



H9c2細胞のK電流に対する芍薬甘草湯の抑制作用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-07-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 菅波, 梓 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000079

福島県立医科大学学位論文

H9c2 細胞の K 電流に対する芍薬甘草湯の抑制作用

Inhibitory effect of Shakuyakukanzoto
on potassium current in H9c2 cells

菅波 梓

福島県立医科大学 大学院 医学研究科

麻酔科学専攻

目次

要旨

1. 著言

2. 方法

- － 1. 細胞培養
- － 2. ホールセルクランプ法
- － 3. 膜容量の測定
- － 4. RNA 干渉法
- － 5. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
- － 6. 試薬
- － 7. 統計処理

3. 結果

- － 1. H9c2 細胞の K 電流
- － 2. 芍薬甘草湯の K 電流に対する作用
- － 3. 芍薬の K 電流に対する作用
- － 4. 甘草の K 電流に対する作用
- － 5. K 電流に対する Kv2.1siRNA の作用
- － 6. ラット骨格筋における Kv2.1mRNA の発現について

4. 考察

5. 図表

6. 文献

謝辞

要旨

芍薬甘草湯（SKT）は、こむらがえりや椎間板ヘルニアなど急激に起こる筋肉の痙攣を伴う疼痛の特効薬としてよく用いられる漢方薬である。しかし、その作用機序はいまだに明らかでない。我々の研究室では、これまで骨格筋に分化するラット心筋由来 H9c2 細胞を用いて、甘草およびその一成分である isoliquiritigenin が potassium (K) 電流を低濃度で抑制することを見出し報告した。芍薬甘草湯は芍薬と甘草が 1 : 1 の割合で混合されている。そこで今回は、ホールセルクランプ法を用いて、H9c2 細胞の ultra-rapid 型電位依存性 K 電流（IKur）に対する芍薬甘草湯の効果について調べた。芍薬甘草湯は H9c2 細胞の K 電流を抑制した。その IC₅₀ 値は約 1.3 mg/ml で Hill 係数は 1.2 であった。この K 電流抑制作用について、芍薬甘草湯、芍薬、甘草ともそれぞれ 10 mg/ml の濃度で比較すると、甘草＞芍薬甘草湯＞芍薬の順に抑制効果が強かった。甘草の主成分であるグリチルリチンについても調べたが、抑制効果は見られなかった。H9c2 細胞の IKur の遺伝子について、RNA 干渉法にて検討したところ、Kv2.1 である可能性が高いことが確認できた。また、RT-PCR 法によりラットの骨格筋に Kv2.1 の mRNA の発現を認めた。

芍薬甘草湯のこむらがえりを改善する機序のひとつとして、骨格筋の K 電流を抑制して、筋線維からの K 流出量を減らし、その間に Na-K ポンプによる K

流入を優位にすることにより、細胞間隙に蓄積した K イオン濃度を減少させ、細胞内外の K 電解質バランスを正常化することが考えられる。

1. 著言

芍薬甘草湯（SKT）は、こむらがえりや椎間板ヘルニアなど急激に起こる筋肉の痙攣を伴う疼痛の特効薬としてよく用いられる漢方薬である（Sumiya et al, 1993, Murakami et al, 2000）。また、慢性維持透析患者はこむらがえりを日常的に発症するが、その治療薬としても知られている（Hyodo and Taira, 2002, 2006 ; Hinoshita and Ogura, 2003）近年、芍薬甘草湯は抗癌薬パクリタキセルの副作用である筋痛や神経痛にも処方され、臨床的にその鎮痛効果が認められている（Hidaka, 2000, 2001, 2009 ; Fujii and Okamoto, 2004）。

木村郁子と木村正康らは、芍薬甘草湯の作用をマウス横隔膜筋標本で調べ、芍薬の一成分である paeoniflorin および甘草の主成分である glycyrrhizin が個々に筋弛緩作用を持つがその効果は弱いこと、それらの2種類の成分を配合すると、より強力な筋弛緩作用が得られることを見出した（Kimura and Kimura, 1982）。しかし、芍薬甘草湯の作用機序の詳細はいまだに明らかでない。

こむらがえりの原因は不明であるが、筋局所の K バランスの異常があると引き起こされやすいことが示唆されている（Sato et al, 2000 ; Hyodo et al, 2006）。運動時に脱水状態に陥ったとき（Kevin and Marcus. 2010）や透析患者（Hyodo et al, 2002 ; 2006）でよく発症することから、細胞内外の K 濃度変化が関与し

ている可能性がある。その治療薬である芍薬甘草湯の効果は速効性であることから、その機序にはイオンチャネルに対する作用の関与が考えられる。

H9c2 細胞 (Kimes and Brandt, 1976) は、ラット新生仔の心筋由来で、心筋にも骨格筋にも分化するため、それらのモデル細胞として用いられている。

H9c2 細胞をホールセルクランプすると、素早く活性化されゆっくり不活性化されるいわゆる ultra-rapid 型の電位依存性 K 電流 (I_{Kur}) が記録される (Suzuki et al, 2005)。この K 電流を通すイオンチャネルの遺伝子は、Kv2.1 と報告されており (Wang and Hino, 2002)、心筋、平滑筋、神経、骨格筋などで発現が確認されている (Imaizumi et al, 1999 ; Campbell et al, 1999)。

以前我々の研究室では、甘草とその一成分である isoliquiritigenin が、H9c2 細胞の K 電流を抑制することを見出した (Noguchi et al, 2009)。芍薬甘草湯は芍薬と甘草が 1 : 1 の割合で混合された漢方薬で、最もよく用いられている漢方薬の一つであるが、その作用機序は不明である。そこで、本研究では、芍薬甘草湯も甘草と同様に H9c2 細胞の K 電流に対して抑制作用を持つかを調べた。もし臨床濃度で芍薬甘草湯が、H9c2 細胞の K 電流を抑制すれば、その効果が骨格筋のこむらがえりに著効する作用機序の一端を担う可能性がある。

2. 方法

2-1. 細胞培養

使用した細胞は、H9c2 細胞（大日本住友製薬、大阪）で、ラットの胎児の心臓から不死化されて確立されたものである (Kimes and Brandt, 1976)。培養は、DMEM 液体培地（低グルコース、和光純薬、大阪）に、10%FBS（ニチレイバイオサイエンス、東京）、ペニシリン G（100 U/ml、萬有製薬、東京）、ストレプトマイシン（100 μ g/ml、明治製薬、東京）を加えて用いた。培養条件は、37℃、10%CO₂、90%空気である。培養用のプラスチックプレートの底に張り付いた細胞は、0.02%トリプシン - EDTA 溶液（37℃）を 5-10 分間作用させて剥離した。遠心後、培養液で再浮遊させ、細胞数を調整し、12 穴プレートに播種して実験に使用した。播種して 4 から 10 日目の細胞を用いた。実験時に、0.2%EDTA-クエン酸 HEPES 緩衝液（pH7.4）で剥離して細胞を使用した。

2-2. ホールセルクランプ法

H9c2 細胞の K 電流をホールセルクランプ法で、デスクトップ型コンピューター（DELL、川崎）に搭載した pCLAMP9 software（Axon 社、Union city、米国）を用いて記録した。電流増幅器は TM-1000（アクト ME、東京）である。

パッチピペットは、外径 2.1 mm、内径 1.5 mm のガラス細管(東京理化学器械株式会社、東京)を用いて、電極製作機(PP-83、成茂、東京)を用いて作成した。このガラス電極に細胞内液を入れたときの電極抵抗が 3-5M Ω になるように、先端の直径を 1.6 μ m 以下にした。

細胞外液はタイロード液を用いた。その組成は(単位は mM) : NaCl 140, KCl 5, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0 , NaHPO₄ 0.33, glucose 5.5, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) 5 (NaOH で pH7.4 に合わせた)。細胞内液は、(mM): KOH 100, Aspartic acid 50, KCl 30, MgCl₂ 3, MgATP 5, BAPTA 10, HEPES 10 (aspartic acid で pH7.2 に合わせた)。

細胞を入れたバスを還流する細胞外液の温度は、恒温槽 (SP-12R, タイテック、神戸) につないだウォータージャケットで 36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C に保つように設定した。

2-3. 膜容量の測定

実験に用いた H9c2 細胞の膜容量を、ホールセルクランプの始めと、終りに測定した。実験の最後のときの膜容量が、実験開始時の値と比較して、10%以上変化があったときは、その記録を除外した。膜容量の平均値 $\pm$ 標準誤差は 120 $\pm$ 16 pF (n=30) であった。

2-4. RNA 干渉法

H9c2 細胞の K 電流が Kv2.1 に由来するかを確かめるために、H9c2 細胞へ 3 種類の Kv2.1 siRNA を導入しノックダウンした。コントロール siRNA および最も効果のあった siRNA を transfection 後、48-72 時間にホールセルクランプ法にて電流を測定した。Transfection を 3 回行った。

2-5. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によるラット骨格筋と H9c2 細胞における Kv2.1mRNA の発現の確認

ラット骨格筋と H9c2 細胞の RNA 抽出には、Acid guanidium thiocyanate phenol chloroform method を用いた。cDNA は、Maloney murine leukaemia virus の RNA をランダムプライマーで逆転写し得た。cDNA は PCR テンプレートを用いて、80 μ l の無菌水で希釈した。DNA 増幅には、10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 125 μ M deoxynucleotide triphosphates, cDNA template (1 μ M), 1 μ M primer mix, 25 units/ml Taq polymerase (Pharmacia, 東京)が含まれた 10 μ l の溶液を用いた。温度サイクル設定は、初期熱変性として 94 度で 2 分間インキュベーションし、94 度で 30 秒間、56 度で 30 秒間、72 度で 2 分間の増幅プログラムを 35 サイクル行った。最終伸長反応

は 72 度で 10 分間とした。今回使用した 15 種類の K チャネルにおけるプライマーのシーケンスは、Table1.に示した通りである (Suzuki et al, 2005)。RT-PCR のコントロールとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)(GenBank accession no.X02231)(493 bp)を用いた。cDNA フラグメントはセンスプライマー(5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAGT-3') およびアンチセンスプライマー (5'-CATACTTGGCAGGTTTCTCC-3')を用いて増幅した。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動した。

2-6. 試薬

芍薬甘草湯 (Paeoniae radix と Glycyrrhizae radix が 1 : 1 で配合された粉末)、芍薬 (Paeoniae radix) (Paeonia lactiflora Pallas, Ranunculaceae の根)、甘草 (Glycyrrhizae radix) (Glycyrrhizae uralensis Fisher, Fabaceae の根と走根の粉末) は、いずれも株式会社ツムラ (東京) から購入した。これらをタイロード液に溶かし、ソニケーション後、濾過し、上清を凍結保存して使用した。Glycyrrhizin (シグマ、東京) は、タイロード液 (室温) に溶かして使用した。

2-7. 統計処理

実験結果はすべて平均±標準偏差として表示した。芍薬甘草湯、芍薬、甘草

の濃度と K 電流抑制効果については、以下の式でフィッティングを行った。

$$I = [(I_{\max} - I_{\min}) / (1 + (IC_{50} / [SKT])^n)] + I_{\min}$$

フィッティングカーブ作成には、図表計算ソフト Origin version 6.1 (OriginLab 社、Northampton、米国) を用いた。IC₅₀ 値は容量反応曲線から得られる、K 電流を 50% 抑制する濃度で、n は Hill 係数である。[SKT] は、芍薬甘草湯の濃度を示す。2 群間の比較には F 検定による分散分析の後に Student's t-test を用いた。Fig. 7 中の (*) は危険率 5% で有意な差があることを示す。

3. 結果

3-1. H9c2 細胞の K 電流

まず、H9c2 細胞の膜電流をホールセルクランプ法で記録した。保持電位を -60mV とし、 -40mV から 100mV まで、 10mV ずつ段階的に大きくなる持続時間 200ms の矩形波脱分極パルス (Fig.1A 内図) を 10 秒おきに連続してかけた。

Fig.1A のインセットに電圧波形を示す。すると、 I_{Kur} (ultra-rapidly activating delayed rectifier K current) の電流波形が得られた (Fig.1A)。この図の、各電圧に対応する電流のピーク値を測ってプロットし、電流電圧曲線を得た (Fig.1B)。Fig.1A および B は本実験条件で得られる H9c2 細胞の典型的な電流とその電流電圧曲線である。

3-2. 芍薬甘草湯の K 電流に対する作用

Fig.1 の条件で -40mV から 100mV まで 15 発の電圧刺激を繰り返すと時間がかかり、電流がランダウンするおそれがある。そこで、実験時間を短縮するために、単一電圧への脱分極刺激を連続的にかけて外向き K 電流を誘発し、それに対する芍薬甘草湯の作用を見ることにした。そのために、保持電位 -60mV から 60mV まで、持続時間が 200ms の単一の電圧パルスを、10 秒おきに連続

してかけた。まず、コントロール電流を記録し、そのあとタイロッド液に溶かした芍薬甘草湯 10 mg/ml を細胞外液として灌流した。そのようにして得た実験結果の典型例が、Fig.2D である。芍薬甘草湯 10 mg/ml は、K 電流を 25.0% に抑制した。3 例の異なる細胞で測定した結果、芍薬甘草湯 10 mg/ml は K 電流を $28.2 \pm 3.1\%$ に抑制した。

そこで、様々な濃度の芍薬甘草湯を K 電流に作用させ、濃度反応曲線を得た。芍薬甘草湯の濃度は、0.3 (Fig.2A), 1 (Fig.2B), 3 (Fig.2C), 10 mg/ml (Fig.2D) である。これらを、各濃度につき 3-4 例の異なる細胞にかけてピーク電流を測定し、電流値の平均 $\pm$ 標準偏差を得た。これをプロットした芍薬甘草湯の濃度反応曲線が Fig.3 である。

芍薬甘草湯は、濃度依存性に H9c2 細胞の K 電流を抑制した。芍薬甘草湯 10 mg/ml が K 電流をほぼ 100% 抑制するとして算出した IC_{50} 値は約 1.3 mg/ml で、Hill 係数は 1.2 であった。

3-3. 芍薬の K 電流に対する作用

芍薬甘草湯は、芍薬と甘草が 1:1 で混合されている。そこで、芍薬のみの K 電流に対する作用を調べた。芍薬をタイロッド液に溶かし、上記と同じ電圧プロトコールを用いて、コントロール電流を測定後、同じ細胞に芍薬を作用させ

た。その代表的な結果を Fig.4 に示す。芍薬は 10 mg/ml の濃度で、K 電流のピーク値を $69.6 \pm 8.0 \%$ (n=3) に抑制した。

3-4. 甘草の K 電流に対する作用

H9c2 細胞の K 電流に対する甘草の抑制作用は、すでに Noguchi ら (2009) が報告している。そこで、その抑制作用を確認するために、甘草のみの K 電流に対する作用を同様のプロトコルを用いて調べた。その代表的な結果を Fig.5 に示す。甘草は 10 mg/ml の濃度で、ピーク電流を $21.5 \pm 18.6 \%$ (n=3) に抑制した。この結果は、Noguchi ら (2009) の結果を確認するものである。即ち、甘草の抑制効果は、芍薬甘草湯 10 mg/ml とほぼ同様であることが分かった。

