

## 防風通聖散が Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットの インスリンシグナル伝達系のタンパク量に及ぼす影響

小林 亮平\*1) 庄 秋栄\*1) 長崎 大\*1,2) 宇野 智子\*1,3) 佐藤 祐造\*1,2)

**背景:** メタボリックシンドロームの基盤にある肥満はインスリン抵抗性を誘発する最も重要な危険因子である。先行研究において、漢方処方である防風通聖散 (BTS) は抗肥満作用のあることが認められている。しかしながら、インスリンシグナル伝達系の影響については、ほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いて、インスリンシグナル伝達系のタンパク量に及ぼす影響について検討した。

**方法:** 13週齢の雄性 OLETF ラットおよび、その対照である雄性 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを無作為に4群に分けた: LETO+saline, LETO+BTS, OLETF+saline, OLETF+BTS。生理食塩水と BTS の経口投与を4週間実施した。血清 FFA とインスリンシグナル伝達系のタンパク量を測定した。インスリンシグナル伝達系 (IR- $\beta$ , IRS-1, PI 3-kinase, Akt) のタンパク量は、Western blot 法により定量した。

**結果:** 血清 FFA とインスリンシグナル伝達系 (IR- $\beta$ , IRS-1, PI 3-kinase, Akt) のタンパク量には有意差を認めなかった。

**結論:** これらの結果から、OLETF ラットにおける BTS の4週間の経口投与は、インスリンシグナル伝達系 (IR- $\beta$ , IRS-1, PI 3-kinase, Akt) のタンパク量には影響を及ぼさないことが示唆された。

キーワード: bofutsushosan, insulin-signaling, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat, skeletal muscle, Western blot technique

### I. 背景

近年、食生活の欧米化やライフスタイルの変化に伴う運動不足 (sedentary life) により、メタボリックシンドローム (MS) が急激に増加している<sup>1)</sup>。MS の基盤にある肥満はインスリン抵抗性<sup>2,3)</sup>を誘発する。インスリン抵抗性は糖代謝異常、脂質異常症、高血圧といった病態の基盤になり、心筋梗塞、脳卒中などの動脈硬化性疾患へとつながるため、最も重要な危険因子である<sup>1)</sup>。

食事の適正化と身体トレーニングの実施という生活習慣の偏りの是正は、筋肉のトレーニングになるとともに、内臓脂肪を効率的に減少させ、個体のインスリン抵抗性改善を介し、MS、2型糖尿病などのインス

リン抵抗性関連の全ての生活習慣病および動脈硬化性心血管障害の予防・治療に有用である<sup>4)</sup>。しかしながら、糖尿病予防プログラム (Diabetes Prevention Program; DPP)<sup>5)</sup>で明らかのように、食事・運動などの生活習慣は正の長期に亘る継続的实施は極めて困難である。

一方、数千年の歴史と伝統により、選択されてきた漢方薬は、よほど適応を誤らない限り副作用をもたらす可能性は少なく、しかもエキス剤化され、利便性が高くなっている<sup>6)</sup>。さらに、漢方薬は複数の有効成分が含まれているため、多様な症状に有効性を示すということが大きな特徴である。このことから、複数の症状を併発する MS に対しても有用性が期待されている。

\* 1) 愛知学院大学大学院心身科学研究科健康科学専攻

\* 2) 愛知学院大学心身科学部健康科学科

\* 3) 愛知学院大学心身科学部健康栄養学科

(連絡先) 〒470-0195 愛知県日進市岩崎町阿良池12 E-mail: K0ba84agu@yahoo.co.jp

防風通聖散 (BTS) は, 防風, 黄芩など18種類の生薬で構成されており (表1), 実証, 卒中体質者で上半身肥満のいわゆる“固太り”に投与されている<sup>7)</sup>. 効能・効果としては高血圧の随伴症状 (動悸, 肩こり, のぼせ), 肥満症, むくみ, 便秘となっており, 脂肪組織を選択的に減少させ, 抗肥満作用のあることが報告されている<sup>8-12)</sup>.

表1 防風通聖散構成生薬

Crude drugs	生薬名	必要量 (g)
Scutellariae Radix	黄芩	44.4
Glycyrrhizae Radix	甘草	44.4
Platycodi Radix	桔梗	44.4
Gypsum Fibrosum	石膏	44.4
Atractylodis Rhizoma	白朮	44.4
Rhei Rhizoma	大黃	33.3
Schizonopetae Spica	荊芥	26.7
Gardeniae Fructus	山梔子	26.7
Paoniae Radix	芍薬	26.7
Cnidii Rhizoma	川芎	26.7
Angelicae Radix	当帰	26.7
Menthae Herba	薄荷	26.7
Saposhnikoviae Radix	防風	26.7
Ephedrae Herba	麻黄	26.7
Forsythiae Fructus	連翹	26.7
Zingiberis Rhizoma	生姜	6.7
Talcum	滑石	66.7
Natrium Sulfuricum	芒硝	15.6

防風通聖散エキス100gを調整するために要する生薬の量

すでに, 我々の研究室では, 牛車腎気丸<sup>13,14)</sup>, 桂枝加朮附湯<sup>15)</sup>とその構成生薬シナモン<sup>16)</sup>が, ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルラットのインスリン抵抗性を改善させることを確認している. 牛車腎気丸において, インスリンシグナル伝達系である IR- $\beta$  タンパク量, IRS-1 タンパク量の改善が確認されており<sup>13)</sup>, 桂枝加朮附湯では, IR- $\beta$  タンパク量, IRS-1 タンパク量の改善も確認されている<sup>15)</sup>. さらに, BTS が肥満誘発性 2 型糖尿病モデルラットにおいて, インスリン抵抗性の指標である glucose infusion rate (GIR) を改善させることも確認されている<sup>17)</sup>.

しかしながら, BTS によるインスリン抵抗性改善の分子生物学的メカニズムについては不明である. そこで本研究では, BTS が肥満誘発性 2 型糖尿病モデルラットのインスリンシグナル伝達系のタンパク量に及ぼす影響を検討した.

## II. 方法

### 1. 実験動物と漢方薬

実験には雄性 Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットおよび, その対照である雄性 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを大塚製薬株式会社徳島研究所から供給を受け, 6 週齢より飼育を開始した. 動物は, 個別ゲージ内で飼育し, 飼料は CE-2 (日本クレア, 東京) を与え, 水は自由摂取とした. 飼育室は, 室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度  $50 \pm 10\%$ , 12 時間明暗サイクル (点灯; AM 8:00, 消灯; PM 8:00) の条件に設定した. 本研究は愛知学院大学心身科学部動物実験委員会指針に従って実施した. 漢方薬は株式会社ツムラ (東京) より提供された医療用防風通聖散エキス粉末 (TJ-62) を用いた.

### 2. 実験プロトコール

6 週齢より OLETF ラットと LETO ラットを無作為に 4 群に分けた, 正常群として LETO+saline ( $n=5$ ) と LETO+BTS ( $n=5$ ), 肥満群として OLETF+saline ( $n=5$ ) と OLETF+BTS ( $n=5$ ) とした. BTS は生理食塩水 (大塚製薬株式会社, 東京) で希釈し, 800 mg/kg BW の投与用溶液を作製した. この溶液を 1 日 1 回, 5 ml/kg BW の用量で 4 週間経口投与した. 解剖後, 直ちに腓腹筋を摘出し,  $-85^\circ\text{C}$  で保存した. 摘出した腓腹筋を Western blot 法により, インスリンシグナル伝達系のインスリン受容体 (insulin receptor; IR)- $\beta$ , インスリン受容体基質 (IR substrate; IRS)-1, ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase; PI 3-kinase), Akt のタンパク量を定量した.

### 3. 血清 FFA の測定

投与 4 週間後, 尾静脈より採血を行った. 採血後, 遠心分離器にて血清サンプルを採取し, 血清 FFA の測定のために  $-85^\circ\text{C}$  で保存した. 血清 FFA の測定は血清 FFA 測定キット (NEFA C-テストワコー, 和光純薬工業株式会社, 大阪) を使用して測定した.

