

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月19日現在

機関番号：23903  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791613  
 研究課題名（和文）カオリン水頭症モデルで見られる異所性アクアポリン1の水頭症発症における役割の解明  
 研究課題名（英文）Elucidation of the role of the ectopic aquaporin 1 in the onset of hydrocephalus of the kaolin-induced hydrocephalus model in rat.  
 研究代表者  
 藤田 政隆 (FUJITA MASATAKA)  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
 研究者番号：10360637

研究成果の概要（和文）：カオリン誘発性水頭症モデルラットを用いて、水頭症発症時に異所性に増加している水チャンネル・Aquaporin 1(AQP1)を、RNA interference (RNAi)を用いてノックダウンすることにより、AQP1が水頭症形成にどのような影響を及ぼすか検討した。その準備として、ウェスタンブロットに適したウサギ抗AQP1血清の調製と、ノックダウンに適したsiRNAの配列を見出すことが出来た。しかし、*in vivo* RNAiを実現するための投与方法については、本期間内に適切な方法を見出すことが出来ず、その確立が今後の課題となった。

研究成果の概要（英文）：We examined how ectopic AQP1, which increased at the development of hydrocephalus, influenced the hydrocephalus formation using the kaolin-induced hydrocephalus model in rat by RNAi knockdown. As the preparation, production of rabbit anti-AQP1 serum suitable for a Western blot was successful and the arrangement of siRNA suitable for knockdown was found out. However, the suitable method of the injection for *in vivo* RNAi could not establish within this period, so it remains as a future subject.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：実験脳外科学

## 1. 研究の背景

現在、くも膜下出血後の合併症などで見られるいわゆる正常圧水頭症に対しては、主にVPシャント術等が施され、患者のQOL改善に大きく寄与している。しかし、VPシャント術を含む外科的治療には、感染や閉塞のリスクが常に存在するため、さらなるQOL改善には、正常圧水頭症そのものを予防することが望ましいと考えられる。しかし、正常圧水頭症には、その発症機序などについて、まだ十分な知見は揃っていないのが現状である。そもそも旧来の教科書には、脳脊髄液は側脳室等脳室内にある脈絡叢より産生され、くも膜下

腔に出た後、大半がくも膜顆粒より静脈洞内に吸収されるとされていた。しかし最近の知見では、とりわけその吸収過程において、くも膜顆粒以外の他の吸収経路の重要性が指摘されている。

水チャンネルであるAQP1は、脈絡叢上皮細胞に発現し、ノックアウトマウスで髄液産生量の減少等を認めることなどから、脳脊髄液の産生との関わりが示唆されている。カオリン誘発性水頭症モデルラットを用いた我々の研究では、AQP1 mRNAの発現が本来認められる側脳室等の脈絡叢のみならず、脳底部くも膜でも異所性に増強していることが確かめられている。(Isomura K, et al. Nagoya Med

J, 46: 181-194, 2003) しかし、この系において使用しうる AQP1 特異的な阻害剤には、現在までに有用なものがなく、AQP1 の発現増強が、水頭症の発症や進行に与える影響について評価できなかつた。その後、ラット髄腔内投与による RNAi 実験手技(Dorn G, et al. *Nucleic Acids Res* 32(5):e49, 2004) が報告され、この手技を応用することで、本来髄液産生と関係があるとされている AQP1 がカオリン水頭症モデルにおいて脳底部で発現することの影響について、直接評価できると考えた。

## 2. 研究の目的

ある分子の機能について哺乳類の個体レベルで検討する際、方法としてマウスの例では、遺伝子組換え技術を用いて分子の一部を改変したり、分子の発現を抑制したりするなどした knockin (knockout) mouse や、多数の目的分子を強制発現させるような transgenic mouse など用いた実験系が知られている。先に述べたように、すでに AQP1 の conventional knockout mouse は作出されており、AQP1 knockout mouse では、髄液産生が抑制され、水頭症発症に際し、脳室拡大の程度が軽減することが報告されている。しかし、この系では全身の AQP1 の発現が抑えられており、全身の水の移動に影響があることから、その表現系の解析において他部位で抑制された影響が否定できない。一方、部位特異的に遺伝子の発現を抑制する conditional knockout mouse などの方法も開発されているが、本研究で問題としている、異所性の AQP1 の発現を抑制することは、容易ではない。一方、RNAi を用いた分子の発現抑制法は、まず、細胞に siRNA が取り込まれる必要があり、個体ではその投与部位から siRNA が到達し細胞内に取り込まれた領域のみに、その影響が限定されてしまう。しかし、その性質を逆に利用し、本研究では、側脳室内あるいは大槽と言った局所に RNAi を投与することで、その領域での AQP1 の機能について評価できると考えた。また、通常、髄液は側脳室からくも膜下腔に流れるとされているが、定常流ではなく、逆流・乱流を伴った脈波であることが観測されている。そのため、髄液流の下流にある大槽内に投与しても、高濃度 siRNA なら側脳室内まで到達する可能性がある。よって、siRNA 濃度と RNAi の及ぶ領域について評価しておくことは、今後の臨床応用に向けて意義のあることと考えた。また、水頭症の病態時には、その病態によって異なることが示唆されていることから、正常と病態時の RNAi の及ぶ領域に相違があることが想定され、その点について評価することも、病態を解明す

る上で、重要と考えた。以上のことから、次の点について明らかにすることを、今回の実験の目的とした。

### <AQP1 タンパク質同定法を確立する>

RNAi により knockdown を行う際、目的遺伝子の発現量については、mRNA を定量する方法とタンパク質を定量する方法が想定される。本実験においては、①AQP1 タンパク質の定量法がまだ充分には確立していなかったこと。②当研究室において、ウサギに AQP1 部分ペプチドを免疫し、抗 AQP1 血清をすでに調製していたこと。など、以上の2点の理由から、AQP1 タンパク質をウェスタンブロット法で定量する方法の確立を目指すこととした。よって、まず実験に先立ち、当研究室にて作製されたウサギ抗 AQP1 血清が、ウェスタンブロット法に適しているかどうかを、AQP1 を発現している培養細胞 (C6 グリオーマ細胞) やラット脳組織から抽出したサンプルを用いて確認することとした。

### <AQP1 をノックダウンできる siRNA 配列について in vitro 上で確認する>

既に、AQP1 のノックダウンの報告はあり、その際の配列も明らかになっているが、今回、in silico 上で見出された配列が、実際に AQP1 の発現を抑制することができるか、in vitro で確認することとした。

### <in vivo での RNAi 実験手技の確立>

先に述べたように、ラット髄腔内に siRNA を投与し、ノックダウンをおこなう系については、既に報告はあるが、まだ十分ではなかった。このため、実験手技を確立する必要があった。具体的には in vivo で siRNA を組織内に効率よく誘導する試薬の検討などを実施し、最適な siRNA 濃度の検討やノックダウンの時間的経過などを、in situ hybridization 法および RT-PCR を用いた mRNA 量とともに、免疫染色やウェスタンブロットを用いたタンパク量の評価することとした。とりわけ、本実験では、髄腔内という特殊な環境下に siRNA を注入し、神経組織内に導入する必要があったため、腹腔内や血管内など他の投与方法に比較し、厳しい条件が必要であることが想定された。

### <部位特異的 AQP1 ノックダウンが可能であるかを評価する>

RNAi の投与部位や濃度によって、AQP1 がノックダウンされる領域にどのような変化があるかを in situ hybridization 法や免疫染色法により検討することとした。先に述べたように、側脳室内投与と大槽内投与では、異なる髄液流の影響を受けると考えられ、このことが、RNAi の効果にどのような影響を及ぼ

すかについて明らかにし、部位特異的に AQP1 ノックダウンが可能であるか明らかにすることとした。

＜正常時と水頭症発症時における RNAi の効果の差について検討する＞

正常ラットおよびカオリン誘発性水頭症モデルラットに AQP1 などの siRNA を投与した際に、投与部位（側脳室・大槽）の違いにより、RNAi の引き起こされる領域の違いについて検討し、投与方法と病態の影響について明らかにすることとした。

＜異所性の AQP1 発現の意義と病態との関係について検討する＞

カオリン誘発性水頭症モデルラットに AQP1 siRNA を投与した際に、投与部位（側脳室・大槽）・時期（カオリン投与直後・4週間後等）の違いにより、脳室サイズや神経症状について違いを比較し、水頭症の進展にどのような影響があるか、AQP1 がどのように作用するかを検討することとした。

### 3. 研究の方法

＜AQP1 タンパク質同定法＞

当研究室において、ウサギ抗 AQP1 抗血清が 2 ロット作製されており、免疫組織化学染色に使用できることは、確認できていた。これらの抗体が、タンパク質の定量に用いることができるかということについて AQP1 を発現している C6 グリオーマ細胞を培養し、そこから精製したタンパク質やラット脳組織から抽出したタンパク質を電気泳動し、ウェスタンブロット法を用いて確認した。

＜in vitro 上での AQP1 RNAi＞

AQP1 の RNAi に関しては、まず、Life Technologies 社の Stealth RNAi™ siRNA を C6 グリオーマ細胞に導入することとした。配列については、in silico にて効率的とされた 3 つの配列について実験することとした。まず C6 細胞を 30-50% 細胞密度となるよう 12 well dish に播種し 24 時間培養した後、Technologies 社の Lipofectamine® RNAiMAX Reagent を用いて Stealth RNAi™ siRNA を C6 細胞に導入した。その際、siRNA の最終濃度について、3nM, 10nM, 30nM の 3 つの条件について、おのおの 3 well ずつ設定した。その後 48 時間培養した後、タンパク質を回収・精製し、ウェスタンブロット法を用いて、Negative control との発現比を計測した。Negative control は Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Kit から適宜選び、導入した。

＜in vivo での RNAi 実験手技＞

最長 6 週間と長期に渡り siRNA の投与を計画していることから、浸透圧ポンプの留置を皮下に留置し、カテーテルを介して、側脳室内、または、大槽内に siRNA を投与することとした。その際、清潔操作などの手技を確立することが必要であった。

また、側脳室投与についてはすでに報告があるが、大槽へのカテーテルの留置については、体動時にカテ先が動いて、脳幹部を傷つける恐れがあることから、カテーテルの長さや留置法について工夫を要すると考えられ、検討することとした。

そして、正常ラット側脳室あるいは大槽内に様々な遺伝子の siRNA を継続投与、in situ hybridization 法および RT-PCR を行い、発現の分布や発現量をみてノックダウンの評価を行い、in vivo RNAi の系を確立することとした。

＜濃度・投与部位の違いによる RNAi の効果の違いについて＞

髄液流の関係から、側脳室内に投与した場合と大槽内に投与した場合では、RNAi の効果が異なることが想定された。よって、siRNA の投与部位や濃度違いが、RNAi の効果にどのように及ぼすか、その領域や mRNA およびタンパク質発現量の違いなどを、in situ hybridization や免疫染色を用いて、各種遺伝子において比較検討することとした。

＜正常時と水頭症発症時における RNAi の効果の差について＞

正常ラットおよびカオリン誘発性水頭症モデルラットの髄液流の違いを考慮し、各種遺伝子の siRNA を投与し、投与部位（側脳室・大槽）の違いにより、RNAi の引き起こされる領域の違いについて、各種遺伝子の mRNA およびタンパク質発現量の違いなどを、in situ hybridization や免疫染色を用いて比較検討することとした。

＜異所性の AQP1 発現の意義と病態との関係について＞

カオリン誘発性水頭症モデルを作製し、さらに先に確立した投与方法に基づき AQP1 siRNA を継続投与し、投与部位（側脳室・大槽）や siRNA 投与期間、さらには投与開始時期（カオリン投与直後あるいは 4 週間後）の差異により、脳室拡大の程度に差を認めるかどうか、カオリン投与後最大 6 週間程度で in situ hybridization や免疫組織学的に比較検討し、またロタロッド・ラダーテストなどを実施し、実際の神経症状について比較することとした。

#### 4. 研究成果

##### <AQP1 タンパク質の同定>

AQP1 を発現している培養細胞株 (C6 ラットグリオーマ細胞) とラット脳組織より精製したサンプルを用いて、得られていた抗血清 2 ロットについて、ウェスタンブロット法での反応性を検討したところ、一方で 28kD 付近に AQP1 と思われる単一のバンドを検出できた。さらに、諸条件で検討した結果、そのロットが今後ウェスタンブロット法で利用できることを確認できた。

##### <AQP1 をノックダウンできる siRNA 配列について *in vitro* 上での確認>

次に、最適な siRNA 配列を決定するために、*in silico* にて検索した 3 つの配列を元に合成した siRNA を C6 細胞に導入し、WB 法で AQP1 の発現量を調べることにより、RNAi の効率について検討した。その結果、1 つの配列 (配列 A) については、効率よく有意差をもって AQP1 タンパク質の発現を低下させることが明らかとなった。(図 1) siRNA 投与後 48 時間で有意にタンパク質の量を低下させていることから、*in vivo* で持続的に投与する際にも、十分な効果が得られることが期待された。

##### <*in vivo* での RNAi 実験手技の確立>

一方、この配列をラットへ投与するにあたり、投与方法を検討したが、これ以降については、

本期間内に適切な方法を見出すことが出来ず、まず、その投与方法の確立が今後の課題となった。

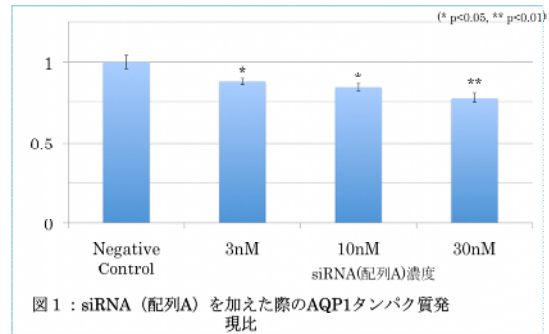


図 1 : siRNA (配列A) を加えた際の AQP1 タンパク質発現比

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 政隆 (FUJITA MASATAKA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号 : 10360637