

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19591005

研究課題名(和文)

片頭痛におけるASICの役割 - 片頭痛動物モデルを用いた検討

研究課題名(英文)

The role of ASIC for pathophysiology of migraine

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

研究成果の概要(和文): 本研究は片頭痛の病態へのASIC (acid sensing ion channel) および TRPV1 受容体 (the transient receptor potential vanilloid subfamily member 1) の関与を検討したものである。片頭痛の病態には、血管反応性の異常に加え、三叉神経と硬膜の神経原性炎症が関与していると考えられている。本研究により片頭痛の病態に関係すると考えられている脳硬膜および三叉神経節におけるTRPV1受容体の存在を明らかにした。さらに、TRPV1受容体のアゴニストであるカプサイシンによる侵害刺激を脳硬膜に加えると、三叉神経節にて痛覚伝達に係る extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が生じることを明らかにした。同様の刺激を神経系株化細胞に与えた場合もERKリン酸化が起こることも明らかにした。また脳硬膜TRPV1受容体陽性神経線維は頭蓋骨内の板間静脈と交差しており板間静脈を介した熱などが、TRPV1受容体の感受性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): In this study, we investigated the role of acid sensing ion channel (ASIC) and the transient receptor potential vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) for pathophysiology of migraine. In addition to vascular dysfunction, the neurogenic inflammation of the dura mater innervated by the trigeminal ganglion is considered to be related to migraine pathophysiology. We demonstrated the existence of the TRPV1 receptor in the dura mater and the trigeminal ganglion in this project. Furthermore, our data showed that the nociceptive stimulation of TRPV1 receptors in the dura mater caused the phosphorylation of ERK, which is in response to the noxious stimulation of peripheral TRPV1 receptors in the trigeminal ganglion in vivo. We also observed the phosphorylation of ERK in vitro. As such phosphorylation was found to occur rapidly after TRPV1 stimulation, we surmised that ERK phosphorylation can serve as sensitive marker of nociception at the level of the trigeminal ganglion. We also observed the developmental pattern of the diploic veins and the relationship between the diploic veins and the dural TRPV1 receptor. Many dural TRPV1 receptor immunoreactive nerve fibers were observed over the diploic veins and these finding indicated the possibility that heat from the diploic veins may affect to the threshold of the TRPV1 receptor

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：片頭痛, TRPV1, ASIC, ERK, diploic vein

1. 研究開始当初の背景

本研究は片頭痛の病態へのASIC (acid sensing ion channel) および TRPV1 受容体 (the transient receptor potential vanilloid subfamily member 1) の関与を検討するものとして申請した。片頭痛の病態には、血管反応性の異常に加え、三叉神経と硬膜の神経原性炎症が関与していると考えられている。この神経原性炎症にTRPV1受容体やASIC受容体が関与している可能性が予想された。

2. 研究の目的

カプサイシンに感受性をもつTRPV1 receptor の存在について検討した。片頭痛の病態を説明する三叉神経血管説では神経原性炎症という無菌的な炎症が脳硬膜におこり片頭痛が生じていると考えられている。本研究では、プロトン受容体の中で侵害刺激に関係するASIC 受容体およびTRPV1 受容体の三叉神経血管系での局在と分布および起源について免疫組織化学により検討した(実験(1),(2))。

痛覚伝達には extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が関与し、足底部や歯根部への侵害刺激により脊髄後角、後根神経節および三叉神経脊髄路核において、ERKのリン酸化が報告されている。そこで片頭痛の主病巣のひとつと考えられている脳硬膜のTRPV1受容体にカプサイシンによる侵害刺激を加えERKリン酸化の有無を検討し、疼痛評価の指標とすることを目的とした。さらに神経系株化細胞PC12を用い *in vitro* にてカプサイシン刺激に対する、ERKのリン酸化の有無も検討し、細胞レベルでの疼痛評価の指標を目的とした(実験(3),(4),(5),(6))。

頭蓋骨内血管のなかで、頭蓋内静脈である板間静脈(diploic vein)は脳硬膜の血管と連絡を持つことが知られている。そこで、diploic veinの経過変化および脳硬膜の神経線維に存在するTRPV1受容体との関係についてマウスを用い検討した(実験(7))。