さらに、甘草のどの成分が K 電流抑制効果を持つのかを検討するため、甘草の主な成分のひとつであるグリチルリチン (glycyrrhizin) の作用について調べた。これまでと同じプロトコルを用いて、グリチルリチン 100 μ M を H9c2 細胞の K 電流に作用させた。代表的な結果を Fig.6 に示す。5 分間作用させたが、グリチルリチン 100 μ M は K 電流を抑制しなかった。

3-5. H9c2 細胞の K 電流に対する Kv2.1siRNA の作用

H9c2 細胞の K 電流は、その形状から IKur(ultla-rapidlly activated slowly

inactivating K current)である。その遺伝子として、これまでの当教室 (Suzuki et al, 2005)や他の研究室 (Wang et al, 2002) からの報告から、Kv2.1 である可能性が示唆されている。そこで、本研究ではそれをさらに確かめるため、RNA 干渉法を用いて、Kv2.1 siRNA を H9c2 細胞に導入し、K 電流の大きさをホールセルクランプで調べた。

用いた 3 種類の siRNA のうち、最も高い効果で Kv2.1 mRNA の発現をノックダウンしたもの (Fig.7A) を H9c2 細胞に導入した。48 時間経過した H9c2 細胞をホールセルクランプした。すると、コントロール siRNA を導入した細胞に比べ、mRNA 発現量が有意に減少していた ($37.5 \pm 7.6 \%$, $n=3$, $p<0.001$) (Fig.7A)。また、K 電流のピーク値も有意に減少していた (コントロール 1.26 ± 0.79 nA, $n=8$; siRNA 0.32 ± 0.24 nA, $n=10$, $p=0.006$) (Fig.7B)。これらのことから、H9c2 細胞の K 電流は、Kv2.1 が責任遺伝子であることが強く示唆された。

3-6. 骨格筋の Kv2.1mRNA の発現について

ラットの骨格筋を用いて、Kv2.1 の遺伝子を発現しているかを RT-PCR 法で調べた。Fig.8 に示すように、ラットの骨格筋には、Kv 1.1, Kv 1.3, Kv 2.1, Kv 3.1, Kv 3.4, Kv 4.3 の mRNA が発現していた。このことから、ラットの骨格筋には、

Kv2.1 が発現していることが確認できた。

4. 考察

今回の実験から、芍薬甘草湯は濃度依存的に H9c2 細胞の K チャネルを抑制することがわかった。その IC_{50} 値は約 1.3 mg/ml で Hill 係数は 1.2 であった。芍薬甘草湯の投与量は、1 日 7.5g でそれを 2 から 3 回に分割して経口服用する。もし 1 回分の服用量 7.5 g を、体重 60kg の人が服用するとすれば、循環血液量を体重の 7% として 4.2 リットルとし、服用した芍薬甘草湯が全部血液に均等に分布すると仮定すると、7.5g/4.2 リットルは、約 1.8mg/ml となる。(多成分から構成される漢方薬は腸内細菌で分解されて吸収される成分も少なくないことから、この計算は無謀かもしれないが、だいたいの目安にはなろう。) 従って IC_{50} 値の約 1.3mg/ml は、臨床的に有効な範囲内の数値と言える。

H9c2 細胞の K チャネルに対する抑制作用を、芍薬甘草湯のみならず、その 2 つの構成成分である芍薬と甘草それぞれについても、10 mg/ml で調べたところ、甘草は K 電流をコントロールの $21.5 \pm 18.65\%$ ($n=3$) に、芍薬甘草湯は $28.2 \pm 3.1\%$ に、芍薬は $69.6 \pm 8.9\%$ ($n=3$) に抑制することがわかった。即ち、K 電流抑制作用の効力は、甘草 > 芍薬甘草湯 > 芍薬の順である。この順序は、in vivo のラットの試験で報告された結果と一致する。Lee ら (2013) は、麻酔下でラットの脛骨神経を頻回電気刺激して、腓腹筋にテタヌスを起こし、その筋の張力を測定

した。実験の 1 時間前にラットの十二指腸に芍薬甘草湯、芍薬、甘草（0.5,1,または 2 g/kg）を投与すると、芍薬甘草湯と甘草では、テタヌスが解除されたが芍薬にはその効果がなかった。即ち、テタヌスを解除する効力は、甘草＞芍薬甘草湯＞芍薬の順であった。

我々は本実験で、IKur 遺伝子の Kv2.1 の mRNA を調べたところ、H9c2 細胞のみならず、ラットの骨格筋にも発現していることを見出した (Fig.8)。また、H9c2 細胞に Kv2.1 の siRNA を導入すると IKur は有意に小さくなった。このことから、本研究で芍薬甘草湯が抑制した K 電流は Kv2.1 である可能性が高く、この K チャネルは骨格筋でも機能していると考えられる。そこで、骨格筋におけるこの K 電流に対する芍薬甘草湯による抑制の病態生理学的意義を考えた (Fig.9)。

芍薬甘草湯は骨格筋の K チャネルを抑制する。すると、K イオンの貯蔵庫である骨格筋の細胞内から細胞外への K 流出を抑制する。電気生理学的に、こむら返りを起こしている筋線維はテタヌス状態 (Somlyo et al, 1981) にあり、その膜電位は、脱分極していると考えられる。脱分極している筋線維膜では、K チャネルは開口している。芍薬甘草湯はその K チャネルの開口を抑制する。すると、筋線維からの K 流出が抑えられる。一方で、Na-K ポンプは K を細胞内へ流入させる。これにより、筋線維の外側の局所で高濃度になっていた K イオンの濃度は低下し、正常の K イオンの細胞内外のバランスを取り戻すと考えられる。K チャネルと

Na-K ポンプの両者の働きにより、相対的に細胞外の K 濃度は低下し、正常へ近づく。K 電解質バランスが正常化することにより、骨格筋の脱分極が回避され、異常な筋収縮が緩和すると考えられる。

芍薬甘草湯を内服すると、骨格筋の中でも過収縮しているものだけを脱分極させ、正常骨格筋の筋収縮は保たれる。過剰収縮が局所的な K イオンの高濃度化により引き起こされたか、あるいは逆に、テタヌスによる脱分極により K チャネルが開口し、その結果筋繊維外局所に K イオンの蓄積が起きたとすれば、芍薬甘草湯により K チャネルが抑制されれば、上記のように Na - K ポンプにより K イオンの筋内への流入により局所の K 濃度は低下する。しかし、芍薬甘草湯の作用機序はそれだけではなく、それ以外に過剰収縮により筋線維の分子機構に何らかの変化が即効性に起こり、芍薬甘草湯はそれを速やかに抑制して、筋収縮を正常化する可能性もある。

漢方薬は数多くの成分を含み、その個々の成分による効果に加え、配合による相乗効果など、複雑な要因を持つことから、漢方薬の作用機序の解明はいまだ困難が多い。しかし、芍薬甘草湯がこむらがえりやその他の筋肉痛の治療薬として長年使用されている理由の背景として、いくつかの機序が明らかになってきている。

Kimura らは、芍薬甘草湯の鎮痙効果の機序のひとつとして、芍薬の主成分

paeoniflorin および甘草の主成分グリチルリチンの共存が神経筋接合部における脱分極性遮断作用をもたらすと報告している (Kimura, 1992)。また Jin らは、芍薬の主成分ペオニフロリンは、末梢血管を拡張させ、末梢血流の改善効果があり (Jin SN et al, 2012)、虚血を伴う筋硬直の疼痛改善につながる可能性を示している。Endo らは、芍薬甘草湯の芍薬および甘草の配合比率についてマウスの腸管運動抑制作用で検討した (Endo and Oikawa, 2007)。芍薬甘草湯内の芍薬の割合を 100%、75%、50%、25%、0% の 5 通りで実験を行った。すると、芍薬 50%、甘草 50% で構成される芍薬甘草湯が腸管運動を最も有意に抑制し、アトロピンと同等の腸管運動抑制効果があることが明らかとなった。これにより芍薬甘草湯は芍薬と甘草の 1 : 1 の配合比率が薬理学的に最適であることが示された。

今回の我々の研究から、芍薬甘草湯が骨格筋に発現する Kv2.1 に由来する K 電流を抑制することが明らかになった。芍薬甘草湯がこむらがえりによる筋硬縮を解除する薬理学的機序のひとつとして、骨格筋の K 電流を抑制することにより、筋線維からの K 流出量を減らし、その間に Na-K ポンプによる K 流入を優位にすることで、細胞間隙に蓄積した K イオン濃度を減少させ、細胞内外の K 電解質バランスを正常化する可能性がある。

不思議なことに、同じ横紋筋でありながら、芍薬甘草湯は骨格筋の過剰収縮は

抑制するが、心筋には作用がない。今後さらに骨格筋のテタヌスや平滑筋の収縮に伴う痛みに関与する分子機構を解明し、芍薬甘草湯が効く分子メカニズムを明らかにする必要がある。

K ⁺ channel subunit	Fragment size(bp)	Sense and antisense	Location
Kv1.1	326	GTACACCTCTGAACCTTCTGG	86 – 106
		AGAGTCTTGAGCTGCGTCTC	392 – 411
Kv1.2	673	CATTTTGTACTACTACCAGTCTGGGG	311 – 336
		GGAGTGTCTGGACAACCTTGAAAATCC	958 – 983
Kv1.3	335	TCGAGACACAGCTCAAGAC	201 – 219
		GTATTCGAAGAGCAGCCA	518 – 535
Kv1.4	271	TCTCTTACAACCTGGAACCAGC	40 – 60
		TGAGGATCATGGGAGGAGT	292 – 310
Kv1.5	267	GAGGTTTTTCCCGCTGCCTGG	1850 – 1870
		TCCAGGGGGCACCAGGGAGAT	2097 – 2116
Kv1.6	505	GAGAAATCCCTGACGCTG	440 – 457
		GCCCAGAACTCTCCGGATA	926 – 944
Kv2.1	616	ACAACGAGTACTTCTTCGACC	248 – 268
		CTCTTGTTGGATTCTGTGAGG	843 – 863
Kv2.2	584	AGTCCTGTGGAGAACTCTG	467 – 485
		CAATGCACACAGCCTCTAC	1032 – 1050
Kv3.1	469	CTCTTCTTCATCCTGGTCTC	1750 – 1769
		CCAGGAAGATGATAAGCAGC	2199 – 2218
Kv3.2	357	TGTGGTGACCATGACTACCT	1329 – 1348
		GGCTCACTTCCTGTACTGTC	1666 – 1685
Kv3.3	320	TCTTCGCCTACGTGCTCAAC	784 – 803
		CGCGTCCTGAAAACACAGAC	1084 – 1103
Kv3.4	450	GGCCTTCAACATTGACCGAA	465 – 484
		ATCATGGTGGCGAAGATGAG	895 – 914
Kv4.1	467	CGGACAAATGCTGTGCGTTAG	1386 – 1407
		TAGGGGAGGAAGGTTGAGTTTCAT	1829 – 1852
Kv4.2	522	ACCCCTGATCACTCTTG TGAC	515 – 535
		AGAGCACTCTCTCCTGTATTGT	1015 – 1036
Kv4.3	270	CTCCCTCAGCTTCGCCAGACC	541 – 562
		CTGCTGGGTGCCGCGAAGAGTC	789 – 810

Table 1. RT-PCR に用いた K チャネルのプライマーの塩基配列 (Suzuki et al, 2005)

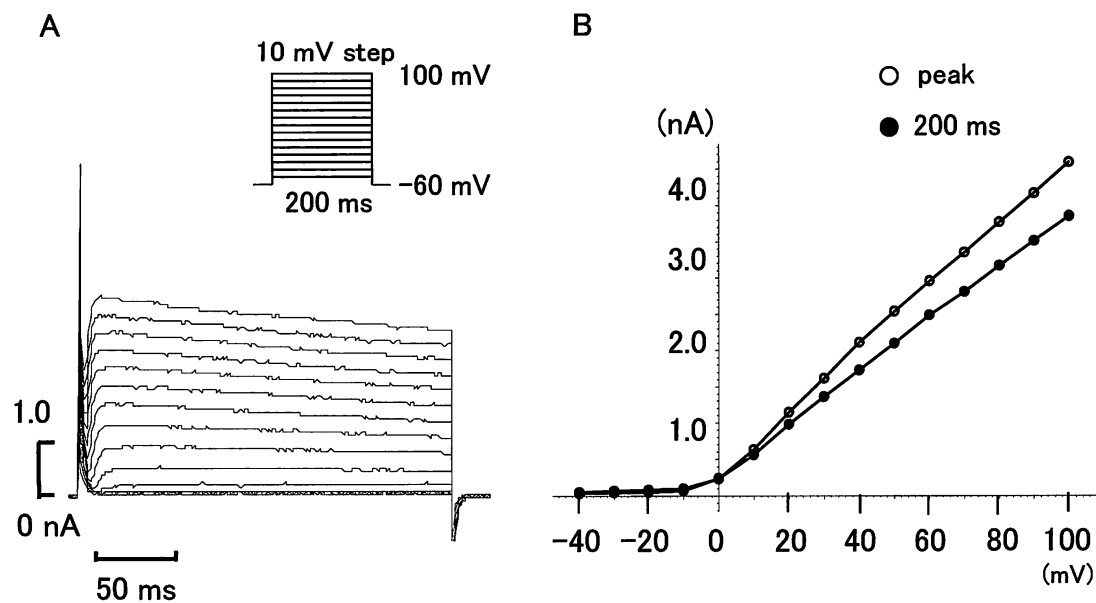


Fig.1 H9c2 細胞の典型的な膜電流 (A) とその電流電圧曲線 (B)

A: ホールセルクランプで得た H9c2 細胞の膜電流の代表例。インセットに一連の電圧パルスを重ねて示す。保持電位 -60 mV として、そこから、-40 mV から 100 mV までの各電位へ 10 mV ステップで、持続時間 200 ms の矩形波パルスを 10 秒おきにかけた。これにより得られた典型的なホールセル膜電流を重ねて示す。

B: 電流の peak (○) および 200 ms (●) での電流値を各電位で測定してプロットした電流電圧曲線。

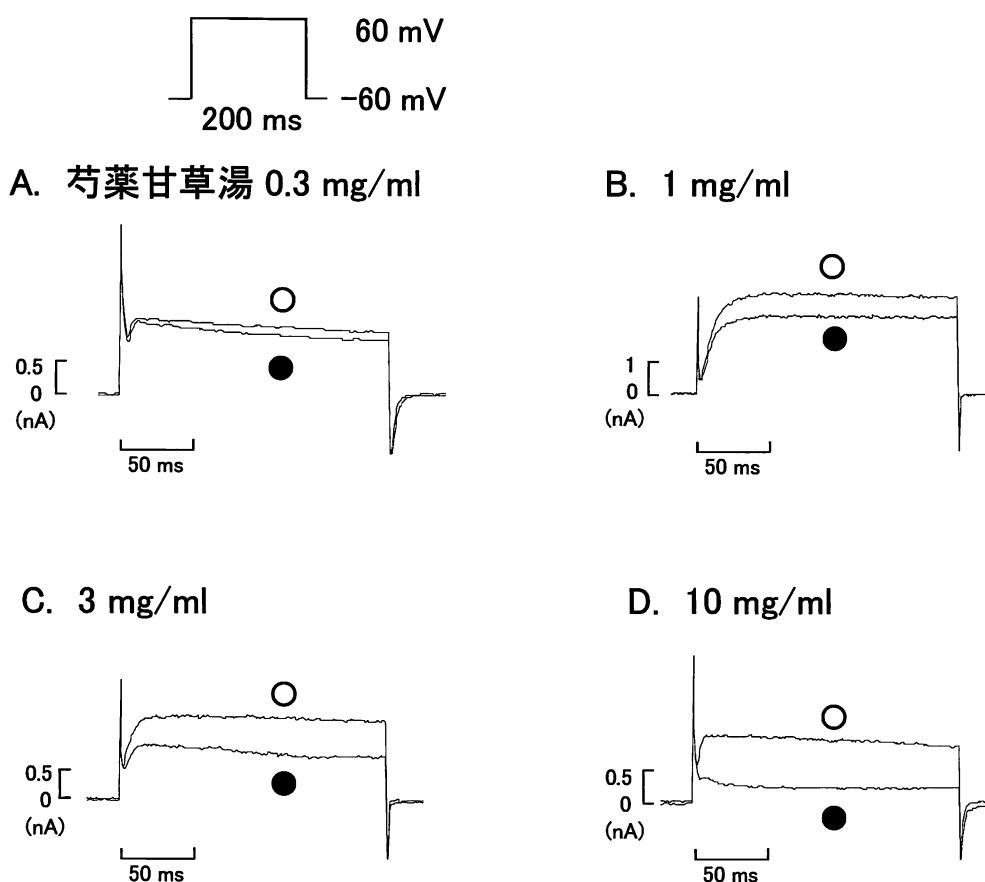


Fig.2 芍薬甘草湯の H9c2 細胞の K 電流に対する抑制作用

図上に電圧パルスを示す。保持電位の-60 mV から 60 mV まで持続時間 200 ms の単一の矩形波パルスを 10 秒おきに連続してかけた。コントロール電流を記録した後、芍薬甘草湯 (0.3 mg/ml (A)、1 mg/ml (B)、3 mg/ml (C)、10 mg/ml (D)) のそれぞれの濃度を細胞外液に還流した。その後、芍薬甘草湯の抑制効果が定常状態になったとき、芍薬甘草湯の存在下の電流 (●) を記録しコントロール電流 (○) と重ねた。A-D はそれぞれ異なる細胞。

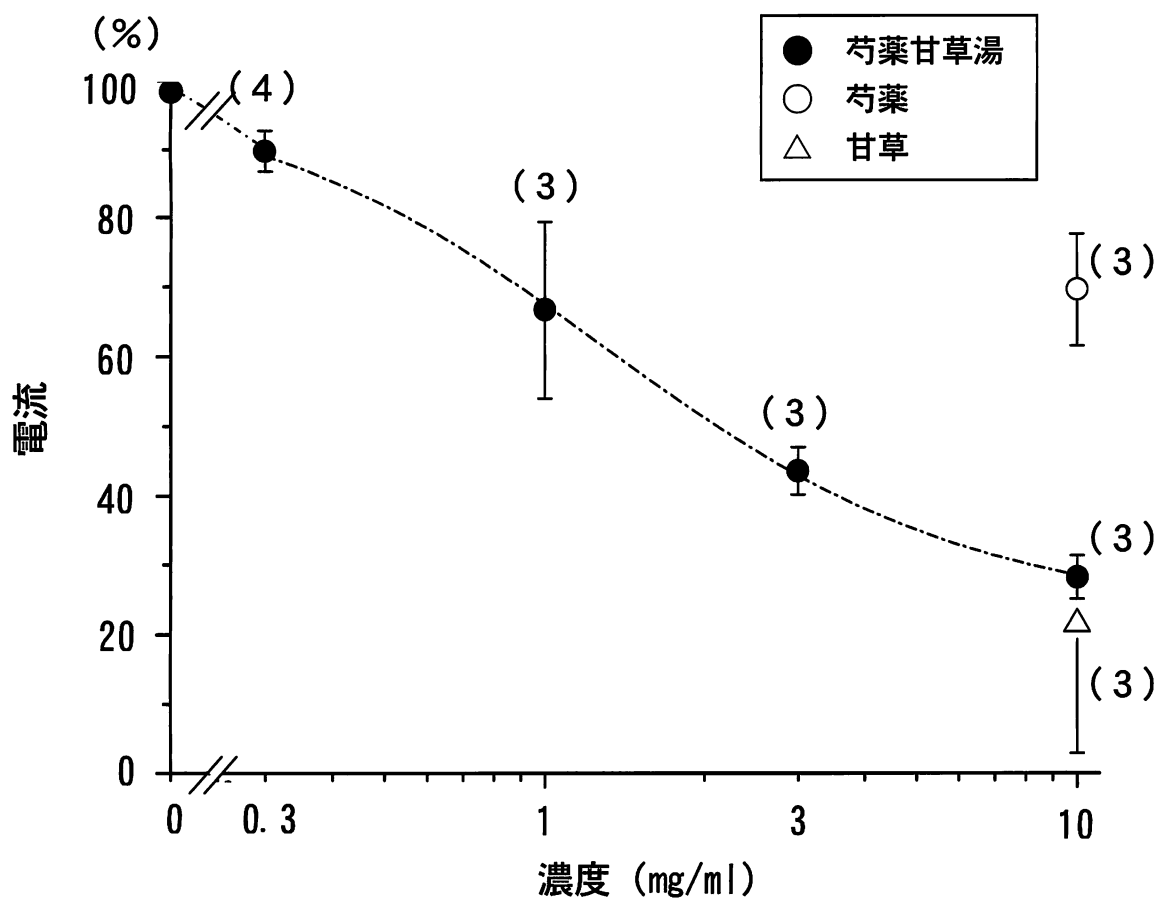


Fig.3 芍薬甘草湯 (●) の濃度反応曲線

Fig.2 A-D に代表例を示した実験で得た電流のピーク値を測定して作成した。芍薬 (10 mg/ml) (○) および甘草 (10 mg/ml) (△) による抑制効果の値もプロットした。データは平均±SD 値。() に示した数は細胞数。芍薬甘草湯の IC_{50} 値は約 1.3 mg/ml。Hill 係数は 1.2。

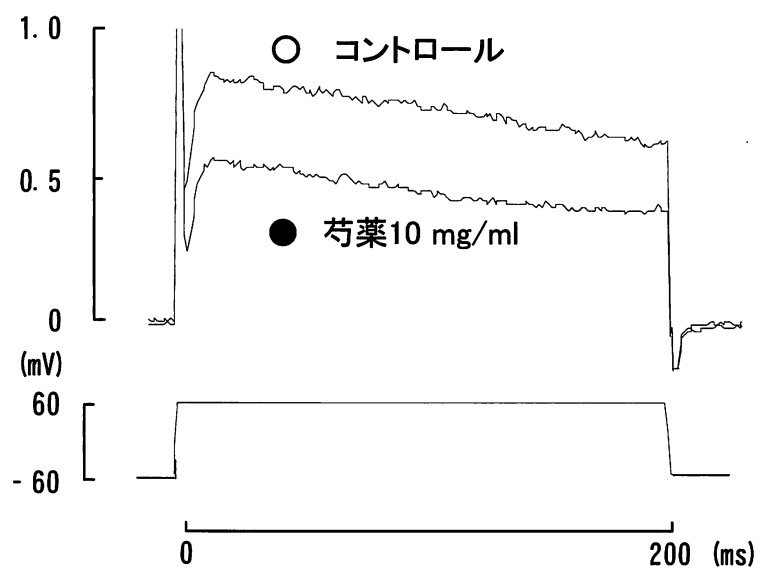


Fig.4 芍薬の H9c2 細胞の K 電流に対する抑制作用
コントロール電流 (○) を記録後、芍薬 (10 mg/ml) を作用させ、約 5 分後、
定常状態になったときに記録した電流 (●)。

