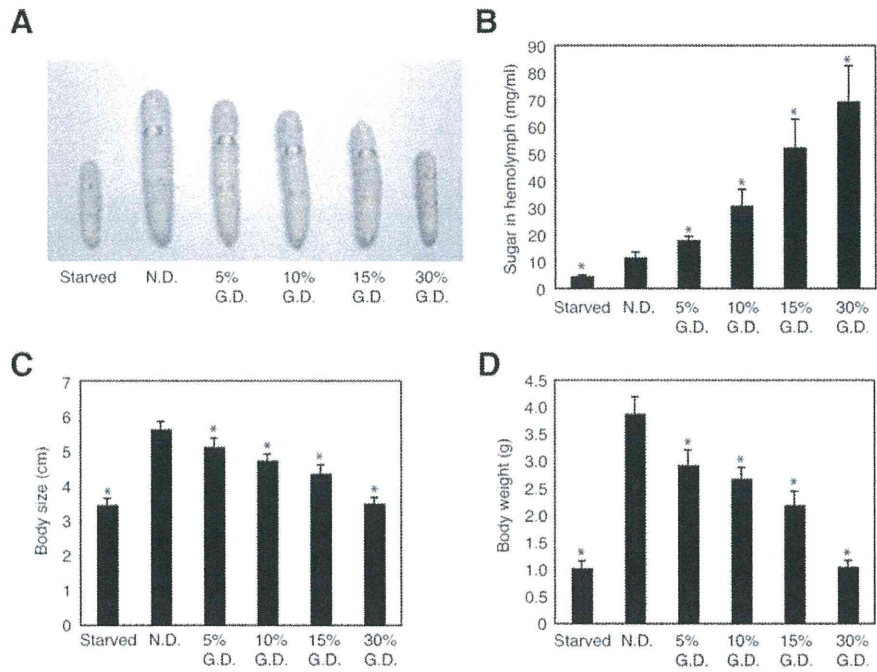


図2 高グルコース餌の摂食により、カイコに成長阻害が起こる  
 絶食、通常餌、高グルコース餌を三日間摂食したカイコの写真(A)、血糖値(B)、体長  
 (C)、体重(D)を測定した。



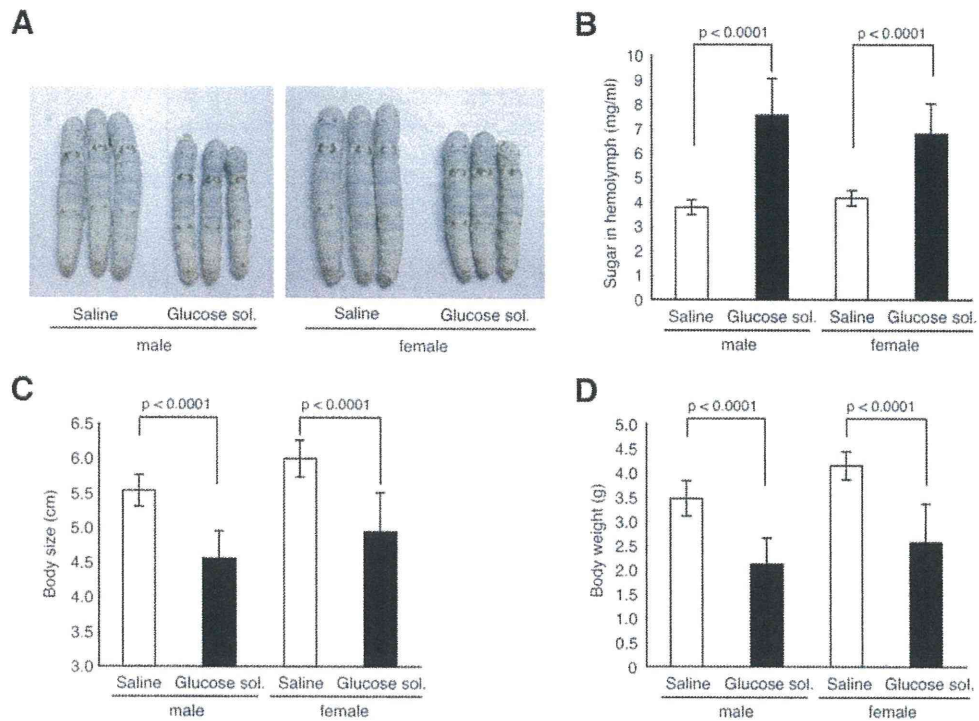


図3 グルコース溶液の注射により、カイコに成長阻害が起こる  
グルコース溶液を繰り返し注射された通常餌を摂食したカイコの写真(A)、血糖値(B)、  
体長(C)、体重(D)を測定した。

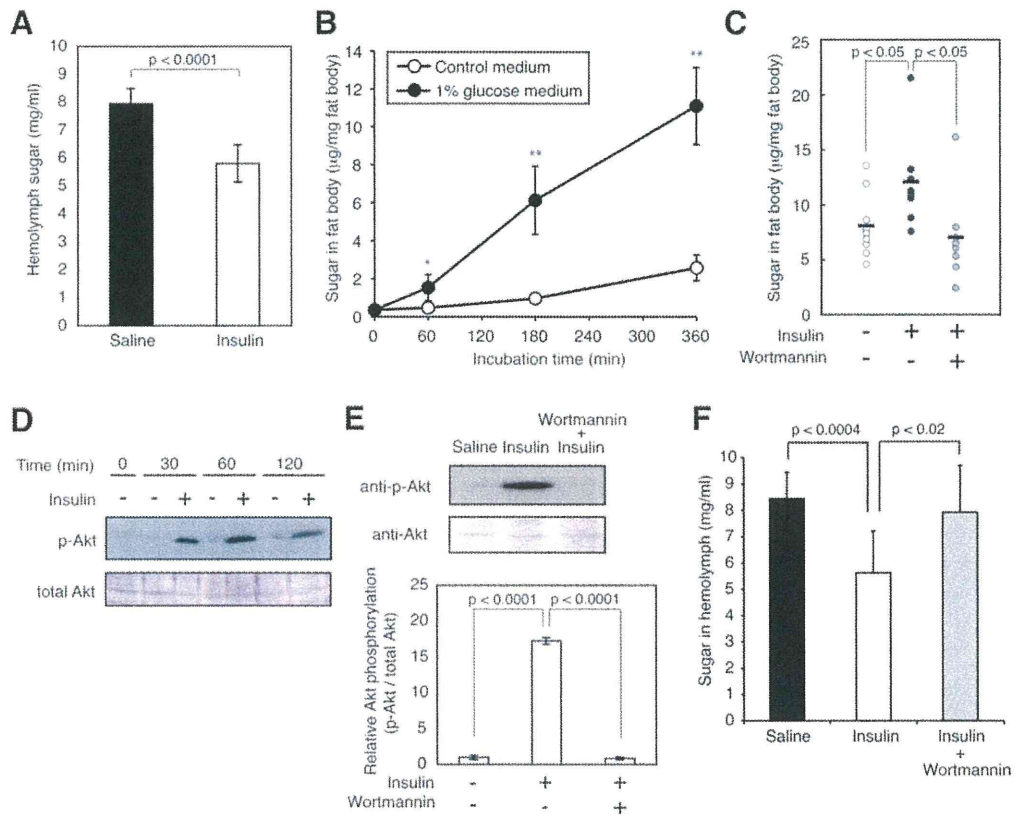


図4 ヒトインスリンの投与による高血糖カイコの血糖値の低下、並びにインスリンシグナル伝達経路の活性化

A. ヒト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. 摘出したカイコの脂肪体の組織培養系における脂肪体中の糖の蓄積

C. ヒトインスリンによるカイコの脂肪体中の糖含量の増加とワートマニンの同時処理によるヒトインスリンの効果の抑制

D. ヒトインスリンの処理によるカイコの脂肪体の Akt のリン酸化の亢進

E. ワートマニンの同時処理によるヒトインスリンの Akt のリン酸化の促進効果の抑制

F. ワートマニンの同時処理によるヒトインスリンの高血糖カイコの血糖値の低下作用の抑制

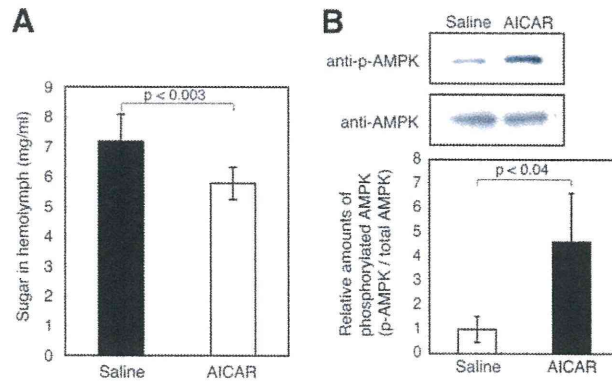


図5 AICARの投与による高血糖カイコの血糖値の低下、並びにAMPKシグナル伝達経路の活性化

A. AICARの投与による高血糖カイコの血糖値の低下

B. AICARの処理によるカイコの脂肪体のAMPKのリン酸化の亢進

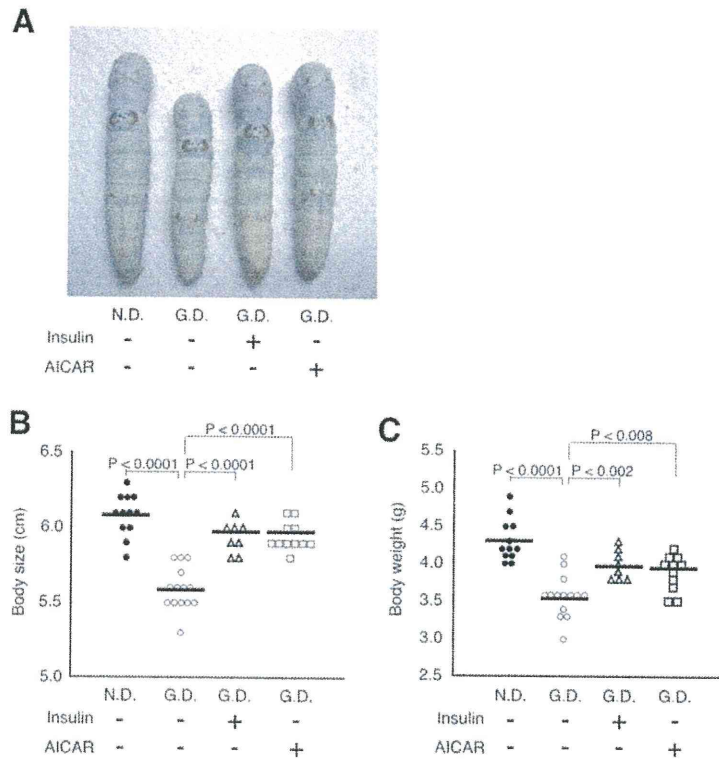


図6 ヒトインスリン、AICAR の繰り返し投与による高血糖カイコの成長阻害の回復

ヒトインスリン、AICAR の繰り返し注射されたカイコの写真(A)、体長(B)、体重(C)を測定した。