

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10830

研究課題名(和文) 温度感受性タンパク (TRP) チャンネルを用いた脳低温療法機序の分子的解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism for focal brain cooling using transient receptor potential (TRP) channels

研究代表者

篠山 瑞也 (SHINOYAMA, Mizuya)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：70467794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脳梗塞に対する局所脳冷却技術の臨床応用を目指し、臨床研究を実施するための医学的根拠を収集した。その結果、局所脳冷却技術による抗脳梗塞効果の新規作用機序がTRPV4チャンネルであることを明らかにした。以下に本研究成果を列挙する。局所脳冷却処置によって脳梗塞モデルマウスの梗塞巣が減少した。局所脳冷却処置による梗塞巣の減少はTRPV4チャンネルの作動剤によって消失した。TRPV4チャンネルの遺伝子が欠損したTRPV4KOマウスでは局所脳冷却処置なしに梗塞巣が減少した。TRPV4チャンネル不活性化による抗脳梗塞作用は血液脳関門の破綻および脳細胞死を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

局所脳冷却技術の臨床応用は難治性てんかんの分野で先行しているが、これまでに脳梗塞に対する局所脳冷却処置の意義を報告した例は少ない。また、局所脳冷却技術の抗脳梗塞作用機序に関しても温度制御による代謝制御および既存治療法以外の観点から解明した例はほとんどない。脳温制御による脳梗塞の制御機構が明らかになれば、温度制御による中枢疾患の制御を薬剤に代替する研究へとパラダイムシフトすることが期待できる。血液脳関門の破綻を抑制し、かつ脳保護効果を持つ治療法および治療薬が臨床応用されれば、これまでの治療法で救えなかった脳梗塞患者を救うことが期待できる。その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a focal brain cooling as a new treatment of stroke. As a result, it was clarified that the novel mechanism of anti-ischemic effects by focal brain cooling is a temperature-sensitive TRPV4 channel. The followings are the highlights in this research. First, infarct volume in the ischemic model mice was decreased by TRPV4 antagonist or the treatment of focal brain cooling at 15 °C that inactivates TRPV4 channel. Second, the reduction of infarct volume by focal brain cooling was inhibited by TRPV4 channel agonist. Third, the infarct volume in TRPV4KO mice was decreased without the treatment of focal brain cooling. Fourth, the mechanisms of the anti-cerebral infarction were suppression of blood-brain barrier breakdown and brain cell death.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳梗塞 局所脳冷却 TRPV4チャンネル 細胞死 血液脳関門 TRPV4チャンネルアゴニスト TRPV4チャンネルアンタゴニスト

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳卒中は日本国内全死因の第4位であり、介護が必要となる原因の第1位である。脳梗塞は脳卒中の半数以上を占める。脳低温療法は、脳梗塞に対する治療法の一つであり、1954年のRosomoffらの報告を初めとして、これまで多くの有効性が報告されている。しかしながら、実際の脳低温療法は、全身冷却が必要なため低血圧や不整脈といった循環器系を始め、易出血性・易感染性といった低体温に起因する多くの合併症のリスクがあり、実臨床で普及していない。これら低温療法の問題点を解決する方法として“局所脳冷却技術”がある。当研究室では、局所脳冷却処置によって脳梗塞モデル動物の脳梗塞を抑制することを明らかにした(He et al, Brain Res, 2013. 1497:53-60.)。この抗脳梗塞作用の機序は多岐にわたるが、温度制御による抗脳梗塞作用を代謝制御および既存治療法以外の観点から作用機序を解明した例(Hoshi et al, J Neurosci, 2018. 38(25):5700-5709.)はほとんどない。

