

の再生が試みられている。本研究はこういった再生医学の中で新しい視点から中枢神経再生の可能性を切り開くことを目指している。すなわち中枢神経が損傷を受け再生させていく過程においてその再生を補助するために有用な分子機構を解明する分子生物学的アプローチである。具体的な研究の概要は以下の通りである。

中枢神経が損傷を受け再生させていく過程において中枢神経細胞は著しい環境の変化を受ける。この環境変化は神経細胞にとって非常なストレスとなる。神経細胞は自身の再生のための機構のみならずこういったストレスに対する防御にも細胞の持つエネルギーを消費せねばならず中枢神経再生への負の要素になっていることが考えられる。そこで我々はこの問題を解決するための第一ステップとして、損傷時に中枢神経細胞が受ける細胞ストレスを明らかとしその防御機構を解明することを試みる。そして第二ステップとして、損傷中枢神経再生過程においてこのストレスを軽減または防御機構を増強することで損傷中枢神経細胞再生効率の改善を図る。

本研究のゴールは困難とされている中枢神経損傷による機能障害回復を、これまでほとんど着目されて来なかったアプローチによって効率的にかつ効果的に修復させるストラテジーを開発することで中枢神経再生研究に貢献する事である。

## B 研究方法と結果

### 1 小胞体ストレス応答関連分子の同定

中枢神経細胞が損傷を受けたとき神経細胞をはじめとする損傷部ではその再生の

ために大量の新生タンパク合成が必要となる。一方損傷部においては血液循環等が障害され栄養や酸素供給が不足する細胞飢餓の状態になっている。こういった環境下ではタンパク合成機構の需要と供給のバランスが崩れており蛋白合成の主要な場である小胞体では著しいストレス負荷(小胞体ストレス)がかかっていると考えられる。

我々はこのストレス応答(unfolded protein response)に関わる分子群を同定していくことでこの分子機構を解明しストレス負荷の軽減をはかる、そしてこの分子機構を利用した小胞体ストレスに対する防御機構の活性化により損傷神経細胞再生を促進させることを期待する。

今回我々は yeast two hybrid 法を用いて小胞体ストレスセンサー蛋白である Ire1 に相互作用を示す分子をスクリーニングした。その結果としてシグナル分子 JAB1 を同定した。この分子は小胞体ストレス応答でも重要な役割を担う Jun のシグナル経路において働く事が知られている分子である。我々の機能解析の結果ではこの小胞体ストレス応答関連分子 JAB1 はその活性化により Ire1 との結合強度を変化させ Ire1 の下流にある転写制御因子 XBP1 をはしめとするストレス応答遺伝子群の活性制御を行っている事が明らかとなった。また JAB1 分子の機能構造を解明する事を意図して5種類の JAB1 活性変異体を作成し JAB1 の各トメインごとの小胞体ストレス応答における機能解析を試みた。この解析により我々は Ire1 に結合するかストレス刺激によっても解離する事ができない JAB1 変異体の作成に成功し、本変異体の強制発現させた細胞では小胞体ストレス刺激によってもその下流が活性化されない事からシグナル経路活性化に本遺伝子の機能トメインが不可欠である事が明らかとなった。

### 2. ミトコンドリアストレス応答

中枢神経が損傷を受けるような環境は細

胞のレベルからみれば、かなり激しい損傷すなわち多様なストレスがかかっている複合的なストレス負荷状態であると考えられる。これまでの細胞内ストレス研究は比較的緩徐な刺激が想定されており、慢性的な刺激下での応答が積極的に解明されて来た。確かに中枢神経が損傷を受けている時、小胞体ストレスといったストレス負荷よりも細胞の生死の方が前面に出てくるので一見重要でないように考えられてきたが細胞が生存し再生に向かうためには各種の細胞内ストレス負荷は再生阻害の方向の要素でありこれらを取り除いてやる事で再生が容易になるという事が考えられる。

我々はまず神経損傷という激しい環境ストレス刺激下であるということからストレスは小胞体のみならず他の細胞内小器官にもかかっていると考えそのストレス応答の有無について検討した。最初にターゲットとしたのはエネルギー供給に重要な役割を果たし更には細胞の生死の決定にも中心的役割を担うミトコンドリアであった。

具体的な研究としてはまずミトコンドリアが正常状態に営んでいる蛋白代謝をミトコンドリア特異的に攪乱する事で誘導されてくる分子を検索した。この検索により我々はミトコンドリアに特異的に障害を与えた時に誘導を受けるミトコンドリア特異的シャペロンを見出した。このストレス応答は小胞体ストレスやその他の細胞ストレスでは誘導されないミトコンドリア特異的なものであった。現在このストレス応答に働く分子群の同定を試みている。

## C 考察及び結論

中枢神経再生が可能でない原因としては

次の3つの要因が考えられている。

- 1) ミエリンに再生阻害因子が存在している
- 2) 中枢神経は再生力が弱い
- 3) 新たな神経細胞が生まれてこない

最近の研究は要因1を中心にして積極的に行われてきた。要因2については再生促進因子の探索などが試みられている。しかし我々は促進因子を増強してやるという発想を転換し再生にとって足かせとなっている各種の要因を取り除いていくことで再生を促進することを考えた。

特に今回新たに見出したミトコンドリアストレス応答は我々の見出したミトコンドリアストレス特異的なシャペロンの誘導を手がかりに応答経路に働く分子の同定を試みることに可能となった。これら分子の同定によりミトコンドリア特異的ストレスの軽減を試みる。また同様の視点からコルシ体やリソソームへのストレス負荷の有無を検討し中枢神経障害時の各種細胞内小器官ストレス負荷については細胞へのストレス負荷の分子機構の全貌を解明しその軽減をはかることで損傷神経再生を促進することを試みる。

## D 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Taichi Katayama, Kazunori Imaizumi, Takunari Yoneda, Manabu Taniguchi, Takayuki Manabe, Akiko Honda, Junichi Hitomi, Kayoko Oono, Kosuke Baba, Shinsuke Matsuzaki, Koichi Takatsuji and Masaya Tohyama Role of ARF4L in recycling between endosomes and the plasma membrane, *Cellular and Molecular Neurobiology*, in press

2) Kayoko Oono, Takunari Yoneda, Shingo Miyata, Takayuki Manabe, Satoru Yamagishi, Satoshi Matsuda, Junichi Hitomi, Kazunori Imaizumi, Taichi Katayama, and Masaya Tohyamaa, JAB1 participates in unfolded protein responses by association and dissociation with IRE1, *Neurochemistry international*, in press

## 2 学会発表

- 1) 米田託成、水野龍義、遠山正彌 ミトコントリアにおける蛋白品質管理機構、第 108 回日本解剖学会総会、福岡、2003
- 2) 米田託成、水野龍義、遠山正彌、ミトコントリアストレス応答の分子機構、第 26 回日

本神経科学大会 名古屋、2003

- 3) 米田託成、水野龍義、吉村多永子、David Ron、遠山正彌、ミトコントリアストレス応答の分子機構、CREST シンポジウム、東京、2004

## E 知的所有権の取得状況

- 1 特許取得 なし
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

### 中枢神経損傷後の細胞応答反応とその修飾の研究

分担研究者 吉峰俊樹

大阪大学大学院 医学系研究科 神経機能制御外科学講座 教授

**研究要旨** びまん性脳損傷モデルでは、びまん性脳損傷の病態を明らかにし BDNF 投与による機能回復の可能性が示唆された。脊髄損傷モデルでは PP1 や MCI-186 による二次損傷の抑制ならびに機能回復の可能性が示唆された。以上の結果から今後、中枢神経損傷の新たな治療法の開発が可能であると考えられた。また、中枢神経損傷後の中枢神経再生の可能性については cyclin dependent kinase (cdk) inhibitor である P21 投与による脳神経細胞軸索再生について検討を行っている。

#### A 研究目的

近年の救急医療の進歩により中枢神経損傷患者の救命率は向上してきたか、慢性期に至っても重篤な機能障害のために社会復帰がかなわない患者が依然多く存在する。また、重症頭部外傷などの中枢神経損傷は社会や家庭の重要な担い手である青壮年層に最も多いことから機能障害の遺存は患者本人・家族に重大な問題を提起するばかりでなく、社会的に大きな問題となっている。中枢神経損傷後の機能回復には、その病態の解明と一時損傷に引き続いておこる二次損傷の軽減が必要であるかその詳細は明らかではなく有用な治療法も確立されていない。以上のことから本研究では主にびまん性脳損傷モデルと脊髄損傷モデルを用いてその病態の解明ならび

