

多角的アプローチによる骨格筋侵害受容器の定量的分類

－「非活動性侵害受容器」に着目して－

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	オオタ ヒロキ 太田 大樹
所属等	新潟医療福祉大学 リハビリテーション学部 理学療法学科 助教
プロフィール	私は、信州大学理学療法学専攻で理学療法士免許を取得した後、名古屋大学大学院に進み、不慣れな運動の後に遅れて骨格筋に痛みが生じる「遅発性筋痛」の基礎メカニズムの解明に取り組んできました。その後、博士号(医学)を取得し、帝京大学医療技術学部柔道整復学科で教鞭をとる傍ら、本申請課題に関連する研究を行ってきました。本年度より新潟医療福祉大学に移り、本研究を引き続き進めています。

1. 研究の概要

本課題の目的は、新たな神経タイプである「非活動性侵害受容器」に焦点を当て、電気生理学的ならびに免疫組織化学的アプローチによって、新たに骨格筋侵害受容器を分類することである。具体的には、(1)骨格筋神経の活動記録を電気生理学的手法により直接行い、その電気的活動特性と骨格筋への刺激応答特性から、骨格筋侵害受容器タイプの分類を試みた。(2)さらに近年、他組織において見つかっている「非活動性侵害受容器」特異的なマーカー因子が、骨格筋神経にも発現するか、蛍光色素とこのマーカー因子に対する抗体を用いた免疫組織化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」の電気生理学的特徴を持つ神経の存在が確認された。一方で、「非活動性侵害受容器」特異的なマーカー因子の発現は、感覚神経細胞体の集まる後根神経節(DRG)において確認されたが、骨格筋神経への発現の有無については解析途中である。

2. 研究の動機、目的

腰痛や肩こりなど骨格筋を由来とする痛み(骨格筋疼痛)は有訴者数がきわめて多く、病態メカニズムの解明と治療の開発は喫緊の課題である。しかし、骨格筋疼痛は他組織の痛みに比べて研究が遅れており、不明な点が多く残されたままである。

一方、痛み(侵害)情報を伝える神経線維は侵害受容器と呼ばれ、Paintal の報告(1960 年)以来、

約 60 年にわたって研究が進められ、様々な神経タイプに分類されてきた。このうち、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“潜在的な痛み神経”の存在がかねてより提唱されてきた。この神経は「非活動性侵害受容器 (sleeping nociceptor)」と呼ばれ、病態下において痛み重要な役割を果たすと考えられる(図 1)が、有効な解析手法がなく、その実態は長らく謎だった。

近年になり、サル[Ringkamp et al., *PLoS One*, 2010]、ブタやヒト[Obreja et al., *Pain*, 2010]、ラットの皮膚[Taguchi et al., *Pain*, 2010]の神経において、繰り返し電気刺激を与えるると神経伝導速度が大幅に遅くなる電気生理学的な特性が見出され、「非活動性侵害受容器」の同定が可能となった。しかし、骨格筋神経において存在するかは未知である。

また、「非活動性侵害受容器」において特異的に発現する因子は見つかっていなかったが、最近、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 3$ (CHRNA3)を遺伝学的に強制発現させた神経細胞において、機械刺激に応答しない特徴が確認され、「非活動性侵害受容器」特異的なマーカー因子として有力視されている[Prato et al., *Cell Rep.*, 2017]。しかし、骨格筋神経において免疫組織化学的な解析は行われていない。

以上より本課題では、(1)骨格筋神経を電気生理学的神経特性により「非活動性侵害受容器」を含め分類し、(2)「非活動性侵害受容器」の特異的発現因子“CHRNA3”が骨格筋にも発現するか調べた。



図1 様々な侵害受容器タイプ

3. 研究の結果

(1) 電気生理学的アプローチ：

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。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(図 2,3)。

その結果、同定した腓腹筋 C 線維(187 例)のうち、機械非感受性線維は 143 例(約 76%)であった。このうち 17 例(C 線維の約 9%)の ADCCV は顕著に遅延し(-10%以下)、「非活



図2 電気生理実験の風景

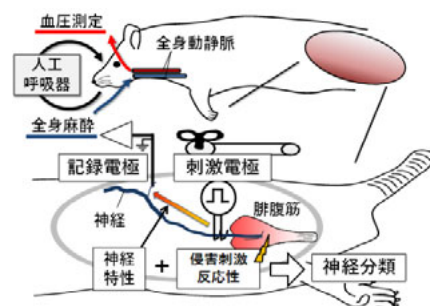


図3 電気生理セットアップ

動性侵害受容器」であると考えられた。さらに、この 17 例のうち 9 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 9%は「非活動性侵害受容器」であり、その一部は実験的炎症(病態)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。

(2) 免疫組織化学的アプローチ：

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 DiI を筋注した(図 4)。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 抗体を順に反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、CHRNA3 染色像を得るための最適な条件を割り出すことができた(図 5)。また DiI で標識された神経細胞において CHRNA3 の染色像を観察することはできていないが、目下、実験を進めているところである。

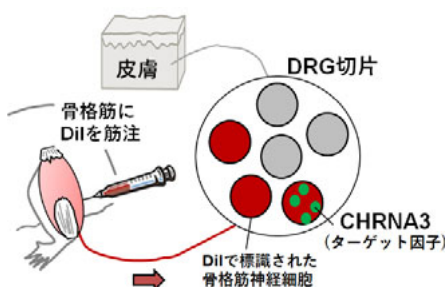


図4「非活動性侵害受容器」
特異的発現因子の発現解析法

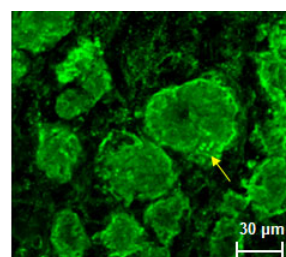


図5 標的因子の染色像

4. これからの展望

今回、電気生理学的解析は、正常ラットに対する実験のみを行った。今後は、病態モデルにおいて各神経タイプの割合を調べる予定である。具体的には、完全フロイントアジュバント (CFA) 筋注による慢性筋痛モデルや、骨格筋収縮由来の非炎症性筋痛モデルである「遅発性筋痛」 [Murase et al, *J Neurosci*, 2010, etc.] において解析を行い、正常ラットの結果と比較する予定である。

一方、免疫組織化学的解析については、DRG において CHRNA3 の染色像を確かめることに成功したが、骨格筋神経での発現は確認できていない。早急に解析を進めるとともに、CHRNA3 発現神経の分布や密度等の定量解析を進める予定である。また、CHRNA3 はアセチルコリンチャネルを構成するサブユニットの 1 つであり、CHRNA5 などその他のサブユニットとともにアセチルコリンチャネルを構成している。また、他のサブユニットとの共発現レベルの解析に加え、Peripherin や NeuN など従来の神経マーカーとの共発現も調べることで、骨格筋神経の「非活動性侵害受容器」に発現する CHRNA3 の形態学的実態を詳しく解析していこうと考えている。

5. 社会に対するメッセージ

「非活動性侵害受容器」は長らくその存在が提唱されていたものの、実際に確認されていない未知の神経タイプでしたが、様々な研究者たちの取り組みにより、皮膚など別組織においてその存在が確かめられ特徴づけがなされました。一方、骨格筋での報告は皆無であり、我々はこのテーマに取り組むこととなりました。

本研究は、電気生理学的アプローチと免疫組織化学的アプローチの2側面から構成されていますが、このうち前者は *in vivo* 単一神経記録法と呼ばれる手法を用いています。生きた動物から末梢神経活動をリアルタイムに記録することができ、世界的にも遂行する研究室が非常に少なく稀有な手法となっています。しかし、骨格筋神経は1個体あたりで記録できる神経の数が限られ、その中でも「非活動性侵害受容器」の特徴を持つ神経の数はさらに少ないため、一定の成果を得るまで長い時間を要しました。それでも、骨格筋神経において「非活動性侵害受容器」の存在を実証することができ、当受容器を含めた新たな骨格筋神経の割合を明らかにすることができました。

また後者の免疫組織化学的実験では、他組織で「非活動性侵害受容器」に特異的に発現する因子が、骨格筋神経においても発現するか調べました。まだ途中の段階ですが、今後、骨格筋神経の細胞体において *CHRNA3* の染色像が確認されることで、骨格筋における有力な「非活動性侵害受容器」マーカーとなることが期待されます。「非活動性侵害受容器」は、正常時では侵害情報を伝えず、病態下において初めて伝えるようになる神経タイプであり、病態時の痛みに重要な役割を担っている可能性が考えられます。「非活動性侵害受容器」をターゲットとした治療薬の開発は、従来の治療薬とは一線を画しており、全く新しい創薬分野の発展が期待されます。

以上のように、本研究のような基礎的研究を、若手研究者である私が継続的に遂行できたのも、貴奨励金の支援によるところが大きいと考えております。この場をお借りし、御礼申し上げます。