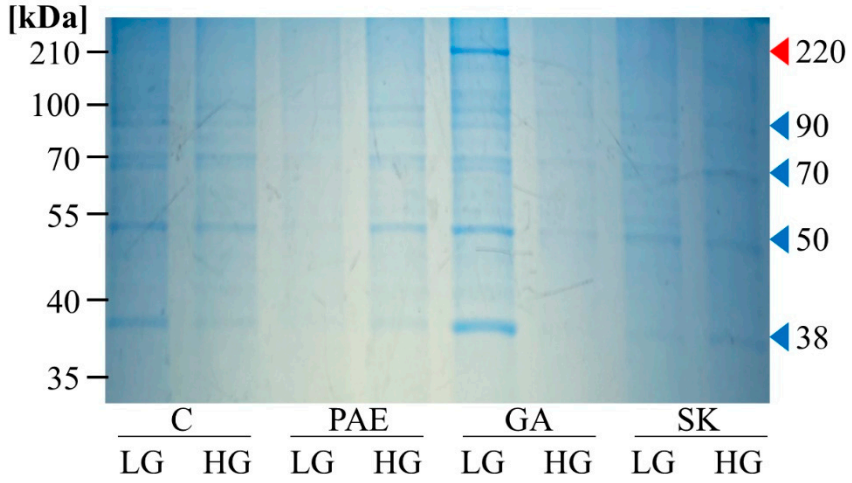
97　芍薬含有漢方薬による脂質・脂質修飾タンパク質解析	松下　祥子

【目的】近年、加齢や生活習慣病に起因する腎機能低下患者が増加傾向にあり、有効かつ副作用の少ない治療薬が求められている。その 1 つとして芍薬含有漢方薬への期待が高まっている。特に芍薬に含まれるペオニフロリンは、高い抗酸化作用を持ち、過酸化脂質の産生抑制による腎保護効果が期待されている。このような脂質変動は腎機能の維持に重要であると考えられるが、芍薬含有漢方薬の各有効成分が腎臓中の脂質変動を誘導し得るのかは不明である。さらに、芍薬含有漢方薬成分がタンパク質の翻訳後修飾の 1 つである脂質修飾を変動させる可能性が示唆されているが、詳細は不明である。そこで本研究では、芍薬含有漢方薬である当帰芍薬散、桂枝茯苓丸、芍薬甘草湯の各有効成分単体および混合成分を腎由来細胞へ添加し、変動する脂質の種類や含有量の変化、さらにタンパク質への脂質修飾の発現変化を解析し、腎機能低下患者への治療効果や芍薬含有漢方薬の新規作用機序の解明に繋げることを目的とした。

【方法】ラット尿細管上皮由来 NRK-52E 細胞に対し、グルコース濃度を変化させ、芍薬含有漢方薬成分を単体もしくは混合して添加した。その後、Bligh-Dyer 法にて脂質を抽出し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析により測定した。さらに、活性酸素および過酸化脂質の産生量を評価した。また、芍薬含有漢方薬成分と共にパルミチン酸アルキンを添加して培養後、パルミチン酸アルキンが修飾されたタンパク質を回収した。その後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量毎に分離し、ゲルを染色した。

【結果】細胞から抽出した脂質試料を解析したところ、それらの試料に特異的なピークが検出され、漢方薬成分添加群毎に増減したことが分かった。グルコース濃度差による *m/z* 536.5 のピーク検出強度比を比較したところ、高グルコース曝露群において、漢方薬成分未添加群よりも当帰芍薬散成分添加群で約 1.5 倍、桂枝茯苓丸成分添加群で約 6.2 倍に検出強度比が増強したことが分かった。また、活性酸素の発現量は、桂枝茯苓丸添加群において大幅に減少しており、過酸化脂質の産生量も最も抑制されたことが分かった。脂質修飾タンパク質を解析したところ、ペオニフロリン単体添加群では、グルコース濃度の増加に伴って、38、50、70、90 kDa 付近のバンドの染色強度が増強した。一方、グリチルレチン酸単体添加群では、ペオニフロリン単体添加群において染色強度が増強した 4 つのバンドに加え、200 kDa 付近のバンドの染色強度が減少したことが分かった。

グルコース濃度および漢方薬成分による脂質修飾タンパク質の発現変動



97. 芍薬含有漢方薬による脂質・脂質修飾タンパク質解析

松下　祥子

日本大学 理工学部 物質応用化学科

Key words：芍薬含有漢方薬，慢性腎臓病，脂質解析，脂質修飾タンパク質

緒　言

本邦は世界有数の長寿国であり、今後益々の高齢者人口の増加が予想されている。高齢者は肝臓や腎臓などの薬物代謝・排泄に関わる臓器の機能低下が観察されるため、薬剤の有効成分が体内に蓄積されることによる副作用の発症例が多いことが知られている。また、高齢者に限らず、糖尿病に起因した糖尿病性腎症などを含む慢性腎臓病（CKD）患者が増加しており、CKD が進行することにより導入される透析患者の増加が見込まれている。そのため、腎機能低下患者に対し、有用性の高い治療薬が求められている。その治療薬の 1 つとして、漢方薬が注目されている。漢方薬は複数の成分が含まれ、それらの相加・相乗効果により薬効が発揮されるため、各成分の混合比を調整することで患者個人に合わせた処方が可能であることが知られている。また、肝代謝型の有効成分が多く、腎機能低下患者においても比較的使用しやすい他、高い抗酸化能を持つことが報告されている。現在、CKD 治療に使用されている漢方薬には、主に芍薬含有漢方薬である当帰芍薬散（TSS）や桂枝茯苓丸（KBG）が知られている他、透析治療時に用いられる鎮痛薬である芍薬甘草湯（SK）が知られている。これらはプロスタグランジン類やロイコトリエン類などの生体内炎症関連脂質メディエーターを変動させることにより、抗炎症作用や抗酸化作用、血流改善、腎保護作用を示すことが報告されてきた。特に、芍薬由来の有効成分であるペオニフロリン（PAE）は高い抗酸化作用を持ち、過酸化脂質の産生抑制による腎保護効果が期待されている［1］。

近年、漢方薬の一種である麻黄湯をラットに投与することにより、生体内炎症関連脂質メディエーターの発現量だけでなく、血液中の遊離脂肪酸およびリン脂質組成の種類と量が変化することが明らかとなった［2］。特に、生体内での酸化反応が引き起こされることにより生成される脂質であるオキシリピン類の増減が観測され、漢方薬成分が治療効果を発現する過程において様々な脂質組成変化を誘発する可能性が示唆された。これらの脂質変化は細胞膜環境を変化させ、漢方薬成分の腎保護作用を亢進させる可能性が考えられる。さらに、腎臓中の脂質変動は老化過程においても観察され、高齢マウスの腎臓では若齢マウスと比較して、セラミドの量が増加し、ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンの量が減っていることが報告されており、老化に従って変動する脂質種の存在が明らかになっている［3］。つまり、腎臓中の脂質変動は腎機能の維持に重要であると考えられる。しかしながら、芍薬含有漢方薬の各有効成分が腎臓中の脂質変動をもたらすのかは不明である。

漢方薬成分は脂質の他にも、タンパク質の発現変化を引き起こすことが明らかとなっている他、タンパク質の翻訳後修飾に関与し、それらのタンパク質の機能発現に重要な作用を示す可能性が示唆されている［4］。例えば、骨髄細胞に対し、甘草の主成分であるグリチルリチンを添加するとタンパク質への脂質修飾に関与する Wingless-type MMTV integration site family：Wnt/β-カテニン経路の活性化が引き起こされることが報告されており、芍薬含有漢方薬および腎臓中においても翻訳後修飾の 1 つである脂質修飾を誘発する可能性が高いと考えられる［5］。しかしながら、脂質修飾に関する解析は行われておらず、芍薬含有漢方薬の各有効成分が腎臓中のタンパク質の脂質修飾を引き起こすのかは不明である。

以上の背景から、芍薬含有漢方薬である TSS、KBG、SK の各有効成分単体および混合成分を腎由来細胞へ添加し、細胞内で引き起こされる脂質の種類・含有量の変化、さらに、タンパク質への脂質修飾の発現変化を明らかにし、腎機能低下患者への治療効果や芍薬含有漢方薬の新規作用機序の解明に繋げることを目的とした。

方　法

1. 薬剤成分の添加による細胞評価

ラット尿細管上皮由来 NRK-52E 細胞に対し、グルコース濃度 1.0（LG）または 4.5（HT）g/L の培地にて、漢方薬成分を単体もしくは混合添加し 24 時間培養した。TSS 成分として PAE、*E*-フェルラ酸、アトラクチレノリド-Ⅲ、KBG 成分として PAE、*E*-ケイ皮酸、アミグダリン、SK 成分として PAE、グリチルレチン酸（GA）を用いた。また、脂質修飾タンパク質の解析時には、パルミチン酸アルキン（C16）も混合して添加した。その後、Cell Counting Kit-8 を用いて 450 nm の吸光度を測定することにより、生細胞数評価を行った。

2. 脂質解析

薬剤添加後の細胞から Bligh-Dyer 法にて脂質を抽出した。その画分を窒素乾固により濃縮し、測定試料とした。なお、脂質量は回収した細胞のタンパク質量を用いて補正した。

得られた脂質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析（MALDI-MS）により測定した。その後、細胞抽出物由来ピークの検出強度と標準試薬由来ピークの検出強度の比を検出強度比として算出した。また、細胞抽出物由来のピークについてデータベースを用いて分子推定を行った。

3. 抗酸化活性評価

細胞に対し、ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテートを 30 分添加し、PAE 単一または TSS、KBG 混合成分添加培地にて 4 時間培養した。また、KBG 成分単体添加群においても同様に培養した。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて励起波長（Ex）：488 nm、蛍光波長（Em）：500～550 nm を検出した。

4. 過酸化脂質解析

細胞に対し、Liperfluo 試薬を終濃度 1 μ mol/L となるよう添加し、30 分加温した。その後、薬剤を添加し、24 時間培養後、Ex/Em：524 / 535 nm にて過酸化脂質を検出した。

5. 脂質修飾タンパク質の解析

薬剤添加後の細胞からタンパク質を抽出し、アジド-アルキン環化反応を用いて C16 ラベルされた脂質修飾タンパク質にビオチンを修飾した。その後、アガロースビーズを用いて精製し、脂質修飾タンパク質を回収した。その後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量毎に分離し、ゲルを Coomassie brilliant blue 染色した。また、染色強度に差が観察されたバンドを切り出し、トリプシンを用いてゲル内酵素消化し、MALDI-MS にて測定した。

結　果

1. PAE 含有漢方薬成分の細胞生存率への影響

TSS 成分、KBG 成分、SK 成分単一または混合添加群において、細胞生存率を評価したところ、グルコース濃度変化および各群間に有意な差は見られなかった。一方、C16 を添加した HG 環境下にて SK 成分を混合添加したところ、吸光度の低下が見られ、細胞の形態が球形に変化したことが分かった。

2. 脂質解析

細胞から抽出した脂質試料を MALDI-MS にて解析したところ、試料に特異的な *m/z* 391.4、536.5、765.6、805.6 のピークが検出されたことが分かった。これらの検出強度比を算出したところ、漢方薬成分添加群毎に増減することが分かった。また、細胞抽出成分として検出された *m/z* 765.6 および 805.6 のピークは、漢方薬成

分添加群毎に検出の有無が異なっていた。データベース検索により、これらの分子推定を行ったところ、*m/z* 536.5 のピークはホスファチジン酸と推定された。また、グルコース濃度の違いによる *m/z* 536.5 の検出強度比を比較したところ、LG 群では未添加群よりも TSS 成分混合添加群で約 0.3 倍、KBG 添加群で約 0.7 倍に低下したことが分かった。一方、HG 群では未添加群と比較して TSS 成分添加群で約 1.5 倍、KBG 成分添加群で約 6.2 倍に検出強度比が増強した。

3. 抗酸化活性評価

HG 群の未添加群において、緑色の蛍光が検出された一方で、LG 群では検出されなかった。この蛍光は、芍薬含有漢方薬成分添加群において減弱しており、特に KBG 群において顕著であったことが分かった。また、KBG 構成成分単体毎の蛍光強度を比較すると、*E*-ケイヒ酸添加群において最も減少していることが分かった。

4. 過酸化脂質解析

過酸化脂質に相当する緑色蛍光は、グルコース濃度に関らず検出され、その強度は HG 環境下において強く検出された（図 1）。LG 環境下の漢方薬成分添加群では、蛍光強度に大きな変化は観察されなかった一方、HG 環境下において、蛍光強度の減少が観察された。特に KBG 添加群において、PAE 単体添加群と比較して蛍光強度が 2 倍程度減少した。

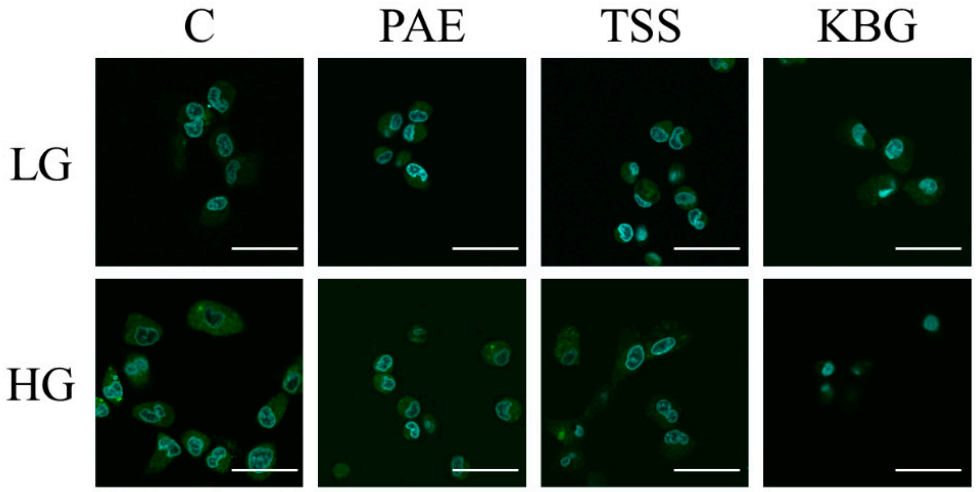


図 1. グルコース濃度および各漢方薬成分添加群における過酸化脂質の検出
緑色：過酸化脂質、青色：核。上段：LG 添加群、下段：HG 添加群。左から未添加群：C、PAE、TSS、KBG 添加群。スケールバー：40 μm。

5. 脂質修飾タンパク質の解析

C16 単体添加群において、グルコース濃度の増加に伴って 38 および 50 kDa 付近のバンドの染色強度が増減した（図 2）。PAE 単体添加群では、グルコース濃度の増加に伴って、38、50、70、90 kDa 付近のバンドの染色強度が増強した。一方、GA 単体添加群では、PAE 単体添加群において染色強度が増強した 4 つのバンドに加え、200 kDa 付近のバンドの染色強度が減少した。混合添加群においてはグルコース濃度変化に伴った染色強度の差は見られなかった。PAE および GA 添加群において染色強度に差が見られたバンドを切り出し、MALDI-MS によりタンパク質の同定を試みたが、検出強度が不足したため、同定には至らなかった。

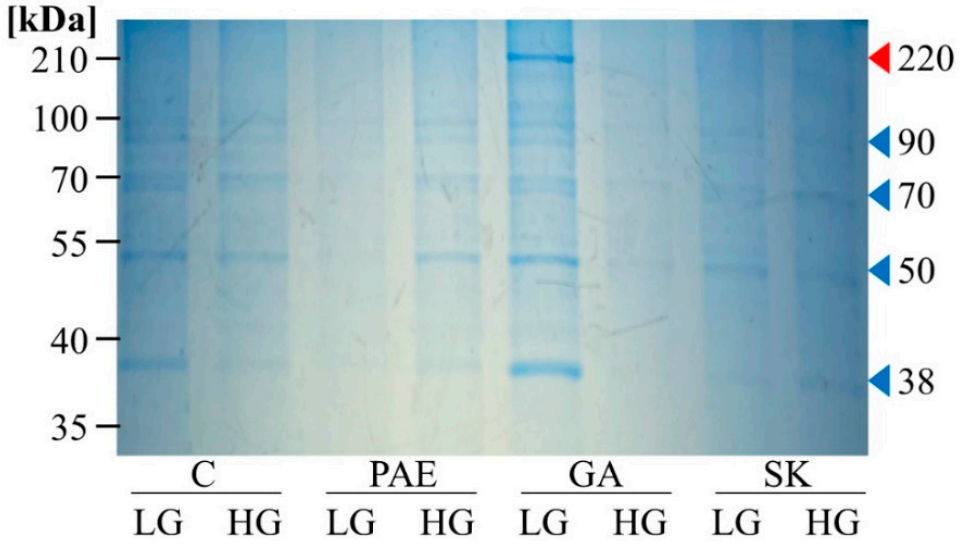


図2. グルコース濃度および漢方薬成分による脂質修飾タンパク質の発現変動
左から薬剤未添加群：C、PAE、GA、SK 添加群。各群のグルコース濃度変化：LG および HG。

考　察

生細胞数評価の結果から、パルミチン酸存在下において SK の濃度が増加すると細胞毒性が生じ得ると考えられた。糖尿病患者では、血液中のパルミチン酸が増加しやすいことが報告されていることから、SK の使用に際し注意が必要であると考えられた［6］。

MALDI-MS による検出強度比の比較時には、MALDI 法にて使用されるイオン化補助剤であるマトリックスとの共結晶の状態など、測定試料の前処理により変動する可能性はあるものの、再現性が得られたことから、各 *m/z* に相当する脂質の細胞内含有量と相関していると考えられた。各ピークの検出強度比は、漢方薬成分の単体添加群毎に異なっていたことから、腎細胞においても脂質変動を誘発すると考えられ、その機序として脂質の生成過程における酵素の発現量や活性の程度が異なる可能性が考えられた。特に、ホスファチジン酸は小胞体におけるリン脂質や中性脂質の合成中間体として機能することが知られている。このことから、今後 MALDI-MS 以外の測定方法を用いて、他の微量な脂質変動の解析が必要であると考えられた。

活性酸素の産生量評価において LG 群と比較して HG 群の蛍光が強く観察され、漢方薬成分によって減弱したことから、HG 刺激により細胞中活性酸素の産生が亢進されており、漢方薬成分によって活性酸素が除去されたと考えられた。特に、TSS 群と比較して KBG 群において蛍光が低かったことから、芍薬含有漢方薬の内、KBG 群の抗酸化能が高いことが考えられた。特に、*m/z* 536.5 の検出強度比の増強と抗酸化能が相関していたことから、ホスファチジン酸が HG 環境下で発生する活性酸素の除去能に関与している可能性が示唆された。また、この検出強度比は KBG の構成成分である *E*-ケイヒ酸添加群において非常に高かったことに加え、活性酸素の除去能が最も高かったことから、*E*-ケイヒ酸が KBG の高い抗酸化活性に関与していることが示唆された。

LG 環境下における過酸化脂質の測定結果から、漢方薬成分による過酸化脂質の産生能は低く、糖尿病発症前から腎保護効果を期待して使用できると考えられた。また、抗酸化能が最も高かった KBG 添加群の過酸化脂質の産生量が低かったことから、KBG の高い抗酸化能によって過酸化脂質の産生が抑制されたことが示唆された。

以上より、特定の脂質変動と抗酸化能や過酸化脂質の産生量が相関していたことから、今後、各漢方薬による脂溶性代謝物変動をより詳細に解明することにより、腎機能低下患者に対する効果的な処方への応用が期待できると考えられた。

電気泳動の結果から、SK 成分単体およびグルコース濃度変化に伴って、タンパク質への C16 修飾を行う酵素の活性や発現量が大きく変動する可能性が示唆された。これらの脂質修飾タンパク質の同定と機能解析および脂質修飾酵素の発現変動を解析することで、腎臓における芍薬含有漢方薬の有用性や新規作用機序の解明につながることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、日本大学大学院理工学研究科物質応用化学専攻物質生命化学研究室の鈴木佑典教授、中村亜紀助手、川合永里子氏（博士前期課程）および学部生の田村賢介氏、髙嶋豊氏にご協力賜りました。この場を借りてお礼申し上げます。

文　献

1） Zhao M, Yu Y, Wang R, Chang M, Ma S, Qu H, Zhang Y. Mechanisms and Efficacy of Chinese Herbal Medicines in Chronic Kidney Disease. Front Pharmacol. 2021 Mar 29;11:619201. PMID: 33854427 DOI: 10.3389/fphar.2020.619201

2） Nishi A, Ohbuchi K, Kushida H, Matsumoto T, Lee K, Kuroki H, Nabeshima S, Shimobori C, Komokata N, Kanno H, Tsuchiya N, Zushi M, Hattori T, Yamamoto M, Kase Y, Matsuoka Y, Kitano H. Deconstructing the traditional Japanese medicine “Kampo”: compounds, metabolites and pharmacological profile of maoto, a remedy for flu-like symptoms. NPJ Syst Biol Appl. 2017 Oct 24;3:32. PMID: 29075514 DOI: 10.1038/s41540-017-0032-1

3） Noh SA, Kim SM, Park SH, Kim DJ, Lee JW, Kim YG, Moon JY, Lim SJ, Lee SH, Kim KP. Alterations in Lipid Profile of the Aging Kidney Identified by MALDI Imaging Mass Spectrometry. J Proteome Res. 2019 Jul 5;18(7):2803-2812. Epub 2019 Jun 19. PMID: 31244212 DOI: 10.1021/acs.jproteome.9b00108

4） Bai J, Xu J, Hang K, Kuang Z, Ying L, Zhou C, Ni L, Wang Y, Xue D. Glycyrrhizic Acid Promotes Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells by Activating the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway. Front Pharmacol. 2021 Apr 16;12:607635. PMID: 33935702 DOI: 10.3389/fphar.2021.607635

5） Hou S, Zhang T, Li Y, Guo F, Jin X. Glycyrrhizic Acid Prevents Diabetic Nephropathy by Activating AMPK/SIRT1/PGC-1α Signaling in db/db Mice. J Diabetes Res. 2017;2017:2865912. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29238727 DOI: 10.1155/2017/2865912

6） Huang L, Lin JS, Aris IM, Yang G, Chen WQ, Li LJ. Circulating Saturated Fatty Acids and Incident Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients. 2019 May 1;11(5):998. PMID: 31052447 DOI: 10.3390/nu11050998.