

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08007

研究課題名(和文) 糖尿病性末梢神経障害の予防法・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of prevention and/or treatment for diabetic peripheral neuropathy

研究代表者

能勢 充彦 (Nose, Mitsuhiro)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：60228327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、アンメット・メデイカル・ニーズの上位に位置する糖尿病性末梢神経障害の治療法・予防法を開発する目的で、漢方方剤の一つの「薬物データベース」として活用し、牛車腎気丸を候補医薬品として見出した。とくに、糖尿病マウスの末梢神経障害の中で、後期に出現する感覚低下を牛車腎気丸が改善することを初めて見出し、その作用は投与量依存的で、また投与後1時間をピークとする一過性の作用であることを明らかとした。また、その作用機序として、牛車腎気丸が一酸化窒素合成の基質の供給ならびに合成酵素の活性化をもたらし、高血糖に由来する内皮機能障害、さらには血流を改善することで症状を改善する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In order to develop the prevention and/or treatment of diabetic peripheral neuropathy, which is placed on the high level of the unmet medical needs in Japan, I found Goshajinkigan as a candidate using Kampo medicines that we can use as one of medical data bases. Especially, this is the first time to demonstrate that Goshajinkigan improves a decrease in sensation appeared in later stages of diabetic peripheral neuropathy in streptozocin-induced type I diabetes mice. This significant effect is dose-dependent and reached at maximum 60 min after oral administration. Moreover, I clearly reveal that Goshajinkigan improves a decrease in sensation through the production of nitric oxide and then show the possibility that Goshajinkigan provides the substrate for nitric oxide synthase and somehow activates the synthase to restore endothelial dysfunction and blood flow disturbance caused by elevated blood glucose.

研究分野：生薬学

キーワード：糖尿病性末梢神経障害 漢方方剤 牛車腎気丸 感覚低下改善作用

1. 研究開始当初の背景

わが国の糖尿病患者数は、生活習慣と社会環境の変化に伴って急速に増加している。糖尿病はひとたび発症すると治癒することなく、放置すると網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こし、末期には失明や足壊疽に至る場合や透析治療が必要となる場合がある。これらの合併症は、患者の QOL を著しく低下させるのみでなく、医療経済的にも大きな負担を社会に強いており、今後も社会の高齢化にしたがって増大するものと考えられる。

合併症の第一位は末梢神経障害 (DN) であり、糖尿病患者の約 54% は足になんらかの自覚症状を感じ、約 58% は足に外観異常を感じている。DN の発症機序については、高血糖を起因とする代謝性因子や血管性因子などが考えられ、それぞれに対応した治療法が試行錯誤されてきたが、現時点においても未だ満足し得る薬剤や治療法は確立されていない。中でも有力な成因仮説がポリオール代謝異常である。すなわち、高血糖によるポリオール代謝経路の亢進に伴い、細胞内にソルビトールが蓄積し、その結果浸透圧ストレスを生じる。また、ソルビトールから生じるフルクトースによる糖化反応の亢進など一連の反応が神経細胞傷害の要因ではないかと考えられている。そのため、ポリオール代謝経路の律速酵素であるアルドース還元酵素の阻害剤 (AR-I) が有用ではないかと考えられ、わが国ではエパルレストアットが上市された。しかしながら、AR-I は日本でのみ認可されている医薬品であり、世界的に認知されているとは言い難い。また、エパルレストアットも初期の軽微な自覚症状の改善には有効とする報告がある一方で、長期間の高血糖状態により神経組織の変性が進行・完成してしまうと効果は期待できないとされるなど、現在ではその効果に疑問がある。

一般に、DN は、初期から中期においては疼痛やしびれ、じんじん、ぴりぴりするといった陽性症状が主体であるが、後期においては感覚低下などの陰性症状に移行する。近年、陽性症状に対する対照療法として種々の薬物療法が採られており、最近疼痛に関しては抗けいれん薬の一つであるプレガバリンの応用が始まった。その他、三環系抗うつ薬や抗てんかん薬や抗精神病薬などの応用もなされるものの、これらの薬剤については依然として副作用の懸念がある。一方で、陰性症状である感覚低下に対しては、全く医薬品がないのが現状である。

先にも述べたように、DN は患者の QOL を低下させ、予後を不良にするため、その早期診断の重要性が叫ばれているものの、基本的治療薬がない状況では早期診断の意義さえ明確にできないというジレンマに陥っており、予防薬や治療薬の開発は喫緊の課題である。

さて、わが国は、西洋医薬品と同様に漢方薬を保健適応の範囲内で用いることができるユニークな医療体系をもち、臨床医の約 8 割以上が漢方薬の処方経験をもつ。近年、漢方薬は化学療法剤による副作用の軽減にも使用されており、各種レジメンによる末梢神経障害の改善に用いられることも多い。化学療法剤による疼痛やしびれに対する牛車腎気丸の有用性についてはいくつか報告があるものの、作用機序については不明な点が残されている。また、1999 年には、DN の疼痛や痛覚過敏に牛車腎気丸が抑制作用を示したとする報告もあり、いくつかの処方には DN への症例報告があるものの、その作用に関する詳細な解析はなされていない。

そこで、本研究では、DN の陽性症状のみならず陰性症状にも有効な漢方薬を探索しようとして検討を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、アンメット・メディカル・ニーズの上位に位置する糖尿病性末梢神経障害の予防薬・治療薬の開発を目的として開始した。先にも述べたように、DN の成因や予防・治療法に関して多くの検討がなされているものの、発症機構についての完全な理解はできておらず、また世界共通の標準治療となるような薬剤の開発には至っていない。研究代表者は、DN の予防薬・治療薬を「薬物ライブラリー」としての漢方薬に求め、いくつかの候補を見出した。本研究では、これらの処方の作用機序を解析することで、有効な構成生薬や成分を追究し、生体内の標的分子をも明らかにすることで、処方の有効性に科学的根拠を与えるとともに、未だ明確な成因が解明されていない本疾患の理解を深め、予防や治療の一手段として確立することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデルの作製および感覚試験
実験動物として、雄性 ICR マウス (SLC) を用い、18 時間絶食し、STZ (150 mg/kg、Sigma) を静脈内投与することで、I 型糖尿病モデルを作製した。STZ 投与後 3 日目に血糖値測定 (グルテスト Neo センサー (三和化学研究所)) を行い、300 mg/dl 以上のものを糖尿病マウスとして実験に供した。

マウスの感覚試験としては、機械的刺激として知られる von Frey 試験を行い、up-down 法により、忌避反応の 50% 閾値を算出し、感覚低下を評価した。

(2) 漢方方剤および構成生薬エキスの調製
牛車腎気丸や桂枝加朮附湯、当帰四逆加呉茱萸生姜湯などの漢方方剤は、それぞれ構成生薬を量り取り、600 ml の精製水を加えて約 1 時間煎じ (ハリオ社製マイコン煎じ器) 生薬残渣をろ過後放冷し、凍結乾燥して各漢方方剤エキスとした。また、構成生薬単味およ

び処方はいくつかの画分に分けて作製したエキスも、それぞれ牛車腎気丸での配合量を遵守し、同様に抽出、凍結乾燥して実験に供した。これらの凍結乾燥エキスは、ヒトの一日服用量であるため、ヒトの標準体重を 60 kg とし、乾燥エキス重量を体重で除した値 (g/kg) をヒト常用量 (ヒト 1 倍量) とし、その 10 倍量を基本投与量として、それぞれ 1 日 1 回経口投与を行った。

(3) 阻害剤による牛車腎気丸の感覚低下改善作用に及ぼす影響

阻害剤として、一酸化窒素合成酵素の阻害剤である L-NAME や温度感受性受容体 TRPV1 のアンタゴニストであるカプサゼピンを用いた。阻害剤は、それぞれ牛車腎気丸投与の 30 分前に腹腔内投与した。

(4) L-アルギニン、L-シトルリンの定量

牛車腎気丸およびその構成生薬エキス中の L-アルギニン、L-シトルリン含量については、OPA 化によるプレカラム標識を行い、高速液体クロマトグラフィーにより定量した。カラム: COSMOSIL 5C18-AR-II (5 μm、4.6 mm I.D. x 150 mm)

移動相: A 液 85%+B 液 15%の混合溶媒

A 液: 10mM リン酸緩衝液 (pH=7.5) - メタノール - テトラヒドロフラン = 91 : 8 : 1

B 液: 10mM リン酸緩衝液 (pH=7.5) - メタノール = 20 : 80

流速: 1.0 ml/min

検出波長: 254 nm

カラム温度: 40°C

(5) 牛車腎気丸及び構成生薬エキスの温度感受性受容体に及ぼす影響

マウス TRPV1 を発現させた Flip-in HEK293 細胞を用いて、牛車腎気丸及び構成生薬エキスを添加し、添加後 80 秒間の細胞内 Ca⁺⁺イオン濃度の上昇を蛍光試薬 FLIPR Calcium 6 を用いて検出した。陽性対照として、カプサイシンを、また TRPV1 アンタゴニストとしてカプサゼピンを用いた。

4. 研究成果

本研究の開始にあたり、糖尿病性末梢神経障害を実験科学的に再現する必要があったため、糖尿病マウスを作製し、その表在性感覚障害の経時的变化を von Frey 試験を用いて、行動薬理的に検証した。

糖尿病マウスの左足蹠を対象に、フィラメントに対する忌避反応について経時的に観察したところ、STZ 投与後 2~3 週間をピークとした感覚過敏が生じ、その後徐々に感覚低下が生じることを明らかにした (Fig.1)。

この経時変化は DN の症状ならびにその経過と、また温熱刺激による tail-flick 法を用いた報告とも一致しており、本モデルを評価系として用いることで、目的とする漢方方剤の探索ができると判断した。

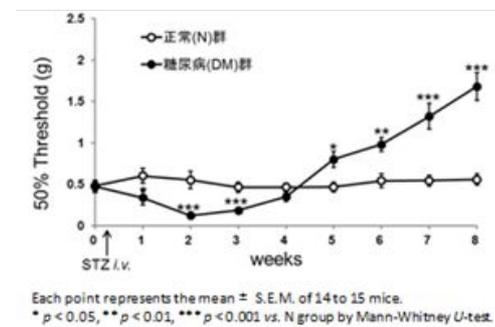


Fig.1 糖尿病マウスにおける機械的刺激応答

そこで、STZ 投与後 8 週間の感覚低下を呈したマウスを用いて、臨床で症例報告のある牛車腎気丸 (GJG) や桂枝加朮附湯 (KJT)、当帰四逆加呉茱萸生姜湯 (TSGST) あるいはエパルレスタット (EPS) をそれぞれ一週間経口投与し、その最終投与後 1 時間に感覚試験を行ったところ、牛車腎気丸と桂枝加朮附湯に有意な感覚低下改善作用が観察された。一方、エパルレスタットや当帰四逆加呉茱萸生姜湯の投与では、改善作用を認めなかった (Fig.2)。

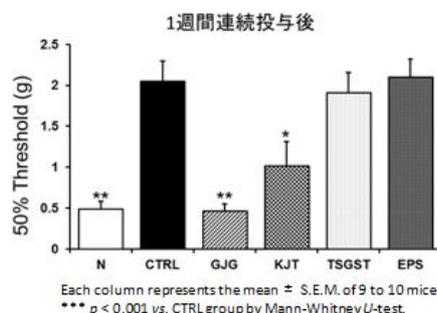


Fig.2 各種漢方方剤の糖尿病性末梢神経障害における感覚低下に与える影響

牛車腎気丸の感覚低下改善作用は、単回投与においても有意な作用として観察され、さらに一週間の休薬により減弱した (Data not shown)。以上の結果から、本モデルにおいて牛車腎気丸が感覚低下の改善作用をもつとして、本研究課題において、その作用特性の解析や作用機序解明を目指した検討を開始した。

まず、牛車腎気丸の投与量依存性と作用の持続時間を検討した。投与量依存性については、投与量をヒト常用量、その 5 倍量、10 倍量で検討した。マウスに STZ 処置を施し、糖尿病とした後、von Frey 試験により感覚低下を確認した後、実験を開始した。

