



Title	大脳皮質拡延性抑制動物モデルを用いた、片頭痛に対する女性ホルモン関与の検討
Author(s)	岡橋, 玲奈
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101552">https://hdl.handle.net/11094/101552</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏名 ( 岡橋 玲奈 )	
論文題名	大脳皮質拡延性抑制動物モデルを用いた、片頭痛に対する女性ホルモン関与の検討
論文内容の要旨	
【目的】	
<p>片頭痛は激しい頭痛発作を特徴とする疾患であり、発症メカニズムとして脳-髄膜に分布する三叉神経血管系及び大脳皮質拡延性抑制 (CSD) との関与が有力とされている。</p> <p>片頭痛患者は男性よりも女性が3倍近く多く、罹患年齢は思春期から閉経までがほとんどである。月経周期において女性ホルモンの血中濃度が急激に減少する月経前後に片頭痛が発症、増悪するといわれていることより、女性ホルモンであるエストロゲン、プロゲステロンの血中濃度変動が片頭痛増悪に関与していることが強く示唆される。</p> <p>本研究では、片頭痛動物モデルであるCSDモデルを用いて片頭痛に対する女性ホルモンの関与について検討を行った。</p>	
【方法】	
1. <u>女性ホルモン皮下投与前後の血中濃度測定</u>	
<p>8 週齢雌性 SD ラットを用い、全身麻酔下で卵巣摘出 (OVX) を行った。10 日後にエストロゲン (E) (200 <math>\mu</math>g/ml)、あるいはプロゲステロン (P) (50 mg/ml) を填入したシリコンチューブを作製し、OVX ラットの頸部皮下へ埋入した。埋入直前、埋入 6 時間後、1 日目、3 日目、5 日目、7 日目に採血し、CLIA 法 (化学発光免疫測定法) により血清濃度を測定した。</p>	
2. <u>女性ホルモン投与と CSD モデルラットの作製</u>	
<p>1 の方法で OVX ラットにエストロゲン (E 群)、プロゲステロン (P 群)、またはその両方 (E+P 群) を投与し、3 日後に以下の実験に用いた。シリコンチューブにセサミオイルを填入して埋入した群を対照群とした (V 群)。</p> <p>イソフルラン 2%と亜酸化窒素による全身麻酔下で気管切開を行い、左側大腿動脈に動脈圧測定用のカテーテルを留置した。筋弛緩薬 (5 mg) の腹腔内投与後、ベンチレータに接続し、脳定位固定装置に固定した。頭皮を正中切開し、頭蓋骨を露出させた。ブレグマとラムダの間の左側頭蓋骨に穴を開け、1 つは KCl 投与用として硬膜を剥離し、大脳皮質表面を露出させた。他の穴には 150 mM NaCl を満たした脳波測定用のガラス電極を皮質表面から 300 <math>\mu</math>m 下に挿入し、Ag/AgCl 基準電極を頸部の皮下に留置した。イソフルランを 1%に設定後、大脳皮質表面に 1 M KCl を浸した綿球を留置し、CSD を 1 時間に 5~7 個発生させた。</p>	
3. <u>三叉神経節へのエストロゲン受容体拮抗薬投与</u>	
<p>エストロゲンの作用部位として、エストロゲン受容体のサブタイプの 1 つである G タンパク質共役型エストロゲン受容体 (GPER) に着目した。OVX ラットに全身麻酔薬 (ブトルファノール、メデトミジン、ミダゾラム) を投与後、脳定位固定装置に固定した。頭蓋骨を露出し、ラムダ縫合から前方に 2.8 mm、側方に 2.7 mm、脳表面から 9 mm の位置に薬剤投与用カニューレを植立した。カニューレ植立 10 日後にエストロゲンあるいはセサミオイルを填入したシリコンチューブを皮下に埋入した。シリコンチューブ埋入直前、埋入後 1 日目、2 日目、3 日目の計 4 回 GPER 受容体拮抗薬 (G15) (80 <math>\mu</math>mol in 0.5 <math>\mu</math>l/回) を 2%イソフルラン麻酔下でカニューレより TG に投与した (E+G15 群、V+G15 群)。0.08% DMSO を投与した群を対照群とした (E+DMSO 群、V+DMSO 群)。その後、2 の方法で</p>	

