

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18695

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は神経障害性疼痛にどのように関与するか

研究課題名（英文）How hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels are involved in neuropathic pain?

研究代表者

三宅 沙紀 (Miyake, Saki)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：40869393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、神経障害性疼痛に対する全く新たな治療薬として、過分極活性化環状ヌクレオチド依存性（HCN）チャンネル阻害薬が注目されているが、神経障害性疼痛には炎症が関わっていることが報告されている。そこで、本研究では、動物モデルおよび培養したRAW264.7細胞に炎症反応を誘導し、HCNチャンネル阻害薬であるivabradineが炎症反応にどのように関与しているかを調べた。その結果、ivabradineは炎症性メディエータであるTNF およびIL-6の産生を抑制し、さらに、その培養細胞において発現しているHCNチャンネルサブタイプのうち、HCN2チャンネルを介して抗炎症作用に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は慢性的な痛みとなり、難治性のために生活の質を低下させる。そのため、世界的に神経障害性疼痛に対する新しい治療薬の開発が期待されている。そのひとつとして、近年、過分極活性化環状ヌクレオチド依存性（HCN）チャンネル阻害薬が注目されている。治療薬を開発する上で、作用機序を解明することは重要であり、本研究代表者はHCNチャンネル阻害薬に抗炎症作用があることを発見したが、これがどのような機序で引き起こされ、また痛みの制御にどのように関与しているかは十分には解明できていない。本研究成果は、HCNチャンネル阻害薬の作用機序の一端を解明したものであるが、治療薬の開発に寄与するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Recently, blockers of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels have attracted attention as a new therapeutic agent for neuropathic pain. However, it has been reported that inflammation is involved in neuropathic pain. Therefore, in the present study, we induced inflammatory responses in animal models and cultured RAW264.7 cells, and evaluated the effects of ivabradine, a blocker of HCN channels. The results indicated that ivabradine suppressed the production of inflammatory mediators, TNF and IL-6, and further suggested that ivabradine is involved in the anti-inflammatory effects via HCN2 channels among the HCN channel subtypes expressed in the cultured cells.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：HCNチャンネル 神経障害性疼痛 抗炎症作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は慢性的な痛みとなり、生活の質を低下させる。近年、神経障害性疼痛に対する全く新たな治療薬として、過分極活性化環状ヌクレオチド依存性(HCN)チャネル阻害薬が注目されている。一方、神経障害性疼痛は、直接的な神経損傷の時だけでなく、炎症が関わっていることが報告されている。本研究代表者は HCN チャネル阻害薬に抗炎症作用があることを発見したが、これがどのような機序で引き起こされ、また痛みの制御にどのように関与しているかはまだ解明できていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、HCN チャネル阻害薬が炎症反応にどのように関与しているのかを解明するために、動物モデルによる *in vivo* 実験と培養細胞を用いた *in vitro* 実験で、炎症を惹起した状態で HCN チャネル阻害薬を投与した際の炎症性メディエータの動態と HCN チャネルの発現を分析し、HCN チャネル阻害薬の作用機序を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 動物モデルによる *in vivo* 実験にはラットを用いた。岡山大学の動物実験委員会の承認のもとに行われた。ラット (Sprague-Dawley 系雄性, 8 週齢, 体重 250~340g, 日本チャールス・リバー株式会社) の後肢足蹠に carrageenan 溶液 ( -カラゲニン, Santa Cruz Biotechnology) を皮下注射することで局所炎症を誘発し、炎症性メディエータ (TNF ) に対する HCN チャネル阻害薬 ivabradine (東京化成工業) の効果を免疫組織学的に評価した。ラットの後肢足蹠に生理食塩水、1% carrageenan 溶液のみ、carrageenan 溶液 (最終濃度 1%) + ivabradine (最終濃度 20  $\mu$ M)、carrageenan 溶液 (最終濃度 1%) + ivabradine (最終濃度 20  $\mu$ M) + forskolin (最終濃度 10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) をそれぞれ皮下注射し、2 時間後に注射部位の肉球組織をサンプルとして採取し、切片 (3  $\mu$ m) にした。切片を一連のキシレン中で 15 分間脱パラフィンし、段階的にエタノール溶液中で再水和させ、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中の切片をメタノールで 30 分間インキュベートすることにより、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。抗原回収は、pH6.0 の 10 mM クエン酸緩衝液を用いた熱処理によって行った。正常血清で処理した後、切片を TNF (LifeSpan BioSciences 社) の一次抗体とともに 4 でインキュベートした。一次抗体のタグ付けは、Vectastain ABC キット (Vector labs 社) を用いた。免疫反応性の可視化は、ジアミノベンジジン/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 (ヒストファイン DAB 基質, 株式会社ニチレイ) で酵素複合体を発色させ、ヘマトキシリンで対比染色し、観察した。