に二次損傷の軽減、治療法の開発を行った。

#### B 研究の方法と結果 C 考察、及び D 結論

##### 1 Src family kinase inhibitor PP1 による脊髄圧挫傷後の運動機能改善効果について

脊髄損傷に伴う二次的損傷には VEGF を介した血管透過性亢進の関与が報告されており、これまでに我々は、VEGF の下流に存在する Src family kinase の特異的阻害剤である PP1 が脊髄圧挫傷後の二次的損傷を抑制し得ることを報告してきた。今回、軽度脊髄損傷モデルを作成し PP1 の運動機能改善

効果を免疫組織学的検索も含めて検討した。

【方法】実験には雌性 Wistar ラット (BW 220g, n=35) を用いた。全麻下に脊髄をヒーマークリップ (把持力 25g) で硬膜外から 5 秒間圧挫する軽度脊髄損傷モデルを作成した。損傷 10 分後に PP1 (1 5mg/kg, PP1 群) 又は溶解液のみ (対照群) を腹腔内投与し、その後の運動機能を 7 段階 (S0-6) で評価した。また 3、7、14 日後に脊髄を摘出し、浮腫進展及び炎症の範囲等を免疫組織学的に検討した。

【結果】損傷直後の運動機能は両群共 flaccid (S6) であった。3 日後においては対照群で spastic であった (S5) か、PP1 群では膝関節での歩行を認めた (S3)。また 7 日後には対照群で膝の動きを認めるのみであった (S4) のに対して、PP1 群では失調性の歩行まで改善していた (S2)。組織学的検討にて PP1 群では浮腫進展及び炎症範囲の著明な縮小を認めた。

【結論】PP1 の投与にて脊髄圧挫傷後の運動機能改善を認めた。機序として脊髄損傷後の浮腫形成や炎症などの二次的損傷の抑制が考えられた。今後、脊髄外傷の治療への応用が期待される。

## 2 MCI-186 による脊髄外傷後の二次的損傷に対する効果について

脊髄外傷後に生じる二次的損傷には、血管透過性亢進、炎症反応の増大等の他に、フリーラシカルの関与が報告されている。ラシカル消去薬 MCI-186 は脳梗塞急性期の虚血障害を抑制する薬剤

として既に臨床応用されているか、脊髄外傷後の二次的損傷に対する効果は未だ明らかではない。今回ラットの脊髄圧挫傷モデルを用いて MCI-186 による二次的損傷への効果について検討した。

【方法】実験には雄性 Wistar ラット (8 週齢, BW 220g, n=20) を用いた。全麻下に脊髄をスキタクリップ (把持力 70g) で硬膜外から 3 秒間圧挫する脊髄圧挫傷モデルを作成した。損傷 10 分後に MCI-186 (3mg/kg, 治療群) 又は溶解液のみ (対照群) を静脈内投与した。3 日後に脊髄を摘出し、dry weight 法を用いて浮腫の定量を行った。また炎症反応について抗 ED-1 抗体等を用いて免疫組織学的に検討した。

【結果】損傷 3 日後の浮腫は治療群で  $70.01 \pm 2.00(\%)$  となり、対照群の  $73.31 \pm 1.75(\%)$  と比べて有意に軽減していた。また抗 ED-1 抗体を用いた macrophage の浸潤の検討では、対照群では広範に macrophage の浸潤を認めたのに対して、治療群では挫滅部とその周囲に限局する傾向を認めた。浸潤範囲を定量したところ治療群では対照群の約 50% と有意な範囲の縮小を認めた。

【結論】本研究により MCI-186 の投与が脊髄損傷後の二次的損傷を軽減することか示され、今後は投与方法などを更に検討することにより脊髄外傷の治療に応用できる可能性が示唆された。

## 3 ひまん性脳損傷モデルにおける病態の解明

遷延性意識障害や活動性の低下は重

症頭部外傷、とくにびまん性脳損傷患者にとって重大な問題である。ノルアドレナリン(NA)系ニューロンは脳のほぼ全域に投射し、脳損傷後の活動性や意識レベルの変化と密接に関連していることが知られている。また、ノルエピネフリン(NE)の放出と代謝は脳損傷の種類や程度、部位により影響されることや、NE 投与により種々の局所脳損傷モデルで受傷後の機能回復が認められることか近年報告されている。びまん性脳損傷後の遷延性意識障害や活動性の低下にも同様に中枢 NA 系の変化が関与していると推察されるかその詳細はいまだ明らかではない。本研究ではラットびまん性脳損傷モデルを用いて、NA 系中枢神経に対してびまん性脳損傷の与える形態的、神経化学的影響について検討を行った。

【方法】雄性 SD ラットに weight-drop device を用いてびまん性脳損傷を作成した。受傷後 1, 2, 7, 14, 28, 56 日の時点で青斑核の NA ニューロンの形態的变化を画像解析ソフトを用いて解析した。また、HPLC-ED を用いて脳組織中の norepinephrine (NE)と代謝物質である 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol(MHPG)を測定し、NE 代謝について解析した。

【結果】受傷直後の死亡率は 19.5%であり中程度から重度の頭部外傷であった。脳挫傷や頭蓋骨骨折は認めず、anti-68kD-neurofilament による免疫染色では受傷後 1-2 日で典型的なびまん性軸索損傷の所見を認めた。青斑核における NA ニューロンのサイズは受傷後 1 日で対照と比較して  $111.2 \pm 3.58\%$ に増

加し( $p < 0.05$ )、7 日では  $72.9 \pm 2.07\%$ へと著明に減少していた( $p < 0.01$ )。14 日でも  $82.4 \pm 3.71\%$ と減少していたが( $p < 0.01$ )、28 日、56 日では対照とほぼ同等に回復していた。軸索は受傷後 1, 2 日では腫脹し、7 日で退縮した。NE 総量は実験期間を通して減少は認めず、むしろ僅かに増加していた( $p < 0.05$ )。一方、NE 代謝は受傷後 2 日では対照群と有意な差を認めなかったか、7 日で  $22.6 \pm 3.38\%$ と著明に低下し、14 日、56 日でも低値にとどまった( $p < 0.01$ )。

【考察】青斑核における NA ニューロン細胞体の腫大、退縮、回復の一連の形態変化は、びまん性脳損傷による軸索輸送の障害とその後の反応によって引き起こされると考えられた。NA ニューロンの形態は受傷後 28-56 日で回復したが大脳皮質での NE 代謝は受傷後 56 日でも低下しておりシナプス活動の低下や NA ニューロン投射経路の減少かその原因として考えられた。長期間にわたる NE 代謝の低下か、臨床で見られるびまん性脳損傷後の遷延性意識障害や活動性低下と関連していることが示唆され、さらなる検討かびまん性脳損傷患者の治療法の確立につながると考えられた。

#### 4 びまん性脳損傷モデルにおける BDNF を用いた治療法の開発

我々はこれまでにびまん性脳損傷動物モデルを確立し、中枢ノルアドレナリン系に対する影響と青斑核神経細胞における BDNF 蛋白の変化を検討してきた。その結果、びまん性脳損傷動物モデル

においては青斑核からの BDNF 供給が減少していることか推測され、びまん性脳損傷動物モデルに対して BDNF を投与することで脳損傷後の機能障害の改善か期待され、慢性期頭部外傷患者の高次脳機能障害の治療につながるのではないかと考えられた。以上のことから、ラットびまん性脳損傷モデルに BDNF を投与し、受傷後の行動、活動性変化に及ぼす影響を定量的に検討した。

【方法】雄性 SD ラット(500-550g)に Marmarou らのモデルに準じた weight-drop device (450g,1.5m)を用いてびまん性脳損傷を作成し、埋め込み型浸透圧ポンプを用いて脳室内に BDNF 20  $\mu$ g/day を受傷直後より2週間持続投与した。受傷前、受傷後2日、1週間、2週間、4週間、8週間の時点で行動記録装置を用いて open field での行動を記録した。記録したデータは移動距離、エリア横切り回数、方向転換回数、初期反応潜時について解析し、同一動物における受傷前値との%値として評価した。

