

氏 名	鈴木 浩 之
(ふ り が な)	(すずき ひろゆき)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	乙 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 7 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 名	Changes in expression of aquaporin-4 and aquaporin-9 in optic nerve after crushing in rats (ラット視神経障害時の aquaporin 4 および aquaporin 9 の発現変化)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 小 野 富 三 人 教授 木 村 文 治 教授 梶 本 宜 永

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

多発性硬化症の亜型と従来考えられていた視神経脊髄炎の中に、アストロサイト障害性である抗 Aquaporin4 抗体陽性視神経炎が含まれていることがわかり、近年注目を集めている。Aquaporin (AQP) は細胞膜に存在する水チャネルで、AQP0 から AQP12 までの 13 種類のアイソフォームが現在報告されており、ヒト視神経のアストロサイトには AQP4 と AQP9 が発現する。AQP4 は中枢神経系の主要な水チャネルで、脳の毛細血管を包むアストロサイトの足突起に主に発現しており、電解質の恒常性や、脳血液関門の維持に重要な役割をはたしている。一方 AQP9 は、水以外に視神経軸索へ乳酸の形でのエネルギー供給を担っている。視神経障害時の AQP の変化はまだ明らかにされていないことから、我々は視神経障害過程における AQP4 と AQP9 の発現変化と、視神経の障害および修復過程との関連を検討した。

《方 法》

ラット視神経を球後 2mm の部位を撮子で把持し挫滅した。経時的に挫滅部を中心に眼窩部視神経（約 4mm）を摘出した。4 本の摘出神経をプールし、AQP4、AQP9、GFAP の発現を、tubulin を内部標準とした western blot で定量した（全 48 匹）。視神経浮腫は含水率で評価した（全 16 匹）。また視神経挫滅部を中心に、AQP4、AQP9、GFAP（アストロサイト）、CD68（マクロファージ）、nestin（アストロサイトのマーカー）の発現局在を、免疫組織化学的に検討した（全 15 匹）。さらに、血液視神経バリア機能を、Evans blue による血管外漏出にて評価した（全 8 匹）。

《結 果》

視神経 AQP4 は、day1 で baseline の $179.3 \pm 25.3\%$ （平均 $\pm$ SD）に増加した。その後次第に減少し、day4 では $87.5 \pm 15.3\%$ 、day7 では $71.6 \pm 12.8\%$ となり、day14 に baseline レベルに回復した。sham 群と crush 群を比較すると、crush 群の AQP4 発現は、day1 で sham 群から 56.5%増加し（ $p < 0.05$, Tukey-Kramer）、day4 と day7 でそれぞれ 45.5%、40.8%減少し（ $p < 0.05$ ）、day14 には sham 群のレベルに回復した。一方、crush 群の AQP9 発現は経時的に増加し、day14 には sham 群の $144.9 \pm 19.9\%$ と有意に増加した（ $p < 0.05$ ）。GFAP は、AQP4 に類似した変化を示した。挫滅視神経の浮腫の程度を含水率で比較すると、day7 で sham 群が 4.3%増加し（ $p < 0.05$, Tukey-Kramer）、day14 には差がなくなった。免疫組織化学的には、AQP4 は day1 で挫滅部に発現亢進が見られたが、次第に発現が減弱し、GFAP も同様の変化を示した。逆に AQP9 は day4 以降、挫滅部で発現亢進がみられた。また CD68 陽性細胞は day4 以降、挫滅部への集積を認めた。day7 における AQP4 と GFAP の 2 重染色では、挫滅部では AQP4 陰性アストロサイトを認め、AQP4 と AQP9 の 2 重染色では、挫滅部の AQP4 発現低下部に AQP9 の発現亢進が認められた。挫滅部で AQP9 は蜂巣状に発現し、GFAP および nestin の共発現が認められた。一方、CD68 陽性細胞と AQP9 の発現は一致しなかった。Evans blue による血管外漏出は、AQP9 陽性、

AQP4 陰性アストロサイトの発現部位に認められた。

《考 案》

ラット視神経挫滅により、AQP4 は day1 で増加した後、減少に転じ、day4 と day7 では baseline よりも有意に低下した。対照的に、AQP9 は day14 をピークに漸増した。AQP4 と AQP9 はアストロサイトに発現するが、挫滅による変化が GFAP とは一致しておらず、単純にアストロサイトの挫滅による変化を反映しているのではなく、遺伝子発現を介して変化していると考えられた。

免疫組織化学的には、AQP4 陰性のアストロサイトが挫滅部に存在し、AQP4 の発現が低下した部位に一致して AQP9 の発現亢進が認められた。この挫滅部の変化は、western blot でみられた AQP4 と AQP9 の変化と同様であり、挫滅部のアストロサイトには一様に western blot で示した AQP の変化が認められると考えられた。

視神経浮腫は day7 で有意に認められ、同時に AQP4 が trough level になったことから、AQP4 の発現低下が、浮腫発症に密接に関係していると考えられた。浮腫の原因としては、Evans blue の血管外漏出を認めたことから血管原性浮腫であることが示唆された。血液脳関門の破たんによる血管原性浮腫では、AQP4 の低下で脳浮腫が遷延することが知られている。視神経挫滅による浮腫でみられた AQP4 と浮腫の遷延もまた血管原性浮腫を示唆する所見である。

挫滅部において、マクロファージ、ミクログリアといった CD68 陽性細胞が集積していることを示したが、これらの細胞はアストロサイトの活性化を促すとの報告や、AQP4 はアストロサイトの足突起に主に発現しており、挫滅部位では初期に足突起が収縮し、挫滅後 14 日目には再び足突起を伸ばして正常な形態まで回復するとの報告があり、我々の示した AQP4 の発現変化のメカニズムに密接に関連していると考えられる。

アストロサイトのリモデリングは、挫滅からの時間的・空間的相違で AQP 発現パターンが異なると考えられる。挫滅部では、AQP4 発現が低下し、AQP9 が強発現した部位を中心にバリア機能が傷害されており、AQP4 発現低下がバリア機能障害に密接に関連して

いると考えられる。

挫滅部にみられた AQP9 発現亢進は、エネルギー供給の観点からは神経保護的に作用すると考えられる。なぜなら、視神経のアストロサイトは、AQP9 を介し乳酸の形で軸索にエネルギーを提供しており、挫滅した視神経ではより重要なエネルギー源となる報告があるからである。一方、脳虚血や脳挫傷の実験モデルでは、AQP9 は細胞外液の乳酸を除去することで乳酸アシドーシスを改善する作用もあわせもつ。いずれの機序も、AQP9 が AQP4 発現低下によるバリア機能障害を補完する方向で作用するものと考えられるが、浮腫が遷延していることから、AQP4 の補完機能としては限定的である。

論文審査結果の要旨

中枢神経の外傷、虚血、変性などで、主要なグリアであるアストロサイトが活性化され、グリア瘢痕が生じることが知られている。中枢神経の主要な水チャネルである AQP4 は、水と電解質の恒常性や、脳血液関門の維持に重要な役割をはたしており、AQP9 は、水以外に視神経軸索へ乳酸の形でエネルギー供給を担っている。しかし、視神経障害時の AQP の変化はまだ明らかにされていないことから、申請者らは、ラット視神経挫滅モデルを用いて、視神経障害過程における AQP4 と AQP9 の発現変化を western blot で定量し、AQP4、AQP9、GFAP、CD68、nestin の発現局在を、免疫組織化学的に検討した。さらに、視神経浮腫の程度を含水率で評価し、血液視神経バリア機能を Evans blue による血管外漏出にて評価した。その結果、挫滅により AQP4 は直後に増加した後に day7 まで減少に転じ、対照的に AQP9 は day14 まで漸増することを明らかにした。視神経浮腫は day7 で有意であった。免疫組織化学的には、AQP4 陰性のアストロサイトが挫滅部に存在し、同部位に一致して AQP9 の発現亢進を認め、GFAP、nestin も共発現していたことから、AQP9 は挫滅部のアストロサイトに発現していることを明らかにした。次いで Evans blue による血管外漏出の検討から、バリア機能の障害が、挫滅部にみられる AQP9 陽性、AQP4 陰性アストロサイトの発現部位に一致して認められることを示した。

申請者は、AQP9 が乳酸の形で軸索にエネルギーを提供することから、AQP9 の発現亢進は、エネルギー供給の観点からは神経保護的に作用すると考案した。一方で、視神経浮腫の発症が AQP4 の trough level になる時期と一致することから、AQP4 の down regulation が、視神経挫滅後の浮腫発症に密接に関係しているとの考案している。すなわち、挫滅部では AQP4 が減少し、AQP9 が代償的に増加しているが、バリア機能維持という観点からは AQP4 の機能を充分補完できていないと考案している。これらの考案は、実験結果をみると妥当なものと考えられ、視神経傷害時の AQP の変化と外傷性浮腫、バリア機能の関連の一部を解明できていると考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

PLoS One 9(12): e114694, 2014 <オンライン掲載>