

皮膚ケラチノサイトの水・グリセリンチャネル AQP3 (アクアポリン3) の脂溶性ビタミンによる発現調節

明治薬科大学病態生理学教室

石橋 賢一

The skin is constantly exposed to external physical and chemical toxins to protect the interior and eventually to keep the homeostasis. This barrier mechanism will be enhanced by moisturizing the skin, which is partially conducted by glycerol, an ancient ingredient of cosmetics. The uptake of glycerol into the keratinocyte is mainly conducted by AQP3, a member of aquaglyceroporins also including AQP7, 9, and 10. Recent analyses of AQP3-null mice showed that the absence of AQP3 not only decreases the water content of the skin but also inhibits the development of skin cancer through the glycerol transport. Therefore, glycerol will be beneficial to moisten the skin and promote its regeneration while it will be harmful to stimulate the growth of skin cancers. Since the glycerol transport is regulated by the amount of AQP3 expression in the keratinocyte, the regulation of AQP3 expression should be examined to predict the clinical outcome of the application of cosmetics. Since we examined the effects of glycerol and vitamin A on AQP3 expression in keratinocarcinoma previously, here we tested the effects of vitamin E and D on the expression of AQP3 in a human normal epidermal keratinocyte cell line (PHK16-0b). Both lipophilic vitamins and lower concentration of glycerol significantly stimulated AQP3 expression examined by RT-PCR technique while higher concentration of glycerol inhibited its expression. It will be more efficient to develop a screening system to examine the effect of cosmetic ingredients on AQP3 expression in the keratinocyte in culture to predict their potential benefits and harms to the skin.

1. 緒言

われわれの体には13種類の水チャネルが発現している。水チャネルは水を選択的に通す古典的なアクアポリン (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6, 8) と、水以外にもグリセロールや尿素も通すaquaglyceroporin (AQP3, 7, 9, 10) と、さらには水を通す細胞内オルガネラに存在するAQP11, 12の3つのサブグループに分けられている¹⁾。

皮膚の角質層には水・グリセリンチャネルであるアクアポリン3 (AQP3) が多く発現している。AQP3は角質層のグリセリンと水の量を調整しており、皮膚の保湿にとっても重要な役割をはたしていることがAQP3 ノックアウトマウスの解析からあきらかになった²⁾。

さらに2005年にAlan Verkmanらによって、血管内皮においてAQP1がないと細胞運動が遅くなって血管新生が遅延することが示されて、アクアポリンの新たな役割が注目されるようになった。皮膚や角膜にあるAQP3も、組織再生に重要な役割をしていることが示されている³⁾。現在のところ細胞運動にアクアポリンが促進的にかかわっていると考えられているが、組織の修復が促進されることから細胞増殖にもかかわっている可能性もある。アクアポリン-11 (AQP-11) のノックアウトマウスでは多発性のう胞腎

になるので、AQP-11が細胞分化、増殖にかかわっており、他のアクアポリンでも同様の役割がある可能性がある⁴⁾。

興味深いことに、最近Verkmanのグループは、AQP3 ノックアウトマウスに皮膚癌が増殖しにくいことを発見し、グリセリンの補充で増殖するようになることを報告している³⁾。これはAQP3の発現をへらすことが皮膚癌の治療になると同時に、AQP3の増加は癌の増殖を促進するという諸刃の剣になる可能性を示している。さらに、グリセリンの輸送が関与していることから、グリセリンが皮膚癌の増殖を促進する危険性も示唆している。

グリセリンは古来ひろく皮膚に直接投与する基剤として使われているので、その安全性について検証することは重要である。とくに化粧品は連日長期に使用されるので問題となる。ただ、これまでグリセリンによる有害事象は長期的には報告されておらず、今回のノックアウトマウスの知見が、ヒトにも適用できるかどうかにはわかには判定しがたい。

われわれはこれまでAQP3をはじめヒト、マウスのアクアポリンを7つあたらにクローニングしてきた (AQP3, 7-12)¹⁾。さらに、皮膚のAQP3についてもビタミンAによって増加することをあきらかにしてきた⁵⁾。またケラチノサイトの腫瘍細胞 (keratinocarcinoma) での内因性AQP3が、ソルビトールによっても増加することもあきらかにしてきた⁵⁾。

一方、皮膚の細かい傷のすみやかな修復は、きめの細かい美的肌を保つために必須である。AQP3によってそれが促進されている可能性があり、AQP3の発現を調節する物質を発見することは、将来的に化粧品の開発のシードを提供する。これは、老化による皮膚のダメージからの修復に



The regulation of aquaglyceroporin AQP3 by lipophilic vitamins in skin keratinocytes

Kenichi Ishibashi, M.D.