3. 研究の方法

(1)TRPV1 の硬膜および三叉神経節における存在について
Sprague-Dawley (SD) 種ラットを用い、深麻酔下に氷冷ピクリン酸添加パラホルムアルデヒド溶液(Zamboni液)により灌流固定後、脳硬膜、三叉神経節、翼口蓋神経節、耳神経節、内頸神経節、上頸髄神経(C₂₋₃)および後根神経節を摘出し、抗TRPV1受容体抗体をもちいた免疫組織化学染色により受容体の局在と分布を光学顕微鏡で検討した。

(2)脳硬膜のTRPV1受容体陽性神経線維の起源

深麻酔下に逆行性神経軸索トレーサーであるTrue Blue Chloride (Molecular Probes)を中硬膜動脈付近の硬膜へのapplicationを行った。2週間後に灌流固定し三叉神経節および後根神経節を摘出し免疫組織化学染色により受容体の局在と分布を光学顕微鏡で検討した。

(3) 硬膜TRPV1 受容体を介するERKのリン酸化 (western blotting)

実験にはSD種ラットを用いた。ペントバルビタール麻酔下に脳固定装置に固定し、頭部皮膚正中切開にて頭蓋骨を露出し歯科用ドリルにてconfluent sinusを中心に硬膜を残して頭蓋骨を摘出し、直径11mmの頭窓を作成した。30分の安静の後、burr-hole硬膜上に10mM カプサイシンを投与した。投与1分、3分および5分後に三叉神経節を摘出した。その後western blottingにて phosphorylated ERK(pERK)、ERKおよび tubulinの発現を検討した。

(4) 硬膜TRPV1 受容体を介するERKのリン酸化(免疫組織化学)

SD種ラット(n=12, control, 1, 3, 5分各群3匹ずつ)を深麻酔下に頭頂部頭蓋骨露出後、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 カプサイシンを投与し、1, 3, 5分後に三叉神経節を摘出した。controlにはethanolを生食で溶解し10%とした溶液を投与し、3分後に同様の処置を行った。6μmの連続切片を作成し pERKの抗体を用い免疫組織化学染色を行った。これらのうち、各群連続16切片の全視野において、全細胞数に対するpERKの割合を算出した。

(5) 硬膜TRPV1 受容体を介するERKのリン酸化に対するTRPV1受容体拮抗薬の効果 (western blotting)

SD種ラットを深麻酔下に頭頂部を皮切し頭蓋骨露出後、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。その後対象を vehicle 腹腔内投与群、capsazepine 16mg/kg 腹腔内投与群、vehicle をburr hole 硬膜上に投与群、capsazepine 4 mg/kg をburr hole 硬膜上に投与群の4群に分類した。30分後各群のburr hole 硬膜上に10mM カプサイシン 100μlを投与し、3分後に三叉神経節を摘出した。Western blottingにて pERK, ERK および tubulin の

発現を検討した。

(6) TRPV1 受容体を介する ERK のリン酸化の *in vitro* による検討(神経系株化細胞 PC12 使用による western blotting)
神経系株化細胞 PC12 に、カプサイシン 30 μ M を投与し、投与 1 分、3 分および 15 分後における ERK リン酸化を blotting により検討した

(7) 頭蓋内板間静脈の経週齢変化および脳硬膜の神経線維に存在する TRPV1 受容体との関係

実験には C57BL/6J マウスを用い以下の検討を行った。若齢動物として 5 週齢、成熟動物として 16 週齢の C57BL/6J マウスを使用した。Diploic vein の経週齢的变化は FITC dextran 投与により直接血管を染色する方法および頭頂骨における骨腔面積の計測を行う 2 つの方法を用い観察した。

FITC dextran 投与による頭頂骨の観察
尾静脈より FITC dextran を投与し、血管内皮を可視化した動物の頭頂骨を摘出後、蛍光顕微鏡で観察し diploic vein の総長を計測した。頭頂骨を摘出後、diploic vein の総長を計測した。

脳硬膜における TRPV1 抗体陽性神経線維の免疫組織化学的検討

脳硬膜における TRPV1 陽性神経線維の存在を免疫組織化学染色により確認するとともにこの TRPV1 陽性線維と diploic vein との重複率を計測した。免疫組織化学染色は、1 次抗体に、抗 TRPV1 受容体抗体使用し、2 次抗体には蛍光抗体を用い蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) TRPV1 の硬膜および三叉神経節における存在について

脳硬膜に TRPV1 受容体陽性の神経線維を認めた(図 1)。

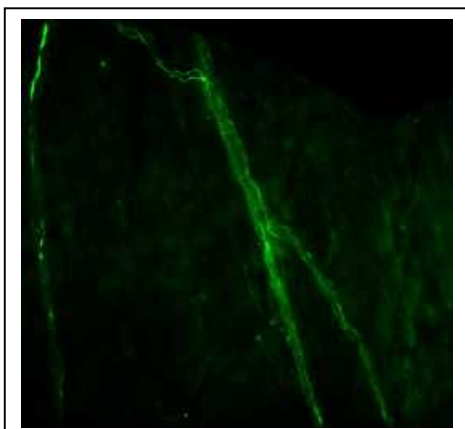


図 1：脳硬膜における TRPV1 受容体抗体陽性神経線維。

また、三叉神経節および後根神経節に TRPV1 受容体陽性の神経細胞を認めた(図 2)。

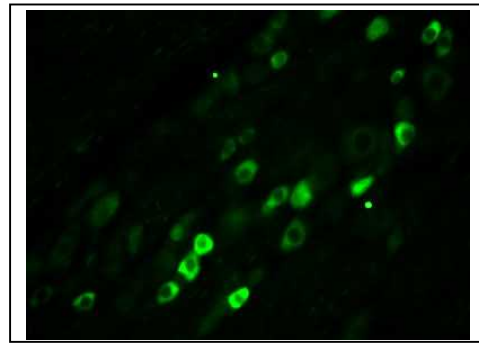


図 2：三叉神経節における TRPV1 受容体抗体陽性神経細胞

(2) 脳硬膜の TRPV1 受容体陽性神経線維の起源

True Blue (TB) の集積は三叉神経節および少数の後根神経節の神経細胞に認められた(図 3)。

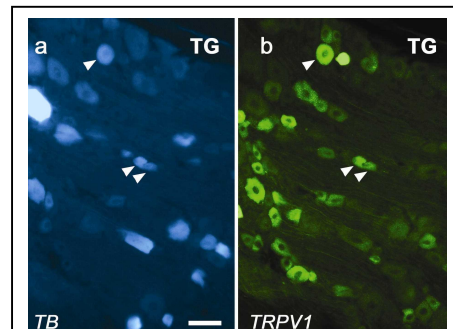


図 3：矢頭は三叉神経節の TB(a) および TRPV1 陽性細胞(b)

なお ASIC については脳硬膜および三叉神経節での局在を明らかにすることができなかった。以上の研究より脳硬膜における TRPV1 受容体の存在を明らかにし、さらにトレーサーを用いた研究からこれらの神経線維が三叉神経節をおもな起源としていることを明らかにした。

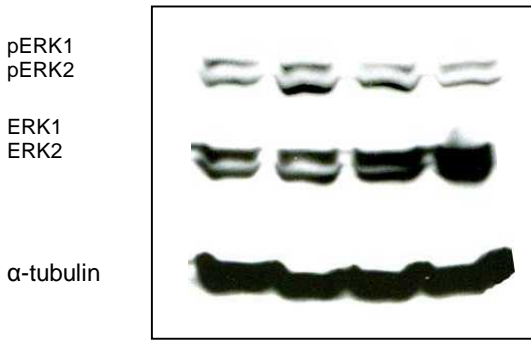
(3) 硬膜 TRPV1 受容体を介する ERK のリン酸化(western blotting)

脳硬膜のカプサイシン刺激 1 分および 3 分後に三叉神経節での ERK リン酸化亢進が認められ、5 分後には刺激前とほぼ同様の状態となった(図 4)。

(4) 硬膜 TRPV1 受容体を介する ERK のリン酸化(免疫組織化学)

Control(図 5a: $0.5 \pm 0.1\%$, $p < 0.05$)と比較して、カプサイシン刺激 3 分後(図 5c: $4.0 \pm 0.8\%$, $p < 0.05$)、5 分後(図 5d: $2.3 \pm 0.2\%$, $p < 0.05$)にリン酸化の有意な上昇を認めた。3 分後がリン酸化上昇のピークで、5 分後に

は減少した。この結果はwestern blotによる時間経過と一致していた。



cont. 1min. 3min. 5min
図4：脳硬膜のカプサイシン刺激による三叉神経節のwestern blot。

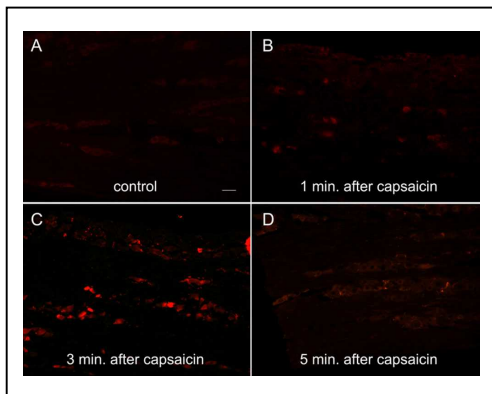


図5：脳硬膜のカプサイシン刺激による三叉神経節の免疫組織化学染色。

(5) 硬膜TRPV1 受容体を介するERKのリン酸化に対するTRPV1受容体拮抗薬の効果 (western blotting)

TRPV1受容体拮抗薬であるcapsazepineを前投与するとカプサイシン刺激3分後に生じる三叉神経節ERKのリン酸化の抑制が認められた(図6)。

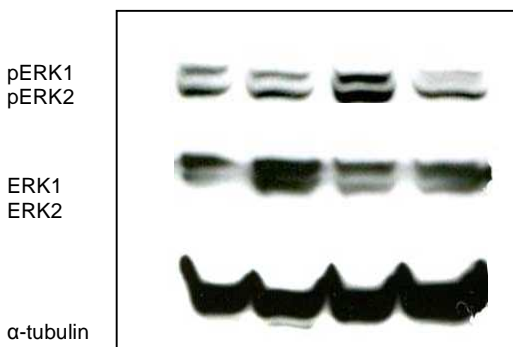


図6：ラット三叉神経節におけるTRPV1受容体拮抗薬投与後のERKリン酸化のwestern blot。 vehicle 腹腔内投与群，

capsazepine 16mg/kg 腹腔内投与群， vehicle をburr hole 硬膜上に投与群， capsazepine 4 mg/kg投与群

(6) TRPV1 受容体を介するERKのリン酸化の*in vitro*による検討(神経系株化細胞PC12使用によるwestern blotting) ERKのリン酸化は，刺激1分後にピークとなりその後，刺激前のリン酸化レベルまで低下した(図7)。この時間経過は，カプサイシンの脳硬膜への投与後に三叉神経節で認められたERKリン酸化とほぼ一致していた。

