

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08925

研究課題名（和文）オプトジェネティクスを用いた神経障害性疼痛モデルマウスの作製と疼痛機序の解明

研究課題名（英文）The development of optogenetics-induced neuropathic pain model mice and the elucidation of pain mechanism

研究代表者

丸田 豊明（Maruta, Toyoaki）

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：20363591

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）：申請者は、オプトジェネティクスを痛み研究に応用し、痛みに関与する電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネルとChR2を脊髄後根神経節ニューロンに共発現させ、青色光照射で各Na<sup>+</sup>チャンネルサブタイプが発現しているニューロンのみを興奮させ疼痛反応を生じさせることができる光応答性疼痛マウス(NaV1.7-ChR2、NaV1.8-ChR2、NaV1.9-ChR2マウスの3系統)を開発した。本研究では、これらの光応答性疼痛マウスを用いて、長時間光照射により各電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネルが発現した神経線維を特異的に興奮させ続けることで神経障害性疼痛モデルを作製し、脊髄後角でのc-Fos陽性細胞の増加を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛の発症機序は複雑で、それが機序解明と根本治療の確立を難しくしている。申請者が開発した光応答性疼痛マウスに光照射することで作製した神経障害性疼痛モデルは、外科的侵襲なしに、痛みを司る神経自体を刺激するというシンプルな方法で作製している。そのため、このモデルを使用すると神経障害性疼痛での細胞内における発症メカニズムを正確に解明することができると考えている。そして、根本的な発症機序を解明できれば、神経障害性疼痛の治療法確立につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The applicant has applied optogenetics to pain research and developed light-responsive pain mice (three strains: Nav1.7-ChR2, Nav1.8-ChR2 and Nav1.9-ChR2 mice). In this study, a neuropathic pain model was created in these light-responsive pain mice by specifically and continuously exciting nerve fibres in which each voltage-gated Na<sup>+</sup> channel was expressed by prolonged light exposure, and an increase in c-Fos positive cells was observed in the dorsal horn of the spinal cord.

研究分野：疼痛

キーワード：疼痛 神経障害性疼痛 ナトリウムチャンネル Nav1.7 Nav1.8 Nav1.9 オプトジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は、神経系の損傷や機能不全により発症する難治性疼痛である。糖尿病性神経症や帯状疱疹後神経痛などのさまざまな神経障害性疼痛があり、本邦でも数百万人の患者がいると推測されるが、決定的な治療法がないのが現状である。このような神経障害性疼痛の発症機序や治療法の研究において、さまざま疼痛モデル動物が作製されてきた。例えば、代表的な Chung モデルは坐骨神経を形成している第 4~6 腰部脊髄神経のうち第 5 と第 6 脊髄神経を結紮することで作製する。しかし、従来の神経障害性疼痛モデル動物作製法では、痛みを司る神経、さらにその中で特定の電位依存性  $\text{Na}^+$  チャンネルが発現している神経線維のみを障害することは不可能である。申請者は、オプトジェネティクスと呼ばれる技術を痛み研究に応用し、痛みに関与する電位依存性  $\text{Na}^+$  チャンネルである Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9 と光応答性チャンネルであるチャンネルロドプシン 2(ChR2)を脊髄後根神経節ニューロンに共発現させ、青色光照射で各  $\text{Na}^+$  チャンネルサブタイプが発現しているニューロンのみを興奮させ疼痛反応を生じさせることができる光応答性疼痛マウス(Nav1.7-ChR2、Nav1.8-ChR2、Nav1.9-ChR2 マウスの 3 系統)の作製に成功した。この光応答性疼痛マウスを用いれば、長時間光照射により各電位依存性  $\text{Na}^+$  チャンネルが発現した神経線維を特異的に興奮させ続けることで神経障害性疼痛モデルを作製することができる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が開発した光応答性疼痛マウスに長時間光照射を行うことで神経障害性疼痛を発生させ、その機序を解明することであった。 $\text{Na}^+$  チャンネルの増加や機能亢進は痛みの電気信号を増強するだけでなく、細胞内シグナル分子も変化させ、それが痛みの可塑性に関与している。光応答性疼痛マウスで作製した神経障害性疼痛モデルを用いることで、特定の電位依存性  $\text{Na}^+$  チャンネルの増加や機能亢進が関与する神経障害性疼痛での細胞内における発症メカニズムを正確に解明できると考えた。

### 3. 研究の方法

本研究では、脊髄後根神経節ニューロンに発現している電位依存性  $\text{Na}^+$  チャンネル Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9 と光感受性チャンネル ChR2 が共発現した Nav1.7-ChR2、Nav1.8-ChR2、Nav1.9-ChR2 マウスを用いた。

#### 神経障害性疼痛モデルの作製

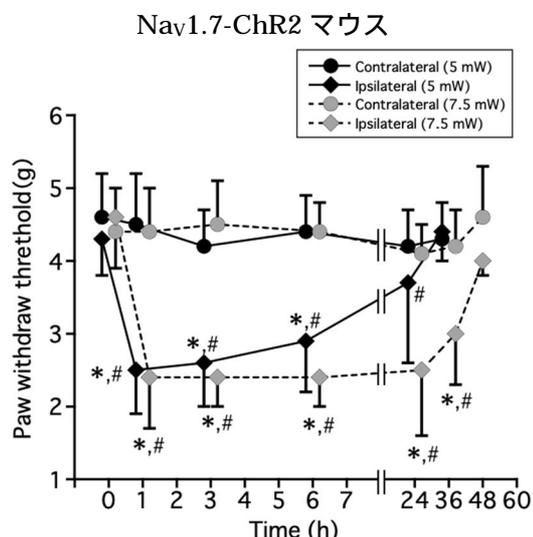
セボフルラン 3%を用いた全身麻酔下に、光応答性疼痛マウスの片方の足底に青色光を 30 分間照射し、可逆的な神経障害性疼痛を発生させた。照射する光の強さは、先行研究で最大の足引っ込み頻度が得られた強さと、その 1.5 倍の強さを用いた。照射前後の疼痛行動評価として、照射前と照射後 1、3、6、24、36、48 時間後に von frey test を行った。

青色光の足底照射後に神経障害性疼痛の発生を確認したのち、脊髄を取り出して、脊髄後角の免疫組織染色を行い c-Fos の発現を観察した。

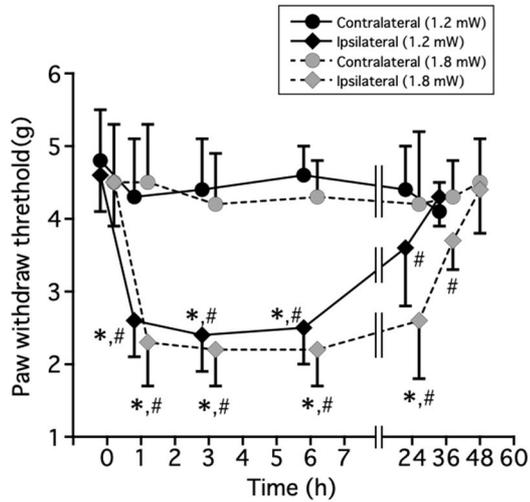
### 4. 研究成果

#### 可逆的な神経障害性疼痛モデルの作製

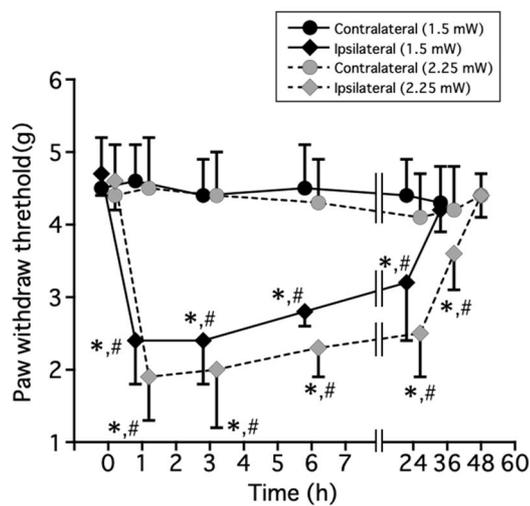
von Frey test の結果を示す。青色光の測定照射により照射側の神経障害性疼痛を発生させることができた。神経障害性疼痛は可逆的であった。照射する光の強さに応じて、疼痛閾値が低下している期間が延長した。



### Nav1.8-ChR2 マウス



### Nav1.9-ChR2 マウス

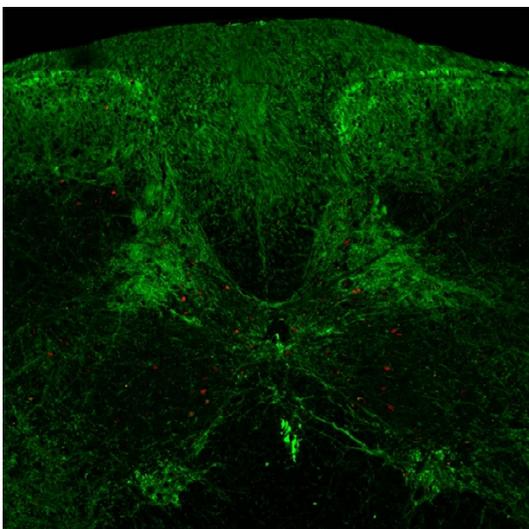


\* $p < 0.05$ , vs contralateral; # $p < 0.05$ , vs Pre

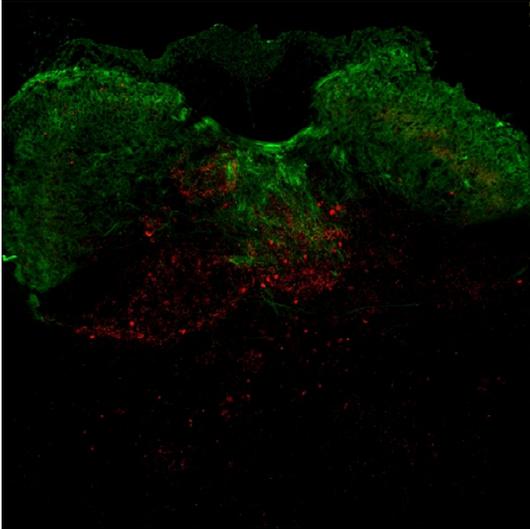
### 脊髄後角の c-Fos の比較

Nav1.7-ChR2 マウスは 7.5 mW、Nav1.8-ChR2 マウスは 1.8 mW、Nav1.9-ChR2 マウスは 2.25 mW の強さの青色光を片側足底に照射し、1~2 時間後に脊髄を採取して免疫組織染色で c-Fos を観察した。青色光照射側の脊髄後角で痛覚受容の指標となる c-Fos 陽性細胞の増加を認めた。

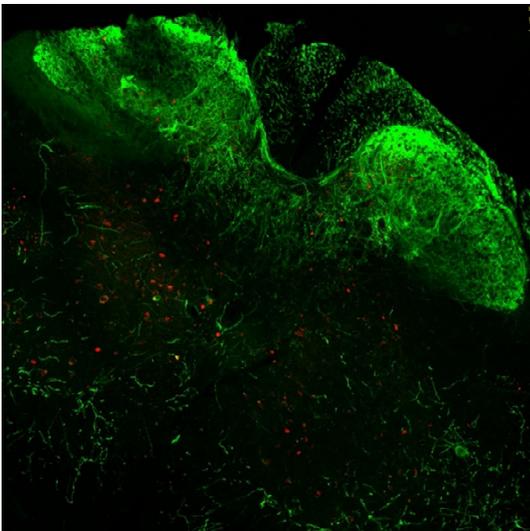
### Nav1.7-ChR2 マウス



Nav1.8-ChR2 マウス



Nav1.9-ChR2 マウス



いずれも左側の脊髄後角が光照射側。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Tomohiro Koshida, Toyoaki Maruta, Nobuhiko Tanaka, Kotaro Hidaka, Mio Kurogi, Takayuki Nemoto, Toshihiko Yanagita, Ryu Takeya, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Changes in TRPV1 Receptor, CGRP, and BDNF Expression in Rat Dorsal Root Ganglion with Resiniferatoxin-Induced Neuropathic Pain: Modulation by Pulsed Radiofrequency Applied to the Sciatic Nerve.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama	6. 最初と最後の頁 359-364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/65741	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 Toyoaki Maruta, Yumi Watanabe, Yukiko Nagata, Rina Kashino, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Epidural Anesthesia and Continuous Epidural Analgesia in a Pediatric Patient With Pelizaeus-Merzbacher Disease: A Case Report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e29983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.29983	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 Toyoaki Maruta, Kotaro Hidaka, Satoshi Kouroki, Tomohiro Koshida, Mio Kurogi, Yohko Kage, Seiya Mizuno, Tetsuro Shirasaka, Toshihiko Yanagita, Satoru Takahashi, Ryu Takeya, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Selective optogenetic activation of Nav1.7-expressing afferents in Nav1.7-ChR2 mice induces nocifensive behavior without affecting responses to mechanical and thermal stimuli.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0275751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0275751	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 Kotaro Hidaka, Toyoaki Maruta, Tomohiro Koshida, Mio Kurogi, Yohko Kage, Satoshi Kouroki, Tetsuro Shirasaka, Ryu Takeya, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Extracellular signal-regulated kinase phosphorylation enhancement and NaV1.7 sodium channel upregulation in rat dorsal root ganglia neurons contribute to resiniferatoxin-induced neuropathic pain: The efficacy and mechanism of pulsed radiofrequency therapy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/17448069221089784	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 Satoshi Kouroki, Toyoaki Maruta, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of cryoprecipitate on an increase in fibrinogen level in patients with excessive intraoperative blood loss: a single-center retrospective study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40981-022-00516-5	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 Kotaro Hidaka, Toyoaki Maruta, Tomohiro Koshida, Mio Kurogi, Yohko Kage, Satoshi Kouroki, Tetsuro Shirasaka, Ryu Takeya, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Extracellular signal-regulated kinase phosphorylation enhancement and Na V 1.7 sodium channel upregulation in rat dorsal root ganglia neurons contribute to resiniferatoxin-induced neuropathic pain: The efficacy and mechanism of pulsed radiofrequency therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular pain	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/17448069221089784	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 Effect of cryoprecipitate on an increase in fibrinogen level in patients with excessive intraoperative blood loss: a single-center retrospective study	4. 巻 8
2. 論文標題 Satoshi Kouroki, Toyoaki Maruta, Isao Tsuneyoshi	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JA clinical reports	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40981-022-00516-5	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 Tetsu Yonaha, Toyoaki Maruta, Go Otao, Koji Igarashi, Sayaka Nagata, Takeshi Yano, Masahiko Taniguchi, Kazuo Kitamura, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 The diagnostic and prognostic value of mature and total adrenomedullin for sepsis: a prospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anaesthesiology intensive therapy	6. 最初と最後の頁 411-417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5114/ait.2021.111345	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 Go Otao, Toyoaki Maruta, Tetsu Yonaha, Koji Igarashi, Sayaka Nagata, Kazuo Kitamura, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 The usefulness of plasma levels of mature and total adrenomedullin as biomarkers indicating the magnitude of surgical stress responses: A single-center, prospective, observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of translational research	6. 最初と最後の頁 302-310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Go Otao, Toyoaki Maruta, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 100
2. 論文標題 Comparison of opioid local anesthetic combination regimens using the number of self-administrated boluses in patient-controlled epidural analgesia after cesarean section: A retrospective single-center study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e25560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000025560	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸田豊明
2. 発表標題 光を当てると痛がる!? オプトジェネティクスを応用した新規疼痛モデル動物の模索
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会九州部会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越田智広、丸田豊明、日高康太郎、興杢聡志、恒吉勇男
2. 発表標題 パルス高周波療法によるTRPV1、CGRP、BDNFの変化：レシニフェラトキシン誘発性疼痛ラット脊髄後根神経節での検討
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 丸田豊明、興杢聡志、日高康太郎、越田智広、白阪哲朗、恒吉勇男
2. 発表標題 オプトジェネティクスを用いた光による痛み制御：ナトリウムチャンネルNav1.7・Nav1.8・Nav1.9を標的とした遺伝子改変マウスの開発と疼痛行動の比較
3. 学会等名 第69回日本麻酔科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸田豊明、興杢聡志、日高康太郎、越田智広、白阪哲朗、恒吉勇男
2. 発表標題 オプトジェネティクスを用いた光による痛み制御：ナトリウムチャンネルNav1.7・Nav1.8・Nav1.9を標的とした遺伝子改変マウスの開発と疼痛行動の比較
3. 学会等名 第69回日本麻酔科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日高康太郎、丸田豊明、越田智広、興杢聡志、白阪哲朗、恒吉勇男
2. 発表標題 帯状疱疹後神経痛モデルラットにおける高周波パルス療法の作用機序の検討
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 日高康太郎、丸田豊明、門田瑤子、興相聡志、越田智広、渡部由美、山賀昌治、恒吉勇男
2. 発表標題 Resiniferatoxin誘発性疼痛ラットでのTramadol治療後の高周波パルス療法の有効性と作用機序の検討
3. 学会等名 第55回日本ペインクリニック学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 丸田豊明、他	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 629
3. 書名 麻酔科トラブルシューティング A to Z 第2版	

1. 著者名 丸田豊明、他	4. 発行年 2023年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 452
3. 書名 くすりがわかる 作用機序×使い方×観察・ケア	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究内容  <a href="http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/masui/research/researchcontent/">http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/masui/research/researchcontent/</a>          研究業績  <a href="http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/masui/research/performance/">http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/masui/research/performance/</a></p>
---

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	黒木 未央  (Kurogi Mio)  (90706483)	宮崎大学・医学部・技能補佐員    (17601)	

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