

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591982

研究課題名（和文） ノックダウン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の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of water channel for mild hypothermia-induced brain edema decrease using knockdown 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（和文）：AQP4 の overexpression の実験のための、hAQP4-M23 および hAQP4-M1 を発現する C6 を得ることができた。これらの発現の増加を、蛍光抗体で蛍光顕微鏡で確認し、ウエスタンブロッティングでも発現増加を確認した。うへまた、hAQP4-M23 に関しては、permanent cell line を完成させた。hAQP4-M1 を発現する C6 について、permanent cell line をほぼ完成できている。AQP4 の Knockdown は vector を完成させたものの、transfection 効率が十分よい条件を得るにはいたっていない。その解決策として、レンチウイルスを用いる方法を現在模索中である。

研究成果の概要（英文）：We constructed hAQP4-M23 and hAQP4-M1 vector and transfected into C6 cells. We confirmed the overexpression of hAQP4-M1 and hAQP4-M23 in C6 cells. Moreover, we constructed permanent cell line of hAQP4-M23-overexpressed-cells of C6. We constructed vector of knockdown for AQP4, however, we could not obtain efficacy of knockdown for AQP4 using our constructed vectors. We tried a new method using lentiviral vectors

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：水チャンネル、脳浮腫、ノックダウン、アクアポリン、脳低温、RAN i

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

に解明されたとはいえない。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ている AQP が、脳浮腫の発生あるいは治癒に関与するものとした報告は、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。

我々は、低酸素負荷によりアストロサイトにて特に発現が多い AQP4、5、9 の発現が時間とともに低下することを (Yamamoto et al. *Mol. Brain Res.* 90:26-38, 2001)、さらに中等度低温 (32°C) では、細胞障害が抑制され、AQP4、5 では、一過性低下の後むしろ正常以上に上昇することを示した (Fujita et al. *Neurosci. Res.* 47:437-44, 2003)。これらの結果は、AQP の発現が脳低温療法における脳浮腫抑制の効果の機序の一端を担っている可能性を示唆したが、低温負荷による AQP の発現変化の機序は依然不明である。

また我々は循環不全時に認められる乳酸アシドーシスの条件下で AQP4 の蛋白発現が増加しそれが AQP4 分解過程の異常である可能性を見出している (Morishima et al. *Neurosci. Res.* 61:18-26, 2008)。

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および乳酸アシドーシス条件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。

2. 研究の目的

(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 knockdown 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 には成功したが、効率をさらに高めるためレンチウイルスを用いた transfection に取り組んでいる。

(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 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 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もつながる。

(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。

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、アストロサイトに発現し、脳浮腫との関係が強く示唆されている AQP4 を knockdown した、アストロサイトの cell line を確立する。

(2) AQP overexpression 細胞株の確立

上記 (1) で作製する AQP knockdown 細胞株とは逆に、AQP4 を overexpression したアストロサイトの cell line を確立する。遺伝子発現には、CAG promoter を用い、IRES 配列を挟んでピューロマイシン耐性遺伝子を発現する pCAG-IP ベクターを用いる予定である。

(3) AQP knockdown に対する rescue experiments を利用した AQP 蛋白の役割の確認

AQP を knockdown したアストロサイトに、正常の AQP4 cDNA の遺伝子導入することで、knockdown によって生じた細胞の phenotype が wild-type に戻ることを確認する。これは、knockdown した目的の蛋白以外の蛋白に、knockdown の影響がないことの確認にもなる。但し、ラットの cDNA と全く同じ配列の cDNA を含んだベクターを導入すると、この cDNA から転写された mRNA も RNAi により阻害される可能性が高く、アミノ酸配列に影響が出ない範囲で塩基配列を変化させることによって RNAi による影響を回避することを予定している。うまくいかない場合は、同じ AQP でも塩基配列の一部異なる cDNA を用いて発現ベクターを構築し、同様に実験を行う予定である。

4. 研究成果

AQP4 の overexpression の実験のための、hAQP4-M23 および hAQP4-M1 を発現する C6 を得ることができた。また、hAPQ4-M23 に関しては、permanent cell line を完成させた。AQP4 の Knockdown は vector を完成させたものの、transfection 効率が十分よい条件を得るにはいたっていない。レンチウイルスを用いる方法を現在模索中である。

RNA interference による knockdown が確認されている配列をもとに、shRNA を発現する construct を作成したうえ、vector に導入した。アストロサイトに transfection する方法として、リポフェクション (Trans-IT Neural) を使用した。Transfection 効率を視覚的に確認できる GFP つきの vector の挿入で、視覚的に約 20% 程度の transfection 効率であることを確認した。ただ RNAi 効果を得る効率は、まだ 10% 程度にとどまった。試行錯誤の結果、現段階ではこれ以上効率をあげるとは難しいと考えられた。その解決策として、transfection 効率を上げるためレンチウイルスを使用した vector の作製を進めている。

