

第59回 名古屋市立大学医学会総会
特別講演Ⅲ

脳における水チャネル〈アクアポリン〉の機能と脳浮腫への関与

祖父江 和 哉

名古屋市立大学大学院医学研究科 麻酔・危機管理医学

Function of aquaporin in the brain and brain edema

KAZUYA SOBUE

Department of Anesthesiology and Medical crisis Management,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

要 旨

アクアポリン (AQP) は、水を通過させるチャネルとして発見され、最近急速に研究が進んでいる。また、水の通過以外の新規機能も注目されている。近年、AQP が脳浮腫の発症や治癒に関与していることが報告されている。麻酔・救急・集中治療領域では、脳浮腫はよく遭遇する病態であるが、発症機序は十分に解明されていなかった。ノックアウトマウスなどの様々な動物モデルを用いた研究により、AQP は脳浮腫の発症・進行あるいは治癒に関与することが示唆されている。今後、AQP は新規脳浮腫治療薬の標的になる可能性がある。

●アクアポリンとは

1. 研究の歴史

脂質二重膜からできている細胞膜には、水が通過する特異的な分子が存在するのではないかという推測は、古くからあった。1992年米国の Peter Agre 博士が、赤血球において水を通過させるチャネルであるアクアポリン (Aquaporin: AQP) を発見した¹⁾。Agre 博士らは、アフリカツメガエルの卵母細胞に AQP タンパク質を発現させると、細胞膜の水透過性が非常に高くなることを証明し、AQP が水を選択的に透過させることを証明した。この業績により、2003年 Agre 博士はノーベル化学賞を受賞した。この受賞を契機に本分子の研究は急速に発展してきた。

2. 構造と機能

アクアポリンは古細菌、細菌、酵母、植物、線虫、昆虫、脊椎動物に広く発現している。ほ乳類では AQP0 から AQP12の13種類が報告されている。その構造と機能から、CHIP(channel-like integral protein) ファミリー (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP8) と GLP (aquaglyceroporin) ファミリー (AQP3, AQP7, AQP9, AQP10) に分けられ²⁾、近年では水を通過させないスーパーファミリー (AQP11, AQP12) も報告されている³⁾。

ファミリー分子の多くが300以下のアミノ酸で構成された6回貫通型の比較的小さい膜タンパク質であり(図1)、1分子が1チャネル(孔)を形成し、形態的にはちょうど砂時計のような構造となっている。また、2カ所のNPA (Asn-Pro-Ala) 類似のアミノ酸モチーフを持つこと

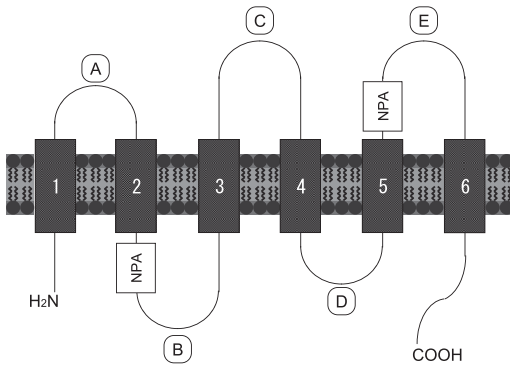


図1 アクアポリンの構造

アクアポリンは6回貫通型膜タンパク質で、2カ所のNPAモチーフを持つ。1つの蛋白質が1つのチャネル(孔)を形成し、4量体をとって安定化している。

が特徴であり、水を特異的に通過させる機能に関与している⁴⁾。さらに、4量体をとることで構造的に安定している。

機能としては大まかに、CHIPファミリーは水の透過であり、GLPファミリーは水に加えグリセロール、尿素、AQP9はマンニトール、ソルビトールも透過させるとされる。AQPスーパーファミリーについては、水の透過性は高くなく、機能は未だ明らかでない^{2,3,5)}。

表1に示すようにヒトの全身臓器に広く発現

表1 ヒトにおけるアクアポリンの発現分布

| アクアポリン | 分布臓器 |
|--------|----------------------------------|
| AQP0 | 水晶体 |
| AQP1 | 腎、赤血球、毛細血管内皮、角膜、脳脈絡膜叢、肺、心、胆嚢、肝など |
| AQP2 | 腎集合管、精巣 |
| AQP3 | 腎臓、大腸、脳、皮膚など |
| AQP4 | 脳、脊髄、骨格筋、肺、腎、内耳、胃、網膜など |
| AQP5 | 肺、唾液腺、角膜、涙腺、脳など |
| AQP6 | 腎 |
| AQP7 | 脂肪組織、腎、精巣など |
| AQP8 | 精巣、肝、脾、脳など |
| AQP9 | 肝、精巣、脳、白血球 |
| AQP10 | 小腸 |
| AQP11 | 腎など |
| AQP12 | 脾 |

AQP: aquaporin

しており、水の移動、様々な分泌、濃縮、脂肪輸送などの生体機能に関与することが報告されている。特に、腎臓のように水の動きが顕著な臓器では、少なくとも7種類のAQPが発現しており、尿濃縮に関与している。

●アクアポリンと関連病態

表2に示すようなAQPファミリーノックアウトマウスが作成され、その機能や疾患との関与が明らかとなってきている。

マウスと同様にヒトでもAQP遺伝子異常と様々な疾患との関連が報告されている⁶⁾。眼の水晶体に発現するAQP0の異常による白内障発症、腎臓に発現するAQP1やAQP2の異常による腎性尿崩症が知られている。また、唾液腺に発現するAQP5の異常が、シェーグレン症候群で報告されている。AQP7の異常による軽度グリセリン代謝障害が報告されている。最近では、多発性硬化症の一亜型と考えられていた意思神経脊髄炎(Neuromyelitis optica; NMO)の患者において、AQP4に対する自己抗体が高率に検出されることが報告され、NMOは多発性硬化症とは病態が異なる可能性も議論されている⁷⁾。

表2 アクアポリン遺伝子の異常と疾患

| | ヒトの病態 | ノックアウトマウスの症状 |
|-------|-----------|------------------------|
| AQP0 | 白内障 | 白内障 |
| AQP1 | 軽度尿濃縮力低下 | 尿濃縮力低下 |
| AQP2 | 腎性尿崩症 | 腎性尿崩症 |
| AQP3 | | 尿濃縮力低下、皮膚乾燥 |
| AQP4 | 視神経脊髄炎* | 尿濃縮力低下、視覚障害、聴力障害、脳浮腫軽減 |
| AQP5 | シェーグレン症候群 | 唾液分泌低下 |
| AQP6 | | |
| AQP7 | グリセリン代謝異常 | グリセリン代謝異常、内臓肥満 |
| AQP8 | | 精巣軽度肥大 |
| AQP9 | | グリセリン代謝異常 |
| AQP10 | | (マウスでは偽遺伝子) |
| AQP11 | | 多発性のう胞腎 |
| AQP12 | | |

*抗AQP4自己抗体産生

●脳におけるアクアポリン

1. 脳におけるアクアポリンの発現と機能

著者らの検討の結果、脳には AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8, AQP9, AQP11, AQP12 と多種類発現していることが明らかとなった (表3)⁸⁾。なかでも AQP4は、他の臓器と比較して脳における発現量が非常に多い。

AQP4は、毛細血管周囲のアストロサイト足突起 (図2)、脳室周囲上皮細胞、くも膜下腔 (軟膜)、視床下部、脈絡膜叢などに存在している。これらの分布から、血液脳関門における水の移動、脳脊髄液量調節、ホルモン分泌などに関与している可能性が考えられる (表4)^{9,10)}。また、AQP1は脈絡膜叢において AQP4 と共発現しており、それぞれが髄液の産生あるいは吸収に関与していると推測されている¹¹⁾。

上述したように、AQP4は毛細血管周囲のアストロサイト足突起に発現しているが、著者らは血液脳関門 (BBB) を形成する毛細血管内皮細胞にも AQP4が発現していることを確認している¹²⁾。加えて、Nicoらは BBB 機能が破綻しているジストロフィン欠損マウスを詳細に調査し、BBB 機能と AQP4発現が密接に関連することを報告している。以上のことから、BBB における水移動にも AQP4が関与している可能性が考えられる。

さらには、アストロサイトの足突起に AQP4 とカリウムチャネル (Kir4.1) とが共存すること¹³⁾、アストロサイトにおける AQP4機能が破綻している α -シントロフィン欠損マウスにおいてはカリウムイオンのクリアランスが悪いことから¹⁴⁾、カリウムイオンの緩衝作用が示唆されている。つまり、カリウムチャネルを通した

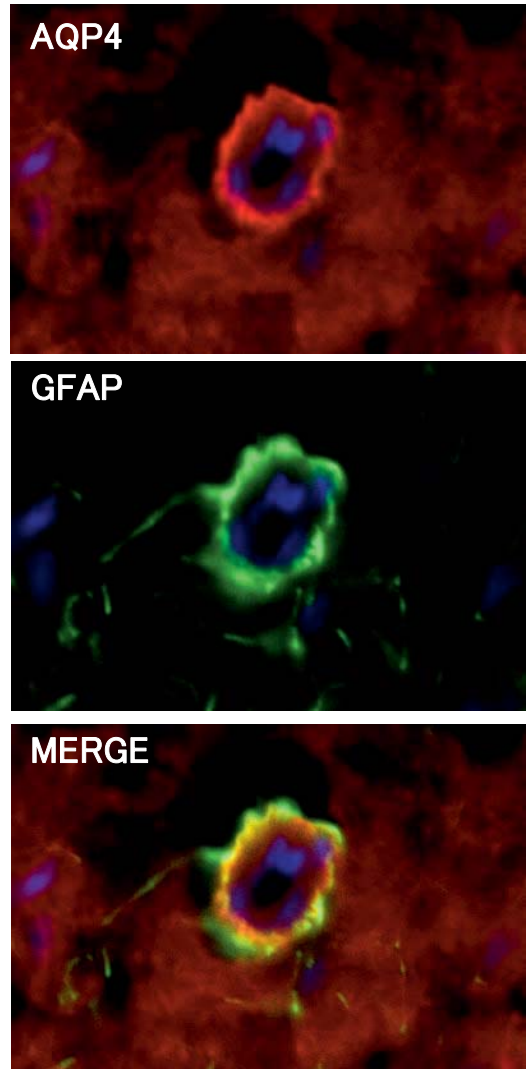


図2 血液脳関門におけるアクアポリン4の発現
血液脳関門を構成するアストロサイトの足突起には AQP4が豊富に発現している。AQP4 (上段) とアストロサイトのマーカー GFAP (中段) は、同じ部位 (下段) に発現しているのが理解できる。

表3 脳における AQP の発現

| AQP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 11 | 12 |
|------------|---|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|
| 脳 | + | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| アストロサイト | - | - | + | + | + | - | - | + | + | ND | ND |
| ミクログリア | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ND | ND |
| オリゴデンドロサイト | - | - | - | - | - | - | - | + | - | ND | ND |
| ニューロン | - | - | + | - | + | - | - | + | - | ND | ND |
| 毛細血管内皮細胞 | + | ND | ND | + | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

+: Positive, -: Negative, ND: Not determined

表4 脳における AQP4の分布と機能

| 発現部位 | 予測される機能 |
|---------------------|---------------|
| 毛細血管周囲(アストロサイト) | 血液脳関門における水の移動 |
| 脳表面 (glia limitans) | 脳脊髄液の産生あるいは吸収 |
| 脳室周囲(上皮細胞) | 脳室における水の移動 |
| 視床下部 | 不明 |

カリウムイオンの移動に AQP4 を通した水の移動が重要であり、神経細胞活動後のカリウムイオンの速やかなクリアランスに貢献していると考えられる。

2. 脳におけるアクアポリン機能制御

チャンネルの機能解析のためには、特異的な阻害薬の存在が重要である。唯一水銀は AQP を阻害するが万能ではなく、AQP0, AQP4, AQP7 は阻害されず、AQP6 に至っては活性化される可能性が報告されている。いくつかの薬剤により AQP4 機能が阻害される可能性はあるが、報告が一定ではない。

著者らは、アストロサイトにおける AQP4 の発現調節に protein kinase C (PKC) や mitogen-activated protein kinase (MAPK) が関与することを見出している。まず、PKC 活性化により AQP4 と AQP9 の発現は低下することが分かった¹⁵⁾。一方、マンニトールの高浸透圧により、AQP4 と AQP9 の発現が増強することが明らかとなった。この発現の増強は、MAPK の一つである p38 MAPK を介して行われることが証明された¹⁶⁾。

他の発現調節としては、細胞外マトリックスへのアンカー蛋白であるシントロフィンが AQP4 分布を制御しているとの報告がある^{17,18)}。先にも述べたようにアストロサイトにおいて、AQP4 は脳毛細血管に隣接した足突起に大量発現しているが、シントロフィン欠損マウスにおいて AQP4 総発現量は低下しないが足突起における AQP4 の発現が著明に低下する。つまり、シントロフィンの PDZ (*PSD 95-Discs large-ZO1*) ドメインと AQP4 の C 末端とが結合し、AQP4 の細胞膜における発現・分布を制御していると考えられる。また、著者らは、reversion-induced LIM protein (RIL) の PDZ ドメインと AQP4 との結合を確認しており、同様にアンカー分子として機能している可能性がある¹⁹⁾。

その他の AQP では、AQP2 の小胞からの放出による発現量制御、AQP6 のゲーティングによる通過制御などが示唆されているが²⁰⁾、AQP4

で同様の制御が行われているかどうかは不明である。

3. 脳における新しい機能

近年、水を通過させるだけでなく、いくつかの新規機能が報告されている。アストロサイトの遊走、細胞の結合、細胞骨格の維持、細胞内器官（ミトコンドリア）における機能などである。しかしながら、これらの報告は一定しておらず、さらなる検討が必要である。

●アクアポリンと脳浮腫

1. 脳浮腫とは

脳浮腫は、麻酔、集中治療、救急領域において、よく遭遇する病態であり、外傷、脳出血、脳腫瘍など様々な中枢疾患に伴って発生する。脳浮腫とは、脳容積増加を伴う脳への水分の異常集積である。ラットの大脳皮質水分量は通常 80% 程度であり、脳に損傷を起こすと 90% 近くまで増加する。進行した脳浮腫は脳ヘルニアを引き起こし、重大な神経学的障害の残存や死へ直結する可能性があるため、ある程度の制御は重要である。また、麻酔においても脳浮腫をコントロールすることは、二次的な神経障害の予防だけでなく、手術操作の容易な術野を提供するためにも必要である。

古典的な脳浮腫分類として、1967年 Klatzo が cytotoxic edema と vasogenic edema とに分類することを提唱した。Cytotoxic edema は、脳血管破綻を伴わない脳浮腫であり、脳細胞の膨張を特徴とする。一方、vasogenic edema は、主に毛細血管の傷害により引き起こされる浮腫である。形態学的には、白質における細胞外腔拡大とアストロサイト膨張が特徴である。

2. 脳浮腫発生へのアクアポリンの関与

最近の研究により、AQP が脳浮腫の発生あるいは進行、状況によっては治癒に関与することがわかってきている。培養細胞を用いた研究では、様々な障害により AQP4 の発現が大きく変化することがわかっている。また、動物実験モデルを用いた検討では、脳外傷、脳虚血、水

中毒など様々な原因の脳損傷によって、AQP4の発現が増加することが分かっている。

AQP4ノックアウトマウスを用いた検討によれば、急性水中毒 (cytotoxic edema) によるアストロサイトの膨張と脳水分量増加が緩徐である。同様に、脳虚血モデル (初期は cytotoxic edema) では脳浮腫の程度が軽度で、神経症状が軽症であった²¹⁾。また、AQP4過剰発現マウスでは、脳浮腫の程度が高度であることが報告されている。少なくとも、AQP4は脳浮腫の初期段階では、その発生あるいは進行に関与している可能性が高いと考える。

一方で、AQP4ノックアウトマウスに vasogenic edema を作成すると、水の排泄が遅延し、脳浮腫の治癒が遅延することが報告されている²²⁾。このことから、AQP4は脳浮腫の治癒過程にも関与している可能性が示唆される。

我々の検討により、損傷によるAQP4発現の増強の機序には、損傷に関連する様々な因子が関与していることがわかってきた^{23, 24, 25)}。浸透圧変化や炎症性サイトカインである IL-1 β は、AQP4の転写を促進し、mRNA と蛋白質の発現を上昇させる^{23, 24)}。一方、アシドーシスはAQP4の転写を促進するのではなく、細胞膜への集積を促し、AQP4蛋白質の分解を阻害することで、発現が増加する²⁵⁾。

3. 新しい脳浮腫治療法の開発

現行の脳浮腫治療では、進行を抑制できないこともしばしば経験する。そこで、AQP4の機能を直接調節することにより脳浮腫を制御する新規治療法の開発が期待される。しかし、その開発にはいくつかの問題点を解決する必要がある。先に述べたように、AQP4は脳浮腫の進行および治癒に関与している可能性があり、治療開始時期やAQP4機能をどのように調節すればよいのか(抑制か促進か)が問題となる。また、AQP4は全身に発現しており、AQP4機能調節薬の全身投与により重大な副作用を生じる可能性がある。さらに、脳への薬剤供給は血液脳関門が存在するために常に脳への特異的な供給方法が問題になる。AQPのような小分子に対する

薬剤の開発は困難であるが、近年既に開発された薬剤を既知の作用以外の作用を検討するエコファーマが話題となっており、AQP4に機能する薬剤の発見も可能となるのではないか。以上のような問題点が解決されれば、AQPを標的とした強力な脳浮腫治療法が開発される可能性は十分にありうると考える。

●おわりに

AQPの機能自体が、未だ十分には解明されていない。また、水を通す以外の新規機能の探索も進んでおり、思いもよらない機能が発見されるのではないだろうか。脳浮腫の発生機序は複合的な要因が存在すると予測され、AQPと他の分子との連関を検討していく必要があり、そのあたりに新規治療法開発の糸口があると考えられる。今後の研究に期待したい。

●謝辞

研究の過程では多くの方に支えていただきました。はじめに長年研究を支えてくださっている本学分子神経生物学分野教授浅井清文先生に深く感謝申し上げます。また、私に最初に研究の機会を与えてくださった勝屋弘忠名誉教授に心から感謝申し上げます。さらには、研究を支えてくれた教室の先生方にも感謝申し上げます。最後に、私に研究者としてのあり方をご教授くださった本学分子医学研究所故加藤泰治教授に深謝申し上げます。

文 献

1. Preston GM, Agre P: Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: Member of an ancient channel family. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 11110-4.
2. Ishibashi K, Kuwahara M, Sasaki S: Molecular biology of aquaporins. Rev Physiol Biochem Pharmacol 2000; 141: 1-32.
3. Ishibashi K: Aquaporin superfamily with unusual npa boxes: S-aquaporins (superfamily, sip-like and subcellular-aquaporins). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2006; 52: 20-7.

4. Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, et al.: Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 2000; 407: 599-605.
5. Nielsen S, Kwon TH, Frøkiaer J, Agre P: Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders. *J Intern Med* 2007; 261: 53-64.
6. Agre P, Kozono D: Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett* 2003; 555: 72-8.
7. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al.: IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. 2005; *J Exp Med* 202: 473-7.
8. Yamamoto N, Yoneda K, Asai K et al.: Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Mol Brain Res* 2001; 90: 26-38.
9. Venero JL, Vizuete ML, Machado A, et al.: Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 321-36.
10. Hasegawa H, Ma T, Skach W, et al.: Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem* 1994; 269: 5497-500.
11. Speake T, Freeman LJ, Brown PD: Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 water channels in rat choroids plexus. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1609: 80-6.
12. Sobue K, Yamamoto N, Yoneda K, et al.: Molecular cloning of two bovine aquaporin-4 cDNA isoforms and their expression in brain endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 393-8.
13. Guadagno E, Moukhles H: Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4. 1, and water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia* 2004; 47: 138-49.
14. Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, et al.: Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: Phenotypic defects in brains of α -syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13615-20.
15. Yamamoto N, Sobue K, Miyachi T, et al.: Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase C. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 95: 110-6.
16. Arima H, Yamamoto N, Sobue K, et al.: Hyperosmotic mannitol stimulates expression of aquaporin 4 and 9 through a p38 mitogen activated kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 44525-34.
17. Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, et al.: Syntrophin-dependent expression and localization of aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14108-13.
18. Yokota T, Miyagoe Y, Hosaka K, et al.: Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at perivascular astrocyte endfeet in 1-syntrophin knockout mice. *Proc Japan Acad* 2000; 76: 22-7.
19. Iida Y, Matsuzaki T, Morishima T, et al.: Localization of reversion-induced LIM protein (RIL) in the rat central nervous system. *Acta Histochem Cytochem* 42: 9-14, 2009.
20. Yasui M, Hazama A, Kwon TH, et al.: Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 1999; 402: 184-7.
21. Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al.: Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nature Med* 2000; 6: 159-63.
22. Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, et al.: Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J* 2004; 18: 1291-3.
23. Arima H, Yamamoto N, Sobue K, et al: Hyperosmotic mannitol stimulates expression of aquaporin 4 and 9 through a p38 mitogen activated kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 44525-34.
24. Ito H, Yamamoto N, Hirate H, et al: Interleukin-1 β induces the expression of aquaporin-4 through a NF- κ B pathway in rat astrocytes. *J Neurochem* 2006; 99: 107-18.
25. Morishima T, Aoyama M, Iida Y, et al: Lactic acid

increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res* 2008; 61: 18-26.

