

水チャネル aquaporin-3 の発現変化とその役割に関する研究

分子機能薬学専攻 薬物活性学分野 堀江一郎

Aquaporin (AQP) は浸透圧勾配による細胞膜の水輸送を促進させる膜タンパク質、いわゆる水チャネルである。現在までに、13 種類のアイソフォームがほ乳類で同定されており、各々が組織特異的に発現している。欠損マウスの表現型解析から、AQP 類は水分代謝異常を伴う種々の疾患の治療を考える上で、新たな創薬ターゲットとなり得ることが示されてきた。中でも、AQP3 は皮膚のケラチノサイト、気道上皮細胞および腎臓の集合管上皮細胞などに発現し、水だけでなくグリセロールも透過させるタイプの AQP である。また、AQP3 の欠損により、皮膚の乾燥症状や創傷治癒の遅延を生じることが示され、AQP3 は特に皮膚組織の恒常性を維持するための生理的な重要な役割を担うと考えられている。しかし、病態生理学的な AQP3 の役割については未だ十分に明らかにされておらず、炎症などの病態時に、AQP3 の活性が変化するか否かは不明である。また、その活性を薬理的に調節できるか否かも不明である。AQP は開閉機構を持たない単純な孔を形成する膜タンパク質であるため、AQP の活性は主として細胞膜発現量に依存する。そこで本研究では、AQP3 活性調節という新たな薬理学的概念を提唱するため、AQP3 の発現量に焦点を絞り、第一に炎症時の AQP3 発現量の変化について、第二に AQP3 発現の薬理的調節について検討を行った。

1. 炎症時における AQP3 の発現変化

はじめに、皮膚炎時の乾燥症状と AQP3 欠損マウスの乾燥症状の表現型の類似に着目し、炎症時の AQP3 の発現変化について調べた。まず、*in vivo* の皮膚炎モデルマウスの皮膚において、炎症部位では AQP3 の発現量が減少することを明らかにした。続いて、ケラチノサイト株 DJM-1 細胞の AQP3 発現に対する炎症性サイトカインの作用を調べた。その結果、炎症性サイトカインの一つである TNF- α が AQP3 のタンパク質および mRNA 発現を減少させた。この AQP3 発現の減少はプロモーター活性の低下とよく一致し、TNF- α が転写抑制を介して AQP3 量を減少させると考えられた。さらに、肺上皮細胞株 A549 細胞における AQP3 発現は IL-1 β によって、滑膜細胞 HFLS 細胞における AQP3 発現は TNF- α および IL-1 β によって、それぞれ抑制され、これらの発現抑制も AQP3 遺伝子の転写抑制と一致した。これらの結果から、AQP3 の発現は種々の組織で炎症により減少することが示唆された。

さらに、炎症性刺激による AQP3 の発現減少に関わるメカニズムを検討した。TNF- α や IL-1 β による AQP3 の発現減少は、MEK-ERK 阻害薬に感受性であった。また、AQP3 プロモーター領域の解析により、IL-1 β による AQP3 の転写抑制には C/EBP 結合部位が重要であることが明らかとなった。さらに、E2F-1 転写因子を siRNA により欠損させると、AQP3 の基本転写活性が抑制されるとともに、IL-1 β による転写抑制も生じなくなった。すなわち、TNF- α などの炎症性刺激により、C/EBP は MEK-ERK シグナル依存的に AQP3 プロモーターへリクルートされ、その結果、E2F-1 依存的な基本転写が阻害されることで AQP3 遺伝子の転写は抑制されると推定された。

2. ケラチノサイトにおける AQP3 発現の薬理的調節

次に、AQP3 の活性の薬理的調節を目的とし、AQP3 の発現を調節する薬物を見出すため、DJM-1 細胞の AQP3 発現に対する種々の生薬の作用を調べた。その結果、4 種類の生薬エキスで AQP3 発現の増加が、また 1 種類で減少が認められた。中でも、荊芥による発現増加作用は最も著明であり、DJM-1 細胞の AQP3 のタンパク質および mRNA 発現を増加させた。この AQP3 発現の増加はプロモーター活性の亢進とよく一致し、荊芥が転写促進を介して AQP3 の発現を増加させると考えられた。また、荊芥は TNF- α によって減少した AQP3 の発現を回復させることも分かった。さらに、荊芥はケラチノサイトの遊走能を著明に亢進し、この作用は siRNA により AQP3 発現を阻害すると、ほぼ完全に消失した。興味深いことに、これらの *in vitro* の結果とよく相関して、ヘアレスマウスの背部皮膚に形成させた実験的創傷で荊芥エキスの塗布は *in vivo* 創傷の治癒を著明に促進することも分かった。これらの結果から、荊芥は AQP3 遺伝子の転写を亢進することで、AQP3 の発現を増加させ、さらに本作用に基づいてケラチノサイトの遊走能および創傷治癒を促進することが示唆された。

以上、本研究では、AQP3 が炎症などの種々の病的状態に応じてその発現が変化する可変的因子であり、AQP3 の発現量の変化が細胞の遊走や創傷の治癒の効率と密接な関係にあることを示唆した。さらに、AQP3 の発現を促進するための新規薬物として荊芥エキスを見出し、荊芥の本作用を介して、創傷治癒の新たな戦略となり得ることを示した。本研究の知見は、AQP3 の活性調節という新たな薬理学的概念の提唱、さらには AQP3 の活性調節薬の開発のための重要な成績である。