(2) *in vitro* 実験にはマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 (株式会社ケー・エー・シー) を用いた。

RAW264.7 細胞を 10% ウシ胎児血清 (FBS) および L-Glutamin (最終濃度 2 mM) を添加した D-MEM (株式会社ケー・エー・シー) 培地で培養し、大腸菌 055:B5 由来のリポ多糖類 (LPS, Sigma-Aldrich) を最終濃度 10 ng/mL を添加し炎症反応を誘導した。LPS に加えて ivabradine (東京化成工業) を添加して、投与 2 時間後に上清液および細胞を回収し、炎症性サイトカインである TNF および IL-6 の上清中の濃度を測定した。測定には、それぞれ Mouse TNF alpha ELISA kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) および Mouse IL-6 ELISA kit (Invitrogen) を用いた。また、HCN チャネルを活性化させる試薬 (forskolin) を加えることによる影響も評価した。

細胞については、TrizolTM (Invitrogen) を用いてトータル RNA を抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて合成した cDNA を試料とした。cDNA に対して PCR 増幅機 (QuantStudio Design & Analysis, Applied Biosystems) およびリアルタイム PCR 用スタンダード試薬 (TB Green® Premix Ex TaqTM, タカラバイオ株式会社) を用いて RT-PCR を行い、基準としたリファレンスサンプル (GAPDH) との Ct 値の差から HCN チャネルサブタイプの遺伝子 (mRNA) の発現量を定量評価した ( Ct 法)。HCN チャネルサブタイプ遺伝子に対するプライマーは、HCN1 チャネルに対して 5-TGTCAATGAAGACAGCTCGG-3 および 5-CGGGATCGATGAGATGAAGT-3 (100bp), HCN2 チャネルに対して 5-CTGCGTGAGGAGATTGTGAA-3 および 5-TTTGAGCTTTGTGTCAGCATGG-3 (108bp), HCN3 チャネルに対して 5-GCCGAGTAACTAGACGGCTG-3 および 5-ATTGACGGTACCCAGCTACG-3 (100bp), HCN4 チャネルに対して 5-CTGACGATGCTGTTGCTGAT-3 および 5-CATTGAAGACGATCCAGGGT-3 (100bp) をそれぞれ用いた。PCR で増幅した拡散の電気泳動については、アガロース (Invitrogen) 核酸電気泳動用特製試薬 (TBE 緩衝原液, ナカライテスク株式会社) 核酸蛍光染色試薬 (Midori Green Direct, Nippon Genetics EUROPE) 核酸分子量マーカー (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, Thermo fisher scientific) アガロースゲル電気泳動装置 (Submerge-mini, ATTO) を用いて行った。

HCN チャネルサブタイプ遺伝子の siRNA の導入は、HCN チャネルサブタイプ遺伝子をコードする低分子干渉 RNA (siRNA, Silencer® Select Cat# 4390771, Thermo Fisher Scientific) およびネガティブコントロール低分子干渉 RNA (negative control siRNA, Silencer® Select Cat# 4390843, Thermo Fisher Scientific) を用い、細胞を播種してから 24 時間後これらをトランスフェクションした。トランスフェクションには上記の siRNA の他、Lipofectamin® RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific) と Opti MEM® 培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。トランスフェクション処理から 24 時間後、10 ng/mL LPS (最終濃度) もしくは 10 ng/mL LPS (最終濃度) + ivabradine (最終濃度 50 μM) を作用させ、2 時間培養後、上清を回収し TNF および IL-6 濃度を測定した。

- (3) データは平均値および標準偏差 (平均値 ± 標準偏差) で示した。統計学的解析には、統計ソフト (GraphPad Prism ver. 4R, San Diego, USA) で、one-way analysis of variance (ANOVA) と post-hoc Dunnett's multiple comparisons test、または two-way analysis of variance (ANOVA) と post-hoc Sidak's multiple comparisons test を用いた。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 動物モデルを用いた免疫組織学的評価

ラットの後肢足蹠に carrageenan 溶液を投与して炎症反応を誘導させた動物モデルにおいて、ivabradine を投与し、2 時間後に注射部位の組織を免疫組織学的に評価した結果、ivabradine によって炎症性メディエータである TNF の産生を抑制されることが示された一方、forskolin によって ivabradine の TNF の産生抑制に対して影響はなかった (図 1)。

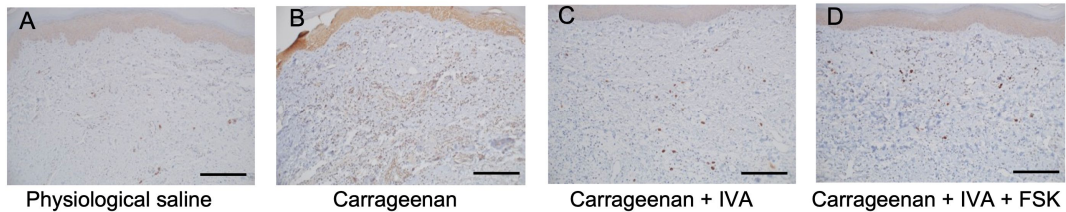


図1 TNFαの産生に対するivabradine の効果 (免疫組織学的評価)  
IVA: ivabradine (20μM), FSK: forskolin (10μM), フルスケールバー: 100μm

##### (2) RAW264.7 細胞を用いた炎症性メディエータに対する ivabradine の効果

LPS を投与して炎症反応を誘導した RAW264.7 細胞に、ivabradine (1, 10, 50 μM) を添加し、2 時間後に上清中の TNF および IL-6 の濃度を測定した結果、1 μM 濃度以上で ivabradine は濃度依存的に TNF の産生を有意に低下させた (図 2A)。また、IL-6 の産生に対しては 10 μM 濃度以上で抑制効果がみられた (図 2B)。

一方、forskolin (最終濃度 10 μM) の添加によって、TNF および IL-6 の産生は抑制された。また、forskolin は ivabradine の TNF および IL-6 の産生抑制効果に対して影響を及ぼさなかった (図 3)。

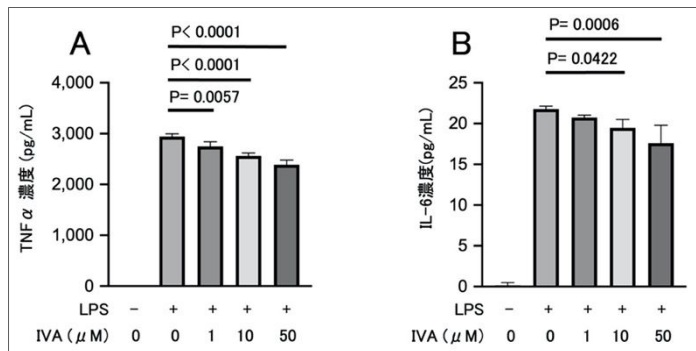


図2 TNFαおよびIL-6産生に対するivabradineの効果  
A: 細胞上清中のTNFα濃度, B: 細胞上清中のIL-6濃度

##### (3) RAW264.7 細胞の HCN チャネルサブタイプの遺伝子発現

RAW264.7 細胞の HCN チャネルサブタイプの遺伝子 (mRNA) 発現を確認した結果、LPS 非存在下および存在下ともに HCN2 および HCN3 チャネル遺伝子の発現は認められたが、HCN1 および HCN4 チャネルの遺伝子発現は認められ

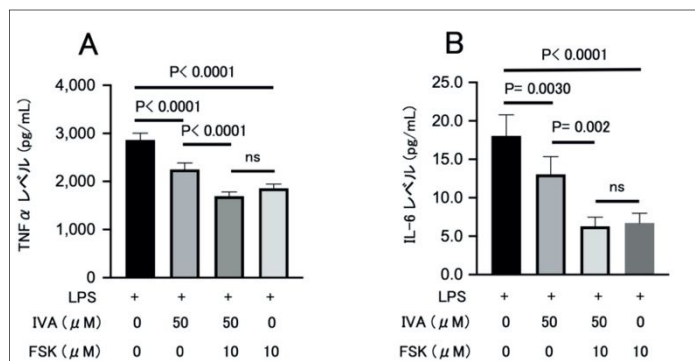


図3 RAW264.7細胞におけるivabradineの抑制効果に対するforskolin (FSK) の影響  
A: 細胞上清中のTNFα濃度, B: 細胞上清中のIL-6濃度

なかった。(図4)

(4) ノックダウンした細胞における TNF および IL-6 産生に対する ivabradine の効果

RAW264.7 細胞に non-targeting siRNA を導入したネガティブコントロール細胞と、HCN2 チャネル遺伝子に特異的な siRNA を導入して HCN2 チャネル遺伝子をノックダウンした細胞を作製し、HCN2 チャネル遺伝子の発現が抑制されており ( $P < 0.0001$ )、ivabradine の存在下においても HCN2 チャネル遺伝子の発現量に変化がないことを確認した (図5)。

HCN2 チャネル遺伝子をノックダウンした細胞を、LPS 下で 2 時間培養し、培養上清中の TNF および IL-6 産生を比較したところ、HCN2 チャネル遺伝子をノックダウンした細胞はネガティブコントロールの細胞と比較して TNF の産生が有意に抑制されており ( $P = 0.014$ )、ネガティブコントロールの細胞では ivabradine の添加によって、TNF の産生が有意に抑制されていた ( $P = 0.0088$ )。一方、HCN2 チャネル遺伝子をノックダウンした細胞に ivabradine を添加しても TNF の産生は抑制されなかった (図 6A)。同様に、IL-6 の産生についても、HCN2 チャネル遺伝子をノックダウンした細胞はネガティブコントロールの細胞と比較して IL-6 の産生が有意に抑制されており ( $P = 0.0296$ )、ネガティブコントロールの細胞では ivabradine の添加によって、IL-6 の産生が有意に抑制されていた ( $P = 0.0243$ )。一方、HCN2 チャネル遺伝子をノックダウンした細胞に ivabradine を添加しても IL-6 の産生は抑制されなかった (図 6B)。

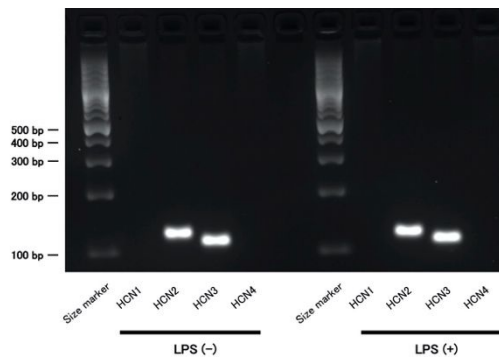


図4 RAW264.7細胞におけるHCNチャネルサブタイプ遺伝子の発現 (左) LPS非存在下, (右) LPS (10 ng/mL) 存在下 各アイソフォームの想定バンドサイズは100~108bp

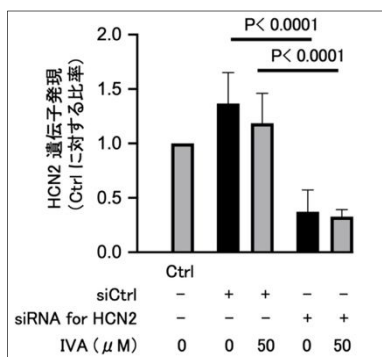


図5 ノックダウンした細胞のHCN2チャネル遺伝子の発現  
siRNA for HCN2 (+): siRNA導入群,  
siCtrl (+):ネガティブコントロール群  
Ctrl: コントロール群, IVA: ivabradine

