

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11246

研究課題名(和文)遅発性筋痛における機械感受性イオンチャネルの役割の解明

研究課題名(英文)The role of mechanically-sensitive ion channels in delayed onset muscle soreness

研究代表者

太田 大樹(Ota, Hiroki)

新潟医療福祉大学・リハビリテーション学部・助教

研究者番号：10712432

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):遅発性筋痛は不慣れな運動の後に遅れて起こる筋機械痛覚過敏であるが、その機械受容チャネルの関与は不明な点が多い。今回、本症候発症に寄与する機械受容チャネルを突き止めるため、行動学的、生化学的手法等を用いて実験を行った。その結果、TRPA1が本症候における筋機械痛覚過敏に関与することがわかった。一方、本症候に対するTRPV2の関与は見出されなかった。さらに、新規の機械受容チャネル候補であるTmem120Aの発現レベルが本症候の筋機械痛覚過敏と同期して増大していた。また、網羅的遺伝子発現解析の結果、Dusp-15が本症候発症に関わる新たな候補因子として挙げられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肩こりや腰痛をはじめとする筋・筋膜性疼痛症候群は骨格筋に起因する痛みであり、罹患者数がきわめて多い。それにもかかわらず、他の組織に起因する痛みと比べ不明な点が多く、その根本的治療法の開発が急がれる。「遅発性筋痛モデル」は筋・筋膜性疼痛症候群を再現したモデルと考えられており、今回、当モデルにおいて新たな本症候発症因子が複数同定された。これらの成果は、骨格筋の痛み機構の学術的意義を有するとともに、骨格筋の痛み治療における全く新しい創薬分野の発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文):Delayed onset muscle soreness (DOMS) is mechanical hyperalgesia that occurs after uncustomed exercise, but the involvement of mechanosensitive ion channels in the soreness remains unknown. In this study, we carried out experiments using behavioral and biochemical techniques to identify the mechanosensitive ion channels that involved in the onset of the soreness. We found that TRPA1, not TRPV2, is involved in muscle mechanical hyperalgesia in DOMS. Furthermore, the expression level of Tmem120A, a novel mechanoreceptor candidate, was increased, compatible with that of mechanical hyperalgesia behavior. Gene expression analysis on rat RNA-seq data suggests that Dusp-15 can be a new candidate for involvement in generating of DOMS.

研究分野：環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：痛み 侵害受容器 機械受容チャネル

## 1. 研究開始当初の背景

筋由来の痛み(筋・筋膜性疼痛症候群)はきわめて高い頻度で発症し慢性化しやすい病態であるが、不明な点が多く残されており、依然として多くの日本人を悩ませている。申請者らグループは、この痛みで重要な機械痛覚過敏(つねる、圧迫する等の機械刺激に対する痛みの増強)をよく再現している「遅発性筋痛」モデル動物を用いて、その発症メカニズムを明らかにしてきた。しかし、骨格筋が機械刺激に対して示す分子機構は不明な点が多く、この問題の克服には「遅発性筋痛」の発症に関わる機械受容チャネルの関与を解明することが必要である。これまで、機械受容チャネル分子として、“Piezo”をはじめ“TRPA1”、TRPV2”、“Acid-Sensing Ion Channels (ASICs)”、“Tmem120A”(Beaulieu-Laroche et al., 2020) 等が候補に挙げられている。ASIC3 については遅発性筋痛発症にかかわる因子の一つであることが実証されている (Matsubara et al., 2018) が、その他の分子の関与は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、行動学および生化学的手法を用いることで、遅発性筋痛発症における機械受容チャネルの関与を調べた。また、対照として筋炎モデルにおける候補因子の関与を調べることで、炎症像に乏しい遅発性筋痛との対比を図った。さらに、これまで筋組織で調べられてこなかった因子に関する検討も行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 筋痛モデルの作製方法

遅発性筋痛モデルの作製：イソフルラン(1.5~1.7%)麻酔下のSDラットの足関節背屈筋群に対し、その支配神経の近傍に刺入した刺激電極から電気刺激により収縮させ、小動物運動負荷装置(NDH-1, バイオリサーチセンター社)を用いて反対方向に伸張させ、これを50回繰り返すことで、同筋に筋機械痛覚過敏を発症させた(Hayashi et al., 2017)。

筋炎モデルの作製：イソフルラン(1.5~1.7%)麻酔下のSDラットの前脛骨筋筋腹中央部に対し、3%λ-カラゲニン(22049, Sigma-Aldrich社, 0.9%NaClに希釈)50μLを27ゲージ針により投与した。

### (2) 行動学的実験

TRPA1 ノックアウトマウス、一次感覚神経特異的および骨格筋特異的 TRPV2 コンディショナルノックアウトマウス、野生型コントロールマウスに対し、伸張性収縮負荷を行い、その前後の筋機械逃避反応閾値の経時的変化を定量した(Ota et al., 2013)。

### (3) 生化学的実験

ラットを安楽殺後、速やかに下腿前面から前脛骨筋を摘出した。同筋を浅層側と深層側に二分し、それぞれを液体窒素にて瞬間凍結後、-80フリーザーで保管した。摘出時期は、伸張性収縮負荷の直後、6、24、48、120時間後およびカラゲニン筋注12時間後とした。凍結保存した筋組織に対しRNeasy mini kit(Qiagen社)を用いて全RNAを精製後、すべての精製物を12.5ng/μLに統一した。この溶液をPCR用反応キット(One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit, TaKaRa社)で調製し、リアルタイムPCR装置(StepOne™, Applied Biosystems社)

を用いて対象遺伝子発現レベルを定量した。対象遺伝子は、**Tmem120A**、**Tmem120** (**Tmem120A** のホモログ)、**Dual Specificity Phosphatase (Dusp)-15** とし、内部標準は **GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)** とした。

#### (4) 網羅的遺伝子発現解析

これまで本研究グループが検証した因子以外に、遅発性筋痛モデルの筋で発現変動する因子があるか調べるため、ラット **RNA-seq** データについて遺伝子発現解析を行った(アメリエフ社)。具体的には、伸張性収縮 24 時間後の運動負荷および無負荷の前脛骨筋を採取してから全 **RNA** を精製した後、クオリティコントロールを行い、発現定量解析および発現二群間比較解析として、**Subread** パッケージの **featureCounts** を用い参照ゲノム配列 (**mRatBN7.2**) ([https://asia.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus/Info/Index](https://asia.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Info/Index)) の遺伝子について、各サンプルのリードカウント算出を行い、**R** パッケージ **edgeR** を用いて、発現量の二群間比較を行った。**Gene Ontology** のエンリッチメント解析は、**R** パッケージ **topGO** および **org.Rn.eg.db** を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 行動学的実験

**TRPA1** および **TRPV2** ノックアウトマウス間において筋機械逃避反応閾値に有意差は認められなかった。**TRPV2** ノックアウトマウスに対する伸張性収縮は、野生型マウスと同様に、筋機械閾値低下を認めたが、**TRPA1** ノックアウトマウスでは閾値低下が見られなかった。ここから、遅発性筋痛発症に **TRPA1** が関与することが行動学的に示された。

### (2) 生化学的実験

申請者が所属する研究室においてすでに、「遅発性筋痛」にて **Tmem120A** 遺伝子が増大することを見出した(未発表データ)が、「遅発性筋痛」は肉眼的に著明な炎症像を伴わない (**Hayashi et al., 2017**) ことから、比較対象として筋炎モデルの筋における **Tmem120A** および **120B** の遺伝子発現レベルを測定した。その結果、両遺伝子ともに無処置筋に比べ炎症筋で有意に増大することが分かり、「遅発性筋痛」における結果と異なっていた。さらに、「遅発性筋痛」発症の重要因子である神経成長因子 (**NGF**) の発現レベルを、収縮負荷筋の浅層と深層に分けて測定・比較したところ、**Tmem120A** と同様に深層ではなく浅層において発現増大していた。以上より、「遅発性筋痛」の収縮負荷筋の浅層領域において、**Tmem120A** および **NGF** が発現増大し、炎症と異なる経路に作用している可能性が示唆された。一方、前脛骨筋の支配レベルを含む後根神経節において **Tmem120A mRNA** 発現レベルを調べたところ、非運動側に比べ有意な増大を認めることができなかった。後根神経節の神経細胞に占める筋支配神経細胞の割合は 1 割程度と少なく本検討では変化が検出できなかったと考えられ、別の検証が必要と考えられた。

