

Reduction of diabetes-induced renal oxidative stress by a cantaloupe melon extract/gliadin biopolymers, oxykine, in mice

Hiroshi ICHIKAWA*

(Received March 1, 2011)

Oxidative stress is implicated as an important mechanism by which diabetes causes nephropathy. Oxykine is the cantaloupe melon extract rich in vegetal superoxide dismutase covered by polymeric films of wheat matrix gliadin. In this study, we examined whether chronic oral administration of oxykine could prevent the progression of diabetic nephropathy induced by oxidative stress using preclinical rodent model of type 2 diabetes. We used female db/db mice and their nondiabetic db/m littermates. The mice were divided into the following three groups: non-diabetic db/m; diabetic db/db, and diabetic db/db treated with oxykine. Blood glucose level, body weight, urinary albumin, and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) were measured during the experiments. Histological and 8-OHdG immunohistochemical studies were performed on 12 weeks from the beginning of treatment. After 12 weeks of treatment, the levels of blood glucose and the body weight were not significantly different between the oxykine-treated group and the non-treated db/db group, however both groups kept significantly high levels rather than db/m mice. The relative mesangial area calculated by mesangial area/total glomerular area ratio was significantly ameliorated in the oxykine treated group compared with non-treated db/db group. The increases in urinary albumin and 8-OHdG at 12 weeks of treatment were significantly inhibited by chronic treatment with oxykine. The 8-OHdG immunoreactive cells in the glomeruli of non-treated db/db mice were more numerous than that of oxykine-treated db/db mice. In this study, treatment of oxykine ameliorated the progression and acceleration of diabetic nephropathy for rodent model of type 2 diabetes. These results indicated that the oxykine reduced the diabetes-induced oxidative stress and renal mesangial cell injury. In conclusion, oxykine might be a novel approach for the prevention of diabetes nephropathy.

Key words: Oxykine, diabetic nephropathy, 8-Hydroxydeoxyguanosine, oxidative stress

キーワード: オキシカイン, 糖尿病腎症, 8-ヒドロキシデオキシグアノシン, 酸化ストレス

抗酸化酵素誘導型食品オキシカインによる糖尿病腎症の阻止効果

市川 寛

1. はじめに

糖尿病における合併症発症予防には、食事療法を中心とした適切な食環境の提供が必須とされる。しかし現実には、糖尿病性腎症を基礎疾患とする慢性腎不全患者は年々増加傾向にある。同時に、高額となった医療費は、患者本人、家族ならびに医療行政

の経済的基盤を圧迫しており、その対策が急務とされている。

糖尿病性腎症の進展には多くの因子が複雑に関与しているといわれている。病理学的には、細胞外マトリックス蛋白の蓄積によるメサンギウム領域の拡大が特徴的であり、その結果、蛋白(アルブミン)尿

*Department of Medical Life Systems, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto
Telephone: +81-774-65-6396, FAX: +81-774-65-6396, E-mail: hichikaw@mail.doshisha.ac.jp

の持続, 高血圧・浮腫の出現とともに, 終末期腎不全へと移行していく^{1,2)}. すでに, 1型及び2型糖尿病を対象にした臨床研究において, 高血糖の持続が糖尿病性腎症をはじめとする血管合併症を引き起こすことが明らかになっており^{3,4)}, 高血糖による代謝異常, すなわち, 腎ポリオール生成, プロテインキナーゼの活性化, 糖化最終産物の蓄積などにより, 腎糸球体内圧上昇をきたし, ついには糖尿病性腎症へと移行するとされている⁵⁾.

同時に, 糖尿病性腎症の発症に酸化ストレスの増大が関与していることが想定されており, 天然物や合成酸化防止剤を用いた研究により, 高血糖による糸球体の過形成やコラーゲン, TGF- β の蓄積に活性酸素種が深く関与しているとの報告がある⁶⁻⁹⁾. 糖尿病の状態では, メサンギウム細胞や, 炎症浸潤細胞, 血管内皮などにおいて, ミトコンドリア, 蛋白の非酵素的糖化反応, およびプロテインキナーゼC依存性のNADPH オキシダーゼの活性化により活性酸素種が生成されることが明らかになっている^{10,11)}. さらに, 高血糖の持続は, ブドウ糖の自動酸化を介して活性酸素種の生成増加をきたし, 同時に, プロスタグランジンの異常代謝やポリオール系の活性化による細胞内ソルビトールの蓄積を引き起こす. Suppression subtractive hybridization (SSH)法を使った最近の報告では, 高血糖は, メサンギウム細胞におけるアクチン細胞骨格調節遺伝子を誘導し, その誘導はミトコンドリアよりの活性酸素に依存しており, プロテインキナーゼCやTGF- β には依存していないとされている¹²⁾.

近年, 臨床的にも病理組織学的にもヒトにおける糖尿病性腎症を反映しているといわれる db/db マウスを用いての研究報告が散見される. この動物モデルは, 16週齢より高血糖及び腎機能不全を示すようになり, 腎ではメサンギウム領域の拡大と糸球体基底膜の肥厚といった糖尿病性腎症の特徴を示す¹³⁾.

最近我々は, このヒト2型糖尿病モデルであるレプチン受容体異常 db/db マウスを用い, 高血糖によ

り惹起される膵島障害や腎メサンギウム細胞の増殖に酸化的ストレスが関与することを見いだした. また, 食品としてカロテノイドの一種であるアスタキサンチンによりこれら酸化的ストレスが軽減し, 糖尿病性腎症の発症を有意に抑制することを報告した¹⁴⁾.

さらに, ヒト糖尿病患者における検討でも, 健康人に比較して血清抗酸化酵素が減少し, 尿中酸化的DNA 損傷マーカーである8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)が, 糖尿病コントロールの悪化に比例して増加することが見いだされている¹⁵⁻¹⁷⁾.

今回我々は, アスタキサンチンのような, 直接的な活性酸素消去活性を持つ食品とは異なり, 今までのSOD(抗酸化酵素)様物質とは全く違うメカニズムと効果を持つ抗酸化素材として, メロン抽出SOD(オキシカイン)に注目した. オキシカインは, 南フランス, アヴィニョン地方で栽培されているヴォークルシアン種を, 特別に品種改良したメロンから抽出した抗酸化酵素(SOD)を, 小麦抽出物のグリアディンでコーティングした次世代型抗酸化素材で, グリアディンに保護されているため, 胃酸・消化酵素での影響を受けずに腸まで達することが特徴であるとされる. さらに, 直接活性酸素を消去するのではなく, 腸管内に取込まれ抗原抗体反応により生体抗酸化酵素(SOD, カタラーゼ, グルタチオンペルオキシターゼ)を誘導するという画期的な働きを持つ.

「SOD様活性を持つ食品素材の探索」というコンセプトですすんできている現在の抗酸化食品開発の流れをはずれ, 体内の抗酸化活性向上をターゲットとしている点や, 体内の代謝や消化を避けて有効成分を患部まで運搬するというドラッグ・デリバリー・システムの機能を持つ食品として, その安全性と効果が期待されているが, 詳細な作用メカニズムについては不明な点も多い. より機能性の高い食品素材, オキシカインの持つ, 糖尿病性腎症の発症の阻止効果, 及びその作用機序を, オキシカイン等の抗酸化食品と比較検討することにより, 食生活の面か

ら糖尿病性腎不全患者の透析導入時期を遅延させることを期待して、以下のような研究を行ったので報告する。

2. 材料と方法

2.1 実験動物

2型糖尿病モデルである雌 db/db マウスおよび非糖尿マウス db/m マウスは日本クレア（東京）より購入した。1群をそれぞれ5匹とし、非糖尿病 db/m マウス、糖尿病 db/db マウス、およびオキシカイン投与糖尿病 db/db マウスの3群に分割した。また、新しい環境に適応させるため、自由飲水にて1週間実験動物用飼育繁殖用飼料 CE-2（日本クレア）を投与した。オキシカイン投与群用の飼料は、オキシカインを0.08%の濃度でCE-2に混じて作成した。食物摂取量は12週後の解剖まで、毎日測定を行い、体重は7日ごとに測定した。実験は米国国立衛生研究所ガイドラインに従って行われ、京都府立医科大学の承認を得て行われた。

2.2 尿中アルブミンおよび8-OHdG分析

マウスの24時間尿を採取後、3000g、10分間の遠沈後、その上清1mlを -80°C にて保存し測定に供した。尿中8-OHdG濃度は、日本老化制御研究所（袋井）より提供を受けた8-OHdG測定用ELISAキットを用い、24時間尿量あたりの総量として表示した。尿アルブミン濃度はELISAキット（Albuwell M, Exocell Inc, 米国）を用いた。

2.3 腎組織学および形態学的解析

腎糸球体の形態学的解析のため、左腎を2分割し10%ホルマリン溶液に固定後、パラフィンに包埋した。腎皮質のPAS染色後、糸球体領域の面積を決定し¹⁸⁾、1腎あたり30以上の糸球体を選び、その平均値を解析した。メサングウム領域の解析はNIHイメージ・ソフトウェアを使用し、糸球体領域に対するメサングウム領域の面積比を求めた。

2.4 免疫組織化学的分析

8-OHdGのオキシカインによる抑制効果を検討す

るために、db/dbマウスの腎を12週後に摘出した。腎臓組織を既報に従い処理し¹⁹⁾、日本老化制御研究所より提供を受けた8-OHdGモノクローナル抗体を使用した。

3. 結果

3.1 体重、血糖値に対するオキシカインの影響

2型糖尿病モデル db/db マウスは6週目において非糖尿病 db/m マウスに比較し肥満を伴う高血糖を示した。実験期間中（6-18週齢）を通してdb/dbマウスの血糖値は、非糖尿病 db/m マウスに比較し、一貫して高値を示していた。オキシカイン投与 db/db マウス群と非投与 db/db マウス群との血糖には実験期間中有意な差は認めなかった。18週目の db/db マウスの体重 ($47.6 \pm 0.6\text{g}$) は、db/m マウス ($29.5 \pm 1.1\text{g}$) に比べ高値を示したが、オキシカイン投与群、非投与群との間には統計学的差異は認めなかった。

3.2 糖尿病性腎症に対するオキシカインの影響

18週目における db/db マウスの尿中アルブミン量は db/m マウスに比較し有意に高値を示した。また、18週間目の db/db マウスの尿中アルブミン増加 ($278 \pm 51 \mu\text{mg/day}$) は、オキシカイン投与により有意に抑制された ($115 \pm 27 \mu\text{mg/day}$)。

db/m マウスと db/db マウス間において組織学的には尿細管の変化は認めなかったが、これとは対照的に、18週目の腎糸球体の組織像では、db/db マウスにおいて、PAS陽性のメサングウム基質の増加を特徴的としたメサングウム領域の拡大が認められた。一方、12週間に及ぶオキシカインの投与により、メサングウム基質の集積は部分的に抑制を受け、糸球体内PAS陽性物質の減少を認めた。

全糸球体領域に対するメサングウム領域の面積比は、db/m マウスに比較し db/db マウスでは有意な増加を認め、オキシカイン投与により面積比の有意な減少を示した。

3.3 尿中および腎組織中の8-OHdGに及ぼすオキシ

カインの影響

db/db マウスにおける尿中 8-OHdG は 6 週齢において db/m マウスに比較し有意な上昇を示した。オキシカイン非投与 db/db マウスの尿中 8-OHdG は、18 週齢時に有意な上昇を示したが、オキシカイン投与群ではこの上昇を有意に抑制した。

酸化ストレスによる腎の障害を評価するために、各群における腎組織の 8-OHdG 免疫染色を行った。オキシカイン非投与 db/db マウスにおける腎組織では、db/m マウスに比較し腎糸球体内 8-OHdG 陽性細胞の有意な増加を認め、またオキシカイン投与により 8-OHdG 陽性細胞数は有意な減少を示した。

db/db マウスにおける腎尿細管 8-OHdG 陽性細胞数も db/m マウスに比較し有意な増加を示したが、オキシカイン投与を投与しても陽性細胞数には変化がなかった。

4. 考察

今回の我々の検討では、2つの重要な知見が明らかにされている。まず、2型糖尿病モデル db/db マウスにおいて、酸化ストレスの指標である 8-OHdG が、尿中及び腎組織中に上昇をきたしていることが示されたことである。さらに重要なことは、このモデルにおいて、強力な抗酸化物であるオキシカインの経口投与が、尿中アルブミンの排出低下をきたしたのみならず、尿中 8-OHdG 量を抑制し、さらに 8-OHdG 陽性メサングウム細胞を減少させ、組織学的にも腎糸球体の変化を抑制し得たことである。

近年、シスプラチンの腎毒性や老化など、様々な疾病における腎での酸化ストレスを評価するマーカーとして 8-OHdG が利用されている²⁰⁻²²⁾。1994年、Haら²³⁾より実験動物における糖尿病性腎症の進展に 8-OHdG が深く関与しているとの最初の報告があった。彼らは、腎皮質、腎乳頭の 8-OHdG が、ストレプトゾトシン投与後に有意に上昇することを示し、インスリン投与による血糖コントロールにより尿中アルブミン、尿中 8-OHdG 排泄が改善することを

示しており、このことは、ストレプトゾトシンという薬剤による直接的な腎毒性というよりも、糖尿病状態を引き起こしたことによる腎障害と考えられている²³⁾。最近の臨床研究では、尿中 8-OHdG の測定は、微小血管障害や動脈硬化を検索するのみならず¹⁷⁾、糖尿病患者における腎症の発症を推測する上でも、有用なマーカーとなっている²⁴⁾。

今回の db/db マウスでの検討では、腎障害初期の指標の一つである尿中アルブミン量と尿中 8-OHdG は同じように増加を示した。さらに、免疫組織化学的検討において、オキシカイン非投与群における 8-OHdG 陽性細胞は増加を示し、また、尿中及び組織中の 8-OHdG は両者ともオキシカインの経口投与により抑制された。以上の結果は、尿中 8-OHdG が糖尿病における腎の酸化ストレスを強く反映しており、さらに、糖尿病性腎症発症予測の有用なバイオマーカーになりうる可能性を示唆している。オキシカインの経口投与が、その抗酸化作用を介して糖尿病マウスにおける腎障害発症を抑制し、尿中及び組織中の 8-OHdG を減少させたという結果がこれらを支持しているといえる。

今回の検討で、オキシカインの経口投与により、高血糖が持続したのにもかかわらず、尿中及び組織中の 8-OHdG 量は、アルブミン尿の低下と関連して明らかな低下を示した。このことより、オキシカインの糖尿病における酸化ストレスに対する直接的な軽減作用が推測される。さらに、以上の結果は糖尿病性腎症の治療戦略を立てる上で、重要なヒントを与えてくれている。

抗酸化物が糖尿病動物モデルにおける腎障害に保護的に作用するという報告があり、近年、ビタミン E、プロブコール、リポ酸またはタウリンなどの抗酸化療法が、アルブミン尿や糸球体内圧上昇などで代表される糖尿病性腎障害を改善させるのみならず、病理組織学的にも改善させると報告されている⁷⁾。また、上野らは、食餌性のグルタチオンがストレプトゾトシン惹起性糖尿病ラットにおける糖尿病性合

併症に効果があることを報告した²⁵⁾。

ヒトに対する抗酸化物の糖尿病性腎症に対する効果を検討したものは限られているが、2型糖尿病患者30人を対象としたクロスオーバー臨床試験において、680 I.U. ビタミンEと1,250 mg ビタミンCを4週間同時投与した時、19%に尿中アルブミン排泄抑制効果があったと報告されている²⁶⁾。

糖尿病を患う個々の患者の生活の質を高めるために、オキシカインの持つ様々な効果を今後明らかにすることが必要である。オキシカインの持つ、糖尿病性腎症発症予防という新しい薬理学的特性に期待したい。

参考文献

- 1) F.N.Ziyadeh. "The extracellular matrix in diabetic nephropathy." *Am J Kidney Dis*, 22(5), 736-744 (1993).
- 2) D.Zhu, Y.Kim, M.W.Steffes, T.J.Groppoli, R. J.Butkowski, and S.M.Mauer, "Glomerular distribution of type IV collagen in diabetes by high resolution quantitative immunochemistry." *Kidney Int.*, 45(2), 425-433 (1994).
- 3) Group, T.D.C.a.C.T.R., "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group." *N Engl J Med*, 329(14), 977-986 (1993).
- 4) Group, U.P.D.S.U., "Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group." *Lancet*, 352(9131), 837-853 (1998).
- 5) R.Kikkawa, D.Koya, and M.Haneda, "Progression of diabetic nephropathy." *Am J Kidney Dis*, 41(3 Suppl 1), S19-S21 (2003).
- 6) T.Inoguchi, H.Tsubouchi, T.Etoh, M.Kakimoto, T.Sonta, H.Utsumi, H.Sumimoto, H.Y.Yu, N.Sonoda, M.Inuo, N.Sato, N.Sekiguchi, K.Kobayashi, and H.Nawata, "A possible target of antioxidative therapy for diabetic vascular complications-vascular NAD(P)H oxidase." *Curr Med Chem*, 10(17), 1759-1764 (2003).
- 7) D.Koya, K.Hayashi, M.Kitada, A.Kashiwagi, R.Kikkawa and M.Haneda, "Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats." *J Am Soc Nephrol*, 14(8 Suppl 3), S250-S253 (2003).
- 8) A.C.Maritim, R.A.Sanders, and J.B.Watkins, 3rd, "Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats." *J Nutr Biochem*, 14(5), 288-294 (2003).
- 9) H.Kaneto, Y.Kajimoto, J.Miyagawa, T.Matsuoka, Y.Fujitani, Y.Umayahara, T.Hanafusa, Y.Matsuzawa, Y.Yamasaki and M.Hori, "Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity." *Diabetes*, 48(12), 2398-2406 (1999).
- 10) M.A.Catherwood, L.A.Powell, P.Anderson, D.McMaster, P.C., Sharpe and E.R.Trimble, "Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells." *Kidney Int*, 61(2) 599-608 (2002)
- 11) J.M.Li, and A.M.Shah, "ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy." *J Am Soc Nephrol*, 14(8 Suppl 3), S221-S226 (2003).
- 12) M.R.Clarkson, M.Murphy, S.Gupta, T.Lambe, H. S.Mackenzie, C.Godson, F.,Martin and H.R.Brady, "High glucose-altered gene expression in mesangial cells. Actin-regulatory protein gene expression is triggered by oxidative stress and cytoskeletal disassembly." *J Biol Chem*, 277(12), 9707-9712. (2002).
- 13) K.Sharma, P.McCue, and S.R. Dunn, "Diabetic kidney disease in the db/db mouse." *Am J Physiol*

- Renal Physiol, 284(6), F1138-F1144. (2003).
- 14) 市川寛, 赤桐里美, 内山和彦, 内藤裕二, 吉川敏一, "アスタキサンチンによる糖尿病性腎症発症予防の実験的検討." 日本病態栄養学会誌 7(2), 119-126 (2004).
- 15) J.Leinonen, T.Lehtimaki, S.Toyokuni, K.Okada, T.Tanaka, H.Hiai, H.Ochi, P.Laippala, V.Rantalaiho, O.Wirta, A.Pasternack and H.Alho, "New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." FEBS Lett, 417(1), 150-152 (1997).
- 16) M.Kanauchi, H. Nishioka and T. Hashimoto, "Oxidative DNA damage and tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy." Nephron, 91(2), 327-329 (2002).
- 17) T.Nishikawa, T.Sasahara, S.Kiritoshi, K.Sonoda, T.Senokuchi, T.Matsuo, D.Kukidome, N.Wake, T.Matsumura, N.Miyamura, M.Sakakida, H.Kishikawa and E.Araki, "Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes." Diabetes Care 26(5), 1507-1512 (2003).
- 18) C.Sassy-Prigent, D.Heudes, S.Jouquey, D.Auberval, M.F.Belair, O.Michel, G.Hamon, J.Bariety and P. Bruneval, "Morphometric detection of incipient glomerular lesions in diabetic nephropathy in rats. Protective effects of ACE inhibition." Lab Invest, 73(1), 64-71 (1995).
- 19) S.Toyokuni, Y.Iwasa, S.Kondo, T.Tanaka, H.Ochi, H.Hiai, "Intranuclear distribution of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. An immunocytochemical study." J Histochem Cytochem, 47(6), 833-836 (1999).
- 20) B.S.De Martinis and M.D.Bianchi, "Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats." Pharmacol Res, 44(4), 317-20 (2001).
- 21) Y.Minamiyama, S.Takemura, S.Toyokuni, Y.Nishino, K.Yamasaki, S.Hai, S.Yamamoto and S.Okada, "Amelioration of cisplatin toxicity by a fermented grain food product." Biofactors 16(3-4), 105-115 (2002).
- 22) S.Inoue, S.Koya-Miyata, S.Ushio, K.Iwaki, M.Ikeda and M.Kurimoto, "Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage." Exp Gerontol 38(9), 965-996 (2003).
- 23) H.Ha, C.Kim, Y.Son, M.H.Chung and K.H.Kim, "DNA damage in the kidneys of diabetic rats exhibiting microalbuminuria." Free Radic Biol Med 16(2), 271-274 (1994).
- 24) Y.Hinokio, S.Suzuki, M.Hirai, C.Suzuki, M.Suzuki, T.,Toyota, "Urinary excretion of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a predictor of the development of diabetic nephropathy." Diabetologia 45(6), 877-82 (2002).
- 25) Y.Ueno, M.Kizaki, R.Nakagiri, T.Kamiya, H.Sumii and T.Osawa, "Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy." J Nutr 132(5), 897-900 (2002).
- 26) P.Gaede, H.E.Poulsen, H.H.Parving and O.Pedersen, "Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in Type 2 diabetic patients." Diabet Med, 18(9), 756-760 (2001).