

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591714
 研究課題名（和文） RNAi を用いた軽度低温の脳浮腫抑制効果に果たす水チャンネル機能の解析
 研究課題名（英文） analysis of water channel function to decrease of brain edema caused by mild hypothermia with using RNAi technique
 研究代表者
 藤田 義人（FUJITA YOSHIHITO）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：90238593

研究成果の概要：今後の研究の基礎となるアクアポリン（AQP）Knockdown 細胞株の確立を重点に行った。Knockdown が確認されている construct に加えオリジナルのものを作成した。vector には、invitrogen 社製の Block-IT Pol II miR RNAi expression vector、pcDNA 6.2-GW/miR を使用した。そのプラスミドを大腸菌に transformation して、大量培養し、Qiagen 社のキットを用いて、目的となる construct を含むプラスミドを大量に、無菌的に精製した。RNAi の効果を確認するが効果が弱く、原因の追求のため GFP を vector に挿入した。その GFP つきの vector の挿入で、視覚的におおざっぱにいて 20% ぐらいの transfection 効率があることを確認した。ただ RNAi 効果をえる効率は、まだ 10% 程度にとどまった。transfection 効率をあげるためレンチウイルスを使用した vector の作製を進めると同時に、現在作成してある GFP つき vector を用い。実際の低温における脳浮腫効果の解明を始めている。また、同時に疾患の重傷度の指標として注目している乳酸値について、乳酸負荷でのアストロサイトにおける水チャンネルの発現の変化についても解析し、論文発表した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：水チャンネル、脳浮腫、RNAi、アクアポリン、脳低温

1. 研究開始当初の背景

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、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。脳浮腫の発生機構については、多くの研究が

なされているが、いまだ十分に解明されたとは言えない。申請者らは水チャンネルであるアクアポリン（AQP）と脳浮腫との関連について注目し研究を進めてきた。中枢神経系においてアストロサイトに主に存在し、脳浮腫の発生あるいは治癒に関与するとして報告は、申請者らの研究も含め数報あるものの、脳低

温による脳浮腫軽減効果の機序を AQP 機能に求めた報告は申請者らの論文のみである。

2. 研究の目的

本研究では、比較的新しい手法である RNA interference (RNAi) を用いて、はじめに、AQP を knockdown したアストロサイトを確立し、その細胞に AQP の遺伝子の一部を変化させた mutant 遺伝子を導入した時に AQP の機能、局在等がどのように変化するかを詳細に検討する。次に、AQP を knockdown したアストロサイトや mutant AQP を発現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におけるアストロサイトの機能変化を調べる。これらの結果を総合し、アストロサイトに発現する AQP の発現変化、機能変化が、脳浮腫の発生および治療にどのように関わっているかを明らかにし、AQP 発現機能調節を主眼においた脳浮腫発生、治療機構の解明を目指す。その効果機序の点より、それに相乗効果のある薬剤を見出し、併用の効果の可能性を模索する。

3. 研究の方法

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

RNAi を用いて、アストロサイトに強く発現し、脳浮腫との関係が強く示唆されている AQP4 および AQP9、さらに、AQP4 と AQP9 同時に knockdown した、アストロサイトの cell line を確立する。我々はすでに、Transient に導入した double-stranded RNA (dsRNA) による AQP4 の knockdown には成功している。また、同時に knockdown とは逆に、AQP4 または AQP9、さらに、AQP4 と AQP9 両者を過剰発現 (overexpression) した cell line の確立も行う。

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

Rescue experiments として二つの方法を計画している。一つは、knockdown した cell line に正常の AQP cDNA を遺伝子導入することで、knockdown によって生じた細胞の phenotype (下記 3 で観察) が wild-type に戻ることを確認する。もう一つは、いろいろな mutation を導入した AQP4 または AQP9 の cDNA を遺伝子導入し、細胞の phenotype や AQP の機能、局在を観察する。Mutation の違いで、AQP の機能、局在に差が出れば、AQP の分子内での部位別の機能解析につながる。

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

申請者らは、これまでに低酸素負荷時における wild-type アストロサイトの形態変化、培養液中の pH、pO₂、pCO₂、base excess (BE)、lactate、glucose の変化を調べ報告した。本

実験では、AQP knockdown および overexpression の cell line に同様の低酸素負荷を行った場合、細胞形態や培養液中の指標がどのように変化するかを観察し、AQP の細胞機能における役割を調べる。

(4) 軽度低温環境が、低酸素負荷時の AQP knockdown、overexpression 細胞株の phenotype に与える影響

申請者らはこれまでに 32°C の中等度低温が、wild-type アストロサイトの低酸素負荷に対し細胞保護的に働いていることを確認している。本実験では、まず軽度低温 (34°C) にしたときに、細胞保護効果がどう変化するかを確認する。その後、中等度 (32°C) と軽度低温環境下 (34°C) で AQP を knockdown および overexpression したアストロサイトに低酸素負荷を行い、細胞障害の程度を検討する。もし、AQP4 と AQP9 単独もしくは AQP4 と 9 同時 knockdown 細胞株、または overexpression 細胞株になんらかの保護効果の違いがあれば、AQP の浮腫発生機構と脳低温療法における役割が明らかになるばかりでなく、今後、脳浮腫の治療方法の指針に影響を与えうると考えられる。これらの結果をもとに、AQP の機能調節による新しい脳浮腫治療法確立への手掛かりとしたい。

4. 研究成果

今後の研究の基礎となるアクアポリン (AQP) Knockdown 細胞株の確立を重点に行った。

Knockdown が確認されている construct を作成したうえ、vector に導入した。shRNA を発現する vector には、神経系の細胞の RNAi で定評のある invitrogen 社製の Block-IT Pol II miR RNAi expression vector、pcDNA 6.2-GW/miR を使用した。そのプラスミドを大腸菌に transformation して、大量培養し、Quiagen 社のキットを用いて、目的となる construct を含むプラスミドを大量に、無菌的に精製した。

アストロサイトに transfection する方法として、リポフェクションを利用した、Trans-IT Neural を使用した。ただ、transfection をおこない RNAi の効率が非常に悪く、10% 以下となっている。このことに関して、transfection 効率の最もよくなると考えられる条件を、medium の組成や、transfection reagent の量、vector の量などの最適条件を検討中した。ウエスタンで RNAi の効果を確認するが効果が弱く、原因が① transfection の効率が悪い② 実際の RNAi がうまくいっていないかははっきりわからなかった。そこで、その原因追求のため、transfection 効率を視覚的に確認するため vector に GFP をつけることを試みた。GFP を vector に挿入した。そして GFP をつけた

vector を大量制作した。

その GFP つきの vector の挿入で、視覚的におおざっぱにあって 20% ぐらいの transfection 効率があることを確認した。ただ RNAi 効果をえる効率は、まだ 10% 程度にとどまった。transfection 効率をあげるためレンチウイルスを使用した vector の作製を進めると同時に、現在作成してある GFP つき vector を用い、実際の低温における脳浮腫効果の解明を始めている。

また、同時に疾患の重傷度の指標として注目している乳酸値について、乳酸負荷でのアストロサイトにおける水チャンネルの発現の変化についても解析し、論文発表した。

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 9 件)

1. Yoshihito Fujita, Akinori Takeuchi, Takeshi Sugiura, Tomonori Hattori, Nobuko Sasano, Yuichiro Mizuochi, Kazuya Sobue, Before-after study of a restricted fluid infusion strategy for management of donor hepatectomy for living donor liver transplantation. *J. Anesth*(in press), 2009 査読有

2. Morishima T, Aoyama M, Iida Y, Yamamoto N, Hirate H, Arima H, Fujita Y, Sasano H, Tsuda T, Katsuya H, Asai K, Sobue K. Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res.* 2008 May;61(1):18-26. Epub 2008 Jan 17. 査読有

3. Fujita Yoshihito, Xu A, Xie L, Arunachalam L, Chou TC, Jiang T, Chiew SK, Kourtesis J, Wang L, Gaisano HY, Sugita S. Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 1 is critical for constitutive and regulated exocytosis but not for loading of transmitters into dense core vesicles. *J Biol Chem.* 2007 Jul 20;282(29):21392-403 査読有

4. Arunachalam L, Han L, Tassew NG, He Y, Wang L, Xie L, Fujita Y, Kwan E, Davletov B, Monnier PP, Gaisano HY, Sugita S Munc18-1 Is Critical for Plasma Membrane Localization of Syntaxin1 but Not of SNAP-25 in PC12 Cells. *Mol Biol Cell.* 2008 Feb;19(2):722-734. Epub 2007 Dec 12. 査読有

5. Nobuko Sasano, Hiroki

Yamauchi, Yoshihito Fujita. Failure of the Airway Scope to reach the larynx. *Can J Anesth* 2007 54:9:775 査読有

6. Nobuko Sasano, Yoshihito Fujita, MinHye So, Kazuya Sobue, Hiroshi Sasano and Hirotada Katsuya. Anesthetic management of a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) during laparotomy. *J. Anesth* 21:72-5, 2007 査読有

7. Fujita Yoshihito, Sobue K, Hattori T, Takeuchi A, Tsuda T, Katsuya H: Inadvertent intrathecal cannulation in an infant demonstrated by three-dimensional computed tomography: a rare complication of internal jugular vein catheterization. *J. Anesthesia* 20:122-5, 2006 査読有

8. Ito H, Sobue K, So M, Hirate H, Sugiura T, Azami T, Fujita Y, Sasano H, Katsuya H. Intra-operative monitoring of vagal nerve activity with wire electrodes. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006 Nov;50(10):1304-5 査読有

9. 藤田義人、森島徹朗、祖父江和哉、勝屋弘忠: 硬膜外麻酔併用全身麻酔時に必要な最小限セボフルラン濃度の検討: 神経麻酔・集中治療プロシーディング 2006:29-30, 2006 査読無

[学会発表] (計 5 件)

① Yoshihito Fujita, Eisuke Kako, Yuichiro Mizuochi, Hironobu Iguchi, Kazuya Sobue. Investigation of blood lactate as an indicator for severity of a child undergone cardiac surgery. 2008.10.18-22 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (ASA) in Orland, Florida.

② Yoshihito Fujita, Tae Kato, Hirotada Katsuya.: Investigation of blood lactate level as indicator for severity assessment. The 6th International Shock Congress in Cologne, Germany 2008.6.28-7.2

③ Yoshihito Fujita, Hiroki Yamauchi, Masato Morita, Rina Kato. Minimum concentration of sevoflurane for adequate sedation with combined General-epidural anesthesia. 2007.10.13-17 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (ASA) in San Francisco

④ Fujita Yoshihito, Sobue Kazuya,

Morishima Tetsuro, Asai Kiyofumi.
Effect of mild hypothermia on the
expression of aquaporin family in
cultured rat astrocytes under hypoxic
condition. the 5th International
Conference of Aquaporin in Nara,
Japan 2007.7.13-16

- ⑤ Fujita Yoshihito, Katsuya Hirotsuda.:
Restricted-Volume Replacement Reduces
Blood Loss during Donor Hepatectomy for
Liver Transplantation. 2006 Annual Meeting
of the American Society of
Anesthesiologists (ASA) in Chicago
2006.10.16-20

[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

藤田 義人 (FUJITA YOSHIHITO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

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

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

(3) 連携研究者

なし