

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09722

研究課題名(和文) 過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャンネル阻害薬の疼痛制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of the antinociceptive action of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel blockers

研究代表者

宮脇 卓也 (Miyawaki, Takuya)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00219825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャンネル(Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels: HCNチャンネル)阻害薬による疼痛制御作用機序を解明することを目的とした。HCNチャンネル阻害薬(ivabradineおよびZD7288)は、ラットにおいて、カラゲニンによる炎症性疼痛を用量依存性に抑制した。さらに、培養したマウスマクロファージ様細胞(RAW264.7)において、LPS刺激によるTNF およびIL-6の産生を抑制した。よって、HCNチャンネル阻害薬はHCNチャンネルを介して炎症性疼痛を抑制することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔顎顔面領域においても難治性の疼痛がみられる。既存の治療薬に対して抵抗性のある症例があり、新しい鎮痛薬の開発が期待されている。本研究で対象とした過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャンネル阻害薬は、新しい鎮痛薬の候補として考えられている。本研究結果によって、HCNチャンネル阻害薬に抗炎症作用があることが証明されたことから、術後疼痛やがん性疼痛など、炎症に伴って発生する難治性疼痛に対して有効な鎮痛薬として、開発されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of pain suppression by hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN channels) inhibitors. HCN channel inhibitors (ivabradine and ZD7288) suppressed carrageenin-induced inflammatory pain in a dose-dependent manner in rats. In addition, LPS-stimulated production of TNF and IL-6 was suppressed in cultured mouse macrophage-like cells (RAW264.7). Thus, these results indicated that HCN channel inhibitors suppress inflammatory pain via HCN channels.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャンネル 炎症性疼痛 疼痛制御作用 抗炎症作用 サイトカイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は口腔顎顔面領域においてもみられ、難治性の慢性疼痛となっている症例が少なくない。主たる治療法として三環系抗うつ薬、SNRI、Na チャネルや Ca チャネルをブロックする薬物などが適用されているが、これらの既存の治療薬に対して抵抗性のある症例があり、新しい治療薬の開発が期待されている。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 channels: HCN チャネル) は膜電位の過分極により活性化され内向き電流を発生させる電位依存性チャネルで、過分極により活性化され膜電位を脱分極方向に押し上げることが知られている。近年、この HCN チャネルが後根神経節にも存在しており、損傷された神経の活動電位の活性化が、HCN チャネル阻害薬によって抑制されることが報告されており、神経障害性疼痛の治療薬として期待されている。しかし、HCN チャネル阻害薬の疼痛制御作用機序については十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

これまでの神経障害性疼痛に対する HCN チャネル阻害薬の研究は、神経の活動電位を評価しているものが主体であるが、近年、神経障害性疼痛の発現と持続に炎症が関与していることが注目されており、HCN チャネル阻害薬の神経障害性疼痛に対して神経細胞への直接的な作用だけでなく、炎症性メディエーターを介した作用を解明することは新しい視点でのアプローチである。よって、本研究では、HCN チャネル阻害薬の神経障害性疼痛に対する作用機序を解明する一端として、抗炎症作用を介した疼痛制御機構を解明することを目的とした。

また、HCN チャネルには活性化反応速度、電位依存、および cAMP に対する感受性などの違いによって HCN1、HCN2、HCN3、および HCN4 の 4 つのサブタイプがあり、発現部位も様々である。そこで、抗炎症作用に関与している HCN チャネルサブタイプの検索も目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物実験による HCN チャネル阻害薬の疼痛制御・抗炎症作用の検証

- ① 炎症性疼痛モデルとして、後肢足蹠に起炎物質である 1%カラゲニン溶液を皮下注したラットを用い、HCN チャネル阻害薬 ivabradine および ZD7288 を刺激部位に皮下注した際の、von Frey Filament による機械的刺激に対する疼痛閾値の低下への効果を評価した。
- ② 神経障害性疼痛モデルおよび炎症性疼痛モデルにおいて、1%カラゲニンおよび ivabradine 投与部位の足蹠皮下組織を採取し、組織学的に白血球などの炎症性細胞の集積を評価した。
- ③ HCN2 および HCN4 チャネルに対して作動作用があるとされている forskolin 添加し、ivabradine の効果が抑制されるかどうかを確認した。

#### (2) HCN チャネル阻害薬 ivabradine の抗炎症作用の *in vitro* での検証

- ① 株化されたマウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7) を培養し、細胞を  $1 \times 10^6$ /mL に調整した後、培養液に LPS (最終濃度 10 ng/mL) を添加し、HCN チャネルに対して特異的阻害薬である ivabradine および ZD7288 を添加し、2、4、および 6 時間後に上清培養液中の TNF  $\alpha$  濃度を測定した。
- ② HCN2 および HCN4 チャネルに対して作動作用があるとされている forskolin 添加し、ivabradine の効果が抑制されるかどうかを確認した。

#### (3) 疼痛制御・抗炎症作用に係わる HCN チャネルサブタイプの検索

RAW264.7 細胞におけるサブタイプ発現を調べるために、培養した RAW264.7 細胞より RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成し、HCN1、HCN2、HCN3、および HCN4 のそれぞれに特異的なプローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、RAW264.7 細胞における HCN1、HCN2、HCN3、および HCN4 の発現を調べ、抗炎症作用に関与しているサブタイプを検索した。

### 4. 研究成果

#### (1) 動物実験による HCN チャネル阻害薬の疼痛制御・抗炎症作用

##### ① カラゲニン投与による疼痛閾値の低下に対する HCN チャネル阻害薬の効果

HCN チャネル阻害薬 ivabradine (10, 20, 50  $\mu$ M) は用量依存性にカラゲニン投与による疼痛閾値の低下を抑制した (図 1)。さらに、ZD7288 (50  $\mu$ M) も同様の効果を示した (図 2)。

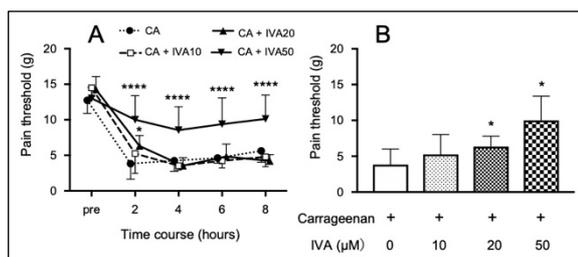


図1 カラゲニン (CA) による疼痛閾値 (Pain threshold) 低下に対する ivabradine (IVA) の効果 (A:経時的変化; B:投与後 2 時間の値の比較) (文献 1 より引用)

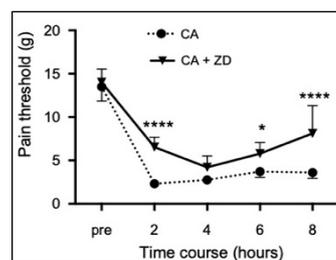


図2 カラゲニン (CA) による疼痛閾値 (Pain threshold) 低下に対する ZD7288 (ZD) の効果 (文献 1 より引用)

② 組織学的評価

HCN チャネル阻害薬 ivabradine (20, 50  $\mu$ M) は、カラゲニン (Carrageenan) 投与によって惹起された炎症性細胞 (白血球など) の集積を抑制した (図 3、図 4)。

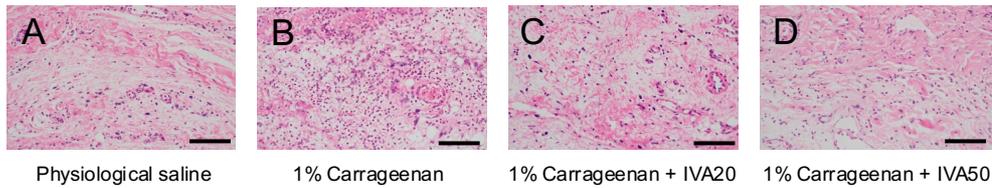


図 3 カラゲニン投与後のラット後肢足趾領域の皮下組織像

生理食塩水 (A)、1%カラゲニン (B)、1%カラゲニン+ ivabradine (IVA) (20  $\mu$ M) (C)、1%カラゲニン+ ivabradine (IVA) (50  $\mu$ M) (D) をラット後肢足趾に皮下注射し、投与後 2 時間のヘマトキシリン-エオジン染色組織像を示している。スケールバーは 100  $\mu$ m を表している。(文献 1 から引用改変)

