

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590758

研究課題名（和文） 低酸素適応応答機構における和漢薬の標的分子と病態変化の解析

研究課題名（英文） Analysis of Target Molecules and Pathogenesis with Traditional Japanese Medicine on the Mechanism of Hypoxic Adaptative Response

研究代表者

後藤 博三（GOTO HIROZO）

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：40313598

研究成果の概要（和文）：近年、生体の低酸素状態とそれに応答する低酸素誘導因子（HIF）の活性化が注目され、末期腎不全においても重要な影響を及ぼしていることが報告されている。本研究では、八味地黄丸の腎不全ラットへの影響を HIF の関与に着目して検討した。その結果、八味地黄丸は尿蛋白を減少し、腎皮質中の HIF 蛋白量を増加した。さらに、低酸素下で尿細管上皮培養細胞を用いて活性成分を検索したところ、シナムアルデヒドとペオノールに HIF 蛋白量の増加作用が認められた。

研究成果の概要（英文）：Recently the hypoxic state of the biological body and the activation of hypoxia inducible factor (HIF) has attracted attention. HIF has been also reported to influence the end-stage of renal failure. In this study, we studied the effect of hachimijiogan on HIF levels in renal failure rats. The results were that the administration of hachimijiogan decreased the uric protein and increased the amount of HIF protein in the renal cortex. Furthermore we studied the active components of hachimijiogan using renal tubular epithelial cultured cells. Cinnamaldehyde and paonol were found to increase the amount of HIF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：東洋医学

1. 研究開始当初の背景

(1)腎臓病（chronic kidney disease: CKD）が、心血管疾患の発症や死亡の重要な危険因子であることが明らかとなっている。CKDの進展に関して、蛋白制限や減塩などの食事療法、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬（angiotensin II receptor blocker: ARB）な

どの薬剤による治療法の進歩にもかかわらず、末期腎不全による透析患者が世界的に増えてきている。

(2)CKDの進行に関しては、ネフロン破壊や糸球体硬化と間質の線維化という共通した機序が存在し、腎における慢性低酸素が腎不全進展の共通経路であるという報告も散見

される。このことから、CKD における低酸素障害に対する治療は、その進展を抑制する重要な因子であると考えられている

(3)八味地黄丸は、約 1800 年以上も前から使用されていた漢方方剤で、基礎研究では、糖尿病性腎症モデルや 5/6 腎摘慢性腎不全モデルラットに対する腎機能低下抑制作用が報告されている。その作用機序として、抗酸化作用に関連した尿毒症物質の減少、器質的変化の改善などが報告されている。

2. 研究の目的

(1)血流障害による組織低酸素が腎不全進展の要因とする報告がなされている 5/6 腎摘慢性腎不全モデルラットを用いて、八味地黄丸の効果を低酸素誘導因子に及ぼす効果に着目して、腎治療薬の主流となっている ARB と比較検討した。

(2)低酸素状態で培養した尿細管細胞を用いて、八味地黄丸の活性成分に関して検討を加えた。

3. 研究の方法

(1)全ての実験は国立大学法人富山大学動物取扱規則に従い、動物実験委員会の承認を得て実施した。体重 260 から 280 g の雄の Sprague-Dawley ラットを 7 日間適応飼育の後、7 日間の間隔で左腎 2/3 切除と右腎動静脈結紮を行った。1 グループ (10 匹) は正常対照群として疑似手術のみを行った (Sham 群)。5/6 腎摘慢性腎不全モデルラット群 (5/6 腎摘群) は Control 群、低用量八味地黄丸群、高用量八味地黄丸群、Candesartan 群の 10 匹ずつに無作為に分けた。手術施行後 5 群の動物を 7 日間飼育し、非観血的尾動脈血圧測定、体重測定、採血、採尿を実施した (9 週齢)。その後、7 日間は低用量八味地黄丸群には 220 mg/kg/day、高用量八味地黄丸群には 660 mg/kg/day の八味地黄丸エキスを胃管により連日投与した。八味地黄丸の投与量はヒト標準投与量の 3 倍と 10 倍になる。また、Candesartan 群には 3 mg/kg/day の ARB である candesartan を同様に経口投与した。投与前の採血は尾静脈から各々の薬物投与開始時に実施した。実験終了時に、ペントバルビタールナトリウム (50 μ g/kg BW) をラットの腹腔内に注射し、深麻酔した。速やかに心臓採血により血液を採取し、腎臓を脱血して摘出し、解析まで -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。採尿は薬物投与前と屠殺前に実施した

