

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592310

研究課題名(和文) RNAiを用いたアクアポリン機能調節による脳浮腫抑制の *in vivo*への応用

研究課題名(英文) Practical use with control of aquaporin for brain edema decrease using knockdown technique

研究代表者

藤田 義人 (Fujita, Yoshihito)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：90238593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNAiは invitrogen社製を利用しshRNAを発現するベクターを作成した。293FTセルラインでshRNAiを発現するレンチウイルスの作成を完了した。AQP4発現量を、RT-PCRで確認した。以前のKnockdownの発現率に比較して、強くKnockdownしていることが確認できた。

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C6の作成し、蛋白発現を確認した。また、hAQP4-M23は、permanent cell line を完成させた。overexpressionできることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Using vector expressing shRNA, we constructed lentivirus expressing sh RNAi of aquaporin(AQP) 4. We confirmed AQP4 knockdown that was stronger than our earlier study. 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.

研究分野：麻酔科学

キーワード：aquaporin knockdown hypothermia

## 1. 研究開始当初の背景

脳浮腫の病態は、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。

我々は、低酸素負荷によりアストロサイトで特に発現が多い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℃)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。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、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。

## 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
- (2).AQP knockdown に対する rescue experiments による AQP 蛋白の機能の確認
- (3).低酸素負荷による AQP knockdown、overexpression 細胞株の phenotype の確認
- (4).軽度低温環境が、低酸素負荷もしくはアシドーシス環境での AQP knockdown、overexpression 細胞株の phenotype に与える影響

(5).動物実験による AQP knockdown モデルでの検証

## 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
- (2). AQP overexpression 細胞株の確立
- (3).AQP knockdown に対する rescue experiments を利用した AQP 蛋白の役割の確認
- (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
- (5).動物実験において AQP knockdown モデルでの検証

## 4. 研究成果

神経系の細胞のRNAiはinvitrogen社製のBock-it Inducible H1 Lentiviral RNAi systemを利用し、Knockdownが確認されている2-3のconstructを作成したうえ、entry vectorであるpENTER/H1/TO Entry Constructに導入した。目的遺伝子をもつpENTER/H1/TO Entry Construct とpLenti4/BLOCK-IT/DESTをかけあわせることにより目的のshRNAを発現する遺伝子をもったpLenti4/BLOCK-IT/Expression Construct vectorを作成した。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shRNAを発現する遺伝子をもったconstructを含むプラスミドを大量に、無菌的に精製した。293FTセルラインでレンチウイルスを発現させるため、作成したpLenti4/BLOCK-IT/Expression Constructに加え、レンチウイルスの作成能力を高めるpLP1、pLP2、pLP/VSVG、pENTER-gusのプラスミドをcotransfectさせた。以上により目的となるAQP Knockdown のshRNAiを発現するレンチウイルスの作成を完了した。アストロサイトのAQP4発現量を、RT-PCRで確認

した。以前のKnockdownの発現率に比較して、強くKnockdownしていることが確認できた。

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。うえまた、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。AQPcDNAを遺伝子導入することで、Knockdownのphenotypeがwild-type程度の発現量に戻せることを確認するための、AQP4のcDNAを作成した。Wild-typeのアストロサイトに導入し、overexpressionできることを確認した。今後、rescueできるかを検討中である。

低酸素負荷によりAQP knockdownと、overexpression 細胞株のphenotypeの形態学変化、培養液の変化を観察した。詳細を検討中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 23 件)

