

平成 21 年 5 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18390432
研究課題名（和文） 水チャネル<アクアポリン>を標的とした新しい脳浮腫治療法の開発
研究課題名（英文） Aquaporin as a target of a new therapy for brain edema
研究代表者
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

研究成果の概要：水チャネルであるアクアポリン（AQP）は、赤血球において水を特異的に通過させるチャネルである。脳には AQP4 が豊富に発現しており、AQP4 が脳浮腫に深く関与している可能性が示唆されている。本研究により、アストロサイトにおいて RIL（reversion-induced LIM）が AQP4 と結合し、AQP4 の細胞内分布や機能を調節している可能性がある。新規脳浮腫治療法への応用が期待できる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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：中枢神経、脳浮腫、アストロサイト、水チャネル

1. 研究開始当初の背景

水チャネルであるアクアポリン（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。ほ乳類ではAQP0からAQP12の13種類が同定されており、様々な臓器に発現し、水の移動の調節、細胞容積の調節、ホルモンの分泌などに関与している。申請者は、脳において多種類のAQPが発現し、特にアストロサイ

ト（星状細胞：Ast）にはAQP3、AQP4、AQP5、AQP8、AQP9が発現していることを報告し、脳においてAQPは水の移動だけでなく、様々な機能を持っている可能性を見出していた（Yamamoto *et al.*：Mol Brain Res, 2001）。

一方、脳浮腫は頭部外傷、脳血管障害、脳腫瘍など様々な病態に随伴して発症し、しばしば致命的となる。その病態は、Ast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。しかし、その発生機序は十分には解明されていなかった。

当時、いくつかの報告や申請者の研究により、AQP が脳浮腫に深く関与している可能性が示唆されていた。浮腫発生初期には、AQP の機能異常は脳浮腫の発生や進行に関与していると考えられるが、AQP の機能異常を引き起こす機序は不明であった。当初、申請者はタンパク質-タンパク質結合を行う分子 RIL (reversion-induced LIM) が AQP4 と結合し、AQP4 の細胞内分布や機能を調節している可能性を発見しており、RIL が細胞内における AQP4 の位置決めや膜への固定に役立っている可能性を見出していた。

2. 研究の目的

本研究では、まず、脳における RIL の発現を確認し、脳における分布を詳細に検討する。次に、RIL と AQP4 とが特異的に結合することを明らかにする。また、AQP4 と RIL との結合を詳細に検討し、AQP4 の機能調節に RIL が果たす役割を明らかにする。さらに、AQP4 の発現を調節することにより新しい脳浮腫治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ウェスタンブロッティング

P1 ラット脳の培養アストロサイトと、メス成体 Wistar ラット脳を組織サンプルとして使用。一次抗体は、ウサギ抗 AQP4 抗体、ヤギ抗 RIL 抗体、マウス抗 GFAP 抗体を使用。

(2) 免疫染色

免疫染色に 4 週齢のオス Wistar ラットを使用。3%PFA で灌流固定後に組織を摘出し、OCT compound 包埋。凍結切片を作成して免疫染色に使用。切片を洗浄後 2%BSA でブロッキングし RIL 抗体を反応させる。4℃で一晩インキュベート後に二次抗体を反応させ、洗浄後に続けて AQP4 または GFAP で多重染色を行う。最後に DAPI で核染色し封入。蛍光顕微鏡で観察。

4. 研究成果

(1) 脳、特にアストロサイトにおける RIL の発現

ラット全脳と培養アストロサイトに対し RIL 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、RIL 分子量である 37kDa のバンドが得られた。この結果から、RIL 抗体の

特異性と、脳、特にアストロサイトでの RIL タンパクの存在が示された。

アストロサイトにおける RIL の発現の報告はこれまでに存在しない。

(2) 脳における RIL の発現分布

次にラット中枢神経系において、免疫染色法で RIL タンパクの局在を検討した。大脳では上皮細胞とアストロサイトで RIL 陽性であった。小脳ではプルキンエ細胞と顆粒層の細胞で RIL 陽性であった。脳幹では、RIL は第四脳室周囲の上皮細胞で強発現しており、血管にも発現が認められた。一部の神経細胞で RIL は強く発現していたが、この部位のアストロサイトにはほとんど発現がみられなかった。脊髄では RIL は中心管周囲の上皮細胞で強く発現していた。アストロサイトも RIL 陽性であった。

ある種の神経細胞には RIL mRNA が存在することが知られているが、その発現レベルは細胞間で一定である。しかし本実験結果では、個々のプルキンエ細胞間で RIL タンパクの発現レベルが異なっていた。これは mRNA レベルとタンパクレベルでの発現制御メカニズムが異なるためかもしれない。またこのような神経細胞間の RIL タンパク発現の違いは、神経細胞の機能ごとに異なる制御システムが存在するためかもしれない。

アストロサイトは RIL 陽性であったが、この発現レベルはアストロサイトの存在部位によって異なっていた。これについては今後検討の余地がある。

(3) AQP4 と RIL の共存

AQP4 は血管周囲やグリア境界のアストロサイト終足に強く発現していた。RIL と AQP4 の共染色の結果、RIL は GFAP 陽性で AQP4 が終足に強く発現しているタイプのアストロサイトの細胞質に存在していることが分かった。視床では第三脳室周囲の上皮細胞で RIL 陽性であった。AQP4 との共染色の結果、RIL は第三脳室側壁周囲の血管に存在するが、上方の壁周囲の血管にはほとんど存在しないことが分かった。

RIL は PDZ domain を介した alpha-actinin と結合することから、中枢神経系において細胞骨格の調節に関与している可能性がある。アストロサイトでは、AQP4 の発現がアクチンによって制御されていることが知られているため、RIL は AQP4 発現調節にも関与している可能性がある。

(4) 今後の方向性

RIL のノックアウトマウスは、現在作成準備を進めているところであり、今後も継続していく予定である。RIL の機能を破壊するこ

とにより、AQP4 の発現分布や機能がどのように変化するかを検討する。

RIL の発現を調節することにより、AQP4 の発現と機能を調節できれば、新たな脳浮腫治療方法の開発へのヒントになりうると考える。

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 Iida Y, 他 6 名 5 番目: Localization of reversion-induced LIM protein (RIL) in the rat central nervous system. *Acta Histochem Cytochem.* 42: 9-14, 2009. 査読あり
- ② 高柳猛彦、祖父江和哉: アクアポリンと脳浮腫治療. *臨床検査増刊号* 52: 1366, 2008.
- ③ Morishima M, 他 11 名 11 番目: Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neuroscience Res* 61: 18-26, 2008. 査読あり
- ④ 祖父江和哉: 脳浮腫の発生機序と水チャネル・アクアポリン. *日本臨床* 64: 1181-1189, 2006, 査読なし
- ⑤ Ito H, Yamamoto N, Hirate H, Morishima T, Umenishi F, Tada T, Asai K, Katsuya H, Sobue K: Interleukin-1 β induces the expression of aquaporin-4 through a NF- κ B pathway in rat astrocytes. *J Neurochem* 99: 107-118, 2006, 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- ① 祖父江和哉、他 4 名: 乳酸アシドーシスは水チャネル<アクアポリン>のアストロサイト細胞膜への集積を促進する. 第 31 回日本神経科学大会 2008. 7. 11 東京.
- ② 祖父江和哉: <一般シンポジウム創薬ターゲットとしての水チャネル>脳疾患の病態生理とアクアポリン. 日本薬学会第 128 回年会 2008. 3. 26 横浜.
- ③ 祖父江和哉: <シンポジウム 膜輸送分子から見た臨床へのアプローチ>脳浮腫とアクアポリン. 第 37 回日本腎臓学会東部学術大会 2007. 10. 6 埼玉.
- ④ 祖父江和哉: <シンポジウム 膜輸送分子から見た臨床へのアプローチ>脳浮腫とアクアポリン. 第 37 回日本腎臓学会東部学術大会 2007. 10. 6 埼玉.
- ⑤ Takeshi Sugiura, 他 8 名 4 番目: Ultrasound examination and localization

of the sacral hiatus. 4th World Congress of the World Institute of Pain (WIP) 2007. 9. 26 Budapest, Hungary.

- ⑥ 飯田裕子、祖父江和哉、他 6 名: 乳酸アシドーシスは培養アストロサイトにおける水チャネルアクアポリン 4 の発現を増加させる. 第 71 回日本生化学会中部支部会例会・シンポジウム 2007. 5. 19 名古屋.
- ⑦ 森島徹朗、祖父江和哉、他 5 名: Lactic acidosis induces expression of aquaporin 4 in rat astrocytes. 第 49 回神経化学会大会 2006. 9. 14 名古屋.
- ⑧ 祖父江和哉、勝屋弘忠: 若手講演会 脳浮腫における水チャネル<アクアポリン>の機能とその調節機構. 日本麻酔科学会第 53 回学術集会 2006. 6. 3 神戸.
- ⑨ 平手博之、祖父江和哉、他 4 名: マニトールによる水チャネル aquaporin4 を介した脳浮腫治療効果の発現機序. 日本麻酔科学会第 53 回学術集会 2006. 6. 1 神戸.
- ⑩ 伊藤弘晃、祖父江和哉、他 4 名: Interleukin-1 β による水チャネル aquaporin 4 発現の誘導 (第 3 報) 脳浮腫形成のメカニズムの解明をめざして. 日本麻酔科学会第 53 回学術集会 2006. 6. 1 神戸.

[図書] (計 3 件)

- ① 祖父江和哉: 血液脳関門と脳浮腫. 「For Professional Anesthesiologists- 脳保護・脳蘇生」 編集坂部武史 克誠堂出版 PP31-40, 2008.
- ② 祖父江和哉: 3.3 病気と水代謝 腫瘍. 編集佐々木成、石橋賢一 「水とからだの事典」 朝倉書店 PP126-130, 2008.
- ③ 祖父江和哉: 2.1 人の臓器での水輸送とその異常 脳. 編集佐々木成、石橋賢一 「水とからだの事典」 朝倉書店 PP241-244, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

- ① NHK サイエンス ZERO 第 185 回<体をうるおす謎の穴 アクアポリン> 2007. 11. 10 放送

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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
杉浦 健之 (SUGIURA TAKESHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20295611

(3) 連携研究者