

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462221

研究課題名(和文) 脳梗塞急性期におけるアクアポリン4/TRPV4 複合体を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the role of TRPV4 in acute ischemic stroke

研究代表者

山田 猛 (YAMADA, TAKESHI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50230462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、急性期脳梗塞において虚血による障害だけでなく脳浮腫を抑えることが重要であると考えている。そこでtransient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)ノックアウトマウスを用いて脳梗塞モデルを作成し、梗塞範囲や水分含有量を調べた。まずマウスの脳梗塞モデルを確立した上で、野生型マウスとTRPV4ノックアウトマウスで比較した。TRPV4ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、24時間後の梗塞範囲が有意に小さかった。水分含有量は十分な統計学的解析が行えなかったが、今後匹数を増やしての検討を継続していくとともに培養細胞を用いた評価を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In acute ischemic stroke, reducing brain edema along with ischemic damage should be an important therapeutic target. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) which locates on the endfeet of brain astrocytes plays an important role for cytotoxic edema formation. Therefore, we aimed to clarify the role of TRPV4 in acute ischemic stroke. First, we established a transient middle cerebral artery (MCA) occlusion mice model. Then we compared the area of infarct in TTC staining and brain water content between wild type mice and TRPV4 knockout mice. Twenty-four hours after 30 minutes MCA occlusion, area of infarct was significantly smaller in TRPV4 knockout mice than those in wild type mice. Brain water content could not be evaluated statistically because of the small number of mice. TRPV4 might be a therapeutic target for acute ischemic stroke. Further investigation is ongoing to increase the number of mice and the experiment with cultured astrocytes derived from TRPV4 knockout mice.

研究分野：虚血性脳血管障害

キーワード：脳梗塞 脳浮腫 TRPV4 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)

脳梗塞治療においては発症初期に梗塞病巣を最小限に食いとめることが、その後の患者の生命予後、機能予後、生活の質の向上に直接関係する。それを目的とし、近年脳梗塞の超急性期治療において、経静脈的血栓溶解療法や経皮的血栓回収術のような血行再建療法が徐々に広まっている。しかし血行再建療法の適応となる症例はごく一部であり、救急医療現場では血行再建療法以外のより多くの脳梗塞患者が対象となり得る基本的な治療が求められているが、現時点で、臨床的効果が実証された治療法はない。

### (2)

心房細動に起因する心原性脳塞栓症は、加齢によって頻度が増加するため、本邦だけでなく、世界中で今後も患者が増加することが予想されている。心原性脳塞栓症は脳主幹動脈閉塞を伴いやすく脳梗塞が重症であるだけでなく、急性期の浮腫が問題となり、中大脳動脈(middle cerebral artery; MCA)領域の広範な脳梗塞は malignant MCA 梗塞と呼ばれ、浮腫による脳ヘルニアの危険から開頭減圧術を行わなければ救命が難しい場合も少なくない。このように、脳梗塞急性期では浮腫に対する治療も重要である。

### (3)

脳梗塞急性期の病巣では、脳虚血によりアストロサイトの浮腫が誘発され、神経細胞死や脳梗塞巣拡大に進展していくことが知られている。脳梗塞後の浮腫は、はじめに細胞性浮腫が生じ引き続き血管性浮腫が進行する。脳損傷モデルの検討により初期の浮腫形成は、アストロサイトの脳血管と接する部位(endfeet)に存在しているアクアポリン 4(aquaporin 4; AQP4)の発現増加と関連し、AQP4 ノックアウトマウスの脳虚血実験では、脳梗塞初期の細胞性浮腫が軽減されることが示されている。しかし、AQP4 ノックアウトマウスでは、細胞性浮腫後に生じる血管性浮腫はむしろ増強されることも示されている。また、AQP4 ノックアウトマウスとイオンチャンネルの一つである(transient receptor potential vanilloid 4; TRPV4)ノックアウトマウス由来のアストロサイト培養系での浸透圧性膨張後の容積調節(regulatory volume decrease; RVD)と免疫染色の解析により、ストレス下での初期のアストロサイトの浮腫形成や改善現象は、AQP4 単独の働きではなく AQP4 と共発現している TRPV4 とが複合的に機能していることが明らかとなっている。

## 2. 研究の目的

### (1)

まずマウス急性期脳梗塞モデルを確立する。

### (2)

次に、急性期脳梗塞における TRPV4 の機能を解明するため、TRPV4 ノックアウトマウス、野生型マウスにおいて脳梗塞のサイズや急性期の浮腫を比較する。

## 3. 研究の方法

### (1)マウス脳梗塞モデルの確立

本研究に最適なマウスの急性期脳梗塞モデルを確立する。これまでに報告されているマウスの脳梗塞モデルとして、suture を用いた糸上げ法、開頭し、MCA を直視下に電気凝固する方法、開頭の上、脳血管にレーザーを照射し血管内に凝血塊を形成させる方法などがある。本研究では、設備等の関係から suture を用いた糸上げ法を用いることとした。

さらに糸上げ法の中にも複数の方法が報告されており、外頸動脈(external carotid artery; ECA)から suture を挿入し MCA を閉塞する方法、総頸動脈(common carotid artery; CCA)から suture を挿入し MCA を閉塞する方法があるため、まず実際にこれらの方法を実践し、手術の成功率と梗塞巣を評価し、本研究に最適な脳梗塞モデルを探る。

なお、脳梗塞モデル作成に当たっては、小動物用麻酔器(室町機械社製)を用いてイソフルラン、酸素混合麻酔気で麻酔を行い、体温保持装置(バイオリサーチ社製)を用いて直腸温を測定しながら麻酔中の体温を一定に保持した。

MCA の閉塞に用いる Suture は Doccol 社製の MCA-O suture (ナイロン糸の先端がシリコンコーティングされたもの)を用いた。MCA の閉塞の確認には、レーザードプラ血流計(OMEGAWAVE 社製)を用いて、マウスの頭蓋骨上の右 MCA 灌流領域に固定したファイバースコープにより脳血流をモニタリングしながら、実際に MCA の閉塞ならびに suture 抜去による再開通を確認した。

### (2)脳梗塞の評価

脳梗塞作成から 24 時間後にイソフルランの深麻酔下に頸椎脱臼しマウスを安楽死させた後に脳を取り出し、ブレインスライサ(Neuroscience Inc 社製)を用いて脳切片を作成した。2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC)を用いて染色を行い、脳梗塞巣を評価した。画像は顕微鏡下で撮影し、画像の解析には Image J を用いて、梗塞の面積を測定し脳断面全体との比(%)を求めた。

次に、脳浮腫の評価のため、脳梗塞作成から 48 時間後に同様にして脳を取り出し、左右の大脳半球に切り分けたのちに 60 の保温庫で 48 時間乾燥させ、前後の重量を測定し脳の水分含有量を測定した。

### (3) 野生型マウス、TRPV4 ノックアウトマウスでの比較

上述の脳梗塞モデルの評価、水分含有量の評価を野生型マウス、TRPV4 ノックアウトマウスのそれぞれで行い、両者を比較する。統計解析には JMP 8.0(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用い、群間の比較には Mann-Whitney's U test を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) マウス脳梗塞モデルの確立

まず、suture は 602056 (6-0 ナイロン糸に径  $0.20 \pm 0.02\text{mm}$ 、長さ 5-6mm のコーティングがなされたもの)を用いて ECA より suture を挿入する方法で作成した。

しかし、ECA より CCA 近位方向へ挿入した suture を引き抜きながらうまく反転させ内頸動脈(internal carotid artery; ICA)へ挿入する手技が難しく、ECA 断端から suture が抜けての出血の合併症を生じやすく、また ICA への挿入角度の問題から ICA 近位部より分岐する翼突口蓋動脈(pterygopalatine artery; PPA)に suture の先端が迷入しやすいため、手術の成功率が低く相対的に麻酔時間も長くなる傾向がみられた。ECA 断端からの反転を容易にするためコーティング長の短い suture を使用することも検討したが、その分 MCA の閉塞が不十分になりやすくなる可能性が懸念された。

そのため我々は次に CCA より suture を挿入する方法で作成した。CCA は ECA と比較して suture の挿入が容易であり、suture のサイズは 602356 のサイズ(6-0 ナイロンに径  $0.23 \pm 0.02\text{mm}$ 、長さ 5-6mm のコーティング)に変更した。CCA から挿入する方法は ECA から挿入する方法と比較して手技的に容易で挿入角度の観点からも PPA に suture が迷入しにくかった。相対的に麻酔時間も短くて済むことが明らかとなった。

MCA 閉塞中にマウスを覚醒させるかどうかに関しては、マウスを覚醒させる場合、覚醒後は体動で脳血流モニタリングは不可能であるため、モニタリングは MCA 閉塞確認までの短時間で済み、並列して多くの匹数の作成が可能であるが、覚醒中にマウスの体動によって suture の位置がずれ、MCA の閉塞が不十分となる可能性があった。それに対して麻酔したまま脳血流のモニタリングを行う場合、一定時間の MCA 閉塞を確認することが可能であるが、閉塞時間に応じて麻酔時間は長くなり、並列でのモデル作成ができないため一定時間内に作成できる数は限られてしまう。本研究では、閉塞時間を確実にするため、後者の方法を採用した(図 1)。

性別は脳梗塞のサイズに影響を与えるため、対象となるマウスは に限定し、8 週齢、体重 23-30g のマウスを対象として、上述の方法で脳梗塞モデルを作成し、梗塞サイズは安定した。

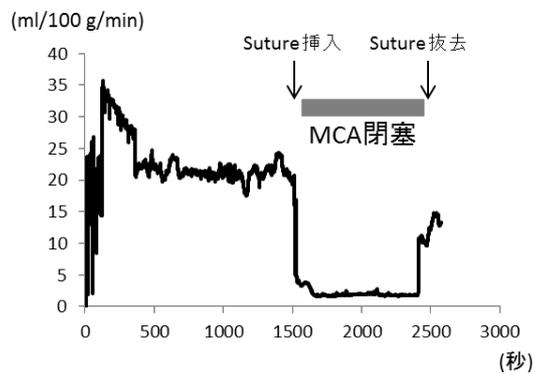


図 1. モデル作成中の脳血流波形

15 分間の MCA 閉塞モデル。脳血流のモニタリングにより閉塞中の MCA 領域の血流低下と再開通による血流上昇が確認できる。

### (2) 脳梗塞の評価

脳梗塞作成から 24 時間後に氷冷したブレインスライサで作成した脳切片を 2%TTC 混合生理食塩水内に 37 °C で 20 分間静置した。切片は嗅球から 1mm 厚で作成したところ、組織が壊れやすく評価が困難であったため、2mm、4mm、6mm の部位において 2mm 厚でそれぞれ作成するようにした。染色した切片は顕微鏡下に 40 倍の画像を撮影した。嗅球から 6mm 以降の切片では、後方循環からの側副血行による個体差が出やすい可能性が考えられたため、評価の対象から除外した。

脳梗塞モデルは MCA の閉塞時間 15 分、30 分、60 分のものを作成した(図 2)。

さらに 30 分閉塞のモデルを用いて、脳梗塞作成から 48 時間後に脳を取り出して左右の大脳半球に切り分け、60 °C の保温庫内で 72 時間乾燥させ、前後で重量を測定し水分含有量の評価を行った。また患側と対側の比を計算した。

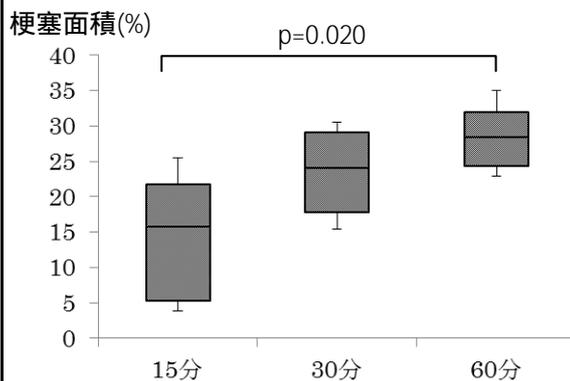
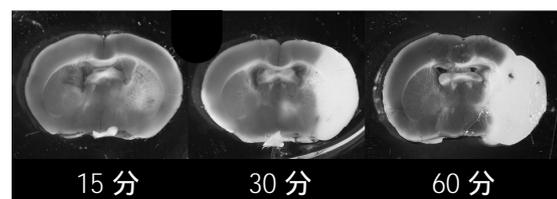


図 2. MCA それぞれ 15 分、30 分、60 分閉塞モデルの TTC 染色(嗅球から 4mm の断面)での比較。下段は脳断面全体に占める梗塞面積

の割合(%)。いずれも野生型(C57BL/6N 系統)、8週齢の、各群 n=9 の連続例での比較。

### (3) 野生型マウス、TRPV4 ノックアウトマウスでの比較

野生型マウス、TRPV4 ノックアウトマウスにおいてそれぞれ8週齢の マウスを対象に上述の評価を行い、比較した。結果、MCA閉塞時間30分のモデルではTRPV4 ノックアウトマウスにおいて野生型と比較して有意に脳梗塞面積が小さかった。一方水分含有量の評価では n が少なく、今回統計学的な検討はできなかった(図 3)。

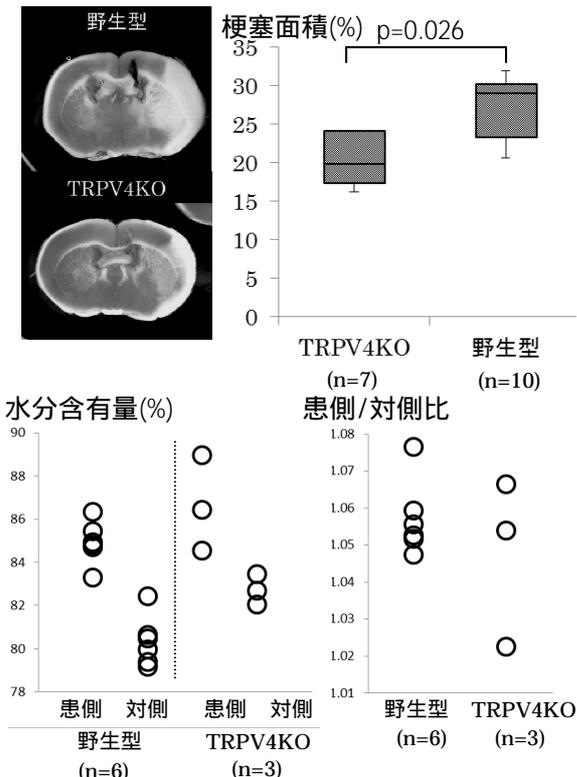


図 3. MCA30 分閉塞モデルを用いた野生型マウス、TRPV4 ノックアウトマウスでの梗塞面積と水分含有量の比較。

#### 【考察と今後の展望】

本研究によって、マウスの急性期脳梗塞モデルの作成法ならびに評価法が確立した。TRPV4 ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して 24 時間後の脳梗塞の範囲が縮小する可能性が示された。

TRPV4 ノックアウトマウスでは、アストロサイトの急性期の細胞性浮腫が抑制されると考えられるが、過去の報告では低浸透圧性の浮腫に対する RVD は TRPV4 ノックアウトマウス由来のアストロサイトでは野生型マウス由来のものと比較してむしろ低下していると報告されている。ストレス下における TRPV4 由来の細胞内カルシウム上昇は急性期の細胞性浮腫の形成と同時に RVD にも関連しており、RVD が生じなければ結果としてアストロサイトの細胞死が生じると予想されるため、虚血の程度によって野生型マウ

スと TRPV4 ノックアウトマウスの差に変化が生じる可能性がある。そのため引き続き閉塞時間を変えての評価が必要と考えられた。現在、まだ十分な実験マウスの匹数が得られていないため、今後引き続きデータを蓄積して検討を行い、学会や論文として発表する予定である。

さらに今後、急性期脳梗塞における TRPV4 の機能の解析を進めていくため、TRPV4 ノックアウトマウス、野生型マウスそれぞれから取り出したアストロサイトの培養細胞を用いた評価を行う予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院神経内科学

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山田 猛 (YAMADA TAKESHI)

九州大学・大学院医学研究院・研究員

研究者番号：50230462

##### (2) 研究分担者

松本 省二 (MATSUMOTO SHOJI)

九州大学・大学院医学研究院・研究員

研究者番号：00570772

吉良 潤一 (KIRA JUN-ICHI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40183305

古田 興之介 (FURUTA KOHNOSUKE)

高知大学・医学部付属病院・講師

研究者番号：60546571

松瀬 大 (MATSUSE DAI)

九州大学・医学部付属病院・講師

研究者番号：60546571

##### (3) 連携研究者

なし