1. Hiroyuki Kinoshita, Noboru Hatakeyama, Yoshihito Fujita, Yoshihiro Fujiwara. Leak in PerseusTM workstation after complete check sequences. Journal of Clinical Anesthesia 2015 in press (査読あり)
2. Yoshihito Fujita, Satoru Moriyama, Satoshi Aoki, Saya Yoshizawa, Maiko Tomita, Taiki Kojima, Yukiko Mori, Naoko Takeuchi, Min-Hye So, Motoki Yano, Kazuya Sobue. Estimation of the success rate of anesthetic management for thymectomy in patients with myasthenia gravis treated without muscle relaxants: A retrospective observational cohort study. J.Anesth, 2015 in press. (査読あり)
3. 仙頭佳起、竹内直子、太田晴子、佐野文昭、上村友二、藤田義人、祖父江和哉：大学病院 ICU における最近 5 年間の小児 veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation の稼働実績と今後の課題 日本集中治療医学会雑誌 22:2015 in press (査読あり)
4. Yoshihito Fujita, Tae Kato, Hiroki Yamauchi, Eisuke Kako, Min-Hye So, Tetsuya Tamura, Kazuya Sobue. Clinical usefulness of blood lactate level as a prognostic indicator comparing with Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II scores: A retrospective, observational, cohort study Nagoya Medical Journal 2014 in press. (査読あり)
5. Minami E, Ito S, Sugiura T, Fujita Y, Sasano H, Sobue K. Markedly elevated procalcitonin in early postoperative period in pediatric open heart surgery: a prospective cohort study. (査読あり)
6. N Sasano, A Tanaka, A Muramatsu, Y Fujita, S Ito, H Sasano, K Sobue. Tidal volume and airway pressure under percutaneous transtracheal ventilation without a jet ventilator: comparison of high-flow oxygen ventilation and manual ventilation in complete and incomplete upper airway obstruction models J Anesth 2014 Jun; 28(3): 341-6 (査読あり)
7. Nagaya Y, Aoyama M, Tamura T, Kakita H, Kato S, Hida H, Saitoh S, Asai K. Inflammatory cytokine tumor necrosis factor  $\alpha$  suppresses neuroprotective endogenous erythropoietin from astrocytes mediated by hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ . Eur J Neurosci. 2014 in press. (査読あり)
8. Kito H, Yamamura H, Suzuki Y, Ohya S, Asai K, Imaizumi Y. Membrane hyperpolarization induced by endoplasmic reticulum stress facilitates  $Ca^{2+}$  influx to regulate cell cycle progression in brain capillary endothelial cells. J Pharmacol Sci.

- 125(2): 227-232, 2014. (査読あり)
9. Nomura T, Aoyama M, Waguri-Nagaya Y, Goto Y, Suzuki M, Miyazawa K, Asai K, Goto S. Tumor necrosis factor stimulates osteoclastogenesis from human bone marrow cells under hypoxia conditions. *Exp Cell Res*. 321(2): 167-177, 2014. (査読あり)
  10. Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y, Ri M, Ishida T, Ueda R, Utsunomiya A, Asai K, Inagaki H. Prognostic impact of microRNA-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hum Pathol*. 45(6): 1192-1198, 2014 (査読あり)
  11. Yoshihito Fujita, Koichi Inoue, Tasuku Sakamoto, Saya Yoshizawa, Maiko Tomita, Yoshie Maeda, Hitomi Taka, Ai Muramatsu, Youichiro Hattori, Hiroyuki Hirate, Toshimasa Toyo'oka, Kazuya Sobue. A comparison between dosages and plasma concentrations of dexmedetomidine in clinically ill patients: a prospective, observational, cohort study in Japan. *Journal of Intensive Care* 2013 1:15 (査読あり)
  12. Y Fujita, A Kondo, H Yamauchi, E Kako, K Sobue. Age-related requisite concentration of sevoflurane for adequate sedation with combined epidural-general anesthesia. *Korean J Anesthesiol*. 2013 June 64(6): 489-493 (査読あり)
  13. Inoue K, Sakamoto T, Fujita Y, Yoshizawa S, Tomita M, Min JZ, Todoroki K, Sobue K, Toyo'oka T. Development of a stable isotope dilution UPLC-MS/MS method for quantification of dexmedetomidine in a small amount of human plasma. *Biomed Chromatogr*. 2013 Jul;27(7):853-8 (査読あり)
  14. Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Asai H, Hussein MH, Suzuki M, Kato S, Saitoh S, Asai K. Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced phagocytosis of cultured microglia via nitric oxide production. *Toxicol Appl Pharmacol*. 268(2): 99-105, 2013. S Ito, Y Fujita, H Sasano, K Sobue. Latent myasthenia gravis revealed by protracted postoperative effect of non-depolarizing neuromuscular blockade. *J.Anesth*,26(6):953-4. 2012 (査読あり)
  15. Asai H, Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Saitoh S, Asai K. Diclofenac enhances aquaporin-4 expression in cultured astrocyte. *Cell Mol Neurobiol*. 33(3): 393-400, 2013. (査読あり)
  16. Ito J, Nagayasu Y, Hoshikawa M, Kato KH, Miura Y, Asai K, Hayashi H, Yokoyama S, Michikawa M. Enhancement of FGF-1 release along with cytosolic proteins from rat astrocytes by hydrogen peroxide. *Brain Res*. 1522: 12-21, 2013. (査読あり)
  17. Kimura R, Okouchi M, Kato T, Imaeda K, Okayama N, Asai K, Joh T. Epidermal growth factor receptor transactivation is necessary for glucagon-like peptide-1 to protect PC12 cells from apoptosis. *Neuroendocrinology*. 97(4): 300-308, 2013. (査読あり)
  18. 志田恭子、祖父江和哉、平手博之、有馬一、藤田義人、笹野寛：麻酔中の誤薬防止のための薬剤シリンジラベル標準カラーコードについての史的研究 *日本臨床麻酔学会誌* 33(5):808-14,2013 (査読あり)
  19. S Ito, Y Fujita, H Sasano, K Sobue. Latent myasthenia gravis revealed by protracted postoperative effect of non-depolarizing neuromuscular blockade. *J.Anesth*,26(6):953-4. 2012 (査読あり)
  20. Aoyama M, Kakita H, Kato S, Tomita M,

- Asai K. Region-specific expression of a water channel protein, aquaporin 4, on brain astrocytes. *J Neurosci Res.* 90(12): 2272-2280, 2012. (査読あり)
21. Kako E, Kaneko N, Aoyama M, Hida H, Takebayashi H, Ikenaka K, Asai K., Togari H, Sobue K, Sawamoto K. Subventricular zone-derived oligodendrogenesis in injured neonatal white matter in mice enhanced by a nonerythropoietic erythropoietin derivative. 2012 Oct;30(10):2234-2247. (査読あり)
  22. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Kikuchi K, Yamagami T, Nozaki M, Aoyama M, Asai K., Otsuka T.11. The Sp1 transcription factor is essential for the expression of gliostatin/thymidine phosphorylase in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther.*14(2): R87, 2012. (査読あり)
  23. 南 仁哲、祖父江和哉、間淵則文、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 日集中医誌 19:51-54, 2012 (査読あり)
- 〔学会発表〕(計 43 件)
1. 藤田義人、宮本 泰周、田中 美緒、中村 絵美、住江 百合、椋田 崇、森由紀子、兒玉 絵里、安田 吉孝、安藤 一雄、吉野 博子、赤堀 貴彦、橋本 篤、黒川 修二、神立 延久、佐藤 祐子、下村 毅、畠山 登、木下 浩之、藤原 祥裕 チェックリストを用いたブリーフィングの導入と、インシデント、アクシデントに与える影響 第23回日本集中治療医学会東海北陸地方会 総会・学術集会 福井 2015.6.20
  2. Fujita Y., Inoue K., Yoshizawa S., Sakamoto T., Toyo'oka T., Sobue K. Discrepancy of correlation for dosage of long-term administration of dexmedetomidine and plasma concentrations between adults and infants (< 10 kg) in critically ill patients 2015 Annual Meeting of the European Anesthesiology(ESA) in Berlin, Germany. May.30-June 2,2015
  3. 上村友二、播磨恵、仙頭佳起、宮津光範、太田晴子、徐民恵、森島徹朗、平手博之、藤田義人、祖父江和哉：小児ICUでの瞳孔記録計(NPi-100)の有効性調査 第42回日本集中治療医学会学術集会 東京 2015.2.9-11
  4. 志田恭子、徐民恵、森島徹朗、平手博之、草間宣好、杉浦健之、藤田義人、田村哲也、岡野将典、祖父江和哉：当院ICUにおける誤薬防止のための多角的な対策～セーフラベルシステム™の導入と多種職への教育の効果～ 第42回日本集中治療医学会学術集会 東京 2015.2.9-11
  5. 佐野文昭、藤田義人、草間宣好、杉浦健之、岡野将典、辻達也、小笠原治、大内田絵美、伊藤秀和、祖父江和哉：名古屋市立大学病院における Rapid Response System 運用の工夫と課題 第42回日本集中治療医学会学術集会 東京 2015.2.9-11
  6. 祖父江和哉、徐民恵、宮津光範、太田晴子、平手博之、杉浦健之、藤田義人：本学クリニカルクラークシップにおける麻酔科プログラムの自己分析と課題 東京 2014.11.1-3
  7. 草間宣好、藤田義人、浅井明倫、富田麻衣子、播磨恵、竹内直子、幸村英文、平手博之、祖父江和哉：上殿皮神経障害が原因と考えられた腰痛の1症例 日本ペインクリニック学会第48回大会 東京 2014.7.24-26
  8. 太田晴子、杉浦健之、大堀久、幸村英文、平手博之、草間宣好、藤田義人、

