

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860158

研究課題名(和文)光遺伝学を用いた慢性筋痛モデル開発と病態機構の解明

研究課題名(英文)Development of chronic muscle pain model and understanding of pathological condition by using optogenetics

研究代表者

林 功栄 (HAYASHI, KOEI)

名古屋大学・環境医学研究所・研究員

研究者番号：00579592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性筋痛症に特徴的な筋の一部に局限した痛覚過敏と筋硬結を作り出すため、光遺伝学の手法を用いて光を当てると筋肉が収縮するよう操作し、繰り返しの光刺激で持続的収縮を誘発して筋肉痛を生じさせる全く新しいモデル動物の開発に取り組んだ。  
筋肉内にチャンネルロドプシン2という光刺激に応答する受容体を発現させ、光刺激で筋肉を収縮させることに成功した。皮膚を介さずに筋へ直接光刺激を加えた方がより強い収縮を誘発できた。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop a chronic muscle pain model with taut band and understand a pathological condition by using optogenetics. Light-stimulation of skeletal muscle expressing the light-sensitive channel Channelrhodopsin-2 (ChR2) evoked tetanic contractions. Light-stimulation exposed directly to the muscle evoked larger tetanic contractions compare with exposed through the skin.

研究分野：疼痛学

キーワード：慢性筋痛症 光遺伝学 筋硬結 チャンネルロドプシン2

### 1. 研究開始当初の背景

運動器（筋、筋膜、関節など）に起因する痛みは高頻度で<文献①, ②>、遷延化しやすく、難治性である。日本の成人人口の約40%が運動器疼痛を有し、約9%（910万人）が日常生活動作に支障をきたしている<文献①>。この割合は加齢により右肩上がりに増加するため<文献③>、高齢化社会が進行する先進諸国において、高齢者 QOL の低下だけでなく、大きな医療経済的負担を生じ、国際的な問題となっている。なかでも、筋・筋膜性疼痛症候群（MPS）など、筋や筋膜に起因する痛みは頻度が高く、日常生活制限に直結するため、病態機構の解明と治療に向けた基礎研究が急務である。

一方、痛みの基礎研究は実験手法の発展とともに、この40年間に飛躍的に進歩した。しかし、主たる研究対象は“皮膚”であり、罹患者の多い運動器の痛みは著しく研究が遅れている。そのため、我々は運動器疼痛の基礎研究に精力的に取り組んできた。特に、遅発性筋痛（※いわゆる運動後の筋肉痛）を生じる伸張性収縮を長期間負荷することで慢性筋痛症の動物モデルを開発し、このモデルの痛覚過敏に再生筋細胞で産生される神経成長因子（NGF）が極めて重要であることを実証した。さらに、デンマークオールボー大学の Graven-Nielsen 博士らとの共同研究で、NGF をヒトに反復投与するトランスレーショナル実験を行い、NGF がヒトと動物の慢性筋痛症に共通した重要な原因物質の1つであることを明らかにした。また最近、我々はげっ歯類で筋の痛みを定量的、かつ再現良く作製・測定するための運動負荷装置と痛覚測定システムを開発した。これにより、筋痛を生じる筋収縮パラメータを同定し、その痛覚過敏にタイプ IIb 筋線維が関与することを解明した。

しかしながら、このようなモデルでは電気刺激により筋全体を収縮させてしまうため、図1のように、臨床的な慢性筋痛症に特徴的な、筋の一部に限局した痛覚過敏と筋硬結（筋組織内に生じる硬いしこり）を作り出すことができていないため、正しく臨床病態を再現していると言えない。



図1 慢性筋痛症の病態像

### 2. 研究の目的

これまでの電気刺激により筋全体の収縮を惹起する筋痛モデルではなく、光遺伝学を駆使し、チャンネルロドプシン（ChR2）の筋内異所性発現により、ChR2 が発現する筋細胞のみを光刺激により選択的に収縮させ、従来とは異なる、より臨床所見に近い動物モデルの開発とメカニズム解明を研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用い、光活性化タンパクである ChR2 を骨格筋内に異所性、かつ限局的に発現させ、青色光照射（波長：約 470 nm）にて ChR2 を活性化させ、局所的な筋収縮を惹起する。これにより、慢性筋痛症に特徴的な筋内の限局的な痛覚過敏と筋硬結（筋のしこり）を実験的に作製する。この部位の筋組織を採取し、どの筋線維タイプが関与するか免疫組織化学により同定する。

(2) 同部位での痛覚過敏出現に関与する物質を RT-PCR 法、ELISA 法、行動薬理学法を用いて同定する。

(3) 単一神経記録法による電気生理学実験より、光遺伝学的に惹起した筋痛覚過敏の末梢神経機構を解明し、従来の電気刺激による筋痛覚過敏モデルとの類似点や差異を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) Serotype 1, 9, 10, DJ の中で、Serotype 9 を用いた AAV ベクターを導入した個体において最も筋細胞上の ChR2 の発現量が多くなる事が分かった。

(2) ChR2 を多数発現できた個体では皮膚上からの光刺激で筋収縮を誘発できたが遅発性筋痛は生じなかった。

(3) 皮膚を切開し筋膜上に直接光刺激を加える事で強い筋収縮を誘導できる事が分かったが、皮膚切開の影響により筋痛を正しく評価できない事が分かった。

(4) AAV ベクターの投与量を 5, 10, 15, 40ul に振って最適な投与量を調べた結果、前脛骨筋に対しては投与量依存的に ChR2 発現量が増加する傾向がみられたが、10, 15, 40ul の間において有意な差はなかったため、15ul が最も発現効率の良い投与量である事が分かった。また、投与後 1, 2, 3, 4 週で発現量を比較したところ、投与後の経過日数依存的に発現量が増加する傾向が見られたが、3, 4 週間では有意な差はなかった。

(5) 1回目のAAVベクター投与3週間後に再度2回目のAAVベクターを投与する事で、ChR2の発現を増大させられる事が分かったが、皮膚を介した光刺激により筋の強縮を誘導するには不十分であった。

(6) ChR2の発現量を増大させるためにエレクトロポレーション法を試みたが、有意な発現増大を誘導する事はできず更なる条件検討が必要である。

(7) 筋・筋膜性疼痛の発現メカニズムを包括的に調べる為、遅発性筋痛モデルを用いた実験も同時進行で実施した結果、遅発性筋痛は伸張性収縮の伸張範囲及び角速度に依存し、筋に付加されるトルクの積分値と上昇率が重要である事が確認された(図2)。

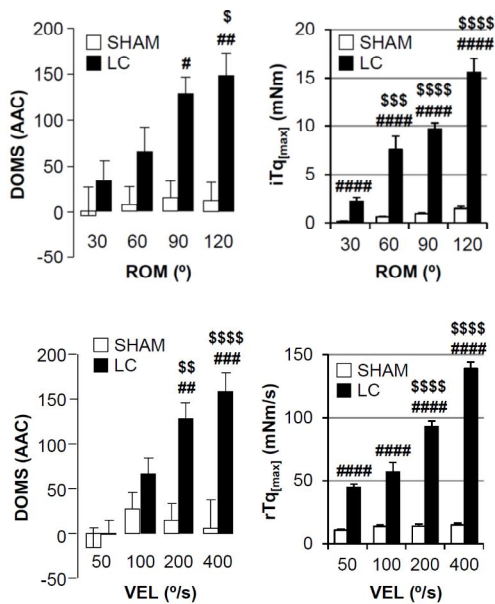


図2 遅発性筋痛(DOMS)は伸張性収縮(LC)の伸張範囲(ROM)及び角速度(VEL)に依存し、筋に付加されるトルクの積分値と上昇率が重要

(8) 筋痛発現において組織損傷は必須ではなく筋において発現増加する神経成長因子が重要な役割を果たす事が明らかとなった(図3, 4)。

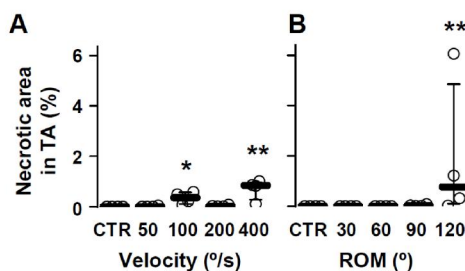


図3 損傷細胞は非常に少ない

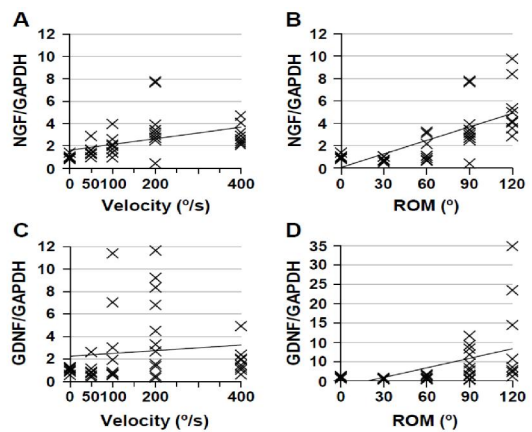


図4 神経成長因子(NGF)は伸張範囲(ROM)及び角速度(VEL)に依存して増大

<引用文献>

- ① Suka M et al. Mod Rheumatol 2005.
- ② Suka M, Yoshida K. Clin J Pain 2009.
- ③ Gibson W. Exp Brain Res 2009.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① K. Hayashi, K. Katanosaka, M. Abe, A. Yamanaka, K. Nosaka, K. Mizumura and T. Taguchi, Muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contractions in rats depends on stretch velocity and range of motion, European Journal of Pain, 査読有、28 JUN 2016  
DOI: 10.1002/ejp.909

[学会発表] (計3件)

- ① 林 功栄 他、遅発性筋痛発症には筋損傷ではなく神経成長因子を介した機構が必要である、第38回日本神経科学大会、2015年07月28日、神戸
- ② 林 功栄 他、遅発性筋痛(いわゆる運動後の筋肉痛)をトリガーする機械的因子、第5回名古屋大学・生理学研究所合同シンポジウム、2015年09月19日、岡崎
- ③ 林 功栄 他、酸感受性イオンチャンネル3は伸張性収縮後の筋機械痛覚過敏に関与する、第93回日本生理学会大会、2016年03月22日、札幌

[図書] (計1件)

①林功栄、尾崎紀之、株式会社技術情報協会、  
痛みのメカニズムとこれからの治療薬・治療  
法の開発. 第 2 章 第 5 節 筋筋膜性疼痛症候  
群、2015、p38-43

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 功栄 (HAYASHI Koei)

名古屋大学環境医学研究所・客員研究者

研究者番号：00579592