

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890245
 研究課題名（和文） アストロサイトのエンドセリン受容体を標的とした脳浮腫治療薬の開発
 研究課題名（英文） Evaluation of astrocytic endothelin receptors as therapeutic targets for brain edema
 研究代表者 田中 一裕（TANAKA KAZUHIRO）大阪大谷大学・薬学部・助教
 研究者番号：80454586

研究成果の概要：

脳病態時におけるエンドセリンの役割について、脳浮腫関与因子の一つであるアクアポリン（AQP）の発現および機能変化に着目して研究をおこない、エンドセリンがin vivoおよびin vitroにおいてアストロサイトのAQP発現を抑制することを明らかにし、さらにエンドセリンが脳浮腫の発生を抑制する可能性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：エンドセリン、アクアポリン、アストロサイト、脳浮腫

1. 研究開始当初の背景

脳卒中の急性期では、遅発性神経細胞傷害に先立ち生じる「脳浮腫」が死因となる場合が多い。脳浮腫とは、脳に過剰な水分の貯留が起こり、脳組織の容積が増加した状態を差し、脳卒中以外に頭部損傷、脳炎等の多くの脳疾患時、あるいは脳外科手術の際に見られる現象である。最近の研究により、浮腫を起こした脳から水を排出させ、脳浮腫を軽減させる病態生理反応の存在が明らかとなった。つまり、アストロサイトにおいて増加した水チャンネル AQP4 を通じて水が脳外へ排出される

ことが示唆された。AQP は種々の組織、細胞において細胞膜での水の重要な透過経路であると考えられており、これまで知られている 13 の AQP の分子種のうち、中枢神経系においては AQP4 が最も発現しており、脳内 AQP4 はアストロサイトに強く発現している。急性脳虚血による脳浮腫では、AQP4 発現が減少しており、細胞内から血管内腔への水の輸送が減少した結果、浮腫がおきていると推測されている。これらの背景のもと、最近 RNAi によるノックダウンの実験がおこなわれ、AQP4 の減少は浮腫状態を延長することが示唆さ

れ、AQP4は病態回復局面で水の排出を担う浮腫抑制因子として注目されるようになった。一方、血管収縮ペプチドであるエンドセリンは、脳にも存在し、そのほとんどをアストロサイトが産生していると考えられている。脳傷害を罹患した患者や脳虚血モデル動物でエンドセリンの増加が認められており、このことから、エンドセリンが脳の病態生理反応に関わる因子であることが示唆されている。我々はこれまでに脳傷害時のアストロサイトの生理、病態的意義解明を目指した薬理学的研究をおこなう中で、脳浮腫関与因子であるケモカイン、マトリックスメタロプロテナーゼ (MMPs) の発現制御におけるエンドセリンの関与を明らかにしてきており、必然的にエンドセリンの脳浮腫病態関与に興味をもたれた。

2. 研究の目的

エンドセリンによる AQP4 の遺伝子レベルから機能面までの変化を明らかにし、その分子基盤の上で、脳浮腫モデル動物でのエンドセリン受容体拮抗薬の有効性を検証するもので、脳浮腫治療の創薬標的分子としてアストロサイトのエンドセリン受容体の有用性を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 培養アストロサイトおよびミクログリアは生後0~2日齢のWistar系ラット大脳皮質より調製した。培養ニューロンは胎生約18日齢のWistar系ラット大脳皮質より調製した。
- (2) AQP4のmRNAおよびタンパク量の測定は定量的RT-PCR法およびイムノブロットにより測定した。
- (3) 水の取り込みは、細胞に蛍光色素であるカルセインを取り込ませ、その蛍光強度の変化によって算出した。
- (4) ラット脳室へのエンドセリンアゴニストの持続投与はミニ浸透圧ポンプを用いておこなった。

4. 研究成果

- (1) 定量的RT-PCR法により、培養ラットアストロサイトにおいてAQP3とAQP9はほとんど発現が認められないが、AQP1とAQP4のmRNAは多く発現していることが示された。
- (2) これらのAQPファミリーは初代培養ニューロンおよびミクログリアで発現がほとんど認められなかった。

