

201208023A

---

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

漢方薬によるメタボリック症候群の病態基盤「自然炎症」の制御

---

平成24年度 研究報告書

主任研究者 丸山 征郎

平成25年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

侵襲の運命決定因子HMGB1を分子標的とした救命的治療法の開発

鹿児島大学・丸山征郎 ----- 1

### II. 分担研究報告

1. 漢方薬によるPPARsの活性化とその機序の研究

鹿児島大学・丸山征郎 ----- 3

2. 漢方薬によるPPARsの活性化とその機序の研究

鹿児島大学・伊藤隆史 ----- 5

3. 生薬成分の分画化、純化とそれによる細胞刺激、シグナル伝達の解析

大阪工業大学・川原幸一 ----- 7

4. 漢方薬による患者治療と効果判定（血液と症状）

鹿児島大学・橋口照人 ----- 9

5. 腎炎ラットにおける漢方薬の治療効果と作用機序の解明

鹿児島大学・大山陽子 -----10

# I. 総括研究報告

研究課題:漢方薬によるメタボリック症候群の病態基盤「自然炎症」の制御

丸山 征郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究要旨

メタボリック症候群(以下メタボ)の病理学的基盤は“くすぶり型”炎症[自然炎症]である。一方加齢の病態にもこの“自然炎症”が根底に在ることが判明してきた。従ってメタボ患者に加齢が加わると、その病勢は加速度的に進行する。特にメタボに加齢による“腎障害(CKD)”が加わると病態の進行は加速される。

一方、炎症は、PAMPs 経路からの刺激に、DAMPs からの刺激が加重されると一挙に劇症化することが判明してきつつある。

本研究では、これらの“自然炎症”、ならびに`PAMPs, DAMPs の相乗作用による炎症の増幅に対する漢方薬の効果を検討した。

プレリミナリーな結果ながら、ある種の生薬は DAMPs からのシグナルを抑制し、インフラマソーム活性化を制御することを証明しえた。これらのことから、自然炎症の抑制に漢方薬も大きな役割を果たすことが期待される。

A. 研究目的

メタボリック症候群(以下メタボ症)の病態基盤:**【自然炎症】を制御する漢方薬**に関して、既に我々が *in vitro*, ならびに動物実験で有効性を証明している五苓散の臨床展開を目指す(下图 1)。

B. 研究方法

生体内で発生する結晶は DAMPs として働くので、実験的にラットに 2,8-dihydroxyadenine(以下アデニン)を経口投与して、腎臓にアデニン結晶を形成しせめた実験的腎障害を作製した(*in vivo*系)。また培養腎尿細管細胞、マクロファージを各種 DAMPs, PAMPs で刺激した実験系を用いた(*in vitro*系)。

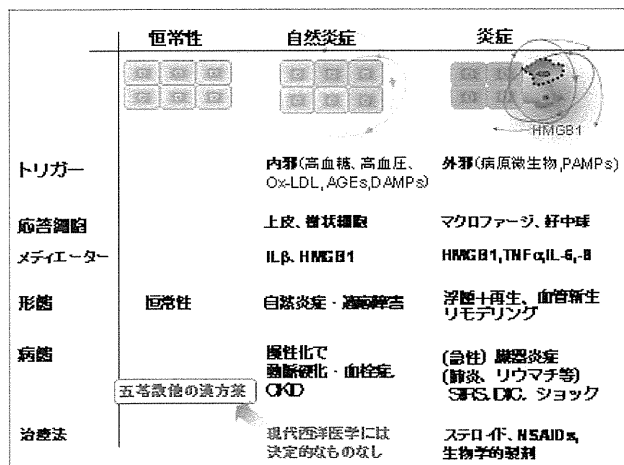


図 1. 自然炎症の概念

1. *in vitro* study: 培養細胞における五苓散の効果

代表的 DAMPs である HMGB1 添加による尿管上皮細胞、マクロファージからの MCP-1 放出と五苓散、その各成分の効果: HMGB1(図2)で細胞を刺激して炎症性サイトカイン MCP-1 放出と五苓散、その構成生薬エキスの効果を調べた。

