

学位論文（博士）

Anti-ischemic Effects of Focal Brain Cooling are
Mediated by Modulation of TRPV4 Channels in Mice
(マウスにおける局所脳冷却の抗虚血効果は
TRPV4 を介する)

氏名 森 尚昌

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. 研究の背景と目的	2
3. 方法	3
4. 結果	6
5. 考察	8
6. 結語	10
7. 参考文献	11
8. 図表	14

要旨

15℃の局所脳冷却（Focal Brain Cooling: FBC）は脳梗塞を軽減することが知られており、TRPV4（transient receptor potential vanilloid 4）の欠損も脳梗塞を軽減することが報告されている。TRPV4 チャンネルは冷却（27℃未満）により不活性化されるため、FBC の抗虚血効果には TRPV4 の不活性化が含まれることが示唆される。しかしながら、TRPV4 の不活性化が FBC の脳梗塞に対する抗虚血効果、抗血液脳関門（Blood Brain Barrier; BBB）破綻効果、および抗アポトーシス効果にどの程度寄与しているのかは不明である。TRPV4 knockout マウスおよび野生型マウスを用いて、脳梗塞に対する FBC の TRPV4 antagonist である RN1734 の寄与と作用機序を検討した。光化学的に血栓症を誘発することによる局所脳梗塞モデルで、梗塞体積、BBB の破綻、およびアポトーシス細胞の数を評価した。TRPV4 antagonist または TRPV4 欠損は、FBC と同様の抗虚血および抗 BBB 破綻効果を示した。RN1734 の脳室内投与は、FBC と同様のアポトーシス細胞数の減少を示した。これらの抗虚血および抗アポトーシス効果は、FBC の直前に TRPV4 agonist である GSK1016790A を投与することで完全に阻害された。我々の結果は、TRPV4 の調節が FBC の抗虚血効果の主な要因であることを示しており、TRPV4 チャンネルの不活性化は、BBB を保護し、アポトーシスを防ぐことで、局所虚血性梗塞を軽減する。したがって、FBC 処置は TRPV4 チャンネルの調節により脳梗塞を軽減する。

研究の背景と目的

脳梗塞は高い罹患率と死亡率を伴うが^{1,2,3}、遺伝子組み換え組織型プラスミノーゲンアクチベータや血栓回収による再疎通により、迅速かつ効果的な機能回復が可能となっている。脳梗塞後、血液脳関門 (Blood Brain Barrier; BBB) が破綻すると脳神経細胞が傷害され、予後不良となるため、その保護は重要である⁴。齧歯類における局所脳冷却 (Focal Brain Cooling; FBC) と急性虚血性脳卒中患者における選択的脳低体温療法は、神経保護作用をもたらすことが報告されている^{5,6,7}。これらの抗虚血効果は、FBC が虚血に対して神経細胞保護作用を有することを示唆しているが、その抗虚血効果のメカニズムは依然として不明である。

FBC の抗虚血効果を考慮し、我々は一過性受容体電位 (Transient Receptor Potential; TRP) チャネルに注目した。TRP チャネルは Ca^{2+} チャネルで、特定の温度範囲内での活性化に依存する生理機能を有する⁸。その中でも、TRP Vanilloid 4 (TRPV4) は、27-37°C で活性化し、大脳皮質、視床、海馬、小脳などの神経細胞に発現している⁹。そのため、冷却 (27°C 未満) および TRPV4 antagonist によって不活性化される^{10,11}。

15°C での FBC、TRPV4 antagonist の投与、および TRPV4 欠損は、脳梗塞を軽減する^{6,12,13}。TRPV4 チャネルは 15°C で冷却することで不活性化される¹⁰ことから、FBC の抗虚血効果には TRPV4 の不活性化が含まれることが示唆される。しかし、TRPV4 の不活性化が FBC の脳梗塞に対する抗虚血効果にどの程度寄与しているかは不明である。TRPV4 antagonist および欠損による抗虚血のメカニズムは、アポトーシスシグナル伝達経路の活性化の減弱と BBB 破綻の予防である¹²⁻¹⁵。これらの結果から、FBC と TRPV4 antagonist の投与は、BBB を保護し、アポトーシスを予防することが示された。しかし、TRPV4 の不活性化が FBC の BBB 保護とアポトーシス予防効果にどの程度寄与しているかは依然として不明である。

本研究では、脳梗塞モデルマウスにおける FBC と TRPV4 antagonist 投与の抗虚血効果を比較し、TRPV4 の不活性化が FBC の抗虚血効果、抗 BBB 破綻効果、抗アポトーシス効果にどの程度寄与するかを明らかにした。さらに、野生型 (wild-type; WT) マウスと TRPV4 knockout (TRPV4KO) マウスで結果を比較し、TRPV4 の欠損が FBC の脳梗塞に対する抗虚血および抗 BBB 破綻効果にどの程度寄与しているかを明らかにした。

方法

動物

高血圧における脳血管の血行状態に生物学的性別が影響するため、雄マウスのみを使用した¹⁶。10～15週齢、体重25～30gの雄性C57BL/6マウス（Japan SLC, Fukuoka, Japan）およびTRPV4ホモ接合体KOマウス（Prof. Tominaga Makoto, Thermal Biology Group, Exploration Research Center, Okazaki, Japan）を、1ケージあたり5匹ずつ飼育した。12時間の明暗サイクル（午前8時点灯）の温度・湿度（それぞれ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $55\%\pm 5\%$ ）制御された標準的な実験室条件下で飼育した。動物には餌と水を自由に与えた。動物の飼育および実験手順は、山口大学医学部実験動物管理使用委員会の承認を得ており、実験は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行われた。

