

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460726

研究課題名(和文) 脳硬膜の神経原性炎症における三叉神経侵害刺激の関与

研究課題名(英文) Trigeminal contribution to the neurogenic inflammation in the dura mater

## 研究代表者

清水 利彦 (Shimizu, Toshihiko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40265799

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)：三叉神経が片頭痛の病態に及ぼす影響を検討した。顔面を支配する三叉神経は脳硬膜に分布する三叉神経分枝と同一の神経細胞を起源とするものが存在することを明らかにした。また顔面を支配する三叉神経にTRPV1のアゴニストであるカプサイシン刺激を加えると脳硬膜において肥満細胞の脱顆粒などを促進し神経原性炎症を誘発することを明らかにした。これらの結果は片頭痛の病態において脳硬膜における神経原性炎症に関する三叉神経の役割を解明していく上で有用な知見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We explored the relationship between the trigeminal fibers distributing the facial region and the dura mater. This study revealed that some neurons in the trigeminal ganglion send nerve fibers to facial region and the dura mater. These results indicate that the trigeminal nociceptive stimulation in the facial region may cause the activation of the nerve fibers in the dura mater. According to these findings, we explored the effects of nociceptive stimulation to the facial trigeminal nerve, and observed the morphological change of the mast cells in the dura mater. We revealed that nociceptive stimulation to the facial trigeminal nerve cause the degradation of the mast cells in the dura mater. These data provide important clues regarding the pathophysiology of migraine.

研究分野：片頭痛

キーワード：片頭痛 硬膜 神経原性炎症 三叉神経

## 1. 研究開始当初の背景

「痛み」は多くの疾患に認められる症状で、その機序の解明および有効な治療法が望まれている。神経内科疾患の中で最も多い疼痛は頭痛で、その中でも片頭痛の有病率は8.4%とされ約800万人の患者数が推定されている。その片頭痛は病態がいまだに明らかではなく、治療法も発作頓挫療法にとどまっている。片頭痛は前兆および頭痛からなる時間経過をもつ疾患である。前兆は、徐々に進展するが持続時間60分未満と定義される可逆性の脳局在神経症状とされている。そして前兆終了後に拍動性の頭痛が出現する。前兆には大脳皮質における cortical spreading depression (CSD)と呼ばれる現象が関与すると考えられている。CSDは一過性に神経細胞が脱分極したあと電気的活動に抑制された状態が15分から30分継続する状態で、可逆的な神経症状として出現する片頭痛の前兆を説明することが可能である。一方、何らかの刺激が三叉神経節に作用すると硬膜の血管周囲に存在する三叉神経の神経終末から substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP)およびニューロキニン A などの神経伝達物質でありかつ血管作動性物質の神経ペプチドが放出される。この結果、硬膜周辺に肥満細胞の脱顆粒や血管透過性の亢進、血漿蛋白の流出、プロトンの放出、血管拡張などが惹起され神経原性炎症とよばれる現象が生じ、疼痛をきたし片頭痛発作の原因となるのではないかと考えられている。本研究はこの神経原性炎症に着目し、片頭痛の病態の解明をめざすものである。申請者は、脳硬膜に分布している感覚神経線維の中に侵害刺激受容体である transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1)を有する神経線維が三叉神経節を起源として存在することを明らかにし頭痛に関連している可能性を報告した<sup>1)</sup>。TRPV1は唐辛子の辛み成分として知られている capsaicin に感受性を示

す受容体でカルシウムイオンに対し高い透過性を有するイオンチャネルである。また TRPV1 受容体はカプサイシンの他に 43 以上の熱刺激やプロトン (pH 6.0,室温)でも直接活性化される。TRPV1 受容体は一次感覚神経線維終末、後根神経節および三叉神経節の小型から中型の神経細胞に特異的に発現していることが明らかにされている。これらより末梢に侵害刺激が加わると TRPV1 受容体が活性化され膜の脱分極が生じ、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネルが活性化され疼痛の信号が中枢側に伝導されると考えられている。申請者は、この末梢の TRPV1 受容体をアゴニストである capsaicin により刺激し、CSD 発生閾値の変化をコントロールと比較した。すると capsaicin により末梢の顔面皮下にある TRPV1 を刺激した動物では CSD の発生回数および持続時間ともコントロールに比べ有意な増加を示した。さらに脳硬膜において浮腫状の変化と炎症性細胞の浸潤が観察された。これらの脳硬膜に認められた形態学的変化は神経原性炎症に伴う血管透過性の亢進を反映しているものと推察される。また片頭痛患者では発作前に頭頸部に有痛性の筋硬結が形成されることが多い。片頭痛発作との関係は明らかでないが、この有痛性の筋硬結をはり治療により消失させると頭痛が改善されることが知られている。このような末梢の感覚神経を介した疼痛の入力が脳硬膜神経における神経原性炎症を惹起し片頭痛の病態を増悪させている可能性に注目し本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) 顔面に分布する三叉神経への侵害刺激が脳硬膜において神経原性炎症をおこす機序について解剖学的検討で明らかにされていない。このため顔面の侵害刺激を支配する末梢三叉神経線維と脳硬膜の侵害刺激を支配する

三叉神経線維の関係を明らかにする。逆行性トレーサーを顔面皮下および脳硬膜に分布する侵害刺激を受容する感覚神経線維に取り込ませ、三叉神経節内での分布と局在を検討する。同一の神経細胞から顔面皮下および脳硬膜に分布する神経線維が認められる場合は、この現象を説明することができる。もし同一の神経細胞ではないが顔面皮下および脳硬膜に分布する神経線維が近接して認められる場合は、神経細胞間において何らかの物質を介した情報伝達がおこなわれている可能性が推察される。その機序解明のため感覚神経に存在するTRPV1などについて免疫組織化学染色をおこないトレーサーの集積する細胞とこれら神経伝達物質を含有する神経細胞についてその分布を明らかにする。

(2) 前述したように片頭痛における頭痛の原因として、何らかの刺激が三叉神経節に作用すると硬膜の血管周囲に存在する三叉神経の神経終末から substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP) およびニューロキニンAなどの神経伝達物質でありかつ血管作動性物質の神経ペプチドが放出される。この結果、硬膜周辺に肥満細胞の脱顆粒や血管透過性の亢進、血漿蛋白の流出、プロトンの放出、血管拡張などが惹起され神経原性炎症とよばれる現象が生じ、疼痛をきたし頭痛が生じると考えられているが、詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、三叉神経と脳硬膜の関係にもとづき、顔面に分布する三叉神経線維に侵害刺激を加えると脳硬膜において神経原性炎症が認められるかを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 顔面の侵害刺激を支配する末梢三叉神経線維と脳硬膜の侵害刺激を支配する三叉神経線維の関係

動物(マウス)へのトレーサー付与  
近交系マウスC57BL/6Jを麻酔下に、顔面の

三叉神経支配領域に逆行性神経軸索トレーサー 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) を皮下投与した。その後、独自の定位固定器に麻酔下のマウスを、独自の定位固定器により頭部を水平に校正して固定する。水平位に固定した頭頂部を皮切し頭蓋骨を露出後、confluent sinusを中心に硬膜を残して頭蓋骨を摘出し作成したburr-hole上に逆行性トレーサーFluorogold (FG)を投与した。投与後脳硬膜に頭蓋骨を再びもどしデンタルセメントにて修復する。  
C57BL/6J)を使用した。頭頂部を皮切し頭蓋骨を露出後、confluent sinusを中心に硬膜を残して頭蓋骨を摘出し作成したburr-hole上に逆行性トレーサーFluorogold (FG ; Hydroxystilbamidine)を投与した。

### 三叉神経節の免疫組織学的検討

トレーサー投与後7日後、深麻酔下に4%パラホルムアルデヒド溶液により灌流固定後、三叉神経節を摘出した。同固定液にて後固定をover nightで行い、次いで10%スクロース添加リン酸緩衝液にて固定液の洗浄を施行した。これらの組織サンプルは液体窒素により凍結しクリオスタット用の組織標本とし、10 μm厚の切片を作成しスライドガラスに貼付した。さらにこれらの組織切片に1次抗体としてTRPV1抗体を反応させ、2次抗体にFITCを用いた。逆行性神経軸索トレーサーDiIとFGおよびTRPV1の三叉神経節における共存についてその分布を検討した。

(2) 顔面に分布する三叉神経線維に侵害刺激を加えた際の脳硬膜における神経原性炎症

### 動物(マウス)への刺激付与

雄性マウス(C57BL/6J)を使用した。左顔面三叉神経領域にcapsaicin(10 mM, 30分)局所投与を6日間連日施行した群(刺激群)を作

成した。対照として無処置のマウスを使用した。

脳硬膜における染色および解析  
深麻酔下に4%パラホルムアルデヒド溶液により灌流固定後、脳硬膜を摘出しトルイジンブルー染色を行った。同側脳硬膜の中硬膜動脈領域を中心とした直径 3 mmの観察円を設定し、観察円内の血管をその形態と走行から動脈、静脈および毛細血管に分類した。それぞれの血管壁周囲の細胞について、形態学的特徴から非脱顆粒および脱顆粒した細胞の2種類に分け単位面積当たりの細胞数を計算した。統計学的解析にはWilcoxon検定を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 顔面の侵害刺激を支配する末梢三叉神経線維と脳硬膜の侵害刺激を支配する三叉神経線維の関係

FGの集積を認める神経細胞は、主に第1枝領域および第2枝領域を支配する三叉神経節の細胞内に認められた(図1)。

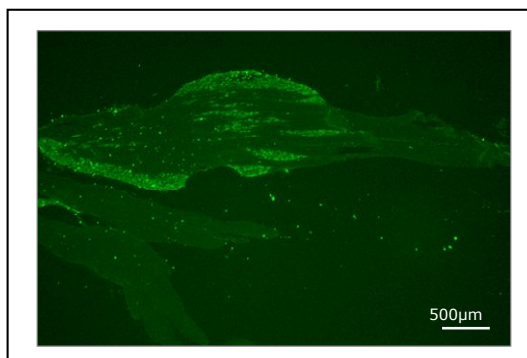


図1：三叉神経節内におけるFGの集積。主に、第1枝領域および第2枝領域を支配する細胞内(I, II)に認められた

さらに、三叉神経節内においてDiIの集積を認める神経細胞(1164個、n=4)のうち25.1%(292個)がFG陽性であった(図2)。また

これらのうち5.8%がTRPV1陽性(図3)であった。

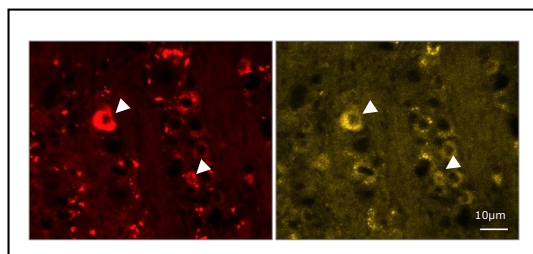


図2：三叉神経節内におけるDiI(赤)およびFG(黄)の集積を認める神経細胞

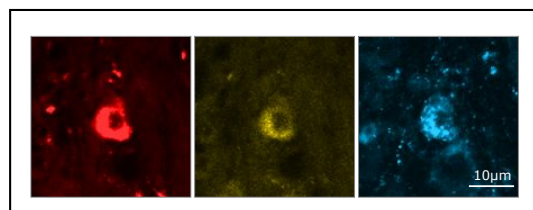


図3：三叉神経節内におけるDiI(赤)、FG(黄)およびTRPV1(青)の集積を認める神経細胞

(2) 顔面に分布する三叉神経線維に侵害刺激を加えた際の脳硬膜における神経原性炎症

それぞれの血管周囲における脱顆粒した細胞数は動脈(対照群 0.8 cells/mm<sup>3</sup>, 刺激群 5.4 cells/mm<sup>3</sup>), 静脈(対照群 2.5 cells/mm<sup>3</sup>, 刺激群 7.6 cells/mm<sup>3</sup>)および毛細血管(対照群 5.1 cells/mm<sup>3</sup>, 刺激群 20.2 cells/mm<sup>3</sup>)であり、いずれの血管周囲においても、対照群に比べ刺激群では、脱顆粒している細胞数が有意に増加していた(図4; p < 0.05, n = 4)。

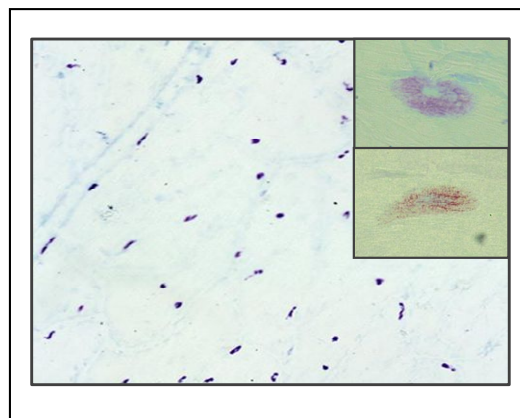


図4：硬膜における脱顆粒している肥満細胞

本研究により 顔面の侵害刺激を支配する末梢三叉神経線維は、脳硬膜の侵害刺激を支配する三叉神経線維と同一の三叉神経節の神経細胞と連絡があることが明らかにされた。この知見は、片頭痛の病態に深く関与すると考えられている“三叉神経と神経原性炎症の相互作用”の実態を明らかにしていく上で有用なものであり今後、片頭痛の病態解明および神経原性炎症を抑制する治療法の確立に役立つものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Toriumi H, Shimizu T, Ebine T, Takizawa T, Kayama Y, Koh A, Shibata M, Suzuki N. Repetitive trigeminal nociceptive stimulation in rats increases their susceptibility to cortical spreading depression. *Neurosci Res* 査読 有 106, 2016,74-78. DOI: 10.1016/j.neures.2015.12.010.
2. Takizawa T, Shibata M, Kayama Y, Toriumi H, Ebine T, Koh A, Shimizu T, Suzuki N. Temporal profiles of high-mobility group box 1 expression levels after cortical spreading depression in mice. *Cephalalgia* 査読 有 36, 2016, 44-52. DOI: 10.1177/0333102415580100.
3. Iwashita T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Ebine T, Funakubo M, Suzuki N. Activation of extracellular signal-regulated kinase in the trigeminal ganglion following both treatment of the dura mater with capsaicin and cortical spreading depression. *Neurosci Res* 査読 有 77, 2013, 110-119. DOI: 10.1016/j.neures.2013.08.001

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Kayama Y, Shibata M, Takizawa T, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, Koh A, Suzuki N. Regulation of TRPM8 expression by inflammatory mediators: Implications for novel migraine therapy. 17<sup>th</sup> Congress of the International Headache Society 2015 (IHC2015) May 14-17 2015; Valencia, Spain.
2. Koh A, Shimizu T, Shibata M, Takizawa T, Kayama Y, Ebine T, Toriumi H, Suzuki N. Distribution of the calcitonin gene-related peptide receptors in the sphenopalatine ganglion of rat. 17<sup>th</sup> Congress of the International Headache Society 2015 (IHC2015) May 14-17 2015; Valencia, Spain.
3. Ebine T, Toriumi H, Takizawa T, Kayama Y, Shibata M, Shimizu T, Suzuki N. Changes in the threshold for potassium induced cortical spreading depression occurrence during the natural estrous cycle in mice. 17<sup>th</sup> Congress of the International Headache Society 2015 (IHC2015) May 14-17 2015; Valencia, Spain.
4. Takizawa T, Shibata M, Kayama Y, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, Koh A, Suzuki N. Microglial activation by multiple inductions of cortical spreading depression. 17<sup>th</sup> Congress of the International Headache Society 2015 (IHC2015); May 14-17 2015; Valencia, Spain.
5. 海老根妙子、鳥海春樹、滝沢 翼、萱間洋平、黄 杏里、柴田 護、清水利彦、鈴木 則宏 . 脳硬膜および顔面に分布する感覚神経線維の三叉神経節における局在について . 第42回日本頭痛学会総会 2014年11月14日 山口県下関市海峡メッセ下関 .
6. Takizawa T, Shibata M, Kayama Y, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, Koh A, Suzuki N. Expression of high-mobility group box-1 in the cerebral cortex after cortical spreading depression. European Headache and Migraine Trust International Congress 2014;

September 19-22 2014; Copenhagen,  
Denmark.

7. 海老根妙子、鳥海春樹、滝沢 翼、萱間洋平、黄 杏里、柴田 護、清水利彦、鈴木 則宏 . 脳硬膜の神経原性炎症における三叉神経侵害刺激の関与について . 第 41 回日本頭痛学会総会 2013 年 11 月 15 日 岩手県盛岡市いわて県民情報交流センター .
8. Ebine T, Toriumi H, Unekawa M, Funakubo M, Iwashita T, Shibata M, Shimizu T, Suzuki N. Changes in the threshold for potassium induced cortical spreading depression occurrence during the natural estrous cycle in mice. 16<sup>th</sup> Congress of the International Headache Society 2013; June 26-30 2013; Boston.USA

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

清水 利彦 ( SHIMIZU, Toshihiko )  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号 : 40265799

### (2)研究分担者

柴田 護 ( SHIBATA, Mamoru )  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号 : 60286466

### (3)連携研究者

なし