

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20064

研究課題名(和文) 過分極誘発陽イオンチャンネルを標的とした慢性疼痛の遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of gene therapy in chronic pain targeting HCN channels

研究代表者

大下 健輔 (oshi ta, kensuke)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70529510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HCNチャンネルファミリーであるHCN4の脊髄後角における局在をさらに詳細に調べるため、HCN4の翻訳開始点にルシフェラーゼ遺伝子をノックインしたマウス(HCN4+/Lcu)を作製した。中枢神経系におけるHCN4由来の化学発光を検索したところ、脊髄後角に一致したシグナルを認めることができた。このHCN4+/Lcuマウスを用いて、炎症性疼痛モデルを作成した。ルシフェリンを腹腔内投与した後に脊髄膨大部を採取し、その化学発光の変化を調べたところ、ホルマリン注入側の化学発光が24時間、48時間後に低下していることが明らかとなり、脊髄後角に発現するHCN4が炎症性疼痛に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate distribution of HCN channels in central nerve system, we generated transgenic mouse(HCN4+/luc), in which firefly luciferase and stop codon was knocked in at the upstream of HCN4 translation initiation site to visualize HCN4-expressing neuron. HCN4-expressing neuron was found in dorsal horn of spinal cord. We then assessed alternation of HCN4 expression in spinal dorsal horn in inflammatory pain model. We observed attenuation of luminescence signal in the ipsilateral dorsal spinal cord 24 h and 48 h after formalin injection into hind paw of HCN4+/luc mouse. HCN4 in spinal dorsal horn was suggested to be involved in inflammatory pain.

研究分野：麻酔学

キーワード：HCN 後根神経節 脊髄後角 遺伝子治療 炎症性疼痛

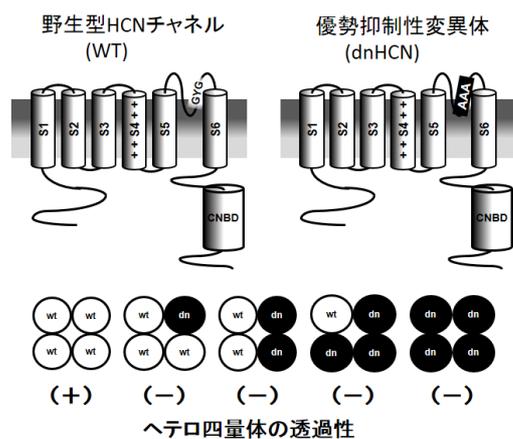
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過分極誘発陽イオンチャンネルには HCN1~4 のサブタイプが存在する。HCN チャンネルは自発発火するニューロンや心臓ペースメーカーに存在するため、ペースメーカーチャンネルとも呼ばれている。ノックアウト(KO)マウスの解析の結果、HCN1 と HCN2 は睡眠覚醒リズム、空間学習、てんかん等において重要な機能を果たすことが明らかになった。

近年、Nav1.8 promoter を使って感覚神経特異的に HCN2 を KO したマウスでは、ホルマリン皮下注射によって惹起した炎症性痛覚過敏が有意に減弱していることが報告され、HCN2 チャンネルは疼痛治療の新たなターゲットとして注目を集めつつある (HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. Science 333, 1462-6, 2011; HCN2 ion channels: an emerging role as the pacemakers of pain. Trends. Pharmacol. Sci. 33, 456-63, 2012)

上図に示すように、HCN2 チャンネルは 6 回



膜貫通型チャンネルファミリーの一つであり、生体内では HCN1~4 がヘテロ 4 量体を形成していると考えられている。HCN チャンネルファミリーのイオン透過性部位のアミノ酸配列は、K チャンネルと同様にグリシン-チロシン-グリシン (GYG) というモチーフを有している。この GYG モチーフをすべてアラニンに置換した変異体 HCN2-AAA はホモ 4 量体を形成した場合にはイオン透過性を有し

ていない。野生型 HCN2 チャンネルと HCN2-AAA がヘテロ 4 量体を形成する場合には、1 分子の HCN-AAA が加わるだけでチャンネル全体のイオン透過性が失われる。

2. 研究の目的

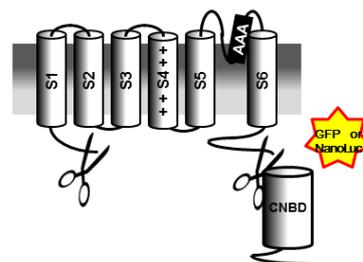
HCN2-AAA を脊髄後根神経節に発現させることができるならば、感覚神経細胞の HCN2 チャンネルの機能を選択的かつ完全に阻害し、痛覚過敏を抑制できる可能性がある。