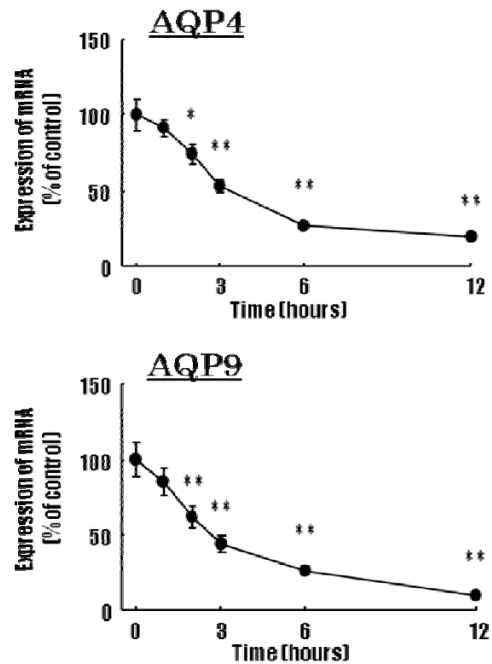


Fig. 1 Effects of endothelin-1 (ET-1) on astrocytic AQP mRNA levels. Serum starved astrocytes were treated with 100 nM ET-1 for 1-12 hours. Expression levels of AQP mRNA were normalized by those of 33PDH mRNA. Results are means \pm S.E.M. and are shown as a percentage of the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 0 time, one-way ANOVA post hoc Tukey test. Experimental numbers (n) are 13-15.

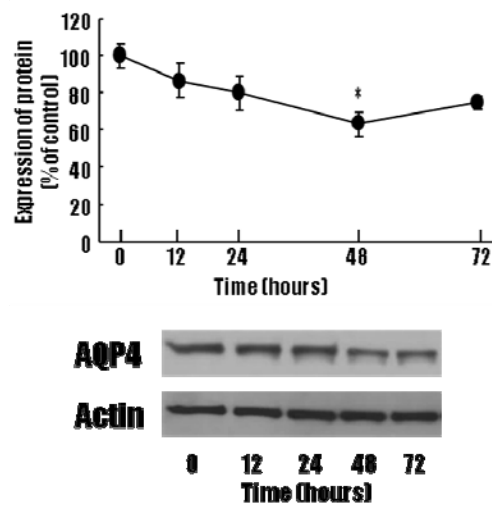


Fig. 2 Effects of ET-1 on astrocytic AQP4 protein levels. Serum starved astrocytes were treated with 100 nM ET-1 for 12-72 hours. Immunoblots were analyzed by densitometry. Upper: Expression levels of AQP4 were normalized by those of β -actin. Results are means \pm S.E.M. and are shown as % of the control. * $p < 0.05$ vs. 0 time, one-way ANOVA post hoc Tukey test. n=6 Lower: Representative immunoblots of AQP4 and actin protein.

- (3) エンドセリンをアストロサイトに処置するとAQP4とAQP9のmRNA発現量が減少した (Fig. 1)。一方で同じ濃度のエンドセリンはAQP1, 3, 5, 8のmRNA発現量に変化を与えなかつ

た。

(4) さらにエンドセリンによりAQP4の蛋白量が減少することをウエスタンブロット法により確認した (Fig. 2)。

(5) エンドセリン処置したアストロサイトにおいて、低張液による浮腫の程度が減少していた (Fig. 3)。

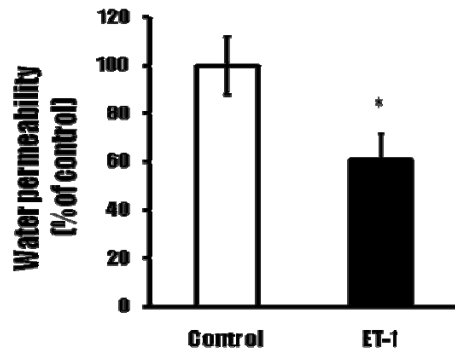


Fig. 3 Effects of ET-1 on the water permeability in astrocyte. After serum-starved astrocytes were treated with 100 nM ET-1 for 48 hours, the cells were loaded with 10 μ m calcein-AM for 30 min. Cell volume changes in response to hypo-osmotic medium (diluted to 150 mOsm with water) was measured as calcein fluorescence intensity. The fluorescence intensity was recorded 1s intervals. Results are means \pm S.E.M. and are shown as % of the non-treatment. *p < 0.05 vs. non-treatment. Student's t test. n=31

(6) ラットの脳内にエンドセリンETB受容体アゴニストを投与すると大脳皮質においてAQP4mRNAの発現量が減少した (Fig. 4)。他の脳領域で大きな変化はみられなかった。また、AQP9についてはどの脳領域においてもエンドセリンによる変化はなかった。

□ Saline
 ■ Ala^{1,3,11,15}-ET-1

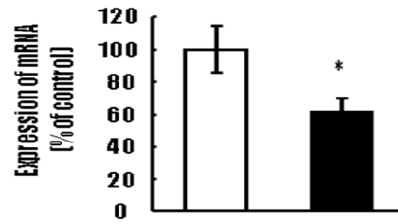


Fig. 4 Effects of intracerebroventricular (icv) administration of Ala^{1,3,11,15}-ET-1 on the expression levels of AQP4 mRNA in the rat brain. Ala^{1,3,11,15}-ET-1 (500 pmol per day) or saline was continuously infused into the lateral ventricle of the rat brain for 7 days. The brains were dissected in cerebral cortex, hippocampus, caudate putamen, and total RNA was extracted from them. Expression levels of AQP4 mRNA were normalized by those of GAPDH mRNA. Results are means \pm S.E.M. and are shown as a percentage of the control. *p < 0.05 vs. saline-treated control. Statistically significant differences were assessed by student's t-test. n=6-9.

(7) 組織化学的な検討から、ラット大脳においてAQP4が発現する細胞はニューロンではなくアストロサイトであることが示された (Fig. 5)。

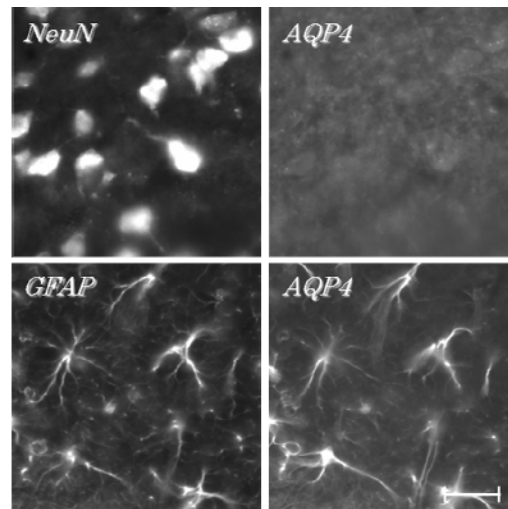


Fig. 5 Immunohistochemical observation of AQP4 in the rat cerebral cortex. Ala^{1,3,11,15}-ET-1 (500 μ mol per day) was continuously infused into the lateral ventricle of the rat brain for 7 days. Brain sections were labeled with an antibody against AQP4. Neuron and astrocyte were visualized with their cell markers, NeuN and GFAP, respectively. Scale bar = 25 μ m.

これらの結果から、脳障害時のエンドセリンシグナルの活性化は、プロテアーゼやケモカインの産生を促進し、障害組織の修復をうながす一方で、アクアポリンの発現量を抑制することで、浮腫の発生を抑制する可能性が示された。

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 1 件)

(1) Yutaka Koyama, Kazuhiro Tanaka

「Endothelins stimulate the production of stromelysin-1 in cultured rat astrocytes.」 Biochem Biophys Res Commun. 2008; 371:659-663. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 田中 一裕, 小山 豊

「ラット大脳皮質および培養アストロサイトにおけるアクアポリン4発現に対するエンドセリンの作用 (Effects of endothelin on aquaporin-4 expression in the rat cerebral cortex and in cultured rat astrocyte)」 第129回日本薬学会年会、2009年3月27日、京都

(2) 田中 一裕, 小山 豊

「bEnd3細胞におけるタイトジャンクション関連蛋白発現に対するエンドセリンの作用 (Effects of endothelin-1 on the expression of tight junction proteins in brain microvessel endothelial cells)」 第82回日本薬理学会年会、2009年3月18日、横浜

(3) 田中 一裕, 小山 豊

「培養アストロサイトおよびラット大脳におけるアクアポリン4発現に対するエンドセリンの作用 (Endothelin decreases aquaporin-4 expression in cultured rat astrocyte and in the rat cerebral cortex)」 第51回日本神経化学学会年会、2008年9月11日、富山

(4) 田中 一裕, 小山 豊

「培養アストロサイトおよびラット大脳におけるアクアポリン発現に対するエンドセリンの作用 (Endothelin decreases aquaporin-4 mRNA expression in cultured rat astrocyte and in the rat cerebral cortex)」 第81回日本薬理学会年会、2008年3月17日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 一裕 (TANAKA KAZUHIRO)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号 80454586

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者