

温度感受性 TRP チャネルの漢方医薬学的研究

—陰陽証への TRP チャネルの関与—

申請代表者	富永 真琴	岡崎統合バイオサイエンスセンター（生理学研究所）	教授
所外共同研究者	三原 弘	岡崎統合バイオサイエンスセンター（生理学研究所）	特別研究員
所内共同研究者	門脇 真	病態制御部門 消化管生理学分野	教授

■背景・目的

TRP チャネルに属するカプサイシン受容体 TRPV1 はカプサイシン, TRPM8 はメントール, TRPV3 はカンフル, TRPA1 はシンナムアルデヒド及びアリルイソチオシアネートと, 天然物由来の物質によって活性化されることが知られ, 未だ検討されていないが他にも多くの生薬成分で活性化されることが予想される。

漢方医学の基本理論では, 患者を“陰陽”や“虚実”という証で病態を分類し治療方針をたてる。陰陽の“陰証”では, 患者がいかにも顔色が悪く, 寒々しい状態にあることを言い, “陽証”は, 患者の血色がよく, いかにも熱のある状態にあることを言うと言われている。陰証には治療原則は温裏・散寒で代表的処方黄連解毒湯や三黄瀉心湯であり, 陽証には清熱で代表的処方真武湯や人参湯である。低血圧, 貧血, 胃炎, むくみ, 風邪, アレルギー, リウマチ, うつなどの陰証の患者には乾姜, 桂皮, 山椒, 人参, 当帰や附子などを含む漢方薬の「温める処方」が用いられ, 高血圧, 糖尿病, 痛風, 脂肪肝など代謝が亢進している生活習慣病などの陽証の患者には, 黄連, 黄芩, 黄柏, 大黄, 石膏, 芍薬などを含む漢方薬の「冷やす処方」が用いられる。しかしながら, その科学的分子基盤は明らかではない。

そこで, 共同研究グループは昨年度, 和漢医薬学総合研究所の公募型共同研究により和漢薬ライブラリー（局方収載生薬標準化合物及び標準生薬抽出物）を用いて, 新たな TRP チャネル刺激物質の探索を行った。その結果, 数種類の生薬抽出物に活性を見出すことができた。そこで, 引き続き探索研究を行うと共に, その活性化の生理学的意義, 薬理学的意義, そして漢方医薬学的意義を検討することを目的とした。

■結果・考察

(1) 方法

HEK293T 細胞に TRP チャネル遺伝子を強制発現させ, TRP チャネルのカルシウムイオン透過性を利用して Ca^{2+} イメージングを用いて検討した。特に本年度は「温める漢方処方」及び「冷やす漢方処方」及びその構成生薬抽出物及び構成生薬含有化合物の効果を重点的に検討した。

細胞は細胞外液を満たしたチャンバーに用意した。それぞれの試料を $100\mu\text{M}/\text{mL}$ (Cassette1) または $100\mu\text{g}/\text{mL}$ (cassette2) の濃度で調整してチャンバーに投与し, 細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。非特異的応答を除外するためチャンネルを強制発現させていない HEK293T 細胞でも実験を行った。また, 同時に多数の試料を検討できるように, イメージングサイトメーター In Cell Analyzer1000 (GE Healthcare) も使用して検討の効率化を図った。

※ In cell Analyzer の使用

培養細胞用の 96 穴プレートと試薬用の 96 穴プレートを用意した。

今回使用している HEK293 は特に剥がれやすい細胞群を使用しているため、培養細胞用のプレートはコーティング済みのものを使用している。(Falcon pure coat®)

細胞は 15000cells/well 程度に Falcon pure coat® の 96 穴プレートに用意した。

カルシウムイメージング用の fluo4 は洗浄のいらぬ NW (non wash type) のキットを使用した。

(2) 結果

結果は添付表 1～表 5 の通りである。

Cassette 1 のラット TRPV1 (TRPrV1) に対するスクリーニングでは、数多くの新規リガンド候補が見つかった。ヒト TRPV4 (TRPhV4) とマウス TRPM2 (TRPmM2) に対するスクリーニングでは、甘草、厚朴、柴胡が共通する新規リガンド候補として挙げられた。

Cassette 2 のヒト TRPM2 (TRPhM2) とヒト TRPA1 (TRPhA1) に対するスクリーニングでは、多数の新規リガンド候補が見つかった。

Cassette 1 の TRPhA1, マウス TRPmV3 (TRP mV3) およびマウス TRPmM8 (TRPmM8) に対するスクリーニング, Cassette 2 のマウス TRPV3 (TRPmV3) および TRPmM8 に対するスクリーニングでは、新規リガンド候補は見つからなかった。

1) Cassette 1, TRPrV1

多数の新規リガンド候補が見つかった。TRPV1 は 43℃ 以上を活性化温度閾値にもち、カプサイシンのような“辛い”ものをリガンドに多く持つ。今回スクリーニングされたもので温薬は白朮、桂枝、延胡索、五味子、当帰の 5 種類で、澤瀉、山梔子、釣藤鈎、黄柏、大黃などの寒薬も含まれていた。辛い生薬は桂枝と延胡索のみであった。今後さらに patch clamp などでの検討を必要とする。

表1 Cassette 1, TRPrV1

			(ratio/capsaicin1μM)
4	Alisol B	沢瀉	1.855
9	Atractylenolide III	白朮	1.855
12	Baicalin	黄芩	1.744
21	(E)-Cinnamic acid	桂皮	1.34
25	Corydaline	延胡索	1.434
30	Dimethylesculetin	茵陳蒿	0.897
38	Geniposidic acid	山梔子	2.426
39	Gentiopicroside	龍胆	2.209
41	Ginsenoside Rb1	紅参・人参	1.184
46	Glabridin	甘草	2.745
48	Gomisin A	五味子	1.901
49	Gomisin N	五味子	1.847
51	Hirsutine	釣藤鈎	1.694
56	(Z)-Ligustilide	当帰	1.736
57	Limonin	黄柏	0.783
62	Nodakenin	前胡	0.961
63	Osthole	蛇牀子	2.246
65	Paeoniflorin	芍薬・赤芍	1.025
67	Palmatine chloride	黄柏・黄連	0.558
72	Saikosaponin b2	柴胡	1.231
74	Schizandrin	五味子	1.292
75	Sennoside A	大黃	1.057

表2 Cassette 1, TRPhV4

			(ratio/GSK100nM)
46	Glabridin	甘草	0.162
52	Honokiol	厚朴	0.165
59	Magnolol	厚朴	0.324
71	Saikosaponin a	柴胡	0.621

表3 Cassette 1, TRPmM2

			(ratio/Ionomycine 5μM)
26	Curcumin	ウコン	0.246
46	Glabridin	甘草	0.173
52	Honokiol	厚朴	0.303
59	Magnolol	厚朴	0.814
71	Saikosaponin a	柴胡	0.239

表 4 Cassette 2, TRPhM2

	(ratio/Ionomycin5 μ M)
1 茵陳蒿	0.107
2 鬱金	0.107
3 延胡索	0.067
4 黄耆	0.067
8 遠志	0.061
9 菝葜	0.07
10 葛根	0.07
13 甘草	0.056
14 桔梗	0.062
15 菊花	0.054
16 枳実	0.112
17 羌活	0.056
18 杏仁	0.057
24 厚朴	0.06
35 酸棗仁	0.058
73 防已	0.052

表 5 Cassette2, TRPhA1

	(ratio/AITC300 μ M)
1 茵陳蒿	0.296
2 鬱金	0.545
5 黄芩	0.236
7 黄連	0.28
10 葛根	0.219
11 栝楼根	0.36
15 菊花	0.328
18 杏仁	0.368
19 苦參	0.268
21 桂皮	0.484
22 紅參	0.294
24 厚朴	0.534
32 山梔子	0.255
62 桃仁	0.26

2) Cassette 1, TRPhV4, TRPmM2

TRPV4 は 27 ~ 35°C 以上, TRPM2 は 36°C 以上に活性化温度閾値をもち, 比較的温かい温度で活性化する事が知られている。スクリーニングされたサンプルは甘草, 厚朴, 柴胡と共通していた。厚朴は温める生薬だが, 甘草, 柴胡は平薬で寒熱どちらにも属さない生薬であった。

3) Cassette 2, TRPhM2

TRPM2 は温度閾値 36°C 以上と比較的温かい温度に反応する。Cassette2 よりスクリーニングされた生薬のうち, 比較的多くが温薬であった。延胡索, 黄耆, 遠志, 桔梗, 杏仁, 厚朴は温薬である。

4) Cassette 2, TRPhA1

TRPA1 は 17°C 以下に活性化温度閾値をもち, 冷たい温度に活性を持つ。スクリーニングされた生薬のうち, 黄連, 栝楼根, 苦參, 山梔子と比較的多くが寒薬であった。

(3) 考察

今回のスクリーニングでは生薬の気味(寒熱・五味)に注目して行った。この結果はスクリーニングの課程であり, 今後さらに Patch clamp などによる追加検討は必須である。しかしながら, 比較的温薬が TRPM2 を活性化し, 寒薬が TRPA1 を活性化したことにより, 漢方薬の構成生薬の TRP に対する作用を検討することにより, 漢方医学の基本理論である陰陽理論の科学的分子基盤を明らかにすることができる可能性があると考え。今後, 引き続き探索研究を行うと共に, その活性化の生理学的意義, 薬理学的意義, そして漢方医薬学的意義を検討していく予定である。そのためには, 陰陽証の病態モデル, 例えば, 微小循環障害疾患モデル, 知覚神経が関与する糖尿病性自律神経障害モデル, 腹部不定愁訴病態モデルマウスなどを用いて, TRP チャネルの活性化の漢方医薬学的意義を検討する予定である。それにより, 漢方医薬学の科学的検証の進展と漢方理論の科学的理解, さらには漢方薬の使用に対する科学的合理性の構築に貢献できると考える。