

学位論文（博士）

局所脳梗塞における TRPA1 活性化の神経保護効果
：野生型マウスとノックアウトマウスからの知見

氏名 岡崎 光希

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 脳神経外科学講座

令和 7 年 1 月

目 次

1. 要旨	1
2. 背景と目的	2
3. 方法	4
(1) 動物	4
(2) 光化学的血栓誘導法	4
(3) 梗塞領域の測定	5
(4) 実験 1：TRPA1 作動薬の投与	6
(5) 実験 2：局所脳冷却	7
(6) 実験 3：エバンスブルー投与	8
(7) 統計	8
4. 結果	9
(1) TRPA1 作動薬の効果	9
(2) TRPA1 欠失における局所脳冷却の効果	10
(3) エバンスブルー漏出	11
5. 考察	13
6. 結語	15
7. 資金提供	15
8. 参考文献	16

1. 要旨

虚血性脳卒中において低体温療法や局所脳冷却（FBC）は神経保護効果を示すが、その合併症や侵襲性から臨床応用には限界がある。我々は、FBC の代替治療として一過性受容体電位（TRP）チャネルの中でも、FBC の温度範囲内で作動する Ankyrin 1（TRPA1）に着目し探索した。TRPA1 の活性化は神経保護効果をもたらすことが報告されており、FBC で見られる神経保護効果に寄与している可能性が示唆される。我々は、TRPA1 を薬理的に活性化することで、FBC の神経保護効果を再現でき、脳梗塞に対するより侵襲の少ない治療が可能になると考えた。野生型（WT）マウスと TRPA1 ノックアウト（TRPA1KO）マウスの光化学的血栓誘導法による局所脳虚血モデルにおいて、TRPA1 作動薬と FBC の効果を検討した。WT マウスでは TRPA1 作動薬である allyl isothiocyanate の脳室内投与により梗塞領域は約半分に縮小し、これは FBC と同程度であった。TRPA1KO マウスは WT マウスよりも梗塞領域が大きかったが、FBC は両群とも梗塞領域を有意に減少させた。さらに、血液脳関門の破綻の程度の評価に用いられるエバンスブルーの漏出量は、TRPA1KO マウスでは WT マウスの約 2 倍であった。これらの所見は、TRPA1 作動薬の神経保護効果の可能性と、TRPA1 欠失による虚血に対する脆弱性の増大を強調するものであった。また同時に、FBC の神経保護効果が TRPA1 の関与なしに発揮、あるいは TRPA1 が関与していても限定的である可能性を示唆している。本研究は、TRPA1 が虚血性脳卒中における神経保護に重要であり、新規の治療法を提供する可能性があることを示唆し

ている。

2. 背景と目的

脳卒中は世界的に死亡および身体障害の主な原因であり、その多くは虚血性脳卒中が占めている[1, 2]。人口の増加と高齢化により、虚血性脳卒中の罹患率は今後数十年で大幅に増加すると予想されている[3]。急性虚血性脳卒中に対して承認されている唯一の薬理的治療は、遺伝子組換え型組織プラスミノゲン活性化因子であるアルテプラザーとテネクテプラザーによる静脈内血栓溶解療法である。大血管の閉塞に対しては、血管内治療と機械的血栓回収術を併用することができる。しかし、これらの治療で救命できない梗塞に対する有効な治療法は存在しない。低体温療法の神経保護効果は古くから確立されているが、虚血性脳卒中を含む神経細胞傷害の治療に全身的な低体温療法を用いることは、不整脈、シバリング、感染症、凝固障害などの重篤な副作用のために断念された[4, 5]。これらの合併症を最小限に抑えるために、選択的な脳冷却法が研究されてきた[6-8]。選択的な脳冷却は、非侵襲的冷却と侵襲的冷却に分類できる[9]。侵襲的冷却は、表面冷却や鼻腔内冷却のような非侵襲的方法と比較して、より直接的で標的を絞った局所冷却が可能である。当科では以前、マウス実験用の局所脳冷却(FBC)装置を開発し、その抗虚血効果を実証した[10]。しかし、その有効性は証明されているものの、侵襲的な処置に伴う高いリスクが、臨床使用への大きな障壁となっている。全身的であれ選択的であれ、冷却による神経保護効果には合

併症のリスクが伴うのが現状である。

一過性受容体電位 (TRP) チャネルは膜タンパク質であり、哺乳類の TRP スーパーファミリーは、アミノ酸配列の相同性に基づいて 6 つのサブファミリーに分類されている。TRP チャネルの中には、特定の温度範囲で活性化するものがある。近年、TRP チャネルの温度依存的活性化を利用した治療アプローチが模索されている。例えば、冷却はてんかん様放電を抑制することが知られており [11]、我々の教室は以前、10~26℃の温度で活性化される TRP メラスタチン 8 チャネルを薬理的に活性化すると、冷却しなくてもこれらの放電が抑制されることを示した [12, 13]。これに倣って、TRP チャネルの薬理的活性化は低体温の神経保護効果を模倣し、脳梗塞に対する侵襲性の低い治療法を提供できるのではないかと考えた。

TRP Ankyrin 1 (TRPA1) チャネルはアストロサイト、脳毛細血管内皮細胞、後根神経節、三叉神経節など神経系に広く発現しており、17℃前後の低温で活性化される [14-18]。TRPA1 チャネルの活性化は、脳虚血に対して神経保護作用を示すことが報告されており [19, 20]、局所脳冷却で用いられる温度範囲で作動する TRPA1 チャネルが、局所脳冷却で観察される抗虚血作用に寄与している可能性が示唆される。FBC は、血液脳関門 (BBB) の破綻を予防することにより、局所脳虚血に対する神経保護作用を発揮することが報告されている [21]。TRPA1 チャネルは BBB を構成する毛細血管内皮細胞やアストロサイトに発現していることから、TRPA1 チャネルの活性化による BBB の破綻防止が TRPA1 を介した神経保護作

用に寄与している可能性も考えられた。しかし、低体温の神経保護効果における TRPA1 チャネルの役割と機序を直接的に示した研究はない。本研究では、TRPA1 ノックアウトマウスを用いて、TRPA1 チャネルが脳冷却の神経保護機構に関与しているかどうかを調べた。

3. 方法

(1) 動物

10～15 週齢、体重 25～30g の雄性 C57BL/6 (Wild type : WT) マウス (日本エスエルシー株式会社、福岡県)、および TRPA1 ホモ接合体 KO (TRPA1KO) マウス (富永誠教授、生命創成探求センター温度生物学研究グループ、愛知県) を 1 ケージ 5 匹に分け、12 時間明暗サイクル (午前 8 時点灯) の温度・湿度調整室 (それぞれ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $55\% \pm 5\%$) で標準的な実験条件下で飼育した。動物は餌と水に自由にアクセスできた。すべての動物飼育および実験手順は、山口大学医学部実験動物使用委員会の承認 (J18030 および J23053) を受け、国立大学法人日本実験動物施設協会のガイドラインに従って実施した。

(2) 光化学的血栓誘導法 (PIT)

右半球の一次感覚運動野の局所脳虚血と FBC は、既報と同様に PIT 法と冷却処理を用いて作成した [10]。すべてのマウスは人工呼吸器 (A. D. S. 1000, Engler Engineering Corporation, Florida, USA) を介して供給される酸素と亜酸化窒素

素の 80%/20%混合ガス中で、導入には 3%のイソフルラン (Pfizer, New York, USA)、維持には 1.5%のイソフルランで麻酔された。処置中は直腸温をモニターし、温度制御加温パッド (NS-TC10、ニューロサイエンス社、東京都) を用いて $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持した。

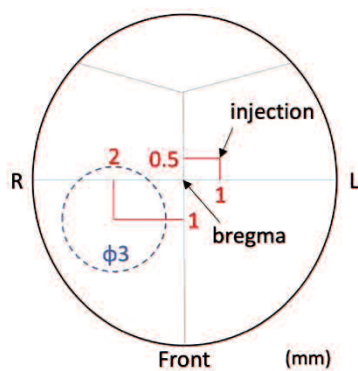


図 1. 開頭範囲および薬剤の脳室内投与時のバーホールの模式図。

(3) 梗塞領域の測定

マウスはローズベンガル静注の 24 時間後に頸椎脱臼にて安楽死させ、リン酸緩衝生理食塩水で経心灌流した。全脳を摘出し、1mm スライスの切片とした。これ

らのスライスを 2%2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 溶液を用いて染色した。4 切片を選択し、梗塞面積を測定した。さらに、各冠状切片の同側半球と対側半球の面積を定量した。すべての測定は Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて行った。脳梗塞急性期には脳浮腫により梗塞容積が過大評価されることがある。浮腫の影響を補正するために、以前に確立された方法に従い、対側半球の面積を同側半球の面積で割って浮腫指数を算出した。次に、測定した梗塞面積を浮腫指数で割って梗塞面積を補正した[22, 23]。その後、補正した梗塞面積の合計を群間で比較した。