温度制御により抗脳梗塞作用が生じることから、研究代表者は新規作用機序の候補として各々のサブタイプに特有の活性化温度領域を有し、Ca<sup>2+</sup>等の陽イオンを非選択的に透過する温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャネルに着目した。本研究では脳温度領域で活性化し、抗脳梗塞作用が得られる冷却温度 15°C で不活性化し、かつ大脳皮質に発現している TRP Vanilloid 4 (TRPV4) に着目した。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞に対する局所脳冷却技術の臨床応用を目指し、臨床研究を実施するための医学的根拠を収集する。具体的には既存の脳梗塞治療法と差別化するために、局所脳冷却技術による抗脳梗塞効果の新規作用機序を明らかにすることを目的とした。

その新規作用機序として TRPV4 チャネルに着目し、以下のことを明らかにする。

- ① TRPV4 チャネルの拮抗剤が局所脳冷却処置と同様に抗脳梗塞作用を示すか
- ② TRPV4 チャネルの不活性化は局所脳冷却処置による抗脳梗塞作用にどの程度寄与するか
- ③ TRPV4 チャネルの不活性化による抗脳梗塞作用はどのような機序で生じるのか

また、これらの結果が TRPV4 チャネルを欠損した TRPV4KO マウスでは TRPV4 チャネル拮抗剤および局所脳冷却処置なしに抗脳梗塞作用を示すか明らかにする。

### 3. 研究の方法

TRPV4 チャネルの拮抗剤が局所脳冷却処置と同様に抗脳梗塞作用を示すか明らかにするために、大脳皮質に局限する局所脳梗塞モデルマウスを作製した。また、TRPV4 チャネルの制御による抗脳梗塞作用の機序を明らかにするために TRPV4 チャネルの制御による脳保護効果の有無と血脳関門の破綻に対する効果について検討した。研究手順は図1に示した。

#### (1) 局所脳梗塞モデルマウスの作製

局所脳冷却処置による抗脳梗塞作用を検討するためには大脳皮質に局限する局所脳梗塞モデル動物が必要となる。大脳皮質に局限する局所脳梗塞モデルラットは存在するが、マウスは報告がなかった。したがって、本研究では薬剤と光刺激によって血栓を誘発する Photochemically Induced Thrombosis (PIT) 法を用いて局所脳梗塞モデルマウスを作製した。

#### (2) 局所脳梗塞に対する効果

TTC (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride) によって呈色を示さない白色領域を梗塞巣とした。抗脳梗塞作用の有無は TTC 染色後の白色領域を指標に判定した。PIT 処置から 24 時間後に TTC 染色を実施した。

以下の4群間で梗塞巣を比較した。

冷却処置なし (non-cooling) 群：冷却デバイスを用いて梗塞部位の脳表温度を1時間 37°C に維持した。

冷却処置あり (cooling) 群：脳表温度を1時間 15°C に維持し、その直後、左脳室に 1% DMSO (溶媒) を投与した。non-cooling + TRPV4 拮抗剤群：脳表温度を1時間 37°C に維持し、TRPV4 拮抗剤である RN1734 を脳室内投与した。

cooling + TRPV4 作動剤群：脳表温度を 15°C に維持し、TRPV4 作動剤である GSK1016790A を脳室内投与した。

#### ① 局所脳梗塞に対する局所脳冷却処置の効果

3群の梗塞巣を比較した。偽処置 (Sham) 群：内頸静脈に光刺激による血栓誘発剤ローズベンガルを注入するが光刺激を実施しない。non-cooling 群：PIT 処置を実施するが脳表温度を1時間 37°C に維持した。cooling 群：脳表温度を1時間 15°C に維持する群とした。

