

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03124

研究課題名(和文) リハビリによる末梢神経再生の分子機構；メカノセンサーTRPV2の役割

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of peripheral nerve regeneration by rehabilitation

研究代表者

柴崎 貢志 (Shibasaki, Koji)

長崎県立大学・看護栄養学部・教授

研究者番号：20399554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞にかかる力を感知するイオンチャネル分子・TRPV2は損傷軸索の再生に関わる有力なメカノセンサーであると考えられた。そして、微弱な膜伸展刺激においてもTRPV2の活性化が認められることを突き止めた。予想通りTRPV2はメカノセンサーとして、微弱な機械刺激を感知する特性を備えていると考察された。リハビリ運動中には、損傷神経に付加的に外部からの力が加わるが、これを軸索上のTRPV2が感じ取り、神経回路の再生を促していることを突き止めた。これらの結果より、TRPV2はリハビリ時の神経再生に関わる有力なメカノセンサーであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が作製した感覚神経特異的なTRPV2KOマウス(TRPV2CKOマウス)を用いて、損傷神経の再生能を比較したところ、野生型(WT)マウスと比較して、TRPV2CKOでは軸索再生が著しく減弱することを見いだした。また、どうして軸索再生能が減弱するのか、その分子基盤を明らかにした。

これらの結果から、末梢神経の再生に対するリハビリやマッサージの効果に対して、TRPV2のメカノセンサー機能を指標に科学的に分子機構を述べるのが可能になった。この成果を応用することでより効果的なリハビリ手法の開発へとつながる。

研究成果の概要(英文)：The passive stretching-dependent axonal outgrowth occurs in our body. It has never been identified for a long time which molecules are the mechanosensors for it. We previously reported that TRPV2 was a mechanosensor channel which contributed axonal outgrowth in membrane stretch dependent manner. These results indicate that TRPV2 might be an important component for passive stretching, if TRPV2 can detect very weak mechanical stimulus. In this study, we examined whether TRPV2 can detect such very weak mechanical stimulus by a Ca²⁺-imaging method and a whole-cell patch clamp recording. We also examined whether the activation of TRPV2 by weak mechanical stimulus lead to the enhancement of axonal outgrowth by rehabilitation. Finally, we identified that TRPV2 had a potential to detect very weak mechanical stimulus, and the activation of TRPV2 can regenerate damaged axons.

研究分野：分子神経生理学

キーワード：TRPV2 メカノセンサー 神経再生 リハビリ 機械刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TRPV2 チャンネルは、成体の後根神経節 (DRG) の神経細胞に高発現し、侵害熱 (52 以上) 受容に関わる温度センサーチャンネルである (J. Neurobiol. 61: 3-12, 2004)。このチャンネルは世界で初めて明らかになった痛みの分子実体であり、その発見により痛み研究が飛躍的に発展し、有効な鎮痛薬の開発につながった。TRPV2 が低浸透圧刺激により活性化するという報告 (Circ. Res. 93: 829-838, 2003) が存在したため、低浸透圧刺激 細胞内への大量の水流入 形質膜にかかる膜伸展刺激というカスケードが存在し、TRPV2 は膜伸展刺激を感知するメカノセンサーとして機能するのではないかと仮説を立て検討を行った。その結果、TRPV2 は発達期神経の軸索・成長円錐に高発現しており、軸索伸長時に生じる膜伸展刺激により活性化し、細胞外から Ca^{2+} を流入させ軸索伸長を促進していることを見いだした (柴崎ら、J. Neurosci. 2010)。さらに、メカノセンサー TRPV2 活性化の分子機構を同定し (FASEB J. 2017 申請者の責任著者論文)、TRPV2 活性化が損傷軸索の再生に寄与する可能性を考察した。

2. 研究の目的

発達期のどの段階で TRPV2 チャンネルの発現が開始するのかに関しては全く研究されていなかった。そこで、研究実施者は、発達期マウス脊髄領域の温度感受性 TRP チャンネル発現様式を解析した。その結果、神経発生のごく初期過程 (マウスの胎生 10.5 日齢) において、感覚神経・運動神経の双方に侵害熱センサー・TRPV2 (52 以上の熱で活性化) が発現開始することを見いだした。子宮内の胎子が 52 以上の熱刺激に暴露されることは生理条件下では考えられないことから、他に内在性のリガンドが存在し、この分子を活性化することで発達期の神経分化の調節に役立っていることが示唆された。

TRPV2 が低浸透圧刺激により活性化するという報告が存在したため、低浸透圧刺激 細胞内への大量の水流入 形質膜にかかる膜伸展刺激というカスケードが存在し、TRPV2 は膜伸展刺激を感知するメカノセンサーとして機能するのではないかと仮説を立て検討を行った。その結果、TRPV2 は発達期神経の軸索・成長円錐に高発現しており、軸索伸長時に生じる膜伸展刺激により活性化し、細胞外から Ca^{2+} を流入させ軸索伸長を促進していることを見いだした。

これまでに様々な研究において、神経回路形成時に細胞膜にかかる膜伸展刺激を感知するメカノセンサー活性化を介して、神経回路形成はポジティブな制御を受けていることが報告されていた。しかしながら、このメカノセンサー分子の実体が長い間全く不明であった。上記の研究実施者の新たな知見により、TRPV2 が長い間分子実体が不明であった神経回路形成を制御するメカノセンサー分子である可能性が出てきた。TRPV2 は非常に Ca^{2+} 透過性の高い分子であり、成体では侵害熱刺激センサー (52 以上で活性化) として機能している。

そこで、TRPV2 が熱センサー・メカノセンサーとしてのデュアル機能を持つことに着目して、TRPV2 を効果的に活性化する手法を見いだすことを検討した。特に、熱による TRPV2 メカノセンサー感受性の増大を切り口に研究展開をすることで、TRPV2CKO マウスを用いて、世界中で申請者だけが可能な検証実験系を構築することを狙った。さらに、動物モデルを用いた末梢神経再生実験を WT と TRPV2CKO マウスを用いて行い、新たな温熱リハビリ器具やリハビリ効果を促進する薬剤の開発を視野に入れた応用研究も行った。最終的に全ての知見を統合して、より効果的なリハビリ手法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

申請者は既に 39 以上の熱によって TRPV2 メカノセンサー感受性の増大が起ることを電気生理学的解析で見いだしていた。また、1 細胞の温度イメージングにて再生中の軸索内部に他領域よりも 2 高いホットスポット (= 39) が局在することを見いだしていた。そこで、この 39 というホットスポット温度が TRPV2 を活性化し、軸索再生を促すのかを検証した。WT と TRPV2CKO マウスから培養 DRG 神経を調製し、これを 37 (生理学的温度) と 39 (ホットスポット温度) で培養し、その軸索長を定量比較した。TRPV2CKO マウス由来の培養神経と比較することで、再生中の軸索内部ホットスポット (39) が軸索再生に有用な生体シグナルとなっていることを明らかにした。さらに、37 (生理学的温度) 培養中に分担研究者の岡部が保有する IR レーザー照射装置を用いて軸索の一部だけを加熱し、TRPV2 活性化依存的に軸索再生が促進するのかも調べた。同様に、ニワトリ胚を用いたタイムラプスイメージングを行い、IR レーザー加熱により生体内においても軸索伸長が加速するのかを検証した。

これらの知見を土台に、生体における損傷神経の軸索再生時にメカノセンサー・TRPV2 がどのような生理機能を果たしているのかを明らかにしていった。末梢神経系ではミエリン形成をしている細胞がシュワン細胞であるため、中枢神経系では全く認められない損傷部位での軸索再

生が自発的に起こることが知られている。そこで、WT、TRPV2CK0 の成体マウス座骨神経を切断し、切断後3、5、7、14、28日目の時点で運動機能評価、筋電図測定を行った後にマウスを解剖し、切断軸索の再生度合いを調べた（WTと比較するとTRPV2CK0では再生が起こるものの、その再生度合いがWTよりも減弱すると予想された）。また、成体マウスの軸索損傷（座骨神経切断）に伴い、損傷3、5、7、14日目の時点で切断側の感覚・運動神経でTRPV2発現が有意な増加をするのかも調べ、軸索損傷時に生体防御反応としてメカノセンサー・TRPV2発現増強を起こすのかも確認した。次に、これらの座骨神経切断マウスを毎日4時間、強制運動装置（現在、地元の機器メーカーと開発）に取り付け、損傷足に強制的に運動を施した場合に、WTの軸索再生能が向上し、TRPV2CK0では再生能が低下しているのかを調べた。これらの実験により、メカノセンサー・TRPV2を運動という形で活性化することで軸索再生能を向上出来ることを証明し、リハビリ運動により末梢神経の再生が促進する分子基盤を明らかにした。

最終年度には、ここまでの研究で見出した「再生中の軸索内部ホットスポット(39)が軸索再生に有用な生体シグナル」という知見を応用した個体実験を行った。申請者が開発している臓器局所温度可変装置（柴崎ら、特許公開 特開 2012-055675）を応用した温熱器具を作製した。そして、座骨神経切断マウス（WTあるいはTRPV2CK0）を毎日4時間、強制運動装置のみ、あるいは強制運動装置+温熱器具に取り付け、損傷足に強制的に運動を施す。WTの温熱群では軸索再生能が著しく向上しているのかを調べ、細胞レベルの知見が個体におけるリハビリ効果に及ぼす影響を検証した。

次に、TRPV2アゴニスト投与によるリハビリ効果促進作用についても検証を行った。座骨神経切断マウス（WTあるいはTRPV2CK0）に対して、TRPV2アゴニスト・プロベネシドを胃内投与した後、毎日4時間、強制運動装置に取り付け、損傷足に強制的に運動を施す。WTのTRPV2アゴニスト投与群でのみ軸索再生能が著しく向上するのかを調べた。

4. 研究成果

再生中の軸索内部ホットスポット(39)が軸索再生に有用な生体シグナルとなっていることを明らかにした。メカノセンサー・TRPV2を運動という形で活性化することで軸索再生能を向上出来ることを証明し、リハビリ運動により末梢神経の再生が促進する分子基盤を明らかにした。また、リハビリ運動の代替として、TRPV2アゴニストの服薬が効果的であることも明らかにした。

TRPV2は神経細胞に発現し、発生期にはその神経回路形成を制御しているが、神経細胞以外の神経系細胞には発現していないのであろうか？この点を明らかにするために、脳内におけるTRPV2発現を解析した。その結果、TRPV2は神経細胞に加え、アストロサイトにも発現していることが明らかになった。アストロサイトに発現するTRPV2が機能的であるのかを調べるために、培養アストロサイトに人工的な侵害熱刺激（60度程度までの加温）の付加を行い、アストロサイトに興奮が惹起されるのかをカルシウムイメージング法を用いて調べた。その結果、培養アストロサイトは約50度以上の熱刺激により興奮すること、その興奮がTRPチャネル阻害剤 Ruthenium Redで阻害されることが明らかになった。これらの結果は、アストロサイトにも機能的なTRPV2が発現している可能性を強く示唆していた。そこで、アストロサイトにTRPV2が機能的に発現していることを直接確かめる実験を行った。培養アストロサイトを識別するためにGFAPプロモーター下にEGFPを発現するコンストラクトを作製し、これを細胞に遺伝子導入した。そして、緑色に光った細胞のみから電流応答を取ることで、GFAP陽性アストロサイトの性質を調べた。さらに遺伝子導入時に、pCAG(Mock)あるいはpCAG-ドミナントネガティブTRPV2変異体(DN-TRPV2)のどちらかを発現させた。これらの細胞に55度程度の熱刺激を行い、熱活性化電流の大きさを調べた。その結果、Mock群では外向き整流性の大きな電流が観察されたが、DN-TRPV2群ではその電流が消失していた。これらの結果から、運動神経・感覚神経以外に、アストロサイトにも機能的なTRPV2が発現していることが示された。さらにこの解析の中で、TRPV4もアストロサイトにRNA発現が認められること、34度以上の温刺激に伴うTRPV4活性化電流が観察されることも明らかになった。アストロサイトに発現するTRPV4の生理学的意義を解析したところ、脳内で神経細胞が活動し、アラキドン酸が産生すると、これを少数だけ存在するTRPV4陽性アストロサイトがキャッチ。するとグリア性伝達物質であるATPが放出することが判明した。このATPを介して、周りのアストロサイトへと次々に興奮信号が伝播し、それらのアストロサイトから別の伝達物質であるグルタミン酸が放出し、神経活動が増強することを突き止めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hosoi N, Shibasaki K, Hosono M, Konno A, Shinoda Y, Kiyonari K, Muramatsu S-I, Ishizaki Y, Hirai H, Furuichi T, Sadakata T	4. 巻 39 (32)
2. 論文標題 Deletion of class II ARFs in mice causes tremor by the Nav1.6 loss in cerebellar Purkinje cell axon initial segments.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 2002-2018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2002-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibasaki K, Yamada K, Miwa H, Yanagawa Y, Suzuki M, Tominaga M, Ishizaki Y	4. 巻 100
2. 論文標題 Temperature elevation in epileptogenic foci exacerbates epileptic discharge through TRPV4 activation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab. Invest.	6. 最初と最後の頁 274-284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0335-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibasaki K	4. 巻 100
2. 論文標題 TRPV4 activation by thermal and mechanical stimuli in disease progression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab. Invest.	6. 最初と最後の頁 218-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0362-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oda M, Yamamoto H, Matsumoto H, Ishizaki Y, Shibasaki K	4. 巻 100
2. 論文標題 TRPC5 regulates axonal outgrowth in developing retinal ganglion cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab. Invest.	6. 最初と最後の頁 297-310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0347-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimauchi-Ohtaki H, Kurachi M, Naruse M, Shibasaki K, Sugio S, Matsumoto K, Ema M, Yoshimoto Y, Ishizaki Y.	4. 巻 692
2. 論文標題 The dynamics of revascularization after white matter infarction monitored in Flt1-tdsRed and Flk1-GFP mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci. Lett.	6. 最初と最後の頁 70-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.10.057.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto H, Sugio S, Krizaj D, Akiyama H, Ishizaki Y, Gailly P, Shibasaki K	4. 巻 38
2. 論文標題 Retinal detachment-induced Müller glial cell swelling activates TRPV4 ion channels and triggers photoreceptor death at body temperature.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 8745-8758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0897-18.2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hoshi Y, Okabe K, Shibasaki K, Funatsu T, Matsuki N, Ikegaya Y, Koyama R	4. 巻 38
2. 論文標題 Ischemic brain injury leads to brain edema via hyperthermia-induced TRPV4 activation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 2888-2817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000486332.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohashi K, Deyashiki K, Miyake T, Nagayasu K, Shibasaki K, Shirakawa H, Kaneko S	4. 巻 470
2. 論文標題 TRPV4 is functionally expressed in oligodendrocyte precursor cells and increases their proliferation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pflügers Archiv	6. 最初と最後の頁 705-716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-018-2130-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita T, Liu Y, Higashitsuji H, Itoh K, Shibasaki K, Fujita J, Nishiyama Y	4. 巻 495
2. 論文標題 Involvement of TRPV3 and TRPM8 ion channel proteins in induction of mammalian cold-inducible proteins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 935-940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.136.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Shibasaki K, Matsumoto H, Sugio S, Krizaj D, Akiyama H, Ishizaki Y, Gailly P
2. 発表標題 Retinal detachment-induced Muller glial cell swelling activates TRPV4 ion channels and triggers photoreceptor death at body temperature.
3. 学会等名 GLIA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴崎貢志、杉尾翔太、Krizaj D、石崎泰樹、Gailly P.、松本英孝
2. 発表標題 Glial swelling evokes neuronal cell death through a temperature and mechano-sensor ion channel, TRPV4.
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 織田麻衣、杉尾翔太、岡部弘基、岩田裕子、小野勝彦、石崎泰樹、柴崎貢志
2. 発表標題 High temperature regions in growth cone enhance TRPV2-mechanosensor activity and axonal outgrowth
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shibasaki K, Matsumoto H, Sugio S, Krizaj D, Akiyama H, Ishizaki Y, Gailly P
2. 発表標題 Retinal detachment-induced Müller glial cell swelling activates TRPV4 ion channels and triggers photoreceptor death at body temperature.
3. 学会等名 ARVO annual meeting (Hawaii) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴崎貢志、杉尾翔太、岡部弘基、岩田裕子、小野勝彦、石崎泰樹
2. 発表標題 メカノセンサーTRPV2が軸索伸長を促す分子基盤
3. 学会等名 第41回日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉尾翔太、織田麻衣、石崎泰樹、柴崎貢志
2. 発表標題 グリア細胞においてはTRPV4活性化によりATP放出が惹起する
3. 学会等名 第41回日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 織田麻衣、杉尾翔太、岡部弘基、岩田裕子、小野勝彦、石崎泰樹、柴崎貢志
2. 発表標題 Mechanosensor function of TRPV2 is sensitized by high temperature region in growth cones, and promotes axonal outgrowth during development.
3. 学会等名 第61回日本神経化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴崎貢志
2. 発表標題 成長円錐内の高温部位がTRPV2活性化と軸索伸長を促進する
3. 学会等名 第91回日本生化学学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shibasaki K, Matsumoto H, Sugio S, Krizaj D, Akiyama H, Ishizaki Y, Gailly P
2. 発表標題 Retinal detachment-induced Müller glial cell swelling activates TRPV4 ion channels and triggers photoreceptor death at body temperature.
3. 学会等名 FAOPS（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugio S, Oda M, Ishizaki Y, , Shibasaki K
2. 発表標題 TRPV4 activation triggers ATP release from Müller glial cells.
3. 学会等名 FAOPS（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.researchgate.net/profile/Koji_Shibasaki 柴崎貢志の研究室 https://sun.ac.jp/researchinfo/kshibasaki/
--

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 分 担 者	岡部 弘基 (Okabe Kohki) (20455398)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ユタ大学			
ベルギー	ルーベン大学			