

Original article

Involvement of glycative stress in diabetic nephropathy and effects of anti-glycation material Kuromoji (*Lindera umbellata* Thunb.)

Kiriko Akiyama¹⁾, Akihiko Shimode¹⁾, Shigeru Matsumi¹⁾, Tetsuya Maruyama¹⁾,
Wakako Takabe²⁾, Masayuki Yagi³⁾, Yoshikazu Yonei³⁾

1) Yomeishu Seizo Co. Ltd., Tokyo, Japan

2) Department of Materials and Life Science, Faculty of Science and Technology,
Shizuoka Institute of Science and Technology, Shizuoka, Japan

3) Anti-Aging Medical Research Center/Glycative Stress Research Center,
Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2020; 7 (4): 287-297

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

糖尿病性腎症に対する糖化ストレスの関与と抗糖化素材クロモジ (*Lindera umbellata* Thunb.) の効果

秋山季理子¹⁾、下出昭彦¹⁾、松見 繁¹⁾、丸山徹也¹⁾、高部稚子²⁾、八木雅之³⁾、米井嘉一³⁾

1) 養命酒製造株式会社

2) 静岡理科大学理工学部物質生命科学科

3) 同志社大学生命医科学部アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター

抄録

【目的】 抗糖化活性をもつクロモジ (*Lindera umbellata* Thunb.) が糖尿病性腎障害に与える影響を検討した。

【方法】 Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラット (STZ ラット) および自然発症糖尿病マウス (db/db マウス) を用い、クロモジエキスを継続的に投与した時の糖化ストレス関連指標および生化学的変化を調べ、腎臓の炎症反応に与える影響を比較した。また、マウス培養マクロファージ細胞 (RAW264.7) を用い、糖化物質が炎症反応に与える影響を調べた。

【結果】 クロモジエキスは STZ ラットと db/db マウスの腎組織中の炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6) 量を抑制した。また、STZ ラットでは腎重量の増加を抑制し、抗 N^ε-(Carboxymethyl) lysine (CML) 自己抗体量を

を抑制した。db/dbマウスでは総コレステロール量の増加を抑制した。RAW264.7細胞にCML-HSA (human serum albumin) を処置するとTNF- α 産生量が増加したが、CML単独処置では増加しなかった。

【結語】 クロモジエキスは糖尿病病態時の糖化ストレスを軽減させることにより、腎組織における炎症反応の進展を抑制すると考えられた。

KEY WORDS: クロモジ (*Lindera umbellata* Thunb.)、糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs)、カルボキシメチルリジン (N^{ϵ} -(Carboxymethyl) lysine)、自己抗体、糖尿病性腎症、炎症性サイトカイン

はじめに

クスノキ科クロモジ (*Lindera umbellata* Thunb.) はリナロール、ゲラニオール等の精油を含む芳香性植物であり^{1,2)}、乾燥させた幹枝は烏樟 (ウシヨウ) と呼ばれる生薬として薬用酒に利用される³⁾。また、不揮発性のクロモジエキス (kuromoji extract: KE) は抗酸化、抗糖化、抗潰瘍作用、免疫機能改善作用および抗ウイルス作用などの多彩な薬理作用があることから、生活習慣病をはじめとした疾病予防を目的とした機能性素材として期待されている⁴⁻⁸⁾。

これまでヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) - グルコース (glucose: GLU) 糖化反応系を用い、500種以上の食品素材を対象に糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs) の生成抑制活性を評価した結果、クロモジエキスは食品素材の中でも強い活性を示すことを明らかにした⁵⁾。また、HSAのみならずコラーゲンおよびエラスチンに対するGLU糖化反応系においても、AGEsに対する生成抑制活性が強いこと、AGEsの分解作用に関連するAGEsの架橋切断作用および酸化蛋白分解酵素 (oxidized protein hydrolase: OPH) の活性増強作用を有することを示した⁶⁾。さらに、ストレプトゾトシン (streptozotocin: STZ) 誘発糖尿病ラットに対するクロモジエキスの投与は腎組織中の増加した炎症性サイトカイン (tumor necrosis factor- α : TNF- α , interleukin-6: IL-6) 量を抑制し、腎機能の改善を認めた⁵⁾。糖尿病性腎症の腎組織にはマクロファージを主体とする炎症細胞の浸潤による炎症性サイトカインの増加⁹⁾、腎症の進展メカニズムとして糖化や酸化ストレスが関与することが報告されている¹⁰⁾。このことから、STZ誘発糖尿病ラットでみられた腎組織における炎症反応の抑制には、クロモジエキスのAGEsの生成および蓄積抑制作用が関与しているものと考えられた。

本研究はSTZ誘発糖尿病ラット (STZラット) および自然発症糖尿病マウス (db/dbマウス) の血清中の抗カルボキシメチルリジン (N^{ϵ} -(Carboxymethyl) lysine): CML)

自己抗体量を測定し、クロモジエキスの糖化ストレス軽減作用が腎炎症に与える影響について検討した。また、培養マクロファージ細胞 (RAW264.7) を用いて、糖化物質の炎症への関与について検討した。

方法

1. 被験物

クロモジエキスの調製は既報の方法に準じた⁵⁾。具体的には、細かく刻んだクロモジ (*Lindera umbellata* Thunb.) の幹枝に10倍量の水を加えて95°Cで1時間加温抽出した抽出液を遠心濾過し不溶物を除き、減圧濃縮機を用いて濃縮し、クロモジエキスとした。陽性対照薬は糖化反応阻害剤である塩酸アミノグアニジン (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪府大阪市) または抗糖尿病薬 (インスリン抵抗性改善剤) としてメトホルミン塩酸塩 (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いた。

2. 糖尿病病態モデル動物におけるKEの効果

1) 実験動物

6週齢のSprague Dawley (SD) 雄性ラット (日本エスエルシー株式会社、静岡県浜松市)、7週齢のC57BLKS/J Iar-m+/+Leprdb (db/+) 雄性マウスおよびC57BLKS/J Iar-+Leprdb/+Leprdb (db/db) 雄性マウス (日本エスエルシー株式会社) を温度: 24 ± 2°C、湿度: 50 ± 10%、照明時間: 1日12時間 (7~19時) に設定されたバリア施設内で飼育し、1週間予備飼育後実験に用いた。

2) 飼育管理

全ての試験期間を通し、ラットは飼育ケージとしてポリカーボネート製ケージ (W26 × D42 × H18 cm) に、マウスはポリカーボネート製ケージ (W11 × D18 × H11 cm) に動物を個別に収容した。ケージには縦製床敷 (実験動物用床敷 ソフトチップ: 日本エスエルシー株式会社)

を入れたものを使用した。飼料は粉末ラボMRストック(日本農産工業株式会社、神奈川県横浜市)を、飲料水は井戸水を給水瓶を使ってそれぞれ自由摂取させた。体重および摂餌量は週1回測定した。

3) モデル動物の作製および群構成

① ストレプトゾトシン (streptozotocin: STZ) 誘発糖尿病ラット

予備飼育終了後7週齢のラットにSTZ(富士フィルム和光純薬株式会社)を60 mg/kg腹腔内投与し3日後に血糖値を測定し、糖尿病病態(300 mg/dL以上)を確認しSTZラットを作製した。被検物の投与はデスポーザブルシリンジおよび経口ゾンデを用いて8週間毎日強制経口投与を行った。血糖値および体重に偏りがないように群分けソフト(StatLight: Yukms corp、神奈川県川崎市)により、正常群(Normal): SDラットに蒸留水を投与した群(n=8)、対照群(Vehicle): STZラットに蒸留水を投与した群(n=8)、クロモジエキス低用量投与群(KE100): STZラットにクロモジエキスを100 mg/kg/day投与した群(n=8)、クロモジエキス高用量投与群(KE300): STZラットにクロモジエキスを300 mg/kg/day投与した群(n=8)、アミノグアニジン投与群(AMG100): STZラットに塩酸アミノグアニジンを100 mg/kg/day投与した群(n=8)を設けた。

② 自然発症糖尿病 (db/db) マウス

予備飼育終了後、8週齢のマウスの体重を個体別に測定し、各群の平均体重および血糖値がほぼ均一になるように、前述の群分けソフトを用いて群分けした。被検物の投与はデスポーザブルシリンジおよび経口ゾンデを用いて12週間毎日強制経口投与を行った。群構成は、db/+群: db/+マウスに蒸留水を投与した群(n=10)、対照群(Vehicle): db/dbマウスに蒸留水を投与した群(n=10)、クロモジエキス低用量投与群(KE100): db/dbマウスに100 mg/kg/dayのクロモジエキスを投与した群(n=10)、クロモジエキス高用量投与群(KE300): db/dbマウスに300 mg/kg/dayのクロモジエキスを投与した群(n=10)、メトホルミン投与群(MET350): db/dbマウスに350 mg/kg/dayのメトホルミン塩酸塩を投与した群(n=10)を設けた。

4) 採血および剖検

部分採血は投与前および投与後については4週間おきに行った。血糖値の測定には無麻酔下で尾静脈採血した血液を用い、ヘモグロビンA1c(HbA1c)の測定にはラットはイソフルラン吸入麻酔下で頸静脈採血した血液を用い、マウスはイソフルラン麻酔下で眼窩静脈採血した血液を用いた。全採血は投与終了日の夕方から翌日まで16時間の絶食後に行った。ラットはイソフルラン麻酔下で腹大動脈より、マウスはイソフルラン麻酔下で心臓より

採血を行い、血清を遠心、分取して凍結保存した。全採血後は腹大動脈および後大静脈を切断して放血安楽死させ、右側腎臓を採取し、重量測定後、ラットは4倍量、マウスは5倍量のRadio-immunoprecipitation(RIPA)バッファー(富士フィルム和光純薬株式会社)を加え、ホモジナイズして遠心(14,000 g、30分)し、上清を分取して測定まで冷凍保存した。

5) 測定方法

血糖値は簡易血糖測定器(ワンタッチウルトラ: ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社、東京都千代田区またはプレジジョンエクシード: アボットジャパン合同会社、東京都港区)を使って測定した。HbA1cはDCA2000システム(バイエル薬品株式会社、大阪府大阪市)を使用して測定した。ラット血清の総コレステロール(TC)、中性脂肪(TG)、遊離脂肪酸(NEFA)、LDLコレステロール(LDL-C)、HDLコレステロール(HDL-C)、総ビリルビン(T-BIL)、グルコース(GLU)およびグリコアルブミン(GA)は生化学自動分析装置(株式会社日立製作所、東京都千代田区)によって測定を行った。マウス血清のTC、TG、LDL-CおよびHDL-CはそれぞれコレステロールE-テストワコー、トリグリセライドE-テストワコー、LタイプワコーLDL-C・MおよびHDL-コレステロールE-テストワコー(富士フィルム和光純薬株式会社)、アディポネクチン(Adipo)はレビス 高分子アディポネクチン-マウス/ラット(富士フィルム和光純薬株式会社)によって測定を行った。さらに、血清中のカルボキシメチルリジン(N^ε-(Carboxymethyl)lysine: CML)自己抗体の測定には、ラットはCircuLex Anti-CML rat autoantibody ELISA Kit(株式会社サイクレックス、長野県伊那市)を用い、マウスはCircuLex Anti-CML mouse autoantibody ELISA Kit(株式会社サイクレックス)を用いて測定した。腎組織上清中のTNF-αおよびIL-6の測定には、ラットはRat OptEIA ELISA Set(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)を用い、マウスはMouse OptEIA ELISA Set(Becton, Dickinson and Company)を用いて測定した。腎組織上清中の蛋白量はラット、マウスともにBCA Protein Assay Kit(タカラバイオ株式会社、滋賀県草津市)を用いて測定した。

6) 動物試験倫理審査について

本試験実施にあたり、「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年10月1日 法律第105号、平成17年6月22日改正)並びに「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日、環境省告示第88号)を遵守すると共に、「日本エスエルシー株式会社実験動物福祉規定」に基づいて福祉審査委員会で審査および承認を受けた。(承認番号: 17117および17118)

3. マウス培養マクロファージ細胞 (RAW264.7) に対する糖化反応物の影響

1) 培養細胞

マウスマクロファージ由来のRAW264.7細胞はATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) より購入した。細胞は10%非働化牛胎児血清 (FBS, Equitech-Bio, Inc., Kerrville, TX, USA)、100 units/mL ペニシリンおよび100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン (ナカライテスク株式会社、京都府京都市) を添加したダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地 (DMEM、シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社、東京都目黒区) を用い、37°C、5% CO₂存在下で培養した。

2) 糖化反応液

CML (株式会社ニッピ、東京都足立区) および CML-HSA (株式会社サイクレックス) はリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) に希釈して用いた。

3) 測定方法

48 well プレートに 4×10^5 個/mL の RAW264.7 細胞を播種後 24 時間培養し、洗浄後、任意濃度に希釈した CML を 50 μL 添加し全量 500 μL となるように培地を加えて 24 時間培養した。また、任意濃度に希釈した CML-HSA および HSA を 125 μL 添加し全量 500 μL となるように培地を加えて 3 時間培養した。培養後、培地上清を採取し、Assay Diluent (Becton, Dickinson and Company) で任意濃度に希釈し、Mouse OptEIA ELISA Set を用いて TNF- α を測定した。

4. データ処理

結果は平均 \pm 標準偏差 (standard deviation: SD) で表し、統計処理は 2 群間の比較は Wilcoxon の順位和検定を用い、多群間の比較にはノンパラメトリックで Bonferroni 法の多重比較検定を用い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1. 糖尿病病態モデル動物における KE の効果

1) 体重、摂餌量および腎重量

① 体重

体重の推移を Fig. 1 に示した。正常群でみられるような体重増加の推移は STZ 試験群ではみられなかった。また、試験 8 週後の体重は STZ 対照群 (255 ± 37.3 g) で正常群 (419 ± 29.1 g) と比較して有意に低値を示したが、対照群と被検物投与群の体重に差はみられなかった (Fig. 1-a)。

db/db 対照群は db/+ 群と比較して試験開始時から体重は高値を示していたが、試験 12 週後においても db/db 対

照群の体重 (38.0 ± 5.4 g) は db/+ 群 (26.7 ± 0.8 g) より有意に高値を示した。対照群と被検物投与群の体重に差はみられなかった (Fig. 1-b)。

② 摂餌量

摂餌量の推移を Fig. 2 に示した。試験期間を通しての一日当たり摂餌量の平均値は、正常群 (24.9 ± 1.07 g/日) と比較して STZ 対照群 (37.4 ± 2.29 g/日) で多く、クロモジエキス低用量投与群 (34.0 ± 3.62 g/日) で有意に少なかったが、アミノグアニジン投与群に差はみられなかった (Fig. 2-a)。

db/+ 群 (4.35 ± 0.53 g/日) と比較して db/db 対照群 (6.51 ± 0.62 g/日) の一日当たりの摂餌量は多かったが、対照群と被検物投与群の摂餌量に差はみられなかった (Fig. 2-b)。

③ 腎重量

剖検時における腎重量を Fig. 3 に示した。正常群 (2.24 ± 0.15 g) に対し STZ 対照群 (2.50 ± 0.24 g) の腎重量は高値を示した。対照群と比較してクロモジエキス低用量投与群 (KE100: 2.25 ± 0.19 g) の腎重量は有意に低値を示したが、アミノグアニジン投与群に差はみられなかった (Fig. 3-a)。

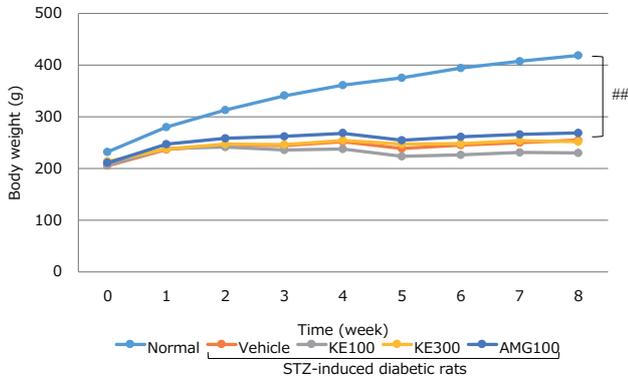
db/+ 群 (0.36 ± 0.02 g) に対して db/db 対照群 (0.40 ± 0.03 g) の腎重量は高値を示したが対照群と被検物投与群に差はみられなかった (Fig. 3-b)。

2) 生化学検査

STZ 試験群 8 週後の血液検査の結果を Table 1-a に示した。糖代謝関連指標の GLU、GA および HbA1c は正常群と比較して STZ 対照群で有意に高値を示したが、対照群と被検物投与群に差はみられなかった。脂質代謝関連指標は TG および HDL-C おいて正常群と比較して STZ 対照群で有意に高値を示したが、対照群と比較してクロモジエキス投与群は高値を示す傾向がみられたものの有意差はなかった (TG, KE300: $p = 0.088$) (HDL-C, KE100: $p = 0.095$)。TC および NEFA は正常群と比較して対照群では差がみられなかったが、TC においてはクロモジエキス投与群で有意に高値を示し、NEFA においてはクロモジエキス高用量投与群とアミノグアニジン投与群において有意に高値を示した。

db/db 試験群 12 週後の血液検査の結果を Table 1-b に示した。GLU および HbA1c は db/+ 群と比較して db/db 対照群で有意に高値を示した。GLU は対照群と比較してメトホルミン投与群で低値を示す傾向がみられ ($p = 0.059$)、HbA1c は対照群と比較してメトホルミン投与群で有意に低値を示した。TC、LDL-C、HDL-C は db/+ と比較して db/db 対照群で有意に高値を示した。クロモジエキス高用量投与群は対照群と比較して TC が有意に低値を示し、TG および LDL-C では低値を示す傾向がみ

a) STZ rats



b) db/db mice

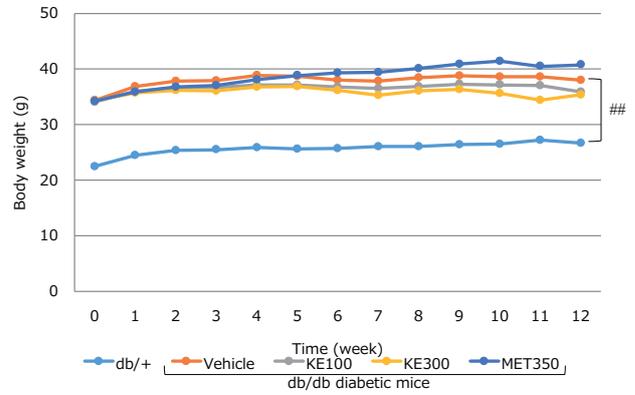


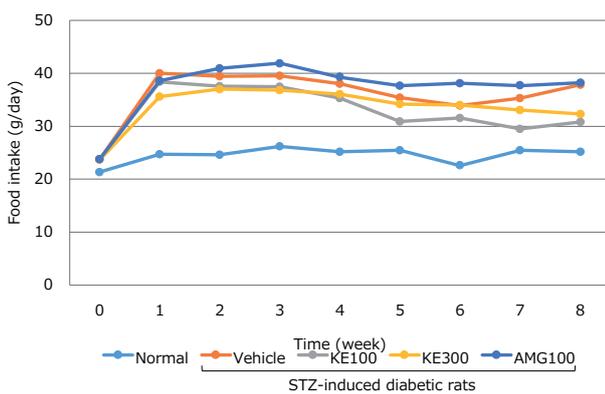
Fig. 1. Change of weight in the diabetic model animals.

a) STZ rats. Normal, no STZ-treat and vehicle treated group; Vehicle, STZ and vehicle treated group; KE100, STZ and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, STZ and 300 mg/kg/day KE treated group; AMG100, STZ and 100 mg/kg/day AMG treated group. Results are expressed as mean, n = 8, ## $p < 0.01$ vs. Normal.

b) db/db mice. db/+, non-diabetic mice and vehicle treated group; Vehicle, db/db diabetic mice and vehicle treated group; KE100, db/db diabetic mice and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, db/db diabetic mice and 300 mg/kg/day KE treated group; MET350, db/db diabetic mice and 350 mg/kg/day MET treated group. Results are expressed as mean, n = 9 - 10, ## $p < 0.01$ vs. db/+.

STZ, streptozotocin (i.p.); KE, kuromoji extract (p.o.); AMG, aminoguanidine (p.o.); MET, metformin (p.o.); i.p., intraperitoneal administration; p.o., oral administration.

a) STZ rats



b) db/db mice

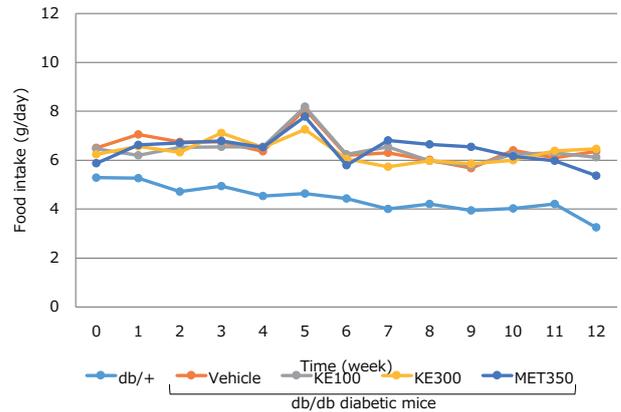


Fig. 2. Change of food intake amount in the diabetic model animals.

a) STZ rats. Normal, No STZ-treat and vehicle treated group; Vehicle, STZ and vehicle treated group; KE100, STZ and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, STZ and 300 mg/kg/day KE treated group; AMG100, STZ and 100 mg/kg/day AMG treated group. Results are expressed as mean, n = 8

b) db/db mice. db/+, non-diabetic mice and vehicle treated group; Vehicle, db/db diabetic mice and vehicle treated group; KE100, db/db diabetic mice and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, db/db diabetic mice and 300 mg/kg/day KE treated group; MET350, db/db diabetic mice and 350 mg/kg/day MET treated group. Results are expressed as mean, n = 9 - 10.