Photochemically Induced Thrombosis (PIT)法とFBC

前回の研究⁶をもとに、以下の如く右半球一次感覚運動野の皮質に局所脳虚血をPIT法で誘導し、FBCの処置を行なった。すべてのマウスは、イソフルラン（Pfizer, New York, NY）の吸入により麻酔を行った（人工呼吸器（ADS 1000; Engler Engineering Corporation, Hialeah, FL））。処置中の体温を一定に保つため、直腸温をモニターし、温度制御加温パッド（NS-TC10, NeuroScience Inc., Osceola, WI）により $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ に一定に保った。頭皮を切開し、頭蓋周囲組織を剥離した後、頭蓋を露出させた。開頭（直径3mm）は、ブregマから右側から1mm前方、2mm外側（図1B）の座標を中心に行なった。生理食塩水に溶解したローズベンガル10 mg/kg（Wako, Glostrup, Dnmark）溶液0.1 mLを左頸静脈から注入した。注入5分後、LED光源（KL 2500 LED; Schott, Mainz, Germany）を用いて開頭部位を10分間照明した（図1C）。既報¹⁷をもとに、開頭部位に薄型サーモセンサー付きペルチェ装置（IT-24; Physitemp, Clifton, NJ）を設置した（図1D）。冷却群は開頭部位の硬膜上部を 15°C で60分間冷却した。対照群は脳温 37°C を60分間維持した。体温は冷却直後に自然に回復した。

薬物処置

すべての薬物および溶媒は、既報¹²と同様に脳室内投与した。開頭後、ブregマの左側0.5mm後方および1.0mm外側に小さな穴（穿頭孔）をあけた。30Gのステンレス針（TSK Laboratory Japan, Tochigi, Japan）を2.5mmの深さで穿頭孔に挿入し、光血栓症直後に薬剤を脳室内投与した（図1E）。TRPV4 agonistであるGSK1016790AおよびTRPV4 antagonistであるRN1734は、1% dimethyl sulfoxide（DMSO; Merck, Tahway, NJ）に溶解した。GSK1016790A（ $10\mu\text{M}$ ）とRN1734（1mM）を、マイクロインジェクションポンプと $10\mu\text{L}$ ハミルトンシリレンジ（1701RN-7758-02; Hamilton, Reno, NV）を用いて、 $0.1\mu\text{L}/\text{分}$ の速度で10分間投与した。脳室内注入の間、皮質温度はペルチェ装置を用いて60分間制御した。脳表面温度の 15°C または 37°C に維持する60分間、薬液の漏出を防ぐために30Gのステンレス針を留置した。他の群には1% DMSOを注射した。実験群は以下のように無作為に割り付けた：脳温（皮質） 37°C 、1%DMSO 脳室内投与（DMSO+非冷却群）；FBC 15°C 、1%DMSO 脳室内投与（DMSO+非

冷却群) ; 脳温 37°C、RN1734 脳室内投与 (RN1734 + 非冷却群) ; FBC 15°C、GSK1016790A を脳室内投与 (GSK1016790A + 冷却群) 。 TRPV4K0 マウスでは、脳温を 37°C にコントロールし、1% DMSO を脳室内投与した (TRPV4K0 群) 。

2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色による梗塞面積の測定

TTC は生体組織では酵素的に還元されて赤色の 1, 3, 5-トリフェニルホルマザンとなり、細胞死を伴う死組織では白色のままである。したがって、TTC 染色は細胞死の指標としてよく用いられる。動物は虚血の 24 時間後に犠牲にし、バブリングしたリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) で経心灌流した。全脳を直ちに摘出し、1 mm の切片に切り分けた。切片を 2% TTC 溶液で染色し、37°C に保たれた暗室で 10 分間インキュベートした。虚血病変の前後領域から 4 枚の脳切片を選択した。梗塞面積は対側半球面積に対する虚血病変の割合として求め、4 切片の平均値とした。梗塞面積は ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて測定した。

Evans Blue (EB) 染色

BBB の破綻は、壊滅的な悪性脳浮腫を引き起こす急性虚血性脳卒中¹⁸の重要な病態生理学的プロセスである。脳浮腫は、虚血性梗塞および脳内出血 (ICH) の 80% に関連している^{19, 20}ため、BBB を保護することは極めて重要である。高分子量の青い色素である EB の同側半球への漏出を測定し、BBB 機能を評価した。PIT 2 時間後の BBB 透過性は、EB 細胞外遊走の測定により評価した (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 。 PIT 1 時間後に 2% EB 溶液 (4 mL/kg) を静脈内注射し、マウスをバブリングした PBS で心臓から灌流した。脳全体を摘出し、1 mm の厚さの切片に切断した。速やかに切片の重量を測定し、50% トリクロロ酢酸でホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離 (12, 000 g、20 分) し、上清をエタノール (1:3) で希釈した。大脳半球における EB 含有量を、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 550; Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて 620nm で測定した。標準曲線を用いて EB 漏出量を測定し、脳組織 1 グラム当たりの量として表した。

terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法による梗塞域の測定

動物は虚血後 24 時間で犠牲にし、バブリングした PBS を心臓から灌流し、続いて 4% パラホルムアルデヒドで処理した。脳全体を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで一晩固定し、パラフィンに包埋してから 5 μ m の切片に切断した。中心梗塞領域周辺の脳切片を選択した。細胞検出 (赤色) にはプロピジウムヨージド (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 染色を使用した。アポトーシス細胞は、TUNEL (Promega, Madison, WI) を用いた。同側の半球全体における TUNEL 陽性細胞 (緑色) の数を、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE, Tokyo, Japan) を用いてカウントした。

統計解析

すべての結果は平均値±標準誤差で表した。複数群における梗塞面積と EB 漏出量の統計解析は、Tukey の検定を用いて行った。TUNEL 陽性細胞数は Tukey 検定または Dunnett 検定を用いて評価した。検定はすべて両側検定とし、統計的有意性は p 値 < 0.05 とした。統計解析は JMP Pro 16.1.0 for MAC を用いた。(SAS Institute, Cary, NC)