すなわち感覚神経細胞の HCN2 チャンネルをターゲットとした疼痛治療の新たな戦略を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HCN2 優性抑制性変異体の作成と動作確認: HCN2 の全長 cDNA は全部で 2588 塩基ほどある。HCN2 の C 端に GFP を融合すると全体で 3308 塩基になる。さらに神経特異的プロモータとして synapsin I promoter を使用する予定であるが、この長さは 401 塩基である。これに polyA signal を加えると、全体で 4000 塩基を越えるため、レンチウイルスベクターには充分サブクローニングできるが、アデノ随伴ウイルスの場合には、サブクローニングできる上限ぎりぎりのサイズになってしまう。

N 端、C 端を短縮し、可視化分子を C 端に付加した $\Delta N\Delta C$ -HCN2-AAA



一方、HCN2 チャンネルは 6 つの膜貫通部位以外に、非常に長い細胞内 N 端ドメインと C 端ドメインが存在する。これらの細胞内ドメインを切断し、チャンネルを短縮した場合でも、チャンネルとしての機能はかなりの程度保存されることが知られている。そこで平成 27 年度はまず第 1 に、全長 HCN2-AAA-GFP を

レンチウイルスベクターにサブクローニングする。これと平行して HCN2-AAA の N 端および C 端の細胞内ドメインを様々な箇所

で切断した truncated mutant $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -HCN2-AAA を作成し、これに GFP もしくは超小型ルシフェラーゼ分子 NanoLuc を融合したコンストラクトを作成する。これを全長 HCN2 cDNA と共に培養細胞に発現させ、優性抑制性変異体として機能することを確認する。優性抑制性変異体として充分満足のいく機能をもつコンストラクトが得られたならば、 $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -HCN2-AAA の C 端に GFP ないし NanoLuc を融合した上でアデノ随伴ウイルスベクターにサブクローニング

する。最終的なウイルス粒子の作成ステップは、非常に困難かつ経験を要する技術であるため、国内ないし海外の研究所に有償で委託する。

(2)ウイルスベクターの機能を *in vivo* で確認する：完成したウイルスベクターが高効率で神経細胞に感染し、かつ HCN2 の機能を抑制できることを培養後根神経節細胞ないし脳スライス標本を使って確認する。

ラットないしマウスの後根神経節を摘出し、酵素処理したのち培養する。培地に $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -HCN2-AAA-GFP ウイルスベクターを加え、数日後に蛍光を指標として感染効率を評価する。培養後根神経節細胞では、生理的に HCN 電流が存在するので、 $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -HCN2-AAA-GFP の感染によって電流量が十分に抑制できていることをパッチクランプ法により確認する。

また新生児ラットの脳を摘出し、脳スライスを作成する。脳スライスを培養しつつ、 $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -HCN2-AAA-GFP ウイルスベクターを加え、感染効率を評価する。

(3)*In vivo* での $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -HCN2-AAA-GFP ウイルスベクターによる遺伝子導入確認：セボフルレン麻酔下にラットの椎弓を切除し、後根神経節を露出する。 $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -HCN2-AAA-GFP ウ

イルスベクターを局所に投与し、皮膚を縫合する。数日後、後根神経節を摘出し、ホルマリン固定する。GFP 蛍光を指標に、感染効率を評価する。もしくは抗 GFP 抗体で免疫染色を行う。

同様にして、摘出した後根神経節を酵素処理し、単離神経細胞を使ってパッチクランプ法により膜電流を記録する。

投与するウイルスベクターのウイルス粒子濃度、投与経路を適宜変更し、最も効率良く HCN2 電流を抑制できる条件を探す。

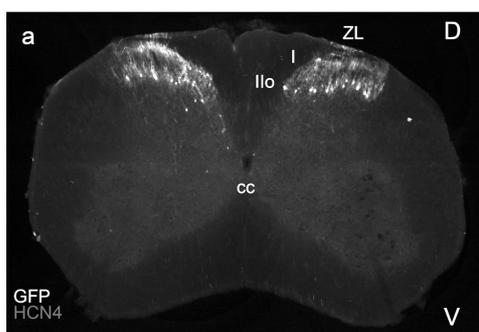
(4) $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -HCN2-AAA-GFP ウイルスベクター感染後の疼痛反応の測定：ラット後肢の皮下にホルマリンを注射し、炎症性疼痛モデルを作成する。慢性疼痛が生じる前の時点で、セボフルレン麻酔下にラット後根神経節に $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -HCN2-AAA-GFP ウイルスベクターを局所投与する。1 日後、3 日後、1 週間後、2 週間後に von Frey フィラメント法により痛覚過敏が 減弱しているか、検討する。対象群としては、GFP をウイルスベクターによってラット後根神経節に感染させ、同様の評価を行う。評価後、セボフルレン麻酔下に後根神経節を摘出し、ホルマリン固定する。その後、GFP 蛍光を指標として、遺伝子導入子効率を評価・確認する。

