

201307006A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 丸山 征郎

平成26（2014）年3月

目 次

I. 総括研究報告		
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		
鹿児島大学・丸山征郎	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 漢方薬の各構成生薬の薬効と相互作用の解析		
鹿児島大学・丸山征郎	-----	5
2. 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		
鹿児島大学・伊藤隆史	-----	7
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	-----	11
4. 漢方薬による血管機能回復への効果解析		
鹿児島大学・橋口照人	-----	13
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	-----	15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		
	-----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷		
	-----	19

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

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

研究代表者 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の病態の基盤には“自然炎症”が存在すること、そしてこの自然炎症こそが、メタボリック症候群の臓器合併症（動脈硬化・血栓症、腎症など）の原因であることが解明されてきて、“自然炎症の発症機構とその制御”は緊急の課題となってきた。本研究では、メタボリック症候群で、①自然炎症が惹起される仕組み、②自然炎症を制御する手段として、伝統的に東洋で使われてきている漢方薬、あるいは植物、食品を選び、漢方薬構成生薬の抗自然炎症活性を吟味して、その作用機序を調べた。そして、これらの結果を踏まえ、③自然炎症制御薬としての漢方薬、生薬、食品、などの可能性を検証した。

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

研究分担者 川原 幸一 大阪工業大学生命工学科・教授

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・教授

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

A. 研究目的

「過剰な炎症」の制御は、生物学的製剤、具体的には TNF α 、IL-6、IL-1 β など炎症性サイトカインとその受容体に対する抗体や阻害剤の開発で可能となって来つつある。しかしメタボリック症候群の病態基盤をなす自然炎症（parainflammation）は、慢性、緩徐に進行し、動脈や腎などを標的として、動脈硬化・血栓症、腎症などを引き起こすので、上記生物学的治療の標的とならず、新しいストラテジーによる新規治療法の開発が求められている。そこでその手段の一つとして、申請者らは、生薬による自然炎症の制御の可能性について研究することを目的として研究を重ねてきた。

B. 研究方法

1. 生薬、食品中の抗自然炎症活性の検証

1) 精製 1,5-AF（生薬：遠志中に含まれている）の抗自然炎症活性を培養細胞とマウスを使った実験で行った。

① *in vitro* 試験：培養ラット腹腔マクロファージを各種濃度の 1,5-AF 存在下で、エン

ドトキシン（LPS）と ATP、あるいはその他の DAMPs/PAMPs で刺激し、上清中の IL-1 β 、TNF α 、HMGB1 を ELISA で測定した。

② *in vivo* 実験：LPS 腹腔内投与前後で、1,5-AF を同じく腹腔内投与して生存率を調べた。

2) 1,5-AF の抗自然炎症活性の作用メカニズムの解析：1,5-AF に抗自然炎症活性を *in vitro*、*in vivo* 双方で認めたので、その分子機序を明らかにする目的で、免疫プロット法でインフラマソームの挙動を解析した。

2. 食品中の自然炎症惹起分子の同定とその炎症惹起の分子細胞機構

1) 各種日本産イチゴの素分画、HPLC で高度に分画した成分について、その血小板活性化抑制作用、HO-1 発現誘導活性を調べた。血小板は周知のごとく、炎症性プロスタグランジン産生細胞であるからである。

2) 食品によるメタボリック症候群の発症機構を明らかにする目的で、パルミチン酸の pro-inflammatory, pro-coagulant 活性

とその分子細胞機構について解析した。

3. 血管代謝系と糖代謝のクロストークの研究
炎症の慢性化を血管—血管新生因子—糖代
アデニン投与による慢性腎不全ラットを作
製し、五苓散の効果とその分子細胞機構に
ついて解析した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は学内倫理委員会の認可のも
と施行した。

C. 研究結果

1. 遠志に含まれる 1,5-AF には抗炎症活性が
あり、それは 1,5-AF のインフラマソーム抑制
による。

in vitro, *in vivo* 双方の実験系で 1,5-AF には
抗炎症活性があることを証明した。これは
1,5-AF によるインフラマソーム活性の抑制の
結果であること証明しえた。また 1,5-AF はエン
ドトキシンによる敗血症モデルマウスにお
いて、救命的效果を示すとともに、多臓器不全
を軽減した。

2. すでにイチゴ中に発見していた抗血小板活
性に加えて、HO-1 誘導活性の存在を発見した。
誘導された HO-1 は各種ラディカル、酸化スト
レス活性を発揮するもの考えられる。

3. 食品中のメタボリック症候群惹起分子の同
定とその作用の解析

高脂肪食は内臓脂肪蓄積を介して、動脈硬
化・血栓症を引き起こすことは周知であるが、
今回の研究では、パルミチン酸が直接マクロフ
ァージ系細胞に TLR-2 を介して作用し、ヒス
トンや HMGB-1, 組織因子の発現を引き起こす
ことを照明した。これはパルミチン酸が内臓肥
満というステップを経ずに、直接炎症や血栓症
をひき起こすことを示すものと考えられた。

4. 五苓散の抗炎症活性

先に申請者らは、アデニン投与腎不全ラットの
作製に成功しているが、このラットに五苓散
を投与してその活性を検討した。結果、五苓散
は腎炎の軽減化（組織像, HMGB1 蓄積、尿量、
尿中ラディカル排泄など）の傾向が観られた。

また、腎組織中の HMGB1 を解析したところ、よ
り活性の弱い部分酸化型があることを観察し
た。

D. 考察

メタボリック症候群の病態の基盤をなすの
は、緩徐なしかし持続する炎症であることは明
らかになっている。この炎症は古典的な紅腫熱
疼を伴う急性炎症とは異なり、内皮細胞や上皮
細胞を炎症の場とし、紅腫熱疼ではなく、バリ
ア—の障害、線維芽細胞の遊走や、HMGB1 やヒ
ストンなど DAMPs の産生・放出を主体とした緩
徐な炎症であることから、自然炎症とも呼ばれ
る。この自然炎症は、急性の古典的な炎症とは
異なり、いわゆる生物学的製剤の対象とはなら
ず、新規の治療法が待たれている。その理由は、
生物学的製剤が高価で、注射薬であること、感
染症などの重篤な副作用をも来たす危険性が
あるからである。

これらのことから我々は、自然炎症に対し、
伝統的な漢方薬で対処する可能性を模索した。
結果、遠志に抗炎症活性があること、それは遠
志中の 1,5-AF によることを見出した。そ
の細胞分子機構として、1,5-AF がインフ
ラマソーム阻害に基づくものであることを見
出した。

またイチゴのなかにも HO-1 の誘導を引き起
こす作用があり、これによって、ラディカル制
御活性を発現することも証明しえた。この本態
分子は現在分離中である。

さらにメタボリック症候群の中心病態であ
る血栓傾向、炎症傾向を、内臓脂肪蓄積を介せ
ず、直接脂肪分のなかのパルミチン酸が引き起
こすことを明らかにしたが、これはメタボリ
ック症候群発症機構の新側面を明らかにした
ものと考えられる。

自然炎症をコントロールしうる薬剤として
漢方薬中の五苓散に着目して検討したところ、
本漢方薬がアデニン誘発実験腎炎において、確
かに腎臓の炎症を軽減すること、それは腎組織
中のラディカル消去、HMGB1 の蓄積軽減な
ど、HMGB1 の量的、質的作用（分子修飾、
すなわち部分酸化型）のよることを明らかにし
たが、これは今後の生薬中の抗炎症活性を評価
する際の大きな視点になるものと考えられる。

また ectopic な部位と細胞からの VEGF-A がラ氏島外の ectopic な部位の β 細胞からのインスリン分泌性に作用することを見出したが、その病理的ないし治療標的としての意義は今後の問題であろう。

E. 結論

緩徐進行性の自然炎症の治療方策の一つとして食品や生薬は十分に評価に耐える可能性があることが示された。

特に遠志中の 1,5-AF の抗炎症活性の発見とその標的の解明は、今後に大きな期待を抱かせるものといえる。また食品中のパルミチン酸が DAMPs として作用する可能性を指摘したが、これはメタボリック症候群を防ぐ、あるいは回避するという食生活という視点からも、重要な発見であった。一方、メタボリック症候群で発生するラディカルを食品や漢方薬で制御しうる可能性とその展望が見えてきた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shrestha C, Ito T, Kawahara KI, Shrestha B, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Maruyama I: Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: A possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 437, 573-578, 2013.

Sarikaphuti A, Nararatwanchai T, Hashiguchi T, Ito T, Thaworanunta S, Kikuchi K, Oyama Y, Maruyama I, Tancharoen S: Preventive effects of *Morus alba* L. anthocyanins on diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Exp Ther Med*, 6, 689-695, 2013.

丸山 征郎「炎症のトポロジーへの血球関与のスペクトラム」別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患、丸山 征郎 編集、北隆館、9-13 頁、2013 年

伊藤 隆史「PAMPs /DAMPs のセンサー細胞としてのマクロファージ・樹状細胞」別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患、丸山 征郎 編集、北隆館、84-89 頁、2013 年

Takenouchi K, Shrestha B, Yamakuchi M, Yoshinaga N, Arimura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Feil R, Kawahara KI, Sakamoto T, Maruyama I, Hashiguchi T: Upregulation of non- β Cell-derived Vascular Endothelial Growth Factor A Increases Small Clusters of Insulin producing Cells in the Pancreas. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2014. in press

伊藤 隆史「メタボリックストレスと自然炎症」*Thrombosis Medicine*、第 4 巻、第 2 号、52-55 頁、2014 年

丸山 征郎「東洋医学における血管観」*血管医学*、第 15 巻、第 1 号、87-91 頁、2014 年

丸山 征郎「生体のシステムから観た漢方の有効性とその作用機序」*日本東洋医学会専門医会誌 (DVD)*、2014 年

丸山 征郎「より大いなるヒトの生存の原理と戦略を俯瞰する -漢方薬の論理と効果-」*Kampo Square*, 2014 年 印刷中

2. 学会発表

伊藤 隆史、第 36 回 日本血栓止血学会学術集会にて発表予定 (平成 26 年 5 月 29~31 日)

大山 陽子、第 65 回 日本東洋医学会学術集会総会にて発表予定 (平成 26 年 6 月 27~29 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1, 5-AF の抗炎症性に関しては国内、国外出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

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（以下メタボ）は、その基盤に「自然炎症」が介在する。この自然炎症は獲得免疫に先行する自然免疫系の中核をなし、抗体（液性、細胞性）に依存しない非特異的免疫反応であるが、バリアー障害に伴い、“侵襲のその場で緊急誘導される防御系”である。最近になり、メタボリック症候群の各臓器障害（腎臓、血管など）の発症にこの自然炎症が関係することが判明してきた。

本研究の目的はメタボの基盤をなすこの自然炎症を漢方薬で制御するという方策の確立である。結果として明らかにしえたことは、生薬のうち数種がこの自然炎症に効果あること、特に生薬“遠志”中の 1,5-anhydrofructose が抗炎症作用を示すこと、その作用機序を明らかにしえた。

A. 研究目的

遠志のなかに含まれる

1,5-anhydrofructose (1,5-AF) の生理活性について、

1. 生体内での代謝とその経路、
 2. 1,5-AF の生理活性、
 3. “遠志”含有の漢方薬の薬効と臓器志向性について、
- それぞれ解明することである。

B. 研究方法

1. 遠志、1,5-AF をボランティアが経口服用し、尿中、血中の 1,5-AF とその代謝産物の経時的ダイナミズムについて、主として HPLC を用いて解析する。

2. 1,5-AF の生理活性

- ① *in vivo*: 上記服用したヒト血液の代謝系の解析（糖代謝、血栓形成能の定量と観測）
- ② ラット、マウスへの投与実験（腹腔内）エンドトキシンを投与して、死亡率と臓器病理所見の評価
- ③ *in vitro*: ラット、マウス腹腔内マクロファージ、骨髄単核球をエンドトキシン（LPS）± 1,5-AF で培養し、上清中の IL-1 β を測定して、1,5-AF の効果を評価

（倫理面への配慮）

すべて本大学の倫理委員会の認可のもとに実験を実施した。

C. 研究結果

1. 1,5-AF の生体内代謝

1,5-AF を経口摂取すると速やかに吸収されて、血中に 1,5-AG となった。すなわち、経口摂取した 1,5-AF の血中濃度は摂取後 2 時間でピークとなり、以後減少し、4 時間後に 0 となった。

2. 循環血中、並びに肝臓で速やかな 1,5-AF \Rightarrow 1,5-AG 代謝が起きていることが、血清、培養細胞レベルで示されたが、脾臓細胞ではほとんど代謝されなかった。

3. 1,5-AF 抗炎症活性

① LPS でプライミングした培養ラット樹状細胞を DAMPs (ATP), PAMPs で刺激し、1,5-AF の効果を解析したところ、1,5-AF は濃度依存性に IL-1 β の産生放出を抑制した。1,5-AF は濃度依存性に抑制した。

② 同様、HMGB1 の産生、放出も抑制した。

4. 1,5-AF の全身性炎症抑制作用

LPS による全身炎症とそれに引き続くショック死を 1,5-AF は濃度依存性に抑制した。

D. 考察

なし

漢方薬の効果の一つに緩徐な抗炎症活性がある。今回の検討で、遠志中の 1,5-AF が *in vitro* のみならず *in vivo* でも抗炎症活性を示すことが明らかとなった。

3. その他
なし

自然炎症は生体内修飾代謝産物 (AGE:

Advanced Glycation Endproducts や酸化変性 L D L など) などの DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) や、生体内組織細胞の障害によって生成される HMGB1 などが TLRs に作用して惹起される。この緩徐で、しかし遷延する炎症の制御はメタボリック症候群や加齢における臓器障害に対する極めて重要な治療戦略であるが、今回、生薬のなかに、この自然炎症を抑制する分子が同定されたことはメタボリック症候群などの自然炎症制御の武器の一つに漢方薬を選択しうることを示唆しており、今後さらに研究を持続発展させてゆきたい。

E. 結論

遠志中の 1,5-AF に自然炎症抑制活性があることを *in vitro* のみならず、*in vivo* の実験系で証明した。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shrestha C¹, Ito T, Kawahara K, Shrestha B, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Maruyama I.. Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: a possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis. Biophys Biochim Res Commun. 2013 Aug 9;437(4):573-8.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 国内、国際特許出願中

2. 実用新案登録

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の病態基盤として、自然炎症が関与していることが明らかになりつつある。高尿酸、高血糖、高コレステロール、高中性脂肪などのメタボリックストレス環境下では、これに適応しようとした細胞が少量の炎症性サイトカインを分泌し、これが関節、膵臓、脂肪組織、血管などに自然炎症を引き起こす。我々は平成 23 年度から 25 年度にかけての研究において、高脂肪食の摂取もしくは飽和脂肪酸の負荷により、マクロファージの細胞内で活性酸素種が増加し、これによって核内タンパク質ヒストンが細胞外に放出されうることを明らかにした。細胞外に放出されたヒストンは、damage-associated molecular patterns (DAMPs) として作用し、血管内皮細胞などの周囲の細胞を活性化して、炎症性変化や血栓形成を助長しうる。これがメタボリックストレス下での自然炎症や血栓症の病態基盤となっている可能性が示唆された。また、自然炎症、それに伴う耐糖能異常、血栓症を改善しうる食品、生薬を探索するなかで、涼寒性食品に分類される食品の中に、このような作用を有するものを同定した。糖尿病肥満モデルラットに、この涼寒性食品成分を摂取させると、耐糖能異常の改善傾向を認め、また、糖尿病性腎症の一つである尿中へのアルブミンの漏出についても、軽減傾向を認めた。これらの抗糖尿病作用の一部は、抗糖尿病薬ピオグリタゾンと同様に、核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) を介した作用である可能性が示唆された。このように、本研究を通じて、メタボリック症候群の病態基盤として、DAMPs が関与している可能性が示され、また、食品由来成分を摂取することにより、メタボリック症候群の病態を軽減できる可能性が示された。

A. 研究目的

メタボリックストレス下での自然炎症や血栓症の分子細胞メカニズムを明らかにする。また、このような病態に対して、東洋医学的アプローチでの病態改善が望めるかどうか検討する。

B. 研究方法

マクロファージ系 cell line の RAW 264.7 細胞を飽和脂肪酸パルミチン酸で刺激した際に細胞外に分泌される分子を解析した。また、その結果パルミチン酸の濃度依存性に細胞外に放出されていたヒストン H3 の免疫細胞化学的検討を行った。また、ヒストン H3 の細胞外放出に関わる細胞内シグナル伝達の解析を行っ

た。さらには、細胞外に放出されたヒストンが血管内皮細胞に及ぼす遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR 法により解析した。過食により肥満・糖尿病を自然発症するラット ZDF/Cr1Cr1j-leprfa/Leprfa を用い、6 週齢より涼寒性食品成分を約 3 g/kgBW/day 摂取させた。耐糖能異常を調べるため、糖尿病初期と考えられる 9 週齢において、1.5 g/kg のブドウ糖腹腔内負荷試験を行った。また、糖尿病性腎症の合併を調べるため、糖尿病が進行した 16 週齢において、24 時間蓄尿検体における尿中アルブミン定量検査を行った。また、6, 9, 12, 15, 18 週齢において、クエン酸で凝固した全血サンプルを採取し、血流下血栓形成能診断システム (T-TAS) を用いて、血栓傾

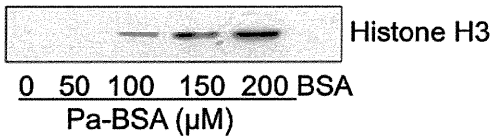
向の解析を行った。

(倫理面への配慮)

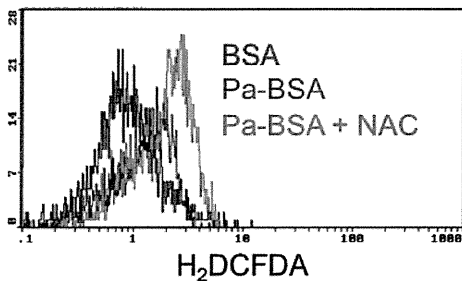
動物実験は、鹿児島大学の動物実験委員会の承認を得たうえで行った。

C. 研究結果

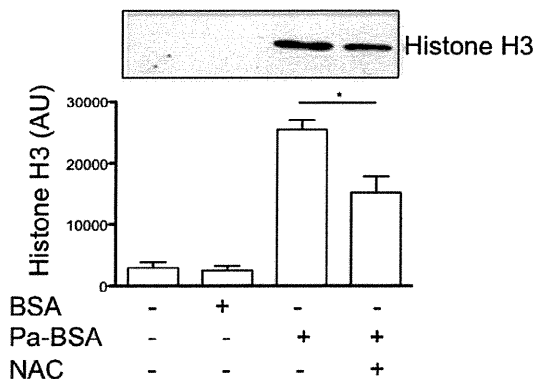
マクロファージ系 cell line の RAW 264.7 細胞をパルミチン酸 (Pa-BSA) で刺激すると、パルミチン酸の濃度依存性に核内タンパク質ヒストン H3 が細胞外へと放出された (下図)。



