

五苓散のアクアポリンを介した水分代謝調節メカニズム

最近、脳浮腫や慢性硬膜下血腫などに対する五苓散の臨床効果がたいへん注目されている。五苓散は漢方の古典（傷寒論、金匱要略）に記載されている方剤で、体内の水分代謝異常を調整し、浮腫状態では利尿作用、脱水状態では抗利尿作用を発揮する利水薬として古くから用いられてきた。これまで、その薬理作用は十分解明されていなかったが、近年、五苓散がアクアポリン（水チャネル）の阻害作用を有することが明らかとなった。ここでは、その作用を発見された磯濱洋一郎先生に、アクアポリンを介した五苓散の作用メカニズムについて解説していただいた。

磯濱 洋一郎

熊本大学大学院生命科学研究部 薬物活性学分野 准教授

体内の水の移動を支えている

アクアポリン (AQP)

ヒトは1日に2Lもの水を体外に放出しており、それを食物や飲料によって補っていますが、体内での水の動きは見かけ以上にダイナミックで、腎臓の糸球体は1日に約180Lもの体液を濾過しその98%を再吸収しています。こうした大量の水の移動を支えているのが、水チャネルのアクアポリン (AQP) です (図1)。

AQPは、1992年、米国のAgreらによって赤血球の膜タンパク質として発見され、後にAQPと名付けられました。その後、AQPは細菌から動植物まで生物界に広く存在していることが確認され、ほ乳類では現在までに13種類のアイソフォームが同定されています。

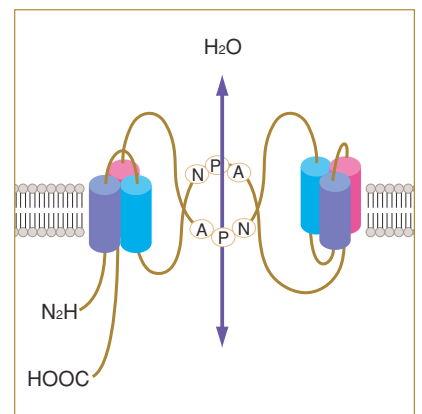
AQPの体内での機能については、

各AQPの欠損マウスが作製されてその表現型の解析が進んでおり、腎臓に存在するAQP1、2および3の欠損で尿量の著明な増加が生じることや、脳に豊富なAQP4の欠損で脳浮腫の形成が抑制されること、外分泌腺に存在するAQP5の欠損で唾液、汗および気道液の分泌が低下することなどが明らかになっているほか、AQP遺伝子異常とさまざまな疾患との関連が報告されています (表1)。

五苓散の効果は従来の薬理的機序では説明できない

さて、五苓散は古くから利水薬として用いられている漢方薬です。臨床研究において血中の電解質濃度にあまり影響することなく尿量を増やすことや、体内の水分過多の状態では尿量を増やし、脱水状態では尿量

を減少させることが報告されているほか、マウスを用いた実験では、フロセミドは絶水状態でも浮腫状態でもどちらも尿量が増えるのに対し、五苓散は浮腫状態でのみ尿量が増えることが示されています。



アクアポリンは細胞膜にある水選択的チャネルタンパク質で、13種類のアイソフォームが全身に存在する。

図1 アクアポリンの構造

(磯濱 洋一郎)

尿量増加作用の機序としては、これまで薬理的には腎血圧上昇による糸球体濾過量の増加か、電解質の再吸収阻害による原尿濃縮抑制の2通りしかありませんでした。しかし、五苓散の作用はそのどちらにも当てはまりません。そこでわれわれが着目したのが、AQPです。

五苓散はAQPを阻害する

まず、細胞膜水透過性に対する五苓散の作用を、Stopped-Flow分光光度計で評価しました。これは、細胞懸濁液と高浸透圧液を瞬時に混合すると細胞は水を排出して収縮し、それに伴って散乱光が増加することから、散乱光の強度を経時的に測定しその変化の初速度から細胞膜水透過性を算出するという方法です。

AQP5を発現するマウス肺上皮細

胞株MLE-12細胞を用いた結果、五苓散は濃度依存的に細胞膜水透過性を抑制し、1.0mg/mL以上では代表的なAQP阻害剤として知られている水銀に匹敵する作用が認められました。また、五苓散の構成生薬について同様の実験を行ったところ、蒼朮に最も強い細胞膜水透過性抑制作用があることがわかりました。

ただ、細胞膜内外の水は電解質の移動に伴う浸透圧勾配によって移動することから、五苓散が電解質の移動に影響している可能性も考えられます。そこで、パッチクランプ法を用いてMLE-12細胞の膜電位を測定したところ、五苓散および蒼朮によって膜電位は変化しないことが確認されました。

そこで、五苓散のMLE-12細胞に対する細胞膜水透過性抑制作用が、AQP5への直接作用であるか否かを検討するため、AQP5を含むプロテ

オリソーム(人工的に作製した脂質二重膜であるリポソームに膜タンパク質を封入したもの)とAQP5を含まないリポソームの水透過性を比較したところ、蒼朮はコントロールリポソームの水透過性は抑制せず、AQP5含有プロテオリポソームの水透過性を抑制することが認められました。これらの結果から、五苓散はAQPを阻害していることが確実となったわけです。

特にAQP4の阻害活性が強い活性にはマンガンが関与

次に、蒼朮エキスを用いて活性成分の探索を行ったところ、80%エタノールに不溶性で水に溶ける分画に強い細胞膜水透過性抑制活性を認め、その活性は金属キレート剤であるEDTAの存在下で消失することから、活性成分には2価の金属イオンであ

表1 アクアポリンの体内分布と機能

	ヒトにおける主な分布臓器	ヒトの病態 (遺伝子異常による疾患)	ノックアウトマウスの主な表現型
AQP0	レンズ(眼球)	白内障	白内障
AQP1	赤血球, 肺, 腎, 脳, 眼球(角膜), 血管内皮	腎性尿崩症	尿量増加
AQP2	腎	腎性尿崩症	尿量増加
AQP3	皮膚, 腎, 肺, 消化管		尿量増加, 皮膚乾燥, 創傷治癒遅延
AQP4	脳, 腎, 肺, 消化管, 骨格筋	てんかん	脳浮腫形成抑制
AQP5	唾液腺, 汗腺, 肺	シェーグレン症候群	唾液分泌低下, 汗分泌低下, 気道液分泌低下
AQP6	腎		
AQP7	脂肪組織, 腎, 睾丸	グリセリン代謝異常	グリセリン代謝異常, 脂肪細胞肥大
AQP8	腎, 肝, 膵, 消化管, 睾丸		精巣肥大
AQP9	肝, 白血球, 脳, 睾丸		
AQP10	消化管		(マウスでは偽遺伝子)
AQP11	脳, 肝, 腎		多嚢胞腎
AQP12	膵		

(磯濱 洋一郎)

ることが示唆されました。

蒼朮に含まれるミネラルを分析した結果、マンガン、コバルト、クロム、銅が豊富に含まれていることがわかり、これらの金属の無機塩について細胞膜水透過性を調べたところ、マンガンに強い抑制作用が認められました。さらに、アフリカツメガエルの卵母細胞にAQP1～5のcRNAを注入してこれらを発現させた細胞を用い、細胞膜水透過性試験を行って各アイソフォームに対する作用を調べた結果、水銀はAQP1, 2, 3および5を阻害したのに対して、マンガンはAQP3, 4, 5, 特にAQP4に対して強い阻害作用

を示しました。

そこで、五苓散で同様の検討を行ったところ、五苓散もマンガンと同程度にAQP4発現細胞の細胞膜水透過性を阻害することが確認されました(図2)。

このように、五苓散の薬理作用の一部はマンガンが担っている可能性が示唆されましたが、無機塩のマンガンをヒトに静注してもほんの数分で血中から消失することから、本来の活性成分はマンガンと塩を形成している有機酸のほうかもしれません。その本体の探索については、今後の検討課題と考えています。

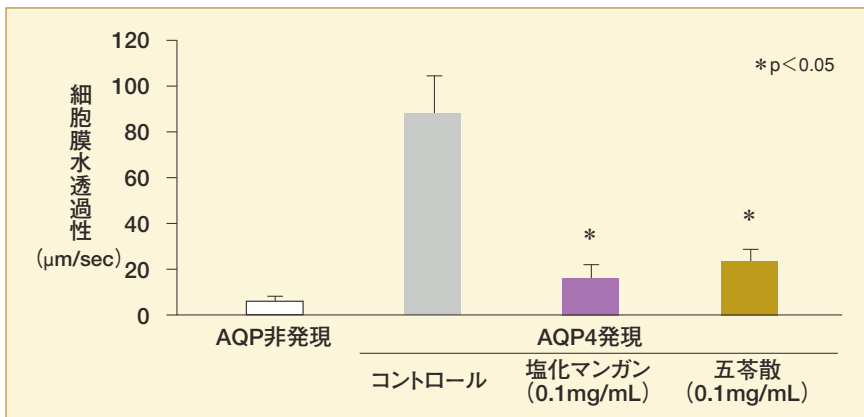


図2 AQP4を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜水透過性に対する五苓散の作用 (n=4) (磯濱 洋一郎)

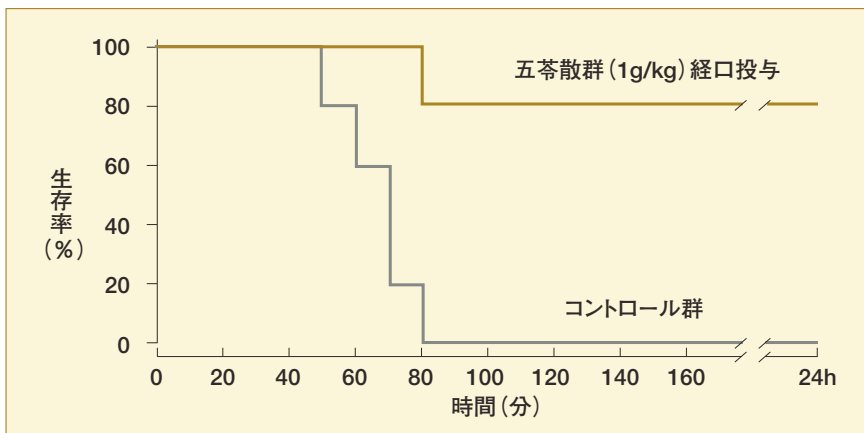


図3 急性水中毒マウスの生存率に対する五苓散の作用 (磯濱 洋一郎)

五苓散はAQP4阻害薬

一連の検討で最も興味深いことは、五苓散がAQP4を阻害することが明らかになったことです。

これまで唯一のAQP阻害物質として知られていた水銀は、AQP4に対しては阻害活性を示さないとされてきました。なぜなら、AQPは、形態的にちょうど砂時計のように水分子が通過するポア(孔)を有しており、その中心部に2カ所のNPAモチーフ(アスパラギン、プロリン、アラニン)があり、いくつかのAQPアイソフォームではそのNPAモチーフの近傍にあるシステイン残基に水銀が共有結合することで水透過性が抑制されるのですが、AQP4にはこのシステイン残基がないからです。

われわれが五苓散の作用を発見するまで、AQP4の阻害活性を有する薬剤は知られていませんでした。

AQP4阻害作用が

脳浮腫抑制に関与

AQP4は、他の臓器と比較して脳に非常に多く、なかでも血液脳関門を形成している毛細血管周囲のアストロサイト足突起や、浸透圧の調節で重要な視床下部のグリア細胞、脳室周囲などに多く発現していることから、血液脳関門における水の透過や脳脊髄液調節に関与していると考えられています。

実際、AQP4はさまざまな脳損傷や脳疾患に伴う脳浮腫の病態に関与していることが明らかとなってきました。急性水中毒によって惹起されるアスト

ロサイト足突起の腫脹がAQP4欠損マウスでは著明に軽減され、同様に脳虚血モデルでも脳浮腫の程度ならびに神経症状が軽度であったことが報告されています。

また、急性水中毒による死亡率がAQP4欠損マウスで著明に減少することも確認されています。これらの結果は、AQP4の阻害薬が脳浮腫の予防・治療薬となり得る可能性を示唆するものです。

そこで、五苓散について急性水中毒の実験を行ったところ、五苓散を与えないコントロール群はすべて死亡しましたが、五苓散投与群では死亡率が激減し(図3)、AQP4欠損マウスと同じ結果が得られました。近年、五苓散の脳浮腫に対する臨床的な有効性が報告されていますが、その作用機序の1つとしてAQP4阻害作用が関与していることを裏付ける結果といえます。

“行ってはいけない方向”への水の動きを阻止する五苓散

では、なぜAQPを阻害することによって浮腫が抑制されるのでしょうか。体内では浸透圧や静水圧といった物理化学的ポテンシャルによって水の移動方向が決まります。一方、AQPは細胞膜の水透過性、すなわち移動効率を調節する役割を担っています。したがって、なんらかの病的状態に陥り浸透圧バランスが崩れてしまうと、行ってはいけない方向に水が移動し、浮腫が生じるのです。

この時、五苓散は、AQPを阻害することで行ってはいけない方向に移動している水の動きをとめ、浮腫を抑制するのではないかと考えられます(図4)。

これまで、脳浮腫にはマンニトール製剤やグリセロール製剤のような

浸透圧剤、腹水や肺水腫には利尿剤などが用いられてきました。これらは、いわゆる物理化学的ポテンシャルによる水の移動方向をコントロールする薬剤です。それに対して、五苓散は水の移動効率をコントロールする利尿薬です。こう考えると、脱水状態でも尿量を増加させるフロセミドと、増加させない五苓散の違いも理解できます。体内の水分子代謝異常の治療には、こうしたふたつの標的があると考えてはどうでしょうか。

漢方でいう“水毒”には、水の貯留だけではなく分泌異常も含まれますが、これもAQPが関与していることが明らかになってきています。東洋医学では、生体は「気」「血」「水」からなるとされていますが、AQPはこれら3つの要素をつなぐ働きを担っているのではないかと考えています。

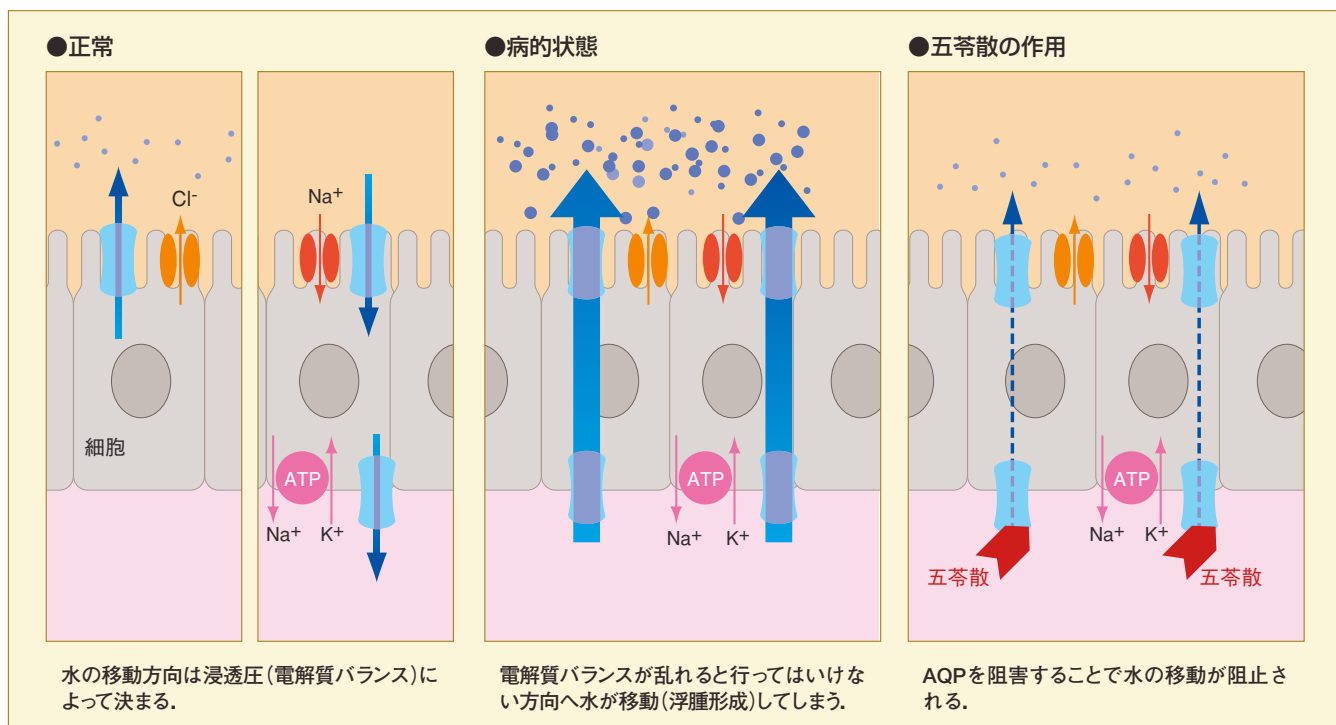


図4 浮腫に対する五苓散の作用(イメージ)

(磯濱 洋一郎)