4. 研究成果

後根神経節に発現する HCN2 が疼痛治療のターゲットになるか明らかにするため、後根神経節の初代培養、電気生理学的機能解析を行った。マウスの後根神経節の摘出、酵素処理後の初代培養に成功した。ホールセルパッチクランプ法を用いて、初代培養後 3 日目の単離後根神経節細胞から、自発活動電位の記録に成功した。さらに、同一細胞において過分極で時間依存性に増大し、caesium sensitive である HCN 電流の記録に成功した。

一方で、同じ HCN チャネルファミリーである HCN4 の脊髄後角における局在をさらに詳細に調べるため、HCN4 の翻訳開始点に

ルシフェラーゼ遺伝子をノックインしたマウス (HCN4 +/Lcu) を作製した。中枢神経系における HCN4 由来の化学発光を検索したところ、脊髄後角に一致したシグナルを認めることができた。この HCN4 +/Lcu マウスを用いて、左足底部に 4%ホルマリンを 20 μ l 皮下注することで、炎症性疼痛モデルを作成した。ルシフェリンを腹腔内投与した後に脊髄膨大部を採取し、その化学発光の変化を調べたところ、ホルマリン注入側の化学発光が 24 時間、48 時間後に低下していることが明らかとなり、脊髄後角に発現する HCN4 が炎症性疼痛に関与する可能性が示唆された。しかしながら、qPCR を用いて炎症性疼痛による HCN4 の RNA 発現量の変化を調べたが、明らかな有意な変化を認めなかった。HCN チャンネルファミリーのうち最も cAMP 感受性が高い HCN4 に注目し、HCN4 遺伝子の翻訳開始点にテトラサイクリントランスアクチベータ (tTA) とその応答配列 (TRE) をノックインしたマウス (HCN4^{+tTA-TRE}) と、テトラサイクリン応答配列制御下で GFP を発現するトランスジェニックマウス (TRE-GFP マウス) とを交配し、中枢神経系における HCN4 チャンネルの局在を詳細に検討した。



その結果、上図に示すように脊髄後角第 2 層 (o) に HCN4 を発現するニューロンが極めて特異的に存在していることを発見した。

現在急性脊髄スライスを用いて、HCN4 陽性ニューロンの電気生理学的特性を検索中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. 小佐々優子, 三島康典, 伊藤明日香, 大下健輔, 新山修平, 牛島一男: 胸腹部大動脈瘤置換術中に発症したと考えられるたこつば型心筋症の 1 例. 臨床麻酔, 41, 84-86. 2017 査読なし
2. 伊藤明日香, 亀山直光, 大下健輔, 野田縁, 小佐々優子, 三島康典, 新山修平, 牛島一男: 心臓手術で手術器脳梗塞を発症した 4 症例. 蘇生, 36, 16-20, 2017 査読なし
3. Nakahara K, Oshita K, Itoh M, Takano M, Sakaguchi Y, Ishihara K: Clinical concentrations of local anesthetics bupivacaine and lidocaine differentially inhibit human Kir2.x inward rectifier K⁺ channels. Anesth Analg, 122(4), 1038-1047, 2016 査読あり
4. Oshita K, Itoh M, Hirashima S, Kuwabara Y, Ishihara K, Kuwahara K, Nakao K, Kimura T, Nakamura K, Ushijima K, Takano M: Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression HCN2, Journal of Molecular and Cellular Cardiology 80:81-89, 2015 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Oshita K, Kozasa Y, Nakagawa T, Nakashima N, Kuwahara K, Takano M: Hypokalemia-induced ventricular arrhythmogenicity is induced in transgenic mice overexpressing HCN2 specifically in the heart. The 95rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 2018 (高知)
2. 大下健輔, 小佐々優子, 中島則行, 桑原宏一朗, 鷹野誠, 牛島一男: 心臓特異的 HCN2 過剰発現マウスでは低カリウム血症による催不整脈性が上昇する. 日本麻酔科学会第 64 回学術集会, 2017 年 6 月 (神戸)
3. 大下健輔, 中島則行, 小佐々優子, 鷹野誠, 牛島一男: 炎症性疼痛による脊髄後角の HCN4 発現変化. 日本麻酔科学会第 63 回学術集会, 2016 年 5 月 (福岡)
4. 小佐々優子, 武谷三恵, 大下健輔, 鷹野誠, 牛島一男: ペースメーカーチャンネル HCN4 の陰性変時作用における新たな機能. 日本麻酔科学会第 63 回学術集会, 2016 年 5 月 (福岡)

〔図書〕(計 2件)

1. 大下健輔, 牛島一男: 代謝管理:高血糖の有害作用は何か? 麻酔科クリニカルクエスチョン 101, 診断と治療社, 202-203, 2016
2. 大下健輔, 牛島一男: 皮膚筋炎, 多発性筋炎. まれな疾患の麻酔 A to Z, 文光堂, 470-471, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大下 健輔 (Oshita, Kensuke)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 70529510

(2)研究分担者

(3)連携研究者

鷹野 誠 (Takano Makoto)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 30236252