

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700309

研究課題名（和文） 温度センサーによる脳機能調節

研究課題名（英文） Regulation of brain function by thermo-sensor

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、野生型と TRPV4 欠損マウスの海馬より培養神経細胞を調整し、静止膜電位および発火特性を調べた。その結果、海馬神経細胞において、TRPV4 は体温により活性化されており、その活性化を介して静止膜電位を脱分極させ、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。さらに、個体レベルでの TRPV4 の学習・記憶に果たす役割を調べ、TRPV4 が脳内温度で恒常的に活性化されていることを証明した。

研究成果の概要（英文）：I found hippocampus strongly expressed *TRPV4* in addition to cholid plexus, where *TRPV4* expression was been reported. I considered that body temperature activates brain TRPV4, and the activation might contribute to depolarization of the resting membrane potential (RMP). I compared the RMP between wild-type and *TRPV4*-deficient neurons at 37°C, and found the wild-type RMP was approximately 5 mV more depolarized than the *TRPV4*-deficient RMP. I also performed current-injection experiments in both neurons, and found that *TRPV4*-deficient neurons required much bigger currents to get their firing. Furthermore, I found that glutamate-induced Ca²⁺ influx in wild-type neurons was much bigger than that in TRPV4-deficient neurons at 37°C. APV (a blocker of NMDA receptors) inhibited the enhancement of glutamate-induced Ca²⁺ influx in wild-type neurons at 37°C, suggesting that body temperature depolarized RMP near the thresholds for NMDA receptor activation compared with room temperature condition. Therefore, I conclude that TRPV4 is activated by body temperature in hippocampus, and produces proper environments for their firing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：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：TRPV4、海馬、体温、脳内温度、神経興奮

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℃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) が生体内で起き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。これらのことを統合し、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

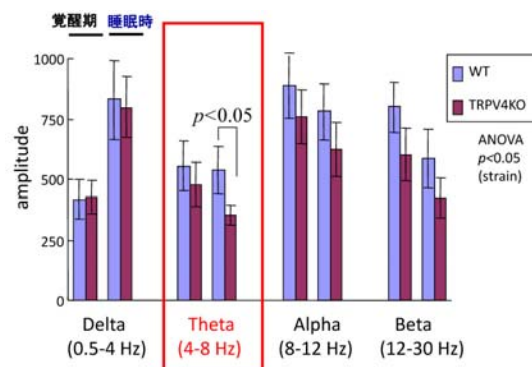
野生型 (C57BL6) あるいは、TRPV4 遺伝子欠損 (TRPV4KO) マウスの大脳皮質に脳波電極埋め込み手術を施した。その後、術後一週間経過後 (手術からの回復を待ち)、4台の赤外線カメラでマウスの行動観察を行いながら、自由行動下のマウスの脳波、筋電図 (頸部より) の測定を行った。マウスのカメラ画像、筋電図、脳波パターンを元に得られたデータを覚醒時脳波、睡眠時脳波に分類し、野生型と TRPV4KO マウスの生体内での神経活動の違いを検証した。上記、TRPV4 の

海馬神経興奮に及ぼす影響 (脳波測定) を調べるために、海馬局所の温度変化をリアルタイムに測定す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サーミスター (先端直径 200 micro m) と誤差範囲を最小限に抑える温度測定器を作製した。

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

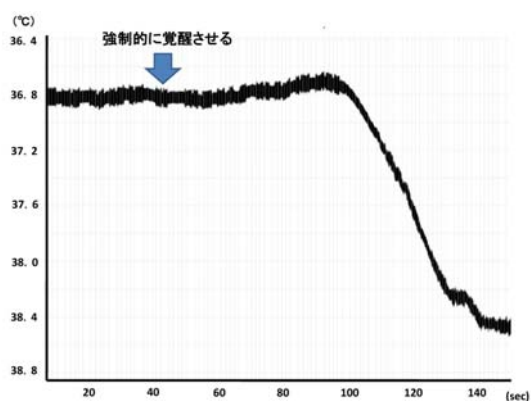
野生型と TRPV4KO マウスの脳波を比較したところ、海馬神経活動を反映するシータ波が、睡眠時に TRPV4KO マウスで野生型よりも有意に小さいことを見いだした (下図)。覚醒時には統計的に有意な差が認められなかったこと (下図) より、覚醒時には TRPV4 以外の様々な因子が神経興奮に寄与し、系統間での違いが見えにくくなっていることが示唆された。一方、睡眠時には純粋に basal な海馬神経活動を見ることができると、体温による TRPV4 活性化を介した海馬神経活動に系統間での違いが現れたと考えられた。



2) 海馬温度のリアルタイム測定系の開発

方法の項で述べた新規サーミスターをマウス海馬に埋め込み、自由行動下の海馬温度を測定した。覚醒時、睡眠時の海馬温度の変化を測定したところ、覚醒・睡眠で海馬の温度変化は+2.0℃程度あることが判明した (下図)。また、行動時に海馬神経活動が活発になる際 (シータ波が出る状態) には、海馬温度がおよそ 0.5℃上昇しており、海馬温度はマウスの行動に応じてダイナミックに変化することが示唆された。このダイナミックな

温度変化が TRPV4 のさらなる活性化をもたらす可能性が考えられた。



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 9 件)

*は報告者が責任著者であることを示す

- ① 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.* inpress (査読あり)
- ② 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)
- ③ 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)
- ④ 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)

- ⑤ Asano T, Uno H, Shibasaki K, Tominaga M, and Urisu T. Development of Cell Culture Type Planar Ion-Channel Biosensor. *Transaction of Materials Research* 33: 767-770, 2008 (査読あり)
- ⑥ Fujita F, Uchida K, Moriyama T, Shima A, Shibasaki K, Sokabe T, Tominaga M, Intracellular alkalization causes painsensation through TRPA1. *Journal of Clinical Investigation* 118: 4049-57, 2008 (査読あり)
- ⑦ Urisu T, Asano T, Zhang T, Uno H, Tero R, Han J, Isoda H, Arima Y, Iwata H, Shibasaki K, Tominaga M. Incubation type Si-based planer ion channel biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:2703-2709, 2008 (査読あり)
- ⑧ Zhang ZL, Asano T, Uno H, Tero R, Suzui M, Nakao S, Kaito T, Shibasaki K, Tominaga M, Utsumi Y, Gao YL, Urisu T Fabrication of Si-based Planar Type Patch-Clamp Biosensor Using SOI Substrate. *Thin Solid Films*, 516: 2813-2815, 2008 (査読あり)
- ⑨ 柴崎貢志、富永真琴、「神経系の TRP チャネルと体温」 *Clinical Neuroscience*, 26(7), 714, 2008 (査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 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)
- ② 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)

- ③ 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)
- ④ Koji Shibasaki, TRPV2 enhances axon outgrowth through membrane stretch activated property in developing sensory and motor neurons. 国際生理学会 (シンポジウム講演)、2009年8月1日、京都国際会館 (京都)
- ⑤ 柴崎貢志、膜伸展刺激活性化チャネルを介した軸索伸長の制御：新規ポジティブフィードバック機構、日本神経化学会 (シンポジウム講演)、2009年6月18日、伊香保ホテル天坊 (群馬)
- ⑥ Koji Shibasaki, Namie Murayama, Makoto Tominaga Thermo TRP channels, TRPV2 and TRPA1 regulate axon outgrowth in developing dorsal root ganglion and motor neurons.、Forum of European Neuroscience、2008年7月11日、ジュネーブ会議場 (スイス)
- ⑦ 柴崎貢志、村山奈美枝、富永真琴、TRPV2/TRPA1 による相補的な軸索伸長調節、日本神経科学学会、2008年7月9日、東京国際フォーラム (東京)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：小動物用局所脳内温度測定センサー
 発明者：柴崎貢志、中山誠
 権利者：中山誠
 種類：特許
 番号：P-2009-0301
 出願年月日：2009.4.4
 国内外の別：国内

〔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：