

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590701

研究課題名（和文） 赤血球の微小循環動態におけるサポニンのアンチエイジング機構の研究

研究課題名（英文） Elucidating mechanism of protection of saponins from Ginseng Panax against oxidative stress.

研究代表者

鈴木 洋司（SUZUKI YOJI）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20226567

研究成果の概要（和文）：

生体にとって必要な酸素を末梢組織の隅々に運搬する赤血球の流れやすさは骨髄で作られてから酸化ストレスが原因で徐々に悪くなる。古来、生薬として用いられて来た紅蔘から抽出したサポニン分画には赤血球膜タンパク質の酸化傷害を抑制し、赤血球の流れやすさの悪化を妨げることが分かった。特に有効なサポニン分画成分は赤血球の膜タンパク質のグルコースの代謝に関わる赤血球の酸化抑制機構に働くことが示唆され。アンチエイジング薬の開発に大きく役立つと考えられた。

研究成果の概要（英文）： Circulating erythrocytes are constantly exposed to oxidative stress as a result of the high cellular concentration of oxygen and hemoglobin, which is a source of the reactive oxygen species. Exposure to oxidative stress dramatically alters the function of the erythrocyte membrane, such as elevation of viscosity, decrease of deformability. Saponins (especially ginsenosides Rg2 & Rh1) from Ginseng Panax protect the rheological functions of erythrocytes against oxidative stress by preventing the oxidation of SH-groups in band 3 protein. The glucose metabolism were suggested to participate in mechanism of protections.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：老年医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体は常に酸化ストレスに曝されている。特に、赤血球はおよそ120日間全身の血管を循環し、酸素と二酸化炭素のガス運搬に携わるため、活性酸素などにより傷害を受け易い。そのため徐々に膜脂質および膜タンパク質が酸化される。膜に傷害を受けた赤血球は

循環動態特性が変化し、血液粘度増加の他、微小循環障害を引き起こす原因ともなる。生活習慣病における循環障害の増悪因子のひとつともなっている。また、このような老化赤血球は脾臓などの網内系のマクロファージによる選択的な貪食・破壊により、循環血中から除去される。この赤血球破壊の亢進は

高齢者の貧血の一因ともなっている。

(2) 我々は、赤血球の種々の循環動態特性と酸化ストレスとの関連を調べてきた。「赤血球膜の脂質およびタンパク質の酸化物量と赤血球流動挙動の障害が相関すること」「脂溶性の抗酸化剤の添加が酸化ストレス傷害を緩和すること」(文献1、2)。赤血球の機能障害の機構も酸化ストレスによる直接的な傷害だけでなく、「カスパーゼ酵素の活性化による間接的な傷害機構の存在の可能性」なども、その分子機構を含め明らかにしてきた(文献3)。これらの研究において、酸化ストレスが赤血球の流動特性を低下させ赤血球老化を進めることを明らかにし、その予防の可能性を示した。アンチエイジングの観点から、生薬成分を調べ、オタネニンジン(Ginseng Panax)由来のサポニンが酸化ストレスによる血液粘度増加を抑制することが分かった。

文献

1) 1) Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, Maeda N. Rheological changes in human red blood cells under oxidative stress. Pathophysiology 6, 103-110 (1999).

2) Cicha I, Tateishi N, Suzuki Y, Maeda N. Rheological changes in human red blood cells under oxidative stress: effects of thiol-containing antioxidants. Pathophysiology 6, 121-128 (1999).

3) Suzuki Y, Ohkubo N, Aoto M, Maeda N, Cicha I, Miki T, Mitsuda N. Participation of caspase-3-like protease in oxidation-induced impairment of erythrocyte membrane properties. Biorheology 44(3):179-90 (2007).

2. 研究の目的

酸化ストレスによる赤血球の老化の機構とサポニンがおよぼす抗老化作用の機序を解明する。またサポニン分画中の抗老化作用の有効成分を同定、解析することで赤血球の寿命の決定要因の制御の可能性と、将来的な赤血球における抗老化薬の可能性を探る。

本研究の目的は酸化ストレスによる赤血球への傷害をサポニンが抑制する機構を明らかにする。酸化ストレスは1)赤血球膜脂質、2)膜タンパク質をそれぞれに酸化し、直接的に膜の機能障害を起こす、また3)カスパーゼを活性化することで間接的な障害も起こす。その結果、赤血球の膜粘弾性の低下を来し、流動挙動特性が低下すると予想される。サポニンの酸化ストレスに対する保護効果が1)~3)の何れに効果があるのかを解明する。サポニンはコレステロール基本骨格に0~3個の糖と水酸基が付いた30種以上の成分を含む。その中で酸化ストレス

に対し保護効果がある成分を同定することで、酸化ストレスによる傷害の機構を明らかにする。また、有効成分の分子構造を解析することで将来の抗老化薬の可能性を探る。

3) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

赤血球の老化とカスパーゼの役割など最近注目されてきており(文献:FASEB J. 19, 416-8, 2005)酸化ストレス傷害による循環障害のメカニズムに関して新しい視点で見ただけでなく、サポニンを循環障害の治療薬として合わせて評価し有効成分の同定と、その保護特性から赤血球老化のメカニズムを探ることは独創的である

赤血球の老化による粘度増加などの流動挙動特性の変化は微小循環障害を引き起こし易くする。特に高血圧、糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病の合併症の発症および増悪に影響する。本研究により赤血球の老化に対する抗老化:アンチエイジングの一つの予防法として、また合併症の治療薬開発の確立に大きく貢献できる。

3. 研究の方法

酸化ストレスを加えた赤血球の流動挙動低下を粘度計により計測し、サポニン分画添加時の保護効果を評価すると同時に膜脂質および膜タンパク質の酸化度を計測し、その保護効果の機構を明らかにする。

(1) 赤血球試料

健康成人から採取した血液を白血球除去後に等張リン酸緩衝食塩水にて洗浄する。

(2) サポニン調整

生薬サポニンおよびその精製分画成分を採取する。

(3) 酸化ストレス処理

酸化ストレスは0~2mMの硫酸鉄と5倍濃度のアスコルビン酸を含む緩衝液に赤血球を浮遊させ、37℃で1時間処理することで与える。また、生薬サポニンまたは、その主要分画成分を加えた場合での酸化ストレス処理を行う。

酸化ストレス処理後、赤血球を緩衝液で洗浄しヘマトクリットを45%に調整する。

(4) 赤血球流動挙動の評価

粘度計測:ヘマトクリット45%に調整した赤血球浮遊液を試料として回転円錐-平板粘度計により測定する。

赤血球変形能計測:倒立顕微鏡とカメラおよび透明回転円錐と平板で構成される高ずりレオスコープにより、赤血球にずり応力を加えて、楕円盤状に変形した赤血球の形から、赤血球変形指数を算出し評価する。

(5) 膜傷害の評価

赤血球を低張緩衝食塩水により溶血さ

せて、4回洗浄する事で赤血球膜試料を作成する。

赤血球膜タンパク量：クマシーブリリアントブルーとタンパク質が結合した時の595nmの吸光度の変化を測定することで定量する。

タンパク質チオール残基：タンパク質中の酸化を受けていないチオール残基量を5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB: イールマン試薬)がチオール基によって還元され、415nmの吸光を示すことを利用して測定する。膜タンパク質酸化の正の相関を示す指標。

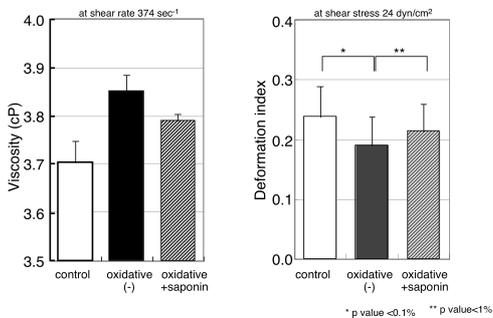
赤血膜過酸化脂質量：2-thiobarbituric acid (TBA) が過酸化脂質により酸化されて535nmの吸光を示すことを利用する。

また、生体試料についてはヘルシンキ宣言に準拠して取り扱った。

4. 研究成果

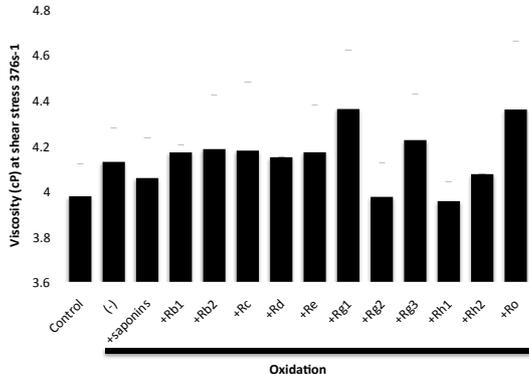
(1) 赤血球の流動挙動：酸化ストレスを加えると血液粘度は増加し、赤血球変形能を低下したが、紅参由来サポニン粗分画を添加すると粘度増加および変形能の低下をそれぞれ抑制した (図1参照)。また、ジンセノサイド Rg2 および Rh1 を添加した場合のみ粘度増加を抑制したが、他のサポニン分画は効果を認めなかった (図2)。

図1 酸化ストレス障害に対するサポニンの保護効果



Erythrocytes are incubated with 0-1mM FeSO₄/Ascorbic acid at 37°C, 60 min.

図2



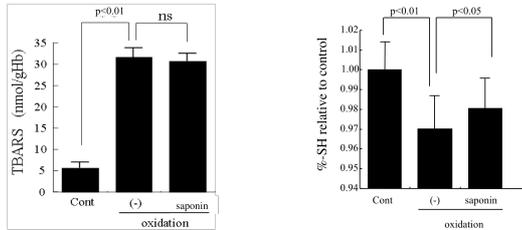
2) 膜傷害の評価：酸化ストレスを加えると

赤血球の膜脂質における過酸化脂質量が増加したが、サポニン添加では抑制できなかった。膜タンパク質についてはタンパク質中のチオール残基量は低下したが、サポニン添加で低下が抑えられた (図3)。

酸化ストレスが加わった時に添加したサポ

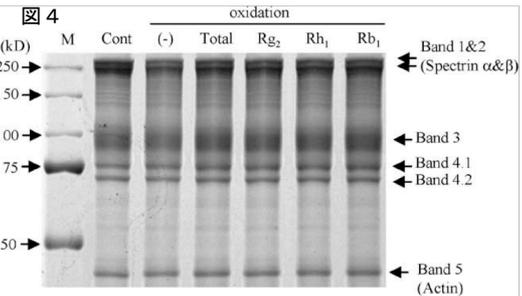
図3

酸化ストレスによる赤血球膜傷害の指標



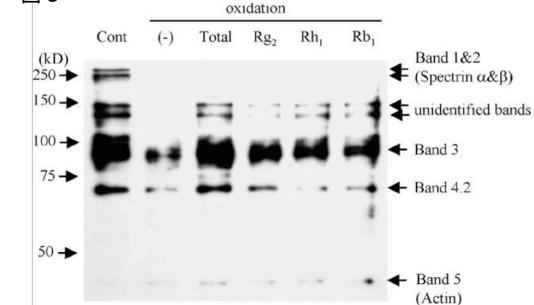
RBC treated with 0-1mM FeSO₄/0-5mM Ascorbic acid w/o 50µg/ml saponin, 60 min at 37°C. ニン分画の Rg2 と Rh1 は膜タンパク質のチオール残基量の減少を抑制したが、電気泳動において、膜タンパク質の重合化および分解は認められなかった (図4)。

しかしながら、チオール基をビオチンで標識



して、赤血球の膜タンパク質毎のチオール基をみると、酸化ストレスによって、骨格タンパク質のスペクトリンと膜貫通タンパク質のバンド3において著明に減少していた。サポニン分画 Rg2 および Rh1 はスペクトリンのチオール基の減少を抑制しなかったが、バンド3では抑制した (図5)。

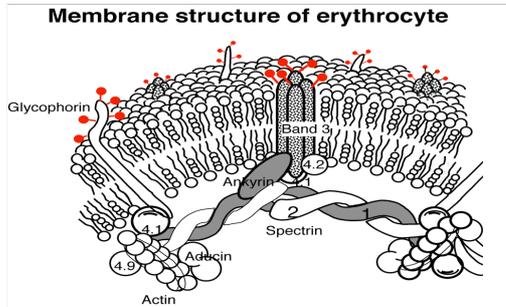
図5



4. 考察

赤血球のレオロジー機能として、赤血球変形能は 1) 赤血球の形態、2) 赤血球の内部粘

度、3) 赤血球膜の粘弾性が影響する。形態に異常はなく、内部粘度に影響する赤血球内ヘモグロビン濃度にも変化はなかった。赤血球膜タンパク質であるスペクトリンとバンド3の酸化傷害で膜の粘弾性が増加したことが変形能の低下を起し、血液粘度の増加に繋がった。サポニン分画中のRg2とRh1はバンド3の酸化傷害を抑制することでレオロジー機能障害を抑えたと考えられた。



Rg2 および Rh1 は水性条件では過酸化水素を消去する効果はない (DATA not shown)。また、化学構造上も直接的に中和できるとは考えにくい。酸化ストレスとしてゆるい低温環境での血液保存実験においても同様な結果であり、また、グルコースがあることが必要条件であることから赤血球の糖代謝が重要な役割を果たしていることが分かっている。コレステロール骨格構造を有するこのサポニン分画が、赤血球自身の酸化還元機構を活性化させている可能性がある。その機構の解明こそが赤血球のみでなく、普遍的なアンチエイジングの大きなテーマと考えられる。

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 2 件)

1. Christensen DJ, Ohkubo N, Oddo J, Van Kanegan MJ, Neil J, Li F, Colton CA, Vitek MP. Apolipoprotein E and peptide mimetics modulate inflammation by binding the SET protein and activating protein phosphatase 2A. *J Immunol.* 186, 2535-42 (2011) [査読有り]

2. Samukawa K, Suzuki Y, Ohkubo N, Aoto M, Sakanaka M, Mitsuda N Protective effect of ginsenosides Rg(2) and Rh(1) on oxidation-induced impairment of erythrocyte membrane properties. *Biorheology* 45, 689-700 (2008) [査読有り]

[学会発表] (計 5 件)

1) 鈴木洋司, 酸化ストレスによる赤血球膜の酸化障害と Ginseng 由来サポニンの保

護効果, 第30回日本生理学会中国四国地方会 (2008. 11. 15 松山)

2) 鈴木洋司, 酸化ストレスによる赤血球レオロジー機能障害と紅参由来サポニンによる保護機構の解明, 第32回日本バイオレオロジー学会年会 (2009/6/4-5 桐生)

3) Suzuki Y., Effect of ginsenosides on rheological functions of erythrocytes against oxidative stress. 第36回国際生理学会世界大会 (2009/7/28-8/1 Kyoto)

4) 鈴木洋司, 血液保存における赤血球レオロジー機能障害と紅参由来サポニンの効果. 第33回日本バイオレオロジー学会年会 (2010/6/3-4 和光)

5) 河野広貴 他, 紅参由来サポニンの血液保存時の機能障害に対する保護効果 第32回日本生理学会中国四国地方会 (2010. 11. 20-21 出雲)

[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

鈴木 洋司 (SUZUKI YOJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 20226567

(2) 研究分担者

満田 憲昭 (MITSUDA NORIAKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 10314329

大久保 信孝 (OKUBO NOBUTAKA)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号： 10432791