

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591648

研究課題名(和文) アクアポリン9が炎症性皮膚炎発症に果たすKey Role

研究課題名(英文) Role of Aquaporin-9 in inflammatory skin disease

研究代表者

竹馬 真理子(Chikuma, Mariko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40531736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Aquaporin 9 (AQP9) は、水およびグリセロールなどの低分子成分を透過する膜蛋白である。我々は、AQP9欠損(AQP9^{-/-})マウスを用いた実験から、好中球に発現するAQP9が、ハプテンにより誘発される接触皮膚炎反応(CHS)に関与することを明らかにした。AQP9は好中球の遊走・浸潤に必須の因子であった。AQP9^{-/-}マウスでは、CHS感作過程で起こる好中球のリンパ節への浸潤が低下することで、CHS反応を抑制していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin-9 (AQP9) is expressed in several immune cells, including neutrophils. Here we show the involvement of AQP9 in hapten-induced contact hypersensitivity (CHS) using AQP9 knockout (AQP9^{-/-}) mice. First, the CHS response to hapten was impaired in AQP9^{-/-} mice compared with wild-type (WT) mice. Second, administration of WT neutrophils into AQP9^{-/-} mice during sensitization rescued the impaired CHS response. Neutrophil recruitment to dLNs upon hapten application was attenuated by AQP9 deficiency. AQP9^{-/-} neutrophils showed a reduced CCR7 ligand-induced migration efficacy, which was attributed to the attenuated recruitment of neutrophils to dLNs. These findings suggest that AQP9 is required for the development of sensitization during cutaneous acquired immune responses via regulating neutrophil function.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アクアポリン 接触皮膚炎 細胞遊走

1. 研究開始当初の背景

水は生命現象にとって必須の物質であり、体内ではみかけ以上にダイナミックな水輸送が行なわれている。この水輸送を支える膜蛋白として発見されたアキアポリン (AQP) は、現在までにAQP0からAQP12までの13の遺伝子が報告されている。その物質透過性からは、水だけを透過させるAQP (0,1,2,4,5)、水とグリセリンのような非イオン性小分子を通すAQP (3,7,9,10)、多様な物質透過性を有するAQP (6,8,11,12) に分類されている。1992年にAQP1が発見された当時、AQPの研究は、腎臓、腸管など水の吸収が盛んな臓器を中心に進められてきた。この進展により、近年では、AQPが、水やその他の物質輸送を介して、さらに高次の生命現象を制御することがわかってきている。

申請者は、AQPの新たな機能として、AQP1が水分透過を介して細胞遊走を制御し、腫瘍浸潤や (Saadoun et al., *Nature*, 2005, 434:786)、虚血性腎疾患 (Hara-Chikuma et al., *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17:39) に関与していること、脂肪細胞に局在するAQP7が、グリセロール透過を介して脂肪代謝を調節することを明らかにしてきた (Hara-Chikuma et al., *J Biol Chem*. 2005, 280: 15493)。特に、申請者は皮膚におけるAQPに着目し、皮膚の構成細胞に発現するAQP分子の機能を一貫して明らかにしてきた。皮膚を構成する主要細胞である表皮ケラチノサイトは、AQP3、9を発現している。申請者はこれまで、AQP3欠損マウスおよびAQP3ノックダウン細胞を主な研究材料に用い、AQP3がグリセロール透過機能を介して皮膚保湿や弾力性を調節していること (Hara et al., *J Biol Chem*. 2002, 277:46616; Hara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100: 7360)、AQP3発現がケラチノサイトの細胞遊走および細胞増殖を調節し、創傷治癒や (Hara-Chikuma M, et al., *J Mol Med*. 2008, 86:221)、腫瘍形成にに關与していること (Hara-Chikuma et al., *Mol Cell Biol*. 2008, 28:326) を明らかにしてきた。またアトピー性皮膚炎発症にAQP3の過剰発現が関与していること明らかにし、AQP3発現を介した皮膚疾患治療への可能性を示唆した (Nakahigashi et al., *J Invest Dermatol*. 2011, 131, 865)。

一方AQP9は、今までの報告や予備検討から、分化した表皮細胞や、皮膚に浸潤する多くの免疫細胞 (好中球、肥満細胞、T細胞など) に発現していることが示唆されているが、その機能はほとんど明らかにされていない。またAQP9欠損マウスが既に樹立されているが、皮膚の詳細な機能解析は未だ実施されておらず、皮膚外観や組織には顕著な異常がないと言及されている (Rojek et al.,

