

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08859

研究課題名(和文) オプトジェネティクスを用いた光による痛み制御～実験動物の開発と疼痛機序の解明～

研究課題名(英文) Pain Control by Light Using Optogenetics ~Development of Experimental Animals and Elucidation of Pain Mechanisms~

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：計画していたすべてのマウス(Nav1.7iCre/+;Ai32/+、Nav1.8iCre/+;Ai32/+、Nav1.9iCre/+;Ai32/+)を作製できた。機械的刺激と温熱刺激に対する疼痛応答は野生型と違いがないことを確認した。また、足底への青色LED光照射試験では、足を引っ込めるといった疼痛応答を示した。また光嫌悪性試験として青色LED光の床と緑色LED光の床の部屋を自由に行き来する実験を行ったところ、青色の部屋の滞在時間が野生型よりも有意に短くなった。そして、脊髄後根神経節で、それぞれのNa⁺チャネルと光感受性チャネルChR2が共発現していることを組織免疫染色で確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の目的どおり、光照射で疼痛反応を起こすマウスを作製することができた。純粋に痛みの神経のみを興奮させて、疼痛反応を評価することができるようになった点が画期的である。今後は、このマウスを用いて、神経障害性モデルを作製し、行動評価を行ってみたい。また、長期光照射により神経障害性疼痛を発症させて、分子生物学的手法や組織免疫染色などを用いて、神経障害性疼痛の発症機序を細胞内分子レベルで解明したい。さらに、同様の手法で光照射で疼痛を感じにくくしたマウスを作製することも可能であり、神経障害性疼痛の機序解明に役立つであろう。

研究成果の概要(英文)：We were able to generate all the planned mice (Nav1.7iCre/+;Ai32/+, Nav1.8iCre/+;Ai32/+, Nav1.9iCre/+;Ai32/+). We confirmed that the pain responses to mechanical and thermal stimuli were not different from the wild type. In addition, the blue LED light irradiation test on the sole of the foot showed a pain response of foot retraction. In addition, in a light aversion test, the animals were allowed to move freely between a blue LED light floor and a green LED light floor, and the time spent in the blue room was significantly shorter than in the wild type. We confirmed by tissue immunostaining that each Na⁺ channel and the photosensitive channel ChR2 were co-expressed in the dorsal root ganglia of the spinal cord.

研究分野：疼痛学、麻酔科学

キーワード：オプトジェネティクス 疼痛 神経障害性疼痛 脊髄後根神経節 Nav1.7 Nav1.8 Nav1.9 ChR2

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛では特定の電位依存性 Na^+ チャンネルが増減することで特定の神経線維が障害されている可能性が示唆されているが、従来の評価法では個々の神経線維の評価をすることができなかった。そこで、オプトジェネティクスにより個々の神経線維の選択的刺激あるいは抑制が可能になれば、過去にない疼痛の評価や神経障害性疼痛の発生機序の解明ができるのではないかと考えた。同じコンセプトの研究がないか検索すると、2013年に Daou らは Nav1.8 の発現した後根神経節ニューロンに ChR2 を発現させて、光を当てることによって機械的刺激や温熱刺激に対する閾値が低くなることを報告していた(J. Neurosci. 33:18631-18640. 2013)。また、2014年に Iyer らはウイルスベクターにより ChR2 を坐骨神経に発現させて、光を当てることによって後ろ足を引っ込めるマウスを作製した。さらに、同様に NpHR(黄色の光で開口するチャンネルで活動電位を抑制する)を発現させて CCI モデルでの機械的刺激や温熱刺激による痛み反応の閾値の低下を抑制することを報告していた(Nat. Biotechnol. 32:274-278. 2014)。本研究では、さらに数種類の Na^+ チャンネルをターゲットにしたダブルトランスジェニックラットを作製し、神経障害性疼痛に関わる神経回路や発生機序を解明したいと考えた。本研究によりどの神経が難治性疼痛発生にどのように関わっているのかが解明されれば、将来、神経障害性疼痛の治療法の確立にも繋がることを期待された。

2. 研究の目的

オプトジェネティクス(光遺伝学的手法)は遺伝子導入によって光応答性タンパクを目的とする細胞に発現させ、光を当てただけで細胞応答を変化させる技術である。標的とする神経細胞に光感受性チャンネルを発現させ、光をオン・オフすることで無数にある神経の中から特定の神経細胞の選択的興奮・抑制を行うことができる。この技術を痛み研究に応用することで特定の神経回路を刺激あるいは抑制できるようになり、痛みの伝達回路の解明やより正確な痛みの評価が可能になる。本研究の目的は、痛みに関与する電位依存性 Na^+ チャンネル Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9 が発現している脊髄後根神経節ニューロンに選択的に光感受性チャンネルを発現させて、神経障害性疼痛における役割を解明することである。