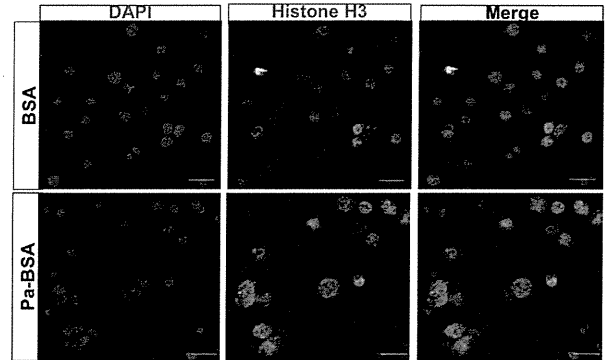
このパルミチン酸刺激に伴い、RAW 264.7 細胞内では H₂DCFDA 蛍光が増強し、細胞内で活性酸素種が増加していると考えられた (下図)。



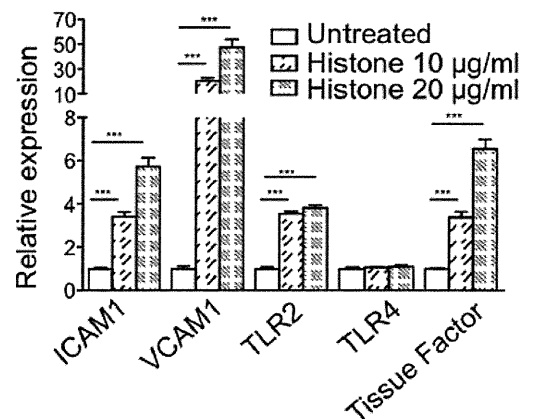
さらに、抗酸化剤の一種である N-アセチルシステイン (NAC) を用いて活性酸素種の作用を抑制すると、ヒストン H3 の細胞外への放出が減少したことから、パルミチン酸刺激に伴うヒストン H3 の細胞外への放出のメカニズムとして、活性酸素種が関わっていることが示唆された (下図)。



次に、免疫細胞化学的検討を行ったところ、パルミチン酸刺激に伴い、ヒストン H3 が核内から細胞質へと移行している像が確認された (下図)。この細胞質へと移行したヒストン H3 が、その後、細胞外へと放出されているのではないかと考えられる。

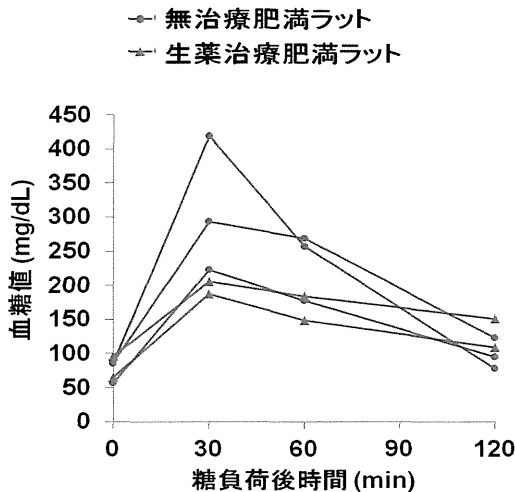


マクロファージ系の細胞から放出されたヒストンは、血管内皮細胞などの周囲の細胞に働きかけると、炎症性的変化や易血栓性的変化を引き起こす。ヒト臍帯静脈内皮細胞をヒストンで刺激すると、下図のように、接着因子 ICAM-1 や VCAM-1 の発現が数倍から数十倍にまで増加し、また、凝固反応の引き金となる tissue factor の発現も数倍に増加する。



我々は、平成24年度までの研究において、涼寒性食品の成分が、血小板凝集を抑制すること、抗糖尿病薬ピオグリタゾンと同様に核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) を活性化することを明らかにしてきた。本年度はその効果を *in vivo* で検討するため、過食により肥満・糖尿病を自然発症するラット ZDF/Cr1Crlj-leprfa/Leprfa に、6 週齢より涼寒性食品成分を約 3 g/kgBW/day 摂取させた。涼寒性食品成分を摂

取させたラットでは、糖尿病初期と考えられる9週齢でのブドウ糖腹腔内負荷試験において、下図のように、ブドウ糖負荷30分後の血糖のピークが抑制される傾向にあった。しかしながら、涼寒性食品成分が有効な個体とそうでない個体があり、全体としては有意な改善効果を示すには至らなかった。



また、糖尿病性腎症の合併を調べるため、糖尿病が進行した16週齢において、24時間蓄尿検体での尿中アルブミン定量検査を行ったところ、ブドウ糖負荷試験において涼寒性食品成分が有効で、血糖のピークを抑制できたラットについては、尿中へのアルブミンの漏出も少なく、糖尿病性腎症の進行を抑制していると考えられた。一方、血糖のピークを抑制できていないラットについては、尿中へのアルブミンの漏出も改善することができなかった。

T-TASを用いた血栓形成能の解析では、今回用いた肥満・糖尿病ラットは痩せ型コントロールラットと比較して血栓形成能の亢進状態を確認することができなかったため、涼寒性食品成分を摂取することによる改善効果の評価することはできなかった。しかしながら、少なくとも、涼寒性食品成分を摂取しても、血栓形成能が大きく低下したり亢進したりすることはなかった。

D. 考察

平成25年度の研究では、メタボリック症候群における自然炎症や血栓症の分子細胞メカニズムを明らかにすべく、*in vitro*ならびに*in vivo*の検討を行った。その結果、高脂肪食の摂取もしくは飽和脂肪酸の負荷により、マク

ロファージ系の細胞から核内タンパク質ヒストンが細胞外へと放出され、これが damage-associated molecular patterns (DAMPs) として作用し、血管内皮細胞などの周囲の細胞を活性化して、炎症性変化や血栓形成を助長し、メタボリックストレス下での自然炎症や血栓症の病態基盤となっている可能性が示唆された。涼寒性食品成分を摂取させることによって、メタボリック症候群ラットの病態は改善する傾向にあったが、この涼寒性食品成分の効果が、ヒストンの細胞外への放出を抑制することによるのかどうかは現在検討中である。

E. 結論

メタボリックストレスを受けた細胞からは、核内タンパク質ヒストンが細胞外へと放出され、これが自然炎症や血栓症の誘因となり、メタボリック症候群の病態を形成している可能性が示唆された。また、涼寒性食品成分はこの病態を軽減する可能性が示唆された。涼寒性食品成分の作用メカニズムについては、今後も解析を続けていく予定である。

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

- Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: A possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis. Shrestha C, Ito T, Kawahara KI, Shrestha B, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Maruyama I. *Biochem Biophys Res Commun.* 437: 573-578 (2013).
- Preventive effects of *Morus alba* L. anthocyanins on diabetes in Zucker diabetic fatty rats. Sarikaphuti A, Nararatwanchai T, Hashiguchi T, Ito T, Thaworanunta S, Kikuchi K, Oyama Y, Maruyama I, Tancharoen S. *Exp Ther Med.* 6: 689-695 (2013).

- 伊藤 隆史「PAMP s /DAMP s のセンサー細胞としてのマクロファージ・樹状細胞」別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患、丸山 征郎 編集、北隆館、84-89 頁、2013 年
- 伊藤 隆史「メタボリックストレスと自然炎症」Thrombosis Medicine、第 4 巻、第 2 号、52-55 頁、2014 年

2. 学会発表

日本血栓止血学会学術集会にて発表予定

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

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：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

Heme Oxygenase (HO) は、誘導型の HO-1 と恒常的に存在する HO-2 がある。その HO-1 は、熱や酸化ストレス、などにより発現が惹起されるタンパク質である。すなわち、HO-1 はストレス負荷時の細胞保護効果に貢献している。最近、イチゴは、ガリク酸、キシリトールなど抗炎症作用物質が含まれている事が判明した。しかしながら、HO-1 との関係は未だ報告されていない。本研究は、イチゴ成分が HO-1 の発現を惹起出来るかを目的とした。その結果、イチゴ凍結乾燥粉末は HO-1 を惹起した。しかしながら、ガリク酸、キシリトールは出来なかった。イチゴには未知の HO-1 惹起物質が示唆された。

A. 研究目的

ヘモグロビンのヘムタンパク質から遊離したヘムは、活性酸素種（Reactive Oxygen Species: ROS）の産生を惹起する。すなわち、生体にとって非常に有害である。この有害なヘムを分解するのが Heme Oxygenase (HO) である。具体的には、HO-1 は、ヘムを一酸化炭素 (CO)、鉄、ビリルビン（胆汁色素）に分解する。CO は活性酸素の除去、ビリルビンは強力なラジカル補足作用がある。さらに、HO-1 の発現により炎症性サイトカインの産生を抑制できる。したがって、HO は、細胞保護効果を有している。

HO には 2 種類のアイソザイム、HO-1、-2 がある。HO-1 は、ストレス（紫外線、熱ショック、低酸素状態、活性酸素、エンドトキシンや重金属など）の応答により惹起される。そして、HO-2 は、恒常的に発現している。近年、前者のストレス応答による HO-1 の発現の惹起物質の探索が行われている。種々のストレスに対する細胞保護効果を見込めることが示唆される。

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 HO-1 を惹起出来るかを目的とした。

B. 研究方法

【HO-1 惹起実験】

細胞には、マウスマクロファージ様細胞の RAW264.7 細胞を用いた。添加する試料は 3 種類である。すなわち、イチゴ凍結乾燥粉末（最終濃度：20ug/ml）、ガリク酸（1mM）、キシリトール（1mM）を用いた。これらの試料を添加し、16 時間培養した。その後、細胞を回収しウェスタンブロット法にて HO-1 の検出を行った。また、アクチンをコントロールタンパク質として用いた。検出方法は、化学発光法を用いた。

C. 研究結果

イチゴ凍結乾燥粉末、ガリク酸、キシリトールの刺激により RAW264.7 細胞から HO-1 の発現増強がみられたのは、イチゴ凍結乾燥粉末のみであった。統計学的処理においてもコントロール群と比較して有意な差が確認された。

