

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19791080

研究課題名 (和文) 水チャネル・アキアポリンを標的とした新規脳浮腫治療薬の開発

研究課題名 (英文) Aquaporin as a target of a new therapy for brain edema

研究代表者

山内 浩揮 (YAMAUCHI HIROKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00448713

研究成果の概要 (和文)：

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。近年、水チャネルであるアクアポリン4 (AQP4) が脳浮腫の発生に関与しているとの報告がなされている。培養アストロサイトをを用いた検討の結果、細胞内情報伝達系である P38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) と転写制御因子である NF- $\kappa$ B が AQP4 発現を制御している可能性を発見した。それぞれの阻害薬により、低酸素によるアストロサイトの障害が軽減される可能性を得た。これらの阻害薬は脳浮腫治療や脳障害治療へ応用できる可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：

The membrane pore proteins, aquaporins (AQPs), facilitate the osmotically driven passage of water and, in some instances, small solutes. AQPs play important roles in maintaining brain homeostasis. In this study, we observed that the expression of AQP4 was increased in cultured rat astrocytes through p38 MAPK or NF- $\kappa$ B. In addition, a p38 MAPK inhibitor, but not ERK and JNK inhibitors, and NF- $\kappa$ B inhibitors suppressed their expression in cultured astrocytes. NF- $\kappa$ B inhibitors and p38 MAPK inhibitor may protect astrocytes from the hypoxia-induced injury.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

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：脳浮腫、アクアポリン、アストロサイト、中枢神経

## 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。麻酔・集中治療の領域では、しばしば遭遇する病態であるにもかか

わらず、その発生機序も完全には解明されていない。また、治療法についても、依然として浸透圧利尿薬の投与や外減圧術などの対症的なものに限られている。

近年、水チャネルであるアクアポリン4

(AQP4)が脳浮腫の発生に関与しているとの報告がなされている。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。現在までに、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。申請者の研究室ではこれまでに、脳において多種類のAQPが発現し、水の移動や脳脊髄液の産生・吸収に関与していることを報告してきた(Sobue K *et al.*: Biochim Biophys Acta, 2000)。最近、申請者の研究室の報告により、脳損傷時のAQP4の発現増強が脳浮腫進行の原因である可能性が示唆され、発症機序解明へ大きな進歩となった(Yamamoto N *et al.*: Mol Brain Res, 2001 and Arima H *et al.*: J Biol Chem, 2003)。また、AQP4の機能を消失させたAQP4ノックアウトマウスを用いた研究では、脳損傷を起こした際の脳浮腫の程度が軽度であり、生存率も高くなった(Manley GT *et al.*: Nature Med, 2000)。これらの研究から、AQP4が浮腫の進行に関与することが明らかとなり、AQP4機能抑制が新しい脳浮腫治療法の標的になりうることを示唆される。

## 2. 研究の目的

理論的には、脳浮腫が発生するような状況に陥った場合に、AQP4の機能を抑制すれば、浮腫の進行を制御して、神経学的な予後を改善できると考える。AQP4機能を抑制する方法としては、AQP4に直接結合して阻害する物質を投与することが考えられる。しかしながら、申請者の研究室を含め、いくつもの研究室で開発が試みられているが、いまだに作成はできていない。そこで、AQP4の発現量を抑制し、機能を低下させる方法が第二の候補に挙げられる。本研究で

は、AQP4の発現量を制御することによる脳浮腫の新しい治療法開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) AQP4発現調節機構の解明とAQP4発現阻害薬の探索

AQP4の発現調節に重要な役割を果たす分子を明らかにし、その分子の阻害薬をAQP4発現阻害薬の候補とする。

まず、脳浮腫の発生に強く関与するアストロサイト(Ast)の培養系を用いて検討する。Astの単離・培養は、すでに確立しており、技術的には問題はない(Sobue K, Neurosci Res, 1999)。培養Astの培養液にP38 MAPK阻害薬SB203580あるいはNF- $\kappa$ B阻害薬SN-50、PSI、MG-132の4種薬剤(いずれも市販されている)をそれぞれ添加し、AQP4の発現抑制を転写レベル、mRNAレベル、タンパク質レベルで確認する。転写活性は、ルシフェラーゼアッセイを用いて行い、AQP4遺伝子のクローニングと必要なベクターの準備をした(Ito H *et al.*: J Neurochem, 2006)。また、mRNAは、定量的RT-PCRを行い、AQP4 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)にて定量した(Yamamoto N *et al.*: Mol Brain Res, 2001)。さらに、AQP4タンパク質量の定量は、ウェスタンブロット法によりタンパク質を可視化し、デンシトメトリーにより定量する(Yamamoto N *et al.*: Mol Brain Res, 2001)。

### (2) 培養アストロサイトを用いたin vitro脳浮腫モデルの確立

AQP4発現阻害薬の脳浮腫抑制効果の確認を行うために、評価システム(=モデル)を開発する。モデルには、培養Astを用いた単純で繰り返し実験できる系の開発を目指

す。

Ast の膨張を脳浮腫のひとつの表現系ととらえ、細胞の容積を細胞内に取り込ませた蛍光色素の濃度の測定により数値化する。同様の方法に関する報告はいくつか存在するが、Verkman らの方法は Ast を用いており、十分に参考にできる (Solenov E et al.: Am J Physiol Cell Physiol, 2004)。カバーガラス上に Ast を培養し、蛍光色素であるカルセインを培養液に添加して細胞内へ取り込ませ、その後カルセインなしの培養液に戻す。倒立蛍光顕微鏡 (名古屋市立大学既存) にカバーガラスをセットし、培養液を低張液にすばやく置換すると、細胞へ水が流入して容積が増加し、カルセインの蛍光強度が低下する。蛍光強度の変化率が細胞容積の変化率として計算できる。以上を細胞容積測定装置とする。

### (3) In vitro 脳浮腫モデルにおける AQP4 発現阻害薬の脳浮腫抑制効果の確認

(2) で確立した in vitro 脳浮腫モデルを用いて、AQP4 発現阻害薬が実際に脳浮腫抑制効果を発揮することを確認する。培養 Ast に低酸素障害を加える際に、(1) で候補とした AQP4 発現阻害薬を同時に投与し、(2) の細胞容積測定装置により細胞容積増加が抑制されることを確認する。また、低酸素障害により増強した AQP4 タンパク質の発現が、AQP4 発現阻害薬により抑制されていることをウエスタンブロット法により確認する。

### (4) 実験動物脳損傷モデルにおける AQP4 発現阻害薬の脳浮腫抑制効果の確認

(3) により、AQP4 発現阻害薬の効果が確認できれば、実験動物における脳浮腫抑制効果を確認する。ラット脳虚血モデル、脳凍結損傷モデル、脳外傷モデルを作成し、同

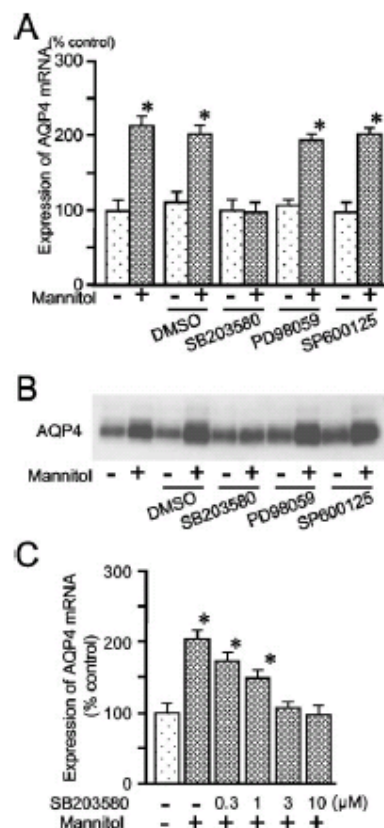
時に AQP4 発現阻害薬を脳室に投与する。AQP4 発現の抑制は免疫組織染色・ウエスタンブロット法により確認する。また、神経学的予後、生存率の改善、副作用についても調査する。

## 4. 研究成果

1. AQP4 発現調節機構の解明と AQP4 発現阻害薬の探索
2. 培養細胞を用いた脳浮腫モデルの確立と阻害薬による浮腫抑制効果確認
3. 実験動物脳損傷モデルにおける阻害薬による浮腫抑制効果確認

### (1) AQP4 発現調節機構の解明と AQP4 発現阻害薬の探索

アストロサイト (Ast) の培養系を用いて検討の結果、P38 MAPK と転写因子 NF- $\kappa$ B が AQP4 の発現を制御していることが明らかとなった。そこで、P38 MAPK 阻害薬 SB203580 あるいは NF- $\kappa$ B 阻害薬 SN-50、PSI、MG-132 の 4 種薬剤をそれぞれ添加したところ、AQP4 の発現抑制を確認した。(Fig. 1)



(2) 培養アストロサイトをを用いた in vitro 脳浮腫モデルの確立

AQP4 発現阻害薬の脳浮腫抑制効果の確認を行うために、評価システム (=モデル) を開発する。モデルには、培養 Ast を用いた単純で繰り返し実験できる系の開発を目指した。

Ast の膨張を脳浮腫のひとつの表現系ととらえ、細胞の容積を細胞内に取り込ませた蛍光色素の濃度の測定により数値化する方法はほぼ確立できたが、安定性に問題があり、現在改良を行っている。

一報、Ast の障害モデルとして、低酸素・際酸素化モデルの作成を同時に行った。大気コントロールチャンバーに培養 Ast を置き、低酸素を行うことにより Ast の障害を引き起こすことができるようになった。

(3) In vitro 脳浮腫モデルにおける AQP4 発現阻害薬の脳浮腫抑制効果の確認

培養 Ast に低酸素障害を加える際に、(1) で候補とした AQP4 発現阻害薬を同時に投与したところ、細胞障害がある程度抑制されることを確認できた。また、低酸素障害により増強する AQP4 タンパク質の発現は、AQP4 発現阻害薬により抑制されていた。

(4) 実験動物脳損傷モデルにおける AQP4 発現阻害薬の脳浮腫抑制効果の確認

ラット脳虚血モデルと脳凍結損傷モデルの確立を行うことができた。今後、AQP4 発現阻害薬を投与し、AQP4 発現の抑制を確認し、神経学的予後、生存率の改善、副作用についても調査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0件)

[学会発表] (計1件)

① Yamauchi H, Ito S, Morita M, Fisher J, Sobue S: High Fraction of Inspired O<sub>2</sub> increases alveolar dead space and arterial to end-tidal Pco<sub>2</sub> difference. Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists 2009.10.17 New Orleans, USA.

[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

山内 浩揮 (YAMAUCHI HIROKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号: 00448713

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし