

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590325

研究課題名(和文) 芍薬甘草湯が抗癌薬パクリタキセルの副作用を緩和するメカニズムの研究

研究課題名(英文) Mechanism of Shakuyaku-kanzo-to reduces paclitaxel-induced neuropathic pain

研究代表者

木村 純子 (Kimura, Junko)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10186322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌薬パクリタキセルの副作用に末梢神経疼痛がある。芍薬甘草湯はパクリタキセルによるマウスの末梢神経痛を軽減させると報告された。一方、神経因性疼痛に電位依存性T型Caチャンネル(Cav3.2)の関与が報告された。そこで、芍薬甘草湯がT型Ca電流を抑制するかをヒトT型Caチャンネルを発現させたHEK293細胞を用い、ホールセルクランプ法で調べた。すると、芍薬甘草湯はhCav3.2 T型カルシウム電流を濃度依存性に抑制した。IC50値は1.3 mg/ml、Hill 係数は1.1であった。パクリタキセルによる末梢神経疼痛を芍薬甘草湯が軽減させる機序に、T型Ca電流抑制作用が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Paclitaxel is widely used for the treatment of solid malignant tumor, but its adverse effect is peripheral neuralgia. Shakuyaku-kanzo-to (SKT) is known to reduce pain of peripheral neuralgia induced by paclitaxel in mice. It was also reported that the voltage-dependent T-type Ca channels (Cav3.2) is involved in neuropathic pain. Therefore we investigated whether SKT inhibits T type Ca current using HEK cells expressing human T type Ca current (hCav3.2). We found that SKT inhibited T-type Ca current in HEK293 cells using the whole cell patch clamp method. SKT at 10 mg/ml completely inhibited the T type Ca current. The IC50 value of SKT was 1.3 mg/ml, and Hill coefficient was 1.1. Our result suggests that the inhibition of T-type Ca current may be involved in the analgesic effect of Shakuyaku-kanzo-to on paclitaxel-induced neuralgia.

研究分野：薬理学

キーワード：抗がん薬 芍薬甘草湯 神経痛 T型Ca電流 ホールセルクランプ法 HEK293細胞

1. 研究開始当初の背景

芍薬甘草湯はこむらがえりなど筋肉痛の特効薬として長年使われてきた漢方薬である。組成は芍薬と甘草の二味が1:1の割合で混合されている。芍薬甘草湯はパクリタキセルによるマウスの末梢神経疼痛を軽減させることが知られている (Hidaka et al. 2009)。また、神経因性疼痛に電位依存性 T 型カルシウムチャンネル (Cav3.2) が関与していることが報告されている (Okubo et al, 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、芍薬甘草湯が T 型カルシウム電流を抑制するかを、Cav3.2 を発現した HEK293 細胞を用いて調べた。

3. 研究の方法

細胞; ヒト型の hCav3.2 を発現した HEK293 細胞は、トーアエイヨー株式会社から提供された。

細胞培養用の培地は DMEM (GIBCO) を用い、FBS (Sigma), G418, ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した。カバーガラスを細く切り滅菌して皿に敷き、その上に細胞を継代培養した。継代後 3 日目から 1 週間の細胞を実験に用いた。

ホールセルクランプ法; 培養皿からカバーガラスを 1 片取り出し、35 ± 0.5 °C に溶液の温度設定したバス底に置き、その上の HEK293 細胞を 1 つ選び、先端直径 1.6 μm 以下のガラスピペットをあて、hCav3.2 T 型カルシウム電流をホールセルクランプ法で測定した。アクトME社製クランプアンプを使用した。保持電位 -80mV、200ms 長の矩形派電圧パルスを、-70 mV から 40mV まで 10mV ステップで 8 秒起きにかけた。電流は pClamp ソフトウェアを用いてコンピュータに取り込み、Clampfit で解析した。

溶液; 細胞外液はタイロッド液。その内容は (単位は mM): NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.33, グルコース 5.5, HEPES 5 (pH 7.4)。細胞内液の主成分は、140 mM セシウム。細胞内液の組成は (単位は mM): CsOH 120, CsCl₂ 20, MgCl₂ 3, MgATP 5, HEPES 10, Aspartic acid 50 (pH 7.2 with aspartic acid)。

芍薬甘草湯溶液: 芍薬甘草湯の粉末は株式会社ツムラから購入した。粉末をタイロッド液に溶かし、10 分間超音波洗浄機で芍薬甘草湯の粒子を細かくしてろ過し、pH 7.4 (NaOH) にして用いた。芍薬甘草湯の濃度は 1mg/ml, 3mg/ml, 10mg/ml である。この濃度は臨床的に使われる 7.5 g/day と比べると、成人の血液量を 5 リットルと推定すると、7.5g/5L すなわち、2.5 mg/ml となり、臨床用量に匹敵すると言える。

4. 研究成果

芍薬甘草湯 10 mg/ml はコントロールの T 型 Ca 電流をほぼ完全に抑制した。芍薬甘草湯を 1, 3, 10 mg/ml をそれぞれ 7 分以上かけ電流電圧曲線を作成した。コントロールでは T 型 Ca 電流のピーク値が約 1 nA であったが、芍薬甘草湯 1 mg/ml を 7 分かけた後では約半分となった。-20 mV で測定した芍薬甘草湯の IC₅₀ 値は 1.3 mg/ml、ヒル係数は 1.1 であった。

芍薬甘草湯の成分は、芍薬と甘草である。芍薬の成分として、ペオニフロリンとアルビフロリンがある。ペオニフロリン 10 μg/ml、またはアルビフロリン 10 μg/ml を作用させたが、いずれにも顕著な抑制効果は認められなかった。甘草の成分 isoliquiritigenin 10 μg/ml にも抑制効果は認めなかった。

痛みを抑制する漢方薬に、牛車腎気丸と附子が知られている。牛車腎気丸と附子の T 型 Ca 電流に対する作用の報告は見つからなかった。そこで、それぞれの 10 mg/ml を HEK293 細胞の T 型 Ca 電流 (hCav3.2) に作用させた。すると、牛車腎気丸は、-20mV で T 型 Ca 電流を、コントロールの 57.7 ± 6.6% (n=5) に抑制した。ブシは、-20mV でコントロールの 58.3 ± 5.6% (n=4) に抑制した。牛車腎気丸とブシは芍薬甘草湯より T 型 Ca 電流抑制効果が弱いことが分かった。

T 型 Ca 電流は低濃度のニッケルが抑制することが知られている。本実験に用いた T 型 Ca 電流に isoliquiritigenin 10 μg/ml をかけた後、Ni 40 μM を加えると、電流はほぼ完全に抑制された。このことから、本実験に用いた T 型 Ca 電流は低濃度 Ni で抑制されることが確かめられた。

今回の実験結果より、芍薬甘草湯は T 型カルシウム電流を抑制することが分かった。つまり、パクリタキセルの副作用で起こる神経痛を軽減する芍薬甘草湯の作用機序に、T 型カルシウムチャンネル抑制効果が関わっている可能性がある。

末梢神経疼痛を抑える他の漢方薬、牛車腎気丸とブシは芍薬甘草湯より T 型 Ca 電流抑制作用が弱かった。甘草の 1 成分 isoliquiritigenin は T 型 Ca 電流を抑制しなかった。今後さらに芍薬甘草湯がどのような機序で T 型カルシウム電流を抑制するか調べる必要がある。

本研究で対象とした T 型 Ca 電流に先駆け、我々は骨格筋および心臓のモデル細胞である H9c2 細胞を用い、それに発現する Kv2.1 K チャンネルに対するパクリタキセルおよび芍薬甘草湯の作用を調べた。すると、どちらも Kv2.1 K 電流を抑制した (Suganami et al. 2014, Kitamura et al. 2015)。これらの抑制作用は相加的に働く可能性があることからさらなる追求はせず、標的を K 電流から Ca

電流に写した。

参考文献

Hidaka T et al. Herbal medicine Shakuyaku-kanzo-to reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in mice. *European Journal of Pain* 13: 22-27, 2009.

川畑篤史 がん化学療法に伴う神経障害性疼痛－最近の研究動向．*日薬理誌* 141:81-84, 2013.

Okubo K et al. Hydrogen sulfide-induced mechanical hyperalgesia and allodynia require activation of both Cav3.2 and TRPA1 channels in mice. *British Journal of Pharmacology* 166: 1738-1743, 2012.

Sadakane et al. Pharmacokinetic profiles of active components after oral administration of a Kampo Medicine, Shakuyakukanzoto, to healthy adult Japanese volunteers. *J Pharmaceutical Sciences* Doi10.1002/jps.24596 (July 2015)

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)

1) Suganami A, Sakamoto K, Ono T, Watanabe H, Hijioka N, Murakawa M, Kimura J. The inhibitory effect of Shakuyakukanzoto on K current in H9c2 cells.

Fukushima Journal of Medical Science. 60(1);22-30,2014

2) Kitamura N, Sakamoto K, Ono T, Kimura J. The inhibitory effect of paclitaxel on Kv2.1 current in H9c2 cells.

Fukushima Journal of Medical Science 61(1); 47-53,2015.

6．研究組織

(1)研究代表者

木村純子 (KIMURA JUNKO)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10186322

