

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860493

研究課題名(和文) アルコールによるAQP4 active-site同定による脳浮腫発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of brain edema under alcohol by means of identification of AQP4 active site

研究代表者

片田 竜一 (Katada, Ryuichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00423757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エタノールによる脳挫傷後脳浮腫の悪化は、アクアポリン4(AQP4)の発現増大が主な原因である。AQP4はNaチャンネルと共役、調整されることが知られている。本研究では、ラット初代培養アストロサイトをj用し、低Na及び高Naあるいはエタノール負荷下において、Na及びエタノールのAQP4発現に及ぼす影響を検討し、脳浮腫の機序解明を目指した。低NaはアストロサイトにおけるAQP4発現を増大させるが、NKCC1をノックダウンさせると増大が抑えられた。このことから、Na異常による脳浮腫の形成につながるAQP4発現変化はAQP4とNaチャンネルとの関連性が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that ethanol has the bad effect on traumatic brain injury, which is due to the increase of aquaporin-4 (AQP4) expression. AQP4 has the interaction between ion channel (sodium channel). In this study, to elucidate the effect of sodium ion and ethanol on brain edema, rat primary astrocytes were incubated in hypo- or hyper-sodium and ethanol condition. Hypo-sodium increased AQP4 expression, however, siNKCC1 inhibited that AQP4 increasing. From these findings, AQP4 expression, which is related to sodium ion-induced brain edema, may be related to changing between AQP4 and sodium channel.

研究分野：法医学

キーワード：アルコール医学 アクアポリン4 脳浮腫 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

法医学実務において、頭部外傷を受傷した事例の約 50%に中等度から高等度のアルコール摂取が認められている。また、血中のエタノール濃度が高ければ高いほど重症化することが知られている。その原因としては、醗酵による重症化、凝固系の変化による止血困難、アルコールそのものによる脳挫傷の重症化などが考えられているが、一定の結論は得られていない。脳挫傷後に生じる脳浮腫は重大な合併症であり、神経学的な予後不良因子であり²⁾、これらが関与している可能性がある。私たちは、ラット脳挫傷モデルにより、エタノールを前投与し、脳挫傷後に生じてくる脳浮腫が増大することにより死亡率が増加することを示した (Katada et al. J. Neurotrauma, 2009)。その脳浮腫の形成において、水チャンネルの一つである aquaporin-4 (AQP4) が関与することが知られており、われわれのこれまでの研究により、AQP4 の発現が、エタノール投与における脳挫傷後 24 時間で有意に上昇していた (Katada et al. Am J Pathol, 2012)。AQP4 は電解質異常、特にナトリウム (Na) 濃度が低下した際、AQP4 の発現が上昇するという報告があり、血中における Na 濃度は、エタノール投与における脳挫傷後 24 時間で有意に低下していた。さらに私たちは、法医学実務において、淡水溺水 (著明な低 Na 血症を来す) 事例において、脳 AQP4 の発現が上昇することを見出した (Katada et al. Forensic Sci Int, revised)。脳浮腫をはじめとした浮腫には、種々のイオンチャンネルが関与していることが知られている。AQP4 はイオンチャンネル等と共役していることがわかっており、Na-K ATPase、metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter-1 (NKCC1)、inward rectifier K^+ -channel (Kir4.1)、Ca イオンの細胞内取り込みに関与する transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)、P2 purinergic receptor などが報告されている。また AQP4 と NKCC1 の共通のアンカー蛋白として alpha-syntrophin が知られている。これらのことから、エタノール投与における脳挫傷後脳浮腫の増悪に AQP4 が関与し、その発現上昇を来す機序として血中の Na 濃度をはじめとした電解質異常およびイオンチャンネルが関与する可能性が示唆される。また溺水事例では Na 濃度異常をはじめとした電解質異常を生じ脳浮腫を来す。そこで本研究では、AQP4 発現・細胞膨化に及ぼすエタノール・Na の AQP4 に及ぼす影響を細胞実験により検討し、脳浮腫形成の機序に迫る。

2. 研究の目的

エタノール存在下で脳挫傷を受傷すると、細胞膜に発現しているイオンチャンネルが活性化・AQP4 発現の上昇を来し、細胞性脳浮腫を来す。また、脳浮腫を来す脳症についても同様もしくはそれに近い機序が働くと予

想されるため、以下の点に関し細胞実験での検討を行った。

- (1). 正常培地での初代培養アストロサイトにおける AQP4、Na チャンネルタンパク発現程度。
- (2). 低 Na 培地および高 Na 培地、エタノール暴露環境でのアストロサイトにおける AQP4 および Na チャンネルのタンパク発現程度の変化。
- (3). AQP4 および Na チャンネルをターゲットとした siRNA の設計および有効性評価。

3. 研究の方法

AQP4 は Na チャンネルと結合 (共役) している。われわれは、エタノール摂取により脳挫傷後、脳 AQP4 発現の上昇、低 Na 血症を呈し脳浮腫が増大する機序を明らかにするため、初代培養アストロサイトにおける AQP4 発現の程度、低 Na 環境での最適培地の検討を行ってきた。初年度は、AQP4 の主要な発現細胞であるアストロサイト使用した細胞実験を行い、低 Na 環境およびエタノール環境による AQP4 およびイオンチャンネル (NKCC1) の発現の程度を以下の方法で検討した。

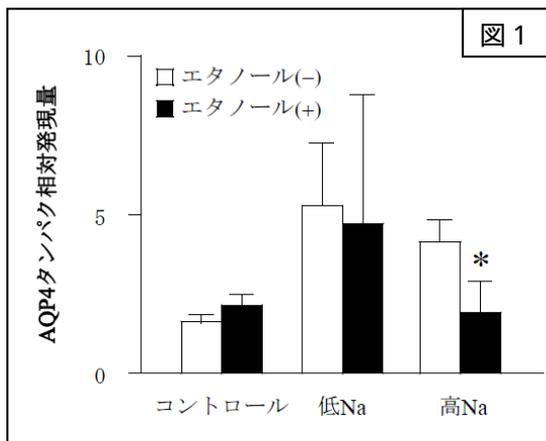
既報に従って、幼若ラット (生後 2-4 日) からアストロサイトを抽出し、牛血清を 10% 含んだ等張 MEM 培地 (塩化ナトリウム: 680 mg/dL)、低ナトリウム MEM 培地 (塩化ナトリウム: 410 mg/dL) および高ナトリウム MEM 培地 (塩化ナトリウム: 950 mg/dL) を作成してアストロサイトに対して負荷を行った。エタノールは 25 mM の濃度で調整した。負荷開始 30 分、3 時間、6 時間、24 時間後にアストロサイトを回収し、タンパクを抽出後、ウェスタンブロッティングで検討した。SDS-PAGE にて泳動後、ニトロセルロース膜に転写。スキムミルクにて 6 時間ブロッキングした後、1 次抗体を 1 時間アプライ、2 次抗体は HRP 標識 anti-rabbit IgG 抗体を 1 時間 30 分アプライし、検出は Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, USA)、Versa Doc 5000 (BioRad) で行い、定量は Quantity One (BioRad) で行った。さらに、エタノール存在下でのナトリウムの影響を検討するため、等張 MEM 培地にエタノールを添加し 3 時間負荷後、エタノール濃度はそのままにして、低ナトリウム MEM 培地あるいは高ナトリウム MEM 培地に 3 時間負荷し、その後アストロサイトからタンパクを抽出後、同様にウェスタンブロッティングで検討した。

AQP4 及び NKCC1 のノックダウンに及ぼす浮腫の影響を検討するため、それぞれに対する siRNA (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) を使用し、同様の検討を行った。

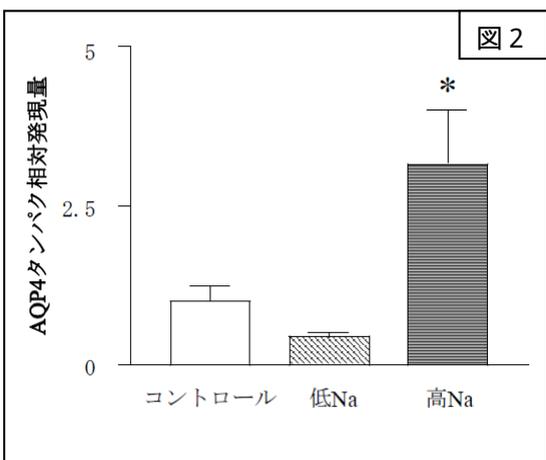
4. 研究成果

エタノール 3 時間負荷におけるアストロサイト AQP4 発現の結果を図 1 に示す。低ナトリウムはアストロサイトにおける AQP4 の発

現を増大させたが、エタノールと同時負荷による有意な差は認められなかった。高ナトリウムにおいて、エタノール(25 mM)の同時負荷は AQP4 発現を有意に減少させた(図 1)。



