指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
宮脇 卓也 印	研究の立案、計画、実施、分析、および論文作成の指導
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 機能再生・再建科学 専攻	身分 大学院生	氏名 松田 怜奈
論 文 題 名 イバブラジンは過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャネル (HCN2) を介してマクロファージの炎症性サイトカインの産生を抑制する		
論文内容の要旨 (2000字程度) 【緒 言】 過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャネル (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gate channel:以下、HCN チャネル) は、非選択的陽イオンチャネルであり、静置電位からの過分極によって活性化される内向きである過分極活性化電流を引き起こすことが知られている。HCN チャネルは HCN1、HCN2、HCN3、および HCN4 の 4 つのアイソフォームがあり、中枢神経系や末梢組織に分布している。心臓では HCN4 チャネルがペースメーカーの役割を有していることが知られている。HCN チャネルの特異的な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、動物モデルにおいて神経の損傷によって引き起こされる難治性の疼痛である神経障害性疼痛に対して効果を有することが示されている。 当研究室の先行研究でマクロファージにおいてイバブラジンは HCN チャネルを介して抗炎症作用を有することが示唆されているが、どのアイソフォームが抗炎症作用に関与しているかは明確ではない。アイソフォームの役割を明確することによって、より効果的な神経障害性疼痛に対する治療薬が開発される可能性がある。本研究では、炎症の病態に関与するマクロファージに着目し、培養マクロファージ様細胞 (RAW264.7) を対象として、HCN チャネルの遮断薬であるイバブラジンの抗炎症作用が、どの HCN アイソフォームに関与しているか検討することとした。 【方 法】 まず、RAW264.7 細胞にリポ多糖 (LPS) を作用させ、イバブラジンを添加して 2 時間培養後上清を回収し、ELISA kit を用いて炎症性サイトカインである TNF α および IL-6 濃度を測定した。次に、培養した細胞から RNA を抽出し HCN1、HCN2、HCN3、および HCN4 チャネル遺伝子のプライマーを使用して、RAW264.7 細胞における HCN チャネルアイソフォームの遺伝子発現を確認した。さらに RAW264.7 細胞に発現している HCN チャネルアイソフォームに対する低分子干渉 RNA (siRNA) を導入しノックダウンを行った。siRNA を作用させてから 24 時間後に LPS を作用させ、イバブラジンを添加して 2 時間培養した。培養後、細胞を回収してチャネル遺伝子の発現を調べ、また上清中の TNF α および IL-6 濃度を測定した。 統計学的分析には、one-way analysis of variance (ANOVA) および two-way analysis of variance (ANOVA) を行い、post-hoc 試験として Dunnett's multiple comparison test または Sidak's multiple comparisons test を用いた。		

論文内容の要旨（2000字程度）

【結 果】

イバブラジンは用量依存的にLPS刺激によるTNF α およびIL-6の産生を抑制した。RAW264.7細胞にはHCN2およびHCN3チャンネルの遺伝子発現が確認された。RAW264.7細胞に発現しているHCN2またはHCN3チャンネルに対し特異的なsiRNAを導入し、HCN2またはHCN3チャンネル遺伝子をノックダウンした細胞では、siRNAを導入していない細胞と比較して、それぞれHCN2またはHCN3チャンネル遺伝子の発現が有意に抑制されていた。LPSを作用させた時、HCN2チャンネル遺伝子をノックダウンした細胞では、siRNAを導入していない細胞と比較してTNF α およびIL-6産生が有意に抑制されていた。また、HCN2チャンネル遺伝子のsiRNAを導入していない細胞では、イバブラジンはTNF α およびIL-6産生を有意に抑制したが、HCN2チャンネル遺伝子をノックダウンした細胞では有意な抑制はみられなかった。一方、HCN3チャンネル遺伝子をノックダウンした細胞では、siRNAを導入していない細胞と比較して、有意な炎症性サイトカイン産生の抑制はみられなかった。

【考 察】

本研究では、培養マクロファージ様細胞であるRAW264.7細胞に、遺伝子レベルではあるがHCN2およびHCN3チャンネルが発現していることが示された。RAW264.7細胞に発現しているHCN2チャンネル遺伝子をノックダウンしたところ、ノックダウンした細胞では炎症性サイトカインの産生が抑制されており、HCN2チャンネルの炎症への関与が考えられた。またHCN2チャンネル遺伝子ノックダウン細胞において、イバブラジンによる抗炎症作用が認められなかったことより、イバブラジンはHCN2チャンネルを介して抗炎症作用をもたらしていると考えられた。一方、HCN3チャンネル遺伝子をノックダウンした細胞では炎症性サイトカイン産生の抑制はみられず、HCN3チャンネルは炎症に関与していないと考えられた。また、ミクログリアにおけるHCNチャンネルの役割について研究された報告では、炎症反応に対してHCN2チャンネルが関与していることが示唆されており、本研究結果を支持するものであると考えられた。

神経障害性疼痛は未だ治療法が確立しておらず新規の治療薬が望まれている。それに対し、イバブラジンは高容量投与ではHCN4チャンネルを介して心臓に対して有害な作用を及ぼす可能性があるものの、血液脳関門を通過せず、中枢神経系に影響を及ぼさないことから臨床的にも忍容性が高い。また傷害組織におけるペースメーカー電流の変化は神経障害性疼痛に根底にある重要なメカニズムである可能性であることから、イバブラジンのようなHCNチャンネルを標的とした薬物の応用は神経障害性疼痛に対する新たな治療戦略として期待でき、またHCN2を標的とした薬物が開発されれば、心機能に影響を与えず、神経障害性疼痛に対し抗炎症作用も含めた治療薬になりうることを示す重要な知見となりうる。

【結 論】

イバブラジンはLPS刺激による炎症性サイトカイン（TNF α およびIL-6）の産生を抑制した。RAW264.7細胞にHCN2およびHCN3チャンネル遺伝子が発現していることを確認し、HCN2またはHCN3チャンネル遺伝子をノックダウンしたところ、HCN2チャンネル遺伝子をノックダウンした細胞では炎症性サイトカインの産生が抑制され、イバブラジンの効果はみられなかった。一方、HCN3チャンネル遺伝子をノックダウンした細胞では、炎症性サイトカインへの影響はみられなかった。以上の結果より、イバブラジンによる炎症性サイトカイン産生の抑制作用は、HCN2チャンネルを介していることが示された。