2007,104:3609)。

2. 研究の目的

ケラチノサイトあるいは免疫細胞に発現するAQP9が、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎あるいは乾癬のような免疫異常を伴う炎症性皮膚疾患の発症に關与している可能性を検討した。AQP9欠損マウスを用い、接触皮膚炎モデルにおける野生型マウスとの表現型を比較することで、AQP9の機能解明を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

3.1. 接触皮膚炎モデル

AQP9 遺伝子欠損マウス (AQP9^{-/-}, C57BL/6 genetic background) は、Rojek博士 (Aarhus University, デンマーク) から入手し、京都大学動物施設内にて、Hetero同士交配により繁殖し実験に供した。AQP9^{-/-}および野生型 (WT) マウスは、2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を腹部に塗布し感作した。塗布5日後にDNFBを耳介に塗布し (チャレンジ)、24時間後の耳介浮腫をmicrometer (Mitsutoyo) により測定した。

感作の成立を調べるため、DNFB塗布5日後に、皮膚所属リンパ節を摘出し、2,4-dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) とともに3日間培養し、細胞増殖能 (³Hサイミジン取り込み) と、培養上清のサイトカイン量 (INF-gamma, IL-17A) を測定した (ELISA kit, e-bioscience)。さらに、DNFB感作5日後のリンパ節の細胞、およびチャレンジ24時間後のリンパ節ならびに皮膚中の細胞を調製し、flow cytometry FACS Fortessa system (Becton Dickinson) により解析した。

3.2. Adoptive Transfer Experiments.

DNFB感作5日後に、AQP9^{-/-}およびWTマウスの所属リンパ節から細胞を調製し、耳介へ皮下投与した。その直後、耳介にDNFBを塗布した。翌日の耳介浮腫を測定した。

3.3. Chemotaxis Assay

AQP9^{-/-}およびWTマウスのBone Marrow細胞から、Percoll分画により好中球を調製した。Transwell Chamber (5 μm pore size, Corning Costar) の上部に好中球をアプラインし、下部のケモアトラクタント (CCL19, CCL21, fMLP) へ遊走した細胞数を、FACSにより解析した。

4. 研究成果

C57BL6のWTマウスから好中球 (Neutrophil)、肥満細胞 (BMMC)、T細胞 (CD4⁺, CD8⁺細胞)、樹状細胞 (BMDC)、およびマクロファージ (BMM) を採取し、AQP9 遺伝子発現量をリアルタイム PCR により測定した。AQP9 は、好中球および肥満細胞で高い発現が確認された (図1, left)。

好中球での AQP9 免疫染色では、AQP9 が細胞膜と細胞質に局在していることが示された (図 1, right)。

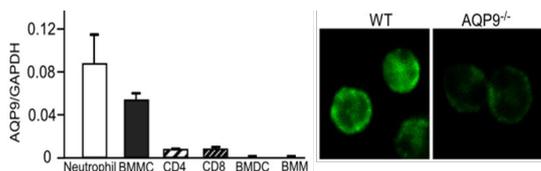


図 1. C57BL6 マウス由来細胞における AQP9 発現 (left;リアルタイム PCR による定量, right;好中球での AQP9 免疫染色)

ハプテン (DNFB) 誘発による接触皮膚炎反応を、WT および AQP9^{-/-}マウスを用い検討した。AQP9^{-/-}マウス皮膚では、発症程度を表す耳介浮腫 (厚さ) が、WT マウスと比較して有意に抑制されていた (図 2, left)。HE 組織染色像から、AQP9^{-/-}マウス皮膚では、WT で認められる免疫細胞の浸潤と表皮肥厚が抑制されていることが示された (図 2, right)。

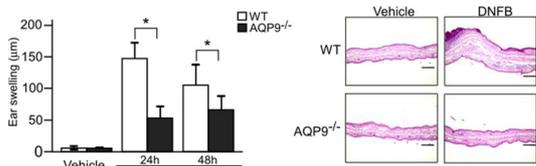


図 2. WT および AQP9^{-/-}マウスにおける接触皮膚炎反応 (left;接触皮膚炎反応による耳介浮腫、right;HE 組織染色)

接触皮膚炎反応惹起時 (チャレンジから 24 時間後) に採取した皮膚を用い、FACS 解析あるいは組織解析により、皮膚内に浸潤している T 細胞 (CD4⁺, CD8⁺)、樹状細胞 (MHCII⁺CD11C⁺)、肥満細胞 (Toluidine blue 染色)、および好中球 (Giemsa 染色) の細胞数を測定した。AQP9^{-/-}皮膚では、CD4⁺および CD8⁺T 細胞、ならびに好中球の浸潤が WT 皮膚と比較して有意に低下していることが示された (図 3)。

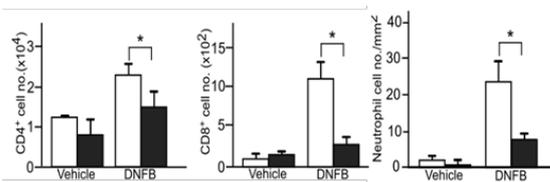


図 3. 接触皮膚炎反応惹起時の皮膚内の細胞数 (CD4⁺、CD8⁺ T 細胞、好中球)

AQP9^{-/-}マウスで接触皮膚炎の感作が成立しているかを検討した。DNFB 塗布 5 日後のリンパ節由来細胞を採取し、ナイーブマウス (WT, AQP9^{-/-} マウス) の耳介皮内に移入した (adoptive transfer)。直後に DNFB を塗布し、1 日後に耳介浮腫を測定したところ、AQP9^{-/-}細胞は WT 細胞と比較して、有意に耳介浮腫を減少させた (図 4)。この結果は、AQP9^{-/-}マウスでは接触皮膚炎反応の感作過程の成立が抑制されていることを示している。

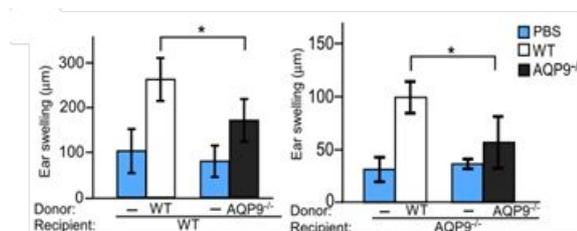


図 4. 所属リンパ節由来細胞の Adoptive transfer による接触皮膚炎反応

AQP9^{-/-}マウスで確認された接触皮膚炎反応の感作不成立の原因を探るため、DNFB 塗布 5 日後のリンパ節由来細胞を採取し、DNBS と共に培養し、詳細を解析した。細胞内へのサイミジン取り込み、および細胞からの IFN-gamma 産生量は WT と AQP9^{-/-}マウス細胞で差はなかった。一方、IL-17 産生は、AQP9^{-/-}細胞で顕著な減少が認められた (図 5)。なお、リンパ節内の細胞分布は、WT と AQP9^{-/-}マウス細胞で有意な差はなかった (data not shown)。リンパ節内の細胞、特に CD8⁺T 細胞からの IL-17 産生が、接触皮膚炎反応に必須であることが報告されている。従って、AQP9^{-/-}細胞で IL-17 産生低下していることが、感作不成立の主な原因と考えた。

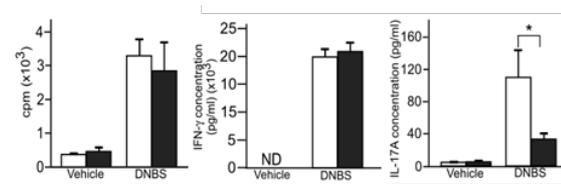


図 5. DNFB 塗布 5 日後のリンパ節由来細胞の細胞増殖能 (left)、IFN-gamma 産生量 (middle)、IL-17 産生量 (right)

種々の検討から、AQP9^{-/-}マウスにおいて観察される接触皮膚炎抑制には、好中球が関与していることを見出した。

WT マウスでは、DNFB 塗布によりリンパ節内の好中球数が顕著に増加し、塗布 18 時間後に細胞数がピークになることを見出した (data not shown)。この時、AQP9^{-/-}マウスでは、好中球の増加が顕著に抑制されていた (図 6, left)。好中

球の中和抗体 (anti-mouse Ly6G mAb) を投与し、好中球を除去した WT マウスでは、DNFB 塗布による接触皮膚炎反応が抑制された (図6, middle)。またこれらのマウス由来のリンパ節細胞では、IL-17 産生が顕著に低下していた (図6, right)。さらに、AQP9^{-/-} マウスに、WT マウス由来の好中球を移入することで、接触皮膚炎抑制と IL-17 産生低下が回復した (data not shown)。以上の結果は、AQP9^{-/-} マウスでの接触皮膚炎低下は、好中球に原因があることを示唆している。

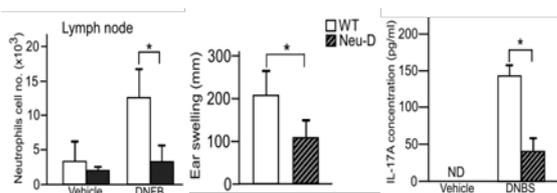


図6. 好中球の接触皮膚炎への関与リンパ節の好中球数 (left)、好中球除去による接触皮膚炎の抑制 (middle) および IL17 産生量低下 (right)

DNFB 塗布後に、AQP9^{-/-} マウスにおいて、リンパ節に局在する好中球数の増加が抑制された要因として、好中球のリンパ節への浸潤/ホーミングが AQP9 欠損により低下したことが予想された。好中球のリンパ節への浸潤には、CCR7-CCL19/21 の関与が報告されている。そこで、好中球の CCL19/21 に対する細胞遊走能を、Transwell を用いて検討した。AQP9^{-/-} 好中球では、CCL19 および CCL21 への細胞遊走が顕著に低下していた (図7, left)。また、AQP9^{-/-} 好中球では、CCL19/CCL21 刺激で誘発される細胞の方向性 (F-actin 染色) が低下していた (図7, right)。好中球に発現する AQP9 が、ケモカイン誘発性の細胞遊走を調節していることが示された。

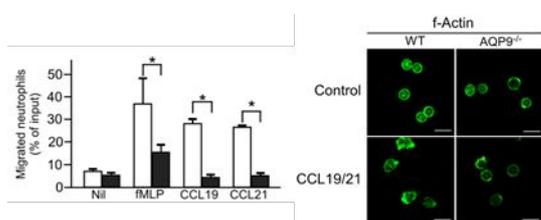


図7. 好中球のケモタクシス (left)、F-actin 染色 (right)

以上の結果から、AQP9 は、皮膚の免疫反応を担う好中球で高い発現が確認され、また接触皮膚炎反応に必須であることが示された。好中球に発現する AQP9 が、ケモカイン誘発性の細胞遊走を調節していることが認められた。

AQP9^{-/-} マウスでは、DNFB 塗布により誘発される好中球のリンパ節への浸潤が低下することで、その後起こる T 細胞の活性化、特に IL-17 産生の抑制が原因となり感作が成立せず、耳介浮腫を指標とする接触皮膚炎反応が惹起されなかったと考えられた。今後も、接触皮膚炎における好中球の役割を詳細に探索するとともに、好中球に発現する AQP9 の機能を明らかにしていく予定である。

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 5 件)

1. Hara-Chikuma M, Satooka H, Watanabe S, Honda T, Miyachi Y, Watanabe T, Verkman AS. Aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide transport is required for NF-κB signaling in keratinocytes and development of psoriasis. Nature Commun. In press. 査読有
2. Moniaga CS, Jeong SK, Egawa G, Nakajima S, Hara-Chikuma M, Jeon JE, Lee SH, Hibino T, Miyachi Y, Kabashima K. Protease activity enhances production of thymic stromal lymphopoietin and basophil accumulation in flaky tail mice. Am J Pathol. 2013, 182:841-51. 査読有
3. Hara-Chikuma M, Chikuma S, Sugiyama Y, Kabashima K, Verkman AS, Inoue S, Miyachi Y. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. J Exp Med. 2012, 209:1743-52. 査読有
4. Nakajima S, Igyártó BZ, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Hara-Chikuma M, Watanabe N, Ziegler SF, Tomura M, Inaba K, Miyachi Y, Kaplan DH, Kabashima K. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. J Allergy Clin Immunol. 2012, 129:1048-1055. 査読有
5. Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Inoue S, Miyachi Y. Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells. FASEB J. 2012, 26:211-8. 査読有

(学会発表) (計 2 件)

1. Moniaga CS et al., AQP9 expressing neutrophils are required for the establishment of contact hypersensitivity. 日本研究皮膚科学会第39回年次学術大会, 2014年12月12日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市)
2. Hara-Chikuma M et al., Aquaporin-3-mediated

hydrogen peroxide transport is required for NF- κ B signaling in keratinocytes and development of psoriasis. 日本研究皮膚科学会第39回年次学術大会、2014年12月12日、ホテル阪急エキスポパーク（大阪府吹田市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹馬 真理子 (Mariko Chikuma)
京都大学医学研究科, 次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点, 特定准教授
研究者番号: 40531736

(2) 研究分担者

宮地 良樹 (Yoshiki Miyachi)
京都大学医学研究科, 皮膚科学講座, 教授
研究者番号: 30127146