【結果】対照群では移動距離、エリア横切り回数、方向転換回数とも受傷後全例において低下し、初期反応潜時の遅延を認めた。受傷後2日の対照群における移動距離は受傷前値の  $42.9 \pm 10.7\%$  に、エリア横切り回数は  $25.5 \pm 12.6\%$  に低下し、初期反応潜時は  $709.8 \pm 88.1\%$  に遅延した。一方 BDNF 投与群では受傷後2日それぞれ  $80.79 \pm 23.7\%$ 、 $73.3 \pm 39.9\%$ 、 $53.4 \pm 43.7\%$  であり有意に改善していた。

【考察】BDNF 脳室内投与により、びまん

性脳損傷モデルにおける受傷後の行動、活動性の改善を認めた。しかし摂食異常による体重減少や生存率の低下などが副作用として認められ、投与量、投与方法などについてさらに検討が必要と考えられた。

#### 5 cyclin dependent kinase (cdk) inhibitor P21 投与による脳神経細胞軸索再生の可能性について

中枢神経系では、成熟神経細胞の軸索再生を阻害するメカニズムが存在し、そのため神経の再生が起こりにくい。この軸索進展抑制分子の代表的なものとして、Nogo, CSPG, MAG などが同定されてきて、逆にこれらの蛋白の機能を阻害することで中枢神経での軸索再生が促されることかわかってきた。その中で、MAG は neurotrophin receptor である p75 を介して軸索の腿縮を惹起しており、これは Rho の活性化による作用であることがわかった。この Rho の活性化は他の再生阻害因子にも共通の signal である。活性化された GTP 結合型 Rho はそのエフェクターである Rho kinase を介してその作用を示し、軸索の腿縮を惹起する。

一方、幼若神経細胞では分化した神経細胞と異なり、MAG 等の再生阻害因子に対して抵抗性を示し、軸索伸展させることか知られている。神経前駆細胞から神経細胞へ分化するにあたって、まず非分裂状態となるため細胞周期の停止か生じるか、この際に cdk inhibitor である p21Cip1/WAF1 か関与する。神経前駆細胞ではこの p21 は核内に存在するか、

神経細胞に分化すると細胞質内へと移行する。前述の細胞周期停止という働きを終えた p21 は Rho kinase と細胞質内で直接結合することにより Rho の活性を抑制し、軸索進展を促す。また、p21 を細胞質内に強制発現させることで神経突起伸長が促進されることも明らかになった。このことから、TAT などの細胞質内移行分子を結合した p21 蛋白を精製し髄腔内投与することにより神経細胞を幼若期の状態にし、軸索を再生するという治療へと応用できる可能性が考えられた。

以上のことから、ラットびまん性脳損傷モデルを使用し、P21 を髄腔内投与、対象と比較しその組織学的検討と機能回復の評価を行っている。

## E 研究発表

### 論文発表

- 1 Fujinaka T, Kohmura E, Yuguchi T, Yoshimine T The Morphological and Neurochemical Effect of Diffuse Brain Injury on Rat Central Noradrenergic System *Neurol Res* 25 35-41,2003
- 2 Akiyama C, Yuguchi T, Nishio M, Fujinaka T, Taniguchi M, Nakajima Y, Yoshimine T Src family kinase inhibitor PP1 improves motor function by reducing edema after spinal cord contusion in rats *Acta Neurochir Suppl* 2003,86 421-3
- 3 Nishio M, Kohmura E, Yuguchi T, Nakajima Y, Fujinaka T, Akiyama C, Iwata A, Yoshimine T Neuronal

apolipoprotein E is not synthesized in neuron after focal ischemia in rat brain *Neurol Res* 2003 Jun,25(4) 390-4

- 4 Yuguchi T, Nishio M, Akiyama C, Ito M, Yoshimine T Posterior microendoscopic surgical approach for the degenerative cervical spine *Neurol Res* 2003 Jan,25(1) 17-21
- 5 Toyota S, Graf R, Valentino M, Yoshimine T, Heiss WD Prediction of malignant infarction perifocal neurochemical monitoring following prolonged MCA occlusion in cats *Acta Neurochir Suppl* 2003,86 153-7

### 学会発表

- 1 Akiyama C, Yuguchi T, Nishio M, Tomishima T, Toyota S, Fujinaka T, Taniguchi M, Nakajima Y, Yoshimine T Src family kinase inhibitor PP1 reduces secondary damage after spinal cord compression in rats *Brain'03 & Brainpet'03*, Jun 29, 2003, Calgary, Alberta (Canada)
- 2 秋山智洋、湯口貴導、西尾雅実、富島隆裕、藤中俊之、谷口理章、中島義和、吉峰俊樹 Src family kinase inhibitor PP1 による脊髄圧挫傷後の運動機能改善効果について *日本神経外傷学会*, 2003 3 29, 奈良
- 3 秋山智洋、湯口貴導、富島隆裕、豊田真吾、藤中俊之、西尾雅実、岩月幸一、中島義和、吉峰俊樹



MCI-186 による脊髄外傷後の 2 次的損傷に対する効果の検討 日本神経外傷学会, 2004 3 26, 東京

G 知的所有権の取得状況

- |          |    |
|----------|----|
| 1 特許取得   | なし |
| 2 実用新案特許 | なし |
| 3 その他    | なし |

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

「脳浮腫における水選択性チャンネル蛋白 (AQP) の役割に関する研究」

分担研究者 種子田 護 近畿大学医学部脳神経外科学 教授  
研究協力者 片岡 和夫 近畿大学医学部脳神経外科学 助教授

研究要旨 外傷性脳損傷では脳浮腫が生じる。脳浮腫は頭蓋内圧亢進を生じ、その制御が重要な治療となる。脳損傷急性期では損傷脳の組織浸透圧の変化が脳浮腫と関係している。また最近その存在が明らかとなった aquaporin (AQP) は生体には不可欠の水を制御するチャンネル蛋白である。脳浮腫の病態に水チャンネル AQP が関与していると考えられる。そこで浸透圧変化・脳腫瘍の脳浮腫の原因と考えられている vascular endothelial cell growth factor (VEGF) および腫瘍性浮腫に有効な副腎皮質ホルモンかアストロサイトの AQP の発現にどう影響を与えるかについて検討した。培養アストロサイト細胞に高浸透圧変化を与えると、アストロサイトの AQP 発現は上昇し、低浸透圧変化を与えると減少した。脳腫瘍周囲に高発現する AQP 4 は脳浮腫形成の一因とされる VEGF が直接的に関与しないことが明らかとなった。

### A 研究目的

生体にとって水分の制御は極めて重要である。最近、生体内での水移動に関する分子レベルでの研究が進み、水選択性チャンネル蛋白・aquaporin (AQP) が発見された。生理的条件下では細胞内のみならず細胞外腔における水移動は多くの場合浸透圧格差に伴う水拡散により行われており、その水の通路が AQP と考えられている。脳組織における水の増加・脳浮腫は外傷性脳損傷でも発生し、頭蓋内圧を亢進させ脳病態をさらに悪化させる。脳浮腫の制御は

外傷性脳損傷の治療の重要な部分を占める。脳浮腫病態における AQP の役割について検討した。

### B 研究方法

マウス由来のアストロサイト細胞を分離し培養系を確立した。アストロサイト培養系を低浸透圧及び高浸透圧刺激、腫瘍性脳浮腫への関与が疑われる mouse vascular endothelial cell growth factor (VEGF) 刺激そして脳浮腫の治療に用いる副腎皮質ホルモン刺激を行った。培養細胞より RNA を

抽出しアクアポリン mRNA 発現について高感度定量的PCR装置を用いた quantitative RT PCR 法にて検討した。

### C 研究結果

AQP は現在 11 のサブタイプが確認されている。さらに AQP ファミリーはアミノ酸の相同性と構造上の特徴及び機能より, CHIP (channel-like integral protein) (AQP 0, 1, 2, 4, 5, 6, 8) と GLP (aquaglyceroporin) (AQP 3, 7, 9) の 2 グループに分類される。機能的には CHIP グループは水を選択的に透過するのに対し, GLP グループは水だけでなく, グリセオールや尿素のような中性小分子も透過するとされている。正常アストロサイト培養細胞からは AQP 4 mRNA の発現が最も多く認められた。低浸透圧刺激(浸透圧 225mOsm)では AQP ファミリーはすべて減少した。高浸透圧刺激(浸透圧 375mOsm)では AQP 4, 8 の mRNA 発現が増加を示した VEGF 刺激では AQP 3, 8 の mRNA 発現が増加し, AQP 9 の mRNA 発現は減少を示した。副腎皮質ホルモン(ヘタメサゾン)刺激では AQP 3 の mRNA 発現が減少した。

### D. 考察

脳挫傷・脳虚血における脳浮腫には細胞内浮腫(cytotoxic edema)と血管性浮腫(vasogenic edema)がある。脳虚血後に cytotoxic edema がおこり, 時間の経過とともに vasogenic edema が引き続き起こる。虚血病態下では経時的な AQP 発現上昇が生じる。すなわち虚血後 1 日で急速に AQP 4

の mRNA が増加し, vasogenic edema が生じている 3 日で最高値に達し 7 日間高値を維持する。また AQP 4 ノックアウトマウスでの虚血性脳浮腫の発生状況をみた研究では, 脳浮腫の程度が軽度となる。すなわち AQP が脳浮腫を悪化させる因子と成りうると考えられる。脳虚血・脳挫傷の脳損傷部では組織浸透圧が急速に上昇する。本研究が明らかにしたように高浸透圧培養下でのアストロサイトは AQP 発現を上昇させる。

### E 結論

AQP ファミリーは細胞内・細胞外腔の浸透圧変化に著明に反応する水チャンネルで, 高浸透圧により AQP 発現上昇が認められた。さらに AQP は脳浮腫を悪化させる因子の一つであることが示唆された。今後, AQP 発現抑制が脳浮腫治療につながると思われる。

### F 研究発表

#### 論文発表

- 1 片岡和夫, 種子田 護 Cerebral de novo aneurysm Clinical Neuroscience 21 1266-1268, 2003
- 2 片岡和夫, 種子田 護 ミクログリア 脳 21, 6 240-244, 2003
- 3 片岡和夫, 中村英剛, 朝井俊治, 種子田 護 脳損傷とミクログリア 脳 21, 6 267-273, 2003

#### 学会発表

- 1 片岡和夫, 種子田護 脳動脈瘤と加齢, 第 12 回日本脳トク学会, 2003 年 6 月

- 2 朝井俊治, 木本敦史, 住井利寿, 寺本佳史, 片岡和夫, 種子田護 内頸動脈硬膜輪近傍動脈瘤に対する神経内視鏡支援手術の有用性, 第 62 回日本脳神経外科学会総会, 2003 年 10 月
- 3 寺本佳史, 片岡和夫, 朝井俊治, 渡邊啓, 種子田 護 虚血性脳浮腫に対するアクアポリンの役割, 第 29 回日本脳卒中学会 2004 年 3 月
- 4 木本敦史, 片岡和夫, 種子田 護 脳動脈瘤の新生と破裂に至るメカニズムに

についての検討, 第 29 回日本脳卒中学会 2004 年 3 月

#### G 知的所有権の取得状況

- |          |    |
|----------|----|
| 1 特許取得   | なし |
| 2 実用新案特許 | なし |
| 3 その他    | なし |

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yoshiya K, et al	Profile of gene expression in the subventricular zone after traumatic brain injury	J Neurotrauma	20	1147 - 1162	2003
Shiozaki T, et al	Efficacy of moderate hypothermia in patients with severe head injury and intracranial hypertension refractory to mild hypothermia	J Neurosurg	99	47 - 51	2003
Hashiguchi N, et al	Mild hypothermia reduces expression of Heat Shock Protein 60 in leukocytes from severely head-injured patients	J Trauma	55	1054 - 1060	2003
Kasai K, et al	Induction of mRNAs and proteins for Na/K ATPase $\alpha$ 1 and $\beta$ 1 subunits following hypoxia/reoxygenation in astrocytes Brain Res Mol Brain Res	Brain Res Mol Brain Res	110	38 - 44	2003
Takaoka M, et al	Semiquantitative analysis of corpus callosum injury using magnetic resonance imaging indicates clinical severity in patients with diffuse axonal injury	J Neurol Neurosurg Psychiatry	73	289 - 293	2002

20030712

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。