

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460706

研究課題名(和文)疼痛疾患モデル一次性感覚ニューロンに認められるミトコンドリア異常の解析

研究課題名(英文) Analysis of pain disease model-associated mitochondrial abnormalities in primary sensory neurons

研究代表者

柴田 護 (Shibata, Mamoru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60286466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスのwhisker padに10 mMカプサイシンを30分間作用させてTRPV1刺激を6日間行った。刺激と同側の三叉神経節の切片を作成して電子顕微鏡でミトコンドリアの観察を行った。なお、三叉神経節採取のタイミングは2, 4, 6日間投与完了の24時間後とした。2日投与では特に形態異常は認めなかったが、4日投与では主として小型の三叉神経ニューロンで内部構造の破壊を呈したミトコンドリアが確認された。しかし、6日間投与後にはニューロン内のミトコンドリア形態はほぼ正常であった。以上のことから、何らかの修復機構が作動するものと考えられた。細胞実験からミトファジーの機能が重要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：TRPV1 is activated by capsaicin. We applied 10 mM capsaicin-immersed cotton to the whisker pad for up to 6 days. Electron microscopic analysis revealed that there was extensive destruction of mitochondrial internal structure in small-sized trigeminal ganglion (TG) neurons at Day 4. Nevertheless, no discernible structural alterations were not observed in the small-sized TG neurons at Day 6, implying that there was a restorative process that normalized mitochondrial status in TG neurons exposed to repetitive TRPV1 stimulation. We established a PC12 clone stably expressing TRPV1. When exposed to capsaicin, these cells exhibited mitochondrial structural derangements in a dose-dependent manner. There were significantly increased mitophagy-affected mitochondria in capsaicin-treated cells. Our-cell-based assays imply that mitophagy plays an important role in the reparative process of mitochondrial health in capsaicin-treated cells.

研究分野：神経内科

キーワード：ミトコンドリア 三叉神経節ニューロン 片頭痛 オートファジー ミトファジー 皮質拡張性抑制

1. 研究開始当初の背景

感覚神経機能の発現に、神経終末とシナプスの役割は非常に重要である。両者の構造は細胞体に比較して体積は小さいものの細胞膜の嵌入によって表面積が広がっており、多くの受容体やイオンチャネルが存在する。特に痛覚系一次ニューロンの神経終末は多くの種類の侵害刺激に対する受容体が存在し、生体にとって危険な侵害性刺激の有無を絶え間なくモニターしている。神経終末やシナプスにおいては、神経伝達物質の放出とイオンチャネルや受容体の細胞膜への輸送に関与するエクソサイトシス、神経伝達物質の再取り込み、イオントランスポーターによる膜電位維持、細胞体との軸索輸送による分子やオルガネラの運搬が活発に行われているが、いずれの機能の発現にも ATP の形によるエネルギー供給が要求される。細胞内で酸化リン酸化によって ATP を産生しているのはミトコンドリアであるため、感覚神経が正常に機能するにはミトコンドリアの働きが極めて重要であることは想像に難くない。ATP 産生以外のミトコンドリアの主な生理学的作用としては、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の処理とカルシウム緩衝作用があげられる。筆者らは、三叉神経節内の ROS 処理に関与する酵素の局在を明らかにしたが、glutathione peroxidase-1 (GPx-1) と superoxide dismutase (SOD)² がニューロンのミトコンドリアに局在することを報告している (Sato H, et al. Neuroscience 2013; 248: 345-358.)。一次感覚ニューロンの神経終末では炎症性疼痛の原因になるような疾患において ROS に曝露されるため、ミトコンドリアが担う ROS 防御機構は一次感覚ニューロン機能の維持に非常に重要と思われる。また、神経終末やシナプスではカルシウムチャネルが活発に機能しているため、適切なカルシウム濃度の維持にミトコンドリアによるカルシウム緩衝作用が重要な役割

を果たしている。ミトコンドリアは分裂と融合によって自律的に増減することが知られている。分裂には DRP1、融合には MFN1/MFN2 と Opa1 とよばれる蛋白質がそれぞれ作用することが明らかとなっており、それらの蛋白質の機能はミトコンドリア膜電位の変化などによって活性化される。また、ミトコンドリアはオートファジー (自食作用) によって分解を受けることも知られている。ミトコンドリアがオートファゴソームという二重膜で取り囲まれ、これにリソソームが融合することで、ミトコンドリア構成成分がリソソームの加水分解酵素によって分解を受ける機構で、ミトファジー (mitophagy) とも呼ばれる。このような動的な機構によって、ミトコンドリアの品質管理が行われていると考えられている。しかし、疼痛モデル/頭痛モデルにおけるミトコンドリアの異常や mitophagy 誘導に着目した研究は非常に少ないのが現状である。

2. 研究の目的

代表的な疼痛疾患動物モデルを作成し、一次感覚ニューロンのミトコンドリアにどのような異常が引き起こされているかを検討する。今回は三叉神経節ニューロンの細胞体を関心領域に設定する。

3. 研究の方法

(1) 侵害受容性疼痛モデル

TRPV1 は侵害性刺激の受容に関与するカチオンチャネルであり、カプサイシンによって活性化されることが知られている。侵害受容疼痛モデルとして、カプサイシン (10 mM) を浸透させた脱脂綿をマウスの顔面 (whisker pad) に 30 分間貼付して局所投与した。これを連日 6 日まで繰り返し、3, 5, 7 日目に三叉神経節を摘出した。3, 5, 7 日において von Frey hair を用いて whisker pad で機械的刺激に対する感覚過敏/アロディニアが誘発されていることを確認した。

(2) 電子顕微鏡観察

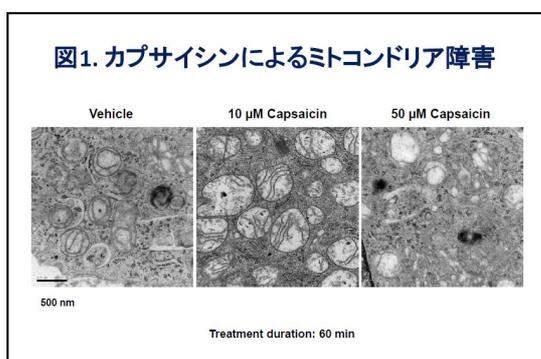
ミトコンドリアの数や形態の変化を検討するため、三叉神経節・神経終末・脳幹および脊髄内のシナプス部で組織切片を作成して、電子顕微鏡観察を行った。

(3) TRPV1 発現 PC12 細胞に対するカプサイシン刺激

ラット TRPV1 を安定発現させる PC12 細胞を樹立し、カプサイシン刺激を行い、電子顕微鏡観察、mitophagy/オートファジー誘導解析を行った。後者に関しては、mitophagy を受けたミトコンドリアを認識する蛍光色素や LC3 に対するウエスタンブロットを用いて検討した。

4. 研究成果

熱疼痛刺激やカプサイシン刺激で活性化される TRPV1 を刺激した際にミトコンドリアにいかなる影響を与えるかを検討した。TRPV1 を発現する PC12 細胞にカプサイシン刺激を行うと、ミトコンドリア障害が生じることを確認するためにミトコンドリア蛍光染色と電子顕微鏡観察を行った。カプサイシン投与量依存性に染色されるミトコンドリアは減少しており、さらに電子顕微鏡像では低用量カプサイシン刺激ではミトコンドリア膨化を、高容量カプサイシン刺激ではミトコンドリア破壊像が確認された (図 1)。同時にオー



トファジー発生のマーカーである微小管関連蛋白質 (microtubule-associated protein) LC3 のウエスタンブロットではカプサイシン用量依存性にオートファジー誘導が生じていることが明らかとなった。

Mitophagy が生じているミトコンドリアを染色する蛍光色素で染色したところカプサイシン刺激によって mitophagy 発生が亢進していることも明らかとなったため、カプサイシン刺激によって生じた損傷ミトコンドリアを mitophagy 誘導によって除去しようという機序が働いているものと推察された。一方、マウスの whisker pad に 10 mM カプサイシンを含むパッチを 30 分間作用させて TRPV1 刺激を 6 日間行った。刺激と同側の三叉神経節の切片を作成して電子顕微鏡でミトコンドリアの観察を行った。なお、三叉神経節採取のタイミングは 2, 4, 6 日間投与完了の 24 時間後とした。2 日投与では特に形態異常は認めなかったが、4 日投与では主として小型の三叉神経ニューロンで内部構造の破壊を呈したミトコンドリアが確認された。しかし、6 日間投与後にはニューロン内のミトコンドリア形態はほぼ正常であった。以上のことから、何らかの修復機構が作動するものと考えられた。現在 *in vivo* におけるミトファジー誘導の解析を行っているところであり、2018 年の American Headache Society の年次総会で成果の一部を発表予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

#: corresponding author

1. Kayama Y, Shibata M#, Takizawa T, Ibata K, Shimizu T, Ebine T, Yuzaki M, Suzuki N. Functional interactions between transient receptor potential M8 and transient receptor potential V1 in the trigeminal system: Relevance to migraine pathophysiology. Cephalalgia 2018;38:883-845. 査読有

2. Kayama Y, Shibata M#, Takizawa T, Ibata K, Shimizu T, Toriumi H, Yuzaki M, Suzuki N. Signaling pathways relevant to nerve growth factor-induced upregulation of

transient receptor potential M8 expression. *Neuroscience* 2017 367:178-188. 査読有

3. Takizawa T#, Shiihashi G, Maehara J, Oki K, MD, Osaka M, Fujiwara H, Ojima H, Ichinose Y, Shibata M, Takahashi S, Suzuki N. Serial changes of corticospinal tract hyperintensity on MRI from the pre-clinical stage in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin Neurosci* 2017 doi: 10.1111/ncn3.12165. 査読有

4. Takizawa T, Shibata M#, Hiraide T, Seki M, Takahashi S, Suzuki N. Possible Involvement of Hypotension in Postprandial Headache: A Case Series. *Headache* 2017;57:1443-1448. 査読有

5. Shibata M#, Suzuki N. Exploring the role of microglia in cortical spreading depression in neurological disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017;37:1182-1191. 査読有

6. Takizawa T, Shibata M#, Kayama Y, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, Uekawa M, Koh A, Yoshimura A, Suzuki N. High-mobility group box 1 (HMGB1) is an important mediator of microglial activation induced by cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017;37:890-901. 査読有

7. Ebine T, Toriumi H, Shimizu T#, Uekawa M, Takizawa T, Kayama Y, Shibata M, Suzuki N. Alterations in the threshold of the potassium concentration to evoke cortical spreading depression during the natural estrous cycle in mice. *Neurosci Res* 2016;112:57-62. 査読有

8. 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* 2016;106:74-78.

9. Takizawa T, Shibata M#, Fujiwara H, Shimizu T, Momoshima S, Suzuki N. Adult-onset recurrent painful ophthalmoplegic neuropathy displaying atypical oculomotor nerve gadolinium-enhancement pattern in the orbit and cavernous sinus. *Cephalalgia* 2016;36:199-200. 査読有

10. Takizawa T, Shibata M#, Kayama Y, Toriumi H, Ebine T, Koh A, Shimizu T, Suzuki N. Temporal profile of high-mobility group box 1 expression levels after cortical spreading depression in mice. *Cephalalgia* 2016;36:44-52. 査読有

11. Osaka M, Shibata M#, Oki K, Yamada S, Kufukibara K, Akiyama T, Yoshida K, Suzuki N. Clinical utility of triptans in the management of headache attributed to dural arteriovenous fistula involving the cavernous sinus. *J Neurol Sci* 2015;349:260-261. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. 柴田 護. 片頭痛治療のすべて-病態から見た新しい治療の展望. 片頭痛の新しい治療薬. 第35回日本神経治療学会総会. 2017年

2. 柴田 護. シンポジウム 3. 頭痛の病態に関わる Hot な分子たち. PACAP と CGRP. 第45回日本頭痛学会総会. 2017年

3. Kitagawa S, Takizawa T, Kayama Y, Toriumi H, Shimizu T, Shibata M, Suzuki N. Cortical spreading depression alters the progranulin expression in cortical neurons. XXIII World Congress of Neurology. 2017 (oral presentation).

4. Kayama S, Shibata M, Takizawa T, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, Suzuki N. Facial

TRPM8 stimulation ameliorates thermal hyperalgesia in a mouse migraine model. IHC2017. 2017.

5. Shibata M. HMGB1 is an important mediator of multiple CSD-induced microglial activation in the cerebral cortex. The 6th Asian Regional Conference for Headache. 2016. (Oral presentation)

6. Kayama Y, Shibata M., Takizawa T, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, Suzuki N. Temporal profiles of TRPM8 and TRPV1 expression in the trigeminal ganglion neurons after CFA-induced inflammation. EHMTIC2016. 2016.

7. 柴田 護. なおる神経内科「片頭痛の現在・過去・未来」CGRP拮抗薬. 第57回日本神経学会学術大会. 2016年

8. Shibata M. シンポジウム 1. How have animal studies contributed to the elucidation of migraine pathophysiology? 第43回日本頭痛学会. 2015年

9. Shibata M. Pan-Asian/Pan-American Program. Temporal Profile of Cortical Microglial Activation after Cortical Spreading Depression. AHS 57th Annual Scientific Meeting. 2015. (Oral presentation)

〔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〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田 護 (SHIBATA, Mamoru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号: 60286466

(2)研究分担者

清水利彦 (SHIMIZU, Toshihiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号: 40265799

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし