

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791433

研究課題名(和文) ペースメーカーチャンネルの遺伝子多型を用いた神経因性疼痛の遺伝子治療

研究課題名(英文) Gene therapy for neuropathic pain applying SNP pace maker ion-channel (HCN channel) transduction to the spinal cord and dorsal root ganglion

研究代表者

賀来 隆治 (KAKU RYUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50444659

研究成果の概要(和文)：ペースメーカーチャンネルとしても知られている Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (以下 HCN) チャンネルは、神経因性疼痛においてビリビリとした痛みを引き起こす自発活動電位をコントロールしている。本研究では、神経損傷時の中枢神経系における HCN チャンネルの働きを明らかにし、遺伝子多型に注目して、そのチャンネル機能を制御することによって自発活動電位を抑え、神経因性疼痛の遺伝子治療に応用することを目的とした。その結果、ラット脊髄神経結紮モデルにおいて、HCN チャンネルのグリコシル化を変化させる、細胞内サイクリック AMP 濃度変化により逃避行動域値が上昇した。またカエルの卵母細胞を用いた電気生理学的検討から、ドミナントネガティブな HCN チャンネルが、活動電位を低下させることが示された。本研究によって得られたこれらの結果は、慢性痛の遺伝子治療を行う上で、非常に重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：HCN ion channels also know as a pace-maker channel play an important role on regulating spontaneous firing of central nerve systems at various neuropathic pain state. In this study, we investigated about the mechanisms of the HCN ion channel expression change to the nerve system. And we also investigated that the possibility of dominant-negative HCN ion channel as the source for the gene therapy to chronic neuropathic pain. We found that increase of cyclic AMP concentration decreased the glycosylated HCN ion channels on the plasma membrane. Non-glycosylated (SNP) HCN channels could reach to the plasma membrane of xenopus oocyte, but it did not pass the current. These findings suggested that the modulation of HCN channel expression on the spinal cord might be useful as the new treatment of chronic neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：遺伝子治療、神経因性疼痛、慢性痛、ペースメーカーチャンネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 帯状疱疹後神経痛、幻肢痛、癌性疼痛の

一部などの神経因性疼痛は、神経の損傷が関与していると考えられる難治性の激しい疼痛

である。これらの痛みは十分な加療が難しいのが現状であり、優れた疼痛治療方法の確立はペインクリニック領域における長年の課題の一つである。

(2) ビリビリとした痛みに関連する自発性活動電位は神経の損傷部位において認められ、この活動電位の発生に大きな役割を果たしていると考えられているのが、HCNチャンネルというイオンチャンネルである。神経損傷時のHCNチャンネル発現機序解明は、自発活動電位の抑制、つまりは慢性痛の抑制に繋がる可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) ペースメーカーチャンネルとしても知られているHCNチャンネルは、脊髄後角、後根神経節に広く発現しており、神経障害時の自発活動電位をコントロールしている。本研究では、神経障害時の中枢神経系におけるHCNチャンネルの発現制御に関する機序を明らかにすることを目的とした。

(2) またグリコシル化されない遺伝子多型チャンネルに注目して、これらの強発現によってチャンネル機能を制御することにより、自発活動電位を抑え、神経因性疼痛の遺伝子治療に応用することも目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) SDラットを用いてL5腰神経結紮モデルを作成する。2週間後に、疼痛行動を確認後、脊髄、後根神経節を摘出し、HCNチャンネルの発現変化について、ウエスタンブロット法、免疫染色法で検討する。

(2) 同モデルにおいて、脊髄神経結紮時にくも膜下腔にカテーテルを挿入し、そこから術後7日目、8日目、9日目に細胞内サイクリックAMP濃度を変化させる薬物を反復投与し、疼痛行動評価を行う。

(3) 遺伝子多型HCNチャンネルの機能について電気生理学的に検討を行う。これらの遺伝子多型チャンネルタンパク質を発現するベクターを作成し、ガラス電極を用いたボルテージクランプ法によってカエル卵母細胞に遺伝子多型HCNチャンネルを発現させた場合に、機能抑制的に働くことを確認する。

## 4. 研究成果

(1) これまでの結果から、細胞内サイクリックAMP濃度によって、ペースメーカーチャンネルのグリコシル化の程度が変化し、その結果、細胞膜への発現が変化することが明らかになった。(図1-2)

かになった。(図1-2)

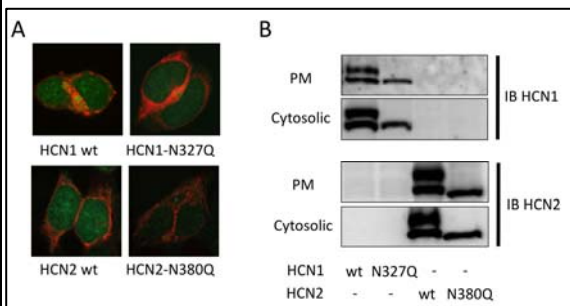


図1: HCNチャンネルのグリコシル化による細胞膜表面への発現変化

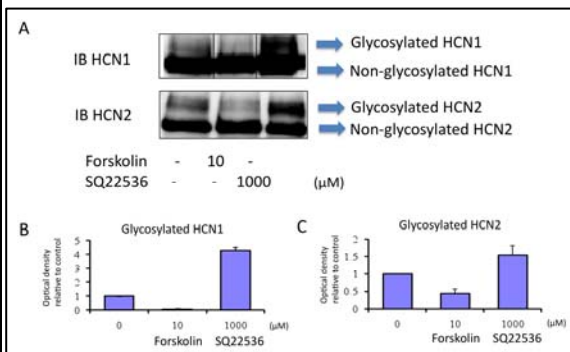


図2: 細胞内サイクリックAMP濃度変化がHCNチャンネルのグリコシル化に与える影響

(2) これらの結果をふまえて、ラット脊髄神経結紮モデルに対し、くも膜下腔に細胞内サイクリックAMP濃度を変化させる薬物を反復投与した。細胞内サイクリックAMP濃度を上昇させるフォスコリンを投与した場合には、術後13日目にフォンフライに対する逃避行動域値が上昇した。一方で、細胞内サイクリックAMP濃度を減少させるSQ22536を投与した場合には、疼痛行動に変化は認めなかった。これらの実験から、フォスコリン、SQ22536という薬物によって細胞内サイクリックAMPが変化し、HCNチャンネルのグリコシル化が変化することにより疼痛行動が変化することが明らかになった。(図3)

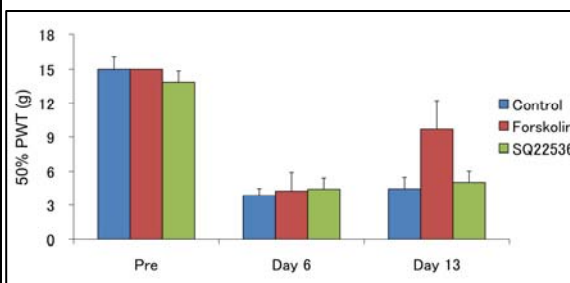


図3: 細胞内サイクリックAMP濃度を変化させる薬物投与による疼痛行動変化

(3) 平成23年度に、アメリカ合衆国ウィスコンシン大学マディソン校に短期留学し、ペースメーカーチャンネルのグリコシル化に関する遺伝子多型を発現したカエルの卵母

細胞を用いて、電気生理学的検討を行った。正常なチャンネルを発現する RNA と、遺伝子多型チャンネルを発現する RNA を、1対1、1対2の割合で混合し、卵母細胞に注入し、24、48 時間後に、2 電極電圧クランプ法によって細胞膜上へ発現したチャンネルの電気生理学的特性を測定した。(図 4) その結果、正常のチャンネルと遺伝子多型チャンネルを1対1の割合で混合した場合、正常のチャンネルを半分だけ発現させた場合よりも膜を通過する電流が少なくなることが明らかになった。これはつまり、遺伝子多型チャンネルは膜への発現は認めるものの、電気を通さないこと、正常のチャンネル機能を抑制することを示していると考えられた。また1対2で混合した場合の結果と合わせて、4つのサブユニットの内、1つだけが遺伝子多型チャンネルに置き換わった場合には電流を通すこと、2つが置き換わった場合には電流を通さなくなることが示唆された。これらの結果により、ラット痛みモデルに対して、ウイルスベクターを用いて遺伝子多型チャンネルを強発現、遺伝子導入する際の正常チャンネル、遺伝子多型チャンネルとの最適な比率（正常チャンネルが30%程度）が明らかになった。(図5)

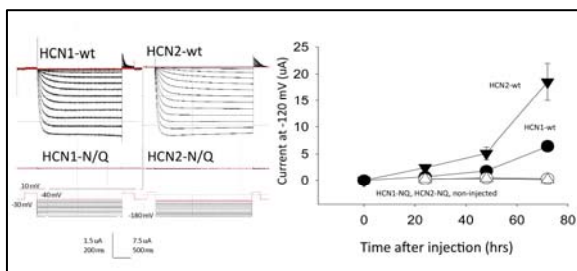


図 4：グリコシル化の有無による HCN チャンネルの電流変化

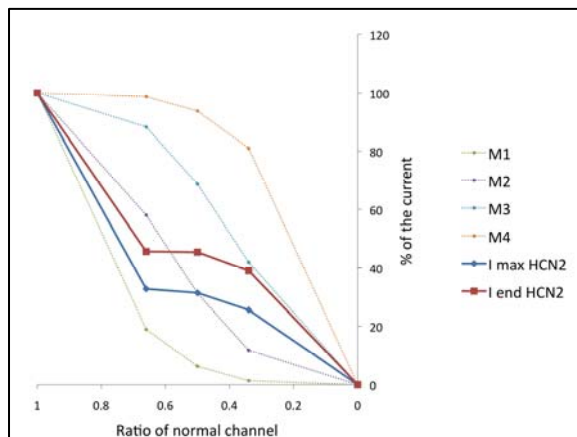


図 5：遺伝子多型チャンネルとの混合発現による HCN チャンネルの電流変化

(4) 本研究において得られたこれらの知見により、グリコシル化されない遺伝子多型 HCN チャンネルは膜電流を通過させないだけでなく、通常の機能をもつチャンネルを抑制

する作用をもつことが示され、これらを中枢神経系に強発現することで、自発活動電位を抑制し、その後の慢性痛、神経因性疼痛への移行を抑えることが出来る可能性が示された。今後は本研究で得られた結果に基づき、動物実験を経た後、臨床応用も視野に入れた研究を進めていく予定である。

#### 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 5 件)

- ① Mizobuchi S, Kanzaki H, Omiya H, Matsuoka Y, Obata N, Kaku R, Nakajima H, Ouchida M, Morita K, Spinal nerve injury causes upregulation of ErbB2 and ErbB3 receptors in rat dorsal root ganglia, *J Pain Res*, 査読有, 6 巻, 2013, 87-94
- ② Mizobuchi S, Matsuoka Y, Obata N, Kaku R, Itano Y, Tomotsuka N, Taniguchi A, Nishie H, Kanzaki H, Ouchida M, Morita K, Antinociceptive effects of intrathecal landiolol injection in a rat formalin pain model, *Acta Med Okayama*, 査読有, 66 巻, 2012, 285-289
- ③ Kawakami T, Park SW, Kaku R, Yang J, Extracellular regulated kinase 5 mediated renal protection against ischemia-reperfusion injury, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 418 巻, 2012, 603-608
- ④ Kanzaki H, Mizobuchi S, Obata N, Itano Y, Kaku R, Tomotsuka N, Nakajima H, Ouchida M, Nakatsuka H, Maeshima K, Morita K, Expression changes of the neuregulin 1 isoforms in neuropathic pain model rats, *Neurosci Lett*, 査読有, 508 巻, 2012, 78-83
- ⑤ Obata N, Mizobuchi S, Itano Y, Matsuoka Y, Kaku R, Tomotsuka N, Morita K, Kanzaki H, Ouchida M, Yokoyama M, Decoy strategy targeting the brain-derived neurotrophic factor exon I to attenuate tactile allodynia in the neuropathic pain model of rats, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 408 巻, 2011, 139-44

[学会発表] (計 4 件)

- ① Taniguchi A, Kaku R, Tomotsuka N, Omiya H, Ishii N, Obata N, Matsuoka Y,

Mizobuchi S, Morita K, Decoy strategy targeting the Brain-derived neurotrophic factor Exon I suppress pain behavior in rat inflammatory pain model、American Society of Anesthesiologists Annual meeting、2012.10.14、ワシントンDC、USA

② Tomotsuka N, Kaku R, Taniguchi A, Obata N, Matsuoka Y, Mizobuchi S, Sato T, Ichikawa H, Morita K, Change of BDNF Expression in the Dorsal Root Ganglion of the Bone Cancer Pain Model, American Society of Anesthesiologists Annual meeting、2012.10.14、ワシントンDC、USA

③ 賀来隆治、小幡典彦、友塚直人、板野義太郎、溝渕知司、森田潔、HCNチャンネルの転写後調節による細胞膜表面への発現調節に関する検討、日本疼痛学会、2010.7.2、京都国際会議場

④ Kaku R, Obata N, Kanzaki H, Yang J, Morita K, Role of the Cyclic AMP in Glycosylation and Plasma Membrane Targeting of the HCN Ion Channels, American Society of Anesthesiologists Annual meeting、2010.10.17、サンディエゴ、USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

賀来 隆治 (KAKU RYUJI)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：50444659

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし