

## 車前子成分を基盤とした抗がん薬誘発末梢神経障害性異常感覚の予防・治療薬シーズの同定

申請代表者	安東 嗣修	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	准教授
所外共同研究者	歌 大介	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	助教
	前坂 未紀	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	学部生
所内共同研究者	小松 かつ子	資源開発研究部門生薬資源科学分野	教授
	當銘 一文	資源開発研究部門生薬資源科学分野	准教授

### ■背景・目的

抗がん薬によるがん化学療法は、がん患者にとって非常に重要な治療法であるが、その副作用が、臨床的に問題となっている。特に、抗がん薬投与によって誘発される痛みやしびれなどの末梢神経障害は、患者の生活の質の低下に加え、抗がん薬治療の休薬の指標ともなっており、がん患者の治療の妨げとなっている。しかし、このような末梢神経障害は、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬等の薬物ではコントロールが難しく、新たな薬物の開発が望まれている。

牛車腎気丸は、十種の生薬（地黄、山薬、山茱萸、茯苓、沢瀉、牡丹皮、桂皮、附子、牛膝、車前子）から構成される漢方方剤であり、抗がん薬投与患者における末梢神経障害に対しての有効性が報告されている。我々は、これまでにパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪が牛車腎気丸の繰り返し投与により抑制されること、また、牛車腎気丸の構成生薬のうち車前子からの抽出エキスにアロディニアの憎悪抑制作用物質が含まれていることを明らかにした。そこで、昨年度、本共同研究において、車前子の熱水抽出物の 20%メタノール溶出画分に抗アロディニア効果を見出した。さらに、本画分を ODS-MPLC により 7 つのフラクションに分け、その内 1 つのフラクションにパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用が見出された。このフラクションを C30-HPLC にて精製し、いくつかの化合物を得た。そのうち 2 種について <sup>1</sup>H-NMR、および高分解能 ESI-MS のスペクトル解析を行い、それぞれ aucubin および geniposidic acid と同定した。そして、この aucubin にパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用があること、その作用機序に末梢神経のシュワン細胞保護による脱髄抑制が関与することを明らかにした。

末梢神経障害を引き起こす抗がん薬は、パクリタキセルだけではない。そこで、本研究では、大腸がん主に用いられ、機械的アロディニアおよび冷ディセスセジア（\*）（冷たい刺激に対して過敏状態）を誘発するオキサリプラチン投与マウスを用いて、アウクビンのこれら不快な異常感覚に対する効果を検討した。また、昨年度、車前子熱水抽出物を用いてメタノール並びに、ODS-MPLC で分画し、活性が確認されたフラクションを C30-HPLC にて精製し、得られた化合物で未解析のもの 2 種について解析を行った。

（\*）ディセスセジア（dysesthesia：不快な異常感覚）

### ■結果・考察

<方法>

使用実験動物：

雄性 c57BL/6 系マウス

疼痛評価（機械的アロディニア）：

von Frey フィラメント（0.69 mN）をマウス後肢足蹠に軽くあて、その時生じる疼痛様反応をスコア化（スコア 0：無反応あるいは後肢の左右への移動、スコア 2：後肢の腹部方向への引き挙げ動作、スコア 3：後肢の振り動作あるいは舐め動作）することにより評価した。

### 疼痛評価（冷ディセスセジア）：

アセトンをマウス後肢足蹠に作用させ、その時生じる疼痛様反応をスコア化（スコア 0：無反応あるいは後肢の左右への移動、スコア 2：後肢の腹部方向への引き挙げ動作、スコア 3：後肢の振り動作あるいは舐め動作）することにより評価した。

### オキサリプラチン誘発性ディセスセジアマウスモデル：

オキサリプラチン（3 mg/kg）をマウスに単回腹腔内注射すると、投与後 10 日目をピークとする機械的アロディニアを生じる。また、投与後 3 日目をピークとする冷ディセスセジアが生じる。

