

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200012

研究課題名（和文）脳内温度と神経活動の機能相関

研究課題名（英文） Interaction between brain temperature and neuronal excitability

研究代表者

柴崎 貢志 (SHIBASAKI KOJI)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20399554

研究成果の概要（和文）：これまで報告されてきた TRPV4 の機能（皮膚における外界の温度受容体としての機能）とは全く異なり、海馬 TRPV4 は脳内温度エネルギーを電気信号に変換することで神経活動調節因子として機能している可能性が高いと考えられた。この可能性を検証するために、野生型（WT）と TRPV4 欠損マウス（TRPV4KO）の海馬よりスライス標本を調整し、静止膜電位および興奮性を調べた。その結果、TRPV4KO は脳内温度エネルギーを電気信号に変換する分子機構の欠如により、WT と比較し、神経興奮性が低下していることが示された。WT と TRPV4KO の海馬に脳波電極を挿入し、個体での異常を調べたところ、スライスパッチクランプのデータと一致して、TRPV4KO は神経興奮性が低下していることが示された。さらに行動テストを行ったところ、TRPV4 が行動異常を示すことも明らかとなった。これらの結果より、脳内温度により TRPV4 は恒常的に活性化されており、神経細胞が興奮しやすい土台環境を産み出していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Physiological brain temperature is an important determinant for neuronal functions, and it is well established that changes in temperature have dynamic influences on hippocampal neuronal activities. I previously revealed that a thermo-sensor TRPV4 (activated above 34° C) is activated by physiological brain temperature in hippocampal neurons and thereby controls their excitability *in vitro*. Therefore, it is considered that the thermo-sensor TRPV4 can convert temperature information to electrical excitability in mammalian brains. I examined whether TRPV4 regulated neuronal excitability through its activation by brain temperature *in vivo*. I recorded electroencephalogram (EEG) from wild type and TRPV4KO mice under free moving condition, and the EEG data revealed that hippocampal activities in TRPV4KO mice was significantly reduced compared with those in WT mice. Consistent with the EEG data, TRPV4KO hippocampal neurons exhibited abnormal excitatory postsynaptic potentials (EPSP) at physiological temperature. Taken together, we, for the first time, revealed that TRPV4 is an important translator from brain temperature to neuronal excitability in mammals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：分子神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：脳内温度、TRP チャンネル、TRPV4、神経興奮、てんかん

1. 研究開始当初の背景

報告者は、感覚神経終末や皮膚の角化細胞において痛み・温度受容に関わることが知られている温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルが中枢神経系にも強い発現を示すことを見いだした。学習・記憶の中心となる海馬における TRP チャンネルの発現を網羅的にスクリーニングし、体温程度の温度 (34 °C 以上、J. Neurosci. 22: 5552-5562, 2002)、アラキドン酸の代謝産物 (Nature 424: 434-438, 2003)、低浸透圧刺激 (Cell 103: 525-535, 2000) により活性化される TRPV4 が海馬に高い発現を示すことを見いだした。このことから、これまで痛み・温度受容に関わると考えられていた TRPV4 (J. Neurobiol. 61: 3-12, 2004) は、中枢神経系においては神経活動調節のような全く異なる役割を担う可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

本研究では、報告者が *in vitro* で得ている知見 (TRPV4 が脳内温度で活性化し、神経細胞の興奮性を維持している) が生体内で起こっているのかを確認し、個体レベルでの TRPV4 の学習・記憶に果たす役割を調べることを第一の目的とした。また、TRPV4 の阻害剤や活性化剤、あるいは脳内温度の人為的な低下が、脳機能にいかなる影響を与えるのかも検証し、本実験で得られる知見が臨床応用可能であるかを調べることを第二の目的とした。これら複合的に解析し、これまで皮膚において外界の温度センサーとして機能すると考えられていた TRPV4 が神経興奮性を向上させている分子メカニズムを明らかにし、新たな神経可塑性のメカニズムを見いだすことを試みた。

3. 研究の方法

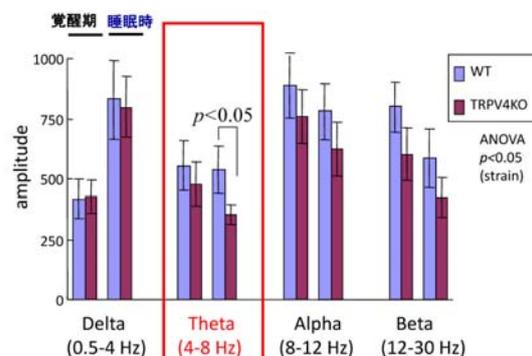
野生型 (C57BL6) あるいは、TRPV4 遺伝子欠損 (TRPV4KO) マウスの大脳皮質に脳波電極埋め込み手術を施した。その後、術後一週間経過後 (手術からの回復を待ち)、3 台の赤外線カメラでマウスの行動観察を行いながら、自由行動下のマウスの脳波、筋電図 (頸部より) の測定を行った。マウスのカメラ画像、筋電図、脳波パターンを元に得られたデータを覚醒時脳波、睡眠時脳波に分類し、野生型と TRPV4KO マウスの生体内での神経活動の違いを検証した。上記、TRPV4 の海馬神経興奮に及ぼす影響 (脳波測定) を調べるために、海馬局所の温度を変化させる新規システ

ムの開発が必要であった。そこで、金属プローブを用いた極小プローブ (先端直径 500 μm) と誤差範囲を最小限に抑える温度可変器を作製した。

4. 研究成果

1) 生体内における海馬 TRPV4 の機能：体温による TRPV4 の恒常的活性化

野生型と TRPV4KO マウスの脳波を比較したところ、海馬神経活動を反映するシータ波が、睡眠時に TRPV4KO マウスで野生型よりも有意に小さいことを見いだした (下図)。覚醒時には統計的に有意な差が認められなかったこと (下図) より、覚醒時には TRPV4 以外の様々な因子が神経興奮に寄与し、系統間での違いが見えにくくなっていることが示唆された。一方、睡眠時には純粋に basal な海馬神経活動を見ることができ、体温による TRPV4 活性化を介した海馬神経活動に系統間での違いが現れたと考えられた。



2) 局所脳内温度の可変システムの開発

方法の項で述べた局所脳内温度可変プローブをマウス海馬に埋め込み、自由行動下の海馬温度を冷却・加温するシステムを完成させた (特許出願中)。WT マウスで海馬の温度を TRPV4 の活性化温度閾値である 32°C に低下させると神経興奮性が有意に低下した。しかし、TRPV4KO マウスの海馬の温度を 32°C に低下した場合にはそのような変化は認められなかった。これらより TRPV4 は海馬温度エネルギーを電気信号に変換し、神経興奮に役立っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

は報告者が責任著者であることを示す

- ① Konno M, Shirakawa H, Iida Shota, Sakimoto S, Matsutani I, Miyake T, Kageyama K, Nakagawa T, Shibasaki K, Kaneko S. Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide. *GLIA* 60(5) : 761-70, 2012 (査読あり)
- ② Cai N, Kurachi M, Shibasaki K, Okano-Uchida T, Ishizaki Y. CD44-positive cells are candidates for astrocyte precursor cells in developing mouse cerebellum. *The Cerebellum* 11:181-193, 2012 (査読あり)
- ③ 柴崎貢志 「痛みセンサーTRPV1 と TRPA1 に関する研究展開」 *臨床麻酔* 36 : p 503-507, 2012. (査読なし)
- ④ 柴崎貢志 「神経発生・神経興奮を制御するセンサー分子から迫るニューロン研究」 *神経化学* 51 : p 1-8, 2012 (査読なし)
- ⑤ Feng L, Eisenstat D.D., Chiba S, Ishizaki Y, Gan L, # Shibasaki K. Brn3b inhibits generation of amacrine cells by binding to and negatively regulating DLX1/DLX2 in developing retina. *Neuroscience* 195 : 9-20, 2011 <cover of the paper> (査読あり)
- ⑥ Saito T, Shibasaki K, Kurachi M, Ishizaki Y. Cerebral microvessel endothelial cells are covered by the VEGF-expressing foot processes of astrocytes. *Neurosci. Letter* 497 : 116-121, 2011 (査読あり)
- ⑦ \$ Ristoiu V, \$ Shibasaki K, Ono K, Ishizaki Y, Tominaga M. Hypoxia induced sensitization of TRPV1 involves activation of HIF1 and PKC. *PAIN* 152 : 936-45, 2011 (Cover of the paper) 中日、科学新聞に掲載 \$:equally contribution (査読あり)

- ⑧ Mihara H, Budaka A, Shibasaki K, Yamanaka A, Sugiyama T, Tominaga M. Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through NO production in mice. *The Journal of Neuroscience* 30 : 16536-44, 2010 毎日、日経新聞に掲載 (査読あり)
- ⑨ Kawaguchi H, Yamanaka A, Uchida K, Shibasaki K, Sokabe T, Murakami S, Tominaga M. PKD2L1/PKD1L3-mediated acid-evoked responses in circumvallate papillae of mice. *J. Biol. Chem.* 285: 17277-17281, 2010 (査読あり)
- ⑩ # Shibasaki K, Murayama N, Ono K, Ishizaki Y, Tominaga M. TRPV2 enhances axon outgrowth through membrane stretch activated property in developing sensory and motor neurons. *The Journal of Neuroscience* 30 : 4601-4612, 2010 (査読あり)
- ⑪ Mandadi S., Sokabe T, Shibasaki K, Katanosaka K, Mizuno A, Moqrich A, Patapoutian A, Mizumura K, Tominaga M. TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Eur. J. Physiol.* 458(6):1093-102, 2009 (査読あり)
- ⑫ Mochizuki, T., Sokabe T, Fujishita, K, Araki I, Shibasaki K, Uchida K, Naruse K, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M. The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures *J. Biol. Chem.* 284(32):21257-64, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 柴崎貢志、脳内温度と神経活動の機能相関、第 54 回日本神経化学会大会 シンポジウム講演 2011 年 9 月 28 日 (石川)
- ② 柴崎貢志、アストロサイト TRPV2 と TRPV4 の機能特性の違い：相補的な神経活動調節、第 34 回日本神経科学大会 シンポジウム講演 2011 年 9 月 16 日 (横浜)
- ③ 柴崎貢志、ユニークなセンサー研究から見えて来た新たな神経回路形成の分子

機構、世界脳週間 2011 招待講演 2011年4月29日(前橋)

- ④ Shibasaki K, Yamada K, Ishizaki Y., Molecular link between brain temperature and neuronal excitability. BMB2010 (日本分子生物学会・日本生化学会合同大会) 2010年12月7日(神戸)
- ⑤ 柴崎貢志、痛み、神経回路形成、神経活動制御に関わるセンサー分子、東京都委託事業 柔道接骨学会 (招待講演) 2010年9月12日(東京)
- ⑥ 柴崎貢志、糖尿病性神経因性疼痛を引き起こす因子の同定、酸素ダイナミクス研究会 (招待講演) 2010年9月4日(東京)
- ⑦ Shibasaki K., A specific subtype of astrocytes regulates neuronal excitability through gliotransmitter release. Neuro2010 (シンポジウム発表) 2010年9月3日(神戸)
- ⑧ Shibasaki K., Ono K, Tominaga M, Ishizaki Y., TRPV2 enhances axon outgrowth through membrane stretch activated property in developing sensory and motor neurons. Forum of European Neuroscience 2010年7月5日(オランダ)
- ⑨ 柴崎貢志、膜伸展刺激活性化チャネルによる軸索伸長制御、日本解剖学会総会 (シンポジウム招待講演) 2010年3月29日、岩手県民会館(盛岡)
- ⑩ Koji Shibasaki, Katsuhiko Ono, Makoto Tominaga, Yasuki Ishizaki TRPV2 enhances axon outgrowth through membrane stretch activated property in developing sensory and motor neurons. 北米神経科学会議、2009年11月15日、McCormick Place (シカゴ・米国)
- ⑪ 柴崎貢志、小野勝彦、富永真琴、石崎泰樹 膜伸展刺激活性化チャネルを介した軸索伸長のポジティブフィードバック制御、日本神経科学学会(座長)、2009年9月16日、名古屋国際会議場(愛知)

[図書] (計2件)

- ① MethPharmTox TRP book (Szallasi A 編) P105-126, Sbhcs, 2012

- ② インテグレートドシリーズ神経科学 (白尾智明 編) P41-50, P97-104, 東京化学同人, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 脳内温度可変装置
発明者: 柴崎貢志、中山誠
権利者: 中山誠
種類: 特許
番号: 特願 2010-225210
出願年月日: 2010年9月10日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/cs/sibaHP/shibasaki.html>

本年、2010年3月に発表した学術論文(報告者の責任著者論文)は、読売、毎日、中日(一面トップ)、日経新聞などの各新聞、NHKニュース、Yahoo トップニュースで報道された。また、海外でも Science Newsなどで報道された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴崎 貢志 (SHIBASAKI KOJI)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 20399554

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: