

# I. 車前子成分の神経障害性疼痛抑制効果と富山県産ブランド化に向けた有効成分の豊富な生薬（薬用植物）の探索

薬学部 応用薬理学研究室	准教授	安東 嗣修
(同)	助教	歌 大介
和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野	教授	小松 かつ子
(同)	准教授	當 銘一文
医学部 病理診断学講座	助教	大橋 若奈

神経障害性疼痛は、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬ではそのコントロールが非常に難しいことが知られている。その中でもがん患者に対する抗がん薬によるがん化学療法の副作用である痛みやしびれなどの末梢神経神経障害は、がん患者の闘病意欲の低下に加え、その発生は投薬治療の中止の一つの指標ともなっており、がん患者の治療の妨げになっている。従って、この末梢神経障害性疼痛のコントロールは非常に重要である。

我々は、これまでに漢方方剤の牛車腎気丸が抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛を抑制すること、またその構成生薬の車前子に活性成分が含まれていること、更に活性成分の一つとしてのアウクビンを見出した。

本年の研究では、アウクビンによる抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛の抑制機序並びに、アウクビンを多く含む生薬並びに、その他の活性成分の探索を行った。

## 【各班のまとめ】

### 1. 慢性疼痛動物モデルを用いた車前子成分の有効性の行動薬理学および電気生理学的検討（応用薬理学：安東嗣修，歌 大介）

マウスへのオキサリプラチン投与により脊髄後角のアストロサイトが活性化し、アウクビンの投与によりその活性化が抑制される。アストロサイト細胞株を用いた検討から、その活性化には、オキサリプラチン、その代謝物ならびに一次求心線維から遊離されるサブスタンス P ではなく、一次求心線維から遊離されるグルタミン酸が関与することを見出した。さらにグルタミン酸によるアストロサイトの活性化は、アウクビンで抑制されることを明らかにした。

オキサリプラチン投与マウス脊髄後角における電気生理学的解析により、自発発火及び非侵害性刺激に対する応答の増加が認められた。このような脊髄後角における神経活動の増加にはアストロサイ

トの活性化が関与すること、アウクビンが中枢にも作用することから、アウクビンの作用点がこれまで明らかにしてきた末梢のシュワン細胞だけでなく、脊髄のアストロサイトにも存在することが明らかとなった。

## 2. 車前子に含まれる末梢神経障害性疼痛抑制作用成分の同定と有効成分含有生薬（薬用植物）の探索（生薬資源科学：小松かつ子，當銘一文）

これまでに抗がん薬誘発機械的アロディニアの抑制作用を有する車前子成分として、アウクビンの他に *pedicularis-lactone* を候補物質として見出した。しかし、*pedicularis-lactone* の含有量は少なく、多く含む生薬として「蔓荊子」を見出し、*pedicularis-lactone* を精製し、抗アロディニア効果を検討し、有効性を見出した。富山県に自生している車前子の基原植物であるオオバコにはアウクビンや *pedicularis-lactone* が、同様に蔓荊子の基原植物であるハマゴウには *pedicularis-lactone* が多く含有されていることも確認した。更に基原植物の自生地域を調べることで、今後、有効成分含有率の高い薬用となる植物が見出されると期待される。

## 3. 車前子成分のグリア細胞を介した疼痛伝達制御の分子メカニズム解析（病理診断学：大橋若奈）

脊髄後角内のグリア細胞の中でもアストロサイトが抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛の発生に重要であることを見出だしてきた。更に、パクリタキセルは、ミクログリアも活性化することが知られている。パクリタキセルはリポポリサッカライド（LPS）と同様に TLR4 受容体に作用することが知られている。TLR4 のシグナルカスケードには、NF- $\kappa$ B 系と STAT3 系が知られており、パクリタキセルは、両系を活性化するが、アウクビンは STAT3 系のみ阻害した。従って、STAT3 の活性化にともなって産生される因子が抗がん薬による末梢神経障害性疼痛に寄与することが示唆される。

### 【3年間の総括】

本研究課題では、末梢神経障害性疼痛の抑制に寄与する車前子成分としてアウクビン及び *pedicularis-lactone* を見出した。更に、生薬「蔓荊子」から *pedicularis-lactone* を精製し、その末梢神経障害性疼痛作用を明らかにした。これら生薬の基原植物であるオオバコやハマゴウは富山にも自生することを確認した。更に、これら因子の生体のターゲットとして、シュワン細胞だけでなく、脊髄グリア細胞（アストロサイトやミクログリア）を明らかにした。今後、富山県産植物のブランド化を目指し、アウクビン及び *pedicularis-lactone* の含有量の多い品種（富山県）の探索と、詳細な疼痛抑制作用機序の解析を行っていく予定である。

# I-1 慢性疼痛動物モデルを用いた車前子成分の有効性の行動薬理学および電気生理学的検討

薬学部 応用薬理学研究室 准教授 安東 嗣 修  
(同) 助 教 歌 大 介

## 【研究目的】

抗がん薬投与によって生じる副作用に痛みやしびれなどの末梢神経障害が生じるが、そのコントロールは、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬等では難しく、非常に困難を極めている。従って、新規治療薬及び予防薬の開発が必要となっている。

我々は、これまでに、漢方方剤の牛車腎気丸（地黄，牛膝，山茱萸，山薬，車前子，沢瀉，茯苓，牡丹皮，桂皮，附子）が、抗がん薬誘発の末梢神経障害性疼痛に有効であることを見出してきた。また、その構成生薬のなかでも車前子に活性成分がふくまれていること、さらに、車前子の主要成分のアウクビンが活性成分の一つであることを見出だしてきた。その中でも、パクリタキセル誘発機械アロディニアに対して、アウクビンの連続投与が有効であること、さらに、末梢神経の髄鞘をつかさどるシュワン細胞において、パクリタキセルの作用が小胞体ストレスを生じさせ、それが脱髄に繋がっていること、アウクビンがその小胞体ストレスを抑制することを見出してきた。オキサリプラチン誘発機械的アロディニアに対してもアウクビンの連続投与が有効であることを明らかにした。しかし、オキサリプラチンは、シュワン細胞に対し、小胞体ストレスを誘導しないことが明らかとなり、アウクビンのオキサリプラチン誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用にシュワン細胞への影響は関与しないことを示唆した。そこで、近年、痛みには脊髄のアストロサイトやミクログリアの関与が報告されていることから、オキサリプラチン誘発機械アロディニアへの脊髄のアストロサイトやミクログリアの関与を調べた。その結果、オキサリプラチンの投与により、ミクログリアの活性化は認められなかったが、アストロサイトの活性は認められ、アウクビンはその活性化を抑制した。

そこで、本研究では、オキサリプラチンによるアストロサイトの活性化の機序に関して、培養アストロサイトを用いて検討し、更にオキサリプラチン投与マウス脊髄における *in vivo* 電気生理学的解析を行った。

## 【研究方法】

### (実験試薬)

オキサリプラチン, オキサレート Na 塩, ジクロロ(1,2-ジアミノシクロヘキサン)白金(II), 及びグルタミン酸は, 和光純薬工業 (大阪) より購入した。サブスタンス P は, ペプチド研究所 (大阪) より購入した。細胞への作用では, オキサリプラチン, オキサレート Na 塩, グルタミン酸及びサブスタンス P は 1%BSA 含有 Ham's F-12 medium に溶解した。ジクロロ(1,2-ジアミノシクロヘキサン)白金(II)は, 0.1%DMSO 及び 1%BSA 含有 Ham's F-12 medium に溶解した。動物への投与では, オキサリプラチンは, 5%糖液に溶解し, 3 mg/kg の用量で単回腹腔内注射した。

アウクビン (和光純薬工業) は, Ham's F-12 medium に溶解し, 刺激物適用 1 時間前から細胞に作用させた。

### (細胞培養)

マウスアストロサイト細胞株 (KT5) は, 10% FBS 含有 Ham's F-12 medium で培養した。実験は, 1%BSA 含有 Ham's F-12 medium 中で行い, 薬物刺激 24 時間後に細胞を回収し, そのタンパク質はウエスタンブロッティングに使用した。

### (ウエスタンブロッティング)

マウスアストロサイトより抽出したタンパク質を常法に従い SDS-PAGE により分離し, PVDF メンブランに分離したタンパク質を転写し, 1 次抗体として anti-GFAP 抗体あるいは anti-GAPDH 抗体と反応させ, その後 2 次抗体として HRP 結合 IgG 抗体と反応させ, 更に ECL (Enhanced ChemiLuminescence) ウエスタンブロッティング検出システム (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いて化学発光させ, X 線フィルムを感光させることで目的とするバンドを検出した。バンドの濃さは, ImageJ フリーソフトウェアを用いて解析した。

### (電気生理学的解析)

実験には, 雄性 C57BL/6 マウスを使用した。オキサリプラチン投与 10 日後に, マウスをウレタン深麻酔後に, 胸腰髄レベルの椎弓切除を行い脳定位固定装置にセットした。実体顕微鏡下に硬膜, クモ膜, 軟膜を処理し, 後根を露出させ電極刺入スペースを確保し, 脊髄表面に酸素 95%, 二酸化炭素 5%で飽和し, 37°Cに加温した人工脳脊髄液を 10-15 mL/min の速度で灌流させた。次に, タングステン電極 (Bowdoinham, ME, U.S.A.) を L4-5 入力部位の脊髄後角浅層 (20-150  $\mu$ m (Laminae I-II)) に刺入し記録した。得られた信号は EX1 (Dagan corporation, Minneapolis, MN, U.S.A.) で増幅し, Digidata 1400A (Molecular Devices, Union City, CA, U.S.A.) を用いてデジタ

ルデータに変換して、コンピューターを用いてソフトウェア Clampex ver. 10.2 (Molecular Devices) に記録した。解析はソフトウェア Clampfit ver. 10.2 (Molecular Devices) を用いて行った。

マウスに刺激を加えない状態で発火を記録し、これを自発発火として評価した。その後、画用絵筆及び有鉤ピンセットを用いて単一ニューロンを同定し、受容野の同定も行い、この領域に対して 0.69 mN の von Frey filament を 10 秒間押し当て、惹起された発火を記録し、これを機械刺激誘発性の発火として評価した。

## 【結果】

### (1) マウスアストロサイト細胞株 KT5 への各種薬物刺激に対するアストロサイト活性化マーカー GFAP 発現

マウスアストロサイト細胞株 KT5 に対して、オキサリプラチンそのもの及びその代謝物であるオキサレート Na 塩及びジクロロ(1,2-ジアミノシクロヘキサン)白金(II)が GFAP の発現に影響するかどうか検討した。その結果、オキサリプラチン (1-30  $\mu\text{M}$ )、オキサレート Na 塩 (1-100  $\mu\text{M}$ )、及びジクロロ(1,2-ジアミノシクロヘキサン)白金(II) (0.01-0.3  $\mu\text{M}$ ) は、KT5 細胞において GFAP の発現に影響しなかった。

アストロサイトの活性化には、一次求心線維から遊離されるグルタミン酸やサブスタンス P の関与が示唆されている。サブスタンス P (0.3-10  $\mu\text{M}$ ) の KT5 細胞への適用は、1  $\mu\text{M}$  をピークとして GFAP の発現を増加させたがコントロールと比べ有意な差ではなかった。一方、グルタミン酸 (0.1-3  $\mu\text{M}$ ) の適用は、0.1  $\mu\text{M}$  においてコントロール比べ有意に GFAP の発現を増加させた。

### (2) マウスアストロサイト細胞株 KT5 におけるグルタミン酸誘発 GFAP 発現に対するアウクビンの効果

KT5 細胞へのグルタミン酸 (0.1  $\mu\text{M}$ ) 適用により、GFAP の発現が増加した。この増加は、アウクビン (50  $\mu\text{M}$ ) の 1 時間前処置により抑制された (図 1)。