### 4. SDS-PAGE, Western blot 法

冷凍した筋肉 (200ml) は, Qinら<sup>14-16)</sup>の方法を用いて, 1 ml の溶解液 (20 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% NP40, 10 mM NaF, 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM EDTA, 1  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 1  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, 1 mM PMSF) 内にてホモジナイザーを使用して粉砕した. 粉砕後,

氷上で1時間静置し、4°C、130000 G、1時間の遠心分離を行った（日立分離用小形超遠心機：CS150GXL，ロータ：S80AT3）。分離後、上澄みを採取した。分光光度計（Molecular Devices）で各上澄みのタンパク量濃度を測定し、-85°Cで保存した。

タンパク質（40μg）をサンプルとして SDS-PAGE（7.5%~10% acrylamide gel）によって分画した。分画後、PVDF膜に転写し、3% BSA でブロッキングし、1次抗体として抗 IR-β 抗体（1：600）、抗 IRS-1 抗体（1：2000）、抗 PI 3-kinase 抗体（1：2000）、抗 Akt 抗体（1：5000）にて4°Cで一昼夜反応させた。PVDF膜洗浄後、2次抗体として Goat Anti-Rabbit IgG（1：5000）を用いて、室温で1時間反応させた。反応後、ECL Plus Western Blotting Detection Regents に PDVF 膜を浸透し、生じた化学発光を Light Capture（AE-6971 Light Capture，アトー株式会社，東京）にて検出した。バンドの数値化は画像処理解析ソフト Scion Image を用いて行った。

## 5. 統計分析

得られたデータは平均値±標準誤差（mean±SE）で表記した。統計解析は一元配置分散分析を用いて、Tukey あるいは Games-Howell により多重比較を行った。各測定項目は危険率5%未満を統計学的に有意差ありと判定した。データは SPSS（19.0 J for Windows）を用いて解析した。

## III. 結果

### 1. 防風通聖散の経口投与が血清 FFA に及ぼす影響（図1）

血清 FFA は LETO+saline 群（1.1 mEq/l）、LETO+BTS 群（1.1 mEq/l）、OLETF+saline 群（1.6 mEq/l）、OLETF+BTS 群（1.3 mEq/l）であり、各群間に有意

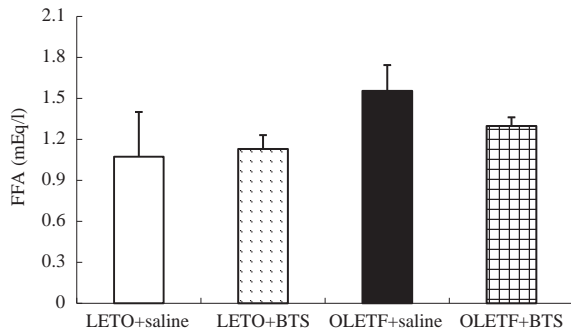


図1 防風通聖散の経口投与が血清 FFA に及ぼす影響

差はみられなかった。

### 2. 防風通聖散の経口投与が IR-β タンパク量に及ぼす影響（図2）

IR-β タンパク量は LETO+saline 群を100%とすると、LETO+BTS 群（115%）、OLETF+saline 群（114%）、OLETF+BTS 群（156%）であった。しかしながら、各群間に有意差はみられなかった。

