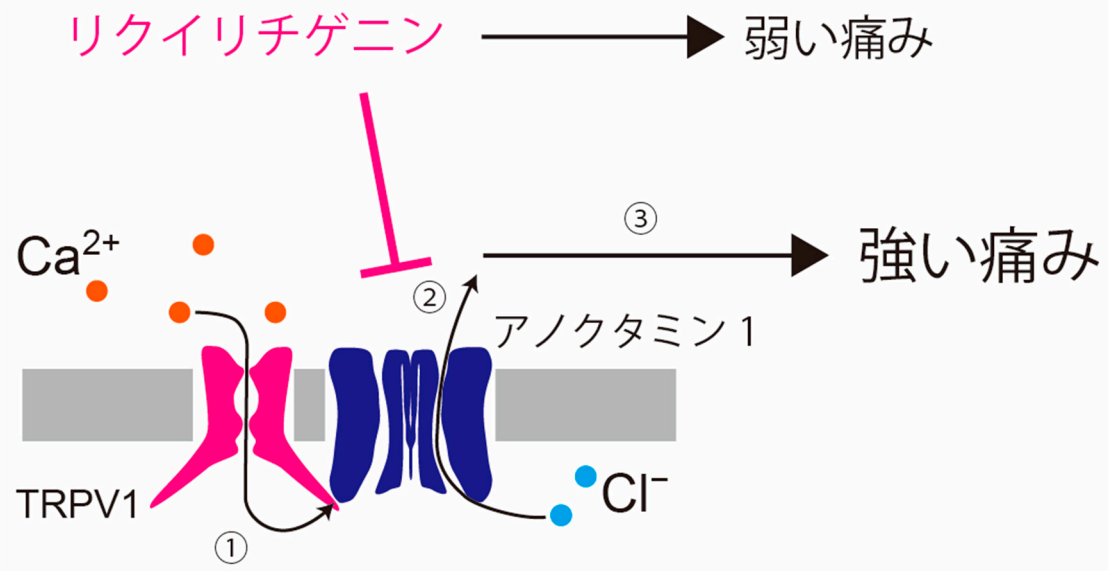
115　アノクタミン1に対する生薬由来成分の薬理学的検討	高山　靖規

【目的】漢方薬は古くから広く使用されており、2019 年からは世界保健機構によっても認められたものの依然として科学的根拠に欠けている。漢方薬には様々な効力があるとされているが、本研究では鎮痛作用について主に検討した。これに際し、カルシウム活性化クロライドチャネル・アノクタミン 1 に着目した。アノクタミン 1 は痛覚神経に発現し、その活性化により疼痛や炎症が増悪する。そのため、生薬由来成分の中にアノクタミン 1 阻害剤となるものがあれば、漢方薬の持つ鎮痛および抗炎症作用について新たな機序を提言できると考えた。そこで、「生薬に含まれる天然化合物のアノクタミン 1 に対する薬理作用の検討」および「生体での漢方薬作用における分子メカニズムの解明」を目的として研究を進めた。

【方法】1. アノクタミン 1 を強制発現させた HEK293T 細胞においてホールセルパッチクランプ記録を行い、アノクタミン 1 電流に対する各種天然化合物の作用を検討した。2. マウスにおける薬理学的行動試験によって同定した天然化合物の鎮痛および抗炎症作用を検討した。

【結果】1. 甘草に由来するフラボノイドであるリクイリチゲニンによってアノクタミン 1 は阻害された。2. 生理活性がリクイリチゲニンと似ているエストロゲンによってもアノクタミン 1 は阻害された。3. リクイリチゲニンの皮下投与はカプサイシンによる急性疼痛をやや抑えた。4. リクイリチゲニンの皮下投与はカプサイシンによる炎症性疼痛を抑える傾向にあった。

