

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 1 3 日現在

機関番号：3 2 6 4 5

研究種目：若手研究

研究期間：2019 ~ 2023

課題番号：1 9 K 1 8 2 8 1

研究課題名（和文）TRPチャネルへの麻酔薬の作用機序解明を通して、新たな脳浮腫治療を探る

研究課題名（英文）Exploring new treatment of cerebral edema through elucidating the mechanism of action of anesthetics on TRP channels

研究代表者

高橋 奈々恵（Takahashi, Nanae）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：0 0 6 3 0 5 5 0

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）：TRPチャネル（transient receptor potential channels）は細胞膜上に存在するチャネルである。今回、脳細胞における年齢毎の特徴的な細胞膜の柔軟性の差、TRPチャネルの機能発現、麻酔薬の作用発現の差を認めた。また、この中でもTRPV4ブロッカーであるRN1734は虚血液暴露時早期に、大脳皮質の神経細胞の変形を抑制した。これらの結果は虚血早期におけるニューロンの収縮はエネルギー不足による脳組織内の水分分布変動による細胞間隙の水の貯留の受動的な反応であり、この反応に TRPV4および水透過チャネルであるアкваポリン4 が関与している可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チオペンタール療法から、麻酔薬の作用機序を解明することで、脳保護になることを模索してきた。なかでも、細胞膜上に存在するTransient receptor potential チャネル（TRPチャネル）に着目した。麻酔薬の細胞膜上の作用機序の着目した研究は非常に少ない。脳スライスを用いて、TRPチャネルを活性化させ、麻酔薬の作用機序に迫った。麻酔薬メカニズム解析を行うことは、脳内の未解決なチャネルや、アストロサイトも含む脳内ネットワーク機構を解明することにもなる。麻酔薬メカニズム解析から脳保護を探ることは、生体保護につながる。本研究は社会的還元性の大きい研究である。

研究成果の概要（英文）：TRP channels (transient receptor potential channels) are channels that exist on cell membranes. In the present study, we observed differences in the flexibility of cell membranes, the functional expression of TRP channels, and the expression of anesthetic effects in brain cells at different ages. Among these, RN1734, a TRPV4 blocker, inhibited neuronal deformation in the cerebral cortex. These results suggest that the contraction of neurons in the early phase of exposure to ischemic blood is a passive response to changes in water distribution in brain tissue due to energy deprivation and that TRPV4 and aquaporin 4, a water permeability channel, may be involved in this response.

研究分野：脳浮腫

キーワード：脳浮腫 脳保護 TRPチャネル

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

かつて、脳浮腫患者の救急処置として短時間型麻酔薬、チオペンタール投与が行われていた。しかし、その薬理学的根拠は未だ解明されていない。麻酔薬の作用は脳浮腫治療につながる可能性を探る。そこで、細胞膜上に分布する多様な刺激に反応するセンサーチャネルと報告されている Transient receptor potential (TRP) チャネルに着目した。ヒトでは 6 つのサブファミリー、27 チャネルで構成される膨大なチャネル群である。本研究では麻酔薬の細胞膜に対する作用メカニズム解明の手がかりを TRP チャネルへの作用を探ることを通して、多様な脳浮腫の病態を組織レベルで解析し、浮腫の種類に応じた臨床的管理法を探る。

## 2. 研究の目的

下記 2 点を目的とした。

### (1) 細胞膜へ麻酔薬がどのように作用するかを探る

低張液や虚血環境下での浮腫の機序から探索する。また、TRP チャネルの加齢に伴う発達過程、加齢に伴う変化についての研究は見当たらない。

今回 TRP チャネル群を低張液で活性化させた状態で低張液の浮腫発生に関わる TRP チャネル、また、これらチャネルの年齢毎の反応の差をみることを目的とした。

### (2) TRP チャネルの中からターゲットを絞り、虚血環境下で脳保護になり得るものを探る 虚血環境での薬物の作用をニューロン、アストロサイト、細胞間隙の主要な 3 点の動きを調べ、脳保護薬物を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ホルモン周期の関係ないオスのマウスを用い、(C57BL/6N)の脳スライスを作製し、酸素をバブリングさせた人工脳脊髄溶液を環流させ、細胞が生きたままの状態での測定を行った。低張液環境は、人工脳脊髄溶液を 3/4 に薄めることで作った。温度も一定に管理した。大脳皮質 (LCC) と海馬 CA1 領域(CA1) における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と細胞浮腫を同時測定した。脳スライス標本に蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 fura-2 で染色し、低張人液暴露時の脳細胞体積と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度をそれぞれ測定した。励起波長 : F340 nm / F380 nm を用いた。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高くなると F340 nm 励起の蛍光強度が上昇し、F380 nm 励起の蛍光強度が低下する。そのときの蛍光強度比をとると、色素の濃度、光源の強度、細胞の大きさ等に関係なく生体反応と連動して動くカルシウムイオン濃度が測定できる。細胞容量変化は、不動点となる励起波長 F360 nm / F360 nm を用いて測定した。この実験で用いた方法は、予備実験で独自に見出した方法である。

(2) (1)の結果から絞った TRPV4 を中心とした薬物を虚血環境においた脳スライスにさらして実験を行った。虚血環境は、正常人工脳脊髄溶液のグルコースを代謝されない糖に変え、

窒素でバブリングし、酸素濃度を低下させた状態で作った。あとは、と同様の方法で、蛍光指示薬に合わせた波長で虚血環境での薬物の虚血性浮腫の作用をニューロン、アストロサイト、細胞間隙の主要な3点について調べた。ニューロンは fura-2 染色、アストロサイトは薄い濃度の sulforhodamine、細胞間隙は Cellvue で染色し、それぞれの細胞容量の変化を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 「細胞膜へ麻酔薬がどのように作用するか」を目的にした成果

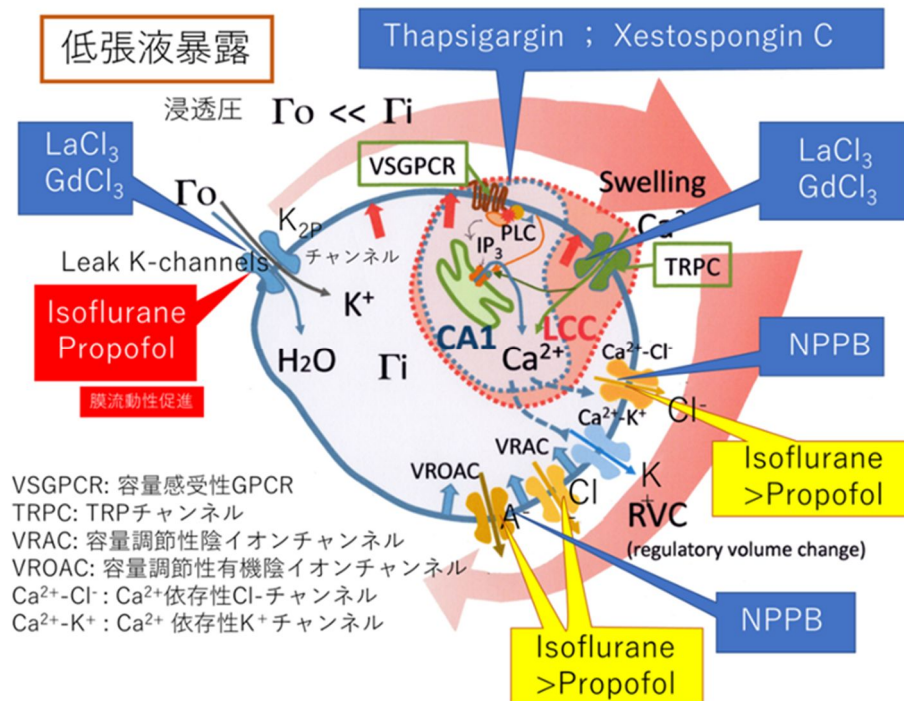
TRPV 抑制薬  $\text{LaCl}_3$  は大脳皮質の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を有意に抑制したが、海馬の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は抑制しなかった。低張液暴露による初期浮腫の発現は、浸透圧勾配に従う細胞外から細胞内への  $\text{H}_2\text{O}$  の流れ込みは、 $\text{LaCl}_3$  で抑制され、伸展感受性  $\text{K}_2\text{p}$  型 K チャンネルの関与が考えられた。

生体反応時に動く  $\text{Ca}^{2+}$  はどこからくるのか。の疑問を解決するべく、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を枯渇させる阻害薬 Thapsigargin (細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵阻害薬) および Xestospongine C ( $\text{IP}_3$  受容体阻害薬) を作用させた。この2つの薬物は、大脳皮質、海馬 CA1 領域、両部位の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を有意に抑制した。この結果は伸展感受性 GPCR の関与を示唆し、それを介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が細胞内のホメオスタシス機構発現の引き金であることを示唆する。イソフルランは伸展感受性 K チャンネルを活性化する報告がある。全身麻酔薬のイソフルランとプロポフォールは膜伸展による GPCR の活性化を共に抑制した。細胞が元の形に戻ろうとするホメオスタシスの力の抑制はイソフルランの方が強力であった。

この結果はイソフルランの方が TRP チャンネルに対して広範囲な作用を持つこと示唆している。陰イオンチャンネル阻害薬である NPPB の作用を作用させたところ大脳皮質と海馬の浮腫を促進し、 $\text{Ca}^{2+}$  上昇を抑制した。この作用にも伸展依存性 GPCR が関与していることを示唆する。

##### 年齢毎の TRP チャンネルの作用発現の差

TRP チャンネル群を低張液で活性化させた状態で年齢毎のチャンネルの反応の差をみた。幼齢脳ではほとんど  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は認められなかった。若令脳、成熟令脳から急激に  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇する細胞膜の発達がみられた。脳細胞浮腫に関しては、有意に年齢が大きくなるにつれて浮腫が起こりづらくなることが確認できた。細胞膜上に分布する TRP チャンネルの年齢毎による反応は有意に異なっていた。細胞膜の年齢毎の発達の差が TRP 作用発現に関わることが推測できる結果を得た。

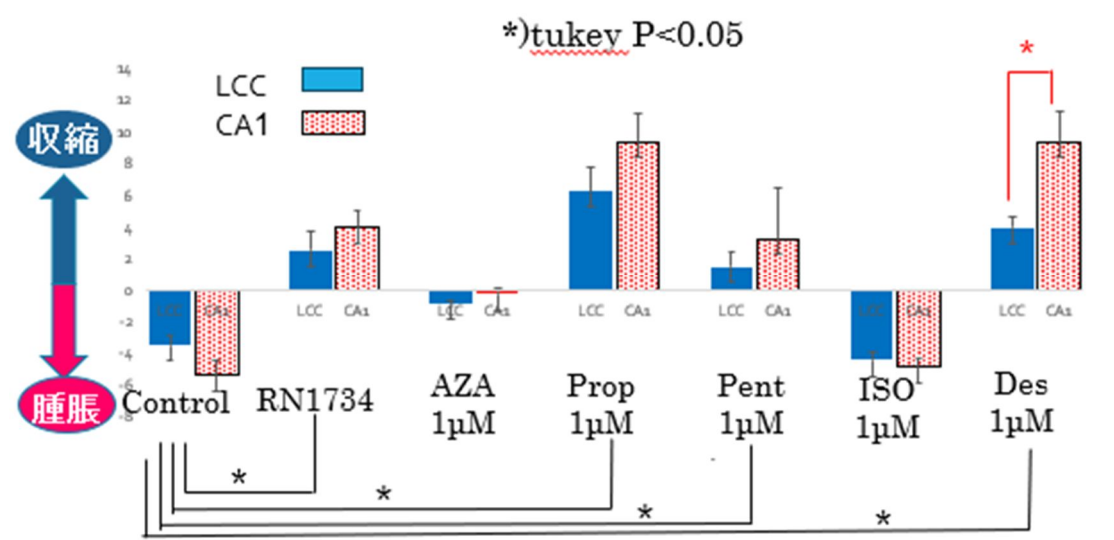


(2) 「TRP チャンネルの中からターゲットを絞り、虚血環境下で脳保護になり得るものを探る」を目的とした成果

虚血環境下での脳細胞はどのような形態になっているのか、各種蛍光染色液を変えることで、ニューロン、アストロサイト、細胞間隙の細胞容量変化をそれぞれ測定した。

マウス脳スライス標本に作用させた薬物について)

静脈麻酔薬プロポフォール  $1 \mu M$  (Prop)、チオペンタール  $1 \mu M$  (Pent)、吸入麻酔薬イソフルラン  $1 \mu M$  (ISO)、デスフルラン  $1 \mu M$  (ISO) そして、虚血時の脳細胞浮腫を感知する TRPV4 受容体ブロッカーの RN1734。また、脳血管拡張作用を併せ持つ Acetazolamide  $1 \mu M$  (AZA) についても検討をおこなった。大脳皮質 (LCC) と海馬 CA1 領域 (CA1) 両方で同時測定をおこなった。デスフルランは、LCC と CA1 の部位毎の作用発現に有意差が認められた。TRPV4 については、虚血時の細胞膜伸展がスイッチとなり、様々な脳へのダメージを与えることが推測されている。今回、TRPV4 ブロッカーRN1734 は細胞間隙の水分貯留を制御し、虚血時に脳保護的に働く可能性が示唆された。Acetazolamide  $1 \mu M$  の低用量では、脳血管拡張作用により、細胞間隙の水分がうまく排出されることによる脳保護が推測される結果を得た。血管上皮内細胞とアストロサイトに発現しているアクアポリン 4 が TRPV4 と連携して血管内に過剰な細胞外水分を送り込む仕組みに関与している可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Nanae Takahashi
2. 発表標題 マウス脳スライス標本における低張液暴露時のTransient receptor potentialの発達過程を脳細胞浮腫とカルシウム上昇から探る
3. 学会等名 NEURO 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋奈々恵
2. 発表標題 細胞間隙の水分制御が脳保護の一端となりうる
3. 学会等名 第49回日本歯科麻酔学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nanae Takahashi
2. 発表標題 Brain cell deformation of the cerebral cortex and hippocampus in mouse brain slices exposed to ischemic conditions
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society The 1st CJK International Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋奈々恵 , 工藤佳久 , 輪嶋善一郎
2. 発表標題 虚血条件に暴露されたマウス脳スライスにおける大脳皮質と海馬の脳細胞変形の検討
3. 学会等名 第67回 日本麻酔科学会
4. 発表年 2020年

1．発表者名 Nanae Takahashi, Toshio Itabashi, Yoshihisa Kudo
2．発表標題 Brain cell deformation of the cerebral cortex and hippocampus in mouse brain slices exposed to ischemic conditions
3．学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4．発表年 2020年

1．発表者名 高橋奈々恵，板橋俊雄
2．発表標題 マウス脳スライス標本における低張液暴露と虚血液暴露時の細胞間隙容量とそれに及ぼす影響因子
3．学会等名 第48回 日本歯科麻酔学会
4．発表年 2020年

1．発表者名 高橋奈々恵
2．発表標題 脳神経学研究の最前線 マウス脳組織の虚血に対する反応の光学的解析とその薬理学的考察
3．学会等名 第39回 日本蘇生学会（招待講演）
4．発表年 2020年

1．発表者名 高橋奈々恵
2．発表標題 虚血条件に暴露されたマウス脳スライスの大脳皮質と海馬におけるニューロン、アストロサイトおよび細胞間隙の変形とそれらにおけるTRPV4の関与
3．学会等名 第75回 日本口腔科学会
4．発表年 2021年

1．発表者名 高橋奈々恵、板橋俊雄
2．発表標題 麻酔薬の全脳虚血時の 大脳皮質と海馬CA1領域における影響
3．学会等名 第68回 日本麻酔科学会
4．発表年 2021年

1．発表者名 Nanae Takahashi
2．発表標題 The existence of a stretch-activated G protein-coupled receptor in mouse brain neurons
3．学会等名 Neuro 2019 ( 国際学会 )
4．発表年 2019年

1．発表者名 Nanae Takahashi
2．発表標題 Intravenous treatment through the utilization of intravenous patient-controlled analgesia with a change in plan from general anesthesia
3．学会等名 ASA annual meeting ( 国際学会 )
4．発表年 2019年

1．発表者名 高橋奈々恵
2．発表標題 マウス脳スライスにおける発達に伴う脳細胞膜のTRPチャネル機能発現から麻酔薬作用機序を探索する
3．学会等名 日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4．発表年 2019年



1．発表者名 高橋奈々恵
2．発表標題 幼齡マウス脳の脳細胞膜発達過程からみたTRPチャンネルにおける麻酔薬作用発現機序
3．学会等名 日本小児口腔外科学会
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

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