

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06956

研究課題名(和文) 熱性けいれんの機序解明による中枢神経の高温感受性の理解

研究課題名(英文) A study in the temperature-sensitive system of the brain by the analysis of pathophysiology of febrile seizure

研究代表者

野村 貞宏 (NOMURA, Sadahiro)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20343296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：温度感受性チャネルであるtransient receptor potential (TRP)が熱性けいれんを抑制していると仮定した。Wild type マウスとTRPM8KOマウスの熱性けいれんモデルを作成し、脳温変化と発作閾値を比較した。TRPM8チャネルを有するwild type マウスはそれを有しないマウスよりも環境温の上昇時に直腸温の上昇を抑制し、直腸温の上昇時に脳温の上昇を抑制し、脳温の上昇時にけいれん発作を抑制していることが判明した。TRPM8作動薬にも熱性けいれん抑制効果が見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低温～平熱域に加え、平熱～高温域でもTRPチャネルが脳機能を調節している可能性が示唆された。熱性けいれんの機序の一部が解明され、治療薬開発の可能性が現れた。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that a transient receptor potential (TRP), the temperature sensor channel, inhibited febrile seizure. Changes in brain temperature and seizure threshold against warming in wild type and TRPM8 knockout (KO) mice were compared. Wild type mice maintained better than TRPM8KO mice in rectal and brain temperature and seizure threshold. A TRPM8 channel agonist effectively inhibited high frequency oscillation immediately before febrile seizure. In addition to the effect in the hypothermic zone, TRP channels was found to control brain function in hyperthermia. It may be one of the mechanism of febrile seizure, and could suggest treatment option.

研究分野：脳神経外科

キーワード：febrile seizure TRP channel brain temperature knockout mouse

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)本研究の学術的背景、研究課題の核心をなす学術的「問い」

熱性けいれんは生後6ヵ月~5歳の間を生じる全般性強直間代けいれんで、乳幼児の2~14%もが経験する疾患である。発作の誘導にはインターロイキン1による神経細胞の過剰興奮、呼吸性アルカローシスによる神経細胞の興奮閾値低下の他、抑制性神経伝達物質であるGABAが乳幼児期においては興奮性に働くことも発生原因とされていた。GABAはCl⁻を細胞外へ流出させて興奮性に、細胞内に流入させて抑制性に働く。流出・流入は細胞内外のCl⁻濃度で決まる。細胞内Cl⁻濃度はK-Cl共輸送体アイソフォーム2(KCC2)で減少、Na-K-2Cl共輸送体アイソフォーム1(NKCC1)で増加する。幼弱な神経細胞はNKCC1が優位で細胞内Cl⁻が増加しており、GABA結合時はCl⁻が流出して神経細胞は興奮する、という仕組みである。熱性てんかんモデルではGABA濃度が上昇していることから、GABAが熱性てんかんの原因の一つとされる理由であった。

年齢依存性があり小児期に限って発生すること、体温上昇時に発生するものの、解熱剤は予防効果を持たないこと、発作発生後は高熱が持続しても24時間以内の再発を伴わないこと、てんかんを残す予後不良例があるとはいえ稀で、抗けいれん剤の継続服用は不要であること等、その特徴には上述の機序で説明できない点が多かった。

2. 研究の目的

我々は中枢神経機能が脳の温度によって変化することを研究してきた。全身低体温療法(32-34)によって脳代謝を抑制し脳圧亢進、脳灌流圧低下状態から脳を保護することができる。局所脳冷却療法(15-20)によって神経細胞の脱分極を抑制し、嫌気性代謝を抑制し、興奮性神経伝達物質の放出を抑制しててんかん発作を抑制できることを証明した。細胞膜に存在するtransient receptor potential (TRP) channelsの温度感受性機構に着目し、低温で作動するTRPA1、TRPM8チャンネルを活性化し、脳冷却療法と同様の効果を示した。解明した病態を治療に応用し、温度を利用した神経機能制御法「Thermal Neuromodulation」を確立しつつある。

我々の次なる研究目的は中枢神経系の高温に対する感受性を知ることである。すなわち、脳冷却時の脳波、脳循環、脳代謝、神経伝達物質、活動電位の変化が、高温域においても連続的に変化するのか、変曲点を迎えるのかを解明すべきと考えている。そのためにこの研究事業では熱性けいれんの機序に、脳低温時と同じくTRPチャンネルが関与しているか否かを調べる。具体的には低温域で作動するTRPチャンネルを持たないことが、熱性けいれんの原因となるという仮説を提唱する。ヒトの乳幼児年齢に相当するWild typeとTRPM8チャンネルKOマウスを用いて、それぞれに熱性けいれんを発症させ、環境温や体温の影響の差を観察する。