リクイリチゲニンによるアノクタミン 1 阻害を介した鎮痛・抗炎症



115. アノクタミン１に対する生薬由来成分の薬理学的検討

高山　靖規

昭和大学 医学部 生理学講座 生体制御学部門

Key words：TRPV1，アノクタミン 1，フラボノイド，性ホルモン

緒　言

生薬を配合して作られる漢方薬には様々な有効成分が含まれているが、多くの漢方薬は抗炎症作用を持っているとされる。しかし、炎症性疼痛については主観的な感覚でしかなく、その分子メカニズムも不明であったため科学的根拠に欠けていた。そこで本研究では本邦において処方頻度の高い漢方薬に含まれる主成分を対象にして、一次感覚神経において痛みに関わるイオンチャネルに対する薬理作用を検討した。その結果、漢方薬のおよそ半数に含まれる甘草（リコリス）に由来するフラボノイド（リクイリチゲニン）がアノクタミン１（別名：TMEM16A）を阻害することを同定した。しかしながら、同じく痛みに関与する transient receptor potential vanilloid 1（TRPV1）や ankyrin 1（TRPA1）は阻害されなかった。このことから、リクイリチゲニンはアノクタミン１選択的に働き、鎮痛効果をもたらすものと考えられた。イオンチャネルに対する種間差の比較をマウスとヒトで行ったが大差はなかった。

これまで、リクイリチゲニンの抗炎症作用やアノクタミン１による炎症増悪は個別に報告されていたが、本研究によりそれら二つの研究領域を結びつけることができた。今後は、漢方薬主成分および各種イオンチャネルの生理活性に着目すればより効率的に分子実態を解明していけるものと期待される。

これに加えて、エストロゲンのアノクタミン１に対する作用も検討した。リクイリチゲニンはエストロゲンβ受容体に結合し、エストロゲン様作用を持つことが知られているためである。その結果、妊娠期に胎児の発達とともに血中濃度が高まるエストリオールに比較的強いアノクタミン１阻害効果が認められた。この生理的意義は未だ不明であるが、妊娠中の生理的変化にアノクタミン１阻害が関わっている可能性が示唆され、今後の重要な検討課題の一つとなった。

これらの研究結果は、2021 年 4 月 8 日付けの Frontiers in Pharmacology にて発表した［1］。

また、マウスを用いて薬理学的行動実験も行なった。その結果、カプサイシンを後肢皮下に投与した場合の急性疼痛関連行動（足舐め行動）はリクイリチゲニンによって抑えることができた。しかしながら、その効果はあまり強力なものではなくなぜこの様な結果になったかは今後の検討課題である。加えて、カプサイシン投与後に Hot プレートにより熱刺激を加え、その際にみられる疼痛関連行動（ジャンプ、および Hot プレートから移動後の足舐め行動）を観察した。その結果、Hot プレート上で見られる疼痛関連行動までの潜時に差は見られなかった。しかし興味深いことに、Hot プレートから飼育ケージに戻した際に見られた足舐め行動はリクイリチゲニンを打った後肢では見られなくなることを発見した。これは今までに解析例のない現象であり、今度ミラーイメージペインの可能性なども加味しながらその詳細を検討する予定である。

方 法

1. 細胞

HEK293T 細胞は 10%FBS、ペニシリン／ストレプトマイシン、GlutaMax を含む D-MEM（High glucose）で培養した。温度 37℃、二酸化炭素濃度 5%のインキュベーターを用いた。

2. ホールセルパッチクランプ記録

HEK293T 細胞に Lipofectamine3000 を用いてマウスもしくはヒトアノクタミン 1、TRPV1 もしくは TRPA1 をトランスフェクションした。トランスフェクション後 20～36 時間で電位固定モードにおいて全細胞電流を計測した。細胞外液組成 : 140 mM NaCl、5 mM KCl、2 mM $CaCl_2$、2 mM $MgCl_2$、10 mM D-Glucose、10 mM HEPES、pH 7.4 (NaOH で調製)。細胞内液組成 : 140 mM NMDG-Cl (for アノクタミン 1) または 140 mM CsCl (for TRPV1、TRPA1)、5 mM BAPTA、10mM HEPES、pH 7.4 (NMDG または CsOH で調製)。細胞内のフリーカルシウムは MAXC program (スタンフォード大学) を用いて計算した。測定には Multiclamp700B amplifier (Molecular Devices)、Digidata 1550B digitizer (Molecular Devices)、解析には pCLAMP 11 (Axon Instruments) を用いた。測定時は 5 秒に 1 回、300 msec 間の Ramp パルス (－100 ～＋100 mV) を加えた。膜電位は 0 もしくは－60 mV に保持した。

3. 薬理学的行動実験

10～12 週齢の C57BL6/NCr マウス (オス) を用いた。12 時間明暗サイクル (7～19 時明期)、自由摂食・飲水、気温 24～25℃、湿度 40～60%飼育した。測定 1 週間前から 1 日 10 分程度、2 日に 1 回ハンドリングを行い、馴化させた。カプサイシンは 10 mM DMSO ストックを生理食塩水で 300 μM に希釈し、30 G 針を用いて後肢側方の皮下に 10 μL 投与した。リクイリチゲニンは生理食塩水に直接溶かし 1 mM とした。投与後 5 分間、急性疼痛関連行動を撮影し、その後 10 分間のインバーバルをおいた後に 54℃の Hot プレートにマウスを乗せ、疼痛関連行動までの潜時を測定した。測定時間は最長 15 秒間とした。測定後、速やかにマウスを飼育ケージへ戻した。この時、熱刺激終了直後に見られる足舐め行動の時間を測定した。

結果および考察

1. リクイリチゲニンによるマウスアノクタミン１阻害

リクイリチゲニンは腸内細菌叢において甘草由来のリクイリチンから生成されるアグリコンである（図 1A）。ここでは、100 nM フリーカルシウムによって惹起されるマウスアノクタミン 1 電流に対する作用を検討した。その結果、リクイリチゲニンは最大で選択的アノクタミン 1 阻害薬（Ani9）とほぼ同等の阻害効果を示したが、前駆体であるリクイリチンは全く作用しなかった（図 1B～D）。また、この時の EC50 は 21.32 μM であった。アグリコンは膜透過性が高い化合物である。すなわち、これらの結果は、甘草を摂取した後に腸を始めとして全身のアノクタミン 1 がリクイリチゲニンにより阻害され得ることを示唆する。

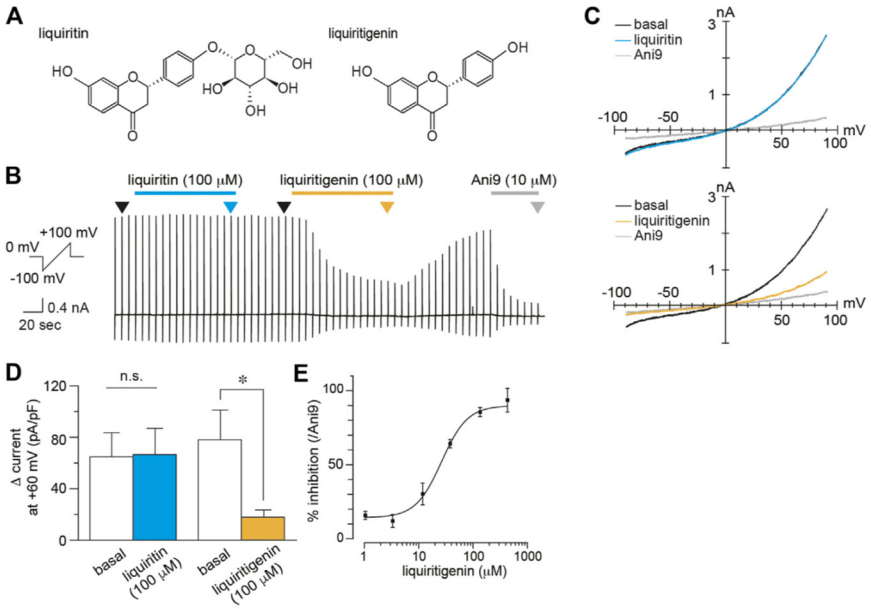


図 1. リクイリチゲニンによるアノクタミン１阻害

A）リクイリチンおよびリクイリチゲニンの化学構造図。

B）電流の典型例（膜電位：0 mV）。

C）B の矢頭における IV カーブ。

D）膜電位＋60 mV における電流密度の比較。N.S.：Not Significant、*p＜0.05 (Wilcoxon matched-pairs signed rank test)。

E）Ani9 による最大抑制を 100%とした場合のリクイリチゲニンの阻害濃度曲線。

2. リクイリチゲニンはマウス TRPV1 および TRPA１には作用しない

TRPV1 や TRPA1 も一次感覚神経に発現しており、それぞれ唐辛子や山葵によって活性化する。リクイリチゲニンの選択性を明らかとするため、これらにおいても同様に検討を行ったが、リクイリチゲニンによって TRPV1 や TRPA1 が抑制されることはなかった（図 2）。

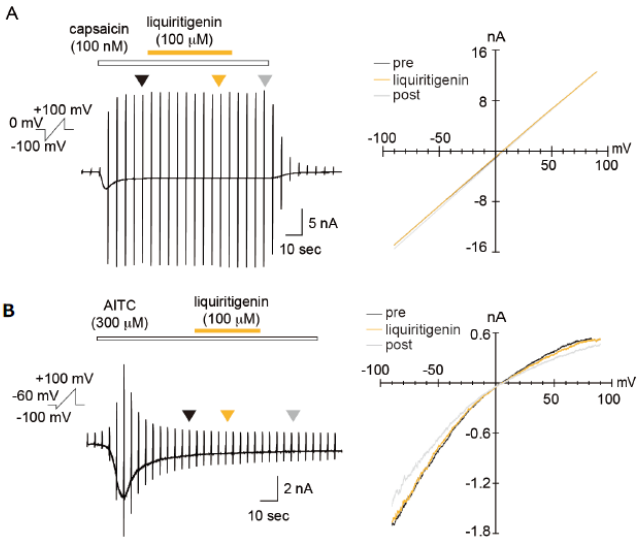


図 2. リクイリチゲニンのマウス TRPV1 および TRPA1 に対する作用

A) 唐辛子の辛味成分であるカプサイシン（100 nM）によって惹起される電流の典型例（膜電位：0 mV）（左）、およびその IV カーブ（右）。

B) 山葵の辛味成分であるアリルイソチオシアネート（AITC、300 μM）によって惹起される電流の典型例（膜電位：0 mV）（左）、およびその IV カーブ（右）。

3. リクイリチゲニンによるヒトアノクタミン 1 阻害

天然化合物のイオンチャネルに対する薬理作用には種間差があることが知られている［2］。そこでヒトクローンにおいてもリクイリチゲニン薬理作用の検討を行った。その結果、300 nM フリーカルシウムによって惹起されたヒトアノクタミン 1 電流はマウス同様に抑制された（図 3A、B）。また、EC50 は 12.89 μM であった。このことは、マウスとヒト間でリクイリチゲニン作用に相違はないものの、ヒトの方がリクイリチゲニンの影響を受けやすいことを示唆する。

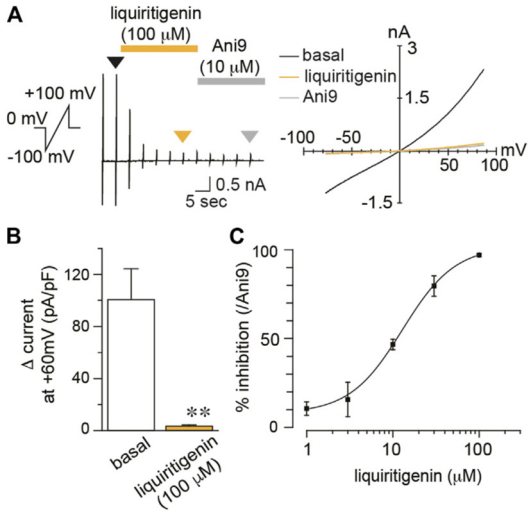


図 3. リクイリチゲニンのヒトアノクタミン 1 に対する作用

A）電流の典型例（左、膜電位：0 mV）、およびその IV カーブ（右）。

B）膜電位＋60 mV における電流密度の比較。**p＜0.01（Wilcoxon matched-pairs signed rank test）。

C）Ani9 による最大抑制を 100%とした場合のリクイリチゲニンの阻害濃度曲線。

4. エストリオールはアノクタミン１を阻害する

リクイリチゲニンにはエストロゲン様作用がある［3］。そこでアノクタミン１にも作用するのか検討した。4 種類のエストロゲン（エストロン、エストラジオール、エストリオール、エステトロール）を 100 μM で検討した結果、マウスおよびヒトの両方においてエストリオールは比較的強いアノクタミン 1 阻害作用を持つことが判明した（図 4）。しかし、その有効濃度は血中濃度よりも大幅に高濃度であった（図 4B、C）。これらの結果は、エストロゲンのアノクタミン１に対する影響は少ないと考えられる。しかし、現時点で妊娠期におけるエストリオールやエステトロール濃度の科学的データは乏しく、またエストロゲンが産生・分泌される組織の周辺における濃度も不明なため、限局的にアノクタミン１が阻害される可能性は未だ否定できない。今後は、生体内におけるエストロゲンの局所濃度測定の技術革新が重要となってくるだろう。

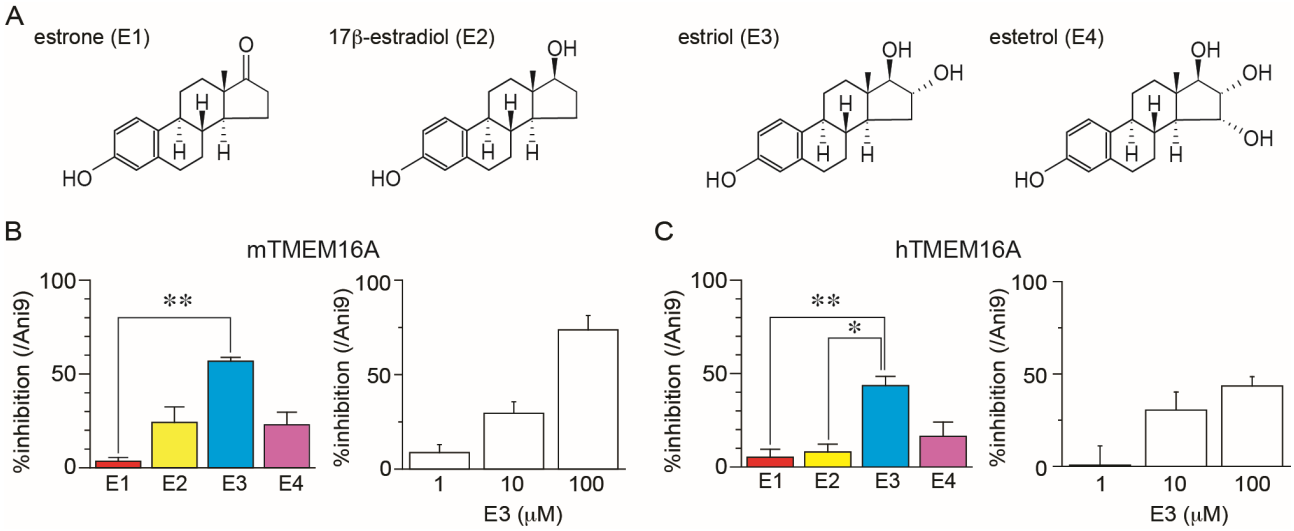


図 4. 各種エストロゲンのマウスおよびヒトアノクタミン１（別名：TMEM16A）に対する作用

A）エストロン（E1）、エストラジオール（E2）、エストリオール（E3）およびエステトロール（E4）の化学構造図。

B）マウスアノクタミン 1 に対する Ani9 の最大抑制を 100%とした場合の各エストロゲン（100 μM）による抑制率の比較（左）、および各濃度における E3 作用の比較（右）。**p<0.01（Wilcoxon matched-pairs signed rank test）。