(4) 実験 1 : TRPA1 作動薬の投与

TRPA1 作動薬である Allyl isothiocyanate (AITC: Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) を WT マウスおよび TRPA1KO マウスに脳室内投与した。AITC の投与量は、先行報告[22]を参考に事前実験で調整・決定した。対照群には 1%ジメチルスルホキシド (DMSO : Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を脳室内投与した。動物を以下の 4 つの実験群に割り付けた (各群 n=5) : WT マウスへの 1%DMSO 脳室内投与 (WT+1%DMSO 群) ; WT マウスへの 10mM AITC 脳室内投与 (WT+AITC 群) ; TRPA1KO マウスへの 1%DMSO 脳室内投与 (A1KO+1%DMSO 群) ; TRPA1KO マウスへの 10mM AITC 脳室内投与 (A1KO+AITC 群)。動物は無作為に実験群に割り付けられた。脳室内投与のため、開頭手術後、ブレグマの 0.5mm 後方、1.0mm 左

外側に小さな穴をあけた（図 1）。PIT 直後に、30G のステンレス針（TSK ラボラトリー・ジャパン、栃木、日本）を脳表から 2.5mm 穿刺し、薬剤を脳室内投与した。1%DMSO に溶解した 10 mM AITC を、マイクロインジェクションポンプと 10 μ l のハミルトンシリンジ（1701RN-7758-02 ; Hamilton, Reno, NV）を用いて、0.5 μ l/分の速度で 15 分間投与した（合計 7.5 μ l）。漏出を防ぐため、注射針は 45 分間そのまま放置した。対象群には、同量（7.5 μ l）の 1%DMSO を注入した。処置終了後、器具を取り外し、頭蓋骨を皮膚フラップで覆った。麻酔から回復後、マウスはケージに入れられ、自由に飲食できるようにした。

(5) 実験 2 : 局所脳冷却 (focal brain cooling ; FBC)

WT マウスと A1KO マウスの両方で、局所脳冷却の効果を評価した。動物は 4 つの実験群に分けられた（各群 n=5）：脳皮質の温度を 37°C に制御した WT マウス（WT 非冷却群）；15°C で FBC を行った WT マウス（WT 冷却群）；脳皮質の温度を 37°C に制御した TPA1KO マウス（A1KO 非冷却群）；15°C で FBC を行った TPA1KO マウス（A1KO 冷却群）。動物は実験群に無作為に割り付けられた。局所冷却のため、開頭部位に薄型サーモセンサー付きペルチェ装置を設置した。PIT 直後から冷却を開始し、開頭部位の硬膜上 15°C で 60 分間脳表面を冷却した（冷却群）。対照群では、ペルチェ装置を用いて脳温を 37°C に 60 分間維持した。この間も温度制御加温パッドを用いて体温を 37 $\pm$ 1°C に維持し、マウスが麻酔から回復するまで維持した。処置後、冷却装置を取り外し、頭蓋骨を皮膚フラップで覆った。覚醒後

に自由に飲水できるケージに戻した。

(6) 実験3：エバンスブルー (Evans blue ; EB) 投与

BBB の透過性を、WT マウスおよび TRPA1KO マウスともに EB (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) を用いて評価した。マウスは以下の5つの実験群に分けられた (各群 n=4) ; WT マウスの脳表温度を 37°C に制御 (WT 非冷却群) ; WT マウスの脳表温度を FBC で 15°C に制御 (WT 冷却群) ; WT マウスに 10mM AITC を脳室内投与 (WT+AITC 群) ; TRPA1KO マウスの脳表温度を 37°C に制御 (A1KO 非冷却群) ; TRPA1KO マウスの脳表温度を FBC で 15°C に制御 (A1KO 冷却群)。動物は無作為に実験群に割り付けられた。PIT および脳室内の薬剤投与の1時間後に2% EB 溶液 (4 mL/kg) を静注した。その1時間後にマウスを安楽死させ、リン酸緩衝生理食塩水で経心灌流した。脳全体を取り出し、脳の重量を測定した。50%トリクロロ酢酸 (200 μ L) で均質化した。その後、遠心分離 (12,000 $\times$ g、20 分間) し、上清 (150 μ L) をエタノール (1 : 3) で希釈し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) を用いて EB 含量を 620nm で定量した。EB 漏出量は標準曲線を用いて定量し、脳組織 1g あたりの量として示した。

(7) 統計解析

すべての結果は平均値 $\pm$ 平均値の標準誤差で表した。複数群間の梗塞面積と EB

漏出の統計解析は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) に Tukey の検定を加えて行った。すべての検定は両側検定で、統計的有意性は p 値 < 0.05 と定義した。

