

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19791079

研究課題名 (和文) アシデミアが蘇生後脳症における脳浮腫に与える影響—水チャネルの機能に注目して—

研究課題名 (英文) Influences of acidemia on brain edema in hypoxic-ischemic encephalopathy through water channel

研究代表者

森島 徹朗 (MORISIMA TETHUROU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10448714

研究成果の概要 (和文)：

心肺蘇生後の脳障害の予防は困難であり、特に脳浮腫の発生は神経学的予後を悪化させる。本研究では、脳浮腫に関与するアクアポリン 4 (AQP4) の機能が蘇生後によく見られるアシドーシスによってどうなるか検討した。結果、乳酸濃度の増加とともに、また経時的に AQP4 のタンパク質量は細胞膜に著しく増加することを確認した。本現象は、AQP4 蛋白質の分解の抑制に関連している可能性が示唆され、脳における AQP4 発現制御機構であると考えられた。この AQP4 増加は、脳浮腫の促進に機能しているのかあるいは保護的な機能を果たしているのかは不明であり、今後の検討が必要である。

研究成果の概要 (英文)：

The water channel protein aquaporin (AQP) may play roles in the homeostasis of water content in the brain and brain edema. One possible mechanism of brain edema is glial swelling due to lactic acidosis associated with ischemia. Here, we investigated the effect of lactic acid on the expression and cellular distribution of AQP 4 in cultured rat astrocytes. After 24h of incubation, the AQP4 expression level increased maximally with 35mM lactic acid. The AQP4 expression levels also increased with hydrochloric acid or acetic acid. In contrast, with sodium lactate, the AQP4 levels did not increase. The increase in AQP4 expression level occurred without a significant increase in AQP4 mRNA expression level by lactic acid. Under the conditions of de novo protein synthesis inhibition with cycloheximide, lactic acid increased the AQP4 expression level. Furthermore, lactic acid increased the AQP4 expression level on the cell surface of the astrocytes, as determined by a cell surface biotinylation assay and immunocytochemical examination. The increase in AQP4 expression level on the cell membrane of astrocytes induced by lactic acid may be a new regulation mechanism of AQP4 in the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

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：心肺蘇生、中枢神経、脳浮腫、水チャネル

1. 研究開始当初の背景

近年、蘇生に成功した心肺停止患者の予後については、単に心拍の再開だけでなく、脳機能の維持や完全社会復帰が求められるようになってきている。蘇生後脳症は強い脳浮腫を伴い、神経学的予後を悪化させる可能性があり、その予防や治療はたいへん重要である。2005 American Heart Association Guidelines for cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Careによれば、心肺蘇生時のアシデミアは許容することとなっているが、脳に対する影響は明確ではない。アシデミアの存在はフリーラジカル産生を亢進したり、DNA障害を惹起したり、細胞内情報伝達を妨げるなど様々な障害を発生する可能性がある。また、乳酸アシドーシスにより神経細胞やグリア細胞のアストロサイト(Ast)が細胞死を来すことが知られている。さらに、乳酸アシドーシスにより細胞膜上のNa⁺/H⁺対向輸送体を介して細胞内にNa⁺が蓄積し、その結果としてAstの膨化、すなわち脳浮腫を生じることが知られている。一方、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ことがわかってきている。

2. 研究の目的

本研究では、AQP4が脳浮腫の発生に重要な役割を果たしているという立場から、乳酸アシドーシスがAQP4機能に与える影響を明らかにすることにより、アシデミアが脳浮腫に及ぼす影響や蘇生後の脳におけるアシデミアの許容範囲を明確にし、より良い蘇生後の中枢神経管理方法を見出すことを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いたin vitro乳酸アシドーシスモデルの確立

乳酸アシドーシスによる様々な影響を検討するために、簡便で繰り返し作成可能なin vitroモデル系を開発し、系の有効性を評価する。

すでに確立した方法(Yamamoto N *et al.*: Mol Brain Res, 2001)によりラット脳よりアストロサイト(Ast)を単離・培養し、乳酸を培養液に添加することにより細胞にアシドーシスを負荷する。実際に、培養液が酸性となっていること、細胞障害が起

こっていること、Astが膨張(=脳浮腫)することを確認する。細胞障害は、培養液中のLDH値の上昇と生細胞数の計測によって行う。また、細胞容積の測定は、Astに蛍光色素カルセインを取り込ませておき、培養液を低張液に急速に変化させることにより生じる細胞容積の増加を蛍光色素の希釈率により計算する。色素の蛍光強度は、倒立型蛍光顕微鏡(名古屋市立大学既存)により観察する。

(2) In vitro乳酸アシドーシスモデルにおけるAQP4機能の変化

(1)で確立したモデルにおいて、細胞容積の増加(=脳浮腫)にはAQP4の発現変化が関与することを確認するため、AQP4の発現変化を検討する。

培養Astに添加する乳酸濃度を変化させ、AQP4の発現量の変化をmRNAとタンパク質のレベルで検討する。mRNAは、定量的RT-PCRで行い、細胞より抽出したmRNAをcDNAに変換後PCRで増幅し、キャピラリー電気泳動(アジレント社DNAアナライザ:名古屋市立大学既存)にて定量する(Yamamoto N *et al.*: Mol Brain Res, 2001)。さらに、AQP4タンパク質量の定量は、ウエスタンブロット法によりAQP4タンパク質を特異抗体により可視化し、デンシトメトリーにより定量する(Yamamoto N *et al.*: Mol Brain Res, 2001)。

(3) AQP4ノックダウン細胞における乳酸アシドーシスによる細胞容積変化

(1)と(2)の検討から、乳酸アシドーシスによりAst内のAQP4の発現が増強し、AQP4を介して水が流入し、細胞が膨張すると仮定できる。

実際に、細胞の膨張にAQP4が関与していることを確認するため、iRNA技術を用いて細胞内のAQP4発現を抑制し(AQP4ノックダウン細胞)、この細胞に(1)と同様に乳酸アシドーシスを負荷し、細胞容積の変化を測定する。AQP4ノックダウンにより細胞容積の増加(=脳浮腫)が抑制されれば、乳酸アシドーシスによる脳浮腫にAQP4が関与していることが明らかとなる。

(4) 実験動物乳酸アシドーシスモデルにおけるAQP4機能の変化

(1)(2)(3)のin vitroの実験により、①乳酸アシドーシスによるAQP4発現増強や細胞容積増加

(=脳浮腫)、②逆にそれらが起こらない最大乳酸濃度(最低pH)が確認できれば、動物モデルにおいて同様の検討を行う。

心室細動誘発による心肺停止モデルや乳酸投与によるアシドーシスモデルを作成し、脳におけるAQP4発現量の変化および脳水分量の変化を検討する。実際にアシデミアが存在することを血液ガス分析により確認する。AQP4発現量は免疫組織染色・ウェスタンブロット法により確認する。脳水分量は、カールフィシャー水分測定器(名古屋市立大学既存)にて施行する。

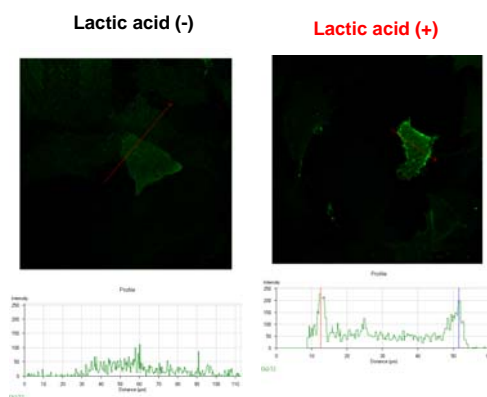
4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いたin vitro乳酸アシドーシスモデル

ラット脳より単離・培養したアストロサイトAstに、乳酸を培養液に添加してアシドーシスを負荷した。培養液の酸性化とともに細胞障害が強くなることを確認した。細胞容積は観察した24時間では大きな変化は認めなかった。

(2) In vitro乳酸アシドーシスモデルにおけるAQP4機能の変化

培養Astに添加する乳酸濃度を変化させ、AQP4の発現量の変化をmRNAとタンパク質のレベルで検討した。乳酸濃度の増加とともに、また経時的にAQP4のタンパク質量は増加した。AQP4 mRNAは変化がなかった。蛋白質量の増加は細胞膜に著しいことを確認した。本現象は、AQP4蛋白質の分解の抑制に関連している可能性が示唆された。



(3) AQP4 ノックダウン細胞における乳酸アシドーシスによる細胞容積変化

実際に、細胞の膨張にAQP4が関与していることを確認するため、iRNA技術を用いて細胞内のAQP4発現を抑制し(AQP4ノックダ

ウン細胞)、この細胞に(1)と同様に乳酸アシドーシスを負荷し、細胞容積の変化を測定することを計画した。AstにおけるAQP4ノックダウン細胞はほぼ確立できたので、今後はこの細胞に乳酸アシドーシスを負荷し、細胞の反応を検討する予定である。

(4) 実験動物乳酸アシドーシスモデルにおけるAQP4機能の変化

動物モデルにおけるアシドーシスのAQP4機能への影響を検討するため、様々な動物モデルの確立を目指した。心室細動誘発による心肺停止モデルの作成はほぼ確立することができた。今後、同モデルの脳におけるAQP4の機能を検討していく予定である。

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2件)

- ① Iida Y, Matsuzaki T, Morishima T, Sasano H, Asai K, Sobue K, Takata K: Localization of reversion-induced LIM protein (RIL) in the rat central nervous system *Acta Histochemica et Cytochemica*. 42(1): 9-14, 2009 査読あり
- ② Morishima M, Aoyama M, Iida Y, Yamamoto N, Hirate Hiroyuki, 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. *Neuroscience Research* 61(1) 18-26, 2008 査読あり

[学会発表] (計2件)

- ① 祖父江和哉, 森島徹朗, 他3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 飯田裕子, 祖父江和哉, 森島徹朗, 他5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.

[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〕

名古屋市立大学大学院医学研究科麻酔・危機
管理医学分野ホームページ URL
<http://www.ncu-masui.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森島 徹朗 (MORISIMA TETHUROU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10448714

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし