

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462411

研究課題名(和文)新規水チャネルの脳浮腫発症における機能の解析と新規脳浮腫治療薬の開発

研究課題名(英文) Analysis of a new water channel function in the brain edema formation and development of new treatment for brain edema

研究代表者

幸村 英文 (KOURMURA, Hidefumi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20347404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳浮腫の発症の機序は複雑であり、いまだ明確な回答はない。水チャネルであるアクアポリン(AQP)のうちAQP4は、発症あるいは回復における重要性が示唆されている。一方、AQP9は脳内には軟膜、海馬、白質などに存在し、詳細な検討によりアストロサイトに比較的発現していることがわかった。培養アストロサイトにおける発現は、P38PAMKとPKAを介して発現上昇、PKCを介して低下した。低酸素により、AQP9は低下し、再酸素しても発現は低下した。ラット中大脳動脈結紮モデルにおいて脳のAQP9の発現は増加傾向であった。AQP9の発現調節機構が明らかとなったため、脳浮腫の治療標的になりうる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of the development of brain edema is complex and it is not yet clear. AQP4, one of a water channel aquaporin (AQP), has been suggested the importance in the development or recovery. On the other hand, AQP9 exists in the brain; pia, hippocampus, white matter. It was found to be relatively expressed in astrocytes by detailed study. In cultured astrocytes, AQP9 expression was increased through the P38PAMK and PKA, was reduced through the PKC. Hypoxia, AQP9 decreases, expressed and re-oxygen decreased. Expression of AQP9 in the cerebral artery ligation model in rats was increased. Since the regulation mechanisms of AQP9 expression were revealed, it can be a therapeutic target in the brain edema.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：脳浮腫 アクアポリン 脳虚血

1. 研究開始当初の背景

麻酔・集中治療領域において、脳障害にもなう脳浮腫はしばしば遭遇する病態である。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、現存の治療では調節ができず致命的となることも少なくない。その病態は、アストロサイトの膨化(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。しかし、その発生機序は完全には解明されていないのが研究開始当初および現在の状況である。近年の報告や申請者グループの研究により、水チャネルであるアクアポリン(AQP)が脳浮腫に深く関与している可能性が示唆されている(Arima and Sobue *et al.*, J Biol Chem, 2003、Yamamoto and Sobue *et al.*: Mol Brain Res, 2001)。

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。申請者はこれまでに、脳において多種類の AQP が発現し、特にアストロサイト(星状細胞: Ast)には AQP3、AQP4、AQP5、AQP8、AQP9 が発現していることを報告しており、脳において水の移動に関与していることを報告してきた。(Sobue *et al.*: Biochim Biophys Acta, 2000、Yamamoto and Sobue *et al.*: Mol Brain Res, 2001)。

発現量が豊富な AQP4 は比較的研究が進んでおり、AQP4 ノックアウトマウス(AQP4^{-/-})を用いた研究によると、AQP4^{-/-}マウスでは脳損傷後の脳浮腫の程度がより軽度であることが示されている(Manley *et al.*: Nature Med, 2000)。つまり、AQP4 は脳(特にアストロサイト)への異常な水の流入を引き起こし、脳浮腫の進行に関与することが明らかとなっている。しかしながら、AQP4^{-/-}マウスで

は脳損傷を与えない限り脳に大きな異常はなく、他の AQP が機能を補完している可能性が高い。この点から、脳浮腫の発症機序を説明するためには、AQP4 だけでなく他の水チャネルの関与も検討する必要がある。AQP4 に次いで発現量が多いのは AQP9 であるが、研究開始当初はその機能は十分には解明されていなかった。

2. 研究の目的

本申請研究では、AQP9 の脳における発現や機能を詳細に検討し、さらに脳損傷時の AQP9 の機能変化や脳浮腫発症への関与を検討することを目的とした。これにより、脳浮腫発症機序の完全なる解明と新規脳浮腫治療法の開発へのヒントを得ることを目指した。

当該研究の申告期間内の目標は、次の 4 点とした。

- 脳における AQP9 の発現分布の確認
- 脳における AQP9 の発現調節機構の解明
- 脳における AQP9 の機能解析
- 脳障害・脳浮腫発生時の AQP9 の機能解析

3. 研究の方法

(1) 脳における AQP9 の発現分布の確認

脳における AQP9 の詳細な発現分布を明らかにすることを目的に行った。申請者の研究室で作成した抗 AQP9 抗体を用いた組織染色をラットの脳に対して行った。

また、脳内に存在する神経細胞、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトを別々に培養し、AQP9 について RT-PCR を定量的に施行した。

(2) AQP9 の発現調節機構の解明

AQP9 の発現調節機構を解明し、人為的発現調節を今後可能とすることを目的に検討を行った。代表的な細胞内情報伝達系(PKC、PKA、p38 MAPK、ERK、JNK 等)や転写因子(NF- κ B)の阻害薬を使用し、AQP 発

現調節に中心的な役割を果たす細胞内情報伝達系あるいは転写因子を見いだすこととした。AQP9 の発現量は real time RT-PCR により、AQP9 蛋白質の発現量はウエスタンブロット法により検討した。

(3)培養アストロサイトにおける AQP9 発現抑制系の作成

AQP9 の機能解析を後の実験で行うために、培養アストロサイトに AQP9 mRNA を阻害する siRNA を遺伝子導入し、AQP9 の発現を低下 (AQP9 発現抑制系)させた培養細胞株の構築を試みた。遺伝子導入する際の RNAi (正確には short hairpin RNA: shRNA) の設計は、siRNA(short interfering RNA)の一時的な遺伝子導入の結果を検討し、効率よくノックダウンできる塩基配列を決定。決定した RNAi 配列を piGENE/mU6 ベクター (Clontech 社) に組み込み、ピューロマイシン耐性遺伝子を発現する pPUR ベクター (Clontech 社) を同時に遺伝子導入した。培養液にピューロマイシンを添加し、ピューロマイシン耐性細胞を選択した。選出した細胞株における AQP9 発現の低下は、抗 AQP9 抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した。

(4)培養アストロサイトにおける AQP9 過剰発現系の作成

AQP9 の機能解析を後の実験で行うために、(3)とは逆に AQP9 を過剰発現したアストロサイト (Ast) の培養細胞株の構築を試みた。AQP9 遺伝子発現には、CAG プロモーターを用い、IRES 配列をはさんでピューロマイシン耐性遺伝子を発現する pCAG-IP ベクターを使用する予定とした。

(5)培養アストロサイトに障害を与えた際の AQP9 の発現・機能変化

脳浮腫発症時に AQP9 がどのように関与

するかを明らかにすることを目的に行った。すでに確立できている培養アストロサイト低酸素・再酸素化モデル(Yamamoto and Sobue et al.: Mol Brain Res, 2001)を用いて検討した。培養 Ast を大気コントロールチャンバー内で低酸素に暴露し、再度大気中へ戻すことによりモデルを作成し、AQP9 の mRNA と蛋白質量を real time RT-PCR あるいはウエスタンブロット法により検討した。同時に、細胞数計測による Ast の障害度の評価を行った。

さらに、液体窒素による脳凍結損傷モデルを作成し、同様に検討を行った。

(6)各種ラット脳障害モデルにおける AQP9 の発現・機能変化

動物実験モデルにおいても AQP9 の脳浮腫発症への関与を検討した。モデルは、ラット脳凍結損傷モデルとラット中大脳動脈結紮モデル(脳虚血・再還流)を作成し、AQP9 の発現変化について抗 AQP9 抗体を用いた免疫染色により詳細に検討した。

4. 研究成果

(1)脳における AQP9 の発現分布の確認

AQP9は脳内には軟膜、海馬、白質などに存在した。培養細胞による詳細な検討では、アストロサイトに比較的発現していることがわかった (Table1)。

Table 1 脳におけるアクアポリンの発現

AQP isoforms	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Brain	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	(-)	+	+
Astrocyte	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	(-)	ND	ND
Microglia	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	(-)	ND	ND
Oligo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	(-)	ND
Neuron	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	(-)	ND	ND
Endothelium	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	(-)	ND	ND

Detected by RT-PCR. +: positive, -: negative, ND: not determined

(2)AQP9 の発現調節機構の解明

AQP9 の発現調節機構を解明し、人為的発現調節を今後可能とすることを目的に検

討を行った。培養アストロサイトにおける発現は、高い浸透圧(マニトール)により P38PAMK を介して AQP9 の発現が遺伝子レベルと蛋白質レベルで増強することが確認できた。また、dbcAMP により PKA を介して発現が上昇することが明らかとなった。一方、TPA により PKC を介して遺伝子レベルと蛋白質レベルで発現が低下した(Fig. 1)。

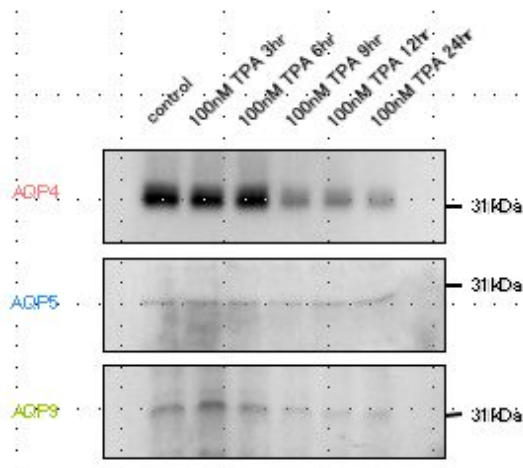


Fig.1 TPA による培養アストロサイトにおけるアキアポリンファミリーの変化
AQP4 と AQP9 は、TPA により PKC を介して発現が増強した。

(3)培養アストロサイトにおける AQP9 発現抑制系の作成

AQP9 の機能解析を後の実験で行うために、培養アストロサイトに AQP9 mRNA を阻害する siRNA を遺伝子導入し、AQP9 の発現を低下(AQP9 発現抑制系)させた培養細胞株の構築を試みた。しかしながら、効率のよい遺伝子配列と導入条件を検討するにとどまった。

(4)培養アストロサイトにおける AQP9 過剰発現系の作成

AQP9 の機能解析を後の実験で行うために、(3)とは逆に AQP9 を過剰発現したアストロサイト(Ast)の培養細胞株の構築を試みた。しかしながら、効率のよい遺伝子配

列と導入条件を検討するにとどまった。

(5)培養アストロサイトに障害を与えた際の AQP9 の発現・機能変化

脳浮腫発症時に AQP9 がどのように関与するかを明らかにすることを目的に行った。培養アストロサイトに低酸素・再酸素化モデル(Yamamoto and Sobue et al.: Mol Brain Res, 2001)を行ったところ、低酸素により AQP9 発現は低下し、再酸素しても発現は低下し続けた。

(6)各種ラット脳障害モデルにおける AQP9 の発現・機能変化

動物実験モデルにおいても AQP9 の脳浮腫発症への関与を検討した。モデルは、ラット脳凍結損傷モデルとラット中大脳動脈結紮モデル(脳虚血・再還流)を作成し、AQP9 の発現変化について抗 AQP9 抗体を用いた免疫染色により詳細に検討した。

ラット中大脳動脈結紮モデルにおいて脳の AQP9 の発現は増加傾向であった。また、ラット脳凍結損傷モデルでは、損傷直後に発現は一時的に低下するが、その後長期的に高発現が持続することが明らかとなった。

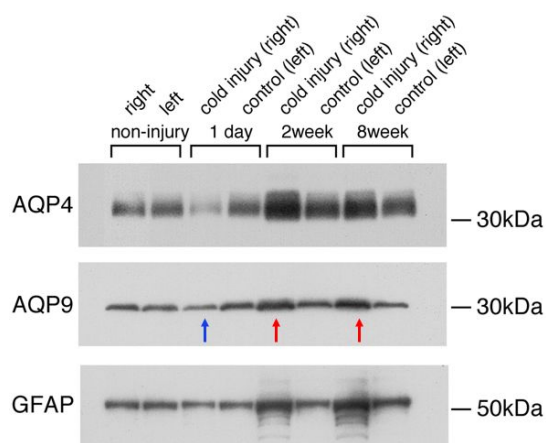


Fig.2 脳凍結損傷モデルにおけるアキアポリン蛋白質の発現変化
AQP9 蛋白質は損傷直後は発現が低下し、その後長期間にわたって高発現が持続する。

以上の結果から、AQP9 は脳浮腫の発現あるいは治癒過程に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、更なる機能解析を行い、脳浮腫の治療の標的分子となるかどうかを見極める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ota H, Hikita T, Sawada M, Nishioka T, Matsumoto M, Komura M, Ohno A, Kamiya Y, Miyamoto T, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Kaibuchi K, Sobue K, Sawamoto K: Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmp13-mediated local inactivation of RhoA. Nat Commun. 2014; 5: 4532.

doi: 10.1038/ncomms5532.

査読あり

Ota H, Hikita T, Nishioka T, Matsumoto M, Ito J, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Kaibuchi K, Sobue K, Sawamoto K: Proteomic analysis of Girdin-interacting proteins in migrating new neurons in the postnatal mouse brain. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 442: 16-21.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.126.

査読あり

藤掛数馬、匹田貴夫、祖父江和哉、澤本和延: 脳梗塞後の修復メカニズムと細胞治療 脳修復過程における内在性神経前駆細胞の移動. 脳循環代謝 2013; 24: 102-6.

査読なし

〔学会発表〕(計 4 件)

藤掛数馬、匹田貴夫、祖父江和哉、澤本和延: 阻害剤ライブラリーを用いた新生ニューロン移動機構の解明. 日本麻酔科学会第 61 回学術集会 2014 年 5 月 15 日-17 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

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 2014 年 5 月 15 日-17 日 パシ

フィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

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(EPO)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学会 2014 年 4 月 18 日 沖縄県自治会館 (沖縄県・那覇市)

田村哲也、青山峰芳、小宮良輔、富田麻衣子、藤掛数馬、吉澤佐也、播磨恵、太田晴子、藤田義人、祖父江和哉: エリスロポエチンの脳保護効果の発現機序解明 - 脳内免疫担当細胞ミクログリアに対する効果に注目して -. 第 41 回日本集中治療医学会学術集会 2014 年 2 月 27 日-3 月 1 日 京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)

〔図書〕(計 2 件)

祖父江和哉、田村哲也: Q 3. 血液脳関門と脳浮腫. 編集 内野博之 「神経麻酔 Q&A エビデンスに基づく最新の知識とテクニック」 総合医学社 p15-9, 2014

田村哲也、吉村真一郎、祖父江和哉: 症例検討 脳外科手術: 血液脳関門, 脳浮腫と輸液製剤の選択. 編集 松永明 「LiSA コレクション 症例で学ぶ周術期の輸血管理」 メディカル・サイエンス・インターナショナル p46-53, 2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幸村 英文 (Komura, Hidefumi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 70464576

(2) 研究分担者

笹野 寛 (SASANO, Hiroshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 20215742

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