統計解析は JMP Pro 16.1.0 for MAC (SAS Institute Inc.) で行った。

4. 結果

(1) TRPA1 作動薬の効果

実験 1 の結果を図 2 に示す。技術的失敗のため 1 匹を解析から除外した (A1KO + AITC 群)。一元配置分散分析の結果、群間に有意差が認められた ($F(3, 15) = 9.088$, $p = 0.0011$, $\text{partial } \eta^2 = 0.645$)。その後の一対比較により、WT マウスでは、AITC の脳室内投与により梗塞面積は約半分に有意に減少した (11.61 ± 1.81 vs. $4.40 \pm 1.19 \text{ mm}^2$, $p = 0.0157$)。一方、TRPA1KO マウスでは、AITC の脳室内投与は梗塞容積を減少させなかった。

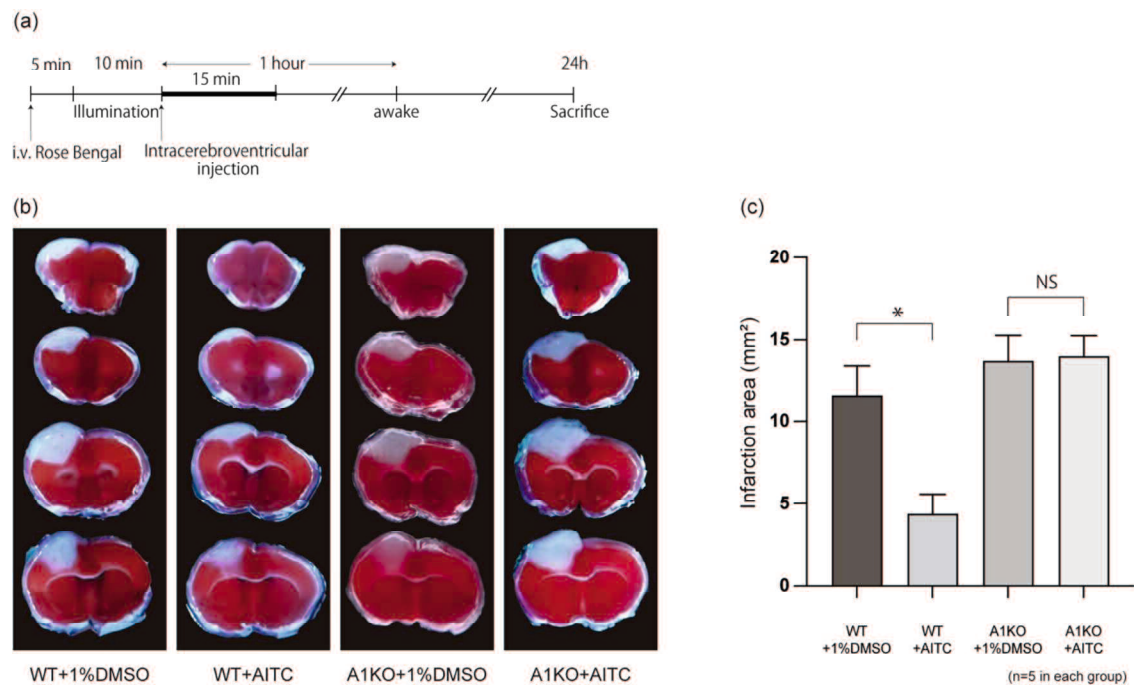


図 2. WT マウスおよび TRPA1KO マウスにおける PIT に対する AITC の効果 (TTC 染色)。

(a) 実験 1 のプロトコール

(b) 各群における PIT 後 24 時間の代表的な TTC 染色; WT+1%DMSO、WT+AITC、A1KO+1%DMSO、A1KO+AITC。

(c) 各群の脳梗塞 (各 n=5) ; WT + 1% DMSO; WT + AITC, A1KO + 1% DMSO, A1KO + AITC。AITC は WT マウスでは梗塞面積を減少させたが、A1KO マウスでは減少させなかった。結果は平均値±平均値の標準誤差で示した;*p < 0.05、Tukey 検定。

(2) TRPA1 欠失における局所脳冷却の効果

実験 2 の結果を図 3 に示す。一元配置分散分析の結果、群間に有意差が認められた ($F(3, 16) = 17.824$, $p < .0001$, $\text{partial } \eta^2 = 0.770$)。WT マウスでは、FBC は梗塞面積を半分以下に減少させた (12.04 ± 1.37 vs. $4.34 \pm 0.65 \text{ mm}^2$, $p = 0.0013$)。A1KO 非冷却群の 1 匹は処置後 24 時間以内に死亡したため、以降の解析から除外した。興味深いことに、FBC は TRPA1KO マウスの梗塞面積を約半分に減少させた (17.20 ± 1.22 vs. $8.95 \pm 1.34 \text{ mm}^2$, $p = 0.0018$)。さらに、TRPA1KO マウスの梗塞面積は WT マウスより大きかった (12.04 ± 1.37 vs. $17.20 \pm 1.22 \text{ mm}^2$, $p = 0.048$)。

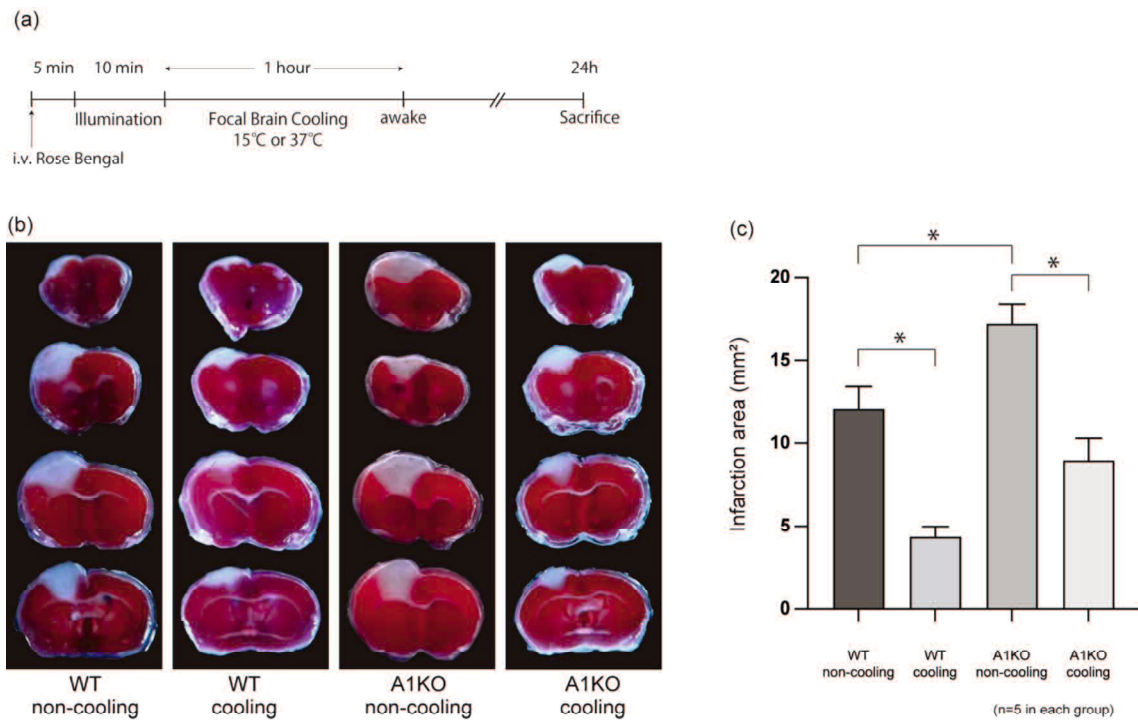


図 3. WT マウスおよび TRPA1KO マウスにおける PIT に対する FBC の効果 (TTC 染色)。

(a) 実験 2 のプロトコール

(b) 各群における PIT 後 24 時間の代表的な TTC 染色 ; WT 非冷却、WT 冷却、A1KO 冷却、A1KO 非冷却。

(c) 各群の脳梗塞 (各 n=5) ; WT 非冷却、WT 冷却、A1KO 非冷却、A1KO 冷却。WT および TRPA1 KO マウスともに、FBC により脳梗塞面積が減少した。TRPA1 KO マウスは WT マウスに比べて梗塞面積が大きかった。結果は平均値±平均値の標準誤差で示した ; *p < 0.05、Tukey 検定。

(3) エバンスブルー漏出

FBC、TRPA1 作動薬、TRPA1 欠失が BBB 破綻に及ぼす影響を調べるため、EB の血管外漏出を評価した。実験 3 の結果を図 4 に示す。技術的失敗のため、1 匹を解析から除外した (A1KO 冷却群)。一元配置分散分析の結果、群間に有意差が認められた ($F(4, 14) = 16.124$, $p < 0.0001$, $\text{partial } \eta^2 = 0.822$)。その後の一対比較では、TRPA1KO マウスでは、PIT 後の EB 漏出量は WT マウスの約 2 倍であった (5.39 ± 0.44 対 $10.72 \pm 1.33 \mu\text{g/g}$, $p = 0.0039$)。WT マウスでは、FBC と AITC 脳室内投与の両方で EB 漏出を減少させたが、統計学的な有意差はなかった (それぞれ $p = 0.2110$; $p = 0.1714$)。同様に、TRPA1KO マウスでも FBC は EB 漏出を減少させたが、統計学的な有意差はなかった ($p = 0.0681$)。

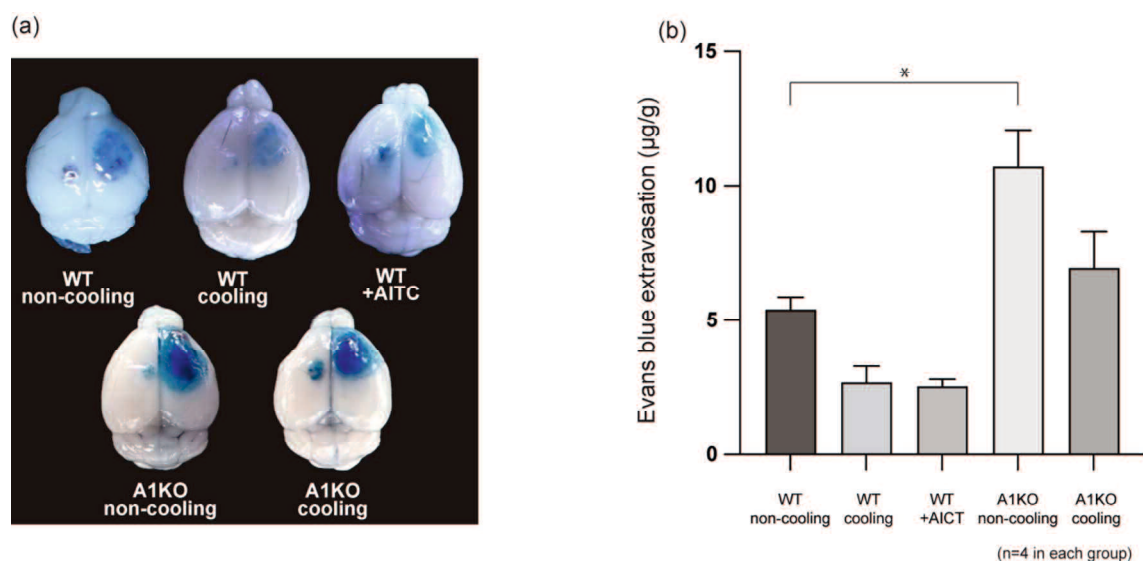


図 4. WT マウスおよび TRPA1KO マウスにおける PIT に対する FBC および AITC の効果 (EB 漏出)。

- (a) 各群における脳実質への EB 漏出の代表例; WT 非冷却、WT 冷却、WT +AITC、A1KO 非冷却、A1KO 冷却。

(b) 脳実質への EB 漏出量を以下の群で測定 (各群 n=4) : WT 非冷却、WT 冷却、WT+AITC、A1KO 非冷却、A1KO 冷却。TRPA1KO マウスは WT マウスに比べて EB 漏出量が多かった。FBC と AITC 投与は漏出量を減少させたが、統計学的な有意差は認めなかった。結果は平均値±平均値の標準誤差で示した ; *p < 0.05、Tukey 検定。

5. 考察

本研究では、TRPA1 チャンネルが脳梗塞に対する FBC の神経保護作用に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。TRPA1 作動薬および TRPA1KO マウスを用い、FBC との効果と比較・検討した。その結果、TRPA1 作動薬の投与は FBC と同様に梗塞領域を縮小させた。意外なことに TRPA1KO マウスは PIT による梗塞領域が大きかった。しかしながら、TRPA1KO マウスに FBC を行くと、われわれの仮説に反して脳梗塞領域は減少した。

TRPA1 作動薬の投与は梗塞領域を有意に減少させたことから、TRPA1 活性化には神経保護作用があることが示唆された。TRPA1 作動薬の神経保護作用はこれまでに報告されている。Pires らは、TRPA1 作動薬であるシンナムアルデヒドを用いて TRPA1 を活性化することで、WT マウスの梗塞領域が減少することを報告している [19]。また、低酸素条件下では、血管拡張作用を有する TRPA1 チャンネルの活性化によって脳血流を改善し、脳虚血に対する神経保護作用を示すことが報告されている [19, 20, 25]。さらに、TRPA1 チャンネルの活性化による抗炎症作用の報

告があり[26]、これも神経保護作用に関与している可能性がある。AITC そのものにも抗炎症作用の報告があるが、TRPA1KO マウスにおいては AITC 投与が梗塞領域を減少させなかったことから、AITC の神経保護作用が TRPA1 チャネルの活性化に依存している可能性を示唆している[27]。他の神経保護メカニズムの可能性を探るため、EB による BBB 破綻の影響も検討した。EB 漏出は FBC と TRPA1 作動薬投与によって抑制されたが、その差は統計学的に有意ではなかった（それぞれ $p = 0.2110$ 、 $p = 0.1714$ ）。

実験 2 では、TRPA1KO マウスの PIT による脳梗塞領域は WT マウスよりも大きかったことから、TRPA1 チャネルは一般的な低温域以外でも活性化されることが示唆された。低酸素は TRPA1 チャネルを活性化し、TRPA1 が通常活性化される温度域に関係なく脳血管拡張を誘導することが報告されている。TRPA1 欠失によりこれらの作用がなくなることが TRPA1KO マウスにおいて観察された脳梗塞領域の増大の一因であると考えられる[19, 20, 25]。実験 2 とは対照的に、実験 1 では、TRPA1KO マウスでは WT マウスに比べて脳梗塞サイズが大きくなる傾向が認められたが、この差は統計学的に有意ではなかった。サンプル数が少ないこと、実験 1 では DMSO を脳室内注射していること、実験 2 では非冷却群でも冷却プローブを脳表面に設置したことなど実験方法の違いが、このような結果の違いにつながったものと推測される。

TRPA1KO マウスの EB 漏出は WT マウスに比べて増加しており、TRPA1 チャネルが BBB 破綻に対して保護的な役割を果たしている可能性が示唆された。脳梗塞は

TRPA1KO マウスでも FBC によって抑制された。このことは、FBC の神経保護作用が TRPA1 チャネルの関与なしに発揮、あるいは TRPA1 チャネルが関与していてもその効果は限定的であることを示唆している。

本研究では、TRPA1 作動薬の神経保護作用と TRPA1 欠失における局所脳虚血の脆弱性を示した。これらの知見は、TRPA1 チャネルが虚血性脳卒中の耐性あるいは保護に重要な役割を果たしていることを示唆している。本研究では、TRPA1 チャネルの FBC の神経保護作用への関与を十分に明らかにすることはできなかったが、TRPA1 作動薬投与による脳梗塞領域の減少は FBC と同程度であり、TRPA1 作動薬の投与が FBC の代替治療となる可能性が示唆された。今後さらに研究が進めば、虚血性脳卒中における TRPA1 チャネルの関与が明らかになり、有効で低侵襲な新しい治療法の開発につながる可能性がある。

6. 結語

虚血性脳卒中において、TRPA1 作動薬は局所脳冷却と同様の神経保護効果を示し、TRPA1 欠失により虚血に対する脆弱性が増大した。

7. 資金提供

著者は、研究、執筆、および本論文の発表に関して、以下の金銭的支援を受けていることを公表する：日本学術振興会科学研究費補助金（19K09458、23K08499）、公益財団法人武田科学振興財団、文部科学省地域イノベーション

ン・エコシステム形成プログラム。

8. 引用文献

1. Roth GA, Forouzanfar MH, Moran AE, Barber R, Nguyen G, Feigin VL, Naghavi M, Mensah GA, Murray CJ. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *N Engl J Med*. 2015 Apr 2;372(14):1333-41. doi: 10.1056/NEJMoa1406656.
2. GBD 2016 lifetime risks of stroke collaborators et al. Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. *N Engl J Med*. 2018 Dec 20;379(25):2429-2437. doi: 10.1056/NEJMoa1804492. PMID: 30575491; PMCID: PMC6247346.
3. Howard G, Goff DC. Population shifts and the future of stroke: forecasts of the future burden of stroke. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Sep;1268:14-20. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06665.x.
4. Safar P, Klain M, Tisherman S. Selective brain cooling after cardiac arrest. *Crit Care Med*. 1996 Jun;24(6):911-4. doi: 10.1097/00003246-199606000-00004.
5. Schwab S, Schwarz S, Spranger M, Keller E, Bertram M, Hacke W. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle

- cerebral artery infarction. *Stroke*. 1998 Dec;29(12):2461–6. doi: 10.1161/01.str.29.12.2461.
6. Harris OA, Muh CR, Surles MC, Pan Y, Rozycki G, Macleod J, Easley K. Discrete cerebral hypothermia in the management of traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *J Neurosurg*. 2009 Jun;110(6):1256–64. doi: 10.3171/2009.1.JNS081320. Erratum in: *J Neurosurg*. 2009 Jun;110(6):1322.
 7. King C, Robinson T, Dixon CE, Rao GR, Larnard D, Nemoto CE. Brain temperature profiles during epidural cooling with the ChillerPad in a monkey model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2010 Oct;27(10):1895–903. doi: 10.1089/neu.2009.1178. Epub 2010 Sep 16.
 8. Choi JH, Poli S, Chen M, Nguyen TN, Saver JL, Matouk C, Pile-Spellman J. Selective Brain Hypothermia in Acute Ischemic Stroke: Reperfusion Without Reperfusion Injury. *Front Neurol*. 2020 Nov 13;11:594289. doi: 10.3389/fneur.2020.594289.
 9. Christian E, Zada G, Sung G, Giannotta SL. A review of selective hypothermia in the management of traumatic brain injury. *Neurosurg Focus*. 2008 Oct;25(4):E9. doi: 10.3171/FOC.2008.25.10.E9.
 10. He Y, Fujii M, Inoue T, Nomura S, Maruta Y, Oka F, Shirao S, Owada

