

炎症性皮膚疾患におけるアクアポリン9の機能解明

京都大学大学院医学研究科次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点

竹馬 真理子

Aquaporins (AQPs, AQP0-12) are membrane water/glycerol channel proteins that participate in various cellular functions in many cell types. AQP9 is expressed in several immune cells including neutrophils; however, its role in cutaneous immune response remains unknown. Here we show the involvement of AQP9 in skin allergic inflammation using AQP9 knockout (AQP9^{-/-}) mice and the contact hypersensitivity (CHS) model.

First, AQP9^{-/-} mice showed impairment of CHS responses to hapten (DNFB) compared with wild-type (WT) mice. Adoptive transfer of AQP9^{-/-} LNs cells into the ears of WT recipients resulted in impaired CHS response, indicating the defect of sensitization in AQP9^{-/-}. IL-17 production was decreased in AQP9^{-/-} compared with WT LNs cells.

WT mice showed high neutrophil accumulation in LNs at 18 h after DNFB application, but it was abrogated in AQP9^{-/-} mice. In accordance, we found the attenuation of AQP9^{-/-} neutrophil migration to LNs after DNFB application. Furthermore, the neutrophil migration in response to CCR7 ligands was suppressed in AQP9^{-/-} using chemotaxis chambers.

Finally, we found that the administration of neutralizing antibody during the sensitization phase suppressed IL-17 production from LNs cells as well as CHS response in WT mice, suggesting the implication of neutrophils for IL-17 production during the development of CHS.

These data suggest that AQP9-expressing neutrophils play an important role in the sensitization phase of CHS through their migration function.

1. 緒言

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いる。1992 年に AQP1 が発見されて以降、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。

我々は皮膚における AQP に着目し、皮膚の構成細胞に発現する AQP 分子の機能を明らかにしてきた。これまでに、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、表皮細胞に発現する AQP3 が、細胞遊走および細胞増殖を調節し、創傷治癒、腫瘍形成あるいはアトピー性皮膚炎発症に関与していることを明らかにしてきた^{1, 2, 3)}。また、T 細胞に発現する AQP3 が、ケモタキスを調節することで、接触皮膚炎発症に関与することを報告している⁴⁾。

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⁵⁾。

我々は、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関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⁶⁾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。

2. 実験

2.1. 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、



Role of Aquaporin-9 in inflammatory skin disease

Mariko Chikuma

Center for Innovation in Immunoregulative Technology and Therapeutics, Kyoto University Graduate School of Medicine

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。

2. 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。その後、耳介にDNFBを塗布した。翌日の耳介浮腫を測定した。

2. 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。

3. 結果

C57BL/6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)。

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)。

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)。

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

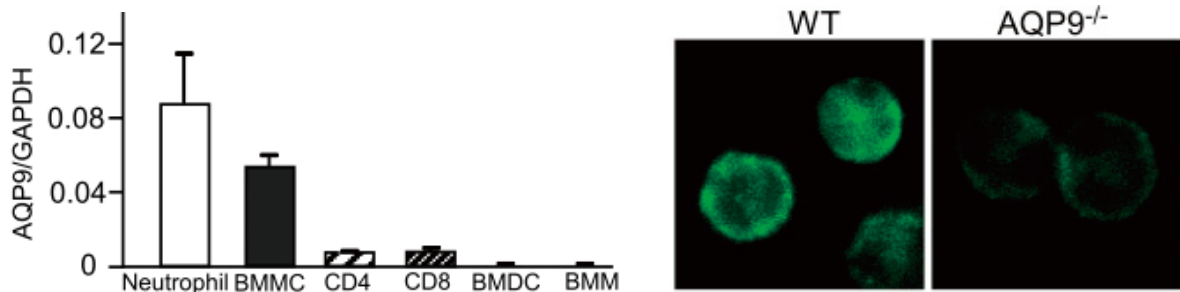


図1 C57BL/6 マウス由来細胞における AQP9 発現 (left; リアルタイム PCR による定量、right; 好中球での AQP9 免疫染色)

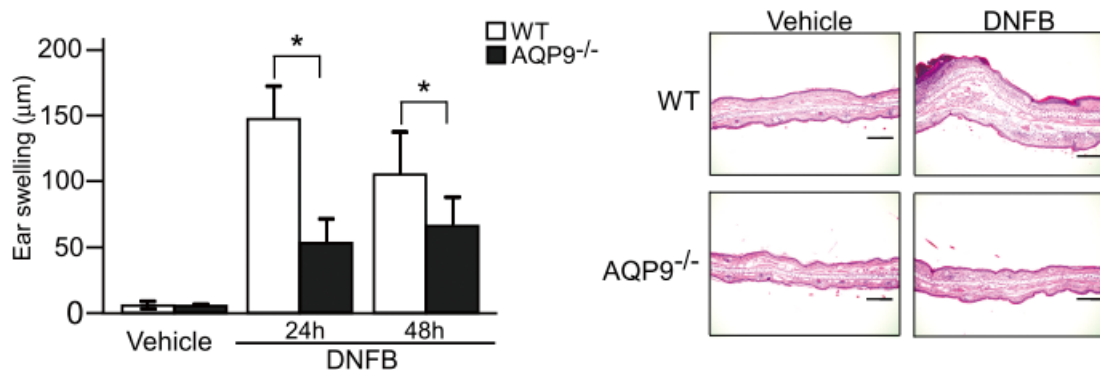


図2 WT および AQP9^{-/-} マウスにおける接触皮膚炎反応 (left; 接触皮膚炎反応による耳介浮腫、right; HE 組織染色)

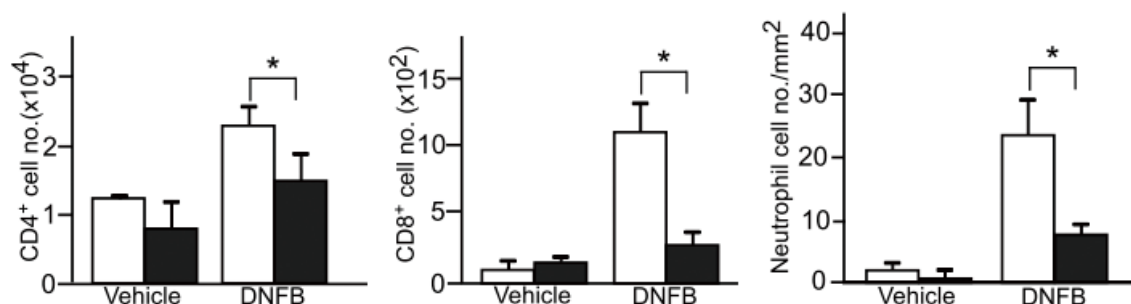


図3 接触皮膚炎反応惹起時の皮膚内の細胞数 (CD4⁺、CD8⁺ T 細胞、好中球)

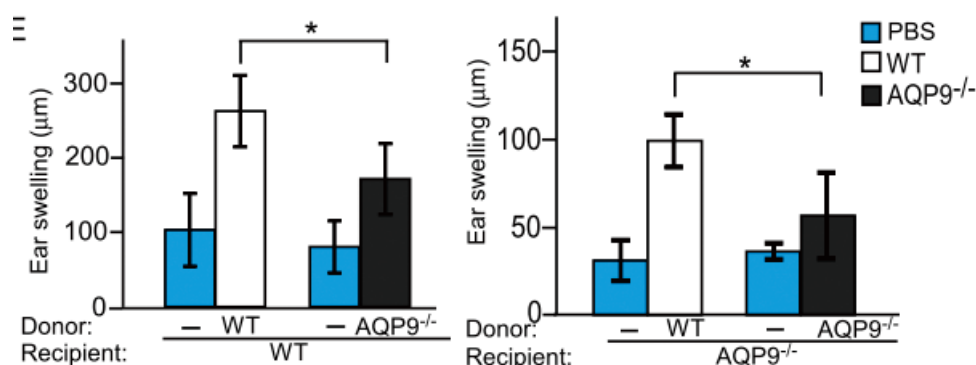


図4 所属リンパ節由来細胞の Adoptive transfer による接触皮膚炎反応

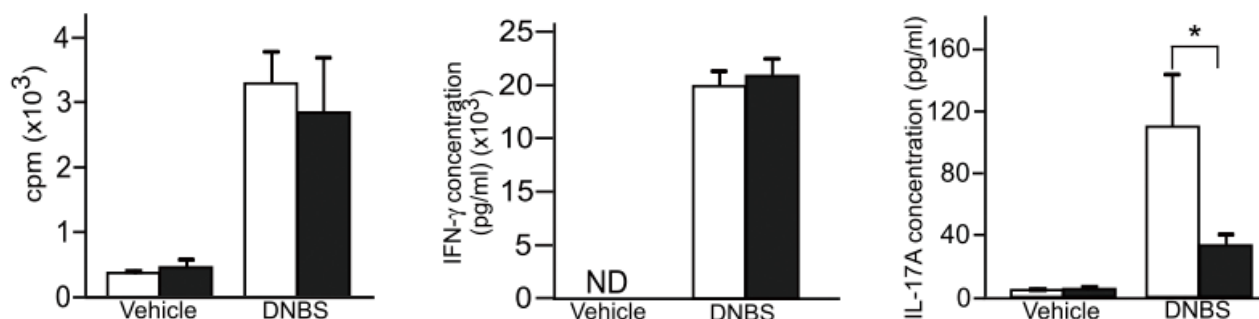


図5 DNFB 塗布 5 日後のリンパ節由来細胞の細胞増殖能(left)、IFN-gamma 産生量 (middle)、IL-17 産生量 (right)

制されていることを示している。

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^{7,8)}。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。

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

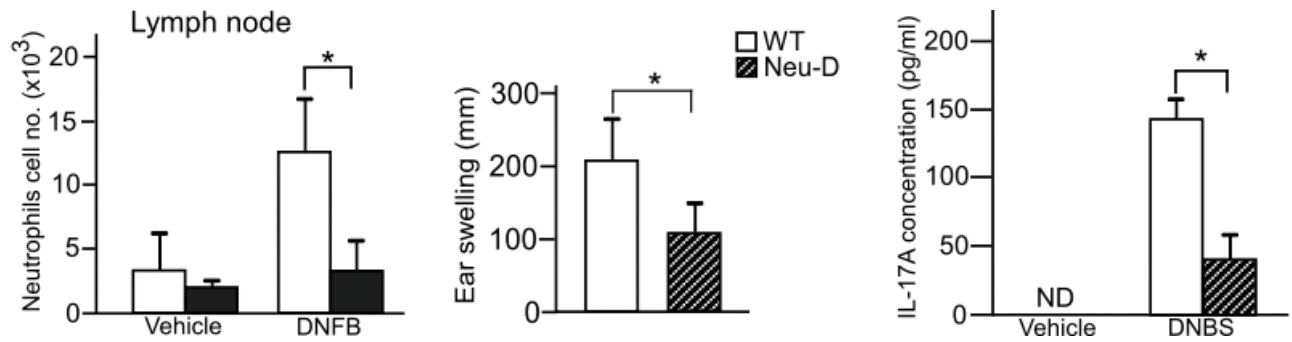


図6 好中球の接触皮膚炎への関与
リンパ節の好中球数(left)、好中球除去による接触皮膚炎の抑制(middle)およびIL17産生量低下(right)

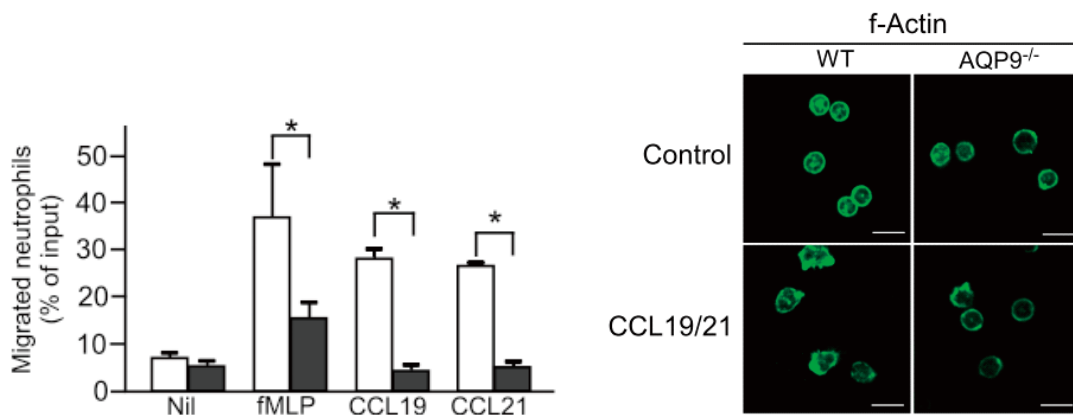


図7 好中球のケモタクシス(left)、F-actin染色(right)

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。

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⁹⁾。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。

4. 考 察

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、その後に起こる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。

(引用文献)

- 1) Hara-Chikuma M & Verkman AS (2008) Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med (Berl)* 86(2): 221-231.
- 2) Hara-Chikuma M & Verkman AS (2008) Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. *Molecular and cellular biology* 28 (1): 326-332.
- 3) Nakahigashi K, et al. (2011) Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *The Journal of investigative dermatology*

- 131 (4): 865-873.
- 4) Hara-Chikuma M, *et al.* (2012) Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. *The Journal of experimental medicine* 209 (10): 1743-1752.
- 5) Rojek AM, *et al.* (2007) Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9): 3609-3614.
- 6) Honda T, Egawa G, Grabbe S, & Kabashima K (2013) Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* 133 (2): 303-315.
- 7) Nakae S, *et al.* (2002) Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17 (3): 375-387.
- 8) He D, *et al.* (2006) CD8⁺ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 177 (10): 6852-6858.
- 9) Beauvillain C, *et al.* (2011) CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* 117 (4): 1196-1204.