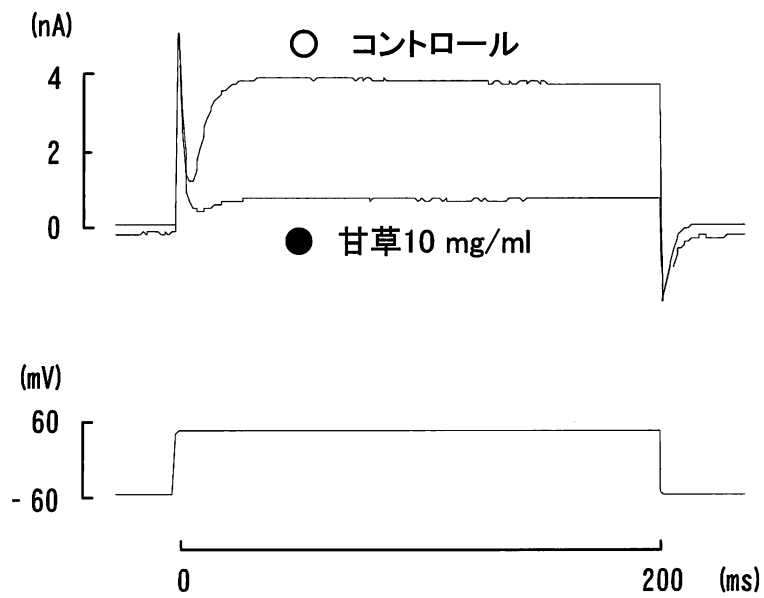


Fig.5 甘草の H9c2 細胞の K 電流に対する抑制作用
コントロール電流 (○) を記録後、甘草 (10 mg/ml) を作用させ、約 5 分後、
定常状態になった電流 (●)。

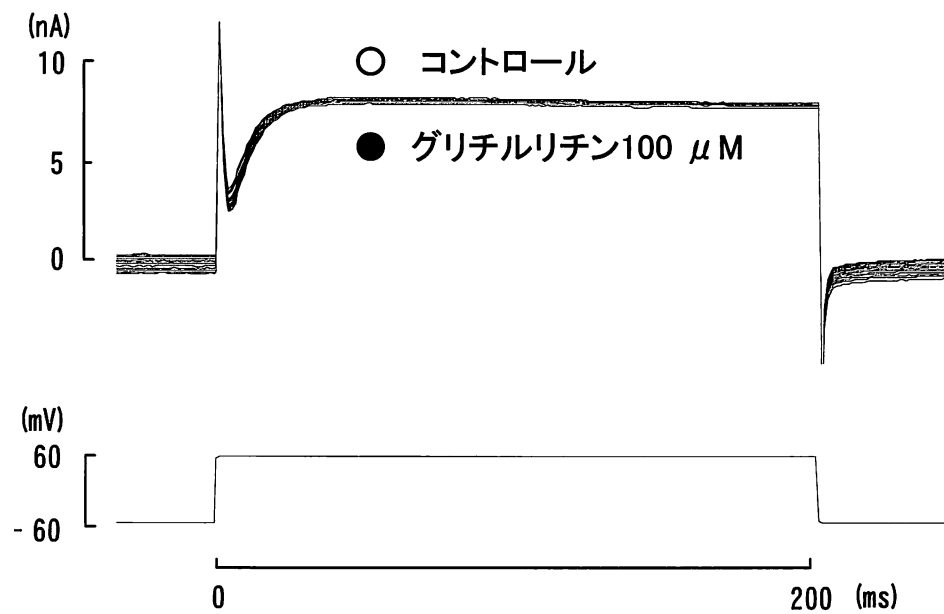


Fig.6 グリチルリチンの H9c2 細胞の K 電流に対する作用
コントロール電流 (○) と、グリチルリチン (100 μ M) を 5 分間作用させた
ときの電流 (●) を重ねて示した。

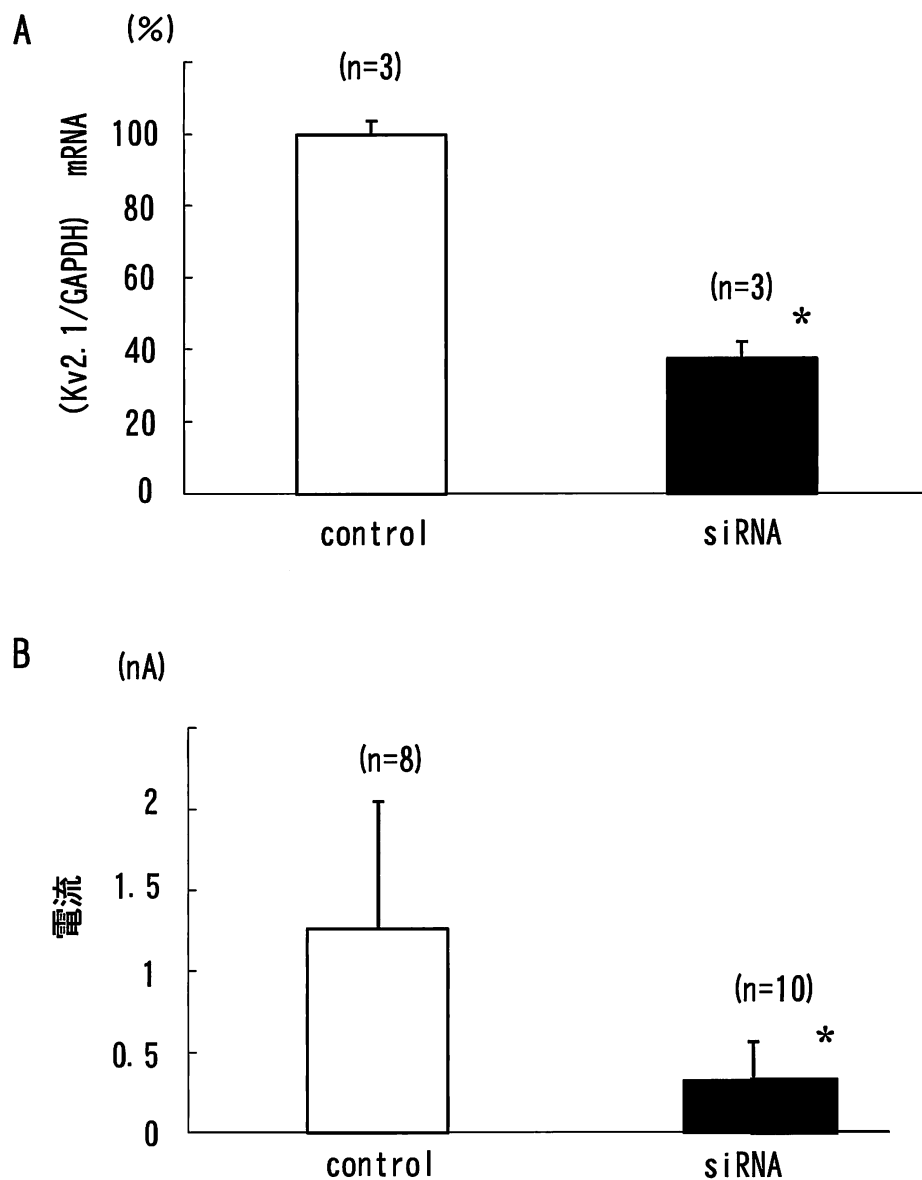


Fig.7 Kv2.1 に対する RNA 干渉法を用いた H9c2 細胞の mRNA 発現量と電流値の変化

A : H9c2 細胞に Kv2.1siRNA を導入し 48 時間後の、Kv2.1mRNA の発現量。GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) の mRNA 発現量に対する比を計算した。

B : コントロール siRNA と、Kv2.1 に対する SiRNA を処理した H9c2 細胞における K 電流の大きさの比較。

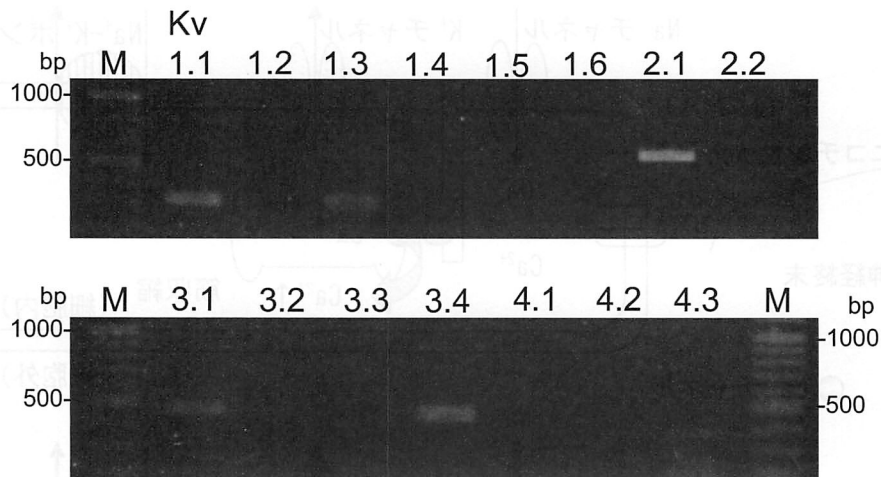


Fig.8 ラット骨格筋における種々の電位依存性 K チャネル遺伝子 (Kv) の発現。M はマーカーを示す。核酸の塩基対数は目盛に示した通り。

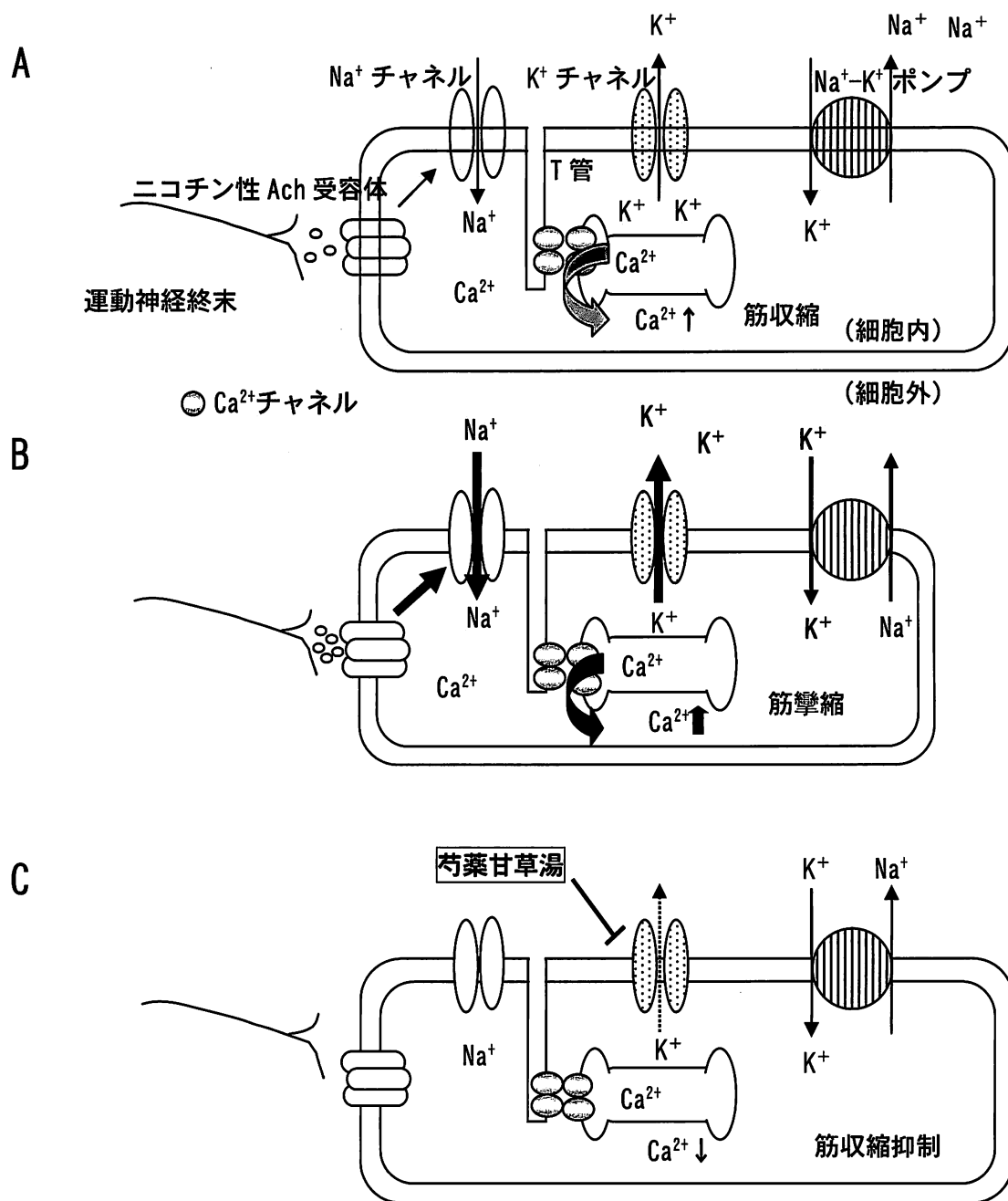


Fig.9 芍薬甘草湯の K チャネルに対する作用の模式図

A: 骨格筋の収縮メカニズム。運動神経からのインパルスにより、運動神経終末でシナプス間隙にアセチルコリン (Ach) が放出される。Ach が神経筋接合部に存在するニコチン性 Ach 受容体に結合すると、受容体チャネルが開口し、Na⁺ の流入が起こる。それに伴い、骨格筋膜の終盤が脱分極し、それがトリガーとなって骨格筋線維膜の Na チャネルが開口し、活動電位が発生する。すると T 細管膜の L 型 Ca チャネルが活性化し、フット構造を介して筋小胞体膜のリア

ノジン受容体を開口させる。リアノジン受容体 (Ca^{2+} 放出チャネル) を介して筋小胞体から Ca^{2+} が細胞質に遊離され、その Ca^{2+} が筋フィラメントに結合することで筋収縮が起こる。

B: こむらがえりを起こしている状態。骨格筋細胞は脱分極し、 K^+ チャネルは開口し、細胞外へ K^+ が流出するため、細胞外の K^+ 濃度が上昇している。 Na^+-K^+ ポンプは細胞外の K^+ を細胞内に流入させるが、その作用が追いつかなくなると細胞内外の K^+ の濃度勾配は小さくなる。

C: 芍薬甘草湯は、 K^+ チャネルを抑制する。 K^+ チャネルが抑制されると、 K^+ 流出が抑えられる。 Na^+-K^+ ポンプは常に K^+ を細胞内へ流入させている。両者の作用で、細胞内外の K^+ バランスが正常化し、骨格筋は弛緩する。

5. 文献

- Campbell DL, Rasmusson RL, Qu Y, Strauss HC. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis. *J gen physiol.* 101:571-601, 1999
- Endo M, Oikawa T, Nunome S, Yamada H, Hanawa T. Pharmacological analysis for the optimal combination ratio of Shakuyaku and Kanzo in Shakuyakukanzoto. *J Trad. Med.* 24:39-42, 2007
- Fujii K, Okamoto S, Saitoh K, Sasaki N, Takano M, Tanaka S, Kudoh K, Kita T, Tode T and Kikuchi Y. The efficacy of Shakuyaku-Kanzo-to for peripheral nerve dysfunction in paclitaxel combination chemotherapy for epithelial ovarian carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho.* 31:1537-1540, 2004
- 日高孝雄ら. Paclitaxel 投与による筋肉痛に対する芍薬甘草湯の効果. 産婦人科漢方研究のあゆみ No.17 診断と治療社; 東京, 79-83, 2000
- 日高孝雄ら. パクリタキセルによる筋肉痛に対する芍薬甘草湯の効果～臨床的および基礎的検討～. *Nikkei-Medical.* 407:34-35, 2001
- Hidaka T, Shima T, Nagira K, Ieki M, Nakamura T, Aono Y, Kuraishi Y, Arai T, Saito S. Herbal medicine Shakuyaku-kanzo-to reduced painful peripheral neuropathy in mice. *Eur J Pain.* 13:22-27, 2009
- Hinoshita F, Ogura Y, Suzuki Y, Hara S, Yamada A, Tanaka N, Yamashita A, Marumo F. Effect of orally administered shao-yao-gan-cai-tang (Shakuyaku-kanzo-to) on muscle cramps in maintenance hemodialysis patients: a preliminary study. *Am J Chin Med.* 31:445-532, 2003
- Hyodo T, Taira T, Kumakura M., Yamamoto S., Yoshida K., Uchida T., Sakai T., Endo T., Baba S. and Hidai H. The Immediate Effect of Syakuyaku-kanzo-to, Traditional Japanese Herbal Medicine, for Muscular Cramps during Maintenance Hemodialysis. *Nephron.* 90:240, 2002

Hyodo T, Taira T, Takemura T, Yamamoto S, Tsuchida M, Yoshida K, Uchida T, Sakai T, Hidai H, Baba S. Immediate effect of Shakuyaku-kanzo-to on muscle cramp in hemodialysis patients. *Nephron Clin pract.* 104:28-32, 2006

Imaizumi Y, Muraki K, Watanabe M. Characteristic of transient outward currents in single smooth muscle cells from the ureter of the guinea-pig. *J Physiol.* 427:301-324, 1999

Jin SN, Wen JF, Wang TT, Kang DG, Lee HS, Cho KW. Vasodilatory effects of sthanol of Radix Paeoniae Rubra and its mechanism of action in the rat aorta. *J Ethnopharmacol.* 142:188-193, 2012

Kevin CM. Marcus SS. Kellie CH. Jeffrey EE. Exercise-Associated Muscle Cramps: Causes, Treatment and Prevention. *Sports Health.* 2:279-283, 2010

Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental Cell Research.* 98:367-381, 1976.

Kimura M. 漢方方剤による病態選択活性の作用機序. 代謝. 29:9-33, 1992

Kimura M., Kimura I., Nojima H. and Takahashi K. The Mechanism of Combined Action in Blocking Effect of paeoniflorin and Glycyrrhizin on Isolated phrenic Nerve-Diaphragm Muscle preparation of Mice. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU.* 15:157-161, 1982;

Lee KK, Omiya Y, Yuzuriha M, Kase Y, Kobayashi H. Angispasmodic effect of shakuyakukanzoto extract on experimental muscle cramps *in vivo*: role of the active constituents of Glycyrrhizae radix. *J Ethnopharmacol.* 145:286-293, 2013.

Murakami et al. 整形外科領域における有痛性筋痙攣（いわゆるこむらえり）に対するツムラ芍薬甘草湯の治療効果. *Nikkei Medical.* 277:190-191, 2000

Noguchi C, Yang J, Sakamoto K, Maeda R, Takahashi K, Ono T, Murakawa M, Kimura J. Inhibitory Effects of Isoliquiritigenin and Licirice Extract on

Voltage-Dependent K⁺ Currents in H9c2 Cells. J Pharmacol. Sci. 108:439-445, 2009

Sato S, Takayasu T, Hyodo T, Sato Y, Yabuuchi I, Yoshimoto M, Kumakura M, Tomimitsu E, Yamamoto S, Yoshida K, Endo T, Sakai T, Hidai H, Baba S. The dramatic effect of Shakuyaku-Kanzo-To, chinese herbal medicine for muscle cramp with pain in hemodialysis patients. Hiyoki Geka. 13:221-227, 2000

Satoh H, Tsuru K. Pharmacological modulation of shakuyakukanzoto (shao-yao-gan-cai-tang) and the ingredients in rat intestinal smooth muscle. Chinese Medicine. 2:62-70, 2011.

Somlyo A.V, Gonzalez-Serratos H, Shuman H, McClellan G, Somlyo AP. Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: An electron-probe study. J Cell Biol. 90:577-594, 1981

Sumiya M. 痙攣,こむら返りと漢方.Science of Kanpo Medicine. 17:189-199, 1993

Suzuki H, Momoi N, Ono T, Maeda S, Shikama Y, Matusoka I, Suzuki H, Kimura J. Inhibitory effect of thiopental on ultra-rapid delayed rectifier K⁺ current in H9c2 cell. J Pharmacol Sci. 99:177-184, 2005

Wang W, Hino N, Yamazaki H, Aoki T, Ochi R. Kv2.1 K⁺ channels underlie major Voltage-gated K⁺ outward current in H9c2 myoblasts. Jpn J Physiol. 52:507-514, 2002

謝辞

本研究に際し、終始懇篤な御指導を賜りました福島県立医科大学医学部 薬理学講座 木村 純子 教授に甚大なる謝意を表します。

本研究を遂行する上で、終始有益な御支援ならびに御指導いただきました福島県立医科大学医学部 薬理学講座 小野 委成 主任医療技師に深謝致します。

本論文の作成にあたり、終始有益な御助言および御校閲をいただきました福島県立医科大学医学部 薬理学講座 坂本 多穂 講師に深謝いたします。

本研究を遂行にあたり、有益な御指導、御助言を賜りました浜松医科大学医学部看護学科 医療薬理学部門 渡邊 泰秀 教授に深謝いたします。

本研究を遂行する上で、多くの御助言を賜り、また丁寧にご指導くださいました福島県立医科大学医学部 薬理学講座 亀岡 弥生 准教授、谷田部 緑 助教、谷田部 淳一 助教、尾形 浩 主任薬剤技師、佐藤 早苗 秘書に心から感謝申し上げます。

本研究の一部は、福島県立医科大学医学部学生の 脇岡 奈保子 氏、渡辺 宏剛 氏、阿部 理 氏との共同研究であり、心より感謝致します。

本研究にあたり、御協力をいただきました福島県立医科大学医学部 薬理学講座の教室員諸氏に心より感謝致します。

本研究を遂行する上で、深い理解を下さり、絶えず御支援ならびに御助言をいただきました福島県立医科大学医学部 麻酔科学講座 村川 雅洋 教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行する上で、終始御支援いただきました星総合病院 麻酔科 武藤ひろみ 部長に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究ならびに本論文の作成において、常にあたたかく見守り応援してくれた家族に心から感謝します。