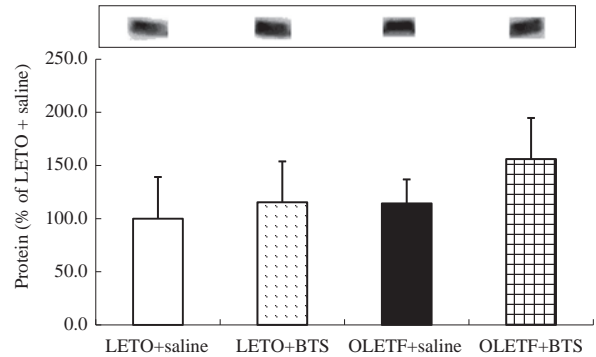


図2 防風通聖散の経口投与が IR-β タンパク量に及ぼす影響

### 3. 防風通聖散の経口投与が IRS-1 タンパク量に及ぼす影響（図3）

IRS-1 タンパク量は LETO+saline 群を100%とすると LETO+BTS 群（105%）、OLETF+saline 群（112%）、OLETF+BTS 群（101%）であった。しかしながら、各群間に有意差はみられなかった。

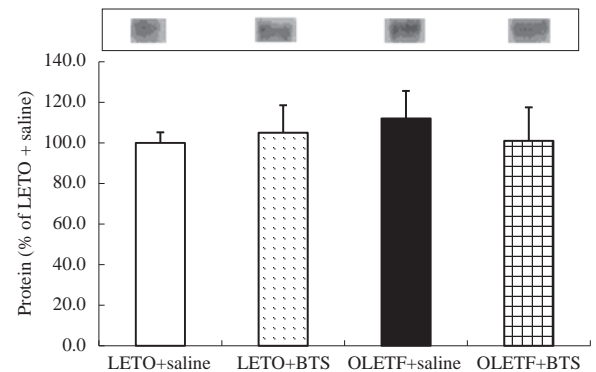


図3 防風通聖散の経口投与が IRS-1 タンパク量に及ぼす影響

### 4. 防風通聖散の経口投与が PI 3-kinase タンパク量に及ぼす影響（図4）

PI 3-kinase タンパク量は LETO+saline 群を100%とすると LETO+BTS 群（157%）、OLETF+saline 群（41

%), OLETF+BTS 群 (135%) であった。しかしながら, 各群間に有意差はみられなかった。

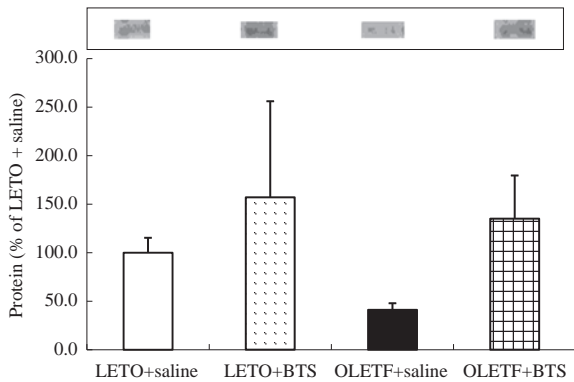


図4 防風通聖散の経口投与が PI 3-kinase タンパク量に及ぼす影響

#### 5. 防風通聖散の経口投与が Akt タンパク量に及ぼす影響 (図5)

Akt タンパク量は LETO+saline 群を 100% とすると LETO+BTS 群 (280%), OLETF+saline 群 (23%), OLETF+BTS 群 (104%) であった。しかしながら, 各群間に有意差はみられなかった。

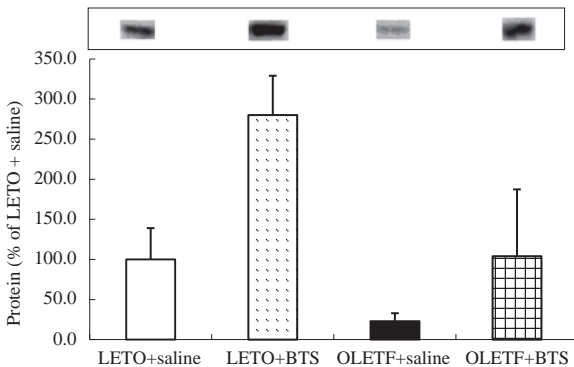


図5 防風通聖散の経口投与が Akt タンパク量に及ぼす影響

### IV. 考 察

本研究では, BTS が肥満誘発性 2 型糖尿病モデルラットのインスリンシグナル伝達系に及ぼす影響を検討した。4 週間の経口投与後, 血清 FFA とインスリンシグナル伝達系のタンパク量 (IR- $\beta$ , IRS-1, PI 3-kinase, Akt) を測定した。本研究の結果から, BTS 投与によってインスリンシグナル伝達系のタンパク量には影響を認めないことが示唆された。

4 週間の BTS の経口投与では, IR- $\beta$ , IRS-1, PI

3-kinase, Akt タンパク量に各群間で有意差を認めなかった。先行研究によると, シナモンの投与では IR- $\beta$ , IRS-1, PI 3-kinase タンパク量に有意差がみられなかったことが報告されている<sup>15)</sup>。さらに, 他の先行研究の漢方薬でも, インスリンシグナル伝達系のタンパク量に対しては影響を認めていないことと同様に, BTS の 4 週間経口投与では, インスリンシグナル伝達系のタンパク量には影響がないことが示唆された。一方, インスリンの細胞内シグナル伝達機構については, チロシリン酸化が重要であるとする興味深い先行研究が報告されている。シナモン投与によって, IR- $\beta$ , IRS-1 チロシリン酸化, IRS-1/PI 3-kinase association が有意に増大したことが確認されている<sup>16)</sup>。同様に牛車腎気丸<sup>13)</sup>, 桂枝加朮附湯<sup>15)</sup>においても IR- $\beta$ , IRS-1 のチロシリン酸化が増加することが報告されており, インスリン抵抗性に対する漢方薬の影響はインスリンシグナル伝達系のタンパク量ではなく, チロシリン酸化に対する影響が大きいことが示唆された。

肥満状態では肥大化した脂肪細胞からアディポネクチン, TNF- $\alpha$ , レジスチンなどのアディポサイトカインが分泌される。脂肪分解により産生された FFA とアディポサイトカインである TNF- $\alpha$ , レジスチンなどはインスリン抵抗性を惹起させることが報告されている<sup>18, 19)</sup>。本研究では血清 FFA に対して, 影響を認めないことが示唆された。インスリンシグナル伝達系に及ぼす要因として FFA だけではなく, アディポネクチン<sup>20)</sup>, TNF- $\alpha$ , レジスチンなどのアディポサイトカインについても検討していくことが課題となった。

今回の実験成績からインスリンシグナル伝達系である GLUT4 タンパク量, IR- $\beta$  チロシリン酸化, IRS-1 チロシリン酸化, PI 3-kinase チロシリン酸化, Akt チロシリン酸化が BTS 投与によるインスリン抵抗性改善の機序として影響していることが推察され, 今後検討を加える予定である。

### V. まとめ

肥満誘発性 2 型糖尿病モデル (OLETF) ラットに対し, BTS を 4 週間の経口投与を行った結果, インスリンシグナル伝達系である IR- $\beta$ , IRS-1, PI 3-kinase, Akt のタンパク量には影響を認めなかった。今後, GLUT4 タンパク量を測定するとともに, インスリンシグナル伝達系チロシリン酸化についても検討を加える予定である。また, TNF- $\alpha$ , アディポネ

クチン、レジスチンについても検索を加えたい。

### 引用参考文献

- 1) Sato Y. et al. (2007). Clinical aspects of physical exercise for diabetes/metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*, **77**, suppl 1, 87–91.
- 2) Abdul-Ghani M.A. et al. (2010). Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol*, Article ID 476279.
- 3) Peppia M. et al. (2010). Skeletal muscle insulin resistance in endocrine disease. *J Biomed Biotechnol*, Article ID 527850.
- 4) Sato Y. et al. (2003). Physical exercise improves glucose metabolism in lifestyle-related diseases. *Exp Biol Med*, **228**, (10) 1208–1212.
- 5) Knowler W.C. et al. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J med*, **333**, (6) 393–403.
- 6) 佐藤祐造他 (2008). 漢方薬によるインスリン抵抗性改善 — euglycemic clamp 法を用いた解析—. 日本体質医学会雑誌, **70**, 3–11.
- 7) 佐藤祐造 (2002). 疾患と漢方：代謝・内分泌. 入門漢方医学, 南江堂, 190–193.
- 8) Yoshida T. et al. (1995). Thermogenic, anti-obesity effects of Bofutsushosan in MSG-obese mice. *Int J Obes*, **19**, (10) 717–722.
- 9) Morimoto Y. et al. (1998). Effect of Bofutsushosan on monosodium glutamate-induced obesity in rats. *J Trad Med*, **15**, 400–401.
- 10) Ohno A. et al. (2001). Effect of Bofutsushosan (Fang-Feng-Tong-Sheng-San) on body weight and fat content in normal mice. *J Trad Med*, **18**, 33–38.
- 11) Morimoto Y. et al. (2001). Effect of Bofutsushosan, a Chinese traditional medicine, on body fat accumulation in fructose-loaded rats. *Folia Pharmacol Jpn*, **117**, 77–86.
- 12) Morimoto Y. et al. (2010). Combination effects of pioglitazone and bofutsushosan on body weight and blood glucose levels in diabetic KKA<sup>y</sup> mice. *J Trad Med*, **27**, (4) 157–165.
- 13) Hu X. et al. (2003). Effect of Gosha-jinki-gan (Chinese herbal medicine: Niu-Che-Sen-Qi-Wan) on insulin resistance in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*, **59**, (2) 103–111.
- 14) Qin B. et al. (2004). Gosha-jinki-gan (a herbal complex) corrects abnormal insulin signaling. *eCAM*, **1**, (3) 269–276.
- 15) Qin, B. et al. (2003). Effects of Keishi-ka-jutsu-to (traditional herbal medicine: Gui-zhi-jia-shu-fu-tang) on in vivo insulin action in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, **73**, (21) 2687–2701.
- 16) Qin B. et al. (2003). Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract*, **62**, (3) 139–148.
- 17) Kobayashi R et al. (2012). Effect of bofutsushosan on insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *J Trad Med*, **29**, 1–9.
- 18) de Alvaro C. et al. (2004). Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in ap38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem*, **279**, 17070–17078.
- 19) Adamska A. et al. (2011). Relationships between serum adiponectin and soluble TNF- $\alpha$  receptors and glucose and lipid oxidation. *Acta Diabetol*, (online first)
- 20) Yamauchi T. et al. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nature Medicine*, **7**, 941–946.

最終版平成24年12月26日受理

## Effect of Bofutsushosan on Protein Content of Insulin-Signaling in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats

Ryohei KOBAYASHI, Qiurong ZHUANG, Masaru NAGASAKI, Tomoko UNO, Yuzo SATO

### Abstract

**BACKGROUND:** Obesity is a key factor in the development of metabolic syndrome and is the most important risk factor for the development of insulin resistance. Previous studies have shown that bofutsushosan (BTS), a Kampo medicine has an anti-obesity effect. However, it remains unclear whether BTS could ameliorate insulin-signaling. In the current study, we investigated the effects of bofutsushosan on the protein content of insulin-signaling in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats.

**METHODS:** Male OLETF rats and their lean counterparts Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats aged 13 weeks were randomly divided into four groups: LETO + saline, LETO + BTS, OLETF + saline, and OLETF + BTS. Saline and BTS were orally administered for 4 weeks. Serum FFA and insulin-signaling protein content were evaluated. Protein content of insulin-signaling intermediates (insulin receptor- $\beta$ :IR- $\beta$ , IR substrate-1:IRS-1, phosphatidylinositol 3-kinase:PI 3-k and Akt) were determined by the Western blot technique.

**RESULTS:** The serum FFA concentrations and the protein content of insulin-signaling (IR- $\beta$ , IRS-1, PI 3-kinase, Akt) didn't show any significant differences in 4 groups.

**CONCLUSIONS:** These results suggest that the four-week oral administration of BTS in OLETF rats didn't affect the protein content of insulin-signaling (IR- $\beta$ , IRS-1, PI 3-kinase, Akt).

Keywords: bofutsushosan, insulin-signaling, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat, skeletal muscle, Western blot technique