結果

FBC 投与と TRPV4 不活性化による脳梗塞予防効果

PIT を用いて誘導した梗塞部位を TTC 染色により検出した。各群の PIT から 24 時間後の代表的な TTC 染色を図 2A に示す。まず、FBC 処置が脳梗塞にどの程度有効であるかを明らかにするために、非冷却群と冷却群の梗塞面積を比較した。PIT は同側半球全体の $19.10\% \pm 1.40\%$ に梗塞病変を生じた (図 2B)。PIT 後 1 時間の FBC により梗塞病変は約 61% 減少した ($7.46\% \pm 1.49\%$, $p = 0.006$ vs. DMSO + non-cooling, Tukey' s test; 図 2B)。第二に、TRPV4 の不活化が FBC の抗虚血効果にどの程度寄与しているかを明らかにするために、梗塞面積を FBC 処置と TRPV4 antagonist (RN1734) 間で比較した。TRPV4 antagonist は梗塞病変を約 50% 減少させた ($9.51\% \pm 1.47\%$, $p = 0.014$ vs. DMSO + non-cooling, Tukey' s test; 図 2B)。FBC と TRPV4 antagonist のこれらの抗虚血作用は同程度であった ($p = 0.827$ vs. DMSO + cooling, Tukey' s test; 図 2B)。一方、FBC による梗塞病変の減少は、TRPV4 agonist (GSK1016790A) 投与によって完全に消失した ($17.39\% \pm 4.33\%$, $p = 0.016$ vs. DMSO + cooling, Tukey' s test; 図 2B)。第三に、TRPV4 antagonist 投与と TRPV4 欠損による抗虚血効果が同様であるかどうかを確認した。TRPV4 欠損症は、FBC 処置を行わずに梗塞病変を約 54% 減少させた ($8.82\% \pm 0.95\%$, $p = 0.016$ vs. DMSO + non-cooling, Tukey' s test; 図 2B)。TRPV4 欠損による抗虚血効果は、TRPV4 antagonist と同程度であった ($p = 0.999$, Tukey' s test; 図 2B)。TRPV4 欠損による抗虚血効果は、WT マウスにおける TRPV4 antagonist の結果を支持するものであった。

FBC と TRPV4 の不活性化による BBB の保護

EB の漏出を各群間で比較し、FBC 処置、RN1734、および TRPV4 欠損による BBB の保護効果を評価した。図 3A は、各群における脳実質への EB の漏出の代表例を示している。脳梗塞では、EB の漏出量は $5.39 \pm 0.44 \mu\text{g/g}$ であった。FBC および TRPV4 antagonist 処置により、それぞれ $2.70 \pm 0.60 \mu\text{g/g}$ および $3.04 \pm 0.25 \mu\text{g/g}$ に減少した ($p = 0.018$ and $p = 0.039$ vs. DMSO + non-cooling group, Tukey' s test; 図 3B)。EB 漏出の減少は、2 つのグループ間で同程度であった ($p = 0.968$, Tukey' s test; 図 3B)。FBC 処置を行わずに TRPV4 を欠損させた場合、EB 漏出は $2.88 \pm 0.72 \mu\text{g/g}$ に減少した ($p = 0.027$ vs. DMSO + non-cooling group, Tukey' s test; 図 3B)。TRPV4 欠損による EB 漏出の減少は、FBC 処置および TRPV4 antagonist 間で同程度であった ($p = 0.994$ vs. DMSO + cooling group and $p = 0.997$, respectively, vs. RN1734 + non-cooling group, Tukey' s test; 図 3B)。TRPV4 欠損による EB 漏出の減少は、WT マウスにおける TRPV4 antagonist の結果を裏付けるものである。

FBC 投与と TRPV4 antagonist 投与による抗アポトーシス作用

アポトーシスは、TUNEL 染色を用いて検出されたアポトーシス陽性細胞をカウントすることにより解明した。図 4A は、代表的な PIT 誘発皮質局所虚血とアポトーシス細胞死の代表的な領域を示す。脳梗塞後のアポトーシス細胞死数は 513.75 ± 63.47 で

あった（図 4C）。FBC および TRPV4 antagonist 投与により、アポトーシス細胞死はそれぞれ 76.50 ± 6.18 および 140.00 ± 33.98 に減少し ($p = 0.015$ and $p = 0.034$ vs. DMSO + non-cooling, Dunnett' s test; 図 4C)、2 群間で同程度の減少が認められた ($p = 0.958$, Tukey' s test; 図 4C)。FBC 処置によるアポトーシス細胞死の減少は、TRPV4 agonist 処置によって完全に消失した (527.67 ± 220.96 , $p = 0.032$ vs. DMSO + Cooling and $p = 1.000$ vs. DMSO + non-cooling; Tukey' s test; 図 4C)。これらの結果と図 4D の TUNEL 陽性細胞の代表的な画像から、FBC 処置の抗アポトーシス作用が TRPV4 agonist によって逆転しうることを示唆している。

考察

本研究では、FBC の脳梗塞に対する保護効果の一つとして、TRPV4 不活性化の関連性と機序を明らかにした。主に 2 つの重要な知見が得られた。第一に、FBC の梗塞に対する保護効果の大部分は、TRPV4 チャネルの不活性化によるものである。第二に、TRPV4 拮抗薬である RN1734 投与、TRPV4 の欠損、FBC 処置は、梗塞後の BBB を保護し、アポトーシスを予防する。

TRPV4 の不活性化が FBC の脳梗塞に対する保護効果にどの程度寄与しているかを調査した。その結果、PIT 誘発による WT マウスの虚血領域は、15°C の FBC 処置、TRPV4 antagonist の脳室内投与、および TRPV4 欠損により、約半分に減少した（図 2B）。梗塞病変の縮小は 3 群間で有意な差は認められなかった。FBC による梗塞病変の縮小は TRPV4 agonist である GSK1016790A の投与により消失し、DMSO+非冷却群と梗塞病変に差は認められなかった（図 2B）。各治療法および TRPV4 欠損による虚血に対する抗虚血効果は、過去の報告により裏付けられている。15°C で 5 時間の FBC は PIT 誘発性虚血領域を縮小し、TRPV4 antagonist は中大脳動脈閉塞（MCAO）マウスの梗塞領域を縮小した^{6,12}。MCAO マウスの梗塞領域は TRPV4 欠損によっても縮小した¹³。したがって、我々のデータは、FBC のほとんどの抗虚血効果は TRPV4 チャネルの不活性化によって媒介されることを示唆した。TRPA1 の不活性化も抗虚血効果に寄与していることから²¹、FBC 処置、TRPV4 agonist、および TRPV4 antagonist を用いた TRPV4KO マウスを用いたさらなる研究により、TRPV4 チャネルの不活性化による抗虚血効果の直接的または間接的経路、および FBC と TRPV4 antagonist の相加的または相乗的效果が解明される可能性がある。