AQP4 の Overexpression 細胞株の確立のため、hAQP4-M23 および hAQP4-M1 を発現するラット星状膠細胞である C6 の作成を試みた。可視化のため Venus を挿入した pCAGIPuro-hAQP4-Venus vector を M1 および M23 それぞれ作成し、ラット星状膠細胞である C6 に、Lipofectamine2000 を用いて形質導入した。蛍光顕微鏡で蛋白発現を確認し、ウェスタンブロッティングでも発現を確認した。また、hAPQ4-M23 に関しては、permanent cell line を、蛍光顕微鏡の蛋白発現と、ウェスタンブロッティングでの蛋白発現の確認を終え、完成させた。現在、hAPQ4-M1 の permanent cell line の作成に取り組んでいる。

また、現在作成してある GFP つき vector で、実際の低温における脳浮腫効果の解明を始めている。さらに、AQP4 を発現する適当な cell line を探し、現在作成されている construct の入った vector を使用して、AQP4 を knockdown できている cell line の確立を試みている。Cell line が確立できれば低温などの条件を付加して、低酸素に対する予防を行う予定である。

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 6 件)

①南仁哲、祖父江和哉、間潤則文、藤田義人
末梢静脈カテーテルからの Acinetobacter 血流感染により敗血症性ショックに至った一例

査読有, 日集中医誌 2012;19:51-54

②E Suzuki, H Hirate, Y Fujita, K Sobue.
Successful airway management in a patient with Goldenhar syndrome using preoperative three-dimensional computed tomography.

Anesth Intensive Care.

査読有, 2011 Jul;39(4):767-8.

③大森隆夫、安井稔博、三宅健太郎、松本卓也、稲垣雅昭、成松紀子、山田富雄、山崎潤二、間潤則文、藤田義人

新型ドクターカー出動で救命した高濃度塩素ガス吸入による急性呼吸窮迫症候群

(ARDS) の 1 症例

日本救急医学中部地方会誌

査読有, 2011:5:19-22

④Morita M, Sasano H, Azami T, Sasano N, Fujita Y, Ito S, Sugiura T, Sobue K.

A novel skin-traction method is effective for real-time ultrasound-guided internal jugular vein catheterization in infants and neonates weighing less than 5 kilograms.

Anesth Analg.

査読有, 2009 ; 109(3):754-9.

⑤ Y Fujita, A Takeuchi, T Sugiura, T Hattori, Y Mizuochi, K Sobue.

Before-after study of a restricted fluid infusion strategy for management of donor hepatectomy for living donor liver transplantation.

J. Anesth,

査読有, 2009; 23:67-74

⑥ Sasano H, Sasano N, Ito S, Fujita Y, Sugiura T, Morita M, Sobue K.

Continuous positive airway pressure applied through a bronchial blocker as a treatment for hypoxemia due to stenosis of the left main bronchus.

Anesthesiology.

査読有, 2009; 110(5):1199-200.

[学会発表] (計 9 件)

①藤田義人、他 9 名
予後予測因子としての ICU 入室時血中乳酸値
の検討
第 39 回日本集中治療医学会学術集会
(2012. 2. 28-3. 1 幕張)

②富田麻衣子、藤田義人、他 6 名
術前絶飲時間が 1 回拍出量変化量に及ぼす
影響
第 31 回日本臨床麻酔学会
(2011. 11. 3-5 沖縄)

③藤掛数馬、藤田義人、他 6 名
麻酔中の血中フェンタニル濃度の実測値と
血中濃度シミュレーター算出値との比較
第 31 回日本臨床麻酔学会
(2011. 11. 3-5 沖縄)

④青木智史、藤田義人、他 6 名
重症筋無力症患者に対する胸腺摘出術の麻
酔管理における筋弛緩薬非使用の安全性
第 31 回日本臨床麻酔学会
(2011. 11. 3-5 沖縄)

⑤S Yoshizawa, H Komura, Y Fujita, S Ito,
K Sobue.
Cystatin C is a Predictor for the Length
of ICU after Cardiac Surgery in Pediatric
Patient
The American Society of Anesthesiologists
Annual Meeting, Chicago Illinois, America
October 15-19, 2011

⑥藤田義人、他 6 名
小児心臓術後患者における重症度評価と
しての乳酸値
第 19 回日本集中治療医東海北陸地方会
(2011. 6. 18 名古屋)

⑦ S Yoshizawa, Y Fujita, H Sasano, T
Sugiura, K Sobue.
Titration of intraoperative fentanyl in
pediatric anesthesia
85th International Anesthesia Research
Society
Vancouver, British Columbia, Canada
May 21-24, 2011

⑧藤田義人、他 9 名
重回帰分析を用いた来院時心肺停止症例の
予後予測
第 38 回日本救急医学会
(2010. 10. 29-31 東京)

⑨藤田義人、他 5 名
小児麻酔におけるフェンタニル量の滴定

第 57 回日本麻酔学会
(2010. 6. 3 福岡)

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