

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03000

研究課題名(和文) 脳内局所の人工的加温・冷却システムを応用した病態制御の試み

研究課題名(英文) Artificial control of disease progression by a new heating and cooling system

研究代表者

柴崎 貢志 (Shibasaki, Koji)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20399554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：34度で活性化する“温度センサーTRPV4”が脳の神経細胞に非常に強く発現していることを見いだした。そして約37度という脳内温度によりTRPV4が恒常的に活性化していることが神経細胞を円滑に動作させるキーであることを突き止めた。では、病気が生じた場合に脳内温度はどのように変化するのであろうか？そこで本研究では、てんかん病態における脳内温度の変化とTRPV4活性化の違い、神経異常興奮との関係を調べた。そして、TRPV4の異常活性化がてんかん病態を増悪化していることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：We have clearly revealed that a thermo-sensor TRPV4 (activated above 34 °C) is activated by physiological temperature in hippocampal neurons and thereby controls their excitability. Therefore, if local brain temperature could dynamically elevate depending on the neuronal activities, a thermo-sensor TRPV4 can enhance electrical excitability in neurons, and might lead to hyperexcitability. In this study, we focused on epilepsy, since it was caused by hyperexcitability of neurons. We generated a model of partial epilepsy in wild type (WT) or TRPV4KO mice, and measured electroencephalogram (EEG). The frequencies of epileptic EEG in WT mice were significantly larger than those in TRPV4KO mice. These results strongly indicate that TRPV4 activation is involved in disease progression of epilepsy. We expected that the disease progression enhanced hyperexcitability, and lead to hyperthermia in the epileptogenic zones.

研究分野：分子神経生理学

キーワード：TRPV4 TRPV2 脳内温度 てんかん 浮腫 グリア アストロサイト 網膜剥離

1. 研究開始当初の背景

報告者は、感覚神経終末や皮膚の角化細胞において痛み・温度受容に関わることが知られている温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルが中枢神経系にも強い発現を示すことを見いだした。学習・記憶の中心となる海馬における TRP チャンネルの発現を網羅的にスクリーニングし、体温程度の温度 (34 以上、J. Neurosci. 22: 5552-5562, 2002)、アラキドン酸の代謝産物 (Nature 424: 434-438, 2003)、低浸透圧刺激 (Cell 103: 525-535, 2000) により活性化される TRPV4 が海馬に高い発現を示すことを見いだした (J. Neurosci. 27: 1566-1575, 2007)。このことから、これまで痛み・温度受容に関わると考えられていた TRPV4 (J. Neurobiol. 61: 3-12, 2004) は、中枢神経系においては神経活動調節のような全く異なる役割を担う可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

本研究では、報告者が *in vitro* で得ている知見 (TRPV4 が脳内温度で活性化し、神経細胞の興奮性を維持している) が生体内で起こっているのかを確認し、個体レベルでの TRPV4 の学習・記憶に果たす役割を調べることを第一の目的とした。また、TRPV4 の阻害剤や活性化剤、あるいは脳内温度の人為的な低下が、脳機能にいかなる影響を与えるのかも検証し、本実験で得られる知見が臨床応用可能であるかを調べることを第二の目的とした。最終的に、脳内を人工的に加温・冷却することで TRPV4 活性を操作し、てんかんやパーキンソン病など難知性神経疾患の新たな治療法へとつなげることを目指した。そして、これら研究の複合的アウトプットとして、これまで皮膚において外界の温度センサーとして機能すると考えられていた TRPV4 が神経興奮性を向上させている分子メカニズムを明らかにし、新たな神経可塑性のメカニズムを見いだすことを目指した。

3. 研究の方法

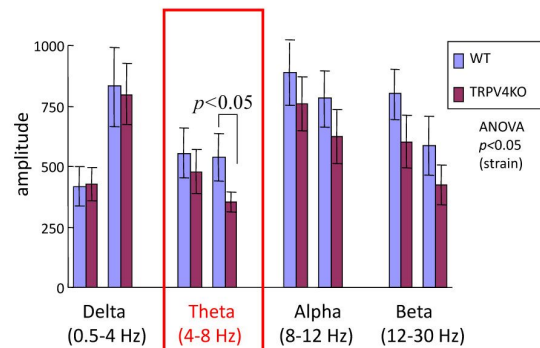
野生型と TRPV4KO マウスにおいて、大脳皮質の埋め込み電極を介したキンドリング刺激 (閾値以下の弱い電気刺激) を毎日与え、神経傷害なしの部分てんかん発作を誘発した。そのモデルマウスのでんかん原性域 (大脳皮質) に脳内温度可変プローブ (民間企業と開発済) を埋め込み (同時に脳波電極、脳内温度測定用のサーミスター、頸部に筋電電極の埋め込み手術も施す) 発作をモニターした。てんかんが誘発された際に (てんかん脳波とマウスの震えや筋電図でモニター) 脳内温度可変装置で病態部位の温度を TRPV4 の活性化温度域値である 34 以下にまで低下させた。この際の、痙攣の様子やてんかん脳波の大きさが野生型のみで有意に抑制されるのかを調べた。さらに、冷却処置を施したマウスと無処置マウスのでんかん原性域

から脳スライス標本を作製し、ホールセルパッチクランプ法により、記録細胞のシナプス電流や膜電位を測定すると共に、ガラス電極内に入れた Fura-2 を用いて、Ca²⁺-イメージングを行い、細胞内 Ca²⁺濃度の定量化を行った。これらの実験により冷却処置により、てんかん発作抑制効果は得られるけれども、神経細胞の生理学的応答性に異常化が起こらないのかを検証した。同時に、上記サンプルを解剖・形態学的に解析し、冷却処置により、神経細胞の形態に異常化が起こらないのかも調べた。

4. 研究成果

1) 脳内温度による TRPV4 の恒常的活性化

野生型と TRPV4KO マウスの脳波を比較したところ、海馬神経活動を反映するシータ波が、TRPV4KO マウスで野生型よりも有意に小さいことを見いだした (下図、Pflugers Archiv. 2015 に発表)。



2) 局所脳内温度の可変システムの開発

方法の項で述べた局所脳内温度可変プローブをマウス大脳皮質に埋め込み、自由行動下の海馬温度を冷却・加温するシステムを完成させた。WT マウスで大脳皮質の温度を TRPV4 の活性化温度閾値である 34 以下に低下させると神経興奮性が有意に低下した。しかし、TRPV4KO マウスの海馬の温度を 34 以下に低下した場合にはそのような変化は認められなかった。これらより TRPV4 は海馬温度エネルギーを電気信号に変換し、神経興奮に役立っていることが示唆された。

3) 脳冷却によるてんかん発作の抑制

部分てんかんモデルマウスのでんかん原性域に局所脳内温度可変プローブを埋め込み、てんかん発作中の脳冷却を行った。その結果、脳内温度を TRPV4 の活性化温度閾値である 34 以下に低下させることでてんかん放電の有意な低下が引き起こされた。TRPV4KO マウスを用いて行った場合にも、てんかん放電の低下が引き起こされた。しか

しながら、WT マウスの方が冷却によるてんかん放電抑制が大きいため、冷却による作用の大部分は脳内温度で恒常的に活性化している TRPV4 の抑制によるものであると考えられた。

4) TRPV4 阻害剤注入によるてんかん発作の抑制

部分てんかんモデルマウスでのてんかん原性域に TRPV4 阻害剤を脳室投与した。その結果、てんかん放電の有意な低下が引き起こされた。TRPV4KO マウスを用いて行った場合には、てんかん放電の低下が引き起こされなかった。これらの結果より、てんかん発作に対して TRPV4 阻害が有用な創薬ターゲットとなり得る可能性が示された。

5) 蛍光温度感受性プローブを用いた培養神経細胞局所の温度計測法確立

2012 年に東京大学薬学部の岡部博士らが蛍光温度感受性プローブを用いた蛍光寿命測定により、細胞内の温度分布を計測する方法を開発している (Nature Commun. 2012)。この方法を用いると1つのミトコンドリアの温度状態をも可視化出来る。報告者は東京大学薬学部の岡部博士・小山博士と共同で培養海馬神経細胞内の温度分布を測定する方法を確立した。その結果、神経細胞ごとに温度状態が異なることやスパイン単位でも温度にばらつきがあることが明らかになった。

6) 蛍光温度感受性プローブを用いた脳スライス標本の温度計測法確立

上述の蛍光温度感受性プローブを用い、脳スライス標本を用いて、細胞ごとの温度分布を調べる手法を東京大学薬学部の岡部博士・小山博士と共同研究で確立した (J. Neurosci. 2018)。

7) 脳浮腫には局所発熱に伴う TRPV4 異常活性化が関与する

脳浮腫は、細胞内外に水分が貯留し、脳が膨張して生じる。そのメカニズムの解析を行った。上述した脳スライス標本を用いた温度計測を正常標本と虚血性脳浮腫標本で行ったところ、脳浮腫標本では 2-3 の発熱が起っていることを突き止めた。さらに、この発熱が TRPV4 を異常活性化することで脳浮腫病態を悪化させていることを明らかにした。これらの結果より、脳浮腫治療標的として TRPV4 阻害薬が有用であることが示された。

8) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) に TRPV4 が発現している

TRPV4 は脳内においてニューロンやグリア細

胞の他、OPC においても in situ hybridization により発現が認められた。ホールセルパッチクランプ法及び細胞内 Ca²⁺イメージング法を用いた検討において、ラット初代培養 OPC に TRPV4 選択的アゴニストである GSK1016790A を投与することにより特異的な細胞応答が惹起されることが明らかとなった。さらに、TRPV4 刺激により Ca²⁺シグナリングと PKC 経路を介して OPC の増殖が促進することも示された。

9) 網膜剥離後の視細胞死はミュラーグリア浮腫に伴う TRPV4 異常活性化により生じる

マウス網膜下にヒアルロン酸注射して網膜剥離を惹起した。その 24 時間後 (視細胞死が起こるピーク) にミュラーグリアの形態変化を解析した結果、正常網膜群と比較し、網膜剥離群で有意なミュラーグリアの浮腫を認めた。TRPV4 は細胞膜上の伸展刺激を感知するセンサー機能を有するため、この細胞浮腫が細胞膜を伸展させ、TRPV4 を活性化している可能性が浮上した。そこで、マウス網膜からミュラーグリアを急性単離し、コンピューター制御下に 10 mmHg ほどのステップ陽圧刺激を負荷し、ホールセルパッチクランプ法にて、その電流応答を調べた。その結果、ミュラーグリアの TRPV4 は 10 mmHg の陽圧刺激に対して活性化を示し、機械刺激が増強するにつれてその活性化も増大することを明らかにした。さらに、ミュラーグリア TRPV4 活性化に伴いサイトカイン放出が起こり、これが視細胞死を引き起こしていることを突き止めた (J. Neurosci. リバイス中)。

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 17 件)

Hoshi T, Okabe K, Shibasaki K, Funatsu T, Matsuki N, Ikegaya Y, Koyama R. (2018) Ischemic brain injury leads to brain edema via hyperthermia-induced TRPV4 activation. **J Neurosci.** in press doi:10.1523/JNEUROSCI.2888-17.2018.

(査読有)

Ohashi K, Deyashiki K, Miyake T, Nagayasu K, Shibasaki K, Shirakawa H, Kaneko S. (2018) TRPV4 is functionally expressed in oligodendrocyte precursor cells and increases their proliferation. **Pflugers Archiv** in

press doi:10.1007/s00424-018-2130-3 (査読有)

Naruse M, Shibasaki K, Ishizaki Y. (2018) Microglial activation induces generation of oligodendrocyte progenitor cells from the subventricular zone after focal demyelination in the corpus callosum. **Dev. Neurosci.** in press doi: 10.1159/000486332. (査読有)

Yamamoto H, Kurachi M, Naruse M, Shibasaki K, Ishizaki Y. (2018) BMP4 signaling in NPCs upregulates Bcl-xL to promote their survival in the presence of FGF-2. **Biochem Biophys Res. Commun.** 496(2):588-593. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.090. (査読有)

Fujita T, Liu Y, Higashitsuji H, Itoh K, Shibasaki K, Fujita J, Nishiyama Y. (2018) Involvement of TRPV3 and TRPM8 ion channel proteins in induction of mammalian cold-inducible proteins. **Biochem Biophys Res. Commun.** 495(1):935-940. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.136. (査読有)

Jo AA, Noel NM, Lakk M, Yarishkin O, Ryskamp DA, Shibasaki K, McCall MA, Krizaj D. (2017) Mouse retinal ganglion cell signaling is dynamically modulated through parallel anterograde activation of cannabinoid and vanilloid pathways. **J Physiol** 595: 6499-6516. doi: 10.1113/JP274562. (査読有)

Fujita T, Higashitsuji H, Liu Y, Itoh K, Sakurai T, Kojima T, Kandori S, Nishiyama H, Fukumoto M, Shibasaki K, Fujita J. (2017) TRPV4-dependent induction of a novel mammalian cold-inducible protein SRSF5 as well

as CIRP and RBM3. **Scientific Reports** 7(1): 2295. doi: 10.1038/s41598-017-02473-x. (査読有)

Deftsu AF, FILLIPI K, Shibasaki K, Cheorghe M, Chiritoiu M & *Ristoiu V. (2017) CXCL1 and CXCL2 chemokines modulate the activity of TRPV1+/IB4+ cultured rat dorsal ganglia neurons upon short-term and acute application. **Journal of Physiology and Pharmacology** Vol. 68, No 3, 3038. doi: 10.1016/j.pain.2011.02.024. (査読有)

Sugio S, Nagasawa M, Kojima I, Ishizaki Y, Shibasaki K. (2017) TRPV2 activation requires interaction with the actin cytoskeleton and enhances growth cone motility. **FASEB J** 31: 1368-1381. doi: 10.1096/fj.201600686RR. (査読有)

Shibasaki K, Hosoi N, Kaneko R, Tominaga M & Yamada K. (2017) Glycine release from astrocytes via functional reversal of GlyT1. **Journal of Neurochemistry** 140: 395-403. doi: 10.1111/jnc.13741. < cover of the paper > (査読有)

Shibasaki K. (2016) TRPV4 ion channel as important cell sensors. **J Anesth** 30 : 1014-1019. doi: 10.1007/s00540-016-2225-y. (査読有)

Shibasaki K. (2016) Physiological significance of TRPV2 as a mechanosensor, thermosensor and lipidsensor. **J Physiol Sci** 66(5): 359-365. doi: 10.1007/s12576-016-0434-7. (査読有)

Shibasaki K, Sugio S, Takao K, Yamanaka A, Miyakawa T, Tominaga M & Ishizaki Y. (2015) TRPV4 activation at the physiological temperature is a

critical determinant of neuronal excitability and behavior. **Pflugers Archiv** 467(12):2495-2507. doi: 10.1007/s00424-015-1726-0. (査読有)

Iijima K, Kurachi M, Shibasaki K, Naruse M, Puentes S, Imai H, Yoshimoto Y, Mikuni M, Ishizaki Y. (2015) Transplanted microvascular endothelial cells promote oligodendrocyte precursor cell survival in ischemic demyelinating lesions. **Journal of Neurochemistry** 135(3):539-550. doi: 10.1111/jnc.13262. (査読有)

Naruse M, Shibasaki K, Ishizaki Y. (2015) FGF-2 signal promotes proliferation of cerebellar progenitor cells and their oligodendrocytic differentiation at early postnatal stage. **Biochem Biophys Res Commun** 463(4):1091-96. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.063. (査読有)

Kusakari S, Saitow F, Ago Y, Shibasaki K, Sato-Hashimoto M, Matozaki Y, Hirai H, Matsuda T, Matozaki T & *Ohnishi H. (2015) Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice. **Mol Cell Biol** 35(9):1557-72. doi: 10.1128/MCB.01339-14. (査読有)

Shibasaki K, Tominaga M, Ishizaki Y. (2015) Hippocampal neuronal maturation triggers post-synaptic clustering of brain temperature-sensor TRPV4. **Biochem Biophys Res Commun** 458: 168-173. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.087 (査読有)

[学会発表](計 14 件)

柴崎真志、杉尾翔太、David Krizaj、石崎泰樹、松本英孝 ミュラーグリア

TRPV4 は細胞浮腫に伴い異常活性化し、網膜剥離病態を悪化させる 第 95 回日本生理学会 (2018 年 3 月 28 日 - 30 日) サポートホール高松・かがわ国際会議場、香川県、高松市

柴崎真志、杉尾翔太、David Krizaj、石崎泰樹、松本英孝 ミュラーグリア TRPV4 活性化は網膜剥離の病態悪化を引き起こす 第 40 回日本神経科学会(2017 年 7 月 20 日 - 23 日) 幕張メッセ、千葉県、千葉市

杉尾翔太、岩田裕子、小野勝彦、石崎泰樹、柴崎真志 メカノセンサーTRPV2 の活性化機構と軸索伸長を促す分子基盤 第 40 回日本神経科学会(2017 年 7 月 20 日 - 23 日) 幕張メッセ、千葉県、千葉市

柴崎真志、杉尾翔太、岩田裕子、小野勝彦、石崎泰樹 Mechanosensor function of TRPV2 is sensitized by high temperature region in growth cones, and promotes axonal outgrowth during development. 第 60 回日本神経化学会 (2017 年 9 月 7 日 - 9 日) 仙台国際センター、宮城県、仙台市

杉尾翔太、石崎泰樹、柴崎真志 TRPV4 accumulates in astrocytic mitochondria, and regulates its metabolic states. 第 60 回日本神経化学会(2017 年 9 月 7 日 - 9 日) 仙台国際センター、宮城県、仙台市

柴崎真志、脳内温度による神経活動の向上; 温度センサーTRPV4 の重要性 第 94 回日本生理学会 (2017 年 3 月 28 日 - 30 日) アクトシティ浜松、静岡県、浜松市 シンポジウム講演

柴崎真志、脳内温度による脳機能維持の分子基盤 Neurovascular Unit 学会 (2017 年 1 月 28 日) 慶應義塾大学、東京、信濃町 招待講演

柴崎真志、杉尾翔太、石崎泰樹、脳内温

度依存的な神経活動調節の分子機構
日本生理学会 札幌 (2016年3月
22-24日)

杉尾翔太、石崎泰樹、柴崎貢志、膜伸展
刺激感知センサー・TRPV2チャンネルによ
る神経回路形成の制御 日本生理学会
札幌 (2016年3月22-24日)

Shibasaki K, Sugio S, Nagasawa M,
Kojima I, Ishizaki Y. TRPV2
activation requires interaction with
the actin cytoskeleton and enhances
growth cone motility. Forum of
European Neuroscience (2016年7月2
日-6日) Copenhagen, Denmark

柴崎貢志、杉尾翔太、石崎泰樹、松本英
孝 網膜剥離後の視細胞死にはミユラ
ーグリアのTRPV4活性化が関与する 第
59回日本神経化学会 (2016年9月8日
-10日)福岡国際会議場、福岡県、福岡
市

杉尾翔太、石崎泰樹、柴崎貢志 メカノ
センサーTRPV2による神経回路形成の制
御 第59回日本神経化学会 (2016年9
月8日-10日)福岡国際会議場、福岡県、
福岡市

Shibasaki K, A novel subtype of
astrocytes expressing TRPV4 regulates
neuronal excitability via release of
gliotransmitters. 25th International
Society of Neurochemistry Meeting
(2015年8月23-27日) Cairns,
Australia

柴崎貢志、Involvement of TRPV1
activation in pain and itch sensation.
日本神経化学会 大宮 (2015年9月
11日-13日) シンポジウム講演

〔図書〕(計1件)

Redmon SN, Shibasaki K, Krozaj D, TRPV4,
encyclopedia of signaling molecule, 2nd
Edition, Sangdun Choi Ed., Springer
(2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/cs/sibaHP/shibasaki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴崎 貢志 (SHIBASAKI KOJI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 20399554

(2) 研究分担者

鈴木 倫保 (SUZUKI MICHIIYASU)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80196873

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()