

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640003

研究課題名(和文)脳内加温冷却システムを用いた神経疾患の治療

研究課題名(英文)Development of a therapeutic method for neurological disorders focusing on artificial temperature control

研究代表者

柴崎 貢志 (Shibasaki, Koji)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20399554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳内の局所温度を自在にコントロールすることで、神経疾患の画期的な治療法となる可能性がある。この点に着目し、マウスの脳内に埋め込むことで局所(1mm³周囲)脳内温度を上は42℃、下は28℃まで加温冷却出来る局所脳内温度可変システムを開発した。そして、脳内冷却に伴う組織損傷や細胞死の有無を調べた。その結果、脳内温度を正常温度の37℃から30℃まで低下させた場合には、全く組織損傷や細胞死は観察されなかった。これらの点より、局所脳冷却を治療に用いた場合には組織損傷を伴う副作用は生じないことが確認出来た。そして、てんかん原性域を30℃まで低下させることで充分にてんかん発作の抑制を出来ることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Artificial control of brain temperature is one of the therapeutic method for neurological disorders. We newly developed a novel electrical device to control the brain temperature in a restricted area. This device can locally control mouse brain temperature from 30℃ to 42℃ in vivo. Firstly, we examined whether local brain cooling caused tissue damage and cell death, and confirmed that none of those was occurred in the cooling region. We speculated that brain cooling treatment at epileptogenic foci could effectively suppress epileptic discharges. Notably, the cooling treatment drastically suppressed neuronal discharges without any side effects including the tissue damage and cell death.

研究分野：分子神経生理学

キーワード：脳内温度 温度 TRPV4 冷却 てんかん 治療 TRPチャンネル 温度センサー

1. 研究開始当初の背景

研究実施者は以前の研究で、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: 5552-62, 2002)、アラキドン酸の代謝産物 (Nature 424: 434-38, 2003)、低浸透圧刺激 (Cell 103: 525-35, 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。このことは、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) が、中枢神経系においては神経活動調節のように全く異なる役割を担う可能性を示唆していた。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 は脳内温度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 Shibasaki ら、J. Neurosci. 2007)。この脳内温度による土台環境の形成により、NMDA 受容体の Mg^{2+} ブロックがはずれやすくなっており、脳内温度による TRPV4 の活性化が神経細胞の活動を規定する重要な要因であることを明らかとした。これは世界初の知見であり、他に類似の研究成果は存在しない。つまり、我々が体温を維持していることは、外界の温度変化に対する耐性機能や、消化酵素などの活性を維持することの他に、神経活動を正に制御し、学習・記憶を行いやすい環境を作りだしている可能性が考察された。

この知見により脳内温度が高くなれば、神経興奮性が向上することが示され、40 以上の高温発熱で生じる熱性痙攣のメカニズムに TRPV4 が密接に関連する可能性が示された。逆に、脳内を TRPV4 活性化温度閾値である 34 以下にまで低下すれば、痙攣発作を抑制出来る可能性が示唆された。

この知見は、脳内温度情報を電気信号へと変換し、神経情報伝達に活かす機構の存在を意味する。この知見を元に脳内温度の恒常性を考察した結果、行動・神経活動変化に依存して、限られた局所においては脳内温度がダイナミックに変動している可能性が浮かび上がった。しかしながら、既存のシステムや測定方法では、そのような局所脳内温度の変動計測が不可能であったために、民間企業と共同でそのシステムを構築した。睡眠から覚醒期への移行に伴い脳内温度が約 0.5 上昇し、この温度上昇を TRPV4 が検出することにより神経活動が正に調節され、覚醒時の行動制御に用いられる新たな生理機構を見いだ

している。さらには、これらの知見を土台に、脳内で神経の異常興奮が起こった場合に局所の脳内温度が変化しているのではないかと仮説を立て、てんかん発作の最中に脳内の関係部位で温度上昇が起ることを確認し、脳内カニューレから冷却した人工脳脊髄液を注入すると、てんかん脳波が減弱し、痙攣行動を抑制出来ることも観察した。

これらの結果より、脳内局所の温度を自在にコントロールすることが出来れば、有用なてんかん発作治療法開発に結びつく可能性が考察された。そして、この操作を実現するために脳内局所の温度を人工的に任意に冷却・加温することが出来る脳内温度可変装置を開発した。

2. 研究の目的

申請者は世界で初めて、室温条件下よりも脳内温度環境下で海馬神経細胞の興奮性が向上する分子メカニズムを明らかとした (Shibasaki et al. J. Neurosci. 2007 発表)。海馬には温度センサー・TRPV4 (34 以上で活性化) が高発現しており、脳内温度がこのセンサー分子を活性化することにより神経興奮性が向上していた。