BBB の破綻が虚血性脳卒中を悪化させることを考慮すると、BBB の保護は極めて重要である^{18,19,20}。我々のデータでは、一過性局所虚血により EB 漏出が増加し、FBC、TRPV4 antagonist の脳室内投与、および TRPV4 欠損により保護された（図 3B）。EB 漏出の減少は 3 つのグループで同様であった（図 3B）。BBB の保護に対する FBC 処置および TRPV4 欠損の影響は、先行研究で得られた知見を忠実に反映していた。薬理的に誘発された低体温（33°C）は、マウスの局所脳虚血発作後の BBB 破綻を予防した¹⁴。ICH は細動脈周囲の EB の滲出を増加させ、血管周囲の EB の色素漏出は TRPV4 antagonist の投与により減少した¹⁵。EB 漏出の程度は、*Trpv4*^{-/-} マウスでは WT マウスよりも有意に低かった¹³。したがって、我々のデータは、FBC による BBB 保護の大部分は TRPV4 チャネルの不活性化によって媒介されることを示唆している。

我々の結果では、PIT による虚血ペナンプラ領域のアポトーシスは、15°C の FBC および TRPV4 antagonist の脳室内投与により減少した（図 4C）。アポトーシスの程度は、2 つのグループ間で有意な差は認められなかった（図 4C）。FBC 処置による抗アポトーシス効果は、PIT 直後に TRPV4 agonist を投与すると消失した（図 4C）。FBC と TRPV4 antagonist のアポトーシスに対する効果は、以前の研究で報告された結果と一致していた。薬理的に誘発された低体温（33°C）は、局所脳虚血脳卒中を発症したマウスの半影領域における TUNEL 陽性細胞の数を減少させ、抗アポトーシス遺伝子 *Bcl2* の発現を増加させた¹⁴。ICH は発症後 24 時間で血腫周囲領域

のアポトーシスを増加させ、TRPV4 antagonist の投与は TUNEL 陽性細胞の数を大幅に減らし、アポトーシスを効果的に防止することが分かっている¹⁵。一方、TRPV4 agonist は用量依存的に海馬 CA1-3 領域の神経細胞死を誘導した¹²。アポトーシスにはエネルギーが必要であり、エネルギー産生が起こる虚血性ペナンプラ領域の神経細胞で顕著である^{21, 22, 23}。これらの知見に基づき、我々のデータは、FBC が誘発する抗アポトーシス効果のほとんどが TRPV4 チャネルの不活性化によって媒介されることを示唆した。神経細胞、アストロサイト、およびミクログリアにおける TRPV4 チャネルは、虚血性脳卒中において異なる役割を果たしている可能性があるため^{12, 24, 25, 26, 27}、今後の研究により、TRPV4 チャネルの細胞特異的な抗虚血効果が明らかになる可能性がある。

本研究では、FBC による TRPV4 の不活性化と、マウスの脳虚血性脳卒中に対する保護効果との関連性およびそのメカニズムを評価した。今回のデータでは、FBC の抗虚血効果のほとんどが TRPV4 チャネルの不活性化によるものであることが示された。高血圧における脳血管の健康状態には生物学的性別が影響するため¹⁶、虚血性脳卒中を発症したマウスを雄と雌で比較すれば、さらに貴重な知見が得られる。また、今回のデータでは TRPV4 チャネルの不活性化が、FBC 処置による BBB の保護とアポトーシスの予防の大部分に寄与していることも示された。炎症、活性酸素、ミトコンドリアの恒常性の神経保護作用も抗虚血効果に寄与しているため、TRPV4 チャネルの調節による FBC の抗虚血メカニズムのさらなる研究が期待される。結論として、虚血ペナンプラ領域における BBB の保護とアポトーシスの予防は、脳卒中後の機能的転帰が改善させる。したがって、FBC 処置は TRPV4 チャネルの調節により、脳卒中後の機能的転帰を改善する可能性がある。

結語

FBC の梗塞に対する保護効果の大部分は、TRPV4 チャネルの不活性化によるものであった。TRPV4 の不活性化による FBC の梗塞に対する保護効果には、BBB の保護とアポトーシスの予防が含まれていた。

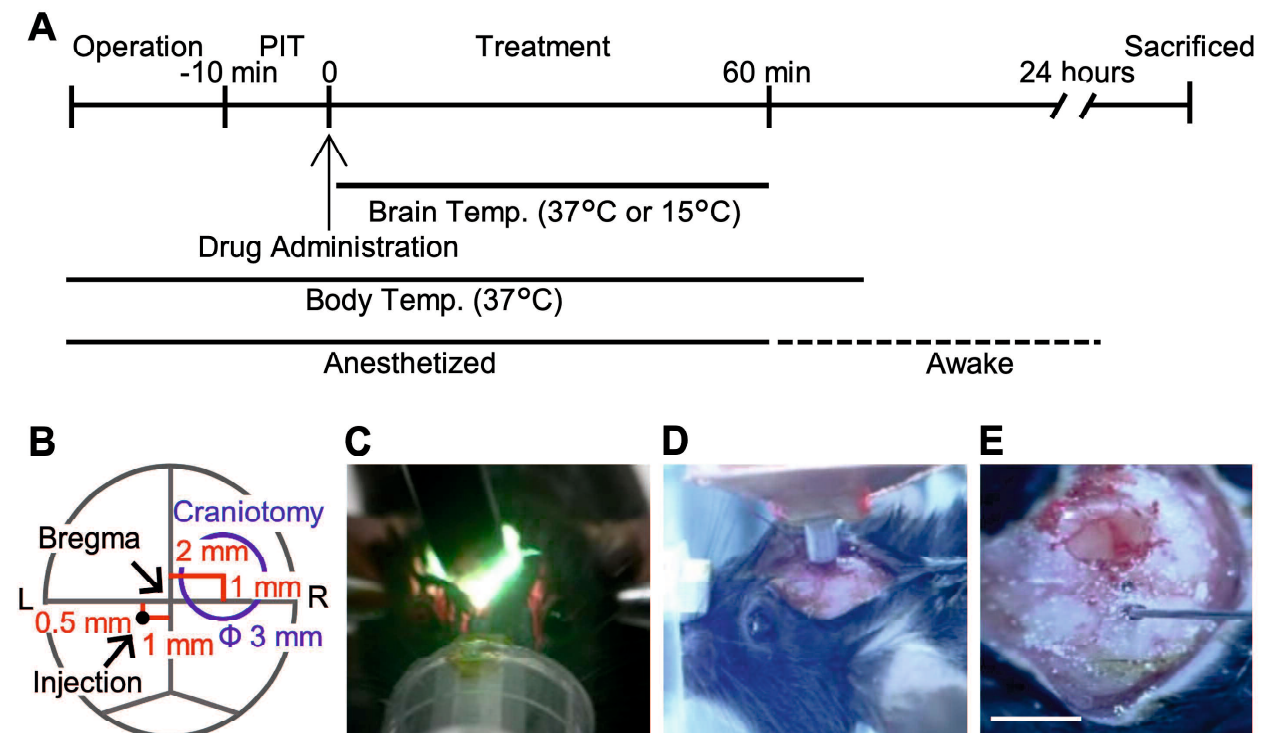
参考文献

1. Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat Neurosci.* 2011 Oct 26;14(11):1363-8. doi: 10.1038/nn.2953.
2. Kim AS, Cahill E, Cheng NT. Global Stroke Belt: Geographic Variation in Stroke Burden Worldwide. *Stroke.* 2015 Dec;46(12):3564-70. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.008226. Epub 2015 Oct 20.
3. Hankey GJ. Stroke. *Lancet.* 2017 Feb 11;389(10069):641-654. doi: 10.1016/S01406736(16)30962-X. Epub 2016 Sep 13.
4. Molina CA, Alvarez-Sabín J. Recanalization and reperfusion therapies for acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27 Suppl 1:162-7. doi: 10.1159/000200455. Epub 2009 Apr 3.
5. Choi JH, Poli S, Chen M, Nguyen TN, Saver JL, Matouk C, Pile-Spellman J. Selective BrainHypothermia in Acute Ischemic Stroke: Reperfusion Without Reperfusion Injury. *Front Neurol.* 2020 Nov 13;11:594289. doi: 10.3389/fneur.2020.594289.
6. 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.
7. Cattaneo G, Schumacher M, Wolfertz J, Jost T, Meckel S. Combined Selective Cerebral Hypothermia and Mechanical Artery Recanalization in Acute Ischemic Stroke: In Vitro Study of Cooling Performance. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015 Nov;36(11):2114-20. doi: 10.3174/ajnr.A4434. Epub 2015 Aug 6.
8. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003 Dec 4;426(6966):517-24. doi: 10.1038/nature02196.
9. Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell.* 2000 Oct 27;103(3):525-35. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00143-4.
10. Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci.* 2002 Aug 1;22(15):6408-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-1506408.2002.
11. Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol

- derivatives. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):13569–77. doi: 10.1074/jbc.M200062200. Epub 2002 Feb 4.
12. Jie P, Lu Z, Hong Z, Li L, Zhou L, Li Y, Zhou R, Zhou Y, Du Y, Chen L, Chen L. Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 is Involved in Neuronal Injury in Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *Mol Neurobiol.* 2016 Jan;53(1):8–17. doi: 10.1007/s12035-014-8992-2. Epub 2014 Nov 18.
13. Tanaka K, Matsumoto S, Yamada T, Yamasaki R, Suzuki M, Kido MA, Kira JI. Reduced Post-ischemic Brain Injury in Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Knockout Mice. *Front Neurosci.* 2020 May 12;14:453. doi: 10.3389/fnins.2020.00453.
14. Choi KE, Hall CL, Sun JM, Wei L, Mohamad O, Dix TA, Yu SP. A novel stroke therapy of pharmacologically induced hypothermia after focal cerebral ischemia in mice. *FASEB J.* 2012 Jul;26(7):2799–810. doi: 10.1096/fj.11-201822. Epub 2012 Mar 29.
15. Zhao H, Zhang K, Tang R, Meng H, Zou Y, Wu P, Hu R, Liu X, Feng H, Chen Y. TRPV4 Blockade Preserves the Blood–Brain Barrier by Inhibiting Stress Fiber Formation in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage. *Front Mol Neurosci.* 2018 Mar 27;11:97. doi: 10.3389/fnmol.2018.00097.
16. Chambers LC, Yen M, Jackson WF, Dorrance AM. Female mice are protected from impaired parenchymal arteriolar TRPV4 function and impaired cognition in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2023 May 1;324(5):H581–H597. doi: 10.1152/ajpheart.00481.2022. Epub 2023 Mar 10.
17. Shibasaki K, Yamada K, Miwa H, Yanagawa Y, Suzuki M, Tominaga M, Ishizaki Y. Temperature elevation in epileptogenic foci exacerbates epileptic discharge through TRPV4 activation. *Lab Invest.* 2020 Feb;100(2):274–284. doi: 10.1038/s41374-019-0335-5. Epub 2019 Oct 22.
18. Qian C, Li PC, Jiao Y, Yao HH, Chen YC, Yang J, Ding J, Yang XY, Teng GJ. Precise Characterization of the Penumbra Revealed by MRI: A Modified Photothrombotic Stroke Model Study. *PLoS One.* 2016 Apr 19;11(4):e0153756. doi: 10.1371/journal.pone.0153756.
19. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Mar;36(3):513–38. doi: 10.1177/0271678X15617172. Epub 2015 Nov 16.
20. Hoshi Y, Okabe K, Shibasaki K, Funatsu T, Matsuki N, Ikegaya Y, Koyama R. Ischemic Brain Injury Leads to Brain Edema via Hyperthermia-Induced TRPV4 Activation. *J Neurosci.* 2018 Jun 20;38(25):5700–5709. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2888-17.2018. Epub 2018 May 23.

