

リポ多糖刺激によるミクログリア活性化におけるアクアポリン4の役割

研究者氏名 教授 安井正人
日本所属機関 慶應義塾大学医学部薬理学教室
共同研究者名 黄 娉, 阿部陽一郎
中国研究者氏名 教授 韓 晶岩
中国所属機関 中国北京大学医学部基礎医学院

要旨

脳浮腫や炎症性脳疾患に対する新薬開発の標的分子としてアクアポリン4 (AQP4) が注目されている。我々は、炎症性脳疾患におけるミクログリアの活性化にAQP4が関与していることを示してきた。本研究では、マイクロRNAi (miRNAi) の技術を用いて、ミクログリア、アストロサイトにおけるAQP4を選択的にノックダウンする手法を確立し、特にミクログリア活性化におけるアクアポリン4発現誘導の役割に着目しつつ、脳浮腫や炎症性脳疾患の新たな治療法開発を目指した。ミクログリア活性化に伴うAQP4の発現誘導については、マウスミクログリア細胞株であるMG5を用いて検討した。この細胞はリポ多糖 (LPS) で刺激すると、IL-1 β やIL-6といった炎症性サイトカインの発現が誘導されることが知られている。この細胞を用いてLPS刺激によるAQP4の発現が誘導されるか否か検討したところ、IL-1 β やIL-6の誘導に必要な濃度の10倍を要したものの、AQP4の発現が誘導され、この系によりLPS刺激に伴うAQP4発現誘導の意義を解析することが可能であることが確認できた。一方、miRNAiについては、マウスAQP4 (mAQP4)に対するノックダウン効果が期待される4つの候補配列について、mAQP4を安定発現するCHO細胞を用いてその効果を見たところ、少なくとも3種類の配列において効果が認められた。そこでこれら3種類の配列を複数連結したコンストラクトをアデノウィルスベクターに組み込み、初代培養アストロサイトの内在性AQP4に対するノックダウン効果を検討したところ、感染4日目ではほとんど効果が見られなかったが、6日目では完全ではないものの、AQP4の発現が低下した。これはおそらくAQP4タンパク質が比較的安定であり、ノックダウン効果の発現に長期を要すると考えられ、RNAiの手法によるAQP4発現制御による脳浮腫や炎症性脳疾患の治療効果は期待できないとの結論に至った。

Key Words 脳浮腫, アクアポリン4 (AQP4), ミクログリア, RNAi, 抗AQP4抗体

緒言:

脳浮腫は脳幹ヘルニアを誘発する可能性が高いため、そのコントロールは臨床で極めて重要である。しかしながら、脳浮腫に対する画期的な新薬は未開発のままで、現在なお対症療法に頼らざるを得ない状況が続いている。脳浮腫や炎症性脳疾患に対する新薬開発の標的分子としてアクアポリン4 (AQP4) が注目されている。例えば、AQP4ノックアウトマウスを用いた検討により、細胞毒性脳浮腫においてはAQP4の発現の消失によって脳浮腫の程度が軽減されることが示されている (1)。一方、我々は、脳損傷時にミクログリアでAQP4が発現してくること、更にAQP4ノックアウトマウスを用いることでAQP4を欠如させておくと活性化に伴うミクログリアの形態変化、食食能の増加、サイトカインの誘導が著しく抑制されることを見だし、炎症性脳疾患におけるミクログリアの活性化にAQP4が関与していることを示した (2)。

本研究では、マイクロRNAi (miRNAi) の技術を用いて、ミクログリア、アストロサイトにおけるAQP4を選択的にノックダウンする手法を確立し、ミクログリア活性化におけるアクアポリン4発現誘導の役割に着目しつつ、脳浮腫や炎症性脳疾患の新たな治療法開発を目指す。

対象と方法:

1. ミクログリア細胞株MG5におけるリポ多糖によるAQP4の発現誘導

マウスミクログリア由来の細胞株MG5とMG5細胞の培養に必要な培養上清を調製するためのアストロサイト様細胞株A1

細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。MG5 細胞は、A1 細胞の培養上清と 10% ウシ胎仔血清を含む DMEM を 7:3 で混合した培地により培養した。A1 細胞は 10%ウシ胎仔血清を含む DMEM で培養した。

MG5 細胞を活性化させるため、リポ多糖 (LPS, Sigma) 2 $\mu\text{g/ml}$ あるいは 20 $\mu\text{g/ml}$ で 24 時間刺激した。LPS 刺激による AQP4 発現誘導は、RT-PCR により評価した。LPS 刺激後の活性化の指標としては CD11b, IL-1 β , IL-6 を用いた。

全 RNA は Isogen (ニッポンジーン) により抽出し、うち 2 μg から SuperScript VILO Master Mix (invitrogen) により cDNA を合成し、GoTaq (Promega) により PCR を行った。用いたプライマーは以下の通りである。AQP4, 5'-AACCTCACCGCTGGCCATGGGCTCCTG-3' and 5'-TACGGAAGACAATACCTCTCCCGAAGAGTC-3'; CD11b, 5'-GACAGGTGCCCTCTACCAGTGTGACTACAG-3' and 5'-TCGTCCGAGTACTGCATCAAAGAGAACAAG-3'; IL-1 β , 5'-AGGCCTAATAGGCTCATCTGGGATCCTCTC-3' and 5'-GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTGCAGTTGTC-3'; IL-6, 5'-TTCTTGGGACTGATGCTGGTGACAACCACG-3' and 5'-AGGTAGCTATGGTACTCCAGAAGACCAGAG-3'; GAPDH, 5'-ACTGGTGTCTTACCACCCATGGAGAAGGC-3' and 5'-CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGC-3'.

2. RNAi による AQP4 発現抑制効果の検討

AQP4 のノックダウンは BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen) を用いて構築した。既に用意されている RNAi のターゲットとなる 4 カ所の候補配列に相当するオリゴDNA をそれぞれ pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR に組み込み、特異的プライマーを用いて塩基配列を確認し、それぞれ #24, #25, #26, 及び #27 と命名した。まずは単独での効果を確認し、効果のあったものについては複数連結することにより相乗的に RNAi 効果が得られるか試みた。RNAi は、最終的に *in vivo* 投与による脳浮腫治療効果を検討する目的でゲートウェイシステムを用いてアデノウイルスベクターによる発現系へと組み込んだ。

RNAi の効果は、ウェスタンブロッティングにより AQP4 タンパク質量を陰性コントロールと比較することで評価した。まず pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR に組みこんだコンストラクトを、マウス AQP4 M1 アイソフォーム cDNA を組み込んだ発現ベクターとともに一過性に CHO 細胞にトランスフェクションすることで確認した後、アデノウイルスベクターへと組換え、AQP4 を安定発現した CHO 細胞株、及び初代培養アストロサイトに感染させ、内在性 AQP4 に対する効果を評価した。

結果：

1. ミクログリア細胞株 MG5 におけるリポ多糖による AQP4 の発現誘導

ミクログリア細胞株である MG5 の LPS 刺激に伴う活性化における AQP4 の役割を調べるため、MG5 細胞を LPS で 24 時間刺激後 RNA を抽出し、RT-PCR により AQP4 の発現レベルを調べた。ミクログリアの活性化は炎症性サイトカイン等、3 種類のマーカーの発現の有無により判断した。CD11b は LPS 刺激前からある程度発現が見られ、LPS 2 $\mu\text{g/ml}$ 24 時間の刺激により増加した。一方、IL-1 β 及び IL-6 は LPS 2 $\mu\text{g/ml}$ 24 時間刺激により発現が強く誘導された (図 1)。このことから、生体内のミクログリア同様、MG5 細胞は LPS 刺激により活性化ミクログリアの性質を獲得することが確認できた。この状況下で、AQP4 の発現を調べたところ、LPS 2 $\mu\text{g/ml}$ では誘導されず、20 $\mu\text{g/ml}$ で弱いながら発現が見られた (図 2)。

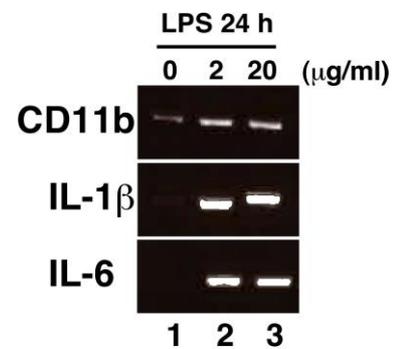


図1. MG5細胞における活性化ミクログリアマーカーの発現
ミクログリア細胞株であるMG5をリポ多糖 (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$ (レーン2)、あるいは20 $\mu\text{g/ml}$ (レーン3) で刺激し、活性化ミクログリアのマーカーであるCD11b、IL-1 β 、及びIL-6に対するプライマーセットを用いてRT-PCR法により各マーカーのmRNAレベルでの発現を未刺激の細胞 (レーン1) と比較した。

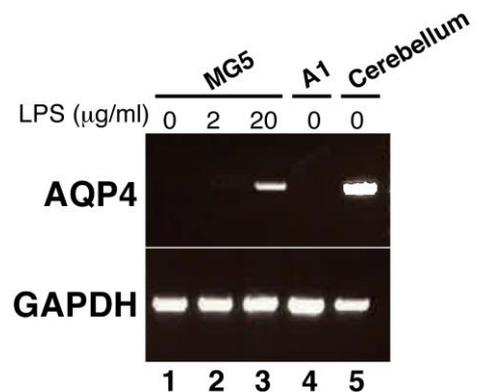


図2. MG5細胞におけるLPS刺激によるAQP4の発現誘導
MG5をLPS 2 $\mu\text{g/ml}$ (レーン2)、あるいは20 $\mu\text{g/ml}$ (レーン3) で刺激し、AQP4に対するプライマーセットを用いてRT-PCR法により各マーカーのmRNAレベルでの発現を未刺激の細胞 (レーン1)、陰性コントロールであるA1細胞 (レーン4)、陽性コントロールである小脳 (レーン5) と比較した。

2. RNAiによるAQP4発現抑制効果の検討

AQP4をノックダウンするために適していると考えられる4つの配列の候補をpcDNA6.2-GW/EmGFP-miRに組み込み(図3, a)、AQP4 M1あるいはM23アイソフォームを安定発現するCHO細胞株に一過性導入し、それぞれのノックダウン効果をウェスタンブロッティングにより確認したところ、#25を除く3つのコンストラクトで弱いながらRNAiの効果が認められた。(図4, レーン2、4及び5)。そこで、これらmiR RNAiコンストラクトを複数連結し(図3, b-e)、RNAi効果の増強を試みた。これらコンストラクトをM23L-mAQP4 M1の発現ベクターとともにCHO細胞にトランスフェクションし、AQP4の発現をウェスタンブロッティングにより検討したところ、調べた限り全てのコンストラクトにおいて、ノックダウン効果が確認できた(図5)。これらコンストラクトが、AQP4を内在性に発現する細胞に対しても有効か否かを検討するため、まずM23L-mAQP4 M1を安定発現するCHO細胞株にこれらコンストラクトを一過性に導入し、その効果を検討した。ところが予想に反し、これらコンストラクトは安定発現株に対してはほとんど効果を示さなかった(図6)。この原因の一つとして、miR RNAiのコンストラクトの導入をリポフェクション法による一過性発現の系で行ったため、トランスフェクション効率が低く、RNAiが導入されなかった細胞で全く効果を発揮できなかったためと考えられた。そこで、導入効率がほぼ100%を達成でき、また将来的に*in vivo*での効果が期待できるアデノウイルスベクターを用いることにした。作製したアデノウイルスベクターを初代培養アストロサイトに感染させ、4日目及び6日目にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングによりAQP4の発現を見たところ、4日目では非感染細胞、あるいは無関係な遺伝子を組み込んだウイルスを感染させた細胞と比較してAQP4の発現量は変化していなかったが、6日目ではAQP4の発現が顕著に減少していた。

考察:

1. ミクログリア細胞株MG5におけるリポ多糖によるAQP4の発現誘導
ミクログリア細胞株MG5を用いた検討より、20 µg/mlという高濃度を要したものの、LPS刺激によりAQP4発現誘導がRT-PCRレベルで確認でき、*in vivo*における現象を再現できることが示された。よってこの系を用いてLPS刺激により誘導されるAQP4の役割を解析することが可能であることが確認できた。

2. RNAiによるAQP4発現抑制効果の検討

将来的な*in vivo*における脳浮腫や炎症性脳疾患の治療を視野にい

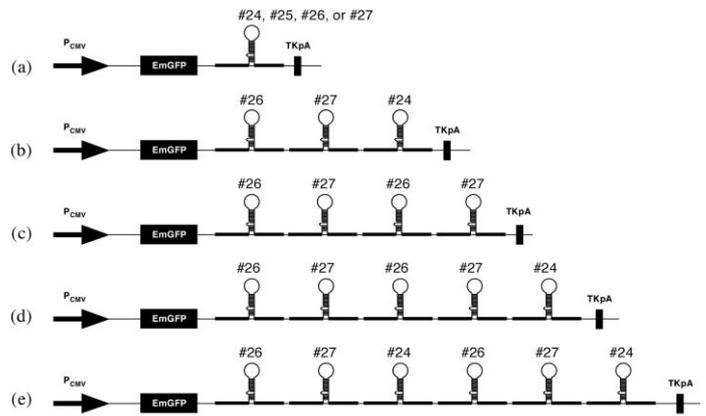


図3. RNAi発現コンストラクトの模式図

AQP4をノックダウンする為に適した4つの配列の候補(#24, #25, #26, #27)をそれぞれpcDNA6.2-GW/EmGFP-miRに組み込み(a)、AQP4を安定発現するCHO細胞に一過性に導入し、その効果を検討した。その結果から、更にいくつかの候補配列を連結したコンストラクトを作製した(b-e)。

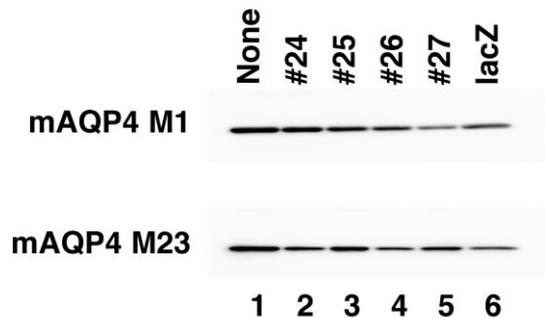


図4 マウスAQP4ノックダウンのためのRNAiの効果の検討
AQP4をノックダウンする為に適した4つの配列の候補である#24(レーン2)、#25(レーン3)、#26(レーン4)、#27(レーン5)及びAQP4とは無関係な遺伝子(lacZ, レーン6)のRNAi配列をそれぞれpcDNA6.2-GW/EmGFP-miRに組み込み、AQP4 M1(上段)あるいはM23(下段)を安定発現するCHO細胞に一過性に導入し、その効果をWestern blottingにより検討した。

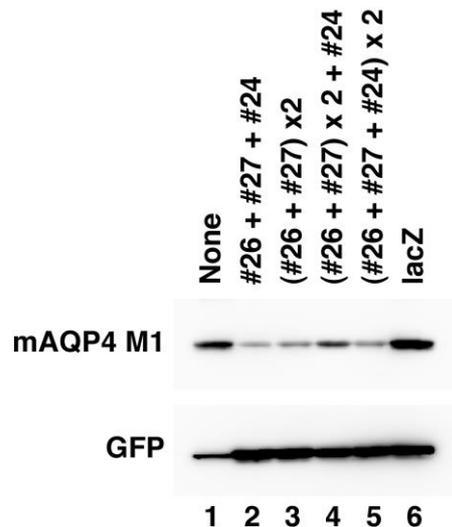


図5 一過性発現系における複数のmiR RNAiによるマウスAQP4ノックダウン効果の検討

マウスAQP4に対してノックダウン効果が見られたRNAiの配列を複数連結し、ノックダウン効果の増強が見られるか否かについて検討した。各RNAiコンストラクトとM23L-mAQP4 M1の乳類発現コンストラクトを共発現させ、ウェスタンブロッティングによりノックダウン効果を評価した。各コンストラクトの構造は図3に示している。

れ、特に RNA ポリメラーゼ II により発現誘導可能な miR RNAi の系を用いて mAQP4 のノックダウンを試みた。あらかじめ用意されている 4 種類の候補について個々に検討したところ、3 つのコンストラクトで効果が期待できたため、これらを複数連結したコンストラクトを作製し、効果の増強を試みた。mAQP4 発現コンストラクトとともに一過性に CHO 細胞にトランスフェクションした場合は十分効果が確認できたもの、AQP4 を内在性に発現する細胞にこれら RNAi コンストラクトを一過性に導入し多場合はほとんど効果を示さなかった。一つの原因として、リポフェクション法による遺伝子導入効率の低さが考えられたため、アデノウイルスベクターによりほぼ 100% の導入効率を実現した。しかしながら、ウイルス感染後 6 日を経過しないと RNAi の効果が現れなかった。これはおそらく AQP4 タンパク質が安定であるため、mRNA レベルで抑制できても、タンパク質レベルで効果を発揮するのに時間を要することを示していると考えられる。よって、脳浮腫や炎症性脳疾患の治療目的では RNAi の手法は相応しくないとの結論に至った。

3. 今後の展望

RNAi による AQP4 の発現抑制については、予想外に AQP4 タンパク質が安定であったことから、効果の発現に長期を要し、実際の治療に用いることは困難であると予想される。

一方、我々は脱髄を伴う自己免疫疾患である視神経脊髄炎 (NMO) の発症メカニズム解明の過程において、AQP4 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の作製を試み、複数の抗体を得ることに成功した (3, 4)。これら抗体の幾つかは、AQP4 の細胞外ドメインに結合することにより速やかに AQP4 の内在化を引き起こすことが明らかになった。これにより細胞膜表面の AQP4 タンパク質は著しく減少する (投稿準備中) ことから、これら抗体を人 IgG とのキメラ化あるいはヒト化 (humanize) することにより脳浮腫や炎症性脳疾患の新たな治療法の確立が期待される。現在局所脳虚血モデル (中大脳動脈閉塞モデル) による効果の検討に入るところである。

参考文献 :

1. Manley, G.T., Fujimura, M., Ma, T., Noshita, N., Filiz, F., Bollen A.W., Chan, P., and Verkman, AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat. Med.* (2000) 6, 159-163.
2. Ikeshima-Kataoka, H., Abe, Y., Abe, T., and Yasui, M. Immunological function of aquaporin-4 in stab-wounded mouse brain in concert with a pro-inflammatory cytokine inducer, osteopontin. *Mol. Cell. Neurosci.* (2013) 56, 65-75.
3. Ramadhanti, J., Huang, P., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Sakihama, T., Misu, T., Fujihara, K., Hamakubo, T., Yasui, M., and Abe, Y. A novel monoclonal antibody against the C-terminal region of aquaporin-4.

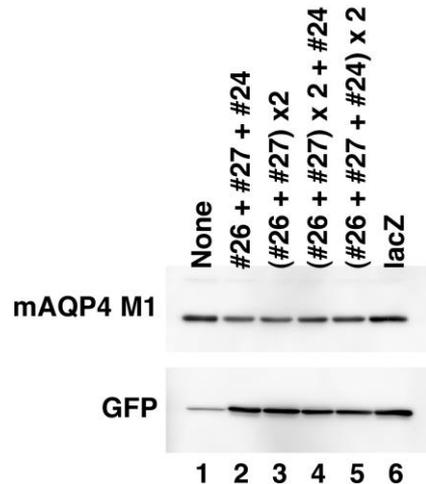


図6 mAQP4安定発現CHO細胞における複数のmiR RNAiによるマウスAQP4ノックダウン効果の検討
図5で用いたものと同じRNAiコンストラクトをmAQP4安定発現CHO細胞に一過性にトランスフェクションし、AQP4のノックダウン効果をウェスタンブロッティングにより評価した。

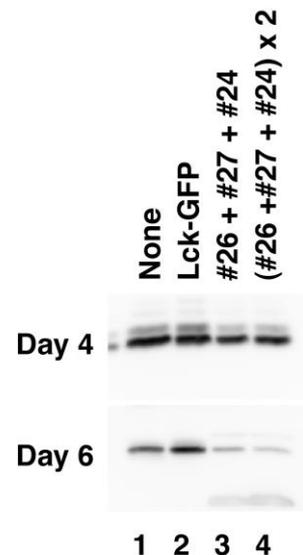


図7 初代培養マウスアストロサイトの内在性AQP4に対するアデノウイルスベクターによる複数のmiR RNAi発現の効果
mAQP4に対するmiR RNAiをアデノウイルスベクターに組み込み、初代培養アストロサイトに感染させ、4日後、及び6日後にタンパク質を抽出し、内在性AQP4に対するノックダウン効果をウェスタンブロッティングにより評価した。陰性コントロールとしてmAQP4に対してノックダウン効果のないコンストラクトであるLck-GFP (レーン2) を用いている。

Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother. (2013) 32, 270-276

4. Miyazaki, K., Abe, Y., Iwanari, H., Suzuki, Y., Kikuchi, T., Ito, T., Kato, J., Kusano-Arai, O., Takahashi, T., Nishiyama, S., Ikeshima-Kataoka, H., Tsuji, S., Arimitsu, T., Kato, Y., Sakihama, T., Toyama, Y., Fujihara, K., Hamakubo, T., and Yasui, M. Establishment of monoclonal antibodies against the extracellular domain that block binding of NMO-IgG to AQP4.

J. Neuroimmunol. (2013) 260, 107-116.

作成日： 2014年 3月 5日