

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460703

研究課題名(和文) 牛車腎気丸に含有される新規標的分子のナトリウムチャネルを介する疼痛制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pain control mechanism via sodium channel of novel target molecule contained in herbal medicine Goshajinkigan

研究代表者

天野 託 (AMANO, TAKU)

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：10294547

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)：牛車腎気丸は末梢神経障害の治療に使用されている。しかし、牛車腎気丸が神経因性疼痛をどのように抑制するかは依然として不明である。本研究は、電位依存性ナトリウムチャネル電流に対する牛車腎気丸および牛車腎気丸含有の成分の効果を調べた。牛車腎気丸および牛車腎気丸に含まれる複数の成分によるナトリウムチャネルNav1.7電流阻害を介して、神経因性疼痛の抑制を示し得ることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Goshajinkigan, one of the traditional Japanese Kampo formulas, has been used for neuropathic pain. However, how goshajinkigan suppresses the neuropathic pain are still unclear. In this study, we investigated the effect of Goshajinkigan and those ingredients to the voltage-gated sodium channels current (VGSCs) of Nav1.7 which predominantly expresses in peripheral nerve, particularly dorsal root ganglion using HEK293 cells expressing human Nav1.7 VGSCs. Our finding suggested that goshajinkigan may exhibit suppression of the neuropathic pain via Nav1.7 Na<sup>+</sup> current inhibition by multiple components included in goshajinkigan.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：牛車腎気丸 六味丸 疼痛 電気生理 ナトリウムチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

電位依存性 Na<sup>+</sup> チャンネル(Na<sup>+</sup> チャンネル)は末梢および中枢神経系における神経細胞の興奮を直接担っている膜蛋白質である。炎症性疼痛や神経因性疼痛などに代表される慢性疼痛の病態生理においても、その背景に神経細胞の過剰興奮が存在し、Na<sup>+</sup> チャンネルが慢性疼痛の発現や進展に重要な役割を果たしている。Na<sup>+</sup> チャンネルは Nav1.1 から Nav1.9 までの 9 種類のサブタイプがクローニングされている。疼痛の興奮伝播にはテトロドトキシン(tetrodotoxin: TTX)感受性の Nav1.7 と TTX 抵抗性の Nav1.8 が最も重要な役割を果たしている。

しかし、疼痛緩和で用いられる牛車腎気丸のメカニズムは不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

脊髄神経支配領域の一次求心性神経の細胞体は、脊髄後根神経節(dorsal root ganglion: DRG)にある。本研究の目的は、疼痛制御に関わる新たな神経ネットワークと新規標的薬が見出すことにある。さらに、牛車腎気丸における末梢神経障害や神経障害性疼痛の鎮痛作用機構に着目し、オピオイド受容体や NSAIDs など介する鎮痛作用発現機序のみを念頭に置いたこれまでの研究とは全く異なる観点からの解明を試みることにし、新たな痛みの新規標的分子を漢方薬の成分から検索し、その標的薬から鎮痛作用発現機序における侵害受容体の役割を解明し、生体の疼痛制御機構の本質を理解することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 細胞培養法

Nav1.7 安定化発現 HEK293 細胞は、10% ウシ血清および 1% penicillin-streptomycin 添加 DMEM 培地を用いてシャーレ内で細胞を培養した。細胞を継代する際には、シャーレ内の培養液を取り除いた後、phosphate buffer saline (PBS) 5mL をシャーレ内に入れ細胞を洗った。次に PBS を取り除き、再び PBS 5mL をシャーレ内に入れピペティングでシャーレから細胞を剥がした。細胞懸濁液を 1500rpm、25℃ で 5 分間遠心分離したのち、上清を取り除き、ペレットを培地で再びピペティングし、1500rpm、5 分間遠心分離した。ペレットを培地で再懸濁させ、新しいシャーレに細胞を播種した後ジェネティシン (G418) 50μL を入れ、培養した。継代は 3~4 日の間隔で行った。

