

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06198・19K21303

研究課題名(和文) アストロサイトのTRPV4チャネルを標的とした急性期脳梗塞の画期的治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of treatment for acute ischemic stroke focusing on TRPV4

研究代表者

田中 弘二 (Tanaka, Koji)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：50722344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアストロサイトの足突起にAQP4チャネルと共発現するTransient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4)に注目し、TRPV4の脳梗塞の新規治療標的としての有効性を明らかにするため実験を行った。
Trpv4ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して脳虚血再灌流後の梗塞サイズが小さく、脳浮腫が軽減され、blood brain barrier(BBB)の機能、構造が保持されるとともにアストロサイト足突起の浮腫が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、急性期にTransient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4)を抑制することは再灌流直後のアストロサイト足突起の浮腫を軽減しblood brain barrierを保持することで脳保護的に働くと考えられた。主幹動脈閉塞を伴う急性期脳梗塞に対する急性期再開通療法の進歩が著しい近年において、虚血再灌流後の脳損傷に対する脳保護効果を示した本研究結果の意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the acute phase of ischemia-reperfusion, hypoperfusion associated with ischemia and reperfusion in microvascular regions and disruption of the blood brain barrier (BBB) contribute to post-ischemic brain injury. We aimed to clarify whether brain injury following transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) is ameliorated in Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) knockout (Trpv4^{-/-}) mice. Compared with WT mice, Trpv4^{-/-} mice showed reduced ischemia-induced lesion volume and reduced water content and Evans blue leakage in the ipsilateral hemisphere alongside milder neurological symptoms after the tMCAO. The loss of zonula occludens-1 and occludin proteins in the ipsilateral hemisphere after the tMCAO was attenuated in Trpv4^{-/-} mice. Transmission electron microscopy revealed that parenchymal microvessels in the ischemic lesion were compressed and narrowed by the swollen endfeet of astrocytes in WT mice, but these effects were markedly ameliorated in Trpv4^{-/-} mice.

研究分野：脳血管障害

キーワード：TRPV4 ノックアウトマウス 脳梗塞 アストロサイト 脳浮腫

1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血再灌流後の脳損傷

脳主幹動脈の急性閉塞に伴う脳梗塞は一般的に重症で死亡率が高く、また長期にわたり後遺症を残す。近年、機械的血栓回収療法をはじめとする急性期再開通療法の進歩によって、主幹動脈の高い再開通率が得られるようになってきている。しかし、有効再開通が得られても一部転帰不良となる症例が存在する。そのような症例では虚血再灌流後の脳低灌流や血液脳関門 (blood-brain-barrier; BBB) の破綻によって虚血再灌流後の脳損傷が生じていると報告されている。

(2) Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)

浸透圧感受性陽イオンチャネルとして報告された TRPV4 は、種々の刺激により活性化することが知られている。TRPV4 は中枢神経に多く発現し、特に血管周囲のアストロサイト足突起では aquaporin (AQP) 4 と共発現している。TRPV4 は細胞外の種々の環境変化で活性化しアストロサイトの浮腫や容量調整、種々のシグナル伝達に関与している。TRPV4 拮抗薬の投与によりマウス一過性中大脳動脈閉塞 (transient middle cerebral artery occlusion; tMCAO) モデルにおいて梗塞体積が減少し、matrix metalloprotease (MMP) の産生を抑制することで虚血再灌流後の BBB 機能が保持されることが報告されている。また TRPV4 は脳梗塞周囲での神経細胞やアストロサイトへの Ca^{2+} 流入や細胞外のグルタミン酸濃度増加に関与していることが報告されている。これらの結果から、脳梗塞の急性期に TRPV4 を抑制することは脳保護的に働くことが予想される。

(3) 急性期脳梗塞における TRPV4 の役割

しかし最近、*Trpv4* ノックアウト (knockout; KO) マウスに対する中大脳動脈永久閉塞 (permanent MCAO; pMCAO) モデルを用いた実験で *Trpv4* KO マウスでは野生型 (wild type; WT) マウスと比較して梗塞体積がむしろ増大するとの報告がなされた。このことから、脳梗塞急性期に TRPV4 の機能を抑制することが脳保護的に働くかどうかに関する結論はまだ得られていない。