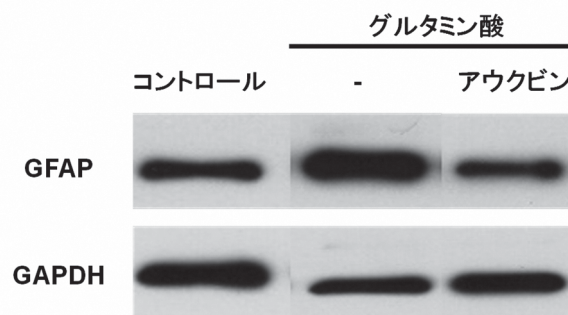


図 1. マウスアストロサイト細胞株 KT5 におけるグルタミン酸誘発 GFAP 発現に対するアウクビンの効果 アウクビン (50  $\mu\text{M}$ ) は、グルタミン酸 (0.1  $\mu\text{M}$ ) 適用 1 時間前より作用させた。

### (3) オキサリプラチン投与マウスの脊髄における神経活動の評価

麻酔下マウスの脊髄へのタングステン電極の挿入により、神経活動を記録した。コントロールマウスでは、自発発火はほとんど認められず、von Frey filament (0.69 mN) 刺激においても神経発火は認められなかった。一方、オキサリプラチン投与マウスでは、自発発火及び von Frey フィラメント (0.69 mN) 刺激における神経発火の増加が認められた (図 2)。

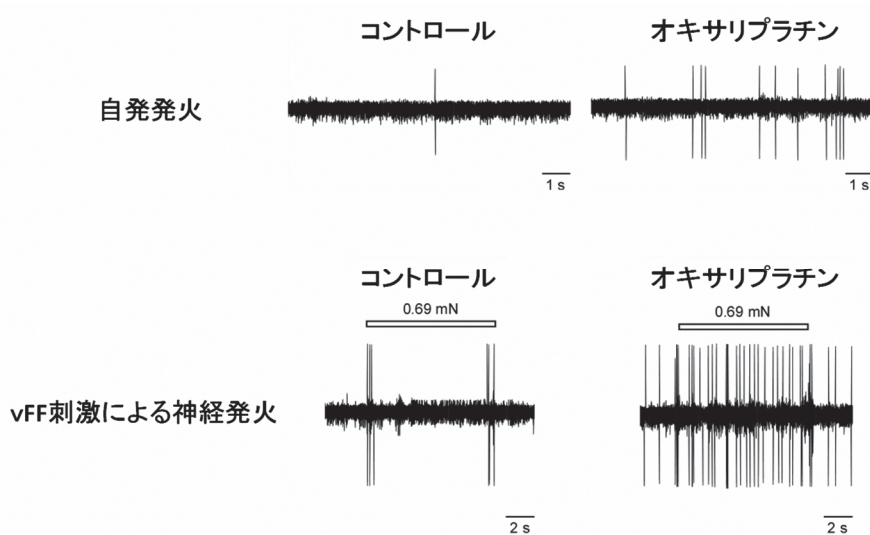


図 2. オキサリプラチン投与マウス脊髄ニューロンの神経活動 オキサリプラチン (3mg/kg) あるいは溶媒を腹腔内注射 10 日後に、自発発火並びに von Frey フィラメント (0.69 mN) 刺激に対する神経活動を記録した。

#### 【考察】

オキサリプラチン投与マウスへのアウクビンの連続投与により、機械的アロディニアの増悪が抑制されることを明らかにしてきた。これまでにパクリタキセル誘発機械的アロディニアに対して、アウクビンの連続投与によりその増悪が抑制されること、その抑制機序の一つに末梢神経、特に有髄神経の髄鞘を形成しているシュワン細胞のパクリタキセルによる小胞体ストレスがアウクビンによって抑制されることが関与することを見出してきた。しかし、オキサリプラチンは、シュワン細胞に対して小胞体ストレスを誘導しないことを初めて見出し、アウクビンによるオキサリプラチン誘発機械的アロディニア抑制作用には、シュワン細胞とは別のターゲットが存在することが考えられた。そこで、脊髄レベルで、痛みに関与するアストロサイトやミクログリアに着目し、オキサリプラチン投与マウス脊髄では、アストロサイトが活性化し、アウクビンの連続投与によりその活性化が抑制されることを明らかにした。そこで、本研究では、オキサリプラチンによるアストロサイト活性化のアウクビンによる抑制作用機序を検討した。

アストロサイトの活性化する因子として、オキサリプラチンやその代謝物の関与をアストロサイト細胞株で検討したところ、これら物質では活性化は認められなかった。従って、生体内因子による活性化が示唆される。オキサリプラチンやその代謝物は、一次求心線維へ作用することが知られている。そこで、一次求心線維から脊髄後角内へ遊離される因子としてサブスタンス P やグルタミン酸によるアストロサイトの活性化を検討した。サブスタンス P は、アストロサイトを活性化する傾向を示したが、顕著なものではなかった。一方、グルタミン酸は明らかにアストロサイトを活性化し、更にアウクビンによりその活性化は抑制された。アウクビンは、中枢移行性が知られており、これまでの結果を勘案すると、オキサリプラチン誘発機械的アロディニアのアウクビンによる抑制作用には、一部脊髄後角のアストロサイトの活性抑制が関与することが示唆される。しかし、今回の研究では、アウクビンによるアストロサイト活性化抑制作用機序の詳細は不明であるため、今後検討していく必要がある。

オキサリプラチン投与マウスの脊髄後角ニューロンの神経活動に対して、自発発火や非侵害刺激に対する応答の増加が認められた。今回は、これら神経活動に対するアウクビンの効果は検討できなかったが、これまでにパクリタキセル投与マウス脊髄後角ニューロンにおいて自発発火や非侵害刺激に対する応答の増加が認められ、アウクビン投与により抑制されることを報告してきた。これらの知見から、オキサリプラチン投与マウスの脊髄後角ニューロンの自発発火や非侵害刺激に対する応答の増加に対してもアウクビンは抑制する可能性がある。脊髄において、その神経活動の活性に、アストロサイトが関与することが知られていることから、アストロサイトのアウクビンによる活性化抑制作用が自発発火や非侵害刺激に対する応答の増加の抑制につながる可能性が考えられる。

今回、抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛以外に糖尿病性末梢神経障害や神経因性疼痛に対して車前子エキス及びアウクビンを含む活性成分の検討はできなかったが、これら病態での疼痛へのアストロサイトの活性化が重要であることが報告されていることから、アウクビンは、更に多くに神経障害性疼痛の制御に寄与すると期待される。

#### 【学会発表】

- 1) 前坂未紀, 當銘一文, 小松かつ子, 歌 大介, 久米利明, 安東嗣修. アウクビンはアストロサイトの活性化を阻害することでオキサリプラチン誘発機械的アロディニアを抑制する. 第 36 回和漢医薬学会学術大会. 富山, 2019
- 2) Huanhuan Y, 當銘一文, 前坂未紀, 安東嗣修, 小松かつ子. Search of anti-allodynic compounds from *Plantaginis Semen* and *Viticis Fructus*. 第 36 回和漢医薬学会学術大会. 富山, 2019
- 3) Maesaka M, Uta D, Kume T, Andoh T. Prophylactic repetitive administration of aucubin attenuates oxaliplatin-induced mechanical allodynia through the inhibition of spinal astrocyte activation. *International*

Workshop on Frontiers in Defensive Survival and Circuit Research, Okazaki, 2020

- 4) 安東嗣修：抗がん薬による末梢神経障害と漢方方剤. 第10回 富山県漢方調剤フォーラム. 富山, 2020 (招待講演)

**【発表論文】**

- 1) Toume K., Hou Z., Yu H., Kato M., Maesaka M., Bai Y., Hanazawa S., Ge Y., Andoh T., Komatsu K. Search of anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen, a crude drug ingredient of Kampo formula “Goshajinkigan”. J. Nat. Med. 73: 761-768 (2019)

**【研究協力者】**

富山大学 薬学部 応用薬理学 前坂 未紀