

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16543

研究課題名（和文）神経障害性疼痛における脊髄後角HCN4発現ニューロンの病態生理学的機能

研究課題名（英文）Pathophysiological function of spinal dorsal horn HCN4-expressing neurons in neuropathic pain

研究代表者

中川 拓（Nakagawa, Taku）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00869050

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：HCN4機能抑制+神経障害モデルの作成、およびHCN機能促進+神経障害モデルの作成に関しては、安定して作成可能な状態となっているが、神経障害性疼痛が発生しているか（非侵害刺激である触刺激を行っているにも関わらず侵害受容としてのシグナル伝達が行われているか）の評価する実験方法の確立に難渋し、実験は中断している。代わりに、マウスの坐骨神経を切断し、足を二週間ギブス固定を行うことによりCRPS（複合性局所疼痛症候群）モデルマウスを作成し、CRPSにおけるHCN4が果たしている役割を解明する研究を開始している。研究はまだ実験条件の検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は有病率が一定数いるものの疼痛コントロールに難渋することが多く、その治療は今後期待されている。今回の研究により、安定的にHCN4機能抑制+神経障害モデルの作成、およびHCN機能促進+神経障害モデルの作成を行えるようになったため、実験手法が確立した際には脊髄層で神経障害性疼痛に関わっている可能性が高いと思われるHCN4チャネル発現神経細胞の生理学的機能の解明に寄与できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Regarding the creation of HCN4 function suppression + neuropathy models and the creation of HCN4 function promotion + neuropathy models, it is stable and possible to create models, but experiments have been discontinued due to difficulties in establishing an experimental method to evaluate whether neuropathic pain is occurring. Instead, We created a mouse model of CRPS (complex regional pain syndrome) by immobilizing the mouse's foot in a cast for two weeks, and have begun research to elucidate the role of HCN4 in CRPS.

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：神経障害性疼痛 ニューロン HCN4

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

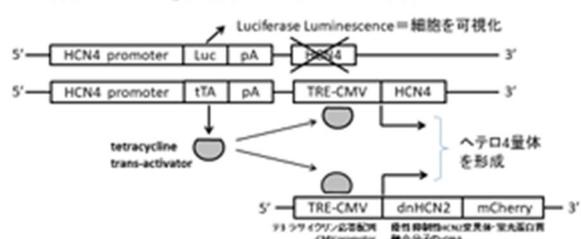
1. 研究開始当初の背景

近年ノックアウト(KO)マウスを使った研究から、過分極誘発陽イオンチャンネル(HCN1~HCN4)の痛覚における機能が注目されている。しかしHCN4のKOマウスは胎生致死であるため、中枢神経系におけるHCN4の機能は不明な点が多い。我々はHCN4遺伝子座にルシフェラーゼ遺伝子をノックインしたマウスを開発し、発光イメージングによってHCN4が脊髄後角~層の興奮性介在ニューロンに特異的に発現していることを発見した。生理的には~層の局所回路では主に触覚刺激の情報処理が行われる。しかし神経障害性疼痛では、局所回路の機能的リモデリングが生じ、主に侵害性刺激の情報処理を行う~層の局所回路に~層の情報がかクロストークしている可能性が極めて高い。そこで本研究ではシナプス入力加重においてHCNチャンネルが重要な機能を果たしている点に注目し、HCN4のゲート機構の変化が神経障害性疼痛の発症に関与している可能性を検討することとした。

2. 研究の目的

侵害刺激を「痛み」として受容するためには、感覚野よりも扁桃体・前帯状回・島皮質からなる「痛み関連領域」が重要な機能を果たす。我々は発光イメージングにより、HCN4は脊髄後角の他に島皮質にも発現していることを見いだした。そのため、全身でHCN4をKOした場合、疼痛刺激に対する応答の変化を評価するのは、解釈が困難である。そこで下図に示したように、テトラサイクリン応答配列(TRE)とCMVプロモータの下流に、イオン透過性を失活させたHCN2チャンネルの優性抑制変異体(dnHCN2)cDNAや、人工リガンド受容体cDNAを挿入したコンストラクトを搭載したアデノ随伴ウイルスベクターを作成し、HCN4Luc/tTA_TREマウスの脊髄後角にマイクロインジェクションする。これにより、脊髄後角のHCN4発現ニューロンへ選択的に目的遺伝子を発現させてその機能を操作し、神経障害性疼痛の病態生理においてHCN4が果たす機能を解明することが本研究の目的である。このように部位選択的にHCN4発現ニューロンの機能に介入できる実験系を保有しているのは我々だけであり、極めて学術的に独自性が高い研究であるといえる。

