

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22390182

研究課題名(和文)片頭痛前兆大脳皮質拡延性抑制が神経障害性疼痛を惹起する脳可塑性と疼痛制御系の解明

研究課題名(英文)Research on migraine pathophysiology related to cortical spreading depression

研究代表者

鈴木 則宏 (Suzuki, Norihiro)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：10158975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮質拡延性抑制(CSD)が片頭痛の病態に及ぼす影響を検討した。CSD誘発は三叉神経節においてTRPV1受容体を介しERKのリン酸化を引き起こすこと、大脳皮質の神経細胞において炎症性疼痛発生と関連の深いDAMPs (damage-associated molecular patterns)の1つであるHMGB1の転写誘導および細胞外放出をCSDの発現する回数に依存的に亢進させることを明らかにした。さらに三叉神経節ニューロンではTRPV1の刺激によりカスパーゼ依存性のアポトーシスが誘導された。これらの結果はCSDが神経障害性疼痛を惹起する脳可塑性と疼痛制御系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 cortical spreading depression (CSD) and the trigeminovascular system. This study revealed that nociceptive stimulation of the dura mater and CSD increased the level of ERK phosphorylation in the trigeminal system, and indicated that CSD can activate the trigeminal system. CSD has also been shown to induce the release of the nuclear protein termed high-mobility group box 1 (HMGB1) from neurons, causing activation of the trigeminovascular system. We explored the effects of CSD inductions on HMGB1 transcriptional activity, and revealed that CSD up-regulates HMGB1 transcriptional activity in neurons, but not in astrocytes. CSD also induced the release of HMGB1 from neurons, but not astrocytes. The magnitude of these alterations depends on the number of CSD inductions. Moreover, TRPV1 stimulation caused caspase-dependent apoptotic cell death of trigeminal ganglion neurons. These data provide important clues regarding the pathophysiology of migraine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：片頭痛 皮質拡延性抑制 HMGB1 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

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。前兆は徐々に進展しかつ持続時間が60分未満の可逆性脳局在神経症状と定義され、その前兆が終了すると拍動性の頭痛が出現する経過をとる。その病態については皮質拡延性抑制(cortical spreading depression; CSD)とよばれる現象の関与が考えられている。すなわち、何らかの刺激により大脳皮質においてCSDが発生することで片頭痛の前兆の症状が出現する。そして、片頭痛における頭痛は何らかの刺激が三叉神経血管系の活動性の上昇と神経原性炎症をきたすことにより生ずるとされている。しかし、臨床的に認められる前兆から頭痛発作へ連続的に移行する機序については明らかにされておらず、本研究ではCSDが三叉神経血管系および大脳の及ぼす影響を検討し、片頭痛の病態との関連を検討した。

2. 研究の目的

(1) CSD と ERK リン酸化について

我々は、脳硬膜に侵害刺激の受容体である transient receptor potential vanilloid subfamily, member 1 (TRPV1) 受容体が存在することを明らかにした。一方 extracellular signal-regulated kinase (ERK) は、MAP キナーゼの代表的なサブファミリーのひとつで、TRPV1 受容体を介した痛覚情報伝達には MAP キナーゼカスケードが関与することが知られている。MAP キナーゼカスケードは細胞内シグナルカスケードのモジュールであり、TRPV1 受容体刺激による痛覚情報伝達に ERK が関与することが報告されている。そこで TRPV1 受容体アゴニストの capsaicin を脳硬膜に投与するし三叉神経節において extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が生じるかを検討するとともに、CSD と三叉神経血管系活性化の関係を明らかにするため、CSD の三叉神経節における ERK リン酸化に対する影響についても検討

した。

(2) CSD と HMGB1 の発現について High-mobility group box 1 (HMGB1) は炎症性のメディエーターで alarmin や damage-associated molecular patterns (DAMPs) と呼ばれる蛋白質ファミリーに属している。通常は核内に存在するが、侵襲性の高い刺激により細胞外に放出される。核内ではヌクレオソムの構成や遺伝子の転写に関与することが知られているが細胞外に放出されると Toll-like receptors (TLRs) や receptor for advanced glycation end products (RAGE) を介してさまざまな炎症作用を惹起することが知られている。また HMGB1 は敗血症の晩期メディエーターとして関節リウマチなどの炎症性疾患で重要な役割を果たすことも知られている。さらに近年では中枢神経系での作用についても注目されてきている。脳梗塞モデルのラットに抗 HMGB1 抗体を投与すると梗塞巣が縮小することや、くも膜下出血の患者の髄液中では HMGB1 の上昇がみられることが報告されている。一方、HMGB1 は疼痛との関連も示唆されており、マウスの脊髄神経結紮モデルにて後根神経節で HMGB1 の mRNA と蛋白発現の上昇が確認されている。最近、CSD 後に大脳皮質ニューロンで核内から核外へ放出されると報告されたが、CSD が HMGB1 の発現レベルに与える影響はこれまで検討されていない。本研究では CSD が大脳皮質の HMGB1 mRNA の転写レベルに与える影響を *in situ hybridization* で検討した。

最後に、TRPV1 刺激は細胞内にカルシウム流入を引き起こす。初代培養三叉神経節ニューロンの TRPV1 刺激が細胞死を引き起こすかについても検討した。

3. 研究の方法

(1) CSD と ERK リン酸化について

深麻酔下に Sprague-Dawley (SD) ラット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、直径

11mm の burr-hole を作成した。30 分後、burr-hole 硬膜上に 10mM capsaicin を投与した。投与 1 分、3 分、5 分後に三叉神経節および脳幹の三叉神経尾側核を摘出し、免疫組織化学および Western blot にて検討した。Western blot については phosphorylated ERK (pERK) および ERK の検出を行い、そのリン酸化の程度を densitometry で定量化した。さらにこのリン酸化に対する TRPV1 のアンタゴニストである capsazepine および MAPK extracellular signalregulated kinase (MEK) inhibitors である PD98059 および U0126 の影響についても検討した。CSD と ERK リン酸化については、SD ラットを用い検討した。脳表に、デンタルセメントにて DC 電極を設置した。動物は、1M の KCl を脳表に滴下し CSD 出現直後 (group-2; n =5) および CSD 出現 30 分後 (group-3; n =5) に三叉神経節を摘出した群および KCl の代わりに生理食塩水を脳表に滴下し、30 分間の経過観察の後、三叉神経節を摘出したコントロール群 (group-1; n =5) の 3 群に分類した。摘出した三叉神経節に western blotting を行ない phosphorylated ERK (pERK) および total ERK の検出を行った。さらに得られた各 band についてリン酸化の程度 (pERK/ total-ERK) を densitometry で定量化した。さらに TRPV1 受容体拮抗薬である capsazepine (50 nM) の髄腔内投与群 (group-5; n =5) および vehicle (20% DMSO) の髄腔内投与群 (group-4; n =5) の 2 群において、それぞれの脳表に、デンタルセメントにて DC 電極を設置し髄腔内投与 30 分後に 1M の KCl を滴下した。CSD 出現 30 分後に三叉神経節を摘出し western blotting にて pERK および total ERK の検出を行いリン酸化の程度を densitometry で定量化した。

(2) CSD と HMGB1 の発現について

雄性 C57BL/6 マウスに、左頭頂葉 (Bregma より外側 2mm、尾側 4mm) に 1M KCl を滴下により CSD を誘発した。CSD 発生は DC ポ

テンシャルの変化により確認した。CSD を 1 回または 5 回誘発したマウスにおいて経心臓的に 4% paraformaldehyde/リン酸緩衝液 PB で灌流固定を行い、凍結切片を作成し免疫組織化学した。10 μ m の厚さで大脳皮質レベルの凍結切片を作成し免疫組織化学染色あるいは *in situ* hybridization を施行した。

In situ hybridization については HMGB1 の塩基配列 (GeneBank: BC064790.1) に基づいて nt. 12-643 に相当する Riboprobe を DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche) を用いてセンス、アンチセンスプローブを作成した。免疫組織化学染色については抗 HMGB1 抗体とニューロンのマーカーである抗 NeuN 抗体あるいはアストロサイトのマーカーである抗 GS6 抗体の二重染色を行った。関心領域を CSD 誘導側の頭頂葉皮質に設定し。単位面積あたりの HMGB1 mRNA 陽性細胞あるいは抗 HMGB1 抗体陽性細胞の数を計測した。

新生ラットから初代培養三叉神経節ニューロンを調整し、capsaicin (100 nM ~ 10 μ M) で TRPV1 刺激を行った。

4 . 研究成果

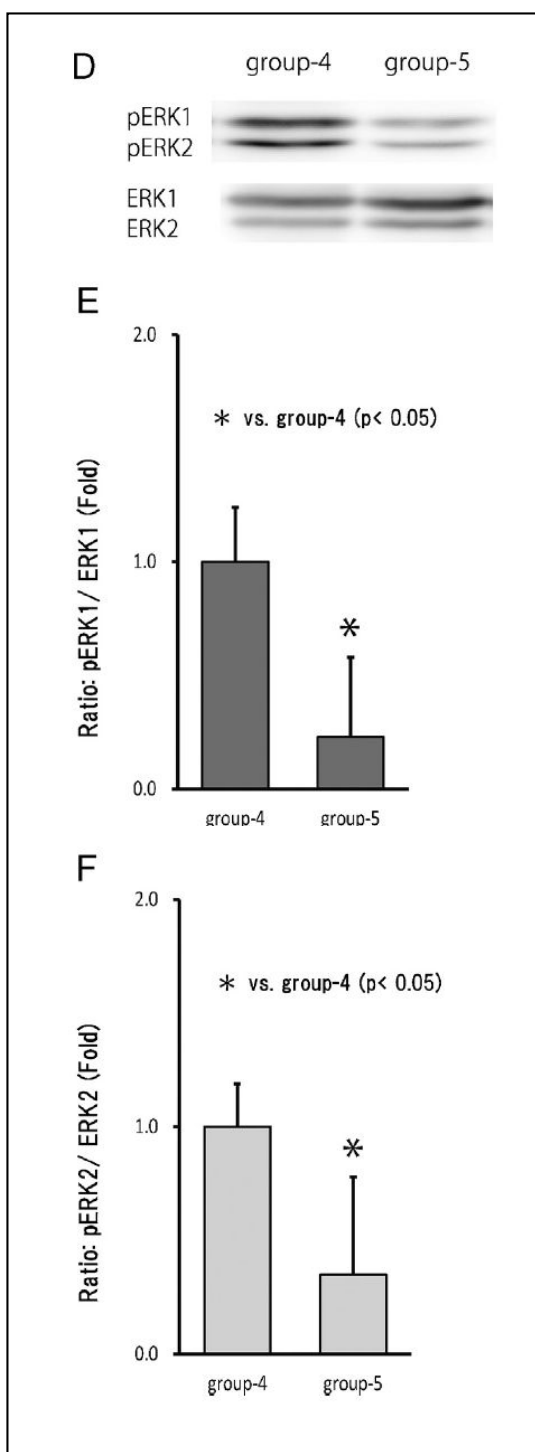
(1) CSD と ERK リン酸化について

硬膜上に capsaicin を投与後、三叉神経節における total ERK に対する ERK1 の比は 1,3 および 5 分後それぞれ、 1.9 ± 1.2 、 2.5 ± 1.1 、 2.3 ± 0.5 で、total ERK に対する ERK2 の比は 2.0 ± 0.6 、 2.5 ± 0.7 、 2.1 ± 0.4 であった。コントロールに対して ERK1/2 とともに capsaicin 刺激 3 分後にリン酸化の有意な上昇を認めた。

また三叉神経節における免疫組織化学染色においても capsaicin 刺激 3 分後に pERK 陽性の神経細胞の有意な増加を認めた。これらの反応は、TRPV1 受容体拮抗薬である capsazepine および MEK inhibitors である PD98059 および U0126 で抑制された。

CSD 誘発 30 分後 (group-3) における三叉神経節の ERK リン酸化レベル (pERK/total-ERK) は、ERK1 が 1.82 ± 0.48 (mean \pm SD) ,

ERK2 が 2.97 ± 0.76 とコントロール群 (group-1) および CSD 誘発直後 (group-2; 1.12 ± 0.45 (ERK1), 1.24 ± 0.63 (ERK2)) と比較し有意な増加を示した ($p < 0.05$)。TRPV1 受容体拮抗薬である capsazepine の髄腔内投与を行なった群 (group-5) では、三叉神経節の ERK リン酸化レベル (pERK/ total-ERK) は、ERK1 が 0.23 ± 0.35 , ERK2 が 0.35 ± 0.43 とコントロール群 (group-4) と比較し有意に低値を示した (図 1 ; $p < 0.05$)。 図 1

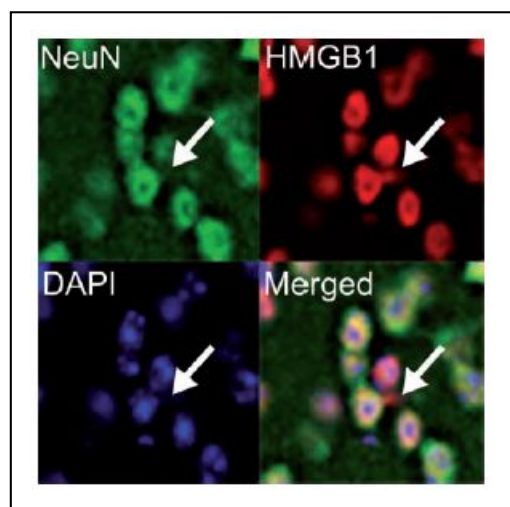


本研究でリン酸化が認められた ERK は細胞内シグナルカスケードのモジュールとして知られている MAP キナーゼの代表的なサブファミリーの 1 つで、感覚神経末梢に分布する TRPV1 受容体を刺激すると脊髄後角や後根神経節で ERK リン酸化が観察されることが報告されている。我々は脳硬膜に分布する TRPV1 受容体に侵害刺激を加えると三叉神経節において ERK リン酸化がおこることを明らかにした。さらに CSD 誘発後三叉神経節において ERK リン酸化がおこり TRPV1 受容体アンタゴニストがこの反応を抑制したことも明らかにした。この結果 CSD により三叉神経節が活性化される過程において TRPV1 受容体が関与している可能性が明らかとなった。

(2) CSD と HMGB1 の発現について

HMGB1 の蛋白質発現は大脳皮質のニューロンとグリアの核に認められたが、mRNA 発現を *in situ* hybridization を用いて検討したところ、定常状態では発現レベルが低かった。このことから、HMGB1 は通常の状態ではターンオーバーの少ない蛋白質であることが示唆された。CSD を 1 回誘導し 3 時間後に、HMGB1 mRNA 発現ニューロンは、正常コントロールの $463.7 \pm 36.7/\text{mm}^2$ から $769.0 \pm 379.5/\text{mm}^2$ へと上昇傾向を示した ($p = 0.51$)。一方、CSD を 5 回誘導した際には、3 時間後に HMGB1 mRNA 発現ニューロンは、 $1400.0 \pm 139.8/\text{mm}^2$ へと有意に ($p < 0.01$) 上昇した。また、個々の細胞における信号強度も増強した。しかし、24 時間後には HMGB1 mRNA 発現ニューロンは $645.7 \pm 103.2/\text{mm}^2$ へと低下し、同時に信号強度も減弱した。アストロサイトでは、ニューロンで認められるような、mRNA 発現の変化を認めなかった。以上より、CSD 後の HMGB1 転写誘導は、ニューロンに限定して生じることと、CSD の回数依存的に起こる現象であることが明らかとなった。

HMGB1 蛋白質の動態に関しては、CSD を 1 回誘導したところ、3 時間免疫染色およびウエスタンブロットでは、発現レベルの低下傾向は示したものの、有意な変化は検出されなかった。一方、CSD を 5 回誘導した場合には、30 分後には明らかな変化は認めなかったが、3 時間後にはウエスタンブロットで、正常コントロールと比較して、 0.38 ± 0.15 倍へと有意に ($p < 0.01$) 低下した。しかし、24 時間後には発現レベルは正常に回復した。免疫組織染色では、CSD に曝露されたニューロンの一部では、核外への放出が観察された (図 2)。



以上の HMGB1 の mRNA および蛋白質の発現レベルの変化を考慮すると、CSD が複数回生じた際に、ニューロンから HMGB1 の放出が起こり、脳組織全体の HMGB1 蛋白質レベルは低下が引き起こされ、それを代償するために HMGB1 の転写亢進がニューロンで惹起されて、24 時間後には蛋白質発現レベルは定常状態へと回復するのではないかと推察された。通常の片頭痛前兆では CSD は 1 回のみしか生じていないと考えられている。そのような状況では、ニューロンからの HMGB1 放出は軽度にとどまると推測される。しかし、片麻痺性片頭痛の前兆時や、脳梗塞のペナンプラ領域やくも膜下出血発生時には CSD は複数回生じていることが明らかにされている。このような場合は、ニューロンからの

HMGB1 放出が強く惹起されていると考えられる。初代培養のラット三叉神経節ニューロンにカプサイシンを作用させたところ、100 nM ~ 10 μ M の範囲で投与量依存的に細胞死が誘導された。この細胞死は、30 分後には明らかであった。薬理的な検討から、この細胞死には活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) とカスパーゼが関与することが明らかとなった。三叉神経節ニューロンは、TRPV1 刺激に対して極めて脆弱であり、過剰な刺激に対しては細胞死を来すことが明らかとなった。慢性片頭痛のように、慢性的な TRPV1 刺激が三叉神経領域に加えられていることが想定される病態においては、三叉神経節ニューロンの障害が引き起こされ、神経障害性疼痛が発生している可能性を示唆する所見であると解釈できる。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 5 件)

1. 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. 査読有 Cephalalgia. 2015 in press. DOI: 10.1177/0333102415580100.
2. Iwashita T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Ebine T, Funakubo M, Suzuki N. A 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, 110-9. doi: 10.1016/j.neures.2013.08.001
3. Sato H, Shibata M, Shimizu T, Shibata S, Toriumi H, Ebine T, Kuroi T, Iwashita T, Funakubo M, Kayama Y, Akazawa C, Wajima K, Nakagawa T, Okano H, Suzuki N. Differential cellular localization of

antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. Neuroscience. 査読有 248, 2013, 345-358. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.010.

4. Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Iwashita T, Funakubo M, Sato H, Kuroi T, Ebine T, Koizumi K, Suzuki N. Reduction of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A. Neurobiol Dis. 査読有 48, 2012, 367-378. doi: 10.1016/j.nbd.2012.07.010.

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 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; 20th, September 2014; Copenhagen, Denmark.
2. Iwashita T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Kayama Y, Ebine T, Takizawa T, Funakubo M, Suzuki N. Effect of cortical spreading depression on the phosphorylation of ERK in the trigeminal ganglion of rat. 16th Congress of the International Headache Society 2013 28th June 2013; Boston.
3. Shibata M, Ebine T, Nagai T, Toriumi H, Shimizu T, Iwashita T, Funakubo M, Takizawa T, Kayama Y, Suzuki N. Capsaicin-induced nerve fiber degeneration in the spinal tract of the trigeminal nucleus. 16th Congress of the International Headache Society 2013 June 28th 2013; Boston.
4. Suzuki N. Dynamic changes in brain microcirculation during cortical spreading depression. The 4th Asian Region

al Conference for Headache 2012; 27^t

^h October 2012; Taipei, Taiwan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 則宏 (SUZUKI, Norihiro)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：10158975

(2)研究分担者

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

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

鳥海 春樹 (TORIUMI, Haruki)
慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)
研究者番号：30528203

小泉 健三 (KOIZUMI, Kenzo)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30439070

舟久保 恵美 (FUNAKUBO, Megumi)
慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)
研究者番号：90548538

(3)連携研究者

なし