

皮膚におけるアクアポリン3の発現調節

自治医科大学 薬理学教室

石橋 賢一、中越 雅道

Water is important for skin to keep its moisture. Water transport is conducted by channel proteins named aquaporins. Several aquaporins play pivotal roles in water metabolism in our body. AQP3 is expressed in the skin and its importance for the skin moisture is demonstrated by the study of AQP3 knockout mice which have accelerated drying of the skin. The prevention of dry skin is important not only from the cosmetic point of view but also from the clinical point of view, i.e. it is responsible for an itch especially in aged people. This study was intended to search for the substances which upregulate the expression of AQP3 in the skin. We used rat skins and human keratinocytes as models. In rat skins, vitamin A increased the AQP3 expression in a high dose (10%) but not in lower doses. However, the AQP3 expression was unaffected by vitamin A in a cell line from human keratocarcinoma. On the other hand, the expression of AQP3 in this cell line responded to hypertonic stimulation with sorbitol suggesting that this cell line is useful for the screening of the candidate substances which increase AQP3 expression.

1. 緒言

水は生命にとって不可欠の物質であり、それを選択的に通す水チャンネルが発見されてこの分野の研究は急速に進展した。水チャンネルは瞬時に大量の水を運ぶ必要がある細胞や浸透圧格差が小さくても水の輸送が必要とされる細胞に存在している。水チャンネルの実体はアクアポリン (aquaporin) と呼ばれる膜蛋白であるがヒトにおいて13個の遺伝子がみついている。この数は植物のシロイヌナズナの38個に比べるには少なく、また線虫の11個に比べても少ないように思える。一方アクアポリンは水だけを通すのでないこともあきらかになり名前にとらわれていると他の重要な機能を見落とす危険がある。水のみならずグリセリンや尿素などの小粒子をとおす aquaglyceroporin と呼ばれるサブグループも存在する (AQP3, 7, 9, 10)¹⁾。

皮膚では角質層に適度な水分 (20-30%) が含まれており皮膚の柔らかさを生み出している。一方体内にたまった熱を体外に放出するために皮膚から水を蒸発させているので、角質層はそれにあうだけの水を透過させる性質も有している。このダイナミックな水の動きに水チャンネルが関与していることが最近 AQP3 のノックアウトマウスが報告された²⁾。このマウスでは腎性尿崩症のほかに皮膚の異常な乾燥が認められた。しかしその機構は直接水の輸送に関与しているという単純なものではなく、ノックアウトマウスの皮膚のグリセリンの含有量が減少していることよ

りグリセリンの輸送を介して皮膚の保湿を保っていると考えられている³⁾。従って AQP3 の発現を調節することで皮膚の保湿性を変える事が期待される。ヒト鼻腔上皮の AQP3 の発現はビタミン A では変化しないようである⁴⁾。AQP3 はケラチノサイトに発現しているがその発現がビタミン A で変化するかどうかは不明である。一方 AQP1 と AQP5 は汗腺に分布しているが直接は皮膚の保湿性には関与しないと考えられる。

そこで今回の研究では皮膚の保湿性に重要な役割を演じる AQP3 の発現を調節する物質を検索し、特にその発現を増やすものを見つけることを目標とした。皮膚の保湿を維持する事で老人に多い乾燥性の掻痒症やアトピー性皮膚炎の治療や皮膚の創傷の治癒の促進をはかることが可能になると考えられる。また化粧品の多くが皮膚の保湿性を向上させる働きがあることを考えると、化粧品の成分としても有望である。さらに加齢による皺を減らす事ができれば美容的にも重要な物質を見つける契機にもなりうる。

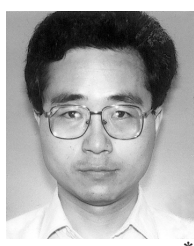
2. 実験

2・1 材料

200g の成体オス SD ラットを用いた。エーテル麻酔下に背部の毛を剃ったあとに薬剤を塗布した。24 時間後に皮膚を採取した。培養細胞は自治医科大学皮膚科教室で系代化したヒト皮膚癌細胞 (keratocarcinoma) を用いた。High glucose の DMEM (ダルベッコ変法イーグルスmedium) にペニシリン (50unit/ml) およびストレプトマイシン (50ug/ml) と 5% 牛胎児血清 (FCS) を添加したもので培養した。Subconfluent の状態で試薬を加え、24 時間後に細胞を採取した。試薬はシグマから購入した。

2・2 RNA, タンパクの抽出

ラットの皮膚はなるべく真皮を含まないようにはぎと



The regulation of AQP3 in skin and keratinocytes.

