厚生労働科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）
分担研究年度終了報告書

皮質拡延性抑制に対する三叉神経の関与に関する研究

研究分担者　清水利彦　柴田 護　鳥海春樹　慶應義塾大学 医学部 神経内科

研究要旨

片頭痛発作の病態に関与するとされている皮質拡延性抑制（cortical spreading depression：CSD）と三叉神経の関係を検討した． CSDの三叉神経節におよぼす影響を検討するため，CSD誘発直後およびCSD発生30分後の三叉神経節におけるextracellular signal-regulated kinase（ERK）リン酸化の程度をコントロール群と比較した．CSD誘発30分後における三叉神経節のERKリン酸化レベルは，ERK1が1.82 ± 0.48，ERK2が2.97 ± 0.76とコントロール群およびCSD誘発直後（1.12 ± 0.45; ERK1，1.24 ± 0.63; ERK2）と比較し有意な増加を示した（$p < 0.05$）．またtrasient receptor potential vanilloid subfamily, member 1（TRPV1）受容体拮抗薬であるcapsazepineの髄腔内投与を行なった群では，三叉神経節におけるERKリン酸化レベルは，ERK1 が 0.23 ± 0.35，ERK2 が 0.35 ± 0.43とコントロール群と比較し有意に低値を示した（$p < 0.05$）．一方，三叉神経がCSD発生の閾値におよぼす影響を調べるため咬筋にトリガーポイントを咬筋に作成した動物においてCSDを発生させるKCl濃度を測定した．この結果トリガーポイントを咬筋に作成した動物ではCSDを発生させる閾値がコントロールと比較し低値を示した．本研究により我々はCSDが三叉神経節を活性化させるとともに三叉神経を介した刺激がCSDを発生させる閾値を低下させることを明らかにした．

研究分担者

清水利彦　慶應義塾大学医学部神経内科　専任講師
柴田　護　慶應義塾大学医学部神経内科　専任講師
鳥海春樹　慶應義塾大学大学院政策メディア研究科
特任准教授

A.研究の目的

皮質拡延性抑制（cortical spreading depression; CSD)は，片頭痛発作における前兆に関与していると考えられている．さらにCSDが三叉神経血管系の活性化に働き片頭痛における頭痛の発生にも重要な役割を果たしている可能性も指摘されているが統一した見解は得られていない．我々は，脳硬膜に侵害刺激の受容体であるtrasient receptor potential vanilloid subfamily, member 1 (TRPV1) 受容体が存在することを示し，さらにTRPV1受容体アゴニストのcapsaicinを投与すると三叉神経節においてextracellular signal-regulated kinase（ERK）のリン酸化が生じることを明らかにした．そこで今回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検討した．

一方，我々は三叉神経末梢の侵害刺激がCSDを発生させる閾値を低下させることも明らかにしている．そこで三叉神経に支配される咬筋にトリガーポイントを作成した動物においてCSDを発生させる閾値の変化の有無についても検討した．

B. 研究方法

1．CSDが三叉神経節におよぼす影響

⑴ Sprague-Dawleyラットの脳表に，デンタルセメントを用い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．

⑵ Sprague-Dawleyラットを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群に分けた．各群の動物の脳表に，デンタルセメントを用いDC電極を設置し，髄腔内投与30分後に1MのKClを脳表に滴下した．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．　三叉神経のCSD誘発に対する影響

C57BL6/J雄性マウス（8週齢・22〜25g）12匹を①コントロール群（当日CSD計測 n = 4），②コントロール群（2日後CSD計測 n = 4）および③トリガーポイント作成群（2日後CSD計測 n = 4）の3群に分類した．①〜③群のマウスをイソフルラン吸入麻酔下（1.2%/400ml/min）で定位固定器に固定し保温パット上に背臥位で静置した．両咬筋に絶縁鍼電極（ステンレス絶縁電気鍼, 株式会社 松葉）を経皮的に刺入し，③群に対して低周波通電器（LFP7000，株式会社 全医療器）で通電し，咬筋を強縮させた．咬筋の強縮により強く咬合したマウスの口をペアンで開口させ，伸張性収縮刺激を加えた．この操作を5分間に80回繰り返し，咬筋のトリガーポイントを作成モデルとした．①，②群については，麻酔下での絶縁鍼刺入のみで通電を行わず，コントロール群とした．①群の動物は前述の操作直後にCSD発生閾値を計測し②，③群の動物は慶應動物センターで2日間の飼育後CSD発生閾値を計測した．頭皮を切開し露出した頭頂骨にデンタルドリルを使用して直径0.5mmの微小孔を2つ形成した．微小孔の位置は，Bregma外方2 mm，尾側2mmおよび4mmに統一した．尾側2mmの微小孔に対してデンタルセメントを用いDC電極を設置し測定した．尾側4mmの微小孔は，デンタルセメント（UniFil LoFlo、株式会社ジーシー）で孔を囲ってCupを作成し，KCl投与ルートとした．この投与ルートへ0.1M〜0.5Mまで0.025M毎に濃度を振ったKCl溶液を低濃度のものから順に満たしていき，それぞれ5分間の静置観察の間にCSDが発生したKCl濃度をその動物のCSD発生閾値とした．

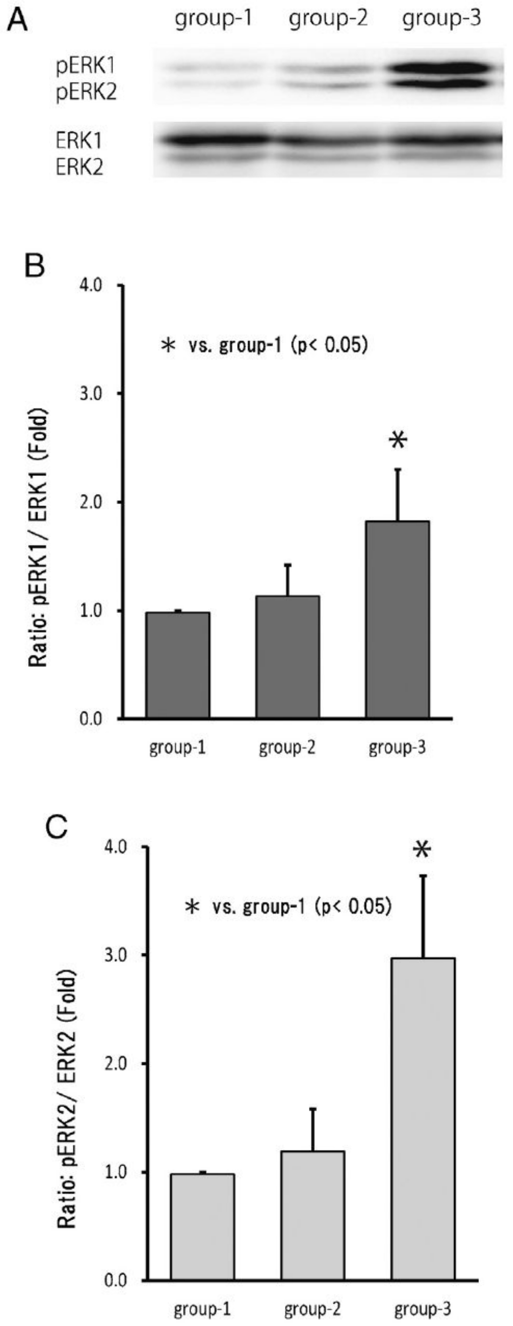
（倫理面への配慮）なお本研究は慶應義塾大学動物実験倫理委員会の承認を得て行われた．

C. 研究結果

1. CSDが三叉神経節におよぼす影響

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±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(図1；$p < 0.05$)．

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2；$p < 0.05$)．



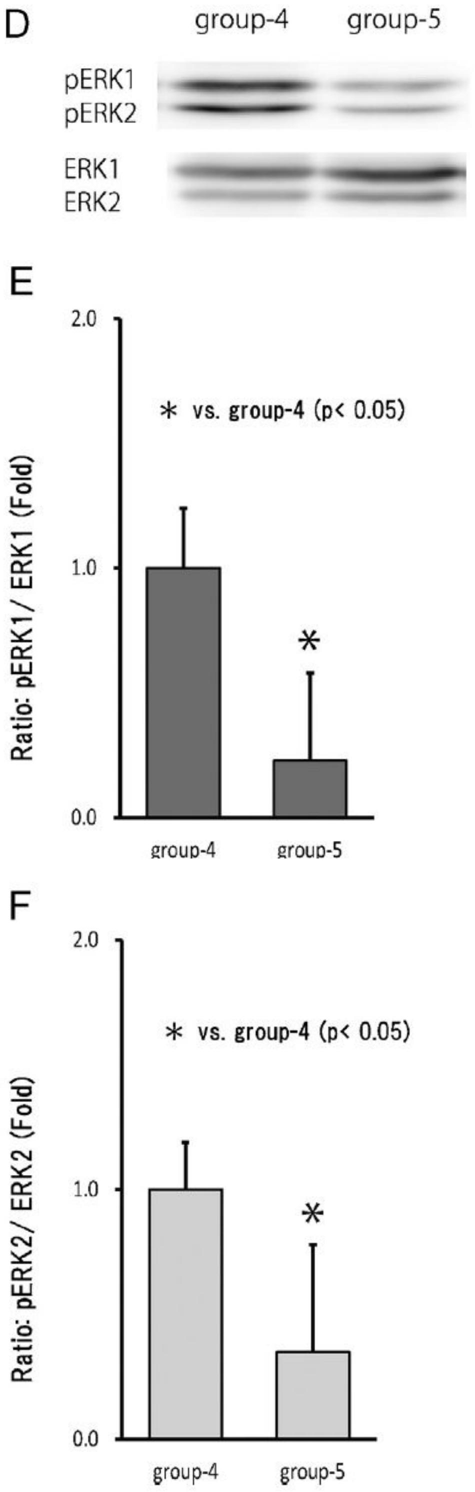


図１：CSDが三叉神経節におよぼす影響．CSD誘発30分後 （group-3）における三叉神経節のERKリン酸化レベルは，コントロール群（group-1）およびCSD誘発直後と比較し有意な増加を示した(p <0.05)．

図２：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リン酸化レベルは，コントロール群（group-4）と比較し有意に低値を示した(p <0.05)．

2.　三叉神経のCSD誘発に対する影響

①コントロール群（当日CSD計測）のCSD発生閾値は0.28 ± 0.01 M (mean±SD), ②コントロール群（2日後CSD計測）では0.28 ± 0.02 Mで両群間においてCSD発生閾値には有為差を認めなかった. ③トリガーポイント作成群（2日後CSD計測）のCSD発生閾値は0.21 ± 0.05 Mであり①コントロール群（当日CSD計測）と②コントロール群（2日後CSD計測）との間に有意な低下が観察された（図3；$p<0.05$）.

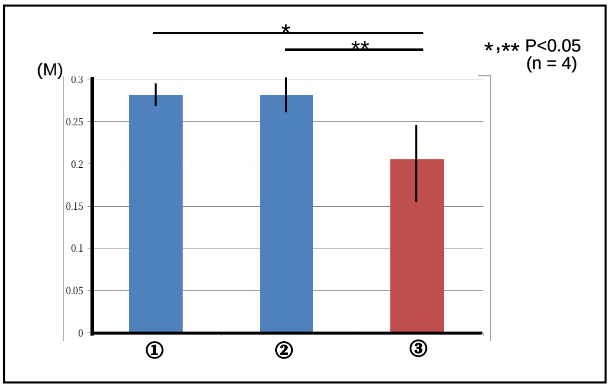


図3：三叉神経のCSD誘発に対する影響. ③トリガーポイント作成群のCSD発生閾値は①コントロール群（当日CSD計測）と②コントロール群（2日後CSD計測）と比較し有意な低下を示した（$p<0.05$）.

考察

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mitogen-activated protein kinase (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報告した. この実験系を発展させ本研究を行い，CSD誘発後三叉神経節においてERKリン酸化がおこり，さらにTRPV1受容体アンタゴニストがこの反応を抑制したことを明らかにした. 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. 片頭痛の発生機序としてCSDが惹起され，その後，三叉神経血管系の活性化がおこり頭痛が生じる可能性が考えられている. しかしCSDと三叉神経活性化の関係についていまだに統一した見解は得られていない. このため本研究により我々の得られた知見は片頭痛発生機序の病態に重要な示唆を与えるものと考えられる.

上記の結果に加え，本研究は咬筋に作成したトリガーポイントがCSD発生閾値を変化させることも明らかにした. すでに我々は，三叉神経終末に侵害刺激を加えるとCSD発生の閾値が低下することを示しており，これらの結果より頭頸部に形成されたトリガーポイントは三叉神経を介しCSD発生の閾値を低下させている可能性があると推察される. 片頭痛患者では頭痛発作があらわれる前に肩こりや後頸部筋のこりを自覚することがあり，このような症例に鍼治療を行うと，肩こりのみならず頭痛の改善も認められることが知られている. 本研究により得られた知見はこのような現象の解明に役立つ可能性を有しているだけでなく，鍼治療が片頭痛に効果を示す作用機序の検討にも重要な役割を有していると推察される.

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 2013; 77: 110-9.

2. Sato H, Shibata M, Shimizu T, Shibata S, Tori

umi 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. 2013; 248: 345-358.

2. 学会発表

1. **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.** 2013年11月15日 盛岡. 日本頭痛学会誌 40:333, 2013.
2. **滝沢 翼、柴田 護、萱間洋平、海老根妙子、清水利彦、鳥海春樹、鈴木則宏.** TRPV1刺激時の三叉神経脊髄路核におけるHMGB1発現誘導. 2013年11月15日 盛岡. 日本頭痛学会誌 40:334, 2013.
3. **滝沢 翼，萱間洋平，海老根妙子，鳥海春樹，岩下達雄，舟久保恵美，柴田 護，清水利彦，鈴木則宏．三叉神経領域カプサイシン刺激時のTRPV1陽性ニューロンにおけるJNKのリン酸化．第54回日本神経学会総会．**2013年5月31日東京.
4. 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. 16th Congress of the International Headache Society 2013 June 2013; Boston

5. Kayama Y, Shibata M, Takizawa T, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, Funakubo M, Iwashita T, Sato H, Suzuki N. Implication of TRPM8 in the TRPV1-mediated trigeminal nociception. 16th Congress of the International Headache Society 2013 June 2013; Boston.
6. 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 June 2013; Boston.
7. 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 2013; Boston.
8. **伊藤和憲,内藤由規,齊藤真吾．ラットを用いた伸張運動負荷による顎関節症モデル作成の試み．第42回慢性疼痛学会（東京），114，2013．**

F．知的所有権の取得

1.特許取得
該当なし
2.実用新案登録
該当なし
3．その他
該当なし