富田麻衣子、吉澤佐也、祖父江和哉：A型ボツリヌス毒素容量調節に難渋し中和抗体価測定を行った眼瞼痙攣の1例  
日本ペインクリニック学会第48回大会  
東京 2014.7.24-26

9. 志田恭子、前田純依、宮津光範、竹内直子、幸村英文、平手博之、草間宣好、杉浦健之、有馬一、藤田義人、祖父江和哉：当院ICUにおける誤薬・誤投予防防止の取り組み - セーフラベルシステム(SLS500i<sup>®</sup>)の導入 - 第22回日本集中治療医学会東海北陸地方会 総会・学術集会 愛知 2014.6.14
10. 吉澤佐也、藤田義人、富田麻衣子、藤掛数馬、播磨恵、祖父江和哉：帝王切開手術時の母体へ糖質輸液が母体・新生児血糖値に及ぼす影響 日本麻酔科学会第61回学術集会 横浜 2014.5.15-17
11. 田村哲也、青山峰芳、藤田義人、仲野実輝、浅井清文、祖父江和哉：エリスロポエチン投与によるミクログリアを介した脳保護効果 日本麻酔科学会第61回学術集会 横浜 2014.5.15-17
12. 浅井明倫、杉浦健之、富田麻衣子、吉澤佐也、太田晴子、徐民恵、草間宣好、平手博之、藤田義人、祖父江和哉：重度低ナトリウム血症を来した帯状疱疹の1症例 東海・北陸ペインクリニック学会第25回東海地方会 名古屋 2014.5.10
13. 田村哲也、太田晴子、藤田義人、祖父江和哉：エリスロポエチンによる脳保護効果とミクログリアの活性 第18回日本神経麻酔・集中治療研究会 沖縄 2014.4.18-19
14. 小笠原治、藤田義人、草間宣好、杉浦健之、有馬一、辻達也、杉原祐介、大内田絵美、西澤義之、祖父江和哉：当院ICUに入室した血液悪性腫瘍を基礎

疾患に持つ重症患者の検討 第41回日本集中治療医学会学術集会 京都  
2014.2.27-3.1

以下省略

〔図書〕(計 4 件)

1. 笹野寛、藤田義人、伊藤彰師、祖父江和哉：「手術室災害対策」- 手術室スタッフへの教育を中心に - 日本臨床麻酔学会誌 33(4):545-9,2013
2. 笹野寛、森田正人、藤田義人、祖父江和哉 超音波ガイド下の血管穿刺 超音波ガイド下血管穿刺の合併症と環境整備 麻酔科医に必要な超音波ガイド手技のポイントと教育 日本臨床麻酔学会誌 33:470-475,2013
3. 藤掛数馬、高ひとみ、宮津光範、笹野寛、藤田義人、有馬一、祖父江和哉 麻酔中の気胸の診断における肺超音波検査の有用性 紙上抄読会 臨床麻酔 36:8:1227-332, 2012
4. 笹野寛、森田正人、薊隆文、藤田義人、祖父江和哉：乳幼児の内頸静脈穿刺成功率を高めるために 日本臨床麻酔学会誌 32(7):897-905,2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤田 義人 (FUJITA Yoshihito)  
愛知医科大学・医学部 教授  
研究者番号：90238593

##### (2) 研究分担者

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

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