CSD を誘発した。

#### 4. 免疫組織学的検討

全ての群で CSD 誘発 1 時間後に灌流固定を行い、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc)、上部頸髄 (C1-C2)、三叉神経節 (TG) を取り出した。

##### (1) ABC法

ミクロトームを用いて Vc、C1-C2 を含む厚さ 40  $\mu\text{m}$  の連続凍結横断切片を作製した。ABC 法にて c-Fos タンパクに対する免疫組織化学的染色を行い、光学顕微鏡にて陽性細胞数をカウントした。

##### (2) 蛍光染色

クライオスタットを用いて TG から厚さ 10  $\mu\text{m}$  の連続凍結水平断切片を作製し、スライドに貼り付けた。カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) に対する免疫組織化学的染色を行い、蛍光顕微鏡にて陽性細胞数をカウントし、全神経細胞数に対する CGRP 陽性細胞数の割合を算出した。

### 【結果】

#### 1. シリコンチューブ皮下投与によるエストロゲン、プロゲステロン血中濃度の経時的変化

E、P とともに血清濃度はシリコンチューブ埋入後 6 時間でピークとなり、その後、1 日目から 7 日目にかけて緩やかに減少した。

#### 2. c-Fos、CGRP 発現に対する女性ホルモンの影響

V 群と比較して E 群では、Vc、C1-2 で c-Fos 陽性細胞数の有意な増加を認めた。また TG における CGRP 陽性細胞数の割合も有意な増加を認めた。P 群、E+P 群は V 群と比較し、Vc、C1-2 における c-Fos 陽性細胞数、TG における CGRP 陽性細胞数の割合に差を認めなかつた。

#### 3. エストロゲンによる c-Fos、CGRP 発現增加に対する TG への G15 投与の影響

Vc、C1-2 における c-Fos 陽性細胞数は E+DMSO 群と比較して、E+G15 群では有意な減少を認めた。また、TG における CGRP 陽性細胞数の割合も E+DMSO 群と比較して、E+G15 群では有意な減少を認めた。

### 【考察および結論】

本研究において、エストロゲン、プロゲステロンを填入したシリコンチューブを皮下投与することで、ヒトの月経周期における女性ホルモンの変動をある程度再現できたと考えられた。

エストロゲン投与により、TG において片頭痛発作を誘発するといわれている CGRP 発現が増加したこと、三叉神経系痛覚伝導路の一次中継核である Vc、C1-2 において神経細胞の活性化の指標である c-Fos 発現が増加したことより、生理周期に伴う片頭痛発症メカニズムとしてエストロゲンの三叉神経系感作により、片頭痛発症時に CGRP 増加を介して痛みが増強されるのではないかと推測された。

さらに、末梢神経系である TG に着目し、エストロゲン受容体の 1 つである GPER の拮抗薬投与による c-Fos、CGRP 発現への影響について検討を行った。その結果、TG への G15 投与によりエストロゲン投与による CGRP 発現、c-Fos 発現が有意に抑制されたことから、エストロゲンは部分的に GPER を介して CSD による三叉神経系痛覚伝導路の活性化を増強している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 ( 岡橋 玲奈 )	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 准教授 工藤 千穂 副査 教授 古田 貴寛 副査 教授 加藤 隆史 副査 准教授 早田 敦子

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、片頭痛に対する女性ホルモンの関与に関して、片頭痛モデルラットにエストロゲン、プロゲステロンを投与して、その影響を免疫組織学的に検討したものである。

その結果、エストロゲンは、三叉神経節におけるGタンパク質共役型エストロゲン受容体を介して三叉神経節におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド発現、三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄におけるc-Fos（神経活動マーカー）発現に関与する可能性を見出した。

本研究の結果は、女性の月経周期に関連した片頭痛発症増悪メカニズムの解明の一助となるものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。