③ ivabradine の疼痛閾値への作用に対する forskolin の効果

forskolin の添加は、カラゲニン投与による疼痛閾値の低下に対する ivabradine の抑制効果を拮抗した (図 4)。

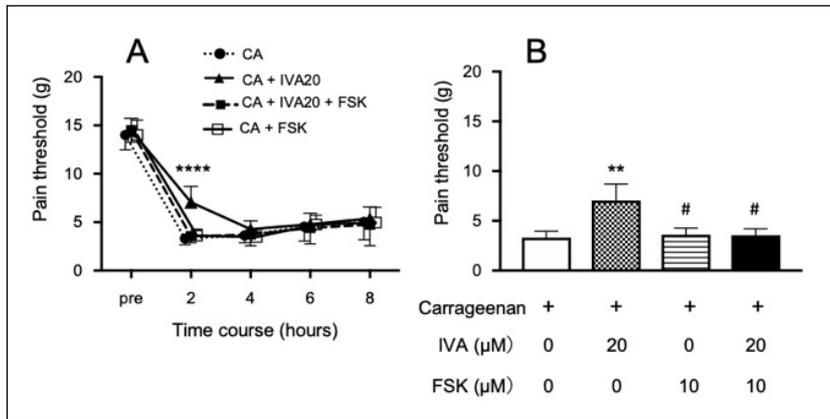


図 4 カラゲニン(CA)による疼痛閾値 (Pain threshold) 低下に対する ivabradine (IVA) の抑制作用に対する forskolin (FSK) の効果 (A: 時間的変化; B: 投与後 2 時間の値の比較) (文献 1 より引用)

(2) HCN チャネル阻害薬の抗炎症作用 (*in vitro*)

① HCN チャネル阻害薬 ivabradine (10, 20, 50  $\mu$ M) は、LPS で刺激されたマウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7) からの TNF  $\alpha$  産生を抑制した (図 5)。さらに、ZD7288 (10, 50  $\mu$ M) も同様の効果を示した (図 6)。

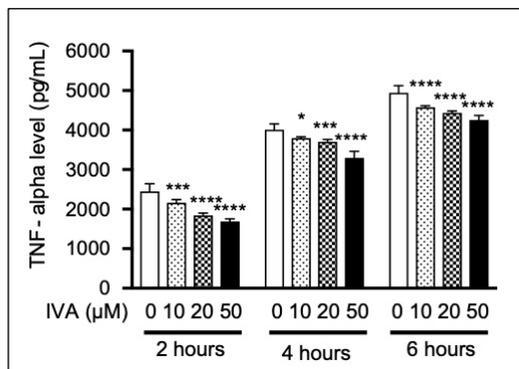


図 5 LPS (10ng/mL) で刺激された RAW264.7 細胞からの TNF  $\alpha$  産生に対する ivabradine (IVA) (10, 20, 50  $\mu$ M) の効果 (文献 1 から引用)

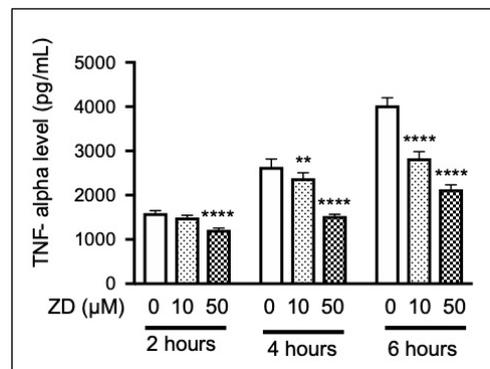


図 6 LPS (10ng/mL) で刺激された RAW264.7 細胞からの TNF  $\alpha$  産生に対する ZD7288 (ZD) (10, 50  $\mu$ M) の効果 (文献 1 から引用)

- ② ivabradine の TNF  $\alpha$  産生を抑制作用に対する forskolin の効果  
 forskolin の添加は、LPS 刺激による TNF  $\alpha$  産生に対する ivabradine の抑制作用を拮抗しなかった (図 7)。

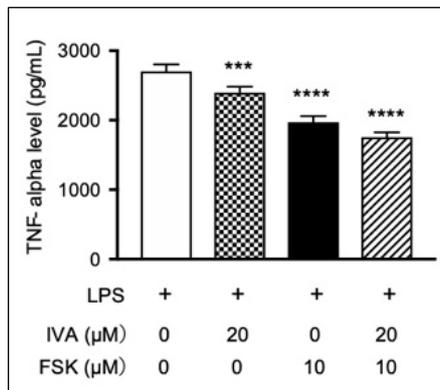


図 7 LPS (10ng/mL) で刺激された TNF  $\alpha$  産生に対する ivabradine (IVA) (10  $\mu$ M) の抑制作用への forskolin (FSK) (1  $\mu$ M) の効果 (文献 1 より引用)

- (3) 疼痛制御・抗炎症作用に係わる HCN チャネルサブタイプの検索

培養した RAW264.7 細胞における、HCN1、HCN2、HCN3、および HCN4 の遺伝子発現を調べた結果、HCN2 と HCN3 の発現が確認できた。これらの HCN チャネルサブタイプが RAW264.7 細胞における抗炎症作用に係わっている可能性が示唆された。しかし、HCN2 および HCN4 チャネルに対して作動作用があるとされている forskolin を添加しても、ivabradine の作用を拮抗できなかったことから (図 7)、HCN3 がより強く関与している可能性が考えられたが、それぞれのサブタイプの役割を明確にするためには、HCN2 または HCN3 の発現をノックダウンして抗炎症作用を評価する必要があると考えられる。

一方、疼痛制御については、動物モデルに forskolin を添加することで ivabradine の作用を拮抗できたことから (図 4)、疼痛制御については HCN2 または HCN4 が関与していることが示唆された。文献的には、すでに HCN2 が神経障害性疼痛に関与していることが報告されており (文献 2, 3)、HCN4 は中枢および心臓に主に分布していることがわかっていることから、炎症性の神経障害性疼痛における疼痛制御についても、HCN2 が関与していることが妥当であると思われる。

以上の研究成果より、炎症性の神経障害性疼痛に対して HCN チャネル阻害薬が有効であり、疼痛制御については HCN2 を介している可能性があること、抗炎症作用については HCN2 以外のサブタイプが関与していることが示唆された。この成果は当分野で世界に先駆けたものであり、今後、HCN チャネルサブタイプの関与について知見を発展させることで、HCN チャネルを標的とした神経障害性疼痛治療薬の開発に発展させることが期待できる。

#### <引用文献>

- ① Miyake S, Higuchi H, Honda-Wakasugi Y, Fujimoto M, Kawai H, Nagatsuka H, Maeda S, Miyawaki T: Locally injected ivabradine inhibits carrageenan induced pain and inflammatory responses via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels. PLOS ONE 14: e0217209, 2019.
- ② Young GT, Emery EC, Mooney ER, Tsantoulas C, McNaughton PA: Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels. Pain 155: 1708-1719, 2014.
- ③ Emery EC, Young GT, Berrocoso EM, Chen L, McNaughton PA: HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. Science 333: 1462-1466, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyake Saki, Higuchi Hitoshi, Honda-Wakasugi Yuka, Fujimoto Maki, Kawai Hotaka, Nagatsuka Hitoshi, Maeda Shigeru, Miyawaki Takuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Locally injected ivabradine inhibits carrageenan-induced pain and inflammatory responses via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0217209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Saki Miyake, Yuka Honda-Wakasugi, Akiko Yabuki-Kawase, Hitoshi Higuchi, Shigeru Maeda, Takuya Miyawaki
2. 発表標題 The inhibitory effect of locally administered ivabradine on inflammatory pain
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	樋口 仁  (Higuchi Hitoshi)  (30423320)	岡山大学・大学病院・講師    (15301)	

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	三宅 沙紀  (Miyake Saki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------