

令和元年6月21日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05124

研究課題名（和文）TET-Offマウスを用いたHCN4の洞房結節における新たな機能の解明

研究課題名（英文）Novel physiological role of HCN4 channel in the sinoatrial node revealed with TET-off genetic switch system

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） 8,800,000円

研究成果の概要（和文）：洞房結節のペースメーカー細胞は自動能を持ち、過分極誘発陽イオンチャネル（HCN4）を特異的に発現していることが知られている。しかしHCN4の機能には不明な点が多く、長年にわたって議論が続いてきた。そこで我々はHCN4の発現量を正常の約3倍から0倍まで可逆的に制御できる遺伝子改変マウスを開発し、洞房結節機能の変化を解析した。その結果、HCN4は迷走神経活動による過剰な徐脈を防ぐ機能を持つことを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓は一生にわたって拍動し続ける。これはわずか数万個のペースメーカー細胞という特殊な細胞が繰り返し電気的な興奮を発生するためである。この細胞の機能が低下すると、身体活動に支障をきたすほど脈拍数が低下することがある。我々は、ペースメーカー細胞にだけ存在するHCN4というイオンチャネル（細胞膜上に存在し、電気の通り道となる特殊な蛋白質）が、過度の脈拍数低下を防ぐ機能を持つことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The heart rate is dynamically controlled by the autonomic nervous systems that regulate the sinoatrial node (SAN). HCN4 pacemaker channels are well-known molecular marker of SAN, although its physiological role still remains matter of debate. We therefore developed novel transgenic mice in which expression level of HCN4 channels could be reversibly changed from zero to ~3 times of that in wild type mice, using tetracycline trans-activator and tetracycline responsive element. We found that overexpression of HCN4 channels reduced the parasympathetic response of SAN, whereas genetic silencing of HCN4 channels generated opposite phenotypic changes. Our study suggested that HCN4 channels attenuate the vagal response of SAN, and prevent excessive bradycardia. We concluded that HCN4 channels maintain the heart rate variability within a physiological range by this mechanism.

研究分野：生理学

キーワード：ペースメーカーチャネル 洞房結節 自律神経

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ネルには HCN1~4 のサブタイプが存在し、心臓では刺激伝導系の洞房結節に主として HCN4 が発現している。HCN1 と HCN2 は、ノックアウト(KO)マウスの解析から、空間学習、てんかん、痛覚などの神経機能において重要な機能を果たすことが判明した。一方、HCN4 のホモ KO マウスは胎生致死であるため、その生理学的機能については不明な点が多い。この問題を克服するために、変異型 estrogen 受容体と cre recombinase の融合分子を利用した tamoxifen 誘導 HCN4 コンディショナルノックアウトマウス (HCN4 icKO) が開発された。しかしながら、この HCN4 icKO マウスを使った研究においてすら、致死的な洞不全と房室ブロックを起こすという報告と、無害な一過性の洞性不整脈が生じるのみであるという報告とが存在し、洞房結節における HCN4 の生理学的機能に関しては、未だにコンセンサスが得られているとは言い難い。

1980 年代に過分極誘発陽イオンチャネル電流 (I_f/I_h) が発見された当初から、 I_f/I_h は、洞房結節の緩徐脱分極相を形成するという説と、洞房結節が心房筋の深い静止膜電位によって電気緊張的に過分極したときに内向き電流を供給し自動能を維持するという説とが提唱され、長年にわたって論争が続いてきた。しかしながら HCN4 icKO を使った報告では、もともと HCN4 を発現していた細胞を同定することが原理的に不可能な条件で得られた実験結果のみに基づいている。また洞房結節が周囲の心房と gap junction で電氣的に連結した状態を保ち、その境界部が電気緊張的に過分極するという生理的な状態で HCN4 の機能を検討した報告はまったく見あたらない。

いっぽう連携研究者である姫野らが、単一ペースメーカー細胞の活動電位のシミュレーションをおこなった結果では、 I_f/I_h は自動能の発生にはほとんど寄与しないと予想された。しかし、洞房結節と心房筋が gap junction で電氣的に連絡した状態でのシミュレーションの結果では、心房に近い周辺部に近づくにつれ、洞房結節細胞群の電気緊張的な過分極が大きくなり、次第に I_f/I_h の活性化が顕著になることが判明した。その結果、 I_f/I_h を通って流れる内向き電流は、洞房結節から心房へ流入する電流の中で非常に大きなウエイトを占めることが予想された。

2. 研究の目的

そこで本研究では、HCN4 の発現量を可逆的に変化させることが可能な遺伝子改変マウスを新たに作成し、その洞房結節の生理学的特性の変化をシミュレーション結果と比較することにより、HCN4 の洞房結節における生理学的機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの作成

すでに作成済みの HCN4 の翻訳開始点に蛍光素(Luc) を KI したマウス(HCN4^{+/Luc}) と、HCN4 遺伝子座にテトラサイクリン遺伝子発現制御システムを KI したマウス(HCN4^{+/TA_TRE}) とを交配した。これにより、洞房結節やペースメーカー細胞をルシフェリンの化学発光によって可視化・同定できると同時にドキシサイクリン (DOX) 投与によって可逆的に HCN4 の発現を完全に抑制できるダブルノックインマウス (HCN4^{Luc/TA_TRE}) を得た。また比較のために α MHC promoter を使って心臓特異的に HCN2 を過剰発現するトランスジェニックマウス (HCN2-Tg) を準備した。全ての実験は 14 ~ 25 週齢、体重 20 ~ 25 g のマウスを使用して行った。

(2) 分子生物学実験

5% セボフルレン麻酔下にマウスから洞房結節標本を摘出し、RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen) および TRIzol reagent を用いて total RNA を抽出した。Superscript II によって single strand cDNA を作成し、qPCR (TaqMan probe) およびマイクロアレイ (Affymetrix) による解析を実施した。

(3) 発光イメージング

30 mg/ml の D-luciferin 水溶液 150 μ l をマウスに腹腔内投与し、15 分後に IVIS-100 により in vivo 発光イメージングを実施した。その後 5% セボフルレン麻酔下にマウスから心臓を摘出し、マクロズーム顕微鏡に装着した EM-CCD カメラにより ex vivo 発光イメージングを実施した。

(4) Ca²⁺イメージング

5% セボフルレン麻酔下にマウスから洞房結節標本を摘出し、Ca²⁺感受性蛍光試薬 Fluo-4 10 μ g/ml および 10 μ M blebbistatin を含む 0.1 mM Ca²⁺ Tyrode 液中で 30 分間インキュベートした。正立水浸顕微鏡と EM-CCD カメラを使用し、この標本の蛍光イメージングを実施した。

(5) パッチクランプ実験

5%セボフルレン麻酔下にマウスから洞房結節標本を摘出し、酵素処理によって単離ペースメーカー細胞を得た。単離細胞を 30 ug/ml D-luciferin を含む KB 液中に保存し、HCN4 発現細胞を化学発光によって同定した。I_f 電流は通常の ruptured whole cell patch 法により 1 mM Ba²⁺ を含む細胞外液中で記録した。自発活動電位は perforated whole cell patch 法によって記録し、dV/dT=0 となる時点から緩徐脱分極相の 2/3 の電位にまで到達する時点の間で拡張期脱分極速度(DDR)を測定した。

(6) 迷走神経刺激

マウスを 3%セボフルレンで麻酔した後、コントロールとしてII誘導の心電図を記録した。マウスの体温をモニターし加熱装置により 37 °C に維持した。続いて頸部正中線上で皮膚を切開し、右迷走神経を剥離した。8-0 ナイロン糸で迷走神経を結紮し、その末梢側に双極電極を設置して電気刺激を行った。刺激強度は 10V 20Hz で 10 秒間行った。実験終了後はセボフルレン濃度を 5% に上げ、decapitation することにより安楽死させた。

(7) 心電図テレメトリ

マウスを 1.5% イソフルレンにて麻酔後、心電図テレメーター送信機 (DSI 社製 TA11ETA-F10) を皮下に埋め込んだ。電極は胸部II誘導が記録できる位置に固定した。8 週間の回復期間の後、自由行動下にマウス心電図を記録した。マウスは 25 °C に保たれた飼育室内で 12 時間明期、12 時間暗期の条件下で飼育した。飼料・水は自由に摂取させた。実験終了後はセボフルレン 5% 深麻酔下に decapitation することにより安楽死させた。

(8) 心拍数変動の解析

心電図の波形データは 1 kHz でデジタル化し、PONEMAH ソフトウェア (DSI 社) で解析を行った。RR 間隔を 1 分間平均することにより平均心拍数(beat per min)を計算し、階級幅 10 bpm で 100 bpm から 800 bpm の範囲でヒストグラムを作成した。心拍数変動の解析は、明期 = 安静期中に記録された心拍数ヒストグラムの解析から最頻値を求め、実施した。RR プロットは 60 秒間の値を使用した。ポアンカレプロットは 20000 点の連続データを使用した。フーリエ解析は安静期間の 2 時間分のデータを対象とし、Kubios HRV standard software を用いて実施した。

4. 研究成果

HCN4^{luc/TA-TRE} マウスに DOX を含有する餌を投与した。投与開始前、投与開始後 1 週目、2 週目、4 週目にそれぞれ心臓を摘出し、HCN4 の発現量を qPCR で比較した。その結果、投与開始前では野生型の 1.3 倍 (有意差なし)、1 週間後で 0.33 倍、2 週間後で 0.10 倍、4 週間後で 0.09 倍と有意に低下していた。この DOX 投与期間中にマウスが死亡することは全く無かった。いっぽう DOX 投与前の HCN4^{+/TA-TRE} では、HCN4 発現量は野生型の 3.1 倍と過剰発現になっていることが判明した。そこで野生型マウス (WT)、HCN4^{+/TA-TRE} = HCN4 過剰発現マウス (HCN4-OEx)、DOX 投与後 2 週間の HCN4^{luc/TA-TRE} マウス = HCN4 ノックダウンマウス (HCN4-KD) の 3 群に分け、パッチクランプ法により I_f 電流密度を比較したところ、HCN4-OEx では 3 倍程度に増加し、HCN4-KD では 0.25 倍程度に減少していることが確認できた。HCN4 の発現抑制は western blot でも確認した。さらにこれら 3 群間で、洞房結節機能に影響する可能性が報告されている分子 (Hcn1、Hcn2、Hcn3、Trpm7、Scn5a、Cacna1c、Cacna1d、Cacna1g、Cacna1h、Kcnj3、Kcnj6、Kcnj9、Kcnq1、Kenh1、Slc8a1、Atp2a2、Ryr1、Ryr2、Casq1、Casq2、Chrm1&2、Rgs6、Adra1a、Adra1b、Gng11) の発現量には差が認められないことをマイクロアレイで確認した。

心拍数ヒストグラムの解析から、WT では活動期は 2 峰性、安静期はやや遅い単峰性の心拍数分布を示した。HCN4-OEx では活動期・安静期ともに単峰性の心拍数分布を示した。しかし HCN4-KD では活動期・安静期ともに心拍数の分布は徐脈側にシフトし、とくに安静期には顕著な徐脈のピークが出現した。この結果から HCN4 発現量の変化は迷走神経活動の高い安静期の心拍数変動に大きな影響を及ぼすことが判明した。

そこで安静時に記録した 2 時間分の心電図テレメトリから RR 変動をより詳細に解析した。その結果、HCN4 発現量と RR 変動幅との間には逆の相関関係が存在することが示唆された。WT、HCN4-KD、HCN4-OEx に対して薬理的な自律神経遮断を行ったところ、いずれの心拍数も約 400 bpm 程度に収斂し、HCN4 発現量は洞房結節の自律神経応答に対して大きな影響を持つことが示唆された。特にフーリエ解析の結果から、交感神経系よりも迷走神経系への応答が顕著に変化していることが明らかになった。

この結果に基づき、麻酔下に3群のマウスの心電図を記録しつつ、頸部迷走神経の電気刺激を行った。WTやHCN4-KDでは可逆的な徐脈を起こすのと同強度の電気刺激によってHCN4-KDでは迷走神経刺激により完全に心停止することが明らかになった。腹腔内にisoproterenolおよびpropranololを投与した後に迷走神経刺激を行った場合も同様の結果が得られた。すなわちHCN4は交感神経刺激に対する洞房結節の応答には関与しないが、迷走神経刺激に対する応答を減弱させ、自発発火を安定化させる機能を持つことが明らかになった。

同様の結果は単離ペースメーカー細胞で記録した自発活動電位でも得られた。すなわちアセチルコリン投与による自発発火頻度の減少の程度はHCN4-KD > WT > HCN4-OExの順であった。HCN4-KDのペースメーカー細胞は不安定な自発発火を示したがisoproterenol投与により発火頻度が上昇し、同条件のWT、HCN4-OExのペースメーカー細胞の発火頻度と有意差は認められなかった。しなしながら、この条件下でもアセチルコリンを投与するとHCN4-KDのみ、アセチルコリンによる発火頻度の低下が有意に大きかった。

これらの結果から、マウス洞房結節においてHCN4は迷走神経刺激によるアセチルコリンK電流の活性化に対抗して、過度の徐脈を抑制し、自発発火を安定化させる機能を持つ、と結論した。コンピュータシミュレーションの結果とは異なり、HCN4は単離ペースメーカー細胞でも安定した自動能を維持するために必要であることが明らかになった。HCN4-KDでは自発発火が不安定であるため、洞房結節領域から周囲への活動電位の伝搬速度を光学的に測定することは困難であった。電気刺激が周囲に波及することを避けるために、オプトジェネティクスを使って洞房結節を駆動し、興奮伝導を解析することを今後試みる予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Oshita K, Kozasa Y, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Kuwahara K, Nakagawa T, Nakashima N, Hiraki T, Takano M: Overexpression of the HCN2 channel increases the arrhythmogenicity induced by hypokalemia. *J Physiol Sci*, 査読有, 2019, in press

<http://dx.doi.org/10.1007/s12576-019-00684-7>

Saito Y, Nakamura K, Yoshida M, Sugiyama H, Takano M, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Ito H: HCN4-overexpressing mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes Generate a new rapid rhythm in rats with bradycardia. *Int Heart J*, 査読有, 2018; 59(3):601-606

<http://dx.doi.org/10.1007/s12576-019-00684-7>

Kozasa Y, Nakashima N, Ito M, Ishikawa T, Kimoto H, Ushijima K, Makita N, Takano M: HCN4 pacemaker channels attenuate the parasympathetic response and stabilize the spontaneous firing of the sinoatrial node. *J Physiol*, 査読有, 2018; 596(5):809-825

<https://doi.org/10.1113/JP275303>

Takeya M, Hashitani H, Hayashi T, Higashi R, Nakamura K, Takano M: Role of mucosa in generating spontaneous activity in the guinea pig seminal vesicle. *J Physiol*, 査読有, 2017; 595(14):4803-4821

<https://doi.org/10.1113/JP273872>

Itoh M, Ishihara K, Nakashima N, Takano M: The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels contain multiple S-palmitoylation sites. *J Physiol Sci*, 2016; 66(3):241-248 査読有

<https://doi.org/10.1007/s12576-015-0420-5>

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*, 2016; 122(4):1038-1047 査読有

<http://doi.org/10.1213/ane.0000000000001137>

[学会発表](計 28 件)

Takeya M, Hashitani H, Hayashi T, Higashi R, Nakamura K, Takano M: Subepithelial synchronous interstitial cells drive spontaneous contractions in the seminal vesicle. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress in conjunction with The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2019

Nakashima N, Nakashima K, Taura A, Nakashima A, Ohmori H, Takano M: Olfactory marker protein controls cAMP-throughput capacity via cAMP-gated channels in normosmia. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress in conjunction with The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2019

Nakagawa T, Yasaka T, Nakashima N, Takano M: Distribution of HCN4 positive cell in mouse spinal dorsal horn. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress in conjunction with The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2019

中川 拓, 八坂敏一, 中島則行, 鷹野 誠: マウス脊髄後角における HCN4 チャネル陽性細胞の分布. 第 69 回西日本生理学会, 2018

中島則行, 中島輝恵, 田浦晶子, 中島明子, 大森治紀, 鷹野 誠: 嗅覚マーカー蛋白は cAMP を吸着する. 第 69 回西日本生理学会, 2018

武谷三恵, 橋谷 光, 林 篤正, 東 龍平, 中村桂一郎, 鷹野 誠: 精囊平滑筋の自動能は上皮下に分布する同期性間質細胞に誘発される. 第 69 回西日本生理学会, 2018

Nakashima N, Nakashima K, Taura A, Takaku A, Ohmori H, Takano M: Cyclic AMP buffering proteins support the phasic and tonic functions of olfactory receptor neurons. The 41th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2018

武谷三恵, 中村桂一郎, 東 龍平, 林 篤正, 太田啓介, 橋谷 光, 鷹野 誠: カルシウムイメージングと FIB/SEM による精囊粘膜の自発活動細胞の観察. 日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会, 2018

Nakashima N, Nakashima K, Taura A, Takaku A, Ohmori H, Takano M: Buffering cAMP in olfactory receptor neurons. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2018

Oshita K, Kozasa Y, Kuwabara Y, Kuwahara K, Ushijima K, Takano M: Hypokalemia-induced ventricular arrhythmogenicity is increased in transgenic mice overexpressing HCN2 specifically in the heart. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2018

Takeya M, Hashitani H, Hayashi T, Nakamura K, Takano M: Spontaneous activity in mucosa of seminal vesicles originates from epithelial basal cells. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2018

中島則行, 鷹野 誠: HCN チャネルはマウスの酸感受性味覚細胞に発現するが、主たる酸受容体ではない. 第 68 回西日本生理学会, 2017

武谷三恵, 橋谷 光, 林 篤正, 中村桂一郎, 鷹野 誠: モルモット精囊粘膜下細胞における自発的電気およびカルシウム活動. 第 59 回日本平滑筋学会総会, 2017

Nakashima N, Takano M: HCN channels are not principally involved in acid detection in mice. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017

小佐々優子, 中島則行, 鷹野 誠, 牛島一男: ペースメーカーチャネル HCN4 は副交感神経刺

激に対するフェールセーフシステムとして働く。日本麻酔科学会 第 64 回学術集会, 2017
大下健輔, 小佐々優子, 中島則行, 桑原宏一郎, 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

Takano M: Pathophysiology of HCN channel family in the heart. International symposium
on ion channels and related disorder, 2017

Ishihara K, Matsuoka S, Takano M: Mechanisms for external K^+ dependence of K^+ permeation
and gating of Kir2.1 inward rectifier K^+ channel. The 94th Annual Meeting of the
Physiological Society of Japan, 2017

Nakashima N, Takano M: HCN channels are not principally involved in acid detection in
mice. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2017

Takeya M, Hashitani H, Hayashi T, Nakamura K, Takano M: Spontaneous electrical and Ca^{2+}
activity in mucosa of guinea pig seminal vesicles. The 94th Annual Meeting of the
Physiological Society of Japan, 2017

21 Kozasa Y, Nakashima N, Ushijima K, Takano M: Cardiac pacemaker channel HCN4 stabilizes
spontaneous firing of SAN against parasympathetic stimulation. The 94th Annual
Meeting of the Physiological Society of Japan, 2017

22 中島則行, 鷹野 誠: 歯芽細胞の核膜アドレナリン受容体の発見。第 67 回西日本生理学会,
2016

23 柳(石原)圭子, 鷹野 誠: Kir2.1 チャネルの細胞外 K イオンに依存する K イオン透過のメ
カニズム。第 67 回西日本生理学会, 2016

24 Kozasa Y, Takeya M, Nakashima N, Ushijima K, Takano M: Cardiac pacemaker channel HCN4
is a limiter for parasympathetic bradycardia and stabilizes spontaneous firing of SAN.
ESC Congress ROME 2016, 2016

25 Nakashima N, Takano M: Visualization of HCN4-expressing neurons with GFP using
Tet-expression system in the mouse central nervous system. The 39th Annual Meeting
of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2016), 2016

26 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, 2016

27 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

28 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

[その他]

ホームページ等

<http://research.kurume-u.ac.jp/data.php?scode=64235632890988>