

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18722

研究課題名（和文）大脳皮質拡延性抑制動物モデルを用いた、片頭痛に対する呉茱萸湯の作用機序の解明

研究課題名（英文）The effect of Goshuyuto, Japanese herbal medicine, on migraine induced by cortical spreading depression.

研究代表者

高津 芙美 (Kozu, Fumi)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00850273

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）：大脳皮質拡延性抑制（Cortical spreading depression, CSD）を誘発する片頭痛動物モデルを用い、片頭痛治療薬として経験的に使用されてきた漢方薬の呉茱萸湯の片頭痛への効果について検討した。その結果、呉茱萸湯の慢性投与はCSD発生数には影響を与えなかったが、CSDにより活性化される痛覚伝導路の一次中継核である三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄の活性化を抑制し、また片頭痛関連行動の一つである不動化の時間を短縮した。さらに、青斑核の活性化も抑制した。以上より、呉茱萸湯が片頭痛を抑制することが動物実験でも明らかとなり、そのメカニズムとして青斑核の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

片頭痛は反復性の激しい頭痛発作を主症状とする疾患であり、患者のQOLは著しく阻害される。また、医療費、生産性の損失といった経済的影響も大きな問題となっていることより、多くの患者に有効な治療薬、予防薬の開発が強く求められている。現在までに、片頭痛予防効果があるといわれている西洋薬については基礎実験が行われてきているものの、同じく片頭痛予防薬として使用されてきた漢方薬の呉茱萸湯の片頭痛抑制効果を検討した基礎実験はなかった。本研究の結果は、呉茱萸湯の片頭痛治療への有効性を裏付けるだけでなく、今後の片頭痛治療戦略へ多に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effectiveness and mechanism of action of Goshuyuto for migraine using the rat model of cortical spreading depression (CSD). Rats were administered chow containing 3% Goshuyuto or normal chow for 4 weeks. CSD was induced by application of 1 M KCl onto the pial surface, and behavioral testing, electrophysiological recordings and immunohistochemical staining were performed. The total duration of immobility, a migraine-related nocifensive behavior, was significantly suppressed by Goshuyuto. There was no difference in the frequency of CSD induced by 1M KCl between the Goshuyuto and vehicle groups. Goshuyuto significantly reduced c-Fos expression in the trigeminal nucleus caudalis and upper cervical cord ("trigeminal cervical complex"), and locus coeruleus. These results suggest that Goshuyuto may alleviate the migraine headache, not by reducing the occurrence of CSD, but by suppressing neuronal activation in the trigeminal cervical complex and the locus coeruleus.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：片頭痛 大脳皮質拡延性抑制 呉茱萸湯 三叉神経系

1. 研究開始当初の背景

片頭痛は激しい頭痛発作を繰り返す疾患で、原因不明の歯痛や顔面痛を主訴として歯科を受診する場合も多いといわれている。片頭痛の発症メカニズムは未だ確立されていないが、髄膜に分布する三叉神経血管系及び大脳皮質拡延性抑制 (Cortical Spreading Depression, CSD) との関与が最も有力とされている。

片頭痛の予防薬として、抗てんかん薬、抗うつ薬、遮断薬、Ca拮抗薬などの西洋薬の他に漢方薬の呉茱萸湯が有効であるといわれてきた。しかし、漢方薬は経験的に使用され発展してきた治療薬であるため、基礎研究や臨床研究などの科学的裏付けとなる研究が不足している。

そこで、本研究では、片頭痛の治療薬として経験的に使用されてきた漢方薬の呉茱萸湯に焦点をあて、片頭痛動物モデルである CSD モデルに対する効果やその作用機序について検討し、明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、経験的に片頭痛に有効であるといわれてきた漢方薬の呉茱萸湯の片頭痛発作に対する効果とそのメカニズムについて、片頭痛動物モデルである CSD モデルを使用して初めて検証し解明することである。

3. 研究の方法

(1) 呉茱萸湯の慢性投与

4週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用した。ラットの固形飼料に呉茱萸湯が3%になるように混餌(オリエンタル酵母工業にて調製)し、4週間投与した。呉茱萸湯を混餌していない固形飼料を投与した群をコントロール群(vehicle)とし、呉茱萸湯群と比較検討した。

(2) CSD 動物モデルの作製

固形飼料投与4週間後、イソフルラン、亜酸化窒素の全身麻酔下で気管切開を行い、ベンチレータに接続し、脳定位固定装置に固定した。

プレグマとラムダの間の右側頭蓋骨に穴を3か所開け、そのうちの1つは脳硬膜を剥離し、皮質表面を露出させた。他の2つの穴より電極を皮質表面から300µm下に挿入した。

イソフルラン1%吸入麻酔下で、大脳皮質表面に1M KClによる化学的的刺激を与えてCSDを誘発した(図1)。脳波、DC potentialを2時間記録し、2時間のCSD発生日数を計数した。

(3) 行動学的検討

呉茱萸湯あるいは普通の飼料の投与3週間目に全身麻酔下で右側頭蓋骨の一部を除去してカニューレを植立し、歯科用レジンで頭蓋骨に固定した。

飼料投与4週間目(カニューレ植立1週間目)にカニューレより1M KCl 20µlを硬膜上に投与した。

ラットを観察用ケージに入れ、1M KCl投与後、ビデオカメラで行動を30分間撮影した。

Immobilization(不動化) Exploration(探索行動) Face grooming(頭部顔面領域の毛づくろい)を観察し、これらの行動の持続時間を計測した(引用文献1,2)。

(4) 免疫組織学的検討

CSD誘発2時間後に深麻酔下で灌流固定を行い、脳を取り出した。凍結切片を作製し、抗-c-Fos抗体、抗-pERK抗体を用いて免疫染色を行い、三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)および上部頸髄(C1-C2) 三叉神経節(TG) 青斑核(LC) 中脳水道周囲灰白質(PAG) 延髄吻側腹内側部(RVM)における神経細胞活性化の指標であるc-Fos陽性細胞数、pERK陽性細胞数を計数した。

(5) 統計学的解析

結果はすべて、箱ひげ図あるいは平均値±標準誤差で表し、危険率は $p < 0.05$ で有意差ありとした。2群の統計学的比較にはStudent's t-testあるいはMann-Whitney testを用いて解析した。固形飼料摂取量と体重の時間的変化は反復測定一元配置分散分析あるいはフリードマン検定を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 飼料摂取量、体重の変化

1週間毎の固形飼料摂取量の推移は、呉茱萸湯群とコントロール群において1週間から4週間まですべて差は認め

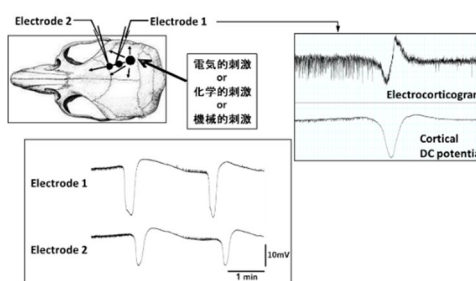
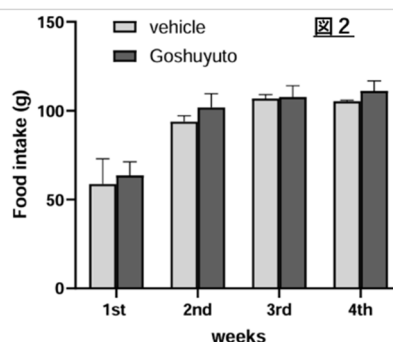


図1 大脳皮質拡延性抑制(CSD)



られなかった(図2)。また、4週間のラットの体重の推移に関しても、いずれの体重計測日でも両群において差は認められなかった(図3)。

(2) CSD 発生数

脳波記録時の循環動態および呼吸状態は、呉茱萸湯群、コントロール群とも正常範囲内であった。両群において、KCI 刺激により CSD 波形が認められた。記録していた2時間の CSD 発生数は両群において差は認められなかった(図4)。

(3) 行動評価

CSD による片頭痛関連行動の変化の検討

Immobilization (不動化) の合計持続時間は、NaCl 刺激群と比較して KCI 刺激群において有意に延長した。

Exploration (探索行動) の合計持続時間は、NaCl 刺激群と比較して KCI 刺激群において有意差は認められなかったが短縮傾向がみられた。

Face grooming (顔面領域の毛づくろい) の合計持続時間は、NaCl 刺激群と比較して KCI 刺激群において有意に短縮した。

呉茱萸湯慢性投与による片頭痛関連行動の変化

Immobilization の合計持続時間は、コントロール群と比較して、呉茱萸湯群において有意に短縮した(図5a)。

Exploration の合計持続時間は、コントロール群と比較して、呉茱萸湯群で有意に延長した(図5b)。

Face grooming の合計持続時間は、コントロール群と呉茱萸湯群に差は認められなかった(図5c)。

(4) 痛覚伝導路の一次中継核 (Vc, C1-C2) における c-Fos 発現

コントロール群と呉茱萸湯群において、大部分の抗 c-Fos 抗体陽性細胞は Vc, C1-C2 の層と層の腹外側に密集して分布していた。吻尾的には、Vc の尾側寄りから C1-C2 にかけて、コントロール群と比較して、呉茱萸湯群において抗 c-Fos 抗体陽性細胞数の有意な減少が認められた(図6)。

(5) 下行性疼痛抑制系の各神経核における c-Fos 発現

LC において、抗 c-Fos 抗体陽性細胞数はコントロール群と比較して呉茱萸湯群で有意な減少が認められた(図7)。PAG と RVM では、両群間で c-Fos 陽性細胞数に差は認められなかった。

(6) TG における pERK 発現

TG における抗 pERK 抗体陽性細胞数の割合は、コントロール群と呉茱萸湯群で有意な差は認められなかった。

(7) 考察

CSD 発生と片頭痛発症に対する呉茱萸湯慢性投与の影響

呉茱萸湯を長期服用することにより、頭痛の発症頻度と鎮痛薬の服用回数が有意に減少したという報告があることより、呉茱萸湯が片頭痛予防薬として有用であると考えられるが、苦味が強いために服薬を継続できない場合もあるといわれている(引用文献3)。本研究においては、苦味で生じる摂食行動の変化を客観的に確認するため、数日おきにラットの体重、飼料の摂取量を計測し、呉茱萸湯群とコントロール群で比較を行った。その結果、両群において差は認められなかったことより、本研究で用いた3%呉茱萸湯では苦味による影響がないと判断した。

本研究の結果では、コントロール群と呉茱萸湯群の間で CSD 発生数に差は認められなかったが、痛覚伝導路の一次中継核である Vc の尾側寄りから C1-C2 において抗 c-Fos 抗体陽性細胞数が有意に減少し、また片頭痛に伴う行動変化である Immobilization の時間の延長が有意に抑制された。片頭痛の発症メカニズムとして、痛覚伝導路の活性化に CSD が関与している可能性が示唆されており(引用文献4,5)、また片頭痛予防薬として使用されて

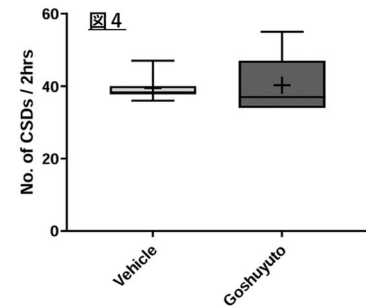
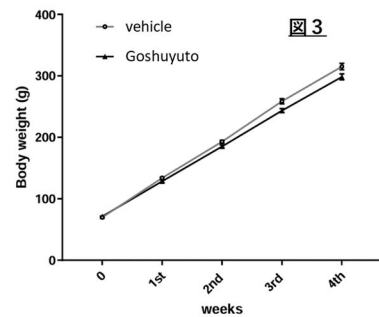
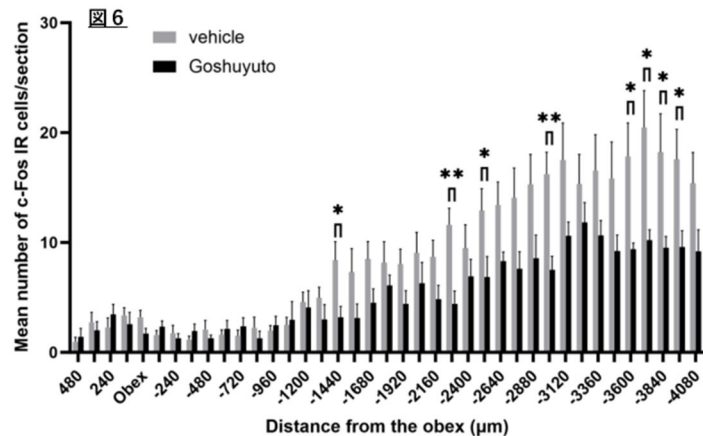
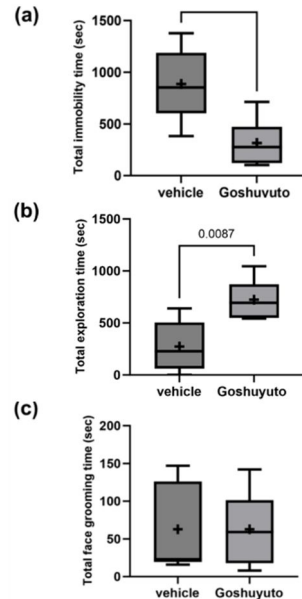


図5



いるさまざまな西洋薬の片頭痛抑制の共通のメカニズムとして CSD 発生抑制が考えられている(引用文献 6)。一方、片頭痛の治療薬として使用される漢方薬の一つである五苓散は CSD 発生に影響を与えなかったとの報告もある(引用文献 7)。本研究の結果より、呉茱萸湯は西洋薬のように CSD 発生に影響を与えるのではなく、CSD によって活性化される痛覚伝導路を何らかの形で抑制することにより頭痛発作を抑制することが示唆された。

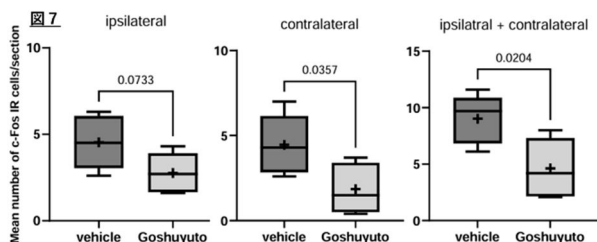
呉茱萸湯の片頭痛抑制作用機序

片頭痛患者では、中枢神経系において pain matrix と呼ばれる疼痛に関係する領域における機能的統合の変化が起きていることが明らかにされている(引用文献 8)。Pain matrix には一次感覚野や視床のほか前帯状皮質、島皮質、扁桃体などが含まれている。これら pain matrix の機能的結合の異常は、PAG から三叉神経脊髄路核や脊髄後角へ投射し痛覚の抑制に関与している下行性疼痛抑制系の機能異常に関係し、片頭痛発作が起きている可能性が考えられている(引用文献 9, 10)。一方で、PAG と LC は、片頭痛発作を誘発する可能性のある片頭痛発生器の候補として挙げられており、片頭痛発生器が活性化されることで CSD や三叉神経血管系の異常な活性化が起こり、頭痛が生じるとも考えられている。特に PAG は、高解像度 MRI により片頭痛患者で PAG における鉄含有量の増加が認められている(引用文献 11, 12)。また、CSD が Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) を介して三叉神経節の活性化に関与していることが報告されている(引用文献 13)。呉茱萸湯の構成生薬である呉茱萸の主成分であるエボジアミンは、TRPV1 に対する部分アゴニスト作用があり、末梢の TRPV1 を脱感作することによって鎮痛効果を示すこと(引用文献 14)や、下行性疼痛抑制系の PAG に発現している TRPV1 受容体の活性化により鎮痛効果を増強させること(引用文献 15)が報告されている。これらのことより、呉茱萸湯が下行性疼痛抑制系あるいは TG に作用して片頭痛発作を抑制しているのではないかと考え、下行性疼痛抑制系に関与している PAG、RVM、LC と TG の活性化について検討した。その結果、LC において、コントロール群と比較して呉茱萸湯群で c-Fos 発現の有意な減少が認められた。一方、TG における pERK 発現、PAG、RVM における c-Fos 発現には有意な差は認められなかった。他の片頭痛動物モデルを用いた過去の研究等において、LC の活性化抑制あるいは機能低下により Vc における c-Fos 発現が減少したという報告(引用文献 16, 17, 18)があることと本研究の結果により、LC の活性化が片頭痛発生メカニズムに何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

以上より、呉茱萸湯の慢性投与は片頭痛発作を抑制すること、その作用機序として LC の活性化抑制の関与が示唆された。

<引用文献>

- Kurauchi Y et al.(2019) Propranolol prevents cerebral blood flow changes and pain-related behaviors in migraine model mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 508(2):445-450.
- Toyama M et al.(2017) Trigeminal nervous system sensitization by infraorbital nerve injury enhances responses in a migraine model. *Cephalalgia* 37(14):1317-1328.
- Odaguchi H et al.(2006) The efficacy of goshuyuto, a typical Kampo (Japanese herbal medicine) formula, in preventing episodes of headache. *Curr Med Res Opin* 22(8):1587-1597.
- Nosedá R et al.(2011) Cortical projections of functionally identified thalamic trigeminovascular neurons: implications for migraine headache and its associated symptoms. *J Neurosci.* 31(40):14204-17.
- Zhang X et al.(2011) Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann Neurol.* 69(5):855-865.
- Ayata C et al.(2006) Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol* 59(4):652-661.
- Iba C et al.(2022) Effect of Goreisan, a Japanese Traditional Medicine, on Cortical Spreading Depolarization in Mice. *Int J Mol Sci* 23(22):13803.
- Lee MJ et al.(2019) Increased connectivity of pain matrix in chronic migraine: a resting-state functional MRI study. *J Headache Pain.* 20(1):29.
- Jones AK et al.(2003) Pain mechanisms and their disorders. *Br Med Bull.* 65: 83-93.
- Moulton EA et al.(2008) Interictal dysfunction of a brainstem descending modulatory center in migraine patients. *PLoS One.* 3(11):e3799.
- Weiller C et al.(1995) Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med.* 1(7):658-660.
- Welch KM et al.(2001) Periaqueductal gray matter dysfunction in migraine: cause or the burden of illness? *Headache.* 41(7):629-637.



Iwashita T et al.(2013) Activation of extracellular signal-related kinase in the trigeminal ganglion following both treatment of the dura mater with capsaicin and cortical spreading depression. *Neurosci Res.* 77(1-2):110-119.

Iwaka E et al.(2016) Evodiamine suppresses capsaicin-induced thermal hyperalgesia through activation and subsequent desensitization of the transient receptor potential V1 channels. *J Nat Med.* 70(1):1-7.

Palazzo E et al.(2008) Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. *Mol Cell Endocrinol.* 1:S79-83.

Greco R et al. (2015) Effects of peripheral FAAH blockade on NTG-induced hyperalgesia--evaluation of URB937 in an animal model of migraine. *Cephalalgia* 35(12):1065-1076.

Greco R, Demartini C, Zanaboni AM, Tumelero E, Reggiani A, Misto A et al. (2020) FAAH inhibition as a preventive treatment for migraine: A pre-clinical study. *Neurobiol Dis* 134:104624.

Vila-Pueyo M, Strother LC, Kefel M, Goadsby PJ, Holland PR (2019) Divergent influences of the locus coeruleus on migraine pathophysiology. *Pain* 160(2):385-394.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川添 由貴, 工藤 千穂, 高津 芙美, 遠山 緑, 河野 彰代, 丹羽 均
2. 発表標題 大脳皮質拡張性抑制動物モデルを用いた、片頭痛に対する呉茱萸湯の効果の検討
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	工藤 千穂 (Kudo Chiho)		

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