

## 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(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590732

研究課題名(和文) 三叉神経系の疼痛受容が皮質拡延性抑制発生に及ぼす影響の解析と機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism analysis of the trigeminal nervous system modification on cortical spreading depression.

## 研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質拡延性抑制(Cortical Spreading Depression: CSD)の発生閾値に影響を及ぼす要因について多角的な検討を加え、多くの成果を得た。特に、三叉神経支配領域にされたTrigger pointが三叉神経系に発現する疼痛receptorの刺激と同様、CSDの発生閾値を低下させることを示したことが、最も重要な成果と言える。これは、片頭痛や脳血管障害などの病態に対する介入経路としてTrigger pointを想定することを可能とするもので、物理療法を併用した新たな治療戦略の構築に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied about the factor which has an influence on an occurrence threshold of Cortical Spreading Depression (CSD), and got many outcomes. The most important outcome is that a trigger point on the trigeminal nervous territory made decrease of the CSD threshold, like a direct stimulus of the pain receptors. Our results suggest the trigger point has a potential to be an intervention pathway for these disorders. These outcomes contribute to building of the new treatment strategy for migraine, headache and the cerebrovascular accident.

研究分野：神経科学

キーワード：脳循環代謝 CSD 片頭痛 脳血管障害 trigger point 鍼灸 acupuncture 統合医療

### 1. 研究開始当初の背景

CSDは、1940年代にLeãoが報告したもので、健常動物の脳表にPotassiumを滴下、あるいは微小な物理的損傷を与える事により、刺激点を中心に同心円状にニューロンの一過性の過活動とそれに続く抑制波が、2~3 mm / 分という非常に緩慢な速度で大脳皮質全域に広がる現象である。これは、大脳の循環代謝機能を反映したのものとして当初より注目されたが、近年、CSDは片頭痛の前兆 (Aura) との相同性や、脳梗塞時の梗塞巣周囲から発する Peri Infarct Depolarization (PID) との相同性が示唆され、Neuro-vascular unit の解析に有用な現象として改めて大きくクローズアップされている。脳表に発生したCSDは、三叉神経節ニューロンの Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) のリン酸化を引起すことから、侵害刺激として受容されていると考えられており、片頭痛患者においては、これが三叉神経系の神経原性炎症や感作 (peripheral sensitization) を引き起こし、脳硬膜血管や脳表血管周囲の知覚過敏が惹起されて病態を形成していると考えられている。しかしながら、CSDを頭痛と関連付けたこれらの先行研究は殆どが健常動物を使用したものであり、複雑な中枢性・末梢性の感作が基盤にある片頭痛の、厳密な疾患モデルの確立には至っていない。このように片頭痛病態モデルの貧弱さが、本研究を着想した背景であり本研究の立案動機である。

### 2. 研究の目的

申請者は、15年の臨床経験を持つ鍼灸師であり、主に頭痛を専門に鍼灸治療に携ってきた。本年より、所属する慶應義塾大学神経内科の特別外来「神経疼痛疾患はり治療外来」担当も拝命している。鍼灸は、片頭痛に対して著効が知られる物理療法で、片頭痛患者の頭頸部に形成された有痛の筋硬結を刺鍼で消失させると、これに有意な相関をもって、片頭痛発作の頻度と重症度の低下が見られる。このような鍼灸に関わる先行研究と、申請者自身の鍼灸臨床の経験を通して、頭頸部筋硬結の様な末梢神経からの慢性的疼痛入力が、CSD発生閾値の低下と脳硬膜神経の過敏を惹起して、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。申請者は、前述の鍼灸臨床が示唆してきた、頭頸部の筋痛が片頭痛を増悪させる現象を確認するため、頭頸部三叉神経系(頰部: whisker pad)への慢性的疼痛付与(capsaicin投与)動物を作成して、CSD発生にどのような影響があるかを確認した。すると興味深いことに、頰部へCapsaicin皮下注射を慢性的に行ったマウスでは、controlマウスと比較してCSDの発生回数・持続時間ともに非常な増加を示し (Toriumi et al. IHC 2011, Berlin; 図1)、CSDの発生閾値も、慢性的疼痛付与マウスでは顕著な低下を見せていた (鳥海ら 第34回日本頭痛学会総会; 図2)。

また、同様の三叉神経系への疼痛付与モデルが、脳硬膜神経に及ぼす影響を確認するため、免疫組織学的検討を行ったところ、通常、硬膜全面にネットワーク状に観察される神経軸索(図1a)が、慢性的疼痛付与マウスの硬膜では、(図1b)の様に非常に細く貧弱なものになっていた。(図1c, d)の強拡大比較では、神経線維が消失し、線維を支持するシュワン細胞の顕著な膨化と不整が分かる。重要な所見として、この現象は刺激と同側のみに顕著で、非刺激側では見られなかった。これは頰部を支配する三叉神経第II枝(Whisker pad)に加えた慢性的疼痛刺激が、神経節から分枝して脳硬膜知覚を支配する硬膜神経に変性を惹起することを示すもので、しかもそれは刺激と同側のみに見られる反応であることから、三叉神経節のレベルで起こる三叉神経節に特異的な刺激の転換(conversion)である可能性が高い。近年、顎関節症などの研究でも同様の現象を示唆する報告が為されており、非常に重要な知見と考える。このように申請者は、現在までの研究で、頭頸部(三叉神経支配領域)への慢性的疼痛刺激が、CSD発生閾値の低下と、硬膜神経に対する神経障害的な反応を起こす事を明らかにしてきた。申請者が確立してきた、三叉神経系への疼痛付与動物を使用してCSD発生閾値変化・硬膜神経の変性評価を行う上記病態モデルは、より実際の片頭痛病態に近い有用なモデルとして、片頭痛治療薬および鍼灸などの薬剤以外の治療法の評価に使用できる、非常に有用なモデルとして提示できる。

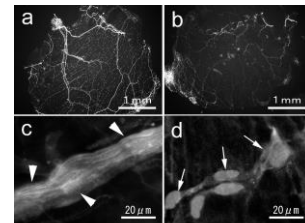


図1  
Control群(a)において明瞭に観察される硬膜の神経ネットワークが、Capsaicin投与群(b)では、不明瞭になっている。Control群の軸索を拡大観察すると、並走する多数の神経線維とそれを包むシュワン細胞(矢頭)が見られるが、Capsaicin投与群では、神経線維の消失と、顕著な形態変化を起したシュワン細胞(矢印)の散在が見取れる。

### 3. 研究の方法

(1) 頭頸部に特性の異なる疼痛刺激を加え、疼痛の種類と、CSD閾値低下作用および硬膜神経の変性強度の相関を明らかにするため、特性の異なる疼痛刺激を与える群を設定し、それぞれの群に対してCSD閾値計測および脳・硬膜の免疫組織学的検討を行う。必要に応じて電子顕微鏡観察も行う。(2) 頭頸部の異なる部位に疼痛刺激を加え、刺激の部位と、CSD閾値低下作用および硬膜神経の変性強度の相関を明らかにするため、刺激部位を変えた群を設定し、それぞれの群におけるCSD閾値計測および脳・硬膜の免疫組織学的検討を行う。必要に応じて電子顕微鏡観察も行う。(3) 疼痛刺激による硬膜神経変性のtime courseを単一動物の経時観察により明らかにするため、動物に恒久的な頭窓(Cranial Window)を作成し、これを通して

疼痛刺激で変性していく脳硬膜神経線維を *in vivo* で経時観察する。また同様に修復過程についても同様に経時観察する。

### **(1) 頭頸部に特性の異なる疼痛刺激を加え、疼痛の種類と、CSD 閾値低下作用および硬膜神経の変性強度の相関を明らかにする**

■ 動物(マウス)への各種刺激付与 近交系マウス C57BL/6J を使用し、下記①, ②, ③の動物群と対照群④⑤を各 9 匹作成する。①慢性的 TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) 活性化モデル: 頬部への慢性的 (6 日連続) capsaicin 投与 (皮下注射およびパッチ貼付)、②慢性炎症モデル: 頬部への CFA (complete freund's adjuvant) 隔日投与 (3 回/6 日間)、③慢性筋痛モデル: 頬筋への伸張性収縮の隔日付与により遅発性筋痛モデル (DOMS) 作成 (3 回/6 日間)、④無処置群、⑤頬部への生理食塩水皮下注射群。上記前処置を行った 5 群に対し下記の検討を行う。

■ CSD 発生閾値計測 CSD は、マウスの左頭頂葉より検出する。麻酔下、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左頭頂骨を水平に校正して固定する。水平位に固定した頭頂骨に直径 0.2mm の穿孔を行い、光感受性レジンを使用して D.C 電極を定位に固定する。また、レーザードップラー血流計プローブと、独自の KCl 溶液 (potassium) 投与用 cup を、同様に定位に作成する。Potassium 投与ルートの頭蓋骨における直径は 0.5mm、容量は 10 $\mu$ l に厳密に作成する。この後、濃度調整したカリウム溶液 (0.025M から 0.5M まで、0.025M 毎に 20 種類の濃度のカリウム溶液を作成する) を低濃度から順次 Potassium cup に 10 $\mu$ l づつ投与し、CSD が発生した時の potassium 濃度を、その動物の CSD 発生閾値とする。これらの計測情報は Power Lab に入力・記録する。実験中は、血圧ほか生理学的指標をモニターし、動物の状態を均一に保つ。CSD 計測後の動物については、4% PFA (Para Form Aldehyde) の経心灌流により固定を行い、脳硬膜、大脳、三叉神経節を採取して、免疫組織学的検討のためのサンプルとする。

■ 脳硬膜神経および脳表の免疫組織学的検討 上記 CSD を発生させた個体群の脳硬膜、大脳、三叉神経節サンプルを凍結切片および whole mount で免疫染色を行う。神経線維のマーカーとしては NF68, NF200, SMI32, PGP9.5 などを使用し、同時に神経線維に併走するグリアについて、Sox10, S100 $\beta$  などをマーカーとして検出し、その形態変化について検討する。また、当モデルの神経原性炎症における重要な Factor と考えられる CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide)、SP (Substans P) などのペプチドの発現についても、同様の検討で明らかにする。

■ 統計学的検討と不測の事態への対応 ①-⑤群において行った上記検討について、適切な統計学的処理を行い、次年度以降の研

究計画に反映させる。当該研究初年である上記計画については、記載された研究手技、手法については既に本年度までに確立されたものを敷衍するため、確実に遂行できると考えられるが、*in vivo* 実験が主柱となる計画であるため、予想以上に個体差が反映される結果となる可能性も若干予想される。この場合は各群 9 匹を予定している計画を変更し、各群 15 匹と母数を増やし、統計学的精度を上昇させて対処する。

### **(2) 頭頸部の異なる部位に疼痛刺激を加え、刺激の部位と、CSD 閾値低下作用および硬膜神経の変性強度の相関を明らかにする**

■ 動物(マウス)への各種刺激付与 下記①-⑥の動物群と対照群④⑤⑥を各 9 匹作成する。①三叉神経第 I 枝領域の慢性的疼痛モデル: 前額部への慢性的 (6 日連続) capsaicin 投与 (皮下注射およびパッチ貼付) 群および、②前頭筋への DOMS 作成群、③三叉神経第 II 枝領域の慢性的疼痛モデル: \*これについては、平成 24 年度計画で取得した data を使用する。④三叉神経第 III 枝領域の慢性的疼痛モデル: 下顎部への慢性的 (6 日連続) capsaicin 投与 (皮下注射およびパッチ貼付) 群および、⑤下顎筋への DOMS 作成群、⑥前額部への生理食塩水皮下注射群、⑦下顎部への生理食塩水皮下注射群。これら前処置を行った 7 群に対し、24 年度計画に挙げたと同様の CSD 発生閾値計測、および脳硬膜神経および脳表の免疫組織学的検討を行う。

■ 大脳皮質および脳幹部に対する電気生理学的検討 前述の各種疼痛付与モデルにおいて、それらの三叉神経系への疼痛侵害入力強度を、大脳皮質体性感覚野における細胞外記録と、脳幹部 *in vivo* blind patch clamp 法 (2) を施行して評価する。これにより、申請者が組織学的評価により得てきたこれまでの知見に、機能面からの評価を加える。