2. 研究の目的

WT マウスと *Trpv4* KO マウスに対して tMCAO モデルを作成し、TRPV4 が虚血再灌流後の脳損傷に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

WT マウスと *Trpv4* KO マウスはいずれも C57BL/6N 系統を用いた。本実験は九州大学動物実験倫理審査委員会の許可を得て行った (A28-028-4、A30-138-1 および 26-60、1-48)。

(2) tMCAO

マウスを 30%酸素混合 2%イソフルラン吸入麻酔下に Doccol 社製の MCAO suture (#602356) を右総頸動脈から挿入し右 MCA を 30 分間閉塞した。OMEGAWAVE 社製のレーザードブラ血流計を用いて脳血流をモニタリングしながら、MCA の閉塞ならびに再開通を確認した。麻酔中は直腸温をモニタリングし、ヒーティングパッドと赤外線ライトを用いて直腸温を 37 に維持した。

(3) 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色

梗塞体積の評価のため、WT マウスと *Trpv4* KO マウス (各 n = 12) に対して、脳虚血再灌流から 24 時間後にイソフルラン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、1mm 厚の脳切片を作成した。TTC 染色を行い、嗅球から 6mm までの切片を顕微鏡下で撮影し、Image J を用いて、TTC 不染帯の面積を測定し梗塞体積を計算した。

(4) 脳水分含有量

脳浮腫の評価のため、WT マウスと *Trpv4* KO マウス (各 n = 12) に対して、脳虚血再灌流から 48 時間後に同様の手技で脳を取り出し、左右の大脳半球に切り分けたのちに 100 の保温庫で 48 時間乾燥させ、前後の重量を測定し脳水分含有量を測定した。

(5) Evans blue (EB) 漏出

BBB の機能を評価するため、WT マウスと *Trpv4* KO マウス (各 n = 12) に対して、脳虚血再灌流から 46 時間後に尾静脈より 2% Evans blue 4ml/kg を注射し、2 時間後に脳を取り出し、500ul のホルムアミド中で 24 時間静置することで EB を抽出し、吸光度計を用いて 620nm 波長での吸光度を測定し EB の漏出量を計算した。

(6) 神経障害スコア

(4) ならびに (5) で使用したマウスに対して、18 点満点からなる神経障害スコアを 24 時間後、48 時間後に評価した。

(7) ウェスタンブロット

BBB の構成蛋白である zonula occludens (ZO)-1、occludin の発現を調べるため、WT マウスと *Trpv4*KO マウス(各 n = 9)に対して、脳虚血再灌流 48 時間後に脳を取り出し、嗅球から 4mm の部位で右大脳半球の 1mm 厚脳切片を作成した。RIPA バッファーを用いて蛋白抽出を行い、ウェスタンブロットを行った。使用した一次抗体は以下の通りである。

ZO-1: 61-7300, Zymed Laboratories, 1:1000

Occludin: ab167161, Abcam, 1:2000

-actin: A5441, Sigma-Aldrich Japan, 1:20000

ZO-1、occludin の発現量は β -actin のそれで補正した。

(8) Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

アストロサイトの容量調節に重要とされている *Trpv4*、*Kir4.1*、*Aqp4* の baseline での発現を調べるため、WT マウスと *Trpv4*KO マウス(各 n = 5)の脳切片から RNA を抽出し、Applied Biosystems 社製の RT-qPCR システムを用いて各 RNA の発現を調べた。各 RNA の発現量は *Gapdh* のそれで補正した。

(9) Transmission electron microscopy (TEM)

WT マウスと *Trpv4*KO マウス(各 n = 1)に対して、脳虚血再灌流 6 時間後に脳を取り出し、九州大学生体防御医学研究所の協力のもと、右線条体を含む脳切片を用いて電子顕微鏡用の標本を作成した。FEI 社製の Tecnai 20 electron microscope を用いて脳細小血管の形態を 5000 倍で観察した。

(10) 統計解析

統計解析には JMP 8.0 を用いて Wilcoxon rank-sum test ないし Kruskal-Wallis test の事後検定として Dunn 検定を行った。p < 0.05 を統計学的優位は判断した。

4. 研究成果

(1) 虚血再灌流後の脳損傷は *Trpv4*KO により軽減される

*Trpv4*KO マウスでは WT マウスと比較して脳虚血再灌流 24 時間後の梗塞体積が小さく(p = 0.001、図 1A、B)、脳虚血再灌流 48 時間後の健側と患側の水分含有量の差が有意に小さかった(p = 0.003、図 1C)。脳虚血再灌流 48 時間後の EB の漏出は *Trpv4*KO マウスで WT マウスと比較して有意に少なかった(p = 0.001、図 1D)。神経障害スコアは 48 時間後で有意に軽症であった(p = 0.001、図 1E)。

(2) 虚血再灌流後、緻密結合構成蛋白は *Trpv4*KO により保持される

BBB の主要な構成蛋白である ZO-1、occludin のウェスタンブロットを行ったところ、脳虚血再灌流 48 時間後において WT マウスでは ZO-1、occludin の発現が減少していた(p = 0.044、p = 0.019、図 2A、B)のに対して、*Trpv4*KO マウスではその差は明らかではなかった(p = 0.400、p = 0.535)。

(3) RT-qPCR

Trpv4、*Aqp4*、*Kir4.1* の baseline における発現を調べたところ、*Trpv4* の発現は *Trpv4*KO マウスにおいて WT マウスと比較して著明に低下していたが(p = 0.008、図 3)、*Aqp4*、*Kir4.1* の発現低下は明らかではなかった(p = 0.421、p = 0.548)。

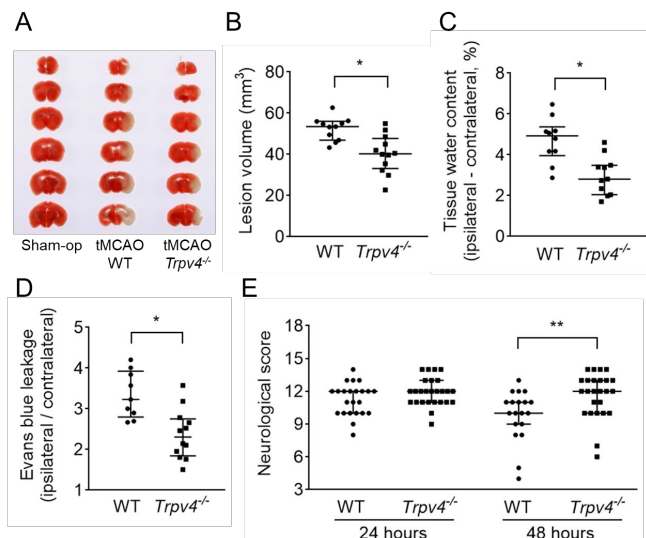


図 1. WT マウスと *Trpv4*KO マウスにおける虚血再灌流後の脳損傷の比較

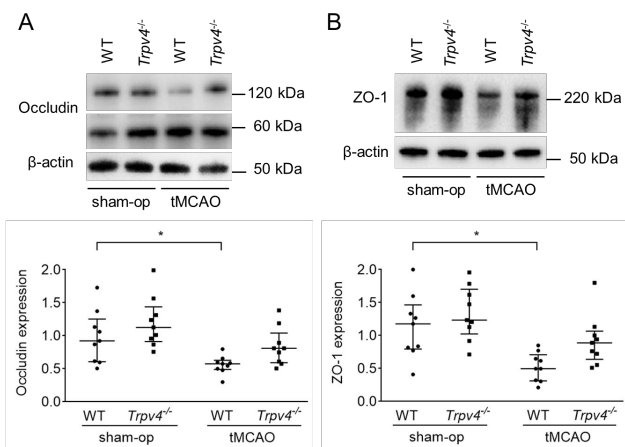


図 2. WT マウスと *Trpv4*KO マウスにおける BBB 構成蛋白のウェスタンブロット

(4) *Trpv4*KO により脳虚血再灌流後のアストロサイト足突起の浮腫が軽減される

脳虚血再灌流 6 時間後の病変側線条体の脳細小血管の形態を TEM で観察したところ WT マウスではアストロサイト足突起の浮腫により血管内腔が著明に狭小化していたが(図 4A、B)、*Trpv4*KO マウスではその変化は軽度であった(図 4C、D)。

【考察と今後の展望】

本研究の結果、*Trpv4*KO により虚血再灌流後の脳損傷が軽減され、BBB が保持されることが分かった。またアストロサイト足突起の浮腫による脳細小血管の狭小化は *Trpv4*KO により軽減された。

過去の報告では再灌流直後に生じるアストロサイト足突起の浮腫は *Aqp4*KO や氷冷した生理食塩水、マンニトールの局所投与で軽減され、結果的に脳損傷を軽減することが報告されている。また狭小化した血管でも通過可能なヘモグロビン含有リポソームを投与することで虚血再灌流後の脳損傷が軽減されるとの報告があり、これらの結果からアストロサイト足突起の浮腫による細小血管の狭小化とそれに伴う脳低灌流が虚血再灌流後の脳損傷に関与していることが推察される。アストロサイト足突起の浮腫の形成機序として AQP4 の発現増加や足突起への局在化が指摘されている。過去の報告では *Trpv4*KO によって AQP4 のアストロサイト足突起への局在化が抑制されることが報告されており、本実験結果においても同様に AQP4 を介した機序が推察される。

*Trpv4*KO マウスでは WT マウスと比較して脳虚血再灌流後の BBB 機能ならびにその構成蛋白が保持されていた。これは過去の TRPV4 拮抗薬を用いた既報告の結果と合致する。肺血管においては TRPV4 を介した血管内皮細胞への Ca²⁺流入によって MMP が活性化し肺血管の透過性亢進がもたらされるとされており、本実験においても MMP を介した機序が推察される。心原性肺水腫に対してはすでに TRPV4 阻害薬である GSK279845 を用いた臨床試験が行われており、肺水腫と脳浮腫ではそのメカニズムが多少異なるものの BBB 保持と浮腫の軽減の観点からも脳梗塞急性期に TRPV4 を抑制することは有効かもしれない。

本研究結果は最近の pMCAO モデルで *Trpv4*KO マウスでは WT マウスよりも梗塞体積が増加するとの報告とは逆の結果であった。この理由として、モデルの違いが影響している可能性がある。脳主幹動脈閉塞を伴う脳梗塞で急性期に再開通が得られない場合、脳損傷の範囲は側副血行に大きく依存する。TRPV4 は血管内皮細胞の endothelial nitric oxide synthase 活性化を介した血管拡張にも関与することが報告されている。*Trpv4*KO マウスでは軟膜血管吻合の拡張が不良なために、pMCAO においてはむしろ虚血の範囲が広くなり、*Trpv4*KO の脳保護効果が打ち消された能性がある。

また、TRPV4 はアストロサイト以外に末梢血中の好中球にも多く発現している。過去の報告では *Trpv4*KO によって好中球の遊走と活性化、reactive oxygen species (ROS) 産生が抑制され、急性肺障害に対して保護的に作用することが報告されている。脳梗塞でも血管再開通後に好中球が病変組織に達することによって脳損傷が進行することが報告されており、好中球由来の ROS を介した脳損傷に対しても TRPV4 の抑制が保護的に働いている可能性がある。

一方で本実験は脳虚血再灌流後短期間の観察のみであり、長期的な転帰との関連に関しては今後も検討が必要である。

本研究結果から急性期虚血性脳卒中における *Trpv4*KO による脳保護効果の一端が解明された。急性期再開通療法の進歩が著しい現在において TRPV4 は新たな急性期脳梗塞の治療ターゲットとなりうる。

我々は今後もマウス脳虚血再灌流モデルでの TRPV4 阻害薬の脳室内投与による脳保護効果の検証を行うとともに、培養細胞を用いた BBB 再構築モデルにおける実験を継続し、TRPV4 を標的とした急性期脳梗塞の新規治療法の確立を目指す。

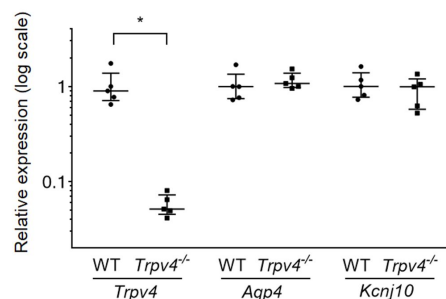


図 3. WT マウスと *Trpv4*KO マウスにおける *Trpv4*、*Aqp4*、*Kir4.1* の mRNA 発現

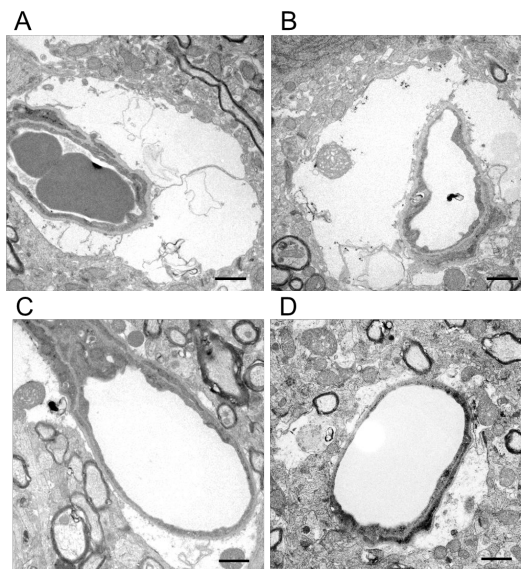


図 4. WT マウスと *Trpv4*KO マウスにおける *Trpv4*、*Aqp4*、*Kir4.1* の mRNA 発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koji Tanaka, Shoji Matsumoto, Takeshi Yamada, Ryo Yamasaki, Makoto Suzuki, Mizuho A Kido, Jun-ichi Kira	4. 巻 14
2. 論文標題 Reduced post-ischemic brain injury in Transient receptor potential vanilloid 4 knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Neurosci	6. 最初と最後の頁 453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.00453.	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 Koji Tanaka, Shoji Matsumoto, Takeshi Yamada, Sukehisa Nagano, Kei-ichiro Takase, Taketo Hatano, Ryo Yamasaki, Jun-ichi Kira	4. 巻 28
2. 論文標題 Temporal Trends in Clinical Characteristics and Door-to-Needle Time in Patients Receiving Intravenous Tissue Plasminogen Activator: A Retrospective Study of 4 Hospitals in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis	6. 最初と最後の頁 104305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104305.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koji Tanaka, Shoji Matsumoto, Konosuke Furuta, Takeshi Yamada, Sukehisa Nagano, Kei-ichiro Takase, Taketo Hatano, Ryo Yamasaki, Jun-ichi Kira	4. 巻 50
2. 論文標題 Modified diffusion-weighted imaging-Alberta Stroke Program Early Computed Tomography Score including deep white matter lesions predicts symptomatic intracerebral hemorrhage following intravenous thrombolysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Thromb Thrombolysis	6. 最初と最後の頁 174-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11239-019-01979-7.	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 Koji Tanaka, Shoji Matsumoto, Konosuke Furuta, Takeshi Yamada, Sukehisa Nagano, Kei-ichiro Takase, Taketo Hatano, Ryo Yamasaki, Jun-ichi Kira	4. 巻 49
2. 論文標題 Differences between predictive factors for early neurological deterioration due to hemorrhagic and ischemic insults following intravenous recombinant tissue plasminogen activator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thromb Thrombolysis	6. 最初と最後の頁 545-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11239-019-02015-4.	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 1件）

1. 発表者名 Koji Tanaka, Shoji Matsumoto, Takeshi Yamada, Ryo Yamasaki, Mizuho A Kido, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Reduced post-ischemic brain injury in Transient receptor potential vanilloid 4 knockout mice
3. 学会等名 International Stroke Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----