

片頭痛の生物学的マーカー

永田栄一郎

(臨床神経 2012;52:1014-1017)

Key words : 片頭痛, バイオマーカー, オミックス, α フォドリン

はじめに

器質的疾患ともなわれない、いわゆる機能性(慢性)頭痛の代表である片頭痛は、患者の数が非常に多いにもかかわらず致命的な疾患でないこと、また、動物などを使用する実験モデル作成が非常に困難なこともあり、その病態は未だに明確なものとは示されていない。現在、片頭痛の診断には2004年に国際頭痛学会が発表した国際頭痛分類第2版の片頭痛診断基準にしたがって診断をしている¹⁾。しかし、中には頭痛専門医の間でも診断に苦慮するケースがある。そこで、片頭痛患者に特異的に発現している分子(バイオマーカー)をみいだすことは、片頭痛診断率を向上させ、更には病態解明および適切な治療に役立つものと考えられる。現在、片頭痛のバイオマーカーは様々な面より検討されている²⁾。血液や髄液中のセロトニン³⁾⁴⁾や数々のニューロペプチド(サブスタンスP, CGRPなど)、オレキシン, matrix metalloproteinase (MMP)9などが報告されており、また、画像をもちいたものでは、fMRI, SPECT, PETやBOLD imagingなど、さらにGWASなどをもちいた遺伝子からの研究や電気生理学的な研究(脳波, VEPなど)などより、片頭痛患者に特異的な指標となるであろうと考えられるものが、片頭痛病態との関連をふくめて報告されているが、未だ片頭痛に特異的なマーカーとして確立されたものはない。

そこで今回、片頭痛診断のバイオマーカーの同定にマイクロアレイ法, SNPやプロテオーム解析など分子生物学的手法を導入し、そのバイオマーカーをもとに、片頭痛発作発生の機序の解明を目指すと共に、それを実際の診療の場においても応用可能な成果を目指すことを目的とする。このように患者検体をリソースとしたオミックス研究(ゲノム, トランスクリプトームおよびプロテオーム解析)で網羅的に原因分子を探索していくことにより、片頭痛の病態を解明していく。以下の研究に関しては本大学倫理委員会の承認済みである。

1. トランスクリプトーム解析(マイクロアレイ法)

国際頭痛分類第2版の診断基準に基づき前兆のある片頭痛患者7名(男性1名, 女性6名)と健常者7名の末梢血リンパ

芽球中よりRNAを抽出した。マイクロアレイ法によりmRNA発現量を測定し、2群間で有意に発現量に差がある遺伝子を抽出した。その結果15の候補遺伝子が抽出され(Fig. 1(A)), 中でも α フォドリンに注目し検討をおこなった。また、他の前兆のある片頭痛患者において α フォドリンのリンパ芽球中mRNA発現をreal time PCR法により検討したところ、健常者の発現量と比較して約1.4倍の発増加がみとめられた(Fig. 1(B))。また、片頭痛病態を反映しているといわれる現象に皮質拡張性抑制(cortical spreading depression (CSD))が良く知られているが、このCSDをおこしたマウスの脳において、 α フォドリン発現を検討した。その結果、CSDをおこした刺激側で α フォドリンの発現が2.5倍以上上昇していた⁵⁾。 α フォドリンは、細胞の裏打ちタンパク質の一つで、240kDaの分子量があり、タンパク質分解酵素であるカルパインやMMPなどにより分解される。とくにカルパインにより150kDaの断片化がおきるが、患者(前兆のある片頭痛および前兆のない片頭痛)血清の α フォドリンに対するウェスタンブロットをおこなったところ、緊張型頭痛患者や健常者と比較して α フォドリンのタンパク質発現量(全長:240kDa)と断片(150kDa)ともにタンパク質発現が上昇していた。これらの結果より、片頭痛診断バイオマーカーの一つとして α フォドリンがあげられるが、この分子が片頭痛病態にどこまで寄与しているか、あるいは片頭痛発作の結果を反映しているのかは今後の課題である。

2. プロテオーム解析

片頭痛発作時に特異的に変化するタンパク質につき、二次元電気泳動法をもちいて、タンパク質の質量分析をおこなった。2名の片頭痛患者において、発作間欠期と発作中3時間後に患者血清を採取した。発作中は、トリプタンなどをふくめ薬剤は内服していない、それぞれの末梢血を採取し、アルブミンを除去し、二次元電気泳動をおこなった。同一患者で、発作間欠期および発作中3時間後の二次元電気泳動にて差異のあるスポットを抽出し、それぞれのスポットにつき質量分析(マスマスペクトロメトリー)をおこなった。その結果、2例の患者より共通してApolipoprotein E (Apo E)の有意な上昇をみとめた。一般的にApoEは、アルツハイマー病などでその多型が

(A)

Gene Name	Common	Genbank	P-value	Fold Change	Description
NM_003127.1_PROBE1	SPTAN1	NM_003127	0.048774	2.083427643	spectrin, alpha, non-erythrocytic1 (alpha-fodrin)
414247.1_PROBE1		AK026459	0.048668	0.391947489	CDNA: FLJ22806 fis, clone KAIA2845
AK000596_PROBE1	HPCAL1	AK000596	0.046562	2.10813709	hippocalcin-like 1
347987.12_PROBE1	FLJ22649	AK026302	0.042768	0.4661192	hypothetical protein FLJ22649 similar to signal peptidase SPC22/23
AK025726_PROBE1		AK025726	0.035553	2.138285031	CDNA FLJ43891 fis, clone TESTI4009454
NM_016938.1_PROBE1	EFEMP2	NM_016938	0.035332	2.023052501	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
NM_016619.1_PROBE1	LOC51316	NM_016619	0.02407	0.419110074	placenta-specific 8
NM_006627.1_PROBE1	POP4	NM_006627	0.023363	0.386208402	POP4 (processing of precursor, S. cerevisiae) homolog
AF125158_PROBE1	ZNF281	AW953662	0.023276	0.347672114	zinc finger protein 281
NM_018349.1_PROBE1	FLJ11175	NM_018349	0.022757	2.691809495	hypothetical protein FLJ11175
NM_024695.1_PROBE1	FLJ13993	NM_024695	0.019032	2.111967302	synonyms: ERGL, CPLX3, CPXIII, FLJ13993, ERGIC-53L; complexinIII;
NM_000595.2_PROBE1	LTA	NM_000595	0.01817	2.135348588	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
NM_013262.2_PROBE1	MIR	NM_013262	0.014135	0.487514377	myosin regulatory light chain interacting protein
AF216077_PROBE1	COL27A1	AF216077	0.012575	0.353496284	collagen, type XXVII, alpha 1
NM_020129.1_PROBE1	PPL13	NM_020129	0.010933	0.29964059	placental protein 13-like protein

(B)

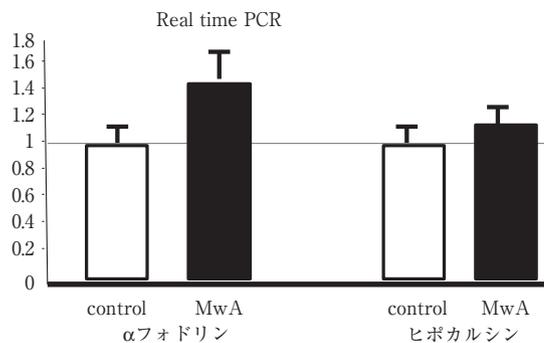


Fig. 1 (A) 片頭痛バイオマーカーの候補遺伝子.

片頭痛患者と健常者のリンパ芽球中遺伝子発現状況をマイクロアレイ法で確認したところ 15 候補遺伝子がみいだされた。7 遺伝子は片頭痛患者で上昇しており、8 遺伝子は低下していた。今回は、細胞骨格タンパク質の一つである α フォドリンに注目した。

(B) Real time PCR による α フォドリンの発現。

他の片頭痛患者においても、α フォドリンの発現が Real time PCR にて健常者と比較して上昇していた。

知られている (ApoE4ε)。また、ApoE は、一酸化窒素 (NO) の産生に関連しており、片頭痛病態における NO を介した脳内血管拡張に関与していると推察される。しかし、少数例であり、今後さらなる症例の蓄積が必要と考えられる。

3. ゲノム解析

最近われわれは、興味ある片頭痛の一家系を経験したので報告する。幼少時に原因不明の四肢末端で発症し、数時間で自然軽快してしまう。四肢の疼痛は、幼少時がもっとも激しいが、それにともない片頭痛も出現する。その家系をしらべたところ、GC 結合タンパク (ビタミン D 結合タンパク) 遺伝子の 21 番目のリジンがグルタミンに変異していることがわかった。この変異部位に関しては、種を越えて広く相同性がある部位である。また、変異部位は、ビタミン D 結合ドメインに位置していることを明らかとした。過去の報告では、片頭痛とビタミン D の関連性についての論文は散見されるが、現時点に

おいて、ビタミン D が片頭痛病態を説明しうる事実は明らかとなっていない。しかし、今後、片頭痛病態およびバイオマーカーとしての重要な key molecule となる可能性があり、さらなる研究を必要とする。

おわりに

片頭痛病態は、現在様々な方法により解明が試みられている。とくに最近では、GWAS などをもちいた大規模スタディが、各国の間でコンソーシアムを形成し、網羅的に遺伝子解析をおこなっている⁽⁶⁾⁽⁷⁾。しかし、その結果より、グルタミン酸に関連した遺伝子が候補遺伝子として挙がってきているが、研究対象や研究デザインを変えることで、その候補遺伝子がことなるものになってしまう現状を考えると、未だ確立した片頭痛の遺伝子は同定されていない。

