

氏 名 うちだ りいちろう
 内 田 理 一 郎
 学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)
 学位記番号 論 薬 博 第 604 号
 学位授与の日付 平成 11 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
 学位論文題目 ヒトα-アミラーゼ阻害剤に関する研究

(主査)
 論文調査委員 教授 市川 厚 教授 川 寄 敏 祐 教授 中 川 照 眞

論 文 内 容 の 要 旨

ヒトにおけるα-アミラーゼは主に唾液腺及び膵臓で生産されている。生産されたこの2種のα-アミラーゼアイソザイム (human salivary amylase=HSA, human pancreatic amylase=HPA) は主に消化管内に分泌されて消化酵素として働くが、その一部は血液中に移行する。血液中のα-アミラーゼの活性値とα-アミラーゼの生産臓器及びその代謝経路の損傷に起因した疾病との間には高い相関が認められており、この事から2種のα-アミラーゼアイソザイム活性を別々に測定する、すなわち分別活性測定する事によって、これらの疾病の診断に重要な役割を果たす事ができる。この目的のために、合成基質と選択的α-アミラーゼ阻害剤とを組み合わせて、α-アミラーゼアイソザイムの分別活性測定を行う方法が広く用いられている。

一方α-アミラーゼ阻害剤の用途として、先に述べた血液中のHPAとHSAの分別活性測定に用いる他に、消化酵素であるα-アミラーゼを腸管内で阻害し、炭水化物の消化吸収を遅延させる事による、糖尿病治療薬としての用途が考えられる。

しかしながら、血液中のHPAとHSAの分別活性測定を行う為の、また糖尿病治療薬として用いる為の好適なα-アミラーゼ阻害剤はこれまで得られていない。また修飾オリゴ糖のα-アミラーゼ阻害に関する、系統的な合成研究もほとんどなされていない。そこで著者は種々の修飾オリゴ糖を合成し、その酵素化学的性質を検討する事により、好適なα-アミラーゼ阻害剤の探索を行った。

第 1 章 ヒトα-アミラーゼアイソザイム分別活性測定用阻害剤に関する研究

非還元末端6位をデオキシ化した7種の修飾マルトオリゴ糖を合成し、HPA及びHSAに対する酵素化学的性質を検討したところ、6³-デオキシマルトトリオース(1)がHPAを優先的に阻害する化合物である事を見いだした (Fig. 1)。

HPA及びHSAを含有するサンプルを1の非存在下、活性測定を行うと、式1に示すHPA活性 (P) 及びHSA活性 (S) のトータルα-アミラーゼ活性 (T) が測定される。次に1の存在下、再度α-アミラーゼ活性を測定すると、式2に示すHPA及びHSAの残存活性率を掛けた残存α-アミラーゼ活性 (R) が測定される。

$T = P + S$式 1

$R = 0.131P + 0.679S$式 2

そこでこの連立方程式を下記の式3及び式4へと変換する事により、測定値T及びRからHPA及びHSAの個々の活性を求めることができる。

$P = (0.679T - R) / 0.548$式 3

$S = (R - 0.131T) / 0.548$式 4

この原理を用いた測定法は、体内共存物質の影響を受けず良好な再現性を示した。化合物1は阻害が安定するまでの時間が非常に短く、血液サンプル、基質などの必要量が1/2で済み、測定時間を短縮する事ができるダブルカイネティック法も可能とした。ま

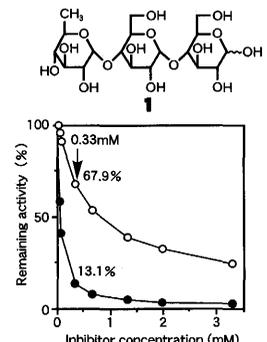


Fig. 1. Remaining activities of HPA(●)and HSA(○)in the presence of various concentrations of 1

たヒト血清を用いて、従来法であるモノクローナル抗体法及び小麦インヒビター法との相関を求めたところ高い相関が認められた。すなわち化合物 1 はヒト α -アミラーゼアイソザイム分別活性測定用阻害剤として望まれる①HPAもしくはHSAのいずれか一方を優先的に阻害する、②阻害が安定するまでの時間が短い、③共役酵素に影響を与えない、④共役酵素及び α -アミラーゼに分解されず安定である、⑤構造が明確である、という条件をすべて満たす阻害剤であり、1 を用いることにより従来法が有する種々の問題点を解決し、簡便でかつ正確な分別活性測定法を確立した。

第2章 糖尿病治療薬に用いるためのヒト α -アミラーゼ阻害剤に関する研究

マルトオリゴ糖の6位の修飾を中心とした、63種の修飾オリゴ糖を系統的に合成した。これらを用い α -アミラーゼ阻害活性試験を行い、Fig. 2 に示す数種の α -アミラーゼ阻害物質を見いだした。そしてこれらの阻害剤と α -アミラーゼサブサイトとの結合位置の推定を行い、デオキシグルコース残基はサブサイト-3に、アゼピン環はサブサイト-1に結合している可能性を示した。またサブサイト-2及び-1に結合する糖残基の6位に位置する部位には、水酸基が必要である可能性もあわせて示した。そして、(3R,4R,5R,6S)-ヘキサヒドロ-3,5,6-トリヒドロキシ-1H-アゼピン-4-ニル α -マルトシド (2) 及び (3R,5R)-3,5-ジヒドロキシピペリジン-4-ニル α -マルトシド (3) には、マウスにおける食後の過血糖抑制試験において有意な血糖値上昇抑制効果が認められた。この試験結果は、これらの α -アミラーゼ阻害剤の医薬品への展開の可能性を示唆するものである。

また第1章及び第2章を通して、HSAのサブサイト-3が疎水性基を強く親和するという性質を利用した新しい修飾オリゴ糖の合成法を確立した。

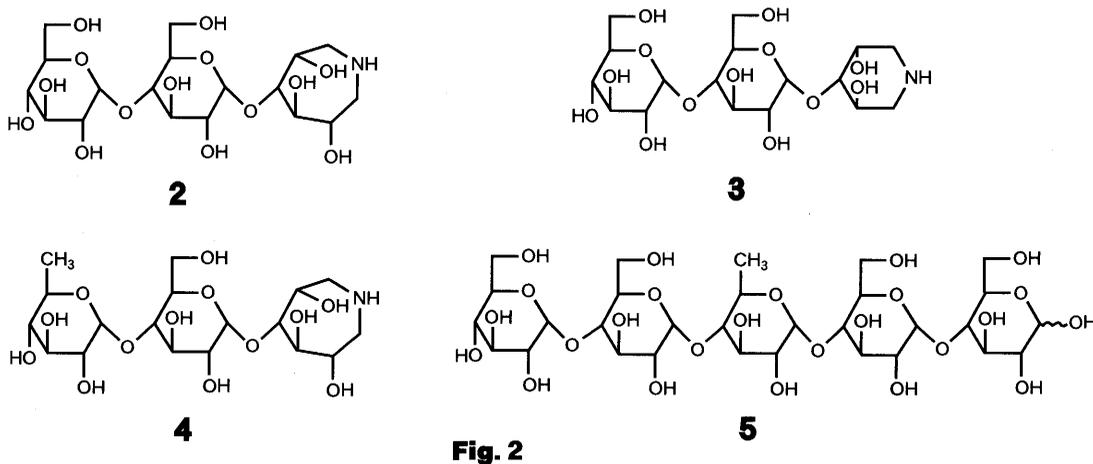


Fig. 2

論文審査の結果の要旨

本論文はヒト α -アミラーゼアイソザイムの分別活性測定用の阻害剤と糖尿病治療薬の開発を目的に、それぞれに特異的な α -アミラーゼ阻害剤を合成し、それらの阻害作用を解析したものである。 α -アミラーゼの分別活性測定に関しては、これまで合成基質と選択的 α -アミラーゼ阻害剤（小麦由来インヒビター及び唾液型アイソザイムに対する免疫抗体）を組合せる二段階の測定方法が用いられている。この方法の欠点は、検体に多量の血液を要し、測定に時間がかかり、再現性に欠けることである。著者は、6位修飾マルトオリゴ糖の α -アミラーゼ阻害活性を検討し、膵臓型アイソザイムを唾液型のそれに比べ優先的に阻害する6'-デオキシマルトトリオースを合成することに成功した。この阻害剤は短時間で阻害が安定し、検体中の共役酵素に影響を与えず、また、共役酵素により分解されないことから、測定法において良好な再現性を示すとともに、血液サンプル、基質などの必要量が1/2で済み、測定時間を短縮できるダブルカイネティック法を可能とする物質であることが検証された。また、この方法による測定は、従来法が有する種々の問題点を解決し、簡便かつ正確な分別活性測定法として、すでに臨床検査の場で応用されている。

著者は、次いで、 α -アミラーゼ阻害剤の用途として、消化酵素である α -アミラーゼを腸管内で阻害し、炭水化物の消化吸収を遅延させることによる糖尿病治療薬としての可能性を検討した。これまで、糖尿病治療薬として用いるための好適な

α -アミラーゼ阻害剤は開発されていない。関連物質として α -グルクロニダーゼ阻害剤が開発されているが、この阻害剤はマルトースの蓄積による腹痛を起こすことがあるとされている。著者は α -アミラーゼ阻害剤を糖尿病治療薬として適用することを目的に、マルトオリゴ糖の6位の修飾を中心とした63種類の修飾オリゴ糖を系統的に合成し、中から数種類の α -アミラーゼ阻害物質を選択した。まず、これら阻害剤の作用様式を明らかにするため、阻害剤と α -アミラーゼサブサイトとの結合位置の推定を行い、デオキシグルコース残基はサブサイト-3に、アゼピン環はサブサイト-1に結合していることを示唆した。また、サブサイト-2及び-1に結合する糖残基の6位に位置する部分には水酸基が必要であることを明らかにした。さらに、マウスにおける食後の過血糖抑制試験において有為な血糖上昇抑制効果のある(3R,4R,5R,6S)-ヘキサヒドロ-3,5,6-トリヒドロキシ-1H-アゼピン-4-ニル α -マルトシド及び(3R,5R)-3,5-ジヒドロキシピペリジン-4-ニル α -マルトシドを見出し、 α -アミラーゼ阻害剤の医薬品への展開の可能性を示唆した。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。更に、平成11年2月3日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。