Meiji Pharmaceutical University,
School of Pharmacy, Department of
Pathophysiology

も関与している可能性もある。さらに、医療の現場においても、圧迫潰瘍(床ずれ、褥瘡)など難治性の傷の治療にもつながりうる重要な知見を提供すると考えられる。

ビタミンAが紫外線から皮膚を保護する機構の一部に、AQP3の増加による皮膚再生の活性化もありうる。また皮膚圧迫潰瘍の治療において、ユーパスタのような高尿素軟膏が使われて効果をあげているが、この機構の一部にもAQP3の誘導がありうる。このような研究によって、AQP3をバイオマーカーとして新薬を開発できる可能性がある。もっとも、AQP3を高度に誘導すると皮膚癌が発生しやすい環境では、皮膚癌の増殖を促進してしまう可能性があるので注意が必要である。

そこで、癌細胞ではなく培養正常ヒト皮膚ケラチノサイトを用いて、軟膏薬としてよく用いられ、AQP3の発現を調節する可能性のある、脂溶性ビタミンである、ビタミンEとDについて検討したので報告する。

2. 実験

文献5に順じて、培養細胞を用いて実験をおこなった。簡単に述べると、正常ヒト皮膚ケラチノサイト(NHEK)(PHK16-0b細胞)⁶⁾を12ウェルプレートに40000細胞播き、翌日約60%コンフルエントに増殖したことを確認後、ビタミン類あるいはグリセロールをそれぞれ添加して培養した。PHK16-0b細胞の培養は、KGM-2 Bullet Kitを用い、培地交換は1日おきに行った。細胞の継代および使用時のプレートへの播き替えは、HEPES緩衝液(HEPES濃度30mmol/L添加した生理食塩水)で洗浄したのち、トリプシン/EDTA液(HEPES緩衝液にトリプシン濃度0.025%、EDTA濃度0.01%添加)を加え、細胞がフラスコ面から丸みをおびるのを確認後、フラスコ面を軽くたたいてフラスコから剥離させ、トリプシン中和液(HEPES緩衝液にFBS10%添加)を加えて細胞を回収した。

ビタミン類はカルシトリオール(ビタミンD; $1\times 10^{-10}\sim 1\times 10^{-8}$ M)、トコフェロール(ビタミンE; $1\times 10^{-10}\sim 1\times 10^{-4}$ M)、酢酸トコフェロール(ビタミンE酢酸塩; $2\times 10^{-10}\sim 2\times 10^{-6}$ M)、グリセロールは0.001~10%を最終濃度になるよう用いた。各ビタミンあるいはグリセロール添加12時間あるいは24時間後、細胞を回収して、トータルRNAを精製(RNeasy Mini Kit, QIAGEN)し、RT-PCRを行い、各ビタミンあるいはグリセロール添加によるヒトAQP3の発現変化を検討した。コントロールは上記添加ビタミン類なし、あるいは最終濃度0.1%エタノールを添加したケラチノサイトを用いた。

3. 結果と考察

0.01% (1.4 mM) グリセロールの添加による12時間と24時間後のAQP3の発現量は、コントロールに比較し明らか

に増加した(1.5~1.8倍)。0.001% (0.14 mM) グリセロールの添加では、コントロールと変わらない発現量であった。一方、0.1% (14 mM) グリセロールの添加では、コントロールの0.8倍に減少し、1% (137 mM) グリセロールの添加では、コントロールの1/10にさらに減少した。10% (1.37 M) グリセロールの添加では、細胞がはがれてしまったため検討できなかった。以上より、高濃度のグリセロールは、ケラチノサイトには毒性がある可能性が示唆された。ただ、少量のグリセロールでAQP3の発現が刺激されるが、中等量では抑制されるという結果は、中等濃度のグリセロールには毒性よりもネガティブフィードバックによる制御作用がある可能性がある。

