

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790160

研究課題名 (和文) 脳における水チャネル、アクアポリンの分布局在の検討

研究課題名 (英文) Immunohistochemical studies of water channel, aquaporins, in the brain.

研究代表者

松崎 利行 (MATSUZAKI TOSHIYUKI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30334113

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、脳における水代謝を理解する目的で、水チャネルであるアクアポリンの分布局在を詳細に検討した。脳においては広範囲にわたってアクアポリン4が神経膠細胞であるアストロサイトの細胞膜に分布することが分かった。これまでアクアポリン4は血管周囲に限局するとされていたが、より広範囲に分布し、脳内の水の移動にきわめて重要なはたらきをしていることが推察された。また、脳を含めて広範囲にアクアポリンの分布を調べた結果、マウスの呼吸器系上皮ではアクアポリン5がラットの呼吸器系上皮よりも広範囲にわたって分布することを見出し、呼吸機能におけるアクアポリン5の重要性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Detailed immunohistochemical localization of water channel, aquaporins, in the brain was examined to understand water transfer in the brain tissue. In addition to the previous studies which described that aquaporin-4 was restricted to the perivascular cell membrane of astrocytes, I revealed that aquaporin-4 was widely distributed on the plasma membrane of astrocytes. This result suggests that aquaporin-4 plays very important role in water handling in the brain. In addition, distribution of aquaporins was examined in the mouse tissue. I found that aquaporin-5 is more widely distributed in the mouse respiratory epithelium than that in the rat. Aquaporin-5 in the mouse respiratory epithelium seems to play an important role in maintaining the respiratory function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：組織細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学、発生学)

キーワード：水チャネル、アクアポリン、脳、呼吸器、免疫組織化学

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜は脂質二重層からなり、単純拡散による水の透過量は限られている。したがって、多量の水を瞬時に透過させるためには水チャネルが必要である。水チャネルは 1992 年に Peter Agre 博士らによって発見され、アクアポリンと名づけられた。今日までに哺乳類では、アクアポリン 0 からアクアポリン 12 までの 13 種類のアイソフォームが同定されている。本研究者はこれまでに各アイソフォームに対する特異抗体を作製し、腎臓・唾液腺・消化管・皮膚・乳腺などにおける分布局在を詳細に検討してきた。これらの結果は、水チャネルの生理的役割および生体内コンパートメント間での水の移動ルートとそのメカニズムを理解する上で大きな貢献を果たした。一方、アクアポリンは水のみを通過させるのではなく、アイソフォームによってはグリセリンや尿素をはじめとする小分子を通過させることもわかっていて、いまだその生理的役割が不明な点も多い。

## 2. 研究の目的

本研究者は今回、脳内での水の移動におけるアクアポリンの役割に注目し、各アイソフォームの分布局在を詳細に検討する。脳には血管・脳実質・脳室といった、異なるコンパートメントが存在する。これらのコンパートメント間での水の移動にはアクアポリンが重要な役割を果たすと考えられる。脳にはアクアポリン 1、アクアポリン 4、およびアクアポリン 9 の少なくとも 3 種類のアイソフォームの発現が報告されている。これらのアクアポリンの細胞レベルでの詳細な分布局在を検討することは脳内の水の移動を理解する上で非常に重要である。脳浮腫の形成にアクアポリンが関与することも示唆されており、詳細なメカニズムの解明は医療現場からも大きな期待を寄せられている。脳のアクアポリンは、体液の浸透圧感知・調節との関係や細胞の接着因子としての機能も示唆されており、本研究は脳の機能を理解する上でも重要な意味を持つ。

## 3. 研究の方法

本研究は日本医科大学動物実験規程に従って実施した（承認番号：20-142、21-053、21-054）。動物としてはラットおよびマウスを用いた。麻酔下に安楽死させ、組織を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、凍結切片あるいはパラフィン切片を作製し、免疫組織化学的手法によりアクアポリンの分布局在を明らかにした。用いた抗アクアポリン抗体は本研究者が自ら作製したものである。分

布局在の解析には通常の光学顕微鏡を含めて、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、電子顕微鏡を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 本研究者が作製したアクアポリン 1、アクアポリン 2、アクアポリン 3、アクアポリン 4、アクアポリン 5 の特異抗体を用いてラット中枢神経における分布を免疫組織化学的に検討した。その結果、アクアポリン 1 とアクアポリン 4 が分布することが確認された。アクアポリン 1 は脳室脈絡組織に分布したが、脳実質には分布しなかった。アクアポリン 4 は脳実質の広範囲に分布した。アクアポリン 4 は脳の血管周囲のアストロサイト終足に分布することが報告されているが、血管周囲に限らず広範囲に観察されたことから、その分布を詳細に検討した。血管のマーカーとして糖輸送体 GLUT1 (glucose transporter 1)、神経細胞のマーカーとして NeuN (neuronal nuclei)、アストロサイトのマーカーとして GFAP (glial fibrillary acidic protein) を用いてアクアポリン 4 との蛍光二重染色をおこない脊髄から脳の全領域を検討した。その結果、アクアポリン 4 は血管周囲に限らず、アストロサイトの細胞膜全体に分布することがわかりつつある。さらに種々の神経核では個々の神経細胞の周囲を取り囲むような強いアクアポリン 4 の免疫反応が得られた。そのほかにも非常に強い免疫反応が得られる領域があることがわかった。これらアクアポリン 4 の分布がとくに多い領域では、とりわけ水の供給量が多いことが想定され、興味深い結果である。アクアポリン 4 の血管周囲のアストロサイト終足への局在は、アクアポリン 4 がアダプタータンパク質を介してアクチン細胞骨格と結合することで保たれる可能性が示唆されている。アダプタータンパク質の候補のひとつとして RIL (reversion-induced LIM protein) に注目し、RIL とアクアポリン 4 との関係の解析もおこない論文として発表した。

