

漢方薬による糖尿病及び糖尿病性認知症の 改善と改善機構

申請代表者	横澤 隆子	富山大学地域連携機構産学連携部門	客員教授
所外共同研究者	常山 幸一	富山大学医学薬学研究部（医学）病理診断学	准教授
所内共同研究者	松本 欣三	病態制御部門 複合薬物薬理学分野	教授

【報告セミナー要旨】

【目的】糖尿病は、腎症、網膜症等の合併症を誘導するほか、アルツハイマー病や脳血管性認知症の重要な危険因子として働く。申請代表者は、これまで糖尿病や糖尿病性腎症の動物モデルを用い、漢薬「冠元顆粒（KK）」あるいは漢方薬「八味地黄丸」等の抗糖尿病作用および糖尿病性腎症の予防・改善作用と作用機序を検討してきた。一方、松本らは脳血管性認知症動物モデルにおける漢方薬「釣藤散（CTS）」の抗認知症効果を中心にその作用機構を検討してきた。そこで、2型糖尿病モデル動物の糖尿病態及び認知行動障害に対するKKとCTSの効果と作用機構の解明を目的に、共同研究を行った。

【方法】1) 実験動物：2型糖尿病モデル動物 C57BLKS/J Iar⁻ + Lepr^{db} / +Lepr^{db} mouse (db/db) とその対照正常動物 C57BLKS/J Iar⁻ m+/m+ mouse (m/m) を用いた。2) 薬物処置：7週齢から db/db 群に薬物投与を開始し、実験期間中継続した。試験薬物として KK と CTS を、対照薬としてコリンエステラーゼ阻害薬 tacrine (THA) を用いた。3) 実験材料の化学的解析：試験薬は LC-MS 解析し、データを WakanDB に登録した。4) 学習記憶及び情動行動：9週齢より行動実験を開始した。参照記憶は水迷路試験で、短期記憶は新規物体認知試験で評価した。空間作業記憶の評価には改良型 Y-迷路試験を用いた。高架式十字迷路試験により不安関連行動を解析した。5) 神経化学及び組織化学的解析：実験開始及び完了後に採血し、常法により血糖値を測定した。行動実験完了後、脳組織を摘出し、血管・脈管形成及び神経保護・再生に関わる血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 及び血小板由来栄養因子 PDGF の発現変化、さらに学習記憶機能に重要なコリン神経系マーカー蛋白 (ChAT) 及びコリン神経細胞の発現レベルに対する影響を解析した。

【結果と考察】1. db/db 群では m/m 群と比べ、学習記憶行動の障害と運動速度の低下が認められた。KK¹⁾、CTS 及び THA は、運動速度には影響せず、学習記憶行動を有意に改善した。さらに db/db 群では不安関連行動も認められ、CTS 投与により改善した。2. KK、CTS 及び THA はいずれも db/db 群の血糖値には影響しなかった。3. db/db 群では脳内 VEGF、PDGF、ChAT の発現量低下、さらに中隔、基底核 ChAT 陽性神経細胞の脱落が認められた。これらの変化は KK 及び CTS により抑制された。以上の結果から、KK と CTS は、糖尿病態における中枢コリン神経系及び VEGF/PDGF 系の機能低下を抑制することによって、認知情動行動を改善する可能性が示唆された¹⁾。

1) Zhao Q., Matsumoto K., Tsuneyama K., Tanaka K., Li F., Shibahara N., Miyata T., Yokozawa T. Diabetes-induced central cholinergic neuronal loss and cognitive deficit are attenuated by tacrine and a Chinese herbal prescription, kangen-karyu: elucidation in type 2 diabetes db/db mice. J. Pharmacol. Sci. 117, 230-242, 2011

■背景・目的

老年期認知症は、患者を介護する家族や社会の負担が極めて甚大な疾患であることから、そのi)発症機序の解明、ii)有効で安全な予防薬・治療薬の開発、及びiii)予防・治療戦略の創出が火急の課題である。一方、糖尿病は網膜症、心筋梗塞・脳梗塞、神経障害等の重篤な合併症を誘導するほか、老年期認知症のリスクファクターにもなっている。特に近年、糖尿病態がアルツハイマー病や脳血管性認知症の重要な発症要因となる可能性も報告されている。

我々は、これまで糖尿病や糖尿病性腎症の動物モデルを用い、“冠元顆粒”や“八味地黄丸”等の漢薬あるいは漢方薬の抗糖尿病作用および糖尿病性腎症を中心とする合併症の予防・改善作用と作用機序を明らかにしてきた[1, 2]。これらの知見を基に、漢方薬や中薬が糖尿病性の認知症の改善にも有効である可能性が高いと考え、その有用性を検証する目的で本研究を企画した。本研究では、主に冠元顆粒を中心に糖尿病モデル動物の認知行動障害に対する影響を検討すると共にその作用機序を検討した。また一部、釣藤散についても基礎的検討を行った。

■結果・考察

(1) 方法

1.1. 実験動物と薬物処置

実験では6週齢雄性C57BLKS/Jiar^{-/+}Leprdb^{+/+}Leprdb^{+/+}マウスを糖尿病態モデル動物(*db/db*)として、またその対象系統であるC57BLKS/Jiar^{-/+}マウスを非糖尿病正常動物(*m/m*)として用いた。7週齢に達した時点から薬物投与(1日1回)開始し、投与は実験期間中継続した。尚、参照薬としてコリンエステラーゼ阻害薬Tacrine (THA: 2.5 mg/kg/day)を腹腔内投与した。

冠元顆粒及び釣藤散

冠元顆粒エキスおよび釣藤散エキスはIskura Co., Ltd. (Tokyo, Japan)およびTsumura Co. (Tokyo, Japan)より供与されたものもしくは購入したものをを用いた。冠元顆粒および釣藤散の組成は以下のとおりである。

冠元顆粒エキス (KK) : 2.25 g *Paeoniae Radix* (*Paeonialactiflora* PALLAS root), 2.25 g *Cnidii Rhizoma* (*Cnidium officinale* MAKINO rhizome), 2.25 g *Carthami Flos* (*Carthamus tinctorius* L. petal), 1.125 g *Cyperi Rhizoma* (*Cyperus rotundus* L. rhizome), 1.125 g *Aucklandiae Radix* (*Aucklandia lappa* DCNE. root), 及び 4.5 g *Salviae Miltiorrhizae Radix* (*Salvia miltiorrhiza* BUNGE root)。これらは25倍量の水で100℃、1時間抽出後、減圧乾燥させた(抽出率:44%)。

釣藤散エキス (CTS) : 3.0 g *Uncariae Unciscum Ramulus* (hooks and branch of *Uncaria hynchophylla* MIQUEL), 3.0 g *Aurantii Nobilis pericarpium* (peel of *Citrus unshiu* MARKOVICH), 3.0 parts *Pinelliae tuber* (tuber of *Pinellia ternate* BREITENBACH), 3.0 g *Ophiopogonis tuber* (root of *Ophiopogon japonicus* KER-GAWLER), 3.0 g *Hoelen* (sclerotium of *Poria cocos* WOLF), 2.0 g *Ginseng radix* (root of *Panax ginseng* C.A. MEYER), 2.0 g *Saposhnikoviae radix* (root and rhizome of *Saposhnikovia divaricata* SCHISCHKIN), 2.0 g *Chrysanthemi flos* (flower of *Chrysanthemum morifolium* RAMATULLE), 1.0 g *Glycyrrhizae radix* (root of *Glycyrrhiza uralensis* FISHER), 1.0 g *Zingiberis rhizome* (rhizome of *Zingiber officinale* ROSCOE), 及び 5.0 g *Gypsum fibrosum* (CaSO₄ 2H₂O)。尚、収率は16.1%であった。

本実験で用いたエキスは富山大学和漢医薬学総合研究所民族薬物資料館に保管(冠元顆粒エキス: No. 26,731; 釣藤散エキス: No. 2020047010)した。各エキスの質量分析プロファイルデータはMassBank database [3]および和漢薬データベース(冠元顆粒エキス: <http://wakandb.u-toyama.ac.jp/wiki/index.php/LCMS:Kangenkaryu>; 釣藤散エキス: <http://wakandb.u-toyama.ac.jp/wiki/index.php/LCMS:Chotosan/11000001>)に保存した(Fig. 1)。

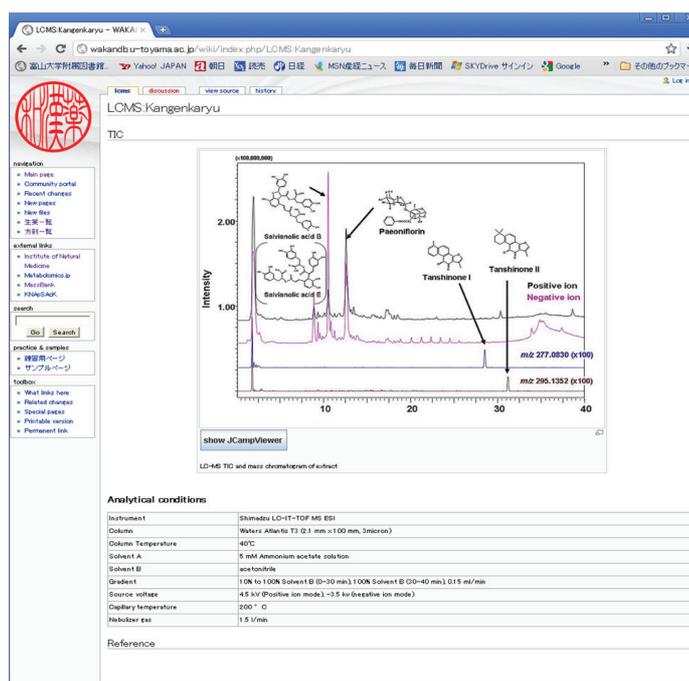


Fig.1 WakanDB での還元顆粒登録画面

1.2. 水迷路試験

空間認知行動を評価するための水迷路試験は18週齢に達した時点から行った。本試験は、先に Murakamiら [4]およびZhaoら [5]の方法を若干、変更して行った。本試験を開始するに先立ち、可視下での水迷路行動を評価した。ここでは水面上1 cmに避難台を設置した条件で、水迷路内にマウスを入れて避難台に到達するまでの時間を測定した。その翌日より訓練試行を1日、3回おこなった。訓練試行では透明の避難台を水面下1 cmに設置し、避難台に到達するまでの時間を測定した。訓練期間中の遊泳時間の上限は120秒とし、その間に避難台に到達できない場合はマウスを避難台まで誘導した。訓練試行を4日間行い、最終訓練試行の翌日、保持試行を行った。保持試行では避難台を除いた条件で、マウスを120秒遊泳させ、避難台を設置した元の4分画中を遊泳する時間を測定した。尚、水迷路試験におけるマウスの行動はビデオトラッキングシステム SMART® (Panlab, S.L., Barcelona, Spain)を用いて記録し、避難台までの到達時間、4分画中を遊泳する時間、遊泳距離、および遊泳速度を解析した。

1.3. 血清中グルコースの測定

7週齢および行動実験を完了した19週齢の時点で各動物の尾静脈より採血し、Glucose CII-Test(Wako Pure Chem., Osaka)を用いて血清中グルコースレベルを測定した。

1.4. リアルタイムPCR

認知行動障害及び改善の神経化学的指標として脳由来神経栄養因子BDNFの脳内発現レベルをリアルタイムPCR法により測定した。測定に用いたBDNF mRNA (NM_007540)およびβ-actin mRNA (NM_007393)のプライマーとして下記のものを用いた。

BDNF mRNA (NM_007540)

Forward : 5'-AGCTGAGCTGTGTGACAGT-3'

Reverse : 5'-TCCATAGTAAGGGCCCGAAC-3'

β -actin mRNA (NM_007393)

Forward : 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'

Reverse : 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'.

1.5. ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は先の方法 [1, 6, 7] を改変して行った。TissueLyser[®] (Qiagen, Osaka) を用いて脳組織サンプルより蛋白を抽出した。蛋白濃度は BCA[™] protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) およびマイクロプレートリーダー (Sunrise Classic; TECAN Japan, Kawasaki) を用いて測定した。蛋白を電気泳動後, polyvinylidene difluoride 膜 (Clear Blot Membrane-p; ATTO, Tokyo) にブロットし, 常法に従って標的蛋白に対する一次抗体で処理した後, horseradish peroxidase (DakoCytomationEnVision + System-HRP labeled Polymer) (Dako Cytomation, Inc., Carpinteria, CA, USA) を付けた二次抗体に結合させ, enhanced chemiluminescence method (Immobilon[™] Western Chemiluminescent HRP Substrate) (Millipore, Billerica, MA, USA) および imaged using Lumino Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo) (和漢医薬学総合研究所 共有機器) を用いてバンド画像を取得し, 解析した。

1.6. 免疫組織化学

学習記憶行動に重要な中枢コリン神経系の起始核である内側中隔および前脳基底核のコリン神経細胞の免疫組織化学染色を先の方法 [7] に準じて行った。麻酔下でマウスを 4% paraformaldehyde 液で固定後, 更に脳組織を 4% paraformaldehyde で一晩後固定を行った。厚さ 5 μ m の冠状切片を作製 (IVS-410, SAKURA Finetek Japan, Tokyo) 後, 切片は anti-ChAT (goat polyclonal antibody 1:400 dilution, AB-144P, Millipore, Billerica, MA, USA) とインキュベートした。peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (1:400 dilution, Alexa Fluor[®] 488; Invitrogen, Tokyo) で処理後, 蛍光イメージを取得した (AX-80; Olympus, Tokyo)。ChAT 抗体陽性細胞は, Image J (ver. 1.41, NIH; Bethesda, MD, USA) を用い, シングルブラインド法で計数した。

1.7. Ex vivo cholinesterase 活性の測定

行動実験完了後, マウス脳を摘出し, 0.1% Triton X-100 を含む 0.1 M リン酸バッファーでホモジェナイズした。遠心後の上清を酵素標品とし, acetylthiocholine を基質として比色法により cholinesterase 活性を測定した (Sunrise Classic; TECAN Japan, Kawasaki)。

(2) 結果と考察

2.1. 糖尿病モデル動物の空間認知行動と薬物効果

18 週齢に到達した時点より, 糖尿病モデル動物 *db/db* マウスの学習記憶能を海馬依存性の空間認知行動を評価する水迷路課題で検討した。その結果, 正常動物である *m/m* マウスでは避難台へ逃避するまでの遊泳時間は訓練に伴って短縮し, 避難台の空間的位置を学習することができた。一方, *db/db* 群では訓練期間中, *m/m* 群と比べ有意に避難台へ逃避する遊泳時間が延長した。さらに最終訓練の 24 時間後に保持試験を行い, 訓練時に避難台を設置した 1/4 象限内を遊泳する時間を解析した

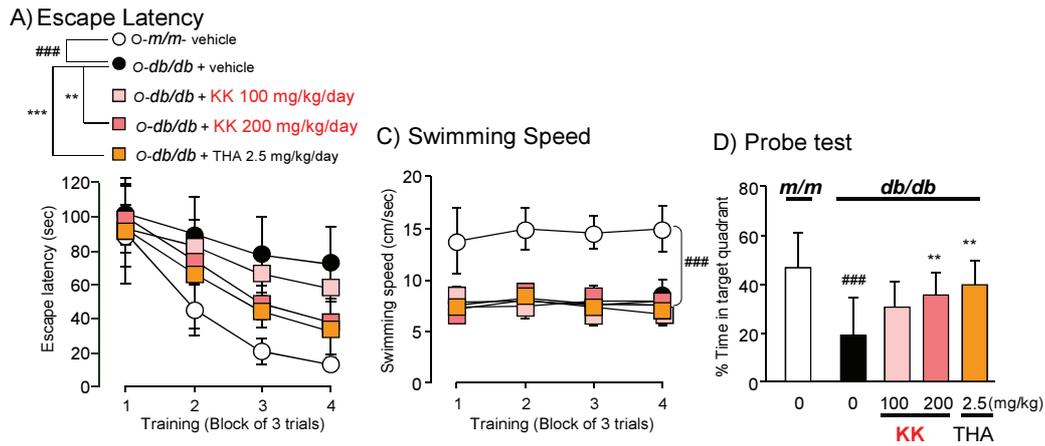


Fig. 2 糖尿病モデルマウス (db/db) の空間認知障害とそれに対する冠元顆粒及び THA の改善効果
###P<0.01 vs. m/m group, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehicle-treated db/db

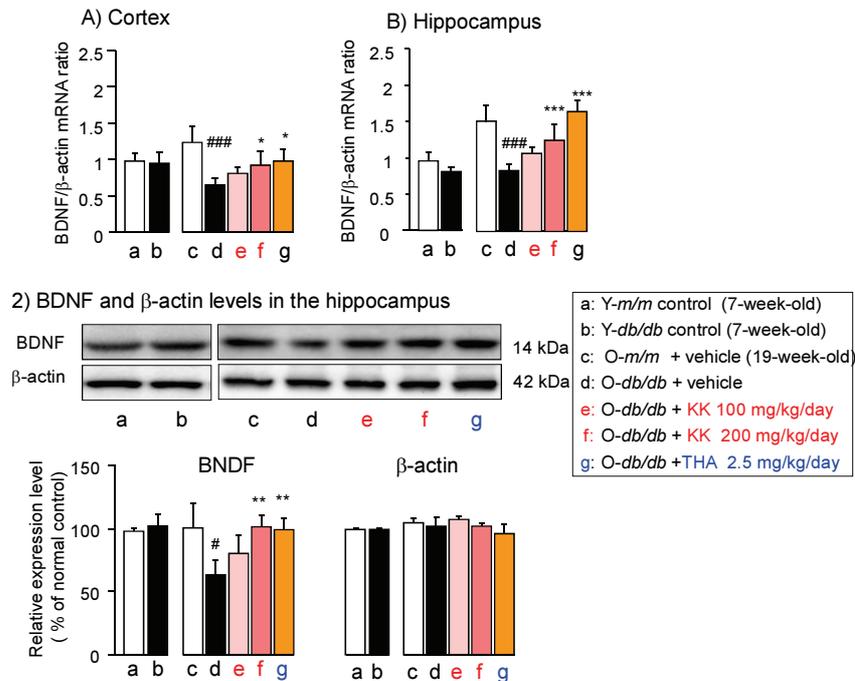


Fig. 3 BDNF mRNA および BDNF 蛋白発現レベルに対する薬物の効果
#P<0.05, ###P<0.001 vs. group c, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. group d

ところ、*db/db*群では*m/m*群と比べて明らかな短縮が認められた (Fig. 2)。これらの結果、*db/db*群では見かけ上、学習障害が発症することが明らかとなった。一方、冠元顆粒投与群およびTHA投与群では障害は改善され、*m/m*群とほぼ同程度の学習行動が観察された。水迷路課題における遊泳速度を解析したところ、*db/db*群では*m/m*群の約50%程度であったことから、*db/db*群の学習障害は遊泳速度の低下に起因する可能性が推測された。しかし薬物処置が*db/db*群の遊泳速度には全く影響が認められなかった。データには示していないが、釣藤散についても検討した結果、冠元顆粒の

効果と同様の効果を認められた。これらの成績から、冠元顆粒や釣藤散は糖尿病態で発症する空間認知障害に対して改善作用を有することが示唆された。

2.2. 体重および血清グルコースレベルに対する薬物の影響

薬物投与開始前となる7週齢および行動実験完了後の19週齢の時点で、各動物の体重および血清中グルコースレベルを測定した。その結果、THA及び冠元顆粒投与は何れも db/db 群の体重や血糖値にはほとんど影響を及ぼさなかった。また釣藤散についても何らの効果も認められなかった。これらから本研究で用いた薬物の糖尿病モデル動物における空間認知障害改善作用と血糖値あるいは体重変化との間には直接的関連性は少ないと推測された。

2.3. 脳内BDNF mRNA及びBDNF蛋白発現レベル

糖尿病態における学習記憶障害とそれに対する薬物の改善効果に関する分子のエビデンスを捉える目的で、学習記憶行動成立に関わる脳内因子の一つであるBDNFの遺伝子および蛋白発現量の変化を測定した (Fig. 3)。ここでは7週齢の若いマウスと19週齢の成熟マウスを用いて検討した。 db/db および m/m の両群における脳内BDNF mRNAおよび蛋白の発現レベルは7週齢の時点では同程度であったが、19週齢の時点では db/db 群で有意な発現量低下が認められた。一方、冠元顆粒やTHAを投与した db/db 群におけるBDNF mRNA およびBDNF蛋白の発現レベルは、水投与群と比べて有意に高く、 m/m 群とほぼ同じであることが明らかとなった。

2.4. コリン神経系マーカー蛋白発現に対する影響

中枢コリン神経系は学習記憶行動に中核的役割を担っていることを考慮し、糖尿病態におけるコリン神経系機能変化を推測するために海馬におけるマーカーとしてアセチルコリン合成酵素ChAT、ムスカリン性 M_1 、 M_3 、および M_5 受容体の蛋白発現量をウエスタンブロット解析した。7週齢の時点におけるこれらのマーカー蛋白の発現量は m/m および db/db 群で差はなかった。しかし、行動実験が完了した19週齢の時点では何れも db/db 群で有意な低下が認められた。冠元顆粒やTHAを投与した db/db 群ではChAT、ムスカリン性 M_3 、および M_5 受容体の発現レベルは db/db -水投与群と比べて有意に高値であった。尚、類似した効果が釣藤散投与でも観察された。

2.5. 中枢コリン神経細胞脱落と薬物効果

糖尿病モデル動物におけるコリン神経系マーカー蛋白発現量の低下および薬物投与による低下抑制の機序を解析するために、主要なコリン神経系の起始核である内側中隔野および前脳基底核におけるコリン神経細胞をChAT抗体で免疫染色を行った。内側中隔および前脳基底核におけるChAT抗体陽性細胞数は、7週齢の時点では m/m および db/db 群でほぼ同じであったのに対し、19週齢の時点では何れの部位においても db/db 群で有意な減少が認められた。一方、冠元顆粒及びTHAを投与した db/db 群ではChAT抗体陽性細胞数の減少は有意に抑制されていることが明らかとなった。また釣藤散についてもコリン神経細胞に対する同様の効果が観察された。これらの結果、糖尿病態におけるコリン神経系マーカー発現量の主たる要因は、コリン神経細胞の変性脱落であること、さらに冠元顆粒及びTHAにはそれを抑制する保護作用があることが示唆された。

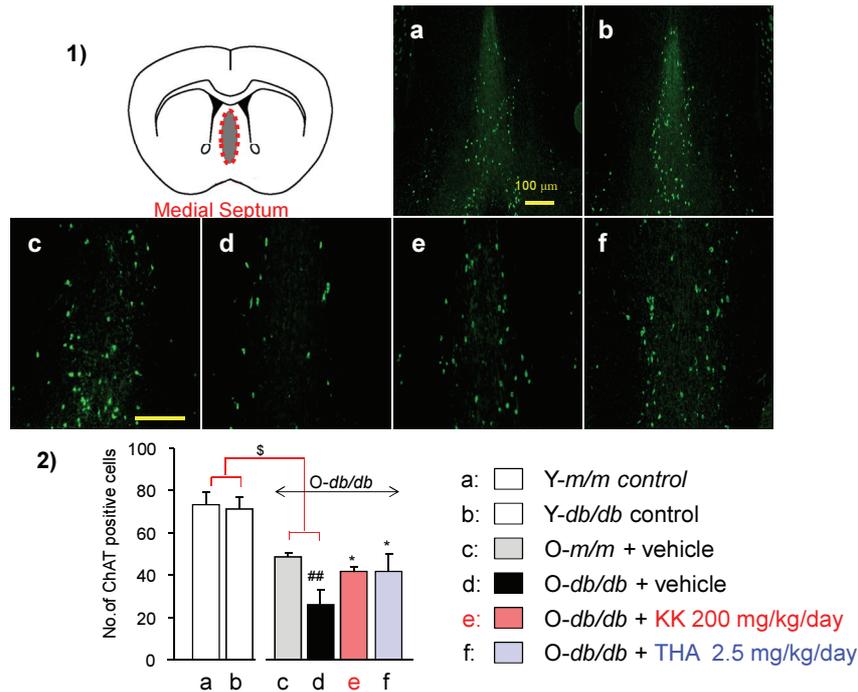


Fig.4 糖尿病モデル動物 (db/db) の内側中隔野におけるコリン神経細胞の脱落と薬物による保護
^sP<0.05 vs. young m/m and db/db groups, ^{##}P<0.01 vs. group c, ^{*}P<0.05 vs. group d

2.6. Ex vivo アセチルコリンエステラーゼ活性に対する薬物の効果

冠元顆粒の効果がTHAと良く類似することから、冠元顆粒投与により、脳内アセチルコリンエステラーゼの活性が阻害される可能性を検証するために、ex vivoにおける本酵素活性を測定した。その結果、THA (2.5 mg/kg/day, i.p.)投与群では脳内アセチルコリンエステラーゼ活性の有意な低下が認められたが、冠元顆粒投与は無効であることが明らかとなった。一方、釣藤散投与もex vivoにおける本酵素活性には影響しないことは既にZhaoら [8]により報告されている。従って冠元顆粒や釣藤散は、THAとは異なる作用機序で糖尿病モデル動物における学習記憶障害の改善やコリン神経細胞脱落の抑制に働いている可能性が高いと考えられる。

■結論

本研究から、冠元顆粒、釣藤散およびTHAは糖尿病誘発の認知障害の発症を抑制する作用を有することが明らかとなった。これらの薬物の効果にはコリン神経細胞の変性脱落に対する抑制が関わっていることが示唆された。他方、試験した薬物はどれも血糖値に対する直接的な作用が認められなかったことから糖尿病病態そのものを改善する効果は乏しいと考えられた。尚、研究成果の一部は下記の論文として発表した。

Qi Zhao et al. Diabetes-induced central cholinergic neuronal loss and cognitive deficit are attenuated by tacrine and a Chinese herbal prescription, Kangen-Karyu: elucidation in type 2 diabetes *db/db* mice, *J Pharmacol Sci* 117, 230 – 242, 2011

■謝辞

本研究で用いたエキスの化学的プロファイリングデータの取得並びにデータのMassBankへおよび和漢薬データベース(WakanDB)への登録は、和漢医薬学総合研究所 田中 謙博士の協力を得て行なわれたものであり、ここに深謝する。

■参考文献

- [1]Yokozawa T, Kim YA, Kim HY, Okamoto T, Sei Y. Protective effect of the Chinese prescription Kangen-karyu against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK₁ cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;109:113-20.
- [2]Yamabe N, Kim HY, Kang KS, Zhao Q, Matsumoto K, Yokozawa T. Effect of Chinese prescription Kangen-karyu on lipid metabolism in type 2 diabetic *db/db* mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;129:299-305.
- [3]Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*. 2010;45:703-14.
- [4]Murakami Y, Zhao Q, Harada K, Tohda M, Watanabe H, Matsumoto K. Choto-san, a Kamp formula, improves chronic cerebral hypoperfusion-induced spatial learning deficit via stimulation of muscarinic M₁ receptor. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2005;81:616-25.
- [5]Zhao Q, Murakami Y, Tohda M, Watanabe H, Matsumoto K. Preventive effect of chotosan, a Kampo medicine, on transient ischemia-induced learning deficit is mediated by stimulation of muscarinic M₁ but not nicotinic receptor. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28:1873-8.
- [6]Yamada M, Hayashida M, Zhao Q, Shibahara N, Tanaka K, Miyata T, et al. Ameliorative effects of yokukansan on learning and memory deficits in olfactory bulbectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;135:737-46.
- [7]Zhao Q, Yokozawa T, Yamabe N, Tsuneyama K, Li XH, Matsumoto K. Kangen-karyu improves memory deficit caused by aging through normalization of neuroplasticity-related signaling system and VEGF system in the brain. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;131:377-85.
- [8]Zhao Q, Murakami Y, Tohda M, Obi R, Shimada Y, Matsumoto K. Chotosan, a Kampo formula, ameliorates chronic cerebral hypoperfusion-induced deficits in object recognition. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2007;103: 360-73.