

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：27301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19418

研究課題名（和文）細胞内発熱と機械刺激による相乗的なイオンチャネル活性化

研究課題名（英文）Synergistic activation of ion channel by intracellular temperature and mechanical stimuli

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） 9,800,000円

研究成果の概要（和文）：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を膜伸展刺激+ホットスポット温度という形で活性化することで軸索伸長能を向上していることを証明し、発生期の神経回路形成の分子メカニズムについて新規の機構を見出した。

本知見を応用して、病態原因解明の研究にも取り組んだ。TRPV2の類縁分子であり、TRPV2同様にメカノセンサー、温度センサーとして機能するTRPV4に着目し、網膜剥離の病態悪化機構を解析し、そのメカニズムを解明した。この知見を応用し、新たな網膜剥離治療法を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本知見を応用して、病態原因解明の研究にも取り組んだ。TRPV2の類縁分子であり、TRPV2同様にメカノセンサー、温度センサーとして機能するTRPV4に着目し、網膜剥離の病態悪化機構を解析した。網膜剥離は強度の近視や糖尿病、ボクサーのように眼に強い刺激を受けることにより発症する。年間1万人に1人が発症すると考えられており、誰もが患者になる可能性がある失明を伴う重篤な疾患である。しかしながら、どのような分子メカニズムで病態悪化が進行するのかよく分かっていなかった。今回、研究実施者の研究からそのメカニズムの全貌が明らかとなり、新たな治療法を見出した。

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 under specific intracellular temperature, if TRPV2 can detect very weak mechanical stimulus at higher intracellular temperature. In this study, we examined whether TRPV2 can detect such very weak mechanical stimulus under specific intracellular temperature 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. Finally, we identified that TRPV2 had a potential to detect very weak mechanical stimulus only under specific intracellular temperature.

研究分野：分子神経生理学

キーワード：TRPV2 メカノセンサー 温度 網膜剥離 機械刺激 TRPV4 神経

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)。

2. 研究の目的

研究実施者は、メカノセンサーTRPV2 活性化の分子機構を同定した (FASEB J. 2017 申請者の責任著者論文)。さらに、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た。また、蛍光温度プローブを用いて、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) が局在することも見いだした。これらの背景事情を踏まえると、神経回路形成期の細胞内に 39 のホットスポットが点在し、この熱+膜伸展 (成長円錐運動により生じる) の相乗作用により TRPV2 が活性化し、神経回路形成を促進させている可能性が高いと考えるに至った。本研究ではこの可能性を検証し、生体内の TRPV2 活性化機構とその生理機能を解き明かすことを目的とした。

3. 研究の方法

生理学的温度 (37) よりも 2 高いホットスポット (39) において、TRPV2 の機械刺激感受性の亢進・活性化が軸索伸長に連動した膜運動をイオンの流れ・電流へとシグナル変換し、さらなる軸索伸長のドライビングフォースにしていることを証明する。WT と感覚/運動神経特異的 TRPV2KO (TRPV2CKO) マウスの DRG から組織片培養を行う。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する。WT のみで 39 環境で 37 環境と比較して、有意な軸索伸長促進が見られると予想される。TRPV2CKO マウス由来の培養神経と比較することで、軸索内部ホットスポット (39) が軸索伸長に有用な生体シグナルとなっていることを明らかにする。さらに、37 (生理学的温度) 培養中に研究強力者の岡部弘基博士 (東大・薬) 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る。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する。このニワトリ胚実験では、TRPV2 の過剰発現、TRPV2 の機能阻害 (J. Neurosci. 2010 にて使用済み) プラスミドの導入を組み合わせ、局所加熱により、TRPV2 の機械刺激感受性が亢進し活性化することが軸索伸長に結びつくことを *in vivo* で証明する。

上記の実験にて得られる知見を土台に、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く。上記実験で見いだす「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う。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する。そして、座骨神経切断マウス (WT あるいは TRPV2CKO) 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。そして、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の神経再生に及ぼす影響を検証する。さらに、TRPV2 アゴニスト投与による軸索再生促進作用についても検証を行い、TRPV2 が神経再生の新規創薬ターゲットとなり得ることを証明する。

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 を膜伸展刺激+ホットスポット温度という形で活性化することで軸索伸長能を向上していることを証明し、発生期の神経回路形成の分子メカニズムについて新規の機構を見出した。

本知見を応用して、病態原因解明の研究にも取り組んだ。TRPV2 の類縁分子であり、TRPV2 同

様にメカノセンサー、温度センサーとして機能する TRPV4 に着目し、網膜剥離の病態悪化機構を解析した。網膜剥離は強度の近視や糖尿病、ボクサーのように眼に強い刺激を受けることにより発症する。年間 1 万人に 1 人が発症すると考えられており、誰もが患者になる可能性がある失明を伴う重篤な疾患である。しかしながら、どのような分子メカニズムで病態悪化が進行するのかよく分かっていなかった。

今回我々は、網膜剥離時の細胞の変化に注目した。そして、網膜剥離を起こした場合、ミュラーグリア細胞が著しく膨れることを見いだした（3 倍に膨らむ）。網膜剥離が起った場合には、TRPV4 がこの細胞膨化を感知し、異常に活性化することを見いだした。さらに、体温下だからこそ、細胞浮腫による TRPV4 異常活性化が生じることを明らかにした。TRPV4 の細胞膨化感知能力は室温ではとても低い。ところが温度センサーゆえに、体温下では 37 °C の温刺激によって TRPV4 が緩く活性化している。ここに、細胞膨化に伴う膜伸展刺激が加わることで TRPV4 は強烈に活性化する（2 つのリガンドが加わることで、それぞれの活性化閾値低下が生じる synergistic 効果が起る）。その結果、この TRPV4 から大量の Ca²⁺が流入してしまう。これが炎症性物質・MCP-1 の放出を引き起こすことを突き止めた。そして、この MCP-1 が本来は存在しないマクロファージを網膜付近へと引き寄せてしまう。最終的には、この大量のマクロファージが視細胞（視覚情報処理に必須の細胞）を次々と殺して網膜組織を破壊してしまうことを突き止めた。さらに、ミュラーグリア特異的 TRPV4 遺伝子欠損マウスを作製し、この動物に網膜剥離を引き起こした場合には、視細胞死がほとんど起らないことを証明した。そして、正常マウスでは、網膜剥離時に TRPV4 阻害薬を投与しておけば、視細胞死を防ぐことが出来ることも突き止めた。今回の研究で、網膜組織がダメージを受ける一連のメカニズムを明らかにした。そして、TRPV4 の働きをブロックする薬剤を用いることで有効な治療法が確立出来ることが立証された。

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12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohashi K, Shibasaki K, Nakazawa H, Kunimasa R, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko R.	4. 巻 44(2)
2. 論文標題 Transient Receptor Potential Melastatin 3 Is Functionally Expressed in Oligodendrocyte Precursor Cells and Is Upregulated in Ischemic Demyelinated Lesions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 181-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00510	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 Matsumoto H, Mukai R, Hoshino J, Ishizaki Y, Shibasaki K, Akiyama H.	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Choroidal congestion mouse model: Could it serve as a pachychoroid model?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246115	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 Asao Y, Tobori S, Kakae M, Shibasaki K, Shirakawa H, Kaneko R.	4. 巻 529(3)
2. 論文標題 Transient receptor potential vanilloid 4 agonist GSK1016790A improves neurological outcomes after intracerebral hemorrhage in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 590-595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.103	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 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 Fik1-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 2888-2917
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14件(うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 柴崎貢志
2. 発表標題 High temperature region heats up TRPV2-mechanosensor function and axonal outgrowth
3. 学会等名 日本生理学会・日本解剖学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shibasaki K
2. 発表標題 Hippocampal TRPV4 regulates neuronal excitability by brain temperature
3. 学会等名 Forum of European Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴崎貢志
2. 発表標題 Glial cells inhibit neuronal excitation through TRPV4 activation by body temperature.
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2020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 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 柴崎貢志
2. 発表標題 脳内温度と神経活動の機能相関；TRPV4による調節
3. 学会等名 Thermal Biology Workshop
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 TRPV4 ion channels and triggers photoreceptor death at body temperature.
3. 学会等名 FAOPS (国際学会)
4. 発表年 2019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 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://sun.ac.jp/researchinfo/kshibasaki/ https://www.researchgate.net/profile/Koji_Shibasaki 柴崎貞志の研究内容 http://www.nips.ac.jp/cs/sibaHP/shibasaki.html
--

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

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			