

田七杜仲精の研究内容：

< 実例報告 > < 専門誌掲載 >

「実験誘発性メタボリックシンドロームに関連する腎損傷 および酸化ストレスに対する田七杜仲精アプローチ」

第5回 S E N S 会議

2011 年 8 月 31 日～9 月 4 日 イギリス

¹F Marotta, ²A Kumari, ³R Catanzaro, ⁴U. Solimene, ⁵S Jain, ¹A Lorenzetti, ⁴E. Minelli, ⁶M. Harada,

¹老化介入リジェネラ・リサーチ・グループ（イタリア、ミラノ）, ²ケベック大学州立学術研究
学院（INRS）水・土・環境研究所（カナダ、ケベック）, ³カターニア大学内科学講座（イタリ
ア）, ⁴ミラノ大学バイオテクノロジー・伝統医学 WHO センター（イタリア、ミラノ）,

⁵国立保健研究所付属国立糖尿病・消化器・腎臓疾患研究所（NIDDK）（米国、ベセスダ）,

⁶MHC 病院、（日本、埼玉）

要点題目: 薬草養生剤によるメタボリックシンドロームに関係する腎疾患の防止

キー・ワード: メタボリックシンドローム、フラクトース誘発、酸化ストレス、腎損傷、DTS 薬
草化学的

[要約]

本研究は、高濃度のフラクトースを摂取したラットの腎臓における酸化・抗酸化バランスと蛋白質損傷に対する DTS 薬草成分の有効性を評価することを目的とした。雄の成熟ウイスターラットは3グループに分け、A群にはコントロール食、B群とC群には高フラクトース食(60 g/100 g)を給餌し、C群には田七杜仲精（DTS：50mg/kg/day）を追加補填して60日間飼育した。60日後、脂質過酸化、窒素過酸化とともに、腎糸球体および間質組織における α -平滑筋アクチン（ α -SMA）の発現を測定した。高フラクトース食飼育ラットは、脂質過酸化、2,4-ジニトロフェノール、3-ニトロチロシンたんぱく質付加体（の値）が有意に上昇し、腎臓における α -SMAのアップレギュレーションが認められた。DTSは、こうした腎組織のレドックスアンバランスを有意に低下させる一方、 α -SMAも一部ダウンレギュレートした（ $p<0.01$ ）。こうしたデータは、臨床的に見てDTSにはメタボリックシンドローム（MS）に関連して起きる腎臓の変化を予防する効果があることを物語るもので、現在は、性差との関連について分析を行っている。

〔序言〕

メタボリックシンドローム(MS)の有病率は、途上国、先進国ともに世界中で増加の一途をたどっている。メタボリックシンドロームとは、肥満、インスリン抵抗性、脂質異常症を含む、冠状動脈疾患リスク因子の総称で、慢性腎疾患(CRD)を引き起こす原因でもある (1)。CRD が高じれば、引いては、末期の腎疾患や冠状動脈疾患を発症し、死に至る (2)。先進国ではフラクトースが大量消費され、過去 30 年間に消費量は約 1000 倍に増加している (3)。長期のフラクトース大量摂取は人体に害を及ぼすことが明らかとなっている (4-6)。これまでの研究の結果、フラクトース食で飼育したラットモデルはインスリン抵抗性症候群を発症し、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高トリグリセリド血症、そして、HDL コレステロール値の低下など、ヒトの場合と非常に似通った代謝プロファイルを有することが示されている。また、高フラクトース食誘発性メタボリックシンドロームが腎臓の構造や機能に有害な影響を与えることも、これまでの研究で確認されている (7)。ヒトを対象にした最近の研究でも、メタボリックシンドロームは糸球体濾過率 (GFR) を実際に低下させ、微量アルブミン尿 を発症させる可能性があるとしており、こうした実験データを裏づけている (8)。筆者らは最近、一般的な健康維持目的で臨床応用されている非常に安全なプロファイルをもつ新規の漢方養生サプリメント、DTS の薬草成分が GSH/GSSG レドックス状態を良好に調整し (9, 10)、実験誘発性糖尿病に二次的に発生する初期腎症をある程度予防しうることを示した (11)。こうしたことから、本研究の目的は、メタボリックシンドロームに関連して起きる腎損傷において DTS 治療が効果的かどうかを評価することにあった。

