

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07457

研究課題名(和文)漢方補腎剤がインスリンシグナル伝達を介した2型糖尿病病態回復に与える影響の検討

研究課題名(英文)Traditional Kampo medicine improve insulin resistance in ob/ob mice via recovery of Akt phosphorylation

研究代表者

長島 史裕 (Nagashima, Fumihiro)

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60228012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：漢方補腎剤である八味地黄丸(HJG)および牛車腎気丸(GJG)を肥満モデルであるob/obマウスに長期投与した。その結果、インスリン負荷試験においてHJGおよびGJG投与群はコントロール群と比較してインスリンによる血糖降下改善作用が認められた。またGJG投与は2型糖尿病の高インスリン血症が有意に改善した。さらにHJG投与はob/obマウスの肝および内臓脂肪におけるAktリン酸化が、GJG投与では肝および骨格筋におけるAktリン酸化がそれぞれ有意に改善した。一方、同じく漢方補腎剤である六味丸は、少なくとも高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性を改善しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3種の漢方補腎剤の糖尿病治療に対する有効性について、ある種の糖尿病モデルマウスで報告されているが、インスリン感受性改善やインスリンシグナル伝達を担うAktリン酸化の影響を解析した報告はほとんどなく、詳細な検討がなされていなかった。その中で本研究の示す意義は漢方補腎剤の2型糖尿病改善に与えるエビデンスをマウス表現型から分子メカニズムまで一貫して証明できた点で非常に大きく、ヒトへの臨床応用を行う前段階として、十分なデータを提供できたと考えられる。漢方薬を用いたインスリン抵抗性病態の改善は、安全かつ安価な糖尿病治療薬の提供を可能にし、重要な意義を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We administered Hachimijiogan (HJG) and Goshajinkigan (GJG) to leptin deficient obese mice (ob/ob). The results showed that insulin resistance was significantly improved in HJG- and GJG-treated mice compared with the control group in the insulin tolerance test. In addition, GJG treatment significantly improved hyperinsulinemia which observed in ob/ob mice. Furthermore, HJG treatment significantly improved Akt phosphorylation in the liver and visceral fat of ob/ob mice, while GJG treatment significantly improved Akt phosphorylation in the liver and skeletal muscle. On the other hand, Rokumigan did not improve insulin resistance induced by high fat diet. We could conclude that HJG and GJG, not Rokumigan, improved insulin resistance via regulating the phosphorylation of Akt in the insulin targeting tissues.

研究分野：天然物化学

キーワード：2型糖尿病 漢方補腎剤 インスリン 八味地黄丸 牛車腎気丸 六味丸

1. 研究開始当初の背景

「平成28年度 国民健康・栄養調査」(厚生労働省)によると、国内では糖尿病患者が1,000万人を超えたことが報告されており、さらに糖尿病予備軍を含めると2,000万人ほどの糖尿病患者予備軍がいるとされ、なお増加の一途を辿っている。その95%は2型糖尿病であり、多くの西洋医学的アプローチによる医薬品が処方されているが、その一方で副作用、医療費の高騰も大きな問題となっている。これらのことを踏まえて昨今、副作用の面、医療費の面において、漢方薬の有用性が見直されてきた経緯がある。しかしながら東洋医学的アプローチとしての2型糖尿病治療薬は多くは存在せず、その作用機序も明確ではなかった。一方で、研究分担者は、老化促進モデルマウス(SAMP8)のサルコペニア病態を漢方補腎剤である「牛車腎気丸」が抑止し、その機序としてインスリンシグナル伝達において重要なAktリン酸化の回復を介することを報告した(*Phytomedicine*, 2015)。このことから牛車腎気丸、八味地黄丸および六味丸などの漢方補腎剤がインスリンシグナル伝達の改善を介して、2型糖尿病のインスリン抵抗性病態を回復させるのではないかと考え、肥満モデルマウスob/obを用いて漢方補腎剤がサルコペニア同様に、インスリンシグナル減弱を抑止することで、耐糖能異常およびインスリン抵抗性を改善することが可能かどうか検討することにした。

2. 研究の目的

老化促進モデルマウスのサルコペニア病態を漢方補腎剤である「牛車腎気丸」が抑止したことを報告しており、2型糖尿病病態でも重要である骨格筋の「インスリンシグナル伝達機構」におけるAktリン酸化の減弱を抑止したことを報告している(*Phytomedicine*, 2015)。この成果は世界で初めて漢方補腎剤の作用点を明確にした報告であった。一方で、Aktリン酸化はインスリン抵抗性病態において減弱し、インスリン刺激によって増加することはすでに知られており、2型糖尿病に対する治療効果を評価するうえでも重要な因子である。この結果を基盤として2型糖尿病のインスリン抵抗性病態に対して漢方補腎剤が薬効を示すのではないかと、という点に着目し、肥満および2型糖尿病のモデルになりうるマウスであるob/obを用いて、漢方補腎剤を長期間投与した際に、インスリン抵抗性について検討するため、インスリンシグナル伝達機構に着目し、2型糖尿病のインスリン抵抗性病態回復の表現型解析とその分子メカニズムの解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

漢方補腎剤の投与

(1) 肥満モデルマウスであるob/obに漢方補腎剤を4%混餌した飼料(CE2ベース)とコントロール食(CE2)を10週間(GJG)および30週間(HJG)給餌した。また、HJGと六味丸に関してはHFD32およびHFD32に4%HJGまたは六味丸を混餌した飼料を4週間および10週間給餌した。

2型糖尿病の表現型解析

(2) ob/obマウスの検討では各漢方薬投与群およびコントロール食群のマウスを1昼夜、絶食にしたのちインスリン負荷試験を行う。具体的には1.5U/kg BWのインスリン溶液を腹腔内投与し、投与前、投与後30分、60分、90分ならびに120分の血糖値を測定した。高脂肪食負荷マウスの実験では、絶食を行わず、1U/kg BWのインスリン投与を行った後、各時間において血糖値

を測定した。

インスリンシグナル伝達の測定

(3) 各漢方薬投与群およびコントロール食群のマウスを麻酔下で安楽死させた後、肝、ヒラメ筋（骨格筋）および内臓脂肪組織を採取、即座に液体窒素で組織を凍らせたのち、-80度で保存した。

(4) 各組織をRIPA Bufferに浸け、ホモジナイザーで粉碎後、不溶分画を遠心分離で取り除いた。

(5) SDS-PAGEでタンパク質を分離し、タンパク質を膜に転写した。

(6) 抗リン酸化Akt/PKB(Protein Kinase B)抗体と反応させ、ウエスタンブロットを行った。

(7) リン酸化したAkt/PKBに関して、撮影装置を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) HJGについて抗糖尿病効果に関する検討を行った。その結果、ob/obマウスにHJGを長期投与すると、インスリン負荷試験においてインスリン投与後120分血糖値は有意に低下しており、2型糖尿病病態であるインスリン抵抗性を改善することが解った。また、HJGの長期投与は、肝および内臓脂肪組織のインスリンシグナルが有意に亢進し（Aktリン酸化の回復）、個体におけるインスリン抵抗性改善のメカニズムとして、インスリンシグナル伝達の改善が挙げられることが明らかになった。

(2) GJGの抗2型糖尿病効果について検討を行った結果、ob/obマウスにGJGを長期投与すると、インスリン負荷試験においてインスリン投与後90分血糖値は有意に低下しており、HJG同様にインスリン抵抗性を有意に改善することが解った。インスリンシグナルの解析においてはHJGとは違い、GJGは肝および骨格筋におけるAktリン酸化が有意に改善されており、インスリンシグナル伝達の改善が、個体のインスリン抵抗性改善に大きく寄与していることが明らかになった。この結果によって、HJGとGJGにおいてインスリン抵抗性改善の作用点の明らかな相違があることも示唆され、それぞれ独自の作用によってインスリン抵抗性を改善していることが確認された。GJGではインスリン抵抗性改善の指標として空腹時の血中インスリン濃度をELISA法にて測定したところ、明らかにインスリン濃度が低下しており、ob/obにおける高インスリン血症を有意に改善することも明確となった。

(3) 加えて、HFD32を用いた高脂肪食負荷に伴う食餌性肥満モデルマウス(C57BL/6J)にHJGを投与した際のインスリン抵抗性改善作用を検討したところ、食餌性肥満においてもob/obと同様にインスリン負荷試験においてインスリン投与後30分および60分の血糖測定において有意な血糖低下作用を見出すことができた。また、空腹時のインスリン分泌には影響を与えなかったものの、随時血糖および空腹時血糖の有意な低下とそれに伴うインスリン抵抗性の指標であるHOMA-IRの有意な低下を確認することができた。さらにインスリンシグナル伝達を精査するために骨格筋、肝および内臓脂肪のAktリン酸化を確認したところ、内臓脂肪においてAktリン酸化の有意な回復が認められた。これらの結果から、八味地黄丸は様々な条件（レプチンが欠損したob/obおよび食餌性肥満モデルC57BL/6J）に由来する肥満に伴ったインスリン抵抗性を有意に改善し、その機序の一端として、内臓脂肪におけるインスリンシグナル伝達の改善が寄与していることが明らかになった。

(4) 六味丸に関して、食餌性肥満モデルにおける10週間の六味丸投与は、少なくとも体重変化や随時血糖に及ぼす影響がないことが示唆された。また、インスリン負荷試験の結果では、高脂肪食負荷マウスおよび高脂肪食負荷+4%六味丸投与マウスとの間で、インスリンによる血糖

降下作用に有意な差はなく、空腹時血糖、空腹時血中インスリン濃度を測定する必要があるが、おそらく、インスリン抵抗性は改善できないことが考えられる。

(5) 以上の研究成果より、漢方補腎剤である HJG および GJG は、作用機序は違うものの、インスリン作用組織におけるインスリンシグナル伝達の有意な改善に伴って、インスリン抵抗性病態が有意に改善されたことが考えられ、一方で六味丸は HJG および GJG と違って、インスリン抵抗性病態を改善できないことが分かった。HJG と GJG に共通し、また六味丸とは違う生薬成分がこの作用に大きく関与した結果、このような作用が発揮されたものと考え、今後、化学成分の分離、精製を行い、培養脂肪細胞や肝細胞を用いた検討で Akt リン酸化を指標に、中心的な役割をする化合物の同定にまで研究を進める必要があると考えられる。さらにこの成果が、新しいインスリン抵抗性改善薬の創薬につなげられることで、より副作用の少ない抗糖尿病薬の開発につなげられると考えられ、今後の展開が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagashima Fumihito, Asakawa Yoshinori	4. 巻 14
2. 論文標題 Diterpenoids From the Argentine and Malaysian Liverworts Anastrophyllum and Jungermannia Species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1934578X19894786	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木早織, 香川正太, 田部勝也, 廣村 信, 古賀貴之, 椎木幾久子, 水津菜月, 大嶺貴亮, 濱地桜子, 奥屋 茂, 木村郁子, 谷澤幸生, 長島史裕
2. 発表標題 八味地黄丸は個体における熱産生を亢進し、抗肥満作用を有する。
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福山彰吾, 香川正太, 越智啓行, 市来 唯, 鈴木早織, 水津菜月, 長島史裕
2. 発表標題 牛車腎気丸が2型糖尿病のインスリン抵抗性病態改善に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 香川正太, 田部勝也, 古賀貴之, 越智啓行, 市来 唯, 福山彰吾, 鈴木早織, 水津菜月, 木村郁子, 長島史裕
2. 発表標題 八味地黄丸は脂肪組織で熱産生亢進を亢進する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福山彰吾, 香川正太, 越智啓行, 市来 唯, 鈴木早織, 水津菜月, 長島史裕
2. 発表標題 牛車腎気丸が2型糖尿病のインスリン抵抗性病態改善に与える影響.
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 越智啓行, 香川正太, 市来 唯, 高橋伸明, 福山彰吾, 長島史裕
2. 発表標題 八味地黄丸は肝および内臓脂肪のインスリンシグナルを介して個体のインスリン抵抗性を改善する.
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤慎太郎, 橋本真奈, 山内麻央, 香川正太, 長島史裕
2. 発表標題 大腸菌の増殖抑制作用を有する苔類のテルペノイド成分.
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	香川 正太 (Kagawa Syota) (30463201)	第一薬科大学・薬学部・講師 (37107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------