本申請では、この脳内温度可変装置を用いて、部分てんかんモデルマウスに対する治療効果を評価し、その臨床応用を目指した。日本国内だけで「てんかん患者」は 100 万人、主な世界医薬品市場 7 カ国合計でも「てんかん患者数」は約 520 万人もいて、多くの人々が日常生活で突発的に起こる痙攣発作に苦しんでいる。既存のてんかん治療薬は効能が低いことに加え、肝臓障害などの副作用がひどいため、治療法としてはあまり有効ではない。そこで、異常神経回路が特定されており、治療法開発を目指した実験系として最適な部分てんかんモデルマウスをキンドリング刺激により作製し、部分てんかん発作に伴う痙攣発作時の神経活動変化と脳内温度変化の関連性を検証し、てんかん発作時の局所脳内温度変化を調べると同時に、脳内温度コントロールを用いた新規治療法開発を目指した。てんかんモデルマウスの大脳皮質に申請者が開発した脳内温度可変プローブを埋め込み、人工的に局所脳内を冷却する。まず、この冷却処置中の加熱効果の検証も行い、冷却に伴う副作用やその軽減の可能性を調べる。脳内温度環境を人為的に変化させた場合の TRPV4 活性を調べ、神経活動が正常レベルにどの程度近づくのかを検討した。

3. 研究の方法

脳内温度可変装置でてんかんモデルマウスの原性域の温度を TRPV4 の活性化温度域値である 34 以下 (30 程度) にまで低下させた場合の組織障害の有無、細胞死の有無

を脳組織標本を作製し、評価した。また、脳内温度を低下させた際に、てんかん発作がどの程度抑制出来るのかを脳波測定により評価した。脳内温度冷却中に、脳内温度可変装置を用いて、てんかん原性域を加温した場合のマウスの行動や組織障害の有無、細胞死の有無に関しても調べた。

また、神経細胞以外の神経系細胞には TRPV4 が発現していないかどうかについても調べた。この点を明らかにするために、脳内における TRPV4 発現を解析した。その結果、TRPV4 は神経細胞に加え、アストロサイトにも発現していることが明らかになった。アストロサイトに発現する TRPV4 が機能的であるのかを調べるために、培養アストロサイトに人工的な化学合成リガンドの投与を行い、アストロサイトに興奮が惹起されるのかをカルシウムイメージング法を用いて調べた。

野生型と TRPV4KO マウスの 2 系統を用いて、部分てんかんモデルマウスを作製した（上述したキンドリング刺激法により作製）。そして、これらのマウスの異常部位に脳波電極、脳内温度可変プローブ（温度計機能も有する）を埋め込み、てんかん脳波とマウスの痙攣具合・筋電図を指標に野生型マウスでは、TRPV4KO マウスよりもてんかん発作が起りやすいことを確認した。

さらに、てんかん発作の最中に異常神経興奮を引き起こしている異常部位を 34 以下（TRPV4 の活性化温度域値）に低下させた場合に、野生型においてはてんかん発作が抑制されることを調べた。TRPV4KO マウスの場合と比較することで、脳内温度で活性化している TRPV4 を不活性化することでてんかん発作の抑制につながっていることを確認出来る。実験終了後にマウス脳切片を作製し、それらの *c-fos* や *arc* 発現を調べ（*in situ* hybridization 法により mRNA 発現を調べること、脳内温度変化に対応したダイナミックな神経興奮変化を起こした神経を同定できる）、脳内温度冷却に伴い脳内においてこの領域の神経活動が影響を受けたのかも検討した。これらのデータを元に、脳内冷却 TRPV4 活性の低下 神経興奮の抑制 てんかん発作の抑制が可能であることを立証した。また、脳内冷却を何度まで行えば、もっとも有用なてんかん発作の軽減が行えるのかを調べ、部分てんかん発作に対する最大効果が得られる温度条件を調べた。

次に、同様のてんかん発作実験の最中に異常神経興奮を引き起こしている異常部位に脳内カニニューレを通じて、TRPV4 特異的阻害薬（別の共同研究で開発中）を注入し、脳内冷却の代替として、TRPV4 特異的阻害薬を用いて、てんかん発作の抑制が可能であるのかも調べた。野生型と TRPV4KO マウスを用いた実験を行うことで、TRPV4 活性の特異的な阻害を介した作用であるのかを検証できた。

これらの実験を通じて、我々が脳内温度

を保つことが脳機能に与える影響を細胞レベル、個体レベルから検証し、神経の機能調節機構としての TRPV4 イオンチャネル・体温/脳内温度維持の新たな役割を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

研究実施者は自身が開発した局所脳内温度可変システムを用い、脳内冷却に伴う組織損傷や細胞死の有無を調べた。その結果、脳内温度を正常温度の 37 から 30 まで低下させた場合には、全く組織損傷や細胞死は観察されなかった。これらの点より、局所脳冷却を治療に用いた場合には組織損傷を伴う副作用は生じないことを確認した。そして、てんかんモデルマウスを利用して、局所脳内温度可変システムでてんかん原性域を 30 まで低下させることで充分にてんかん発作の抑制が組織損傷などの副作用無しに出来ることを見いだした。

TRPV4 以外の温度センサーは脳内に発現していないのであろうか？この点を明らかにするために、脳内における TRPV2 発現を解析した。その結果、TRPV2 がアストロサイトに発現していることが明らかになった。アストロサイトに発現する TRPV2 が機能的であるのかを調べるために、培養アストロサイトに人工的な侵害熱刺激（60 度程度までの加温）の付加を行い、アストロサイトに興奮が惹起されるのかをカルシウムイメージング法を用いて調べた。その結果、培養アストロサイトは約 50 度以上の熱刺激により興奮すること、その興奮が TRP チャネル阻害剤 Ruthenium Red で阻害されることが明らかになった。これらの結果は、アストロサイトにも機能的な TRPV2 が発現している可能性を強く示唆していた。そこで、アストロサイトに TRPV2 が機能的に発現していることを直接確かめる実験を行った。培養アストロサイトを識別するために GFAP プロモーター下に EGFP を発現するコンストラクトを作製し、これを細胞に遺伝子導入した。そして、緑色に光った細胞のみから電流応答を取ることで、GFAP 陽性アストロサイトの性質を調べた。さらに遺伝子導入時に、pCAG (Mock)あるいは pCAG -ドミナントネガティブ TRPV2 変異体 (DN-TRPV2) のどちらかを発現させた。これらの細胞に 55 度程度の熱刺激を行い、熱活性化電流の大きさを調べた。その結果、Mock 群では外向き整流性の大きな電流が観察されたが、DN-TRPV2 群ではその電流が消失していた。これらの結果から、運動神経・感覚神経以外に、アストロサイトにも機能的な TRPV2 が発現していることが示された。さらにこの解析の中で、TRPV4 もアストロサイトに RNA 発現が認められること、34 度以上の温刺激に伴う TRPV4 活性化電流が観察されることも明らかになった。

そこで、アストロサイトに発現する TRPV4 の生理学的意義を解析したところ、脳内で神経細胞が活動し、アラキドン酸が産生すると、これを少数だけ存在する TRPV4 陽性アストロサイトがキャッチ。するとグリア性伝達物質である ATP が放出することが判明した。この ATP を介して、周りのアストロサイトへと次々に興奮信号が伝播し、それらのアストロサイトから別の伝達物質であるグルタミン酸が放出し、神経活動が増強することを突き止めた。

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 7 件)

は報告者が責任著者であることを示す

*Naruse M, *#Shibasaki K, Yokoyama S, Kurachi M, Ishizaki Y. Dynamic Changes of CD44 Expression from Progenitors to Subpopulations of Astrocytes and Neurons in Developing Cerebellum. *PLoS ONE* 2013;8(1): e53109 (査読あり)*Co-1st author

#Shibasaki K, Ishizaki Y, Mandadi S. Astrocytes express functional TRPV2 ion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441: 327-332 (2013)

Okano-Uchida T, Naruse M, Ikezawa T, Shibasaki K, Ishizaki Y. Cerebellar neural stem cells differentiate into two distinct subtypes of astrocytes in response to CNTF and BMP2. *Neuroscience Letters* 552 15-20 (2013)

Kayakabe M, Kakizaki T, Kaneko R, Sasaki A, Nakazato Y, Shibasaki K, Ishizaki Y, Saito H, Suzuki N, Furuya N, Yanagawa Y. Motor dysfunction in cerebellar Purkinje cell-specific vesicular GABA transporter knockout mice. *Front Cell Neurosci.* 7:286 (2014)

Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M. Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J.* 28(5):2238-48 (2014)

#Shibasaki K, Ikenaka K, Tamalu F, Tominaga M, Ishizaki Y. A novel

subtype of astrocytes expressing TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. *J. Biol. Chem.* 289 (21):14470-80 (2014) <cover of the paper> 毎日、上毛新聞に掲載

#Shibasaki K, Tominaga M, Ishizaki Y, Hippocampal neuronal maturation triggers post-synaptic clustering of brain temperature-sensor TRPV4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458: 168-173 (2015)

[学会発表](計 6 件)

Shibasaki K, Yamada K, Miwa H, Tominaga M, Ishizaki Y. TRPV4 is a critical determinant for neuronal excitability through its converter function from temperature to electrical activity. *Neuro2013 2013年6月20日(京都)*

Shibasaki K, Yamada K, Miwa H, Tominaga M, Ishizaki Y. TRPV4 is a critical determinant for neuronal excitability through its converter function from temperature to electrical activity. *国際生理学会 (IUPS) 2013年7月12日(英国)*

Shibasaki K, KF Tanaka, Ishizaki Y. Local temperature changes of epileptogenic zone relate to disease progression through enhancement of TRPV4 activity. *日本生理学会 2014年3月18日(鹿児島)*

Shibasaki K, Ishizaki Y, Mandadi S. Astrocytes express functional TRPV2 ion channels. *欧州神経科学会議 (FENS) 2014年7月10日(イタリア)*

柴崎貢志 てんかんの病態悪化に関わる温度センサーTRPV4 *日本生理学会 2015年3月21日(神戸)シンポジウム講演*

柴崎貢志 神経活動を制御する特殊なアストロサイト亜集団 *日本生理学会 2015年3月22日(神戸)シンポジウム講演*

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/cs/sibaHP/shibasaki.html>

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・准教授

研究者番号：20399554

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

()

研究者番号：