### **(3) 疼痛刺激による硬膜神経変性の time course を単一動物の経時観察により明らかにする**

■ Cranial window の作成 此処まで明らかにしてきた脳硬膜神経線維の変性につき、*in vivo* で生体での live 観察を行い、変性と再生の time course を明らかにする。麻酔下のマウス左頭頂骨に直径 3mm の円形窓を歯科用ドリルで作成し、これに同径に作成したガラスを歯科用セメントにより接着、頭蓋冠を密封し、恒久的観察可能な頭窓を設置する。この cranial window 設置動物に対し、24 年度計画で使用した 頭頸部に特性の異なる疼痛刺激を加えた群、および 頭頸部の異なる部位に疼痛刺激を加えた群 を、各 9 匹で設定し、刺激を加えた当日から連日、吸入麻酔下に顕微鏡下に動物を設置して、神経線維の形態変化を経時間観察する。最終年度には、ここまでに得られた成果を総括し、当該疾病モデルを使用した 治療的介入法 について検討していく。特に、GABA 作動系の片頭痛予防薬や、

鍼 (acupuncture) について、これらの治療法が当該モデルにおいて CSD 発生閾地変化および硬膜神経線維の再生過程に及ぼす影響について評価を行う。

#### 4. 研究成果

本研究の成果は、下記発表論文として結実した。特に、末梢神経刺激により脳表の CSD 閾値が変容をきたす現象を定量化可能としたことにより、今後前処置として末梢神経刺激が加わった大脳皮質のダメージに対する耐性の変化を評価することにより、片頭痛の予防治療や脳梗塞のリスク計測の可能性を示唆するもので、非常にインパクトのある成果と考える。

#### 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 12 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. Cephalalgia. (査読有) 2015 pii: 0333102415580100. [Epub ahead of print]

2. Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Osada T, Masamoto K, Kawaguchi H, Itoh Y, Kanno I, Suzuki N. Hyperperfusion counteracted by transient rapid vasoconstriction followed by long-lasting oligemia induced by cortical spreading depression in anesthetized mice. J Cereb Blood Flow Metab. (査読有) 35, 2015: 689-98. doi: 10.1038/jcbfm.2014.250.

3. Masamoto K, Takuwa H, Seki C, Taniguchi J, Itoh Y, Tomita Y, Toriumi H, Unekawa M, Kawaguchi H, Ito H, Suzuki N, Kanno I. Microvascular sprouting, extension, and creation of new capillary connections with adaptation of the neighboring astrocytes in adult mouse cortex under chronic hypoxia. J Cereb Blood Flow Metab. (査読有) 34, 2014 :325-31. doi: 10.1038/jcbfm.2013.201.

4. 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, :110-9. doi: 10.1016/j.neures.2013.08.001.

5. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion.

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. Neuroscience. (査読有) 248, 2013, : 345-58. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.010.

6. Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Masamoto K, Kanno I, Suzuki N. Potassium-induced cortical spreading depression bilaterally suppresses the electroencephalogram but only ipsilaterally affects red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries. J Neurosci Res. (査読有) 91, 2013, :578-84. doi: 10.1002/jnr.23184.

7. Itoh Y, Toriumi H, Ebine T, Unekawa M, Yamada S, Konoeda F, Koizumi K, Tomita Y, Suzuki N. Disturbance in neurovascular unit plays a pivotal role in pathophysiology of small vessel disease in the brain. Rinsho Shinkeigaku. (査読有) 52, 2012 :1365-8. PMID: 23196620

8. Toriumi H, Ebine T, Kuroi T, Mamoru S, Shimizu T, Suzuki N. Acupuncture; as a valuable tool for headache. Rinsho Shinkeigaku. (査読有) 52, 2012:1297-8. PMID: 23196597

9. 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 :367-78. doi: 10.1016/j.nbd.2012.07.010.

10. Kuroi T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Funakubo M, Iwashita T, Sato H, Koizumi K, Suzuki N. Alterations in microglia and astrocytes in the trigeminal nucleus caudalis by repetitive TRPV1 stimulation on the trigeminal nociceptors. Neuroreport. (査読有) 23, 2012 :560-5. doi: 10.1097/WNR.0b013e3283546242.

11. Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N.

Suppressive effect of chronic peroral topiramate on potassium-induced cortical spreading depression in rats. Cephalalgia. (査読有) 32, 2012 :518-27. doi: 10.1177/0333102412444015.

12. Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N.

Sustained decrease and remarkable increase in red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries associated with potassium-induced cortical spreading depression.

Microcirculation. (査読有) 19,

2012 :166-74. doi:

10.1111/j.1549-8719.2011.00143.x.

[学会発表] (計 0 件)

[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]

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

畝川 美悠紀 (Unekawa Miyuki)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 10548481

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

海老根 妙子 (Ebine Taeko)  
慶應義塾大学・医学研究科・大学院生