HCN4^{TA,TRNA}マウスの脊髄後角へTRE-dnHCN2-mCherryウイルスベクターを注入すると、HCN4発現ニューロンのI_h電流を完全に抑制することができる。



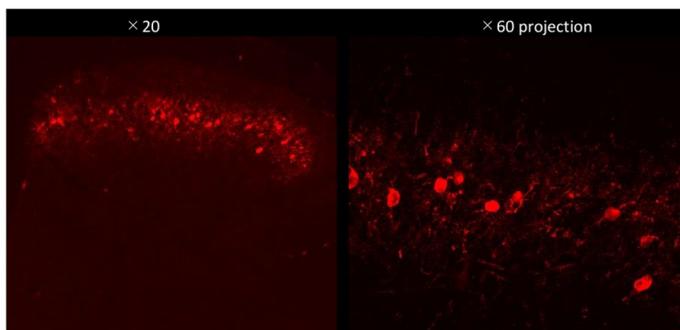
3. 研究の方法

1) HCN4機能抑制+神経障害モデルの作成 HCN4は他のHCN1-3とヘテロ4量体チャンネルを形成するため、イオン透過性を失活させたdnHCN2をHCN4発現ニューロンに遺伝子導入すると、完全にI_h電流を抑制することができる(上図)。そこで九州大学薬学大学院・津田誠教授の研究室で開発された方法により、TRE-CMV-dnHCN2-mCherryを搭載したAAV9アデノ随伴ウイルスベクター液(〜5×10¹² GC/ml, 500 nl)を14~20週齢のHCN4Luc/tTA_TREマウスの脊髄後角(L3-L4)表層にマイクロインジェクションする(Kohro et al., A new minimally-invasive method for microinjection into the mouse spinal dorsal horn. Sci. Rep. 5:14306, 2015)。3週間後、全身麻酔下にこのマウスのL3-L5脊髄神経を露出し、L4脊髄神経のみを直視下に切断して神経障害モデルを作成する。その後、2週間回復させた後に実験に使用する。2) HCN4機能促進+神経障害モデルの作成 HCN4は細胞内cAMP濃度が上昇すると浅い膜電位でも活性化され、電流量が増加する。1)と同様にして、人工化合物をリガンドとして結合するGs蛋白質連結型受容体(Gs-DREADD)をHCN4tTA_TRE/Lucマウスの脊髄後角のHCN4発現ニューロンに遺伝子導入し、3週間後に神経障害モデルを作成する。2週間後、人工リガンドである酸化クロザピンを腹腔内投与し、選択的にHCN4発現ニューロンにおいてcAMPを増加させ、HCN4を活性化した状態で実験に使用する。3) コントロール+神経障害モデルの作成 同様にTRE-CMV-mCherryのみを発現させたのち神経障害モデルを作成する。上記1)~3)のマウスを使用して以下の(実験1~4)を行い、3群間で結果を比較検討する。(実験1)Chaplanらの方法にしたがってVonFray試験を行い、神経障害性疼痛の程度が変化しているか、検討する(Chaplan et al., Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J. Neurosci. Method. 53, 55-63, 1994)。(実験2)機械的アロディニアのモデルとして、絵筆による触刺激を加え、疼痛回避行動をとるか比較検討する。刺激2時間後に心臓灌流により脊髄をホルマリン固定する。L3-L4レベルの脊髄後角においてcFosの発現を免疫組織化学的に検討し、3群間で

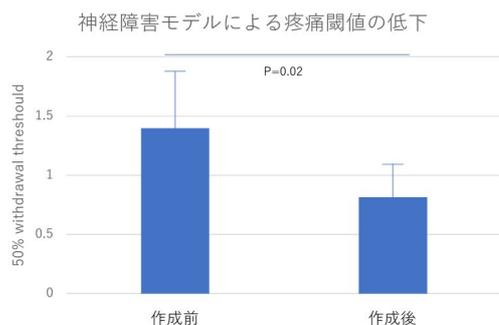
較検討する。(実験3) L3/L4 脊髄神経根を付けたままの脊髄矢状断スライスを作成し、膜電位感受性色素を負荷する。神経根に電極を装着して電気刺激を加える。電気刺激の振幅・頻度を調節し、脊髄神経中の A 線維(触覚) C 線維(温痛覚)を別々に発火させる。膜電位感受性色素の蛍光強度の変化から、神経活動の空間的な広がりを比較する。特に侵害刺激を中枢に伝える層の活動が A 線維を刺激したときにも上昇するか、検討する。(実験4) L3/L4 脊髄神経根を付けたままの脊髄矢状断スライスを作成する。mCherry 蛍光シグナルを指標として HCN4 発現ニューロンを同定し、パッチクランプ法により膜電位や膜電流を記録する。神経根の電気刺激を行いながら後シナプス電位を記録し、その振幅・時間経過を3群間で比較検討する。また過・脱分極通電したときの膜抵抗、時定数を比較する。

4. 研究成果

HCN4 機能抑制 + 神経障害モデルの作成に関して、TRE CMV-dnHCN2-mCherry を搭載した AAV9 アデノ随伴ウイルスベクターの脊髄後角(L3-L4)へのマイクロインジェクションは問題なく行えた(下図 インジェクション後の脊髄後角の mCherry)



これらのマウスで神経障害性疼痛モデルマウスの作成を行い、行動実験を行った。下図のように神経障害モデルマウスを作成した時の疼痛閾値の低下は安定して得られたが、dnHCN2-AAV をインジェクションし HCN 電流を抑制したマウスでの疼痛閾値が低下した医データは得られなかった。



神経障害モデルマウスは足裏の触刺激で疼痛閾値が低下するため、触刺激により脊髄後角に c-Fos 発現細胞が有意に増えると予測していたが、実験条件の検討をどれだけ重ねても明らかな増加を認めるデータは得られなかった。神経障害モデルマウス作成実験の難易度が高いこと、ウイルスインジェクションから神経障害モデルを作成し行動実験および免疫組織化学実験を行うのに約1か月と時間がかかること、実験に使用できる HCN4 遺伝子改変マウス自体の出生数がそれほど多くないこと、責任研究者の多忙や異動があったことにより実験を継続することが困難となった。かわりに、別のより簡易であると思われる実験を開始することとした。マウスの坐骨神経を切断し、足を二週間ギプス固定を行うことにより CRPS (複合性局所疼痛症候群) モデルマウスを作成し、CRPS における HCN4 が果たしている役割を解明する研究を開始している(下図)。CRPS モデルマウスの作成は行えているが、研究としてはまだ実験条件の検討中である。

坐骨神経切断とギプス固定による CRPS モデル

CRPSモデル



3本分岐のうち上2本のみ結紮切離2mm
6-0プロリン

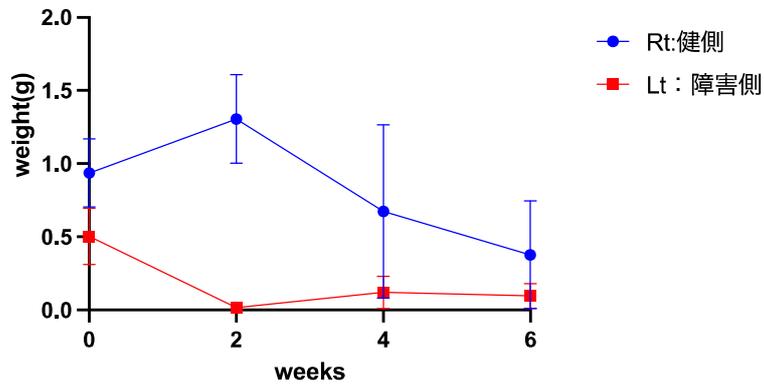


2週間ギプスで固定する



CRPS モデルによる 疼痛閾値の低下

von frey test



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------