

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10526

研究課題名(和文)脳水チャネルアควアポリンのRNAi機能調節による脳浮腫抑制の臨床応用

研究課題名(英文)Clinical use of functional regulation of aquaporin for brain edema decrease using knockdown technique

研究代表者

藤田 義人(Fujita, Yoshihito)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：90238593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：目的となるAQP KnockdownのshRNAiを発現するレンチウイルスの作成を完了した。アストロサイトのAQP4発現量を、RT-PCRで確認した。以前のKnockdownの発現率に比較して強くKnockdownしていることが確認できた。hAQP4-M23に関しては、permanent cell lineを完成させた。再酸素化を行う際の至適酸素濃度の決定のため、高濃度の酸素の影響を調べた。50%と80%の条件での培養で細胞傷害を確認した。アストロサイトだけでなく、神経細胞であるSH-SY5Yの培養系でも同様の傷害を確認した。今後さらに脳低温療法の効果の向上に寄与する方策を検討したい。

研究成果の概要(英文)：For making aquaporin (AQP) 4 knock down, we used Lentiviral RNAi system of Invitrogen corporation. Finally, we obtained AQP 4 knockdown model with pLenti4/BLOCK-IT/Expression Construct and plasmid of pLP1, pLP2, pLP/VSVG, and pENTER-gus. We confirmed that AQP4 knockdown that was stronger than our earlier experiment. We constructed hAQP4-M23 and hAQP4-M1 vector and transfected into C6 cells. We confirmed the overexpression of hAQP4-M1 and hAQP4-M23 in C6 cells. Moreover, we constructed permanent cell line of hAQP4-M23-overexpressed-cells of C6. In hypoxic condition, we tried to decide apoptosis or necrosis with flow cytometry. For optimal oxygen concentration, we experimented cell culture of astrocyte and SH-SY5Y in hyperoxia. We confirmed cell damage of hyperoxia in this condition. We try to continue neuron protection of various condition and drugs using RNAi technique.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脳低温 アストロサイト アクアポリン 水チャネル

1. 研究開始当初の背景

脳浮腫の病態は、アストロサイト(星状膠細胞)の膨化(水の移動による)とそれに伴う二次的神経細胞死と考えられている。

我々は、低酸素負荷によりアストロサイトで特に発現が多い AQP4 の発現が時間とともに低下することを(Yamamoto et al. Mol. Brain Res. 90:26-38, 2001) さらに中等度低温(32℃)では、細胞障害が抑制され、AQP4 では、一過性低下の後むしろ正常以上に上昇することを示した(Fujita et al. Neurosci. Res. 47:437-44,2003)。これらの結果は、AQP4 の発現が脳低温療法における脳浮腫抑制の効果の機序の一端を担っている可能性を示唆したが、低温負荷による AQP の発現変化の機序は依然不明である。我々は RNA interference (RNAi)を用いて AQP4 の遺伝子発現調節に取り組んできた。AQP を knockdown すると、AQP の機能、局在等がどのように変化するかは明らかになっていない。AQP を knockdown したアストロサイトや AQP を overexpression したアストロサイトにおける低酸素負荷時および軽度低温下および乳酸アシドーシス条件下におけるアストロサイトの機能変化も明らかではない。また AQP4 の遺伝子発現調節により、脳保護効果の増強の可能性が in vivo の条件であるかどうかも明らかでない。

2. 研究の目的

(1).RNAi を用いたアクアポリン(AQP) knockdown 細胞株の確立

(2).AQP knockdown に対する rescue experiments による AQP 蛋白の機能の確認

(3).低酸素負荷による AQP knockdown、overexpression 細胞株の phenotype の確認

(4).軽度低温環境が、低酸素負荷もしくはアシドーシス環境での AQP knockdown、overexpression 細胞株の phenotype に与え

る影響

(5).動物実験による AQP knockdown モデルでの検証

3. 研究の方法

RNAi の手法を用いた AQP4 を knockdown したアストロサイトの cell line はほぼ確立している。さらに AQP4 overexpression 細胞株も作成する。AQP4 knockdown に正常の AQP4 cDNA の遺伝子導入し、rescue experiments を行うことで、AQP4 蛋白の役割を確認する。さらに、AQP4 knockdown または overexpression 株に低酸素負荷を行い、AQP4 の増減が低酸素付加による脳浮腫に与える影響を明らかにする。それらに加えて、低酸素負荷に対する軽度低温による保護効果を確認し、さらに薬物処置を行うことでの併用効果を検討し、AQP4 の発現機能調節が脳浮腫の発生、治療への関わりを明らかにする。これらの実験結果を踏まえて、in vivo での臨床応用を模索する。

4. 研究成果

神経系の細胞の RNAi は invitrogen 社製の Lentiviral RNAi system を利用した。293FT セルラインでレンチウイルスを発現させるため、作成した pLenti4/BLOCK-IT/Expression Construct に加え、レンチウイルスの作成能力を高める pLP1、pLP2、pLP/VSVG、pENTER-gus のプラスミドを cotransfect させた。以上により目的となる AQP Knockdown の shRNAi を発現するレンチウイルスの作成を完了した。アストロサイトの AQP4 発現量を、RT-PCR で確認した。以前の Knockdown の発現率に比較して、強く Knockdown していることが確認できた。

hAPQ4-M23 に関しては、permanent cell line を、蛍光顕微鏡の蛋白発現と、ウエスタンブロッティングでの蛋白発現の確認を終え、完成させた。Wild-type のアストロサイトに導入し、overexpression できることを

確認した。

低酸素負荷により AQP knockdown と、overexpression 細胞株の phenotype の形態学変化、培養液の変化を観察した。細胞傷害がネクローシスかアポトーシスによるものかをフローサイトメトリーで検討している。

再酸素化を行う際の至適酸素濃度の決定のため、高濃度の酸素の影響を調べた。50%と 80%の条件での培養で細胞傷害を確認した。アストロサイトだけでなく、神経細胞である SH-SY5Y の培養系でも同様の傷害を確認した。高濃度の酸素傷害を低温が軽減できるかを検討している。またエリスロポエチンが、脳での免疫を司るマイクログリアの LPS で誘導される炎症性サイトカインの誘導を抑制することを見出した。今後さらに脳低温療法の効果の向上に寄与する方策を検討したい。

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 25 件)

1. S Yoshizawa, Yoshihito Fujita, et al. Effect of maternal low-glucose during Cesarean section neonatal hypoglycemia. J Anesthesiol Cli Sci. 2018; 7: 2.
2. M Hoshika, Y Fujita, et al. Effect of 2- or 4-hour oral intake restriction on intraoperative intravascular volume optimization using stroke volume variation analysis: A single-blinded randomized control trial. Korean J Anesthesiol. 2017 ; 71; 239-41.
3. M So, S Yoshimura, Y Fujita, et al.. Early Enteral Nutrition is Acceptable in Cyanotic Patients with Systemic-Pulmonary Shunt after Cardiovascular Surgery. J Reg Anesth Intensive Care. 2017; 1: 1-4
4. Y Fujita, et al. Effect of different surgery procedures on the accuracy of prediction of the plasma concentration of fentanyl: compareson between mastectomy and laparoscopic prostatectomy. JA Clinical Reports. 2017; 3:30
5. M Okumura, A Ujjiro, Y Otsuka, H Yamamoto, SWada, H Iwata, T Kan, S Miyauchi, A Hashimoto, Y Sato, Y Fujita, Y Fujiwara, H Shimaoka. Cardiac arrest caused by rapidly increasing ascites in a patient with TAFRO syndrome: a case report. Acute Medicine & Surgery 2017 4:344-348
6. Y Fujita, et al. Correlations between dosage and plasma dexmedetomidine concentrations in critically ill infants: a prospective, observational cohort study. Korean J Anesthesiol. 2017 ; 70: 426-433
7. K Miyake, Y Fujita, et al. Effects of landiolol on refractory tachyarrhythmia after total cavopulmonary connection: a retrospective, observational, cohort study. J Anesth. 2016; 30:331-6.
8. S Yoshimura, Y Fujita, et al. A short fasting before surgery conserves basal metabolism and suppresses catabolism according to indirect calorimetry performed under general anesthesia. J Anesth. 29:453-456 2015.
9. H Kinoshita, N Hatakeyama, Y Fujita, Y Fujiwara. Leak in Perseus™ workstation after complete check sequences. J Clin Anesth. 2015 27(4):367-8
10. Y Fujita, et al. Estimation of the success rate of anesthetic management for thymectomy in patients with myasthenia gravis treated without muscle relaxants: A retrospective observational cohort study. J.Anesth, 2015 29:794-7
11. Y Fujita, et al. Clinical usefulness of blood lactate level as a prognostic indicator comparing with Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II

- scores: A retrospective, observational, cohort study. *Nagoya Medical Journal* 2015 54:89-99
12. Oncolytic Reovirus Combined with Trastuzumab Enhances Antitumor Efficacy through TRAIL Signaling in Human HER2-Positive Gastric Cancer Cells. Shingo H, Mori M, Aoyama M, Kataoka M, Tanaka M, Ebi M, Kubota E, Mizoshita T, Tanida S, Johnston RN, Asai K, Joh T. *Cancer Lett* 356 (2): 846–54, 2015.
 13. Regulation of Store-Operated Ca²⁺ Entry Activity by Cell Cycle Dependent up-Regulation of Orai2 in Brain Capillary Endothelial Cells. Hiroaki K, Yamamura H, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Asai K, Imaizumi Y. *Biochem Biophys Res Commun* 459 (3): 457–62, 2015.
 14. Stimulation of Neuronal Cells by Culture Supernatant of T Lymphocytes Triggered by Anti-CD3 mAb Followed by Propagation in the Presence of Interleukin-2. Masae I, Okada A, Asai K, Kojima K, Okada H. *Microbiol Immunol* 60 (1): 47–55, 2016.
 15. Hypoxic Stress up-Regulates Kir2.1 Expression and Facilitates Cell Proliferation in Brain Capillary Endothelial Cells. Hideto Y, Suzuki Y, Yamamura H, Asai K, Imaizumi Y. *Biochem Biophys Res Commun* 476 (4): 386–92, 2016.
 16. CXCR4⁺CD45⁻ Cells Are Niche Forming for Osteoclastogenesis via the SDF-1, CXCL7, and CX3CL1 Signaling Pathways in Bone Marrow. Goto Y, Aoyama M, Sekiya T, Kakita H, Waguri-Nagaya Y, Miyazawa K, Asai K, Goto S. *Stem Cells* 34 (11): 2733-2743, 2016.
 17. Mineralocorticoid Receptor Stimulation Induces Urinary Storage Dysfunction via Upregulation of Epithelial Sodium Channel Expression in the Rat Urinary Bladder Epithelium. Seiji Y, Hotta Y, Maeda K, Kataoka T, Maeda Y, Hamakawa T, Sasaki S, Yasui T, Asai K, Kimura K. *J Pharmacol Sci* 130 (4): 219–25, 2016.
 18. A Diagnostic Marker for Superficial Urothelial Bladder Carcinoma: Lack of Nuclear ATBF1 (ZFHX3) by Immunohistochemistry Suggests Malignant Progression. Makoto K, Hara N, Bilim V, Koike H, Suzuki M, Kim TS, Gao N, Dong Y, Zhang S, Fujinawa Y, Yamamoto O, Ito H, Tomita Y, Naruse Y, Sakamaki A, Ishii Y, Tsuneyama K, Inoue M, Itoh J, Yasuda M, Sakata N, Jung CG, Kanazawa S, Akatsu H, Minato H, Nojima T, Asai K, Miura Y. *BMC Cancer* 16 (1): 805, 2016.
 19. Expression and Subcellular Localization of AT Motif Binding Factor 1 in Colon Tumours. Hiromi K, Miura Y, Kawaguchi M, Suzuki S, Okamoto Y, Ozeki K, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Asai K, Joh T. *Mol Med Rep* 16 (3): 3095–3102, 2017.
 20. Do Mesenchymal Stem Cells Derived From Atypical Lipomatous Tumors Have Greater Differentiation Potency Than Cells From Normal Adipose Tissues? Hiroyuki I, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Takeuchi A, Miwa S, Higuchi T, Abe K, Taniguchi Y, Yamada S, Asai K, Otsuka T, Tsuchiya H. *Clin Orthop Relat Res* 475 (6): 1693–1701, 2017.
 21. Neuroprotective Erythropoietin Attenuates Microglial Activation, Including Morphological Changes, Phagocytosis, and Cytokine Production. Tamura, T, Aoyama M, Ukai S, Kakita H, Sobue H, Asai K. *Brain Res* 1662: 65–74, 2017.
 22. Mithramycin Has Inhibitory Effects on

Gliostatin and Matrix Metalloproteinase Expression Induced by Gliostatin in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes. Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Oguri Y, Ikuta K, Kobayashi M, Nozaki M, Asai K, Aoyama M, Otsuka T. *Mod Rheumatol*, 2017. doi: 10.1080/14397595.2017.1350332.

23. 磯部英男、藤田義人 チェックリストを用いたブリーフィングの導入と、早期リハビリテーションに与える影響 *日救急医学会誌* 2018; 29: in press
24. 小宮良輔、吉澤佐也、幸村英文、藤田義人、祖父江和哉：重症患者におけるNT-proBNP 簡易迅速測定装置の測定値の妥当性 *Cardiovascular Anesthesia* 2015;19:21-24
25. 仙頭佳起、竹内直子、太田晴子、佐野文昭、上村友二、藤田義人、祖父江和哉：大学病院 ICU における最近 5 年間の小児 veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation の稼働実績と今後の課題 *日集中医誌* 2015;22:505-11

〔学会発表〕(計 28 件 国際学会 10 件のみ記載 国内 18 件)

1. Takeuchi Y, Fujita Y, Shimomura T, Kurokawa S, Noguchi H, Fujiwara Y. Anesthetic management of a patient with congenital insensitivity to pain and anhidrosis using remifentanyl. 2018 Annual Meeting of the European Anesthesiology (ESA) in Copenhagen, Denmark. June 1-3, 2018
2. Hashimoto A, Ishihara R, Fujita Y, Fujiwara Y. Hypothermia during general anesthesia was associated with the postoperative delirium after endovascular repair of aortic aneurysm. 2018 Annual Meeting of the European Anesthesiology

(ESA) in Copenhagen, Denmark. June 1-3, 2018

3. Takayanagi H, Tanaka K, Sato Y, Fujita Y, Fujiwara Y: Programmed intermittent bolus infusion reduces phrenic paralysis associated with interscalene block. Annual Meeting of American Society Anesthesiologist, Boston, MA, USA, October 21-25, 2017
4. Hashimoto A, Takayanagi H, Kanamori H, Sato Y, Fujita Y, Fujiwara Y: Continuous rectus sheath block provides effective analgesia after breast reconstruction with free abdominal flap. Annual Meeting of American Society Anesthesiologist, Boston, MA, USA, October 21-25, 2017
5. Tanaka K., Sakakibara K., Hashimoto A. Feng G.G., Fujita Y., Fujiwara Y. Inhibition of T-type Ca²⁺ channel induces human neuroblastoma cell death and enhances neurotoxicity of bupivacaine. 2017 Annual Meeting of the European Anesthesiology (ESA) in Geneva, Switzerland. June 3-5, 2017.
6. Tanaka K., Shikata Y., Fujita Y., Hashimoto A., Sato Y., Fujiwara Y. Programmed intermittent bolus infusion for interscalene block reduces the incidence of phrenic paralysis on the first postoperative day in patients having shoulder surgery. 2017 Annual Meeting of the European Anesthesiology (ESA) in Geneva, Switzerland. June 3-5, 2017
7. Ono Y., Fujita Y., Hashimoto A., Sato Y., Fujiwara Y. The long-term efficacy and safety of rocuronium and sugammadex in patients undergoing renal transplantation. 2017 Annual Meeting of the European Anesthesiology (ESA) in Geneva, Switzerland. June 3-5, 2017.

8. Fujita Y., Kajiura T., Hashimoto A., Sato Y., Fujiwara Y. Comparison between refraining from using neuromuscular blockade and using neuromuscular blockade with sugammadex in perioperative management of the patients with myasthenia gravis. 2016 Annual Meeting of the European Anesthesiology (ESA) in London, England. May 28-30, 2016.
9. Fujita Y., Inoue K., Yoshizawa S., Sakamoto T., Toyooka T., Sobue K. Discrepancy of correlation for dosage of long-term administration of dexmedetomidine and plasma concentrations between adults and infants (< 10 kg) in critically ill patients. 2015 Annual Meeting of the European Anesthesiology (ESA) in Berlin, Germany. May.30-June 2,2015. *Eur J Anaesthesiol* 2015; 32, supplement 53:336.
10. Miyake k., Fujita Y. Miyazu M., Hirate H., Sugiura T., Sobue K. Efficacy and safety of landiolol for the management of postoperative tachyarrhythmia in patients treated with the Fontan procedure. 2015 Annual Meeting of the European Anesthesiology(ESA) in Berlin, Germany. May.30-June 2,2015. *Eur J Anaesthesiol* 2015; 32, supplement 53:229.

〔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〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 義人 (FUJITA Yoshihito)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：90238593

(2)研究分担者

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