

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15269

研究課題名（和文）難治性てんかんに対する温度感受性TRPM8チャネルの有効性と病態制御基盤の解明

研究課題名（英文）Efficacy of temperature-sensitive TRPM8 channels in refractory epilepsy and the elucidation of pathogenetic regulation

研究代表者

森山 博史（Moriyama, Hiroshi）

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40816633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：温度感受性TRPM8チャネルの薬剤による活性化がてんかん発作を抑制すると仮説を立てて研究を実施した。TRPM8チャネルを脳内に発現するマウスはTRPM8チャネルの活性化によって薬剤誘発性のてんかん発作を抑制した。一方、TRPM8チャネル遺伝的に欠損させたTRPM8欠損マウスではTRPM8チャネルの活性化による抗てんかん様の効果は検出されなかった。また、TRPM8欠損マウスとTRPM8チャネルを有するマウスとのてんかん発作を比較した結果、TRPM8欠損マウスはてんかん発作を起こしやすいことがわかった。その原因はてんかん発作の原因物質の一つであるグルタミン酸の細胞外濃度の上昇によるものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TRPM8チャネルの活性化剤がてんかん治療薬の候補であることがわかった。既存の抗てんかん薬と異なる作用機序の解明ができたため薬剤抵抗性を示す難治性てんかん患者への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that drug-induced activation of a temperature-sensitive Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) channel would suppress epileptic seizures in mice and conducted this study. The results showed that TRPM8 channel activators suppressed drug-induced epileptic seizures in wild type mice. In contrast, TRPM8 channel activators did not affect drug-induced epileptic seizures in TRPM8 deficient mice. In addition, we compared the epileptic seizures in TRPM8 deficient mice with wild type mice. TRPM8 deficient resulted in a shorter firing latency of epileptic discharges, and epileptic seizures to worsen. The cause was an increase in the extracellular concentration of glutamate which is one of the responsible for epileptic seizures.

研究分野：薬理

キーワード：てんかん マウス 脳波 TRPM8KO TRPM8作動薬 細胞外グルタミン酸 てんかん発作 てんかん性異常脳波

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

てんかん患者の生涯有病率は約 1%であり、このうち抗てんかん薬でコントロール不良な難治性てんかん患者は約 3 割と多い。この状況に対し当研究室では、てんかん焦点を切除すること無く直接冷却することによりてんかん発作を抑制できる「局所脳冷却」技術を開発した。しかしながら、局所脳冷却処置は侵襲性が高く臨床応用には至っていない。

過去、局所脳冷却の生理基盤を調べた研究は存在するが、脳温度制御による作用を薬剤に代替できた報告は極めて少ない。脳冷却状態を擬似的に誘発できる薬剤を見出せば、開頭、脳冷却の侵襲無く、てんかん発作抑制効果を引き出せる抗てんかん薬の開発につながる可能性がある。そこで、申請者は難治性てんかんに有効であった冷却温度 (15°C) で活性化する温度感受性 Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) チャネルに着目した。

2. 研究の目的

本研究では「薬剤による TRPM8 チャネルの活性化がてんかんの新規治療法になり得る」と仮説を立てた。申請者は仮説を立証するため以下 2 つの問いを解決する。

問 1：局所脳冷却処置による抗てんかん作用を薬剤で代替可能か？

解決案：TRPM8 作動薬によるてんかん性異常脳波の抑制作用がてんかん性異常脳波の強度を指標に定量解析する。

問 2：TRPM8 チャネルの活性化による抗てんかん作用の仕組みは？

解決案：細胞外濃度をリアルタイムに測定・数値化できるバイオセンサーを用いて、てんかん性異常脳波検出時に起きる興奮性 (グルタミン酸) / 抑制性 (GABA) の不均衡を数値化する。その後、TRPM8 チャネルの活性化により興奮性 / 抑制性の不均衡を正常化できるか検証する。

3. 研究の方法

(1) 動物

10-12 週齢の C57BL/6 雄性マウス及び TRPM8 チャネルを遺伝的に欠損させた TRPM8 (KO: Knock out) 雄性マウスを用いた。1 ゲージにつき 5 匹のマウスを収容し、温度を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度を $55 \pm 5\%$ に制御した部屋で飼育した。さらに、部屋は 12 時間の明暗サイクルで午前 8 時に点灯させた。動物は摂餌や給水を自由にできる環境であった。動物の飼育及び実験は山口大学医学部の実験動物飼育及び使用委員会に承認されており、すべての実験は国立大学法人日本実験動物施設協会のガイドラインに従って実施した。

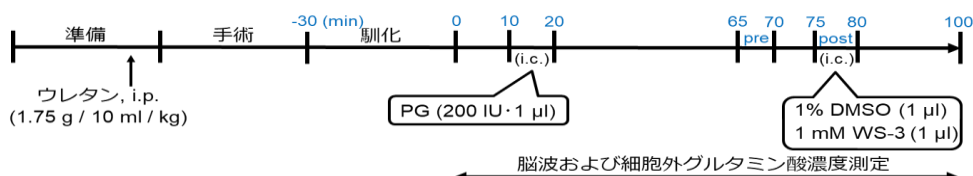
(2) 薬効評価

① TRPM8 チャネル作動薬後注入 (図 1)

脳波測定時間は 100 分とした。脳波測定開始から 10 分後にてんかん誘発剤を 10 分間かけて注入した。てんかん誘発剤注入開始から 60 分後に TRPM8 作動薬を注入した。

てんかん誘発剤注入から 60 分後にてんかん様異常脳波の振幅が定常状態になるため、てんかん誘発剤注入開始から、55~60 分 (5 分間) のてんかん様異常脳波の強度を基準に TRPM8 作動薬の効果の評価した。TRPM8 作動薬の評価時間帯は TRPM8 作動薬注入開始から 5~10 分 (5 分間) とした。

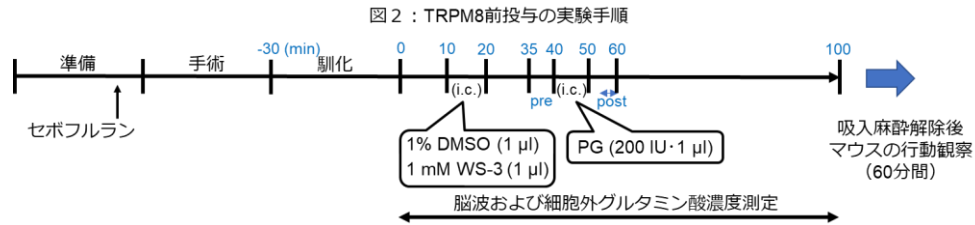
図 1：TRPM8 後投与の実験手順



② TRPM8 チャンネル作動薬前注入 (図 2)

脳波測定時間は 100 分とした。脳波測定開始から 10 分後に TRPM8 作動薬を 10 分間かけて注入した。TRPM8 作動薬注入開始から 30 分後にてんかん誘発剤を注入した。

てんかん誘発剤注入直前の 5 分間を基準に、てんかん誘発剤注入開始から、55~60 分 (5 分間) のてんかん様異常脳波の強度を比較した。細胞外グルタミン酸濃度の評価時間帯はてんかん誘発剤注入開始から 15~20 分の 5 分間とした。



(3) 薬剤投与方法

① 準備

TRPM8 チャンネル作動薬後注入ではウレタン (1.75 mg/kg) 麻酔を使用した。また、TRPM8 チャンネル作動薬前注入ではマウスに 4%セボフルラン/20%酸素/80%窒素で麻酔を導入したのち、下肢をピンセットで挟む痛み刺激により適宜覚醒状態を確認しながら 2%セボフルランで麻酔を維持した。マウスの頭部を定位固定装置によって固定した。温度センサーと加湿パッドを用いて直腸温が $38.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保った。

② てんかん誘発剤および TRPM8 チャンネル作動薬の投与

てんかん誘発剤であるペニシリン G (PG : 明治, 日本) を 0.9%生理食塩水中に 200 IU/μl の濃度で溶解した。TRPM8 作動薬 (Funakoshi, 日本) は 1%ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide:DMSO, Merck KGaA, Darmstadt, ドイツ) に溶解した。

体性感覚野への薬剤注入は 10 μl Hamilton シリンジに 26 ゲージの針 (1701RN-7785-02; Hamilton, Reno, NV) を取り付けて使用した。PG 1 μl で針の内部を充填した。次に注射筒の内部に 8.6 μl の TRPM8 作動薬 (WS-3) で満たした後、0.4 μl の空気を注射筒に取り込んだ。そののち、PG 1 μl を充填した針に取り換え、PG を 1 μl 充填した。この操作により 2 液を空気で分離した。

テフロンチューブ (JT-10; 長さ 50cm, 容量 6 μl, Eicom, 日本) を用いて注入用カニューレ (28G; Eicom 株式会社, 日本) と 2 液の入っているシリンジを連結した。シリンジ内の溶液を先端まで押し出した。脳波測定開始から 5 分後に注入用カニューレを左体性感覚皮質上の穿頭孔の脳表面から 0.75mm 深部に留置した。

TRPM8 チャンネル作動薬後注入 : 注入用カニューレと Bio Sensor を穿頭孔に留置してから約 5 分後に PG を 10 分間かけて投与した。PG 注入開始から 60 分後に WS-3 を 10 分間かけて注入した。対照群には溶媒を投与した。

TRPM8 チャンネル作動薬前注入 : 注入用カニューレと Bio Sensor を穿頭孔に留置してから約 5 分後に WS-3 を 10 分間かけて投与した。WS-3 注入開始から 30 分後に PG を 10 分間かけて注入した。

(4) 脳波測定

尾部、両脇に電極を留置することにより心電図と心拍数を計測した。頭部の皮膚を切開し、体性感覚皮質上 (ブレグマから後方に 1.0 mm, 側方に 2.0 mm の位置) と小脳上に直径 1.0 mm の穿頭孔をあけた。左右体性感覚皮質の穿頭孔には皮質脳波 (Electrocorticogram: ECoG) を測定する電極を留置し、小脳上の穿頭孔にはアース電極を留置した。さらに、左の体性感覚皮質上の穿頭孔には温度センサー (IT-23, Physitemp Instruments, LLC, NJ, USA) を留置した。

また, 2kHz のサンプリングレートでの A/D コンバーター (PowerLab 8/30; AD Instruments, キャッスルヒル, オーストラリア) を用いて, ECoG を持続的に記録した. この際, バイオアンプ (EX-1; Dagan Corporation, Minneapolis, MN, USA) で ECoG を増幅させた. ECoG の測定における条件は以下のとおりである. 高周波フィルタを 10kHz とし, ノッチフィルタはオフにした. Lab Chart Pro v 8.1.5 (AD Instruments) を用いて各周波数帯領域の強度を算出した. ECoG を高速フーリエ変換したのちに β 1 波の強度を算出した.

(5) 細胞外グルタミン酸濃度の測定

左体性感覚野の注入用カニューレと同じ位置に Bio Sensor (#7011, Pinnacle Technolog, USA) を留置し, リアルタイムで細胞外グルタミン酸濃度を計測した.

(6) てんかん発作スコア

吸入麻酔解除後 60 分間行動観察した. てんかん発作スコアは先行論文 (*J Neurosci.* 2011. 31:12963-71) を参考にした. 発作スコアは以下の通り

0: けいれんなし

1: 耳と顔のけいれん

2: 体を軸方向に痙攣するけいれん

3: ミオクローヌスのけいれんと下肢だけで直立

4: 横向き, ワイルドランニング, ワイルドジャンプ

5: 全身性强直間代発作

6: 死亡

4. 研究成果

(1) TRPM8 作動薬のてんかんに対する効果

① TRPM8 チャンネル作動薬後注入 (例: 図 3 左上)

てんかん誘発剤によっててんかん様異常脳波の強度は増加した. この増加は溶媒投与では抑制されなかったが, TRPM8 作動薬の投与では抑制された.

② TRPM8 チャンネル作動薬前注入

溶媒をてんかん誘発剤よりも前に投与しても, てんかん誘発剤によっててんかん様異常脳波の強度は増加した. 一方, TRPM8 作動薬をてんかん誘発剤よりも前に投与すると, てんかん誘発剤によって増加するてんかん様異常脳波の強度は減少した.

溶媒前投与群の麻酔薬解除後のてんかん発作スコアは平均 4.00 だった. また, TRPM8 作動薬前投与群のてんかん発作スコアは溶媒前投与群と比べ有意に減少した.

(2) TRPM8 チャンネル欠損がてんかんに与える影響

① TRPM8 チャンネル作動薬後注入 (例: 図 3 右上)

てんかん誘発剤によって誘発されたてんかん様異常脳波の強度は TRPM8 チャンネルの欠損によってさらに増加した. また, TRPM8 チャンネル欠損マウスは TRPM8 チャンネル作動薬を投与してもてんかん誘発剤によって増加するてんかん様異常脳波の強度を抑制できなかった.

② TRPM8 チャンネル作動薬前注入

TRPM8 チャンネル欠損マウスに溶媒投与後, てんかん誘発剤を投与するとてんかん様異常脳波の強度は正常マウスと比べ, 増加した. また, TRPM8 チャンネル欠損マウスは TRPM8 チャンネル作動薬を前投与してもてんかん誘発剤によって増加するてんかん様異常脳波の強度を抑制できなかった.

TRPM8 チャンネル欠損マウスに溶媒を前投与した群は正常マウスに溶媒を前投与した群と比べ, てんかん発作スコアは有意に上昇した. また, TRPM8 作動薬前投与群のてんかん発作スコアは溶媒前投与群と比べ差がなかった.

(3) TRPM8 作動薬の細胞外グルタミン酸濃度に対する効果

① TRPM8 チャンネル作動薬後投与 (例: 図 3 左下)

体性感覚野にてんかん誘発剤を投与すると細胞外グルタミン酸濃度は上昇した. て

んかん誘発剤投与から 60 分後に溶媒を投与しても細胞外グルタミン酸濃度は変化しなかった。一方、てんかん誘発剤投与から 60 分後に TRPM8 作動薬を投与すると細胞外グルタミン酸濃度は減少した。

② TRPM8 チャネル作動薬前投与

溶媒をてんかん誘発剤よりも前に投与しても、てんかん誘発剤によって細胞外グルタミン酸濃度は増加した。一方、TRPM8 作動薬をてんかん誘発剤よりも前に投与すると、てんかん誘発剤による細胞外グルタミン酸濃度の上昇率は減少した。

(4) TRPM8 チャネル欠損が細胞外グルタミン酸濃度に与える影響

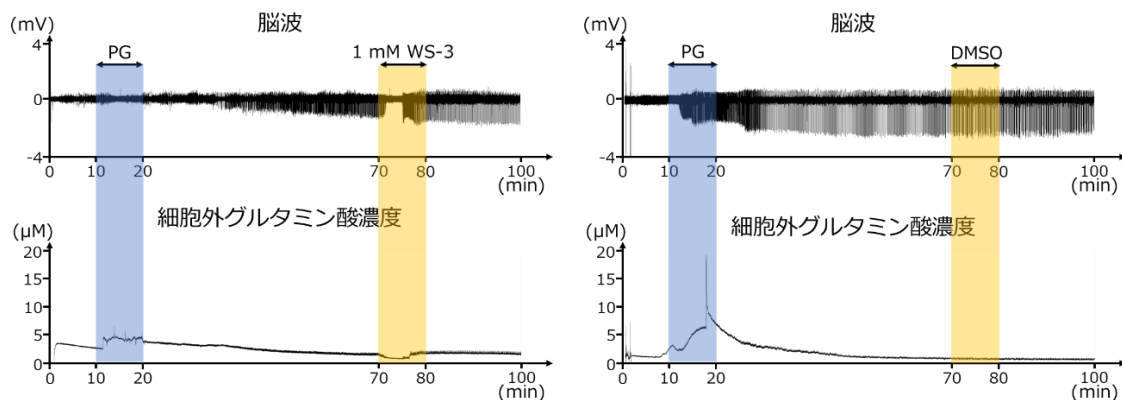
① TRPM8 チャネル作動薬後 (例: 図 3 右下)

てんかん誘発剤によって増加する細胞外グルタミン酸濃度は TRPM8 チャネル欠損によってさらに増加した。また、TRPM8 チャネル欠損マウスにてんかん誘発剤投与後に溶媒を投与しても細胞外グルタミン酸濃度に影響しなかった。さらに、TRPM8 チャネル欠損マウスは TRPM8 チャネル作動薬を投与しても細胞外グルタミン酸濃度が減少しなかった。

② TRPM8 チャネル作動薬前投与

TRPM8 チャネル欠損マウスに溶媒を前投与した群は正常マウスに溶媒を前投与した群と比べ、てんかん誘発剤による細胞外グルタミン酸濃度の上昇は増加した。また、TRPM8 チャネル欠損マウスに TRPM8 作動薬を前投与しても、てんかん誘発剤による細胞外グルタミン酸濃度の上昇は減少しなかった。

図 3 : TRPM8 後投与の実験結果 (左: 正常マウス, 右: TRPM8 欠損マウス)



以上の研究成果から、TRPM8 チャネルの作動薬はてんかん発作に有効であることが示唆された。また、TRPM8 作動薬の抗てんかん様の作用機序はてんかん発作の原因物質であるグルタミン酸の細胞外濃度制御によるものであった。

本研究では薬剤誘発てんかんモデルマウスを用いて TRPM8 作動薬の抗てんかん様作用機序を解明した。今後は細胞単位での TRPM8 作動薬による抗てんかん様作用の検討が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Moriyama Hiroshi, Nomura Sadahiro, Imoto Hirochika, Inoue Takao, Fujiyama Yuichi, Haji Kohei, Maruta Yuichi, Ishihara Hideyuki, Suzuki Michiyasu	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 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.766782	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 Hiroshi, Nomura Sadahiro, Imoto Hirochika, Oka Fumiaki, Maruta Yuichi, Mori Naomasa, Fujii Natsumi, Suzuki Michiyasu, Ishihara Hideyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Suppressive effects of a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) agonist on hyperthermia-induced febrile seizures in infant mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2023.1138673	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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

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