

令和元年6月4日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05438

研究課題名(和文) 温度生物学を基盤とした新規神経治療パラダイムの創成

研究課題名(英文) Construction of a novel treatment paradigm based on the thermal neurobiology

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：局所脳冷却療法がてんかん発作を止め、脳卒中時の脳保護に有効であることが明らかになりつつある。本研究では同治療法の作用を3点解明した。1. 焦点冷却に有効な脳温15℃は、神経ネットワークの遮断には不十分である。2. 15℃での神経細胞は電流刺激による脱分極頻度が低下し、それによって発作が止まる。3. 低温による脳機能変化はTRPM8 channelを作動させたとき、およびTRPV4 channelを阻害したときの脳機能変化に類似している。すなわちTRP channelに機能変化を与えることが脳冷却療法の機序である。さらに言えば、TRP channelに影響する薬剤で脳冷却療法を代用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんは神経細胞の異常興奮による発作を繰り返し起こす疾患、脳卒中は不可逆的な高次脳機能障害や運動機能障害を来す疾患で、いずれも難治である。てんかん焦点を冷却して発作を抑制する局所脳冷却技術と、脳卒中から脳を保護する技術が開発されている。本研究では脳温と神経ネットワークの関係、脳温と神経細胞活動の関係、脳温とTRP channelsの作用の関係を解明した。これにてんかんと脳卒中に対して脳冷却療法が有効であることが分子、細胞レベルからも証明されたことになり、冷却デバイスの開発、脳温測定機器の開発、TRP channel関連創薬等、臨床応用が推進される期待が高まった。

研究成果の概要(英文)：Focal brain cooling therapy for epileptic seizure and cerebral stroke has been developed. In the present study, we investigated three mechanisms of the treatment. First, brain temperature at 15℃ was effective when it was applied for focal epileptic seizure, however, not enough for inhibition of epileptic network in generalized seizure. Second, brain temperature at 15℃ reduced the frequency of neuronal depolarization, that was a mechanism to terminate seizure. Third, changing of brain function by cooling was similar to those by stimulation of TRPM8 channel and inhibition of TRPV4 channel. Namely, to modify the TRP channel function was proven to be the mechanism of the focal brain cooling on brain function. Moreover, medicines influencing TRP channel functions possibly be substituted for focal brain cooling therapy.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：brain cooling epilepsy active potential TRPM8

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) てんかんは神経細胞の異常興奮による発作を繰り返し起こす疾患で、有病率は約 1% である。抗てんかん薬で発作を抑制できない例は外科手術の適応になるが、脳機能部位を焦点に持つ症例には焦点切除術は困難である。我々はてんかん焦点を切除すること無く、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。脳温を 15℃ に下げるとてんかん発作と異常脳波は抑制され、脳には組織学的な損傷は加わらないことを証明した。てんかんだけでなく脳虚血への効果として、脳梗塞ラットの光塞栓モデルで 15℃ の局所脳冷却を行い、脳梗塞の体積が縮小したことを示した。冷却によって脳血流が低下するにも関わらず、脳組織中の乳酸濃度は低下する。血流低下以上に脳代謝が抑制されている、すなわち酸素・エネルギーの不足が補われていることがわかる。興奮性神経伝達物質の放出を抑制し、抑制性神経伝達物質は軽度抑制することも、冷却が脳に保護的に働く理由の一つである。このように脳冷却療法はてんかんにも脳梗塞にも優れた治療効果を持ち、臨床応用が期待されている。

(2) 生体が温度を感知し、反応する仕組みは transient receptor potential (TRP) channels が担っているとされている。TRP channel は細胞膜上に存在する陽イオンチャネルであり、異なる温度域で活性化されるサブタイプがある。脳冷却がてんかん発作を止め、脳保護的に働く機序も、ある TRP channels の活性化、または別の TRP channels の不活性化によるのではないかと思われる。ただしそれを解明した研究は未だない。

2. 研究の目的

(1) 脳冷却が神経組織のどこで発作を抑制しているかを調べる。焦点の冷却が有効であることは、神経細胞の興奮が抑制されるためと考えられるが、神経ネットワークを抑制して興奮の伝播を遮断している可能性もある。非焦点部位を冷却し、焦点部位の冷却の場合との効果の違いを見て、冷却効果の到達部位を考察する。

(2) 脳冷却が神経細胞の活動電位にどう関わっているかを調べる。脳のスライスを作成し、温を変化させながら、パッチクランプ法で静止膜電位、発作閾値、脱分極頻度を測定する。冷却によって脳代謝が低下することは確認していたが、脳代謝低下がてんかん発作抑制の原因であるか結果であるかは未解明であった。活動電位の変化の様式によってそれを解明する。

(3) 前述の TRP channels の中から、本研究では低温時に活性化する TRP melastatin 8 (TRPM8) channel、正常脳温で活性化されている TRP vanilloid 4 (TRPV4) channel の 2 つを選び、これらが脳冷却と同じ効果を持つかどうかを調べる。てんかん発作抑制にはペニシリン G (PG) 誘発てんかんモデルを用い、TRPM8 channel 作動薬を用いて発作抑制を試みる。脳保護効果確認にはラットの光脳塞栓モデルを用い、TRPV4 channel の阻害薬を用いる。これらの効果を確認できれば、脳冷却効果の機序がこれらの TRP channels を介していることが判明し、さらに、TRP channels の作動薬、阻害薬を用いることによって、脳冷却療法に変わる薬物療法を開発することができる。

3. 研究の方法

(1) 脳冷却によるてんかん波伝搬の抑制

非焦点部位の脳を冷却することで、冷却がてんかん波の発生だけでなく伝搬も抑制できるか、すなわち発作ネットワークの遮断ができるかを調べた。雄 SD ラット 12 匹を用いた。全身麻酔下に開頭し、脳波電極を左右前頭葉に、脳冷却装置を右の体性感覚野に、温度センサーを冷却装置直下の脳表に留置した。覚醒後全身状態の回復を確認して実験を開始した。腹腔内にビククリンメチオダイド (gamma aminobutyric acid-A (GABA-A) receptor 拮抗薬) を投与し、焦点不明、または多焦点と考えられるモデルを作成した。ラットを 4 群に分け、発作出現後、脳表温度を 15℃、10℃、5℃、および非冷却とし、10 分間持続した。冷却中止後は自然復温とし、冷却中止後 10 分間記録を続けた。発作のモニタリングには Racine stage score (Racine 0: 反応なし、1: 顔面の自動症や耳やひげの攣縮、2: 体軸の引きつり、3: 遅発性のミオクローヌス発作、4: 間代性痙攣、5: 反復性の強直-間代痙攣もしくは致死的なけいれん) を用いた。冷却側脳温と両側皮質脳波 (Electrocorticogram, ECoG) の測定も行った。

(2) 冷却による神経細胞の活動電位の変化

冷却が神経細胞の活動電位に与える影響を、カレントクランプ法を用いて調べた。7 例の難治性てんかん患者を対象とし、側頭葉から直径 10mm、高さ 10 mm の円柱状脳標本を採取した。採取部位は治療として必要な側頭葉切除部位の範囲内であり、本研究のための追加切除は行っていない。細胞に電極を留置し、静止膜電位を測定した。与える電流を -100 pA から +550 pA まで徐々に強くして細胞を刺激し、脱分極閾値、脱分極頻度、スパイク幅を測定した。25 の標本を 15℃、25℃、35℃ に順次変化させて同様の測定を行った。37℃ では標本中の神経細胞の機能的維持が困難だったため、35℃ を正常体温としてデータを解釈した。

(3) TRP channel の作動薬および阻害薬による脳保護効果

TRPM8 channel 作動薬によるてんかん波の抑制

低温で活性化される TRPM8 channel を活性化することによって、平温でも脳冷却と同じ様に てんかん発作抑制効果が得られるか否か調べた。10-11 週齢の雄 SD ラットの皮質に PG を 10 分間かけて 400 単位注入し、皮質焦点型てんかんモデルを作製した。ECoG および皮質温度を測定しながら、TRPM8 および TRPA1 作動薬であるイシリン (0.3、1.0、3.0 mM) を PG 注入 90 分後から 10 分間かけて投与した。PG により誘発されたてんかん様異常脳波のスパイク振幅、持続時間、発火頻度および各周波数帯別パワー (、 、 波) を Lab Chart 8 pro[®] を用いて算出し、てんかん様異常脳波に対するイシリンの効果を評価した。また TRPM8 拮抗薬である AMTB をイシリン (3.0 mM) 注入直前に注入し、TRPM8 channel への効果を打ち消すことで脳波抑制効果も消失するかを確認した。

TRPV4 channel 阻害薬による脳梗塞領域の拡大抑制

10-15 週齢の雄 C57BL/6 マウスに Rose Bengal 10mg/kg を経頸静脈的に投与し、脳表に 10 分間照射する事で光塞栓法による脳梗塞モデルを作製した。マウスを 4 群に分け、対照群では梗塞部位の脳温を 37 に維持し、TRPV4 阻害群では同 channel の拮抗薬である RN-1734 を梗塞巣の対側に経脳室投与し、脳温は 37 にした。局所脳冷却群では 15 で 1 時間冷却し、TRPV4 作動群では同 channel の作動薬である GSK1016790A を投与しながら脳温を 15 で 1 時間冷却した。照射から 24 時間後に TTC 染色を行って梗塞巣領域のサイズを測定した。

4. 研究成果

(1) 脳冷却によるてんかん波伝搬の抑制

非冷却ラットにおける 10 分間のスパイク回数は 312 ± 52 回であった。15、10、5 では 222 ± 23 回 (71.2%, $p < 0.01$)、 229 ± 61 回 (73.4%, $p < 0.05$)、 195 ± 42 回 (62.5%, $p < 0.01$) へとそれぞれ有意に減少した。スパイク数の減少は非冷却側でも観察され、平温時が 316 ± 58 回、15、10、5°C でそれぞれ 195 ± 26 回 (61.7%, $p < 0.05$)、 219 ± 57 回 (69.3%, $p < 0.05$)、and 189 ± 48 回 (62.7%, $p < 0.05$) だった。

10 分間の Racine stage score は平温ラットの 2.58 ± 0.23 から、15、10、5 ではそれぞれ 1.00 ± 0.17 、 1.00 ± 0.17 、 0.75 ± 0.18 に減少した。(いずれも $p < 0.001$)。いずれの温度群でも、冷却中の各個体のスコアは 0~2 にとどまった。言い換えると冷却側のみが抑制され、Racine stage 3 に相当する片側のけいれん発作を示した個体はなかった。発作が完全に抑制された期間は冷却した 10 分間のうち、15、10、5 でそれぞれ 4.1 ± 2.2 分、 4.3 ± 1.2 分、 5.9 ± 1.1 分だった (図 1)。

以上の結果から、非焦点部位に行う局所脳冷却での十分な発作抑制は 5 で得られ、焦点部位の冷却で効果が現れる 15 よりも強度の冷却が必要であることが判明した。以前の我々の研究で、脳表 15 冷却の効果は皮質第 4 層まで達することと、15 では正常神経機能は抑制されず、10 では抑制されることが証明されている。15 においててんかん発作が抑制され、粗大運動機能が保たれることは、皮質間での線維連絡が遮断され、第 5 層以下にある錐体路や視床への投射ニューロンは抑制されないことで説明した。今回非焦点部位の 5 冷却が効果を示したのは、皮質第 5 層以下の投射性ニューロンまでもが抑制されたためである。神経機能を保ったまま非焦点部位の冷却で全般化発作を抑制することはできず、これが局所脳冷却療法の限界と思われた。

(2) 冷却による神経細胞の活動電位の変化

脱分極閾値は 35、25、15 で -27.0 mV であり、25 では -32.6 mV に低下し、15 では 25 と同等だった。静止膜電位は 35 と 25 の間では差がなく、25 の -65.5 mV から 15 になると -54.0 mV に上昇した。以上のため低電流刺激での初回脱分極は 35、25、15 と温度が下がるに従って発生しやすくなった。電流刺激を強

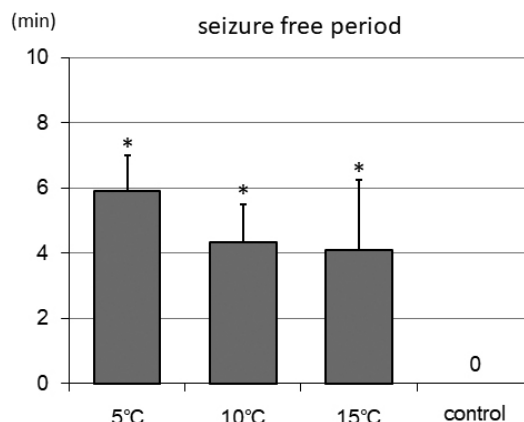


図 1. 冷却中の発作発生時間

非冷却群のラットは 10 分間発作が停止することはなかった。5、10、15 の局所脳冷却を行ったラットではそれぞれ発作が抑制されたが、いずれも発作を起こしている時間の方が長かった。最も発作抑制時間が長かったのは 5 冷却群だった。

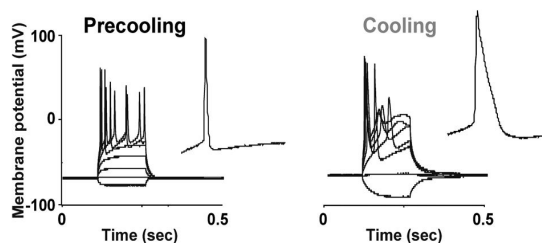


図 2. 25 と 15 における膜電位

15 (Cooling) では 25 (Precooling) に比べて静止膜電位が上昇し、スパイク頻度が低くなり、スパイク幅が広がった。

めるに従い、35 と 25 とでは脱分極の頻度が増加し、その上昇度には差がなかったが、15 では電流刺激を強めても脱分極頻度が上昇せず、他の温度群に比べて有意に低かった。活動電位波形を見るとスパイク幅が 25 では 1.85 ms、15 では 6.55 ms へと有意に広がっていた(図 2)。冷却によって再分極が遅延したことが分かった。低電流刺激での脱分極の発生は頻度が低いため、臨床的なてんかん性異常脳波には直結しない。刺激による脱分極の発生頻度が上昇しやすい状況が、てんかん性放電の発生しやすい状況である。今回の結果から、温度によって神経細胞の電気生理的特性が変化すること、それが脳冷却の発作抑制機序であることが明らかになった。

(3) TRP channel の作動薬および阻害薬による脳保護効果

TRPM8 channel 作動薬によるてんかん波の抑制

イシリンは皮質温度を変化させることなく用量依存的にてんかん様異常脳波を抑制した(図 3)。特に、3 mM のイシリン投与は PG 誘発性てんかん様異常脳波のスパイク振幅、持続時間、発火頻度をいずれも抑制し、さらにてんかん様異常脳波により増加した各周波数帯別パワーを基礎律動レベルまで抑制した。これらのイシリンの抑制効果は TRPM8 拮抗薬である AMTB 投与によって消失した。以上により温度感受性 TRPM8 channel の活性化による抗てんかん作用を検出することができた。

TRPV4 拮抗薬による脳梗塞領域の拡大抑制

脳温を 37 に維持した 2 群間では、TRPV4 拮抗薬を用いた群の方が脳梗塞面積は有意に小さかった。TRPV4 channel 阻害薬の RN-1734 は局所脳冷却に匹敵する脳保護効果を示した。脳温を 15 に冷却した 2 群では、TRPV4 作動薬を用いた群の方が脳梗塞面積は有意に大きかった(図 4)。TRPV4 作動薬の GSK1016790A は局所脳冷却の脳保護効果を打ち消した。以上より、TRPV4 channel の抑制が冷却の作用機序と考えられた。

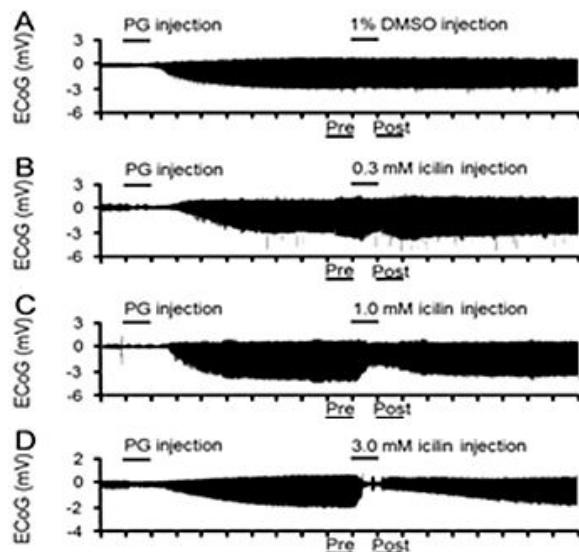


図 3. ペニシリンG誘発てんかんでのイシリンによるスパイク抑制

縦軸に皮質脳波の振幅を示す。(A) TRPM8 channel 作動薬イシリンを投与しなかった群に比べ、脳室内にイシリンを(B) 0.3 mM、(C) 0.0 mM、(D) 3.0 mM 投与した群ではスパイクが容量依存性に抑制された。

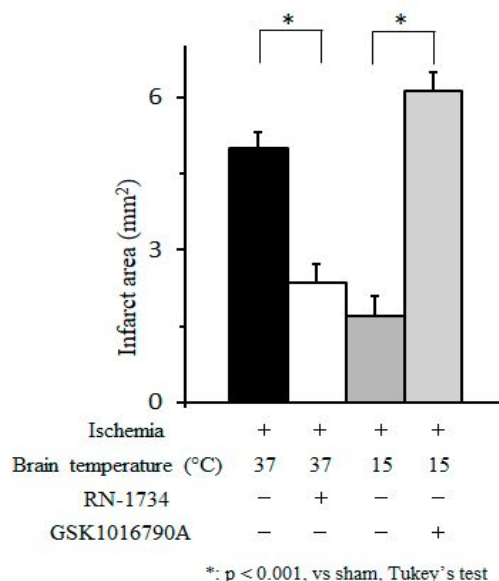


図 4. TRPV4 channel 阻害薬、作動薬による脳梗塞サイズの変化

TRPV4 channel 阻害薬 RN-1734 によって脳梗塞サイズが縮小した。局所脳冷却を行ったラットで TRPV4 channel 作動薬の GSK1016790A を用いると脳梗塞は縮小できなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. He Y, Inoue T, Nomura S, Maruta Y, Kida H, Yamakawa T, Hirayama Y, Imoto H, Suzuki M. Limitations of Local Brain Cooling on Generalized Motor Seizures from Unknown Foci in Awake Rats. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2019 Apr 15;59(4):147-153. doi: 10.2176/nmc.oa.2018-0112. (査読有)
2. Nomura S, Kida H, Hirayama Y, Imoto H, Inoue T, Moriyama H, Mitsushima D, Suzuki M. Reduction of spike generation frequency by cooling in brain slices from rats and from patients with epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018 Aug 17:271678X18795365. doi: 10.1177/0271678X18795365. [Epub ahead of print] (査読有)

[学会発表](計 7 件)

1. 森尚昌, 藤山雄一, 森山博史, 井上貴雄, 岡史朗, 末廣栄一, 石原秀行, 野村貞宏, 鈴木喜郎, 富永真琴, 鈴木倫保. PIT model に対する局所脳冷却および TRPV4 antagonist の脳保護効果. 第 44 回日本脳卒中学会学術集会, 2019 年 3 月 21 日 ~ 23 日, パシフィコ横浜, 横浜市
2. 野村貞宏, 井本浩哉, 井上貴雄, 森山博史, 鈴木倫保. 脳冷却によるてんかん発作抑制の機序解明. 第 42 回日本てんかん外科学会, 2019 年 1 月 24-25 日, 都市センターホテル, 東京都
3. Hiroshi Moriyama, Sadahiro Nomura, Hiroyuki Kida, Takao Inoue, Hirochika Imoto, Yuichi Maruta, Yuichi Fujiyama, Dai Mitsushima, Michiyasu Suzuki. Influence of a cooling compound, icilin, on penicillin G-induced epileptiform discharges in a rat model: Validation of focal cortical cooling effects by TRPM8 activation. Society for Neuroscience 2018, November 3-7, 2018, San Diego, USA
4. 森山博史, 野村貞宏, 木田裕之, 井上貴雄, 井本浩哉, 丸田雄一, 藤山雄一, 土師康平, 美津島大, 鈴木倫保. TRPM8 チャネル活性化による薬剤誘発性てんかん様異常脳波の抑制効果. 第 52 回日本てんかん学会学術集会, 2018 年 10 月 25 ~ 27 日, パシフィコ横浜, 横浜市
5. 森尚昌, 藤山雄一, 森山博史, 井上貴雄, 岡史朗, 末廣栄一, 石原秀行, 野村貞宏, 鈴木喜郎, 富永真琴, 鈴木倫保. PIT model に対する局所脳冷却および TRPV4 antagonist の脳保護効果. 一般社団法人 日本脳神経外科学会 第 76 回学術総会, 2018.10.10-13, 仙台国際センター, 仙台市
6. 野村貞宏, 井本浩哉, 藤山雄一, 森尚昌, 鈴木倫保. ラットの全般性てんかんに対する局所脳冷却療法の効果. 一般社団法人日本脳神経外科学会 第 76 回学術総会, 2018.10.10-13, 仙台国際センター, 仙台市
7. Sadahiro Nomura, Yeting He, Takao Inoue, Hirochika Imoto, Hiroshi Moriyama, Takuma Nishimoto, Michiyasu Suzuki. Suppression of Generalized Onset Motor Seizure in a Rat Model by Focal Brain Cooling. The 46th. International Society for Pediatric Neurosurgery, 2018.10.7-11. Tel Aviv, Israel

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：柴崎 貢志

ローマ字氏名：SHIBASAKI, Koji

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20399554

研究分担者氏名：美津島 大

ローマ字氏名：MITSUSHIMA, Dai

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：70264603

研究分担者氏名：富永 真琴

ローマ字氏名：TOMINAGA, Makoto

所属研究機関名：大学共同利用機関法人自然科学研究機構

部局名：生命創成探究センター

職名：教授

研究者番号（8桁）：90260041

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森 尚昌

ローマ字氏名：MORI, Naomasa

研究協力者氏名：森山 博史

ローマ字氏名：MORIYAMA, Hiroshi

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、研究者個人に帰属されます。