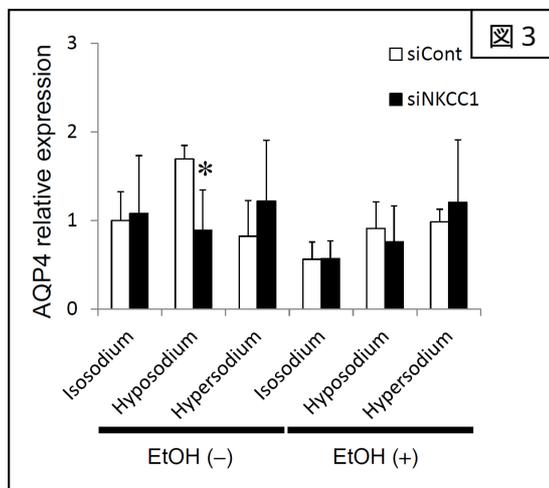
このことから、エタノールは高ナトリウム環境においてアストロサイトの AQP4 発現を減少させる。エタノール(25 mM)を 3 時間負荷させた後、エタノール濃度はそのまま低ナトリウム、高ナトリウムに 3 時間負荷した結果を図 2 に示す。エタノールが負荷された状態から高ナトリウムに変化するとアストロサイト AQP4 発現が増大した。



AQP4 は Na-K ATPase などのナトリウムイオンに関するイオンチャンネルと関連があると言われている。また、エタノールも同様にイオンチャンネルに影響することが知られている。低ナトリウム環境においては AQP4 発現が増大するものの、エタノールは AQP4 発現に関与するイオンチャンネルには影響を及ぼさず、高ナトリウム環境においては、高ナトリウムとエタノールの同時負荷では AQP4 発現が抑制されるが、エタノール存在下で高ナトリウム環境へと変化させると発現が増大した。このことから、高ナトリウムがアストロサイト AQP4 発現に及ぼす機序において、エタノールが影響することが示された。

AQP4 を siRNA でノックダウンすると NKCC1 発現に対しては影響を及ぼさなかった。しかしながら、NKCC1 の siRNA によるノックダウンでは、低ナトリウム環境において発現が低

下した(図 3)。



エタノールは NKCC1 ノックダウンにおける AQP4 発現に影響を及ぼさなかった。AQP4 と NKCC1 の アンカー 蛋白である alpha-syntrophin については、siAQP4 で高ナトリウム及びエタノール暴露環境で発現が増大した。このことから、低ナトリウム環境における AQP4 発現増大に対し、NKCC1 が関与することが示された。しかしながらエタノールのように AQP4 発現に関する機序に影響を及ぼすのかは今後の検討課題である。

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 2 件)

Katada R, Sugimoto K, Yoshida M, Matsumoto H. Ethanol increases astrocyte aquaporin-4 expression under hyper-sodium condition. Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence, 査読有, 49, 2014, 188-194

片田竜一、杉本香奈、吉田原規、松本博志. エタノールはナトリウムによる AQP4 動態変化に影響する. アルコールと医学生物学, 査読無, Vol. 33, 2014, 56-57

[学会発表](計 6 件)

Katada R, Sugimoto K, Nakama K, Yoshizawa H, Yoshida M, Matsumoto H. The role of sodium channel on ethanol-induced aquaporin-4 expression. Neuroscience2014, November 18, 2014, Washington DC, USA.

Katada R, Sugimoto K, Yoshida M, Matsumoto H. Ethanol-induced AQP4 expression is involved in sodium ion channel in astrocyte. 16th International Society of Addiction Medicine Annual Meeting, October 6 2014, Yokohama, Japan.

片田竜一、杉本香奈、中間健太郎、吉澤

秀憲, 吉田原規, 松本博志. エタノールによる水チャンネル発現変化に及ぼす Na チャンネルの影響. 平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 .2014 年 10 月 3 日、横浜.

片田竜一, 杉本香奈, 佐藤崇裕, 中間健太郎, 吉澤秀憲, 吉田原規, 松本博志. エタノールによるアクアポリン 4 発現増大に及ぼす Na チャンネルの役割. 第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 12 日、横浜.

Katada R, Sugimoto K, Yoshida M, Matsumoto H. Astrocyte aquaporin-4 expression is increased by hyper-sodium under ethanol exposure. 37th Annual Research Society on Alcoholism (RSA) Scientific Meeting and 17th Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA), June 24, 2014, Bellevue, USA.

Katada R, Sugimoto K, Yoshida M, Matsumoto H. Water channel aquaporin-4 is regulated by sodium ion and ion channel. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine, June 17, 2014, Fukuoka, Japan.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.legal.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片田 竜一 (KATADA RYUICHI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：00423757

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：