

# 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

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）応用薬理学	准教授	安東 嗣修
（同）	助教	歌 大介
富山大学・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
富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）分子医科薬理学	教授	服部 裕一
（同）	助教	大橋 若奈

末梢神経障害性疼痛の中でも抗がん薬によって誘発される末梢神経障害性疼痛の発生は、抗がん薬投与の休薬の指標となっていることに加え、がん患者の QOL の著しい低下にも繋がっている。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。

これまでに、漢方方剤の牛車腎気丸は抗がん薬パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛に有効であること、その漢方方剤の構成生薬の一つである車前子の成分に活性があることを見出してきた。更にその後の研究から車前子成分の一つであるアウクビンが抗がん薬パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛の憎悪を抑制し、一次感覚神経の髄鞘を形成しているシュワン細胞の障害を保護することも明らかにしてきた。更に昨年は、抗がん薬オキサリプラチン誘発の機械的アロディニアもアウクビンが抑制することを見出した。

そこで、本年の研究では、オキサリプラチン誘発の末梢神経障害性疼痛に対するアウクビンの抑制作用機序の解明、アウクビン以外の車前子の有効成分の解析、更には富山県で採取したオオバコの種子（車前子）中のアウクビン含有量の解析を行った。

## 【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）

マウスへ抗がん薬オキサリプラチンを投与すると、疼痛様反応である機械的アロディニアが生じ、アウクビンの連続投与により機械的アロディニアが抑制される。本研究では、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の抑制作用機序に一次感覚神経のシュワン細胞への障害抑制や脊髄後角でのミクログリアの活性が関与しないこと、その一方で、脊髄アストロサイトの活性化制

御が関与することを見出した。従って、アウクビンのオキサリプラチンによる機械的アロディニアの抑制に、脊髄アストロサイトの活性化抑制が関与することが示唆される。

オキサリプラチン投与患者の末梢神経障害の特徴に冷刺激に対する不快異常感覚の増大が認められる。アウクビンは、この冷刺激による不快異常感覚の憎悪を抑制した。この不快異常感覚には温度感受性イオンチャネル TRPM8 が関与しているが、アウクビンはその発現を抑制しなかった。従って、TRPM8 の感受性低下やそのほかの機序が、アウクビンによる冷刺激誘発不快異常感覚の抑制に寄与している可能性が示唆される。

## 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）

車前子中のアウクビン以外の有効成分の探索において、pedicularis-lactone を含む画分で抗アロディニア効果が認められた。しかし、pedicularis-lactone そのものが抗アロディニア効果を示すか不明であった。しかし、車前子から pedicularis-lactone を動物実験で使用できる量を確保することは難しい。そこで、pedicularis-lactone を多く含む生薬を探索し、蔓荊子を見出し、現在成分の分画を進めている。今後、本 pedicularis-lactone を用いて動物実験を行う予定である。

次に車前子エキスの経口投与による血中の車前子エキス由来化合物の検出を行った。アウクビンは血中で検出できたが pedicularis-lactone は検出できなかった。このことから、アウクビンはそのまま生理活性を示し、pedicularis-lactone は代謝物が生理活性を示す可能性を見出した。

アウクビンや pedicularis-lactone を多く含む車前子の探索では、本年は富山県内（富山市池田，富山市杉谷，立山町利田）で採取したオオバコの種子（車前子）を用いてアウクビンや pedicularis-lactone の含有量の解析を行った。その結果、アウクビンは検出されたが pedicularis-lactone はほとんど検出されなかった。その含有量に関しては、文献値と比較すると少なく、今後他の地域のオオバコを採取し、アウクビンや pedicularis-lactone を多く含む種を見出す。

## 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(分子医科薬理学:服部裕一，大橋若奈)

抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛を含む多くの神経障害性疼痛には、脊髄のミクログリアやアストロサイトが重要な役割を担っていることが知られている。研究代表者らのマウスを用いた検討から、オキサリプラチン誘発の末梢神経障害性疼痛に脊髄アストロサイトの活性化が関与することが明らかとなった。そこで、本研究では、アストロサイト活性化へのアウクビンの効果を検討した。オキサリプラチンは、アストロサイトへ作用し、炎症性サイトカインの IL-1 $\beta$  mRNA の発現を増加させたが、

アストロサイトの活性化の指標である GFAP mRNA の発現や他の炎症性サイトカイン (IL-6, TNF $\alpha$ , MCP-1 mRNA) を増加させなかった。オキサリプラチン刺激による IL-1 $\beta$  mRNA 発現増加は、アウクビンによって抑制されなかった。以上の結果から、マウスにおける脊髄アストロサイトの活性化及びアウクビンの効果は、アストロサイトへの直接作用でないことが示めされ、他の細胞及びメディエーターを介していることが示唆される。

# 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

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学） 応用薬理学 准教授 安東 嗣 修  
（同） 助 教 歌 大 介

## 【研究目的】

抗がん薬によるがん化学療法は、がん患者のがん治療に重要である。しかし、患者のQOL（生活の質）を著しく低下させ、さらに投薬中止の措置が取られ、既存に鎮痛薬や鎮痛補助薬ではコントロールが難しい副作用である末梢神経障害（しびれや疼痛などであり、投薬を中止してもその症状は、1年以上続くこともある）が、現在問題となっている。従って、抗がん薬による末梢神経障害のコントロールは、非常に重要であるが、有用な予防・治療学がないのが現状である。そこで、新規治療薬および予防薬の開発が必要となっている。

我々は、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）、更には、その構成生薬の車前子の成分に、抗がん薬パクリタキセル誘発の機械的アロディニア（健常では感じない程度の刺激に対して過敏になっている状態）の憎悪抑制作用を抑制する効果があることを見出した。更に、車前子の成分であるアウクビンにパクリタキセル誘発の機械的アロディニアの憎悪抑制作用があることを明らかにした。また、アウクビンは、末梢神経の有髄神経の髄鞘の形成に関与するシュワン細胞におけるパクリタキセルによって誘発される小胞体ストレスに対して抑制効果することも見出した。

末梢神経障害を誘発代表的な抗がん薬には、パクリタキセルの他に、オキサリプラチン、ビンクリスチン、ボルテゾミブが知られている。昨年、アウクビンの連続投与が、オキサリプラチン誘発の機械的アロディニアの憎悪を抑制し、ビンクリスチンやボルテゾミブ誘発のアロディニアを抑制しないことを見出した。また、オキサリプラチン投与患者の症状の一つに冷たい刺激に対して過敏になっていることが知られていることから、マウスモデルを用いて、冷刺激に対する不快異常感覚へのアウクビンの効果を検討したところ、抑制傾向を示した。

そこで、本研究では、オキサリプラチン誘発機械的アロディニア及び冷刺激誘発不快異常感覚に対するアウクビンの憎悪抑制作用機序の解明を試みた。

## 【研究方法】

### (実験動物)

実験には、雄性 C57BL/6 マウスを使用した。

### (抗がん薬)

オキサリプラチン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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)

アウクビン (50 mg/kg) 和光純薬工業, 大阪) は、生理食塩水に溶解し、抗がん薬投与翌日より 1 日 1 回腹腔内注射した。

### (行動評価)

機械的アロディニアの評価は、マウス後肢足蹠に von Frey フィラメント (0.69mN) を適用し、この機械的刺激に対する後肢の反応を 3 段階のスコア化 (0: 反応なしまたは後肢を横にずらす行動, 1: 後肢の引き上げ行動 (lifting), 2: 後肢の振り動作 (flinching) または刺激部位へのなめ行動 (licking)) し、評価した。冷刺激による不快異常感覚は、マウス後肢足蹠にアセトン塗布し、塗布直後の反応 (評価しない) に続く後肢の反応を 3 段階のスコア化 (0: 反応なしまたは後肢を横にずらす行動, 1: 後肢の引き上げ行動 (lifting), 2: 後肢の振り動作 (flinching) または刺激部位へのなめ行動 (licking)) し、評価した。

### (免疫組織化学的染色)

オキサリプラチン投与 10 日後のマウス脊髄を用いて、蛍光免疫染色を行った。染色には、ミクログリアのマーカーである Iba1 及びアストロサイトのマーカーである GFAP に対する抗体を用いて行った。蛍光組織観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (富山大学生命科学先端研究支援ユニット遺伝子実験施設) を用いて観察した。

### (リアルタイム PCR)

オキサリプラチン投与 3 日後のマウス後根神経節より、常法に従い total RNA を抽出し、cDNA を作製後、以下のプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行った。

プライマー : TRPM8, 5'-ggctggagatgagattgtgag-3' (sense) and 5'-gctgaagtgggtgagaaga-3' (antisense); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 5'-ccaaggtcatcatgacaac-3' (sense) and 5'-ttactccttgaggccacgt-3'

(antisense).

(細胞培養)

シュワン細胞株 (LY-PPB6) 及び結腸癌細胞株 (CMT93) は, 10% FBS 含有 DMEM で培養した。

(細胞障害性試験)

CMT93 細胞における細胞障害性試験は, LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ) を用いて行った。

(ウエスタンブロッティング)

LY-PPB6 における小胞体ストレスマーカーCHOP の発現は, ウエスタンブロッティングにより行った。

## 【結果】

### (1) シュワン細胞へのオキサリプラチン投与における小胞体ストレス

パクリタキセルは, シュワン細胞株 LY-PPB6 細胞に対して, 小胞体ストレスマーカーの CHOP の発現を増加させる。そこで, オキサリプラチンを LY-PPB6 細胞に作用させると, CHOP の発現を誘導しなかった。

### (2) オキサリプラチン投与マウス脊髄後角におけるアストロサイト及びミクログリアの活性化とアウクビンの効果

オキサリプラチンの投与により, 脊髄後角におけるミクログリアの活性化は観察さなかったが, アストロサイトの活性化が観察された。このアストロサイトの活性化は, アウクビンの連投により抑制された。

### (3) オキサリプラチン投与により誘発される冷刺激に対する不快異常感覚へのアウクビンの効果

昨年度, オキサリプラチン投与により誘発される冷刺激に対する不快異常感覚に関して, アウクビンの連続投与が抑制傾向を示したため, 再度検討した。その結果, アウクビンの連続投与は, オキサリプラチン誘発冷不快異常感覚の憎悪を有意に抑制した。

### (4) オキサリプラチン誘発 TRPM8 mRNA 発現誘導へのアウクビンの効果

冷刺激に対して応答する温度感受性イオンチャンネルに TRPM8 がある。これまでにオキサリプラチン投与により、一次感覚神経の細胞体が集合している後根神経節において TRPM8 mRNA の発現が増加することを報告してきた。この増加に対して、アウクビンの連続投与は、オキサリプラチン投与による TRPM8 mRNA 発現増加に影響しなかった。

#### (5) オキサリプラチンによる結腸がん細胞 (CMT93) への細胞毒性へのアウクビンの効果

オキサリプラチンは、大腸がん(結腸, 直腸)に用いられる抗がん薬である。そこで、アウクビンがオキサリプラチンによる結腸がん細胞 (CMT93) への細胞毒性に対して影響があるかどうか検討した。その結果、オキサリプラチン (500  $\mu$ M) 誘発の CMT93 細胞への細胞毒性に対して、アウクビン (25-500  $\mu$ M) は影響しなかった。

### 【考察と今後の展望】

これまでオキサリプラチン誘発機械的アロディニアに対して車前子成分アウクビンが有効であること、その機序にマスト細胞が関与していないことを明らかにした。これまで、パクリタキセル誘発機械的アロディニアに、末梢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障害(小胞体ストレス)が関与すること、このパクリタキセル誘発小胞体ストレスをアウクビンが抑制することを見出だしてきた。そこで、オキサリプラチンがシュワン細胞に小胞体ストレスを誘発するか、そのマーカーである CHOP の発現を指標に調べたところ、オキサリプラチンは CHOP の発現を誘導しなかった。このことから、パクリタキセル誘発機械的アロディニアに、末梢神経のシュワン細胞の障害が関与しないことが示唆される。次に、様々な神経障害性疼痛の発症に関与する脊髄後角のミクログリア並びにアストロサイトに着目し、アウクビンのオキサリプラチン誘発末梢神経障害性機械的アロディニアの抑制作用これら細胞が関与するか検討した。オキサリプラチン投与により、脊髄ミクログリアの活性化は認められなかった。その一方で、アストロサイトの活性化が認められた。アストロサイトの活性化は、活性化ミクログリアからの IL-1 $\beta$  や IL-6 等の炎症性サイトカインが関与するが、オキサリプラチン投与マウスではミクログリアの活性化は認められなかったことから、アストロサイトの活性化にこれらサイトカインの関与は小さいと考えられる。アストロサイト活性化には、ミクログリアの活性化だけでなく一次感覚神経からのサブスタンス P 等の伝達物質の関与も知られている。今後解析は必要であるが、オキサリプラチン投与によるアストロサイトの活性化に一次感覚神経からの伝達物質が関与している可能性が示唆される。本研究では、オキサリプラチン投与によるアストロサイトの活性化が、アウクビンの投与により抑制された。今回、アウクビンによるアストロサイトの活性化抑制作用機序の解明まで行えていないが、アウクビンによるアストロサイトの活性化の抑制や一次感覚神経から遊離される伝達物質及び関連受容体の発現制御等がアストロサイトの活性化抑制作用に

寄与する可能性がある。今後、本仮説を検証する予定である。

オキサリプラチンの末梢神経障害の特徴に冷刺激に対して過敏となる不快異常感覚がある。昨年の研究では、本冷刺激に対する不快異常感覚にアウクビンによる抑制効果が小さいことを報告した。再度本年、アウクビンの効果を検討したところ、コントロール群比べ有意にオキサリプラチン投与マウスにおける冷刺激に対する不快異常感覚をアウクビンが抑制した。昨年との違いは、冷刺激に対する薬効評価の技術の向上と考えられる。ところで、オキサリプラチン投与による冷刺激に対する不快異常感覚の誘発には、温度感受性チャネルの TRPM8 が関与することを我々は報告してきた。一次感覚神経の細胞体が集合する後根神経節において、オキサリプラチン投与により TRPM8 mRNA の発現が増加したが、アウクビンはその発現に影響しなかった。アウクビンが、TRPM8 の発現以外に、TRPM8 の感受性に影響するのか、それとも他のメカニズムが関与するのか、今後明らかにする予定である。

アウクビンを今後、がん患者に使用するにあたり、抗がん薬の抗がん作用に影響しないことが重要である。そこで、オキサリプラチンが主に消化器がんで使用されることから、結腸がん細胞を用いて検討した。アウクビンは、オキサリプラチンによる結腸がん細胞の細胞死に影響しなかった。したがって、アウクビンは、オキサリプラチン投与患者への使用が可能であることが示唆される。

今後、アウクビンによる末梢神経障害の機序の解明並びに、現在進めている車前子抽出画分のアウクビン以外の活性成分の有効性を検討し、さらに、抗がん薬のみならず、他の神経障害性疼痛に有効であるかも検討する予定である。

## 【学会発表】

- 1) 安東嗣修. 不快な異常感覚制御に向けた和漢薬及び活性成分の探索と作用機序の解明並びに臨床利用への展開. 第 35 回和漢医薬学会学術大会; 2018 Sep 1-2; 岐阜 (学術貢献賞受賞講演)
- 2) Maesaka M, Toume K, Komotsu K, Uta D, Kume T, Andoh T. Prophylactic repetitive administration of aucubin attenuates oxaliplatin-induced mechanical allodynia through the inhibition of spinal astrocyte activation. The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa pharmaceutical Network (3rd TAA-Pham Symposium); 2018 Sep 10-12; Toyama
- 3) 前坂未紀, 當銘一文, 小松かつ子, 歌大介, 久米利明, 安東嗣修. Oxaliplatin 誘発末梢神経障害性機械的 allodynia に対する aucubin の効果. 痛み研究会 2018「痛みを中心とする有害状況適応の神経戦略バイオロジー」平成 30 年度生理研研究会; 2018 Dec 13-14; 愛知

## 【受賞】

- 1) 安東 嗣修. 和漢薬学会学術貢献賞. 不快な異常感覚制御に向けた和漢薬及び活性成分の探索と作用機序の解明並びに臨床利用への展開. 第 35 回和漢医薬学会学術大会; 2018 Sep 1-2; 岐阜



### **【企業面談】**

富山県内製薬関連企業 S 社と 2019 年 1 月 29 日に面談を行い，車前子成分の外用剤の開発に関して議論した。

### **【研究協力者】**

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）応用薬理学 前坂 未紀

## I-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

富山大学・和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野 小松 かつ子  
(同) 當 銘 一 文

### 【背景・目的】

抗がん薬によるがん化学療法は、がん疾患における重要な治療法の1つである。しかし、副作用として嘔吐、疼痛、痺れなどの末梢神経障害が生じ大きな問題となっている。抗がん薬による末梢神経障害は比較的高頻度で出現し、その発現や増悪により患者のQOLが著しく低下する。さらに症状が悪化すれば、抗がん薬の減薬や治療中止につながる場合もある。また、この末梢神経障害は、抗がん薬治療の終了後においても継続することが多く、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬による改善が非常に難しいことから、新たな予防・治療法の開発が強く求められている。

10種の生薬により構成される漢方方剤 牛車腎気丸は、主に下肢痛、腰痛、しびれなどのほか排尿障害に適応を有し、糖尿病性末梢神経障害にも用いられている。さらに近年、本方剤は抗がん薬による末梢神経障害の改善を目的として用いられるようになってきた<sup>1</sup>。

これまでに、安東らはマウスへの抗がん薬パクリタキセルの投与により疼痛様反応（機械的アロディニア）が生じることを見出した。また、漢方方剤の牛車腎気丸（1.0 g/kg）の連続投与により本疼痛様反応の発生が抑制されること、牛車腎気丸の構成生薬のうち、車前子及び牛膝が含まれない八味地黄丸（0.1 - 1.0 g/kg）、六味丸（0.1 - 1.0 g/kg）の投与では抑制されないことを明らかにした<sup>2</sup>。この結果より、牛車腎気丸に用いられる車前子及び牛

膝に疼痛様行動を抑制する有効成分が含まれていることが示唆されたため、両者の作用を検討した。その結果、車前子の熱水抽出物（0.03 - 0.3 g/kg）の連続投与は、パクリタキセル誘発機械的アロディ

表1 牛車腎気丸関連方剤と構成生薬

生薬名	牛車腎気丸	八味地黄丸	六味丸
地黄	5 - 8	5	5 - 6
山茱萸	2 - 4	3	3
山薬	2 - 4	3	3
沢瀉	3	3	3
茯苓	3 - 4	3	3
牡丹皮	3	3	3
桂皮	1 - 2	1	
加工附子	0.5 - 1	0.5 - 1	
牛膝	2 - 3		
車前子	2 - 3		
	+	-	-

数字は一日分の量を示す(g)

下段の+は抗アロディニア作用があることを示す。

ニアを抑制する一方で、牛膝の熱水抽出物 (0.03 - 0.3 g/kg) の連続投与では抑制されなかった。この結果より、抗アロディニア作用を有する成分は車前子に含まれていることが示唆された<sup>3</sup>。

車前子はオオバコ *Plantago asiatica* Linné (オオバコ科 Plantaginaceae) の種子を基原とする生薬であり<sup>4</sup>、これまでに成分に関する報告はあるものの、鎮痛作用、神経障害性疼痛の抑制作用に着目した成分の報告はなかった。昨年度までに車前子に含まれる末梢神経障害性疼痛抑制成分を明らかにする目的で、マウスモデルによる抗アロディニア作用を指標として、成分分画を進め、活性画分から 4 種のイリドイド化合物の同定に成功した [aucubin (1), geniposidic acid (2), pedicularis-lactone (3), iridolactone (4)]。このうちイリドイド配糖体である 1 及びイリドイド 3 を主に含む画分は、30 mg/kg 及び 100 mg/mL の経口投与で有意に抗アロディニア作用を示すことを明らかにした。

本研究では上記を踏まえ、3 を効率的に精製し、薬理作用の解析に用いるべく、3 を含む植物材料、生薬材料の探索を行った。また、昨年度までに未解決であった、抗アロディニア作用を示した 3 を主に含む画分中の 3 の含量を定量するとともに、車前子を投与したマウスの血漿中における車前子成分の移行性について解析を行った。

## 【方法】

### 化合物 3 を含む植物材料、生薬材料の探索

生薬「玄参」(中国浙江省産)、「蔓荆子」(中国広西壮族自治区産)は栃本天海堂から購入した。それぞれの抽出は 3 の単離に関する既報を参考に抽出、分画を行った。

玄参：100 g の生薬を、50%MeOH を用い、400 mL、30 分間、超音波処理を行い 3 回抽出した。その後、シリカゲルカラム (ワコーゲル C-300HG) にて酢酸エチル、メタノール、水の混合溶媒にて溶出し画分を得た。

蔓荆子：100 g の生薬を、ヘキサン 400 mL を用い、30 分間、超音波にて脱脂した。その後残渣を MeOH 400 mL にて 30 分間、超音波処理を行い 3 回抽出した。その後、シリカゲルカラム (ワコーゲル C-300HG) にて酢酸エチル、メタノール、水の混合溶媒にて溶出し画分を得た。

それぞれ得られた抽出物、及びシリカゲル分画物について、下記の条件にて LCMS による分析を行った。

### 富山県で採取したオオバコ種子の分析

富山県内の 3 か所 (富山市池田、富山市杉谷、立山町利田) にて採取したオオバコ種子をすり鉢で粉碎し、得られた粉末を熱水中、30 分間抽出した。得られた抽出物を、さらにシリカゲルカラム (ワコーゲル C-300HG) に付し、EtOAc : MeOH : H<sub>2</sub>O 5:1:0.5 ~ MeOH により溶出した画分について LCMS 分析を行った。アウクビンの定量は、標品として市販のアウクビン標準品 (和光) を用い、絶対検量

線法にて行った。ピークの検出は UV 190 nm, ネガティブモードの MS における  $m/z$  391 のシグナルを用いた。

### LCMS 分析条件

LCMS システムは、島津製作所製 Prominence HPLC システム及び LCMS-IT-TOF を用いた。分析条件は以下のとおり。

Column: Develosil C30-UG-5 (5  $\mu$ m, 2.0 $\times$ 150 mm), flow rate: 0.2 mL/min.

Solvent system: A; water with 0.1% formic acid, B; MeCN with 0.1% formic acid,

1% B (0-5min), 1-10% B (5-15 min), 10-35% B (15-25 min), 35-100% B (25-30 min), 100% B (30-40 min), 100-1% B (40-40.5 min), 1% B (40.5-50 min).

Sample injection: 5  $\mu$ L

Detection: 190-400 nm for UV,  $m/z$  150-1000 for MS.

### 蔓荊子における 3 の探索

化合物 3 の単離を目的に、蔓荊子からの成分の探索を行った。既報<sup>5</sup>に従い、粉碎した蔓荊子 700 g をヘキサン (3 L, 3 回, 超音波 30 分) で抽出し, 残渣をさらに, メタノール (3 L, 3 回, 超音波 30 分) で抽出した。得られたメタノール抽出物 8.1 g のうち, 7.3 g をシリカゲルカラム (ワコーゲル C-300HG) に付し, 酢酸エチル, メタノール, 水の混合溶媒で溶出させた。このうち, 3 の存在を LCMS にて確認した画分 (0.38 g, EtOAc : MeOH : H<sub>2</sub>O 20:1:0 ~ 10:1:1 にて溶出) についてさらにシリカゲルカラム (ワコーゲル C-400HG) に付し, クロロホルム, メタノール, 水の混合溶媒で溶出させた。3 の存在を LCMS にて確認した画分 (9 mg, CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O 92:8:0.1 にて溶出) についてさらに ODS オープンカラムにて分画を行った。

### 定量 <sup>1</sup>H NMR

試料及び試薬は, 精密天秤 (ウルトラマイクロ天秤 MSA2.7S, ザルトリウス社製) にて精密に秤量した。定量 NMR 用の DSS [Sodium 3-(Trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3-*d*<sub>6</sub>-sulfonate] を 10 mg 精密に秤量し, 20 mL の NMR 用重水 (D<sub>2</sub>O) に溶解させ内標準液を調製した。秤量した試料を 1 mL の内標準液に溶解させ, NMR 用試料とした。このうち 0.7 mL を NMR 測定管に分注し, 定量 <sup>1</sup>H NMR 用のパルスシーケンス [フリップ角 : 90°, パルス繰り返し時間 : 64 秒 (データ取り込み時間 4 秒), デジタル分解能 : 0.25 Hz, サンプル回転 : 無し, <sup>13</sup>C デカップリング : 有り, 積算回数 : 8 回, 測定温度 : 25°C] で測定を行った。試料は 3 回調製し, それぞれの試料について測定を 1 回行った。3 回の測定値の平均を定量値とした。

## LCMSによる経口投与後の血中車前子由来化合物の解析

栃本天海堂にて購入した車前子(中国江蘇省産) 100 gを800 mLの精製水を用い、2回熱水抽出し、車前子エキスを調製した。車前子エキスは、5%アラビアゴムを用いて懸濁液を調製し、雄性 C57BL/6 マウスに1 g/kgの用量で1日1回、5日間連続して経口投与し、最終投与の1時間後に採血を行った。得られた血液に、等量のヘパリンを加え混合した後、遠心分離を行い、血漿サンプルを得た。

血漿サンプルは以下の前処理を行った。血漿サンプルに0.05%のギ酸を含むメタノール溶液を4倍量添加し、ボルテックスミキサーにて5分間攪拌した。10分静置した後、4°C、10500 rpmで10分間遠心分離を行い、得られた上清をさらにAmicon Ultra (10K)により限外ろ過処理した。得られたろ液は、遠心エバポレーターを用いた減圧濃縮による溶媒留去を行った。最終的に乾燥した試料を超純水50 µLにて溶解し、4°C、10500 rpmで10分間遠心分離を行い、得られた上清をLCMSの試料とした。

### 【結果及び考察】

車前子の抗アロディニア作用成分一つとして昨年度推定した化合物**3**の抗アロディニア作用は、本化合物を主に含む画分を用いて行った動物実験結果であり、精製した化合物を用いての実験ではなかった。本化合物は市販されておらず、正確な薬理作用の解析のためには、精製した**3**を得ることが必須である。そこで、本研究では、**3**を高含量に含む植物材料、生薬材料の探索を行った。文献調査の結果、シオガマグク属植物 *Pedicularis chinensis* (ハマウツボ科 *Orobanchaceae*) の根<sup>6</sup>及び生薬「玄参」の基原であるゴマノハグサ *Scrophularia buergeriana* (ゴマノハグサ科 *Scrophulariaceae*) の根<sup>7</sup>、生薬「蔓荊子」の基原であるハマゴウ *Vitex rotundifolia* (クマツヅラ科 *Vervaceae*) の果実<sup>5</sup>などからの単離の報告があった。

このうち市販の生薬「玄参」及び「蔓荊子」を入手し、その抽出物について**3**の検出をLCMS分析にて試みたが、検出はできなかった。そこで、それぞれの抽出物について、シリカゲルを用い、**3**の分離が可能な条件にてカラム分画を行い、得られた画分についてLCMS分析を行った。その結果、蔓荊子の分画物においてのみ**3**の検出が可能であった。

そこで、市場品の蔓荊子(中国広西壮族自治区産)を用い、**3**の単離を目的に成分の分画を行った。既報<sup>5</sup>に従い、粉碎した蔓荊子をヘキサンにて脱脂し、残渣をメタノールにて抽出した。得られたメタノール抽出物をシリカゲルカラムにより分画し、**3**の存在をLCMSにて確認した画分について、さらにシリカゲルカラムにて分画した。LCMSにて**3**の存在を確認した画分をさらにODSカラムにて分画し、得られたフラクションの<sup>1</sup>H NMRを測定したところ、**3**のシグナルが確認された。しかし、1 mg以下と少なく、まだ不純物を含んでいた。これ以上の分離・精製は困難と考え、スケールアップをして同様の操作を行うべく、10倍量の蔓荊子(7 kg)を用い、化合物の分離・精製を進めている。今後、

分画法を改良するなどして、動物実験に必要な 300 mg 以上の **3** を得て、薬理試験に供する予定である。

### **富山県で採取したオオバコ種子の分析**

車前子の基原植物となるオオバコは、アジア地域に広く分布する。富山県内にも公園や舗装されていない道路脇など、至る所に生育が見られる。そこで、富山県内の 3 か所（富山市池田、富山市杉谷、立山町利田）にて採取したオオバコ (*Plantago asiatica*) 種子の抽出物について、抗アロディニア作用をもつ **1** 及び **3** の分析を行った。今回行った条件では、**3** は検出されなかった。一方で、**1** は、UV 検出による定量では乾燥重量当たり 0.04-0.09%、LCMS による定量では 0.09-0.13% 含まれることがわかった。Wang らは、*Plantago asiatica* の種子に約 0.2%（乾燥重量当たり）含まれることを報告<sup>8</sup>している。今回の実験から、富山県内にて採取したオオバコ中には **1** が含まれることがわかったが、文献報告値と比較すると特別その含量が高いわけではないことが予想された。今後、市販の車前子を購入するとともに、国内の他地域のオオバコ種子を収集し、**1** 及び **3** の含量を調べることを計画している。

### **3 を主要に含む抗アロディニア作用を示す画分の定量 <sup>1</sup>H NMR**

昨年度の実験において、有意な抗アロディニア作用が認められた **3** を主要に含む画分について、定量 <sup>1</sup>H NMR による検討を行った。定量にはピークの分離が良好であった 7 位の水素のシグナルを用いた。予想に反して、この画分中の **3** の含量は 13.4% と低値であった。<sup>1</sup>H NMR においては、本化合物のシグナルが主要であることを確認している。<sup>1</sup>H NMR においては、分子中に水素をもつ化合物は検出されるが、水素を持たない化合物は検出されないため、この画分には、ミネラル成分などの <sup>1</sup>H NMR で検出されない成分が含まれる可能性が考えられた。

### **血漿中の車前子由来化合物の解析**

車前子熱水抽出物をマウスに経口投与（1 g/kg, 1 日 1 回, 5 日間）して得た血漿サンプルにおいては、**1**, **2** が検出された。一方で、**3**, **4** は検出されなかった。

**1** は、化合物単独の腹腔内投与<sup>9</sup> 及び経口投与において抗アロディニア作用を示すことを明らかにしている。本化合物が血中において代謝を受けることなく存在していることは、本化合物の薬理活性及び体内動態に関して有用な知見であると考えられる。

また、抗アロディニア作用を示した **3** を主要に含む画分（FR3）を経口投与（100 mg/kg, 14 日間）したマウスの血漿サンプルにおいては、**3** は検出されなかった。**3** はこれまでの LCMS 分析において、**1**, **2** と比較して検出感度が低いことがわかっている。そのため、**3** を主要に含む画分（FR3）を投与したマウスの血漿サンプルにおいては、**3** が吸収された後、代謝を受けて変化を起こすこと、もしくは

は存在しているものの、今回の実験では検出できていない可能性が考えられた。

## 【結論】

現在有効な対処法がない抗がん剤による末梢神経障害性疼痛の新たな治療法・予防法を見出すことを目的に、これまでに牛車腎気丸の構成生薬である車前子から抗アロディニア作用成分としてイリド化合物 **1** 及び **3** を見出している。**3** は未精製の画分を用いて薬理作用を解析していたため、精製された **3** を得て、薬理活性試験へ供する目的で、**3** を含む生薬の探索を行った。その結果、生薬「蔓荊子」に **3** が含まれていることがわかり、現在その分画を鋭意進めている。車前子投与による血漿の解析においては、車前子熱水抽出物の経口投与により抗アロディニア作用を示す **1** が、血中にそのまま移行することが確認できたが、**3** は確認できず、代謝されている可能性も考えられた。車前子の抗アロディニア作用が **1** のみならず **3** またはその代謝物によるものであることがわかれば、車前子エキスとしての有用性を提示できるものであり、興味深い。

## 【研究協力者】

Yu Huanhuan 富山大学大学院医学薬学教育部(薬学) 博士後期課程2年 (生薬資源科学分野)  
花澤 志帆 富山大学薬学部 5年 (生薬資源科学分野)

## 【参考文献】

1. Yamamoto, T.; Murai, T.; Ueda, M.; Katsuura, M.; Oishi, M.; Miwa, Y.; Okamoto, Y.; Uejima, E.; Taguchi, T.; Noguchi, S.; Kurokawa, N. [Clinical features of paclitaxel-induced peripheral neuropathy and role of Gosya-jinki-gan (article in Japanese: 邦題 Paclitaxel による末梢神経障害の臨床的特徴と牛車腎気丸の役割)]. *Gan To Kagaku Ryoho* **2009**, 36, 89-92.
2. Andoh, T.; Kitamura, R.; Fushimi, H.; Komatsu, K.; Shibahara, N.; Kuraishi, Y. Effects of goshajinkigan, hachimijiogan, and rokumigan on mechanical allodynia induced by Paclitaxel in mice. *J Tradit Complement Med*. **2014**, 4, 293-7.
3. Andoh, T.; Kato, M.; Kitamura, R.; Mizoguchi, S.; Uta, D.; Toume, K.; Komatsu, K.; Kuraishi, Y. Prophylactic administration of an extract from Plantaginis Semen and its major component aucubin inhibits mechanical allodynia caused by paclitaxel in mice. *J Tradit Complement Med*. **2016**, 6, 305-308.
4. Ministry of Health, Labour and Welfare, *The Japanese Pharmacopeia, 17th edn*. **2016**, p 1517.
5. Ono, M.; Ito, Y.; Kubo, S.; Nohara, T. Two new iridoids from *Viticis trifoliae* Fructus (fruit of *Vitex rotundifolia* L.). *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 45, 1094-1096.
6. Li, Y.; Changzeng, W.; Zhongjian, J. Iridoids in roots of *Pedicularis chinensis*. *Phytochemistry* **1995**, 40, 491-494.

7. Lin, S.J.; Tan, C.H.; Jiang, S.H.; Li, Y.M.; Zhu, D.Y. C9-iridoids from *Scrophularia buergeriana*. *Helv Chim Acta* **2006**, *89*, 2789-2793.
8. Wang, D.; Qi, M.; Yang, Q.; Tong, R.; Wang, R.; Bligh, S.W.; Yang, L.; Wang, Z. Comprehensive metabolite profiling of Plantaginis Semen using ultra high performance liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry coupled with elevated energy technique. *J Sep Sci.* **2016**, *39*, 1842-52.
9. Andoh, T.; Uta, D.; Kato, M.; Toume, K.; Komatsu, K.; Kuraishi, Y. Prophylactic Administration of Aucubin Inhibits Paclitaxel-Induced Mechanical Allodynia via the Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress in Peripheral Schwann Cells. *Biol Pharm Bull.* **2017**, *40*, 473-478.

### 【学会発表など】

1. Yu HH, Hou ZY, Toume K, Kato M, Maesaka M, Anhd T, Komatsu K. Discovery of anti-allodynic compounds from the seeds of *Plantago asiatica*, a ingredient of Kampo formula “Goshajinkigan” 2018 Joint seminar between Institute of Natural medicine at University of Toyama and Natural product research Institute at Seoul Natinal University; **2018**, 11, 5; Seoul, Korea.
2. Toume K., Yu H. H., Hou Z. Y., Andoh T., Kato M., Maesaka M., Komatsu K. Exploration of anti-allodynic compounds from the seeds of *Plantago asiatica*, an ingredient of Kampo formula ‘Goshajinkigan’. The 3rd Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network Symposium; **2018**, 9, 10-12; Toyama, Japan.
3. Toume K. Challenge by Kampo medicine (Japanese traditional medicine) for overcoming difficulties in modern medicine: Search for anti-allodynic components from Plantaginis Semen that inhibit paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. 2018 Symposium on traditional medicine and primary healthcare in Toyama and Myanmar; **2018**, 6, 25 ; Toyama.



## I-3 車前子由来物質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

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 分子医科薬理学 教授 服部 裕一  
（同） 助教 大橋 若奈

### 【研究目的】

末梢神経障害は抗がん剤治療に伴う副作用の一つであり、休薬の指標として抗がん剤治療を妨げるのみならず、休薬の後も症状の持続が認められ生活の質をも大きく低下させる要因となっている。緩和と治療薬の開発が求められているものの、有効な治療法に乏しいのが現状である。抗がん剤の一種であるパクリタキセルも末梢神経障害の副作用を持つ。パクリタキセル誘発性末梢神経障害には、マクロファージを介した機構が考えられている。マクロファージの細胞膜上に発現する自然免疫受容体にパクリタキセルはリガンドとして作用し活性化を促し、マクロファージから炎症性サイトカインをはじめとした種々の炎症性メディエーターが産生され、これが末梢神経障害の増悪に寄与しているとの機構である。興味深いことに、マクロファージは末梢組織のみならず中枢にも存在し、これはミクログリアと呼ばれている。モデルマウスを用いた検討から、パクリタキセル誘導性末梢神経障害には中枢系の寄与が示唆されており、中枢においてはパクリタキセルのミクログリアを介した機構が末梢神経障害に関与しうる可能性が浮かび上がる。本研究では、パクリタキセルの神経障害誘導の中枢での機構について解析を実施する。

牛車腎気丸は抗がん剤投与による末梢神経障害の緩和に有効であることが報告されている。この有効性は、牛車腎気丸から車前子と牛膝を除いた八味地黄丸ではほとんど報告されていないことから、末梢神経障害の緩和には、車前子または牛膝由来成分の関与が示唆される。研究代表者の安東らは、車前子には神経障害性疼痛の軽減作用があることを報告し、その有効成分としてアウクビンを同定している。本研究にて、中枢で末梢神経障害誘導応答に対する、車前子由来成分であるアウクビンの効果を明らかにすることを目的として、グリア細胞の炎症応答へのアウクビンの抑制効果について検証を行う。昨年度は、マウス由来ミクログリア細胞株 MG6 細胞を用いた検討から、パクリタキセルがミクログリアに直接作用し、炎症性サイトカイン、一酸化窒素といった炎症性物質の放出を促し炎症応答を誘導することを見出した。すなわち、パクリタキセルはミクログリアからの神経障害性物質の産生誘導を介して神経障害作用を発揮している可能性が示唆された。アウクビンは、パクリタキセルによるミクログリアの炎症応答には影響しなかったことから、アウクビンはミクログリアとは異なる

細胞に作用して、神経障害性疼痛抑制作用を発揮している可能性が浮上した。神経障害性疼痛の発現には、中枢においては、ミクログリアに加えて、アストロサイトが重要な役割を果たしている。そこで、本年度は、アストロサイト介在性の神経障害性疼痛機構におけるアウクビンの寄与について解析を実施した。

## 【方法】

(アストロサイト細胞株)

ヒト由来アストロサイト細胞株 U-251MG 細胞は、医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。10%のウシ胎仔血清を含んだ E-MEM 培地 (051-07615, 富士フィルム和光純薬) にて 37 度 5%二酸化炭素環境下で培養を行った。

(ミクログリア細胞株)

マウス由来ミクログリア細胞株 MG6 細胞は理研 BRC より入手した。10 %のウシ胎仔血清、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のウシインシュリンと 100  $\mu\text{M}$  の 2-メルカプトエタノールを含んだダルベッコ変法イーグル培地にて 37 度 5%二酸化炭素環境下で培養を行い、継代数 20 以下の細胞を実験に用いた。

(試薬)

オキサリプラチン (156-02691, 和光純薬工業) は、DNase, RNase-free 水に溶解し、実験により 10-50  $\mu\text{M}$  の濃度にて投与した。リポポリサッカライド (LPS B55:O5)は、DNase, RNase-free 水に溶解し、100  $\text{ng}/\text{ml}$  の濃度にて投与した。サブスタンス P は、DNase, RNase-free 水に溶解し、10  $\text{nM}$  の濃度にて投与した。車前子由来成分オウクビン (016-10351, 和光純薬工業) は、生理食塩水に溶解し、100  $\mu\text{M}$  の濃度にて投与した。

(qRT-PCR 法による炎症性サイトカイン産生評価)

炎症性サイトカインの測定は、qRT-PCR 法を用いて行った。U251 細胞にパクリタキセル、オキサリプラチン、LPS、サブスタンス P を投与し 24 時間培養した。セパゾール試薬(09379-55、ナカライテスク)を用いて細胞を回収し、RNA を抽出した。cDNA を合成したのち、qPCR 法により GFAP、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、MCP-1、GAPDH の mRNA 量を測定した。細胞へのアウクビン投与は、パクリタキセル投与の 30 分前に実施した。

(MTS 法による細胞障害活性測定)

細胞障害活性は MTS 法により評価した。アウクビンを 1-100  $\mu\text{M}$  の濃度で MG6 細胞と U251MG 細胞に投与し、24 時間培養した。MTS 試薬を添加し 2 時間培養したのち、490nm の波長にて吸光度を

測定した。

## 【結果】

### 1) オキサリプラチンのアストロサイト炎症応答誘導：炎症性サイトカイン産生

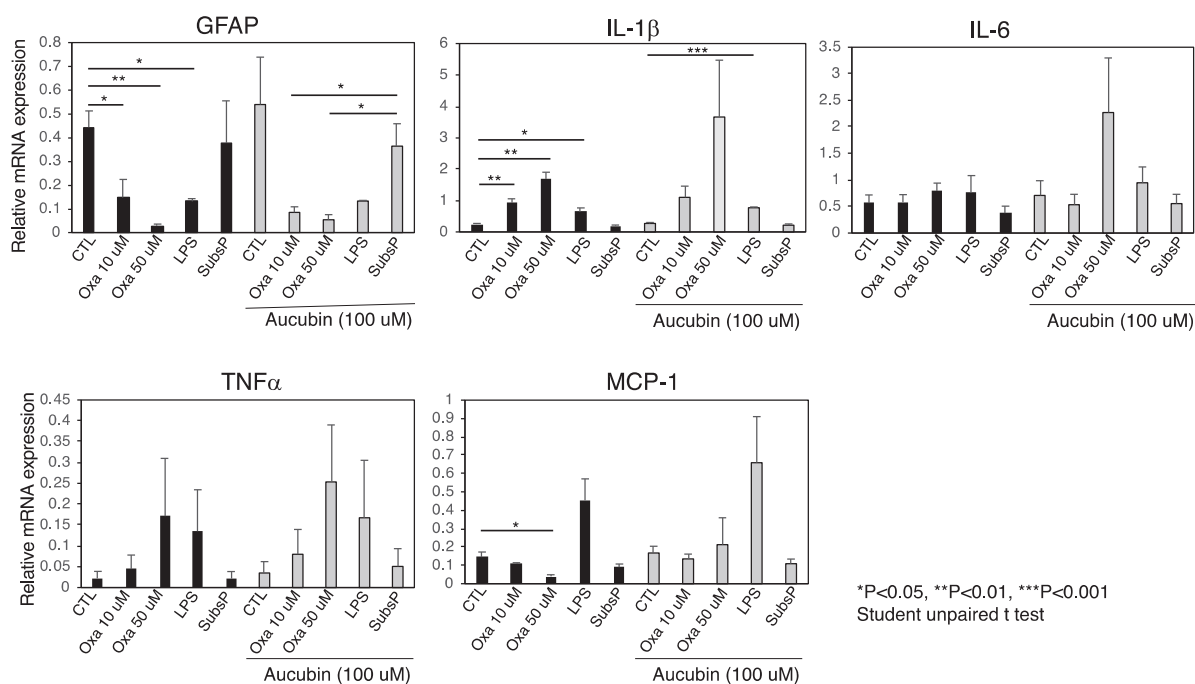
研究代表者の安東らは、オキサリプラチン誘導性の末梢神経障害モデルマウスにおいて、アウクビンはオキサリプラチンによるミクログリア活性化には影響せず、オキサリプラチンによるアストロサイトの活性化を特異的に抑えることを見出している。アウクビンの中枢におけるアストロサイト活性化抑制機構の解析を実施した。アストロサイトがどのような刺激に反応し、炎症応答を惹起するのかを明らかとするため、種々のリガンドによりアストロサイトを刺激し、炎症性サイトカインとアストロサイトの活性化マーカーの変動を指標として炎症応答の解析を行った。まず、末梢神経障害を誘導する抗がん剤のオキサリプラチンに対する応答性を検討した。アストロサイト細胞株 U251 細胞に、オキサリプラチンを 10, 50  $\mu\text{M}$  の濃度で投与し、投与後 24 時間の GFAP と IL-1 $\beta$  と IL-6 と TNF $\alpha$  と MCP-1 の mRNA 量を qPCR 法にて検討した。オキサリプラチンによる刺激は、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  の発現を濃度依存的に顕著に誘導し、IL-6 と TNF $\alpha$  の発現誘導は示さなかった。一方で、MCP-1 の発現は減弱した。次いで、グラム陽性菌の菌体成分である LPS に対する応答性を検証した。LPS による刺激は、オキサリプラチン刺激と同様に、IL-1 $\beta$  の誘導を促した一方で IL-6 は変動せず、TNF $\alpha$  と MCP-1 については、上昇する傾向を認めたものの統計的有意差は示さなかった。神経ペプチドであるサブスタンス P による刺激は IL-1 $\beta$  と IL-6 と TNF $\alpha$  と MCP-1 のいずれのサイトカインについても mRNA の上昇を誘導しなかった。興味深いことに、オキサリプラチンまたは LPS の刺激により IL-1 $\beta$  の発現が上昇するのと相反するように、活性化マーカーである GFAP の発現が低下した (図 1)。

以上より、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトに作用し、IL-1 $\beta$  の産生を介して炎症応答の惹起しうることが示唆された。

### 2) アストロサイト U251 細胞の炎症応答誘導に対するアウクビンの効果

次いで、アウクビンのアストロサイトの炎症応答に対する抑制効果について検証を行った。アストロサイト U251 細胞にアウクビン 100  $\mu\text{M}$  を投与し、30 分後にオキサリプラチンにて刺激し、24 時間後の炎症性サイトカインの mRNA レベルを測定した。その結果、アウクビンはオキサリプラチン投与によって誘導される炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の mRNA 発現に対して顕著な抑制効果を示さなかった (図 1)。更に、アウクビンは、LPS 誘導性の IL-1 $\beta$  mRNA 産生に対しても有意な抑制効果を示さないことが分かった。前項の検討の結果、サブスタンス P による刺激はアストロサイトに有意な変化を示さなかったが、アウクビン存在下でも同様に変化を認めなかった。以上

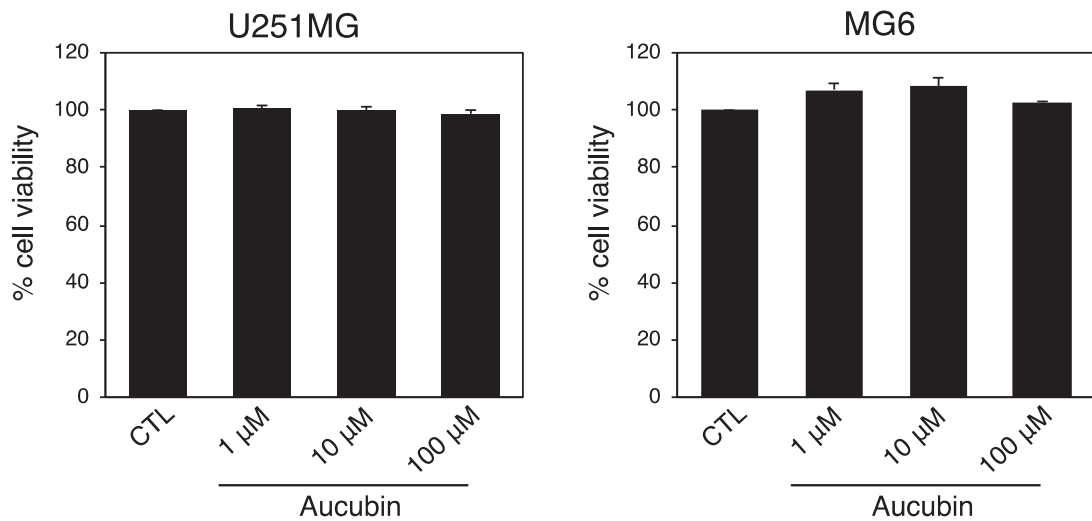
の結果は、アウクピンはオキサリプラチンまたは LPS による応答に直接的な抑制効果は有していないことを示唆する。



(図 1. 種々の刺激によるアストロサイトの炎症性サイトカイン産生誘導とアウクピンの効果。オキサリプラチンまたは LPS の投与により炎症性サイトカインである IL-1β の転写が誘導された。アウクピンはオキサリプラチンまたは LPS 誘導性のサイトカイン産生の抑制効果を示さなかった。)

### 3) アウクピンのミクログリア MG6 細胞とアストロサイト U251 細胞への細胞障害活性の検証

マウスモデルを用いた検証から、アウクピンはオキサリプラチンによって誘発される末梢神経障害およびアストロサイトの活性化を抑制する。このアウクピンの効果は、中枢においてはアストロサイトに対して細胞障害活性を示すことによるか否かについて検証を行った。アウクピンを 1, 10, 100 μM の濃度でアストロサイト U251 細胞に投与し、24 時間培養後の細胞生存率を MTS 試薬にて評価した。その結果、アウクピン投与は MG6 細胞と U251 細胞の生存率を下げることは認められなかった (図 2)。アストロサイトはミクログリアから放出される物質によっても活性化されることから、アウクピンのミクログリア MG6 細胞に対する細胞障害活性を検証した。その結果、アウクピン処理は、MG6 細胞の細胞生存に影響を与えなかった。以上より、検討した濃度域において、アウクピンは MG6 細胞、U251 細胞に対して細胞毒性を示さないことが分かった。



(図 2. アウクビンのミクログリア MG6 細胞とアストロサイト U251 の細胞生存に与える影響。アウクビン 1-100 uM 投与は、細胞生存率を低下させる効果を示さなかった。)

### 【考察と今後の展望】

ヒトアストロサイトマ由来細胞株 U251 細胞を用いた解析により、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトに作用し炎症性サイトカインである IL-1β の転写を誘導することが示された。一方で、代表的な炎症性サイトカインである IL-6 や TNFα の転写の誘導を認めなかった。IL-1β は前駆体として産生され、細胞内タンパク質分解酵素により切断されることにより活性型となり、細胞外へ放出され、機能を発揮することを考慮すると、オキサリプラチンにより活性型 IL-1β の産生と放出も誘導されうるかは今後検討すべき課題である。一方で、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトの活性化マーカーである GFAP の発現を抑制することを見出した。これは、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトを負に制御する能力を有しているのか、または、IL-1β の誘導に伴って生じた現象なのか、の可能性が存在することから注意深く見極める必要があるが、本検討により、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトの機能の制御に関わることを示唆しうるものと考えられる。菌体由来成分である LPS はその受容体である TLR4 を介して、脳内マクロファージであるミクログリアの炎症応答を誘導し種々の中枢性病態と関わっていることが示唆されていることから、LPS は中枢においてミクログリアのみならずアストロサイトにも作用し、中枢疾患病態と関わっている可能性を示している。

アウクビンは、オキサリプラチンまたは LPS による IL-1β の転写の抑制効果を示さなかった。すなわち、アウクビンは、オキサリプラチンのアストロサイトの作用を直接的に抑制するのではなく、別の経路を介してアストロサイトの活性化を抑制することが考えられる。

中枢において、アストロサイトは様々な刺激により活性化する。神経ペプチドであるサブスタンス

P は、一次求心性ニューロンに含まれ、刺激に応じて神経週末のシナプス小胞から放出され、神経伝達物質として機能する。そこで、本検討では、サブスタンス P によるアストロサイトの活性化とその活性化機構へのアウクビンの関与の可能性を考え、検証を行った。本モデルにおいて、サブスタンス P はアストロサイト U251 細胞に対しては炎症性サイトカインの産生誘導能を示さないとの知見が得られた。

アウクビンが直接的にアストロサイトの生存に影響を与えての活性状態の制御が、アウクビンによるアストロサイト活性化の抑制機構として含まれるか否かについての検証を進めた。その結果、アウクビンは検討に用いた濃度域においては、アストロサイトの細胞生存および増殖に影響を及ぼすことは認められなかった。加えて、アウクビンはミクログリア MG6 細胞に対しても同様の効果を示した。すなわち、アウクビンは細胞障害活性とは別の機構によって、アストロサイトの活性を制御していることが考えられる。

本検討により、中枢系においてオキサリプラチンと LPS はアストロサイトの活性を変化させうることが分かった。アストロサイトが活性化に伴い放出する様々なメディエーターは、脊髄後角神経細胞などのニューロンへ作用することを考えると、アストロサイトの活性化を制御する成分は、疼痛制御を担う有望な候補分子へとつながることが期待される。

## 【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部(医学) 分子医科薬理学講座

Sailesh Palikhe