### (3) 網羅的遺伝子発現解析

参照ゲノム配列(**mRatBN7.2**)から網羅的遺伝子解析によって伸張性収縮側と反対側の間で二群間比較解析を行った結果、**Dusp-15** が収縮筋で高値を示した。併せて、リアルタイム **PCR** 装置を用いて伸張性収縮 24 時間後の筋と無処置筋との間で **Dusp-15 mRNA** レベルを定量したところ、無処置筋に比べ有意に発現増大しており、同サンプルの **NGF mRNA** 発現レベルと高い相関関係を認めた。**Dusp-15** が筋組織で果たす機能は全く不明であるが、今回の結果から遅発

性筋痛の責任因子である **NGF** と相互に作用しあっている可能性が示唆されたため、今後さらなる検証を行う予定である。

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 1件）

1. 著者名 Ota H, Takebe H, Mizumura K, Taguchi T	4. 巻 71
2. 論文標題 Responses of cutaneous C-fiber afferents and spinal microglia after hindlimb cast immobilization in rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-021-00803-3	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 Ejiri Y, Uta D, Ota H, Mizumura K, Taguchi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Nociceptive chemical hypersensitivity in the spinal cord of a rat reserpine-induced fibromyalgia model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	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） 10.1016/j.neures.2022.03.005	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27件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Taguchi T, Katanosaka Y, Ota H, Katanosaka K
2. 発表標題 TRPV2-deficient mice exhibit decreased mechanical sensitivity of nociceptors in the skin
3. 学会等名 International Symposium on Mechanobiology for Human Health : 8 years progress in The AMED-CREST/PRIME project on mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ota H, Tsuboshima K, Yokota I, Okada K, Hanamatsu H, Furuakwa J, Kanagawa M, Taguchi T
2. 発表標題 Intramuscular injection of hyaluronic acid prevents the development of muscle pain after exercise
3. 学会等名 International Symposium on Mechanobiology for Human Health : 8 years progress in The AMED-CREST/PRIME project on mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口徹, 貝沼利矩, 太田大樹
2. 発表標題 繰り返し寒冷ストレス誘発性疼痛モデルラットにおける痛み関連行動と脊髄ニューロンの活性化亢進
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田大樹, 坪島功幸, 田口徹
2. 発表標題 運動後に筋で発現増大するヒアルロン酸による遅発性筋痛発症予防効果
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田大樹, 坪島功幸, 田口徹
2. 発表標題 遅発性筋痛モデルラットにおける糖鎖ヒアルロン酸による筋痛予防効果
3. 学会等名 2022年度生理学研究所研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口徹, 花田亘平, 太田大樹
2. 発表標題 伸張性収縮負荷による実験的ヒト腰痛モデルの作製
3. 学会等名 第44回日本疼痛学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田大樹, 坪島功幸, 田口徹
2. 発表標題 糖鎖ヒアルロン酸による遅発性筋痛の発症予防効果
3. 学会等名 第44回日本疼痛学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口徹, 坪島功幸, 太田大樹
2. 発表標題 伸張性収縮後の筋力低下に対する細胞外マトリクス糖鎖の予防効果
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田大樹, 大井理史, 片野坂公明, 田口徹
2. 発表標題 遅発性筋痛モデルラットの筋および末梢神経におけるTmem120A, Bの発現定量
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口徹, 花田亘平, 太田大樹
2. 発表標題 胸腰部への伸張性収縮負荷による筋圧痛閾値ヒートマップの作製
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田大樹, 大井理史, 片野坂公明, 田口徹
2. 発表標題 運動および炎症後の骨格筋におけるTmem120aおよびTmem120b mRNAの発現
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上創太, 貝沼利矩, 太田大樹, 田口徹
2. 発表標題 持続ストレス負荷モデルラットのホルマリンテストにおける侵害受容感作
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ota H, Washizawa L, Hayashi K, Katanosaka Y, Katanosaka K, Kashio M, Tominaga M, Taguchi T, Mizumura K.
2. 発表標題 Involvement of TRPA1 but not TRPV2 in rodent models of lengthening contraction-induced muscular mechanical hyperalgesia.
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ota H, Washizawa L, Hayashi K, Katanosaka Y, Katanosaka K, Kashio M, Tominaga M, Taguchi T, Mizumura K.
2. 発表標題 TRPA1 contributes to lengthening contraction induced muscular mechanical hyperalgesia.
3. 学会等名 The 4th International TRP Meeting (TRP2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 太田大樹, 大井理史, 田口徹.
2. 発表標題 遅発性筋痛モデルラットの筋および筋膜における神経成長因子の発現定量.
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口徹, 片野坂友紀, 太田大樹, 片野坂公明.
2. 発表標題 細径線維受容器終末のTRPV2チャネルを介した機械痛覚の末梢神経機構.
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田大樹, 大井理史, 田口徹.
2. 発表標題 遅発性筋痛発症因子の筋および筋膜における発現変化の部位差.
3. 学会等名 第14回日本運動器疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田大樹, 大井理史, 片野坂公明, 田口徹.
2. 発表標題 遅発性筋痛モデルラットにおける機械受容チャネルTACANの発現増大.
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田大樹, 大井理史, 片野坂公明, 田口徹.
2. 発表標題 遅発性筋痛モデルラットの筋における機械受容チャンネルTmem120Aの発現増大.
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ota H, Oi R, Katanosaka K, Taguchi T.
2. 発表標題 Increased expression of TACAN in the rat muscle after lengthening contractions.
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 太田大樹, 田口徹
2. 発表標題 遅発性筋痛におけるTRPV2チャンネルの関与: コンディショナルノックアウトマウスを用いた行動学的解析
3. 学会等名 第20回新潟医療福祉学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鷲澤玲央, 太田大樹, 田口徹
2. 発表標題 運動後に生じる筋機械痛覚過敏におけるTRPV2チャンネルの関与: モデルラットを用いた行動薬理学解析
3. 学会等名 第20回新潟医療福祉学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口徹, 太田大樹
2. 発表標題 機械痛覚に関わる神経・分子機構の探索
3. 学会等名 第20回新潟医療福祉学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田大樹, 片野坂公明, 村瀬詩織, 加塩麻紀子, 富永真琴, 片野坂友紀, 田口徹, 水村和枝
2. 発表標題 マウス遅発性筋痛モデルにおける機械感受性TRPチャネルの関与
3. 学会等名 第13回日本運動器疼痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田大樹, 片野坂公明, 村瀬詩織, 加塩麻紀子, 富永真琴, 片野坂友紀, 田口徹, 水村和枝
2. 発表標題 遅発性筋痛の分子機構: TRPA1およびTRPV2ノックアウトマウスを用いた解析
3. 学会等名 第42回日本疼痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田大樹, 片野坂公明, 村瀬詩織, 加塩麻紀子, 富永真琴, 片野坂友紀, 田口徹, 水村和枝
2. 発表標題 マウス遅発性筋痛モデルにおけるTRPチャネルの関与
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口徹, 太田大樹
2. 発表標題 動物モデルから探る骨格筋痛のメカニズム
3. 学会等名 第50回日本慢性疼痛学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap <a href="https://researchmap.jp/hirokiota/">https://researchmap.jp/hirokiota/</a>  新潟医療福祉大学教員プロフィール <a href="https://www.nuhw.ac.jp/n/teacher/pt/%e5%a4%aa%e7%94%b0-%e5%a7%e6%a8%b9/">https://www.nuhw.ac.jp/n/teacher/pt/%e5%a4%aa%e7%94%b0-%e5%a7%e6%a8%b9/</a>
---

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
研究分担者	片野坂 友紀  (Katanosaka Yuki)  (60432639)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師    (15301)	

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
---------	---------