Kenichi Ishibashi, Masamichi Nakakoshi

Jichi Medical School, Department of Pharmacology

り、液体窒素に入れ固まった状態でクリオプレスをを用いてすみやかにパウダーにした。それをRNAeasy (キアゲン) の lysis buffer に入れ、protenase K 処理をおこなったあとカラムで total RNA を抽出した。培養細胞から RNA を抽出するには培養液を PBS (リン酸緩衝生理食塩水) であったあと lysis buffer を入れて機械的に細胞をこすりとった。それを RNAeasy のカラムを通して total RNA の抽出をおこなった。RNA は 20ug を 1% アガロース RNA 用ゲルの各レーンに電気泳動した。20XSSC でナイロン膜 (Hybond plus) にトランスファーした。培養細胞のタンパクの抽出にはホモジナイザーバッファー (0.32M sucrose, 5mM Tris pH7.2, 2mM EDTA, 0.1mM PMSF, 1ug/ml pepstatin A) 内で超音波破碎したあと、1000g で 10 分遠心した上清を 250,000g で 30 分超遠心した沈澱をホモジナイザーバッファーにけん濁した。

2・3 ノーザンブロット

ナイロン膜を 50% formamide 入りのハイブリ液で 42 度 16 時間ハイブリさせたあと 2XSSC で室温にて 15 分洗ったあと、2XSSC で 42 度 15 分、0.2XSSC で 58 度 15 分洗って増感紙といっしょにレントゲンフィルムにはさんだ。プローブはラットあるいはヒト AQP3 cDNA の全長をランダムプライマーで 32P-dCTP でラベルした。ニックカラムで未反応の 32P-dCTP を除いた。一方 RNA のトランスファーの定量性を検定するために、脱プローブ後ヒト GAPDH cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。GAPDH のデンシトメーター値で AQP3 の値を補正して比較した。

2・4 ウェスタンブロット

サンプルバッファー (75mM Tris, 2% SDS, 15% glycerol, 3% 2-mercaptoethanol, pH6.8) にタンパク 10ug を溶かし、95 度で 5 分変性させたあと 15% のポリアクリアミドゲルで

SDS-PAGE をおこなった。セミドライ・トランスファー装置でゲルから PVDF 膜 (Immobilon) にタンパクを転写した。膜は TBST (Tris-buffered saline, 0.05% Tween20) に 2% スキムミルクを加えたブロッキングバッファーで 4 度一晚処理した。抗ラット AQP3 抗体を 500 倍に TBST で希釈し室温で 1 時間インキュベートした。TBST で洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体と室温で 1 時間インキュベートした。TBST で洗浄後、化学発光検出キットで発光させ ECL フィルムに感光させた。

3. 結果

3・1 ラット皮膚へのビタミン A の AQP3 発現への影響

ラット皮膚には 1.8kb のサイズの AQP3 のバンドが検出された (Fig. 1)。ラット背部の剃毛した皮膚にビタミン A (all trans retinoic acid) を溶かすのに用いた DMSO 単独投与しただけで AQP3 の発現が増加することがあきらかになった (Fig. 1)。さらにビタミン A の影響をみるために 0.1%, 1%, 10% のビタミン A を塗布して 24 時間後の AQP3 の発現をノーザンブロットで調べた。10% で増加がみられたが、0.1%, 1% の低容量では DMSO のコントロールと較べて変化がみられなかった。これは 5 匹のラットでおこなったが同様の結果であった。

つぎに剃毛による傷が AQP3 の発現に影響する可能性があるのも毛のはえていない後ろ足に塗布した。やはり 10% ビタミン A で AQP3 の発現が誘導されることがわかった (Fig. 2)。

3・2 ヒト皮膚癌培養細胞での AQP3 の発現

皮膚での AQP3 の発現はケラチノサイトに局限している。従って AQP3 の発現をケラチノサイトで直接検討できれば有用性が高い。そこで当大学皮膚科に保存されているヒト皮膚癌培養細胞に AQP3 が発現しているものがないかスクリ

