

財団法人 日中医学協会


2011 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2012 年 3 月 13 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 戴 毅 
所属機関名： 兵庫医療大学
所属部署名： 薬学部 職名： 准教授
所 在 地： 兵庫県神戸市中央区港島 1-3-6
電 話： 078-304-3147 内線：

1. 助成金額：900,000 円

2. 研究テーマ

TRPA1 受容体を標的とする天然薬物成分の探索およびその鎮痛メカニズムの解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 戴 毅	職名：准教授
所属機関名： 兵庫医療大学	部署名：薬学部
中国側研究者氏名： 張 文生	職名：教授
所属機関名： 北京師範大学	部署名：資源学院

4. 当該研究における発表論文等

本研究成果の一部を第 28 回和漢医薬学会学術大会で発表した。

題名：ゴシユクの主成分エボジアミンによる一次知覚ニューロンの活性化

現在、論文発表に向けて執筆中である。

5. 成果の概要

われわれは TRP チャネル受容体ファミリーを標的とする天然薬物成分を探索し、その鎮痛作用機序を解析した。まず中国側研究者に依頼し、鎮痛作用を持つ漢方薬を実験研究の候補として文献的に調査してもらった。次に、中国側が提供した情報に基づき、TRP チャネルタンパクを標的とする天然薬物（生薬エキス）をカルシウムイメージング法を用いてスクリーニングした。結果として鎮痛効果の持つ漢方処方によく使われる呉茱萸及びその構成成分の一次感覚ニューロンに対する刺激効果が確認された。さらに呉茱萸構成成分のエボジアミンとルテカルピンについて、その鎮痛作用機序を詳細に解析した。

【目的】ゴシュユ（呉茱萸）は *Evodia rutaecarpa*（ミカン科）の果実で、有効成分としてエボジアミンおよびルテカルピンが知られている。漢方臨床においては、ゴシュユはその鎮痛効果が期待され、呉茱萸湯、温経湯、当帰四逆加呉茱萸生姜湯など疼痛性疾患を治療する処方に配剤されている。今回、ゴシュユの鎮痛薬理作用を調べるため、一次知覚ニューロンに対するゴシュユエキス、エボジアミンおよびルテカルピンの作用を Ca^{2+} imaging 法および whole-cell patch clamp 法を用いて測定した。

【方法】SD ラット（4 週齢）の脊髄後根神経節（DRG）を採取した後、DRG ニューロンをガラスプレートに播種し $37^{\circ}C$ の CO_2 インキュベータにて培養した。16-24 時間後、ゴシュユおよびその有効成分、カプサイシン、アリルイソチオシアネート、カプサゼピンなどの試料を投与し、細胞内 Ca^{2+} の変化を観察した。またゴシュユの主成分によるカプサイシン惹起電流への影響を調べた。

【結果】ゴシュユエキスの投与により、DRG ニューロンにおける Ca^{2+} の上昇が認められた。また、エボジアミンはゴシュユエキスと同じ効果が観察されたが、ルテカルピンは DRG ニューロンに対する効果が認められなかった。総 DRG ニューロン数の中で、カプサイシン（TRPV1 アゴニスト）、アリルイソチオシアネート（TRPA1 アゴニスト）、エボジアミンに反応した細胞はそれぞれ 52%、23%、38%であった。カプサイシンに反応した細胞のうちエボジアミンに反応したのは 71%、エボジアミンに反応したニューロンのうちカプサイシン陽性は 95%であった。一方アリルイソチオシアネートに反応を示す細胞とエボジアミンに反応を示す細胞は全く別のポピュレーションであることが明らかになった。また、エボジアミンの効果は細胞外 Ca をフリーにすることや、カプサイシン受容体選択的アンタゴニストであるカプサゼピンを投与することによって完全に抑制された。一方、エボジアミンの惹起電流はカプサゼピンによって完全にブロックされたが、エボジアミン存在下ではカプサイシンの惹起電流は増大した。

【考察】以上のことから、DRG ニューロンに対するゴシュユの刺激作用はルテカルピンではなく、エボジアミンであることが示唆された。またカプサゼピンによってエボジアミンの効果が完全にブロックされたことから、エボジアミンはカプサイシンと同じバインディングサイトをシェアし、TRPV1 を活性化させる可能性が示唆された。TRPV1 は、熱およびプロトンにより活性化される一次知覚ニューロンの nociceptor に特異的に発現する受容体で、痛み受容に重要な役割を担っている。カプサイシンは発痛物質である一方、TRPV1 受容体を脱感作させることで鎮痛効果を有することが知られており、ゴシュユの鎮痛薬理作用はその主成分のエボジアミンによる TRPV1 の脱感作が関与するものと考えられる。

【結語】呉茱萸の成分エボジアミンは TRP チャネルに介してその鎮痛効果を示すことが明らかになった。エボジアミンあるいは類似化合物を候補とした新薬開発が期待される。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

本申請に関わる研究においては、北京師範大学の共同研究者らは文献検索、候補薬物の選定、薬物および抽出成分の提供およびデータのディスカッションに、積極的に参加して下さった。中国は漢方医学の発祥地で、漢方薬（天然薬物）を用いた臨床経験の文献は非常に多いので、鎮痛効果を発揮しうる天然薬物の選定段階においては、中国人共同研究者は大きいな役割を果たした。先方の物的および知的資源を利用したからこそ、的確に候補薬物を同定できたと考える。また、豊富な天然薬物資源の確保が不可欠との意味では、天然薬物資源が非常に豊富な中国の研究者との連携で、薬物資源を最大限に確保できたことは、本研究成績の取得には不可欠な要素だったと考える。

天然薬物成分エボジアミンの鎮痛効果とそのメカニズムの解析

戴 毅¹、岩岡恵実子¹、張文生²

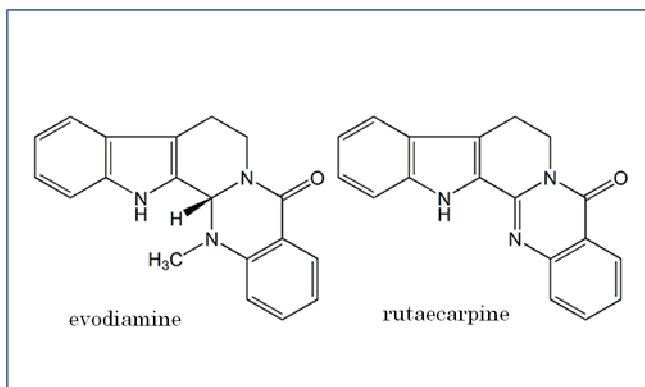
¹兵庫医療大学薬学部、²北京師範大学資源学部

【要旨】： 痛みは日常臨床上最も多い訴えである。我が国では、人口の 13.4% (1700 万人) が何らかの慢性的な痛みを抱えている。一方、慢性疼痛疾患に対する漢方薬治療がその優れた効果により注目され、漢方薬の成分から疼痛治療の新薬開発が期待されてきた。感覚神経終末に発現している TRP (transient receptor potential) ファミリータンパクの TRPV1 や TRPA1 などのチャネル受容体は、慢性・難治性疼痛疾患においてその発現変化、機能調節がダイナミック的に変動し、痛みの発生・維持に重要な役割が示唆されてきた。われわれのこれまでの研究によって、漢方薬を含むある種の天然薬物の鎮痛メカニズムに TRP チャネルの脱感作が関与していることが明らかとなった^{1~3}。本研究は TRPA1 および TRPV1 タンパクを標的とする新たな天然薬物成分をスクリーニングしたうえ、天然薬物成分エボジアミンの鎮痛効果とそのメカニズムを解析した。

Key Words: TRPA1, TRPV1, 疼痛, ゴシユユ, 一次感覚ニューロン

【緒言】 ゴシユユ (呉茱萸) は *Evodia rutaecarpa* (ミカン科) の果実で、有効成分としてエボジアミンおよびルテカルピンが知られている。漢方臨床においては、ゴシユユはその鎮痛効果が期待され、呉茱萸湯、温経湯、当帰四逆加呉茱萸生姜湯など疼痛性疾患を治療する処方に配剤されている。今回、ゴシユユの鎮痛薬理作用を調べるため、一次知覚ニューロンに対するゴシユユエキス、エボジアミンおよびルテカルピンの作用を Ca^{2+} imaging 法および whole-cell patch clamp 法を用いて測定した。

(ゴシユユとその主成分：)



【方法】SD ラット（4 週齢）の脊髄後根神経節（DRG）を採取した後、DRG ニューロンをガラスプレートに播種し 37°C の CO₂ インキュベータにて培養した。16-24 時間後、ゴシュユおよびその有効成分、カプサイシン、アリルイソチオシアネート、カプサゼピンなどの試料を投与し、細胞内 Ca²⁺ の変化を観察した。またゴシュユの主成分によるカプサイシン惹起電流への影響を調べた。

【結果】ゴシュユエキスの投与により、DRG ニューロンにおける Ca²⁺ の上昇が認められた。また、エボジアミンはゴシュユエキスと同じ効果が観察されたが、ルテカルピンは DRG ニューロンに対する効果が認められなかった。総 DRG ニューロン数の中で、カプサイシン（TRPV1 アゴニスト）、アリルイソチオシアネート（TRPA1 アゴニスト）、エボジアミンに反応した細胞はそれぞれ 52%、23%、38%であった。カプサイシンに反応した細胞のうちエボジアミンに反応したのは 71%、エボジアミンに反応したニューロンのうちカプサイシン陽性は 95%であった。一方アリルイソチオシアネートに反応を示す細胞とエボジアミンに反応を示す細胞は全く別のポピュレーションであることが明らかになった。また、エボジアミンの効果は細胞外 Ca をフリーにすることや、カプサイシン受容体選択的のアнтаゴニストであるカプサゼピンを投与することによって完全に抑制された。一方、エボジアミンの惹起電流はカプサゼピンによって完全にブロックされたが、エボジアミン存在下ではカプサイシンの惹起電流は増大した。

Fig.1 エボジアミンの投与による細胞内Ca²⁺濃度変化の一例

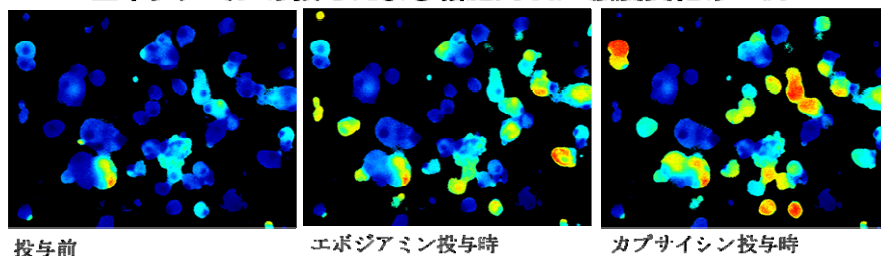
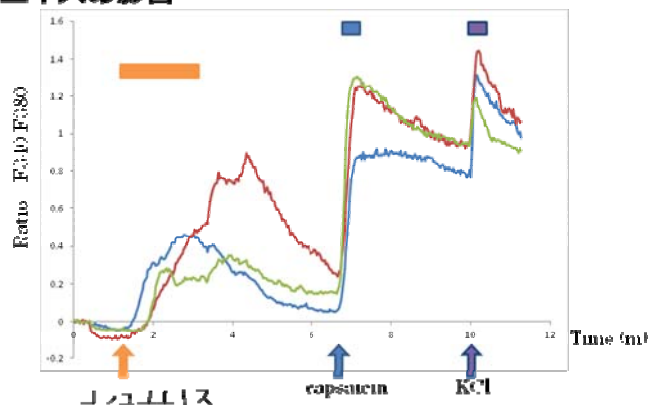
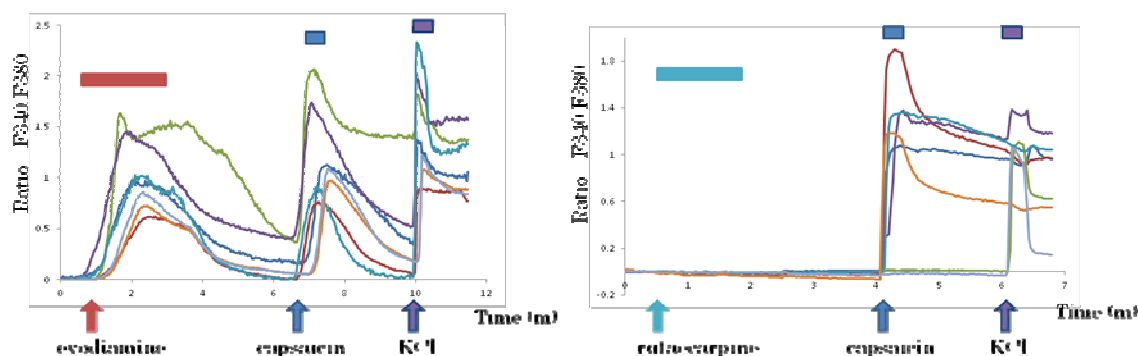


Fig.2 ゴシュユエキスの影響



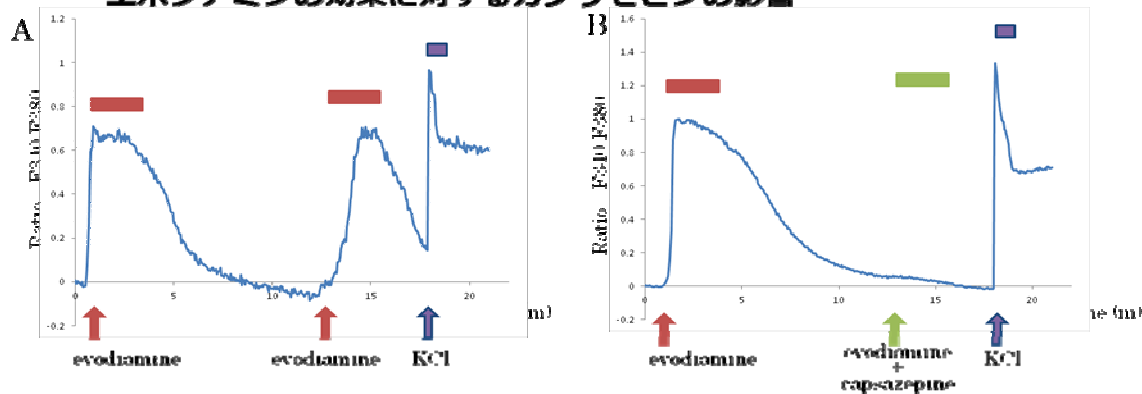
ゴシュユエキスの投与により、DRGニューロンにおけるCa²⁺ の上昇が認められた。

Fig.3 エボジアミンおよびルテカルピンの影響



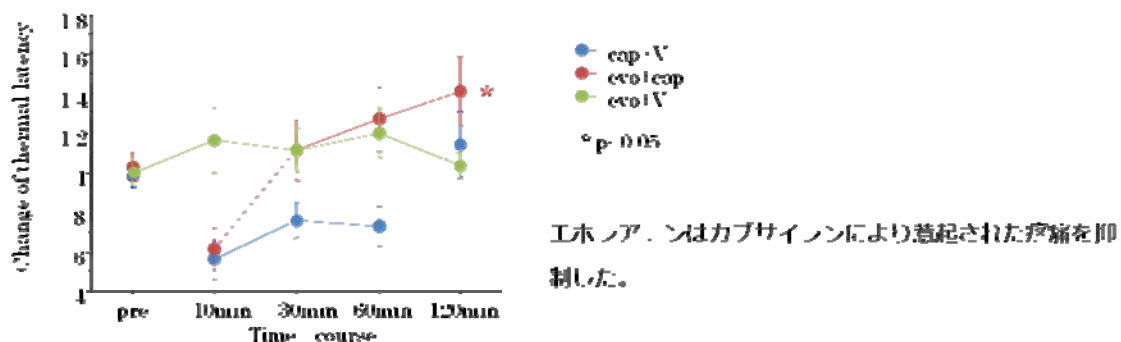
エボジアミンはゴシュユエキスと同じ効果が観察されたが、ルテカルピンはDRGニューロンに対する効果が認められなかった。

Fig.4 エボジアミンの効果に対するカプサゼピンの影響



エボジアミンの効果はカプサイシン受容体選択的アンタゴニストであるカプサゼピンを投与することによって完全に抑制された。

Fig.5 エボジアミンの疼痛行動抑制効果



エボジアミンはカプサイシンにより惹起された疼痛を抑制した。

【考察】以上のことから、DRG ニューロンに対するゴシュユの刺激作用はルテカルピンではなく、エボジアミンであることが示唆された。またカプサゼピンによってエボジアミンの効果が完全にブロックされたことから、エボジアミンはカプサイシンと同じバインディングサイトをシェアし、TRPV1 を活性化させる可能性が示唆された。TRPV1 は、熱およびプロトンにより活性化される一次知覚ニューロンの nociceptor に特異的に発現する受容体で、痛み受容に重要な役割を担っている。カプサイシンは発痛物質である一方、TRPV1 受容体を脱感作させることで鎮痛効果を有することが知られており、ゴシュユの鎮痛薬理作用はその主成分のエボジアミンによる TRPV1 の脱感作が関与するものと考えられる。

【結語】呉茱萸の成分エボジアミンは TRP チャネルに介してその鎮痛効果を示すことが明らかになった。エボジアミンあるいは類似化合物を候補とした新薬開発が期待される。

【参考文献】

1. **Dai Y**, Tomoko Moriyama, Tomohiro Higashi, Kazuya Togashi, Kimiko Kobayashi, Hiroki Yamanaka, Makoto Tominaga, Koichi Noguchi, PAR2-mediated potentiation of TRPV1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain, **J. Neurosci.**, 24, 4293-4299, 2004
2. **Dai Y**, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J Clin Invest.** 117(7):1979-87. 2007
3. Wang S, **Dai Y**, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain.** 131:1241-51. 2008

注：本研究は、2011年8月27日第28回和漢医薬学会学術大会にてポスター発表した。

作成日：2012年3月13日