

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590242

研究課題名（和文）細胞内水チャネルによる細胞内水代謝の調節と病態生理

研究課題名（英文）The Regulation and Pathophysiology of Intracellular Water Metabolism by an Intracellular Aquaporin

研究代表者

石橋 賢一（ISHIBASHI KENICHI）

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80223022

研究成果の概要（和文）：

今回の研究で多発性嚢胞腎になる AQP11（細胞内に分布する水チャネル）を欠損するマウス腎を網羅的に遺伝子や蛋白発現を野生型と比較することで、小胞体ストレス（変性タンパク質が小胞体に蓄積して細胞への悪影響が生じること）が関与していることが明らかになった。腎臓以外にも AQP11 の肝、精巣、胸腺などの病態に関与していたが、とくに脳での毛細血管内皮細胞に AQP11 が発現しており、浸透圧変化に適応するのに重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study revealed the importance of endoplasmic reticulum (ER) stress reaction induced by the accumulation of unfold proteins in the ER for the development of polycystic kidneys in AQP11 null mice by comprehensive gene and protein expression surveys of the kidney. Other than the kidney, AQP11 plays some roles in the liver, testis, thymus and brain. It is noteworthy that AQP11 is expressed at the endothelium of cerebral capillaries seemingly for the adaptation of osmotic stresses in the brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：水チャネル・多発性嚢胞腎・細胞内・小胞体・血液脳関門・ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

水チャネル（アクアポリン、AQP）は 1990 年代の初めに分子実体があきらかになった膜タンパクで、細胞膜以外に細胞内にも存在する。AQP11 は細胞内小胞体 ER 膜に分布し、AQP11 欠損マウスは多発性嚢胞腎による腎不全で生後 1～2 ヶ月で死ぬ。嚢胞は近位尿管細胞内巨大空胞化のあとにおきてくる特異な病態である。

2. 研究の目的

腎臓近位尿管のように大量の水と電解質が流入する細胞では細胞内水代謝をうまく処理しないと、オルガネラ内での浸透圧やイオン濃度変化がおきて、変性した蛋白やオルガネラができオートファジーや ER ストレスがおきると考えられる。AQP11 も水をとおすので、細胞内での水輸送の破綻がいかに巨大細胞内空胞化形成、さらには嚢胞形成につな

がるかを明らかにして、変性蛋白、脂質、オルガネラや、オートファジー制御で病変の修飾、治療ができるかどうかをあきらかにするのが目的。

3. 研究の方法

AQP11 欠損マウスの細胞内空胞形成がはじまる生後 3 日と嚢胞が完成した生後 30 日の AQP11 欠損マウスの腎臓の遺伝子発現をマイクロアレイで正常腎と比較する。

AQP11 欠損マウスの嚢胞形成がはじまる生後 21 日の腎臓の蛋白を 2 次元電気泳動で比較する。

正常と疾患モデルでの AQP11 の全身の発現動態について PCR, 免疫組織染色であきらかにする。とくに腎、肝の病態モデルでの AQP11 の発現動態を観察する

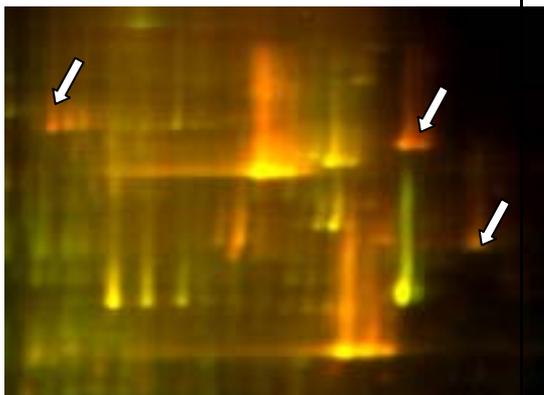
水中毒や食塩負荷によって血液中の浸透圧を変えた時の AQP11 発現への影響について腎と脳で検討する。

細胞内空胞がみられる生後 6 日の AQP11 欠損マウスの肝臓の遺伝子発現パターンをマイクロアレイで比較する。

4. 研究成果

(1) 腎臓での検討

AQP11 欠損マウス腎臓のプロテオーム解析を行った。生後 17 日の腎臓から蛋白を分離して、2 次元電気泳動で流して AQP11 欠損によって増加した蛋白のスポット (野生型と欠損型の泳動をマージした下図で赤いスポット: 矢印) を、ヒートショック蛋白 HSPA5 (ER ストレスタンパク質), Major Urinary Protein3 (MUP3: PKD モデルマウスである jck マウスの嚢胞液中でこのファミリーが確認されている) と同定した。



また、野生型マウスと AQP11 欠損マウスの生後 3 日と 30 日の腎臓でそれぞれ発現の変化している遺伝子をマイクロアレイで網羅的に調べた。3 日では ER ストレス関連遺伝子の増加、30 日では炎症や線溶系に関するものが増加していた。嚢胞腎発生機序に不明な点が多いが、今回マイクロアレイや 2 次元蛋白泳動で ER ストレスや炎症の関与

をあきらかにできた

また生後 3 日目マウスの腎臓のタンパクを用いてオートファジーのマーカー (LC3) をプローブとしたウェスタンブロットを行ったが活性体である LC3-II に差はみられなかった。生後 1, 3 日目のマウス腎凍結切片初期エンドソームのマーカーで染めたが、野生型に比べ AQP11 欠損型で初期エンドソームマーカーの EEA1 のシグナルが弱く、初期エンドソームの在量が少ないことがわかった。

(2) 肝臓での検討

AQP11KO マウスでの肝臓における空胞変性の機構を検討するために生後 6 日齢の AQP11 欠損マウスと野生型マウスの肝臓でマイクロアレイ解析を行った。小胞体ストレス関係の遺伝子はあまり変動しておらず (KO/WILD Hspa5: 1.153 倍, Der13: 1.006 倍)、小胞体ストレス誘発アポトーシス関連の遺伝子変化も確認することはできなかった (Ddit3: 0.95 倍, Casp12: 1.13 倍)。しかし、肝臓での遺伝子変化として鉄代謝に関わる遺伝子発現の変化が確認された。

(3) 全身での AQP11 分布と病態による変化

腎臓以外の病変の検索の目的で、RT-PCR で精巣、腎臓、肺、胸腺、肝臓、小腸、大腸、眼で AQP11 の発現がみられた。ウェスタンブロットで精巣、腎臓、胸腺、肝臓、小腸、大腸でバンドを検出した。In Situ Hybridization では空腸、回腸では吸収上皮細胞で、胸腺では髄質と比較すると皮質での発色が強く見られた。肝臓では肝実質細胞全体に弱いシグナルと中心静脈付近の肝実質細胞に比較的強いシグナルが認められた。

AQP11 欠損マウス組織切片で精巣の精母細胞、小腸の絨毛吸収上皮、肝臓の門脈域の肝実質細胞で細胞の空胞変性が見られた。

AQP11 は胸腺では皮質での発現が強く見られ、リンパ球ではなく胸腺細胞に発現していた。AQP11 欠損マウスでは胸腺の発育障害がみられた。

精巣ではセルトリ細胞に AQP11 は発現しており、テストステロン筋肉注射によって AQP11 mRNA が低下した。これは AQP11 が精子形成にホルモン依存的に関与していることを示唆する。

腎臓ではアミノグリコシド腎障害のマウスモデルにおいて AQP11 mRNA の減少がみられた。

肝臓では、アセトアミノフェン急性肝障害モデルを作成して中心静脈付近の肝細胞障害をおこすと AQP11 mRNA の発現低下がみられた。また 3 日間絶食にすると肝臓の AQP11 mRNA の発現の低下がみられた。

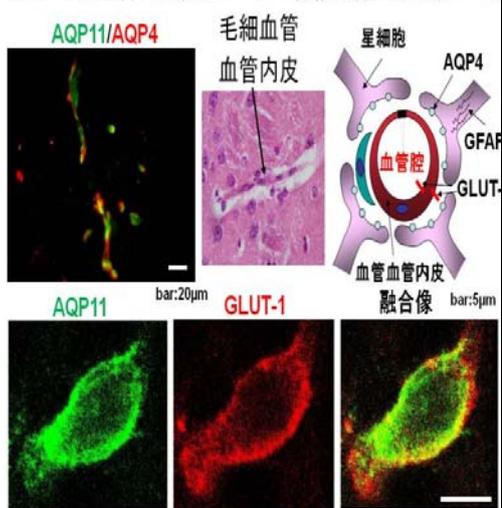
(4) 脳での AQP11 の発現と役割の解明

免疫組織染色で AQP11 は脳では脈絡叢と毛細血管に発現していた。脈絡叢では上皮細胞の細胞内に、毛細血管では血管内皮細胞膜に発現していた。

生後 1 日では AQP11 は軟膜と脈絡叢に発現しているが、成長するにつれて軟膜の AQP11 は減少して、かわりに脳実質に分布する毛細血管の発現が増加して、生後 4 週では軟膜の AQP11 はほとんどみられなくなる。実際に組織をホモジェナイズして遠心して毛細血管の部分分離してリアルタイム PCR で AQP11 の発現量を定量化してみると、生後 1 日では血管部分と脳実質部分がほぼ等量発現しているが、生後 4 週では血管部分が 2.5 倍多いことがあきらかになった。

毛細血管のまわりにあるグリアの足突起には AQP4 が発現しているが、AQP11 はその近くの血管内皮細胞の基底膜側細胞膜に発現しており、同じく血管内皮細胞の管腔側に発現している AQP1 とはオーバーラップしていない。

AQP11は血管内皮細胞マーカー糖輸送体1と発現が一致



AQP11 欠損マウスの脳を組織的に観察すると、毛細血管は変化がないが、脈絡叢上皮細胞の細胞内に空胞をみとめた。次に脳のプロテオーム解析を行った。生後 1 週のマウスの脳から蛋白を分離して、2 次元電気泳動で流して AQP11 欠損によって新たに出現してきたり、失われる蛋白のスポットを調べたところ出現してきたり増加してくるスポットはなかったが減少するスポットが同定された。Time of Flight Mass Spectrometry TOFMS (飛行時間型質量分析法) で同定したところアルブミンであった。コンタミの可能性も考えられるが、AQP11 欠損マウスでは浮腫のためにアルブミンの脳実質の濃度が低下している可能性も考えられる。そこで、脳水分量を Karl-Fisher 法によって AQP11 ノックアウトマウスと正常マウスで比較した。ともに

79%で AQP11 欠損による変化はみられなかった。

脳毛細血管は血液脳関門 (blood brain barrier; BBB) として重要な役割をしているので、AQP11 欠損マウスと正常マウスで BBB の機能を比較した。ビオチンの流出を組織学的にアビジンとの反応で漏れを検出する鋭敏な方法で検討すると、漏出はともに認められなかった。浸透圧を変化させた状態や LPS (lipopolysaccharide) 投与による敗血症モデルでも検討したが AQP11 欠損マウスでも BBB の破綻は観察されなかった。

つぎに、浸透圧モデルを作成して AQP11 欠損マウスへの影響を調べてみた。はじめに正常マウスで脳の AQP1, AQP4, AQP11 の発現をリアルタイム PCR で定量してみた。低 Na モデル (低浸透圧モデル) ではその急性モデル (4 時間後) ではこれらの AQP に変化はみられなかった。一方、その慢性モデル (3.5 日後) では軽度の Na 負荷では AQP1 のみが増加し、重症モデルでは AQP11 のみが減少した。

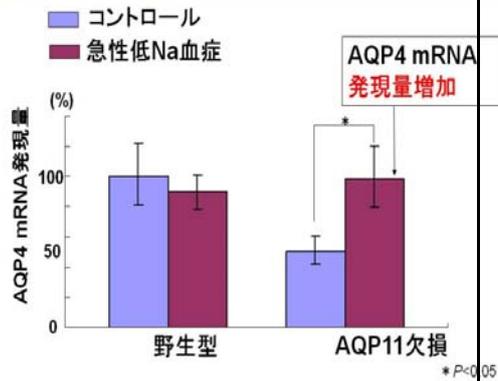
逆に、高 Na モデル (高浸透圧モデル) では、急性の軽度 Na 負荷では AQP1 と AQP11 が減少し、高度 Na 負荷の急性高 Na モデルではすべてに変化がみられなかった。また慢性高 Na モデルでも変化はみられなかった。

一方脳浮腫治療に臨床的によく用いられるマニトール投与モデル (高浸透圧モデル) では、投与後 6 時間、12 時間の急性高浸透圧モデルではすべての AQP が減少した。

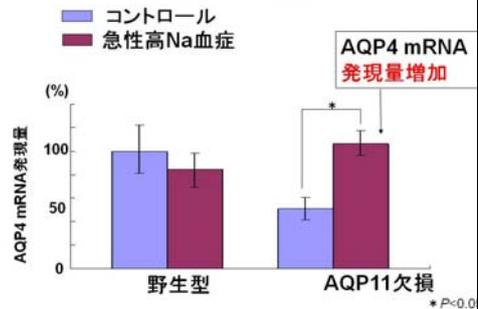
同じ細胞にある AQP1 と AQP11 は似た変化をする傾向があることがわかった。

AQP11 欠損マウスの脳では AQP1 に変化はなかったが、AQP4 は低下していた。しかし、急性の高 Na や低 Na モデルで、AQP11 欠損マウスの脳での AQP1 は変化しなかったが、AQP4 は増加して正常レベルまで回復していた。これは AQP11 が欠損することで、同じ細胞にある AQP1 は変化しないが、AQP11 の近くに発現している AQP4 は、浸透圧が変化する時には、違う細胞にあるにもかかわらず相補的に働いて代償しようとしていることが考えられる。

急性低Na血症によるAQP4 mRNAの発現量変化



急性高Na血症によるAQP4 mRNAの発現量変化



(5) 今後の展望

AQP11 欠損マウスが嚢胞腎になるメカニズムは解明できておらず、細胞内シグナル分子を含めたより細かい検討が必要で、嚢胞腎の発症や進行に介入する治療法の開発につなげていきたい。さらに、近位尿細管の再生や修復に関与する可能性もあるので、薬剤性腎障害や急性腎不全などのモデルにおける関与についても明らかにしたい。

また、脳においては毛細血管における役割が注目されるが、今後脳浮腫をおこす脳梗塞や脳炎や脳出血などの疾患モデルにおける発現や病態修飾、さらには治療応用についてあきらかにしていきたい。

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 8 件)

- ① Ishibashi K, Kondo S, Hara S, Morishita Y.: The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 査読有 300, pp. R566-R576 (2011) doi:10.1152/ajpregu.90464.2008.
- ② Ikeda M, Andoo A, Shimono M, Takamatsu N, Taki A, Muta K, Matsushita W, Uechi T,

Matsuzaki T, Kenmochi N, Takata K, Sasaki S, Ito K, Ishibashi K. The NPC motif of aquaporin-11, unlike the NPA motif of known aquaporins, is essential for full expression of molecular function. *J Biol Chem*, 査読有 286, pp. 3342-3350 (2011)

doi: 10.1074/jbc.M110.180968

- ③ Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals. *Clin Exp Nephrol*. 査読有 13, pp. 107-117 (2009) Doi: 10.1007/s10157-008-0118-6

[学会発表] (計 2 2 件)

- ① Koike S, Tanaka Y, Morishita Y, Ishibashi K, Aquaporin-11 Expression in the Brain: Choroid Plexus and Capillaries with Blood-Brain Barrier Function. *Renal Week 2011*, American Society of Nephrology, 2011/11, Philadelphia, USA
- ② Ishibashi K. Systemic Distribution of AQP11 and Phenotypic Analysis of AQP11-Null Mice. *Renal Week 2010*, American Society of Nephrology, 2010/11, Denver, USA
- ③ Tanaka Y, Hirokawa T, Kondo S, Hara S, Ishibashi K. The role of AQP11 in intracellular organelles. 36th International Congress of Physiological Sciences, 2009/8, Kyoto, Japan

[図書] (計 1 件)

Ishibashi K. New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12. pp. 251-262, In "Aquaporins" Beitz E ed. *Handbook of Experimental Pharmacology* 190, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2009) doi: 10.1007/978-3-540-79885-9_13

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
[その他]
ホームページ等

<http://www.my-pharm.ac.jp/~kishiba/sub3>

[.html](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者

石橋 賢一 (ISHIBASHI KENICHI)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80223022

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：