

血流低下に伴う脳機能障害に果たす **TRP** チャネルの  
病態生理学的役割の解明

2017

宮之原 遵

謹呈

拙書ではございますが、御一読頂ければ幸いに存じます。  
今後とも御指導、御鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

平成30年3月26日

宮之原 遵



血流低下に伴う脳機能障害に果たす **TRP** チャネルの  
病態生理学的役割の解明

2017

宮之原 遵



# 目次

|  |    |
|--|----|
| 緒言.....                                      | 1  |
| 第一章 マウス急性虚血性脳卒中モデルにおける TRPV1 の病態生理学的役割.....  | 3  |
| 実験方法.....                                    | 4  |
| 実験結果.....                                    | 7  |
| 考察.....                                      | 13 |
| 第二章 マウス慢性脳低灌流モデルにおける TRPM2 欠損の影響.....        | 15 |
| 実験方法.....                                    | 16 |
| 実験結果.....                                    | 19 |
| 考察.....                                      | 26 |
| 第三章 ミクログリアに発現する TRPM2 の慢性脳低灌流における病態への関与..... | 28 |
| 実験方法.....                                    | 28 |
| 実験結果.....                                    | 31 |
| 考察.....                                      | 37 |
| 総括および結論.....                                 | 39 |
| 謝辞.....                                      | 40 |
| 発表論文目録.....                                  | 41 |
| 参考文献.....                                    | 42 |



## 緒言

脳は生命維持に最も重要な臓器であり、その活動は脳血流により運搬される酸素や栄養に強く依存している。脳血流低下による酸素・栄養供給不全には、まずは血栓・塞栓による血管閉塞などの理由で一過性に急激な血流低下が生じる急性虚血性脳卒中が挙げられ、しばしば身体障害や言語障害などの重篤な後遺障害を伴う。またもう一つには、血流低下自体は緩やかであるものの持続的な低血流状態、すなわち慢性脳低灌流があり、潜在的に進行していくことで認知機能障害をはじめとした症状をもたらすとされている。以上、これらの脳血流低下は深刻な高次脳機能障害の成因となり、さらに本病態には加齢がリスク因子に挙げられることを考慮すると、今後の長寿社会においてはより一層医療経済学的に重要な問題となる。

近年、これらの病態には、脳常在性ミクログリアの異常活性化や血液脳関門の破綻によるマクロファージや好中球の浸潤により炎症性サイトカインや細胞傷害性因子の産生を介した過剰な炎症応答が惹起されることが示唆されている。これらの炎症制御は本病態において重要なターゲットであることが想定されるが、その病態メカニズムには不明な点が多く、治療標的分子に関する情報が不足しているのが現状である。

**Transient receptor potential (TRP) チャンネル**は、1989年にショウジョウバエの光受容応答変異株の原因遺伝子として初めて同定されたリガンド作動性カチオンチャンネルである。ほ乳類には少なくとも 29 種類の TRP チャンネルが存在することが知られており、多様な機能に関与することが報告されている。その一部は脳や免疫系の細胞に広く分布し、炎症環境を感知することが知られている。本研究では、第一章において急性虚血性脳卒中と TRPV1 に、第二章および第三章では慢性脳低灌流と TRPM2 に着目して以下の検討を行った結果、以下の新知見を得た。

第一章では、マウス急性虚血性脳卒中モデルにおいて、TRPV1 が脳虚血後の神経症状や運動機能の増悪および梗塞巣増大に寄与することを示した。

第二章では、マウス慢性脳低灌流モデルにおいて、TRPM2 が本病態における認知機能障害および白質傷害に寄与することを示した。

第三章では、TRPM2 の機能的発現が報告されているミクログリア/マクロファージに着目し、ミノサイクリン/マクロファージ活性化抑制薬や骨髄キメラマウスを用いた検討より、ミクログリアに発現する TRPM2 が慢性脳低灌流における病態増悪に関与することを示した。

これらの研究成果について、以下に論述する。



なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

|                |  |
|----------------|--|
| ADPR:          | adenosinediphosphate ribose                      |
| ANOVA:         | analysis of variance                             |
| BBB:           | blood brain barrier                              |
| BCAS:          | bilateral common carotid artery stenosis         |
| BM:            | bone marrow                                      |
| CD:            | cluster of differentiation                       |
| CNS:           | central nervous system                           |
| CX3CL1:        | chemokine (C-X3-C motif) ligand 1                |
| CX3CR1:        | chemokine (C-X3-C motif) receptor 1              |
| DAMPs:         | damage-associated molecular pattern molecules    |
| GFAP:          | glial fibrillary acidic protein                  |
| GFP:           | green fluorescent protein                        |
| HMGB1:         | high mobility group box 1                        |
| IL:            | interleukin                                      |
| LPS:           | lipopolysaccharide                               |
| MHC:           | major histocompatibility complex                 |
| mRNA:          | messenger ribonucleic acid                       |
| NDS:           | neurological deficit score                       |
| NLRP3:         | nod-like receptor protein 3                      |
| NO:            | nitric oxide                                     |
| OPC:           | oligodendrocyte precursor cell                   |
| PBS:           | phosphate buffered saline                        |
| PFA:           | paraformaldehyde                                 |
| rCBF:          | regional cerebral blood flow                     |
| ROS:           | reactive oxygen species                          |
| RT-PCR:        | reverse transcription-polymerase chain reaction  |
| TBS:           | tris buffered saline                             |
| TNF $\alpha$ : | tumor necrosis factor $\alpha$                   |
| TLR4:          | toll-like receptor 4                             |
| TREM2:         | triggering receptor expressed by myeloid cells 2 |
| TRPM2:         | transient receptor potential melastatin 2        |
| TRPV1:         | transient receptor potential vanilloid 1         |
| TTC:           | 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride              |

## 第一章 マウス急性虚血性脳卒中モデルにおける TRPV1 の

### 病態生理学的役割

急性虚血性脳卒中は先進国の死亡原因の第二位に挙げられ (1)、一命を取り留めても身体障害や言語障害などの重篤な後遺障害を呈する (2)。本病態にかかる医療経済学的な負担は今後高齢化社会が加速するにあたって増していくと考えられ、脳梗塞の病態解明と新たな治療標的の探索が強く求められている (2)。実際、組織プラスミノゲン活性化因子などを用いた現在の治療法は、神経細胞死に関与するメカニズムよりもむしろ血流確保を目的としたものであり、部分的にしか功を奏さないのが現状である (3)。

TRPV1 はカプサイシン受容体として知られ、43 度以上の熱や pH < 6.0 の酸、数多くの脂質に対して活性化する (4)。TRPV1 は末梢の侵害受容に関与するとされているものの、げっ歯類においては海馬、皮質、小脳、嗅球、中脳をはじめとした脳内において幅広く発現しており (5,6)、TRPV1 が CNS においても生理的な機能を担うことが示唆されている。実際に、腹側中脳部における TRPV1 刺激は中脳ドパミン神経へのグルタミン酸入力を増強させる (7)。さらに、近年の報告では TRPV1 は海馬介在ニューロン (8)、歯状回 (9)、側坐核 (10) におけるシナプス可塑性に関与することが報告されている。これらの知見は TRPV1 が CNS において機能していることを示唆しているものの、神経障害、特に急性虚血性脳卒中における病態生理学的役割はよくわかっていない。

したがって本研究では、急性虚血性脳卒中における神経障害への TRPV1 の関与を検討するために、マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルを用いて、TRPV1 の遺伝子欠損および遮断による神経症状、運動機能障害、梗塞単体積への影響を観察した。

## 実験方法

### 使用動物

実験には雄性 C57BL6/J 系マウス (体重 20–30 g、8–12 週齢; 日本 SLC、静岡) を使用した。TRPV1 遺伝子欠損 (TRPV1-KO) マウスは University of California, San Francisco David Julius 教授より供与していただいた。TRPV1-KO マウスはバックグラウンド系統である C57BL/6J 系マウスに 10 世代戻し交配させた。全ての動物は室温が  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。実験は全て、京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行われた。

### 試薬と薬物投与

イソフルランはファイザー株式会社 (New York、USA) より購入した。ソムノペンチルは共立製薬株式会社 (東京) より購入した。カプサゼピンは Sigma (Missouri、USA) より購入し、術前 30 分前に  $20\text{nmol}/5\mu\text{l}$  で側脳室内に投与した。

### マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルの作製

実験動物用吸入麻酔気化器 (TK-4, TK-7; バイオマシナリー、千葉) を用いてイソフルランによりマウスを麻酔し、濃度 3% で麻酔導入を行い、手術中は濃度 1% で麻酔を維持した。マウスをうつ伏せにした状態で heating pad system で直腸温を測定し、 $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  に維持した。正中線に沿って頸部を切開し、左総頸動脈を露出し迷走神経を慎重に剥離した。心臓側の総頸動脈、外頸動脈を順に縫合糸 (滅菌済み絹製縫合糸 No.7; アルフレッサファーマ株式会社 大阪) で二重に結紮した。内頸動脈は一度結紮し、内頸動脈からの血流を遮断し、総頸動脈には補助用の縫合糸を一つかけ、総頸動脈上の結紮部位と補助糸用縫合糸の間に切れ込みを入れ、その切れ込みより内頸動脈に向かってナイロン栓子 (ナイロン糸 (滅菌済ナイロン縫合糸 No.8; 秋山製作所、埼玉) の先端 5 mm に  $180\text{--}200\ \mu\text{m}$  の太さにてシリコン (JM シリコン; MORITA、大阪) をコーティングしたもの) を挿入した。ナイロン栓子の先が中大脳動脈の起始部に到達し、ナイロン栓子を掴んでいるピンセットに軽い抵抗が生じた状態で内頸動脈および総頸動脈の補助糸を結紮した。虚血中は濃度 1% で麻酔を維持し、虚血処置 60 分後において、ナイロン栓子を引き抜くことにより中大脳動脈の血流を再開通させた。切開創部を縫合糸 (滅菌済ブレードシルク No.5; 秋山製作所、埼玉) にて丁寧に縫合し、heating pad system 上に仰向けにした状態で麻酔から醒めるのを待ち、麻酔より覚醒した後に飼育ケージに移動させ手術前と同条件にて飼育した。

## 局所脳血流量 (rCBF; regional cerebral blood flow) の測定

イソフルラン麻酔下で、左頭皮を切開し、左側頭筋を剥離した後、bregma より左外側に 6 mm、尾側に 2 mm の位置に GJ プローブ (オメガウェーブ、東京) をアロンアルファ (東亜合成、東京) と硬化促進剤 (1796、スリーボンド、東京) を用いて接着した。GJ プローブを laser-Doppler flowmetry (FLO-C1 または FLO-N1; オメガウェーブ、東京) に接続し血流量 (ml/min/100 g) を測定した。虚血開始前の血流量を 100% とし、虚血 5 分後より再灌流 25 分後まで 10 分毎に測定を行い、虚血中の血流が 20% 以下かつ再灌流後に血流が 60% 以上に回復した個体のみを実験に使用した。

## 神経症状の評価

再灌流後 1、2 日後の神経症状をマウスの行動観察から次の通りに 0-5 の 6 段階で評価した。0, 正常; 1, 右前肢および体躯の屈曲; 2, 回転運動; 3, 左にもたれかかるような姿勢; 4, 正向反射の消失; 5, 無動。

## 運動機能障害の評価

再灌流後 1、2 日後の運動機能障害をマウスの行動観察から次の通りに 0-5 の 6 段階で評価した。0, 正常; 1, 四肢でぶら下がり、尾を巻きつける; 2, 前肢および後肢の片足あるいは両足を使ってぶら下がる; 3, 前肢の片足あるいは両足を使ってぶら下がる; 4, 5 に同じ、かつロープに登ろうと試みる; 5, 落下。

## 梗塞巣体積の評価

再灌流 1、2 日後に頸椎脱臼により安楽死させ、断頭した。頭蓋をセッションで順に剥離することにより全脳を露出し、アクリル製ブレインスライサー (ブレインサイエンス・イデア、大阪) とカミソリ (フェザー安全剪刀、大阪) にて吻側より 1 mm 厚の冠状切片を 8 枚作製した。12 穴プレートに 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 溶液を 2 ml 注ぎ、切片の尾側を下面にして 20 分間 37°C にて溶液中に静置した。その後、12 穴プレートに 10% ホルマリン溶液を 2 ml 注ぎ、冠状切片を TTC 溶液からホルマリン溶液へと移し、2 日間 4°C にて静置した。スワン滅菌シャーレ上に 8 枚の切片の尾側を下面にして静置した。カラーイメージスキャナー (GT7600U; EPSON、長野) を用いて、撮像した。TTC 染色により染色されていない白色の部分梗塞巣として判定し、Image J (National Institutes for Health, Maryland, USA) を用いて面積を測定し、各脳切片の尾側面の梗塞巣面積を計測することで評価した。

## 免疫染色法

### ○ 経心灌流固定および冠状切片作製

マウスをソムノペンチル (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて開胸し、0.1 M PBS (pH7.4) を 20 ml 経心灌流することで脱血した後、4% PFA in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 10 ml で経心灌流し、全身を固定した。その後全脳を摘出し、4%PFA 溶液で 4°C にて 3 時間、後固定を行った。次に 4°C にて 15% sucrose in 0.1 M phosphate buffer に一晩静置し、粉碎したドライアイス (中川産業、京都) にて脳組織を凍結し冠状切片作製まで -80°C にて保存した。次に、マイクロトーム刃 (LEICA819; Leica, Germany) を装着した凍結マイクロトーム (LEICA3000; Leica, Germany) を用いて厚さ 20  $\mu$ m の凍結切片を作製し、MAS コート付スライドガラス (松浪硝子工業、大阪) に接着した。切片作製の前に組織サンプルはマイクロトーム内で 30 分以上静置し、マイクロトーム内の温度 (-17 から -20°C) まで組織サンプルの温度が上昇してから切片作製を開始した。

### ○ 蛍光抗体法

脳切片を 0.1% Triton-X100 を含む PBS にて透過処理を施した後、0.3% BSA を含む PBS (抗体希釈液) にてブロッキングした。一次抗体として rabbit polyclonal anti-Iba1 antibody (1:500; WAKO、大阪)、rabbit polyclonal anti-GFAP antibody (1:1000; DAKO、Denmark)、rat monoclonal anti-Gr-1 (Ly-6G) antibody (1:300; R&D Systems、Minnesota、USA) を用いて 4°C で一晩静置し、PBS による洗浄後、適切な蛍光標識二次抗体 (1:300; Molecular Probes、Oregon、USA) と室温遮光条件で 1 時間反応させた。PBS による洗浄後、Vectashield (Vector、California、USA) によりスライドガラス上に封入した。乾燥後、共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i; オリンパス、東京) により画像を取得した。

## 統計解析

値は全て、平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。二群間の差は Student's t-test により解析し、免疫染色については two-way ANOVA および Bonferroni *post hoc* test を用いて、Prism 5 software (GraphPad、California、USA) により解析した。危険率 5% 未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

## 実験結果

### TRPV1 遺伝子欠損の神経症状、運動機能障害、梗塞巣体積に及ぼす影響

急性虚血性脳卒中における TRPV1 の関与を検討するために、マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルにおいて TRPV1 遺伝子欠損の影響を評価した。まず、TRPV1 遺伝子欠損により脳血流量に影響するのか検討するために、虚血開始 5 分後から再灌流 25 分後までの rCBF を 10 分毎に測定した。野生型マウスと比較して TRPV1-KO マウスではいずれの時間においても rCBF に差はなかった (図 1-1A)。次に、脳虚血 24、48 時間後において、虚血-再灌流により惹起される神経症状を評価した。その結果、野生型マウスでは脳虚血 1、2 日後において重篤な神経症状が観察されたが、TRPV1-KO マウスでは 2 日後において有意に低いスコアを示した (図 1-1B)。また、運動機能について評価を行ったところ、野生型マウスでは脳虚血 1、2 日後において重篤な運動機能障害が観察されたが、TRPV1-KO マウスでは 1、2 日後において有意に低いスコアを示した (図 1-1C)。さらに、野生型マウスでは 2 日後、広範な梗塞巣の形成が認められた一方で、TRPV1-KO マウスでは梗塞巣体積の有意な減少が認められた (図 1-1D,E)。これらの結果より、TRPV1 遺伝子欠損は急性虚血性脳卒中における神経症状、運動機能障害、梗塞巣体積増大を改善することが示された。

### TRPV1 遮断薬の神経症状、運動機能障害、梗塞巣体積に及ぼす影響

急性虚血性脳卒中における TRPV1 の関与を更に検討するために、TRPV1 遮断薬であるカプサゼピンによる評価を行った。まず、Vehicle 投与マウスと比較してカプサゼピン投与マウスでは虚血-再灌流後のいずれの時間においても rCBF に差はなかった (図 1-2A)。また、Vehicle 投与マウスでは脳虚血 1、2 日後において重篤な神経症状 (図 1-2B) および運動機能障害 (図 1-2C) が観察されたが、カプサゼピン投与マウスでは 48 時間後において有意に低いスコアを示した。さらに、Vehicle 投与マウスでは 2 日後、広範な梗塞巣の形成が認められた一方で、カプサゼピン投与マウスでは梗塞巣体積の有意な減少が認められた (図 1-2D,E)。これらの結果より、TRPV1 の遮断は TRPV1 遺伝子欠損と同様に、急性虚血性脳卒中における神経症状、運動機能障害、梗塞巣体積増大を改善することが示された。

### TRPV1 遺伝子欠損に対する TRPV1 遮断薬の影響

カプサゼピンによる保護効果が TRPV1 特異的なものであるのかを検討するために、TRPV1-KO マウスにおいてカプサゼピンを投与することで評価を行った。

まず、Vehicle 投与 TRPV1-KO マウスと比較してカプサゼピン投与 TRPV1-KO マウスでは虚血-再灌流後のいずれの時間においても rCBF に差はなかった (図 1-3A)。さらに、脳虚血 1、2 日後における神経症状 (図 1-3B) および運動機能障害 (図 1-3C)、2 日後における梗塞巣体積増大 ((図 1-3D,E) に対するカプサゼピン投与の影響は認められなかった。この結果から、カプサゼピンに認められた保護効果は TRPV1 を介したものであることが示唆される。

### TRPV1 遺伝子欠損のミクログリアおよびマクロファージ、アストロサイト、好中球集積に対する影響

最後に、Iba1、GFAP、Gr1 染色により、脳虚血 1、2 日後における梗塞巣周囲のミクログリアおよびマクロファージ、アストロサイト、ならびに梗塞巣内部の好中球の集積を検討した。Iba1 (図 1-4A)、GFAP (図 1-4B)、Gr1 (図 1-4C) 陽性細胞数は脳虚血 1、2 日後において増加が認められた。しかしながら、野生型および TRPV1-KO マウスで有意な差は認められなかった。

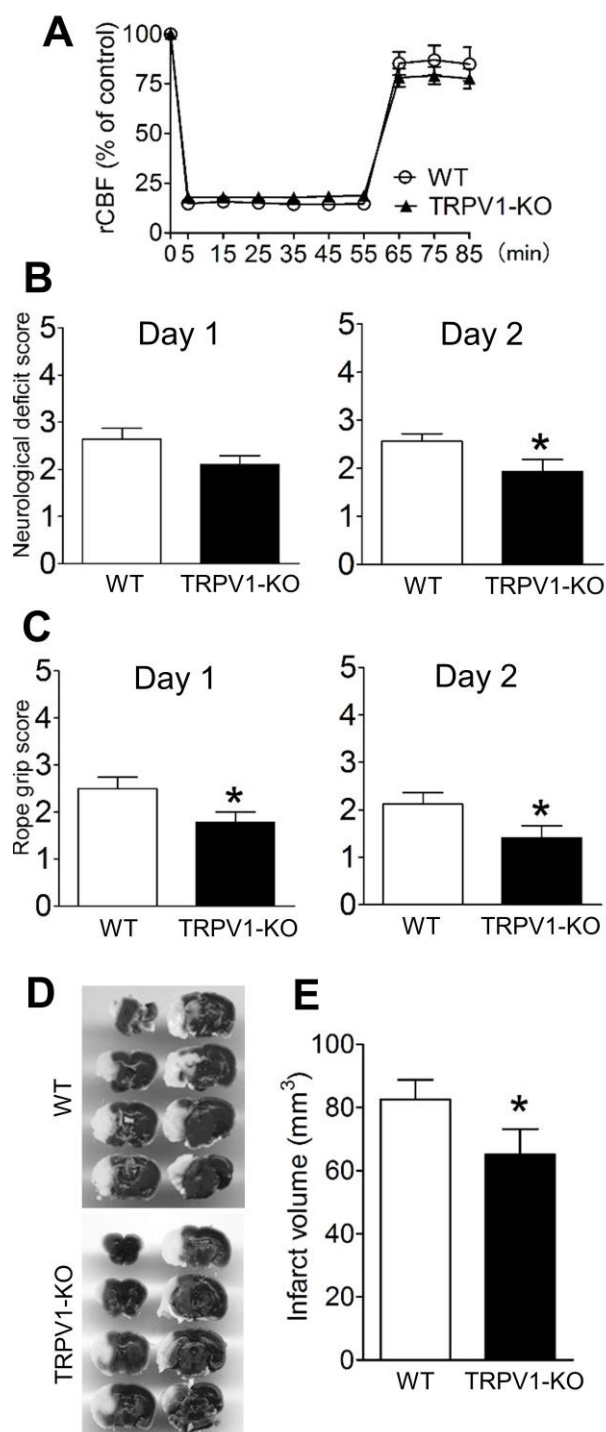


図 1-1 TRPV1 遺伝子欠損により脳虚血傷害の進展が抑制された。

(A) レーザードップラー血流系計を用いて中大脳動脈の支配領域の局所脳血流量を測定した。虚血直前を 100%としている。(B,C) 虚血-再灌流処置 1、2 日後において、野生型マウスおよび TRPV1-KO マウスの神経学的スコア (B) および運動機能 (C) を評価した。(D) 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける TTC 染色画像の典型例。上段が野生型マウス、下段が TRPV1-KO マウス。(E) 虚血-再灌流処置 1、2 日後における野生型マウスおよび TRPV1-KO マウスの梗塞巣体積。\* $P < 0.05$ .  $n = 15-22$  for A-D,  $n = 8-9$  for E.



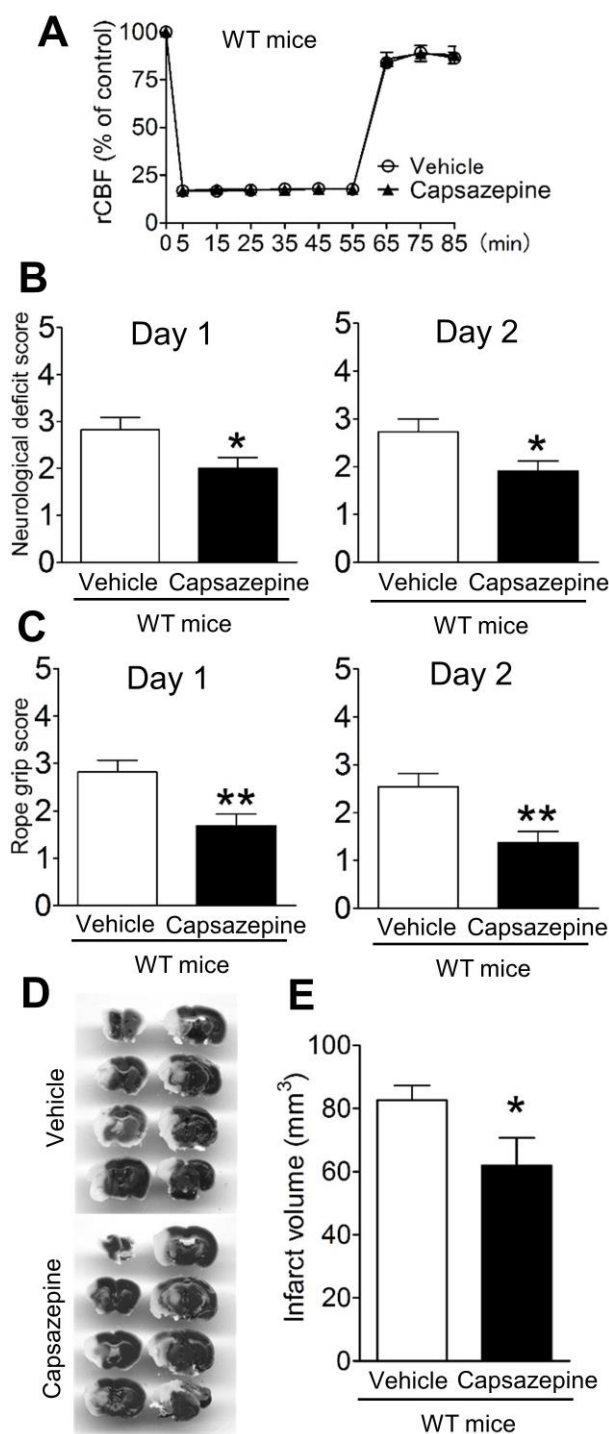
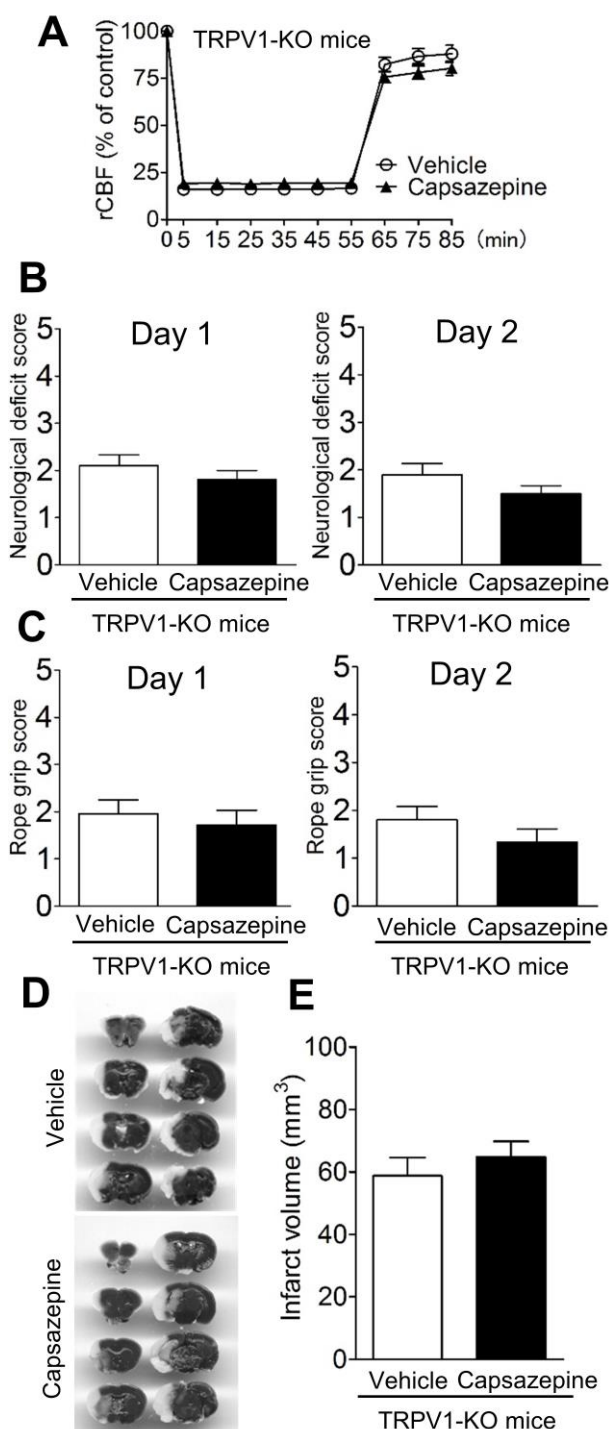


図 1-2 TRPV1 遮断薬により脳虚血傷害の進展が抑制された。

(A) レーザードップラー血流系計を用いて中大脳動脈の支配領域の局所脳血流量を測定した。虚血直前を 100%としている。(B,C) 虚血-再灌流処置 1、2 日後において、Vehicle 投与マウスおよびカプサゼピン投与マウスの神経学的スコア (B) および運動機能 (C) を評価した。(D) 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける TTC 染色画像の典型例。上段が Vehicle 投与マウス、下段がカプサゼピン投与マウス。(E) 虚血-再灌流処置 1、2 日後における Vehicle 投与マウスおよびカプサゼピン投与マウスの梗塞巣体積。\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .  $n = 11$ .



**図 1-3 TRPV1-KO マウスで TRPV1 遮断薬の保護作用は消失した。**

(A) レーザードップラー血流系計を用いて中大脳動脈の支配領域の局所脳血流量を測定した。虚血直前を 100%としている。(B,C) 虚血-再灌流処置 1、2 日後において、Vehicle 投与マウスおよびカプサゼピン投与マウスの神経学的スコア (B) および運動機能 (C) を評価した。(D) 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける TTC 染色画像の典型例。上段が Vehicle 投与マウス、下段がカプサゼピン投与マウス。(E) 虚血-再灌流処置 1、2 日後における Vehicle 投与マウスおよびカプサゼピン投与マウスの梗塞巣体積。n = 10.

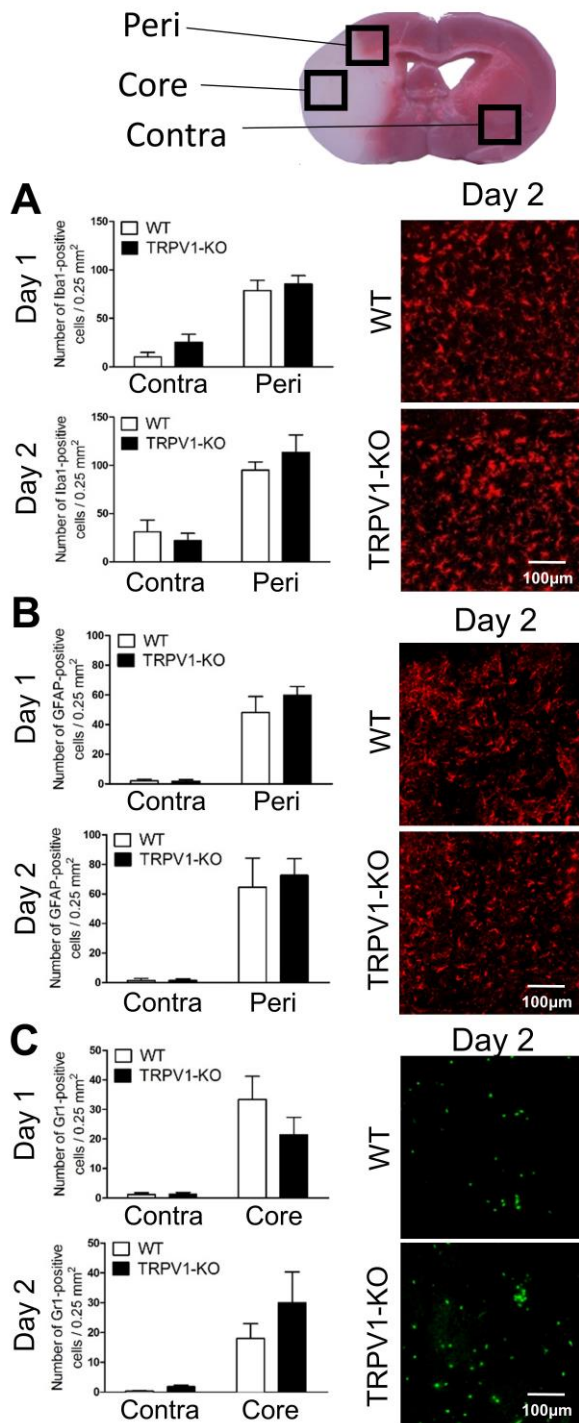


図 1-4 TRPV1 遺伝子欠損は脳虚血後の各細胞の集積に影響しなかった。

(A-C) 虚血-再灌流処置 1、2 日後の梗塞巣周囲における Iba1 (A), GFAP (B), Gr1 (C) の計数結果および各細胞数の計数結果および虚血-再灌流処置 2 日後の免疫染色画像。スケールバーは 200 μm である。 n = 5-6.

## 考察

本章において著者は、TRPV1 遺伝子欠損により神経症状や運動機能障害の軽減および梗塞巣体積の減少が認められることを示した。さらにカプサゼピンの側脳室内投与により、野生型においては神経症状や運動機能障害の軽減および梗塞巣体積の減少が認められた一方で、TRPV1-KO マウスではその効果が認められなかった。これらの結果から、TRPV1 活性化は脳虚血の病態増悪に寄与していることが示された。

TRPV1 は末梢や中枢神経系において様々な細胞種に発現しており (5,6)、急性虚血性脳卒中の病態においても特定の細胞種において機能することが示唆される。本研究では、カプサゼピンの脳内投与および TRPV1 の欠損が神経症状や運動機能障害の軽減および梗塞巣体積の減少を示したことから、少なくとも TRPV1 の機能が脳虚血病態の改善に影響を及ぼしていると考えられる。過去の研究において、TRPV1 は脳内においてミクログリア (11,12) やアストロサイト (13) に発現することが報告されている。本研究では、脳虚血 1、2 日後における Iba1、GFAP、Gr1 陽性細胞数は、増加は認められたものの、両遺伝子型で有意差は認められなかった。したがって、これらの細胞種は TRPV1 を介した急性虚血性脳卒中の病態増悪に重要ではない可能性がある。

これまでの電気生理学的な研究により、TRPV1 活性化がプレシナプス (7,8,14-16) とポストシナプス (9,10) 両方を介したシナプス伝達を制御することが明らかとなっている。カプサイシンや内因性 TRPV1 アゴニストであるアナンダミドによる刺激で、黒質緻密部ドパミン神経 (7)、線条体ニューロン (14)、中脳水道周囲灰白質ニューロン (15) における自発的興奮性後シナプス電流を増加させた。さらに、Shodai らは、TRPV1 を介したカルシウム流入が、末梢神経の神経終末において、電位依存性カルシウムチャンネル非依存にグルタミン酸放出に関与することを報告した (16)。これらの結果は、TRPV1 刺激が中枢神経系においてもグルタミン酸放出に関与することを示唆する。グルタミン酸が神経伝達物質として以外にも、急性虚血性脳卒中において神経変性にも関与すること (17)、TRPV1 の内因性アゴニストであるパルミトイルエタノールアミド (20) やアナンダミド (21) の脳内レベルが脳虚血後に増加することを考慮すると、TRPV1 の過剰活性化が脳虚血後の神経毒性に関与する可能性が考えられる。さらに、当研究室における過去の報告において、TRPV1 の活性化が培養ラット皮質ニューロンにおいて神経毒性を示すことがわかっていることから (18)、TRPV1 を介した細胞体またはポストシナプスでのカルシウム流入が直接的に神経の生存に影響を与える可能性がある。もし、側頭葉てんかん患者と同様に (19)、

急性虚血性脳卒中患者の中樞神経においても TRPV1 の発現上昇が認められるのであれば、TRPV1 による神経毒性はより促進されると考えられる。

急性虚血性脳卒中の病態では、脳内において嫌気性代謝や乳酸蓄積、pH 低下が認められる (22)。また、他にもブラジキニン (23) やプロスタグランジン (24) といった起炎物質も産生される。さらに近年の研究では、ブラジキニンを介したプロテインキナーゼ C のリン酸化が TRPV1 を活性化し、一次感覚神経シナプスにおけるグルタミン酸放出を促進させることが報告されている (25)。これらのことから、神経における TRPV1 が急性虚血性脳卒中において様々な刺激に応答することでグルタミン酸神経毒性へ寄与している可能性が考えられる。

カプサゼピンの側脳室内投与により病態は改善されたものの、その効果は TRPM8 (26) のような非特異的な作用によることも考えられた。しかしながら本研究では、TRPV1-KO マウスにおいてカプサゼピンの保護作用は消失したことから、カプサゼピンの効果は TRPV1 特異的なものであること考えられる。

一方で、過去の研究では、TRPV1 活性化がげっ歯類脳虚血モデルにおいて、おそらく低体温を惹起することにより保護作用を示すことが報告されている (27,28)。しかしながら、TRPV1 アゴニストであるリンバニルの 25mg/kg 投与により低体温が生じ、脳虚血病態に対する保護作用を及ぼした一方で、50mg/kg の高用量での投与では有意な作用が認められなかった (27)。この違いを生み出す仮説として、中樞と末梢における TRPV1 の果たす役割の違いが考えられる。プロトンを介した TRPV1 活性化が腹部内蔵における温度調節に恒常的に関与していることや (29)、TRPV1 アンタゴニストである AMG9810 による体温上昇が  $\beta$  アドレナリン受容体アンタゴニストであるプロプラノロールにより抑制されることは (30)、中樞よりもむしろ末梢における TRPV1 活性化が主に低体温に関与することを強く示唆している。この考えは、脳透過性の高い TRPV1 のアンタゴニストである AS1928370 が体温上昇にほとんど効果を示さなかったこと (31) にも支持されている。したがって、中樞神経系において影響を及ぼす低用量の TRPV1 アゴニストは、末梢 TRPV1 を介した低体温による保護が主作用であると考えられる。しかしながら、急性虚血性脳卒中における TRPV1 の影響の相反する結果を考慮すると、TRPV1 活性化を介した低体温療法は中樞において神経毒性のリスクを伴うことを留意すべきである。したがって、末梢の TRPV1 には影響を及ぼさないような中樞特異的な TRPV1 の選択的抑制が可能であれば、低体温を維持しつつ TRPV1 を介した神経毒性をも抑制できるという点でより魅力的な治療戦略となり得る。

以上、本章において著者は、TRPV1 が急性虚血性脳卒中において重要な役割を果たすことを明らかにした。

## 第二章 マウス慢性脳低灌流モデルにおける TRPM2 欠損の影響

慢性脳低灌流は脳への酸素や栄養の供給不全を招くが、加齢 (32) や動脈硬化、高血圧、肥満 (33) といった様々な因子により引き起こされることが報告されている。さらに、慢性脳低灌流はアルツハイマー型 (34) や脳血管性 (35) の認知症や、多発性硬化症 (36)、大うつ病 (37)、てんかん (38) などのその他の中枢神経疾患においても認められる。近年、認知機能障害は認知症に限らず (35)、多発性硬化症 (39)、パーキンソン病 (40)、大うつ病 (41)、統合失調症 (42)、てんかん (43) を含む多くの中枢神経疾患で生じることが明らかとなってきた。これらの事実は、慢性脳低灌流が認知機能障害を伴うあらゆる中枢神経疾患の上流に位置することを示唆する。この仮説に一致して、いくつかの研究では、慢性脳低灌流が上述の神経変性疾患および精神障害の病態を惹起することが示されているが (33)、慢性脳低灌流に起因した認知機能障害における詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。

現在行われている研究として、慢性脳低灌流は炎症応答の増悪に関与することが報告されている (44)。マウス (45) やヒト (46) において、炎症が慢性脳低灌流に起因する認知機能障害に寄与すること、さらに抗炎症薬が本病態における認知機能障害を改善すること (47) が報告されており、炎症応答の制御が慢性脳低灌流における認知機能の低下において重要な標的となることが示唆される。

TRPM2 は過酸化水素を含む活性酸素感受性や温度感受性を有しているポリマーダルな  $\text{Ca}^{2+}$  透過性陽イオンチャネルであり、C 末端の細胞内ドメインに ADPR を分解するピロホスファターゼ活性をもつ Nudix モチーフを有している (48)。TRPM2 は脳内で神経細胞 (49)、ミクログリア (50,51) における発現が報告されている他、単球/マクロファージ (52)、好中球 (53) などの末梢免疫細胞にも発現している。過去の研究では、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて TRPM2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入が単球の炎症性サイトカイン産生を促進させることが示された (52)。また著者の所属する研究室では、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、TRPM2 がミクログリアおよびマクロファージのサイトカイン産生に関与し、炎症応答を媒介することを報告している (54)。

そこで本章では、TRPM2 遺伝子欠損マウス (TRPM2-KO マウス) を用いて、マウス慢性脳低灌流モデルを作成し、TRPM2 遺伝子欠損の影響を検討した。本モデルである両側総頸動脈狭窄 (BCAS) モデルは比較的緩徐な慢性脳低灌流を

惹起し、虚血性脳卒中様の強い虚血病態は呈さないことを確認している (55)。BCAS で惹起される低灌流は、認知機能障害を伴う様々な中枢神経疾患で認められる低灌流を想定した強度である。

## 実験方法

### 使用動物

実験には雄性 C57BL6/J 系マウス (体重 20–30 g、9–12 週齢; 日本 SLC、静岡) を使用した。TRPM2-KO マウスは京都大学工学研究科 森泰生先生より供与していただいた。その他については、第一章実験方法に同じ。

### 両側総頸動脈狭窄 (BCAS)

マウスの頸部を 1.5% イソフルラン麻酔下で切開し、両総頸動脈を直径 0.18 mm の微小コイルにより狭窄した。総頸動脈剥離までの過程は第一章実験方法に同じ。頭皮を切開、左側頭筋を剥離し、bregma 左外側に 6 mm、尾側に 2 mm の位置にドップラー血流計のプローブを固定し単位時間当たりの局所脳血流量を測定した。処置開始前の血流を 100% とし、処置 60 分後の血流を測定した。

### Y 迷路試験

Y 迷路試験は術後 14、28 日後に行った。Y 迷路はそれぞれ等角の 3 つのアームから構成される (長さ 40 cm、高さ 12 cm、幅 3 cm)。試験直後のマウスの場所を A とし、その他のアームを B、C とした。8 分間の試行をビデオカメラにより記録した。交替行動率は三回連続して異なるアームに侵入する割合とした (e.g. ABC, CAB, BCA)。アームへの総侵入回数を自発的行動量の指標とした。アームへの総侵入回数が 15 回未満のマウスを除外基準とした。

### 新奇物体探索試験

新奇物体探索試験は術後 14、28 日後に行った。試験は 30Lx の暗室で行われ、マウスは訓練試行前に 3 日間、1 日 10 分黒箱 (30 x 30 x 30 cm) にて馴化させた。訓練試行において、2 つの物体 (黄色三角柱および青色四角錐) が黒箱内に配置され、マウスを 10 分間自由に探索させた。6 時間後、テスト試行として青色四角錐を木製の球体に置換し、再度マウスに探索させた。訓練試行においては青色四角錐、テスト試行においては木製の球体における探索時間をそれぞれ自発的行動量の指標とした。嗜好性は総探索時間に対する、訓練試行においては青色四角錐、テスト試行においては木製の球体への探索時間の割合を算出し、認

知機能の指標とした。

### **Fluoromyelin 染色**

凍結切片を FluoroMyelin Green (1:300; Molecular Probes、Oregon、USA) により、遮光条件で 1 時間反応させた。Bregma + 0.7 mm における脳梁部 200 x 200  $\mu\text{m}^2$  領域での平均蛍光強度を評価した。その他の免疫染色プロトコルについては第一章実験方法に同じ。

### **免疫染色法**

一次抗体として GSTpi (rabbit anti-GSTpi antibody, 1:200; MBL Life Science) を用いた。Bregma + 0.7 mm における脳梁部での細胞数を評価した。その他の免疫染色プロトコルについては第一章実験方法に同じ。

### **酵素抗体法**

NeuN の組織染色に関して、一次抗体として NeuN (mouse anti-NeuN antibody, 1:500) を用いて 4°C で一晩静置し、PBS による洗浄後、biotinylated horse anti-rmouse IgG (1:200; Vector、California、USA) と室温で 90 分間反応させた。PBS による洗浄後、ABC Elite reagent (1:200, Vector, California, USA) と室温で 60 分間反応させた。TBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ活性は diaminobenzidine (Dojindo) および  $\text{H}_2\text{O}_2$  で可視化した。70%、90%、100%、エタノール溶液で脱水し、切片上に ENTELLAN@neu (MERCK) を滴下し、カバーガラス (松浪硝子工業、大阪) にて封入した。蛍光バイオ顕微鏡 (BZ8100) により画像を取得した。

IgG 染色は切片を PBS による洗浄後、biotinylated horse anti-rmouse IgG (1:200, Vector, California, USA) と室温で 90 分間反応させた。その後のプロトコルは NeuN の組織染色に同じ。

### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>測定**

脳梁を摘出した後、液体窒素を用いて急速冷却し、使用するまで -80°C で保存した。50 mM phosphate buffer (pH 7.4) with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide 中で組織をホモジナイズした。ホモジネートは 22000 g、4°C の条件下で 10 分間遠心し、上清を回収した。上清中の  $\text{H}_2\text{O}_2$  量は Amplex Red Assay Kit (Invitrogen) を用いて測定した。

### **ELISA法**

脳梁部を、PBS (0.1% Triton X-100、1% protease-inhibitor mixture) 中でホモジナイズした。ホモジネートは 22000 g、4°C の条件下で 10 分間遠心し、上清を回収した。



タンパク量をDC protein assay reagents (Bio-Rad) により測定した。IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL6量をmouse IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL6 ELISA kit (R&D Systems) により定量した。

### リアルタイムRT-PCR法

摘出した組織は液体窒素を用いて急速冷却し、使用するまで-80°Cで保存した。マウス脳からの全RNAの抽出はISOGEN® (Nippon Gene, Tokyo) を用いて、仕様書に基づいて行った (56)。ReverTra Ace® (Toyobo, Osaka) を用いて全RNAをcDNAに逆転写し、全RNA 1  $\mu$ g分に相当するcDNAをTHUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (Toyobo, Osaka) を用いて全量20  $\mu$ lにて定量的リアルタイムRT-PCRを行った。反応は、StepOne™ real-time PCR system (Applied Biosystems) を用い、95°Cで10分、その後95°Cで10秒、60°Cで60秒を40サイクルのプログラムで行った。解析にはStepOne™ software (Applied Biosystems) を用いた。PCR産物の確認は、融解曲線により行った。各mRNAの発現量は、標準曲線法を用いて計算し、内部標準として測定したHPRT1のmRNA発現量との相対的な値として表現した。用いたマウス用のプライマーは以下の通りである。

TRPM2 (Fw: 5'-ACA GAC AAT GCC TGG ATC G-3', Rv: 5'-TGG ATC ATG AGT GTG CAG GT-3'), 18S (Fw: 5'-GCA ATT ATT CCC CAT GAA CG-3', Rv: 5'-GGC CTC ACT AAA CCA TCC A-3')

### 統計解析

値は全て、平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。One-way ANOVA および Dunnett's *post hoc* test、Kruskal-Wallis test および Dunn's *post hoc* comparison test、two-way ANOVA および Bonferroni *post hoc* test のいずれかを用いて、Prism 6 software (GraphPad, California, USA) により解析した。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

## 実験結果

### 慢性脳低灌流における認知機能障害に対する TRPM2 遺伝子欠損の影響

まず、BCAS 処置 60 分後の血流は、野生型マウス、TRPM2-KO マウスともに basal の約 60%まで低下し、両群間で差がないことを確認した。慢性脳低灌流状態における認知機能障害への TRPM2 の関与を検討するために、Y 迷路試験を行った。交替行動率は、BCAS 処置 14 日では差が認められなかった (図 2-1A)。28 日後において野生型マウスで有意な減少が認められたが、その減少は TRPM2-KO マウスでは抑制した (図 2-1B)。自発的行動量の指標としてのアームへの総侵入回数については、両遺伝子型で変化は認められなかった (図 2-1C,D)。認知機能障害への TRPM2 の関与の更なる検討として、新奇物体探索試験を行った。テスト試行において、BCAS 処置 14 日後では新奇物体への嗜好性に差は認められなかったが (図 2-1E)、28 日後では野生型マウスで有意な減少が認められ、その減少を TRPM2-KO マウスでは抑制した (図 2-1F)。これらの結果より、慢性脳低灌流状態における認知機能障害に TRPM2 が関与することが示唆される。

### 慢性脳低灌流における白質傷害に対する TRPM2 遺伝子欠損の影響

白質傷害は様々な中枢神経疾患に特徴的に認められ、認知症や(57) その他の精神疾患 (58) との関連が報告されている。慢性脳低灌流状態における白質傷害への TRPM2 の関与を検討するために、ミエリン密度の定量を行った。野生型マウスでは、BCAS 処置後のミエリン密度の段階的な低下が認められた (図 2-2A,B)。一方で、TRPM2-KO マウスではその低下が認められなかった (図 2-2A,C)。さらに、白質構成細胞の一種である成熟オリゴデンドロサイト数を定量するため、抗 GSTpi 抗体による免疫染色を行った。ミエリン密度と同様、GSTpi 陽性細胞数は野生型マウスにおいて段階的な低下が認められたが (図 2-2D,E)、その低下は TRPM2-KO マウスでは認められなかった (図 2-2D,F)。これらのことから、慢性脳低灌流状態における白質傷害に、TRPM2 が関与することが示唆される。

慢性脳低灌流状態における灰白質への TRPM2 の関与を検討するために、抗 NeuN 抗体を用いた免疫染色を行った。CA1 (図 2-3A,E)、CA3 (図 2-3B, F)、歯状回 (図 2-3C, G)、大脳皮質 (図 2-3D, H) の各部位において、BCAS 処置後の神経細胞数は Sham 群と比較して差は認められなかった。

### 慢性脳低灌流における炎症性変化に対する TRPM2 遺伝子欠損の影響

BCAS 処置 14 日および 28 日における白質部での変化について、さらなる検討

を行った。BBB は慢性脳低灌流における病態増悪因子の 1 つである (59)。そこで IgG 染色により BBB の破綻を検討したところ、BCAS 処置 14 日後において有意な上昇が認められたが、両遺伝子型で差は認められなかった (図 2-4A,B)。TRPM2 の内因性活性物質である過酸化水素の定量を行ったところ、BCAS 処置 14 日後において有意な上昇が認められたが、両遺伝子型で差は認められなかった (図 2-4C)。次に BCAS 処置 14 日、28 日後において、TRPM2 遺伝子の発現および各種炎症性サイトカインのタンパク定量を行った。BCAS 処置 28 日後において、TRPM2 の mRNA レベルの有意な上昇を確認した (図 2-5A)。また野生型マウスにおいて、BCAS 処置 28 日後における IL1 $\beta$  (図 2-5B)、TNF $\alpha$  (図 2-5C)、IL6 (図 2-5D) の有意な産生上昇が認められた。一方で、TRPM2-KO マウスでは IL1 $\beta$  (図 2-5B) および TNF $\alpha$  (図 2-5C) のタンパク量は有意に低下していた。これらの結果より、TRPM2 は慢性脳低灌流における炎症増悪に寄与することが示唆される。

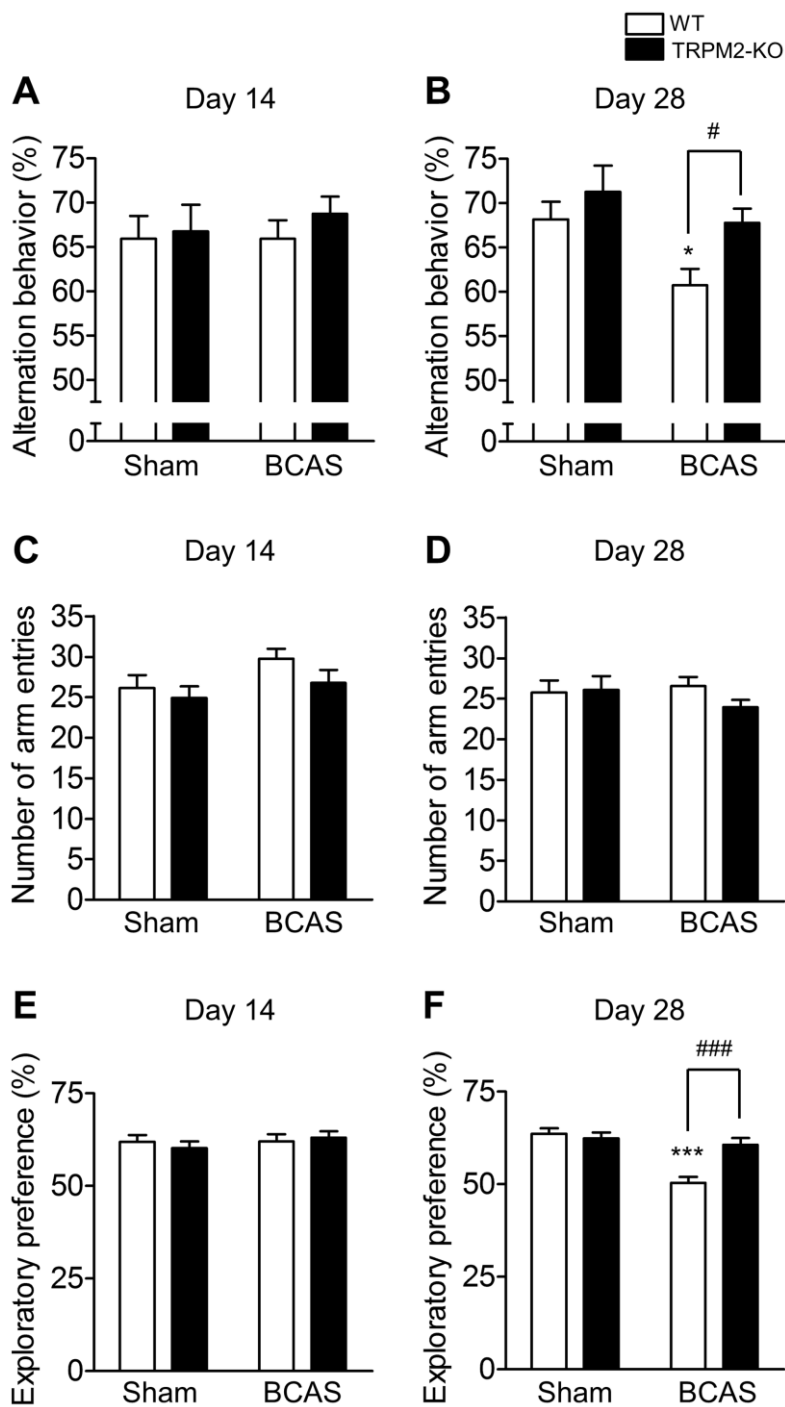


図 2-1 BCAS 処置 28 日後における認知機能障害は TRPM2 遺伝子欠損により抑制された。(A-D) BCAS 処置 14 日 (A,C) および 28 日後 (B,D) の Y 迷路試験における交替行動率 (A,B) およびアームへの総侵入回数 (C,D)。 (E,F) BCAS 処置 14 日 (E) および 28 日後 (F) の新奇物体探索試験における新奇物体への探索嗜好性。 n = 12–25 for A–D; n = 10–13 for E,F. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs WT sham; # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$  vs WT BCAS.

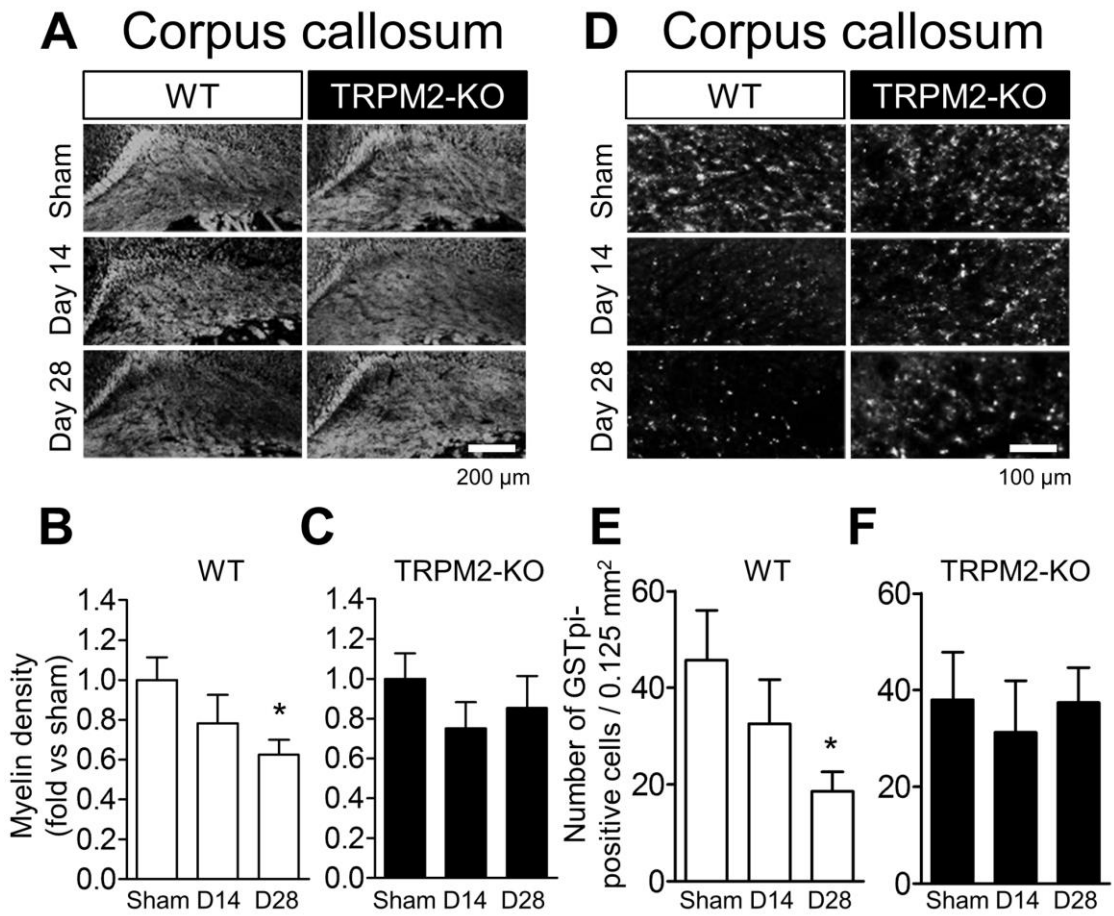


図 2-2 BCAS 処置 28 日後における白質傷害は TRPM2 遺伝子欠損により抑制された。

(A–C) 白質脳梁部でのフルオロミエリン染色による免疫染色画像、および野生型マウス、TRPM2-KO マウスにおける定量結果。(D–F) 白質脳梁部での抗 GSTpi 抗体による免疫染色画像、および野生型マウス、TRPM2-KO マウスにおける定量結果。n = 8–12 for A–C; n = 6–9 for D–F. \* $P < 0.05$  vs WT sham.

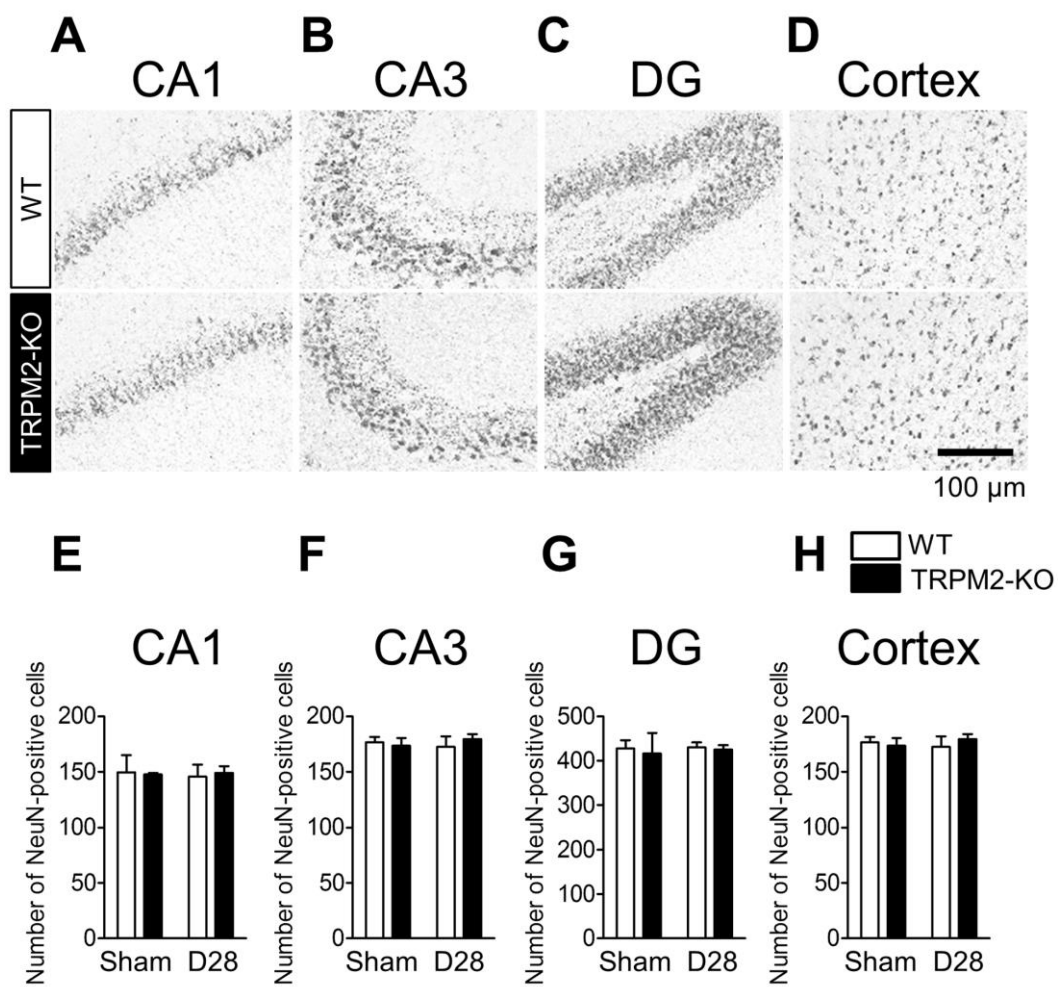


図 2-3 BCAS 処置 28 日後における海馬神経細胞数は変化しなかった。  
 (A-H) CA1 (A)、CA3 (B)、歯状回 (C)、大脳皮質 (D) での抗 NeuN 抗体による免疫染色画像、および各定量結果 (E-H)。n = 3-6.

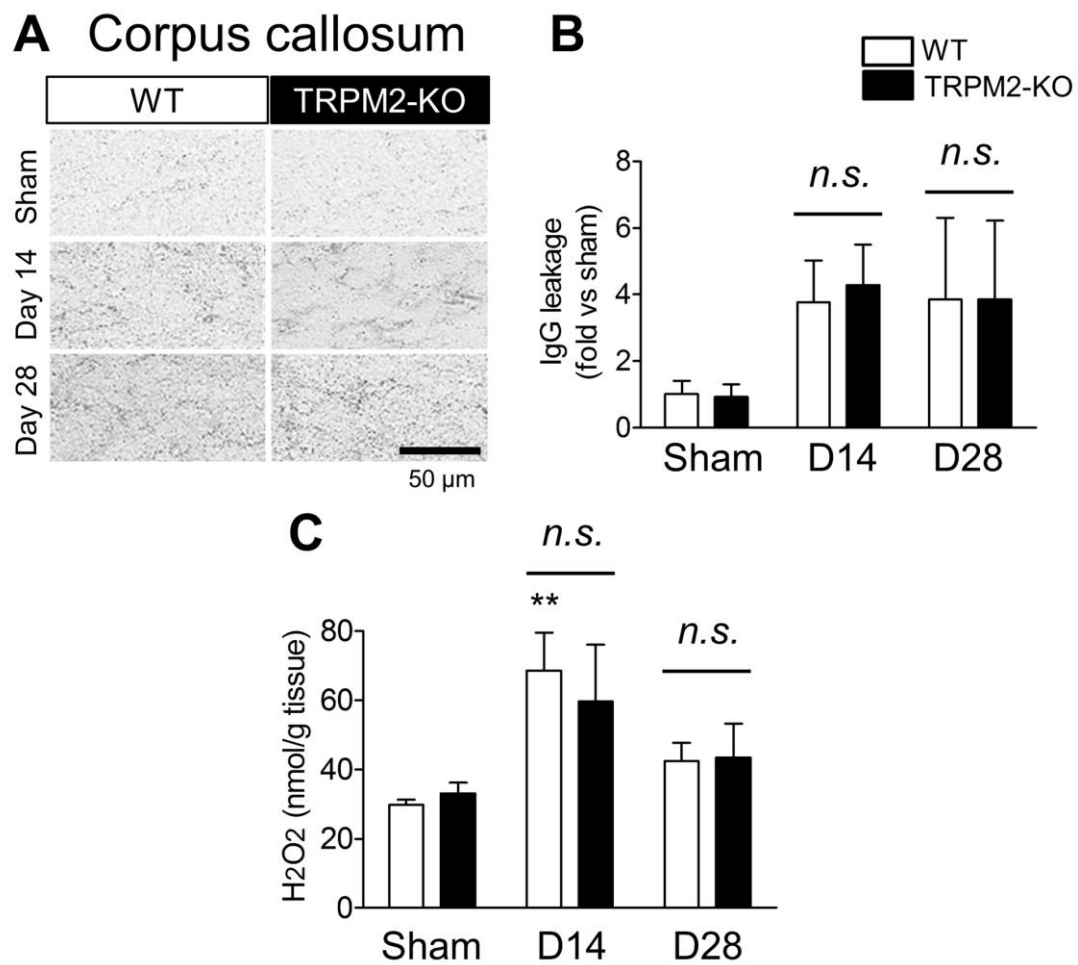


図 2-4 BCAS 処置 14 日、28 日後における BBB 透過性および過酸化水素産生量は両遺伝子型で差は認められなかった。

(A-B) 白質脳梁部における、抗 IgG 抗体による免疫染色画像 (A)、および各定量結果 (B)。(C) 脳梁組織における過酸化水素量の定量結果。n = 4-8. \*\* $P < 0.01$  vs WT sham.

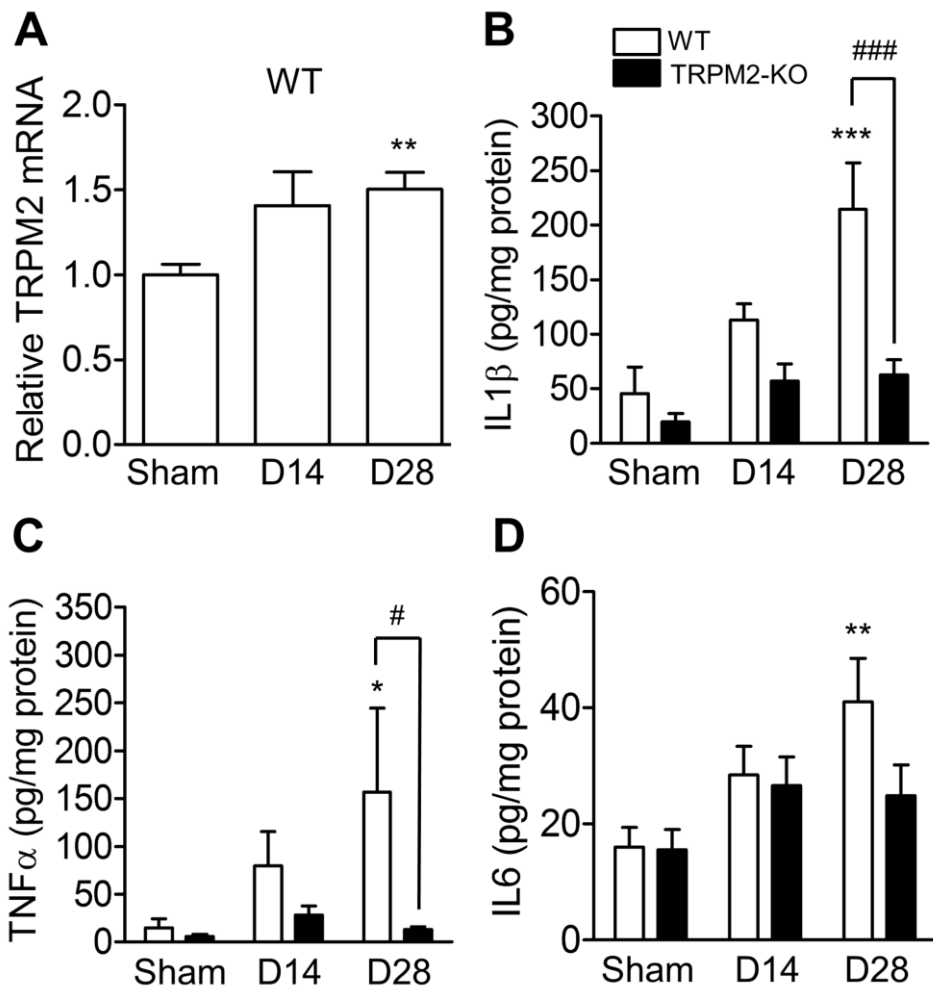


図 2-5 BCAS 処置 28 日後において野生型マウスで TRPM2 遺伝子発現および炎症性サイトカイン産生の上昇が認められた。

(A) 脳梁組織における、TRPM2 遺伝子の real-time PCR 結果。(B-D) ELISA 法による脳梁組織における IL1β (B)、TNFα (C)、IL6 (D)の定量結果。n = 9-14. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs WT sham; # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$  vs WT BCAS.



## 考察

本章において著者は、TRPM2が慢性脳低灌流における認知機能障害、白質傷害、および脳内炎症性サイトカインの産生に寄与することを示した。

BCASモデルを用いた研究において示唆されている病態初期の変化はBBBの破綻である。SeoらはIgG染色において、脳梁部におけるIgG漏出がBCAS処置3、7日後より生じることを報告した (59)。この時点ではアストロサイトやミクログリアの顕著な活性化は認められないとされている (60)。視神経脊髄炎の患者において、BBBの破綻と炎症性サイトカインの産生量が相関することが報告されている (61)。トロンビン (62) やCCL11 (63) といった末梢血由来因子はCNSにおける炎症を増悪させることから、BBBの恒常性はこれらの毒性因子が脳内に浸潤するのを防ぐ一端を担っていると考えられる。実際に、BBB透過性亢進は血管性認知症やアルツハイマー型認知症患者における白質高信号と相関することが知られている (64)。本研究では、野生型マウスとTRPM2-KOマウスでBBB破綻の程度に差が認められなかったことから、TRPM2はBBB破綻に寄与せず、慢性脳低灌流病態のより下流において機能することが示唆される。

ROSはオリゴデンドロサイトの脆弱性 (65) やBBB透過性亢進 (66) に関与するとされている。これらの徴候はいずれも慢性脳低灌流における認知機能障害に関与するものである (67)。より重要なことに、ROSはTRPM2の内因性活性化物質であることが知られる (68)。ROSのスキャベンジャーやマーカーを用いた研究では、慢性脳低灌流においてROSが産生されることが示唆されている (69-71)。本研究においてROSの産生を脳梁部において定量したところ、両遺伝子型で差が認められなかったことから、TRPM2はROS産生自体には影響を与えず、TRPM2-KOによる保護作用はROS減少によるものではないことを示している。

次に、炎症性サイトカイン産生や白質傷害についての検討を行ったところ、TRPM2欠損によりIL1 $\beta$ やTNF $\alpha$ の産生、および白質傷害が抑制された。IL1 $\beta$ の産生レベルは脳血管性認知症患者 (72) および統合失調症患者由来単球 (73) で上昇すること、またマウス慢性脳低灌流モデルにおいて、IL1受容体の欠損および中和抗体処置によって白質傷害やOPCの遊走が促進されることが報告されている (74)。TNF $\alpha$ については、脳血管性認知症患者 (75) や統合失調症患者 (76) において顕著な発現上昇が認められている。また、その産生レベルは双極性障害 (77) や未熟新生児 (78) における白質高信号と相関することから、炎症性サイトカインの過剰発現は白質傷害と強く関連することが示唆される。TRPM2はNLRP3を介した活性化IL1 $\beta$ の産生に関与すること (79)、TRPM2はヒト単球におけるLPS誘発TNF $\alpha$ およびIL6の産生 (80)、培養ミクログリアにおけるアミロイド $\beta$ 誘発TNF $\alpha$ 産生 (81) に必要であることが報告されている。これらの

知見は本研究結果と一致するものである。ゆえに、TRPM2 がこれらのサイトカイン産生を亢進し、白質傷害を惹起することで慢性脳低灌流における認知機能障害に関与している可能性がある。

以上、第二章において著者は、TRPM2 が慢性脳低灌流における認知機能障害や白質傷害といった病態増悪に寄与することを示した。

## 第三章 ミクログリアに発現する TRPM2 の慢性脳低灌流 における病態への関与

第二章において著者は、TRPM2 が慢性脳低灌流において認知機能障害や白質傷害、脳内炎症性サイトカイン産生に寄与することを示した。そこで第三章では、TRPM2 を介した病態増悪に関与する責任細胞の同定を目指した。

本病態モデルにおいては、アストロサイトや、ミクログリアあるいはマクロファージといった脳内グリア細胞の異常活性化が報告されている (82)。また、TRPM2 は脳内で神経細胞 (49)、ミクログリア (50,51) における発現が報告されている他、単球/マクロファージ (52)、好中球 (53) などの末梢免疫細胞にも発現しているとされ、どの細胞に発現する TRPM2 が慢性脳低灌流において重要な働きをしているのか正確に特定することは困難であることが予想される。

そこで本章では、責任細胞同定のために複数の手法を用いた。まず、グリア細胞および末梢免疫細胞に着目し、その浸潤および集積における TRPM2 の関与について免疫組織化学的検討を行った。また、薬理的な細胞選択的阻害を目的としてミクログリア/マクロファージの活性化抑制薬であるミノサイクリンの投与実験を行った。さらに、中枢常在性の細胞および末梢由来の骨髄細胞を識別する手法として骨髄キメラマウスを用いて、ミクログリア/マクロファージの活性化がもたらす慢性脳低灌流における病態増悪への TRPM2 の関与を詳細に検討した。

### 実験方法

#### 使用動物

第二章実験方法に同じ。

#### 両側総頸動脈狭窄 (BCAS)

第二章実験方法に同じ。

#### 免疫染色法

一次抗体としてGSTpi (rabbit anti-GSTpi antibody, 1:200; MBL Life Science)、Iba1 (rabbit anti-Iba1 antibody, 1:500; Wako Pure Chemical Industries)、GFAP (rabbit anti-GFAP antibody, 1:1000; Dako)、CD3 (rat anti-CD3 antibody, 1:100; BD Biosciences) を用いた。Bregma + 0.7 mmにおける脳梁部およびBregma - 2.8 mm

における海馬 0.125  $\mu\text{m}^2$ 領域での細胞数を評価した。その他の免疫染色プロトコルについては第二章実験方法に同じ。

### 試薬と薬物投与

ミノサイクリン塩酸塩は Sigma (Missouri, USA) より購入した。ミノサイクリン (50 mg/kg) は 0.1 M PBS 溶液 (pH7.4) に溶解させた。テルモシリンジ (1 ml ツベルクリン用 SS-01T; テルモ、東京) とテルモ注射針 (26G NN-2613S; テルモ、東京) を接続したものを用い、BCAS 処置 30 分後およびその後は 1 日 1 回腹腔内投与した。

### 新奇物体探索試験

第二章実験方法に同じ。

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>測定

海馬を摘出した後、液体窒素を用いて急速冷却し、使用するまで -80°C で保存した。以下、第二章実験方法に同じ。

### 骨髄キメラマウスの作製

骨髄由来細胞 (BM; bone marrow) ドナーマウスとして雄性 TRPM2-KO (TRPM2<sup>-/-</sup>) マウスと雌性 GFP トランスジェニックマウス (GFP-TRPM2<sup>+/+</sup>) を交配させ、さらに得られた GFP 陽性 TRPM2<sup>+/+</sup> を交配させることで、GFP 陽性野生型マウスおよび GFP 陽性 TRPM2-KO マウスを用意した (83)。レシピエントマウスは 6 週齢の雄性マウスを用い、移植前日の夕方より絶食させた。レシピエントマウスは 10 分かけて 8 Gy の  $\gamma$  線を照射した。BM ドナーマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、ヒビテン® 溶液 (大日本住友製薬、大阪) に浸して消毒し、大腿骨および脛骨を単離し、テルモ注射針 (26G NN-2613S) の針先を骨髄内に刺し、1 ml の冷 PBS を注入し骨髄細胞を回収した。2000 rpm で 10 分遠心後、PBS で懸濁させた。 $\gamma$  線照射の 3-5 時間後、骨髄細胞をレシピエントマウスに  $4.0 \times 10^6$  cells/200  $\mu\text{l}$  で静脈内投与した。作製後、レシピエントマウスはフィルター付きケージ内で飼育し、6 週間飼育後に実験に用いた。本論中の表記に関して、野生型のレシピエントマウスに GFP 陽性野生型マウス由来の BM を移植したものを WT<sup>WT-BM</sup>、TRPM2-KO マウスのレシピエントマウスに GFP 陽性野生型マウス由来の BM を移植したものを TRPM2<sup>WT-BM</sup> と記述した。

### フローサイトメトリー解析

骨髄移植後の血中 GFP 陽性細胞の純度を測定するためにフローサイトメトリー解析を行った。骨髄移植 6 週間後の骨髄キメラマウスより末梢血 100  $\mu\text{l}$  を尾静脈

より採血した。血液に3倍希釈した生理食塩水を300  $\mu$ l加え10秒反応させ溶血させた。速やかに生理食塩水を1 ml加え、2000 gで5分間遠心した。同様に生理食塩水1 mlで洗浄後、2000 gで5分間遠心し、0.02 M ethylenediaminetetraacetic acid および0.01% bovine serum albuminを含むPBS溶液500  $\mu$ l に懸濁させた。フローサイトメーター (Gallios, Beckman Coulter; California, USA) を用いてGFPの純度を測定した。ネガティブコントロールとしては野生型マウスを、ポジティブコントロールとしてはGFPトランスジェニックマウスの血液を用いた。

### リアルタイムRT-PCR法

第二章実験方法に同じ。用いたマウス用のプライマーは以下の通りである。

TRPM2 (Fw: 5'-ACA GAC AAT GCC TGG ATC G-3', Rv: 5'-TGG ATC ATG AGT GTG CAG GT-3'), CX3CR1 (Fw: 5'-TCA CCG TCA TCA GCA TCG A-3', Rv: 5'-CTG CAC TGT CCG GTT GTT CA-3'), CXCL1 (Fw: 5'-GCG ACA AGA TGA CCT CAC GA-3', Rv: 5'-TGT CGT CTC CAG GAC AAT GG-3'), MHCII (H2-Aa; Fw: 5'-GAC GCT CAA CTT GTC CCA AAA C-3', Rv: 5'-GCA GCC GTG AAC TTG TTG AAC-3'), CD68, (Fw: 5'-TTC TGC TGT GGA AAT GCA AG-3', Rv: 5'-AGA GGG GCT GGT AGG TTG AT-3'), TLR4 (Fw: 5'-TCC AGC CAC TGA AGT TCT GA-3', Rv: 5'-ACC AGG AAG CTT GAA TCC CT-3'), CD14 (Fw: 5'-AGG GTA CAG CTG CAA GGA C-3', Rv: 5'-CTT CAG CCC AGT GAA AGA CA-3'), TREM2 (Fw: 5'-GCA CCT CCA GGA ATC AAG AG-3', Rv: 5'-GGG TCC AGT GAG GAT CTG AA-3'), IL1 $\beta$  (Fw: 5'-TGA GCA CCT TCT TTT CCT TCA-3', Rv: 5'-TTG TCT AAT GGG AAC GTC ACA C-3'), TNF $\alpha$  (Fw: 5'-TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC-3', Rv: 5'-GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT-3'), IL6 (Fw: 5'-GTG GCT AAG GAC CAA GAC CA-3', Rv: 5'-TAA CGC ACT AGG TTT GCC GA-3'), 18S (Fw: 5'-GCA ATT ATT CCC CAT GAA CG-3', Rv: 5'-GGC CTC ACT AAA CCA TCC A-3')

### 統計解析

値は全て、平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。二群間の差は Student's t-test により、三群以上の差は、two-way ANOVA および Bonferroni *post hoc* test を用いて、Prism 6 software (GraphPad, California, USA) により解析した。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

## 実験結果

### 慢性脳低灌流における白質部位での Iba1 陽性細胞の関与

慢性脳低灌流の病態生理においてどの細胞に発現する TRPM2 が重要であるかを明らかにするために、脳梁部における免疫組織化学的検討を行った。BCAS 処置 14、28 日後においてアストロサイトと想定される GFAP 陽性細胞数の増加が認められたが、両遺伝子型において差は認められなかった (図 3-1A,B)。一方で、マクロファージおよびミクログリアのマーカである Iba1 陽性細胞数が、野生型マウスでは顕著な増加が認められたが、TRPM2 遺伝子欠損マウスでは BCAS 処置 14 日から段階的な低下を示した (図 3-1C,D)。そこで、ミクログリアおよびマクロファージの関連遺伝子の発現に関して検討を行った。その結果、ミクログリアおよびマクロファージに特異的に発現する受容体である (84) CX3CR1 の発現量は BCAS 処置後において野生型マウスでは上昇が認められたが、TRPM2-KO マウスでは抑制された (図 3-1E)。CX3CR1 のリガンドであり、ニューロン由来ケモカインである (84) CX3CL1 に関しては BCAS 処置による発現変動は確認されなかった (図 3-1F)。活性化ミクログリアおよびマクロファージのマーカである (85)、MHCII (図 3-1G) および CD68 (図 3-1H) については、BCAS 処置 14 日後において野生型マウスでは有意な上昇を認めたが、TRPM2-KO マウスでは抑制された。自然免疫に関与する受容体である TLR4 (図 3-1I) およびその共受容体である CD14 (図 3-1J) の発現上昇の程度については両遺伝子型で差は認められなかった。ミクログリアおよびマクロファージの抗炎症性の貪食マーカである (86)、TREM2 に関しては BCAS 処置による発現変動は確認されなかった (図 3-1K)。

Iba1 陽性細胞が慢性脳低灌流における認知機能障害に関与するかを直接的に検討するために、ミクログリアおよびマクロファージの抑制薬であるミノサイクリンの投与実験を行った。ミノサイクリンの 1 日 1 回投与により、想定通り、BCAS 処置 28 日後における Iba1 陽性細胞数は Vehicle 群と比較して有意に減少した (図 3-1L,M)。さらに、新奇物体探索試験を行ったところ、テスト試行において、BCAS 処置により減少した新奇物体への嗜好性が、ミノサイクリン投与群で有意に改善した (図 3-1N)。これらの結果から、慢性脳低灌流状態における認知機能障害に Iba1 陽性細胞が関与する可能性が示唆される。

### 慢性脳低灌流における海馬での Iba1 陽性細胞の関与

白質脳梁部と同様に、認知機能に重要な役割を果たす海馬領域においてアストロサイト、ミクログリアおよびマクロファージの関与を検討した。CA1 (図 3-2A,B)、CA3 (図 3-2E,F)、歯状回 (図 3-2I,J) における GFAP 陽性細胞数は、野生型マウスおよび TRPM2-KO マウス両群において有意な増加または傾向が認められたが、両遺伝子型で差はなかった。一方で、Iba1 陽性細胞に関しては、CA1 (図 3-2C,D)、CA3 (図 3-2G,H)、歯状回 (図 3-2K,L) において、野生型マウスで有意な増加が認められたのに対し、TRPM2-KO マウスではその増加の有意な抑制またはその傾向が認められた。次に、BCAS 処置 28 日後における TRPM2 遺伝子発現を検討したところ、野生型マウス由来の海馬組織において TRPM2 mRNA の発現上昇傾向が認められた (図 3-2M)。また、白質脳梁部での結果と同様に、野生型マウスで認められた CX3CR1 の遺伝子発現上昇は TRPM2 遺伝子欠損により有意に抑制された一方で (図 3-2N)、CX3CL1 の発現に関しては変化が認められなかった (図 3-2O)。しかしながら、白質脳梁部における知見とは異なり、BCAS 処置 28 日後における IL1 $\beta$  (図 3-2P)、TNF $\alpha$  (図 3-2Q)、IL6 (図 3-2R) の遺伝子発現についてはわずかな上昇しか確認できなかった。さらに、海馬における過酸化水素の産生は BCAS 処置 28 日後においては認められなかった (図 3-2S)。図 2-3 における検討結果も考慮して、これらの結果は、少なくとも BCAS 処置 28 日後時点では海馬傷害に至る炎症の程度は軽度であることが示唆される。

### 慢性脳低灌流の病態に寄与する Iba1 陽性細胞の細胞種同定

最後に、BCAS 処置後に上昇する Iba1 陽性細胞が末梢由来マクロファージなのか、あるいは中枢常在性のミクログリアであるのかを、末梢由来骨髄細胞を GFP 標識した骨髄キメラマウスを作製することで検討した。GFP 陽性野生型マウス由来骨髄を野生型マウス (WT<sup>WT-BM</sup>) および TRPM2-KO マウス (TRPM2-KO<sup>WT-BM</sup>) に移植したマウスをそれぞれ作製した。作製した骨髄キメラマウスは 98%以上の骨髄置換に成功していることを確認した。まず、sham 群において免疫染色を施したところ、Iba1 陽性細胞の異常活性化 (図 3-3A,C) および GFP 陽性細胞の顕著な浸潤 (図 3-3B) は認められなかった。このことから、キメラマウスの脳内に対する  $\gamma$  線照射の影響はほとんどないと考えられる。BCAS 処置 28 日後において免疫染色を行ったところ、GFP 陽性細胞を両群で確認できたが、細胞数に差は認められなかった (図 3-3D,E)。また、Iba1 陽性細胞数は Fig. 5 と同様に、TRPM2-KO<sup>WT-BM</sup> マウスで有意な低下が認められた (図 3-3D,F)。興味深いことに、Iba1 陽性細胞は GFP を共発現していなかった (図 3-3D)。このことは、Iba1 陽性細胞は末梢由来マクロファージではなく、中枢常在性のミクログリアであると考えられる。

グリアであることを示唆する。さらに、BCAS 処置 28 日後において、 $WT^{WT-BT}$  マウスと比較して  $TRPM2-KO^{WT-BM}$  マウスでは  $GSTpi$  陽性細胞数の有意な増加が観察された (図 3-3G,H)。GFP 陽性細胞における共染色では、ほとんどが T 細胞のマーカーである CD3 と共発現していた (図 3-3I)。認知機能についての検討を行ったところ、野生型骨  $TRPM2-KO^{WT-BM}$  マウスでは、 $WT^{WT-BT}$  マウスと比較して、Y 迷路試験における交替行動率 (図 3-3J) および新奇物体探索試験における新奇物体への嗜好性 (図 3-3K) のそれぞれにおいて高値を示した。

これらの結果より、BCAS 処置後に上昇する  $Iba1$  陽性細胞は、末梢由来マクロファージではなく、脳常在性のミクログリアであることが示唆され、 $TRPM2$  はミクログリアの活性化に重要であることが示唆された。



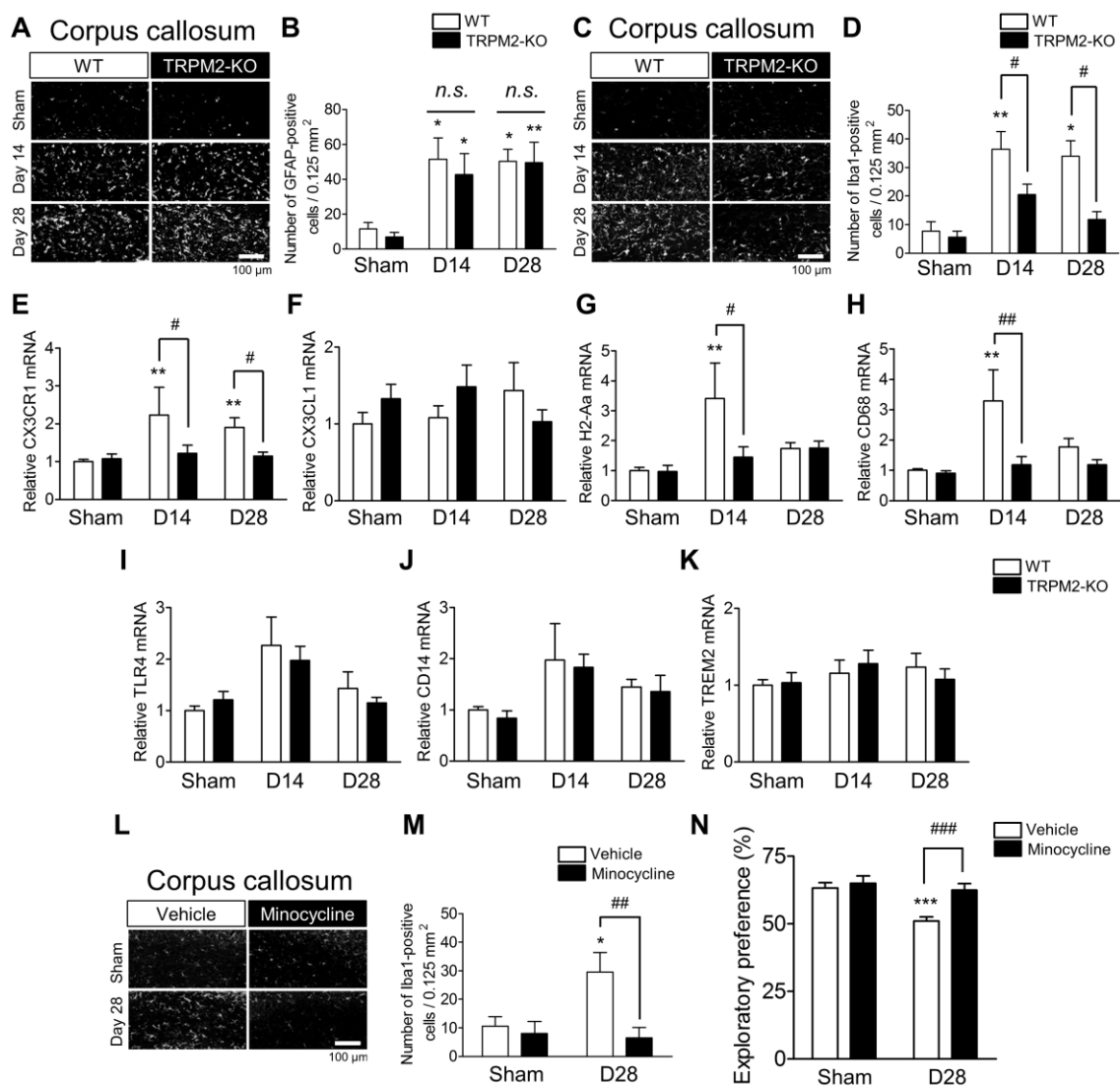


図 3-1 BCAS 処置後に認められる Iba1 陽性細胞数の増加は TRPM2 欠損により抑制されるとともに、ミクログリアおよびマクロファージの薬理的抑制は認知機能を改善した。

(A,B) 脳梁部 GFAP 陽性細胞に関する免疫染色画像 (A) および計数結果 (B)。(C,D) 脳梁部 Iba1 陽性細胞に関する免疫染色画像 (A) および計数結果 (B)。(E-K) 各種遺伝子発現検討。(L,M) ミノサイクリン投与実験における脳梁部 Iba1 陽性細胞に関する免疫染色画像 (L) および計数結果 (M)。(N) ミノサイクリン投与実験における新奇物体探索試験。n = 5–12 for A-D; n = 6–16 for E-K; n = 4–5 for M; n = 12–13 for N. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs WT sham; # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$  vs WT BCAS or vehicle.

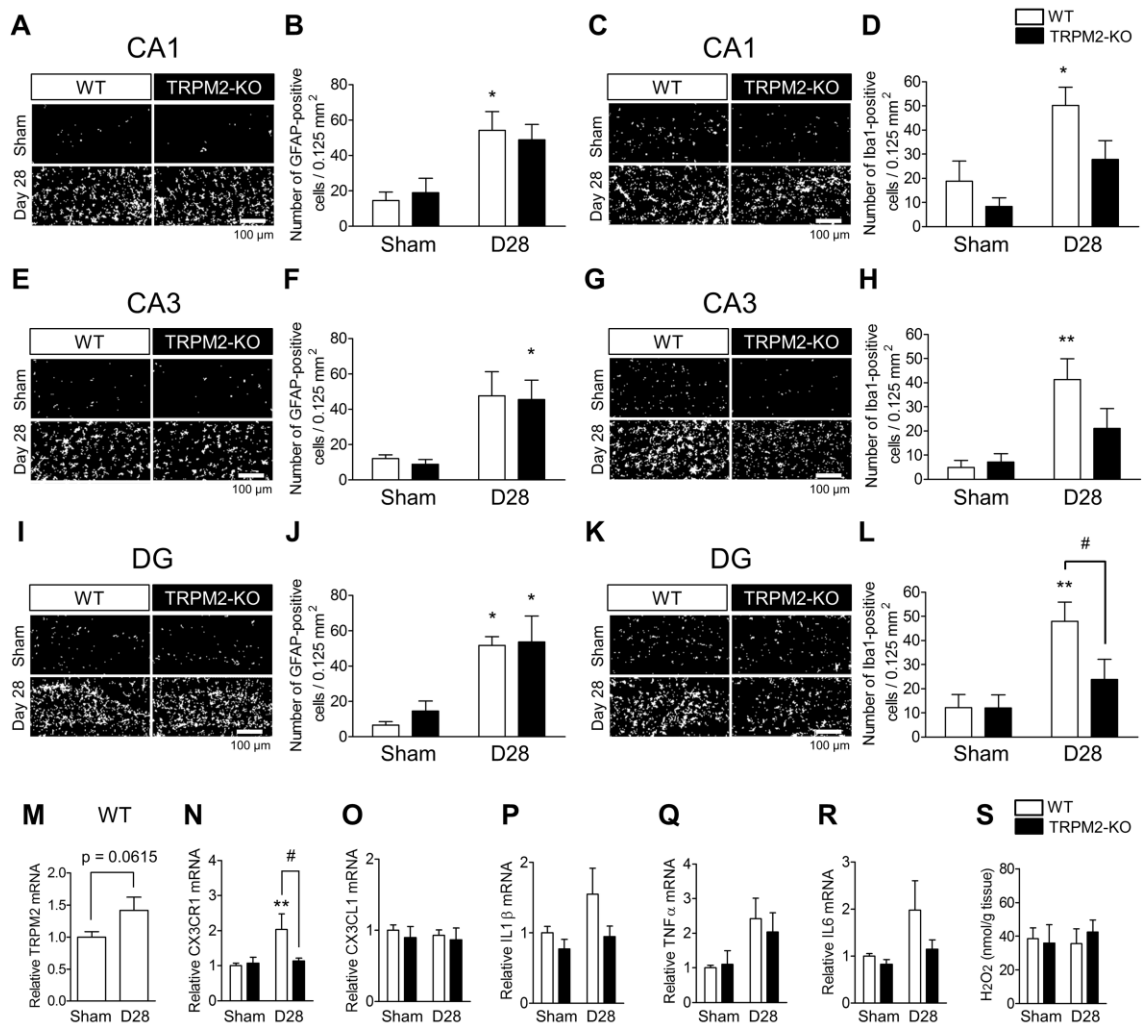


図 3-2 BCAS 処置 28 日後に海馬において GFAP および Iba1 陽性細胞数の増加が認められたが、炎症性サイトカインの顕著な発現上昇は認められなかった。(A,B,E,F,I,J) GFAP 陽性細胞に関する CA1、CA3、歯状回における免疫染色画像および計数結果。(C,D,G,H,K,L) Iba1 陽性細胞に関する CA1、CA3、歯状回における免疫染色画像および計数結果。(M-R) 各種遺伝子発現検討。(S) 海馬組織における過酸化水素量の定量結果。n = 4-6 for A-L; n = 6-16 for E-K; n = 5-13 for M-R; n = 5-6 for S. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs WT sham; # $P < 0.05$  vs WT BCAS.

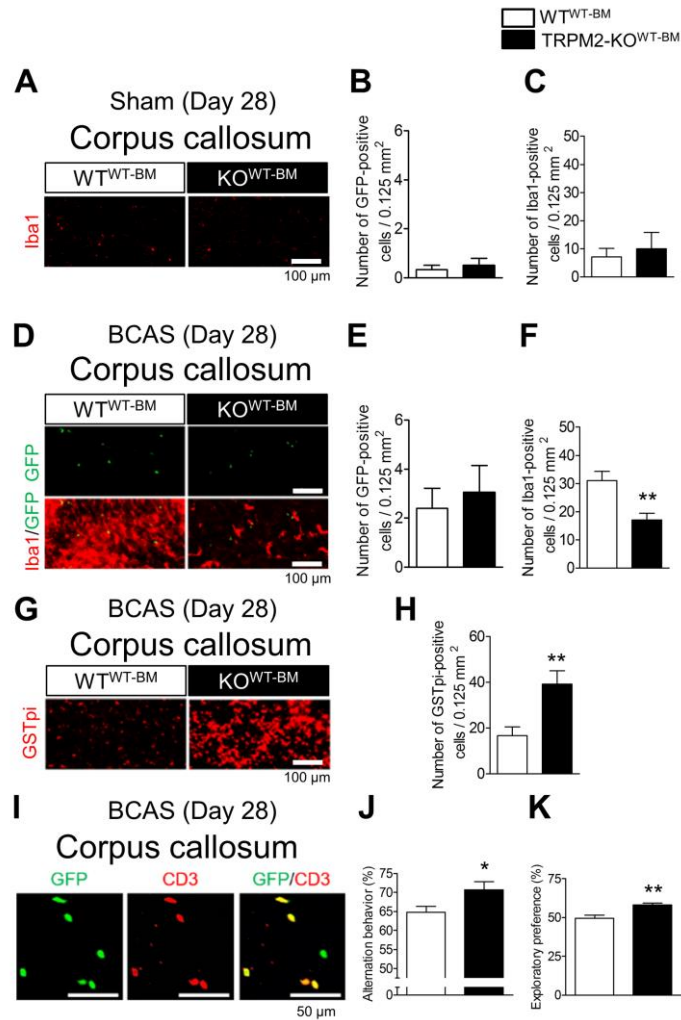


図 3-3 BCAS 処置 28 日後に増加した Iba1 陽性細胞は末梢由来マクロファージではなく、中枢常在性のミクログリアであった。

(A–C) sham 処置を施した骨髄キメラマウスの脳梁における、Iba1/GFP 陽性細胞に関する免疫染色画像 (A) および GFP (B)、Iba1 (C) 陽性細胞数の計数結果。(D–F) BCAS 処置 28 日後における骨髄キメラマウスの脳梁における、Iba1/GFP 陽性細胞に関する免疫染色画像 (D) および GFP (E)、Iba1 (F) 陽性細胞数の計数結果。(G,H) BCAS 処置 28 日後における骨髄キメラマウスの脳梁における、GSTpi 陽性細胞に関する免疫染色画像 (G) および計数結果 (H)。CD3/GFP 陽性細胞に関する免疫染色画像 (I)。n = 3 for B,C; n = 9–15 for E,F,H,J,K. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs WT<sup>WT-BM</sup>.

## 考察

本章において著者は、TRPM2が中枢常在性のミクログリア活性化を介して慢性脳低灌流における病態増悪に寄与することを示した。

ミクログリア/マクロファージの関与について免疫組織化学的検討を行ったところ、TRPM2欠損によりBCAS処置によるそれらの細胞数増加は抑制された。さらに、CX3CR1、MHCII、CD68の発現は野生型マウスで上昇を確認したが、TRPM2-KOマウスでは認められなかった。この知見と一致して、過去の報告では免疫抑制薬がラット慢性脳低灌流モデルにおける白質傷害に対して著効を示すことが報告されている (87)。さらに、TRPM2はミクログリア活性化 (51,54,88) や病態モデルにおける炎症応答に寄与すること (52,54,89) が明らかとなった。したがって、著者の研究結果は、ミクログリアまたはマクロファージに発現するTRPM2が白質における炎症性サイトカインの上昇に寄与することを示唆する。

本研究では、TRPM2 責任細胞はミクログリアあるいはマクロファージであると想定し、骨髄キメラマウスを用いた実験を行った。その結果、興味深いことに、Iba1 陽性細胞は GFP 標識されなかった。加えて、TRPM2-KO<sup>WT-BM</sup> マウスは、骨髄が野生型であるにも関わらず、全欠損 TRPM2-KO マウスと同程度の Iba1 陽性細胞数の減少を示した。このことから、本モデルでは末梢由来のマクロファージはほとんど浸潤せず、本研究結果は活性化した Iba1 陽性細胞はミクログリアであることを示唆する初めての報告となる。本モデルにおけるミクログリアの関与については、ミクログリア特異的 CX3CR1 受容体を標的とした実験による報告 (61) とも一致する。

過剰な炎症性サイトカイン産生は組織傷害に強く寄与することが知られている (90)。本研究において、白質脳梁部においては IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  および IL6 の過剰産生が認められたが、海馬領域においては、Iba1 陽性細胞や GFAP 陽性細胞の増加は認められたにも関わらず、これら炎症性サイトカインの発現は微弱だった。組織間で認められたこの違いの原因は不明である。しかしながら、活性化ミクログリアから産生される炎症性サイトカインはオリゴデンドロサイト系譜細胞の毒性に重要な役割を果たす (91,92)。オリゴデンドロサイトや OPC が海馬と比較して白質において豊富に存在することを考慮すると、傷害を受けた細胞から放出される DAMPs (93) が海馬よりも白質においてより存在している環境であると言える。そして、DAMPs によってミクログリアがさらに活性化することによって過剰な炎症性サイトカインの放出が促進されるのかもしれない。その結果として、海馬よりもむしろ白質においてより顕著な炎症環境が再現されている可能性がある。

本モデルにおいて、アストロサイトは傷害的な機能と保護的な機能の両面で

の研究が報告されている。GFAP 陽性細胞における NF $\kappa$ B の抑制は炎症シグナルおよび白質傷害・認知機能障害を改善した (45)。一方で、GFAP 陽性細胞における BDNF の欠損は病態を増悪させた (94)。本研究では GFAP 陽性細胞数に両群間で差は認められなかったため、TRPM2 は BCAS 後のアストロサイト活性化には重要でないと考えられる。しかしながら、新生児低酸素/脳虚血傷害モデルにおいて、TRPM2 遺伝子の欠損は Iba1 および GFAP 陽性細胞の両方の細胞数減少を引き起こしたことから (89)、慢性脳低灌流におけるアストロサイトにおける TRPM2 の関与についてはより詳細な検討が待たれる。

BCAS モデルにおいては、末梢由来白血球の浸潤が確認されている (95)。本研究では好中球の浸潤を十分に確認することができなかった (図 省略) 一方で、T 細胞に関しては GFP 陽性細胞のうち著しい割合での存在を確認することができた。このことから、BCAS 処置後に浸潤する末梢由来白血球は、マクロファージあるいは好中球ではなく、T 細胞であることが示唆される。

以上、第三章において著者は、TRPM2 がミクログリアの活性化を介して慢性脳低灌流における炎症応答に関与することを示した。第二章および第三章の結果より、TRPM2 は慢性脳低灌流の関与する中枢神経疾患において有力な創薬標的となることが期待される。

## 総括および結論

本研究において著者は、脳血流低下後の病態形成における TRP チャンネルの関与について検討を行い、以下の新規知見を得た。

TRPV1 遺伝子欠損マウスおよび TRPV1 拮抗薬を用いた検討により、マウス急性虚血性脳卒中モデルにおける神経症状や運動機能の増悪および梗塞巣増大に TRPV1 が寄与することが明らかとなった。

マウス慢性脳低灌流モデルにおいて、TRPM2 遺伝子欠損により BCAS 処置 28 日後の野生型マウスでは認知機能障害および白質傷害が認められたのに対して、TRPM2-KO マウスではそれらが顕著に抑制されていた。また、野生型マウスでは炎症性サイトカインである IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  および IL6 が増加したのに対し、TRPM2-KO マウスではそれらの産生が抑制されていた。

BCAS 処置 14、28 日後において Iba1 陽性細胞の顕著な増加が野生型マウスで認められ、TRPM2-KO マウスではその増大は抑制されていた。また、野生型マウスで認められた炎症性ミクログリアおよびマクロファージ関連遺伝子の発現上昇が TRPM2-KO により抑制された。これらの細胞を薬理的に抑制することで認知機能の改善効果が認められた。さらに、骨髄キメラマウスを用いた検討により、Iba1 陽性細胞は脳常在性のミクログリアであることが示された。TRPM2-KO<sup>BM-WT</sup> マウスでは、末梢骨髄が野生型であるにも関わらず、Iba1 陽性細胞数の増加、成熟オリゴデンドロサイト細胞数の減少および認知機能障害が抑制された。

以上、著者は各種マウスモデルを用いて、血流低下に伴う脳機能障害に果たす TRP チャンネルの病態生理学的役割の一端を明らかにした。本研究の成果は、脳血流低下が関与する様々な中枢神経疾患に対する治療薬の開発に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

## 謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 金子周司 教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科 白川久志 准教授、永安一樹 助教ならびに京都大学医学部附属病院薬剤部 中川貴之 准教授に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました名古屋大学大学院創薬科学研究科 赤池昭紀 教授、京都大学大学院薬学研究科 久米利明 准教授、神戸薬科大学薬学部 泉安彦 講師に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、本研究に多大なるご協力をいただきましたハーバード大学医学部 荒井健 Assistant Professor、TRPV1-KO マウスをご提供下さいましたカリフォルニア大学サンフランシスコ校 David Julius 教授、TRPM2-KO マウスをご提供下さいました京都大学大学院工学研究科 森泰生 教授に深く感謝いたします。

研究生生活を始めるにあたり御指導、御助言をいただきました崎元伸哉 博士、三宅崇仁 博士、勇昂一 博士、金野真和 博士、宗像将也 修士をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。また、本研究にご協力いただきました浅尾靖仁 学士、抱将史 君に心から感謝いたします。そして、日々の研究生生活において互いに切磋琢磨し合えた土岸広治 博士、宗可奈子 博士、西谷直也 学士、浅岡希美 学士、勝本るみ 学士、中村彩希 学士、水藤拓人 修士、五明美香子 修士、山口一真 修士に心からお礼を述べるとともに、筒井真人 学士、長島卓也 学士、尾山翔平 修士、出屋敷綾音 学士、平瀬僚 くん、富澤恵里 さん、楊秋斌 学士、大橋佳奈 学士、栗田沙織 さん、藤田沙也香 さん、宮村咲映 さんをはじめとする京都大学大学院生体機能解析学分野、および京都大学大学院薬品作用解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しましてご援助をいただきました日本学術振興会、充実した健康長寿社会を築く総合医療開発リーダー育成プログラムに深く感謝いたします。

著者の良き理解者であり研究活動に専念出来るように終始支えて下さった父 光一郎、母 秀美、妹 優美、弟 遼、弟 透、および両祖父母、叔母 泰子、叔母 篠原美智代、叔父 西原幹夫に心から感謝いたします。

## 発表論文目録

- 1) A pathophysiological role of TRPV1 in ischemic injury after transient focal cerebral ischemia in mice  
(マウス一過性局所脳虚血で生じる虚血性脳傷害における TRPV1 の病態生理学的役割)  
Jun Miyanohara, Hisashi Shirakawa, Kazuaki Sanpei, Takayuki Nakagawa, Shuji Kaneko  
平成 27 年 11 月 20 日発行 Biochemical and Biophysical Research Communications 第 467 巻第 3 号 478 頁～483 頁に**掲載**
  
- 2) TRPM2 channel aggravates CNS inflammation and cognitive impairment via activation of microglia in chronic cerebral hypoperfusion  
(TRPM2 は慢性脳低灌流においてミクログリア活性化を介して CNS 炎症および認知機能障害を増悪させる)  
Jun Miyanohara, Masashi Kakae, Kazuki Nagayasu, Takayuki Nakagawa, Yasuo Mori, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko  
The Journal of Neuroscience, **in press**



## 参考文献

1. Murray CJL, Lopez AD (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1269–1276.
2. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. *Lancet* 371:1612–1623.
3. Deb P, Sharma S, Hassan KM (2010) Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* 17:197–218.
4. Tominaga M, Tominaga T (2005) Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch* 451:143–150.
5. Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L, Blumberg PM (2005) Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res* 135:162–168.
6. Martins D, Tavares I, Morgado C (2014) “Hotheaded”: the role OF TRPV1 in brain functions. *Neuropharmacology* 85:151–157.
7. Marinelli S, Di Marzo V, Berretta N, Matias I, Maccarrone M, Bernardi G, Mercuri NB (2003) Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci* 23:3136–3144.
8. Gibson HE, Edwards JG, Page RS, Van Hook MJ, Kauer JA (2008) TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 57:746–759.
9. Chavez AE, Chiu CQ, Castillo PE (2010) TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci* 13:1511–1518.
10. Grueter BA, Brasnjo G, Malenka RC (2010) Postsynaptic TRPV1 triggers cell typespecific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 13:1519–1525.
11. Kim SR, Kim SU, Oh U, Jin BK (2006) Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via ca2t-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. *J Immunol.* 177:4322–4329.
12. Miyake T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S (2015) Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia* 63:1870–1882.

13. Mannari T, Morita S, Furube E, Tominaga M, Miyata S (2013) Astrocytic TRPV1 ion channels detect blood-borne signals in the sensory circumventricular organs of adult mouse brains. *Glia* 61:957–971.
14. Musella A, De Chiara V, Rossi S, Prosperetti C, Bernardi G, Maccarrone M, Centonze D (2009) TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Mol Cell Neurosci* 40:89–97.
15. Kawahara H, Drew GM, Christie MJ, Vaughan CW (2011) Inhibition of fatty acidamide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br J Pharmacol* 163:1214–1222.
16. Shoudai K, Peters JH, McDougall SJ, Fawley JA, Andresen MC (2010) Thermally active TRPV1 tonically drives central spontaneous glutamate release. *J Neurosci* 30:14470–14475.
17. Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 115:157–188.
18. Shirakawa H, Yamaoka T, Sanpei K, Sasaoka H, Nakagawa T, Kaneko S (2008) TRPV1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 377:1211–1215.
19. Sun FJ, Guo W, Zheng DH, Zhang CQ, Li S, Liu SY, Yin Q, Yang H, Shu HF (2013) Increased expression of TRPV1 in the cortex and hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci* 49:182–193.
20. Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N (2003) Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci* 23:7767–7775.
21. Muthian S, Rademacher DJ, Roelke CT, Gross GJ, Hillard CJ (2004) Anandamide content is increased and CB1 cannabinoid receptor blockade is protective during transient, focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 129:743–750.
22. Robbins NM, Swanson RA (2014) Opposing effects of glucose on stroke and reperfusion injury: acidosis, oxidative stress, and energy metabolism. *Stroke* 45:1881–1886.
23. Groger M, Lebesgue D, Pruneau D, Relton J, Kim SW, Nussberger J, Plesnila N (2005) Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:978–989.
24. Kawano T, Anrather J, Zhou P, Park L, Wang G, Frys KA, Kunz A, Cho S, Orío M, Iadecola C (2006) Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of

- COX-2 neurotoxicity. *Nat Med* 12:225–229.
25. Sikand P, Premkumar LS (2007) Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. *J Physiol* 581:631–647.
  26. Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R (2004) Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* 141:737–745.
  27. Muzzi M, Felici R, Cavone L, Gerace E, Minassi A, Appendino G, Moroni F, Chiarugi A (2012) Ischemic neuroprotection by TRPV1 receptor-induced hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 32:978–982.
  28. Cao Z, Balasubramanian A, Marrelli SP (2014) Pharmacologically induced hypothermia via TRPV1 channel agonism provides neuroprotection following ischemic stroke when initiated 90 min after reperfusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 306:R149–R156.
  29. Garami A, Shimansky YP, Pakai E, Oliveira DL, Gavva NR, Romanovsky AA (2010) Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *J Neurosci* 30:1435–1440.
  30. Alawi KM, Aubdool AA, Liang L, Wilde E, Vepa A, Psefteli MP, Brain SD, Keeble JE (2015) The sympathetic nervous system is controlled by transient receptor potential vanilloid 1 in the regulation of body temperature. *FASEB J* 29:4285–4298.
  31. Watabiki T, Kiso T, Kuramochi T, Yonezawa K, Tsuji N, Kohara A, Kakimoto S, Aoki T, Matsuoka N (2011) Amelioration of neuropathic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist AS1928370 in rats without hyperthermic effect. *J Pharmacol Exp Ther* 336:743–750.
  32. Aanerud J, Borghammer P, Chakravarty MM, Vang K, Rodell AB, J\_onsdottir KY, Møller A, Ashkanian M, Vafae MS, Iversen P, Johannsen P, Gjedde A (2012) Brain energy metabolism and blood flow differences in healthy aging. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1177–1187.
  33. Daulatzai MA (2017) Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 95:943–972.
  34. Zlokovic BV (2005) Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28:202–208.
  35. Gorelick PB et al. (2011) Vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *Stroke* 42:2672–2713.

36. D'haeseleer M, Beelen R, Fierens Y, Cambron M, Vanbinst AM, Verborgh C, Demey J, De Keyser J (2013) Cerebral hypoperfusion in multiple sclerosis is reversible and mediated by endothelin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5654–5658.
37. Nagafusa Y, Okamoto N, Sakamoto K, Yamashita F, Kawaguchi A, Higuchi T, Matsuda H (2012) Assessment of cerebral blood flow findings using <sup>99m</sup>Tc-ECD single-photon emission computed tomography in patients diagnosed with major depressive disorder. *J Affect Disord* 140:296–299.
38. Sone D, Watanabe M, Ota M, Kimura Y, Sugiyama A, Maekawa T, Okura M, Enokizono M, Imabayashi E, Sato N, Matsuda H (2017) Thalamic hypoperfusion and disrupted cerebral blood flow networks in idiopathic generalized epilepsy: arterial spin labeling and graph theoretical analysis. *Epilepsy Res* 129:95–100.
39. Chiaravalloti ND, DeLuca J (2008) Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7:1139–1151.
40. Kehagia AA, Barker RA, Robbins TW (2010) Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 9:1200–1213.
41. Marazziti D, Consoli G, Picchetti M, Carlini M, Faravelli L (2010) Cognitive impairment in major depression. *Eur J Pharmacol* 626:83–86.
42. Aquila R, Citrome L (2015) Cognitive impairment in schizophrenia: the great unmet need. *CNS Spectr* 20:35–39.
43. Holmes GL, Lenck-Santini PP (2006) Role of interictal epileptiform abnormalities in cognitive impairment. *Epilepsy Behav* 8:504–515.
44. Akiguchi I, Tomimoto H, Suenaga T, Wakita H, Budka H (1997) Alterations in glia and axons in the brains of Binswanger's disease patients. *Stroke* 28:1423–1429.
45. Saggi R, Schumacher T, Gerich F, Rakers C, Tai K, Delekate A, Petzold GC (2016) Astroglial NF- $\kappa$ B contributes to white matter damage and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia. *Acta Neuropathol Commun* 4:76.
46. Kawamoto Y, Akiguchi I, Tomimoto H, Shirakashi Y, Honjo Y, Budka H (2006) Upregulated expression of 14-3-3 proteins in astrocytes from human cerebrovascular ischemic lesions. *Stroke* 37:830–835.
47. Fu X, Zhang J, Guo L, Xu Y, Sun L, Wang S, Feng Y, Gou L, Zhang L, Liu Y (2014) Protective role of luteolin against cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 126:122–130.
48. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM (2001) ADP-ribose gating of

- the calcium permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411:595–599.
49. Kaneko S, Kawakami S, Hara Y, Wakamori M, Itoh E, Minami T, Takada Y, Kume T, Katsuki H, Mori Y, Akaike A (2006) A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci* 101:66–76.
  50. Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C (2004) Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C129–C137.
  51. Miyake T, Shirakawa H, Kusano A, Sakimoto S, Konno M, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S (2017) TRPM2 contributes to LPS/IFN $\gamma$ -induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 444:212–217.
  52. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H, Mori Y (2008) TRPM2-mediated Ca<sup>2+</sup>-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med* 14:738–747.
  53. Hiroi T, Wajima T, Negoro T, Ishii M, Nakano Y, Kiuchi Y, Mori Y, Shimizu S (2013) Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 97:271–81.
  54. Haraguchi K, Kawamoto A, Isami K, Maeda S, Kusano A, Asakura K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S (2012) TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J Neurosci* 32:3931–3941.
  55. Temma T, Yamazaki M, Miyanohara J, Shirakawa H, Kondo N, Koshino K, Kaneko S, Iida H (2017) Sequential PET estimation of cerebral oxygen metabolism with spontaneous respiration of <sup>15</sup>O-gas in mice with bilateral common carotid artery stenosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 37:3334–3343.
  56. Shirakawa H, Katsumoto R, Iida S, Miyake T, Higuchi T, Nagashima T, Nagayasu K, Nakagawa T, Kaneko S (2017) Sphingosine-1-phosphate induces Ca<sup>2+</sup> signaling and CXCL1 release via TRPC6 channel in astrocytes. *Glia* 65:1005–1016.
  57. Douaud G, Jenkinson E, Smith RA, Gass A, Monsch AU, Rao A, Whitcher B, Zamboni G, Matthews PM, Sollberger M, Smith S (2013) Brain microstructure reveals early abnormalities more than two years prior to clinical progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 33:2147–2155.

58. de Groot JC, de Leeuw FE, Oudkerk M, Hofman A, Jolles J, Breteler MM (2000) Cerebral white matter lesions and depressive symptoms in elderly adults. *Arch Gen Psychiatry* 57:1071–1076.
59. Seo JH, Miyamoto N, Hayakawa K, Pham LD, Maki T, Ayata C, Kim KW, Lo EH, Arai K (2013) Oligodendrocyte precursors induce early blood-brain barrier opening after white matter injury. *J Clin Invest* 123:782–786.
60. Duan W, Gui L, Zhou Z, Liu Y, Tian H, Chen JF, Zheng J (2009) Adenosine A2A receptor deficiency exacerbates white matter lesions and cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion in mice. *J Neurol Sci* 285:39–45.
61. Uchida T, Mori M, Uzawa A, Masuda H, Muto M, Ohtani R, Kuwabara S (2016) Increased cerebrospinal fluid metalloproteinase-2 and interleukin-6 are associated with albumin quotient in neuromyelitis optica: their possible role on blood-brain barrier disruption. *Mult Scler* 23:1072–1084.
62. Yang Y, Zhang M, Kang X, Jiang C, Zhang H, Wang P, Li J (2015) Thrombin-induced microglial activation impairs hippocampal neurogenesis and spatial memory ability in mice. *Behav Brain Funct* 11:30.
63. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. (2011) The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477:90–94.
64. Farrall AJ, Wardlaw JM (2009) Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging* 30:337–352.
65. Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, Rosenberg PA (2011) The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *Int J Dev Neurosci* 29:423–440.
66. Toyama K, Koibuchi N, Uekawa K, Hasegawa Y, Kataoka K, Katayama T, Sueta D, Ma MJ, Nakagawa T, Yasuda O, Tomimoto H, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S (2014) Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a novel target molecule for cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:616–625.
67. Liu H, Zhang J (2012) Cerebral hypoperfusion and cognitive impairment: The pathogenic role of vascular oxidative stress. *Int J Neurosci* 122:494–499.
68. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y (2002) LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status

- confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 9:163–173.
69. Dong YF, Kataoka K, Toyama K, Sueda D, Koibuchi N, Yamamoto E, Yata K, Tomimoto H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S (2011) Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Hypertension* 58:635–642.
  70. Miyamoto N, Maki T, Pham LD, Hayakawa K, Seo JH, Mandeville ET, Mandeville JB, Kim KW, Lo EH, Arai K (2013) Oxidative stress interferes with white matter renewal after prolonged cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke* 44:3516–3521.
  71. Yang Y, Ju J, Deng M, Wang J, Liu H, Xiong L, Zhang J (2017) Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  promotes endogenous adaptive response in rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Int J Mol Sci* 18:3.
  72. Zuliani G, Ranzini M, Guerra G, Rossi L, Munari MR, Zurlo A, Volpato S, Atti AR, Ble A, Fellin R (2007) Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *J Psychiatr Res* 41:686–693.
  73. Uranova NA, Bonartsev PD, Androsova LV, Rakhmanova VI, Kaleda VG (2017) Impaired monocyte activation in schizophrenia: ultrastructural abnormalities and increased IL-1 $\beta$  production. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* doi:10.1007/s00406-017-0782-1
  74. Zhou Y, Zhang J, Wang L, Chen Y, Wan Y, He Y, Jiang L, Ma J, Liao R, Zhang X, Shi L, Qin Z, Zhou Y, Chen Z, Hu W (2017) Interleukin-1 $\beta$  impedes oligodendrocyte progenitor cell recruitment and white matter repair following chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Behav Immun* 60:93–105.
  75. Tarkowski E, Tullberg M, Fredman P, Wikkelso C (2003) Correlation between intrathecal sulfatide and TNF-alpha levels in patients with vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 15:207–211.
  76. Pandey GN, Rizavi HS, Zhang H, Ren X (2017) Abnormal gene and protein expression of inflammatory cytokines in the postmortem brain of schizophrenia patients. *Schizophr Res* doi:10.1016/j.schres.2017.04.043.
  77. Benedetti F, Poletti S, Hoogenboezem TA, Mazza E, Ambrée O, de Wit H, Wijkhuijs AJ, Locatelli C, Bollettini I, Colombo C, Arolt V, Drexhage HA (2016) Inflammatory cytokines influence measures of white matter integrity in Bipolar Disorder. *J Affect Disord* 202:1–9.
  78. Ellison VJ, Mocatta TJ, Winterbourn CC, Darlow BA, Volpe JJ, Inder TE (2005) The relationship of CSF and plasma cytokine levels to cerebral white matter injury in the premature newborn. *Pediatr Res* 57:282–286.
  79. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R, Sutterwala FS, Qiao L (2013) TRPM2

- links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun* 4:1611.
80. Wehrhahn J, Kraft R, Harteneck C, Hauschildt S (2010) Transient receptor potential melastatin 2 is required for lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 184:2386–2393.
  81. Alawieyah Syed Mortadza S, Sim JA, Neubrand VE, Jiang LH (2017) A critical role of TRPM2 channel in A $\beta$ 42 -induced microglial activation and generation of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Glia* doi: 10.1002/glia.23265.
  82. Shibata M, Ohtani R, Ihara M, Tomimoto H (2004) White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 35:2598–2603.
  83. Isami K, Haraguchi K, So K, Maeda S, Asakura K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S (2013) Involvement of TRPM2 in peripheral nerve injury-induced infiltration of peripheral immune cells into the spinal cord in mouse neuropathic pain model. *PLoS One* 8:e66410.
  84. Liu Y, Wu XM, Luo QQ, Huang S, Yang QW, Wang FX, Ke Y, Qian ZM (2015) CX3CL1/CX3CR1-mediated microglia activation plays a detrimental role in ischemic mice brain via p38MAPK/PKC pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 35:1623–1631.
  85. Perry VH, Holmes C (2014) Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 10:217–24.
  86. Jay TR, von Saucken VE, Landreth GE (2017) TREM2 in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurodegener.* 12:56.
  87. Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kimura J (1998) Dose dependent, protective effect of FK506 against white matter changes in the rat brain after chronic cerebral ischemia. *Stroke* 792:105–113.
  88. Jeong H, Kim YH, Lee Y, Jung SJ, Oh SB (2017) TRPM2 contributes to LPC-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> influx and microglial activation. *Biochem Biophys Res Commun* 485:301–306.
  89. Huang A, Turlova E, Li F, Bao MH, Szeto V, Wong R, Abussaud A, Wang H, Zhu S, Gao X, Mori Y, Feng ZP, Sun HS (2017) Transient receptor potential melastatin channels (TRPM2) mediate neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *Exp Neurol* 296:32–40.
  90. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 87:10–20.
  91. Peferoen L, Kipp M, van der Valk P, van Noort JM, Amor S (2014) Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology*.



141:302–313.

92. Bradl M, Lassmann H (2010) Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:37–53.
93. Seong SY, Matzinger P (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4:469–478.
94. Miyamoto N, Maki T, Shindo A, Liang AC, Maeda M, Egawa N, Itoh K, Lo EK, Lok J, Ihara M, Arai K (2015) Astrocytes promote oligodendrogenesis after white matter damage via brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 35:14002–14008.
95. Yata K, Nishimura Y, Uekawa M, Tomita Y, Suzuki N, Tanaka T, Mizoguchi A, Tomimoto H (2014) In vivo imaging of the mouse neurovascular unit under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 45:3698–3703.