D. 考察

本研究において、イチゴ凍結乾燥粉末中に HO-1 を惹起する未知の物質の存在が明らかになった。エンドトキシン刺激による High Mobility Group Box-1 (HMGB1) の放出抑制は、HO-1 が関与していることが示唆される。最近、イチゴ中のガリク酸、キシリトールが抗炎症作用を示している。しかしながら、ガリク酸、キシリトールは、HO-1 の惹起が出来なかった。

おそらく、他の機構、シグナル伝達系の調節により抗炎症を発揮していることが考えられる。今後は、イチゴ凍結乾燥粉末中の未知の物質を同定することが必要である。

E. 結論

イチゴ凍結乾燥粉末中により、未知の H0-1 惹起物質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

該当なし（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

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

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

平成 23 年度に報告した腹腔内環境の修飾における血管新生因子の影響に関する研究が「血管機能と健康」の観点から本年度にて結論を得ることができた。糖代謝は腹腔内環境の影響を受ける代表的な内分泌システムである。一方、膵β細胞の産生する血管内皮細胞増殖因子-A（以下、VEGF-A）と膵β細胞の機能についてはこれまで多数報告されていたが、非膵β細胞由来の VEGF-A とβ細胞を含む膵構成細胞との関連についての報告はこれまでなかった。平成 25 年度の研究において non-β細胞由来（内臓平滑筋 dominant）の VEGF-A 発現の up-regulation が islet を構成していないインスリン産生細胞数をマウスモデルにおいて増加していることを見出した。今回の観察は腹腔内環境の構成に重要な役割を持つ血管新生因子と糖代謝の関連を考察する上で重要な結果である。

A. 研究目的

β細胞は islet を構成するインスリン産生細胞として認識されている。しかしながら、鏡検下に観察される“ラ氏島を構成していない”インスリン産生細胞（insulin producing cells、以下 IPCs）についての検討は世界的にも殆どなされていない。一方、血管内皮細胞増殖因子-A（以下、VEGF-A）は angiogenesis/vasculogenesis の鍵分子であり、β細胞由来の VEGF-A は islet の血管形成および機能維持に必須の役割を果たしている。これまで VEGF-A の islet への生物学的影響に関する研究はインスリンプロモーター下にドライブされるβ細胞由来 VEGF-A の overexpression あるいは deficient モデルにて検討されてきたが、今回我々は non-β細胞由来（内臓平滑筋 dominant）の VEGF-A 発現を up-regulation させたマウスの膵組織の変化について検討した。

B. 研究方法

内臓平滑筋 dominant に VEGF-A の発現を up-regulation する tg マウス（SM-CreER^{T2}/hVEGF mice）を作出して SM-CreER^{T2} (ki) mice を対象コントロールとして膵組織を組織学的に比較観察するとともにβ細胞の分化に関す

る因子の発現の比較および STZ 投与による糖尿病モデルマウスの病態を比較検討した。

（倫理面への配慮）

本申請においては個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究およびヒト遺伝子解析研究は含まれない。VEGF 関連疾患トランスジェニックマウスについては、鹿児島大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認済み（承認番号 24038）である。

C. 研究結果

SM-CreER^{T2}/hVEGF mice の膵組織において、islet を構成していない IPCs（100~215 μm²）数の“islet を含む IPCs clusters 数”に対する割合はコントロールに比較して優位に増加した（473 out of 1992 clusters IPCs in SM-CreER^{T2}/hVEGF mice, n=5 vs 199 out of 976 in SM-CreER^{T2} (ki) mice, n=3, *p* < 0.05）。しかしながら、膵外分泌線の面積に対するトータルの IPCs の面積比に有意差は認めなかった。また、islet を構成していない IPCs は IPCs のみ、あるいはα細胞との cluster 形成として観察されたが、δ細胞との cluster 形成は観察されなかった。膵管に観察される IPCs はβ細胞の progenitor 細胞として知られているが、その数に有意差は認めなかった。islet を構成していない IPCs の中で細胞増殖の指標となる

proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞は SM-CreER^{T2}/hVEGF mice にのみ観察された。膵組織の β 細胞の分化に關与する代表的因子 (*Ins1*, *Ins2*, *Nkx6-1*, *Pdx-1*, *Ngn3*, *Mafa*) の RT-PCR 解析の比較において有意差は認めなかった。8 週齡マウスへの STZ 5 日間投与 (50mg/kg/day) における比較では SM-CreER^{T2}/hVEGF mice において血糖値が低く、体重減少が抑制されている傾向を認めた。

D. 考察

本研究により腹腔内環境における non- β 細胞由来 (内臓平滑筋 dominant) の VEGF-A は膵組織における、これまで注目されていなかった islet を構成していない IPCs を増やすことが明らかとなった。今回観察した IPCs がどのような分化過程をたどるのか、あるいは血中の血糖レベルに応答するインスリン分泌応答機能を有するのかなの検討がこれからの課題であると考え。

E. 結論

non- β 細胞由来 (内臓平滑筋 dominant) の血管内皮細胞増殖因子-A は膵組織において “ラ氏島を構成していない” インスリン産生細胞の数を増加させる。この観察は、腹腔内環境・血管新生因子・糖代謝の關連を繋ぐ新しい知見であると考え。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takenouchi K, Shrestha B, Yamakuchi M, Yoshinaga N, Arimura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Feil R, Kawahara KI, Sakamoto T, Maruyama I, Hashiguchi T. : Upregulation of non- β Cell-derived Vascular Endothelial Growth Factor A Increases Small Clusters of Insulin producing Cells in the Pancreas. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2014. in press

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

五苓散は代表的な利尿剤で、体内の水分代謝異常を調節し正常に戻す働きが知られており、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、五苓散は自然炎症を惹起する代表的な DAMPs (Damage associated molecular patterns) のひとつである HMGB1 (High mobility group box-1 protein) の腎臓内での発現上昇を緩和させた。以上より、五苓散は慢性腎炎において抗炎症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濃度、時間依存性に血中、尿中、腎組織中 HMGB1 が上昇することを明らかにしている。核内蛋白として発見された HMGB1 は、本研究のテーマである「自然炎症」を惹起する代表的な DAMPs の一つであり、さらに近年 HMGB1 は自身を酸化還元することでサイトカイン機能を変化させ、炎症調節することが明らかとなっている。

今回、我々は本モデルにおいて炎症の場である腎組織内での HMGB1 発現を指標に五苓散の慢性腎炎へ与える影響を検討した。さらに昨年度の我々の報告より、五苓散は腎炎組織中の活性酸素を有意に低下させることを明らかにしている。よって、今回は五苓散投与下での HMGB1 の酸化還元型発現についても同時に検討を行った。

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、腎組織内の HMGB1 発現量を ELISA にて測定した。さらにヘパリンビーズに吸着させた組織内 HMGB1 の酸化還元型の検討をウェスタンブロッティング法にて行った。

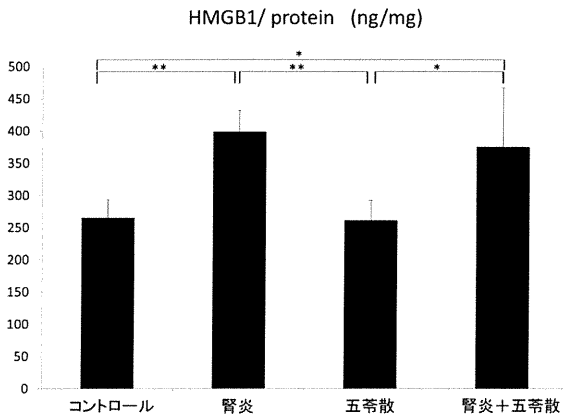
(倫理面への配慮)

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。

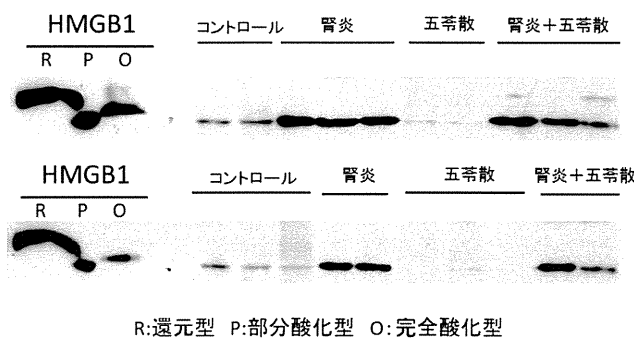
C. 研究結果

腎炎群と比較し、腎炎+五苓散投与群での腎組織内 HMGB1 の発現は抑制傾向であった。

(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)



次に、ウェスタンブロッティング法を用いて、4群間のHMGB1酸化還元型の検討を行った。結果、検出されたHMGB1は腎炎群、および腎炎+五苓散投与群共に部分酸化型が主であった。



D. 考察

五苓散は慢性腎炎ラットの腎組織中HMGB1の上昇を抑制する傾向にあり、腎炎において抗炎症作用を持つ可能性が示唆された。しかしながら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。前回、我々が行った五苓散は腎組織における活性酸素量を有意に抑制するといった報告からHMGB1の酸化還元型変換において五苓散が与える影響について検討を行った。今回行った条件では、五苓散のHMGB1酸化還元型変換への影響を明らかにすることはできなかったが、五苓散が腎炎組織中の活性酸素を有意に抑制するという結果を踏まえ、HMGB1の酸化還元型変換に対し何らかの影響を与えると推察し、さらに

投与量や投与期間など条件の幅を広げていくことより、今後も検討を行っていきたい。

E. 結論

五苓散は慢性腎不全動物モデルにおいて抗炎症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

第65回 日本東洋医学会学術集会総会にて
発表予定 (平成26年6月27~29日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表