

薬用人蔘の標的分子の探索

— Ginsenoside-Roの標的分子と抗腎炎作用 —

岩 尾 洋¹⁾ 三 浦 克 之¹⁾
金 勝 慶¹⁾ 寒 川 慶 一²⁾

- 1) 大阪市立大学大学院医学研究科分子病態薬理学*
2) 日本食薬療法研究会

Anti-Nephritis Effects of Ginsenoside-Ro and Target Molecule

Hiroshi IWAO¹⁾, Katsuyuki MIURA¹⁾, Shoukei KIM¹⁾, Keiichi SAMUKAWA²⁾

1) Department of Pharmacology, Osaka City University Medical School

2) Japan Association of Food and Drug Therapy

Abstract

Crude saponin fraction of red ginseng showed anti-inflammatory effects. Several kinds of extracted ginsenosides also showed anti-inflammatory effects. However, the precise mechanism of these anti-inflammatory effects has not been elucidated. In the present study, we investigated the effects of ginsenoside-Ro on the Thy-1 treated experimental glomerulonephritis and searched for responsive molecule affecting ginsenoside-Ro. Ten female Wistar rats of 8-week old were injected anti-rat CD90(Thy-1)/mouseCD90.1(Thy-1.1) (PharMingen, USA) at a dose of 0.25mg/kg body weight, and divided into two groups; non-treatment control group (n=5) and ginsenoside-Ro treated group (30mg/kg i.p./day). Rats were kept in metabolic cages, and urine samples were collected for 24 hours for 6 consecutive days. Urinary excretion of protein was decreased about 15% by the treatment of ginsenoside-Ro. The cytosol fractions of liver and kidney tissues were applied to the BIACORE system (Biacore, Japan). The specific binding was observed in the ginsenoside-Ro immobilized CM-5 sensor chip. These results suggest that ginsenoside-Ro has anti-glomerulonephritis effects, and its responsive molecule may exist.

緒 言

近年、腎不全のため透析へと移行する患者は年々増加傾向にあり、年間15万人の患者が透析治療を受け医療費の約6,500億円を費やしている。この事からも慢性糸球体腎炎から腎不全へと至る過程を防ぐ強力な薬の開発が望まれて

いる。ヒトの慢性腎不全に至る大きな原因のひとつである腎炎のうちで最も頻度が高いのがIgA腎症を含むメサンギウム増殖性腎炎である。メサンギウム細胞の増殖性変化により腎糸球体機能が破壊されることが原因である。

われわれは以前に、オレアノール酸系化合物の抗腎炎作用を検討した。メサンギウム増殖性腎炎モデルである抗Thy1腎炎ラットに、オ

*〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3

レアノール酸系化合物を経口投与すると、尿蛋白排泄低下作用、血漿尿素窒素と血漿クレアチニンの低下作用、糸球体細胞数増加の抑制作用などの抗腎炎作用が観察された。また、オレアノール酸系化合物の抗腎炎作用は、従来から治療に使われてきたグルココルチコイドなどの免疫抑制剤、レニン・アンジオテンシン系阻害薬、抗凝固剤、抗血小板剤などとは異なる作用機序を持つことが明らかとなり、新規の作用機序を持つ腎炎治療薬と考えられた¹⁾。オレアノール酸骨格に糖鎖がついた Ginsenoside-Ro にも抗炎症作用が報告されており、抗 Thy 1 腎炎ラットの蛋白尿を抑制作用と、血液中と尿中クレアチニンおよび尿素窒素を検討した。さらに、本研究では、オレアノール酸系化合物の中から精製された Ginsenoside-Ro を中心に標的分子の探索を行った。

実験材料および方法

動物実験

固形普通食で飼育した体重 110 ~ 120 g の 8 週令雌性 Wistar ラット 10 匹を使用した。メタボリックケージにて 24 時間飼育採尿後、ランダムに 2 群に分け対照群 (5 匹) と Ginsenoside-Ro 投与群 (5 匹) とした。Ginsenoside-Ro 投与は、毎日 30 mg/kg 体重を腹腔内に投与した。2 群とも anti-rat CD 90 (Thy-1) / mouse CD 90.1 (Thy-1.1) (PharMingen 社製、米国) をラットの尾静脈から体重 1 kg 当たり 0.25 mg 投与した²⁾。Thy-1.1 投与後メタボリックケージにて飼育した。投与後 6 日目まで 24 時間ごとの蓄尿により尿量を測定した。尿中蛋白質量の定量は BCA 蛋白測定用試薬 (PIERCE 社) を用いて行った³⁾。さらに、尿中と血漿中の尿素窒素とクレアチニン測定を行った。Ginsenoside-Ro の投与 6 日目にラットにエーテル麻酔を行い、腹部大動脈から採血した。さらに、腎臓と肝臓の一部を採取した。

BIAcore による解析

Ginsenoside-Ro (15 mg) に 0.1 モルの過ヨウ

素酸ナトリウムを加えて 2 時間反応後、エチレングリコールにて反応を停めた。白色沈渣を 50 % DMSO に溶解し、カルボキシメチルデキストランを導入したセンサーチップ (Sensor Chip CM5; ビアコア株式会社) にアルデヒドカップリング法にて固定化した。0.15 M NaCl と 0.005 % Surfactant P 20 を含む 0.01 M HEPES (pH 7.4) バッファーにて腎臓と肝臓組織をホモジネートした後、遠心した上清を BIAcore にかけた。

実験結果

1) 尿中蛋白排泄量に及ぼす効果 (図 1 参照)

尿中蛋白排泄量は、Thy-1.1 投与により約 2 倍に増加し投与後 2 日目まで最大となり、以降漸減した。尿中蛋白排泄量は、Ginsenoside-Ro の投与により減少傾向を示し、投与 2 日目の抑制効果は約 15 % であった。

2) 尿中と血漿中の BUN とクレアチニン

実験最終日 (6 日目) の血中および尿中クレアチニン濃度は、対照群では 0.56 ± 0.22 mg/dl (平均値 \pm S D), 59.5 ± 11.2 mg/dl, Ginsenoside-Ro 投与群では 0.6 ± 0.14 mg/dl, 61.2 ± 5.7 mg/dl であった。血中および尿中尿素窒素は、対照群では 17.2 ± 2.7 mg/dl, 2096 ± 486 mg/dl, Ginsenoside-Ro 投与群では 17.6 ± 1.7 mg/dl, 2520 ± 421 mg/dl であった。

3) BIAcore (図 2 参照)

BIAcore センサーグラムに示したように、腎臓および肝臓の細胞質液には、Ginsenoside-Ro に結合する画分が存在することが明らかとなった。

考 察

Ginsenoside-Ro 投与群で尿中蛋白排泄量の抑制作用に、有意差は見られないもののある程度の効果が見られた。以前に報告したオレアノール酸系化合物の尿蛋白排泄低下作用と同様の結果を示した。ラット腎垂全摘モデルでは、

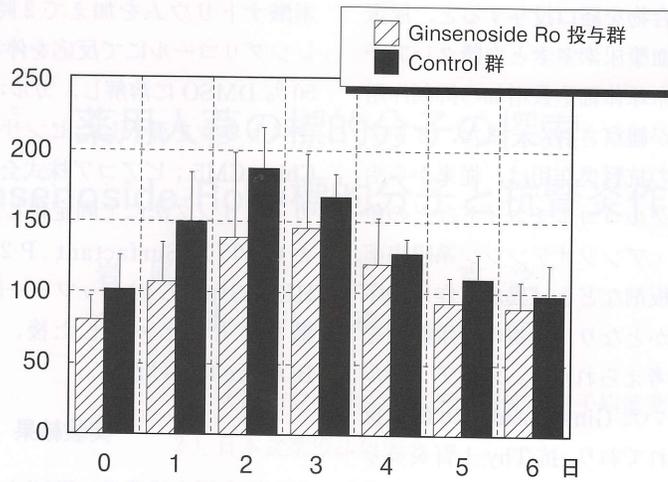


図1 24時間尿中蛋白排泄量(mg/日)

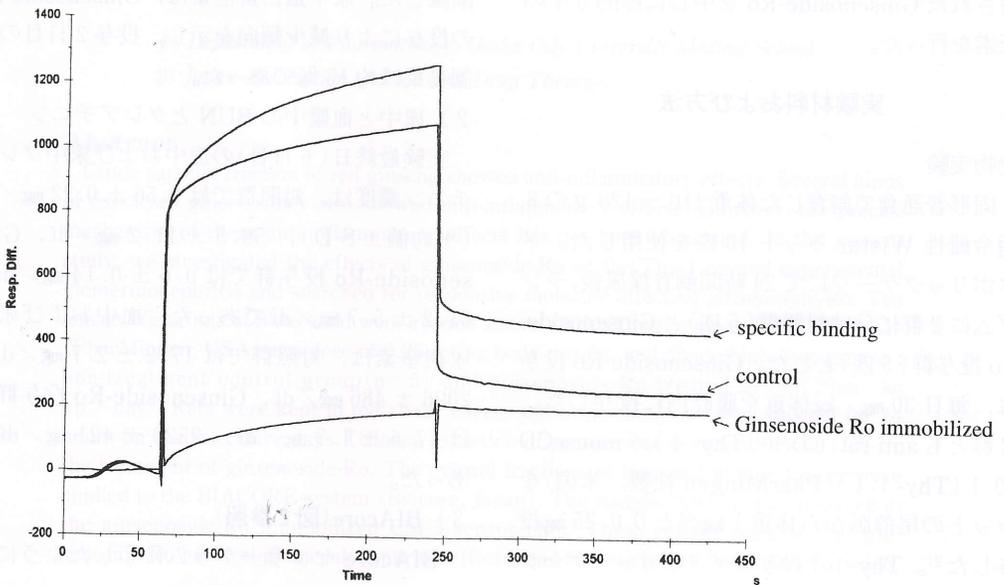


図2 Ginsenoside-Roのセンサーグラム

薬用人参エキスならびにサポニン画分の投与により尿中蛋白排泄の減少と血中尿素窒素の低下が認められ、メサングウム細胞の増殖も抑制されたと報告されている⁴⁾。このことは、ジンセノサイドに広く認められる抗炎症作用の一部に Ginsenoside-Ro が関与していることを示唆するものである。

BIAcoreの結果から Ginsenoside-Ro に結合する分子の存在が示唆されたが、回収された蛋白質が微量のため十分な解析が出来なかった。今後は、トランスクリプトームの解析に加え MALDI-TOF MS によるプロテオームの解析が待たれる。

文 献

- 1) 岩尾 洋 : 平成 10 年度科学研究費補助金研究実績報告書「腎炎治療薬の分子設計」
- 2) Seto M, Kim S, Yoshifusa H, Nakamura Y, Masuda T, Hamaguchi A, Yamanaka S and Iwao H : Effects of prednisolone on glomerular signal transduction cascades in experimental glomerulonephritis : *J Am Soc Nephrol* **9** : 1367-1376(1998)
- 3) Wiechelmann K, Braun R and Fitzpatrick J : Investigation of the bicinchoninic acid protein assay : identification of the groups responsible for color formation : *Anal Biochem* : **175** 231-237(1988)
- 4) 横澤隆子, 大浦彦吉 : 薬用人参 '95 - 代謝調節剤としての薬用人参の作用 - (熊谷朗編), p88-96, 共立出版, 東京(1994)