

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790400

研究課題名 (和文) *In vivo*/*in vitro* 抗酸化評価に基づく生活習慣病治療薬の適正使用研究課題名 (英文) *In vivo/in vitro* evaluation of antioxidant activity of drugs for lifestyle disease.

研究代表者

門脇 大介 (KADOWAKI DAISUKE)

熊本大学・薬学部・講師

研究者番号：70433000

研究成果の概要 (和文)：

メタボリックシンドロームにおいて酸化ストレスはその病態の発症及び進展に深く関与している。そのため、新規抗酸化剤の開発研究が活発になされているが、抗酸化剤の適応を的確に有する薬剤はほとんどないのが現状である。加えて、新規抗酸化剤の処方追加は医療経済的に負担が大きいと、既存の薬剤の中から抗酸化作用を有する薬物を活用する、いわゆる育薬が実践的な対策として期待されている。

そこで、現在、メタボリックシンドローム改善薬として臨床使用されている降圧薬のプレイオトロピックエフェクトとしての抗酸化作用を解析し、抗酸化作用を加味したメタボリックシンドローム治療に対する新たな治療戦略を提案することを目的とし、*in vivo* 及び *in vitro* の両面から評価した。その結果、オルメサルタンが *in vivo* において抗酸化作用を有することを初めて明らかにした。また、抗酸化作用が降圧効果よりも腎保護効果に関与している可能性が強く示唆された。種々の *in vitro* 実験より、オルメサルタンの抗酸化作用の機序として、自身の化学構造に基づくラジカルスカベンジャー様の直接的な機序と血管内皮における NADPH oxidase の活性化ルートを抑制する間接的な機序の少なくとも二つの経路の存在する可能性が示唆された。従って、高血圧でない場合にも、メタボリックシンドロームの予備軍の段階からの早期投与が有効である可能性を示す有益な知見であり、このような育薬による治療戦略の構築が有用であることを実証でできたと考える。

研究成果の概要 (英文)：

Angiotensin II type 1 (AT1) receptor blockers (ARBs) inhibit the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and have been shown to be effective for treating hypertension. Recently, apart from their ability to lower blood pressure (BP), ARBs had also been reported to show protective effects in cardiovascular and renal diseases. Antioxidant activity is thought to be one of the most important protective effects and several mechanisms have been proposed in the *in vitro* studies. However, the antioxidant effect of olmesartan has not been extensively examined in the *in vivo* studies. Therefore, the aim of this study was to examine the antioxidant activity of olmesartan by utilizing oxidized albumin, a sensitive marker of oxidative stress, in the *in vivo* and *in vitro* evaluation systems. As a result, olmesartan effectively lowered the extent of oxidative damage to albumin in the *in vitro* and the *in vivo* studies. The antioxidant activity of olmesartan is greatly related to its renoprotective effects but not its antihypertensive effect. It is possible that the direct and indirect antioxidant effect of olmesartan is due to its common core structure through modulation of NADPH oxidase activity. Therefore, the potential indication of olmesartan as an antioxidant drug in addition to its antihypertensive effect should be explored. These results are important for developing a new ARB, which has a great protective effect in cardiovascular and renal diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：酸化ストレス，生活習慣病，降圧薬，慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、肥満，高血圧，耐糖能異常，脂質異常症などの心血管疾患のリスクファクターを個人で併せ持つ病態であり，本邦においても生活習慣の欧米化に伴い急速に患者数が上昇している。事実，日本内科学会のメタボリックシンドローム診断基準を用いた厚生労働省の国民健康栄養調査（平成 16 年）によると，メタボリックシンドローム該当者は男女合わせて約 940 万人と推計され，その予備軍まで含めると 1020 万人にも上るという結果となっている。そのため，厚生省は平成 20 年から新しい特定健診・保健指導を導入し，平成 27 年までに生活習慣病有病者とその予備軍を 25%削減するプログラムを実施することとしている。このように，メタボリックシンドロームの予防及び治療は急務であり，社会的問題となっている。

この病態の特徴として，内臓脂肪や心・腎・血管などの標的臓器及び血中で酸化ストレスが亢進していることが知られている。その際，酸化ストレスはアディポサイトカイン異常やインスリン抵抗性のトリガーとして関与するだけでなく，臓器合併症の進展にも深く関わっている。さらに最近，メタボリックシンドロームにおいて酸化 LDL やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の亢進が明らかにされ，これらによる酸化ストレスのさらなる亢進が臓器合併症にも重要な役割を果たしているのではないかと考えられている。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームにおいて酸化ストレスはその病態の発症及び進展に深く関与している。そのため，新規抗酸化剤の開発研究が活発になされているが，抗酸化剤の適応を的確に有する薬剤はほとんどないのが現状である。加えて，新規抗酸化剤の処方追

加は医療経済的に負担が大きいいため，既存の薬剤の中から抗酸化作用を有する薬物を活用する，いわゆる育薬が実践的な対策として期待されている。

そこで，現在，メタボリックシンドローム改善薬として臨床使用されている降圧薬のプレイオトロピックエフェクトとしての抗酸化作用を解析し，抗酸化作用を加味したメタボリックシンドローム治療に対する新たな治療戦略を提案する。（図 1）

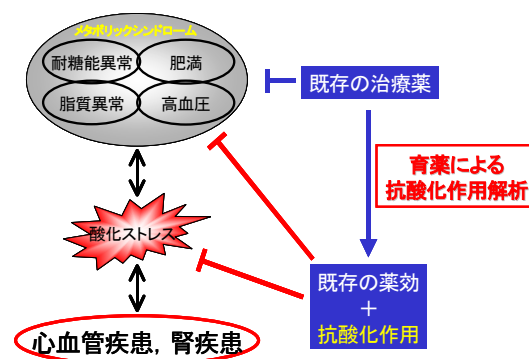


図1 抗酸化作用を加味したメタボリックシンドロームに対する治療戦略

3. 研究の方法

In vivo（病態モデル動物）および in vitro におけるメタボリックシンドローム治療薬の抗酸化作用を評価し，抗酸化作用が示唆される薬物については患者を対象とした臨床試験を行う。

（1）メタボリックシンドローム治療薬の in vitro における抗酸化作用のスクリーニング

①酸化アルブミンによる抗酸化能評価

健常人血清および各種病態患者の血清に各種薬物を添加し，37℃，1週間インキュベーションする。その後血清を，アルブミンの酸

化型・還元型を特異的に分離するカラムを用いた HPLC 解析により、酸化アルブミンを指標とした抗酸化能評価を行う。また、精製したヒト血清アルブミンを用いて、クロラミン T や過酸化水素を添加した場合の HPLC 解析も行う。

②電子スピン共鳴 (Electron spin resonance, ESR) による抗酸化能評価

フリーラジカルは生体内半減期が短いため測定が非常に困難であるため、フリーラジカルを特異的に捕捉する DMPO を代表とするスピントラップ剤を用い評価する。ESR 測定はラジカル産生系の種類を変えることによりフリーラジカル種が特定できるため、スーパーオキシドやヒドロキシルラジカル、メチルラジカルの消去活性を評価可能となり、薬物が消去可能なラジカル種を特定できる。具体的にはキサンチンオキシダーゼによりスーパーオキシドを、フェントン反応によりヒドロキシルラジカルを産生させ、スペクトルを解析する。

③血管内皮細胞を用いた抗酸化能評価

血管内皮細胞のモデルとして汎用されている人臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、酸化ストレスを誘発する刺激剤添加により ROS を産生させる。細胞内で産生された ROS に特異的に反応する蛍光試薬である CMH2-DCFDA の蛍光強度を測定することで、各種薬物添加による細胞内 ROS 産生の抑制効果を評価する。酸化ストレス誘発物質としては、一般的に用いられる PMA や LPS などを用い、病態モデルとしてはアンジオテンシン II や H2O2、尿毒症物質、高濃度グルコースなどを計画している。この際、蛍光顕微鏡による細胞の形態変化や蛍光の局在についても観察する。さらに、細胞傷害性を WST-8 やトリパンプブルーによる生細胞計測により評価する。

④抗酸化作用と炎症マーカーとの相関性の検討

抗酸化作用により細胞傷害性が抑制された薬物については、炎症マーカー (IL-6, TNF- α など) やアポトーシスマーカーの遺伝子及びタンパク質レベルでの発現変動について検討する。

(2) 病態モデル動物を用いた薬物の抗酸化作用の有効性評価

in vitro スクリーニングより抗酸化作用を有する可能性が認められた薬物に対して、病態モデル動物を用いた in vivo での検討を行

う。病態モデルとして、糖尿病、肥満 (高脂血症)、高血圧を設定し、表 1 に示す項目について検討を行う。また、免疫染色法などの手法を用いて組織を評価する。

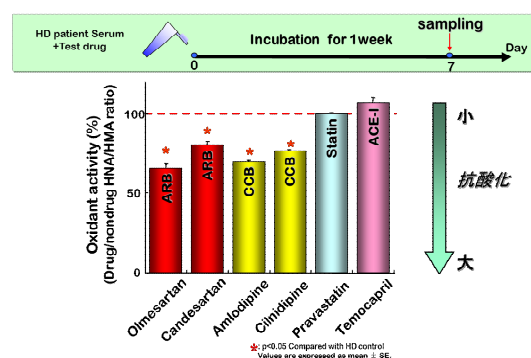
4. 研究成果

(1) メタボリックシンドローム治療薬の in vitro における抗酸化作用のスクリーニング

メタボリックシンドローム治療薬として、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) であるオルメサルタン、カンデサルタン、カルシウム拮抗薬 (CCB) としてアムロジピン、シルニジピン、スタチン系薬としてプラバスタチン、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) としてテモカプリルを選択した。また、in vitro の検討において薬物濃度は健康人に単回投与した際の最高血中濃度 (Cmax) を用いた。

①酸化アルブミンによる抗酸化能評価
薬物スクリーニングとして酸化アルブミンによる抗酸化能評価を行った。透析患者の血清に各種薬物を添加し、37°C、1 週間インキュベーション後、アルブミン酸化度を測定した結果を図 2 に示す。この結果から、ARB および CCB においては抗酸化作用を有することが示唆された。そこで次に精製したヒト血清アルブミンを用いて、クロラミン T や過酸化水素を添加した際のアルブミン酸化度を評価した。その結果、CCB においては抗酸化作用を示さず、オルメサルタンのみがどちらの反応系においても良好な抗酸化能を有していることが示された。(図 3) そこで以降の検討はオルメサルタンを中心に行うこととした。

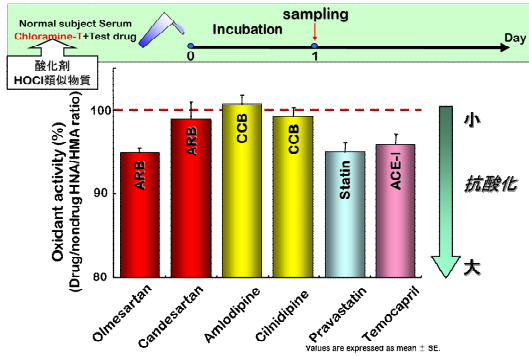
図 2 血液透析患者血漿における薬物の抗酸化効果



②血管内皮細胞を用いた抗酸化能評価

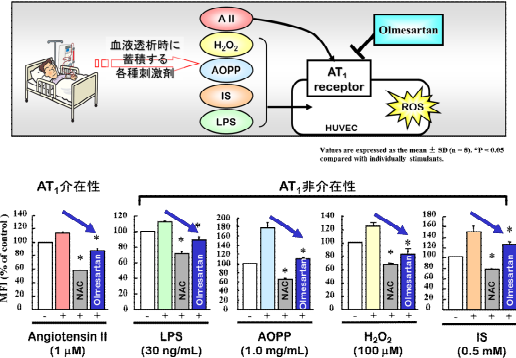
近年、酸化ストレスによる臓器障害では、血管内皮細胞の障害が引き金となることが明らかになってきている。そこで、血管内皮細胞のモデルとして汎用されている人臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、酸化ストレス