STZ, streptozotocin (i.p.); KE, kuromoji extract (p.o.); AMG, aminoguanidine (p.o.); MET, metformin (p.o.); i.p., intraperitoneal administration; p.o., oral administration.

Table 1. The values of blood markers after treatment in the diabetic model animals.**a) STZ rats**

	STZ(-)	STZ(+)			
	Normal	Vehicle	KE100	KE300	AMG100
GLU (mg/dL)	243 ± 37.3	496 ± 66.3 ##	480 ± 42.6	464 ± 63.5	530 ± 53.6
GA (%)	1.81 ± 0.22	8.41 ± 0.81 ##	8.85 ± 2.71	7.94 ± 2.38	8.79 ± 0.68
HbA1c (%)	3.53 ± 0.14	8.06 ± 0.95 ##	8.53 ± 1.95	7.98 ± 1.71	8.53 ± 1.14
TC (mg/dL)	77 ± 9.0	96 ± 37.8	171 ± 65.4 **	145 ± 40.1 *	109 ± 17.4
TG (mg/dL)	99 ± 21.7	481 ± 385.2 #	868 ± 529.2	1101 ± 881.0	544 ± 211.4
NEFA (µEq/L)	376 ± 63.3	457 ± 138.3	644 ± 123.3	847 ± 307.1 **	655 ± 129.8 *
LDL-C (mg/dL)	8.3 ± 1.2	16.6 ± 12.8	38.4 ± 29.7	34.6 ± 23.2	14.5 ± 3.4
HDL-C (mg/dL)	28.1 ± 2.0	35.0 ± 9.1 #	45.0 ± 11.6	38.8 ± 6.3	41.3 ± 6.6

b) db/db mice

	db/+	db/db			
		Vehicle	KE100	KE300	MET350
GLU (mg/dL)	102 ± 36.3	428 ± 64.4 ##	419 ± 79.7	381 ± 101.3	330 ± 109.6
HbA1c(%)	3.87 ± 0.12	9.53 ± 1.18 ##	9.61 ± 1.09	8.88 ± 1.62	7.99 ± 1.71 *
TC (mg/dL)	103 ± 12.0	132 ± 15.4 ##	118 ± 12.6	117 ± 10.0 *	120 ± 16.8
TG (mg/dL)	109 ± 25.4	133 ± 27.1	111 ± 25.3	101 ± 26.4	77 ± 18.4 **
LDL-C (mg/dL)	39.2 ± 6.4	48.5 ± 12.5 #	42.2 ± 6.4	37.9 ± 4.3	27.6 ± 3.4 **
HDL-C (mg/dL)	62.6 ± 9.6	86.4 ± 13.2 ##	84.6 ± 11.1	84.4 ± 6.9	88.8 ± 15.5
Adipo (µg/mL)	7.39 ± 3.94	7.78 ± 1.24	6.96 ± 1.95	6.60 ± 1.87	9.38 ± 7.35

a) STZ rats. Normal, no STZ-treat and vehicle treated group; Vehicle, STZ and vehicle treated group; KE100, STZ and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, STZ and 300 mg/kg/day KE treated group; AMG100, STZ and 100 mg/kg/day AMG treated group. Results are expressed as mean ± SD, n = 8, #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 vs. Normal; **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. Vehicle.

b) db/db mice. db/+, non-diabetic mice and vehicle treated group; Vehicle, db/db diabetic mice and vehicle treated group; KE100, db/db diabetic mice and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, db/db diabetic mice and 300 mg/kg/day KE treated group; MET350, db/db diabetic mice and 350 mg/kg/day MET treated group. Results are expressed as mean ± SD, n = 9 - 10, #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 vs. db/+, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 vs. Vehicle. STZ, streptozotocin (i.p.); KE, kuromoji extract (p.o.); AMG, aminoguanidine (p.o.); MET, metformin (p.o.); GLU, glucose; GA, glycoalbumin; HbA1c, hemoglobin A1c; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; NEFA, non-esterified fatty Acid; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; Adipo, adiponectin; SD, standard deviation; i.p., intraperitoneal administration; p.o., oral administration.

られた (TG: $p = 0.067$, LDL-C: $p = 0.084$)。メトホルミン投与群ではTGおよびLDL-Cが対照群と比較して有意に低値を示した。

3) 血清中抗CML自己抗体量

STZ試験群8週後の血清中の抗CML自己抗体量の結果をFig. 4-aに示した。正常群 ($108 \pm 54.4 \mu\text{g/mL}$) に対しSTZ対照群 ($321 \pm 171.6 \mu\text{g/mL}$) の抗CML自己抗体量は有意に高値を示したが、対照群と比較してクロモジエキス投与群 (KE100: $71 \pm 55.8 \mu\text{g/mL}$, KE300: $113 \pm 89.3 \mu\text{g/mL}$) およびアミノグアニジン投与群 ($122 \pm 76.3 \mu\text{g/mL}$) は有意に低値を示した。

db/db試験群12週後の血清中の抗CML自己抗体量の結果をFig. 4-bに示した。db/+群 ($22.6 \pm 4.9 \mu\text{g/mL}$) に対しdb/db対照群 ($37.7 \pm 20.9 \mu\text{g/mL}$) の抗CML自己抗体量は有意に高い値を示したが、対照群と比較して被験物投与群では差はみられなかった。

4) 腎組織中の炎症性サイトカイン量

STZ試験群8週後の腎組織中のTNF- α およびIL-6量をFig. 5-a, bに示した。腎組織中の蛋白量当たりのTNF- α 量は正常群 ($1.26 \pm 0.22 \text{ ng/mg protein}$) と比較してSTZ対照群 ($1.72 \pm 0.39 \text{ ng/mg protein}$) で有意に高値を示したが、対照群と比較してクロモジエキス低用量投与群 (KE100: $1.01 \pm 0.30 \text{ ng/mg protein}$) およびアミノグアニジン投与群 ($0.85 \pm 0.12 \text{ ng/mg protein}$) では有意に低値を示した。IL-6量は正常群と比較してSTZ対照群で差はみられなかったが、対照群 ($6.39 \pm 1.27 \text{ ng/mg protein}$) と比較してクロモジエキス投与群 (KE100: $4.54 \pm 1.63 \text{ ng/mg protein}$, KE300: $4.24 \pm 1.75 \text{ ng/mg protein}$) およびアミノグアニジン投与群 ($4.03 \pm 0.51 \text{ ng/mg protein}$) は有意に低値を示した。

db/db試験群12週後の腎組織中のTNF- α およびIL-6量をFig. 5-c, dに示した。腎組織中の蛋白量当たりのTNF- α 量は対照群 ($0.70 \pm 0.19 \text{ ng/mg protein}$) と比較してクロモジエキス高用量投与群 (KE300: $0.47 \pm 0.12 \text{ ng/mg protein}$) は有意に低値を示した。IL-6量は対照群 ($0.47 \pm 0.12 \text{ ng/mg protein}$) と比較してクロモジエキス高用量投与群 (KE300: $0.32 \pm 0.08 \text{ ng/mg protein}$) およびメトホルミン投与群 ($0.35 \pm 0.10 \text{ ng/mg protein}$) は有意に低値を示した。TNF- α およびIL-6量はdb/+群とdb/db対照群で差はみられなかった。

2. マウス培養マクロファージ細胞 (RAW264.7) に対する糖化反応物の影響

RAW264.7細胞への糖化物添加によるTNF- α 産生量をFig. 6に示した。CML溶液添加24時間後の培養液中のTNF- α 産生量は非添加と比較して変化はみられなかった (Fig. 6-a)。CML-HSA溶液添加3時間後の培養

液中のTNF- α 産生量は濃度依存的に増加が認められ、 $5 \mu\text{g/mL}$ および $10 \mu\text{g/mL}$ 処置では有意に増加した。また、HSA溶液のみではTNF- α の増加はみられなかった (Fig. 6-b)。

考察

1. 糖尿病モデル動物について

STZラットは1型糖尿病モデルとして用いられる。STZの投与により膵 β 細胞で活性酸素種の産生が惹起され β 細胞が細胞死を起こしインスリン分泌が阻害されることで、急激に血糖値が上昇、高血糖が維持される^{11,12}。一方、db/dbマウスは2型糖尿病モデルとして用いられる。db/dbマウスは食欲抑制ホルモンのレプチンの受容体に欠損があるため、過食が原因で肥満を伴い、6~10週齢で高血糖を発症する¹³。いずれの糖尿病モデルも糖尿病性腎症に特徴的な糸球体メサンギウム基質の拡大や糸球体基底膜の肥厚などが腎臓で観察され¹³、組織中には炎症性サイトカインの上昇が認められる^{14,15}。さらに、腎臓にはAGEsの蓄積がみられることから、腎症の発症には生体蛋白質の糖化反応により生じた糖化ストレスが強く関与していると考えられている^{10,16,17}。本試験では、両モデル動物において腎重量が増加し、STZラットの腎組織中にはTNF- α およびIL-6産生量の増加が認められた。腎重量の増加は糖尿病性腎症の初期症状においても認められる腎肥大によるものと考えられ、両モデル動物において持続した高血糖が腎臓における炎症反応の進展に関与していると考えられる。

AGEsはヒトや動物の組織で加齢に伴い増加し、糖尿病性腎症¹⁸、慢性腎不全¹⁹、動脈壁のアテローム硬化性病変²⁰およびアルツハイマー病²¹などと関連性があることが報告されている。また、AGEsは抗原性を有し、自己抗体が産生されることが知られている。糖尿病患者の血清からはAGEsの自己抗体が高濃度で検出され、前述した様々な疾患に関連すると考えられている²²。特に、糖尿病性腎症の重症度との関連性が知られており、軽度の微量アルブミン尿症患者に比べ透析が必要な腎不全患者の方が高濃度に検出される²³。また、各種AGEsに共通したエピトープを有するCMLの自己抗体は血糖値が 200 mg/dL 以上の2型糖尿病患者では健常者と比較して約5倍も増加する²²。このことからCMLに対する自己抗体量は生体内のAGEsの形成および蓄積を反映するため、糖尿病の二次合併症早期発見に重要な役割を演じると考えられる。本試験においても両モデル動物の血清中にはCMLに対する自己抗体量の明らかな上昇を認めた。特にSTZラットにおける抗体量の増加は顕著であったが、この増加はAGEs生成阻害剤のアミノグアニジンの投与で抑制された。このことは両モデル動物における腎炎症

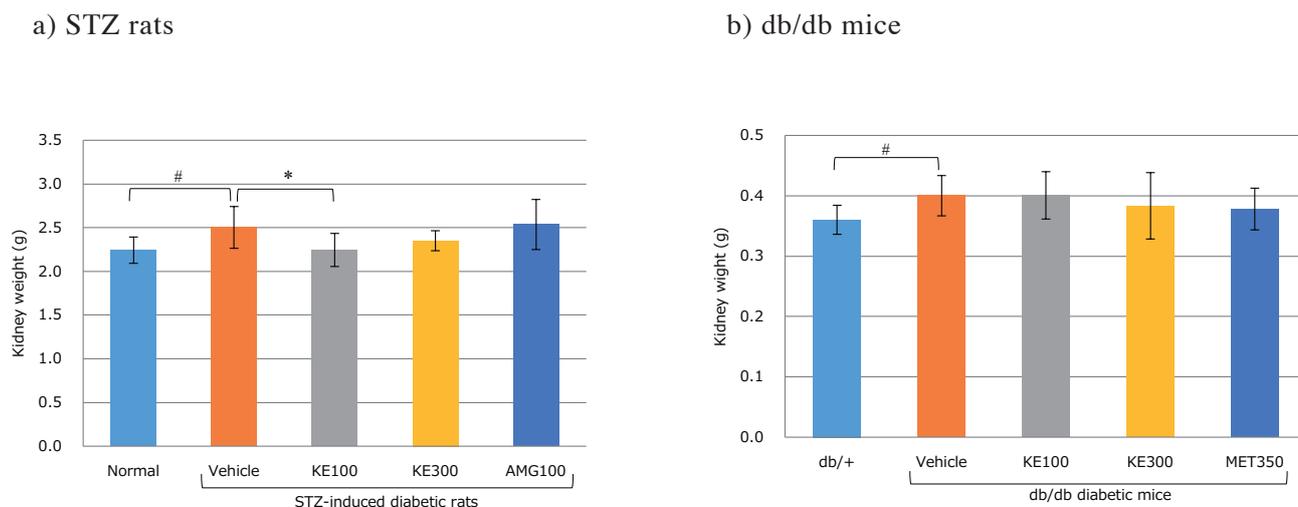


Fig.3. Kidney weight after treatment in the diabetic model animals.

a) STZ rats. Normal, No STZ-treat and vehicle treated group; Vehicle, STZ and vehicle treated group; KE100, STZ and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, STZ and 300 mg/kg/day KE treated group; AMG100, STZ and 100 mg/kg/day AMG treated group. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 8$, # $p < 0.05$ vs. Normal; * $p < 0.05$ vs. Vehicle.

b) db/db mice. db/+, non-diabetic mice and vehicle treated group; Vehicle, db/db diabetic mice and vehicle treated group; KE100, db/db diabetic mice and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, db/db diabetic mice and 300 mg/kg/day KE treated group; MET350, db/db diabetic mice and 350 mg/kg/day MET treated group. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 9 - 10$, # $p < 0.05$ vs. db/+.

STZ, streptozotocin (intraperitoneal administration, i.p.); KE, kuromoji extract (oral administration, p.o.); AMG, aminoguanidine (p.o.); MET, metformin (p.o.); SD, standard deviation; i.p., intraperitoneal administration; p.o., oral administration.

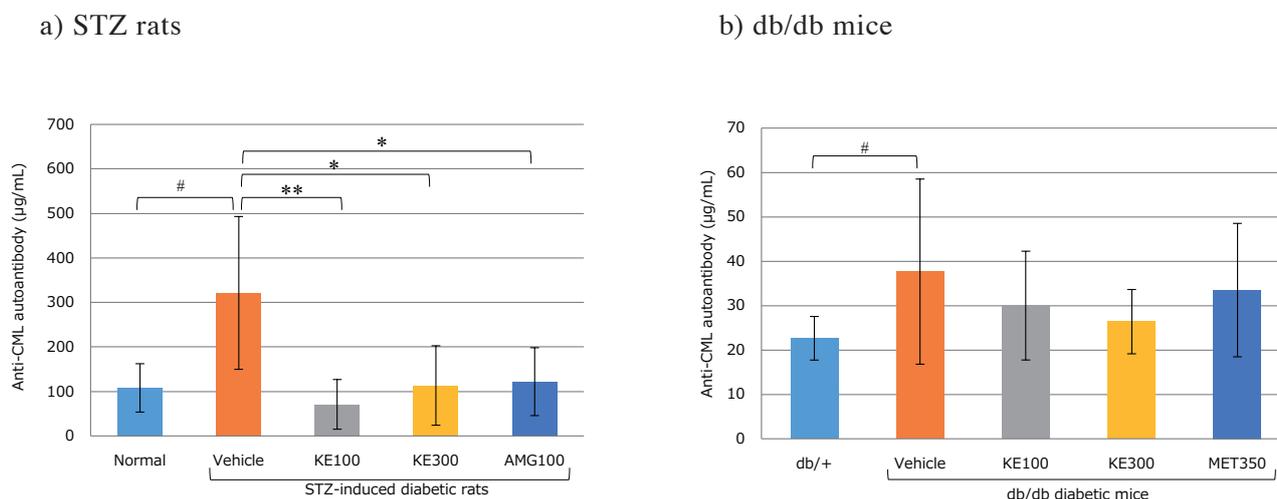


Fig.4. The values of blood anti-CML autoantibody after treatment in the diabetic model animals.

a) STZ rats. Normal, No STZ-treat and vehicle treated group; Vehicle, STZ and vehicle treated group; KE100, STZ and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, STZ and 300 mg/kg/day KE treated group; AMG100, STZ and 100 mg/kg/day AMG treated group. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 8$, # $p < 0.05$ vs. Normal; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle.

b) db/db mice. db/+, non-diabetic mice and vehicle treated group; Vehicle, db/db diabetic mice and vehicle treated group; KE100, db/db diabetic mice and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, db/db diabetic mice and 300 mg/kg/day KE treated group; MET350, db/db diabetic mice and 350 mg/kg/day MET treated group. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 9 - 10$, # $p < 0.05$ vs. db/+.

STZ, streptozotocin (i.p.); KE, kuromoji extract (p.o.); AMG, aminoguanidine (p.o.); MET, metformin (p.o.); CML, N^{ϵ} -(Carboxymethyl) lysine; SD, standard deviation; i.p., intraperitoneal administration; p.o., oral administration.

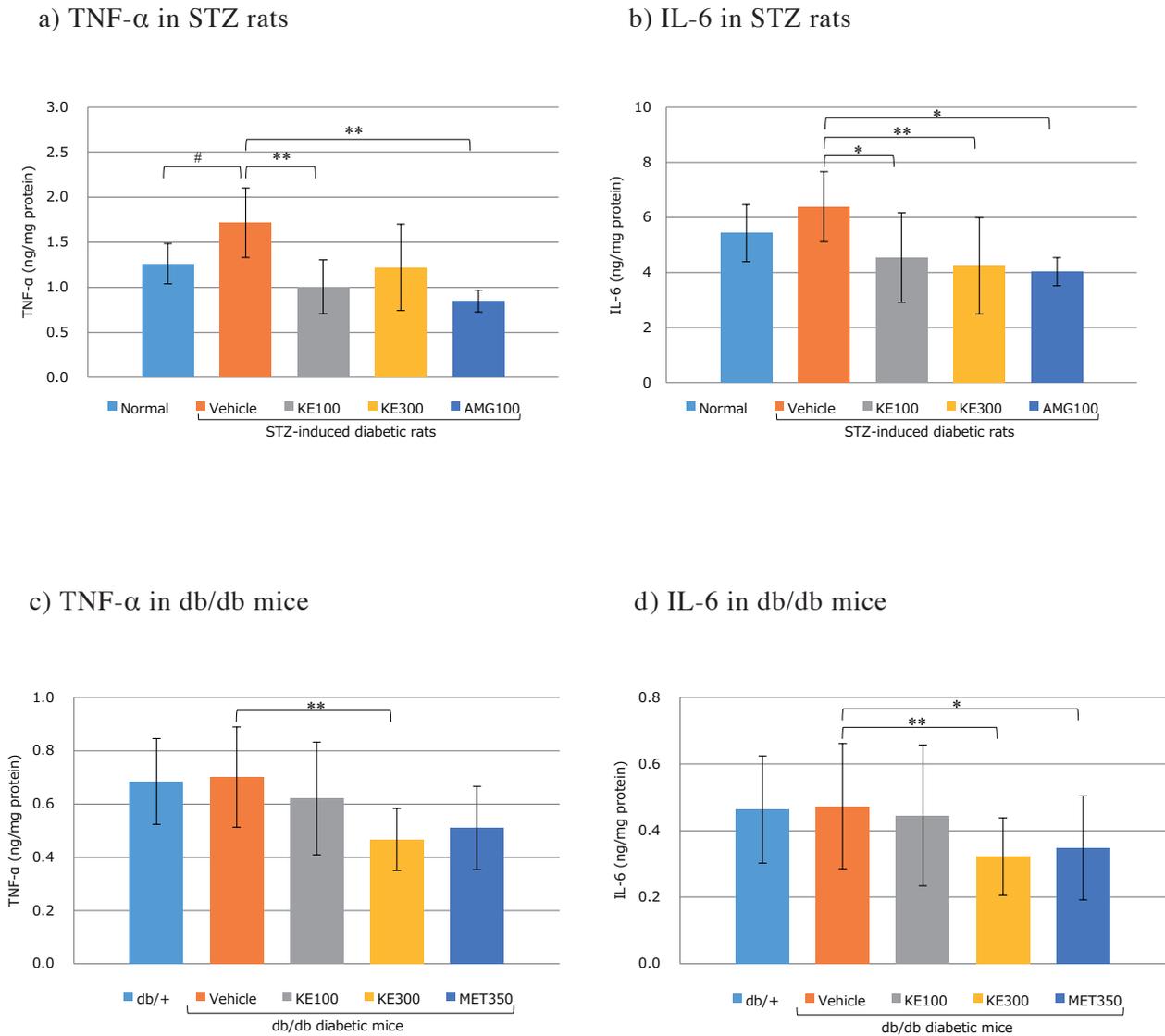


Fig.5. The values of kidney cytokine after treatment in the diabetic model animals.

a) TNF- α , **b)** IL-6 in STZ rats. Normal, no STZ-treat and vehicle treated group; Vehicle, STZ and vehicle treated group; KE100, STZ and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, STZ and 300 mg/kg/day KE treated group; AMG100, STZ and 100 mg/kg/day AMG treated group. Results are expressed as mean \pm SD, n = 8, # $p < 0.05$ vs. Normal; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle.

c) TNF- α , **d)** IL-6 in db/db mice. db/+, non-diabetic mice and vehicle treated group; Vehicle, db/db diabetic mice and vehicle treated group; KE100, db/db diabetic mice and 100 mg/kg/day KE treated group; KE300, db/db diabetic mice and 300 mg/kg/day KE treated group; MET350, db/db diabetic mice and 350 mg/kg/day MET treated group. Results are expressed as mean \pm SD, n = 9 – 10, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. Vehicle.

