

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791448

研究課題名（和文） 蘇生後低酸素症の脳浮腫発症における水チャネルの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of water channel in ischemic brain injury after cardiac arrest

研究代表者

徐 民恵（SOU MINE）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60381886

研究成果の概要（和文）：脳浮腫の病態のひとつであるアストロサイトの膨張は、低酸素-再酸素化（虚血-再灌流）によって生じる AQP 4 発現増強に関連する。また、動物モデルにおいても脳虚血により発症する脳浮腫に、AQP 4 の関与が示唆された。アストロサイトにおける AQP4 の発現増強の機序として、転写因子 NF- κ B と p38 MAPK の関与を確認した。さらに、NF- κ B の阻害薬（SN-50）あるいは p38 MAPK の阻害薬（SB203580）によりアストロサイトに投与して、低酸素-再酸素化（虚血-再灌流）を起こしたところ、AQP4 の急速な発現上昇が抑制される傾向を得た。今後のさらなる検討が必要であるが、本研究により脳浮腫の調節ができる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Astrocytic swelling is one of the mechanisms of brain edema. We found that AQP4 enhanced expression which rose by ischemia-reoxygenation relates to astrocytic swelling. Participation of AQP4 was suggested to the cerebral edema by brain ischemia in an animal model. When astrocyte was medicated with the inhibitory drug (SN-50) of NF- κ B, or the inhibitory drug (SB203580) of p38 MAPK and ischemia-reoxygenation was caused, the tendency for the rapid revelation rise of AQP4 to be controlled was acquired. Although the further examination was required, a possibility that regulation of cerebral edema could be performed by this research was suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：蘇生学

1. 研究開始当初の背景

心肺停止患者については、単に心拍の再開だけでなく、脳機能の回復や完全社会復帰が求められるようになってきている。蘇生後の低酸素脳症は、皮質・基底核・視床などの灰白質の壊死や強い全脳性の浮腫を伴い、適切な処置を行わなければ神経学的予後は不良となる可能性がある。特に、脳浮腫の予防は重要であり、浮腫の進行は二次的な神経障害を引き起こし、予後をさらに悪化させる。しかし、その発生の機序は十分には解明されていなかった。

水チャネルであるアクアポリン 4 (AQP4) が脳浮腫の進行に関与する明らかとなり (Manley GT *et al.*: Nature Med, 2000)、発生機序の解明に期待が寄せられていた。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 種類が発見されており、様々な臓器に発現して、水移動の調節、細胞容積の調節、ホルモン分泌などに関与している。脳においては、AQP4 が水の移動や脳脊髄液の産生・吸収に関与していることがわかってきていた。申請者の研究室は、脳における AQP に関して国内外のグループの中でも早期から研究を開始していた。以前から、AQP4 の発現調節機構や脳浮腫の病態に果たす AQP4 の機能について検討をすすめてきており、基礎的知見を蓄積してきていた (Arima H *et al.*: J Biol Chem, 2003、Ito H *et al.*: J Neurochem, 2006)。

2. 研究の目的

蘇生後低酸素脳症における脳浮腫の発症機序に果たす AQP4 の役割を解明し、さらに

AQP4 を標的とした新規脳浮腫治療薬・低酸素脳症治療薬の開発を目指すものである。本研究により、蘇生後の脳障害を軽減する新規治療法を開発できれば、社会復帰率の改善につながる可能性がある。

3. 研究の方法

脳浮腫の病態には、アストロサイトの膨張が特徴的である。また、AQP4 はアストロサイトに豊富に発現している。そこで、本研究ではラットの脳より単離したアストロサイトの培養細胞を使用した。培養環境を低酸素にできる特殊チャンバーを使用し、アストロサイトを低酸素状態にした後、通常の培養条件 (O₂=21%) に戻すことにより、虚血-再灌流を再現した。AQP4 の発現は mRNA については RT-PCR により、蛋白質についてはウエスタンブロット法により検出を行った。

心室細動誘発による心肺停止モデルは、電気的な心停止を発症させる。全脳虚血が起こった際の脳における AQP4 の発現は、ウエスタンブロット法と免疫化学組織染色により検討した。

NF- κ B の阻害薬 (SN-50) あるいは p38 MAPK の阻害薬 (SB203580) をアストロサイトに投与して、虚血-再灌流を起こし、AQP4 の発現をウエスタンブロット法にて確認する。

4. 研究成果

単純なアストロサイト培養系を用い、低酸素-再酸素化 (虚血-再灌流) によって AQP 発現がどのように変化するかを検討した。低酸素環境が作り出せる特殊チャンバー (名古屋市立大学現有) を用い、培養アストロサイトを低酸素状態 (虚血) とした後、通常の大気に戻した (再灌流)。低酸素により AQP4 発現はいったん低下するが、低酸素-再酸素化

(虚血-再灌流)によって、AQP4発現はmRNA、蛋白質ともに増強した。増強する機序については今後の検討課題である。

動物モデルにおいてもAQP4発現が増強するかどうかを確認することとした。心室細動誘発による心肺停止モデルを作成し、全脳虚血が起こった際に、脳におけるAQP4の発現が増強するかどうかを検討した。心肺停止モデルは手技についてはほぼ安定して作成が可能となった。一方で、すでに確立している凍結損傷モデルでAQP4の発現を確認したところ、ウェスタンブロット法と免疫化学組織染色により虚血中心部の発現低下と周囲の発現低下を確認できた。また、損傷側脳の水分量の増加を確認した。障害により、AQP4が明らかに変化することが明確となった。

アストロサイトにおけるAQP4の発現増強の機序として、転写因子NF- κ Bとp38 MAPKの関与を確認した。そこで、NF- κ Bの阻害薬(SN-50)あるいはp38 MAPKの阻害薬(SB203580)をアストロサイトに投与して、低酸素-再酸素化(虚血-再灌流)を起こし、AQP4の発現が実際に抑制されることをウェスタンブロット法にて調査したところ、AQP4の急速な発現上昇が抑制される傾向を得た。今後のさらなる検討が必要であるが、脳浮腫の調節ができる可能性が示唆された。

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)

①Asai H, Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Saitoh S, Asai K: Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced aquaporin-4 expression in cultured

astrocyte. *Cell Mol Neurobiol.* 2013; 33(3): 393-400.

doi: 10.1007/s10571-013-9905-z.

②Kako E, Kaneko N, Aoyama M, Hida H, Takebayashi H, Ikenaka K, Asai K, Togari H, Sobue K, Sawamoto K: Subventricular zone-derived oligodendrogenesis in injured neonatal white matter in mice enhanced by a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *Stem Cells* 2012; 30(10): 2234-47.

doi: 10.1002/stem.1202.

③祖父江和哉、有馬一、藤田義人: 神経保護Q&A-神経救急・集中治療的アプローチの実際 - 神経救急・集中治療の重要性と必要な基礎知識および脳保護・脳蘇生の展望 脳障害の病態と血液脳関門. 救急・集中治療 2011; 23(7-8): 1013-8.

④Takayanagi T, Sasaki H, Kawashima A, Mizuochi Y, Hirate H, Sugiura T, Azami T, Asai K, Sobue K: A New Enteral Diet, MHN-02, Which Contains Abundant Antioxidants and Whey Peptide, Protects Carbon Tetrachloride-Induced Hepatitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2011; 35(4): 516-22. doi: 10.1177/0148607110381599.

⑤祖父江和哉、高柳猛彦、平手博之、杉浦健之、藤田義人、浅井清文: 水チャネル<アクアポリン>の中樞神経における多様な機能と関連疾患. *日本歯科麻酔学会雑誌* 2010; 38(2): 145-50.

[学会発表] (計2件)

①So M, Arima H, Suzuki E, Kako E, Sobue K: Evaluation of anesthetic factors on characteristics of emergence from anesthesia: Why do patients bite the orotracheal tube? Annual Meeting of

International Anesthesia Research
Society (IARS) Vancouver, Canada
2011. 5. 21-24 (presentation 5. 24)

②加古英介、金子奈穂子、青山峰芳、戸莉創、
祖父江和哉、澤本和延：アジアロエリスロポ
エチンの脳低酸素虚血に対する治療効果。
日本麻酔科学会第 58 回学術集会 神戸
2011. 5. 19-21(発表 5. 19)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徐 民恵 (SOU MINE)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：68381886

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70212462

祖父江 和哉 (SOBUE KAZUYA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90264738

有馬 一 (ARIMA HAJIME)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20254295

平手 博之 (HIRATE HIROYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20363939