

平成21年3月26日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18790431  
 研究課題名（和文） インスリン抵抗性に対する和漢薬の効果とその作用機序の解明  
 研究課題名（英文） The effects and mechanisms of traditional medicine on insulin resistance  
 研究代表者  
 藤本 孝子（FUJIMOTO TAKAKO）  
 富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教  
 研究者番号：70377266

研究成果の概要：Zucker fatty ラットを用いて、インスリン抵抗性に対する和漢薬の効果を検討した。その結果、八味地黄丸に高インスリン血症改善作用、黄連解毒湯、桂枝茯苓丸、大柴胡湯、八味地黄丸、防己黄耆湯に脂質代謝を是正する作用が認められ、これらの作用によりインスリン抵抗性に好影響を与える可能性を示唆する知見が得られた。さらに、八味地黄丸ならびに防己黄耆湯投与後の脂肪組織における遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した結果、和漢薬の投与により遺伝子発現が異なっており、これらの変化がインスリン抵抗性における作用発現の相違に関与している可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：インスリン抵抗性、和漢薬、生活習慣病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の高脂肪食の摂取・運動不足などの生活習慣の変化により、糖尿病、内臓肥満、高中性脂肪血症、高血圧などの動脈硬化危険因子を複数有するメタボリックシンドロームの患者数が増加しており、その予防策と治療法が急務となっている。

(2) インスリン抵抗性は糖尿病だけではなく、高血圧、肥満などいわゆる生活習慣病の基盤となっている重要な病態である。

(3) 近年の研究より、脂肪組織は単に余剰エネルギーを中性脂肪として蓄えるだけではなく、種々のアディポサイトカインを分泌する重要な内分泌臓器であることが明らかとなり、その分泌異常により骨格筋や肝臓で

のインスリン抵抗性が惹起されると考えられている。このようなアディポサイトカインの分泌異常を是正することが新たな創薬ターゲットとして注目されている。

(4) 近年の高齢化や生活習慣病の増加による疾病構造の変化に伴い、東洋医学の役割や重要性が再認識されてきている。

## 2. 研究の目的

上述した研究背景から、近年臨床の場で注目されている糖尿病発症前のインスリン抵抗性のみ存在する状態をターゲットとし、インスリン抵抗性を増悪させることの知られている因子に対する効果を検討することにより、和漢薬の中からインスリン抵抗性改善作用を有するものを探索し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Zucker fatty ラット (肥満・2型糖尿病モデル) に 6 種類の和漢薬 (黄連解毒湯、桂枝茯苓丸、大柴胡湯、当帰芍薬散、八味地黄丸、防己黄耆湯) をそれぞれ 10 週間経口投与後、血液、肝臓、筋肉、脂肪組織を採取し、各種パラメーターを測定した。

(2) 脂肪負荷試験 (投与 4 週目に実施)  
16 時間絶食後、脂肪(20%大豆油, 10 ml/kg BW)を負荷し、負荷直後、30 分、1, 2, 3, 4, 5 時間後の血液を尾静脈より採血し血中中性脂肪値を測定した。

(3) 糖負荷試験 (投与 6 週目に実施)  
16 時間絶食後、グルコース(2 g/kg BW)を負荷し、負荷直後、30, 60, 120 分後の血液を尾静脈より採取し血糖値を測定した。

(4) インスリン、アディポネクチン、レプチン、CRP、MCP-1、PAI-1、IL-6、TNF- $\alpha$  は ELISA 法で測定した。

(5) 血糖、総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸は市販のキットを用いて測定した。

(6) 脂肪組織の RNA は RNeasy Mini Kit を用いて、カラム法により抽出した。得られた RNA を用いて、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、脂肪組織中の網羅的遺伝

子発現解析を実施した。

## 4. 研究成果

(1) 実験期間中、正常ラットに比べ、Zucker fatty ラットでは顕著な体重の増加が見られたが、いずれの和漢薬投与においても変化は見られなかった。また、肝臓と脂肪組織重量に対しても和漢薬投与による影響はなかった。

(2) 正常ラットに比べ、Zucker fatty ラットでは脂肪負荷後の血中中性脂肪値が著しく増加していた。これに対し、黄連解毒湯、桂枝茯苓丸、大柴胡湯投与群で有意に改善した。

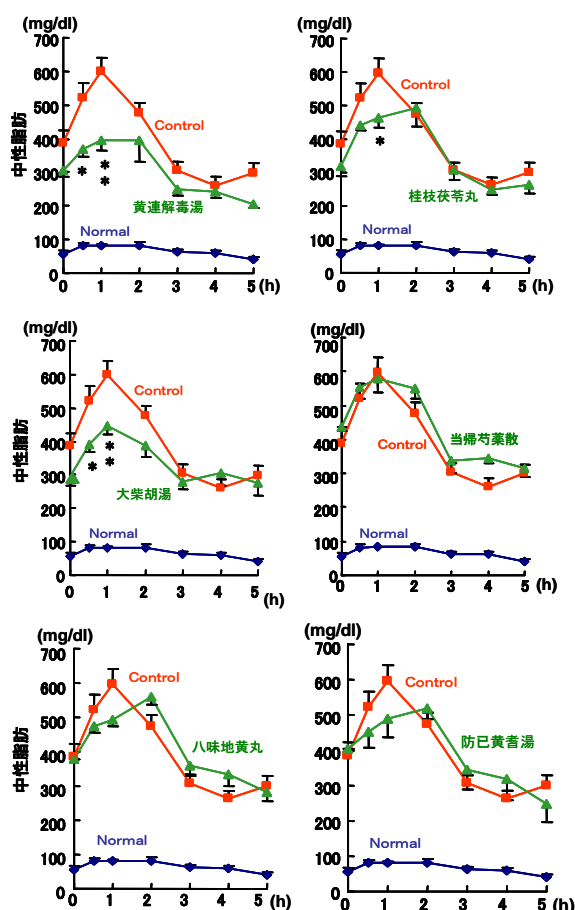


図 1 脂肪負荷試験に対する和漢薬の効果  
\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. control rats.

(3) 糖負荷試験を行った結果、正常ラットに比べ、Zucker fatty ラットでは耐糖能異常が認められたが、いずれの和漢薬投与においても有意な変化は認められなかった。

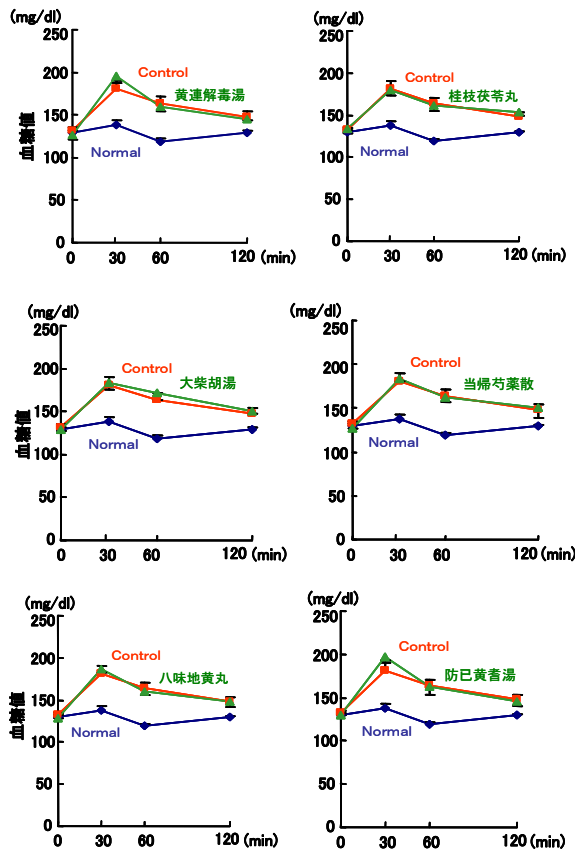
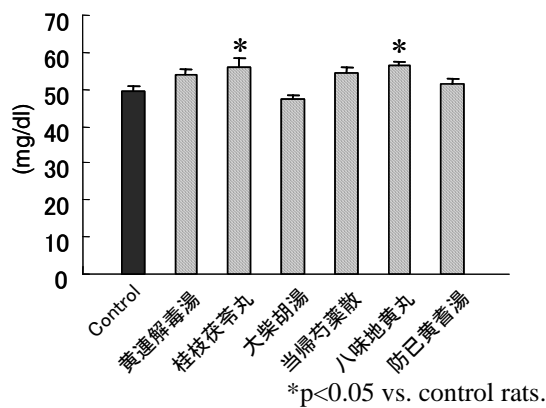


図2 糖負荷試験に対する和漢薬の効果

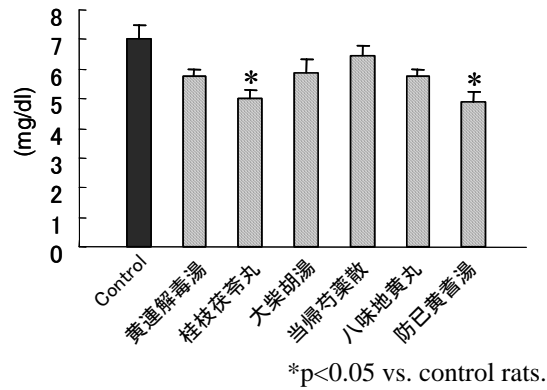
(4) 空腹時血糖は、和漢薬投与による変化は認められなかったが、空腹時のインスリン値がコントロール群に比べ八味地黄丸投与群で有意に低下した。

(5) 空腹時の血中総コレステロール、遊離脂肪酸値に対する和漢薬の効果は認められなかったが、桂枝茯苓丸と八味地黄丸投与群で HDL-コレステロールの有意な上昇、桂枝茯苓丸と防己黄耆湯投与群で LDL-コレステロールの有意な低下が認められた。



\*p<0.05 vs. control rats.

図3 HDL-コレステロールに対する和漢薬の効果



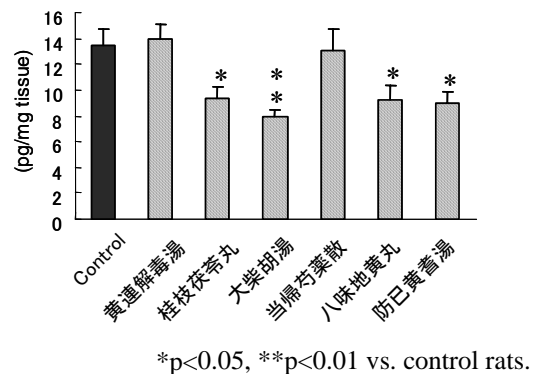
\*p<0.05 vs. control rats.

図4 LDL-コレステロールに対する和漢薬の効果

(6) 肝組織中の総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸に対しては、和漢薬投与による影響はなかった。

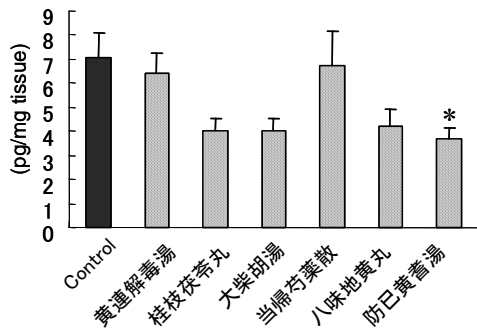
(7) 血清中のアディポサイトカイン（アディポネクチン、レプチン、CRP、MCP-1、PAI-1、IL-6、TNF- $\alpha$ ）レベルはコントロール群に比べ、いずれの和漢薬投与群においても有意な変化は認められなかった。

(8) 脂肪組織中の MCP-1、IL-6、TNF- $\alpha$  を測定した結果、MCP-1 レベルは変化しなかったが、桂枝茯苓丸、大柴胡湯、八味地黄丸、防己黄耆湯投与群で TNF- $\alpha$  レベルの有意な低下、防己黄耆湯投与群で IL-6 レベルの有意な低下が認められた。



\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. control rats.

図5 脂肪組織中の TNF- $\alpha$  に対する和漢薬の効果



\*p<0.05 vs. control rats.

図 6 脂肪組織中の IL-6 に対する和漢薬の効果

(9) 筋組織中の TNF- $\alpha$  レベルはいずれの和漢薬投与においても変化は認められなかった。

(10) Zucker fatty ラットに八味地黄丸あるいは防己黄耆湯を投与した場合の脂肪組織における遺伝子発現について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析することを試みた。その結果、コントロール群との発現強度が 2 倍以上上昇、あるいは低下した遺伝子は八味地黄丸で 43 遺伝子に上昇、48 遺伝子に低下が認められた。防己黄耆湯では 90 遺伝子に上昇、288 遺伝子に低下が認められた。その中で、これら 2 方剤に共通する遺伝子も存在しており、上昇したものでは 30 遺伝子、低下したものでは 3 遺伝子認められた。これらの変化がインスリン抵抗性を増悪させる因子に対する八味地黄丸と防己黄耆湯の作用発現の相違に関与している可能性が示唆された。

(11) 本研究結果から和漢薬にインスリン抵抗性に影響を及ぼす因子を改善する可能性を見出した。本研究のように糖尿病発症前のインスリン抵抗性のみ存在する状態に着目し、6 種類の和漢薬を比較した動物実験報告例は他になく、生活習慣病予防や和漢薬の効果に関して科学的な根拠を提示する観点からも意義のあるものと考えられる。また、和漢薬の投与により脂肪組織における遺伝子発現が異なっていることが認められ、さらに詳細な分析を進めることにより、作用機序の一端を明らかにすることが可能になると考えている。

## 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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤本 孝子 (FUJIMOTO TAKAKO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：70377266