2. *in vivo* study: アデニン投与と実験的腎不全ラットにおける五苓散の効果

アデニン)をラットに経口投与して、腎不全ラットを作製した。

1)この腎不全ラットに五苓散を投与して、血中炎症性サイトカインの濃度からその抗炎症効果を検証した。

2) 同じくこの腎不全ラットの血中の活性酸素を調べた。

C. 研究結果

1) in vitro study: アデニン刺激での培養細胞空におけるMCP-1 放出に対する五苓散の効果

ラット尿細管上皮細胞 NRK-52E に対し、結晶化アデニン刺激し MCP-1 の放出を測定した。結果、72 時間刺激にて五苓散同時投与および 3 時間後投与双方で有意に MCP-1 の放出が抑制された。(\*p<0.05, \*\*p<0.01)(図2)。

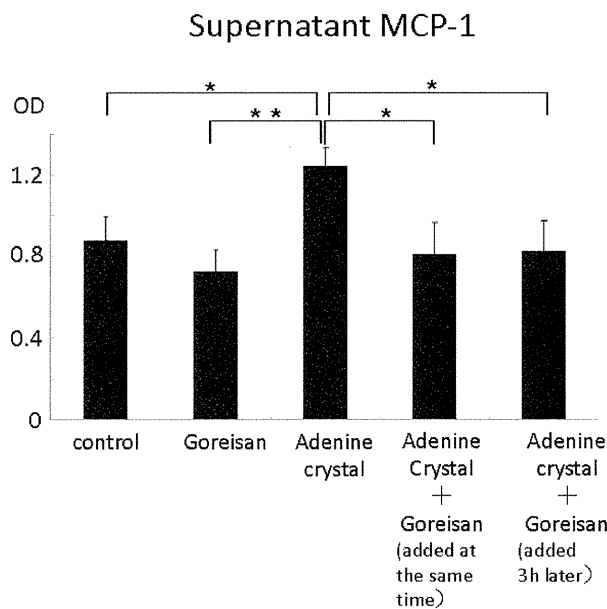


図 2

2) in vivo study: アデニン投与実験的腎不全ラットにおける五苓散の効果(図3)

①血中、尿中の MCP-1

これは前年度に報告したとおり、再現性のある結果で、腎炎群と比較し、血中、尿中 MCP-1 上昇は抑制傾向であった。(\*p<0.05)

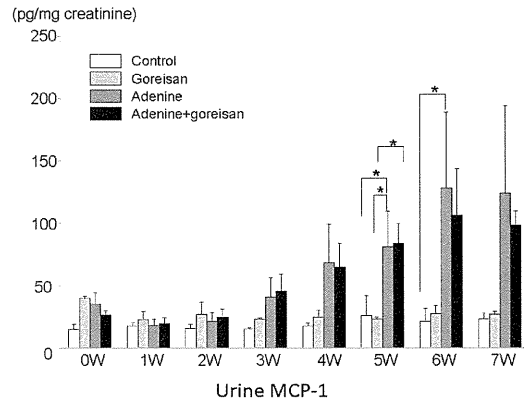
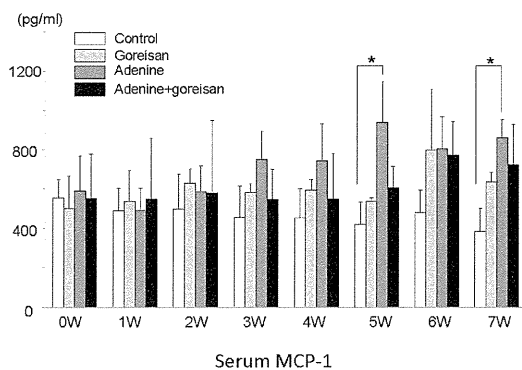


図 3. 血中 (上)、尿中(下)の MCP-1 濃度

D. 考察

五苓散は、DAMPs の一つと考えられるアデニン結晶沈着による慢性腎炎ラットの血中、尿中 MCP-1 を抑制した。これまでの結果から、五苓散は図4のように DAMPs からのシグナルを抑制して、結果的にインフラマソーム活性化を制御して緩徐に自然放出抑制が考えられた(図4)。

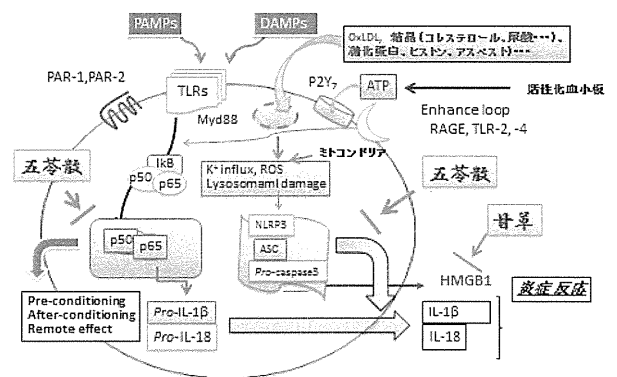


図 4. 漢方薬による PAMPs/DAMPs シグナリング 介在性自然炎症の制御とその作用点

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## II. 分担研究報告

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)  
分担研究報告書

分担課題:漢方薬の各構成生薬の薬効と相互作用の解析

研究分担者 丸山征郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究要旨

メタボリック症候群(動脈硬化、肥満、高血圧、糖尿病など)の病理的基盤に“くすぶった炎症”が存在することが判明してきたことは最近の大きな進歩である。このくすぶった炎症は“自然炎症”ないし、内因性炎症、parainflammation などと呼ばれており、その制御は大きな課題である。一方、加齢にもまた上記炎症が介在することが判明してきた。

翻ってみると、本邦ではメタボリック症候群の高齢者が増加しつつあり、これらの年齢層では、さらに自然炎症のプロセスの制御が重要となってくる。

本研究では、この自然炎症に最新の炎症理論:【PAMPs, DAMPs →NF- $\kappa$ B + inflammasome 理論】がどのように関連するか、そしてそれに対して漢方薬は有効であるのか否かを検討することである。

結果として、もちろん現代西洋医学の抗炎症剤のように劇的に炎症を制御するのではなく、緩徐に、緩和に炎症を抑制する生薬があることを明らかにすることができた。

A. 研究目的

1. 自然炎症に DAMPs, PAMPs はどのように関係するか
2. 自然炎症に漢方薬は有効か?  
以上の2点を明らかにすることを目的として研究する。

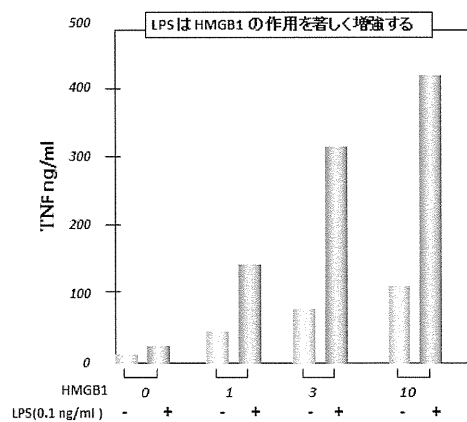
B. 研究方法

1. 代表的 DAMPs として位置づけられている HMGB1(High Mobility Group Box-1 Protein) と代表的 PAMPs である LPS(Lipopolysaccharide、エンドトキシン)でマクロファージ系細胞を刺激して、TNF $\alpha$ 、HMGB1、IL-1 $\beta$ 、IL-18 の産生、を調べた。TNF $\alpha$  は NF- $\kappa$ B 活性化の、IL-1 $\beta$ 、IL-18 は NF- $\kappa$ B 活性化に加えて inflammasome の活性化の指標とした。測定はそれぞれ ELISA 測定キットを使用した。
2. 人参養栄湯をメタボリック症候群の高齢者に使用する漢方薬として選び、その効果を調べた。(倫理面への配慮)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の倫理審査委員会、動物実験指針の基準に従い、その認可のもとに実験を行った。

