

学位論文（博士）

Prevention and alleviation of penicillin-
induced epileptic discharge by transient
receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)
antagonist in mice: Effects mediated by
extracellular glutamate control

(マウスにおける TRPV4 拮抗薬によるペニシリン誘発
性てんかん放電の予防と軽減：細胞外グルタミン酸
制御を介した効果)

氏名 土師 康平

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 8 年 1 月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 方法	5
4. 結果	9
5. 考察	13
6. 結論	16
7. 謝辞	16
8. 参考文献	16
9. 図	20

1. 要旨

TRPV4 チャンネルは、シナプス前膜およびアストロサイトに発現し、てんかんに関与する因子として注目されている。我々は、TRPV4 チャンネルがてんかんの治療標的として果たす役割を調査した。野生型マウスまたは TRPV4 欠損マウスの皮質にペニシリン G (PG) を注射した。また、PG 注入の前後に TRPV4 拮抗薬である RN 1734 を注入した。マウスにおけるてんかん放電 (ED) と細胞外グルタミン酸濃度を記録した。

野生型マウスでは PG 投与後にグルタミン酸濃度が増加し ED が発生した。TRPV4 欠損マウスではグルタミン酸濃度および ED の β 波帯パワーが野生型マウスより低値であった。野生型マウスに PG 投与前に RN 1734 を投与した場合、PG 投与後の後期段階におけるグルタミン酸濃度とスパイク振幅は TRPV4 欠損マウスと同等であった。しかし、EDs 発現後に RN 1734 を投与した場合、EDs の軽減効果はわずか 10 分間しか持続せず、グルタミン酸濃度は低下しなかった。RN 1734 は EDs を時間依存的に調節し、進行中の EDs では顕著な効果を示したものの、前投与後の効果は限定的であった。これらの結果は、TRPV4 拮抗薬が活動依存的にグルタミン酸動態を調節することを示唆している。

2. 研究の背景

てんかんの有病率は比較的高く（100 人に 1 人），患者の 30%が難治性てんかんである⁽¹⁾．難治性てんかん患者には外科的治療が選択されるが，てんかん焦点によって適応が制限される．したがって，難治性てんかんに対する新規治療法の開発が必要である．

一過性受容体電位バニロイド 4（TRPV4）チャネルは，脳細胞，気管上皮細胞，膀胱尿路上皮細胞など様々な細胞に発現している⁽²⁾．TRPV4 チャネルはポリモーダルタンパク質であり，25°C～37°Cの温度，低浸透圧状態，あるいは機械的ストレスによって活性化される．TRPV4 チャネルの不活性化は，全般性発作モデルにおいて異常なてんかん様脳波を抑制する^{(3)–(5)}．したがって，TRPV4 チャネルは新規抗てんかん薬の潜在的標的として大きな注目を集めている．TRPV4 チャネル不活性化による抗てんかん作用の基盤となるメカニズムは現在研究中である．

多くの研究により，細胞外グルタミン酸濃度とてんかん発作との関連性が明らかになっている⁽⁶⁾．内側側頭葉てんかん患者では細胞外グルタミン酸濃度の上昇が認められ⁽⁷⁾，グルタミン酸トランスポーター欠損マウス（GLT1）は致死的なてんかん発作を示す⁽⁸⁾．局所的なグルタミン酸濃度の上昇は発作の発症と持続に寄与し，これは発作誘発性放出（シナプス前膜からの放出），星状細胞性グルタミン酸輸送体の再取り込み不全，あるいは活性化星状細胞による産生によって引き起こされる^{(2), (9)}．TRPV4 チャネルは，活性化星状細胞からのグルタミン酸産生，あるいはシナプス前膜からの放出のいずれかに関与しているが，発作発生においてどちらのプロセスがより関与しているかは依然として不明である．

アストロサイトにおける TRPV4 チャネルは，てんかんおよび脳浮腫に関与する因子として近年注目を集めている．TRPV4 チャネルの活性化はアストロサイトによる ATP 放出を引き起こし，これが周囲のアストロサイトを興奮させ，シナプスにおける神経活動を誘発する⁽¹⁰⁾．例えば，有望な新規抗けいれん薬であるループ利尿薬ブメタニドはアストロサイトに作用する⁽⁶⁾．

本研究は，TRPV4 チャネル不活性化による抗てんかん作用の基盤となるメカニズムを解明することを目的とした．TRPV4 チャネル拮抗薬および TRPV4 チャネル欠損マウスを用いて，皮質電気図（ECoG）を取得し，同一病変部位における細胞外グルタミン酸濃度を測定して，それらの相関関係を調べた．

3. 方法

動物モデル

8～12 週齢，体重 28～32 g の野生型または TRPV4 欠損 C57BL/6 マウス（日本 SLC 株式会社，福岡）を用いた．神経細胞の興奮性や発作閾値に著しい影響を及ぼす可能性のある発情周期関連のホルモン変動による変動を最小限に抑えるため，対象動物は全て雄とした．全てのマウスは，温度・湿度管理された実験室（それぞれ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ， $55 \pm 5\%$ ）において，12 時間明暗サイクル（午前 8 時点灯）の標準的な実験室条件下で飼育された．マウスは餌と水を自由摂取できた．

マウスの飼育および実験手順は，山口大学医学部実験動物管理委員会により承認された．すべての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実施された．

電極，カテーテル，プローブの配置

マウスはウレタン（1. 75 mg/10 ml/kg，腹腔内投与）で麻酔され，頭部は定位固定装置で固定した．直腸温は温熱パッドで $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に調整し，皮質温は $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に維持した．ブレグマから後方 1. 0mm，両側 2. 5mm の位置に直径 1. 0mm のバーホールを 2 箇所作成した．左側のバーホールは ECoG 電極と注入カニューレ（直径 0. 4mm×長さ 40mm，容量 $3 \mu\text{l}$ ，EIM-40，Eicom 社製）の設置に使用した．右側バーホールは薬剤注入なしの ECoG データ測定用 ECoG 電極設置に使用した．両側体性感覚皮質および小脳領域の硬膜外腔に 2 本の ECoG レファレンス電極を配置した．温度センサー（IT-24；Physitemp，東京，日本）を同バーホールから皮質表面に設置した．接地電極は尾部に設置した．

薬剤

薬剤は混合しないように左カニューレから注入した．対照群マウスには PG（ペニシリン G，GABAA 受容体を阻害し発作閾値を低下させることでてんかん発作を誘発する薬剤；明治製薬，日本）と 10% DMSO（ジメチルスルホキシド，溶媒；Merck KGaA，ドイツ，ダルムシュタット）を投与し，治療群のマウスには PG および RN 1734（TRPV4 チャネルの選択的拮抗薬，Merck KGaA，ドイツ，ダルムシュタット）を投与した．26 ゲージの取り外し可能な針（1701RN-7758-02，ハミルトン，ネバダ州リノ）付き $10 \mu\text{l}$ ハミルトンシリンジを使用した．取り外し可能な針の $1 \mu\text{l}$ の内部空洞に $1 \mu\text{l}$ の PG（200 IU/ μl で 0. 9% 生理食塩水に溶解）を充填し， $10 \mu\text{l}$ のシリンジ本体に $1 \mu\text{l}$ の

PG と $8.6 \mu\text{l}$ の RN 1734 を充填し、 $0.4 \mu\text{l}$ の空気で分離した⁽¹¹⁾。次に、注入カニューレとハミルトンシリンジをテフロンチューブ (JT-10, 長さ 50 cm , 容量 $4 \mu\text{l}$, Eicom, 日本) で接続した。注入カニューレは、脳表面から 0.75 mm の深さまで挿入した。PG は、ECoG 記録開始 30 分後から、マイクロインジェクションポンプ (ESP-64, Eicom, 日本) を用いて $0.1 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で 10 分間にわたって皮質内に投与した。DMSO (10%) または RN 1734 (10% DMSO, DMSO : Merck KGaA, 生理食塩水に溶解) を 10 分間にわたって皮質内に投与し、PG 投与開始 90 分後に RN 1734 投与を開始し、 $0.1 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で投与した。Merck KGaA 製) を生理食塩水に溶解) を皮質内投与した。RN 1734 投与は PG 注入開始 90 分後から開始し、マイクロインジェクションポンプを用いて $0.1 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で 10 分間投与した (図 1A)。

PG 誘発性てんかん放電 (ED) のスパイク振幅は、ECoG 開始後 5 分ごとに平均化された。予備実験では、PG 誘発性 ED は 50 分でスパイクを開始し、90 分でピークに達し、120 分以上持続した。したがって、PG 投与後 85~90 分の ED を 5 分間評価することとした。さらに、RN 1734 投与直後に ED のスパイク振幅が低下することを確認したため、RN 1734 の効果評価期間は投与直後の 5 分間と設定した。

ECoG のパワー解析

ECoG 信号はバイオアンプ (EX-1; Dagan Corporation, Minneapolis, MN, USA) で増幅され、A/D コンバーター (PowerLab 8/30; AD Instruments, Castle Hill, Australia) を用いて 2 kHz のサンプリングレートで 120 分間の連続記録が行われた (ECoG 基本リズムの安定化に 30 分, PG 注入後の ECoG 測定に 90 分)。ECoG 記録には低域フィルター (0.1 Hz) , 高域フィルター (10 kHz) , ノッチフィルター (オフ) を適用した。ベータ波帯域 ($14\text{--}24 \text{ Hz}$) は皮質におけるてんかん発作の有用な指標であり、局所脳冷却の抗てんかん効果前後で有意な差異を示した。したがって、ECoG の高速フーリエ変換後、 β 帯域の周波数帯強度を算出した。異常なてんかん様 ECoG におけるスパイク波は、スパイク持続時間が 100 ms 未満のものと定義した。RN 1734 による TRPV4 阻害を評価するため、PG と併用した 3 種類の異なる用量 (1 mM , 3 mM , 10 mM) の RN 1734 を用いた ECoG 記録を評価した。対照群には PG または 10% DMSO を投与した。全結果は平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した。同一群におけるベースラインと投与前、投与前と投与後の β 波帯のパワー強度差は、一元配置分散分析 (ANOVA) に続いて Dunnett 検定または Wilcoxon 検定で評価し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。ベースライン時の β バンド波のパワー強度について

て、野生型マウスと TRPV4 欠損マウスの差は対応のある t 検定を用いて評価し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

グルタミン酸濃度の測定

細胞外グルタミン酸レベルは、既報の方法に従いグルタミン酸バイオセンサー (Pinnacle Technology, Inc., Part #7004-Glutamate, Lawrence, KS, USA) を用いて測定した。WT マウスと TRPV4 欠損マウスは初回検査と同様に麻酔・固定後、左側バーホールから一次体性感覚野 (S1) へグルタミン酸バイオセンサーを挿入した。この部位は PG 注入を受けた皮質領域に対応し、EcoG 記録で一貫しててんかん様放電を示していた。この領域を選択したのは、電気生理学的活動と細胞外グルタミン酸濃度の直接的な空間相関を可能にするためである。

バイオセンサーの定位座標は、Paxinos およびフランクリンのマウス脳アトラスに基づいて決定し、以下のとおりであった：前後方向 (AP) はブレグマから -1.0 mm 、左右方向 (ML) は正中線から $\pm 2.5\text{ mm}$ 、背腹方向 (DV) は皮質表面から -2.0 mm であった。生体センサーは、組織損傷を最小限に抑えるため、慎重に目標深度まで挿入した。生体センサーの挿入直後に EcoG の記録を開始した。10 分後、PG を 10 分間注入し、PG 注入の 60 分後に RN 1734 を投与した (図 2A)。また、バイオセンサーを用いた ECoG 記録と並行して、細胞外グルタミン酸濃度を測定した。細胞外グルタミン酸濃度と β 波強度を、以下の 2 つの期間 (各 10 分間) で評価した：PG 注入中の 10 分間、および EDs のスパイク振幅が観察される PG 注入後 50 分間。

群間における細胞外グルタミン酸濃度または β バンド波強度の差は、Student の t 検定または Mann-Whitney U 検定を用いて評価し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

細胞外グルタミン酸と β 波の強度との関連性を、t 検定およびピアソンの積率相関係数を用いて解析した。

RN 1734 の予防的投与と発作スコアリング

最後に、TRPV4 不活性化が EDs だけでなくてんかん発作にも及ぼす影響を評価するため、以下の手順で覚醒下実験を実施した。野生型または TRPV4 欠損マウスをセボフルラン (導入時 3%, 維持時 1.5%) で麻酔し、ECoG を記録した。前述の方法と同様に、ECoG 記録と並行してバイオセンサーを用いて細胞外グルタミン酸濃度を測定した。セボフルランによる安定化 30 分後、マイクロイン

ジェクションポンプを用いて 10%ジメチルスルホキシド (DMSO : Merck KGaA 製) に溶解した RN 1734 を生理食塩水に溶解した溶液を, 10%DMSO または RN 1734 として, 0. 1 μ l/分の速度で 10 分間皮質内投与した. PG は 30 分後に投与した. セボフルランによる安定化から 150 分後に ECoG を記録し, 鎮静を中断してマウスを覚醒させ, ビデオモニタリングを継続した (図 3A) .

先行研究 3, 4 に基づき, 細胞外グルタミン酸濃度と痙攣スコア (ステージ 1 : 耳・顔面けいれん, ステージ 2 : 体幹軸方向の痙攣性けいれん, ステージ 3 : ミオクローヌスと後脚立ち上がり, ステージ 4 : 横転, 激しい走行動作, 激しい跳躍 ; ステージ 5 : 全身性强直間代発作 ; ステージ 6 : 死亡) を t 検定およびピアソンの積率相関係数を用いて解析した. てんかん発作の重症度は発作スコアで評価した. 群間における発作スコアの差は Student' s-t 検定または Mann-Whitney U 検定で評価し, $p < 0. 05$ を有意とみなした.

統計解析

全データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で提示した. データの正規性は Shapiro-Wilk 検定で, 分散の等分散性は Levene' s 検定で評価した.

