

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16465

研究課題名(和文) DREADDシステムを利用した脊髄後角HCN4をターゲットとした疼痛治療開発

研究課題名(英文) Development of DREADD-based gene therapy targeting HCN4 in spinal dorsal horn

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：過分極誘発陽イオンチャネル(HCN1～4)は細胞内cAMPによって電流が増大するという特徴を持ち、痛覚伝導路において重要な機能を果たすことが報告されているが、脊髄における発現分布や機能については不明な点が多い。我々はHCN4陽性細胞の細胞体が主にII層深部とIII層に局在していることが明らかとした。さらに脊髄後角においてHCN4はパルプアルブミンもしくはプロテインキナーゼC(PKC)と共発現しており、HCN4陽性細胞の大多数が興奮性介在ニューロンであることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は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HCN4+/lucを交配したマウス(HCN4luc/tTA-TRE)を作成した。このマウスを用いて、HCN4陽性細胞の細胞体が主にII層深部、III層に局在していることが明らかとした。さらに脊髄後角においてHCN4陽性細胞はパルプアルブミンもしくはプロテインキナーゼC(PKC)と共発現しており、興奮性介在ニューロンであることが判明した。PKC陽性の興奮性介在ニューロンはアロディニア形成に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We generated transgenic mouse (HCN4+/luc), in which luciferase and stop codon was knocked-in at the upstream of HCN4 translation initiation site to visualize HCN4-expressing cells. We found that HCN4 was expressed in spinal dorsal horn by assessing the chemiluminescence in HCN4+/luc. In addition, we generated another line knock-in mouse which in HCN4 expression level could be reversibly suppressed by oral doxycycline (DOX) administration using tetracycline trans activator and the responsive element (HCN4+/tTA-TRE). We crossed these two lines and generated a double knock-in mouse to knockdown HCN4 completely with DOX and clarified that the locus of HCN4 is specifically in spinal dorsal horn. HCN4 positive cells in spinal dorsal horn was co-expressed with parvalbumin and protein kinase C, which indicated that the most of HCN4 positive cells was included in excitatory interneuron. We will perform further investigation of contribution of HCN4 positive cells on development of allodynia.

研究分野：麻酔学

キーワード：慢性疼痛 DREADD HCN 脊髄後角

### 1. 研究開始当初の背景

過分極誘発湯インチャンネルは HCN1 ~ 4 のサブタイプを持ち、6 回膜貫通型チャンネルファミリーの一つで、細胞内 C 端には cyclic nucleotide binding domain (CNBD) を持ち、CNBD に cAMP が結合すると HCN チャンネルの電位依存性活性化曲線が右方移動し、チャンネル開口率の上昇、HCN 電流の増加を引き起こす。この性質に基づき、HCN チャンネルは心臓ペースメーカー細胞では自律神経系による心拍数の制御や、ニューロンでは自発発火頻度や後シナプス電位の荷重の制御に中心的な役割を果たしている。近年、後根神経節に存在する HCN チャンネルは疼痛制御において重要な働きを示していることが報告されている。

一方、我々は HCN4 の翻訳開始点にホタルルシフェラーゼをノックインしたマウス (HCN4<sup>luc/+</sup>) を作成し、ルシフェラーゼによる化学発光を確認することで、HCN4 が脊髄後角に特異的に発現していることを明らかにした。

この HCN4 発現ニューロンは、疼痛制御において重要な機能を果たすことが予想されるが、その機能は全く不明のままである。

HCN4 は脊髄後角浅層だけでなく、中枢神経系の様々な部位に存在している。そのため、単純な HCN4 ノックアウトマウスや HCN4 阻害剤の全身投与では、疼痛制御における HCN4 の機能を解明することは容易ではない。そこで申請者はこの HCN4 発現ニューロンの脊髄後角におけるその機能を明らかとするため DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drug) システムを利用することを着想した。

DREADD システムとは内在しない人工化合物をリガンドとする遺伝子改変受容体を特定のニューロンに発現させ、そのリガンドを投与することにより、そのニューロンの興奮性を人工的に操作する技術である。例えば G タンパク質結合型である M3 ムスカリン型受容体に突然変異を加え、特異的リガンドである酸化クロザピン (CNO) に対する親和性を上昇させ、内因性のアセチルコリンには反応しないが CNO によってのみ反応する Gi カップリング DREADD (hM4Di) が開発されている。また、逆に Gs カップリング DREADD (GsD) も開発されている。

そこで本研究では、下図に示すように tetracycline 応答配列によって GsD もしくは hM4Di を発現するトランスジェニックマウス (TRE-DREADD-tg) を作成し、HCN4<sup>+tTA-TRE</sup> マウスと交配することにより、HCN4 を発現するニューロンにおいて特異的に GsD もしくは hM4Di を発現するマウス (HCN4<sup>+tTA-TRE</sup>・TRE-DREADD-tg) を作成する。さらに、このマウスの髄腔内に人工リガンドを局所投与することで HCN4 発現ニューロンの細胞内 cAMP 量を制御し、その活動を制御することを試みる。

### 2. 研究の目的

本研究では HCN4 の発現部位をさらに詳細に解析し、DREADD システムを使用することで、脊髄後角の HCN4 を特異的に活性化し、その脊髄における機能を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

HCN4 の発現部位を詳細に解析するため、HCN4 遺伝子の翻訳開始点にホタルルシフェラーゼをノックインしたマウス (HCN4<sup>luc/+</sup>) を用いて、脊髄後角に HCN4 が特異的に発現していることを発見した。さらに 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<sup>+tTA-TRE</sup>) と HCN4<sup>+luc</sup> を交配したマウス (HCN4<sup>luc/tTA-TRE</sup>) を作成し、ドキシサイクリンを投与することで HCN4 の発現を可逆的にノックダウンした。このマウスを使用して、免疫組織化学染色を行い、HCN4 陽性細胞の細胞体が主にどこに発現しているかを明らかにする。更にパルプアルブミンもしくはプロテインキナーゼ C $\gamma$  (PKC $\gamma$ ) との 2 重染色を行う。

HCN4 と DREADD を共発現するため HCN4<sup>+tTA-TRE</sup> マウスと交配する目的で TRE-DREADD (hM4Di/GsD)-tg マウスを作成する。

HCN4<sup>+tTA-TRE</sup>・TRE-DREADD-tg マウスにテトラサイクリンを約 2 週間内服させる。これで HCN4 と DREADD が共発現しているマウスとなる。次にこのマウスを用いて疼痛モデルを作成する。神経障害性疼痛は坐骨神経を結紮する Seltzer モデルや脊髄神経結紮する Chung モデル、炎症性疼痛モデルであるホルマリンモデル、CFA (フロイト完全アジュバント) モデルを作成する。疼痛の評価は von frey filament も用いた up-down 法やホットプレートテストなどを行う。コントロールとしてテトラサイクリンを投与していない HCN4<sup>+tTA-TRE</sup>・TRE-DREADD-tg マウスの疼痛モデルを使用する。ここでの髄腔内に特異的リガンドを注入しその疼痛行動の変化をコントロールと比較する。

#### 4. 研究成果

我々は HCN4 遺伝子の翻訳開始点にホタルルシフェラーゼをノックインしマウス (HCN4+/luc) を用いて、脊髄後角に HCN4 が特異的に発現していることを発見した。さらに 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 HCN4+/luc を交配したマウス (HCN4luc/tTA-TRE) を作成し、ドキシサイクリンを投与することで HCN4 の発現を可逆的にノックダウンした。このマウスを使用して、免疫組織化学染色を行い、HCN4 陽性細胞の細胞体が主に II 層深部と III 層に局在していることが明らかとなった。さらに脊髄後角において HCN4 はパルプアルブミンもしくはプロテインキナーゼ C $\gamma$  (PKC $\gamma$ ) と共発現しており、HCN4 陽性細胞の大多数が興奮性介在ニューロンであることが判明した。

さらにテトラサイクリン応答配列の下流に Gs を活性化する DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs) の cDNA を挿入したアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-GsDREADD) を HCN4Luc/tTA-TRE の脊髄に注入した。その後 L4 脊髄神経を切断し、人工アゴニストである CNQX を投与した後にアロディニアを脊髄の cFos 発現で比較することを検討している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oshita K, Kozasa Y, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Kuwahara K, Nakagawa T, Nakashima N, Hiraki T, Takano M	4. 巻 69
2. 論文標題 Overexpression of the HCN2 channel increases the arrhythmogenicity induced by hypokalemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 653-660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-019-00684-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Taku, Yasaka Toshiharu, Nakashima Noriyuki, Takeya Mitsue, Oshita Kensuke, Tsuda Makoto, Yamaura Ken, Takano Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Expression of the pacemaker channel HCN4 in excitatory interneurons in the dorsal horn of the murine spinal cord	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00666-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito Mai, Oshita Kensuke, Tanaka Kazuyuki, Hara Masato, Hiraki Teruyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Massive obstetric hemorrhage during cesarean section in a patient after conception by frozen-thawed embryo transfer: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40981-019-0308-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Oshita K., Urschel K., Botos B., Achenbach S., Dietel B., Tauchi M.	4. 巻 331
2. 論文標題 Alteration of connexin expression during early stage of atherosclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 e57 ~ e57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.atherosclerosis.2021.06.161	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川拓、大下健輔、八坂敏一、中島則行、鷹野誠、山浦健
2. 発表標題 アロディニア病態モデルマウスにおける脊髄後角HCN4陽性興奮性インターフェロンの機能
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳山 晋, 田中香織, 受田美紗, 大下健輔, 平木照之
2. 発表標題 重症筋無力症患者の抜管後の低換気に対し非侵襲的陽圧換気を用いて管理を行った1例
3. 学会等名 九州麻酔科学会第59回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横溝美智子, 原 将人, 兵頭彩子, 大下健輔, 平木照之
2. 発表標題 小児人工心肺中に人工肺入口圧の上昇をきたした3症例の検討
3. 学会等名 第26回日本心臓血管麻酔学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳山 晋, 大下健輔, 横溝美智子, 井上由衣, 上瀧正三郎, 平木照之
2. 発表標題 覚醒剤誘発性肺高血圧症合併患者に対する全身麻酔管理
3. 学会等名 第41回日本臨床麻酔学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 飯田宏樹、川口昌彦、大下健輔	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 412
3. 書名 神経麻酔と神経集中治療の基礎と実践【電子版付】	

〔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
---------	---------