21. Sabri M, Lass E, Macdonald RL. Early brain injury: a common mechanism in subarachnoid hemorrhage and global cerebral ischemia. *Stroke Res Treat.* 2013;2013:394036. doi: 10.1155/2013/394036. Epub 2013 Feb 28.
22. Mehta SL, Vemuganti R (2014). Mechanisms of stroke induced neuronal death: multiple therapeutic opportunities. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2 (8): 438-446. doi: <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.8.438.446>
23. Uzdensky AB. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis.* 2019 Oct;24(9-10):687-702. doi: 10.1007/s10495-019-01556-6.
24. Dunn KM, Hill-Eubanks DC, Liedtke WB, Nelson MT. TRPV4 channels stimulate Ca²⁺ induced Ca²⁺ release in astrocytic endfeet and amplify neurovascular coupling responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr 9;110(15):6157-62. doi: 10.1073/pnas.1216514110. Epub 2013 Mar 25.
25. Nishimoto R, Derouiche S, Eto K, Deveci A, Kashio M, Kimori Y, Matsuoka Y, Morimatsu H, Nabekura J, Tominaga M. Thermosensitive TRPV4 channels mediate temperature-dependent microglia movement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Apr 27;118(17):e2012894118. doi: 10.1073/pnas.2012894118.
26. 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.
27. Tureckova J, Hermanova Z, Marchetti V, Anderova M. Astrocytic TRPV4 Channels and Their Role in Brain Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 12;24(8):7101. doi: 10.3390/ijms24087101.

図 1

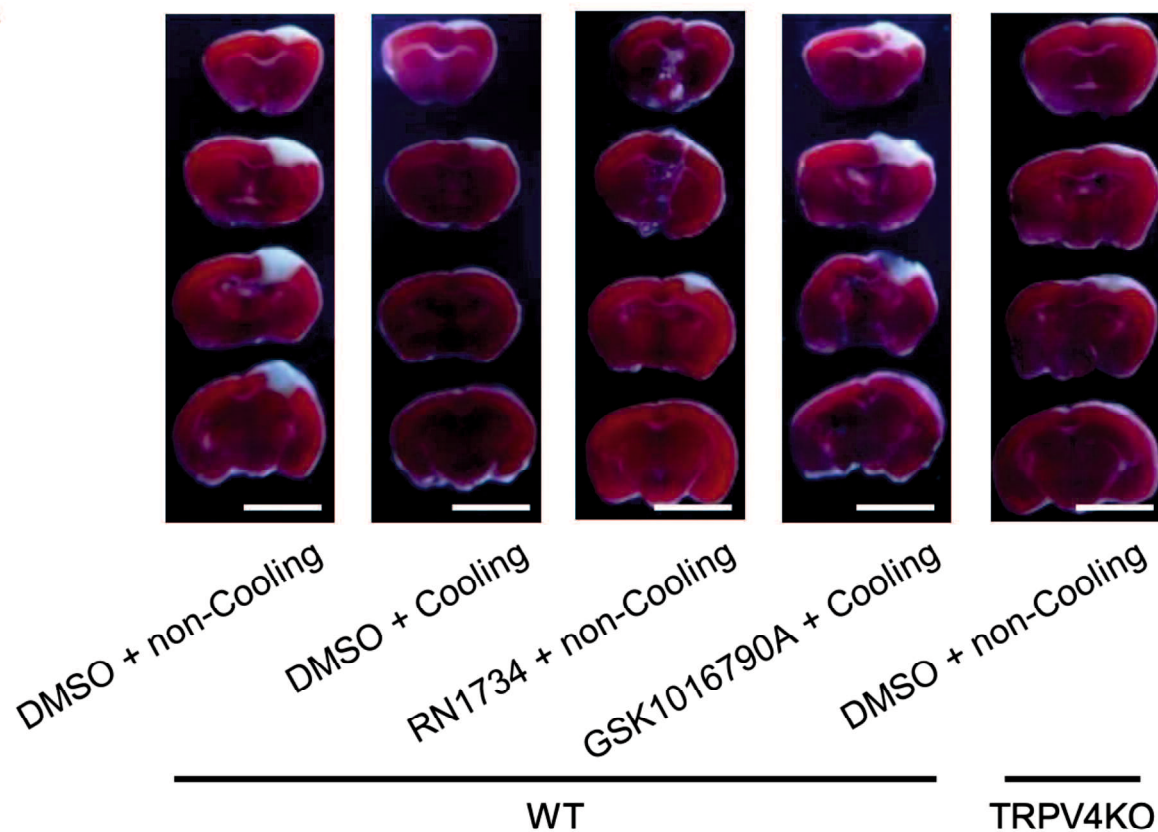


実験プロトコルと各操作の画像

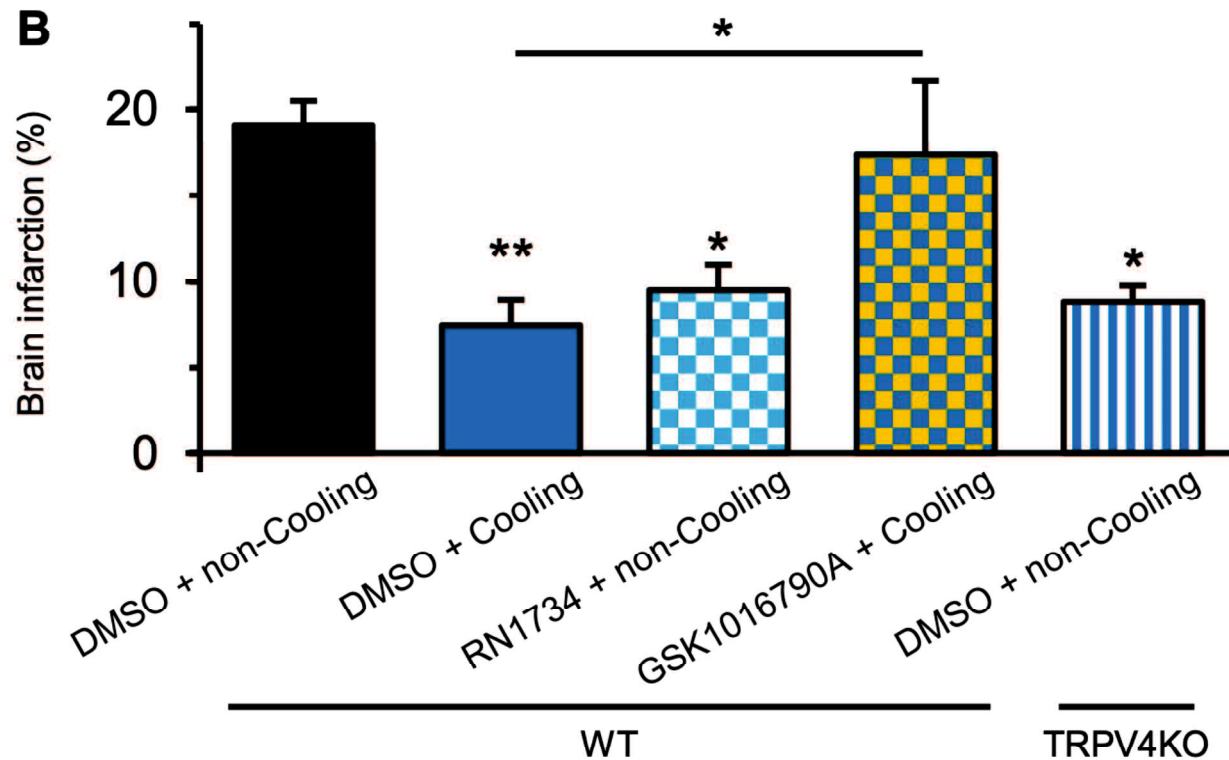
(A) 光化学的誘発血栓症、局所脳冷却、薬物処置のプロトコル。(B) 開頭部位と脳室内注入用の穴（穿頭孔）の概略図。(C) 光化学的誘発血栓症を引き起こす画像。(D) 開頭部位の脳表面に置かれた細い温度センサーとペルチェ素子の画像。(E) 開頭手術部位の脳表面の画像。30G ステンレス針が穿孔に挿入されている。スケールバーは 3mm。