- Y, Kida H, Kunitsugu I, Yamakawa T, Tokiwa T, Yamakawa T, Suzuki M. Neuroprotective effects of focal brain cooling on photochemically-induced cerebral infarction in rats: analysis from a neurophysiological perspective. *Brain Res.* 2013 Feb 25;1497:53-60. doi: 10.1016/j.brainres.2012.11.041. Epub 2012 Dec 23.
11. 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.* 2019 Nov;39(11):2286-2294. doi: 10.1177/0271678X18795365. Epub 2018 Aug 17.
 12. Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature.* 2007 Jul 12;448(7150):204-8. doi: 10.1038/nature05910. Epub 2007 May 30.
 13. Moriyama H, Nomura S, Kida H, Inoue T, Imoto H, Maruta Y, Fujiyama Y, Mitsushima D, Suzuki M. Suppressive Effects of Cooling Compounds Icilin on Penicillin G-Induced Epileptiform Discharges in Anesthetized Rats. *Front Pharmacol.* 2019 Jun 13;10:652. doi: 10.3389/fphar.2019.00652.

14. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003 Mar 21;112(6):819–29. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00158-2.
15. Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, Shibata T, Uchida K, Mori Y. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)*. 2008 Jul-Aug;2(4):287–98. doi: 10.4161/chan.2.4.6745. Epub 2008 Jul 6.
16. Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci*. 2011 Dec 11;15(1):70–80. doi: 10.1038/nn.3000.
17. Sullivan MN, Gonzales AL, Pires PW, Bruhl A, Leo MD, Li W, Oulidi A, Boop FA, Feng Y, Jaggar JH, Welsh DG, Earley S. Localized TRPA1 channel Ca²⁺ signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. *Sci Signal*. 2015 Jan 6;8(358):ra2. doi: 10.1126/scisignal.2005659.

18. Kheradpezhoh E, Choy JMC, Daria VR, Arabzadeh E. TRPA1 expression and its functional activation in rodent cortex. *Open Biol.* 2017 Apr;7(4):160314. doi: 10.1098/rsob.160314.
19. Pires PW, Earley S. Neuroprotective effects of TRPA1 channels in the cerebral endothelium following ischemic stroke. *Elife.* 2018 Sep 21;7:e35316. doi: 10.7554/eLife.35316.
20. Thakore P, Alvarado MG, Ali S, Mughal A, Pires PW, Yamasaki E, Pritchard HA, Isakson BE, Tran CHT, Earley S. Brain endothelial cell TRPA1 channels initiate neurovascular coupling. *Elife.* 2021 Feb 26;10:e63040. doi: 10.7554/eLife.63040.
21. Zhao J, Mu H, Liu L, Jiang X, Wu D, Shi Y, Leak RK, Ji X. Transient selective brain cooling confers neurovascular and functional protection from acute to chronic stages of ischemia/reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Jul;39(7):1215–1231. doi: 10.1177/0271678X18808174.
22. Nouraei C, Fisher M, Di Napoli M, Salazar P, Farr TD, Jafarli A, Divani AA. A Brief Review of Edema-Adjusted Infarct Volume Measurement Techniques for Rodent Focal Cerebral Ischemia Models with Practical Recommendations. *J Vasc Interv Neurol.* 2019 May;10(3):38–

- 45.
23. Reglodi D, Tamas A, Somogyvari-Vigh A, Szanto Z, Kertes E, Lenard L, Arimura A, Lengvari I. Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 2002 Dec;23(12):2227-34. doi: 10.1016/s0196-9781(02)00262-0.
24. Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci.* 2011 Dec 11;15(1):70- 80. doi: 10.1038/nn.3000.
25. Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O_2 . *Nat Chem Biol.* 2011 Aug 28;7(10):701-11. doi: 10.1038/nchembio.640.
26. Landini L, Souza Monteiro de Araujo D, Titiz M, Geppetti P, Nassini R, De Logu F. TRPA1 Role in Inflammatory Disorders: What Is Known So Far? *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 20;23(9):4529. doi: 10.3390/ijms23094529.
27. Subedi L, Venkatesan R, Kim SY. Neuroprotective and Anti-Inflammatory

Activities of Allyl Isothiocyanate through Attenuation of JNK/NF- κ B/TNF- α Signaling. Int J Mol Sci. 2017 Jul 3;18(7):1423. doi: 10.3390/ijms18071423.