

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16384

研究課題名(和文) 過分極化動作性HCN1チャネルを介したてんかん発症の調節メカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of the modulation mechanism in induction of epileptic seizure via hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel 1

研究代表者

清水 佐紀 (Shimizu, Saki)

大阪医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00630815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：てんかんの発症における過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャネル1(HCN1チャネル)の役割とその機能メカニズムを明らかにする目的で、HCN1チャネル遺伝子欠損ラットあるいは選択的なHCNチャネル遮断薬ZD7288を用いて、行動薬理学的および神経化学的評価を行った。本研究結果より、HCN1チャネルはてんかん発作の発現感受性を制御する上で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、HCN1チャネルの抑制は大脳皮質や扁桃核領域における神経活動を亢進し、けいれん発現を助長することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、HCN1チャネルの欠損および抑制は、薬物誘発や電撃刺激に伴うけいれん発現に対して、いずれも増強作用を示すことが明らかとなった。この結果は、様々なてんかんの発症におけるHCN1チャネルの重要な役割を示すものであり、HCN1チャネルはてんかん発作の発現に対して抑制的な制御機構を有していることを示唆している。また、大脳皮質や扁桃核領域にはHCN1チャネルが豊富に存在しており、HCN1チャネルを介したけいれん発現制御に深く関与している脳部位であることが考えられる。本研究結果は、HCN1チャネルを介したてんかん発症の制御機構解明における有益な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role and mechanism of hyperpolarized activated cyclic nucleotide-dependent channel 1 (HCN1 channel) in induction of epileptic seizure, we performed the behavioral and immunohistochemical study using Hcn1 knock-out (Hcn1-KO) rats and a selective HCN channel blocker, ZD7288. This research suggests that HCN1 channels play a crucial role in controlling the onset susceptibility to epileptic seizure, implying that hyperactivation of the cerebral cortex and amygdala is involved in the enhancement of seizure susceptibility due to loss of HCN1 channel.

研究分野：薬理学

キーワード：HCN1チャネル てんかん けいれん発現 行動薬理学 大脳皮質運動野 扁桃核

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜の過分極によって活性化される過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャンネル 1 (HCN1 チャンネル) は脳や心臓に多く分布し、自発性リズム形成や神経発火のオシレーション調節を担っている。近年、HCN1 チャンネルの遺伝子変異が幼児期のてんかん性脳症や遺伝性全般発作などの発症に関与することや、内側側頭葉てんかん患者の海馬領域において、HCN1 チャンネルのダウンレギュレーションが生じていることなどが報告がされている (*Brain*, 141, 3160-3178, 2018; *Neurobiology of Disease*, 118, 55-63, 2018; *Hippocampus*, 30, 1112-1126, 2020)。しかし、HCN1 チャンネルのてんかん発症における制御機構や機能メカニズムについては十分な報告がなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究は新たに作出された HCN1 チャンネル遺伝子欠損 (*Hcn1*-KO) ラット、あるいは HCN1 チャンネル遮断薬 ZD7288 を用いて、てんかん発症における HCN1 チャンネルの役割とその機能メカニズムについて、行動薬理学的および神経化学的手法を用いて解析する。さらに、根本的治療法のないてんかんに対する「HCN1 チャンネルをターゲットとした新規治療法の考案・創出」を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 1) てんかん原性形成過程の評価

雄性 *Hcn1*-KO ラットおよび起源動物である F344 ラット (対照) に対して、単回投与ではけいれんを誘発しない低用量の pentylenetetrazole (PTZ) を 12 日間連続投与し、PTZ 誘発キンドリングを評価した。

#### 2) 各種けいれん発現に対する感受性評価

実験には雄性 *Hcn1*-KO ラットおよび F344 ラット、あるいは HCN チャンネル遮断薬 ZD7288 の脳内投与 (海馬内あるいは脳室内) を施した ddY 系雄性マウスを使用し、各種けいれん誘発剤の投与あるいは電撃刺激に対するけいれん発現の感受性評価を行った。

4-Aminopyridine (4-AP) 誘発けいれん: ddY 系雄性マウスを用いて、HCN チャンネル遮断薬の ZD7288 (3  $\mu$ g/side) を両側海馬内へ局所注入した後、K チャンネル遮断薬である 4-AP (8 mg/kg, i.p.) を腹腔内投与した。*Hcn1*-KO ラットおよび F344 ラットに対しては、4-AP (4 mg/kg, i.p.) を投与した。いずれの動物種の場合も、4-AP 投与後 60 分間行動観察し、けいれん発現を評価した。

Pilocarpine 誘発けいれん重積発作: ddY 系雄性マウスに ZD7288 (3  $\mu$ g) を脳室内投与し、非選択的ムスカリン受容体遮断薬の methylscopolamine (3 mg/kg, i.p.) を投与することで末梢性副作用を軽減した後、非選択的ムスカリン受容体作動薬の pilocarpine (350 mg/kg, i.p.) を処置した。*Hcn1*-KO ラットおよび F344 ラットには 200 mg/kg の pilocarpine を腹腔内投与した。いずれの動物種の場合も、pilocarpine 投与後 60 分間行動観察し、けいれん発現を評価した。

最大電撃けいれん: 各動物の両耳に電撃刺激 (Current: 21 mA (マウス) or 30-33 mA (ラット), Frequency: 200 pulses/sec, Pulse width: 0.5 msec, Shock duration: 1 sec) を処置し、けいれん発現を評価した。

#### 3) けいれん発現に伴う脳内興奮部位の探索

*Hcn1*-KO ラットのけいれん発現時における脳内興奮部位の探索を行う目的で、けいれん発現評価後の動物の脳を摘出し、最初期遺伝子の産物である Fos タンパクの免疫組織染色を行った。

#### 4) 脳内アミノ酸含量の定量解析

*Hcn1*-KO ラットおよび F344 ラットの全脳 9 部位における脳内アミノ酸含量を定量するため、定常状態における各動物の脳を摘出し部位分けした後、HPLC 測定用のサンプル処理を施した。HPLC を用いて、各脳部位におけるアミノ酸含量 (抑制性神経伝達物質: GABA、興奮性神経伝達物質: グルタミン酸およびアスパラギン酸) の定量解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) てんかん原性形成過程の評価

*Hcn1*-KO ラットおよび F344 ラットに対して、低用量 PTZ (40 mg/kg, i.p.) の 12 日間連続投与を行った結果、両動物間において PTZ 誘発キンドリングの形成過程にほぼ差は認められなかった。よって、てんかん原性の形成過程には、*Hcn1* 欠損はほぼ影響しないことが考えられた。

##### 2) 各種けいれん発現に対する感受性評価

4-AP 誘発けいれん：マウスの両側海馬内へ ZD7288 を局所注入したことにより、対照 (vehicle 局所注入) と比較して、4-AP によるけいれんスコアの上昇かつ発作発現までの潜伏時間の短縮が認められた。*Hcn1*-KO ラットにおいても 4-AP 投与により、F344 ラットと比較して顕著なけいれん発現の増強が確認された。

Pilocarpine 誘発けいれん重積発作：ZD7288 脳室内投与マウスでは、けいれん発作が繰り返し生じる(けいれん重積)個体が多く観察された。また、*Hcn1*-KO ラットでは pilocarpine 投与により、測定した全ての個体においてけいれん重積発作が認められ、*Hcn1* 欠損による顕著なけいれん発現助長作用が確認された。一方、F344 ラットではいずれの動物においてもけいれん発現は認められなかった。

最大電撃けいれん：ZD7288 脳室内投与マウスでは、電撃刺激によるけいれんスコアおよびけいれん発現率のいずれにおいても、対照と比較して有意な上昇が認められた。また *Hcn1*-KO ラットにおいても発作発現における顕著な閾値低下が認められ、F344 ラットと比較して有意に高いけいれん発現感受性が確認された。

以上の結果より、*Hcn1* 欠損により薬物性および電気刺激性けいれん発現のいずれにおいても、HCN1 チャンネルの抑制および欠損により、けいれん発現における閾値低下が認められ、けいれん発現の感受性が亢進していることが明らかとなった。

##### 3) けいれん発現に伴う脳内興奮部位の探索

Pilocarpine 誘発けいれん重積発作：Fos タンパクを指標として、pilocarpine によりけいれん重積発作が認められた *Hcn1*-KO ラットの脳内興奮部位を探索した。*Hcn1*-KO ラットでは F344 ラット(けいれん発現なし)と比較して、大脳皮質運動野および扁桃核領域における Fos 発現の有意な上昇が認められた。

最大電撃けいれん：電撃けいれんを発現した *Hcn1*-KO ラットの脳内興奮部位について評価した結果、*Hcn1*-KO ラットでは F344 ラット(けいれん発現なし)と比較して、大脳皮質や扁桃核領域における Fos 発現の有意な上昇が認められた。

##### 4) 脳内アミノ酸含量の定量解析

定常状態において、*Hcn1*-KO ラットは F344 ラットと比較して、橋・延髄領域におけるグルタミン酸およびアスパラギン酸の有意な低下、中脳領域におけるアスパラギン酸の有意な低下がみられた。一方で、延髄の下オリーブ核領域では部位特異的な GABA の低下が認められた。

本研究結果から、HCN1 チャンネルは薬物や電撃刺激などによる様々なけいれん発現に対して抑制的な制御機構を有していることが考えられた。特に、HCN1 チャンネルの抑制は大脳皮質や扁桃核領域における神経の過活動により、けいれん発現を助長することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Y. Ohno, N. Kunisawa, S. Shimizu	4. 巻 22
2. 論文標題 Emerging Roles of Astrocyte Kir4.1 Channels in the Pathogenesis and Treatment of Brain Diseases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 10236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910236	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 A. Nishitani, H. Nagayoshi, S. Takenaka, M. Asano, S. Shimizu, Y. Ohno, T. Kuramoto	4. 巻 69
2. 論文標題 Involvement of NMDA receptors in tremor expression in Aspa/Hcn1 double-knockout rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 388-394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.20-0025	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Saki Shimizu, Yuto Ishizaki, Tatsuya Hattori, Yuki Kotaru, Sara Mishio, Airi Maida, Mei Moriyama, Takumi Sano, Juri Miyakoshi, Takashi Kuramoto, Yukihiko Ohno
2. 発表標題 Enhanced sensitivity of epileptic seizure by deficit of hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel 1
3. 学会等名 第95回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石崎悠斗、清水佐紀、服部達矢、小垂祐貴、三塩沙羅、庫本高志、大野行弘
2. 発表標題 過分極活性化環状ヌクレオチド依存性HCN1チャネル欠損ラットにおけるけいれん感受性評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------