

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21538

研究課題名(和文) TRPA1を標的とする漢方薬含有化合物データベースの構築とその薬理機序の解明

研究課題名(英文) Building a database of TRPA1 agonists derived from traditional Chinese medicine and elucidation of its pharmacological mechanism

研究代表者

王 勝蘭 (Wang, Shenglan)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：50714359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Flexstationアッセイで、漢方薬由来の27種類化合物のスクリーニングを検討した。その中で、4種類化合物がTRPA1を活性化することを確認した。EC50が濃い濃度で反応が弱いことが認められた。TRPA1におけるこれらの化合物の効果は、選択的TRPA1阻害剤HC030031により抑制された。更に、化合物がTRPA1を脱感作する効果やラット疼痛モデルにおける鎮痛効果が認められた。一方、その中の2種類化合物(エボジアミンとルテカルピン)がTRPV1を活性化することを確認した。エボジアミンはTRPV1を活性化し、パーシャルアゴニストとしての競合的結合と脱感作の2つの機序で抑制することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Using flexstation calcium assay, we screened 27 natural compounds derived from traditional Chinese medicines. Four compounds were identified to activate TRPA1 channel with the higher EC50 values and lower responses. The agonistic effects of these compounds on TRPA1 could be inhibited by HC030031, a selective TRPA1 antagonist, in TRPA1 expressing human X cells and dorsal root ganglion (DRG) neurons. Further studies showed that these compounds induced the desensitization of TRPA1 channel and the analgesic effects on rat pain models. In addition, we identified two compounds (evodiamine and rutaecarpine) which activated TRPV1 channel. Evodiamine partially activated TRPV1 and inhibited TRPV1 activation through competitive partial antagonism and channel desensitization.

研究分野：神経科学

キーワード：TRPA1 漢方薬 疼痛

1. 研究開始当初の背景

痛みは日常臨床上最も多い訴えである。我が国では、13.4% (1700万人)の人々が何らかの慢性的な痛みを抱えており、医療機関を受診した人のうち満足のいく程度に痛みが和らいだ人が22.4%と報告されている(服部ら、ペインクリニック25,2004)。痛みのなかには、神経障害性疼痛のように鎮痛薬が効きにくい「慢性難治性疼痛」があり、多くの患者が苦しみ、QOLが低下したまま社会生活を強いられている。慢性難治性疼痛の特効薬は乏しく、今なお多くの研究開発が行われているが、有効な治療薬がないのが現状である。一方、近代西洋薬の開発に果たした伝統薬物、天然薬物の役割は大きく、今なお薬物開発において重要な地位を占めている。慢性難治性疼痛の臨床治療においても、天然薬物成分を含有する漢方薬の効果が注目されている。漢方薬は永年の人類の叡智による薬効付帯情報を有する創薬リソースで、臨床予測性の高い新規創薬シーズが見出される可能性が高いことから、漢方薬成分による難治性疼痛治療の新薬開発が期待されている。

TRP (transient receptor potential) ファミリー受容体は多様な機能を示すイオンチャネルで、細胞内外の様々かつ複合的な刺激によって活性化する“センサー”やシグナルを変換する“トランスデューサー”として機能する。TRP ファミリーメンバーのTRPV1やTRPA1、TRPM8などは疼痛受容と疼痛シグナル伝達において極めて重要な分子として働くことが明らかになっている。近年、シンナムアルデヒドやカンフルなど多くの天然薬物成分はTRPA1チャネルなどを活性化する或いは抑制することが報告され、漢方薬はTRPチャネルを介して生体内環境を調節し疼痛受容の制御に関わる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、現在日本で使用されている医療用漢方製剤に含まれる約200種類の化合物の中から、ペインセンサーTRPA1受容体を標的とする化合物を、*in vitro*と*in vivo*系アッセイを組み合わせた新しい総合評価系を用いてスクリーニングを行い、ライブラリを構築する。さらに、これらの中から難治性疼痛治療薬のリードと期待できる漢方方剤含有化合物を見出し、その鎮痛薬理機序を解明する。

3. 研究の方法

本研究は、細胞内カルシウムアッセイ、電気生理学的、行動薬理的、形態学的手法を用いて、TRPA1或はTRPV1受容体を標的とする化合物を検討した。

(1) 細胞の培養

TRPA1或はTRPV1強制発現細胞の構築。Human embryonic kidney 293 (HEK293)細胞にTRPA1或はTRPV1を導入し、TRPA1とTRPV1強制発現HEK細胞を構築した。導入したHEK細胞を培養し、2日後にカルシウムアッセイ或は電気生理測定を行った。

人由来X細胞を96well plateに培養し、2日後カルシウムアッセイを行った。

ラット脊髄後根神経(DRG)ニューロンを培養して1日後に、カルシウム測定或は電気生理学的測定を行った。

(2) カルシウムアッセイ

蛍光プローブを細胞にローディングして、それぞれの化合物によって、細胞内のカルシウム変化をFlexstationマルチプレートリーダーにより測定した。

(3) 電気生理学的測定

ホールセルパッチクランプ法を用いてそれぞれの化合物による細胞の内向き電流を記録した。化合物がTRPA1或はTRPV1を活性化することを検討した。

(4) 動物行動測定

5-6 週齢のラットを用いて、足底に化合物を注射し、自発痛や温度による痛み行動を測定した。

4. 研究成果

(1) TRPA1 及び TRPV1 を標的とした化合物のスクリーニング。カルシウムアッセイ法で、人由来 X 細胞に TRPA1 が存在することを確認した。さらに TRPV1 が発現しないことを確認した。この X 細胞を用いて、TRPA1 を活性化する化合物のスクリーニングを行った。(図 1~図 3)

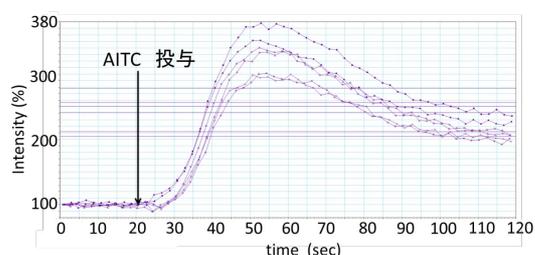


図 1: カルシウムアッセイ法で、AITC を投与すると細胞内のカルシウムを増加することから X 細胞に TRPA1 が存在することを確認した。

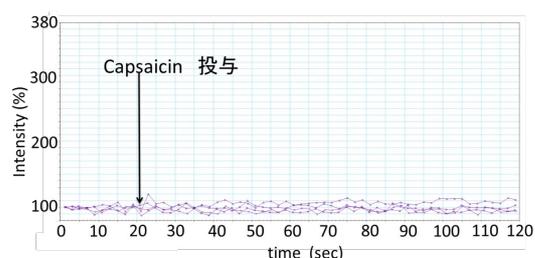


図 2: カルシウムアッセイ法で、capsaicin を投与すると TRPV1 が X 細胞に存在しないことを確認した。

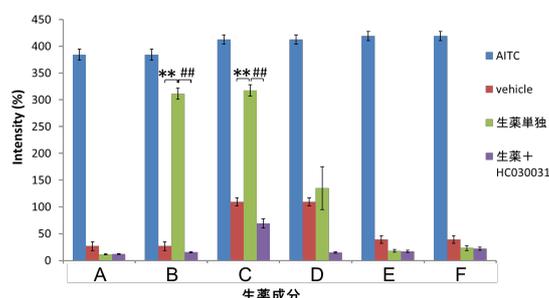


図 3: カルシウムアッセイ法で、生薬成分を単独投与及び TRPA1 選択的阻害剤である HC030031 との同時投与すると、生薬成分が TRPA1 を活性化することを確認した。

(特許申請や論文作成の関係上、生薬名や化合物名を公表していない)

(2) 生薬呉茱萸の成分であるエボジアミンが TRPV1 チャンネルを活性化することを確認した。一方、TRPA1 を活性化することが認められなかった。(図 4~図 9)

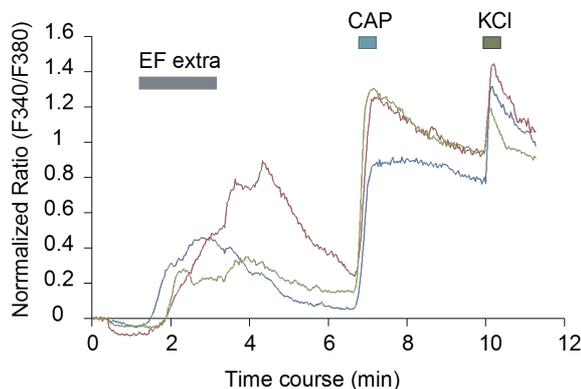


図 4: 呉茱萸エキス (EF) を培養 DRG ニューロンに投与すると、細胞内カルシウムが増加することを確認した。

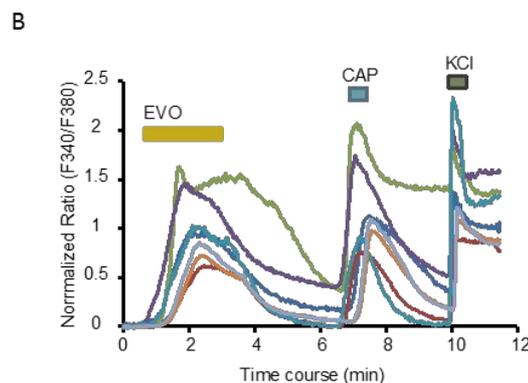
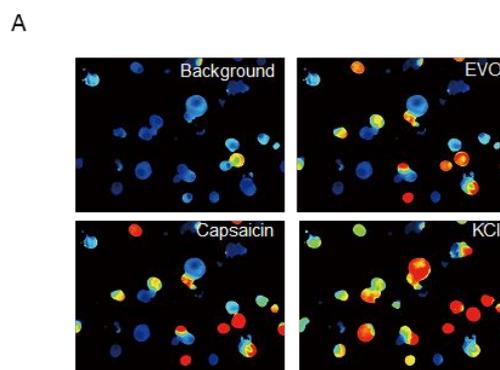


図 5: 呉茱萸に含有化合物エボジアミン (EVO) を DRG ニューロンに投与すると、TRPV1 が発現された細胞に反応することを確認した (A, B)。

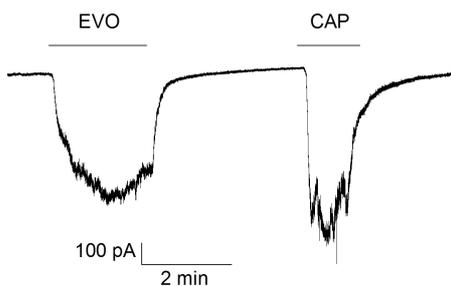


図 6: 培養した DRG ニューロンにエボジアミンをアプライすると内向き電流が確認され、同一細胞にカプサイシン (CAP) を投与すると同じく内向き電流が観察された。

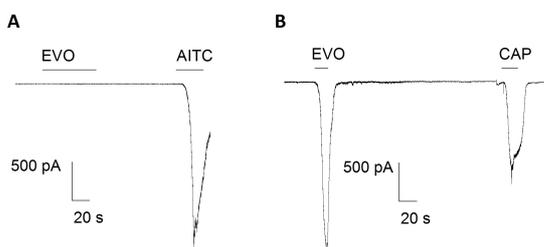


図 7: TRPA1 或は TRPV1 が強制発現された HEK 細胞を用いて、エボジアミンが TRPV1 を活性化することを確認した (A, B)。

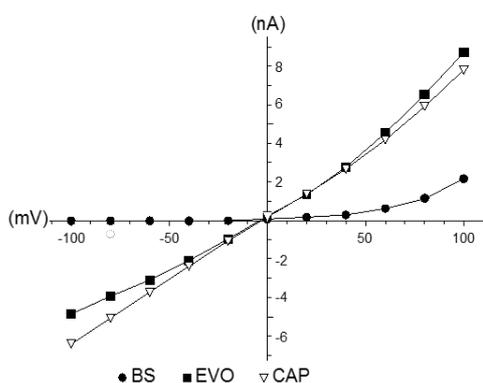


図 8: TRPV1 が強制発現された HEK 細胞を用いて、呉茱萸成分であるエボジアミンが TRPV1 を活性化する I-V カーブを作成した。I-V カーブから、エボジアミンはカプサイシンと同様な外向き整流性が認められた。

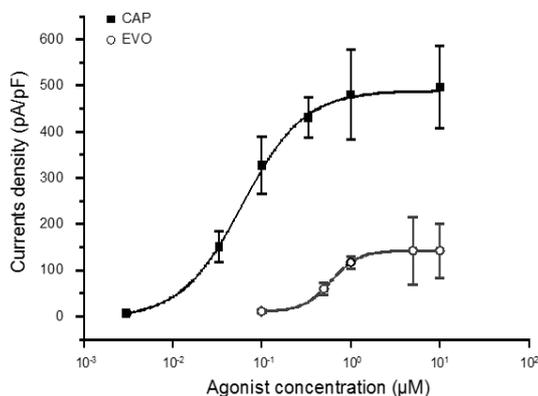


図 9: TRPV1 に対するエボジアミンの用量反応関係を調べた。エボジアミンの EC50 は $0.6 \mu\text{M}$ である、カプサイシンより 10 倍高く、最大反応はカプサイシンの 3 分の 1 であることがわかった。これらの結果により、エボジアミンは TRPV1 のパーシャルアゴニストであることが示唆された。

(3) エボジアミンによるカプサイシン電流の抑制作用により、TRPV1 チャンネルに対して、パーシャルアゴニストとしての競合結合機序と脱感作機序の 2 つが存在することが示唆された。(図 10 ~ 図 12)

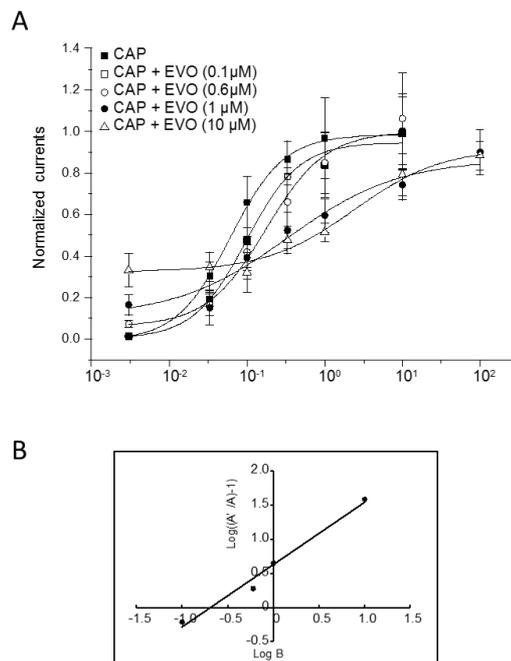


図 10: エボジアミンとカプサイシンを同時投与すると、濃度依存にカプサイシンの最大反応性が変化しないが、EC50 は増加す

ることで、カプサイシンのドーズカーブを右側に移動させた(A,B)。エボジアミンはカプサイシン電流を競合的に抑制することがわかった。

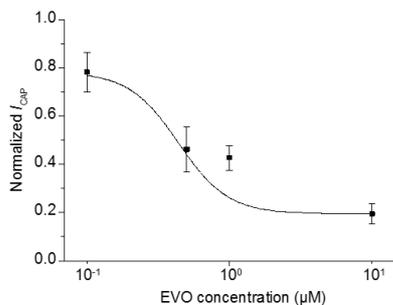


図 11: エボジアミンによる TRPV1 チャンネルの脱感作作用を調べた。ドーズカーブで示しているように、エボジアミンの前処置は用量依存的にカプサイシン電流を抑制したことが確認された。

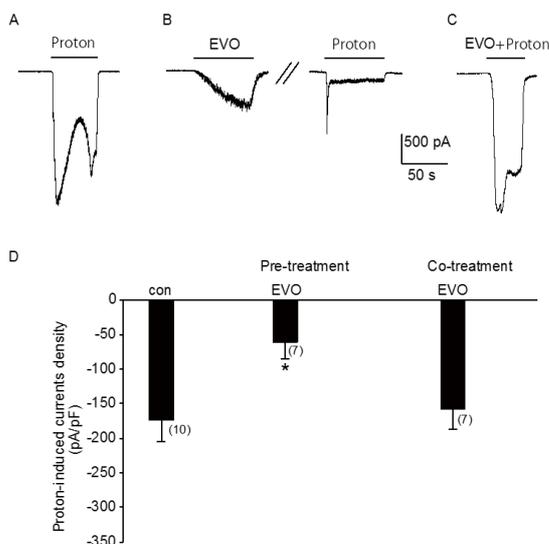


図 12: エボジアミンは TRPV1 内因性アゴニストであるプロトンに対する抑制効果を確認した。pH6 の酸性灌流液による TRPV1 電流を引き起こしたが(A,D)、エボジアミン処置後のプロトン電流は、酸灌流液単独投与時の電流に比べ弱小化していることがわかった(B,D)。しかし、エボジアミンと酸の同時投与では、抑制効果が認められなかった(C,D)。これらの結果から、エボジアミンは TRPV1 の脱感作を通して酸による

TRPV1 活性化を抑制したことが考えられた。

(4)エボジアミンは TRPV1 と関わる熱刺激行動を抑制した。(図 13)

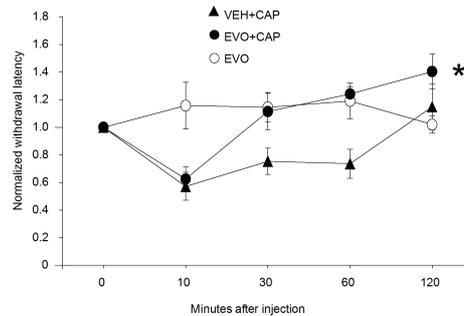


図 13: エボジアミンはラットの足底に注射し、カプサイシンが起した熱刺激に対する敏感行動を抑制した。

以上の結果により、様々の生薬由来化合物が TRP チャンネルにターゲットとして働いていることがわかった。TRP チャンネルを活性化し、パーシャルアゴニストとしての競合的結合と脱感作の2つの機序で抑制することがわかった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Wang S, Yamamoto S, Kogure Y, Zhang W, Noguchi K, Dai Y. Partial Activation and Inhibition of TRPV1 Channels by Evodiamine and Rutaecarpine, Two Major Components of the Fruits of *Evodia rutaecarpa*. *J Nat Prod.* 2016 May 27;79(5):1225-1230. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00599. Epub 2016 May 9. 査読有

Iwaoka E, Wang S, Matsuyoshi N, Kogure Y, Aoki S, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Evodiamine suppresses capsaicin-induced thermal hyperalgesia through activation

and subsequent desensitization of the transient receptor potential V1 channels. J Nat Med. 2016 Jan;70(1):1-7. doi: 10.1007/s11418-015-0929-1. Epub 2015 Jul 19. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

Shenglan Wang, Satoshi Yamamoto, Yoko Kogure, Koichi Noguchi, Yi Dai. Partial activation and inhibition of TRPV1 channels by evodiamine and rutaecarpine, two major components of evodiae fructus. The 18th international congress of oriental medicine 2016. Okinawa convention center, Ginowan, Okinawa, Japan. 2016.04.16

王勝蘭、山本悟史、野口光一、戴毅 . エボジアミンは TRPV1 チャネルのパーシャルアゴニストである . 第 37 回日本疼痛学会 . 市民会館崇城大学ホール (熊本市民会館) (熊本県熊本市) 2015.07.04

6 . 研究組織

(1)研究代表者

王 勝蘭 (Wang, Shenglan)
兵庫医療大学・薬学部・助教
研究者番号 : 50714359