2 つの独立群間の比較には, データが正規分布かつ分散が等しい場合にスチューデントの t 検定を適用し, そうでない場合は Mann-Whitney U 検定を用いた. 同一群内の対照比較には, paired t 検定または Wilcoxon 符号順位検定を適宜実施した.

単一時点における 3 群以上の比較には, 一元配置分散分析 (ANOVA) に続いて Dunnett の事後検定を実施した. 分散の不均一性が認められた場合は Welch の分散分析を適用した. 正規性の仮定が満たされない場合には, 非パラメトリック代替法として Kruskal-Wallis 検定を用いた.

β 帯域パワーおよび細胞外グルタミン酸濃度の経時データは, 群間要因として群, 群内要因として時間を設定した反復測定二要因分散分析で解析した. 有意な主効果または群 $\times$ 時間相互作用が検出された場合, 適切な補正を施した事後多重比較を実施した.

電気生理学的パラメータ (β 帯域パワーまたはスパイク振幅) と細胞外グルタミン酸濃度の相関は, 正規分布データに対してピアソンの積率相関係数を用

いて評価し、対応する p 値を報告した。

全ての統計解析は EZR（自治医科大学埼玉医療センター）を用いて実施した。両側検定の p 値 < 0.05 を有意とみなした。

4. 結果

TRPV4 拮抗薬は、PG 誘発性 ECoG 振幅および β バンドパワーを用量依存的に減少させる。

図 1A に、PG 誘発性 ED に対する TRPV4 欠損の抑制効果を研究するために用いたプロトコルを示す。TRPV4 拮抗薬である RN 1734 は、濃度依存的に左側 ECoG 振幅および β バンドパワーを減少させた（図 1B-E）。野生型マウスでは、RN 1734 による ED 抑制効果は約 10 分間持続した後、スパイクが再開した。これに対し、TRPV4 欠損マウスでは実験開始時から ED が低値であった（図 1E, F）。心拍数データは、野生型マウス ($n = 24$; 563.2 ± 6.37 bpm) と TRPV4 欠損マウス ($n = 6$; 523.7 ± 13.2 bpm) の間で麻酔深度に有意差を示さなかった (Mann-Whitney U 検定, $p = 0.26$, 図 1H)。脳温度は野生型マウスと TRPV4 欠損マウス間で有意差は認められなかった (それぞれ 30.2 ± 0.09 °C 対 30.3 ± 0.13 °C, $p = 0.55$, Student's-t 検定; 図 1I)。

PG + DMSO 群と PG + RN 1734 群では、5 分ごとの β 波帯域パワーの推移に有意差が認められた（図 1J）。PG + DMSO 群では、PG 投与 60 分後に β 波帯のパワーが増加した（基礎値: 0.06 ± 0.02 μV^2 , 投与前: 3.4 ± 0.3 μV^2 , $p = 0.0313$, Wilcoxon 検定, 図 1J)。PG 投与 60 分後に DMSO をてんかん様焦点に投与したが、投与前後で β 帯域パワーに差は認められなかった（投与前: 3.4 ± 0.3 μV^2 , 投与後: 2.9 ± 0.3 μV^2 , $p = 0.26$, Dunnett 検定; 図 1J）。対照的に、RN 1734 (1, 3, 10 mM) は β バンドパワーを減少させた（投与前: 3.4 ± 0.8 μV^2 , 投与後: 2.7 ± 0.8 μV^2 , $p = 0.0313$, Wilcoxon 検定; 投与前: 4.3 ± 0.6 μV^2 , 投与後: 1.9 ± 1.0 μV^2 , $p = 0.046$, Dunnett 検定; および投与前: 4.7 ± 1.3 μV^2 , 投与後: 0.8 ± 0.4 μV^2 , $p = 0.0313$, Wilcoxon 検定; 図 1J)。

各処理群 (1mM, 3mM, 10mM RN 1734) において Shapiro-Wilk 検定により正規性が確認された (全て $p > 0.05$)。一方, Levene's 検定では群間の分散の不均一性が示された ($p = 0.018$)。したがって Welch 分散分析を適用したところ, 前後変化量 (Δ) に有意な群間差が認められた ($F = 7.37$, $p = 0.0016$)。同様に, ノンパラメトリックな Kruskal-Wallis 検定でも群間有意差

が認められた ($H = 17.52$, $p = 0.00055$) . さらに傾向性分析では、投与量と Δ の間に強い正の相関が示され (Spearman の $\rho = 0.84$, $p < 0.001$) , 明らかな用量依存性効果が確認された.

TRPV4 拮抗薬は TRPV4 欠損マウスにおける PG 誘発 β バンドパワーに影響しない

RN 1734 投与は野生型マウスでは PG 誘発 ECoG 振幅および β バンドパワーを減少させたが, TRPV4 欠損マウスでは影響しなかった (図 1F, G) . PG 誘発 β バンドは, 野生型マウス, ならびに PG + 10% DMSO または 10 mM RN 1734 投与マウスと比較して, TRPV4 KO マウスで有意に低値であった (それぞれ $3.4 \pm 0.3 \mu V^2$ 対 $1.7 \pm 0.6 \mu V^2$, $p=0.02$, および $4.7 \pm 1.3 \mu V^2$ 対 TRPV4 KO: $1.7 \pm 0.4 \mu V^2$, それぞれ, $p=0.03$, Student' s-t 検定; 図 1B, F, J) .

野生型マウスと TRPV4 欠損マウス双方に, PG 注射 60 分後に DMSO および 10 mM RN 1734 を注射した. 注射前後の β 波帯パワーに差は認められなかった (注射前: $1.7 \pm 0.6 \mu V^2$, 注射後: $1.6 \pm 0.5 \mu V^2$, $p = 0.95$, および注射前: $1.7 \pm 0.4 \mu V^2$, 注射後: $2.7 \pm 0.3 \mu V^2$, $p = 1.00$, Dunnett 検定; 図 1F, G, J). さらに, RN 1734 は TRPV4 欠損マウスにおいて β バンドパワーを抑制しなかった. TRPV4 拮抗薬は, PG 誘発性 ECoG 振幅および β バンドパワーを用量依存的に減少させた.

TRPV4 拮抗薬は TRPV4 欠損マウスにおける PG 誘発性細胞外グルタミン酸濃度に影響しない

図 2A は, β バンドのパワーと細胞外グルタミン酸濃度の相関関係を調べるために用いたプロトコルを示す. RN 1734 は WT マウスでは ECoG 振幅と β バンドパワーを低下させたが, TRPV4KO マウスでは低下させなかった (図 2B, C) . 野生型マウスと TRPV4 欠損マウスにおける 5 分ごとの β バンドパワーおよび細胞外グルタミン酸濃度の変化をそれぞれ図 2D および図 2E に示す. 野生型マウスでは, PG 注入後にまず細胞外グルタミン酸濃度が上昇し, 続いて β バンドパワーが増加した (図 2D, E) . 対照的に, 野生型マウス ($n = 4$) と比較して, TRPV4 欠損マウス ($n = 4$) では, ベースラインの細胞外グルタミン酸濃

度が有意に低かった (287.2 ± 44.5 mV 対 119.2 ± 26.6 mV; $p = 0.029$, Mann-Whitney U 検定; 図 2F) . PG 投与 60 分後に EDs 焦点へ RN 1734 (10 mM) を注入すると, 野生型マウスでは β バンドパワーが有意に減少した (注入前: $2.4 \pm 0.7 \mu V^2$, 注入後: $0.8 \pm 0.3 \mu V^2$, $p = 0.0063$) を示した. 一方, TRPV4 欠損マウスでは有意な変化は認められなかった (投与前: $0.5 \pm 0.3 \mu V^2$, 投与後: $0.4 \pm 0.2 \mu V^2$, $p = 0.97$, Dunnett 検定; 図 2G) .