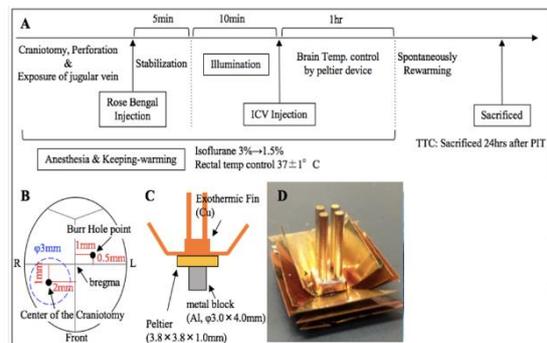


図1 A: 研究手順 B: 開頭場所および薬剤注入部位 C: 空冷式冷却装置の設計図 D: 冷却デバイス

## ② 局所脳梗塞に対する TRPV4 チャンネル不活性化の効果

non-cooling + DMSO 群と non-cooling + TRPV4 拮抗剤群との梗塞巣を比較した。また、局所脳梗塞に対する局所脳冷却処置の効果のうち、TRPV4 チャンネル不活性化がどの程度寄与しているかを明らかにするために、non-cooling + DMSO 群、cooling + DMSO 群および cooling + TRPV4 作動剤群の梗塞巣を比較した。

## ③ 局所脳冷却処置および TRPV4 チャンネル不活性化による抗脳梗塞作用機序の解明

### ① 細胞に対する効果

先行研究で報告されている脳冷却処置および TRPV4 チャンネル不活性化による脳細胞死の抑制効果が局所脳梗塞モデルマウスでも検出されるか検討した。細胞死の抑制効果については細胞死のうちプログラムされた細胞死（アポトーシス）を染色可能な TUNEL 染色キットを用いて判別した。

### ② 血液脳関門に対する効果

血液脳関門の機能が破綻すると通常、透過しない高分子化合物が脳実質へと漏出する。この原理を利用し、脳梗塞による血液脳関門の破綻および局所脳冷却処置または TRPV4 チャンネル不活性化による抑制効果の有無を判定した。高分子化合物であるエバンスブルーの内頸静脈注入から 1 時間後にリン酸緩衝液を用いて灌流し、脳実質に漏出したエバンスブルーを回収した。回収した脳組織片を 50% トリクロロ酢酸でホモジナイズ後遠心分離し、得られた上清に対してマイクロプレートリーダーを用いて吸光度 (620 nm) 測定を実施し、脳実質に漏出したエバンスブルーを定量化した。

## 4. 研究成果

### ① 大脳皮質に局限する脳梗塞モデルマウスの作製 (図 2)

PIT 処置により大脳皮質に局限する梗塞巣は増加した。この増加は 1 時間 15°C に維持する局所脳冷却処置により減少した。

これらの結果は、マウスを用いても PIT 処置により大脳皮質に局限する脳梗塞モデルを作製でき、脳梗塞に対して局所脳冷却処置が有効であることを示している。

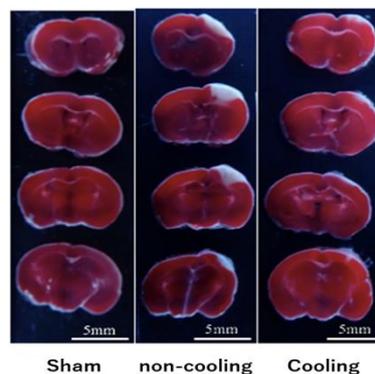


図 2 光塞栓法による脳梗塞と局所脳冷却の効果

### ② 脳梗塞に対する TRPV4 チャンネル不活性化の効果 (図 3)

PIT 処置により生じる梗塞巣は TRPV4 チャンネルの拮抗剤である RN-1734 によって減少した。

この non-cooling + TRPV4 拮抗剤群の梗塞巣は局所脳冷却処置 (cooling) 群の梗塞巣と差がなかった。

次に、TRPV4 チャンネルの不活性化が局所脳冷却処置による抗脳梗塞作用にどの程度寄与しているかを明らかにするために、non-cooling + DMSO 群、cooling + DMSO 群および cooling + TRPV4 作動剤群の梗塞巣を比較した。その結果、局所脳冷却処置後に TRPV4 チャンネルの作動剤である GSK1016790A を脳室内投与すると、局所脳冷却処置により減少した梗塞巣は局所脳冷却処置を実施しなかった non-cooling 群の梗塞巣と同程度となった。

これらの結果は、TRPV4 チャンネルの不活性化が局所脳冷却処置による抗脳梗塞作用の主たる経路であると考えられる。また、TRPV4 チャンネルの不活性化による抗脳梗塞作用は局所脳冷却処置による抗脳梗塞作用と同程度であったことから、局所脳冷却処置のみならず TRPV4 チャンネル拮抗剤も脳梗塞に対する新規治療法となり得る可能性を示した。

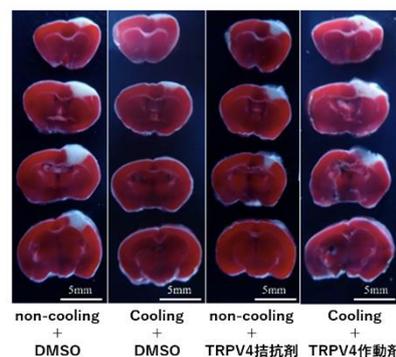


図 3 光塞栓法による脳梗塞 (白色部分) と TRPV4 チャンネル制御による抗脳梗塞

### ③ TRPV4 チャンネル不活性化による抗脳梗塞の作用機序解明

#### ① 細胞に対する効果

細胞死のうち、プログラムされた細胞死 (アポトーシス) の量は脳梗塞によって増加した。この脳梗塞によるアポトーシスの増加は局所脳冷却処置および TRPV4 チャンネル拮抗剤 RN-1734 の脳室内投与によって減少した。局所脳冷却処置群と TRPV4 チャンネル拮抗剤投与群のアポトーシス量に差はなかった。さらに、局所脳冷却処置による抗アポトーシス効果は TRPV4 チャンネル作動剤 GSK1016790A の脳室内投与によって消失した。

#### ② 血液脳関門に対する効果

野生型マウス

PIT 処置により生じた脳実質へのエバンスブルーの漏出は局所脳冷却処置および TRPV4 チャネル拮抗剤の脳室内投与によって減少した。また、局所脳冷却処置群と TRPV4 チャネル拮抗剤投与群のエバンスブルー漏出量に差はなかった。さらに、局所脳冷却処置によって得られた血液脳関門の破綻に対する抑制効果は TRPV4 チャネル作動剤の脳室内投与によって消失した。

#### TRPV4KO マウス

TRPV4 チャネルを欠損した TRPV4KO マウスは局所脳冷却処置および TRPV4 チャネル拮抗剤の脳室内投与なしに PIT 処置による脳実質へのエバンスブルーの漏出量を減少させた。

#### (4) 研究の総括と今後の展望

本研究の成果から、TRPV4 チャネルの不活性化が局所脳冷却処置による抗脳梗塞作用の主たる経路の一つであることが明らかとなった。この抗脳梗塞作用は血液脳関門の破綻に対する抑制および脳実質の細胞死抑制によるものであることがわかった。

脳梗塞に対する局所脳冷却技術および薬剤による TRPV4 チャネル制御を臨床応用するにはまだ超えるべき課題があるが、それらの課題を克服した場合、脳梗塞の新規治療法として期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 尚昌, 藤山 雄一, 森山 博史, 井上 貴雄, 貞廣 浩和, 岡 史朗, 末廣 栄一, 石原 秀行, 野村 貞宏, 鈴木 喜郎, 富永 真琴, 鈴木 倫保
2. 発表標題 PIT modelに対する局所脳冷却およびTRPV4 antagonistの脳保護効果
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 尚昌, 藤山 雄一, 森山 博史, 井上 貴雄, 貞廣 浩和, 岡 史朗, 篠山 瑞也, 末廣 栄一, 石原 秀行, 野村 貞宏, 富永 真琴, 鈴木 倫保
2. 発表標題 PIT modelに対する局所脳冷却およびTRPV4 antagonistの脳保護効果
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第78回学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	井上 貴雄  (INOUE Takao)		
研究協力者	森 尚昌  (MORI Naomasa)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森山 博史  (MORIYAMA Hiroshi)		