〔薬草療法剤の準備〕

田七杜仲精 (DTS) (成分：田七人參、杜仲、オリゴ糖、協通事業、日本、東京) は国際標準化機構 ISO 9001/140001 の規格に則り、品質管理手続きの下で非遺伝子組み換え作物から加工されたもので、漢方養生研究所 (日本、東京) のご好意により寄贈いただいた。

〔材料と方法〕

雄のウイスターラット (200-250g) はプラスチックケージに個別収容し、管理された環境の下で飼育した。研究期間中、ラットには標準的な食餌を自由に摂取させ、実験前の 1 週間を順化期間とした。すべての手続きは、実験動物の使用と管理に関する国際ガイドラインに厳密に従った。ラ

田七杜仲精の研究内容：

ットは 20 匹ごとの 3 グループに分け、対照群とフラクトース食飼育群の体重がそれぞれ均一になるようにした。A 群には通常のコントロール食を、B 群と C 群には高フラクトース食（食餌中フラクトース 65%、メタボリックシンドロームモデル: MS ラット）を給餌し、C 群にはこれに加え DTS (150mg/kg/day) を 60 日間与えた。60 日後、脂質過酸化の程度や酵素/非酵素の抗酸化物質について測定を行った。腎臓のニトロ化修飾たんぱく質および酸化修飾たんぱく質の蓄積は免疫組織化学的に評価した。

[腎組織のグルタチオンおよび MDA の分析]

分析には、細胞内のグルタチオン (GSH) を 5,5'-ジチオビス-(2- ニトロ安息香酸) (DTNB) で酸化し、グルタチオンレダクターゼの存在下でカルボニルレダクターゼによって還元するマイクロタイタープレート酵素リサイクリング法を採用した。リン酸ナトリウム (125 mM) およびエデト酸 (EDTA) (1 mM) を含むバッファーと反応液 (1 mM DTNB : 2.8 ml、1 mM NADPH : 3.75 ml、バッファー : 5.85 ml、GSH レダクターゼ : 20 U) は新たに用意した。GSH スタンダードおよび腎ホモジネート (50 μ l) をマイクロタイタープレートへ装填し、直後に反応液 100 μ l を添加して、5 チオ 2 ニトロ安息香酸の生成速度を 405 nm で定量化した。脂質過酸化の指標として腎組織のマロンジアルデヒド (MDA) 値を測定した。チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) としての MDA はチオバルビツール酸 (TBA) と反応し、532 nm に吸収極大をもつ赤色色素を生成する。ELISA プレートリーダーを使用して可視領域内の吸光度を測定した。遠心管内のホモジネート 0.5 ml にリン酸 (3 ml; 1%) と TBA (1 ml; 0.6%) を添加し、その混合液を 45 分間加熱した。冷却した後、混合液に n ブタノール 4 ml を添加して 1 分間渦撹拌した後、20000 rpm で 20 分間遠心した。有機質層を新しい遠心管に移し替え、その吸光度を 532 nm で測定した。MDA の標準曲線を 0-40 μ M の濃度領域で作成した。

[腎組織のたんぱく質内取り込み 3-NT の測定]

腎臓は、氷冷のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS バッファー) (pH 7.2 ~ 7.4) で血液を洗浄し、ハサミで切断した後、50 mM トリス、150 mM 塩化ナトリウム、0.1 mM EDTA、20 mM 両イオン性界面活性剤 (CHAPS) (pH 7.4) を含むバッファー内で湿潤重量 10 ml/g の組織にホモジナイズした。サンプルを二等分し、そのうち 100- μ l 分に氷冷の酸沈殿バッファーを加え、5 分間待った後に 12,000 x g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。サンプル注入のために上清を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用バイアルにセットした。残りの 100- μ l は、たんぱく質内に取り込まれたニトロ

田七杜仲精の研究内容：

チロシン（3-NT）定量化前にたんぱく質分解させた。組織ホモジネートはプロテイナーゼ K を加えて 55° C で 8 時間インキュベートした。室温に戻してから沈殿ブッファァーを加え、さらに前述のと通りの準備を行った。マルチチャンネル電気化学検出器 Coul-Array を接続した無勾配 HPLC システムを使用し、100-mm C-18 カラムで移動相（溶離液：90 mM 酢酸ナトリウム、35 mM クエン酸、130 μ M EDTA、460 μ M オクタンスルホン酸ナトリウム(pH 4.35)) として 3-NT をバックグラウンド物質から効率的に分離した。流速は 0.75 ml/min に、また、温度は 30° C に設定した。3-NT 検出に最適なポテンシャルは 800 mV であることが判明した。

3-NT に対するシステムの選択性を最大にするために、他に二本の電極を 3-NT の最適ポテンシャルの両側の 700mV と 900 mV にそれぞれ設置した。3-NT の溶出は、3-NT に 10 mM ハイドロサルファイトナトリウムを添加することによってさらに確認できた。

[α -平滑筋アクチンのメッセンジャー RNA 発現量の定量化]

総 RNA は RNA トリゾル試薬を使用して冷凍肝組織から抽出した。各サンプルにつき総 RNA 5 マイクログラムを相補的 DNA (cDNA)に逆転写させ、それを 1/100 に希釈して、5 μ l を PCR 反応のテンプレートとして用いた。リアルタイム定量 PCR は、Syber Green Taq qPCR Master Mix を用い ABI PRISM 7300 PCR System で実施した。標準曲線を作成した目的遺伝子の発現量は、内部標準遺伝子のグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH)を用いて補正を行った。PCR は各サンプルや各遺伝子ごとに二重に実施し、それを二回繰り返した。目的遺伝子の相対発現量は PCR 装置付属ソフトの SDS v1.3.2 によって手に入れた。GAPDH プライマーは以下の通りとした：フォワード 5' -GCCAAAAGGGTCATCATCTCA-3' AB231852 、リバーズ 5' -GTGGTTCACGCCCATCACA-3' 、プローブ 5' -CCTCCGCCGATGCCCCCA-3' 。ウエスタンブロット法は抗ヒト α -SMA マウスモノクローナル抗体を用いて実施した。

[結果]

高フラクトース食飼育ラットの腎臓（の大きさ）や重量/体重 $\times 10^3$ g/g は、健常対照ラットと比較して有意に増加（それぞれ 1.8 ± 0.2 g 対 1.3 ± 0.2 g、 4.2 ± 3.3 対 3.3 ± 0.4 、 $p < 0.05$ ）したが、DTS 補填ラットではこうした現象は認められなかった（高フラクトース食ラットとの対比でそれぞれ 1.4 ± 0.2 g、 3.6 ± 0.2 、 $p < 0.05$ ）。

[腎組織のレドックス状態]

予想した通り、MS ラットは通常食飼育ラットと比較して、グルタチオンが有意に減少し、MDA

田七杜仲精の研究内容：

が増加した ($p < 0.01$, fig 1)。DTS の補填は、そうした現象を防止することが立証された (非 DTS 治療 MS ラット対比、 $p < 0.05$)。腎組織のたんぱく質内取り込み 3-NT 測定結果の分析では、3-NT は MS ラットにおいて有意に増加 ($p < 0.001$) したが、DTS を補填することによってほぼ正常レベルに戻ることができた (MS ラット対比、 $p < 0.01$)。

[α SMA のメッセンジャー RNA 発現量の定量化]

糸球体および間質組織におけるこのマーカーの値は、MS ラットでは有意に上昇 (通常食餌ラット対比、 $p < 0.001$) したが、DTS 補填 MS ラットでは、一部とはいえ有意の低下が認められた (MS ラット対比、 $p < 0.01$)

[考察]

保健衛生の大問題となっているメタボリックシンドロームの流行は、食事を通じたフラクトースの過剰摂取と無関係ではなく (12)、フラクトースがメタボリックシンドローム発生原因の一つに挙げられている (13)。フラクトースは多くの果物や蜂蜜に含まれる天然の糖分で、糖類のなかでもっとも甘みが強く、一般に甘味料として使用されている。高フラクトース食を摂取しても有意の体重増につながらないことから、フラクトース食飼育ラットモデルを使用することにより、代謝変化と、肥満または遺伝的素因などの交絡因子の影響のない高血圧発症との関係について調査が行われてきた。

最近の知見によると、メタボリックシンドロームは腎疾患の発症とも係わりがあり、慢性腎不全患者の予後不良の指標ともなっている (14)。実際、Cirillo らは (15) 先般、近位尿細管細胞によるフラクトース代謝によって炎症仲介物質が発生すること、特に、単球走化性促進因子 (MCP-1) の mRNA が発現することを報告している。本研究中、筆者らはこの変数を具体的に取り上げたわけではないが、漢方養生剤の介入により、その特性とみられる抗炎症作用 (16, 17) を通じて糖尿病ラットの糸球体での MCP-1 発現が有意に減少することを突き止めた (11)。こうした付随現象は、免疫学的炎症プロセスの結果とみなされている。MCP-1 による炎症細胞の腎組織への動員は他のサイトカインや成長因子を刺激し、多くの腎細胞集団の表現型修飾を高め、最終的に α -SMA を過剰発現させ細胞外マトリックス成分の合成を高めることになる。本研究において DTS 補填後に α SMA が有意にダウンレギュレートすることを指摘できるのは興味深い。したがって、腎細胞における α -SMA 発現の減少は、この腎疾患進行マーカーに対する DTS の予防効果と考えるべきである。

さらに、本研究からも明らかなように、レドックス状態のインバランスはメタボリックシンドロームの特徴でもある。DTS のさらなる効用は、その特殊成分 (17, 19, 20) のために、GSH/GSSG レドックス状態を直接調整し、かつ、グルタチオンレダクターゼ (9, 10) の活性も高める特性によるものかもしれない。加齢による代謝機能障害によって起こる生理的ストレスを効果的に処理す

田七杜仲精の研究内容：

る機能が腎臓にないことを考えれば、こうしたデータはある程度当然と言えるだろう。

最後に、DTS 主成分のひとつで、糸球体の血行動態を改善させる杜仲についての最新の知見にもある通り(21)、DTS には一酸化窒素に関連して血管を拡張させる特性もあるのかもしれない。以上を総合すると、他の研究(9-11)で安全プロファイルが確かめられている DTS の成分は、統合医療の患者に対するツールとして最適と言えるだろう。

[参考文献]

- 1) Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 2002;288:2709–2716.
- 2) Malik S, Wong ND, Franklin SS, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 2004;110:1245-1250.
- 3) Miller A, Adeli K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2008; 7: 204-209.
- 4) Rayssiguier Y, Gueux E, Nowacki W, Rock E, Mazur A. High fructose consumption combined with low dietary magnesium intake may increase the incidence of the metabolic syndrome by inducing inflammation. *Magnesium Research*. 2006;19:237-243.
- 5) George AB: How bad is fructose? *Am J Clin Nutr* 2007, 86:895-896.
- 6) Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y: Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2007, 86:899-906.
- 7) Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, Soto V, vila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F423-F429.
- 8) Hao Z, Konta T, Takasaki S, Abiko H, Ishikawa M, Takahashi T, Ikeda A, Ichikawa K, Kawata S, Kato T, Kubota I. The association between microalbuminuria and metabolic syndrome in the general population in Japan: the Takahata study. *Intern Med* 2007; 46: 341-346.
- 9) Marotta F, Lorenzetti F, Harada M, Ono-Nita SK, Minelli E, Marandola P. Redox status impairment in liver and kidney of prematurely senescent mice: effectiveness of DTS phytotherapeutic compound. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1067:408-413.
- 10) Marotta F, Harada M, Minelli E, Ono-Nita SK, Marandola P. "Accelerating aging" chemotherapy on aged animals: protective effect from nutraceutical modulation. *Rejuvenation Res*. 2008;11:513-517.

田七杜仲精の研究内容：

- 11) Marotta F, Harada M, Dallah ED, Yadav H, Solimene U, Di Lembo S, Minelli E, Jain S, Chui DH. Protective effect of a poly-phyto compound on early stage nephropathy secondary to experimentally-induced diabetes. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010; 24:41-49.
- 12) Abdulla MH, Sattar MA, Johns EJ. The Relation between Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Altered Renal Haemodynamic and Excretory Function in the Rat. *Int J Nephrol*. 2011;2011:934659.
- 13) Nakagawa T, . A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F625-F631.
- 14) Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V, Whelton PK, He J. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in US adults. *Ann Intern Med* 2004; 140: 167-174.
- 15) Cirillo P, Gersch MS, Mu W, Scherer PM, Kim KM, Gesualdo L, Henderson GN, Johnson RJ, Sautin YY. Ketohexokinase-dependent metabolism of fructose induces proinflammatory mediators in proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 545-553.
- 16) Yoshikawa M, Morikawa T, Yashiro K, Murakami T, Matsuda H. Bioactive saponins and glycosides. XIX. Notoginseng (3): immunological adjuvant activity of notoginsenosides and related saponins: structures of notoginsenosides-L, -M, and -N from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001; 49:1452-1456.
- 17) Zhang Y, Ye QF, Lu L, Xu XL, Ming YZ, Xiao JS. *Panax notoginseng* saponins preconditioning protects rat liver grafts from ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2005; 4:207-212
- 18) Karamouzis I, Pervanidou P, Berardelli R, Iliadis S, Papassotiriou I, Karamouzis M, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. Enhanced oxidative stress and platelet activation combined with reduced antioxidant capacity in obese prepubertal and adolescent girls with full or partial metabolic syndrome. *Horm Metab Res*. 2011; 43:607-613.
- 19) Xu Z, Tang M, Li Y, Liu F, Li X, Dai R Antioxidant properties of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) extracts and their effects on color stability and lipid oxidation of raw pork patties. *J Agric Food Chem*. 2010; 58:7289-7296.
- 20) Xia W, Sun C, Zhao Y, Wu L. Hypolipidemic and antioxidant activities of sanchi (*radix notoginseng*) in rats fed with a high fat diet. *Phytomedicine*. 2011; 18:516-520.
- 21) Jin X, Otonashi-Satoh Y, Sun P, Kawamura N, Tsuboi T, Yamaguchi Y, Ueda T, Kawasaki H. Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) Mediates Endothelium-dependent vasodilator Effects of Aqueous Extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. Leaves in Rat Mesenteric Resistance Arteries. *Acta Med Okayama*. 2008; 62:319-325.

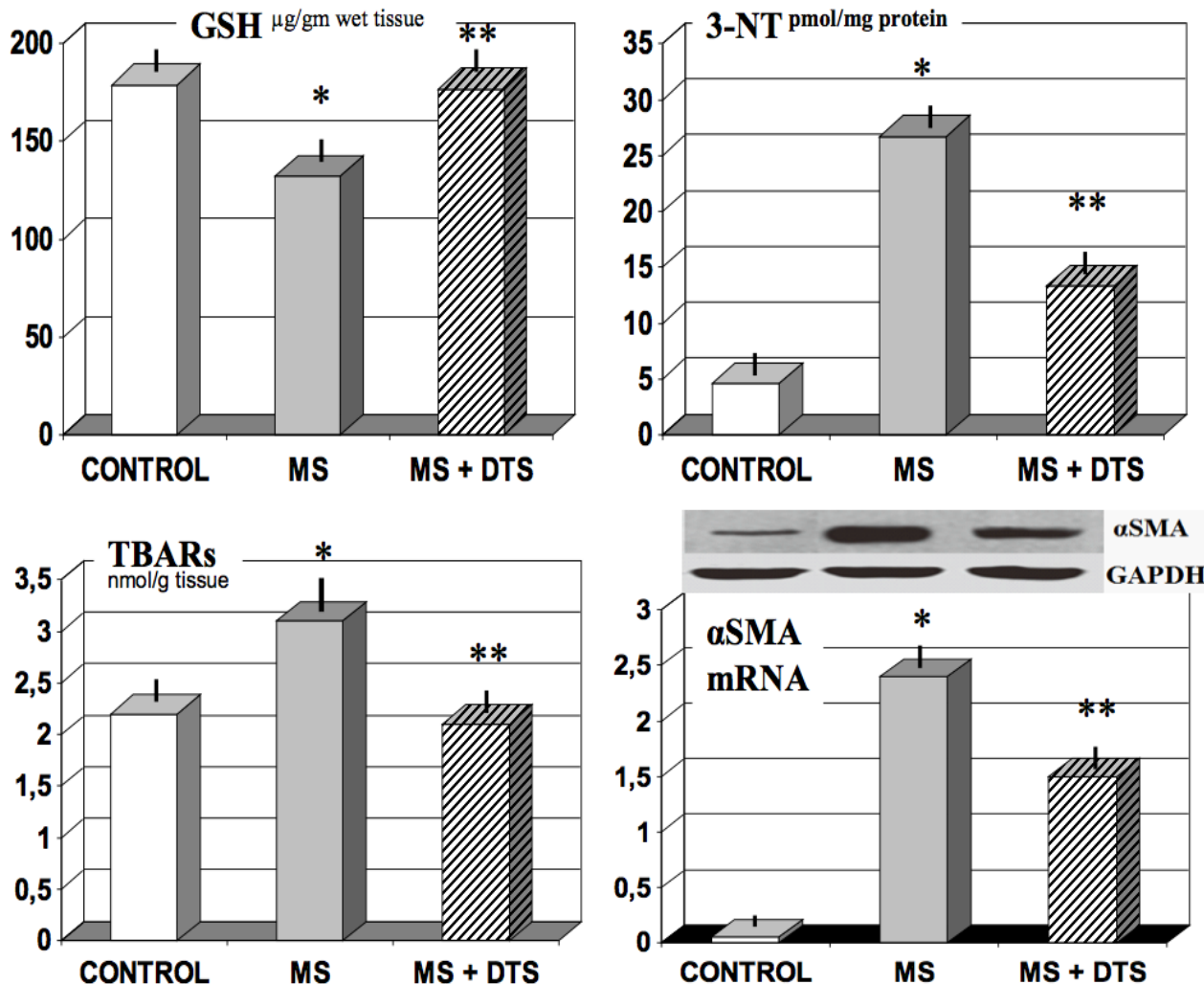


図 1.の説明

左上のパネル: MS ラットにおいて腎組織のグルタチオン (GSH) 値が低下したが、DTS 補填により同値は完全に正常値を回復；同左下: MS ラットにおいて上昇した腎 MDA 値が、DTS の補填で正常値へ；同 右上: 同齡ラットと比較して MS ラットにおいて HPLC 測定腎実質 3-NT 修飾たんぱく質値が増加したが、DTS 補填により一部回復；同右下: MS ラットにおける腎尿細管間質の α SMA 異常発現が DTS 補填により一部回復。* $p<0.05$ 、対照群との対比; ** $p<0.05$ 、非 DTS 補填 MS ラット群との対比。