頭痛研究は、動物モデルが作成困難で、人間を対象とした研究が中心となるため様々な研究の制限があり、明確な発生機

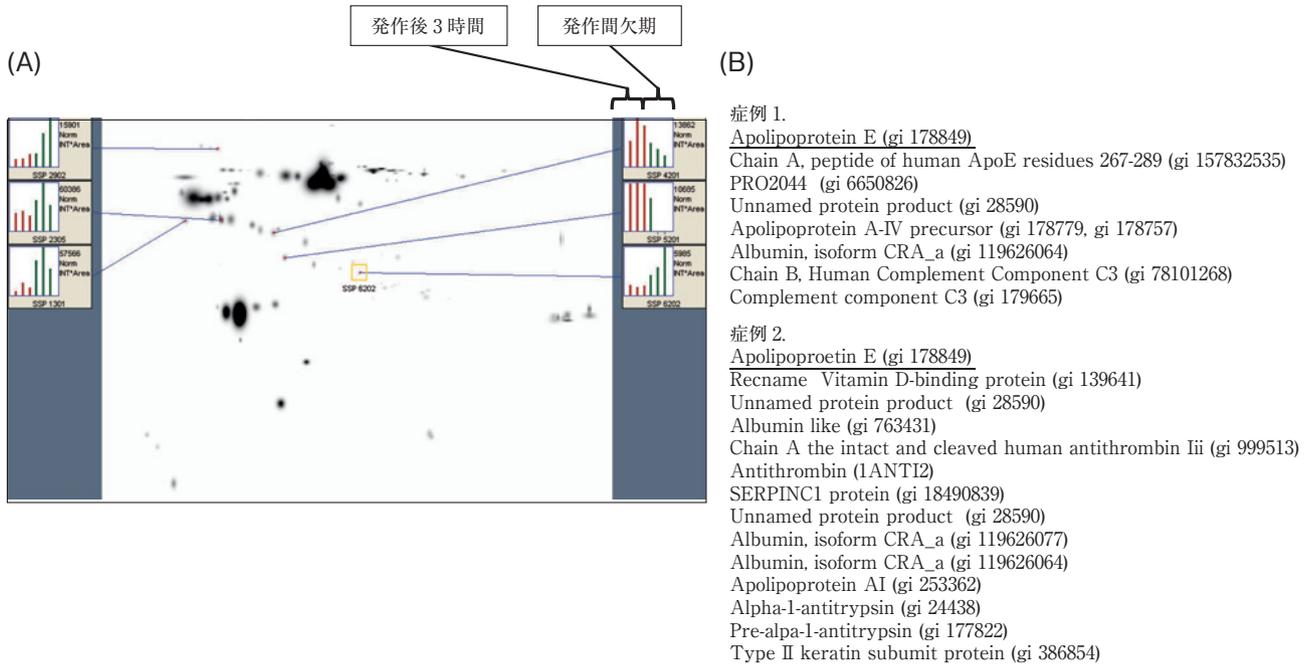


Fig. 2 (A) 2次元電気泳動法により、片頭痛患者の発作前、発作中の血液中タンパク質の発現差異を検討した。

(B) 2名の片頭痛患者において、Apolipoprotein Eが有意に発作中で上昇していた。

序が導きにくい。しかし、この問題を解決しなければ、頭痛研究の進歩はなく、今後、新たな手法や技術を駆使して、できるだけ片頭痛病態の本質に近づいていく努力が必要である。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

文 献

- 1) 日本頭痛学会・国際頭痛分類普及委員会. 国際頭痛分類第2版 (ICHD-II). 新訂増補日本語版. 医学書院; 2007. p. 44-56.
- 2) Loder E, Harrington MG, Cutrer M, et al. Selected confirmed, probable, and exploratory migraine biomarkers. *Headache* 2006;46:1108-1127.
- 3) Nagata E, Shibata M, Hamada J, et al. Plasma 5-hydroxytryptamine (5-HT) in migraine during an attack-free period. *Headache* 2006;46:592-596.
- 4) Nagata E, Hamada J, Shimizu T, et al. Altered levels of serotonin in lymphoblasts derived from migraine patients. *Neurosci Res* 2007;57:179-183.
- 5) Nagata E, Hattori H, Kato M, et al. Identification of biomarkers associated with migraine with aura. *Neurosci Res* 2009;64:104-110.
- 6) Anttila V, Stefansson H, Kallela M, et al. Genomic-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet* 2010;42:869-874.
- 7) Chasman DI, Schurks M, Anttila V, et al. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet* 2011; 43:695-699.

Abstract**Identification of biomarkers associated with migraine**

Eiichiro Nagata, M.D.

Department of Neurology, Tokai University School of Medicine

The diagnosis of migraine can be difficult, even for headache specialists, because some patients do not necessarily fulfill the International Headache Society criteria for migraine. Hence, reliable disease markers of migraine are required for accurate migraine diagnosis. We performed “Omics” analysis such as transcriptomics, proteomics, and genomics utilizing the lymphoblast cell lines and serum obtained from migraineurs. We verified that α fodrin, which was among the identified 15 genes that were differentially expressed in lymphoblasts originating from patients with migraine, increased after cortical spreading depression in an animal model. We also investigated the alterations of protein expressions induced by migraine attacks using proteomics analysis. Notably, in two migraineurs, the level of apolipoprotein E protein expression during attacks was significantly higher than pre-attack levels. Recently, we have found a novel family lineage with migraine. They also exhibit severe myalgia with arms and legs. GC binding protein which binds to vitamin D was identified as the product of the causative gene in this family. Our omics approach will contribute to a better understanding of migraine pathophysiology.

(Clin Neurol 2012;52:1014-1017)

Key words: migraine, biomarker, omics, α fodrin