図3 クロラミンT添加血漿における薬物の抗酸化効果



を誘発する刺激剤添加により ROS を産生させ、その ROS 産生をオルメサルタンが抑制するかどうかを検討した。その結果、その程度は異なるものの、PMA, LPS, アンジオテンシン II, H2O2, および尿毒症物質であるインドキシル硫酸による ROS 産生をオルメサルタン添加により抑制した。(図4) また、このメカニズムとしてシグナル伝達物質である PKC および PI3K の機能を抑制することが示唆された。さらに、リアルタイム PCR による検討により、NADPH oxidase の発現抑制も認められた。また、ROS 産生を抑制することにより細胞障害性を軽減することが WST-8 により明らかとなった。

図4 HUVECにおける各種刺激剤に対するROS産生とオルメサルタンの効果



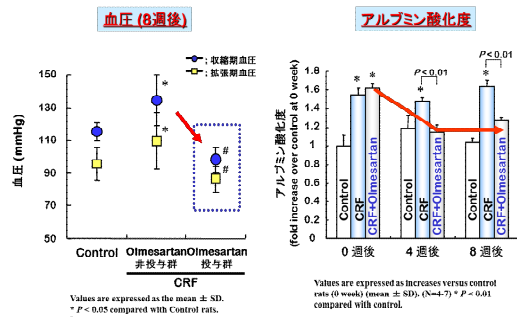
③ 抗酸化作用と炎症マーカーとの相関性の検討

HUVECs において、AII 刺激による ROS 産生の亢進は、一酸化窒素 (NO) 産生能の低下及び炎症性サイトカインである単球遊走因子 (MCP-1) の発現亢進、さらには細胞生存率の低下を誘引した。オルメサルタンはそれらに対して抑制効果を示した。またヒト不死化近位尿細管細胞 (HK-2 細胞) において、AII 刺激による ROS 産生の亢進は、腎線維化の指標となる TGF-β1 の産生を誘引し、オルメサルタンはその産生を抑制した。

(2) 病態モデル動物を用いた薬物の抗酸化作用の有効性評価

(1) の検討により、オルメサルタンが抗酸化作用を有することが示されたため、メタボリックシンドロームの特徴の一つである腎における酸化ストレス亢進に着目し、5/6 腎臓摘出モデルラットに対するオルメサルタンの抗酸化作用を評価した。常法により 5/6 腎臓摘出モデルラットを作成後、オルメサルタンを 10mg/kg/日 で 8 週間投与を行った。その結果、酸化アルブミンを指標とした酸化ストレスマーカーは 4 週間後に有意に低下し、その効果は 8 週間後まで持続しており、オル

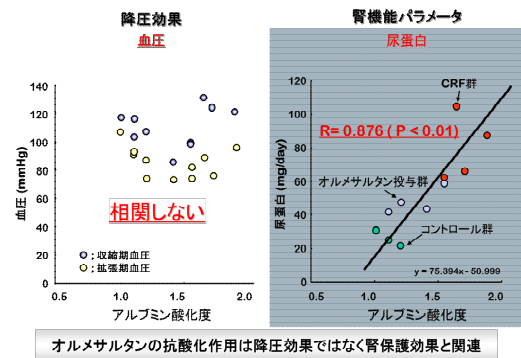
図5 オルメサルタン投与腎不全モデル(CRF)ラットにおける血圧(8週後)とアルブミン酸化度の変動



メサルタンの薬理作用である降圧効果も 8 週目において十分発揮されていた。(図5)

また、血液中の抗酸化力に関しても、銅の還元能を指標とした PAO 活性の有意な上昇が認められた。これらのことから、オルメサルタンの抗酸化作用が *in vivo* においても確認された。さらに、この効果は血圧低下作用とは独立していること、またオルメサルタンの抗酸化効果は腎保護効果に関連することを見出した。(図6)

