

平成 21 年 5 月 23 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791093
 研究課題名（和文） 細胞障害に対する水チャネル<アクアポリン>の保護的作用と新しい脳浮腫治療への応用
 研究課題名（英文） Cell protective function of aquaporin and development of a new method for brain edema.
 研究代表者
 安藤 雅樹（ANDOU MASAKI）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：10381865

研究成果の概要：水を特異的に通過させるアクアポリン 4（AQP4）は、脳浮腫に深く関与している可能性が示唆されている。脳浮腫の抑制にはアストロサイトにおける AQP4 機能の維持が重要と考え、AQP4 機能を解析するために siRNA による AQP4 発現抑制系をほぼ確立できた。また、細胞障害における AQP4 機能を解析するために、培養アストロサイトを用いた低酸素障害モデル系を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，麻酔・蘇生学

キーワード：中枢神経、脳浮腫、アクアポリン

1. 研究開始当初の背景

脳浮腫は頭部外傷、脳血管障害、脳腫瘍など様々な病態に随伴して発症し、しばし

ば致命的となるにもかかわらず、依然として治療法は浸透圧利尿薬の投与や外減圧術などの対症的なものに限られている。また、

脳浮腫の発生機序でさえ十分には解明されていなかった。最近、申請者の研究室の報告により、水チャネルであるアクアポリン4 (AQP4) の発現低下が脳浮腫発生の発端である可能性が示唆され、発症機序解明へ大きな進歩となった (Yamamoto *et al.*: Mol Brain Res, 2001 and Arima *et al.*: J Biol Chem, 2003)。

AQP は、赤血球において水を特異的に通過させるチャネルとして 1990 年初期に発見された。現在までに、ほ乳類では AQP0 から AQP12 の 13 種類が同定されており、様々な臓器に発現し、水の移動の調節、細胞容積の調節、ホルモンの分泌に関与している。申請者の研究室ではこれまでに、脳において多種類の AQP が発現し、水の移動や脳脊髄液の産生・吸収に関与していることを報告してきた。(Sobue *et al.*: Biochim Biophys Acta, 2000)。さらに申請者は、初期実験により、AQP4 の機能が低下すると低酸素による細胞障害が容易に起こることを最近見出した。つまり、AQP4 機能が低下すると細胞が脆弱化する可能性を発見した。

2. 研究の目的

(1) 培養アストロサイトを用いた低酸素障害モデル系の作成

簡易な細胞障害モデルとして、培養アストロサイトを用いた低酸素負荷による障害モデル系を完成する。

(2) RNAi を用いた AQP4 ノックダウン培養細胞株の確立

RNAi (interfering RNA) を用いて AQP4 発現を低下させた (ノックダウン) 培養細胞系を作成し、培養アストロサイトを用いた低酸素障害モデルを適応して AQP4 発現が低下した細胞は細胞障害が起りやすくなることを明らかにする。同時に、その機序を詳細に検討する。

(3) 新規脳浮腫治療薬開発

AQP4 機能を維持する化合物や方法を見出し、新しい脳浮腫治療薬開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養アストロサイトを用いた低酸素障害モデル系の作成

細胞障害時の AQP4 の機能解析や薬物のスクリーニングなどに応用するために、低酸素による簡便な細胞障害モデルを作成する。脳浮腫に強く関与するアストロサイトをラット脳より単離・培養し、大気コントロールチャンバ (名古屋市立大学現有) により低酸素負荷をかけることで細胞障害を引き起こす。細胞障害の程度は、形態変化、生細胞数、培養液への LDH 放出などにより決定する。チャンバに注入する酸素濃度や低酸素負荷時間を様々に変化させ、短時間で効率よく細胞障害が起こるモデルの完成を目指す。

(2) RNAi を用いた AQP4 ノックダウン培養細胞株の確立

培養アストロサイトに AQP4 mRNA を阻害する RNAi を遺伝子導入し、AQP4 の発現を低下 (ノックダウン) させた培養細胞株 (cell line) を構築する。遺伝子導入の際の RNAi (正確には short hairpin RNA: shRNA) の設計は、siRNA (short interfering RNA) の一時的な遺伝子導入の結果を検討し、効率よくノックダウンできる塩基配列を決定する予定である。決定した RNAi 配列を piGENE/mU6 ベクター (Clontech 社) に組み込み、ピューロマイシン耐性遺伝子を発現する pPUR ベクター (Clontech 社) を同時に遺伝子導入する。培養液にピューロマイシンを添加し、ピューロマイシン耐性細胞を 10 株程度選出する。選出した細胞株における AQP4 発現の低下は、抗 AQP4 抗体を用いたウエスタンブロット法により確認する。

4. 研究成果

(1) 培養アストロサイトを用いた低酸素障害モデル系

細胞障害時の AQP4 の機能解析や薬物のスクリーニングなどに応用するために、低酸素による簡便な細胞障害モデルを作成し

た。アストロサイトをラット脳より単離・培養し、大気コントロールチャンバにより低酸素負荷をかけることで細胞障害を引き起こした。生細胞数の低下と培養液へのLDH放出の増加を確認した。短時間で効率よく細胞障害が起こるモデルが完成した。

(2) RNAi を用いた AQP4 ノックダウン培養細胞株

培養アストロサイトに AQP4 mRNA を阻害する RNAi を遺伝子導入し、AQP4 の発現を低下（ノックダウン）させた培養細胞株（cell line）の構築をめざした。数種類の RNAi を設計・作成し、一時的な遺伝子導入を試みた。効率よく遺伝子導入を行うことができる条件は確立できた。培養アストロサイトに AQP4 mRNA を阻害するための RNAi（正確には short hairpin RNA: shRNA）を導入し、AQP4 発現の低下は抗 AQP4 抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した。

また、上記の RNAi 配列の piGENE/mU6 ベクター（Clontech 社）への組み込みを試みており、得られたクローンのスクリーニングを施行している。適切なクローンが発見できれば、ピューロマイシン耐性遺伝子を発現する pPUR ベクター（Clontech 社）を同時に遺伝子導入し、ピューロマイシン耐性細胞を 10 株程度選出し、適切な株を選定していく予定である。

(3) 今後の方向性

AQP4 の発現を抑制することにより、アストロサイトの性質がどのように変化するかを検討していく。また、培養アストロサイトを用いた低酸素障害モデル系を用いて、AQP4 の発現抑制により障害への脆弱性が増すかどうかを確認し、AQP4 発現を増加させるような薬剤を検索し、新規脳障害・脳浮腫治療薬開発を目指す。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

①安藤雅樹、竹内昭憲、谷内仁、増田和彦、服部友紀、久保貞祐、祖父江和哉：救急専従医のいない二次救急医療施設での研修医に対する救急標準化教育の現状—研修医へのアンケート調査を通して—別冊 日臨救急医学会誌（J J S E M） 11: 434-9, 2008. 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

①島田靖子、加藤利奈、森田正人、成松紀子、安藤雅樹、服部友紀、薊隆文、祖父江和哉：小児天性心疾患症例に対するカフなしチューブの入れ換え率—小児カフ付きチューブ導入の前調査として—。第 28 回日本臨床麻酔学会 2008. 11. 22 京都。

②安藤雅樹、竹内昭憲、谷内仁、増田和彦、服部友紀、久保貞祐、祖父江和哉：医学部 5 年生の救急部臨床実習期間は一週間で十分なのか。第 36 回日本救急医学 2008. 10. 13 札幌

③井上明日香、伊藤彰師、加藤利奈、成松紀子、安藤雅樹、水落雄一朗、森田正人、平手博之、薊隆文、祖父江和哉：痙攣コントロールに難渋して長期 ICU 管理を要した傍腫瘍性脳炎の一例。第 16 回日本集中治療医学会 東海北陸地方会 2008. 7. 5 岐阜。

④井上明日香、伊藤彰師、加藤利奈、成松紀子、安藤雅樹、水落雄一朗、森田正人、平手博之、薊隆文、祖父江和哉：痙攣コントロールに難渋して長期 ICU 管理を要した傍腫瘍性脳炎の一例。第 16 回日本集中治療医学会 東海北陸地方会 2008. 7. 5 岐阜。

⑤山内浩輝、祖父江和哉、杉浦健之、安藤雅樹、加藤利奈、成松紀子、笹野寛、勝屋弘忠：当院 ICU におけるランジオロールの使用経験。第 15 回日本集中治療医学会 東海北陸地方会 2007. 6. 16 名古屋。

⑥安藤雅樹、他 5 名：ICU 長期入室患者における深在性真菌症のリスクファクター。第 34 回日本救急医学会 2006. 10. 30 福岡。

〔図書〕（計 0 件）

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 雅樹 (ANDOU MASAKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10381865

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者