(2)①屠殺時の検体を用いて血清アルブミン (s-Alb)、血中尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン (s-Cre)、クレアチニンクリアランス (Ccr)、尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を測定した。

②腎組織及び培養細胞を用いてリアルタイム RT-PCR により hypoxia inducible factor

(HIF)-1 α 、vascular endothelial growth factor (VEGF)、glucose transporter 1 (Glut-1) mRNA を測定した。実験データは全て β -actin mRNA 量によって補正した。

③摘出した腎臓の皮質をとりわけ、ウエスタンブロット法により HIF-1 α 蛋白質量を測定した。

(3)凍結保存した腎の残存腎皮質に、マウス抗 HIF-1 α 抗体を切片上に添加し標的分子を茶色に発色させ、対比染色としてヘマトキシリン染色を施行し鏡検した。

(4)ラット近位尿細管上皮細胞 (NRK-52E) を N₂ 94 %、CO₂ 5 %、O₂ 1 % の低酸素下で培養し、八味地黄丸エキス及び各生薬エキスを 100 μ g/ml で、cinnamaldehyde、paeonol など各成分を 10 μ g/ml で添加した。

(5)それぞれの測定結果は、平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm S.D.) で表した。群間の比較は一元配置分散分析後、Dunnett's test にて解析し、危険率 5%未満を統計学的に有意と判定した。

4. 研究成果

(1)①体重、腎重量、血圧及び尿量の経過：実験終了時、体重は Sham 群に比して 5/6 腎摘の 4 群はいずれも有意に低く、この 4 群間では有意差はなかった。投与後の体重あたりの腎重量は 5 群間で差を認めなかった。収縮期血圧と拡張期血圧も 5 群間で差を認めなかった。尿量は Sham 群に比べて 5/6 腎摘を施した 4 群とも有意に増加し、5/6 腎摘を施した 4 群間では有意差を認めなかった。

② s-Alb、BUN、s-Cre、尿中蛋白質量、尿中 8-OHdG の経過：実験終了時、s-Alb 値は 5 群間で有意差を認めなかった。BUN 値は Sham 群に比べて Control 群と低用量八味地黄丸群で有意に上昇した。s-Cre 値は、Sham 群に比べて Control 群でのみ有意な上昇を認めた。尿中蛋白質量は、Sham 群に比べて Control 群でのみ有意な上昇を認め、高用量八味地黄丸群と Candesartan 群は Control 群に比べて有意な減少を認めた。Ccr 値は、5/6 腎摘を施した 4 群はいずれも Sham 群に比べて有意な減少を認めた。尿中 8-OHdG 値は、Sham 群に比べて Control 群で有意に増加して、Control 群に比べて八味地黄丸群では低用量、高用量とも有意に低下し、Candesartan 群でも有意な低下がみられた。

③腎間質の組織学的評価：腎組織の azan 染色にて、Sham 群、5/6 腎摘を施した 4 群のいずれも間質の線維化を認めなかった。

④腎皮質における HIF-1 α 蛋白質及び標的遺伝子：腎皮質中の HIF-1 α 蛋白質量は、5/6 腎摘を施した 4 群はいずれも Sham 群に比べて有意な上昇を認め、高用量八味地黄丸群は Control 群に比べても有意な上昇を認めた (図 1)。VEGF mRNA、及び Glut-1 mRNA は、

高用量八味地黄丸群において Sham 群と Control 群に比べて有意な上昇を認めた。腎皮質の HIF-1 α 免疫染色にて、Control 群と比して低用量八味地黄丸群では HIF-1 α 陽性細胞が多くみられた。また高用量八味地黄丸群は低用量よりも HIF-1 α 陽性細胞がさらに多くみられた。一方、Candesartan 群の HIF-1 α 陽性細胞は八味地黄丸投与群よりも少なかった。

(2) ①NRK-52E 細胞における八味地黄丸の HIF-1 α 蛋白への影響：NRK-52E 細胞を低酸素培養し、八味地黄丸エキスを 100 μ g/ml で添加し、添加した細胞と非添加の細胞を 8 時間まで経時的に比較したところ、全ての時

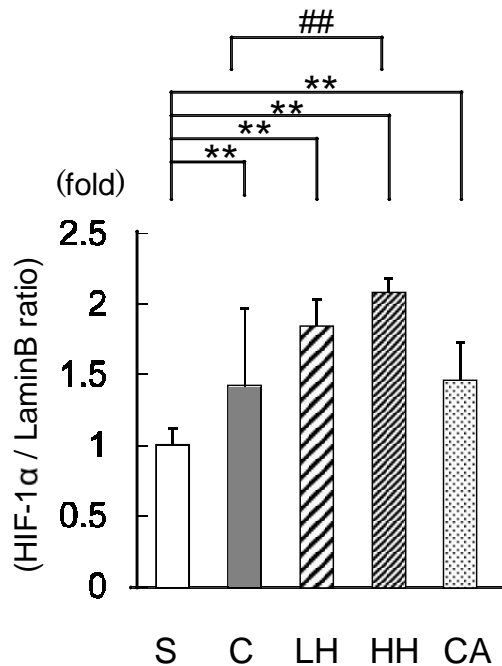


図 1：腎皮質の HIF-1 α 蛋白量の比較 (S: Sham 群、C: Control 群、LH: 低用量八味地黄丸群、HH: 高用量八味地黄丸群、CA: Candesartan 群、** P <0.01 対 Sham 群、# P <0.01 対 Control 群)

点において八味地黄丸添加により HIF-1 α 蛋白検出量の増加が認められ、そのピークは低酸素培養開始 6 時間後であった。また検出されたバンドが HIF-1 α 蛋白によるものであることを確認するため、HIF-1 α に対する siRNA を遺伝子導入し HIF-1 α をノックダウンさせ、低酸素下にて 6 時間の培養をしたところ、HIF-1 α 蛋白検出量は減少した。

② NRK-52E 細胞における八味地黄丸の構成生薬の HIF-1 α 蛋白及び標的遺伝子への影響：NRK-52E 細胞を低酸素培養し、八味地黄丸を構成する 8 種類の生薬エキスを各々 100 μ g/ml で添加し低酸素下で 6 時間培養したところ、桂皮エキスと牡丹皮エキスを添加した

培養細胞において HIF-1 α 蛋白検出量が control に比べて有意に増加した。HIF-1 α 蛋白の標的遺伝子である VEGF mRNA、Glut-1 mRNA も有意に増加した。

③ NRK-52E 細胞における桂皮、牡丹皮の主要成分の HIF-1 α 蛋白及び標的遺伝子への影響：NRK-52E 細胞を低酸素培養し、桂皮の主要成分である cinnamaldehyde、cinnamic acid、牡丹皮の主要成分である paeonol、paeoniflorin、これまでに HIF-1 α に関して報告のある epigallocatechin gallate (EGCG) を各 10 μ g/ml で添加し低酸素下で 6 時間培養したところ、cinnamaldehyde、paeonol 添加により HIF-1 α 蛋白量が DMSO のみ添加した培養細胞に比べて有意に増加した (図 2)。同様に cinnamaldehyde、paeonol 添加において VEGF mRNA、Glut-1 mRNA も DMSO のみ添加した培養細胞に比べて有意に増加した。

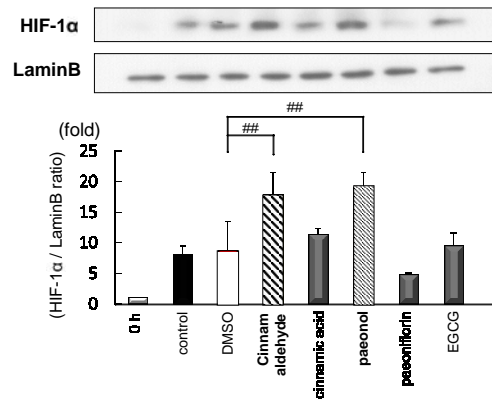


図 2：NRK-52E 細胞に対する桂皮、牡丹皮の主要成分の HIF-1 α 蛋白量の比較、# P <0.01 対 DMSO

(3) ①八味地黄丸群では、Control 群に比較して、高用量群で尿蛋白の減少効果が認められた。また、腎組織中の HIF-1 α 蛋白量は有意に増加し、八味地黄丸による HIF の活性化作用が示唆された。このことは、関連遺伝子である VEGF mRNA と Glut-1 mRNA が増加したことから支持される。また、組織学的検索においても、尿細管上皮細胞における HIF-1 α 蛋白検出量の増加が確認された。

②腎においては HIF-1 α 発現の主体は近位尿細管上皮細胞であるため、活性成分の検索にラット近位尿細管上皮細胞 (NRK-52E) を用いて八味地黄丸の構成生薬の HIF 発現作用を検討した。その結果、桂皮と牡丹皮に HIF-1 α 蛋白増加作用を認めた。さらにこれらの生薬の主要成分に関して、HIF-1 α 蛋白増加作用を検討したところ、各々の主成分である桂皮の cinnamaldehyde と牡丹皮の paeonol に活性が認められた。

③以上のことから、八味地黄丸は、HIF 活性

化を介した腎保護作用を有することが示唆された。作用機序として、HIF-1 α mRNA は増加せず HIF-1 α 蛋白量が増加したことから、HIF-1 α 蛋白の分解抑制作用が示唆された。本結果から、低酸素誘導因子を介した腎治療薬という観点から、八味地黄丸は既存の腎不全治療に加えて、新たな治療手段を提供する可能性が考えられる。

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 Oka H., Goto H., Koizumi K., Nakamura S., Tsuneyama K., Zhou Y., Jo M., Fujimoto T., Sakurai H., Shibahara N., Saiki I., and Shimada Y.: Effect of Hachimiijiogan against Renal Dysfunction and Involvement of Hypoxia-Inducible Factor-1 α in the Remnant Kidney Model. Evid Based Complement Alternat Med. 査読有 2011;2011:348686. Epub 2011 Feb 24.

② Oka H., Goto H., Koizumi K., Nogami T., Watari H., Nakamura S., Zhou Y., Sakurai H., Shibahara N., Saiki I., Shimada Y.: Cinnamaldehyde and paeonol increase HIF-1 α activity in proximal tubular epithelial cells under hypoxia. Journal of Traditional Medicine. 査読有 28, 149-157, 2011.

[学会発表] (計1件)

①岡 洋志, 後藤博三, 小泉桂一, 引網宏彰, 藤本 誠, 野上達也, 済木育夫, 嶋田豊: 腎機能障害に対する八味地黄丸の効果と低酸素適応応答因子の関与. 第27回和漢医薬学会学術大会, 2010, 8, 28-29, 京都.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 低酸素応答因子の増強剤および増強方法

発明者: 後藤博三、岡洋志、小泉桂一

権利者: 富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-182680

出願年月日: 2010年8月18日

国内外の別: 国内

名称: 低酸素応答因子の増強剤および増強方法

発明者: 後藤博三、岡洋志、小泉桂一

権利者: 富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-182714

出願年月日: 2010年8月18日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 博三 (GOTO HIROZO)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号: 40313598

(2) 研究分担者

引網 宏彰 (HIKIAMI HIROAKI)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号: 70345586