

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10851

研究課題名(和文) アクアポリン11の特性に基づいた脳浮腫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the brain edema therapeutics based on a characteristic for AQP11

研究代表者

望月 靖子 (MOCHIZUKI, YASUKO)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20386452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：AQP11と脳梗塞の関与を検討した。マウス総頸動脈結紮脳梗塞モデルを作成し、結紮15分と1時間を比較検討した。結紮15分後に再還流したマウスの脳はAQP11の発現が30分後に増加するが、1日後には20%減少した。結紮1時間後に再還流した場合は、いずれもAQP11の発現は減少した。結紮15分以外ではAQP11の発現は減少し、AQP4の発現も増加した。これに伴い、ミクログリア、アストログリア、リソソーム膜マーカーが増加した。血管内皮モデル細胞でも浸透圧の変化によりAQP11の発現を検討した。脳梗塞同様、浸透圧が高いとAQP11の発現は増加し、一過性の脳梗塞時にAQP11が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで脳梗塞とAQP11の関与は不明であったが、今回の研究から脳梗塞モデルマウスでは、脳梗塞の症状が明確に現れる成体のみならず、幼若マウスでもAQP11は同様に発現が変化することを判明した。梗塞時間の長さにより再還流後のAQP11の発現が増加することを示すことができたが、これは梗塞時間と再還流時間の組み合わせの1例である。さらにAQP11の発現が減少した今回のモデルでは常にAQP4、ミクログリア、アストログリア、リソソーム膜のマーカーが増加していたことより、これらのマーカーの増減とAQP11の発現を制御することで脳梗塞の治療から予後の予測、延命への対応に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study is to clarify the relation between brain infarction and AQP11. We generated brain infarction model mice which was ligated common carotid artery. Comparative analysis was performed for ligation time and reperfusion time. We investigated AQP11 expression for these models. AQP11 was increased that the combination model which was ligated for 15min and sacrificed after 30min. But, when it was sacrificed after 1 day later, AQP11 was decreased 20%. In the model which was ligated 1hr, AQP11 was decreased regardless of reperfusion time. This model was showed that AQP4 was increased as AQP11 was decreased. The expression of the microglia, astroglia and lysosomal-associated membrane marker gene were increased. Furthermore, our study was investigated the AQP11 expression of blood vessel endothelium model. We clarified that AQP11 was increased under hypertonic condition. For these results, it was suggested that AQP11 was participated in the transient cerebral ischemia.

研究分野：病態生理学

キーワード：脳梗塞 アクアポリン AQP11 総頸動脈結紮脳梗塞モデルマウス AQP4

1. 研究開始当初の背景

脳は頭蓋骨に囲まれており、脳梗塞、脳出血、脳浮腫をはじめとする脳疾患は、その急速な初期治療が重要である。本研究で着目する水チャネル Aquaporin(AQP)ファミリーは 13 種が報告されている。その多くは細胞膜に発現し、水、グリセロール、小分子のいずれかを通すものがほとんどである。なかでも AQP11 は腎臓で多く発現し、AQP11 欠損マウスは生後 1 ヶ月以内に嚢胞腎の症状を示して死亡する (Morishita Y. et al.2005)。申請者は、AQP11 を欠損させたバックグラウンドを持つ GFP-LC3 トランスジェニックマウスを作成することにより、AQP11 欠損マウスに生じる嚢胞腎は、近位尿細管でオートファジーが亢進されることを明らかにした。さらにアポトーシスおよび酸化ストレスに關与する各遺伝子 (Caspase ファミリー遺伝子、Apaf-1、Keap1/Nrf2) の発現は、嚢胞形成が進行するにつれて増加することを明らかにした (Tanaka Y. et al. 2016)。これまでは、欠損させた表現型が明らかな腎臓での機能解明が優先され、脳での AQP11 の機能に関しては詳細に調べられていない。

2. 研究の目的

申請者が注目した AQP11 の欠損マウスは多発性嚢胞腎による腎不全で死亡する。さらに AQP11 は腎臓以外に血液脳関門の血管内皮細胞と脈絡叢上皮細胞に発現することを報告した (Koike S. et al. 2016)。これまでに AQP4 が脳浮腫に重要であることが報告されているが、同じ部位に発現する AQP11 も脳浮腫の症状に關与している可能性がある。AQP11 が脳ではどのような役割を担っているのかを脳梗塞モデルを作成して解明するのが本研究の目的である。AQP11 欠損マウスに脳梗塞モデルを作成することにより、血液脳関門での AQP11 の脳浮腫や脳脊髄液代謝の制御への關与を解明して、脳梗塞、脳出血、脳浮腫の新たな治療戦略を提案できるようにする。

3. 研究の方法

脳梗塞モデルマウスの作成および脳血管内皮細胞モデル培養細胞を用いて検討した。

(1) 脳梗塞モデルマウス作成

AQP11 欠損マウスおよび野生型を用いて脳梗塞モデルマウスを作成した。用いたマウスは 15 週齢以降の C57BL/6J 野生型マウスおよび AQP11 欠損マウス (ヘテロタイプ) であり、脳梗塞作成方法は、両側総頸動脈結紮術を行った。一定時間の結紮の後、再灌流をし、30 分、1 時間、1 日、2 日後の脳を取り出した。

(2) 脳組織からの RNA 抽出および AQP11 を含む各マーカー遺伝子発現変化の検討

一定時間の結紮および再灌流後、脳組織を取り出した。Bregma - Lambda 領域を切り出した後、RNA を抽出した。さらに RT-qPCR 法にて AQP11 およびその他 AQP、ミクログリア、アストログリア、オートファジーに關与するリソソーム膜のマーカー、アポトーシス調節因子の発現量を比較検討した。

(3) 脳血管内皮細胞モデル培養細胞での AQP11 の発現有無の検討

モデル培養細胞はマウス条件的不活化脳毛細血管内皮細胞 (TM-BBB) を用いた。TM-BBB に AQP11 が発現しているか RT-PCR 法、RT-qPCR 法、ウエスタンブロット法、免疫染色で検討した。

(4) 脳血管内皮細胞モデル培養細胞を用いた浸透圧変化による AQP11 の発現変化

条件的不活化脳毛細血管内皮細胞 (TM-BBB) に sucrose を添加して培養することで浸透圧を変化させ、AQP11 の発現の変化を免疫染色法にて比較検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスおよび AQP11 欠損マウスの両側総頸動脈における AQP11 の発現の評価

両側総頸動脈を 15 分あるいは 60 分結紮させたモデルを作成した。15 分の結紮の後、再灌流させたモデルでは再灌流後 30 分までは AQP11 の発現増加がわずかに見られた。1 日後には AQP11 の発現は減少し、2 日後も未施術に比較すると AQP11 は減少しているが、わずかに増加した。また、性差による違いは見られなかった (図 1)。60 分の結紮では、再灌流後 30 分および 1 時間後は雌雄で AQP11 の発現パターンでは雄は未施術よりも AQP11 の発現は増加したが、雌は減少した。再灌流後 1 日後は、雄雌ともに AQP11 の発現は減少した。2 日後は、再灌流後 1 日後より増加したが、未施術よりも減少した (図 2)。

図 1 野生型マウス 両側総頸動脈 15 分結紮における AQP11 の変化

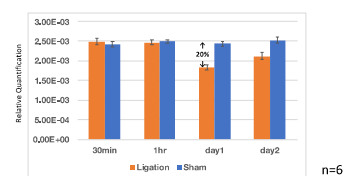
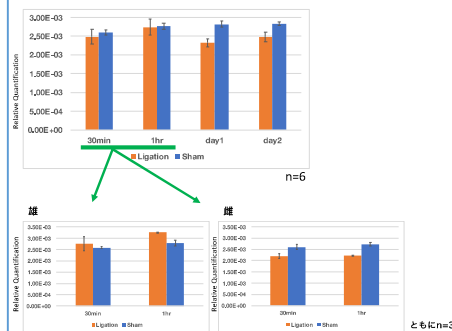


図 2 野生型マウス 両側総頸動脈 1 時間結紮における AQP11 の変化



この際、AQP11 欠損マウス（ヘテロタイプ）では野生型の結果と同様の結果となった。この結紮時間により AQP11 の発現が増加することは他の結紮時間ではみられなかったため、脳梗塞を生じた時間により AQP11 の発現制御が初期治療のひとつになると示唆された。

(2) 野生型マウスの両側総頸動脈における他の AQP の発現の評価

マウス総頸動脈を 15 分あるいは 1 時間結紮させて再灌流させた後、1 日あるいは 2 日後の AQP の変化を検討した。15 分結紮（図 3 左側）および 1 時間結紮（図 3 右側）後、再灌流 1 日あるいは 2 日後の AQP4 の発現を比較した。各時間の結紮後、全ての条件で AQP4 の発現は増加した（図 3 のグラフ青は未施術、オレンジは施術）。さらに AQP1 についても 15 分結紮（図 4 左側）および 1 時間結紮（図 4 右側）後、再灌流 1 日あるいは 2 日後の AQP1 の発現を比較した。各時間の結紮から再灌流後 1 日では未施術に比べ、わずかに発現が増加する個体もいた。再灌流後 2 日経過すると未施術と比べ、AQP1 の発現は減少した（図 4 のグラフ青は未施術、オレンジは施術）。

以上の結果より AQP11 の発現減少に伴い主に AQP4 の発現が増加することは、AQP4 は AQP11 の代償的に働いていると示唆され、脳梗塞初期に AQP11 の発現変化に伴い AQP4 を増加するよう制御できれば初期および長期治療へ発展できると示唆された。

(3) 野生型マウスの両側総頸動脈における各マーカー遺伝子の発現変化

マウス総頸動脈を 15 分結紮（図 5-8 左）および 1 時間結紮（図 5-8 右）後、再灌流 1 日あるいは 2 日後の Iba1（図 5）の発現を比較した。Iba1 はどちらの結紮時間も再灌流後 1 日では 2 倍、2 日では 3-5 倍と時間の経過に伴い発現が顕著に増加した。GFAP（図 6）は結紮時間 15 分（図 6 左）と 1 時間（図 6 右）とも再灌流後 5 倍以上発現が増加した。Lamp2（図 7）と Bax（図 8）は、結紮時間 1 時間で再灌流後 1 日経過したマウス群でもわずかな発現の増加がみられた（図 7、図 8 ともグラフ青は未施術、オレンジは施術。各図の左側は結紮時間 15 分、右側は結紮時間 1 時間の発現量を示す。）

脳梗塞により AQP11 の発現の減少に伴い梗塞部位ではオートファジーやアポトーシスよりもマイクログリア、アストログリアが盛んに脳の機能を維持していることが結びついた。

(4) 脳血管内皮細胞モデル培養細胞（TM-BBB）での AQP11 の発現および浸透圧変化の評価

TM-BBB の RT-PCR、RT-qPCR、ウエスタンブロット法より TM-BBB には AQP11 が発現していることが確認できた。さらに、sucrose を添加して高浸透圧条件で培養することにより AQP11 の発現増加を確認できた。浸透圧の変化で AQP11 の発現変化を検討したことは初めてである。今後、モデル培養細胞として血管の内外の極性を定めてから、低酸素やその他の脳梗塞の脳内の条件下で検討することで、AQP11 が脳梗塞部位でどのような役割をするのか臨床応用へと発展可能な基礎研究のモデルとなることが示唆された。

今回の結果を総合すると、AQP11 は一過性の脳梗塞での関与が示唆された。今後は脳梗塞モデルの手法、梗塞時間および再灌流時間を変えることで、AQP11 が最も変化のある条件があるか検討する予定である。さらには、今回のモデルでも脳梗塞モデルの結紮および再灌流により AQP11 の発現変化が見られたことから、脳血管内皮細胞モデル細胞で血管内外の極性を調節し、各条件下で AQP11 の発現の変化や水以外に他の物質や因子の通過の検討を行い、臨床的な治療へ近づける基礎研究への発展を継続中である。

図 3 野生型マウス 両側総頸動脈結紮における AQP4 の変化

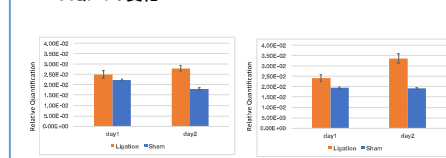


図 4 野生型マウス 両側総頸動脈結紮における AQP1 の変化

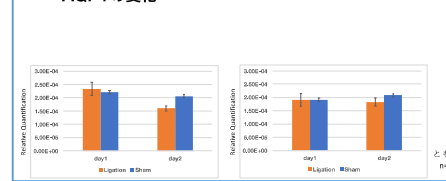


図 5 野生型マウス 両側総頸動脈結紮における Iba1 の変化 (Iba1; ionized calcium binding adaptor molecule 1, ミクログリアマーカー)

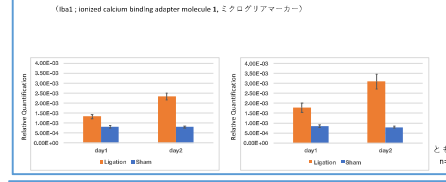


図 6 野生型マウス 両側総頸動脈結紮における再灌流後の GFAP の変化 (GFAP; glial fibrillary acidic protein)

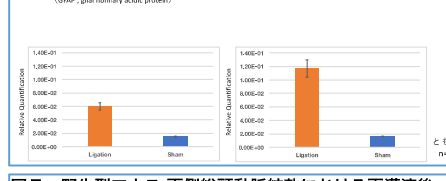


図 7 野生型マウス 両側総頸動脈結紮における再灌流後の Lamp2 の変化 (Lamp2; lysosomal-associated membrane protein 2)

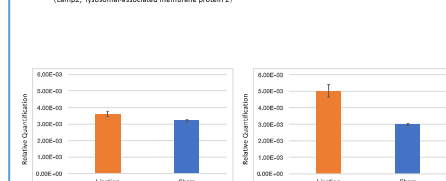
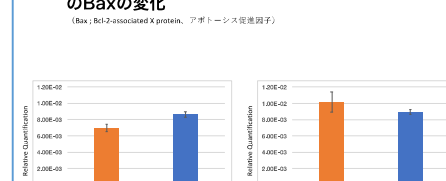


図 8 野生型マウス 両側総頸動脈結紮における再灌流後の Bax の変化 (Bax; Bcl-2-associated X protein, アポトーシス関連因子)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中靖子
2. 発表標題 脳梗塞成獣モデルマウスを用いた 脳虚血による脳アクアポリン発現変化の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuko Tanaka, Yumi Tsuji, Natsumi Kato, Minori Nakae, Kenichi Ishibashi
2. 発表標題 Global analysis of specific gene expression in thymus gland of AQP11 null mice
3. 学会等名 9th FAOPS congress in conjunction with The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------