### 電気生理学的解析

シャーレに細胞を播種した後、24~96 時間後の細胞を使用した。HEK293 Nav1.7 細胞を、細胞の灌流液 [(細胞外液)イオン組成 (mM): 140 NaCl, 0.03 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 MgCl<sub>2</sub>, 10 d-glucose; pH7.4 with TEA-OH]にて灌流している小水槽内で保持した。パッチ電極 [(細胞内液)イオン組成 (mM): 115 CsCl, 25 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 11 EGTA,

and 10 HEPES; pH7.4 with Cs-OH] を用い、顕微鏡直視下、室温にて HEK293 Nav1.7 細胞にてホールセル記録を行った。膜電位は -60mV に固定した。また、ホールセル記録には、NARISHIGE 社製のガラス管 (1.5×90mm) を使用して作成した微小ガラス電極のうち、電極抵抗が 3~10 MΩ のものを使用した。ホールセル電流は、Axon CNS Digidater1440A (Axon Instruments) を使用して記録し、アンプは patch clamp EPC 8 (HEKA Instruments) を用い、データ解析には clampex および clampfit (Axon Instruments) を用いた。

膜電位変化に伴うチャンネル電流の変化を測定するため、holding potential を -60mV とし、-80mV から 100mV まで 10mV ずつ変化させて脱分極させた際に流れる電流を測定し、それぞれの脱分極電位に対する電流量をプロットし、グラフを作成した。また、薬物による Nav1.7 チャンネル電流に対する影響は、薬物投与前のピーク電流に対する投与後のピーク電流の大きさをプロットした。

膜電位変化に伴う Nav1.7 チャンネル電流の変化観察時にホールセルパッチ形成 5 分経過後、各生薬およびケイヒ成分の細胞外投与を開始した。細胞外投与約 3 分後にピーク電流を測定し、Nav1.7 チャンネル電流に対する作用を観察した。

### 各生薬の熱水抽出エキス作成法

牛車腎気丸、六味丸および各生薬については細胞の灌流液 (細胞外液) に必要量を溶解させた後、3000rpm、25℃ で 5 分間遠心分離しその上清を使用した。

## 4. 研究成果

### Nav1.7 に対する牛車腎気丸の作用

牛車腎気丸の投与により Nav1.7 ナトリウムチャンネルの活性化のピーク電流に濃度依存的な抑制が認められた。さらに、牛車腎気丸の投与により、Nav1.7 ナトリウムチャンネルの不活性化は、過分極側へのシフトが認められた。

### Nav1.7 に対する六味丸の作用

六味丸の投与により Nav1.7 ナトリウムチャンネルの活性化のピーク電流に濃度依存的な抑制が認められたが、不活性化には、影響をあたえなかった。

### Nav1.7 に対する各種生薬の作用

地黄、山薬、山茱萸、茯苓、沢瀉、牡丹皮の熱水抽出エキス 1mg/mL による Nav1.7 チャンネル電流抑制作用は認められなかった。これに対し、附子、桂皮、牛膝、車前子の熱水抽出エキス 1mg/mL においては、それぞれ Nav1.7 チャンネル電流の抑制が認められた。各種生薬のうち、附子のみが Nav1.7 ナトリウムチャンネルの不活性化に関与し、過分極側へのシフトが認められた。

さらに、附子に含まれるネオリンおよびアコニンおよび牡丹皮に含まれるペオノールは Nav1.7 ナトリウムチャンネルの活性化のピーク電流に濃度依存的な抑制が認められた。

本研究において、附子を除く牛車腎気丸構成生薬のうち、桂皮、牛膝、車前子の熱水抽出エキスによる Nav1.7 チャネル電流抑制作用が認められた。以上のことから、牛車腎気丸で認められる Nav1.7 チャネル電流抑制作用は、複数の生薬に含まれる複数の化合物による協働作用である可能性が示唆されたが、さらなる、鎮痛有効成分である標的分子の探索と疼痛制御機構を明らかにすることが今後課題である。

#### 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 4 件)

#### 2014 年度

1. Neuroprotective effect of yokukansan against cytotoxicity induced by corticosterone on mouse hippocampal neurons.  
Nakatani Y, Tsuji M, Amano T, Miyagawa K, Miyagishi H, Saito A, Imai T, Takeda K, Ishii D, Takeda H.  
Phytomedicine. 2014 21(11):1458-65.

#### 2016 年度

2. Corticosterone Inhibits the Proliferation of C6 Glioma Cells via the Translocation of Unphosphorylated Glucocorticoid Receptor.  
Nakatani Y, Amano T, Takeda H.  
Biol Pharm Bull. 2016;39:1121-9.
3. Yokukansan enhances the proliferation of B65 neuroblastoma.  
Nakatani Y, Amano T, Yamamoto H, Sakai N, Tsuji M, Takeda H.  
J Tradit Complement Med. 2016 Feb 22;7(1):34-44.

#### 2017 年度

4. Neuroprotective effect of liquiritin as an antioxidant via an increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase expression on B65 neuroblastoma cells.  
Nakatani Y, Kobe A, Kuriya M, Hiroki Y, Yahagi T, Sakakibara I, Matsuzaki K, Amano T.  
Eur J Pharmacol. 2017 815:381-390.

[学会発表](計 9 件)

#### 2014 年度

1. 牛車腎気丸のナトリウムチャネルサブタイプ Nav1.7 に対する作用  
天野 託、中谷 善彦、武田 弘志  
第 131 回薬理学会関東部会 2014.10.11

#### 2015 年度

2. Herbal medicine Goshajinkigan and Rokumigan inhibit Nav1.7 voltage-gated sodium channel current  
Yoshihiko Nakatani, Kazuya Miyagawa, Minoru Tsuji, Hiroshi Takeda, Taku Amano

第 88 回日本薬理学会 2015.3.20

3. Neuro2a 細胞における SNAP25 の細胞生存に及ぼす影響  
山本 彩佳、大井 ありさ、根本 佳奈、高木 正史、高橋 詩織、中谷 善彦、天野 託  
生体機能と創薬シンポジウム 2015 2015.8.27
4. 抗悪性腫瘍薬の開発を指向した新規ベンズインドール誘導体の抗グリオーマ作用の検討  
渡邊 有加里、高橋 詩織、Nyo Mi SWE、中谷 善彦、渡邊 敏子、天野 託  
生体機能と創薬シンポジウム 2015 2015.8.27
5. 甘草含有成分である liquiritin のセロトニン神経由来細胞株 B65 における menadione 誘導酸化ストレスに対する細胞保護効果とそのメカニズムに関する検討  
中谷 善彦、天野 託、矢作 忠弘、辻 稔、武田 弘志  
第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会 2015.9.24

#### 2016 年度

6. 牡丹皮を介した六味丸の Nav1.7 チャネル電流抑制作用  
塚田 和代、片所 真紀、山内 美輝、根来 加菜子、山口 真里奈、塩川 真穂、遠藤 沙希子、中谷 善彦、矢作 忠弘、松崎 桂一、天野 託  
第 134 回日本薬理学会関東部会 2016.7.9
7. Dibutyryl-cAMP による Neuro2a 分化誘導時における SNAP25 と Tyrosine hydroxylase との相互作用についての検討  
高橋 詩織、増子 瑞希、山本 彩佳、大井 ありさ、根本 佳奈、高木 正史、中谷 善彦、天野 託  
第 134 回日本薬理学会関東部会 2016.7.9
8. 抗悪性腫瘍薬開発を目指した新規ベンズインドール誘導体による抗グリオーマ作用とその作用機序の検討  
渡邊 有加里、藤野 恵理、高橋 詩織、Nyo Mi SWE、中谷 善彦、渡邊 敏子、天野 託  
第 134 回日本薬理学会関東部会 2016.7.9

#### 2017 年度

9. リン酸化 Akt および MAPK 発現変化を介した新規ベンズインドール誘導体の抗グリオーマ作用の解明  
藤野 恵理、八木澤 昂大、渡邊 有加里、高橋 詩織、Nyo Mi SWE、中谷 善彦、渡邊 敏子、天野 託  
第 138 回日本薬理学会関東部会 2018.3.11

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

天野 託 (AMANO TAKU)  
国際医療福祉大学・薬学部・教授  
研究者番号：10294547

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

中谷 善彦 (NAKATANI YOSHIHIKO)  
国際医療福祉大学・薬学部・助教  
研究者番号：40582169  
榊原 巖 (SAKAKIBARA IWAO)  
日本薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：50581972  
矢作忠弘 (YAHAGI TADAHIRO)  
日本大学・薬学部・助教  
研究者番号：40632766

##### (4) 研究協力者

( )