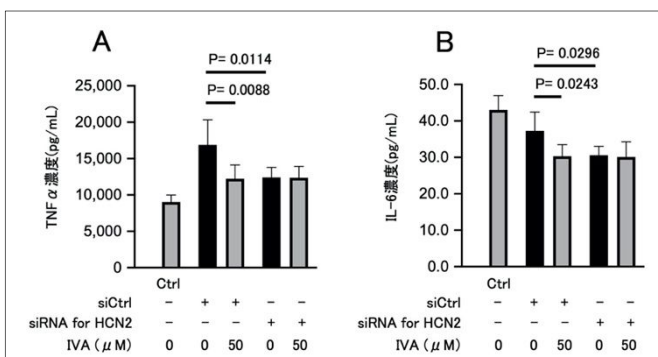


図6 HCN2チャネル遺伝子をノックダウンした細胞におけるTNFαおよびIL-6産生への影響  
A: 細胞上清中のTNFα濃度, B: 細胞上清中のIL-6濃度  
siRNA for HCN2 (+): siRNA導入群, siCtrl (+):ネガティブコントロール群  
Ctrl: LPSを作用させたコントロール群, IVA: ivabradine

(5) 以上の結果から、まずラットを対象とした *in vivo* 実験によって HCN チャネル阻害薬 ivabradine が抗炎症作用を有していることが改めて確認でき、疼痛制御に抗炎症作用が関わっていることが示唆された。RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* 実験でも ivabradine が抗炎症作用を有していることが確認できた。さらに、HCN チャネルサブタイプである HCN1、HCN2、HCN3、および HCN4 チャネルの遺伝子発現を調べた結果、RAW264.7 細胞に HCN2 と HCN3 チャネル遺伝子の発現が確認でき、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関わっている可能性が示唆された。当研究室の過去の研究 (文献 1) で、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、HCN3 チャネルがより強く関与している可能性が考えられたが、本研究で HCN2 チャネルの遺伝子発現をノックダウンしたことで、ivabradine の抑制作用がみられなくなったことから、HCN2 チャネルが抗炎症作用に関わっている可能性が示唆された。HCN チャネル阻害薬の疼痛制御作用においても HCN2 チャネルが関わっていることが報告されていることから (文献 2)、今後、HCN2 チャネルを介した作用機序をさらに解明する必要があると考えられた。

免疫細胞では多くのイオンチャネルが機能的に関与しており、チャネルを通じて流入・流出する 2 価の陽イオン ( $Ca^{2+}$  など) は、セカンドメッセンジャーとして細胞内のシグナル伝達経路を制御する役割を担っており、免疫細胞のシグナル伝達を間接的に制御しているとされていることから (文献 3, 4) ivabradine による HCN チャネル遮断により、 $Ca^{2+}$  の細胞内流入が抑制され、炎症性サイトカイン産生が抑制されるのではないかという仮説も考えられる。

また、中枢神経系の組織に常在するマクロファージ様細胞であるミクログリアは、細胞の恒常性と炎症プロセスを仲介しているが、多くのイオンチャネルと細胞表面の受容体がこれらの機能を形成していることがわかっており、近年、単離されたミクログリア細胞において、

HCN チャネルサブタイプの発現と、その役割について調べられている（文献 5）。この研究では中枢の免疫担当細胞であるミクログリアにおいて、HCN2 チャネルが抗炎症作用のターゲットとなることを示唆しており、われわれの研究の結果を支持している。ミクログリアは慢性疼痛の発症に深く関わっていることから、ミクログリアを対象に研究を進めていくのも、今後の展開の方向性であると考えられる。

< 引用文献 >

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.

Lainez S, Tsantoulas C, Biel M, McNaughton PA. HCN3 ion channels: roles in sensory neuronal excitability and pain. J Physiol 597: 4661-4675, 2019.

Feske S, Wulff H, Skolnik EY. Ion channels in innate and adaptive immunity. Annu Rev Immunol 33: 291-353, 2015.

Hogan PG, Lewis RS, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. Annu Rev Immunol 28:491-533, 2010.

Izquierdo P, Attwell D, Madry C. Ion channels and receptors as determinants of microglial function. Trends Neurosci 42: 278-292, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三宅沙紀、松田怜奈、樋口 仁、宮脇卓也
2. 発表標題 HCNチャネル遮断薬はどのアイソフォームを介して抗炎症作用を示すのか
3. 学会等名 第50回 日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅沙紀、松田怜奈、藤本磨希、樋口 仁、宮脇卓也
2. 発表標題 抗炎症に関わるHCNチャネルサブタイプの研究
3. 学会等名 第36回 中国・四国歯科麻酔研究会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------