

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670292

研究課題名(和文)化学発光によるHCN4発現ニューロンの同定と、神経因性疼痛における機能の解明

研究課題名(英文)Identification of HCN4-expressing neurons using HCN4-luciferase knock-in mouse

研究代表者

鷹野 誠 (TAKANO, Makoto)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：30236252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、自発発火する洞房結節細胞やニューロンに存在するHCN4という分子に注目し、その遺伝子座にホタルの発光蛋白質を組み込んだ遺伝子改変マウスを作成した。このマウスではHCN4が発現しているニューロンをホタルのように光らせることができる。この光を手がかりに、脊髄では後角にHCN4発現ニューロンが存在していることを発見した。HCN4発現ニューロンが痛覚伝導路や神経障害性疼痛においてどのような機能を果たすか解明するために、その機構解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：We generated transgenic mouse, in which cDNA of firefly luciferase-GFP fusion protein was knocked in at HCN4 locus (HCN4+/Luc), and visualized HCN4-expressing neurons in central nervous system. HCN4-expressing neurons were found in dorsal horn of spinal cord, and in III layer of sensory cortex.

研究分野：生理学

キーワード：HCN4 ニューロン 脊髄後角 大脳皮質

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し、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。近年、HCN2 のノックアウト(KO)マウスを使った神経障害性疼痛の研究において、疼痛反応が有意に減弱していることが報告されるなど、HCN チャンネルファミリーは疼痛治療の新たなターゲットとして注目を集めている。HCN チャンネルファミリーのうち、HCN4 は免疫染色法を使った実験結果から、体性感覚情報処理の中樞である視床の VPL・VPM に発現していることが報告されている。それにもかかわらず、HCN4 の生理学的機能は殆ど明らかにされていない。これは HCN4 の単純なノックアウト (KO) マウスは胎生致死となるためである。一方、我々は HCN4 チャンネルが発現する領域をルシフェリンの化学発光と GFP 蛍光によって可視化・同定できるマウスと、テトラサイクリン遺伝子発現システムを使って HCN4 の発現を可逆的に抑制できるマウスの作成に成功している。

2. 研究の目的

そこで本研究ではこれらのマウスを使い、痛覚伝導路において HCN4 を発現する神経細胞を同定し、痛覚における HCN4 発現ニューロンの生理学的機能を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)トランスジェニックマウスの作成：
HCN4 遺伝子座の一方のアレルにテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA)とその応答配列(TRE)をノックイン (KI)した HCN4^{tTA}/TRE マウスと、蛍ルシフェラーゼ (Luc) を KI したマウス HCN4^{+/Luc} とを交配し、ダブル KI マウス

(HCN4^{tTA}/TRE/Luc)を作成した。また、テトラサイクリン応答配列の下流に GFP cDNA を挿入した mini gene を組み込んだトランスジェニックマウス (TRE_GFP) と、HCN4^{+/tTA}/TRE とを交配し、HCN4 を過剰発現すると同時にその発現部位を可視化可能なダブルトランスジェニックマウス (HCN4^{tTA}/+・TRE_GFP) を作成した。

(2)発光イメージング：In vivo での HCN4 発現領域の可視化するためには、150 mg/kg のルシフェリンを腹腔内投与し 15 分後に IVIS Xenogen イメージング装置で全身の撮影を行った。

Ex vivo および in vitro での可視化のためには、同じくイソフルレン麻酔下に 150 mg/kg のルシフェリンをマウスの腹腔内に投与して 15 分後に心臓、脳および脊髄を摘出し、LAS4000 イメージング装置を使用して撮影をおこなった。

続いて氷冷した状態で脳スライサー (堂阪) を使って脊髄水平断および脳の矢状断、前額断スライスを作成した。95%O₂、5%CO₂ 混合ガスでバブリングした人工脳脊髄液中でスライスを 15 分間回復させたのち、実体顕微鏡および正立水浸式顕微鏡に EM-CCD カメラを装着して発光イメージングを実施した。

(3)免疫染色と蛍光イメージング：

HCN4^{tTA}/+・TRE_GFP を 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脊髄を取り出したのちに 12 時間の後固定を実施した。PBS で洗浄後、さらに 4℃にて 30% w/v のスクロース PBS 溶液でインキュベートした。コンパウンド (OCT Compound, Sakura®Finetek) に包埋・凍結後に、クライオスタット (Leica Biosystems) を用いて 30 ミクロンの薄切切片とした。PBS 中にて、余分なコンパウンドを除去した後、抗 HCN4 抗体 (1:400、Alomone 社) を含む Working Solution にて室温・24 時間、

フローティング法にてインキュベートした。PBS-X (Triton-X 0.3%を含む) で3回洗浄し、二次抗体 (Alexa-Fluor594 を 1:200) を含む Working Solution 中でフローティング法にてインキュベートした (室温、2時間)。PBS-X にて3回洗浄し、MAS コートスライドガラス (マツナミガラス) に切片を貼り付けて、Vectashield マウンティング液 (VectorLabs) にて封入した。蛍光顕微鏡を用いて、B 筋起にて内在性 GFP を、G 筋起にて Alexa-Fluor594 で標識された HCN4 の局在を観察した。

4. 研究の成果

体表面に近い味蕾や嗅神経の HCN4 発現細胞に由来する化学発光を短時間の露光で可視化することに成功した。四肢や尻尾からも破骨細胞に由来すると思われる強い化学発光シグナルを検出することができたが、詳細は不明である。新生児マウスでは、透過性の高い長波長の発光基質 (アカルミネ) を投与することにより、頭蓋骨を透して発光シグナルを検出することが可能だった。脳スライス標本では、重本らの報告とは異なり、視床 VPL、VPM 付近の発光シグナルは明瞭ではなく、むしろ基底核、黒質、大脳皮質 (特に島皮質) に強いシグナルが認められた。脊髄では後角の 1 層付近に特異的なシグナルが認められた。強拡大で HCN4 発現ニューロンを単一細胞レベルで同定することは、スライス内での光の散乱のため、十分な S/N を得ることが容易ではなかった。

そこで単一細胞レベルでの発現部位解析をおこなうため HCN4^{tTA/+}・TRE_GFP から脳・脊髄スライス標本を作製した。その結果、脊髄後角では発光イメージングと同様に、脊髄後角に GFP 蛍光、免疫蛍光シグナルが一致して認められた。強拡大では脊髄後角の第 1 層の神経の細胞体にシグナ

ルを認めることができた。

脳では、大脳皮質感覚野、島皮質および聴覚連合野、基底核、視床髄板内核、上丘、黒質などに GFP 内在蛍光が強く認められた。強拡大では皮質 1 層の錐体細胞の細胞体に GFP 蛍光を認めることができ、免疫染色の赤色蛍光もおおむね一致することが判明した。一方、視床 VPL、VPM では重本らの報告とは異なり、GFP 蛍光、免疫染色とも明瞭なシグナルは認められず、むしろ髄板内核に強い GFP 蛍光と免疫染色シグナルが認められた。このように HCN4 の分布は先行論文とは異なっている箇所も多く見つかった。現在は HCN4^{tTA/+}・TRE_GFP から作成した新鮮な脳・脊髄スライス標本を用い、HCN4 発現ニューロンの電気生理学的特性を検討している。今後は HCN4^{+Luc} を使って神経障害性疼痛モデルを作成し、HCN4 発現量変化が生じる部位のスクリーニングをおこない、その病態生理学的な意義を明らかにしていく予定である。

5. 発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1. Itoh M, Ishihara K, Nakashima N, Takano M: The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels contain multiple S-palmitoylation sites. *J Physiol Sci*; 66:241-248, 2016. 査読有
doi:10.1007/s12576-015-0420-5
2. Nakahira 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*; 122:1038-1047, 2016. 査読有.
doi:10.1213/ANE.0000000000001137
3. Murata Y, Yasaka T, Takano M, Ishihara K: Neuronal and glial expression of inward rectifier potassium channel subunits Kir2.x in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *Neurosci Lett*; 617:59-65, 2016. 査読有
doi:10.1016/j.neulet.2016.02.007

4. Oba T, Yasukawa H, Nagata T, Kyogoku S, Minami T, Nishihara M, Ohshima H, Mawatari K, Nohara S, Takahashi J, Sugi Y, Igata S, Iwamoto Y, Kai H, Matsuoka H, Takano M, Aoki H, Fukumoto Y, Imaizumi T: Renal nerve-mediated erythropoietin release confers cardioprotection during remote ischemic preconditioning. *Circ J*; 79:1557-1567, 2015. 査読有
doi:10.1253/circj.CJ-14-1171
5. Harrell DT, Ashihara T, Ishikawa T, Tominaga I, Mazzanti A, Takahashi K, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Sumitomo N, Uno K, Takano M, Priori SG, Makita N: Genotype-dependent differences in age of manifestation and arrhythmia complications in short QT syndrome. *Int J Cardiol*; 190:393-402, 2015. 査読有
doi:10.1016/j.ijcard.2015.04.090
6. Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Minami T, Yasukawa H, Okayama S, Nakamura K, Okabe Y, Tanaka E, Takemura G, Kosai K, Yamashita Y, Matsuishi T: Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes *Mecp2*-null mice to arrhythmias. *Sci Rep*; 5:11204, 2015. 査読有
DOI:10.1038/srep11204
7. 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 of HCN2. *J Mol Cell Cardiol*; 80:81-89, 2015. 査読有
doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.12.019
8. Saito Y, Nakamura K, Yoshida M, Sugiyama H, Ohe T, Kurokawa J, Furukawa T, Takano M, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Ito H: Enhancement of spontaneous activity by HCN4 overexpression in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes - a possible biological pacemaker. *PLoS One*; 10:e0138193, 2015. 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0138193
9. Igata S, Hayashi T, Itoh M, Akasu T, Takano M, Ishimatsu M: Persistent α_1 -adrenergic receptor function in the nucleus locus coeruleus causes hyperexcitability in AD/HD model rats. *J Neurophysiol*; 111:777-786, 2014. 査読有
doi:10.1152/jn.01103.2012
1. 鷹野 誠, 小佐々優子, 武谷三恵, 中島則行, 石原圭子: HCN4 過剰発現・ノックアウトマウスにおける洞房結節機能の変化. 第 55 回日本生体医工学会大会, 平成 28 年 4 月 27 日, 富山国際会議場(富山)
2. Takeya M, Hashitani H, Hayashi T, Nakamura K, Takano M: Role of mucosa in generating spontaneous activity in the guinea pig seminal vesicle. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 22, 2016, Sapporo Convention Center (札幌)
3. Ishihara K, Itoh M, Igata S, Takano M: Revisiting K^+ dependence of conductance and gating of strong inward rectifier K^+ channels. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 24, 2016, Sapporo Convention Center (札幌)
4. Kozasa Y, Takeya M, Nakashima N, Ushijima K, Takano M: The role of pacemaker channel HCN4 against bradycardic response. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 22, 2016, Sapporo Convention Center (札幌)
5. Nakashima N, Takano M: Visualization of HCN4-expressing neurons with GFP using *Tet*-expression system. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 23, 2016, Sapporo Convention Center (札幌)
6. 小佐々優子, 武谷三恵, 中島則行, 牛島一男, 鷹野 誠: 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. 第 66 回西日本生理学会, 平成 27 年 10 月 9 日, 久留米大学筑水会館(久留米)
7. 中島則行, 鷹野 誠: ノックインマウスを使った HCN4 発現ニューロンの可視化. 第 66 回西日本生理学会, 平成 27 年 10 月 9 日, 久留米大学筑水会館(久留米)
8. 柳(石原)圭子, 井形幸代, 伊藤政之, 鷹野 誠: 内向き整流性カリウムチャンネルのポアの開口には細胞外カリウムイオンの存在を必要としない. 平成 27 年度生理学研究所研究会「膜システムの機能的・構造的統合」, 平成 27 年 9 月 1 日, 生理学研究所(岡崎)
9. Takano M, Kozasa Y, Takeya M, Ohshita K, Ito M, Ishihara K, Nakashima N: Controversy still goes on; lessons from