図 2

A



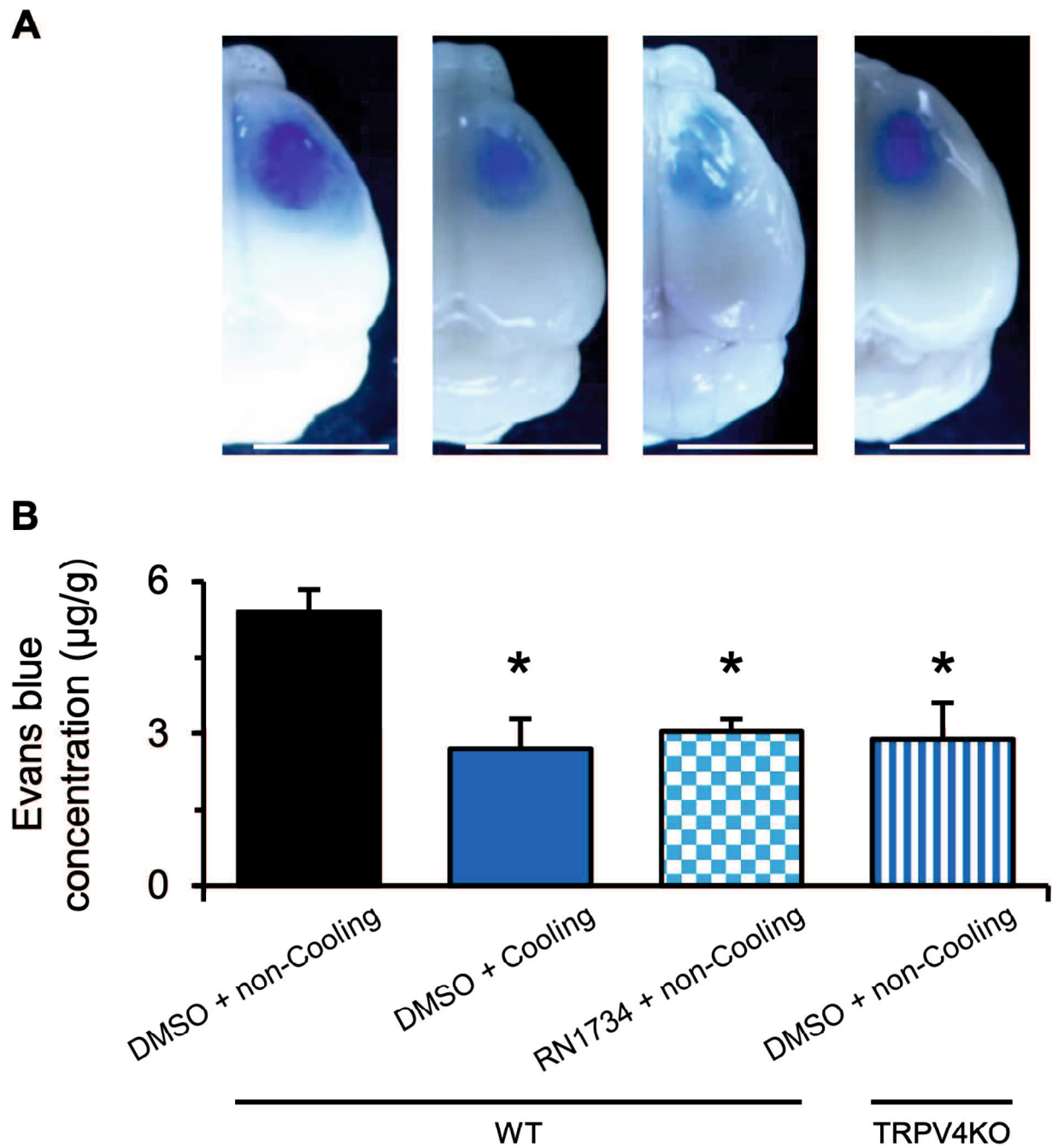
B



局所脳冷却、TRPV4 antagonist、局所脳冷却を伴う TRPV4 agonist、および TRPV4 欠損が光化学的虚血により誘発された局所虚血に及ぼす影響

(A) 各群における虚血 24 時間後の代表的な TTC 染色法: 野生型マウスにおける DMSO + non-cooling (n = 8)、DMSO + cooling (n = 7)、1 mM RN1734 + non-cooling (n = 10)、GSK1016790A + cooling (n = 7)、さらに TRPV4 knockout mice (n = 7)。スケールバーは 5mm。赤; 正常な脳組織、白; 虚血病変。(B) 各群における脑梗塞の割合。結果は平均値±標準誤差で示す。One-way ANOVA test, $F_{(4, 33)} = 6.6211$, $**p = 0.0005$. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, Tukey's test。
TRPV4: transient receptor potential vanilloid 4; TTC: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride; RN1734: a TRPV4 antagonist; GSK1016790A: a TRPV4 agonist

図 3

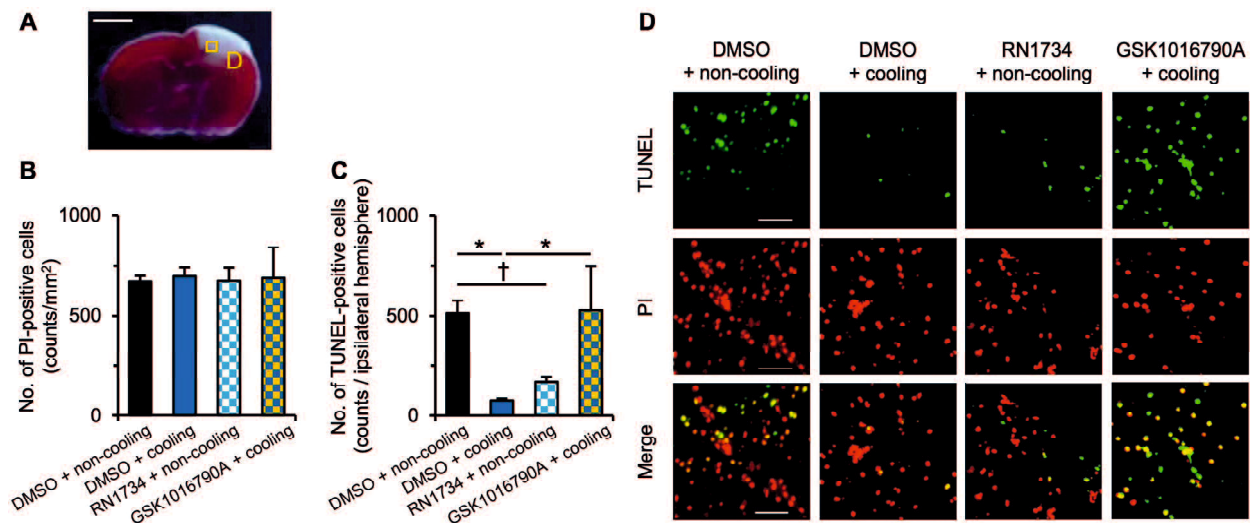


光化学的に誘発された血栓症による EB 漏出に対する局所脳冷却、TRPV4 antagonist および TRPV4 欠損の影響

(A) 各群における脳実質への EB 漏出の代表例；野生型における DMSO + non-cooling (n = 4)、DMSO + cooling (n = 4) RN1734 + non-cooling (n = 4)、さらに TRPV4 knockout mice (n = 4)。スケールバーは 5mm。 (B) 脳実質への EB 漏出量。結果は平均値 ± 標準誤差で示す。One-way ANOVA test, $F_{(3, 12)} = 5.6215$, $**p = 0.0121$. $*p < 0.05$, vs. WT / DMSO+ non-Cooling group, Tukey' s test.

Evans Blue : Evans Blue ; TRPV4: transient receptor potential vanilloid 4; WT: wild-type; RN1734: a TRPV4 antagonist

図 4



局所脳冷却、TRPV4 antagonist、および TRPV4 欠損が PIT 誘発性アポトーシスに及ぼす影響

(A) PIT 誘発性局所皮質虚血の代表例。スケールバーは 3mm。オレンジ色の四角はアポトーシスおよび細胞死の代表画像。(B, C) 各グループにおける虚血半球の PI 陽性細胞数および TUNEL 陽性細胞数: 野生型における DMSO + non-cooling (n = 4)、DMSO + cooling (n = 4)、RN1734 + non-cooling (n = 4)、and GSK1016790A + cooling (n = 3)。(D) 各群における TUNEL 陽性細胞、PI 染色、およびそれらの合成画像を、高倍率 (×20) の顕微鏡写真を用いて示す。スケールバーは 20μm。結果は平均値±標準誤差で示す。One-way ANOVA test, $F_{(3, 11)} = 6.6041$, $**p = 0.0082$. $*p < 0.05$, Tukey's test; $^{\dagger}p < 0.05$, vs DMSO + non-cooling, Dunnett's test. TRPV4: transient receptor potential vanilloid 4; PIT: photochemically induced thrombosis; TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling; PI: propidium iodide; RN1734: a TRPV4 antagonist; GSK1016790A: a TRPV4 agonist