### パクリタキセル誘発性疼痛マウスモデル：

パクリタキセル（5 mg/kg）をマウスに単回腹腔内注射すると、投与後 14 日目をピークとする機械的アロディニアを生じる。

### トルイジンブルー染色：

マウス吻側背部皮膚の凍結切片を用い、0.1%トルイジンブルーで染色した。

### 成分探索：

車前子の熱水抽出物を水に溶解した後、水の 1.5 倍量のメタノールを添加することで 60%メタノール水溶液とし、多糖類の沈殿を生じさせた。その後、遠心分離（4,000rpm, 15 分）により得られた上清をダイヤイオン HP-21 カラムに付し、水-メタノール溶媒を用い、メタノールを 20%ずつ段階的に増加させ溶出した。活性フラクションの分画は ODS-MPLC および、分取 HPLC を用いて行った。

ODS-MPLC では、Biotage MPLC システム（Isolera One）、Biotage SNAP Ultra C18 カラム（120 g,  $\phi$ 42×150 mm）を用い、水とメタノールの混合溶媒（5-100%メタノール）、流速 50 mL/min の条件で分画を行った。溶媒のグラジエント条件は以下の通り [5% MeOH（0-4.3 min）, 5-15% MeOH（4.3-23.7 min）, 30% MeOH（23.7-32.3 min）, 100% MeOH（32.3-39.6 min）]。ピーク検出は 200~400 nm の波長領域で行った。

分取 HPLC は、Waters の分取 HPLC システムを用いた（ポンプ Delta 600, UV 検出器 2489）。C30 カラムは Develosil C30-UG-5（20×250 mm, 20×50 mm のガードカラム追加）を用いた。溶媒 A として 0.1%のギ酸水溶液を、溶媒 B としてアセトニトリルを用い、流速 10 mL/min の条件で分画を行った。溶媒のグラジエント条件は以下の通り [4% B（0-10 min）, 4-30% B（10-32 min）]。ピーク検出は 210 および 257 nm の波長で行った。

### 単離成分の構造解析：

核磁気共鳴（NMR）装置は、日本電子製 JEOL ECX-400 spectrometer または、JEOL ECA500II spectrometer を用い、重水素化溶媒 D<sub>2</sub>O もしくは DMSO-d<sub>6</sub> を用いて測定した。ESI-MS は島津製 LCMS-IT-TOF 質量分析計にて測定した。旋光度は日本分光製 JASCO P2100 デジタル旋光度計を用いて測定した。

## <結果>

### オキサリプラチン誘発ディセスセジアへの aucubin の効果

Aucubin（50 mg/kg）をオキサリプラチン投与翌日より、1 日 1 回腹腔内注射すると、オキサリプラチン誘発機械的アロディニアの憎悪が抑制された。一方、オキサリプラチン誘発冷ディセスセジアは、抑制傾向を示した。

オキサリプラチン投与により、皮膚のマスト細胞の増加並びに脱顆粒が促進される。このことがオキサリプラチン誘発機械的アロディニアの憎悪に関係することを我々は見出している。しかし、aucubin は、オキサリプラチン誘発のマスト細胞の増加並びに脱顆粒には影響しなかった。

### 車前子エキス活性画分中の化合物の同定とパクリタキセル誘発機械的アロディニアに対する効果：

車前子熱水抽出物を各種カラムクロマトグラフィー（ダイヤイオン HP21, ODS カラム）により分画し、C30-HPLC で精製し、4 種の化合物を得た。その内 2 種は、昨年 aucubin と geniposidic acid であること明らかにした。そこで、本年は、残りの 2 種の化合物について解析した。

#### (化合物 1)

ESI-LC/MS において  $m/z$  185.0797 [M+H]<sup>+</sup>, 207.0604 [M+Na]<sup>+</sup>を示したことから分子式を C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> と推定した。<sup>1</sup>H-および <sup>13</sup>C-NMR は pedicularis-lactone **[1]** のものと良い一致を示した。旋光度は、 $[\alpha]_D^{25} +33.4$  (c 0.19,

MeOH)であり, pedicularis-lactone の旋光度  $[\alpha]_D^{15} +45.5$  (c 0.15, MeOH) 【1】と良い一致を示した。そこで, 化合物 1 を pedicularis-lactone と同定した。

### (化合物 2)

ESI-LC/MS において  $m/z$  185.0812  $[M+H]^+$ , 207.0629  $[M+Na]^+$  を示したことから分子式を  $C_9H_{12}O_4$  と推定した。 $^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR は iridolactone 【1】のものと同じ一致を示した。旋光度は,  $[\alpha]_D^{24} -12.8$  (c 0.14, MeOH) であり, iridolactone の旋光度  $[\alpha]_D^{27} -15.3$  (c 0.3, MeOH) 【2】と良い一致を示した。以上より, 化合物 2 を iridolactone と同定した。

### <文献>

- 【1】 Li, Y.; Changzeng, W.; Zhongjian, J., Iridoids in roots of *Pedicularis chinensis*. *Phytochemistry* 1995, 40 (2), 491-494.
- 【2】 Tanaka, H.; Kamikubo, T.; Yoshida, N.; Sakagami, H.; Taniguchi, T.; Ogasawara, K., Enantio- and diastereocontrolled synthesis of (-)-iridolactone and (+)-pedicularis-lactone. *Org. Lett.* 2001, 3 (5), 679-681.

これら化合物を主に含有する画分 3 (pedicularis-lactone が主成分) および画分 4 (iridolactone が主成分) を用いて, 抗アロディニア効果を検討したところ, pedicularis-lactone が主成分である画分 3 でパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪が抑制された。

### <考察>

車前子の成分である aucubin は, パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制する (昨年度の成果)。今回, 本研究において aucubin は, オキサリプラチン誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制することを見出した。これまでに, オキサリプラチン誘発機械的アロディニアの憎悪に, 皮膚内マスト細胞の増加とその脱顆粒が関与することを明らかにしてきた。そこで, aucubin のマスト細胞への影響を検討した。しかし, オキサリプラチンによる皮膚におけるマスト細胞の増加と脱顆粒に対して aucubin は影響しなかった。したがって, aucubin は, マスト細胞に影響しない可能性が示唆される。Aucubin は, パクリタキセル投与による末梢神経の脱髄や髄鞘を形成するシュワン細胞への障害を抑制することを見出してきている。オキサリプラチン投与によっても末梢神経の脱髄が進行することが知られている。したがって, aucubin は, 脱髄の保護を介して機械的アロディニアを抑制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って生じる冷刺激に対する過敏反応 (冷ディセスセジア) は, aucubin によって抑制されなかった。オキサリプラチン投与による冷刺激誘発の過敏反応には, 温度感受性イオンチャネル TRPM8 が関与することを見出している。おそらくアウクビンは, TRPM8 の発現や活性化に影響しなかった可能性がある。

これまでに, aucubin や geniposidic acid を同定し, aucubin がパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制することを見出した。本研究では, さらに車前子の抗アロディニア作用を示す活性成分の分析を行い, pedicularis-lactone および iridolactone を同定した。これら 2 つの成分にはこれまで疼痛抑制に関する報告はない。本研究では, それぞれの成分を主に含有する画分を用いてパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪への作用を検討したところ, pedicularis-lactone 含有の画分でアロディニアの憎悪抑制作用が認められた。今後, pedicularis-lactone 自身による抗アロディニア効果とその疼痛抑制作用機序の検討を行う予定である。

## ■結論

車前子の成分である aucubin は, パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛だけでなく, オキサリプラチン誘発末梢神経障害性疼痛においても有用である。また, aucubin 以外にも pedicularis-lactone が抗アロディニア活性を示す車前子の有効成分である可能性がある。

## ■学会発表

### 学会:

① 當銘一文, 加藤 充, 侯 志艶, 北村 亮, 葛 躍偉, 白 焱晶, 倉石 泰, 安東嗣修, 小松かつ子. 車前子由来パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛を抑制する成分の探索研究. 第35 回和漢医薬学会学術大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.

様式 1-5

種目 (一般研究 I)

- ② 侯 志艶, 當銘一文, 安東嗣修, 小松かつ子. Search on anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen that suppress paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. 日本生薬学会第 64 回年会 ; 2017 Sep 9-10 ; 千葉.

## ■研究協力者

侯 志艶 : 富山大学和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野