Fig.3 に示すように、牛車腎気丸は投与量依存性を示し、ヒト常用量の 5 倍量、10 倍量で有意な感覚低下の改善作用を示した。

次に作用の持続時間について、投与後 1 時間と 5 時間を選択して検討した。その結果、牛車腎気丸は 1 時間で有意な改善作用を示し、5 時間後では減弱した。

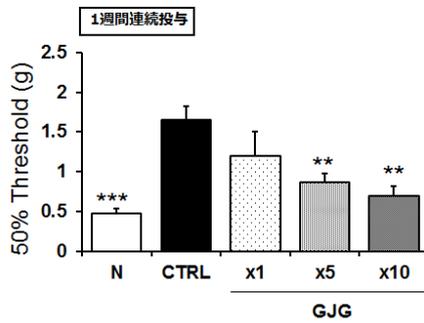


Fig.3 牛車腎気丸の感覚低下改善作用における投与量依存性について

N, normal; CTRL, DM+水; GJG, DM+牛車腎気丸

Each column represents the Mean \pm S.E.M. of 9 to 10 mice. *** p <0.01, ** p <0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U-test.

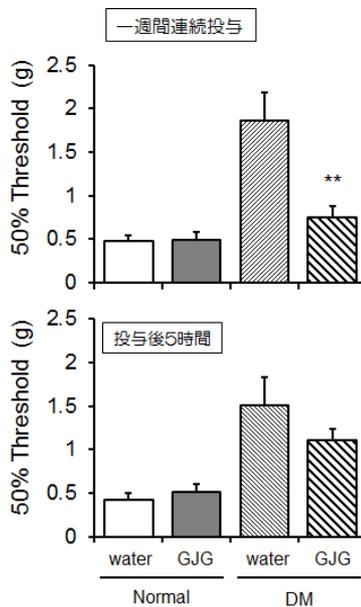


Fig.4 牛車腎気丸の感覚低下改善作用の持続性について

N, normal; CTRL, DM+水; GJG, DM+牛車腎気丸

Each column represents the Mean \pm S.E.M. of 9 to 10 mice. ** p <0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U-test.

先行研究により、牛車腎気丸は DN の感覚過敏に対して抑制作用を示し、その作用機序として一酸化窒素 (NO) あるいはダイノルフィンを介した抑制であることが薬理的に検証されている。感覚低下を示す糖尿病マウスの四肢の温度は低く、牛車腎気丸投与により、その皮膚表面温度の低下が改善されているように感じたことから、本研究でも牛車腎気丸は血流改善を介して感覚低下を改善している可能性が考えられた。そこで、血流改善の一端を、先行研究と同様に NO 産生が担うのかどうか、一酸化窒素合成酵素 (NOS) の阻害剤である NG-nitro-L-arginine methyl ester を用いて検証した。牛車腎気丸投与の 30 分前に、L-NAME を腹腔内投与し (5mg/kg) 牛車腎気丸投与後 1 時間に von Frey 試験を行った (Fig. 5)。

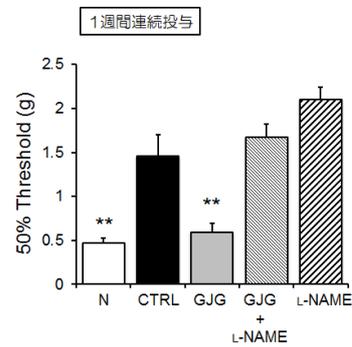


Fig.5 牛車腎気丸の感覚低下改善作用に及ぼす NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) の影響について

Each column represents the Mean \pm S.E.M. of 8 to 10 mice. ** p <0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U-test.

これまでの検討から、本モデルにおいて、牛車腎気丸は投与後 1 時間をピークとした一過性の感覚低下改善作用を示し、その作用発現に NO 産生が関わっていることが明らかとなった。作用時間の早さや持続時間の短さを考えると、この NO を介した作用機構では合成酵素の誘導というよりは L-アルギニンという基質の供給ではないかと考えた。そこで、o-フタルアルデヒド (OPA) によるプレカラム蛍光標識法を用いた HPLC 法にて牛車腎気丸の L-アルギニン含量を定量した。

その結果、牛車腎気丸エキス (9.18 \pm 0.12g) 中に L-アルギニンが 37.7 \pm 2.69mg 存在することがあきらかとなった。一酸化窒素合成酵素の直接的な基質である L-アルギニンは、投与量として 6.28 \pm 0.45mg/kg であり、基質の供給という可能性が改めて示唆された。

つぎに、牛車腎気丸の有効生薬を探索する目的とさらに臨床で用いることのできる漢方処方拡大を目的で、牛車腎気丸の類方である八味地黄丸と六味地黄丸の本モデルにおける作用を検討した。八味地黄丸は、牛車腎気丸から牛膝と車前子を除いたもので、六味地黄丸はさらに附子と桂皮を除いたものである。その結果、両処方ともに感覚低下改善作用をもつことが明らかとなり、臨床におけるバリエーションを提示することができたと考えている (Data not shown)。

類方を用いた検討により、有効生薬は六味地黄丸の構成生薬に存在することが示唆された。先行研究によると、感覚過敏の抑制に関わる生薬として、山薬、沢瀉、附子、桂皮が挙げられ、とくに山薬や沢瀉は NO 産生を介する作用が示唆され、附子はダイノルフィンを介した鎮痛作用に寄与していることが推定されている。

そこで、牛車腎気丸の有効生薬を絞り込んで行くために、先行研究をもとに牛車腎気丸をいくつかの画分に分けて、感覚低下改善作用を検証することにした。すなわち、牛車腎気丸を牛膝・車前子画分、附子・桂皮画分、山薬・沢瀉画分、四味 (熟地黄、牡丹皮、山

茺菀、茯苓)画分として煎じ、それぞれ凍結乾燥して得られたエキスをヒト常用量として用いた。その結果、牛車腎気丸における有効生薬を含む画分は、感覚過敏抑制作用を検討した先行研究と同様に、山薬、沢瀉、附子を含むことが明らかとなった。

これらの画分について、L-アルギニン含量を測定したところ、四味画分では $6.43 \pm 0.53\text{mg}$ 、山薬・沢瀉画分で $31.7 \pm 1.65\text{mg}$ 、附子・桂皮画分で $3.20 \pm 0.35\text{mg}$ 、牛膝・車前子画分で $0.49 \pm 0.08\text{mg}$ となり、牛車腎気丸中の L-アルギニンはその約 84% が山薬・沢瀉由来であることが判明し、附子・桂皮画分は四味画分の約 1/2 であったことから、それぞれ別の作用機序で感覚低下改善作用を示すことが示唆された。

そこで、山薬、沢瀉、附子、桂皮の単味エキスを作製し、それぞれの感覚低下改善作用と L-アルギニン含量を測定した。その結果、山薬と桂皮に強い感覚低下改善作用を認め、次いで附子、沢瀉にも有意な感覚低下改善作用が観察された (Fig. 6)。

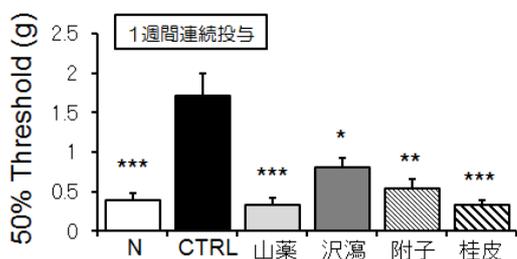


Fig.6 山薬、沢瀉、附子、桂皮単味エキスの感覚低下改善作用について

Each column represents the Mean \pm S.E.M. of 9 to 10 mice. *** $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. the control group by Mann-Whitney U-test.

また、それぞれ単味エキス中の L-アルギニン含量を測定したところ、山薬は $9.59 \pm 0.36\text{mg}$ 、沢瀉は $18.68 \pm 1.18\text{mg}$ 、附子は $0.47 \pm 0.04\text{mg}$ 含有し、桂皮は trace レベルしか含有しないことが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、L-アルギニン含量は沢瀉 > 山薬 > 附子 > 桂皮の順である一方で、感覚低下改善作用は山薬 = 桂皮 > 附子 > 沢瀉となることが判明し、NO を介した作用機序をもつとしても、単なる基質の供給ではなく、NOS の活性化も生じている可能性が示唆された。さらに、行動薬理実験の最中に観察している体温の上昇を血流改善として解析を行っている現状を考えると、桂皮の作用はシナナムアルデヒドによる TRPA1 受容体への作用と考えることもできる。今後、TRPA1 アンタゴニストを用いた阻害実験など薬理的なアプローチから検討する必要がある。

本研究では、糖尿病性末梢神経障害の感覚低下を牛車腎気丸が改善することを見出し、その作用機序として NO 産生を介した機構を推定した。実際に、牛車腎気丸を投与した際

の血中 NO 濃度の上昇について、正常マウスや糖尿病マウスなどを用いて検討してきたが、種々検討した結果、牛車腎気丸、とくに構成生薬の牛膝には大量の硝酸塩が含まれており、硝酸イオンや亜硝酸イオンを定量する Griess 法では分析できないことが判明した。正常マウスや糖尿病モデルマウスにおいて、牛車腎気丸投与により Griess 法では血中硝酸・亜硝酸イオン濃度は上昇するが、これはエキス中の硝酸塩の吸収を見ているに過ぎなかった。そこで、血中で産生されるであろう NO の end-product としてのニトロチロシンを定量することを試みたが、陽性対照とした SNP 投与ではニトロチロシンの有意な上昇は観測したものの、牛車腎気丸投与では逆にニトロチロシン含量の低下を認め、現在のところ血中での NO 産生を観察することはできていない (Data not shown)。

また、マウスの TRPA1 や V1 を強制発現させた Flip-in HEL293 細胞を用いて、牛車腎気丸の TRPA1・V1 アゴニストとしての作用を確認することも試みたが、現状では明確な結果とはなっておらず (Data not shown)、*in vivo* での阻害剤を用いた検討を行ったところ、TRPV1 アンタゴニストであるカプサイゼピン前処置により、牛車腎気丸の改善作用は消失した (Data not shown)。一方で、TRPA1 アンタゴニストによる阻害実験は今後の課題である。

以上のように、牛車腎気丸は、一つの作用機序として NO 産生や TRPV1 受容体などを介して血流を改善し、糖尿病性末梢神経障害の感覚低下を改善する作用をもつ。現時点では、その有効成分の一つとして、NO 合成酵素の基質である L-アルギニンを含有することは判明しているが、実際にその含有量で有効なのかの検証も急がなければならない。また、NO 合成酵素としては血管内皮細胞における eNOS を想定した検証も今後の課題となっており、HUVEC を用いた解析を予定している。その他、血流改善を立証するための血流の可視化など、レーザースペックル型血流計などの導入、さらには血液自体の性状に与える影響はないかなど検討すべきことが多く残されており、現在それら一つずつ解決すべく、予算獲得も踏まえて検討している。

DN は、糖尿病合併症の中でも高率に発症し、足の傷に気づかず、感染症に陥り、足壊疽などによる切断を余儀なくされ、QOL の低下に苦しむ患者は多い。その一方で、DN の成因については不明な点が多く、効果的な薬剤は未だ存在しておらず、国際的に通用する医薬品の開発が望まれている。本研究では、牛車腎気丸が DN の感覚過敏だけでなく、感覚低下に対して治療効果を示すことを見出し、その作用機序解析を進めてきたが、まだその入り口に立っているに過ぎない。

現在、糖尿病発症時から投与することで、血糖値の改善は示さないものの、感覚過敏や感覚低下を予防する作用を示すことも見出

しており (Data not shown) 本処方¹の作用を分子レベルで理解することができれば、必ずやDNに対する予防法や治療法を開発することにつながると考えており、現在も尚研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

稲垣晃熙、石黒友希、田中留衣、山田 民、赤崎太志、荒井貴一、日坂真輔、能勢充彦：漢方処方の科学的解析 (第 20 報) 糖尿病性末梢神経障害における牛車腎気丸の感覚低下改善作用について、天然薬物研究方法論アカデミー第 20 回研究集会、東京、2017 年 8 月。

能勢充彦、田中留衣、稲垣晃熙、山田 民、赤崎太志、荒井貴一、日坂真輔：漢方処方の科学的解析 (第 18 報) 糖尿病性末梢神経障害モデルにおける牛車腎気丸の感覚低下改善作用について、日本生薬学会第 63 回年会、富山、2016 年 9 月。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能勢 充彦 (NOSE Mitsuhiko)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：60228327

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

赤崎 大志 (AKASAKI Taishi)
荒井 貴一 (ARAI Yoshikazu)
石黒 友希 (ISHIGURO Yuki)
稲垣 晃熙 (INAGAKI Koki)
田中 留衣 (TANAKA Rui)
日坂 真輔 (HISAKA Shinsuke)
山田 民 (YAMADA Tami)