以前、われわれは別の細胞で50, 100, 200mMのグリセロールでは、24時間後のAQP3蛋白の発現に影響しなかったという結果を得ている⁵⁾。これは浸透圧によると考えられるソルビトール200mMで、AQP3の発現が2倍に増加するという結果とは違っており、グリセロールに浸透圧とは異なる特異的な細胞作用が存在することを示唆している。今後、時間経過やタンパク量の発現も含めて検討する必要がある。

一方、カルシトリオール(活性型ビタミンD)の添加によるAQP3のRNA発現量の変化をみると、添加濃度に依存して増加し、 1×10^{-8} Mの濃度で1.5倍に増加した。さらに、酢酸トコフェロール(ビタミンE)添加(2×10^{-10} M)によっても、AQP3の発現量の同程度の増加が見られた。これに対して、トコフェロールのみでは、添加濃度を変えてもAQP3のRNA発現量および形態の変化は全く生じなかった。さらに、トコフェロール添加後の培養が12時間後、24時間後でも、共にAQP3の発現量に変化は認められなかった。これは、トコフェロール単体ではバイオアベイラビリティに問題がある可能性があるため、今後検討されなければならない。

以上より、正常ヒト皮膚ケラチノサイトPHK16-0b細胞において、少量グリセロール、カルシトリオール、酢酸トコフェロールの添加により、AQP3mRNAの発現量が増加することがあきらかになった。以前我々はケラチノカルチノーマ細胞において、ビタミンA添加によるAQP3の発現変化を認められなかったが⁵⁾、今回正常ヒト表皮ケラチノサイト(NHEK)を用いることで、より正常に近い反応を検討できたのではないかと考えられる。

今回もちいた脂溶性ビタミンは皮膚疾患によく用いられるものなので、AQP3発現調節にどのように関与するかに興味をもたれる。以前のわれわれの検討でも⁵⁾、脂溶性物質の溶解に用いるDMSOだけで、AQP3の発現が増加することを認めており、vehicleの影響には細心の注意を払う必要がある。今回は、エタノールをvehicleにもちいており、エタノールそのものだけでは、AQP3の発現に影響

をしないのを確認しているが、実際の化粧品などでは混合物が多いので、それらの影響も考慮する必要がある。

今後、これらの培養細胞での知見が、皮膚組織においても認められるかを検証していく必要がある。さらには、AQP3の発現を定量化するより簡便な方法を開発することで、もっと多くの化学物質を効率よくスクリーニングすることが可能になる。自動化も含めたスクリーニング系の開発は、より効果的で安全な化粧品の開発にもつなげられる可能性があるため重要である。

一方、マウスでみられたような³⁾、皮膚癌をグリセリンが促進する可能性があるため、ケラトカルチノーマ細胞におけるAQP3の発現制御が、正常皮膚ケラチノサイトと同様であるのかも検討していく必要がある。ケラトカルチノーマ細胞のAQP3を減少させるが、正常皮膚ケラチノサイトのAQP3の発現を増加させる物質を同定することが、より安全な化粧品の開発には望まれると考えられるからである。

謝 辞

本研究に対して、重ねてご支援いただいたコスメトロジー財団に感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Ishibashi K, Hara S, and Kondo S: Aquaporin water channels in mammals. Clin Exp Nephrol.13, 107-117, 2009.
- 2) Hara-Chikuma M, and Verkman AS. : Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. Biol Cell. 97, 479-486, 2005.
- 3) Hara-Chikuma M, and Verkman AS. : Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. Mol Cell Biol. 28, 326-332, 2008.
- 4) Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, *et al.* : Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. Mol Cell Biol. 25, 7770-7779, 2005.
- 5) Nakakoshi M, Morishita Y, Usui K, *et al.*: Identification of a keratinocarcinoma cell line expressing AQP3. Biology of the Cell. 98, 95-100, 2006.
- 6) Ishibashi Y, Sugita T, Nishikawa A.: Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to Malassezia yeasts. FEMS Immunol Med Microbiol. 48, 400-409, 2006.