3. 研究の方法

(1)対象

Wild type マウス(生後10-14日齢の雄C57BLマウス)およびTRPM8KOマウス(同日齢)

(2)方法

マウスに体温計を留置し、加温によって体温が上昇し、痙攣が発生することを確認した。体温上昇はヒートランプを用いた高温チャンバーモデル法で行った。外気温(室温)を26-28に維持し、Wild type マウスをチャンバーに入れた。チャンバーはガラス製で、自由に動き回るスペースがあり、発作を観察することができる。直腸内とチャンバー内にそれぞれ温度センサーを

留置した。観察開始 20 分後、ヒートランプを当てチャンバー内を 43 度にしてマウスの体温を上昇させた。

Wild type マウスと TRPM8KO マウスを用いた。直腸温、脳温、脳波をモニタリングした。と同様に加温し発作閾値、頻度、程度を比較した。

Wild type マウスと TRPM8KO マウスに 1% DMSO または 1mM WS-3 (TRPM8 チャンネル作動薬) を皮下注した。と同様の実験を行った。

4 . 研究成果

高温チャンバーモデルによる熱性けいれんモデルを確立し、高い再現性で体温を上昇させ、発作を発生させることに成功した。

加温開始時の直腸温、脳温はいずれも 25 度であった。加温によって Wild type マウスの体温は経時的に上昇し、30 分後には直腸温が 43 度、脳温が 40 度になった。けいれん閾値は直腸温 38.5-40.2 度、脳温 36.0-38.8 度だった。TRPM8KO マウスは体温が上昇しやすく、Wild type マウスの直腸温が 40 度を過ぎた時に TRPM8KO マウスの直腸温は 42 度に達した。一方 TRPM8KO マウスのけいれん閾値は低く、直腸温 34.0-38.5 度、脳温 33.2-36.1 度だった。なお、各個体において発作が始まる時の脳温/直腸温比は Wild type では 0.94-0.97、TRPM8KO マウスでは一定で、0.97 だった。すなわち TRPM8KO マウスは直腸温の上昇時に脳温を低めに保つ働きがなく、発作閾値も低い事が証明された。一方発作が始まる前の低温域においては脳温/直腸温の関係は逆転し、Wild type よりも TRPM8KO マウスの方が体温に対する脳温は低かった。TRPM8KO マウスの脳は熱しやすく冷めやすいともいえる。加温を停止し、チャンバーの天井を室温下に開放すると発作は頓挫し、直腸温も減衰曲線を描いて低下した。発作後はしばらく動作を停止していたが呼吸停止例はなく、数時間後には回復した。

これらの発作が随意運動かてんかん発作かを鑑別するために、両者の脳波を測定した。Wild type, TRPM8KO マウスのいずれも、体動が激しくなった時は脳波異常も見られたことから、この運動は温熱の苦痛による逃避動作等ではなく、てんかん発作であることが確認できた。通常帯域の脳波測定と合わせて、脳波の高周波成分である High frequency oscillation も測定した。Wild type では First ripple が少なく、TRPM8KO マウスでは多かった。これは TRPM8 が欠損すると熱性けいれんが起こりやすい理由の一つと言える。

TRPM8 チャンネル作動薬 WS-3 は、Wild type マウスにおいて発作抑制効果も脳温上昇抑制効果も示さなかった。しかし脳波と同時に測定した high frequency oscillation (HFO) において、WS-3 投与群は fast ripple の振幅が有意に小さかった (-0.15 mV vs. -0.60 mV) ($p < 0.001$)。TRPM8KO マウスでも WS-3 は発作抑制効果も脳温上昇抑制効果も示さなかった。HFO fast ripple の振幅も抑制されなかった。これは、チャンネルがないところへ作動薬を効かせることはできないため当然の結果と言える。

以上の結果から TRPM8 チャンネルは環境温の上昇時に直腸温の上昇を抑制し、直腸温の上昇時に脳温の上昇を抑制し、脳温の上昇時に熱性けいれん発生を抑制し、直腸温の低下時に脳温の低下を抑制していることが判明した。TRPM8KO 作動薬には HFO を抑制し、熱性けいれん発作を抑制する可能性が見いだされた。TRPM8 チャンネルは体温よりも低温で作用を発揮するチャンネルである。この TRPM8 チャンネルが高温の時に作用を発揮する理由はまだ解明できていない。TRPM8 チャンネルの持つ温度感受性以外の作用が機能している可能性も考慮に入れ、研究を進める必要がある。

文献、あるいはモデル動物により熱性けいれんの定義が異なっていたが、それらの中から本研究における定義を定め、直腸温が 34 度を超えて上昇中で、10 秒以上の強直性または間代性けい

れんを認めるか、10 秒未満の同様の発作を 2 回以上認めるもの、にまとめた。当初は直腸温が 38.5 以上を 10 分間以上維持し 15 分が経過するまでに、という項目も加えていたが、TRPM8KO マウスでの発作を調べると、34 台でも体温が上昇中であれば発作を起こすことが判明し、この一節を削除した。これにより、観察者間による陽性陰性の差がない実験を遂行することが可能になった。ヒト幼児の熱性けいれんとマウスの熱性けいれんは発生条件がやや異なることが判明した。ヒトの熱性けいれんは体温が 38 付近と比較的低く、かつ正常体温から 39~40 に上昇する途中で発生することが多い。一方 Wild type マウスでは 38.5 以上が 10 分以上持続された後に 40 付近に達して発作に至った。TRPM8KO マウスは前述のように低い直腸温・脳温でも発作に至った。生物種間に大きな開きがあった理由は解明できていない。ヒトの熱性けいれんで発作に至るまでの高体温持続時間はこれまで不明であった。38 未満の幼児は発熱による症状を呈しにくいいため、平常時から持続モニターをしない限りは 38 付近でどの程度微熱が続いていたのかを知り得ないからである。本研究ではマウスで 10 分以上というデータが得られたので、これを参考にヒトでの研究を進めることが可能と思われた。

本事業はいったん終了するが、将来は体温を上昇させつつ興奮性神経伝達物質 Glutamate の細胞外濃度を測定する。これを Wild type マウスと TRPM8KO マウスで比較する。TRPM8 チャネルによる Glutamate 放出抑制が高体温時には障害されると考えており、TRPM8 チャネルが欠損することで、平熱時においても高熱と同じような脳環境にさらされることが原因と推測している。TRPM8 による熱性けいれんの機序が解明されたら、TRPV1 チャネルまたは TRPV2 チャネルの KO マウスを用いて、体温上昇の程度を Wild type マウスと比較する。ついで、体温上昇時の発作発生率、発作発生閾値、異常脳波の差、High frequency oscillation の差を比較する。予想される結果としては TRPV1KO または TRPV2KO マウスでは体温が上昇しやすく、平熱に近い体温でもけいれん発作を起こしやすく、脳波異常や First ripple も発生しやすい。これが証明できれば、高温時に機能を発揮する TRPV1, V2 チャネルが発熱時には Glutamate 放出を抑制し、発作を起こしにくくしていることと、一方発熱時に発作を起こしやすいマウスは TRPV1 または TRPV2 チャネルに何らかの異常があり、発作を抑制できないことという仮説が証明される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Moriyama H, Nomura S, Kida H, Inoue T, Imoto H, Maruta Y, Fujiyama Y, Mitsushima D, Suzuki M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Suppressive Effects of Cooling Compounds Icilin on Penicillin G-Induced Epileptiform Discharges in Anesthetized Rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Pharmacol	6. 最初と最後の頁 652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2019.00652.	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 He Y, Inoue T, Nomura S, Maruta Y, Kida H, Yamakawa T, Hirayama Y, Imoto H, Suzuki M.	4. 巻 59
2. 論文標題 Limitations of Local Brain Cooling on Generalized Motor Seizures from Unknown Foci in Awake Rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 147-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.oa.2018-0112.	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 Moriyama H, Nomura S, Imoto H, Inoue T, Fujiyama Y, Haji K, Maruta Y, Ishihara H, Suzuki M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Suppressive Effects of Transient Receptor Potential Melastatin 8 Agonist on Epileptiform Discharges and Epileptic Seizures.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Pharmacol	6. 最初と最後の頁 766-782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.766782. eCollection 2021.	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 Nomura Sadahiro, Inoue Takao, Imoto Hirochika, Sadahiro Hirokazu, Sugimoto Kazutaka, Maruta Yuichi, Ishihara Hideyuki, Suzuki Michiyasu	4. 巻 2
2. 論文標題 A focal brain-cooling device as an alternative to electrical stimulation for language mapping during awake craniotomy: patient series	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Case Lessons	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/CASE21131	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村貞宏、井本浩哉、井上貴雄、森山博史、鈴木倫保
2. 発表標題 脳冷却によるてんかん発作抑制の機序解明
3. 学会等名 第42回日本てんかん外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村貞宏、井上貴雄、井本浩哉、丸田雄一、貞廣浩和、梶原浩司、鈴木倫保
2. 発表標題 脳冷却装置を用いた術中言語機能マッピング
3. 学会等名 一般社団法人 日本脳神経外科学会 第77回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山博史、野村貞宏、井本浩哉、丸田雄一、土師康平、井上貴雄、鈴木倫保、石原秀行
2. 発表標題 細胞外グルタミン酸濃度調節を介したTRPM8チャネルの抗てんかん作用
3. 学会等名 第54回日本てんかん学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	森山 博史 (MORIYAMA Hiroshi) (40816633)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	

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
---------	---------