

平成 2 7 年 6 月 1 0 日現在

機関番号：1 3 2 0 1

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：2 5 8 6 0 4 9 7

研究課題名（和文）五苓散によるアクアポリン2発現調節機序及び末梢性浮腫改善機序の解明

研究課題名（英文）Effect of Goreisan on edema improvement mechanism and expression of aquaporin 2.

研究代表者

条 美智子 (Jo, Michiko)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：8 0 4 3 2 1 1 0

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は2種類の糖尿病モデルラット（Zucker Diabetic Fattyラット、GKラット）にピオグリタゾン投与し、五苓散による末梢性浮腫の改善効果を評価し、その改善機序を証明することである。五苓散の投与により飲水量・尿量および腎組織中のAQPタンパク質発現量が変化したことより、腎機能を悪化させることなくピオグリタゾンに起因する浮腫に対して有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the mechanisms of the effects of goreisan, a Kampo formula, on edema in animal models of type 2 diabetes. The changes in urinary osmolality, water intake and the AQP expression by goreisan-treatment in animal models of type 2 diabetes suggest that AQP expression is associated with the effects of goreisan on modulation of water balance without causing renal dysfunction.

研究分野：漢方薬学

キーワード：五苓散 アクアポリン 浮腫

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体のピオグリタゾン[®]は、インスリン抵抗性を改善する画期的な薬剤であるが、深刻な末梢性浮腫が生じることが重要な問題となっている。しかし、現状の対処療法として用いられている利尿薬は、ピオグリタゾンで生じる過剰な水分の体内貯留には無効なことが多く、長期的な使用では電解質異常による高血糖、高尿酸血症が発症し、糖尿病を悪化させる危険性が指摘されている。またピオグリタゾンで誘発される末梢性浮腫は、利尿薬の投与を繰り返しても改善しないため、ピオグリタゾンの投薬治療自体を拒否するケースもある。ピオグリタゾンの末梢性浮腫の主な原因は、循環血漿量増加による体内貯留が考えられているが、その機序の1つに集合管でのNa⁺再吸収亢進ならびにAQP2タンパク質発現の亢進が関与していることが明らかとなっている。

アクアポリン (AQP) は水チャンネルであり生体の恒常性を維持する上で極めて重要な分子である。生体の膜に存在し、生体内のみならず生体外への水の移動を担っており、機能的に水チャンネルに相当するものはAQP以外には知られていない。近年、多くの疾患が、この水チャンネルであるAQPの機能異常を起因とすることが解明されており、AQPは病態解析ならびにその標的治療分子として注目されている。これらのことから腎臓におけるAQP2は末梢性浮腫といった薬剤投与による副作用発現を防止することのできる新たな標的治療分子になる可能性がある。

現在、漢方方剤は様々な疾患に臨床応用されており、QOLを重視する漢方医学の治療は国際的にも評価されている。その中でも五苓散は、漢方医学において体内の水分代謝調節作用を持ち、生体の恒常性の維持に有意に作用する。基礎研究においては水分バランス調節、エタノール投与による組織中電解質異常改善、抗基底膜抗体による腎炎予防作用を有することが報告されている。しかし、末梢性浮腫に対する五苓散の薬理作用、作用機序等についての検討はなされていない。

2. 研究の目的

臨床で広く用いられている五苓散がピオグリタゾンによる末梢性浮腫を改善することが可能かを解明し、さらに、その効果機序に関する科学的な裏づけを示すことは重要な課題である。本研究により、糖尿病治療において、新たにピオグリタゾンと五苓散の併用療法が新規に確立でき、将来的に、五苓散を併用する新たな糖尿病治療方法の構築を目的としている。

3. 研究の方法

Zucker Diabetic Fatty ラット (インスリン抵抗性を示す自然発症 2 型糖尿病モデル) 及び GK ラット (2 型糖尿病に多い非肥満、インス

リン分泌低下型) にピオグリタゾンの経口投与を行い、通常飼料 (PGZ 群)、あるいは 0.5% および 1% に調製した五苓散エキス粉末含有飼料 (0.5%GRS 群・1%GRS 群)、ポジティブコントロールとしてフロセミド (Fur 群) またはスピロノラクトン (Spi 群) を 4 および 8 週間投与した。また正常対照群 (C 群) には、水道水および通常飼料を与えた。

(1) 五苓散の水分代謝に及ぼす影響については 1 週間ごとに、個別代謝ケージで飼育し 24 時間の食餌摂取量、飲水量、尿量を測定し、血清及び尿浸透圧、血清及び尿中電解質濃度を測定した。

(2) 経過中は体重、血糖値を測定した。血糖値は尾静脈より血液を採取し測定した。

(3) 投与期間終了後に血液、尿、腎臓を採取し各種測定を行った。

血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニンクリアランス (CCr)、尿中タンパク量、血糖値は市販キットを用いて測定した。