- HCN4 knock-out mice. The Joint Meeting of the 30th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society and the 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology, July 29, 2015, Kyoto International Conference Center (京都)
10. Ono K, Okamoto Y, Umehara S, Adachi T, Ohba T, Amano A, Takano M: Atrial fibrillation and arrhythmogenic activities of pulmonary vein cardiomyocytes. The Joint Meeting of the 30th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society and the 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology, July 31, 2015, Kyoto International Conference Center (京都)
 11. Harrell Daniel T, Ashihara T, Ishikawa T, Mazzanti A, Takahashi K, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Sumitomo N, Uno K, Takano M, Priori Silvia G, Makita N: Meta-analysis of short QT syndrome discloses genotype-dependent clinical characteristics in age of manifestation and arrhythmia complications. The Joint Meeting of the 30th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society and the 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology, July 30, 2015, Kyoto International Conference Center (京都)
 12. Itoh M, Ishihara K, Takano M: Zdhc3/7, the members of protein-palmitoylation enzymes, inhibit the current amplitude of HCN2 channel. The 120th Annual Meeting of the Japanese Association Anatomists, the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 21, 2015, Kobe Convention Center (神戸)
 13. Yanagi-Ishihara K, Itoh M, Takano M: Mechanism of the complete block of the Kir2.1 inward rectifier K⁺ channel under the external K⁺-free condition. The 120th Annual Meeting of the Japanese Association Anatomists, the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 21, 2015, Kobe Convention Center (神戸)
 14. Kozasa Y, Ohshita K, Nakashima N, Ushijima K, Takano M: Luminescence imaging of HCN4 expression and phenotypic analysis of HCN4 TET-off mouse. The 120th Annual Meeting of the Japanese Association Anatomists, the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 22, 2015, Kobe Convention Center (神戸)
 15. Takeya M, Hayashi T, Nakamura K, Takano M: Epithelium-dependent periodical excitation in response to stretch of guinea pig seminal vesicle. The 120th Annual Meeting of the Japanese Association Anatomists, the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 22, 2015, Kobe Convention Center (神戸)
 16. 鷹野 誠: ペースメーカーチャネルの病態生理～遺伝子改変マウスから得た知見～. 第 68 回福岡不整脈同好会, 平成 27 年 1 月 24 日, グランドハイアット福岡(福岡)
 17. 中島則行, 中島輝恵, 田浦晶子, 鷹野 誠, 大森治紀: ヌクレオチド結合タンパクによる細胞内 cAMP 濃度の調整. 第 107 回近畿生理学談話会, 平成 26 年 10 月 25 日, 兵庫医療大学(兵庫)
 18. 小佐々優子, 大下健輔, 中島則行, 杉山千絵美, 伊藤政之, 牛島一男, 鷹野 誠: 化学発光による HCN4 発現部位の可視化. 第 65 回西日本生理学会, 平成 26 年 10 月 24 日, 琉球大学研究者交流施設 50 周年記念館, (沖縄)
 19. Murata Y, Honda Y, Yasaka T, Takano M, Masuko S, Ishihara K: Differential expression of Kir2.x inward rectifier K⁺ channels in neurons and glial cells in rat dorsal root ganglion and spinal cord. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2014), September 11, 2014, Pacifico Yokohama (横浜)
 20. Kuwabara Y, Kuwahara K, Takano M, Kinoshita H, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Igata S, Usami S, Minami T, Yamada Y, Nakao K, Yamada C, Shibata J, Nishikimi T, Ueshima K, Nakao K: Increased expression of HCN channels in the ventricular myocardium contributes to enhanced arrhythmicity in mouse failing hearts. The Joint Congress of the 29th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society and the 31st Annual Scientific Session of the Japanese Society of Electrocardiology, July 23, 2014, Prince Park Tower Tokyo (東京)
 21. Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Okabe Y, Tanaka E, Matsuishi T: Analysis of cardiac arrhythmias and gene expression in MeCP2-null Mouse. 13th Rett Syndrome Symposium, June 24-26, 2014, Westfields Marriott Washington Dulles (Chantilly, USA)

〔図書〕(計 1 件)

鷹野 誠: 南江堂(東京), 不整脈学,
2012, 614 (29-31).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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〕

久留米大学医学部生理学講座ホームページ

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/physiol2/>

久留米大学研究者紹介

<http://research.kurume-u.ac.jp/data.php?scode=81615>

632890988

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

中島 則行 (NAKASHIMA, Noriyuki)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 80625468