

平成 2 6 年 6 月 2 5 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659701

研究課題名（和文）芍薬甘草湯の鎮痛作用機序の解明

研究課題名（英文）The mechanisms of action of Shakuyakukanzoto to reduce muscle pain

研究代表者

井石 雄三（Iseki, Yuzo）

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：60622313

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000 円、（間接経費） 540,000 円

研究成果の概要（和文）：筋けいれんを伴う疼痛治療薬である芍薬甘草湯の作用機序を解明するため、骨格筋に分化する心筋由来のH9c2細胞のホールセルパッチ・クランプ法を用いて、電位依存性K⁺電流（IK_{Kur}）に対する効果を検討した。芍薬甘草湯は、濃度依存的にIK_{Kur}を阻害し、50%抑制濃度は1.3mg/ml、ヒル係数は1.2であった。芍薬甘草湯の成分別では、IK_{Kur}を阻害する強さは、甘草、芍薬甘草湯、芍薬であったが、甘草の主成分であるグリチルリジンにはIK_{Kur}を阻害しなかった。本研究結果は、芍薬甘草湯がIK_{Kur}を阻害してK⁺流出を減らすことによって、細胞内外のK⁺バランスを正常化し、筋肉痛を軽減することを示唆する。

研究成果の概要（英文）：Shakuyakukanzoto is a commonly used for the treatment of acute pain associated with muscle cramp. In the present study using the whole-cell patch clamp technique, we examined effects of Shakuyakukanzoto on the ultra-rapidly activating slowly inactivating delayed rectifier K⁺ current (IK_{Kur}) in H9c2 cells, that is a cell line derived from embryonic rat heart, and can differentiate into skeletal myocytes. Shakuyakukanzoto inhibited IK_{Kur} in a concentration-dependent manner. The half-maximal concentration (IC₅₀) was approximately 1.3 mg/ml and the Hill coefficient was 1.2. The order of potency of inhibiting IK_{Kur} was Kanzo> Shakuyakukanzoto> Shakuyaku. Glycyrrhizin, which is a major component of Kanzo, had no inhibitory effect on IK_{Kur}. Our result suggest that Shakuyakukanzoto may normalize intracellular and extracellular K⁺ balance by inhibiting IK_{Kur} and reducing K⁺ efflux. This may be a part of the mechanism that Shakuyakukanzoto improving muscle pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：芍薬甘草湯 芍薬 甘草 ポタシウム電流 ホールセルクランプ法 H9c2細胞 ポタシウム電流

1. 研究開始当初の背景

芍薬甘草湯は、こむらがえり、椎間板ヘルニア、パクリタキセルなどの抗がん剤による筋肉痛など骨格筋の攣縮による痛み治療に使用される漢方薬である。

Kimura らは、ラットの横隔膜を用いて芍薬の主成分であるペオニフロリン、甘草の主成分であるグリチルリジンは弱い筋弛緩作用しか示さないが、両者の混合によって強い筋弛緩作用を示すことを報告した。(Kimura M, et al. The mechanism of combined action in blocking effect of paeoniflorin and glycyrrhizin on Isolated phrenic nerve-diaphragm muscle preparation of mice. Proc Symp WAKAN-YAKU. 15:157-161, 1982.)しかし、その作用機序は明らかになっていない。

こむらがえりは、運動中の脱水や血液透析中の血清 K^+ 濃度の異常によって発生する。これらは、細胞内外の K^+ 濃度変化が筋攣縮に関与していることを示唆する。また、芍薬甘草湯のこむらがえりに対する効果は短時間で現れるため、芍薬甘草湯はイオンチャネルに作用している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨格筋のポタシウムイオン(K^+)チャネルに対する芍薬甘草湯の作用を明らかにし、その鎮痛機序を解明することである。

H9c2 細胞は、ラットの胎生期心室由来細胞であるが、心筋細胞にだけでなく骨格筋繊維にも分化するので、骨格筋細胞モデルとして使用した。H9c2 細胞には ultra-rapid 型遅延整流 K^+ 電流(IK_{ur})があり、その遺伝子は Kv2.1 と報告されている。Kv2.1 は、神経細胞、心筋、平滑筋と骨格筋に発現している。

本研究ではH9c2細胞を用いて芍薬甘草湯、芍薬、および甘草の IK_{ur} に対する効果を検討した。

3. 研究の方法

H9c2 細胞(大日本製薬、大阪)は加湿された 10%の CO₂ と 90%の空気環境で、37 °C の 10% の胎児ウシ血清を含む Eagle 液中で培養した。細胞はサブカルチャーから 4-11 日後に使用し、電子生理的記録のために、0.02%トリプシン含有 Ca^{2+} -free 溶液に移した。膜電流は、ホールセル・パッチ・クランプ法で記録した。芍薬甘草湯、芍薬、甘草をパッチ・クランプ細胞外の灌流液に添加して、その効果を検討した。

H9c2 細胞の IK_{ur} が Kv2.1 であることを確認するため、H9c2 細胞に小干渉 RNA(siRNA) をトランスフェクションさせ、48-72 時間後に Kv2.1 をノックダウンした細胞で膜電流を測定した。

Kv2.1 mRNA の発現を確認するため、ラットの骨格筋と H9c2 細胞から全 RNA を抽出した。

結果は平均±SD で表した。電流は種々の芍薬甘草湯の濃度における最大値のパーセント抑制で示し、抑制濃度中央値(IC₅₀) とヒル係数は、Origin6.1 版(OriginLab、Northampton, USA)を用いて決定した。濃度反応曲線は、以下の式を用いて適合させた。

$$I = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) / [1 + ([SKT] / IC_{50})^{nH}]$$

[SKT]: 芍薬甘草湯濃度

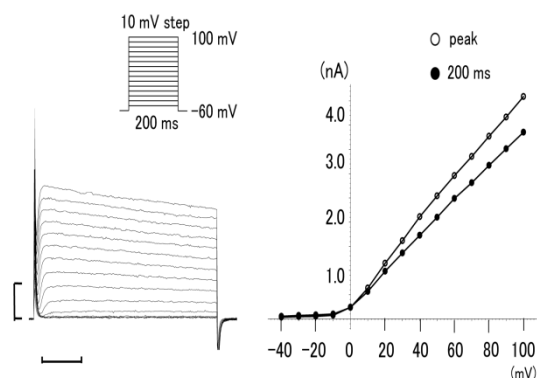
nH: Hill 係数

2 群間の差は、F 検定の後 student-t 検定で、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

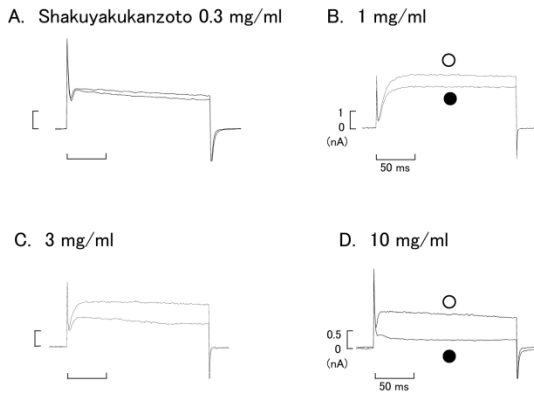
H9c2 細胞の K^+ 電流

H9c2 細胞では、-60mV の静止膜電位から -40 と 100mV の電圧範囲で持続時間 200ms の脱分極矩形電圧パルスを 10 秒間隔で与えることによって、非常に早く活性化されてゆっくりと不活化される遅延整流 K^+ 電流(IK_{ur})が誘発された。

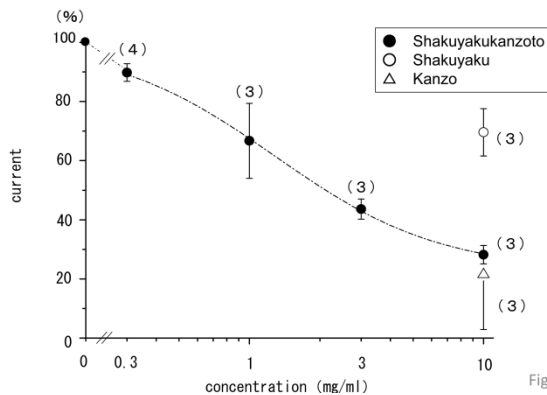


芍薬甘草湯の K^+ 電流に対する効果

10 秒間隔で持続時間 200ms の静止膜電位 -60mV から 60mV の範囲の矩形電圧パルスを与えて対照の電流値を測定した後、10mg/ml の芍薬甘草湯を細胞外溶液に灌流した。10mg/ml の芍薬甘草湯は、対照値の $28.2 \pm 3.1\%$ まで IK_{ur} を抑制した。



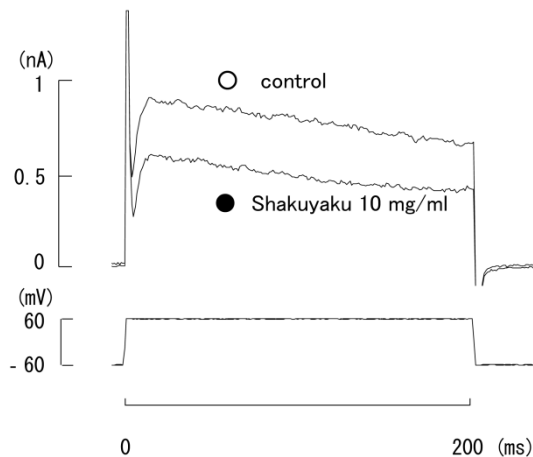
0.3 ~ 10mg/ml の芍薬甘草湯灌流による I_{Kur} 抑制の濃度反応曲線から、芍薬甘草湯は濃度依存的に I_{Kur} を抑制し、 IC_{50} はおよそ 1.3mg/ml で、ヒル係数は 1.2 であった。



芍薬の K^+ 電流に対する効果

芍薬甘草湯は、芍薬 50%と甘草 50%の合剤である。

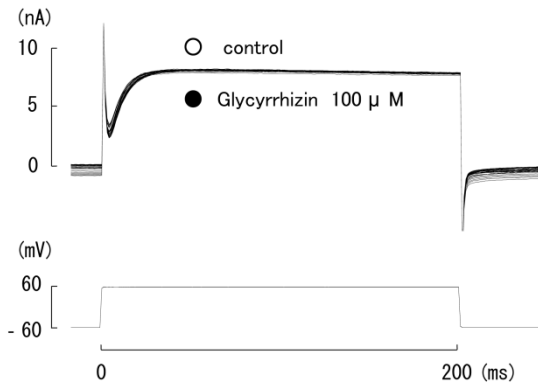
芍薬単独の K^+ 流に対する効果を検討したところ、10mg/ml の芍薬は、対照値の $69.6 \pm 8.0\%$ まで、ピーク電流を抑制した。



甘草の K^+ 流に対する効果

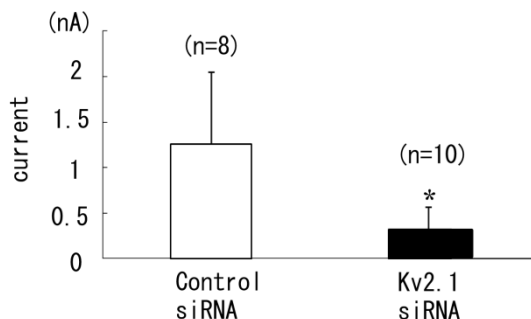
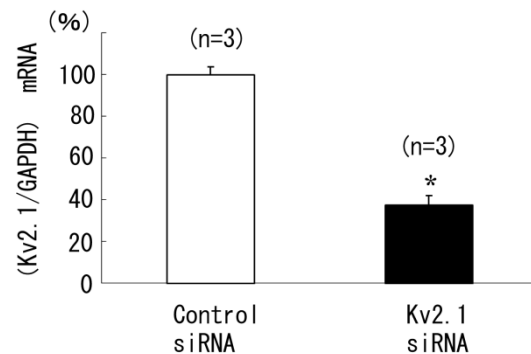
10mg/ml の甘草は、対照値の $21.5 \pm 18.6\%$ までピークの I_{Kur} を抑制した。10mg/ml の甘草の抑制効果は、10mg/ml の芍薬甘草湯のそれ

に等しかった。甘草の主要構成要素の 1 つであるグリチルリジンの効果を検討したところ、 $100 \mu M$ のグリチルリジンは 5 分間灌流しても K^+ 電流に影響を及ぼさなかった。



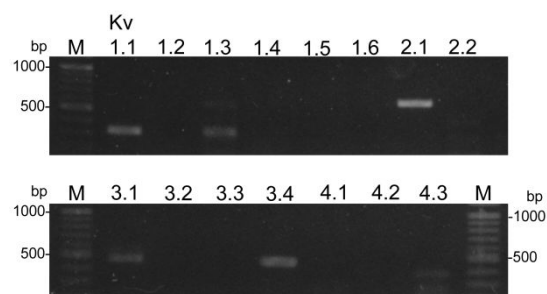
H9c2 細胞の K^+ 電流に対する Kv2.1 siRNA の効果

H9c2 細胞の I_{Kur} が Kv2.1 であることを確かめるために、Kv2.1 mRNA 発現量と I_{Kur} の大きさの関係を、対照 siRNA または Kv2.1 siRNA をトランスフェクションした H9c2 細胞で比較した。48 時間のトランスフェクションの後、Kv2.1 siRNA トランスフェクション細胞では対照 siRNA トランスフェクション細胞の $37.5 \pm 7.6\%$ に Kv2.1 mRNA の発現量が減少した ($p < 0.001$)。 I_{Kur} のピーク値は、対照 siRNA トランスフェクション細胞 1.26 ± 0.79 nA に対して、Kv2.1 siRNA トランスフェクション細胞 0.32 ± 0.24 nA と、有意に減少した。これらの結果から、H9c2 細胞の I_{Kur} は Kv2.1 であることが示唆された。



ラット骨格筋肉における Kv2.1 mRNA の発現

ラット骨格筋の Kv2.1 表現を確認するために、RT-PCR 法を行った。ラット骨格筋において、Kv1.1、Kv1.3、Kv2.1、Kv3.1、Kv3.4 と Kv4.3 の mRNA 発現が確認された。



本研究において、芍薬甘草湯が H9c2 細胞で Kv2.1 K^+ 電流を抑制することが明らかとなった。この結果は、芍薬甘草湯のこむらがえり治療効果のメカニズムは細胞内外の K^+ バランスの正常化による可能性があることを示唆する

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

井石 雄三

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：60622313

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし