

氏名	三宅 沙紀		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5945号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	局所投与されたイバブラジンは過分極活性化環状ヌクレオチド依存性 (HCN) チャネルを介してカラゲニンによって誘発された神経障害性疼痛および炎症反応を抑制する		
論文審査委員	岡元 邦彰 教授	小橋 基 准教授	島田 康史 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨 (2000字程度)

背景：近年、神経障害性疼痛の治療標的として、過分極活性化環状ヌクレオチド依存性 (HCN) チャネルが注目されている。HCN チャネルは非選択的陽イオンチャネルであり、様々な組織に分布し、特に心臓、脳およびニューロンに発現していることが知られている。最近の報告では、HCN チャネルが軸索損傷後の異常な末梢神経活動に関与していることが示唆されており、末梢神経に分布する HCN チャネルを介して HCN チャネル遮断薬が神経障害性疼痛に対して抑制効果を有することが示されている。HCN チャネル遮断薬であるイバブラジンは、抗狭心薬および強心薬として臨床応用されているが、神経障害性疼痛に対する効果は明らかにされていない。また、臨床的には炎症によって引き起こされる神経障害性疼痛を予防することは重要である。そこで本研究では、炎症によって誘発された神経障害性疼痛に対するイバブラジンの効果を評価し、さらに炎症反応に対するイバブラジンの効果を評価することを目的とし、ラットを用いた *in vivo* 研究および培養細胞を用いた *in vitro* 研究を行った。

方法：岡山大学の動物実験委員会の承認のもと、8 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用し、1%カラゲニン 50 μ L をラットの右後肢足蹠に皮下注射することにより局所の炎症を誘発した。注射後 von Frey フィラメントで機械的刺激を与えることによって、痛み行動の 50% 閾値 (疼痛閾値) を評価した。また、イバブラジン (最終濃度 10、20 および 50 μ M) を加えたカラゲニン混合液を同様に皮下注射し、疼痛閾値に対するイバブラジンの効果を評価した。次に、HCN チャネルを活性化させるフォルスコリンおよびラモトリジンをを用いて、イバブラジンの効果に対する拮抗作用を調べた。また、イバブラジンと同じ HCN チャネル遮断薬である ZD7288 をカラゲニンに添加し、その効果についても評価した。さらに、注射領域の組織を採取し、ヘマトキシリン-エオジン染色下で白血球の集積、および免疫染色下で炎症メディエーターである TNF α の発現を観察し、イバブラジンが炎症反応に及ぼす影響を評価した。また別に、培養したマウスマクロファージ様細胞 (RAW 264.7) をリポ多糖類 (LPS) で刺激し、RAW 細胞における TNF α 産生に対するイバブラジンおよび ZD7288 の効果を調べた。統計学的分析には、統計ソフトを用いて one-way analysis of variance (ANOVA) または two-way ANOVA、および post-hoc 試験として Tukey's multiple comparisons test、Sidak's multiple comparisons test または Dunnett's multiple comparison test を行った。有意水準は 5% 未満とした。

結果：カラゲニンをラットの後肢足蹠に投与すると疼痛閾値は低下したが、イバブラジンを混合すると、カラゲニンによって低下した疼痛閾値は、イバブラジンの用量に依存して増加した。HCN チャネルの活性作用のあるラモトリジンおよびフォルスコリンの添加は、両者ともに疼痛閾値に対するイバブラジンの効果を拮抗した。ZD7288 はイバブラジンと同様に、カラゲニンによる疼痛閾値の低下を抑制した。また、イバブラジンは、カラゲニンによる皮下注射領域の白血球の集積および TNF α の発現を抑制した。さらに、イバブラジンおよび ZD7288 は、培養細胞において LPS の刺激で誘導された TNF α の産生を用量依存的に抑制した。

考察：本研究は、局所投与されたイブuprofenが、カラゲニンによる神経障害性疼痛を抑制することを示した。これはイブuprofenが、炎症によって引き起こされた神経障害性疼痛を緩和する治療薬の候補であり得ることを示唆するものである。また、本研究では、イブuprofenが神経障害性疼痛だけでなく、白血球の集積および TNF α 発現を含むラットの後肢足蹠における炎症反応に対しても抑制効果を有することが示された。さらに、培養細胞において、イブuprofenおよび ZD7288 は LPS による TNF α の産生を抑制した。これらは、イブuprofenが炎症性細胞の HCN チャンネルを介して抗炎症作用を有することを示唆している。炎症性細胞から放出される炎症メディエーターは、末梢神経に作用して神経障害性疼痛を引き起こすことが知られている。したがってイブuprofenは、HCN チャンネルを介して末梢神経だけでなく、末梢神経の周囲の炎症性細胞にも直接作用し、神経障害性疼痛を抑制した可能性が考えられた。イブuprofenはすでに抗狭心薬として臨床的に使用されていることから、今後、炎症によって引き起こされた神経障害性疼痛に対しても臨床応用が期待できる。

結論：本研究の結果は、局所投与されたイブuprofenが、カラゲニンによる神経障害性疼痛に対して、HCN チャンネルを介して抑制作用があることを示した。この作用は、末梢神経に対する作用だけでなく、抗炎症効果も伴っていることが考えられた。この知見は、イブuprofenの局所投与が炎症によって引き起こされた神経障害性疼痛を抑制するのに有用であり得ることを示唆している。

論文審査結果の要旨

近年、神経障害性疼痛の治療標的として、過分極活性化環状ヌクレオチド依存性 (HCN) チャネルが注目されている。HCN チャネルは非選択的陽イオンチャネルであり、様々な組織に分布し、特に心臓、脳およびニューロンに発現していることが知られている。最近の報告では、HCN チャネルが軸索損傷後の異常な末梢神経活動に関与していることが示唆されており、末梢神経に分布する HCN チャネルを介して HCN チャネル遮断薬が神経障害性疼痛に対して抑制効果を有することが示されている。HCN チャネル遮断薬であるイバブラジンは、心不全の治療薬として臨床応用されているが、神経障害性疼痛に対する効果は明らかにされていない。また、臨床的には、炎症によって引き起こされる神経障害性疼痛を予防することは重要である。そこで、本研究では、炎症によって誘発された神経障害性疼痛に対するイバブラジンの効果を検討し、さらに、炎症反応に対するイバブラジンの効果を解析した。

研究には、アロディニアを伴う炎症性疼痛モデルラットを用いた。ラット後肢足蹠に 1%カラゲニン溶液を皮下注射 (50 μ l) することにより炎症性疼痛モデルを作成した。カラゲニン単独溶液投与群とイバブラジン添加カラゲニン溶液投与群 (イバブラジン最終濃度: 10、20、または 50 μ M の 3 群) を比較し、イバブラジンの疼痛抑制作用を検討した。von Frey フィラメントを使用し、up-down 法に従い評価した結果、カラゲニンによって誘発された炎症性疼痛はイバブラジンの添加によって用量依存性に抑制された。また HCN チャネル作動薬であるラモトリジンやフォルスコリンを同時に足蹠に投与した場合、イバブラジンの疼痛抑制作用は消滅した。さらに組織学的には、カラゲニン投与後 2 時間における足蹠組織にみられた炎症性細胞浸潤、および炎症性サイトカインの TNF α の発現がイバブラジンの添加によって強く抑制された。また、培養したマウスマクロファージ様細胞 (RAW 264.7) をリポ多糖類 (LPS) で刺激し、RAW 細胞における TNF α 産生に対するイバブラジンの効果を調べたところ、イバブラジンは LPS の刺激で誘導された TNF α の産生を用量依存的に抑制した。以上の結果より、イバブラジンの疼痛抑制作用は HCN チャネルを介した作用によるものであることが示唆された。

上記のように本論文は、局所投与したイバブラジンがカラゲニンによって誘発された神経障害性疼痛および炎症反応を抑制することを示したものであり、イバブラジンの新たな作用を示す重要な研究成果であると考えられる。また、術後疼痛に対して応用できる可能性があり、臨床的に意義ある論文であると考えられる。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。