TRPV4 欠損マウスにおけるこの効果の欠如は, これらの動物において既にベースラインの β バンドパワーが低かったことに起因する可能性が高い. 対照的に, RN 1734 投与は, てんかん放電開始後に投与した場合, いずれの群においても細胞外グルタミン酸濃度を有意に変化させなかった (野生型マウス, 投与前: 55.9 ± 14.5 mV, 投与後: 62.3 ± 8.9 mV, $p = 0.98$; TRPV4 KO マウス, 投与前: 8.7 ± 2.9 mV, 投与後: 4.1 ± 2.5 mV, $p = 0.88$, Dunnett 検定; 図 2H) .

二要因反復測定分散分析により, 群間効果 ($F(1,6) = 10.45$, $p = 0.0179$) および時間間効果 ($F(19,114) = 19.10$, $p < 0.001$) , ならびに群-時間間の有意な交互作用 ($F(19,114) = 6.01$, $p < 0.001$) が認められ, 細胞外グルタミン酸濃度の時間的変化が群間で有意に異なることを示した. β 帯域パワーについては, 二要因反復測定分散分析により, 有意な時間間効果 ($F(19,114) = 6.93$, $p < 0.001$) および有意な群 $\times$ 時間の交互作用 ($F(19,114) = 2.26$, $p = 0.0044$) が認められたが, 群間効果は統計的有意性に達しなかった ($F(1,6) = 4.43$, $p = 0.0799$) . これらの結果は, β 帯域活動の時間的プロファイルが群間で有意に異なっていたことを示している. PG 注入時から EDs 発現までの間, 細胞外グルタミン酸の最大濃度は, RN 1734 注入直前の異常てんかん様 ECoG の β 波帯パワーと有意に相関した ($r^2 = 0.8$, $p = 0.014$, ピアソン積率相関係数; 図 2I) . この相関は, PG 注入に伴うグルタミン酸濃度の上昇に伴い増加する傾向を示した.

TRPV4 拮抗剤の事前投与および TRPV4 欠損は EDs と細胞外グルタミン酸を減少させる.

図 3A は, 細胞外グルタミン酸濃度と発作の相関関係を調べるために用いたプロトコルを示す. 代表的な ECoG 振幅および β バンドパワーの変化から, RN 1734 の投与により, 野生型マウスと TRPV4 欠損マウスの両方で PG 誘発性 ECoG 振幅および β バンドパワーが減少したことが示された (図 3B-D) . 両群マウ

スにおけるスパイク振幅と細胞外グルタミン酸濃度の 5 分ごとの変化は、それぞれ図 3E および図 3F に示す。野生型マウス ($n = 6$) では、DMSO 群において PG 注入に反応して細胞外グルタミン酸濃度が有意に上昇したが (95.9 ± 15.3 mV 対 193.0 ± 29.3 mV, $p = 0.029$, 対応のある t 検定; 図 3G), 10 mM RN 1734 群では増加しなかった (95.9 ± 15.3 mV 対 111.9 ± 12.1 mV, $p = 0.80$, Student's t 検定; 図 3G)。対照的に、TRPV4 KO 群 ($n = 4$) では、DMSO 群 (95.9 ± 15.3 mV 対 88.8 ± 10.4 mV, それぞれ, $p = 0.51$, Student's t 検定; 図 3G) および 10 mM RN 1734 群 (111.9 ± 12.1 mV 対 88.8 ± 10.4 mV, $p = 0.20$, Student's t 検定; 図 3G) のいずれにおいても有意な上昇は認められなかった。野生型マウスでは、PG 誘発スパイク振幅は DMSO 群が 10 mM RN 1734 群および TRPV4 欠損マウスの DMSO 群よりも高かった (-2.8 ± 0.2 mV 対 -0.9 ± 0.3 mV, それぞれ, $p = 0.0025$, Student's t 検定, および -2.8 ± 0.2 mV 対 -0.9 ± 0.2 mV, それぞれ, $p = 0.0018$, Student's t 検定; 図 3H)。10 mM RN 1734 群における PG 誘発スパイク振幅は、野生型マウスと TRPV4 欠損マウスで同等であった (それぞれ -0.9 ± 0.3 mV 対 -0.9 ± 0.2 mV, $p = 0.97$, Student's t 検定; 図 3G)。

図 3F の細胞外グルタミン酸について、二要因反復測定分散分析により、時間間効果が有意であった ($F(19, 114) = 5.55$, $p < 0.001$)。一方、群間効果 ($F(2, 6) = 1.60$, $p = 0.2775$) も群間-時間相互作用 ($F(38, 114) = 1.03$, $p = 0.445$) も統計的有意性に達しなかった。これらの結果は、PG 投与後の細胞外グルタミン酸濃度が時間経過とともに変化した、この実験条件下では群間でその時間的プロファイルに有意差が認められなかったことを示している。一方、図 3E のスパイク振幅については、群 ($F(2, 6) = 0.41$, $p = 0.681$) や時間間効果 ($F(19, 114) = 0.95$, $p = 0.523$)、および群と時間の交互作用 ($F(38, 114) = 1.02$, $p = 0.446$) に有意差は認められなかった。これらの知見は、この実験設定においてスパイク振幅が群依存性または時間依存性の有意な変化を示さなかったことを示唆している。

PG 注入から EDs 出現までのグルタミン酸の最大濃度は、異常なてんかん様 ECoG のスパイク振幅強度と有意に相関していた (WT: $r^2 = 0.94$, $p = 0.0066$, TRPV4 欠損マウス: $r^2 = 0.87$, $p = 0.032$, ピアソンの積率相関係数: 図 3J) と有意に相関し、PG 注入によるグルタミン酸濃度の上昇に伴い減少する傾向を示した。

TRPV4 拮抗薬および TRPV4 欠損マウスはいずれも PG 誘発性発作を抑制する。

DMSO 投与の野生型マウスは、(a) 10 mM RN 1734 投与群の野生型マウス (4.3 ± 0.3 対 2.3 ± 0.5 , $p = 0.026$, Mann-Whitney U 検定, 図 3I) および (b) DMSO 処理 TRPV4 欠損マウス (4.3 ± 0.3 vs. 2.0 ± 0.4 , $p = 0.017$, Mann-Whitney U 検定; 図 3I) と比較して高い発作スコアを示した。したがって、TRPV4 の不活性化と欠損の両方が発作スコアを低下させた。

5. 考察

本研究では、TRPV4 の不活性化が EDs を抑制し、その結果としててんかん発作が抑制されることを実証した。また、TRPV4 不活性化による抗てんかん作用のメカニズム解明のため、ECoG と細胞外グルタミン酸濃度の相関関係を検証した。本研究の主な知見は以下の通りである：(1) TRPV4 拮抗薬 RN 1734 は、用量依存的に EDs を約 10 分間抑制し、てんかん発作を抑制した (図 1 および図 3)。(2) TRPV4 欠損マウスでは野生型マウスに比べ ED 強度と発作スコアが有意に低く、RN 1734 は当然ながら TRPV4 欠損マウスでは無効であった。(3) PG による細胞外グルタミン酸濃度の上昇は、 β バンドパワーの上昇に先行して生じた。TRPV4 拮抗薬による β バンドパワー上昇への効果は一時的で、約 10 分間しか持続しなかったが、細胞外グルタミン酸濃度上昇への効果は弱かった (図 2)。(4) PG 投与前に TRPV4 拮抗薬を投与すると、PG 投与後の後期段階における β バンドパワーと細胞外グルタミン酸濃度が低下した。

TRPV4 欠損 (TRPV4 KO マウスと同様) と同等の効果を示す最適な RN 1734 濃度を決定するため、まず TRPV4 拮抗薬 RN 1734 (10 mM) による薬物誘発性 EDs の用量依存的抑制を検討した。その結果、RN 1734 は薬物誘発性 EDs を有意に抑制した。神経興奮に対する TRPV4 拮抗薬の抑制効果を実証したこれまでの *in vitro* 研究と一致して、我々は、RN 1734 が *in vivo* で ED のパワーを抑制することを発見した。

さらに、薬物誘発性 EDs の強度低下が、TRPV4 欠損マウスと TRPV4 拮抗薬投与マウスで同程度であることを示した。これまでの研究では TRPV4 欠損が EDs 強度を抑制することが示されているが、てんかん発作への影響は未解明であった^{(12), (13)}。しかし我々の結果は、TRPV4 の不活性化または欠損が EDs を抑制し、発作スコアを低下させることを実証した。

TRPV4 欠損による EDs への抑制効果は、TRPV4 欠損がキンドリングや過熱によって誘発される EDs の低出力に寄与することを示した過去の報告と一致する^{(12), (13)}。私たちの知る限り、皮質焦点性てんかんモデルにおいて TRPV4 拮抗薬が EDs に及ぼす抑制効果を報告した初めての研究である。TRPV4 欠損マウスのニューロンでは興奮性が有意に低下し、野生型マウスニューロンと比較して安静膜電位が -5mV 低下した⁽⁸⁾。これらの結果は、TRPV4 欠損ニューロンが放電を誘発するために WT ニューロンよりも大きな脱分極を必要とすることを示している。これらの研究と一致して、我々は拮抗薬を用いた *in vivo* 実験で TRPV4 抑制が EDs に及ぼす効果を実証した。しかし、TRPV4 抑制が ED に及ぼす効果が単に静止膜電位を低下させ閾値を上昇させるだけであるならば、拮抗薬を PG 投与前または後に投与した場合でも同様の効果が期待される。これに対し、我々の実験では、PG 投与後に RN 1734 を投与した場合、ED 抑制効果は約 10 分間しか持続せず、発作を持続させる他のメカニズムが関与していることを示唆している。

さらに、二要因反復測定分散分析を用いて時間経過全体を評価したところ、TRPV4 拮抗薬がてんかん様放電発現後に投与された場合にのみ有意な群間-時間相互作用が認められた。一方、PG 注入前に拮抗薬を投与した場合、群に依存する有意な効果は検出されなかった。これらの知見は、TRPV4 阻害の効果は時間的に均一ではなく、TRPV4 が痙攣発作の開始よりも、進行中のてんかん様活動の時間的進展と維持に優先的に関与していることを示唆している。TRPV4 阻害のこの段階依存的効果は、その基盤となるメカニズムが神経細胞の興奮性のみに限定されず、活動依存的な細胞外グルタミン酸の調節を伴う可能性を示唆している。PG 刺激で増加し、TRPV4 拮抗薬で調節されたグルタミン酸の起源については、アストロサイト特異的欠損マウスや拮抗薬を使用しなかったため結論づけられない。限られた結果に基づき、以下のメカニズムを提案する：ニューロンから放出されたグルタミン酸は神経伝達物質として機能するため、過剰投与は直ちに ED を引き起こすはずである。一方、アストロサイトはシナプス外グルタミン酸を調節し、グルタミン酸の持続的蓄積は ED 閾値を低下させる。本研究では、細胞外グルタミン酸濃度のピーク上昇が ED のピーク上昇に先行した（図 2B, 3B）。これは PG が神経細胞からのグルタミン酸放出を増強するよりも、むしろアストロサイトによるグルタミン酸調節を攪乱する可能性を示唆している。TRPV4 欠損および PG 注入前の TRPV4 拮抗薬投与（図 3C-D, 3F-G）は、神経細胞およびアストロサイト双方のグルタミン酸増加を抑制した可能性がある。このうちアストロサイト TRPV4 チャネルへの影響は重要と考えられる。なぜなら低グルタミン酸条件下では神経細胞の抑制は不要であったから

である。

対照的に、ED 中に投与された拮抗薬の効果は ED に限定された（図 1C-E, 2B）。TRPV4 拮抗薬は新規グルタミン酸産生を抑制したが、グルタミン酸レベルは低下させなかった（図 2B, 2E, 2H）。したがって、グルタミン酸作動性ニューロンにおける神経伝達物質のわずかな減少は ED を一時的に低下させるものの、ED の閾値は低いまま維持される。その他の妥当な説明としては、薬物の急速な代謝や標的領域からの拡散、受容体結合の短時間動態、注射法による局所的な迅速なクリアランス、ED の本質的な自己維持メカニズムなどが挙げられる。これらのメカニズムに関する我々の推測は、TRPV4 陰性の海馬ニューロンやアストロサイトは、グルタミン酸作動性神経系においてシナプス後細胞の興奮性が低く、アストロサイトでは細胞外グルタミン酸濃度が低いというこれまでの報告によって部分的に裏付けられている^{(8), (10), (12)}。ニューロンとグリア細胞における TRPV4 の異なる役割とその下流回路メカ

ニズムの解明に加え、脳内における RN 1734 の薬物動態に関する研究が必要である。

これらの分散分析結果をグルタミン酸調節の観点から解釈すると、発作時の TRPV4 の段階特異的役割には、純粋な神経細胞メカニズムではなく星状細胞メカニズムが寄与するという仮説を支持する。星状細胞の TRPV4 チャネルは、イオン不均衡、細胞腫脹、機械的ストレスといった活動依存性変化によって活性化されることが知られており、これらは進行中のてんかん様活動中に次第に増強する。したがって、発作開始後にのみ有意な群間-時間相互作用が認められた事実は、アストロサイト性 TRPV4 を介したグルタミン酸放出が、発作の伝播および維持段階で機能的に重要となり、発作誘発ではなく病的な細胞外グルタミン酸蓄積を促進するという概念と一致する。

本研究の限界点として、実験ごとのマウス群サイズが 4~6 匹と小さく、電気生理学的記録およびグルタミン酸測定で観察された生物学的変動性を考慮するには統計的検出力不足であった点が挙げられる。第二に、TRPV4 拮抗薬の溶媒として 10%ジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた対照群を設定したが、生理食塩水を用いたシャム群は設定されなかった。したがって、DMSO の影響を完全に排除できず、結果の解釈には注意が必要である。

第三に、RN 1734 の溶解性が低いため、大量の DMSO が必要であった。圧力関連損傷を最小限に抑えるため注入速度を極限まで抑えたものの、マウス脳への総注入量 $2\mu\text{l}$ は大きく、局所浮腫・細胞損傷・非特異的薬物拡散を引き起こし、電気生理学的結果を混同させる可能性がある。臨床応用可能な TRPV4 拮抗薬を

開発するには、組織損傷を伴わないことを示す組織学的検証、注入液の実際の拡散範囲を明らかにするトレーサー実験および薬物の溶解性に関するデータ収集の必要性がある

第四に、溶解性、分布、持続時間の差異により、他の選択的 TRPV4 拮抗薬（シトラール、RN-9893、GSK2193874）は発作開始後のより持続的な抑制をもたらす可能性がある。今後の研究では、これらの化合物を用いた用量反応およびタイミングパラダイムを直接比較すべきである。

6. 結論

TRPV4 の不活性化は、皮質焦点性てんかんモデルにおいて EDs を抑制し、発作の重症度を軽減した。TRPV4 阻害の効果は介入のタイミングに依存し、進行中の PG 誘発発作時にはグルタミン酸動態と β 波活動に有意な調節が認められたが、前処理後のピーク相では限定的ながら有意な差が観察された。

7. 謝辞

本研究において TRPV4KO マウスを提供いただいた岡崎生命科学研究センター (ExCELLS) 熱生物学グループの冨永誠教授に感謝申し上げます。

8. 参考文献

(1) Turovsky EA, Braga A, Yu Y, Esteras N, Korsak A, Theparambil SM, et al.

Mechanosensory signaling in astrocytes. *J Neurosci* (2020) 40:9364–71. doi:

10.1523/JNEUROSCI.1249-20.2020.

(2) Lu KT, Huang TC, Tsai YH, Yang YL. Transient receptor potential vanilloid type 4

channels mediate Na-K-Cl co-transporter-induced brain edema after traumatic brain

injury. *J Neurochem* (2017) 140:718–27. doi: 10.1111/jnc.13920.

(3) Chen X, Sun FJ, Wei YJ, Wang LK, Zang ZL, Chen B, et al. Increased expression of

transient receptor potential vanilloid 4 in cortical lesions of patients with focal cortical dysplasia. *CNS neurosci Ther* (2016) 22:280–90. doi: 10.1111/cns.12494.

(4) Chen X, Yang M, Sun F, Liang C, Wei Y, Wang L, et al. Expression and cellular distribution of transient receptor potential vanilloid 4 in cortical tubers of the tuberous sclerosis complex. *Brain Res* (2016) 1636:183–92. doi: 10.1016/j.brainres.2016.02.012.

(5) Shibasaki K, Yamada K, Miwa H, Yanagawa Y, Suzuki M, Tominaga M, et al. Temperature elevation in epileptogenic foci exacerbates epileptic discharge through TRPV4 activation. *Lab Invest* (2020) 100:274–84. doi: 10.1038/s41374-019-0335-5.

(6) Hunt RF, Hortopan GA, Gillespie A, Baraban SC. A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp Neurol* (2012) 237:199–206. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.06.013.

(7) Benfenati V, Amiry-Moghaddam M, Caprini M, Mylonakou MN, Rapisarda C, Ottersen OP, et al. Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (TRPV4) in rat cortical astrocytes. *Neuroscience* (2007) 148:876–92. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.06.039.

(8) 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* (2014) 289:14470–80. doi: 10.1074/jbc.M114.557132.

(9) Glass M, Dragunow M. Neurochemical and morphological changes associated with human epilepsy. *Brain Res Brain Res Rev* (1995) 21:29–41. doi: 10.1016/0165-0173(95)00005-n.

(10) Nomura S, Inoue T, Imoto H, Suehiro E, Maruta Y, Hirayama Y, et al. Effects of focal brain cooling on extracellular concentrations of neurotransmitters in patients with epilepsy. *Epilepsia* (2017) 58:627–34. doi: 10.1111/epi.13704.

(11) Moriyama H, Nomura S, Imoto H, Inoue T, Fujiyama Y, Haji K, et al. Suppressive effects of transient receptor potential melastatin 8 agonist on epileptiform discharges and epileptic seizures. *Front Pharmacol*, (2021) 12:766782. doi: 10.3389/fphar.2021.766782.

(12) Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M, Ibi D, Someya E, Koike H, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylenetetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. *J Neurosci* (2011) 31:12963–71. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3118-11.2011.

(13) Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, Tominaga M. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by

transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* (2007) 27:1566–75. doi:
10.1523/JNEUROSCI.4284-06.2007.

9. 図

Fig. 1

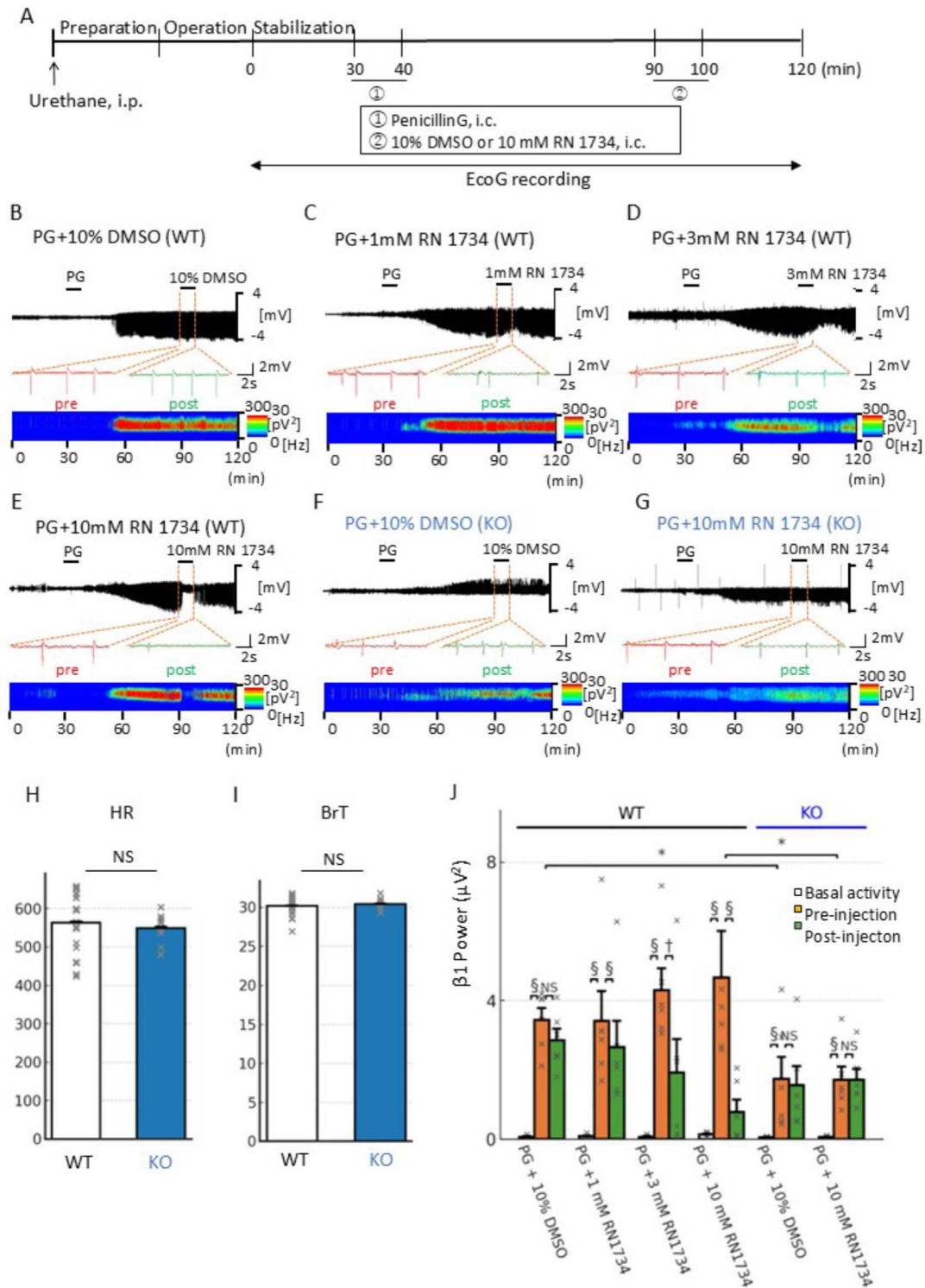


図 1 TRPV4 欠損による PG 誘発性 EDs の抑制効果

(A) 実験プロトコル. マウスはウレタンで麻酔した. ECoG の β 波帯のパワーを, 基礎活動期 (25-30 分), PG 投与前 (85-90 分), 投与後 (90-95 分) の各期間において 5 分間測定した. (B) PG + 10% DMSO ($n = 6$), (C) PG + 1 mM RN 1734 ($n = 6$), (D) PG + 3 mM RN 1734, (E) PG + 10 mM RN 1734 を投与した野生型マウスにおける ED の変化. TRPV4 欠損マウスへの (F) PG + 10% DMSO ($n = 6$) および (G) PG + 10 mM RN 1734 投与後の ED 変化. WT マウスと KO マウスを (H) 心拍数および (I) 脳温度で比較. (J) ベースライン時 (白), 投与前 (オレンジ), 投与後 (緑) における β 帯域の調査結果の概要. 結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示される.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's t 検定, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$, Dunnett 検定, § $p < 0.05$, Wilcoxon 検定, x 記号: 個々のデータポイント.

NS: 有意差なし; TRPV4: 一過性受容体電位バニロイド 4; PG: ペニシリン G; EDs: てんかん放電; ECoG: 皮質電位図; RN 1734: TRPV4 拮抗薬; WT: 野生型マウス; KO: ノックアウトマウス.

Fig. 2

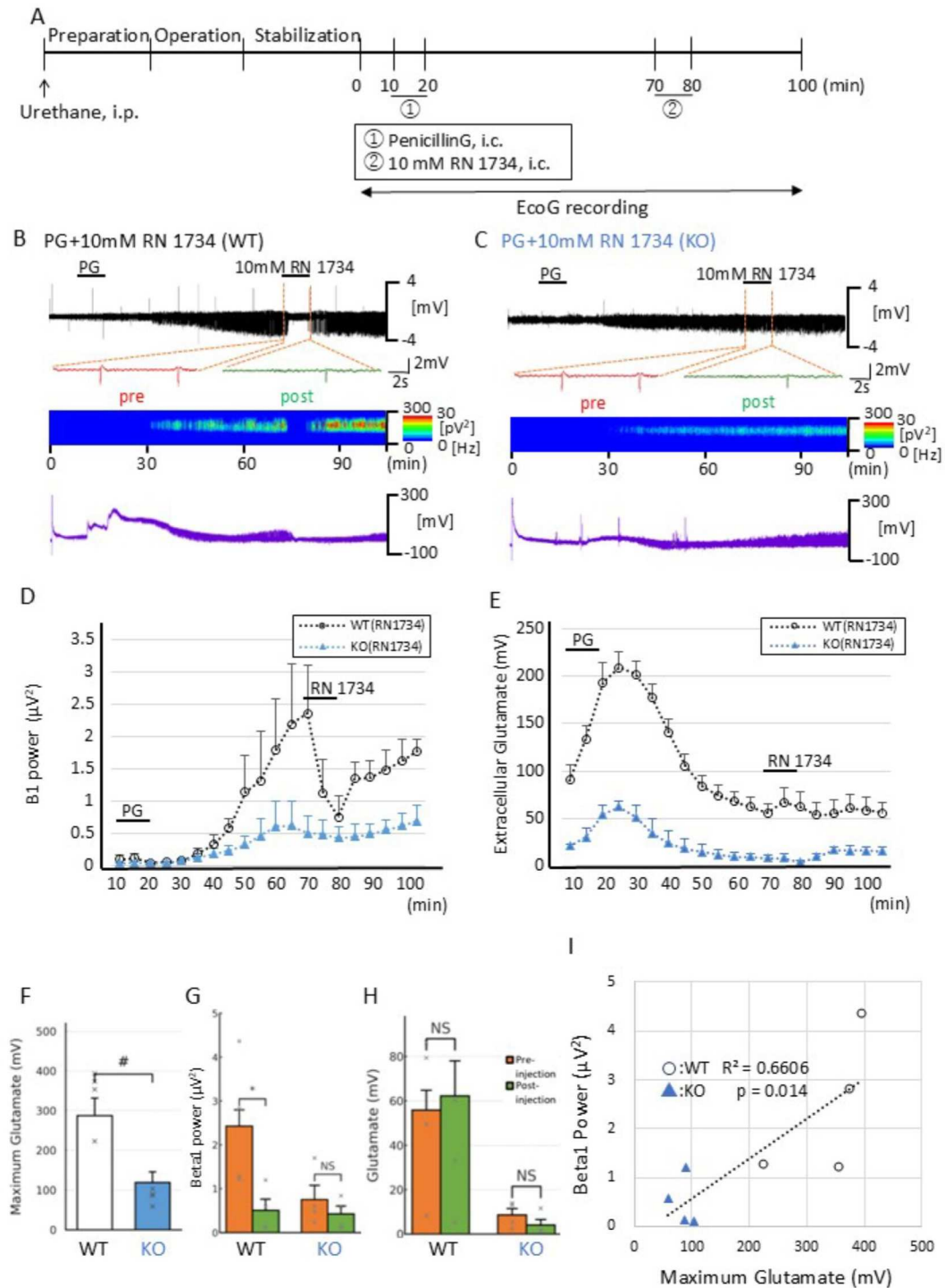


図2 ベータ帯域のパワーと細胞外グルタミン酸濃度の相関関係

(A) 実験プロトコル. マウスはウレタンで麻酔した. ECoG における β 帯域のパワーと細胞外グルタミン酸濃度は, 基礎活動期 (5-10 分), PG 投与前 (75-80 分), 投与後 (80-85 分) の各期間において, 5 分間隔 (0-100 分) で測定した. WT マウス ($n = 4$) における (B) PG + 10 mM RN 1734 投与群と, (C) TRPV4 KO マウス ($n = 5$) における PG + 10 mM RN 1734 投与群の, EDs の変化, β バンドスペクトル, 細胞外グルタミン酸濃度を示す. 野生型マウスと TRPV4 欠損マウスを比較した: (D) ベータバンドパワー, (E) 細胞外グルタミン酸濃度, (F) 5 分ごとの最大グルタミン酸濃度. (G) ベータバンドパワーと (H) 細胞外グルタミン酸濃度は, 野生型マウスと TRPV4 欠損マウスにおいて RN 1734 投与前 (オレンジ) と投与後 (緑) に測定された. (I) 野生型マウス (白丸) と TRPV4 欠損マウス (青三角) における β バンドパワーと細胞外グルタミン酸濃度の相関関係.

結果は平均 $\pm$ 標準誤差で示される; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student' s-t 検定, # $p < 0.05$, Mann-Whitney U 検定, NS, 有意差なし; r^2 , ピアソン積率相関係数の二乗, x 記号: 個々のデータポイント.

Fig. 3

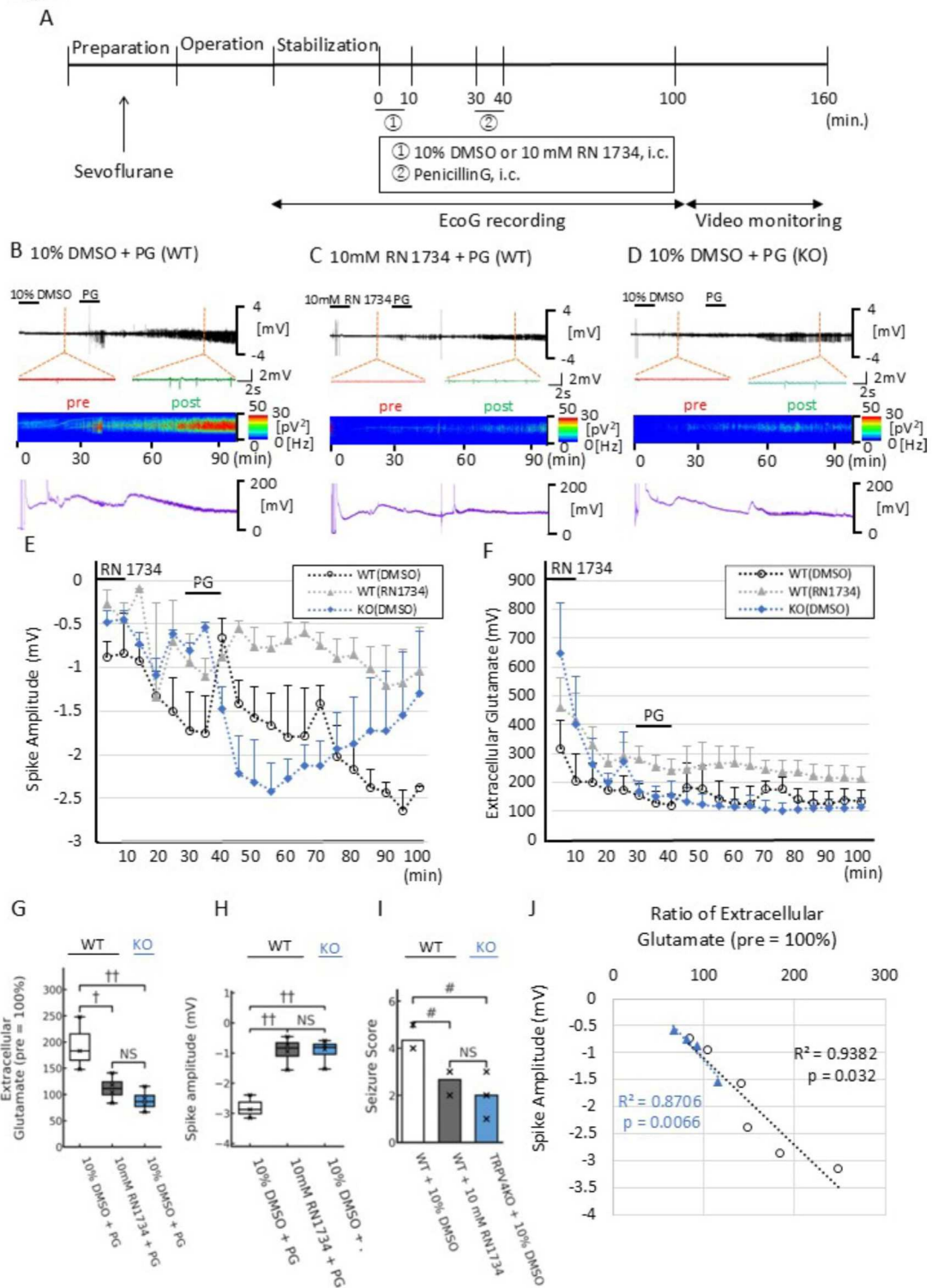


図3 細胞外グルタミン酸濃度と発作の相関関係

(A) 実験プロトコル. マウスはセボフルランで麻酔した. 基礎活動期 (5-10 分), PG 投与前 (75-80 分), 投与後 (80-85 分) の各期間において, ECoG の β バンドパワーと細胞外グルタミン酸濃度を 5 分間隔 (0-100 分) で測定した. 図には, 野生型マウスにおける (B) 10% DMSO + PG ($n = 3$), (C) 10 mM RN 1734 + PG ($n = 3$) 投与群, および TRPV4 欠損マウスにおける (D) 10% DMSO + PG ($n = 4$) を投与した群の EDs 変化量, β バンドパワースペクトル, および細胞外グルタミン酸濃度を示す. (E) 野生型マウス (10% DMSO 投与群: 黒, 10 mM RN 1734 投与群: 灰色) および TRPV4 欠損マウス (10% DMSO 投与群: 青) において, 5 分間隔で測定した β バンドパワー (F) および細胞外グルタミン酸濃度. (G) 投与前/投与後細胞外グルタミン酸濃度の比, (H) スパイク振幅, (I) 発作スコアを測定した. (G) 10% DMSO 処理群 (白) および 10 mM RN 1734 処理群 (灰色) の野生型マウス, ならびに 10% DMSO 処理群 (青) の TRPV4 KO マウスにおいて, PG 投与前後の細胞外グルタミン酸濃度の比率, (H) スパイク振幅, および (I) 発作スコアを測定した. (J) 野生型マウス (白丸) および TRPV4 欠損マウス (青三角) において, スパイク振幅と PG 投与前後の細胞外グルタミン酸濃度比との相関を測定した.

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示される; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student's t 検定, # $p < 0.05$, Mann-Whitney U 検定, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$, Dunnett 検定, NS, 有意差なし; r^2 : ピアソンの積率相関係数の二乗値, x 記号: 個々のデータポイントを示す