3. 研究の方法

本研究は AdAMS (先端モデル動物支援プラットフォーム) の実験動物作製支援に採択され、Nav1.7-iCre、Nav1.8-iCre、Nav1.9-iCre マウスを筑波大学の高橋智先生と水野聖哉先生に作製していただいた。これらの遺伝子改変マウスは電位依存性 Na^+ チャンネルのサブタイプ Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9 のそれぞれの遺伝子の下流に Cre-recombinase 遺伝子をノックインしたものである。Nav1.7-iCre、Nav1.8-iCre、Nav1.9-iCre マウスを光感受性チャンネル ChR2 の遺伝子が組み込まれた Flox マウスである Ai32 マウスと交配させ、Cre/loxP システムにより、脊髄後根神経節ニューロンにおいて、上記のそれぞれの Na^+ チャンネルと ChR2 が共発現した Nav1.7^{iCre/+};Ai32/+、Nav1.8^{iCre/+};Ai32/+、Nav1.9^{iCre/+};Ai32/+マウスを作製した。そして、Nav1.7^{iCre/+};Ai32/+、Nav1.8^{iCre/+};Ai32/+、Nav1.9^{iCre/+};Ai32/+マウスにおいて、機械的刺激や温熱刺激に対する疼痛応答に異常がないか、設計したとおりに光に対する疼痛応答が得られるかを検討した。

従来の疼痛行動評価として von Frey test (IITC 社製の von Frey 電子痛覚測定装置を使用) と Plantar test (Ugo basile 社製デバイスを使用) を行った。また、光に対する疼痛行動評価として青色 LED 光の足底照射 (Doric 社製の LED デバイスを使用) と光嗜好 (嫌悪) 性試験 (BRC バイオリサーチセンター社製 OPA 試験デバイスを使用) を行った。

さらに、脊髄後根神経節 (DRG) の組織免疫染色を行い、 Na^+ チャンネルと ChR2 の共発現についても確認した。

4. 研究成果

(1) von Frey test と Plantar test

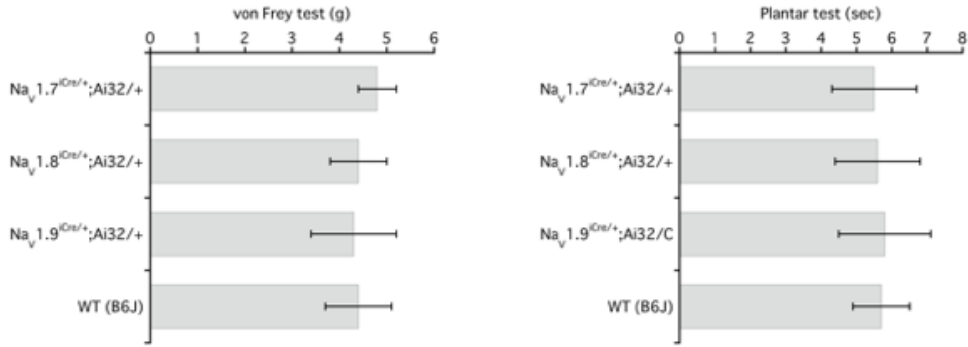


図1. von Frey test と Plantar test

Nav_v1.7^{iCre/+};Ai32/+、Nav_v1.8^{iCre/+};Ai32/+、Nav_v1.9^{iCre/+};Ai32/+はいずれも Wild type と差はなかった。機械的刺激や温熱刺激に対する疼痛応答は異常ないと考えられた。

(2) 青色 LED 光照射に対する逃避行動

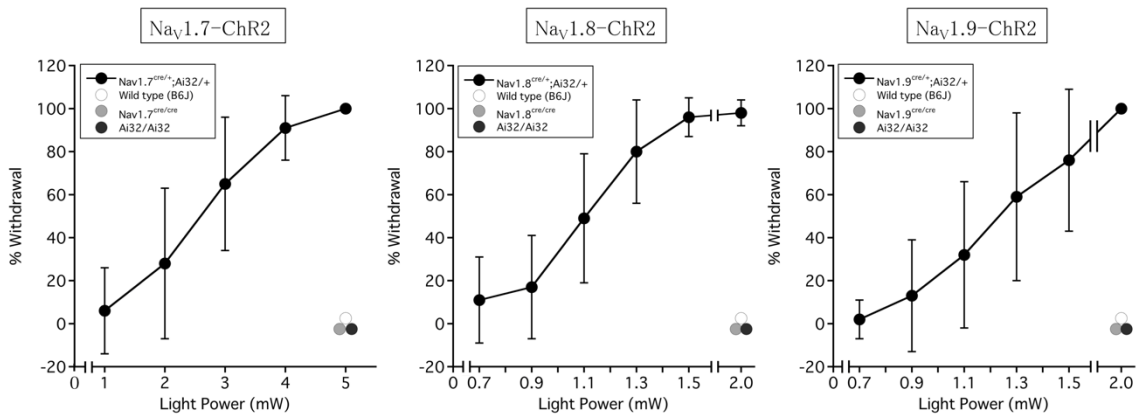


図2. 青色 LED 光の足底照射試験

Nav_v1.7-ChR2 (Nav_v1.7^{iCre/+};Ai32/+)、Nav_v1.8-ChR2 (Nav_v1.8^{iCre/+};Ai32/+)、Nav_v1.9-ChR2 (Nav_v1.9^{iCre/+};Ai32/+) は青色 LED 光の足底照射で足引っ込み応答を起こした。この逃避行動は光強度が強くなるに従い、頻度が多くなった。

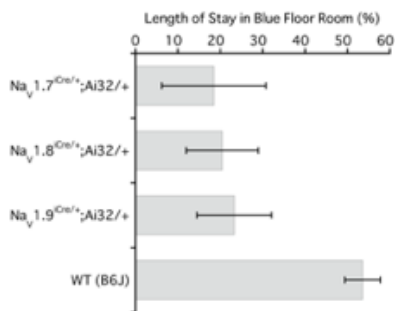


図3. 光嗜好(嫌悪)性試験

青色光の床の部屋と緑色光の床の部屋を自由に行き来できるようにして10分間観察し、青色光の部屋の滞在時間を記録した。Nav_v1.7^{iCre/+};Ai32/+、Nav_v1.8^{iCre/+};Ai32/+、Nav_v1.9^{iCre/+};Ai32/+はいずれも Wild type より有意に滞在時間が短くなった。

(3) DRG の免疫染色

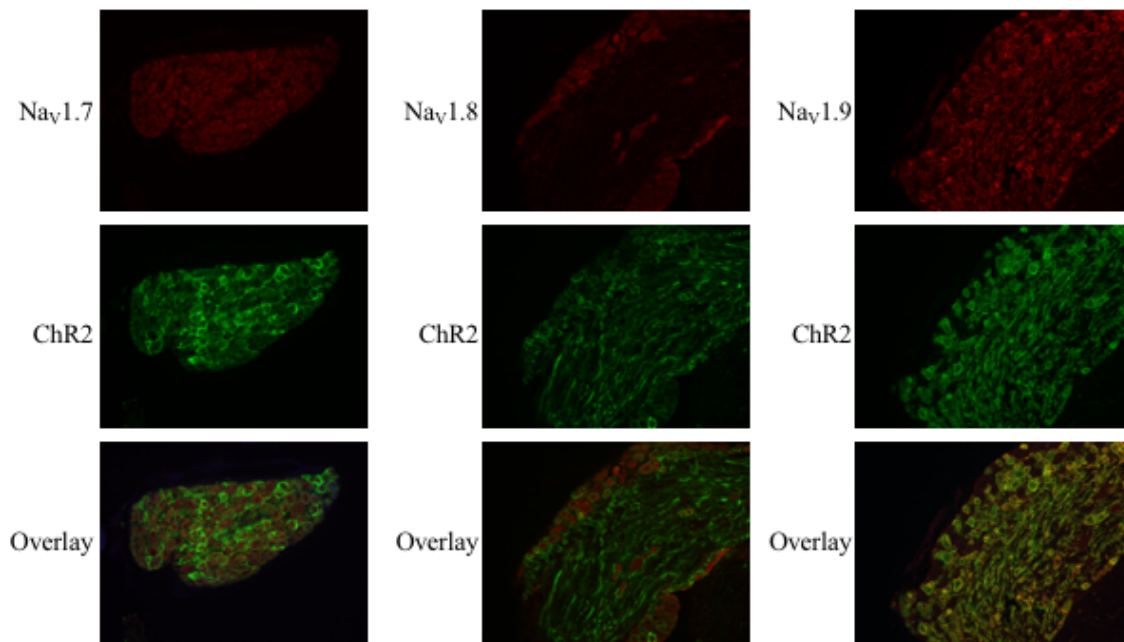


図4. DRG の免疫染色

それぞれの Na⁺チャンネルと ChR2 は共発現していることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 柳田俊彦, 丸田豊明, 根本隆行	4. 巻 44
2. 論文標題 インスリンと記憶: 海馬におけるその働きと治療へのアプローチ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床麻酔	6. 最初と最後の頁 307-316
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 無
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 -
1. 著者名 丸田豊明, 丸田望, 柳田俊彦, 恒吉勇男	4. 巻 44
2. 論文標題 がん薬物療法が引き起こす末梢神経障害のエビデンス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床麻酔	6. 最初と最後の頁 947-954
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 無
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 -
1. 著者名 Syunsuke Kuroki, Yoshihiro Nagamine, Yoshihumi Kodama, Yoko Kadota, Satoshi Kouroki, Toyoaki Maruta, Shiho Kanemaru, Masahiro Amano, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Intraoperative Single-Dose Intravenous Acetaminophen for Postoperative Analgesia After Skin Laser Irradiation Surgery in Paediatric Patients: A Small Prospective Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Turkish Journal of Anaesthesiology and Reanimation	6. 最初と最後の頁 192 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5152/TJAR.2019.10476	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 Maruta Toyoaki, Nemoto Takayuki, Hidaka Koutaro, Koshida Tomohiro, Shirasaka Tetsuro, Yanagita Toshihiko, Takeya Ryu, Tsuneyoshi Isao	4. 巻 14
2. 論文標題 Upregulation of ERK phosphorylation in rat dorsal root ganglion neurons contributes to oxaliplatin-induced chronic neuropathic pain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0225586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225586	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 丸田豊明, 太田尾 剛, 與那覇 哲, 北村和雄, 恒吉勇男	4. 巻 39
2. 論文標題 【神経体液性因子の新展開】 周術期バイオマーカーとしてのアドレノメデュリン	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 循環制御	6. 最初と最後の頁 169-171
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 無
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9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 丸田豊明、太田尾剛、與那覇哲、北村和雄、恒吉勇男
2. 発表標題 周術期バイオマーカーとしてのアドレノメデュリン
3. 学会等名 第39回日本循環制御医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸田豊明、佐藤文明、澤田 修、石山健次郎、恒吉勇男
2. 発表標題 術中大量出血に対するクレオプレシピテートの使用効果：後ろ向き研究
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松川美澄、佐藤文明、丸田豊明、白阪哲朗、恒吉勇男
2. 発表標題 頸部腫瘍による気管狭窄のためPCPS待機下で気管挿管した一例
3. 学会等名 九州麻酔学会第56回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toyoaki Maruta, Kotaro Hidaka, Tomohiro Koshida, Takayuki Nemoto, Tetsuro Shirasaka, Ryu Takeya, Isao Tsuneyoshi
2. 発表標題 Up-regulation of ERK phosphorylation in rat DRG neurons with oxaliplatin-induced neuropathic pain.
3. 学会等名 ASA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Go Otao, Toyoaki Maruta, tetsu Yonaha, Sayaka Nagata, Kazuo Kitamura, Isao Tsuneyoshi
2. 発表標題 Adrenomedullin as a perioperative biomarker: the correlation between inflammatory/ infectious parameters and sequential organ failure assessment/ acute physiology and chronic health evaluation scores in surgical patients.
3. 学会等名 ASA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 緑川沙樹、丸田豊明、宮里岳志、石山健次郎、河野太郎、恒吉勇男
2. 発表標題 高位胸部硬膜外麻酔により下肢の運動障害を生じた一症例
3. 学会等名 第23回日本神経麻酔集中治療学会・第6回アジア神経麻酔集中治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菓子野里奈、澤田 修、佐藤文明、緑川沙樹、丸田豊明、恒吉勇男
2. 発表標題 食道癌が左肺に穿破した患者で高頻度ジェット換気を併用した分離肺換気を行った麻酔経験
3. 学会等名 九州麻酔学会第57回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotaro Hidaka, Toyoaki Maruta, Mio Kuroki, Tomohiro Koshida, Tetsuro Shirasaka, Isao Tsuneyoshi
2. 発表標題 Upregulation of Nav1.7 sodium channels expression and the effects of pulsed radiofrequency treatment in rat DRG with resiniferatoxin-induced neuropathic pain.
3. 学会等名 Euroanaesthesia 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸田豊明、越田智広、日高康太郎、黒木未央、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末梢神経疼痛モデル動物の開発:Nav1.7を標的とした疼痛モデルマウスの紹介.
3. 学会等名 第42回日本疼痛学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 全身状態の良不良を評価するための情報を提供する方法及び測定試薬	発明者 北村和雄、恒吉勇男、丸田豊明、太田尾剛、五十嵐浩二、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、JP 2018-151295 A	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

宮崎大学医学部麻酔生体管理学教室 研究紹介 http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/masui/research/
--

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