

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
(自 署)	研究の立案，計画，実施，分析，および論文作成の指導
(自 署)	
(自 署)	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野 歯科麻酔・特別支援歯学	身分 大学院生	氏名 田中 譲太郎
論 文 題 名 過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャネル（HCNチャネル）阻害薬が株化ミクログリアの細胞内カルシウムイオン動態に及ぼす影響		
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-gated channel：以下HCNチャネル）は、非選択的陽イオンチャネルであり、内向きである過分極活性化電流を引き起こし、細胞の活動電位の発火頻度を調節することで、静止電位の決定や制限、膜抵抗の変化、およびシナプスの伝達と感覚への関与していることが知られている。近年、HCNチャネルは神経の損傷によって引き起こされる神経障害性疼痛の発症及び維持に関与することが報告されており、実際、その阻害薬であるイバブラジンやZD7288は、神経障害性疼痛に対して抑制効果を有することも報告されている。神経障害性疼痛にはミクログリアの細胞膜上のP2X4受容体やP2X7受容体の活性化を介した細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の上昇と、それに伴う脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor: BDNF）の産生放出が重要な役割を果たしている。しかしHCNチャネル阻害薬がミクログリアにおける$[Ca^{2+}]_i$動態やBDNF産生にどのような影響を及ぼすかは未だ明らかになっていない。そこで本研究ではP2X4およびP2X7受容体を介した$[Ca^{2+}]_i$の上昇とBDNF産生に及ぼすHCNチャネル阻害薬の影響を解析した。 【方 法】 株化ミクログリア6-3細胞（以下6-3細胞）及び株化ミクログリアRa2細胞（以下Ra2細胞）における$[Ca^{2+}]_i$変化はFura2を用いて評価した。P2X4受容体アゴニストであるATPまたはP2X7受容体アゴニストであるBzATPで刺激した際の$[Ca^{2+}]_i$変化を評価し、HCNチャネル阻害薬であるイバブラジンおよびZD7288が$[Ca^{2+}]_i$変化にどのような影響を及ぼすか検討した。<i>bdnf</i>遺伝子発現の定量評価にはRa2細胞を用い、ZD7288を30分間前処置させた後、ATPを3時間作用させた。その後抽出したRNAをcDNAに逆転写し、PCRを行い<i>bdnf</i>遺伝子発現を定量評価した。 統計学分析として、$[Ca^{2+}]_i$変化の群間比較にはone-way analysis of variance (ANOVA) とpost-hoc試験としてTukey's multiple comparisons testを用い、<i>bdnf</i>遺伝子発現における群間比較にはFriedman testとpost-hoc試験としてDunn's multiple comparisons testを用いた。有意水準は$p<0.05$とした。		

論文内容の要旨（2000字程度）

【結 果】

6-3細胞にATPを添加すると速やかに $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した．HCNチャネル阻害薬（イバブラジン, ZD7288）の前処置でATPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が有意に抑制された．またBzATPを添加した場合も同様に $[Ca^{2+}]_i$ は上昇し, HCNチャネル阻害薬（イバブラジン, ZD7288）の前処置でATPによる $[Ca^{2+}]_i$ は有意に抑制された．同様に, Ra2細胞においてもHCNチャネル阻害薬（ZD7288）の前処置で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制された．Ra2細胞にATPを添加すると*bdnf*遺伝子発現は有意に増加し, ZD7288を前処置することで*bdnf*遺伝子発現量は有意に減少した．

【考察】

今回の結果から, HCNチャネル阻害薬はP2X4受容体及びP2X7受容体の両方に作用し, $[Ca^{2+}]_i$ を抑制する可能性が示唆された．また, ZD7288によってBDNFの遺伝子発現レベルが有意に低下したことから, BDNFの放出を抑制することが神経障害性疼痛に対するHCNチャネル阻害薬の作用機序のひとつである可能性が示唆された．

【結 語】

HCNチャネル阻害薬は株化ミクログリアにおいてATPおよびBzATPによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制することが示された．さらに, ATPで刺激されたBDNF遺伝子発現の増加を抑制した．以上の結果より, HCNチャネル阻害薬のミクログリアへの効果が神経障害性疼痛に対する作用機序のひとつである可能性が示唆された．よって, ミクログリアに作用させる中枢神経系指向のHCNチャネル阻害薬が神経障害性疼痛の治療薬となりうると考えられた．