

## バナジルーハロゲン置換ピコリン酸錯体のインスリン様作用

田山小次郎, 安達祐介, 安井裕之, 桜井 弘\*

京都薬科大学代謝分析学教室

## Insulinomimetic activity of vanadyl complexes with halogenated picolinic acids

Kojiro Tayama, Yusuke Adachi, Hiroyuki Yasui, Hiromu Sakurai\*

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

### Abstract

Vanadyl ion and its complexes have been found to normalize the blood glucose levels in both type 1 and 2 diabetic animals. We have developed various types of vanadyl complexes, and found that the bis (picolinate) oxovanadium (IV) [VO(pa)<sub>2</sub>] complex is an effective agent for treating diabetes mellitus. Then, we used VO(pa)<sub>2</sub> as a leading compound for developing more active agents with hypoglycemic effects. By introducing an electron-withdrawing group such as a halogen atom into the pyridine ring of picolinic acid, seven kinds of vanadyl picolinate complexes were prepared. The structures of these complexes were characterized by elemental analysis and physical methods such as visible, IR, and ESR absorption spectra, and magnetic susceptibility. Introduction of an iodine to the picolinic acid gave a stronger insulinomimetic activity than that of VO(pa)<sub>2</sub>. The hyperglycemia of streptozotocin-induced insulin dependent diabetic mice was normalized when bis(4-chloropicolinate)oxovanadium(IV) [VO(4cpa)<sub>2</sub>] or bis(4-iodopicolinate)oxovanadium(IV) [VO(4ipa)<sub>2</sub>] was given by a single intraperitoneal injection. The metallokinetic features of vanadyl species in the blood were examined by using the blood circulation monitoring-electron paramagnetic resonance (BCM-EPR) method. Vanadyl concentrations in the blood of normal rats given VO(4cpa)<sub>2</sub> and VO(4ipa)<sub>2</sub> remained higher and longer than those of VO(pa)<sub>2</sub> because of their slower clearance rates. On the basis of the results, we conclude that introduction of a halogen atom to 4th position of picolinic acid enhances insulinomimetic activities and reduces clearance rate of the vanadyl species from the blood.

**Keywords :** diabetes, vanadium(IV), complex, insulinomimetic activity, halogenated picolinic acid

### Introduction

#### 1 はじめに

2002年の調査によるとわが国では糖尿病の可能性を否定できない人が約1,620万人に達したと報告されている[1]。インスリン注射や合成薬剤を超える新しい薬剤の創生が求められる中、原子番号23の遷移金属であるバナジウム

に血糖降下作用が見出され、新しい経口糖尿病治療薬として期待されている。バナジウムは様々な酸化数を取ることができるが、毒性が低く生体中で安定に存在し血糖降下活性を示す4価バナジウムのバナジルが有用であると判断されている[2-4]。著者らは現在までにバナジルとトリプトファン代謝物であるピコリン酸との錯体において高いインスリン様作用を持つことを明らかにしている[5]。さらに、ピコリン酸の5位に電子吸引性基であるハロゲン基を導入することによりin vitroにおいて高いインスリン様作用を持つことを明らかにしてきた[6,7]。本研究では、ピコリン酸の4、5、6位にハロゲン原子を導入した配位子を用いてバナジル錯体を合成し、in vitroインスリン様作用およびin vivo血糖降下作用を検討することとした。

連絡先：桜井 弘

〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町5

京都薬科大学 代謝分析学教室

T E L : 075-595-4629

F A X : 075-595-4753

E-mail : sakurai@mb.kyoto-phu.ac.jp

論文受理日：平成17年10月21日

## Materials and Methods

### 2-1 配位子およびバナジル錯体の合成

4-および5-ヨードピコリン酸(4 ipa, 5 ipa)は文献既知の方法により合成した[8,9]。6-ヨードピコリン酸(6 ipa)は4 ipaの合成方法にしたがって合成した。4-クロロピコリン酸(4 cpa)、6-フルオロピコリン酸(6 fpa)、6-クロロピコリン酸(6 cpa)および6-プロモピコリン酸(6 bpa)は市販品を用いた。4 ipa, 4 cpa, 5 ipa, 6 fpa, 6 cpaおよび6 ipaの各配位子と水酸化ナトリウムを加えた水溶液に硫酸バナジウム水溶液を加え、数時間加熱攪拌し析出した物質をろ別後、精製し目的の錯体を得た。6 bpaを配位子にもつバナジウム錯体は配位子に水酸化バリウムを加えた水溶液に硫酸バナジウム水溶液を加え、析出した白色固体( $\text{BaSO}_4$ )をろ別し、ろ液を濃縮して析出した物質を精製し目的物を得た。

### 2-2 In vitroインスリン様作用の評価

インスリン様作用の評価はNakaiらの方法に基づいて行った[10]。ラット副腎丸周辺から得た白色脂肪細胞をエピネフリンで刺激して放出される遊離脂肪酸(FFA)を50%抑制するバナジル錯体の濃度を $\text{IC}_{50}$ 値として評価した。これはインスリンが脂肪酸の遊離を抑制する点に着目し、バナジル錯体の脂肪酸遊離抑制作用を測定することにより間接的にインスリン様作用を評価する実験系である。

### 2-3 In vivo血糖降下作用の評価

合成したバナジル錯体を1型糖尿病モデルマウスであるストレプトゾトシン誘導糖尿病マウス(STZマウス)に単回腹腔内投与し、尾静脈より経時的に血糖値を測定した。

### 2-4 バナジル錯体の血中動態の評価

バナジル錯体の血中動態はTakechiらの方法に基づいて測定した[11]。バナジルイオン(核スピン数:7/2)は不対電子を持っているためESRによる測定が可能である。そこで、正常ラットにバナジル錯体を静脈内投与し、循環血液中のバナジル種をリアルタイムで観測した。作成した検量線より各錯体の血中濃度を定量し、得られた血中濃度の推移を2-コンパートメントモデルで解析し、血中濃度下面積(AUC)、平均滞留時間(MRT)、半減期( $t_{1/2}$ )、全身クリアランス( $\text{CL}_{\text{tot}}$ )およびみかけの分布容積(Vd)を算出した。これらの薬物動態パラメータはおのおのの独立したものでなく $\text{AUC}=\text{Dose}/\text{CL}_{\text{tot}}$ 、 $\text{CL}_{\text{tot}}=(0.693/t_{1/2}) \times \text{Vd}$ 、 $\text{MRT}=\text{Vd}/\text{CL}_{\text{tot}}$ などの相互関係が存在する。

## Results & Discussion

7種類のバナジル-ハロゲン化ピコリン酸誘導体錯体を合成した(Fig.1)。合成したバナジル錯体は配位子とバナジルが2:1の割合で結合し、バナジルピコリン酸錯体と同じ $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_2)$ 型配位様式をとっていることがわかった。

**Table 1**  $\text{IC}_{50}$  values of vanadyl ion and vanadyl complexes with picolinic acid and its derivatives

Complex	$\text{IC}_{50}$ (mM)
$\text{VOSO}_4$	$1.29 \pm 0.10$
$\text{VO}(\text{pa})_2$	$1.00 \pm 0.02$
$\text{VO}(\text{4cpa})_2$	$1.76 \pm 0.11^*$
$\text{VO}(\text{4ipa})_2$	$0.83 \pm 0.05$
$\text{VO}(\text{5ipa})_2$	$0.76 \pm 0.10^*$
$\text{VO}(\text{6fpa})_2$	$5.47 \pm 1.00$
$\text{VO}(\text{6cpa})_2$	$3.46 \pm 0.52$
$\text{VO}(\text{6bpa})_2$	n.d.

Data are expressed as means  $\pm$  S.D. for 3 experiments. Significance: \*  $p < 0.05$  vs.  $\text{VO}(\text{pa})_2$

脂肪細胞におけるバナジル錯体のインスリン様作用を評価した結果、ピコリン酸にヨード原子を導入したバナジル錯体において有意に脂肪酸の遊離が抑制されることが分かった。これはヨード原子を導入することによりバナジル錯体が細胞膜に結合しやすくなったためと考えられる[7](Table 1)。

**Table 2** Pharmacokinetic parameters of vanadyl complexes with picolinic acid and its derivatives

	$\text{VO}(\text{pa})_2$	$\text{VO}(\text{4ipa})_2$	$\text{VO}(\text{4cpa})_2$
$\text{AUC}(\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{mL})$	$1.90 \pm 0.15$	$2.60 \pm 0.17^{**}$	$2.13 \pm 0.2^*$
MRT(min)	$35.1 \pm 4.5$	$50.2 \pm 5.5^*$	$42.3 \pm 1.7$
$\text{CL}_{\text{tot}}(\text{mL}/\text{min}/\text{kg})$	$5.2 \pm 0.4$	$3.8 \pm 0.2^{**}$	$4.6 \pm 0.5^*$
Vd(mL/kg)	$182 \pm 28$	$189 \pm 12$	$196 \pm 13$
$t_{1/2}(\alpha)$ (min)	$0.5 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.2$
$t_{1/2}(\beta)$ (min)	$26.5 \pm 3.3$	$37.3 \pm 4.0^*$	$31.6 \pm 1.0$

Rats were treated with vanadyl complexes such as  $\text{VO}(\text{pa})_2$  (n=3),  $\text{VO}(\text{4ipa})_2$  (n=3), and  $\text{VO}(\text{4cpa})_2$  (n=3). Significance: \* $p < 0.05$  vs.  $\text{VO}(\text{pa})_2$ , \*\* $p < 0.01$  vs.  $\text{VO}(\text{pa})_2$ , \* $p < 0.05$  vs.  $\text{VO}(\text{4cpa})_2$ .

続いて、1型糖尿病モデルであるSTZ-マウスにバナジル錯体を単回腹腔内投与すると、ピコリン酸の4位にハロゲン原子を導入した $\text{VO}(\text{4cpa})_2$ および $\text{VO}(\text{4ipa})_2$ において優れた血糖降下作用が認められた。この血糖降下作用は $\text{VO}(\text{pa})_2$ と比べて有意であった。一方、ピコリン酸の5位や6位にハロゲン原子を導入しても血糖降下作用は認められなかった(Fig. 2)。

さらに血糖降下活性が高かったバナジル錯体についてESRを用いて血中動態を測定した。測定前にバナジル錯体の血液中的安定性を確認したところ、経時的なESRスペクトルの線型および信号強度の変化を示さなかったため、血液中にはほとんど酸化還元反応を受けることな

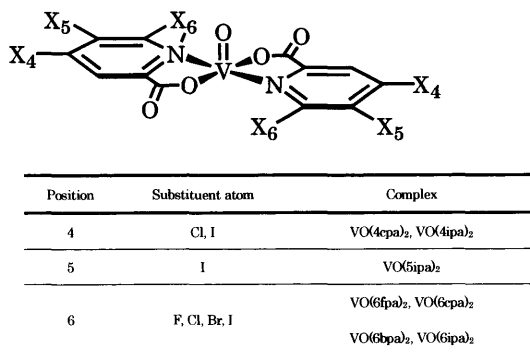


Fig. 1 Prepared vanadyl complexes with halogenated picolinic acids

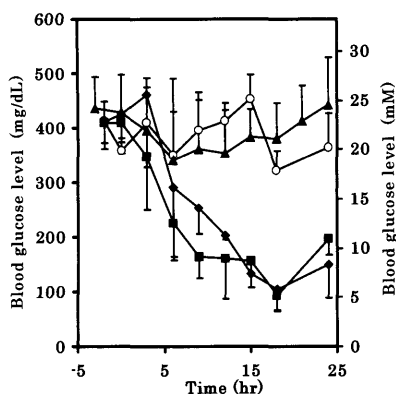


Fig. 2 Changes of blood glucose levels in STZ-mice received a single i.p. injection of vanadyl complexes such as (○) Control, (▲) VO(pa)<sub>2</sub>, (◆) VO(4cpa)<sub>2</sub>, or (■) VO(4ipa)<sub>2</sub> at a dose of 10 mg V/kg body weight. The complexes were dissolved in 5% acacia. VO(4cpa)<sub>2</sub> was effective for 3/6 mice, and VO(4ipa)<sub>2</sub> was effective for 6/6 mice. Values are means ± S.D.s for 3-10 mice

くバナジル種として安定に存在することを確認した。血糖降下活性の高いバナジル錯体VO(4cpa)<sub>2</sub>およびVO(4ipa)<sub>2</sub>は、VO(pa)<sub>2</sub>と比較して有意に血中濃度下面積(AUC)の増大および全身クリアランス(CL<sub>tot</sub>)の減少が確認されたが、みかけの分布容積(Vd)には錯体間で有意な差はなかった(Table 2)。この結果は、各錯体間で組織への分布に大きな違いはなく、錯体の体内動態は血液循環からの消失速度によって大きく変化することを示し、ピコリン酸の4位にハロゲン原子を導入することは血中滞留性を増大させることがわかった。

以上の結果からバナジル錯体の血中滞留性が増加することが血糖降下作用の増強に関与していると考えた。そこで、全身クリアランスと血糖降下活性との間に相関性があるかどうかを考察した。このとき、血糖降下活性の指標はGlucose Lowering Effect (%) = ([glucose]0h - [glucose]12h) / [glucose]0h とした。

ここでは[glucose]0hは単回投与前の血糖値、そして

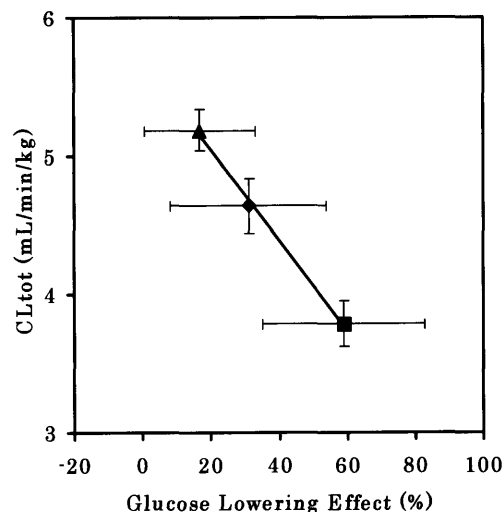


Fig. 3 Linear relationship between CL<sub>tot</sub> and glucose lowering effect (%) for (▲) VO(pa)<sub>2</sub>, (◆) VO(4cpa)<sub>2</sub>, and (■) VO(4ipa)<sub>2</sub>

[glucose]12hは単回投与12時間後の血糖値を示す。Fig. 3に示すように、バナジルピコリン酸錯体において両パラメータの間に良好な直線関係のあることが明らかとなった(R=0.9964)。

以上の結果から、ピコリン酸の4位にハロゲン基を導入すると全身クリアランスが低下し、血中濃度が上昇することにより高い血糖降下活性を示すことが明らかになった。

#### Acknowledgements

本研究は文部科学省科学研究補助金「特別推進研究(桜井 弘)」により行った。

#### References

- 1) 厚生労働省：平成14年度糖尿病実態調査報告，2002。
- 2) F. T. G. Hudson : Vanadium toxicity of biological significance. Elsevier Publ Co, New York, pp 140, 1964.
- 3) J. M. Llobet, and J. L. Domingo : Acute toxicity of vanadium compounds in rats and mice. Toxicology Lett, 23, 227-231, 1984.
- 4) H. Sakurai, S. Shimomura, K. Fukuzawa, and K. Ishizu : Detection of oxovanadium(IV) and characterization of its ligand environment in subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium(V). Biochem Biophys Res Commun, 96, 293-298, 1980.
- 5) H. Sakurai, K. Fujii, H. Watanabe, and H. Tamura : Orally active long-term acting insulin-mimetic vanadyl complex : bis (picolinato) oxovanadium(IV). Biochem Biophys Res Commun, 214, 1095-1101, 1995.
- 6) H. Sakurai, and H. Yasui : Structure-activity rela-

- tionship of insulinomimetic vanadyl-picolinate complexes in view of their clinical use. *J Trace Elem Exp Med*, 16, 269-280, 2003.
- 7) T. Takino, H. Yasui, A. Yoshitake, Y. Hamajima, R. Matsushita, J. Takada, and H. Sakurai: A new halogenated antidiabetic vanadyl complex bis (5-iodopicolinato) - oxovanadium(IV): in vitro and in vivo insulinomimetic evaluations and metalokinetic analysis. *J Biol Inorg Chem*, 6, 133-142, 2001.
- 8) O. Lohse: Improved large-scale preparation of 4-iodopicolinic acid. *Synth Commun*, 26, 2017-2025, 1996.
- 9) M. Riley, and N. Perham: The reaction of protein amino groups with methyl 5-iodopyridine-2-carboximidate. *Biochem J*, 131, 625-635, 1973.
- 10) M. Nakai, H. Watanabe, C. Fujisawa, T. Satoh, J. Takada, R. Matsushita, and H. Sakurai: Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: Studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol Pharm Bull*, 18, 719-726, 1995.
- 11) K. Takechi, H. Tamura, K. Yamaoka, and H. Sakurai: Pharmacokinetic analysis of free radicals by in vivo BCM (blood circulation monitoring)-ESR method. *Free Rad Res*, 26, 483-496, 1997.