血液中のアディポネクチン、レプチン、インスリンは ELISA 法で測定した。

腎組織中のタンパク質発現量は、摘出した腎臓の皮質と髄質を分離し、さらに髄質を内質と外質に分けてホモジナイズし、膜画分を豊富に含むサンプルを遠心分離により調製した。これらのサンプルを用いてウエスタンブロット法により、水チャンネル; AQP1 ~ 3、Sodium-potassium pump; Na⁺/K⁺-ATPase α_1 ・Na⁺/K⁺-ATPase β_1 タンパク質発現量を測定した。

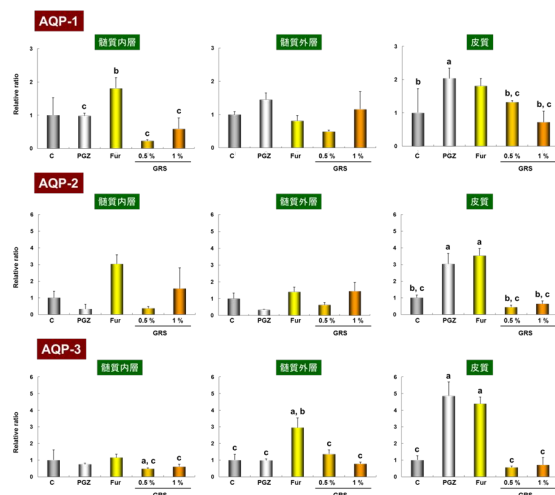
4. 研究成果

(1) Zucker Diabetic Fatty ラット

五苓散を 4 週間投与した結果、アディポネクチンについては、C 群に比べて、PGZ 群、Fur 群、0.5% および 1%GRS 群が有意に増加していた。第一週目の飲水量は、0.5% および 1%GRS 投与群では、PGZ 群および Fur 群と比べて有意に減少し、さらに 1%GRS 群では C 群と比較しても有意に減少していた。また尿量についても、第一週目に 0.5% および 1%GRS 群は Fur 群と比較して有意に減少していた。さらに血糖値の経時的变化を検討したところ、第一週目では、Fur 群、0.5% および 1%GRS 群で C 群に比べて有意に減少し、3 週目では 0.5% および 1%GRS 群で C 群に比べて、有意に減少した。また、4 週目では、C 群に比べ、PGZ 群、Fur 群、0.5% および 1%GRS 投与群において有意に減少していた。

8 週間投与において 0.5% 及び 1% GRS 群では PGZ 投与群に比較して BUN が減少傾向を示し、尿中タンパク量については増加したが有意な差は認められなかった。飲水量および

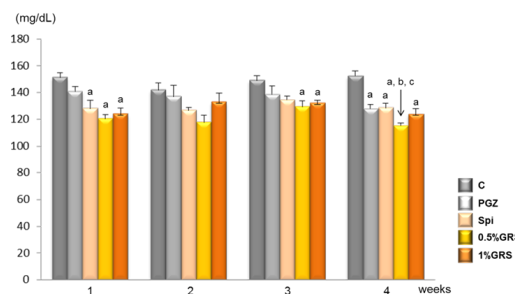
尿量についても有意な差は認められなかったが尿浸透圧および尿中 Na 排泄量は有意に増加した。PGZ 群の腎皮質における AQP1~3 タンパク質発現量は C 群に比較して有意に増加し、GRS 群より有意に減少した。Fur 群の腎髄質内層における AQP1 および腎髄質外層の AQP3 タンパク質発現量は PGZ 群に比較して有意に増加し、GRS 投与により有意に減少した（図）。以上の結果より、五苓散は腎機能を悪化させることなく、PGZ 投与による AQP_s タンパク質発現を正常化し、ピオグリタゾンに起因する浮腫に対して有用である可能性がある」と推測された。



a $P < 0.05$ vs C, b $P < 0.05$ vs PGZ, c $P < 0.05$ vs Fur

(2) GK ラット

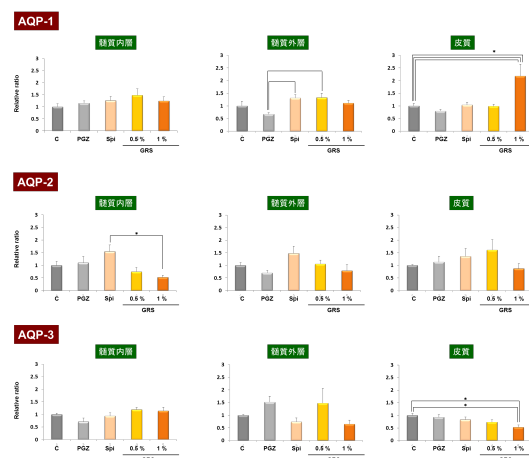
4 週間投与において腎重量は、GRS により Cont 群、Spi 群に比べて有意に減少した。また、飲水量は、第一週目では、GRS 群は PGZ 群および Spi 群と比較して有意に減少し、さらに 1%GRS 群は Cont 群と比較して有意に減少した。また尿量についても、第一週目に GRS 群は Spi 群と比較して有意に減少した。血糖値の経時的変化を検討したところ、第一週目では Spi 群及び GRS 群が、3 週目では GRS 群が Cont 群に比べて有意に減少していた。また、4 週目では、Cont 群に比較し、PGZ 群、Spi 群、GRS 群において有意に減少した（図）。



a $P < 0.05$ vs C, b $P < 0.05$ vs PGZ, c $P < 0.05$ vs Spi

GRS 群の腎髄質外層における AQP1 タンパク質発現量は PGZ 群と比較して有意に増加し、

AQP2 タンパク質発現量は、Spi 群と比較して有意に減少した（図）。

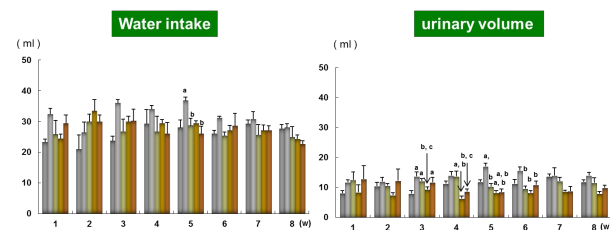


8 週間投与での腎機能パラメーターの 1 つである BUN は Cont 群に比べ PGZ 群・Spi 群・1%GRS 群では有意に低下した。また腎重量は Cont 群に比べ、PGZ 群・Spi 群が低下し、1%GRS 群では PGZ 群に比較して有意な低下を示した。

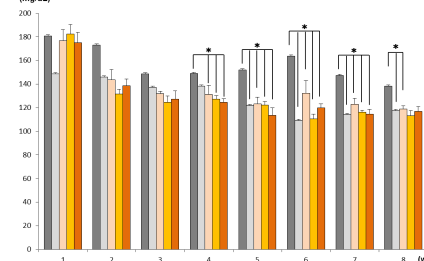
Group	Body weight (g)	Kidney weight (g/100 g BW)	Blood urea nitrogen (BUN) (mg/dl)	Urinary protein (mg/day)
Control	306 ± 4	0.427 ± 0.013	25.7 ± 1.07	67.9 ± 3.35
PGZ	344 ± 9 *	0.386 ± 0.009 *	19.0 ± 1.12 *	71.4 ± 8.50
Spi	334 ± 8	0.394 ± 0.011 *	19.5 ± 1.68 *	101.1 ± 12.2
0.5% GRS	323 ± 5	0.371 ± 0.005 *	22.8 ± 1.54	108.3 ± 8.48 ^{a,b}
1% GRS	320 ± 12	0.360 ± 0.005 ^{a,c}	18.3 ± 1.16 *	99.1 ± 9.30

a $P < 0.05$ vs C, b $P < 0.05$ vs PGZ, c $P < 0.05$ vs Spi

アディポネクチンについては、GRS 群では PGZ 群・Spi 群と比べて減少していた。飲水量および尿量は、PGZ 群・Spi 群と比較し、五苓散投与により有意な減少を示した（図）。



血糖値の経時的変化を検討したところ、第 5 週目 ~ 6 週目の血糖値は、Spi 群、0.5%および 1%GRS 群が Cont 群に比べて有意に減少していた。



* $P < 0.05$

(2) 考察

五苓散の投与により飲水量・尿量および腎組織中の AQP2 タンパク質発現量が正常化したことより糖尿病の病態である口渴と頻尿を改善した可能性がある。また血糖降下作用においてはピオグリタゾンに比べ、五苓散を併用することで増強されたことからピオグリタゾンと五苓散を用いた糖尿病に対する併用療法が有効である可能性が示唆された。しかし、血糖降下作用は投与期間によって五苓散を併用することにより増強されるまたは五苓散を併用しても変化がないという結果が得られたことより、今後、投与期間による五苓散の併用効果の相違について詳細な検討が必要である。

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

条美智子、渥美卓也、久志田郁、入矢美沙、柴原直利：ピオグリタゾン誘発末梢性浮腫に対する五苓散の効果に関する基礎的検討（第4報）第31回和漢医薬学会学術大会, 2014, 8, 30-31, 千葉

6．研究組織

(1)研究代表者

条 美智子 (JO MICHIKO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：80432110