

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591463

研究課題名（和文）アクアポリン3の腫瘍形成および細胞増殖への関与と機序解明

研究課題名（英文） Involvement of aquaporin-3 in keratinocyte proliferation and tumorigenesis

研究代表者

竹馬 真理子（CHIKUMA MARIKO）

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：40531736

研究成果の概要（和文）：アクアポリン3（AQP3）が表皮細胞増殖を制御し、表皮細胞過増殖をとともう各種皮膚疾患（皮膚ガン、アトピー性皮膚炎）の病態形成に関与している可能性を検証した。培養ヒト表皮細胞を用いた実験から、AQP3を過剰発現させるとは細胞増殖が亢進し、AQP3ノックダウン細胞では、増殖が低下した。表皮細胞過増殖を伴うアトピー性皮膚炎では、AQP3の強発現が確認できた。アトピー性皮膚炎マウスモデルでは、AQP3欠損マウスは、アトピー様症状（過角化、皮膚バリア機能崩壊）を形成不全であった。以上の結果から、表皮細胞のAQP3発現は、細胞増殖を制御しており、表皮細胞過増殖を伴う種々の皮膚疾患の形成に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated the involvement of aquaporin-3 (AQP3) in epidermal hyperplasia in skin diseases, such as atopic dermatitis (AD). We found significantly increased AQP3 transcript and protein expression in the epidermis of human AD lesions. The upregulation of AQP3 expression in human keratinocytes by transfection with human AQP3 DNA plasmid increased cell proliferation. In mouse AD models, AQP3 was strongly overexpressed in the epidermis in wild-type mice. Epidermal hyperplasia was reduced in AQP3-deficient mice, with a decreased number of proliferating keratinocytes and normal barrier function. These results suggest the involvement of AQP3 in epidermal hyperplasia by a mechanism involving upregulated AQP3 expression and consequent enhancement of keratinocyte proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚科学、アクアポリン

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生命が維持されている。この水輸送を支える膜蛋白として発見さ

れたアクアポリン (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おり、哺乳類では、ほぼ全ての臓器に分布している。また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, 8)、水だけでなくグリセリンのような非イオン性小分子も通す AQP (3, 7, 9) に分類されている。

1992年のAQP1発見以降、AQPの研究は、水輸送が盛んな臓器を中心に進められてきた。例えば、腎臓では少なくとも7種類のAQPファミリー(1, 2, 3, 4, 6, 7, 11)の存在が見出され、尿生成過程(濃縮・再吸収)での各々のAQPの役割が明らかになっている。一方近年のAQP研究は、AQPの直接的な水透過機序から、水透過を介した新たな機能解明、ならびに水透過以外の役割の探索に研究が移行している。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, 434:786-92)、虚血性腎疾患(Hara-Chikuma et al., J Am Soc Nephrol, 2006, 17:39-45)に関与していることを明らかにした。また水透過以外の機能として、脂肪細胞に局在するAQP7が、グリセロール透過を調節することで、脂肪代謝に関与することを明らかにした(Hara-Chikuma et al., J Biol Chem. 2005, 280: 15493-6)。実際AQP7欠損マウスでは、脂肪細胞内でのグリセロール蓄積による内臓肥満を見出した。

皮膚では、AQP3が表皮ケラチノサイトで発現しており、申請者はこれまで、AQP3欠損マウスなどを材料に、AQP3のケラチノサイトでの機能解明に注力してきた。まずAQP3欠損マウスの皮膚乾燥やそれに伴う弾力性の低下を見出し(Ma et al., J Biol Chem. 2002, 277: 17147-53; Hara et al., J Biol Chem. 2002, 277: 46616-21)、AQP3によるグリセロール透過が角層水分量保持に貢献していることを明らかにした(Hara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003, 100: 7360-5)。次に、AQP3欠損マウス皮膚では創傷治癒が遅延しており、前述のAQP1同様、AQP3の水分透過作用によりケラチノサイトの細胞遊走が調節されていることを明らかにした(Hara-Chikuma M, et al., J Mol Med. 2008, 86:221-31)。

さらに最近の研究では、イニシエータ(DMBA)およびプロモーター(TPA, ホルボールエステル)を連続投与する化学発癌マウスモデルにおいて、AQP3欠損では腫瘍が形成されないことを見出した

(Hara-Chikuma et al., Mol Cell Biol. 2008, 28:326-32, 図1)。AQP3欠損表皮では、TPA投与によるプロモーション過程(細胞増殖亢進)が顕著に抑制されており、これが腫瘍形成を阻害する主要因であると考えた。また該マウス由来培養ケラチノサイトおよびヒトケラチノサイトを用いた種々の実験結果から、AQP3の新たな機能として、グリセロール透過を介した細胞増殖調節を示唆した。しかしながら、腫瘍形成および細胞増殖におけるAQP3の詳細な機能解析は途上である。

以上の経緯より、申請者は、AQP3の腫瘍形成および細胞増殖への関与と機序解明の重要性に着目した。特にヒト扁平上皮癌ではAQP3が過剰発現していることや、その他多くの癌でも種々のAQPファミリー(1, 3, 4, 5, 7, 8, 9)の過剰発現が認められていることから(Verkman et al., J Mol Med. 2008, 86:523-9)腫瘍形成の過程に、AQP3の過剰発現が必須である可能性を考えた。AQP3発現が細胞増殖に関与し、これが腫瘍形成を阻害する主要因であると考察していたが、腫瘍形成および細胞増殖におけるAQP3の詳細な機能解析は途上であった。さらに、多くの炎症性皮膚疾患では、表皮ケラチノサイトの過増殖を伴うことから、これら細胞増殖制御にAQP3発現が関与している可能性も考えられた。

2. 研究の目的

AQP3が表皮細胞増殖を制御し、表皮細胞過増殖をともなう各種皮膚疾患(皮膚ガン、アトピー性皮膚炎)の病態形成に関与していると仮定した。AQP3発現の表皮細胞増殖への関与の有無とその作用機序の解明、ならびに種々皮膚疾患への関与の可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト皮膚サンプル採取

アトピー性皮膚炎患者および健常者皮膚は、DISPERSE処理により表皮層を分離し、mRNAを採取しリアルタイムPCR法により、AQP3量を解析した。

(2) アトピー性皮膚炎(AD)マウスモデル

野生型およびAQP3欠損マウス(ヘアレスマウスバックグランド)は、背中に卵白アルブミン(OVA, 100 mg in 100 µl saline)を貼付し、AD症状を惹起した(1週間のうち4日間貼付、1ヶ月間)。ハプテンADモデルでは、2.5% oxazolone

(Oxa)を1回塗布し、1週間後から、0.1% Oxaを隔日塗布した(3週間)。最終貼付あるいは塗布から24時間後に経皮水分蒸散量(TEWL)測定および皮膚のサンプリングを実施した。パラフィン切片により、HE染色およびAQP3免疫染色を実施した。皮膚は、Heat split 処理により表皮層を分離し、ホモジネート上清を用い AQP3 のWestern Blotting を実施した。

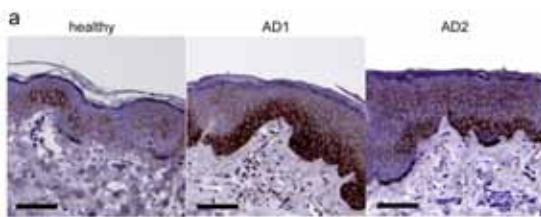
(3) AQP3 発現量の表皮細胞増殖への関与

ヒト表皮細胞 (Normal human epidermal keratinocytes および HaCaT cells) は、ヒト由来 AQP3 コンストラクトをトランスフェクトした (Lipofectamine 2000 使用)。トランスフェクト2日後に、RNA を採取し、リアルタイム PCR 法により AQP3 遺伝子量発現量の確認を実施した。また、DNA 合成量を MTT 法あるいは BrDU-Elisa 法により測定した。

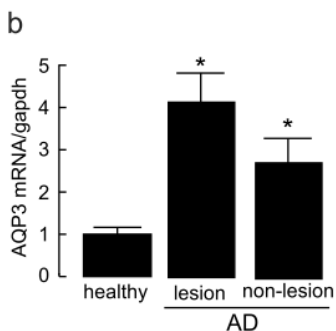
4. 研究成果

(1) アトピー性皮膚炎患者における AQP3 発現量

アトピー性皮膚炎 (AD) 患者表皮における AQP3 発現量を、健康者表皮における発現量と比較したところ、AD 表皮では AQP3 が有意に増加していた(図1-a; AQP3 免疫染色、b; AQP3 発現量)。



(図1-a; AQP3 免疫染色)



(図1-b; AD 表皮における AQP3 発現量)

(2) AD マウスモデルにおける AQP3 発現の重要性

AD 発症における AQP3 発現の役割を検討するため、AQP3 欠損マウスおよび野生型マウスを用い、以下の AD マウスモデルを実施した。

卵白アルブミン(OVA)投与モデル
ハプテン連続塗布モデル

OVA 投与 AD マウスモデルにおいて、野生型マウスでは AD の特徴である表皮細胞過増殖を伴う hyperkeratosis が誘発され、さらに、AQP3 発現量が顕著に増加していた(図2; OVA 投与モデルにおける AQP3 発現)。一方、AQP3 欠損マウス皮膚では、表皮層の顕著な肥厚は認められなかった(図3; OVA 投与モデルにおける HE 染色)。また野生型皮膚では、皮膚バリア機能の指標である経皮水分蒸散量 (TEWL) の顕著な増加がおり、バリア機能の破綻が予測された。AQP3 欠損マウス皮膚では、TEWL の変動は見出されなかった。以上から、AQP3 発現は、AD 発症過程の表皮過増殖ならびにバリア機能破綻に関与していることが示唆された(図4; TEWL)。

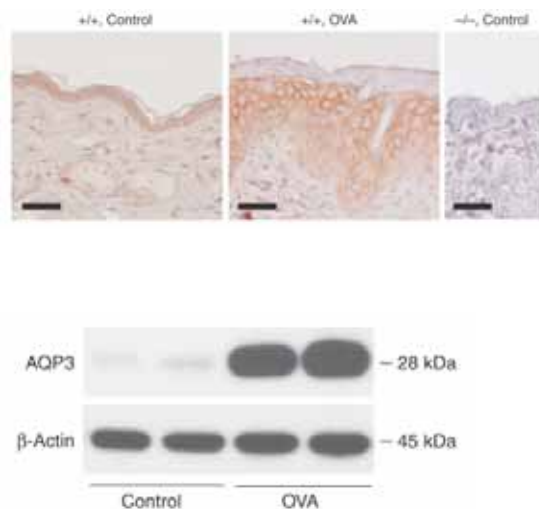


図2; OVA 投与マウスモデルにおける AQP3 免疫染色 (上段), および表皮の AQP3 Western Blotting

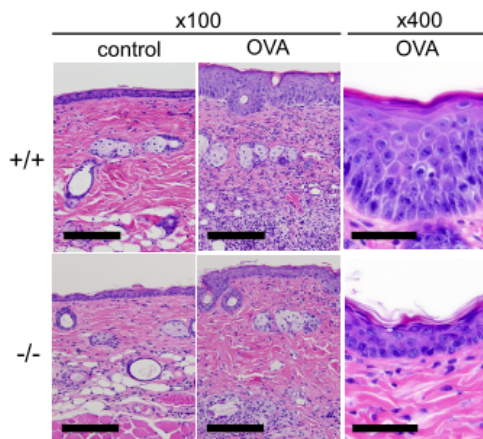


図3; OVA 投与モデルにおける HE 染色

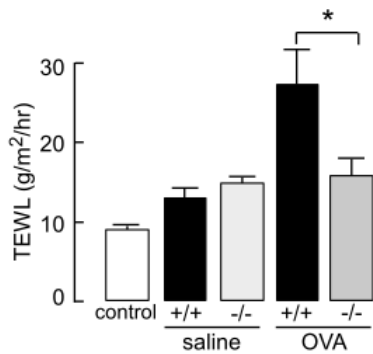


図 4 ; OVA 投与モデルにおける TEWL

さらに、OVA モデルとは発症機序が異なるハプテン連続塗布による AD 発症においても、AQP3 欠損マウスは、表皮の肥厚（図 5）、バリア機能の崩壊が抑制されていた。

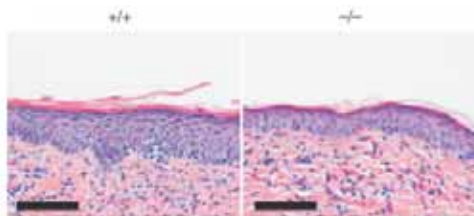


図 5 ; ハプテン連続塗布モデルにおける HE 染色

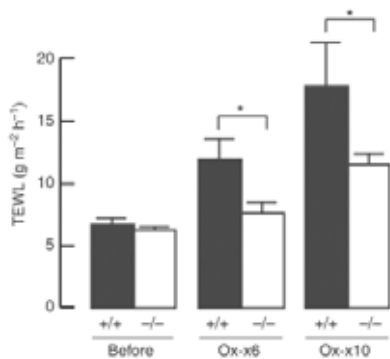


図 6 ; ハプテン連続塗布モデルにおける TEWL

(3) AQP3 発現量の表皮細胞増殖への関与

HaCaT cells は、AQP3 プラスミドの導入により、AQP3 を過剰発現させた。AQP3 過剰発現細胞では、コントロール細胞と比較して、細胞増殖が亢進した（図 7）。本細胞では、表皮細胞の増殖関連遺伝子であるケラチン 5、14 の遺伝子量が增加しており、AQP3 発現量増加により、細胞増殖関連遺伝子が増加することで、細胞増殖が亢進した可能性が示唆された（図 8）。一方、細胞分化関連遺伝子（ケラチン 1、10）には変動は認められなかつ

た。

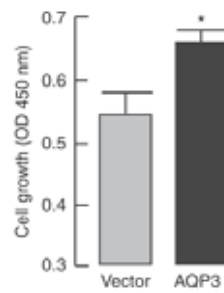


図 7 ; AQP3 過剰発現表皮細胞における細胞増殖能

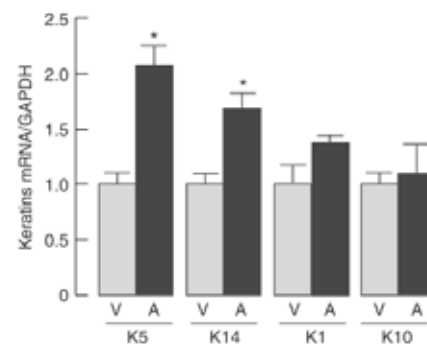


図 8 ; AQP3 過剰発現表皮細胞における増殖・分化関連遺伝子発現 (V: Vector, A: AQP3)

以上の結果により、表皮細胞では、AQP3 発現量抑制により細胞増殖が低下し、発現量増加にともない細胞増殖が亢進したことから、AQP3 発現量は細胞増殖を制御する因子の 1 つであると考えられた。さらに、アトピー性皮膚炎マウスモデルにおいて、AQP3 欠損マウスでは発症が抑制されたことから、アトピー性皮膚炎発症に AQP3 が関与していると考えられた。

AQP3 の本来の機能である水あるいはグリセロールなど小分子の細胞内への透過が、どのように細胞増殖制御に関与しているかを、今後詳細に検討する必要がある。AQP3 発現量を抑制することによる、新たな皮膚疾患治療への応用が考えられる。

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 3 件)

1. 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. doi: 10.1096/fj.11-186627
2. Nakahigashi K, Kabashima K, Ikoma A, Verkman AS, Miyachi Y, Hara-Chikuma M. Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol.* 2011, 131:865-73. doi:10.1038/jid.2010.395
 3. Hara-Chikuma M, Takahashi K, Chikuma S, Verkman AS, Miyachi Y. The expression of differentiation markers in aquaporin-3 deficient epidermis. *Arch Dermatol Res.* 2009, 301:245-52. doi:10.1007/s00403-009-0927-9

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹馬 真理子(CHIKUMA MARIKO)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号：40531736

(2)研究分担者

宮地 良樹(MIYACHI YOSHIKI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：302127146