

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：33111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17687

研究課題名（和文）有効な治療法確立に向けた骨格筋侵害受容器の電気生理学的分類と局所的遺伝子解析

研究課題名（英文）Electrophysiological and local gene analysis of nociceptors from skeletal muscle for effective treatments

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では「非活動性侵害受容器」に着目し、電気生理学的特性による骨格筋神経の分類を行った。また、骨格筋神経細胞における「非活動性侵害受容器」特異的マーカー因子の発現形態を組織学的手法により調べた。その結果、骨格筋神経において「非活動性侵害受容器」が存在し病態化により活動性を獲得することや、骨格筋神経には交感神経が極めて多く分布することがわかった。さらに、「非活動性侵害受容器」の特異的マーカー因子が骨格筋神経にも発現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肩こりや腰痛などの骨格筋の痛みは、我が国においてきわめて罹患者数が多くありふれた病態であるにもかかわらず、不明な点が多く残されている。その理由の一つに、骨格筋の痛みそのものの理解が他組織に比べ遅れている点が挙げられる。本研究では、骨格筋神経にも「非活動性侵害受容器」が存在し活性化すること、この特異的マーカー因子が骨格筋神経細胞にも発現するとの知見を得ることができた。これらの研究成果は、骨格筋神経の再分類という学術的意義とともに、骨格筋の痛み治療に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we classified nerve fibers in skeletal muscle by analyzing electrophysiological properties. And, we examined whether a specific marker of "silent nociceptor" is expressed in sensory neurons innervating skeletal muscle. Our results demonstrated that there is "silent nociceptor" in skeletal muscle, it is activated in pathological condition, and many of fibers in skeletal muscle are sympathetic efferents. Furthermore, we firstly observed the specific marker of "silent nociceptor" in sensory neurons innervating skeletal muscle.

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 交感神経 非活動性侵害受容器 骨格筋疼痛 単一神経記録法

1. 研究開始当初の背景

骨格筋由来の痛みは極めて高い頻度で発症し慢性化しやすい病態であるが、不明な点が数多く残されており、依然として多くの日本人を悩ませている。その理由の一つに骨格筋痛み神経の基礎的知見の不足が挙げられる。

痛み神経は「侵害受容器」と呼ばれ、痛み情報を末梢組織から中枢へと伝え、これまでの

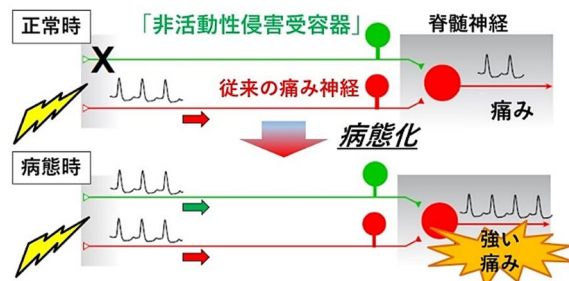


図1「非活動性侵害受容器」のイメージ

研究活動によって様々なタイプに分類されている。そのうち「非活動性侵害受容器 (silent nociceptor)」（図1）は、正常時は痛みを伝えず病態下ではじめて伝えるようになる“潜在的な侵害受容器”として長らく提唱されてきたが、最近になって皮膚など他組織においてその存在が実証され、病態への関与も明らかとなった[Taguchi, Ota et al., *Pain*, 2010][Obreja et al., *Pain*, 2011]。しかし、骨格筋では依然としてその存在が実証されておらず、活性化機構も不明である。一方、骨格筋は他組織に比べ交感神経の割合が高いことが組織実験により示されている[Baron et al., *J Comp Neurol*, 1988]が、この電気生理学的特性についても調べられていない。

また近年、「非活動性侵害受容器」の特異的マーカー因子が培養細胞を用いた研究で同定され[Prato et al., *Cell Rep*, 2017]、この神経線維を標的にした新しい鎮痛方法の開発が期待されている。しかし、骨格筋神経における発現や骨格筋の痛みメカニズムへの関与は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋支配神経を電気生理学的特性により「非活動性侵害受容器」や交感神経を含め再分類を試みた。さらに、病態化によって神経線維の分布が変化するか調べた。加えて、「非活動性侵害受容器」特異的マーカー因子が骨格筋神経細胞に発現しているか調べた。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的実験

雄性SDラットを用い、全身麻酔下で血圧、心拍、直腸温を生理的範囲に保持し、*in vivo* 単一神経記録法により腓腹筋神経からC線維を同定した。次に、同定したC線維軸索への反復電気刺激(5 Hz、10秒間)により活動依存的伝導速度変化(ADCCV)を記録した。腓腹筋へのピンチ刺激により線維の機械感受性の有無を調べた(図2)。さらに、「非活動性侵害受容器」と考えられた一部の線維に対して炎症メディエータの混合物(炎

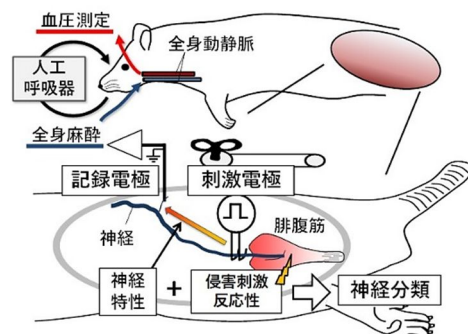


図2 電気生理セットアップ

症スープ)を筋注し、新たに機械感受性を獲得するか調べた。また、交感神経幹の特性を調べるため、上記と同様に全身活動を生理学的範囲に保持し、腹腔から交感神経幹に刺激電極を、下腿から腓腹筋神経に記録電極をそれぞれ留置し、腓腹筋を支配する交感神経幹の特性を調べた(図3)。

さらに、以上を完全フロイントアジュバント(CFA)ならびに神経性長因子(NGF)筋注によって作製した病態ラットにおいても解析し、正常ラットと比較した。

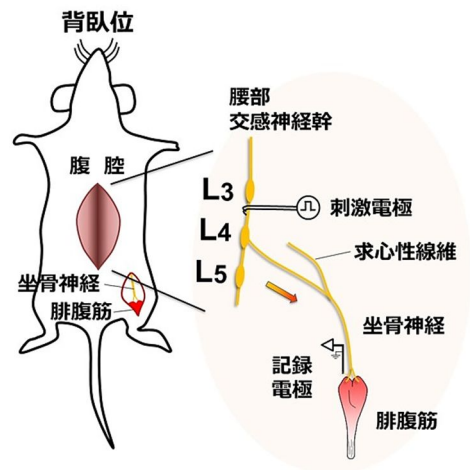


図3 交感神経記録セットアップ

(2) 免疫組織化学的実験

一次感覚神経細胞体が集積する後根神経節(DRG)から骨格筋神経を標識(可視化)するために、正常ラット腓腹筋に逆行性神経トレーサー色素 Dil を筋注した。筋注7日後にラットから第3~5腰髄レベルのDRGを取り出し、凍結切片を作製した後、抗CHRNA3抗体ならびにAlexa Fluor488抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに、非ペプチド性侵害受容器のマーカである抗IB4抗体を用いて、CHRNA3発現細胞との共発現レベルを調べた。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的実験

同定した腓腹筋C線維(197例)のうち、機械非感受性線維は153例(約78%)であった。このうち35例(C線維の約18%)のADCCVは顕著に遅延し(-5%以下)、「非活動性侵害受容器」であると考えられた。

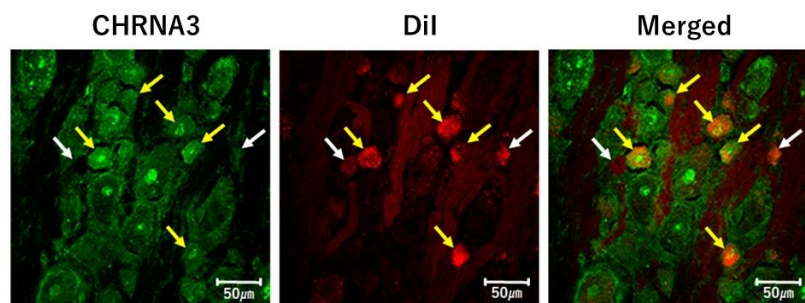


図4 骨格筋神経細胞とCHRNA3の共発現

さらに、この35例のうち

12例の腓腹筋に炎症スープを投与したところ、3例は投与3~10分後に新たに機械感受性を示した。以上より、腓腹筋C線維のうち約18%は「非活動性侵害受容器」であり、その一部は実験的炎症惹起により不活状態から活性状態にモーダルシフトすることがわかった。さらに、交感神経幹を直接電気刺激することにより、骨格筋に分布する交感神経のADCCVの遅延が小さいことがわかった。以上より、骨格筋神経には「非活動性侵害受容器」が分布すること、骨格筋神経の多くが交感神経であることが明らかとなった。一方、CFAモデルにおいて、筋炎症下の骨格筋神経における「非活動性侵害受容器」の特徴を持つ神経タイプの割合は正常動物の割合よりも少なかったが、有意な差異は認められなかった。また、NGFモデルにおいては、正常ラットと比べ各神経の割合に大きな差異は見られなかったが、軸索特性においては差異が認められた。

(2) 免疫組織化学的実験

「非活動性侵害受容器」特異的マーカー因子 CHRNA3 の発現が DRG のうち骨格筋神経細胞体において観察された (図 4)。さらに、CHRNA3 はペプチド性神経細胞体においても発現が確認された。以上より、「非活動性侵害受容器」特異的マーカー因子が骨格筋神経に発現することが明らかとなり、これまでの電気生理学的アプローチによる存在実証を支持する結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ota H, Katanosaka K, Murase S, Furuyashiki T, Narumiya S, Mizumura K	4. 巻 28 (3)
2. 論文標題 EP2 receptor plays pivotal roles in generating mechanical hyperalgesia after lengthening contractions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports	6. 最初と最後の頁 826-833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/sms.12954	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 該当する

1. 著者名 田口徹、太田大樹、若月康次、濱上陽平	4. 巻 39(別冊春号)
2. 論文標題 筋・筋膜性疼痛および線維筋痛症の末梢神経機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ペインクリニック	6. 最初と最後の頁 S61-S68
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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ota H, Matsubara T, Hotta H, Mizumura K, Taguchi T
2. 発表標題 Mechanically-insensitive afferents in the rat skeletal muscle
3. 学会等名 2019年度 痛み研究会（生理学研究所・国際学術集会）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ota H, Matsubara T, Hotta H, Mizumura K, Taguchi T
2. 発表標題 Electrophysiological analysis of mechanically-insensitive afferents and sympathetic efferents in skeletal muscle.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田大樹, 林功栄, 片野坂公明, 村瀬詩織, 加塩麻紀子, 富永真琴, 田口徹, 水村和枝
2. 発表標題 遅発性筋痛におけるTRPA1チャネルの役割
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田大樹, 田口徹
2. 発表標題 遅発性筋痛モデルの筋機械痛覚過敏におけるTRPA1チャネルの役割
3. 学会等名 第19回新潟医療福祉学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田大樹, 松原崇紀, 堀田晴美, 水村和枝, 田口徹
2. 発表標題 正常ならびに病態モデルラットの骨格筋における非活動性侵害受容器と交感神経の軸索伝導特性
3. 学会等名 第7回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田大樹, 林功栄, 片野坂公明, 村瀬詩織, 加塩麻紀子, 富永真琴, 田口徹, 水村和枝
2. 発表標題 ラットおよびマウス遅発性筋痛モデルの機械痛覚過敏におけるTRPA1の関与
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ota H, Matsubara T, Hotta H, Mizumura K, Taguchi T
2. 発表標題 Characterization of mechanically-insensitive afferents and sympathetic efferents in skeletal muscle
3. 学会等名 9th FAOPS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田大樹、平澤孝枝
2. 発表標題 骨格筋における非活動性侵害受容器の電気生理学的・免疫組織化学的探索
3. 学会等名 第1回帝京大学研究交流シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田大樹、松原崇紀、堀田晴美、水村和枝、田口徹
2. 発表標題 骨格筋における非活動性侵害受容器と交感神経の電気生理学的特徴
3. 学会等名 第23回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 骨格筋に分布する交感神経の軸索伝導特性
2. 発表標題 太田大樹、松原崇紀、堀田晴美、水村和枝、田口徹
3. 学会等名 第46回自律神経生理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田大樹、松原崇紀、堀田晴美、水村和枝、田口徹
2. 発表標題 骨格筋における非活動性侵害受容器と交感神経の軸索伝導特性
3. 学会等名 第6回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田大樹、松原崇紀、水村和枝、田口徹
2. 発表標題 実験的炎症下における骨格筋非活動性侵害受容器の活性化
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap http://researchmap.jp/hirokiota/ 新潟医療福祉大学教員プロフィール https://www.nuhw.ac.jp/faculty/medical/pt/teacher/ota.html

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
研究協力者	水村 和枝 (MIZUMURA Kazue) (00109349)	中部大学・生命健康科学部・客員教授 (33910)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	田口 徹 (TAGUCHI Toru) (90464156)	新潟医療福祉大学・リハビリテーション学部・教授 (33111)	
連携 研究者	平澤 孝枝 (HIRASAWA Takae) (10402083)	帝京大学・理工学部・准教授 (32643)	