C. 研究結果

1. 代表的 DAMPs は容量依存性にマクロファージからの TNF $\alpha$  産生、放出を促進した。しかるにその効果は、代表的 PAMPs である LPS によって著しく促進された(図1)。



2. 人参養栄湯は NF- $\kappa$ B 活性化を抑制した。これは人参養栄湯を構成する全ての生薬:地黄、当帰、白朮、茯苓、人参、桂皮、遠志、芍薬、陳皮、黄耆、甘草、五味子の全てにあるわけではなく、その中の1生薬に回収された。そしてこの生薬のなかのまたある特定の単糖に活性があることが判明した。しかし、その活性は弱かったことが

ら、他の生薬、あるいはその中の成分(脂肪酸、あるいは糖など)によって活性が増幅されるものと考えられた。

#### D. 考察

PAMPs あるいは DAMPs 単独では炎症惹起活性は弱く、双方からのシグナルによって強い炎症がおきるものと考えられる。したがって単独の刺激では、いわばくすぶった炎症、いわゆる自然炎症(parainflammation)の段階で留まるものと考えられる。

今回実験に選んだ人参養栄湯は、このうち PAMPs からのシグナルと DAMPs からのシグナルを制御することが示された。

このことから、人参養栄湯はメタボリック症候群の高齢者の病理基盤である自然炎症を緩やかに抑制する可能性があるものと考えられる。

#### E. 結果

漢方薬のなかには自然炎症を制御する活性を持つものがある。人参養栄湯はそのうちの一つであり、これは PAMPs, DAMPs からのシグナルの抑制である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

第64回東洋医学会学術総会会頭講演にて発表  
予定

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得(申請予定)

Inflammasome 抑制活性を有する単糖による炎症の制御



平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)  
分担研究報告書

分担課題: 漢方薬によって活性化される PPARs の転写非依存性経路の研究

研究分担者 伊藤 隆史 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任講師

### 研究要旨

メタボリック症候群は脳梗塞や心筋梗塞などの重篤な血栓症の準備段階と考えられ、慢性持続性の病態であることから、東洋医学的アプローチによる介入が望まれている。本研究において、食薬の抗血栓作用を検討した結果、涼寒性食品に分類される食品の中に、抗血栓作用を有するものを同定した。また、無核の血小板中に核内受容体として知られる PPARs が豊富に含まれていることが判明した。食薬由来成分が PPARs を介して転写非依存性に抗血栓作用を発揮している可能性を調べたが、少なくとも血小板凝集抑制作用に関しては、PPARs の関与は認められなかった。また、次年度の研究に向けた予備実験として、メタボリック症候群モデル動物の血液を、新規開発の血栓形成能解析装置で調べたところ、血栓形成能が通常の動物よりも亢進していることが判明した。次年度は、抗血栓性の涼寒性食品成分を摂取させた際に、メタボリック症候群ラットの血栓傾向が是正されるかどうかを検討するとともに、その分子細胞メカニズムとしての血小板ならびに白血球の役割を解析する予定である。

### A. 研究目的

メタボリック症候群は心筋梗塞や脳梗塞などの重篤な血栓症の病態基盤であり、慢性のくすぶり型の病態であることから、東洋医学的アプローチによる介入が望まれている。我々は、平成23年度の研究で、涼寒性食品に分類される食品の中に、抗血栓作用を有するものを同定したため、本年度はその作用機序の検討を行うとともに、次年度の研究の予備検討として、メタボリック症候群動物モデルでの血栓形成能の解析を行う。

### B. 研究方法

抗血栓性の涼寒性食品成分の作用機序として、血小板の PPARs を介した転写非依存性経路の関与を考え、PPAR  $\alpha$  の選択的阻害剤 (GW6471) ならびに PPAR  $\gamma$  の選択的阻害剤 (GW9662) を添加して血小板凝集能を調べた。また、次年度の研究の予備検討として、新規開発のリアルタイム血栓モニタリングシステム (T-TAS) を用い、高血圧ラット、高脂肪食摂取マウス、マイクロミニブタの血栓形成能を検討した。

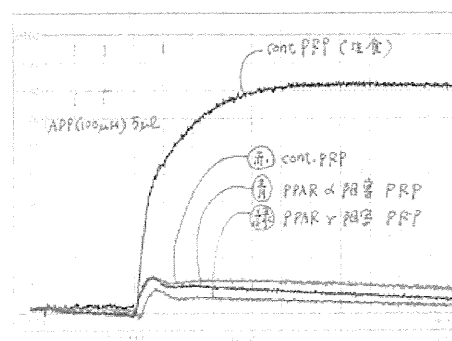
### (倫理面への配慮)

ヒトの血液を用いた研究は、鹿児島大学臨床

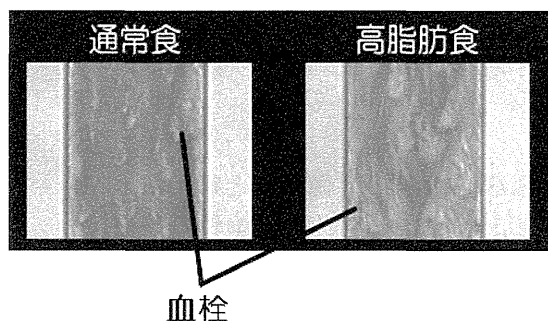
研究倫理委員会の承認を得たうえで行った。書面にてインフォームドコンセントを得たうえで、提供者に不利益が生じないよう十分配慮した。また、動物実験は、鹿児島大学の動物実験委員会の承認を得たうえで行った。

### C. 研究結果

多血小板血漿を ADP で刺激すると、血小板は凝集するが(下図黒線)、涼寒性食品を添加すると血小板凝集が抑制された(下図赤線)。GW6471 で処理した多血小板血漿(下図青線)でも、GW9662 で処理した多血小板血漿(下図緑線)でも、涼寒性食品成分の血小板凝集抑制作用は全くキャンセルされなかったため、この抗血小板作用は PPARs を介さない機序だと考えられた。



また、メタボリック症候群モデル動物の血栓形成能を T-TAS を用いて検討したところ、高脂肪食を摂取したマウスでは通常食を摂取したマウスに比べて血栓形成能が亢進していた(下図)。



高血圧ラットも同様で、正常血圧ラットと比べて血栓形成能が亢進していた。

#### D. 考察

メタボリック症候群患者に対して、西洋医学ではスタチンがよく処方される。スタチンは PPARs を介して抗血小板作用を発揮することが知られているが、涼寒性食品成分は PPARs 非依存性の経路で抗血小板作用を発揮することが確認された。現在、涼寒性食品成分のうち、抗血小板活性を有する分子を抽出して同定する作業を進めているところである。また、次年度の研究に向けた予備実験として、メタボリック症候群モデル動物の血液を、新規開発の血栓形成能解析装置で調べたところ、血栓形成能が通常の動物よりも亢進していることが判明した。次年度は、抗血栓性の涼寒性食品成分を摂取させた際に、メタボリック症候群ラットの血栓傾向が是正されるかどうかを検討するとともに、その分子細胞メカニズムとしての血小板ならびに白血球の役割を解析する予定である。

#### E. 結論

涼寒性食品成分には抗血栓作用が認められたが、これは西洋医学で用いられるスタチンとは異なり、PPARs 非依存性の作用機序であった。また、メタボリック症候群モデル動物では血栓形成能が亢進していることが確認され、次年度に向けて意義のある予備検討ができた。

#### F. 健康危険情報

当該研究に関わる人員に、健康被害は認められなかった。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
第 49 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会にて発表予定 (25 年 9 月 6 日-7 日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

分担課題: 生薬成分の分画化、純化とそれによる細胞刺激、シグナル伝達の解析

研究分担者 川原 幸一 大阪工業大学生命工学科・教授

#### 研究要旨

High Mobility Group Box-1 (HMGB1) は、本来は細胞の核内において、生命の維持に貢献している。最近、この HMGB1 が敗血症患者の血中から検出され、放出後は、RAGE や TLR-4 を介して炎症をさらに惹起させることが報告された。よって、この HMGB1 の放出を抑制することは、新規治療法の開発につながることを示唆される。本研究では、イチゴ抽出物を用いて、エンドキシン刺激による HMGB1 の放出が抑制出来ないかを目的とした。その結果、イチゴ抽出液は、HMGB1 放出を抑制出来た。

#### A. 研究目的

細胞の核に存在する High Mobility Group Box-1(以下 HMGB1 と略す)は、近年、細胞傷害、または、サイトカイン等で活性化された細胞より放出することが判明した。放出された HMGB1 は、サイトカインのように振舞い、敗血症、脳梗塞、歯周病などの治療のターゲットになっている。

ヘビイチゴは、生薬として使われてきた。ヘビイチゴと同様に、現在よく市販されているイチゴ成分中にも、アントシアニンなど抗炎症性成分が含まれている。そこで本研究では、イチゴ成分がエンドキシン刺激による HMGB1 の放出抑制を目的とした。

#### B. 研究方法

##### 【HMGB1 放出実験】

マウスマクロファージ様細胞の RAW264.7 細胞を用い、エンドキシン(最終濃度 100ng/ml)刺激を 16 時間行う。その後、培養上清を全量回収する。その培養上清にヘパリン-セファロースビーズ(GE 社)40ul を添加し、4℃にて 4 時間ローテートする。次に、そのヘパリン-セファロースビーズから HMGB1 を回収し、1 次抗体に抗 HMGB1 抗体を用いた。検出方法は、化学発光法を用いた。

##### 【HMGB1 放出抑制実験】

RAW264.7 細胞を用い、LPS を添加する前にイチゴ抽出液を加える。1 時間後、LPS を添加する。検出は、HMGB1 放出実験と同じ方法で行った。

#### 【HMGB1 放出抑制によるシグナル伝達の探索】

LPS 刺激、1 時間後の RAW264.7 細胞を回収しそのタンパク抽出物を用いた。1 次抗体に p42/44、JNK、p38MAPK のリン酸化抗体を用い活性を検出した。

#### C. 研究結果

LPS 刺激により RAW264.7 細胞から HMGB1 の放出を確認した。さらに、イチゴ抽出液は、HMGB1 放出抑制を行った。また、本実験の細胞内のシグナル伝達を確認した結果、LPS は、全ての MAPKs 系を活性化した。しかしながら、イチゴ抽出液は、どのシグナル伝達経路をも抑制出来たが、その阻害剤では全く抑制出来なかった。

#### D. 考察

本研究において、イチゴ抽出液中に HMGB1 放出抑制物質の存在が明らかになった。最近、イチゴ中のキシリトールが抗炎症作用を示している。しかしながら、キシリトールは、HMGB1 の放出を抑制出来なかった。おそらく、未知の HMGB1 の放出抑制物質が存在することが示唆された。キシリトールも含めさらなる研究が必要である。

シグナル伝達においては、MAPKs 系の活性化をイチゴ抽出液中は抑制したが、全く HMGB1 放出抑制とは関係性がなかった。さらに解析が必要である。

E. 結論

自然物質より、新規炎症性サイトカインである HMGB1 の放出抑制する物質の存在が明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

第35回日本分子生物学会

第85回日本生化学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)  
分担研究報告書

分担課題:漢方薬による血管機能回復への効果解析

研究分担者 橋口 照人 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・血管代謝病態解析学・教授

研究要旨

Burn out や vital exhaustion が心血管イベントの発症と関連のあることは国内外の報告において明らかである。また、過労死も若年に起こりうることから、これらの血管イベントは動脈硬化に至るプロセスとは異なる機序であることが予測される。疲労は身体的、精神的要素を包含した複雑な概念である。疲労の蓄積が血管イベントを含む疾患の布石となることは経験的に明らかであることから、疲労を客観的に捉える多くの試みがなされてきたが確立されるには至っていない。血管内皮機能は健常人における疲労(感)を感知するセンサーとして考えることが可能であり、血管内皮機能の評価は疲労(感)の客観的指標となりうることが示唆される。

A. 研究目的

血管内皮機能を低下させる要因には動脈硬化に至るプロセス以外に日常生活における環境要因が存在すると思われる。本研究では血管内皮機能の評価が疲労(感)の客観的指標になり得ることを示すことを目的とした。

B. 研究方法

Flow Mediated Dilatation (以下 FMD)のコンセプトを踏襲して開発された Peripheral Arterial Tonometry (End-PAT2000, Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel) による血管(内皮)機能検査を健常人労働者 74 名を対象に施行した。

(倫理面への配慮)

臨床研究倫理審査の了承のもとに行われた。

C. 研究結果・考察

健康診断にて異常を認めなかった健常人を対象としたため、血管内皮機能の正常群と異常群の比較において一般的な動脈硬化の危険因子(脂質など)においてはどの項目においても有意差を認めなかった。また日常労働の前後においても血管内皮機能に有意差を見出すことは出来なかった。しかし個々人の疲労(感)の程度で群分けすることにより血管内皮機能に有意差を認めた。血管内皮機能を低下させる要因には動脈硬化に至るプロセス以外に日常生活における環

境要因(疲労感)が存在することが示唆された。また、血管内皮機能の評価は疲労(感)の客観的指標になり得ると考えられた。

E. 結論

- ① 血管機能は健常人においても多様性を有する。
- ② 血管機能は日内変動を有する。
- ③ 日常生活レベルにおける疲労(感)も血管機能に影響を与える。
- ④ 血管内皮機能の評価は疲労(感)の客観的指標となり得る可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表  
平成 24 年度の発表はなし。
2. 学会発表  
平成 24 年度の発表はなし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 分担課題: 腎炎ラットにおける漢方薬の治療効果と作用機序の解明

研究分担者 大山 陽子・鹿児島大学医学部歯学部附属病院検査部・特任助教

### 研究要旨

五苓散は、体内の水分調節作用により症状を改善する漢方薬として広く使われ、腎疾患では腎炎やネフローゼ症候群などに用いられている。経験的に使われている五苓散の腎炎における分子生物学的な作用機序について、我々は昨年度に引き続き慢性腎炎を引き起こす結晶誘発腎肉芽腫モデルを用い検討した。結果、五苓散が炎症腎における組織内活性酸素を有意に低下させることを確認した。五苓散は慢性腎炎においてラディカルスカベンジャー作用をもつ可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々はアデニンを経口投与することで、腎臓に難溶性の 2,8-dihydroxyadenine (2,8-DHA) 結晶を誘発させ、慢性腎炎を引き起こす結晶誘発性肉芽腫モデルにおいて、炎症の程度と比例して濃度依存性に血中活性酸素量が上昇することを明らかにしている。今回、我々は本モデルに五苓散を投与し、活性酸素を指標に慢性腎炎へ与える影響を検討した。

### B. 研究方法

結晶誘発性腎炎ラットを用い、コントロール群、五苓散投与群、腎炎群、腎炎+五苓散投与群の 4 群に分け 2 週間観察、尿中、および腎組織内の活性酸素量を測定した。腎組織に関しては、腎組織ライセート中の活性酸素量を測定し、蛋白量当たりで換算した。測定系としては非蛍光型 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) が活性酸素により蛍光型 2', 7'

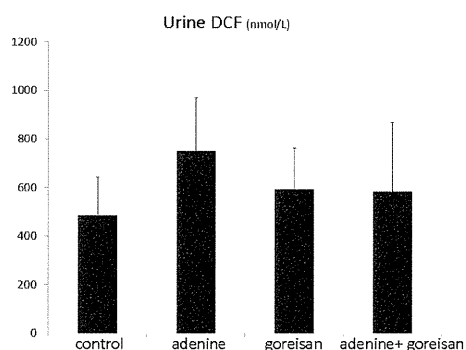
-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) へ変換されるシステムを利用した。

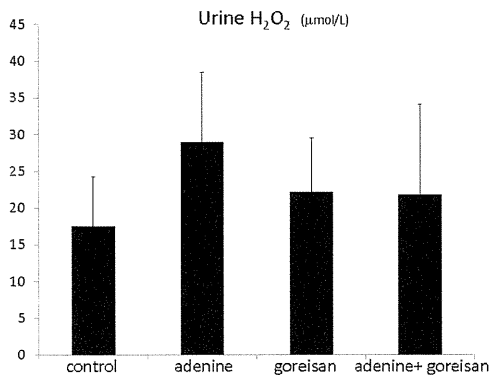
(倫理面への配慮)

本研究は鹿児島大学動物実験委員会にて承認されている。

### C. 研究結果

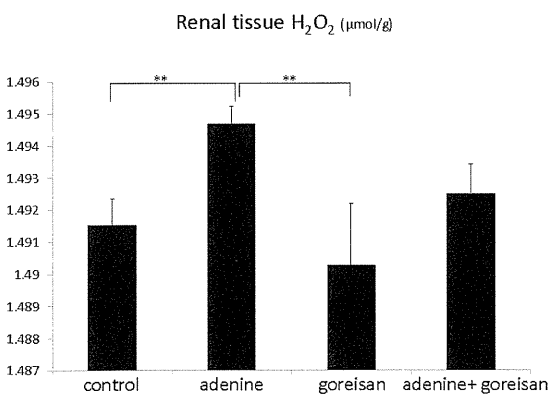
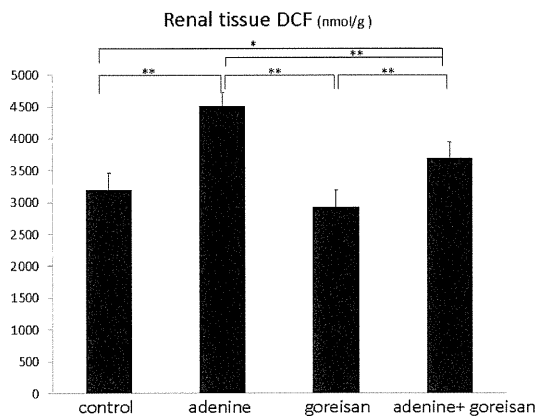
腎炎群と比較し、腎炎+五苓散投与群での尿中活性酸素は抑制傾向であった。





また腎組織内活性酸素量は腎炎群と比較し、腎炎+五苓散投与群で有意に減少した。

(\*p<0.05、\*\*p<0.01)



#### D. 考察

五苓散は、慢性腎炎ラットの尿中、腎組織中活性酸素量の上昇を抑制する傾向にあり、腎炎においてラディカルスカベンジャ-作用を持つ可

能性が示唆された。尿に関してはラット間での数値のバラつきが大きく、有意差を示すまでには至らなかったが、腎組織においては、五苓散は腎炎モデルラットにおける活性酸素量を有意に減少させた。

#### E. 結論

五苓散は慢性腎不全動物モデルにおいてラジカルスカベンジャ-作用をもつ可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