図6 CRFラットにおける腎機能パラメータと酸化ストレスの関連性



オルメサルタンの抗酸化作用は降圧効果ではなく腎保護効果と関連

これらの知見を総括すると、代表的なメタボリックシンドローム治療薬の中でオルメサルタンは優れた抗酸化作用を有する降圧薬であることが示唆された。高血圧でない場合にも、メタボリックシンドロームの予備軍の段階からの早期投与が有効である可能性を

示す有益な知見であり、このような育薬による治療戦略の構築が有用であることを実証できたと考える。

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 10 件)

1. Zhang JS, Anraku M, Kadowaki D, Imai T, Suenaga A, Odani A, Otagiri M. Spectroscopic studies of interactions of chondroitin sulfates with cisplatin. *Carbohydr Res.* 346, 631-7 (2011) 査読有
2. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Fluid resuscitation with hemoglobin-vesicles prevents *Escherichia coli* growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. *J Pharmacol Exp Ther.* 337, 201-8 (2011) 査読有
3. Taguchi K, Iwao Y, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Repeated injection of high doses of hemoglobin encapsulated liposomes (hemoglobin-vesicles) induces accelerated blood clearance in a hemorrhagic shock rat model. *Drug Metab Dispos.* 39, 484-489. (2011) 査読有
4. Anraku M, Fujii T, Kondo Y, Kojima E, Hata T, Tabuchi N, Tsuchiya D, Goromaru T, Tsutsumi H, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M, Tomida H. Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. *Carbohydrate Polymers.* 83 501-505 (2011) 査読有
5. Taguchi K, Miyasato M, Ujihira H, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. Hepatically-metabolized and -excreted artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicles, can be safely used under conditions of hepatic impairment. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 248, 234-241 (2010) 査読有
6. Miyamoto Y, Iwao Y, Tasaki Y, Sato K, Ishima Y, Watanabe H, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M. The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions. *FEBS Lett.* 584, 2816-2820 (2010) 査読有
7. Nishi K, Fukunaga N, Ono T, Akuta T, Yumita N, Watanabe H, Kadowaki D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Construction of an Expression System for Human α 1-Acid Glycoprotein in *E. coli*: the Role of Oligosaccharide Moieties on Structural and Functional Properties. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 25, 200-207 (2010) 査読有
8. Matsumoto K, Nishi K, Kikuchi M, Watanabe H, Nakajou K, Komori H, Kadowaki D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Receptor-mediated uptake of human α 1-acid glycoprotein into liver parenchymal cells in mice. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 25, 101-107 (2010) 査読有
9. Satoh M, Koizumi A, Izumi S, Kugoh Y, Kiriyama E, Oguma E, Furukubo T, Matsunaga, C, Yamakawa T, Kadowaki D, Hirata S. Improvement of hyperphosphatemia following patient education. *the Journal of Pharmacy Technology.* 25, 3-9 (2009) 査読有
10. Anraku M, Fujii T, Furutani N, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M, Gebicki JM, Tomida H. Antioxidant effects of a dietary supplement: reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan. *Food and Chemical Toxicology.* 47, 104-109 (2009) 査読有
11. Nishi K, Ueno M, Murakami Y, Fukunaga N, Akuta T, Kadowaki D, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. A site-directed mutagenesis study of drug-binding selectivity in genetic variants of human α 1-acid glycoprotein. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 98, 4316-4326 (2009) 査読有
12. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri M. Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG)ylated liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce the accelerated blood clearance phenomenon in mice. *Drug Metabolism*

and Disposition. 37, 2197-2203 (2009) 査読有

13. Kadowaki D, Anraku M, Tasaki Y, Taguchi K, Shimoishi K, Seo H, Hirata S, Maruyama T, Otagiri M. Evaluation for antioxidant and renoprotective activity of olmesartan using nephrectomy rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 32, 2041-2045 (2009) 査読有
14. Maruyama T, Kadowaki D. To facilitate the compliance of phosphate binder for the control of hyperphosphatemia in chronic kidney disease patients. *Clinical Calcium*. 19, 248-252 (2009) 査読有

[学会発表] (計 26 件)

1. 坂口 翔一, 宮本 洋平, 佐藤 圭創, 丸山 徹, 小田切 優樹, 平田 純生, 門脇 大介 高尿酸血症治療薬ベンズプロマロンの抗酸化作用評価 日本薬学会第 131 年会 (2011/3/29) グランシップ静岡, 静岡
2. Daisuke Kadowaki, Makoto Anraku, Yuka Tasaki, Kazuaki Taguchi, Kazuki Shimoishi, Ayaka Suenaga, Hiroshi Watanabe, Hakaru Seo, Sumio Hirata, Toru Maruyama, Masaki Otagiri, Relationship between Antioxidant and Renoprotective Activity of Olmesartan, 70th FIP WORLD CONGRESS OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES, (2010/8/28) Lisboa Congress Center, Portugal
3. 門脇 大介, 済川 聡美, 長嶋 美里, 成田 勇樹, 曾田 彩夏, 平田 純生 アセトアミノフェンが CRF モデルラットの腎機能に及ぼす影響と投与量の関係 第 53 回日本腎臓学会学術総会 (2010/6/16) 神戸国際会議場, 神戸
4. 浦田 由紀乃, 門脇 大介, 柴田 啓智, 下石 和樹, 森 直樹, 山室 露子, 宮村 重幸 腎排泄型薬剤の持参薬に関する多施設実態調査 第 19 回日本医療薬学会年会 (2009/10/24) 長崎ブリックホール, 長崎
5. Daisuke Kadowaki, Makoto Anraku, Yuka Tasaki, Kazuaki Taguchi, Kazuki Shimoishi, Ayaka Suenaga, Hiroshi Watanabe, Sumio Hirata, Toru Maruyama, Masaki Otagiri, EVALUATION FOR ANTIOXIDANT AND RENOPROTECTIVE ACTIVITY OF OLMESARTAN USING NEPHRECTOMY RATS, AFPS 2009,

(2009/10/15) Centennial Hall Kyushu University School of Medicine, Fukuoka

6. 門脇 大介 RA 系阻害薬の腎保護効果 第 2 回日本腎と薬剤研究会 (2008/12/6) 熊本市民会館, 熊本 (招待講演)
7. Daisuke Kadowaki, Makoto Anraku, Yuka Tasaki, Kazuaki Taguchi, Kenichiro Kitamura, Kazuki Shimoishi, Toru Maruyama, Masaki Otagiri IN VIVO EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OLMESARTAN UTILIZING OXIDIZED ALBUMIN The 23rd JSSX Annual Meeting (2008/10/30) 熊本市民会館, 熊本
8. 丸山 徹, 門脇 大介, 下石 和樹, 小田切 優樹 慢性腎臓病における包括的な抗酸化治療戦略 医療薬学フォーラム 2008 (2008/7/13) タワーホール船堀, 東京
9. 門脇 大介, 平田 純生 腎不全患者への薬物適正使用を目指して-不眠に対する薬物の使い方- 第 53 回日本透析医学会 (2008/6/22) 神戸コンベンションセンター, 神戸 (招待講演)

[図書] (計 3 件)

1. 門脇 大介 CKD の治療と薬 Q&A, じほう, (2010) 5-7, 128
 2. 門脇 大介 透析ケア冬季増刊号ナースが知りたい透析患者のくすり Q&A64, メディカ出版, (2009) 12-17, 40-43
 3. 門脇 大介, 平田 純生 腎不全ハンドブック-CKD から先端透析療法: up to date, 医薬ジャーナル社, (2009) 99-103
6. 研究組織
(1) 研究代表者
門脇 大介 (KADOWAKI DAISUKE)
熊本大学・薬学部・講師
研究者番号: 70433000