ケイガイによる AQP3 発現亢進作用 ケラチノサイトのアクアポリン-3 発現に対する 荊芥エキスの作用とその薬理学的意義

磯濱洋一郎

要約：アクアポリン 3 (AQP3) は主に皮膚のケラチノサイトに存在する水チャネルであり、皮膚の保湿のみならずケラチノサイトの遊走にも関わることを示されている。従って、AQP3 の発現を促進する薬物は皮膚疾患時の乾燥症状や外傷の治療薬としての応用が期待できる。我々は、種々の生薬についての検討から荊芥 (ケイガイ) に著明な AQP3 発現亢進作用を見出した。ケイガイエキスはこの本作用を通じて、in vitro でのケラチノサイト遊走能を促進するとともに、in vivo でも実験的に形成したマウスの創傷治癒を促進することが分かった。これらの作用は皮膚科領域で用いられる漢方方剤にケイガイが含まれる薬理学的意義を示唆する

とともに、これらの漢方薬の作用を応用した新たな治療薬の開発の可能性を示している。

1. はじめに

アクアポリン (AQP) 類は、細胞膜を介した水分子の移動を促進する水チャネルとして知られており、ほ乳類では、これまでに 13 種類のアイソフォームが見出されている。すでに、各 AQP アイソフォームの欠損動物も作製され、その表現型も調べられている (表 1)。これらの中で、アクアポリン 3 (AQP3) は皮膚のケラチノサイトに多く存在する AQP であり、他のアイソフォームとは異なり、水分子のみならずグリ

表 1 ヒト AQP 類の体内分布、欠損マウスの表現型および機能調節薬に期待される薬効

AQP	水透過性	体内分布	欠損マウス表現型	機能調節薬に期待される薬効
AQP0	Low	レンズ (眼球)	白内障	
AQP1	High	赤血球, 肺, 腎, 脳, 眼球, 血管内皮	尿量増加	利尿 (阻害薬)
AQP2	High	腎	尿量増加	利尿 (阻害薬)
AQP3	High	皮膚, 腎, 肺, 眼球, 消化管	尿量増加, 皮膚乾燥, 創傷治癒遅延	利尿 (阻害薬) 皮膚保湿 (亢進薬)
AQP4	High	腎, 脳, 肺, 消化管	脳浮腫形成抑制	抗脳浮腫 (阻害薬)
AQP5	High	唾液腺, 汗腺, 肺	唾液分泌低下, 汗分泌低下, 気道液分泌低下	抗口渴, 鎮咳・去痰 (亢進薬)
AQP6	Low	腎		
AQP7	High	脂肪組織, 腎, 睪丸	グリセリン代謝異常, 脂肪細胞肥大	抗肥満 (亢進薬)
AQP8	High	腎, 肝, 膵, 消化管, 睪丸	精巣肥大	
AQP9	Low	肝, 白血球, 脳, 睪丸		
AQP10	Low	消化管		
AQP11	?	脳, 肝, 腎	多膿胞腎	
AQP12	?	脾		

キーワード：アクアポリン 3, 荊芥, ケラチノサイト, 創傷治癒
東京理科大学 薬学部 応用薬理学研究室 (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641)
E-mail: isohama@rs.tus.ac.jp 原稿受領日：2013 年 12 月 9 日, 依頼原稿
Title: Increase in aquaporin 3 expression in keratinocytes by *Schizonepeta tenuifolia*
Author: Yoichiro Isohama

セロールの輸送をも促進するという特性をもつ。従って、AQP3は皮膚の保湿と密接に関係すると考えられ、これを支持するようにAQP3の欠損マウスでは著明な皮膚乾燥の症状を呈する(1, 2)。また、興味深いことに、AQP3はケラチノサイトの遊走能と密接に関わっており、欠損動物では創傷治癒の遅延が生じることも知られるなど、AQP3の発現を亢進する薬物には皮膚の保湿作用のみならず、創傷治癒の促進作用が期待されている(表1)。

一方、我々はこれまでに、五苓散がAQP4機能を阻害することで、脳浮腫の形成を抑制することを始め、漢方薬のもつ「利水作用」すなわち水分代謝調節作用にAQP類が少なくとも一部関わっていることを示して来た(3)。AQPを標的とした西洋医学的な医薬品は未だ開発されておらず、これらの作用は西洋薬とは異なる漢方薬の特長的な薬理作用の一端を担っている可能性がある。本研究では、皮膚疾患に用いられる漢方方剤の作用がケラチノサイトに存在するAQP3の機能あるいは発現の調節を介している可能性を考え、種々の生薬エキスの作用を調べ、荊芥(ケイガイ)エキスを著明なAQP3発現亢進作用を認めたので紹介する。

2. 炎症性刺激によるケラチノサイトのAQP3発現の低下

まず、炎症に伴うAQP3発現量の変化を調べるために、皮膚炎を自然発症したNC/Ngaマウスより、正常および炎症部位の皮膚を採取し、AQP3のmRNA発現量を調べた。すると、炎症部位のAQP3 mRNA量は正常部位の約1/2と著明に減少することが分かった

(図1)。次に、この炎症時のAQP3発現低下の機序を調べるために、ケラチノサイトの細胞株DJM-1細胞を用いたin vitroの実験系で種々のサイトカインの作用を調べたが、TNF- α に著明なAQP3発現抑制作用を認めた。TNF- α はmRNAおよびタンパク質の両方で、処理濃度(0.02~20 ng/ml)依存的にAQP3の発現を低下させ、また、これは細胞膜の水透過性として評価したAQP3機能ともよく相関した(図2)。なお、このTNF- α によるAQP3発現の低下は転写レベルでの反応であった。また、TNF受容体の下流シグナルとしてERKおよびC/EBPの活性化が関わっており、これに伴いAQP3の基本転写活性に重要なE2F-1転写因子が抑制されることが少なくとも一部関わっている

図1 NC/Ngaマウス皮膚の健常部位および炎症部位皮膚でのAQP3 mRNA発現の比較

皮膚炎を自然発症したNC/Ngaマウスより健常部位および炎症部位の皮膚を採取し、real-time PCR法によりAQP3 mRNA量を評価した。Mean $\pm$ SE (n=3)。P<0.05: analyzed with t-test.

図2 ケラチノサイトのAQP3発現に対するTNF- α の作用

ケラチノサイト細胞株DJM-1細胞を上記濃度のTNF- α 存在下に24時間培養し、AQP3 mRNA (A)、タンパク質 (B) 量および細胞膜水透過性 (C) を測定した。Mean $\pm$ SE (n=3)。*P<0.05, **P<0.01 vs. control with Newman-Keuls test. (文献4より改変)

ことを明らかにしている(4)。

ケラチノサイトは皮膚の最上層に存在する細胞であり、皮膚のバリア機能と密接に関わっている。このバリア機能にはケラチノサイト自身の角質化の他に、表皮での水分や皮脂の維持が重要であると考えられている。また、AQP3 は水だけでなくグリセロールも透過させる性質をもち、AQP3 の発現減少が皮膚での水分および皮脂の維持機能の破綻を意味している(1,2)。すなわち、皮膚の炎症に伴う AQP3 発現の低下は、随伴症状として高頻度に生じる乾燥症状の一因となる可能性が考えられる。

3. ケイガイによる AQP3 発現の亢進作用

皮膚科領域で用いられる漢方方剤は、皮膚の保湿を

目的として用いられることが少なくない。そこで、ケラチノサイトの DJM-1 細胞を用いた *in vitro* の実験系で、主に皮膚科領域で用いる漢方方剤に含まれる種々の生薬エキスの AQP3 発現に対する作用を調べた。その結果、今回検討した生薬の中で、唯一、ケイガイだけに著明な発現増加作用を認めた。ケイガイの MeOH 抽出エキスの存在下に 24 時間細胞を培養すると、処理濃度 (0.01~0.1 mg/ml) 依存的に AQP3 の mRNA 量が増加し、0.1 mg/ml の濃度ではコントロールの約 2.5 倍と著明な高値を示した。また、本作用は、Western blot 法による AQP3 タンパク質レベルでの検討でも同様に認められ、さらに細胞膜の水透過性すなわち AQP3 機能ともよく一致した (図 3)。

前項で示したように、炎症時に著しく産生が増加す

図3 ケラチノサイトの AQP3 発現に対するケイガイエキスの作用

DJM-1 細胞を上記の濃度のケイガイエキス存在下に 24 時間培養し、AQP3 mRNA (A) およびタンパク質 (B) 量を測定した。Mean ± SE (n=3). * $P < 0.05$ vs. control with Newman-Keuls test.

図4 TNF- α による AQP3 発現の低下に対するケイガイおよびデキサメタゾン

の作用 DJM-1 細胞にケイガイエキス (A) またはデキサメタゾン (DEX) を TNF- α と共処理し、24 時間後の AQP3 mRNA 量を測定した。Mean ± SE (n=3). * $P < 0.05$ vs. Control, # $P < 0.05$ vs. TNF- α alone with Newman-Keuls test.

る TNF- α は、AQP3 発現を低下させる。そこで、ケイガイエキスを TNF- α と同時に細胞に処理し、その作用を調べたが、ケイガイの MeOH 抽出エキ스는 TNF- α の共存下でも AQP3 の mRNA 発現を著明に増加させることが分かった (図 4)。一般に、炎症性皮膚疾患時の乾燥症状は掻痒とも密接な関係にある。ケイガイエキスに抗炎症作用があるか否かは調べていないが、炎症性刺激による AQP3 発現の低下を抑制し、さらにその発現を亢進したことは、ケイガイに炎症時の皮膚乾燥を緩和する作用があると推定できる。一方、興味深いことにステロイド性抗炎症薬であるデキサメタゾンでは、上述の TNF- α によって低下した AQP3 発現に著明な影響を与えなかった (図 4)。一般に、ステロイド性抗炎症薬は外用薬として炎症性皮膚疾患の第一選択薬として用いられる。この結果は、乾燥症状を呈する皮膚疾患に対するステロイドの有用性に疑問を呈する結果である。

4. ケラチノサイトの遊走能および in vivo 創傷治癒に対するケイガイの作用

上述のように、AQP3 はケラチノサイトの細胞膜での水およびグリセロールの透過に重要な役割を果たすが、本細胞の遊走能にも密接に関わることが知られている (5, 6)。そこで、ケイガイによる AQP3 発現の亢進が、細胞遊走能に対して影響するか否かを調べた。単細胞層を形成するまで培養した DJM-1 細胞を、ピペットチップの先端で掻き取り、その後ケイガイエキス存在下あるいは非存在下にさらに 24 時間培養し、掻き取った間隙幅の縮小速度を計測した。すると、本 in vitro 実験系でケイガイエキスは有意 ($P < 0.05$) に間隙の短縮速度すなわち遊走能を促進することが分かった (図 5)。さらに、本作用が AQP3 発現の亢進に基

づくか否かを調べるため、AQP3 の特異的 siRNA を導入して本細胞の AQP3 を欠損させると、ケイガイエキスによる遊走促進作用はほぼ完全に消失した (図 5)。従って、ケイガイエキスは AQP3 の発現亢進を介して細胞の遊走すなわち in vitro での創傷治癒促進活性をもつことが確認された。

そこで、ケイガイエキスによる創傷治癒促進効果を in vivo の動物実験により検証した。ヘアレスマウスの背部皮膚にバイオキシーパンチを用いて直径 5 mm の実験的創傷を形成させ、一方にケイガイエキス ($5 \mu\text{g}/\text{site}$) を含む軟膏を、もう一方に軟膏基剤のみを 1 日 1 回塗布し、その後の創傷部面積の縮小を比較検討した。その結果、ケイガイエキスを塗布した創傷面積は、1 日目 ($P < 0.001$) および 2 日目 ($P < 0.05$)

図 6 実験的創傷の治癒に対するケイガイエキスの作用
マウスの背部皮膚に形成させた創傷 (初期面積, Control: $24.22 \pm 1.22 \text{ mm}^2$, ケイガイ: $26.01 \pm 1.42 \text{ mm}^2$) にコントロールまたはケイガイ ($5 \mu\text{g}/\text{site}$) を含む軟膏を塗布し、その後の創傷部面積を測定した。Mean $\pm$ SE ($n=8$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. control with paired t -test.

AQP3 expression

図 5 ケラチノサイトの遊走能に対するケイガイエキスの作用

DJM-1 細胞に control siRNA または AQP3 siRNA を導入し、24 時間後にケイガイエキス ($0.1 \text{ mg}/\text{ml}$) を加え、スクラッチアッセイ法により細胞の遊走能を測定した。Mean $\pm$ SE ($n=3$). * $P < 0.05$ vs. control with t -test.

でコントロールに比べて有意に小さく、ケイガイの塗布が創傷治癒速度を促進すると考えられた(図6)。一般に、創傷の治癒速度は創傷感染や糖尿病等の基礎疾患があると遅延することが知られている。従って、従来、創傷治癒促進効果が報告されている薬物は、growth factor 類を除けば、抗生物質等、これらの遅延を回復させるものが殆どである。本研究で、ケイガイエキスに健常動物での創傷治癒を促進する作用を見出したことは興味深い。

5. おわりに

ケイガイを含む漢方方剤には、荊芥連翹湯、十味敗毒湯および当帰飲子などがあるが、面白いことにこれらは全て皮膚疾患の治療に用いられる方剤であり、皮膚科以外の疾患に用いられる漢方方剤にケイガイが含まれることは殆どない。本研究により、生薬ケイガイ

の MeOH 抽出エキスが、AQP3 の発現を亢進し、本作用を通じて、皮膚の保湿および創傷の治癒を促進する効果をもつことが明らかとなった。本研究の成績は、このような伝統的な漢方薬の使用目的に合理性を与えるものであろう。また、今後、ケイガイエキス中の AQP3 発現亢進に関わる活性成分の同定を通じて、新たな皮膚保湿および創傷治癒促進を目的とした新規医薬品の開発に繋がる可能性が考えられる。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Ma T, et al. J Biol Chem. 2002;277:17147-17153.
- 2) Hara M, et al. J Biol Chem. 2002;277:46616-46621.
- 3) 磯濱洋一郎. 薬局. 2012;63:49-56.
- 4) Horie I, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2009;387:564-568.
- 5) Cao C, et al. Biochem J. 2006;400:225-234.
- 6) Hara-Chikuma M, et al. J Mol Med. 2008;86:221-231.