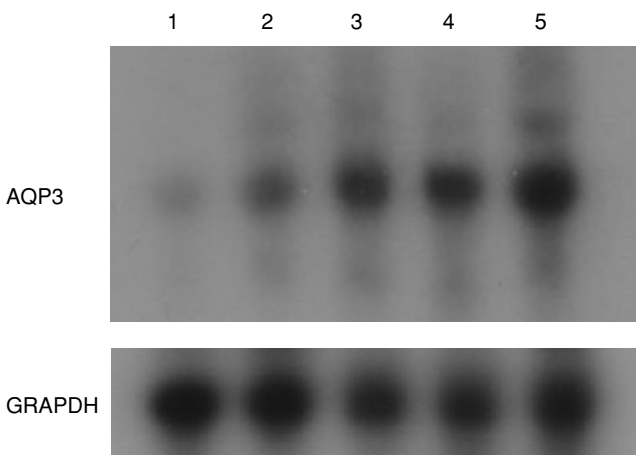


Fig.1. AQP3 mRNA expression in rat skins
Northern blot analysis of rat skins 24 h after treatment with 1: no treatment, 2: DMSO treated, 3: 0.1% vitamin A, 4: 1% vitamin A, 5: 10% vitamin A(all trans retinoic acid).

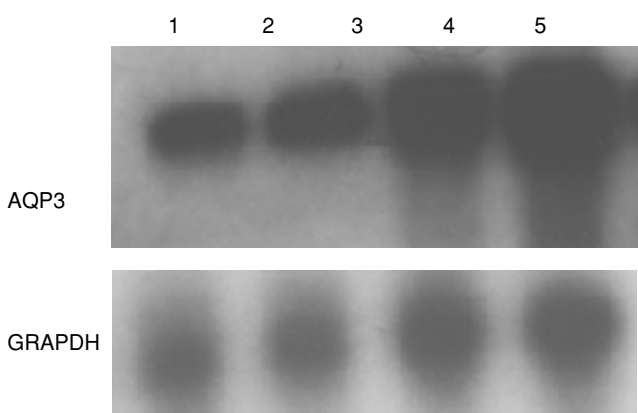


Fig.2. AQP3 mRNA expression in rat hind feet.
Northern blot analysis of rat hind foot skins 24 h after treatment with 1 and 2: DMSO, 3 and 4: 10% vitamin A.

ーニングしたところ kishi となづけられた細胞に AQP3 が発現していることが明らかになった。まずこの細胞の AQP3 の発現が浸透圧の変化に応じて変化するかどうか調べた。細胞に取り込まれない浸透圧物質であるソルビトールによる浸透圧の刺激に反応して AQP3 の発現が増加することがわかった (Fig. 3)。一方、細胞にとりこまれて浸透圧格差の生じない尿素では浸透圧に対する反応がみられなかった (Fig.3)。これらの結果はウェスタンブロットでは 30kDa のバンドと 40kDa 付近の幅の広いバンドが見られたが後者は糖鎖のついた AQP3 と考えられる。ノーザンブロットと同様の結果がウェスタンブロットでも見られ、タンパクレベルの発現でも

AQP3 がソルビトールで増加し尿素ではかわらないという上記の結果が確認された (Fig. 4)。以上の結果からこの細胞は AQP3 の発現が正常のケラチノサイトと同様の変化をする⁵⁾ので AQP3 の発現を調節する物質の検索に使えると考えられる。まずラットで用いたビタミン A の影響を調べてみた。この細胞では 10⁻⁶M のビタミン A でも AQP3 のノーザンブロットでの変化はみられなかった (Fig. 5)。

同じく、dexamethasone(10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M), dibutyl-cAMP(10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷M), dibutyl-cGMP (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷M) でも 24 時間後の AQP3 の発現のノーザンブロットでの変化はみられなかった。

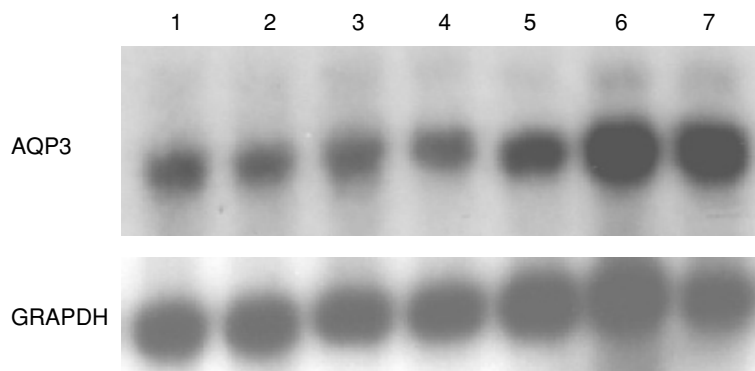


Fig.3. AQP3 mRNA expression in a human keratocarcinoma with hypertonic medium.

Northern blot analysis of a human keratocarcinoma cell line 24 h after treatment with 1: 200 mM urea, 2: 100 mM urea, 3: 50 mM urea, 4: control, 5: 100 mM sorbitol, 6: 200 mM sorbitol, 7: 300 mM sorbitol.

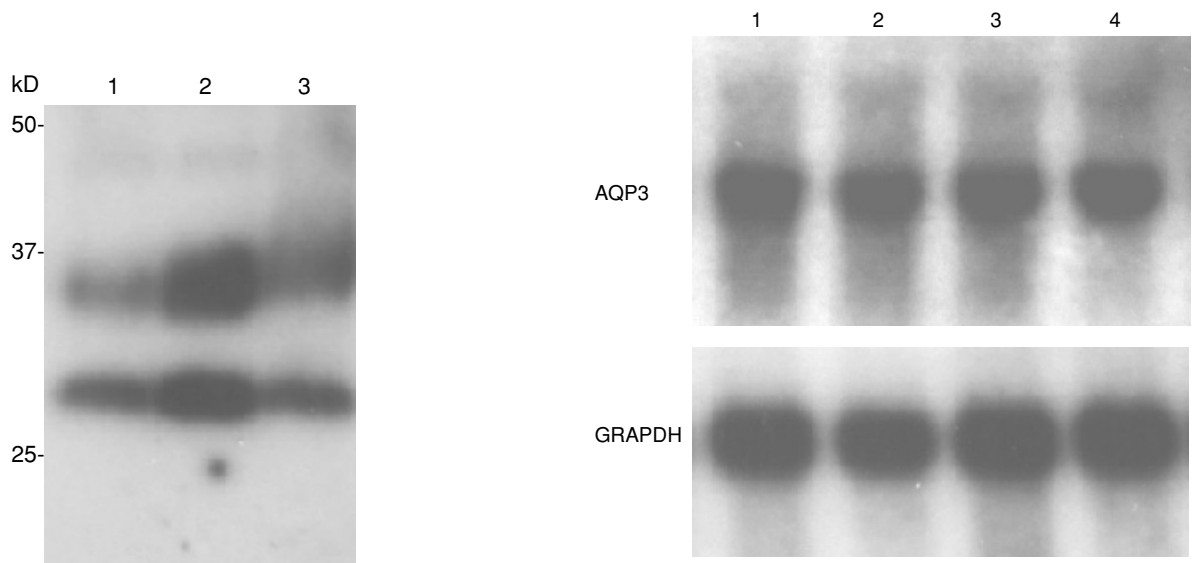


Fig.4. AQP3 protein expression in a human keratocarcinoma cell line.

Western blot analysis of a human keratocarcinoma cell line 24 h after treatment with 1: control, 2: 200 mM sorbitol, 3: 200 mM urea.

Fig.5. AQP3 mRNA expression in a human keratocarcinoma cell with vitamin A.

Northern blot analysis of a human keratocarcinoma cell line 24 h after treatment with 1. vehicle(DMSO), 2: 10⁻⁸M vitamin A, 3: : 10⁻⁷M vitamin A, 4: : 10⁻⁶M vitamin A.