STZ, streptozotocin (intraperitoneal administration, i.p.); KE, kuromoji extract (oral administration, p.o.); AMG, aminoguanidine (p.o.); MET, metformin (p.o.); TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-6, interleukin-6; SD, standard deviation; i.p., intraperitoneal administration; p.o., oral administration.

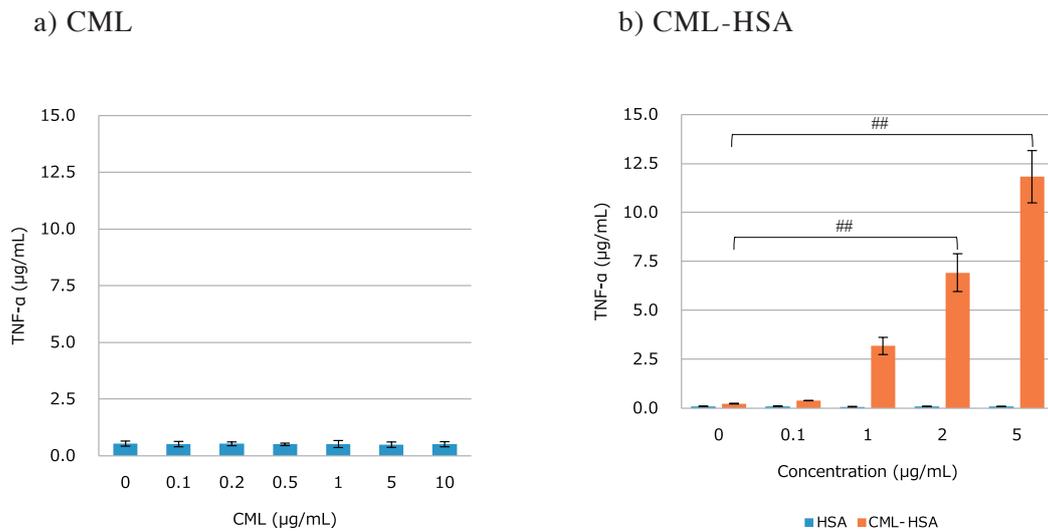


Fig. 6. The values of TNF- α production by treatment with glycated materials in RAW264.7 cells.

a) CML treatment. **b)** CML-HSA treatment. The culture supernatant was collected 24 hours (a) or 3 hours (b) after the application and measured for TNF- α content by ELISA. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$, ## $p < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{g/mL}$ (control). CML, N^{ϵ} -(Carboxymethyl)lysine; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; HSA, human serum albumin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SD, standard deviation.

反応には AGEs 産生増加に伴う糖化ストレスが強く関与し、その影響は 1 型糖尿病モデルの STZ ラットで顕著であると考えられる。

AGEs による炎症性サイトカイン上昇のメカニズムの一つとして、マクロファージに存在する RAGE (Receptor for AGEs) を介した AGEs/RAGE 炎症シグナル伝達系への関与が報告されている。腎症患者では糸球体と間質に炎症細胞であるマクロファージの著明な浸潤がみられ^{10, 24}、STZ ラットおよび db/db マウスの腎組織では RAGE の増加が認められる^{15, 25, 26}。しかし、RAGE を介した炎症反応の誘発に関しては各 AGEs について相反する議論が続いており、CML に関しても RAGE と結合するための必要な構造を有していないとの報告もある^{27, 28}。一方で RAGE との結合には AGEs への蛋白質の修飾が重要であることが示されている。CML-BSA と RAGE との結合に対し、CML 単体を共処置しても CML-BSA の RAGE への結合には競合しなかった²⁹。また、ヒト単球由来細胞への CML 単体処置では TNF- α の産生がみられなかったのに対し、カゼイン糖化物の処置では産生を示し、これに CML に対する抗体または RAGE 拮抗薬を共処置することにより TNF- α 産生が抑制された²⁷。我々もマクロファージ由来 RAW264.7 細胞への CML 単体処置では TNF- α 産生はみられなかったが、CML-HSA 処置において用量依存的な産生増加が認められたことから、マクロファージの炎症誘発には AGEs への蛋白質の修飾が重要であることを支持する結果であった。

2. クロモジの作用について

クロモジエキスは STZ ラットの血清中の CML に対する自己抗体の上昇を強く抑制し、腎重量の増加、腎組織中の TNF- α および IL-6 量の増加を抑制した。

クロモジエキスは HSA、コラーゲンおよびエラスチンに対する GLU 糖化反応系において蛍光性 AGEs、CML、3-deoxyglucosone (3DG)、glyoxal (GO)、および methylglyoxal (MGO) などの生成を抑制し、特に CML に対しては強い生成抑制活性を有する⁶。さらに、AGEs 架橋切断作用と酸化蛋白分解酵素 (OPH) の活性増強作用があり、AGEs を分解する作用も有する⁶。また、クロモジの枝には procyanidin B1 および procyanidin B2 などのフラバン-3-オール誘導体や kaempferol, quercetin, hyperoside, pinocembrin などの flavonoid 化合物が含まれ、AGEs 生成阻害活性、MGO や GO の捕捉作用および AGEs による آپトシスの誘導の抑制作用が報告されている³⁰⁻³⁶。

各種 AGEs に共通したエピトープを有する CML に対する自己抗体量は、生体内の AGEs の形成および蓄積を反映する。クロモジエキスが有する強い抗糖化活性により AGEs の生成および蓄積を減少させることで AGEs/RAGE 炎症シグナル伝達系を介したマクロファージ系炎症性細胞の活性化を抑え、腎臓の炎症反応の進展を軽減したと考えられる。また、db/db マウスより STZ ラットの方が糖化ストレスによる影響は強くみられたが、クロモジの効果は STZ ラットにおいてより明確であった。AGEs の生成および蓄積が早くから進行する 1 型糖尿病

モデルの方がクロモジの作用が顕著にみられたと考えられる。

一方、db/db マウスにおいてはTCの増加がクロモジエキス投与により抑制された。コレステロール合成の主な場所は肝臓や小腸であるが、STZラットは小腸での合成が多いのに対し、db/db マウスでは肝臓における合成が多いことが報告されている³⁷⁾。STZラットのようなインスリン依存的な糖尿病動物とdb/db マウスのようなインスリン非依存的な糖尿病動物ではコレステロール合成に違いがあると考えられている。また、procyanidin B1とprocyanidin B2はdb/dbマウスにおいてTGおよびTCの増加抑制が報告されている²⁵⁾がSTZラットでの報告は見当たらない。今回、db/dbマウスのみ認められたクロモジエキスのコレステロールの増加抑制作用は各糖尿病モデルの脂質代謝のメカニズムの違いが影響しているものと考えられる。

結論

糖尿病モデルでは生体内で増加したAGEsがマクロファージなどの炎症性細胞を刺激することにより腎炎症を引き起こしていると考えられた。抗糖化作用をもつクロモジエキスはSTZラットおよびdb/dbマウスで腎炎症を抑

制したが、その抑制作用は糖化ストレスの影響が大きい1型糖尿病モデルであるSTZラットでより顕著に見られた。クロモジエキスの糖尿病病態時の腎組織における炎症反応の抑制にはクロモジが有する強い糖化ストレス軽減作用が関与しているものと考えられた。

謝辞

本研究は総合科学技術・イノベーション会議のSIP(戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号14533567)「次世代農林水産業創造技術」(農研機構生研センター受託研究)によって実施された。

利益相反申告

本研究を遂行するにあたりSIP協力企業として養命酒製造株式会社より支援を受けた。

参考文献

- 1) 古畑光治, 堀口貞次郎, 加藤正秀, 烏樟の薬理学的研究(第1報)クロモジ油の季節的变化について. 生薬学雑誌. 1966; 86: 683-687.
- 2) 林 七雄, 古前 恒. くろもじの化学生態学. 香料. 1976; 115: 31-40.
- 3) 江崎宣久, 酒井里美, 小島 暁, 他. 「冷え」の自覚および末梢体表温度に対する補益薬酒(養命酒®)連続服用の効果: オープン試験による予備的検討. 薬理と治療. 2007; 35: 335-341.
- 4) Ezaki N, Kato M, Takizawa N, et al. Pharmacological studies on *Linderae umbellatae* Ramus: IV. Effects of condensed tannin related compounds on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. *Planta Med.* 1985; 51: 34-38.
- 5) Yagi M, Takabe W, Matsumi S, et al. Screening and selection of anti-glycative materials: Kuromoji (*Lindera umbellata*). *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 317-328.
- 6) Yagi M, Takabe W, Matsumi S, et al. Biochemistry of kuromoji (*Lindera umbellata*) extract: Anti-oxidative and anti-glycative actions. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 329-340.
- 7) 松見 繁, 丸山徹也. ストレス負荷マウスの免疫機能に対するクロモジの作用. 日本未病システム学会第24回総会要旨集. 2017: F1-3. (抄録)
- 8) Igase M, Yonei Y, Matsumi S, et al. Effectiveness of kuromoji (*Lindera umbellata* Thunb.) extract in the prevention of influenza infection after vaccination: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Glycative Stress Res.* 2019; 6: 75-81.
- 9) 四方賢一. 糖尿病性腎症の成因と炎症メカニズム. 糖尿病. 2005; 48: 673-676.
- 10) 岡田震一, 四方賢一, 横野博史. 糖尿病性腎症の発症・進展における炎症機転の関与. 岡山医学会雑誌. 2005; 117: 9-15.
- 11) 佐藤寿哉, 石井久淑. 進化する糖尿病モデル動物. 北海道医療大学歯学雑誌. 2015; 34(1): 47.
- 12) 武田裕司, 下村智子, 若林一郎. 実験的糖尿病モデルラットの免疫応答. 日衛誌. 2014; 69: 166-176.
- 13) Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: Their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2016; 9: 279-290.
- 14) Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812: 719-731.
- 15) Park CH, Yokozawa T, Noh JS, et al. Oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit, attenuates diabetes-induced renal damage through the advanced glycation end product-related pathway in db/db Mice. *J Nutr.* 2014; 144: 1150-1157.

- 16) Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, et al. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2002; 51: 3274-3282.
- 17) Sohn E, Kim J, Kim CS, et al. The extract of *Litsea japonica* reduced the development of diabetic nephropathy via the inhibition of advanced glycation end products accumulation in db/db mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 769416.
- 18) Imai N, Nishi S, Suzuki Y, et al. Histological localization of advanced glycosylation end products in the progression of diabetic nephropathy. *Nephron*. 1997; 76: 153-160.
- 19) Yamada K, Miyahara Y, Hamaguchi K, et al. Immunohistochemical study of human advanced glycosylation end-products (AGE) in chronic renal failure. *Clin Nephrol*. 1994; 42: 354-361.
- 20) Kume S, Takeya M, Mori T, et al. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol*. 1995; 147: 654-657.
- 21) Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, et al. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 4766-4770.
- 22) Ashraf JM, Abdullah SMS, Ahmad S, et al. Prevalence of autoantibodies against 3-DG-glycated H2A protein in type 2 diabetes. *Biochemistry (Mosc)*. 2017; 82: 579-586.
- 23) Shibayama R, Araki N, Nagai R, et al. Autoantibody against N^ε-(carboxymethyl)lysine: An advanced glycation end product of the Maillard reaction. *Diabetes*. 1999; 48: 1842-1849.
- 24) Furuta T, Saito T, Ootaka T, et al. The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis*. 1993; 21: 480-485.
- 25) Noh JS, Kim HY, Park CH, et al. Hypolipidaemic and antioxidative effects of oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit, on renal damage in type 2 diabetic mice. *Br J Nutr*. 2010; 104: 1120-1128.
- 26) Muthenna P, Raghu G, Anil Kumar P, et al. Effect of cinnamon and its procyanidin-B2 enriched fraction on diabetic nephropathy in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2014; 222: 68-76.
- 27) van der Lugt T, Weseler AR, Gebbink WA, et al. Dietary advanced glycation endproducts induce an inflammatory response in human macrophages *in vitro*. *Nutrients*. 2018; 10(12): 1868.
- 28) Buetler TM, Leclerc E, Baumeyer A, et al. N^ε-carboxymethyllysine-modified proteins are unable to bind to RAGE and activate an inflammatory response. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52: 370-378.
- 29) Kislinger T, Fu C, Huber B, et al. N^ε-(Carboxymethyl) lysine adducts of proteins are Ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem*. 1999; 274: 31740-31749.
- 30) Yang R, Wang WX, Chen HJ, et al. The inhibition of advanced glycation end-products by five fractions and three main flavonoids from *Camellia nitidissima* Chi flowers. *J Food Drug Anal*. 2018; 26: 252-259.
- 31) Jiang W, Wang, Liu D, et al. Protective effects of Kaempferitrin on advanced glycation end products induce mesangial cell apoptosis and oxidative stress. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(11): 3334.
- 32) Morimitsu Y, Yoshida K, Esaki S, et al. Protein glycation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris*). *Biosci Biotechnol Biochem*. 1995; 59: 2018-2021.
- 33) Li X, Zheng T, Sang S, et al. Quercetin inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal. *J Agric Food Chem*. 2014; 62: 12152-12158.
- 34) Zhang Z, Sethiel MS, Shen W, et al. Hyperoside downregulates the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and promotes proliferation in ECV304 cells via the c-Jun N-terminal kinases (JNK) pathway following stimulation by advanced glycation end-products *in vitro*. *Int J Mol Sci*. 2013; 14: 22697-22707.
- 35) Potipiranun T, Adisakwattana S, Worawalai W, et al. Identification of pinocembrin as an anti-glycation agent and α -glucosidase inhibitor from fingerroot (*Boesenbergia rotunda*): The tentative structure-activity relationship towards MG-trapping activity. *Molecules*. 2018; 23(12): 3365.
- 36) Borriello M, Iannuzzi C, Sirangelo I. Pinocembrin protects from AGE-induced cytotoxicity and inhibits non-enzymatic glycation in human insulin. *Cells*. 2019; 8(5): 385.
- 37) Feingold KR, Lear SR, Moser AH. De novo cholesterol synthesis in three different animal models of diabetes. *Diabetologia*. 1984; 26: 234-239.