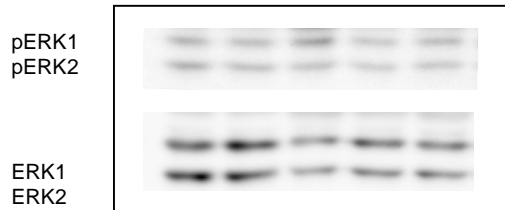


図7：神経系株化細胞PC12のカプサイシン刺激によるERKリン酸化のwestern blot。

はコントロール， はvehicle投与， はカプサイシン投与1分後， はカプサイシン投与3分後， はカプサイシン投与5分後。

以上(3)-(6)の研究は脳硬膜に存在するTRPV1受容体にカプサイシンによる侵害刺激を加え，三叉神経節にてERKリン酸化が生じることを明らかにするとともに，神経系株化細胞においても同様の刺激によりERKリン酸化のおきることを明らかにしたものである。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，MAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)，MAPキナーゼキナーゼ(MAPKK)，MAPキナーゼ(MAPK)の順にリン酸化されて活性化し，上流から下流へとシグナルを伝達する。MAPキナーゼの代表的なサブファミリーとしてERK1/2，JNK，p38およびERK5/BMK1の4つが知られている。ERK1(44Kd)とERK2(42Kd)はアミノ酸レベルで80%以上の相同性をもつセリン/スレオニンキナーゼであり，ERK1とERK2を総称してERKと呼ばれることが多い。ERKはEGF(epidermal growth factor)やFGF(fibroblast growth factor)などによる増殖刺激やTPAなどの発癌プロモーターなどによってリン酸化され細胞の増殖制御に関与することがよく知られてが，その他に細胞の分化や運動，アポトーシスなどにも関与することも知られている。さらに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。カプサイシンで足底部などを刺激すると脊髄後角や後根神経節でまた歯根部を刺激すると三叉神経脊髄路核でのERKリン酸化が観察されている。しかし、脳硬膜での侵害刺激によるERKのリン酸化については現在まで見当されておらず、加えて、神経系株化細胞を用いた*in vitro*の検討でも同様の傾向が認められたことは、極めて重要な知見と考えられる。従来より、頭痛の動物モデルを作成した場合、疼痛をどのように評価するかが難問であった。しかし、今回の研究結果から、脳硬膜のカプサイシン刺激により三叉神経節におけるERKリン酸化が生じた場合は、痛覚刺激が伝わっていると判断することができる。さらに、神経株化細胞に関してもERKのリン酸化が疼痛のパラメーターとなる可能性があり、今後、これらの指標が、頭痛の疼痛評価に有用となる可能性が考えられる。

(7) 頭蓋内板間静脈の経週齢変化および脳硬膜の神経線維に存在する TRPV1 受容体との関係

FITC dextran 投与による頭頂骨の観察

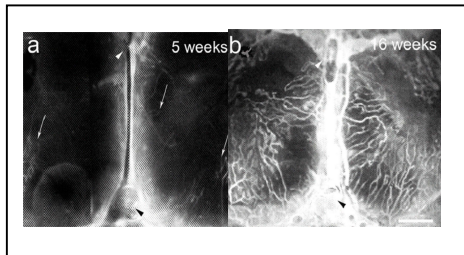


図8：FITC dextran 投与により描出されるdiploic vein (a：5週齢，b：16週齢)。

矢頭(白)は上矢状静脈洞，矢頭(黒)はconfluence of sinuses.

5週齢においてFITC dextranで描出されるdiploic veinの総長は 48.9 ± 10.9 mm (mean \pm SD, n = 5)であった(図8a)。16週齢でdiploic veinの総長は 146.6 ± 19.1 mmと有意に増加した($p < 0.05$; 図8b)。

脳硬膜におけるTRPV1抗体陽性神経線維の免疫組織化学的検討

5週齢および16週齢ともに脳硬膜においてTRPV1陽性神経線維を認めた(図9a, c)。さらにTRPV1陽性神経線維とdiploic veinの重複する部位が5週齢および16週齢において観察された(図9b, d)。定量的解析のため頭頂部脳硬膜を走行するTRPV1陽性神経線維長に対しdiploic veinと重複する部位のTRPV1

陽性線維長の割合を計算した(n = 5)。重複率は5週齢で6.9%，16週齢で19.6%と、5週齢から16週齢にかけて有意に拡大していた($p < 0.05$; 図9)。

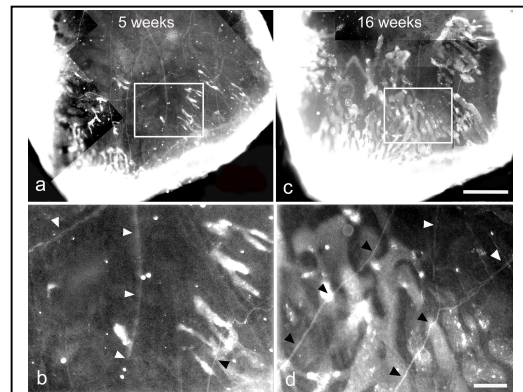


図9：硬膜におけるTRPV1受容体陽性線維(a:5週齢，c:16週齢)。(b)および(d)はそれぞれ(a)(c)の部位の拡大を示す。白い矢頭はdiploic veinとの重複を認めない線維で黒い矢頭はdiploic veinとの重複を示す。

本研究は脳硬膜におけるTRPV1受容体の存在を明らかにした我々のデータにもとづき、頭蓋骨内のdiploic veinに注目しその週齢による変化とTRPV1受容体の関係を検討したものである。Diploic veinは、中硬膜動脈から静脈洞に流出する頭蓋内における血流のネットワークの一部に関与している。その存在は以前から知られているが経時的な変化については現在までほとんど検討されていない。本研究において我々は、マウス頭頂骨におけるdiploic veinの灌流域が5週齢(若齢期)から16週齢(成熟期)にかけて有意に拡大することを明らかにした。片頭痛発作は思春期に始まりその後徐々に発作回数が増加し、頭痛の程度が増強することが知られており、マウスにおけるdiploic veinの分布領域が類似の経時的変化を示したことは極めて興味深い。さらに片頭痛発作には頭蓋内の動静脈シャントの関与も示唆されている。これらの知見から我々が今回注目したdiploic veinは頭蓋内における動静脈シャントとして働き、経時的にそのサイズが変化することで片頭痛の病態に密接に関係している可能性が考えられる。また、本研究において我々は脳硬膜のTRPV1陽性線維と頭頂骨上の頭蓋内diploic veinの重複する部位が5週齢から16週齢にかけて増加することも明らかにした。TRPV1受容体は侵害刺激を伝達する受容体で外因性物質であるカプサイシンのほか酸や熱に対しても感受性を持つことが知られ

ている。またTRPV1受容体はATPなどの物質により興奮の閾値を低下させることも明らかにされている。これらより、硬膜に炎症などが生じた際にATPなどが放出され、TRPV1受容体の興奮性の閾値を低下させる可能性が考えられる。この結果diploic veinを介しTRPV1受容体に伝わった熱が、興奮性の閾値の低下したTRPV1受容体に反応し侵害刺激として伝達される可能性も推察される。以上の知見よりdiploic veinは片頭痛の病態の鍵を握る組織の1つであり、極めて重要な知見を提供するものと考えられる。

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3件)

1. Toriumi H, Shimizu T, Shibata M, Unekawa M, Tomita Y, Tomita M, Suzuki N. Developmental and circulatory profile of the diploic veins. *Microvascular Res.* 査読有, Vol 81, 2011, 97-102.

2. 清水利彦, 柴田 護, 鈴木則宏. 片頭痛の病態研究および治療に関する最近の知見. *臨床神経学*. 査読有, 51 巻, 2011, 103-109.

3. Shimizu T, Toriumi H, Sato H, Shibata M, Nagata E, Gotoh K, Suzuki N. Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat. *Brain Res.* 査読有, Vol. 1173, 2007, 84-91.

[学会発表](計4件)

1. 岩下達雄, 清水利彦. 脳硬膜侵害刺激による三叉神経節神経細胞における ERK リン酸化の経時変化. 第 51 回日本神経学会総会. 2010 年 5 月 20 日 東京.

2. 清水利彦. A 型ボツリヌス毒素の三叉神経節における TRPV1 発現への影響. 投与量による比較検討. 第 37 回日本頭痛学会総会. 2009 年 11 月 29 日 宇都宮.

3. Shimizu T. The effect of Botulinum toxin type A on the TRPV1 receptor in the trigeminal ganglion of the rat. *European Headache and Migraine Trust International Congress* Sep, 7, 2008 London, UK

4. 清水利彦. ラット脳硬膜における TRPV1 陽性神経の起源について. 第 48 回日本神経

学会総会 2007 年 5 月 18 日 名古屋

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

なし

(3) 連携研究者

なし