4 考 察

皮膚の保湿に重要な水チャネルである AQP3 の発現の変化を調節する物質を検索するために2つの実験モデルを用いた。1つはラットの皮膚であり、もう1つはヒト皮膚癌培養細胞である。ラットの皮膚では DMSO の塗布だけでも AQP3 の発現がふえたことから剃毛により皮膚が傷付き炎症などの影響や DMSO による浸透圧の変化が原因として考えられる。よりヒトに近い毛のはえていない足の裏の皮膚を用いても、ビタミン A による AQP3 の発現誘導がみられたのでヒトの皮膚でも同様の結果が期待される。ただ皮膚の RNA を足の裏の皮膚から十分な量をこわさないでとることは困難であり、クリオプレスという凍った皮膚をパウダーにする装置と protenaseK 処理を行う事でやっと可能になった。これは表皮では細胞間結合が強固なため、細胞内に RNase の活性を抑える lysis buffer が入りにくく、RNA の崩壊を防ぐのがむづかしいためと考えられる。クリオプレスで機械的にバラバラにするだけでなく、proteinase K で化学的にも個々の細胞に分ける事で壊れていない RNA を十分量うることができると思われる。真皮部分の細胞成分は少ないので RNA は表皮それもケラチノサイトの RNA を反映していると考えられる。従ってより簡便なスクリーニングのシステムが望まれるので、ヒト皮膚癌培養細胞で AQP3 の発現を調べたところ1つの cell line で AQP3 が発現しているのを見つけた。この細胞は浸透圧の変化に応じて AQP3 の mRNA だけでなくタンパクも変化させることがあきらかになり、正常のケラチノサイトに近い性質をもっていると考えられる。しかし癌細胞であるので性質が変わっている可能性もあり、結果の解釈に注意が必要である。とくに薬物に対するレセプターの発現や細胞内シグナリングが変わっていると適切な反応が期待できない。それでも AQP3 を増加させる物質のスクリーニングの手始めとしては簡便であり、タンパクや RNA の抽出が容易でありきれいな結果がえられるので有用と考えられる。

ビタミン A はヒトにおいて皺をへらすことが美容的にも利用されている。従って AQP3 の発現が変化するかどうかは興味あるところである。今回は24時間という短い時間にもかかわらずビタミン A によって AQP3 の発現が増加することがあきらかになった。10%という高用量で変化がみられたのであるが長期にわたれば低用量でも効果が期待できる。しかし一方で長期になるとビタミン A 直接の作用だけでなく組織の変化に伴う二次的な影響をみる可能性もあるので解釈はむづかしい。一方培養細胞ではビタミン A の効果が認められなかった。これは癌細胞によって形質が変化しているためでないことは primary culture のケラチノサイトでビタミン A の AQP3 への影響を調べてみる必要がある。もしケラチノサイトでもビタミン A の AQP3 への影響が見られないならば、ビタミン A の皮

膚の AQP3 発現への影響は二次的な可能性があり、ビタミン A により誘導される未知の物質が AQP3 の誘導をしていると考えられる。今後この機構の解明が必要である。

ヒト皮膚癌培養細胞はスクリーニングとして有用なのでよく用いられる誘導物質であるデキサメサゾン（ステロイドホルモン）、サイクリック AMP、サイクリック GMP について検討してみたが AQP3 は誘導されなかった。これは AQP3 がヒト気管培養細胞 (A549 cells) においてデキサメサゾンで誘導されるというこれまでの報告⁶⁾と違って、細胞の違いや実験条件の違いを考慮に入れる必要がある。今後この細胞を用いて AQP3 を誘導するものが見つかれば、皮膚においても誘導できるかどうか、またそれによって皮膚の保湿性が高まるかどうか、また毒性がないかどうかを検討していく必要がある。

5. 総 括

皮膚の保湿性に重要な役割を演じる AQP3 の発現を調節する物質の検索をおこなった。ラット皮膚ではビタミン A による AQP3 の発現増加がみられたが、ヒト皮膚癌細胞ではビタミン A の AQP3 への影響は認められなかった。この培養細胞はソルビトールによる浸透圧の上昇に応じて AQP3 の発現が増加し、AQP3 の発現を調節する物質のスクリーニングに有用であると考えられる。

(引用文献)

- 1) 石橋賢一：水チャネルの構造と機能。医学のあゆみ 201, 1077-1082, 2002.
- 2) Ma T, Hara M, Sougrat R, et al.: Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *J Biol Chem.* 277, 17147-17153, 2002.
- 3) Hara M, Ma T, Verkman AS.: Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *J Biol Chem.* 277, 46616-46621, 2002.
- 4) Jun ES, Kim YS, Yoo MA, et al.: Changes in expression of ion channels and aquaporins mRNA during differentiation in normal human nasal epithelial cells. *Life Sciences* 68, 827-840, 2001.
- 5) Sugiyama Y, Ota Y, Hara M et al.: Osmotic stress up-regulates aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1522, 82-88, 2001.
- 6) Tanaka M, Inase N, Fushimi K. et al.: Induction of aquaporin 3 by corticosteroid in human airway epithelial cell line. *Am J Physiol* 273, L1090-L1095, 1997.