(2) 本研究者がこれまでにこなってきたアクアポリンの研究から、ラットとマウスではアクアポリンの発現様式に違いが見られることが示唆される。アクアポリンノックアウトマウスの解析のための基礎データとして、マウスにおけるアクアポリンの正確な分布局在を明らかにすることはきわめて重要であり、中枢神経系を含めラットとマウスとの比較検討をおこなった。その際、マウスの呼吸器系でのアクアポリンの分布局在に興味深い結果が得られたので、詳細な検討をお

こない論文として発表した。ラットではアクアポリン5の発現は上部呼吸器の腺細胞とI型肺胞上皮細胞に限られるとの報告があるが、本研究でマウスの呼吸器上皮を詳細に検討したところ、鼻腔から肺胞にかけて広範囲に管腔面の細胞膜にアクアポリン5が発現することが判明した。中でもラットではI型肺胞上皮にのみアクアポリン5の発現がみられ、II型肺胞上皮には発現していないが、マウスではI型肺胞上皮に加え、II型肺胞上皮にも非常に高いレベルでの発現が認められた。呼吸器上皮の管腔表面には液体層が存在し、その量や、成分の調節は呼吸機能の維持のために重要である。その際に上皮細胞の管腔側細胞膜に分布するアクアポリン5が水の透過経路として重要なはたらきをしていることが考えられる。また、基底側壁部細胞膜にはアクアポリン3およびアクアポリン4が分布することから、これらの水チャンネルを介して経上皮細胞的な水の移動が可能である。ラットとマウスでとくにアクアポリン5の分布が異なる理由の解明は今後の課題であるが、呼吸器上皮の水代謝を理解する上できわめて重要な結果である。

#### 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5件)

(1) 小澤一史, 松崎利行. 組織細胞化学シリーズ (若手研究者へのヒント) 免疫電子顕微鏡法の基礎 (3). 日本医科大学医学会雑誌第5巻:215-220, 2009 査読有

(2) Toshiyuki Matsuzaki, Hidekazu Hata, Hitoshi Ozawa, Kuniaki Takata. Immunohistochemical localization of the aquaporins AQP1, AQP3, AQP4, and AQP5 in the mouse respiratory system. Acta Histochem Cytochem 42: 159-169, 2009 査読有

(3) 松崎利行, 高田邦昭, 小澤一史. 腎臓と唾液腺における細胞膜水チャンネル, アクアポリン. 顕微鏡 44:111-116, 2009 査読有

(4) Yuko Iida, Toshiyuki Matsuzaki, Tetsuro Morishima, Hiroshi Sasano, Kiyofumi Asai, Kazuya Sobue, Kuniaki Takata. Localization of reversion-induced LIM protein (RIL) in the rat central nervous system. Acta Histochem Cytochem 42: 9-14, 2009 査読有

(5) 松崎利行. 細胞膜水チャンネル, アクアポリン-腎臓を中心にして-. 日本医科大学医学会雑誌第5巻:118-124, 2009 査読有

[学会発表] (計7件)

(1) 稲島有規, 松崎利行, 小林牧人, 小澤一史. ラット下垂体における水チャンネル, アクアポリン4の局在. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会, 盛岡, 2010年3月28-30日

(2) 松崎利行, 畑 英一, 高田邦昭, 小澤一史. マウス呼吸器系における水チャンネル, アクアポリンの分布局在. 第50回日本組織細胞化学学会総会・学術集会, 滋賀, 2009年9月26-27日

(3) Toshiyuki Matsuzaki, Nobuhiko Sawai, Kuniaki Takata, Hitoshi Ozawa. Immunohistochemical distribution of water channel, AQP4, in the rat central nervous system. The 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones, 北九州, 2009年9月4-8日

(4) 小澤一史, 松崎利行. 免疫電子顕微鏡法の基礎と応用. 第34回組織細胞化学講習会, 徳島, 2009年7月29-31日

(5) 松崎利行, 澤井信彦, 高田邦昭, 小澤一史. ラット中枢神経系における水チャンネルAQP4の分布局在の検討. 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会, 岡山, 2009年3月28-30日

(6) 松崎利行, 高田邦昭. マウス耳下腺腺房細胞の果粒放出に伴う, 頂部細胞膜タンパク質AQP5の分布局在の変化. 日本顕微鏡学会関東支部 第33回講演会, 新宿, 2009年3月7日

(7) 松崎利行, 澤井信彦, 高田邦昭, 小澤一史. ラット脳における水チャンネルAQP4の分布局在. 日本顕微鏡学会関東支部 第33回講演会, 新宿, 2009年3月7日

[図書] (計2件)

(1) 小澤一史, 松崎利行. 免疫電子顕微鏡の基礎と応用. 組織細胞化学2009 (日本組織細胞化学学会編), 学際企画: pp25-34, 2009

(2) 高田邦昭, 松崎利行. 免疫組織化学の原理と応用. 組織細胞化学2008 (日本組織細胞化学学会編), 学際企画: pp1-11, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎利行 (MATSUZAKI TOSHIYUKI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30334113

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：