C）ヒトアノクタミン 1 におけるエストロゲンの比較。*p<0.05、**p<0.01（Kruskal-wallis ANOVA）。

5. リクイリチゲニンはカプサイシンによる痛みを減弱させる

マウスにおいてカプサイシン（300 μM）により惹起される疼痛関連行動の時間を測定した（図 5A）。その結果、効果は薄かったもののリクイリチゲニン（1 mM）の同時投与により疼痛関連行動は減弱した。これに加えて、Hot プレートテストも行った（図 5B）。Hot プレートにおける逃避行動までの潜時は変化しなかったが、熱刺激を加えた後の足舐める時間を左右後肢に分けて解析したところ、リクイリチゲニンを同時投与した群ではカプサイシンを投与しなかった側の後肢（左）をよく舐める傾向にあった。現在解析を進めている中途ではあるが、これはリクイリチゲニンが炎症を抑えているとともに熱による痛みを優位に抑える可能性を示唆している。このような現象はこれまでに報告が無いため、今後の重要な検討課題として研究を進める。

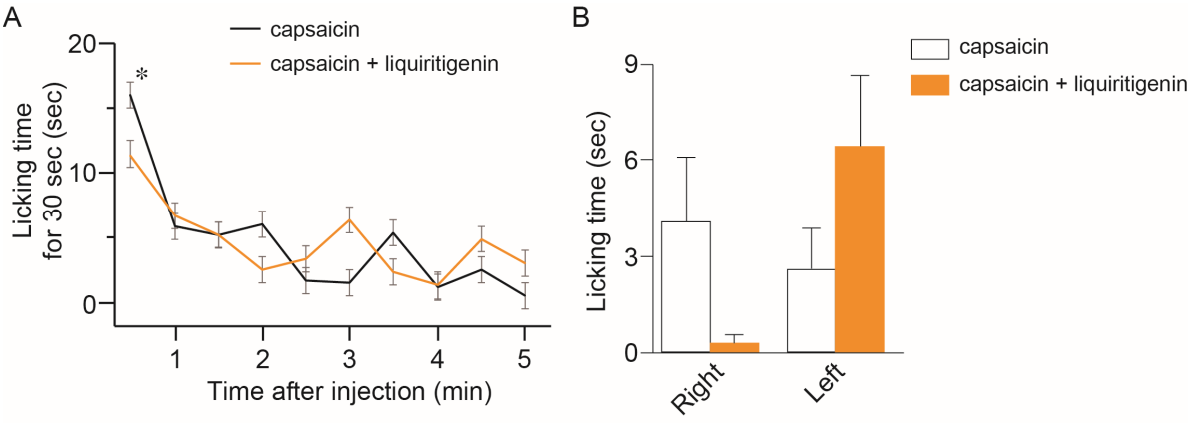


図 5. リクイリチゲニンによる疼痛抑制

A) カプサイシン（300 μM）単独もしくはリクイリチゲニン（1 mM）との混合液を右後肢足外側に 10 μL 皮下投与した場合の疼痛関連行動（足舐め）時間。*p<0.05（Student's T-test）。

B) A の試験を行った 10 分後に 54℃Hot プレートに最長 15 秒乗せた直後に見られる疼痛関連行動の総時間。例数不足のため統計処理は行っていない

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、昭和大学大学院医学研究科生体制御学研究室の加藤真未（大学院生）および砂川正隆教授である。

文　献

1) Kato M, Takayama Y, Masataka S. A Calcium-activated chloride channel TMEM16A inhibited by liquiritigenin. Front Pharmacol. 2021 Apr 8;12:628968. PMID: 33897420. DOI: 10.3389/fphar.2021.628968

2) Nagatomo K, and Kubo Y. (2008). Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 17373–17378. PMID: 18988737. DOI:10.1073/pnas.0809769105

3) Mersereau JE, Levy N, Staub RE, Baggett S, Zogric T, Chow S, Riche WA, Tagliaferri M, Cohen I, Bjeldanes LF, Leitman DC. (2008). Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor β agonist. Mol. Cell Endocrinol. 283, 49–57. PMID:18177995. DOI:10.1016/j.mce.2007.11.020