

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09254

研究課題名(和文) 神経因性疼痛の病態発現メカニズムとしてのHCNチャネルと硫化水素のクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between HCN channels and hydrogen sulfide in the generation of neuropathic pain.

研究代表者

駒切 洋 (Komagiri, You)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80405753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経因性疼痛の病態発現に寄与することが示唆されている硫化水素と過分極活性化陽イオンチャネル(HCNチャネル)の連関について検討した。培養後根神経節細胞を用いた電気生理学実験および蛍光イメージングにより、硫化水素が一酸化窒素産生を増強し、グアニル酸シクラーゼを介して過分極活性化陽イオンチャネル(HCNチャネル)の活性化を引き起こすという新たなチャネル活性化機構が明らかとなった。さらに硫化水素は過分極刺激からの膜電位の回復相の増強を引き起こすことも確認できた。本研究によって硫化水素が後根神経節細胞の興奮性をHCNチャネル活性化を介して調節している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって硫化水素が一酸化窒素産生を介してHCNチャネルを活性化させ、後根神経節細胞の興奮性を上昇させる可能性が示唆された。硫化水素とHCNチャネルはこれまで神経因性疼痛における後根神経節細胞の異常発火メカニズムへの関与が別個に報告されてきた。本研究によりこの2つの分子の連関が明らかになったことから、神経因性疼痛の病態発現メカニズムのさらなる解明や効果的な治療法の確立につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I investigated the crosstalk between hydrogen sulfide and hyperpolarization-activated cation channels (HCN channels), which have been suggested to contribute to the pathogenesis of neuropathic pain. Using electrophysiological recording and fluorescence imaging, I revealed a novel channel regulation mechanism in which hydrogen sulfide enhances nitric oxide production and activates HCN channels via guanylate cyclase in cultured dorsal root ganglion neurons. Furthermore, hydrogen sulfide enhanced the recovery phase of the membrane potential from hyperpolarizing stimulation. This study suggests the possibility that hydrogen sulfide modulates the excitability of dorsal root ganglion neurons via HCN channel activation.

研究分野：生理学

キーワード：硫化水素 HCNチャネル 後根神経節 一酸化窒素 神経因性疼痛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は神経組織自身の障害により発生し、痛覚過敏や異痛症を伴う長期間持続する難治性の疼痛であり、その発生メカニズムは未だ解明されていない。これまでに傷害や炎症後の神経因性疼痛の発生原因および治療のターゲットの有力な候補として、過分極活性化陽イオンチャンネル (HCN チャンネル) と内因性ガス状生理活性物質である硫化水素がそれぞれ個別に報告されている。HCN チャンネルには細胞内の cAMP によって活性化するという特徴があり、一方で硫化水素は種々のイオンチャンネルの調節に寄与し、細胞内の cAMP 濃度を上昇させるという効果が報告されているにも関わらず、硫化水素が HCN チャンネルの活性調節に影響を持つか否かということは現在までに調べられていない。

### 2. 研究の目的

神経因性疼痛における後根神経節細胞における異常発火の原因として注目されてきた内因性硫化水素と過分極活性化陽イオンチャンネル (HCN チャンネル) の連関を調べ、神経因性疼痛の病態発生メカニズムの背景となる新たな知見を獲得することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) ラット後根神経節細胞の初代培養

成ラットから採取した脊髄後根神経節を酵素処理 (collagenase type IV および trypsin) で消化し、その後滅菌パスツールピペットを用いたピペッティングにより機械的に細胞を単離した。単離した細胞は遠心洗浄した後に培養液 (DMEM) に浮遊させて細胞懸濁液とした。細胞をポリリジンコートしたカバーガラス上に接着させて 7-14 日間培養し実験に使用した。

#### (2) パッチクランプ法による全細胞電位固定による細胞膜電流および電流固定による細胞膜電位の計測

初代培養した後根神経節細胞を用いてパッチクランプ法による電気生理学的実験を行った。全細胞電流および膜電位は、細胞内を人工的な細胞内液で灌流させずに細胞内情報伝達機構を生理的に維持した状態で記録可能なグラミシジン穿孔パッチ法により測定、記録した。

#### (3) 蛍光色素を用いた一酸化窒素測定

経時的な一酸化窒素レベルの測定には膜透過型一酸化窒素感受性色素である DAF2-DA を用いた。初代培養した後根神経節細胞に DAF-2DA を 40 分間負荷し、DAF-2 蛍光像を蛍光画像解析装置により取得し、測定開始時からの相対的な蛍光強度を一酸化窒素濃度の変動として算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養後根神経節細胞における HCN チャンネル電流に対する硫化水素ドナーの作用

培養後根神経節細胞からのグラミシジン穿孔パッチ法による全細胞電流測定開始後、電位依存性 Na チャンネル電流の測定を行い、興奮性を有した神経細胞であることを確認した後に図 1A に示した二段階の矩形波パルスを与え、発生した電流を解析することにより HCN チャンネルの活性化の電位依存性を調べた。細胞外に硫化水素のドナー (NaHS) を適用したところ、HCN チャンネル電流の活性化が観察され (図 1A の赤で示したトレース)、活性化曲線の二分の一活性化電位 ( $V_{half}$ ) は有意に約 10 mV 正の方向へシフトした (図 1B)。これは硫化水素が HCN チャンネルの活性化の電位依存性をより浅い過分極で活性化させるように変化させたことを意味する。硫化水素ドナーによる HCN チャンネル電流の  $V_{half}$  の変化量は濃度依存性を示し、その  $EC_{50}$  は 103.3  $\mu$ M だった (図 1C)。

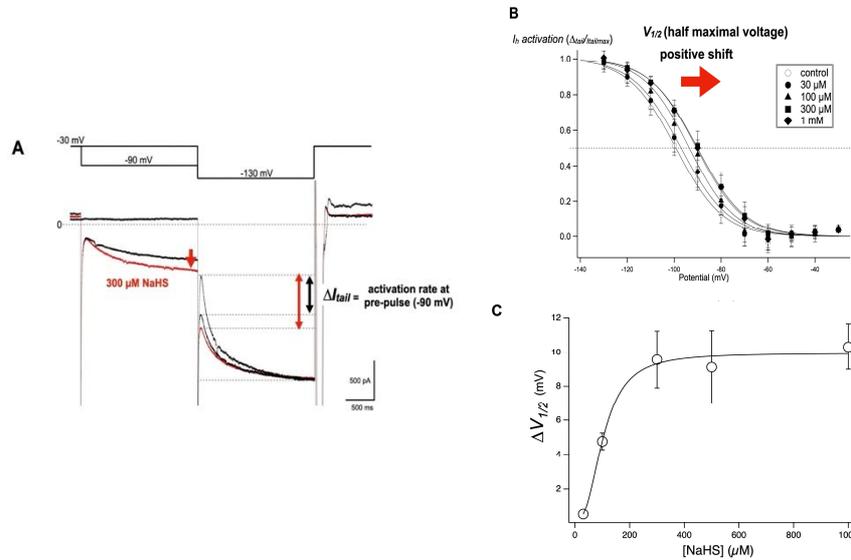


図1 HCN チャネル電流に対する硫化水素ドナーの作用

## (2) 硫化水素による HCN チャネル活性化のメカニズム

HCN チャネルは細胞内のサイクリックヌクレオチドによって調節を受けることが知られている。そこでアデニル酸シクラーゼおよびグアニル酸シクラーゼ阻害薬を用いて硫化水素による HCN チャネル活性化のメカニズムを調べた。硫化水素による HCN チャネルの活性化はアデニル酸シクラーゼの阻害剤 (SQ-22536、DDA) には影響を受けず、グアニル酸シクラーゼの阻害剤 (ODQ) によって有意に抑制された (図 2A)。この結果から硫化水素の HCN チャネルに対する作用にはグアニル酸シクラーゼ活性化を介することが示唆されたため、さらにその上流での一酸化窒素とその産生の関与を検討した。一酸化窒素合成酵素阻害剤である L-NMMA を前処置すると、硫化水素ドナーによる HCN 電流の電位依存性のシフトは有意に抑制された (図 2B)。加えて、一酸化窒素の除去剤である C-PTIO 前処置では硫化水素ドナーの効果は完全に消失した (図 2B)。

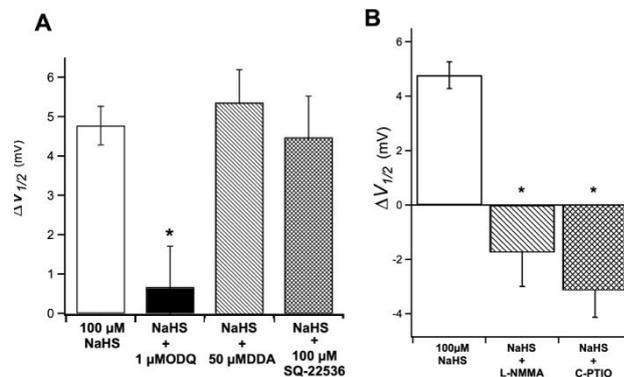


図2 硫化水素による HCN チャネル活性化作用はグアニル酸シクラーゼ阻害薬、NO 合成酵素阻害薬及び NO 除去剤によって抑制された。A. ODQ: グアニル酸シクラーゼ阻害薬 DDA, SQ-22536: アデニル酸シクラーゼ阻害薬 B. L-NMMA:NO 合成酵素阻害薬 C-PTIO: NO 除去剤

## (3) 培養後根神経節細胞における硫化水素による一酸化窒素産生増強

硫化水素による HCN チャネル活性化には一酸化窒素の発生が関与していることが示唆されたことから、硫化水素ドナーの添加が実際に後根神経節細胞内での一酸化窒素産生に影響を与えるかどうかを一酸化窒素検出蛍光プローブである DAF-2 を用いた蛍光イメージングにより調べた。硫化水素ドナー適用後、DAF-2 の相対的蛍光強度は大きく増加した (図 3)。この結果から後根神経節細胞内の一酸化窒素産生量は硫化水素によって大きく増強されることが確かめられた。

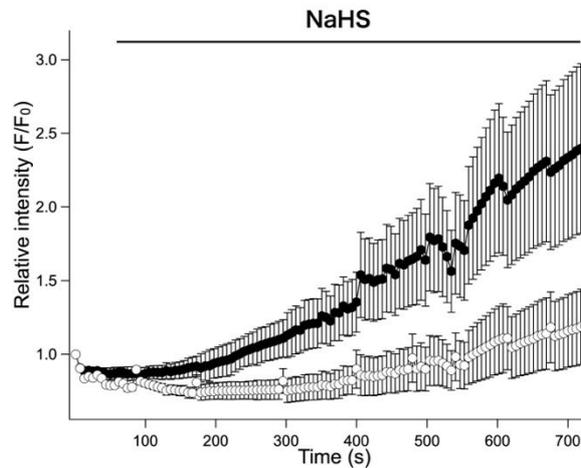


図3 培養後根神経節細胞における一酸化窒素産生に対する硫化水素ドナーの作用

#### (4) 過分極電流刺激による膜電位回復相 (Voltage-sag)の増強

電流固定下による膜電位測定において、HCNチャネルを発現している後根神経節細胞は過分極電流刺激に対する応答として過分極からの特徴的な回復相 (voltage-sag)を示す(図4A)。硫化水素ドナーは-90 mVより深い膜電位からの回復の増強を有意に引き起こすことが確かめられた(図4B)。

さらにこの voltage-sag の増強効果は一酸化窒素除去剤の前処置によって消失した(図5)。

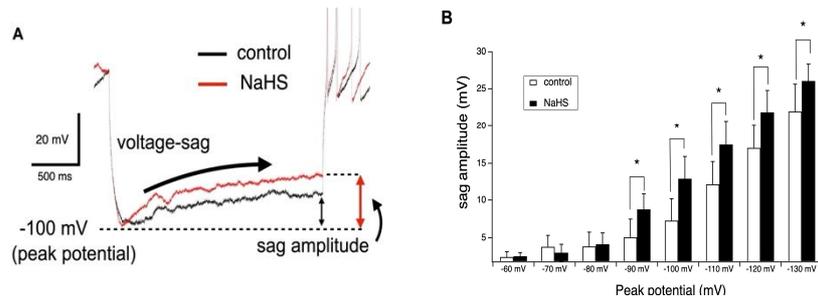


図4 過分極電流刺激時の回復相 (voltage-sag) に対する硫化水素ドナーの作用

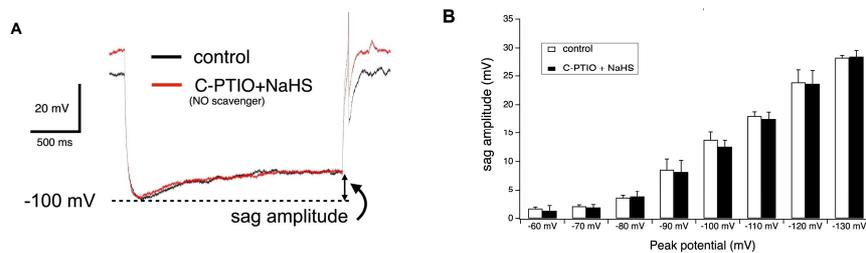


図5 硫化水素による voltage-sag 増強に対する NO 除去剤の効果

一連の実験結果から、後根神経節細胞において硫化水素が一酸化窒素合成酵素による一酸化窒素産生を増強し、下流のグアニル酸シクラーゼ活性化を介したサイクリックヌクレオチド産生によって HCN チャネルの活性化を引き起こすという新たなチャネル活性化機構が明らかとなった。さらにこの一酸化窒素産生を介した硫化水素による HCN チャネル活性化が電流固定下における過分極刺激からの回復相の増強を引き起こしたことから、硫化水素が後根神経節細胞の興奮性を HCN チャネルの活性化を介して調節している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Komagiri You	4. 巻 699
2. 論文標題 Hydrogen sulfide induces Ca <sup>2+</sup> influx in the principal cells of rat cortical collecting ducts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149562-149562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2024.149562	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 駒切洋
2. 発表標題 ラット背根神経節細胞における硫化水素によるHCN チャネル電流 (I <sub>h</sub> )活性化機構
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 駒切洋
2. 発表標題 ラット背根神経節細胞におけるHCNチャネル電流 (I <sub>h</sub> )に対する硫化水素の効果
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 駒切洋
2. 発表標題 ラット脊髄背根神経節細胞における硫化水素による一酸化窒素産生を介したHCNチャネル活性化
3. 学会等名 第101回 日本生理学会大会
4. 発表年 2024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
---------	---------